

DOI: 10.16781/j.0258-879x.2018.10.1122

· 论 著 ·

## 混合谱系激酶结构域样蛋白在小鼠妊娠早期子宫及蜕膜中的表达及调控

张 衡<sup>1</sup>, 武琳琳<sup>1</sup>, 李世杰<sup>1</sup>, 匡 野<sup>2</sup>, 马兴红<sup>1\*</sup>

1. 东北农业大学生命科学学院, 哈尔滨 150030

2. 哈尔滨医科大学附属第二医院妇产科, 哈尔滨 150001

**[摘要]** **目的** 探讨混合谱系激酶结构域样蛋白(MLKL)在小鼠妊娠早期子宫及蜕膜组织中的表达规律。

**方法** 构建小鼠早期妊娠模型、人工诱导子宫蜕膜化模型、雌二醇和(或)孕酮处理子宫模型;体外培养人子宫内膜基质细胞,应用雌二醇、醋酸甲羟孕酮和二丁酰环腺苷酸诱导其蜕膜化。通过实时荧光定量 PCR、原位杂交和蛋白质印迹法分析小鼠早期妊娠子宫、蜕膜化子宫和激素处理子宫中 MLKL mRNA 和蛋白的表达规律,通过实时荧光定量 PCR 检测 MLKL mRNA 在体外诱导的人蜕膜化细胞中的表达。**结果** (1)在小鼠早期妊娠子宫中,MLKL mRNA 及蛋白在妊娠第 1~4 天的子宫腔上皮表达量较低且不规律,在妊娠第 5 天的子宫腔上皮及其周围的蜕膜细胞中表达,妊娠第 6~8 天主要集中在蜕膜组织中表达,着床后表达量逐日增高并在妊娠第 7 天达到最高峰,妊娠第 8 天表达稍有下降。(2)在人工诱导蜕膜化的小鼠子宫中,MLKL mRNA 表达量很高,整个蜕膜区域均有表达,而在对照组小鼠子宫中则无明显表达。MLKL 蛋白的表达与 mRNA 相一致。MLKL mRNA 在体外诱导的人蜕膜化细胞中的表达量高于对照组,差异有统计学意义( $P<0.05$ )。(3)在孕酮处理的小鼠子宫中 MLKL mRNA 及蛋白表达量增高,与对照组相比差异有统计学意义( $P<0.05$ )。**结论** MLKL 受孕酮的调控参与哺乳动物胚胎着床和蜕膜化过程。

**[关键词]** 混合谱系激酶结构域样蛋白;程序性细胞坏死;妊娠;胚胎植入;蜕膜**[中图分类号]** R 321-33 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2018)10-1122-06

### Expression and regulation of mixed lineage kinase domain-like protein in uterus during early pregnancy and decidua in mice

ZHANG Heng<sup>1</sup>, WU Lin-lin<sup>1</sup>, LI Shi-jie<sup>1</sup>, KUANG Ye<sup>2</sup>, MA Xing-hong<sup>1\*</sup>

1. College of Life Science, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, Heilongjiang, China

2. Department of Obstetrics and Gynecology, the 2<sup>nd</sup> Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin 150001, Heilongjiang, China

**[Abstract]** **Objective** To investigate the expression of mixed lineage kinase domain-like protein (MLKL) in uterus during early pregnancy and decidua in mice. **Methods** Different mouse models including early pregnancy model, artificially induced decidualization model and hormone and/or progesterone treatment of uterine model were constructed; human endometrial stromal cells were cultured *in vitro* and were induced for decidualization by treating with estradiol-17 $\beta$ , medroxyprogesterone acetate and dibutyl cyclic adenosine monophosphate. The expression of MLKL mRNA and protein in the uterus of early pregnancy, decidual uterus, and hormone-treated uterus in mice were analyzed by real-time fluorescent quantitative PCR, *in situ* hybridization and Western blotting. The expression of MLKL mRNA in human decidual cells induced *in vitro* was detected by real-time fluorescent quantitative PCR. **Results** (1) In the uterus during early pregnancy in mice, the expression of MLKL mRNA and protein in uterine epithelium on the 1<sup>st</sup> to 4<sup>th</sup> day of pregnancy (day 1 was day of vaginal sperm) was low and irregular. It was expressed in the uterine epithelium and surrounding decidual cells on the 5<sup>th</sup> day of pregnancy, and was mainly expressed in the decidua from the 6<sup>th</sup> to 8<sup>th</sup> day of pregnancy. After the implantation, the expression of MLKL mRNA and protein was day-by-day increased and reached the highest on the 7<sup>th</sup> day of pregnancy, with a slight decrease on the 8<sup>th</sup> day. (2) In the uterus of mice with artificially induced decidualization, MLKL mRNA was expressed in the

