

# 行政院國家科學委員會專題研究計畫 成果報告

利用反向寡核甘酸抑制小鼠原核期胚胎之血癌抑制因子表  
現：探討著床前期胚胎發生之基因調控

計畫類別：個別型計畫

計畫編號：NSC94-2320-B-040-016-

執行期間：94年08月01日至95年07月31日

執行單位：中山醫學大學生化暨生物科技研究所

計畫主持人：劉哲育

計畫參與人員：謝逸憲 王佩璽 洪銓成

報告類型：精簡報告

處理方式：本計畫可公開查詢

中 華 民 國 95 年 10 月 31 日

## 利用反向寡核甘酸抑制小鼠原核期胚胎之血癌抑制因子表現：探討著床前期胚胎發生之基因調控

計畫類別： 個別型計畫  整合型計畫

計畫編號：94-2320-B-040-016

執行期間： 94 年 8 月 1 日至 95 年 7 月 31 日

計畫主持人：劉哲育

共同主持人：

計畫參與人員：

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：中山醫學大學生物化學研究所

## 一、中文摘要及關鍵詞

關鍵詞：胚胎、血癌抑制因子、胚胎著床前期

血癌抑制因子 ( leukemia inhibitory factor ; LIF) 即屬於這些分泌激素之一。基本上對於動物和人類的研究報告，都認為 LIF 在胚胎著床上扮演重要的角色，但 LIF 是否影響著床前期的胚胎發育尚無確切研究報告指出。前期研究利用 LIF antisense 核酸注入原核期鼠胚，觀察胚胎著床前發育情形。分別注入 0.25、0.5、1.0 或 2.0 fmol 的血癌抑制因子反義寡核苷酸於鼠胚中，各組生長至囊胚期的速率分別為 80.6%，83.5%，39.4% 及 13.2%；而沒有注射任何物質的對照組發育至囊胚期的速率為 85.4%，由各個實驗組和對照組在囊胚期形成速率統計比較發現中、高濃度的各組 (0.5, 1.0 及 2.0 fmol) 具有統計上的差異，其囊胚期形成速率明顯降低。本期研究利用基因晶片 (cDNA microarray) 分析技術，分析桑椹胚期 (morular stage) 胚胎內被 LIF antisense 核酸影響的相關基因。結果分析 9652 個基因，在 LIF antisense 處理組有 8925 個基因有反應，在 sense 處理組有 8758 個基因有反應。而共同都有反應有 8681 個基因，其中 4327 個基因沒有變化，154 個基因表現量增加，219 個基因表現量降低。基因表現量增加，如 poly (ADP-ribose) glycohydrolase，與細胞凋亡有關。基因表現量降低，如 SOX2，與細胞生存生長有關。故我們的結果顯示 LIF antisense 處理組的胚胎在桑椹胚期雖然外型上沒有改變，但是基因已經出現變異。

## 二、英文摘要及關鍵詞

Keyword: *embryo, leukemia inhibitory factor, pre-implantation stages*

Leukemia inhibitory factor (LIF) is an essential factor for implantation and establishment of pregnancy. However, its role in the development of pre-implantation embryos remains controversy. In pervious study, changes in pre-implantation embryos were determined after microinjection of LIF antisense oligonucleotide at the two-pronucleus stage. Although no significant differences were found in the percentages between the untreated group and the 0.25-fmol treated group, the 0.5- or 1.0-fmol treated groups had significantly lower percentages of embryos developed to the morula or blastocyst stage and the 2.0-fmol treated group had significantly lower percentages of embryos developed to the four-cell, morula, or blastocyst stage. No embryos developed to the four-cell stage in the 4.0-fmol treated group. Moreover, in this study, by using cDNA microarray techniques, the related-genes which are affected by LIF antisense will be identify at mouse morula stge. The result showed that among 9652 genes, 8925 genes had been detected in the LIF antisense group and 8758 genes in the LIF sense group. 154 genes were up-regulation, such as poly (ADP-ribose) glycohydrolase, a cell apoptosis protein. 219 genes were down-regulation, such as SOX2 which is correlated with cell growth. Thus our data suggested that the altered expressions of many genes had been observed at the morula stage of embyo with microinjection of LIF antisense oligonucleotide, although at this stage the morphological change was not different from that in the sense oligonucleotide group.

## 三、前言

Leukemia inhibitory factor (LIF) is multifunctional cytokine. It has been considered to be an essential factor for implantation and establishment of pregnancy [1, 2]. Although LIF is mainly provided by material uterus for pre-implantation embryos [3], the expression of this cytokine is only depended on the embryo in *in-vitro* fertilization.

