

溶菌酶 1 在小鼠超数排卵前后孵化及休眠囊胚中 差异表达的研究

卢文瑾¹, 郭勇¹, 胡新宇¹, 张寅屏⁴, 黄启震¹, 刘迪², 王力红³, 田凤¹, 盛熙晖¹,
齐晓龙¹, 邢凯¹, 倪和民¹, 王相国^{1*}

(1. 北京农学院动物科学技术学院, 北京 102206; 2. 厦门大学医学院生殖调控与生殖健康研究福建省高校重点实验室, 厦门 361102; 3. 中山大学附属口腔医院·口腔医学研究所, 广州 510030; 4. 北京市昌平区畜牧水产推广站, 北京 102200)

【摘要】 目的 研究溶菌酶 1 (lysozyme 1, LYZ1) 基因在超数排卵前后小鼠孵化囊胚和休眠胚胎中的分布以及表达, 探究动物胚胎着床过程中新的调节机制。方法 从妊娠 5 d ICR 小鼠体内获取的正常孵化囊胚和超排囊胚, 利用小鼠延迟着床模型于妊娠第 8 天获取休眠胚胎和超排休眠胚胎。利用免疫荧光和 Western Blot 方法检测 LYZ1 蛋白在四组胚胎中的分布和差异表达变化。结果 LYZ1 在超数排卵前、后小鼠孵化囊胚和休眠胚胎中均有表达, 且主要集中在内细胞团中, 滋养层细胞和胞质中少见分布; 与未进行超排的小鼠相比, LYZ1 蛋白在超排后小鼠胚胎中表达量显著上调, 与未营造休眠模型的小鼠相比, LYZ1 蛋白在休眠模型小鼠胚胎中的表达量显著上调。结论 LYZ1 蛋白在囊胚内细胞团中表达, 可能参与调节胚胎内细胞团的发育; LYZ1 蛋白在超排-休眠胚胎中的高表达, 说明 LYZ1 蛋白在休眠和超数排卵的双重影响下, 会因为抵御不利环境而上调。

【关键词】 小鼠; 溶菌酶 1; 孵化囊胚; 休眠胚胎; 超数排卵

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2018) 05-0580-07

Doi: 10.3969/j.issn.1005-4847.2018.05.007

Differential LYZ1 protein expression in hatched murine blastocysts and dormant embryos before and after superovulation

LU Wenjin¹, GUO Yong¹, HU Xinyu¹, ZHANG Yiping⁴, HUANG Qizhen¹, LIU Di², WANG Lihong³,
TIAN Feng¹, SHENG Xihui¹, QI Xiaolong¹, XING Kai¹, NI Hemin¹, WANG Xiangguo^{1*}

Corresponding author: WANG Xiangguo, E-mail: xiangguo731@163.com

【Abstract】 Objective To explore the regulation of mammalian embryo implantation, we investigated the expression of Lysozyme 1 (LYZ1) in normal hatching murine blastocysts and dormant embryos before and after superovulation. **Methods** Normal hatched blastocysts were obtained from day 5 pregnant mice, while dormant embryos were collected from delayed implantation models on day 8. LYZ1 protein expression in the embryos was detected by immunofluorescence and western blot. **Results** LYZ1 protein was expressed in both hatching blastocysts and dormant embryos before and after superovulation, where it was mainly concentrated in the inner cell mass. LYZ1 was rarely distributed in trophoblasts or in their cytoplasm. Compared with untreated mice, LYZ1 protein expression in superovulation embryos was significantly upregulated; moreover, LYZ1 protein expression in the dormancy model was significantly upregulated. **Conclusions** LYZ1 protein was expressed in the inner cell mass of embryos, where it may be involved in

[基金项目] 2016 年度科技创新服务能力建设 - 科技计划重点项目 (KZ201610020018); 2018 科技创新服务能力建设 (KZ201610020018)。

Fund by 2016 Technology Innovation Service Capacity Building-Key Projects of Science and Technology Plan (KZ201610020018); 2018 Scientific and Technological Innovation Service Capacity Building (KZ201610020018)。

[作者简介] 卢文瑾 (1993 年—) 女, 硕士研究生, 研究方向: 产科与胚胎工程。Email: 569036046@qq.com

[通信作者] 王相国 (1986 年—) 男, 博士, 讲师, 研究方向: 动物生殖机理调控与产科疾病。Email: xiangguo731@163.com

regulating early development. The high LYZ1 protein expression in dormant embryos after superovulation indicated that LYZ1 protein is upregulated in embryos experiencing adverse environmental conditions, such as the dual effects of dormancy and superovulation.

【Keywords】 mouse; LYZ1; hatched blastocyst; dormant embryo; superovulation

Conflict of interest statement: We declare that we have no conflict of interest statement.

