

# 高通量基因表达分析方法在胚胎着床研究中的应用

苏仁伟<sup>1</sup> 杨增明<sup>1,2\*</sup>

(<sup>1</sup>东北农业大学生命科学学院, 哈尔滨 150030; <sup>2</sup>厦门大学生命科学学院, 厦门 361005)

**摘要** 哺乳动物胚胎着床是一个复杂而严密的过程, 涉及到众多相关基因的表达与调控。传统的实验技术很难一次性对这些基因的表达状况做系统的分析。近年来, 高通量基因表达分析方法在哺乳动物胚胎着床过程研究中得到了广泛的应用, 在 mRNA 水平、microRNA 水平和蛋白质水平都有大量的着床相关的因子被筛选出来。本文旨在对应用高通量方法的研究加以总结概括, 为进一步研究哺乳动物胚胎着床的分子机理奠定基础。

**关键词** 哺乳动物; 胚胎; 子宫内膜; 着床; 高通量分析方法

哺乳动物胚胎着床是一个严密而有序的过程, 是胚胎滋养层细胞与子宫内膜进行一系列细胞与分子水平上的相互作用, 进而相互识别、黏附, 并最终建立紧密联系的过程, 是哺乳动物生殖过程中最关键的步骤之一。胚胎的成功着床需要三个必要的条件: 发育到囊胚期并从透明带中孵出, 具有黏附能力的活性胚胎; 具有接受能力的子宫内膜; 胚胎与子宫建立成功的分子对话。

胚胎着床是一个极其复杂的生理过程, 涉及到众多基因的表达、调控及相互作用。以往的研究多限于一个或几个基因, 难以对与胚胎着床相关的基因进行全面分析。为了全面了解胚胎着床的基因表达谱及胚胎着床相关基因间的网络调控机理, 需要使用高通量的基因表达分析技术以同时检测大量着床相关基因的表达。近年来, 高通量方法得到了快速的发展和广泛的应用。目前在 RNA 水平应用的高通量方法主要包括: 基因芯片(gene chip or microarray)、microRNA 芯片(microRNA microarray)、基因表达系列分析(serial analysis of gene expression, SAGE)以及深度测序技术(deep sequencing)。在蛋白质水平上使用的高通量检测手段有荧光差异双向电泳(fluorescence 2-dimensional differential in-gel electrophoresis, DIGE)和液相色谱串联质谱技术(liquid chromatography-tandem mass spectrometric, LC-MS/MS)等。

本文旨在对近年来应用高通量方法对啮齿类及灵长类胚胎着床过程机理的研究进行归纳总结, 从而为胚胎着床相关的研究提供素材。

## 1 基因芯片技术在胚胎着床过程中的应用

基因芯片是将待检测组织与固定于片基上的高密度探针阵列进行杂交的技术, 可以在同一时间内对大量基因的表达进行平行分析。基因芯片是目前应用最为广泛, 手段最为成熟的高通量基因分析技术。

### 1.1 基因芯片技术在着床前胚胎发育中的应用

成功的胚胎着床需要有着床能力的囊胚和处于接受态的子宫的相互作用, 对哺乳动物而言, 从透明带中孵出的具有活性的胚胎对着床是必需的。由于胚胎的直径小于 100 微米, 而且每次排出的卵子只有一个(如灵长类)或十几个(如啮齿类), 使得研究胚胎的高通量方法所需要的材料极度缺乏, 直到 RNA 扩增技术的出现才使得这一问题得到解决。近年来, 研究人员利用基因芯片技术对着床前胚胎的发育过程以及致密化、胚泡的形成以及孵化等过程进行了大量的研究, 得到一大批和这些过程相关的基因。

目前已有多篇以着床前各个时期胚胎基因表达谱为研究对象的报道, 研究发现囊胚特异性表达的基因主要与形态发生及各种新陈代谢途径有关<sup>[1,2]</sup>。比较桑葚胚和囊胚的基因表达谱发现, 数十个基因可能与桑葚胚-囊胚转变有关, 同时发现能量代谢相关的基因在桑葚胚-囊胚转化过程中也有极大的变化<sup>[3]</sup>。而比较完整的人类囊胚和分离内细胞团(Inner Cell Mass, ICM)细胞、滋养层(Trophectoderm, TE)细胞,

