

刘子涵,滕亚迪,马梅香,等.小鼠囊胚在孵化期间关键基因表达动态变化[J].华中农业大学学报,2024,43(2):197-204.
DOI:10.13300/j.cnki.hnlkxb.2024.02.022

小鼠囊胚在孵化期间关键基因表达动态变化

刘子涵,滕亚迪,马梅香,吴俞霖,安礼友

新疆大学生命科学与技术学院,乌鲁木齐 830017

摘要 为探索囊胚孵化发育中关键基因的表达规律、进一步解析妊娠识别机制,以小鼠囊胚为模型,对孵化进程中不同时期的囊胚进行转录组分析,并对关键基因表达量进行qPCR检测,对关键蛋白表达模式进行免疫荧光染色。转录组分析发现小鼠囊胚从扩张、孵化到完成孵化的孵化过程,差异基因表达呈2种调控模式,对调控模式中的基因集进行GO分析、KEGG分析,发现涉及免疫与炎症、细胞分化、凋亡过程等生物过程。qPCR结果显示 *Ptgs1*、*Lyz2*、*Il-1 α* 、*Cfb*、*Ccl9* 表达上调,*Cd36* 表达下调,结果与转录组分析一致。免疫荧光染色分析发现 *Plac1*、*Cdx2*、*C3* 在小鼠囊胚孵化过程中表达下调,*Lyz2*、*Il-1 β* 则表达上调。以上研究结果表明小鼠囊胚在孵化进程中,基因表达呈特定的分化动态,异常基因表达将导致孵化停滞。

关键词 小鼠囊胚;孵化;基因表达;分化模式;生长发育

中图分类号 Q7 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2024)02-0197-08

哺乳动物胚胎发育从受精开始,经过一系列细胞增殖和分化,最终形成一个由滋养外胚层(trophectoderm, TE)围绕内细胞团(inner cell mass, ICM)的空腔结构,即囊胚。随着囊胚腔的不断扩大,胚胎从透明带中孵化出来与子宫内膜接触,开始胚胎植入和妊娠,从而在子宫内发育成完整个体^[1-2]。囊胚孵化是植入之前一种必需的早期发育现象,过程包括胚泡扩张、压力增加、透明带变薄至破裂^[3-4],是胚胎具备着床活力和成功怀孕的先决条件,决定了胚胎随后的生存和发育。囊胚孵化是非常重要且被精确调控的生理现象^[5]。这些调控都具有精确的时空模式,在这期间会发生大量细胞因子的动态表达,如类固醇激素、生长因子、细胞因子、酶和转录因子等^[6],都参与了植入前囊胚的发育调节,为胚胎植入提供了良好的环境。目前已有的研究主要关注囊胚及之后发育的细胞胚层谱系演化和调控分子机制^[7-8],对囊胚孵化期间的基因表达动态关注较少。

孵化对哺乳动物囊胚的着床至关重要,任何影响囊胚孵化的不良因素都可能会引起胚胎着床失败^[9-11]。目前囊胚孵化过程的分子机制仍未阐明。为探究小鼠囊胚孵化过程的分子机制,本研究以ICR小鼠胚胎为研究对象,将囊胚分成孵化前、孵化中、

孵化后和孵化停滞4个阶段,通过转录组分析各孵化阶段基因表达的差异,得到孵化的差异表达基因;选取其中10个差异表达目标基因,通过荧光定量PCR(qPCR)检测4个时期的囊胚基因表达,采用免疫荧光染色对基因蛋白表达进一步验证,旨在为进一步解析囊胚孵化过程中的分子事件提供基础数据,有望为辅助生殖技术的开发和优化提供新思路。

1 材料与方法

1.1 实验动物

本研究所用5~7周龄雌鼠和8周龄ICR雄鼠来源于新疆医科大学实验动物中心。小鼠饲养在规范的鼠房中[温度(23±2)℃,湿度(25±3)%,开关灯时间间隔为12h]。动物实验遵照新疆大学动物实验与实验动物福利相关规范(XJUAE-2022-07)实施。

1.2 试剂与仪器

试剂:孕马血清促性腺激素(PMSG)、人绒毛膜促性腺激素(HCG)购自宁波激素二厂;胎牛血清(FBS)购自HyClone;磷酸缓冲盐溶液(PBS)、KSOM胚胎培养液、多聚甲醛固定液(PFA)、聚乙烯醇(PVA)和石蜡油购自SIGMA;细胞核荧光染料(DAPI)、兔抗(*Lyz2*、*C3*、*Cdx2*、*Il-1 β* 、*Plac1*)和羊抗

收稿日期:2023-08-29

基金项目:新疆维吾尔自治区自然科学基金杰出青年科学基金项目(2022D01E09);天池英才计划“动物早期胚胎着床命运决定的分子机制”

