

· 综 述 ·

动物胚胎植入与子宫内膜类器官研究进展

涂静怡¹, 申长庆¹, 雷锐玲¹, 杨洁², 王世成¹, 彭思祺¹, 李浪¹, 邱小燕^{1*}

1 西南大学 动物科学技术学院 重庆市草食动物科学重点实验室, 重庆 400715

2 昆明理工大学 灵长类转化医学研究院, 云南 昆明 650500

涂静怡, 申长庆, 雷锐玲, 杨洁, 王世成, 彭思祺, 李浪, 邱小燕. 动物胚胎植入与子宫内膜类器官研究进展[J]. 生物工程学报, 2024, 40(12): 4452-4466.

TU Jingyi, SHEN Changqing, LEI Ruiling, YANG Jie, WANG Shicheng, PENG Siqi, LI Lang, QIU Xiaoyan. Research progress in animal embryo implantation and endometrial organoids[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2024, 40(12): 4452-4466.

摘 要: 胚胎植入涉及胚胎与母体子宫内膜间复杂的相互作用, 目前对于胚胎植入仍然有许多问题有待探究。子宫内膜上皮类器官与子宫内膜组装体模型为体外研究胚胎植入的过程提供了一个全新的思路。本文总结了胚胎植入过程、雌孕激素协同、胚胎源信号对子宫内膜容受态建立的调控机制、子宫内膜类器官的建立、子宫内膜组装体以及利用内膜组装体探索母-胎互作的最新研究进展, 为研究胚胎植入过程中胚胎与母体子宫间的交流互作提供了新策略。

关键词: 胚胎植入; 子宫内膜; 子宫内膜类器官; 子宫内膜组装体

Research progress in animal embryo implantation and endometrial organoids

TU Jingyi¹, SHEN Changqing¹, LEI Ruiling¹, YANG Jie², WANG Shicheng¹, PENG Siqi¹, LI Lang¹, QIU Xiaoyan^{1*}

1 Chongqing Key Laboratory of Herbivore Science, College of Animal Science and Technology, Southwest University, Chongqing 400715, China

2 Institute of Primate Translational Medicine, Kunming University of Science and Technology, Kunming 650500, Yunnan, China

Abstract: Embryo implantation involves a complex interaction between the embryo and the endometrium of the mother, the study of which faces a variety of problems. The modeling of endometrial epithelial organoids and endometrial assembloids provides a new way to study the

资助项目: 国家自然科学基金(32072778); 贵州省科技计划(黔科合支撑[2022]重点 027)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (32072778), and the Science and Technology Project of Guizhou Province (Qiankehe Support [2022] Key 027).

*Corresponding author. E-mail: lym@swu.edu.cn

Received: 2024-02-22; Accepted: 2024-05-10

process of embryo implantation *in vitro*. This paper summarized the latest research progress in embryo implantation, the regulation mechanism of endometrial receptivity by estrogen-progesterone coordination and embryo-derived signals, the establishment of endometrial organoids, and the development and application of endometrial assembloids in the research on mother-embryo interaction, providing new strategies for studying the communication between embryo and maternal uterus during implantation.

Keywords: embryo implantation; endometrium; endometrial organoids; endometrial assembloids

类器官是近年来的研究热点, 胚胎植入涉及胚胎与母体子宫内膜间复杂的相互作用, 子宫内膜类器官的成功建立, 能够用于探索胚胎体外延时培养以及在体外模拟胚胎植入的过程, 为研究胚胎植入失败的机制提供了可靠的体外模型。本课题组在前期研究中利用空气-液体界面培养方法, 成功建立了具有腔上皮、腺上皮和基质细胞的子宫内膜类器官模型(ALI-EnAO), 并证实了该模型能够响应激素诱导、呈现月经周期的变化^[1]。本文总结了胚胎植入过程、雌孕激素协同和胚胎源信号这2个因素对子宫内膜容受态建立的影响, 也对子宫内膜类器官、子宫内膜组装体的建立进行了小结, 最后对利用子宫内膜组装体探索母-胎互作的最新研究进行了综述, 为揭示胚胎与母体的互作机制提供了新的思路, 并为调控生殖过程、提高哺乳动物妊娠率奠定了理论基础。

1 胚胎植入

哺乳动物的胚胎发育起始于精子与卵细胞结合形成的受精卵, 受精卵在输卵管中进行多次卵裂并最终形成囊胚。活化的囊胚与母体子宫交叉互作, 与母体建立血供关系, 为胚胎的发育提供营养和生长条件。胚胎植入是哺乳动物胚胎发育过程中的一个重要环节, 胚胎只有与具有容受性的子宫内膜相互接触并交流, 才能建立母-胎关系, 实现两者的物质交换并促进胚胎正常发育。

人类的生殖效率极低, Muter 等^[2]研究发现在所有受孕的年轻健康女性中, 只有40%–60%能够成功妊娠, 其中约30%的妊娠失败是由于胚胎植入失败而导致。在家畜中, 胚胎损失也大多发生在着床阶段, 这也成为家畜繁殖效率低下的一个重要原因。Mathew 等^[3]研究发现高产奶牛的繁殖效率只有40%左右, 2/3的妊娠在围着床期停止; 猪和马中, 在植入时也观察到较高的胚胎死亡率^[4]。因此, 深入探究胚胎植入及其机制对于提高妊娠效率至关重要。

1.1 不同物种胚胎植入方式

不同物种间的着床方式具有一定的区别(表1), 人和啮齿类动物主要采用侵入性植入方式, 即滋养层侵入进子宫内膜内部; 而根据侵袭深度的不同, 侵入性植入又分为偏心植入(eccentric implantation)和间质植入(interstitial implantation), 偏心植入是指胚胎部分嵌入子宫组织, 留下的部分暴露在子宫腔中; 而间质植入是指胚胎深入子宫, 被子宫内膜组织完全吞噬。对于家畜动物和非人灵长类, 主要采用的是非侵入性植入方式, 即胚胎与子宫内膜表面接触并黏附^[5]。虽然不同物种的胚胎植入方式不同, 但最终的目标都是与子宫建立密切的联系。

1.2 胚胎植入过程

在人类中, 胚胎植入发生在月经周期的黄体期^[6]。胚胎与子宫内膜之间的相互作用大致上可以分为定置、黏附、侵入这3个步骤(图1)。

表 1 不同物种植入方式之间的对比^[5]Table 1 Comparison between implantation of different species^[5]

Species	Menstrual cycle (d)	Implantation time (days of pregnancy)	Types of implantation	Pregnancy stage (d)
Human	28	6-7	Invasive implantation (interstitial implantation)	283
Mouse	4-5	4.5	Invasive implantation (eccentric implantation)	21
Porcine	21	13	Non-invasive implantation	114
Cattle	21	19	Non-invasive implantation	280
Sheep/Goat	16-19/18-21	14	Non-invasive implantation	150
Horse	21	42	Non-invasive implantation	336

