妇幼合并症 DOI:10.13406/j.cnki.cyxb.001217

双酚 A（BPA）对人原代绒毛外滋养细胞（EVT）迁移和侵袭能力的影响

兰 曦[1],马明福[1],王应雄[2],杨智曦[1],杨玉有[1],张天枫[1],赵乐天[1],李练兵[1],丁裕斌[2]

（1. 重庆市人口和计划生育科学技术研究院、国家卫生和计划生育委员会出生缺陷与生殖健康重点实验室,重庆 400020;
2. 重庆医科大学公共卫生与管理学院、生殖生物学实验室,重庆 400016）

【摘 要】目的:研究双酚 A(bisphenol A,BPA)对绒毛外滋养细胞(extravillous trophoblasts,EVT)迁移和侵袭能力的影响。**方法**:本研究共收集 98 例胎盘绒毛标本,采用随机分组的方式将 EVT 细胞分为对照组和不同浓度的 BPA 处理组(每组≥3 例)。用免疫荧光法(immunofluorescence,IFC)对分离的对照组 EVT 细胞进行鉴定;BPA 暴露 48 h 后,用流式细胞术(FCM)检测 BPA 暴露对 EVT 细胞活力、凋亡和增殖的影响;用 Transwell 法检测 EVT 细胞的迁移和侵袭能力。**结果**:①IFC 显示 EVT 细胞中人类白细胞抗原 G (human leukocyte antigen G,HLA-G)阳性细胞的比例即 EVT 细胞的纯度>92.7%;②流式细胞术和免疫印迹法显示非毒性剂量的 BPA 不影响 EVT 细胞的凋亡(F=1.808,P=0.233)、活力(F=0.624,P=0.609)和增殖能力(F=0.174,P=0.913;F=0.260,P=0.852);③Transwell 显示 EVT 的迁移和侵袭能力随 BPA 浓度的增高而呈剂量依赖性增强(F=24.080,P=0.000;F=144.900,P=0.000)。**结论**:BPA 以剂量依赖的方式增强 EVT 细胞的迁移和侵袭能力。

【关键词】双酚 A(BPA);绒毛外滋养细胞(EVT);迁移和侵袭

【中图分类号】R394.6 **【文献标志码】**A **【收稿日期】**2016-12-13

Effect of bisphenol A(BPA) on migration and invasion of extravillous trophoblast(EVT) cells

Lan Xi[1],Ma Mingfu[1],Wang Yingxiong[2],Yang Zhixi[1],Yang Yuyou[1],Zhang Tianfeng[1],Zhao Letian[1],Li Lianbing[1],Ding Yubin[1]

(1. The Key Laboratory of Birth Defects and Reproductive Health of the National Health and Family Planning Commission,Chongqing Population and Family Planning Science and Technology Research Institute;
2. Laboratory of Reproductive Biology,School of Public Health and Management,Chongqing Medical University)

【Abstract】*Objective*:To study the effect of bisphenol A(BPA) on the migration and invasion abilities of extravillous trophoblasts (EVT). ***Methods***:In this study,98 placental villi were collected and randomly divided into control group and BPA treatment groups (more than 3 cases in each group). Immunofluorescence(IFC) was used to identify the purity of control EVT cells;Flow cytology(FCM) was used to test the cell viability,apoptosis and proliferation ability of EVT after BPA exposure for 48 h. Transwell assay was used to measure the migration and invasion ability of EVT cells. ***Results***:①IFC assay showed that the purity of EVT(human leukocyte antigen G,HLA-G positive cells) was above 92.7%. ②FCM and Western blot assays indicated that cell apoptosis(F=1.808,P=0.233),viability (F=0.624,P=0.609) and proliferation(F=0.174,P=0.913;F=0.260,P=0.852) ability of EVT were not affected by the non-toxic doses of BPA. ③BPA increased the migration and invasion ability of EVT in a dose-dependent manner(F=24.080,P=0.000;F=144.900,P=0.000). ***Conclusion***:BPA increased the migration invasion abilities of EVT cells in a dose-dependent manner.

【Key words】bisphenol A(BPA);extravillous trophoblasts(EVT);migration and invasion

作者介绍:兰 曦,Email:371439622@qq.com,
研究方向:胚胎植入。

通信作者:李练兵,Email:lilianbing677@163.com。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(编号:81130051、81671493);国家卫生计生委出生缺陷与生殖健康重点实验室开放课题资助项目(编号:1201);重庆市科学技术委员会资助项目(编号:cstc2009CA5001)。

优先出版:http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1046.r.20170313.1524.094.html (2017-03-13)

