

# 行政院國家科學委員會專題研究計畫 成果報告

## 血癌抑制因子對胚胎發育機轉之研究 研究成果報告(精簡版)

計畫類別：個別型  
計畫編號：NSC 96-2314-B-040-039-  
執行期間：96年08月01日至97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：碩士級-專任助理人員：黃梨香

處理方式：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 97年10月31日

血癌抑制因子對胚胎發育機轉之研究

**The effect of gene expression on development in mouse embryo on  
morula stage of leukemia inhibitory factor (LIF)-deficiency**

計畫類別：  個別型計畫  整合型計畫

計畫編號： NSC 96-2314-B-040 -039 -

執行期間： 96 年 8 月 1 日至 97 年 7 月 31 日

計畫主持人：李茂盛

共同主持人：

計畫參與人員：黃梨香

成果報告類型(依經費核定清單規定繳交)： 精簡報告  完整報告

本成果報告包括以下應繳交之附件：

- 赴國外出差或研習心得報告一份
- 赴大陸地區出差或研習心得報告一份
- 出席國際學術會議心得報告及發表之論文各一份
- 國際合作研究計畫國外研究報告書一份

處理方式：除產學合作研究計畫、提升產業技術及人才培育研究計畫、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

執行單位：中山醫學大學 醫學研究所

中 華 民 國 97 年 10 月 30 日

## 中文摘要

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，血癌抑制因子對胚胎的發育及著床皆扮演相當重要的角色，探討血癌抑制因子對胚胎發育的影響是十分具有醫學研究價值的主題。根據先前的研究，我們知道血癌抑制因子確實會影響體外胚胎的發育，且由晶片分析的結果亦發現有數個基因會受血癌抑制因子缺乏的影響。而進一步探討血癌抑制因子對胚胎發育調控的機轉則為本研究的目的。本計劃首先設計血癌抑制因子的干擾型核醣核酸來抑制血癌抑制因子，並進一步觀察血癌抑制因子對胚胎發育的影響，而在回復血癌抑制因子抑制效果時，添加生殖道中常見之生長因子(LIF, IGF-II, EGF, GM-CSF, TGF $\alpha$ )，觀察體外系統血癌抑制因子被抑制時胚胎發育的情形。我們分析胚胎的型態、大小及細胞數目已比較加入這些生長因子的效果。我們在此計畫中成功建立了以干擾性核醣核酸抑制血癌抑制因子的模式，此模式可以抑制囊胚生成率由 82.2% 降至 45%。我們發現上皮生長因子可以有意義的提升被干擾性核醣核酸抑制血癌抑制因子後的囊胚生成率，然而上皮生長因子與血癌抑制因子之間交互作用的機轉則需進一步的研究。本研究之資訊將有助於改善胚胎培養的環境以提高臨床醫師在不孕症治療方面的治癒率。

關鍵詞: 血癌抑制因子、干擾型核醣核酸、生長因子、表皮生長因子

## 英文摘要

Embryo development was regulated by gene expression in infertility couples treated with in vitro fertilization. Leukemia inhibitory factor (LIF) is an essential factor for implantation and establishment of pregnancy. It is valuable medical topic of search on the mechanisms of LIF for embryo development. 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. The aim of this study is search on the mechanism of gene expression regulated from LIF at preimplantation stage mouse embryos. We design our project for three parts in this study. We treated mouse embryos with LIF-SiRNA to observe the effects on embryo development after knock down function of LIF in preimplantation mouse embryos. Supply kinds of growth factors to culture medium for LIF-deficiency mouse embryos. In this study, these factors secreted from reproductive tract including LIF, IGF-II, EGF, TGF $\alpha$  and GM-CSF. We analysis the embryo development, embryo size, and blastomeres to evaluate the effect of growth factors. We have set the model to inhibit the LIF protein expression by LIF-SiRNA and the blastocyst decreased from 82.2% to 45%. We find that the EGF will increase the balstocyst rate after LIF-Si RNA treated. The interaction of LIF and EGF need further more researche. Our results may supply advantage information for improvement of embryo culture and IVF treatment on reproductive medicine.

