

MK 基因对小鼠子宫基质细胞蜕膜化进程的影响*

杨根岭 罗文萍 刘真真 谭冬梅 王应雄 谭毅**

(重庆医科大学实验动物中心, 重庆 400016)

摘要 为探索肿瘤坏死因子相关凋亡诱导配体(TNF related apoptosis inducing ligand, TRAIL)的死亡受体(mouse killer, MK)对小鼠子宫基质细胞蜕膜化进程的影响, 构建 MK 基因过表达和 siRNA 干扰重组腺病毒. 原代培养的小鼠子宫基质细胞感染 MK 过表达或者干扰重组腺病毒并诱导蜕膜化, 72 h 后用免疫细胞化学与流式细胞术分别检测蜕膜细胞的标志物催乳素(prolactin, PRL)与蜕膜细胞凋亡率的变化情况. 妊娠 d4 小鼠子宫角注射 MK 重组腺病毒, 观察胚胎植入点的数量变化. 实验结果表明, 与对照组相比, 在诱导的蜕膜细胞中过表达 MK 使得催乳素的含量显著降低($P < 0.05$), 同时, 蜕膜细胞的凋亡率明显升高($P < 0.05$), 而 siRNA 干扰之后催乳素的含量显著升高, 凋亡率明显下降($P < 0.05$), 但是, 子宫角注射 MK 基因过表达和 siRNA 干扰重组腺病毒之后, 胚胎植入数量均显著减少($P < 0.01$). 提示 MK 基因通过参与小鼠子宫内膜基质细胞的蜕膜化进程, 调节蜕膜细胞增殖与凋亡之间的平衡从而影响胚胎的植入.

关键词 死亡受体 MK, 蜕膜化, 胚胎植入

学科分类号 Q492

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2011.00022

肿瘤坏死因子相关凋亡诱导配体(TNF related apoptosis inducing ligand, TRAIL)是 TNF 家族成员之一, 通过线粒体和细胞膜上死亡受体两种途径诱导肿瘤细胞凋亡, 但对正常组织细胞的生长不产生影响, 因此, 近年来 TRAIL 被认为是一种极具潜力且安全的抗肿瘤因子^[1]. 在人类已发现有 5 种 TRAIL 受体: DR4、DR5、DcR1、DcR2 和 OPG (osteoprotegerin), 其中 DR4、DR5 为死亡受体, 含胞内死亡结构域(death domain, DD)和依赖 Caspase 途径凋亡信号的识别结构^[2]. 在小鼠, TRAIL 的死亡受体(mouse killer, MK)与人类的 DR5 是同系物, 是唯一可诱导肿瘤细胞凋亡的 TRAIL 受体.

蜕膜细胞具有类似肿瘤细胞大核多核的特点, 鉴于胚胎植入与肿瘤侵袭有诸多相似性, 本课题组在前期工作中发现 MK 在小鼠胚胎植入后的子宫蜕膜细胞中表达, 推测 MK 可能在小鼠子宫蜕膜化及胚胎植入过程中具有促进蜕膜细胞凋亡的作用. 据此, 我们利用 MK 基因过表达和 siRNA 干扰重组腺病毒感染原代培养小鼠子宫基质细胞并进行人工诱导蜕膜化, 探索 MK 对小鼠蜕膜细胞增殖与凋亡的影响, 同时, 通过子宫角注射 MK 基

因重组腺病毒, 进一步观察 MK 对胚胎植入的影响.

1 材料和方法

1.1 材料

清洁级 NIH 小鼠, 6~8 周(合格证号为【SCXK(渝)2007-0001】), 雌雄鼠按 2:1 自然合笼, 次晨发现阴栓者记为妊娠 d1 孕鼠.

pAdTrack-TO4(GFP)、pAdEasy-1 腺病毒载体质粒由重庆医科大学感染性疾病分子生物学教育部重点实验室唐霓研究员赠送. 干扰表达重组 MK 腺病毒 AdEasy-SES-HUS-MKsiRNA(RFP)由本课题组制备^[3]. Trizol、限制性内切酶、T4 连接酶, MKsiRNA 和 β -actin 引物购自 Takara 公司; 质粒提取试剂盒购自 Promega 公司; DMEM/F₁₂ 无酚红培养基、Lipofectamine™ 2000 Reagent 转染试剂盒、

* 国家自然科学基金(30770816)和重庆市自然科学基金(CSTC2009BB5409)资助项目.