绒毛外滋养细胞(extravillous trophoblasts,EVT)起源于细胞滋养层细胞(cytotrophoblasts,CTB),在早期妊娠中,EVT 侵袭到子宫蜕膜细胞和子宫螺旋动脉进而实现胎盘锚定和螺旋动脉重塑[1]。成功的妊娠过程中,EVT 的侵袭扮有至关重要的作用[2]。EVT 细胞侵袭能力可能受多种因素的影响。滋养细胞的侵袭不足将会导致胎盘浅着床和子宫螺旋动脉重塑障碍,进而导致子痫前期和胎儿宫内生长发育迟缓等妊娠疾病;而滋养细胞侵袭过度将会导致胎盘异位症和绒毛膜癌等疾病[3-4]。

双酚 A(bisphenol A,BPA)是一种环境内分泌干扰物的代表物质,被广泛应用于塑料制品和环氧树脂的生产中。日常生活中,包括孕龄内女性和孕妇在内的广大人群无法避免与 BPA 接触,可经皮肤和个人护理等产品将其摄入体内[5]。BPA 被认为是降低女性生育能力的因素之一[6],可损伤人子宫内膜基质细胞、损害大鼠和小鼠的卵子形成、减少植入位点和改变社交性行为[7-12]。小鼠和大鼠的在体实验表明,BPA 可干扰胎盘形成、造成退行性改变,进而导致生殖紊乱[13-16]。BPA 暴露影响人滋养细胞正常的侵袭、增殖、凋亡和分化[17-18]。但 BPA 对 EVT 细胞侵袭的影响和机制仍不清楚。

目前,以 HTR-8/SVneo 为代表的滋养细胞系是研究 EVT 细胞的常用模型[19],但它与分离的原代 EVT 具有不同的全基因转录组和甲基化组[20],其永生化的特性亦与不可增殖的原代 EVT 有诸多不同。本文根据 Male 等[21]分离原代滋养细胞的方法,即用胰酶消化-差速贴壁的方法,用 EVT 的特异性标志物人类白细胞抗原 G(human leukocyte antigen G,HLA-G)来对其纯度进行验证,拟探究环境类雌激素 BPA 对人原代 EVT 迁移和侵袭能力的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 临床标本 临床标本的使用皆严格遵循重庆医科大学实验伦理委员会的管理与规定。选择接受人流手术的病例 98 例,纳入标准:宫腔内见孕囊、胚芽,内见原始心管搏动,孕期为 6~8 周。取其无菌胎盘绒毛,于含双抗的 F12 培养基(冰盒中)取回,即刻进行分离。

1.1.2 实验试剂 BPA(Sigma)、Ham's F12 培养基(Corning)、胎牛血清(Corning)、淋巴细胞分离液(Nycomed)、纤连蛋白(BD biosciences)、胰酶(碧云天)。异硫氰酸荧光黄(fluorescein isothiocyanate,FITC)标记的荧光鼠二抗(碧云天),DAPI 核染料(碧云天)。Transwell 小室和 Matrigel 基质胶(BD biosciences)。HLA-G 鼠抗体(Santa Cruze)、增质细胞核抗原(proliferating cell nuclear antigen,PCNA)兔抗体(cell signaling technology,CST),β-actin 兔抗体(中杉金桥),SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液(5×,碧云天)、SDS-PAGE 凝胶配制试剂盒(碧云天),脱脂牛奶(Bio-rad)。

1.2 方法

1.2.1 绒毛外滋养细胞的分离和培养方法 ①用纤连蛋白(20 μL 溶解于 1 mL Ham's F-12 培养基中)包被 35 mm 直径的细胞培养皿,室温下孵育 45 min 后吸出皿内的溶液,即刻使用或存于-20 ℃(2 周内使用)。②将胰酶预热至 37 ℃。③将胎盘绒毛用 PBS 清洗后置于干净的培养皿上,轻轻将滋养细胞从与其连接的致密结缔组织上分离下来,弃掉残留的膜组织。用无菌镊子或剪刀等将绒毛组织上的血块除去。④将组织转移到预热的胰酶溶液中,并将此悬液倒入 100 mL 瓶中,同时放入磁力搅拌子。将该 100 mL 瓶放置于磁力搅拌器上 37 ℃搅拌 8~9 min。⑤将胰酶消化后的组织先后用 100 μm 和 40 μm 直径的细胞滤器(Corning)过滤,以 3 000 r/min 的转速离心该滤液 10 min。⑥弃掉上清液,用 10 mL Ham's F12 培养基重悬细胞团块,吸取 5 mL 细胞悬液于预先准备的 8 mL 淋巴细胞分离液中。以 4 000 r/min 的转速离心 20 min。⑦在淋巴细胞分离液和培养基的液面交界处收集细胞,用 20 mL Ham's F12 培养基清洗细胞,以 3 500 r/min 的转速离心 5 min。⑧用 3 mL Ham's F12 培养基重悬细胞团块,以去除胎盘巨噬细胞。于 37 ℃敷箱中孵育 20 min。⑨收集未贴壁的细胞(细胞可即刻使用,或种于纤连蛋白包被的 35 mm 的细胞培养皿中)。以随机分组的方式将分离的 EVT 细胞按实验需要分为对照组和不同浓度的 BPA 处理组,每组≥3 例。

