

白血病抑制因子在胚胎植入期大鼠卵巢中的表达^{*}

乔海莲, 吕长荣, 赵 瑾, 张 燕, 曹 力, 王根辈, 范光丽

(西北农林科技大学 动物科技学院, 陕西 杨凌 712100)

[摘 要] 采用免疫组织化学超敏 SP 法, 对大鼠胚胎植入期卵巢组织内白血病抑制因子(Leukemia inhibitory factor, LIF)的表达进行了检测。结果表明, LIF 在不同发育阶段卵泡的颗粒细胞中均有表达, 在原始卵泡、初级卵泡和次级卵泡的卵母细胞中高表达, 成熟卵泡的卵母细胞中等表达; 在初级卵泡和次级卵泡的内膜细胞中 LIF 高表达, 在成熟卵泡的内膜细胞低表达; 在卵巢组织基质细胞、血管内皮细胞、粒性黄体细胞、生殖上皮中高表达, 在卵泡液中中等表达。说明 LIF 在大鼠胚胎植入期卵巢中的多种细胞内均呈高水平表达。

[关键词] 白血病抑制因子; 免疫组织化学; 大鼠卵巢

[中图分类号] S852.1

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2007)03-0057-04

Expression of leukemia inhibitory factor of rat ovary during the period of embryo implantation

QIAO Hai-lian, LU Chang-rong, ZHAO Jin, ZHANG Yan,

CAO Li, WANG Gen-bei, FAN Guang-li

(College of Animal Science and Technology, Northwest A & F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: This study was carried out to examine the expression of leukemia inhibitory factor (LIF) during the period of embryo implantation in rats ovary by SP method. Results indicated the expression of LIF was strong in granulosa cells of follicles in different development periods; the oocyte in primary follicles, primary follicle and secondary follicles were strong staining; the one in mature follicles was moderate staining, expression of LIF protein of the theca interna cells in primary follicles and secondary follicles was strong, the ones in mature follicles were weak; furthermore, immunoreactive products were observed strong staining in stromal cells, vascular endothelial cells, granulosa lutein cells and germinal epithelium cells; the follicular fluid was moderate staining. The study demonstrated high expression of LIF protein in the many kinds of cells of rat ovary during the period of embryo implantation.

Key words: leukemia inhibitory factor; immunohistochemical method; rat ovary

白血病抑制因子(leukemia inhibitory factor, LIF)是白介素-6家族中的一员, 因具有促进小鼠M1型白血病细胞分化并抑制其增殖而得名^[1]。LIF是一种糖蛋白, 在体内具有多种活性, 如参与造血调控, 刺激肝细胞合成急性反应期蛋白, 刺激骨髓多能造血干细胞的生长, 刺激血小板形成, 促进乙酰胆碱的合成和胆碱能神经元的分化及功能的发挥, 促进

骨吸收, 促进细胞增殖, 抑制胚胎干细胞分化, 参与神经肌肉修复等。LIF是通过与靶细胞膜表面的受体结合而发挥其生物学功能。大量研究表明, LIF在卵泡发育、胚胎植入、妊娠维持等方面均起着重要的作用, 在胚胎植入期子宫蜕膜中的表达量突发性升高, 而在自然流产蜕膜中的表达量远远低于其在正常妊娠子宫蜕膜中的表达量。但有关LIF在卵巢中

^{*} [收稿日期] 2006-08-25

[基金项目] 国家自然科学基金项目(39670550); 西北农林科技大学研究生科技创新基金项目(05ych020)

[作者简介] 乔海莲(1975-), 女, 陕西榆林人, 在读博士, 主要从事神经解剖学和神经生物学研究。E-mail: qiaohailian@163.com

[通讯作者] 范光丽(1943-), 女, 山西太原人, 教授, 博士生导师, 主要从事神经生物学研究。E-mail: Guanglifan@yahoo.com.cn

的分布和表达情况的报道较少, 对其在胚泡植入期卵巢中的定位和表达尚未见报道。为此, 本研究采用免疫组织化学方法, 研究了 LIF 在妊娠大鼠胚泡植入期卵巢组织中的表达, 以探讨 LIF 在早期胚胎发育和胚泡植入过程中的作用。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试验动物 健康、未产、质量约 250 g 的性成熟 SD 大鼠 20 只(雌雄各半), 购自第四军医大学实验动物中心, 清洁级饲养, 自由采食和饮水。

