

综述

胚胎着床的过程与机制研究进展

许祺欣, 苏仁伟*

华南农业大学兽医学院, 广州 510642

摘要: 哺乳动物的胚胎着床是胚胎与子宫内膜建立紧密联系的过程, 是妊娠的起始和关键步骤, 胚胎着床的失败直接导致妊娠失败和不孕。近年来, 随着技术的进步, 胚胎着床的研究工作取得了长足的进展。本文旨在对近10年取得的和胚胎着床有关的研究成果进行综述, 重点关注包括腔上皮和腺上皮的子宫内膜上皮在着床过程中的变化、作用及分子机制, 以及上皮细胞与胚胎滋养层细胞和子宫基质细胞之间的相互作用。

关键词: 胚胎着床; 子宫内膜; 上皮极性; 子宫腺体

中图分类号: R332; R363.2; R329.2

Research progress in process and mechanisms of embryo implantation

XU Qi-Xin, SU Ren-Wei*

College of Veterinary Medicine, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China

Abstract: The onset of tight connection between embryo and uterine endometrium terms “embryo implantation”, the beginning and a key step of mammalian pregnancy. Defective implantation leads to failure of pregnancy and infertility. In recent years, along with the technological advance, researches on embryo implantation have achieved great advances. This paper reviews the key research achievements that have been reached in the last decade in the field of embryo implantation, focusing on the changes, roles, and underlying mechanisms of both luminal and glandular epithelia during implantation process, as well as their interactions with embryo trophoblast cells and endometrial stromal cells.

Key words: embryo implantation; uterine endometrium; luminal cell polarity; uterine glands

哺乳动物的卵为少黄卵, 由其受精发育而成的胚胎无法依靠自身携带的营养物质存活下去, 因此需要黏附在母体子宫内膜表面甚至植入到子宫内膜内部, 并建立与母体之间的紧密联系, 依靠母体子宫提供的营养支持完成发育。胚胎着床也叫做胚胎附植或胚胎植入, 是指处于活化状态的囊胚期胚胎与处于接受态的子宫进行物理和生理的相互作用, 并最终建立紧密联系的过程^[1]。胚胎着床是雌性哺乳动物生殖过程中最关键的步骤之一, 着床失败的胚胎无法继续发育, 是导致不孕的重要原因之一。

研究表明, 在人类女性的一个月经周期中, 成功妊娠的几率不超过 30%, 其中约有 75% 的胚胎在着床前或着床后短期内丢失^[2,3]。此外, 最新的研究结果表明, 除了着床失败以外, 即便胚胎着床在子宫内膜上, 着床时的一些异常也可能导致后续妊娠的丢失^[4]。因此, 胚胎着床过程的正常有序进行是保证妊娠建立和维持并最终分娩出健康后代的关键。

1 胚胎着床

胚胎着床的过程一般可以分为三个连续的时

Received 2019-07-13 Accepted 2019-09-22

Research from the corresponding author's laboratory was supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 31771664) and National Key Research and Development Program of China (No. 2018YFC1004402).

*Corresponding author. Tel: +86-20-85284899; E-mail: renweisu@scau.edu.cn

期：定位、黏附和侵入（图 1），着床过程中的每个事件的成功进行都是进入下一个阶段所必需的^[1]。在小鼠定位期，胚胎滋养层细胞与子宫腔上皮之间的接触逐渐紧密，子宫腔随着腔液的吸收和内膜的水肿而发生闭合，子宫腔上皮紧紧包裹着胚泡，形成着床小室^[5,6]，此时的胚胎仍然可以用生理盐水从子宫中轻轻冲洗出来；在妊娠第 4 天午夜至第 5 天凌晨（以雌雄小鼠合笼后见到阴道栓记为妊娠第 1 天），胚胎滋养层细胞与腔上皮细胞的膜蛋白之间发生黏附反应并建立紧密的物理联系，此时的胚胎无法用生理盐水冲洗出子宫；胚胎的黏附诱导上皮基质中的血管通透性增加，因此可通过尾静脉注射大分子染料芝加哥蓝指示着床位点的存在；在妊娠第 5 天晚至第 6 天，围绕胚胎的子宫腔上皮消失，胚胎滋养层外胚层细胞穿过上皮下基膜并到达内膜基质，与基质中的腺体、血管和蜕膜化的基质

细胞建立直接联系，该过程称为侵入^[7,8]。

1.1 子宫内膜的接受性

具有着床能力的囊胚以及具有接受能力的子宫是胚胎成功着床的两个要素，二者缺一不可。根据子宫对胚胎着床的敏感性可将子宫的状态分为接受前期、接受期和非接受期。只有处于接受期子宫才能接受胚胎的着床，这个时间窗口通常很短，称为“着床窗口 (window of implantation)”。在小鼠，着床窗口的开放时间大约为妊娠第 4 天至第 5 天^[8]，而人类女性的着床窗口开放时间为月经周期的第 20~24 天，即排卵后的 6~10 天^[9,10]。着床窗口的开放主要受到来自卵巢的甾体激素雌激素 (estrogen, 主要为活性形式 17 β 雌二醇, 17 β -estradiol, E2) 和孕酮调节的。雌激素主要由卵巢的卵泡内膜细胞和小黄体颗粒细胞分泌，在雌性动物中可以刺激卵泡以及子宫内膜腺体发育，以及刺激子宫和阴道平滑

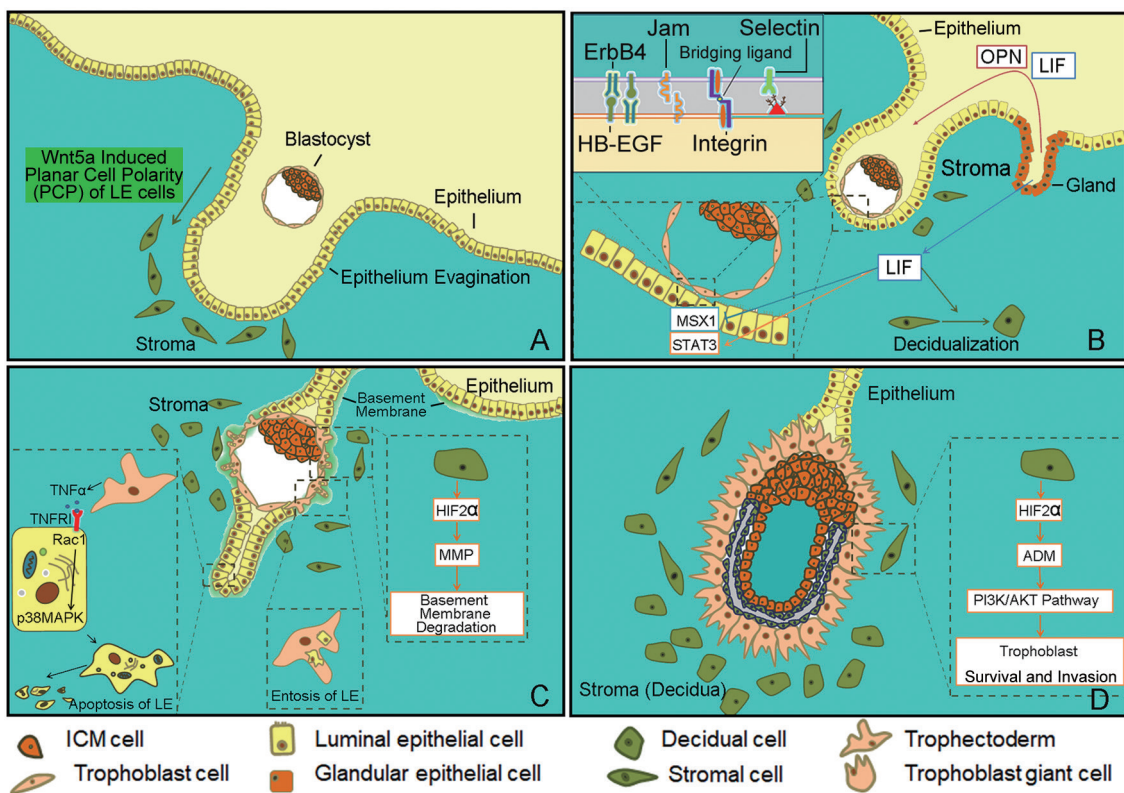


图 1. 小鼠胚胎着床过程示意图

Fig. 1. Diagram for the processing of mouse embryo implantation. A: Apposition of blastocyst; B: Attachment of blastocyst onto surface of luminal epithelium (LE); C: Disappear of LE; D: Invasion of embryonic trophoblast. PCP: planar cell polarity; OPN: osteopontin; LIF: leukemia inhibitory factor; MSX1: Msh homeobox 1; STAT3: signal transducer and activator of transcription 3; HB-EGF: heparin-binding EGF-like growth factor; Jam: junctional adhesion molecule; TNF α : tumor necrosis factor α ; Rac1: Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1; p38MAPK: p38 mitogen-activated protein kinase; HIF2 α : hypoxia-inducible factor 2 α ; ADM: adreno-medullin; ICM, inner cell mass.

