

褪黑素参与苯并(a)芘诱导的孕早期卵巢功能异常

徐翰婷 何俊琳 刘学庆 丁裕斌 高茹菲 耿艳清 穆欣艺 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,
重庆医科大学生殖与发育国际合作联合实验室, 重庆 400016)

摘要 该研究探讨了孕早期苯并芘[Benzo(a)pyrene, B(a)P]暴露对卵巢雌激素和孕激素的影响及其可能的机制。将SPF级健康成年雌雄昆明小鼠交配合笼, 次晨查得阴栓则记为孕第1天(D1)。孕鼠随机分为对照组($n=60$)和B(a)P组($n=60$), 每日称重后以0.1 mL/10 g动物体重分别灌胃给予玉米油和0.2 mg/(kg·d)浓度B(a)P。ELISA(enzyme linked immunosorbent assay)方法检测孕D4小鼠血清雌激素(estrogen, E2)、孕激素(progesterone, P4)和褪黑素水平; qRT-PCR检测孕D1~D4小鼠卵巢组织雌孕激素合成限速酶 17β -HSDI(17 β -hydroxysteroid dehydrogenase 1)和 $P450SCC$ (cholesterol side-chain cleavage enzyme)mRNA水平; Western blot和免疫组化法分别检测卵巢组织褪黑素受体MT1(melatonin receptor 1)、MT2(melatonin receptor 2)蛋白质水平。研究结果发现, 与对照组相比, B(a)P暴露导致孕早期小鼠血清中E2、P4明显降低; 同时, 卵巢雌孕激素合成限速酶 17β -HSDI和 $P450SCC$ mRNA水平下调($P<0.05$)。B(a)P组小鼠血清中褪黑素水平明显增高($P<0.01$), 而卵巢黄体细胞MT1、MT2蛋白质水平下降($P<0.05$)。综上所述, 褪黑素及其受体可能参与了B(a)P诱导的孕早期卵巢功能异常。

关键词 苯并(a)芘; 卵巢; 雌孕激素; 褪黑素受体

Melatonin are Involved in Benzo(a)pyrene-Induced Ovarian Dysfunction during Early Pregnancy

Xu Hanting, He Junlin, Liu Xueqing, Ding Yubing, Gao Rufe, Geng Yanqing,
Mu Xinyi, Wang Yingxiong, Chen Xuemei*

(Laboratory of Reproductive Biology, School of Public Health and Management, Joint International Research Laboratory of Reproduction & Development, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

Abstract This paper investigated the effect of Benzo(a)pyrene (B(a)P) on ovarian function in mice during early pregnancy and its mechanism. Adult female and male Kunming mice were mated to produce pregnancy. Female mice were checked the vaginal plug at the next morning, and recorded as “pregnant day 1 (D1)”. The pregnant mice were divided into two groups: control group ($n=60$), BaP-treated group ($n=60$), and then received corn oil and 0.2 mg/(kg·d) B(a)P respectively from D1. The serum and ovaries were collected from D1 to D4, respectively. ELISA was used to detect the levels of serum estrogen, progesterone and melatonin. The mRNA levels of 17β -HSDI and $P450SCC$ in the ovaries were determined by qRT-PCR. Western blot and immunohistochemistry were used to examine the protein levels of MT1 and MT2 in the ovaries. The results showed that B(a)P decreased the levels of serum estrogen and progesterone. The mRNA levels of 17β -HSDI and $P450SCC$ in the ovaries were down-regulated by B(a)P.

收稿日期: 2017-11-09 接受日期: 2018-03-02

国家自然科学基金(批准号: 81573175)资助的课题

*通讯作者。Tel: 023-68485008, E-mail: shirly-cxm@163.com

Received: November 9, 2017 Accepted: March 2, 2018

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.81573175)

*Corresponding author. Tel: +86-23-68485008, E-mail: shirly-cxm@163.com

网络出版时间: 2018-05-21 16:40:33

URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20180521.1640.010.html>

B(a)P caused an increase in the level of serum melatonin at the early stage of pregnancy, while the levels of MT1 and MT2 proteins were decreased in the ovarian corpus luteum cells after the B(a)P treatment. These findings indicate that B(a)P can lead to ovarian dysfunction during early pregnancy and melatonin might be involved in this process.