刘子涵,E-mail:m15639122552@163.com

通信作者:安礼友,E-mail:anliyou@aliyun.com

兔(AF488)购自Abcam公司;反转录试剂盒和qPCR试剂盒购自Abm公司。

仪器:电子天平(DENYER)、CO₂胚胎培养箱(Thermo Forma)、超净台(AIRTECH)、体视显微镜(Motic)、恒温台(BYA)、PCR仪、实时荧光定量PCR仪(Applied biosystems)、激光扫描共聚焦显微镜(Nikon)、35 mm培养皿(BIOFIL)、一次性注射针和玻璃毛细管(1.5 mm外径)。

1.3 小鼠超数排卵

育龄雌鼠经腹腔注射PMSG 7.5 U,46~48 h后腹腔注射HCG 7.5 U。与雄鼠合笼,次日检查阴栓,若阳性,则标记妊娠0.5 dpc,待72 h后,脱颈处死后解剖孕鼠获取子宫,吸取M2培养液,冲出位于子宫的囊胚,清洗完毕后,移入提前平衡好的KSOM培养液微滴中,放置于37℃恒温培养箱中进行培养。雌鼠超数排卵数量依照实际情况而定。

1.4 囊胚的获取及试验分组

在培养前4~6 h或提前1 d制作KSOM培养滴,覆盖石蜡油置于37℃恒温培养箱中平衡CO₂。在培养液中发育最好的胚胎/孵育液比例约是1个胚胎/2 μL培养液。由于胚胎对pH及温度波动非常敏感,所以尽量减少小鼠囊胚在空气中的暴露时间。将所取囊胚放入恒温箱中培养,及时查看囊胚发育状况,及时更换液滴继续培养。

根据Gardner分级,对3.5 dpc的囊胚进行分级后统计。I级:早期囊胚,囊胚腔体积<囊胚总体积的1/2;II级:囊胚腔体积>囊胚总体积的1/2;III级:完全扩张囊胚,囊胚腔占据整个囊胚;IV级:扩张后囊胚,囊胚腔体积较早期囊胚明显扩大,透明带变薄;V级:正在孵化的囊胚,囊胚正在从透明带破裂口孵出;VI级:孵化出的囊胚,囊胚完全从透明带中脱出。

小鼠囊胚在KSOM中孵育暂存,培养6~12 h后可选出孵化前(I、II、III、IV级囊胚)、孵化中(V级囊胚)、孵化完成(VI级囊胚)和到期孵化停滞囊胚共4组。将4组囊胚分别进行反转录、qPCR及免疫荧光染色试验。

1.5 基因表达的qPCR验证

从6只雌鼠体内取出囊胚共150枚,将囊胚在KSOM培养液中培养直至孵化,每个时期选取5枚囊胚,共计20枚胚胎。每个时期胚胎裂解后反转录得到cDNA。每5枚囊胚可反转录得到120 μL cDNA,每个时期验证10个基因,每个基因3个重复。

首先使用试剂盒合成cDNA,对不同时期的囊胚

分别进行裂解、RNA提取及反转录,反转录获得的cDNA放入-20℃储存供qPCR使用。先前通过转录组分析已经筛选出了10个关键基因(*Cd36*、*Ccl9*、*C3*、*Cyp17a1*、*IL-1a*、*Ccl5*、*Susd4*、*Cfb*、*Ptgs1*、*Lyz2*),设计qPCR扩增引物。使用看家基因*Gapdh*作为内参,以各个时期的cDNA作为模板,利用对应的引物PCR扩增目的片段。反应体系:20 μL反应体积,含10 μL *BlasTaq 2*×qPCR Master Mix,上游、下游引物各0.5 μL,2 μL cDNA。扩增反应条件为:95℃,1 min,1个循环;95℃,15 s;60℃,1 min;45个循环。扩增产物4℃保存。扩增产物在含核酸染料的质量分数为2%琼脂糖凝胶、1×TAE缓冲液中电泳20 min,检测扩增条带。跑胶完成后在凝胶成像仪中成像。对扩增产物的荧光信号达到设定荧光阈值对应的扩增循环数(CT值)按照Livak法进行分析处理,可定量反映扩增产物的浓度。

1.6 关键基因表达的免疫荧光试验

选取每个时期的囊胚30枚,分为6个检测组(control、C3、Cdx2、Il-1β、Lyz2、Plac1),每组5枚囊胚,分别进行免疫荧光染色。一抗染不同的抗体(C3、Cdx2、Il-1β、Lyz2、Plac1),control组不染一抗;二抗均染相同的抗体AF488。

