



胚胎植入研究的回顾和展望

陈琦^{①②}, 彭洪英^①, 张莹^{①②}, 雷丽^{①②}, 曹宇静^①, 段恩奎^{①*}

① 中国科学院动物研究所, 计划生育生殖生物学国家重点实验室, 北京 100101;

② 中国科学院研究生院, 北京 100094

* 联系人, E-mail: duane@ioz.ac.cn

2009-06-30 收稿, 2009-08-25 接受

国家重点基础研究发展计划(批准号: 2006CB944006)和国家自然科学基金(批准号: 30770819)资助项目

摘要 胚胎植入的成功与否是决定胚胎能否进一步发育的门槛。人类对胚胎植入现象的观察和认识已经超过百年, 从早年胚胎植入的解剖学、组织学、超微结构, 到胚胎植入的激素调控认识, 再到最近 10 多年来的基因功能研究及基因组、蛋白组学的大规模分析, 我们对胚胎植入的生理和分子机制已经有了越来越深刻的认识; 同时, 这些知识积累为临床上开展和改进辅助生育技术起到了重要的推进作用。目前我们已经知道, 胚胎植入能否正常发生, 一方面需要早期胚胎发育形成囊胚并获得着床能力, 同时子宫需要协同进入接受状态, 即所谓的植入“窗口期”。这两个相对独立却又彼此联系的过程涉及母体全身的激素调控以及局部的胚胎与子宫间复杂的信息交流。本文将围绕子宫和胚泡这二条主线对胚胎植入研究历史的一些重要事件进行回顾和阐述, 总结植入过程中已知的重要分子信号通路, 并提出该领域尚存的诸多有趣而重要的问题。相信有关胚胎植入机理的进一步阐明将为女性不孕不育的治疗以及新型避孕药的开发带来新的曙光。

关键词
胚胎植入
子宫接受性
囊胚激活
发展历史

对人类妊娠而言, 由于早期流产所衍生出的社会经济问题正备受全球范围内的关注, 而多数早期流产往往发生于胚胎植入期前后。目前尽管全球人口数在快速上涨, 到 2050 年预计将突破 90 亿, 然而, 全世界仍有 15% 的夫妇由于不孕不育无法拥有自己的子女。体外受精以及胚泡移植技术的出现和运用已经为多种原因导致的人类不孕不育提供了解决方案, 然而, 胚泡在移植进入子宫后的低植入率始终让人非常失望, 这很大程度上是由于移植进入的胚胎与子宫的发育不同步(子宫处于非接受状态)^[1]。在胚胎植入领域, 近年来通过小鼠实验和临床的证据逐步确立了一个新兴的学说, 该学说认为胚泡植入的成功与否不能仅仅以“植入”和“不植入”来判断, 而且胚泡在子宫中植入的时相对于妊娠中后期的胎盘发生和胎儿发育也是至关重要的, 如果胚胎植入的时

相发生短暂的延后则会明显导致妊娠失败率的上升^[2~5]。即胚胎植入的质量将决定整个妊娠的质量及成年以后疾病的发生。因此, 深入揭示与胚胎植入过程相关的分子细节则显得非常有必要。它将帮助我们解决目前全球范围内两个重大的难题, 即治疗不孕和开发新型避孕药。

胚胎植入能否正常发生, 一方面需要早期胚胎发育形成囊胚并获得着床能力, 同时子宫需要协同进入接受状态, 即所谓的植入“窗口期”。这两个相对独立却又彼此联系的过程涉及母体全身的激素调控以及局部的胚胎与子宫间复杂的信息交流。从基础研究的角度来看, 经过多年的积累, 我们对胚胎植入各个阶段形态学及细胞学上已经有了较为清楚的认识; 基于近年来实验技术的进步, 目前我们已经能够对胚泡和子宫内的基因和蛋白质表达进行全面的检

引用格式: 陈琦, 彭洪英, 张莹, 等. 胚胎植入研究的回顾和展望. 科学通报, 2009, 54: 2771~2782

Chen Q, Peng H Y, Zhang Y, et al. Embryo implantation: A time for recalling and forwarding. Chinese Sci Bull, 2009, 54, doi: 10.1007/s11434-009-0632-3

测,并对植入过程中的一些分子间相互作用作出预测.另外,大量的基因敲除小鼠模型也为我们提供了相关基因功能的丰富信息,并逐渐成为该领域的主要研究手段.然而,仅仅通过分析胚胎植入相关的基因表达谱以及通过基因敲除鼠的表型分析来揭示植入的机理显然是不够的.因为如果对胚胎植入的研究背景缺乏深厚的了解,简单的表达及表型分析往往不能揭示该复杂生理现象背后的奥秘;同时,一味地通过基因敲除来研究胚胎植入会导致我们忽视一些植入过程中非常基本而重要的现象,导致对胚胎植入过程的理解趋于狭隘.因此,对本领域的重要发展史及一些有趣的非主流方向进行一个回顾和分析则显得非常必要.本综述将针对胚胎植入过程中的若干重要环节,以来自动物模型(主要是大鼠和小鼠)的信息为主,从生理和分子机制的角度阐述本领域的一些重要发展史,同时我们会在适当的时候对其他物种及人类的相关比较研究进行讨论.

1 关于胚胎植入过程中子宫“窗口期”概念的确立

早年关于子宫对植入接受窗口的研究是基于成熟的胚胎移植技术.在这里我们需要介绍一个大、小鼠胚胎移植中经常用到的概念“假孕状态”,即当没有生育能力的雄鼠(如人工结扎输精管)与雌鼠交配后即产生了假孕雌鼠,在交配后最初的4天之内(见栓的当天作为第1天),假孕雌鼠子宫所处的激素环境与正常交配是类似的,因此假孕子宫对于胚胎植入的敏感性也是类似的.如果在第4天将囊胚从正常妊娠小鼠子宫内冲出,移植到假孕第4天(同步移植)小鼠的子宫中,则能够发生胚胎植入和随后的蜕膜化并最终生出小鼠.基于胚胎移植的技术,后来在大鼠和小鼠中通过非同步胚胎移植的实验发现(以小鼠为例),如果将囊胚移植到尚未进入接受态的子宫中(如在小鼠中将第4天的囊胚移植到第3天的假孕子宫中),囊胚可以在子宫中保持其状态等待子宫进入接受状态后发生植入,其结果与同步移植的植入情况相似;然而,如果将尚未发育到囊胚阶段的胚泡移植到已经进入接受态的子宫中(第3天的胚泡移植到第4天的子宫),子宫则不会等待胚泡发育到囊胚,而是直接进入一种非接受状态,以至胚胎植入不能发生^[6-8].这种非同步胚胎移植实验的结果非常清楚地揭示了几个问题:()子宫必须进入接受态才能发

生植入;()子宫在进入接受态的情况下,只有具有植入能力的囊胚(而非其他形式的胚泡)才能在子宫中植入;()胚胎可以等待子宫进入接受期,而子宫不会等待胚泡发育到囊胚,而是直接进入不应状态.其中,我们通常把子宫能够接受胚胎植入的那段时间称为“窗口期”.在窗口期之后,子宫随即进入“非接受期”,这一时期子宫内的环境不仅变得不利于植入,而且对存留在子宫内的胚胎有害^[8,9],在这一时期即使给子宫移植正常的囊胚也不能发生植入.目前认为,假孕小鼠的子宫在第4天处于接受期,第5天开始进入非接受期,第6天完全进入非接受期^[4,9].如果给第5天假孕小鼠移植囊胚,虽然能够发生植入,但是与第4天移植相比,植入后的胚胎中期妊娠退化率明显升高,证明了胚胎植入的正常时相对于胎儿后续发育是至关重要的^[4].来自人类临床医学的证据以及植入窗口发生紊乱的敲除鼠进一步证明了这个结论^[2,4,5].在正常情况下,胚泡和子宫能够相对独立地按时协同发育到可以植入的状态.那么,子宫和胚胎分别是受哪些因素的调节同步进入到可植入状态的呢?接下来我们就分别从子宫和胚胎两个方面来阐述这个问题.

