

哺乳动物的延迟着床及其分子调控

栾黎明 于浩 杨增明*

(东北农业大学生命科学学院, 哈尔滨 150030)

摘要 延迟着床是指胚胎在发育到胚泡阶段时暂时进入休眠状态,并不立即着床。在这个时期,胚泡或者停止细胞分化与增长,以使其大小及内部细胞数量保持稳定,或者经历一个少量细胞发生分化的缓慢增长阶段。共有7个目中的近100种哺乳动物有延迟着床现象。延迟着床受光周期、哺乳刺激和营养等各方面因素的影响,同时还受激素和多种生长因子等调节。虽然各种动物中延迟着床的机制各不相同,但延迟着床均可有效地延长妊娠期,使该物种在一年中最适宜的时期进行交配和产仔。利用在小鼠或大鼠中建立的延迟着床模型,可模拟正常的胚胎着床过程,有利于研究胚胎着床过程中的分子调控机制。

关键词 延迟着床; 胚泡; 胚胎着床; 催乳素

胚胎着床是哺乳动物生殖过程中一个十分重要的过程,大量的胚胎损失发生在胚胎着床期前后。胚胎着床是处于活化状态的胚泡与处于接受态的子宫相互作用,然后胚胎滋养层与子宫内膜建立紧密联系的过程。通常,当胚胎发育到胚泡期时便开始胚胎着床过程。但有些动物在一段时间内,胚泡在子宫中游离,并不立即着床,子宫也处于非接受态,此时即为延迟着床状态^[1]。延迟着床又称胚胎滞育,可分为两种形式:兼性滞育和专性滞育。兼性滞育常发生在有袋动物、小鼠和大鼠的哺乳期,在这些动物哺育幼仔时,新的胚胎处于滞育状态,内部卵裂球不发生分裂。专性滞育常发生在鼬科动物、熊、海豹、一些蝙蝠以及欧洲狗等动物,处于专性滞育的胚胎,其内部卵裂球仅有少量的有丝分裂。

延迟着床分为3个阶段:(1)进入延迟着床;(2)延迟着床的维持;(3)重新激活。目前大部分研究集中于后两个阶段,因此对胚胎停止发育的分子机制和代谢机制所知甚少,只是对其维持和激活的调控有一些了解。自然界中的许多哺乳动物,为了更好地繁衍生息而进化产生的胚胎延迟着床现象,为人们提供了一个很好的研究胚胎着床的模型,这将帮助人们进一步深入研究胚胎着床的分子调控机制。

延迟着床的启动往往依赖于光周期、哺乳刺激以及营养的利用率等因素。光周期通过对褪黑素的调节影响催乳素的分泌,而褪黑素和催乳素对延迟着床的启动都有促进作用^[2]。

多数季节性饲养动物都定时分泌催乳素,在春夏浓度最高,秋冬最低。袋鼠类在发情前期结束时分娩,然后进行排卵和受精。在第二次分娩后的第6~8天,即当胚胎发育到约100个细胞时,雌性袋鼠由于受幼仔吮吸乳汁的刺激,而使胚胎进入延迟着床状态^[3]。在分娩后的哺乳期,小鼠和大鼠的胚胎也发生延迟着床,这是因为哺乳期的小鼠和大鼠缺乏下丘脑激素释放因子,使垂体分泌FSH的过程受到抑制,从而降低了雌激素的水平,缺乏雌激素刺激的胚胎发育停滞,进入延迟着床状态^[4]。尤氏大袋鼠初次妊娠时,胚胎进入延迟着床的过程由光周期调节,以后妊娠时则由哺乳刺激来抑制胚胎的发育。尤氏大袋鼠的胚胎和黄体在延迟着床阶段均不生长,因此,即使没有卵巢激素,其胚胎在体内也可存活11个月^[5]。貂等鼬科动物与有袋目动物进入延迟着床的机制不完全相同,貂在排卵后黄体就退化,孕酮分泌量极低,随即便进入延迟着床^[6]。

1.2 延迟着床的维持

1 自然界中存在的延迟着床现象

1.1 延迟着床的启动

收稿日期: 2004-10-08 接受日期: 2004-11-25

国家杰出青年科学基金资助项目(No.39825120)

