

围产医学

DOI: 10.11699/cyxh20131013

早孕小鼠胚胎着床窗口期子宫内膜 mmu-miR-106b 表达规律及其作用

耿艳清, 杨德辉, 鲁之中, 陈雪梅, 何俊琳, 王应雄, 丁裕斌, 刘学庆
(重庆医科大学公共卫生与管理学院生殖生物学研究室, 重庆 400016)

【摘要】目的:探讨 mmu-miR-106b 在早孕小鼠胚胎着床过程中的表达规律, 阐明其对胚胎着床的调控作用。**方法:**应用 real-time PCR 和原位杂交检测 mmu-miR-106b 在早孕小鼠孕 4 d、孕 5 d 及孕 6 d 子宫内膜中的表达; 子宫内膜基质细胞转染 mmu-miR-106b 的模拟物和抑制剂后, MTT 和流式细胞仪检测细胞的增殖凋亡情况; 结合靶基因预测数据库, 利用 Western blot 确定 mmu-miR-106b 在子宫内膜中的靶基因。**结果:**mmu-miR-106b 在小鼠孕 6 d 子宫内膜的表达较孕 4 d 明显下调 ($P=0.039$), 孕 5 d 着床点与着床旁组织表达无明显差异 ($P=0.606$), 定位于子宫内膜基质细胞; 上调 mmu-miR-106b 会促进子宫内膜基质细胞的增殖, 下调其表达会促进细胞凋亡; 通过 miRGen、Targetscan、Pictar 数据库筛查获得与胚胎着床相关的靶基因核磷蛋白 1、肿瘤易感基因 101 (tumor susceptibility gene 101, Tsg101) 和 10 号染色体缺失的同源性磷酸酶张力蛋白等, 其中 Tsg101 的表达受到 mmu-miR-106b 负调控 ($P=0.042$)。**结论:**mmu-miR-106b 可能通过靶向 Tsg101, 影响胚胎着床过程中子宫内膜基质细胞增殖, 对胚胎着床发挥调控作用。

【关键词】胚胎着床; 子宫内膜; mmu-miR-106b

【中国图书分类法分类号】R714.1

【文献标志码】A

【收稿日期】2012-11-09

Expression rules and potential role of mmu-miR-106b in the endometrium of mouse during embryo implantation

GENG Yanqing, YANG Dehui, LU Zhizhong, CHEN Xuemei, HE Junlin, WANG Yingxiong,
DING Yubin, LIU Xueqing

(Laboratory of Reproductive Biology, School of Public Health and Management, Chongqing Medical University)

【Abstract】Objective: To explore the expression rules and potential role of mmu-miR-106b in the endometrium mouse during embryo implantation. **Methods:** Real-time PCR and in situ hybridization were used to detect the expressions of mmu-miR-106b in the endometria of pregnant mice on d4, d5 and d6. MTT and flow cytometry were performed to understand its roles in endometrial stromal cell proliferation, cycle and apoptosis after endometrial stromal cells being transfected with mimics and inhibitor. Western blot was carried out to predict the potential target genes of mmu-miR-106b by combining anticipated algorithms. **Results:** Expression of mmu-miR-106b in the endometria on d6 was lower than that on d4 ($P=0.039$) and there was no significant difference in mmu-miR-106b expression between implantation sites and inter-implantation sites of pregnant mice on d5 ($P=0.606$). Mmu-miR-106b was located in endometrial stromal cells. Increased mmu-miR-106b could promote cell proliferation and reduced mmu-miR-106b would increase cell apoptosis. Related target genes of nucleophosmin1, tumor susceptibility gene 101 (Tsg101) and phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome ten were achieved by miRGen, Targetscan and Pictar screening and expression of Tsg101 was regulated by mmu-miR-106b in endometrial stromal cells of pregnancy mice ($P=0.042$). **Conclusions:** Mmu-miR-106b may play an important role in the proliferation of endometrial stromal cells during embryo implantation process by targeting Tsg101.

