

王春雪,牛凯迪,于月新. 低分子肝素通过 EGFR/PI3K/Akt 信号通路对胚胎植入障碍小鼠子宫内膜容受性的影响[J]. 中国实验动物学报, 2020, 28(5): 659-667.

Wang CX, Niu KD, Yu YX. Effect of low-molecular-weight heparin on the endometrial receptivity of mice with blastocyst implantation disorder through EGFR/PI3K/Akt signaling pathway [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2020, 28(5): 659-667.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2020.05.011

低分子肝素通过 EGFR/PI3K/Akt 信号通路对胚胎植入障碍小鼠子宫内膜容受性的影响

王春雪¹,牛凯迪²,于月新^{2*}

(1. 锦州医科大学北部战区总医院研究生培养基地生殖医学中心,沈阳 110000;

2. 北部战区总医院生殖医学中心,沈阳 110000)

【摘要】 目的 应用低分子肝素治疗胚胎植入障碍小鼠,观察 EGFR/PI3K/Akt 信号通路的变化,探究其对子宫内膜容受性的作用机制。**方法** 将 72 只 C57BL/6 小鼠随机分为 6 组,空白组、模型组、阿司匹林组、低分子肝素高剂量组、低分子肝素中剂量组、低分子肝素低剂量组。除空白组外,其余各组用吲哚美辛建立胚胎植入障碍模型。妊娠第 5 天上午脱颈处死小鼠,计数小鼠子宫胚胎植入数,应用免疫组化、Western Blot、Real-time PCR 检测子宫内膜 HBEGF、EGFR、PI3K、Akt 的表达。**结果** 与模型组比较,空白组及药物治疗组小鼠子宫宫体红润、植入分布均匀,植入位点数增加($P < 0.05$),子宫内膜 HE 染色上皮细胞厚,间质细胞较大且排列紧密,腺体及血管较多;低分子肝素高剂量子宫内膜 HBEGF、EGFR、PI3K、Akt 蛋白及 mRNA 的表达高于各组($P < 0.05$)。**结论** 低分子肝素可通过促进 HBEGF 的表达,激活 EGFR/PI3K/Akt 信号通路,进而改善子宫内膜容受性,增加胚胎植入成功率。

【关键词】 低分子肝素;胚胎植入;HBEGF;EGFR/PI3K/Akt;子宫内膜容受性

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2020) 05-0658-09

Effect of low-molecular-weight heparin on the endometrial receptivity of mice with blastocyst implantation disorder through EGFR/PI3K/Akt signaling pathway

WANG Chunxue¹, NIU Kaidi², YU Yuexin^{2*}

(1. Reproductive Medicine Center, Jinzhou Medical University Northern Theater General Hospital Postgraduate Training Base, Shenyang 110000, China. 2. Reproductive Medicine Center, Northern Theater General Hospital, Shenyang 110000)

Corresponding author: YU Yuexin. E-mail: yuyuexinpingan@163.com

【Abstract】 Objective To investigate the effect of low-molecular-weight heparin on the EGFR/PI3K/Akt signaling pathway, to explore its effect on endometrial angiogenesis during blastocyst implantation, and to evaluate the mechanism of the drug's effect on endometrial receptivity. **Methods** Seventy-two C57BL/6 mice were randomly divided into six groups: blank group, model group, aspirin group, low-molecular-weight heparin high-dose group, low-molecular-weight heparin medium-dose group, and low-molecular-weight heparin low-dose group. Apart from the blank group, in the remaining groups indomethacin was used to establish a blastocyst implantation disorder model. On the morning of the fifth day of pregnancy, the mice were sacrificed by cervical dislocation and the number of uterus-implanted blastocysts was counted. The expression of HBEGF, EGFR, PI3K, and Akt in endometrium was determined by immunohistochemistry, Western

[作者简介] 王春雪(1995—)女,硕士,医师,研究方向:子宫内膜容受性。Email: wangchunxue0312@163.com

[通信作者] 于月新(1972—)女,博士,主任医师,研究方向:子宫内膜容受性。Email: yuyuexinpingan@163.com

Blotting, and Real-time PCR. **Results** Compared with the model group, the mice in the blank group and the drug treatment group had uteruses with ruddy, uniformly distributed implants, and a greater number of implanted sites ($P < 0.05$). The endometrial HE-stained epithelial cells were thick, the interstitial cells were large and compactly arranged, and there were more glands and blood vessels. The protein and mRNA expression levels of HBEGF, EGFR, PI3K, and Akt in the endometrium with low molecular weight heparin and high dose was higher than that of each group ($P < 0.05$).

Conclusions Low-molecular-weight heparin can promote the expression of HBEGF and activate the EGFR/PI3K/Akt signaling pathway, thereby improving endometrial receptivity and increasing the success rate of blastocyst implantation.