首先将特定时期的囊胚在0.1% PVA中洗3遍,每遍3~5 min,洗去囊胚表面的KSOM及石蜡油。在4% PFA缓冲液中固定20 min,继续用0.1% PVA洗3遍。在室温下用含0.5% Triton X-100的PBS透化15 min,0.1% PVA洗3遍,每遍10 min。随后用4% PBS常温封闭1 h或在37℃恒温箱中封闭30 min。随后分组并分别在2% PBS稀释过的一抗(control组在PVA)中于37℃恒温箱中孵育1 h或者4℃过夜。用0.1% PVA洗3遍后,将囊胚在相应二抗中避光、37℃孵育1 h。孵育结束用0.1% PVA洗3遍,将囊胚移入DAPI中染色5 min,再次移入0.1% PVA中,使用激光扫描共聚焦显微镜对样品进行成像。对拍摄的照片进行荧光强度分析,采用平均灰度值(mean±SEM)评价囊胚孵化过程中的分子蛋白表达水平。

1.7 数据统计分析

采用Microsoft Excel 2016进行试验数据处理,采用Origin 2018(OriginLab Corp, USA)绘制图表。所用数据均有3个重复,采用均一化处理后进行不同时期相对表达量的趋势分析。

2 结果与分析

2.1 转录组聚类分析

分别对孵化前囊胚(E)、A位点孵化囊胚(A-site)、B位点孵化囊胚(B-site)、C位点孵化囊胚(C-site)、孵化后囊胚(H)和孵化停滞囊胚(N)进行RNA-Seq测序。通过转录组分析发现,在孵化进程中的每个进程囊胚基因表达呈一致的相关性聚类,且呈现规律化的转变;完全孵化的囊胚和孵化前囊胚各自分为不同的2类(图1)。

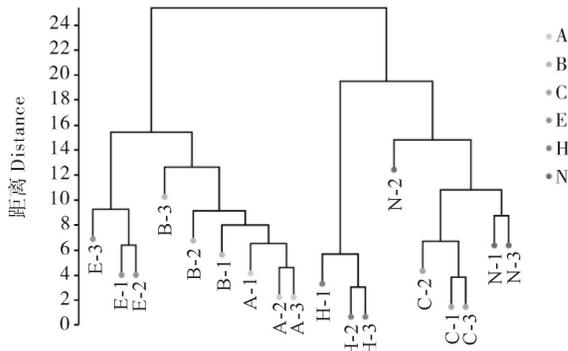


图1 转录组样本聚类分析

Fig. 1 Transcriptome sample cluster analysis

对出生率相差最大的B-site、C-site孵化囊胚差异基因进行分析,发现共有178个基因转录表达差异显著($P < 0.05$),其中75个基因表达上调,103个基因表达下调(图2)。对差异基因进行分析发现,与免疫

炎症相关的基因 *IL-1a*、*IL-1b* 等在B-site与C-site间呈现显著差异,表明即使同为孵化中的发育进程,分化分子事件依然不同。

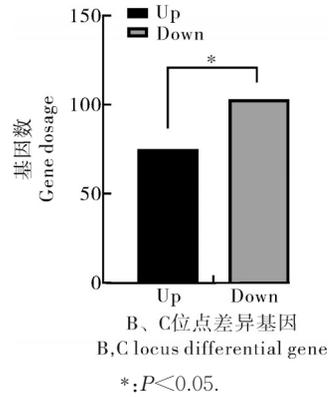
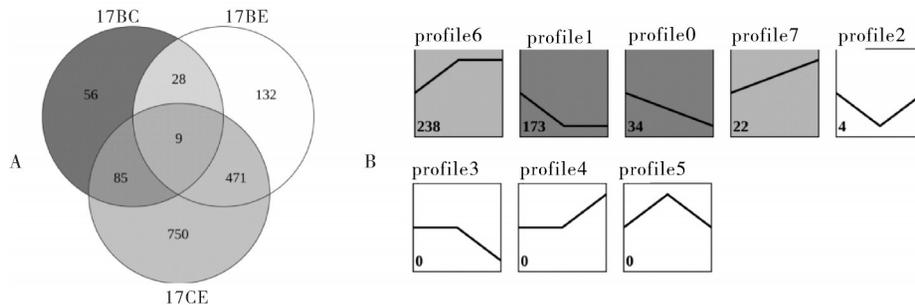


图2 B、C位点差异基因分析柱状图

Fig. 2 Histogram of differential gene analysis at B and C site

2.2 基因表达分化模式分析

通过对E、B-site、C-site、N囊胚差异基因韦恩图分析,发现471个基因的表达与囊胚的孵化有相关性(图3A),这决定了从扩张囊胚到B-site、C-site孵化表型发育的关键基因。对这471个相关基因进行趋势分析,得到两类趋势图(图3B),其中呈现下降趋势的基因有207个,上调趋势的基因有260个。结果表明,囊胚孵化基因表达一类呈上调表达,一类呈下调表达,共同决定了分化进程与相关分子事件。



A: B、C位点差异基因韦恩图;B:差异基因趋势图。A: Venn map of differential genes at sites B and C; B: Trend map of differential genes.

