

白血病抑制因子对胚泡金属蛋白酶表达的影响^{*}

孔 英 葛常辉 燕 秋 朱正美^{**}

(大连医科大学生物化学教研室, 大连 116027)

摘要 为了探讨白血病抑制因子 (LIF) 对胚泡着床作用的机理, 胚泡经与 LIF 及其特异性抗体培养后, 通过 RT-PCR 及免疫印迹技术, 分析了 LIF 与着床前小鼠胚泡的基质金属蛋白酶 9 (MMP9) 表达和分泌之间的关系。结果显示: LIF 可明显诱导胚泡 MMP9 的分泌和基因表达; 经 LIF 特异性抗体封闭后, 胚泡 MMP9 的分泌及基因表达下降, 且下降趋势随着 LIF 被封闭时间延长而减弱, 对 MMPs 组织抑制因子 1 (TIMP1) 的影响则不明显。说明 LIF 可能通过诱导 MMP9 的分泌及基因表达来影响胚泡对子宫内膜细胞外基质的水解, 促进着床。

关键词 小鼠, 胚泡, 白血病抑制因子, 基质金属蛋白酶, 单克隆抗体

学科分类号 Q492.6

胚胎着床是妊娠建立的第一步, 是经过胚泡与子宫内膜相互识别、相互黏着和组织相容的过程, 此过程受多种因素的影响和调节^[1]。基质金属蛋白酶 (matrix metalloproteinases, MMPs) 的表达和分泌被认为是决定胚泡着床的重要条件, MMPs 组织抑制因子 (tissue inhibitor of metalloproteinases, TIMPs) 特异性抑制和调节 MMPs 的活性, 在激素与许多相关因子的调节下, 胚泡合体滋养层细胞分泌 MMPs 及其组织抑制因子 TIMPs, 在一定的时间和部位降解内膜的细胞外基质 (extracellular matrix, ECM), 使胚泡能够侵入子宫内膜, 完成着床^[2~4]。研究已表明其中金属蛋白酶 MMP9 (IV型胶原酶) 在介导细胞滋养层对母体子宫内膜的侵入中发挥着主要作用^[5]。此外, 白血病抑制因子 (leukemia inhibitory factor, LIF) 已被证明是着床必需的关键的细胞因子, 其表达高峰在“植入窗口期”, 它具有调节胚胎的生长发育和侵入的作用^[6]。由上述可知 MMPs 及 LIF 均为胚泡正常着床所必需, 但两者间的关系尚不清楚。本文应用 LIF 及其单克隆抗体在体外处理着床前胚泡, 通过免疫印迹法及 RT-PCR 法, 分析了 LIF 对 MMP9 及其特异抑制因子 TIMP1 的分泌与基因表达的影响, 以探讨 LIF 在小鼠胚泡植入过程中的作用机理。

1 材料和方法

1.1 实验动物

6~8 周 (24~26 g) 成年雌性昆明小白鼠 (大连医科大学实验动物中心)。在光周期 12 h; 暗

周期 12 h 条件下饲养。注射 5~10 IU 孕马血清 (PMSG) 进行超数排卵, 48 h 后注射 5~10 IU 绒毛膜促性腺激素 (hCG), 随后与成年雄鼠 1:1 合笼交配, 次日阴道检查有阴栓者确定为妊娠第一天, 在妊娠第 4 天上午 10~12 时断头处死雌鼠, 从子宫中收集胚泡进行体外培养。

1.2 主要试剂

小鼠 LIF 因子为美国 Chemicon 公司产品, 山羊抗小鼠 LIF 单克隆抗体为 Sigma 公司产品; 兔抗小鼠 MMP9、兔抗小鼠 TIMP1、碱磷酶标记的羊抗兔 IgG 均购自美国 Santa Cruz Biotech 公司。

1.3 胚泡体外培养

选取发育良好, 状态均匀一致的第四天胚泡分成两组, 移入到 35 mm 培养皿内经预温 (37℃) 的 M16 微滴培养液中, 置 37℃, 5% CO₂ 的培养箱中培养。

准备 8 滴 37℃预温的 M16 微滴培养液, 每组 4 滴各 50 μl, 分别为: a. 单纯 M16 培养液; b. 含 LIF-Ab (3 μg) 的 M16 培养液, 每液滴放入 60~70 个胚胎, 37℃培养 3 h, 洗去抗体, 换入新的 M16 培养液, 继续培养 0.5、1.5、3、6 h 后分别收集胚胎和培养液, 于 -70℃冻存。

