

胚胎植入的分子基础^{*}

刘以训

(动物研究所生殖生物学国家重点实验室 北京 100080)

摘要 胚胎植入研究有望从根本上解决女性避孕问题,它被列为生殖生物学领域最重要的科学问题,也是控制哺乳动物“育”与“不育”最关键的薄弱环节之一。它涉及胚胎和母体子宫内膜细胞多重复杂的相互作用,涉及源于母体子宫黄体 and 胚胎组织多种分子在时间和空间精细的调节过程,涉及在胚胎植入点同步发生组织重建和改组、细胞凋亡以及血管发生。

关键词 胚胎植入,血管发生,细胞凋亡,蛋白水解



1 国内外研究现状

胚胎植入是女性生殖过程中最下游一个十分关键的控制“育”与“不育”最薄弱的环节。阻断胚胎植入或者植入过程不会影响全身机能,因此被认为是发展女性避孕药的最理想的靶点。

在世界卫生组织洛氏基金会以及 CONRAD 和 CLCCR 基金会联合支持下,1999 年以来已建立了六个国际合作研究中心,同时还有近十个研究室参加,旨在揭示胚胎植入分子的机理,并在此基础上与相关制药公司合作,联合开发一种或数种非甾体、无毒、无害、稳定、方便、每月使用一次的抗胚胎植入的避孕药,以便从根本上解决女性避孕问题。下面就有关研究进展做一简述。

1.1 胚胎植入“窗口”

胚胎植入“窗口”是指胚胎植入前在子宫内膜所发生的暂时的特殊“生理接受状态”。从输卵管来的受精卵只有在这种接受状态下才能与子宫内

膜进行信号交换,相互识别,发生植入过程。非人灵长类和人类胚胎植入“窗口”开放时间只有 5—7 天,而小鼠和大鼠只有 1 天。胚胎植入只在这十分有限的时间内发生。胚胎植入“窗口”的建立主要由黄体分泌的孕酮和雌激素以及子宫表达的细胞因子、生长因子、蛋白水解酶类调控^[1]。有证据表明,黄体分泌的孕酮可刺激子宫内膜纤溶酶原抑制因子 PAI-1 的表达,而抑制纤溶酶原激活因子的产生。而雌激素的作用正好相反,两者的协调表达对“窗口”的形成有重要的作用^[2]。有报道指出,子宫中白血病抑制因子 LIF 对胚胎植入“窗口”的建立和胚胎植入有重要作用。敲除 LIF 的小鼠,不能着床。还有报道,子宫内膜出血伴随性因子(Ebaf)在胚胎植入“窗口”关闭中起重要作用。早孕因子(EPF)、着床前因子(PIF)、某些生长因子(GF)、集落刺激因子-1(CSF-1)、前列腺素(PGE₂)、IFN- γ 等都与植入“窗口”的建立相关^[3]。

1.2 胚胎植入是由多基因调控的复杂过程

胚胎植入是一个涉及胚胎与母体细胞多重相互作用的过程。母体信息交流(Cross talk)和相互识别可能是胚胎植入发生过程中最重要的事件^[1]。生殖生物学家一直致力于寻找胚胎植入最早的信息

* 收稿日期:2002 年 7 月 14 日

分子。张致一院士早在 20 世纪 80 年代初就提出了胚胎滋养层细胞所表达的 CG 可能是来自胚胎的最早信息分子的概念。受精卵对母体来说是一个“异源物”,它含有来自父方的遗传物质。从理论上讲,它会受母体免疫系统的排斥。但是最终这个“异源物”被母体识别、融合,在子宫形成一个特殊的母体-胎儿融合的暂时性的结构——胎盘。有资料证明,胚胎滋养层细胞与子宫基质细胞最初接触时,滋养层细胞立即融合形成合体滋养层细胞,滋毛柱的紧密相连的合体滋养层,使母体-胎儿血液循环分开,并形成两者物质交流和免疫的屏障。合体滋养层的形成可能是通过融合母体抗原决定簇和它们之间的相互作用,以消除妊娠免疫的问题,但是分子机制至今还不清楚。实验证明,母体与胎儿组织融合的界面形成了一个特殊结构——基板(Basal, plate)。胚胎植入的重要过程以及相关调控分子的发生都与它密切相关^[4]。