图3 差异基因表达趋势分析

Fig. 3 Trend analysis of differential gene expression

2.3 基因表达与生物进程分析

对分化模式中的差异基因进行GO分析,富集的前10个信号通路中主要是免疫与炎症相关通路(图4),如:刺激反应、补体的激活、体液免疫反应和白介素1受体结合等。提示孵化进程发生了免疫学相关生物学转变,与胚胎着床的妊娠识别相关。

KEGG分析中富集的前10个信号通路主要包括病毒感染、细胞因子与受体互动、信号的调控转录等

相关信号通路,这些信号通路都与先天免疫相关,表明囊胚发育过程中免疫学特征发生转变(图5)。结果表明,孵化后的囊胚在子宫中与黏膜免疫细胞发生先天免疫相关反应,支持妊娠阶段着床的发生。

2.4 PCR结果分析

qPCR扩增结果发现,在小鼠囊胚孵化过程中, *Ptgs1*、*Ly2*、*Il-α*、*Cfb*、*Ccl9*基因表达上调, *Cd36*基因表达下调, *Ccl5*、*C3*、*Cyp17a1*、*Ptgs1*处于较低表达水平或

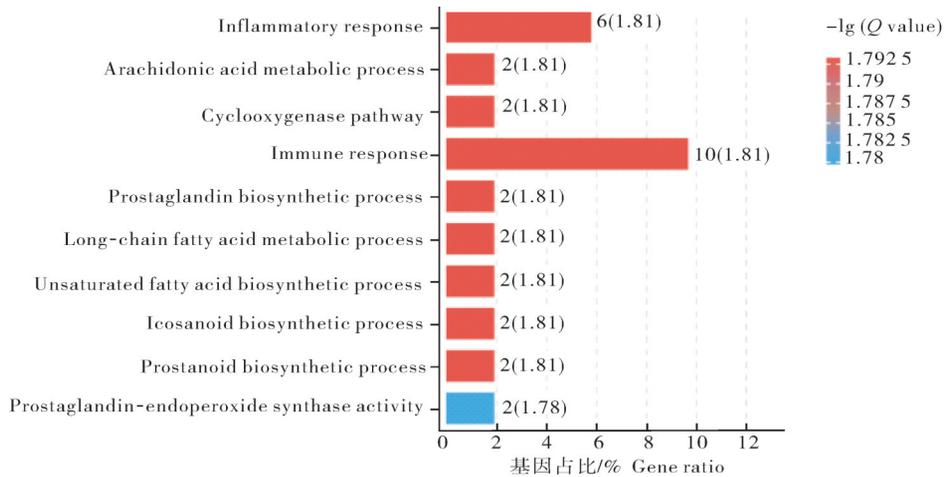


图4 GO富集条形图

Fig.4 GO enrichment bar chart

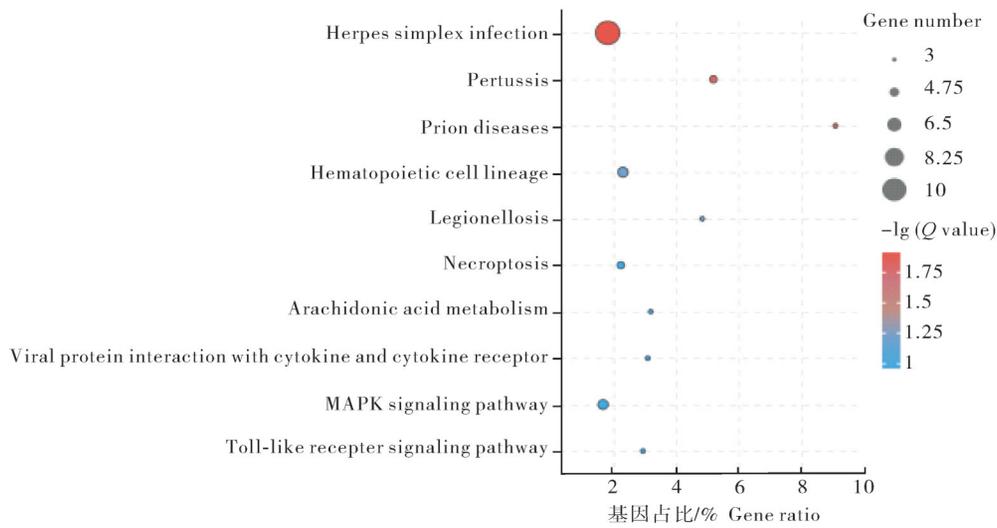


图5 KEGG分析显著性气泡图

Fig.5 KEGG analyzed significant bubble maps

