

雌、孕激素对牛子宫内膜上皮细胞 $\alpha v \beta 3$ 体外诱导差异表达的影响

詹同彤¹, 潘兴乾¹, 王彦平², 杨健¹, 陈超磊¹, 麻柱², 刘林², 倪和民¹
王相国¹, 齐晓龙¹, 盛熙晖¹, 刘云海¹, 郭勇^{1*}

(1. 北京农学院动物科学技术学院, 北京 102206; 2. 北京奶牛中心, 北京 100020)

【摘要】 目的 研究体外培养的牛子宫上皮细胞内整合素 $\alpha v \beta 3$ 基因诱导差异表达的变化, 以期探究牛子宫容受态的标志蛋白提供参考。**方法** 运用 RT-PCR 方法分析不同浓度雌激素、孕激素以及雌、孕激素协同作用对牛子宫内膜上皮细胞中整合素 $\alpha v \beta 3$ 的诱导表达变化情况。**结果** 单独添加孕激素 10^{-7} mg/mL 时, 整合素 $\alpha v \beta 3$ 表达量均最高, 10^{-7} mg/mL 组内 αv 和 $\beta 3$ 的表达量均显著高于对照组 ($P < 0.05$)。单独添加雌激素 10^{-10} mg/mL 组, αv 的表达量最高, 而 $\beta 3$ 的表达量最低。协同添加雌、孕激素组中, 整合素 $\alpha v \beta 3$ 的表达量均高于对照组, 其中 αv 的表达量显著高于对照组 ($P < 0.05$); $\beta 3$ 的表达量与对照组相比差异不显著 ($P > 0.05$)。**结论** 单独添加孕激素和协同使用雌、孕激素时, 均可以促进牛子宫内膜上皮细胞中整合素 $\alpha v \beta 3$ 的 mRNA 表达量上升; 单独添加雌激素的作用则与之相反。由此, 整合素 $\alpha v \beta 3$ 在“种植窗”期的牛子宫内膜上皮中可作为一个潜在的子宫容受态参考标志基因。

【关键词】 牛; 雌激素; 孕激素; 整合素 $\alpha v \beta 3$; 子宫内膜上皮

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2018) 01-0072-07

Doi: 10.3969/j.issn.1005-4847.2018.01.011

Effects of estrogen or/and progesterone on the differential expression of $\alpha v \beta 3$ in bovine endometrial epithelial cells in vitro

ZHAN Tongtong¹, PAN Xingqian¹, WANG Yanping², YANG Jian¹, CHEN Chaolei¹, MA Zhu², LIU Lin²,
NI Hemin¹, WANG Xiangguo¹, QI Xiaolong¹, SHENG Xihui¹, LIU Yunhai¹, GUO Yong^{1*}

(1. College of Animal Science and Technology, Beijing University of Agriculture, Beijing 102206, China.

2. Beijing Dairy Cattle Center, Beijing 100020)

Corresponding author: GUO Yong. E-mail: y63guo@126.com

【Abstract】 Objective The aim of this study is to explore the changes of expression of integrin $\alpha v \beta 3$ in bovine uterine epithelial cells *in vitro* induced by estrogen or/and progesterone alone or in combination, and to provide a new reference marker for determining bovine uterine receptivity state. **Methods** RT-PCR was used to analyze the transcriptional changes of $\alpha v \beta 3$ expression in bovine endometrium treated by different concentrations of estrogen, progesterone alone or in combination. **Results** The expression of integrin $\alpha v \beta 3$ reached the highest level when the culture medium was added with

【基金项目】 2016 年度北京科技创新服务能力建设项目 (No. KZ201610020018); 2018 北京市科技计划“奶牛良种扩繁关键技术与推广应用”课题 (No. D171100002417002)。

Funded by 2016 Beijing Municipal Science and Technology Innovation Service Capacity Building Project (Grant No. KZ201610020018), and 2018 Beijing Municipal Scientific and Technical Project - Key Technique Investigation and Application of Dairy Cattle Breeding and Propagation (Grant No. D171100002417002)。

【作者简介】 詹同彤 (1993 -), 女, 硕士研究生, 研究方向: 动物产科与胚胎工程。E-mail: 1697471169@qq.com

【通信作者】 郭勇 (1963 -), 男, 教授, 研究方向: 动物生殖生理与生物技术。E-mail: y63guo@126.com

progesterone at the concentration of 10^{-7} mg/mL, and the expression of αv and $\beta 3$ in the 10^{-7} mg/mL concentration group was significantly higher than that of the control one ($P < 0.05$). Moreover, the expression of αv was highest in the 10^{-10} mg/mL E_2 group, but the expression of $\beta 3$ was the lowest in that one. In addition, adding with both estrogen and progesterone, the transcriptional level of integrin $\alpha v \beta 3$ was significantly higher than that in the control one. The transcriptional level of αv in the treatment group was significantly higher than that in the control group ($P < 0.05$), but the transcriptional level of $\beta 3$ in this group was not ($P > 0.05$). **Conclusions** It can be concluded that integrin $\alpha v \beta 3$ can be used as a new potential reference marker gene for detecting the bovine uterine receptive status.

