生殖生理与胚胎着床 DOI:10.13406/j.cnki.cyxb.001318

ApoA Ⅳ在早孕期小鼠和女性妊娠不同时期的变化规律及其作用

刘 鑫[1],李 剑[2],刘 娜[1],高茹菲[1],何俊琳[1],王应雄[1],刘学庆[1]
(1. 重庆医科大学公共卫生与管理学院生殖生物学研究室,重庆 400016;
2. 重庆医科大学附属第一医院妇产科实验室,重庆 400016)

【摘 要】目的:探讨载脂蛋白 A Ⅳ(apolipoprotein A Ⅳ,ApoA Ⅳ)在早孕期小鼠和妊娠期女性不同时期的表达规律,初步分析其在早孕期小鼠胚胎着床和蜕膜化过程中的作用。**方法**:将 84 只购于重庆医科大学实验动物中心的雌性昆明小鼠随机分成 2 组,真孕组(42 只)为正常雌鼠与正常雄鼠交配,假孕组(42 只)为正常雌鼠与结扎后的雄鼠交配,应用 ELISA 方法分别分析早孕期真孕组和假孕组小鼠孕 1 天~7 天(d_1~d_7)血清中 ApoA Ⅳ和高密度脂蛋白(high density lipoprotein,HDL)的表达量;将重庆医科大学附属第一医院产前诊断中心提供的 70 例孕妇血清按照孕周的不同分为孕早期 12 周(15 例)、13 周(15 例)和孕中期15~18 周(每组各 10 例)组,分别检查血清中 ApoA Ⅳ和 HDL 的表达量;利用免疫组化法,分析 ApoA Ⅳ在孕 d_1、d_5、d_6、d_7 子宫内膜中的表达情况。**结果**:ApoA Ⅳ和HDL 在早孕期小鼠真孕组血清中孕 d_1~d_7 随着妊娠天数的增加,其表达量逐渐升高,孕 d_2~d_7 分别与孕 d_1 相比具有统计学差异($P<0.01$),而在假孕组中并无明显的变化($P>0.05$);ApoA Ⅳ和 HDL 在早、中孕期女性血清中的表达量随着妊娠周数的增加其升高趋势也逐渐加强,孕 12 周血清中 ApoA Ⅳ和 HDL 的表达量分别都明显低于后面的孕周($P=0.000$);通过免疫组化结果显示,ApoA Ⅳ在孕 d_1 的腺上皮有轻微的表达,而在孕 d_5、d_6 具有广泛表达且在孕 d_7 初级蜕膜区表达明显降低($P<0.05$)。**结论**:早孕期小鼠血清中的 ApoA Ⅳ表达量可能与胚胎发育和子宫内膜基质细胞的蜕膜化进程相关。

【关键词】脂蛋白 A Ⅳ;高密度脂蛋白;小鼠;子宫内膜
【中图分类号】R714.1 **【文献标志码】**A **【收稿日期】**2016-05-24

Vary rules and potential role of ApoA Ⅳ in different stages of mice and females during pregnancy

Liu Xin[1], Li Jian[2], Liu Na[1], Gao Rufei[1], He Junlin[1], Wang yinxiong[1], Liu Xueqing[1]
(1. Laboratory of Reproductive Biology, College of Public Health and Management, Chongqing Medical University; 2. Obstetrics and Gynecology Laboratory, The First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University)

【Abstract】***Objective***: To investigate the expression of ApoA Ⅳ during early pregnancy in mice and the expression of ApoA Ⅳ in the different stages of pregnant women; to analyze the role of ApoA Ⅳ during the process of embryo implantation and decidualization. ***Methods***: Totally 84 mice were randomly divided into 2 groups: normal mated males and females rats were assigned into pregnant group(n=42); female rats mating with male rats after ligation were assigned into pseudopregnant group(n=42). All animals were purchased from the experimental animal center of Chongqing Medical University. ELISA was used to detect the expressions of serum ApoA Ⅳ and high density lipoprotein(HDL) in the pregnant and pseudopregnant rats which were pregnancy in d_1 to d_7 days. A total of 70 pregnant women were examined for serum levels of ApoA Ⅳ and HDL. Fifteen women in the first trimester(12 weeks), 15 women in the first trimester(13 weeks) and 40 women in the second trimester(15 to 18 weeks, 10 cases per week) were enrolled from the Obstetrics and Gynecology Laboratory of the First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University. Immunohistochemistry was performed to detect the expression of ApoA Ⅳ in pregnant mice uterus of d_1, d_5, d_6 and d_7. ***Results***: ApoA Ⅳ and HDL were gradually increased with the number of days during early pregnancy in mice. There was a significant difference of the levels of ApoA Ⅳ and HDL between d_2 to d_7 and d_1($P<0.01$). However, there was no significant difference in levels of ApoA Ⅳ and HDL in

作者介绍:刘 鑫,Email:292570523@qq.com,
研究方向:胚胎着床。
通信作者:刘学庆,Email:cqmu_liuxueqing@126.com。
基金项目:国家自然科学基金资助项目(编号:NSFC31571551)。
优先出版:http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1046.r.20170622.1115.020.html (2017-06-22)

pseudopregnant group(P>0.05). In human specimens, the levels of ApoA Ⅳ and HDL were increased with the increase of gestation weeks. The expression levels of ApoA Ⅳ and HDL in serum of 12-week gestation were significantly lower than those in the later gestation weeks(P=0.000). Based on the results of immunohistochemistry, ApoA Ⅳ was slightly expressed in the glandular epithelium on d_1, d_5 and d_6, it had a wide range of expression. On d_7, it was strongly expressed in secondary decidual zone(P<0.05). ***Conclusion***: The expression level of ApoA Ⅳ may be related to embryo development and endometrial stromal cells decidualization during early pregnancy.

