

科技部補助專題研究計畫成果報告 期末報告

小鼠胚胎著床之信號傳導轉錄激活因子三、有絲分裂原激活蛋白質激酶及著床相關訊息傳遞路徑於誘導性排卵週期之研究

計畫類別：個別型計畫
計畫編號：MOST 103-2314-B-040-022-
執行期間：103年08月01日至104年07月31日
執行單位：中山醫學大學醫學研究所

計畫主持人：李茂盛

計畫參與人員：碩士級-專任助理人員：傅俞菁

處理方式：

1. 公開資訊：本計畫涉及專利或其他智慧財產權，2年後可公開查詢
2. 「本研究」是否已有嚴重損及公共利益之發現：否
3. 「本報告」是否建議提供政府單位施政參考：否

中華民國 104 年 10 月 16 日

中文摘要：提昇胚胎的著床率一直是在人工協助生殖技術的治療中個不易解決的問題。這是由於胚胎要能成功的著床必須同時具備有著床能力的胚胎以及具有接受胚胎能力的子宮。而在胚胎與子宮間剛開始進行的交互作用中，有許多因數參與進而影響著床，但在訊息傳遞路徑的研究，尚未有完整且清楚的報導。因此瞭解胚胎著床的訊息傳遞路徑機制才能順利提高著床的成功率。有鑑於著床時期胚胎及子宮的訊息傳導路徑的變化尚未有完整的研究報導，若直接觀察人類的體內著床過程，因涉及倫理及懷孕過程的安全性等因素而不能進行，因此以動物的模式而不以人類胚胎及檢體觀察早期著床，可以更精確觀察到著床位置的分子訊息細微的變化。本研究將以小鼠胚胎及子宮經過卵巢刺激後訊息傳遞路徑的差異，以探討著床過程訊息傳遞機制之變化。本計劃以即時定量核糖核酸晶片測試，分別觀察信號傳導轉錄啟動因數三、有絲分裂原啟動蛋白質激酶及細胞週期等數個訊息傳遞路徑的在著床時期的囊胚及子宮的變化。

中文關鍵詞：誘導性排卵週期、著床、訊息傳遞

英文摘要：To improve the implantation rate is an important issue in the assisted reproductive technology. The successful implantation depends upon the implantation-competent blastocysts and the receptive uterus. This process is initiated via blastocyst-endometrium interaction and delicately regulated by multiple factors. There were not enough studies on the signal pathways at ovarian stimulated cycles. The mechanism and affected factors are still not clear now. There are ethic issues using human samples for implantation researches. We studied on the signal pathways to observe changes of gene expression at ovarian stimulated cycles. The advantage of the animal model in this study is easy to find implantation site for analyzing the change in microenvironment. There were relative rare studies on the signal pathways for embryo development at ovarian stimulated cycles. The objective of this study was to compare the expression profiles of genes involved in STAT3, MAPK, WNT and cell cycle among embryos produced by natural ovulation or hormonal superovulation. We analyzed gene expression of blastocysts and uterus tissues on implantation window on STAT3, MAPK, and cell cycle at ovarian stimulated cycles, respectively.

英文關鍵詞：ovarian stimulated cycles, implantation, signal transduction

科技部補助專題研究計畫成果報告

(期中進度報告/期末報告)

小鼠胚胎著床之信號傳導轉錄啟動因數三、有絲分裂原啟動蛋白質激酶及著床相關訊息傳遞路徑於誘導性排卵週期之研究

Study on the signal transducer and activator of transcription 3, mitogen activated protein kinases and relative implantation signal transduction pathways of mouse embryo implantation at ovarian stimulated cycles

計畫類別：個別型計畫 整合型計畫

計畫編號： MOST 103-2314-B-040 -022

執行期間：2014 年 8 月 1 日至 2015 年 7 月 31 日

執行機構及系所：中山醫學大學醫研所

計畫主持人：李茂盛

計畫參與人員：傅俞菁

期末報告處理方式：

1. 公開方式：

非列管計畫亦不具下列情形，立即公開查詢

涉及專利或其他智慧財產權，一年二年後可公開查詢

2. 「本研究」是否已有嚴重損及公共利益之發現：否 是

3. 「本報告」是否建議提供政府單位施政參考否 是，(請列舉提供之單位；本部不經審議，依勾選逕予轉送)

中華民國 104 年 7 月 31 日

目錄

一、中文摘要.....	I
二、英文摘要.....	I
三、報告內容.....	1
(一)、前言.....	1
(二)、研究目的.....	1
(三)、文獻探討.....	1
(四)、研究方法.....	5
(五)、結果與討論.....	9
(六)、結論.....	11
四、參考文獻.....	12
五、科技部補助專題研究計畫成果報告自評表.....	17
六、附錄.....	18

一、中文摘要

(**關鍵詞:** 誘導性排卵週期、著床、訊息傳遞)

提昇胚胎的著床率一直是在人工協助生殖技術的治療中個不易解決的問題。這是由於胚胎要能成功的著床必須同時具備有著床能力的胚胎以及具有接受胚胎能力的子宮。而在胚胎與子宮間剛開始進行的交互作用中，有許多因數參與進而影響著床，但在訊息傳遞路徑的研究，尚未有完整且清楚的報導。因此瞭解胚胎著床的訊息傳遞路徑機制才能順利提高著床的成功率。有鑑於著床時期胚胎及子宮的訊息傳導路徑的變化尚未有完整的研究報導，若直接觀察人類的體內著床過程，因涉及倫理及懷孕過程的安全性等因素而不能進行，因此以動物的模式而不以人類胚胎及檢體觀察早期著床，可以更精確觀察到著床位置的分子訊息細微的變化。本研究將以小鼠胚胎及子宮經過卵巢刺激後訊息傳遞路徑的差異，以探討著床過程訊息傳遞機制之變化。本計劃以時定量核糖核酸晶片測試，分別觀察信號傳導轉錄啟動因數三、有絲分裂原啟動蛋白質激酶及細胞週期等數個訊號傳遞路徑的在著床時期的囊胚及子宮的變化。

二、英文摘要

(**Keyword :** ovarian stimulated cycles, implantation, signal transduction)

To improve the implantation rate is an important issue in the assisted reproductive technology. The successful implantation depends upon the implantation-competent blastocysts and the receptive uterus. This process is initiated via blastocyst-endometrium interaction and delicately regulated by multiple factors. There were not enough studies on the signal pathways at ovarian stimulated cycles. The mechanism and affected factors are still not clear now. There are ethic issues using human samples for implantation researches. We studied on the signal pathways to observe changes of gene expression at ovarian stimulated cycles. The advantage of the animal model in this study is easy to find implantation site for analyzing the change in microenvironment. There were relative rare studies on the signal pathways for embryo development at ovarian stimulated cycles. The objective of this study was to compare the expression profiles of genes involved in STAT3, MAPK, WNT and cell cycle among embryos produced by natural ovulation or hormonal superovulation. We analyzed gene expression of blastocysts and uterus tissues on implantation window on STAT3, MAPK, and cell cycle at ovarian stimulated cycles, respectively.

三、報告內容

(一)、前言

提昇胚胎的著床率一直是在人工協助生殖技術的治療中不易解決的問題。這是由於胚胎要能成功的著床必須同時具備有著床能力的胚胎以及具有接受胚胎能力的子宮。而在胚胎與子宮間剛開始進行的交互作用中，有許多因數參與進而影響著床。因此瞭解胚胎著床的機制才能順利提高著床的成功率。而選擇適當的著床時機及用藥是影響治療成敗重要的關鍵，釐清卵巢誘導週期胚胎及子宮的訊息傳導路徑的變化是瞭解著床機制的重要關鍵，但詳細的機轉及所影響的因數皆不清楚，如果可以清楚這些訊息傳導路徑在誘導週期的變化，便可具體提供臨床醫師面對著床失敗的患者一個新的治療的方向，增加著床成功的機會。

(二)、研究目的

卵巢誘導週期胚胎及子宮的訊息傳導路徑的變化尚未有完整的研究報導，若直接觀察人類的體內著床過程，因涉及倫理及懷孕過程的安全性等因素而不能進行，因此以動物體內及外培養的模式而不以人類胚胎及檢體觀察早期著床，可以更精確觀察到著床位置的分子訊息細微的變化。本研究以小鼠胚胎及子宮經過卵巢刺激後訊息傳遞路徑的改變，以深入瞭解著床過程訊息傳遞機制之變化。本計劃研究小鼠受超排刺激的胚胎及子宮內膜表現訊息傳遞路徑表現，並以及時定量 RNA 晶片測試，確定 STAT3, MAPK, WNT, 及細胞週期路徑的在著床時期的變化。

(三)、文獻探討

懷孕是一個複雜且不可逆的過程，包括受精、胚胎發育、著床、子宮內膜蛻膜化 (decidualization)、胎盤生成及胎兒順利娩出 (Carson et al., 2000; Wang and Dey, 2006)。提昇胚胎的著床率一直是在人工協助生殖技術的治療中不易解決的問題。這是由於胚胎要能成功的著床必須同時具備有著床能力的胚胎以及具有接受胚胎能力的子宮 (Dey et al., 2004)。而在胚胎與子宮間剛開始進行的交互作用中，有許多因數參與進而影響著床。因此瞭解胚胎著床的機制才能順利提高著床的成功率。

