تاثیر فاکتور مهارکننده لوسمی انسانی بر تکوین جنین دو سلولی موش ICR

قاسم ساکی .Ph.D☆، علیقلی سبحانی .Ph.D☆، محمد اکبری .Ph.D☆، فرید ابولحسنی .Ph.D☆
مژده صالح‌نیا .Ph.D☆، فیروزه اکبری اسبق .M.D☆

☆ دانشگاه علوم پزشکی تهران، دانشکده پزشکی، گروه علوم تشریح

♦ آدرس مکاتبه: تهران، صندوق پستی: ۶۴۴۷-۱۴۱۵۵، دانشگاه علوم پزشکی تهران، دانشکده پزشکی، گروه علوم تشریح

چکیده

* **هدف:** بررسی اثر فاکتورهای مهارکنندهٔ لوسمی بر تکوین جنینهای دو سلولی موش ICR

* **مواد و روشها:** در این تحقیق ابتدا به هر موش ماده نژاد ICR، ۷/۵ واحد هورمون گونادوتروپین سرم خون مادیان حامله (Pregnant Mare Serum Gonadotropine (PMSG و ۴۸ ساعت بعد ۷/۵ واحد هورمون گونادوتروپین جفت انسان Human Chrionic Gonadotropine (HCG) به روش داخل صفاتی تزریق شد. سپس موشهای ماده به صورت دو به یک در کنار موشهای نر از همان نژاد قرار گرفتند. ۱۳ تا ۱۴ ساعت بعد از تزریق HCG، موشهای مادهٔ دارای پلاک واژنی مثبت از قفس نرها جدا شده و ۴۶ تا ۴۸ ساعت بعد از تزریق HCG با روش قطع نخاعی گردنی (Cervical Dislocation) کشته و جنینهای دو سلولی با روش Flushing جمع آوری شدند. جنینهای دو سلولی با مشخصات مورفولوژیک نرمال به صورت تصادفی در محیط کشت KSOM حاوی سه دوز متفاوت LIF (۱۵۰۰IU/ml، ۱۰۰۰IU/ml، ۵۰۰IU/ml) و نیز محیط کشت فاقد این ترکیب به عنوان کنترل به مدت ۱۲۰ ساعت کشت داده شدند. در طی این مدت روزانه تکوین جنینها با استفاده از میکروسکوپ معکوس (invert) با بزرگنمایی ۱۰۰X مورد بررسی قرار گرفتند. جهت آنالیز آماری یافته‌ها در جداول ثبت اطلاعات نوشته و سپس با روش $\chi 2$ مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند.

* **یافته‌ها:** میزان کل جنینهای ۴، ۸ و ۱۶-۹ سلولی حاصله در محیطهای کشت با غلظتهای متفاوت فاکتور مهار کننده لوسمی انسانی در مقایسه با گروه کنترل (بدون فاکتور مهارکننده لوسمی) تفاوت معنی داری را نشان نمی‌دهد، اما میزان مورولا، بلاستوسیست و بلاستوسیست در حال خروج از پرده شفاف (Hatching) پس از ۱۲۰ ساعت کشت در محیطهای با غلظتهای متفاوت فاکتور مهارکننده لوسمی تفاوت معنی داری را نشان می‌دهد ($P < 0.05$).

* **نتیجه‌گیری:** نتایج حاصل از این مطالعه نشان می‌دهد که فاکتور مهارکننده لوسمی انسانی بر تکوین جنینهای موش سفید نر نژاد ICR در مراحل اولیه تکاملی (۲ تا ۱۶-۹ سلولی) تاثیر معنی‌داری نداشته اما باعث بهبود تکوین مورورلا، بلاستوسیست و هچینگ بلاستوسیست می‌شود.