【Key words】embryo implantation; endometrium; mmu-miR-106b

微小 RNA 是一类高度保守的非编码小 RNA (miRNA), 长约 18~25 个核苷酸, 通过与靶 mRNA 特

异性的碱基配对引起靶 mRNA 的降解或者抑制其翻译, 即通过与靶 mRNA 的 3' 端非编码区域 (3'-untranslated region, 3' UTR) 不完全互补配对导致该 mRNA 的翻译受到抑制^[1], 从而对基因进行转录后表达的调控^[2]。大多数的哺乳动物 miRNA 对组织形成、细胞生长、分化、凋亡和代谢等生物学过程起时

作者介绍: 耿艳清, Email: aqing000@163.com,

研究方向: 胚胎着床的分子机制。

通信作者: 刘学庆, Email: a68733172@online.cq.cn。

基金项目: 重庆市自然科学基金资助项目 (编号: CSTC2008BB5232)。

空调控的作用^[3-4]。通过生物计算和实验预测人类基因组编码大约 1 000 个 miRNAs, 调控约 30% 的蛋白编码基因^[5-8]。这个预测提示可能所有的细胞通路因子均受 miRNA 调控。最近研究发现在 miRNA 敲除的小鼠模型生殖系统出现表形异常, 证明他们对于胚胎着床和发育具有基因表达调节器的重要作用^[9-12]。

胚胎着床过程是胚泡与子宫第 1 次直接建立联系的过程, 是哺乳动物生殖过程中的重要一步, 它包括子宫的内分泌、旁分泌、自分泌和近分泌作用的调节, 子宫容受性的损失是辅助生殖技术失败的主要原因之一^[13]。目前胚泡植入和滋养层侵袭被认为是成功建立妊娠的关键^[14]。该过程涉及细胞增殖、细胞凋亡等复杂的分子事件, 尽管子宫内膜许多因子的正常表达在胚胎着床过程中起着重要作用, 但是胚胎着床中子宫内膜作用的分子机制仍然不完全清楚。mmu-miR-106b 在多种肿瘤组织中高表达, 作为促癌基因发挥作用, 而胚胎着床与肿瘤侵袭存在相似的生物学行为, 本课题组应用 miRNA 芯片筛查发现 mmu-miR-106b 在早孕小鼠子宫内膜中胚胎着床前后存在显著差异^[15], 而目前此领域尚无关于 mmu-miR-106b 的研究报道, 本研究用 real-time PCR 对 miRNA 芯片中差异表达的 mmu-miR-106b 进行了验证, 用原位杂交对 mmu-miR-106b 表达进行了定位, 并通过转染 mmu-miR-106b 模拟物和抑制剂, 观察了其对于子宫内膜基质细胞增殖和凋亡的影响, 最后应用数据库预测其相关靶基因, 对靶基因进行了初步分析, 从而为研究 miRNA 在胚胎着床过程的作用打下基础。

1 材料与方法

1.1 动物与试剂

1.1.1 动物 清洁级昆明小鼠, 6~8 周龄, 体质量 25~30 g, 雌雄兼用, 购自重庆医科大学实验动物中心[合格证号: SCXK(渝)20050002], 饲养于清洁级动物房, 自由摄食, 饲养 1 周后开始实验。以雌雄比例 2:1 合笼交配, 次晨发现阴栓者记为 d1, 依次类推。将孕鼠随机分为 3 组: d4 组(22 只)、d5 组(16 只)、d6 组(16 只)。脱颈处死, 3 组中均任选 8 只无菌条件下取小鼠子宫内膜提取总 RNA 备用; 另 8 只无菌条件下取小鼠的子宫组织经 4% 多聚甲醛固定 1 h, 30% 蔗糖脱水 4℃ 过夜, OTC 包埋剂包埋组织, 冰冻切片机连续切片, 取厚 10 μm 的切片, 贴片后室温风干 30 min, -80℃ 保存待用。其中 d5 着床点通过尾静脉注射台盼蓝识别, 未被着色处为着床旁组织; d4 小鼠用 PBS 冲洗子宫后(除去胚泡)刮取子宫内膜; d6 小鼠除去胚胎后刮取子宫内膜。另外 d4 组 6 只小鼠分离原代基质细胞备用。