[Key words] cattle; estrogen; progesterone; integrin $\alpha v \beta 3$; endometrial epithelium

Conflict of interest statement: We declare that we have no conflict of interest statement.

已知哺乳动物胚胎着床失败, 大约有 1/3 是由于胚胎质量低劣所造成, 另有 2/3 则由于子宫内膜容受性不足所引起^[1]。动物早期胚胎在植入前与子宫之间会有一个识别的过程。拥有着床能力、正常发育的胚胎必须同处于接受胚胎到来状态的子宫在时空上保持完全一致, 着床才能顺利进行并起始正常妊娠^[2-3]。子宫内膜容受态的建立过程涉及多种基因的表达, 如白血病抑制因子 (LIF)、表皮生长因子 (EGF)、粘蛋白 1 (MUC-1)、整合素 (integrin)、Hoxa10 和 Hoxa11 基因等, 这些调控基因能与早期胚胎在特定时、空上完成同步表达, 使激活态的胚胎与处于容受态的子宫进行“精确对话”。

整合素有调控着床和囊胚侵入的功能最早是在人类的子宫内膜实验中发现的^[4-6], 之后逐渐在绵羊和猪的子宫内膜细胞中发现了整合素的表达^[7-8]。人们发现整合素的部分亚型在羊子宫内膜细胞中均存在不同程度的表达, 其中, 整合素 $\alpha v \beta 3$ 的表达量会随着子宫容受态的建立而显著上升^[9-11]。2002 年, MacIntyre 等^[12]的研究表明整合素表达于植入期牛子宫胚胎的界面及整个妊娠期的胎盘。Zeiler 等^[13]在研究中证实牛子宫内膜上皮细胞可表达整合素 $\alpha v \beta 3$ 。虽然在反刍动物子宫内膜细胞中检测到了整合素, 但对其表达规律和功能机制尚不明确, 因此, 其是否是子宫容受态的标志还有待进一步研究。

孕激素 (P_4) 和雌激素 (雌二醇, E_2) 在调控子宫内膜容受态和胚胎发育同步化的过程中各自发挥作用且彼此相互协调。排卵前有足够的雌激素起到刺激性作用以及排卵后孕激素调节容受性相关因子的表达, 是建立子宫内膜容受性的必要条件^[14-15]。研究证实, 孕激素通过自分泌途径直接作用于子宫内膜上皮细胞的孕激素受体 PR, 从而促进整合素 $\alpha v \beta 3$ 的表达; 通过旁分泌途径间接地刺激下游基因转录, 诱导产生 EGF 或 HB-EGF; EGF 或 HB-EGF 再作用于子宫内膜上皮中各自相应受体, 产生整合素 $\alpha v \beta 3$ 及其

配体 OPN^[16]。已有研究表明, 孕激素对子宫内膜表达整合素有诱导性作用, 而雌激素则相反^[17]。此外, 孕激素在调控子宫内膜整合素 $\alpha v \beta 3$ 及 OPN 的表达, 比雌激素对二者的调控更具有重要的作用^[18]。

整合素 $\alpha v \beta 3$ 基因在反刍动物子宫内膜容受性调节中的研究较少, 对其表达调控机理尚不明了。因此本实验主要研究目的是在孕激素、雌激素单独或相互协同下, 分析子宫上皮中整合素 $\alpha v \beta 3$ 基因体外诱导差异表达的变化及作用机制, 探讨孕激素、雌激素、整合素 $\alpha v \beta 3$ 在牛子宫容受态中的联系及表达意义, 为牛子宫容受态提供体外研究模型, 也为整合素 $\alpha v \beta 3$ 是否能作为牛子宫容受态标记基因提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 子宫组织

本实验选取荷斯坦奶牛子宫组织, 取自河北省大厂县屠宰场。子宫离体后清洗干净, 于 37℃ 的生理盐水中保存备用。

1.1.2 试剂与仪器

Gibco 公司: 基础培养液 DMEM-F12、胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS)、磷酸缓冲液 DPBS; Sigma 公司: 胰蛋白酶 (TE)、TritonX-100、水溶性孕酮、雌二醇; Abcam © 公司: 角蛋白一抗、荧光二抗; 北京百泰克生物技术有限公司: $2 \times$ power Taq PCR Master-Mix; 北京化工厂: 氯仿、异丙醇、无水乙醇。

二氧化碳培养箱 (Thermo Scientific Forma 371)、4 孔板; Olympus 公司: 倒置显微镜; 北京百晶生物: 电泳槽、电泳仪电源; Bratt: 手掌离心机; 西德: 电子天平。

1.2 方法

1.2.1 牛子宫内膜组织的分离、原代培养

实验动物屠宰后, 采集子宫时要注意进行无菌操作。在操作间里, 反复清洗牛子宫至无血水。选

取一段子宫角,展开后用镊子等器械剥离出含有脂肪的子宫内膜层,剔除脂肪并得到薄且透明的组织,剪成糜状后反复清洗组织悬液数次。

取少量悬液将其均匀接种至 6 cm 的培养皿中,摇匀盘中的组织块,加入适量的 DMEM-F12 (20 % FBS)湿润组织块,最后在 37℃、浓度为 5% 的 CO₂ 培养箱中进行培养。每天应细心察看器皿中有组织块的区域,保证每 48 h 等量换液。