【Keywords】 low molecular weight heparin; blastocyst implantation; HBEGF; EGFR/PI3K/Akt; endometrial receptivity

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

低分子肝素在生殖领域常用于复发性流产、反复植入失败等多种疾病的治疗。已有研究表明低分子肝素通过影响囊胚与子宫内膜表面的粘附、滋养层分化和浸润^[1],对子宫内膜容受性产生调控作用,从而提高胚胎植入的成功率^[2],但其具体机制仍不清楚。肝素结合性表皮生长因子(heparin binding epidermal growth factor, HB-EGF)是子宫内膜容受性的标志物之一,HBEGF 与其受体表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, EGFR)的相互作用是胚胎植入和滋养层浸润过程中母胎对话的重要因素。

EGFR/磷脂酰肌醇 3-激酶(phosphoinositide 3-kinase, PI3K)/蛋白激酶 B(Serine/threonine protein kinase, PKB 也称 Akt)(EGFR/PI3K/Akt)信号通路是体内一条极为重要的信号通路,在刺激细胞外生长因子与细胞生长、分化、增殖和血管生成等多种细胞过程之间发挥重要作用^[3]。本研究旨在探讨低分子肝素对 EGFR/PI3K/Akt 信号通路的影响,探究其对子宫内膜容受性的作用机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

8 ~ 10 周龄 SPF 级 C57BL/6 雌性小鼠 72 只,体重(18 ± 2)g,未交配过;雄性小鼠 30 只,体重(20 ± 2)g,证明有生育能力,购于辽宁长生生物技术有限公司【SCXK(辽)2015-0001】,实验动物饲养于北部战区总医院医学动物实验室【SYXK(军)2015-020】,室温(23 ± 2)℃,自然光照条件,自由摄食、饮水。福利伦理审查证号 2019004,动物实验过程中遵循 3R 原则。

1.1.2 药物制备

吲哚美辛肠溶片,规格每片 25 mg(临汾宝珠),

取 25 mL 在研钵中研碎,溶于 25 mL 生理盐水,制成浓度为 1 mg/mL 的溶剂;注射用低分子量肝素钙,规格 5000 IU/支(兆科药业),取 1 支溶于 500 mL 生理盐水制成 10 IU/mL 的溶液;阿司匹林肠溶片,规格每片 100 mg(湖南新汇),取 50 mg 在研钵中研碎,溶于 10 mL 0.5%羧甲基纤维素钠溶液中,制成浓度为 10 mg/mL 的溶液。

1.1.3 试剂和仪器

HBEGF 抗体(Affinity);pEGFR 抗体(Affinity);pPI3K 抗体(Affinity);pAkt 抗体(Affinity);DAB 显色试剂(20 ×)(迈新);反转录试剂盒(近岸蛋白);荧光定量 PCR 试剂盒(近岸蛋白);SDS-PAGE 凝胶快速制备试剂盒(美仑);飞克特超敏 ECL 液(美仑);垂直电泳槽(六一仪器);半干转电转印仪(六一仪器);紫外凝胶成像仪(美国 Bio-Rad);普通 PCR 仪(ABI);Real-time PCR 仪 7300(ABI);光学显微镜 CX40(OLYMPUS);PCR 引物:生工生物工程股份有限公司,引物序列及其内参磷酸甘油醛脱氢酶(GAPDH)序列(见表 1)。

1.2 方法

1.2.1 分组与建模

将 72 只 C57BL/6 小鼠随机分为 6 组,空白组、模型组、低分子肝素高剂量组、低分子肝素中剂量组、低分子肝素低剂量组、阿司匹林组,每组 12 只。

雌鼠每日阴道涂片观察动情周期变化,当阴道涂片有大量无核角化上皮细胞时即为发情期,将发情期的雌鼠于每日 16:00 与雄鼠合笼,雌雄比 2:1。次日检查合笼雌鼠的阴道,有阴道栓或引道涂片可见精子的小鼠视为妊娠第 1 天。除空白组外,其余各组用吲哚美辛建立胚胎植入障碍模型,于第 2、3 天的 9:00 和 16:00 皮下注射 0.13 mL 吲哚美辛溶剂,空白组皮下注入等量生理盐水。

表 1 引物序列及 GAPDH 内参序列

Table 1 Primer sequence and GAPDH internal reference sequence

引物 Primers	引物序列 Primer sequence	长度(bp) Length
HBEGF	F:5'-CGGGGAGTGCAGATACCTG-3'	19
	R:5'-TTCTCCACTGCTAGAGTCAGC-3'	21
EGFR	F:5'-GCCATCTGGGCCAAAGATACC-3'	21
	R:5'-GTCTTCGCATGAATAGGCCAAT-3'	22
PI3K	F:5'-ACACCACGGTTTGGACTATGG-3'	21
	R:5'-GGCTACAGTAGTGGGCTTGG-3'	20
Akt	F:5'-ATGAACGACGTAGCCATTGTG-3'	21
	R:5'-TTGTAGCCAATAAAGGTGCCAT-3'	22
GAPDH	F:5'-AGGTCGGTGTGAACGGATTG-3'	21
	R:5'-TGTAGACCATGTAGTTGAGGTCA-3'	23

第 1 天开始每日 15:00 给药,连续 5 日。空白组和模型组皮下注射生理盐水 0.3 mL,低分子肝素高剂量组 200 IU/kg,中剂量组 150 IU/kg,低剂量组 100 IU/kg 皮下注射药物,阿司匹林组 100 mg/kg 灌胃给药。第 5 天下午尾静脉注射 1% 台盼蓝 0.2 mL,10 min 后颈椎脱臼法处死孕鼠,取出子宫,计数小鼠子宫植入位点数。PBS 缓冲液冲洗子宫,将子宫分为两部分,一部分 4% 甲醛固定,用于免疫组化检测,另一部分液氮速冻后-80℃ 保存,用于 Western Blot、Real-time PCR 检测。