2 子宫进入“窗口期”的激素调节及发现历史

2.1 与胚胎植入相关的激素分泌模式

从胚胎植入发生的时间来看,大多数动物的胚胎植入都发生在排卵后黄体完全形成后的一段时间内,对于人类即发生在月经周期的黄体期,对于小鼠、大鼠来讲发生在动情周期的间情期(dioestrus phase),而动情(月经)周期是一个受到激素严格调控的过程^[10].事实上,任何和胚胎植入相关的讨论都需要首先从母体激素分泌的模式以及调节开始^[10].在20世纪70年代之前,生殖生物学家们对围胚胎植入期的激素分泌模式和调控展开了系统的研究,确立了激素对于胚胎植入调控的主导作用.

关于胚胎植入前的激素分泌模式,我们现在已经知道主要分为3个阶段:()在小鼠的动情前期(相当于人类月经周期的卵泡期),存在一个排卵前雌激素高峰(preovulatory estrogen),而这一时期几乎没有孕激素;()在排卵(在小鼠中也是交配发生的时间)后的两天,雌激素和孕激素的含量都呈非常低的水平;()这一时期之后随着黄体的形成,孕激素的含

量迅速升高(第 3~4 天),同时雌激素的分泌在妊娠第 4 天也出现一个小峰,黄体期雌激素(luteal-phase estrogen,第 4 天)^[10,11](图 1)。而小鼠的胚胎植入则发生在第 4 天晚上 24 点左右。现在我们已经知道以上的激素分泌模式对于子宫进入接受态是非常重要的,而且我们可以根据该分泌模式通过人工给予激素的方法使小鼠子宫进入接受状态^[12,13]。

2.2 雌孕激素的作用及发现史

那么,以上的激素分泌模式中各个因素究竟对于子宫准备进入接受态和胚胎植入起到什么作用呢?下面的讨论将主要基于小鼠和大鼠的研究发现。

首先我们先讲相对简单的一个因素:关于黄体的形成及分泌的孕酮对胚胎植入的作用在很早以前就已经确立^[14,15],对于绝大多数的哺乳动物来讲,孕酮对于胚胎植入是一个绝对必要的因素。近年来的基因敲除鼠模型也更加明确地说明了孕酮受体敲除鼠是不能发生植入的^[16,17]。

对于植入前分泌的雌激素对子宫准备进入接受态作用的认识经历了不少波折,在 20 世纪的前 50 年,关于雌激素对胚胎植入是否是需要的问题一直颇有争议。在阐述这些事件之前我们需要先介绍一个和植入过程紧密相关的事件,即子宫蜕膜化(deciduation):囊胚与子宫上皮发生黏附反应后,围绕囊胚子宫基质细胞开始广泛地增殖和分化(蜕膜化),伴随着蜕膜区大量的血管发生(angiogenesis);以至于植入位点处的子宫体积和重量迅速地增大,最终使胚泡完全包埋入子宫系膜对侧的基质床中^[18](小鼠中从第 6 天起形成肉眼可以看见的蜕膜鼓包,目前认为蜕膜的一大作用是在有功能的胎盘形成之前为胚泡

的发育提供养料,并且早期蜕膜对发育初期的胚胎起到免疫保护作用^[18~20]。在台盼蓝反应发明(1960 年)以前,子宫能否发生蜕膜化反应(可见的蜕膜鼓包)在很长一段时间内被作为检验子宫是否进入接受态的标志。早在 1908 年,Loeb 发现对处于接受态的豚鼠子宫给予物理损伤可以造成与胚胎植入非常类似的子宫蜕膜化反应^[10],之后这一结论在小鼠、大鼠等多种啮齿类动物中得到了重复^[10],由于早期人们认为这种物理创伤引起的蜕膜化反应与胚胎植入引发的蜕膜化在过程上是一致的,因而该方法被广泛地运用于研究与子宫接受性相关的问题。在这个观点的基础上,人们发现在卵巢切除的小鼠或大鼠中仅给予孕酮后,通过子宫物理损伤能够诱发蜕膜化反应,因此判定孕酮是胚胎植入过程中唯一需要的激素。

然而,发生在小鼠和大鼠中的另一个生理现象对以上结论提出了质疑。在小鼠和大鼠哺乳期间发生交配后,如果允许幼仔哺乳,则可以导致胚胎植入延迟发生^[10],哺乳的小鼠越多,胚胎植入延迟的时间越长。这个状态下,母鼠的卵巢中有组织学正常、并且有功能的黄体(分泌孕激素),并且这个时期给哺乳母鼠的子宫进行物理损伤可以诱发蜕膜化反应,也进一步证实了该时期确实有孕酮的分泌。然而,这个时期处于子宫内的胚胎却不能发生植入。这种哺乳期胚泡延迟植入的现象在小鼠和大鼠中均能发生,导致生殖生物学家们开始怀疑除了孕酮之外还有其他因素(怀疑有另一种激素)参与了胚胎植入的启动。这也开始让人们认识到通过物理损伤诱发的蜕膜化与正常胚胎植入诱发的蜕膜化是有区别的。

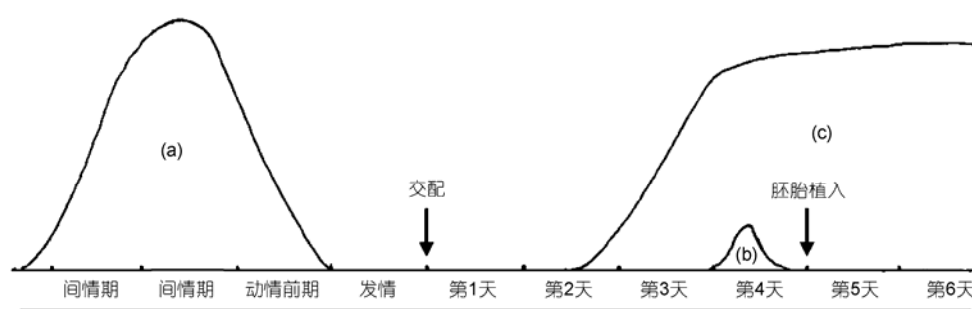


图 1 小鼠围植入期激素分泌模式图

(a) 排卵前雌激素(preovulatory estrogen); (b) 黄体期雌激素(luteal-phase estrogen); (c) 孕激素(progesterone)。本模式图改绘自文献^[10, 11]