#### 四、研究目的

In order to distinguish the precise role of LIF at the pre-implantation stages of embryogenesis *in vitro*, we employed antisense oligos to attenuate the function of LIF gene in the *in-vitro* embryos and determined the effects of this treatment to the pre-implantation development and implantation. In pervious study, changes in pre-implantation embryos were determined after microinjection of LIF antisense oligonucleotide at the two-pronucleus stage. Although no significant differences were found in the percentages between the untreated group and the 0.25-fmol treated group, the 0.5- or 1.0-fmol treated groups had significantly lower percentages of embryos developed to the morula or blastocyst stage and the 2.0-fmol treated group had significantly lower percentages of embryos developed to the four-cell, morula, or blastocyst stage. No embryos developed to the four-cell stage in the 4.0-fmol treated group. Moreover, in this study, by using cDNA microarray techniques, the related-genes which are affected by LIF antisense will be identify at mouse morula stge.

#### 五、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。在最初幾次的分裂中，第一次分裂需 24 小時，其後約 10-12 小時分裂一次 (McLaren, 1982)，胚葉細胞在分裂過程中，其表面結構亦產生變化，早期胚葉細胞表面平均分佈著微絨毛，發育到 8 細胞期時，鄰近之細胞有細胞突起相互接觸，使細胞間更加緊密，此時胚胎之型態 有極大的改變稱為致密化 (Ducibella, 1975)。囊胚的形成為胚細胞首次分化，滋養外胚層細胞變薄，且表面覆滿微絨毛，排列十分緊密，胚葉細胞彼此形成一連結複合物，並構成一個密封的外圍，滋養外胚層細胞，負責囊胚內外的主動運輸，及轉移營養之功能，(McLaren, 1982)，主要形成滋養葉細胞、胎盤組織、以及胚體外之外胚層。而內細胞團細胞較小以膜間聯繫連結，內細胞團細胞則主要形成胎體、卵黃囊、尿膜。

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达 (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; EGF)、轉型生長因子 (transforming growth factor- $\alpha$ ; TGF- $\alpha$ ) 及血癌抑制因子 (leukemia inhibitory factor; LIF) 等。

當胚胎進入囊胚期時，會從輸卵管進入子宮而發生胚胎著床的現象，著床的過程牽涉到胚胎和子宮間複雜的相互作用。著床前胚胎與子宮同步發育，胚胎發育至囊胚而此時子宮轉變為可著床狀態，半異基因 (semiallogenic) 的胚胎逃過母體的免疫反應，與囊胚接觸的子宮血管叢會增加微血管通透性與血流；在囊胚接觸到子宮腔上皮後胚囊週圍的子宮內膜基質發生局部蛻膜化的現象，以及胚胎滋養細胞有控制的侵入子宮 (Hearn J.P. et al, 1988)。

胚胎著床前發育 (embryo preimplantation development) 是須要來自母親生殖管道 (reproductive tract) 所分泌的周邊分泌激素 (paracrine) 和來自胚胎自己所分泌的自分泌激素 (autocrine) 共應營養培育完成。血癌抑制因子 (leukemia inhibitory factor; LIF) 即屬於這些分泌激素之一。LIF 基因在哺乳動物 (包含人類) 的胚胎生長分化各個階段都有表

現，甚至在母親生殖管道上輸卵管及子宮內皆有表現 (Hardy et al., 2002)。LIF 屬於 interleukin-6 成員之一，LIF 受到月經週期的調節，與囊胚的發育及著床皆有關聯 (Senturk et al., 1998)。此外，在受到基因突變導致缺乏 LIF 的老鼠，則著床無法發生 (Stewart et al., 1992; Hirzel et al., 1999)，在 1991 年 Robertson 等人的研究報告中發現 LIF 可以加強小鼠胚胎囊胚及孵化的形成 (Robertson et al., 1991)，類似的結果在牛的胚胎也被發表了 (Marquant-Le et al., 1993)，而在 Fry 等人對羊的研究中則發現 LIF 可以增加胚胎的著床率 (Fry et al., 1992)。但是 LIF 對人類胚胎體外培養的研究還相當少，Dunlison 等人 (1996) 將 LIF (1,000 IU/mL) 加入捐贈自接受試管嬰兒治療夫婦的胚胎中培養，發現囊胚期胚胎的形成率從 18% 增加至 44% ( $P < 0.025$ )，而囊胚的品質也從 10% 提高至 33% ( $P < 0.025$ )，但是培養到第七天時則沒有囊胚再形成也沒有胚胎在孵化。Jurisicova 等人 (1995) 將 463 個臨床治療後剩餘的胚胎分成五組，這些分裂早期的胚胎，除了 164 個胚胎為控制組外，其於四組的數目分別為 54、78、87、80；而於培養液中加入不同濃度的 LIF 分別為：5、7.5、10、20ng/mL，每天觀察每一個胚胎的胎發育狀態及型態，直到囊胚期。就總體而言，人類胚胎在體外發育至著床的數量相少。控制組培養至第五天時只有 28% 發育至早期的囊胚，到了第六、七天時有 19.5% 發育至囊胚後期；而添加 LIF 5、7.5、10、20ng/mL 於培養各組，並沒有明顯促進胚胎發育成早期或後期囊胚的效果。只有在 7.5 及 10ng/mL 有稍微促進後期囊胚形成的比例，其數值分別為 38% 及 36%，但是這些差異並無統計上的意義。根據以上節錄 Dunlison 及 Jurisicova 等人對 LIF 不一致的研究結果還需要未來更深入的研究。而根據我們實驗室將 LIF antisense 核甘酸注入原核期鼠胚發現在較高濃度的劑量下大部分的胚胎皆停滯於桑椹胚期，小部分僥倖生長到囊胚期的胚胎，則形態較小。可見對於 LIF 在胚胎著床前發育中角色差異的研究，應被重新評估。