** 通讯联系人.

Tel: 023-68485997, E-mail: tanyee66@hotmail.com

收稿日期: 2011-01-11, 接受日期: 2011-05-03

活性炭处理胎牛血清和胶原酶购自 Invitrogen 公司; 雌二醇、孕酮及 cAMP 购自 Sigma 公司; Annexin V-FITC 细胞凋亡检测试剂盒购自凯基生物公司; MK 山羊抗鼠多克隆抗体(Sc-19529)、山羊抗小鼠 β -catenin 多克隆抗体(Sc-1496)购自美国 Santa Cruz 公司; 催乳素兔抗鼠多克隆抗体购自武汉博士德公司。

1.2 方法

1.2.1 过表达 MK 基因重组腺病毒的制备与鉴定. 提取妊娠 d4 小鼠子宫总 RNA, 经 RT-PCR 反应, 克隆出 MK 基因的 cDNA 序列, 鉴定正确后将其克隆到腺病毒穿梭载体 pAdTrack-TO4 上, 得到 pAdTrack-MK 载体质粒, 测序后经 *Pme* I 酶切纯化与骨架载体 pAdEasy-1 在 BJ5183 细菌中进行同源重组^[4], 得到 pAdEasy-Track-MK 载体质粒, 再经过 *Pac* I 酶切纯化后, 在 HEK293 细胞中包装、扩增、纯化获得腺病毒颗粒 AdEasy-Track-MK. RT-PCR 与 Western blotting 检测感染过表达腺病毒的 HEK293 细胞中 MK 基因 mRNA 及蛋白质表达水平. 参照 Kaneto 等^[5]的方法进行滴度测定后, 分装保存于 -80℃ 备用。

1.2.2 MK 基因 siRNA 重组腺病毒的制备与鉴定. 干扰质粒 pAdEasy-SIS-HUS-MKsiRNA 由本课题组前期构建, 干扰序列为 GTGAAATCCGGGAGGTTTA, 在 HEK293 细胞中包装并扩增腺病毒颗粒备用^[5]。

1.2.3 小鼠子宫基质细胞人工诱导蜕膜化及重组 MK 腺病毒感染. 小鼠子宫基质细胞的分离和培养参见文献[6]. 分离的基质细胞以 $1 \times 10^5/\text{ml}$ 浓度接种到 6 孔板中, 在含 10% 活性炭处理的胎牛血清的无酚红 DMEM/F12 培养基中培养 24 h 后, 分别取重组 MK 腺病毒进行细胞感染. 实验分为空白对照组(不经任何处理)、AdEasy-Track-MK 组、AdEasy-SIS-HUS-MKsiRNA 组、AdEasy-Track-TO4 组、AdEasy-SIS-HUS-Control 组. 转染 4 h 后更换含 $1 \mu\text{mol/L}$ P4、 10 nmol/L E2、 0.5 mmol/L cAMP 的培养基进行蜕膜化诱导, 继续培养至 72 h 时终止培养, 收获细胞进行 RT-PCR 与 Western blotting 检测 MK 蛋白的表达变化。

1.2.4 MK 基因对蜕膜细胞标志物催乳素(PRL)蛋白水平的影响. 小鼠子宫基质细胞, 分别感染各组 MK 重组腺病毒 $15 \mu\text{l}$ 并人工诱导蜕膜化 72 h 后, 利用免疫细胞化学技术检测 PRL 的表达情况, 以同型 IgG 代替一抗作为阴性对照, 结果用

Imagepro-Plus 软件进行分析。

1.2.5 MK 基因对蜕膜细胞凋亡率的影响. 将原代培养的小鼠子宫基质细胞分别感染各组 MK 重组腺病毒并人工诱导蜕膜化, 72 h 时收集细胞, 利用流式细胞术检测蜕膜细胞的凋亡情况。

1.2.6 MK 对胚胎植入的影响. 于上午 8:00 取妊娠 d4 小鼠一侧子宫角分别注射 MK 过表达或 siRNA 重组腺病毒, 另一侧子宫角分别注射 MK 过表达或 siRNA 重组空腺病毒, 每侧 $10 \mu\text{l}$, 每组 10 只, d8 上午 10:00 无菌解剖检测胚胎植入位点情况。

1.2.7 统计学处理. 注射腺病毒组与注射空腺病毒组之间试验数据差异用 Student *t* test, 统计数据以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 过表达 MK 重组腺病毒的制备与鉴定