1.2.2 胚泡植入位点数

每组平均植入位点数 = 该组植入胚泡总数 / 该组妊娠小鼠数

1.2.3 RT-PCR 法检测 HB-EGF、EGFR、PI3K、Akt 基因表达

TRIzol 法提取总 RNA;逆转录合成 cDNA;荧光定量检测 CT 值,每个样品重复 3 次;2^{-△△Ct} 法计算基因表达量。

1.2.4 免疫组化法检测 HB-EGF、EGFR、PI3K、Akt 蛋白定位

切片、贴片;脱蜡、水化;封闭;一抗 4℃ 过夜;二抗孵育;DAB 显色;苏木素复染;脱水、透明;中性树脂封片。

1.2.5 Western Blot 检测 HB-EGF、EGFR、PI3K、Akt 蛋白表达

蛋白提取;BCA 蛋白定量;SDS-PAGE 凝胶制备;上样电泳;半干法转膜;抗体杂交;印记膜发光;用 Image-Pro Plus 6.0 软件对目的条带进行灰度分析。

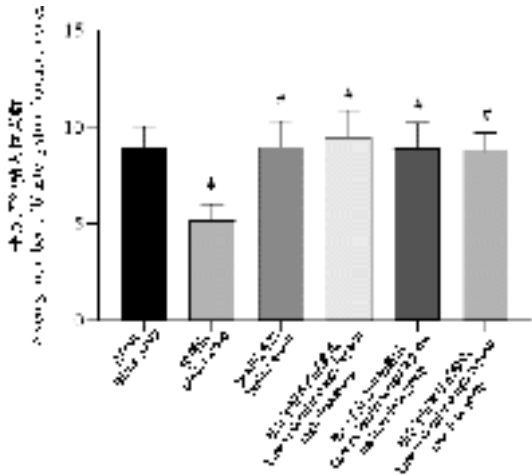
1.3 统计学分析

数据采用 SPSS 21.0 软件进行统计分析,计量资料采用均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。组间比较差异采用单因素方差分析 (One-way ANOVA),两两比较采用 LSD 法, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 胚泡植入位点数

与空白组比较,模型组平均胚泡植入位点数降低 ($P < 0.05$),证明建模成功。与模型组比较,药物治疗组平均胚泡植入位点数均增高 ($P < 0.05$),治疗组间无显著性差异 ($P > 0.05$) (图 1)。



注:与空白组比较,* $P < 0.05$;与模型组比较,# $P < 0.05$ 。(下同)

图 1 各组小鼠妊娠第 5 天平均胚泡植入位点数

Note. Compared with the blank group, * $P < 0.05$. Compared with the model group, # $P < 0.05$. (The same in the following Figures)

Figure 1 Average number of blastocyst implantation sites on the 5th day of pregnancy in each group of mice

2.2 HB-EGF 的表达

2.2.1 HBEGF 蛋白定位

HBEGF 蛋白主要表达于子宫腔上皮、腺上皮及间质细胞。空白组在子宫腔上皮、腺上皮及间质细胞呈阳性表达;模型组在子宫腔上皮和腺上皮呈弱阳性,间质细胞呈阴性表达;药物组在子宫腔上皮、腺上皮及间质细胞均有表达,其中低分子肝素低剂量组表达呈弱阳性表达,低分子肝素中剂量组与阿司匹林组相呈阳性,低分子肝素高剂量组呈阳性或强阳性表达 (图 2)。

2.2.2 HBEGF 蛋白表达

与空白组比较,除低分子肝素高剂量组外,模型组及其他药物治疗组 HBEGF 蛋白表达均显著降低 ($P < 0.01$);与模型组比较,低分子肝素各剂量组

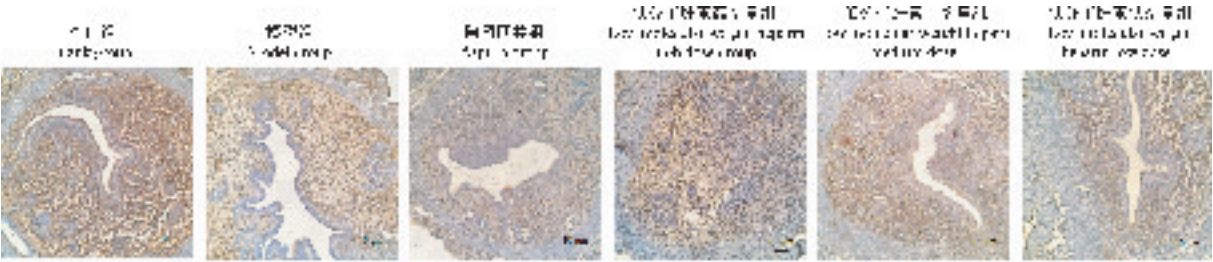


图2 小鼠子宫内膜 HBEGF 蛋白定位
Figure 2 Location of HBEGF protein in mouse endometrium

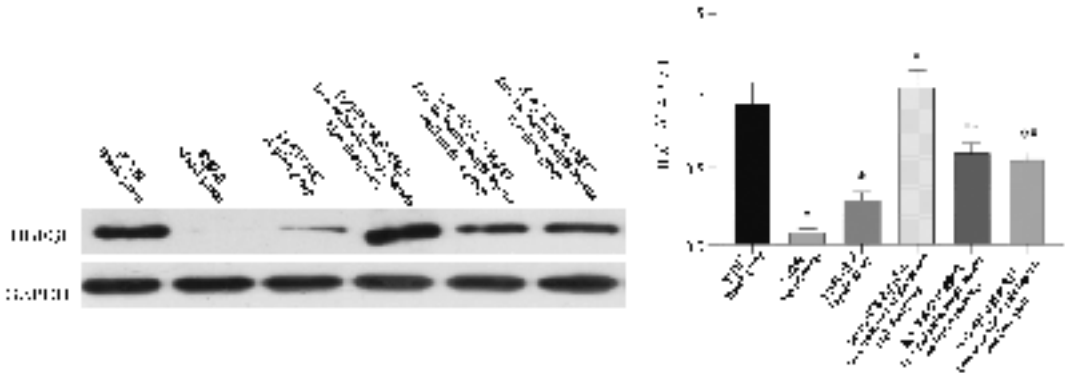


图3 小鼠子宫内膜 HBEGF 蛋白表达
Figure 3 HBEGF protein expression in mouse endometrium

均显著增高($P < 0.01$),其中低分子肝素高剂量组最高(图3)。

2.2.3 HBEGF mRNA 表达

与空白组比较,模型组子宫内膜 HBEGF mRNA 表达量降低($P < 0.05$)。与模型组比较,低分子肝素高剂量组子宫内膜 HBEGF mRNA 表达量增高($P < 0.05$)(图4)。