1.1.2 试剂 Trizol 试剂、脂质体 2000(Lipofectamine™ 2000) 购自 Invitrogen 公司; 引物由上海生物工程公司合成; RT-PCR 及 real-time PCR 试剂盒购自大连宝生物有限公司; 原位杂交探针购自丹麦 Exiqon 公司; 原位杂交试剂盒购自鼎国生物技术公司; DMEM 培养基购自 Hyclone 公司; 胎牛血清购自四季青公司; mmu-miR-106b 模拟物和抑制剂购自广州锐博生物公司; MTT 试剂购自 Sigma 公司; 细胞凋亡检测试剂盒、细胞裂解液购自碧云天公司; 预制胶购自文渊阁公司; 核蛋白 1(nucleophosmin 1, Npm1)、肿瘤易感基因 101(tumor susceptibility gene 101, Tsg101) 和 10 号染色体缺失的同源性磷酸酶张力蛋白(phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome ten, PTEN) 抗体购自 abcam 公司; β-actin 及二抗购自中杉金桥。

1.2 方法

1.2.1 总 RNA 的提取及完整性检测 采用 Trizol 试剂抽提子宫内膜, 异丙醇沉淀浓缩 RNA, 灭菌 DEPC 水溶解总 RNA, 紫外分光光度计测总 RNA 的吸光度值, 甲醛变性琼脂糖凝胶电泳检测其完整性。

1.2.2 Real-time PCR 参照 Chen 等^[16]的方法, 运用 real-time PCR 检测 mmu-miR-106b 的表达量, 验证 miRNA 芯片结果。采用 U6 作为内参, 进行归一化。引物序列如表 1 所示。

表 1 miRNAs 引物序列

Tab.1 Primer sequences of miRNAs		
miRNAs		引物序列(5'→3')
mmu-miR-106b	逆转录引物	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGG
		TATTCGCACTGGATACGACATCTGC
	PCR正向引物	CGGCTAAAGTGCTGACAGTGC
	PCR反向引物	GTGCAGGGTCCGAGGT
U6	PCR正向引物	GCTTCGGCAGCACATATACTAAAAT
	PCR反向引物	CGCTTCACGAATTTGCGTGTTCAT

1.2.3 原位杂交 冰冻切片室温平衡 10 min, 50℃ 干燥 10 min, 4% 多聚甲醛固定 10 min, 乙醛化 10 min, 蛋白酶 K 37℃ 消化 7 min, 50℃ 预杂交 3 h, 滴加含探针(浓度为 40 nmol/L) 的杂交液, 50℃ 杂交过夜, 梯度杂交缓冲液充分洗涤, 37℃ 封闭 30 min, 兔抗地高辛 37℃ 孵育 60 min, 碱性磷酸酶标记的羊抗兔 IgG 37℃ 孵育 60 min, 室温显色 10 min, 自来水冲洗, 核固红复染 5 min, 脱水, 透明, 中性树脂封片。

1.2.4 小鼠子宫内膜基质细胞原代培养及转染 无菌取 d4 小鼠子宫内膜, 胰酶消化, 离心, 种瓶。基质细胞用含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基于 37℃、5% CO₂ 培养箱中培养。以每孔 10⁴ 个细胞的密度, 接种于 96 孔板中, 次日转染。用不含血清的 DMEM 培养基稀释 mmu-miR-106b 模拟物和抑制剂以及 Lipofectamine™ 2000, 将二者混匀, 室温孵育 20 min; 将混合液加入含有细胞的培养孔中, 培养 4~6 h 后更换新鲜的 DMEM 培养基。