RT-PCR 扩增出 MK 的 cDNA 为 1 167 bp, pAdTrack-MK 质粒经 *Sal* I 与 *Hind* III 双酶切切出与 MK 基因大小相同的条带(图 1a), 测序结果与 GenBank(NM-020275)报告的基因序列完全一致. 重组子 pAdEasy-Track-MK 与对照质粒经过 *Pac* I 酶切后形成大小 2 个片段, 小片段约为 4.5 kb (图 1b). 脂质体转染 HEK293 细胞 72 h 出现大量绿色荧光(图 2a). 进行扩增纯化后腺病毒 AdEasy-Track-MK 的滴度为 3.8×10^{11} nfu/L. 转染过表达 MK 重组腺病毒 72 h 后的 293 细胞, MK 基因的 mRNA 与蛋白质表达均显著增加(图 3)。

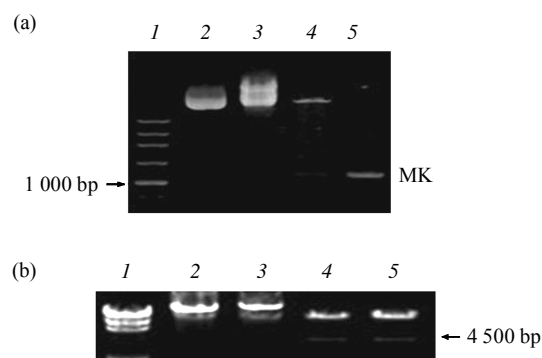


Fig. 1 Digestion of MK recombinant plasmids

(a) Digestion of pAdTrack-MK plasmid with *Sal* I and *Hind* III. 1: DNA marker; 2: pAdTrack-TO4; 3: pAdTrack-MK; 4: pAdTrack-MK plasmid digested with *Sal* I and *Hind* III; 5: MK gene. (b) Digestion of pAdEasy-Track-MK plasmid with *Pac* I. 1: Marker; 2: pAdEasy-1; 3: pAdEasy-Track-MK; 4, 5: pAdEasy-Track-MK/control plasmid digested with *Sal* I and *Hind* III.

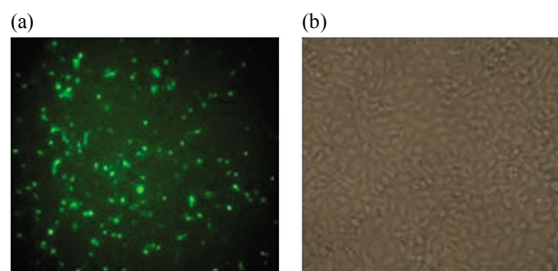


Fig. 2 HEK-293 cells transfected with pAdEasy-Track-MK plasmid (40×)
(a) Under fluorescence lens. (b) A bright field image.

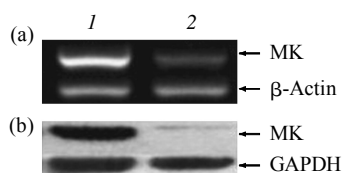


Fig. 3 Verification of MK over-expressing recombinant adenovirus

(a) Detection of MK mRNA in HEK293 transfected with Adeasy-Track-MK/Adeasy-Track-TO4(1) or Adeasy-Track-TO4(2). (b) Detection of MK protein by Western blotting in HEK293 transfected with Adeasy-Track-MK(1) or Adeasy-Track-TO4(2).

2.2 MK 蛋白在小鼠子宫人工诱导蜕膜细胞的表达

原代培养的小鼠子宫基质细胞分别感染 MK 基因过表达和 siRNA 重组腺病毒并人工诱导蜕膜化 72 h, 荧光显微镜下分别观察显示出较强的绿色荧光和红色荧光(图 4)。Western blotting 检测结果

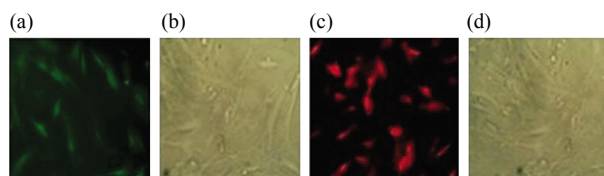


Fig. 4 Decidual stromal cells transfected with MK recombinant adenovirus (100×)

(a) Decidual stromal cells transfected with MK over-expression recombinant adenovirus under fluorescence field. (b) Decidual stromal cells transfected with MK over-expression recombinant adenovirus under bright field. (c) Decidual stromal cells transfected with MK siRNA recombinant adenovirus which under fluorescence field. (d) Decidual stromal cells transfected with MK siRNA recombinant adenovirus which under bright field.