**[收稿日期]** 2018-06-07 **[接受日期]** 2018-08-02**[基金项目]** 国家自然科学基金(31271601, 31571553), 黑龙江省教育厅海外学人科研资助项目(1253HQ016). Supported by National Natural Science Foundation of China (31271601, 31571553) and Scientific Research Foundation for Returned Overseas Chinese Scholars of Education Department of Heilongjiang Province (1253HQ016).**[作者简介]** 张 衡, 硕士生. E-mail: zh7952dian@163.com

\*通信作者(Corresponding author). Tel: 0451-55190321, E-mail: neaumalab@126.com

entire decidual region with high level; while there was no significant expression in the uterus of the control mice. The expression of MLKL protein was consistent with the expression of *MLKL* mRNA. The expression of *MLKL* mRNA in human decidual cells induced *in vitro* was significantly higher than that in the control group ( $P < 0.05$ ). (3) The expression of *MLKL* mRNA and protein in progesterone-treated uterus was significantly increased compared with the control group ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** MLKL regulated by steroid hormone progesterone is involved in embryo implantation and decidualization of mammals.

**[Key words]** mixed lineage kinase domain-like protein; necroptosis; pregnancy; embryo implantation; decidua

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2018, 39(10): 1122-1127]

规律性的细胞死亡在发育和维持成体组织的内稳态中具有重要作用。近年研究表明,生理和病理的细胞坏死能以一种有规律的方式发生<sup>[1]</sup>。这种有规律的坏死被称为程序性坏死<sup>[2]</sup>,它被认为是与经典的 Caspase 介导的细胞凋亡相互补的程序性细胞死亡方式<sup>[3]</sup>。细胞坏死也参与一些重要的生理过程,如免疫抵御、排卵、软骨细胞的死亡和肠上皮细胞的死亡等<sup>[4]</sup>。该过程是由不同细胞水平的生物化学和分子事件共同诱导的,而蛋白激酶受体相互作用蛋白激酶 3 (receptor interacting protein kinase 3, RIPK3) 和它下游的底物混合谱系激酶结构域样蛋白 (mixed lineage kinase domain-like protein, MLKL) 则是程序性细胞坏死中的关键性细胞成分。

细胞凋亡以及自噬均参与哺乳动物胚胎着床过程,但程序性细胞坏死在胚胎着床过程中的作用尚不清楚。MLKL 是程序性细胞坏死的下游重要信号分子,本研究通过观察 MLKL 在早期妊娠子宫和子宫蜕膜化过程中的表达,探讨程序性细胞坏死是否参与哺乳动物胚胎着床和蜕膜化过程,同时分析雌二醇和孕酮对 MLKL 的调控作用。

## 1 材料和方法

1.1 主要试剂 TRIzol 试剂, Invitrogen 公司; SYBR Green Realtime PCR Master Mix-Plus, TaKaRa 公司; NBT/BCIP 底物显色试剂, Roche 公司; 左旋咪唑、二甲基亚砷 (dimethyl sulfoxide, DMSO)、17 $\beta$ -雌二醇、孕酮、醋酸甲羟孕酮, Sigma 公司; MLKL 抗体, 由厦门大学韩家淮实验室赠送; 甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH) 抗体, Cell Signaling Technology 公司; 辣根过氧化物酶标记山羊抗兔 IgG, ABClonal 公司; 蛋白质相对分子质量标准品 (marker), Thermo 公司。