1.2.5 MTT 检测细胞活力和流式细胞仪检测细胞周期及凋亡 MTT 步骤 用 mmu-miR-106b 模拟物和抑制剂及阴性对照转染细胞 72 h 以后, 每孔加入 5 mg/ml MTT 试剂 20 μl, 培养 3 h 后加 150 μl 二甲基亚砷, 振荡 10 min, 测 492 nm 波长处吸光值, 计算细胞活力值(细胞活力值=实验组平均吸

光度值/对照组平均吸光度值 $\times 100\%$)。流式细胞术:转染 72 h 后收集细胞,依次加入 5 μl 藻红蛋白标记的重组人膜联蛋白 V、2 μl 7-氨基放线菌素 D, 37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴暗处孵育 15 min 后加入 400 μl 缓冲液,流式细胞仪检测细胞凋亡。

1.2.6 生物信息学分析 采用常用 miRNA 靶基因预测数据库 miRGen、Targetscan、Pictar 检索 mmu-miR-106b 的靶基因,取其交集,从中筛选与增殖、凋亡相关的基因。

1.2.7 蛋白提取及 Western blot 用 mmu-miR-106b 模拟物和抑制剂及阴性对照转染细胞 72 h 后收获细胞。细胞裂解液提取细胞总蛋白,用 BCA 蛋白定量法测定总蛋白浓度。预制胶电泳分离后将蛋白转移至聚二氟乙烯膜上;5%脱脂奶粉封闭 1 h 后,一抗 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜;PBST 洗 3 次,辣根过氧化物酶标记的二抗孵育 1 h 后, PBST 洗 3 次,化学发光法显影。

1.2.8 统计学分析 real-time PCR 结果分析,以胚胎着床前后 mmu-miR-106b 拷贝数与 U6 拷贝数之比值作为实验结果,用均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示;用多媒体图像分析系统软件分析原位杂交图像。采用 SPSS 15.0 统计学软件分析,数据采用单因素方差分析,多组间的两两比较采用 LSD- t 法,以 $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 总 RNA 提取及质量鉴定结果

所有样品均进行总 RNA 浓度检测和甲醛变性凝胶电泳。每个样品总 RNA 的吸光度值在 1.8~2.0 之间;如图 1,甲醛变性凝胶电泳显示条带清晰, RNA 条带亮度 28 S:18 S $\approx$ 2:1,表明 RNA 完好无降解。

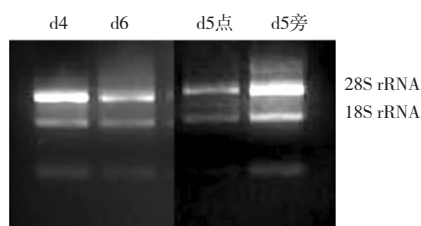


图 1 d6、d4 及 d5 着床点、旁小鼠子宫内总 RNA 电泳图

Fig.1 Electrophoresis results of RNA of implantation sites and inter-implantation sites in the endometria of pregnant mice on d4, d5 and d6

2.2 d4、d6 和 d5 子宫内着床点及着床旁组织中 mmu-miR-106b 的表达

运用 real-time PCR 检测小鼠 d4、d5、d6 子宫内 mmu-miR-106b 的表达水平,采用 U6 作为内参进行归一化处理。mmu-miR-106b 的 real-time PCR 扩增曲线和熔解曲线如图 2 所示,熔解曲线呈单峰,引物的特异性较好。着床后 mmu-miR-106b 表达量下降 ($F=3.393, P=0.039$),结果见表 2; d5 与 d4 相比无明显差异 ($F=0.974, P=0.315$),但比 d6 明显上调 ($F=3.217, P=0.003$); d5 着床点与着床旁组织相比 mmu-miR-106b 表达无明显差异 ($F=0.529, P=0.606$),结果见图 3。

