

小鼠囊胚不同孵化结局的基因表达分化模式研究*

马梅香, 吴俞霖, 巴合达西·阿达力, 刘亚恒, 阿依舒阿克·对山别克, 安礼友[†]

(新疆大学 生命科学与技术学院 新疆生物资源基因工程重点实验室, 新疆 乌鲁木齐 830017)

摘要: 目前对哺乳动物受精卵到囊胚发育命运的研究较为清楚, 但囊胚孵化到着床前的分化过程还不明确, 囊胚有两种孵化结局, 即孵化和未孵化, 故初步分析了囊胚两种孵化结局的发育差异. 通过分析不同孵化结局囊胚的转录组, 发现囊胚由扩张到孵化过程中基因表达呈现特异的趋势, 1 433个基因在孵化过程中表达上调, 743个基因表达下调; 如果囊胚未能孵化, 这部分上调基因的表达调控受到显著抑制. 孵化与未孵化囊胚间的差异基因涉及免疫与炎症、细胞分化、凋亡等生化过程, 提示这些分子可能与着床过程的母胎识别相关. 通过qPCR分析发现, 孵化囊胚相较未孵化囊胚, 基因 *Podxl*、*Lama1*、*Ptk2b* 表达上调, *Pramel17*、*Amigo2*、*Pramel31* 表达下调, 数据与转录组分析结果一致. 结果表明: 小鼠囊胚在孵化过程中基因表达呈现特定的分化, 决定了孵化与否的命运结局, 分化也与胚胎着床能力形成相关.

关键词: 小鼠囊胚; 孵化结局; 基因表达; 代谢通路

DOI: 10.13568/j.cnki.651094.651316.2023.10.29.0001

中图分类号: Q756 **文献标识码:** A **文章编号:** 2096-7675(2024)06-0665-07

引文格式: 马梅香, 吴俞霖, 巴合达西·阿达力, 刘亚恒, 阿依舒阿克·对山别克, 安礼友. 小鼠囊胚不同孵化结局的基因表达分化模式研究[J]. 新疆大学学报(自然科学版中英文), 2024, 41(6): 665-671.

英文引文格式: MA Meixiang, WU Yulin, BAHEDAXI Adali, LIU Yaheng, AYISHUAKE Duishanbieke, AN Liyou. Differentiation of mouse blastocysts with differential hatching outcomes[J]. Journal of Xinjiang University(Natural Science Edition in Chinese and English), 2024, 41(6): 665-671.

Differentiation of Mouse Blastocysts with Differential Hatching Outcomes

MA Meixiang, WU Yulin, BAHEDAXI Adali, LIU Yaheng,
AYISHUAKE Duishanbieke, AN Liyou

(Xinjiang Key Laboratory of Biological Resources and Genetic Engineering, School of Life Science and Technology, Xinjiang University, Urumqi Xinjiang 830017, China)

Abstract: Current research has significantly enhanced our understanding of the developmental trajectory of mammalian zygotes as they transition into blastocysts. However, the mechanisms governing the differentiation of blastocysts during the hatching phase leading to pre-implantation remain poorly defined. At the blastocyst stage, embryos can either successfully hatch or fail to do so. This study sought to explore the developmental variations between these two hatching outcomes. Through transcriptome analysis, we uncovered distinct gene expression patterns during the transition from expansion to hatching. Our results indicated that during the hatching process, 1 433 genes were upregulated, while 743 genes experienced downregulation. Importantly, in instances where blastocysts did not hatch, the regulation of the upregulated genes was significantly suppressed. The differentially expressed genes between hatched and non-hatched blastocysts are involved in critical biochemical pathways, including immune and inflammatory responses, cell differentiation, and apoptosis, et al., suggesting their potential importance in maternal-fetal recognition and implantation. Furthermore, qPCR analysis corroborated the transcriptome findings, revealing that in hatched blastocysts, genes *Podxl*, *Lama1*, and *Ptk2b* were upregulated, whereas *Pramel17*, *Amigo2*, and *Pramel31* were downregulated. These results imply that the specific patterns of gene expression in mouse blastocysts during the hatching process are pivotal in determining their hatching fate, and are closely associated with the development of embryonic implantation capability.