1.2 实验动物 性成熟的 ICR 品系小鼠购于黑

龙江省中医药大学[许可证号: SYXK (黑) 2016-004], 饲养于东北林业大学[许可证号: SYXK (黑) 2015-002], 在人工控制的条件下, 室温 22  $^{\circ}\text{C}$ , 光照周期为 12 h 光照、12 h 黑暗, 自由摄食和饮水。早期妊娠模型建立: 雄鼠与雌鼠按 1 : 3 合笼交配。次晨检查雌鼠的阴道栓, 并把见栓当天记为妊娠第 1 天。人工诱导蜕膜化模型建立: 将健康雄性小鼠的双侧输精管结扎, 待其恢复至少 2 周后, 与自然发情的雌鼠按 1 : 3 合笼, 次日早上检查阴道栓, 并把见栓当天记为假孕第 1 天。假孕第 4 天上午 9 : 00 将小鼠一侧子宫注射芝麻油 50  $\mu\text{L}$ , 另一侧作为对照。假孕第 8 天上午 9 : 00 取材。激素处理模型: 将健康成年雌鼠的双侧卵巢切除, 待其恢复至少 2 周后, 随机将这些小鼠分为 4 组, 根据分组分别皮下注射类固醇激素 (溶于芝麻油中) 或芝麻油: 对照组注射芝麻油, 每只 0.1 mL; 孕酮处理组注射孕酮, 每只 2 mg/0.1 mL; 雌二醇处理组注射 17 $\beta$ -雌二醇, 每只 25 ng /0.1 mL; 雌二醇+孕酮共处理组注射 17 $\beta$ -雌二醇 25 ng 和孕酮 2 mg, 每只 0.1 mL。激素注射 24 h 后取材。

1.3 实时荧光定量 PCR 取小鼠子宫组织 50~100 mg, 提取组织总 RNA, 并将总 RNA 反转录为 cDNA。以 cDNA 为模板进行 PCR。MLKL (NCBI 序列号: NC\_000074.6) 引物序列: 上游引物 5' -CAG AAA CAT CAG CAG CTC CA-3', 下游引物 5' -ATG ATT TCC CGC AAC AAC TC-3', 由生工生物工程 (上海) 股份有限公司合成。反应体系 (20  $\mu\text{L}$ ) 如下: SYBR Premix *Ex Taq* (Tli RNaseH Plus) (2 $\times$ ) 10  $\mu\text{L}$ , 上、下游引物 (10  $\mu\text{mol/L}$ ) 各 0.4  $\mu\text{L}$ , Rox Reference Dye (50 $\times$ ) 0.4  $\mu\text{L}$ , 模板 cDNA 2  $\mu\text{L}$ , 水 6.8  $\mu\text{L}$ 。反应条件: 95  $^{\circ}\text{C}$  预变性 31 s; 95  $^{\circ}\text{C}$  5 s、60  $^{\circ}\text{C}$  34 s, 40 个循环后收集荧光信号。使用 Applied Biosystems<sup>®</sup> 7500 Real-Time PCR System 操作, 由仪器自动绘制熔解

曲线,采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算目的基因相对表达量。

1.4 原位杂交 将冻存的正常妊娠第1~8天和人工蜕膜化小鼠子宫组织切片烘片2 min,用4%四氟乙烯-全氟烷氧基乙烯基醚共聚物(polyfluoroalkoxy, PFA)固定1 h,磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline, PBS)洗去固定液,1% Triton X-100透膜20 min,洗涤;预杂交;杂交;洗涤;0.5%封闭液[TSA™ PLUS DNP (AP) System试剂盒,PerkinElmer公司]室温封闭;Anti-Digoxigenin-POD(1:100, Roche公司)室温孵育;TNT(0.1 mol/L Tris pH 7.5, 0.15 mol/L NaCl, 0.05%吐温-20)洗涤;DNP Amplification Reagent(1:50, PerkinElmer公司)避光孵育10 min;洗涤;Anti-DNP-AP(1:200, PerkinElmer公司)4℃避光孵育过夜。洗涤,用缓冲液2(0.1 mol/L Tris pH 7.5, 0.1 mol/L NaCl, 0.05 mol/L MgCl<sub>2</sub>)平衡5 min,滴加显色试剂NBT/BCIP(1:50)与2 mmol/L左旋咪唑室温显色,甲基绿对染,甘油封片,照相。

