

行政院國家科學委員會專題研究計畫 成果報告

血癌抑制因子及表皮生長因子訊息傳遞對著床前期小鼠胚胎發育之研究(第3年)
研究成果報告(完整版)

計畫類別：個別型
計畫編號：NSC 98-2314-B-040-010-MY3
執行期間：100年08月01日至101年07月31日
執行單位：中山醫學大學醫學研究所

計畫主持人：李茂盛

計畫參與人員：學士級-專任助理人員：白依萍

公開資訊：本計畫涉及專利或其他智慧財產權，2年後可公開查詢

中華民國 101年10月31日

中文摘要：根據我們近年來的研究及其他學者的文獻發現表皮生長因子除了對小鼠胚胎發育有幫助，對大鼠和其他哺乳類動物的發育都有正向調節的效果。血癌抑制因子對著床前期胚胎發育至桑葚胚期扮演一個極重要的角色。我們收集 B6CBF1 小鼠胚胎觀察正常情況及各種不同濃度抑制劑於胚胎培養液中，觀察胚胎生長發育結果，在胚胎培養液中添加各種抑制劑及補充血癌抑制因子及表皮生長因子後，觀察小鼠胚胎於體外培養至第五天形成囊胚的直徑改變的情形，發現添加 50ug 血癌抑制因子或表皮生長因子後皆稍微增加囊胚的直徑。於注射血癌抑制因子干擾核醣核酸，並添加各個不同抑制劑的培養液下生長至囊胚的胚胎，並染的要測定的訊息傳遞路徑下游的蛋白抗體 STAT3 (phosphor-Ser727) 及 STAT3(Ab727)、ERK、AKT 等。注射血癌抑制因子干擾 RNA 並添加 EGF 受體抑制劑 PD168393，導致 EGF receptor 受抑制時，LIF 無法改善此抑制情形，而補充 EGF 對注射血癌抑制因子干擾 RNA 並添加 PD168393 導致 EGF receptor 受抑制的改變影響不明顯，囊胚率由 18.7% 變為 23.5%。原假設推測 EGF 與 LIF 可能共同引起的三條訊息傳遞路徑在小鼠胚胎的觀察可以初步推測存在 STAT3 路徑，而路徑 Ras/Raf/ MEK/ MAPK 與 STAT3 兩條路徑之影響經進一步證實發現影響不明顯。接著我們利用胚胎發育的結果分析 EGF 和 LIF 對小鼠胚胎的相互影響。跟據我們補充 50ug LIF 或 EGF 再分析 LIF 和 EGF 對胚胎發育的影響，發現這兩種因子可以共享 STAT3 訊息傳導路徑，以協助小鼠胚胎發育的。本研究亦對於部分胚胎進行去氧核醣核酸片段測試胚胎細胞凋亡，大部份的胚胎細胞如果已經呈現黑色萎縮狀態，經去氧核醣核酸片段測試皆無明顯的陽性之反應，而當 AKT 路徑被抑制時，胚胎呈現細胞凋亡的陽性反應。當 LIF 缺陷的胚胎發育過程中，EGF 可透過 STAT3 訊息傳導路徑，以補足 LIF 的缺乏，改善胚胎發育。

中文關鍵詞：血癌抑制因子、表皮生長因子、干擾 RNA

英文摘要：Introduction: Leukemia inhibitory factor (LIF) is an essential factor for implantation and establishment of pregnancy. We have reported that mouse embryos development was effected by LIF-deficiency in vitro. We also found that some genes change their experssion after LIF-deficiency by analysis with gene chips. We found that the epidermal growth factor (EGF) increased the balstocyst rate after LIF-SiRNA treated. The aim of this study is search on the relationships of signal transduction pathways from

LIF and EGF at preimplantation stage mouse embryos.
Methods: Mouse zygotes were collected from the oviducts of B6CBF1 female mice successfully mated in the laboratory and placed into wells with fresh human tubal fluid medium. Microinjection was performed used antisense LIF to mouse cytoplasmic and then added different inhibitors (PD168393, JAK-I - II, PD98059, U0126) with or without 50ug LIF/EGF. We analyzed the interaction of their AKT, MAPK signal or STAT3 signal transduction pathway between EGF and LIF on mouse embryo development.
Results: Embryos development rates were decreased by inhibitors (PD168393 or JAK-I - II, U0126) or LIF antisense oligonucleotide. Arrested and dark embryos were positive reaction by TUNEL assay. We detected the proteins in STAT3 signal transduction pathway STAT3 (phosphor-Ser727), STAT3 (Ab727), pathway MAPK MEK1(phosphor-Ser221), MEK1(A221), Akt(phosphor-Thr308) and Akt(Ab308) proteins. There was no statistic difference on increasing embryo growth rate in AKT and MAPK pathway by supplied LIF and EGF proteins in culture medium. LIF and EGF may share STAT3 pathway for assisting mouse embryo development.
Conclusion: Our data indicate that EGF is able to compensate for LIF during LIF-deficient embryo development, and suggests that EGF may through STAT3 pathway to improve embryo development.

英文關鍵詞： leukemia inhibitory factor, epidermal growth factor, SiRNA

行政院國家科學委員會補助專題研究計畫

期中進度報告
期末報告

血癌抑制因子及表皮生長因子訊息傳遞對著床前期小鼠胚胎發育之研究

計畫類別：個別型計畫 整合型計畫

計畫編號：NSC 98-2314-B-040 -010 -MY3

執行期間：98年8月1日至101年7月31日

執行機構及系所：中山醫學大學 醫學研究所

計畫主持人：李茂盛

共同主持人：

計畫參與人員：黃梨香、鄭恩惠、白依萍

本計畫除繳交成果報告外，另含下列出國報告，共 0 份：

- 移地研究心得報告
- 出席國際學術會議心得報告
- 國際合作研究計畫國外研究報告

處理方式：除列管計畫及下列情形者外，得立即公開查詢

涉及專利或其他智慧財產權，一年二年後可公開查詢

中華民國 101 年 10 月 31 日

目錄

中文摘要及關鍵字	III
英文摘要及關鍵字	IV
報告內容	
一、前言	1
二、目的	1
三、文獻探討	1
四、研究方法	4
五、結果與討論（含結論與建議）	6
六、參考文獻	7
七、附表及附圖	10

中文摘要及關鍵字

根據我們近年來的研究及其他學者的文獻發現表皮生長因子除了對小鼠胚胎發育有幫助，對大鼠和其他哺乳類動物的發育都有正向調節的效果。血癌抑制因子對著床前期胚胎發育至桑葚胚期扮演一個極重要的角色。我們收集B6CBF1小鼠胚胎觀察正常情況及各種不同濃度抑制劑於胚胎培養液中，觀察胚胎生長發育結果，在胚胎培養液中添加各種抑制劑及補充血癌抑制因子及表皮生長因子後，觀察小鼠胚胎於體外培養至第五天形成囊胚的直徑改變的情形，發現添加50ug血癌抑制因子或表皮生長因子後皆稍微增加囊胚的直徑。於注射血癌抑制因子干擾核糖核酸，並添加各個不同抑制劑的培養液下生長至囊胚的胚胎，並染的要測定的訊息傳遞路徑下游的蛋白抗體STAT3 (phosphor-Ser727)及STAT3(Ab727)、ERK、AKT等。注射血癌抑制因子干擾RNA並添加EGF受體抑制劑PD168393，導致EGF receptor受抑制時，LIF無法改善此抑制情形，而補充EGF對注射血癌抑制因子干擾RNA並添加PD168393導致EGF receptor受抑制的改變影響不明顯，囊胚率由18.7%變為23.5%。原假設推測EGF與LIF可能共同引起的三條訊息傳遞路徑在小鼠胚胎的觀察可以初步推測存在STAT3路徑，而路徑Ras/Raf/MEK/MAPK與STAT3兩條路徑之影響經進一步證實發現影響不明顯。接著我們利用胚胎發育的結果分析EGF和LIF對小鼠胚胎的相互影響。跟據我們補充 50ug LIF或EGF再分析LIF和EGF對胚胎發育的影響，發現這兩種因子可以共享STAT3訊息傳導路徑，以協助小鼠胚胎發育的。本研究亦對於部分胚胎進行去氧核糖核酸片段測試胚胎細胞凋亡，大部份的胚胎細胞如果已經呈現黑色萎縮狀態，經去氧核糖核酸片段測試皆無明顯的陽性之反應，而當AKT路徑被抑制時，胚胎呈現細胞凋亡的陽性反應。當LIF缺陷的胚胎發育過程中，EGF可透過STAT3訊息傳導路徑，以補足LIF的缺乏，改善胚胎發育。

關鍵字: 血癌抑制因子、表皮生長因子、干擾 RNA

英文摘要及關鍵字

Introduction: Leukemia inhibitory factor (LIF) is an essential factor for implantation and establishment of pregnancy. We have reported that mouse embryos development was effected by LIF-deficiency in vitro. We also found that some genes change their experssion after LIF-deficiency by analysis with gene chips. We found that the epidermal growth factor (EGF) increased the balstocyst rate after LIF-SiRNA treated. The aim of this study is search on the relationships of signal transduction pathways from LIF and EGF at preimplantation stage mouse embryos.

