

闫乐艳, GEORGE Mann, 施振旦. 利用 Onapristone 研究绵羊子宫内膜组织中孕酮对 PGF2 α 分泌以及 COX-2 表达的影响[J]. 江苏农业学报, 2017, 33(3): 624-629.

doi: 10.3969/j.issn.1000-4440.2017.03.020

利用 Onapristone 研究绵羊子宫内膜组织中孕酮对 PGF2 α 分泌以及 COX-2 表达的影响

闫乐艳¹, GEORGE Mann², 施振旦¹

(1. 江苏省农业科学院畜牧研究所, 江苏 南京 210014; 2. 诺丁汉大学生物学院, 英国 拉夫堡 LE12RD)

摘要: 为了探讨孕酮通过环氧合酶-2 (COX-2)/ 前列腺素 2 α (PGF2 α) 信号通路调节家畜黄体溶解的作用机制, 本研究采用孕酮受体的特异抑制剂 Onapristone 处理体外培养的绵羊子宫内膜组织, 检测分泌到培养液中的 PGF2 α 浓度以及子宫内膜中 PGF2 α 合成过程中关键酶基因 COX-2 的 mRNA 和蛋白质表达水平。结果显示, Onapristone 添加到子宫内膜组织培养液中后, 内膜组织合成分泌的 PGF2 α 浓度明显下降, 且抑制了 COX-2 mRNA 和蛋白质表达水平, 高剂量的 Onapristone (20.0 μ mol/L) 处理 72 h 后 COX-2 的蛋白表达水平仅为对照组的 23%。表明, 孕酮通过其受体介导的 COX-2/ PGF2 α 信号通路调节家畜的黄体溶解过程, 且 COX-2 对于 PGF2 α 的合成起到重要的作用。

关键词: 孕酮受体抑制剂 Onapristone; 前列腺素 2 α (PGF2 α); 环氧合酶-2 (COX-2); 孕酮; 绵羊

中图分类号: S858.26 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-4440(2017)03-0624-06

Regulation of progesterone in PGF2 α secretion and COX-2 expression by onapristone in ovine endometrial cells

YAN Le-yan¹, GEORGE Mann², SHI Zhen-dan¹

(1. Institute of Animal Science, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Nanjing 210014, China; 2. School of Biosciences, University of Nottingham, Loughborough LE12 5RD, UK)

Abstract: To explore the regulatory role of progesterone in luteolysis via cyclooxygenase-2 (COX-2) /prostaglandin F2 α (PGF2 α) signal pathway in livestock, the ovine endometrium explants were cultured and treated with specific inhibitor of progesterone receptor (onapristone). The PGF2 α concentration and mRNA and protein expression levels of PGF2 α synthesis-related enzyme COX-2 were detected. The applications of onapristone (0.2 μ mol/L, 2.0 μ mol/L or 20.0 μ mol/L) in ovine endometrium culture medium inhibited the PGF2 α secretion, especially when the explants were cultured for 72 h in the presence of 20.0 μ mol/L onapristone ($P < 0.05$). In addition, the mRNA expression of COX-2 was suppressed in endometrial explants cultured with onapristone for 24 h, 48 h and 72 h ($P < 0.01$). The endometrial COX-2 protein expression was also downregulated significantly after 20.0 μ mol/L onapristone treatment for 72 h, only about 23% of the control. In

conclusion, progesterone regulates luteolysis via progesterone receptor/ COX-2 / PGF2 α signal pathway in sheep, and COX-2 seems to be the primary enzyme responsible for PGF2 α production.

Key words: progesterone receptor inhibitor (onapristone); prostaglandin (PGF2 α); cyclooxygenase (COX-2); progesterone; sheep

收稿日期: 2017-02-28

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31601943)

作者简介: 闫乐艳 (1984-), 女, 山东济宁人, 博士, 助理研究员, 主要从事家畜遗传育种与繁殖方面的研究。(Tel) 025-84390336; (E-mail) yanleyan198469@126.com

通讯作者: 施振旦, (Tel) 025-84390956; (E-mail) zdshi@jaas.ac.cn

哺乳动物卵巢黄体是甾体激素的主要来源,在调控动物繁殖机能方面具有至关重要的作用。在动物未妊娠的情况下,则黄体启动退化程序,继而进入新一轮的发情周期。而妊娠期间黄体退化却可导致胚胎死亡或流产。