【Key words】apolipoprotein A Ⅳ; high density lipoprotein; mice; endometrium

在人类和哺乳动物生殖过程中，胚胎着床(embryo implantation)是胚胎与母体子宫内膜之间精细而复杂的重要环节，其结果是决定妊娠成功与否的关键，也是妊娠过程的必经之路[1-2]。胚胎着床涉及众多基因和蛋白分子。孕 d_4~d_5 被认为是允许小鼠胚胎植入子宫内膜的关键时期[3-4]，在此期间，大量分子介质，包括粘附分子、细胞因子、生长因子、脂质等[5]被识别。目前，越来越多的基因和子宫内膜自身分泌、表达的蛋白分子被研究并证实与妊娠过程相关，然而由其他组织分泌的蛋白以及其他物质是否也参与胚胎着床却研究较少。

已有研究表明，母体脂类代谢不仅与不孕相关，还对胚胎的生长发育起着至关重要的作用[6]，孕产妇患高脂血症会造成胎儿日后患动脉粥样硬化的风险提高[7-9]，子宫内膜异位症患者胚胎着床失败与子宫内膜中载脂蛋白 A(apolipoprotein A, ApoA) Ⅰ异常表达相关[10]。本课题组前期应用蛋白质同位素相对标记与绝对定量技术筛选早孕期小鼠孕 d_1、d_4 以及 d_5 着床点和着床旁子宫内膜蛋白质表达差异时发现，ApoA Ⅳ随着妊娠天数的增加，其表达量逐渐升高，且孕 d_5 着床点的表达量明显高于着床旁组织。然而 ApoA Ⅳ在子宫内膜中具有什么样的功能至今还未见相关报道。ApoA Ⅳ在 d_5 点、旁的差异性表达是否与胚胎着床存在一定的相关性，ApoA Ⅳ本身载运的蛋白物质是否参与胚胎着床都引起我们强烈的关注。

载脂蛋白(apolipoprotein, Apo)是一种特殊的蛋白质，与血液中的胆固醇、甘油三脂、磷脂和脂肪酸等正常成分相结合而形成脂蛋白，以利于脂类物质转运和代谢。如今发现的载脂蛋白主要分为 A、B、C、D、E 5 类，ApoA Ⅳ属于 A 类中的一种。ApoA Ⅳ首次在大鼠的高密度脂蛋白(high density lipoprotein, HDL)中发现[11]，主要在肝脏和小肠中合成，相对分子质量为 46 kD，含 396 个氨基酸[12]，基因定位于染色体 11q23，长 2 594 bp，含有 2 个内含子和 3 个外显子[13]。ApoA Ⅳ在 HDL 的代谢过程中起着重要的调节作用，它还是 HDL 的主要组成部分[14]，血液中 90%以上的 ApoA Ⅳ与 HDL 结合呈脂蛋白结合状态[15]。

结合课题组前期研究的结果，为了进一步探明 ApoA Ⅳ在妊娠过程中的变化情况，我们进行了初步研究，以探究 ApoA Ⅳ在早孕期小鼠和早、中孕期女性不同妊娠时间段的变化规律及其作用。以期为深入研究载脂蛋白在生殖方面的作用打下一定的基础。

1 材料和方法

1.1 实验动物

昆明小鼠(6~8 周龄，体质量 25~30 g，雌雄兼有)购于重庆医科大学实验动物中心[合格证号：SCXK(渝)20050002]，饲养于 SPF 级动物房，自由摄食，饲养 2 周后开始实验。

将 84 只周龄和体质量相同或相近的雌性昆明小鼠随机分成 2 组，代养于 SPF 级房间。真孕组和假孕组各 42 只，真孕组为正常雄鼠与正常雌鼠交配，假孕组为结扎后的雄鼠与正常雌鼠交配。又以体质量相近的归为一个小组，真孕 d_1~d_7 组共 7 组，每小组 6 只；假孕 d_1~d_7 组共 7 组，每小组 6 只。于下午 18:00 点按雌雄比例 2:1 合笼进行交配，次日凌晨 8:00 在雌鼠阴道口发现阴栓者记为 d_1，依次类推。

1.2 孕妇血清

本研究收集的血清标本均为 2014 年 5 月至 2015 年 10 月在重庆医科大学附属第一医院产前诊断中心就诊的孕妇，主要收集了孕 12、13 周以及孕 15~18 周的孕妇血清。所有受试者都签署了知情同意书，纳入标准为：①所有检测对象均无遗传病史；②无免疫缺陷；③无染色体异常；④无性传播疾病；⑤无内分泌疾病；⑥超声检测子宫形态正常。

其中孕 12[(27.53 ± 2.62)岁]、13[(26.20 ± 2.81)岁]周血清标本各 15 例，孕 15[(27.90 ± 1.91)岁]、16[(26.80 ± 2.80)岁]、17[(26.40 ± 2.76)岁]、18[(27.90 ± 1.97)岁]周血清标本各 10 例，差异无统计学意义(F=1.043, P=0.401)。

