

doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2019.12.006

View this article at: http://dx.doi.org/10.3978/j.issn.2095-6959.2019.12.006

小鼠卵母细胞 miR-135 的表达对胚胎发育的影响

梁见弟¹, 叶艳娜², 张昭¹

(1. 东莞市人民医院生殖医学科, 广东 东莞 523059; 2. 东莞职业技术学院卫生健康学院, 广东 东莞 523186)

[摘要] 目的: 探究小鼠卵母细胞miR-135的表达对胚胎发育的影响。方法: 实时荧光定量PCR(real-time polymerase chain reaction, real-time PCR)检测小鼠不同发育质量囊胚中miR-135的表达。小鼠卵母细胞注射miR-135抑制剂(miR-135 inhibitor)后, 再体外受精(in vitro fertilization, IVF), 分析不同质量囊胚构成比; 检测植入前胚胎发育过程中2细胞期、4细胞期、桑椹胚和囊胚的数量; 使用荧光染色观察囊胚中胰岛素样生长因子1受体(insulin-like growth factor 1 receptor, IGF1R)的表达及分布; 将囊胚植入小鼠后, 观察发育后胎儿的冠臀长度。结果: miR-135在高质量发育的囊胚中高表达。卵母细胞注射miR-135抑制剂后, 再进行IVF, 高质量囊胚比例降低和植入前胚胎发育迟缓; 显微镜下观察发现: 囊胚中IGF1R的表达无明显改变, 但分布模式出现变化, 表达集中于基底膜上; 植入后胎鼠的冠臀长度明显变短。结论: 抑制小鼠卵母细胞miR-135的表达会抑制胚胎发育。

[关键词] miR-135; 卵母细胞; 胚胎发育; 发育生物学

Effect of miR-135 expression on embryonic development in mouse oocytes

LIANG Jiandi¹, YE Yanna², ZHANG Zhao¹

(1. Department of Reproductive Medicine, Dongguan People's Hospital, Dongguan Guangdong 523059; 2. School of Health, Dongguan Polytechnic, Dongguan Guangdong 523186, China)

Abstract **Objective:** To investigate the effects of miR-135 expression in oocytes on embryonic development. **Methods:** Real-time quantitative polymerase chain reaction (real-time PCR) was used to detect the expression of miR-135 in blastocysts with different developmental quality. Then, the oocytes were injected with miR-135 inhibitor before in vitro fertilization, the composition ratio of different developmental quality was analyzed. The number of 2 cell stage, 4 cell stage, morula stage and blastocyst stage during the development of preimplantation embryos was detected. The expression and distribution of IGF1R in blastocysts was observed by fluorescence staining. After the blastocyst was implanted into mice, the length of the crown and hip of the developing fetus was observed. **Results:** MiR-135 was highly expressed in high quality blastocysts. After the oocytes were injected

收稿日期 (Date of reception): 2019-05-27

通信作者 (Corresponding author): 梁见弟, Email: liangjiandigbb@aliyun.com

基金项目 (Foundation item): 东莞市医疗卫生科技计划 (201610515000073)。This work was supported by Dongguan Medical and Health Technology Program, Guangdong Province, China (201610515000073).

with miR-135 inhibitor and then fertilized in vitro, the proportion of high-quality blastocysts was decreased and preimplantation embryonic development became retardation. Microscopic observation showed no significant change in the expression of IGF1R in blastocysts, but the distribution pattern was changed, and the expression was concentrated on the basement membrane. After implantation, the length of the crown and buttock in fetal mice became shorter. **Conclusion:** Inhibition of miR-135 expression in mouse oocytes inhibits embryonic development.

Keywords miR-135; oocyte; embryo development; developmental biology

妊娠的成功取决于卵泡发育、受精、胚胎发育和适当子宫环境^[1]。卵母细胞为早期胚胎的发育提供了大量必需的营养物质^[2]。因而,作为生命发生的基础,卵母细胞质量的高低直接关系到受精率、卵裂率、早期胚胎存活、妊娠建立和维持、胎儿发育,甚至新生个体一生的命运^[3]。有研究^[4-6]指出:早期胚胎的发育质量可能与发育过程中卵母细胞中的miRNA积累及与胚胎基因组激活或不正确的表观遗传重编程有关。这些问题也严重影响胚胎体外受精(in vitro fertilization, IVF)的成功率,导致胚胎的损失。辅助生殖技术(assisted reproductive technique, ART)方法不断优化可以克服许多问题,然而,最主要的问题仍然是体外环境不能完全模拟体内存在的条件。为改善ART结果,需要解决的一个基本问题是准确预测与胚胎发育相关的卵母细胞中一些分子变化。

