

邵红莲, 谭韬. 小鼠植入后胚胎体外延时培养体系的应用进展 [J]. 中国比较医学杂志, 2020, 30(8): 119-124.

Shao HL, Tan T. Advances in the application of an *in vitro* culture system of mouse post-implantation embryos [J]. Chin J Comp Med, 2020, 30(8): 119-124.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2020.08.019

小鼠植入后胚胎体外延时培养体系的应用进展

邵红莲¹, 谭韬^{1,2*}

(1. 昆明理工大学 生命科学与技术学院, 昆明 650500; 2. 昆明理工大学 云南中科灵长类生物医学重点实验室, 昆明 650500)

【摘要】 小鼠是研究哺乳动物中一种小型的模式生物, 在研究非人灵长类以及人类胚胎之前, 需要先在小鼠体内确定实验能否进行再转移到高等哺乳动物。现有体系的限制使小鼠胚胎只能在体外培养至 E6.5, 小鼠胚胎体外延时培养体系的建立对于理解胚胎植入后的关键事件以及分子机制有着非常重要的作用, 更为人胚胎的发育研究提供有效平台。单细胞测序技术的发展为小鼠胚胎体外延时培养提供了新的可能, 在这里我们介绍了小鼠植入后胚胎的普通体外延时培养体系、3D 培养体系、单细胞测序技术在胚胎领域的应用, 以及其未来可能的发展方向。

【关键词】 小鼠胚胎发育; 体外延时培养体系; 3D 培养体系; 单细胞转录组测序

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2020) 08-0119-06

Advances in the application of an *in vitro* culture system of mouse post-implantation embryos

SHAO Honglian¹, TAN Tao^{1,2*}

(1. Faculty of Metallurgical and Energy Engineering, Kunming University of Science and Technology, Kunming 650093, China.

2. Yunnan Key Laboratory of Primate Biomedical Research, Institute of Primate Translational Medicine, Kunming University of Science and Technology, Kunming 650500)

【Abstract】 Mice are a small mammal model for scientific research. Before studying non-human primates and human embryos, it must be determined whether the experiment can be carried out in mice and then employ higher mammals. The limitation of the existing system is that mouse embryos can only be cultured *in vitro* to E6.5. Establishment of a mouse embryo *in vitro* culture system is very important to understand the critical events and molecular mechanisms of embryo peri-implantation. The development of single-cell RNA sequencing technology provides new possibilities for *in vitro* time-lapse culture of mouse embryos. Here, we introduce an *in vitro* time-lapse culture system and 3D culture system for mouse embryo implantation, the application of single-cell RNA sequencing technology in the field of embryos, and its possible future direction of development.

【Keywords】 mouse embryonic development; *in vitro* time-lapse culture system; 3D culture system; single cell RNA sequencing

哺乳动物植入后胚胎发育的相关机制是发育学领域的关注热点, 小鼠是最易获得且最具特征的

哺乳动物胚胎发育模型。哺乳动物的早期胚胎发育经历: 受精卵→2-细胞→4-细胞→8-细胞→桑椹

[作者简介] 邵红莲(1994—), 女, 硕士, 研究方向: 小鼠胚胎体外培养体系的建立及优化。E-mail: 2075543557@qq.com

[通信作者] 谭韬(1981—), 男, 教授, 博士, 研究方向: 早期胚胎发育的表现遗传学研究。E-mail: tant@lpr.cn

胚→囊胚→原肠胚几个阶段,植入后早期胚胎发育是指囊胚由输卵管进入子宫着床并继续发育的过程^[1-5]。小鼠胚胎体外培养体系的成功建立,可以作为一个深入研究小鼠植入后胚胎发育的相关机制平台,也可以作为其他哺乳动物胚胎体外培养体系的建立及优化的参考依据。

现阶段已有较多小鼠植入前胚胎发育机制的相关研究,植入前胚胎发育过程的核基因组、转录组、蛋白表达变化等问题都得到了比较详细的解答^[6]。Xue 等^[7]研究发现,受精卵胚胎处于转录静止状态,其发育完全由母系提供的蛋白质和来自卵浆的 RNAs 控制,2 细胞期才发生重要的基因激活。桑椹胚时期内细胞团(inner cell mass, ICM)和滋养外胚层(trophoblastic ectoderm, TE)分化形成囊胚的分子机制也较为详尽^[8-9]。