1.5 蛋白质印迹分析 取冻存的正常妊娠第1~8天、激素处理和人工诱导蜕膜化的小鼠子宫组织匀浆,取上清用BCA蛋白浓度测定试剂盒(Biosharp公司)测定蛋白样品浓度。取等质量的蛋白样品(约20 μL)进行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE)。将蛋白转膜后用脱脂奶粉溶液4℃封闭过夜,分别与兔源MLKL一抗(1:700)和鼠源GAPDH一抗(1:300, Santa Cruz公司)37℃孵育1 h, PBST洗10 min×3次,与5%脱脂奶粉溶液稀释的二抗37℃孵育1 h, PBST洗10 min×3次,用电化学超敏发光液(Coolaber公司)显影,曝光。用ImageJ软件对灰度进行相对定量分析,以GAPDH作为内参。

1.6 体外诱导人子宫内膜基质细胞蜕膜化 人子宫内膜基质细胞系CRL-4003(美国典型微生物菌种保藏中心)使用不含酚红的DMEM/F-12(1:1)培养基进行传代培养。为了去除血清中本身含有的激素对实验结果的影响,选用活性炭吸附处理后的胎牛血清(fetal bovine serum, FBS),将其以1:10的比例加入培养基中。细胞以 $1\times 10^6$ /mL的密度接种于35 mm直径培养盘中,在含有5% CO<sub>2</sub>的37℃培养箱中培养。当细

胞贴壁生长,长到80%融合时,可以开始诱导蜕膜化。更换新鲜的培养液,在处理组中加入终浓度为36 nmol/L的雌二醇、1 μmol/L的醋酸甲羟孕酮(雌二醇和醋酸甲羟孕酮的溶剂均为无水乙醇),并加入终浓度为0.1 mmol/L的二丁酰环腺苷酸(Sigma公司);在对照组中按体积比1:1 000加入无水乙醇。每隔1 d更换1次新鲜培养液,并按上述浓度重新添加激素和二丁酰环腺苷酸。用TRIzol试剂分别收集处理后第3天、第6天和第9天的细胞,采用实时荧光定量PCR检测催乳素(prolactin, PRL)和MLKL mRNA的表达。

1.7 统计学处理 采用GraphPad Prism 5.0软件绘图并分析数据。实验数据用 $\bar{x}\pm s$ 表示,组间比较采用单因素方差分析或Student's *t*检验,检验水准( $\alpha$ )为0.05。

## 2 结果

2.1 MLKL在小鼠早期妊娠子宫中的表达 实时荧光定量PCR、原位杂交和蛋白质印迹分析结果显示,在小鼠早期妊娠子宫中,MLKL mRNA及蛋白在妊娠第1~4天的小鼠子宫腔上皮表达,但表达量较低且不规律;在妊娠第5天的小鼠子宫腔上皮及其周围的蜕膜细胞中表达,与之对照的妊娠第5天非着床位点无明显表达;妊娠第6~8天主要集中在蜕膜组织中表达,着床后表达量逐日增高并在妊娠第7天达到最高峰,第8天表达量稍有下降(图1)。

2.2 MLKL在蜕膜化子宫中的表达 原位杂交结果显示,在人工诱导蜕膜化的小鼠子宫中MLKL mRNA表达量很高,整个蜕膜区域均有表达(图2A),而在未处理的对照组子宫中则无明显表达。MLKL蛋白的表达与mRNA相一致(图2B)。为了更精确地研究MLKL在子宫蜕膜化中的作用,将人子宫内膜基质细胞进行传代培养,并对其体外蜕膜化诱导。实时荧光定量PCR结果显示,作为蜕膜化标志分子的PRL mRNA在体外诱导蜕膜化的人子宫内膜基质细胞中表达量非常高,证明人子宫内膜基质细胞蜕膜化体外诱导成功且效率较高(图2C)。MLKL mRNA在体外诱导蜕膜化人子宫内膜基质细胞中表达量高于对照组,差异有统计学意义( $P<0.05$ ,图2D)。

