

# 性腺激素对山羊子宫内膜细胞 TNF- $\alpha$ 与 TGF- $\beta$ 分泌活性的影响

屈延延, 齐雪峰\*, 南志春, 王爱华, 赵献军, 靳亚平

(西北农林科技大学动物医学院 农业部家畜生殖内分泌与胚胎工程重点开放实验室, 杨凌 712100)

**摘要:** 为探讨性腺激素对山羊子宫内膜细胞分泌活性的影响, 基于套皿培养技术构建永生化山羊子宫内膜上皮细胞(EEC)与基质细胞(ESC)共培养体外研究模型, 通过 ELISA 检测性腺激素  $E_2$  和/或  $P_4$  对单独培养 EEC 中 TNF- $\alpha$  与 TGF- $\beta$  分泌活性的调节作用以及 ESC 对该培养体系的影响。结果显示: 与未加激素对照组相比, 单独或混合添加  $E_2$  和  $P_4$  均可显著增加单独培养 EEC 向顶端分泌 TNF- $\alpha$  水平 ( $P < 0.05$ ), 而对细胞基底端 TNF- $\alpha$  分泌活性影响不显著;  $E_2$  单独作用较对照组显著降低 EEC 向细胞顶端分泌 TGF- $\beta$  水平 ( $P < 0.05$ ),  $P_4$  单独或与  $E_2$  共同作用下则主要对单独培养 EEC 顶端及基底端分泌 TGF- $\beta$  水平具有显著增强作用 ( $P < 0.05$ )。对于 EEC-ESC 共培养细胞模式,  $E_2$  和/或  $P_4$  显著降低 EEC 顶端和基底端 TNF- $\alpha$  分泌水平 ( $P < 0.05$ ); EEC 顶端 TGF- $\beta$  分泌水平在  $E_2$  和/或  $P_4$  作用下显著降低 ( $P < 0.05$ ), 而 EEC 基底端 TGF- $\beta$  分泌水平不受激素作用所影响。激素对单独培养及与 ESC 共培养模式下的极化 EEC 顶端及基底端 TNF- $\alpha$  与 TGF- $\beta$  分泌水平的差异, 提示 ESC 对激素作用下山羊子宫内膜上皮细胞分泌方向及分泌水平的重要调节作用。

**关键词:** 山羊; 子宫内膜细胞; 性腺激素; TNF- $\alpha$ ; TGF- $\beta$

中图分类号: S857.2

文献标识码: A

文章编号: 0366-6964(2012)03-0476-06

## Effect of Sex Hormone on the Cells Secretion Activity of TNF- $\alpha$ and TGF- $\beta$ in Goat Endometrial Cells

QU Yan-yan, QI Xue-feng\*, NAN Zhi-chun, WANG Ai-hua, ZHAO Xian-jun, JIN Ya-ping

(Key Laboratory of Animal Reproductive Endocrinology and Embryo Biotechnology of Ministry of Agriculture, College of Veterinary Medicine, Northwest A & F University, Yangling 712100, China)

**Abstract:** The aim of this study was to study the effect of sex gland hormones on the secretory activity to endometrial cells of goats. Based on the hanging cell coculture insert system, immortalization of goats endometrial epithelial cells (EEC) and stromal cells (ESC) has trained coculture *in vitro* studies model, the different levels and combinations of progesterone ( $P_4$ ) and estradiol ( $E_2$ ) were added in medium, without or with ESC together, TNF- $\alpha$  and TGF- $\beta$  secretory activity of EEC were determined by ELISA. The results showed that compared with no hormone control group, the secretion of TNF- $\alpha$  on EEC apical was enhanced markedly by  $P_4$  ( $P < 0.05$ ) when added alone or together  $E_2$  and  $P_4$ , but not significant on basolateral; TGF- $\beta$  secretory activity of both EEC apical and basolateral were reduced markedly by different concentrations and combinations of  $E_2$  and/or  $P_4$  ( $P < 0.05$ ), but TGF- $\beta$  on EEC apical was restrained significantly by  $E_2$  alone ( $P < 0.05$ ). About coculture with ESC together, both apical and basolateral of TNF- $\alpha$  secretion were repressed significantly by sex hormones  $E_2/P_4$  ( $P < 0.05$ ); TGF- $\beta$  on EEC apical

