生殖生理与胚胎着床 DOI:10.13406/j.cnki.cyxb.001337

Mmu-miR-24对小鼠着床期子宫内膜基质细胞和蜕膜细胞的调节作用

杨 洋[1],吴梦云[1],李 荣[2],王应雄[1],刘学庆[1]
(1. 重庆医科大学公共卫生与管理学院生殖生物研究室,重庆 400016;2. 重庆医科大学附属第一医院妇产科,重庆 400016)

【摘 要】**目的**:探讨 mmu-miR-24 在小鼠子宫内膜基质细胞和蜕膜细胞中的作用。**方法**:收集妊娠第 1、4、5、6 天(D_1、D_4、D_5、D_6)的小鼠子宫;分离小鼠基质细胞,体外激素人工诱导蜕膜化。实时定量 PCR(real-time quantitative PCR,qRT-PCR)、原位杂交(in situ hybridization,ISH)以及蛋白印迹(Western blot)检测 mmu-miR-24 及相应因子的表达。采用脂质体 2000 转染 mmu-miR-24 模拟物(mimics)及抑制物(inhibitor)模型上调或下调 mmu-miR-24 表达后,检测细胞凋亡与细胞周期。**结果**:mmu-miR-24 在 D_1 高表达,且表达量高于 D_4(P=0.003)。mmu-miR-24 在 D_4 的腔上皮、腺上皮及少量基质细胞中表达,而在妊娠第 5 天着床点(D_5 implantation site,D_5IS)及妊娠第 6 天着床点(D_6IS)的蜕膜区表达,且 D_5IS 的表达量高于第 5 天着床旁(D_5 inter-implantation site,D_5IIS)的表达量,但无统计差异(P=0.094)。在基质细胞中,mimics 干扰后,S 期的细胞数降低(P=0.000),增殖因子 PCNA 表达降低,总凋亡细胞数目增加(P=0.042),凋亡因子 BAX 表达增高;通过 inhibitor 干扰后,G1 期细胞数降低(P=0.005),S 期与 G2 期细胞数有所升高(P=0.075,P=0.054),PCNA 表达增多,晚期凋亡细胞数目减少(P=0.009),BAX 表达降低。在蜕膜细胞中,mimics 干扰后,与对照组相比,G1 期细胞数升高(P=0.002),S 期细胞数降低(P=0.000),PCNA 表达降低,晚期凋亡细胞数目增加(P=0.025),BAX 表达增多;inhibitor 干扰后,与对照组相比,S 期细胞数升高(P=0.026),PCNA 表达增多;晚期凋亡细胞数目减少(P=0.006),BAX 表达降低。**结论**:在胚胎植入前,mmu-miR-24 的低表达可促进基质细胞的增殖;在胚胎植入期,mmu-miR-24 的高表达可促进蜕膜细胞凋亡,有利于妊娠的维持。

【关键词】mmu-miR-24;胚胎植入;蜕膜化;细胞凋亡;细胞增殖
【中图分类号】R714.13 【文献标志码】A 【收稿日期】2017-04-01

Effect of Mmu-miR-24 on endometrial stromal and decidual cells during early pregnancy in mice

Yang Yang[1], Wu Mengyun[1], Li Rong[2], Wang Yingxiong[1], Liu Xueqing[1]
(1. Laboratory of Reproductive Biology, School of Public Health and Management; Chongqing Medical University; 2. Department of Obstetrics and Gynecology, The First Affliated Hospital of Chongqing Medical University)

【Abstract】***Objective***: To explore the effect of microRNA-24(mmu-miR-24) in endometrial stromal cells during early pregnancy in mice. ***Methods***: Uterus tissues were collected on pregnancy of day 1,4,5,6(D_1,D_4,D_5,D_6). The expressions of mmu-miR-24 and other factors were detected by real-time quantitative PCR(qRT-PCR), in situ hybridization, and Western blot. The primary stromal cells were induced by estradiol(E2) and progesterone(P4) for decidulization. Flow cytometry was implemented to detect cell cycle and cell apoptosis. ***Results***: The expression of mmu-miR-24 was detected in uterine luminal, glandular epithelium, and stromal cell on Day 4. The expression level of mmu-miR-24 on D_5IS was higher than the level on D_5IIS. On D_5IS and D_6IS, mmu-miR-24 was located in decidual zone. When mmu-miR-24 mimics being incorporated into stromal cells, the number of stromal cells in the S phase was decreased, the expression of PCNA was decreased, the total apoptotic cell was increased, and the expression of BAX was increased. In contrast, when mmu-miR-24 inhibitor being incorporated into stromal cells, the number of stromal cells in G1 phase and S phase were decreased and increased respectively, and PCNA expression level was increased, the number of non-viable apoptotic cell was decreased, and BAX level was decreased in stormal cells. On the other hand, when incorporating mmu-miR-24 mimics into the decidual cells, the number of decidual cells in the S phase was decreased, and PCNA expression level was decreased, the number of non-viable apoptotic cell was increased, and BAX level was increased in decidual cells. Lastly, when treating decidual cells with mmu-miR-24 inhibitor, the number of decidual cells in the S phase was increased, and PCNA expression level was in-

作者介绍:杨 洋,Email:834023516@qq.com,
研究方向:胚胎着床及其发育分子研究机制。
通信作者:刘学庆,Email:cqmu_liuxueqing@126.com。
基金项目:国家自然科学基金青年基金资助项目(编号:31501207)。
优先出版:http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1046.r.20170623.1048.002.html (2017-06-23)

creased, the number of non-viable apoptotic cell was decreased, and BAX level was decreased in decidual cells. ***Conclusion***: The low expression of mmu-miR-24 in stromal cells may promote the progress of cell proliferation. The high expression of mmu-miR-24 in decidual cells may promote the progress of cell apoptosis during decidulization.