近来研究^[7-10]表明:微小RNA(microRNAs, miRNAs)的表达与胚胎发育相关。而作为miRNAs中的一员,miR-135也显示与胚胎发育相关。比如,miR-135a在胚胎发育过程中通过Wnt/ β -catenin信号通路调节前脑发育^[8];miR-135a通过下调E3泛素连接酶7来调控胚胎植入前胚胎发育^[9];miR-135b通过抑制TGF- β /BMP信号通路影响人类神经外胚层的发育^[10]。而目前尚无关于卵母细胞miR-135表达改变是否对胚胎发育产生影响的研究。因此,本研究通过显微注射向卵母细胞注射miR-135抑制剂,然后进行IVF,观察胚胎发育情况,旨在探究小鼠卵母细胞miR-135的表达对胚胎发育的影响。

1 材料与方法

1.1 小鼠卵母细胞收集及培养

8周龄雌性B6D2F1小鼠通过腹腔注射妊娠母马血清促性腺激素(PMSG,每只小鼠5 U,宁波第二激素厂),48 h后,用人绒毛膜促性腺激素(hCG,每只小鼠5 U,宁波第二激素厂)超促排卵。在hCG注射后15 h从输卵管壶腹收集MII

卵母细胞,使用透明质酸酶消化2 min后除去卵丘细胞。将裸露的卵母细胞在M2培养基(Sigma-Aldrich,美国)中洗涤,并在37 °C,含5%CO₂保温箱中孵育。

1.2 显微注射

使用配备有TransferMan NK2显微操作器和InjectMan NI2(Eppendorf,德国)的Leica Hoffman显微镜(LSM6000)在M2培养基中进行miR-135抑制剂的显微注射。将5 μ L的miR-135抑制剂(miR-135 inhibitor)(50 μ mol/L)注射到卵母细胞细胞质中。将5 μ L的阴性对照抑制剂(miR-NC)(50 μ mol/L)注射到对照卵母细胞细胞质中。MiR-135 inhibitor和miR-NC由制造商(GenePharma,中国上海)提供。每次注射约50个卵母细胞,并且每次注射实验重复至少3次。

1.3 IVF

将正常卵母细胞和显微注射miR-NC或miR-135 inhibitor的卵母细胞分别置于500 μ L的EmbryoMax[®]人输卵管液(HTF,美国)培养基中,然后分别添加100 μ L已获能1 h的精子(最终浓度10 000~20 000个精子/mL),置于37 °C,5%CO₂的细胞培养箱中共培养5 h。此后,分别收集上述受精卵,并在EmbryoMax[®] KSOM(Millipore,美国)培养基中培养。

1.4 体外胚胎发育观察

使用Eclipse E800激光扫描共聚焦免疫荧光显微镜(Nikon,日本)观察并统计受精卵发育成2细胞期、4细胞期、桑椹胚和囊胚期的比例。根据胚胎发育过程中胚胎细胞团形态、卵裂球形态和均一度、胚胎碎片数量、透明带形态和细胞质形态的胚胎的形态学评估指标,将囊胚分为高质量囊胚和低质量囊胚。高质量囊胚:胚胎细胞团呈均匀对称的球形,单个卵裂球或细胞大小、密度、颜色一致,胚胎发育阶段与预期发育阶段(一般小鼠胚胎发育过程:受精卵24 h→2细胞期16 h→4细

胞期12 h→8细胞期20 h→桑椹胚12 h→囊胚期)一致, 透明带完整; 细胞质均匀清晰, 没有颗粒现象; 碎片含量<10%。低质量囊胚: 胚胎细胞团以及卵裂球大小、形状不规则, 单个卵裂球或细胞大小、密度、颜色一致存在一定差异, 细胞质有颗粒现象, 碎片在10%~40%。

1.5 实时聚合酶链反应检测囊胚 miR-135 表达

对囊胚通过TRIzol试剂(Sigma-Aldrich, 美国)提总RNA, 然后使用miScript PCR System(Qiagen, 美国)产生miRNA的反转录。反转录反应用约200 ng总RNA进行。将总RNA与5× miScript HiFlex Buffer(Qiagen, 美国), 10× miScript Nucleic mix(Qiagen, 美国), RNase-free water(Qiagen, 美国)和miScript reverse transcriptase(Qiagen, 美国)在37 °C下孵育1 h, 然后在95 °C下孵育5 min。