以上对另一种激素参与植入的怀疑在后来得到了印证, Krehbiel 发现, 给予处于延迟植入的哺乳期的大鼠注射少量的雌激素可以使得处于延迟植入的胚泡发生植入^[10]。不久, 相同的结论也在小鼠得到了证实^[21]。这些结果导致科学家们开始提出一个假说: 即在生理情况下少量的雌激素对于胚胎植入的启动也许是必须的; 而哺乳期发生的延迟植入现象则是由于这一时期雌激素的缺乏(哺乳对雌激素分泌的抑制)。针对以上假说, 后来出现了一系列经典的实验用更加直接的手段证实了雌激素对小鼠和大鼠正常胚胎植入的必要性^[10]。其具体方法以小鼠为例: 在胚胎植入前, 将妊娠小鼠的卵巢在不同时间摘除, 然后给予外源的孕激素, 随后观察胚胎植入是否发生。其结果表明这种处理后胚胎植入与否取决于卵巢摘除的时间, 如果卵巢摘除的发生在一个特定时间(第4天早上)之后, 那么胚胎植入可以正常发生; 然而如果卵巢摘除发生在这个时间之前, 则胚胎植入不能发生; 这种情况下胚胎会在子宫中进入一种休眠状态, 如果继续给予孕激素, 这种状态可以延续数天, 如果同时给予少量的外源性雌激素, 则能够重新诱发植入反应。以上实验确定了两个重要的事实: () 正常胚胎植入过程中除了需要孕激素参与外, 植入前的雌激素分泌对于植入的启动也是必须的; () 胚胎植入前雌激素分泌的大致时间是在第4天早上, 即黄体期雌激素。另外, 由于这种人为地延迟植入与哺乳期的延迟植入现象颇为类似, 目前我们称其为“延迟植入模型”, 以此衍生出的“假孕延迟植入+囊胚移植”模型目前广泛地运用于胚胎植入研究领域(见后述)。这一系列的实验确定了小鼠和大鼠胚胎植入前要孕酮和雌激素的共同参与, 也奠定了我们今天看到的关于胚胎植入前激素调控机制的大体框架。近年来通过更加精细的实验认识到: 植入前子宫接受性对于雌激素的剂量非常敏感, 如果给予少量的雌激素(3 ng/小鼠)则可以使子宫的接受性维持一个相对长的时间, 而如果给予大量的雌激素(25 ng/小鼠)则导致子宫进入接受期后迅速地进入不应期^[22]; 通过子宫内注射植物油诱导人工蜕膜化来检验子宫敏感性的方法也得出了类似的结论^[23]。另外, 最近的研究表明, 蜕膜化进程也需要子宫内新合成的雌激素参与才能正常发生^[24]。

另外, 关于排卵前雌激素的分泌对子宫接受性的影响后来在 Finn 等人^[25]的研究中也得到了详细的

阐述, 这一时期的雌激素分泌对于胚胎植入的影响不如植入前雌激素那样重要, 但这时的雌激素分泌会帮助子宫在接受期获得最大的敏感性。基于此, 目前在小鼠去卵巢后人工给予激素诱导子宫接受性的实验中, 排卵前雌激素的给予也成为了常规的方法。

2.3 胚泡分泌雌激素参与胚胎植入?

这里需要提及的是, 关于植入前雌激素分泌的作用研究被推及到更多的物种, 但却发现并不是所有物种的胚胎植入都需要雌激素参与; 例如, 金黄地鼠和豚鼠的胚胎植入就可以不依赖雌激素进行(只需要孕激素), 也不能通过去卵巢给予孕酮的方式制作延迟植入模型。对于这些物种来讲, 一个重要的假说是这些物种的囊胚能够自己合成和分泌雌激素进而启动胚胎植入的发生^[26], 而且这种假说也得到了一些证据的支持, 比如在金黄地鼠的囊胚中可以检测到用于合成雌激素的芳香化酶(aromatase)的表达^[27](小鼠的囊胚已被证明没有芳香化酶的基因 Cyp19 表达^[28])。对于人类而言, 目前还没有足够的证据说明植入前是否需要一个雌激素的上升, 关于人类胚泡是否分泌雌激素目前也还没有定论。

2.4 关于人工诱导蜕膜化

关于诱导蜕膜化的具体方法, 由于认识到物理创伤引发的蜕膜化过程和胚胎植入有差异, 因此科学家们开始寻找其他能够更好模拟正常蜕膜化进程的诱导方法, 后来发现, 事实上在子宫接受期还有很多其他方法都可以诱导人工蜕膜化, 比如说空气、植物油等^[29,30]。由于宫腔给予植物油的方法对于各个实验室来讲相对容易操作, 而且使用植物油作为蜕膜化的诱导剂所需要的激素环境与正常胚胎植入更为相似, 使其成为了目前最普遍使用的一种人工诱导蜕膜化的方法^[12]。不过近几年的几项研究均表明, 人工诱导的蜕膜化与胚胎诱导的蜕膜化在机理以及下游基因调控上还是存在明显的不同, 而且不同诱导方式产生的蜕膜化进程也有所不同^[31~33]。

3 与子宫接受性相关的分子信号通路——来自敲除鼠模型的提示

近20年来, 随着基因操作水平的提高, 目前已经有大量的基因敲除鼠服务于科研。一些与早期植入以及子宫蜕膜化相关的重要通路也被陆续发现;

已经有大量的敲除鼠表现出了胚胎植入或蜕膜化的缺陷,其中多数与子宫的接受性获得缺陷有关。例如:细胞因子家族的 *Lif*, *IL-11*^[35-37], 前列腺素信号家族的 *cPLA2 α* , *COX-2*, *PPAR δ* ^[4,38-40]以及与之相关的溶血磷脂家族的受体 *LPA3*^[41]; 孕激素受体及其分子伴侣 *FKBP52*^[41,42]; 发育相关基因 *Ihh*, *BMP2*, *Wnt4*^[43-45]; 生长因子家族的 *HB-EGF*, *Areg*^[46]; 其他还包括与血管发生相关的基因^[47,48]也与植入的启动和蜕膜化的进程密切相关。本文由于篇幅的限制就不再对每个通路进行详尽的描述,如需继续阅读请参考本领域的其他相关综述^[11,18,49-51]。在这里值得一提的是近几年来随着子宫特异性基因敲除技术的发展(通过 *PR-Cre* 小鼠与目的基因-*Loxp* 小鼠杂交后获得只在表达 *PR* 的组织中特异地敲除目的基因),使过去很多胚胎致死性的基因(很多发育相关基因)能够实现子宫特异的基因敲除(如 *Ihh*, *BMP2* 等)^[43,44],从而使得研究这些基因在胚胎植入的功能成为了可能。相信在未来的几年内我们会发现更多与胚胎植入密切相关的发育相关基因。