1.2.2 免疫荧光法(immunofluorescence,IFC)鉴定 EVT 细胞 用 HLA-G 对分离的 EVT 细胞进行纯度鉴定。将分离的 EVT 细胞用 PBS 清洗 2 遍,洗去未贴壁的细胞,吸出 PBS,冰甲醇固定细胞 20 min 后再次用 PBS 清洗 3 次,每次 5 min。用 5% BSA 于 37 ℃封闭 1 h,HLA-G 一抗(Santa,1:50 稀释)4 ℃孵育过夜。次日,用 PBS 清洗 3 次,每次 10 min。荧光鼠二抗(碧云天,FITC 标记)37 ℃孵育 1 h,PBS 清洗 3 次,每次 10 min。用 DAPI(碧云天,1:1 000 稀释)染核 10 min,PBS 清洗后,用荧光淬灭剂封片。选取显微镜下任意 5 个视野对 HLA-G 阳性的细胞和总的细胞进行计数,计算其阳性率。

1.2.3 流式细胞术(flow cytology,FCM)检测细胞活力、凋亡和细胞周期 BPA 暴露于人绒毛外滋养细胞 48 h 后,细胞融合约 90%,用胰酶消化 EVT 细胞,离心取细胞沉淀后悬浮于 PBS(细胞活力、凋亡)或预冷 75%乙醇(细胞周期)中,用流式细胞仪(BD biosciences)进行检测。检测细胞活力时,将细胞离心、重悬于 500 μL 含 5 μg/mL 碘化丙啶(propidium

iodide，PI）的 PBS 缓冲液中，活细胞表现出较大的 FS 值和较弱的荧光强度；坏死的细胞碎片具有较小的 FS 值和较弱的荧光性；凋亡细胞显示出较小的 FS 值和较强的荧光强度。通过计算活细胞占所有细胞的百分率，即可得知细胞存活率。检测细胞凋亡时，在 BPA 处理组和对照组中加入 5 μL 标有 FITC 的膜联蛋白 V（annexin V）和 2 μL PI，37 ℃下避光孵育 15 min，用流式细胞仪检测。检测细胞周期时，75%乙醇 4 ℃固定 12 h 以上，离心细胞后加入 50 μL PBS，轻柔吹散细胞，加入 0.5 mL PI，37 ℃避光 30 min，用流式细胞仪检测。

1.2.4 BPA 暴露剂量和方法 用微量天平称取适当 BPA（Sigma）溶解于 DMSO 中，使浓度为 10^{-4} mol/L，-20 ℃保存。待细胞密度达到 70%以上时，将 BPA 溶液加入细胞培养基中使浓度为 10^{-7}、10^{-6}、10^{-5}、5×10^{-5} 和 10^{-4} mol/L，以 0.01% DMSO 为对照组，处理时间为 48 h。

1.2.5 Western blot 检测蛋白表达的变化 待细胞融合约 90%时，PBS 清洗细胞 3 次，将 200 μL 上样缓冲液用中号无菌枪头加入到含细胞的 24 孔板中，搅碎、收集细胞于 EP 管中，100 ℃高温变性 10 min，存放于-80 ℃。将变性的蛋白加入到 8%聚丙烯酰胺凝胶中，以 80 V 进行电泳约 90 min，用湿转法以 100 V 转膜 2 h 至 PVDF 膜上，用 5%脱脂牛奶于 37 ℃摇床中封闭 1 h，一抗（1∶1 000 稀释）4 ℃孵育过夜。PBST 洗去一抗后在 37 ℃下摇床孵育二抗（1∶1 000 稀释）1 h。PBST 洗去二抗后，用 ECL 化学发光法、凝胶成像系统（Bio-rad）进行成像分析、Quantity One 软件进行灰度分析。

1.2.6 Transwell 法检测细胞迁移、侵袭能力 迁移实验：在 Transwell 小室（直径 65 mm，孔径大小为 8 μm）的上室加入 300 μL 含 1×10^5 个细胞的无血清细胞悬液，下室加入 800 μL 含 10%胎牛血清的完全培养基。侵袭 24 h 后，用冰甲醇固定 Transwell 小室膜 30 min，并用 PBS 清洗 3 遍后行苏木精染色 5 min，将膜上的细胞进行梯度酒精脱水、中性树脂封片。显微镜下随机取 5 个高倍视野进行计数，取平均数。

侵袭实验：在迁移实验的基础上，预先将 Matrigel 基质胶以 1∶6 的比例稀释于培养基后，铺于 Transwell 小室中，待基质胶风干后使用。上室中加入 300 μL 含 3×10^5 个细胞的无血清培养基细胞悬液。其余步骤同 Transwell 迁移实验。

