

NF- κ B在小鼠胚胎着床前植入期 子宫内膜的表达研究

刘丽媛¹ 贾咏存¹ 余秋波^{2*}

¹宁夏回族自治区人民医院临床检验诊断中心, 西北民族大学第一附属医院, 银川 750002;

²重庆医科大学分子医学检测中心, 重庆 400016)

摘要 核转录因子NF- κ B(nuclear factor of kappa B)是参与炎症反应的重要转录因子, 而胚胎着床这一生理过程类似于炎症反应。该研究通过Real-time PCR、Western blot以及免疫组织化学等方法检测了妊娠小鼠孕第1天(d1)至第5天(d5)子宫内膜NF- κ B的表达情况, 并通过ELISA方法检测了妊娠小鼠(孕d1~d5)血清中白细胞介素-6(interleukin-6, IL-6)与肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)的含量。研究发现, NF- κ B于孕d1开始表达, 且随着妊娠天数的增加表达呈现逐渐上升的趋势, 其mRNA水平与蛋白质水平相一致。NF- κ B在孕d5于子宫内膜表达着床点高于着床旁, 而在假孕小鼠子宫内膜中NF- κ B的表达低于真孕组, 炎症因子IL-6与TNF- α 的含量也随妊娠天数的增加表达逐渐上升。该研究结果表明, NF- κ B可能通过炎症反应的过程参与了胚胎着床这一生理过程。

关键词 NF- κ B; 胚胎着床; 子宫内膜

The Study on NF- κ B Expression in the Endometrium of Mice Embryo Implantation at the Stage of Pre-Implantation

Liu Liyuan¹, Jia Yongcun¹, Yu Qiubo^{2*}

¹Clinical Laboratory Diagnostic Center, Ningxia People's Hospital,
the First affiliated Hospital of Northwest University for Nationalities, Yinchuan 750002, China;

²Molecular Medical Laboratory, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

Abstract NF- κ B (nuclear factor of kappa B) is an important nuclear transcription involved in the inflammatory response, and embryo implantation is a physiological process is similar to the inflammation. This study examined the expression of NF- κ B in endometrium of pregnancy mice (d1-d5) by Real-time PCR, Western blot and immunohistochemistry, and we detected the content of interleukin-6 (IL-6) and tumor necrosis factor- α (TNF- α) in serum of pregnancy mice (d1-d5) by ELISA method. The study found that NF- κ B was expressed on the first day of pregnancy and showed a gradual increased with the number of days of pregnancy. NF- κ B was expressed in the endometrium of pseudopregnant mice and which was lower than that in the endometrium of pregnant mice at 5 d, and the expression of inflammatory cytokines IL-6 and TNF- α also increased with the number of the pregnancy days. The results of this study indicated that NF- κ B may participate in the physiological process of embryo

收稿日期: 2017-09-18 接受日期: 2017-12-29

国家自然科学基金(批准号: 81100443)和重庆市卫生局课题(批准号: 2013-2-151)资助的课题

*通讯作者。Tel: 15823232225, E-mail: yqb76712@gmail.com

Received: September 18, 2017 Accepted: December 29, 2017

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.81100443) and the Foundation of the Health Bureau of Chong Qing (Grant No.2013-2-151)

*Corresponding author. Tel: +86-15823232225, E-mail: yqb76712@gmail.com

网络出版时间: 2018-03-08 17:00:33 URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20180308.1700.010.html>

implantation through the process of inflammatory reaction.

Keywords NF- κ B; embryo implantation; endometrium

人类生殖是个相当低效的过程^[1]。有10%~15%的育龄妇女是不孕的,而着床失败成为不孕的主要因素。成功的妊娠需要容受态的子宫与具有活性的胚胎相互作用^[2]。其中有三分之一的着床失败归源于胚胎本身,三分之二源于子宫内膜容受性不足^[3]。在胚胎着床过程中,胎母之间建立对话包括一系列复杂的分子调控过程,如细胞因子、生长因子、细胞黏附分子等参与其中^[4]。但是具体的分子机制还尚不清楚。

其中,NF- κ B(nuclear factor of kappa B)是近年来研究发现参与生殖过程中比较多的转录因子^[5-6]。其属于Rel家族转录激活蛋白,包括RelA(p65)、RelB等^[7],在哺乳动物细胞中最常见的形式是p65/p50二聚体^[8]。有研究表明,NF- κ B能够调控免疫反应与炎症反应的急性期,其中月经形成与胚胎着床是子宫内膜中主要的炎症反应^[9-10],那么NF- κ B是否参与了胚胎着床的前植入期。鉴于此,本研究将焦点聚集于研究NF- κ B,检测其在胚胎着床前植入期子宫内膜的表达。