肌的收缩,促进精卵结合等。雌激素的浓度对着床窗口的开放时间具有重要的影响,低浓度的雌激素下子宫着床窗口时间较长,而高浓度的雌激素则会让着床窗口时间缩短^[11]。孕酮则主要由雌性动物第一次发情或妊娠后卵巢的大黄体颗粒细胞分泌。孕酮具有调节发情周期、减少子宫收缩、以及减少母体对胚胎的免疫排斥反应等作用,对胚胎着床、妊娠的建立和维持都具有不可或缺的作用^[12,13]。在下丘脑-垂体-性腺轴控制下,由卵巢分泌的雌激素和孕酮会诱导子宫内膜发生周期性的变化,即雌性动物的发情周期,在灵长类被称为月经周期。在人类与啮齿动物中,卵泡产生的雌激素刺激子宫内膜的生长,同时诱导子宫内膜细胞表达孕酮受体,从而在孕酮的作用下将子宫内膜转化为富含营养和支持作用的可接受状态,表现为子宫上皮细胞生长的停滞和子宫基质细胞的增生^[14]。

雌激素和孕酮分别通过其核受体雌激素受体 α (estrogen receptor α , ER α)和ER β 以及孕激素受体A (progesterone receptor A, PRA)和PRB行使功能。基因敲除小鼠的研究表明,ER α 在子宫窗口期对基质细胞的增殖有重要的作用,而ER β 主要与子宫内膜的稳态相关^[15,16]。PRA主要与妊娠期子宫转变为可接受状态有关,另外PRA可以抑制PRB和其他类固醇受体包括雌激素受体ER的转录活性,而PRB缺失的小鼠可以正常妊娠^[17]。这些结果说明在胚胎着床过程中起主要作用的雌激素和孕酮受体分别为ER α 和PRA,雌激素和孕酮通过这两个受体共同调节胚胎的着床^[15,16]。作为调节胚胎着床最重要的信号通路,雌激素和孕酮信号通路以及与之相关的信号通路的失调都会导致胚胎着床的失败^[7,8,15]。在雌激素和孕酮的调节下,子宫上皮和基质之间存在复杂的旁分泌相互作用^[15]。印度刺猬基因 (Indian Hedgehog, *Ihh*)是子宫内膜上皮中孕酮的直接靶基因^[17],其编码的蛋白IHH可以通过与其在基质细胞上表达的跨膜受体补丁蛋白1 (patched-1, PTCH1)结合介导上皮对基质细胞的信号转导^[18]。IHH与PTCH1的结合导致另一个跨膜受体SMO (Smothened)被释放并激活,进而启动转录因子胶质瘤相关癌基因同源物 (Glioma-associated oncogene homolog, *Gli*)和鸡卵清蛋白上游转录因子II (chicken ovalbumin upstream transcription factor II, COUP-TFII, *Nr2f2*基因编码)的活性并启动下游基因的表达,从而影响基质细胞的增殖和分化等一系列与胚胎着床有关

的细胞进程。子宫特异性敲除*Ihh*和*Nr2f2*可导致基质细胞蜕膜化失败^[17-19],子宫特异性敲除*Ihh*和*Nr2f2*的小鼠表型相似,胚胎无法黏附到子宫腔上皮,且子宫基质细胞的蜕膜化无法启动,表明上皮旁分泌信号对基质细胞的作用又可以反过来影响上皮细胞的功能^[20,21]。另外,上皮细胞停止增殖是胚胎黏附到腔上皮的重要前提,孕酮的另一个靶基因心脏和神经嵴衍生表达基因2 (heart and neural crest derivatives expressed 2, *Hand2*)是介导孕酮抑制子宫上皮细胞增殖的重要分子,其敲除鼠的子宫上皮细胞增殖无法受到孕酮信号通路的抑制^[22]。在体外共培养模型中的研究证实,雌激素通过上调基质中纤维细胞生长因子10 (fibroblast growth factor 10, Fgf10)促进上皮的增殖^[23],而HAND2通过抑制基质细胞中FGFs的表达抑制上皮的增殖,在*Hand2*敲除鼠中,FGFs表达上调,并与上皮细胞上的受体FGF受体 (FGF receptor, FGFR)结合,进而通过ERK信号通路激活ER α 的表达,从而促进上皮细胞的增殖和黏蛋白1 (Mucin 1, *Muc1*)等雌激素靶基因的表达^[22]。而*Muc1*作为高度糖基化的细胞膜蛋白,其在上皮细胞腔面的高表达阻止了胚胎与上皮细胞之间的黏附。在人子宫内膜中,IHH及其下游分子PTCH1、SMO和GLI1/2在分泌期表达并受到孕酮的调节^[24]。在人子宫内膜基质细胞中,孕酮信号通路诱导的HAND2可以抑制FGF9的表达^[25]。敲低HAND2的基质细胞蜕膜化能力受损,蜕膜化标志分子的表达水平显著下调^[26]。

1.2 胚胎的着床能力

研究表明,在小鼠妊娠过程中,是卵巢雌激素的代谢物儿茶酚雌激素而不是雌激素本身激活了胚胎的着床能力^[27]。而猪、兔、仓鼠等物种则不需要卵巢来源雌激素的作用,这些物种的胚胎本身可以分泌雌激素来激活其着床能力^[28]。在妊娠第4天上午卵巢雌激素峰出现前切除小鼠两侧的卵巢,胚胎会进入到休眠期,这种胚胎的休眠可以通过每天给小鼠皮下注射一定剂量的孕酮来维持,这一胚胎休眠的维持时间可达数周,给小鼠注射低剂量的E2即可重新激活胚胎并启动着床^[28]。基因转录组和蛋白质组分析表明,细胞周期、钙信号通路、黏附分子、线粒体功能与能量代谢等相关的分子在休眠胚胎和激活胚胎中的表达有很大的差异,表明这些生理过程和信号通路对胚胎的激活起到重要的调节作用^[29,30]。此外,还有研究显示胚胎的休眠与自噬相

关, 抑制自噬作用会缩短休眠胚胎的生存时间, 表明休眠胚胎可以利用自噬调节其细胞内物质的重新分配, 从而延长其生存时间^[31]。最近, Bulut-Karslioglu 等的研究表明休眠胚胎的哺乳动物雷帕霉素靶蛋白 (mammalian target of rapamycin, mTOR) 信号通路受到抑制与其休眠状态高度相关, 通过单一抑制囊胚的 mTOR 信号通路即可使胚胎进入一种类似休眠的状态, 此状态下胚胎蛋白质合成的过程受到抑制, 胚胎的状态与卵巢切除小鼠延迟着床模型子宫中冲出的休眠囊胚非常相似。使用 mTOR 抑制剂可以保持囊胚在体外的休眠状态长达 22 天, 在移植回接受态小鼠子宫后仍可以成功着床^[32]。但是, 该方法只适用于囊胚期的胚胎, 在桑椹胚期抑制 mTOR 信号通路无法达到相同的效果^[32]。对于不同活性状态的胚胎, 子宫内膜着床窗口的开放时间是不同的, 例如在小鼠中, 着床窗口对正常活性囊胚的开放时间相较于对休眠囊胚的开放时间长数个小时^[33]。Li 等将囊胚移植到假孕第 1 天的输卵管中, 在第 4 天早上 8:00 的同侧子宫中就发现着床位点的存在, 而同时期移植到对侧输卵管的受精卵要等到第 4 天晚上 23:00 才能在对应的子宫角中着床^[34]。这些研究结果表明, 胚胎所处的时期和状态对子宫着床窗口开放和持续的时间都有重要的影响; 但是, 接受囊胚移植的小鼠出生率显著低于受精卵移植的窝仔数, 说明胚胎和子宫发育时期的同步对胚胎的着床质量和后续妊娠的维持都具有重要的影响^[34]。

激活的胚胎可以通过分泌信号分子影响子宫内膜的接受性, 例如给狒狒的子宫中灌注胚胎源信号激素绒毛膜促性腺激素 (chorionic gonadotropin, CG) 可以诱导子宫内膜上皮和基质出现类似胚胎着床位点的反应, 如上皮斑和前蜕膜化等^[35]。研究表明, CG 可以刺激上皮细胞中环氧化酶 2 (cyclooxygenase 2, COX2) 的表达, 进而促进上皮分泌前列腺素 E2 (prostaglandin E2, PGE2), 并通过旁分泌作用促进邻近的子宫基质细胞发生蜕膜化^[36]。CG 的另一个靶基因是缺口蛋白 Notch1, 该蛋白因其突变果蝇的翅膀上出现缺口而得名。CG 诱导的 Notch1 信号通路可以通过下游靶基因叉头蛋白 O1 (forkhead box protein O1, FOXO1) 促进子宫内膜基质细胞的蜕膜化^[37, 38]。在病理条件下, 例如在子宫内膜异位症患者中, 子宫内膜对 CG 的反应能力降低, 无法上调 Notch1 的表达, 造成蜕膜化能力受损, 进而影响子

宫内膜接受胚胎着床的能力^[39, 40]。Notch 信号通路还被证明与子宫内膜的产后修复有密切关联, 子宫特异性缺失该信号通路关键转录因子的小鼠第一次妊娠可以生产 2~3 只仔鼠, 然而在后续的子宫颈内膜产后修复过程中出现障碍, 造成第二次以及后续妊娠过程中的胚胎着床失败, 从而产生继发性不孕^[41]。此外, 在一项人类卵母细胞捐赠者上进行的临床研究还表明, hCG 宫腔灌注可以纠正因使用促性腺激素释放激素 (gonadotropin-releasing hormone, GnRH) 进行超数排卵造成的子宫内膜基质和腺体发育不同步, 并调节甾类激素受体的表达^[42]。