1.3 统计学分析

采用 GraphPad 5.0 软件进行数据分析，梯度浓度 BPA 处理组与对照的比较采用 ANOVA 检验法，数据采用 F 值和 P 值表示。所有实验均重复 3 次以上，检验水准 $\alpha=0.05$。

2 结 果

2.1 绒毛外滋养细胞的鉴定

根据 Male[21]的方法分离 EVT 细胞，并种植于纤连蛋白包被的 6 孔板内，可贴壁生长并存活至少 1 周。显微镜下观察，可见 EVT 细胞的形态呈多边形或梭形（图 1）。免疫荧光法检测在 EVT 细胞中特异性表达的 HLA-G，结果显示（图2），HLA-G 阳性的细胞比例在 92.7%以上，故分离的 EVT 细胞纯度较高，证实该细胞为 EVT 细胞。

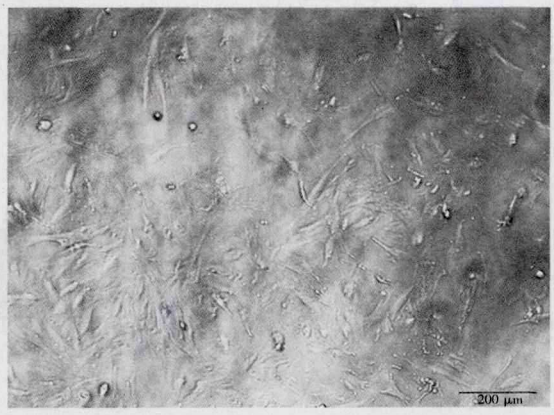
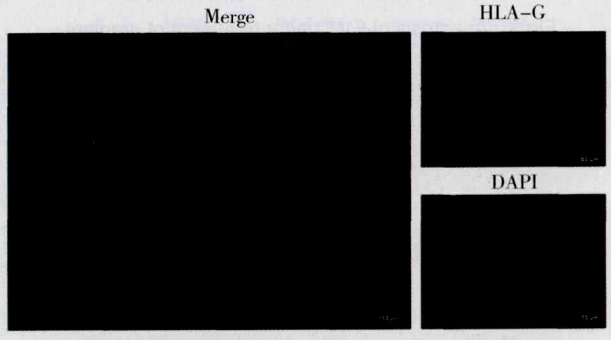


图 1 人原代 EVT 细胞形态学图片

Fig.1 The morphology of EVT



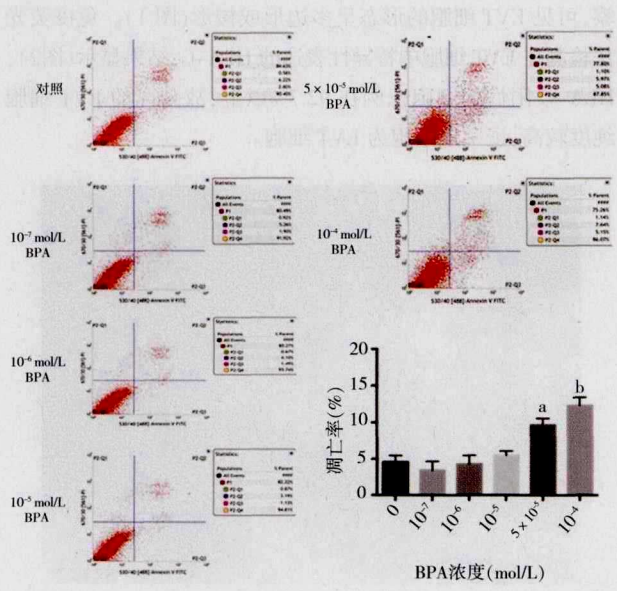
FITC标记的绿色荧光代表 HLA-G 阳性的细胞，DAPI 标记细胞核。图中标尺为 100 μm

