

# 自噬抑制剂3-MA对围着床期小鼠 子宫胚胎着床的影响

陈梦月 高茹菲 李娜 苏燕 陆思宇 龙菁 何俊琳  
陈雪梅 刘学庆 丁裕斌 王应雄\*

(重庆医科大学公共卫生与管理学院生殖生物学研究室, 重庆医科大学生殖与发育国际合作联合实验室, 重庆 400016)

**摘要** 该文探索了自噬抑制剂3-MA对围着床期小鼠子宫胚胎着床的影响。将成年昆明雌性小鼠随机分为对照组、3-MA低剂量组(15 mmol/L)和3-MA高剂量组(30 mmol/L)。自小鼠孕D1起, 腹腔注射自噬抑制剂3-MA, 直到处死, 以腹腔注射PBS作为对照。收集孕D4、D5、D6子宫内膜组织, Western blot检测自噬抑制剂3-MA注射后自噬相关因子Atg5和LC3蛋白表达, 形态学观察对照组和3-MA自噬抑制剂组胚胎着床点数量。Real-time PCR检测*CathepsinB*、*P62*、孕激素受体(*PR*)和雌激素受体 $\alpha$ (*ER* $\alpha$ ) mRNA在孕D5子宫内膜的表达。免疫组化检测PR在孕D5子宫内膜的表达。结果显示, 在自噬抑制剂3-MA的作用下, 自噬相关因子Atg5、LC3蛋白在孕D4~D6小鼠子宫中的表达量明显降低, *CathepsinB*、*P62* mRNA在孕D5小鼠子宫中的表达显著降低。注射3-MA自噬抑制剂后, 孕D6小鼠着床点(IS)数量比正常组明显减少。在孕D5小鼠子宫内膜着床旁(IIS)和着床点中, 自噬抑制剂3-MA干预组PR的蛋白质表达量明显降低, *PR*和*ER* $\alpha$  mRNA表达量均显著降低, 随着3-MA抑制剂剂量的升高, *PR*和*ER* $\alpha$  mRNA表达降低得更显著。结果表明, 自噬抑制剂3-MA可能会对小鼠胚胎着床时子宫内膜容受性产生影响, 其机制有待进一步研究。

**关键词** 胚胎着床; 自噬; 3-MA; PR; ER $\alpha$

## Effects of Autophagy Inhibitor 3-MA on Mouse Embryo Implantation during the Peri-Implantation Period

Chen Mengyue, Gao Rufeifei, Li Na, Su Yan, Lu Siyu, Long Jing, He Junlin,  
Chen Xuemei, Liu Xueqing, Ding Yubing, Wang Yingxiong\*

(Laboratory of Reproductive Biology, School of Public Health and Management, Joint International Research Laboratory of Reproduction & Development, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

**Abstract** Adult female Kunming mice were randomly divided into control group, 3-MA low dose group (15 mmol/L) and 3-MA high dose group (30 mmol/L). Animals were injected with autophagy inhibitor 3-MA until intraperitoneal, PBS for control. The expressions of Atg5 and LC3 protein after autophagy inhibitor 3-MA injection in endometrium were detected by Western blot. Morphological observation of control group and 3-MA

收稿日期: 2017-10-24 接受日期: 2018-03-21

国家自然科学基金(批准号: 31771663、81300486)、渝中区基础与前沿科技项目(批准号: cstc2015jcyjA10013)、重庆市科委前沿与应用基础研究项目(批准号: 20150104)、重庆市研究生科研创新项目(批准号: CYS16117)和重庆医科大学优秀青年学者项目(批准号: CYYQ201508)资助的课题

\*通讯作者。Tel: 023-68485008, E-mail: wxy61221@aliyun.com

Received: October 24, 2017 Accepted: March 21, 2018

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.31771663, 81300486), the Projects of Foundation and Cutting-edge Technology of Yuzhong District (Grant No.cstc2015jcyjA10013), the Frontier and Applied Basic Research Project of Chongqing Science and Technology Commission (Grant No.20150104), the Chongqing Graduate Research and Innovation Project (Grant No.CYS16117) and Outstanding Young Scholars Program of Chongqing Medical University (Grant No.CYYQ201508)