1.3 主要试剂

兔免疫组化试剂盒、DAB 显色试剂盒购于北京中杉金桥生物技术有限公司，Apolipoprotein A-Ⅳ抗体购于 Antibodies-online 公司，RapiBio Lag(RB)试剂盒、小鼠 ApoA Ⅳ ELISA 检测试剂盒、小鼠 HDL ELISA 检测试剂盒、人 ApoA Ⅳ ELISA 检测试剂盒、人 HDL ELISA 检测试剂盒均购于上海研辉生物技术有限公司。

1.4 小鼠材料的收集

无菌条件下，2 组小鼠均先用乙醚麻醉，然后用高温灭菌干燥后的弯镊摘取小鼠眼球进行取血于 1.5 mL EP 管中，4 ℃冰箱过夜，次日早晨取其上清液于-80 ℃冰箱保存。脱颈处死小鼠，在冰盒上进行接下来的操作，无菌条件下将每小组每一只小鼠的子宫段进行包埋处理。其中 d_5 着床点通过尾静脉注射台盼蓝识别，未被着色处为着床旁组织。

1.5 ELISA

将实验所需的板条从铝箔袋中取出于室温平衡 20 min，多余的板条放进自封袋内存于 4 ℃冰箱保存；设定标准品孔和样本孔，标准孔为 6 个，每个标准孔按顺序分别加入不同浓度的标准品 50 μL；余下的为样本孔，先加入待测的样本 10 μL，再加稀释液 50 μL；多余的为空白孔，无须做任何处理；除了空白孔外，将辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase，HRP)标记的检测抗体 100 μL 分别加入标准品孔和样品孔中，然后用封板膜封住需要反应的孔，置于 37 ℃的水浴锅中温育 1 h；弃去液体，于吸水纸上拍干，然后再每孔加满洗涤液，静置 2 min，轻轻地甩去洗涤液，于吸水纸上再拍干，再加满洗涤液，如此重复洗涤板条 5 次；标准品孔和样品孔分别加入 50 μL 底物 A、B 液，室温避光环境下孵育 20 min；最后，每孔加入 50 μL 终止液，15 min 内在波长为 450 nm 的条件下测定各个孔的吸光度(absorbance，A)值。

1.6 免疫组化

经 4%多聚甲醛固定 4 h，浓度为 75%、85%、95%、100%的酒精分别进行脱水 2 h，二甲苯透明 45 s 左右，56 ℃烤箱用软蜡处理 3 h，硬蜡进行最后包埋。切片机连续切片，厚度为 4 μm，贴片后经 56 ℃干烤 4 h，备用。

将石蜡切片放于二甲苯Ⅰ、二甲苯Ⅱ脱蜡各 40 min；100%、90%、80%、70%的梯度酒精进行水化各 3 min，流水冲洗 10 min，蒸馏水浸洗 10 min；PBS 浸洗 5 min×3 次；枸橼酸盐缓冲液浸泡组织切片，于微波炉内高火 15 min 进行抗原热修复；自然冷却后用 PBS 浸洗 3 min×3 次洗掉枸橼酸盐，将组织周围的水吸干，放入湿盒，去离子水室温孵育 15 min 后 PBS 洗涤 3 min×3 次；加入免疫组化试剂盒 A 液(封闭用的正常血清 5%浓度)，37 ℃孵育 30 min；加入一抗 4 ℃过夜；次日，加入免疫组化试剂盒 B 液(生物素标记兔抗山羊 IgG)，37 ℃孵育 30 min 后，PBS 浸洗 3 min×3 次；加入免疫组化试剂盒 C 液(辣根酶标记链酶卵白素工作液)，37 ℃孵育 30 min 后，PBS 浸洗 3 min×3 次；DAB 显色(1 mL DAB 底物液+1 滴 DAB)；苏木精复染 3~5 min；70%、80%、90%、100%的梯度酒精脱水各 3 min；二甲苯透明 5 min×3 次；滴香柏油于组织面，用干净的盖玻片封片。所有组织切片均在一抗浓度、显色时间一致的前提下进行。一抗的工作浓度为 1:200，显微镜下观察，细胞质染为棕黄色者为阳性细胞。

1.7 统计学分析

实验数据采用 SPSS 16.0 软件进行统计分析。符合计量资料以均数 ± 标准差（$\bar{x} \pm s$）表示，多组间差异比较采用单因素方差分析。小鼠血清 ELISA 检测结果采用析因设计方差分析，各组之间相互比较采用 SNK 法；人类血清 ELISA 检测结果采用单因素方差分析。并对检测指标和妊娠天数或周数进行相关性分析。每个实验至少重复 3 次，检验水准 α=0.05。