Paria 等人 (1992) 認為利用 antisense 核酸可以了解特殊基因在胚胎著床前發育的角色。因此本計畫利用這個模式繼續深入研究 LIF 在胚胎著床前發育中的重要性。實驗過程：利用 LIF antisense 的模式，觀察 LIF 調控胚胎著床前發育的生物指標和分子機制。前期研究利用 LIF antisense 核酸注入原核期鼠胚，觀察胚胎著床前發育情形。分別注入 0.25、0.5、1.0 或 2.0 fmol 的血癌抑制因子反意寡核甘酸於鼠胚中，各組生長至囊胚期的速率分別為 80.6%，83.5%，39.4% 及 13.2%；而沒有注射任何物質的對照組發育至囊胚期的速率為 85.4%，由各個實驗組和對照組在囊胚期形成速率統計比較發現中、高濃度的各組 (0.5、1.0 及 2.0 fmol) 具有統計上的差異，其囊胚期形成速率明顯降低。本期研究利用基因晶片 (cDNA microarray) 分析技術，分析桑椹胚期 (morular stage) 胚胎內被 LIF antisense 核酸影響的相關基因。

## 六、研究方法

本實驗參考 Hogan 之方法略作修正，其步驟包括誘發超級排卵、鼠胚的採取、輸卵管之洗胚、鼠胚的培養、顯微鏡檢及資料收集、結果分析及監控等項，茲分述如下：

### (1) 誘發超級排卵：

選擇週齡介於六至八週性成熟之雌鼠，以藥物施以誘發超級排卵 (Superovulation Induction) 其方法為：第一天下午 3-6 時腹腔注射法注射 10 IU PMSG。第三天下午 3-6 時

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(1:1)讓其互相交配。第四天下午 3-6 時觀察雌鼠是否有陰道塞(Vaginal Plug)，作為判斷交配與否之根據；不同時期的鼠胚，其取出的時間也不同；通常於注射 HCG 後約 12-16 時可以取得原核期之鼠胚。

## (2) 取胚：

取胚前一天，將培養液分別取 50  $\mu$ l 兩滴滴於四孔培養皿中，再覆蓋礦物油於培養基上，置於 37°C，5%CO<sub>2</sub> 培箱中過夜，以調整酸鹼值，待用。取胚時，先將老鼠施以頸椎脫臼法(Cervical Dislocation),再以 75%酒精消毒腹部。以消毒過的小剪刀及鑷子，打開老鼠的腹腔，將其腹部的毛皮往上掀。在下腹腔的部位找出子宮，老鼠為雙子宮，延著子宮往上可發現卵巢，輸卵管則介於卵巢與子宮之間，為一螺旋管狀。取下輸卵管時應先以子夾住子宮，在其下方剪斷，再延著子宮、輸卵管、卵巢，在卵巢的下方剪斷，避免剪破壺腹膜，並置於培養皿中；以同樣的方法取下另一邊輸卵管，將剪下的輸卵管置於預先做好酸鹼平衡的培養液之培養皿中。

## (3) 輸卵管之洗胚：

將培養皿置於解剖顯微鏡下，取一 30G 針之 1 cc 胰島素空針，充滿預熱之磷酸緩衝液 (PBS),先把針頭磨鈍，避免洗胚時插入輸卵管壁；以針頭將輸卵管割破，用鑷子夾住輸卵管，使胚胎順利洗出，再以玻璃尿酸酶去掉胚胎外面的卵丘細胞，即可得到原核期單一細胞授精卵。

## (4) 鼠胚的培養：

將取出合用的 1-cell 期胚胎，均分成約 10 個胚胎一組之組別並置於入 CO<sub>2</sub> 之培養箱中培養。注入 antisense LIF 後，每天定時觀察胚胎發育情形，在穩定情況下，胚胎於體外培養的第二天會發育至 2-cell 期，第三天會發育至 4-cell 期，第四天會發育至桑葚胚期。