图 2 用 HLA-G 鉴定 EVT 细胞的纯度

Fig.2 Identification of EVT by HLA-G

2.2 BPA 暴露对 EVT 细胞活力和凋亡的影响

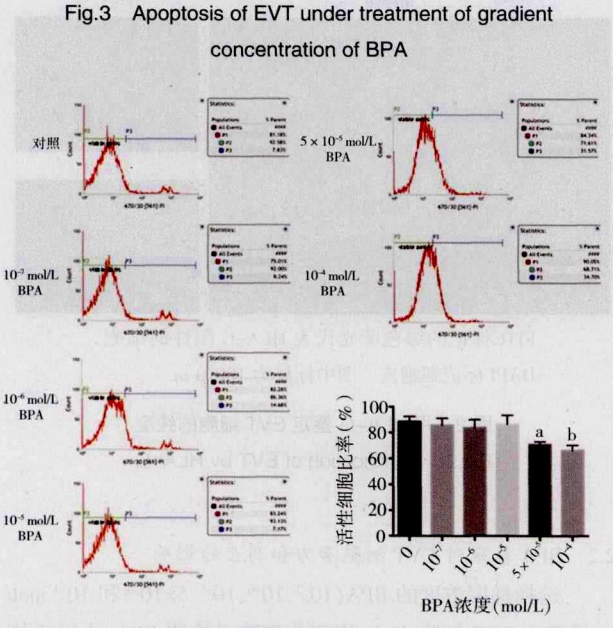
选择梯度浓度的 BPA（10^{-7}、10^{-6}、10^{-5}、5×10^{-5} 和 10^{-4} mol/L）暴露于 EVT 细胞 48 h，用流式细胞术检测 BPA 对 EVT 细胞活力和凋亡的影响。结果显示，5×10^{-5} mol/L 和 10^{-4} mol/L 浓度的 BPA 处理组中 EVT 凋亡细胞的比例（P2-Q2 和 P2-Q3 象限）明显增多（F=37.540，P=0.000，图 3）、活细胞比例明显减少（F=10.490，P=0.000，图 4），提示 5×10^{-5} mol/L 和 10^{-4} mol/L 浓度的 BPA 增加了 EVT 细胞的凋亡、抑制 EVT 细胞的活力，而 10^{-5} mol/L 及更小浓度的 BPA 对 EVT 的凋亡（F=1.808，P=0.233，图 3）和活力细胞的比例（F=0.624，P=0.609，图 4）没有影响，提示该浓度的 BPA 对 EVT 细胞的凋亡和活力没有影响。因此排除 5×10^{-5} mol/L 和 10^{-4}mol/L 这 2 个浓度作为 BPA 对 EVT 的暴露剂量，而选择非毒性剂量的 10^{-7}、10^{-6}、10^{-5} mol/L 作为 BPA 暴露的功能试验浓度。



a：P<0.01；b：P<0.001

图 3　梯度浓度 BPA 对 EVT 细胞凋亡的影响

Fig.3　Apoptosis of EVT under treatment of gradient concentration of BPA



a：P<0.01；b：P<0.001

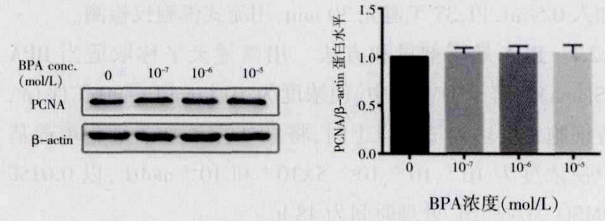
P2表示活细胞

图 4　梯度浓度 BPA 对 EVT 细胞活力的影响

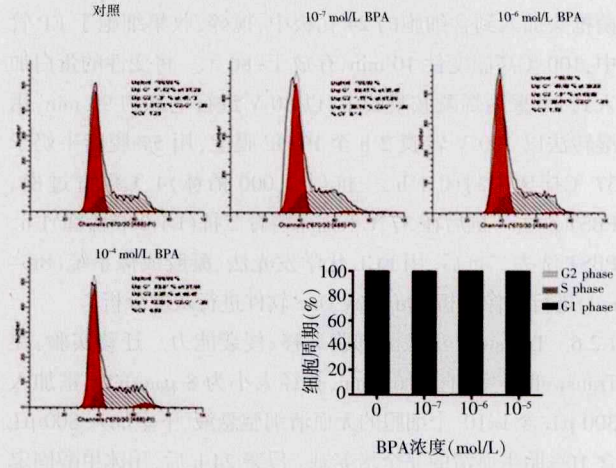
Fig.4　Cell viability of EVT under treatment of gradient concentration of BPA

2.3　BPA 暴露对 EVT 增殖能力的影响

为排除细胞增殖能力对 EVT 迁移和侵袭能力的干扰作用，本研究用免疫印迹法检测 EVT 细胞增殖能力标志因子增殖细胞核抗原（proliferating cell nuclear antigen，PCNA）的表达水平，并用流式细胞术检测细胞周期。结果显示，比起内参蛋白 β-actin 的条带灰度值，BPA 处理组的 PCNA 蛋白条带灰度值没有明显变化，提示所选梯度浓度的 BPA（10^{-7}、10^{-6} 和 10^{-5} mol/L）不改变 EVT 细胞中 PCNA 的蛋白表达水平（F=0.260，P=0.852，图 5A）。细胞周期中 S 期和 G2 期的细胞所占比例常用于表示细胞的增殖情况，本研究发现 BPA 处理组的 EVT 细胞中处于 G1 期、S 期和 G2 期的细胞比例跟对照组相比无明显差异（F=0.174，P=0.913，图 5B）。以上结果表明 BPA 暴露未明显影响 EVT 的增殖能力。