哺乳动物胚胎的着床以及发育过程一直是生殖领域研究的热点,胚胎在发育过程中受多种激素、生长因子以及各种酶的影响。早在 20 世纪 60 年代,科学家就发现,哺乳动物胚胎发育到囊胚阶段存在不立即着床的现象,这种现象使动物的交配和妊娠的时间得以延长,从而最大限度地保证后代在适宜的环境里出生并成长^[1]。胚胎发育到胚泡阶段时暂时进入休眠状态而并不立即着床的现象称为延迟着床,处于延迟着床状态的胚胎又称休眠囊胚,此时胚胎在子宫中代谢速度变缓,停留时间延长。大鼠、小鼠、雪貂以及有袋动物均存在延迟着床现象。此外,无脊椎动物、植物、昆虫也存在延迟着床现象^[2]。研究者在蝙蝠中发现,虽然群体中母蝙蝠交配时间不尽相同,但群体中大部分雌性蝙蝠能保证同时分娩,让幼崽在同一时间出生,这种同步化现象能扩大幼崽种群,保证种群的存活率,大大减少幼崽的死亡率,对于种群来说是进化优势的体现^[3]。

溶菌酶 1 (lysozyme 1 LYZ1) 是存在于哺乳动物体液中的一种小分子碱性酶,广泛存在于哺乳动物的血液以及肝中,眼泪、尿液、唾液和乳汁中也有分布;在黏膜表面,其浓度可达到 1 mg/mL;在巨噬细胞、嗜中性粒细胞和树突状细胞等专业吞噬细胞中也有分布^[4]。溶菌酶家族中所有成员都具有水解细菌细胞壁肽聚糖的能力,并且总体结构相似。LYZ1 是体液免疫中最为关键的第一道防御系统中的重要组成成分,对革兰阳性菌以及部分革兰阴性菌都有杀灭作用。细菌细胞壁的主要成分肽聚糖,是 N-乙酰葡萄糖胺和 N-乙酰胞壁酸交织形成的多糖支架,他们之间依靠 β -1,4-糖苷键相互交联,N-乙酰胞壁酸分子上接四肽侧链,肽链再相互连结,形成的网状结构成为支撑细菌细胞的基础。LYZ1 专一作用于多糖支架之间的 β -1,4-糖苷键,细菌细胞壁将失去支撑作用,从而使细菌溶解,人及哺乳动物不含细胞壁,故溶菌酶对人体无毒害作用^[5]。目前溶菌酶已被运用于多种研究领域,在食品行业可用做防腐剂,或去除酒中的沉淀^[6];在医疗行业常与其他抗菌药物一起使用治疗细菌感染;由于溶菌

酶只对细胞壁有破坏作用,在生物工程行业上也常用于原生质体的制备。但在生殖方面的功能少见报道,研究证实,处于延迟着床状态的囊胚不含有透明带,比正常孵化囊胚具有更强的抗逆性。本实验室前期研究结果证明:经程序化冷冻的小鼠休眠囊胚解冻后存活率显著高于正常孵化囊胚,显示经历冷冻过程的休眠囊胚具有更好的抗冻潜力,而实验室前期基因表达谱^[7]结果发现:程序化冷冻处理前、后休眠胚胎中 *Apol8*^[8] 基因在表达水平显著差异, *RhoA*^[9]、*Hba- α* ^[10]、*C3*^[11] 等基因与正常孵化囊胚相比也有差异。与此类似,前人在冷冻、超排以及休眠三个因素对小鼠胚胎差异表达基因进行分析,发现 LYZ1 基因在超排前后和休眠胚胎表达有明显差异。

因此,研究 LYZ1 及其家族在生殖领域的作用潜力能进一步为阐明胚胎发育过程提供新的依据。本试验通过研究超排和休眠因素对 LYZ1 蛋白在小鼠休眠囊胚与正常孵化囊胚中分布的影响,分析休眠囊胚具有更强发育潜力的原因,挖掘 LYZ1 基因在小鼠囊胚阶段的潜在作用,探索哺乳动物胚胎着床过程中新的调控机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

SPF 级的性成熟 ICR 品系雌性小鼠 50 只,平均体重 25 ~ 30 g,8 ~ 11 周龄;SPF 级的性成熟 ICR 品系雄性小鼠 25 只,平均体重 35 ~ 40 g,9 ~ 12 周龄,均来源于北京维通利华动物科技有限公司【SCXK(京)2014-0008】,试验操作在北京农学院屏障动物实验室内进行【SYXK(京)2015-0004】。

1.1.2 实验试剂

芝麻油、孕酮购自 Sigma,美国;兔抗 LYZ1 单克隆抗体,购自 Abcam,货号: ab108508;抗兔 LYZ1 抗体,购自 Cell Signaling,货号: 7074P2;PMSG、hCG 购自宁波三生有限公司;TBST (pH8.0, 10 \times) 购自康为世纪,货号: CW0043S;PVDF 膜,购自索莱宝。