4 囊胚激活参与决定植入“窗口期”的发现及分子机制

4.1 囊胚“激活”现象的认识和相关激素调控

激素调控子宫接受性的观念确定后,很长一段时间一直认为子宫接受性的长短是决定植入“窗口期”的因素,而忽视了囊胚的状态是否与植入窗口的长短相关。Dey 实验室于 1993 年开创了一个经典的实验,通过给假孕延迟植入小鼠的子宫移植处于休眠或激活状态的囊胚并同时给予雌激素后观察植入,结果发现处于激活状态的囊胚比休眠的囊胚能够获得更加宽广的植入“窗口期”^[9]。这个实验第一次揭示了囊胚的激活状态对于胚胎植入具有非常重要的作用,从此我们认识到囊胚只有在处理过雌激素的子宫内激活后才能发生植入,“囊胚激活”这个概念也由此产生。这个实验中也清楚地证实了母体在接受雌激素后能够在很短的时间内将休眠囊胚激活使之具有植入能力。基于此现象,后来在小鼠囊胚上找到了雌激素受体,并猜测其通过接受雌激素信号激活囊胚^[52];然而,进一步通过体外诱导休眠囊胚激活实验却证明儿茶酚雌激素 4-OH-E2 (而不是雌激素 E2)才能使休眠囊胚进入激活状态;并且雌激素受体特异性阻断剂也不能抑制 4-OH-E2 对囊胚的激活,说

明囊胚的激活并不是受雌激素及其受体直接调控的。目前认为子宫中的 *CYP1B1* 通过将雌激素转化为儿茶酚化的雌激素(4-OH-E2)后,以旁分泌的方式激活位于子宫内的囊胚^[53]。为了证明雌激素和儿茶酚雌激素对于子宫和囊胚的分别作用,Dey S K 实验室采用了一个精妙的设计将两种互相联系的过程得以分开阐释:即采用 2-FL-E2 替代 E2 来处理延迟植入的子宫,2-FL-E2 是一种雌激素异构体,能够诱发子宫产生类似于 E2 的效应,但是它和 E2 不同之处在于它不能被儿茶酚化酶转变儿茶酚雌激素,并且还对儿茶酚雌激素的形成有强烈的抑制作用。在人工延迟植入模型中,给处于延迟植入状态的小鼠给予 2-FL-E2 不能启动植入;因为此时子宫虽然在 2-FL-E2 的作用下进入了接受态,但囊胚仍然处于休眠状态。通过胚胎移植的实验则进一步证明:如果给假孕延迟植入的子宫给予 2-FL-E2,同时移植体外经儿茶酚雌激素 4-OH-E2 激活的休眠囊胚,则可以发生植入;而在同样的体系下移植经雌激素 E2 处理的休眠囊胚则不能发生植入,这充分阐释了在小鼠胚胎植入中能够激活休眠囊胚的介质是 4-OH-E2 而不是 E2^[53]。该研究通过采用 2-FL-E2 清楚地区分了 E2 及其儿茶酚衍生物对子宫和囊胚的分别作用,第一次提出了一种雌激素如何分别调节子宫和囊胚进入胚胎植入的模式:一方面雌激素 E2 经血液内分泌方式影响子宫的接受性,另一方面雌激素在子宫内被转化为儿茶酚化雌激素 4-OH-E2,通过旁分泌的方式激活子宫内处于休眠状态的囊胚。只有当这两方面的条件同时满足才能启动植入。这为“囊胚激活”现象提供了有力的证据及可能的机理。

然而,需要注意的是,目前虽然知道了 4-OH-E2 可以将休眠的囊胚激活,但其中涉及的分子机制还很大程度上处于未知状态。比如,我们还不知道囊胚上是否存在特异的儿茶酚雌激素受体以及其直接的下游信号途径。

4.2 “囊胚激活”相关的分子信号途径

近年来通过基因芯片分析技术研究发现,处在休眠/激活两种不同生理状态下的囊胚在分子水平上呈现特异性差异表达^[54]。其中有表达差异的基因按照主要功能的不同可分为细胞周期相关、细胞信号相关以及能量代谢相关,提示囊胚从休眠到激活功能上的变化是由一系列复杂的转录水平的事件所调控^[54];同时,目前也确定了在蛋白水平上对囊胚激

活的一些相关分子,如HB-EGF伴随着囊胚激活表达量明显上升^[54],而大麻素受体CB1的表达则明显降低^[55]。值得一提的是,HB-EGF于植入前6~8h首先在囊胚上表达,是目前知道的囊胚进入植入状态最早期的标记分子^[56];随后HB-EGF在囊胚上的表达可以很快诱导该基因在囊胚所处位置子宫上皮的强烈表达,形成一种HB-EGF“自我诱导环”(self-loop induction)^[54]。这种“自我诱导环”的效应通过近几年一个经典的“小珠移植”实验(beads transfer)(以能够携带一定细胞因子的小珠(beads)代替胚泡移植如子宫,用以研究特定细胞因子对于诱发植入反应的影响^[57])得到了进一步证实:实验发现,通过给假孕第4天的子宫移植携带HB-EGF的小珠可以诱发小珠所处上皮的HB-EGF表达,同时能够诱导该处子宫发生类似胚胎植入的一系列反应,如发生台盼蓝反应,表达COX-2等早期植入和蜕膜化的特异标记物^[50,57]。另外,HB-EGF的受体家族ErbB1-4也在囊胚上都有表达,其中ErbB1、ErbB4的表达加强被认为是囊胚激活的标志^[58,59],其中植入前ErbB4在囊胚上的定位从胞浆转移到胞膜,目前被认为是囊胚上介导HB-EGF信号最重要的受体之一^[59,60]。HB-EGF敲除鼠表现出胚胎植入时间延迟及其产仔量下降,其功能的缺失可以被另一个EGF家族的基因Areg部分代偿^[46,61]。总之,目前的研究结果表明EGF家族信号对于囊胚的激活以及囊胚与子宫在植入前及早期植入过程中的对话交流具有重要的作用。

大麻素信号是近些年来发现的植入前调节囊胚与子宫同步化以及囊胚激活的一个重要信号,由内源性大麻素anandamide及其受体CB1介导的大麻素信号对调节植入前胚胎发育及子宫接受性的同步化过程有重要作用,作为一种脂类信号分子,anandamide在子宫的水平及其受体CB1在囊胚的表达量伴随子宫接受性的获得和囊胚的激活同时下调;与之相反,在非接受期子宫和休眠的囊胚中两者的表达量则同时上升^[55,62]。实验中还发现,anandamide在低浓度和高浓度下经CB1分别激活丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)信号通路和钙通道活性,以达到对囊胚功能的不同调控^[55],高浓度时抑制囊胚激活,低浓度时促进囊胚激活^[55,63]。

最新的研究发现,Wnt信号通路是调节囊胚获能的又一关键因素^[64]。Wnt信号通路由一系列癌基因和抑癌基因编码的蛋白质组成,在胚胎发育与肿瘤

发生等生理、病理过程中起着重要作用。通过 β -catenin-TCF/LEF小分子选择性抑制剂和腺病毒介导的过表达Wnt- β -catenin的抑制蛋白DKK1,发现阻断经典Wnt信号通路对早期胚胎发育和子宫接受性并无影响,但能够干扰囊胚获得着床能力。利用延迟着床模型及休眠囊胚体外培养和胚胎移植实验进一步发现,这一作用影响了囊胚激活过程。接下来的研究发现激活Wnt- β -catenin和PGI2-PPAR δ 信号通路可以协同促进囊胚获得着床能力^[64],这与过去发现儿茶酚雌激素激活囊胚后导致COX-2及PG信号加强的结论是一致的^[53]。