相较于众多的植入前形态发生和信号通路的研究,植入期和植入后期的研究非常有限。尤其是人类及非人类灵长类动物的胚胎,其植入期、植入后期的形态发生、转录组和表观基因组的特异性调控都未得到系统的研究。由于人类胚胎 14 d 原则的伦理限制以及难以获取胚胎,小鼠胚胎成为众多基础研究的常用胚胎模型。小鼠胚胎的体外延时培养体系不仅能够解释植入过程和植入后的胚胎发生事件,更为探索高级哺乳动物体外培养体系建立基础。该篇综述对小鼠植入后胚胎体外延时培养体系进行总结,并对更高等的哺乳动物的体外培养体系发展提供更好的思路。

1 普通培养体系

目前常用的体外培养体系(*in vitro* culture, IVC)可大致分为两类:IVC1 与 IVC2。IVC1 用于滋养层细胞(trophoblast cells, TS)贴壁前的培养,IVC2 用于 TS 贴壁后的培养。目前很多实验室都在进行小鼠的体外延时培养,培养体系在不停的优化,但依旧不能获得稳定的体系。

1.1 基于 DMEM、Whitten 的体外培养体系

2011 年, Takaoka 等^[10]使用 DMEM、Whitten 培养基培养 E5.0-E5.5 和 E3.7 胚胎。首先在添加 50% 胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)和 25 mm HEPES-NaOH (pH 7.2)的 DMEM 中恢复胚胎。随后将 E5.0-E5.5 胚胎转移到培养基中,该培养基由 75% 大鼠血清和 25% DMEM 缓冲 44 mM NaHCO₃ (pH 7.2)组成。将 E3.7 胚胎转移到改良的 Whitten 培养基中。胚胎在 35 mm 的玻璃底塑料培养皿中培养。

1.2 基于 CMRL1066 的体外培养体系

2012 年, Morris 等^[11]人为了研究小鼠植入后胚胎前后轴的形成,建立了一套体外培养体系。在该体系中, IVC1 的基础成分为 CMRL1066、L-谷氨酰胺、丙酮酸钠、双抗(青霉素和链霉素)、胎小牛血清(fetal calf serum, FCS)等。IVC2 基础成分与 IVC1 相同,但使用人脐带血清(human cord serum, HCS)替代了 FCS。该培养体系使用了聚丙烯酰胺凝胶与玻璃结合,并覆盖各种蛋白质涂层,以便能够清晰地跟踪前内胚层内胚层的逐步发育。但是凝胶制备的复杂性和 HCS 分离难度使该方法难以广泛应用,而且来源不同的 HCS 可能会导致培养结果的不同。

1.3 基于 Advanced-DMEM/F12 的体外培养体系

2014 年, Bedzhov^[12]团队描述了一个支持小鼠胚胎发育至囊胚之后的体系,提供了一个新的分步培养方案,奠定了小鼠植入后胚胎体外延时培养体系的发展基础。在该研究中,采用 Advanced-DMEM/F12 代替 CMRL-1066,同时添加双抗(青霉素和链霉素)、L-谷氨酰胺、 β -雌二醇、孕酮、N-乙酰-L-半胱氨酸等成分。为进一步降低 HCS 的需求,他们还添加了 ITS-X 和敲除血清替代品(KnockOut serum replacement, KSR)。IVC1 与 IVC2 均基于以上成分,二者最主要的区别在于, IVC1 使用 FBS 作为胚胎的营养成分,而 IVC2 使用 KSR 替代 FBS。该研究还采用了特殊的光学材料(ibiTreat μ -plates, eight-well)作为基质,在体外将小鼠囊胚培养到卵圆柱阶段,体外培养的胚胎形态以及谱系标志物的检测和正常体内 E6.5 相同。

