

# 细胞外囊泡在早期胚胎发育中的作用及其在辅助生殖技术中的应用

王海潮, 李晓璇, 蓝红燕, 童晓娟

浙江大学医学院附属邵逸夫医院妇产科生殖中心 浙江省生殖健康疾病临床医学研究中心 全省生育力精准保护与促进重点实验室, 浙江 杭州 310016

**[摘要]** 细胞外囊泡(EV)是一类由细胞分泌的膜囊泡,包括外泌体、微囊泡和凋亡小体,在细胞间的通信、物质运输和信号传递中发挥重要作用。近年来,越来越多的研究表明EV在早期胚胎发育过程中发挥关键作用。通过携带蛋白质、核酸(如信使RNA和微RNA)和脂质等生物分子,EV能调节胚胎的基因表达、细胞增殖、分化及其微环境。研究发现,来源于女性生殖道不同部位的EV能够影响胚胎的发育潜能,提升胚胎质量,促进胚胎植入。此外,胚胎自身产生的EV也参与细胞间信息传递,在胚胎发育过程中起着重要作用。本文综述了EV在早期胚胎发育中的研究进展,探讨EV在介导细胞间通信、调控基因表达以及胚胎发育中的作用,展望了其在生殖医学和临床应用中的潜在前景,为优化辅助生殖技术提供新思路。



**[关键词]** 细胞外囊泡;早期胚胎发育;微RNA;信号转导;辅助生殖技术;综述

**[中图分类号]** R321 **[文献标志码]** A

## The role of extracellular vesicles in early embryo development and their application in assisted reproductive technologies

WANG Haichao, LI Xiaoxuan, LAN Hongyan, TONG Xiaomei (Assisted Reproduction Unit, Department of Obstetrics and Gynecology, Sir Run Run Shaw Hospital, School of Medicine, Zhejiang University, Zhejiang Provincial Clinical Research Center for Reproductive Health and Disease, Zhejiang Key Laboratory of Precise Protection and Promotion of Fertility, Hangzhou 310016, China)

Corresponding author: TONG Xiaomei, E-mail: 3406028@zju.edu.cn, ORCID: 0000-0002-6982-445X

收稿日期(Received):2025-01-26 修改返回日期(Revised):2025-07-09 接受日期(Accepted):2025-09-05

基金项目(Funding):浙江省“尖兵”“领雁”研发攻关计划(2023C03034)

第一作者(First author):王海潮,住院医师,主要从事卵母细胞体外成熟及早期胚胎发育阻滞的分子机制研究;E-mail: wanghaichao93@163.com;ORCID:0000-0002-0149-9240

通信作者(Corresponding author):童晓娟,主任医师,博士生导师,主要从事生殖障碍疾病的诊治、胚胎植入前遗传学检测技术及早期胚胎发育的遗传学致病机制研究;E-mail:3406028@zju.edu.cn;ORCID:0000-0002-6982-445X

[ **Abstract** ] Extracellular vesicles (EVs) are membrane-bound vesicles secreted by cells, including exosomes, microvesicles, and apoptotic bodies, which play critical roles in intercellular communication, material transport, and signal transduction. In recent years, increasing evidence has highlighted the essential function of EVs in early embryo development. By carrying bioactive molecules such as proteins, nucleic acids (e. g., mRNA and miRNA), and lipids, EVs regulate embryonic gene expression, cell proliferation, differentiation, and the microenvironment. Studies have shown that EVs derived from various segments of the female reproductive tract can enhance embryonic developmental potential, improve embryo quality, and facilitate implantation. Additionally, EVs secreted by embryos themselves participate in intercellular communication and play pivotal roles during embryogenesis. This review summarizes recent advances in understanding the functions of EVs in early embryo development, discusses their roles in mediating cell-cell communication and regulating gene expression, and explores their potential applications in reproductive medicine and clinical practice, offering new perspectives for optimizing assisted reproductive technologies.

[ **Key words** ] Extracellular vesicles; Early embryo development; MicroRNA; Signal transduction; Assisted reproduction technology; Review

[J Zhejiang Univ (Med Sci), XXXX, XX(XX): 1-13.]

[ **缩略语** ] 细胞外囊泡(extracellular vesicle, EV); 体外受精(*in vitro* fertilization, IVF); 辅助生殖技术(assisted reproductive technology, ART); 分化抗原(cluster of differentiation, CD); 信使 RNA(messenger RNA, mRNA); 微 RNA(microRNA, miRNA, miR); BCL2 相关 X 蛋白(BCL2 associated X, BAX); 质膜钙转运 ATP 酶(plasma membrane calcium-transporting ATPase, PMCA); 突触融合蛋白(syntaxin, STX); STX 结合蛋白(STX-binding protein, STXB); POU5 类同源框(POU class 5 homeobox, POU5F); SRY-box 转录因子(SRY-box transcription factor, SOX); KLF 转录因子(KLF transcription factor, KLF); TEA 域转录因子(TEA domain transcription factor, TEAD); 尾型同源框(caudal type homeobox, CDX); B 细胞淋巴瘤蛋白(B cell lymphoma, BCL); 内细胞团(inner cell mass, ICM); 滋养外胚层(trophectoderm, TE); 磷脂酰肌醇 3 激酶(phosphatidylinositol 3-kinase, PI3K); 蛋白激酶 B(protein kinase B, PKB, Akt); 哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mammalian target of rapamycin, mTOR); 丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK); 水通道蛋白(aquaporin, AQP); 内源性绵羊肺腺瘤逆转录病毒(endogenous Jaagsiekte sheep retrovirus, enJSRV);  $\tau$  干扰素(interferon  $\tau$ , IFNT); 哺乳动物雷帕霉素靶蛋白复合物(mammalian target of rapamycin complex, mTORC); 胚胎移植(embryo transfer, ET); 人类白细胞抗原(human leucocyte antigen, HLA)

胚胎发育是一个高度复杂的生物学过程, 涵盖配子受精、卵裂、组织和器官发育等关键阶段<sup>[1]</sup>, 其过程受到遗传、母体的激素水平和营养供给、外界环境以及表观遗传修饰等多种因素的调控。EV 是由细胞分泌、被脂质双层膜包裹形成

的颗粒<sup>[2]</sup>, 包括外泌体、微囊泡、凋亡小体三种类型。其可作为信号载体, 通过被受体细胞内吞或与受体细胞膜融合以递送其包裹的脂质、蛋白质和核酸等内容物, 介导细胞间通信, 调节机体各种生理或病理过程<sup>[3-4]</sup>。EV 存在于多种生物体液

中,包括与生殖过程密切相关的体液,如精液、卵泡液、输卵管液以及子宫液等<sup>[5]</sup>,参与调控精子和卵母细胞成熟、精子获能、顶体反应、胚胎发育、胚胎植入等多个生殖过程<sup>[6]</sup>,是胚胎发育过程中细胞间通信的重要媒介<sup>[7-8]</sup>,其信号异常可能是诱发某些生殖病理的关键因素。因此,深入研究EV介导胚胎发育的作用机制,不仅有助于揭示生殖障碍的发生机制,还可能为其诊断和治疗提供新策略<sup>[9-10]</sup>。

自1978年世界上首例试管婴儿Louise Brown通过IVF诞生以来,ART在不孕不育治疗领域取得了显著进展<sup>[11]</sup>。在过去40年间,通过IVF出生的婴儿数约占全球总出生人口数的0.1%<sup>[12]</sup>。体外胚胎的质量直接决定了ART的成功率。因此,关注EV在早期胚胎发育中的作用机制,探索其作为调控因子和潜在生物标志物在ART中的应用具有重要意义。本文综述了EV在早期胚胎发育过程中作用的最新研究进展,探讨EV在ART领域的应用现状,以期为未来的研究和临床应用提供新思路。

1 细胞外囊泡对早期胚胎发育的调控作用

受精后,雌雄原核形成并相互靠近,开始合子的第一次细胞分裂。与此同时,胚胎开始从输卵管向子宫迁移,在子宫中着床形成孕囊。在这一过程中,EV介导分子的双向运输,在调节植入前胚胎发育以及建立胚胎-母体相互作用方面发挥重要作用。

2013年,Ng等<sup>[13]</sup>首次鉴定了人子宫内膜上皮细胞分泌的EV,其直径为50~150 nm,呈现CD9和CD63阳性,内含调节胚胎发育和植入的分子物质。同时,体外培养的囊胚中检测到与之共培养的输卵管来源EV,可见胚胎能主

动吸收EV<sup>[14]</sup>。Saadeldin等<sup>[15]</sup>研究发现,体外培养的猪胚胎可分泌EV,且能够被相邻胚胎摄取,提示EV有助于在不同胚胎之间产生相互支持的微环境。EV介导的通信在一定程度上解释了群体胚胎培养以及胚胎与不同类型体细胞共培养系统带来的积极效果。作为细胞间通信的重要介质,EV来源广泛,对早期胚胎发育产生多方面的调控作用(表1)。