1.2.2 牛子宫内膜细胞传代培养与纯化

细胞长到 90% 左右时,用胰酶进行消化传代。先吸去培养液,用 DPBS 清洗,后加入 1 mL 胰酶,放入培养箱中消化 10 ~ 15 min,当在显微镜下发现细胞变圆时加入 DMEM-F12 (10% FBS)培养液终止消化。随后移入 1.5 mL EP 管中离心,离心后传到新的培养皿中,放入培养箱,每 48 h 换一次培养液。

采用差时消化的方法进行纯化。先吸去培养液,用 DPBS 清洗,加入胰酶,当细胞变圆、漂浮时,加入 DMEM-F12 (10% FBS)培养液终止消化。弃去液体,再加入新鲜培养液继续培养,每 48 h 换一次培养液。可根据细胞的生长情况进行多次纯化,直到子宫内膜上皮细胞纯度较高时即可。

1.2.3 牛子宫内膜细胞的冻存与复苏

子宫内膜培养中可选择冻存备用。冻存过程的消化过程同上,离心后加入冻存液,并转入冻存管中。在 4℃ 冰箱中放 10 min, -20℃ 中放 20 min, -80℃ 过夜,第二天放入液氮罐中长期保存。

进行细胞复苏时应先将水温度调至 37℃,将细胞从液氮罐中取出后在空中轻晃冻存管约 10 s,随后放入水浴锅中。待液体融化后移入 1.5 mL EP 管中离心,离心后加入新鲜的 DMEM-F12 (10% FBS)培养液,混匀接种到四孔板中。当子宫内膜细胞铺满约 80% 时即可进行后续实验。若细胞培养过程中成纤维细胞长得较多时,则要进行纯化处理。

1.2.4 不同浓度孕酮、雌激素、以及孕酮与雌激素协同作用下子宫内膜细胞的收集与保存

外源性添加孕酮浓度选取 10⁻⁵、10⁻⁶、10⁻⁷、10⁻⁸、10⁻⁹、10⁻¹⁰ mg/mL;外源性添加雌激素浓度选取 10⁻⁸、10⁻⁹、10⁻¹⁰、10⁻¹¹、10⁻¹² mg/mL;外源性添加雌、孕激素时选取 10⁻⁷ mg/mL 孕激素和 10⁻¹⁰ mg/mL 雌激素。

在实验前,子宫内膜细胞需要无血清饥饿 48 h,再用不含血清且有不同浓度孕酮、不同浓度雌二醇、以及含有 10⁻⁷ mg/mL 孕酮和 10⁻¹⁰ mg/mL 雌二醇的 DMEM-F12 培养 24 h。弃去废液,用 DPBS 清洗,细胞消化后移入新的 EP 管中, -80℃ 保存待提 RNA。

1.2.5 子宫内膜细胞总 RNA 的提取及相关基因表达的检测

实验引物由英潍捷基公司合成,引物相关参数见表 1。子宫内膜细胞总 RNA 的提取后以 20 μL M-MLV 逆转录酶的标准进行反转录反应体系,按照总 RNA 1 μg 反转录体系添加所需物质合成 cDNA,PCR 扩增后电泳,在凝胶成像系统下观察,拍照。

1.3 数据分析和统计学分析

用 Image J 软件对胶图进行灰度值分析,并用 SPSS 22.0 对数据进行单因素方差分析, *P* < 0.05 代表数据间差异有显著性。

表 1 引物相关参数

Tab.1 Parameters of the primers

名称 Names	退火温度 (℃) Ta	上游引物(5' - 3') Forward sequence	下游引物(5' - 3') Reverse sequence
β-actin	59	cctcgccgattcacgaaacta	actctcgttctgatccaactc
αv	59	cagcgaggactttgggaatg	tgcgccgataaacacatatg
β3	59	ggctaccgtctgtgatgaga	tctcagtcactcagccccaag

2 结果

2.1 正常传代牛子宫内膜上皮细胞

应用组织块培养法对牛子宫内膜上皮细胞进行原代培养(图 1A)。由于原代培养的子宫细胞中含有成纤维细胞,所以需要对其进行纯化处理。图 1B 中箭头所指为多次纯化后的牛子宫内膜上皮细胞,如图可见,细胞形态较好,可肉眼看见大理石纹的上皮细胞,而且数量在不断增多,可进行后续实验。