گل واژگان: فاکتور مهارکننده لوسمی، جنین قبل از لانه گزینی، موش ICR

مقدمه

فاکتور مهارکنندهٔ لوسمی[1] توسط Metcelf و همکاران برای اولین بار در سال ۱۹۸۶ در یکی از مراکز تحقیقات پزشکی ملبورن استرالیا کشف شد. این فاکتور یک سایتوکین Pleitropic از خانواده Interleukin-6 است و گیرندگی آن بر روی سلولهای عصبی، مگاکاریوسیتها، میوبلاستها، سلولهای اپی تلیالی پستان، سلولهای توده داخلی (ICM)[2] و اندومتر رحم دیده شده است (۱، ۲، ۳) فاکتور مهار کنندهٔ لوسمی، یک گلیکوپروتئین ترشحی با وزن مولکولی ۶۷Kd-۳۸ است (۴) و توسط سلولهای اندومتر رحم (۵، ۶)، سلولهای اپی‌تلیالی بخش آمپولی لولهٔ رحم (۷) و حتی خود جنین ترشح می‌شود (۸). این فاکتور از گلیکوزیلاسیون پروتئینهایی با وزن مولکولی تقریباً ۲۰ Kd به دست می‌آید (۴) و از طریق گیرنده سطح سلولی[3] عمل می‌کند (۹). فاکتور مهارکنندهٔ لوسمی دارای اعمالی مانند جلوگیری از تمایز سلولهای بنیادی جنین[4] (۱۰)، تحریک آزاد سازی کلسیم استخوان (۱۱)، القاء سنتز پروتئین (۱۲)، تکثیر و توان زیستی جنین[5] می‌باشد (۱). همچنین این فاکتور نقش ویژه‌ای در عمل لانه‌گزینی داشته و تخریب ژن مربوط به این فاکتور (Knokout of gene) باعث عدم لانه گزینی جنین می‌شود (۱۳). مطالعات نشان داده است که میزان این فاکتور در مایع رحمی زنان نابارور با منشا ناشناخته (Unexplained infertility) کمتر از میزان آن در مایع رحمی زنان بارور است (۱۴). فاکتور مهارکنندهٔ لوسمی نقش بسیار مهمی در تکامل جنینها داشته و باعث افزایش تکوین و هچینگ بلاستوسیست موش (۱۵)، Bovine (۱۶)، گوسفند (۱۷) و افزایش میزان حاملگی در گاو به هنگام انتقال جنینهای کشت داده شده به رحم می‌شود (۱۷). Jurisicova و همکاران (۱۸) معتقدند که LIF بر تکوین جنینهای واقع در مراحل اولیه تکاملی (Early stage) موثر نبوده و فقط بر جنینهای مورولا و بلاستوسیست موثر است. اما دیگر محققین از جمله Michell و همکاران (۱۹) در تحقیقات خود نشان دادند که LIF باعث بهبودی تکامل جنینها و کاهش میزان فراگمانتاسیون در تمام مراحل تکامل جنینها حتی جنینهای ۲ سلولی می‌شود. حال با توجه به اینکه بهبود شرایط کشت باعث افزایش توان زیستی جنینها و در نهایت افزایش حاملگی می‌باشد و با وجود اختلاف نظر بین محققین در مورد زمان اثر LIF انسانی بر جنین در حال تکامل، تصمیم گرفته شد که در این تحقیق اثر LIF با غلظتهای متفاوت بر تکوین جنینهای موش دو سلولی سفید آزمایشگاهی نژاد ICR در محیط کشت KSOM+Amino Acid مورد بررسی و مطالعه قرار گرفت.