1.1.2 主要试剂 兔抗 LIF 蛋白多克隆抗体为武汉博士德生物工程有限公司产品; 链霉素菌抗生物素蛋白- 过氧化酶免疫组化超敏 SP 试剂盒, 福州迈新生物技术开发有限公司产品; 四盐酸 3, 3'-二氨基联苯胺(DAB)和 APES, Sigma 公司进口, 华美生物工程公司分装; Tris 为天津化学试剂有限公司生产。

1.1.3 主要仪器 Leica CM 1900 石蜡切片机, 德国 Leica 公司产品; Motic 生物显微镜, 厦门 Motic 实业有限公司产品; Sartorius AA-160 型电子读数分析天平, 北京赛多利斯仪器系统有限公司产品。

1.2 大鼠配种

雌性大鼠每天下午 16:00 做阴道涂片, 显微镜下观察, 发现大量有核细胞的母鼠与公鼠以 1:1 合笼过夜, 于次日早晨 8:00 进行阴道涂片, 以看到阴道栓或大量精子的时间记为妊娠第 1 天。

1.3 大鼠卵巢采集

妊娠 5~6 d 的大白鼠腹腔注射 100 g/L 的水合氯醛(1.5 mL/只)进行麻醉, 剖开腹腔取其卵巢, 放入 4℃预冷的 pH 7.4 的 40 g/L 多聚甲醛磷酸缓冲液中固定, 保存。

1.4 大鼠卵巢组织切片的制备

将固定的大鼠卵巢用流动自来水冲洗 12~24 h, 然后依次经梯度乙醇脱水, 二甲苯透明, 常规石蜡包埋后连续切片(片厚 5 μm), 裱片于用含体积分数 1% APES 的丙酮预处理的载玻片上, 制备得 3 套切片, 45℃恒温箱烤片, 备染。

1.5 大鼠卵巢组织切片的染色观察

制备的 3 套切片, 1 套进行常规组织学 HE 染色, 1 套进行 LIF 蛋白免疫组化染色, 剩下 1 套用作阴性对照染色, 以确定本试验免疫组化反应的特异性。

1.5.1 免疫组织化学超敏 SP 法染色 (1) 切片脱

蜡复水, 按抗体要求进行组织抗原修复(经 pH 6.0 的 0.01 mol/L 的柠檬酸抗原修复液修复热抗原)。

(2) 每张切片加 1 滴(约 50 μL) 过氧化酶阻断溶液(A 液), 室温下孵育 10 min, PBS 冲洗 3 次, 每次 3 min。(3) 除去 PBS 液, 每张切片加 1 滴(约 50 μL) 正常非免疫动物血清(B 液), 室温下孵育 10 min。(4) 除去血清, 每张切片加 1 滴(约 50 μL) 兔抗大鼠 LIF 抗体, 室温下孵育 60 min 或 4℃过夜。(5) PBS 冲洗 3 次, 每次 5 min。除去 PBS 液, 每张切片加 1 滴(约 50 μL) 生物素标记的第二抗体(C 液), 室温下孵育 10 min。PBS 冲洗 3 次, 每次 3 min。(6) 除去 PBS 液, 每张切片加 1 滴(约 50 μL) 链霉菌抗生物素- 过氧化物酶溶液(D 液), 室温下孵育 10 min。PBS 冲洗 3 次, 每次 3 min。(7) 除去 PBS 液, 每张切片加 2 滴(约 100 μL) 新鲜配置的 DAB 溶液, 显微镜下观察 3~10 min。(8) 自来水冲洗, 苏木素复染, 自来水冲洗返蓝。(9) 梯度乙醇脱水干燥, 二甲苯透明, 中性树胶封片。试验中的 A、B、C、D 液均为试剂盒自带。

1.5.2 阴性对照组切片染色 切片按免疫组织化学超敏 SP 法染色步骤处理, 只是把 1.5.1 节第(4)步骤中加的兔抗大鼠 LIF 抗体用 PBS 液代替, 其余步骤完全相同。

染好的切片在显微镜下观察并照相。光镜下, 有棕黄色颗粒的细胞判为阳性, 根据着色强弱分以下几级: 淡黄色判为弱阳性(+); 棕黄色判为中等阳性(++); 深棕黄色判为强阳性(+++)。阴性对照切片细胞呈蓝紫色。