2 胚胎着床中子宫内腔上皮的作用

子宫内腔上皮是子宫内膜的第一道屏障, 也是子宫内膜与活性胚胎滋养层细胞首先接触的地方, 在胚胎着床的全过程中发挥着重要的作用。利用基因工程鼠模型, 研究人员在过去的 20 年中鉴定出一系列对胚胎着床有重要影响的上皮表达基因^[7, 8]。这些基因编码的蛋白包括 Kruppel 样因子 5 (Kruppel like factor 5, Klf5)^[43]、Msh 同源框 1 (Msh homeobox 1, Msx1)^[44, 45] 和 SRY 盒基因 17 (SRY-box 17, Sox17)^[46] 等多个受雌激素和孕酮调控的转录因子。除了调节上皮细胞功能以外, 这些上皮转录因子也可以通过旁分泌信号对子宫基质细胞的基因表达产生重要影响^[45]。很多旁分泌信号在胚胎着床过程中被激活, 例如激活素 A (activin A)、降钙素、CG、GnRH、胎盘蛋白 (glycodelin)、肝素结合表皮生长因子样生长因子 (heparin-binding EGF-like growth factor, HB-EGF)、胰岛素样生长因子 (insulin-like growth factor, IGF)、IGF 结合蛋白 1 (IGF-binding protein 1, IGFBP1) 和转化生长因子 β (transforming growth factor β , TGF β) 等, 这些旁分泌信号介导了胚胎滋养层细胞和子宫内膜上皮细胞之间的对话和相互作用^[8, 47]。

2.1 腔上皮与胚胎滋养层细胞的黏附

着床过程中, 子宫腔上皮细胞的首要作用是介导与胚胎滋养层之间的黏附, 到目前为止, 已有很多与黏附相关的黏附分子和配体-受体被鉴定出来: (1) HB-EGF 及其受体 ErbB1/4 在小鼠腔上皮细胞与胚胎滋养层细胞表明都有表达, 二者的结合对腔上皮细胞与胚胎滋养层细胞之间的黏附起到重要的作用^[7]。在人体中, HB-EGF 在雌激素和孕酮的调节下在子宫内腔上皮细胞上呈周期性表达, 并且在

胞饮突完全发育完成及子宫内膜处于接受态时达到峰值, 提示 HB-EGF 及其受体在人胚胎-上皮黏附过程中起到重要的作用。(2) 在包括人和小鼠在内的多种哺乳动物的胚胎着床过程中, 整合素及其配体都起到了重要的黏附作用。整合素是一类跨膜糖蛋白, 介导细胞-细胞或细胞-细胞外基质之间的黏附作用。在人中, 整合素 $\alpha1\beta1$ 、 $\alpha4\beta1$ 以 $\alpha v\beta3$ 都被证明与着床窗口的开放有关, 其中 $\alpha v\beta3$ 主要在接受期子宫内膜的重要标志结构胞饮突上表达^[48]。(3) 在人体中, L-选择素表达在囊胚的表面, 体外实验结果表明 L-选择素可以通过与其糖蛋白配体之间的结合介导胚胎的定位和黏附^[49]。(4) 紧密连接分子 (junctional adhesion molecule, JAM) 家族蛋白定位在细胞连接处, 通过同源二聚体或家族内分子形成的异源二聚体介导细胞和细胞之间的连接和黏附^[50]。研究表明 JAM2 在晚期囊胚滋养层细胞上的表达显著高于桑椹胚和早期囊胚, 同时在孕酮和 LIF-STAT3 的调节下特异性地表达在接受态小鼠子宫内膜上皮细胞上, 体外实验表明, 包被了 JAM2 重组蛋白的培养皿能够显著地提高激活囊胚的黏附率^[50]。

2.2 腔上皮细胞的极性与胚胎定位与黏附

上皮极性的重排被认为是胚胎着床能够顺利进行到黏附和侵入阶段的必要变化, 在从胚胎定位到黏附于腔上皮表面的过程中, 腔上皮细胞的极性发生了明显的变化。在定位期, 上皮细胞具有明显的极性, 在胚胎黏附发生时, 上皮细胞逐渐失去极性^[8, 51]。在超微结构上, 上皮细胞腔面的微绒毛渐渐消失, 变为胞饮突, 是子宫内膜接受性的重要超微结构标志^[48]。在小鼠, 仅表达在上皮细胞腔面的黏蛋白 MUC1 的表达量在孕酮的作用下逐渐降低, 使胚胎和上皮之间得以进行接触和黏附^[20]。在人子宫中, MUC1 的表达仅在胚胎黏附位点和周围的上皮上发生, 而没有扩展到整个子宫内膜^[52, 53]。另一方面, 胚胎黏附位点腔上皮的 E 钙黏素 (E-cadherin) 表达降低^[54], 提示该位点上皮发生了黏附链接的重构和细胞间侧面连接的松动^[55-57]。着床过程中上皮细胞去极化和雌激素的作用受到抑制有关, 在多个基因敲除鼠上的研究结果表明, 如雌激素的活性得不到适当的抑制, 其靶基因黏蛋白 *Muc1* 的表达维持在较高水平, 并且上皮腔面微绒毛发达, 这些都是阻碍胚胎与腔上皮之间建立黏附反应的因素^[4, 20-22]。另外一面, 雌激素可以通过腺体分泌的靶蛋白

白血病抑制因子 (leukemia inhibitory factor, LIF) 对 E-cadherin 的亚细胞定位进行调节, 促进腔上皮细胞的去极化^[51]。

在小鼠中, *Msx1* 在第 4 天早上高表达, 而后在第 4 天晚上胚胎上皮间发生黏附之前被下调^[44]。在 *Lif* 敲除小鼠子宫中, MSX1 的表达并不发生下调, 而重组 LIF 蛋白的处理可以显著下调 *Msx1* 的表达, 说明 *Msx1* 的下调是受到 LIF 调节的^[58, 59]。与小鼠上的表达变化一致, 在人类女性月经周期中, MSX1 在分泌早期的表达显著高于增殖期, 并在分泌中期胚胎黏附发生前有显著下调^[60]。在患有不孕症的女性子宫内膜中, MSX1 的表达量显著低于正常子宫内膜, 在子宫中敲除 *Msx1* 和 *Msx2* 的雌性小鼠胚胎着床失败^[8, 61]。进一步的研究表明在这些敲除鼠中, 围着床期的腔上皮细胞 E-cadherin 和 β -连环蛋白的表达和亚细胞定位发生变化, 微绒毛和纤毛的量也明显高于对照小鼠, 说明 *Msx1/2* 敲除鼠的子宫腔上皮在胚胎围着床期保留了较高的极性, 阻碍了胚胎的黏附和着床的顺利进行^[44, 45]。另一个和 LIF 直接相关的转录因子是信号转导和转录激活因子 3 (signal transducer and activator of transcription 3, STAT3), LIF 通过其受体 LIFR 和 GP130 直接磷酸化 STAT3 并启动下游基因的转录^[62]。上皮特异性敲除 *Stat3* 的小鼠中 E-cadherin 和多个闭锁蛋白 (claudin) 的表达没有下调, 导致上皮的去极化障碍, 胚胎与上皮的黏附失败^[63]。此外, 近年的研究还鉴定出多个与上皮细胞的去极化相关信号通路、转录因子和酶, 例如 I 型骨形成蛋白 (bone morphogenetic protein, BMP) 家族受体 *Alk3*^[13]、*FOXO1*^[12] 和原蛋白转化酶 6 (proprotein convertase 6, PC6)^[64, 65]。由于篇幅有限, 在此不对详细内容进行赘述。与前述几个关键分子的作用机制相反, 缺少 Ras 相关的 C3 肉毒杆菌毒素底物 1 (Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1, Rac1) 的小鼠子宫腔上皮由野生型的高柱状变为立方上皮, 与细胞极性有关的细胞连接黏附分子如蛋白酶激活受体 3 (protease-activated receptor 3, Par3)、封闭蛋白 (occludin)、claudin-7、纤维肌动蛋白 F-actin 和 E-cadherin 的表达或亚细胞定位都发生了变化, 表明这些小鼠的子宫腔上皮提前发生了去极化^[66]。Ezrin-moesin-radixin (ERM) 蛋白是肌动蛋白丝和细胞膜腔面的接头蛋白, 对细胞极性的建立至关重要^[67]。RAC1 缺失的子宫上皮细胞无法激活 ERM 蛋白, 因而对细胞的极化造成了损

伤, 进而影响了子宫的接受性^[66]。

除了腔面-基底面极性, 上皮细胞的水平极性也可能在胚胎着床过程中起到了重要的作用。水平细胞极性 (planar cell polarity, PCP) 是上皮细胞表面细胞结构沿着水平方向特异性分布的现象, 在发育和器官分化过程中具有重要的调节功能, 而 Wnt 信号通路特别是 WNT5a 在 PCP 中扮演了重要的角色^[68, 69]。小鼠胚胎的着床总是发生在系膜 (由子宫外膜在圆柱状子宫角的一侧汇合而成, 起到将子宫固定到体壁上的作用, 有血管穿行其中) 对侧。在着床发生以前, 部分腔上皮向系膜对侧生长, 造成子宫腔一些特定位点向系膜对侧延伸, 最终系膜对侧特化形成供胚胎着床的着床小室, 这里也是胚胎最后和子宫上皮发生黏附的位置^[70]。最新的研究表明, 小鼠胚胎的这种偏心着床方式和子宫上皮细胞的水平细胞极性有关^[5]。敲除或过激活 *Wnt5a* 都会导致小鼠胚胎着床异常, 胚胎着床位点偏向系膜侧而不是系膜对侧, 进而在妊娠后期造成大量的胚胎重吸收和流产^[70]。在子宫中特异性敲除 *Wnt5a* 的膜结合信号介导分子 Vang 样蛋白 2 (Vang-like protein 2, Vangl2) 可导致小鼠子宫上皮中和 PCP 相关的蛋白表达和亚细胞定位出现异常, 上皮细胞的偏心率和纵横比提高, 导致着床小室无法正常形成, 胚胎在子宫腔中的定位出现混乱, 进而造成着床缺陷以及后续妊娠过程中出现着床胚胎被吸收和窝仔数下降^[5, 71]。在 WNT5a 及其受体 ROR 敲除或过激活的小鼠子宫中, 也出现了类似的表型和 PCP 蛋白的异常定位表达, 提示在小鼠胚胎着床过程中, WNT5a-ROR 信号通路是 PCP 的主要调节者^[70]。