**Key Word:** Leukemia inhibitory factor (LIF), small interfering RNA, (SiRNA), growth factor, epidermal growth factor (EGF)

## 報告內容

### 一. 前言

生物體為了因應生存環境地時刻變遷，必需要有一套完整且精緻的平衡機制，才能應付隨時可能發生的變化與挑戰，而許多生長因子及細胞激素則是扮演調節我們體內代謝的一大功臣。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，探討血癌抑制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

### 二. 研究目的

根據先前的研究，我們知道血癌抑制因子確實會影響體外胚胎的發育，而血癌抑制因子對胚胎發育調控的機轉如何則為本研究的目的。由於越來越多的證據顯示以干擾型 RNA (siRNA) 對基因抑制的專一性及效果優於反意寡核苷酸，因此我們以干擾型 RNA 更換之前所採用抑制血癌抑制因子反意寡核苷酸。觀察血癌抑制因子對胚胎發育的影響，而在回復血癌抑制因子抑制效果時，添加生殖道中常見之生長因子觀察體外系統血癌抑制因子被抑制時胚胎發育的情形。

### 三. 文獻探討

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; 上皮生長因子)、轉型生長因子(transforming growth factor-a ; TGF-a) 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)，具有 6 個潛在的天門冬醯胺糖化位置 (N-glycosylation sites)，3 個雙硫鍵，3 個 exon，主要型態的 mRNA 的長度為 4kb，次要型態為 1.8kb。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)。

血癌抑制因子訊息傳遞的路徑是透過與受體 gp130 結合後使得原本與 gp130 結合的 Jak 激酶 (Janus Kinase)被磷酸化，已經磷酸化的 Jak 接著刺激溶於細胞質 gp130 尾端的酪氨酸(tyrosine)磷酸化，磷酸化的 gp130 再使細胞質中的轉錄作用的訊息傳遞子及活化子(Signal transducer and activator of transcription, STAT)的 SH2 domain 磷酸化，STAT 接著形成雙體進入細胞核調節下游的基因 (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。

血癌抑制因子是一種多功能的細胞動力素，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上皮中皆會分泌血癌抑制因子(Shen and Leder, 1992; Yang et al., 1994; Cullinan et al., 1996; Voggiagis 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(Dunghlison 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(Mitchell et al., 1994; Marquant-Le et al., 1994; Dunghlison et al., 1996; Hsieh et al., 2000; Tsai et al., 2000)。

然而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)，胚胎發育受損的情形有可能是因為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會促進囊胚的形成(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，肝制凝素結合上皮生長因子(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; Zhao et al., 1999)並且也可以促進著床前期的胚胎發育(Martin et al., 1998; Sjoblom et al., 1999)。

本人先前的研究發現部分基因在血癌抑制因子受抑制時，表現量會改變，本研究期望可以進一步釐清生殖道中其他生長因子與血癌抑制因子之間之關連性。

#### 四. 研究方法

##### 1、小鼠胚胎之收集及培養(Nagy et al., 2003)

研究所使用的動物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。收集小鼠胚胎之前須配製人類輸卵管液培養基(Quinn 1995)，此培養基的成分為：NaCl 101.6 mM, KCl 4.69 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.37 mM, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.2 mM, Na Lactate 60 % syrup 21.4 mM, Na pyruvate 0.33 mM, Glucose 2.78 mM, NaHCO<sub>3</sub> 2.78 mM, CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O 2.04 mM, penicillin-G streptomycin 2000 IU/l, phenol red 1% ，取胚前一天，將人類輸卵管液培養基以 20μl 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°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，即一手置於母鼠之頸部處固定，另一手抓住尾巴往後拉，使頸椎脫臼。接著解剖母鼠取出其輸卵管，先用酒精噴灑於母鼠之腹部，以外科剪刀在腹部剪一小洞，用手將其皮膚向外拉扯，直至露出腹部肌膜，剪開腹膜，將生殖道拉出剪下輸卵管，放入人類輸卵管液培養基液滴中，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(cumulus cells)。等卵丘細胞開始脫落擴散時，即可以玻璃毛細管吸吐受精卵數次，以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，每天觀察、記錄胚胎生長

狀況。

## 2、建立血癌抑制因子干擾性 RNA 對胚胎發育之影響模式

以 retro virus 為載體設計三組抑制不同位置的血癌抑制因子干擾性 RNA，其作用位置(劃線處)及序列分別為:

(1).The mir-30 sequence in the hairpin(1750..1768)

TGCTGTTGACAGTGAGCGCGCCAGACAGACAGGTAGCATAATAGTGAAGCCA  
CAGATGTATTATGCTACCTGTCTGTCTGCTTGCCTACTGCCTCGGA

(2). The mir-30 loop construct sequence in the hairpin(4360..4378)