Methods: Mouse zygotes were collected from the oviducts of B6CBF1 female mice successfully mated in the laboratory and placed into wells with fresh human tubal fluid medium. Microinjection was performed used antisense LIF to mouse cytoplasmic and then added different inhibitors (PD168393, JAK-I –II, PD98059, U0126) with or without 50ug LIF/EGF. We analyzed the interaction of their AKT, MAPK signal or STAT3 signal transduction pathway between EGF and LIF on mouse embryo development.

Results: Embryos development rates were decreased by inhibitors (PD168393 or JAK-I –II, U0126) or LIF antisense oligonucleotide. Arrested and dark embryos were positive reaction by TUNEL assay. We detected the proteins in STAT3 signal transduction pathway STAT3 (phosphor-Ser727), STAT3 (Ab727), pathway MAPK MEK1(phosphor-Ser221), MEK1(A221), Akt(phosphor-Thr308) and Akt(Ab308) proteins. There was no statistic difference on increasing embryo growth rate in AKT and MAPK pathway by supplied LIF and EGF proteins in culture medium. LIF and EGF may share STAT3 pathway for assisting mouse embryo development.

Conclusion: Our data indicate that EGF is able to compensate for LIF during LIF-deficient embryo development, and suggests that EGF may through STAT3 pathway to improve embryo development.

Key word: leukemia inhibitory factor, epidermal growth factor, SiRNA

報告內容

一、前言

當不孕症患者進入試管嬰兒療程時胚胎在體外培養時會根據胚胎發育的需求，適當調節基因的表現外，其中血癌抑制因子是影響胚胎發育及著床的重要因子，而根據我們的先前的研究發現，血癌抑制因子及表皮生長因子應存在著某種關聯，此二因子對胚胎發育的影響應是十分具有醫學研究價值的主題，雖然許多報告證明表皮生長因子及血癌抑制因子或其接受體可在胚胎中被偵測到，但是確實的訊息傳遞路徑並未有報導，本計劃第一年度已確定正常發育之胚胎中血癌抑制因子及表皮生長因子訊息傳遞路徑，可能透過 STAT3 路徑及 Ras/Raf/MEK/MAPK 兩條路徑，第二年度的計畫將抑制正常發育之胚胎中血癌抑制因子，再進一步觀察透過 STAT3 路徑之訊息傳遞物質之抑制劑這些路徑對對胚胎發育的影響，。

二、研究目的

本研究的目的藉由表皮生長因子及血癌抑制因子訊息傳遞路徑探討此兩個重要因子對胚胎發育調控的機轉。我們期望經由本研究應可確認血癌抑制因子在胚胎中的訊息傳遞與表皮生長因子間的關聯性，據以提供血癌抑制因子及表皮生長因子相互間對胚胎發育的機轉，以更深入增加我們了解血癌抑制因子對胚胎發育時的影響的機制及相關基因的表現情形，確認胚胎於體內發育可能的生理機制，據以提供胚胎體外培養環境的改善，而此種資訊亦將有助提高臨床醫師在不孕症治療方面的治癒率。

本計劃將分三年進行，第一年度我們已確定：正常發育之胚胎中血癌抑制因子及表皮生長因子訊息傳遞路徑，透過訊息傳遞物質之抑制劑進一步的觀察這些路徑對對胚胎發育的影響。第二年度將探討以干擾性RNA抑制血癌抑制因子後，觀察其訊息傳導路徑受影響的情形，藉由STAT3 之抑制劑，添加表皮生長因子觀察胚胎發育的路徑是否經由STAT3 的路徑來代償血癌抑制因子的表現路徑。已確定正常發育之胚胎中血癌抑制因子及表皮生長因子訊息傳遞路徑，我們接著觀察此二因子之間的關聯，所採用的策略為利用血癌抑制因子干擾RNA 抑制胚胎發育的情形，再添加表皮生長因子，並利用表皮生長因子之接受體抑制劑PD168393 處理已經血癌抑制因子干擾RNA抑制的胚胎的胚胎觀察下游之STAT3, PI3K, Ras 是否皆不被活化，此外血癌抑制因子可能與表皮生長因子共用的STAT3 路徑經添加DNSTAT3 抑制劑阻斷STAT3 磷酸化，再觀察血癌抑制因子或表皮生長因子是否仍可傳遞訊息至使成為STAT3 磷酸化蛋白，藉由STAT3 之抑制劑，探討以干擾性RNA抑制血癌抑制因子後添加表皮生長因子觀察胚胎發育的路徑是否經由STAT3 的路徑來代償血癌抑制因子的表現路徑。

三、文獻探討

小鼠胚胎的分裂由原核期開始，依分裂的數目通常分為2細胞期、4細胞期、8細胞期、桑葚胚期及囊胚期而進入孵化，接著著床於子宮。基因表現方面，胚胎進入2細胞期時，胚體中雙套染色體之轉錄活性被誘發而啟動了胚源性基因的表達(Schultz, 1993)；而哺乳動物的胚於著床前期之發育具有階段性的特異性的生長因子及其接受體之表現(Watson et al., 1992)，此類生長因子包括胰島素 (insulin)、類胰島素生長因子(insulin-like growth factor I；IGF-1)、表皮生長因子(epidermal growth factor；表皮生長因子)、轉型生長因子(transforming growth factor- α ；TGF- α) 及血癌抑制因子(leukemia inhibitory factor；LIF)等。

人類的血癌抑制因子基因位於第 22 對染色體 q14 的位置，血癌抑制因子屬於介白質-6 蛋白家族的成員之一，分子量為 20kD，未成熟的蛋白型態含有 202 個胺基酸，成熟的蛋白型態由 180 個胺基酸組成(Gearing et al., 1987)。血癌抑制因子的結晶體結構於 1994 年被鑑定出來(Robinson et al., 1994)，主要為 4 個螺旋分別由 2 個長環及一個短環所串聯。螺旋狀的細胞動力素被分類為短鏈(short chain)及長鏈(long chain)兩種，血癌抑制因子、介白質-2、介白質-4 及顆粒球巨噬群落刺激因皆形成單體型式 (monomeric form)同屬短鏈細胞動力素(Boulay and Paul, 1992; Bazan, 1992)。

目前已知血癌抑制因子廣泛的存在各種細胞中，在心臟、肝臟、子宮內膜、中樞神經系統、腎臟、肺臟、胸腺等器官及組織也都偵測得到血癌抑制因子。血癌抑制因子和許多生理系統上的增殖、分化、細胞存活有關(Metcalf, 1992; Hilton, 1992)。

人類及多種哺乳類動物的輸卵管及子宮內膜表皮中皆會分泌血癌抑制因子(Shen and Leder, 1992; Yang et al., 1994; Cullinan et al., 1996; Vogliagis et al., 1996)，人類血癌抑制因子會受到月經週期的調節，隨著月經週期而在子宮內膜細胞中有週期性增減的表現，此外，在受到基因突變導致缺乏血癌抑制因子的老鼠，著床無法發生(Stewart et al., 1992)。

胚胎能否順利著床取決於著床前期胚胎和子宮內膜的發育狀況，影響著床前期胚胎發育至囊胚的因子中，血癌抑制因子是著床及成功懷孕所必須的因子，血癌抑制因子對著床前期胚胎發育至桑葚胚期扮演一個極重要的角色，是否應補充於體外培養的環境中也仍有爭議(Dunlison et al., 1996; Jurisicova et al., 1995)，我們之前的結果採用體外培養的方法得到的結果，和其他諸多體外培養的研究中皆證實血癌抑制因子是在著床前期的胚胎發育中是一個非常重要的因子(Dunlison et al., 1996; Tsai et al., 2000)。

