

DOI: 10.13376/j.cblls/2017005

文章编号: 1004-0374(2017)01-0031-12



王海滨, 博士、研究员、中国科学院“百人计划”引进海外杰出人才、国家杰出青年基金获得者、“973”项目首席科学家、中国青年科技奖获得者。2008年初作为“百人计划”引进海外杰出人才, 全职回中国科学院动物研究所干细胞与生殖生物学国家重点实验室(原计划生育生殖生物学国家重点实验室)工作。近10年来一直从事胚胎植入和胎盘发生的调控机理研究, 在 *J Clin Invest*、*PLoS Biology*、*Cell Research*、*PNAS* 等刊物发表SCI论文90多篇, 多次受邀在 Nature Conference、Keystone Symposia、Gordon Conference 等国际学术会议做大会报告, 目前担任 *Biol Reprod*、*Am J Reprod Immunol*、*PLoS ONE* 和 *J Reprod Immunol* 等国际期刊编委。

胚胎植入研究的进展与展望

王海滨

(中国科学院动物研究所干细胞与生殖生物学国家重点实验室, 北京 100101)

摘要: 胚胎与母体子宫第一次亲密接触并相互对话, 进而建立起直接生理联系的过程被称为胚胎植入。这一过程的正常发生与否决定着胚胎能否继续发育和最终的妊娠结局。正常育龄妇女每个月经周期妊娠成功率只有30%左右, 其中近70%的妊娠失败被认为是发生在胚胎植入环节。胚胎植入的成功发生需要具有植入能力的囊胚和处于接受态的子宫之间同步互作并建立起直接的生理联系。在临床的辅助生殖诊疗中, 尽管形态正常的胚胎移植到子宫中, 妊娠的成功率也只有50%左右, 这其中子宫接受态的异常被认为是一个很关键的、急需克服的限制因素。反之, 更为可靠的胚胎质量判断标准是辅助生殖治疗研究中的另一个关键问题。针对子宫接受态建立和囊胚激活这两个决定胚胎植入成败的关键事件, 阐述了胚胎植入领域近年来的研究进展, 介绍了国内科学家在该领域所做的贡献, 同时简要探讨了本领域发展面临的问题以及出路, 以使读者能明晰胚胎植入这一重要生理过程发生的分子基础以及该领域面临的挑战和未来发展方向。

关键词: 胚胎植入; 子宫接受态; 囊胚激活

中图分类号: R321.3 文献标志码: A

Embryo implantation: progress and challenge

WANG Hai-Bin

(State Key Laboratory of Stem Cell and Reproductive Biology, Institute of Zoology,
Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China)

Abstract: Embryo implantation involves the first physical and physiological interaction between the embryo and uterus, which determines the success of postimplantation conceptus development and term pregnancy outcome. During natural conception, an average rate of successful pregnancy occurring in a given menstrual cycle is limited to about 30%, and implantation failure has been considered as the major cause, reaching approximate 70%.

收稿日期: 2016-07-19

基金项目: 国家重大科学研究计划(2011CB944400); 国家自然科学基金项目(81130009, 81330017)

*通信作者: E-mail: hbwang@ioz.ac.cn, haibin.wang@vip.163.com; Tel: 010-64807868

Successful implantation requires synchronization between blastocysts achieving implantation competency and uteri entering a receptive state. In clinical IVF-ET practice, the pregnancy success rate was limited to about 50% even when morphological normal embryos were transferred, where defective uterine receptivity was proved to be one of the limiting factors. Meanwhile, it is also equally important to develop more reliable criteria for assessment of embryo quality in IVF-ET practice. This review summarizes recent progress in the field of embryo implantation, with a particular highlight in future challenge and direction.

Key words: embryo implantation; uterine receptivity; blastocyst activation

在哺乳动物中, 新生命起源于精子和卵子结合形成的受精卵, 受精卵经过一系列的细胞分裂过程形成囊胚, 而囊胚在正常生理情况下只有植入母体子宫才能继续发育^[1-2]。胚胎植入事件对于后续胎儿发育和妊娠成败至关重要。例如, 正常育龄妇女在一个月经周期中妊娠成功的几率只有30%左右, 而近70%的妊娠失败被认为是由于植入失败造成的^[3]。在临床的辅助生殖诊疗中, 将形态正常的胚胎移植到子宫中, 妊娠的成功率也只有50%左右, 其中子宫接受态的异常被认为是一个很关键的、需要克服的因素; 另外, 胚胎质量对植入和后代健康的影响目前尚不十分清楚。反之, 如果能深入了解胚胎植入的分子机制, 不仅有可能为避孕药物的研发提供潜在靶点, 更可为不孕不育等妊娠疾病的诊疗提供新思路。然而, 由于伦理道德的限制, 目前尚无法直接对人类胚胎植入进程中囊胚-子宫对话的分子机制进行深入阐释。以基因工程小鼠为模式动物的研究为深入了解胚胎植入的分子机制提供了很大帮助。

以小鼠的研究为例, 植入的成功发生需要处于接受态的子宫和具有植入能力的囊胚同步互动并建立起功能性联系^[1]。子宫如何进入接受态以及囊胚如何获得植入能力是胚胎植入领域的两大基本科学问题。子宫接受态的建立受卵巢雌孕激素的协同调控, 涉及一系列信号分子时空特异性的表达, 然而子宫中不同类型的细胞是如何响应雌孕激素信号, 彼此之间又是如何相互作用共同确保子宫接受态的建立, 这些问题还远未阐述清楚。研究显示, 雌激素及其衍生物对于小鼠囊胚的激活至关重要, 然而, 评估激活囊胚的分子标记, 及其分泌的参与植入过程中母胎对话的胚源信号分子等方面仍有待进一步研究。虽然我国在胚胎植入领域的研究起步较晚, 但是随着近年来国家对本领域科研投入的增加, 国内科学家在本领域取得了一系列可喜的成果。本文主要基于以小鼠为模式动物的研究结果, 围绕子宫接受态建立和囊胚激活这两条主线, 阐述了胚胎植

入领域近年来的研究进展, 介绍了国内科学家在该领域所做的贡献, 以使读者明晰胚胎植入这一重要生理学过程发生的分子基础, 并初步探讨了这一领域未来的发展方向和面临的挑战。

1 子宫接受态的概念

囊胚和子宫的对话只能在一个相对较短且有限的时间段内发生, 这一时间段被称为子宫接受态窗口期或者植入窗口期^[4-5]。植入窗口期的概念是伴随着胚胎移植技术的发展而被提出来的。以大鼠的研究为例, 当妊娠第5天(见栓为第1天)的囊胚移植到正常妊娠或者假孕第4或第5天的大鼠子宫中, 能够正常发生植入, 但是移植到第5天以后的子宫中, 则植入失败^[6]。这一结果提示子宫并非一直处于一种易于胚胎植入的状态。进一步利用正常妊娠或延迟植入的小鼠模型, 证明了小鼠中也存在着植入窗口期。根据子宫对囊胚植入的敏感性, 将其分为三个时期: 接受态前期、接受态和非接受态期(不应期)。在接受态前期, 子宫利于胚胎的发育但胚胎不能起始植入; 接受态时期的子宫接受获得植入能力的囊胚并起始植入反应; 而不应期的子宫不仅不利于胚胎的植入, 甚至不利于囊胚在子宫中的存活^[1-2,4-5]。小鼠妊娠第4天前被认为是接受态前期; 第4天起为接受态时期; 从妊娠第5天下午开始, 子宫进入不应期^[7]。在月经周期中, 排卵后的第1~7天通常被认为是接受态前期, 排卵后的第7~10天为接受态期, 其余的时间则被认为是不应期^[8]。

2 雌孕激素与子宫接受态

妊娠是一个涉及胚胎植入、子宫内膜蜕膜化、胎盘发生以及最终的胎儿娩出等一系列彼此独立又级联递呈事件的生理过程^[4]。前一事件的顺利完成是后一事件得以正常发生的前提。但是子宫是如何精确控制各个事件的有序发生, 这一问题还远未阐述清楚。目前普遍的观点认为卵巢分泌的孕激素和