2.2 不同浓度孕酮诱导牛子宫内膜细胞中整合素 αvβ3 的差异表达

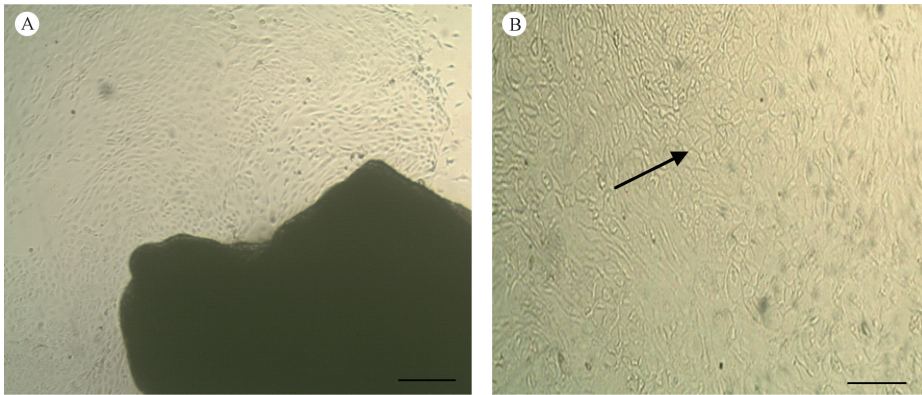
在有外源性孕激素添加时,整合素 αvβ3 的 mRNA 表达量均有不同程度的提高,且均在 10⁻⁷ mg/mL 时达到最高(图 2, *P* < 0.05)。

2.3 不同浓度雌激素诱导牛子宫内膜细胞中整合素 αvβ3 的差异表达

随着外源性雌激素浓度的添加,αv 的 mRNA 表达量不断增加,在 10⁻¹⁰ mg/mL 时表达量最高(图 3 A 和 B, *P* < 0.05);β3 的表达量逐渐降低,其中在 10⁻¹⁰ mg/mL 时表达量最低(图 3 A 和 C, *P* < 0.05)。

2.4 孕酮与雌激素共同诱导牛子宫内膜细胞中整合素 αvβ3 的差异表达

在有外源性 10⁻⁷ mg/mL 孕激素和 10⁻¹⁰ mg/mL 雌激素添加时,整合素 αv 的 mRNA 表达量显著高于对照组(图 4 A 和 B, *P* < 0.05);整合素 β3 的 mRNA 表达量亦高于对照组,但差异无显著性(图 4 A 和 C, *P* > 0.05)。

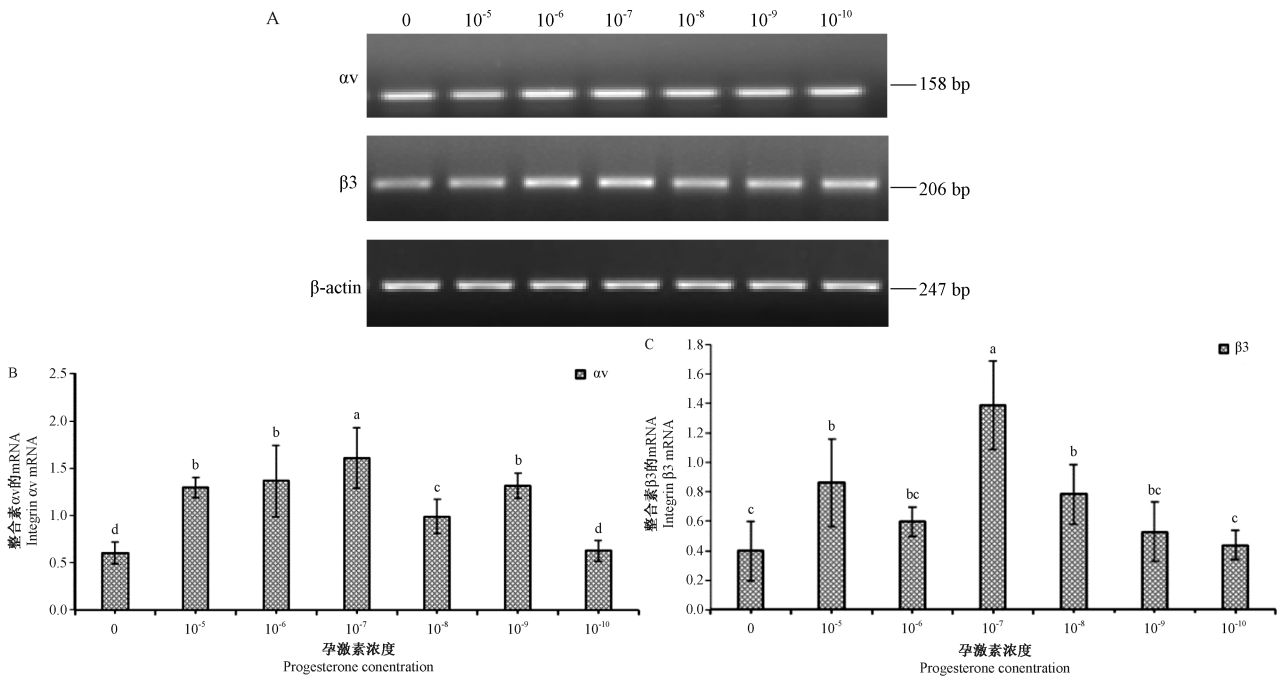


注:A:原代牛子宫内膜培养第 5 天;B:纯化后的传代牛子宫内膜细胞。

图 1 组织块培养法获得的牛子宫内膜细胞(4×10)

Note. A. A piece of primary bovine endometrial tissue was cultured for 5 days. B. Purified bovine endometrial cells after passage.