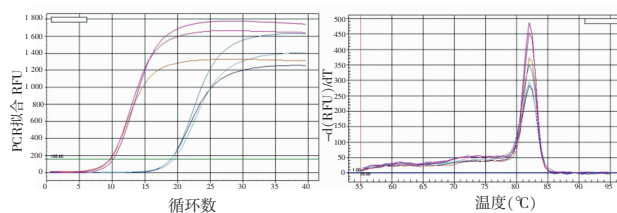


图 2 mmu-miR-106b real-time PCR 扩增曲线和熔解曲线

Fig.2 Amplification curve and melting curve of real-time PCR of mmu-miR-106b

表 2 d6、d4 mmu-miR-106b real-time PCR 结果和芯片结果比较及 d5 点、旁组织 real-time PCR 结果

Tab.2 Expression of mmu-miR-106b on d6 and d4 detected by real-time PCR and microarray and results of implantation sites and inter-implantation sites on d5 by real-time PCR

miRNA	d6:d4	d5 着床点:d5 着床旁	
		real-time PCR	miRNA 芯片
mmu-miR-106b	0.266 $\pm$ 0.006	0.492 $\pm$ 0.015	1.800 $\pm$ 0.084

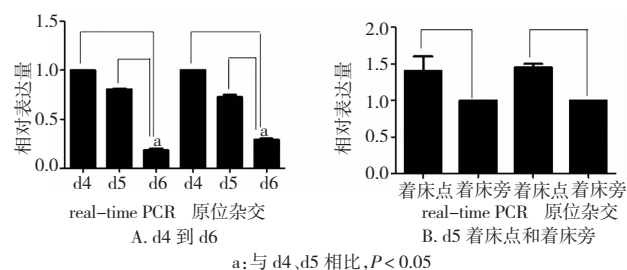


图 3 mmu-miR-106b 的 real-time PCR 和原位杂交检测结果

Fig.3 Results of mmu-miR-106b detected by real-time PCR and in situ hybridization

2.3 mmu-miR-106b 原位杂交结果

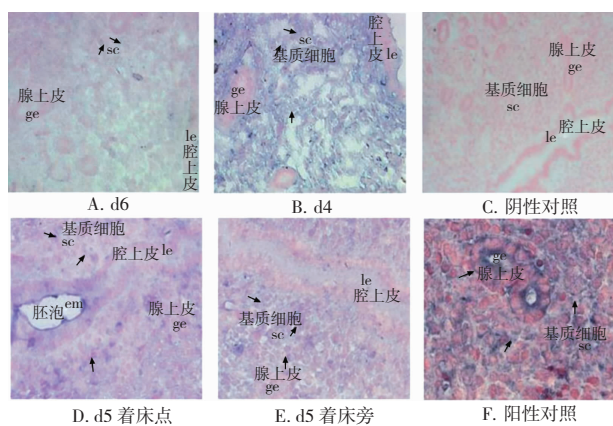
原位杂交统计结果和图 3 所示, d5 着床点与着床旁组织中 mmu-miR-106b 的表达无明显差异 ($F=1.167, P=0.192$), d4 到 d6 mmu-miR-106b 的表达逐渐下调,且 mmu-miR-106b 在 d6 的表达明显低于 d4 ($F=2.317, P=0.012$), d5 与 d4 ($F=0.174, P=0.263$) 相比无差异而较 d6 ($F=2.817, P=0.008$) 明显上调。原位杂交检测定位结果如图 4, mmu-miR-106b 主要表达于基质细胞中,而腔上皮及腺上皮细胞中几乎没有表达。

2.4 mmu-miR-106b 对小鼠子宫内基质细胞增殖和凋亡的影响

如图 5 所示,原代培养小鼠子宫内基质细胞,转染 mmu-miR-106b 模拟物后细胞活力升高,转染 mmu-miR-106b 的抑制剂后细胞活力下降。流式细胞术检测细胞周期和凋亡率,与空白和阴性对照相比,抑制剂处理的子宫内基质细胞被阻滞在 G1 期,凋亡率明显增加(实验重复 3 次, $F=2.915, P=0.009$)。

2.5 数据库检索结果

运用生物信息学技术,通过比对 miRGen、Targetscan、Pictar 等 miRNA 靶基因预测数据库,结合胚胎着床前 mmu-miR-106b 表达变化及相关文献,得到 mmu-miR-106b 的靶基因见表 3。