收稿日期: 2011-07-19

基金项目: 国家自然科学基金(30901089); 国家博士点基金资助项目(20090204120011)

作者简介: 屈延延(1986-), 女, 陕西洛川人, 硕士生, 主要从事家畜生殖内分泌学与免疫学相关研究, E-mail: qyy19860518@126.com

\* 通讯作者: 齐雪峰, 讲师, 博士, E-mail: yxyan2002@126.com

was restrained significantly by E<sub>2</sub>/P<sub>4</sub> ( $P < 0.05$ ), but not significant on basolateral. Our results indicated that the sex hormones in coculture mode alone or together with ESC, all can regulate the secretion of TNF- $\alpha$  and TGF- $\beta$  with different levels, suggested that ESC play an important regulatory role to the secrete direction and secretion levels of goat EEC when coculture with sex hormones.

**Key words:** goat; endometrial cell; sex gland hormone; TNF- $\alpha$ ; TGF- $\beta$

子宫内膜受各种生殖激素的影响,随机体生理状态的变化而变化,在内分泌和免疫方面发挥着独特的功能。子宫内膜上皮细胞(Endometrial epithelial cells, EEC)和基质细胞(Endometrial stromal cells, ESC)之间的相互作用对于子宫内膜正常功能的发挥具有十分重要的作用。ESC 通过分泌可溶性因子和细胞外基质调节 EEC 的分化和生长,而 EEC 则通过分泌可溶性因子和细胞—细胞间的直接作用调节 ESC 的功能<sup>[1]</sup>。动物子宫局部微环境中表达大量的细胞因子,其中转化生长因子  $\beta$  (Transforming growth factor- $\beta$ , TGF- $\beta$ )和肿瘤坏死因子  $\alpha$  (Tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ )在机体子宫局部免疫防御和生殖中具有关键的调节作用<sup>[2-4]</sup>。TGF- $\beta$  是一种具有多种生理功能的生长因子,可参与调节细胞增生、分化,调节细胞与细胞黏连,促进细胞外基质合成等生理过程。目前认为 TGF- $\beta$  也参与妊娠免疫调节<sup>[4-6]</sup>。Ingman 等对 TGF- $\beta$  基因敲除小鼠的研究发现, TGF- $\beta$  基因敲除小鼠生殖功能严重受损,推测胚胎发育障碍可能是由于体内 TGF- $\beta$  缺失,导致生殖内分泌功能受损<sup>[7]</sup>。TNF- $\alpha$  可在免疫细胞表达,也可由生殖系统分泌产生,是一种与生殖过程密切相关的炎性细胞因子。正常情况下子宫内膜的腺上皮、基底膜及卵巢间质中均有少量 TNF- $\alpha$  mRNA 的表达,这对维持子宫内膜组织内环境稳定和发情周期的调节发挥着重要作用<sup>[8-9]</sup>。雌二醇(17 $\beta$ -estradiol, E<sub>2</sub>)和孕酮(Progesterone, P<sub>4</sub>)是来自卵巢和子宫最主要的性腺激素,大量研究证明 E<sub>2</sub> 与 P<sub>4</sub> 在调节子宫内膜细胞分泌活性中发挥关键作用<sup>[10-12]</sup>,研究 E<sub>2</sub> 和 P<sub>4</sub> 对子宫内膜功能的影响将为深入理解子宫局部对病原的免疫保护和对胎儿的免疫耐受及妊娠失败等提供新思路。目前,关于人类与啮齿类动物的子宫内分泌—免疫调节相关研究已有大量文献报道<sup>[13-16]</sup>,而有关性腺激素对反刍动物子宫内膜细胞分泌活性的研究尚缺乏直接证明。