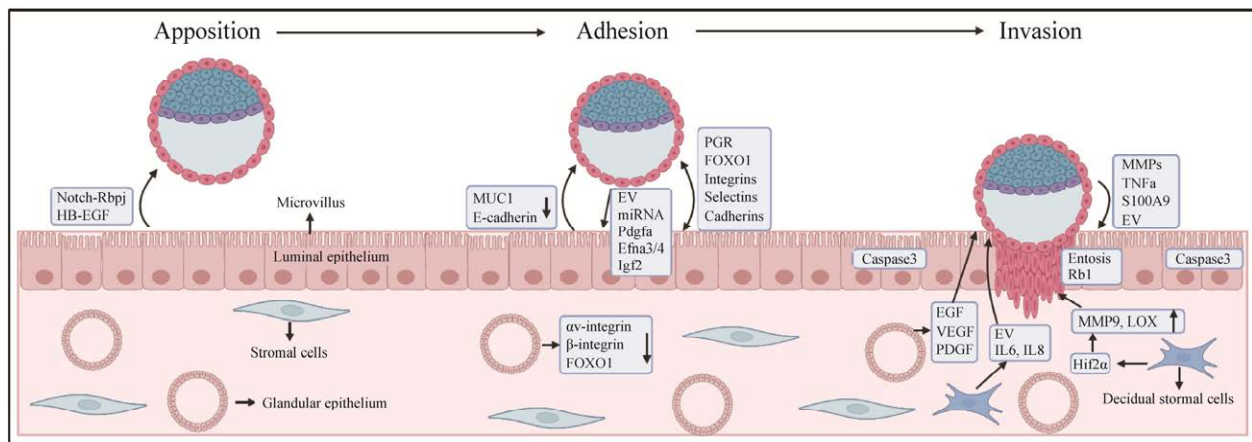


图 1 胚胎植入过程

Figure 1 The process of embryo implantation. Notch-Rbpj: Signaling pathway (Rbpj is the major downstream effector of the evolutionarily conserved Notch signaling pathway); HB-EGF: Heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor; MUC1: Mucin 1; EV: Extracellular vesicles; miRNA: microRNA; Pdgfa: Platelet-derived growth factor alpha polypeptide; Efna3/4: Ephrin A3/4; Igf2: Insulin like growth factor 2; PGR: Progesterone-receptor; FOXO1: Forkhead box O1; MMPs: Matrix metalloproteinases; TNF α : Tumor necrosis factor α ; S100A9: S100 calcium-binding protein A9; EGF: Epidermal growth factor; VEGF: Vascular endothelial growth factor; PDGF: Platelet-derived growth factor; IL6: Interleukin 6; IL8: Interleukin 8; Rb1: Retinoblastoma; LOX: Lipoxygenase; Hif2 α : Hypoxia inducible factor 2 α .

1.2.1 定置(apposition)

胚胎定置是指滋养外胚层细胞(trophoblast, TE)与子宫内腔上皮细胞接触,是胚胎与子宫之间的第一次交流。胚胎可以通过子宫内腔上皮中的纤毛摆动来寻找适合植入的位点, Deng 等^[7]发现这个过程主要由肝素结合表皮生长因子(heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor, HB-EGF)信号传导驱动(图 1), HB-EGF 主要在子宫的上皮细胞中表达,其受

体在囊胚中表达,通过受体-配体间的相互作用,囊胚与子宫进行接触。研究表明,Notch 信号通路分子 Rbpj 与囊胚在子宫内的准确定位密切相关^[8](图 1)。小鼠胚胎在植入前会在子宫中不断滚动来寻找一个适合植入的位点,这与胚胎-子宫间的交流互动密切相关,但其中的具体机制尚不明确。

1.2.2 黏附(adhesion)

囊胚与子宫内膜上皮细胞接触后,滋养层

通过整合素、选择素、钙黏蛋白等黏附分子与子宫内膜上皮细胞建立更紧密的相互作用,从而促进胚胎牢固地黏附在子宫内膜上。Gebriel 等^[9]发现子宫内膜上皮特异性孕激素受体 (progesterone receptor, PR)对胚胎黏附至关重要(图 1),上皮特异性 PR 基因缺失导致管腔上皮细胞在胚胎发育第 3.5 天(E3.5)时持续增殖,且管腔上皮的极性保持不变,抑制了胚胎附着。Adiguzel 等^[10]研究发现在小鼠胚胎植入时,FOXO1 在管腔上皮和腺上皮中的表达也显著上调(图 1),而 FOXO1 敲除小鼠的管腔上皮极性和细胞凋亡改变,使胚胎不能成功黏附。研究也发现,在胚胎附着位点的管腔上皮顶端的黏蛋白 1 (mucin1, MUC1)的表达水平会局部降低,而 αV 和 $\beta 3$ 整合素亚基的表达会有所增加^[11](图 1)。管腔上皮这些局部的变化很有可能是胚胎的作用导致的,对胚胎的成功黏附至关重要。

在滋养层黏附过程中,胚胎来源的细胞外囊泡(extracellular vesicles, EV)和 microRNA (miRNA)也发挥着关键作用(图 1)。EV 是由大多数细胞分泌的小型膜结合结构,能够携带并向其他细胞输送重要的生物大分子,例如蛋白质、脂类、DNA 和 mRNA (包括 miRNA)^[12]。miRNA 是小型非编码 RNA 分子,能够与目标 mRNA 结合并调节基因表达。miRNA 可以在细胞内发挥作用,也能够以游离或者与 EV 结合的形式分泌,之后被靶细胞接收并控制基因表达^[13]。胚胎/滋养层细胞 EV 中含有多种 miRNA,这些 miRNA 在子宫内膜上皮细胞和基质细胞上都有不同的靶点,据推测,这些靶基因可能改变子宫内膜的基因表达,从而介导滋养层的黏附^[14]。Tan 等^[15]在对小鼠子宫内膜的测序中发现,子宫内膜也存在许多 EV,且 miR-34c-5p、miR-210、miR-369-5p、miR-30b 和 miR-582-5p 在“植入窗口”时期大量富集,同

时发现 miR-34c-5p 可调控生长停滞特异性 1 (growth arrest specific 1, GAS1)的表达水平,从而促进胚胎正常着床。Wang 等^[16]研究发现,胚胎来源的血小板衍生生长因子受体 α (platelet-derived growth factor receptor α , Pdgfa)和肝配蛋白 A3/4 (Efna3/4)与母体源信号共同作用(图 1),激活管腔上皮中特定的功能,促进胚胎与子宫内膜的黏附。Wang 等^[17]最新的研究发现胚胎来源的胰岛素样生长因子 2 (insulin-like growth factor 2, Igf2)还能够激活上皮信号传导及转录激活蛋白 3 (signal transducer and activator of transcription 3, STAT3),增加溶酶体的数量和酸化程度,使得紧密连接蛋白 1 (claudin 1, Cldn1)和 Muc1 表达降低,促进胚胎的黏附(图 1)。胚胎与子宫内膜的黏附作用不仅涉及子宫内膜自身的改变,还与胚胎来源的上述多种信号分子有关,这个复杂的过程对于胚胎的成功植入至关重要。

1.2.3 侵入(invasion)

滋养层与子宫内膜黏附后,随着滋养外胚层(trophectoderm, TE)迁移和侵袭能力变强,植入位点的上皮细胞极性丢失以及细胞外基质(extracellular matrix, ECM)重塑,腔上皮细胞被破坏,使得 TE 能够侵入蜕膜组织,以到达母体的毛细血管从而确保对胚胎的血液供应。

在侵袭的过程中,人类的滋养层会分化为侵袭性绒毛外滋养层(extrayillous trophoblast, EVT),小鼠的滋养层则分化为滋养层巨细胞(trophoblast giant cell, TGC),这 2 种细胞类型的分化可能与子宫内膜产生的激素和分泌因子有关,EVT 和 TGC 这 2 种滋养层细胞会分泌不同的基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinases, MMP)使部分 ECM 得到降解,促进滋养层进入到子宫内膜基质部分^[18-19](图 1)。

然而,胚胎破坏子宫内膜腔上皮细胞的确切机制还有待研究。在小鼠中,植入部位的管

腔上皮细胞被破坏,但是没有检测到凋亡标志物。内吞作用(entosis)是一种细胞被另一种细胞吞噬的现象,这可能是上皮被破坏的一种方式,同时,研究也发现滋养层通过内吞作用,使其接触的上皮细胞被破坏,而不与囊胚接触的上皮细胞则通过胱天蛋白酶 3 (caspase 3)介导其凋亡^[20] (图 1)。体外细胞实验也证明,滋养层细胞可以吞噬子宫内膜上皮细胞,这表明在胚胎植入过程中,内吞可能是滋养层侵入子宫内膜的另一种途径,滋养层细胞可能会吞噬腔上皮细胞,从而使胚胎嵌入子宫内膜基质^[20]。同时胚胎中的一些促炎细胞因子,例如肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor α , TNF α)通过 TNFR 和 p38 蛋白来实现对上皮细胞的去除(图 1);胚胎中的 S100 钙结合蛋白 A9 (S100 calcium-binding protein A9, S100A9)也可能参与上皮细胞的清除,但具体机制还有待进一步探索^[7]。Akaeda 等^[21]研究发现由 *Rb1* 编码的视网膜母细胞瘤蛋白(retinoblastoma protein, RB)是细胞周期停止(cell cycle arrest, CCA)的一个重要原因,在 *Rb1* 敲除小鼠中观察到胚胎植入失败,表明 *Rb1* 诱导的 CCA 参与了腔上皮细胞的死亡从而促进胚胎侵袭(图 1)。Akaeda 等^[22]最新研究发现缺氧诱导因子(hypoxia inducible factor, HIF)是一种重要的转录因子,缺氧诱导因子 2 α (hypoxia inducible factor α , Hif2 α)在胚胎植入后的子宫内膜基质中高表达(图 1),基质 Hif2 α 诱导基质金属蛋白酶 MMP9 和赖氨酰氧化酶(lysyl oxidase, LOX)表达,参与管腔上皮去除和滋养层侵袭过程。