【Key words】mmu-miR-24; embryo implantation; decidulization; cell proliferation; cell apoptosis

母-胎间相互交流是维持成功妊娠的基础，在胚胎着床前的第 4 天(D_4)，子宫内膜基质细胞显著增殖为随后的胚胎着床提供条件[1-4]。随着胚胎的植入，子宫内膜基质细胞开始分化，形成具有特殊功能的蜕膜细胞[5-6]，从而为胚胎提供营养以及对随后胎盘的形成具有重要意义[7]。子宫内膜细胞蜕膜化异常将导致胚胎植入失败、胚胎吸收，并导致妊娠失败[8]。已有研究表明，一些细胞因子在植入前的基质细胞中表达，参与调控基质细胞增殖与蜕膜化的进程，如 Hoxa10 等[9-10]。近年来，一些研究也发现 microRNA(miRNA)参与了胚胎着床的调控过程[11-12]。miRNA 是一类小分子 RNA，通过与靶 mRNA 的 3' 端非翻译区(3'-UTR)完全或部分互补结合，引起靶 mRNA 降解或转录后翻译抑制而调控靶基因的表达[13]。目前已发现一些 miRNA 在胚胎植入"窗口期"和子宫内膜蜕膜化过程中存在表达差异[14]，如 miR-98 在大鼠子宫内膜机制细胞中低表达时，可促进细胞增殖，高表达时抑制细胞增殖，促进细胞凋亡[13]。在基质细胞中，miR-29a 可能靶向促凋亡因子，从而抑制基质细胞的凋亡[15]。miR-24 主要通过调控细胞的增殖和凋亡，抑制肿瘤细胞生长[16-17]。有研究发现在反复流产的病人中，miR-24 在蜕膜组织中低表达[18]，故本研究推测其可能通过调控基质细胞或蜕膜细胞的增殖和凋亡，影响妊娠过程。

1 方法与材料

1.1 动物与材料

昆明小鼠(6~8 周龄，25~30 g)饲养于重庆医科大学动物实验中心。人工条件下饲养，室温 22 ℃，可自由进食与饮水。雌鼠与雄鼠合笼，次日见雌鼠阴道栓者为妊娠第 1 天(D_1)。尾静脉注射 0.4%胎盘蓝，从而区分植入点与植入旁[19]。

1.2 RNA 的提取与实时定量

子宫组织或细胞中提取总 RNA，按 TRIzol 试剂盒说明书步骤进行；cDNA 逆转录试剂盒进行逆转录。引物序列见表 1。使用 ABI 热循环仪 7500 进行扩增。热循环条件为 95 ℃预变性 30 s，40 个热循环(95 ℃，持续 5 s，60 ℃，30 s)；BIO 公司的 iQ5 RT-PCR 软件分析数据，Graphpad 5.0 软件作图。提取 3 个独立样本。

1.3 原位杂交

收集小鼠子宫，固定于 4%多聚甲醛，梯度脱水，二甲苯透明，包埋，切片，二甲苯中脱蜡。为降低背景，乙酰化标本 5 min，PBS 清洗。1×蛋白酶 K 37 ℃消化 8 min，PBA 清洗。滴加 100 μL 预杂交液，52 ℃预杂交 3 h，去多余液体。配制 mmu-miR-24/Scramble 探针杂交工作液(探针浓度 40 μmol/L)，85 ℃变性探针杂交工作液 5 min，冰浴 1 min，滴加探针杂交工作液，加盖盖玻片，52 ℃杂交过夜。5×SSC，2×SSC，0.2×SSC 溶液清洗。37 ℃封闭 30 min，甩去多余液体。兔抗地高辛-BSA(1:50 稀释)，37 ℃孵育 60 min，PBS 清洗。AP-羊抗兔 IgG (1:50 稀释)37 ℃孵育 60 min，PBS 清洗。滴加 NBT/BCIP 显色液 15 min 后，核固红复染 2 min，自来水冲洗。梯度乙醇脱水，二甲苯透明，封片。

表 1 qRT-PCR 引物序列

Tab.1 Primers sequence for qRT-PCR

基因或 microRNA	引物序列(5→3)
Mmu-miR-24	RT引物：GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATT CGCACTGGATACCTGTTCGTGCAGGGTCCGAGGT
	正义链：TGGCTCAGTTCAGCAGGAACAG
	反义链：GTGCAGGGTCCGAGGT
U6	RT 引物：CGCTTCACGAATTTGCGTGTCAT
	正义链：GCTTCGGCAGCACATATACTAAAAT
	反义链：CGCTTCACGAATTTGCGTGTCAT
Dtprp	正义链：AGCCAGAAATCACTGCCACT
	反义链：TGATCCATGCACCCATAAAA
β-actin	正义链：TCCTATGTGGGTGACGAGGC
	反义链：TACATGCCTGGGGTGTTGAAGTCT