1. 胚胎著床過程子宮內膜容受性 (endometrial receptivity) 的改變子宮內膜容受性是指子宮內膜接受胚胎著床的能力，著床前子宮與胚胎同步發育，胚胎發育至囊胚時子宮轉變為可著床狀態，胚胎僅在一個極短的時間內有機會附著到子宮內膜上，這個時期稱為著床窗 (implantation window) (Dey et al., 2004)。子宮內膜容受性的建立機制十分複雜，有許多因素參與調節，這些因素包括：卵巢性

激素、胚胎品質及其分泌的胚胎性因數、子宮內膜局部分子表現等等(Simon et al., 2000; Riesewijk et al., 2003)。正常的著床狀態下，卵巢分泌的雌性激素週期性的調節子宮內膜容受性下，胚胎和子宮內膜局部週期性地表達容受性相關分子，從而促進容受性的建立(Ponnampalam et al., 2004, Talbi et al., 2005)。許多疾病可以影響子宮內膜容受性的建立，如黃體功能不全、內膜異位症、多囊卵巢症以及子宮內膜損傷性疾病等，因此瞭解影響子宮內膜容受性的分子機制及訊息傳遞路徑對臨床上不孕的治療和提高胚胎著床率是十分重要的。

2. 哺乳類動物胚胎著床之生理機制

著床時子宮的基質細胞(stroma cell)會因應囊胚或人工刺激，釋放組織胺(histamine)、前列腺素(prostaglandin)、白三烯(leukotrienes)及血小板活化素(platelet activating factor) (Kennaway et al., 2012)，使纖維母細胞轉化為蛻膜細胞，子宮內膜的蛻膜化在荷爾蒙的調節上主要是經由雌性素(estrogen)和黃體素(progesterone)誘發轉變而成的。在人類這種改變是由黃體激素(progesterone)所主導，始於月經黃體期後期。在小鼠，黃體素和雌性素可加強生殖道中胚胎著床前的發育(Winuthayanon et al., 2010; Franco et al., 2012)，著床窗口時期HOX (homeobox)基因、細胞動力素(cytokines)、抑鈣素(calcitonin)、及細胞黏黏分子等都是子宮內膜是否接受胚胎著床的重要生物標記(Cavagna et al., 2003 Daikoku et al., 2011.)，此外，著床前胚胎尚須要額外的旁泌因數及生長因數才能完全發育及分化(Boden et al., 2006; Kennaway et al., 2012)。小鼠子宮接受性和人類相似，僅在懷孕、假懷孕(pseudopregnancy)或適當給予黃體素或雌性素的有限時期發生(Wang and Dey., 2006; Sakoff and Murdoch, 1995)。當胚胎從輸卵管進入子宮，囊胚孵化後，胚胎滋養層細胞即自透明帶移行出來準備附著於子宮內膜上皮細胞。雖然對囊胚接觸子宮內膜的著床過程的調節機轉仍未完全明瞭，但有相當多的證據顯示胚胎藉著分子生物訊息的分泌與傳遞與母體之子宮內膜進行交互作用，亦有研究指出胚胎本身表面分泌 L-選擇素(L-selectin)，與子宮內膜的醣蛋白作用，產生強力黏著劑的作用，使胚胎著床(Genbacev et al., 2003)。

3. 著床期子宮內膜及胚胎的訊息傳遞路徑的作用

(1). 胚胎著床過程中信號傳導轉錄啟動因子 3(signal transducer and activator of transcription 3, STAT3)的調控作用 STATs 存在於細胞質中，接受到訊號時，會形成雙偶體運送至細胞核中，扮演轉錄因子之角色(Imada et al., 2000)。當細胞激素(cytokines)例如介白素(interleukin6, IL-6)、干擾素(Interferon)或是生長因數像是血小板成長因子(PDGF)和內皮細胞生長因數(epidermal growthfactor, EGF)等可以藉由與其接受器結合之方式，足以刺激下游 JAK-STAT 訊號之活化(Takaoka 2006)。這些受到活化的接受器進行構形上的改變並且吸引與此接受器相關之 JAKs 蛋白靠近。此時 JAK 蛋白間會互相的活化其酪氨酸接受器活化區並且提供一個 STATs 的結合區域。STATs 可以藉由辨認這一些特定區域並且利用蛋白上之 SH2 功能

區與這些接受器結合，使得下游訊號得以傳遞(Hebenstreit et al., 2005)。STAT3 在許多組織當中都會有表現，尤其是在移植胚胎時期後會有大量的增加，STAT3 剔除後，胚胎可以正常的發育至第 6.5 天，然而到約第 7.5 天時，中胚層尚未開始發育之際，胚胎便會快速的死亡(Liu et al., 1998)，在妊娠 D6-D8 以及人工誘導蛻膜化的蛻膜細胞中，磷酸化 STAT3 的表現量很高，STAT3 的磷酸化可能在小鼠胚胎著床和蛻膜化過程中具有重要作用(Teng et al., 2004)。利用組織專一剔除小鼠的實驗發現，當 STAT3 失去大部分的活性後，上皮細胞會凋亡，作用導致乳腺快速退化、皮膚組織重塑、角質細胞移行、巨噬細胞失去活性以及許多與 T-helper 細胞所相關的發炎反應及細胞激素均明顯的減少(Yu and Kim 2012; Murase et al., 2012 and Yuan et al., 2011)。

(2). 胚胎著床相關因數與 STAT3 對著床的影響

在小鼠懷孕第三天時，將具有細胞透性的 STAT3 磷酸化的抑制劑注入小鼠子宮腔後，會有意義的降低胚胎著床率(Catalano et al., 2005)。將抑制 STAT3 活性的寡聚核苷酸在著床前注入子宮腔，導致著床率顯著降低(Nakamura et al., 2006)。子宮中 STAT3 的磷酸化對於胚胎著床過程是至關重要的，所以經由 STAT3 訊息路徑傳導的因數皆有可能關鍵性的影響著床。目前已知 LIF 及 LIF 受體在著床前小鼠子宮的腺上皮中表達，LIF 基因剔除後胚胎不能著床 (Stewart et al., 1992)；在體外分離培養的子宮上皮中， LIF 能夠通過 LIF 受體使 STAT3 發生磷酸化並轉移到細胞核中表現其訊息。LIF 能夠誘導子宮中 STAT3 的磷酸化，若將 LIF 受體的其中一單體 gp130 上與 STAT 啟動相關的區域剔除後，STAT3 的磷酸化明顯下調，並且可導致胚胎著床完全失敗(Ernst et al., 2001)。我們先前的研究發現表皮生長因數會在胚胎的 LIF 表現量降低時代償表現維持胚胎的發育，並透過 STAT3 訊息傳遞路徑完成。Lo 等學者研究發現，表皮生長因數受體(epidermal growth factor recept; EGFR)可與 STAT3 可同結合在環氧合酶(Cyclooxygenase-2; COX-2) 協同啟動 COX-2 的啟動子上(Lo et al., 2010)。COX-2 也可以透過前列腺素 E2 (prostaglandin E2, PGE2)調節 STAT3 的活性，而 EGF 蛋白家族的 HB-EGF(Heparin binding epidermal growth factor) 也被研究發現會透過自泌及旁泌等方式調節胚胎的發育及著床時胚胎貼附的能力(Limet al., 2009)，亦有報告指出血管內皮增生因數(vascular endothelial growth factor; VEGF)能夠通過其受體增加人類微血管內皮細胞(HDMEC)或鼻咽癌細胞系 CNE1-LMP1 中 STAT3 的磷酸化，並促進內皮細胞的移動(Yahata et al., 2003; Wang et al., 2010)，著床過程中的血管通透性增加與 VEGF 在子宮中的高度表現相關，而 STAT3 與 VEGF 在子宮中交互作用還不清楚。此外，MicroRNA 21 (miRNA21) 21 上游增強子上具有兩個 STAT3 結合位點(Hu et al., 2008)，在胚胎著床時 STAT3 可能是 miR-21 的下游基因。詳細的機轉仍待進一步的研究。

(3) 其它影響著床的訊息傳遞路徑

MAPK pathway 在部份細胞中負責傳導增殖及分化的作用。在小鼠子宮和人類的內膜細胞研究發現，經由 MAPK 訊息傳遞路徑的 ERK1/2 (extracellular signal-regulated kinase 1/2) 在著床過程胎盤的蛻膜化作用扮演重要的角色(Lee et al., 2013)；而 Wnt4 訊息傳遞途徑則透過調節 LIF 及 progesterone、BMP4 等路徑來促進小鼠的蛻膜化作用 (Franco et al., 2011; VasquezandDeMayo 2013)，在著床過程中對於胎盤形成、血管新生及胚胎分化亦會經由 TGF 訊息傳遞路徑來進行(Jones et al., 2006)，而這些訊息傳遞路徑在胚胎著床過程的變化仍缺乏詳細的研究，需要更進一步的研究探討。