总而言之,当前围绕囊胚休眠/激活期基因和蛋白表达的实验还很有限,关于来自胚泡的信号如何影响子宫功能的细节在很大程度上还处于未知状态。这主要受限于难以从啮齿类动物和人类获得足够的组织样本进行分析。随着微量蛋白质组及基因组学的出现,目前对植入期胚泡信号的分析已经成为了可能。一旦鉴定出候选信号分子,我们进而可以用与胚泡大小相当的小珠(beads)作为吸附载体,将特定的信号分子导入子宫分析其作用。对囊胚如何获得植入能力的分子机制的进一步探索将帮助提高人类体外受精后的妊娠率。

5 胚胎植入过程中的其他问题

5.1 关于植入过程中胚泡诱导的子宫接受性改变

目前的主流观点仍然认为,胚胎植入过程中子宫的接受性主要由雌孕激素的调节而获得;然而,作为一种高活性的生物体,植入过程中的囊胚是否能够通过旁分泌、近分泌的方式对子宫的接收状态进行调节还很少有学者讨论。事实上,一些来自非同步胚胎移植的证据表明发育提前的胚胎能够在一定程度上对子宫植入的接受性进行调节,使其接受性提前来到^[65],来自体外培养实验以及体内实验的证据也提示植入前或植入过程中的胚胎在一定程度上能够诱导子宫获得并保持植入接受性^[66,67]。近年来一系列来自临床IVF-ET的研究数据更对这种胚泡诱导的子宫接受性改变提供了新的证据:研究提示,当移植进入子宫的胚胎不止一个时,先发生植入的胚胎能够诱导子宫接受性发生改变进而有利于后续的胚胎发生植入^[68,69]。不过,这种胚泡诱导的子宫接受性改变目前还缺乏更直接的证据,其发生机理也不得而

知。鉴于胚胎植入是一个胚胎和子宫共同参与的动态过程, 我们有理由相信胚胎本身在植入过程中绝不是一个完全被动的角色, 而很可能积极地参与到调节子宫接受性并调控最终的胚胎植入结果。对于这一方向的研究也许会成为胚胎植入今后发展的另一个新兴方向。

5.2 关于胚胎在子宫内的选择性定位: 胚泡等距分布和胚泡定向分布

() 胚泡等距分布(embryo spacing). 在多胎哺乳动物中(如兔、大鼠、小鼠), 植入前的胚胎在进入子宫后会沿子宫长轴进行有规律的等距分布(embryo spacing)(图 2), 该机制确保每个植入点之间保持有序的间隔, 有效避免了单个胚胎的后续发育因相互拥挤而受阻。该现象在生殖生物学领域是一个非常基础而古老的问题, 自其发现到现在已超过百年, 然而该现象背后涉及的分子机理仍然很不清楚。对于胚胎等距分布的机理, 早期的研究人员 Mossman (1937 年) 设想先进入子宫的胚胎会首先定位于靠近输卵管的子宫处, 并在周围形成一个“不应区”, 随后进入的胚胎会依次在远离输卵管方向的子宫壁找到位置继续形成“不应区”, 最终形成等距分布的效果^[70]。然而, 后来 McLaren 等人^[71]通过实验证明 Mossman 的假设是错误的, 子宫长轴上的每个位置事实上都有可能成为潜在的植入位点, 并不存在预先设定的位置; 由

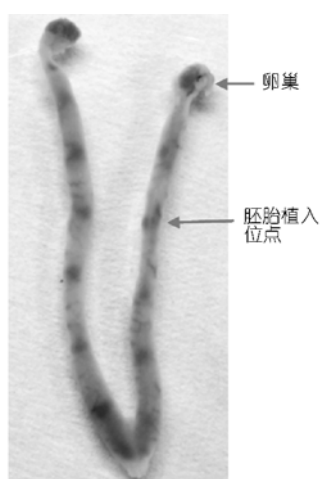


图 2 小鼠胚胎植入等距分布(embryo spacing)示意图

处死小鼠前 10 min 给予尾静脉注射台盼蓝, 由于植入位点血管通透性上升, 故呈现清晰的彩斑。注意各个植入位点之间保持近似于等距的间隔分布

此提出新的假设, 认为造成胚胎在子宫内等距分布的唯一因素是子宫的收缩运动。之后通过对植入前的子宫进行不同时间大量的连续切片和观测, 从形态学上阐明了小鼠胚泡在子宫内分布的进程, 即妊娠第 4 天早上进入子宫的胚泡首先趋于聚集在子宫中部, 然后朝子宫两侧逐渐分开呈均匀分布^[72]。关于调节胚胎在子宫内等距分布的信号途径, 目前相对确定的是前列腺素信号的紊乱能够破坏胚泡的等距分布, 导致胚泡拥挤^[73,74]。胞浆型磷脂酶 A2 (cPLA2 α) 是生成前列腺素前体的重要酶, 近年来证明缺乏该酶的小鼠生殖能力明显下降, 其主要原因是由于缺乏该酶的小鼠表现出植入时间的延后, 并且伴随子宫内胚泡分布紊乱^[4]。此外, 溶血磷脂家族的溶血磷脂酸(LPA)的受体 LPA3 敲除鼠也表现出与 cPLA2 敲除鼠非常相似的表型, 后证明 LPA3 敲除后也是通过影响前列腺素信号通路最终影响胚胎植入^[5]。后续的研究表明 LPA3 敲除鼠导致胚胎分布紊乱的一个原因确实是由于敲除鼠子宫收缩能力下降^[75]。然而, 单纯地给这些基因敲除鼠补充前列腺素信号的终产物(PGE2, PGI2)并不能纠正胚泡在子宫内分布的紊乱^[4,5]。这也说明目前关于 PG 信号如何对子宫肌肉的收缩进行精确的时空调控还不得而知。除了知道前列腺素和胚胎等距分布的关系以外, 其他实验表明一些能够影响子宫肌肉正常收缩的药物以及一些异常的激素环境也能导致胚泡分布紊乱^[76~78]。另外, 胚胎也有可能通过释放信号主动参与等距分布的调控, 然而, 这些情况在生理状态下的意义及其分子调控机制还需要进一步研究。

() 植入过程中的胚胎定向(embryo orientation). 与胚胎等距分布相比, 植入中的胚胎定向的问题显得更加复杂和难以解释。早在 1937 年, Mossman 发现对子宫植入位点进行横切后可以看到植入的胚泡始终非常一致地定植于子宫的对系膜侧, 并且对于大鼠、小鼠、豚鼠等啮齿动物而言, 植入胚胎时内细胞团(inner cell mass, ICM)的位置都是朝向系膜侧^[70](图 3)。从这里可以看出, 胚胎定向这个概念包括两个层次的问题: (1) 整个胚胎在子宫中的相对位置(对系膜侧); (2) 关于 ICM 的朝向问题。对于第一个问题, 似乎主要是由子宫来控制的, 因为即使进入子宫的不是胚泡, 而是小珠子、油或者是空气, 都会最后定