显示 MK 蛋白的含量在感染了过表达与干扰表达腺病毒后发生了显著变化($P < 0.05$, 图 5)。

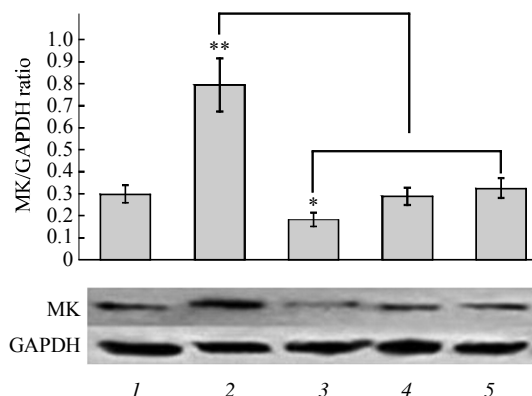


Fig. 5 The relative expression of MK protein in transfected decidual stromal cells

1: Blank; 2: AdEasy-Track-MK; 3: AdEasy-SES-HUS- MKsiRNA; 4: AdEasy-Track-TO4; 5: AdEasy-SES-HUS-Control. ** $P < 0.01$, * $P < 0.05$.

2.3 人工诱导时间对蜕膜细胞中 PRL 蛋白的影响

蜕膜细胞的标志物分子 PRL 蛋白含量随着诱导时间的延长而增加, 并在 72 h 的时候达到最大(图 6)。

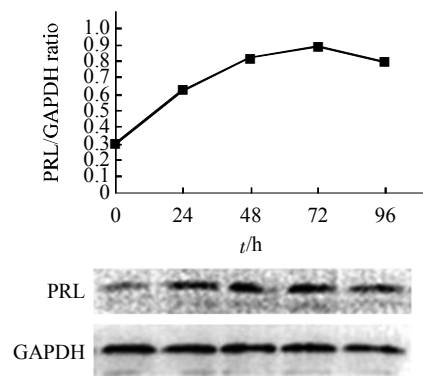


Fig. 6 The protein changes of Prolactin in decidual stromal cells followed by inducing time

2.4 MK 对蜕膜细胞中 PRL 蛋白水平的影响

免疫细胞化学图片经 Imagepro-Plus 软件处理结果显示: MK 基因过表达组的蜕膜细胞中 PRL 蛋白含量与对照组相比显著降低($P < 0.05$), 而 siRNA 干扰组蜕膜细胞中 PRL 蛋白含量与对照组相比显著升高($P < 0.01$, 图 7)。

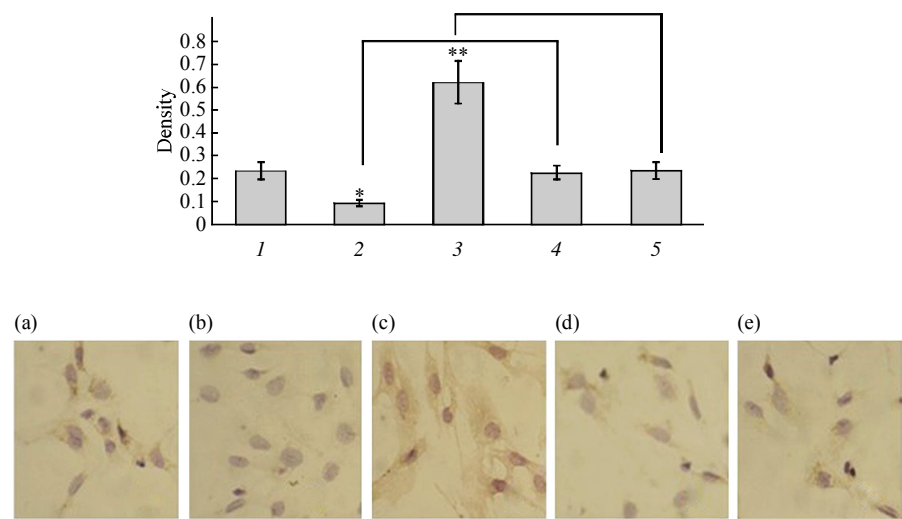


Fig. 7 Prolactin detection by immunocytochemistry in decidual stromal cells (100×)
(a) Blank. (b) Transfected with AdEasy-Track-MK. (c) Transfected with AdEasy-SES-HUS-MK siRNA. (d) AdEasy-Track-TO4. (e) AdEasy-SES-HUS-Control. 1: Blank; 2: AdEasy-Track-MK; 3: AdEasy-SES-HUS-MK siRNA; 4: AdEasy-Track-TO4; 5: AdEasy-SES-HUS-Control. ** $P < 0.01$, * $P < 0.05$.