收稿日期: 2010-03-02 接受日期: 2010-10-14

\* 通讯作者。 Tel: 0592-2186823, E-mail: zmyang@xmu.edu.cn

同样发现桑葚胚分化为ICM和TE两个多能性细胞谱系是受到新陈代谢相关基因的调控<sup>[4]</sup>。这些结果表明,胚胎在囊胚期确实发生了剧烈的新陈代谢活动,这可能为随后胚胎及时在子宫内腔上皮上着床打下了基础。

孵化是胚胎着床前必须经历的一个过程,在囊胚孵化前后差异表达的基因包括细胞黏附和迁移分子、表观遗传调节基因、应激应答调节基因和免疫应答调节基因<sup>[5]</sup>。Wnt信号通路在着床后胚胎体轴形成过程中起重要作用,其众多成员在囊胚期都高表达, $\beta$ -catenin定位在ICM的细胞核中,提示Wnt通路的靶基因在ICM中处于转录激活状态<sup>[6]</sup>。桑葚胚分化为ICM和TE同样是受到包括Wnt信号通路在内的多个信号通路的调控<sup>[4]</sup>。但Wnt信号通路在着床前胚胎特定细胞中的激活是如何影响着床后胚胎发育仍不清楚。

延迟着床也称为胚胎滞留,是指囊胚期的胚胎处于休眠状态。在小鼠妊娠第4天早上切除双侧卵巢能够诱发囊胚的休眠,即所谓的“休眠胚胎”,通过持续的孕酮处理通常可以维持这一状态长达一到两周。注射雌激素可以激活囊胚,启动其在孕酮维持的子宫中着床,即“激活胚胎”。比较休眠胚胎和激活胚胎的基因表达谱,得到229个差异表达的基因,这些基因的功能主要集中在细胞周期、能量代谢通路、钙离子信号通路和黏附分子。这与前述的结果较为一致,说明在能够着床的激活胚胎中上述过程起重要的作用。其中肝素结合性表皮生长因子(heparin-binding EGF-like growth factor, *Hbegf*)基因在激活胚胎<sup>[7]</sup>或正常的囊胚期胚胎<sup>[1,2]</sup>中显著上调,在着床位点该基因在腔上皮高表达<sup>[8]</sup>。重组HB-EGF蛋白孵育过的小珠子能够像活性胚胎一样诱导局部子宫内膜通透性增加,并伴随子宫基质中环氧化酶(Cyclooxygenase, Cox-2)和骨形态发生蛋白(bone morphogenetic protein, Bmp2)的表达<sup>[9]</sup>。这些结果显示囊胚产生的HB-EGF能分泌到细胞外以旁分泌的形式诱导子宫中着床相关因子的表达。因而,HB-EGF被认为是介导胚胎-子宫分子对话的重要的候选分子。

## 1.2 基因芯片技术在哺乳动物子宫接受态研究中的应用

成功的着床不仅需要有着床能力的囊胚,还需要处于接受期的子宫。在卵巢雌激素和孕酮的调节下,子宫环境发生一系列改变以适应胚胎的着床。在小

鼠,妊娠第1~3天子宫不能接受活性胚胎的着床,为接受前期(prereceptive phase);第4天进入接受期(receptive phase),接受胚胎着床的能力最强;到第5天则完全不能接受胚胎着床,为非接受期(nonreceptive phase)。在人类和其他灵长类,一般认为子宫接受期在月经周期的第20天到24天,或者是LH峰后的第6天到第10天<sup>[10]</sup>。然而,子宫内膜如何转换为接受态的分子机制尚不清楚。

在人类女性和其他雌性灵长类中,根据不同的生理状态,可以将月经周期分为增殖前期、增殖中期、增殖后期、分泌前期、分泌中期、分泌后期和月经期。研究人员对这些时期的人子宫内膜进行基因芯片分析,鉴定出了一些在不同黄体时期差异表达的分子作为接受态的分子标志,这些分子有助于评估正常的子宫内膜是否处于接受期<sup>[11,12]</sup>。