在该研究中, Bedzhov 等^[12]还尝试了两种培养方法。第一种方法从早期囊胚开始,去除透明带后,囊胚可以附着在基质上,5 d 后发育成卵圆柱体;第二种方法是从晚期囊胚开始,在 3 d 内分离出的附壁 TE 形成卵圆柱体,通过这种方法可以观察到以前隐藏的发育时期。他们使用的培养体系可用于直接监测小鼠植入期胚胎谱系发生,胚胎生长等情况。至此,小鼠胚胎体外延时培养体系已初见规模,能够很好的支持众多小鼠胚胎研究。

2 3D 培养体系

早在几十年前,研究者就观察到,细胞在活体内和培养皿中所处的微环境截然不同。当细胞系嵌入 3D 基质或标准组织培养板中时^[13],细胞表现出显著的不同形态和生长特征^[14]。自此,细胞培养技术的一个重要进展是引入了 3D 培养系统。与二维方法相比,3D 方法的一个主要优点是减少了细胞

培养系统和体内环境之间的差距,显示出更接近复杂的体内条件特征^[15-17]。在传统的 2D 条件下,对分化、增殖和细胞功能非常重要的细胞外基质(extracellular matrix, ECM)成分、细胞间相互作用都会丢失^[18]。在 3D 培养系统中,未分化细胞的存活率也得到了提高,这对研究与环境相关的物理化学因素对胚胎细胞的影响是有帮助的。

3D 支架是用各种天然(胶原蛋白、明胶、弹性蛋白、丝素蛋白、壳聚糖、甲壳素、纤维蛋白、纤维蛋白原等)和合成聚合物制成的,同时也包括一些公认的天然和合成物质的混合物。常用的 3D 支架材料有琼脂糖、胶原、纤维连接蛋白、明胶、层粘连蛋白和卵黄蛋白。这些复合材料在孔隙率、纤维、渗透性和机械稳定性等物理特性方面模拟天然 ECM。微结构增强了胚胎中粘附细胞的生物物理学和生物化学相互作用,使其在体外更好的表达相应的基因。3D 基质为胚胎增殖、分化和分泌细胞特异性 ECM 提供了一个生物活性环境^[19]。以下介绍了常用 3D 基质及其在胚胎培养当中的用途。

2.1 基质胶(matrigel)

Matrigel 在干细胞领域已经有了充分的应用,在胚胎培养当中也有所尝试。Bedzhov 等^[20]使用 Matrigel 培养 E3.5 胚胎的 ICM。该研究将单个 ICMs 滴入 ibiTreat 显微术塑料 m 板中的基质凝胶中,37℃ 孵育 2~3 min,直至基质凝胶凝固。然后用加热过的 IVC1 培养基填充培养皿。在以 Matrigel 为基质的 3D 培养体系当中,TS 的发育更加接近于体内的状态,可以在一定程度上模拟体内的着床过程。

2.2 聚丙烯酰胺胶

Niu 等^[21]评估了与玻璃结合并覆盖各种蛋白质涂层的聚丙烯酰胺水凝胶在 3D 胚胎延时培养体系中的使用。在该研究中,首先通过改变 N'-N'-亚甲基双丙烯酰胺和丙烯酰胺的比例来优化聚丙烯酰胺水凝胶的表面硬度,其次使用了不同的蛋白质涂层。采用 I 型大鼠尾胶原涂层时,87%(13/15)的胚胎可附着在基质上,38%(5/13)的胚胎可发育成卵圆柱。相比之下,层粘连蛋白或纤维蛋白-布朗宁与胶原结合使用时,80%(12/15)的胚胎可以附着,41%(5/12)的胚胎可形成卵圆柱。这些胚胎发育出正确的形态和外胚层(epiblast, EPI)、TE 和原始内胚层(primitive endoderm, PrE),并且表达相应的组织标记基因。