2.5 MK 基因对蜕膜细胞凋亡率的影响

的蜕膜细胞凋亡率显著增加($P < 0.05$), 而 siRNA 组蜕膜细胞凋亡率显著减少($P < 0.05$, 图 8).

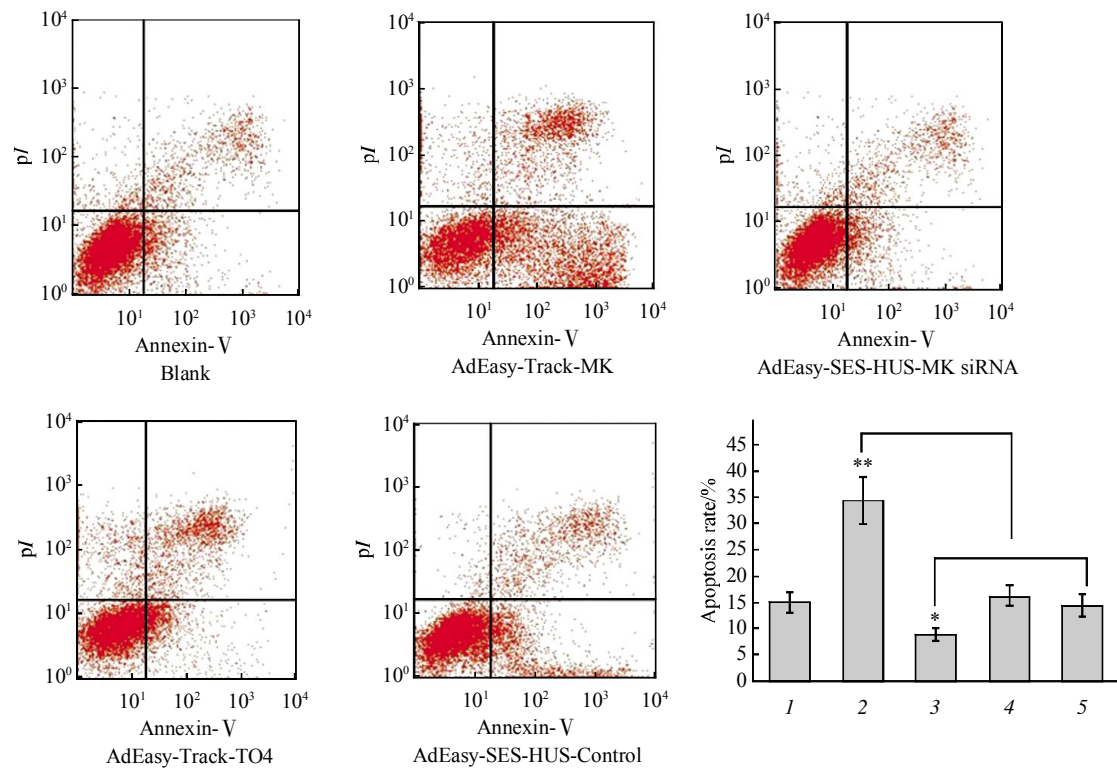


Fig. 8 The rate of apoptosis of decidual cells treated with various MK recombinant adenovirus
1: Blank; 2: AdEasy-Track-MK; 3: AdEasy-SES-HUS-MK siRNA; 4: AdEasy-Track-TO4; 5: AdEasy-SES-HUS-Control. ** $P < 0.01$, * $P < 0.05$.

2.6 MK 对胚胎植入的影响

妊娠 d4 小鼠子宫角注射 MK 重组腺病毒结果显示: 注射 MK 基因过表达组的胚胎植入位点数量与对照组相比显著减少($P < 0.01$), siRNA 组的胚胎植入位点数量则显著减少($P < 0.01$, 图 9).

