

小鼠围着床期子宫内膜甲基化CpG结合域蛋白2的表达规律

周一青 何俊琳 陈雪梅 王应雄 刘学庆 丁裕斌*
(重庆医科大学公共卫生与管理学院生殖生物学教研室, 重庆 400016)

摘要 为研究甲基化CpG结合域蛋白2(methyl-CpG binding domain protein 2, MBD2)在围植入期小鼠子宫内膜的表达规律, 通过采用实时荧光定量PCR(Real-time fluorescence quantitative PCR, qPCR)、Western blot和免疫组化技术检测未孕小鼠(d0)和不同孕天小鼠子宫MBD2的表达情况。qPCR结果显示, d0至d7的小鼠子宫内膜组织均有*MBD2* mRNA表达, 在d5至d7高表达。MBD2蛋白在子宫内膜的表达规律与qPCR结果相符。MBD2蛋白在孕d1到d4中度表达于腔上皮、腺上皮和基质细胞, 在d5至d7基质细胞表达增强, 主要表达于蜕膜区。假孕小鼠子宫内膜中, MBD2在腔上皮、腺上皮和基质细胞中中度表达, d5至d7基质细胞表达明显减弱。动物模型中, 宫角注射*MBD2*基因反义寡聚脱氧核苷酸, 可抑制MBD2的表达, 降低人工诱导蜕膜化反应和蜕膜化标志物PRL的表达。MBD2在早孕小鼠子宫内膜的表达模式提示其可能参与了蜕膜化过程。

关键词 甲基化CpG结合域蛋白2; 小鼠; 蜕膜化

The Expression Pattern of Methyl-CpG Binding Domain Protein 2 (MBD2) in Mouse Endometrium during Preimplantation

Zhou Yiqing, He Junling, Chen Xuemei, Wang Yingxiong, Liu Xueqing, Ding Yubin*
(Laboratory of the Reproductive Biology, School of Public Health and Management,
Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

Abstract The experiment was aim to explore the expression pattern of Methyl-CpG binding domain protein 2 (MBD2) during peri-implantation in the mouse endometrium. Expression of *MBD2* mRNA and MBD2 protein in the non-pregnant and pregnant mouse endometrium from d0 to d7 was examined by Real-time fluorescence quantitative PCR (qPCR), Western blot and immunohistochemistry. *MBD2* mRNA expressed in uterine endometrium of the non-pregnant (d0) and pregnant mouse (d1 to d7). *MBD2* mRNA increased gradually from d5 to d7. Western blot analysis showed that the protein expression of MBD2 in mouse endometrium had the similar expression pattern to its mRNA that detected by Real-time fluorescence quantitative PCR. Moreover, from pregnant d1 to d4, MBD2 was expressed in epithelium, glandular cells and stromal cells in the endometrium. On d5 to d7, MBD2 was more intensely expressed in stromal cells, especially in the decidual zone. The expression of MBD2 in the pseudopregnant on d1 and d4 was expressed in epithelium, glandular cells and stromal cells in the endometrium. But it was significantly lower in the stromal on d5 to d7. Using artificial decidualization and treatment with

收稿日期: 2014-02-19 接受日期: 2014-04-29

国家自然科学基金(批准号: 81370731)资助的课题

*通讯作者。Tel: 023-68485008, E-mail: dingyb@gmail.com

Received: February 19, 2014 Accepted: April 29, 2014

This work was supported by National Science Foundation of China (Grant No.81370731)

*Corresponding author. Tel: +86-23-68485008, E-mail: dingyb@gmail.com

网络出版时间: 2014-07-02 14:16 URL: <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.11844/cjcb.2014.08.0046.html>

antisense oli-godexynucleotides of *MBD2*, the expression of *MBD2* in the uterus was remarkably inhibited and the level of decidualization was decreased. These results suggested that *MBD2* was involved in modulating the decidualization of mouse uterine.

Key words MBD2; mouse; decidualization

胚胎着床是人类和哺乳动物生殖过程中的关键环节。成功的胚胎着床受到子宫内膜容受性的形成、囊胚的同步发育以及母胎同步对话等多因素的影响^[1-3]。近来研究发现,围着床期子宫内膜功能性变化(如受性建立、内膜细胞的增殖和分化)受到表观遗传修饰的调控(如DNA甲基化、组蛋白乙酰化和siRNA等)^[4]。DNA甲基化修饰作用是生理活动中最常见的表观遗传修饰方式之一,它通过DNA甲基转移酶(DNA methyltransferases, DNMTs)的作用,可在基因启动子CpG二核苷酸富集区域的胞嘧啶(C)的5'端添加甲基基团,从而达到抑制基因转录的效果。Yamagata等^[5]和Vincent等^[6]研究发现, *DNMT1*和*DNMT3a* mRNA在整个月经周期子宫内膜有规律性表达,并且DNMT1、DNMT3a、DNMT3b受类固醇激素调控。这表明, DNA甲基化在子宫内膜月经周期发挥作用。