*通讯作者。Tel: 0451-55191416, E-mail: zmyang@mail.neau.edu.cn

延迟着床维持的时间因物种而异, 如獾和小袋鼠为 10~11 个月, 而大鼠和小鼠为 4~10 天。在海豹中种间差异很大, 长的为 5 个月, 短的为 1 个月。澳大利亚海狮的生殖周期为 18 个月, 其中 3~5 个月是处于延迟着床状态。西部斑点臭鼬的延迟着床是由于其子宫内部机能尚不健全所致, 持续大约 200 天^[7]。小鼠胚胎在早期发育过程中, 受到子宫内环境一定程度的抑制作用, 而在有袋类动物中没有这方面的证据。Spindler 等^[8]在体外培养小鼠第 4 天囊胚时, 添加处于延迟状态的袋鼠子宫分泌物时, 发现小鼠囊胚的糖类代谢情况明显增加, 证明袋鼠子宫分泌物可能并不是使胚胎发生延迟着床的原因, 而只是提供一个环境使延迟着床的胚胎能够继续存活。

1.3 延迟着床的结束: 胚胎的激活

小鼠胚胎激活后, 滋养层的扩展总是伴随着子宫代谢活性的增加^[9]。由于在缺少特定的氨基酸、血清因子、葡萄糖和一些离子时, 滋养层不会发生扩展, 显然, 子宫是通过调节其分泌物来控制活化胚胎的发育。此外, 当阻止滋养层扩展时, 小鼠活化胚胎的新陈代谢并不减少^[9], 这表明滋养层的扩展和胚胎的新陈代谢是由不同的通路分别控制的。

在延迟着床的激活过程中, 胚泡内部的代谢反应也随着发生一系列的变化。臭鼬胚泡在开始激活的同时, 糖原和脂类迅速减少, 滋养外胚层和内细胞团中 RNA 与蛋白质合成显著增加^[10]。这说明胚泡正以糖原和脂类作为能量来源, 重新恢复其内部的新陈代谢。在小鼠中, 胚泡在接收激活信号的 12 h 内, 有丝分裂及细胞数量明显增加, 此时丙酮酸是胚泡主要的能量来源; 16 h 以后, 葡萄糖取代丙酮酸成为其主要能量来源^[11]。去除尤氏大袋鼠的哺乳刺激后第 4 天, 其子宫分泌性开始增强, 第 5 天时胚泡的新陈代谢开始增加, 而且其乳汁中糖类的含量明显降低^[12]。所以, 激活反应的第 5 天是尤氏大袋鼠胚泡新陈代谢的转折点。

小鼠的人工延迟着床模型中, 囊胚在受到雌激素刺激的 1 h 后开始表达两种一氧化氮合成酶: eNOS 和 iNOS, 从而触发囊胚重新激活的级联反应^[13], 这间接地说明了一氧化氮对胚胎的发育具有重要作用。熊、海豹及有袋类动物(如雪貂、水貂、貂、斑点臭鼬等)也可以通过切除卵巢并注射孕酮来人工诱导延迟着床, 但与小鼠或大鼠不同, 注射雌激素无法激活胚胎并诱导着床。经多年的探索, Schulz 等^[14]首次用黄体蛋白中葡萄糖-6-磷酸异构酶(GPI)激活

处于延迟着床的雪貂胚胎, 并发现, GPI 是一种 60 kDa、等电点为 8.5 的蛋白质, 在围着床期的黄体中大量表达, 子宫内连续注射 GPI 抗体, 可使雪貂的着床位点显著减少, 说明 GPI 以内分泌形式, 由黄体经血液循环到达子宫, 对雪貂的着床进行调节。