人體的多種組織都有表皮生長因子分佈，如：十二指腸的胃粘膜細胞、外分泌腺體以及多種腫瘤細胞等。在生殖系統中，精液、羊水在子宮內膜、蛻膜、著床前胚胎、滋養層細胞等生殖組織中存在表皮生長因子或表皮生長因子受體，表皮生長因子通過自分泌、旁分泌和內分泌途徑，參與內膜發育、胚胎發育、植入過程、妊娠維持、胎盤激素合成分泌等生理過程的調節(Murray, 1993; Das, 1993)。

表皮生長因子對小鼠及多種哺乳動物中都表現出對著床前胚胎發育具有調節作用，Taga 於 1992 年的實驗顯示，表皮生長因子對小鼠二細胞的發育不表現出明顯的效應，只在桑葚胚以後，表皮生長因子自分泌和旁分泌才對胚胎的發育起作用。然而 Buyalos (1994)發現，將小鼠二細胞胚胎培養在含有表皮生長因子的培養液中，完全擴展和正在孵化的囊胚的比例明顯高於對照組，且表皮生長因子的促進作用可被抗表皮生長因子抗體所阻斷。Terual (1997)發現將小鼠二細胞胚胎單獨培養時，表皮生長因子可明顯增加胚胎的分化生長速率，證明表皮生長因子對小鼠二細胞胚胎的生長有促進作用。表皮生長因子是否作用於早期胚胎取決於胚胎表皮生長因子接受體是否有活性，免疫螢光測定出小鼠未受精卵細胞和二細胞胚胎中呈現很弱的表皮生長因子接受體，四細胞以後各期，蛋白表現逐漸增強。除滋養層細胞外，內細胞團中也有表皮生長因子接受體的表達。

表皮生長因子對胚胎著床時期的影響亦有諸多報導，Johnson(1993)證實在大鼠妊娠 4、5、6 日的子宮腺表皮中存在表皮生長因子和表皮生長因子接受體。Gharib(1993)在綿羊著床期滋養層細胞上也發現表皮生長因子接受體存在，其分子量與小鼠表皮生長因子接受體相

同，表皮生長因子及其接受體的存在暗示表皮生長因子參與了調節胚胎的發育。從著床前的豬胚胎上同樣發現分子量為 170kd 的表皮生長因子接受體，該受體蛋白在有表皮生長因子和 ATP 時發生磷酸化(Zhang, 1992)。在兔(Hofmann, 1990)、牛(Rieger 1998)、貓(Boomsma 1997)等動物的滋養層細胞和子宮內膜上都證實有表皮生長因子和表皮生長因子接受體的表現。

血癌抑制因子訊息傳遞的路徑是透過與血癌抑制因子與其受體 (LIFR) 作結合，而 LIF-LIFR 這個複合物會吸引 gp130，此時形成三複合物 (trimeric complexes)，由於三複合物的產生，使得 Jak kinase 交互磷酸化 (cross phosphorylation)，接著使得受體位於細胞質內的酪氨酸殘基 (tyrosine residue) 被磷酸化，磷酸化後的酪氨酸主要提供 STAT3 的結合區位。而當 STAT3 被吸引過去後，STAT3 的 SH2 domain 會磷酸化自身會磷酸化，並且形成雙聚合體 (dimer)，進而調節下游的基因(Gerhartz, 1996; Heinrich, 1998)，也有學者提出當磷酸酪氨酸激酶與磷酸化的 gp130 結合後可能會經由 MAPK 路徑(mitogen- activated protein kinase pathway)(Stahl et al., 1995)傳遞訊息。

表皮生長因子會與表皮生長因子受體結合，受體接合後會雙體化，雙體化之後的表皮生長因子受體會活化彼此細胞內酪氨酸激酶區，進一步活化下游不同的訊息傳遞路徑，其主要的路徑有三 (1) PI3K/ AKT 路徑，此路徑使細胞不易進行細胞凋亡；(2) Ras/Raf/ MEK/ MAPK 路徑；(3) STAT 路徑表皮生長因子傳遞的路徑的訊息傳遞若失去正常調控，會造成細胞過度生長、抑制細胞凋亡、增加血管新生、增加腫瘤的侵犯與轉移能力(Pang et al., 2007; Kang et al., 2008; Andersen et al., 2008)。

血癌抑制因子基因剔除小鼠在體內血癌抑制因子完全缺乏的情況下仍能發育到囊胚階段(Stewart et al., 1992)，此種現象和體外培養胚胎將血癌抑制因子抑制導胚胎受損的情況不同(Cheng et al., 2004)，體外試驗之胚胎發育受損的情形有可能是因為缺乏生殖道中的細胞產生的其他生長因子所致，諸多生殖道中的生長因子及細胞動力素都可能促進囊胚的形成(Hardy and Spanos 2002)，例如：胚胎本身不表現第一型類胰島素生長因子(insulin-like growth factor I)而由輸卵管產生後存在於輸卵管液及子宮腔液中(Lighten et al., 1997)，添加第一型類胰島素生長因子於培養液中可以增加胚胎發育至囊胚的比例(Spanos et al., 2000)，此外，肝凝素結合表皮生長因子(heparin binding-epidermal growth factor, HB-EGF) 及巨噬細胞群落刺激因子都由生殖道產生(Bridsal et al., 1996)，並且也可以促進著床前期的胚胎發育(Martin et al., 1998; Sjoblom et al., 1999)。

也有報告指出表皮生長因子和血癌抑制因子共同參與了胚胎著床的過程(Zhang et al 1996)，表皮生長因子與血癌抑制因子間可能共用的訊息傳遞路徑為 STAT 及 MAPK，此兩條路徑皆與細胞的增殖有關，故這兩種生長因子對胚胎的生長發育甚至著床應扮演著相當重要的角色，但其交互作用及調節的機轉則需要更進一步的研究來驗證。

四、研究方法

當小鼠胚胎中血癌抑制因子被抑制時，我們添加表皮生長因子之接受體抑制劑 PD168393 或 STAT3 抑制劑 JAKI-II 處理雙原核期的胚胎，觀察表皮生長因子及血癌抑制因子影響胚胎發育的情形，並進行免疫螢光染色確定此二因子及其受體之表現，血癌抑制因子可能與表皮生長因子共用的 STAT3 路徑；所以添加 JNKI-II 抑制劑阻斷 STAT3 被磷酸化，再觀察血癌抑制因子或表皮生長因子是否仍可傳遞訊息至使成為 STAT3 磷酸化蛋白，藉由此實驗設計可先確定表皮生長因子及血癌抑制因子對影響胚胎發育的 STAT3 正常生理路徑的影響。

四、研究方法、進行步驟

1、小鼠胚胎之收集及培養(Nagy et al., 2003)

為得到較多的受精卵研究所使用的動物品系為購自國科會動物中心純品系的 C57BL/6J 母鼠與 CBA 公鼠自行交配所生的第一子代，選擇週齡介於六至八週性成熟之雌鼠，以 10IU 之 PMSG 進行腹腔注射以誘發超級排卵，48 小時後再注射 10 IU 之 HCG，注射 10IU 之 HCG 後，立刻將一母鼠與一公鼠置入一籠內讓其互相交配。隔天清晨觀察雌鼠是否有陰道塞 (Vaginal Plug)，作為判斷交配與否之根據，於注射 HCG 後約 12-16 時可以取得原核期之鼠胚。收集小鼠胚胎並置於人類輸卵管液培養基培養。取胚前一天，將人類輸卵管液培養基以 20 μ l 為一滴，滴於 35-mm 培養皿中，再覆蓋礦物油於培養基上，置於 37 $^{\circ}$ C，5% 二氧化碳培養箱中過夜，以調整酸鹼值，待用。

將懷孕母鼠以頸椎脫臼法犧牲，將接裝有人類輸卵管液培養基注射針筒之磨鈍的 30G 注射針刺入繖部的洞口以眼科鑷子夾緊注射針與繖部，緩緩將人類輸卵管液培養基注射入輸卵管中收集單一細胞期胚胎，在解剖顯微鏡下以吸管收集鼠胚後，放入回溫之玻尿酸酶內數分鐘以去除卵丘細胞。等卵丘細胞開始脫落擴散時，即可以玻璃毛細管去除包被於鼠胚外之卵丘細胞，再以人類輸卵管液培養基清洗受精卵後，將胚胎放入事先準備好已調整酸鹼值及溫度並覆蓋礦物油之人類輸卵管液培養液中，置入培養箱內培養，添加血癌抑制因子或表皮生長因子或各種抑制劑每天觀察、記錄胚胎生長狀況。

2、血癌抑制因子干擾性RNA 顯微注射法

根據96年度之研究成果使用血癌抑制因子雙股干擾性RNA [序列 CCAGAUCAAGAAUCAACUG(138-)]具有抑制血癌抑制因子表現之效果。因此本年度以仍此序列作為本實驗用之SiRNA序列。以顯微注射之方式將SiRNA送入雙原核合期之胚胎中，觀察胚胎生長發育之情形。