相对表达量为0(图6)。qPCR检测的基因表达水平与转录组分析中孵化进程的基因表达呈现一致性变化,证实转录组测序分析中呈现的基因表达水平可靠。

2.5 免疫荧光染色结果分析

通过对免疫荧光的平均灰度值进行分析,数据显示C3、Cdx2、Il-1 β 、Lyz2、Plac1在囊胚中均呈现阳性表达,control组没有绿色荧光,证明试验结果可靠。不同分子在小鼠囊胚中表达模式不同,但同一基因在不同时期的表达模式相同(图7)。分析发现C3、Il-1 β 、Lyz2、Plac1主要在TE上表达,Cdx2表达于TE的细胞核上,在囊胚孵化出的细胞中也有表达。免疫荧光染色结果显示Plac1、Ccdx、C3在小鼠囊胚孵化过程中表达下调,Lyz2、Il-1 β 在小鼠囊胚孵化过程中表达上调,与转录组分析和qPCR结果分析基因表达趋势一致(图8)。到期未孵化囊胚仍可检

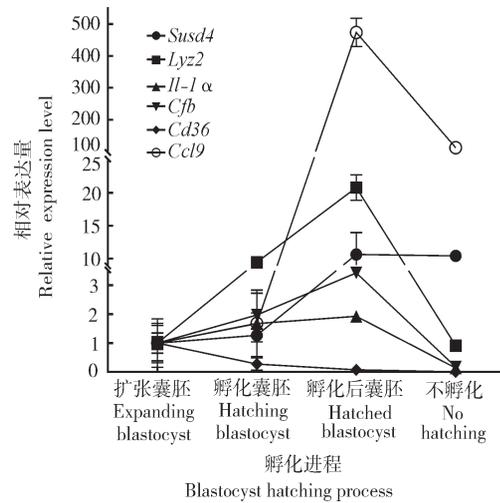


图6 关键差异基因在胚胎孵化进程中的表达
Fig.6 Expression of key differential genes during embryo hatching

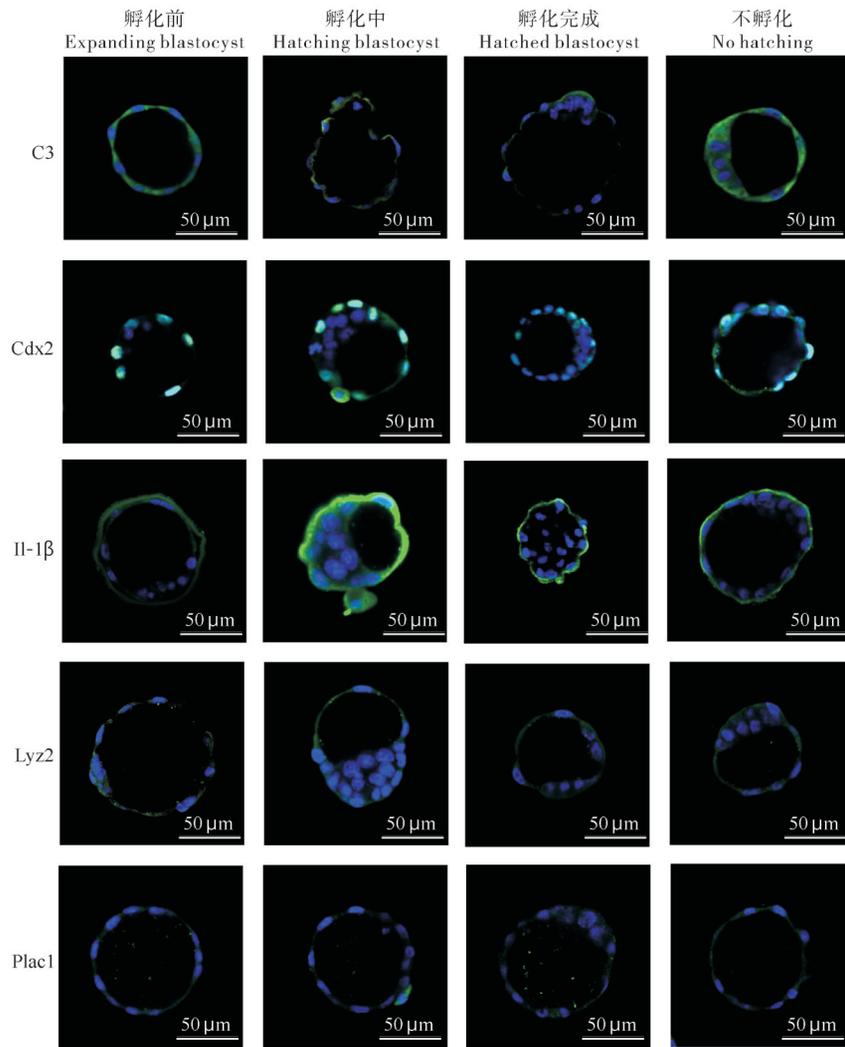


图 7 免疫荧光染色检测关键基因在胚胎孵化中的蛋白表达

Fig.7 The protein expression of key genes during embryo hatching detected using immunofluorescence staining