مواد و روشها

موشهای ماده نژاد ICR با سن ۸ تا ۱۰ هفته با تزریق داخل صفاتی ۷/۵ واحد هورمون گونادوتروپین سرم خون مادیان حامله (PMSG) و ۴۸ ساعت بعد ۷/۵ واحد هورمون گونادوتروپین جفت انسانی (HCG) تحریک تخمک گذاری شدند. سپس به صورت دو به یک در کنار موش نر با سن ۱۲-۱۰ هفته همان نژاد که در شرایط ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی نگهداری می‌شدند، قرار گرفتند. صبح روز بعد (۱۳ تا ۱۴ ساعت بعد از تزریق HCG) موشهای ماده برای اطمینان از وقوع جفت‌گیری مورد معاینه پلاک واژنی قرار گرفته و از قفس نرها جدا شدند. موشهای ماده دارای پلاک واژنی، ۴۸-۴۶ ساعت بعد از تزریق HCG به روش قطع نخاعی گردنی (Cervical Dislocation) کشته شده و به سرعت لوله رحمی آنها جدا و به قطره‌ای از محیط کشت که قبلاً آماده شده بود انتقال یافتند. در زیر استریو میکروسکوپ با فلاش کردن مقدار اندکی محیط کشت به داخل لوله رحمی جنینها از لوله رحم خارج شدند. سپس جنینهای دو سلولی با مشخصات مورفولوژیک خوب را به صورت تصادفی به چهار گروه تقسیم در محیط KSOM حاوی:

(Kcl, 186mg/Lit, p-5405sig), (Nacl, 5552mg/Lit S-5886 Sig),

(Cacl2.2H20, 2514mg/Lit, 031-00435Wako), (KH2p04, 47mg/Lit P-5655 Sig),

(NaHco32.19mg/Lit S-5761 Sig), (Mgso4.7H20 493mg/Lit M-1880 Sig),

(Glucose 22mg/Lit G-7021sig), (EDTA-2Na 1000/Lit 343-01861 sig),

(Glutamin-146mg/Lit, G5440 Sig), (Na pyruvate 22mg/Lit P-5280 Sig),

(Antibiotic Antimycotic-100000IU Lit 15240-0096 GibcoBRL)

و آمینو اسیدهای ضروری

(MEN essential amino acid solution 10ml/Lit M-5550 Sig) و غیر ضروری

(MEM nonessential amino acid solution 5ml/Lit M-7145 Sig) و آلبومین سرم گاوی (Bovine Serum Albumin) به میزان 1ml/Lit (۲۰) که غلظتهای متفاوتی (۵۰۰IU/ml, ۱۰۰۰Iu/ml, ۱۵۰۰IU/ml) از فاکتورهای مهارکننده لوسمی (L-۵۱۵۸sigma) به آن اضافه شده بود به مدت ۱۲۰ ساعت کشت داده شدند. قطرات محیط کشت ۳۰µl در زیر روغن بوده و برای تسهیل در مطالعات مورفولوژیک، تنها یک جنین در هر قطره گذاشته شد. محیط کشت روزانه تعویض می‌شد و شرایط کشت دمای ۳۷ درجه سانتیگراد و گاز کربنیک ۵ درصد بود.

* ارزیابی تکوین جنینها

تکوین جنینهای کشت داده شده در گروههای مختلف توسط میکروسکوپ معکوس و با بزرگنمایی ۱۰۰X و هر ۲۴ ساعت یک بار صورت می‌گرفت. جنینهایی که بلاستومر غیر همسان با فراگمانتاسیون ۲۵درصد و یا بیشتر و سیتوپلاسم غیر شفاف داشتند از مطالعه خارج شدند. تعداد نمونه‌های تکامل یافته به جنینهای چهار سلولی (جنینهای سه سلولی نیز چهار سلولی در نظر گرفته شدند)، ۸ سلولی (جنینهای ۷-۵ سلولی هشت سلولی در نظر گرفته شد)، ۱۶-۹ سلولی، مورولا (جنینهایی که دارای ۱۶-۹ سلولی بوده متراکم و مرز بین سلولها تقریباً نامشخص است)، بلاستوسیست (جنینهایی که در آنها بلاستوسل مشاهده می‌شود) و هچینگ بلاستوسیست (سلولهای تروفواکتودرم در حال خروج از پرده شفاف) طی ۱۲۰ ساعت کشت شمارش و در فرم ثبت

1. Leukemia Inhibitory Factor
2. Inner Cell Mass
3. Cell Surface Receptor Complex
4. Stem Cell
5. Cell Survival

اطلاعات یادداشت شدند.