2.3 3D 培养体系在其他哺乳动物中的应用

Shao 等^[22]基于人多能干细胞(pluripotent stem cells, PSC)的模型,建立了称为植入后羊膜囊胚状

体(post-implantation amniotic sac embryoid, PASE),它能够概括围绕羊膜囊发育的多个植入后胚胎发生事件。在没有母体或胚胎外组织的情况下,PASE 自组织形成一个具有不对称羊膜 EPI 的上皮囊肿,类似于人类羊膜囊。在进一步的发育过程中,PASE 以 SNAI1 依赖的方式启动一个类似于后原条发育的过程。此外,他们还发现到非对称 BMP-SMAD 信号与 PASE 的发展同步,并证实 BMP-SMAD 的激活/抑制调节了 PASE 的稳定发展。该研究为小鼠胚胎体外延时培养提供了新的思路,即构建 3D 的培养体系,为胚胎着床及着床后的发育提供可能的条件。他们采用 3D 培养体系来培养植入后人羊膜囊,其在 8 孔板底部铺有一层 Matrigel,且在日常培养基中添加了 ECM。Matrigel 能够向 EPI 细胞提供极化信号,胚胎干细胞在 Matrigel 内培养后能够形成类似体内胚胎花环的 EPI 结构,凋亡细胞数量也少于一般的二维培养^[22]。

3D 培养体系在体外通过细胞外基质构建类体内环境,有效促进了哺乳动物胚胎在体外的发育过程,进而促进胚胎前后轴形成动力学、胚胎滋养巨细胞与子宫内层相互作用等问题的理解^[23]。但 3D 体系仍然不够成熟,不能够完全模拟小鼠胚胎体内着床以及着床后的进一步发育。寻找更合适的 3D 体系材料及其构建方法、并将其与已知的维持胚胎的培养体系结合是该领域的重点研究方向。现如今,3D 打印技术逐渐成熟,能够建立更加精细的结构,该技术将来可以被应用于小鼠胚胎体外延时培养的 3D 体系的建立,也有可能进一步为非人类灵长类动物和人类的胚胎的体外培养提供技术支持和研究基础。

3 培养体系添加物

有研究者报道了小鼠囊胚到卵圆柱转变过程中的关键形态发生事件,这些步骤将简单的 EPI 细胞球转化为杯状上皮细胞^[12]。Copp^[24]揭示了体外囊胚着床后,TS 与 ECM 的粘附强度随时间而发生变化,这限制了极性细胞进一步的体外发育,从而导致卵圆柱的形成。Bedzhov 等^[20]人发现,胚胎外细胞系分泌的基底膜成分为 PSC 提供了极化信号。这导致 EPI 整体重组为玫瑰花状结构,并伴随管腔发生。除了 3D 体系,胚胎发育过程中,胚胎外细胞系分泌的细胞因子也会决定胚胎发育的质量。因此体外培养体系中的各类添加物对胚胎发生也发挥重要作用。

3.1 细胞因子

在囊胚(E3.5)中三种不同的细胞系 TE、ICM

中的 EPI 和 PrE 发育过程中,许多关键的谱系因子,如 CDX2、POU5F1 和 SOX17,分别在小鼠胚胎发育过程中表现出保守表达。在小鼠体内胚胎发育过程中,成纤维细胞生长因子(fibroblast growth factor, FGF)信号和随后的细胞内丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)途径激活 EPI 和 PE 细胞的分化,最终分别产生胚胎固有细胞和卵黄囊。在小鼠胚胎培养过程中抑制 FGF/MAPK 信号可增加 ICM 内表达 NANOG 细胞的比例,FGF 受体上调可导致 ICM 细胞转化为 GATA6 阳性 PE 前体。IGF1 受体、IGF1 和胰岛素受体分别在人 PE 和 EPI 中表达,通过磷酸肌醇 3 激酶(PI3K)/mTOR,可以维持胚胎内细胞干性的通路,如对 PE 发育有重要作用的 FGF 通路^[25]。在小鼠胚胎培养基中,添加 IGF 和 EGF 有利于胚胎从透明带孵出。对小鼠胚胎研究表明,TGF- α 和 EGF 能分别通过自分泌作用和旁分泌作用促进囊胚腔的扩张膨大。IL-1、IL-6、CSF-1 以及 TNF- α 等生长因在人早期胚胎植入过程中担任不同的角色,最终促进胚胎成功着床以及后续的胚胎发育。Niu 等^[21]在体外建立了一个培养体系,在人胚胎培养体系的基础上进行优化,能够将高级哺乳动物食蟹猴的胚胎延时培养至 20 d,获得的胚胎能够出现谱系分化、胎盘形成、羊膜囊和卵黄囊成腔化以及原始生殖细胞分化等哺乳动物胚胎发育过程中的关键事件。他们通过 ROCK 抑制剂 Y-27632 促进了猴胚胎的发育,减少胚胎内细胞的凋亡。因此细胞因子及其作用通路是优化胚胎体外延时培养体系的重要研究方向。