1 材料与方法

1.1 研究对象

实验用SPF级昆明小鼠购自重庆医科大学实验动物中心,鼠龄8~10周,体质量25~30 g。所有实验动物均经过重庆医科大学伦理委员会批准。小鼠饲养于光照14 h,黑暗10 h,室温37 °C的环境中,雌鼠与雄鼠按2:1合笼交配,次日检查发现阴道阴栓记为妊娠第1天(d1)。建立小鼠假孕模型,将正常成年雄鼠输精管结扎后饲养14天,与雌鼠按1:2合笼交配,次日检查雌鼠阴道,发现阴栓记为假孕第1天(Pd1)。小鼠随机分为7组(含未孕组d0),每组20只,分别于

孕1、2、3、4、5天,早上8:00~9:00注射0.4%胎盘蓝0.15 mL,10 min后脱颈处死取子宫,4%多聚甲醛固定做免疫组化。

1.2 试剂

试剂包括:Trizol裂解液、逆转录试剂盒、Real-time PCR试剂盒(宝生物工程大连有限公司)、兔抗NF- κ B-p65单克隆抗体(Bioworld公司)、免疫组化试剂盒和DAB显色试剂盒(北京中杉金桥生物技术有限公司)、小鼠IL-6酶联免疫吸附检测(ELISA)试剂盒和小鼠TNF- α (ELISA)试剂盒(武汉博士德生物有限公司)。

1.3 RNA提取与Real-time PCR

参照Trizol试剂说明书提取小鼠子宫内膜组织总RNA,采用紫外分光光度计测定RNA浓度和纯度,将合格的RNA进行逆转录。进行实时荧光定量PCR实验,反应体系为:SYBR green mix 12.5 μ L、上游引物1 μ L、下游引物1 μ L、cDNA 2 μ L、去RNA酶水8.5 μ L。反应条件为:95 °C 3 min;95 °C 10 s,60 °C 30 s,循环38次,65~95 °C条件下检测溶解曲线。引物(NF- κ B-p65)序列如表1所示。

1.4 免疫组织化学染色

置新鲜的小鼠子宫内膜组织于4%多聚甲醛中固定12 h,梯度酒精脱水,二甲苯透明4~10 min,浸蜡3 h后包埋,4 μ m厚连续切片。石蜡切片脱水。参照SP-9001免疫组化检测试剂盒,NF- κ B-p65单克隆抗体(Bioworld公司)用PBS稀释比例为1:80,阴性对照以PBS代替一抗操作。Olympus BX40显微镜采集图像。将免疫组织化学染色结果中胞质或胞核出现棕黄色颗粒作为阳性标准。

1.5 Western blot检测技术

取小鼠子宫内膜组织100 mg,低温碾磨后,加

表1 实时定量PCR引物序列

Table 1 Real-time PCR primer sequences

基因名称	引物序列
Gene	Primer sequence
NF- κ B	Forward: 5'- TGG ACG ATC TGT TTC CCC TC-3'
	Reverse: 5'- CCC CTC GCA TTT ATA GCG GA-3'
β -actin	Forward: 5'-CCT GAG GCT CTT TTC CAG CC-3'
	Reverse: 5'-TAG AGG TCT TTA CGG ATG TCA ACG T-3'

入2 μ L蛋白酶抑制剂PMSF(100 mmol/L)和200 μ L蛋白质裂解液(上海碧云天生物技术有限公司)冰浴裂解20 min(每5 min振荡1次)。4 $^{\circ}$ C、12 000 r/min离心15 min后,BCA法蛋白质定量。所有蛋白质样品(50 μ g)以4:1溶解混匀于5 \times loading buffer中,煮沸10 min。上样,80 V恒压凝胶电泳2 h,将蛋白质转膜至0.45 μ m PVDF膜上,5% BSA室温封闭1 h,一抗孵育4 $^{\circ}$ C过夜,PBST孵育3次,每次5 min。二抗孵育1 h,PBST孵育3次,每次5 min。化学发光法ECL显影。Quantity One软件对结果进行分析。

1.6 ELISA技术

取小鼠全血约500 μ L,2 000 r/min离心2~3 min,取上清即为血清。按照ELISA试剂盒的说明书操作,测定各组小鼠血清中IL-6与TNF- α 的含量。

1.7 统计学分析

每组实验重复3次,结果采用SPSS 19.0统计软件处理,结果以均值 \pm 标准差表示,检验水准为 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 正常妊娠小鼠子宫内膜核转录因子NF- κ B的mRNA水平

NF- κ B的mRNA水平检测结果分析见图1。与对照组(con)相比,孕第1天(d1)NF- κ B的mRNA水平上调,有显著差异。从d2起,与对照组相比,各组(d2、d3、d4、d5)NF- κ B的mRNA水平表达明显上调,且差异性显著。随着妊娠天数的增加,NF- κ B在小鼠子宫内膜表达逐渐升高($P_1=0.036$ 、 $P_2=0.001$ 、 $P_3=0.000$ 、 $P_4=0.000$ 、 $P_5=0.000$,图1和表2)。