1.1.3 实验仪器

光学显微镜, 江南仪器厂; 电子天平, Sartorius, BS124S, 美国; 显微镜 BX51, Olympus, 日本; 盖玻片、载玻片, 江苏世泰实验器材有限公司; 低温高速离心机, Beckman Allegra Centrifuge 64R, 美国; 掌上离心机, Bratt, 美国; 超净工作台, 上海智城分析仪器 ZHJH-1112B; 激光共聚焦显微镜, Olympus, 日本; 脱色摇床, Qilinbeier TS-1000; 凝胶成像仪, BIO-RAD, 美国。

1.2 实验方法

实验分为 4 组: A 为不超排-孵化; B 为超排-孵化; C 为不超排-休眠; D 为超排-休眠。

1.2.1 超排处理

选择阴门潮红、处于发情期的雌鼠, 于晚间 18:00 腹腔注射 PMSG 0.1 mL (10 IU/只), 间隔 46~48 h 后, 腹腔注射 hCG 0.1 mL (10 IU/只), 注射后立即合笼(公母比为 1:1), 次日上午 08:00 点之前检查阴道栓, 检出阴道栓雌鼠用于获取超排孵化囊胚和超排休眠胚胎, 将此天记为胎龄第 1 天(day 1)。

1.2.2 孵化囊胚的获取

于见栓第 5 天(day 5) 上午 08:00 颈椎脱臼法处死见栓雌鼠, 摘取母鼠双侧子宫, 除去系膜, 使用 PBS 工作液多次冲洗双侧子宫角收集囊胚, 经 PBS 洗涤 3 次, 储存在 -80°C 保存备用。见栓第 4 天(day 4) 上午 08:00 麻醉见栓雌鼠, 将雌鼠双侧卵巢从背部摘除, 保留输卵管并缝合, 此后, 每天早晨 08:00 于小鼠颈部皮下注射 0.1 mL 孕酮(0.2 mg/mL), 连用 3 d, 在次日上午(day 8) 08:00 冲洗双侧子宫收集休眠胚胎。回收的胚胎经 PBS 洗涤 3 次, 储存在 -80°C 冰箱备用。

1.2.3 休眠胚胎的获取

见栓第 4 天(day 4) 上午 08:00 麻醉见栓雌鼠, 摘除雌鼠双侧卵巢, 小心操作以保留输卵管, 随后连续 3 d 早晨 08:00 在小鼠颈部皮下浓度为 0.1 mL 孕酮(0.2 mg/mL), 次日上午(day 8) 08:00 用 PBS 工作液冲洗双侧子宫收集休眠胚胎。回收的胚胎经 PBS 洗涤 3 次, 储存在 -80°C 冰箱备用。

1.2.4 共聚焦显微镜术检测 LYZ1 蛋白在各组胚胎上的分布

①固定: 胚胎于 PBS 中充分洗涤, 此后, 室温条件下置于 4% 多聚甲醛中固定 30 min; ②清洗: 固定后的胚胎置于 0.1% BSA-PBS 液滴中室温清洗 6 次, 每次 8 min; ③通透: 清洗后的胚胎室温条件下置于

2.5% Tween 20-PBS 中通透 5 min; ④清洗: 用 0.1% BSA-PBS 洗涤 6 次, 每次 8 min; ⑤LYZ1 抗体孵育: 4°C 条件下 胚胎置于 LYZ1 抗体(1:2000) 中过夜孵育; ⑥清洗: 先后采用 0.2% Triton X-100, 0.1% BSA-PBS 各清洗 6 次, 每次 8 min; ⑦二抗孵育: 37°C 条件下 胚胎在置于稀释好的抗 LYZ1 抗体荧光二抗(1:1500) 中避光孵育 1.5 h; ⑧清洗: 先后采用 0.2% Triton X-100, 0.1% BSA-PBS 各清洗 6 次, 每次 8 min; ⑨染核: 将胚胎置于 PI 染核液中染核 5 min, 再将胚胎置于 0.1% BSA-PBS 液滴中洗去染核液, 重复 3 次, 每次 10 min; ⑩压片: 洗净后将胚胎置于在载玻片中央, 用少量凡士林支撑起盖玻片四角, 在轻轻盖上盖玻片, 缓慢操作, 以免将胚胎挤压变形; ⑪封片: 盖玻片四周用透明快干指甲油封住, 在暗室条件下, 尽快放入 Confocal 显微镜中成像。