2.3 EGFR 表达

2.3.1 pEGFR 蛋白定位

pEGFR 蛋白主要表达于子宫腔上皮、腺上皮及间质细胞。空白组在子宫腔上皮、腺上皮及间质细胞呈阳性表达;模型组在子宫腔上皮、腺上皮呈阳性,间质细胞呈弱阳性表达;药物治疗组在子宫腔上皮、腺上皮及间质细胞均表达,其中低分子肝素低剂量组呈弱阳性,低分子肝素中剂量组与阿司匹林组呈阳性,低分子肝素高剂量组呈强阳性(图5)。

2.3.2 pEGFR 蛋白表达

与空白组比较,低分子肝素高剂量组 pEGFR 蛋白表达增高($P < 0.05$),其余各组均降低($P < 0.05$);与模型组比较,药物治疗组 pEGFR 蛋白表达均增高($P < 0.05$)(图6)。

2.3.3 EGFR mRNA 表达

与空白组比较,模型组子宫内膜 EGFR mRNA

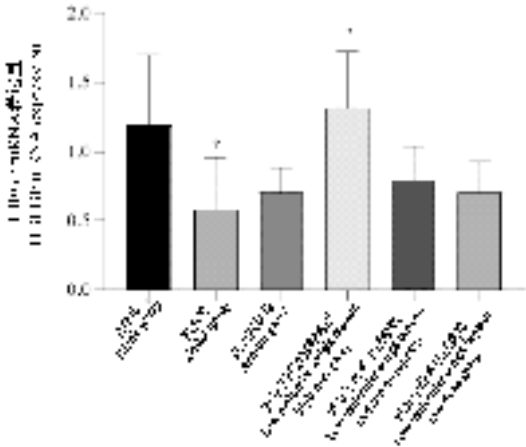


图4 HBEGF mRNA 表达量
Figure 4 HBEGF mRNA expression

表达量显著降低($P < 0.05$),其余各组无显著差异;与模型组比较,低分子肝素高剂量组子宫内膜 EGFR mRNA 表达量增高($P < 0.05$)(图7)。

2.4 PI3K 表达

2.4.1 pPI3K 蛋白定位

pPI3K 蛋白主要表达于子宫内腔上皮、腺上皮以及血管上皮细胞。空白组在子宫腔上皮、血管上皮呈阳性表达,腺上皮呈弱阳性;模型组在子宫腔上皮、腺上皮及血管上皮细胞呈弱阳性或阴性表