2 结 果

2.1 妊娠早期小鼠血液中 ApoA Ⅳ的结果

收集真孕组和假孕组孕 d_1~d_7 早孕期小鼠血清，每组每天至少 6 只。ELISA 检查各只小鼠血清中 ApoA Ⅳ的表达量。真孕组和假孕组中各天 ApoA Ⅳ的表达量见表 1。应用析因分析数据，其分组主效应 F=158.290、P=0.000，时间主效应 F=23.140、P=0.000，交互效应 F=9.230、P=0.000。结果(图 1)表明：真孕组和假孕组的 ApoA Ⅳ表达量不同，真孕组小鼠血清中 ApoA Ⅳ的表达量随着妊娠天数的增加而逐渐升高，假孕组小鼠血清中 ApoA Ⅳ的表达量变化不明显。怀孕天数不同，ApoA Ⅳ的表达量不同，真孕组小鼠血清中 ApoA Ⅳ的表达量在孕 d_5、d_6、d_7 明显高于 d_1，P 值均小于 0.05。真、假孕组与怀孕天数之间不存在交互作用。对 ApoA Ⅳ与小鼠怀孕天数之间的相关性分析数据表明，ApoA Ⅳ与小鼠怀孕天数存在正相关关系(r=0.962，P=0.000)。因此推测，血清中ApoA Ⅳ的表达量与胚胎着床存在某种相关性。

2.2 妊娠早期小鼠血液中 HDL 的结果

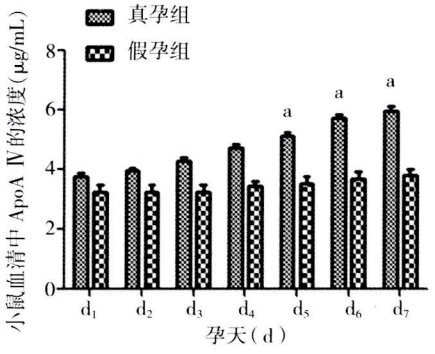
由于 ApoA Ⅳ主要与 HDL 结合，因此我们又检测了早孕期小鼠血液中 HDL 的变化情况。真孕组和假孕组中各天数 HDL 的表达量见表 2。应用析因分析数据，其分组主效应

表 1 真孕组和假孕组各天数 ApoA Ⅳ的表达量（$\bar{x} \pm s$，μg/mL）

Tab.1 Relative expression of ApoA Ⅳ of pregnant and pseudopregnant group（$\bar{x} \pm s$，μg/mL）

组别	d_1(n=6)	d_2(n=6)	d_3(n=6)	d_4(n=6)	d_5(n=6)	d_6(n=6)	d_7(n=6)
真孕	3.78 ± 0.18	3.41 ± 0.06	4.30 ± 0.18	4.34 ± 0.11	4.98 ± 0.21	5.40 ± 0.23	6.08 ± 0.27
假孕	3.26 ± 0.36	3.24 ± 0.41	3.39 ± 0.36	3.43 ± 0.33	3.54 ± 0.37	3.70 ± 0.38	3.80 ± 0.36

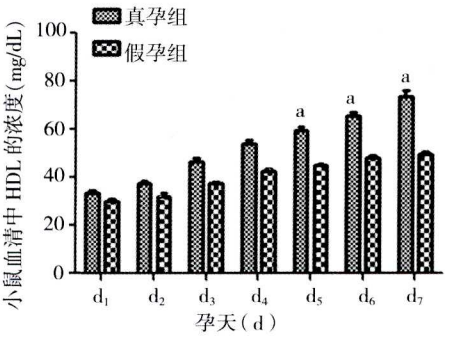
为 F=333.720、P=0.000，时间主效应 F=157.830、P=0.000，交互效应 F=16.610、P=0.000。结果（图 2）显示：真孕组和假孕组的HDL 表达量不同，真孕组小鼠血清中 HDL 的表达量随着妊娠天数的增加而逐渐升高，假孕组小鼠血清中 HDL 的表达量变化不明显。不同怀孕天数 HDL 的表达量不同，真孕组小鼠血清中 HDL 的表达量在 d_5、d_6、d_7 明显高于 d_1，P 值均小于 0.05。真、假孕组与怀孕天数之间不存在交互作用。对 HDL 与小鼠怀孕天数之间的相关性分析数据表明，HDL 与小鼠怀孕天数也存在正相关关系（r=0.979，P=0.000）。由此发现，早孕期小鼠血液中 ApoA Ⅳ和 HDL 的表达量与妊娠天数存在密切相关的联系。那么 ApoA Ⅳ在小鼠子宫内膜中的表达情况怎么样呢？因此检测了小鼠子宫内膜中 ApoA Ⅳ的表达量。



a：与 d_1 比较，P<0.05

图 1　真、假孕组小鼠孕 d_1～d_7 血液中 ApoA Ⅳ的变化情况

Fig.1　Changes in blood ApoA Ⅳ from d_1 to d_7 in pregnant mice and pseudopregnancy mice



a：与 d_1 比较，P<0.05

图 2　真、假孕组小鼠孕 d_1～d_7 血液中 HDL 的变化情况

Fig.2　HDL changes in blood from d_1 to d_7 in pregnant mice and pseudopregnancy mice

2.3　妊娠早期小鼠子宫内膜中 ApoA Ⅳ的结果

通过免疫组化检测 ApoA Ⅳ在早孕期小鼠子宫内膜中的表达情况，结果（图 3）显示：ApoA Ⅳ只在 d_1 的腺上皮有轻微表达；在 d_5 点（$d_5$is）、d_6 点（$d_6$is）具有广泛的表达；而在 d_7 点（$d_7$is）初级蜕膜区表达降低而次级蜕膜区明显增高。因此，本研究提出假设：早孕期小鼠血清中 ApoA Ⅳ和 HDL 的代谢过程可能与子宫内膜的重塑相关。