2.2 正常妊娠小鼠子宫内膜核转录因子NF- κ B的免疫组织化学技术分析

小鼠子宫内膜组织免疫组织化学染色结果(d0、d1、d2、d3、d4)如图2。与阴性对照组相比,小鼠妊娠d0天,小鼠子宫腔上皮和腺上皮NF- κ B水平较低,随着妊娠天数的增加,在d1、d2、d3、d4的NF- κ B水平逐渐增强,直至妊娠d4,且在基质细胞内也能检测到NF- κ B的表达。

2.3 孕小鼠着床点与着床旁以及假孕小鼠子宫内膜核转录因子NF- κ B的免疫组织化学分析

小鼠子宫内膜组织免疫组织化学染色结果(d5)如图3。与着床旁(d5)相比,在着床点(d5)腔上皮和腺上皮NF- κ B水平明显增高,且也明显高于假孕(d5)组。

2.4 正常妊娠小鼠子宫内膜核转录因子NF- κ B的蛋白质水平分析

Western blot分析结果见图4。与妊娠第1天相比,NF- κ B蛋白质水平升高,随着妊娠天数的增加而逐渐上升,在第5天达最高。

2.5 正常妊娠小鼠着床点与着床旁子宫内膜NF- κ B的mRNA与蛋白质水平分析

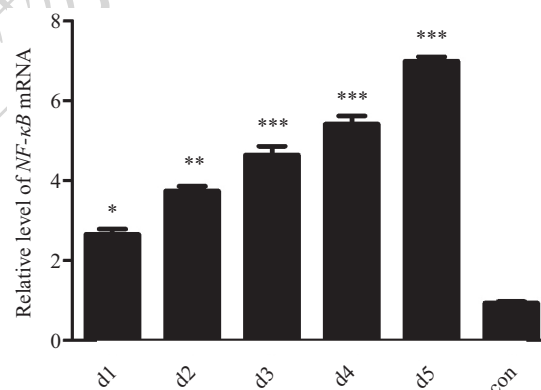
Western blot分析结果见图5。NF- κ B的表达(d5)与着床旁相比较,着床点的表达明显高于着床旁。

2.6 正常妊娠小鼠与假孕小鼠子宫内膜核转录因子NF- κ B的mRNA与蛋白质水平

Western blot结果显示,与假孕组相比较,真孕组着床点NF- κ B的mRNA与蛋白质水平(d5)明显增高(图6)。

2.7 正常妊娠小鼠血清中IL-6与TNF- α 含量分析

IL-6与TNF- α 含量检测结果分析见图7。与对照组(con)相比,IL-6于孕d1轻微上升,无显著差异



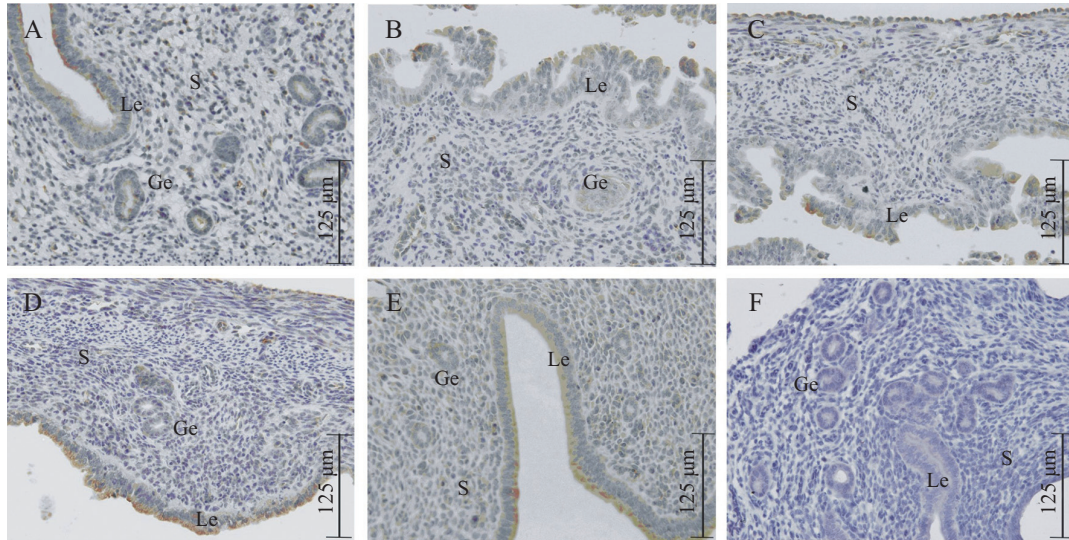
* $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$,与对照组(con)比较。

* $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$ vs con group.