雌激素在这一系列事件中发挥着至关重要的作用。尽管孕激素的存在对于目前已经研究过的所有哺乳动物的植入过程都是必需的,但雌激素的必需与否则有物种特异性。例如,卵巢雌孕激素对于大、小鼠的植入反应是必需的,但在猪、豚鼠、兔子以及仓鼠等的植入过程中并未检测出卵巢雌激素的存在,不过胚胎合成的雌激素被认为可能在这些物种的植入过程中起着重要的作用。另外,目前尚不清楚人的植入反应是否也需要雌激素发挥作用^[1]。

探索雌孕激素对植入接受态建立的调节,有必要先介绍一下植入前雌孕激素的分泌模式。根据组织学结构和功能的变化,人子宫月经周期可被分为两个时期:增殖期或卵泡期(第1~14天,其中排卵发生在第13~14天)和分泌期或黄体期(第15~28天)。在人的月经周期中,雌孕激素的分泌也是动态变化的,在增殖早期,雌孕激素均不分泌或分泌量极低;从排卵前的第10天开始,雌激素逐渐开始分泌,在排卵期达到最高峰,随后下降,在随后的分泌期,再次分泌并出现一个较小的分泌峰;进入分泌期后,孕酮开始分泌并迅速达到一个峰值,随后在整个分泌期一直维持着较高的水平,直至这个周期结束^[1,8]。在小鼠排卵前的动情前期,孕激素分泌很少或者基本不分泌,而此时存在一个较高的雌激素峰;在交配(排卵)后的前2天,雌激素和孕激素水平很低,从第3天开始,伴随着功能性黄体的形成,孕激素的分泌迅速增加并一直维持在一个较高的水平;同时,雌激素在妊娠第4天也出现一个较小的分泌峰,被称为黄体期雌激素峰(或植入前雌激素峰)^[1]。根据这种独特的分泌模式,在妊娠第4天早上的雌激素峰到来之前,摘除小鼠卵巢而去除卵巢雌孕激素的作用,并从第5天开始持续注射孕酮,可以维持子宫处于一种不接受胚胎植入的中性状态,同时胚胎也处于休眠状态,而随后对小鼠注射雌激素,可以促使子宫迅速进入接受态并激活囊胚,起始植入反应^[9-10]。这一延迟植入小鼠模型再次证明了雌孕激素对于接受态建立的重要作用。

在小鼠中,雌孕激素分别通过核内的雌激素受体(ER)和孕激素受体(PR)发挥作用,这两种受体都存在着两种不同的亚型,它们分别是ER α /ER β 和PRA/PRB。来自基因敲除小鼠的证据显示,在子宫中起主导作用的雌孕激素受体分别为ER α 和PRA^[11-13]。研究表明,雌孕激素受体介导的信号通路激活需要共激活分子的参与。FKBP52是孕酮受体的一个伴侣分子,它和PR共同表达于子宫基质

细胞,FKBP52被认为是孕酮信号通路所必需的。FKBP52全身性敲除小鼠不能发生植入反应,主要表现为孕酮信号的减弱,造成妊娠第4天子宫腔上皮细胞的持续增殖与基质细胞增殖的减少^[14-15]。外源注射过量孕酮可以挽救FKBP52缺失造成的缺陷^[16]。这些结果提示了FKBP52在孕酮信号通路中的作用。孕酮受体的另外一个经典的共激活分子是固醇受体共激活子2(SRC2, *Ncoa2*),SRC2可以与孕酮受体相互作用并影响其功能,SRC2敲除小鼠因缺陷的孕酮功能而导致植入失败^[17]。此外,SRC2在人子宫内膜中的表达暗示其可能在人也参与孕酮的作用^[18]。Kruppel样转录因子Klf9也是孕酮受体的共激活因子,其可与PRA和PRB相互作用,影响子宫内膜上皮细胞的孕酮响应基因的表达^[19]。进一步的研究发现,Klf13可以在一定程度上补偿Klf9的作用^[20]。

与孕酮受体相比,雌激素受体特异的共激活分子的研究相对较少。在许多不同的生物学过程中,固醇类受体共激活因子家族成员SRC1/2/3以及P300等均被证明可以作为ER的共激活分子调节ER的转录活性^[21],然而,特异地在植入过程中起作用的ER共激活分子还鲜有报道。值得一提的是,最近有研究发现固醇类受体共激活因子家族成员(SRC6, *Ncoa6*)可以作为雌激素受体的负调节因子调节子宫接受态的建立。*Ncoa6*子宫特异性敲除异常提高了子宫基质细胞和上皮细胞的雌激素响应性,进而影响了孕酮响应基因的表达,造成雌孕激素受体活性失调,最终导致植入失败。进一步的研究显示,SRC6可能促进ER的泛素化而加速其降解,同时下调ER α 共激活分子SRC3的表达,实现雌孕激素受体活性的平衡,从而促进子宫接受态的建立^[22]。以上证据揭示了雌孕激素受体的共激活因子对其活性精确调控的关键性,而目前我们知道的子宫中特异的雌孕激素受体辅助因子还比较少,要深入了解雌孕激素对子宫接受态建立的调节功能,还需要更全面的发掘雌孕激素受体调控网络中的关键因子。

卵巢雌孕激素的协同作用调节子宫接受态的建立,处于接受态的子宫发生了明显的形态学改变,其中最为直观的是子宫腔的闭合。子宫腔的闭合过程中所涉及的一个重要方面是宫腔内液体的吸收^[23]。雌孕激素失衡会导致这一过程受阻,最终影响子宫腔的闭合。例如,段恩奎研究组的研究结果显示,过量的雌激素可能通过水通道蛋白Aqp5/8导致子宫腔内液体的异常积累^[24];他们和乔杰研究组合作,

还揭示了过量的子宫腔内液体会影响胚胎的正常植入,从而导致不良的妊娠结局^[25]。与此同时,我们和段恩奎研究组合作研究发现,RBPJ特异性敲除的子宫中雌激素受体活性异常升高,导致子宫腔的闭合异常,造成胚胎植入缺陷,引发一系列不利的连锁反应,最终使得胎儿的出生率降低^[26]。

3 子宫接受态的调控网络

子宫接受态的建立是在雌孕激素的指导下,涉及包括黏附分子、生长因子、细胞因子、脂类分子以及转录因子在内的一系列信号分子的时空特异性表达的过程。这些信号分子组成一个复杂而精确的调控网络,共同确保子宫接受态的成功建立。

在众多黏附分子中,表达于胚胎和子宫上皮细胞中的整合素和选择素分子可能参与囊胚-子宫的分子对话。不同的整合素分子在小鼠和人的子宫中有不同的表达模式,其中, $\alpha 4\beta 1$ 和 $\alpha v\beta 3$ 整合素都表达于接受态时期的小鼠子宫,抑制这两种分子的活性会导致植入的缺陷^[27-28]。在处于植入窗口期的人子宫内膜细胞中, $\alpha 1\beta 1$ 、 $\alpha 4\beta 1$ 和 $\alpha v\beta 3$ 整合素都有表达^[29],而 $\alpha v\beta 3$ 整合素在很多不明原因的流产患者子宫中的表达较低^[30]。章汉旺研究组的研究结果显示,降钙素通过上调人子宫内膜上皮细胞 $\alpha v\beta 3$ 整合素来促进胚胎植入^[31]。这些结果提示,这些整合素分子可能在人的子宫接受态建立过程中发挥作用。此外,选择素与它的寡糖基配体也可能参与了人的胚胎-子宫上皮细胞之间的分子对话过程^[32]。并且,黄荷凤研究组的研究结果显示,子宫中高表达L-选择素有利于胚胎植入反应^[33]。植入接受态建立过程中另一个重要的黏附分子是Muc1。在小鼠中,接受态建立前的子宫腔上皮细胞高表达Muc1,而在接受态建立后迅速下调,这一表达模式被认为是阻碍囊胚提前与子宫上皮细胞发生黏附反应^[34]。在人中,冯云和张爱军组检测了不明原因反复流产患者子宫内膜中LIF、整合素 $\beta 3$ 以及Muc1的表达情况,发现Muc1的表达显著下调^[35]。陈友国研究组发现,在不育的子宫内膜异位症患者的子宫中,Muc1的表达异常下调^[36]。另外,孙晓溪研究组发现Muc1在输卵管积水患者子宫中的表达也降低^[37]。这些结果表明,Muc1在人的胚胎植入过程中可能发挥重要作用。