4. 卵巢誘導刺激造成內膜基因表現改變

試管嬰兒療程中會以藥物刺激卵巢進行超級排卵，以得到足夠的卵子及篩選品質優良的胚胎，但是早期的小鼠研究發現這種超級排卵的過程相較於自然排卵週期會抑制胚胎著床率(Fossum et al., 1989)；經卵巢刺激得到的小鼠囊胚之 E-cadherin, LIF 及 progesterone receptor 表現量皆比自然週期的囊胚表現量低 (Movaghar and Askarine 2012)。以體外受精輔助生殖技術進行羊及小鼠的研究，亦發現早期懷孕的過程胎盤及胚胎的發育與部份甲基化的基因群組(global methylation) 都呈現有統計意義的改變(Fortier et al., 2008; Delle et al., 2010; Grazul-Bilska et al., 2013)。在基因晶片的研究發現不論是小鼠或人類的自然週期及卵巢誘導週期的子宮內膜基因晶片呈現相當大量的基因表現差異 (Xiao et al., 2013; Haouzi et al., 2009., 2012)，Hsaouzi 等人(2009) 報導，性腺刺激激素(gonadotropin)作用週期的子宮內膜與自然週期的子宮內膜其中有許多轉錄基因表現量不同，例如 TGF 訊號、細胞週期及 leukocyte 移動等，但該類晶片以人類子宮內膜為檢體，受限於倫理考量，無法直接觀察體外受精的胚胎與卵巢誘導週期的子宮的交互作用及其著床時訊號傳遞路徑的變化，目前已發表的研究大多僅觀察到子宮增殖、營養素代謝等路徑的改變，無法得知卵巢誘導週期訊息傳遞路徑影響著床的真實狀況。早期胚胎著床失敗是造成不孕症的重要原因之一，成功的著床須要健康胚胎和子宮內膜緊密的進行交互作用。然而這種交互作用雖陸續有報導，但是訊息傳遞的網路及細節仍然不是十分清楚，一方面源自於著床本身涉及胚胎發育及子宮內膜因應著床變化複雜的過程。此外，人類不孕症如涉及試管嬰兒的療程，皆有卵巢藥物刺激以促進超級排卵及予以適當激素維持子宮內膜正常的發育，但也因為刺激卵巢藥物的作用而造成胚胎以及子宮內膜的基因表現改變，甚至可能進一步影響胚胎與子宮內膜的交互作用。因此有學者建議謹慎評估胚胎發育及自然或誘導週期植入子宮的接受性，以期有更好的胚胎著床率 (Al-Azawi et al., 2013)。但是採用冷凍胚胎配合不同的植入週期，胚胎與內膜基因的表現與交互作用到底如何？此種交互作用的訊息傳遞路徑仍不清楚，目前尚未有全面且完整的研究。此部份對臨床治療影響很重要，值得更進一步研究，以瞭解在真正胚胎著床過程中的訊息傳

遞變化，以提供臨床醫師進行試管嬰兒療程的參考。

(四)、研究方法

本計畫使用之動物實驗數量及方式，經中山醫學大學實驗動物照護及使用委員會審查同意。分別比較小鼠自然排卵週期與受超排刺激的新鮮囊胚與冷凍胚胎及子宮內膜表現的差異，並以及時定量RNA 晶片測試，確定訊息傳遞路徑及細胞週期路徑的在著床時期的變化。本年度將觀察JAK/STAT3 路徑、MAPK 路徑及訊號路徑、Wnt訊號路徑及細胞週期路徑，在超排刺激下對囊胚及子宮個別的影響。

(1). 胚胎部份：第一組為超排體內受精組，選擇週齡介於六至八週性成熟之雌鼠，以5 IU之PMSG 進行腹腔注射以促進濾泡成熟，44 小時後再注射5 IU之HCG以誘導排卵，注射5 IU之HCG後，立刻將一雌鼠與六至八週性成熟之雄鼠置入同一籠內讓其互相交配。隔天清晨觀察雌鼠是否有陰道塞，作為判斷交配與否之根據，交配成功之雌鼠則犧牲以取得原核期之鼠胚，此為第0.5 日的胚胎，繼續培養至囊胚(Fortier *et al.*, 2008 ; Nagy *et al.*, 2003 a)。第二、三組為超排體外受精組，選擇週齡介於六至八週性成熟之雌鼠，以5 IU 之PMSG 進行腹腔注射以促進濾泡成熟，44 小時後再注射5 IU 之HCG 以誘導排卵，隔天取出卵子，與同日取出之精蟲進行體外受精，第四組為自然受精後於第3.5 天沖洗子宮得到的之囊胚，待這四組胚胎成長至囊胚期，第一、二、四組分別萃取RNA，第三組囊胚，以玻璃化(vitrification)快速冷凍方式進行囊胚冷凍，因正常小鼠排卵週期約4至5日，故囊胚冷凍5日後解凍，培養至胚胎恢復為冷凍時之大，分別萃取RNA。RNA部份以反轉錄及時定量PCR 的方法，分別比較胚胎發育主要訊息傳遞路徑STAT3，MAPK，WNT及細胞週期路徑在自然與誘導卵巢週期的冷凍及解凍胚胎的差異。

(2). 子宮內膜部份分為自然週期組及藥物誘導兩組，選擇週齡介於六至八週性成熟之雌鼠，自然週期組每日定時進行小鼠陰道抹片，在動情期當日傍晚與輸精管結紮的公鼠進行交配，隔日清晨若有陰道栓塞，則定義為此為受精第0.5 日的子宮，採取受精後第2.5 及5.5日的內膜進行訊息傳遞路徑之研究，藥物誘導組則5 IU 之PMSG 進行腹腔注射以促進濾泡成熟，44 小時後再注射5 IU 之HCG 以誘導排卵，注射5 IU 之HCG 後，立刻與輸精管結紮的公鼠進行交配隔日清晨若有陰道栓塞，則定義為此為受精第0.5 日的子宮，採取受精後第2.5 及5.5 日的內膜進行訊息傳遞路徑之研究。所使用的方法如下述：

1. 小鼠胚胎之收集及培養：

收集小鼠胚胎之前須配製人類輸卵管液培養基 (Quinn 1995)，此培養基的成分為：NaCl 101.6 mM, KCl 4.69 mM, KH₂PO₄ 0.37 mM, MgSO₄·7H₂O 0.2

mM, Na Lactate 60 % syrup 21.4 mM, Na pyruvate 0.33 mM, Glucose 2.78 mM, NaHCO₃ 2.78 mM, CaCl₂·2H₂O 2.04 mM, penicillin-G streptomycin 2000 IU/l, phenol red 1%, 取胚前一天, 將人類輸卵管液培養基以 20μl 為一滴, 滴於 35-mm 培養皿中, 再覆蓋礦物油於培養基上, 置於 37°C, 5%二氧化碳培養箱中過夜, 調整酸鹼值待用。

將懷孕母鼠以頸椎脫臼法犧牲, 即一手置於母鼠之頸部處固定, 另一手抓住尾巴往後拉, 使頸椎脫臼。接著解剖母鼠取出其輸卵管, 先用酒精噴灑於母鼠之腹部, 以外科剪刀在腹部剪一小洞, 用手將其皮膚向外拉扯, 直至露出腹部肌膜, 剪開腹膜, 將生殖道拉出剪下輸卵管, 放入人類輸卵管液培養基液滴中, 將接裝有人類輸卵管液培養基注射針筒之磨鈍的30G注射針刺入繖部的洞口以眼科鑷子夾緊注射針與繖部, 緩緩將人類輸卵管液培養基注射入輸卵管中收集單一細胞期胚胎, 在解剖顯微鏡下以吸管收集鼠胚後, 放入回溫之玻尿酸酶內數分鐘以去除卵丘細胞 (cumulus cells)。等卵丘細胞開始脫落擴散時, 即可以玻璃毛細管吸吐受精卵數次, 以去除包被於鼠胚外之卵丘細胞, 再以人類輸卵管液培養基清洗受精卵後, 將胚胎放入事先準備好已調整酸鹼值及溫度並覆蓋礦物油之人類輸卵管液培養液中, 置入培養箱內培養, 每天觀察、記錄胚胎生長狀況。當胚胎長到囊胚早期時細胞期時置換於添加30% fetal bovine serum, 0.9 nmol/L E2, 63.5 nmol/L Progesterone, 100 mg/mL insulin 的Dulbecco's modified eagle medium/F12 (DMEM/F12) 培養液的小鼠體外著床系統。

2. 公鼠輸精管結紮 (Nagy et al., 2003 b) :