前列腺素 2 α (Prostaglandin F2 α , PGF2 α) 是哺乳动物的主要溶黄体因子^[1]。在反刍动物体内,孕酮(P₄)通过调节子宫中 PGF2 α 的分泌,从而调节黄体溶解过程^[2]。长期以来研究者认为,黄体期早期孕酮水平决定了随后的功能性黄体溶解时间^[3]。外源性孕酮处理将导致黄体提前溶解^[4],这一作用可能是通过改变子宫上的受体(PGR)的数量而实现的^[5],而 PGR 拮抗剂可以推迟黄体的溶解^[6]。

奥那司酮(Onapristone, ZK-98299)属于选择性孕酮受体拮抗剂(SPRMs),它与最原始且广泛应用的 PGR 拮抗剂——米非司酮(Mifepristone, RU486)结构类似^[7],但与孕酮受体的相对亲和力大于 RU486。研究者发现,Onapristone 可以抵消孕酮对牛胚胎体外发育的抑制作用^[8]。在早期(5~7 d)的牛黄体细胞体外培养过程中添加 Onapristone 对孕酮和 PGF2 α 的分泌均有明显的抑制作用^[9],但是 Onapristone 对中期(8~12 d)黄体细胞中 PGF2 α 的分泌无明显作用^[10]。我们前期在绵羊上的研究发现,对黄体期早期(3~5 d)的绵羊注射 Onapristone 后,减少内源性 PGF2 α 释放,且推迟黄体溶解,但是黄体晚期(12~14 d)的绵羊注射 Onapristone 对 PGF2 α 的释放并没有显著影响,具体的作用机理还不明确^[11]。

环氧合酶(COX, 又称 PGHS)是合成各种前列腺素的限速酶^[12]。在发情期以及妊娠期绵羊、牛、猪子宫内膜上均有 COX-1 和 COX-2 的表达^[13-17],且子宫内膜合成 PGF 的能力主要是由 COX-2 介导的,其对于黄体溶解期以及胚胎着床期的前列腺素生成起着主要的调节作用。对绵羊注射孕酮后,子宫颈上 COX-2 的 mRNA 和蛋白质表达水平都显著增高^[18],但该研究中对 PGF2 α 的水平并没有进行检测。

从以往的研究结果可以看出,Onapristone 对 PGF2 α 分泌的调节作用并不一致,其具体的作用机制还需要更深入的研究。此外孕酮是否通过 COX-2 来调节 PGF2 α 分泌也还不明确。因此,本试验拟利用绵羊的子宫内膜组织块体外培养模型,对 Ona-

pristone 处理后培养液中 PGF2 α 的浓度以及组织中 PGF2 α 合成关键酶 COX-2 的 mRNA 和蛋白质表达水平进行检测,进一步探讨孕酮调节黄体溶解的作用机制。

1 材料与方法

1.1 试验材料与主要试剂

绵羊子宫由当地(诺丁汉,英国)的绵羊屠宰场提供,以无菌操作采集新鲜的黄体期绵羊子宫(共 4 个),置于 37 °C 生理盐水(添加青霉素和链霉素)中,2 h 内送到实验室。

DMEM/F12、PBS、Hepes、青霉素/链霉素、两性霉素 B 等购自 Thermo Fisher Scientific (UK), Onapristone 购自 Schering AG (Germany), BSA、胰蛋白酶抑制剂、胶片购自 Sigma-Aldrich (UK), COX-2 抗体、内参 Histone 3 抗体以及对应的 HRP 标记的第二抗体均购自 Abcam (UK), Trizol 购自 Invitrogen, PGF2 α 试剂盒、预染蛋白 Marker、ECL 检测系统均购自 GE Healthcare (UK), SYBR Green RT-PCR 试剂盒(包括 SYBR Green PCR Master Mix 以及 Taq Man Reverse Transcription Reagents)购自 Applied Biosystems, 其他试剂自己配制。