2 结果与分析

结果显示, 免疫组织化学超敏 SP 法染色的切片背景为无色或浅蓝色, 免疫阳性产物为棕色, 阴性对照切片为蓝紫色。表明本试验具有免疫反应的特异性。

免疫组化染色结果显示, 免疫反应产物广泛分布于不同发育阶段的卵泡及间质细胞、生殖上皮细胞、血管内皮细胞、卵泡液、粒性黄体细胞。原始卵泡中的卵母细胞和周围的一层扁平状卵泡细胞的胞浆及胞核内, 充满棕色颗粒, 呈强阳性反应(+++) (图 1A)。初级卵泡的卵母细胞、颗粒细胞、卵泡膜细胞的细胞核和细胞浆内均充满棕色颗粒, 且呈强阳性反应(+++) (图 1B)。次级卵泡的卵母细胞、颗粒细胞、卵泡内膜细胞的胞浆中 LIF 蛋白免疫反应产物, 与原始卵泡和初级卵泡内同类细胞相比, 变化不大; 而接近成熟的次级卵泡的卵泡腔中卵泡液

呈中等阳性反应(++) (图1C)。近成熟卵泡的卵母细胞与卵泡液呈中等阳性反应(++); 颗粒细胞呈强阳性反应(+++), 阳性产物位于细胞核和细胞浆中。而内膜细胞呈弱阳性反应(+), 阳性产物存在于胞核中(图1D)。基质血管内皮细胞呈强阳性

反应(+++) (图1F); 卵巢表面被覆的单层立方形生殖上皮细胞呈强阳性反应(+++) (图1G); 黄体中的粒性黄体细胞胞浆呈强阳性反应(+++) (图H)。所有阴性对照切片未见棕色阳性反应产物, 呈蓝紫色(图1I)。