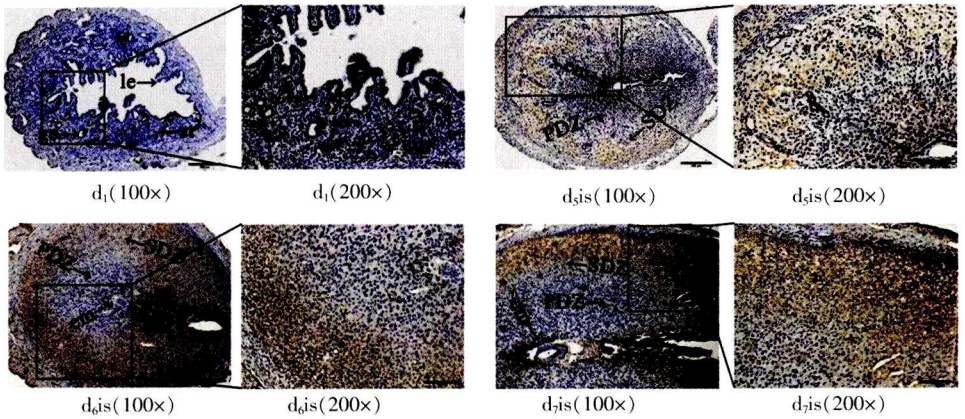
2.4　人类孕期血液中 ApoA Ⅳ和 HDL 的结果

检测了孕早期 12、13 周以及孕中期 15~18 周孕妇血清中 ApoA Ⅳ和 HDL 的表达量，具体参数见表 3。ELISA检测血

表 2　真孕组和假孕组中各天数 HDL 的表达量（$\bar{x}\pm s$，mg/dL）

Tab.2　Relative expression of HDL of pregnant and pseudopregnant group（$\bar{x}\pm s$，mg/dL）

组别	d_1（n=6）	d_2（n=6）	d_3（n=6）	d_4（n=6）	d_5（n=6）	d_6（n=6）	d_7（n=6）
真孕	3345 ± 1.84	37.47 ± 2.18	46.73 ± 2.53	54.31 ± 2.35	59.67 ± 2.02	65.80 ± 2.01	73.62 ± 4.62
假孕	30.33 ± 1.21	32.33 ± 1.86	37.36 ± 1.68	42.49 ± 1.84	45.05 ± 1.33	48.07 ± 1.34	49.74 ± 1.34



le：腔上皮；ge：腺上皮；st：基质；em：胚胎；PDZ：初级蜕膜区；SDZ：次级蜕膜区。

棕色为阳性染色。同天数右图为所框区域的局部放大

图 3　ApoA Ⅳ在小鼠不同孕天子宫内膜的免疫组化染色

Fig.3　Immunohistochemisty staining of ApoA Ⅳ antibody in mice endometrium on different pregnant days

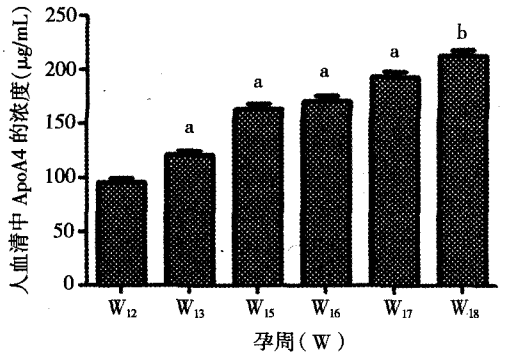
表 3 人类各孕周 ApoA Ⅳ和 HDL 的表达量

Tab.3 Relative expression of ApoA Ⅳ and HDL of pregnant women

指标	孕 12 周（n=15）	孕 13 周（n=15）	孕 15 周（n=10）	孕 16 周（n=10）	孕 17 周（n=10）	孕 18 周（n=10）	F 值	P 值
ApoA Ⅳ(μg/mL)	100.11 ± 12.48	126.73 ± 12.65	164.06 ± 21.83	175.72 ± 15.65	198.83 ± 13.42	219.12 ± 18.84	99.56	0.00
HDL(mg/mL)	52.00 ± 5.61	59.69 ± 5.66	61.73 ± 5.93	63.80 ± 5.52	68.11 ± 5.49	78.68 ± 6.59	28.22	0.00

清中 ApoA Ⅳ的表达量，结果（图 4）显示，随着妊娠周数的增加，血清中 ApoA Ⅳ的表达量增加升高，且孕 12 周血清中 ApoA Ⅳ的表达量明显低于后面的孕周，P 值均小于 0.001。相关性分析表明，ApoA Ⅳ与孕周同样存在正相关关系（r=0.939，P=0.000）。