另准备 2 滴 37℃预温的 M16 微滴培养液, 分别为: a. 单纯 M16 培养液; b. 含 LIF (10 mg/L) 的 M16 培养液, 每个液滴放入 60~70 个胚胎, 37℃培养 3 h, 将胚泡移入不含 LIF 的 M16 培养

^{*} 国家自然科学基金资助项目 (39870184)。

^{**} 通讯联系人。

Tel: 0411-4720616, E-mail: zmhu@mail.dlptt.ln.cn

收稿日期: 2001-07-23, 接受日期: 2001-10-18

液, 继续培养 3 h 后分别收集胚胎和培养液, 于 -70°C 冻存.

1.4 RNA 提取和 RT-PCR 分析

PCR 引物由 TaKaRa 公司合成, 引物序列见表 1.

Table 1 Primers used in this study

Genes	Sequence (5'-3')	Expect product size
MMP9 (F)	CCCCAAAGACCTGAAAACCTC	467 bp
MMP9 (R)	GGCAGAGACATCACAGAGTTG	
TIMP1 (F)	CGCAGATATCCGCTACGCCTA	354 bp ^[5]
TIMP1 (R)	CACAAGCCTGGATTCCGTGG	
GAPDH (F)	ACCACAGTCCATGCCATCAC	452 bp ^[7]
GAPDH (R)	TCCACCACCCTGTTGCTGTA	

(F): forward primer; (R): reverse primer. MMP9 引物由中国科学院动物研究所提供.

将收集的各组胚胎分别置于 1.5 ml 离心管中, 用异硫氰酸胍法^[8]提取 RNA.

逆转录反应所用试剂购自 TaKaRa 试剂公司. 反应体系内含 2 μg 总 RNA, 4 μl Mg^{2+} (25 mmol/L), 2 μl 10 $\times$ RT 缓冲液, 2 μl dNTP (10 mmol/L), 1 μl RNA 酶抑制剂 (40 U/ μl), 1 μl AMV 逆转录酶 (5 U/ μl), 1 μl 随机引物 (Oligo dT), 加无 RNase 水至总体积为 20 μl . 混匀, 50°C 45 min, 99°C 5 min, 5°C 5 min. -20°C 保存待用.

每管取 5 μl 逆转录产物, 加入 4 μl Mg^{2+} (25 mmol/L), 4 μl dNTP (2.5 mmol/L), 5 μl 10 $\times$ PCR 缓冲液, 上下游引物各 1 μl (30 pmol/L), Taq 酶 0.5 μl , 加水至总体积为 50 μl , 混匀离心后入 PCR 反应. PCR 反应条件如下: 94°C 预变性 7 min, 然后 94°C 变性 50 s, 60°C 退火 50 s, 72°C 延伸 90 s, 进行 45 个循环, 最后 72°C 延伸 5 min.

1.5 MMP9 及 TIMP1 分泌的免疫印迹法分析

硝酸纤维素 (NC) 膜, 经 TBS 浸泡 10 min 后, 将膜平放在点杂交仪内, 将 LIF 处理实验组及对照组培养液各 10 μl , LIF 抗体封闭实验组 (0.5 h、1.5 h、3 h 和 6 h) 以及对照培养液各 10 μl , 点样于 NC 膜上, 负压抽干后取出膜; 浸入 5% BSA-TBS 封闭液中, 室温下振荡 2 h, 置于含 1:500 兔抗鼠 MMP9 单克隆抗体封闭液, 4°C 过夜. 次日取出膜经 TBS 清洗 3×10 min 后, 置于含 1:1000 AP 标记的羊抗兔 IgG 封闭液 37°C 孵育

反应 1 h; TBS 清洗 3×10 min 后, 加入新配制的 AP 反应底物, 于避光处显色 5~10 min, 蒸馏水清洗终止反应后, 用滤纸吸干水分避光保存. 同样取 LIF 抗体封闭实验组及对照培养液各 10 μl , 点膜, 室温封闭 2 h, 置于含 1:500 兔抗鼠 TIMP1 单克隆抗体封闭液, 4°C 过夜. 其后处理同上.

1.6 结果分析

RT-PCR 产物在 1.0% 琼脂糖凝胶中进行电泳, 照相记录结果经扫描通过 QuantiScan 分析软件处理, 以内参照 GAPDH 为基准分析计算各条带的相对含量.

