生殖生理与胚胎着床 DOI:10.13406/j.cnki.cyxb.001148

苯并(a)芘通过干扰 Wnt7a 影响小鼠胚胎着床

李雪妍,沈 茶,刘学庆,丁裕斌,何俊琳,高茹菲,王应雄,陈雪梅
(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 400016)

【摘 要】**目的**:苯并(a)芘(benzo(a)pyrene,BaP)被证实是对生殖有不良影响的雌激素类似物,研究发现苯并(a)芘影响胚胎着床,本研究检测 BaP 对早孕小鼠子宫中 Wnt 信号通路的影响,以探讨其干扰胚胎着床的机制。**方法**:将成年雌雄昆明鼠进行交配,次日见阴栓记为妊娠第 1 天(D_1)。将孕鼠随机分为玉米油对照组(n=45)和 BaP 处理组(n=45),玉米油对照组从妊娠第 1 天开始给予玉米油灌胃,BaP 处理组则给予 0.2 mg/(kg·d)的 BaP 进行灌胃,直至妊娠的第 4、5、6 天(D_4、D_5、D_6)分别处死,收取子宫材料,计数着床点数目,采用荧光定量 PCR,免疫组化法,Western blot 分别检测所收集子宫内膜材料中 Wnt 信号通路相关基因表达情况。**结果**:苯并(a)芘染毒后,引起胚胎着床数下降,差异具有统计学意义(P=0.000);荧光定量 PCR 显示 Wnt7a mRNA 水平在 BaP 组较对照组表达下降,差异具有统计学意义(P=0.000);而 β-catenin mRNA 在 BaP 组水平升高,差异具有统计学意义(P=0.002、P=0.003、P=0.011);Western blot 和免疫组化也均显示 BaP 染毒后 Wnt7a 的表达下降,β-catenin 的表达有所上升。**结论**:苯并(a)芘可能通过干扰 Wnt7a、β-catenin 的表达影响小鼠胚胎着床。

【关键词】苯并(a)芘;小鼠;胚胎着床;Wnt7a
【中图分类号】R321.3 【文献标志码】A 【收稿日期】2016-07-09

Benzo(a) pyrene influences embryo implantation of mice by interfering with Wnt7a

Li Xueyan, Shen Cha, Liu Xueqing, Ding Yubin, He Junlin, Gao Rufei, Wang Yingxiong, Chen Xuemei
(Laboratory of the Reproductive Biology, School of Public Health and Management, Chongqing Medical University)

【Abstract】***Objective***: To explore the effect of benzo(a)pyrene(BaP) on Wnt signaling in mice uteri during early pregnancy. ***Methods***: Adult female and male Kunming mice were mated to produce pregnancy. The pregnant mice were divided into two groups: control group(n=45); BaP-treated group(n=45), and then received corn oil and 0.2 mg/(kg·d) BaP respectively from D_1. The uteri were collected on pregnant 4 to 6 days respectively and the implantation numbers were counted. Real-time PCR(qRT-PCR), Western blot and immunohistochemistry(IHC) were used to detect the gene expression of Wnt signaling pathway. ***Results***: The implantation numbers were reduced in BaP-treated group than in control group(P=0.000). The results of RT-PCR revealed down-regulated of mRNA levels of Wnt7a in BaP-treated group(P=0.000), whereas the expression of β-catenin was elevated in this group(P=0.002, P=0.003, P=0.011). Western blot and IHC also showed the up-regulated expression of β-catenin, and the reduced expression of Wnt7a in BaP-treated group. ***Conclusion***: BaP can lead to the aberrant expression of Wnt7a and β-catenin, which might interfere embryo implantation.