1.2 组织样品采集及处理

在实验室内,将新鲜组织用 PBS(含青霉素/链霉素, 2.5 g/ml 两性霉素 B)冲洗 3 遍,去除脂肪等多余物质,然后在无菌条件下纵向剖开子宫角,用弯剪刀和眼科镊将含有子宫内膜上皮细胞和间质细胞的子宫内膜组织取下,用 Hepes 清洗后,放在 McIlwain 组织剪切器上剪成 <1 mm³ 小块,在 Hepes 液中清洗后离心,去除上清液,再次用 Hepes 液清洗离心,去除上清液。

在六孔板的孔中放入灭菌后的不锈钢小网格,在网格上放入大小合适的擦镜纸,将得到的干净子宫内膜组织块放在纸上培养,每孔放入的子宫内膜组织质量约 200 mg,每孔培养液为 5 ml。对照组培养液为 DMEM/F12+0.1% BSA +1% 青霉素/链霉素,在绵羊子宫内膜组织块的培养液中分别添加 0.2 μ mol/L、2.0 μ mol/L 或 20.0 μ mol/L Onapristone (ZK-98299)。对照组和所有 Onapristone 处理组均各设 9 个重复培养孔(4 \times 9)。培养条件为 37.0 °C, 5% CO₂, 共重复培养 4 次。间隔 24 h 更换 1 次培养液。在培养 24 h、48 h 和 72 h 后收集上层的培养液

(1 ml), -20 ℃ 保存用于 PGF2 α 浓度的测定,同时收集子宫内膜组织并称质量(mg),置于-80 ℃ 保存用于后续基因和蛋白质的检测。

1.3 培养液中 PGF2 α 浓度测定

培养液中的 PGF2 α 浓度参照 Charpigny 等^[13] 的 RIA(Radioimmunoassay)法测定,操作方法严格按照试剂盒说明书进行。分析的灵敏度为 5~10 pg/ml,且与其他前列腺素的交叉反应性小于 0.1%。检测结果根据培养的子宫内膜质量换算为每 1 mg 子宫内膜组织合成的 PGF2 α 量(ng/mg)。

1.4 荧光定量 PCR 检测

采用荧光定量 PCR 技术检测绵羊子宫内膜组织中 COX-2 基因表达量。以无 Onapristone 处理为空白对照。根据 GenBank 公布的绵羊 COX-2 基因(U68486.1)序列,设计引物(表 1),绵羊 β -actin 基因(U39357)作为内参基因。Trizol 法提取子宫内膜组织总 RNA,紫外分光光度计检测 RNA 质量和浓度,进行反转录、荧光定量 PCR 扩增。目的基因、管家基因荧光定量 PCR 程序为:反应总体积 50.0 μ l,包括 2 \times SYBR Green PCR Master Mix 25.0 μ l,上下游正反引物各 1.0 μ l,cDNA 模板 2.0 μ l,去离子水 21.0 μ l,同时设无模板对照(即模板用等量的去离子水代替)。反应条件为:95 ℃ 预变性 10 min;95 ℃ 15 s,60 ℃ 1 min,40 个循环。每个处理重复 3 次。

表 1 荧光定量 PCR 引物序列

Table 1 Primers and sequences used in quantitative real-time PCR

基因	GenBank 登录号	引物序列	产物长度 (bp)
COX-2	U68486.1	正向:5'-CAGAGCTCTTCTCTCTGTGC-3'	138
		反向:5'-CAAAAGGCGACGGTTATGC-3'	
β -actin	U39357	正向:5'-CATCCTGACCCTCAAGTACCC-3'	105
		反向:5'-GTGCTGCTGAAGCTGTAGCC-3'	

1.5 Western blotting 检测 COX-2 的蛋白表达

将收集的子宫内膜组织样品经 PBS 洗涤 2 次,离心(1 500 g, 10 min),弃上清液后加入 100 μ l 含胰蛋白酶抑制剂(P2714)的蛋白质抽提试剂,超声波破碎 10 s 充分裂解细胞,14 000 g 离心 5 min。取上清液转移至新的离心管中,煮沸(100 ℃)3 min,然后置冰上预冷 5 min,-70 ℃ 冻存备用。