1.1 卵泡来源EV对胚胎发育的调控作用

卵泡来源EV通过携带核酸和蛋白质调节卵

表1 不同来源的细胞外囊泡(EV)在早期胚胎发育中的作用  
Table 1 The role of extracellular vesicles (EVs) from different origins in early embryo development

| EV来源 | 功 能                                                                     | 参考文献       |
|------|-------------------------------------------------------------------------|------------|
| 卵泡   | 维持精子活力,诱导精子获能和顶体反应                                                      | [19]       |
|      | 调控代谢和发育相关基因的表达,囊胚形成率提高约11.5%                                            | [20]       |
| 输卵管  | 防止精子过早获能,调控精子顶体反应,减少IVF多精受精                                             | [25-28]    |
|      | 提供能量来源和信号前体,调控代谢和发育相关基因的表达,缓解氧化应激和内质网应激                                 | [7,29-36]  |
|      | 参与早期胚胎的染色质修饰和表观遗传调控                                                     | [36,40,42] |
|      | 调控膜运输相关基因的表达,改善冷冻保存后的胚胎发育和存活率                                           | [41-42]    |
|      | 囊胚形成率提高10.6%~30.4%                                                      | [7,32-35]  |
|      | 囊胚总细胞数增加8.9~24.8                                                        | [7,33]     |
|      | 囊胚ICM/TE比值提高7.8%~15.3%                                                  | [34-35]    |
|      | 囊胚凋亡指数降低约6.2%,减少囊胚细胞凋亡                                                  | [33,35]    |
|      | 囊胚孵出率提高8.3%~16.5%,囊胚附着和植入能力提高                                           | [7,34]     |
|      | 出生率提升约15%                                                               | [35]       |
| 子宫   | 诱导精子顶体反应                                                                | [48]       |
|      | 调控发育相关基因的表达,抑制氧化应激和内质网应激                                                | [53-54,77] |
|      | 囊胚形成率提高9.3%~33.5%                                                       | [53-55,77] |
|      | 囊胚总细胞数增加14.4~23.0                                                       | [76-77]    |
|      | 囊胚ICM/TE比值提高约10.1%                                                      | [53,55]    |
|      | 囊胚凋亡指数降低4.4%~5.0%                                                       | [53,55]    |
|      | 囊胚孵出率提高10.4%~33.6%                                                      | [53-54,76] |
|      | 调控胚胎发育和细胞凋亡相关基因的表达                                                      | [69]       |
|      | 囊胚形成率提高6%~7.7%                                                          | [63,65]    |
|      | 囊胚总细胞数增加约7.2                                                            | [63]       |
| 胚胎   | 囊胚ICM/TE比值提高约9.2%                                                       | [63]       |
|      | 囊胚凋亡指数降低约4.9%                                                           | [65]       |
|      | 出生率提升约11%                                                               | [63]       |
|      | 促进胚胎植入                                                                  | [68]       |
|      | 囊胚形成率提高约16%,囊胚总细胞数增加,ICM/TE比值提高,凋亡指数降低                                  | [78]       |
| 精浆   |                                                                         |            |
| 血浆   | 受精率提高30.0%~33.7%,8细胞胚胎率提高40.0%~49.7%,桑葚胚率提高37.8%~43.0%,囊胚率提高30.7%~36.9% | [79]       |

IVF:体外受精;ICM:内细胞团;TE:滋养外胚层。



泡细胞的增殖、分化,促进卵丘细胞扩张和卵母细胞成熟,支持卵母细胞发育<sup>[16-18]</sup>。卵泡来源EV对早期胚胎发育也发挥积极作用。牛卵泡来源EV能够维持精子的活力,诱导精子获能和顶体反应,营造有利的受孕微环境<sup>[19]</sup>。此外,牛卵泡来源EV携带与DNA-蛋白质相互作用、核小体组装、表观遗传修饰、胚胎发育相关的mRNA和miRNA,能够调控胚胎中bta-miR-631等miRNA的含量及DNA甲基化和羟甲基化水平,调控代谢和发育相关基因的表达,使囊胚形成率提高约11.5%<sup>[20]</sup>。这些作用提示卵泡来源EV可能在排卵后和受精期间仍存在于输卵管中并对胚胎发生作用。近期研究发现,可发育至囊胚的卵母细胞的卵泡来源EV中miR-34c表达水平高于发育失败的卵母细胞,卵母细胞体外成熟过程中补充miR-34c类似物可增加胚胎细胞数并提高胚胎质量,提示卵泡来源EV中的miRNA能够调控卵母细胞质量进而影响胚胎发育潜能<sup>[21]</sup>。此外,Nepsha等<sup>[22]</sup>研究表明,年轻健康女性(24岁)的卵泡来源EV能够显著下调36岁以上高龄女性囊胚中凋亡相关基因BAX和TP53I3的表达,提示卵泡来源EV可能具有改善高龄女性囊胚质量的潜在作用。然而,该研究缺乏囊胚凋亡率等直接证据,未来须结合凋亡检测和发育潜能分析,进一步阐明卵泡来源EV的作用机制。

## 1.2 输卵管来源EV对受精和胚胎发育的调控作用

输卵管是受精和早期胚胎生长发育的关键场所,输卵管液作为输卵管与胚胎之间重要的通信媒介,在早期胚胎发育中起着至关重要的作用<sup>[23]</sup>。输卵管来源EV是该过程中的重要信使,能够调控胚胎发育所需的微环境。

**1.2.1 调节精子功能和受精过程** 输卵管来源EV可通过整合素介导的膜融合等机制向精子递送物质,调控精子功能<sup>[24]</sup>。Al-Dossary等<sup>[25]</sup>在小鼠中首次发现输卵管来源EV,其含有PMCA4并将该蛋白质运送至精子,有助于防止精子过早获能并在获能和顶体反应后维持精子钙稳态。Bathala等<sup>[26]</sup>对人输卵管来源EV的研究也获得上述发现,并鉴定出PMCA1——当PMCA4缺失时,输卵管来源EV中PMCA1会出现补偿性增加。此外,排卵后,猪输卵管来源EV中STX2和STXB1蛋白水平升高,参与调控精子顶体反应和受精<sup>[27]</sup>。值

得注意的是,猪输卵管来源EV还可以调控卵母细胞透明带的硬化从而有效减少IVF多精受精<sup>[28]</sup>。

**1.2.2 促进胚胎发育和提升胚胎质量** 大量研究表明,输卵管来源EV有利于胚胎发育。研究显示,牛输卵管来源EV可携带肌醇、乳酸、甘氨酸等代谢物,这些物质作为能量生成及蛋白质合成底物被胚胎吸收,改变胚胎磷脂组成,并在囊胚腔扩张前后表现出特定变化,为早期胚胎发育提供能量来源和生物合成的信号前体<sup>[29-30]</sup>。同时,牛输卵管来源EV能够调控胚胎转录组,上调SPINT2、PRDX2、NEAT1、PSMD4等有益胚胎发育基因的表达<sup>[31]</sup>,促进丙酮酸脱氢酶和谷氨酸脱氢酶表达,增加三羧酸循环中丙酮酸的通量,改善线粒体的功能,调节胚胎代谢,最终提高囊胚质量和发育<sup>[32]</sup>。猪输卵管来源EV则通过缓解胚胎内质网应激来减少细胞凋亡,促进多能性相关基因(POU5F1、SOX2、NANOG、KLF4和MYC)和植入相关基因(VIM、KRT8、TEAD4和CDX2)的表达,从而提高囊胚形成率、ICM/TE比值、附着和植入能力<sup>[33-34]</sup>。小鼠输卵管来源EV能够增加胚胎Bcl2(抗凋亡)和Pou5f1(多能性)基因表达,抑制Bax(促凋亡)基因表达,降低凋亡指数,提高ICM/TE比值、囊胚形成率和出生率<sup>[35]</sup>。兔输卵管来源EV能够降低胚胎活性氧和5-甲基胞嘧啶水平,抑制细胞凋亡,提高囊胚形成率和ICM/TE比值<sup>[36]</sup>。

输卵管来源EV中的miRNA对早期胚胎发育发挥重要作用。小鼠输卵管来源EV可向精子传递miR-34c-5p,而miR-34c-5p是受精卵的第一次卵裂所必需的<sup>[37]</sup>。牛输卵管来源EV中的miR-17-5p可促进胚胎向囊胚阶段发育<sup>[8]</sup>;miR-148b通过调控与细胞分化和增殖相关的基因转录来影响TGF- $\beta$ 信号通路,改善胚胎质量<sup>[38]</sup>。研究还表明,妊娠状态与非妊娠状态牛输卵管来源EV中miRNA表达谱存在显著差异,主要涉及PI3K/Akt、mTOR和MAPK等与细胞生长和增殖相关的信号通路,其中PI3K/Akt信号通路能够调节植入前胚胎卵裂球的增殖<sup>[39]</sup>。研究发现,人和牛输卵管来源EV中的miRNA均能靶向调控多种胚胎发育相关的基因和信号通路<sup>[7, 40]</sup>。