1.4 细胞免疫荧光染色

细胞经冰甲醇溶液室温固定 12 min，PBS 洗 3 次，1% Triton X-100 孵育 10 min，PBS 洗 3 次，用 5%BSA 溶液室温封闭 1 h。孵育抗 Vimentin 抗体(1:200)，4 ℃孵育过夜。复温，PBS 洗 3 次。后加入 FITC 标记的 IgG 二抗，室温孵育 1 h，PBS 洗 3 次。最后加入 DAPI(1:1 000)溶液复染细胞核 10 min，PBS 洗 2 次，荧光显微镜下观察细胞荧光信号。

1.5 细胞培养与转染及体外人工诱导蜕膜化

小鼠断头处死后取子宫，然后将子宫纵向剪开，剪为 2~5 mm 小块，在培养皿中加含 0.5%胰酶及 6 mg/mL 中性蛋白酶Ⅱ的混合液，4 ℃消化 2 h，37 ℃消化 30 min。然后吹打组织使之产生丝状后，离心 5 min，去上清，加入 0.5%胶原酶Ⅱ溶液，37 ℃消化 30 min。消化后的细胞悬液依次经 70 目的细胞筛、HBSS 洗涤、离心后去上清液，接种。培养基含 10%的胎牛血清及 10 U/mL 青霉素-链霉素溶液，培养 1 h 后换液，在 37 ℃和 5%CO_2 的条件下培养。Vimentin 免疫荧光染色鉴定基质细胞纯度。

细胞转染按试剂说明书步骤进行，子宫内膜细胞通过 miRNA-24mimics-lipo2000(工作浓度 50 nmol/L)及 inhibitor-lipo2000(工作浓度 100 nmol/L)转染。取对数生长期细胞，无

血清培养基清洗细胞 2 次，加入预先配好的转染复合物，培养箱中孵育 6 h 后，更换培养基，培养箱中继续培养，48 h 后收获细胞。加入 10 nmol/L 雌二醇(Sigma-Aldrich)及 1 μmol/L 孕酮(Sigma-Aldrich)进行小鼠基质细胞蜕膜化诱导，48 h后，按上述转染步骤继续做细胞实验。

1.6 流式细胞术检测细胞凋亡与细胞周期

细胞经 PBS 洗 2 遍，用胰酶消化，并收集；加入 70%预冷乙醇，4 ℃固定过夜(12 h 以上)；去乙醇，PBS 洗涤；离心，1 000 r/min，5 min；0.5 mL PBS 重悬细胞，加入 PI(碘化丙啶)和 RNase A 至终浓度 50 μg/mL；37 ℃水浴 30 min；避光；BD 流式细胞仪检测，并通过 PI 通道检测细胞周期各时期比例变化。

细胞经 PBS 洗 2 遍，用胰酶消化，去胰酶溶液，PBS 清洗，离心，去上清液。用 200 μL 含 5 μL Annexin V-FITC 的染料，混匀，4 ℃孵育 30 min。加入 PI 染料，孵育 10 min，用 300 目铜网过滤，1 h 后流式细胞仪检测细胞凋亡。

1.7 蛋白印迹

蛋白通过裂解液和蛋白酶抑制剂混合液共同提取。使用 BCA 试剂盒测得蛋白的浓度。以 20 μg/孔的蛋白样品进行电泳，之后转移到 PVDF 膜上转膜。用脱脂牛奶封闭，加入一抗 4 ℃过夜。PCNA(1:500)BAX(1:500)。PBST(PBS 溶液中加入吐温)洗 3 次，孵二抗 1 h，PBST 清洗 3 次。条带进行化学发光反应，BIO-RAD 凝胶成像仪拍照。

1.8 统计分析

使用 SPSS 17.0 统计软件及 Graphpad 5.0 软件进行数据分析及作图，采用 t 检验进行两组计量资料比较；采用单因素方差分析对多组数据统计分析，同时采用 LSD-t 进行组间多重比较，定量数据以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。检验水准 α=0.05。

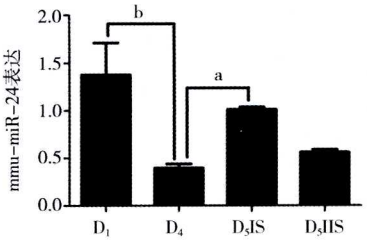
2 结 果

2.1 mmu-miR-24 在早孕阶段的表达

通过 qRT-PCR 检测 mmu-miR-24 在 D_1、D_4、D_5 着床点(implantation site，IS)及 D_5 着床旁(inter-implantation site，IIS)的表达，采用单因素方差分析，其结果具有差异(F=6.990，P=0.013)。且 mmu-miR-24 在 D_1 高表达，且表达量高于D4，具有统计学差异[(1.379 ± 0.335)，(0.395 ± 0.441)；P=0.003]；mmu-miR-24 在 D_5IS 的表达量高于 D_4[(1.014 ± 0.025)，(0.395 ± 0.441)；P=0.032]；D5IS 的表达量高于 D_5IIS，但无统计学差异[(1.014 ± 0.025)，(0.560 ± 0.029)；P=0.094](图1A)。原位杂交结果显示 mmu-miR-24 在 D_4 表达于腔上皮和腺上皮以及少量的基质细胞中、D_5IS 的初级蜕膜区以及 D6IS 的次级蜕膜区(图 1B)。