A. BPA 暴露的 EVT 细胞中 PCNA 的表达



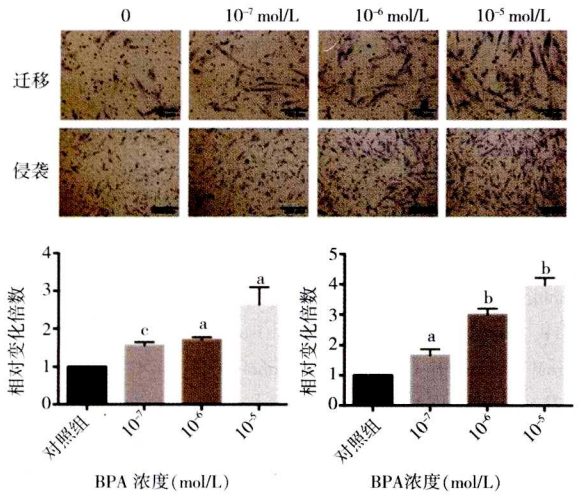
B. FCM 检测 BPA 暴露的 EVT 细胞周期

图 5　非毒性剂量的 BPA 对 EVT 细胞增殖能力的影响

Fig.5　Proliferation of EVT under treatment of non-toxic doses of BPA

2.4　BPA 暴露对 EVT 细胞迁移和侵袭能力的影响

Transwell 法检测 BPA 对 EVT 迁移和侵袭能力的影响，结果显示（图 6），随着 BPA 浓度的增高，穿过 Transwell 小室的 EVT 细胞比对照组（0.01% DMSO）细胞个数明显增多，BPA 处理组比对照组细胞的个数比例随 BPA 浓度升高而逐渐变大（F=24.080，P=0.000），提示 EVT 细胞的迁移能力在 BPA 暴露后呈剂量依赖性增强。BPA 对 EVT 细胞的侵袭能力的影响结果表明，分解 Matrigel 胶、穿过 Transwell 小室膜的细胞个数随 BPA 浓度的增大而增多，BPA 处理组和对照组细胞的个数比例也逐渐增多（F=144.900，P=0.000），表明该细胞的侵袭能力也随着 BPA 浓度的增加而增强。以上结果显示，BPA 以剂量依赖的方式增强 EVT 细胞的迁移和侵袭能力。



a：$P<0.01$；b：$P<0.001$；c：$P<0.05$；对照组为 0.01% DMSO 处理组

A. EVT 细胞迁移　　B. EVT 细胞侵袭

图 6　BPA 暴露对 EVT 细胞迁移和侵袭能力的影响

Fig.6　Migration and invasion of EVT under BPA treatment

3　讨　论

HLA-G 特异性表达在 EVT 细胞中，被视为 EVT 的标志物，可用于 EVT 的鉴定[22]。本研究中分离的细胞中 HLA-G 阳性的细胞在 93.7%以上的纯度，证实 EVT 的纯度较高。分离初期混合细胞中，血细胞和 Hofbauer 细胞均为非贴壁细胞，故分离次日更换培养基可弃掉上述细胞。需注意 EVT 细胞不易贴壁，因此应将 EVT 种植于包被有纤连蛋白的培养皿上。EVT 是滋养细胞中唯一的上皮型细胞，分离后期悬浮细胞后，利用成纤维细胞与上皮细胞贴壁速度的差异，待易贴壁的成纤维细胞先贴壁，收集未贴壁的细胞，可大大减少成纤维细胞的混杂。

本研究通过胰酶消化-差速贴壁的方法分离人原代 EVT 细胞，是环境有害因素对生殖健康相关影响研究中极为理想的细胞模型。环境类雌激素 BPA 被报道可影响癌细胞的迁移和侵袭能力以及对人永生滋养细胞系具有一定的凋亡诱导和侵袭、迁移能力的影响[17,23-24]。研究发现非毒性剂量的 BPA 不影响 EVT 细胞的凋亡、增殖能力，而 Morice 等[18]发现 BPA（10^{-8}、10^{-7} mol/L）抑制绒癌细胞系 JEG-3 的增殖能力。Mørck 等[25]发现 BPA（10^{-9} mol/L）增强绒癌细胞系 Bewo 中分化标志物 β-hCG 的表达、降低凋亡表示物 Caspase3 的表达。虽然 BPA 暴露的时间都为 48 h，造成这些差异的原因可能是不同滋养细胞系之间的差异特性。