2 结 果

2.1 LIF 抗体对胚胎 MMP9/TIMP1 分泌的影响

图 1 免疫印迹分析结果显示 MMP9 及 TIMP1 的蛋白分泌在培养期间随着培养时间延长均逐渐增加, 但胚胎表面 LIF 被抗体封闭后, 与对照组比较, MMP9 蛋白分泌在 0.5 h 即被明显抑制, 抑制作用持续至 6 h (图 1a); 而对 TIMP1 分泌的影响则不明显 (图 1b).

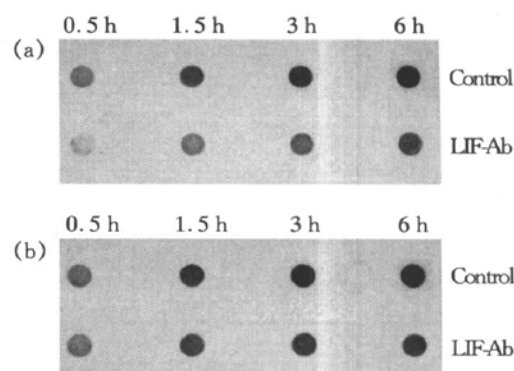


Fig. 1 Effects of LIF Ab blocking to secretion of MMP9 and TIMP1 of embryos by dot blot

After 3 h of blocking LIF by specific antibody, embryos continued to culture for 6h, then secretion of MMP9 and TIMP1 were analyzed by dot blot. (a) MMP9; (b) TIMP1.

2.2 LIF 抗体对胚胎 MMP9 和 TIMP1 表达的影响

图 2 RT-PCR 分析结果显示, 经 LIF 抗体封闭后, 胚胎的 MMP9 基因表达明显降低 (经 t 检验, $P < 0.05$), 经时观察的结果表明, 在封闭后 0.5 h 即有明显变化, 1 h 最明显, 随着封闭时间延长, 实验组的 MMP9 基因表达有所恢复 (图 2a), 而其抑制因子 TIMP1 基因的表达则比对照组有所增强, 但无显著性差别 (经 t 检验, $P > 0.05$) (图 2b). 本实验重复 4 次, 结果基本一致.