2 延迟着床调控因子的研究进展

2.1 相关激素对延迟着床过程的调控

催乳素对不同动物的作用各不相同。南极软毛海豹胚胎的激活反应与是否断奶并不相关, 其催乳素可以同时促进泌乳和激活胚泡^[15]。外源性催乳素对貂的胚泡着床有促进作用, 但不能直接诱导其着床。并且, 催乳素的抑制剂溴麦角环肽可抑制貂中催乳素受体 mRNA 的增加^[7], 表明催乳素对其自身受体有上调作用。在有袋目动物中, 注射溴麦角环肽会迅速激活胚泡, 这说明催乳素对胚泡的生长有抑制作用。此外, 有袋目动物黄体上有催乳素受体, 所以催乳素可能还抑制黄体的分泌^[3]。催乳素的释放受哺乳刺激调控。将乳腺的神经去除 72 h 后, 由于缺乏催乳素抑制, 黄体将重新具有分泌活性, 从而诱导胚胎激活并终止延迟着床。即使此时再重新开始哺乳, 也无法阻止胚胎的激活反应^[16], 说明催乳素对延迟着床过程中的泌乳和胚胎激活都起重要作用。

类固醇激素对控制子宫分泌物和胚胎的生长有重要作用。许多动物的激活反应都伴随着卵巢激素的变化。卵巢雌激素与其受体相互作用, 可使子宫进入接受态, 而由雌二醇合成的 4-羟基-17 β -雌二醇, 则作为一种旁分泌激素介导胚泡的激活反应^[17]。只有当这两种激素同时起作用时, 才能启动胚泡着床。

澳洲海狮的孕酮水平在延迟着床期间较低, 在胚泡激活前开始增加。雌激素在胚泡激活前也有一明显波动, 但肌肉注射孕酮、雌激素或雌激素与孕酮共同处理均不能诱导激活反应^[18]。抱子宫中雌激素与催乳素浓度在延迟着床期间很低, 激活后可迅速增加, 而孕酮浓度在延迟着床、激活和着床期间则基本保持恒定^[19]。西部斑点臭鼬的血浆 LH、催乳素和孕酮浓度在延迟着床期间均相对较低, 但在着床前逐渐增加^[10]。以上结果显示, 延迟着床的激活受类固醇激素的调节, 但不同物种的调节机制各不相同。

2.2 相关分子对延迟着床过程的调控

子宫分泌物中一些对胚胎生长起重要作用的生

长因子(如 IGF、EGF、PDGF、FGF、TGF- β 等)在激活反应中有明显变化。例如, 尤氏大鼠胚泡可通过 IGF 的介导, 使细胞内葡萄糖浓度增加, 从而促进其内部新陈代谢^[20]; 小鼠胚泡激活时, 雌激素在着床位点可诱导产生 HB-EGF 样生长因子^[21]; 臭鼬胚泡激活前, EGF 与 EGF 受体均显著增加^[22]。此外, 还有一些相关分子(如白血病抑制因子, LIF)在此过程中起重要作用。貂子宫中, LIF 在延迟着床期间浓度较低, 在激活反应的前两天有短暂的升高^[23]。与此相似, 臭鼬子宫中 LIF mRNA 的表达水平在延迟着床期间较低, 当胚泡恢复发育时显著升高, 并维持高水平直到着床^[24]。臭鼬子宫中可检测到两种 LIF 受体 mRNA, 它们的浓度随着胚泡的恢复发育而逐渐增加, 但在胚泡激活后期, 又微有下降^[25]。我们也发现, LIF 受体在小鼠延迟着床期间没有表达^[26]。当胚泡激活后, LIF 受体在子宫内膜和腺体中的表达方式与第 5 天正常胚胎着床时十分相似^[26], 说明 LIF 受体的表达依赖于活化胚胎的存在。以上结果表明, 许多生长因子及相关分子在延迟着床期间不存在, 但在雌激素激活胚泡的同时迅速产生, 可见, 胚泡的成功激活需要一个复杂的、雌激素依赖的细胞信号转导网络。