\*Corresponding author. Tel: +86-23-68485008, E-mail: wxy61221@aliyun.com

网络出版时间: 2018-05-15 18:18:05 URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20180515.1817.036.html>

injection group was performed on the endometrial tissue of D4, D5 and D6. The expressions of *CathepsinB*, *P62*, progesterone receptor (*PR*) and estrogen receptor  $\alpha$  (*ER\alpha*) mRNA in the endometrium of D5 were detected by Real-time PCR. The expressions of *Atg5*, *LC3* protein and *CathepsinB*, *P62* mRNA of 3-MA injection group in the uterus of pregnant mice were significantly lower than that of the control group. After the injection of 3-MA autophagy inhibitor, the number of implantation sites (IS) in pregnant D6 was significantly lower than that in the control group. The expression of *PR* protein in 3-MA intervention group was significantly decreased and the expressions of *PR* and *ER\alpha* mRNA were significantly decreased in the uterine endometrium inter-implantation sites (IIS) and implantation sites. With 3-MA inhibitor's dose increased, *PR* and *ER* mRNA expression decreased much more. The results showed that autophagy inhibitor 3-MA might affect the endometrial receptivity of mouse during the peri-implantation period, and its mechanism needs further study.

**Keywords** embryo implantation; autophagy; 3-MA; *PR*; *ER\alpha*

自噬是真核细胞中普遍存在的生命现象, 是将细胞内变形、衰老或损伤的蛋白质和细胞器转运到溶酶体腔中消化降解的一种代谢过程, 是不同于细胞凋亡的另一种程序性细胞死亡, 在维持细胞存活、更新、物质再利用和内环境稳定中起着重要作用<sup>[1]</sup>。自噬受到一系列蛋白的调控, 细胞自噬紊乱往往会引发多种疾病<sup>[2]</sup>。子宫内膜容受性的建立严格依赖雌孕激素的调控<sup>[3]</sup>。有报道称, 在胚胎着床延迟模型中, 雌孕激素注射可抑制自噬, 提示雌孕激素可能对自噬产生了抑制作用<sup>[4-5]</sup>。已有报道证实, *P62*蛋白参与自噬降解过程, 该蛋白表达水平和细胞内自噬水平呈负相关。在自噬过程中, 还有很多其他的蛋白参与, 如组织蛋白B(*CathepsinB*)<sup>[6-7]</sup>。3-甲基腺嘌呤(3-methyladenine, 3-MA)是常见的一种细胞自噬抑制剂, 它通过抑制三型磷脂酰肌醇激酶3(class III phosphatidylinositol 3-kinase, class III PI3K)来抑制自噬体的形成, 从而抑制自噬过程<sup>[8]</sup>。但自噬抑制剂3-MA是否通过影响自噬对早孕小鼠胚胎着床产生影响, 目前尚不明确。本研究利用3-MA自噬抑制剂注射的小鼠模型<sup>[9]</sup>, 探讨自噬抑制后对围着床期小鼠胚胎着床的影响。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 实验动物 SPF级昆明雌性小鼠(6~8周龄, 25~30 g)由重庆医科大学动物中心提供, 动物许可证号[SCXK(渝)20070001]。标准条件饲养, 自由饮水进食。

1.1.2 试剂 鼠单克隆 $\beta$ -actin、兔多克隆Atg5、兔多克隆P62抗体购于北京博奥森生物技术有限公司。

鼠单克隆LC3、鼠单克隆PR、兔多克隆ER $\alpha$ 抗体购于英国Abcam公司。RIPA裂解液、PMSF、BCA蛋白质浓度测定试剂盒、SDS-PAGE凝胶配制试剂盒、SDS-PAGE蛋白质上样缓冲液购于上海碧云天生物技术有限公司。无水乙醇、氯仿和异丙醇购于重庆锦荣化工有限公司。Trizol、逆转录试剂盒和SYBR定量PCR试剂盒购于TaKaRa公司。免疫组化试剂盒、DAB显色液购于北京中杉生物技术有限公司。3-MA自噬抑制剂和麻醉药购于Sigma公司。引物参照GenBank中的序列, 由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。