尽管滋养层细胞具有一定的侵袭能力,但是一些分子的参与可以帮助滋养层细胞获得更强的侵袭特性^[23]。研究发现,胚胎内细胞团的胚胎干细胞产生的 EV 可诱发滋养层细胞入侵,体外研究也表明,胚胎干细胞产生的 EV 可增

强滋养层细胞的迁移和入侵^[24]。Liu 等^[25]发现子宫内膜基质细胞蜕膜化后产生的 EV 可以增强滋养层细胞中 N-钙黏蛋白的表达,提高细胞中 SMAD2、SMAD3 的磷酸化水平,促进滋养层的侵袭(图 1)。子宫内膜分泌的一些细胞因子也能够促进滋养层的侵袭,例如子宫内膜腺体分泌的表皮生长因子(epidermal growth factor, EGF)、血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)、血小板衍生生长因子(platelet-derived growth factor, PDGF)等^[26](图 1),一旦胚胎侵入母体,蜕膜化子宫内膜基质细胞的分泌物(例如白细胞介素 6、白细胞介素 8 等)会促进滋养层的侵袭,并且这些分泌物会改变滋养层细胞上黏附分子的表达,使胚胎能够固定在蜕膜组织上。因此,只要胚胎侵入母体,蜕膜化的整个子宫系统都会开始帮助胚胎入侵。

2 子宫内膜

2.1 子宫内膜的结构与功能

激素反应性子宫来源于中段中胚层(intermediate mesoderm)和苗勒氏管(mullerian duct),具有单层管腔上皮和周围未分化的基质;之后上皮发育并内陷入间质部分,形成腺体,未分化的间质也发育成基质。在形成功能性子宫内膜的同时,间质中的子宫肌层也在逐步发育,并且还伴随着免疫细胞的浸润^[27]。Kirkwood 等^[28]研究成年小鼠的子宫发现,由间充质发育而成的基质细胞主要可以分为 5 种类型:位于基底大血管周围的血管平滑肌细胞、位于整个组织小血管周围的周细胞以及 3 种不同类型的成纤维细胞。研究这些细胞的特定功能将为探索胚胎-子宫的相互作用提供新的思路。

小鼠子宫内膜由子宫腔边缘的管腔上皮(luminal epithelium, LE)、嵌入基质组织的腺上

皮(glandular epithelium, GE)和子宫肌层组成。人类子宫内膜由与子宫肌层接触的基底层和邻近子宫腔的功能层组成,这两层都含有腺上皮和基质组织。单细胞测序发现,小鼠子宫内膜中的细胞类型有:上皮细胞(腔上皮和腺上皮)、基质细胞、平滑肌细胞、内皮细胞、免疫细胞;在人类中,还具有纤毛上皮细胞,而其他物种中是否存在这种细胞类型还有待研究^[29]。Wang 等^[16]对妊娠小鼠进行单细胞测序发现,雌激素反应性管腔上皮细胞(estrogen-responsive epithelium, EEC)在功能上分化为黏附上皮细胞(adhesive epithelium, AEC)和支持上皮细胞(supporting epithelium, SEC),而在人类中,SOX9 阳性人子宫内膜上皮细胞(类似于小鼠 EEC)分化为非纤毛管腔上皮(类似于小鼠 SEC)、纤毛管腔上皮(类似于小鼠 AEC)。这一发现对于研究胚胎着床过程以及不同物种间的着床差异具有重要意义。

2.2 子宫内膜容受态的调控

子宫内膜容受性受到母体雌孕激素以及胚胎来源的信号分子的共同作用(图 2)。

2.2.1 雌孕激素协同下上皮-基质串扰

卵巢产生的雌孕激素对子宫内膜“容受窗口”的打开至关重要,雌激素促进子宫内膜上皮细胞的增殖,而孕激素拮抗雌激素的作用,抑制上皮细胞的增殖并诱导分化。雌孕激素的效应主要通过雌激素受体(estrogen receptor, ER)、孕激素受体(PR)来实现(图 2)。

ER 和 PR 均为核受体,主要在上皮细胞和基质细胞的细胞核上表达,ER 有 ER α 和 ER β 这 2 种亚型。在小鼠上的研究表明,雌激素主要通过 ER α 调节子宫内膜容受性,雌激素作用于基质细胞中的 ER α ,促进基质细胞产生有丝分裂增殖信号,例如 IGF1 和 FGF9^[30](图 2),通过旁分泌的作用促进上皮细胞增殖;ER α 也能

够促进 MUC1 的表达(图 2),MUC1 由管腔上皮分泌,阻断囊胚附着^[30]。Fukui 等^[31]研究发现上皮中的 ER α 能够促进腺上皮分泌白血病抑制因子(leukemia inhibitory factor, LIF)(图 2),LIF 作用于管腔上皮并通过旁分泌机制介导基质细胞蜕膜发生,同时,上皮细胞中的 LIF-STAT3 信号转导能够启动植入腔的形成,便于囊胚的附着。孕激素的作用主要是抑制上皮细胞增殖,促进基质细胞增殖和分化,从而促进子宫内膜容受性的建立和基质细胞蜕膜化(图 2)。孕激素受体 PR 具有 PR-A 和 PR-B 这 2 种亚型,对动物模型的研究显示,孕激素主要通过 PR-A 调节子宫内膜功能和蜕膜形成^[30]。因此,ER α 和 PR-A 在胚胎植入和子宫内膜容受性建立过程中的上皮-基质对话机制具有重要作用。Bao 等^[32]最新的研究表明,N6-甲基腺苷(N⁶-methyladenosine, m⁶A)通过在转录后水平影响雌孕激素信号传导,这对于胚胎植入至关重要(图 2)。m⁶A 修饰由甲基转移酶复合物催化,该复合物由甲基转移酶样 3(methyltransferase like 3, METTL3)和甲基转移酶样 4(methyltransferase like 4, METTL4)以及其他调节亚基组成。子宫特异性缺失 METTL3 会导致子宫内膜容受性受损以及植入前胚胎丢失。METTL3 直接靶向 PR 的编码基因(图 2),METTL3 缺失会导致 PR 蛋白水平降低,影响孕激素对子宫内膜的信号传导;METTL3 依赖性 m⁶A 还能够调节雌激素途径,以维持黄体酮和雌激素信号之间的平衡^[32](图 2),这些发现对于深入了解雌激素、孕激素对子宫内膜容受性调节机制具有重要意义。

2.2.2 胚胎源信号参与子宫内膜容受态的调控

子宫内膜容受性除了受到母体雌孕激素的调控外,一些胚胎来源的信号分子也会对其容受性产生影响(图 2)。Wang 等^[16]研究发现,胚胎的血小板源性生长因子(platelet-derived growth

factor, PDGF)和促红细胞生成素产生肝细胞受体 A (erythropoietin-producing hepatocellular receptor A, EPHA)信号能够进一步激活黏附上皮细胞(adhesive epithelium, AEC)和支持上皮细胞(supporting epithelium, SEC), 增强胚胎与子宫内膜的附着(图 2)。胚胎肿瘤坏死因子 TNF 通过上皮 RAC1-Pak1-ERM 通路, 经 TNFR1 和 p38 来清除上皮细胞^[33](图 2), 研究也发现胚胎中高表达的 S100A9 也是促进胚胎植入的关键促炎细胞因子^[34]。Zhou 等^[35]研究发现胚胎来源的胰岛素样生长因子-2 (insulin-like growth factor, IGF2)是促进胚胎植入的一个关键胚胎衍生因子, IGF1R 特异地表达于子宫内膜上皮细胞中, IGF2 可以通过 IGF1R 激活上皮细胞外信号调节激酶 1/2 (extracellular signal-regulated kinase 1/2, ERK1/2)和 STAT3 信号传导, 这对于胚胎附着至关重要。Kim 等^[36]研究发现 HB-EGF 和 VANGL 平面细胞极性蛋白 2 (VANGL planar cell polarity protein 2, Vangl2)对于胚胎植入至关重要(图 2), 将浸泡有 HB-EGF 的琼脂糖珠转移到假孕子宫中, 会引起类似植入的反应, 而在缺失 *Vangl2* 的子宫中, 这种反应就会减弱。目前, 关于胚胎如何与母体子宫相互作用从而促进胚胎植入这一过程的研究还非常有限, 关于母-胎的互作交流仍然需要进一步探索。