* آنالیز آماری

اختلاف تکوین جنینها در محیط کشت متفاوت با آزمون مجذور کای (2χ) مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفته و اختلافات با $P< 0.05$ معنی دار محسوب شدند.

یافته‌ها

تعداد و درصد جنینهای چهار، نه تا شانزده سلولی، مورولا، بلاستوسیست و هچینگ بلاستوسیست حاصل از تکوین جنینهای دو سلولی در محیطهای کشت متفاوت در جدول ۱ نشان داده شده است.

درصد جنینهای چهار سلولی، هشت سلولی، ۱۶-۹ سلولی، مورولا، بلاستوسیست و هچینگ بلاستوسیست در محیط کشت Ksom+Amino Acid به ترتیب ۹۵/۷۵درصد، ۹۰/۹درصد، ۷۸/۱۸درصد، ۴۹/۹۶درصد، ۳۹/۳۹درصد، ۱۶/۳۶درصد و در محیط کشت Ksom+aa+۱۵۰۰lu/ml LIF به ترتیب ۹۳/۸۶درصد، ۸۷/۷۳درصد، ۷۹/۷۵درصد، ۶۳/۸۰درصد، ۵۲/۲۸درصد، ۲۹/۴۴درصد و در محیط کشت Ksom+aa+۱۰۰۰lu/ml LIF به ترتیب برابر با ۹۵/۹۶درصد، ۸۹/۳۰درصد، ۷۷/۳۵درصد، ۶۶/۰۳درصد، ۵۹/۴۰درصد، ۳۲/۰۷درصد و در محیط کشت Ksom+aa+۵۰۰lu/ml LIF برابر با ۹۲/۵۴درصد، ۸۵/۷۱درصد، ۸۰/۱۲درصد، ۶۲/۱۱درصد، ۵۸/۳۸درصد، ۲۸/۵۲درصد است. درصد جنینهای چهار، هشت و نه تا شانزده سلولی حاصل در محیطهای کشت حاوی LIF در مقایسه با گروه کنترل تفاوت معنی داری نشان نمی‌دهد ($P> 0.05$)، اما درصد مورولا، بلاستوسیست و هچینگ بلاستوسیستهای حاصل به طور معنی داری در محیطهای کشت دارای LIF از گروه کنترل بیشتر بود ($P< 0.05$). درصد جنینهای مرحله مورولا، بلاستوسیست و هچینگ بلاستوسیستهای حاصل به طور معنی‌داری در محیطهای کشت دارای LIF از گروه کنترل بیشتر بود ($P< 0.05$). درصد جنینهای مرحله مورولا، بلاستوسیست و هچینگ بلاستوسیست در سه غلظت ۱۵۰۰IU/ml، ۱۰۰۰IU/ml، ۵۰۰IU/ml فاکتور مهارکننده‌لوسمی باهم دیگر تفاوت معنی داری ندارند. بنابراین LIF با سه غلظت فوق بر تکوین جنینهای موش ICR در مراحل اولیه‌تکاملی (دو تا ۱۶-۹ سلولی) تاثیر تحریکی یا مهاری نداشته و تاثیر آن بر جنینهای مرحله مورولا، بلاستوسیست و هچینگ بلاستوسیست قابل ملاحظه و معنی‌دار است.