原核期鼠胚以 antisense oligonucleotide 注入：

本實驗所設計之 LIF gene 的 antisense oligonucleotide 是委託 Gene tool (U.S.A.)公司以其特殊之軟體設計障礙效率最高的一段序列為模板，並利用 Morpholino 修飾增加穩定度。抑制的序列為 Anti LIF: GACCTTCATTATGGGCTGGACTCTA (156~180)，另外為了對照注射時的傷害又設計了一段無意義的序列 Control: ATCAGGATTGGTGG CATC TTCCCAG 此二序列皆經基因庫的比對，前者只專一性的抑制 LIF 基因，後者在小鼠則無顯抗的基因。為了抵抗細胞內存在之核酸酵素此段序列之股價部分也已經特殊處理，此外為了確定期注入的位置及劑量於個序列後標定 FITC 螢光物質以利螢光顯微鏡下觀察。Antisense LIF 配置成 0.5mM、0.25mM 的濃度，nonsense antisense 配成 0.5mM 的濃度分別於小鼠胚胎原核期時注射至胚胎核中，操作時全部在相位差倒立顯微鏡下進行，並以 Narishige 之顯為操作器操作，在顯為操作培養皿中 r 滴入十滴以平衡過酸鹼值的 HTF 培養液，然後以礦物油

覆蓋，再將十個一組的原核期鼠胚至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 antisense oligonucleotide 的顯微注射管，經油壓調整後注入鼠胚的核中，注入的體積約 1-2 $\mu$ l。注射後將各組放回二氧化碳培養箱培養，並每日定時觀察，於第四日將桑甚胚期之胚胎取出繼續以下之步驟。

## Blastocyst Morphology

A grading system is devised in order to compare blastocyst morphology in the presence and absence of antisense treatment. Grade I blastocysts are of excellent morphology displaying a fully expanded blastocoele cavity, discrete inner cell mass (ICM), smooth trophoctoderm (TE) and appear to have numerous cells in the mural TE. Grade II blastocysts are of good morphology, but have a few excluded cells in the blastocoele cavity or a slightly diffuse ICM. grade III blastocysts have poor morphology, with many excluded fragments or cells in the cavity and/or between the TE and zona pellucida and no discrete ICM . The TE and ICM of grade III embryos will be very granular and irregular and intracellular vacuoles will be present in both cell lineages.

## DNA 晶片分析基因表現

### (1) RNA 的萃取

收集注射 0.25、0.5mM LIF antisense、nonsense antisense 及沒有注射的控制組，分別萃取 RNA，再以 DNA 晶片分析基因表現。根據一般的方法，每次的偵測可能需要 100 個卵子或受精卵，為了提高偵測的敏感度，我們採用了以下的步驟：以 RNA carrier 及 stabilizers 加入 RNA 萃取液中，避免萃取過程中 RNA 的流失。雜交的探針混合以基因特異性的 primer 來增加 hybridization 的效率。並以 digoxigenin nonradioactive labeling 系統來標定，以增加 signals 的偵測，RNA 的萃取同前述。為了增加 RNA 的品質，再將 RNA 的萃取液通過 bromo-3-chloropropane，使沉澱，再以 75% ethanol (Sigma)洗滌。純化後的 RNA(約 0.5mg)加水後保存於-70°C。純化後的 RNA 用來合成 first-strand cDNA 並以 nonradioactive labeling。

### (2) RNA 的反轉錄

合成 first-strand cDNA，加入 Total RNAs (0.5 mg) 與 CDS primer mix (1 mL; Clontech Laboratories, Palo Alto, CA) 混合並加入含有 AMV reverse transcriptase (18.5 units; Roche Molecular Biochemicals, Indianapolis, IN)的 Dig cDNA master buffer 進行反轉錄(15  $\mu$ L in total volume)。First-strand cDNA 的反轉錄在 48°C 進行 50 分鐘，最後加入 stop solution (1 mL) 結束反應。

### (3) Probe 標定

因為 probes 以基因特異性 primer (i.e., CDS primer mix) 標定，其複雜性比使用 oligo(dT) 或 random primers 來的低。降低 probe 約 1/10 的複雜性並伴隨降低非特異性的背景以增加敏感度。以 digoxigenin-11-dUTP 標定再利用 anti-digoxigenin antibody 放大，可以與放射性標定的 cDNA 相似，更可再經 second antibody against the primary antibody 放大，以檢測出較低的基因表現。

#### (4) Hybridization 及檢測 (DNA chip)

使用 Clontech Laboratories 的小鼠 cDNA 基因晶片，總共分析 588 種小鼠基因。此基因晶片亦包含有 plasmid 及 bacteriophage DNAs 做為 negative controls，另外有數種 housekeeping cDNAs 做為 positive controls。為了抑制非特異性的背景，使用 5 mL of DIG Easy Hyb solution (Roche Molecular Biochemicals, Indianapolis, IN) 其中含有 0.5 mg of fish sperm DNA 來做 prehybridization 在 68°C，1-2 小時。以含有 Cot-1 DNA (3 ug; Clontech Laboratories) 熱的 hybridization solution 置換 prehybridization solution 並加入 probes (10 uL)。此 hybridizations 必須保持在 68°C，16 小時。經過洗滌後此晶片以 Dig Luminescent Detection Kit (Roche Molecular Biochemicals) 檢測。由 CDP-Star substrate 轉變而來的訊號光點可以用 Fluor-S MAZ Multi-Imager System (Bio-Rad, Hercules, CA) 掃描獲得。