箭头所示蓝紫色表示阳性结果

图4 mmu-miR-106b 在孕 4 d、孕 5 d、孕 6 d 小鼠子宫内膜的表达 (400 ×)

Fig.4 Expression of mmu-miR-106b in the endometria of pregnant mice on d4, d5 and d6 (400 ×)

表 3 mmu-miR-106b 的靶基因
Tab.3 Target genes of mmu-miR-106b

miRNA	靶基因
mmu-miR-106b	Npm1
	Tsg101
	PTEN

2.6 在小鼠子宫内膜基质细胞中, mmu-miR-106b 负性调控 Tsg101

用 mmu-miR-106b 模拟物和抑制剂分别转染子宫内膜基质细胞, 用 Western blot 检测转染前后预测靶基因 Npm1、

Tsg101 和 PTEN 的蛋白表达水平, 发现转染前后子宫内膜基质细胞中 Npm1、PTEN 的蛋白表达量没有明显改变, 仅 Tsg101 的表达发生改变, 如图 6 所示, 模拟物组中 Tsg101 的表达减少, 抑制剂组中 Tsg101 的表达量增加, 表明在小鼠子宫内膜基质细胞中, mmu-miR-106b 负性调控 Tsg101 (实验重复 3 次, $F=3.271$, $P=0.042$)。

3 讨论

大多数哺乳动物的 miRNA 具有调节其他基因表达的活性, 参与生命过程中一系列的重要进程, 对组织形成、细胞生长、分化、凋亡和代谢等生物学过程起时空调控的作用^[3-4]。有研究发现 miR-21 通过调控其靶基因癌抑制基因在胚胎着床过程中起重要作用^[17-18], 说明 miRNA 对胚胎正常着床具有重要意义。

研究表明, mmu-miR-106b 的表达在肿瘤发生中起着促进增殖、类似癌基因的作用, 其靶标也多为增殖凋亡相关基因^[19]。本研究发现, 早孕小鼠子宫内膜组织中 mmu-miR-106b 的表达孕 6 d 较孕 4 d 明显降低, 表达部位主要在子宫内膜基质细胞。胚胎着床过程中蜕膜细胞同时经历着增殖与凋亡, 有研究显示, 增殖细胞核抗原在胚泡植入窗口期小鼠子宫内膜中高表达, 可能通过参与子宫内膜蜕膜化调控胚泡植入^[20]。本研究证实上调 mmu-miR-106b

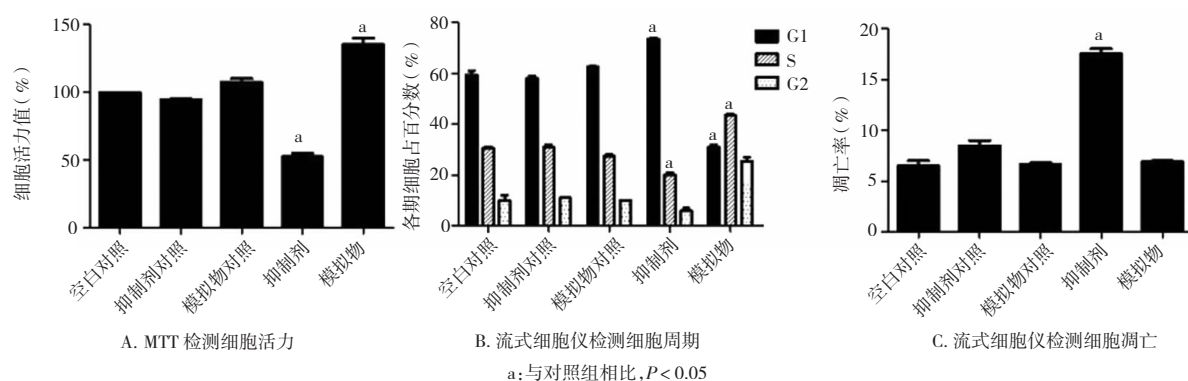


图 5 mmu-miR-106b 模拟物和抑制剂对子宫内膜基质细胞活力、细胞周期以及细胞凋亡的影响

Fig.5 Effects of mmu-miR-106b mimics and inhibitor on endometrial stromal cell viability, cycle, and apoptosis