2.3 子宫内膜基质蜕膜

子宫内膜基质细胞发生蜕膜化产生子宫内膜蜕膜细胞, 与子宫内的免疫细胞、血管内皮细胞等共同构成子宫内膜蜕膜组织, 蜕膜组织形成涉及子宫内膜基质细胞的分泌转化、特化的自然杀伤细胞的涌入、母体 T 细胞和 B 细胞的排斥以及血管重塑^[37]。该蜕膜组织为早期胚胎生长的物质交换、能量传递提供场所, 也为胎盘发育奠定基础。

间充质/基质细胞和上皮细胞之间能够发生转化, 包括间充质-上皮转化(mesenchymal to

epithelial transition, MET)及上皮-间充质转化(epithelial to mesenchymal transition, EMT)两个过程^[38]。上皮细胞通常表现出明显的顶端-基底极性, 这种极性分布与细胞内的脂质和蛋白质从顶端向基底侧的位置变化、细胞角蛋白的表达、细胞外基质(ECM)在基底膜层的附着、相邻细胞间的连接有关; 而间充质表型的细胞形状明显拉长、具有前后极性、表达波形蛋白、有短暂的细胞间接触, 并可以通过质膜上的伪足在 ECM 中移动, 而不是附着在 ECM 上。MET 和 EMT 这 2 个过程对于子宫内膜容受态的建立至关重要, 子宫内膜上皮细胞经历 EMT, 获得迁移能力, 细胞极性丧失, 为胚胎植入做准备; 子宫内膜蜕膜化则是 MET 的过程, 即细长的纺锤形子宫内膜基质成纤维细胞转化为分泌的上皮样蜕膜细胞。在 MET 过程中, 基质细胞的细胞核变圆并出现更多的核小体, 细胞内吞噬体和溶酶体增多, 细胞质明显扩大; 同时会积累糖原和脂质, 扩大粗面内质网, 重组细胞骨架^[39]。黄体酮是调节蜕膜化的关键类固醇激素, 前列腺素、雄激素、促性腺激素(促卵泡生成素、促黄体生成素和人绒毛膜促性腺激素)也参与蜕膜化过程^[40], 其中具体的机制变化还有待研究。

在小鼠中, 囊胚植入是蜕膜化发生的先决条件。Kim 等^[36]研究发现, 大约在妊娠第 5 天早晨, 囊胚植入部位周围的基质细胞会分化为蜕膜细胞, 形成初级蜕膜区(primary decidualization zone, PDZ), PDZ 是无血管上皮样细胞, 然后蜕膜逐渐向间质周围扩散; 到第 6 天, PDZ 旁边的基质细胞继续增殖并分化成多倍体蜕膜细胞, 在 PDZ 周围形成一个区域, 称为次级蜕膜区(secondary decidualization zone, SDZ); 到第 7 天, SDZ 发育成熟, 而 PDZ 则因细胞凋亡而逐渐退化; 第 8 天后, 胎盘和胚胎生长慢慢取代 SDZ。蜕膜是一个极其复杂的过程, 蜕膜细

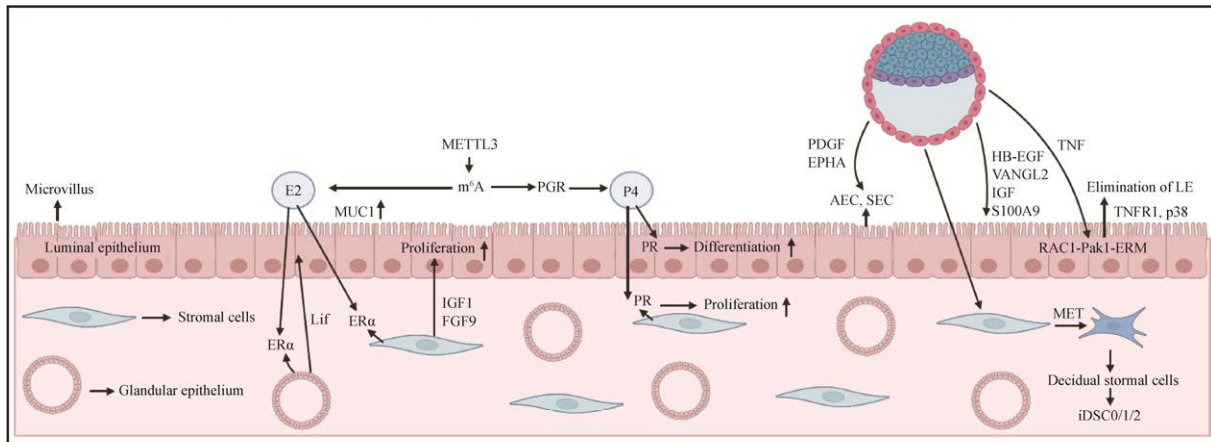


图2 子宫内类器官的调控机制

Figure 2 Regulation mechanism of endometrial receptivity. MUC1: Mucin 1; ER α : Estrogen receptor α ; Lif: Leukemia inhibitory factor; IGF1: Insulin like growth factor 1; FGF9: Fibroblast growth factor 9; PR: Progesterone receptor; m⁶A: N⁶-methyladenosine; METTL3: Methyltransferase-like protein 3; PDGF: Platelet-derived growth factor; EPHA: Erythropoietin-producing hepatocyte receptor A; AEC: Adhesive epithelium; SEC: Supporting epithelium; HB-EGF: Heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor; VANGL2: VANGL planar cell polarity protein 2; IGF: Insulin like growth factor; S100A9: S100 calcium-binding protein A9; TNF: Tumor necrosis factor; TNFR1: Tumor necrosis factor receptor 1; p38: The p38 family is a highly evolutionarily conserved group of mitogen-activated protein kinases (MAPKs); MET: Mesenchymal to epithelial transition; iDSC0/1/2: Immune-featured decidual stromal cells 0/1/2.

胞的功能也有待详细研究。Yang 等^[41]对小鼠 E5.5–E9.5 的着床位点蜕膜组织进行分析,发现了一种具有免疫特征的蜕膜基质细胞(immunefeatured decidual stromal cells, iDSCs),并且具有 3 个亚群: iDSC0/1/2, 这 3 个亚群在妊娠过程中呈现不同的空间定位,但最终在 E8.5 时期(胚胎发育第 8.5 天)确定每个亚群分布的位置, iDSC0 和 iDSC2 主要位于血管生成中心, iDSC1 位于免疫招募中心(图 2)。iDSC0 亚群高表达与血管发育相关的基因, iDSC1 亚群高表达炎症反应相关的基因, iDSC2 高表达细胞溶解和凋亡相关的基因, 这项研究对于探索着床过程中蜕膜基质细胞的功能具有重要意义。

Robertson 等^[42]和 Garcia-Flores 等^[43]的研究发现, 与小鼠不同, 人的子宫内膜蜕膜化无需胚源信号, 人子宫内膜随激素的变化(排卵后孕酮水平的升高和局部 cAMP 生成的增加)使人

类的子宫内膜基质细胞自发蜕膜化。虽然人类和小鼠蜕膜方式不同的原因目前尚不明晰, 但不论是人类还是啮齿类动物, 妊娠早期蜕膜化子宫内壁的血管生成和螺旋动脉重塑同时发生, 为早期胚胎生长提供来自母体血管的营养^[37]。

3 子宫内类器官

研究人员常使用癌细胞系和永生化细胞系来研究细胞的功能。尽管这样的细胞系相对容易获得和维护, 但在长期传代后, 永生化的细胞系在表型和基因型上可能与其原代来源的细胞不同, 永生化的细胞系难以深入探究这些疾病的具体发病机制和治疗策略, 从而阻碍了临床研究的继续深入。2D 培养模型的另一个主要缺点是不存在与细胞外基质(ECM)之间的相互作用。ECM 是围绕细胞的 3D 矩阵支架, 缺少 ECM 的支撑而单层培养改变了子宫内膜上皮