【Key words】benzo(a)pyrene; mice; embryo implantation; Wnt7a

作者介绍:李雪妍,Email:821820877@qq.com,
研究方向:环境与生殖健康。
通信作者:陈雪梅,Email:shirly-cxm@163.com。
基金项目:国家自然科学基金资助项目(编号:81202234、81573175);
重庆市科学技术委员会资助项目(编号:cstc2013jcyjA10046)。
优先出版:http://www.cnki.net/kcms/detail/50.1046.r.20170103.1655.048.html (2017-01-03)

苯并(a)芘(benzo (a) pyrene,BaP)是多环芳烃中最具代表性,也是危害较大的一类持久性有机污染物(persistent organic pollutants,POPs)。BaP 由一个苯环和一个芘分子结合而成,广泛存在于我们的日常生活中,包括空气、水体、食品等。研究表明,BaP 具有明显致癌作用,可诱发皮肤、肺部和消化道癌症[1]。POPs 污染物中,BaP 是众多 POPs 中检出率较高的一种[2-3]。女性担负着孕育与繁衍后代的重任,保护其生育能力关系到后代的健康。相比男性而言,女性生殖系统更容易受到外来化学物质的损伤。因此,BaP 对雌性生殖系统影响越发受到关注。有研究随机抽选待孕妇女和妊娠妇女进行调查,发现与不吸烟妇女相比,吸烟妇女等待第一胎妊娠时间延长,并且受孕率下降[4-5]。Soldin 等[6]研究吸烟与妇女基础甾体激素的关系时发现,与不吸烟者相比,主动吸烟者和被动吸烟者血清中的雌三醇、孕酮、醛固酮和 25-羟维生素 D_3 水平均出现显著降低。由于胚胎植入过程受到卵巢雌孕激素的调节,本课题组推测具有内分泌干扰活性的BaP 可能会影响胚胎植入过程。胚胎植入过程涉及众多信号分子参与,其中Wnt 信号通路是比较受到关注的一条,它参与多种生命过程,包括胚胎和器官发生、肿瘤形成等。为了进一步了解 BaP 对雌性生殖的危害,本文以小鼠为研究对象,通过建立 BaP 染毒的孕鼠模型,检测小鼠着床情况及 Wnt 信号通路基因的变化,探索 BaP 对胚胎植入的影响及其可能的机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 动物 本实验选用 SPF 级 6~8 周龄昆明小鼠,体质量 25~30 g,雌雄兼用,购自重庆医科大学实验动物中心[实验动物生产许可号:SCXK(渝)2007-0002,实验动物使用许可号:SCXK(渝)2007-0001],饲养于清洁级动物房。

1.1.2 试剂 BaP(96%纯度)、玉米油(99%纯度)和麻醉用乙醚购自美国 Sigma 公司;RIPA 蛋白裂解液购自碧云天生物技术研究所;Trizol 裂解液、逆转录试剂盒和 SYBR 定量PCR 试剂盒购自大连宝生物工程有限公司;Wnt7a 抗体购自Gene-Tex;β-catenin 抗体购自 Cell Signaling Technology;β-actin 及二抗购北京中杉生物技术有限公司;免疫组化试剂盒和 DAB 显色液购自北京中杉生物技术有限公司。

1.2 方法

1.2.1 实验动物与材料收集 小鼠饲养 1~2 周后开始实验。于每天傍晚 5 时左右以雌雄比例 2:1 合笼交配,次晨发现阴栓者记为第 1 天(D_1),依次计算妊娠天数。将孕鼠随机分为对照组和 BaP 处理组,每组 45 只。小鼠于 D_1 开始,每天早晨称量孕鼠体质量,并按照 0.1 mL/10 g 体质量给予 0.2 mg/(kg·d)的 BaP 灌胃,对照组给予等体积玉米油灌胃。孕鼠分别于 D_4、D_5 或 D_6(每个时间点 15 只孕鼠)早上 8 时至 9 时吸入乙醚麻醉,颈椎脱臼处死并分离子宫。留取一部分子宫放入 4%多聚甲醛固定;其余部分,D_4 小鼠子宫用 PBS 冲洗子宫后(除去胚泡)刮取子宫内膜,D_5、D_6 小鼠子宫除去胚胎后刮取子宫内膜并保存于液氮,用于相关实验,同时记录孕鼠的胚胎着床数。

1.2.2 着床位点数分析 D_5 小鼠从尾静脉注射 1%台盼蓝 0.1 mL,5 min 后脱颈处死。分离小鼠子宫,分别计数蓝色的胚胎着床位点个数,并拍照。D_6 小鼠胚胎着床点肉眼可见,可直接处死小鼠,分离子宫并计数[7]。