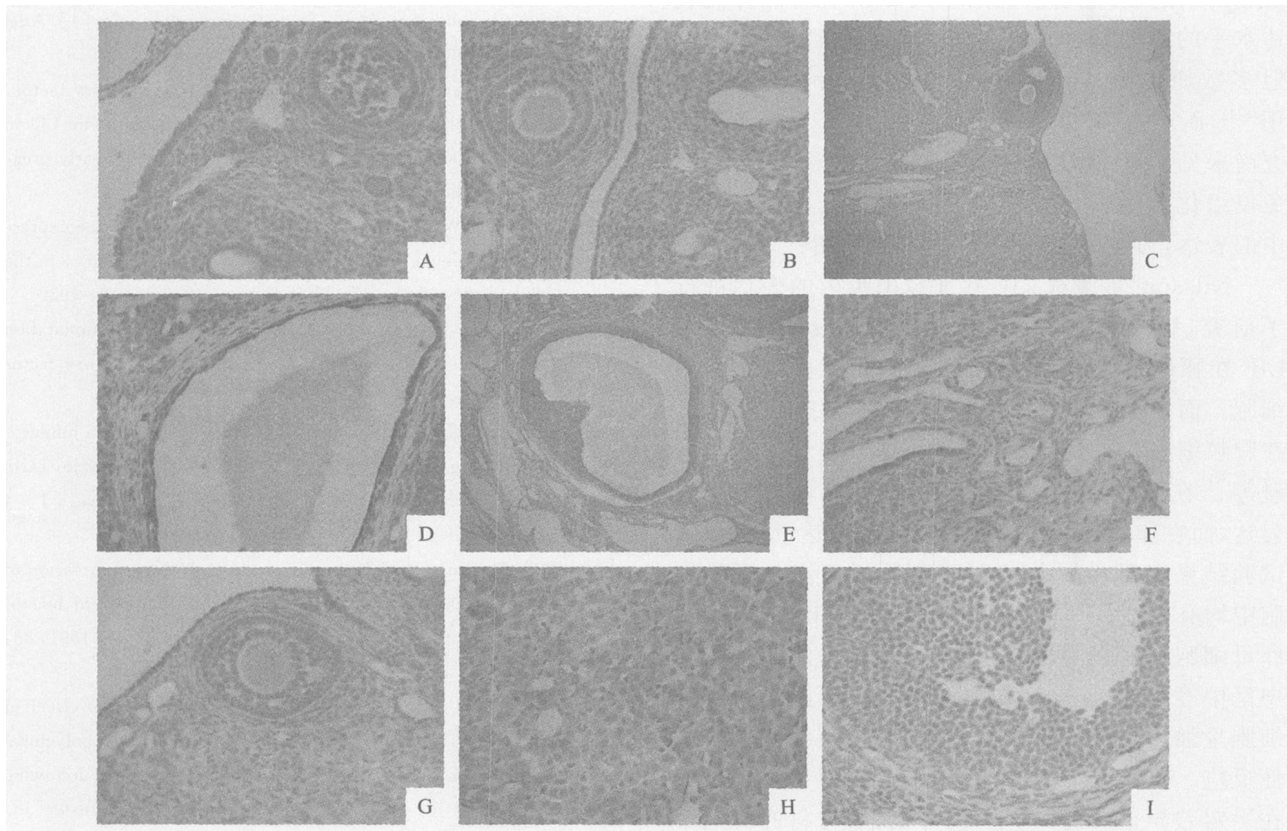


图1 胚胎植入期SD大鼠卵巢组织中LIF蛋白分布图

A~H 图中的箭头分别示SP法染色的原始卵泡($\times 400$)、初级卵泡($\times 400$)、次级卵泡($\times 100$)、近成熟卵泡($\times 400$)、卵泡液($\times 100$)、血管内皮细胞($\times 400$)、生殖上皮($\times 400$)和粒性黄体细胞($\times 400$); I 卵泡阴性对照($\times 400$)

Fig 1 Photographs of leukemia inhibitory factor (LIF) staining location

during implantation of embryo in SD rat ovary

A row shows primordial follicle, primary follicle, secondary follicle, next to mature follicle, follicular fluid, vascular endothelial cells, germinal epithelium cells and granulosa lutein cells respectively from figure A to H.

All other figure was magnification $\times 400$ except that figure C and E was magnification $\times 100$

Figure 1 shows negative control of follicle: Magnification: $\times 400$

3 讨论

胚胎着床是一个复杂的生理过程, 需要诸多激素、生长因子、细胞因子、与基质降解相关的酶分子以及血管形成因子等的共同参与。LIF是L-6家族中一种具有广泛生物学功能的细胞因子, 广泛分布于不同的组织和细胞, 参与多种功能的发挥。有研究表明, LIF在兔、羊、猪、水貂、鼬、猕猴、人等胚胎的着床过程中起着重要的调节作用^[2-3]。Stewart等^[4]

用同源重组的方法将LIF基因突变后发现, LIF缺陷的同源纯合子雄性小鼠仍然具有繁殖能力, 而LIF同源纯合子雌性小鼠与纯合子雄鼠交配后, 虽能产生具有内细胞团及滋养层的成活胚泡, 但这些胚泡并不能着床。如果将这些胚泡移植到野生型假孕受体内, 由于这些受体体内有LIF的表达, 移植的胚泡能够正常着床并正常发育成胎儿, 提示LIF对小鼠胚胎着床是必需的。Vogiagis等^[5]报道, LIF基因在兔、猪、羊胚泡着床期转录达到峰值。Bhatt

等^[6]研究表明, LIF mRNA 在受孕第 4 天小鼠子宫的腺上皮中大量转录, 并与着床时间保持高度一致。当着床延迟时, LIF mRNA 转录的峰值也随之延迟。近年来大量研究均证实, LIF 在雌性生殖系统中发挥着重要作用^[7], 甚至提出 LIF 的作用几乎贯穿妊娠的全过程。随着研究的深入, LIF 在母胎界面表达水平的高低与自然流产的关系备受研究者关注, 但多数研究集中于蜕膜组织中 LIF 的表达及作用^[8-9], 而对在胚泡植入期卵巢组织中 LIF 表达的研究尚未见报道。本试验选用大鼠作为实验动物, 采用免疫组化 SP 法研究了 LIF 在胚泡植入期卵巢组织中的表达, 为 LIF 的临床应用积累了资料。