在对人子宫内膜接受态的研究中,有5个各自独立的类似研究使用Affymetrix公司的HG-95型基因芯片或改进型HG-95v2研究了接受态子宫内膜的表达谱<sup>[13-17]</sup>。另有一个研究使用HG U133芯片对该时期子宫内膜进行了分析<sup>[18]</sup>。虽然检测平台是基本一致的,但结果却大相径庭。比较这6个研究所筛选出差异基因的一致性时发现,在数百个基因中只有骨桥蛋白(osteopontin)在6个研究结果中都在分泌中期高表达。该基因是一个结构基因,与细胞黏附功能有关,在多种组织中都有表达,在子宫内膜主要在腺上皮表达,提示在人子宫内膜中的功能可能与黏附无关<sup>[19]</sup>。但在小鼠中,骨桥蛋白在着床期间受雌激素的诱导而在子宫腔上皮表达<sup>[20]</sup>。基因芯片结果的这种不一致性可能由很多原因造成,其中子宫内膜材料收集的时间及所处生理时期的不同是一个主要原因。在上述的研究中,所收集子宫内膜的时期不尽相同:Kao和Borthwick的研究所收集的材料来自增殖晚期和分泌中期,而其他几个研究则来自分泌早期和分泌中期。不同的数据分析方法和标准也是产生差异的主要原因之一,例如在所有6个研究中,有一个是以3倍差异为标准<sup>[6]</sup>,而其他5个研究则以2倍差异为标准。另外,志愿者的遗传背景、样品的数量以及是否进行了混合等也是影响结果的重要原因。

由于子宫内膜中包含多种细胞,对于那些在不同细胞中表达差异较大的基因就很难准确地显示其变化的状况。将处于增殖晚期和分泌中期女性的子宫内膜的上皮细胞分离出来再进行分析<sup>[21]</sup>,发现子宫内膜腔上皮中在分泌中期上调的基因主要为细胞周期

调节相关的基因。

在小鼠中,很多研究对比了接受前期或非接受期和接受期的子宫内膜,以期能够筛选出一些能够代表接受态子宫内膜特征的分子标志。在对妊娠第5天着床点和非着床点的基因表达谱研究中得到36个着床点上调基因和27个下调基因,比较延迟着床小鼠和延迟着床激活小鼠,发现激活子宫中上调的27个基因在着床点也有上调,说明激活状态的子宫与正常妊娠的着床点是极其相似的<sup>[8]</sup>。子宫腔上皮作为胚胎着床过程中最先与胚胎滋养层细胞发生接触的组织,对子宫接受态的建立起到极其重要的作用。使用激光显微切割技术(Laser Capture microdissection, LCM)<sup>[22]</sup>或酶消化的方法<sup>[23]</sup>将小鼠正常妊娠第5天的着床点和非着床点子宫腔上皮分离出来再进行芯片分析,鉴定出一批差异表达的基因。两个研究虽然都以小鼠子宫腔上皮为研究对象,但是由于分离上皮的方法不同,所以在所筛选出的差异基因中一致性并不高。

雌激素通过其核受体ER $\alpha$ 和ER $\beta$ 在诸多生理过程中起到重要的作用,特别是在胚胎着床过程中,因卵巢切除而处于延迟状态的小鼠胚胎只有注射雌激素之后才能被激活从而启动着床。卵巢切除的小鼠使用雌激素处理后进行芯片分析,发现在6小时只有0.9%的基因受到雌激素的调控,而在12小时则有高达8.4%的基因受到雌激素的影响,说明雌激素对多数基因的调控可能是通过间接作用实现的<sup>[24]</sup>。使用ER $\alpha$ 和ER $\beta$ 敲除鼠和基因芯片技术证明,雌激素主要是通过ER $\alpha$ 调节其靶基因的,ER $\beta$ 所起的作用很小<sup>[25]</sup>。

孕酮通过其受体PR对子宫的很多功能起到调节作用,敲除PR的小鼠在排卵、子宫对着床前胚胎的应答和维持胚胎发育、蜕膜化反应等诸多生殖过程中存在缺陷。在人子宫内膜分泌期使用单一的孕酮受体拮抗剂米非司酮(Mifepristone),即RU486处理可以迅速导致子宫内膜转变为非接受态<sup>[26]</sup>。将分泌中期组织分离后在体外培养12小时后,用基因芯片检测子宫内膜的基因表达,在大约1000个基因中共有12个基因明显受到RU486的影响<sup>[27]</sup>。处于分泌中期(LH峰后第7天)的妇女接受RU486注射后6小时和24小时的活检组织与未注射组相比,有大量的基因表达显著发生变化<sup>[28]</sup>。