Keywords benzo(a)pyrene; ovary; estrogen and progesterone; melatonin receptor

苯并(a)芘[Benzo(a)pyrene, B(a)P]是一种亲脂性的多环芳烃类(polycyclic aromatic hydrocarbons, PAHs)环境污染物,具有致突变和致癌性^[1-2]。B(a)P污染广泛,可随汽车废气、烟草与木材燃烧及炭烤食物过程中产生的烟进入人体^[3]。已知B(a)P属于环境雌激素内分泌干扰物(endocrine-disrupting chemicals, EDCs)^[4],对生殖过程产生不利影响,本课题组前期也发现孕早期暴露于B(a)P可以影响小鼠子宫容受性,造成胚胎着床点数下降^[5]。

小鼠早孕期从受精开始至胚胎着床的完成,其中胚胎着床是妊娠的关键环节,只发生在有限的时间内,称为“着床窗”。在小鼠,着床窗口期开始于妊娠第4天,此时胚胎进入子宫,同时卵巢出现一个雌孕激素分泌的高峰,调节小鼠子宫进入容受性状态,以利于胚胎植入^[6]。由于子宫的容受状态与卵巢分泌雌激素(E2)和孕酮(P4)的功能密切相关,本课题组前期结果提示,孕早期暴露于B(a)P可影响子宫容受性,导致胚胎着床数下降,推测其可能干扰了着床前期卵巢雌孕激素的分泌。褪黑素是由松果体分泌的一种吲哚类激素,在调节昼夜节律中发挥着重要作用。近年来研究发现,褪黑素在生殖过程中也扮演重要角色^[7],参与对雌孕激素的调控^[8-10],在哺乳动物的囊胚发育、胚胎植入等过程有重要影响^[11-12]。有研究发现,B(a)P等PAHs物质能够影响血清褪黑素水平^[13],但褪黑素是否参与B(a)P导致的着床前期小鼠卵巢功能异常过程,尚不清楚。

本研究以早孕昆明小鼠作为实验对象,建立B(a)P染毒模型,通过测定孕早期小鼠血浆雌孕激素水平及合成相关基因表达、卵巢褪黑素及其受体水平等指标,探讨褪黑素是否参与了B(a)P所引起的早孕小鼠卵巢功能异常这一过程,初步阐释B(a)P导致早孕小鼠卵巢功能异常的可能机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 本实验动物为SPF级6~8周龄昆明小鼠,体质量为25~30 g,雌雄兼用,购自

重庆医科大学实验动物中心[实验动物生产许可证号: SCXK(渝)2007-0002, 实验动物使用许可证号: SCXK(渝)2007-0001]。温度(22±2) °C,相对湿度(55±10)%, 12 h光照饲养,自由饮水摄食。本研究符合所在单位实验动物伦理委员会所制定的伦理学标准。

1.1.2 试剂 B(a)P(96%纯度)、玉米油(99%纯度)和麻醉用乙醚购自Sigma公司。小鼠褪黑素(MT) ELISA检测试剂盒、小鼠雌激素(E)ELISA检测试剂盒、小鼠孕酮(PROG)ELISA检测试剂盒购自上海研辉生物科技有限公司。MT1抗体购自OriGene公司, MT2抗体购自Novus公司, β-actin抗体购自Sigma公司。RIPA蛋白裂解液、BCA蛋白浓度测定试剂盒购于上海碧云天生物技术有限公司。PBS粉末、枸橼酸钠粉末、免疫组化试剂盒、HRP标记二抗和DAB显色液购自北京中杉生物技术有限公司。Trizol裂解液、MT1引物、MT2引物、Actin引物、PrimeScript RT Reagent Kit及SYBR Premix Ex Taq™ II均为日本TaKaRa产品。