图1 NF- κ B基因在小鼠妊娠前期子宫内膜的相对表达
Fig.1 mRNA level of NF- κ B in the endometrium at the stage of pre-implantation

表2 小鼠妊娠前期子宫内膜NF- κ B的mRNA相对水平
Table 2 mRNA level of NF- κ B in the endometrium at the stage of pre-implantation

组别	NF- κ B相对表达量(平均值 \pm 标准差)
Groups	Relative level of NF- κ B ($\bar{x}\pm s$)
d1	2.653 \pm 0.235
d2	3.744 \pm 0.202
d3	4.641 \pm 0.389
d4	5.618 \pm 0.361
d5	6.988 \pm 0.203
con	0.939 \pm 0.064

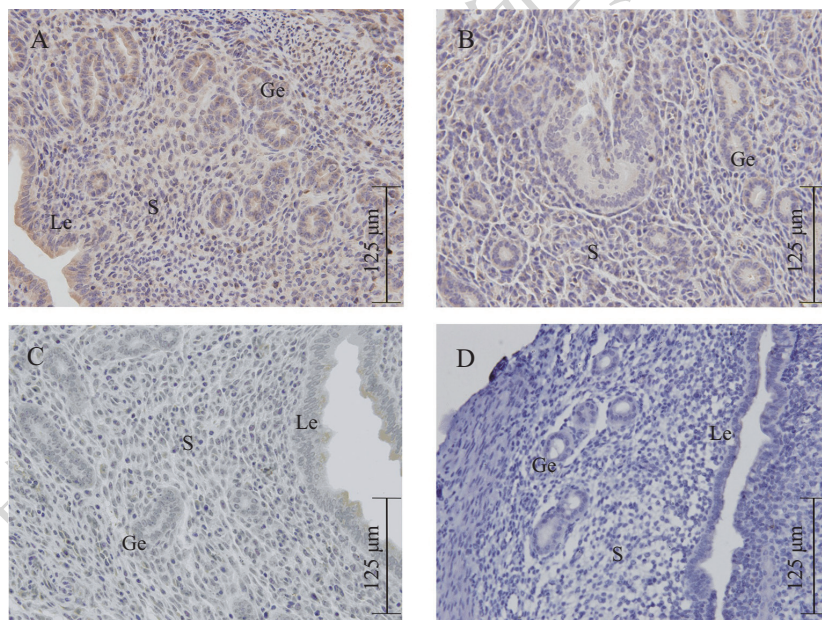


A~E: NF- κ B免疫组化表达检测(d0、d1、d2、d3、d4); F: 阴性对照。Le: 腔上皮细胞; Ge: 腺上皮细胞; S: 基质细胞。

A-E: immunohistochemical measurement on the expressions of NF- κ B (d0, d1, d2, d3, d4); F: negative control. Le: luminal epithelium; Ge: glandular epithelium; S: stromal cells.

图2 胚胎着床植入前期子宫内膜组织中NF- κ B的蛋白质水平

Fig.2 The level of NF- κ B protein in the endometrium at the stage of pre-implantation



A: 着床点(d5); B: 着床旁(d5); C: 假孕d5; D: 阴性对照。Le: 腔上皮细胞; Ge: 腺上皮细胞; S: 基质细胞。

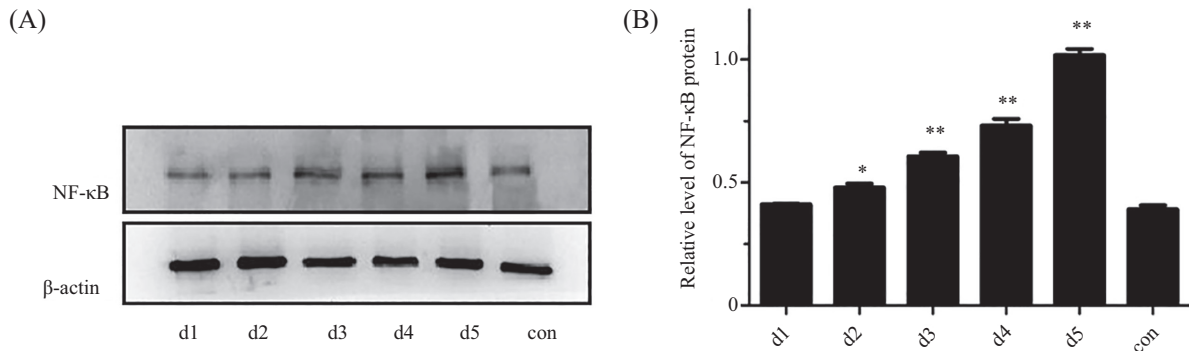
A: implantation site (d5); B: inter-implantation site (d5); C: pseudopregnancy d5 (Pd5). Le: luminal epithelium; Ge: glandular epithelium; S: stromal cells.