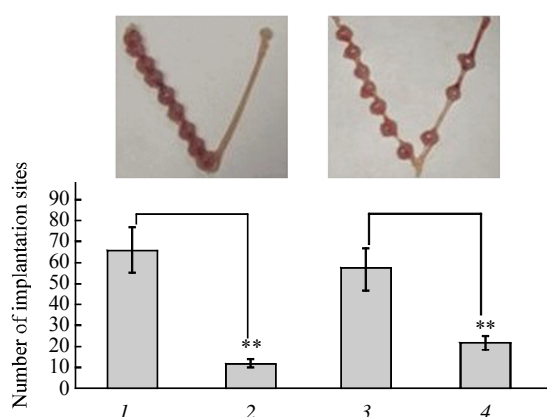


Fig. 9 The number of implanting embryos in uterine horns injected with MK recombinant adenovirus respectively

1: AdEasy-Track-TO4; 2: AdEasy-Track-MK; 3: AdEasy-SES-HUS-Control; 4: AdEasy-SES-HUS-MKsiRNA. ** $P < 0.01$.

3 讨 论

胚胎着床是人类和哺乳动物生殖过程中妊娠建立的第一步,也是决定妊娠成功与否的关键,成功地植入取决于处于接受态的子宫内膜和具有侵入性的胚胎之间的同步协调反应^[7].在哺乳动物胚胎着床的过程中,胚胎和子宫内膜之间发生“对话”,形成由胚胎和母体两种成分共同构成的胎盘.当胚胎黏附到子宫腔上皮时,子宫内膜增殖、再分化形成蜕膜组织,它由无数的蜕膜细胞组成,蜕膜的形成过程就是蜕膜化(decidualization)^[8].蜕膜是一种由多种细胞成分(基质细胞、蜕膜细胞、NK 细胞、巨嗜细胞、B 淋巴细胞等)组成的异质性组织,除对胎儿、胎盘的的营养作用外,它同时作为一种功能复杂的局部免疫器官,在妊娠及维持正常妊娠的过程中,发挥关键性作用^[9-10].

在小鼠,随着第 4 天晚上胚泡的黏附发生在子宫系膜对侧的腔上皮后,腔上皮就逐步发生凋亡,紧紧围绕着床胚泡的基质细胞开始广泛的增殖,然后分化成为大核多核的蜕膜细胞.在第 5 天下午和第 6 天早晨,胚泡周围的基质细胞停止增殖并进行

分化,形成初级蜕膜带(primary decidual zone, PDZ).初级蜕膜带的细胞随后发生凋亡,到第 8 天之前这种细胞基本消失.而初级蜕膜带外侧的基质细胞继续增殖并分化成蜕膜细胞,形成次级蜕膜带(secondary decidual zone, SDZ),随后次级蜕膜带细胞也发生凋亡^[11].同时又形成新的蜕膜细胞又依照同样的方向不断退化和死亡^[12],并被邻近的滋养层细胞或巨嗜细胞吞噬^[13].蜕膜细胞的增殖和凋亡同时并存,二者在动态平衡中协调蜕膜细胞的数量和滋养层细胞的侵入^[14-21].小鼠子宫蜕膜细胞在胚胎植入后以有序的凋亡和增殖来适应其快速生长发育的需要,现已证明,蜕膜细胞的增殖与退化是一个涉及多种因素的细胞凋亡过程^[23-24].

TRAIL 作为一种极具有潜力的抗肿瘤因子在生殖领域的研究还很少,本课题组的前期研究结果表明,TRAIL/MK 在植入后子宫蜕膜中的表达具有一定规律,推测 TRAIL 在植入后有序蜕膜化进程中起着重要作用,TRAIL 不仅具有抑制蜕膜基质细胞增殖的生理效应还能促进蜕膜基质细胞的凋亡^[25-26].本实验从 TRAIL 的死亡受体 MK 的角度进行研究,探索 MK 对胚胎植入的影响.免疫细胞化学结果显示,当 MK 过表达时蜕膜细胞中催乳素含量显著降低,提示蜕膜化程度受到了抑制,而当干扰 MK 表达时则促进了蜕膜化的进行.流式细胞术发现当 MK 过表达时蜕膜细胞的凋亡率显著增加,而干扰 MK 表达时对蜕膜细胞的存活与维持似乎有积极的效应.宫角注射 MK 过表达和干扰重组腺病毒之后,植入并正常发育的胚胎数量均显著减少,同时发现部分停止发育、体积明显缩小的退化胚胎和红点的出血点,推测当 MK 过表达时,加速了蜕膜细胞的凋亡,使得处于成熟阶段的蜕膜细胞减少,不能为胚胎提供足够的营养,导致胚胎不能植入或退化.而当干扰 MK 表达时蜕膜细胞凋亡率降低,PDZ 不能按正常进程退化消失,过快发育的胚胎不能获得相应的发展空间,同时阻碍了 SDZ 的发生发展,干扰了母胎之间的对话,从而导致胚胎植入位点数量显著减少.