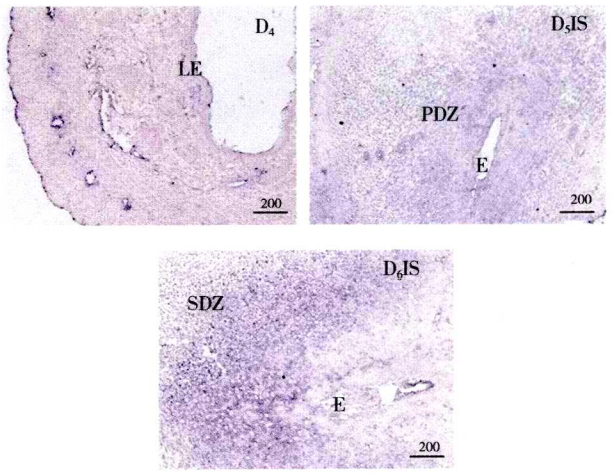
2.2 mmu-miR-24 对基质细胞的调控作用

分离 D_4 小鼠子宫内膜基质细胞，采用 mmu-miR-24 mimics 以及 inhibitor 体外调控其表达，从而探究 mmu-miR-24 对子宫内膜细胞的调节。检测 Vementin 免疫荧光分析基质细胞纯度，结果显示细胞纯度较高(图 2A)。Mimics(pre-mmu-miR-24 组)干扰后，发现 mmu-miR-24 的表达量明显高于对照组[(1.29 ± 0.781)，(0.949 ± 0.419)；t=3.852；P=0.018](图 2B)。Inhibitor(anti-mmu-miR-24 组)干扰后，mmu-miR-24 的表达量明显低于对照组[(5.287 ± 0.836)，(1.859 ± 0.497)；t=3.524；P=0.024](图 2C)。在 pre-mmu-miR-24 干扰组，流式细胞术检测发现 G1 期的细胞数明显高于对照组(P=0.003)，S 期的细胞数明显减少(P=0.000)(图 2D)；细胞增殖标志物 PCNA 明显降低(图 2H)。同时总凋亡细胞数增加(P=0.042)(图 2F)，凋亡因子 BAX 表达升高(图 2J)。anti-mmu-miR-24 干扰组 G1 期的细胞数明显低于对照组(P=0.005)，G2 期与 S 期的细胞数明显增多(P=0.008；P=0.054)(图 2E)，PCNA 表达升高(图 2I)且晚期与总凋亡细胞数降低(P=0.009；P=0.011)(图 2G)，BAX 表达降低(图 2K)。



D_1 与 D_4 以及 D4 与 D5IS 相比，a：P<0.05；b：P<0.05

A. RT-PCR 检测 mmu-miR-24 的表达



LE：腔上皮；PDZ：初级蜕膜区；SDZ：次级蜕膜区；E：胚胎

B. ISH 检测 mmu-miR-24 在小鼠早孕子宫内膜的表达

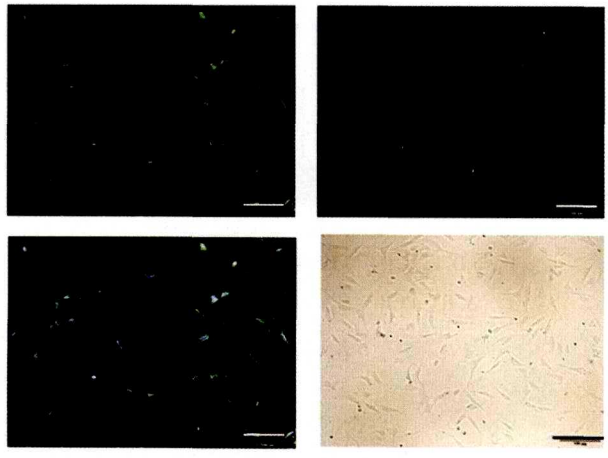
图 1 miRNA-24 在早孕小鼠子宫内膜中的表达

Fig.1 Expression of mmu-miR-24 in the uteri during early pregnancy

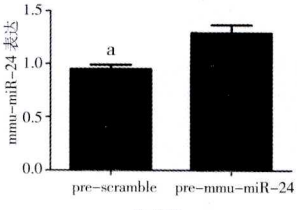
2.3 mmu-miR-24 在蜕膜细胞中的调控作用

qRT-PCR 检测蜕膜化标志物 dtprp[20]显示诱导蜕膜化模型成功建立[(0.097 ± 0.019)，(21.240 ± 0.173)；t=121.2；P=0.000](图 3A)。mmu-miR-24 在诱导蜕膜化组明显高于对照组[(1.001 ± 0.087)，(0.659 ± 0.721)；t=3.009；P=0.040](图 3B)。通过 mmu-miR-24 mimics 与 inhibitor 来上调或敲降 mmu-miR-24 表达，发现其表达量在 pre-mmu-miR-24 组明显高于对照组[(1.385 ± 0.096)，(0.948 ± 0.042)；t=4.167；