由于子宫内分泌—免疫调节是一种随发情周期

变化和妊娠进展而在时空上不断变化的动态过程,其复杂性以及细胞因子作用的多向性和重复性及其网络性的作用特点,大大增加了在体研究的难度。因而,建立体外子宫模型成为最有前景的研究方法之一。进行体外研究的一个先决条件是必须有足够的细胞数量,原代培养的细胞一方面由于数量的限制和无法长期传代,另外受分离方法的影响,很难达到完全的纯化,其中污染的其他细胞很可能会影响试验结果的准确性而限制了其应用。通过细胞端粒酶修饰而建立的永生化细胞系克服了早先的细胞永生化学程序常常造成的细胞核型的异常和功能特性的改变<sup>[17-18]</sup>。本研究以 hTERT (human telomerase reverse transcripta) 转染获得的永生化山羊 ESC 和 EEC 为基础,通过 ELISA 检测 E<sub>2</sub> 和 P<sub>4</sub> 对永生化山羊 EEC 中 TNF- $\alpha$  和 TGF- $\beta$  分泌活性的调节作用以及 ESC 对该培养体系的影响,为深入研究子宫内膜生理或病理机理、胚胎—子宫内膜间相互作用、以及家畜妊娠率的提高和生殖道的抗感染免疫机制提供依据。

## 1 材料与方 法

### 1.1 细胞

hTERT 转染获得的永生化山羊 ESC 和 EEC 由西北农林科技大学动物医学院靳亚平教授馈赠。该细胞形态及免疫化学特性均与原代培养细胞相似<sup>[19-20]</sup>。

### 1.2 主要试剂

DMEM/F-12 为 Gibco 产品;葡聚糖处理胎牛血清为 Biowest 产品;胰蛋白酶为 Amresco 产品;ELISA 试剂盒为 R&D 公司产品;E<sub>2</sub> 和 P<sub>4</sub> 均为 Sigma 公司产品,分别用无水乙醇和氯仿配制,过滤除菌,-20℃冻存,使用时用含血清的培养液稀释成设定浓度的工作液;悬挂式 24 孔板细胞培养套皿(PET 膜,孔径 0.4  $\mu\text{m}$ )为 Millipore 公司产品。

### 1.3 ESC 和 EEC 的复苏与传代培养

从液氮中取出冻存的山羊 ESC 和 EEC 分别放

入 37.5 °C 水浴锅中迅速解冻, 1 000 r · min<sup>-1</sup> 离心 5 min, 弃上清, 用新配制的 DMEM/F-12 完全培养液调整浓度至 1 × 10<sup>5</sup> 个 · mL<sup>-1</sup> 接种于细胞培养瓶, 置于 37 °C、5%CO<sub>2</sub> 的培养箱中恒温培养 2~3 d (以下培养条件均与此同)。待细胞生长至约 80% 时, 吸弃旧培养液, 无菌 PBS 液洗涤 2~3 遍后, 加入 2 mL 0.25% 胰酶消化 2~3 min, 显微镜下观察待细胞收缩变圆时, 弃去胰酶, 加入新鲜培养液, 用吸管轻轻吹打制成细胞悬液, 调节细胞密度为 1 × 10<sup>5</sup> 个 · mL<sup>-1</sup> 接种于细胞培养瓶中, 置 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养。根据细胞生长情况, 每 2~3 d 传代 1 次, 传代培养 3~4 次后进行下一步试验。

#### 1.4 性腺激素对单独培养 EEC 分泌活性的影响

采用套皿技术<sup>[21]</sup>: 将新鲜配制 DMEM/F-12 完全培养基加入 24 孔细胞培养板, 每孔 500 μL, 随后用无菌眼科镊将细胞培养套皿小室 (PET 膜, 孔径 0.4 μm) 嵌入 24 孔板各孔, 于各小室内加入 EEC 细胞悬液 200 μL (1 × 10<sup>5</sup> 个 · mL<sup>-1</sup>), 置 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养。通过细胞电阻仪每日测定 EEC 的穿膜阻力值 (Trans epithelial resistance, TER)。根据测定的 TER 值 (>1 000 Ω · 孔<sup>-1</sup>), 确定皿内 EEC 生长至完全细胞单层时, 将表 1 所述各浓度的 E<sub>2</sub> 或/和 P<sub>4</sub> 分别加入下室培养孔和上室套皿, 激素添加剂量及比例参照文献<sup>[10、12、22]</sup>。激素空白对照组补加等量 DMEM/F-12 培养液。上述培养体系于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养 48 h, 分别吸取上室和下室细胞培养上清液, ELISA 检测套皿内培养上清液中 TNF-α 及 TGF-β 含量。