3 人工延迟着床模型的建立及其应用

Yoshinaga 等^[27]发现, 小鼠妊娠第 4 天时, 将其卵巢切除, 能使子宫处于类似接受态前期的状态, 同时可使囊胚停止发育, 处于延迟着床状态。孕酮可使这种状态维持几天, 雌激素则可使囊胚激活而终止延迟着床。除此之外, 切除垂体或干扰垂体的正常功能也可以人工诱导延迟着床。近来还发现, 在大鼠妊娠第 1~7 天, 以每天 300 mg/kg 连续注射芳香酶抑制剂 Fad(fadrozole hydrochloride)后, 着床前胚胎的发育、透明带的脱落以及子宫对蜕膜化刺激的反应性均被延迟, 结果使大鼠的着床被延迟 1~2 天, 而胚胎活性不受影响^[26], 这说明芳香酶抑制剂可产生多种抗着床效应。小鼠经促性腺激素超排后, 胚泡的形成和孵出, 以及着床过程均被延迟^[28], 这说明很可能在超排过程中, 卵巢受到刺激从而引发胚胎发育的阻滞。Sibug 等^[29]也发现, 超排处理可引起小鼠的延迟着床, 同时 VEGF 的表达也明显降低。但目前尚无法证实是 VEGF 的下调导致了延迟着床, 还是延迟着床引起了 VEGF 的下调。若上述结果可以推广到人类, 则可以解释体外受精的胚

胎发育迟缓以及胎儿体重较轻等问题。

20 世纪末, 人工延迟着床模型开始应用于胚胎着床相关分子的研究中, 并且取得了一系列有意义的成果。近年来很多生殖生物学中重要的发现都是利用延迟着床模型, 并结合一些先进的分子生物学手段来完成的。研究发现, 在小鼠正常妊娠过程中, 串珠素 mRNA 在着床前胚胎中表达较低, 妊娠第 4.5 天, 也就是当胚胎具有黏附能力时, 其表达达到峰值。而在小鼠延迟着床模型中, 串珠素 mRNA 在活化前的胚胎中表达较低, 雌激素激活胚胎 12 h 后, 表达显著升高^[30]。这样就从不同角度证明了, 串珠素在胚胎中的表达是随其黏附能力的获得而增加的。应用小鼠的人工延迟着床模型, Martin 等^[31]研究发现, 着床前 18 h, 子宫内 Na⁺ 及胰凝乳蛋白酶的变化可激活胚胎内氨基酸运输系统, 从而协调胚胎着床过程, 证明该系统不仅能促进胚胎内部的蛋白质合成与滋养层的分化, 而且还可以作为着床的发育检验点, 触发胚胎滋养层向子宫内膜的侵入。体外受精(*in vitro* fertilization, IVF)和胚胎移植(embryo transfer, ET)技术的日益成熟, 已经在很大程度上解决了人类不育的问题, 但在移植时尽管选用的都是健康胚胎, IVF 获得的胚胎的着床率仍然相当低。这说明在着床窗口期间, 子宫受到卵巢雌激素和孕酮刺激后, 由非接收态分化为接收态的过程中出现了异常, 而人们对该过程的分子机制所知甚少。正常情况下, 着床窗口持续的时间很短, Ma 等^[32]巧妙地应用小鼠的延迟着床模型, 证明通过控制雌激素的浓度可以决定着床窗口开启的时间长短, 从而为提高 IVF/ET 技术的成功率开拓了新的思路。Li 等^[33]更是利用延迟着床模型并结合基因剔除、基因芯片等先进技术, 在小鼠中首次发现了一条涉及孕酮受体、脂氧合酶(LOX)和 PPAR 的新通路。应用小鼠的延迟着床模型, Hamatani 等^[34]全面地对比检测了延迟和激活的胚胎中 20 000 个基因的表达情况, 发现其中 229 个基因表达有差异。这些基因主要属于细胞周期、细胞信号转导和能量代谢等通路。说明胚胎在延迟和激活两种状态下的基因表达是有差异的, 并进一步确定某些特定通路(尤其是 HB-EGF 信号通路)在胚胎激活过程中起的重要作用。利用大鼠的延迟着床模型研究发现, 至少注射 400 mg/kg 甲氧氯、50 mg/kg 双酚丙烷或 30 mg/kg β -谷固醇, 可以激活处于延迟状态的大鼠胚泡^[35], 所以, 利用人工延迟着床模型, 还可以鉴定和量化