Logan等^[7]用DNMT抑制剂5'-AZA处理人子宫内膜基质细胞第9 d, 诱发生成纤维细胞样细胞转化为蜕膜样细胞, 第10 d蜕膜化标志基因*prolactin*和*IGFBP-1*表达上调。提示DNA甲基化参与子宫内膜的蜕膜化过程。

DNMT1、DNMT3a和DNMT3b在小鼠早孕期内膜呈现规律性表达,即在容受态前期表达逐步升高, d3表达至峰值,此后在容受期和着床期表达逐步下降,且三种DNMT在胚胎着床点的表达较着床点旁降低, DNMT3a呈现显著性降低^[8]。0.5 μm/kg和5 μm/kg 5-AZA(DNMT抑制剂)腹腔注射假孕小鼠2~4 d, 胚胎移植实验发现高剂量组能够明显抑制假孕d5小鼠子宫内膜DNMT1和DNMT3a的表达,并影响胚胎的植入^[9]。DNMT在子宫内膜特定时空的低表达,将引发基因或基因组被动去甲基化,有利于子宫内膜容受性的建立和蜕膜化。这均提示,子宫内膜表达的一些基因的甲基化修饰亦可能受到激素的调控,并参与调控胚胎植入前后子宫的发育、内膜细胞的增殖和分化。

甲基化CpG结合蛋白(methyl-CpG binding domain, MBD)家族是一类与甲基化CpG二核苷酸结合的核

蛋白, MBD2作为该家族成员,能有机地将DNA甲基化和组蛋白修饰藕联起来,在表观遗传学中发挥中枢纽带作用。部分研究认为, MBD2还具有去甲基化酶活性^[10]。

MBD2在小鼠围植入期的表达如何以及是否参与子宫内膜功能的调控,目前还不清楚。为此,本研究利用小鼠着床模型,分析了MBD2的表达规律,以探索其在胚胎着床中的功能。

1 材料与方法

1.1 动物与试剂

1.1.1 动物 由重庆医科大学实验动物中心提供[合格证号: SCXK(渝)2012-0001] 30只8~10周龄SPF级昆明雌小鼠, 5只同品系雄小鼠, 体重18~22 g。饲养于重庆医科大学动物中心动物房, 控制温度适度、湿度, 给予自由饮食和饮水, 12 h光照。

1.1.2 试剂 Trizol裂解液, 逆转试剂盒、实时荧光定量PCR(Real-time fluorescence quantitative PCR, qPCR)试剂盒购自大连宝生物(大连)有限公司; MBD2和β-actin引物由上海生工生物工程有限公司合成; RIPA蛋白裂解液购自江苏碧云天生物技术有限公司; 预制胶购自上海文渊阁科技生物有限公司; 兔来源多克隆一抗MBD2和PRL购自Santa Cruz公司; β-actin一抗购自北京中杉金桥生物技术有限公司; 二抗、SP9001免疫组化试剂盒、DAB显色试剂盒均购自北京中杉金桥生物技术有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 孕小鼠模型的建立 选择性成熟的小鼠, 按雄雌比例1:2合笼, 次日晨7点有阴栓者记为妊娠(d1)。未孕小鼠计为孕d0。将正常成年雄鼠输精管结扎后饲养14 d, 按1:2与雌鼠合笼交配, 次日发现有阴栓者记为假孕第1 d(pd1)。取pd4小鼠, 于上午9:00在子宫角一侧注入10 μL芝麻油, 另一侧子宫角注射PBS, 作为对照。于pd8获得人工诱导蜕膜化子宫。

1.2.2 siRNA沉默小鼠子宫MBD2基因表达 MBD2基因反义片段(A-ODNs)和正义片段(S-ODNs)由上海博尚生物技术有限公司设计并合成(表1)。将

表1 qPCR引物和MBD2干扰序列

Table 1 Primer sequences for qPCR and short interfering RNA (siRNA) sequences for MBD2