Fig. 1 Bovine endometrial cells obtained by explant culture (4×10)



注:A: αv、β3 和 β-actin RT-PCR 检验结果; B: αv 相对于 β-actin 灰度分析; C: β3 相对于 β-actin 灰度分析。不同字母表示差异有显著性 ($P < 0.05$)。

图 2 不同浓度孕激素诱导牛子宫内膜上皮细胞中 αv、β3、β-actin 的 mRNA 差异表达

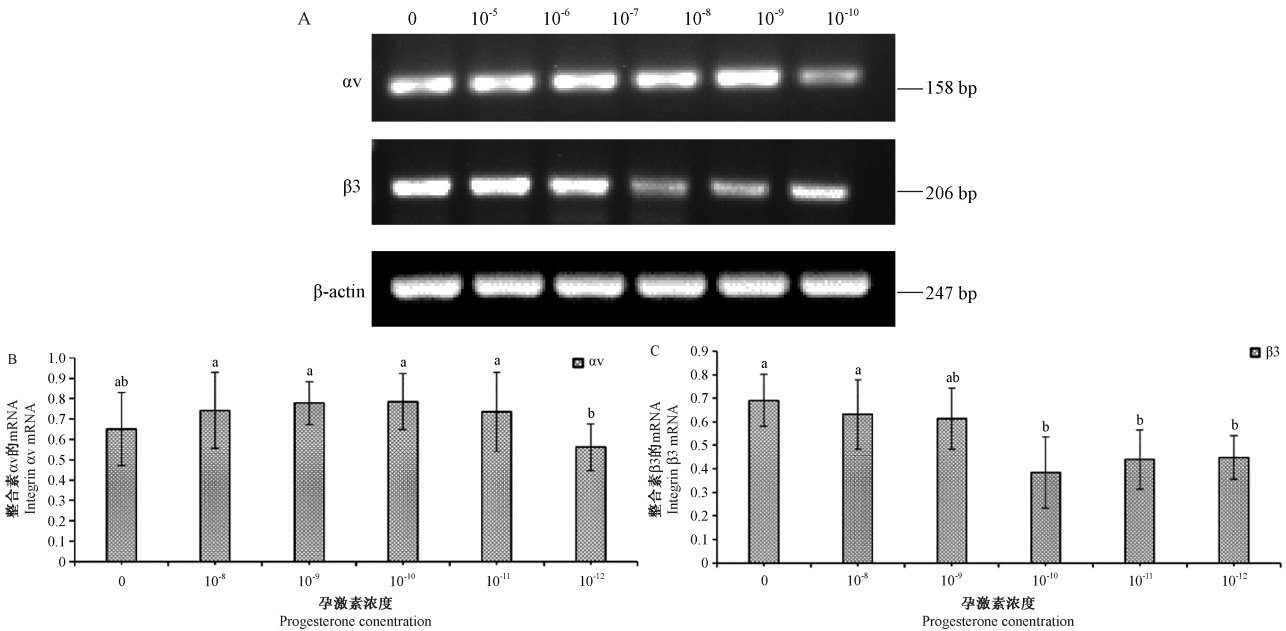
Note. A. The mRNA expressions of αv, β3 and β-actin detected by RT-PCR. B. Gray intensity of αv band versus that of β-actin band intensity. C. Gray intensity of β3 band versus that of β-actin band. Different letters indicate significant difference ($P < 0.05$).

Fig. 2 The mRNA expression of integrin αv, β3 and β-actin in bovine endometrial epithelial cells induced by different concentrations of progesterone

3 讨论

哺乳动物的胚胎植入不仅需要早期胚胎获得着床的能力,也需要子宫具有接受胚胎的能力,即胚胎必须与处于“容受”状态的子宫在时空上完全同步时,胚胎才能使着床顺利、正常妊娠以及分娩。所以

子宫内膜容受态的建立是胚胎顺利着床的关键因素之一。迄今为止,国际上针对动物早期妊娠机理方面的研究已有许多报道,发现不同动物中参与早期妊娠精确调节的因素并不完全相同。目前针对小鼠、大鼠等典型实验动物模型研究较多^[19,21],并陆续证明雌激素、孕激素、多种因子和酶类都参与各自