子宫接受态建立过程中的一个重要的细胞因子是白血病抑制因子(LIF)。在雌激素的作用下,LIF表达于妊娠第4天的子宫腺上皮细胞,伴随着

植入的起始,LIF也表达于胚胎周围的上皮下基质细胞^[38]。研究显示,LIF主要与子宫腔上皮细胞中表达的受体LIFR/gp130结合,激活Stat3信号通路来发挥作用^[39-41]。杨增明课题组的研究结果显示,早期生长反应蛋白-1(EGR-1)作为LIF-LIFR/gp130-Stat3信号通路轴下游分子参与胚胎植入过程^[42]。此外,岳占碰和柳巨雄研究组还发现EGR-1可以影响包括COX2、Mpges-1、VEGF以及P53等蛋白的表达,从而在胚胎植入过程中发挥作用^[43]。最近,吴缅教授和史庆华教授等课题组合作,发现miRNA-181在正常的子宫接受态建立过程中表达降低,而过表达miRNA-181使得LIF的表达减少,从而导致植入失败^[44]。在人中,LIF主要表达于处于植入窗口期的子宫内膜细胞^[45]。一些不明原因流产或者不孕不育患者子宫则表现出低水平的LIF表达^[46-47],但是目前还不清楚LIF是否是子宫接受态建立所必需的^[4]。例如,周应芳研究组发现,子宫内膜异位患者子宫表达LIF的能力降低^[48]。这些研究使我们对LIF信号调控网络有了更深的认识。

植入反应发生的一个重要标志是子宫内血管通透性的增加,基于这一现象,在小鼠血液循环中注入小分子染料(如芝加哥蓝)可以特异地标示出植入位点。前列腺素类分子(PGs)被证明在其中发挥着重要作用。在子宫细胞中,胞质磷脂酶cPLA2 α 可以催化细胞膜磷脂形成花生四烯酸,后者可被环氧合酶COX1/2催化合成PGH2,最后形成其他前列腺素类分子,它们通过与其核受体PPAR δ 相互作用调节植入过程^[2,4]。此外,溶血磷脂酸受体3(LPA3)信号通路可能与cPLA2 α -COX1/2-PGs信号轴相关,因为LPA3^{-/-}小鼠和cPLA2 α ^{-/-}小鼠的表型类似,它们都表现出COX2的表达异常,而且人工注射前列腺素(PGE2和PGI2)可以挽救LPA3缺失造成的植入窗口期延迟,但是却不能挽救胚胎定位的异常^[7,49],提示胚胎定位可能有其他的机制。段恩奎研究组的研究发现, β -肾上腺素受体的短暂性激活可以下调LPA3的表达,同时激活cAMP-PKA信号通路,使得子宫收缩受到抑制,最终导致胚胎定位失败^[50]。这一系列研究结果证明了cPLA2 α -COX1/2-PGs信号轴在子宫接受态建立过程中的重要作用。在此基础上,杨增明研究组系统检测了前列腺素转运蛋白及其代谢酶在子宫中的表达。他们还通过外源注射花生四烯酸的方式,发现花生四烯酸可以促进子宫内膜基质细胞表达cPLA2 α 和COX2^[51],这提示花生四烯酸可以作为一种cPLA2 α -

COX2 信号通路的正反馈调节分子起作用。有意思的是, 陈小章、周文良以及黄荷凤研究团队合作研究发现, 胚胎释放丝氨酸蛋白酶可激活小鼠子宫内膜上皮细胞中的钠离子通道 (epithelial Na^+ channel, ENaC), 触发钙离子内流, 从而诱导前列腺素 PGE2 释放, 同时促进转录因子 CREB 的磷酸化和 COX2 的表达上调。研究人员检测到在小鼠胚胎植入时 ENaC 的活性最高, 阻断或抑制 ENaC 可导致胚胎植入失败。此外, 研究人员还发现辅助生殖技术中, 未能受孕妇女的子宫中 ENaC 的表达水平比成功受孕患者的要低^[52]。

胚胎植入是一个高度复杂且受到精确调控的过程, 大量研究结果表明多种转录因子在其中发挥重要作用。其中, 同源框转录因子家族成员在组织和器官发育以及早期妊娠中研究较多。该家族成员中的 Hoxa10 和 Hoxa11 被发现参与植入过程。在小鼠中, Hoxa10 主要表达于子宫上皮和基质细胞中, 并随着植入接受态的建立, 其表达进一步增强。Hoxa10 突变小鼠表现为雌孕激素不能诱导基质细胞增殖但不影响上皮细胞增殖, 最终导致植入失败^[53-55]。朱桂金研究组发现 MEIS 可作为 Hoxa10 的共激活分子在人的胚胎植入过程中发挥作用^[56]。鼓楼医院的孙海翔教授等发现 PCAF 可以乙酰化 Hoxa10, 减弱其转录活性, 使得 $\beta 3$ 整合素等基因表达下调, 最终导致子宫内膜接受态建立失败^[57]。李朝军研究组的工作显示, Hoxa10 反过来又可以抑制 PCAF 的表达^[58]。随后, 孙海翔和胡娅莉教授进一步研究发现, Hoxa10 可以调控上皮细胞中基质金属蛋白酶 MMP26 的表达, 促进胚胎黏附^[59]。Hoxa11 高表达于人和小鼠的子宫基质细胞并在植入反应发生时表达最强, Hoxa11^{-/-} 小鼠子宫腺上皮细胞分化异常, 主要表现为腺上皮细胞不能正常表达 Lif, 而基质细胞也无法响应雌孕激素的作用, 最终导致植入失败^[60-62]。除了 Hoxa10 和 Hoxa11, 朱桂金教授等发现同源框转录因子 Hoxa9 和 HoxD10 也可能参与人子宫内膜接受态的建立^[63]。Msx1 作为另一个同源框转录因子, 只短暂性地表达于黏附反应发生前的子宫上皮细胞, 在黏附反应发生时, Msx1 的表达迅速下调, 并在此后的整个妊娠期间均无表达^[64]。此外, Msx1 在人的子宫内膜增殖晚期到分泌早期出现高水平的表达, 在进入接受态期表达也出现下调^[65]。Msx1 的表达下调对于子宫接受态的建立至关重要, 以 Lif^{-/-} 小鼠为例, 其子宫持续表达 Msx1, 最终植入失败。而 Msx1 子宫条件性

敲除小鼠由于植入的缺陷而导致生殖力下降, Msx1/2 同时敲除小鼠由于子宫腔上皮的极性和完整性改变而导致植入失败^[66]。在临床的研究中也发现子宫中 MSX1 蛋白的低表达水平与女性的不育有关^[67]。除此之外, Kruppel 样转录因子 Klf5 也在植入过程中发挥作用, Klf5 主要表达于植入前的子宫腔上皮和腺上皮细胞, Klf5 子宫条件性敲除小鼠主要表现为胚胎周围的子宫上皮细胞无法正常凋亡, 造成植入缺陷^[68]。

在雌孕激素的指导下, 这些信号分子在子宫接受态建立过程中呈现出时间和空间上的特异性表达, 它们或是调控了植入过程中细胞本身的适应性, 或是参与上皮-基质对话, 或是参与胚胎-子宫分子对话。总的来看, 这些信号分子组成了一个复杂而精确的调控网络, 共同确保子宫接受态的建立和植入的成功发生。