细胞的功能活动, 它们失去了极性并改变了分泌功能。类器官原代细胞直接从组织中获得, 因此在表型和生理上被认为更接近于原组织, 并且采用 3D 培养模式, 更好地展现了其生理功能, 可在分子水平上研究细胞功能。2009 年, Sato 等^[44]使用来源于小鼠肠道的成体干细胞培养出首个小肠类器官, 该类器官具有 Lgr5⁺肠干细胞, 能够很好地模拟体内小肠的形态结构和功能。小肠类器官的成功建立使得类器官研究迅速成为一个热点, 目前已经从小鼠和人的组织中培育出多种类器官, 例如肾脏、肝脏、大脑、视网膜等^[45-46]。目前类器官的研究主要集中在发育问题、遗传疾病、肿瘤癌症等方面, 尽管类器官模型能解决一部分体外难以解决的问题, 但仍然有许多不完善的地方, 还需要更深入的研究。

子宫内膜与许多生殖疾病有关, 例如子宫内膜异位症、子宫内膜癌、复发性流产等, 严重影响到女性的生殖健康; 同时, 胚胎的成功植入和后继发育也与子宫内膜密切相关, 因此, 研究子宫内膜的生理功能和调控机制, 能够为生殖健康提供新思路, 进一步改善妊娠结局。目前关于子宫内膜与胚胎植入的研究主要集中在啮齿类动物, 且大多数是通过组织切片的方式获得材料来进行研究与分析, 很难了解在植入开始的时间点胚胎与子宫内膜的变化, 也缺少对这个过程的可视化观察。而对于灵长类动物和家畜动物, 探秘体内胚胎植入成本较高、技术要求较高、基础设施要求更全面, 使得这方面的研究受到较大限制。啮齿类动物常作为研究胚胎植入和子宫内膜容受性的实验模型, 考虑到物种之间胚胎植入方式差异较大, 单一模型并不能完全反映各物种的真实情况。因此, 需要构建体外不同物种的子宫内膜模型来研究不同物种胚胎-子宫内膜的相互作用, 并实现胚

胎植入初始过程的可视化。

3.1 子宫内膜上皮类器官的建立

Boretto 等^[47]首次研究培育出小鼠和人类的子宫内膜上皮类器官, 这些类器官内具有柱状上皮, 与子宫内膜的特征相似, 例如管腔内存在纤毛、微绒毛、分泌物, 最重要的一个特征是该类器官能够响应雌孕激素的变化。在此基础上, 关于子宫内膜上皮类器官的研究越来越多, Turco 等^[48]优化了子宫内膜上皮类器官的培养方法, 使其能够长期扩增、遗传稳定, 并在使用生殖激素处理后分化; 同时还从恶性子宫内膜中提取了类器官, 为研究子宫内膜疾病奠定了基础。Tang 等^[49]还对小鼠的子宫内膜上皮类器官的原代培养进行了优化, 并对具体的方法进行了描述, 使其能够更加稳定地长期传代培养。

对于人类来说, 除了子宫内膜活检之外, 子宫内膜上皮类器官也可由月经中流出的腺体片段和足月胎盘分离的组织中产生^[50-51]。因此, 可以利用来源于患者的组织样本促进类器官医疗的发展。除了组织来源获得的类器官之外, 以 3D 方式培养永生化上皮细胞也能够产生类器官。人子宫内膜癌细胞(ishikawa)是源于女性子宫内膜腺癌患者的子宫内膜细胞系, Buck 等^[52]在基质胶的培养中也能够形成腺体样的球状体, 但是因为其来源于子宫内膜腺癌, 该腺体样的球体对于雌孕激素的反应不尽相同。而之前培养的子宫内膜上皮类器官的主要限制是顶端极性在内部位置, 从而阻碍了胚胎与上皮顶端表面相互作用的研究。Ahmad 等^[53]将子宫内膜上皮类器官的极性成功扭转过来, 使其顶端极性向外, 为研究上皮与胚胎的相互作用奠定了更为可靠的体外研究基础。

除小鼠和人类之外, 关于家畜动物子宫内膜上皮类器官的建立也是一个研究热点, 因家

畜动物重要的经济价值,使得体内研究子宫内膜与胚胎植入的成本较大,因此建立体外的研究模型可能对处理动物生殖疾病具有重要意义。Thompson 等^[54]使用来自新鲜或解冻的家养母马子宫内膜组织成功建立了马的子宫内膜上皮类器官,并能响应激素作用。Thompson 等^[55]在之后的研究中也发现了较好的马子宫内膜上皮类器官冷冻保存方法。Saadeldin 等^[56]成功构建了猪子宫内膜上皮类器官,并改善了类器官长期冷冻保存的方法;之后将第 7 天的孤雌激活胚胎与类器官共培养,证明该子宫内膜上皮类器官能够支持胚胎附着、滋养层细胞生长和胚胎的延伸。Bourdon 等^[57]从发情周期第 12–15 天的牛子宫内膜上皮细胞中培养出球状结构,并观察到极化的上皮细胞呈管状,并表达细胞角蛋白,但这一结果还有待继续研究。马和猪子宫内膜上皮类器官的成功建立为家畜动物体外研究子宫内膜相关生理功能以及生殖疾病奠定了基础。

用于子宫内膜上皮类器官培养的细胞外基质(ECM)也是制备类器官的一个关键因素,目前常用的基质胶是从小鼠肉瘤中提取的,但是这种基质胶存在与肿瘤相关的问题以及批次间的差异。目前已经研究出用组织和合成水凝胶制备而成的脱细胞外基质来培养类器官的方法^[58],Venkata 等^[59]和 Jamaluddin 等^[60]研究发现来源于牛、猪的子宫内膜的脱细胞外基质能够用于人子宫内膜上皮类器官的培养。这种培养方法具有很好的应用前景,如果使用对应物种的脱细胞外基质有可能会促进相应类器官的生长,提高类器官的生长效率,尽可能地与体内的真实情况接近。

3.2 子宫内膜组装体

上述培养的子宫内膜上皮类器官主要通过将来源于组织的腺体样片段或上皮细胞嵌入

ECM 中产生 3D 结构,而这种方式培养出来的类器官是腺体样的,只含有腺上皮这种单一的细胞类型。而体内的子宫内膜组织成分是极其复杂的,还包括管腔上皮、基质细胞、内皮细胞、免疫细胞等各种细胞类型,只有在体外培养中尽可能模拟体内的细胞类型,才能真正地在体外构建与体内相似的子宫内膜模型。

目前关于体外子宫内膜细胞的共培养主要集中于上皮细胞与基质细胞。2003 年, Park 等^[61]研究了一种由子宫内膜上皮细胞和基质细胞组成的子宫内膜细胞培养系统,该系统将基质细胞嵌入基质胶和 I 型胶原的混合物中,并将上皮细胞接种在其表面形成管腔上皮,该系统模拟了人子宫内膜的结构以及上皮细胞和基质细胞间的相互作用,为探索上皮-基质互作提供了一些思路。而在子宫内膜上皮类器官建立之后,使用类器官与基质细胞共培养的体外模型也越来越多。Wiwatpanit 等^[62]建立了一种含有上皮细胞和基质细胞的无支架子宫内膜类器官培养的方法,即将上皮细胞和基质细胞接种到 1.5% 琼脂糖 3D 培养物中,外表面具有上皮细胞,而类器官中心具有基质细胞,且表达特异性的标志物,并在此基础上研究了多囊卵巢综合征(polycystic ovary syndrome, PCOS)雄激素水平对类器官的影响。Rawlings 等^[63]将子宫内膜上皮类器官和原代基质细胞共培养,形成了一个与子宫内膜组织相似的组装体模型,且能够体外模拟蜕膜,之后将该子宫内膜模型与人类囊胚共培养,构建了一个简单的植入模型,胚胎在 72 h 内保持活性,并表明蜕膜化后的基质细胞与植入时子宫内膜的变化密切相关。Gnecco 等^[64]使用基于聚乙二醇(polyethylene glycol, PEG)合成的 ECM 共培养人原代子宫内膜上皮类器官和子宫内膜基质细胞,并使用这种体外模型模拟了月经周期中子宫内膜对激素的反

