DOI:10.13406/j.cnki.cyxb.000954

孕早期苯并(a)芘暴露对小鼠胚胎着床的影响

沈　茶,何俊琳,刘学庆,丁裕斌,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教研室,重庆　400016)

【摘　要】**目的**:探讨孕早期 BaP 暴露对胚胎着床的影响,为进一步完善 BaP 对雌性生殖功能的影响提供实验依据。**方法**:将 60 只孕鼠随机分为对照组和 BaP 组,每组 30 只,每组再随机分成 3 小组,每组 10 只。从妊娠第 1 天对照组用玉米油、BaP 组用 0.2 mg/(kg·d)剂量 BaP 进行灌胃染毒,至妊娠的第 4 天(D4)、第 5 天(D5)、第 6 天(D6)处死并取材。计数小鼠胚胎着床点数目,ELISA 方法检测小鼠血浆中雌激素和孕激素水平,荧光定量 PCR、Western blot 及免疫组织化学方法检测小鼠子宫内膜中雌激素受体-α(estrogen receptor-α,ERα)和孕激素受体(progesterone receptor,PR)水平。**结果**:比较对照组与 BaP 组的胚胎着床数,BaP 组的着床点数在妊娠 D5 和 D6 均低于对照组,差异有统计学意义($P<0.05$);BaP 组血浆雌激素水平和孕激素水平均高于对照组,差异均有统计学意义($P<0.05$),不同染毒时间的雌激素水平与孕激素水平不同,由高到低依次为妊娠 D6、D5、D4,各时间点的差异均有统计学意义($P<0.05$);ERα 的 mRNA 水平在 BaP 组的表达高于对照组,差异有统计学意义($P<0.05$),不同染毒时间 ERα 的 mRNA 水平不同,妊娠 D6 的表达高于妊娠 D4 和 D5,差异有统计学意义($P<0.05$),PR 的 mRNA 水平在 BaP 组的表达低于对照组,差异有统计学意义($P<0.05$)。Western blot 和免疫组化结果也表明苯并(a)芘暴露组小鼠子宫中ERα 表达量升高,PR 表达量下降。Western blot 和免疫组化结果也表明 BaP 组小鼠子宫中 ERα 表达量升高,PR 表达量下降。**结论**:BaP 可能通过影响孕鼠雌孕激素水平及 PR 的表达模式,最终导致胚胎着床点数的下降。

【关键词】苯并(a)芘;雌孕激素;胚胎着床;小鼠
【中图分类号】R321.3　　【文献标志码】A　　【收稿日期】2016-03-24

Effect of Benzo(a)pyrene on embryo implantation in mice during early pregnancy

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

【Abstract】***Objective***: To illuminate the effects of benzo(a)pyrene(BaP) on embryo implantation during the early pregnancy. ***Methods***: Totally 60 pregnant mice were randomly divided into two groups. The control group was administered corn oil only, and the treated groups were exposed to BaP at 0.2 mg/kg body weight by oral gavage once a day. Pregnant mice were killed on days 4-6 by cervical dislocation, 10 mice each day. The uteri tissues were collected. The numbers of the implantation sites were calculated. The levels of estradiol(E2) and progesterone(P4) in plasma were determined by ELISA. qRT-PCR and Western blot were employed to detect the expression of the estrogen receptor-α(ERα) and the expression of progesterone receptor(PR). ***Results***: Compared with those of control group, the numbers of embryo implantation sites were decreased in the BaP groups($P<0.05$). The result of ELISA indicated that the levels of E2 and P4 in plasma were elevated in BaP treatment groups($P<0.05$). qRT-PCR showed that the mRNA level of ERα was up-regulated($P<0.05$) and mRNA level of PR was down-regulated in the BaP treatment groups($P<0.05$). Western blot and IHC showed that expression of ERα was up-regulated while the expression of PR was down-regulated after BaP exposure. ***Conclusion***: BaP can cause the disorder of ERα and PR in the process of embryo implantation in mice, which will affect the expression pattern of ERα and PR and lead to the decrease in the number of embryo implantation.