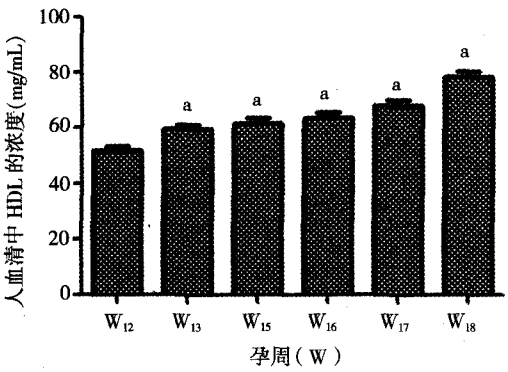
ApoA Ⅳ与 HDL 存在紧密相关的关系，相应孕期女性血液中 HDL 表达量的变化情况检测结果（图 5）显示，随着妊娠周数的增加，血清中 HDL 的表达量也呈逐渐升高的趋势，且孕 12 周血清中 HDL 的表达量明显低于后面的孕周，P 值均小于 0.001。相关性分析表明，HDL 与孕周也存在正相关关系（r=0.795，P=0.000）。



a：与 W_{12} 比较，P=0.000

图 4 早、中孕期女性血液中 ApoA Ⅳ的变化情况（$\bar{x} \pm s$，n=70）

Fig.4 Changes of ApoA IV in the blood of pregnant women ($\bar{x} \pm s$, n=70)



a：与 W_{12} 比较，P=0.000

图 5 早、中孕期女性血液中 HDL 的变化情况（$\bar{x} \pm s$，n=70）

Fig.5 Changes of HDL in the blood of pregnant women ($\bar{x} \pm s$, n=70)

3 讨 论

脂质代谢对正常的生理过程和胚胎发育都起着非常重要的作用[16]。本研究发现，随着早孕期小鼠妊娠天数的增加，真孕组小鼠血清中 ApoA Ⅳ的表达量逐渐升高，而在假孕组中，血清中 ApoA Ⅳ的表达量变化不大，且无统计学差异。真孕组与假孕组相比，真孕组明显高于假孕组，差异具有统计学意义。研究早孕期小鼠血清中 HDL 的变化情况发现，HDL 的结果与 ApoA Ⅳ的结果相一致，说明脂质代谢与胚胎植入存在密切关系。许多动物模型证实，HDL 代谢对生殖十分重要[17-20]，HDL 与卵泡的发育相关[21]，雌性卵子内过多的胆固醇聚集将会使卵子自发激活从而导致雌性不孕[22]，HDL 受体不足同样可能造成不孕[23]，母体 HDL 水平还与胚胎质量和生殖结果密切相关[21]。同时，已有研究表明，ApoA Ⅳ的主要功能是参与脂质的吸收以及在 HDL 的逆向转运过程中起重要的作用[24]，HDL 逆向转运可以减少胆固醇的聚集。未脂化的胆固醇对细胞是有毒的，而 HDL 逆向转运则是保护血管壁完整性的重要防御机制[25]。在蛋白质组学 ITARQ 筛选当中发现，早孕期小鼠 d_5 着床点 ApoA Ⅳ的表达量明显高于着床旁组织。因此推测，ApoA Ⅳ的表达可能与子宫内膜重塑存在一定的关联。胚胎植入以后，子宫内膜发生蜕膜化，蜕膜化过程成功与否对于着床和妊娠的维持都至关重要[26]。子宫内膜蜕膜化反应先是从血管周围启动，然后逐渐发展到黄体晚期基质细胞和妊娠的子宫内膜中[27]。血管生成是子宫内膜蜕膜化至关重要的一部分，蜕膜中将形成新的血管网络，血管变细、分支增多、血流增强，从而形成母体循环与胚胎之间的第一个交换装置，以保证胚胎生存和成功妊娠[28]。为了验证之前的推测，我们进行了组织学分析，结果显示 ApoA Ⅳ在早孕期小鼠 d_1 的子宫内膜中几乎无表达，但随着胚胎植入，在 d_5、d_6 具有广泛的表达，且在 d_7 初级蜕膜区表达降低而次级蜕膜区明显增高。结果与我们的推测相一致。文献报道指出，在孕鼠子宫中，脂类代谢物质被高度激活[29]，

激活的物质参与蜕膜化的进程[30]，蜕膜细胞增大，脂质和糖原含量上升，从而为胚胎提供营养支持[31]。还有文献报道指出，小鼠静脉注入 ApoA Ⅰ或者与 ApoA Ⅰ结合的 HDL 可以增加毛细血管的密度和内皮祖细胞[32-33]，内皮祖细胞能够刺激血管生成，聚集受损的内皮细胞形成新的内皮细胞[34]，从而促进血管生成，改善血液流动[35]。静脉注入 ApoA Ⅰ还可以增加血管生长因子 mRNA 的水平，例如血管内皮生长因子、趋化因[34]。因此，本研究提出假设，早孕期小鼠子宫内膜中与 ApoA Ⅰ同族且功能相近的 ApoA Ⅳ的这种时空差异性表达可能与子宫内膜蜕膜区形成过程中血管的生成相关，从而参与子宫内膜的重塑过程。

研究目的最终是希望能够对人的妊娠过程具有一定的意义。因此，本课题组又对人类妊娠过程中不同时间段的孕妇血清进行了研究。结果表明：早、中孕期妊娠女性的血清中，无论是 ApoA Ⅳ还是 HDL，其表达量都随妊娠周数的增加而增加。对 ApoA Ⅳ和 HDL 与妊娠周数之间做线性分析发现，无论是 ApoA Ⅳ还是 HDL，都与妊娠周数存在具有统计学意义的正相关关系。其结果与小鼠模型上观察到的趋势相一致，进一步证明了 ApoA Ⅳ和 HDL 在妊娠过程中起着相当重要的作用。