操作時全部在相位差倒立顯微鏡下進行，並以Narishige 之顯微操作器操作，在顯微操作培養皿中滴入十滴已平衡過酸鹼值的HTF 培養液，然後以礦物油覆蓋，再將十個一組的原核期鼠胚置於油滴下的培養液中，以事先用拉針儀及斷針機製備之平口固定針管固定胚胎，再以事先製備並預先注入血癌抑制因子之反意寡核甘酸的顯微注射管，經油壓調整後注入鼠胚中。注射後將各組放回二氧化碳培養箱培養，並每日定時觀察。

3、添加表皮生長因子及其訊息傳遞路徑抑制劑

為了觀察表皮生長因子與血癌抑制因子間的相互影響情形，我們將血癌抑制因子 SiRNA 注入雙原核期的鼠胚後，添加表皮生長因子及其接受器之抑制劑PD168393 或DNSTAT3 觀察其影響，將各組鼠胚放回二氧化碳培養箱培養，並每日定時觀察胚胎生長情形，據以推測當血癌抑制因子在体外培養缺乏時是否可由補充表皮生長因子改善，並與第一年度生理系統的補救機制進行分析比較。

4、細胞免疫染色

為確定血癌抑制因子及其接受體與表皮生長因子及其接受體在 B6CBF1 品系小鼠胚胎正常表現的情形，我們觀察各個發育期的鼠胚以細胞免疫染色的方法確認此二因子及其受體是否有表現。

首先將胚胎以 Acidic Tyrod's 溶液溶解外層之透明帶，再以磷酸緩衝液洗滌三遍後將胚胎置於載玻片上，以 2% 的福馬林固定 15 分鐘，以磷酸緩衝液洗滌三遍後，接著以 0.2% 的

Triton X-100 於室溫下處理 5 分鐘，以磷酸緩衝液洗滌五遍，與 1% 雙氧水作用 10 分鐘，以磷酸緩衝液洗滌三遍，以含有 10% 胎牛血清的磷酸緩衝液於室溫下處理 1 小時，接著以 1mg/ml 的血癌抑制因子抗體於 4°C 培養隔夜，以 TBST 溶液(Tris-HCl 50 mM, Tween 20 0.025%, pH 7.8) 清洗，以含有 10% 胎牛血清的磷酸緩衝液於室溫下處理 10 分鐘，再以 1mg/ml 二級抗體 (Rodamin-goat anti-rabbit IgG) 作用 1 小時，以 TBST 溶液清洗 5 遍，每遍 2 分鐘，以處理 45 分鐘，再以 TBST 溶液清洗 5 次，每次 5 分鐘，分別以 70%、80% 及 90% 的酒精處理 5 分鐘漸進脫水，然後以甘油處理，在螢光相位差顯微鏡下觀察呈色情形。

5、囊胚直徑之測量

為了評估此二種因子對囊胚實際的大小對胚胎發育的影響，我們將胚胎直接至於相位差顯微鏡下，以 200 倍的倍數觀察包含透明帶的囊胚直徑，利用事先置於接目鏡內的尺測量，呈圓形的胚胎測量任選的兩段互相垂直的直徑，若胚胎呈橢圓形則測量最長及最短的直徑，每個胚胎分別測量兩次並紀錄。

6、西方墨點法 (Western blotting)

(1). 萃取蛋白質 (Extraction of protein)

小鼠胚胎以緩衝溶液清洗二次，然後加入 0.2 ml lysis buffer [50 mM Tris-base (pH 7.4)/2 mM EDTA/2 mM EGTA/150 mM NaCl/1 mM PMSF/10 µg/ml leupeptin/1 mM sodium orthovanadate/1% (v/v) 2-mercaptoethanol/1% (v/v) Nonidet P40/0.3% sodium deoxycholate]，採用震盪器作用 1 分鐘放置冰上作用 5 分鐘的方式重複十次，作用完全後離心 (12000 rpm, 4 °C, 15 分鐘)，取出上清液並轉移到另一個微量小管。此時得到全胚胎細胞萃取液。

(2). 蛋白質濃度測定

蛋白質的定量採用 Bradford protein assay 方法，其原理為蛋白質可與 Coomassie brilliant blue G-250 形成藍色複合物，當藍色越深表示蛋白含量越高。測試方法首先以一系列已知濃度 BSA 加入五分之一體積的 Bradford protein dye，以波長 595 nm 可見光之析光度做一標準曲線，再以同樣的方法測得樣品之 O.D. 值，即可根據標準曲線求得樣品蛋白之濃度。

(3). 西方墨點法 (Western blotting)

首先將全細胞萃取液(50 µg)加入 5× Treating buffer 混勻煮沸 10 分鐘，迅速置入冰浴中，再進行 SDS-聚丙酰胺板膠電泳分析。SDS-聚丙酰胺板膠電泳之上層膠體為 4 % Stacking gel，下層膠體為 10 % Separating gel。將做好之板膠固定到電泳裝置上，並將電泳緩衝液 (0.02 M Tris-base、0.192 M Glycine 和 0.1 % SDS) 注滿上下電泳槽，然將處理過的蛋白樣品溶液加入板膠上所形成的 U 型槽中，以 140 伏特進行電泳。電泳結束後進行蛋白轉移，將膠體進入冰冷之轉漬緩衝液 (0.02 M Tris-base、0.192 M Glycine 和 20 % methanol) 5 到 10 分鐘，將膠體平鋪在兩張浸濕的 Whatman 3M 濾紙上，此時將預先浸濕的硝化纖維紙 (nitrocellulose paper) 蓋在膠體上面，依次在覆蓋兩張浸濕的 3M 濾紙，並以玻棒輕趕其間的氣泡後裝入 Transfer Holder，然後置於 Electrotransfer Tank (內含轉漬緩衝液) 於 4°C 下，進行 0.1 V 電轉移，電轉移過夜之後，取出消化纖維紙浸入 1% BSA 的 Blocking buffer (w/v) 緩衝液 (1 % BSA、0.9 % (w/v) NaCl、100 mM Tris-base 和 0.1% Tween 20)，在室溫下搖晃一個小時。然後加入欲偵測的 1 級抗體於 5 ml 含 1% (w/v) BSA 之緩衝液，與消化纖維紙在 4°C 反應置隔天，之後以清洗緩衝液 (0.9 % (w/v) NaCl、100 mM Tris-base 和 0.1 % Tween 20 pH=7.4) 清洗兩次，每一次 10 分鐘，最後再清洗一次到掉即可。接著再進一步加入有 20 µg 2 級抗體含 1% (w/v) BSA 之 10 ml 緩衝液，於室溫作用一個小時，然後以清洗緩衝液清洗兩次，每一次 10 分鐘，最後再清洗一次到掉即可。最後以 ECL 呈色試劑來做呈色。

7、去氧核糖核酸片段測試胚胎細胞凋亡(terminal deoxynucleotidyl transferase mediated dUTP nick end labeling; TUNEL assay)

胚胎檢體以 1% 福馬林於 4°C 下固定一小時，然後將胚胎細胞以 PBS 各五分鐘洗三次，然後以 0.2% Triton X-100(t-Octylphenoxypolyethoxyethanol; Sigma)/PBS 處理十分鐘，使細胞膜通透化，染色體解緻密化，再將此玻片以 PBS 各五分鐘洗三次，以細胞凋亡偵測系統(Promega, USA)檢測之。其步驟為先以平衡緩衝液在室溫下處理 5 分鐘，再混合平衡緩衝液，fluorescein-12-dUTP 與核甘酸混合液及 TdT 酵素一起於 37°C 下反應一小時，然後以 2 倍 SSC 洗去非特異性結合，再將此檢體以 PBS 各五分鐘洗三次，加 DAPI(4,6-diamino-2-phenylindole) 負染去氧核糖核酸，在螢光顯微鏡(Nikon)下呈綠色之細胞，即有去氧核糖核酸片段化之現象，因為雙股去氧核糖核酸中，如有單股缺陷即會被 TdT 酵素接上有綠色螢光之 dUTP，計數有去氧核糖核酸片段化之胚胎細胞比例。

8、統計方法

本研究在胚胎發育率之統計以卡方檢定(chi-test)為統計方法，在胚胎直徑測量後得到的數值以平均值±標準偏差(mean±SD, standar deviation)表示，並以 Student's *t*-test 為統計方法，用 photoshop 軟體 對免疫螢光染色的結果進行表現量的比較。p 值小於 0.05 時定義為有顯著差異。