【Key words】benzo(a)pyrene; estradiol and progesterone; embryo implantation; mice

作者介绍:沈　茶,Email:shencha@yeah.net,
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.20160513.1029.054.html (2016-05-13)

苯并(a)芘(benzo(a)pyrene,BaP)是多环芳烃类的代表性化合物,作为一种持久性有机污染物,广泛存在于空气和水体中。第三军医大学曹佳团队近几年对重庆市主城区及三峡库区水体污染情况的调查显示在多达 100 多种有机污染物中,多环芳烃是其中检出种类最多的一类,BaP 是其代表性的化合物,污染程度较为严重[1]。另有多篇文献报道国内其他城市的 BaP 污染情况也较为突出[2-3]。以前关于 BaP 的研究主要针对其致癌性及机制,最近几年 BaP 对生殖过程的影响逐渐受到关注。对妊娠中期妇女的一系列流行病学调查结果显示,孕期 BaP暴露可导致胎儿出生体质量下降,身长及头围减小[4-5]。吸烟妇女血液及卵泡液中 BaP 含量显著高于非吸烟妇女,而其妊娠率却明显低于非吸烟者[6-7]。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[8]。动物研究发现雌性大鼠亚慢性暴露于 BaP 可诱导卵巢颗粒细胞凋亡[9]。孕 11~20 d 的大鼠吸入 BaP 可导致胎仔存活率下降[10]。但这些研究多关注于 BaP 对未孕个体生殖系统的影响或是对正常妊娠后胚胎发育的影响,而对于妊娠的早期事件,即胚胎植入过程的影响鲜有报道。

为进一步了解的 BaP 的生殖毒性,本文选择小鼠作为实验对象,采用灌胃法,通过测定小鼠血浆雌孕激素水平和子宫内膜中雌孕激素受体水平等指标,探讨 BaP 对小鼠胚胎着床的影响,以期为探索 BaP 对雌性生殖功能的影响提供新的方向和依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 动物 实验动物为 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],标准条件饲养,自由摄食。

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。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。RIPA 蛋白裂解液购自碧云天生物技术研究所。ERα、PR 抗体购自 Abcam 公司,β-actin 及二抗购北京中杉生物技术有限公司。ECL 发光液购自默克密理博公司。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 周后开始实验。雌雄小鼠按照 2:1 的比例合笼交配,次晨发现阴栓者记为 D1,依次计算妊娠天数。将孕鼠随机分为正常组和 BaP 处理组,每组 45 只小鼠。从 D1 天开始至处死前 1 d,每天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)BaP 灌胃,对照组给予等体积玉米油灌胃。孕鼠分别于 D4、D5 或 D6(每个时间点 15 只孕鼠)早上 8:00~9:00 用乙醚吸入麻醉,眼眶静脉采血后颈椎脱臼处死并分离子宫,留取一部分子宫直接放入 4%多聚甲醛固定,其余部分,D4 小鼠用 PBS 冲洗子宫后(除去胚泡)刮取子宫内膜;D5、D6 小鼠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 血浆雌孕激素水平分析 小鼠处死前,用乙醚吸入麻醉 5~10 s 后,从眼眶采血。将血液收集到肝素钠抗凝管中,20 min 后转移进 1.5 ml EP 管,4 ℃,2 000×g 离心 15 min 后取上清液,用 ELISA 法检测血浆中雌激素和孕激素水平。

1.2.3 着床位点数分析 妊娠 D5 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,计数蓝色的胚胎着床位点的个数,并照相。D6 小鼠胚胎着床位点肉眼可见,可直接处死小鼠,分离子宫计数。