Key words: mouse blastocyst; incubation outcome; gene expression; metabolic pathway

* 收稿日期: 2023-10-29

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“受精卵与输卵管互作对发育结局的影响”(2022D01E09); 大学生创新训练计划“囊胚的孵化命运分子决策及预测”(S202210755076)。

作者简介: 马梅香(1998—), 女, 硕士生, 从事辅助生殖的研究, E-mail: 1339344354@qq.com.

[†] 通讯作者: 安礼友(1984—), 男, 博士, 副教授, 主要从事胚胎发育和生殖免疫的研究, E-mail: anliyou@aliyun.com.

0 引言

胚胎着床是一个复杂而连续的动力发育过程。胚胎着床由激活的囊胚与其接受子宫之间的交互作用调控,包括囊胚的附着、侵入和胎盘的形[1-2]。此过程胚胎必须从透明带(ZP)孵化,并侵入管腔子宫内膜上皮。孵化失败可由体外受精(IVF)培养条件或冷冻保存引起的ZP硬化所致,导致妊娠失败[3-4]。有研究报道,一半的移植胚胎可检测到着床事件。然而,由于继续妊娠期间胎儿丢失,人类IVF期间每次移植的临床妊娠率为30%~35%[5]。人类体外受精过程中,每次移植都有临床妊娠。同样,小鼠接受健康胚胎时也经常观察到孵化失败现象[6]。成功孵化可以确保高质量的胚胎发育[7-8]。小鼠的早期胚胎发育从精子和成熟卵母细胞结合形成受精卵开始。随后经历一系列细胞增殖与分化,形成一个由外胚层(EPI)、滋养层(TE)和原始内胚层(PE)三个谱系细胞组成的囊胚,TE围绕内细胞团(ICM)形成的空腔结构是囊胚腔。囊胚腔逐渐扩大导致胚胎细胞从ZP孵化。TE分化成直接参与侵入子宫内膜的滋养细胞系,开始胚胎的植入和妊娠,从而在子宫中发育成完整的个体[9-12]。囊胚孵化是胚胎植入前一种必要的早期发育事件,涉及胚泡扩张、压力增加、ZP变薄和破裂[13-15],是胚胎着床和后续生长发育的先决条件。囊胚孵化是一个被精确调控的生理现象[16]。期间细胞基因随之动态表达,分化相关分子动态变化决定了囊胚的孵化命运,即孵化或孵化失败。前人主要关注囊胚着床时期以及后续胚胎发育过程中的分子调控机制,然而,尚未揭示囊胚孵化过程的基因差异表达模式。本文以小鼠胚胎为研究对象,将囊胚分为孵化前囊胚(E)、孵化囊胚(H)和到期孵化失败囊胚(N)三种孵化状态,使用转录组分析各孵化状态基因表达的差异,进而得到孵化结局相关的分化分子模式,通过荧光定量PCR(qPCR)验证相关基因的表达。通过基因表达分析初步探讨不同孵化结局的囊胚分化模式,为进一步研究小鼠囊胚孵化期发育机制提供思路和数据基础。

1 材料和方法

1.1 研究材料

1.1.1 实验动物

使用5~7周龄的雌鼠和8月龄的ICR雄鼠,小鼠来自新疆医科大学实验动物中心。小鼠饲养在规范的鼠房中(温度为 (23 ± 2) °C,湿度为 (25 ± 3) %,昼夜光照间隔为12 h)。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实施(XJUAE-2022-07)。

1.1.2 实验仪器及材料

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公司,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)、石蜡油购自Sigma公司,细胞核荧光染料(DAPI)、兔抗(Pramel17、Amigo2、Pramel31、Podxl、Lama1、Ptk2b)、羊抗兔(AF488)购自Thermo Fisher公司,反转录试剂盒、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),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,玻璃毛细管(1.5 mm外径)。

1.2 研究方法

1.2.1 孵化囊胚的转录组分析

对18例小鼠胚胎RNA-Seq结果进行数据转化,得到孵化前(E)、成功孵化(H)、到期孵化失败(N)三种时期囊胚的基因表达。将三组数据分别以E vs. N、E vs. H、H vs. N成对进行差异分析,获得差异表达基因集,并对它们进行趋势分析,获得不同趋势下差异基因集。