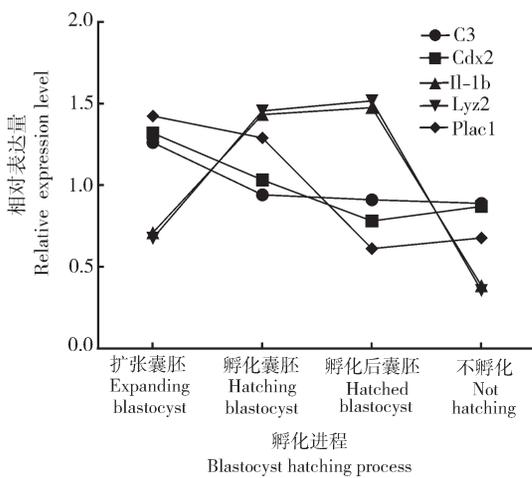


图 8 关键分子在孵化过程的蛋白表达分化趋势

Fig.8 Differential trends in protein expression of key molecules during incubation

测到相关分子的 FITC 荧光信号,因此并不是死亡导致的发育终止,可以猜测是由于体外培养条件的改变或体外操作等导致囊胚发生透明带的二次硬化,进而导致其孵化困难,发育停滞,从而显现出差异化的分子表达。

3 讨论

囊胚的植入是成功妊娠的关键,胚胎通过侵入母体子宫组织获取其生存和发育所必需的营养物质。植入是一个持续变化的动态和交互的过程,需要囊胚和子宫内膜之间精细的双向通讯,包括免疫细胞、细胞因子、生长因子、趋化因子和黏附分子等方面的细胞和分子互作^[12]。子宫内膜通常由类固醇激素和胚胎信号启动免疫调节,利用细胞微囊泡调节生理微环境中的 microRNA、蛋白质和脂质,用于

随后的胚胎植入和维持妊娠^[13]。本研究以小鼠为试验模型,发现小鼠囊胚在孵化过程中存在特殊的基因表达分化趋势,涉及的差异基因聚类到免疫相关信号通路。孵化过程的分化,可能是胚胎为植入做积极准备。解析着床前窗口期胚胎的发育,可为揭示胚胎着床分子机制提供新视野。

研究表明母体免疫系统对胚胎植入有积极贡献,胚胎信号被母体免疫细胞识别以诱导免疫耐受,通过激活炎症和免疫变化来诱导子宫内膜分化并促进胚胎着床,从而促进子宫内膜容受性^[14-16]。在植入过程中,子宫免疫细胞,包括NK细胞、巨噬细胞、树突状细胞和T细胞,密切合作建立有利于胚胎植入的支持环境^[15-16]。研究报道显示,胚胎着床是一个炎性平衡的动态过程,如促炎症因子和抗炎因子会在胚胎和子宫内膜中呈现动态表达,这些细胞因子在囊胚孵化和植入中发挥重要的作用^[6,17]。促炎症细胞因子系统可能在囊胚孵化中处于支配地位,细胞因子和细胞通路系统同样在囊胚孵化过程中发挥重要作用,在小鼠植入初期,胚胎信号通过内分泌系统和免疫系统的合作,在胚胎附着之前实现对子宫内膜分化的双重控制^[18-19],胚胎会表现出大量免疫相关基因的动态表达,参与免疫调节,建立免疫耐受,为小鼠胚胎着床做准备^[20-22]。本研究发现,*Ptgs1*、*Lyz2*、*IL-1 α* 、*Cfb*、*Ccl9*呈上调表达,可能参与着床相关的反应,但孵化过程中的炎性分子参与着床的机制还需进一步研究。

参与胚胎着床的相关分子之间的调控是相当复杂的,不同时期的特定基因表达介导特定的分子事件,涉及多种基因、细胞因子及信号转导通路的调控^[23-27],其确切的机制相当复杂,至今仍未被阐明。本研究显示,孵化进程相关差异基因参与了病毒感染、细胞因子与受体互作、信号的调控转录等相关信号通路,这些信号通路都与先天免疫相关,表明囊胚发育过程中免疫学特征发生转变。本研究表明孵化后的囊胚在子宫中与黏膜免疫细胞发生了先天免疫相关反应。以往相关研究并未阐明囊胚孵化过程中关键分子的分化机制与差异变化。本研究通过转录组分析发现关键基因在mRNA、蛋白层面一致化的表达模式,关键基因在分化过程中呈现特定的分化模式。研究为进一步解析囊胚孵化过程中的分子事件提供了新的研究方法,对继续深入探究胚胎自然孵化规律及其与妊娠的分子机制提供了数据基础。本研究中,经过转录组分析与差异基因功能分析后,