### 七、結果

本研究分別注入 2.0 fmol 的血癌抑制因子反意寡核苷酸於鼠胚中，各組生長至囊胚期的速率為 13.2%；而沒有注射任何物質的對照組發育至囊胚期的速率為 85.4%，由各個實驗組和對照組在囊胚期形成速率統計比較發現中、高濃度的各組具有統計上的差異，其囊胚期形成速率明顯降低。為了確認胚胎生長的速率的降低是否由血癌抑制因子對影響，本研究利用基因晶片 (cDNA microarray) 分析技術，分析桑椹胚期 (morular stage) 胚胎內被 LIF antisense 核酸影響的相關基因 (圖一)。結果如圖二，我們分析 9652 個基因，在 LIF antisense 處理組有 8925 個基因有反應，在 sense 處理組有 8758 個基因有反應。而共同都有反應有 8681 個基因，其中 4327 個基因沒有變化，154 個基因表現量增加 (表一 顯示表現差異較大的前 37 個基因)，219 個基因表現量降低 (表二 顯示表現差異較大的前 60 個基因)。基因表現量增加，也被 real-time RT-PCR 所確認，如 poly (ADP-ribose) glycohydrlase，與細胞凋亡有關。基因表現量降低，也被 real-time RT-PCR 所確認，如 SRY-box containing gene 2，與細胞生存生長有關。故我們的結果顯示 LIF antisense 處理組的胚胎在桑椹胚期雖然外型上沒有改變，但是基因已經出現變異。

### 八、討論

早期的胚胎發育在進入著床前有三個階段：包含第一個階段，卵子到兩個細胞的胚胎；第二個階段，進入二個細胞時期，轉錄作用開始；第三個階段是從四個細胞時期到囊胚時期。這些發育的階段都包含了不同的基因的表現。我們這篇研究計畫主要是為了了解在胚胎的發育過程中，荷爾蒙調控的重要性，如 LIF。因此本實驗利用 RNA 放大的方式來克服 Micr array 分析的困難，再次確認 LIF 在胚胎發育中的重要性。



本實驗在兩個核的細胞進行微量注射，將 LIF 的 antisense 注射進入到雄核裡面，結果發現在樞胚期有 154 個基因表現量增加 (表一 顯示表現差異較大的前 37 個基因)，219 個基因表現量降低 (表二 顯示表現差異較大的前 60 個基因)。基因表現量增加，也被 real-time RT-PCR 所確認，如 poly (ADP-ribose) glycohydrlase，與細胞凋亡有關。基因表現量降低，也被 real-time RT-PCR 所確認，如 SRY-box containing gene 2，與細胞生存生長有關。可見基因表現變異可能在樞胚期之前已經開始，故更肯定 LIF 的 antisense 對於胚胎發育的影響。

本結果提供了胚胎發育方面的一些研究結果，尤其在胚胎發育的過程中荷爾蒙對於胚胎生長及分化的重要性。雖然在其它的報告對於我們的結果及 LIF 調控胚胎發育有不同的看法，他們認為 LIF 調控胚胎發育主要在胚胎著床的時候或著床後的過程 (Kimber, 2005)。但是我們這一篇的研究結果使我們更確認我們的觀點，即 LIF 主要是影響胚胎著床前的胚胎發育。故本研究結果將可提供離體胚胎發育研究與應用的資料，並可作為未來研究荷爾蒙對於胚胎發育的重要性的研究模式。