一些化学物质的雌激素活性。

雌激素对啮齿类动物的胚胎着床作用重大, 因为它可以引发一系列基因在子宫内膜中表达, 从而对着床过程进行精细的调控。为了研究那些受雌激素诱导的基因的时空特异性表达和相互作用的情况, Chen 等^[36]利用大鼠延迟着床模型, 并结合基因差异表达筛选技术, 发现了一系列在雌激素处理后表达开放和关闭的基因。其中分泌型白细胞蛋白酶抑制剂(SLPI)仅在早期妊娠的第 4、5 天高表达, 而这正是大鼠着床窗口开放的时期, 用大鼠延迟着床模型检验所得到的结果, 进一步确认了其表达严格受到雌激素的调控。

另外, 对比研究正常和延迟的小鼠着床发现, 在 LIF^{-/-} 小鼠的胚胎着床过程中, 尽管 EGF 受体家族都正常表达, 但 EGF 家族中的一些特定生长因子, 如两性调节因子、肝素结合样表皮生长因子和上皮调节因子均不表达, 环氧合酶-2(COX-2)则在囊胚周围的子宫组织中表达异常^[37], 说明这些因子与 LIF^{-/-} 小鼠的着床失败相关, 同时说明 LIF 对囊胚的激活有一定作用。其他分子如 stathmin^[38]、脂肪酸氨基水解酶(fatty acid amide hydrolase, FAAH)^[39]、整合素 $\alpha 4$ 亚单位^[40], 以及我们实验室最近发现的前列腺素 E 合成酶^[41]、前列腺素 I 受体 PPAR δ ^[39]、LIF 受体和 LIF 信号转导元件 gp130^[26]、Basigin^[43] 等分子在小鼠或大鼠延迟着床期间均没有表达, 但当注射雌激素诱导胚胎着床时, 在胚胎着床位点和子宫蜕膜区可检测到它们的特异性表达, 从而证明这些分子及其所在的信号转导系统可能参与胚胎着床和蜕膜化过程, 并发挥一定作用。

4 小结与展望

延迟着床是一个奇特的自然选择的过程, 对天然延迟着床调控机制的深入研究, 可以有助于人们从另一侧面了解胚胎着床过程的分子机制; 同时, 人工延迟着床模型的广泛应用, 也提供了一种新的研究着床窗口分子网络开启与关闭的有效手段, 对治疗不孕症、开发胚胎着床特异性的避孕药及提高动物的繁殖率等都有重要的现实意义。

虽然人们现在对着床的分子机制了解不多, 并且目前还未找到可以解除自然延迟着床的有效方法, 但随着基因剔除、基因芯片、蛋白质芯片、激光显微切割及 RNA 干涉等技术的迅速发展, 以及人类基因组结构与功能、信号传递途径等研究的逐

步深入, 使得筛选与胚胎着床相关的基因以及研究胚胎着床的调控机制成为可能。近来, Reese 等^[44]利用基因芯片技术比较了 12 588 个基因在小鼠子宫胚胎着床位点与非着床位点表达的差异, 发现在胚胎着床位点处有 178 个基因上调, 201 个基因表达下调。Lee 等^[45]用小鼠延迟着床模型, 结合差异显示反转录 PCR 技术, 鉴定了子宫中受雌激素调节的 36 种基因, 发现着床过程中有 5 种基因在 mRNA 水平有变化, 其中 4 种是以前未报道过的新基因。所以, 利用延迟着床模型, 并结合各种新兴技术, 还可以鉴定胚胎着床过程中特异性表达的基因, 从而有助于勾画出子宫接受性和胚胎激活之间相互影响、相互联系的分子网络, 使人们进一步深入了解哺乳动物胚胎着床的调控机制。

参考文献 (References)