1.2.3 qRT-PCR 分析 采用 Trizol Reagent 抽提子宫内膜,异丙醇沉淀浓缩 RNA,灭菌 DEPC 水溶解总 RNA,紫外分光光度计测总 RNA 的光密度值,琼脂糖凝胶电泳检测其完整性。逆转录为 cDNA 后,运用 qRT-PCR 检测 Wnt7a、β-catenin 的表达情况,相对表达量用 $2^{-\Delta\Delta Q}$ 法分析。相关引物由上海生物工程公司合成。

1.2.4 Western blot 分析 取得 D_4、D_5 和 D_6 小鼠子宫内膜组织后,进行组织研磨,加入蛋白裂解液(碧云天)提取组织总蛋白,用 BCA 蛋白定量法测定总蛋白浓度,并计算蛋白上样量。蛋白样品(每支约 50 μg)溶于 5×Buffer(比例 4:1),沸水煮沸 15 min。配制分离胶(10%)和浓缩胶(5%),60 V 恒压预电泳 30 min 后进行蛋白上样,80 V 恒压电泳 90 min;待充分分离后,截取所需蛋白分子量部分,250 mA 电转至 PVDF膜;5%BAS 封闭 PVDF 膜 1 h 后,滴加 5%BSA 稀释的一抗 Wnt7a (GTX105680,GeneTex,1∶1 000);β-catenin (#8814,Cell Signaling Technology,1:1 000);β-actin(sc-47778,ZSGB-BIO,1:1 000),4 ℃ 冰箱过夜;次日 PBST 清洗 3 次,10 min/次;滴加 5%脱脂奶粉或 BAS 稀释的二抗,室温孵育 1 h 后,PBST 清洗 3 次,10 min/次;化学发光 ECL 法显色,观察条带。

1.2.5 免疫组化分析 取得小鼠子宫后,剪下一部分组织于 4%多聚甲醛中固定 24 h 后,用 75%、80%、95%、100%乙醇梯度脱水,二甲苯透明 1 min,浸软蜡 5 h,硬蜡包埋。制成 1 cm^3 蜡块,石蜡切片机切成 4 μm 子宫内膜组织切片。烤片 5 h后,组织玻片于二甲苯Ⅰ脱蜡 60 min,后二甲苯Ⅱ脱蜡 60 min;梯度酒精水化:100%、90%、80%、70%各 3 min,流水冲洗 10 min,后蒸馏水浸泡 5 min;然后将切片放于 pH6.0 的 0.1 mmol/L 枸橼酸盐缓冲液中,微波炉高火煮沸,后调至中低火,热修复 15 min,取出室温冷却。去离子水室温孵育 10 min 后 PBS 浸洗 3 次,每次 3 min;滴加免疫组化试剂盒 A 液(封闭用的正常血清),37 ℃水浴锅孵育 30 min;Wnt7a 抗体(1:50,GTX105680,GeneTex)或 β-catenin(1:50,#8814,Cell Signaling Technology)4 ℃过夜。次日复温 30 min 后,滴加免疫组化试剂盒 B 液(生物素标记羊抗兔 IgG),37 ℃孵育 30 min 后,PBS 浸洗 3 次,每次 3 min;加入免疫组化试剂盒 C 液(辣根

酶标记链酶卵白素工作液），37 ℃ 孵育 30 min 后，PBS 浸洗 3 次，每次 3 min；DAB 显色，棕色为阳性结果，自来水终止反应。苏木精复染 2 min，自来水冲洗干净，盐酸酒精分色 1 s 左右，自来水冲洗，饱和碳酸锂蓝化 5 s，自来水冲洗干净。乙醇脱水：70%、80%、90%、100%各 3 min；二甲苯透明 2 次，每次 5 min，中性树胶封片。

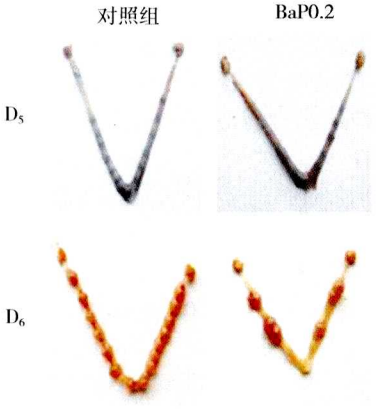
1.3　统计学分析

每个实验至少重复 3 次，采用 SAS 9.1 软件和 GraphPad Prism 5.0 进行统计学分析，结果采用均数 ± 标准差（$\bar{x} \pm s$）表示，对照组与 BaP 组两组间比较采用两独立样本 t 检验。检验水准 α=0.05。