五、 結果與討論 (含結論與建議)

本實驗收集 B6CBF1 小鼠胚胎觀察正常情況及各種不同濃度抑制劑於胚胎培養液中，觀察胚胎生長發育結果，以可以維持控制組 50% 囊胚率為後續實驗最適合的濃度，PD168393 為 2uM、LY294002 為 20uM、U0126 為 2uM、PD98059 為 100M、AG490 及 JAK-I-II 皆 0.1uM。在胚胎培養液中添加各種抑制劑及補充血癌抑制因子及表皮生長因子後，觀察小鼠胚胎於體外培養至第五天形成囊胚的直徑改變的情形，發現添加 50ug 血癌抑制因子或表皮生長因子後皆稍微增加囊胚的直徑，發現注射 LIF-SiRNA 後成長至囊胚體積變小，添加 50ug 血癌抑制因子或表皮生長因子後皆增加囊胚的直徑，但無統計意義。(圖一)。本研究對於部分胚胎進行去氧核糖核酸片段測試胚胎細胞凋亡反應不明顯，而添加 LY294002，導致 Akt 路徑被抑制的胚胎，大部份的胚胎細胞如果已經呈現黑色萎縮狀態，經去氧核糖核酸片段測試皆呈現陽性之反應，跟據先前 Straszewski 等學者(2012)的研究證實 Akt 會傳遞訊息至 Fas cascade 導致細胞凋亡，本研究的研究發現這條路徑亦存在著床前期的胚胎(圖二)。

針對於添加各個不同抑制劑的培養液下生長至囊胚的胚胎，分別染的原預定要測定的訊息傳遞路徑的抗體，包括 EGF receptor、LIF receptor、MEK1(phosphor-Ser221)、MEK1(A221)、STAT3(phosphor-Ser727)、STAT3(Ab727)、Akt(phosphor-Thr308)及 Akt(Ab308)等。由圖三可以看出正常發育的胚胎次三種訊息傳遞路徑皆存在，我們以 photoshop 影像軟體進行螢光量改變的定量(圖四)，發現當加入 AKT pathway 中抑制 PI3K 的抑制劑在 LY294002，再補充血癌抑制因子時，血癌抑制因子對磷酸化的改變影響不明顯，但是對 PD98059 抑制的 EGF receptor 下游路徑的 MEK1 的磷酸化回復的強度約可增加百分之二十；而對 U0126 所抑制的 MEK 蛋白，LIF 也有類似增加磷酸化的效果。此外血癌抑制因子對 STAT3 的抑制劑 AG490 的磷酸化作用回復亦有幫助。因此原假設推測 EGF 與 LIF 可能共同引起的三條訊息傳遞路徑在小鼠胚胎的觀察可以初步推測僅存在 STAT3 路徑及路徑為 Ras/Raf/MEK/MAPK 兩條路徑。原本實驗設計中預採用的西方墨點法，我們亦已採用不同數量的正常培養的胚胎進行分析測試，我們發現如果使用冷光呈色，每組至少要使用 15 至 100

個胚胎進行分析，才能偵測到可以觀察的訊號(圖五)，而如此龐大數量的胚胎若接著進行LIF SiRN 進行胚胎發育的抑制再觀察三種路徑的分析，需要數倍以上的總小鼠胚胎數，較不符合經濟效益，亦不符合動物實驗的3R原則，故再未有更理想的分析方法之前先採用細胞免疫染色之結果做分析的參考。

我們進一步對STAT3路徑有抑制效果的抑制劑PD168393及JAK-I-II，B6CBF1小鼠胚胎正常情況下添加此二種抑制劑於胚胎培養液中，觀察胚胎生長發育結果，可以維持控制組50%囊胚率為後續實驗最適合的濃度，抑制劑PD168393及JAK-I-II，影響胚胎生長的濃度分別為2uM及0.1uM，並同時觀察根據先前之研究成果使用血癌抑制因子雙股干擾性RNA抑制血癌抑制因子表現，以顯微注射之方式將SiRNA送入雙原核期之胚胎中，觀察胚胎生長發育之情形。表一及表二為胚胎受血癌抑制因子缺時添加抑制劑再補充LIF或EGF，胚胎發育之影響。注射血癌抑制因子干擾RNA並添加PD168393導致EGF receptor受抑制時，LIF無法改善此抑制情形，囊胚率由18.7%變更為15.0%，而補充EGF對注射血癌抑制因子干擾RNA並添加PD168393導致EGF receptor受抑制的改變影響不明顯，囊胚率由18.7%變更為23.5%。注射血癌抑制因子干擾RNA並添加STAT3上游的磷酸化蛋白(phosphor-Ser727)質抑制劑(JAK-I-II)，導致STAT3路徑受抑制時，LIF及EGF皆可以改善此抑制情形，囊胚率分別由4.5%增加為10.5%及22%。而STAT3磷酸化蛋白質皆仍存在，LIF及EGF皆有類似增加磷酸化的效果。

我們分別統計LIF被抑制後添加EGF receptor inhibitor (PD168393), MEK inhibitor (168393), JAK inhibitor (JAK-I-II) 及PI3-kinase inhibitor, LY294002,再補充LIF及EGF蛋白觀察胚胎發育的情形(Table 3~ Table 6)。原假設推測EGF與LIF可能共同引起的三條訊息傳遞路徑應僅存在STAT3路徑及部分Ras/Raf/ MEK/ MAPK路徑，唯有當JAK inhibitor (JAK-I-II)路徑受阻時，胚胎即使添加LIF或EGF亦無法恢復胚胎發育。因此我們認為EGF與LIF應共用STAT3路徑。而Ras/Raf/ MEK/ MAPK路徑，部份對胚胎發育的影響是否有幫助。

根據其他學者的研究其他種類的細胞，如astrocyte progenitors, lung carcinomas, ovarian cancer cell lines等 (Burrows et al., 1997; Mehler et al., 2000; Molne et al., 2000; Gao et al, 2007; Colomiere et al.,2008)皆存在LIF與EGF共同經由STAT3 路徑進行訊息傳導，而本研究是首度證實著床前期的小鼠胚胎存在LIF與EGF共同經由STAT3 路徑。經由本研究應可確認血癌抑制因子在胚胎中的訊息傳遞與表皮生長因子間的關聯性，據以提供血癌抑制因子及表皮生長因子相互間對胚胎發育的機轉，以更深入增加我們了解血癌抑制因子對胚胎發育時的影響的機制及相關基因的表現情形，確認胚胎於體內發育可能的生理機制，據以提供胚胎體外培養環境的改善，而此種資訊亦將有助提高臨床醫師在不孕症治療方面的治癒率。

六、 參考文獻

- Andersen P, Pedersen MW, Woetmann A, Villingshøj M, Stockhausen MT, Odum N, Poulsen HS. EGFR induces expression of IRF-1 via STAT1 and STAT3 activation leading to growth arrest of human cancer cells. *Int J Cancer*. 2008 Jan 15;122(2):342-9.
- Boulay, J.L. and Paul, W.E. The interleukin-4 family of lymphokines. *Curr. Opin. Immunol*. 4:294-298, 1992.