引物 Primer	序列 Sequence
MBD2 forward primer	5'-CCT GGG AAA TGC TGT TGA-3'
MBD2 reverse primer	5'-CCT TAT TGC TCG GGT GGT-3'
β -actin forward primer	5'-CCT GAG GCT CTT TTC CAG CC-3'
β -actin reverse primer	5'-TAG AGG TCT TTA CGG ATG TCA ACG T-3'
MBD2 A-ODNs	5'-GTC GAC TCC AAA TGA AGA CTT CAG CTG AGG TTT ACT TCT GAA-3'
MBD2 S-ODNs	5'-AGG GTT AGA GAA GGG CTC ACG TGA GCC CTT CTC TAA CCC TGA-3'

MBD2 A-ODNs(或S-ODNs) 10 μ g溶入100 μ L芝麻油中,取10 μ L MBD2 A-ODNs或S-ODNs注射到pd4小鼠子宫一侧,另一侧子宫角注射PBS,作为对照,在pd8早晨9:00将小鼠处死,收集两侧子宫角,解剖镜下拍摄其形态。称重后石蜡包埋或液氮冻存,用于其他实验。

1.2.3 qPCR检测MBD2的表达 子宫内总RNA的提取采用Trizol裂解液抽提,氯仿萃取,异丙醇沉淀,乙醇洗涤,RNase-free水溶解总RNA沉淀,紫外分光光度计测总RNA的D值,取部分RNA做琼脂糖凝胶电泳检测完整性,-80 $^{\circ}$ C保存备用。cDNA合成按照TaKaRa试剂盒(大连宝生物工程有限公司)说明书逆转录。qPCR检测MBD2 mRNA表达反应体系:SYBR green mix 5 μ L,引物上下游各0.3 μ L,cDNA 1 μ L,RNase-free H₂O 3.4 μ L。反应条件:95 $^{\circ}$ C 3 min;95 $^{\circ}$ C 10 s,60 $^{\circ}$ C 30 s,循环40次,65~95 $^{\circ}$ C的条件下检测溶解曲线,相应的PCR引物见表1。采用 β -actin作为内参,进行归一化处理。每一实验重复3次,每次3个复孔。

1.2.4 免疫组织化学 4%多聚甲醛固定小鼠子宫20 h,经70%、80%、95%、100%梯度酒精脱水、二甲苯透明、石蜡包埋后,进行组织切片(厚度4 μ m)。按常规实验步骤进行免疫组化染色:二甲苯I和二甲苯II各20 min脱蜡;流动自来水冲洗5 min,蒸馏水冲洗后入PBS浸洗3 min;微波炉煮沸置在枸橼酸盐缓冲液中的切片,热修复抗原15 min;3%的双氧水室温孵育10 min灭活内源性酶;PBS浸洗3次,每次3 min;湿盒内加入MBD2一抗(Santa Cruz公司)(1:100)4 $^{\circ}$ C过夜;二步法免疫组化检测试剂盒(中杉金桥公司)检测一抗表达,37 $^{\circ}$ C孵育20 min,PBS冲洗,2 min \times 3次;DAB溶液显色,苏木精复染细胞核,脱水树脂封片。显微镜观察并用奥林巴斯(日本)图像采集系统拍摄,IPP医学图像分析管理系统(Media Cybernetics,

美国)分析每张切片阳性表达的灰度值和阳性细胞比例。

1.2.5 蛋白提取及Western blot 根据RIPA裂解液说明书提取组织总蛋白,用BCA蛋白定量法测定总蛋白浓度。预制胶恒压电泳,待分离后将蛋白转移至聚偏二氟乙烯膜上,5%脱脂奶粉封闭1 h后,一抗4 $^{\circ}$ C过夜,PBST洗3次,辣根过氧化物酶标记二抗孵育1 h后,PBST洗3次,ECL法显影。Quantity One(Bio-Rad公司)软件对Western blot结果图像进行灰度分析。

1.3 统计学分析

实验数据采用采用SPSS 17.0统计软件进行统计分析。qPCR实验结果和Western blot结果均采用单因素方差分析,各组之间相互比较采用LSD-t法。每个实验至少重复3次,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 qPCR检测MBD2 mRNA在围植入期子宫内膜的表达

结果显示,MBD2 mRNA在d0到d7小鼠子宫内膜组织中均有表达。与d0相比较,d1到d4表达差异均无显著性;至d5,MBD2的表达达到最高峰,d6和d7的表达呈逐渐下降的趋势,但仍显著高于d0(图1)。

2.2 MBD2蛋白在围植入期子宫内膜的表达及定位

不同孕天小鼠子宫内膜的免疫组化染色结果显示,MBD2在d1~d5的腔上皮和腺上皮的表达均为中度染色。MBD2在d1~d5的基质细胞中染色逐渐加深,即从d1的弱表达至d5的强表达。d5~d8,MBD2在基质细胞中的表达主要位于蜕膜区,即在d5点和d6点围绕胚胎的子宫基质发生蜕膜化形成初级蜕膜区高表达,随着蜕膜化的进行,在d7和d8,逐渐表达在胚胎周围为次级蜕膜区域(图2)。