在小鼠,使用孕酮处理卵巢切除的野生型和孕酮受体敲除(PRKO)小鼠,在第一次注射4小时或40小

时后检测直接或非直接受到孕酮调节的基因表达的变化。最终在4小时得到139个基因被孕酮及其受体直接上调,而96个基因被直接下调,上调基因中包括已证实与着床相关的*Ihh*。而40小时后对孕酮处理有间接应答的基因则主要表现为下调<sup>[29]</sup>。比较正常妊娠4天的小鼠子宫和使用RU486处理的小鼠子宫的表达谱,78个已知的基因下调超过两倍,而70个基因在RU486处理后上调。上调基因中大部分为孕酮的靶基因,其中一些为直接靶基因,其时空表达定位与PR对应<sup>[30]</sup>。

## 2 microRNA 芯片技术在胚胎着床过程中的应用

microRNA(miRNA)是非编码RNA(non-coding RNA)的一种,可以通过对靶mRNA的转录后调节进而影响很多的生理过程。由于miRNA的长度较短(22个碱基左右),研究人员使用各种方法来提高探针与miRNA之间的Tm值以使之更有效的杂交,例如使用锁定核苷酸(Locked Nucleic Acid, LNA)来提高Tm值。

miRNA生物合成过程中一个重要的酶是Dicer,属于III型核酸内切酶。在雌性小鼠的生殖道和卵巢中条件敲除Dicer将导致该小鼠不育<sup>[31,32]</sup>,由此可见miRNA在生殖过程中的重要作用。在对各期胚胎(MII期卵母细胞、2细胞、4细胞、8细胞和囊胚)miRNA的表达谱分析中发现在囊胚期特异表达的miRNA有miR-290、miR-291、miR-292、miR-293、miR-294和miR-295这一簇。使用TargetsScan预测潜在的靶基因并对靶基因进行功能聚类分析发现,与囊胚特异性的miRNA的靶基因功能主要集中在动作电位的传递<sup>[33]</sup>。使用LNA修饰的miRNA芯片检测第5天着床点和非着床点的miRNA表达谱,鉴定得到8个上调miRNA,其中miR-21可能通过其靶基因Reck调节基质金属蛋白酶MMP-9,从而影响到胚胎的侵入过程<sup>[34]</sup>。筛选第1天和第4天的小鼠子宫中miRNA的表达,发现32个miRNA在接受期子宫显著上调。其中miR-101a和miR-199a\*可以通过其靶基因Cox-2参与调节着床过程<sup>[35]</sup>。

将增殖晚期和分泌中期的人子宫内皮细胞分离,同时进行mRNA和miRNA两个表达谱的芯片分析,发现12个miRNA上调和12个miRNA下调。将两个数据库通过miRNA与其靶基因进行交叉分析,发现细胞周期相关的基因在分泌中期富集<sup>[21]</sup>。

### 3 基因表达系列分析(SAGE)技术在胚胎着床过程中的应用

基因表达系列分析(serial analysis of gene expression, SAGE)是以测序为基础,定性和定量分析全基因组表达模式的技术。这一技术主要基于两个原理:(1)从mRNA的特定位置产生的短寡核苷酸序列标签(9~10碱基)含有足够的信息用来特异地鉴定一个转录本,利用这些标签能鉴定其对应基因及其在mRNA群体中的丰度。(2)短序列标签串联成单一克隆,进行测序鉴定,能极大地提高数据获取的效率。通过测一个克隆,能够鉴定30~50个不同的mRNA,使SAGE能通过较少的测序研究低丰度mRNA的表达。SAGE能在定性和定量两方面给出基因表达的信息,具有高通量、高效性,并且可能发现新的基因。根据不同的酶切方法得到的标签长度不同,由SAGE又衍生出LongSAGE和SuperSAGE等方法。

我们首次应用基因表达系列分析(SAGE)技术,分析了小鼠早期妊娠第5天非着床位点和着床位点子宫的基因表达谱<sup>[36]</sup>。首先利用早期妊娠小鼠第5天的子宫分别构建了非着床位点和着床位点两个SAGE文库。经过测序发现在11bp标签长度,共有1039个标签在非着床位点特异性表达,1252个标签在着床位点特异性表达。195个标签在非着床位点显著上调,其中100个标签是单一匹配的;261个标签在着床位点显著上调,其中127个是单一匹配的。将标签对应的基因进行功能聚类分析显示与着床位点相比,在非着床位点负责免疫反应的基因以及细胞骨架组织、核糖体结构组分和结构分子活性的基因显著上调。而与非着床位点相比,着床位点中更多表达与细胞凋亡相关的基因以及与细胞周期、信号转导活性、细胞通讯、催化活性和转运子活性等相关的基因,钙离子结合相关基因着床位点显著多于非着床位点。