### 1.2 方法

1.2.1 实验动物分组及处理 将成年昆明雌性小鼠随机分为3组, 每组10只, 再将昆明小鼠按雌性与雄性的比例为3:1/4:1进行合笼, 以第2天早上查见阴栓记为孕第1天, 即孕D1。实验分为对照组、3-MA抑制剂低剂量组和3-MA抑制剂高剂量组, 对照组(即在小鼠孕D1时, 每天腹腔注射PBS, 直至处死); 用PBS溶液将3-MA抑制剂按不同浓度溶解, 即3-MA抑制剂低剂量组(自小鼠孕D1起, 每天按照15 mmol/L剂量对其进行腹腔注射, 直至处死); 3-MA抑制剂高剂量组(自小鼠孕D1起, 每天按照30 mmol/L剂量对其进行腹腔注射, 直至处死)。孕鼠分别于D4、D5、D6早上8:00~10:00颈椎脱臼处死, 分离子宫, 记录小鼠胚胎着床数量, 留取部分子宫用4%多聚甲醛固定, 其余部分子宫分别分离着床点、着床旁子宫内膜, 并保存于液氮。

1.2.2 Western blot免疫印迹法检测自噬相关分子蛋白的表达 取小鼠子宫内膜组织30~40 mg放入匀浆器中, 加入适量裂解液与PMSF混合液, 置于冰上

充分研磨30 min后静置30 min,放入4 °C低温离心机内,12 000 r/min离心20 min,BCA法测蛋白浓度。以此作为1个独立蛋白样本,共提取3个样本。根据蛋白总量约50 μg上样,以β-actin为内参蛋白,配制10% SDS-PAGE分离胶进行电泳,将蛋白质转移至0.45 μm的PVDF膜上(Millipore公司),经5% BSA、37 °C烤箱中封闭60 min后,孵育抗Atg5抗体及抗LC3抗体(1:500)、抗β-actin抗体(1:1 000) 4 °C过夜,次日将膜取出。用PBST洗涤4次,每次10 min,经辣根过氧化物酶标记的二抗(1:1 000) 37 °C摇床孵育60 min后,PBST洗涤4次,每次10 min,最终凝胶成像系统(BioRad公司)成像,采用Image-PRo Plus 6.0进行统计分析。

### 1.2.3 实时荧光定量聚合酶链反应(Real-time PCR)

**检测自噬相关分子mRNA的表达** 取出小鼠子宫内膜组织,放入含有1 mL提前预冷的Trizol提取液中充分研磨至无肉眼可见沉淀,经过氯仿的提取、异丙醇的沉淀、新鲜配置的75%乙醇的洗涤后,测量RNA的浓度( $D_{260}/D_{280}$ 在1.8~2.0之间),批间和组内重复均在3次以上。按照PRimeScript™ RT MastERα Mix试剂盒说明书,将RNA逆转录成cDNA,逆转录反应条件:37 °C,15 min;85 °C,5 s;5 °C保存。按照SYBR® PRemix Ex Taq™ II试剂盒说明书,在Bio-Rad iQ5荧光实时定量PCR仪上进行PCR反应,反应总体系为15 μL:SYBR 7.5 μL、正反引物各0.6 μL、DEPC处理水5.1 μL、cDNA 1.2 μL。反应条件为:95 °C预变性3 min,95 °C变性5 s,60 °C延伸30 s,39个循环,以β-actin作为内参,相对表达量用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法分析。相关引物均由上海生工生物工程股份有限公司合成。各基因引物序列如下。*ERα*正义链:5'-GCA CAA GCG TCA GAG AGA TG-3',反义链:5'-AAG GAC AAG GCA GGG CTA TT-3';*P62*正义链:5'-CCT CTG AGT CTC GGG AAT TTC A-3',反义链:5'-GAC TTA CTG CAC GTT TGG GC-3';*CathepsinB*正义链:5'-TCC TTG ATC CTT CTT TCT TGC C-3',反义链:5'-ACA GTG CCA CAC AGC TTC TTC-3';*PR*正义链:5'-GAG AGC TGT TTG ACC GTG TG-3',正义链:5'-TGT AGC CAG GGA AGA AGT GG-3';*β-actin*正义链:5'-ATA TCG CTG CGC TGG TCG TC-3',反义链:5'-AGG ATG GCG TGA GGG AGA GC-3'。