3.2 激素及有机物

胚胎环境中的激素以及体内环境中的有机物质也对胚胎发育有着重要的作用。人绒毛膜促性腺激素(human chorionic gonadotropin, hCG)在体内可以吸附于 TS 表面,保护 TS 免受母体淋巴细胞的攻击。体内 hCG 的浓度也与囊胚发育质量有显著相关性。在体外,孕马血清促性腺激素和 hCG 的合用可以在一定范围内增加小鼠胚胎的发育数量和发育率^[26]。雌激素也在小鼠早期胚胎发育过程中发挥重要作用,其小鼠胚胎的体外培养体系中都有添加。牛磺酸和 EDTA 可以克服二细胞阻滞,一些氨基酸如谷氨酰胺也会参与蛋白质、DNA 的合成,成为胚胎发育最初 48 h 内的重要能量来源,而且谷氨酰胺具有防止细胞氧化的功效,一些研究表明,在培养液中添加谷氨酰胺,可提高小鼠在体外

的囊胚孵化率^[27]。

4 单细胞转录组测序对胚胎发育的启示

小鼠植入前胚胎体外培养体系较为成熟,能够培养至原条出现阶段。但随着囊胚的发育进行,胚胎内的细胞逐渐分化,所需求的信号分子也随之发生改变。这也对体外环境是否能够支持不同细胞系的发育提出了更高的要求。研究表明转录因子网络的协同作用对于胚胎发育成功的谱系分离是必不可少的^[28-31]。对早期胚胎的单细胞转录组分析(single cell RNA sequencing, scRNA-seq)给胚胎发育领域带来了很多新的启发^[25]。scRNA-seq 在不到 10 年的时间里飞速发展,该技术能够揭示胚胎内的每一个细胞各自的发育事件及其产生的变化,详细研究特定基因和调控序列在发育中的作用。

4.1 胚胎发育的基因表达

Smart-seq2 技术的出现及优化为胚胎发育的单细胞转录组学提供了一个很好的平台^[32-34]。Mohammed 等^[35]人通过对 E3.5 到 E6.5 小鼠胚胎进行 scRNA-seq 来研究从着床期到早期原肠胚形成的调控环境,以探索从植入前到早期原肠胚早期的小鼠发育。有研究者将该方法直接应用于 E3.5 小鼠囊胚未分化 ICM 中的单个细胞,发现存在两个细胞群,一个具有 PrE 表达,另一个具有多能性 EPI 样基因表达。两个群体间差异表达的基因在胚胎中 E4.5 在形态分化的 PE 和 EPI 中得到了很好的保存,表明该方法成功地检测到了表面上同质的细胞群体在单细胞水平上细微但本质的差异^[36-37]。为了建立小鼠囊胚 ICM 内 EPI 与 PrE 谱系分离的图谱,Ohnishi 等^[38]描述了单个 ICM 细胞的基因表达谱。这项研究提出了一个模型,即 ICM 中细胞基因的表达水平出现随机变异,且彼此独立,随后通过一系列信号通路增强支持了 ICM 谱系分离。众多胚胎 scRNA-seq 是胚胎内细胞群体的鉴定强有力的工具,为细胞命运的溯源提供证据。

4.2 胚胎发育的细胞命运图谱

体内哺乳动物细胞分化轨迹的全面描绘代表胚胎发育过程中基因表达变化的基线,其可用于再生医学的优化体外分化方案的参照^[39]。Scialdone 等^[39]通过单细胞转录组分析小鼠胚胎早期中胚层分化的问题。传统的多细胞 DNA 分析的实验方法依赖于细胞数较多的样本,不适合胚胎早期谱系多样性的研究。为了解决这个问题,他们使用 scRNA-seq 研究了 1205 个中胚层单细胞向造血系统的分化过程,涵盖了从 E6.5 早期原肠胚形成到 E7.75 原