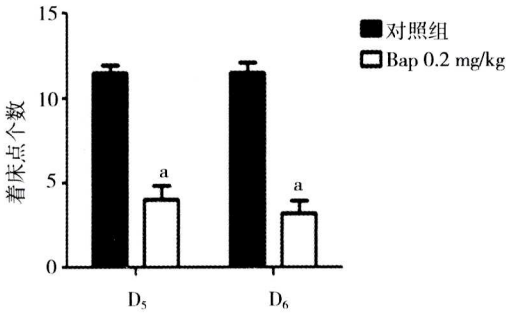
2　结　果

2.1　BaP 对小鼠胚胎着床位点数的影响

分别计数小鼠在孕 D_5、D_6 的着床点数，结果发现 0.2 mg/(kg·d)的 BaP 处理后，妊娠 D_5，BaP 组胚胎着床点数目与对照组相比明显减少，差异具有统计学意义（P=0.000），妊娠 D_6，BaP 组的着床点数少于对照组，差异具有统计学意义（P=0.000）（图 1，表 1）。



A. 子宫形态图



a：与对照组比较，P < 0.05

B. 胚胎着床位点数统计

图 1　BaP 影响孕鼠着床点数统计（$\bar{x} \pm s$，n=9）

Fig.1　Counting of the number of implantation sites in mice ($\bar{x} \pm s$, n=9)

表 1　对照组与 BaP 处理组子宫着床位点数比较（$\bar{x} \pm s$，n=9）

Tab.1　Comparison of the number of implantation sites ($\bar{x} \pm s$, n=9)

组别	D_5	D_6
对照组	11.67 ± 1.32	11.67 ± 2.00
BaP组	4.11 ± 2.62	3.11 ± 2.57
t 值	7.720	7.880
P 值	0.000	0.000

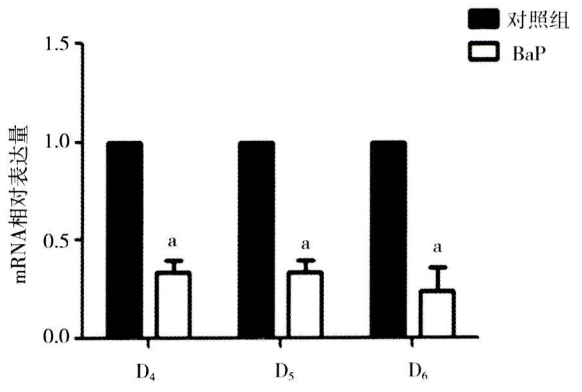
2.2　BaP 影响子宫内膜中 Wnt7a 的表达

2.2.1　mRNA 表达变化　实验对妊娠 D_4、D_5 和 D_6 对照组小鼠和 0.2 mg/(kg·d)的 BaP 染毒小鼠妊娠 D_4、D_5 和 D_6 子宫内膜中 Wnt7a 的 mRNA 水平分别进行检测，发现 D_4、D_5、D_6，BaP 处理后 Wnt7a 的 mRNA 水平均出现了降低（均 P=0.000）（表 2，图 2）。

表 2　对照组与 BaP 处理组 Wnt7a mRNA 相对表达量（$\bar{x} \pm s$，n=6）

Tab.2　Relative expression of mRNA of Wnt7a ($\bar{x} \pm s$, n=6)

组别	D_4	D_5	D_6
对照组	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00
BaP组	0.36 ± 0.14	0.39 ± 0.10	0.36 ± 0.14
t 值	11.530	14.880	11.080
P 值	0.000	0.000	0.000