1.2.4 免疫组化分析 取得小鼠子宫后,剪下一部分组织在 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 5 min,浸蜡 3 h 后包埋。用石蜡切片机切成 4 μm 子宫组织切片。去离子水孵育 10 min 后 PBS 浸洗 3 次,每次 3 min;加入免疫组化试剂盒 A 液(封闭用的正常血清),37 ℃孵育 30 min;ERα 和 PR 抗体 (1:50,abcam)4 ℃过夜,阴性对照用非免疫球蛋白代替;复温 30 min 后,加入免疫组化试剂盒 B 液 (生物素标记羊抗兔 IgG 和抗鼠 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 3 min,自来水冲洗干净,饱和碳酸锂蓝化 30 s,自来水冲洗干净,盐酸酒精分色 1 s 左右,自来水冲洗干净。70%、80%、90%、100%乙醇脱水,各 3 min。二甲苯透明 2 次,每次 5 min,中性树胶封片。

1.2.5 定量 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 的吸光度(absorbance,A)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 ERα 和 PR 的表达情况,相对表达量用 $2^{-\Delta\Delta G}$ 法分析。相关引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。

1.2.6 Western blot 分析 取得 D4、D5 和 D6 小鼠子宫内膜组织后,用细胞裂解液提取组织总蛋白,用 BCA 蛋白定量法测定总蛋白浓度。配制分离胶(8%)和浓缩胶(5%);60 V 恒压预电泳 1 h 后上样,80 V 恒压电泳;待充分分离后将蛋白转移至 PVDF 膜上;5%脱脂奶粉封闭 1 h 后,一抗 4 ℃过夜;PBST 清洗 3 次,5 min/次;辣根过氧化物酶标记的二抗孵育 1 h 后,PBST 清洗 3 次,5 min/次;ECL 法显色。

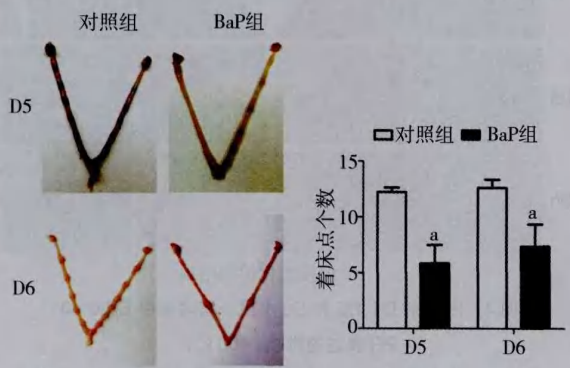
1.3 统计学分析

运用 SPSS 17.0 统计软件进行统计分析,所有数据采用均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示,计量资料服从正态分布及方差齐性的使用独立样本 t 检验或方差分析,不服从正态分布或方差齐性的计量资料使用非参数检验。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

取妊娠 D5 和 D6 的小鼠子宫，观察形态（图 1A），记录着床位点数并进行统计分析（图 1B）。分别比较妊娠 D5 和妊娠 D6 对照组与 BaP 组的着床位点数，结果显示妊娠 D5，BaP组的着床位点数少于对照组，差异有统计学意义（Z=−2.863，P=0.004）；妊娠 D6，BaP 组的着床位点数少于对照组，差异有统计学意义（Z=−2.633，P=0.007），见表 1。



A. 子宫形态图　　B. 胚胎着床点数统

a：与对照组比较，P<0.05

图 1 BaP 影响小鼠胚胎着床位点数（$\bar{x}\pm s$，n=10）

Fig.1 BaP leading to a reduction in the number of implantation sites in mice（$\bar{x}\pm s$，n=10）