1.2.2 富集基因集分析

筛选出的差异基因呈现表达上调和下调趋势,提示与相关生物学事件相关。将差异基因集与趋势基因集进行GO数据库注释与富集分析和KEGG细胞信号通路分析,获得基因集涉及的关键生物学过程和功能。

1.2.3 基因表达qPCR验证

使用试剂盒合成cDNA,对不同孵化状态的囊胚分别进行裂解、反转录获得cDNA,合成产物-20 °C储存,供qPCR使用。通过转录组分析筛选出的6个关键基因(*Pramel17*、*Amigo2*、*Pramel31*、*Podxl*、*Lama1*、*Ptk2b*),

设计qPCR扩增引物.使用看家基因*Gapdh*作为内参,以E、H、N囊胚的cDNA作为模板,利用对应的引物进行PCR扩增.20 μ L总反应体系,含10 μ L Blasaq 2 \times qPCR Master Mix,上下游引物各0.5 μ L,2 μ L cDNA.扩增反应条件为:95 $^{\circ}$ C,1 min;1个循环.95 $^{\circ}$ C,15 s;60 $^{\circ}$ C,1 min;45个循环.扩增产物4 $^{\circ}$ C保存.

扩增产物在含核酸染料2%琼脂糖凝胶、1 \times TAE缓冲液中电泳20 min,检测扩增条带.电泳完成后在凝胶成像仪中进行成像.

1.2.4 小鼠的超数排卵

育龄雌鼠经腹腔注射7.5 U的PMSG,46~48 h后腹腔注射7.5 U的HCG.随后与雄鼠合笼,次日清晨,检查阴栓,若阳性,则标记妊娠0.5 dpc,待72 h后回收囊胚.

1.2.5 囊胚的获取

脱颈处死小鼠后,解剖孕鼠获取子宫,用M2培养液从子宫角冲洗子宫腔,从冲洗液中捡取囊胚,清洗完毕,移入提前平衡好的KSOM培养液微滴中,置于37 $^{\circ}$ C恒温培养箱中进行培养.培养用的KSOM培养液微滴须在培养前4~6 h或提前一夜制作,覆盖石蜡油置于37 $^{\circ}$ C恒温培养箱中平衡.小鼠胚胎在培养液中体外发育适宜的胚胎/孵育液比例约是10个胚胎/20 μ L培养液.细胞胚胎对pH及温度波动都非常敏感,因此要尽量缩短小鼠囊胚在空气中的暴露时间.将所取囊胚放入培养箱中37 $^{\circ}$ C、5% CO₂、饱和湿度培养.

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<囊胚总体积的一半;Ⅱ级:囊胚腔体积>囊胚总体积的一半;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,ZP变薄;Ⅴ级:正在孵化的囊胚,囊胚正在从ZP破裂口孵出;Ⅵ级:孵化出的囊胚,囊胚完全从ZP中脱出.本研究涉及的样本,E对应为Ⅱ级、Ⅲ级囊胚,H为Ⅵ级,N的外观评级为Ⅲ级或Ⅳ级.

1.2.6 实验设计与数据分析

小鼠囊胚在KSOM中孵育暂存,培养6~12 h后可选出孵化前囊胚(Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ、Ⅳ级囊胚)、孵化中囊胚(Ⅴ级囊胚)、孵化完成囊胚(Ⅵ级囊胚)和到期未孵化的囊胚共四组.将四组不同时期的囊胚分别进行反转录、qPCR实验,分析实验结果.

2 实验结果

2.1 小鼠囊胚孵化结局与基因表达差异相关

对18例小鼠胚胎RNA-Seq结果进行数据过滤,得到E、H、N三种囊胚的基因表达数据.将三组数据以E vs. N、E vs. H、H vs. N分组进行差异基因比较,获得三种时期的基因表达差异(图1(a)),数据可见孵化前与孵化后囊胚基因表达差异最大,表明孵化过程经历了显著的基因表达调控.筛选出N vs. H分组中表达存在差异的基因,其中孵化囊胚相较于未孵化囊胚上调表达基因1 433个、下调表达基因743个.PCA分析显示这些基因在H、N两种孵化结果的表达方式有较大差异(图1(b)).