表 1 试验处理

组别 Treatment	1	2	3	4	5
雌二醇(E <sub>2</sub> ) 17β-Estradiol	0	1 000	100	10	0
孕酮(P <sub>4</sub> ) Progesterone	0	0	10	100	1 000

#### 1.5 性腺激素和 ESC 共同作用对 EEC 分泌活性的影响

基于套皿技术构建 EEC-ESC 细胞复层模型<sup>[21]</sup>: 将浓度为 1 × 10<sup>5</sup> 个 · mL<sup>-1</sup> 的 ESC 细胞悬液加入 24 孔培养板的培养孔, 每孔 500 μL, 将上室套皿嵌入, 加入 EEC 细胞悬液 (1 × 10<sup>5</sup> 个 · mL<sup>-1</sup>), 每皿 200 μL, 于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱培养。待皿内

EEC 单层 TER 值达到 1 000 Ω · 孔<sup>-1</sup> 时, 将表 1 所述各浓度的 E<sub>2</sub> 或/和 P<sub>4</sub> 分别加入下室培养孔和上室套皿, 分组顺序与 1.4 同, 下室培养孔 500 μL · 孔<sup>-1</sup>, 上室套皿 200 μL · 孔<sup>-1</sup>。对照组补加等量 DMEM/F-12 培养液, 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养 48 h, 分别吸取上室和下室细胞培养上清液, ELISA 检测套皿内培养上清液中 TNF-α 及 TGF-β 含量。

## 2 结果

### 2.1 性腺激素对单独培养山羊 EEC 分泌活性的影响

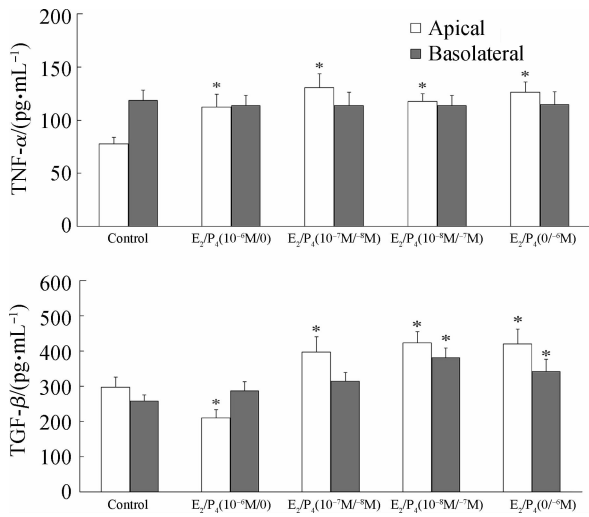
本研究通过套皿培养技术, 检测性腺激素对体外培养山羊子宫内膜上皮细胞单层分泌活性的影响。试验结果显示, 当套皿内 EEC 形成完全细胞单层后 (TER 值 >1 000 Ω · 孔<sup>-1</sup>), 激素作用下, 上室套皿与下室 24 孔培养板各孔上清培养液内 TNF-α 与 TGF-β 分泌水平具有显著差异。如图 1A 所示: 与未加激素对照组相比, 单独或混合添加 E<sub>2</sub> 和 P<sub>4</sub>, 均可显著增加上皮细胞向顶端分泌 TNF-α 水平 (P < 0.05), 而对细胞基底端 TNF-α 分泌活性影响不显著; 性腺激素对 EEC 中 TGF-β 的极性分泌水平也具有明显作用, 如图 1B 所示: E<sub>2</sub> 单独作用较对照组显著降低 EEC 向细胞顶端分泌 TGF-β 水平 (P < 0.05)。P<sub>4</sub> 单独或与 E<sub>2</sub> 共同作用则主要对 EEC 细胞顶端及基底端分泌 TGF-β 水平具有显著增强效应 (P < 0.05)。