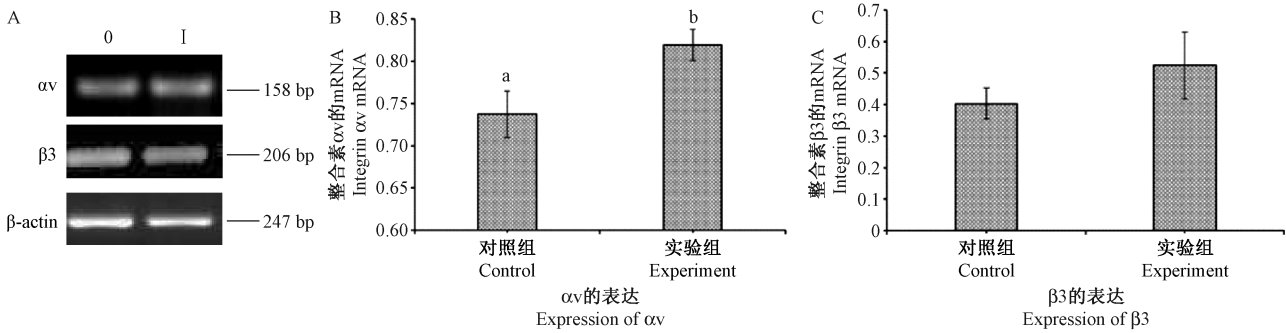


注:A: αv 、 $\beta 3$ 和 β -actin RT-PCR 检验结果;B: αv 相对于 β -actin 灰度分析;C: $\beta 3$ 相对于 β -actin 灰度分析。不同字母表示差异显著 ($P < 0.05$)。

图 3 不同浓度雌激素诱导牛子宫内膜上皮细胞中 αv 、 $\beta 3$ 、 β -actin 的 mRNA 差异表达

Note. A: The mRNA expressions of αv 、 $\beta 3$ and β -actin were tested by RT-PCR. B: Quantification of αv band intensities versus β -actin band intensities. C: Quantification of $\beta 3$ band intensities versus β -actin band intensities. Different letters mean significant difference ($P < 0.05$).

Fig. 3 The mRNA expression of integrin αv 、 $\beta 3$ and β -actin in bovine endometrial epithelial cells at different concentrations of estrogen



注:A: αv 、 $\beta 3$ 和 β -actin RT-PCR 检验结果,从左至右的各组顺序为 0、I。其中 I 是孕激素为 10^{-7} mg/mL 和雌激素为 10^{-10} mg/mL 实验组。B: αv 相对于 β -actin 灰度分析;C: $\beta 3$ 相对于 β -actin 灰度分析。不同字母表示差异有显著性 ($P < 0.05$)。

图 4 雌激素及孕激素协同作用诱导牛子宫内膜上皮细胞中 αv 、 $\beta 3$ 、 β -actin 的 mRNA 的差异表达

Note. A: The mRNA expressions of αv 、 $\beta 3$ and β -actin were tested by RT-PCR. The order from left to right is 0, I. I is the experimental group that is progesterone 10^{-7} mg/mL and estrogen 10^{-10} mg/mL. B: Gray intensities of αv band versus β -actin band intensities. C: Gray intensities of $\beta 3$ band versus β -actin band intensities. Different letters indicate significant differences ($P < 0.05$).

Fig. 4 The mRNA expression of αv 、 $\beta 3$ and β -actin in bovine endometrial epithelial cells induced by estrogen plus progesterone

体内早期胚胎的精确调节^[3,20-22]。但是,参与牛、羊等反刍家畜体内胚胎精确调节的因素与这些实验动物存在很大差别。因此,为了更好的探究激素对子宫内膜容受态的影响,建立可靠的“体外诱导模型”显得尤为重要,以期从体外角度进一步提高反刍动物体外胚胎的移植妊娠率。

子宫内膜上皮细胞的获取采用先组织块培养法后再进行消化纯化的方案。有研究学者认为用组织块培养法获得的细胞中子宫内膜基质细胞的数量较多,需要多次纯化才能得到纯度较高的子宫内膜上皮细胞,这样一来流程就变得比较繁琐^[23]。但也有研究学者通过组织块培养法所获得的子宫内膜原代

细胞,质量好效率高,而且操作简单不易污染^[24]。笔者将子宫内膜细胞经过纯化后传代得到形态良好且纯度较高的子宫内膜上皮细胞,并用于后续实验。

整合素 $\alpha v \beta 3$ 因为参与上皮的蜕膜作用从而对胚胎的黏附有利,促进着床的顺利进行,被认为是“种植窗”开放的标志物^[25]。“种植窗”期的子宫内膜中,整合素 $\alpha v \beta 3$ 受甾体激素的调控。程琰等^[26]研究表明雌激素、孕激素能调节整合素 $\alpha v \beta 3$ 在子宫内皮细胞中的表达。对于反刍动物,特别是牛子宫内皮细胞中整合素 $\alpha v \beta 3$ 与甾体类激素研究的相关报道很少。在本实验中,外源性加入不同浓度孕激素能使牛子宫内皮细胞中整合素 $\alpha v \beta 3$ 的表达量升高,而外源性加入不同浓度雌激素均会抑制 $\beta 3$ 的表达。就目前研究而言,胚胎着床前孕激素对子宫内膜中整合素 $\alpha v \beta 3$ 的表达有诱导促进作用,而雌激素则有相反作用。宋凤丽等^[27]用雌激素单独作用人子宫内膜癌细胞时,整合素 $\beta 3$ mRNA 及蛋白的表达显著下降;而孕激素单独应用对整合素 $\beta 3$ 表达无明显影响。由此可见,整合素 $\alpha v \beta 3$ 的分泌是受雌激素和孕激素影响的。