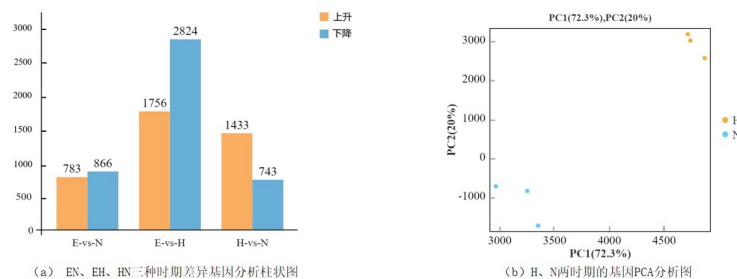


图1 胚胎孵化过程中转录本样本关系

2.2 小鼠囊胚不同孵化结局呈现差异化基因表达模式

通过E vs. N、E vs. H、N vs. H差异基因韦恩图分析,发现其中1 147个基因表达与差异孵化进程相关(图2(a)),这些基因决定了囊胚从扩张囊胚到孵化囊胚或孵化失败囊胚两种结局.对这一基因集进行趋势分析,得到了2个显著的趋势图.数据显示,H结局相较N结局呈现更低下调趋势的基因187个,更高上调趋势的基因106个(图2(b)).结果表明,囊胚孵化过程中有一类基因表达量提高,另一类表达量下降,这两类基因表达程度决定了囊胚的孵化结局与相关分子事件.

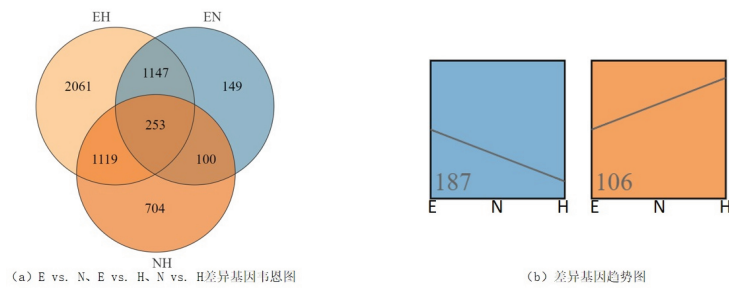


图2 差异基因表达趋势分析

2.3 小鼠囊胚孵化结局相关差异表达基因呈功能分化态势

参考GO数据库基因注释信息,对1147个差异基因集进行GO数据库富集分析.经GO注释分类后发现,到期孵化囊胚相较于未孵化囊胚上调表达基因富集的事件主要与细胞增殖、细胞凋亡的负调控有关(图3(a)),如溶酶体的组装、各种生化反应相关酶的合成和信号传导等.而下调表达基因富集事件主要与细胞定位和细胞活力相关(图3(b)),如胞外组织结构的合成、DNA模板合成、氧化还原酶的合成以及活性调控等.数据说明,从孵化前囊胚向孵化囊胚及到期末孵化囊胚过程中,细胞增殖、凋亡、结构重塑等生物学进程决定了囊胚的孵化命运结局.

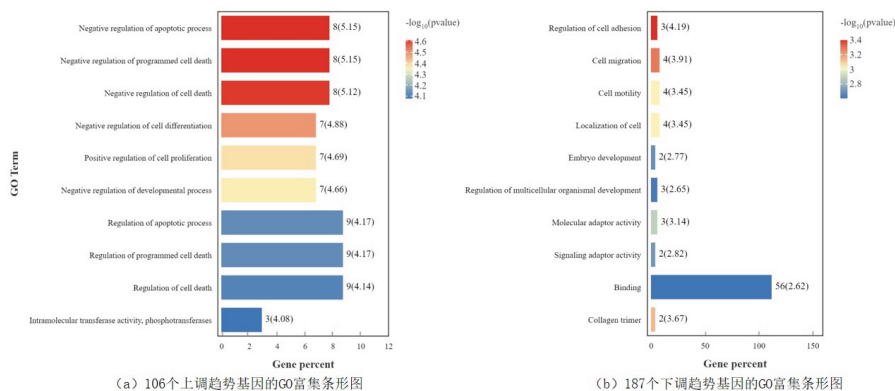


图3 胚胎孵化进程中差异基因GO富集分析

富集的上调趋势基因KEGG分析发现,其参与的细胞信号通路主要包括细胞代谢、激素合成等相关信号通路(图4(a)),这些信号通路同发育及代谢有关.而呈现下降趋势的基因参与癌症、心肌病和蛋白质的消耗相关信号通路(图4(b)).数据显示,囊胚孵化过程中,代谢和细胞信号传导经历了特定的过程,决定了囊胚的最终孵化与否.