使用Primer3-BioTools软件设计基因特异性引物[miR-135正向引物: 5'-CGATATGGCTTTTTATTCTA-3', 反向引物: 5'-GAGCAGGGTCCGAGGT-3'。U6正向引物: 5'-CTCGCTTCGGCAGCACA-3', 反向引物: 5'-AACGCTTCACGA ATTTGCGT-3']。扩增在含有Power SYBR Green PCR Master Mix(2×)(Thermo Fisher Scientific, 美国), 0.5 μmol/L正向和反向引物和1 μL cDNA的10 μL反应体系中进行。PCR循环条件如下: 95 °C 10 min, 45个循环95 °C 15 s和60 °C 60 s随后通过熔解曲线分析以确认单个cDNA产物的扩增。按照说明书指示, 使用ΔCt方法计算miR-135的相对表达值。

1.6 共聚焦显微镜观察囊胚中囊胚中胰岛素样生长因子1受体的表达

将囊胚在3%多聚甲醛(Sigma, 美国)上的载玻片上固定20 min, 并在0.1%吐温-20(Sigma, 美国)溶液中透化20 min。将囊胚用含有20%驴血清和2%BSA(Sigma, 美国)的PBS中在室温下封闭1 h。将载玻片用PBS洗涤3次, 然后与囊胚中胰岛素样生长因子1受体(insulin-like growth factor 1 receptor, IGF1R)抗体(Cell Signaling, 美国)孵育1 h。用PBS洗涤3次, 然后用特异的荧光素标记的二抗孵育20 min。将囊胚在PBS中再洗涤3次, 并用DAPI(Molecular Probes, 美国)染细胞核20 min。用PBS洗涤3次, 并将胚胎安装在VectaShield(Vector Labs, 美国)中, 盖上盖玻片并密封。使用Eclipse

E800激光扫描共聚焦免疫荧光显微镜(Nikon, 日本)获取囊胚中IGF1R的荧光图像。

1.7 囊胚植入和冠臀长度测量

将来自上述培养条件的囊胚移植到交配后3 d的假妊娠ICR雌性小鼠中。每个受体小鼠转移10个胚胎到子宫角中, 在囊胚移植后第14天麻醉处死, 收集鼠胎并评估冠臀长度。

1.8 统计学处理

使用SPSS 16.0统计软件进行数据分析。本研究中的数据均为至少3次独立实验的平均值, 结果表示为均数±标准差($\bar{x}\pm s$)。两组数据比较使用双尾t检验, 多组数据比较采用单因素方差分析。P<0.05为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 高质量发育囊胚中存在高水平 miR-135

通过实时聚合酶链反应(real-time polymerase chain reaction, real-time PCR)检测正常卵母细胞的受精卵发育的不同质量囊胚中miR-135的表达水平, 结果如图1A所示: 高质量囊胚中miR-135水平为 98.4 ± 7.8 , 低质量囊胚中miR-135水平为 24.6 ± 3.5 , 差异有统计学意义($t=4.546$, $P<0.001$)。进一步对注射miR-NC或miR-135 inhibitor卵母细胞的受精卵发育成的囊胚进行检测, 结果如图1B所示: 在高质量囊胚中, miR-135 inhibitor组的囊胚比例显著低于miR-NC组($t=3.154$, $P<0.001$); 而在低质量囊胚中, miR-135 inhibitor组的囊胚比例显著高于注射miR-NC组($t=2.978$, $P<0.001$)。

2.2 卵母细胞注射miR-135 inhibitor抑制胚胎植入前胚胎发育

进一步研究卵母细胞注射miR-135 inhibitor对胚胎发育的影响, 结果(图2)显示: 在miR-NC组中, 发育成2细胞期、4细胞期、桑椹胚和囊胚期的比例分别为 $(87\pm 7)\%$, $(85\pm 5)\%$, $(82\pm 5)\%$ 和 $(78\pm 2)\%$ ($n=84$); 在miR-135 inhibitor组中, 发育成2细胞期、4细胞期、桑椹胚和囊胚期的比例分别为 $(81\pm 3)\%$, $(76\pm 6)\%$, $(52\pm 3)\%$ 和 $(38\pm 2)\%$ ($n=112$)。统计学分析结果显示: 卵母细胞注射miR-135 inhibitor组显著抑制胚胎发育, 差异有统计学意义($P<0.001$)。