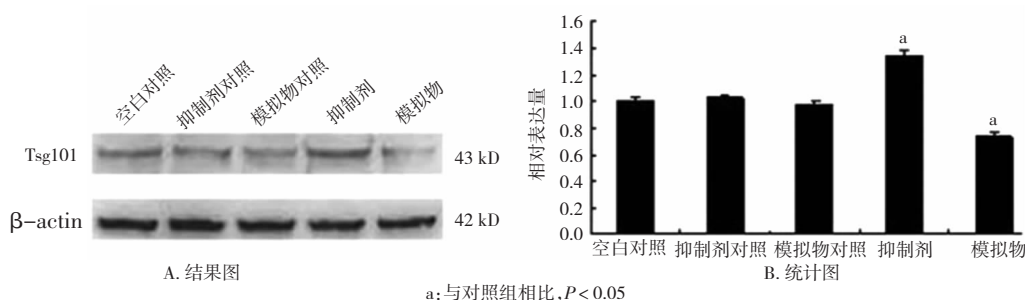


图 6 转染前后子宫内膜基质细胞中 Tsg101 的表达水平

Fig.6 Expression of Tsg101 in endometrial stromal cells before and after transfection

会促进子宫内膜基质细胞的增殖,下调其表达会使子宫内膜基质细胞阻滞在 G1 期,抑制细胞增殖,促进凋亡。因此,mmu-miR-106b 在子宫内膜中可能调控增殖凋亡相关的靶基因。通过生物信息学检索,mmu-miR-106b 与胚胎着床相关的靶基因主要有 Npm1、Tsg101 和 PTEN,实验结果表明 mmu-miR-106b 的靶基因为 Tsg101。Tsg101 是 1996 年 Li 和 Cohen^[21]用随机纯合子剔除法在 NTH3T3 成纤维细胞中发现一个新基因,定位于染色体 11p15.1-p15.2,小鼠的 Tsg101 的功能失活可使 NTH3T3 成纤维细胞转化为具有转移性的癌细胞。Tsg101 目前认为是一个备选抑癌基因,其蛋白能通过泛素化作用调控蛋白降解,在蛋白运输、细胞存活与增殖、转录调控、稳定细胞周期蛋白依赖性激酶抑制因子 P21 等方面发挥作用。Wagner 等^[22]利用定点诱变的方法发现胚胎和成体组织的正常功能维持需要 Tsg101 蛋白的存在,Tsg101 缺陷细胞表现出细胞周期调控缺陷,细胞死亡增加。Tsg101 的作用是多方面的,具体机制还需进一步探究。

综上所述,胚胎着床过程中存在一系列的细胞增殖、侵入及细胞凋亡,早孕小鼠胚胎着床前后 mmu-miR-106b 可能通过调控 Tsg101 的表达,进而影响子宫内膜细胞增殖过程,调控胚胎着床,对于其调控机制还有待于进一步研究。