本研究发现，早孕期小鼠胚胎着床后其血液中的 ApoA Ⅳ和 HDL 的表达量明显增高。有文献报道指出：胚胎植入后，脂类物质对胚胎的形成至关重要，它不仅负责胎儿的营养，同时还可以通过一系列的信号传递激活或抑制胎儿不同器官系统的发育[36-37]，抑制脂类物质的生物合成途径以及脂类物质生物合成所需酶基因的突变[38]都会导致婴儿出生后缺陷，如前脑无裂畸形、心脏病等[39]。虽然胎儿自身可以合成一定的脂类，但已有大量数据暗示，胎儿的生长发育必须要有大量外生脂类的参与。脂蛋白复合物传递到胎儿之前，血管和绒膜绒毛已经形成，母亲的脂类通过胎盘膜转运到胎儿的血液循环[40]。肥胖和血脂异常的孕妇通过影响脂蛋白水平，从而影响胎儿的生长。母体脂类水平以及母胎间的转运是否正常都将直接影响妊娠的结局。ApoA Ⅳ主要是以转运 HDL 来实现的，因此，本研究认为 ApoA Ⅳ和 HDL 在胚胎着床后的这种高表达可能与胚胎的发育相关。

综上所述，妊娠过程涉及一系列复杂的分子事件，ApoA Ⅳ在早孕期小鼠妊娠过程中究竟起着什么样的作用？通过本研究组的实验观察，本研究推测，早孕期小鼠 ApoA Ⅳ的表达不仅与胚胎发育相关，还可能通过调节子宫内膜中毛细血管的生成和密度来影响蜕膜化的进程。由于本研究并未找到 ApoA Ⅳ合适的抑制剂，因而并未开展后续的实验研究。本研究增加了对 ApoA Ⅳ在早孕期小鼠妊娠过程中表达规律和所起作用的初步认识，提示非子宫内膜合成的基因同样参与了胚胎着床过程。然而本研究也仅是一个初步探索，ApoA Ⅳ在妊娠过程中的具体作用以及作用机制都还有待于更深一步的研究。

参 考 文 献

[1] Xiong J, Zeng P, Ye D. Lipoxins:a novel regulator in embryo implantation[J]. Scientific World Journal, 2011, 11(11): 235-241.

[2] Guo B, Tian Z, Han B, et al. Expression and hormonal regulation of Hoxa10 in canine uterus during the peri-implantation period[J]. Reproduction in Domestic Animals, 2009, 45(6): e255-e259.

[3] Dey SK. Focus on implantation[J]. Reproduction, 2005, 128(6): 655-656.

[4] Yoshioka S, Fujiwara H, Nakayama T, et al. Intrauterine administration of autologous peripheral blood mononuclear cells promotes implantation rates in patients with repeated failure of IVF-embryo transfer [J]. Human Reproduction, 2006, 21(12): 3290-3294.

[5] Achache H, Revel A. Endometrial receptivity markers, the journey to successful embryo implantation[J]. Human Reproduction Update, 2006, 12(6): 731-746.

[6] Herrera E. Lipid metabolism in pregnancy and its consequences in the fetus and newborn[J]. Endocrine, 2002, 19(1): 43-55..

[7] Napoli C, Witztum JL, Calara F, et al. Maternal hypercholesterolemia enhances atherogenesis in normocholesterolemic rabbits, which is inhibited by antioxidant or lipid-lowering intervention during pregnancy: an experimental model of atherogenic mechanisms in human fetuses[J]. Circulation Research, 2000, 87(10): 946-952.

[8] Palinski W, D'Armiento FP, Witztum JL, et al. Maternal hypercholesterolemia and treatment during pregnancy influence the long-term progression of atherosclerosis in offspring of rabbits[J]. Circulation Research, 2001, 89(11): 991-996.

[9] Alvarez JJ, Montelongo A, Iglesias A, et al. Longitudinal study on lipoprotein profile, high density lipoprotein subclass, and postheparin lipases during gestation in women[J]. Journal of Lipid Research, 1996, 37(2): 299-308.

[10] Brosens JJ, Hodgetts A, Ferozezaidi F, et al. Proteomic analysis of endometrium from fertile and infertile patients suggests a role for apolipoprotein A-I in embryo implantation failure and endometriosis[J]. Molecular Human Reproduction, 2009, 16(4): 273-285.

[11] Swaney JB, Reese H, Eder HA. Polypeptide composition of rat high density lipoprotein: characterization by SDS-gel electrophoresis[J]. Biochemical & Biophysical Research Communications, 1974, 59(2): 513-519.

[12] Green PH, Glickman RM, Saudek CD, et al. Human intestinal lipoproteins. Studies in chyluric subjects[J]. Journal of Clinical Investigation, 1979, 64(1): 233–242.

[13] Ezeh B, Haiman M, Alber HF, et al. Plasma distribution of apoA-Ⅳ in patients with coronary artery disease and healthy controls[J]. Journal of Lipid Research, 2003, 44(8): 1523–1529.

[14] Kamboh MI, Friedlaender JS, Ahn YI, et al. A common deletion polymorphism in the apolipoprotein A4 gene and its significance in lipid metabolism[J]. Arteriosclerosis & Thrombosis A Journal of Vascular Biology, 1994, 14(5): 656–662.

[15] Guyard-Dangremont V, Lagrost L, Gambert P. Comparative effects of purified apolipoproteins A-Ⅰ, A-Ⅱ, and A-Ⅳ on cholesteryl ester transfer protein activity[J]. Journal of Lipid Research, 1994, 35(6): 982–992.