### 4 深度测序技术在胚胎着床过程中的应用

深度测序技术(deep sequencing),又称下一代测序技术(next generation sequencing)以区别于传统的Sanger法测序技术。深度测序平台的代表是罗氏公司(Roche)的454测序仪(Roch GS FLX Sequencer),Illumina公司的Solexa基因组分析仪(Illumina Genome Analyzer)和ABI的SOLiD测序仪(ABI SOLiD Sequencer)。深度测序技术与以往的高通量方法相比具有明显的优势:数字化的信号可以直接对测序对象进

行定量;可重复性好;精确度及分辨率高,可以达到单碱基分辨率;通量高,可以对基因组进行高覆盖率测序且性价比高。例如一些低表达量的基因不能被基因芯片检测到,但是深度测序技术可以解决这一问题。因而,深度测序技术在基因组测序及多态性分析、DNA甲基化、组蛋白修饰、转录组测序及定量、Small RNA表达谱、发现新基因、可变剪切鉴定、DNA-蛋白质相互作用等多个方面有广泛的应用。

由于深度测序技术是近年来兴起的新型技术,目前尚未见在哺乳动物着床研究中的应用。我们使用Solexa测序平台对小鼠延迟和激活的子宫miRNA表达谱进行了测序分析,除了发现一些差异表达的miRNA以外,还由测序结果预测出6个新的小鼠miRNA并进行了Real-time PCR验证。另外,我们还发现在很多miRNA的种子序列中心区域的碱基存在大规模的编辑现象,并且编辑率在延迟样本中远高于激活的样本(未发表结果)。

### 5 蛋白质高通量技术在胚胎着床过程中的应用

到目前为止,虽然芯片技术和上述的几种高通量技术已经得到广泛的应用,但是很多的细胞功能涉及蛋白水平的变化,而这些蛋白的变化不一定能够直观地反映在RNA水平上。高通量蛋白质组技术的发展使得检测蛋白质组的转录后调节成为可能。

DIGE在哺乳动物着床过程中的使用已经比较广泛。在人中,增殖中期(月经周期第8~10天)和分泌中期(月经周期第19~23天)子宫内膜样品通过2D电泳发现,在得到的1017个点中有196个差异表达,从中鉴定出有41个基因编码的76个蛋白,多数属于JNK和EGF信号通路<sup>[37]</sup>。对比接受态(LH+7)和非接受态(LH+2)人子宫内膜的蛋白质表达谱,得到32个差异表达的蛋白,但是在两次重复之间只有两个蛋白是一致的<sup>[38]</sup>。在这些蛋白中,有一部分与相同生理时期的mRNA表达谱<sup>[16]</sup>相对应,但是还有一部分不能对应的蛋白,这些蛋白可能是受到了转录后调节。在小鼠,利用DIGE分析假孕第4天野生型和Hoxa-10敲除小鼠的子宫基质细胞,鉴定出FKBP52为受Hoxa-10调控的下游分子<sup>[39]</sup>。

上述研究都是使用2D电泳为分离蛋白的手段,液相色谱串联质谱法(liquid chromatography-tandem mass spectrometric, LC-MS/MS)的发展使得蛋白质组

学的研究得以脱离凝胶电泳。将增殖期和分泌期的人子宫内膜样本使用ICAT标记后直接进行nanobroe LC-MS/MS分析鉴定得到119个蛋白,其中五分之一在两个样本之间存在差异<sup>[40]</sup>。最近,LC-MS/MS技术得到长足的进展,可以分析复杂样本的蛋白质组。对猪体外受精胚胎的分析检测到1625个蛋白,而对家蚕胚胎蛋白质组进行分析,能够得到2168个可区分的蛋白质。这些数量的蛋白虽然只占基因总数的十分之一不到,但相比传统的蛋白质检测方法已经可以为研究人员提供大量的可用数据了。

## 6 影响高通量分析的因素及高通量技术的应用前景

高通量技术,尤其是基因芯片的结果和诠释受到众多因素的影响,包括所使用的不同的分析平台、不同的样品和探针的制备流程、不同的小鼠品系或人类样本来源以及不同的数据处理和分析。