应,使用该体外 3D 模型能够解析上皮细胞与基质细胞间的相互作用,为解决相关生殖疾病奠定基础。但上述的子宫内膜组装体模型中只包含子宫内膜腺上皮和基质细胞,却缺少腔上皮。本课题组在前期研究中通过改进了细胞外基质和利用空气-液体界面培养方法,成功建立了具有腔上皮、腺上皮和基质细胞的人类子宫内膜类器官模型(ALI-EnAO),成功再现了体内子宫内膜的细胞组成,并证实了该模型能够响应激素诱导、呈现月经周期的变化^[1],在前期工作基础上,正在进一步研究子宫内膜类器官在胚胎植入方面的影响,探讨建立的该体外模型是否能够模拟体内胚胎植入过程,同时也正在尝试建立不同物种的子宫内膜类器官模型,期望能够探索不同物种间子宫内膜以及胚胎植入方面的差异。

目前,体外子宫内膜的构建中主要集中于上皮细胞和基质细胞的共培养,而关于内皮细胞和免疫细胞的研究较少。Zhang 等^[65]使用来自患者的子宫内膜组织进行原代培养,构建了植入窗口(window of implantation, WOI)时期的子宫内膜类器官,其结构、功能与体内具有显著相似性,并在其中鉴定出了上皮细胞、基质细胞和免疫细胞,上皮细胞组装成腺体并被免疫细胞和基质细胞包围,但该模型的稳定性没有被验证,因此后续还需要更多的研究来弥补这方面的空缺。

4 子宫内膜类器官用于母-胎互作的研究

胚胎的成功植入涉及囊胚与子宫内膜间的相互作用,而这个过程仍存在许多未解决的问题。对于小鼠胚胎植入的研究主要是通过在小鼠妊娠的特定时间点获取子宫组织来进行观察,但植入初始阶段囊胚与子宫内膜的变化尚

不明确,现有的技术限制了对这个过程的探索。而对于家畜动物,考虑到其特殊的经济效益,获取植入时组织的成本较大。而在人类中由于伦理的限制,难以获得植入的组织样本进行研究。因此,研究人类和家畜囊胚与子宫内膜的相互作用机制比研究小鼠的互作机制更具有挑战性。

体外子宫内膜上皮类器官的构建为研究胚胎植入提供了一个新思路,使得在体外可视化研究植入过程成为一种可能,一定程度上解决了在体内难以研究的问题。同时,关于子宫内膜上皮类器官、子宫内膜其他细胞类型的研究也越来越多,使在体外构建的子宫内膜组装体模型在细胞类型和功能上均与体内类似,这也为研究胚胎与子宫内膜中不同的细胞类型之间的互作奠定了基础。Shibata 等^[66]建立了一种上皮顶端暴露在外侧的子宫内膜组装体模型 AO-EMO,还具有基质细胞和内皮细胞,当与人类胚胎干细胞衍生的类囊胚进行共培养时,能够观察到合胞体破坏子宫内膜上皮细胞并与基质细胞融合,此研究为体外探索植入时囊胚与子宫内膜细胞间的互作提供了一定的理论参考。

尽管体外的模型不能完全模拟体内的生理变化,但是通过子宫内膜类器官体外植入的研究,也能够获得一些体内难以观察到的定位、黏附、侵入过程中的分子和生理变化,为妊娠识别失败等生殖相关问题提供一定的理论依据,甚至在一定程度上提供了部分治疗方法。因此,使用子宫内膜类器官研究胚胎植入时期的母-胎互作,为解决与植入失败相关问题提供了一个理想的方式。

5 总结与展望

类器官是近年来的研究热点,而子宫内膜

类器官对于生殖健康具有重要意义, 只有了解子宫内膜在植入前后相应的结构和功能变化, 才能调控生殖过程, 提高哺乳动物的成功妊娠率。

虽然子宫内膜上皮类器官或子宫内膜组装体具有与原组织相似的特征, 但是还存在以下问题: (1) 子宫内膜类器官的细胞类型单一, 缺少免疫细胞、内皮细胞等, 不能完全反映体内的所有细胞类型。(2) 体外的类器官模型是否能够模拟体内的再生过程, 人类的月经周期存在一个子宫内膜脱落后再生长的过程, 而这个过程目前在体外难以模拟。(3) 类器官模型是否能在体外模拟一些生殖疾病(例如子宫内膜异位症、子宫内膜癌等), 从而为这些疾病提供一些治疗措施。(4) 类器官是否能够支持胚胎的体外生长以及模拟植入的发生, 为研究植入失败的机制提供一个可靠的体外模型。为解决以上问题, 可以将类器官与新兴技术相结合, 例如 3D 打印、微流控、活细胞成像等, 实现多种细胞共培养从而模拟体内复杂的变化, 从而在体外模拟一些生殖疾病或是揭示胚胎植入过程中的相关问题, 为治疗生殖疾病和辅助生殖技术的发展提供价值。

REFERENCES

- [1] TIAN JW, YANG J, CHEN TW, YIN Y, LI N, LI YX, LUO XY, DONG E, TAN HY, MA YP, LI TQ. Generation of human endometrial assembloids with a luminal epithelium using air-liquid interface culture methods[J]. *Advanced Science*, 2023, 10(30): e2301868.
- [2] MUTER J, LYNCH VJ, McCOY RC, BROSENS JJ. Human embryo implantation[J]. *Development*, 2023, 150(10): dev201507.
- [3] MATHEW DJ, PETERSON KD, SENN LK, OLIVER MA, EALY AD. Ruminant conceptus-maternal interactions: interferon-tau and beyond[J]. *Journal of Animal Science*, 2022, 100(7): skac123.
- [4] WACLAWIK A, KACZMAREK MM, BLITEK A, KACZYNSKI P, ZIECIK AJ. Embryo-maternal dialogue during pregnancy establishment and implantation in the pig[J]. *Molecular Reproduction and Development*, 2017, 84(9): 842-855.
- [5] SIRIWARDENA D, BOROVIK TE. Evolutionary divergence of embryo implantation in primates[J]. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 2022, 377(1865): 20210256.
- [6] ASHARY N, TIWARI A, MODI D. Embryo implantation: war in times of love[J]. *Endocrinology*, 2018, 159(2): 1188-1198.
- [7] DENG WB, WANG HB. Efficient cell chatting between embryo and uterus ensures embryo implantation[J]. *Biology of Reproduction*, 2022, 107(1): 339-348.
- [8] ZHANG S, KONG SB, WANG BY, CHENG XH, CHEN YJ, WU WW, WANG Q, SHI JC, ZHANG Y, WANG SM, LU JH, LYDON JP, DeMAYO F, PEAR WS, HAN H, LIN HY, LI L, WANG HM, WANG YL, LI B, et al. Uterine Rbpj is required for embryonic-uterine orientation and decidual remodeling via Notch pathway-independent and-dependent mechanisms[J]. *Cell Research*, 2014, 24(8): 925-942.
- [9] GEBRIL M, HIROTA Y, AIKAWA S, FUKUI Y, KAKU T, MATSUO M, HIRATA T, AKAEDA S, HIRAOKA T, SHIMIZU-HIROTA R, TAKEDA N, TAHA T, AL BALAH O, ELNOURY MAH, FUJII T, OSUGA Y. Uterine epithelial progesterone receptor governs uterine receptivity through epithelial cell differentiation[J]. *Endocrinology*, 2020, 161(12): bqaa195.
- [10] ADIGUZEL D, CELIK-OZENCI C. FoxO1 is a cell-specific core transcription factor for endometrial remodeling and homeostasis during menstrual cycle and early pregnancy[J]. *Human Reproduction Update*, 2021, 27(3): 570-583.
- [11] NIMBKAR-JOSHI S, KATKAM RR, CHAUDHARI UK, JACOB S, MANJRAMKAR DD, METKARI SM, HINDUJA I, MANGOLI V, DESAI S, KHOLKUTE SD, PURI CP, SACHDEVA G. Endometrial epithelial cell modifications in response to embryonic signals in bonnet monkeys (*Macaca radiata*)[J]. *Histochemistry and Cell Biology*, 2012, 138(2): 289-304.
- [12] NGUYEN HPT, SIMPSON RJ, SALAMONSEN LA, GREENING DW. Extracellular vesicles in the intrauterine environment: challenges and potential functions[J]. *Biology of Reproduction*, 2016, 95(5): 109, 1-12.
- [13] CAPALBO A, UBALDI FM, CIMADOMO D, NOLI L, KHALAF Y, FARCOMENI A, ILIC D, RIENZI L. MicroRNAs in spent blastocyst culture medium are derived from trophectoderm cells and can be explored