بحث

ارتقای کیفیت شرایط کشت یکی از جنبه‌های با اهمیت در مطالعات پیش از لانه گزینی است زیرا در شرایط آزمایشگاهی موجود میزان و سرعت تکوین جنینها (۲۱)، تعداد سلولها (۲۲)، فعالیت میتوزی جنینها (۲۳) و توان زیستی آنها (۲۴) نسبت به جنینهای رشد یافته که در محیط *In vivo* کمتر است. به همین دلیل تاکنون تلاشهای فراوانی به منظور بهبود تکوین جنینها پی ریزی شده است که از آن جمله می‌توان به روش هم کشتی[1] یا کشت همزمان جنینهای اولیه[2] با سلولهای اپی تلیال لوله رحم (۲۵)، فیبروبلاست رحم (۲۶) و سلولهای مشتق از کلیهٔ میمون سبز آفریقایی[3] (۲۷) اشاره نمود که نتایج حاصل از این نوع کشتها رضایت بخش بوده است. گفته می‌شود علت اصلی نتایج خوب سیستم هم کشتی این است که از سلولهای تغذیه کننده[4] فاکتورهای رشد و دیگر مواد مغذی ترشح می‌شود که فاکتور مهارکننده لوسمی یکی از آن فاکتورهاست (۱۳). در این تحقیق به جای استفاده از فاکتور مهارکننده لوسمی حاصل از هم کشتی که نیازمند صرف وقت و هزینه بالاست، از LIF مصنوعی (Recombinant) مشابه نوع انسانی به دلیل آسانی دسترسی، سادگی کاربرد و عدم احتمالی عفونت ویروسی استفاده شده است. مطالعات قبلی نشان داده است که فاکتور مهارکنندهٔ انسانی بر جنینهای موش (۱۵)، گوسفند (۱۷)، Bovine (۱۶) و خوک (۲۸) موثر است. مطالعات متعددی نشان داده است که LIF در محیط کشت باعث افزایش تشکیل بلاستوسیست و هچینگ آنها به میزان ۴ برابر در گوسفند می‌شود. Dunglison و همکاران طی تحقیقی اعلام نمودند که LIF باعث بهبود تشکیل بلاستوسیست انسانی از ۱۸/۴ درصد می‌شود (۲۹). اما درمورد زمان اثر این فاکتور بر جنینها اختلاف نظر وجود دارد، به طوری که Michell و همکاران (۱۹) در تحقیقات خود نشان دادند که LIF باعث بهبودی تکامل جنینها و کاهش میزان فراگمانتاسیون

جدول ۱: میزان تکوین جنینها طی ۱۲۰ ساعت کشت در محیطهای کشت متفاوت

محیط کشت	تعداد جنین دوسلولی	دفعات تکرار	تعداد جنینهای ۴ سلولی (درصد)	تعداد جنینهای ۸ سلولی (درصد)	تعداد جنینهای ۱۶-۹ سلولی (درصد)	تعداد مورولا (درصد)	تعداد بلاستوسیست (درصد)	تعداد هچینگ بلاستوسیست(درصد)
KSOM+aa(کنترل)	۱۶۵	۱۰	۱۵۸(۹۵/۷۵درصد)	۱۵۰(۹۰/۹۰درصد)	۱۲۹(۷۸/۱۸درصد)	۸۲(۴۹/۶۹درصد)*	۶۵(۳۹/۳۹درصد)	۲۷(۱۶/۳۶درصد)
KSOM+aa+ 1500IU/mlLIF	۱۶۳	۱۰	۱۵۳(۹۳/۸۶درصد)	۱۴۳(۸۷/۷۳درصد)	۱۳۰(۷۹/۷۵درصد)	۱۰۳(۶۳/۸۰درصد)*	۹۵(۵۸/۲۸درصد)	۴۸(۲۹/۴۴درصد)
KSOM+aa+ 1000IU/mlLIF	۱۵۹	۱۰	۱۵۱(۹۵/۹۶درصد)	۱۴۲(۸۹/۳۰درصد)	۱۲۳(۷۷/۳۵درصد)	۱۰۵(۶۶/۰۳درصد)*	۹۵(۵۹/۴درصد)	۵۱(۳۲/۰۷درصد)
KSOM+aa+ 500IU/mlLIF	۱۶۱	۱۰	۱۴۹(۹۲/۵۴درصد)	۱۳۸(۸۵/۷۱درصد)	۱۲۹(۸۰/۱۲درصد)	۱۰۰(۶۲/۱۱درصد)*	۹۴(۵۸/۳۸درصد)	۴۶(۲۸/۵۲درصد)