图3 真孕及假孕(d5)子宫内膜组织中NF- κ B水平

Fig.3 The level of NF- κ B in the endometrium of pregnancy and pseudopregnancy at 5 d

($P_1=0.368$)。从孕d2起, IL-6的含量(d2、d3、d4、d5)组与对照组相比明显上升, 且差异性显著。随着妊娠天数的增加, IL-6在小鼠血清中含量逐渐升高($P_2=0.013$ 、 $P_3=0.000$ 、 $P_4=0.000$ 、 $P_5=0.000$, 图7A和表2)。与对照组(con)相比, TNF- α 含量在孕d1明显上

升, 且有显著差异($P_1=0.012$)。从孕d2起, TNF- α 含量(d2、d3、d4、d5)组与对照组相比明显上升, 且差异性显著。随着妊娠天数的增加, 小鼠血清中TNF- α 含量逐渐升高($P_2=0.013$ 、 $P_3=0.000$ 、 $P_4=0.000$ 、 $P_5=0.000$, 图7B和表3)。

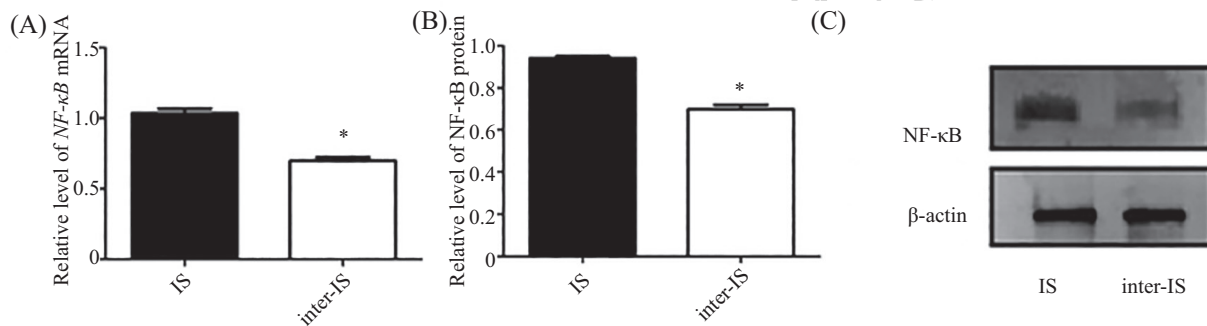


A: 小鼠子宫内膜NF-κB蛋白质水平(d1、d2、d3、d4、d5); B: 小鼠子宫内膜NF-κB蛋白质相对水平的柱状图(d1、d2、d3、d4、d5); * $P<0.05$, ** $P<0.01$, 与对照组(con)比较。

A: the level of NF-κB protein (d1, d2, d3, d4, d5) detected by Western blot; B: histogram of relative level of NF-κB protein in the endometrium (d1, d2, d3, d4, d5) detected by Western blot; * $P<0.05$, ** $P<0.01$ compared with the control (con) group.

图4 小鼠胚胎着床前期子宫内膜NF-κB蛋白质相对水平

Fig.4 The relative level of NF-κB protein in the endometrium at the stage of pre-implantation



A: *NF-κB* mRNA相对水平在着床点和着床旁的柱状图(d5); B: NF-κB蛋白质相对水平在着床点和着床旁的柱状图(d5); C: Western blot测定着床点和着床旁NF-κB蛋白质水平(d5)。* $P<0.05$, 与IS组比较。

A: histogram of relative level of *NF-κB* mRNA in the endometrium of the implantation site and inter-implantation site at 5 d; B: histogram of relative level of NF-κB protein in the endometrium of the implantation site and inter-implantation site at 5 d; C: the protein level of NF-κB in the endometrium of the implantation site and inter-implantation site detected by Western blot (d5); * $P<0.05$ compared with the IS group.

图5 在着床点及着床旁(d5)子宫内膜组织中NF-κB mRNA及蛋白质水平

Fig.5 The level of NF-κB mRNA and protein in the endometrium of the implantation site and inter-implantation site at 5 d

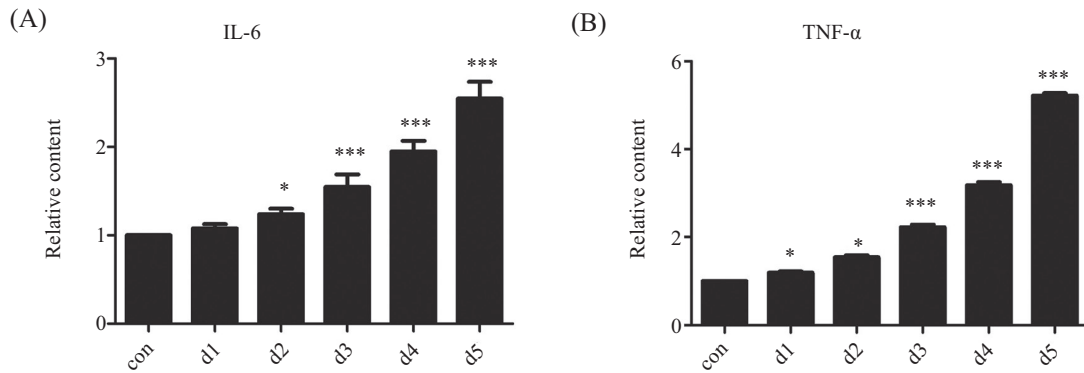


A: *NF-κB* mRNA相对水平在着床点真孕和假孕组(d5)的柱状图; B: NF-κB蛋白质相对水平在着床点和假孕组(d5)的柱状图; C: Western blot测定着床点和假孕组(d5)的NF-κB蛋白质水平。* $P<0.05$, 与假孕d5组比较。

A: histogram of relative level of *NF-κB* mRNA in the endometrium of the pregnancy group and pseudopregnancy group at 5 d; B: histogram of relative level of NF-κB protein in the endometrium of the pregnancy group and pseudopregnancy group at 5 d; C: the protein level of NF-κB in the endometrium of the pregnancy group and pseudopregnancy group by Western blot (d5); * $P<0.05$ compared with the Pd5 group.