## 九、參考文獻

- Cheng TC**, Huang CC, Chen CI, Liu CH, Hsieh YS, Hang CY, Lee MS, Liu JY. Leukemia Inhibitory Factor Antisense Oligonucleotide Inhibits the Development of Murine Embryos at Pre-Implantation Stages. *Biology of Reproduction*, 2004. In press
- Ducibella T**, Anderson E. (1975) Cell shape and membrane changes in the eight-cell mouse embryo: prerequisites for morphogenesis of the blastocyst. *Dev Biol.*, 47: 45-58.
- Dunglison 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: 191-196.
- Fry RC**, Batt PA, Fairclough RJ, Parr RA. (1992) Human Leukaemia inhibitory factor improves the viability of cultured ovine embryos. *Biol. Reprod.*, 46: 470-474.
- Hambartsoumian E.** (1998) Endometrial leukemia inhibitory factor (LIF) as a possible cause of unexplained infertility and multiple failures of implantation. *Am. J. Reprod. Immunol.*, 39(2): 137-143.
- Hardy K**, Spanos S. (2002) Growth factor expression and function in the human and mouse preimplantation embryo. *J. Endocrinol.*, 172(2): 221-236.
- Hearn JP**, Webley GE, Gidley-Baird AA. (1991) Chorionic gonadotrophin and embryo-maternal recognition during the peri-implantation period in primates. *J. Reprod. Fertil.*, 92(2): 497-509.
- Hirzel DJ**, Wang J, Das SK, DEY SK, Mead RA. (1999) Change in uterine expression of leukemia inhibitory factor during pregnancy in the Western spotted skunk. *Biol. Reprod.*, 60(2): 484-492.
- 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.
- Kimber SJ**, (2005) Leukaemia inhibitory factor in implantation and uterine biology *Reproduction*, 130(2): 131-145.

- Lee KF**, Chow JF, Xu JS, Chan ST, Ip SM, Yeung WS. (2001) A comparative study of gene expression in murine embryos developed in vivo, cultured in vitro, and cocultured with human oviductal cells using messenger ribonucleic acid differential display. *Biol. Reprod.*, 4(3): 910-917.
- Liang P**, Averboukh L, Keyomarsi K, Sager R, Pardee AB. (1992) Differential display and cloning of messenger RNAs from human breast cancer versus mammary epithelial cells. *Cancer Res.*, 52(24): 6966-6968.
- Marquant-Le Guinne B**, Humbolt P, Guillon N, Thibier M. (1993) Murine LIF improves the development of IVF cultured bovine morulae. *J. Reprod. Fertil. Abstr.*, 12: 61.
- Mclaren A**, Austin CR, Short RV. (1982) The embryo in reproduction in mammals II embryonic and fetal development. 2<sup>nd</sup> edition Cambridge University Press, p1-25.
- Paria BC**, Dey SK, Andrews GK. (1992) Antisense c-myc effects on preimplantation mouse embryo development. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 89(21): 10051-10055.
- Robertson SA**, Larvanos TC, Seamark RF. (1991) In-vitro models of the maternal fetal interface. In: Wegmann TG, Gill TG III, Nisbet-Brown E, eds. New York: Oxford University Press, 191-206.
- Schultz RM**. (1993) Regulation of zygotic gene activation in the mouse. *Bioessay*, 15(8): 531-538.
- Senturk LM**, Arici A. (1998) Leukemia inhibitory factor in human reproduction. *Am. J. Reprod. Immunol.*, 39(2): 144-151.
- Simon C**, Moreno C, Remohi J, Pellicer A (1998) Cytokines and embryo implantation. *J Reprod. Immunol.*, 39(1-2): 117-131.
- Sjoblom C**, Wikland M, Robertson SA. (1999) Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor promotes human blastocyst development in vitro. *Hum. Reprod.*, 14(12): 3069-3076.
- Smith AG**, Heath JK, Donaldson DD, Wong GG, Moreau J, Stahl M, Rogers D. (1988) Inhibition of pluripotential embryonic stem cell differentiation by purified polypeptides. *Nature*, 336: 688-690.
- Spanos S**, Becker DL, Winston RM, Hardy K. (2000) Anti-apoptotic action of insulin-like growth factor-I during human preimplantation embryo development. *Biol. Reprod.*, 63(5): 1413-1420.
- Stewart CL**, Kaspar P, Brunet LJ, Bhatt H, Gadi I, Kontgen F, Abbondanzo SJ. (1992) Blastocyst implantation depends on maternal expression of leukaemia inhibitory factor. *Nature*, 359: 76-79.
- Tanaka TS**, Jaradat SA, Lim MK, Kargul GJ, Wang X, Grahovac MJ, Pantano S, Sano Y, Piao Y, Nagaraja R, Doi H, Wood WH 3rd, Becker KG, Ko MS. (2000) Genome-wide expression profiling of mid-gestation placenta and embryo using a 15,000 mouse developmental cDNA microarray. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 97(16): 9127-9132.

**Watson A. J.**, Hogen A., Hahnel A., Wiemer K.E., and Schultz G. A., (1992) Expression of growth factor ligand and receptor gene in the preimplantation bovin embryo. *Mol. Reprod. Develop.*, 31: 87-95.

**Williams RL**, Hilton DJ, Pease S, Willson TA, Stewart CL, Gearing DP, Wagner EF, Metcalf D, Nicola NA, Gough NM. (1988) Myeloid leukaemia inhibitory factor maintains the developmental potential of embryonic stem cells. *Nature.*, 336: 684-687.