MK 通过调节蜕膜细胞凋亡影响蜕膜化的进程在胚胎植入过程中起着重要作用,但在胚胎植入过程中,子宫内环境中还存在很多其他促凋亡因子,共同在蜕膜化过程中发挥作用^[27].成功的胚胎植入取决于胚胎与子宫内膜间的协调反应,也有研究发现滋养层细胞存在 DcR1 的表达,在巨嗜细胞为 DcR2, MK 主要存在滋养外胚层的顶端^[28].本实验

仅从 MK 在蜕膜细胞中的作用做了简单的探索, 至于 MK 在滋养层细胞中如何与诱骗受体竞争结合 TRAIL 诱导细胞凋亡, 以及 MK 如何通过自分泌和(或)旁分泌与其他促凋亡因子相互协调、共同在子宫蜕膜细胞、胚胎滋养层细胞、uNK 细胞之间发挥作用还不清楚, MK 与其他促凋亡因子之间的相互作用机理及信号通路将是本研究下一步的研究方向和内容。

参 考 文 献

- [1] Wiley S R, Schooley K, Smolak P J. Identification and characterization of a new member of the TNF family that induces apoptosis. *Immunity*, 1995, **3**(6): 673-682
- [2] Pascal S, Dian O, Aubry T, *et al.* Identification of a new murine tumor necrosis factor receptor locus that contains two novel murine receptors for tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL). *Biol Chem*, 2003, **278**(7): 5444-5454
- [3] 杨根岭, 张晋平, 徐 倩, 等. 小鼠 MK 基因 siRNA 重组腺病毒载体的构建及鉴定. *重庆医科大学学报*, 2010, **35**(2): 165-168
Yang G L, Zhang J P, Xu Q, *et al.* *J Chongqing Medical Univ*, 2010, **35**(2): 165-168
- [4] He T C, Zhou S B, Luis T, *et al.* A simplified system for generation recombinant adenoviruses. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, **95**(5): 2509-2514
- [5] Kaneto H, Xu G, Song K H. Activation of the hexosamine pathway leads to deterioration of pancreatic β -cell function through the induction of oxidative Stress. *Biol Chem*, 2001, **276**(33): 31099-31104
- [6] Tan Y, Li M, Cox S, *et al.* HB-EGF directs stromal cell polyploidy and decidualization *via* cyclin D3 during implantation. *Dev Biol*, 2004, **265**(1): 181-195
- [7] Dey S K, Lim H, Das S K, *et al.* Molecular cues to implantation. *Endocrine Reviews*, 2004, **25**(3): 341-373
- [8] Evans M J, Kaufman M H. Establishment in culture of pluripotential cells from mous embryos. *Nature*, 1981, **292**(5819): 154-156
- [9] Monice F L, Andrade C G, Abrahamsohn P A, *et al.* Granulated decidual cells in the mouse deciduoma: a putative source of decidual prolactin in mice. *Cells Nssues Organs*, 2001, **16**(8): 252-263
- [10] Paria B C, Zhao X, Das S K, *et al.* Zonula occludens-I and E-cadherin are coordinately expressed in the mouse uterus with the initiation of implantation and decidualization. *Developmental Biology*, 1999, **20**(8): 488-501
- [11] Das S K. Cell cycle regulatory control for uterine stromal cell decidualization in implantation. *Reproduction and Fertility*, 2009, **35**(8): 1470-1626
- [12] Correia-da-Silva G, Bell S C, Pringle J H, *et al.* Patterns of uterine cellular proliferation and apoptosis in the implantation site of the rat during pregnancy. *Placenta*, 2004, **25**(6): 538-547
- [13] Abrahams V M, Kim Y M, Straszewski S L, *et al.* Macrophages and apoptotic cell clearance during pregnancy. *Am J Reprod Immunol*, 2004, **51**(4): 275-282
- [14] Joswig A, Gabriel H D, Kibschull M, *et al.* Apoptosis in uterine epithelium and decidua in response to implantation: evidence for two different pathways. *Reprod Biol Endocrinol*, 2003, **1**(1): 44-52
- [15] Selam B, Kayisli U A, Mulayim N, *et al.* Regulation of Fas ligand expression by estradiol and progesterone in human endometrium. *Biol Reprod*, 2001, **65**(4): 979-985
- [16] Luo Q, Kang Q, Song W X, *et al.* Selection and validation of optimal siRNA target sites for RNAi-mediated gene silencing. *Gene*, 2007, **39**(5): 160-69
- [17] Goldman S, Weiss A, Shalev E. The effect of progesterone on gelatinase expression in the decidual and fetal membranes before and after contractions. *Am J Obstet Gynecol*, 2007, **197**(5): 521-527
- [18] Blanco O, Tirado I, Muñoz-Fernández R, *et al.* Human decidual stromal cells express HLA-G: Effects of cytokines and decidualization. *Hum Reprod*, 2008, **23**(1): 144-152
- [19] King A. Uterine leukocytes and decidualization. *Hum Reprod Update*, 2000, **6**(1): 28-36
- [20] Bell S C. Assessment of endometrial differentiation and function. *Br Med Bull*, 1990, **46**(3): 720-732
- [21] Tan Y, Li M, Cox S, *et al.* HB-EGF directs stromal cell polyploidy and decidualization *via* cyclin D3 during implantation. *Dev Biol*, 2004, **265**(1): 181-195
- [22] Selam B, Kayisli U A, Mulayim N, *et al.* Regulation of Fas ligand expression by estradiol and progesterone in human endometrium. *Biol Reprod*, 2001, **65**(4): 979-985
- [23] Joswig A, Gabriel H D, Kibschull M, *et al.* Apoptosis in uterine epithelium and decidua in response to implantation: evidence for two different pathways. *Reprod Biol Endocrinol*, 2003, **1**(1): 44-52
- [24] Selam B, Kayisli U A, Mulayim N, *et al.* Regulation of Fas ligand expression by estradiol and progesterone in human endometrium. *Biol Reprod*, 2001, **65**(4): 979-985
- [25] Tan D M, He M Z, Chen Q, *et al.* Expression of trail in mouse uterine endometrium during embryo implantation. *J Reproduction Contraception*, 2006, **17**(1): 15-22
- [26] 张晋平, 罗文萍, 张 倩, 等. TRAIL 基因抑制小鼠子宫基质细胞的蜕膜化. *生物化学与生物物理进展*, 2010, **37**(3): 288-296
Zhang J P, Luo W P, Zhang Q, *et al.* *Prog Biochem Biophys*, 2010, **37**(3): 288-296
- [27] Wulff C, Weigand M, Kreienberg R, *et al.* Angiogenesis during primate placentation in health and disease. *Reprod*, 2003, **126**(5): 569-577
- [28] Riley J K, Heely J M, Wyman A H, *et al.* TRAIL and KILLER are expressed and induce apoptosis in the murine preimplantation embryo. *Biol Reprod*, 2004, **71**(3): 871-877