4 上皮-基质互作的分子基础

从形态结构上, 小鼠子宫组织主要由三部分构成: 上皮、基质和肌层。大量实验证据显示, 这些不同区域的子宫细胞可以单独或者通过彼此之间相互作用共同促进子宫接受态的建立。在小鼠中的研究结果显示, 妊娠前两天, 排卵前的雌激素诱导上皮细胞增殖, 从第 3 天开始, 伴随着功能性黄体的形成, 孕激素分泌增加, 诱发基质细胞大量增殖, 同时上皮细胞停止增殖并开始分化, 妊娠第 4 天的植入前雌激素峰进一步促进基质细胞的增殖和上皮细胞的分化^[2,4-5]。然而, 雌孕激素受体在围植入时期的子宫上皮细胞和基质细胞都有表达, 一个有意思的科学问题是这些表达于不同细胞类型的雌孕激素受体是否直接对不同细胞类型的增殖和分化行为进行调控呢。

体外组织重构实验发现, 在基质细胞雌激素受体 ER α 敲除的情况下, 尽管上皮细胞仍存在 ER α , 雌激素的刺激也不能诱导上皮细胞的增殖^[69]。进一步研究显示, 基质细胞在雌激素的作用下, 分泌诸如 IGF-1、EGF 和 FGF 等多肽类生长因子促进上皮细胞增殖^[70-74]。这些结果提示基质细胞中的 ER α 响应雌激素的刺激, 通过旁分泌的方式作用于上皮细胞, 促进上皮细胞增殖。随着组织特异性敲除小鼠技术的发展, 在对子宫上皮细胞特异性敲除 ER α 的小鼠的研究中发现, 雌激素的刺激并不影响上皮细胞的增殖, 进一步证实了组织重构实验的结果^[75]。另外, 有证据显示子宫上皮和基质细胞中的 ER α 对

于上皮细胞的分化都是必要的^[76]。

同样利用组织重构策略发现孕酮可以通过基质细胞表达的 PR 拮抗雌激素诱导的上皮增殖^[77]。随后的研究进一步发现,孕酮可以诱导基质细胞表达 Hand2,而 Hand2 子宫特异性敲除小鼠的基质细胞持续高表达 FGF,高表达的 FGF 通过旁分泌的方式诱导上皮细胞异常增殖,使得子宫接受态建立失败,最终导致不育^[78]。这些结果说明,Hand2 是介导基质-上皮对话的中间媒介之一。利用 Wnt7a-Cre/PR-loxp 上皮特异性敲除小鼠模型进行研究发现,上皮细胞表达的 PR 可以直接调控上皮细胞自身表达 Ihh,从而抑制雌激素诱导的上皮细胞增殖^[79]。这一系列实验结果揭示了基质细胞和上皮细胞中表达的孕酮受体可以参与上皮-基质的分子对话过程。

子宫腔上皮和肌层之间的区域还包含子宫腺体,腺上皮细胞和子宫腔上皮细胞之间的相互作用对于子宫接受态的建立也是至关重要的。研究表明,LIF 可能是介导这种相互作用的一个重要分子,腺上皮细胞分泌的 LIF 主要与子宫腔上皮细胞中表达的受体 LIFR/gp130 结合并激活 Stat3 信号通路来发挥作用。在 Lif^{-/-}小鼠中,子宫腔上皮和腺上皮细胞中的 Stat3 不能正常激活入核,并且植入反应不能发生^[38-40]。这一系列研究结果提示,LIF 可能介导了子宫腺上皮细胞和腔上皮细胞之间的相互作用。另外,彭景梗研究组发现 SPINK3 作为一个子宫腺体特异性分泌的蛋白也参与胚胎植入的过程^[80]。

总之,在雌孕激素的作用下,上皮和基质细胞通过各自的雌孕激素受体响应激素配体信号,调控一系列信号分子的表达,并通过自分泌或者旁分泌的方式实现上皮和基质之间的分子对话,共同调节子宫接受态的建立,最终促使植入反应的正常发生。

5 囊胚激活以及囊胚-子宫分子对话

只有获得植入能力的囊胚才能起始植入反应,囊胚获得植入能力的过程称为囊胚激活。延迟植入小鼠模型的建立大大促进了囊胚激活的研究,从延迟植入小鼠的子宫中可以获得不具有植入能力的囊胚,也称为休眠囊胚。与激活囊胚相比,休眠囊胚表现出代谢活性减弱和细胞分裂减少等特征^[2,5]。持续注射孕酮可以长期维持囊胚的休眠状态,而注射低剂量的雌激素则能迅速激活囊胚并起始植入反应^[10],这提示雌激素在囊胚激活和子宫接受态建立过程中的重要作用。

最初的研究显示,雌激素受体表达于植入前的

囊胚,但是雌激素的处理并不能激活体外培养的休眠囊胚^[81],提示雌激素并不能直接激活胚胎。但是,岳利民研究组发现,雌激素可以通过其快速效应引起休眠囊胚细胞内的钙离子浓度增加^[82]。进一步的研究发现,雌激素经过子宫代谢产生的儿茶酚胺类雌激素直接参与囊胚的激活^[81]。我们课题组早期研究发现,子宫接受态建立时大麻素的合成活性降低,这种低水平的大麻素可以通过囊胚表达的大麻素受体 CB1 活化 MAPK 信号通路,激活囊胚,反之,高水平的大麻素对囊胚的激活是不利的^[83]。参与囊胚激活的母胎对话分子还有 HB-EGF。HB-EGF 在黏附反应发生前的几个小时高表达于胚胎周围的腔上皮细胞。它主要以跨膜蛋白和可溶性蛋白两种形式存在,这两种形式的 HB-EGF 分别以近分泌和旁分泌的方式作用于胚胎滋养层细胞上表达的生长因子受体家族分子(如 ErbB1),从而介导胚胎-子宫之间的分子对话^[84-86]。激活囊胚也可以表达 HB-EGF,通过旁分泌和自分泌的方式发挥作用^[87-88],这样 HB-EGF 信号就在子宫和胚胎之间形成了一个放大的环路,逐渐增强该通路的活性。利用单独吸附了 HB-EGF 的琼脂糖珠子也可以很好地模拟胚胎的植入反应^[87],这进一步证实了 HB-EGF 参与到胚胎黏附的过程中。此外,我们还研究揭示了经典 Wnt 信号通路的激活对于囊胚植入能力的获得也是至关重要的^[89]。最近,利用小鼠延迟植入模型和蛋白质组学等手段,我们全面分析了囊胚激活过程中全局分子变化,进一步发现线粒体和溶酶体系统参与了囊胚的激活过程^[90]。在植入过程中,与胚胎接触的上皮细胞需要被清除,才能利于胚胎滋养层细胞的进一步侵入。有研究发现,在这个过程中发生的细胞学行为是有滋养层细胞直接对上皮细胞造成的侵入性死亡(entosis)^[91]。同时,我们研究组也发现,在这个过程中胚胎来源的 TNF- α 信号通过上皮表达的受体也参与上皮的清除过程^[92]。最近的研究表明,微囊泡参与囊胚和子宫上皮之间的互作,胚胎分泌的微囊泡携带 miRNA 等分子可以被上皮细胞摄取,可以调控植入过程中上皮的分化^[93]。囊胚本身的内细胞团和滋养外胚层在植入的过程中也有分子对话,其中内细胞团可以通过分泌产生微囊泡(microvesicle)作用于滋养层细胞,促进滋养层细胞的迁移行为,完成植入的过程^[94]。