始红细胞生成的时间过程。在 E6.5 小鼠胚胎中,位于 PrE 和 EPI 交界处的细胞经历上皮-间充质转化。随后,细胞发生迁移进而获得不同的细胞命运,或围绕着 EPI,或进入 PrE 形成卵黄囊、脐带和胎盘。细胞命运图谱显示,成熟组织,如血液和心脏,起源于原肠胚前成纤维细胞的特定区域,但仍然不清楚胚胎中众多细胞的命运是如何决定的^[40]。

Pijuan-Sala 等^[40]报告了在受精后 6.5~8.5 d 的九个连续时间点收集的来自小鼠胚胎的 116,312 个单细胞的转录谱。构建了从多能性向所有主要胚胎谱系的细胞分化的分子图谱,并探讨了内脏和原条衍生、内胚层融合的复杂事件^[39]。Cao 等^[41]分析了在妊娠 9.5~13.5 d 之间的 61 个胚胎大约 200 万个细胞的转录体。由此产生的“小鼠器官发生细胞图谱”(MOCA)提供了这一关键时期发育过程的全局视图^[41-42]。scRNA-seq 为追踪胚胎发育过程的所有细胞命运提供了可能,而且该领域还需要更深入的研究去完善其他哺乳动物胚胎谱系分化图谱。

4.3 其他哺乳动物胚胎发育的单细胞测序研究

与此同时,众多研究者对高级哺乳动物的胚胎也进行了单细胞转录组的研究,探索胚胎发育的复杂机制。EPI 是哺乳动物所有体细胞和生殖细胞的起源。为了探索人类和灵长类多能性的个体发育,Nakamura 等人^[43]对食蟹猴(*Macaca fascicularis*)植入前和植入后的 EPI 进行了全面的 scRNA-seq。结果表明,在囊胚发育过程中,食蟹猴 EPI 在着床过程中发生了重要的转录组变化。该研究不仅揭示了 EPI 发育的差异性和一致性,而且确定了关键物种间多能性谱的发育坐标,为更好地建立人胚胎的培养体系提供了线索。Zhou 等人^[44]结合体外培养的胚胎发育和 scRNA-seq,系统分析了来自人的 65 个移植前后胚胎的 8000 多个单个细胞。转录组数据的无监督降维和聚类算法显示了 EPI、PrE 和 TE 谱系的逐步植入路径,表明胚胎在植入过程中为着床于子宫内膜做好了充分准备。该研究提供了对调节人类胚胎植入的复杂分子机制的理解,并有助于推进未来对早期胚胎发育和生殖医学的理解。众多的测序研究结果揭示了小鼠、高级哺乳动物以及人胚胎发育过程中的复杂路径,同时其详尽的转录组信息为体外延时培养获得的胚胎发育谱系提供了很好的参照标准,也为解析发育过程的分子机制提供了有力的支持。

5 结论与展望

胚胎是生命的起源,理解胚胎的发育历程有助

于研究高等动物的发育过程。小鼠胚胎以其哺乳动物的胚胎特性和较短的发育时间等优势,成为了很好的胚胎研究的模型。猴胚胎、人胚胎的植入发育研究都是建立在小鼠胚胎的模型上来开展的。建立体外延时培养的小鼠胚胎体系,有助于我们更好的理解哺乳动物在着床后所经历的事件,揭示胚胎发育的过程。高级哺乳动物以及人胚胎的延时培养研究能够反哺小鼠胚胎体外延时培养体系的有效建立。

总之,植入后胚胎体外培养这个领域在胚胎发育过程的研究中是至关重要的。目前针对胚胎的体外培养技术还存在不足,需要更多的研究投入。未来的研究需要更多地理解胚胎发育的机制以及发育过程中的事件,这可以为生殖医学等相关领域提供相应的基础,也可以帮助我们理解生殖医学中的多种问题,例如胚胎受孕后的流产、胚胎与子宫内膜的交互作用以及移植胚胎吸收等相关事件。

参考文献:

- [1] Bischof P, Campana A. Trophoblast differentiation and invasion: its significance for human embryo implantation [J]. *Early Pregnancy*, 1997, 3(2): 81-95.
- [2] Zernicka-Goetz M, Morris SA, Bruce AW. Making a firm decision: multifaceted regulation of cell fate in the early mouse embryo [J]. *Nat Rev Genet*, 2009, 10(7): 467-477.
- [3] Rossant J, Tam PP. Blastocyst lineage formation, early embryonic asymmetries and axis patterning in the mouse [J]. *Development*, 2009, 136(5): 701-713.
- [4] Arnold SJ, Robertson EJ. Making a commitment: cell lineage allocation and axis patterning in the early mouse embryo [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2009, 10(2): 91-103.
- [5] Lawson KA, Meneses JJ, Pedersen RA. Clonal analysis of epiblast fate during germ layer formation in the mouse embryo [J]. *Development*, 1991, 113(3): 891-911.
- [6] Rossant J. Mouse and human blastocyst-derived stem cells: vive les differences [J]. *Development*, 2015, 142(1): 9-12.
- [7] Xue Z, Huang K, Cai C, et al. Genetic programs in human and mouse early embryos revealed by single-cell RNA sequencing [J]. *Nature*, 2013, 500(7464): 593-597.
- [8] Leung CY, Zernicka-Goetz M. Mapping the journey from totipotency to lineage specification in the mouse embryo [J]. *Curr Opin Genet Dev*, 2015, 34: 71-76.
- [9] Paranjpe SS, Veenstra GJ. Establishing pluripotency in early development [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2015, 1849(6): 626-636.
- [10] Takaoka K, Yamamoto M, Hamada H. Origin and role of distal visceral endoderm, a group of cells that determines anterior-posterior polarity of the mouse embryo [J]. *Nat Cell Biol*, 2011, 13(7): 743-752.
- [11] Morris SA, Grewal S, Barrios F, et al. Dynamics of anterior-