P=0.014]（图 3C）；其表达量在 anti-mmu-miR-24 干扰组明显低于对照组（0.449 ± 0.012），1.15 ± 0.136；t=5.095；P=0.007）（图3D）。在pre-mmu-miR-24 组，上调 mmu-miR-24 可明显升高 G1 期的细胞数（P=0.002），S 期的细胞数明显减少（P=0.000）（图3E），PCNA 表达降低（图 3I）；增加晚期蜕膜细胞凋亡细胞数（P=0.025）与总凋亡细胞数（P=0.023）（图 3G），BAX 表达升高（图 3K）。表明上调 mmu-miR-24 可抑制蜕膜细胞的增殖，促进蜕膜细胞凋亡。在 anti-mmu-miR-24 组，下调 mmu-miR-24，可明显使 G2 期与 S 期的细胞数增多（P=0.020；P=0.026），PCNA 表达升高（图 3J）；且降低晚期蜕膜细胞凋亡数（P=0.006）（图 3H），BAX 表达降低（图 L）。

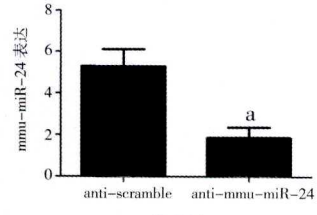


A. 通过免疫荧光检测基质细胞的标志物 Vimentin 以及光镜下基质细胞形态



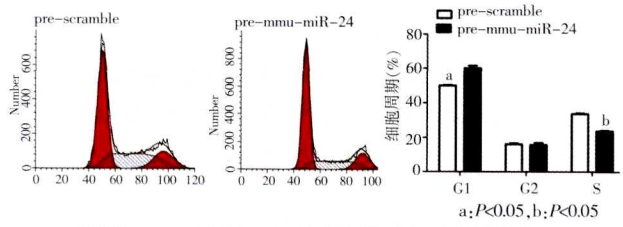
a：P<0.05

B. mmu-miR-24 mimics 转染后，qRT-PCR 检测 miR-24 的表达



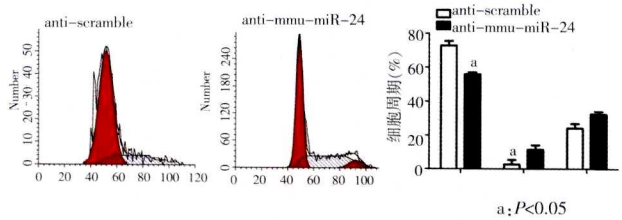
a：P<0.05

C. 转染 mmu-miR-24 inhibitor 后，通过 RT-PCR 检测 miR-24 的表达



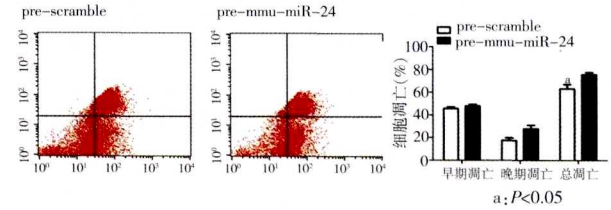
a：P<0.05，b：P<0.05

D. 转染 mmu-miR-24mimics 后，通过流式细胞检测细胞周期



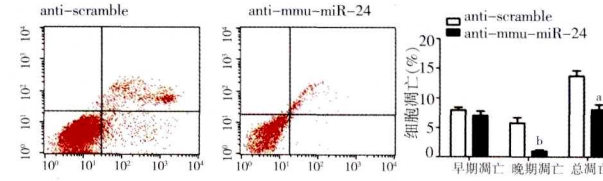
a：P<0.05

E. 转染 mmu-miR-24 inhibitor 后，通过流式细胞检测细胞周期



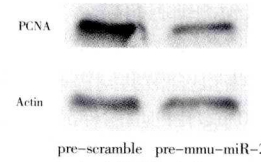
a：P<0.05

F. 转染 mmu-miR-24-24 mimics 后，通过流式细胞检测细胞凋亡

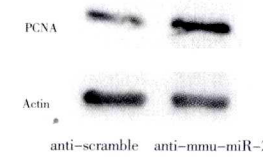


a：P<0.05；b：P<0.05

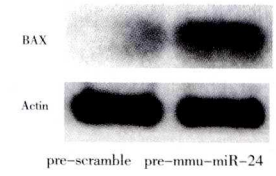
G. 转染 mmu-miR-24inhibitor 后，通过流式细胞检测细胞凋亡