1.3 胎盘发生及其调控

脊椎动物从卵生到胎生,从多胎到单胎的系统进化体现在胚胎个体发生过程和胎儿发育的自我保护机制的完善上。胎儿在胎盘中发育是最安全的。胎盘是哺乳动物母胎气体和营养物质交换的场所,而且也是由母胎双方组织免疫兼容形成的一个暂时性内分泌器官。

胎盘发生过程中的一个关键因素是滋养层细胞的分化和浸润^[5]。它是胚胎首先分化的细胞类型,对胚胎粘附于子宫壁及随后的蜕膜组织重建极为重要。啮齿类的滋养外胚层在妊娠过程中分化为几种形态和功能迥异的亚群:滋养层巨细胞、海绵滋养层和迷宫。其中滋养层巨细胞及海绵滋养层具有侵入能力。灵长类的滋养外胚层同样分化为三种亚群的细胞:细胞滋养层干细胞、合体细胞滋养层和绒毛外细胞滋养层。不同的物种,其滋养层细胞分化受到不同生长因子、细胞因子的调控。恒河猴早期妊娠过程中,子宫腔上皮及腺上皮形成的上皮斑能够表达多种与血管发生、蛋白水解、细胞凋亡相关的细胞因子^[6,7],而且很快就退化。就目前的资料来看,它似乎只存在于非人灵长类,在人和啮齿类中未见报道,其功能不详。

啮齿类是在对系膜区着床,内细胞团位于系膜

侧,最初与母体子宫内膜接触的是壁滋养层。灵长类是在系膜侧偏心区着床,着床位点在子宫体正中矢状切面的上部,内细胞团位于系膜侧,最初与母体子宫内膜接触的是极滋养层。孵出的胚胎一旦与子宫壁接触,即迅速向内侵入,到第 8 天基本上全部包埋在子宫壁中。而在非人灵长类,如恒河猴中,极滋养层在附着到子宫内膜形成初级着床位点时,胚体仍部分暴露于子宫表面,胚体对侧的滋养层细胞附着到对侧子宫壁,形成次级着床位点,随后发育为次级胎盘。次级胎盘只在非人灵长类发现,其功能至今不清^[6]。关于次级胎盘发生及其功能研究报道非常少,从比较胚胎学角度看,它可能是一个非常令人感兴趣的结构,因为它的形成也是由胚体对侧滋养层接触子宫壁而起始的,这与啮齿类相似。它的发生部位也与啮齿类相似。这提示我们:次级胎盘在进化上是否为一个“遗迹器官”?我们的系统研究证明,血管发生、细胞凋亡和细胞外基质蛋白水解是在胚胎植入和胎盘形成中同步协调发生的三个关键过程^[6,8]。

1.4 血管发生(Angiogenesis)

哺乳动物胚胎植入窗口的建立、胚胎着床和胎盘发生过程中伴随着活跃的血管发生^[9]。血管发生是指新的毛细血管在原血管处形成新血管的过程,是子宫与胚胎在激素调节下,通过效应分子与调节分子之间复杂相互作用的结果。大致可分为血管基膜的降解、内皮细胞的增殖、迁移与成熟和内皮细胞分化形成毛细血管三个阶段。正常有序的血管发生对胚胎着床及胎盘形成至关重要,局部阻断血管发生将会阻断胚胎植入。血管发生异常将导致妊娠失败及多种妊娠疾病。血管新生素(Angiopoietins, Ang1-4)及其受体 Tie1 和 Tie2 在血管发生中的作用越来越引起人们的重视。敲除 Ang1 和 Ang2 的小鼠胚胎不能存活。给动物注射抗血管内皮因子(VEGF)的可溶性 FLT-1/IgG 嵌合体可阻止黄体形成和抑制胚胎植入。在胎盘发生过程中,绒毛内有大量的胎儿血管发生。在母体蜕膜中螺旋动脉要重建,血管通透性要增加,都需要血管新生相关因子的调控^[10,11]。我们的实验结果表明,VEGF 和 bFGF 在胚胎植入早期(D15—D35),在母胎界面的基底部位,螺旋动脉内皮细胞、腺上皮细胞和绒毛

层细胞都特异表达,说明它们参与绒毛内胎儿血管新生和母体蜕膜组织血管通透性的调节^[12]。

1.5 细胞凋亡(Apoptosis)