1.2.5 LYZ1 蛋白在各组胚胎间差异表达变化

①从 -80°C 冰箱中将冻存有胚胎的离心管取出, 置于冰上, 每 100 枚胚胎中加入 10 μL 裂解液, 短时涡旋震荡后, 冰上孵育 30 min, 充分使其裂解; ②12 000 r/min 4°C 离心 5 min, 获取上清液, 等体积加入 $2 \times$ protein loading buffer; ③沸水浴 5 min, 待冷却备用; ④配制浓度为 12% SDS-PAGE 分离胶, 15% SDS-PAGE 浓缩胶, 室温静止, 待凝胶凝聚后上样, 电泳 1.5 h, 电泳结束后转移蛋白至 PVDF 膜上; ⑤室温条件下, 将 PVDF 膜完全浸入封闭液中, 摇床封闭 2 h; ⑥ 4°C 条件下, 将 PVDF 膜置于 LYZ1 抗体(1:1500) 中过夜孵育; ⑦用 $1 \times$ TBST 洗涤未结合到膜上的抗体, 3 次, 10 min/次; ⑧ 37°C 条件下, 将 PVDF 膜转移至抗 LYZ1 抗体的荧光二抗(1:1000) 中摇床孵育 1.5 h; ⑨孵育后用 $1 \times$ TBST 洗去未结合到 PVDF 膜上的荧光二抗; ⑩ECL 化学显色后, 凝胶成像仪成像。

1.2.6 图像分析

用 Image J 软件对凝胶成像系统所得图片进行灰度分析。

1.3 统计学方法

实验数据采用 SPSS 20 软件进行独立样本 T 检验分析方法, 以平均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$) 表示, 以 $\alpha = 0.05$ 为检验水准, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

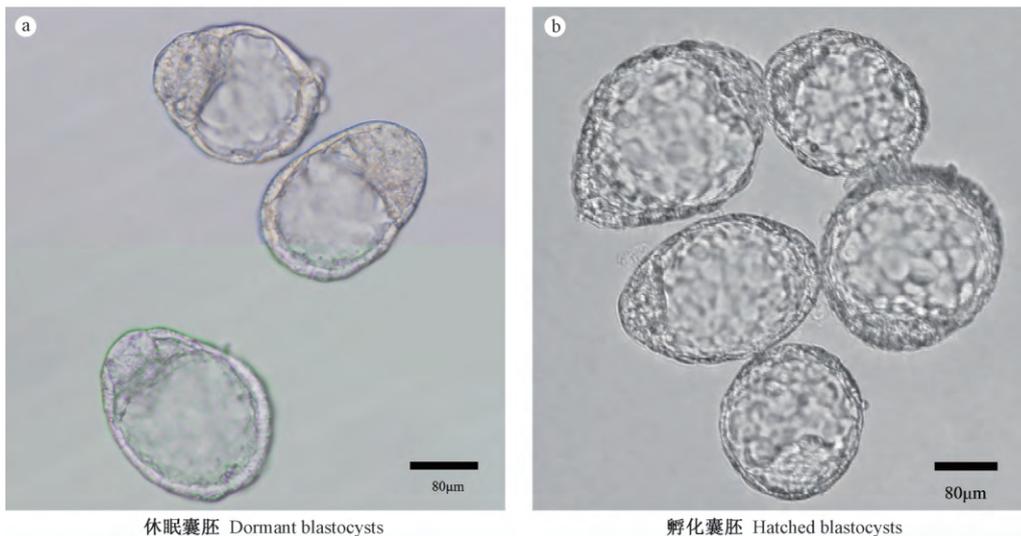
2 结果

2.1 孵化囊胚和休眠囊胚形态结构观察

孵化囊胚与休眠囊胚均已完全孵化, 无透明带

(图 1a 和 1b)。从图 1 中可以看出,两种胚胎内细胞团和滋养外胚层细胞结构完整,边缘清晰,可用

于后续实验。



休眠囊胚 Dormant blastocysts

孵化囊胚 Hatched blastocysts

图 1 小鼠休眠囊胚和孵化囊胚(bar = 80 μm)

Figure 1 Dormant and hatched mouse blastocysts (scale bar: 80 μm)

2.2 LYZ1 蛋白在超数排卵前后孵化囊胚和休眠胚胎中的分布情况

LYZ1 蛋白在超排前后的小鼠孵化囊胚和休眠胚胎中的滋养层细胞和内细胞团中均有分布,但进行超数排卵过程后的休眠胚胎中的 LYZ1 蛋白明显集中于内细胞团中。见图 2。

2.3 LYZ1 蛋白在超数排卵前后孵化囊胚和休眠胚胎中的差异表达分析

各组胚胎蛋白中看家基因 β -actin 表达稳定,可用于后续实验。用 Image J 软件对凝胶成像系统图片进行灰度值分析(见图 3a)。SPSS 20.0 对数据进行单因素方差分析,结果如图 3b 所示:超数排卵前后的小鼠正常孵化囊胚和休眠胚胎均能检测到 LYZ1 蛋白的表达;且超排前后孵化囊胚(A 组、B 组)中 LYZ1 蛋白表达差异无显著性($P > 0.05$);而超排-休眠囊胚(D 组)LYZ1 蛋白表达差异极显著高于超排-孵化组(B 组)和不超排-休眠的囊胚(C 组);同时休眠后的不超排囊胚(C 组)与休眠前不超排孵化囊胚(A 组)相比,差异无显著性($P > 0.05$)。