## 十、附表及附圖

TABLE 1. Differentially expressed genes with up-regulated in 2.0 fmol LIF antisense oligonucleotide-treated embryos

No.	unigene_code	GeneName	ratio
1	Mm.17991	cytochrome P450	3.15
2	Mm.27015	forkhead box D1	3.01
3	Mm.21005	cystatin 9	2.98
4	Mm.23782	expressed sequence AI427652	2.64
5	Mm.5	homeo box A10	2.52
6	Mm.32744	opsin (encephalopsin)	2.33
7	Mm.1341	epidermal growth factor	2.26
8	Mm.28398	fatty acid binding protein 2, intestinal	2.07
9	Mm.896	interleukin 1 receptor, type I	2.01
10	Mm.20461	gamma-glutamyl hydrolase	1.98
11	Mm.22695	collapsin response mediator protein 1	1.90
12	Mm.4182	protein kinase C, beta	1.88
13	Mm.3506	arginase type II	1.88
14	Mm.2774	deiodinase, iodothyronine, type I	1.87
15	Mm.3907	solute carrier family 6	1.86
16	Mm.89048	coagulation factor II	1.84
17	Mm.3092	inhibin beta-B	1.80
18	Mm.6611	solute carrier family 27	1.77
19	Mm.38323	OVO homolog-like 1	1.73
20	Mm.1137	integrin beta 2 (Cd18)	1.71
21	Mm.16519	nuclear receptor subfamily 2	1.69
22	Mm.38192	schlafen 4	1.68
23	Mm.3264	TXK tyrosine kinase	1.68
24	Mm.16086	ATP-binding cassette	1.68
25	Mm.3243	protein C receptor, endothelial	1.67
26	Mm.10194	myomesin 2	1.59
27	Mm.3865	seb4 mRNA	1.58
28	Mm.8137	chromodomain helicase DNA binding protein 1	1.55
29	Mm.34384	BH3 interacting domain death agonist	1.54

30	Mm.26587	thyroid hormone receptor alpha	1.53
31	Mm.16224	guanylate cyclase activator 1a (retina)	1.51
32	Mm.2904	zinc finger protein 216	1.48
33	Mm.6258	ectodysplasin-A	1.46
34	Mm.15295	epoxide hydrolase 2	1.44
35	Mm.5641	B lymphocyte gene 1	1.43
36	Mm.20947	RAD17 homolog ( <i>S. pombe</i> )	1.39
37	Mm.15962	poly (ADP-ribose) glycohydrolase	1.32

**TABLE 2. Differentially expressed genes with down-regulated in 2.0 fmol LIF antisense oligonucleotide-treated embryos**

No.	unigene_code	GeneName	ratio
1	Mm.27465	hepatic nuclear factor 4	-3.58
2	Mm.25347	fibulin 5	-3.27
3	Mm.3249	Eph receptor A4	-2.68
4	Mm.2731	phosphatidylethanolamine N-methyltransferase	-2.62
5	Mm.4462	SH3-domain binding protein 1	-2.52
6	Mm.43636	zinc finger protein 289	-2.48
7	Mm.4541	SRY-box containing gene 2	-2.35
8	Mm.26859	gap junction membrane channel protein beta 5	-2.31
9	Mm.3963	E74-like factor 3	-2.17
10	Mm.3991	solute carrier family 25	-2.09
11	Mm.4818	cyclin-dependent kinase 5	-2.04
12	Mm.38490	ADP-ribosylation factor 1 GTPase activating protein	-2.02
13	Mm.7504	glutathione synthetase	-2.01
14	Mm.27723	feminization 1 a homolog ( <i>C. elegans</i> )	-1.97
15	Mm.394	intercellular adhesion molecule 2	-1.95
16	Mm.6800	keratin complex 2, basic, gene 8	-1.95
17	Mm.29210	aplysia ras-related homolog N (RhoN)	-1.92
18	Mm.686	actin, alpha, cardiac	-1.90
19	Mm.30201	aplysia ras-related homolog G (RhoG)	-1.90
20	Mm.26995	thimet oligopeptidase 1	-1.90
21	Mm.1971	calreticulin	-1.89
22	Mm.460	suppressor of Ty 5 homolog ( <i>S. cerevisiae</i> )	-1.86
23	Mm.182255	CD97 antigen	-1.83
24	Mm.29772	N-acetylglucosamine kinase	-1.82
25	Mm.2409	alcohol dehydrogenase 1, complex	-1.80
26	Mm.143768	f-box only protein 3	-1.79
27	Mm.1775	hematological and neurological expressed sequence 1	-1.78
28	Mm.2534	proline-serine-threonine phosphatase-interacting protein 1	-1.78
29	Mm.42948	thioredoxin peroxidase, pseudogene 1	-1.77
30	Mm.687	aplysia ras-related homolog B (RhoB)	-1.76
31	Mm.16537	actin, alpha 2, smooth muscle, aorta	-1.74