TGCTGTTGACAGTGAGCGCGGGAGTTTCAGGGATTTGGAA  
ATAGTGAAGCCACAGATGTATTTCCAAATCCCTGAAACTCCATGCCTACTGCCTCGGA

(3)Stem:19 bases(sense/antisen) (3798..3816)

TGCTGTTGACAGTGAGCGAGGTGACAAATTCCTCTTTGA  
TTAGTGAAGCCACAGATGTAATCAAGAGGAATTTGTACCCCTGCCTACTGCCTCGGA

此外以空的載體為控制組，接下來構築 siRNA 載體，首先各取 1 µl 的 sense 和 antisense oligonucleotide(400 uM)、1 µl 的 T4 PNK kinase、1 µl 的 10×kinase 緩衝液和 1 µl 的 ATP (100 mM) 混合並且放入 PCR 機器進行 37°C 作用 30 分鐘和 65°C 作用 15 分鐘後就會形成雙股核甘酸。接下來將完成的雙股核甘酸與載體進行接合作用和轉型作用，並且篩選正確的 siRNA-LIF 的菌落，在培養較大量之菌液純化載體後以磁式轉殖法及顯微注射之方式將載體送入雙原核合期之胚胎中，觀察胚胎生長發育之情形。此外亦直接合成雙股 SiRNA 三組，分別為

AAGCUAUGUGCGCCUAACA(238-), GCUCAAUGCUACUAUAGUC(408-),  
CCAGAUCAAGAAUCAACUG(138-)亦稀釋成不同之濃度注射入鼠胚。

## 3、顯微注射法

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或干擾性核糖核酸的顯微注射管，經油壓調整後注入鼠胚中，注入的體積約 2pl。注射後將各組放回二氧化碳培養箱培養，並每日定時觀察。

## 4、細胞免疫染色

為確定注入血癌抑制因子反意寡核甘酸的抑制基因血癌抑制因子表現的效果，我們將注入不 2.0 fmole 濃度血癌抑制因子反意寡核甘酸及干擾性核糖核酸後，各個發育期的鼠胚以血癌抑制因子細胞免疫染色的方法確認血癌抑制因子是否有表現。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(goat anti-rabbit IgG)作用 1 小時，以 TBST 溶液清洗 5 遍，每遍 2 分鐘，以 Avidin-

biotinylated horseradish peroxidase 處理 45 分鐘，再以 TBST 溶液清洗 5 次，每次 5 分鐘，然後以 DAB 溶液(0.05% DBA, 3% 雙氧水溶於 0.05M, pH 7.4 的 Tris 中)處理 20 分鐘，再以 0.05M, pH 7.4 的 Tris 緩衝液洗滌兩次，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

為了評估不同型態的囊胚實際的大小，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後接著進行核差別染色。

#### 6、囊胚期胚胎之核差別染色(differential stain)

為了進一步評估我們對胚胎分級後，每一組囊胚的細胞總數目、內細胞團細胞數目及滋養外胚層細胞數目我們採用胚胎免疫手術(immunosurgery)之原理對囊胚進行核的染色(Piekos et al.,1995)，以 96 孔培養皿操作，先以 pH 2.5 的 Acid Tyrods' 溶液將囊胚的透明帶去除，將胚胎培養於含有 10 mM trinitrobenzene- sulphonic acid, 4 mg/ml polyvinylpyrrolidone 及 0.015% 的 Triton X-100 的 M16 培養液中，置於冰上 10 分鐘後以 M2 培養液洗滌三次以上，接著將胚胎培養於含有 0.1 mg/ml anti-dinitrophenol (DNP)-bovine serum albumin 的 M2 培養液中，於 37°C 作用 15 分鐘後以 M2 培養液洗滌三次以上，將胚胎培養於以 M2 培養液十倍稀釋的天竺鼠血清補體(guinea pig complement serum)中，並添加 10 g/ml 的紅色螢光試劑 propidium iodide，於 37°C 作用 15 分鐘後以磷酸緩衝液洗滌三次以上，然後將胚胎置於含有 22 g/ml 的藍色螢光試劑 bisbenzimidazole 的絕對酒精中，存放於 4°C，經隔夜作用後，將胚胎固定在載玻片上，以甘油使脫水的胚胎漲大，再以蓋玻片覆蓋在胚胎上輕壓一下後，以螢光顯微鏡調整至 UV-2A 及 G-2A 兩種濾鏡觀察。滋養外胚層細胞會呈現紅色的螢光，而內細胞團會呈現藍色的螢光，分別記錄胚胎的細胞數目。