2.3 环胚上皮细胞的消失与滋养外胚层的侵入

随着胚胎滋养外胚层细胞与着床小室周围腔上皮黏附的完成, 胚胎着床进入最后一个阶段, 即胚胎滋养层的侵入。不同物种的胚胎侵入方式有很大的不同: 在小鼠的妊娠第 5 天晚至第 6 天, 围绕胚胎的子宫腔上皮及基膜消失, 滋养外胚层细胞与环着床小室且已经开始蜕膜化的基质细胞建立直接联系^[7, 8]。人的胚胎侵入与小鼠的置换式着床不同, 人胚胎滋养外胚层细胞在侵入期通过相邻子宫内壁上皮细胞之间的细胞间隙穿过子宫内壁上皮及下面的基膜到达上皮细胞下的基质层, 完成着床过程, 称为侵入式着床^[7, 49]。此外, 还有以兔等动物为代表的融合式着床, 其侵入过程为胚胎滋养外胚层细胞与子宫腔上皮细胞发生融合成为合胞体, 从而穿

透上皮屏障到达子宫基质^[7]; 以及猪、牛和羊等表面着床的动物, 其胚胎滋养层细胞并未侵入到子宫基质中, 而是与母体子宫腔上皮直接接触进行物质的交换^[1]。

小鼠子宫腔上皮的消失对胚胎正常侵入基质并建立直接联系至关重要, 如若保持完整则胚胎着床无法完成^[6, 66, 72]。上述与腔上皮极性有关的研究中腔上皮大多未按时消失, 说明腔上皮去极性和上皮滋养层细胞黏附的完成是腔上皮按时消失的重要前提。但是, 这一重要过程的细胞分子机制还不明确。一直以来, 多数研究人员都认为着床胚胎周围腔上皮细胞的消失是由细胞凋亡介导的^[1, 7]。而最近发表的几项研究逐渐改变了这一认知。侵入性细胞死亡 (entosis) 是近年来新发现的一种不同于细胞凋亡的细胞死亡方式, 由一种细胞侵入另一种细胞引起^[73]。该过程与细胞吞噬作用 (phagocytosis) 类似, 但被吞噬的细胞不是已经死亡或将要死亡的细胞, 而是活细胞^[73]。Li 等的研究表明, 在滋养外胚层侵入和周围腔上皮细胞消失的过程中, 可能存在这种新的细胞死亡方式: 从妊娠第 5 天晚上 20:00 开始, 腔上皮层开始变得不完整, 有部分上皮细胞消失造成上皮层的缺口, 但 Cleaved-Caspase 3 和 TUNEL 染色证实此时与胚胎直接接触的着床小室腔上皮细胞并没有发生凋亡, 而是被滋养外胚层细胞吞噬到细胞内, 这种滋养层细胞吞噬上皮细胞的能力也在体外共培养实验中得到了证实。因此, Li 等认为在着床过程中, 滋养外胚层细胞通过吞噬周围的腔上皮细胞并诱导其侵入性细胞死亡来达到穿透上皮层的目的^[6]。该研究对小鼠胚胎侵入过程中腔上皮的消失机制提出了全新的理论, 证明了侵入性细胞死亡在胚胎着床过程中的作用。

不过, 细胞凋亡并不是完全没有作用, 在妊娠第 5 天晚 24:00, 未与胚胎发生直接接触的着床小室底部腔上皮细胞中开始出现凋亡信号, 至第 6 天早 9:00, 该位置的大部分腔上皮细胞发生凋亡^[6], 该结果与另一篇研究报道相一致^[66]。在妊娠第 6 天早上, *Rac1* 敲除小鼠着床胚胎周围的腔上皮细胞并没有正常消失, 其着床小室底部的腔上皮细胞也没有发生凋亡, 作者推测 RAC1 的缺失可能导致这部分腔上皮细胞逃避了凋亡引发的上皮消失^[66]。进一步的体内和体外研究证明胚胎分泌的肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor α , TNF α) 可以通过上皮细胞表达的受体 TNFR1 和 RAC1-p38 通路诱导上皮细

胞的凋亡^[66]。上述两项研究在结论上有所不同，但实验结果并无矛盾之处，Tu等^[66]没有研究妊娠第5天晚上腔上皮细胞的凋亡情况，因此不能排除第5天晚上发生侵入式细胞死亡的可能，另外一篇报道也显示在此时期腔上皮细胞不存在凋亡^[72]；在第6天早上，两项研究对着床小室底部未与胚胎直接接触的腔上皮细胞的凋亡现象观察结果一致。侵入性细胞死亡需要吞噬和被吞噬的细胞发生直接接触，而TNF α 诱导的细胞凋亡则可以在相对远的距离上发生，因此侵入胚胎对腔上皮细胞按时消失的调控方式有可能是二者的结合：与胚胎直接接触的腔上皮细胞发生侵入性细胞死亡，而底部未直接接触的腔上皮细胞由胚胎分泌TNF α 诱导凋亡^[47]。

3 子宫内腺上皮与胚胎着床

子宫内腺中含有两种不同类型的上皮细胞：腔上皮和腺上皮。几个世纪以来，人们一直坚信子宫腺体分泌的各种因子是成功妊娠所必需的^[74]。最近几十年的现代生物学研究表明子宫腺体通过其分泌物对雌性生殖中的多个阶段产生影响，比如子宫接受态的建立、胚胎着床、囊胚滋养外胚层的激活和子宫内腺基质细胞蜕膜化的形成^[75-78]。最近几年，随着基因工程鼠技术，特别是子宫特异性基因敲除方法的成熟，腺体发生和腺体功能有关的研究取得了长足的进展。双光子显微镜三维成像技术的出现给子宫腺体的研究带来很大的进步。应用该技术，Yuan等发现在着床和蜕膜化过程中，已经存在的子宫腺体并没有消失，而是通过长的导管部一直与胚胎的着床小室相连，提示子宫腺体在胚胎着床过程中有更加重要的作用^[71]。研究还显示，着床小室的形成和腺体的发育都依赖于活性胚胎的存在，而活性胚胎的信号分子HB-EGF可能是促进这些发育过程的关键^[27,71]。

3.1 腺体的发生

与大多数器官发育与分化都是在胎儿时期完成不同，多数哺乳动物的子宫在出生时没有完成发育和分化，初生的雌性哺乳动物的子宫主要包括中央的管状上皮细胞和围绕在其周围的数层间充质细胞^[76,78]。子宫腺体发生指的是哺乳动物在出生后的短时间内，部分子宫腔上皮细胞增殖、分化、并向子宫基质内迁移内陷、变粗变长、分支和弯曲，最终形成管状的子宫腺体的过程^[75,78]。在鼠中，根据最新的三维成像技术得到的结果，可以将腺体

发生过程分为以下5个时期：萌芽期、泪珠期、延伸期、卷曲期和分支期，不同发育时期的腺体可能出现在同一时期的子宫内^[79]。在人和有月经的灵长类动物胎儿的子宫中，虽然在妊娠第140天左右已经有浅层的腺体萌芽，且在出生时子宫浅层基质中已经具有初级腺体结构，但一直到青春期前，子宫腺体发育都十分缓慢，到青春期后，子宫腺体在形态和功能上才发育完全^[80]。

子宫腺体的发生需要特定的细胞发生增殖和细胞与细胞、细胞与细胞间外基质的相互作用，还需要调控关键激素和生长因子的表达^[75]。在鼠出生后第2~10天，每天注射孕酮可以阻止腺体的发生。这些雌性小鼠在成年后子宫中没有任何腺体(uterine gland knockout, UGKO)^[81,82]。到目前为止，有多个基因被证实在腺体发生中起到关键的作用，这些基因和信号通路包括*Cdh1* (编码E-cadherin蛋白)、*Hoxa11* (homeobox A11, 同源盒基因A11)、*Wnt7a*等(请参阅^[75])以及TGF β ^[83]和Notch1信号通路^[84]。其中Wnt信号通路和转录因子FOXA2的研究比较深入^[74,78]。

FOXA2是最早被鉴定为子宫腺体上皮标志物的分子，并作为转录因子调控众多和腺体发育及功能相关的因子，包括LIF^[77]。在初生小鼠子宫中特异性敲除*Foxa2*导致小鼠腺体缺失并在成年后表现为不孕，在腺体发生已经完成的成年小鼠子宫上皮中特异性敲除该基因则不影响腺体的形态，但是小鼠依然因腺体功能障碍而不孕^[85]。与*Foxa2*敲除类似，在初生小鼠子宫上皮中过激活Notch信号通路也可以导致腺体发育缺陷和不孕^[84]。而在成年小鼠子宫上皮中过激活Notch信号通路则与*Foxa2*敲除鼠的表型有所不同，过激活的小鼠虽然也表现为LIF分泌量减少且不孕，但其腺体除了功能出现障碍外，形态上也有所改变。腺体的部分上皮细胞不表达腺上皮的标志分子FOXA2，提示Notch信号通路可能与妊娠过程中腔上皮和腺上皮的转化有关(数据未发表)。