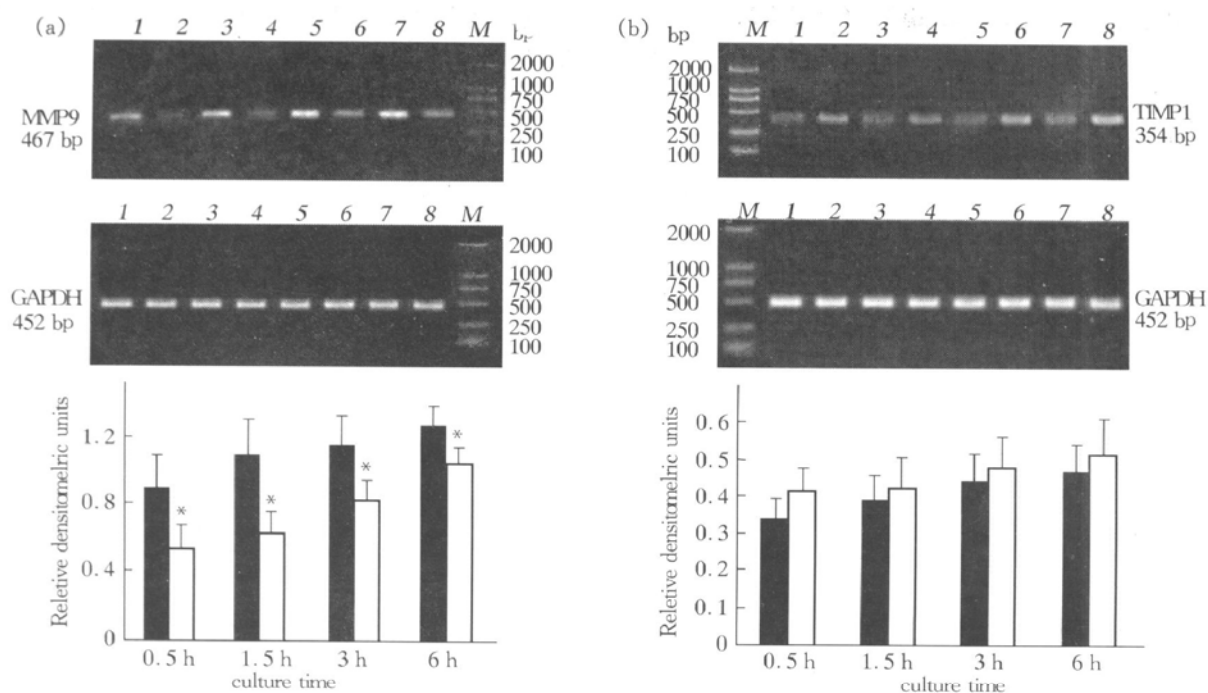


Fig 2 Effects of LIF-Ab blocking on gene expression of MMP9 and TIMP1 of embryos by RT-PCR analysis

(a) MMP9. 1, 3, 5, 7: control (0.5, 1.5, 3, 6 h); 2, 4, 6, 8: LIF-Ab treated (0.5, 1.5, 3, 6 h). M: DL2000DNA marker.

(b) TIMP1. ■: 对照组; □: LIF-Ab. * $P < 0.05$. $n = 4$.

2.3 LIF 对胚胎 MMPs 分泌的影响

免疫印迹分析结果显示胚胎的培养液中加入 LIF 后, 胚胎分泌的 MMP 9 蛋白明显增加 (图 3).



Fig 3 Effects of LIF on secretion of MMP9 of embryos by dot blot analysis

After 3 h incubating with LIF, embryos continued to culture for 3 h, then secreted MMP9 was analyzed by dot blot. The one of duplicate results was shown.

1: control; 2: LIF-treated.

2.4 LIF 对胚胎 MMP9 基因表达的影响

RT-PCR 分析结果显示, 胚胎培养液中加入 LIF 后, 胚胎 MMP9 基因表达高于对照组 (图 4). 重复实验的结果相同.

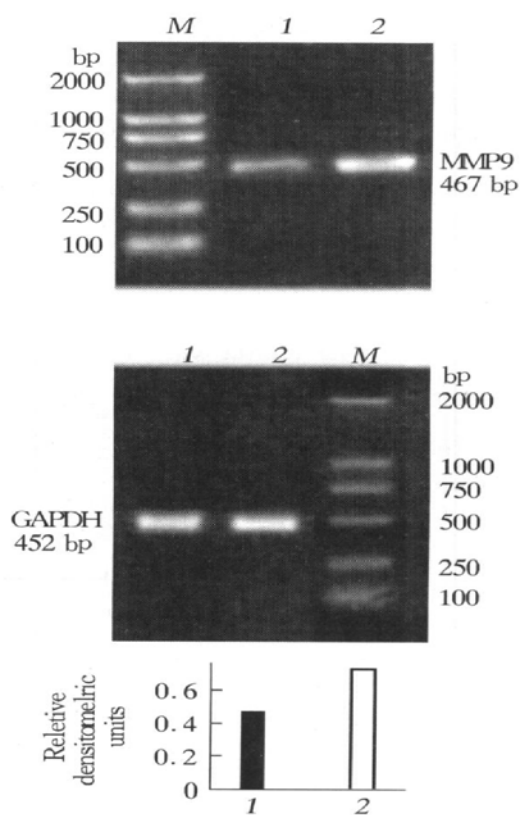


Fig 4 Effect of LIF on gene expression of MMP9 of embryos by RT-PCR

■: 对照组; □: LIF. 1: control; 2: LIF treated. M: DL2000 DNA marker. The one of duplicate results was shown.

3 讨 论

胚泡着床是建立妊娠的关键环节, 其间包括胚胎的早期发育, 子宫内膜接受态的建立, 胚泡与子宫内膜上皮细胞的相互识别、定位及黏附, 进而穿透子宫内膜表面, 植入子宫内膜基质中。正常妊娠的维持需胚胎与母体之间协同作用, 基质金属蛋白酶 (MMPs) 作为水解多种细胞外基质成分的一组蛋白水解酶, 广泛参与胚胎的发育与着床, 其表达和分泌被认为是决定胚泡着床的重要条件之一。MMPs 作为胚泡滋养层细胞对子宫内膜侵入性标志, 其蛋白质表达水平和滋养层细胞的最大侵入能力相吻合。着床前胚泡 MMPs 的分泌达到高峰, 从而选择性水解子宫内膜基质成分及基底膜^[9], 而蜕膜细胞产生的转移生长因子 β , 可诱导滋养层及蜕膜细胞合成 TIMPs (金属蛋白酶组织抑制因子), 与相应的 MMPs 酶原及其活化形式结合, 从而抑制活化 MMPs 的生成, 并使 MMP-TIMP 水平维持在一定范围的动态平衡, 调节滋养层细胞的侵入, 因此胚胎着床有赖于 MMPs 的存在, MMPs 的表达及活性对胚胎向子宫的植入起关键作用^[3, 10]。