#### 7、添加相關之蛋白及生觀察胚胎發育情形

為了觀察添加血癌抑制因子蛋白及生殖道中常見之賀爾蒙及生長因子與血癌抑制因子間的影響情形，我們將血癌抑制因子 SiRNA 注入雙原核期的鼠胚後，跟據先前晶片結果及比對 Hardy and Spanos, (2002)報導過生殖道中較常見影響內泌和自泌之生長因子及細胞激素(包括: LIF, IGF-II, EGF, GM-CSF, TGF $\alpha$ ) 的培養液中，將各組鼠胚放回二氧化碳培養箱培養，並每日定時觀察，觀察胚胎是否有回復生長情形，據以推測當血癌抑制因子在活體內缺乏時生理系統的補救機制。

#### 8、統計方法

本研究在探討血癌抑制因子對胚胎發育影響的部分，胚胎發育率之統計以卡方檢定(chi-test)為統計方法，在胚胎直徑及核差別染色後得到的數值以平均值 $\pm$ 標準偏差(mean $\pm$ SD, standar deviation)表示，並以 Student's *t*-test 為統計方法，*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)

本研究共使用了六組血癌抑制因子干擾性核糖核酸(LIF-SiRNA)僅第三組之 LIF-SiRNA 對桑葚期及囊胚期小鼠的胚胎發育具有統計上的抑制效果，且發育至囊胚期的抑制效果比以反易寡核甘酸抑制的效果差(Table1)。這個結果有可能是 SiRNA 對血癌抑制因子抑制較具專一性且抑制位置不同所致。基本而言二者對血癌抑制因子影響胚胎發育的結果是有一致的趨勢，且以免疫染色法觀察注射 LIF-SiRNA 的後囊胚期胚胎及控制組的胚胎發現確實有血癌抑制因子表現量降低的效果(Figure 1B, C)，故再以成功建立的 LIF-SiRNA 抑制血癌抑制因子表現來觀察此因子缺乏下其他因子的重要



性。

將常於生殖道被偵測到的生長因子 IGF-II, EGF, GM-CSF, TGF $\alpha$  以 50 ng/ml 濃度添加於已注射 LIF-SiRNA 抑制血癌抑制因子鼠胚發育的培養液中，觀察胚胎發育的情形，並測定第五天囊胚的直徑及以核差別染色確定內細胞團及外胚滋養層細胞的數目，發現 EGF 對被抑制血癌抑制因子囊胚期鼠胚發育有回復的效果，且具有統計上的意義，但是在囊胚的直徑及胚胎的細胞數目方面則僅有回復的趨勢，而沒有統計上的差異，但這一部份或許導因於操作的胚胎數目不足，故應進一步增加數目來評估，而其他的生長因子對血癌抑制因子受到抑制的情況並沒有明顯的回復繼續發育的幫助，(Table 2, Table 3, Fig 1A) 因此血癌抑制因子缺乏時在生殖道中或許可藉由廣泛分布的上皮因子來完成促進胚胎發育的效果。

上皮生長因子除了對小鼠胚胎發育有幫助之外(Miyauchi et al., 1995; Kleinstein et al., 1993; Johnson et al., 1994) )，對大鼠和其他哺乳類動物的發育都有正向調節的效果(Morita et al., 1994; Johnson et al., 1993; Hofmann et al., 1990; Lonergan et al., 1996 Rieger et al., 1998; Boomsma et al., 1997; Lennard et al., 1998)，且亦有報告指出尚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)，上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 兩條，此兩條路徑接與細胞的增殖有關，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互進一步的研究來驗證。

## 六. 研究成果自評

本計劃原本預定分三部份進行，預計完成血癌抑制因子的干擾型 RNA 來抑制血癌抑制因子模式後，並進一步觀察生長因子，血癌抑制因子下游基因及對於血癌抑制因子訊息傳遞路徑與上皮生長因子關聯性做深入的探討。但受限於研究經費及時間，目前只能進行到原訂第一年的研究進度，但是我們仍能看出上皮生長因子與血癌抑制因子之間對胚胎發育存在的關連性應仍有進一步深入探討的價值，以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。