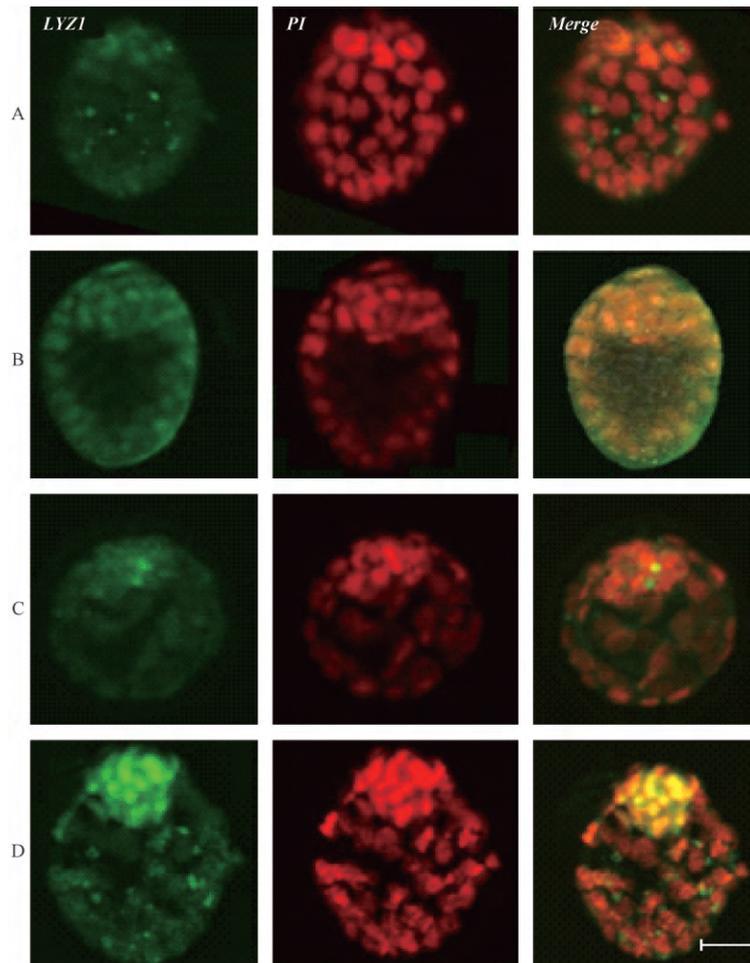
3 讨论

广泛分布于体液中的溶菌酶作为免疫反应中的重要成员参与了体内多种免疫反应,其水解细菌细胞壁的出色能力赋予了溶菌酶在非特异性免疫中的重要地位。它可改善和增强巨噬细胞吞噬消

化功能,识别细菌脂多糖,灭杀细菌,增强机体抵抗力,由于水解作用的专一性,细菌很少对溶菌酶产生抗性。有报道显示,经放射线照射后的家兔血清中溶菌酶含量呈现下降趋势^[12],因此血清中溶菌酶的含量或可作为衡量机体放射损伤的一项指标来反映机体的损伤程度^[13]。

与正常孵化囊胚相比,休眠囊胚细胞的代谢率低,与周围环境的能量交换过程较少。滞育期间,胚胎细胞将进入一种维持自身较低的能量及代谢的状态。正常孵化囊胚经历短暂“窗口期”就会着床,与母体子宫建立紧密联系。而胚胎滞育期间,子宫不具有容受性,经过微量雌激素刺激,胚胎才会开始着床,因此相比于能量代谢旺盛、与母体子宫发生信息与物质联结的正常孵化囊胚相比,休眠囊胚能更好的抵抗外界各种刺激。这与本研究发现的 LYZ1 蛋白在超排后休眠囊胚中的表达显著高于孵化囊胚基本一致。

蛋白表达定位结果显示,LYZ1 蛋白在四组胚胎的内细胞团中均有表达,而休眠囊胚中表达量明显高于孵化囊胚,说明 LYZ1 蛋白在早期胚胎发育过程中具有重要作用,并且主要在内细胞团内发挥作用以维持细胞的稳定状态。蛋白相对表达水平结果研究表明,超排后休眠囊胚中 LYZ1 蛋白的表达极显著上调,说明休眠囊胚与正常孵化囊胚在抵御不利环境下的机制有很大不同。LYZ1 为保护胚胎免受外界影响而在此时上调,高水平 LYZ1 蛋白可



注: A. 不超排-孵化囊胚; B. 超排-孵化囊胚; C. 不超排-休眠囊胚; D. 超排-休眠囊胚。绿色荧光表示 LYZ1 蛋白分布区域; 红色荧光表示细胞核。