3.2 腺体的功能

在人、小鼠和多种其它哺乳动物，子宫腺体直接合成或从血液中选择性转运多种营养物质和调节因子到子宫腔中，为着床前和着床后早期发育的胚胎提供组织性营养^[77,86-88]。组织性营养包括大量的离子、糖分、氨基酸、酶、细胞因子和外泌体等，对胚胎着床、蜕膜化和胎盘发生以及胎儿发育起到

重要的作用^[74]。研究人员对子宫腺体在胚胎着床过程中作用的了解最早来自孕酮诱导的 UGKO 动物, 这些雌性绵羊和小鼠的子宫在成年后无法支持胚胎的正常发育, 也不能接受胚胎的着床^[81, 82, 89, 90]。前述(3.1节)的众多缺失子宫腺体的基因敲除小鼠多数无法接受胚胎的着床, 这些小鼠中的主要着床缺陷发生在胚胎黏附期^[74, 75]。在这些基因中, FOXA2 最早被鉴定为腺上皮的标志分子, 表达于所有时期的子宫腺体上皮中, 但在子宫其他细胞类型中都没有表达^[91]。因此, 子宫缺失 *Foxa2* 敲除鼠的胚胎着床的失败完全是因为子宫腺体的缺失, 是最适合用作研究腺体的功能的模型。

小鼠腺体的分泌物中, 公认的对胚胎着床最重要是 LIF。腔上皮细胞最重要的功能就是与胚胎之间的黏附, 缺少 LIF 的敲除小鼠是因为黏附期异常造成胚胎着床失败的, LIF 也是世界上第一个使用基因敲除鼠证明其对胚胎着床关键作用的分子^[58]。LIF 由子宫腺体合成并分泌到整个子宫腔中, 激活腔上皮细胞膜上的受体并启动 STAT3 信号通路和其它下游基因的表达^[51]。使用 *Pgr-Cre* 在子宫发育早期敲除 *Foxa2* 的小鼠缺乏腺体, 其腺体功能障碍主要的体现是 LIF 分泌的缺失, 给 *Foxa2* 基因敲除的腺体缺失小鼠注射重组 LIF 蛋白能挽救胚胎的黏附和蜕膜化的发生^[91, 92]。但是这种挽救并不彻底, 胚胎黏附完成后, 腔上皮不能按时消失, 导致胚胎的侵入无法顺利进行, 造成早期妊娠中的胚胎丢失^[92]。与之对应, 使用 *Ltf-iCre* 在腺体发育完全的成年小鼠子宫敲除 *Foxa2* 虽然也因为 LIF 的缺失导致胚胎黏附的失败, 但重组 LIF 蛋白可以完全挽救胚胎的着床并正常产下仔鼠^[92], 说明 LIF 是调节胚胎的定位和黏附的充分必要因素, 但子宫腺体还可以通过其他因素影响腔上皮细胞的按时消失和胚胎的侵入, 或者说影响了滋养外胚层诱导的腔上皮细胞的侵入性细胞死亡。

另一个直接参与胚胎的黏附过程的子宫分泌物是骨桥蛋白 (osteopontin, OPN), 也称分泌性磷酸化蛋白 1 (secreted phosphoprotein 1, SPP1)。在包括人和小鼠在内的多个物种中, OPN 都被证明是由雌激素刺激下的子宫腺体分泌的^[93–97]。OPN 含有 Arg-Gly-Asp (RGD) 结构域, 能够被整合素所识别, 从而介导细胞和细胞之间的黏附^[98]。OPN 能够同时和子宫内腔上的整合素 $\alpha V\beta 3$ 以及滋养层细胞上的 $\alpha v\beta 6$ 相结合, 从而介导胚胎和腔上皮之间的黏附^[99]。

在小鼠, OPN 可以通过与囊胚表面的整合素结合激活细胞内磷脂酰肌醇 3 激酶 - 丝苏氨酸蛋白激酶 (phosphoinositide 3-kinase/serine-threonine kinase, PI3K-AKT) 通路从而促进胚胎黏附^[97]。在早期五个对比接受态和非接受态人子宫内膜的芯片结果中, *SPP1* 也是唯一一个在所有研究中都有差异表达的基因^[7, 49, 100], 在体外实验中, OPN 包裹的珠子可以通过整合素 $\alpha V\beta 3$ 黏附到子宫上皮 Ishikawa 细胞系上^[101]。

4 子宫内膜上皮与基质细胞的相互作用

在胚胎着床和蜕膜化过程中, 子宫内膜基质细胞和上皮细胞之间存在着复杂的相互作用, 这些旁分泌相互作用的顺利、正确进行是保证胚胎着床成功的关键。如本文第 2 节所述, 在雌激素和孕酮的共同调节下, 由上皮向基质方向的 IHH-PTCH1 旁分泌信号通路和基质向上皮方向的 FGF-FGFR 旁分泌信号通路共同作用, 保证子宫内膜接受态的建立。这些旁分泌通路上任何一个基因的敲除都能导致胚胎黏附的失败^[15]。在黏附完成的胚胎滋养层和腔上皮的诱导下, 子宫基质细胞开始进行分化, 从成纤维状的梭形细胞分化为原型的有分泌功能的多倍体蜕膜细胞, 这个过程称为蜕膜化^[7]。其中 IHH-PTCH1 信号通路被证明可以通过 COUP-TFII 和 HAND2 两个转录因子诱导蜕膜化相关的分子表达并启动蜕膜化^[14, 20]。Pawar 等研究显示, 上皮特异性敲除 *Stat3* 的小鼠基质细胞的蜕膜化受到影响, 可能是上皮基质间通过 EGFR 配体 - 受体旁分泌信号调节受损所致^[63]。此外, 上皮 PCP 还可以通过片段极性蛋白质散乱同源物 (segment polarity protein dishevelled homolog, DVL) 信号通路对着床后基质细胞的蜕膜化过程起到促进作用^[5]。

小鼠胚胎侵入过程中上皮细胞基膜的消失一直被认为是由蜕膜化的基质细胞诱导的^[7]。最近, 这一过程的机制被发掘: 子宫基质细胞中特异性敲除低氧诱导因子 2 α (hypoxia-inducible factor 2 α , HIF2 α) 的小鼠表现为胚胎侵入的失败, 机制研究表明, 基质细胞中的 HIF2 α 可以通过基质金属蛋白酶 (matrix metalloproteinase, MMP) 降解着床小室周围上皮的基膜, 促进该部分上皮细胞的脱离^[72], 也可能因此促进了胚胎滋养外胚层细胞对上皮细胞的吞噬和细胞侵入性死亡。同时, 基质 HIF2 α 也可以通过诱导 PI3K/AKT 信号通路促进滋养外胚层细胞的生存,

表1. 常用子宫特异性Cre基因工程工具鼠

Table 1. List of transgenic mice that carrying uterine specific Cre recombinase

Mouse strain	Tissue specificity	Temporal specificity	References
Pgr-Cre	Whole uterus (Epithelium + stroma + myometrium)	Postnatal day 2–3 (Epithelium) 3 weeks to adult (Whole uterus)	[5, 26, 44, 72, 85, 102]
Ltf-iCre	Luminal epithelium (LE) Glandular epithelium (GE)	Adult Inducible by E2 up to 4 weeks	[71, 85, 103]
Spr2f-Cre	Luminal epithelium (LE) Glandular epithelium (GE)	3 weeks (GE) Adult (LE+GE)	[85, 104, 105]
Wnt7a-Cre	Luminal epithelium (LE) Glandular epithelium (GE)	Fetus	[63, 106]
Amhr2-Cre	Mesenchyme (Stroma + myometrium in adult)	Fetus	[72, 107]
Pbsn-Cre	Glandular epithelium (GE)	10 weeks (No data before 10 weeks)	[108, 109]

进而促进胚胎的侵入过程^[72]。

5 展望

胚胎的成功着床是哺乳动物妊娠的起始，是生命繁衍过程中最重要的生理过程之一。胚胎着床的成功需要多种组织细胞类型之间有序的相互作用，这些细胞类型包括本文中所提到的胚胎滋养层细胞以及其后续分化形成的众多类型、子宫内膜的腔上皮和腺上皮细胞、基质细胞及其分化形成的蜕膜细胞，还包括胚胎的内细胞团细胞、子宫内膜中的多种免疫细胞和血管内皮细胞、甚至子宫平滑肌细胞。胚胎着床的研究进展离不开技术的进步，随着单细胞测序技术的成熟，研究人员开始着手对这些细胞类型进行更细致的分类和分化谱系的预测和追踪，相信在不久的将来就可以取得突破。随着这些研究的深入和细胞类型的细化，在进行基因功能和机制性研究时可以进行更加细致、深入的解析，从而描绘出详尽的胚胎着床生理机制和分子图谱。

以 CRISPR-Cas9 为代表的高效基因编辑技术的进步也给胚胎着床的研究带来有利的影响。首先是更加方便快速地构建子宫各细胞类型的特异性基因敲除工具鼠，从最初子宫特异的 Pgr-Cre，到上皮细胞特异的 Wnt7a-Cre 和 Ltf-iCre，腺体特异性的 Pbsn-Cre 以及基质和肌层细胞特异的 Amhr2-Cre。正是这些愈发细化特异的工具鼠的出现，才有了近十几年来胚胎着床领域研究的快速发展（详见表 1）。相信在不久的将来，蜕膜细胞特异、腺体特异以及可诱导型工具鼠都将成为研究人员手中有力的研究工具。基因编辑技术给胚胎着床研究带来的另一个