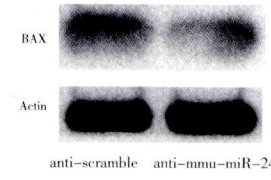
H. 细胞增殖标志物 PCNA 蛋白印迹结果



I. 细胞增殖标志物 PCNA 蛋白印迹结果



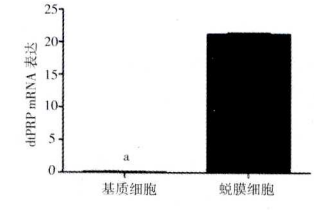
J. 细胞凋亡标志物 BAX 蛋白印迹结果



K. 细胞凋亡标志物 BAX 蛋白印迹结果

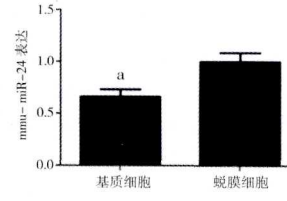
图 2　mmu-miR-24 在子宫内膜基质细胞的调节作用

Fig.2　Regulatory role of mmu-miR-24 in stromal cell



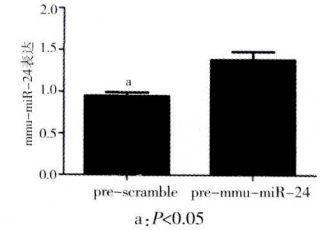
a：P<0.05

A. 通过 RT-PCR 检测蜕膜化的标志物 dtprp



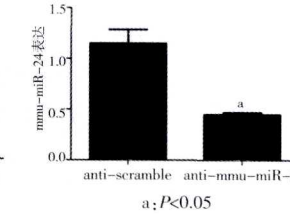
a：P<0.05

B. 通过 RT-PCR 检测蜕膜细胞中的 mmu-miR-24 的表达



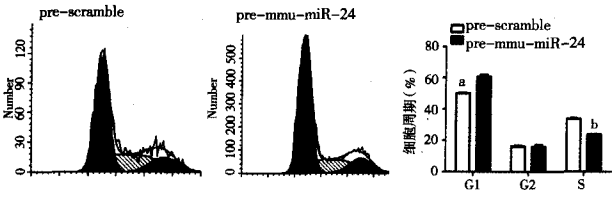
a：P<0.05

C. 转染 mmu-miR-24 mimics 后，通过 RT-PCR 检测 miR-24 的表达

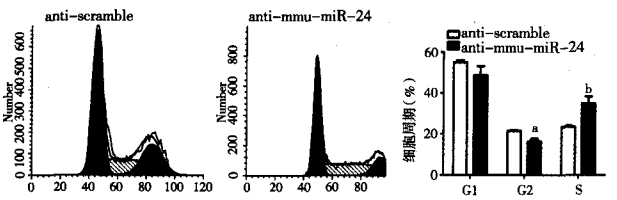


a：P<0.05

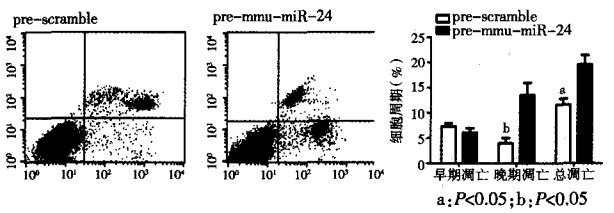
D. 转染 miR-24 inhibitor 后，通过 RT-PCR 检测 miR-24 的表达



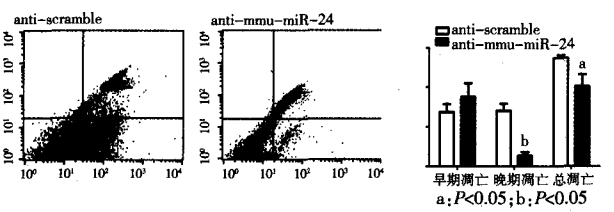
E. 转染 mmu-miR-24mimics 后，通过流式细胞检测细胞周期



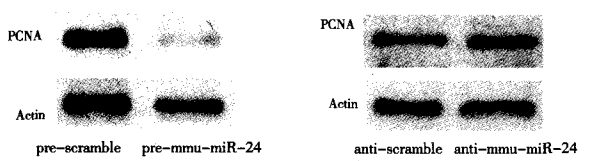
F. 转染 mmu-miR-24 inhibitor 后，通过流式细胞检测细胞周期