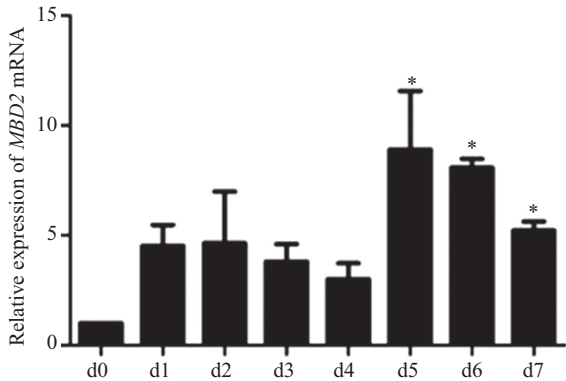
2.3 妊娠小鼠子宫内膜组织MBD2蛋白表达

Western blot结果显示,MBD2蛋白在d0~d7小

鼠子宫内膜组织中均有表达, 且组间表达有差异 ($P<0.05$)。与d0比较, 在妊娠d1~d5, 随着妊娠天数的递增, MBD2蛋白质的表达量逐渐升高, d1~d4均无显著性差异。妊娠d5达到高峰, 随后的d6~d7持续高表达(图3)。

2.4 假孕小鼠子宫内膜组织MBD2的表达

通过免疫组织化学检测了MBD2在假孕小鼠不



* $P<0.05$, 与d0比较。

* $P<0.05$ vs d0 group.

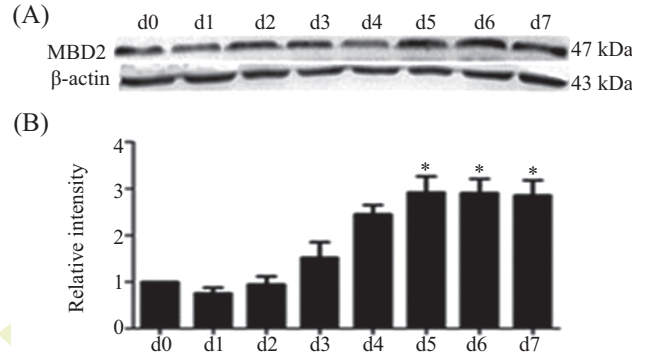
图1 qPCR检测MBD2 mRNA在小鼠子宫内膜孕的表达

Fig.1 The expression of MBD2 mRNA in mice endometria during d0~d7 pregnancy analyzed by qPCR

同孕天子宫内膜组织中的表达, 结果显示: MBD2在pd1的基质细胞和腔上皮、腺上皮微弱表达, pd4时在腔上皮和腺上皮、基质细胞的表达有所增加, 在pd5~pd7基质细胞的表达明显减弱, 腔上皮, 腺上皮表达微弱减少(图4)。

2.5 MBD2对小鼠子宫蜕膜化的影响

pd4宫腔注射芝麻油溶解的MBD2反义寡聚脱



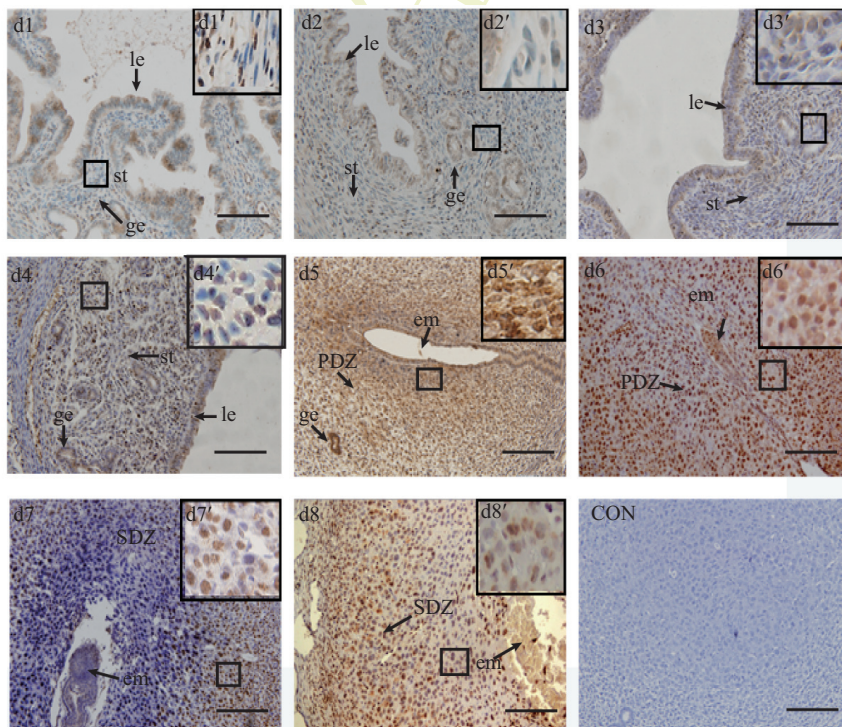
A: Western blot检测MBD2蛋白表达; B: MBD2蛋白表达定量分析。