一些细胞因子的表达高峰和胚泡“植入窗口期”相吻合, 它们通过自分泌或旁分泌方式执行多种生理功能, 调节滋养层细胞蛋白水解酶的活性, 参与蛋白酶表达的时空调节, 进而对胚胎生长发育及胚胎侵入过程进行精细调节。目前与胚泡植入相关的细胞因子有 4 类: 白血病抑制因子 (LIF), 表皮生长因子 (EGF), 集落刺激因子-1 (CSF-1), 和白介素-1 (IL-1)^[1, 6, 11]。其中对 LIF 的研究最多, 且公认为最重要。母体来源的 LIF 是小鼠胚泡成功植入的关键因素, 在小鼠子宫内, LIF 主要在子宫腔上皮和内膜腺上皮表达, 在胚泡着床前后子宫内 LIF 的表达出现高峰, 用基因打靶技术敲除 LIF 基因的小鼠能正常受精生成胚泡但胚泡不能着床, 而将这些胚泡移植到假孕野生型小鼠子宫内, 可以正常着床并发育至成体^[12], 说明子宫内膜 LIF 与胚泡植入的紧密相连, 是着床窗口开放所必需的细胞因子。研究还表明^[13~15], 含有 LIF 的培养液能促进早期胚胎的生长发育, 加速胚胎孵化, 促进滋养层细胞增殖和内细胞团生长, 并可提高胚泡形成率和存活率, 启动胚泡植入及调节蜕膜化过程, 在小鼠妊娠第 3 天子宫角注射 LIF 抗体可明显抑制小鼠胚胎着床数, 表明中和胚胎表面

LIF 可以阻断母胎之间的识别和粘着, 进而导致着床失败, 体外培养时, 外加 LIF 抗体亦可抑制胚泡扩展率。近期研究显示^[16], 胚泡培养液中加入 LIF 对基质金属蛋白酶 mRNA 的表达有一定的促进作用。进一步我们用 LIF 及其特异性抗体处理着床前胚胎, 观察 LIF 对胚胎 MMPs 分泌及基因表达的影响, 以分析 LIF 与胚泡着床过程中 MMPs 之间的关系, 探讨 LIF 在胚泡植入过程中的作用机制。结果显示, LIF 被其抗体中和后 0.5 h 胚泡的 MMP9 蛋白分泌及基因表达即明显被抑制, 随着培养时间的延长, 抑制作用略有减弱, MMP9 的抑制因子 TIMP1 的蛋白分泌并无明显下降, 且 TIMP1 基因表达在 LIF 被特异性抗体结合后有所升高, 而加入 LIF 则可明显促进胚泡 MMP9 蛋白分泌及基因表达, 结果说明 LIF 对 MMP9 的分泌及基因表达有特异性的调节作用。

着床是在激素的调控下多种细胞因子相互影响、相互作用共同的复杂的发育过程^[1]。激素-细胞因子-黏附分子等因素间形成一网络系统, 影响胚泡着床过程及早期妊娠的建立与维持, 对其相互作用机理的研究为人类生育调控中助孕技术及抗着床技术的发展均有重要意义。本文结果说明 LIF 对胚泡 MMPs 的调节可能是通过它对 MMPs 相关基因表达的影响而实现的, 为进一步研究着床相关因子间的关系 (即着床调节网络) 提供了依据。