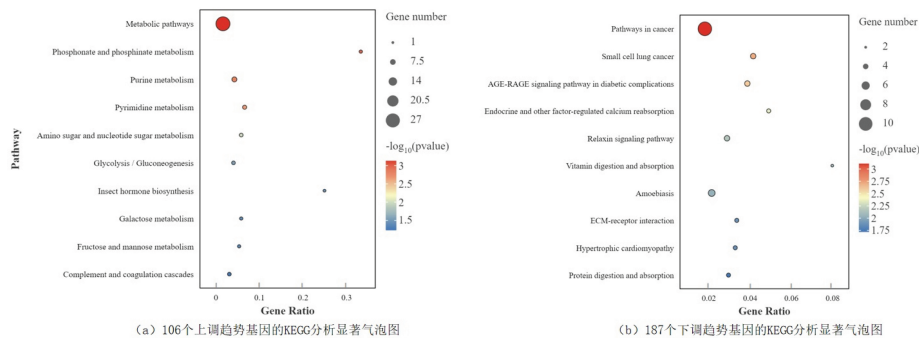


图4 胚胎孵化进程中差异基因KEGG分析

2.4 qPCR证实孵化进程中关键分子表达呈规律变化

从6只小鼠体内共取出囊胚150枚,将囊胚在KSOM培养液中培养,每个孵化状态(图5)5枚囊胚为一份检测样本,重复4次,每组共计使用20枚胚胎.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,分别检测6个基因的表达,每个qPCR实验设计3次生物学重复.

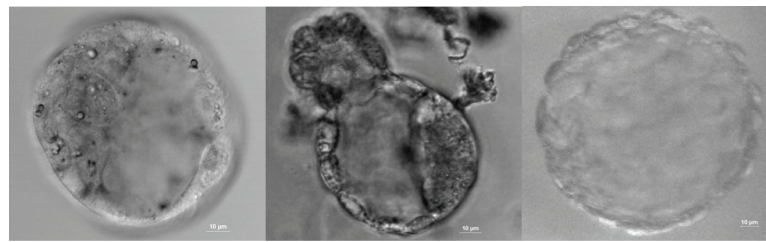


图5 不同孵化状态的小鼠囊胚明场图

通过qPCR扩增发现,小鼠囊胚孵化过程中,*Lama1*、*Ptk2b*在H中基因表达上调;*Pramel17*、*Amigo2*、*Pramel31*、*Podxl*处于较低表达水平,表达变化趋势的改变不明显(图6(b)),qPCR检测的基因表达水平与转录组分析呈现一致性,证实转录组测序分析数据呈现的基因表达水平可靠。