## 七、參考文獻：

- Bazan, J.F. Science. 1257:410-413, 1992.
- Boomsma RA, Mavrogianis pA, Verhage HG. Histochem J, 29:495-504, 1997.
- Boulay, J.L. and Paul, W.E. Curr. Opin. Immunol. 4:294-298, 1992.
- Cheng TC, Huang CC, Chen CI, Liu CH, Hsieh YS, Huang CY, Lee MS, and Liu JY. Biology of Reproduction. 70: 1270-1276, 2004.
- Dunlison GF, Barlow DH, Sargent IL. Hum. Reprod 11, 191-6, 1996
- 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. EMBO J. 6:3995-4002, 1987.
- Hardy, K. and Spanos, S. J. Endocrinol. 172: 221-236, 2002.
- Heinrich, P.C., Behrmann, I., Muller-Newen, G., Schaper, F. and Graeve, L. Biochem. J. 334:297-314.1998.
- Hofmann GE, Anderson tL. Am J Obstet Gynecol, 161:837-841, 1990
- Johnson SE, Rothstein jL, Knowles BB. Dev Dyn, 201:261-226, 1994
- Kleinstein J, Westermann w, Mennenga K et al. Am J Reprod Immunol, 30:58-62, 1993.

Lennard SN, Gerstenberg c, Allen WR et al. *J Reprod Fertil*, 112:49-57, 1998.

Lighten, A.D., Hardy, K., Winston, R.M. and Moore, G.E.. *Mol. Reprod. Dev.* 47: 134–139, 1997.

Lonergan P, Carolan C, Van IA et al. *Biol Reprod*, 54:1420-1429, 1996.

Metcalf, D. *Growth Factors* 7: 169-173, 1992.

Miyauchi A, Momoeda m, Nakabayashi M et al. *Hum Reprod*, 10:3284-3288, 1995.

Morita Y, Tsutsumi o, Taketani Y. *Am J Obstet Gynecol*, 171:406-409, 1994.

Johnson DC, Chatterjee s. *Placenta*, 14 :429-438, 1993.

Rieger D, Luciano aM, Modina S et al. *J Reprod Fertil*, 112:123-130, 1998.

Robinson RC, Grey LM, Staunton D, Vankelecom H, Vernallis AB, Moreau JF, Stuart DI, Heath JK, Jones EY. *Cell*. 77:1101-16, 1994.

Shen, M.M. and Leder, P. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 89: 8240-8244, 1992.

Spanos, S., Becker, D.L., Winston, R.M. and Hardy, K. *Biol. Reprod.* 63: 1413-1420, 2000.

Sjoblom, C., Wikland, M. and Robertson, S.A. *Hum. Reprod.* 14:3069-3076, 1999.

Stahl, N., Farruggella, T.J., Boulton, T.G., Zhong, Z., Darnell, J.E. Jr. and Yancopoulos, G.D. 267:1349-1353. 1995.

Stewart C, L. et al *Nature* ; 359 : 76-78, 1992.

Tsai, H.D., Chang, C.C., Hsieh, Y.Y., Hsu, L.W., Chang, S.C. and Lo, H.Y. *E J. Assist. Reprod. Genet.* 17:352-355, 2000.

Vogiagis, D., Marsh, M.M., Fry, R.C. and Salarnonsen, L.A. *J. Endocrinol.* 148: 95-102, 1996.

Yang, Z.M., Le, S.P., Chen, D.B. and Harper, M.J. *Mol. Reprod. Dev.* 38: 148-152, 1994.

Zhang X, Shu MA, Harrey MB et al. *Biol Reprod*, 54(5):1052-1058, 1996.

Zhao, Y. and Chegini, N. 42:303-311, 1999.

Table I. Percentages (%) of mouse embryos developing into different pre-implantation stages after microinjection of LIF antisense or siRNA at the two-pronucleus stage