只选择了其中部分差异基因,并未全面比较小鼠囊胚发育过程中的全基因表达模式,或许有部分与小鼠囊胚孵化事件相关的关键基因被忽略。因此,下一步需要继续深入探究孵化过程中的基因表达及分化模式。

囊胚孵化的过程是一群不同的基因有规律地变化的过程,体现在相关基因的趋势变化,差异基因呈现聚类表达。囊胚孵化过程中会发生一系列分子事件,其中的关键分子在群体和个体中均出现差异化表达。本研究通过对特定孵化时期的多枚小鼠囊胚进行试验,明确关键基因在小鼠孵化过程中的特异表达,可作为解析囊胚着床发育分化命运的检测目标分子,筛选出的目的基因可以作为胚胎质量预测及鉴定的关键分子,可为解析囊胚着床发育分化提供可靠的数据支撑。解析胚胎信号以进一步阐明免疫控制机制,将有助于有效开展临床生殖障碍免疫治疗,最大限度减少植入失败。

参考文献 References

- [1] MOROS-NICOLÁS C, CHEVRET P, JIMÉNEZ-MOVILLA M, et al. New insights into the mammalian egg zona pellucida [J/OL]. *International journal of molecular sciences*, 2021, 22 (6) : 3276 [2023-08-29]. <https://doi.org/10.3390/ijms22063276>.
- [2] PARK S B, KIM H J, CHOI Y B, et al. The effect of various assisted hatching techniques on the mouse early embryo development [J]. *Clinical and experimental reproductive medicine*, 2014, 41(2) : 68-74.
- [3] LEONAVICIUS K, ROYER C, PREECE C, et al. Mechanics of mouse blastocyst hatching revealed by a hydrogel-based microdeformation assay [J]. *PNAS*, 2018, 115 (41) : 10375-10380.
- [4] LIN S P, LEE R K K, TSAI Y J. Animal experimentation: *in vivo* hatching phenomenon of mouse blastocysts during implantation [J]. *Journal of assisted reproduction and genetics*, 2001, 18(6) : 341-345.
- [5] KAWAMURA K, CHEN Y, SHU Y M, et al. Promotion of human early embryonic development and blastocyst outgrowth *in vitro* using autocrine/paracrine growth factors [J/OL]. *PLoS one*, 2012, 7 (11) : e49328 [2023-08-29]. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0049328>.
- [6] SESHAGIRI P B, VANI V, MADHULIKA P. Cytokines and blastocyst hatching [J]. *American journal of reproductive immunology*, 2016, 75(3) : 208-217.
- [7] HARDY K, SPANOS S. Growth factor expression and func-