以往的研究证实了在“种植窗”期,孕激素能诱导整合素在子宫内膜上的表达,雌激素则抑制其表达,雌、孕激素同时能对整合素 $\alpha v \beta 3$ 产生周期性表达。杨海燕等^[28]研究表明随子宫内膜分泌期的推进,整合素 $\alpha v \beta 3$ 及其配体 OPN 的表达量也逐渐表达完全。在雌、孕激素协同组中,外源性加入 10^{-7} mg/mL 孕激素以及 10^{-10} mg/mL 雌激素能促进整合素 $\alpha v \beta 3$ 的表达量上调。Raheem KA 等^[29]用 10 ng/mL 孕酮和 100 pg/mL 雌激素同时作用于绵羊子宫内皮细胞,发现能使 MUC-1 表达含量上调,且差异显著。Apparao KB 等^[30]研究表明雌激素单独作用可抑制整合素 $\alpha v \beta 3$ 的配体 OPN 的表达,但孕、雌激素联合使用却可增强其表达。这些结果都为体外诱导体系提高反刍动物体外胚胎的移植妊娠率提供了新的参考依据。

总而言之,子宫容受性的建立非常繁琐复杂,建立过程中涉及无数基因的表达与调控。因此,只有明确子宫内膜容受性的标志物及其表达规律,了解其调控机制才能更好的解决体外胚胎移植妊娠率普遍偏低的问题。本实验主要集中于在胚胎着床前,研究雌、孕激素对子宫内膜上皮细胞中整合素 $\alpha v \beta 3$ 基因的表达差异及在子宫内皮细胞容受态中的联系。本实验的研究结果为牛子宫容受态的研究提供了一定

的依据及体外研究模型,同时也证实整合素 $\alpha v \beta 3$ 可以作为评判牛子宫容受态的一个标记基因。

参 考 文 献 (References)

- [1] Achache H, Revel A. Endometrial receptivity markers, the journey to successful embryo implantation [J]. *Human Reprod Update*, 2006, 12(6): 731–741.
- [2] Paria BC, Reese J, Das SK, et al. Deciphering the cross-talk of implantation: advances and challenges [J]. *Science*, 2002, 296(5576): 2185–2188.
- [3] Spencer TE, Sandra O, Wolf E. Genes involved in conceptus-endometrial interactions in ruminants: insights from reductionism and thoughts on holistic approaches [J]. *Reproduction*, 2008, 135(2): 165.
- [4] Tani T, Kato Y, Tsunoda Y. Direct exposure of chromosomes to nonactivated ovum cytoplasm is effective for bovine somatic cell nucleus reprogramming [J]. *Biol Reprod*, 2001, 64: 324–330.
- [5] Du F, Sung LY, Tian XC, Yang X. Differential cytoplasm requirement for embryonic and somatic cell nuclear transfer in cattle [J]. *Mol Reprod Dev*, 2002, 63: 183–191.
- [6] Stepto NK, Cassar S, Joham AE, et al. Women with polycystic ovary syndrome have intrinsic insulin resistance on euglycaemic-hyperinsulinaemic clamp [J]. *Human Reprod*, 2013, 28(3): 777–784.
- [7] Pedersen HG, Schmidt M, Sangild PT, et al. Clinical experience with embryos produced by handmade cloning: work in progress [J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2005, 234: 137–143.
- [8] Misica-Turner PM, Oback FC, Eichenlaub M, et al. Aggregating embryonic but not somatic nuclear transfer embryos increases cloning efficiency in cattle [J]. *Biol Reprod*, 2007, 76: 268–278.
- [9] Iager AE, Ragina NP, Ross PJ, et al. Trichostatin A improves histone acetylation in bovine somatic cell nuclear transfer early embryos [J]. *Cloning Stem Cells*, 2008, 10: 371–380.
- [10] Hill JR, Schlafer DH, Fisher PJ, et al. Abnormal expression of trophoblast major histocompatibility complex class I antigens in cloned bovine pregnancies is associated with a pronounced endometrial lymphocytic response [J]. *Biol Reprod*, 2002, 67: 55–63.
- [11] Heyman Y, Chavatte-Palmer P, Le Bourhis D, et al. Frequency and occurrence of late-gestation losses from cattle cloned embryos [J]. *Biol Reprod*, 2002, 66: 6–13.
- [12] MacIntyre DM, Lim HC, Ryan K, et al. Implantation-associated changes in bovine uterine expression of integrins and extracellular matrix [J]. *Biol Reprod*, 2002, 66(5): 1430–1436.
- [13] Zeiler M, Leiser R, Johnson GA, et al. Development of an in vitro model for bovine placentation: a comparison of the in vivo and in vitro expression of integrins and components of extracellular matrix in bovine placental cells [J]. *Cells Tissues Organs*, 2007, 186: 229–242.
- [14] Laird SM, Tuczerman EM, Li TC. Cytokine expression in the en-