芯片技术在产生巨大信息量的同时,也需要更多可以对其进行细致深入分析的方法,同时也需要各方面结果具有较好的一致性。有很多因素会影响到不同研究人员对于同一事件的研究结果。首先,样本的选择。在本文中所有涉及的使用自然月经周期子宫内膜为研究对象的研究中,每组研究人员对样本的选取时间和标准各不相同。以28天为标准的月经周期,对比LH峰值和排卵日等因素,我们将同样是研究人子宫内膜表达谱的各研究人员收集的子宫内膜样本的时间进行了对比,发现只有少数研究人员所收集样本的时间是大概一致的。另外,有的研究分离了腔上皮<sup>[21]</sup>而其他几组研究人员则使用全子宫内膜。其次,分析参数设置的一致性。例如在研究人子宫内膜着床窗口有关的6篇文章中,只有一篇<sup>[16]</sup>是使用3倍作为确定一个基因是否被调控的标准,而其他5篇研究都是使用2倍标准。

因此,在这一类的研究中需要注意如下重要的几点才能取得令人满意的结果:正确设计实验;对样本的选取和调控基因的标准给予严格的定义并尽量确立行业标准;使用诸如Real-time PCR或者Northern杂交等方法确认数据;将得到的信息与功能分析联系起来以展示其重要性。

一个基因想要执行相应的细胞功能,需要经过多层次的调控,包括转录调控、转录后调控、翻译及翻译后加工等,不同水平的调控不一定能同时体现出来。不同的高通量技术对应不同的调控水平的表

达情况:基因芯片主要是针对mRNA进行分析;SAGE和深度测序技术则除了对mRNA分析以外还可以对基因组进行分析,例如发现一些单点突变等;在翻译水平则有以DIGE和LC-MS/MS为代表的技术。另外转录后修饰例如泛素化和磷酸化同样在调节蛋白功能例如酶的半衰期上起到重要的作用。这些方面的研究还需要相应的蛋白质水平的高通量方法,现在可以使用一些特定的方法将发生这些修饰的蛋白分离出来再进行分析从而得到蛋白质组中的修饰情况。

从基因组到具体的生理功能需要经过多层次的复杂的调控过程,将这些不同层次水平的高通量方法结合起来才能有效地理解这些复杂的过程。可以预见,将来随着各种高通量方法的进步,随着新技术的不断涌现,以及对这些方法技术更合理有效的应用,人们对于哺乳动物着床过程的机理的研究必将更加深入。

## 参考文献(References)

- 1 Hamatani T, Carter MG, Sharov AA, Ko MS. Dynamics of global gene expression changes during mouse preimplantation development. *Dev Cell* 2004; 6(1): 117-31.
- 2 Zeng F, Baldwin DA, Schultz RM. Transcript profiling during preimplantation mouse development. *Dev Biol* 2004; 272(2): 483-96.
- 3 Tanaka TS, Ko MS. A global view of gene expression in the preimplantation mouse embryo: morula versus blastocyst. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2004; 115 Suppl 1: S85-91.
- 4 Adjaye J, Huntriss J, Herwig R, BenKahla A, Brink TC, Wierling C, *et al.* Primary differentiation in the human blastocyst: comparative molecular portraits of inner cell mass and trophoblast cells. *Stem Cells* 2005; 23(10): 1514-25.
- 5 Chen HW, Chen JJ, Yu SL, Li HN, Yang PC, Su CM, *et al.* Transcriptome analysis in blastocyst hatching by cDNA microarray. *Hum Reprod* 2005; 20(9): 2492-501.
- 6 Wang QT, Piotrowska K, Ciemerych MA, Milenkovic L, Scott MP, Davis RW, *et al.* A genome-wide study of gene activity reveals developmental signaling pathways in the preimplantation mouse embryo. *Dev Cell* 2004; 6(1): 133-44.
- 7 Hamatani T, Daikoku T, Wang H, Matsumoto H, Carter MG, Ko MS, *et al.* Global gene expression analysis identifies molecular pathways distinguishing blastocyst dormancy and activation. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; 101(28): 10326-31.
- 8 Reese J, Das SK, Paria BC, Lim H, Song H, Matsumoto H, *et al.* Global gene expression analysis to identify molecular markers of uterine receptivity and embryo implantation. *J Biol Chem* 2001; 276(47): 44137-45.
- 9 Paria BC, Reese J, Das SK, Dey SK. Deciphering the cross-talk of implantation: advances and challenges. *Science* 2002; 296(5576): 2185-8.
- 10 Donaghy M, Lessey BA. Uterine receptivity: alterations