细胞凋亡是一个生理性细胞自杀现象。我们的实验表明,它是胚胎植入过程中在蜕膜和绒毛细胞中所发生的一种非常普遍的现象^[11]。在胚胎植入过程中引发细胞凋亡,主要是通过 Fas/FasL 信号传递通路,引起细胞凋亡^[12,13]。死亡信号 FasL 是通过它的受体(Fas)相关的死亡域接头蛋白传递的,这个接头蛋白又与一种或多种半胱天冬氨酸蛋白酶 Caspase 偶联。有资料显示,滋养层细胞表达的 Fas/FasL 除了与细胞凋亡相关外,还可能与母体对胎儿的免疫耐受有关^[12]。人胎盘也表达 TNF- α 和 IFN- γ ,前者能诱导滋养层细胞凋亡,而后者能促进这一过程。滋养层细胞表达的 EGF 能抑制它的凋亡。凋亡信号的级联多重性使得诱导细胞凋亡和抑制细胞凋亡的信号之间存在一个精细平衡。一些诱导细胞凋亡的死亡信号是可以被逆转的,这样细胞就能避免自身降解而获得新生。发现是 Bcl-2 能抑制多种细胞凋亡的原癌基因,它同 Bax 结合形成同源二聚体,能抑制 Bcl-2 的作用,从而促进凋亡。现已证实,植入窗口期子宫内膜和早期植入点蜕膜细胞都能表达 Bcl-2 和 Bax 基因,显然它们对调节胚胎植入过程中的细胞凋亡也有重要作用。我们近年来的研究发现,人和恒河猴早期胎盘绒毛滋养层细胞柱、上皮斑和蜕膜组织中的腺上皮都有凋亡发生,并受 Bcl-2 和 Bax 基因调控^[12]。

1.6 胚胎植入过程中的蛋白水解作用(Proteolysis)

胚胎植入过程中的一个重要标志是滋养层细胞向子宫内膜的侵入,它十分类似于肿瘤细胞浸润过程。滋养层细胞与子宫内膜细胞接触后会发生合体化。合体滋养层细胞不断向外扩展,侵入子宫内膜,在蛋白水解酶的作用下,在基质细胞基膜和细胞外基质降解的同时,细胞滋养层细胞不断分裂与合体滋养层融合,使后者不断向外扩展,以至合体滋养层发生中空,形成初级绒毛。在胚胎植入和胎盘发生过程中,在胚胎植入部位要发生有限的、被精细调控的细胞外基质的局部降解,并伴随组织重建和改组。这一过程已证实是由纤溶酶原激活因子(tPA, uPA)和抑制因子(PAF-1, PAF-2)以及

金属蛋白酶(MMP)和其抑制因子(TIMP)调控的^[4,6,7,8]。上述激活因子和抑制因子无论从蛋白水平或 mRNA 水平都发现在胚胎植入窗口期的子宫内膜和妊娠早期的胎盘中有特异表达,主要位于子宫内膜的腺体上皮细胞和胚胎植入点的母胎界面,上述分子的定位都十分接近于它们的作用底物,但在表达时间和细胞分布上有差异。同时还发现,上述分子在胚胎植入部位的表达与诱发细胞凋亡的分子和血管新生的分子的表达在时间和空间上是协同发生的。因此,人们有理由认为,在胚胎植入过程中,细胞凋亡、血管新生和蛋白水解是同步进行的,彼此相关。有些分子可能同时参与几个过程,有些分子是某一过程的激活因子,而在另一过程中又可能成为抑制因子。

2 发展抗胚胎植入避孕药的思路

关于人的胚胎植入的分子机理还不十分清楚。因为很难找到人的胚胎植入点作为直接研究材料。虽然在实验动物上已做了某些研究,但由于种间差异性,难以直接用于临床。因此,首先要建立与人十分相似的非人灵长类动物模型,寻找和确认控制“胚胎植入窗口”形成或涉及细胞凋亡、血管新生和蛋白水解过程的关键分子;第二,确认这些关键分子干扰黄体功能(主要抑制孕酮分泌),子宫内膜胚胎植入前的发育和早期胎盘发生的作用;第三,在上述研究的基础上,同相关制药厂合作,发展一种无毒、无害、使用方便、每月一次的抗着床或诱发月经来潮的非甾体复合避孕药。