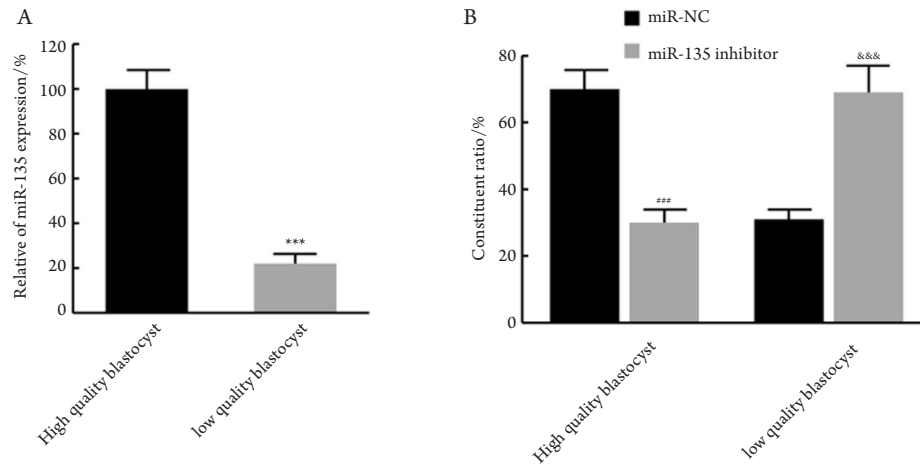


图1 囊胎中miR-135表达水平

Figure 1 MiR-135 expression level in blastocyst

(A) MiR-135在不同发育质量囊胚中的表达水平。 $\bar{x} \pm s$, $n=25$, $***P<0.001$ vs高质量囊胚。(B) miR-NC组和miR-135 inhibitor组中囊胚的构成比。 $\bar{x} \pm s$, $n=25$, $***P<0.001$ vs高质量囊胚+miR-NC组; $&&&P<0.001$ vs低质量囊胚+miR-NC组。

(A) MiR-135 expression level in blastocysts with different developmental quality. $\bar{x} \pm s$, $n=25$, $***P<0.001$ vs high-quality blastocyst. (B) The constituent ratio of blastocysts in miR-NC group and miR-135 inhibitor group. $\bar{x} \pm s$, $n=25$, $***P<0.001$ vs high quality blastocyst + miR-NC group; $&&&P<0.001$ vs low quality-blastocyst + miR-NC group.

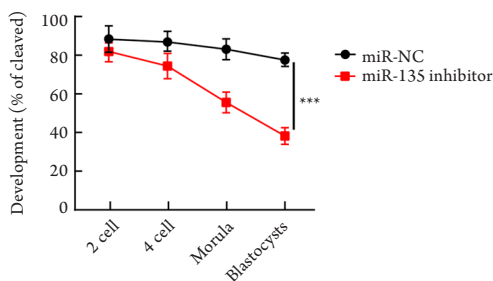


图2 卵母细胞注射miR-135 inhibitor对胚胎植入前胚胎发育的影响($***P<0.001$ vs miR-NC组)

Figure 2 Effect of injection of miR-135 inhibitor into oocytes on preimplantation embryonic development ($***P<0.001$ vs miR-NC group)

2.3 卵母细胞注射 miR-135 inhibitor 对囊胎中 IGF1R 表达和分布的影响

使用荧光染色观察囊胚中IGF1R的表达及分布, 结果(图3)显示: miR-NC组与miR-135 inhibitor组中IGF1R荧光强度无明显改变; 而染色的分布模式显示: miR-135 inhibitor组的囊胚基底外侧膜中的IGF1R染色荧光强度高于miR-NC组。

2.4 卵母细胞注射 miR-135 inhibitor 使胎鼠生长受限

将注射miR-NC或miR-135 inhibitor的卵母细

胞经IVF后, 分别将囊胚植入到小鼠体内, 并对胎鼠的冠臀长度进行检测, 结果(图4)显示: 对照组($n=37$)胎鼠冠臀长为(1.02 ± 0.03) cm, 而miR-135 inhibitor组($n=37$)冠臀长为(0.98 ± 0.02) cm, 差异有统计学意义($t=2.869$, $P<0.01$)。