- posterior axis formation in the developing mouse embryo [J]. Nat Commun, 2012, 3: 673.
- [12] Bedzhov I, Leung CY, Bialecka M, et al. *In vitro* culture of mouse blastocysts beyond the implantation stages [J]. Nat Protoc, 2014, 9(12): 2732–2739.
- [13] Montesano R, Schaller G, Orci L. Induction of epithelial tubular morphogenesis *in vitro* by fibroblast-derived soluble factors [J]. Cell, 1991, 66(4): 697–711.
- [14] Zhang K, Manninen A. 3D cell culture models of epithelial tissues [J]. Methods Mol Biol, 2019, 1926: 77–84.
- [15] Cukierman E, Pankov R, Stevens DR. Taking cell-matrix adhesions to the third dimension [J]. Science, 2001, 29(5547): 1708–1712.
- [16] Ravi M, Paramesh V, Kaviya SR. 3D cell culture systems - advantages and applications [J]. J Cell Physiol, 2015, 230(1): 16–26.
- [17] Vinci M, Gowan S, Boxall F. Advances in establishment and analysis of three-dimensional tumor spheroid-based functional assays for target validation and drug evaluation [J]. BMC Biol, 2012, 10: 29.
- [18] Mazzoleni G, Lorenzo DD, Steinberg N. Modelling tissues in 3D: the next future of pharmacotoxicology and food research [J]. Genes Nutr, 2009, 4(1): 13–22.
- [19] Gu Z, Guo J, Wang H, et al. Bioengineered microenvironment to culture early embryos [J]. Cell Prolif, 2020, 53(2): e12754.
- [20] Bedzhov I, Zernicka-Goetz M. Self-organizing properties of mouse pluripotent cells initiate morphogenesis upon implantation [J]. Cell, 2014, 156(5): 1032–1044.
- [21] Niu Y, Sun N, Li C, et al. Dissecting primate early post-implantation development using long term *in vitro* embryo culture [J]. Science, 2019, 366(6467): eaaw5754.
- [22] Shao Y, Taniguchi K, Townshend RF, et al. A pluripotent stem cell-based model for post-implantation human amniotic sac development [J]. Nat Commun, 2017, 8(1): 208.
- [23] Ruane PT, Berneau SC, Koeck R, et al. Apposition to endometrial epithelial cells activates mouse blastocysts for implantation [J]. Mol Hum Reprod, 2017, 23(9): 617–627.
- [24] Copp AJ. The mechanism of mouse egg-cylinder morphogenesis *in vitro* [J]. J Embryol Exp Morphol, 1981, 61: 277–287.
- [25] Guo G, Huss M, Tong GQ. Resolution of cell fate decisions revealed by single-cell gene expression analysis from zygote to blastocyst [J]. Dev Cell, 2010, 18(4): 675–685.
- [26] 姚瀛, 徐营, 陈毅斐. 激素对小鼠胚胎体外发育的影响 [J]. 现代农业科技, 2010, 3: 319–321, 323.
- [27] 衣少莉. 牛磺酸、EDTA 和类固醇激素对小鼠胚胎体外发育的影响 [D]. 北京: 中国农业大学, 2004.
- [28] Jedrusik A, Parfitt DE, Guo G, et al. Role of Cdx2 and cell polarity in cell allocation and specification of trophectoderm and inner cell mass in the mouse embryo [J]. Genes Dev, 2008, 22(19): 2692–2706.
- [29] Kang M, Piliszek A, Artus J, et al. FGF4 is required for lineage restriction and salt-and-pepper distribution of primitive endoderm factors but not their initial expression in the mouse [J]. Development, 2013, 140(2): 267–279.
- [30] Ralston A, Rossant J. Cdx2 acts downstream of cell polarization to cell-autonomously promote trophectoderm fate in the early mouse embryo [J]. Dev Biol, 2008, 313(2): 614–629.
- [31] Niwa H, Toyooka Y, Shimosato D, et al. Interaction between Oct3/4 and Cdx2 determines trophectoderm differentiation [J]. Cell, 2005, 123(5): 917–929.
- [32] Ramsköld D, Luo S, Wang YC, et al. Full-length mRNA-Seq from single-cell levels of RNA and individual circulating tumor cells [J]. Nat Biotechnol, 2012, 30(8): 777–782.
- [33] Kurimoto K, Yabuta Y, Ohinata Y, et al. An improved single-cell cDNA amplification method for efficient high-density oligonucleotide microarray analysis [J]. Nucleic Acids Research, 2006, 34(5): e42.
- [34] Picelli S, Faridani OR, Björklund AK, et al. Full-length RNA-seq from single cells using Smart-seq2 [J]. Nat Protoc, 2014, 9(1): 171–181.
- [35] Mohammed H, Hernando-Herraez I, Savino A, et al. Single-cell landscape of transcriptional heterogeneity and cell fate decisions during mouse early gastrulation [J]. Cell Rep, 2017, 20(5): 1215–1228.
- [36] Rossant J, Chazaud C, Yamanaka Y. Lineage allocation and asymmetries in the early mouse embryo [J]. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci, 2003, 358(1436): 1341–1349.
- [37] Picelli S, Björklund ÅK, Faridani OR, et al. Smart-seq2 for sensitive full-length transcriptome profiling in single cells [J]. Nat Methods, 2013, 10(11): 1096–1098.
- [38] Ohnishi Y, Huber W, Tsumura A, et al. Cell-to-cell expression variability followed by signal reinforcement progressively segregates early mouse lineages [J]. Nat Cell Biol, 2014, 16(1): 27–37.
- [39] Scialdone A, Tanaka Y, Jawaid W, et al. Resolving early mesoderm diversification through single-cell expression profiling [J]. Nature, 2016, 535(7611): 289–293.
- [40] Pijuan-Sala B, Griffiths JA, Guibentif C, et al. A single-cell molecular map of mouse gastrulation and early organogenesis [J]. Nature, 2019, 566(7745): 490–495.
- [41] Cao J, Spielmann M, Qiu X, et al. The single-cell transcriptional landscape of mammalian organogenesis [J]. Nature, 2019, 566(7745): 496–502.
- [42] Shahbazi MN, Zernicka-Goetz M. Deconstructing and reconstructing the mouse and human early embryo [J]. Nat Cell Biol, 2018, 20(8): 878–887.
- [43] Nakamura T, Okamoto I, Sasaki K, et al. A developmental coordinate of pluripotency among mice, monkeys and humans [J]. Nature, 2016, 537(7618): 57–62.
- [44] Zhou F, Wang R, Yuan P, et al. Reconstituting the transcriptome and DNA methylome landscapes of human implantation [J]. Nature, 2019, 572(7771): 660–664.

[收稿日期]2020-07-03