本研究发现非毒性剂量的 BPA 暴露 EVT 细胞 48 h 后，其迁移和侵袭能力呈剂量依赖性增强，而 Spagnoletti 等[17]发现 BPA（10^{-11}、10^{-9} 和 10^{-7} mol/L）暴露于滋养细胞系 HTR-8/SVneo 48 h 将抑制其的迁移和侵袭能力。HTR-8/SVneo 虽是 EVT 的永生化细胞系，其与 EVT 细胞之间的差异仍不可避免。除了基因转录组和甲基化组等不同以外，HTR-8/SVneo 和 EVT 的功能因子表达谱亦有差别，如细胞迁移、侵袭能力的负相关因子 E-cadherin 在 HTR-8/SVneo 细胞中无表达，但 EVT 细胞中可见明显的 E-cadherin 表达[26]。因此本研究以人原代 EVT 细胞为研究对象，探究 BPA 对滋养细胞迁移和侵袭的影响，相比较于如 HTR-8/SVneo 等人滋养细胞系模型，人原代 EVT 细胞更接近人体内滋养细胞的特性，EVT 的离体培养可最大限度保留其在体内的生物性状。

BPA 暴露被报道在卵巢癌等几种癌细胞中诱导基质金属蛋白酶（matrix metalloproteinases，MMPs）和/或 integrin-β1/α5 高表达并增强细胞的迁移能力[23,27]。有研究报道 BPA 通过改变上皮间质转化过程（epithelial-mesenchymal transition，EMT）的标志物（如波形蛋白、N-钙黏蛋白）的表达而影响癌细胞的侵袭[28-29]。而上述 BPA 影响下的细胞迁移、侵袭能力的改变涉及 MAPK/Erk[30]、PI3K/Akt 和 IKKβ/NF-κB[29,31-32]等通路的激活。同癌细胞相似，滋养细胞通过上皮-间质转化过程而获得迁移、侵袭表型[33]，综合本研究发现 BPA 暴露对 EVT 功能的改变和上述的研究机制，BPA 影响 EVT 细胞的迁移和侵袭能力的机制有待进一步探讨。

综上所述，本研究以人原代 EVT 细胞为模型，发现低剂量浓度的 BPA 以剂量依赖的方式增加 EVT 细胞的迁移和侵袭能力。该研究提示 BPA 有导致滋养细胞过度侵袭疾病的可能，为寻找生殖系统疾病的致病机制提供了新思路。

参　考　文　献

[1]　Tilburgs T，Crespo AC，van der Zwan A，et al. Human HLA-G+ extravillous trophoblasts：Immune-activating cells that interact with decidual leukocytes[J]. Proc Natl Acad Sci USA，2015，112(23)：7219-7224.

[2]　Moindjie H，Santos ED，Gouesse RJ，et al. Preimplantation factor is

an anti-apoptotic effector in human trophoblasts involving p53 signaling pathway[J]. Cell Death Dis,2016,7(12):e2504.

[3] Barber A,Robson SC,Myatt L,et al. Heme oxygenase expression in human placenta and placental bed:reduced expression of placenta endothelial HO-2 in preeclampsia and fetal growth restriction[J]. FASEB J,2001,15(7):1158-1168.

[4] Nakashima A,Shiozaki A,Myojo S,et al. Granulysin produced by uterine natural killer cells induces apoptosis of extravillous trophoblasts in spontaneous abortion[J]. Am J Pathol,2008,173(3):653-664.

[5] Maffini MV,Rubin BS,Sonnenschein C,et al. Endocrine disruptors and reproductive health:the case of bisphenol-A[J]. Mol Cell Endocrinol,2006,254-255:179-186.

[6] Rubin BS,Lenkowski JR,Schaeberle CM,et al. Evidence of altered brain sexual differentiation in mice exposed perinatally to low,environmentally relevant levels of bisphenol A [J]. Endocrinology,2006,147(8):3681-3691.

[7] Hunt PA,Koehler KE,Susiarjo M,et al. Bisphenol a exposure causes meiotic aneuploidy in the female mouse[J]. Curr Biol,2003,13(7):546-553.

[8] Susiarjo M,Hassold TJ,Freeman E,et al. Bisphenol A exposure in utero disrupts early oogenesis in the mouse[J]. PLoS Genet,2007,3(1):e5.

[9] Varayoud J,Ramos JG,Bosquiazzo VL,et al. Neonatal exposure to bisphenol A alters rat uterine implantation-associated gene expression and reduces the number of implantation sites[J]. Endocrinology,2011,152(3):1101-1111.

[10] Farabollini F,Porrini S,Della Seta D,et al. Effects of perinatal exposure to bisphenol A on sociosexual behavior of female and male rats[J]. Environ Health Perspect,2002,110(s3):409-414.

[11] Forte M,Mita L,Cobellis L,et al. Triclosan and bisphenol a affect decidualization of human endometrial stromal cells[J]. Mol Cell Endocrinol,2016,422:74-83.

[12] Spencer F,Chi L,Zhu MX,et al. Uterine molecular responses to bisphenol A treatment before and after decidual induction in pseudopregnant rats[J]. Int J Hyg Environ Health,2002,204(5-6):353-357.