[16] Herrera E, Ortegasenovilla H. Lipid metabolism during pregnancy and its implications for fetal growth[J]. Current Pharmaceutical Biotechnology, 2014, 15(1): 24–31.

[17] Miettinen H, Rayburn H, Krieger M. Abnormal lipoprotein metabolism and reversible female infertility in HDL receptor(SR-BI)-deficient mice[J]. Journal of Clinical Investigation, 2001, 108(11): 1717–1722.

[18] Aiello RJ, Brees D, Francone OL. ABCA1-deficient mice: insights into the role of monocyte lipid efflux in HDL formation and inflammation[J]. Arteriosclerosis Thrombosis & Vascular Biology, 2003, 23(6): 972–980.

[19] Steffensen KR, Gustafsson JA. Putative metabolic effects of the liver X receptor(LXR)[J]. Diabetes, 2004, 53(1): 36–42.

[20] Yesilaltay A, Morales MG, Amigo L, et al. Effects of hepatic expression of the high-density lipoprotein receptor SR-BI on lipoprotein metabolism and female fertility[J]. Endocrinology, 2006, 147(4): 1577–1588.

[21] Fujimoto VY, Kane JP, Ishida BY, et al. High-density lipoprotein metabolism and the human embryo[J]. Human Reproduction Update, 2010, 16(1): 20–38.

[22] Yesilaltay A, Dokshin GA, Busso D, et al. Excess cholesterol induces mouse egg activation and may cause female infertility[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2014, 111(46): 4972–4980.

[23] Miettinen H, Rayburn H, Krieger M. Abnormal lipoprotein metabolism and reversible female infertility in HDL receptor(SR-BI)-deficient mice[J]. Journal of Clinical Investigation, 2001, 108(11): 1717–1722.

[24] Stan S, Delvin E, Lambert M, et al. Apo A-Ⅳ: an update on regulation and physiologic functions[J]. Biochimica Et Biophysica Acta, 2003, 1631(2): 177–187.

[25] Moreno PR, Sanz J, Fuster V. Promoting mechanisms of vascular health circulating progenitor cells, angiogenesis, and reverse cholesterol transport[J]. Journal of the American College of Cardiology, 2009, 53(25): 2315–2323.

[26] 韩丙辰，杨增明. 子宫内膜蜕膜化的特征及其调节因素[J]. 中国细胞生物学学报，2007，29(5)：666–670.

[27] Bell SC. Assessment of endometrial differentiation and function [J]. British Medical Bulletin, 1990, 46(3): 720–732.

[28] Minah K, Ju PH, Won SJ, et al. VEGF--a regulated by progesterone governs uterine angiogenesis and vascular remodelling during pregnancy[J]. Embo Molecular Medicine, 2013, 5(9): 1415–1430.

[29] Skaznikwikiel ME, Kanekotarui T, Kashiwagi A, et al. Sphingosine-1-phosphate receptor expression and signaling correlate with uterine prostaglandin-endoperoxide synthase 2 expression and angiogenesis during early pregnancy[J]. Biology of Reproduction, 2006, 74(3): 569–576.

[30] Sun X, Dey SK. Endocannabinoid signaling in female reproduction[J]. Acs Chemical Neuroscience, 2012, 3(5): 349–355.

[31] 黄 媛. 蜕膜化子宫内膜间质细胞细胞骨架重塑研究进展[J]. 国际生殖健康/计划生育杂志，2011，30(3)：234–236.

[32] Sumi M, Sata M, Miura S, et al. Reconstituted high-density lipoprotein stimulates differentiation of endothelial progenitor cells and enhances ischemia-induced angiogenesis[J]. Arteriosclerosis Thrombosis & Vascular Biology, 2007, 27(4): 813–818.

[33] Prosser H, Ng M, Bursill C. Multifunctional regulation of angiogenesis by high-density lipoproteins[J]. Cardiovascular Research, 2014, 101(1): 145–154.

[34] González-Pecchi V, Valdés S, Pons V, et al. Apolipoprotein A-I enhances proliferation of human endothelial progenitor cells and promotes angiogenesis through the cell surface ATP synthase[J]. Microvascular Research, 2015, 98: 9–15.

[35] Cheng CC, Chang SJ, Chueh YN, et al. Distinct angiogenesis roles and surface markers of early and late endothelial progenitor cells revealed by functional group analyses[J]. Bmc Genomics, 2013, 14(1): 1–10.

[36] Ingham PW, Mcmahon AP. Hedgehog signaling in animal development: paradigms and principles[J]. Genes & Development, 2001, 15(23): 3059–3087.

[37] Wagner M, Siddiqui MA. Signal transduction in early heart development (I): cardiogenic induction and heart tube formation[J]. Experimental Biology & Medicine, 2007, 232(7): 852–865.

[38] Smith DW, Lemli L, Opitz JM. A newly recognized syndromeof multiple congenital anomalies[J]. Journal of Pediatrics, 2014, 64(2): 210–217.

[39] Cooper MK, Porter JA, Young KE, et al. Teratogen-mediated inhibition of target tissue response to Shh signaling[J]. Science, 1998, 280(5369): 1603–1607.

[40] Lin DS, Pitkin RM, Connor WE. Placental transfer of cholesterol into the human fetus[J]. American Journal of Obstetrics & Gynecology, 1977, 128(7): 735–739.

（责任编辑：张辉洁）