**1.2.3 改善冷冻胚胎存活和发育率** Lopera-Vásquez等<sup>[41-42]</sup>研究发现,牛输卵管来源EV可增加囊胚TE的细胞数和玻璃化冷冻后囊胚的存活率。输卵管来源EV对胚胎存活率和冷冻耐受性

的有益影响可能与其上调胚胎中膜运输相关基因 *AQP3* 的表达有关。*AQP3* 基因编码水通道蛋白 3, 参与水和冷冻保护剂在细胞膜上的快速运输, 从而促进冻融后的胚胎存活<sup>[42-43]</sup>。

**1.2.4 参与早期胚胎表观遗传调控** 研究表明, 体外培养的胚胎比体内发育的胚胎 DNA 甲基化水平更高<sup>[44-45]</sup>。值得注意的是, 在牛输卵管来源 EV 中检测到组蛋白甲基转移酶、组蛋白去甲基化酶及 DNA 甲基转移酶等多种表观遗传调控酶基因的转录本<sup>[40]</sup>。体外胚胎培养添加输卵管来源 EV 能够提高牛囊胚 *DNMT3A* (编码从头 DNA 甲基转移酶) 和 *SNRPN* (一种父系表达的印记基因) 表达, 降低兔胚胎 5-甲基胞嘧啶水平<sup>[36, 42, 46]</sup>, 提示输卵管来源 EV 在早期胚胎的染色质修饰和表观遗传调控过程中发挥重要作用。

上述研究表明, 输卵管来源 EV 直接与胚胎相互作用, 可调控胚胎发育相关关键基因的表达和 DNA 甲基化模式, 改善植入前胚胎发育, 提升胚胎质量。然而, 过量输卵管来源 EV 可能会通过增加铵离子水平对胚胎发育造成不利影响<sup>[35]</sup>。研究发现, 当铵离子浓度超过 300  $\mu\text{mol/L}$  时, 胚胎调节细胞内 pH 值的能力下降, ICM 发育显著受阻, 囊胚形成率降低<sup>[35, 47]</sup>, 表明适量输卵管来源 EV 对于维持植入前胚胎的正常发育至关重要。

### 1.3 子宫来源 EV 对胚胎发育和植入的调控作用

子宫腔液中富含多种胚胎发育所需的物质, 其中子宫来源 EV 是胚胎发育过程的重要参与者。子宫来源 EV 于 2008 年首次被发现并被证实能将精子黏附分子 1 转移到精子表面<sup>[48]</sup>, 参与诱导顶体反应、卵丘细胞基质中透明质酸的降解以及精子与透明带结合等过程<sup>[49]</sup>。研究显示, 绵羊子宫来源 EV 可将 enJSRV RNA 从子宫内膜上皮细胞转移至胚胎, 促进滋养层细胞增殖和分泌 IFNT<sup>[50-51]</sup>。IFNT 是反刍动物中关键的妊娠识别信号分子, 其主要功能包括维持黄体功能 (调控孕酮合成)、调节子宫内膜基因表达 (涉及胚胎营养运输) 等, 对于胚胎植入过程至关重要<sup>[52]</sup>。黄体早期子宫来源 EV 能够激活牛胚胎生长发育相关基因 (如 *IFNT* 和 *GRN*) 的表达, 抑制 *BAX* 和 *BIP* (粗面内质网应激标志物) 的表达, 降低凋亡指数, 提高囊胚形成率<sup>[53-54]</sup>。与输卵管来源 EV 相似, 小鼠子宫来源 EV 也能够上调 *Bcl2* 和 *Pou5f1*

等基因表达并下调 *Bax* 基因表达, 抑制细胞凋亡, 调节胚胎发育<sup>[55]</sup>。黄体中期子宫来源 EV 与黄体早期输卵管来源 EV 之间的 miRNA 表达谱存在差异, 可见两者对受体具有差异性调控, 以满足胚胎发育不断变化的需求<sup>[56]</sup>。Liu 等<sup>[57]</sup>研究发现, 子宫内膜来源 EV (可视作子宫来源 EV 的一种特殊类型) 通过携带 let-7 miRNA 抑制 Myc/mTORC1 和 mTORC2 信号通路, 引起小鼠胚胎可逆性滞育。同时, let-7 对胚胎的调控作用在人类中具有保守性<sup>[57]</sup>。这些发现阐明了子宫内膜来源 EV 在协调胚胎-子宫内膜对话中的关键作用, 为理解胚胎在不利环境下维持存活并选择最佳植入时机的分子机制提供了新见解。最新研究表明, 子宫内膜来源 EV 可调控人囊胚转录组, 即上调促胚胎发育及抗凋亡相关基因 (*CSF1R*、*GLRX*、*SEC24D*、*PDK1* 等) 表达, 下调胚胎发育负调控基因 (如 *S100A4*) 表达, 增强细胞多能性相关的 NANOG 网络和 ERK/MAPK 及 ID1 信号通路的活性, 抑制细胞应激相关的 ATM 和 Sirtuin 信号通路的活性<sup>[58]</sup>。这些调控作用显著提升了胚胎质量, 为解析胚胎-子宫内膜互作调控胚胎发育的分子机制提供了新的实验证据和理论依据。

此外, 子宫状态对 EV 的功能具有重要影响。研究人员通过人类 EV 和小鼠胚胎共培养发现, 与生育能力正常女性的子宫内膜来源 EV 比较, 反复植入失败患者的子宫内膜来源 EV 降低了小鼠囊胚形成率、胚胎细胞总数、孵出率和侵袭性<sup>[59]</sup>, 提示子宫内膜来源 EV 可能通过改变 miRNA 等成分影响胚胎发育潜能。Cai 等<sup>[60]</sup>研究发现, miR-218-5p 在反复植入失败患者的子宫内膜来源 EV 中显著上调, 在体外实验中能抑制 TE 和 ICM 发育必需转录因子基因 (*Cdx2*、*Yap1*、*Sox2*、*Nanog*、*Tead4*) 表达, 导致小鼠胚胎停滞于桑椹胚阶段, 降低囊胚形成率和孵出率。此外, 健康与患子宫内膜炎牛的子宫腔液外泌体中 miRNA 表达谱存在差异, 且患病牛子宫外泌体降低了 IVF 胚胎的囊胚形成率, 提示子宫炎症能影响外泌体成分 (如 miRNA), 干扰胚胎发育, 从而导致母体不孕<sup>[61]</sup>。以上证据表明, 子宫内膜状态影响子宫来源 EV 的成分和生物学功能, 进而调节胚胎发育过程。

### 1.4 胚胎来源 EV 对胚胎发育的调控作用

植入前胚胎发育的各阶段均会释放胚胎来



源EV<sup>[15, 62-64]</sup>。胚胎来源EV作为胚胎间通信的调控因子,能够穿越透明带被受体胚胎吸收,促进胚胎发育<sup>[15, 65-66]</sup>。研究发现,培养基中补充胚胎来源EV可提高牛囊胚形成率,减少细胞凋亡,提升囊胚质量<sup>[63, 65]</sup>。猪胚胎来源EV携带细胞多能性和增殖相关基因(如 *POU5F1*、*SOX2*、*KLF4*、*MYC* 和 *NANOG* 等)的转录本,摄取胚胎来源EV能够提高体细胞核移植胚胎的卵裂率和囊胚形成率<sup>[15]</sup>。在人胚胎来源EV中同样发现了多能性相关基因 *POU5F1*、*NANOG* 等转录本的存在<sup>[67]</sup>,提示这些分子可能参与介导EV对受体胚胎多能性的调控作用。此外,发育至囊胚阶段的牛胚胎来源EV含有高丰度的miR-378a-3p,其能够提高囊胚质量,调节孵出、促进胚胎植入<sup>[68]</sup>;而在未形成囊胚的胚胎及其分泌的EV中miR-146b含量增加,其能调节与胚胎发育和细胞凋亡有关的基因表达,导致胚胎质量下降<sup>[69]</sup>。以上研究提示,胚胎来源EV能介导胚胎间通信,为群体培养的协同效应提供分子机制解释。更重要的是,胚胎来源EV携带的特异性分子可作为评估胚胎质量和预测发育潜能的新的标志物。

此外,通过囊胚腔液的核酸测序和蛋白质组学分析,研究者发现了潜在的胚胎状态生物标志物,并提出囊胚腔液可能成为ART中揭示胚胎质量信息的重要来源<sup>[70-73]</sup>。已有研究报道人和小鼠囊胚腔液中均存在EV<sup>[64, 74]</sup>。Battaglia等<sup>[74]</sup>发现人囊胚腔液中存在89个miRNA参与调控胚胎发育的关键信号通路,如细胞多能性、细胞重编程、表观遗传修饰、细胞间通信、细胞黏附和细胞命运等,且80%已鉴定的miRNA在ExoCarta数据库中被描述为exo-miRNA(具有外泌体包装倾向的序列),提示胚胎来源EV还可能介导胚胎内的细胞间通信。