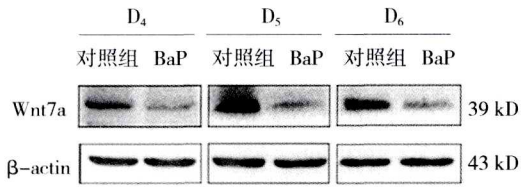


a：与对照组比较，P < 0.05

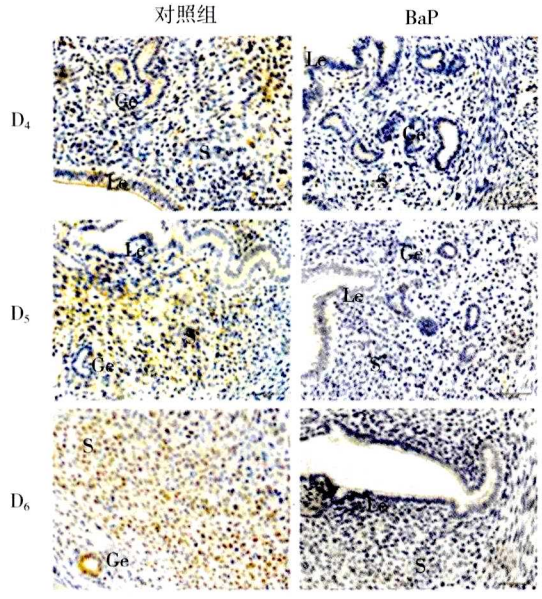
图 2　BaP 暴露影响孕 D_4、D_5、D_6 小鼠子宫内膜 Wnt7a 的 mRNA 表达（$\bar{x} \pm s$，n=6）

Fig.2　Effect of BaP exposure on the mRNA expression of Wnt7a in uterine tissues of D_4,D_5,D_6 pregnant mice ($\bar{x} \pm s$, n=6)

2.2.2　蛋白水平变化　通过 Western blot 检测发现，与对照组相比，0.2 mg/(kg·d)的 BaP 暴露组小鼠子宫内膜中的 Wnt7a 蛋白表达水平明显下调（图 3A）。免疫组化结果显示，在对照组中 Wnt7a 主要表达在腔上皮、腺上皮和基质细胞中，而BaP 处理后表达都有所下降（图 3B）。



A. Western blot 检测结果



B. 免疫组化检测结果

图 3　BaP 暴露对小鼠子宫内膜中 Wnt7a 表达情况的影响(400×)

Fig.3　Effect of BaP exposure on protein expression of Wnt7a of pregnant mice endometria on D_4, D_5, D_6(400×)

2.3　BaP 影响子宫内膜中 β-catenin 的表达

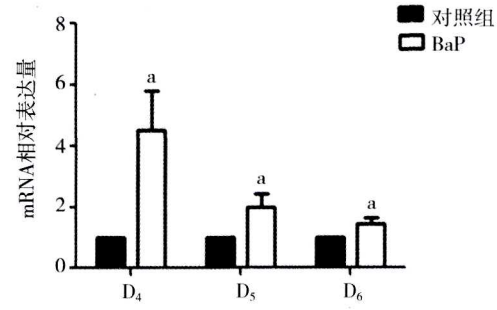
2.3.1　mRNA 表达变化　分别检测对照组小鼠和 0.2 mg/(kg·d)的 BaP 染毒小鼠在妊娠 D_4、D_5 和 D_6 子宫内膜中的 β-catenin mRNA 表达，结果证实，在 D_4、D_5、D_6 BaP 处理组孕鼠子宫内膜中 β-catenin mRNA 的水平均较对照组明显增高（P=0.002、P=0.003、P=0.011）（表 3，图 4）。

表 3　对照组与 BaP 处理组 β-catenin mRNA 相对表达量（$\bar{x}\pm s$，n=6）

Tab.3　Relative expression of mRNA of β-catenin（$\bar{x}\pm s$，n=6）

组别	D_4	D_5	D_6
对照组	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00
BaP组	3.59 ± 1.51	2.07 ± 0.67	1.64 ± 0.51
t 值	4.200	3.900	3.130
P 值	0.002	0.003	0.011

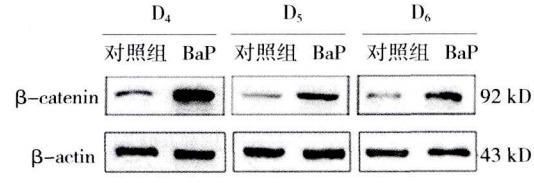
2.3.2　蛋白水平检测　Western blot 检测了对照组孕鼠和 0.2 mg/(kg·d)的 BaP 染毒孕鼠在妊娠 D_4、D_5 和 D_6 子宫内膜中 β-catenin 蛋白的表达。结果发现 BaP 暴露组相比对照组 β-catenin 的蛋白表达水平增高（图 5A）。免疫组化结果显示，在对照组，D_4 β-catenin 只有在腔上皮有少量表达，而 BaP 处理组 β-catenin 表达较对照组有所增高，在 D_5、D_6 BaP 组孕鼠子宫中 β-catenin 也更多地表达在腔上皮和基质细胞（图 5B）。