有利影响是对大动物可进行直接的基因编辑。以往，由于传统的基因编辑技术效率低下且需要多代繁殖，包括非人灵长类在内的大动物因为生殖周期长、价值高等因素，在基因编辑动物模型方面只能让位于小鼠和大鼠等啮齿类动物。然而，胚胎着床研究的一大问题在于物种之间的不一致性，物种之间的着床方式和分子机制存在着巨大的差异，以小鼠为研究对象的结果对其他物种的借鉴程度有限。随着高效基因编辑技术的成熟，在非人灵长类和畜牧动物上直接对目的基因进行干预已经成为可能，在这些大动物上更深入细致研究特异性的胚胎着床机制，将为提高辅助生殖临床成功率和畜牧生产效率提供更直接、有效的理论基础。

参考文献

- 1 Yang ZM (杨增明), Sun QY, Xia GL. Reproductive Biology. 2nd edition. Beijing: Science Press, 2019, 329–402 (in Chinese).
- 2 Urato AC, Norwitz ER. A guide towards pre-pregnancy management of defective implantation and placentation. Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol 2011; 25(3): 367–387.
- 3 Koot YE, Teklenburg G, Salker MS, Brosens JJ, Macklon NS. Molecular aspects of implantation failure. Biochim Biophys Acta 2012; 1822(12): 1943–1950.
- 4 Zhang S, Kong S, Wang B, Cheng X, Chen Y, Wu W, Wang Q, Shi J, Zhang Y, Wang S, Lu J, Lydon JP, DeMayo F, Pear WS, Han H, Lin H, Li L, Wang H, Wang YL, Li B, Chen Q, Duan E, Wang H. Uterine Rbpj is required for embryonic-uterine orientation and decidual remodeling via Notch pathway-independent and -dependent mechanisms. Cell Res 2014; 24(8): 925–942.

- 5 Yuan J, Cha J, Deng W, Bartos A, Sun X, Ho HH, Borg JP, Yamaguchi TP, Yang Y, Dey SK. Planar cell polarity signaling in the uterus directs appropriate positioning of the crypt for embryo implantation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2016; 113(50): E8079–E8088.
- 6 Li Y, Sun X, Dey SK. Entosis allows timely elimination of the luminal epithelial barrier for embryo implantation. *Cell Rep* 2015; 11(3): 358–365.
- 7 Wang H, Dey SK. Roadmap to embryo implantation: clues from mouse models. *Nat Rev Genet* 2006; 7(3): 185–199.
- 8 Cha J, Sun X, Dey SK. Mechanisms of implantation: strategies for successful pregnancy. *Nat Med* 2012; 18(12): 1754–1767.
- 9 Blesa D, Ruiz-Alonso M, Simon C. Clinical management of endometrial receptivity. *Semin Reprod Med* 2014; 32(5): 410–413.
- 10 Donaghy M, Lessey BA. Uterine receptivity: alterations associated with benign gynecological disease. *Semin Reprod Med* 2007; 25(6): 461–475.
- 11 Ma WG, Song H, Das SK, Paria BC, Dey SK. Estrogen is a critical determinant that specifies the duration of the window of uterine receptivity for implantation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; 100(5): 2963–2968.
- 12 Vasquez YM, Wang X, Wetendorf M, Franco HL, Mo Q, Wang T, Lanz RB, Young SL, Lessey BA, Spencer TE, Lydon JP, DeMayo FJ. FOXO1 regulates uterine epithelial integrity and progesterone receptor expression critical for embryo implantation. *PLoS Genet* 2018; 14(11): e1007787.
- 13 Monsivais D, Clementi C, Peng J, Titus MM, Barrish JP, Creighton CJ, Lydon JP, DeMayo FJ, Matzuk MM. Uterine ALK3 is essential during the window of implantation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2016; 113(3): E387–E395.
- 14 Vasquez YM, DeMayo FJ. Role of nuclear receptors in blastocyst implantation. *Semin Cell Dev Biol* 2013; 24(10–12): 724–735.
- 15 Adams NR, DeMayo FJ. The role of steroid hormone receptors in the establishment of pregnancy in rodents. *Adv Anat Embryol Cell Biol* 2015; 216: 27–49.
- 16 Wetendorf M, DeMayo FJ. The progesterone receptor regulates implantation, decidualization, and glandular development via a complex paracrine signaling network. *Mol Cell Endocrinol* 2012; 357(1–2): 108–118.
- 17 Takamoto N, Zhao B, Tsai SY, DeMayo FJ. Identification of Indian hedgehog as a progesterone-responsive gene in the murine uterus. *Mol Endocrinol* 2002; 16(10): 2338–2348.
- 18 Varjosalo M, Taipale J. Hedgehog: functions and mechanisms. *Genes Dev* 2008; 22(18): 2454–2472.
- 19 Krishnan V, Elberg G, Tsai MJ, Tsai SY. Identification of a novel sonic hedgehog response element in the chicken ovalbumin upstream promoter-transcription factor II promoter. *Mol Endocrinol* 1997; 11(10): 1458–1466.
- 20 Kurihara I, Lee DK, Petit FG, Jeong J, Lee K, Lydon JP, DeMayo FJ, Tsai MJ, Tsai SY. COUP-TFII mediates progesterone regulation of uterine implantation by controlling ER activity. *PLoS Genet* 2007; 3(6): e102.
- 21 Lee K, Jeong J, Kwak I, Yu CT, Lanske B, Soegiarto DW, Toftgard R, Tsai MJ, Tsai S, Lydon JP, DeMayo FJ. Indian hedgehog is a major mediator of progesterone signaling in the mouse uterus. *Nat Genet* 2006; 38(10): 1204–1209.
- 22 Li Q, Kannan A, DeMayo FJ, Lydon JP, Cooke PS, Yamagishi H, Srivastava D, Bagchi MK, Bagchi IC. The antiproliferative action of progesterone in uterine epithelium is mediated by Hand2. *Science* 2011; 331(6019): 912–916.
- 23 Chung D, Gao F, Jegga AG, Das SK. Estrogen mediated epithelial proliferation in the uterus is directed by stromal Fgf10 and Bmp8a. *Mo Cell Endocrinol* 2015; 400: 48–60.
- 24 Wei Q, Levens ED, Stefansson L, Nieman LK. Indian Hedgehog and its targets in human endometrium: menstrual cycle expression and response to CDB-2914. *J Clin Endocrinol Metab* 2010; 95(12): 5330–5337.
- 25 Murata H, Tsuzuki T, Kido T, Kakita-Kobayashi M, Kida N, Hisamatsu Y, Okada H. Progesterone-induced heart and neural crest derivatives-expressed transcript 2 inhibits angiopoietin 2 via fibroblast growth factor 9 in human endometrial stromal cells. *Reprod Biol* 2019; 19(1): 14–21.
- 26 Shindoh H, Okada H, Tsuzuki T, Nishigaki A, Kanzaki H. Requirement of heart and neural crest derivatives-expressed transcript 2 during decidualization of human endometrial stromal cells *in vitro*. *Fertil Steril* 2014; 101(6): 1781–1790. e1–e5.
- 27 Paria BC, Lim H, Wang XN, Liehr J, Das SK, Dey SK. Coordination of differential effects of primary estrogen and catecholesterogen on two distinct targets mediates embryo implantation in the mouse. *Endocrinology* 1998; 139(12): 5235–5246.
- 28 Cha JM, Dey SK. Reflections on rodent implantation. *Adv Anat Embryol Cell Biol* 2015; 216: 69–85.
- 29 Hamatani T, Daikoku T, Wang H, Matsumoto H, Carter MG, Ko MS, Dey SK. Global gene expression analysis identifies molecular pathways distinguishing blastocyst dormancy and activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; 101(28): 10326–10331.
- 30 Fu Z, Wang B, Wang S, Wu W, Wang Q, Chen Y, Kong S, Lu J, Tang Z, Ran H, Tu Z, He B, Zhang S, Chen Q, Jin W, Duan E, Wang H, Wang YL, Li L, Wang F, Gao S, Wang H. Integral proteomic analysis of blastocysts reveals key molecular machinery governing embryonic diapause and reactivation for implantation in mice. *Biol Reprod* 2014;