- Bridsal, M.A., Hopkisson, J.F., Grant, K.E., Barlow, D.H. and Mardon, H.J. Expression of heparin-binding epidermal growth factor messenger RNA in the human endometrium. *Mol. Hum. Reprod.* 2:31-34, 1996.
- Boomsma RA, Mavrogianis PA, Verhage HG. Immunocytochemical localization of transforming growth factor alpha, epidermal growth factor and epidermal growth factor receptor in the cat endometrium and placenta. *Histochem J*, 1997;29(6):495-504
- Cheng TC, Huang CC, Chen CI, Liu CH, Hsieh YS, Huang CY, Lee MS, and Liu JY. Leukemia Inhibitory Factor Antisense Oligonucleotide Inhibits the Development of Murine Embryos at Pre-Implantation Stages. *Biology of Reproduction.* 70: 1270-1276, 2004.
- Dunlison GF, Barlow DH, Sargent IL. (1996) Leukaemia inhibitory factor significantly enhances the blastocysts formation rates of human embryos cultured in serum-free medium. *Hum. Reprod* 11, 191-6
- Gearing, D.P., Gough, N.M., King, J.A., Hilton, D.J., Nicola, N.A., Simpson, R.J., Nice, E.C., Kelso, A. and Metcalf, D. Molecular cloning and expression of cDNA encoding a murine myeloid leukemia inhibitory factor (LIF). *EMBO J.* 6:3995-4002, 1987.
- Gharib HN, Chenen, Guillomot Metal. Localization and characterization of EGF/TGF-alpha receptors on peri-implantation trophoblast in sheep. *J Reprod Fertil*, 1993;98(2):385-392
- Hardy, K. and Spanos, S. Growth factor expression and function in the human and mouse preimplantation embryo. *J. Endocrinol.* 172: 221-236, 2002.
- Heinrich, P.C., Behrmann, I., Muller-Newen, G., Schaper, F. and Graeve, L. Interleukin-6-type cytokine signalling through the gp130/Jak/STAT pathway. *Biochem. J.* 334:297-314. 1998.
- Hofmann GE, Andersont L. Immunohistochemical localization of epidermal growth factor receptor during implantation in the rabbit. *Am J Obstet Gynecol*, 1990;161:837-841
- Johnson DC, Chatterjees. Epidermal growth factor (EGF) replaces estradiol for the initiation of embryo implantation in the hypophysectomized rat. *Placenta*, 1993;14(4):429-438
- Juriscova A, Ben-Chetrit A, Varmuza SL, Casper RF. (1995) Recombinant human leukemia inhibitory factor does not enhance in vitro human blastocyst formation. *Fertil Steril* 64: 999-1002
- Kang MK, Kang SK Interleukin-6 induces proliferation in adult spinal cord-derived neural progenitors via the JAK2/STAT3 pathway with EGF-induced MAPK phosphorylation. *Cell Prolif.* 2008 Jun;41(3):377-92.
- Lighten, A.D., Hardy, K., Winston, R.M. and Moore, G.E. Expression of mRNA for the insulin-like growth factors and their receptors in human preimplantation embryos. *Mol. Reprod. Dev.* 47: 134-139, 1997.
- Martin, K.L., Barlow, D.H. and Sargent, I.L. Heparin-binding epidermal growth factor significantly improves human blastocyst development and hatching in serum-free medium. *Hum. Reprod.* 13:1645-1652, 1998.
- Nagy, A., Gertsenstein, M., Vintersten, K. and Behringer, R. *Manipulating the Mouse Embryo: A Laboratory Manual*, 3rd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2003c, pp. 251-260.

- Pang RW, Poon RT. From molecular biology to targeted therapies for hepatocellular carcinoma: the future is now. *Oncology*. 2007;72 Suppl 1:30-44.
- Schultz R.M. (1993) Regulation of zygotic gene activation in the mouse. *Bio. Essay* ; 8 : 531-538
- Spanos, S., Becker, D.L., Winston, R.M. and Hardy, K. Anti-apoptotic action of insulin-like growth factor-I during human preimplantation embryo development. *Biol. Reprod.* 63: 1413-1420, 2000.
- Sjoblom, C., Wikland, M. and Robertson, S.A. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor promotes human blastocyst development in vitro. *Hum. Reprod.* 14:3069-3076, 1999.
- Stahl, N., Farruggella, T.J., Boulton, T.G., Zhong, Z., Darnell, J.E. Jr. and Yancopoulos, G.D. Choice of STATs and other substrates specified by modular tyrosine-based motifs in cytokine receptors. *Science* 267:1349-1353. 1995
- Stewart C.L. et al (1992) Blastocyst implantation depends on maternal expression of leukemia inhibitory factor. *Nature*; 359:76-78.
- Straszewski-Chavez SL, Abrahams VM, Aldo PB, Romero R, Mor G. AKT controls human first trimester trophoblast cell sensitivity to FAS-mediated apoptosis by regulating XIAP expression. *Biol Reprod.* 82:146-52, 2010.
- Taga, T. and Kishimoto, T. Cytokine receptors and signal transduction. *FASEB J.* 6: 3387-3396, 1992.
- Tsai, H.D., Chang, C.C., Hsieh, Y.Y., Hsu, L.W., Chang, S.C. and Lo, H.Y. Effect of different concentrations of recombinant leukemia inhibitory factor on different development stage of mouse embryo in vitro. *J. Assist. Reprod. Genet.* 17:352-355, 2000.

七、附表及附圖

Table 1. Compared the embryo development rate after EGF supplement on mouse embryos treated with anti-LIF (2 fmol) and/or inhibitors.

Stage	Control		anti-LIF (2 fmol)			+LIF protein 50ug		
	Untreat (n=46)	solution (n=40)	- (n=45)	PD168393 (n=32)	JAK-I-II (n=44)	- (n=40)	PD168393 (n=33)	JAK-I-II (n=46)
Two-cell	89.1	75	71.1	62.5	50.0	92.5	72.3	63.0
Four-cell	82.6	70	66.6	62.5	38.6	87.5	39.4	47.8
Morula	78.3	70 ^c	62.2 ^a	43.7	15.9 ^a	82.5 ^{b,c}	36.4 ^b	23.9 ^c
Blastocyst	73.9	65	28.9 ^d	18.7	4.5 ^d	75.0 ^{e,f}	15.0 ^e	10.9 ^f

a-f, Chi-test P<0.05

Table 2. Compared the embryo development rate after EGF supplement on mouse embryos treated with anti-LIF and/or inhibitors.

Stage	Control		anti-LIF (2 fmol)			+EGF protein 50ug		
	solution (n=46)	NaCl (n=40)	- (n=45)	PD 168393 (n=32)	JAK -I-II (n=44)	- (n=38)	PD 168393 (n=33)	JAK-I-II (n=41)
Two-cell	89.1	75	71.1	62.5	50.0	97.4	76.5	73.2
Four-cell	82.6	70	66.6	62.5	38.6	94.7	47.1	51.2
Morula	78.3	70	62.2 ^a	43.7	15.9 ^a	92.1 ^{b,c}	47.1 ^b	34.1 ^c
Blastocyst	73.9	65	28.9 ^d	18.7	4.5 ^d	84.2 ^{e,f}	23.5 ^e	22.0 ^f

a-f, Chi-test P<0.05

Table 3. Compared the embryo development rate after EGF supplement on mouse embryos treated with anti-LIF and inhibitor PD168393.

Stage/number	Control		anti-LIF (2 fmol)					
	Un-treated (n=46)	(n=40) 75.0	Control			PD168393		
			Blank (n=45)	+ LIF (n=40)	+EGF (n=38)	Blank (n=32)	+ LIF (n=33)	+EGF (n=33)
Two-cell	89.1	70.0	71.1	92.5	97.4	62.5	72.3	73.2
Four-cell	82.6	77.5	66.6	87.5	94.7	62.5	39.4	47.1
Morula	78.3	65.0c	62.2 ^{a,b,d}	82.5a	92.1 ^b	43.7 ^e	36.4	47.1
Blasto-cyst	73.9	75.0b	28.9 ^{c,d,f}	75.0 ^{f,g}	84.2 ^h	18.7 ^e	15.0 ^g	23.5 ^h

a~h; Chi-test; p<0.05

Table 4. Compared the embryo development rate after EGF supplement on mouse embryos treated with anti-LIF and inhibitor PD98059.

Stage/number	Control		anti-LIF (2 fmol)					
	Un-treated (n=46)	NaCl (n=40)	Control			PD98059		
			Blank (n=45)	+ LIF (n=40)	+EGF (n=39)	Blank (n=32)	+ LIF (n=35)	+EGF (n=44)
Two-cell	89.1	85.0	71.1	92.5	92.3	62.5	85.7	79.5
Four-cell	82.6	80.0	66.6	87.5	94.7	62.5	54.3	72.7
Morula	78.3	77.5	62.2 ^a	80.0	89.7 ^a	43.7	42.9	56.8
Blastocyst	73.9	75.0 ^b	28.9 ^{b,c,d}	67.5 ^{c,e}	76.9 ^{d,f}	18.7 ^g	34.3 ^e	54.4 ^{f,g}

a~g; Chi-test; p<0.05

Table 5. Compared the embryo development rate after EGF supplement on mouse embryos treated with anti-LIF and inhibitor JAK I -II.