1.2 方法

1.2.1 动物实验与材料收集 小鼠饲养1周后开始实验。于17:00将雌雄小鼠按3:1比例合笼交配,次晨7:00查得阴栓记为D1,苦味酸标记,随机分为正常组和B(a)P组,每组60只小鼠,依次计算妊娠天数。从D1日起,每日称重正常组与B(a)P组小鼠,后以0.1 mL/10 g动物体质量分别灌胃给予玉米油和0.2 mg/(kg·d)浓度B(a)P。孕鼠分别于D1、D2、D3或D4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卵巢,留单侧卵巢直接放入4%多聚甲醛固定,其余部分冻存于液氮中,用于相关实验。

1.2.2 血浆激素水平分析 孕D4小鼠处死前,用乙醚吸入麻醉5~10 s后,眼眶采血,收集于EP管内。全血室温静置20 min后,低温离心(1 000 r/min, 10 min),分离血清。用ELISA检测血清中褪黑素、雌激素和孕激素水平。

1.2.3 Western blot分析 取孕D1~D4小鼠卵巢组织称重后,加入适量RIPA蛋白质裂解液进行组织研

磨提取组织总蛋白,用BCA蛋白质浓度测定试剂盒测定总蛋白浓度,确定上样蛋白质约50 μg 计算蛋白质上样量。配制10% SDS-PAGE分离胶和5% SDS-PAGE浓缩胶,80 V恒压进行电泳;电泳充分后,截取目的蛋白质,以 β -actin为内参,以250 mA湿转至0.44 mm PVDF膜上;电转完毕后,取条带于5%脱脂牛奶内封闭1 h;孵育抗MT1抗体(1:1 000)、抗MT2抗体(1:1 000)和抗 β -actin抗体(1:2 000),4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜。次日,以PBST洗膜(3次 \times 15 min)后,加入5%脱脂牛奶稀释的二抗(1:1 000)孵育1 h;再次用PBST洗膜(3次 \times 15 min)后,现配发光液,ELC法显色,进行条带分析。运用Quantity One(Bio-Rad, Hercules, CA, USA)软件测量显色条带灰度值,以 β -actin为内参,计算目的蛋白相对表达量。

1.2.4 免疫组化(immunohistochemistry, IHC)分析 取小鼠单侧卵巢在4%多聚甲醛中固定24 h后,用75%酒精24 h、85%酒精12 h、95%酒精2 h、100%酒精1 h \times 2梯度脱水,二甲苯透明5~10 s,浸软蜡4 h后用硬蜡包埋。用石蜡切片机切成5 μm 卵巢组织切片,60 $^{\circ}\text{C}$ 烘烤5 h。烘烤组织玻片1~2 h后,脱蜡:二甲苯I、II各1 h。水化:100%、90%、80%、75%梯度酒精水化各4 min,流水冲洗10 min,去离子水浸泡5 min,后用PBS浸洗(3次 \times 3 min)。抗原热修复:组织玻片插入倒满枸橼酸钠溶液的抗原修复盒内,微波炉内高火加热至沸,沸腾2~3 s后中低火抗原热修复15 min,后室温自然冷却。去离子:PBS浸洗(3次 \times 3 min),3% H_2O_2 溶液孵育10 min。封闭:PBS浸洗(3次 \times 3 min),加免疫组化试剂盒封闭用血清,37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴30 min。一抗:MT1和MT2抗体(1:50),4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜。次日室温复温30 min,二抗:PBS浸洗(3次 \times 3 min),免疫组化试剂盒生物素标记羊抗兔IgG,37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴30 min。显色:PBS(3次 \times 3 min),免疫组化试剂盒辣根酶过氧化物酶工作液,37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴30 min;PBS浸洗(3次 \times 3 min),现配DAB显色液避光显色,组织出现明显棕色变化以自来水终止反应。染色:苏木精复染2 min,流水冲洗干净;饱和碳酸锂溶液蓝化3~5 s,流水冲洗干净;盐酸酒精分色2~3 s,流水冲洗干净。封片:75%、80%、90%、100%梯度酒精脱水,各4 min;二甲苯I、II透明,各5 min;中性树脂胶封片。