参 考 文 献

- 1 Sharkey A. Cytokines and implantation. *Rev Reprod*, 1998, **3** (1): 52~61
- 2 Hulboy D L, Rudolph L A, Matrisian L M. Matrix metalloproteinases as mediators of reproductive function. *Molecular Hum Reprod*, 1997, **3** (1): 27~45
- 3 刘 煜, 张嘉宁, 朱正美. 基质金属蛋白酶与生殖的关系. *生殖医学杂志*, 1997, **6** (4): 249~253
Liu Y, Zhang J N, Zhu Z M. *J Reprod Med*, 1997, **6** (4): 249~253
- 4 Matrisian L M. Metalloproteinases and their inhibitors in matrix remodeling. *Trends Genet*, 1990, **6** (4): 121~125
- 5 Harvey M B, Leco K J, Arcellana Panlilio M Y, et al. Proteinase expression in early mouse embryos is regulated by leukaemia inhibitory and epidermal growth factor. *Development*, 1995, **121** (4): 1005~1014
- 6 Hsin Fu, Chen M D, Jin Yuh, et al. Expression of leukaemia inhibitory factor and its receptor in preimplantation embryo. *Fertil Steril*, 1999, **72** (4): 713~719
- 7 Sidhu S S, Kimber S J. Hormonal control of H-type alpha (1-2) fucosyltransferase messenger ribonucleic acid in the mouse uterus. *Biol Reprod*, 1999, **60** (1): 147~157
- 8 Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem*, 1987, **162** (1): 156~159

- 9 Xu P, Wang Y L, Zhu S J, *et al.* Expression of matrix metalloproteinase 2, -9 and 14, tissue inhibitors of metalloproteinase 1, and matrix proteins in human placenta during the first trimester. *Biol Reprod*, 2000, **62** (4): 988
- 10 Lala P K, Graham C H. Mechanisms of trophoblast invasiveness and their control: the role of proteases and protease inhibitors. *Cancer Metastasis Rev*, 1990, **9** (4): 369~ 379
- 11 Yue Z P, Yang Z M. Epidermal growth factor family and the mammalian embryo implantation. *Reproduction & Contraception*, 2001, **21** (1): 3
- 12 Stewart C L, Kaspar P, Brunet L J, *et al.* Blastocyst implantation depends on maternal expression of leukemia inhibitory factor. *Nature*, 1992, **359** (6390): 76~ 79
- 13 Duglison G F, Barlow D H, Sargent I L. Leukemia inhibitory factor significantly enhance the blastocyst formation rates of human embryos cultured in serum-free medium. *Hum Reprod*, 1996, **11** (1): 191~ 196
- 14 Tsai H D, Chang C G, Hsieh Y Y, *et al.* Recombinant human leukemia inhibitory factor enhances the development of preimplantation mouse embryo *in vitro*. *Fertil Steril*, 1999, **71** (4): 722~ 725
- 15 Cai L Q, Cao Y J, Duan E K. Effects of leukemia inhibitory factor on embryo implantation in the mouse. *Cytokine*, 2000, **12** (11): 1676~ 1682
- 16 张 键, 铁国栋, 曹宇静, 等. 纤维黏连蛋白与白血病抑制因子对小鼠胚胎基质金属蛋白酶基因表达的影响. *科学通报*, 2001, **46** (5): 401~ 404
Zhang J, Tie G D, Cao Y J, *et al.* Effects of fibronectin and leukemia inhibitory factor on gene expression of MMPs in mouse blastocyst. *Chinese Sci Bull*, 2001, **46** (15): 1296~ 1299

Effect of LIF on Expression of Matrix Metalloproteinases (MMPs) in Cultured Mouse Embryo^{*}

KONG Ying, GE Chang-Hui, YAN Qiu, ZHU Zheng-Mei^{**}

(Department of Biochemistry, Institute of Glycobiology, Dalian Medical University, Dalian 116027, China)

Abstract In order to investigate the mechanism of the essential role of leukemia inhibitory factor (LIF) in blastocyst implantation, blastocyst was incubated with LIF and its specific antibody. The effect of LIF on matrix metalloproteinases (MMPs) of pre-implantation blastocyst was analyzed by RT-PCR and immunoblotting techniques. The results showed that gene expression and secretion of MMP9 were significantly induced by LIF treatment, after blocking by LIF antibody, those effects were decreased, and the decreasing tendency was weakened with the increase of the incubation time. However the effect of LIF on tissue inhibitor of metalloproteinase1 (TIMP1) was not obviously. The results indicate that LIF may play its role by inducing the gene expression and increasing the secretion of MMP9 to facilitate blastocyst implantation.

Key words mouse, embryo, leukemia inhibitory factor, matrix metalloproteinases, monoclonal antibody

^{*} This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (39870184).

^{**} Corresponding author. Tel: 86-411-4720616, E-mail: zmhu@mail.dlptt.ln.cn

Received: July 23, 2001 Accepted: October 18, 2001