Effects of Mouse Killer Gene on Decidualization of Uterine Stromal Cells in Mice*

YANG Gen-Ling, LUO Wen-Ping, LIU Zhen-Zhen, TAN Dong-Mei, WANG Ying-Xiong, TAN Yi**

(Laboratory Animal Center, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

Abstract To explore the effects of the death receptor (mouse killer, MK) of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) on decidualization of mouse uterine stromal cells, both of the over-expression and siRNA of MK gene recombinant adenovirus were applied to infect the primary culture of mouse uterine stromal cells followed by decidualization induction with estrogen, progesterone plus cAMP. Seventy-two hours later, immunocytochemical assay and flow cytometry were used to detect the prolactin protein expression and apoptosis of decidualized cells, which were transfected with MK recombinant adenovirus (overexpression and RNAi). Moreover, each MK recombinant adenovirus was injected into the uterine horns of mice on the early morning of d4 of pregnancy. The number of implanting embryos was counted on d8 of pregnancy. The results showed that the levels of prolactin protein decreased significantly, but the apoptosis rate increased in the decidualized cells transfected with MK over-expression adenovirus. In the MK siRNA group, the prolactin levels were increased while the apoptosis rate was downregulated markedly. However, uterine injection of either the over-expression or the siRNA adenovirus led to dramatic decline the numbers of the implanting embryos. These results suggested that MK was involved in modulating the decidualization of mouse uterine stromal cells possibly through balancing proliferation and apoptosis of the decidualized cells.

Key words mouse killer (MK), decidualization, implantation

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2011.00022

*This work was supported by grants from The National Natural Science Foundation of China(30770816) and Chongqing Natural Science Foundation (CSTC2009BB5409).

**Corresponding author.

Tel: 86-23-68485997, E-mail: tanyee66@hotmail.com

Received: January 11, 2011 Accepted: May 3, 2011