G. 转染 mmu-miR-24 mimics 后，通过流式细胞检测细胞凋亡

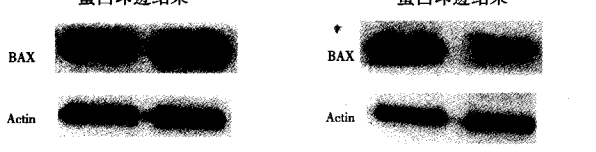


H. 转染 mmu-miR-24 inhibitor 后，通过流式细胞检测细胞凋亡



I. 检测增殖标志物 PCNA 蛋白印迹结果

J. 检测增殖标志物 PCNA 蛋白印迹结果



K. 检测凋亡标志物 BAX 蛋白印迹结果

L. 检测凋亡标志物 BAX 蛋白印迹结果

图 3　mmu-miR-24 在子宫内膜蜕膜细胞中的调节作用

Fig.3　Regulatory role of miR-24 in decidual cel

3　讨　论

在小鼠早孕期 D_1 由于 E2 刺激，D_1 的腔上皮增殖[21]。在 D_4，子宫内膜基质细胞开始大量增殖，腔上皮开始从增殖状态转变为分化状态[22-23]，为“窗口期”的形成和胚胎的粘附创造了条件。已有研究表明，Wnt5a 可促进基质细胞增殖，当其表达下调时，基质细胞增殖降低[24]；在敲除 *Lpar3* 的雌鼠中，发现在 D_4 和 D_5 时子宫基质细胞增殖降低，最终导致着床延迟[25]；在反复植入失败的病人中，ER 在基质细胞中的表达下降，使基质细胞的增殖能力降低，导致植入失败[26]；而在 miRNAs 对子宫内膜作用的研究中，也发现过表达 miR-143 可抑制子宫内膜基质细胞的增殖[27]。这些都说明基质细胞增殖对于正常的胚胎着床具有重要意义而增殖异常往往会导致妊娠的失败。本研究发现，mmu-miR-24 在 D_4 的表达明显低于 D_1。通过建立基质细胞模型，且主要表达于腺上皮和腔上皮细胞。在体外实验中，抑制 mmu-miR-24 表达后，发现其促进细胞周期且抑制细胞凋亡；而过表达 mmu-miR-24 结果则相反，说明 mmu-miR-24 在 D_4 的低表达有利于基质细胞的增殖过程，从而为基质细胞的蜕膜化作好准备；而腔上皮表达则可能与胚胎粘附时，子宫内膜着床点的腔上皮细胞为了利于胚胎植入，在短时间内发生凋亡有关。

在胚胎着床时期，部分子宫内膜基质细胞开始蜕膜化，形成具有特殊功能的蜕膜细胞[5]，该蜕膜细胞能够促进胚胎植入，维持正常妊娠[28]。已有研究表明蜕膜细胞凋亡增加，会导致自发流产[29]；凋亡相关因子 TRAIL 在蜕膜细胞中表达上调，为胚胎的植入提供保护作用[30]；AEA 可促进蜕膜细胞凋亡，当其水平异常时可导致蜕膜组织的稳定性改变[31]；这都说明蜕膜细胞的凋亡对胚胎着床具有重要作用。本研究发现，由于胚胎植入，mmu-miR-24 在 D_5 主要表达于初级蜕膜化区，D_6 主要表达次级蜕膜化区中，此期基质细胞既有增殖又有分化形成蜕膜细胞[2]。已有文献表明，与细胞增殖相关的一些基因与 mmu-miR-24 表达模式极其相似，如 KRAS 基因在 D_5 着床点表达于初级蜕膜化区，D_6 着床点表达于次级蜕膜化区，而且该基因的表达与基质细胞蜕膜化密切相关[32]。这是否有些矛盾？事实上有研究发现，未分化的子宫内膜基质细胞对于凋亡是抵抗的，但它们的增殖是分化形成蜕膜细胞的基础；而分化形成的蜕膜细胞的有序凋亡有利于胚胎植入过程[33]。这说明在蜕膜化区中蜕膜细胞的凋亡，以及基质细胞通过增殖进行蜕膜化，均有利于蜕膜组织功能的实现。在人工诱导蜕膜化细胞模型中，通过上调 mmu-miR-24 表达，发现其具有促进蜕膜细胞凋亡的作用，而 mmu-miR-24 在蜕膜化区的表达，表明其参与了蜕膜细胞的凋亡调控，有利于胚胎植入过程。

综上所述，本研究初步明确 mmu-miR-24 对早

期妊娠的调节作用，为研究 mmu-miR-24 异常表达对胚胎植入的影响奠定基础，但是其具体调节机制有待进一步研究。

参 考 文 献

[1] Carson DD, Bagchi I, Dey SK, et al. Embryo implantation[J]. Dev Biol, 2000, 223(2): 217-237.

[2] Wang H, Dey SK. Roadmap to embryo implantation: clues from mouse midels[J]. Nat Rev Genet, 2006, 7(3): 185-199.

[3] Cross JC, Werb Z, Fisher SJ. Implantation and the placenta: key pieces of the development puzzle[J]. Science, 1994, 266(5190): 1508-1518.

[4] Das SK. Cell cycle regulatory control for uterine stromal cell decidualization in implantation[J]. Reprod Sci, 2009, 137(6): 889-99.

[5] Kilpatrick LM, Stephens AN, Hardman BM, et al. Proteomic identification of caldesmon as a physiological substrate of proprotein convertase 6 in human uterus decidual cells essential for pregnancy establishment[J]. J Proteome Res, 2009, 8(11): 4983-4992.

[6] Laws MJ, Taylor RN, Sidell N, et al. Gap junction communication between uterine stromal cells plays a critical role in pregnancy-associated neovascularization and embryo survival[J]. Development, 2008, 135(15): 2659-2668.

[7] Cha J, Bartos A, Park C, et al. Appropriate crypt formation in the uterus for embryo homing and implantation requires Wnt5a-ROR signaling[J]. Cell Rep, 2014, 8(2): 382-392.

[8] Sun X, Terakawa J, Clevers H, et al. Ovarian LGR5 is critical for successful pregnancy[J]. FASEB J, 2014, 28(5): 2380-2389.

[9] Benson GV, Lim H, Paria BC, et al. Mechanisms of reduced fertility in Hoxa-10 mutant mice: uterine homeosis and loss of maternal Hoxa-10 expression[J]. Development, 1996, 122(9): 2687-2696.

[10] Lim H, Ma L, Ma WG, et al. Hoxa-10 regulates uterine stromal cell responsiveness to progesterone during implantation and decidualization in the mouse[J]. Mol Endocrinol, 1999, 13(6): 1005-1017.