$P< 0.05$ *

1. Co Culture
2. Early Embryo
3. Vero Cell
4. Feeder Cells

در تمام مراحل تکاملی در جنینهای دو سلولی می‌شود؛ در صورتی که Jurisicora و همکاران (۱۸) معتقدند که فاکتور مهارکننده لوسمی بر تکوین جنینهای واقع در مراحل اولیه تکاملی موثر نبوده و فقط بر جنینهای مرحله مورولا و بلاستوسیست موثر است. در مورد غلظت LIF عده‌ای از محققان (۱۵، ۲۸) در مطالعات خود متوجه شدند که ۱۰۰۰IU/ml به عنوان غلظت پایه است، در حالی که Tsai و همکاران در مطالعه خود به این نتیجه رسیدند که تکوین جنینهای مورولا بلاستوسیست در محیط کشت دارای LIF بهبود می‌یابند، اما در غلظتهای متفاوت (۱۵۰۰IU/ml، ۱۰۰۰، ۵۰۰) فاکتور مهارکننده لوسمی تفاوت معنی داری را در تکوین جنینها مشاهده ننموده‌اند (۳۰). مطالعات نشان داده است که بهترین میزان تکامل جنینها در محیط کشت KSOM+aa است. این محیط کشت بر تکثیر و تمایز سلولی اثر مثبت داشته که شاید دلیل آن حفظ سطح mRNA(Support Level) سلولهای جنینی می‌باشد (۳۱). هم چنین این محیط کشت پروتئینهای ساخته شده و بیان ژنهای مرتبط با رشد (related Growth genes) را بیشتر از محیطهای کشت دیگر فعال می‌کند (۳۲). در این تحقیق از محیط کشت KSOM که به آن اسیدهای آمینه ضروری و غیر ضروری اضافه شده است استفاده گردید.

در این تحقیق مشاهده گردید که LIF بر جنینهای اولیه در مراحل ۲ تا ۱۶-۹ سلولی موثر نبوده ولی میزان تکوین جنینهای مورولا، بلاستوسیست و هچینگ بلاستوسیست به طور معنی داری افزایش می‌یابد. نتایج مطالعه با مطالعات Jurisicova (۱۸) و Wang G و همکاران (۳۳) مبنی بر عدم تفاوت تکوین جنینها در غلظتهای مختلف LIF همخوانی دارد. از این مطالعه می‌توان نتیجه گرفت غلظت ۵۰۰IU/ml می‌تواند به عنوان غلظت پایه در نظر گرفته شود. این یافته با نتایج حاصله از مطالعه Tsai و همکاران نیز مطابقت دارد (۳۰). حال این سوال مطرح می‌شود که چرا LIF بر جنینهای Early Stage موثر نبوده ولی باعث بهبودی تکامل مورولا، بلاستوسیست و هچینگ بلاستوسیستها می‌شود؟ جواب این سوال به تحقیق بیشتری نیازمند است، اما شاید به این دلیل باشد که نیاز جنین به فاکتورهای رشد از جمله LIF و دیگر مواد مغذی در طول سیر تکاملی به تدریج زیاد می‌شود و یا به این دلیل باشد که جنین در مراحل اولیه تکاملی فاقد گیرنده‌های لازم برای جذب این فاکتور باشد. بدین ترتیب می‌توان گفت که اضافه نمودن LIF به محیط کشت KSOM+aa از اثر تحریکی و یا مهاری بر جنینهای مراحل اولیه تکاملی (Early Stage) برخوردار نبوده ولی باعث بهبودی تکوین جنینهای مراحل قبل از لانه گزینی (Stage Preimplantation) به طور معنی دار می‌شود. همچنین می‌توان ادعا کرد که اثر LIF در غلظت ۵۰۰IU/ml مشابه اثر فاکتور در غلظتهای (۱۰۰۰IU/ml و ۱۵۰۰IU/ml) است. بنابراین غلظت ۵۰۰IU/ml می‌تواند به عنوان غلظت پایه در نظر گرفته شود. به هر حال با مطالعات بیشتر شاید در آینده LIF در جهت افزایش میزان تکوین مورولا و بلاستوسیست نمونه‌های انسانی در آزمایشگاههای باروری و ناباروری استفاده شود.