**1.2.4 免疫组织化学检测PR的蛋白表达** 取得小鼠子宫后,包埋切片,二甲苯脱蜡2 h,梯度乙醇水化,

自来水冲洗。EDTA抗原修复15 min,自然冷却至室温,PBS洗涤5 min,3次,加入去离子水孵育10 min,PBS洗涤5 min,3次,5%山羊血清封闭,37 °C孵育30 min,弃血清后加入一抗4 °C湿盒孵育过夜。次日,取出玻片于室温复温1 h,PBS洗涤5 min,3次,加入生物素标记的二抗37 °C孵育30 min,PBS洗涤5 min,3次,滴加辣根过氧化物酶标记的抗体,37 °C孵育30 min,PBS洗涤5 min,3次,配置DAB显色剂显色,脱水,封片,结果用奥林巴斯BX40显微镜观并拍照。

### 1.3 统计分析

采用SPSS 20.0软件进行统计分析。两组之间的数据差异采用 $t$ 检验分析评估。数据均以均数±标准差表示, $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 自噬抑制剂3-MA干预后自噬相关标志分子在早孕小鼠子宫内膜中的表达情况

为了研究自噬抑制剂3-MA对围着床期小鼠子宫胚胎着床的影响,我们建立了自噬抑制剂3-MA干预模型,腹腔注射3-MA自噬抑制剂后,观察自噬相关标志分子的表达是否异常。Real-time PCR结果显示,注射自噬抑制剂3-MA后,自噬相关标志分子*CathepsinB* mRNA在孕D5小鼠子宫中着床点和着床旁子宫内膜的表达较对照组均显著降低( $P<0.001$ )(图1A);*P62* mRNA在孕D5小鼠子宫中,着床点和着床旁子宫内膜的表达较对照组均明显降低( $P<0.05$ )(图1B)。Western blot结果显示,注射自噬抑制剂3-MA后,在孕D4、D5、D6小鼠子宫中,Atg5和LC3的蛋白表达明显降低(图1C)。

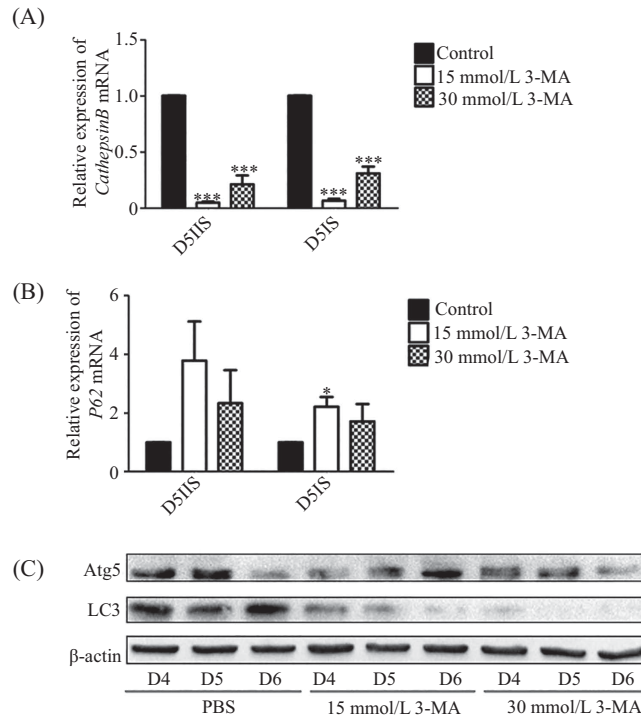
### 2.2 自噬抑制剂3-MA对围着床期小鼠胚胎着床点数量的影响

腹腔注射自噬抑制剂3-MA(15 mmol/L)抑制自噬后,观察孕D6小鼠子宫胚胎着床点数量的变化。结果显示,在自噬抑制剂3-MA的作用下,孕D6小鼠的胚胎着床点数量较对照组显著减少( $P<0.001$ )(图2A和图2B)。

### 2.3 自噬抑制剂3-MA干预后PR和ERα在孕D5小鼠子宫内膜的表达

孕D5早期胚胎发育形成囊胚并获得着床能力,同时子宫协同进入接受状态,即植入“窗口期”。Real-time PCR检测结果显示,注射自噬抑制剂3-MA后,容受性相关因子PR和ERα mRNA在小鼠孕D5着