由於進行胚胎移置 (embryo transfer) 前受胚母鼠需處於假懷孕 (pseudopregnancy) 狀態, 使子宮環境處於適合胚胎發育之階段, 故需以經輸精管結紮之公鼠與母鼠交配, 挑選八週齡以上配種能力強之公鼠, 本研究以 ICR 公鼠進行輸精管結紮, 公鼠於術後兩週即可用於配種。本實驗採用之麻醉劑為戊巴比妥鹽, 注射小鼠的劑量為100mg/kg, 使用前秤10 mg直接溶於1 ml 之生理食鹽水中備用, 此種麻醉劑注射小鼠依體重每10克以0.1 ml 注射公鼠。注射時以手指抓緊小鼠背頸部皮膚以固定之, 以1 ml 之針筒、27G針頭吸取藥劑, 於下腹一側鼠蹊部將針頭穿刺入腹腔中, 避免針頭刺到膀胱等臟器, 緩緩將藥劑注入腹腔內, 並於針頭抽出前停留一會以避免藥劑隨針頭抽出而流出體外。公鼠結紮乃以手術方式進行, 手術前應以濕熱方式將手術器械滅菌 (autoclave), 將公鼠秤重並依體重注射麻醉劑至腹腔中, 接著將公鼠平置於手術墊布、腹部朝上, 以75%酒精消毒腹部, 以剪刀於腹部皮層及肌肉層切開一個約1.5公分之傷口, 接著於腹腔壁附近尋找連接睪丸及輸精管之脂肪塊 (fat pad), 並以鑷子小心將其拖出體外, 以眼科夾固定部分輸精管後, 以酒精燈燒紅之鑷子夾斷並移除一小斷輸精管, 將結紮完成之輸精管連同睪丸及脂肪塊小心置回腹腔中, 再以相同之步驟處理另一側之輸精管。完成結紮後, 以手術

針線分別將肌肉層及皮層縫合，將術後小鼠移至籠中待其恢復後再移回動物房，手術後兩週之輸精管結紮小鼠即可開始用於配種。

3. 胚胎冷凍及解凍：

將配置的100%急速冷凍保護溶液（包含20%乙二醇, 20%雙甲基磺氧化物及0.5 M蔗糖）以人類輸卵管液稀釋為50%急速冷凍保護溶液，並分別備製於4細胞格培養盤（4-well plate）並予以標示。胚胎於步驟50%及100%冷凍保護溶液別處理2分鐘及30秒後，將胚胎吸至含有100%急速冷凍保護溶液的冷凍微管中，直接置入溫度為小於196°C的液態氮中。急速玻璃化冷凍法解凍過程中，須事先製備解凍溶液包括0.25M及0.125M蔗糖溶液，將胚胎分別放置於4-well plate中，再以37°C培養箱平衡後使用，囊胚解凍後存活且於大約1~2小時，會再回復為解凍前之囊胚狀態。

4. 小鼠之體外受精：

性成熟之雌性母鼠，注射性腺激素5 IU後44至48小時注射人類絨毛膜激性腺素5 IU，取卵前一天，將人類輸卵管液培養基以15ul一滴，滴於35-mm培養皿中，再覆蓋礦物油於培養基上，置於37°C，5%二氧化碳培養箱中過夜，以調整酸鹼值待用。將小鼠以頸椎脫臼法犧牲，迅速分離副睪和輸精管，盡可能去除脂肪和結締組織，置於精子培養皿中。在副睪切一小口，擠出精子。培養箱中靜置半小時。觀察精子活力並計數，加入受精皿（終濃度為每ml約1-2百萬精子），解剖母鼠取出其輸卵管，先用酒精噴灑於母鼠之腹部，以外科剪刀在腹部剪一小洞，用手將其皮膚向外拉扯，直至露出腹部肌膜，剪開腹膜，將生殖道拉出剪下輸卵管，放入人類輸卵管液培養基液滴中。撕開壺腹部，使卵子團流出。用微吸管將卵子移至受精皿，培養箱中靜置4小時，觀察原核及第二極體，將受精卵移入發育培養皿，當胚胎長到囊胚期時萃取RNA。

5. 小鼠囊胚及子宮內膜之及時定量 quantitative RNA array：

為了可以大量完整的比較訊息傳遞路徑的變化，本計畫在各路徑的表現將選用及時定量RNA array的方法觀察各路徑基因的表現。

(1) RNA之萃取

考慮到囊胚細胞數較少故先將胚胎細胞去除培養基後，放到Trizol中phase separate，然後再轉到RNAeasy mini kit，並且用2次On-Column RNase-free DNase I處理。RNAeasy mini kit抽取囊胚之RNA，加入350µl的Buffer RLT，震盪混勻；將液體移入到2ml的收集管內，全速離心2min；加入一倍體積的70%乙醇混勻；移出700µl混合物到RNAeasy column，小心蓋上蓋子，10000rpm離心15s，倒掉收集管內的液體；加入700µl的Buffer RW1，小心蓋上蓋子，10000rpm離心15s，倒掉收集管內的液體；加入500µl Buffer RPE小心蓋上蓋子，10000rpm離心15s，倒掉收集管內的液體；加入500µl Buffer RPE小心蓋上蓋子，10000rpm離心2min；

將column移入到一個新的2ml收集管內，蓋上蓋子，全速離心1min；將column移入到一個新的1.5ml離心管內，column中加入30µl的Rnase-free water，小心蓋上蓋子，10000rpm離心1min；將收集管內收集到的液體再次移入column，10000rpm離心1min，收集到的液體即為RNA。為了增加RNA的品質，再用2次On-Column RNase-Free DNase I處理。純化後的RNA保存於-70°C。

子宮部份之RNA則將小鼠犧牲後，剪下子宮並刮取內膜組織，置入1.5ml離心管，加入1ml Trizol以均質機研磨，研磨完後以RNAeasy mini kit抽取RNA。

(2) RNA的反轉錄

使用RT² Nano PreAMP cDNA Synthesis Kit合成first-strand cDNA，加入Total RNAs (25ng) 與Buffer GE 2 µl加RNase-free water補到總體積10 µl。42°C反應5分鐘，接著放在冰上至少1分鐘。加入10µl Reverse-transcription mix (4 µl 5X buffer BC3、1µl control P2、µl cDNA synthesis enzyme mix、1µl RNase inhibitor、3µl RNase-free water) 上下輕微混勻，first-strand cDNA的反轉錄在42°C進行15分鐘，然後馬上放在95°C保持5分鐘中斷反應，保存於-20°C。

(3) PCR array

以96孔盤PCR array觀察JAK/STAT3路徑、MAPK訊號路徑及細胞週期路徑 SABiosciences PCR array，以Real-time quantification PCR進行PCR array。收取每次實驗數據，彙整後分析結果。各路徑表列於下：

(a) 根據已發表JAK/STAT3訊號路徑，摘取有表現的基因縮寫列於下表，使用96孔盤之SABiosciences Mouse JAK / STAT Signaling Pathway PCR Array，其中RTC及PPC為control組。

A2m	Akt1	Bcl2l1	Ccnd1	Cdkn1a	Cebpb	Cebpd	Crk	Crp	Csf1r	Cxcl9	Egfr
Epor	F2	Fas	Fcer2a	Fcgr1	Gata3	Gbp2b	Ghr	Ifnar1	Ifng	Ifngr1	Il10ra
Il10rb	Il20	Il2ra	Il2rg	Il4	Il4ra	Il6st	Insr	Irf1	Irf9	Isg15	Jak1
Jak2	Jak3	Jun	Junb	Lrg1	Mcl1	Mpl	Myc	Nfkb1	Nos2	Nr3c1	Oas1a
Osm	Pdgfra	Pias1	Pias2	Prl	Prlr	Ptpn1	Ptpn11	Ptprc	Spi1	Sh2b1	Sh2b2
Smad1	Smad2	Smad3	Smad4	Smad5	Socs1	Socs2	Socs3	Socs4	Socs5	Sp1	Src
Stam	Stat1	Stat2	Stat3	Stat4	Stat5a	Stat5b	Stat6	Stub1	Tyk2	Usf1	Yy1
Actb	B2m	Gapdh	Gusb	Hsp90ab1	MGDC	RTC	RTC	RTC	PPC	PPC	PPC

(b) 根據已發表MAPK訊號路徑，摘取有表現的基因縮寫列於下表，使用96孔盤之SABiosciences MAP Kinase Signaling Pathway PCR Array，其中RTC及PPC為control組。

Araf	Atf2	Cena1	Cena2	Ccnb1	Ccnb2	Ccnd1	Ccnd2	Ccnd3	Ccne1	Cdc42	Cdk2
Cdk4	Cdk6	Cdkn1a	Cdkn1b	Cdkn1c	Cdkn2a	Cdkn2b	Cdkn2c	Cdkn2d	Chuk	Col1a1	Creb1
Crebbp	Dlk1	E2f1	Egfr	Egr1	Elk1	Ets1	Ets2	Fos	Grb2	Hras1	Hspa5
Hspb1	Jun	Kcnn1	Kras	Ksr1	Lamtor3	Map2k1	Map2k2	Map2k3	Map2k4	Map2k5	Map2k6

Map2k7	Map3k1	Map3k2	Map3k3	Map3k4	Map4k1	Mapk1	Mapk10	Mapk11	Mapk12	Mapk13	Mapk14
Mapk3	Mapk6	Mapk7	Mapk8	Mapk8ip1	Mapk8ip2	Mapk8ip3	Mapk9	Mapkapk2	Mapkapk5	Max	Mef2c
Mknk1	Mos	Myc	Nfatc4	Nras	Pak1	Rac1	Raf1	Rb1	Sfn	Smad4	Trp53
Actb	B2m	Gapdh	Gusb	Hsp90ab1	MGDC	RTC	RTC	RTC	PPC	PPC	PPC