- associated with benign gynecological disease. *Semin Reprod Med* 2007; 25(6): 461-75.
- 11 Ponnampalam AP, Weston GC, Trajstman AC, Susil B, Rogers PA. Molecular classification of human endometrial cycle stages by transcriptional profiling. *Mol Hum Reprod* 2004; 10(12): 879-93.
  - 12 Talbi S, Hamilton AE, Vo KC, Tulac S, Overgaard MT, Dosiou C, *et al.* Molecular phenotyping of human endometrium distinguishes menstrual cycle phases and underlying biological processes in normo-ovulatory women. *Endocrinology* 2006; 147(3): 1097-121.
  - 13 Kao LC, Tulac S, Lobo S, Imani B, Yang JP, Germeyer A, *et al.* Global gene profiling in human endometrium during the window of implantation. *Endocrinology* 2002; 143(6): 2119-38.
  - 14 Borthwick JM, Charnock-Jones DS, Tom BD, Hull ML, Teirney R, Phillips SC, *et al.* Determination of the transcript profile of human endometrium. *Mol Hum Reprod* 2003; 9(1): 19-33.
  - 15 Carson DD, Lagow E, Thathiah A, Al-Shami R, Farach-Carson MC, Vernon M, *et al.* Changes in gene expression during the early to mid-luteal (receptive phase) transition in human endometrium detected by high-density microarray screening. *Mol Hum Reprod* 2002; 8(9): 871-9.
  - 16 Riesewijk A, Martin J, van Os R, Horcajadas JA, Polman J, Pellicer A, *et al.* Gene expression profiling of human endometrial receptivity on days LH+2 versus LH+7 by microarray technology. *Mol Hum Reprod* 2003; 9(5): 253-64.
  - 17 Mirkin S, Arslan M, Churikov D, Corica A, Diaz JI, Williams S, *et al.* In search of candidate genes critically expressed in the human endometrium during the window of implantation. *Hum Reprod* 2005; 20(8): 2104-17.
  - 18 Haouzi D, Mahmoud K, Fourar M, Bendhaou K, Dechaud H, De Vos J, *et al.* Identification of new biomarkers of human endometrial receptivity in the natural cycle. *Hum Reprod* 2009; 24(1): 198-205.
  - 19 Johnson GA, Burghardt RC, Bazer FW, Spencer TE. Osteopontin: roles in implantation and placentation. *Biol Reprod* 2003; 69(5): 1458-71.
  - 20 White FJ, Burghardt RC, Hu J, Joyce MM, Spencer TE, Johnson GA. Secreted phosphoprotein 1 (osteopontin) is expressed by stromal macrophages in cyclic and pregnant endometrium of mice, but is induced by estrogen in luminal epithelium during conceptus attachment for implantation. *Reproduction* 2006; 132(6): 919-29.
  - 21 Kuokkanen S, Chen B, Ojalvo L, Benard L, Santoro N, Pollard JW. Genomic profiling of microRNAs and messenger RNAs reveals hormonal regulation in microRNA expression in human endometrium. *Biol Reprod* 2009; 82(4): 791-801.
  - 22 Yoon SJ, Choi DH, Lee WS, Cha KY, Kim SN, Lee KA. A molecular basis for embryo apposition at the luminal epithelium. *Mol Cell Endocrinol* 2004; 219(1-2): 95-104.
  - 23 Chen Y, Ni H, Ma XH, Hu SJ, Luan LM, Ren G, *et al.* Global analysis of differential luminal epithelial gene expression at mouse implantation sites. *J Mol Endocrinol* 2006; 37(1): 147-61.
  - 24 Hong SH, Nah HY, Lee JY, Gye MC, Kim CH, Kim MK. Analysis of estrogen-regulated genes in mouse uterus using cDNA microarray and laser capture microdissection. *J Endocrinol* 2004; 181(1): 157-67.
  - 25 Watanabe H, Suzuki A, Kobayashi M, Takahashi E, Itamoto M, Lubahn DB, *et al.* Analysis of temporal changes in the expression of estrogen-regulated genes in the uterus. *J Mol Endocrinol* 2003; 30(3): 347-58.
  - 26 Danielsson KG, Marions L, Bygdeman M. Effects of mifepristone on endometrial receptivity. *Steroids* 2003; 68(10-13): 1069-75.
  - 27 Catalano RD, Yanaihara A, Evans AL, Rocha D, Prentice A, Saidi S, *et al.* The effect of RU486 on the gene expression profile in an endometrial explant model. *Mol Hum Reprod* 2003; 9(8): 465-73.
  - 28 Sharkey AM, Catalano RD, Evans AL, Charnock-Jones DS, Smith SK. Novel antiangiogenic agents for use in contraception. *Contraception* 2005; 71(4): 263-71.