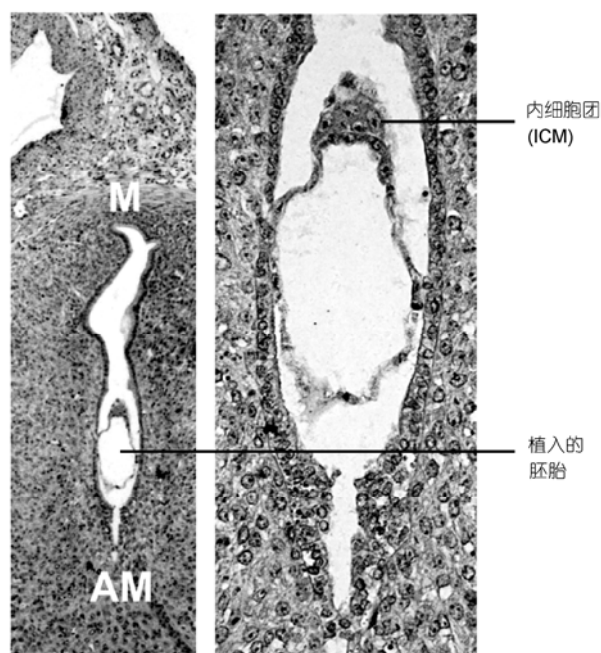


图3 小鼠胚胎植入定向(embryo orientation)示意图

显示妊娠小鼠 Day5 的胚胎植入位点。(a) 整个胚胎植入于子宫腔的对系膜侧(anti-mesometrial pole, AM); (b) 囊胚内细胞团(ICM)的方向指向子宫系膜侧(mesometrial pole, M)

位于对系膜侧^[54]。早年曾有学者认为这种现象是由于简单的重力作用使得胚泡落入对系膜侧^[79]，然而后来有一个经典的实验否定了这种假设，其做法是将一部分大鼠子宫通过手术进行极性翻转(图4)，然后让其怀孕，结果发现不管是在未翻转区域还是在翻转区域，胚胎都会定位在对系膜侧^[79]，这个实验充分说明了胚胎在对系膜侧定植这个事件不是简单地受重力影响，其中必然涉及子宫对其内容物的主动转运。从植入前子宫内的变化来看，该过程可能与基质的有序水肿导致子宫腔从系膜侧到对系膜侧依次关闭有关(luminal closure)；然而其具体机理目前还很大程度上处于未知状态，这可能与上皮下基质中介导前列腺素信号有关的受体的特异表达有关^[80]。对于两个问题，即内细胞团的定向问题则更加的复杂，目前甚至还没有一种能够比较合理解释该现象的假说，从我们实验室的观察以及过去文献中的一些结果看，这种 ICM 定向的发生可能是在整个胚泡定位在对系膜侧之后由 ICM 在囊胚内的迁移完成，因为在发生植入的第4天晚上，有时可以观察到 ICM 朝向对系膜侧的情况，而在第5天的切片中 ICM 则

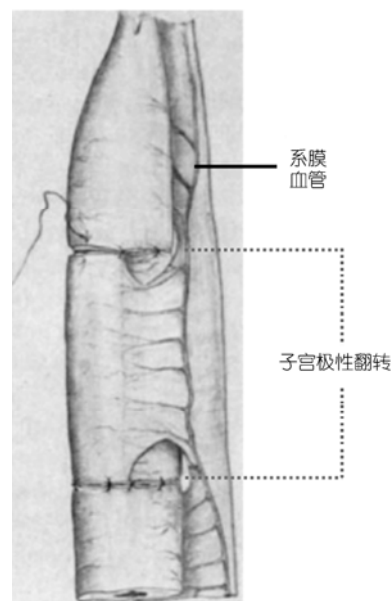


图4 通过手术进行部分子宫极性翻转手术

引自文献^[77]

都非常一致地朝向系膜侧。有学者认为，这种胚泡极性的确定可能和在囊胚上某些分子的极性表达有关^[81]。需要注意的是，对于灵长类动物，包括人类，其植入的时候 ICM 侧是朝向子宫壁的，这点与小鼠等相反。这种 ICM 定向的生理意义可能在于为后续胚胎发育与子宫内环境最大程度地适应，因此在不同物种中出现了不同的情况，也许正如 Richard Assheton(1895 年)在观察兔子胚泡植入的定向时写道：“胚泡和子宫此时的摆放位置是如此地完美，以至于胚胎位于其他任何的位置都将显得非常地不合适和不可能，也许正是这种位置关系确保了胚胎进一步正常发育”^[79]；然而，阐明这种定向是如何发生以及被调节的细节还有待于今后实验技术及在体观察手段的进步。

需要强调的一点是，对于胚胎等距分布以及胚胎定向的讨论虽然主要局限于多胎动物和啮齿类动物，但这两个事件的本质事可以概括为“胚胎在子宫内定位的调节”。从这个角度去理解，则会发现这其实与人类妊娠以及 IVF-ET 中遇到的很多情形是密切相关的。因为在人类的胚胎植入过程中，胚胎的正常植入位点往往是位于子宫体的底部，我们相信这个位置是在进化中经过长时期的选择获得的相对最佳位置。事实上，如果胚胎植入的位置发生了紊乱，

在临床上极易造成流产以及其他严重的后果,如胎盘前置、子宫狭部妊娠等。近年来随着 IVF-ET 数量的不断增多,进行多个胚胎移植后出现了一个越来越受关注的现象,即“消失的双胞胎”。对这种现象目前认为的一个主要原因是由于两个胚胎植入的位置太过靠近,导致其中一个发育受到阻碍最终被吸收,而临床统计发现这种情况下存活的一个胎儿发生先天不足的几率要比正常单胎妊娠的几率大很多^[82],这与小鼠中胚胎拥挤后导致的结果相类似^[4,5]。因此,对于胚胎在子宫内进行定位选择机制的研究将帮助揭示和克服人类生殖医学中遇到的难题。

6 结束语

胚胎植入是一个非常复杂而又无比精妙的生物过程,随着该领域的迅速发展,其涉及的丰富知识远非一篇综述所能囊括和阐明,本文旨在通过介绍过

去本领域一些重要发展史和经典的实验起到抛砖引玉的作用;并提出一些本领域存在的基础问题及今后可能发展的方向。希望有更多的科研同行对此产生兴趣并加入到胚胎植入的基础研究中来,为阐明科学现象,最终治疗不孕不育及开发新型非甾体类的安全避孕药作出贡献。

7 后记

目前 *Journal of Reproduction and Fertility* (*Reproduction* 的前身), *Journal of Embryology and Experimental Morphology* (*Development* 的前身) 已经对自创刊以来的老文献进行了免费的全文开放阅读,这两本杂志的老文献中涵盖了胚胎植入领域大量的早期经典发现,有兴趣的读着可以从网站上阅读本领域重要发现的原始资料,从文字中体验胚胎植入本领域乃至整个生殖生物学的发展历程。