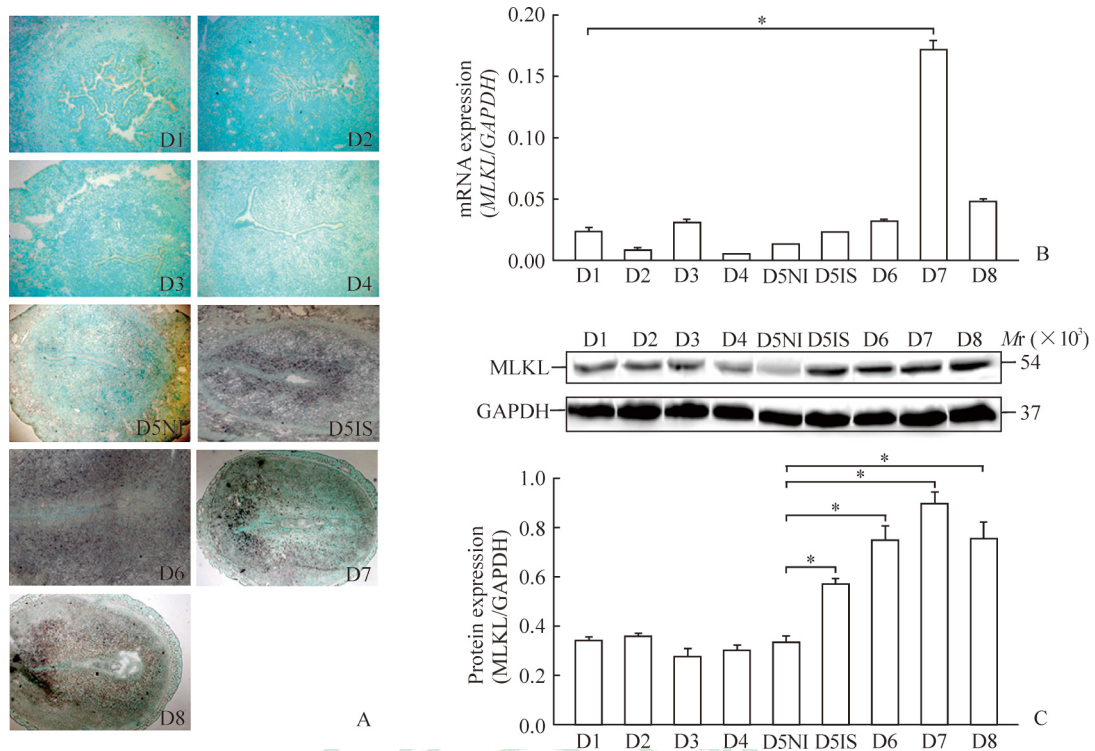


图 1 MLKL 在小鼠早期妊娠第 1 ~ 8 天子宫中的表达

Fig 1 Expression of MLKL in mouse uterus during early pregnancy from day 1 to day 8

A: *In situ* hybridization (original magnification:  $\times 100$  [D1-D4, D5NI, D5IS, D6],  $\times 40$  [D7, D8]); B: Real-time PCR; C: Western blotting. MLKL: Mixed lineage kinase domain-like protein; GAPDH: Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; D1-D8: Pregnancy day 1 to day 8; NI: Non-implantation site; IS: Implantation site. \* $P < 0.05$ .  $n = 3$ ,  $\bar{x} \pm s$