* $P<0.05$, 与d0比较。

A: Western blot analysis of MBD2 expression; B: densitometric analysis of MBD2 protein. * $P<0.05$ vs d0 group.

图3 MBD2蛋白在围植期子宫内膜的表达

Fig.3 Expression of MBD2 protein during pre-implantation

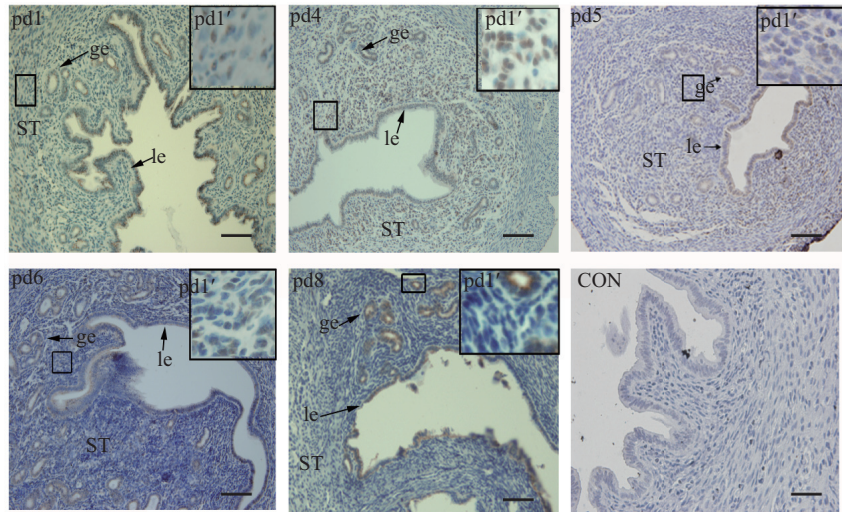


le: 腔上皮; ge: 腺上皮; st: 基质; em: 胚胎; PDZ: 初级蜕膜区; SDZ: 次级蜕膜区。棕色为阳性染色。d1' 到d8' 为该图中所框出区域的局部放大(400×)。标尺=200 μm。

le: luminal epithelium; ge: glandular epithelium; st: troma; em: embryo; PDZ: primary decidual zone; SDZ: secondary decidual zone. Positive cells appeared in brown. d1' to d8' for the frame out local amplification area (400×). Scale bar=200 μm.

图2 MBD2在小鼠不同孕天子宫内膜的免疫组化染色

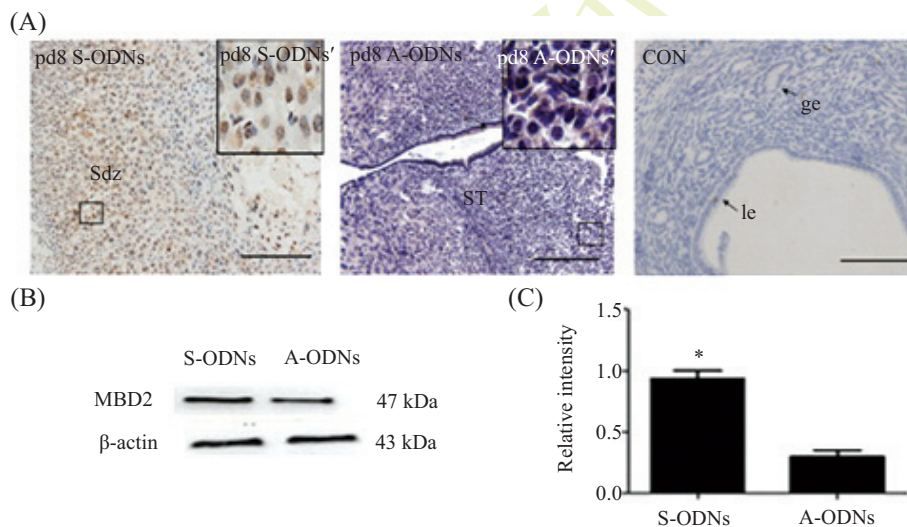
Fig.2 Immunohistochemistry staining of MBD2 antibody in mice endometrium on different pregnant days



棕色为阳性染色。Pd1'、pd4'、pd5'~pd7'为所框出区域的局部放大(400×)。标尺=200 μm。
Positive cells appeared in brown. pd1', pd4', pd5' to pd7' for the frame out local amplification area (400×). Scale bar=200 μm.