图 2 LYZ1 蛋白在各组胚胎中分布情况

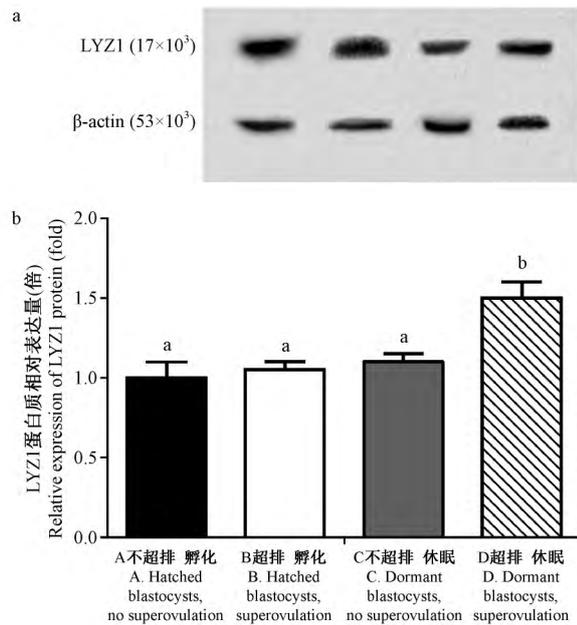
Note: A) Hatched blastocysts, no superovulation; B) hatched blastocysts, superovulation; C) dormant blastocysts, no superovulation; D) dormant blastocysts, superovulation. Green fluorescence represents LYZ1 protein, and red fluorescence represents nuclei.

Figure 2 Localization of LYZ1 protein in the embryos of each group

能有利于胚胎在相对不利条件下存活,维持细胞内稳态。超排-孵化组的 LYZ1 蛋白在滋养层细胞中有分布,其余三组的 LYZ1 蛋白主要集中在内细胞团中表达。而内细胞团比滋养层细胞具有更少的线粒体,所以其能量代谢水平比滋养层细胞更低,所以在内细胞团细胞中自噬活动较少,细胞能量代谢处于静止状态^[14]。Lee 等^[15]发现,小鼠滋养层细胞中的自噬比内细胞团中的高。LYZ1 在胚胎内细胞团和滋养层细胞中的广泛分布,是胚胎在面对不利环境时提高存活能力的表现,这也是休眠囊胚抗逆性强于正常孵化囊胚的另一种体现。

胚胎休眠期间,有许多基因和蛋白在休眠时期有差异表达^[16]。然而,尽管休眠小鼠囊胚中的 DNA 合成和有丝分裂停止,代谢率下降,但仍满足

了胚胎存活的最低营养需要^[17]。造成此差异的原因是在滞育期间小鼠胚胎提供代谢需求的机制与孵化囊胚有很大不同^[18]。有证据表明,延长的休眠周期与休眠胚胎的数量呈负相关^[14],雌激素停药后激活自噬,诱发延迟着床,而自噬在休眠囊胚延长存活的过程中持续存在。Weitlauf^[18]发现延迟着床的胚胎再激活时,虽然细胞整体自噬总体水平并无下降,但内细胞团中的自噬体数量有下降的趋势。延迟着床期间,细胞能通过自噬作用溶解少量细胞,被消化成碎片的细胞可以作为胚胎细胞中重要的营养物质被溶酶体-高尔基体消化,重新循环合成滞育期间需要的蛋白质。溶菌酶也是一种溶酶体酶,自噬发生时,自噬小泡与溶酶体将融合形成自噬吞噬体,从而影响溶菌酶的分泌过程。Starling^[14]



注: a. Western Blot 检测 LYZ1 蛋白在各组胚胎间的相对表达量。b. Western Blot 检测 LYZ1 蛋白相对表达量分析图: A. 不超排-孵化囊胚; B. 超排-孵化囊胚; C. 不超排-休眠囊胚; D. 不超排-休眠囊胚。上标相同字母表示差异无显著性 ($P > 0.05$); 不同字母表示差异有极显著性 ($P < 0.01$)。

图 3 LYZ1 蛋白在各组胚胎中差异表达分析

Note: a. Western blot analysis of relative LYZ1 protein expression in the embryos; b. western blot analysis of relative LYZ1 protein expression in: A. hatched blastocysts, no superovulation; B. hatched blastocysts, superovulation; C. dormant blastocysts, no superovulation; and D. dormant blastocysts, superovulation. The same letter indicates no significance ($P > 0.05$), while different letters indicate significance ($P < 0.01$).