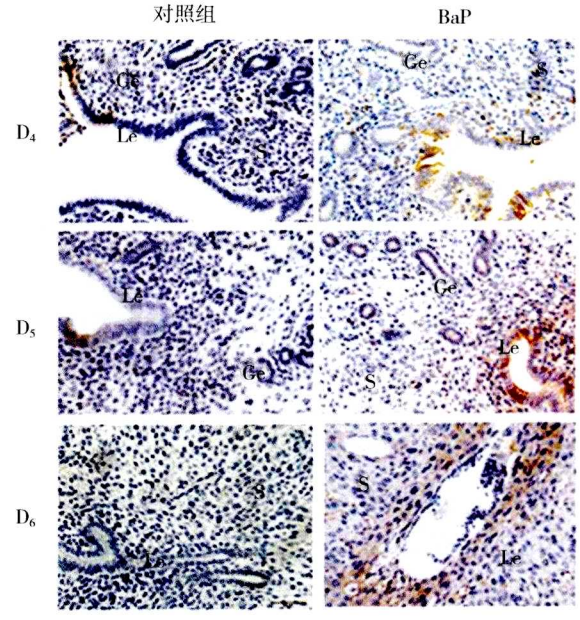
a：与对照组比较，P<0.05

图 4　BaP 暴露影响孕 D_4，D_5，D_6 孕鼠子宫内膜 β-catenin 的 mRNA水平（$\bar{x}\pm s$，n=6）

Fig.4　Effect of BaP exposure on β-catenin expression in tissues of D_4, D_5, D_6 pregnant mice（$\bar{x}\pm s$，n=6）



A. Western blot 检测结果



B. 免疫组化检测结果

图 5　BaP 暴露对 Wnt 信号通路中 β-catenin 蛋白表达的影响(400×)

Fig.5　Effect of BaP exposure on β-catenin protein expression in the uterine tissues of D_4, D_5, D_6 pregnant mice(400×)

3 讨 论

多环芳烃是一类普遍存在的环境污染物，主要来源于烟草烟雾、煤炭燃烧、汽车尾气和室内烹调油烟，易在水体、土壤和作物中残留蓄积，是影响人群健康的大气颗粒物质主要的载体成分[8-9]。人群流行病学研究表明，大气颗粒污染物中的 BaP 除了造成呼吸系统疾病外，还会损害人群的生殖健康，如干扰性激素的合成与分泌，降低精子数量及活力，抑制精子生成，降低妊娠率，增加早产、死产发生率等。香烟中的 BaP 可引起新生小鼠早熟原始卵泡的激活从而影响其成年后的生殖功能[10]。Miller 等[11]证实给予雌性小鼠 BaP 腹腔注射染毒可导致卵巢黄体数目和体积的持续减少且具有剂量-反应关系。苯并芘作为证实的雌激素类似物，对生殖系统的影响不容忽视。虽然研究已经证实 BaP 对于妊娠结局的不良影响，而对于妊娠早期，胚胎植入这个时期的影响，研究相对较少。课题组前期通过建立 BaP染毒模型发现，0.2 mg/(kg·d)的 BaP 染毒剂量将会导致子宫内膜的组织形态学改变，促进胚胎着床的胞饮突数目明显下降，证实了 BaP 暴露对胚胎着床的影响[12]，但其中的机制却尚未阐明。基于此，本实验选用了前期证实的 BaP 有效染毒剂量0.2 mg/kg，统计 BaP 暴露后小鼠胚胎着床数，并进一步探讨 BaP 干扰胚胎着床的机制。