利用 Bradford 法测定样品中的蛋白质浓度后,

将等量的样品蛋白质在 5%~12% 的 SDS-PAGE 上电泳分离。然后利用微型电泳转移装置,将分离得到的蛋白质在 4 ℃ 条件下,以恒流 200 mA、2.5 h 转移至 0.2 μ m NC 膜上。转移结束后,先用 TBST(含 0.1% Tween-20 的 Tris-HCl 缓冲液)洗涤膜 3 次,每次 10 min,然后用含 5% 脱脂奶粉的 TBST 在室温下封闭膜 1 h,接着用含 5% BSA 的 TBST 稀释的 COX-2(23672)抗体以及 Histone 3 抗体(1:1 000)在 4 ℃ 条件下过夜孵育,TBST 清洗 3 次,每次 10 min 后,用含 1% 脱脂奶粉的 TBST 稀释(1:5 000)过的 HRP 标记二抗(sc-2020),37 ℃ 孵育膜 1 h,再次用 TBST 洗膜 3 次,每次 10 min,按照说明书,使用 ECL 检测系统检测膜上蛋白,用 X 光胶片曝光,胶片经显影、定影、漂洗、晾干后,用凝胶成像系统扫描拍摄并用 Image J 软件分析。

1.6 数据统计分析

利用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算出 Onapristone 处理不同时间后 COX-2 基因在绵羊子宫内膜组织中的表达量相对于对照组中表达量的差异倍数。基因相对表达量以及 PGF2 α 的浓度数据均利用 SPSS 17.0 统计软件进行单因素方差分析(ANOVA)和 Tukey's 多重比较,结果以平均数 \pm 标准误表示,以 $P<0.05$ 表示差异显著, $P<0.01$ 表示差异极显著。

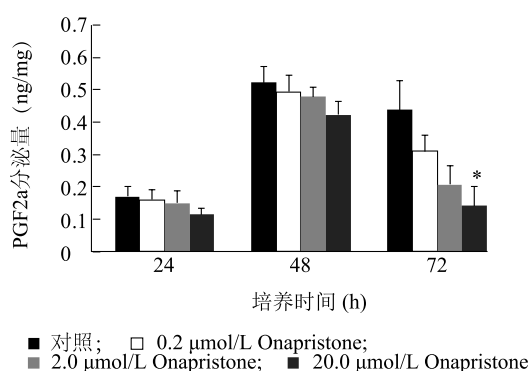
2 结果

2.1 Onapristone 对绵羊子宫内膜组织分泌 PGF2 α 的影响

首先利用 RIA 法测定了绵羊子宫内膜组织块培养 24 h、48 h、72 h 时培养液中 PGF2 α 的浓度。结果(图 1)表明,在绵羊子宫内膜组织块的培养液中分别添加 0.2 μ mol/L、2.0 μ mol/L、20.0 μ mol/L Onapristone 后,培养 24 h 以及 48 h,Onapristone 对子宫内膜分泌的 PGF2 α 并没有显著的影响。而在添加 Onapristone 培养 72 h 后,PGF2 α 的分泌被明显的抑制,尤其是添加高剂量(20.0 μ mol/L) Onapristone 组,每 1 mg 内膜组织分泌的 PGF2 α 量显著低于对照组($P<0.05$)。

2.2 Onapristone 对绵羊子宫内膜组织 COX-2 mRNA 表达的影响

利用荧光定量 PCR 技术检测了对照组和 Onapristone 处理组子宫内膜组织中 COX-2 的 mRNA 相对表达量。从图 2 可以看出,绵羊子宫内膜组织体

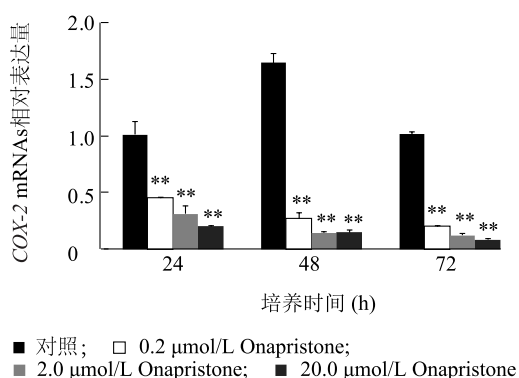


* 表示相应处理组与空白对照组差异达到显著水平 ($P < 0.05$)。

图1 Onapristone 处理对绵羊子宫内合成 PGF2 α 的影响

Fig.1 Effect of onapristone on the production of PGF2 α in o-vine endometrium explants