Nilsson 等^[10]对 LIF 在大鼠卵巢内的表达进行了研究, 结果表明, 在原始卵泡和初级卵泡阶段, LIF 在颗粒细胞及周围的体细胞内的表达高于卵母细胞。而在次级卵泡中, LIF 主要在卵细胞中表达, 在颗粒细胞及周围的体细胞中的表达量很少。岳占碰等^[11]在猕猴卵巢中发现, LIF 主要在卵母细胞内表达, 而在卵泡周围的基质细胞内的表达量甚少。本试验结果表明, LIF 在不同发育阶段卵泡的颗粒细胞中均有表达; 在原始卵泡、初级卵泡和次级卵泡的卵母细胞中呈强阳性反应, 在成熟卵泡的卵母细胞中呈中等阳性反应; 在初级卵泡和次级卵泡的内膜细胞呈强阳性反应, 在成熟卵泡的内膜细胞呈弱阳性反应。该结果与 Nilsson 和岳占碰的试验结果存在一定差异, 原因可能是: 其一, 获取材料的时间不同, Nilsson 的试验所用的大鼠处于非妊娠期, 而本试验的大鼠处于胚泡植入期, 可能由于动物不同发育时期 LIF 的表达量不尽相同, 因而出现了 LIF 分布范围与表达量强度的差异; 其二, LIF 在卵巢内表达量的高低会因动物种类不同而出现差异。本研究还发现, 基质细胞、血管内皮细胞、生殖上皮细胞均呈强阳性反应, 卵泡液呈中等阳性反应。

综上所述, LIF 蛋白在大鼠胚泡植入期卵巢组织中的多种细胞内均呈高水平表达, 这一试验结果进一步证明 LIF 在哺乳动物妊娠植入期扮演着极其重要的角色。下一步的工作将是对 LIF 作用机理进行深入研究, 这将为哺乳动物体外受精-胚胎移

植成功率的提高奠定理论依据, 为人类节育新技术的研发提供新思路。

[参考文献]

- [1] Hilton D J, Nicola N A, Metcalf D. Purification of a murine leukemia inhibitory factor from Krebs ascites cells[J]. *Anal Biochem* 1998; 173: 359-367.
- [2] Yue Z P, Yang Z M, Wei P, et al. Leukemia inhibitory factor, leukemia inhibitory factor receptor, and glycoprotein 130 in rhesus monkey uterus during menstrual cycle and early pregnancy[J]. *Biol Reprod*, 2000, 63: 508-512.
- [3] Hirzei D J, Wang J, Das S K, et al. Changes in uterine expression of the leukemia inhibitory factor during pregnancy in the western spotted skunk[J]. *Biol Reprod*, 1999, 60: 484-492.
- [4] Stewart C L, Raspar P, Brunet L J, et al. Blastocyst implantation depends on maternal expression of leukemia inhibitory factor[J]. *Nature*, 1992, 359: 76-79.
- [5] Vogiagis D, Fry R C, Sandeman R M, et al. Leukemia inhibitory factoring endometrium during the oestrous cycle, early pregnancy and in ovariectomized steroid-treated ewe[J]. *J Reprod Fertil*, 1997, 109(2): 279-288.
- [6] Bhatt H, Brunet L J, Stewart C L, et al. Uterine expression of leukemia inhibitory factor coincides with the onset of blastocyst implantation[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1991, 88: 11408.
- [7] Mitchell M H, Swanson R J, Oehninger S. *In vivo* effect of leukemia inhibitory factor (LIF) and an anti-LIF polyclonal antibody on murine embryo and fetal development following exposure at the time of transcervical blastocyst transfer[J]. *Biol Reprod*, 2002, 67(2): 460.
- [8] Kojima K, Kanzaki H, Iwai M, et al. Expression of leukemia inhibitory factor in human endometrium and placenta[J]. *J Biol Reprod*, 1994, 50: 882.
- [9] Geising D P, Comeau M R, Friend D J, et al. The gp130 signal transducer, gp130: an oncostatin M receptor and affinity converter for the LIF receptor[J]. *Science*, 1992, 255: 1434.
- [10] Nilsson E E, Kezele P, Skinner M. Leukemia inhibitory factor (LIF) promotes the primordial to primary follicle transition in rat ovaries[J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2002, 188: 65-73.
- [11] 岳占碰, 李世杰, 张学明, 等. 白血病抑制因子及其受体在月经周期猕猴卵巢内的表达[J]. *畜牧兽医学*, 2006, 22(2): 14-16.