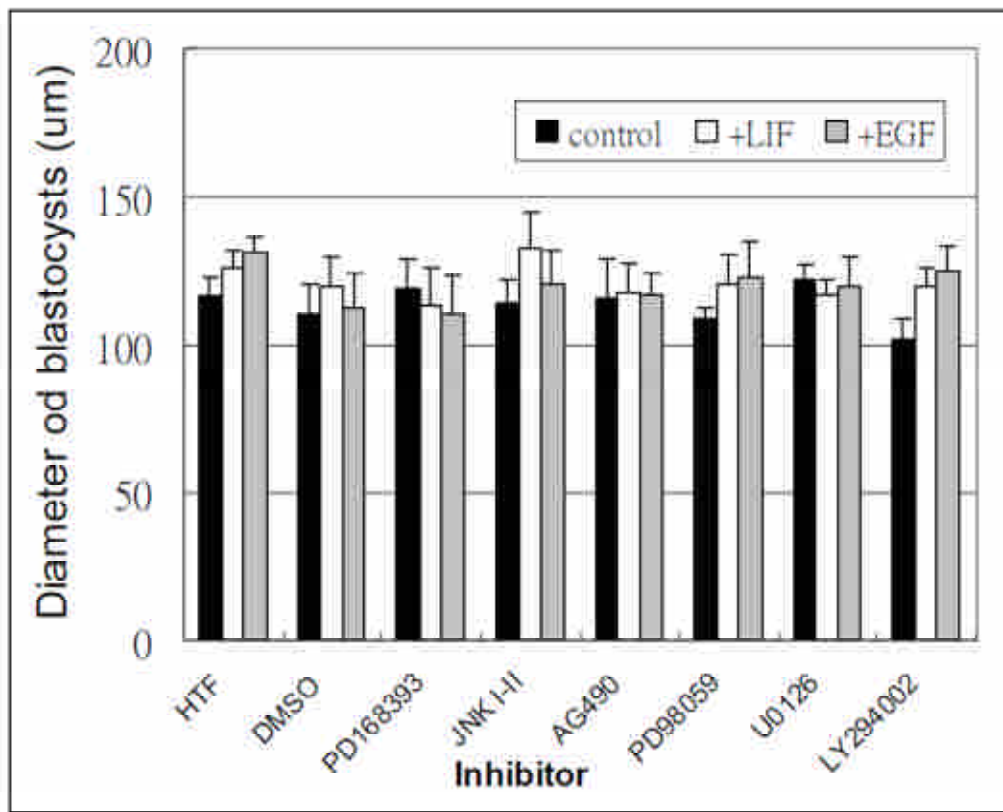
Stage/number	Control		anti-LIF (2 fmol)					
	Un-treat d	NaCl	Control			JAK-I-II		
			Blank	+ LIF	+EGF	Blank	+ LIF	+EGF
	(n=40)	(n=40)	(n=40)	(n=40)	(n=38)	(n=44)	(n=44)	(n=41)
Two-cell	92.5	82.2	90.5	92.5	97.4	50.0	63.9	73.2
Four-cell	90.0	80.0	87.5	87.5	94.7	38.6	47.8	51.2
Morula	87.5	77.8	60.0 ^{a,b,c}	82.5 ^{a,d}	92.1 ^{b,e}	15.9 ^c	23.9 ^d	34.1 ^e
Blastocyst	87.5	75.6 ^f	27.5 ^{f,g,h,i}	75.0 ^g	84.2 ^{h,j}	4.5 ^{i,k,l}	10.9 ^j	22.0 ^{k,l}

a~h; Chi-test; p<0.05

Table 6. Compared the embryo development rate after EGF supplement on mouse embryos treated with anti-LIF and inhibitor LY294002.

Stage/number	Control		anti-LIF (2 fmol)					
	Un-treated (n=46)	NaCl (n=40)	Control			LY294002		
			Blank (n=45)	+ LIF (n=40)	+EGF (n=39)	Blank (n=39)	+ LIF (n=35)	+EGF (n=44)
Two-cell	89.1	85.0	71.1	92.5	92.3	51.3	85.0	89.7
Four-cell	82.6	80.0	66.6	87.5	94.7	48.7	67.5	74.3
Morula	78.3	77.5	62.2 ^a	80.0	89.7 ^a	46.2	55.0	61.6
Blastocyst	73.9	75.0 ^b	28.9 ^{b,c,d}	67.5 ^c	76.9 ^{d,e}	43.9	47.5	51.3 ^e

a~e; Chi-test; p<0.05



圖一、在胚胎培養液中添加各種抑制劑及補充血癌抑制因子及表皮生長因子後，觀察小鼠胚胎魚體外培養至第五天形成囊胚的直徑改變的情形，黑色的柱狀代表沒有補充生長因子的情況，添加血癌抑制因子及表皮生長因子之長條圖分別以白色及灰色表示。


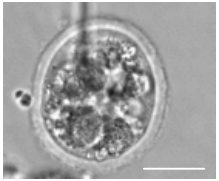
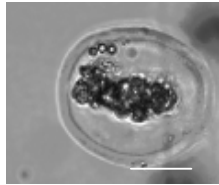

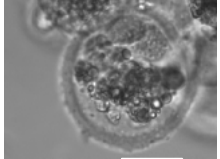
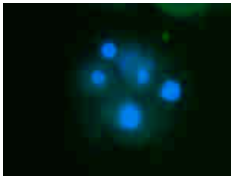


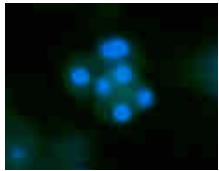
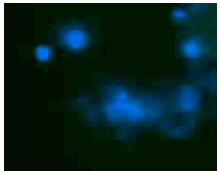
	Blank	+PD168393	+LY294002	+PD98059	+JAK-I-II
morphology					
Tunel assay					

Figure 2. Results of Tunel assay after treated by different inhibitors on preimplantation mouse embryo.

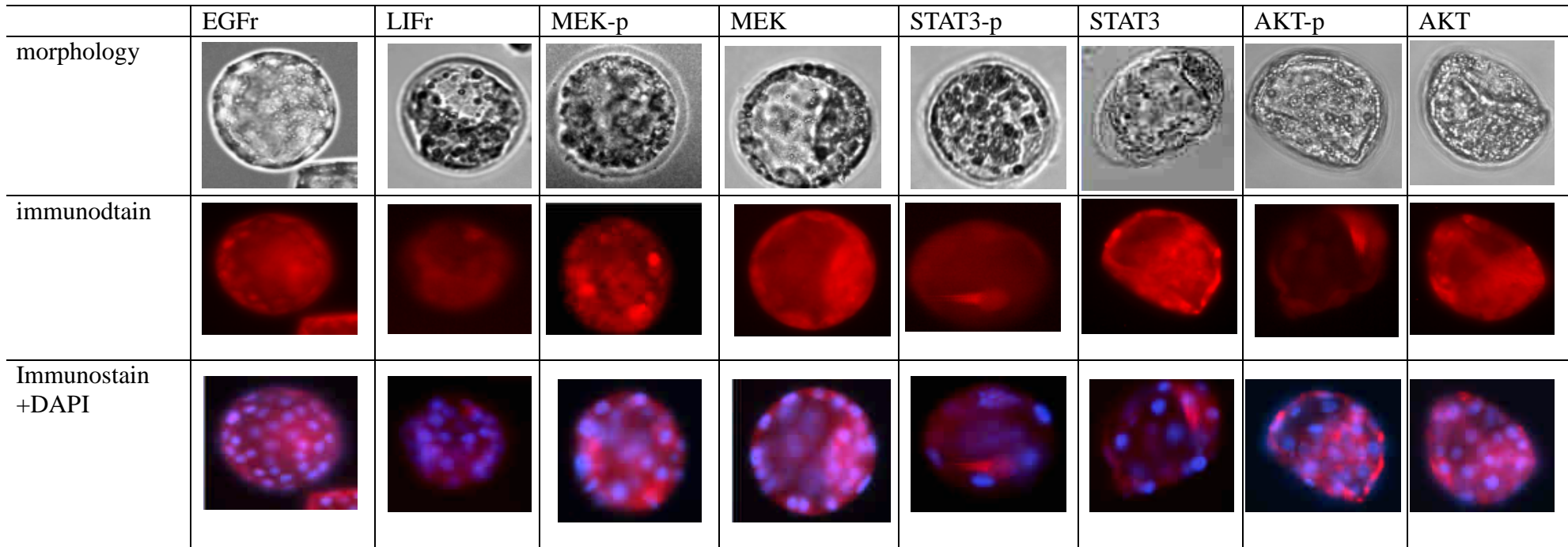


Figure 3. Immunostain of blastocyst using antibodies of EGF receptor, LIF receptor, MEK1(phosphor-Ser221), MEK1(Ab221), STAT3 (phosphor-Ser727), STAT3 (Ab727), Akt(phosphor-Thr308), Akt(Ab308)