6 展望

来自小鼠和人中的研究结果已经极大地促进了

人们对于胚胎植入的了解, 大量涉及子宫接受态建立和囊胚激活的信号分子逐步被发现, 但是该领域仍有许多的问题尚需克服。

基因敲除技术的发展使得人们研究单个基因的功能成为可能, 但是重要基因缺失后往往会造成胚胎致死或发育缺陷, 这极大地限制了其应用范围。随着条件性敲除小鼠技术的发展, 对于子宫各个部分都有敲除活性的 PGR-Cre 工具小鼠模型克服了这些缺陷^[95], 它的广泛应用极大地促进了该领域的发展。然而, 子宫是一个由上皮、基质和肌层组成的器官, 在胚胎植入过程中, 包括雌孕激素受体在内的多种信号分子同时表达于这些不同类型的细胞中, 显然 PGR-Cre 工具小鼠无法实现子宫区域特异性的遗传操作, 因此无法清楚地了解这些分子在特定细胞类型中的作用。为了明确研究特定分子在特定细胞类型中的功能, 我们需要有细胞类型特异性的工具小鼠模型。目前已经出现了子宫上皮细胞 (Wnt7a-Cre、Spr2f-Cre、Ltf-Cre)、基质细胞 (AMHR2-Cre) 和肌层细胞 (Smmhc-Cre、Sm22-cre) 各个部分特异敲除的工具小鼠模型^[75,96-98]。这些工具小鼠的运用已经验证和补充了经典的组织重构实验的结论。一个新的问题是, 这些已有的子宫细胞类型特异性敲除工具小鼠模型只能在空间上实现对基因的操作, 它们在子宫发育的关键时期也具有敲除活性, 一些发育过程中关键基因的失活往往会造成子宫发育的异常, 从而限制了我们对这些基因在成年子宫中的功能研究; 另外, 一些基因持续地表达于整个妊娠的多个阶段, 因此很难利用已有的工具小鼠模型准确地研究其在妊娠不同阶段的功能。为解决这一问题, 构建一些在时间上可以诱导、在空间上可以定点的条件性敲除工具小鼠模型显得尤为迫切。实现在特异细胞类型中特定时间点的敲除可以为研究细胞间的互作提供有力的工具。同时, 利用不同细胞谱系标记的手段, 我们还可以追踪子宫发育过程以及成年子宫周期性增殖修复过程中的细胞谱系来源等。已经有研究证实, 在产后子宫的修复过程中, 基质细胞可以向上皮细胞转分化, 对产后上皮细胞的修复有重要贡献^[96-97]。因此, 对子宫不同细胞谱系来源以及命运决定的研究可以为将来的细胞治疗提供重要参考。

胚胎植入涉及一系列信号分子的时空特异性表达开启和关闭, 这些信号分子组成一个复杂而精确的信号网络调节胚胎植入。前文已经提到, 雌孕激素主要通过它们各自的核受体 ER α 和 PRA 精确调控子宫中这些信号分子的表达。激素配体结合并激

活受体入核, 结合 DNA, 调控靶基因的转录活性。经典的模型中, 受体发挥作用需要 SRC、P300 等辅助因子的存在, 但近些年的研究发现越来越多的分子可以参与到 ER 和 PR 的转录调控中。例如, 最近的研究提示, 在乳腺癌的细胞中雌激素受体发挥作用需要 ER 与核内的其他转录因子形成一个巨大的复合体共同结合于靶基因的增强子调控区^[99]。而 Bert W. O'Malley 的实验室也通过蛋白免疫沉淀和 DNA Pull Down 等技术在癌症细胞中鉴定了大量可以与 ER 等核受体相互作用的蛋白质^[100-101]。他们还汇总了目前已知的雌孕激素受体辅助因子, 并将其收集在专门的数据库里, 感兴趣的读者可以参考相关网站 (Nuclear Receptor Signaling Atlas, <http://www.nursa.org>)。在胚胎植入过程中, 是否存在未知的雌孕激素受体辅助因子及其如何精确协调雌孕激素受体的转录调控功能还需要进一步的鉴定和验证。随着 microRNA 在调控基因表达中的作用逐渐被揭示, 近年来, 国内包括王应雄、杨增明等研究组分别检测了植入过程中的 microRNA 表达谱, 并初步揭示了 microRNA 在调控植入过程中的作用^[102-103]。近些年研究比较多的表观遗传修饰分子可以参与基因的转录调控, 而在由雌孕激素受体所主导的这个转录调控网络中, 是否也存在表观遗传修饰分子的参与, 目前还鲜有报道, 这也是该领域下一步需要重点关注的方向。此外, 胚源信号如何参与调控子宫中分子的时空特异性表达, 这需要进行更多的研究。总之, 对胚胎植入过程调控网络的全面认识也是我们深入了解胚胎着床怎样决定妊娠结局和后代健康的基础。

在以往的胚胎植入领域研究中, 对子宫本身和囊胚之前的早期胚胎发育关注比较多, 而对于胚胎在围植入期的发育分化调控和与子宫之间互作的认识还处于初级阶段。这也是由于植入后胚胎发育的在体性质决定的, 经典的研究手段只能在特定的时间点观测胚胎在子宫内的发育; 而人类的研究中还面临伦理限制的问题, 不可能在体研究胚胎围植入期的发育。近几年随着胚胎培养手段的发展, 国际上有研究组重新发展了 20 世纪 70~80 年代开发的小鼠囊胚体外培养到肢体发育阶段的方法^[104-106], 结合新的成像技术, 第一次在体外实现了对植入后胚胎发育的实时观测^[107]。利用该平台手段, 研究人员发现并确定了植入后胚胎发育的高度自组织性^[108]。最近的研究报道显示, 在人类的胚胎中也已经实现了囊胚的体外培养, 目前已经可以体外培养人类的

囊胚到第13天,并且观测到与体内类似的各类细胞谱系分化和胚胎结构建立,实现了在伦理限制内的最长时间培养观测^[109-110]。这些新型的体外培养手段的充分利用和改进有可能帮助我们建立一种更接近体内生理活动的体外胚胎植入模型,在实时观测研究胚胎发育分化的同时,也有利于解析围植入期胚胎与子宫在体生理对话的发生机制。

基础研究的最目的都是为人类服务,辅助生殖诊疗技术的发展就是人类对于生殖基础研究的一个重要临床应用。近年来,我国在生殖领域的临床应用方面也取得了重要的进展,例如戴建武研究组和南京鼓楼医院合作,开发了一套基于胶原的、适用于特定组织再生的功能生物材料。利用该材料,他们在大鼠和猪的严重子宫损伤模型中,成功引导了子宫内膜再生,显著提高胚胎植入的成功率^[111]。他们将这一技术应用于临床,并于2014年7月17日在南京鼓楼医院成功出生了第一例子宫内膜再生临床研究婴儿。将组织工程的手段与细胞治疗结合起来可能是下一步解决更多生育问题的重要方案。虽然辅助生殖技术已经有了很大的发展,但是将形态正常的胚胎移植到子宫中,妊娠的成功率也只有50%左右。辅助生殖成功率没有进一步上升的一个关键因素就是我们对子宫接受态的判定还很不足,不能选择最合适的时间窗口进行胚胎移植。尽管通过各种组学研究已经发现了一些子宫接受态相关的标记分子,但是比较稳定、可靠的标记分子还没有。因此还需要进一步通过基础研究揭示胚胎植入过程中的关键节点,并以此节点为依据探索稳定、可靠的接受态相关的分子标记,借此实现对子宫接受态的准确判断,这样才有可能进一步提高辅助生殖成功率。另外,移植胚胎的质量评价对于提高辅助生殖成功率以及生出健康后代也是至关重要的。高质量的移植胚胎得益于优化的培养体系、形态发生观测以及着床前基因型诊断(PGD)等技术的进步,例如最近发展的单细胞基因组测序技术实现了在诊断过程中对胚胎伤害的最小化^[112-113]。囊胚激活的研究对于进一步优化体外培养体系以及完善胚胎的质量评价体系也有重要意义。

致谢:感谢何波和孔双博博士对完成本文稿付出的重要贡献,感谢本实验室的全体成员对文稿的阅读和校审,感谢国家自然科学基金委员会、科技部、中国科学院以及社会各界在科研经费上的大力支持。由于篇幅等原因,对于本文中没能引用的科学

家及其研究成果表示歉意。

[参 考 文 献]