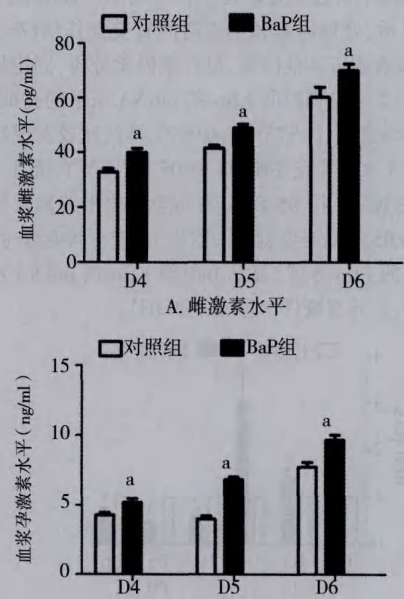
表 1 对照组和处理组着床位点数比较（$\bar{x}\pm s$，n=10）

Tab.1 Comparison of the number of implantation sites（$\bar{x}\pm s$，n=10）

组别	D5	D6
对照组	12.000 ± 1.247	12.800 ± 1.874
BaP组	7.000 ± 4.738	7.100 ± 5.744
Z 值	−2.863	−2.633
P 值	0.004	0.007

2.2 BaP 影响小鼠血浆中雌孕激素的水平

ELISA 分别检测对照组和 BaP 组孕鼠 D4、D5 和 D6 血浆中的雌孕激素水平，见表 2、图 2。雌激素分析结果显示，处理因素与染毒时间没有交互作用（F=0.245，P=0.784）。处理因素的主效应有统计学意义（F=21.425，P=0.000），BaP 组血浆雌激素水平高于对照组。染毒时间的主效应有统计学意义（F=94.844，P=0.000）；进一步两两比较，妊娠 D6 雌激素水平最高，其次为妊娠 D5，妊娠 D4 最低，差异有统计学意义（P<0.05）。



a：与对照组比较，P<0.05

图 2 BaP 诱导小鼠妊娠 D4、D5 和 D6 天血浆雌激素和孕激素水平增高（$\bar{x}\pm s$，n=10）

Fig.2 BaP causing an increase in plasma levels of estradiol and progesterone in the treatment group on D4, D5 and D6（$\bar{x}\pm s$，n=10）

孕激素分析结果显示，处理因素与染毒时间有交互作用（F=6.311，P=0.003）。接着固定其他因素，进行单因素效应分析。BaP 组中不同染毒时间的孕激素水平有差异，差异有统计学意义（F=64.286，P=0.000），对照组中不同染毒时间的孕激素水平有差异，差异有统计学意义（F=66.761，P=0.000），两两比较，处理组中孕激素水平由高到低为妊娠 D6、D5、D4，差异有统计学意义（P=0.000），对照组中，妊娠 D6 的孕激素水平明显高于妊娠 D4 和 D5，差异有统计学意义（P=0.000）。固定染毒时间，分别比较 3 个染毒时间里 BaP 组和对照组的孕激素水平，发现 3 个染毒时间里，BaP 组的孕激素水平均高于对照组，差异有统计学意义（P<0.05）。

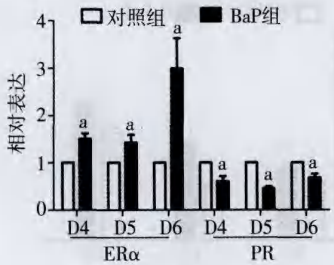
表 2 BaP 对小鼠血清中雌孕激素水平的影响（$\bar{x}\pm s$，n=10）

Tab.2 Effects of BaP on plasma estradiol and progesterone levels（$\bar{x}\pm s$，n=10）

组别	雌激素（pg/ml）			孕激素（ng/ml）		
	D4	D5	D6	D4	D5	D6
对照组	32.84 ± 4.04	41.53 ± 3.43	60.16 ± 11.74	4.29 ± 0.58	4.00 ± 0.73	7.74 ± 1.04
BaP组	39.89 ± 4.92	48.89 ± 4.60	69.94 ± 7.89	5.19 ± 0.83	6.82 ± 0.64	9.67 ± 1.14
时间因素	F=94.844，P=0.000			F=124.480，P=0.000		
处理因素	F=21.425，P=0.000			F=73.469，P=0.000		
交互作用	F=0.245，P=0.784			F=6.311，P=0.003		