图6 真孕及假孕(d5)子宫内膜组织中NF-κB mRNA及蛋白质水平的表达

Fig.6 The mRNA and protein level of NF-κB in the endometrium of pregnancy and pseudopregnancy at 5 d



* $P < 0.05$, *** $P < 0.01$, 与对照组(con)比较。

* $P < 0.05$, *** $P < 0.01$ vs con group.

图7 IL-6与TNF- α 在小鼠妊娠前期血清中含量相对水平柱状图

Fig.7 Histogram of relative level of IL-6 and TNF- α content in serum of pregnant mice at the stage of pre-implantation

表3 IL-6与TNF- α 在小鼠妊娠前期血清中的含量

Table 3 The level of IL-6 and TNF- α content in serum of pregnant mice at the stage of pre-implantation

组别 Groups	IL-6 ($\bar{x} \pm s$)	TNF- α ($\bar{x} \pm s$)
con	261.65 \pm 22.49	108.82 \pm 1.87
d1	281.14 \pm 14.30	130.06 \pm 6.44
d2	322.44 \pm 13.72	167.97 \pm 9.21
d3	401.19 \pm 31.32	242.33 \pm 15.63
d4	507.57 \pm 29.82	346.09 \pm 9.11
d5	661.69 \pm 33.83	567.88 \pm 1.05

3 讨论

胚胎着床是建立成功妊娠的重要步骤,期间需要胎母间的有效对话^[11]。滋养细胞黏附到子宫内膜并侵入到母体内是受一系列黏附分子、细胞因子、整合蛋白等以自分泌或者旁分泌的方式进行高度的调节^[12]。

在小鼠胚胎着床过程中,随着胚胎黏附到腔上皮并侵袭到基质细胞中,子宫中的各元件,包括腔上皮、腺上皮以及基质细胞都要经历连续的增殖与分化的过程^[13]。在小鼠体内,孕1~2天腔上皮与腺上皮经历一个增殖状态,第3天基质细胞黏附到上皮细胞开始增殖,一直到孕4天,胚胎黏附到容受态的腔上皮开始侵入基质细胞,基质细胞就开始向分泌的蜕膜细胞进行分化^[13]。以上这一切都是子宫内膜在不同时期以及胚胎着床过程中所发生的不同的适应性反应,其变化受各种细胞因子以及生长因子的调控^[14]。

有研究表明, NF- κ B在女性生殖系统中担任重

要的角色,并认为NF- κ B受激素调控在生殖系统中表达, NF- κ B-p65从胞质转入核内与DNA结合,而结合在DNA上的NF- κ B活性增加,从而参与了生殖系统的调控与表达^[15]。NF- κ B的同二聚体和异二聚体来源于五个亚单位: p50/p105(NF- κ B1)、p52/p100(NF- κ B2)、p65(RelA)、c-Rel和RelB。其中, RelA/NF- κ B1异二聚体多见于体内, p65(RelA)亚单位参与NF- κ B复合物的激活过程^[16-17], p65(RelA)可以不经转换而转入核内^[10]。当位于细胞质的NF- κ B二聚体接受细胞外信号,该二聚体绑定到核因子 κ B抑制因子 α (I κ B α), I κ B α 磷酸化后释放NF- κ B^[18],其结合到DNA,转录到细胞核激活下游一些靶基因发挥作用。Pei等研究^[19]发现, p65对NF- κ B的激活很重要。Shen等^[20]认为, NF- κ B-p65的表达可以作为鉴定子宫内膜异位症的预测指标。基于以上研究与发现, NF- κ B是否参与了类似于炎症反应过程的胚胎着床这一生理过程,引起了我们的关注,因此我们确定了NF- κ B为我们的研究对象。我们在查

阅有关文献中发现在哺乳动物细胞中最常见的形式是p65/p50二聚体^[17],且Nakashima等^[21]研究发现,用地塞米松、乙酰水杨酸等NF- κ B的抑制剂只能有效地抑制NF- κ B的p65亚基而对p50亚基没有影响。结合以上NF- κ B在体内的转运机制与相关文献的研究成果,本研究进一步确定检测的重点集中在p65的表达。