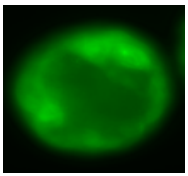
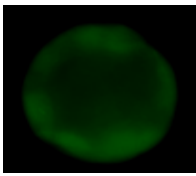
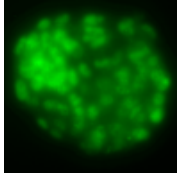
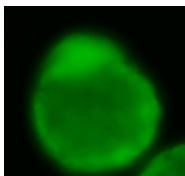
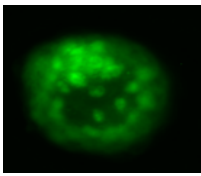
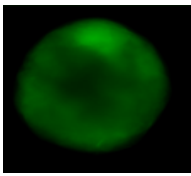
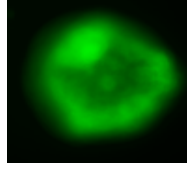
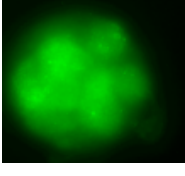
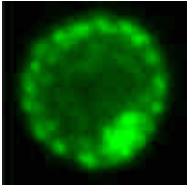
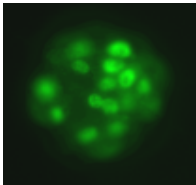
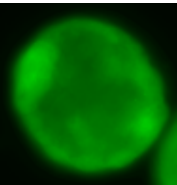
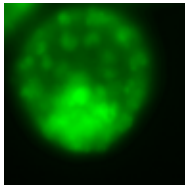
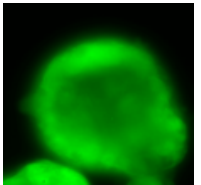
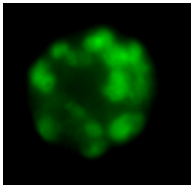
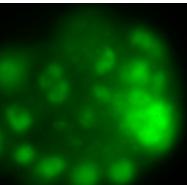
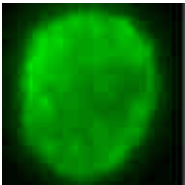
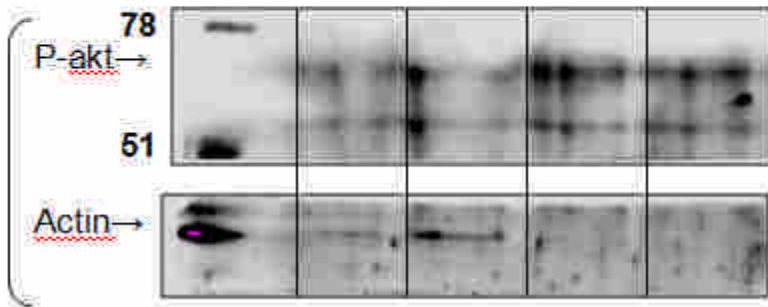
	Control		LIF antisense (2 fmol)					
	Control	PD98059	Control			PD98059		
			Blank	+LIF	+EGF	Blank	+LIF	+EGF
MEK-P								
MEK								

Figure 4. Immunostain of blastocyst using antibodies of MEK1(phosphor-Ser221), MEK1(A221)

Stage	2PN	2 cell	Morula	Blast
Embryo number	X60	X140	X60	X14



圖五、為控制組之鼠胚進行western blotting的結果分析，雙原核期、2細胞期、桑葚胚期及囊胚期各組胚胎所使用的數目分別為60、140、60及14個。

國科會補助計畫衍生研發成果推廣資料表

日期:2012/10/31

國科會補助計畫	計畫名稱: 血癌抑制因子及表皮生長因子訊息傳遞對著床前期小鼠胚胎發育之研究
	計畫主持人: 李茂盛
	計畫編號: 98-2314-B-040-010-MY3 學門領域: 婦產科
無研發成果推廣資料	

98 年度專題研究計畫研究成果彙整表

計畫主持人：李茂盛		計畫編號：98-2314-B-040-010-MY3				計畫名稱：血癌抑制因子及表皮生長因子訊息傳遞對著床前期小鼠胚胎發育之研究	
成果項目		量化			單位	備註（質化說明：如數個計畫共同成果、成果列為該期刊之封面故事...等）	
		實際已達成數（被接受或已發表）	預期總達成數（含實際已達成數）	本計畫實際貢獻百分比			
國內	論文著作	期刊論文	0	1	100%	篇	於100年度生殖醫學年會學術研討會發表成果並獲得 basic science 的 prize paper
		研究報告/技術報告	0	0	100%		
		研討會論文	0	1	100%		
		專書	0	0	100%		
	專利	申請中件數	0	0	100%	件	
		已獲得件數	0	0	100%		
	技術移轉	件數	0	0	100%	件	
		權利金	0	0	100%	千元	
	參與計畫人力（本國籍）	碩士生	0	0	100%	人次	
		博士生	0	0	100%		
博士後研究員		0	0	100%			
專任助理		0	0	100%			
國外	論文著作	期刊論文	0	0	100%	篇	
		研究報告/技術報告	0	0	100%		
		研討會論文	0	0	100%		
		專書	0	0	100%	章/本	
	專利	申請中件數	0	0	100%	件	
		已獲得件數	0	0	100%		
	技術移轉	件數	0	0	100%	件	
		權利金	0	0	100%	千元	
	參與計畫人力（外國籍）	碩士生	0	0	100%	人次	
		博士生	0	0	100%		
博士後研究員		0	0	100%			
專任助理		0	1	100%			

<p>其他成果 (無法以量化表達之成果如辦理學術活動、獲得獎項、重要國際合作、研究成果國際影響力及其他協助產業技術發展之具體效益事項等，請以文字敘述填列。)</p>	<p>於 100 年度生殖醫學年會學術研討會發表成果並獲得 basic science 的 prize paper</p>
--	---

	成果項目	量化	名稱或內容性質簡述
科 教 處 計 畫 加 填 項 目	測驗工具(含質性與量性)	0	
	課程/模組	0	
	電腦及網路系統或工具	0	
	教材	0	
	舉辦之活動/競賽	0	
	研討會/工作坊	0	
	電子報、網站	0	
	計畫成果推廣之參與(閱聽)人數	0	

國科會補助專題研究計畫成果報告自評表

請就研究內容與原計畫相符程度、達成預期目標情況、研究成果之學術或應用價值（簡要敘述成果所代表之意義、價值、影響或進一步發展之可能性）、是否適合在學術期刊發表或申請專利、主要發現或其他有關價值等，作一綜合評估。

1. 請就研究內容與原計畫相符程度、達成預期目標情況作一綜合評估

達成目標

未達成目標（請說明，以 100 字為限）

實驗失敗

因故實驗中斷

其他原因

說明：

2. 研究成果在學術期刊發表或申請專利等情形：

論文： 已發表 未發表之文稿 撰寫中 無

專利： 已獲得 申請中 無

技轉： 已技轉 洽談中 無

其他：（以 100 字為限）

於 100 年度生殖醫學年會學術研討會發表成果並獲得 basic science 的 prize paper

3. 請依學術成就、技術創新、社會影響等方面，評估研究成果之學術或應用價值（簡要敘述成果所代表之意義、價值、影響或進一步發展之可能性）（以 500 字為限）

在少子化危機逐年增強，生育年齡逐年提高，生殖醫學對社會的貢獻顯得更加重要。不孕症患者進入試管嬰兒療程時，胚胎會根據體外發育的需求，適當調節基因的表現，其中血癌抑制因子是影響胚胎發育及著床的重要因子，根據我們的先前的研究發現，血癌抑制因子及表皮生長因子應存在著某種關聯，本計劃確定正常發育之胚胎，可能透過 STAT3 及 MEK 兩條路徑，我們再進一步透過 STAT3 路徑之訊息傳遞物質之抑制劑這些路徑對對胚胎發育的影響，確定這兩種因子可以共享 STAT3 訊息傳導路徑，以協助小鼠胚胎發育。本研究是第一篇以小鼠胚胎檢體確定 LIF 缺陷的胚胎發育過程中，EGF 可透過 STAT3 訊息傳導路徑，以補足 LIF 的缺乏，改善胚胎發育。我們經由本研究應可確認血癌抑制因子在胚胎中的訊息傳遞與表皮生長因子間的關聯性，據以提供血癌抑制因子及表皮生長因子相互間對胚胎發育的機轉，以更深入增加我們了解血癌抑制因子對胚胎發育時的影響的機制及相關基因的表現情形，確認胚胎於體內發育可能的生理機制，據以提供胚胎體外培養環境的改善，而此種資訊亦將有助提高臨床醫師在不孕症治療方面的治癒率，是很有價值的研究，本研究亦已獲得 101 年度台灣生殖醫學會口頭報告論文獎的殊榮，論文即將投稿國際期刊。