- for human embryo reproductive competence assessment[J]. *Fertility and Sterility*, 2016, 105(1): 225-235.e1-3.
- [14] GROSS N, KROPP J, KHATIB H. MicroRNA signaling in embryo development[J]. *Biology*, 2017, 6(3): 34.
- [15] TAN Q, SHI S, LIANG JJ, ZHANG XW, CAO DR, WANG ZG. MicroRNAs in small extracellular vesicles indicate successful embryo implantation during early pregnancy[J]. *Cells*, 2020, 9(3): 645.
- [16] WANG HQ, LIU Y, LI D, LIU JY, JIANG Y, HE YL, ZHOU JD, WANG ZL, TANG XY, ZHANG Y, ZHEN X, CAO ZW, SHENG XQ, YANG CF, YUE QL, DING LJ, HU YL, HU ZB, LI CJ, YAN GJ, et al. Maternal and embryonic signals cause functional differentiation of luminal epithelial cells and receptivity establishment[J]. *Developmental Cell*, 2023, 58(21): 2376-2392.e6.
- [17] WANG PK, DU SL, GUO CH, NI ZL, HUANG ZY, DENG N, BAO HL, DENG WB, LU JH, KONG SB, ZHANG H, WANG HB. The presence of blastocyst within the uteri facilitates luminal epithelium transformation for implantation *via* upregulating lysosome proteostasis activity[J]. *Autophagy*, 2024, 20(1): 58-75.
- [18] TURCO MY, MOFFETT A. Development of the human placenta[J]. *Development*, 2019, 146(22): dev163428.
- [19] APLIN JD, RUANE PT. Embryo-epithelium interactions during implantation at a glance[J]. *Journal of Cell Science*, 2017, 130(1): 15-22.
- [20] LI YJ, SUN XF, DEY SK. Entosis allows timely elimination of the luminal epithelial barrier for embryo implantation[J]. *Cell Reports*, 2015, 11(3): 358-365.
- [21] AKAEDA S, HIROTA Y, FUKUI Y, AIKAWA S, SHIMIZU-HIROTA R, KAKU T, GEBRIL M, HIRATA T, HIRAOKA T, MATSUO M, HARAGUCHI H, SAITO-KANATANI M, TAKEDA N, FUJII T, OSUGA Y. Retinoblastoma protein promotes uterine epithelial cell cycle arrest and necroptosis for embryo invasion[J]. *EMBO Reports*, 2021, 22(2): e50927.
- [22] AKAEDA S, AIKAWA S, HIROTA Y. Spatial and molecular anatomy of the endometrium during embryo implantation: a current overview of key regulators of blastocyst invasion[J]. *The FEBS Journal*, 2024.
- [23] VELICKY P, KNÖFLER M, POLLHEIMER J. Function and control of human invasive trophoblast subtypes: intrinsic *vs.* maternal control[J]. *Cell Adhesion & Migration*, 2016, 10(1/2): 154-162.
- [24] DESROCHERS LM, BORDELEAU F, REINHART-KING CA, CERIONE RA, ANTONYAK MA. Microvesicles provide a mechanism for intercellular communication by embryonic stem cells during embryo implantation[J]. *Nature Communications*, 2016, 7(1): 11958.
- [25] LIU M, CHEN X, CHANG QX, HUA R, WEI YX, HUANG LP, LIAO YX, YUE XJ, HU HY, SUN F, JIANG SJ, QUAN S, YU YH. Decidual small extracellular vesicles induce trophoblast invasion by upregulating N-cadherin[J]. *Reproduction*, 2020, 159(2): 171-180.
- [26] SHARMA S, GODBOLE G, MODI D. Decidual control of trophoblast invasion[J]. *American Journal of Reproductive Immunology*, 2016, 75(3): 341-350.
- [27] HABIBA M, HEYN R, BIANCHI P, BROSENS I, BENAGIANO G. The development of the human uterus: morphogenesis to menarche[J]. *Human Reproduction Update*, 2021, 27(1): 1-26.
- [28] KIRKWOOD PM, GIBSON DA, SMITH JR, WILSON-KANAMORI JR, KELEPOURI O, ESNAL-ZUFIAURRE A, DOBIE R, HENDERSON NC, SAUNDERS PTK. Single-cell RNA sequencing redefines the mesenchymal cell landscape of mouse endometrium[J]. *FASEB Journal*, 2021, 35(4): e21285.
- [29] YANG Y, ZHU QY, LIU JL. Deciphering mouse uterine receptivity for embryo implantation at single-cell resolution[J]. *Cell Proliferation*, 2021, 54(11): e13128.
- [30] MARQUARDT RM, KIM TH, SHIN JH, JEONG JW. Progesterone and estrogen signaling in the endometrium: what goes wrong in endometriosis?[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2019, 20(15): 3822.
- [31] FUKUI Y, HIROTA Y, SAITO-FUJITA T, AIKAWA S, HIRAOKA T, KAKU T, HIRATA T, AKAEDA S, MATSUO M, SHIMIZU-HIROTA R, TAKEDA N, IKAWA M, OSUGA Y. Uterine epithelial LIF receptors contribute to implantation chamber formation in blastocyst attachment[J]. *Endocrinology*, 2021, 162(11): bqab169.
- [32] BAO HL, WANG HB. Basic research advances in China on embryo implantation, placentation, and parturition[J]. *Maternal-Fetal Medicine*, 2024, 6(1): 37-49.
- [33] 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[J]. *Cell Death and Differentiation*, 2016, 23(1): 169-181.