外培养过程中添加孕酮受体抑制剂 Onapristone 后,与对照组中正常培养的子宫内组织相比,0.2 $\mu\text{mol/L}$ 、2.0 $\mu\text{mol/L}$ 、20.0 $\mu\text{mol/L}$ 的 Onapristone 处理组中 COX-2 的 mRNA 表达量在培养 24 h、48 h 以及 72 h 时均有着不同程度的下降,与对照组差异极显著 ($P < 0.01$)。



** 表示相应处理组与空白对照组差异达到极显著水平 ($P < 0.01$)。

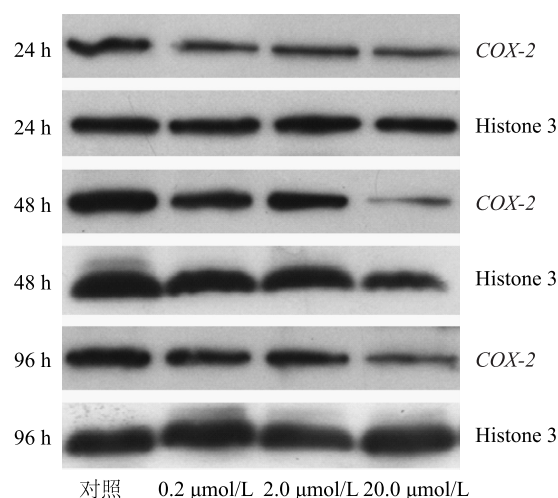
图2 Onapristone 处理对绵羊子宫内 COX-2 mRNA 表达的影响

Fig.2 Effect of onapristone on the mRNA expression of COX-2 in ovine endometrium explants

2.3 Onapristone 对绵羊子宫内组织 COX-2 的蛋白质表达水平的影响

利用 Western blot 检测了添加 0.2 $\mu\text{mol/L}$ 、2.0 $\mu\text{mol/L}$ 、20.0 $\mu\text{mol/L}$ 的 Onapristone 到绵羊子宫内组织块体外培养液中 PGF2 α 合成过程中关键酶 COX-2 的蛋白质表达水平(图 3、图 4)。COX-2 蛋白

表达量经内参蛋白 Histone 3 表达量校正后的结果显示,不同剂量的 Onapristone 对 COX-2 在子宫内组织中的蛋白质表达起到不同程度的抑制作用(图 4)。尤其是在添加 Onapristone 的 72 h 后,高剂量 Onapristone 组(20.0 $\mu\text{mol/L}$)子宫内组织 COX-2 的蛋白质表达量明显的低于对照组正常培养的子宫内组织 COX-2 的蛋白质表达水平,仅为对照组蛋白水平的 23%。



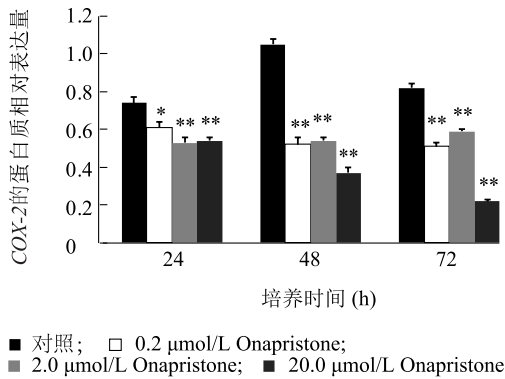
24 h、48 h、72 h 为 Onapristone 处理时间;0.2 $\mu\text{mol/L}$ 、2.0 $\mu\text{mol/L}$ 、20.0 $\mu\text{mol/L}$ 为 Onapristone 处理浓度;Histone 为内参蛋白。

图3 不同浓度 Onapristone 处理绵羊子宫内组织后 COX-2 蛋白 Western blot 结果

Fig.3 Western blot analysis of COX-2 protein in ovine endometrium explants after onapristone treatment