  - 29 Jeong JW, Lee KY, Kwak I, White LD, Hilsenbeck SG, Lydon JP, *et al.* Identification of murine uterine genes regulated in a ligand-dependent manner by the progesterone receptor. *Endocrinology* 2005; 146(8): 3490-505.
  - 30 Cheon YP, Li Q, Xu X, DeMayo FJ, Bagchi IC, Bagchi MK. A genomic approach to identify novel progesterone receptor regulated pathways in the uterus during implantation. *Mol Endocrinol* 2002; 16(12): 2853-71.
  - 31 Gonzalez G, Behringer RR. Dicer is required for female reproductive tract development and fertility in the mouse. *Mol Reprod Dev* 2009; 76(7): 678-88.
  - 32 Nagaraja AK, Andreu-Vieyra C, Franco HL, Ma L, Chen R, Han DY, *et al.* Deletion of Dicer in somatic cells of the female reproductive tract causes sterility. *Mol Endocrinol* 2008; 22(10): 2336-52.
  - 33 Yang Y, Bai W, Zhang L, Yin G, Wang X, Wang J, *et al.* Determination of microRNAs in mouse preimplantation embryos by microarray. *Dev Dyn* 2008; 237(9): 2315-27.
  - 34 Hu SJ, Ren G, Liu JL, Zhao ZA, Yu YS, Su RW, *et al.* MicroRNA expression and regulation in mouse uterus during embryo implantation. *J Biol Chem* 2008; 283(34): 23473-84.
  - 35 Chakrabarty A, Tranguch S, Daikoku T, Jensen K, Furneaux H, Dey SK. MicroRNA regulation of cyclooxygenase-2 during embryo implantation. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007; 104(38): 15144-9.
  - 36 Ma XH, Hu SJ, Ni H, Zhao YC, Tian Z, Liu JL, *et al.* Serial analysis of gene expression in mouse uterus at the implantation site. *J Biol Chem* 2006; 281(14): 9351-60.
  - 37 Chen JI, Hannan NJ, Mak Y, Nicholls PK, Zhang J, Rainczuk A, *et al.* Proteomic characterization of midproliferative and midsecretory human endometrium. *J Proteome Res* 2009; 8(4): 2032-44.
  - 38 Dominguez F, Garrido-Gomez T, Lopez JA, Camafeita E, Quinero A, Pellicer A, *et al.* Proteomic analysis of the human receptive versus non-receptive endometrium using differential in-gel electrophoresis and MALDI-MS unveils stathmin 1 and annexin A2 as differentially regulated. *Hum Reprod* 2009; 24(10): 2607-17.
  - 39 Daikoku T, Tranguch S, Friedman DB, Das SK, Smith DF, Dey SK. Proteomic analysis identifies immunophilin FK506 binding protein 4 (FKBP52) as a downstream target of Hoxa10 in the periimplantation mouse uterus. *Mol Endocrinol* 2005; 19(3): 683-97.

40 DeSouza L, Diehl G, Yang EC, Guo J, Rodrigues MJ, Romaschin AD, *et al.* Proteomic analysis of the proliferative and secretory

phases of the human endometrium: protein identification and differential protein expression. *Proteomics* 2005; 5(1): 270-81.

## Application of High-throughput Gene Expression Analysis in the Study of Embryo Implantation

Ren-Wei Su<sup>1</sup>, Zeng-Ming Yang<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>College of Life Science, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China;

<sup>2</sup>College of Life Science, Xiamen University, Xiamen 361005, China)

**Abstract** Mammalian implantation is a complex and orderly process in which a large number of genes are involved. It is hard to analyze the expression of these genes in a single study by traditional methods. Recently, high-throughput gene expression analysis has been widely used to study the mechanism of embryo implantation. Many of mRNAs, microRNAs and proteins have been identified as implantation-related factors. In order to further understand the molecular mechanism of embryo implantation in mammals, high-throughput methods will be of importance for investigating mammalian implantation.

**Key words** mammal; embryo; endometrium; implantation; high-throughput analysis

Received: March 2, 2010 Accepted: October 14, 2010

\*Corresponding author. Tel: 86-592-2186823, E-mail: zmyang@xmu.edu.cn