参 考 文 献

- [1] Stark A, Brennecke J, Bushati N, et al. Animal microRNAs confer robustness to gene expression and have a significant impact on 3'UTR evolution[J]. *Cell*, 2005, 123(6): 1133-1146.
- [2] Cai X, Schärer A, Lu S, et al. Epstein-Barr virus microRNAs are evolutionarily conserved and differentially expressed[J]. *PLoS Pathog*, 2006, 2(3): e23.
- [3] Quellet D L, Perron M P, Gobeil L A, et al. MicroRNAs in gene regulation: when the smallest governs it all[J]. *J Biomed Biotechnol*, 2006(4): 69616.
- [4] Song L, Tuan R S. MicroRNAs and cell differentiation in mammalian development[J]. *Birth Defects Res C Embryo Today*, 2006, 78(2): 140-149.
- [5] Lewis B P, Burge C B, Bartel D P. Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets[J]. *Cell*, 2005, 120(1): 15-20.
- [6] Berezikov E, Guruv V, van de Belt J, et al. Phylogenetic shadowing and computational identification of human microRNA genes[J]. *Cell*, 2005, 120(1): 21-24.
- [7] Bentwich I, Avniel A, Karov Y, et al. Identification of hundreds of conserved and nonconserved human microRNAs[J]. *Nat Genet*, 2005, 37(7): 766-770.
- [8] Xie X, Lu J, Kulbokas E J, et al. Systematic discovery of regulatory motifs in human promoters and 3'UTRs by comparison of several mammals[J]. *Nature*, 2005, 434(7031): 338-345.
- [9] Van Rooij E, Sutherland L B, Qi X, et al. Control of stress-dependent cardiac growth and gene expression by a microRNA[J]. *Science*, 2007, 316(5824): 575-579.
- [10] Rodriguez A, Vigorito E, Clare S, et al. Requirement of bic/microRNA-155 for normal immune function[J]. *Science*, 2007, 316(5824): 608-611.
- [11] Thai T H, Calado D P, Casola S, et al. Regulation of the germinal center response by microRNA-155[J]. *Science*, 2007, 316(5824): 604-608.
- [12] Zhao Y, Ransom J F, Li A, et al. Dysregulation of cardiogenesis, cardiac conduction, and cell cycle in mice lacking miRNA-1-2[J]. *Cell*, 2007, 129(2): 303-317.
- [13] Edwards R G. Clinical approaches to increasing uterine receptivity during human implantation[J]. *Human Reprod*, 1995, 10(s2): 60-66.
- [14] Herrler A, von Rango U, Beier H M. Embryo-maternal signalling: how the embryo starts talking to its mother to accomplish implantation[J]. *Reprod Biomed Online*, 2003, 6(2): 244-256.
- [15] 鲁之中, 陈雪梅, 曾 兰, 等. 早孕小鼠胚胎着床前后子宫内膜 microRNAs 差异表达[J]. *细胞生物学杂志*, 2009, 31(6): 848-852.
- Lu Z Z, Chen X M, Zeng L, et al. The different expression of microRNAs in endometrium of early pregnant mouse during embryo implantation[J]. *Chinese Journal of Cell Biology*, 2009, 31(6): 848-852.
- [16] Chen C, Ridzon D A, Broomer A J, et al. Real-time quantification of microRNAs by stem-loop RT-PCR[J]. *Nucleic Acids Res*, 2005, 33(20): e179.
- [17] Hu S J, Ren G, Liu J L, et al. MicroRNA expression and regulation in mouse uterus during embryo implantation[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2008, 283(34): 23473-23484.
- [18] Ma X H, Hu S J, Ni H, et al. Serial analysis of gene expression in mouse uterus at the implantation site[J]. *J Biol Chem*, 2006, 281(14): 9351-9360.
- [19] Ivanovska I, Ball A S, Diaz R L, et al. MicroRNAs in the miR-106b family regulate p21/CDKN1A and promote cell cycle progression[J]. *Mol Cell Biol*, 2008, 28(7): 2167-2174.
- [20] 孟 君, 魏莎莉, 覃致远, 等. PCNA 在小鼠胚胎着床过程中的作用[J]. *重庆医科大学学报*, 2009, 34(10): 1354-1357.
- Meng J, Wei S L, Qin Z Y, et al. Effect of PCNA in the mouse uterus during embryo implantation[J]. *Journal of Chongqing Medical University*, 2009, 34(10): 1354-1357.
- [21] Li L, Cohen S N. Tsg101: a novel tumor susceptibility gene isolated by controlled homozygous functional knockout of allelic loci in mammalian cells[J]. *Cell*, 1996, 85(3): 319-329.
- [22] Wagner K U, Krempler A, Qi Y, et al. TSG101 is essential for cell growth, proliferation, and cell survival of embryonic and adult tissues[J]. *Mol Cell Biol*, 2003, 23(1): 150-162.

(责任编辑: 关蕴良)