- [1] Wang H, Dey SK. Roadmap to embryo implantation: clues from mouse models. *Nat Rev Genet*, 2006, 7: 185-99
- [2] Zhang S, Kong S, Lu J, et al. Deciphering the molecular basis of uterine receptivity. *Mol Reprod Dev*, 2013, 80: 8-21
- [3] Norwitz ER, Schust DJ, Fisher SJ. Implantation and the survival of early pregnancy. *N Engl J Med*, 2001, 345: 1400-8
- [4] Cha J, Sun X, Dey SK. Mechanisms of implantation: strategies for successful pregnancy. *Nat Med*, 2012, 18: 1754-67
- [5] Tu Z, Ran H, Zhang S, et al. Molecular determinants of uterine receptivity. *Int J Dev Biol*, 2014, 58: 147-54
- [6] Dickman Z, Noyes RW. The fate of OVA transferred into the uterus of the rat. *J Reprod Fertil*, 1960, 1: 197-212
- [7] Song H, Lim H, Paria BC, et al. Cytosolic phospholipase A2alpha is crucial [correction of A2a deficiency is crucial] for 'on-time' embryo implantation that directs subsequent development. *Development*, 2002, 129: 2879-89
- [8] Lim HJ, Wang H. Uterine disorders and pregnancy complications: insights from mouse models. *J Clin Invest*, 2010, 120: 1004-15
- [9] Paria BC, Jones KL, Flanders KC, et al. Localization and binding of transforming growth factor- β isoforms in mouse preimplantation embryos and in delayed and activated blastocysts. *Dev Biol*, 1992, 151: 91-104
- [10] Paria BC, Huet-Hudson YM, Dey SK. Blastocyst's state of activity determines the "window" of implantation in the receptive mouse uterus. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1993, 90: 10159-62
- [11] Lubahn DB, Moyer JS, Golding TS, et al. Alteration of reproductive function but not prenatal sexual development after insertional disruption of the mouse estrogen receptor gene. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1993, 90: 11162-6
- [12] Lydon JP, DeMayo FJ, Funk CR, et al. Mice lacking progesterone receptor exhibit pleiotropic reproductive abnormalities. *Genes Dev*, 1995, 9: 2266-78
- [13] Mulac-Jericevic B, Mullinax RA, DeMayo FJ, et al. Subgroup of reproductive functions of progesterone mediated by progesterone receptor-B isoform. *Science*, 2000, 289: 1751-4
- [14] Tranguch S, Cheung-Flynn J, Daikoku T, et al. Cochaperone immunophilin FKBP52 is critical to uterine receptivity for embryo implantation. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, 102: 14326-31
- [15] Yang Z, Wolf IM, Chen H, et al. FK506-binding protein 52 is essential to uterine reproductive physiology controlled by the progesterone receptor A isoform. *Mol Endocrinol*, 2006, 20: 2682-94
- [16] Tranguch S, Wang H, Daikoku T, et al. FKBP52 deficiency-conferred uterine progesterone resistance is genetic background and pregnancy stage specific. *J Clin Invest*, 2007, 117: 1824-34

- [17] Mukherjee A, Soyak SM, Fernandez-Valdivia R, et al. Steroid receptor coactivator 2 is critical for progesterone-dependent uterine function and mammary morphogenesis in the mouse. *Mol Cell Biol*, 2006, 26: 6571-83
- [18] Mukherjee A, Amato P, Allred DC, et al. Steroid receptor coactivator 2 is required for female fertility and mammary morphogenesis: insights from the mouse, relevance to the human. *Nucl Recept Signal*, 2007, 5: e011
- [19] Zhang XL, Zhang D, Michel FJ, et al. Selective interactions of Kruppel-like factor 9/basic transcription element-binding protein with progesterone receptor isoforms A and B determine transcriptional activity of progesterone-responsive genes in endometrial epithelial cells. *J Biol Chem*, 2003, 278: 21474-82
- [20] Simmen RC, Eason RR, McQuown JR, et al. Subfertility, uterine hypoplasia, and partial progesterone resistance in mice lacking the Kruppel-like factor 9/basic transcription element-binding protein-1 (*Bteb1*) gene. *J Biol Chem*, 2004, 279: 29286-94
- [21] Yi P, Wang Z, Feng Q, et al. Structure of a biologically active estrogen receptor-coactivator complex on DNA. *Mol Cell*, 2015, 57: 1047-58
- [22] Kawagoe J, Li Q, Mussi P, et al. Nuclear receptor coactivator-6 attenuates uterine estrogen sensitivity to permit embryo implantation. *Dev Cell*, 2012, 23: 858-65
- [23] Chen Q, Zhang Y, Elad D, et al. Navigating the site for embryo implantation: biomechanical and molecular regulation of intrauterine embryo distribution. *Mol Aspects Med*, 2013, 34: 1024-42
- [24] Zhang Y, Chen Q, Zhang H, et al. Aquaporin-dependent excessive intrauterine fluid accumulation is a major contributor in hyper-estrogen induced aberrant embryo implantation. *Cell Res*, 2015, 25: 139-42
- [25] Lu S, Peng H, Zhang H, et al. Excessive intrauterine fluid cause aberrant implantation and pregnancy outcome in mice. *PLoS One*, 2013, 8: e78446
- [26] Zhang S, Kong S, Wang B, et al. Uterine Rbpj is required for embryonic-uterine orientation and decidual remodeling via Notch pathway-independent and -dependent mechanisms. *Cell Res*, 2014, 24: 925-42
- [27] Illera MJ, Cullinan E, Gui Y, et al. Blockade of the $\alpha(v)\beta(3)$ integrin adversely affects implantation in the mouse. *Biol Reprod*, 2000, 62: 1285-90
- [28] Basak S, Dhar R, Das C. Steroids modulate the expression of $\alpha4$ integrin in mouse blastocysts and uterus during implantation. *Biol Reprod*, 2002, 66: 1784-9
- [29] Lessey BA. The use of integrins for the assessment of uterine receptivity. *Fertil Steril*, 1994, 61: 812-4
- [30] Lessey BA, Castelbaum AJ, Sawin SW, et al. Integrins as markers of uterine receptivity in women with primary unexplained infertility. *Fertil Steril*, 1995, 63: 535-42
- [31] Xiong T, Zhao Y, Hu D, et al. Administration of calcitonin promotes blastocyst implantation in mice by up-regulating integrin $\beta3$ expression in endometrial epithelial cells. *Hum Reprod*, 2012, 27: 3540-51
- [32] Genbacev OD, Prakobphol A, Foulk RA, et al. Trophoblast L-selectin-mediated adhesion at the maternal-fetal interface. *Science*, 2003, 299: 405-8
- [33] Wang B, Sheng JZ, He RH, et al. High expression of L-selectin ligand in secretory endometrium is associated with better endometrial receptivity and facilitates embryo implantation in human being. *Am J Reprod Immunol*, 2008, 60: 127-34
- [34] Surveyor GA, Gendler SJ, Pemberton L, et al. Expression and steroid hormonal control of Muc-1 in the mouse uterus. *Endocrinology*, 1995, 136: 3639-47
- [35] Xu B, Sun X, Li L, et al. Pinopodes, leukemia inhibitory factor, integrin- $\beta3$, and mucin-1 expression in the peri-implantation endometrium of women with unexplained recurrent pregnancy loss. *Fertil Steril*, 2012, 98: 389-95
- [36] Shen F, Yan C, Liu M, et al. Decreased expression of mucin-1 in endometriosis endometrium correlated with progesterone receptor B involved in infertility. *Arch Gynecol Obstet*, 2015, 291: 439-45
- [37] Li L, Xu BF, Chen QJ, et al. Effects of hydrosalpinx on pinopodes, leukaemia inhibitory factor, integrin $\beta3$ and MUC1 expression in the peri-implantation endometrium. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, 2010, 151: 171-5
- [38] Song H, Lim H, Das SK, et al. Dysregulation of EGF family of growth factors and COX-2 in the uterus during the preattachment and attachment reactions of the blastocyst with the luminal epithelium correlates with implantation failure in LIF-deficient mice. *Mol Endocrinol*, 2000, 14: 1147-61
- [39] Stewart CL, Kaspar P, Brunet LJ, et al. Blastocyst implantation depends on maternal expression of leukaemia inhibitory factor. *Nature*, 1992, 359: 76-9
- [40] Chen JR, Cheng JG, Shatzer T, et al. Leukemia inhibitory factor can substitute for nidatory estrogen and is essential to inducing a receptive uterus for implantation but is not essential for subsequent embryogenesis. *Endocrinology*, 2000, 141: 4365-72
- [41] Sun X, Bartos A, Whitsett JA, et al. Uterine deletion of *Gpl30* or *Stat3* shows implantation failure with increased estrogenic responses. *Mol Endocrinol*, 2013, 27: 1492-501
- [42] Liang XH, Deng WB, Li M, et al. Egr1 protein acts downstream of estrogen-leukemia inhibitory factor (LIF)-STAT3 pathway and plays a role during implantation through targeting Wnt4. *J Biol Chem*, 2014, 289: 23534-45
- [43] Guo B, Tian XC, Li DD, et al. Expression, regulation and function of Egr1 during implantation and decidualization in mice. *Cell Cycle*, 2014, 13: 2626-40
- [44] Chu B, Zhong L, Dou S, et al. miRNA-181 regulates embryo implantation in mice through targeting leukemia inhibitory factor. *J Mol Cell Biol*, 2015, 7: 12-22
- [45] Laird SM, Tuckerman EM, Dalton CF, et al. The production of leukaemia inhibitory factor by human endometrium: presence in uterine flushings and production by cells in culture. *Hum Reprod*, 1997, 12: 569-74
- [46] Hambartsoumian E. Endometrial leukemia inhibitory factor (LIF) as a possible cause of unexplained infertility and multiple failures of implantation. *Am J Reprod Immunol*, 1998, 39: 137-43