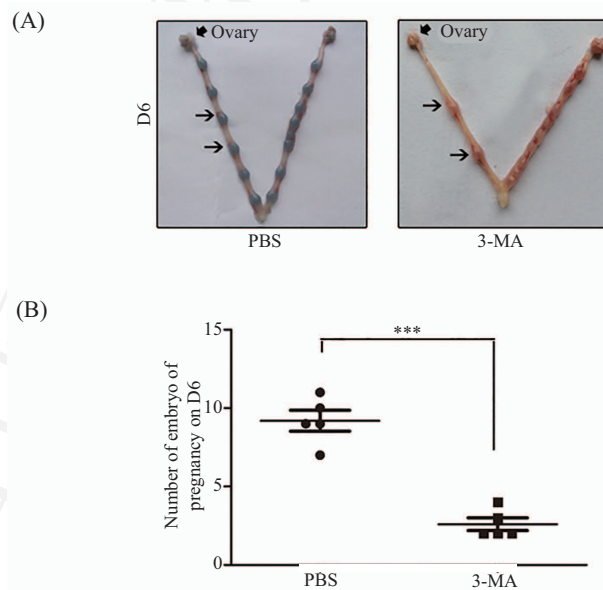


A: 注射自噬抑制剂3-MA后, 自噬相关标志分子*CathepsinB* mRNA在早孕小鼠子宫内膜中的表达情况; B: 注射自噬抑制剂3-MA后, 自噬相关标志分子*P62* mRNA在早孕小鼠子宫内膜中的表达情况; C: 注射自噬抑制剂3-MA后, 自噬相关标志分子Atg5、LC3蛋白在孕D4~6小鼠子宫内膜的表达。\* $P < 0.05$ , \*\*\* $P < 0.001$ , 与对照组比较。IS: 着床点; IIS: 着床旁。

A: the expression of autophagy-associated marker molecule *CathepsinB* mRNA in the endometrium of early pregnancy mice after injection of autophagy inhibitor 3-MA; B: the expression of autophagy-associated marker molecule *P62* mRNA in the endometrium of early pregnancy mice after injection of autophagy inhibitor 3-MA; C: the expression of autophagy-associated marker Atg5 and LC3 proteins in the endometrium of pregnant mice D4~6 days after injection of autophagy inhibitor 3-MA. \* $P < 0.05$ , \*\*\* $P < 0.001$  vs control group. IS: implantation site; IIS: inter-implantation site.

图1 自噬抑制剂3-MA干预后自噬相关标志分子在早孕小鼠子宫内膜中的表达情况

Fig.1 The expression of autophagy-related markers in the endometrium of early pregnancy mice after 3-MA intervention