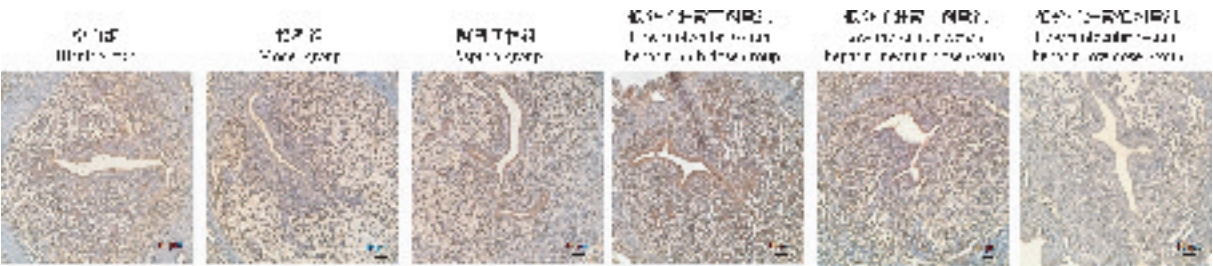


图 5 小鼠子宫内膜 pEGFR 蛋白定位
Figure 5 Location of pEGFR protein in mouse endometrium

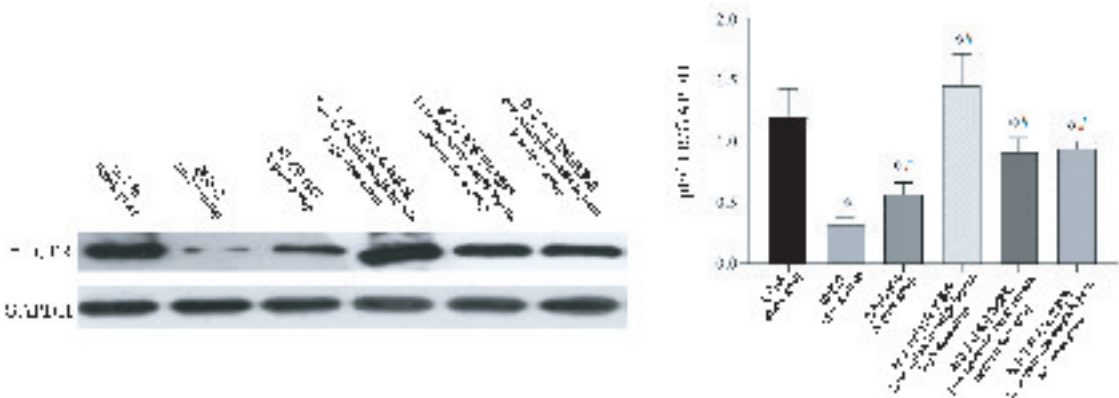


图 6 小鼠子宫内膜 pEGFR 蛋白表达
Figure 6 pEGFR protein expression in mouse endometrium

达;药物治疗组在子宫腔上皮、腺上皮以及血管上皮细胞与均呈阳性表达(图 8)。

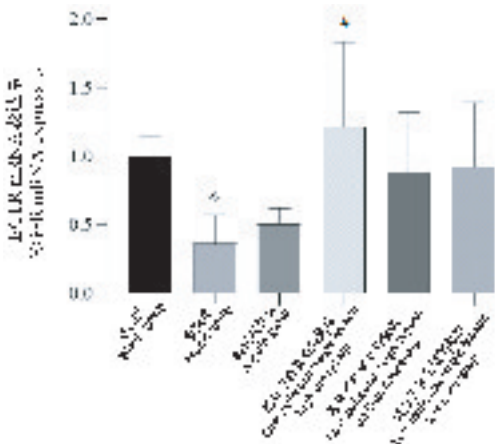


图 7 小鼠子宫内膜 EGFR mRNA 表达量
Figure 7 EGFR mRNA expression

2.4.2 pPI3K 蛋白表达

与空白组比较,除低分子肝素高剂量外,其余各组 pPI3K 蛋白表达均降低 ($P < 0.05$);与模型组比较,药物治疗组 pPI3K 蛋白表达均增高 ($P < 0.05$)(图 9)。

2.4.3 PI3K mRNA 表达

与空白组比较,模型组及低分子肝素中、低剂量组子宫内膜 PI3K mRNA 表达量降低 ($P < 0.05$),低分子肝素高剂量组表达量增高 ($P < 0.05$);与模型组比较,低分子肝素高剂量组子宫内膜 PI3K mRNA 表达量增高 ($P < 0.05$)(图 10)。

2.5 Akt 表达

2.5.1 pAkt 蛋白定位

pAkt 蛋白主要表达于子宫腔上皮、血管上皮细胞。空白组在子宫腔上皮及血管上皮呈阳性表达;模型组在子宫腔上皮及血管上皮细胞呈弱阳性或阴性表达;药物治疗组在子宫腔上皮及血管上皮细胞均呈阳性表达(图 11)。

2.5.2 pAkt 蛋白表达

与空白组比较,模型组及阿司匹林组子宫内膜 pAkt 蛋白表达均显著降低 ($P < 0.05$),低分子肝素高剂量组显著增加 ($P < 0.05$);与模型组比较,药物治疗组 pAkt 蛋白表达均显著增高 ($P < 0.05$),其中低分子肝素高剂量组 pAkt 蛋白表达最高(图 12)。