- [47] Piccinni MP, Beloni L, Livi C, et al. Defective production of both leukemia inhibitory factor and type 2 T-helper cytokines by decidual T cells in unexplained recurrent abortions. *Nat Med*, 1998, 4: 1020-4
- [48] Xiao Y, Sun X, Yang X, et al. Leukemia inhibitory factor is dysregulated in the endometrium and uterine flushing fluid of patients with adenomyosis during implantation window. *Fertil Steril*, 2010, 94: 85-9
- [49] Ye X, Hama K, Contos JJ, et al. LPA3-mediated lysophosphatidic acid signalling in embryo implantation and spacing. *Nature*, 2005, 435: 104-8
- [50] Chen Q, Zhang Y, Peng H, et al. Transient β 2-adrenoceptor activation confers pregnancy loss by disrupting embryo spacing at implantation. *J Biol Chem*, 2011, 286: 4349-56
- [51] Zhao ZA, Zhang ZR, Xu X, et al. Arachidonic acid regulation of the cytosolic phospholipase A 2 α /cyclooxygenase-2 pathway in mouse endometrial stromal cells. *Fertil Steril*, 2012, 97: 1199-205. e1-9
- [52] Ruan YC, Guo JH, Liu X, et al. Activation of the epithelial Na⁺ channel triggers prostaglandin E(2) release and production required for embryo implantation. *Nat Med*, 2012, 18: 1112-7
- [53] Satokata I, Benson G, Maas R. Sexually dimorphic sterility phenotypes in Hoxa10-deficient mice. *Nature*, 1995, 374: 460-3
- [54] Lim H, Ma L, Ma WG, et al. Hoxa-10 regulates uterine stromal cell responsiveness to progesterone during implantation and decidualization in the mouse. *Mol Endocrinol*, 1999, 13: 1005-17
- [55] Bagot CN, Kliman HJ, Taylor HS. Maternal Hoxa10 is required for pinopod formation in the development of mouse uterine receptivity to embryo implantation. *Dev Dyn*, 2001, 222: 538-44
- [56] Xu B, Geerts D, Qian K, et al. Myeloid ecotropic viral integration site 1 (MEIS) 1 involvement in embryonic implantation. *Hum Reprod*, 2008, 23: 1394-406
- [57] Zhu LH, Sun LH, Hu YL, et al. PCAF impairs endometrial receptivity and embryo implantation by down-regulating β 3-integrin expression via HOXA10 acetylation. *J Clin Endocrinol Metab*, 2013, 98: 4417-28
- [58] Sun H, Chen L, Yan G, et al. HOXA10 suppresses p/CAF promoter activity via three consecutive TTAT units in human endometrial stromal cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 2009, 379: 16-21
- [59] Jiang Y, Yan G, Zhang H, et al. Activation of matrix metalloproteinase-26 by HOXA10 promotes embryo adhesion *in vitro*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2014, 445: 622-8
- [60] Hsieh-Li HM, Witte DP, Weinstein M, et al. Hoxa 11 structure, extensive antisense transcription, and function in male and female fertility. *Development*, 1995, 121: 1373-85
- [61] Gendron RL, Paradis H, Hsieh-Li HM, et al. Abnormal uterine stromal and glandular function associated with maternal reproductive defects in Hoxa-11 null mice. *Biol Reprod*, 1997, 56: 1097-105
- [62] Taylor HS, Vanden Heuvel GB, Igarashi P. A conserved Hox axis in the mouse and human female reproductive system: late establishment and persistent adult expression of the Hoxa cluster genes. *Biol Reprod*, 1997, 57: 1338-45
- [63] Xu B, Geerts D, Bu Z, et al. Regulation of endometrial receptivity by the highly expressed HOXA9, HOXA11 and HOXD10 HOX-class homeobox genes. *Hum Reprod*, 2014, 29: 781-90
- [64] Daikoku T, Song H, Guo Y, et al. Uterine Msx-1 and Wnt4 signaling becomes aberrant in mice with the loss of leukemia inhibitory factor or Hoxa-10: evidence for a novel cytokine-homeobox-Wnt signaling in implantation. *Mol Endocrinol*, 2004, 18: 1238-50
- [65] Tapia A, Vilos C, Marin JC, et al. Bioinformatic detection of E47, E2F1 and SREBP1 transcription factors as potential regulators of genes associated to acquisition of endometrial receptivity. *Reprod Biol Endocrinol*, 2011, 9: 14
- [66] Daikoku T, Cha J, Sun X, et al. Conditional deletion of Msx homeobox genes in the uterus inhibits blastocyst implantation by altering uterine receptivity. *Dev Cell*, 2011, 21: 1014-25
- [67] Bolnick AD, Bolnick JM, Kilburn BA, et al. Reduced homeobox protein MSX1 in human endometrial tissue is linked to infertility. *Hum Reprod*, 2016, 31: 2042-50
- [68] Sun X, Zhang L, Xie H, et al. Kruppel-like factor 5 (KLF5) is critical for conferring uterine receptivity to implantation. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2012, 109: 1145-50
- [69] Cooke PS, Buchanan DL, Young P, et al. Stromal estrogen receptors mediate mitogenic effects of estradiol on uterine epithelium. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, 94: 6535-40
- [70] Adesanya OO, Zhou J, Samathanam C, et al. Insulin-like growth factor 1 is required for G2 progression in the estradiol-induced mitotic cycle. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, 96: 3287-91
- [71] Sato T, Wang G, Hardy MP, et al. Role of systemic and local IGF-I in the effects of estrogen on growth and epithelial proliferation of mouse uterus. *Endocrinology*, 2002, 143: 2673-9
- [72] Chen B, Pan H, Zhu L, et al. Progesterone inhibits the estrogen-induced phosphoinositide 3-kinase \rightarrow AKT \rightarrow GSK-3 β \rightarrow cyclin D1 \rightarrow pRB pathway to block uterine epithelial cell proliferation. *Mol Endocrinol*, 2005, 19: 1978-90
- [73] Kurita T, Medina R, Schabel AB, et al. The activation function-1 domain of estrogen receptor α in uterine stromal cells is required for mouse but not human uterine epithelial response to estrogen. *Differentiation*, 2005, 73: 313-22
- [74] Zhu L, Pollard JW. Estradiol-17 β regulates mouse uterine epithelial cell proliferation through insulin-like growth factor 1 signaling. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, 104: 15847-51
- [75] Winuthayanon W, Hewitt SC, Orvis GD, et al. Uterine epithelial estrogen receptor α is dispensable for proliferation but essential for complete biological and biochemical responses. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2010, 107: 19272-7