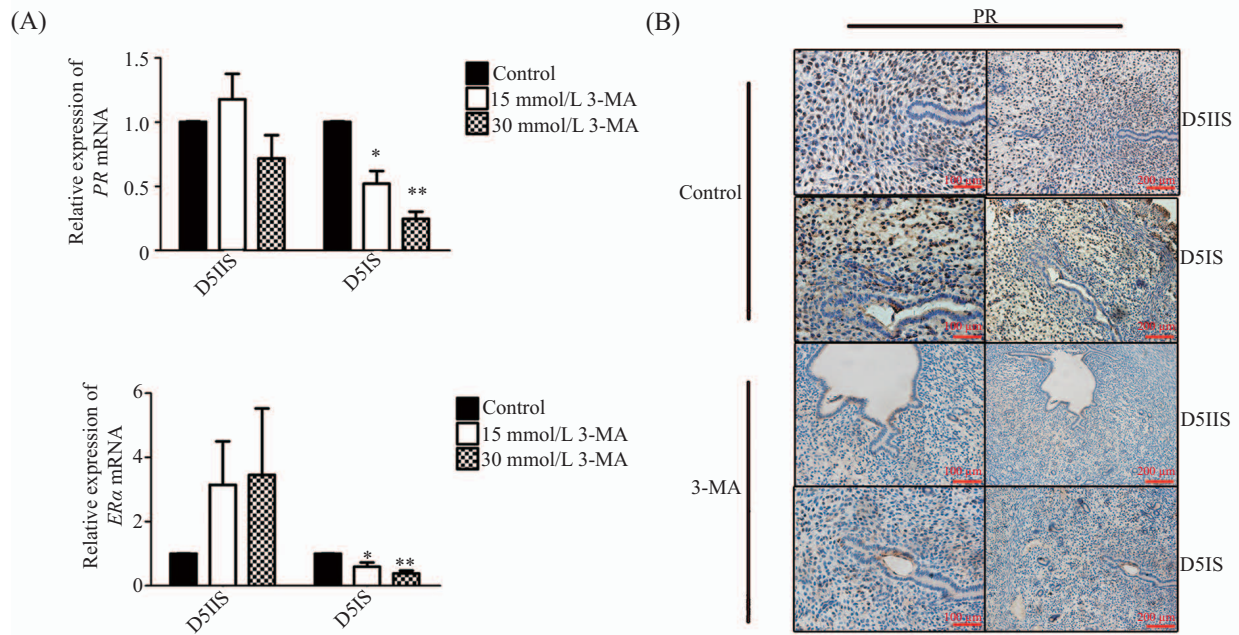


A: 肉眼观察自噬抑制剂3-MA处理后孕D6小鼠胚胎着床点数量; B: 图A的统计图。\*\*\* $P < 0.001$ , 与对照组比较。

A: the number of mouse embryo implantation sites after autophagy inhibitor 3-MA treatment on D6; B: quantified levels of implantation sites in image A. \*\*\* $P < 0.001$  vs control group.

图2 自噬抑制剂3-MA对围着床期小鼠胚胎着床点数量的影响

Fig.2 Effects of autophagy inhibitor 3-MA on the numbers of embryo implantation sites early pregnancy mice



A: 注射自噬抑制剂3-MA后, PR和ERα mRNA在孕D5小鼠子宫内膜表达情况; B: 注射自噬抑制剂3-MA后, PR在孕D5小鼠子宫内膜的表达情况。IS: 着床点; IIS: 着床旁。\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , 与对照组比较。

A: the expression of PR and ERα mRNA in endometrium of pregnant mice on D5 after injection of autophagy inhibitor 3-MA; B: the expression of PR in the endometrium of pregnant mice after injection of autophagy inhibitor 3-MA. IS: implantation site; IIS: inter-implantation site. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  vs control group.

图3 自噬抑制剂3-MA干预后PR和ERα在孕D5小鼠子宫内膜的表达情况

Fig.3 The expression of PR and ERα in the endometrium after the intervention of the autophagy inhibitor 3-MA on D5

床点的表达明显降低( $P < 0.05$ )(图3A)。免疫组化检测发现,与对照组相比较,3-MA抑制组(15 mmol/L) PR的表达明显降低(图3B)。结果提示,在自噬抑制剂3-MA的作用下,早孕小鼠子宫内膜容受性可能受损。

### 3 讨论

自噬是一种普遍存在的细胞再循环途径,它向溶酶体提供细胞质成分,是与细胞存活密切相关的分解代谢途径,对正常细胞功能至关重要。同时,子宫内囊胚的长期存活与自噬密不可分。在某些情况下,如营养缺乏、氧化应激、缺氧、炎症和感染等,会导致自噬的上调或下降<sup>[10-11]</sup>。有研究表明,自噬失调可能会有助于代谢紊乱,包括胰岛素抵抗、糖尿病、肥胖、动脉粥样硬化和骨质疏松症。同时,自噬参与了子宫内囊胚周期的调节,在分泌晚期能参与细胞凋亡过程<sup>[12]</sup>。有报道证实,在子宫内囊胚异位症中自噬水平上调<sup>[13]</sup>。同时,以高胰岛素血症为特征的多囊卵巢综合征(polycystic ovarian syndrome, PCOS)妇女通常会经历卵巢功能障碍,而自噬参与了胰岛素导致的卵巢功能受损<sup>[14]</sup>。3-甲基腺嘌呤(3-

MA)是一种常用的细胞自噬抑制剂,腹腔注射3-MA后,早孕小鼠子宫内自噬相关标志因子Atg5、LC3的蛋白表达和CathepsinB、P62的mRNA表达均减少,同时,孕D6小鼠胚胎着床位数减少。这提示,自噬过程的改变可能会影响小鼠胚胎的着床。