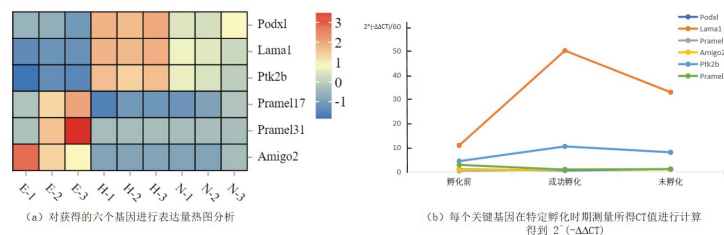


图6 qPCR分析关键差异基因在胚胎孵化进程中的表达

3 讨论

本文对小鼠囊胚孵化过程进行转录组分析,发现小鼠囊胚孵化过程中存在两种特定的基因表达模式,关键的基因聚类信号通路,作为细胞命运的决定性因素,主要涉及细胞增殖和代谢等关键生物学事件.验证部分基因发现,与细胞增殖和细胞凋亡相关的基因在囊胚孵化过程中呈现上调表达趋势,与细胞定位和细胞活力相关的基因呈现下调表达趋势.通过不同孵化结局的囊胚细胞检测,并结合基因的功能及转录组数据,最终筛选出同囊胚细胞定位有关的*Podxl*、诱导细胞进行分化的*Lama1*、影响卵母细胞受精的*Ptk2b*、调节卵巢癌细胞黏附的*Amigo2*、决定细胞活力的*Pramel17*和*Pramel31*六个基因^[17-21].通过后续实验发现,相关基因呈现动态表达、而非单调变化,其中*Lama1*和*Ptk2b*在孵化囊胚中基因表达上调,并且相较孵化失败囊胚,这两种基因表达水平更高,说明基因的表达程度对囊胚孵化结局产生了影响。

以往研究表明,囊胚孵化是一个复杂的过程,涉及多种分子的调控,包括蛋白酶、第二信使、转录因子、激素受体、生长因子和细胞因子等^[22].这些因子在囊胚孵化过程中扮演着重要角色,目前对早期发育胚胎的研究才刚刚开始.如丝氨酸蛋白酶和半胱氨酸蛋白酶参与了ZP的溶解,丙酮酸对于受精卵合子基因组激活是必需的,葡萄糖与脂代谢在八细胞后期的卵裂球致密化过程中协同作用促进TE形成,一些相关的代谢物能够通过影响表观修饰调控胚胎发育^[23-27].本文发现*Pramel17*、*Amigo2*、*Podxl*三个基因都参与囊胚的命运决定,但发育过程中的表达趋势却不相同,说明调节细胞增殖、细胞凋亡的相关因子能够促进囊胚孵化,其中具体的分子机制还需进一步研究。

决定胚胎孵化命运相关分子之间的调控十分复杂,孵化过程中不同基因的表达介导特定的分子事件,涉及多种基因,在多个分子水平上进行协调调控,目前的研究对于早期胚胎发育过程中相关的信号通路、转录调控以及表观遗传学调控已经作出相对深入全面的解析^[28],但是代谢途径上对囊胚孵化的决定作用还不太清楚.不同物种的研究结果对囊胚孵化行为的描述存在差异,甚至对同一物种的描述也有争议^[29].Sathananthan等^[30]发现人类囊胚通常在非胚胎极处孵化,而Miyata等^[31]认为人类囊胚的自然孵化部位通常靠近ICM发育.有报道称,小鼠胚胎是在非胚极孵化的^[32].然而,最近的研究发现,小鼠囊胚孵化部位不影响胎儿发育,但有规律地分布^[33].这些矛盾的结果强调了孵化位点是否直接影响胚胎着床和随后发育的不确定性^[34].辅助孵化(AH)是为促进胚胎孵化和着床而发展起来的.人类临床中,AH通常通过辅助生殖程序实施^[35],尤其可以提高老年妇女和多囊卵巢综合征或反复植入失败患者的植入率和妊娠率^[36-38].然而,AH在改善整体妊娠结局中的作用仍存争议^[39].一些研究认为,AH增加了临床妊娠率,但只有非显著性的结果,需要提高出生率和增加多胎妊娠

的发生率^[35-36,40]. 这些发现意味着AH介导的孵化过程可能对妊娠结局产生影响^[34]. 本研究显示, 孵化过程中相关基因参与了细胞内多种生化代谢信号通路, 这些信号通路在不同结局的囊胚细胞中激活程度不同, 表明囊胚发育过程中不同生化反应进行的程度不同, 囊胚孵化的命运结局也不相同. 以往的研究并未阐述关键分子的分化机制和差异变化. 我们可以通过这个思路进行辅助孵化技术的创新, 即通过改变孵化环境中的各种理化因素、辅助囊胚向正确的孵化方向发育.

本文分析发现囊胚孵化过程中基因表达呈现特定的分化模式. 为进一步解析囊胚孵化过程发生的分子事件提供了新的思路, 并为深入研究囊胚孵化命运决策因子提供了数据基础. 转录组分析中, 选取了与生物代谢相关的基因进行验证分析, 其它未涉及检测的关键基因可能被忽略. 下一步, 我们仍将继续深入研究孵化过程相关基因的重要作用.