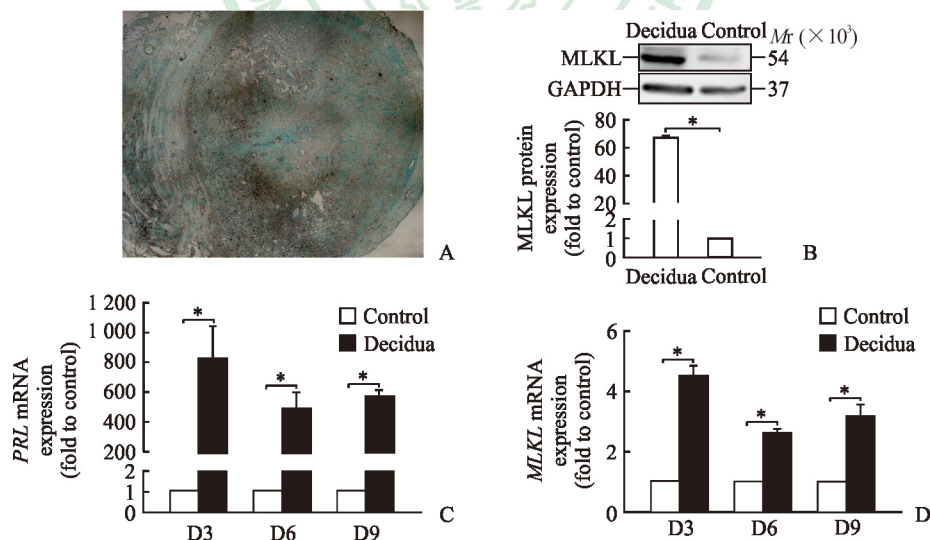


图 2 MLKL 在小鼠人工蜕膜化子宫组织及体外诱导蜕膜化人子宫内膜基质细胞中的表达

Fig 2 Expression of MLKL in uterus of mice with artificially induced decidualization and human decidual cells induced *in vitro*

A: Expression of MLKL in uterus of mice with artificially induced decidualization by *in situ* hybridization; B: Expression of MLKL protein in uterus of mice with artificially induced decidualization by Western blotting; C, D: Expression of *PRL* and *MLKL* mRNA in human decidual cells induced *in vitro* by real-time PCR. MLKL: Mixed lineage kinase domain-like protein; GAPDH: Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; PRL: Prolactin. D3, D6, D9: Pregnancy day 3, day 6, and day 9. Original magnification:  $\times 100$  (A). \* $P < 0.05$ .  $n = 3$ ,  $\bar{x} \pm s$

2.3 *MLKL* 在激素处理子宫中的表达 与对照组小鼠子宫相对比,孕酮处理组小鼠子宫中 *MLKL* mRNA 和蛋白表达量增高,差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ); 雌二醇处理组和雌二醇+孕酮共处

理组小鼠子宫中, *MLKL* mRNA 的表达量与对照组差异无统计学意义, *MLKL* 蛋白的表达量与对照组和单独孕酮处理组相比虽略有差异但无统计学意义 (图 3)。

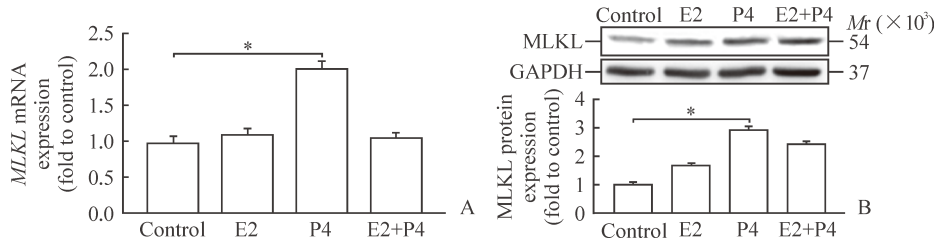


图 3 *MLKL* 在类固醇激素处理的小鼠子宫中的表达

Fig 3 Expression of *MLKL* in steroid-treated mouse uterus

A: Expression of *MLKL* mRNA by real-time PCR; B: Expression of *MLKL* protein by Western blotting. *MLKL*: Mixed lineage kinase domain-like protein; *GAPDH*: Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; E2: Estrogen; P4: Progesterone. \* $P < 0.05$ .  $n = 3$ ,  $\bar{x} \pm s$