子宫内囊胚容受性是指母体子宫内囊胚对胚胎的接受能力,子宫内囊胚容受性的变化受一系列相关因子调控。有报道指出,白血病抑制因子(leukemia inhibitory factor, LIF)的表达定位于胚胎植入的子宫内囊胚附近,是子宫内囊胚容受性理想的标志物<sup>[15]</sup>。整合素β3在围植入期小鼠子宫内囊胚中的表达随着怀孕天数的增加而逐渐增强,其表达高峰在孕D5, LIF可能通过上调整合素β3的表达促进胚胎的黏附和植入<sup>[16-17]</sup>。另有报道称,子宫内囊胚环氧合酶-2(cyclooxygenase-2, COX-2)的表达降低或缺乏,可能导致子宫内囊胚容受性下降<sup>[18]</sup>。在着床延迟的基因敲除小鼠中,注射前列腺素能挽救着床,这证明前列腺素在胚胎着床过程中起重要作用。前列腺素能通过cAMP/PKA和PI3K/AKT通路活化β-catenin,而β-catenin分子活化后能上调COX-2的表达,从而提高子宫内囊胚容受性<sup>[17]</sup>。以上结果均提示,胚胎着床

和子宫内膜容受性的建立过程密不可分。

子宫内膜容受性的建立与雌、孕激素的分泌密切相关, 雌、孕激素对子宫内膜的调节主要通过雌激素受体(ER $\alpha$ )<sup>[19]</sup>、孕激素受体(PR)<sup>[20-23]</sup>来发挥作用。于是, 我们检测了抑制自噬后的围着床期子宫内膜中雌、孕激素受体的表达情况, 提示自噬抑制后, 围着床期子宫内膜中的雌孕激素受体的表达均降低, 且抑制剂剂量越高, 雌、孕激素受体表达量降低越明显。雷帕霉素靶蛋白(mTOR)是自噬过程的主要调节器, 其活性异常可能与子宫内膜细胞自噬的改变有关。在mTOR上游, 存活的PI3K/Akt通路调节mTOR活性<sup>[24-25]</sup>, 而PI3K/AKT通路能通过上调COX-2的表达, 从而提高子宫内膜容受性。以上提示, 自噬对子宫内膜容受性的建立有着十分重要的作用。本文利用自噬抑制剂3-MA干预模型发现, 3-MA对围着床期小鼠胚胎着床产生影响。但不足的是, 目前尚不能排除由于胚胎本身的影响, 导致注射3-MA后, 自噬相关因子的表达降低, 此处仍有待进一步验证。

综上所述, 本研究探讨了自噬抑制剂3-MA对围着床期小鼠子宫胚胎着床的影响, 初步发现3-MA可能会通过影响雌孕激素的表达从而影响胚胎着床和子宫内膜容受性的建立, 其具体机制还需进一步探讨。