- 90(3): 52.
- 31 Lee JE, Oh HA, Song H, Jun JH, Roh CR, Xie H, Dey SK, Lim HJ. Autophagy regulates embryonic survival during delayed implantation. *Endocrinology* 2011; 152(5): 2067–2075.
- 32 Bulut-Karslioglu A, Biechele S, Jin H, Macrae TA, Hejna M, Gertsenstein M, Song JS, Ramalho-Santos M. Inhibition of mTOR induces a paused pluripotent state. *Nature* 2016; 540(7631): 119–123.
- 33 Paria BC, Huet-Hudson YM, Dey SK. Blastocyst's state of activity determines the “window” of implantation in the receptive mouse uterus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993; 90(21): 10159–10162.
- 34 Li SJ, Wang TS, Qin FN, Huang Z, Liang XH, Gao F, Song Z, Yang ZM. Differential regulation of receptivity in two uterine horns of a recipient mouse following asynchronous embryo transfer. *Sci Rep* 2015; 5: 15897.
- 35 Fazleabas AT, Donnelly KM, Srinivasan S, Fortman JD, Miller JB. Modulation of the baboon (*Papio anubis*) uterine endometrium by chorionic gonadotrophin during the period of uterine receptivity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; 96(5): 2543–2548.
- 36 Banerjee P, Sapru K, Strakova Z, Fazleabas AT. Chorionic gonadotropin regulates prostaglandin E synthase via a phosphatidylinositol 3-kinase-extracellular regulatory kinase pathway in a human endometrial epithelial cell line: implications for endometrial responses for embryo implantation. *Endocrinology* 2009; 150(9): 4326–4337.
- 37 Afshar Y, Miele L, Fazleabas AT. Notch1 is regulated by chorionic gonadotropin and progesterone in endometrial stromal cells and modulates decidualization in primates. *Endocrinology* 2012; 153(6): 2884–2896.
- 38 Strug MR, Su RW, Kim TH, Jeong JW, Fazleabas A. The Notch family transcription factor, RBPJ κ , modulates glucose transporter and ovarian steroid hormone receptor expression during decidualization. *Reprod Sci* 2018; 1933719118799209.
- 39 Sherwin JR, Hastings JM, Jackson KS, Mavrogianis PA, Sharkey AM, Fazleabas AT. The endometrial response to chorionic gonadotropin is blunted in a baboon model of endometriosis. *Endocrinology* 2010; 151(10): 4982–4993.
- 40 Su RW, Strug MR, Joshi NR, Jeong JW, Miele L, Lessey BA, Young SL, Fazleabas AT. Decreased Notch pathway signaling in the endometrium of women with endometriosis impairs decidualization. *J Clin Endocrinol Metab* 2015; 100(3): E433–E442.
- 41 Strug MR, Su RW, Kim TH, Mauriello A, Ticconi C, Lessey BA, Young SL, Lim JM, Jeong JW, Fazleabas AT. RBPJ mediates uterine repair in the mouse and is reduced in women with recurrent pregnancy loss. *FASEB J* 2018; 32(5): 2452–2466.
- 42 Strug MR, Su R, Young JE, Dodds WG, Shavell VI, Diaz-Gimeno P, Ruiz-Alonso M, Simon C, Lessey BA, Leach RE, Fazleabas AT. Intrauterine human chorionic gonadotropin infusion in oocyte donors promotes endometrial synchrony and induction of early decidual markers for stromal survival: a randomized clinical trial. *Hum Reprod* 2016; 31(7): 1552–1561.
- 43 Sun X, Zhang L, Xie H, Wan H, Magella B, Whitsett JA, Dey SK. Kruppel-like factor 5 (KLF5) is critical for conferring uterine receptivity to implantation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2012; 109(4): 1145–1150.
- 44 Daikoku T, Cha J, Sun X, Tranguch S, Xie H, Fujita T, Hirota Y, Lydon J, DeMayo F, Maxson R, Dey SK. Conditional deletion of Msx homeobox genes in the uterus inhibits blastocyst implantation by altering uterine receptivity. *Dev Cell* 2011; 21(6): 1014–1025.
- 45 Sun X, Park CB, Deng W, Potter SS, Dey SK. Uterine inactivation of muscle segment homeobox (Msx) genes alters epithelial cell junction proteins during embryo implantation. *FASEB J* 2016; 30(4): 1425–1435.
- 46 Whitby S, Salamonsen LA, Evans J. The endometrial polarity paradox: Differential regulation of polarity within secretory-phase human endometrium. *Endocrinology* 2018; 159(1): 506–518.
- 47 Aplin JD, Ruane PT. Embryo-epithelium interactions during implantation at a glance. *J Cell Sci* 2017; 130(1): 15–22.
- 48 Quinn CE, Casper RF. Pinopodes: a questionable role in endometrial receptivity. *Hum Reprod Update* 2009; 15(2): 229–236.
- 49 Su RW, Fazleabas AT. Implantation and establishment of pregnancy in human and nonhuman primates. *Adv Anat Embryol Cell Biol* 2015; 216: 189–213.
- 50 Su RW, Jia B, Ni H, Lei W, Yue SL, Feng XH, Deng WB, Liu JL, Zhao ZA, Wang TS, Yang ZM. Junctional adhesion molecule 2 mediates the interaction between hatched blastocyst and luminal epithelium: induction by progesterone and LIF. *PLoS One* 2012; 7(4): e34325.
- 51 Rosario GX, Stewart CL. The Multifaceted actions of leukemia inhibitory factor in mediating uterine receptivity and embryo implantation. *Am J Reprod Immunol* 2016; 75(3): 246–255.
- 52 Meseguer M, Aplin JD, Caballero-Campo P, O'Connor JE, Martin JC, Remohi J, Pellicer A, Simon C. Human endometrial mucin MUC1 is up-regulated by progesterone and down-regulated *in vitro* by the human blastocyst. *Biol Reprod* 2001; 64(2): 590–601.
- 53 Singh H, Nardo L, Kimber SJ, Aplin JD. Early stages of

- implantation as revealed by an *in vitro* model. *Reproduction* 2010; 139(5): 905–914.
- 54 Wallingford MC, Angelo JR, Mager J. Morphogenetic analysis of peri-implantation development. *Dev Dyn* 2013; 242(9): 1110–1120.
- 55 Thie M, Fuchs P, Butz S, Sieckmann F, Hoschützky H, Kemler R, Denker HW. Adhesiveness of the apical surface of uterine epithelial cells: the role of junctional complex integrity. *Eur J Cell Biol* 1996; 70(3): 221–232.
- 56 Li Q, Wang J, Armant DR, Bagchi MK, Bagchi IC. Calcitonin down-regulates E-cadherin expression in rodent uterine epithelium during implantation. *J Biol Chem* 2002; 277(48): 46447–46455.
- 57 Paria BC, Zhao X, Das SK, Dey SK, Yoshinaga K. Zonula occludens-1 and E-cadherin are coordinately expressed in the mouse uterus with the initiation of implantation and decidualization. *Dev Biol* 1999; 208(2): 488–501.
- 58 Stewart CL, Kaspar P, Brunet LJ, Bhatt H, Gadi I, Köntgen F, Abbondanzo SJ. Blastocyst implantation depends on maternal expression of leukemia inhibitory factor. *Nature* 1992; 359(6390): 76–79.
- 59 Daikoku T, Song H, Guo Y, Riesewijk A, Mosselman S, Das SK, Dey SK. Uterine Msx-1 and Wnt4 signaling becomes aberrant in mice with the loss of leukemia inhibitory factor or Hoxa-10: evidence for a novel cytokine-homeobox-Wnt signaling in implantation. *Mol Endocrinol* 2004; 18(5): 1238–1250.
- 60 Bolnick AD, Bolnick JM, Kilburn BA, Stewart T, Oakes J, Rodriguez-Kovacs J, Kohan-Ghadr HR, Dai J, Diamond MP, Hirota Y, Drewlo S, Dey SK, Armant DR, Network NNCRM. Reduced homeobox protein MSX1 in human endometrial tissue is linked to infertility. *Hum Reprod* 2016; 31(9): 2042–2050.
- 61 Nallasamy S, Li Q, Bagchi MK, Bagchi IC. Msx homeobox genes critically regulate embryo implantation by controlling paracrine signaling between uterine stroma and epithelium. *PLoS Genet* 2012; 8(2): e1002500.
- 62 Cheng JG, Chen JR, Hernandez L, Alvord WG, Stewart CL. Dual control of LIF expression and LIF receptor function regulate Stat3 activation at the onset of uterine receptivity and embryo implantation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; 98(15): 8680–8685.
- 63 Pawar S, Starosvetsky E, Orvis GD, Behringer RR, Bagchi IC, Bagchi MK. STAT3 regulates uterine epithelial remodeling and epithelial-stromal crosstalk during implantation. *Mol Endocrinol* 2013; 27(12): 1996–2012.
- 64 Heng S, Paule SG, Li Y, Rombauts LJ, Vollenhoven B, Salamonsen LA, Nie G. Posttranslational removal of α -dystroglycan N terminus by PC5/6 cleavage is important for uterine preparation for embryo implantation in women. *FASEB J* 2015; 29(9): 4011–4022.
- 65 Heng S, Cervero A, Simon C, Stephens AN, Li Y, Zhang J, Paule S, Rainczuk A, Singh H, Quinonero A, Tapia A, Velasquez L, Salamonsen L, Rombauts LJ, Nie G. Proprotein convertase 5/6 is critical for embryo implantation in women: regulating receptivity by cleaving EBP50, modulating ezrin binding, and membrane-cytoskeletal interactions. *Endocrinology* 2011; 152(12): 5041–5052.
- 66 Tu Z, Wang Q, Cui T, Wang J, Ran H, Bao H, Lu J, Wang B, Lydon JP, DeMayo F, Zhang S, Kong S, Wu X, Wang H. Uterine RAC1 via Pak1-ERM signaling directs normal luminal epithelial integrity conducive to on-time embryo implantation in mice. *Cell Death Differ* 2016; 23(1): 169–181.
- 67 McClatchey AI. ERM proteins at a glance. *J Cell Sci* 2014; 127(Pt 15): 3199–3204.
- 68 Gao B, Song H, Bishop K, Elliot G, Garrett L, English MA, Andre P, Robinson J, Sood R, Minami Y, Economides AN, Yang Y. Wnt signaling gradients establish planar cell polarity by inducing Vangl2 phosphorylation through Ror2. *Dev Cell* 2011; 20(2): 163–176.
- 69 Ho HY, Susman MW, Bikoff JB, Ryu YK, Jonas AM, Hu L, Kuruvilla R, Greenberg ME. Wnt5a-Ror-Dishevelled signaling constitutes a core developmental pathway that controls tissue morphogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2012; 109(11): 4044–4051.
- 70 Cha J, Bartos A, Park C, Sun X, Li Y, Cha SW, Ajima R, Ho HY, Yamaguchi TP, Dey SK. Appropriate crypt formation in the uterus for embryo homing and implantation requires Wnt5a-ROR signaling. *Cell Rep* 2014; 8(2): 382–392.
- 71 Yuan J, Deng W, Cha J, Sun X, Borg JP, Dey SK. Tridimensional visualization reveals direct communication between the embryo and glands critical for implantation. *Nat Commun* 2018; 9(1): 603.
- 72 Matsumoto L, Hirota Y, Saito-Fujita T, Takeda N, Tanaka T, Hiraoka T, Akaeda S, Fujita H, Shimizu-Hirota R, Igaue S, Matsuo M, Haraguchi H, Saito-Kanatani M, Fujii T, Osuga Y. HIF2 α in the uterine stroma permits embryo invasion and luminal epithelium detachment. *J Clin Invest* 2018; 128(7): 3186–3197.
- 73 Overholtzer M, Mailleux AA, Mouneimne G, Normand G, Schnitt SJ, King RW, Cibas ES, Brugge JS. A nonapoptotic cell death process, entosis, that occurs by cell-in-cell invasion. *Cell* 2007; 131(5): 966–979.
- 74 Kelleher AM, DeMayo FJ, Spencer TE. Uterine glands: Developmental biology and functional roles in pregnancy. *Endocr Rev* 2019; 40(5): 1424–1445.
- 75 Cooke PS, Spencer TE, Bartol FF, Hayashi K. Uterine