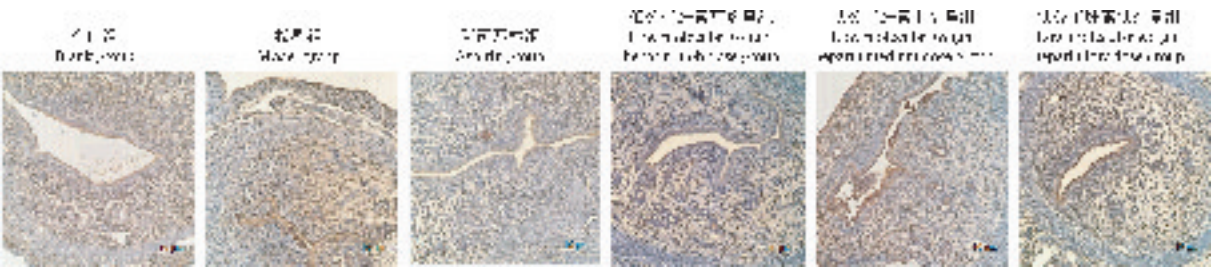


图 8 小鼠子宫内膜 pPI3K 蛋白定位
Figure 8 Location of pPI3K protein in mouse endometrium

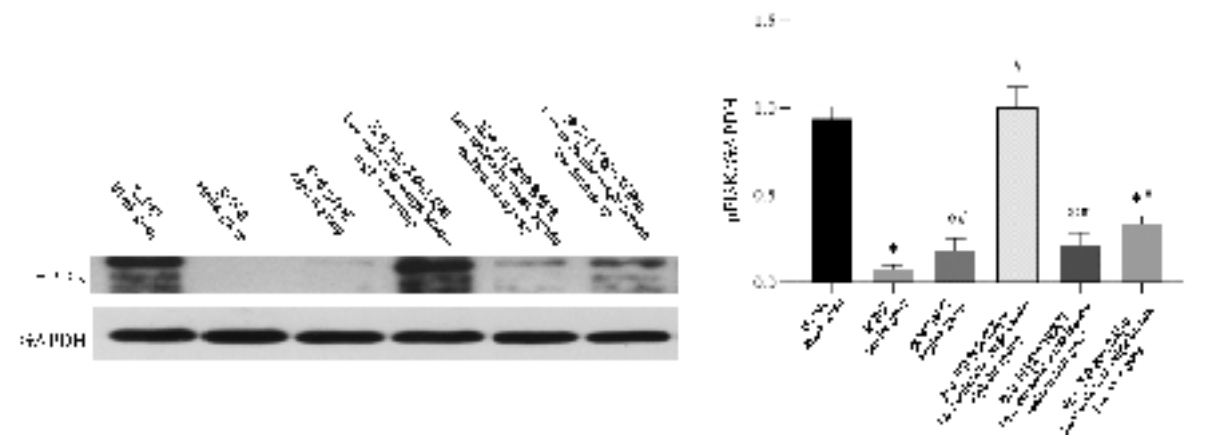


图 9 小鼠子宫内膜 pPI3K 蛋白表达
Figure 9 pPI3K protein expression in mouse endometrium

2.5.3 Akt mRNA 表达

与空白组比较,模型组子宫内膜 Akt mRNA 表达量降低($P < 0.05$),低分子肝素高剂量组表达量增高($P < 0.05$);与模型组比较,低分子肝素高剂量组子宫内膜 Akt mRNA 表达量增高($P < 0.05$)(图 13)。

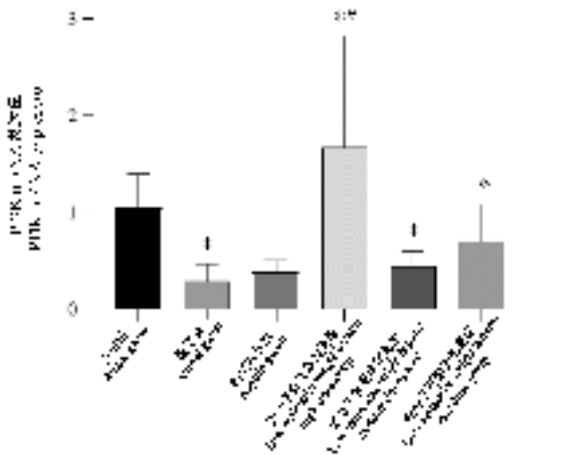


图 10 PI3K mRNA 表达量
Figure 10 PI3K mRNA expression

3 讨论

3.1 动物模型的建立

为探讨低分子肝素对胚胎植入的影响,本研究使用吲哚美辛建立小鼠胚胎植入障碍模型。吲哚美辛是环氧酶(cyclooxygenase, COX)抑制剂,可通过抑制 COX 的表达,使前列腺素(prostaglandin, PGs)合成减少,血管内皮生长因子(vascular endothelial growth facto, VEGF)的表达降低,使子宫内膜血管生成减少,从而抑制子宫内膜容受性^[4]。有研究表明,小鼠妊娠第 4 天发育正常的胚胎可移行至子宫腔,第 4.5 天植入子宫内膜^[5],因此于妊娠第 3、4 天 9:00 和 16:00 皮下注射吲哚美辛溶剂,可使小鼠子宫内膜的腺体、血管等均受到影响,且植入障碍程度与吲哚美辛呈剂量依赖性,当剂量为 3 mg/kg 时,胚胎植入率可降低 77%,为建模最佳剂量^[6-7]。

3.2 低分子肝素与子宫内膜容受性

低分子肝素相比于普通肝素具有更高的安全性,除抗凝作用外,还有抗炎和免疫调节作用。近年来,在临床上常用于治疗复发性流产(recurrent

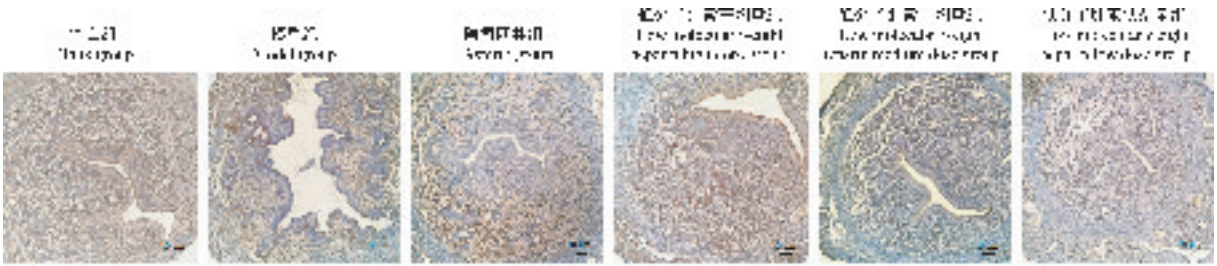


图 11 小鼠子宫内膜 pAkt 蛋白定位
Figure 11 Location of pAkt protein in mouse endometrium

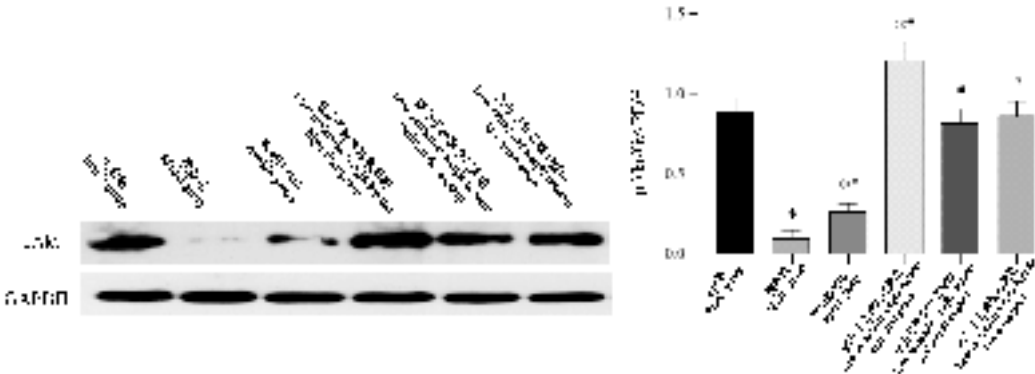


图 12 小鼠子宫内膜 pAkt 蛋白表达
Figure 12 pAkt protein expression in mouse endometrium

spontaneous abortion, RSA) 和血栓性疾病相关的妊娠并发症^[8],对 RSA 患者应用低分子肝素后可提高胚胎植入成功率^[9]。有研究发现,低分子肝素可通过增加流向植入部位的血流量和减少血栓性病变来改善子宫内膜及胎盘的生物学功能^[10-11]。