参考文献

- 1 Norwitz E R, Schust D J, Fisher S J. Implantation and the survival of early pregnancy. *N Engl J Med*, 2001, 345: 1400—1408[doi]
- 2 Wilcox A J, Baird D D, Weinberg C R. Time of implantation of the conceptus and loss of pregnancy. *N Engl J Med*, 1999, 340: 1796—1799[doi]
- 3 Dey S K. Reproductive biology: fatty link to fertility. *Nature*, 2005, 435: 34—35[doi]
- 4 Song H, Lim H, Paria B C, et al. Cytosolic phospholipase A2alpha is crucial [correction of A2alpha deficiency is crucial] for ‘on-time’ embryo implantation that directs subsequent development. *Development*, 2002, 129: 2879—2889
- 5 Ye X, Hama K, Contos J J, et al. LPA3-mediated lysophosphatidic acid signalling in embryo implantation and spacing. *Nature*, 2005, 435: 104—108[doi]
- 6 Doyle L L, Gates A H, Noyes R W. Asynchronous transfer of mouse ova. *Fertil Steril*, 1963, 14: 215—225
- 7 Dickmann Z N R. The fate of ova transferred into the uterus of the rat. *J Reprod Fertil*, 1960, 1: 197—212[doi]
- 8 Goto Y, Noda Y, Shiotani M, et al. The fate of embryos transferred into the uterus. *J Assist Reprod Genet*, 1993, 10: 197—201
- 9 Paria B C, Huet-hudson Y M, Dey S K. Blastocyst’s state of activity determines the “window” of implantation in the receptive mouse uterus. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1993, 90: 10159—10162[doi]
- 10 Finn C A, Martin L. The control of implantation. *J Reprod Fertil*, 1974, 39: 195—206
- 11 Wang H, Dey S K. Roadmap to embryo implantation: clues from mouse models. *Nat Rev Genet*, 2006, 7: 185—199[doi]
- 12 Finn C A, Martin L. Endocrine control of the timing of endometrial sensitivity to a decidual stimulus. *Biol Reprod*, 1972, 7: 82—86
- 13 Curtis H S, Goulding E H, Eddy E M, et al. Studies using the estrogen receptor alpha knockout uterus demonstrate that implantation but not decidualization-associated signaling is estrogen dependent. *Biol Reprod*, 2002, 67: 1268—1277[doi]
- 14 Allen W M, Corner G W. PHYSIOLOGY OF THE CORPUS LUTEUM: . Normal growth and implantation of embryos after very early ablation of the ovaries, under the influence of extracts of the corpus luteum. *Am J Physiol*, 1929, 88: 340—346
- 15 Tranguch S, Smith D F, Dey S K. Progesterone receptor requires a co-chaperone for signalling in uterine biology and implantation. *Reprod Biomed Online*, 2006, 13: 651—660
- 16 Lydon J P, Demayo F J, Conneely O M, et al. Reproductive phenotypes of the progesterone receptor null mutant mouse. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 1996, 56: 67—77[doi]
- 17 Lydon J P, Demayo F J, Funk C R, et al. Mice lacking progesterone receptor exhibit pleiotropic reproductive abnormalities. *Genes Dev*, 1995, 9: 2266—2278[doi]
- 18 Dey S K, Lim H, Das S K, et al. Molecular cues to implantation. *Endocr Rev*, 2004, 25: 341—373[doi]

- 19 Wang X, Matsumoto H, Zhao X, et al. Embryonic signals direct the formation of tight junctional permeability barrier in the decidualizing stroma during embryo implantation. *J Cell Sci*, 2004, 117: 53—62[[doi](#)]
- 20 Collins M K, Tay C S, Erlebacher A. Dendritic cell entrapment within the pregnant uterus inhibits immune surveillance of the maternal/fetal interface in mice. *J Clin Invest*, 2009, 119: 2062—2073
- 21 Whitten W K. Endocrine studies on delayed implantation in lactating mice; role of the pituitary in implantation. *J Endocrinol*, 1958, 16: 435—440[[doi](#)]
- 22 Ma W G, Song H, Das S K, et al. Estrogen is a critical determinant that specifies the duration of the window of uterine receptivity for implantation. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100: 2963—2968[[doi](#)]
- 23 Finn C A, Pope M D, Milligan S R. Timing of the window of uterine sensitivity to decidual stimuli in mice. *Reprod Fertil Dev*, 1992, 4: 565—571[[doi](#)]
- 24 Das A, Mantena S R, Kannan A, et al. *De novo* synthesis of estrogen in pregnant uterus is critical for stromal decidualization and angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009, 106: 12542—12547[[doi](#)]
- 25 Finn C A, Martin L. The role of the oestrogen secreted before oestrus in the preparation of the uterus for implantation in the mouse. *J Endocrinol*, 1970, 47: 431—438[[doi](#)]
- 26 Wang X, Wang H, Matsumoto H, et al. Dual source and target of heparin-binding EGF-like growth factor during the onset of implantation in the hamster. *Development*, 2002, 129: 4125—4134
- 27 Reese J, Wang H, Ding T, et al. The hamster as a model for embryo implantation: Insights into a multifaceted process. *Semin Cell Dev Biol*, 2008, 19: 194—203
- 28 Stromstedt M, Keeney D S, Waterman M R, et al. Preimplantation mouse blastocysts fail to express *CYP* genes required for estrogen biosynthesis. *Mol Reprod Dev*, 1996, 43: 428—436[[doi](#)]
- 29 Hetherington C M. Induction of decidualization in the mouse by carbon dioxide. *Nature*, 1968, 219: 863—864[[doi](#)]
- 30 McLaren A. Stimulus and response during early pregnancy in the mouse. *Nature*, 1969, 221: 739—741[[doi](#)]
- 31 Bany B M, Cross J C. Post-implantation mouse conceptuses produce paracrine signals that regulate the uterine endometrium undergoing decidualization. *Dev Biol*, 2006, 294: 445—456[[doi](#)]
- 32 Kashiwagi A, Digirolamo C M, Kanda Y, et al. The postimplantation embryo differentially regulates endometrial gene expression and decidualization. *Endocrinology*, 2007, 148: 4173—4184[[doi](#)]
- 33 Lefevre P, Campos D B, Murphy B D. Talk to me: the embryo dictates gene expression by the endometrium. *Endocrinology*, 2007, 148: 4170—4172[[doi](#)]
- 34 Herington J L, Underwood T, McConaha M, et al. Paracrine signals from the mouse conceptus are not required for the normal progression of decidualization. *Endocrinology*, 2009, [doi]
- 35 Stewart C L, Kaspar P, Brunet L J, et al. Blastocyst implantation depends on maternal expression of leukaemia inhibitory factor. *Nature*, 1992, 359: 76—79[[doi](#)]
- 36 Robb L, Li R, Hartley L, et al. Infertility in female mice lacking the receptor for interleukin 11 is due to a defective uterine response to implantation. *Nat Med*, 1998, 4: 303—308[[doi](#)]
- 37 Song H, Lim H, Das S K, 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—1161[[doi](#)]
- 38 Lim H, Paria B C, Das S K, et al. Multiple female reproductive failures in cyclooxygenase 2-deficient mice. *Cell*, 1997, 91: 197—208[[doi](#)]
- 39 Lim H, Gupta R A, Ma W G, et al. Cyclo-oxygenase-2-derived prostacyclin mediates embryo implantation in the mouse via PPARdelta. *Genes Dev*, 1999, 13: 1561—1574[[doi](#)]
- 40 Wang H, Xie H, Sun X, et al. Stage-specific integration of maternal and embryonic peroxisome proliferator-activated receptor delta signaling is critical to pregnancy success. *J Biol Chem*, 2007, 282: 37770—37782[[doi](#)]
- 41 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—14331[[doi](#)]
- 42 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—1834[[doi](#)]
- 43 Lee K, Jeong J, Kwak I, et al. Indian hedgehog is a major mediator of progesterone signaling in the mouse uterus. *Nat Genet*, 2006, 38: 1204—1209[[doi](#)]