参考文献:

- [1] SALAMONSEN L A, EVANS J, NGUYEN H P, et al. The microenvironment of human implantation: Determinant of reproductive success[J]. *American Journal of Reproductive Immunology*, 2016, 75(3): 218-225.
- [2] WANG H B, DEY S K. Roadmap to embryo implantation: Clues from mouse models[J]. *Nature Reviews. Genetics*, 2006, 7(3): 185-199.
- [3] TANNUS S, COHEN Y, HENDERSON S, et al. The effect of assisted hatching on live birth rate following fresh embryo transfer in advanced maternal age[J]. *Reproductive Sciences*, 2019, 26(6): 806-811.
- [4] LEONAVICIUS K, ROYER C, PREECE C, et al. Mechanics of mouse blastocyst hatching revealed by a hydrogel-based microdeformation assay[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2018, 115(41): 10375-10380.
- [5] KOOT Y E, TEKLENBURG G, SALKER M S, et al. Molecular aspects of implantation failure[J]. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2012, 1822(12): 1943-1950.
- [6] SCHIMMEL T, COHEN J, SAUNDERS H, et al. Laser-assisted zona pellucida thinning does not facilitate hatching and may disrupt the in vitro hatching process: A morphokinetic study in the mouse[J]. *Human Reproduction*, 2014, 29(12): 2670-2679.
- [7] CHIMOTE N M, CHIMOTE N N, NATH N M, et al. Transfer of spontaneously hatching or hatched blastocyst yields better pregnancy rates than expanded blastocyst transfer[J]. *Journal of Human Reproductive Sciences*, 2013, 6(3): 183-188.
- [8] KHORRAM O, SHAPIRO S S, JONES J M. Transfer of nonassisted hatched and hatching human blastocysts after in vitro fertilization[J]. *Fertility and Sterility*, 2000, 74(1): 163-165.
- [9] PARIAS B C, HUET-HUDSON Y M, DEY S K. Blastocyst's state of activity determines the "window" of implantation in the receptive mouse uterus[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1993, 90(21): 10159-10162.
- [10] MOROS-NICOLÁS C, CHEVRET P, JIMÉNEZ-MOVILLA M, et al. New insights into the mammalian egg zona pellucida[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2021, 22(6): 3276.
- [11] 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.
- [12] XIA W K, XIE W. Rebooting the epigenomes during mammalian early embryogenesis[J]. *Stem Cell Reports*, 2020, 15(6): 1158-1175.
- [13] WASSARMAN P M, LITSCHER E S. Mammalian fertilization: The egg's multifunctional zona pellucida[J]. *The International Journal of Developmental Biology*, 2008, 52(5/6): 665-676.
- [14] MA M X, ZHANG L, LIU Z H, et al. Effect of blastocyst development on hatching and embryo implantation[J]. *Theriogenology*, 2024, 214: 66-72.
- [15] 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.
- [16] 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]. *PLoS One*, 2012, 7(11): e49328.
- [17] ZHANG H L, NIEVES J L, FRASER S T, et al. Expression of podocalyxin separates the hematopoietic and vascular potentials of mouse embryonic stem cell-derived mesoderm[J]. *Stem Cells*, 2014, 32(1): 191-203.
- [18] TATENO H, MATSUSHIMA A, HIEMORI K, et al. Podocalyxin is a glycoprotein ligand of the human pluripotent stem cell-specific probe rBC2LCN[J]. *Stem Cells Translational Medicine*, 2013, 2(4): 265-273.