综上所述,不同组织、细胞来源的EV所介导的细胞间信号通信在协调早期胚胎发育(从受精卵到植入前囊胚)的复杂过程中发挥着关键作用。

## 2 体内与体外来源细胞外囊泡调控胚胎发育的差异

研究表明,与体内输卵管来源EV比较,体外培养的牛输卵管上皮细胞来源EV中参与关键生殖过程(包括精子-卵母细胞识别、受精及早期胚胎发育)的功能蛋白(如输卵管糖蛋白1)缺失或

明显减少<sup>[14]</sup>,这种差异可能源于体外培养的输卵管上皮细胞与其他生殖细胞(如卵泡细胞、子宫内膜细胞等)之间缺乏生理性旁分泌信号交流。而在生理状态下,输卵管上皮细胞在整个月经周期中持续受到激素微环境(如雌激素、孕酮等)的动态精密调控,并与周围细胞保持着复杂的细胞间通信网络<sup>[23, 27, 34]</sup>。提示在利用体外培养系统研究胚胎发育相关EV功能时,须谨慎考虑其与生理状态的差异,未来研究应着重于建立更接近体内微环境的培养系统,以提高EV研究的生理相关性。

Aguilera等<sup>[54]</sup>发现,与体内子宫来源EV共培养后牛胚胎的囊胚形成率和孵化率均高于子宫内膜上皮细胞体外培养来源EV。同时,两种子宫来源EV处理的胚胎表现出不同的基因表达模式:体外培养子宫来源EV共培养胚胎的多能性相关基因(*SOX2*、*NANOG*)表达上调,而凋亡相关基因(*BAX*)表达下调;体内子宫来源EV共培养胚胎*INFT*、*BAX*表达增加。这提示体外培养的子宫来源EV更倾向于支持胚胎存活,发挥保护作用(如维持多能性、抑制凋亡),而体内子宫来源EV由于受到母体免疫细胞、激素波动等复杂调控,可能参与更复杂的胚胎选择和母胎通信。这种差异凸显了微环境对EV生物活性的调控作用,并影响胚胎发育潜能。

此外,研究表明,体外培养牛胚胎相比体内牛胚胎能产生更高浓度的小EV,两者miRNA谱不同:体内胚胎来源EV富含针对Ras、MAPK、催产素代谢和甘油磷脂代谢等关键发育途径的miRNA,而体外培养胚胎来源EV的miRNA则主要富集于赖氨酸降解、HIF-1信号通路和Wnt信号通路等途径,可见胚胎在体外环境中所产生的细胞应激和适应性反应<sup>[75]</sup>。

上述结果表明,优化体外培养体系以模拟体内微环境至关重要,可将EV的生物学调控网络有效应用于ART,提升胚胎发育潜力。

## 3 细胞外囊泡应用于辅助生殖技术

### 3.1 EV应用于优化IVF培养基

ART是临床上治疗不孕不育的一项重要医疗辅助手段,包括人工授精和IVF-ET。虽然ART技术已相对成熟,但其成功率仍然有很大的上升空间。胚胎培养基是ART不可或缺的一部分,其

组成成分对早期胚胎的发育至关重要,优化胚胎培养基、提升胚胎质量是提高 ART 效率的关键。作为胚胎发育和母胎对话的关键信使,多种组织来源的 EV 已在 ART 的小鼠模型中被探索性地应用于胚胎培养基优化研究。人输卵管管腔液来源 EV 能够上调小鼠胚胎发育的相关基因,降低活性氧水平和凋亡细胞比例,囊胚形成率和孵出率分别提高约 11.9% 和 16.5%,总细胞数增加约 8.9 个<sup>[7]</sup>。生理条件下采集人输卵管标本的可能性不大,该研究的输卵管取自接受子宫切除术的子宫肌瘤患者,而这种病理状况是否会改变输卵管来源 EV 的特性还需进一步明确。从人经血中分离获得的子宫内膜间充质基质细胞所分泌的 EV 可增加小鼠囊胚总细胞数,提高孵出率,促进胚胎发育,并刺激胚胎释放血管内皮生长因子和血小板衍生生长因子 AA 等血管生成因子,调节子宫内膜血管生成、分化和组织重塑<sup>[76]</sup>。同时,人源子宫内膜间充质基质细胞分泌的 EV 还能调节抗氧化酶的表达并促进胚胎多能性活性,提高高龄小鼠的囊胚形成率,并增加囊胚总细胞数<sup>[77]</sup>。精浆 EV 能够提高囊胚形成率和 ICM/TE 比值,增加囊胚总细胞数,减少细胞凋亡,提示精浆 EV 具有提高 IVF 胚胎发育能力的潜力<sup>[78]</sup>。

血浆 EV 能够提高小鼠 IVF 受精率和各阶段胚胎(8 细胞、桑葚胚及囊胚)的形成率,表明在 IVF 培养基中添加血浆来源的 EV 也有利于胚胎发育<sup>[79]</sup>。上述研究均通过添加天然 EV 至 IVF 培养基改善体外胚胎发育。然而,天然 EV 存在产量低、靶向性差等局限性。因此,基于 EV 内活性分子的关键调控作用(表 2),开发工程化 EV 递送治疗性载体,有望精准补充体外配子/胚胎发育可能缺乏的重要分子或拮抗发育抑制性因子,从而提升 IVF 胚胎质量和发育潜能。最新的研究发现,反复植入失败患者子宫内膜 EV 中高水平的 miR-218-5p 会引发胚胎发育阻滞,通过工程化 EV 递送 miR-218-5p 抑制剂可显著改善这一状况,这为临床治疗反复植入失败相关的胚胎发育

表 2 细胞外囊泡(EV)内容物质对早期胚胎发育的影响  
Table 2 The role of extracellular vesicles (EVs) cargo on early embryo development

|       | 内容物质                                    | EV 来源  | 物 种  | 作 用                                      | 参考文献    |
|-------|-----------------------------------------|--------|------|------------------------------------------|---------|
| miRNA | miR-34c                                 | 卵泡     | 牛    | 调控卵母细胞成熟过程进而提高胚胎质量                       | [21]    |
|       | miR-34c-5p                              | 输卵管    | 小鼠   | 调控 <i>BCL2</i> 表达,第一次卵裂所必需               | [37]    |
|       | miR-17-5p                               | 输卵管    | 牛    | 促进胚胎向囊胚阶段的发育                             | [8]     |
|       | miR-148b                                | 输卵管    | 牛    | 调控 TGF- $\beta$ 信号通路,提高胚胎质量              | [38]    |
|       | miR-21                                  | 子宫     | 小鼠   | 抗凋亡,促进胚胎发育及植入                            | [55]    |
|       | miR-218-5p                              | 子宫     | 小鼠   | 调控胚胎发育必须转录因子表达,阻碍胚胎发育                    | [60]    |
|       | let-7                                   | 子宫     | 人、小鼠 | 抑制 Myc/mTORC1 和 mTORC2 信号通路,引起胚胎可逆性滞育    | [57]    |
|       | miR-378a-3p                             | 胚胎     | 牛    | 提高囊胚质量、调控孵出                              | [68]    |
|       | miR-146b                                | 胚胎     | 牛    | 阻碍胚胎发育、降低胚胎质量                            | [69]    |
|       | 编码组蛋白甲基转移酶、组蛋白去甲基化酶、DNA 甲基转移酶的 mRNA     | 输卵管    | 牛    | 调控早期胚胎的染色质修饰和表观遗传                        | [40]    |
| mRNA  | 编码 HSP70、IL-、干扰素调节因子和 enJSRV 包膜蛋白的 mRNA | 子宫     | 羊    | 与滋养层细胞的 Toll 样受体相互作用来刺激其增殖和分泌 $\tau$ 干扰素 | [50-51] |
|       | <i>POU5F1</i> 、 <i>NANOG</i>            | 胚胎     | 人、猪  | 细胞增殖和分化                                  | [15,67] |
|       | PMCA4                                   | 输卵管、子宫 | 人、小鼠 | 钙离子泵,防止精子过早获能、维持精子钙稳态                    | [25-26] |
|       | SPAM1                                   | 输卵管、子宫 | 小鼠   | 调控精子获能和顶体反应、卵丘细胞基质中透明质酸的降解以及精子与透明带结合     | [26,48] |
|       | STX2、STXB1                              | 输卵管    | 猪    | 调控精子顶体反应和受精                              | [27]    |
|       | MYH9、OVGP1                              | 输卵管    | 牛、猪  | 改变透明带的结构避免多精受精                           | [14,28] |

miRNA、miR:微 RNA;BCL:B 细胞淋巴瘤蛋白;TGF:转化生长因子;mTORC:哺乳动物雷帕霉素靶蛋白复合物;mRNA:信使 RNA;HSP:热休克蛋白;enJSRV:内源性绵羊肺腺瘤逆转录病毒;POU5F:POU5 类同源框;PMCA:质膜钙转运 ATP 酶;SPAM:精子黏附分子;STX:突触融合蛋白;STXB:STX 结合蛋白;MYH:肌球蛋白重链;OVGP:输卵管糖蛋白。