主要参考文献

- 1 Giudice L C. Genes associated with embryonic attachment and implantation and the role of progesterone. *J. Reproductive Med.*, 1999, 44(suppl): 165- 171.
- 2 陈贵安,冯强,张丽珠等. 人子宫内膜 PA 和 PAF-1 活性的激素调节. *生理学报*, 1992, 44(5): 502- 509.
- 3 Salamonsen L A. The role of proteinases in implantation. *Reviews of reproduction*, 1999, 4: 11- 22.
- 4 Feng Q, Liu Y X, Liu K et al. Expression of urokinase plasminogen activator inhibitors and urokinase receptor in pregnant rhesus monkey uterus during early placentation. *Placenta*, 2000, 21: 184- 193.

- 5 Levy R, Nelson D M. To be, or not to be, That is the question. Apoptosis in human trophoblast. *Placenta*, 2000, 21: 1– 13.
- 6 Feng Q, Liu K, Liu Y X et al. Plasminogen activators and inhibitors are transcribed during early macaque implantation. *Placenta*, 2001, 22(2/3): 186– 199.
- 7 Hu Z Y, Liu Y X, Zou R J et al. Expression of tissue type and urokinase type plasminogen activators as well as their inhibitors type 1 and type 2 in the placenta of human and rhesus monkey. *J. Anatomy (London)*, 1999, 194: 183– 195.
- 8 Liu Yixun, Hu Zhaoyuan, Liu Kui et al. Localization and distribution of tissue type and urokinase type plasminogen activators and their inhibitors type 1 and type 2 in fetal membranes of human and rhesus monkey. *Placenta*, 1998, 19(1): 171– 180.
- 9 Ong S, Lash G, Baker P N. Angiogenesis and placental growth in normal and compromised pregnancies. *Baillieres Best Pract Res. Clin Obstet Gynaecol*, 2000, 14(6): 969– 980.
- 10 Bogic L V, Brace R A, Cheung C Y. Cellular localization of vascular endothelial growth factor in ovine placenta and fetal membranes. *Placenta*, 2000, 21(2– 3): 203– 209.
- 11 Sherer DM et al. Angiogenesis during implantation, and placental and early embryonic development. *Placenta*, 2001, 22(1): 1– 13.
- 12 Gao F et al. Apoptosis occurs in implantation site of the rhesus monkey during early stage of pregnancy. *Contraception*, 2001, 64(3): 193– 200.
- 13 Hammer A, Dohr G. Expression of Fas– ligand in first trimester and term human placental villi. *J. Reprod. Immunol*, 2000, 46: 83– 90.
- 14 Pampfer S, Donnay I. Apoptosis at the time of embryo implantation in mouse and rat. *Cell Death Differ.*, 1999, 6: 533– 545.

Molecular Basis of Implantation

Liu Yixun

(State Key Laboratory of Reproductive Biology, Institute of Zoology, CAS, 100080 Beijing)

Implantation is the most important scientific topic in the research field of reproductive biology and one of the key weak steps of controlling fertility and infertility. Implantation processes are involved in multiple molecular interactions secreted by the uterus, corpus luteum and the embryo and undergo extensive tissue remodeling, angiogenesis and apoptosis in the implantation site. Supported by WHO/Rockefeller Foundation and CONRAD/CICCR, Six Joint International Implantation Research Centers and several research groups have been established Since 1999. It is the goal of these Centers to develop a safe, stable, efficacious and non-steroidal anti-implantation contraceptive agent for woman use.

刘以训 中国科学院院士, 中国科学院动物研究所生殖生物学国家重点实验室学术委员会主任, 研究员。1936 年 10 月出生于山东省安丘市。WHO/ 洛氏基金胚胎植入中心主任, 中国动物学会生殖生物学会理事长, *Human Reproduction* (UK)、*Achives of Andrology* (USA) 和 *Biology of Reproduction & Endocrinology* (USA) 编委。发表论文 150 余篇, 其中 *SCI* 论文 70 余篇, *SCI* 引文 450 余次。曾获中国科学院自然科学奖一等奖 1 项、二等奖 5 项、三等奖 3 项。培养博士后、博士和硕士研究生 30 余名。