- [76] Buchanan DL, Setiawan T, Lubahn DB, et al. Tissue compartment-specific estrogen receptor- α participation in the mouse uterine epithelial secretory response. *Endocrinology*, 1999, 140: 484-91
- [77] Kurita T, Young P, Brody JR, et al. Stromal progesterone receptors mediate the inhibitory effects of progesterone on estrogen-induced uterine epithelial cell deoxyribonucleic acid synthesis. *Endocrinology*, 1998, 139: 4708-13
- [78] Li Q, Kannan A, DeMayo FJ, et al. The antiproliferative action of progesterone in uterine epithelium is mediated by Hand2. *Science*, 2011, 331: 912-6
- [79] Franco HL, Rubel CA, Large MJ, et al. Epithelial progesterone receptor exhibits pleiotropic roles in uterine development and function. *FASEB J*, 2012, 26: 1218-27
- [80] Chen W, Han BC, Wang RC, et al. Role of secretory protease inhibitor SPINK3 in mouse uterus during early pregnancy. *Cell Tissue Res*, 2010, 341: 441-51
- [81] Paria BC, Lim H, Wang XN, et al. Coordination of differential effects of primary estrogen and catecholestrogen on two distinct targets mediates embryo implantation in the mouse. *Endocrinology*, 1998, 139: 5235-46
- [82] Yu LL, Zhang JH, He YP, et al. Fast action of estrogen on intracellular calcium in dormant mouse blastocyst and its possible mechanism. *Fertil Steril*, 2009, 91: 611-5
- [83] Wang H, Matsumoto H, Guo Y, et al. Differential G protein-coupled cannabinoid receptor signaling by anandamide directs blastocyst activation for implantation. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100: 14914-9
- [84] Das SK, Wang XN, Paria BC, et al. Heparin-binding EGF-like growth factor gene is induced in the mouse uterus temporally by the blastocyst solely at the site of its apposition: a possible ligand for interaction with blastocyst EGF-receptor in implantation. *Development*, 1994, 120: 1071-83
- [85] Raab G, Kover K, Paria BC, et al. Mouse preimplantation blastocysts adhere to cells expressing the transmembrane form of heparin-binding EGF-like growth factor. *Development*, 1996, 122: 637-45
- [86] Paria BC, Elenius K, Klagsbrun M, et al. Heparin-binding EGF-like growth factor interacts with mouse blastocysts independently of ErbB1: a possible role for heparan sulfate proteoglycans and ErbB4 in blastocyst implantation. *Development*, 1999, 126: 1997-2005
- [87] Paria BC, Ma W, Tan J, et al. Cellular and molecular responses of the uterus to embryo implantation can be elicited by locally applied growth factors. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, 98: 1047-52
- [88] Hamatani T, Daikoku T, Wang H, et al. Global gene expression analysis identifies molecular pathways distinguishing blastocyst dormancy and activation. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, 101: 10326-31
- [89] Xie H, Tranguch S, Jia X, et al. Inactivation of nuclear Wnt- β -catenin signaling limits blastocyst competency for implantation. *Development*, 2008, 135: 717-27
- [90] Fu Z, Wang B, Wang S, et al. Integral proteomic analysis of blastocysts reveals key molecular machinery governing embryonic diapause and reactivation for implantation in mice. *Biol Reprod*, 2014, 90: 52
- [91] Li Y, Sun X, Dey SK. Entosis allows timely elimination of the luminal epithelial barrier for embryo implantation. *Cell Rep*, 2015, 11: 358-65
- [92] Tu Z, Wang Q, Cui T, et al. Uterine RAC1 via Pak1-ERM signaling directs normal luminal epithelial integrity conducive to on-time embryo implantation in mice. *Cell Death Differ*, 2016, 23: 169-81
- [93] Vilella F, Moreno-Moya JM, Balaguer N, et al. Hsa-miR-30d, secreted by the human endometrium, is taken up by the pre-implantation embryo and might modify its transcriptome. *Development*, 2015, 142: 3210-21
- [94] Desrochers LM, Bordeleau F, Reinhart-King CA, et al. Microvesicles provide a mechanism for intercellular communication by embryonic stem cells during embryo implantation. *Nat Commun*, 2016, 7: 11958
- [95] Soyal SM, Mukherjee A, Lee KY, et al. Cre-mediated recombination in cell lineages that express the progesterone receptor. *Genesis*, 2005, 41: 58-66
- [96] Huang CC, Orvis GD, Wang Y, et al. Stromal-to-epithelial transition during postpartum endometrial regeneration. *PLoS One*, 2012, 7: e44285
- [97] Patterson AL, Zhang L, Arango NA, et al. Mesenchymal-to-epithelial transition contributes to endometrial regeneration following natural and artificial decidualization. *Stem Cells Dev*, 2013, 22: 964-74
- [98] Kovacic B, Hoelbl-Kovacic A, Fischhuber KM, et al. Lactotransferrin-Cre reporter mice trace neutrophils, monocytes/macrophages and distinct subtypes of dendritic cells. *Haematologica*, 2014, 99: 1006-15
- [99] Liu Z, Merkurjev D, Yang F, et al. Enhancer activation requires trans-recruitment of a mega transcription factor complex. *Cell*, 2014, 159: 358-73
- [100] Malovannaya A, Lanz RB, Jung SY, et al. Analysis of the human endogenous coregulator complexome. *Cell*, 2011, 145: 787-99
- [101] Foulds CE, Feng Q, Ding C, et al. Proteomic analysis of coregulators bound to ER α on DNA and nucleosomes reveals coregulator dynamics. *Mol Cell*, 2013, 51: 185-99
- [102] Hu SJ, Ren G, Liu JL, et al. MicroRNA expression and regulation in mouse uterus during embryo implantation. *J Biol Chem*, 2008, 283: 23473-84
- [103] Chen K, Chen X, He J, et al. Mouse endometrium temporal and spatial expression mRNA and microRNA associated with embryo implantation. *Reprod Sci*, 2015, 22: 1399-408
- [104] Hsu YC. Differentiation *in vitro* of mouse embryos beyond the implantation stage. *Nature*, 1972, 239: 200-2
- [105] Hsu YC. Differentiation *in vitro* of mouse embryos to the stage of early somite. *Dev Biol*, 1973, 33: 403-11
- [106] Hsu YC. *In vitro* development of individually cultured whole mouse embryos from blastocyst to early somite stage. *Dev Biol*, 1979, 68: 453-61
- [107] Morris SA, Grewal S, Barrios F, et al. Dynamics of anterior-posterior axis formation in the developing mouse embryo. *Nat Commun*, 2012, 3: 673

- [108] Bedzhov I, Zernicka-Goetz M. Self-organizing properties of mouse pluripotent cells initiate morphogenesis upon implantation. *Cell*, 2014, 156: 1032-44
- [109] Deglincerti A, Croft GF, Pietila LN, et al. Self-organization of the *in vitro* attached human embryo. *Nature*, 2016, 533: 251-4
- [110] Shahbazi MN, Jedrusik A, Vuoristo S, et al. Self-organization of the human embryo in the absence of maternal tissues. *Nat Cell Biol*, 2016, 18: 700-8
- [111] Ding L, Li X, Sun H, et al. Transplantation of bone marrow mesenchymal stem cells on collagen scaffolds for the functional regeneration of injured rat uterus. *Biomaterials*, 2014, 35: 4888-900
- [112] Hou Y, Fan W, Yan L, et al. Genome analyses of single human oocytes. *Cell*, 2013, 155: 1492-506
- [113] Huang J, Yan L, Fan W, et al. Validation of multiple annealing and looping-based amplification cycle sequencing for 24-chromosome aneuploidy screening of cleavage-stage embryos. *Fertil Steril*, 2014, 102: 1685-91