(c) 根據已發表Wnt訊號路徑，摘取有表現的基因縮寫列於下表，使用96孔盤之SABiosciencesMouse WNT Signaling Pathway PCR Array，其中RTC及PPC為control組。

Aes	Apc	Axin1	Axin2	Bcl9	Btrc	Ccnd1	Ccnd2	Csnk1a1	Csnk2a1	Ctbp1	Ctnnb1
Ctnnbip1	Daam1	Dab2	Dixdc1	Dkk1	Dkk3	Dvl1	Dvl2	Ep300	Fbxw11	Fbxw4	Fgf4
Fos1	Foxn1	Frat1	Frzb	Fzd1	Fzd2	Fzd3	Fzd4	Fzd5	Fzd6	Fzd7	Fzd8
Fzd9	Gsk3b	Jun	Kremen1	Lef1	Lrp5	Lrp6	Mapk8	Mmp7	Myc	Nfatc1	Nkd1
Nlk	Pitx2	Porcn	Ppard	Prickle1	Pygo1	Rhoa	Rhou	Ruvbl1	Sfrp1	Sfrp2	Sfrp4
Sox17	Tcf7	Tcf7l1	Tle1	Vangl2	Wif1	Wisp1	Wnt1	Wnt10a	Wnt11	Wnt16	Wnt2
Wnt2b	Wnt3	Wnt3a	Wnt4	Wnt5a	Wnt5b	Wnt6	Wnt7a	Wnt7b	Wnt8a	Wnt8b	Wnt9a
Actb	B2m	Gapdh	Gusb	Hsp90ab1	MGDC	RTC	RTC	RTC	PPC	PPC	PPC

(d) 根據已發表細胞週期路徑，摘取有表現的基因縮寫列於下表，使用96孔盤之SABiosciences Mouse Cell Cycle PCR Array，其中RTC及PPC為control組。

Ab11	Atm	Atr	Aurka	Aurkb	Bcl2	Birc5	Brca1	Brca2	Casp3	Ccna1	Ccna2
Ccnb1	Ccnb2	Cenc	Ccnd1	Ccnd2	Ccnd3	Ccne1	Ccnf	Cdc20	Cdc25a	Cdc25c	Cdc6
Cdc7	Cdk1	Cdk2	Cdk4	Cdk5rap1	Cdk6	Cdkn1a	Cdkn1b	Cdkn2a	Cdkn2b	Cdkn3	Chek1
Chek2	Cks1b	Ddit3	Dst	E2f1	E2f2	E2f3	E2f4	Gadd45a	Gpr132	Hus1	Itgb1
Mad2l1	Mcm2	Mcm3	Mcm4	Mdm2	Mki67	Mre11a	Msh2	Myb	Nbn	Nek2	Notch2
Pkd1	Pmp22	Ppm1d	Rad17	Rad21	Rad51	Rad9a	Ran	Rb1	Rbl1	Rbl2	Sfn
Shc1	Skp2	Slfn1	Smc1a	Stag1	Stmn1	Terf1	Tfdp1	Trp53	Trp63	Tsg101	Wee1
Actb	B2m	Gapdh	Gusb	Hsp90ab1	MGDC	RTC	RTC	RTC	PPC	PPC	PPC

(五)、結果與討論

1. 早期的小鼠研究發現這種超級排卵的過程相較於自然排卵週期會抑制胚胎著床率；但是這種影響是由哪些因子調控及哪些基因表現受到影響還不是很清楚。我們的 PCR Array 的研究結果發現小鼠的卵巢誘導週期及自然週期的囊胚呈現大量的基因表現差異。我們觀察 JAK/STAT3 路徑、MAPK 路徑及訊號路徑、WNT 訊號路徑及細胞週期路徑，在超排刺激下對囊胚及子宮個別的影響。每個訊息路徑各檢測 89 個基因，共 356 個基因。比較超排刺激後的基因表現量變化，發現有 180 個基因表現量有差異。其中有 104 個基因表現量

上升 (≥ 3 倍), 有 76 個基因表現量下降 (≤ 3 倍) (Tab.1).

- (1) 比較超排刺激與自然週期的囊胚細胞週期路徑基因表現變化, 有 39 個基因表現量上升 (≥ 3 倍), 有 10 個基因表現量下降 (≤ 3 倍) (Tab.1)。Cdk4、Casp3、Sfn、Rb1、E2F 等基因表現量明顯上升, Hus1、Ccnd1、Ccnd2 等基因表現量下降; Cdk4 是調控細胞週期 G1 期至 S 期很重要的基因, Cdk4 與 Ccnd1 形成聚合物之後磷酸化並抑制 Rb 基因, 隨後 E2F 因子被釋放並活化下游之細胞增生基因表現。另外, Hus1 參與細胞週期 G2 期至 M 期, 為 DNA damage repair 很重要的基因; 因此超排刺激囊胚可能會使囊胚細胞週期傾向大量增生階段, 但是細胞損傷修復功能會受到抑制。
 - (2) 比較超排刺激與自然週期的囊胚的 JAK/STAT3 路徑基因表現變化, 有 7 個基因表現量上升 (≥ 3 倍), 有 28 個基因表現量下降 (≤ 3 倍) (Tab.1)。Stat5 基因表現量上升, IL-6、Jak1/2/3、Stat3 等基因表現量下降 (Fig.1)。Stat5 受 JAK kinase 活化並參與調控胚胎著床前的發育 (Makoto Nakasato et al.2006); Jak1/2/3、Stat3 表現量下降進而影響囊胚的 ICM lineage (Do et al. 2013)。
 - (3) 比較超排刺激與自然週期的囊胚的 MAPK 路徑基因表現變化, 有 49 個基因表現量上升 (≥ 3 倍), 有 18 個基因表現量下降 (≤ 3 倍) (Tab.1)。Ras、Raf、Mek1/2/3、Erk1/2、Jnk1/2/3 表現量上升, 表示超排刺激可能使囊胚細胞傾向增生及分化, 同時細胞凋亡 (apoptosis) 也增加 (Fig.1)。
 - (4) 比較超排刺激與自然週期的囊胚的 WNT 路徑基因表現變化, 有 9 個基因表現量上升 (≥ 3 倍), 有 20 個基因表現量下降 (≤ 3 倍) (Tab.1)。Wnt2、Wnt4、Wnt16、Fzd2/6、Ruvbl1 等基因表現量下降 (Fig.1), 在早期研究發現在 WNT 路徑主要影響子宮發育、內膜褪膜化及胚胎著床, 而由我們的結果發現在超排刺激下, 囊胚的 WNT 路徑也會受到抑制, 也許這也是超級排卵抑制著床率的原因之一。
2. 子宮內膜部份分為超排刺激及自然週期組兩組, 採取受精後第 2.5 及 5.5 日的內膜進行訊息傳遞路徑之研究, 第 2.5 日的內膜在超排刺激後與自然週期比較有明顯差異, 第 5.5 日的內膜表現量差異不明顯。觀察 JAK/STAT3 路徑、MAPK 路徑及訊號路徑、WNT 訊號路徑及細胞週期路徑, 每個訊息路徑各檢測 89 個基因, 共 356 個基因。比較超排刺激後的基因表現量變化, 發現第 2.5 日的內膜有 53 個基因表現量有差異。其中有 45 個基因表現量上升 (≥ 3 倍), 有 8 個基因表現量下降 (≤ 3 倍) (Tab.2)。超排刺激與自然週期的第 2.5 日內膜之細胞週期路徑及 MAPK 基因表現變化不明顯。在超排刺激與自然週期的第 2.5 日內膜的 JAK/STAT3 路徑基因表現變化, 發現 STAT1、STAT2 及 IRFs 等與抗病毒免疫反應之基因表現量上升。比較在超排刺激與自然週期的第 2.5 日內膜的 WNT 路徑基因表現量變化, 發現 Wif1、Wnt1 等表現量上升, Lef1、Wnt4、Wnt7a、Wnt11、Wnt16、Sox17 等基因表現量下降。因此超排

刺激內膜可能使 Wif1 增加並抑制 Wnt4、Wnt7a 基因，進而影響子宮內膜褪膜化及胚胎著床。

3. 根據之前研究 (Loutradi et al. 2008; M.G. Larman et al. 2011) 發現囊胚以快速冷凍方式能得到比慢速冷凍 (slow freezing) 較好的懷孕率，所以本實驗以玻璃化(vitrification)快速冷凍方式進行囊胚冷凍，比較誘導卵巢週期的冷凍及新鮮囊胚的差異，觀察胚胎發育主要訊息傳遞路徑 STAT3, MAPK, WNT 及細胞週期路徑的基因表現變化。每個訊息路徑各檢測 89 個基因，共 356 個基因，其中有 132 個基因表現量有差異。其中有 66 個基因表現量上升 (≥ 3 倍)，有 66 個基因表現量下降 (≤ 3 倍) (Tab.3)。