Figure 3 Differential expression analysis of LYZ1 protein in the embryos of each group

认为自噬途径分泌溶菌酶是由内质网应激引发的。很可能当体内稳态受到干扰,蛋白质运输、分拣系统出现压力或应激时,溶菌酶将进入自噬运转系统,被双层囊泡结构包裹着运输至相应部位参与调节。

Sae-Kwang 等^[19]在对小鼠构建败血症模型后,发现术后第 5 天,患败血症小鼠全部死亡,但对患病小鼠体内注射溶菌酶 5 d 后能将小鼠存活率提高到 20%~30%。这是因为在机体发生炎症反应时,血管内皮蛋白 C 受体 (EPCR) 会脱落成为可溶性的血管内皮蛋白 C 受体 (s EPCR),而 s EPCR 是血管受损的标志之一,脱落的 EPCR 刺激体内免疫系统,引起炎症反应,而血管上皮中的溶菌酶能抑制血管内皮蛋白 C 受体的脱落,表明溶菌酶在炎症反应发生时能维持血管完整性。2012 年,Kaizu 等^[20]用 RNA

干扰技术造成溶菌酶在对虾体内缺失,以此分析溶菌酶在对虾体内的功能。结果显示,缺失溶菌酶的对虾在 5 d 内全部死亡,死亡原因是对虾淋巴中的血细胞数量大量减少和体内细菌数量显著增加。Lapcharoen 对感染疟原虫的按蚊进行了溶菌酶基因敲除实验^[21],结果显示敲除该基因后,疟原虫卵囊数量显著减少。原因是当疟原虫入侵按蚊体内,激活了按蚊的先天性免疫防御反应,按蚊肠上皮会分泌出一些蛋白酶和表面蛋白,其中就含有溶菌酶,这些蛋白经过一系列复杂的级联反应,最终生成黑色素和毒性物质,此过程称为黑化包被反应,按蚊通过此机制抵御和消灭入侵体内的疟原虫^[22]。这些都显示出溶菌酶在胚胎发育过程中是至关重要的,缺失将会导致生物致死或对寄生虫卵囊发育产生消极影响,在遭遇不利条件时又能上调使机体维持稳态。

在小鼠孵化囊胚中,LYZ1 蛋白少量分布在整个透明带滋养层细胞中,在孵化和休眠囊胚中,LYZ1 集中分主要分布在胚胎细胞的内细胞团中。发育至囊胚阶段的胚胎,在经历短暂的“窗口期”后进行胚胎着床,在母-胎进行营养与物质交换的胎盘中,以及乳汁中均含有溶菌酶,预示从孵化囊胚时期开始,LYZ1 已在胚胎发育过程中发挥一定的作用。囊胚的休眠过程延长了囊胚在子宫隐窝中停留的时间,子宫外环境和胚胎自身主动调节代谢速度变缓,来保证胚胎存活,胚胎代谢减缓到能维持其生存的最低水平,在这种情况下,母体子宫的免疫系统调动一系列激素与酶参与休眠过程,以此保证胚胎的正常代谢和存活。

目前 LYZ1 的功能研究主要集中在免疫系统和非特异性免疫中,本研究发现其在胚胎发育中同样有着至关重要的作用。由此可见,LYZ1 基因对于囊胚在超数排卵和休眠双重因素下有着不可忽视的作用。下一步研究将继续检测 LYZ1 在小鼠不同妊娠阶段的表达以及分布,将有助于进一步了解 LYZ1 在胚胎不同发育阶段的分布和功能,能更完整地诠释该基因在生殖方面的功能。

参 考 文 献 (References)

- [1] Yoshinaga K, Adams CE. Delayed implantation in the spayed, progesterone treated adult mouse [J]. J Reprod Fertil, 1966, 12 (3): 593.
- [2] Lopes FL, Desmarais JA, Murphy BD. Embryonic diapause and its regulation [J]. Reproduction, 2004, 128 (6): 669.
- [3] Bernard RTF. Reproductive synchrony and annual variation in