[13] Lee CK,Kim SH,Moon DH,et al. Effects of bisphenol A on the placental function and reproduction in rats[J]. J Prev Med Public Health,2005,38(3):330-336.

[14] Susiarjo M,Sasson I,Mesaros C,et al. Bisphenol a exposure disrupts genomic imprinting in the mouse[J]. PLoS Genet,2013,9(4):e1003401.

[15] Tachibana T,Wakimoto Y,Nakamuta N,et al. Effects of bisphenol A(BPA) on placentation and survival of the neonates in mice[J]. J Reprod Dev,2007,53(3):509-514.

[16] Tait S,Tassinari R,Maranghi F,et al. Bisphenol A affects placental layers morphology and angiogenesis during early pregnancy phase in mice[J]. J Appl Toxicol,2015,35(11):1278-1291.

[17] Spagnoletti A,Paulesu L,Mannelli C,et al. Low concentrations of bisphenol A and para-nonylphenol affect extravillous pathway of human trophoblast cells[J]. Mol Cell Endocrinol,2015,412:56-64.

[18] Morice L,Benaîtreau D,Dieudonné MN,et al. Antiproliferative and proapoptotic effects of bisphenol A on human trophoblastic JEG-3 cells[J]. Reprod Toxicol,2011,32(1):69-76.

[19] Graham CH,Hawley TS,Hawley RG,et al. Establishment and characterization of first trimester human trophoblast cells with extended lifespan[J]. Exp Cell Res,1993,206(2):204-211.

[20] Novakovic B,Gordon L,Wong NC,et al. Wide-ranging DNA methylation differences of primary trophoblast cell populations and derived cell lines:implications and opportunities for understanding trophoblast function[J]. Mol Hum Reprod,2011,17(6):344-353.

[21] Male V,Gardner L,Moffett A. Isolation of cells from the feto-maternal interface[J]. Curr Protoc Immunol,2012,40:41-11.

[22] Horii M,Li Y,Wakeland AK,et al. Human pluripotent stem cells as a model of trophoblast differentiation in both normal development and disease[J]. Proc Natl Acad Sci USA,2016,113(27):E3882-3891.

[23] Ptak A,Hoffmann M,Gruca I,et al. Bisphenol A induce ovarian cancer cell migration via the MAPK and PI3K/Akt signalling pathways [J]. Toxicol Lett,2014,229(2):357-365.

[24] Derouiche S,Warnier M,Mariot P,et al. Bisphenol A stimulates human prostate cancer cell migration via remodelling of calcium signalling[J]. Springerplus,2013,2(1):54.

[25] Mørck TJ,Sorda G,Bechi N,et al. Placental transport and in vitro effects of bisphenol A[J]. Reprod Toxicol,2010,30(1):131-137.

[26] Batistatou A,Makrydimas G,Zagorianakou N,et al. Expression of dysadherin and E-cadherin in trophoblastic tissue in normal and abnormal pregnancies[J]. Placenta,2007,28(5-6):590-592.

[27] Zhang XL,Liu N,Weng SF,et al. Bisphenol A increases the migration and invasion of triple negative breast cancer cells via oestrogen-related receptor gamma[J]. Basic Clin Pharmacol Toxicol,2016,119(4):389-395.

[28] Lin X,Yang Z,Zhang P,et al. miR-154 inhibits migration and invasion of human non-small cell lung cancer by targeting ZEB2[J]. Oncol Lett,2016,12(1):301-306.

[29] Chen ZJ,Yang XL,Liu H,et al. Bisphenol A modulates colorectal cancer protein profile and promotes the metastasis via induction of epithelial to mesenchymal transitions[J]. Arch Toxicol,2015,89(8):1371-1381.

[30] Kim HR,Kim YS,Yoon JA,et al. Egr1 is rapidly and transiently induced by estrogen and bisphenol A via activation of nuclear estrogen receptor-dependent ERK1/2 pathway in the uterus[J]. Reprod Toxicol,2014,50:60-67.

[31] Ma XF,Zhang J,Shuai HL,et al. IKKbeta/NF-kappaB mediated the low doses of bisphenol A induced migration of cervical cancer cells [J]. Arch Biochem Biophys,2015,573:52-58.

[32] Ptak A,Gregoraszczuk EL. Bisphenol A induces leptin receptor expression,creating more binding sites for leptin,and activates the JAK/Stat,MAPK/ERK and PI3K/Akt signalling pathways in human ovarian cancer cell[J]. Toxicol Lett,2012,210(3):332-337.

[33] Zuo Q,Huang S,Zou Y,et al. The lnc RNA SPRY4-IT1 modulates trophoblast cell invasion and migration by affecting the epithelial-mesenchymal transition[J]. Sci Rep,2016,6:37183.

（责任编辑：张辉洁）