Stage	Control				Si RNA Vector (cytoplasm)			LIF-ds SiRNA			
	Untreat (n=51)	NaCl (n=31)	Non-sense (n=46)	anti-LIF (fmol) 2.0 (n=52)	1 (n=78)	2 (n=66)	3 (n=87)	1 (n=26)	2 (n=32)	3 (n=24)	solution (n=30)
Two-cell	90.2	93.5	91.3	92.2	92.3	93.9	93.1	92.3	93.8	91.7	93.3
Four-cell	85.7	90.3	84.7	67.3	89.7	93.9	92.0	80.8	78.1	75.0	86.7
Morula	83.4	83.8 <sup>a</sup>	84.7	51.9 <sup>a</sup>	84.6	87.9	89.7	76.9	62.5	58.3 <sup>c</sup>	83.3 <sup>c</sup>
Blasto-cyst	83.4	77.4 <sup>b</sup>	76.0	17.3 <sup>b</sup>	74.9	83.3	86.2	73.0	59.4	41.7 <sup>d</sup>	80.0 <sup>d</sup>

a-d, Chi-test P<0.05

Table 2. Compared the embryo development rate from growth factors supplement on mouse embryos treated with LIF SiRNA.

Stage	Blank (n=30)	Si RNA (n = 40)	Supplement ( 50 ng/ml)				
			EGF (n = 34)	GM-CSF (n = 36)	IGF II (n = 36)	TGF (n=25)	LIF (n =38)
Two-cell	93.3	95.0	94.1	88.9	88.9	92.0	94.7
Four-cell	91.1	85.0	94.1	77.8	77.8	80.0	78.9
Morula	86.7	70.0	88.2	66.7	55.6	72.0	73.7
Blastocyst	82.2	45.0 <sup>a</sup>	76.5 <sup>a</sup>	61.1	44.4	52.0	68.4

a, Chi-test P=0.05

TABLE 3. Changes in the number of cells in the inner cell mass (ICM) and trophectoderm (TE) of the blastocysts derived from murine embryos after microinjection of LIF antisense oligonucleotide at the two-pronucleus stage

	Control		LIF SiRNA( 1.0 fmol)					
	Untreated (n=9)	solution <sup>a</sup> (n=8)	Control (n=10)	EGF 50ng/ml (n = 12)	GM-CSF 50ng/ml (n = 13)	IGF II 50ng/ml (n = 11)	TGF $\alpha$ 50ng/ml (n=11)	LIF 50ng/ml (n =12)
hatching rate (%)	88.9 (8/9)	87.5 (7/8)	40.0(4/10)	66.7(8/12)	46.1(6/13)	36.4(4/11)	45.5(5/11)	66.7(8/12)
n. of blastocysts measured	8	7	4	8	6	4	5	8
diameter of blastocysts ( $\mu\text{m}$ ) <sup>b</sup>	113.6 $\pm$ 11.2 <sup>b</sup>	110.5 $\pm$ 7.4	101.5 $\pm$ 5.3	108.5 $\pm$ 3.4	103.5 $\pm$ 5.9	102.2 $\pm$ 5.9	104.5 $\pm$ 6.7	106.5 $\pm$ 5.9
n. of blastomeres	57.5 $\pm$ 6.5	60.6 $\pm$ 9.7	36.3 $\pm$ 8.7	43.2 $\pm$ 5.5	38.2 $\pm$ 7.4	43.6 $\pm$ 8.7	41.8 $\pm$ 10.4	45.3 $\pm$ 8.7
n. of cells in ICM	21.6 $\pm$ 4.2	20.6 $\pm$ 3.6	9.1 $\pm$ 4.1	13.7 $\pm$ 3.8	11.6 $\pm$ 5.6	12.1 $\pm$ 5.1	12.6 $\pm$ 2.1	14.1 $\pm$ 3.1
n. of cells in TE	35.9 $\pm$ 6.2	40.1 $\pm$ 8.3	27.2 $\pm$ 6.2	29.5 $\pm$ 8.3	26.6 $\pm$ 7.7	31.5 $\pm$ 6.3	29.2 $\pm$ 9.1	25.3 $\pm$ 6.2
ratio of ICM/TE cells (%)	60.2 $\pm$ 18.9	51.3 $\pm$ 21.5	33.4 $\pm$ 13.9	46.4 $\pm$ 12.9	43.6 $\pm$ 11.7	38.4 $\pm$ 12.4	43.1 $\pm$ 16.1	55.7 $\pm$ 13.9

<sup>a</sup> Compared with the untreated group

<sup>b</sup> Mean  $\pm$  Standard deviation.

t-test (no significant statistic)

Figure 1



(A). Examples of differential staining of blastocysts. Pink cells were trophoblasts and blue cells were ICM. Immunocytochemical analysis of LIF protein expression on Days 5 in mouse embryos. (B) The blastocyst was from Solution treated group (c) The blastocyst was from SiRNA-6 treated group. (200X)