- foetal growth rate in the long fingered bat (*Miniopterus schreibersii*) [J]. *J Zool* ,1994 232(3):485-490.
- [4] Ragland SA ,Criss AK. From bacterial killing to immune modulation: Recent insights into the functions of lysozyme [J]. *Plos Pathogens* 2017 ,13(9):e1006512.
- [5] 张士瑾 ,许娜. 动物型溶菌酶研究新进展 [J]. *中国海洋大学学报(自然科学版)* 2014 44(6):46-51.
Zhang SC ,Xu N. New progress in research on animal lysozyme [J]. *J Ocean Univ China (Nat Sci Edi)* 2014 44(6):46-51.
- [6] 孙国庆 ,哈福 ,苗永旺 等. 动物溶菌酶基因的研究进展 [J]. *中国牛业科学* 2012 38(3):51-54 59.
Sun GQ ,Ha H ,Miao YW ,et al. Advances in the study of animal lysozyme genes [J]. *China Cattle Sci* ,2012 ,38(3):51-54 ,59.
- [7] 张劲侯 ,刘云海 ,倪和民 等. 程序化冷冻的小鼠休眠胚胎的基因表达谱差异分析 [J]. *中国实验动物学报* ,2012 ,20(5):15-19.
Zhang SY ,Liu YH ,Ni HM ,et al. Differential analysis of gene expression profiles of dormant embryos in programmed frozen mice [J]. *Acta Lab Anim Sci Sin* 2012 20(5):15-19.
- [8] 王力红 ,郭勇 ,翟椿东 等. 程序化冷冻前后小鼠休眠胚胎中 Apol8 蛋白分布和表达 [J]. *中国农学通报* ,2017 ,33(21):149-153.
Wang LH ,Guo Y ,Zhai CD et al. Distribution and expression of Apol 8 protein in dormant embryos of mice before and after programmed freezing [J]. *Chin Agricul Sci Bull* 2017 33(21):149-153.
- [9] Gu M ,Ni H ,Sheng X ,et al. RhoA phosphorylation mediated by Rho/RhoA-associated kinase pathway improves the anti-freezing potentiality of murine hatched and diapaused blastocysts [J]. *Sci Rep* 2017 7(1):6705.
- [10] 刘迪 ,倪和民 ,顾美超 等. 程序化冷冻前后小鼠正常孵化囊胚和休眠胚胎中 C3 基因表达的研究 [J]. *中国畜牧兽医* ,2017 44(2):514-520.
Liu D ,Ni HM ,Gu MC ,et al. Study on the expression of C3 gene in normal incubated blastocysts and dormant embryos of mice before and after programmed freezing [J]. *China Anim Husbandry Vet Med* 2017 44(2):514-520.
- [11] 刘迪 ,倪和民 ,顾美超 等. 程序化冷冻前后小鼠孵化囊胚和休眠胚胎的 Hba- α 蛋白分布和差异表达 [J]. *中国实验动物学报* 2016 24(6):579-584.
Liu D ,Ni HM ,Gu MC ,et al. The distribution and differential expression of Hba-alpha protein in hatchable blastocysts and dormant embryos of mice before and after freezing procedure [J]. *Acta Lab Anim Sci Sin* 2016 24(6):579-584.
- [12] 赖炳森 ,孙树秦 ,叶平 等. 不同剂量 γ 线整体照射后家兔血清溶菌酶含量的改变 [J]. *军事医学* ,1984 (1):31-36.
LAI BS ,SUN SQ ,YE P , et al. Changes in serum lysozyme content in rabbits after different doses of gamma ray irradiation [J]. *Milit Med Sci* ,1984 (1):31-36.
- [13] Leese H J ,Baumann C G ,Brison D R , et al. Metabolism of the viable mammalian embryo: quietness revisited [J]. *Mol Human Reprod* 2008 ,14(12):667-672.
- [14] Lee J ,Oh HA ,Song H , et al. Autophagy regulates embryonic survival during delayed implantation [J]. *Endocrinology* ,2011 ,152:2067-2075.
- [15] Fu Z ,Wang B ,Wang S , et al. Integral proteomic analysis of blastocysts reveals key molecular machinery governing embryonic diapause and reactivation for implantation in mice [J]. *Biol Reprod* 2014 90(3):52.
- [16] Levine B , Klionsky DJ. Development by self-digestion: molecular mechanisms and biological functions of autophagy [J]. *Dev Cell* 2004 6(4):463.
- [17] Weitlauf HM ,Greenwald GS. Survival of blastocysts in the uteri of ovariectomized mice [J]. *J Reprod Fertil* ,1968 ,17(3):515-520.
- [18] Starling S. Innate immunity: A new way out for lysozyme [J]. *Nat Rev Immunol* 2017 ,17(9):532.
- [19] Ku SK ,Yoon EK ,Lee HG ,et al. Inhibitory effects of lysozyme on endothelial protein C receptor shedding in vitro and in vivo [J]. *BMB Reports* 2015 48(11):624-629.
- [20] Kaizu A ,Fagutao FF ,Kondo H ,et al. Functional analysis of C-type lysozyme in penaeid shrimp [J]. *J Biol Chem* ,2011 ,286(52):44344-44349.
- [21] Lapcharoen P ,Komalamisra N ,Rongsriyam Y , et al. Investigations on the role of a lysozyme from the malaria vector *Anopheles dirus* during malaria parasite development [J]. *Dev Comp Immunol* 2012 36(1):104-111.
- [22] 黄复生 ,王兴相. 大劣按蚊血细胞对约氏疟原虫卵囊黑化作用的观察 [J]. *中国病原生物学杂志* ,1995 8(4):284-285.
Huang FS ,Wang XX. Observation of the effect of the blood cells of the inferior *Anopheles albopictus* on the egg-follicle blackening of the *Plasmodium albicans* [J]. *J Pathol Biol* ,1995 8(4):284-285.

[收稿日期] 2018-05-11