图4 免疫组织化学检测MBD2在假孕小鼠子宫内膜中的表达

Fig.4 Immunohistochemistry of MBD2 in mice endometria during pseudopregnancy



A: 免疫组化检测人工诱导蜕膜化小鼠子宫分别注射MBD2 A-ODNs和MBD2 S-ODNsMBD2后MBD2的表达; 棕色为阳性染色。pd8 S-ODNs'和pd8 A-ODNs'为所框出区域的局部放大(400×)。标尺=200 μm; B: Western blot检测MBD2蛋白表达; C: MBD2蛋白表达定量分析。* $P<0.05$, 与A-ODNs比较。

A: immunohistochemistry staining of artificial decidualization mice endometrium by MBD2 after S-ODNs: sense oligodeoxynucleotides; and A-ODNs: antisense oligodeoxynucleotides. Positive cells appeared in brown. pd8 S-ODNs' and pd8 A-ODNs' for the frame out local amplification area (400×). Scale bar=200 μm; B: Western blot analysis of MBD2 expression; C: densitometric analysis of MBD2 protein.* $P<0.05$ vs A-ODNs group.

图5 反义寡聚脱氧核苷酸沉默子宫MBD2的表达

Fig.5 MBD2 protein expression suppressed by ODNs

氧核苷酸(A-ODNs)和对照MBD2正义链(S-ODNs), 免疫组织化学结果显示, 子宫内膜基质细胞MBD2表达降低(图5A)。Western blot结果显示, MBD2 A-ODNs显著降低MBD2表达(图5B和图5C)。

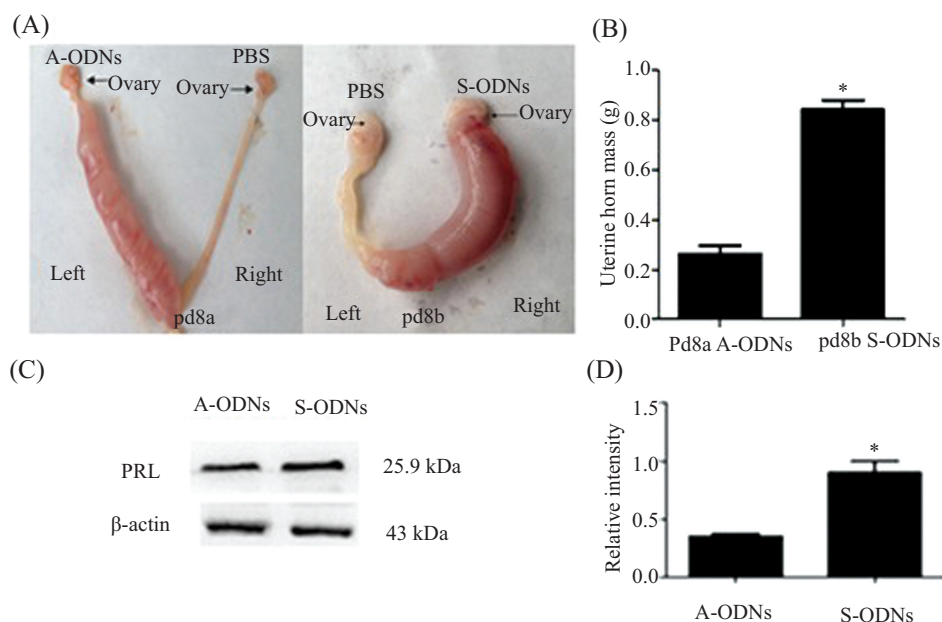
注射MBD2 A-ODNs后的一侧子宫湿重显著降低($P<0.05$), 子宫内膜蜕膜化受到明显抑制(图6A和图6B)。Western blot进一步检测了蜕膜化标志分子泌乳素(prolactin, PRL)的表达显著降低($P<0.05$)(图

6C和图6D)。

3 讨论

胚胎植入过程子宫内膜的程序性变化主要受甾体激素的调节, 同时有诸多遗传学水平调控的基因参与。近来研究发现, DNA甲基化可能在胚胎着床过程子宫内膜程序性变化中担负重要角色。