NF- κ B能够调控免疫反应与炎症反应的急性期,其中月经形成与胚胎着床是子宫内膜中主要的炎症反应^[18]。Nakamura等^[6]研究认为,NF- κ B在未孕小鼠子宫中发情前期和发情期处于激活状态。在孕鼠中,NF- κ B在交配后1.5天激活持续到着床期,这点与我们的研究结果类似。以上研究强烈表明,NF- κ B参与了胚胎着床的过程。在本研究中发现,在孕d1、d2、d3、d4中与d0未孕组相比较有明显的阳性表达,提示我们从孕d1开始NF- κ B就开始发挥作用。从第2天开始,腔上皮和腺上皮表达明显,d4基质细胞开始表达,说明母体在为迎接胚胎着床的过程中发生着适应性的改变。同时,均在5天表达量达到最高峰。以上几天的变化可将其胚胎向子宫内膜黏附的过程理解为一个炎症反应的过程。在d5天着床“窗口期”免疫耐受,母体对胚胎这种外来异物,发生了类似炎症反应的排斥过程,此时NF- κ B发挥的调控作用,为胚胎着床的“窗口期”形成作了充分的准备工作。在本研究中,用着床点与着床旁相比较,NF- κ B在着床点子宫内膜的表达高于着床旁,更进一步说明NF- κ B作为一个关键的核转录因子,参与了胚胎着床的过程。

炎症是机体对抗外界刺激物或病原微生物入侵或组织损伤等不利环境而发生的一种基本的生物学反应,其促进损伤细胞和组织的修复^[22]。胚胎着床是处于活化状态的胚胎与处于接受态的子宫内膜建立联系的过程。自身胚胎作为母体的一种同种半异体移植物而进入机体,必然引起机体的排斥反应,由于各种因子的介导与胚胎本身发生的适应性反应,这种对外界刺激的反应的修复表现为胚胎着床。这一炎症性反应表现适度则为胚胎着床,过度则导致机体流产。NF- κ B的活化与人类许多疾病相关,比如炎症性肠病、肾小球肾炎、感染性休克以及各种肿瘤等炎症性疾病^[23]。在本研究中,NF- κ B主要表达于小鼠前着床植入期子宫内膜,其参与了胚胎着床期机体的免疫反应和炎症反应和增殖分化

等基因的转录。同时,我们采用ELISA方法检测了正常妊娠小鼠d1到d5中IL-6与TNF- α 的表达,这两者作为炎症因子的标志物,均随着妊娠天数的增加表达逐渐增加。此研究从另外一个方面证明了NF- κ B参与着床的过程有可能是通过类似炎症反应的过程介导胚胎着床。有研究报道,IL-6有利于妊娠的建立与维持,其主要由Th2体液免疫反应细胞分泌,避免了半同种移植物胚胎被母体免疫系统排斥与攻击^[24]。而NF- κ B在子宫内膜上皮细胞的活化,可能启动了炎症因子和细胞因子的瀑布样反应,导致炎症因子TNF- α 的产生。TNF- α 这一炎症因子的产生有助于胚胎植入、促进绒毛发育和胎盘形成,在炎症反应过程中,亦是激活细胞瀑布式级联反应的关键因子,在胚胎着床中发挥重要作用^[25]。IL-6和TNF- α 的共同增加更进一步证明了NF- κ B是通过调节炎症反应来介导胚胎着床这一生理过程的。本研究还发现,NF- κ B在假孕组表达明显低于真孕组,且NF- κ B在假孕组的表达没有高峰,说明只有胚胎形成并参与着床这一生理行为,才能引起NF- κ B参与调控的子宫内膜这一类似炎症反应的生理过程发生。研究表明,NF- κ B参与了胚胎着床的过程,并可能调控了其下游多种细胞因子、黏附分子的表达,介导胚胎着床过程复杂的网络调控系统,在胚胎着床的前植入期发挥了类似炎症反应的重要作用,为研究下游各种表达情况作了前铺垫。

参考文献 (References)

- 1 Vercelli CA, Aisemberg J, Billi S, Cervini M, Ribeiro ML, Farina M, *et al.* Anandamide regulates lipopolysaccharide-induced nitric oxide synthesis and tissue damage in the murine uterus. *Reprod Biomed Online* 2009; 18(6): 824-31.
- 2 Agarwal A, Gupta S, Sharma RK. Role of oxidative stress in female reproduction. *Reprod Biol Endocrinol* 2005; 3: 28.
- 3 Nakamura H, Kimura T, Koyama S, Ogita K, Tsutsui T, Shimoya K, *et al.* Mouse model of human infertility: transient and local inhibition of endometrial STAT-3 activation results in implantation failure. *FEBS Lett* 2006; 580(11): 2717-22.
- 4 Nimbkar-Joshi S, Rosario G, Katkam RR, Manjramkar DD, Metkari SM, Puri CP, *et al.* Embryo-induced alterations in the molecular phenotype of primate endometrium. *J Reprod Immunol* 2009; 83(1/2): 65-71.
- 5 Zhu J, Li Y, Chen C, Ma J, Sun W, Tian Z, *et al.* NF- κ B p65 overexpression promotes bladder cancer cell migration via FBW7-mediated degradation of RhoGDI α protein. *Neoplasia* 2017; 1(9): 672-83.
- 6 Nakamura H, Kimura T, Ogita K, Nakamura T, Takemura M, Shimoya K, *et al.* NF- κ B activation at implantation window