### 2.2 性腺激素及 ESC 共同作用对山羊 EEC 分泌活性的影响

为检测子宫内膜基质细胞在激素调节上皮细胞分泌活性中的作用, 本研究构建了基于永生化山羊子宫内膜细胞的体外 EEC-ESC 细胞复层模型。结果表明, 相对于未添加激素组, 性腺激素对该培养模式 EEC 中 TNF-α 与 TGF-β 分泌活性主要呈抑制作用。如图 2A 所示, 与对照组相比, E<sub>2</sub> 和 P<sub>4</sub> 单独或共同作用均显著降低 EEC 向顶端和基底端 TNF-α 分泌水平 (P < 0.05)。子宫内膜上皮细胞单层向上室内分泌的 TGF-β 水平在激素作用下均显著降低 (P < 0.05), 而下室内 TGF-β 分泌水平不受激素作用所影响 (图 2B)。

## 3 讨论

子宫局部内分泌—免疫调节是一种随发情周期



\* \* 表示差异显著,  $P < 0.05$ ;  $n = 5$ 。下图同  
 \* \* " mean significantly different at  $P < 0.05$  level,  $n = 5$ . The same as below

图 1 性腺激素对 EEC 中 TNF- $\alpha$  和 TGF- $\beta$  分泌活性的影响

Fig. 1 Effect of sex hormones on release of TNF- $\alpha$  and TGF- $\beta$  by EEC

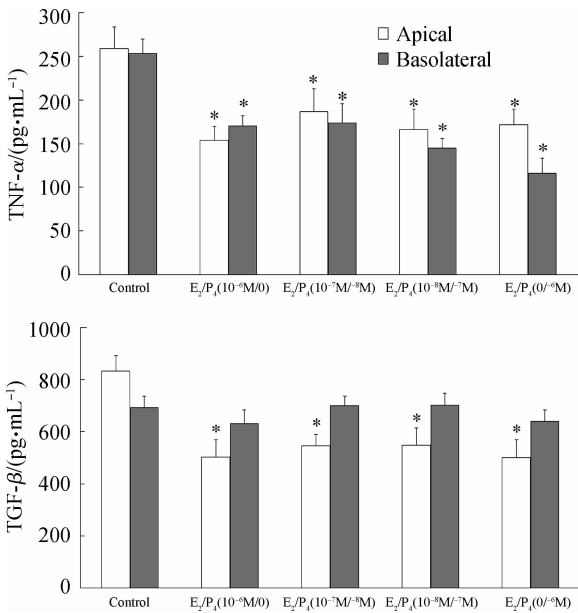


图 2 性腺激素对 EEC/ESC 共培养模式 EEC 中 TNF- $\alpha$  和 TGF- $\beta$  分泌活性的影响

Fig. 2 Effect of sex hormones on release of TNF- $\alpha$  and TGF- $\beta$  by coculture EEC/ESC

用具有重要意义。本试验通过套皿技术建立山羊子宫内皮细胞和基质细胞的体外共培养模型,比较分析了不同浓度及比例组合的 E<sub>2</sub> 和 P<sub>4</sub> 对子宫内皮细胞 2 种关键细胞因子 TNF- $\alpha$  与 TGF- $\beta$  分泌活性的调节作用。

很多研究通过 RT-PCR、免疫组化、ELISA、Western blot 等方法检测表明细胞因子和趋化因子的免疫调节作用对于子宫内膜功能的正常发挥起着关键作用<sup>[15,23-25]</sup>。子宫局部免疫微环境随发情周期及生殖周期有规律的变化表明性腺激素对子宫内皮细胞与免疫细胞分泌活性的重要调节作用<sup>[5,10-11]</sup>。研究表明子宫内皮细胞产生多种具有重要生物学功能的细胞因子<sup>[4-6]</sup>,其中 TNF- $\alpha$  和 TGF- $\beta$  的 mRNA 与蛋白质表达均受到 E<sub>2</sub> 和 P<sub>4</sub> 的调控<sup>[5,11,23]</sup>。Grant 等<sup>[2]</sup>对体外培养人子宫内皮细胞的分泌活性进行检测发现,极化的上皮细胞可同时向细胞顶端和基底端分泌 TNF- $\alpha$  和 TGF- $\beta$ ,E<sub>2</sub> 和 P<sub>4</sub> 均对该 2 种细胞因子的分泌水平具有不同的调节作用。关于人类及鼠子宫内分泌-免疫调节相关的在体或体外研究有大量报道<sup>[10-11,21,23,25-27]</sup>,关于羊等反刍动物的相关研究鲜有报道。Meeusen 等<sup>[28]</sup>的研究表明,反刍动物子宫内具有与其他动物明显不同的免疫调节机制。