障碍提供了潜在的新型纳米治疗策略<sup>[60]</sup>。

### 3.2 EV应用于胚胎质量评估和植入预测

在IVF周期中,形态学评估是目前评估胚胎质量和发育潜力最常用的方法。然而,许多发育良好、形态正常的囊胚仍存在染色体异常或无法植入的问题<sup>[80]</sup>。胚胎植入前遗传学检测虽已被广泛应用,但活检的长期生物安全性仍被视为一个考虑的重要因素<sup>[81]</sup>。研究表明,胚胎培养基中凋亡小体与纳米囊泡之间DNA含量差异极小,提示胚胎来源EV中存在非选择性DNA包装<sup>[64]</sup>。无论是高质量胚胎还是停育胚胎,其释放的EV均含有基因组DNA片段,且与胚胎凋亡率无关<sup>[64, 82]</sup>。值得注意的是,胚胎来源EV中的DNA比游离DNA显示出更高的胚胎基因组DNA代表性<sup>[64]</sup>。这些发现表明,胚胎来源EV可成为无创胚胎植入前遗传学检测的可靠样本来源。未来研究须进一步验证胚胎来源EV中DNA序列的包装特征,以确保其准确性及其与传统诊断方法的一致性。最近的研究表明,人非整倍体胚胎与整倍体胚胎分泌的EV具有不同的转录谱,其中*PPM1J*、*LINC00561*、*ANKRD34C*和*TMED10*已被鉴定为具有胚胎倍性诊断潜力的特征性转录标志物,有望推动开发基于胚胎来源EV的全新无创胚胎植入前非整倍体遗传学检测方法<sup>[83]</sup>。此外,胚胎来源EV浓度和携带物质的特征能够作为评估胚胎质量的潜在生物标志。研究表明,植入失败的人IVF胚胎比成功植入的胚胎分泌了更多的EV<sup>[84]</sup>,且通过使用流式细胞术测定DNA阳性EV数增多<sup>[85]</sup>。以上结果与在牛退化胚胎产生更多EV的发现相似<sup>[86]</sup>,其可能是由于胚胎中细胞损伤、凋亡或程序性死亡促进了EV和DNA的释放<sup>[85, 87]</sup>。HLA-G通过控制滋养层细胞侵袭和维持局部免疫抑制状态在胚胎植入中发挥关键作用<sup>[88]</sup>。人胚胎来源EV携带大量HLA-G<sup>[67]</sup>,可溶性HLA-G也被证明在妊娠结局中起预测作用<sup>[89]</sup>,提示量化胚胎来源EV中的可溶性HLA-G可能可以作为胚胎发育能力的预测指标。此外,关于胚胎来源EV大小与胚胎质量和植入的相关性研究结果目前尚存在分歧。部分研究表明人高质量或成功植入的胚胎倾向于分泌较小EV,而另一些研究则相反<sup>[84, 90]</sup>,因此EV大小作为胚胎质量标志物仍需进一步验证。

胚胎分泌的miRNA已被证实对胚胎发育、整

倍性、植入及妊娠结局具有重要的预测价值。研究发现,miR-191在人非整倍体胚胎培养基中的丰度高于整倍体<sup>[91]</sup>。妊娠与未妊娠的胚胎培养基中释放的miRNA表达谱存在差异<sup>[84]</sup>。与成功植入的整倍体囊胚比较,植入失败的整倍体囊胚培养基中miR-372-3p、miR-373-3p和miR-518a-3p水平较高<sup>[92]</sup>,而miR-20a和miR-30c水平较低<sup>[93]</sup>。miR-191、miR-645和miR-372在未妊娠的胚胎培养基中的含量高于活产胚胎<sup>[91]</sup>。总的来说,miR-372、miR-191等miRNA是评估胚胎发育能力极具潜力的候选标志物<sup>[94]</sup>。另外,细胞外miRNA可以封装于EV中<sup>[94]</sup>,有望应用于胚胎质量评估和植入能力预测。

近年来,血浆/血清来源的EV及其包含的miRNA也被证明对胚胎植入具有诊断价值。在妊娠丢失的患者中,血浆EV标志物CD9水平从怀孕前到妊娠第6周显著升高<sup>[95]</sup>。植入失败与临床妊娠的患者之间血浆和血浆外泌体的miRNA表达谱存在差异,两者均存在差异的miRNA靶基因富集于胚胎植入相关通路<sup>[96]</sup>。反复植入失败患者血清外泌体中has-miR-145和hsa-miR-23b丰度在内膜增生期和分泌期均显著下降,提示这些miRNA可作为反复植入失败患者早期诊断的潜在生物标志物<sup>[97]</sup>。最近研究发现,子宫内膜异位症患者血清EV中的miRNA表达谱不仅与其病理特征密切相关,还可作为预测ART妊娠结局的新的无创生物标志物<sup>[98]</sup>。

上述证据表明,EV检测有望成为胚胎质量和发育能力的无创预测工具,但目前在临床应用中尚未确立统一、经过广泛验证的金标准标志物。

### 3.3 EV应用于评估ART最佳时机

人工授精和IVF-ET的成功都依赖于子宫腔内的正常胚胎发育,因此宫内环境对胚胎生长的影响不容忽视。子宫内膜容受性的评估包括子宫内膜的组织学检查、经阴道超声检查(测量子宫内膜厚度、体积和外观)以及子宫内膜活检样本的基因表达分析,但这些方法较为主观或具有侵入性。不同的子宫内膜状态会显著影响子宫来源EV的内含物质组成<sup>[59, 61]</sup>,因此子宫来源EV的内含物质可以指示子宫内膜是否为胚胎着床做好准备。例如,EV相关hsa-miR-30d是子宫液中植入窗口期间相对于月经周期其他阶段表达差异最大的miRNA,具有作为生物标志物的潜



力<sup>[99]</sup>。最近的研究表明,子宫液中EV的转录组反映了子宫内膜组织的RNA谱以及非接受期和接受期之间的变化<sup>[100]</sup>。因此,通过采集子宫液分析子宫来源EV中的特定分子组成,有望成为一种微创的方法以辅助评估子宫内膜容受性,从而为确定ART(如胚胎移植)的最佳时机提供参考依据。

#### 4 结 语

EV的特征、在生殖微环境中的作用及其对早期胚胎发育的影响已在多种哺乳动物中得到广泛研究,但多为体外实验和动物模型。体外研究难以再现动态而复杂的人类生殖环境,因此我们对EV所携带特定成分,特别是在蛋白质组学和代谢组学特征方面的认识仍较为有限。尽管已有充分证据表明EV可以充当细胞间通信载体并在早期胚胎发育中发挥重要作用,但其作用机制(如特定分子如何被靶细胞识别、摄取及发挥功能)尚未明确。此外,尽管EV研究领域取得了显著进展,但在将其研究成果转化应用于临床生殖医学之前,仍面临诸多技术和方法学的挑战:首先,从复杂的生殖体液中高效、高纯度地分离特定亚型的EV仍存在困难;其次,EV样本的采集、处理、储存流程亟需建立严格、统一的标准操作规范以保证结果的可重复性和可比性;第三,EV及其内含物质的分析技术(如高通量测序、质谱、高分辨率成像)的灵敏度、特异性和通量仍需进一步提升。

未来的研究方向应重点关注以下方面:①机制深度解析:利用类器官、共培养等更接近生理的系统,深入探究不同来源EV(特别是人类来源)及其关键效应分子(如特定miRNA、蛋白质)调控胚胎发育、子宫内膜容受性的精确分子机制和信号网络;②转化应用探索:评估将特定来源或工程化修饰的EV作为新型“胚胎培养添加物”的安全性和有效性,探索其在优化胚胎培养基、提高胚胎质量、克服发育阻滞、提升ART成功率方面的潜力;③诊断标志物开发及验证:基于大规模、多中心临床队列研究,利用高通量组学技术和生物信息学分析,系统筛选并严格验证来源于胚胎培养液、子宫液或母体血液的EV及其携带分子(如miRNA、DNA甲基化标志物、蛋白质)作为评估胚胎质量、预测植入结局及分析子宫内

膜容受性的无创或微创生物标志物,并建立标准化的检测流程和评价体系;④深入探究不同病理状态(如子宫内膜异位症、多囊卵巢综合征、复发性流产)下生殖道来源EV的改变及其对胚胎发育的影响,将为理解相关不孕不育症的发病机制和开发新的诊疗策略提供重要线索。