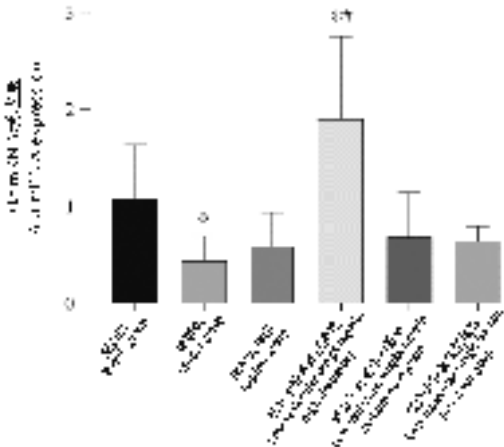


图 13 Akt mRNA 表达量
Figure 13 Akt mRNA expression

HBEGF 作为子宫内膜容受性的标志物,可促进胚胎植入部位的血管生成,维持胚胎的正常生长发育。HBEGF 在整个月经周期中表达,在“窗口期”子宫腔上皮、腺上皮、间质细胞表面 HBEGF 蛋白及

mRNA 表达达最高^[12-13]。HBEGF 是 EGF 家族的一员,HBEGF 在猪、大鼠、小鼠和人的子宫中均表达^[14]。当 HBEGF 表达降低,胚胎植入部位血管生成减少,易出现胚胎发育缓慢甚至流产^[15]。

3.3 低分子肝素激活 EGFR/PI3K/Akt 信号通路
HBEGF 可表达为可溶性 (solubility, sol) 和跨膜 (transmembrane, tm) 两种生物活性^[16],分别激活表皮生长因子受体 (human epidermal growth factor receptor, HER) 的两种受体 EGFR (HER1) 和 erb4 (HER4)^[17],并将硫酸乙酰肝素结合到细胞表面^[18]。EGFR 可在蜕膜和滋养细胞中表达,与 HBEGF 相互作用可影响胚胎植入和滋养层浸润^[19-20],提高胚胎的存活率^[21]。

EGFR 具有多种配体,如 EGF, TGF- α , HBEGF 和双调蛋白等^[22]。EGFR 通过二聚化后刺激 Ras 蛋白,导致磷酸化级联反应的发生激活 PI3K^[23],PI3K 被活化后,使底物二磷酸磷脂酰肌醇 (phosphatidylinositol-4, 5-bisphosphate, PIP2) 水解形成三磷酸肌醇 (inositol-1,4,5-trisphosphate, IP3) 和二酰甘油 (diacylglycerol, DAG)。IP3 是第二信使的一种,可参与信号传导,激活 Akt 使其磷酸化 (pAkt)^[24],pAkt 可影响细胞增殖分化、血管生成^[25]。所以,EGFR/PI3K/Akt 信号通路在刺激细

胞外生长因子及细胞增殖分化、血管生成等发挥重要作用。子宫内膜血管生成对胚泡植入具有重要意义,良好的子宫内膜血供可提高子宫内膜容受性,增加胚泡植入率。

本研究结果显示:(1)胚泡植入数量:与模型组相比较,低分子肝素组与阿司匹林组胚泡植入数量增加;(2)HBEGF 的表达,低分子肝素组与阿司匹林组可增加 HBEGF 蛋白、mRNA 表达,其中高剂量组增加尤为明显;(3)EGFR、PI3K、Akt mRNA 表达:模型组子宫内膜 EGFR、PI3K、Akt mRNA 表达均低于空白组及药物治疗组,低分子肝素高剂量组 EGFR、PI3K、Akt mRNA 高于空白组水平,阿司匹林组与低分子肝素中、低剂量组表达相近;(4)EGFR、PI3K、Akt 蛋白表达:模型组子宫内膜 EGFR、PI3K、Akt 蛋白表达均低于空白组及药物治疗组,低分子肝素高剂量组 EGFR、PI3K、Akt 蛋白表达均高于各组,低分子肝素中、低剂量组 EGFR、PI3K、Akt 蛋白表达高于阿司匹林组。低分子肝素高剂量平均胚泡植入数目高于空白组,虽无统计学差异,但该组 HBEGF、EGFR、PI3K、Akt 蛋白及 mRNA 表达均高于空白组,说明从基因到临床表现需要一定时间,同时药物起作用需要一定的起效剂量。

综上,低分子肝素可通过增加 HBEGF 的表达,激活 EGFR/PI3K/Akt 信号通路,对小鼠子宫内膜容受性产生调控作用,从而提高胚泡植入成功率。许多因素可影响子宫内膜容受性,低分子肝素是否与其他细胞因子的表达以及信号通路有关,还需进一步实验研究。

参 考 文 献(References)