本试验结果显示性腺激素 E<sub>2</sub> 和/或 P<sub>4</sub> 对单独培养 EEC 及 EEC-ESC 共培养模式下的山羊子宫内皮细胞中 TNF- $\alpha$  与 TGF- $\beta$  分泌水平具有不同的调节作用。对于单独培养 EEC,E<sub>2</sub> 单独作用会抑制 TGF- $\beta$  的顶端分泌,而 P<sub>4</sub> 单独或与 E<sub>2</sub> 共同作用可不同程度增强 EEC 顶端和基底端中 TGF- $\beta$  分泌活性,对 TNF- $\alpha$  只限于顶端促分泌作用,基底端则不受影响。相关研究表明,性腺激素主要通过与其靶细胞上的相应受体特异性结合发挥其调节作用<sup>[26]</sup>。本研究中 E<sub>2</sub> 和/或 P<sub>4</sub> 对山羊 EEC 顶端和基底端分泌活性的不同调节作用提示子宫内皮细胞上 E<sub>2</sub> 和 P<sub>4</sub> 受体的存在,其中 P<sub>4</sub> 对 EEC 中 TGF- $\beta$  分泌活性的增强作用与相关研究报道相似<sup>[29]</sup>。P<sub>4</sub> 对 EEC 中 TNF- $\alpha$  顶端分泌水平的增强作用则与在人及小鼠的相关研究报道存在一定差异<sup>[2]</sup>,这种差异可能与不同种属间子宫微环境生理特性及组织结构差异等方面的有关。

子宫内皮细胞和基质细胞的相互调节作用,对于子宫正常功能的发挥具有重要的作用<sup>[21,27,30]</sup>。Pierro 等<sup>[31]</sup>通过人子宫内皮细胞

和妊娠进程而在时空上不断变化的动态过程,其复杂性以及细胞因子作用的多向性(一种因子多种功能)和重复性(多种因子同一功能)等,大大增加了在体内研究的难度,因而,建立体外子宫模型对于探讨子宫内皮细胞特性的影响因素以及各因素之间的相互作用

与基质细胞共培养体外模型,发现  $E_2$  对上皮细胞的增殖作用是通过激素受体阳性的基质细胞旁分泌作用发生。单独培养的局限性使得人们转而建立更能模拟在体环境的体外三维模型<sup>[32-33]</sup>。Grant 等<sup>[2]</sup>在分离自小鼠的 EEC 和 ESC 共培养体系中,则发现 ESC 可降低 EEC 分泌 TNF- $\alpha$  的活性,而对 TGF- $\beta$  分泌功能无影响。本研究通过套皿培养技术建立了 EEC 与 ESC 共培养模型。ELISA 结果检测表明,  $E_2$  和/或  $P_4$  作用下,共培养体系 EEC 和 ESC 中 TNF- $\alpha$  和 TGF- $\beta$  的分泌水平均较无激素处理对照组表现出不同程度下降趋势,尤其是 TNF- $\alpha$  的分泌活性下降显著。激素对单独培养和共培养子宫内膜细胞模式下分泌水平调节作用的差异,提示 EEC-ESC 间相互作用在子宫局部内分泌-免疫调节中的重要作用。基于套皿培养技术构建 EEC-ESC 细胞复层模型较单独培养细胞能更准确地模拟在体子宫内膜组织,为子宫局部微环境内分泌-免疫调节机制的研究提供新方法。