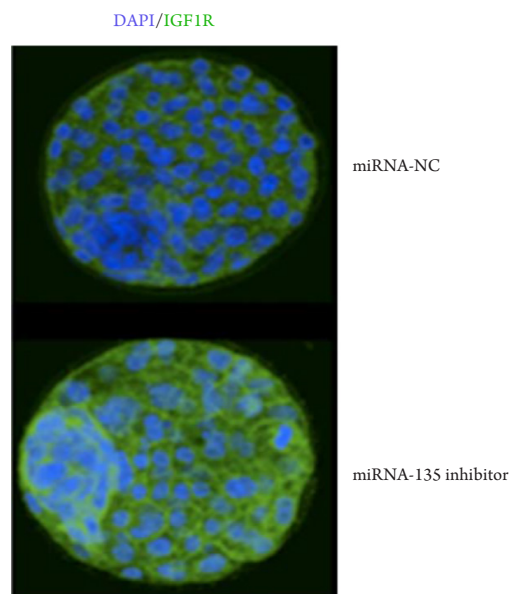


图3 显微镜下囊胚中IGF1R免疫荧光染色图($\times 200$)

Figure 3 Immunofluorescence staining of IGF1R in blastocysts under microscope ($\times 200$)

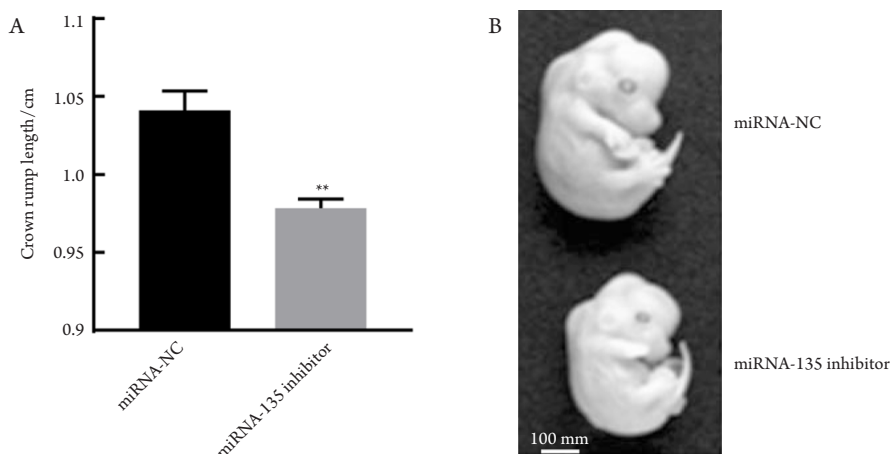


图4 卵母细胞注射miR-135 inhibitor对胚胎植入后胚胎发育的影响。

Figure 4 Effect of injection of miR-135 inhibitor into oocytes on implantation embryonic development

(A)胎鼠的冠臀长度统计结果；(B)鼠胎形态图。 $**P<0.01$ vs miR-NC。

(A) Statistical data of the length of crown and hip in fetal mice; (B) The fetal mice morphology. $**P<0.01$ vs miR-NC.

3 讨论

卵母细胞是雌(女)性生殖细胞,不仅是子代遗传物质的主要来源之一,并且卵母细胞的细胞质为早期胚胎发育提供了微环境,其成分变化对胚胎发育起重要作用^[2]。研究^[11]显示:卵母细胞的细胞质中央颗粒化可能影响其受精、卵裂以及囊胚的形成。卵母细胞的细胞质中同型半胱氨酸浓度与卵母细胞或胚胎之间存在负相关^[12]。此外,卵母细胞的细胞质中代谢特征可影响胚胎发育潜能和妊娠结局^[13]。

目前研究^[14]发现:miRNAs在卵母细胞、受精卵、卵裂期、桑椹胚和囊胚期呈现动态变化。而卵母细胞miRNAs的异常改变能影响卵母细胞成熟、受精、胚胎发育以及妊娠结局^[15-17]。Zhang等^[15]发现:抑制猪卵母细胞miR-29b表达可导致囊胚发育迟缓和降低质量。Liang等^[16]发现:卵母细胞过表达miR-29b可降低DNA甲基转移酶的表达,提高牛体细胞核转移囊胚的质量。Sinha等^[17]发现:牛卵母细胞过表达miR-130b促进牛颗粒细胞和卵丘细胞的增殖和存活、卵母细胞成熟、桑椹胚和囊胚的形成,而抑制miR-130b表达以上结果相反。而卵母细胞miRNAs种类繁多,进一步筛选更多的卵母细胞中影响胚胎发育的miRNAs有助于提高IVF成功率。本研究结果显示:miR-135在高发育质量的小鼠囊胚中高表达;而小鼠卵母细胞注射miR-135 inhibitor后,高发育质量的囊胚比例明显降低。因此,推测卵母细胞miR-135表达