胚胎着床是一个复杂的过程，这个过程涉及许多蛋白分子和信号通路[13-14]，其中经典的 Wnt 信号通路是比较受关注和广泛研究的一条。在经典 Wnt 信号通路中，Wnt 配体与其受体结合，激活下游的 β-catenin 而发挥各种生理功能，包括胚胎的形成、组织和器官的发生、细胞分化等[15]。有文献报道，检测早孕小鼠子宫内膜中 Wnt 及其受体 Fzd 基因的时空表达变化发现，多个 Wnt 家族成员及其受体Fzd 的基因表达在着床窗口期(D_4~D_5)增高，尤其是Wnt4 和 Wnt7a 在着床点表达明显增高[16]，而其下游的 β-catenin 异常表达也会影响子宫内膜的蜕膜化，从而导致着床失败[17]。因此，提出猜想：BaP 对胚胎着床的影响可能与 Wnt 信号通路有关。于是实验对经典 Wnt 信号通路中 β-catenin 和 Wnt7a 的表达进行了检测。Western blot 结果显示，在妊娠 D_4、D_5、D_6，BaP 处理组小鼠子宫内膜 Wnt7a 蛋白水平出现下调，组化也显示，在对照组 Wnt7a 主要表达在腔上皮，基质细胞以及腺上皮，而 BaP 处理后，表达出现明显下降，这与 Western blot 结果一致。而在经典 Wnt 信号通路中，除了 Wnt 配体，β-catenin 的激活对于后续生物学过程的进行不可或缺[18]。为了进一步确认 BaP 暴露后对于 Wnt 信号通路的干扰，对 β-catenin 的表达进行了检测。发现 β-catenin 与 Wnt7a 的表达出现相反的变化，Western blot 显示，BaP 暴露后 β-catenin 的蛋白表达水平较对照组升高，而其在子宫腔上皮的表达也逐渐增高，并且 D_6 在基质细胞表达出现增高，有文献报道，Wnt/β-catenin 与胚泡对子宫内膜的粘附有关，抑制或过表达 β-catenin 都将导致胚胎植入失败，导致不孕[19]。同时，在 1 项对具有雌激素效应的烈性杀虫药硫丹的研究中发现，药物暴露后小鼠生育能力下降，孕 D_5 的小鼠子宫 Wnt7a 的表达出现下调，β-catenin 出现上调[20]，也就是说，适当适时的 Wnt/β-catenin 表达对于早期妊娠至关重要。有研究报道，β-catenin 与子宫腺体的发生，以及子宫内膜细胞的增殖和凋亡有关[21]，这些都可能造成子宫内膜容受性的受损，而导致着床失败。同时通过基因敲除实验也发现 Wnt7a 缺失后，小鼠子宫缩小，子宫腺体形成缺乏，进而影响子宫内膜容受性的建立，使妊娠率显著下降[22]。本研究中发现 BaP 暴露干扰 Wnt7a 和 β-catenin 的表达，导致着床失败，这是否与子宫腺体形成受损、子宫内膜细胞的凋亡平衡打破，进而子宫内膜容受性下降有关，同时有哪些重要的分子和信号通路参与了这一过程，这些都需要后面的研究中进行深入探索。

基于 Wnt 家族对着床和妊娠的重要意义，以及实验所发现的 BaP 暴露后 Wnt7a、β-catenin 的异常改变，本研究推测 BaP 干扰了 Wnt 信号通路，并且最终导致了胚胎着床的失败，证实了 Wnt 蛋白在BaP 暴露干扰胚胎着床中的重要意义，这为进一步探究 BaP 生殖毒性的分子机制提供了线索，也为环境污染物危害的减少和预防提供了参考。

参 考 文 献

[1] 宋筱瑜，王华骞. 乳腺上皮细胞经致癌物苯并芘和 4-甲基亚硝胺-1-(3-吡啶)-1 丁酮联合诱导后的生物学特性变化研究[J]. 卫生

研究，2011，40(3)：368-370.

[2] Archibong AE，Inyang F，Ramesh A，et al. Alteration of pregnancy related hormones and fetal survival in F-344 rats exposed by inhalation to benzo[a]pyrene[J]. Reprod Toxicol，2002，16(6)：801-808.

[3] Batel A，Linti F，Scherer M，et al. Transfer of benzo[a]pyrene from microplastics to Artemia nauplii and further to zebrafish via a trophic food web experiment：CYP1A induction and visual tracking of persistent organic pollutants[J]. Environ Toxicol Chem，2016，35(7)：1656-1666.

[4] Waylen AL，Metwally M，Jones GL，et al. Effects of cigarette smoking upon clinical outcomes of assisted reproduction：a meta-analysis[J]. Hum Reprod Update，2009，15(1)：31-44.