2.3　BaP 影响小鼠子宫内膜中雌激素受体-α(estrogen receptor-α,ERα)和孕激素受体(progesterone receptor,PR)的表达

2.3.1　ERα 和 PR 的 mRNA 表达变化　qRT-PCR 方法检测对照组和 BaP 组小鼠在妊娠 D4、D5 和 D6 子宫内膜中 ERα 和 PR 的 mRNA 表达情况如表 3、图 3 所示。ERα 的 mRNA 水平分析显示，处理因素和染毒时间有交互作用(F=5.236，P=0.011)，接着固定其他因素，进行单因素分析，固定处理因素，BaP 组中不同染毒时间 ERα 的 mRNA 水平的高低不同，差异有统计学意义(F=5.236，P=0.019)，两两比较发现妊娠D6 Erα 的 mRNA 水平均较妊娠 D4 和 D5 高，差异有统计学意义(P<0.05)，妊娠 D4 和 D5 ERα 的 mRNA 水平差异没有统计学意义(P>0.05)。固定染毒时间因素，比较不同染毒时间BaP 组和对照组的 ERα 水平，显示 BaP 组 ERα 的 mRNA 水平均高于对照组，差异有统计学意义(P<0.05)。



a：与对照组比较，P<0.05

图 3　BaP 暴露影响 D4、D5 和 D6 孕鼠子宫内膜中 ERα 和 PR mRNA 的表达($\bar{x}\pm s$,n=6)

Fig.3　Effect of BaP exposure on ERα and PR expression in the uterine tissue of D4,D5,D6 pregnant mice($\bar{x}\pm s$,n=6)

PR 水平分析显示，处理因素和染毒时间没有交互作用(F=2.179，P=0.131)，时间因素的主效应没有统计学意义(F=2.179，P=0.131)，处理因素的主效应有统计学意义(F=83.484，P<0.001)，BaP 组 PR 的 mRNA 水平低于对照组。

2.3.2　蛋白水平表达变化　Western blot 结果显示，0.2 mg/(kg·d)BaP 暴露可以上调妊娠 D4、D5 和 D6 小鼠子宫内膜中 ERα 的蛋白表达，同时下调 PR 的蛋白表达(图 4A)。免疫组化结果显示，在对照组中 ERα 主要表达于上皮细胞和基质细胞的细胞核中，在 BaP 组中表达量明显上升。同时，Western blot 显示，PR 的蛋白水平在 BaP 组明显下降。免疫组化结果支持这一结论。在对照组，妊娠 D4 PR 主要表达在腔上皮和基质细胞，随后越来越多的表达在基质细胞，而在 BaP 组，PR 的蛋白表达下降，尤其是在基质细胞，表达量明显降低(图 4B)。

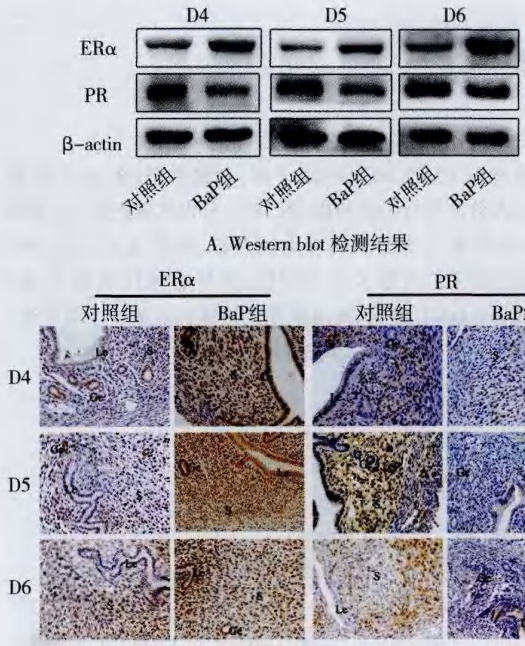


图 4　BaP 对 D4、D5 和 D6 小鼠子宫内膜中 ERα 和 PR 表达的影响(400×)

Fig.4　Effect of BaP on protein expression of ERα and PR of pregnant mice endometria on D4, D5, D6(400×)