References

1. Hilto Dj, LIF: Lots of interesting function. Trends Biochem Sci 1992; 17: 72-76

2. Nichols J, David Son D, Tagik T, Yoshida K, Chambers I, Smith A: Complementary tissue specific expression of LIF and LIF receptor mRNA in early mouse embryogenesis. Mech Dev 1996; 57: 123-131

3. Cullinian EB, Abbondanzo SJ, Anderson PS., Pollard JW, Lessery BA, Stewart CL: LIF and LIF receptor expression in human endometrium suggest a potential autocrine/paracrine function in regulating embryo implantation Proc Natl Acad Sci USA 1996: 93: 5115-5120

4. Hilton DJ, Nicola NA, Metcalf D: Purification of murine leukemia inhibitory factor from krebs ascites cells. Anal Biochem 1998; 173: 359- 367

5. Vagiagis D, Marsh MM, Frey RC, Salamonsen LA: LIF in human endometrium throughout the menstrual cycle. J Endocrinol 1996; 148: 95-102

6. Chen DB, Hilsenrath R, Yang ZM, Le Sp, Kim SR, Chkong CJ: LIF in human endometrium during the menstrual cycle. Cellular origin and action on production of glandular epithelial cell prostaglandin in vitro. Hum Reprod 1995; 10: 911-918

7. Kehz MD, Attar E, Buradagunta S, OlivDL, Kliman HJ, Arici A: Modulation of LIF gene expression and protein biosynthesis in the human fallopian tube. Am J Obstet Gynecol 1996; 175: 1611-1619

8. Murray R, Lee F, Chin CP: The gene for LIF and interleukin-6 are expressed in mouse blastocyst prior to the onset of hematopoiesis: Mol Cell Biol 1990; 10: 4953-4956

9. Hirano T, matsuda T, Nakashima K: Signal transduction through gp130 that is shared among the receptors for the interlokin-6 related cytokine subfamily. Stem Cell (Dayt) 1994; 121: 262-277

10. Wiliams RL, Hilton DJ, Prease S, Willson TA, Stewart CL, Greating DP, wanger EF, Metcalf D, Nicola NA, Gough NM: Myeloid LIF maintains the developmental potential of embryonic stem cell. Nature 1988; 336: 684-686

11. Abe E, Tanaka H, Ishimi Y, Miaura C, Hyashi T, Magasawa H, Tomida M, yanaguchi Y, Hozumi M, Suda T: Differentiation-inducing factor purified conditioned medium of mitogen-treated spleen cell