- tion in the human and mouse preimplantation embryo[J]. The journal of endocrinology, 2002, 172(2): 221-236.
- [8] DiAZ-CUETO L, GERTON G L. The influence of growth factors on the development of preimplantation mammalian embryos [J]. Archives of medical research, 2001, 32 (6) : 619-626.
- [9] LACEY L, HASSAN S, FRANIK S, et al. Assisted hatching on assisted conception *in vitro* fertilisation (IVF) and intracytoplasmic sperm injection (ICSI)[J/OL]. The Cochrane database of systematic reviews, 2021, 3(3): CD001894 [2023-08-29]. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD001894.pub5>.
- [10] ELHUSSIENY A, EL MANDOUH M, HANAFI S, et al. Effect of laser assisted hatching on clinical outcome of assisted reproductive technology [J]. Ain-Shams medical journal, 2013, 64(4): 18-23.
- [11] LIU H C, COHEN J, ALIKANI M, et al. Assisted hatching facilitates earlier implantation[J]. Fertility and sterility, 1993, 60(5): 871-875.
- [12] VAN MOURIK M S M, MACKLON N S, HEIJNEN C J. Embryonic implantation: cytokines, adhesion molecules, and immune cells in establishing an implantation environment[J]. Journal of leukocyte biology, 2009, 85(1): 4-19.
- [13] HSIENMING W, LIANGHSUAN C, LETIEN H, et al. Immune tolerance of embryo implantation and pregnancy: the role of human decidual stromal cell- and embryonic-derived extracellular vesicles[J/OL]. International journal of molecular sciences, 2022, 23 (21) : 13382 [2023-08-29]. <https://doi.org/10.3389/ijms.2022.13382>.
- [14] ROBERTSON S A, CHIN P Y, GLYNN D J, et al. Peri-conceptual cytokines-setting the trajectory for embryo implantation, pregnancy and beyond[J]. American journal of reproductive immunology, 2011, 66(S1): 2-10.
- [15] HIROSHI F, YOSHIHIKO A, KAZUHIKO I, et al. Dual positive regulation of embryo implantation by endocrine and immune systems-step-by-step maternal recognition of the developing embryo[J]. American journal of reproductive immunology, 2016, 75(3): 281-289.
- [16] FUJIWARA H, ONO M, SATO Y, et al. Promoting roles of embryonic signals in embryo implantation and placentation in cooperation with endocrine and immune systems [J/OL]. International journal of molecular sciences, 2020, 21 (5) : 1885 [2023-08-29]. <https://doi.org/10.3390/ijms21051885>.
- [17] SESHAGIRI P B, ROY S S, SIREESHA G, et al. Cellular and molecular regulation of mammalian blastocyst hatching [J]. Journal of reproductive immunology, 2009, 83 (1/2) : 79-84.
- [18] FUJIWARA H. Immune cells contribute to systemic cross-talk between the embryo and mother during early pregnancy in cooperation with the endocrine system [J]. Reproductive medicine and biology, 2006, 5(1): 19-29.
- [19] ZHIROSHI F. Do circulating blood cells contribute to maternal tissue remodeling and embryo-maternal cross-talk around the implantation period? [J]. Molecular human reproduction, 2009, 15(6): 335-343.
- [20] MCGOWEN M R, EREZ O, ROMERO R, et al. The evolution of embryo implantation [J]. The international journal of developmental biology, 2014, 58(2/3/4): 155-161.
- [21] YOSHINAGA K. Two concepts on the immunological aspect of blastocyst implantation[J]. The journal of reproduction and development, 2012, 58(2): 196-203.
- [22] REN X L, LIU Q, CHEN W, et al. Effect of the site of assisted hatching on vitrified-warmed blastocyst transfer cycles: a prospective randomized study[J]. Journal of assisted reproduction and genetics, 2013, 30(5): 691-697.
- [23] MATSUMOTO H. Molecular and cellular events during blastocyst implantation in the receptive uterus: clues from mouse models [J]. The journal of reproduction and development, 2017, 63(5): 445-454.
- [24] HIROMICHI M, EMIKO F, MIDORI Y. Molecular and cellular events involved in the completion of blastocyst implantation[J]. Reproductive medicine and biology, 2016, 15(2): 53-58.
- [25] ZHANG S, KONG S B, LU J H, et al. Deciphering the molecular basis of uterine receptivity[J]. Molecular reproduction and development, 2013, 80(1): 8-21.
- [26] ZHANG S, LIN H Y, KONG S B, et al. Physiological and molecular determinants of embryo implantation[J]. Molecular aspects of medicine, 2013, 34(5): 939-980.
- [27] DEY S K, LIM H, DAS S K, et al. Molecular cues to implantation[J]. Endocrine reviews, 2004, 25(3): 341-373.

Dynamic changes of key genes expression in mice during hatching of blastocysts

LIU Zihan, TENG Yadi, MA Meixiang, WU Yulin, AN Liyou

College of Life Science and Technology, Xinjiang University, Urumq 830017, China

Abstract The mouse blastocysts were used as a model to study the expression profiles of key genes in mice during the hatching and development of blastocyst and to further analyze the mechanism of pregnancy recognition. The transcriptome of blastocysts at different stages of the hatching process was analyzed. The expression levels of key genes were detected with qPCR. The expression patterns of key proteins were studied with immunofluorescence staining. The results of analyzing the transcriptome showed that the expression of differential genes exhibited two regulatory patterns during the hatching process of mouse blastocysts from expansion, hatching to the completion of hatching. The results of GO analysis and KEGG analysis on the set of genes in the regulatory pattern showed that they were involved in biological processes including immunity and inflammation, cell differentiation, and apoptosis, etc. The results of qPCR showed that the expression of key genes *Ptgs1*, *Lyz2*, *Il-1 α* , *Cfb* and *Ccl9* were up-regulated, while *Cd36* was down-regulated during hatching of mouse blastocysts, which was consistent with the results of transcriptome analyses. The results of immunofluorescence staining showed that *Plac1*, *Cdx2* and *C3* were down-regulated, while *Lyz2* and *Il-1 β* were up-regulated during the hatching of mouse blastocysts. It is indicated that the expression of gene exhibits specific dynamics of differentiation and the expression of abnormal gene can lead to hatching at a standstill.

Keywords mouse blastocysts; hatching; gene expression; pattern of differentiation; growth and development

(责任编辑:赵琳琳)