- 44 Lee K Y, Jeong J W, Wang J, et al. Bmp2 is critical for the murine uterine decidual response. *Mol Cell Biol*, 2007, 27: 5468—5478[doi]
- 45 Li Q, Kannan A, Wang W, et al. Bone morphogenetic protein 2 functions via a conserved signaling pathway involving Wnt4 to regulate uterine decidualization in the mouse and the human. *J Biol Chem*, 2007, 282: 31725—31732[doi]
- 46 Xie H, Wang H, Tranguch S, et al. Maternal heparin-binding-EGF deficiency limits pregnancy success in mice. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, 104: 18315—18320[doi]
- 47 Laws M J, Taylor R N, Sidell N, et al. Gap junction communication between uterine stromal cells plays a critical role in pregnancy-associated neovascularization and embryo survival. *Development*, 2008, 135: 2659—2668[doi]
- 48 Plaks V, Birnberg T, Berkutski T, et al. Uterine DCs are crucial for decidua formation during embryo implantation in mice. *J Clin Invest*, 2008, 118: 3954—3965
- 49 Carson D D, Bagchi I, Dey S K, et al. Embryo implantation. *Dev Biol*, 2000, 223: 217—237[doi]
- 50 Paria B C, Reese J, Das S K, et al. Deciphering the cross-talk of implantation: advances and challenges. *Science*, 2002, 296: 2185—2188[doi]
- 51 Lee K Y, Jeong J W, Tsai S Y, et al. Mouse models of implantation. *Trends Endocrinol Metab*, 2007, 18: 234—239[doi]
- 52 Hou Q, Paria B C, Mui C, et al. Immunolocalization of estrogen receptor protein in the mouse blastocyst during normal and delayed implantation. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, 93: 2376—2381[doi]
- 53 Paria B C, Lim H, Wang X N, et al. Coordination of differential effects of primary estrogen and catecholesterogen on two distinct targets mediates embryo implantation in the mouse. *Endocrinology*, 1998, 139: 5235—5246[doi]
- 54 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—10331[doi]
- 55 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—14919[doi]
- 56 Das S K, Wang X N, Paria B C, 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—1083
- 57 Paria B C, 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—1052[doi]
- 58 Paria B C, Das S K, Andrews G K, et al. Expression of the epidermal growth factor receptor gene is regulated in mouse blastocysts during delayed implantation. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1993, 90: 55—59[doi]
- 59 Wang J, Mayernik L, Schultz J F, et al. Acceleration of trophoblast differentiation by heparin-binding EGF-like growth factor is dependent on the stage-specific activation of calcium influx by ErbB receptors in developing mouse blastocysts. *Development*, 2000, 127: 33—44
- 60 Paria B C, 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
- 61 Das S K, Chakraborty I, Paria B C, et al. Amphiregulin is an implantation-specific and progesterone-regulated gene in the mouse uterus. *Mol Endocrinol*, 1995, 9: 691—705[doi]
- 62 Guo Y, Wang H, Okamoto Y, et al. N-acylphosphatidylethanolamine-hydrolyzing phospholipase D is an important determinant of uterine anandamide levels during implantation. *J Biol Chem*, 2005, 280: 23429—23432[doi]
- 63 Liu W M, Duan E K, Cao Y J. Effects of anandamide on embryo implantation in the mouse. *Life Sci*, 2002, 71: 1623—1632[doi]
- 64 Xie H, Tranguch S, Jia X, et al. Inactivation of nuclear Wnt-beta-catenin signaling limits blastocyst competency for implantation. *Development*, 2008, 135: 717—727[doi]
- 65 Ueda O, Yorozu K, Kamada N, et al. Possible expansion of “Window of Implantation” in pseudopregnant mice: Time of implantation of embryos at different stages of development transferred into the same recipient. *Biol Reprod*, 2003, 69: 1085—1090[doi]
- 66 Shiotani M, Noda Y, Mori T. Embryo-dependent induction of uterine receptivity assessed by an *in vitro* model of implantation in mice. *Biol Reprod*, 1993, 49: 794—801
- 67 Wakuda K, Takakura K, Nakanishi K, et al. Embryo-dependent induction of embryo receptivity in the mouse endometrium. *J Reprod Fertil*, 1999, 115: 315—324
- 68 Matorras R, Matorras F, Mendoza R, et al. The implantation of every embryo facilitates the chances of the remaining embryos to implant in an IVF programme: a mathematical model to predict pregnancy and multiple pregnancy rates. *Hum Reprod*, 2005, 20: 2923—2931[doi]
- 69 van M A, Fiddlers A A, Janssen J M, et al. In unselected patients, elective single embryo transfer prevents all multiples, but results in signifi-

- cantly lower pregnancy rates compared with double embryo transfer: a randomized controlled trial. *Hum Reprod*, 2006, 21: 338—343
- 70 Wimsatt W A. Some comparative aspects of implantation. *Biol Reprod*, 1975, 12: 1—40[[doi](#)]
- 71 McLaren A, Michie D. The spacing of implantations in the mouse uterus. *Mem Soc Endocr*, 1959, 6: 65—75
- 72 Restall B J, Bindon B M. The timing and variation of pre-implantation events in the mouse. *J Reprod Fertil*, 1971, 24: 423—426
- 73 Wellstead J R, Bruce N W, Rahima A. Effects of indomethacin on spacing of conceptuses within the uterine horn and on fetal and placental growth in the rat. *Anat Rec*, 1989, 225: 101—105[[doi](#)]
- 74 Kinoshita K, Satoh K, Ishihara O, et al. Involvement of prostaglandins in implantation in the pregnant mouse. *Adv Prostaglandin Thromboxane Leukot Res*, 1985, 15: 605—607
- 75 Hama K, Aoki J, Inoue A, et al. Embryo spacing and implantation timing are differentially regulated by LPA3-mediated lysophosphatidic acid signaling in mice. *Biol Reprod*, 2007, 77: 954—959[[doi](#)]
- 76 Pusey J, Kelly W A, Bradshaw J M, et al. Myometrial activity and the distribution of blastocysts in the uterus of the rat: Interference by relaxin. *Biol Reprod*, 1980, 23: 394—397[[doi](#)]
- 77 Yoshinaga K, Rice C, Krenn J, et al. Effects of nicotine on early pregnancy in the rat. *Biol Reprod*, 1979, 20: 294—303[[doi](#)]
- 78 Legrand C, Banuelos-nevarez A, Rigolot C, et al. Comparative effects of 6-hydroxydopamine and alpha-adrenoceptor antagonists on intrauterine migration and spacing of blastocysts in the rat. *J Reprod Fertil*, 1987, 81: 51—58
- 79 Alden R H. Implantation of the rat egg. I. Experimental alteration of uterine polarity. *J Exp Zool*, 1945, 100: 229—235[[doi](#)]
- 80 Yang Z M, Das S K, Wang J, et al. Potential sites of prostaglandin actions in the periimplantation mouse uterus: Differential expression and regulation of prostaglandin receptor genes. *Biol Reprod*, 1997, 56: 368-379[[doi](#)]
- 81 Haffner-krausz R, Gorivodsky M, Chen Y, et al. Expression of Fgfr2 in the early mouse embryo indicates its involvement in preimplantation development. *Mech Dev*, 1999, 85: 167—172
- 82 Pinborg A, Lidegaard O, Andersen A N. The vanishing twin: a major determinant of infant outcome in IVF singleton births. *Br J Hosp Med (Lond)*, 2006, 67: 417—420