[5] Benedict MD，Missmer SA，Vahratian A，et al. Secondhand tobacco smoke exposure is associated with increased risk of failed implantation and reduced IVF success[J]. Hum Reprod，2011，26(9)：2525-2531.

[6] Soldin OP，Makambi KH，Soldin SJ，et al. Steroid hormone levels associated with passive and active smoking[J]. Steroids，2011，76(7)：653-659.

[7] Geng Y，Gao R，Chen X，et al. Folate deficiency impairs decidualization and alters methylation patterns of the genome in mice[J]. Mol Hum Reprod，2015，21(11)：844-856.

[8] Anthony AE，Remensh A，Inyang F，et al. Endocrine disruptive actions of inhaled benzo (a)pyrene on ovarian function and fetal survival in fisher F-344 adult rats[J]. Reprod Toxixol，2012，34(4)：635-643.

[9] Oliveira M，Slezakova K，Delerue-Matos C，et al. Exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons and assessment of potential risks in preschool children[J]. Environ Sci Pollut Res Int，2015，22(18)：13892-13902.

[10] Sobinoff AP，Pye V，Nixon B，et al. Jumping the gun：smoking constituent BaP causes premature primordial follicle activation and impairs oocyte fusibility through oxidative stress[J]. Toxicol Appl Pharm，2012，260(1)：70-80.

[11] Miller MM，Plowchalk DR，Weitzman GA，et al. The effect of benzo(a)pyrene on murine ovarian and corpora lutea volumes[J]. Am J Obstet Gynecol，1992，166(5)：1535-1541.

[12] Zhao Y，Chen X，Liu X，et al. Exposure of mice to benzo(a)pyrene impairs endometrial receptivity and reduces the number of implantation sites during early pregnancy[J]. Food Chem Toxicol，2014，69：244-251.

[13] Muñoz-Descalzo S，Hadjantonakis AK，Arias AM. Wnt/β-catenin signalling and the dynamics of fate decisions in early mouse embryos and embryonic stem(ES) cells[J]. Semin Cell Dev Biol，2015，47：101-109.

[14] Zhang YM，Zhang YY，Bulbul A，et al. Baicalin promotes embryo adhesion and implantation by upregulating fucosyltransferase Ⅳ(FUT4) via Wnt/beta-catenin signaling pathway[J]. FEBS Lett，2015，589(11)：1225-1233.

[15] Zhou F，Huo J，Liu Y，et al. Elevated glucose levels impair the WNT/β-catenin pathway via the activation of the hexosamine biosynthesis pathway in endometrial cancer[J]. J Steroid Biochem Mol Bio，2016，159：19-25.

[16] Hayashi K，Erikson DW，Tilford SA，et al. Wnt genes in the mouse uterus：potential regulation of implantation[J]. Biol Reprod，2009，80(5)：989-1000.

[17] Jeong JW，Lee HS，Franco HL，et al. Beta-catenin mediates glandular formation and dysregulation of beta-catenin induces hyperplasia formation in the murine uterus[J]. Oncogene，2009，28(1)：31-40.

[18] Engert S，Burtscher I，Liao WP，et al. Wnt/β-catenin signaling regulates Sox17 expression and is essential for organizer endoderm formation in the mouse[J]. Development，2013，140(15)：3128-3138.

[19] Li J，Zhang JV，Cao YJ，et al. Inhibition of the beta-catenin signaling pathway in blastocyst and uterus during the window of implantation in mice[J]. Biol Reprod，2005，72(3)：700-706.

[20] Ingaramo PI，Milesi MM，Schimpf MG，et al. Endosulfan affects uterine development and functional differentiation by disrupting Wnt7a and β-catenin expression in rats[J]. Mol Cell Endocrinol，2016，425：37-47.

[21] Tepekoy F，Akkoyunlu G，Demir R. The role of Wnt signaling members in the uterus and embryo during pre-implantation and implantation[J]. J Assist Reprod Genet，2015，32(3)：337-346.

[22] Dunlap KA，Filant J，Hayashi K，et al. Postnatal deletion of Wnt7a inhibits uterine gland morphogenesis and compromises adult fertility in mice[J]. Biol Reprod，2011，85(2)：386-396.

（责任编辑：冉明会）