#### 4 结 论

性腺激素  $E_2$  与/或  $P_4$  对单独培养 EEC 顶端分泌 TNF- $\alpha$  与 TGF- $\beta$  水平具有显著增强作用,而对细胞基底端分泌活性影响不显著;相反地,性腺激素对 EEC-ESC 共培养细胞复层模式下 EEC 中 TNF- $\alpha$  与顶端分泌 TGF- $\beta$  具有显著抑制作用。激素对单独培养及与 ESC 共培养模式下的 EEC 分泌水平的差异,提示 ESC 对激素作用下山羊子宫内膜上皮细胞分泌方向及分泌水平的重要调节作用。

#### 参考文献:

- [ 1 ] ROBERTS R M, CHEN Y, EZASHI T, et al. Interferons and the maternal-conceptus dialog in mammals[J]. *Semin Cell Dev Biol*, 2008,19:170-177.
- [ 2 ] GRANT T K S, WIRA C R, KATHERINE S G T, et al. Effect of oestradiol on mouse uterine epithelial cell tumour necrosis factor- $\alpha$  release is mediated through uterine stromal cells [J]. *Immunology*, 2005, 115:99-107.
- [ 3 ] CAKMAK H, GUZELOGLU-KAYISLI O, KAYISLI U A, et al. Immune-endocrine interactions in endometriosis[J]. *Front Biosci*, 2009,1:429-443.
- [ 4 ] KUMIKO S, KEIICHIRO K, CHANDANA B H, et al. Transforming growth factor beta family expression at the bovine fetomaternal interface[J]. *Reprod Biol Endocrinol*, 2010, 8:120.
- [ 5 ] AYATOLLAHI M, GERAMIZADEH B, YAZDANI M, et al. Effect of the immunoregulatory cytokines on successful pregnancy depends upon the control of graft rejection mechanisms [J]. *Transplant Proc*, 2007, 39(1):244-245.
- [ 6 ] WAN Y Y, FLAVELL R A. TGF- $\beta$  and regulatory T cell in immunity and autoimmunity[J]. *J Clin Immunol*, 2008, 28:647-659.
- [ 7 ] INGMAN W V, ROBKER R L, WOITTEZ K. Null mutation in TGF- $\beta$ 1 disrupts ovarian function and causes oocyte incompetence and early embryo arrest [J]. *Endocrinology*, 2006, 147(2):835-845.
- [ 8 ] HAIDER S, KNOFLER M. Human tumour necrosis factor: physiological and pathological roles in placenta and endometrium[J]. *Placenta*, 2009, 30:111-123.
- [ 9 ] HELMIG S, ALIAHMADI N, SCHNEIDER J. TNF- $\alpha$  gene polymorphisms in asbestos induced diseases[J]. *Biomarkers*, 2010, 15(5):400-409.
- [10] RUSSO L A, PEANO B J, TRIVEDI S P, et al. Regulated expression of matrix metalloproteinases, inflammatory mediators, and endometrial matrix remodeling by 17 $\beta$ -estradiol in the immature rat uterus[J]. *Reprod Biol Endocrinol*, 2009, 124(7):1-19.
- [11] KING A E, CRITCHLEY H O D. Oestrogen and progesterone regulation of inflammatory processes in the human endometrium [J]. *J Steroid Biochem*, 2010, 120:116-126.
- [12] WANG H B, LU S H, LIN Q X, et al. Reconstruction of endometrium *in vitro* via rabbit uterine endometrial cells expanded by sex steroid[J]. *Fertil Steril*, 2010, 93(7):2385-2395.
- [13] HUCK B, STECK T, HABERSACK M, et al. Pregnancy associated hormones modulate the cytokine production but not the phenotype of PBMC-derived human dendritic cells[J]. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, 2005,122:85-94.
- [14] LEDEE N, DUBANCHET S, LOMBROSO R, et al. Downregulation of human endometrial IL-18 by exogenous ovarian steroids[J]. *Am J Reprod Immunol*, 2006,56:119-123.
- [15] MOURIK M S, MACKLON N S, HEIJNEN C J. Embryonic implantation: cytokines, adhesion molecules, and immune cells in establishing an implantation environment[J]. *J Leukoc Biol*, 2009, 85(1):4-19.