(1) 比較冷凍及新鮮囊胚細胞週期路徑基因表現變化，有 45 個基因表現量上升 (≥ 3 倍)，有 4 個基因表現量下降 (≤ 3 倍) (Tab.3)。Chek1、Cdk4、Sfn、Mdm2、Tsg101 等基因表現量明顯上升；Chek1 及 Tsg101 為參與細胞週期調控點(cell cycle checkpoint)與修復 DNA 損傷(DNA damage repair)重要基因，Sfn 及 Mdm2 引發細胞週期終止及細胞凋亡；因此冷凍囊胚可能會使囊胚細胞週期啟動細胞損傷修復功能及部分細胞有凋亡現象。

(2) 比較冷凍及新鮮囊胚的 JAK/STAT3 路徑基因表現變化，有 6 個基因表現量上升 (≥ 3 倍)，有 3 個基因表現量下降 (≤ 3 倍) (Tab.3)。JAK/STAT3 路徑基因表現變化不明顯。

(3) 比較冷凍及新鮮囊胚的 MAPK 路徑基因表現變化，有 11 個基因表現量上升 (≥ 3 倍)，有 19 個基因表現量下降 (≤ 3 倍) (Tab.3)。Ras、Raf、EGFR 等促使細胞增生及分化基因表現量上升，其中 MAPK14、MKK6 等細胞凋亡相關基因也被啟動。

(4) 比較冷凍及新鮮囊胚的 WNT 路徑基因表現變化，有 4 個基因表現量上升 (≥ 3 倍)，有 40 個基因表現量下降 (≤ 3 倍) (Tab.3)。Wnt3a、Wnt4、Wnt6、Wnt7、Fzd1/3/7/9、Ruvbl1 等基因表現量下降(Fig.2)，由我們的結果發現冷凍囊胚的 WNT 路徑也會受到抑制，而 WNT 路徑和子宮發育、內膜褪膜化及胚胎著床相關，因此推測冷凍囊胚可能也會影響胚胎著床。

(六)、結論

我們的 PCR Array 的研究結果發現小鼠的卵巢誘導週期及自然週期的囊胚呈現大量的基因表現差異。超排刺激囊胚可能會使囊胚傾向大量增生階段，但是細胞損傷修復功能會受到抑制，囊胚的 ICM lineage、細胞凋亡 (apoptosis)、子宮內膜褪膜化及胚胎著床也會受到影響。另外，比較快速冷凍及新鮮的囊胚，也發現冷凍囊胚的細胞凋亡增加而且胚胎著床相關基因也受到抑制。使用荷爾蒙刺激超排卵似乎對於胚胎發育及著床有些負面的作用，因此應謹慎

評估胚胎發育及自然或誘導週期植入子宮的接受性，以期有更好的胚胎著床率。

四、參考文獻

- Al-Azawi T, Tavukcuoglu S, Khaki AA, Al-Hasani S. Can we improve implantation by cancellation of fresh embryo transfer? Middle East Fertility Society Journal. 2013, 18: 9–12
- Boden MJ, Kennaway DJ. Circadian rhythms and reproduction. *Reproduction* 2006; 132: 379-392.
- Catalano RD, Johnson MH, Campbell EA, Charnock-Jones DS, Smith SK, Sharkey AM. Inhibition of Stat3 activation in the endometrium prevents implantation: a nonsteroidal approach to contraception. *Proc Natl AcadSci U S A* 2005; 102: 8585-8590.
- Cavagna M, Mantese JC. Biomarkers of endometrial receptivity--a review. *Placenta* 2003; 24 Suppl B: S39-S47.
- Daikoku T, Cha J, Sun X, Tranguch S, Xie H, Fujita T, Hirota Y, Lydon J, DeMayo F, Maxson R, Dey SK. Conditional deletion of Msx homeobox genes in the uterus inhibits blastocyst implantation by altering uterine receptivity. *Dev Cell* 2011; 21: 1014-1025.
- Delle PL, Lin W, Liu X, Donjacour A, Minasi P, Revelli A, Maltepe E, Rinaudo PF. Effect of the method of conception and embryo transfer procedure on mid-gestation placenta and fetal development in an IVF mouse model. *Hum Reprod* 2010; 25: 2039-2046.
- Dey SK, Lim H, Das SK, Reese J, Paria BC, Daikoku T, Wang H. Molecular cues to implantation. *Endocr Rev* 2004; 25:341-73.
- Dang Vinh Do, Jun Ueda Daniel M, Messerschmidt, Chanchao Lorthongpanich, Yi Zhou, Bo Feng, Guoji Guo, Peiyu J. Lin, Md Zakir Hossain, Wenjun Zhang⁵, Akira Moh, Qiang Wu, Paul Robson, Huck Hui Ng⁴, Lorenz Poellinger, Barbara B. Knowles, Davor Solter and Xin-Yuan Fu. A genetic and developmental pathway from STAT3 to the OCT4–NANOG circuit is essential for maintenance of ICM lineages in vivo. *Genes & Dev.* 2013. 27: 1378-1390.
- Ernst M, Inglese M, Waring P, Campbell IK, Bao S, Clay FJ, Alexander WS, Wicks IP, Tarlinton DM, Novak U, Heath JK, Dunn AR. Defective gp130-mediated signal transducer and activator of transcription (STAT) signaling results in degenerative joint disease, gastrointestinal ulceration, and failure of uterine implantation. *J Exp Med* 2001; 194: 189-203.

- Fortier AL, Lopes FL, Darricarrere N, Martel J, Trasler JM. Superovulation alters the expression of imprinted genes in the midgestation mouse placenta. *Hum Mol Genet* 2008; 17: 1653-1665.
- Fossum GT, Davidson A, Paulson RJ. Ovarian hyperstimulation inhibits embryo implantation in the mouse. *J In Vitro Fert Embryo Transf* 1989; 6: 7-10.
- Franco HL, Dai D, Lee KY, Rubel CA, Roop D, Boerboom D, Jeong JW, Lydon JP, Bagchi IC, Bagchi MK, DeMayo FJ. WNT4 is a key regulator of normal postnatal uterine development and progesterone signaling during embryo implantation and decidualization in the mouse. *FASEB J* 2011; 25: 1176-1187.
- Franco HL, Rubel CA, Large MJ, Wetendorf M, Fernandez-Valdivia R, Jeong JW, Spencer TE, Behringer RR, Lydon JP, Demayo FJ. Epithelial progesterone receptor exhibits pleiotropic roles in uterine development and function. *FASEB J* 2012; 26: 1218-1227.
- Garamszegi N, Garamszegi SP, Shehadeh LA, Scully SP. Extracellular matrix-induced gene expression in human breast cancer cells. *Mol Cancer Res* 2009; 7: 319-329.
- Genbacev OD, Prakobphol A, Foulk RA, Krtolica AR, Ilic D, Singer MS, Yang ZQ, Kiessling LL, Rosen SD, Fisher SJ. Trophoblast L-selectin-mediated adhesion at the maternal-fetal interface. *Science* 2003; 299:405-408.
- Gonzalez RR, Devoto L, Campana A, Bischof P. Effects of leptin, interleukin-1 alpha, interleukin-6, and transforming growth factor-beta on markers of trophoblast invasive phenotype: integrins and metalloproteinases. *Endocrine* 2001; 15: 157-164.
- Grazul-Bilska AT, Johnson ML, Borowicz PP, Baranko L, Redmer DA, Reynolds LP. Placental development during early pregnancy in sheep: effects of embryo origin on fetal and placental growth and global methylation. *Theriogenology* 2013; 79: 94-102.
- Haouzi D, Assou S, Mahmoud K, Tondeur S, Rème T, Hedon B, De Vos J, Hamamah S. Gene expression profile of human endometrial receptivity: comparison between natural and stimulated cycles for the same patients. *Hum Reprod.* 2009; 24:1436-1445.
- Haouzi D, Dechaud H, Assou S, De Vos J, Hamamah S. Insights into human endometrial receptivity from transcriptomic and proteomic data. *Reprod Biomed Online.* 2012 ;24 :23-34.
- Hebenstreit D, Horejs-Hoeck J, Duschl A. JAK/STAT-dependent gene regulation by cytokines. *Drug News Perspect* 2005; 18: 243-249.
- Imada K, Leonard WJ. The Jak-STAT pathway. *Mol Immunol* 2000; 37: 1-11. Jones RL, Stoikos C, Findlay JK, Salamonsen LA. TGF-beta superfamily expression and actions in the endometrium and placenta. *Reproduction* 2006; 132: 217-232.