culture stimulation bone resorption. Proc Natl Acad Sci USA 1986; 83: 5958-5962
12. Baumann H, Wang GG: Hepatocyte-stimulating factor III shares structural and functional identify with LIF. J Immunol 1989; 143: 11163-11167
13. Stewart CL, Kaspar P, Brunet LJ, Bhatt H, Gadi I, and Kontgen F: Blastocyst implantation depends on maternal expression of leukemia inhibitory factor. Nature 1992; 359: 76-79
14. Hambatsoumian E: Endometrial leukemia inhibitory factor (LIF) as a possible cause of unexplained infertility and multiple failures of implantation. Am J reprod Immunol 1998; 39: 137-143
15. Tsai HD, Chang CC, Hsieh YY, Lo Hy, Hsu Lw, Chang SC: Recombinant human LIF enhances the development of preimplantation mouse embryo. In vitro Fertil Steril 1999; 71: 722-725
16. Han Ym, Lee Se, Mogoe T, Lee KK, Fukui Y: Effect of human LIF on in vitro development of FVF-derived bovine morula and blastocyst. Theriogenology 1995; 44: 507-516
17. Fry RC, Batt PA, Fairclough RJ, Parr RA: Human LIF improves the viability of ovine embryos. Biol Reprod 199; 46: 470-474
18. Jurisicova A, Ben Chetrit A, Varmuza SH, Casper RF: Recombinant human LIF dos not enhance in vitro human blastocyst formation: fertile Steril 1995; 94: 999-1002
19. Michell MH, Swanson RJ, Hodgen GD, Dehninger S: Enhancement of in vitro murine embryo development by recombinant LIF: J Soc Gynecol Invest 1994; 1: 215-219
20. kito S, Tatano S, Ohato Y: Kinetics of in vitro fertilization and development of an inbred mouse strain: a study comparing RFM/MS with c57BL/6j J Mamm Ova Res 2002; 19: 32-38
21. Erbach GT, Lawitts SA, Papaionnou VE And Biggers JD: Differential growth of mouse preimplantation embryo in chemically defined Biol Reprod 1994; 50: 1027-1033
22. Harlow GM, Quinn P: Development of mouse preimplantation embryos in vivo and in vitro Aust Biol Sci 1982; 35: 187-193
23. Jung T, Fischer B: Correlation between diameter and DNA or protein synthetic activity in rabbit blastocysts Biol Reprod 1988; 39: 1111-1119
24. Carney EW, Foote RH: Effect of superovulation, embryo recovery, culture systemand embryo transfer on development of rabbit embryo in vivo and in vitro. L Reprod Fert 1990; 98: 543-551
25. Frasor J, Sherbahn R, Barbara S, Mold MW, Binsor Z: Optimizing tubal epithelial cell growth promotes mouse embryos hatching in co-culture J Assist Reprod Genet 1996; 423-430
26. Barmat LI, Liu HC, Spandorfer SD, Xu K, Veeck L, Damario MA, Rosenwakes Z: Human preembryo development on autologous endometrial co-culture versus convential medium. Fertil Steril 1998; 70: 1109-1113
27. Chen HF, Ho ZN, Chen Su, Chao KH, Liu HR, Huang SC, Lee Ty, Yang Ys: Peptid extracted from vers cell cultures overcome the blastocyst block of mouse embryo in a serum free medium. J Assist Reprod Genet 1994; 11: 165-171
28. Eckert J, tao T, Niemann H: Ratio of inner cell mass and trophoblastic cells in blastocysts derived from bovine 4 and 8 cells embryo and isolated blastomers cultured in vitro in the presence or absence of protein and human LIF Biol. Reprod 1997; 57: 552-560
29. Dungilson GF, Barlow DH, sergeant IL: LIF significantly enhances to blastocyst formation rates of human embryos cultured in serum free medium. Hum Reprod 1996; 11: 191-196
30. Tsai HD, Chang CC, Hsieh YY, Hsu Lw, Chang SC, Lo Hy: Effect of different concentration of recombinant LIF on different development stage of mouse embryo in vitro. J Assist Reprod Genet 2000; 17: 352-355
31. Anbari K, Schultz RM: Effect of sodium and betaine in culture medium on development and relative rates of protein synthesis in preimplantation mouse embryos in vitro. Mol Reprod Dev 1993; 35: 24-28
32. Ho Y, Wigglesworth K, Eppig JJ, Schultz RM: Preimplantation development of mouse embryo in KSOM: Augment by amino acids and analysis of gene expression. Mol Reprod Dev 1995; 41: 232-238
33. Wang G, deng X, Zhang H, Yu H, Siang S: Effect of recombinant human leukemia inhibitor on the preimplantation mouse embryo development in vitro. Zhanghua Fu Chan Ke Zhi. 2002; 37(2): 72-73