[11] Yang Y, Xie Y, Xu L, et al. Expression of mmu-miR-96 in the endometrium during early pregnanvy and its regulatory effects on stromal cell apoptosis via Bcl2[J]. Mol Med Rep, 2017, 15(4): 1547-1554.

[12] Liu W, Niu Z, Li Q, et al. MicroRNA and Embryo Implantation[J]. American Journal of Reproductive Immunology, 2016, 75(3): 263-271.

[13] Xia HF, Jin XH, Cao ZF, et al. MiR-98 is involved in rat embryo implantation by targeting Bcl-xl[J]. FEBS Lett, 2014, 588(4): 574-583.

[14] Pan Q, Luo X, Toloubeydokhti T, et al. The expression profile of micro-RNA in endometrium and endometriosis and influence of ovarian steroids on their expression[J]. Molecular Human Reproduction, 2007, 13(11): 797-806.

[15] Xia HF, Jin XH, Cao ZF, et al. MicroRNA expression and regulation in the uterus during embryo implantation in rat[J]. FEBS J, 2014, 281(7): 1872-1891.

[16] Wu J, Zhang YC, Suo WH, et al. Induction of anion exchanger-1 translation and its opposite roles in the carcinogenesis of gastric cancer cells and differentiation of K562 cells[J]. Oncogene, 2010, 29(13): 1987-1996.

[17] Wang S, Zhang R, Claret FX, et al. Involvement of microRNA-24 and DNA methylation in resistance of nasopharyngeal carcinoma to ionizing radiation[J]. Mol Cancer Ther, 2014, 13(12): 3163-3174.

[18] Li D, Li J. Association of miR-34a-3p/5p, miR-141-3p/5p, and miR-24 in decidual natural killer cells with unexplained recurrent spontaneous abortion[J]. Med Sic Monit, 2016, 22: 922-929.

[19] Liu S, He J, Geng Y, et al. Costimulatory molecule CD28 participates in the process of embryo implantation in mice[J]. Reproductive Sicences, 2014, 21(6): 686-695.

[20] Cakmak H, Taylor HS. Implantation failure: molecular mechanisms and clinical treatment[J]. Human Reproduction Update, 2011, 17(2): 242-253.

[21] O'Brien JE, Peterson TJ, Tong MH, et al. Estrogen-induced proliferation of uterine epithelial cells is independent of estrogen receptor alpha binding to classical estrogen response elements[J]. The Journal of Biological Chemistry, 2006, 281(36): 26683-26692.

[22] Cooke PS, Buchanan DL, Lubahn DB, et al. Mechanism of estrogen action: lessons from the estrogen receptor-alpha knockout mouse[J]. Biol Reprod, 1998, 59(3): 470-475.

[23] Hegele-Hartung C, Chwalisz K, Beier HM. Distribution of estrogen and progesteron receptors in the uterus: an immunohistochemical study in the immature and adult pseudopregnant rabbit[J]. Histochenistry, 1992, 97(1): 39-50.

[24] Rider V, Talbott A, Bhusri A, et al. WINGLESS(WNT) signaling is a progesterone target for rat uterine stromal cell proliferation[J]. J Endocrinol, 2016, 229(2): 197-207.

[25] Diao H, Li R, El Zowalaty AE, et al. Deletion of lysophosphatidic acid receptor 3(Lpar3) disrupts fine local balance of progesterone and estrogen signaling in mouse uterus during implantation[J]. Biology of Reproduction, 2016, 93(5): 123.

[26] Wongwananuruk T, Sato T, Kajihara T, et al. Endometrial androgen signaling and decidualization regulate trophoblast expansion and invasion in co-culture: a time-lapse study[J]. Placenta, 2016, 47: 56-62.

[27] Tian S, Su X, Qi L, et al. MiR-143 and rat embryo implantation [J]. Biochimica et Biophysica Acta, 2015, 1850(4): 708-721.

[28] Franco HL, Dai D, Lee KY, et al. WNT4 is a key regulator of normal postnatal uterine development and progesterone signaling during embryo implantation and decidulization in the mouse[J]. FASEB J, 2011, 25(4): 1176-1187.

[29] Lu J, Zhu L, Zhang L, et al. Abnormal expression of trail receptors in decidual tissue of chlamydia trachomatis-infected rats during early pregnancy loss[J]. Reprod Sci, 2016[Epub ahead of print].

[30] Popovici RM, Kao LC, Giudice LC. Discovery of new inducible genes in vitro decidualized human endometrial stromal cells using microarray technology[J]. Endocrinology, 2000, 141(9): 3510-3513.

[31] Almada M, Piscitelli F, Fonseca BM, et al. Anandamide and decidual remodeling: COX-2 oxidative metabolism as a key regulator[J]. Biochim Biophys Acta, 2015, 1851(11): 1473-1481.

[32] Long X, Zhang M, Wang Y, et al. Expression of KRAS in the endometrium of early pregnant mice and its effect during embryo implantation[J]. Reprod Biomed Online, 2015, 31(1): 51-61.

[33] Boeddeker SJ, Hess AP. The role of apoptosis in human embryo implantation[J]. J Reprod Immunol, 2015, 108: 114-122.

（责任编辑：冉明会）