- glands: development, function and experimental model systems. *Mol Hum Reprod* 2013; 19(9): 547–558.
- 76 Cooke PS, Ekman GC, Kaur J, Davila J, Bagchi IC, Clark SG, Dziuk PJ, Hayashi K, Bartol FF. Brief exposure to progesterone during a critical neonatal window prevents uterine gland formation in mice. *Biol Reprod* 2012; 86(3): 63.
- 77 Filant J, Spencer TE. Uterine glands: biological roles in conceptus implantation, uterine receptivity and decidualization. *Int J Dev Biol* 2014; 58(2–4): 107–116.
- 78 Spencer TE. Biological roles of uterine glands in pregnancy. *Semin Reprod Med* 2014; 32(5): 346–357.
- 79 Vue Z, Gonzalez G, Stewart CA, Mehra S, Behringer RR. Volumetric imaging of the developing prepubertal mouse uterine epithelium using light sheet microscopy. *Mol Reprod Dev* 2018; 85(5): 397–405.
- 80 Gray CA, Bartol FF, Tarleton BJ, Wiley AA, Johnson GA, Bazer FW, Spencer TE. Developmental biology of uterine glands. *Biol Reprod* 2001; 65(5): 1311–1323.
- 81 Filant J, Spencer TE. Endometrial glands are essential for blastocyst implantation and decidualization in the mouse uterus. *Biol Reprod* 2013; 88(4): 93.
- 82 Filant J, Zhou H, Spencer TE. Progesterone inhibits uterine gland development in the neonatal mouse uterus. *Biol Reprod* 2012; 86(5): 146, 1–9.
- 83 Gao Y, Duran S, Lydon JP, DeMayo FJ, Burghardt RC, Bayless KJ, Bartholin L, Li Q. Constitutive activation of transforming growth factor Beta receptor 1 in the mouse uterus impairs uterine morphology and function. *Biol Reprod* 2015; 92(2): 34.
- 84 Su RW, Strug MR, Jeong JW, Miele L, Fazleabas AT. Aberrant activation of canonical Notch1 signaling in the mouse uterus decreases progesterone receptor by hypermethylation and leads to infertility. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2016; 113(8): 2300–2305.
- 85 Kelleher AM, Peng W, Pru JK, Pru CA, DeMayo FJ, Spencer TE. Forkhead box A2 (FOXA2) is essential for uterine function and fertility. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2017; 114(6): E1018–E1026.
- 86 Jones CJ, Aplin JD, Burton GJ. First trimester histiotrophe shows altered sialylation compared with secretory phase glycoconjugates in human endometrium. *Placenta* 2010; 31(7): 576–580.
- 87 Jones CJ, Choudhury RH, Aplin JD. Tracking nutrient transfer at the human maternofetal interface from 4 weeks to term. *Placenta* 2015; 36(4): 372–380.
- 88 Bazer FW. Uterine protein secretions: Relationship to development of the conceptus. *J Anim Sci* 1975; 41(5): 1376–1382.
- 89 Gray CA, Bazer FW, Spencer TE. Effects of neonatal progestin exposure on female reproductive tract structure and function in the adult ewe. *Biol Reprod* 2001; 64(3): 797–804.
- 90 Gray CA, Taylor KM, Ramsey WS, Hill JR, Bazer FW, Bartol FF, Spencer TE. Endometrial glands are required for preimplantation conceptus elongation and survival. *Biol Reprod* 2001; 64(6): 1608–1613.
- 91 Jeong JW, Kwak I, Lee KY, Kim TH, Large MJ, Stewart CL, Kaestner KH, Lydon JP, DeMayo FJ. Foxa2 is essential for mouse endometrial gland development and fertility. *Biol Reprod* 2010; 83(3): 396–403.
- 92 Kelleher AM, Milano-Foster J, Behura SK, Spencer TE. Uterine glands coordinate on-time embryo implantation and impact endometrial decidualization for pregnancy success. *Nat Commun* 2018; 9(1): 2435.
- 93 White FJ, Ross JW, Joyce MM, Geisert RD, Burghardt RC, Johnson GA. Steroid regulation of cell specific secreted phosphoprotein 1 (osteopontin) expression in the pregnant porcine uterus. *Biol Reprod* 2005; 73(6): 1294–1301.
- 94 Apparao KB, Illera MJ, Beyler SA, Olson GE, Osteen KG, Corjay MH, Boggess K, Lessey BA. Regulated expression of osteopontin in the peri-implantation rabbit uterus. *Biol Reprod* 2003; 68(5): 1484–1490.
- 95 Johnson GA, Burghardt RC, Joyce MM, Spencer TE, Bazer FW, Pfarrer C, Gray CA. Osteopontin expression in uterine stroma indicates a decidualization-like differentiation during ovine pregnancy. *Biol Reprod* 2003; 68(6): 1951–1958.
- 96 von Wolff M, Strowitzki T, Becker V, Zepf C, Tabibzadeh S, Thaler CJ. Endometrial osteopontin, a ligand of beta3-integrin, is maximally expressed around the time of the “implantation window”. *Fertil Steril* 2001; 76(4): 775–781.
- 97 Chaen T, Konno T, Egashira M, Bai R, Nomura N, Nomura S, Hirota Y, Sakurai T, Imakawa K. Estrogen-dependent uterine secretion of osteopontin activates blastocyst adhesion competence. *PLoS One* 2012; 7(11): e48933.
- 98 Kazanecki CC, Uzwiak DJ, Denhardt DT. Control of osteopontin signaling and function by post-translational phosphorylation and protein folding. *J Cell Biochem* 2007; 102(4): 912–924.
- 99 Erikson DW, Burghardt RC, Bayless KJ, Johnson GA. Secreted phosphoprotein 1 (SPP1, osteopontin) binds to integrin alpha v beta 6 on porcine trophectoderm cells and integrin alpha v beta 3 on uterine luminal epithelial cells, and promotes trophectoderm cell adhesion and migration. *Biol Reprod* 2009; 81(5): 814–825.
- 100 Mirkin S, Arslan M, Churikov D, Corica A, Diaz JI, Williams S, Bocca S, Oehninger S. In search of candidate genes critically expressed in the human endometrium during the window of implantation. *Hum Reprod* 2005; 20(8): 2104–

- 2117.
- 101 Kang YJ, Forbes K, Carver J, Aplin JD. The role of the osteopontin-integrin $\alpha\beta 3$ interaction at implantation: functional analysis using three different *in vitro* models. *Hum Reprod* 2014; 29(4): 739–749.
- 102 Soyal SM, Mukherjee A, Lee KY, Li J, Li H, DeMayo FJ, Lydon JP. Cre-mediated recombination in cell lineages that express the progesterone receptor. *Genesis* 2005; 41(2): 58–66.
- 103 Daikoku T, Ogawa Y, Terakawa J, Ogawa A, DeFalco T, Dey SK. Lactoferrin-iCre: a new mouse line to study uterine epithelial gene function. *Endocrinology* 2014; 155(7): 2718–2724.
- 104 Contreras CM, Akbay EA, Gallardo TD, Haynie JM, Sharma S, Tagao O, Bardeesy N, Takahashi M, Settleman J, Wong KK, Castrillon DH. *Lkb1* inactivation is sufficient to drive endometrial cancers that are aggressive yet highly responsive to mTOR inhibitor monotherapy. *Dis Model Mech* 2010; 3(3–4): 181–193.
- 105 Yoo JY, Kang HB, Broaddus RR, Risinger JI, Choi KC, Kim TH. MIG-6 suppresses endometrial epithelial cell proliferation by inhibiting phospho-AKT. *BMC Cancer* 2018; 18(1): 605.
- 106 Winuthayanon W, Hewitt SC, Orvis GD, Behringer RR, Korach KS. Uterine epithelial estrogen receptor α is dispensable for proliferation but essential for complete biological and biochemical responses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010; 107(45): 19272–19277.
- 107 Jamin SP, Arango NA, Mishina Y, Hanks MC, Behringer RR. Requirement of *Bmpr1a* for Mullerian duct regression during male sexual development. *Nat Genet* 2002; 32(3): 408–410.
- 108 Jin C, McKeehan K, Wang F. Transgenic mouse with high Cre recombinase activity in all prostate lobes, seminal vesicle, and ductus deferens. *Prostate* 2003; 57(2): 160–164.
- 109 Choi JP, Zheng Y, Skulte KA, Handelsman DJ, Simanainen U. Development and characterization of uterine glandular epithelium specific androgen receptor knockout mouse model. *Biol Reprod* 2015; 93(5): 120.