本文附加文件见电子版。

**志谢** 本研究得到浙江省“尖兵”“领雁”研发攻关计划(2023C03034)支持

**Acknowledgements** This study was supported by “Pioneer” and “Leading Goose” R&D Program of Zhejiang (2023C03034)

**作者贡献** 王海潮、李晓璇、蓝红燕和童晓媚参与论文选题和设计或参与资料获取、分析或解释,起草研究论文或修改重要智力性内容。所有作者均已阅读并认可最终稿件,并对数据的完整性和安全性负责。具体见电子版

**Author Contributions** WANG Haichao, LI Xiaoxuan, LAN Hongyan and TONG Xiaomei participated in brewing and designing experiments, or acquisition, analysis, or interpretation of data for the work; drafting the work, or revising it critically for important intellectual content. All authors have read and approved the final manuscript, and take responsibility for the integrity and security of the data. See the electronic version for details

**数据可用性** 本研究未生成任何新数据集,所有分析数据均已公开,并已在文中明确标引

**Data Availability** This study did not generate any new datasets, all data analyzed are publicly available, and have been properly cited

**医学伦理** 本研究不涉及人体或动物实验

**Ethical Approval** This study does not contain any studies with human participants or animals performed by any of the author

**利益冲突** 所有作者均声明不存在利益冲突

**Conflict of Interests** The authors declare that there is no conflict of interests

©The author(s) XXXX. This is an open access article under the CC BY-NC-ND 4.0 license (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>)

## 参考文献(References)

- [1] MACHTINGER R, LAURENT L C, BACCARELLI A A. Extracellular vesicles: roles in gamete maturation, fertilization and embryo implantation[J]. **Hum Reprod Update**, 2016, 22(2): 182-193.
- [2] THÉRY C, OSTROWSKI M, SEGURA E. Membrane vesicles as conveyors of immune responses[J]. **Nat Rev Immunol**, 2009, 9(8): 581-593.
- [3] MATHIEU M, MARTIN-JAULAR L, LAVIEU G, et al. Specificities of secretion and uptake of exosomes and other extracellular vesicles for cell-to-cell communication[J]. **Nat Cell Biol**, 2019, 21(1): 9-17.
- [4] VAN NIEL G, D'ANGELO G, RAPOSO G. Shedding light on the cell biology of extracellular vesicles[J]. **Nat Rev Mol Cell Biol**, 2018, 19(4): 213-228.
- [5] GURUNATHAN S, KANG M H, SONG H, et al. The role of extracellular vesicles in animal reproduction and diseases[J]. **J Anim Sci Biotechnol**, 2022, 13(1): 62.
- [6] MACHTINGER R, RODOSTHENOUS R S, ADIR M, et al. Extracellular microRNAs in follicular fluid and their potential association with oocyte fertilization and embryo quality: an exploratory study[J]. **J Assist Reprod Genet**, 2017, 34(4): 525-533.
- [7] LI Y, LIU C, GUO N, et al. Extracellular vesicles from human Fallopian tubal fluid benefit embryo development *in vitro*[J]. **Hum Reprod Open**, 2023, 2023(2): hoad006.
- [8] AOKI S, INOUE Y, SHINOZAWA A, et al. miR-17-5p in bovine oviductal fluid affects embryo development [J]. **Mol Cell Endocrinol**, 2022, 551: 111651.
- [9] GUZEWSKA M M, MYSZCZYNSKI K, HEIFETZ Y, et al. Embryonic signals mediate extracellular vesicle biogenesis and trafficking at the embryo-maternal interface[J]. **Cell Commun Signal**, 2023, 21(1): 210.
- [10] SÁNCHEZ G B, BUNN K E, PUA H H, et al. Extracellular vesicles: mediators of intercellular communication in tissue injury and disease[J]. **Cell Commun Signal**, 2021, 19(1): 104.
- [11] FISHEL S. First *in vitro* fertilization baby-this is how it happened[J]. **Fertil Steril**, 2018, 110(1): 5-11.
- [12] FADDY M J, GOSDEN M D, GOSDEN R G. A demographic projection of the contribution of assisted reproductive technologies to world population growth[J]. **Reprod BioMedicine Online**, 2018, 36(4): 455-458.
- [13] NG Y H, ROME S, JALABERT A, et al. Endometrial exosomes/microvesicles in the uterine microenvironment: a new paradigm for embryo-endometrial cross talk at implantation[J/OL]. **PLoS One**, 2013, 8(3): e58502.
- [14] ALMIÑANA C, CORBIN E, TSIKIS G, et al. Oviduct extracellular vesicles protein content and their role during oviduct-embryo cross-talk[J]. **Reproduction**, 2017, 154(3): 153-168.
- [15] SAADELDIN I M, KIM S J, CHOI Y B, et al. Improvement of cloned embryos development by co-culturing with parthenotes: a possible role of exosomes/microvesicles for embryos paracrine communication[J]. **Cell Reprogram**, 2014, 16(3): 223-234.
- [16] SANTONOCITO M, VENTO M, GUGLIELMINO M R, et al. Molecular characterization of exosomes and their microRNA cargo in human follicular fluid: bioinformatic analysis reveals that exosomal microRNAs control pathways involved in follicular maturation[J]. **Fertil Steril**, 2014, 102(6): 1751-1761.e1.
- [17] DA SILVEIRA J C, VEERAMACHANENI D N, WINGER Q A, et al. Cell-secreted vesicles in equine ovarian follicular fluid contain miRNAs and proteins: a possible new form of cell communication within the ovarian follicle[J]. **Biol Reprod**, 2012, 86(3): 71.
- [18] PAN B, TOMS D, SHEN W, et al. microRNA-378 regulates oocyte maturation *via* the suppression of aromatase in porcine cumulus cells[J/OL]. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, 2015, 308(6): E525-E534.
- [19] HASAN M M, RESHI Q U A, LÄTTEKIVI F, et al. Bovine follicular fluid derived extracellular vesicles modulate the viability, capacitation and acrosome reaction of bull spermatozoa[J]. **Biology**, 2021, 10(11): 1154.
- [20] DA SILVEIRA J C, ANDRADE G M, DEL COLLADO M, et al. Supplementation with small-extracellular vesicles from ovarian follicular fluid during *in vitro* production modulates bovine embryo development[J/OL]. **PLoS One**, 2017, 12(6): e0179451.
- [21] BENEDETTI C, PAVANI K C, GANSEMANS Y, et al. From follicle to blastocyst: microrna-34c from follicular fluid-derived extracellular vesicles modulates blastocyst quality[J]. **J Anim Sci Biotechnol**, 2024, 15(1): 104.
- [22] NEPSHA O S, BURMENSKEYA O V, AKHMEDOVA Z F, et al. Changes in the transcription of proliferation- and apoptosis-related genes in embryos in women of different ages under the influence of extracellular vesicles from donor follicular fluid *in vitro*[J]. **Bull Exp Biol Med**, 2024, 176(5): 658-665.
- [23] COY P, GARCÍA-VÁZQUEZ F A, VISCONTI P E, et al. Roles of the oviduct in mammalian fertilization[J]. **Reproduction**, 2012, 144(6): 649-660.
- [24] AL-DOSSARY A A, BATHALA P, CAPLAN J L, et al. Oviductosome-sperm membrane interaction in cargo delivery: detection of fusion and underlying molecular players using three-dimensional super-resolution structured illumination microscopy (sr-sim)[J]. **J Biol Chem**, 2015, 290(29): 17710-17723.
- [25] AL-DOSSARY A A, STREHLER E E, MARTIN-DELEON P A. Expression and secretion of plasma membrane  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase 4a (PMCA4a) during murine estrus: association with oviductal exosomes and uptake in sperm[J/OL]. **PLoS One**, 2013, 8(11): e80181.
- [26] BATHALA P, FERESHTEH Z, LI K, et al. Oviductal extracellular vesicles (oviductosomes, OVS) are con-