32	Mm.22409	chloride intracellular channel 4 (mitochondrial)	-1.73
33	Mm.2055	matrix metalloproteinase 12	-1.73
34	Mm.149	RAD52 homolog, ( <i>S. cerevisiae</i> )	-1.72
35	Mm.28084	guanosine diphosphate (GDP) dissociation inhibitor 1	-1.71
36	Mm.28130	PCTAIRE-motif protein kinase 3	-1.70
37	Mm.24255	transducin-like enhancer of split 3	-1.70
38	Mm.426	glutathione S-transferase, pi 2	-1.68
39	Mm.16562	actin, gamma 2, smooth muscle, enteric	-1.67
40	Mm.130	cytokine inducible SH2-containing protein 1	-1.65
41	Mm.2582	vacuolar protein sorting 45 (yeast)	-1.63
42	Mm.42948	peroxiredoxin 2	-1.62
43	Mm.103351	ATP-binding cassette	-1.60
44	Mm.192991	metallothionein 1	-1.59
45	Mm.42196	nuclear protein 95	-1.58
46	Mm.18087	lectin, galactose binding, soluble 9	-1.58
47	Mm.8131	integrin linked kinase	-1.57
48	Mm.7244	anterior gradient 2 ( <i>Xenopus laevis</i> )	-1.57
49	Mm.21868	raf-related oncogene	-1.53
50	Mm.16757	solute carrier family 20, member 1	-1.50
51	Mm.25194	myosin Ic	-1.48
52	Mm.8180	lymphocyte antigen 6 complex	-1.48
53	Mm.183257	cofilin 1, non-muscle	-1.47
54	Mm.10	spermidine synthase	-1.46
55	Mm.14601	glutathione S-transferase, mu 2	-1.45
56	Mm.17911	lectin, galactose binding, soluble 6	-1.44
57	Mm.24662	S100 calcium binding protein A1	-1.42
58	Mm.8940	activin receptor IIB	-1.40
59	Mm.4927	aconitase 1	-1.36
60	Mm.4551	villin 2	-1.29

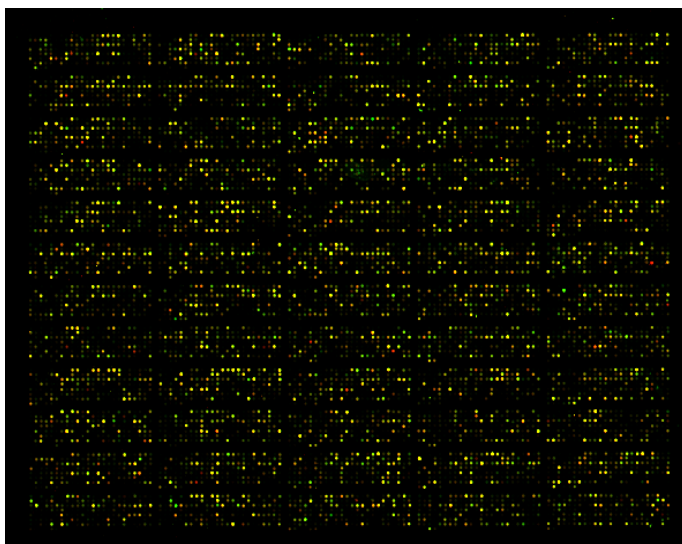


Fig. 1 Image for differentially expressed genes in control embryos and 2.0 fmol LIF antisense oligonucleotide-treated ones. Untreated mRNA probe, green color; LIF-treated mRNA probe, red color.

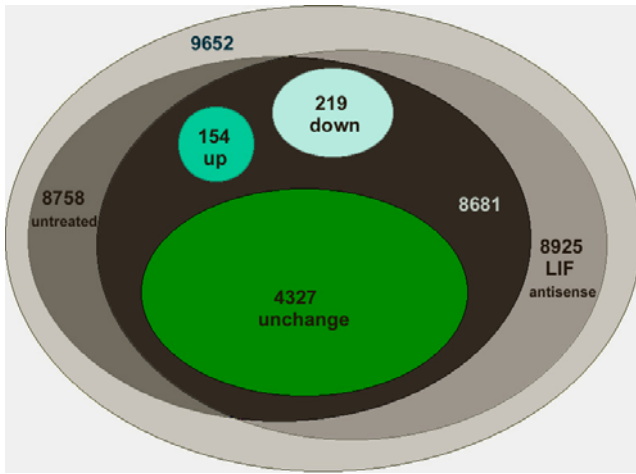


Fig. 2 Overlapping gene expression in control embryos and 2.0 fmol LIF antisense oligonucleotide-treated ones.

### 十一、計畫成果自評

1. 研究內容與原計畫相符，發現 LIF 表現減少下會抑制胚胎發育，而大部分的胚胎的基因變異在桑葚胚期已經產生。
2. 達成預期目標情況。
3. 研究成果之學術價值，即 LIF 在胚胎著床前發育的角色，應被重新評估。
4. 適合在學術期刊發表。