可能与胚胎发育相关。为进一步研究miR-135在胚胎发育中的作用,本研究对小鼠卵母细胞注射miR-135 inhibitor后,再行IVF,发现2细胞期、4细胞期、桑椹胚和囊胚的数量减少。同时,本研究将IVF后的囊胚植入小鼠体内以观察其对植入后胚胎发育的影响,结果显示:卵母细胞注射miR-135 inhibitor抑制植入后小鼠胎儿发育相对迟缓,表明小鼠卵母细胞注射miR-135 inhibitor抑制胚胎发育。

另外,本研究还发现:小鼠卵母细胞注射miR-135 inhibitor后,IGF1R总表达强度无发生明显变化,但分布模式发生了改变,在囊胚基底外侧膜表达增强。IGF1R是IGF-1的受体。IGF-1是一种分子结构与胰岛素相似的多肽蛋白激素,在生长过程中起着重要作用,并具有合成代谢作用^[18]。已有研究^[18-19]表明:给予一定浓度的外源性IGF-1刺激卵母细胞,在IVF后能促进胚胎中IGF1R的表达和胚胎发育。本研究发现:虽然卵母细胞注射miR-135 inhibitor对囊胚中TGF1R表达无显著影响,但改变了TGF1R在囊胚中的分布方式。研究^[20]发现:在胎儿生长受限的胚胎中,TGF1R的分布模式发生了明显改变,不均一的TGF1R分布不利于葡萄糖和氨基酸的代谢。因此推测卵母细胞注射miR-135 inhibitor可能通过调节囊胚的IGF1R分布改变胚胎胰岛素信号转导并改变能量代谢,进而导致胚胎发育迟缓。