- Kennaway DJ, Boden MJ, Varcoe TJ. Circadian rhythms and fertility. *Mol Cell Endocrinol* 2012; 349: 56-61.
- Lee CH, Kim TH, Lee JH, Oh SJ, Yoo JY, Kwon HS, Kim YI, Ferguson SD, Ahn JY, Ku BJ, Fazleabas AT, Lim JM, Jeong JW. Extracellular signal-regulated kinase 1/2 signaling pathway is required for endometrial decidualization in mice and human. *PLoS One* 2013; 8: e75282.
- Lim HJ, Dey SK. HB-EGF: a unique mediator of embryo-uterine interactions during implantation. *Exp Cell Res* 2009; 315: 619-626.
- Liu KD, Gaffen SL, Goldsmith MA. JAK/STAT signaling by cytokine receptors. *Curr Opin Immunol* 1998;10: 271-278.
- Lo HW, Cao X, Zhu H, Ali-Osman F. Cyclooxygenase-2 is a novel transcriptional target of the nuclear EGFR-STAT3 and EGFRvIII-STAT3 signaling axes. *Mol Cancer Res* 2010; 8: 232-245.
- Loutradi KE, Kolibianakis EM, Venetis CA, Papanikolaou EG, Pados G, Bontis I, Tarlatzis BC. Cryopreservation of human embryos by vitrification or slow freezing: a systematic review and meta-analysis. *Fertil Steril* 2008;90:186–193.
- Martel D, Monier MN, Roche D, Psychoyos A. Hormonal dependence of pinopode formation at the uterine luminal surface. *Hum Reprod* 1991; 6: 597-603.
- Menkhorst E, Salamonsen L, Robb L, Dimitriadis E. IL11 antagonist inhibits uterine stromal differentiation, causing pregnancy failure in mice. *Biol Reprod* 2009; 80: 920-927.
- Makoto Nakasato, Yoshiyuki Shirakura, Masatoshi Ooga, Masato Iwatsuki, Masahiko Ito, Shun-ichiro Kageyama, Senkiti Sakai, Masao Nagata and Fugaku Aoki, Involvement of the STAT5 Signaling Pathway in the Regulation of Mouse Preimplantation Development. *Biology of Reproduction* October 1, 2006 vol. 75 no. 4 508-517
- Movaghar B, Askarian S. Expression of e-cadherin, leukemia inhibitory factor and progesterone receptor in mouse blastocysts after ovarian stimulation. *Cell J* 2012; 14: 225-230.
- Murase S, Kim E, Lin L, Hoffman DA, McKay RD. Loss of signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) signaling during elevated activity causes vulnerability in hippocampal neurons. *J Neurosci* 2012;32: 15511-15520.
- Nagy, A., Gertsenstein, M., Vintersten, K. and Behringer, R. *Manipulating the Mouse Embryo: A Laboratory Manual*, 3rd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2003a, pp. 188-200.
- Nagy, A., Gertsenstein, M., Vintersten, K. and Behringer, R. *Manipulating the Mouse Embryo: A Laboratory Manual*, 3rd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2003b, pp. 251-260.

- Nakamura H, Kimura T, Koyama S, Ogita K, Tsutsui T, Shimoya K, Taniguchi T, Koyama M, Kaneda Y, Murata Y. Mouse model of human infertility: transient and local inhibition of endometrial STAT-3 activation results in implantation failure. *FEBS Lett* 2006; 580: 2717-2722.
- Ponnampalam AP, Weston GC, Trajstman AC, Susil B, Rogers PA. Molecular classification of human endometrial cycle stages by transcriptional profiling. *Mol Hum Reprod* 2004; 10: 879-893.
- Quinn P. Enhanced results in mouse and human embryo culture using a modified human tubal fluid medium lacking glucose and phosphate. *J. Assist. Reprod. Genet.* 12: 97-105, 1995.
- Riesewijk A, Martin J, van Os R, Horcajadas JA, Polman J, Pellicer A, Mosselman S, Simon C. Gene expression profiling of human endometrial receptivity on days LH+2 versus LH+7 by microarray technology. *Mol Hum Reprod* 2003; 9: 253-264.
- Sakoff JA, Murdoch RN. Uterine receptivity to the artificial decidual agent, concanavalin A, in pseudopregnant QS mice. *Reprod Fertil Dev* 1995; 7: 1095-1100.
- Simon C, Martin JC, Pellicer A. Paracrine regulators of implantation. *Baillieres Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 2000; 14: 815-826.
- Stewart CL, Kaspar P, Brunet LJ, Bhatt H, Gadi I, Kontgen F, Abbondanzo SJ. Blastocyst implantation depends on maternal expression of leukemia-inhibitory factor. *Nature* 1992; 359: 76-79.
- Talbi S, Hamilton AE, Vo KC, Tulac S, Overgaard MT, Dosiou C, Le Shay N, Nezhat CN, Kempson R, Lessey BA, Nayak NR, Giudice LC. Molecular phenotyping of human endometrium distinguishes menstrual cycle phases and underlying biological processes in normo-ovulatory women. *Endocrinology* 2006; 147: 1097-1121.
- Teng CB, Diao HL, Ma XH, Xu LB, Yang ZM. Differential expression and activation of Stat3 during mouse embryo implantation and decidualization. *Mol Reprod Dev* 2004; 69: 1-10.
- Wang H, Dey SK. Roadmap to embryo implantation: clues from mouse models. *Nat Rev Genet* 2006; 7: 185-199.
- Wang Z, Luo F, Li L, Yang L, Hu D, Ma X, Lu Z, Sun L, Cao Y. STAT3 activation induced by Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 causes vascular endothelial growth factor expression and cellular invasiveness via JAK3 and ERK signaling. *Eur J Cancer* 2010; 46: 2996-3006.
- Winuthayanon W, Hewitt SC, Orvis GD, Behringer RR, Korach KS. Uterine epithelial estrogen receptor alpha is dispensable for proliferation but essential for complete biological and biochemical responses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010; 107: 19272-19277.

- Xiao S, Diao H, Zhao F, Li R, He N, Ye X . Differential Gene Expression Profiling of Mouse Uterine Luminal Epithelium During Periimplantation. *Reprod Sci.* 2013, Jul: 1-13
- Yahata Y, Shirakata Y, Tokumaru S, Yamasaki K, Sayama K, Hanakawa Y, Detmar M, Hashimoto K. Nuclear translocation of phosphorylated STAT3 is essential for vascular endothelial growth factor-induced human dermal microvascular endothelial cell migration and tube formation. *J Biol Chem* 2003; 278:40026-40031.
- Yu JH, Kim H. Role of janus kinase/signal transducers and activators of transcription in the pathogenesis of pancreatitis and pancreatic cancer. *Gut Liver* 2012; 6: 417-422.
- Yuan K, Huang C, Fox J, Gaid M, Weaver A, Li G, Singh BB, Gao H, Wu M. Elevated inflammatory response in caveolin-1-deficient mice with *Pseudomonas aeruginosa* infection is mediated by STAT3 protein and nuclear factor kappaB (NF-kappaB). *J Biol Chem* 2011; 286: 21814-21825.

六、附錄

Table 1.

Summarizing RT profile PCR array analysis of embryos of mice from superovulation vs natural ovulation.

Group	Total no. of genes	No. of up-regulated genes	No. of down-regulated genes	Genes not differentially expressed
JAK/STAT pathway	89	7	28	54
WNT pathway	89	9	20	60
MAPK pathway	89	49	18	22
Cell cycle pathway	89	39	10	40
Total group	356	104	76	176

Table 2.

Summarizing RT profile PCR array analysis of endometrium (2.5 days after fertilization) of mice from superovulation vs natural ovulation.

Group	Total no. of genes	No. of up-regulated genes	No. of down-regulated genes	Genes not differentially expressed
JAK/STAT pathway	89	25	1	63
WNT pathway	89	9	6	74
MAPK pathway	89	5	0	84
Cell cycle pathway	89	6	1	82
Total group	356	45	8	303

Table 3.

Summarizing RT profile PCR array analysis of frozen-thawed and fresh embryos of mice from superovulation mice.

Group	Total no. of genes	No. of up-regulated genes	No. of down-regulated genes	Genes not differentially expressed
JAK/STAT pathway	89	6	3	80
WNT pathway	89	4	40	45
MAPK pathway	89	11	19	59
Cell cycle pathway	89	45	4	40
Total group	356	66	66	224

Fig. 1.

Network of genes up-regulated or down-regulated in embryos after ovarian superovulation in mice. The differences in color of molecules show the up- (red) or down- (blue) regulation and connecting lines indicate a known relationship between molecules.