MBD2是MBD蛋白家族成员之一, 是一类与甲



A: 人工诱导蜕膜化的小鼠子宫外形图。pd8a为左侧子宫注射玉米油溶解的MBD2反义寡聚脱氧核苷酸(A-ODNs), 右侧注射PBS; pd8b为右侧注射玉米油溶解的MBD2正义寡聚脱氧核苷酸(S-ODNs), 左侧注射PBS; B: 人工诱导蜕膜化注射A-ODNs一侧和注射S-ODNs一侧子宫重量。* $P < 0.05$, 与pd8 A-ODNs比较; C: Western blot检测PRL蛋白表达; D: PRL蛋白表达定量分析。* $P < 0.05$, 与A-ODNs比较。

A: artificial decidualized uterus. In pd8a, the left horn was injected with MBD2 A-ODNs dissolved in maize oil and the right horn was injected with PBS. In pd8b, the left horn was injected with PBS and the right horn was injected with MBD2 S-ODNs dissolved in maize oil. * $P < 0.05$ vs pb8 A-ODNs group; B: the weight of artificial decidualized uterus injected with MBD2 A-ODNs or MBD2 S-ODNs; C: Western blot analysis of PRL expression; D: densitometric analysis of PRL protein. * $P < 0.05$ vs A-ODNs group.

图6 MBD2反义寡聚脱氧核苷酸(ODNs)对小鼠子宫蜕膜化的影响

Fig.6 The effects of antisense oligo-deoxynucleotide (ODNs) of MBD2 on decidualization in mouse

甲基化CpG二核苷酸结合的核蛋白, 它位于18q21的保守区域, 有6个外显子和一个长约50 Kb的无编码的外显子^[11], 它可与启动子区域甲基化的DNA结合招募组氨酸去乙酰化酶, 导致染色质重塑, 从而抑制转录, 抑制基因表达^[12]; 另一方面, MBD2有去甲基化酶的功能^[13]。MBD2虽然不能直接导致某种疾病的发生, 但其通过甲基化等表观遗传沉默方式参与了生物体多种重要的生物功能。

van Kaam等^[14]的结果显示, MBD2在子宫内膜的分泌期表达水平高于增殖期和月经期, 这说明MBD2的表达与子宫内膜的周期性变化相关联。此外, 体外培养的增生期子宫内膜组织加入雌、孕激素诱导后, 可上调MBD2和DNMT1的表达^[12-13]。这从另一个侧面证明了MBD2参与妊娠过程中子宫内膜发育和分化的调控, 且可能与激素的调控相关。

现已知孕激素在妊娠的建立和维持中发挥了重要作用^[15]。孕激素的生物活性是通过细胞内孕激素受体发挥作用的^[16-17], 孕激素受体在d1表达极低, d2在上皮细胞和基质细胞有微弱的表达, d3和d4在上皮细胞表达略有增强而在基质细胞表达显著增

强, 着床后期在基质细胞的表达继续增强, 显著高于着床前期^[18-19]。已有研究证实, MBD2能结合于甲基化和非甲基化的孕激素受体- β 启动子区, 从而调控孕激素受体表达^[20]。本文研究发现, MBD2表达与孕激素的波动趋势相似, 在d5胚胎着床时到达高峰, 并持续高表达至d6和d7, 这显示MBD2表达存在的时空差异可能与小鼠围着床期子宫内膜的孕激素动态波动有关联。此外, 在我们的研究中还发现, MBD2的表达在d5表达达到高峰, 可能与胚胎的出现、促进了MBD2的表达有关。

本文探讨了胚胎着床前后子宫内膜中MBD2的表达模式, 免疫组化结果显示, MBD2在子宫内膜发生蜕膜化(d6、d7)时, 基质细胞增殖分化明显, 并开始形成大量蜕膜细胞, 提示该基因可能参与胚胎着床后子宫内膜的增殖与分化。MBD2在假孕小鼠子宫内膜中发现pd5到pd7基质细胞表达明显减少, 已知假孕pd5到pd7没有胚胎的植入, 因而不能发生蜕膜化。推测MBD2可能和子宫内膜的蜕膜化相关。通过人工诱导蜕膜化模型, 发现注射MBD2反义寡聚脱氧核苷酸后, 在妊娠pd8子宫内膜蜕膜化程度减

弱。进一步证明, MBD2的表达与子宫内膜的蜕膜化相关。此外, 蜕膜化的标志分子PRL在MBD2的敲低表达后, 其表达亦随之减弱, 进一步揭示MBD2可能参与了子宫内膜的蜕膜化过程。但是MBD2对子宫内膜蜕膜化的调控是通过影响基质细胞的增殖还是分化仍有待进一步研究。