综上,抑制卵母细胞miR-135表达会降低胚胎质量和减缓胚胎发育。

参考文献

1. Wirleitner B, Okhowat J, Vištejnová L, et al. Relationship between follicular volume and oocyte competence, blastocyst development and live-birth rate: optimal follicle size for oocyte retrieval[J]. *Ultrasound Obstet Gynecol*, 2018, 51(1): 118-125.
2. Lu X, Gao Z, Qin D, et al. A maternal functional module in the mammalian oocyte-to-embryo transition[J]. *Trends Mol Med*, 2017, 23(11): 1014-1023.
3. 徐文丹, 崔毓桂, 茅彩萍. 卵母细胞代谢及其调节[J]. *生殖医学杂志*, 2017, 26(10): 1047-1051.
XU Wendan, CUI Yogui, MAO Caiping. Research progress of oocyte metabolism and its regulation[J]. *Journal of Reproductive Medicine*, 2017, 26(10): 1047-1051 1047-1051.
4. 朱卫国. 胚胎发育的精细表观遗传调控[J]. *中国科学(生命科学)*, 2016, 46(12): 1449-1450.
ZHU Weiguo. Precision epigenetic regulation on embryonic development[J]. *Science in China (Series C)*, 2016, 46(12): 1449-1450.
5. 范文涛, 钟杨生, 陈芳艳, 等. miRNA在动物胚胎形成、发育中的研究进展[J]. *生物学杂志*, 2016, 33(2): 91-94.
FAN Wentao, ZHONG Yangsheng, CHEN Fangyan, et al. Research progress of miRNA regulation in animal embryo formation and development[J]. *Journal of Biology*, 2016, 33(2): 91-94.
6. 王峥, 徐家伟, 孙莹璞. 辅助生殖技术与胚胎DNA甲基化[J]. *国际生殖健康/计划生育杂志*, 2017, 36(1): 36-38.
WANG Zheng, XU Jiawei, SUN Yingpu. Assisted reproductive technology and embryonic DNA methylation[J]. *Journal of International Reproductive Health/Family Planning*, 2017, 36(1): 36-38.
7. Tesfaye D, Gebremedhn S, Salilew-Wondim D, et al. MicroRNAs: tiny molecules with a significant role in mammalian follicular and oocyte development[J]. *Reproduction*, 2018, 155(3): R121-R135.
8. Caronia-Brown G, Anderegg A, Awatramani R. Expression and functional analysis of the Wnt/beta-catenin induced mir-135a-2 locus in embryonic forebrain development[J]. *Neural Dev*, 2016, 11: 9.
9. Pang RT, Liu WM, Leung CO, et al. miR-135A regulates preimplantation embryo development through down-regulation of E3 ubiquitin ligase seven in absentia homolog 1A (SIAH1A) expression[J]. *PLoS One*, 2011, 6(11): e27878.
10. Bhinge A, Poschmann J, Namboori SC, et al. MiR-135b is a direct PAX6 target and specifies human neuroectoderm by inhibiting TGF- β /BMP signaling[J]. *EMBO J*, 2014, 33(11): 1271-1283.
11. 李恩书, 叶英辉, 朱依敏, 等. 受精卵细胞质晕与胚胎发育潜能及临床妊娠结局的关系[J]. *中华生殖与避孕杂志*, 2013, 33(9): 581-585.
LI Enshu, YE Yinghui, ZHU Yimin, et al. Relationships between the zygote cytoplasmic halo in embryonic developmental potential and clinical pregnancy outcomes[J]. *Reproduction and Contraception*, 2013, 33(9): 581-585.
12. 何驰华, 杨菁. 人卵母细胞胞浆中央颗粒化对胚胎发育潜能的影响及其分级和成因探讨[J]. *生殖医学杂志*, 2014, 23(11): 902-906.
HE Chihua, YANG Jing. Investigating effect of centrally located granular cytoplasm of oocytes on embryos developmental potential and its classification standard and formation cause[J]. *Journal of Reproductive Medicine*, 2014, 23(11): 902-906.
13. 赵铭佳, 吴剑华, 李翠, 等. 同型半胱氨酸对卵子质量及体外受精妊娠结局的影响[J]. *中国妇幼保健*, 2017, 32(18): 4476-4479.
ZHAO Mingjia, WU Jianhua, LI Cui, et al. Effect of homocysteine on oocyte quality and pregnancy outcomes of in vitro fertilization[J]. *Maternal & Child Health Care of China*, 2017, 32(18): 4476-4479.
14. Hossain MM, Salilew-Wondim D, Schellander K, et al. The role of microRNAs in mammalian oocytes and embryos[J]. *Anim Reprod Sci*, 2012, 134(1/2): 36-44.
15. Zhang Z, Cao Y, Zhai Y, et al. MicroRNA-29b regulates DNA methylation by targeting Dnmt3a/3b and Tet1/2/3 in porcine early embryo development[J]. *Dev Growth Differ*, 2018, 60(4): 197-204.
16. Liang S, Nie ZW, Guo J, et al. Overexpression of microRNA-29b decreases expression of DNA methyltransferases and improves quality of the blastocysts derived from somatic cell nuclear transfer in cattle[J]. *Microsc Microanal*, 2018, 24(1): 29-37.
17. Sinha PB, Tesfaye D, Rings F, et al. MicroRNA-130b is involved in bovine granulosa and cumulus cells function, oocyte maturation and blastocyst formation[J]. *J Ovarian Res*, 2017, 10(1): 37.
18. Chen P, Pan Y, Cui Y, et al. Insulin-like growth factor 1 enhances the developmental competence of yak embryos by modulating aquaporin 3[J]. *Reprod Domest Anim*, 2017, 52(5): 825-835.
19. Qu P, Li Y, Deng T, et al. Effects of insulin-like growth factor-1 on development of somatic cell cloned bovine embryos[J]. *Cell Reprogram*, 2016, 18(3): 162-170.
20. Hill DJ, Clemmons DR, Riley SC, et al. Immunohistochemical localization of insulin-like growth factors (IGFs) and IGF binding proteins-1, -2 and -3 in human placenta and fetal membranes[J]. *Placenta*, 1993, 14(1): 1-12.

本文引用: 梁见弟, 叶艳娜, 张昭. 小鼠卵母细胞miR-135的表达对胚胎发育的影响[J]. *临床与病理杂志*, 2019, 39(12): 2674-2679. doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2019.12.006

Cite this article as: LIANG Jiandi, YE Yanna, ZHANG Zhao. Effect of miR-135 expression on embryonic development in mouse oocytes[J]. *Journal of Clinical and Pathological Research*, 2019, 39(12): 2674-2679. doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2019.12.006