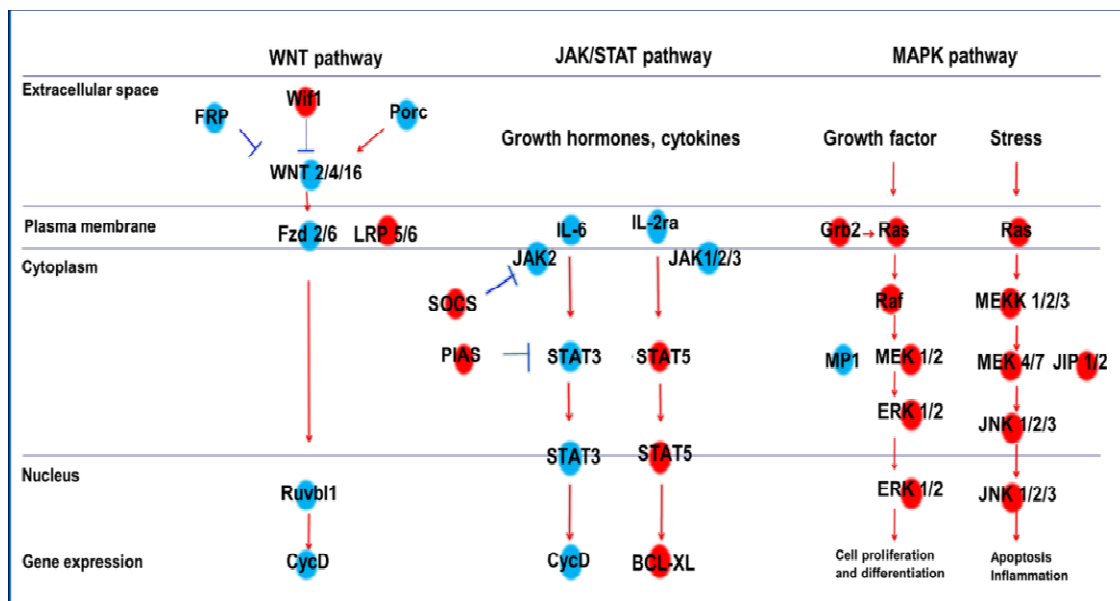
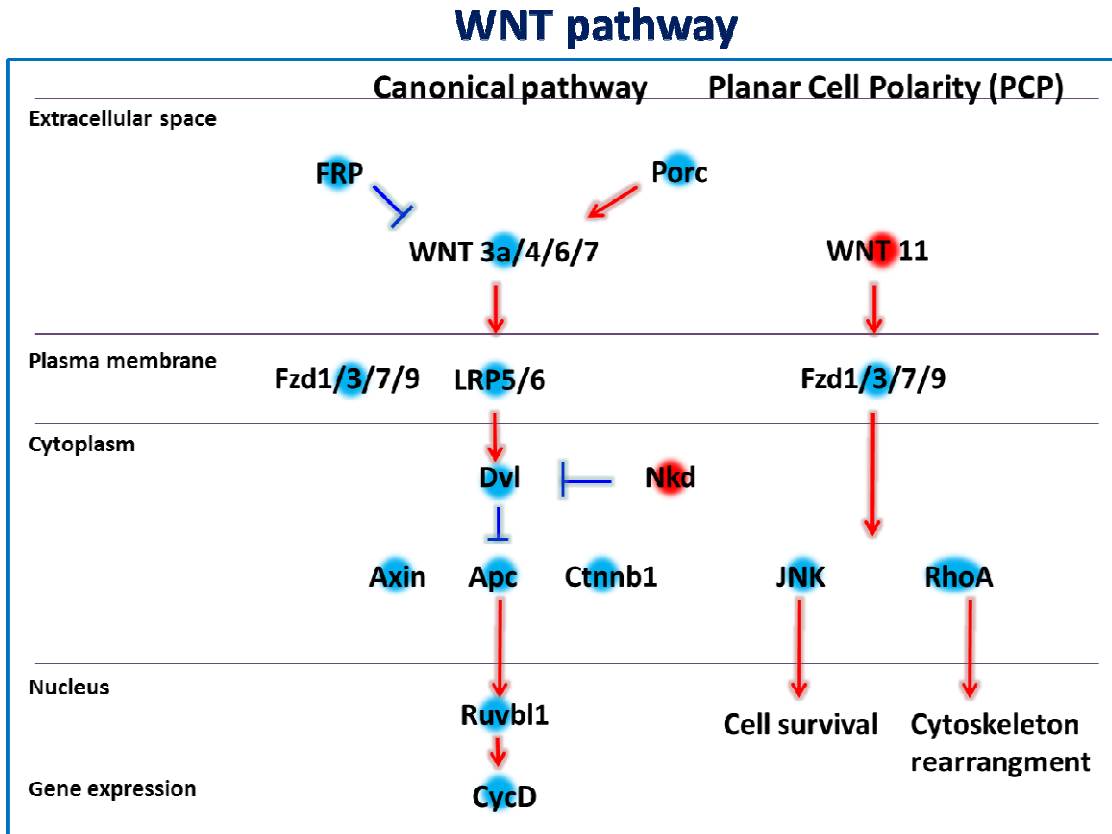


Fig. 2.

Network of genes up-regulated or down-regulated of frozen-thawed and fresh embryos of mice from superovulation mice. The differences in color of molecules show the up- (red) or down- (blue) regulation and connecting lines indicate a known relationship between molecules.



科技部補助計畫衍生研發成果推廣資料表

日期:2015/10/16

科技部補助計畫	計畫名稱: 小鼠胚胎著床之信號傳導轉錄激活因子三、有絲分裂原激活蛋白質激酶及著床相關訊息傳遞路徑於誘導性排卵週期之研究
	計畫主持人: 李茂盛
	計畫編號: 103-2314-B-040-022- 學門領域: 婦產科
無研發成果推廣資料	

103年度專題研究計畫研究成果彙整表

計畫主持人：李茂盛		計畫編號：103-2314-B-040-022-					
計畫名稱：小鼠胚胎著床之信號傳導轉錄激活因子三、有絲分裂原激活蛋白質激酶及著床相關訊息傳遞路徑於誘導性排卵週期之研究							
成果項目		量化			單位	備註（質化說明：如數個計畫共同成果、成果列為該期刊之封面故事...等）	
		實際已達成數（被接受或已發表）	預期總達成數（含實際已達成數）	本計畫實際貢獻百分比			
國內	論文著作	期刊論文	0	0	100%	篇	
		研究報告/技術報告	0	0	100%		
		研討會論文	1	1	100%		
		專書	0	0	100%	章/本	
	專利	申請中件數	0	0	100%	件	
		已獲得件數	0	0	100%		
	技術移轉	件數	0	0	100%	件	
		權利金	0	0	100%	千元	
	參與計畫人力（本國籍）	碩士生	0	0	100%	人次	
		博士生	0	0	100%		
		博士後研究員	0	0	100%		
		專任助理	1	1	100%		
國外	論文著作	期刊論文	0	1	100%	篇	
		研究報告/技術報告	0	0	100%		
		研討會論文	0	0	100%		
		專書	0	0	100%	章/本	
	專利	申請中件數	0	0	100%	件	
		已獲得件數	0	0	100%		
	技術移轉	件數	0	0	100%	件	
		權利金	0	0	100%	千元	
	參與計畫人力（外國籍）	碩士生	0	0	100%	人次	
		博士生	0	0	100%		
		博士後研究員	0	0	100%		
		專任助理	0	0	100%		
其他成果 （無法以量化表達之成果如辦理學術活動、獲得獎項、重要國際合作、研究成果國際影響力及其他協助產業技術發展之具體效益事項等，請以文		2015年台灣生殖醫學年會優秀海報獎					

字敘述填列。)			
	成果項目	量化	名稱或內容性質簡述
科 教 處 計 畫 加 填 項 目	測驗工具(含質性與量性)	0	
	課程/模組	0	
	電腦及網路系統或工具	0	
	教材	0	
	舉辦之活動/競賽	0	
	研討會/工作坊	0	
	電子報、網站	0	
	計畫成果推廣之參與(閱聽)人數	0	

科技部補助專題研究計畫成果報告自評表

請就研究內容與原計畫相符程度、達成預期目標情況、研究成果之學術或應用價值（簡要敘述成果所代表之意義、價值、影響或進一步發展之可能性）、是否適合在學術期刊發表或申請專利、主要發現或其他有關價值等，作一綜合評估。

1. 請就研究內容與原計畫相符程度、達成預期目標情況作一綜合評估

達成目標

未達成目標（請說明，以100字為限）

實驗失敗

因故實驗中斷

其他原因

說明：

2. 研究成果在學術期刊發表或申請專利等情形：

論文： 已發表 未發表之文稿 撰寫中 無

專利： 已獲得 申請中 無

技轉： 已技轉 洽談中 無

其他：（以100字為限）

2015年台灣生殖醫學年會優秀海報獎

3. 請依學術成就、技術創新、社會影響等方面，評估研究成果之學術或應用價值（簡要敘述成果所代表之意義、價值、影響或進一步發展之可能性）（以500字為限）

提昇胚胎的著床率一直是在人工協助生殖技術的治療中不易解決的問題。這是由於胚胎要能成功的著床必須同時具備有著床能力的胚胎以及具有接受胚胎能力的子宮。而在胚胎與子宮間剛開始進行的交互作用中，有許多因子參與進而影響著床。本研究計畫已初步發現小鼠的卵巢誘導週期及自然週期的囊胚呈現大量的基因表現差異。超排刺激囊胚可能會影響細胞損傷修復功能、胚胎發育、細胞凋亡（apoptosis）、子宮內膜褪膜化及胚胎著床。冷凍囊胚可能使細胞凋亡增加而且胚胎著床相關基因受到抑制。因此推論使用荷爾蒙刺激超排卵似乎對於胚胎發育及著床有些負面的作用。根據此次結果可提供胚胎著床前期訊息傳導路徑在誘導週期的變化更進一步的了解，而此種資訊亦將有助臨床醫師面對著床失敗的患者一個新的治療的方向，提高臨床醫師在不孕症治療著床失敗方面的治癒率。對於參與之工作人員，已獲得之訓練如下：(1) 學會小鼠的飼養繁殖照顧。(2) 學習小鼠胚胎之體外培養及觀察。(3) 小鼠之體外受精。(4) 胚胎冷凍及解凍。