- dometrium of women with implantation failure and recurrent miscarriage [J]. Reprod Biomed Online, 2006, 13(1): 13–23.
- [15] 郭艺红, 孙莹璞, 乔玉环, 等. 不同用药方案对小鼠种植窗期子宫内膜白血病抑制因子及包饮突表达的影响 [J]. 郑州大学学报(医学版), 2010, 45(2): 202–206.
- Guo YH, Sun YP, Qiao YH, et al. Expression of LIF and Pinopodes in mouse endometrium during the implantation window based on different treatment protocols. [J]. J Zhengzhou Univ (Med Sci), 2010, 45(2): 202–206.
- [16] Lessey BA. Two pathways of progesterone action in the human endometrium implications for implantation and contraception [J]. Steroids, 2003, 68(10–13): 809–815.
- [17] Weber GF. The metastasis gene osteopontin: a candidate target for cancer therapy [J]. Biochim Biophys Acta, 2002, 1552(2): 61–85.
- [18] Peyghambari F, Salehnia M, Forouzanmehr Moghadam M, et al. The correlation between the endometrial integrins and osteopontin expression with pinopodes development in ovariectomized mice in response to exogenous steroids hormones [J]. Iran Biomed J, 2010, 14(3): 109–119.
- [19] Hantak AM, Baqchi IC, Baqchi MK. Role of uterine stromal-epithelial crosstalk in embryo implantation [J]. Int J Dev Biol, 2014, 58(2–4): 139–146.
- [20] Wang H, Dey SK. Roadmap to embryo implantation: clues from mouse models [J]. Nat Rev Genet, 2006, 7(3): 185–199.
- [21] Melford SE, Taylor AH, Konje JC. Of mice and (wo)men: factors influencing successful implantation including endocannabinoids [J]. Hum Reprod Update, 20(3): 415–428.
- [22] Bazer FW, Burghard RC, Spencer TE, et al. Interferons and progesterone for establishment and maintenance of pregnancy: interactions among novel cell signaling pathways [J]. Reprod Biol, 2008, 8(3): 179–211.
- [23] 赵诚悦, 马红, 郭镇华, 等. 猪子宫内膜基质细胞和腺上皮细胞的分离培养 [J]. 吉林农业大学学报, 2013, 35(4): 471–474.
- Zhao YC, Ma H, Guo ZH, et al. Isolation and culture of stromal cells and gland epithelial cells of endometrium in pig [J]. J Jilin Agric Univ, 2013, 35(4): 471–474.
- [24] Standerholen FB, Myromslien FD, Kommisrud E, et al. Comparison of electronic volume and forward scatter principles of cell selection using flow cytometry for the evaluation of acrosome and plasma membrane integrity of bull spermatozoa [J]. Cytometry A, 2014, 85A: 719–728.
- [25] 张瑜, 惠宁. 米非司酮对子宫内膜作用的研究进展 [J]. 中国医药导报, 2012, 9(2): 16–18.
- Zhan Y, Hui N. Research progress of Mifepristone on endometrium [J]. Chin Med Herald, 2012, 9(2): 16–18.
- [26] 程琰, 胡蓉, 马开东, 等. 滋养细胞分泌 14–3–3 τ 蛋白对子宫内膜基质细胞表达整合素 $\alpha v \beta 3$ 蛋白的影响 [J]. 复旦学报(医学版), 2009, 36(5): 505–509.
- Cheng Y, Hu R, Ma KD, et al. Effects of 14–3–3 τ protein secreted by human trophoblast cells on the expression of integrin $\alpha v \beta 3$ protein in human endometrial stromal cells [J]. Fudan Univ J Med Sci, 2009, 36(5): 505–509.
- [27] 宋凤丽, 殷莉, 刘雪梅, 等. 雌激素和孕激素及肝素结合表皮生长因子对子宫内膜癌细胞中整合素 $\beta 3$ 表达的调节 [J]. 医药导报, 2005, 24(7): 562–565.
- Song FL, Yin L, Liu XM, et al. Regulation of integrin $\beta 3$ expression in endometrial carcinoma cells by estrogen, progesterone and heparin binding epidermal growth factor [J]. Herald Med, 2005, 24(7): 562–565.
- [28] 杨海燕, 倪吴花, 余蓉. 子宫内膜骨桥蛋白和整合素 $\alpha v \beta 3$ 表达与 IVF-ET 反复种植失败的关系. [J]. 实用医学杂志, 2011, 27(17): 3127–3129.
- Yang HY, Ni WH, Yu R. Expression of osteopontin and integrin $\alpha v \beta 3$ in endometrium and their correlation with recurrent implantation failure in IVF-ET [J]. J Practical Med, 2011, 27(17): 3127–3129.
- [29] Raheem KA, Marei WFA, Campbell BK, et al. *In vivo* and *in vitro* studies of MUC1 regulation in sheep endometrium [J]. Theriogenology, 2016, 85(9): 1635–1643.
- [30] Apparao KB, Murray MJ, Fritz MA, et al. Osteopontin and its receptor $\alpha v \beta 3$ integrin are coexpressed in the human endometrium during the menstrual cycle but regulated differentially [J]. J Clin Endocrinol Metab, 2001, 86(10): 4991–5000.

[收稿日期] 2017–10–09