- served in humans: murine OVS play a pivotal role in sperm capacitation and fertility[J]. **Mol Hum Reprod**, 2018, 24(3): 143-157.
- [27] LAEZER I, PALMA-VERA S E, LIU F, et al. Dynamic profile of EVs in porcine oviductal fluid during the periovulatory period[J]. **Reproduction**, 2020, 159(4): 371-382.
- [28] ALCÂNTARA-NETO A S, FERNANDEZ-RUFETE M, CORBIN E, et al. Oviduct fluid extracellular vesicles regulate polyspermy during porcine *in vitro* fertilisation[J]. **Reprod Fertil Dev**, 2020, 32(4): 409-418.
- [29] GATIEN J, MERMILLOD P, TSIKIS G, et al. Metabolic profile of oviductal extracellular vesicles across the estrous cycle in cattle[J]. **Int J Mol Sci**, 2019, 20(24): 6339.
- [30] BANLIAT C, LE BOURHIS D, BERNARDI O, et al. Oviduct fluid extracellular vesicles change the phospholipid composition of bovine embryos developed *in vitro* [J]. **Int J Mol Sci**, 2020, 21(15): 5326.
- [31] BAUERSACHS S, MERMILLOD P, ALMIÑANA C. The oviductal extracellular vesicles' RNA cargo regulates the bovine embryonic transcriptome[J]. **Int J Mol Sci**, 2020, 21(4): 1303.
- [32] SIDRAT T, KHAN A A, JOO M D, et al. Bovine oviduct epithelial cell-derived culture media and exosomes improve mitochondrial health by restoring metabolic flux during pre-implantation development[J]. **Int J Mol Sci**, 2020, 21(20): 7589.
- [33] FU B, MA H, ZHANG D J, et al. Porcine oviductal extracellular vesicles facilitate early embryonic development via relief of endoplasmic reticulum stress[J]. **Cell Biol Int**, 2022, 46(2): 300-310.
- [34] FANG X, TANGA B M, BANG S, et al. Oviduct epithelial cell-derived extracellular vesicles improve porcine trophoblast outgrowth[J]. **Vet Sci**, 2022, 9(11): 609.
- [35] QU P, ZHAO Y, WANG R, et al. Extracellular vesicles derived from donor oviduct fluid improved birth rates after embryo transfer in mice[J]. **Reprod Fertil Dev**, 2019, 31(2): 324-332.
- [36] QU P, LUO S, DU Y, et al. Extracellular vesicles and melatonin benefit embryonic develop by regulating reactive oxygen species and 5-methylcytosine[J/OL]. **J Pineal Res**, 2020, 68(3): e12635.
- [37] FERESHTEH Z, SCHMIDT S A, AL-DOSSARY A A, et al. Murine oviductosomes (OVS) microRNA profiling during the estrous cycle: delivery of OVS-borne microRNAs to sperm where miR-34c-5p localizes at the centrosome[J]. **Sci Rep**, 2018, 8: 16094.
- [38] CAÑÓN-BELTRÁN K, CAJAS Y N, ALMPANIS V, et al. microRNA-148b secreted by bovine oviductal extracellular vesicles enhance embryo quality through BPM/TGF-beta pathway[J]. **Biol Res**, 2024, 57(1): 11.
- [39] MAZZARELLA R, BASTOS N M, BRIDI A, et al. Changes in oviductal cells and small extracellular vesicles miRNAs in pregnant cows[J]. **Front Vet Sci**, 2021, 8: 639752.
- [40] ALMIÑANA C, TSIKIS G, LABAS V, et al. Deciphering the oviductal extracellular vesicles content across the estrous cycle: implications for the gametes-oviduct interactions and the environment of the potential embryo [J]. **BMC Genomics**, 2018, 19(1): 622.
- [41] LOPERA-VÁSQUEZ R, HAMDI M, FERNANDEZ-FUERTE B, et al. Extracellular vesicles from BOEC in *in vitro* embryo development and quality[J/OL]. **PLoS One**, 2016, 11(2): e0148083.
- [42] LOPERA-VÁSQUEZ R, HAMDI M, MAILLO V, et al. Effect of bovine oviductal extracellular vesicles on embryo development and quality *in vitro*[J]. **Reproduction**, 2017, 153(4): 461-470.
- [43] LOPERA-VÁSQUEZ R, HAMDI M, MAILLO V, et al. Effect of bovine oviductal fluid on development and quality of bovine embryos produced *in vitro*[J]. **Reprod Fertil Dev**, 2017, 29(3): 621-629.
- [44] DESHMUKH R S, ØSTRUP O, ØSTRUP E, et al. DNA methylation in porcine preimplantation embryos developed *in vivo* and produced by *in vitro* fertilization, parthenogenetic activation and somatic cell nuclear transfer[J]. **Epigenetics**, 2011, 6(2): 177-187.
- [45] WRIGHT K, BROWN L, BROWN G, et al. Microarray assessment of methylation in individual mouse blastocyst stage embryos shows that *in vitro* culture may have widespread genomic effects[J]. **Hum Reprod**, 2011, 26(9): 2576-2585.
- [46] LUCIFERO D, SUZUKI J, BORDIGNON V, et al. Bovine SNRPN methylation imprint in oocytes and day 17 *in vitro*-produced and somatic cell nuclear transfer embryos[J]. **Biol Reprod**, 2006, 75(4): 531-538.
- [47] LANE M, GARDNER D K. Ammonium induces aberrant blastocyst differentiation, metabolism, pH regulation, gene expression and subsequently alters fetal development in the mouse[J]. **Biol Reprod**, 2003, 69(4): 1109-1117.
- [48] GRIFFITHS G S, GALILEO D S, REESE K, et al. Investigating the role of murine epididymosomes and uterosomes in GPI-linked protein transfer to sperm using SPAM1 as a model[J]. **Mol Reprod Dev**, 2008, 75(11): 1627-1636.
- [49] GRIFFITHS G S, MILLER K A, GALILEO D S, et al. Murine SPAM1 is secreted by the estrous uterus and oviduct in a form that can bind to sperm during capacitation: acquisition enhances hyaluronic acid-binding ability and cumulus dispersal efficiency[J]. **Reproduction**, 2008, 135(3): 293-301.
- [50] BURNS G, BROOKS K, WILDUNG M, et al. Extracellular vesicles in luminal fluid of the ovine uterus[J/OL]. **PLoS One**, 2014, 9(3): e90913.
- [51] RUIZ-GONZÁLEZ I, XU J, WANG X, et al. Exosomes, endogenous retroviruses and toll-like receptors: pregnancy recognition in ewes[J]. **Reproduction**, 2015, 149(3): 281-291.



- [52] BAZER F W, YING W, WANG X, et al. The many faces of interferon tau[J]. **Amino Acids**, 2015, 47(3): 449-460.
- [53] QIAO F, GE H, MA X, et al. Bovine uterus-derived exosomes improve developmental competence of somatic cell nuclear transfer embryos[J]. **Theriogenology**, 2018, 114: 199-205.
- [54] AGUILERA C, WONG Y S, GUTIERREZ-REINOSO M A, et al. Embryo-maternal communication mediated by extracellular vesicles in the early stages of embryonic development is modified by *in vitro* conditions[J]. **Theriogenology**, 2024, 214: 43-56.
- [55] LV C, YU W X, WANG Y, et al. *MiR-21* in extracellular vesicles contributes to the growth of fertilized eggs and embryo development in mice[J]. **Biosci Rep**, 2018, 38(4): BSR20180036.
- [56] MAZZARELLA R, CAÑÓN-BELTRÁN K, CAJAS Y N, et al. Extracellular vesicles-coupled miRNAs from oviduct and uterus modulate signaling pathways related to lipid metabolism and bovine early embryo development[J]. **J Anim Sci Biotechnol**, 2024, 15(1): 51.
- [57] LIU W M, CHENG R R, NIU Z R, et al. Let-7 derived from endometrial extracellular vesicles is an important inducer of embryonic diapause in mice[J]. **Sci Adv**, 2020, 6(37): eaaz7070.
- [58] SEGURA-BENÍTEZ M, CARBAJO-GARCÍA M C, QUIÑONERO A, et al. Endometrial extracellular vesicles regulate processes related to embryo development and implantation in human blastocysts[J]. **Hum Reprod**, 2025, 40(1): 56-68.
- [59] LIU C, YAO W, YAO J, et al. Endometrial extracellular vesicles from women with recurrent implantation failure attenuate the growth and invasion of embryos[J]. **Fertil Steril**, 2020, 114(2): 416-425.
- [60] CAI L, LV M, WEI J, et al. MiR-218-5p from extracellular vesicles of endometrium in patients with recurrent implantation failure impairs pre-implantation embryo development[J]. **Int J Nanomedicine**, 2025, 20: 5661-5679.
- [61] WANG X, TIAN F, CHEN C, et al. Exosome-derived uterine microRNAs isolated from cows with endometritis impede blastocyst development[J]. **Reprod Biol**, 2019, 19(2): 204-209.
- [62] VYAS P, BALAKIER H, LIBRACH C L. Ultrastructural identification of CD9 positive extracellular vesicles released from human embryos and transported through the zona *Pellucida*[J]. **Syst Biol Reprod Med**, 2019, 65(4): 273-280.
- [63] QU P, QING S, LIU R, et al. Effects of embryo-derived exosomes on the development of bovine cloned embryos [J/OL]. **PLoS One**, 2017, 12(3): e0174535.
- [64] SIMON B, BOLUMAR D, AMADOZ A, et al. Identification and characterization of extracellular vesicles and its DNA cargo secreted during murine embryo development[J]. **Genes**, 2020, 11(2): 203.
- [65] PAVANI K C, HENDRIX A, VAN DEN BROECK W, et al. Isolation and characterization of functionally active extracellular vesicles from culture medium conditioned by bovine embryos *in vitro*[J]. **Int J Mol Sci**, 2018, 20(1): 38.
- [66] KIM J, LEE J, LEE T B, et al. Embryotrophic effects of extracellular vesicles derived from outgrowth embryos in pre- and peri-implantation embryonic development in mice[J]. **Mol Reprod Dev**, 2019, 86(2): 187-196.
- [67] GIACOMINI E, VAGO R, SANCHEZ A M, et al. Secretome of *in vitro* cultured human embryos contains extracellular vesicles that are uptaken by the maternal side[J]. **Sci Rep**, 2017, 7(1): 5210.
- [68] PAVANI K C, MEESE T, PASCOTTINI O B, et al. Hatching is modulated by microRNA-378a-3p derived from extracellular vesicles secreted by blastocysts [J/OL]. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 2022, 119(12): e2122708119.
- [69] PAVANI K C, GUAN X, CHUNDURU J, et al. microRNA-146b negatively affects bovine embryo development and quality[J]. **Reproduction**, 2023: REP-23-0155.
- [70] TEDESCHI G, ALBANI E, BORRONI E M, et al. Proteomic profile of maternal-aged blastocoel fluid suggests a novel role for ubiquitin system in blastocyst quality [J]. **J Assist Reprod Genet**, 2017, 34(2): 225-238.
- [71] JENSEN P L, BECK H C, PETERSEN J, et al. Proteomic analysis of human blastocoel fluid and blastocyst cells[J]. **Stem Cells Dev**, 2013, 22(7): 1126-1135.
- [72] KAVOUSSI S K, CHEN S H, WININGER J D, et al. The expression of pregnancy-associated plasma protein-A (PAPP-A) in human blastocoel fluid-conditioned media: a proof of concept study[J]. **J Assist Reprod Genet**, 2022, 39(2): 389-394.
- [73] POLI M, ORI A, CHILD T, et al. Characterization and quantification of proteins secreted by single human embryos prior to implantation[J]. **EMBO Mol Med**, 2015, 7(11): 1465-1479.
- [74] BATTAGLIA R, PALINI S, VENTO M E, et al. Identification of extracellular vesicles and characterization of miRNA expression profiles in human blastocoel fluid [J]. **Sci Rep**, 2019, 9(1): 84.
- [75] BRIDI A, ANDRADE G M, DEL COLLADO M, et al. Small extracellular vesicles derived from *in vivo*-or *in vitro*-produced bovine blastocysts have different miRNAs profiles-Implications for embryo-maternal recognition [J]. **Mol Reprod Dev**, 2021, 88(9): 628-643.
- [76] BLÁZQUEZ R, SÁNCHEZ-MARGALLO F M, ÁLVAREZ V, et al. Murine embryos exposed to human endometrial MSCs-derived extracellular vesicles exhibit higher VEGF/PDGF AA release, increased blastomere count and hatching rates[J/OL]. **PLoS One**, 2018, 13(4): e0196080.
- [77] MARINARO F, MACÍAS-GARCÍA B, SÁNCHEZ-MARGALLO F M, et al. Extracellular vesicles derived from endometrial human mesenchymal stem cells