- [1] Nelson SM, Greer IA. The potential role of heparin in assisted conception[J]. Hum Reprod Update, 2008, 14(6): 623-645.
- [2] Yang XL, Chen F, Yang XY, et al. Efficacy of low-molecular-weight heparin on the outcomes of *in vitro* fertilization/intracytoplasmic sperm injection pregnancy in non-thrombophilic women: a meta-analysis[J]. Acta Obstet Gynecol Scand, 2018, 97(9): 1061-1072.
- [3] Sun Z, Xue H, Wei Y, et al. Mucin O-glycosylating enzyme GALNT2 facilitates the malignant character of glioma by activating the EGFR/PI3K/Akt/mTOR axis [J]. Clin Sci (Lond), 2019, 133(10): 1167-1184.
- [4] 刘敏, 吴艳婷, 金志春. 子宫内膜容受性与 IVF-ET 妊娠结局的相关性研究[J]. 中国优生与遗传杂志, 2018, 26(8): 133-136.
- [5] Bedzhov I, Graham SJL, Leung CY, et al. Developmental plasticity, cell fate specification and morphogenesis in the early mouse embryo[J]. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci, 2014, 369(1657): 20130538.
- [6] Poyser NL. A comparison of the effects of indomethacin and NS-398 (a selective prostaglandin H synthase-2 inhibitor) on implantation in the rat[J]. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids, 1999, 61(5): 297-301.
- [7] 吴云霞, 黄光英. 吲哚美辛致小鼠胚泡着床障碍模型的建立[J]. 中国药理学通报, 2005, 21(3): 373-375.
- [8] Oberkersch R, Attorresi AI, Calabrese GC. Low-molecular-weight heparin inhibition in classical complement activation pathway during pregnancy[J]. Thromb Res, 2010, 125(5): e240-e245.
- [9] Tzafettas J, Petropoulos P, Psarra A, et al. Early antiplatelet and antithrombotic therapy in patients with a history of recurrent miscarriages of known and unknown aetiology[J]. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol, 2005, 120(1): 22-26.
- [10] Yinon Y, Ben ME, Margolis L, et al. Low molecular weight heparin therapy during pregnancy is associated with elevated circulatory levels of placental growth factor[J]. Placenta, 2015, 36(2): 121-124.
- [11] Quenby S, Mountfield MS, Cartwright JE, et al. Effects of low-molecular-weight and unfractionated heparin on trophoblast function[J]. Obstet Gynecol, 104(2): 354-361.
- [12] Yoo HJ, Barlow DH, Mardon HJ. Temporal and spatial regulation of expression of heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor in the human endometrium: a possible role in blastocyst implantation[J]. Dev Genet, 1997, 21(1): 102-108.
- [13] Chobotova K, Spyropoulou I, Carver J, et al. Heparin-binding epidermal growth factor and its receptor ErbB4 mediate implantation of the human blastocyst[J]. Mech Dev, 2002, 119(2): 137-144.
- [14] Giudice LC, Telles TL, Lobo S, et al. The molecular basis for implantation failure in endometriosis: on the road to discovery[J]. Ann N Y Acad Sci, 2002, 955: 252-264.
- [15] 王春雪, 于月新, 牛凯迪. 肝素对子宫内膜容受性影响的研究进展[J]. 国际生殖健康/计划生育杂志, 2019, 38(2): 158-160.
- [16] Iwamoto R, Mekada E. Heparin-binding EGF-like growth factor: a juxtacrine growth factor[J]. Cytokine Growth Factor Rev, 2000, 11(4): 335-344.
- [17] Elenius K, Corfas G, Paul S, et al. A novel juxtamembrane domain isoform of HER4/ErbB4. Isoform-specific tissue distribution and differential processing in response to phorbol

- ester[J]. J Biol Chem, 1997, 272(42): 26761–26768.
- [18] Chobotova K, Karpovich N, Carver J, et al. Heparin-binding epidermal growth factor and its receptors mediate decidualization and potentiate survival of human endometrial stromal cells[J]. J Clin Endocrinol Metab, 2005, 90(2): 913–919.
- [19] Leach RE, Kilburn B, Wang J, et al. Heparin-binding EGF-like growth factor regulates human extravillous cytotrophoblast development during conversion to the invasive phenotype[J]. Dev Biol, 2004, 266(2): 223–237.
- [20] Paria BC, Elenius K, Klagsbrun M, et al. Heparin-binding EGF-like growth factor interacts with mouse blastocysts independently of ErbB1; a possible role for heparan sulfate proteoglycans and ErbB4 in blastocyst implantation[J]. Development, 1999, 126(9): 1997–2005.
- [21] Leach RE, Khalifa R, Ramirez ND, et al. Multiple roles for heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor are suggested by its cell-specific expression during the human endometrial cycle and early placentation[J]. J Clin Endocrinol Metab, 1999, 84(9): 3355–3363.
- [22] Iwamoto R, Mekada E. ErbB and HB-EGF signaling in heart development and function[J]. Cell Struct Funct, 2006, 31(1): 1–14.
- [23] Arcaro A, Zvelebil MJ, Wallasch C, et al. Class II phosphoinositide 3-kinases are downstream targets of activated polypeptide growth factor receptors[J]. Mol Cell Biol, 2000, 20(11): 3817–3830.
- [24] Wang X, McCullough KD, Franke TF, et al. Epidermal growth factor receptor-dependent Akt activation by oxidative stress enhances cell survival[J]. J Biol Chem, 2000, 275(19): 14624–14631.
- [25] Ye B, Jiang LL, Xu HT, et al. Expression of PI3K/AKT pathway in gastric cancer and its blockade suppresses tumor growth and metastasis[J]. Int J Immunopathol Pharmacol, 2012, 25(3): 627–636.

[收稿日期] 2020-04-07