### 3 讨论

细胞凋亡参与哺乳动物胚胎着床过程,在胚胎着床期间大鼠胚胎周围的子宫上皮细胞经历了凋亡性的细胞死亡,最终导致它们被滋养层细胞所吞噬<sup>[5]</sup>。还有研究发现,自噬与滋养层细胞密切相关,滋养层细胞侵入子宫上皮的过程有可能因为自噬功能的异常而被阻断,滋养层细胞的功能作用也会受到它的影响<sup>[6-7]</sup>。近年来程序性细胞坏死受到广泛关注,而 *MLKL* 在肿瘤坏死因子 (tumor necrosis factor, TNF) 诱导的程序性坏死通路中具有重要作用<sup>[8-9]</sup>。本研究结果显示当妊娠进入第 5 天,胚胎着床发生, *MLKL* mRNA 的表达量开始升高,集中定位在子宫腔上皮,并在早期妊娠过程中持续表达,显示出规律性,而在非着床位点处则观察不到明显的表达; *MLKL* 蛋白同样在妊娠第 5 天开始表达量显著升高。这表明 *MLKL* 与胚胎着床过程关系密切,并且其在子宫腔上皮细胞中的表达可能受着床胚胎的特异性影响。

子宫基质细胞的蜕膜化是胎盘形成以及维持妊娠的必要条件之一。蜕膜化过程包含很多生物学事件,例如子宫内膜基质细胞的生长、细胞形态的显著变化、细胞的凋亡,基质成纤维细胞的再分化、多倍体化,以及细胞外基质的重新建立、细胞间连接的建立等<sup>[10-11]</sup>。研究显示,完全发育的蜕膜组织能分泌生长因子和细胞因子来支持胚胎发育,并支持母源的血管形成为发育中的胚胎提供营养;

同时蜕膜组织还能发挥免疫调节的作用,为胚胎提供阻止其他滋养层细胞侵入的屏障,并且在功能性胎盘形成之前保护胚胎免受母体排斥<sup>[5,12-14]</sup>。本研究结果显示 *MLKL* mRNA 在妊娠第 5 天着床位点处表达较明显,并且主要表达于着床位点周围的子宫腔上皮以及蜕膜区域;妊娠第 6~8 天子宫的蜕膜区域均有较为明显的表达,其表达量在妊娠第 7 天达到最高峰,之后稍有下降;在人工蜕膜化小鼠模型以及体外诱导人蜕膜化细胞中, *MLKL* mRNA 和蛋白表达量均非常高;而在未发生蜕膜化的对照组中, *MLKL* mRNA 和蛋白的表达基本检测不到。这些结果表明 *MLKL* 可能在小鼠子宫蜕膜化过程中起作用。

作为早期妊娠过程中关键的调控因子,雌二醇与孕酮这两种卵巢激素相互作用,调节早期妊娠的正常建立<sup>[15]</sup>。2014 年, Vanden Berghe 等<sup>[16]</sup>发现了孕酮介导的程序性细胞坏死的信号转导途径。随后, Wu 等<sup>[17]</sup>采用孕酮处理,通过激活 TNF- $\alpha$ /RIPK1/RIPK3/*MLKL* 途径,诱导小鼠输卵管上皮细胞程序性坏死,再次证实了孕酮对 *MLKL* 的激活作用。本研究结果也证实了这一点。与对照组相比,在孕酮处理组小鼠子宫中, *MLKL* mRNA 和蛋白表达量均增高;但在单独雌二醇处理以及雌二醇+孕酮共处理组小鼠子宫中, *MLKL* mRNA 和蛋白表达量并不同步,说明 *MLKL* 在转录后的翻译过程中发生了变化,而雌二醇和孕酮的相互作用可能影响了孕酮对 *MLKL* 的表达调控。*MLKL* 的

表达是否受雌二醇调控还未见研究报道。因此, 我们认为 MLKL 在小鼠子宫中的表达受孕酮的调控。

综上所述, 本研究结果表明 MLKL 在胚胎着床以及蜕膜化过程中发挥作用。今后仍需继续对其上下游的调控因子进行深入研究, 以进一步阐明程序性细胞坏死在早期妊娠中的作用及机制。