- of the mouse uterus. *Am J Reprod Immunol* 2004; 51(1): 16-21.
- 7 Ilbey YO, Ozbek E, Cekmen M, Simsek A, Otunctemur A, Somay A. Protective effect of curcumin in cisplatin-induced oxidative injury in rat testis: mitogen-activated protein kinase and nuclear factor-kappa B signaling pathways. *Hum Reprod* 2009; 24(7): 1717-25.
- 8 Wu WK, Sung JJ, Lee CW, Yu J, Cho CH. Cyclooxygenase-2 in tumorigenesis of gastrointestinal cancers: an update on the molecular mechanisms. *Cancer Lett* 2010; 295(1): 7-16.
- 9 Geisert R, Fazleabas A, Lucy M, Mathew D. Interaction of the conceptus and endometrium to establish pregnancy in mammals: role of interleukin 1beta. *Cell Tissue Res* 2012; 349(3): 825-38.
- 10 Celik O, Celik E, Turkuoglu I, Yilmaz E, Ulas M, Simsek Y, *et al.* Surgical removal of endometrioma decreases the NF- κ B1 (p50/105) and NF- κ B p65 (Rel A) expression in the eutopic endometrium during the implantation window. *Reprod Sci* 2013; 20(7): 762-70.
- 11 Banerjee P, Sapru K, Strakova Z, Fazleabas AT. Chorionic gonadotropin regulates prostaglandin E synthase via a phosphatidylinositol 3-kinase-extracellular regulatory kinase pathway in a human endometrial epithelial cell line: implications for endometrial responses for embryo implantation. *Endocrinology* 2009; 150(9): 4326-37.
- 12 Yang YJ, Cao YJ, Bo SM, Peng S, Liu WM, Duan EK. Leptin-directed embryo implantation: leptin regulates adhesion and outgrowth of mouse blastocysts and receptivity of endometrial epithelial cells. *Anim Reprod Sci* 2006; 92(1/2): 155-67.
- 13 Matzuk MM, Nallasamy S, Li Q, Bagchi MK, Bagchi IC. Msx Homeobox genes critically regulate embryo implantation by controlling paracrine signaling between uterine stroma and epithelium. *PLoS Genetics* 2012; 8(2): e1002500.
- 14 Gentilini D, Busacca M, Di Francesco S, Vignali M, Viganò P, Di Blasio AM. PI3K/Akt and ERK1/2 signalling pathways are involved in endometrial cell migration induced by 17 β -estradiol and growth factors. *Mol Hum Reprod* 2007; 13(5): 317-22.
- 15 Paciolla M, Boni R, Fusco F, Pescatore A, Poeta L, Ursini MV, *et al.* Nuclear factor-kappa-B-inhibitor alpha (NFKBIA) is a developmental marker of NF- κ B/p65 activation during *in vitro* oocyte maturation and early embryogenesis. *Human Reproduction* 2011; 26(5): 1191-201.
- 16 Beinke S, Ley SC. Functions of NF- κ B1 and NF- κ B2 in immune cell biology. *Biochem J* 2004; 382: 393-409.
- 17 Chen LF, Greene WC. Shaping the nuclear action of NF-kappaB. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2004; 5(5): 392-401.
- 18 Heike LP. Activators and target genes of Rel/NF- κ B transcription factors. *Oncogene* 1999; 18: 6853-66.
- 19 Pei XH, Yang Z, Liu HX, Qiao SS. Aplasia Ras homologue member I overexpression induces apoptosis through inhibition of survival pathways in human hepatocellular carcinoma cells in culture and in xenograft. *Cell Biol Int* 2011; 35(10): 1019-24.
- 20 Shen F, Wang Y, Lu Y, Yuan L, Liu X, Guo SW. Immunoreactivity of progesterone receptor isoform B and nuclear factor kappa-B as biomarkers for recurrence of ovarian endometriomas. *Am J Obstet Gynecol* 2008; 199(5): 486.e1-e10.
- 21 Nakashima O, Terada Y, Inoshita S, Kuwahara M, Sasaki S, Marumo F. Inducible nitric oxide synthase can be induced in the absence of active nuclear factor- κ B in rat mesangial cells: involvement of the janus kinase 2 signaling pathway. *J Am Soc Nephrol* 1999; 10: 721-9.
- 22 Medzhitov R. Origin and physiological roles of inflammation. *Nature* 2008; 454(7203): 428-35.
- 23 Baldwin AS. Series introduction: the transcription factor NF- κ B and human disease. *J Clin Inv* 2001; 107(1): 3-6.
- 24 Daher S, de Arruda G, Denardi K, Blotta MH. Cytokines in recurrent pregnancy loss. *J Reprod Immunol* 2004; 62(1/2): 151-7.
- 25 Chan JY, Biden TJ, Laybutt DR. Cross-talk between the unfolded protein response and nuclear factor- κ B signalling pathways regulates cytokine-mediated beta cell death in MIN6 cells and isolated mouse islets. *Diabetologia* 2012; 55(11): 2999-3009.