- [1] 范衡宇等. *生物化学与生物物理进展*, 2001, **28**: 11
- [2] Rozell MD et al. *J Exp Zool*, 1993, **267**: 524
- [3] Gidley-Baird AA. *J Reprod Fertil Suppl*, 1981, **29**: 97
- [4] Renfree MB et al. *J Reprod Fertil*, 2000, **119**: 121
- [5] Cummings AM et al. *Reprod Toxicol*, 2000, **14**: 111
- [6] Mead RA. *J Reprod Fertil Suppl*, 1981, **29**: 11
- [7] Gales NJ et al. *J Reprod Fertil*, 1997, **111**: 159
- [8] Spindler RE et al. *J Exp Zool*, 1999, **283**: 590
- [9] Dey SK et al. *Endocr Rev*, 2004, **25**: 341
- [10] Gordon K et al. *J Reprod Fertil*, 1987, **79**: 397
- [11] Song JH et al. *Mol Reprod Dev*, 1998, **51**: 13
- [12] Hirzel DJ et al. *Biol Reprod*, 1999, **60**: 484
- [13] Gouge RC et al. *Biol Reprod*, 1998, **58**: 875
- [14] Schulz LC et al. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, **100**: 8561
- [15] Spindler RE et al. *J Exp Zool*, 1996, **276**: 132
- [16] Spindler RE et al. *J Reprod Fertil*, 1999, **115**: 79
- [17] Lambert RT et al. *Reproduction*, 2001, **121**: 863
- [18] Mead RA et al. *Biol Reprod*, 1995, **53**: 827
- [19] Boyd IL. *J Reprod Fertil*, 1991, **91**: 637
- [20] Paria BC et al. *Biol Reprod*, 1994, **51**: 205
- [21] Song H et al. *Mol Endocrinol*, 2000, **14**: 1147
- [22] Ni H et al. *Biol Reprod*, 2002, **67**: 351
- [23] Passavant C et al. *Biol Reprod*, 2000, **63**: 301
- [24] Ni H et al. *Mol Reprod Dev*, 2002, **63**: 143
- [25] Spindler RE et al. *Biol Reprod*, 1998, **58**: 1425
- [26] Tamada H et al. *Contraception*, 2003, **68**: 65
- [27] Yoshinaga K et al. *J Reprod Fertil*, 1966, **12**: 593
- [28] Van der Auwera I et al. *Hum Reprod*, 2001, **16**: 1237
- [29] Sibug RM et al. *Hum Reprod*, 2002, **17**: 1643
- [30] Smith SE et al. *Dev Biol*, 1997, **184**: 38
- [31] Martin PM et al. *Biol Reprod*, 2003, **69**: 1101
- [32] Ma WG et al. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, **100**: 2963
- [33] Li Q et al. *J Biol Chem*, 2004, **279**: 11570
- [34] Hamatani T et al. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, **101**: 10326
- [35] Paria BC et al. *Endocrinology*, 1998, **139**: 5235

- [36] Chen D *et al. Biol Reprod*, 2004, **71**: 508
[37] Xiao LJ *et al. Reproduction*, 2002, **124**: 219
[38] Tamura K *et al. Endocrinology*, 2003, **144**: 1464
[39] Xiao AZ *et al. Mol Hum Reprod*, 2002, **8**: 651
[40] Basak S *et al. Biol Reprod*, 2002, **66**: 1784
[41] Li Q *et al. J Biol Chem*, 2004, **279**: 11570
[42] Ding NZ *et al. Reproduction*, 2003, **125**: 817
[43] Ni H *et al. Biol Reprod*, 2003, **68**: 744
[44] Reese J *et al. J Biol Chem*, 2001, **276**: 44137
[45] Lee S *et al. Mol Reprod Dev*, 2003, **64**: 405

Molecular Regulation of Delayed Implantation in Mammals

Li-Ming Luan, Hao Yu, Zeng-Ming Yang*

(College of Life Sciences, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China)

Abstract Delayed implantation occurs when the conceptus enters a state of suspended animation at the blastocyst stage of development. Blastocysts may either cease cell division so that their size and cell numbers remain constant, or undergo a period of very slow growth with minimal cell division. There are almost 100 mammalian species in seven different mammalian orders undergoing delayed implantation. Many factors are involved in regulating delayed implantation, including lactational stimulus, hormonal regulation, photoperiod and nutrition. Delayed implantation can effectively lengthen the gestation period, which allows mating to occur and young animals to be born at the optimal time.

Key words delayed implantation; blastocyst; implantation; prolactin

Received: October 8, 2004 Accepted: November 25, 2004

This work was supported by the National Science Fund for Distinguished Young Scholars (No.39825120)

*Corresponding author. Tel: 86-451-55191416, E-mail: zmyang@mail.neau.edu.cn