- enhance embryo yield and quality in an aged murine model[J]. **Biol Reprod**, 2019, 100(5): 1180-1192.
- [78] MA Y, WANG J, QIAO F, et al. Extracellular vesicles from seminal plasma improved development of *in vitro*-fertilized mouse embryos[J]. **Zygote**, 2022, 30(5): 619-624.
- [79] JAVADI M, GHOLAMI FARASHAH M S, ROSHANGAR L, et al. Plasma-derived extracellular vesicles improve mice embryo development[J]. **Mol Biol Rep**, 2024, 51(1): 621.
- [80] FRAGOULI E, ALFARAWATI S, DAPHNIS D D, et al. Cytogenetic analysis of human blastocysts with the use of FISH, CGH and aCGH: scientific data and technical evaluation[J]. **Hum Reprod**, 2011, 26(2): 480-490.
- [81] GIACOMINI E, MAKIEVA S, MURDICA V, et al. Extracellular vesicles as a potential diagnostic tool in assisted reproduction[J]. **Curr Opin Obstet Gynecol**, 2020, 32(3): 179-184.
- [82] CAAMAÑO D, CABEZAS J, AGUILERA C, et al. DNA content in embryonic extracellular vesicles is independent of the apoptotic rate in bovine embryos produced *in vitro*[J]. **Animals**, 2024, 14(7): 1041.
- [83] MAKIEVA S, GIACOMINI E, SCOTTI G M, et al. Extracellular vesicles secreted by human aneuploid embryos present a distinct transcriptomic profile and upregulate MUC1 transcription in decidualised endometrial stromal cells[J]. **Hum Reprod Open**, 2024, 2024(2): hoae014.
- [84] ABU-HALIMA M, HÄUSLER S, BACKES C, et al. Micro-ribonucleic acids and extracellular vesicles repertoire in the spent culture media is altered in women undergoing *in vitro* Fertilization[J]. **Sci Rep**, 2017, 7(1): 13525.
- [85] PALLINGER E, BOGNAR Z, BODIS J, et al. A simple and rapid flow cytometry-based assay to identify a competent embryo prior to embryo transfer[J]. **Sci Rep**, 2017, 7: 39927.
- [86] DISSANAYAKE K, NÖMM M, LÄTTEKIVI F, et al. Individually cultured bovine embryos produce extracellular vesicles that have the potential to be used as non-invasive embryo quality markers[J]. **Theriogenology**, 2020, 149: 104-116.
- [87] MELLISHO E A, VELÁSQUEZ A E, NUÑEZ M J, et al. Identification and characteristics of extracellular vesicles from bovine blastocysts produced *in vitro*[J/OL]. **PLoS One**, 2017, 12(5): e0178306.
- [88] RIZZO R, MELCHIORRI L, STIGNANI M, et al. HLA-G expression is a fundamental prerequisite to pregnancy[J]. **Hum Immunol**, 2007, 68(4): 244-250.
- [89] SHER G, KESKINTEPE L, NOURIANI M, et al. Expression of sHLA-G in supernatants of individually cultured 46-h embryos: a potentially valuable indicator of 'embryo competency' and IVF outcome[J]. **Reprod Biomed Online**, 2004, 9(1): 74-78.
- [90] VERAGUAS D, AGUILERA C, HENRIQUEZ C, et al. Evaluation of extracellular vesicles and gDNA from culture medium as a possible indicator of developmental competence in human embryos[J]. **Zygote**, 2021, 29(2): 138-149.
- [91] ROSENBLUTH E M, SHELTON D N, WELLS L M, et al. Human embryos secrete microRNAs into culture media: a potential biomarker for implantation[J]. **Fertil Steril**, 2014, 101(5): 1493-1500.
- [92] CIMADOMO D, RIENZI L, GIANCANI A, et al. Definition and validation of a custom protocol to detect miRNAs in the spent media after blastocyst culture: searching for biomarkers of implantation[J]. **Hum Reprod**, 2019, 34(9): 1746-1761.
- [93] CAPALBO A, UBALDI F M, CIMADOMO D, et al. microRNAs in spent blastocyst culture medium are derived from trophoctoderm cells and can be explored for human embryo reproductive competence assessment [J]. **Fertil Steril**, 2016, 105(1): 225-235.e1-3.
- [94] HAWKE D C, WATSON A J, BETTS D H. Extracellular vesicles, microRNA and the preimplantation embryo: non-invasive clues of embryo well-being[J]. **Reprod Biomed Online**, 2021, 42(1): 39-54.
- [95] RAJARATNAM N, DITLEVSEN N E, SLOTH J K, et al. Extracellular vesicles: an important biomarker in recurrent pregnancy loss?[J]. **J Clin Med**, 2021, 10(12): 2549.
- [96] ZENG H, FU Y, SHEN L, et al. microRNA signatures in plasma and plasma exosome during window of implantation for implantation failure following *in-vitro* fertilization and embryo transfer[J]. **Reprod Biol Endocrinol**, 2021, 19(1): 180.
- [97] AZHARI F, PENCE S, HOSSEINI M K, et al. The role of the serum exosomal and endometrial microRNAs in recurrent implantation failure[J]. **J Matern Fetal Neonatal Med**, 2022, 35(5): 815-825.
- [98] MURAOKA A, YOKOI A, YOSHIDA K, et al. Serum-derived small extracellular vesicles as biomarkers for predicting pregnancy and delivery on assisted reproductive technology in patients with endometriosis[J]. **Front Endocrinol (Lausanne)**, 2025, 15: 1442684.
- [99] VILELLA F, MORENO-MOYA J M, 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[J]. **Development**, 2015, 142(18): 3210-3221.
- [100] GIACOMINI E, SCOTTI G M, VANNI V S, et al. Global transcriptomic changes occur in uterine fluid-derived extracellular vesicles during the endometrial window for embryo implantation[J]. **Hum Reprod**, 2021, 36(8): 2249-2274.

[本文编辑 余方 刘丽娜]