参考文献 (References)

- 1 Carson DD, Bagchi I, Dey SK, Enders AC, Fazleabas AT, Lessey BA, *et al.* Embryo implantation. *Dev Biol* 2000; 223(2): 217-37.
- 2 Achache H, Revel A. Endometrial receptivity markers the journey to successful embryo implantation. *Hum Reprod Update* 2006; 12(6): 731-46.
- 3 Guzeloglu-Kayisli O, Basar M, Arici A. Basic aspects of implantation. *Reprod Biomed Online* 2007; 15(6): 728-39.
- 4 Munro SK, Farquhar CM, Mitchell MD, Ponnampalam AP. Epigenetic regulation of endometrium during the menstrual cycle. *Mol Hum Reprod* 2010; 16(5): 297-310.
- 5 Yamagata Y, Asada H, Tamura I, Lee L, Maekawa R, Taniguchi K, *et al.* DNA methyltransferase expression in the human endometrium: down-regulation by progesterone and estrogen. *Hum Reprod* 2009; 24(5): 1126-32.
- 6 Vincent ZL, Farquhar CM, Mitchell MD, Ponnampalam AP. Expression and regulation of DNA methyltransferases in human endometrium. *Fertil Steril* 2011; 95(4): 1522-5.
- 7 Logan PC, Ponnampalam AP, Rahnema F, Lobie PE, Mitchell MD. The effect of DNA methylation inhibitor 5-Aza-2'-deoxycytidine on human endometrial stromal cells. *Hum Reprod* 2010; 25(11): 2859-69.
- 8 Ding YB, He JL, Liu XQ, Chen XM, Long CL, Wang YX. Expression of DNA methyltransferases in the mouse uterus during early pregnancy and susceptibility to dietary folate deficiency. *Reproduction* 2012; 144(1): 91-100.
- 9 Ding YB, Long CL, Liu XQ, Chen XM, Guo LR, Xia YY, He JL, Wang YX. 5-Aza-2'-deoxycytidine leads to reduced embryo implantation and reduced expression of DNA methyltransferases and essential endometrial genes. *PLoS One* 2012; 7(9): e45364.
- 10 Detich N, Theberge J, Szyf M. Promoter-specific activation and demethylation by MBD2/demethylase. *J Biol Chem* 2002; 277(39): 35791-4.
- 11 Hendrich B, Abbott C, McQueen H, McQueen H, Chambers D, Cross S, Bird A. Genomic structure and chromosomal mapping of the murine and human Mbd1, Mbd2, Mbd3, and Mbd4 genes. *Mamm Genome* 1999; 10(9): 906-12.
- 12 Snape A. MBDs mediate methylation, deacetylation and transcriptional repression. *Trends Genet* 2000; 16(1): 20.
- 13 Wade P A, Geggion A, Jones PL, Ballestar E, Aubry F, Wolffe AP. Mi-2 complex couples DNA methylation to chromatin remodelling and histone deacetylation. *Nat Genet* 1999; 23(1): 62-6.
- 14 van Kaam KJ, Delvoux B, Romano A, D'Hooghe T, Dunselman GA, Groothuis PG. Deoxyribonucleic acid methyltransferases and methyl-CpG-binding domain proteins in human endometrium and endometriosis. *Fertil Steril* 2011; 95(4): 1421-7.
- 15 Lee KY, DeMayo FJ. Animal models of implantation. *Reproduction* 2004; 128(6): 679-95.
- 16 Bagchi IC, Cheon YP, Li Q, Bagchi MK. Progesterone receptor-regulated gene networks in implantation. *Front Biosci* 2003; 9: s852-61.
- 17 Lydon JP, Demayo FJ, Conneely OM, O'Malley BW. Reproductive phenotypes of the progesterone receptor null mutant mouse. *J Steroid Biochem Mol Biol* 1996; 56: 67-77.
- 18 Finn CA, Martin L. The control of implantation. *J Rep Fert* 1974; 39(1): 195-206.
- 19 Wang H, Dey SK. Roadmap to embryo implantation: Clues from mouse models. *Nat Rev Genet* 2006; 7(3): 185-99.
- 20 张广化. 子宫内膜癌细胞孕激素受体基因表观遗传学调控的研究-DNA甲基化及鸟大沉默相关的染色质成分变化. 天津医科大学(Zhang Guanghua. Study on the epigenetic regulation of progesterone receptor in endometrial cancer cells-chromatin composition alterations associated with DNA methylation and expression silencing. Tianjin Medical University) 2010.