3　讨　论

BaP 是一种典型的多环芳烃类化合物，广泛存在于空气和水体中，人类主要通过饮用受污染的水、食用烧烤及烟熏食物等途径摄入 BaP。根据相关文献的报道[11]，本研究模拟人体摄入 BaP 的途径，选用 0.2 mg/(kg·d)的剂量以灌胃的方式从妊娠第一天起对孕鼠进行染毒。实验结果显示 BaP 暴露后，小鼠胚胎着床数明显下降，证明 BaP 对妊娠早期的重要事件——胚胎着床确有不利影响。近年来，已有研究证实了 BaP 暴露与不良生殖结局相关[8,12]，而胚胎着床作为整个妊娠过程中的关键环节，其成功与否直接影响妊娠结局[13]。虽然已有研究显示 BaP 可以导致不良妊娠结局[14]，但其机制尚不明确，而其

表 3　子宫内膜雌激素受体和孕激素受体 mRNA 相对表达量($\bar{x}\pm s$,n=10)

Tab.3　Relative expression of mRNA of ER α and PR ($\bar{x}\pm s$,n=10)

组别	ERα			PR		
	D4	D5	D6	D4	D5	D6
对照组	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00
BaP组	1.51±0.28	1.43±0.40	2.99±1.56	0.61±0.26	0.45±0.10	0.68±0.19
时间因素		F=5.236，P=0.011			F=2.179，P=0.131	
处理因素		F=19.262，P=0.000			F=83.484，P=0.000	
交互作用		F=5.236，P=0.011			F=2.179，P=0.131	

对于妊娠早期事件——胚胎着床的影响更是鲜有报道。

胚胎着床的过程是胚泡和子宫内膜相互作用的过程，其中子宫内膜容受性的建立是保证胚胎成功着床的重要条件[15-16]。子宫内膜的容受状态仅维持在特定的时间段内，称为着床窗口期，在小鼠中大约出现在交配后 4.5 d[15]。围绕胚胎着床可以分为着床前期（D4）、着床窗口期（妊娠第 5 天，D5）和着床后期（D6）[17-18]。由于子宫内膜容受性的建立严格依赖于雌、孕激素的调控[19]，因此检测了 BaP 对小鼠血浆中雌、孕激素水平的影响。检测结果显示，BaP 处理组小鼠着床窗口期前后的雌激素和孕激素水平较正常组明显上升。雌、孕激素对子宫内膜的调节主要通过相应的激素受体发挥作用，即 ERα[20]和 PR[21-23]。进一步对雌孕激素受体的检测发现，在BaP 处理组，小鼠子宫内膜 ERα 的水平明显上升，而 PR 的水平明显下降。有研究指出，雌激素浓度在一个狭窄的范围内决定着子宫内膜容受性的持续时间，在着床窗口期，低浓度的雌激素水平对于子宫内膜的发育及胚胎着床至关重要，而高浓度的雌激素会使着床窗口期很快的关闭，并且抑制着床相关基因的表达，尤其是孕激素受体的表达[16]。因此推测，BaP 打破了小鼠胚胎着床期间雌孕激素的平衡，改变了雌孕激素受体的表达模式，导致了胚胎着床的异常。

综上所述，本实验证实了在孕早期暴露于 BaP 干扰了雌孕激素分泌及其受体的表达，从而影响了胚胎着床。本研究为进一步探索 BaP 的生殖毒性提供了新的方向，同时也为减少孕期妇女 BaP 的职业暴露提供了重要的实验依据。

参 考 文 献

[1] 田怀军，舒为群，张学奎，等. 长江、嘉陵江（重庆段）源水有机污染物的研究[J]. 长江流域资源与环境，2003，12(2)：118-123.

[2] Yu Y，Xu J，Wang P，et al. Sediment-porewater partition of polycyclic aromatic hydrocarbons (pahs) from lanzhou reach of yellow river，china[J]. J Hazard Mater，2009，165(1-3)：494-500.