- [19] DIXELIUS J, JAKOBSSON L, GENERSCH E, et al. Laminin-1 promotes angiogenesis in synergy with fibroblast growth factor by distinct regulation of the gene and protein expression profile in endothelial cells[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2004, 279(22): 23766-23772.
- [20] LUO J P, MCGINNIS L K, CARLTON C, et al. PTK2b function during fertilization of the mouse oocyte[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2014, 450(3): 1212-1217.
- [21] LIU Y Y, YANG J, SHI Z G, et al. In vivo selection of highly metastatic human ovarian cancer sublines reveals role for AMIGO2 in intra-peritoneal metastatic regulation[J]. *Cancer Letters*, 2021, 503: 163-173.
- [22] SESHAGIRI P B, SEN ROY S, SIREESHA G, et al. Cellular and molecular regulation of mammalian blastocyst hatching[J]. *Journal of Reproductive Immunology*, 2009, 83(1/2): 79-84.
- [23] SIREESHA G V, MASON R W, HASSANEIN M, et al. Role of cathepsins in blastocyst hatching in the golden hamster[J]. *Molecular Human Reproduction*, 2008, 14(6): 337-346.
- [24] SHARMA N, LIU S Y, TANG L, et al. Implantation Serine Proteinases heterodimerize and are critical in hatching and implantation[J]. *BMC Developmental Biology*, 2006, 6: 61.
- [25] JUKAM D, SHARIATI S A M, SKOTHEIM J M. Zygotic genome activation in vertebrates[J]. *Developmental Cell*, 2017, 42(4): 316-332.
- [26] YANG Y, LIU B, XU J, et al. Derivation of pluripotent stem cells with in vivo embryonic and extraembryonic potency[J]. *Cell*, 2017, 169(2): 243-257.
- [27] EISSENBERG J C, SHILATIFARD A. Histone H3 lysine 4 (H3K4) methylation in development and differentiation[J]. *Developmental Biology*, 2010, 339(2): 240-249.
- [28] DENG Q L, RAMSKÖLD D, REINIUS B, et al. Single-cell RNA-seq reveals dynamic, random monoallelic gene expression in mammalian cells[J]. *Science*, 2014, 343(6167): 193-196.
- [29] NEGRÓN-PÉREZ V M, HANSEN P J. The bovine embryo hatches from the zona pellucida through either the embryonic or abembryonic pole[J]. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 2017, 34(6): 725-731.
- [30] SATHANANTHAN H, MENEZES J, GUNASHEELA S. Mechanics of human blastocyst hatching in vitro[J]. *Reproductive Biomedicine Online*, 2003, 7(2): 228-234.
- [31] MIYATA H, MATSUBAYASHI H, FUKUTOMI N, et al. Reply of the authors: Relevance of the site of assisted hatching in thawed human blastocysts[J]. *Fertility and Sterility*, 2010, 94(4): e66.
- [32] GONZALES D S, JONES J M, PINYOPUMMINTR T, et al. Trophoctoderm projections: A potential means for locomotion, attachment and implantation of bovine, equine and human blastocysts[J]. *Human Reproduction*, 1996, 11(12): 2739-2745.
- [33] LIU S J, SUN J B, HAO X, et al. Blastocyst hatching site is regularly distributed and does not influence foetal development in mice[J]. *Scientific Reports*, 2020, 10(1): 2475.
- [34] AN L Y, LIU Y H, LI M Y, et al. Site specificity of blastocyst hatching significantly influences pregnancy outcomes in mice[J]. *The FASEB Journal*, 2021, 35(9): e21812.
- [35] LI D, YANG D L, AN J, et al. Effect of assisted hatching on pregnancy outcomes: A systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials[J]. *Scientific Reports*, 2016, 6: 31228.
- [36] KNUDTSON J F, FAILOR C M, GELFOND J A, et al. Assisted hatching and live births in first-cycle frozen embryo transfers[J]. *Fertility and Sterility*, 2017, 108(4): 628-634.
- [37] LU X M, LIU Y B, CAO X, et al. Laser-assisted hatching and clinical outcomes in frozen-thawed cleavage-embryo transfers of patients with previous repeated failure[J]. *Lasers in Medical Science*, 2019, 34(6): 1137-1145.
- [38] WAN C Y, SONG C, DIAO L H, et al. Laser-assisted hatching improves clinical outcomes of vitrified-warmed blastocysts developed from low-grade cleavage-stage embryos: A prospective randomized study[J]. *Reproductive Biomedicine Online*, 2014, 28(5): 582-589.
- [39] ALTERI A, VIGANÒ P, ABU MAIZAR A, et al. Revisiting embryo assisted hatching approaches: A systematic review of the current protocols[J]. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 2018, 35(3): 367-391.
- [40] ZENG M F, SU S Q, LI L M. The effect of laser-assisted hatching on pregnancy outcomes of cryopreserved-thawed embryo transfer: A meta-analysis of randomized controlled trials[J]. *Lasers in Medical Science*, 2018, 33(3): 655-666.