3 讨论

在家畜非妊娠时期,周期性的黄体形成和溶解过程是哺乳动物新的发情周期的起始,是维持正常生殖功能所必须的生殖调节过程,对于妊娠动物来说,正常的黄体功能是维持妊娠所必需。研究结果已经证实,前列腺素 2 α 是启动黄体溶解的关键因素,黄体退化开始于子宫脉冲式分泌 PGF2 α ^[1]。而孕酮通过其受体 PGR 调节 PGF2 α 的分泌,决定黄体退化过程的开始时间。Ottobre 等^[4]的研究结果表明,外源性孕酮处理将导致黄体提前溶解,缩短黄体期。我们前期的研究发现,对黄体期早期(3~5 d)的绵羊注射孕酮受体拮抗剂 Onapristone 后,可以减少 PGF2 α 的释放,从而推迟黄体溶解^[11]。但孕



* 表示相应处理组与空白对照组差异达到显著水平 ($P < 0.05$)。
** 表示相应处理组与空白对照组差异达到极显著水平 ($P < 0.01$)。

图4 Onapristone 处理对绵羊子宫内膜 COX-2 的蛋白表达的影响

Fig.4 Effect of onapristone on the protein expression of COX-2 in ovine endometrium explants

酮调节 PGF2 α 的分泌的具体信号通路还有待于明确。

本研究发现,在处于黄体早期的绵羊子宫内膜组织体外培养过程中添加孕酮受体拮抗剂 Onapristone,将抑制内膜组织合成分泌 PGF2 α ,特别是添加 20.0 $\mu\text{mol/L}$ Onapristone 72 h 后,子宫内膜组织分泌的 PGF2 α 量显著的低于对照组。这一研究结果表明,在绵羊黄体期的早期阶段,Onapristone 通过孕酮受体抑制了 PGF2 α 的合成。这与我们前期的研究结果类似,即在黄体早期的绵羊体内注射 Onapristone 抑制 PGF2 α 的分泌,血液中 PGFM 的释放明显减少^[11]。对牛的研究也发现,在早期(5~7 d)的黄体细胞体外培养过程中添加 Onapristone 对 PGF2 α 的分泌也有明显的抑制作用^[9]。由此可以推测,孕酮对于黄体早期子宫内膜组织合成分泌 PGF2 α 是必须的。但 Onapristone 对培养的中期(8~12 d)黄体细胞 PGF2 α 的分泌并无明显影响^[10],黄体晚期阶段的绵羊注射 Onapristone 对 PGF2 α 的释放也没有显著影响^[11],这可能说明孕酮通过不同的作用机制来调节不同阶段黄体中 PGF2 α 的合成和分泌。

Charpigny 等^[13]对去势母羊注射孕酮极显著地促进子宫内膜中 COX-2 的蛋白质表达,并认为子宫内膜合成 PGF 的能力主要是由 COX-2 介导的。在本研究中,孕酮受体拮抗剂 Onapristone 对体外培养

的处于黄体早期的绵羊子宫内膜组织中 COX-2 的 mRNA 及蛋白质表达水平均起到了明显的抑制作用,说明阻断孕酮与其受体结合后通过抑制 COX-2 的表达进而抑制 PGF2 α 的合成分泌。这一结果也证明了孕酮调控黄体早期阶段子宫中 PGF2 α 分泌时 COX-2 起着重要的作用。但是在牛上的研究发现,虽然孕酮可以促进 PGF2 α 的分泌,对 COX-2 的 mRNA 表达水平却没有影响^[14]。牛和羊上的研究结果不一致可能说明在不同动物上,孕酮对 COX-2 的表达有着不同的调节机制。

综上所述,孕酮受体特异抑制剂 Onapristone 可以有效抑制 PGF2 α 合成关键酶 COX-2 的基因和蛋白质表达,从而抑制 PGF2 α 的合成分泌,研究结果进一步完善了孕酮是通过 COX-2/PGF2 α 信号通路调节家畜黄体溶解这一理论。

参考文献:

- [1] STOCO C, TELLERIA C, GIBORI G. The molecular control of corpus luteum formation, function, and regression [J]. Endocrine Reviews, 2007, 28(1): 117-149.
- [2] BOGACKI M, SILVIA W J, REKAWIECKI R, et al. Direct inhibitory effect of progesterone on oxytocin-induced secretion of prostaglandin F(2alpha) from bovine endometrial tissue [J]. Biology of Reproduction, 2002, 67(1): 184-188.
- [3] MCCracken J A, CUSTER E E, LAMSA J C. Luteolysis: a neuroendocrine-mediated event [J]. Physiological Reviews, 1999, 79: 263-323.
- [4] OTTOBRE J S, LEWIS G S, THAYNE, et al. Mechanism by which progesterone shortens the oestrous cycle of the ewe [J]. Biology of Reproduction, 1980, 23: 1046-1053.
- [5] OKUMU L A, FORDE N, FAHEY A G, et al. The effect of elevated progesterone and pregnancy status on mRNA expression and localisation of progesterone and oestrogen receptors in the bovine uterus [J]. Reproduction, 2010, 140: 143-153.
- [6] MORGAN G L, GEISERT R D, MCCANN J P, et al. Failure of luteolysis and extension of the interoestrous interval in sheep treated with the progesterone antagonist mifepristone (RU486) [J]. Journal of Reproduction and Fertility, 1993(98): 451-457.
- [7] CHABBERT-BUFFET N, MEDURI G, BOUCHARD P, et al. Selective progesterone receptor modulators and progesterone antagonists: mechanisms of action and clinical applications [J]. Human Reproduction Update, 2005, 11: 293-307.
- [8] PEREIRA R M, MARQUES C C, BAPTISTA M C, et al. Embryos and culture cells: a model for studying the effect of progesterone [J]. Animal Reproduction Science, 2009, 111: 31-40.
- [9] BAH M M, ACOSTA T J, PILAWSKI W, et al. Role of intraluteal prostaglandin F(2alpha), progesterone and oxytocin in basal and

- pulsatile progesterone release from developing bovine corpus luteum [J]. Prostaglandins Other Lipid Mediat, 2006, 79 (3/4): 218-229.
- [10] KAWAGUCHI S, BOWOLAKSONO A, YOSHIOKA S, et al. Luteoprotective mechanisms of prostaglandin F2 α stimulated by luteinizing hormone in the bovine corpus luteum [J]. Journal of Reproduction and Development, 2013, 59(3): 225-230.
- [11] MANN G E, WATHES D C, ROBINSON R S. The progesterone receptor antagonist, onapristone has differential effects on the timing and control of the luteolytic mechanism depending on timing of administration in sheep [J]. Molecular and Cellular Endocrinology, 2013, 376(1/2): 1-11.
- [12] SMITH W L, GARAVITO R M, DEWITT D L. Prostaglandin endoperoxide H synthases (cyclooxygenases)-1 and -2 [J]. The Journal of Biological Chemistry, 1996, 271: 33157-33160.
- [13] CHARPIGNY G, REINAUD P, TAMBY J P, et al. Expression of cyclooxygenase-1 and -2 in ovine endometrium during the estrous cycle and early pregnancy [J]. Endocrinology, 1997, 138 (5): 2163-2171.
- [14] XIAO C W, LIU J M, SIROIS J, et al. Regulation of cyclooxygenase-2 and prostaglandin F synthase gene expression by steroid hormones and interferon-tau in bovine endometrial cells [J]. Endocrinology, 1998, 139(5): 2293-2299.
- [15] AROSH J A, PARENT J, CHAPDELAINE P, et al. Fortier expression of cyclooxygenases 1 and 2 and prostaglandin E synthase in bovine endometrial tissue during the estrous cycle [J]. Biology of Reproduction, 2002, 67: 161-169.
- [16] KIM S, CHOI Y, SPENCER T E, et al. Effects of the estrous cycle, pregnancy and interferon tau on expression of cyclooxygenase two (COX-2) in ovine endometrium [J]. Reproductive Biology and Endocrinology, 2003, 1: 58.
- [17] BLITEK A, WACLAWIK A, KACZMAREK M M, et al. Expression of cyclooxygenase-1 and -2 in the porcine endometrium during the oestrous cycle and early pregnancy [J]. Reproduction in Domestic Animals, 2006, 41(3): 251-257.
- [18] ZHANG Q, COLLINS V, CHAKRABARTY K, et al. Regulation of the prostaglandin enzymatic system by estradiol and progesterone in nonpregnant sheep cervix [J]. Reproduction, 2007, 133: 1027-1034.

(责任编辑:陈海霞)