### 参考文献 (References)

- Mizushima N, Levine B, Cuervo AM. Autophagy fights disease through cellular self-digestion. *Nature* 2008; 451(7182): 1069-75.
- Leventhal JS, He JC, Ross MJ. Autophagy and immune response in kidneys. *Semin Nephrol* 2014; 34(1): 53-6.
- Wang H, Dey SK. Roadmap to embryo implantation: clues from mouse models. *Nat Rev Genet* 2006; 7(3): 185-99.
- Zhu W, Pan X, Li F, Zhang Y, Lu X. Expression of Beclin 1 and LC3 in FIGO stage I-II cervical squamous cell carcinoma and relationship to survival. *Tumour Biol* 2012; 33(5): 1653-9.
- Xiao X, He Q, Lu C, Werle KD, Zhao RX, Chen J, *et al.* Metformin impairs the growth of liver kinase B1-intact cervical cancer cells. *Gynecol Oncol* 2012; 127(1): 249-55.
- Correa RJ, Valdes YR, Shepherd TG, DiMattia GE. Beclin-1 expression is retained in high-grade serous ovarian cancer yet is not essential for autophagy induction *in vitro*. *J Ovarian Res* 2015; 8: 52-67.
- Gondi CS, Rao JS. Cathepsin B as a cancer target. *Expert Opin Ther Targets* 2013; 17(3): 281-91.
- Wu YT, Tan HL, Shui G, Bauvy C, Huang Q, Wenk MR, *et al.* Dual role of 3-methyladenine in modulation of autophagy via different temporal patterns of inhibition on class I and III phosphoinositide 3-kinase. *J Biol Chem* 2010; 285(14): 10850-61.
- Wu X, He L, Chen F, He X, Cai Y, Zhang G, *et al.* Impaired autophagy contributes to adverse cardiac remodeling in acute myocardial infarction. *PLoS One* 2014; 9(11): e112891.
- Cao B, Camden AJ, Parnell LA, Mysorekar IU. Autophagy regulation of physiological and pathological. *Am J Reprod Immunol* 2017; 77(5): e12650.
- Choi S, Shin H, Song H, Lim HJ. Suppression of autophagic activation in the mouse uterus by estrogen and progesterone. *J Endocrinol* 2014; 221(1): 39-50.
- Kim KH, Lee MS. Autophagy—a key player in cellular and body metabolism. *Nat Rev Endocrinol* 2014; 10(6): 322-37.
- Choi J, Jo M, Lee E, Oh YK, Choi D. The role of autophagy in human endometrium. *Biol Reprod* 2012; 86(3): 70-88.
- Su Y, Wu J, He J, Liu X, Chen X, Ding Y, *et al.* High insulin impaired ovarian function in early pregnant mice and the role of autophagy in this process. *Endocr J* 2017; 64(6): 613-21.
- 隋晓倩, 于德钦, 张冬梅. 子宫内膜容受性各相关标志物研究进展. *生殖与避孕(Sui Xiaolian, Yu Deqin, Zhang Dongmei. Review of research on the related markers of endometrial receptivity. Reproduction & Contraception)* 2005; 35(3): 185-90.
- 刘能辉, 周昌菊. 整合素 $\beta 3$ 在围植入期小鼠子宫内膜中的表达. *中国现代医学杂志(Liu Nenghui, Zhou Changju. Expression of integrin  $\beta 3$  in Peri-implantation mouse endometrium. China Journal of Modern Medicine)* 2013; 23(7): 1-6.
- 王丽, 周剑萍, 张炜, 刘银坤. LIF及其抗体对小鼠胚胎着床影响的体外研究. *现代妇产科进展(Wang Li, Zhou Jianping, Zhang Yi, Liu Yinkun. The effect of LIF and its antibody on mouse embryo implantation *in vitro*. Current Advances In Obstetrics and Gynecology)* 2003; 12(5): 327-9.
- Marions L, Danielsson KG. Expression of cyclo-oxygenase in human endometrium during the implantation period. *Mol Hum Reprod* 1999; 5(10): 961-5.
- 赵振奥, 杨增明. 胚胎着床过程中的前列腺素调控网络. *中国细胞生物学报(Zhao Zhen'ao, Yang Zengming. Prostaglandin regulatory network in embryo implantation. Chinese Journal of Cell Biology)* 2011; 33(7): 808-15.
- Pampfer S, Donnay I. Apoptosis at the time of embryo implantation in mouse and rat. *Cell Death Differ* 1999; 6(6): 533-45.
- Nikas G. Endometrial receptivity: changes in cell-surface morphology. *Semin Reprod Med* 2000; 18(3): 229-35.
- Makrigiannakis A, Minas V, Kalantaridou SN, Nikas G, Chrousos GP. Hormonal and cytokine regulation of early implantation. *Trends Endocrinol Metab* 2006; 17(5): 178-85.
- Makrigiannakis A, Karamouti M, Petsas G, Makris N, Nikas G, Antsaklis A. The expression of receptivity markers in the fallopian tube epithelium. *Histochem Cell Biol* 2009; 132(2): 159-67.
- Choi J, Jo M, Lee E, Kim HJ, Choi D. Differential induction of autophagy by mTOR is associated with abnormal apoptosis in ovarian endometriotic cysts. *Mol Hum Reprod* 2014; 20(4): 309-17.
- Liu L, Liao JZ, He XX, Li PY. The role of autophagy in hepatocellular carcinoma: friend or foe. *Oncotarget* 2017; 8(34): 57707-22.