- [34] HE B, ZHANG HX, WANG JQ, LIU MY, SUN Y, GUO CH, LU JH, WANG HB, KONG SB. Blastocyst activation engenders transcriptome reprogram affecting X-chromosome reactivation and inflammatory trigger of implantation[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2019, 116(33): 16621-16630.
- [35] ZHOU C, LV MY, WANG PK, GUO CH, NI ZL, BAO HL, TANG YD, CAI H, LU JH, DENG WB, YANG XY, XIA GL, WANG HB, WANG C, KONG SB. Sequential activation of uterine epithelial IGF1R by stromal IGF1 and embryonic IGF2 directs normal uterine preparation for embryo implantation[J]. Journal of Molecular Cell Biology, 2021, 13(9): 646-661.
- [36] KIM YS, YUAN J, DEWAR A, BORG JP, THREADGILL DW, SUN XF, DEY SK. An unanticipated discourse of HB-EGF with VANGL2 signaling during embryo implantation[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2023, 120(20): e2302937120.
- [37] MORI M, BOGDAN A, BALASSA T, CSABAI T, SZEKERES-BARTHO J. The decidua-the maternal bed embracing the embryo-maintains the pregnancy[J]. Seminars in Immunopathology, 2016, 38(6): 635-649.
- [38] GELLERSEN B, BROSENS JJ. Cyclic decidualization of the human endometrium in reproductive health and failure[J]. Endocrine Reviews, 2014, 35(6): 851-905.
- [39] OWUSU-AKYAW A, KRISHNAMOORTHY K, GOLDSMITH LT, MORELLI SS. The role of mesenchymal-epithelial transition in endometrial function[J]. Human Reproduction Update, 2019, 25(1): 114-133.
- [40] EVANS J, SALAMONSEN LA, WINSHIP A, MENKHORST E, NIE GY, GARGETT CE, DIMITRIADIS E. Fertile ground: human endometrial programming and lessons in health and disease[J]. Nature Reviews Endocrinology, 2016, 12(11): 654-667.
- [41] YANG M, ONG J, MENG FJ, ZHANG FX, SHEN H, KITT K, LIU TF, TAO W, DU P. Spatiotemporal insight into early pregnancy governed by immune-featured stromal cells[J]. Cell, 2023, 186(20): 4271-4288.e24.
- [42] ROBERTSON SA, MOLDENHAUER LM, GREEN ES, CARE AS, HULL ML. Immune determinants of endometrial receptivity: a biological perspective[J]. Fertility and Sterility, 2022, 117(6): 1107-1120.
- [43] GARCIA-FLORES V, ROMERO R, PEYVANDIPOUR A, GALAZ J, PUSOD E, PANAITESCU B, MILLER D, XU Y, TAO L, LIU ZJ, TARCA AL, PIQUE-REGI R, GOMEZ-LOPEZ N. A single-cell atlas of murine reproductive tissues during preterm labor[J]. Cell Reports, 2023, 42(1): 111846.
- [44] SATO T, VRIES RG, SNIPPETT HJ, van de WETERING M, BARKER N, STANGE DE, van ES JH, ABO A, KUJALA P, PETERS PJ, CLEVERS H. Single Lgr5 stem cells build crypt-villus structures *in vitro* without a mesenchymal niche[J]. Nature, 2009, 459(7244): 262-265.
- [45] LANCASTER MA, KNOBLICH JA. Organogenesis in a dish: modeling development and disease using organoid technologies[J]. Science, 2014, 345(6194): 1247125.
- [46] van de WETERING M, FRANCIES HE, FRANCIS JM, BOUNOVA G, IORIO F, PRONK A, van HOUTD W, van GORP J, TAYLOR-WEINER A, KESTER L, MCLAREN-DOUGLAS A, BLOKKER J, JAKSANI S, BARTFELD S, VOLCKMAN R, van SLUIS P, LI VSW, SEEPO S, PEDAMALLU CS, CIBULSKIS K, CARTER SL, et al. Prospective derivation of a living organoid biobank of colorectal cancer patients[J]. Cell, 2015, 161(4): 933-945.
- [47] BORETTO M, COX B, NOBEN M, HENDRIKS N, FASSBENDER A, ROOSE H, AMANT F, TIMMERMAN D, TOMASSETTI C, VANHIE A, MEULEMAN C, FERRANTE M, VANKELECOM H. Development of organoids from mouse and human endometrium showing endometrial epithelium physiology and long-term expandability[J]. Development, 2017, 144(10): 1775-1786.
- [48] TURCO MY, GARDNER L, HUGHES J, CINDROVA-DAVIES T, GOMEZ MJ, FARRELL L, HOLLINSHEAD M, MARSH SGE, BROSENS JJ, CRITCHLEY HO, SIMONS B, HEMBERGER M, KOO BK, MOFFETT A, BURTON G. Long-term, hormone-responsive organoid cultures of human endometrium in a chemically defined medium[J]. Nature Cell Biology, 2017, 19(5): 568-577.
- [49] TANG SN, PARKS SE, LIAO ZA, COPE DI, BLUTT SE, MONSIVAIS D. Establishing 3D endometrial organoids from the mouse uterus[J]. Journal of Visualized Experiments, 2023(191): 10.3791/64448.
- [50] CINDROVA-DAVIES T, ZHAO XH, ELDER K, JONES CJP, MOFFETT A, BURTON GJ, TURCO MY. Menstrual flow as a non-invasive source of endometrial organoids[J]. Communications Biology, 2021, 4(1): 651.
- [51] MARINIĆ M, RANA S, LYNCH VJ. Derivation of endometrial gland organoids from term placenta[J]. Placenta, 2020, 101: 75-79.
- [52] BUCK VU, KOHLEN MT, STERNBERG AK,

- RÖSING B, NEULEN J, LEUBE RE, CLASSEN-LINKE I. Steroid hormones and human choriogonadotropin influence the distribution of alpha6-integrin and desmoplakin 1 in gland-like endometrial epithelial spheroids[J]. *Histochemistry and Cell Biology*, 2021, 155(5): 581-591.
- [53] AHMAD V, YEDDULA SGR, TELUGU B, SPENCER TE, KELLEHER AM. Development of polarity-reversed endometrial epithelial organoids[J]. *Reproduction*, 2024, 167(3): e230478.
- [54] THOMPSON RE, JOHNSON AK, DINI PY, TURCO MY, PRADO TM, PREMANANDAN C, BURTON GJ, BALL BA, WHITLOCK BK, PUKAZHENTHI BS. Hormone-responsive organoids from domestic mare and endangered Przewalski's horse endometrium[J]. *Reproduction*, 2020, 160(6): 819-831.
- [55] THOMPSON RE, MEYERS MA, PUKAZHENTHI BS, HOLLINSHEAD FK. Evaluation of growth, viability, and structural integrity of equine endometrial organoids following cryopreservation[J]. *Cryobiology*, 2022, 104: 56-62.
- [56] SAADELDIN IM, HAN A, BANG S, KANG H, KIM H, ABADY MM, JEONG JS, KWON HJ, LEE S, CHO J. Generation of porcine endometrial organoids and their use as a model for enhancing embryonic attachment and elongation[J]. *Reproduction*, 2024, 167(2): e230429.
- [57] BOURDON G, CADORET V, CHARPIGNY G, COUTURIER-TARRADE A, DALBIES-TRAN R, FLORES MJ, FROMENT P, RALIOU M, REYNAUD K, SAINT-DIZIER M, JOUNEAU A. Progress and challenges in developing organoids in farm animal species for the study of reproduction and their applications to reproductive biotechnologies[J]. *Veterinary Research*, 2021, 52(1): 42.
- [58] KOZLOWSKI MT, CROOK CJ, KU HT. Towards organoid culture without matrigel[J]. *Communications Biology*, 2021, 4(1): 1387.
- [59] VENKATA VD, JAMALUDDIN MFB, GOAD J, DRURY HR, TADROS MA, LIM R, KARAKOTI A, O'SULLIVAN R, IUS Y, JAABACK K, NAHAR P, TANWAR PS. Development and characterization of human fetal female reproductive tract organoids to understand Müllerian duct anomalies[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2022, 119(30): e2118054119.
- [60] JAMALUDDIN MFB, GHOSH A, INGLE A, MOHAMMED R, ALI A, BAHRAMI M, KAIKO G, GIBB Z, FILIPE EC, COX TR, BOULTON A, O'SULLIVAN R, IUS Y, KARAKOTI A, VINU A, NAHAR P, JAABACK K, BANSAL V, TANWAR PS. Bovine and human endometrium-derived hydrogels support organoid culture from healthy and cancerous tissues[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2022, 119(44): e2208040119.
- [61] PARK DW, CHOI DS, RYU HS, KWON HC, JOO H, MIN CK. A well-defined *in vitro* three-dimensional culture of human endometrium and its applicability to endometrial cancer invasion[J]. *Cancer Letters*, 2003, 195(2): 185-192.
- [62] WIWATPANIT T, MURPHY AR, LU ZX, URBANEK M, BURDETTE JE, WOODRUFF TK, KIM JJ. Scaffold-free endometrial organoids respond to excess androgens associated with polycystic ovarian syndrome[J]. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 2020, 105(3): 769-780.
- [63] RAWLINGS TM, MAKWANA K, TAYLOR DM, MOLÈ MA, FISHWICK KJ, TRYFONOS M, ODENDAAL J, HAWKES A, ZERNICKA-GOETZ M, HARTSHORNE GM, BROSENS JJ, LUCAS ES. Modelling the impact of decidual senescence on embryo implantation in human endometrial assembloids[J]. *eLife*, 2021, 10: e69603.
- [64] GNECCO JS, BROWN A, BUTTREY K, IVES C, GOODS BA, BAUGH L, HERNANDEZ-GORDILLO V, LORING M, ISAACSON KB, GRIFFITH LG. Organoid co-culture model of the human endometrium in a fully synthetic extracellular matrix enables the study of epithelial-stromal crosstalk[J]. *Med*, 2023, 4(8): 554-579.e9.
- [65] ZHANG Y, ZHAO RS, YANG CY, SONG JZ, LIU PS, LI Y, LIU BY, LI T, YIN CJ, LU MH, HOU ZZ, ZHANG CX, CHEN ZJ, WU KL, ZHAO H. Human receptive endometrial organoid for deciphering the implantation window[J]. *eLife*, 2023, 12: RP90729.
- [66] SHIBATA S, ENDO S, NAGAI LAE, KOBAYASHI EH, OIKE A, KOBAYASHI N, KITAMURA A, HORI T, NASHIMOTO Y, NAKATO R, HAMADA H, KAJI H, KIKUTAKE C, SUYAMA M, SAITO M, YAEGASHI N, OKAE H, ARIMA T. Modeling embryo-endometrial interface recapitulating human embryo implantation[J]. *Science Advances*, 2024, 10(8): eadi4819.

(本文责编 郝丽芳)