## [参 考 文 献]

- [1] CHAN F K. Fueling the flames: mammalian programmed necrosis in inflammatory diseases[J/OL]. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2012, 4. pii: a008805. doi: 10.1101/cshperspect.a008805.
- [2] GALLUZZI L, VITALE I, ABRAMS J M, ALNEMRI E S, BAEHRECKE E H, BLAGOSKLONNY M V, et al. Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012[J]. *Cell Death Differ*, 2012, 19: 107-120.
- [3] HILDEBRAND J M, TANZER M C, LUCET I S, YOUNG S N, SPALL S K, SHARMA P, et al. Activation of the pseudokinase MLKL unleashes the four-helix bundle domain to induce membrane localization and necroptotic cell death[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2014, 111: 15072-15077.
- [4] FESTJENS N, VANDEN BERGHE T, VANDENABEELE P. Necrosis, a well-orchestrated form of cell demise: signalling cascades, important mediators and concomitant immune response[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2006, 1757(9/10): 1371-1387.
- [5] WELSH A O, ENDERS A C. Trophoblast-decidual cell interactions and establishment of maternal blood circulation in the parietal yolk sac placenta of the rat[J]. *Anat Rec*, 1987, 217: 203-219.
- [6] AKAISHI R, YAMADA T, NAKABAYASHI K, NISHIHARA H, FURUTA I, KOJIMA T, et al. Autophagy in the placenta of women with hypertensive disorders in pregnancy[J]. *Placenta*, 2014, 35: 974-980.
- [7] GONG J S, KIM G J. The role of autophagy in the placenta as a regulator of cell death[J]. *Clin Exp Reprod Med*, 2014, 41: 97-107.
- [8] ZHAO J, JITKAEW S, CAI Z, CHOKSI S, LI Q, LUO J, et al. Mixed lineage kinase domain-like is a key receptor interacting protein 3 downstream component of TNF-induced necrosis[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2012, 109: 5322-5327.
- [9] MURPHY J M, CZABOTAR P E, HILDEBRAND J M, LUCET I S, ZHANG J G, ALVAREZ-DIAZ S, et al. The pseudokinase MLKL mediates necroptosis via a molecular switch mechanism[J]. *Immunity*, 2013, 39: 443-453.
- [10] FAZLEABAS A T, BELL S C, FLEMING S, SUN J, LESSEY B A. Distribution of integrins and the extracellular matrix proteins in the baboon endometrium during the menstrual cycle and early pregnancy[J]. *Biol Reprod*, 1997, 56: 348-356.
- [11] TAN J, RAJA S, DAVIS M K, TAWFIK O, DEY S K, DAS S K. Evidence for coordinated interaction of cyclin D3 with p21 and cdk6 in directing the development of uterine stromal cell decidualization and polyploidy during implantation[J]. *Mech Dev*, 2002, 111(1/2): 99-113.
- [12] PARIJA B C, ZHAO X, DAS S K, DEY S K, YOSHINAGA K. Zonula occludens-1 and E-cadherin are coordinately expressed in the mouse uterus with the initiation of implantation and decidualization[J]. *Dev Biol*, 1999, 208: 488-501.
- [13] PENG S, LI J, MIAO C, JIA L, HU Z, ZHAO P, et al. Dickkopf-1 secreted by decidual cells promotes trophoblast cell invasion during murine placentation[J]. *Reproduction*, 2008, 135: 367-375.
- [14] ROGERS P A, MURPHY C R, ROGERS A W, GANNON B J. Capillary patency and permeability in the endometrium surrounding the implanting rat blastocyst[J]. *Int J Microcirc Clin Exp*, 1983, 2: 241-249.
- [15] KUMAR R, YADAV A, PAKRASI P L. Expression of ER- $\alpha$  and ER- $\beta$  during peri-implantation period in uterus is essential for implantation and decidualization in golden hamster[J]. *Life Sci*, 2017, 170: 115-122.
- [16] VANDEN BERGHE T, LINKERMANN A, JOUAN-LANHOUE T, WALCZAK H, VANDENABEELE P. Regulated necrosis: the expanding network of non-apoptotic cell death pathways[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2014, 15: 135-147.
- [17] WU N Y, HUANG H S, CHAO T H, CHOU H M, FANG C, QIN C Z, et al. Progesterone prevents high-grade serous ovarian cancer by inducing necroptosis of p53-defective fallopian tube epithelial cells[J]. *Cell Rep*, 2017, 18: 2557-2565.

[本文编辑] 孙 岩