[3] Li J，Shang X，Zhao Z，et al. Polycyclic aromatic hydrocarbons in water，sediment，soil，and plants of the aojiang river waterway in wenzhou，china[J]. J Hazard Mater，2010，173(1-3)：75-81.

[4] Choi H，Jedrychowski W，Spengler J，et al. International studies of prenatal exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons and fetal growth [J]. Environ Health Perspect，2006，114(11)：1744-1750.

[5] Perera FP，Rauh V，Whyatt RM，et al. Effect of prenatal exposure to airborne polycyclic aromatic hydrocarbons on neurodevelopment in the first 3 years of life among inner-city children[J]. Environ Health Perspect，2006，114(8)：1287-1292.

[6] Neal MS，Hughes EG，Holloway AC，et al. Sidestream smoking is equally as damaging as mainstream smoking on ivf outcomes[J]. Hum Reprod，2005，20(9)：2531-2535.

[7] Neal MS，Zhu J，Foster WG. Quantification of benzo[a]pyrene and other pahs in the serum and follicular fluid of smokers versus non-smokers[J]. Reprod Toxicol，2008，25(1)：100-106.

[8] 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 Pharmacol，2012，260(1)：70-80.

[9] Xu C，Chen JA，Qiu Z，et al. Ovotoxicity and ppar-mediated aromatase downregulation in female sprague-dawley rats following combined oral exposure to benzo[a]pyrene and di-(2-ethylhexyl) phthalate [J]. Toxicol Lett，2010，199(3)：323-332.

[10] 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.

[11] Grova N，Valley A，Turner JD，et al. Modulation of behavior and nmda-r1 gene mrna expression in adult female mice after sub-acute administration of benzo(a)pyrene[J]. Neurotoxicology，2007，28(3)：630-636.

[12] Archibong AE，Ramesh 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 Toxicol，2012，34(4)：635-643.

[13] Paria BC，Reese J，Das SK，et al. Deciphering the cross-talk of implantation：advances and challenges[J]. Science，2002，296(5576)：2185-2188.

[14] Tian S，Pan L，Sun X. An investigation of endocrine disrupting effects and toxic mechanisms modulated by benzo[a] pyrene in female scallop chlamys farreri[J]. Aquat Toxicol，2013(144-145)：162-171.

[15] Zorn TM，Soto-Suazo M，Pellegrini CR，et al. Estradiol receptor binding to the epithelium of uterine lumen and glands：Region-and time-related changes during preimplantation and periimplantation periods studied by autoradiography[J]. Histochem Cell Biol，2003，120(1)：1-12.

[16] Dey SK，Lim H，Das SK，et al. Molecular cues to implantation[J]. Endocrine Reviews，2004，25(3)：341-373.

[17] Chan SY. Effects of prostaglandin e2 and f2 alpha on peri-implantation development of mouse embryos in vitro[J]. Prostaglandins，1991，42(4)：321-336.

[18] Liu G，Zhang X，Lin H，et al. Effects of e-cadherin on mouse embryo implantation and expression of matrix metalloproteinase-2 and -9[J]. Biochem Biophys Res Commun，2006，343(3)：832-838.

[19] Wang H，Dey SK. Roadmap to embryo implantation：Clues from mouse models[J]. Nat Rev Genetics，2006，7(3)：185-199.

[20] Pampfer S，Donnay I. Apoptosis at the time of embryo implantation in mouse and rat[J]. Cell Death Differ，1999，6(6)：533-545.

[21] Nikas G. Endometrial receptivity：Changes in cell-surface morphology[J]. Semin Reprod Med，2000，18(3)：229-235.

[22] Kodaman PH，Taylor HS. Hormonal regulation of implantation[J]. Obstet Gynecol Clin North Am，2004，31(4)：745-766，ix.

[23] Makrigiannakis A，Karamouti M，Petsas G，et al. The expression of receptivity markers in the fallopian tube epithelium[J]. Histochem Cell Biol，2009，132(2)：159-167.

（责任编辑：张辉洁）