- [16] ST-LOUIS I, SINGH M, BRASSEUR K, et al. Expression of COX-1 and COX-2 in the endometrium of cyclic, pregnant and in a model of pseudopregnant rats and their regulation by sex steroids[J]. *Reprod Biol Endocrinol*, 2010, 24:98-103.
- [17] HE Y L, WU Y H, HE X N, et al. An immortalized goat mammary epithelial cell line induced with human telomerase reverse transcriptase (hTERT) gene transfer [J]. *Theriogenology*, 2009, 71: 1417-1424.
- [18] ZHAO C F, HU H Y, MENG L, et al. Immortalization of bovine mammary epithelial cells alone by human telomerase reverse transcriptase[J]. *Cell Biol Int*, 2010, 34:579-586.
- [19] 盛红霞, 吴庆侠, 靳亚平, 等. 山羊子宫内膜基质细胞永生生化研究[J]. 畜牧兽医学报, 2009, 40(6):818-823.
- [20] 吴庆侠, 王爱华, 司永嘉, 等. 山羊子宫内膜上皮细胞转染 pCI-neo-hTERT 质粒后的永生生化[J]. 中国兽医学报, 2010, 30(2):228-232.
- [21] GRIFFITH J S, RODGERS A K, SCHENKEN R S. *In vitro* models to study the pathogenesis of endometriosis [J]. *Reproductive Sciences*, 2010, 17(1): 5-12.
- [22] 陈秀荔, 靳亚平, 张彦明. 分离培养兔子子宫内膜细胞的鉴定及性激素对子宫内膜间质细胞形态的影响[J]. 畜牧兽医学报, 2006, 37(11):1226-1231.
- [23] STOIKOS C J, HARRISON C A, SALAMONSEN L A, et al. A distinct cohort of the TGF $\beta$  superfamily members expressed in human endometrium regulate decidualization[J]. *Hum Reprod*, 2008, 23: 1447-1456.
- [24] COOKE F N T, PENNINGTON K A, YANG Q, et al. Several fibroblast growth factors are expressed during pre-attachment bovine conceptus development and regulate interferon-tau expression from trophoctoderm[J]. *Reproduction*, 2009, 137:259-269.
- [25] JESSMON P, LEACH R E, ARMANT D R. Diverse functions of HBEGF during pregnancy[J]. *Mol Reprod Dev*. 2009, 76:1116-1127.
- [26] TSUJI Y, TAMAOKI T H, HASEGAWA A, et al. Expression of interleukin-18 and its receptor in mouse ovary[J]. *Am J Reprod Immunol*, 2001, 46: 349-357.
- [27] DYAO L, AGOULNIK A I, COOKE P S, et al. Relative roles of the epithelial and stromal tissue compartment(s) in mediating the actions of relaxin and estrogen on cell proliferation and apoptosis in the mouse lower reproductive tract[J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2009, 1160:121-129.
- [28] MEEUSEN E N T, BISCHOF R J, LEE C S. Comparative T cell responses during pregnancy in large animals and humans [J]. *Am J Reprod Immunol*, 2001, 46:169-179.
- [29] WIRA C R, FAHEY J V, GHOSH M, et al. Sex hormone regulation of innate immunity in the female reproductive tract: the role of epithelial cells in balancing reproductive potential with protection against sexually transmitted pathogens [J]. *Am J Reprod Immunol*, 2010, 63:544-565.
- [30] SINGH H, NARDO L, KIMBER S J, et al. Early stages of implantation as revealed by an *in vitro* model[J]. *Reproduction*, 2010, 139(5): 905-914.
- [31] PIERRO E, MINICI F, ALESIANI O, et al. Stromal-epithelial interactions modulate estrogen responsiveness in normal human endometrium[J]. *Biol Reprod*, 2001, 64(3):831-838.
- [32] LALITKUMAR P G L, LALITKUMAR S, MENG C X, et al. Mifepristone, but not levonorgestrel, inhibits human blastocyst attachment to an *in vitro* endometrial three-dimensional cell culture model[J]. *Hum Reprod*, 2007, 22(11):3031-3037.
- [33] MENG C X, ANDERSSON K L, TIN-LEY U, et al. Effect of levonorgestrel and mifepristone on endometrial receptivity markers in a three-dimensional human endometrial cell culture model[J]. *Fertil Steril*, 2009, 91(1):256-264.

(编辑 白永平)