1.2.5 qRT-PCR分析 采用Trizol Reagent抽提卵巢组织,异丙醇、现配75%乙醇沉淀浓缩RNA,灭菌DEPC水溶解总RNA,紫外分光光度计测总RNA的

吸光度值($1.8 < D_{260}/D_{280} < 2.0$),逆转录为cDNA。qRT-PCR检测17 β -HSD1和P450SCC的表达情况。qRT-PCR反应条件:95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性10 s;95 $^{\circ}\text{C}$ 15 s,61 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,共40个循环。每个样本设立3个复孔,以 β -actin为内参,采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 计算目的基因的相对表达量。

1.2.6 统计分析 每个实验至少重复3次,运用GraphPad Prism 5.0软件进行统计分析。所有数据采用均数 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,对照组与B(a)P组之间的数据采用两独立样本 t 检验。 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 B(a)P对小鼠卵巢雌孕激素分泌的影响

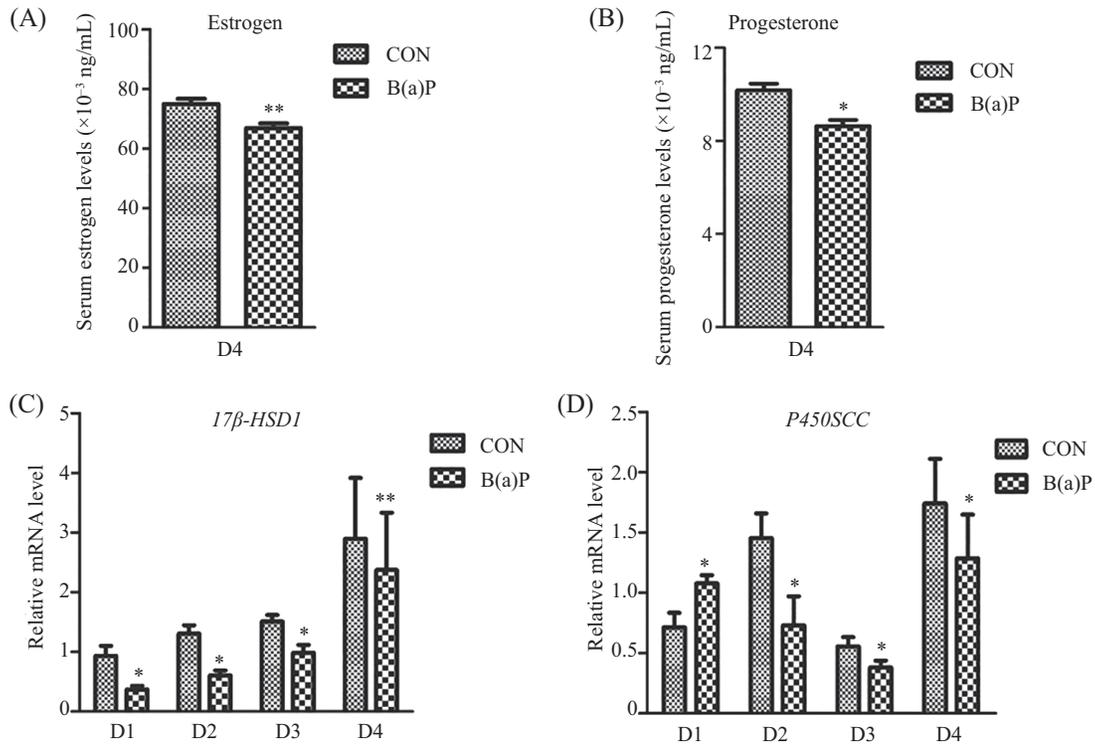
为了明确B(a)P对小鼠子宫容受性的影响是否与卵巢雌孕激素分泌异常有关,我们首先采用ELISA检测孕D4对照组和B(a)P组血清雌激素、孕激素水平,发现相比对照组,B(a)P处理组雌激素、孕激素水平显著降低($P < 0.05$)(图1A和图1B)。由于类固醇激素合成酶是卵巢合成雌孕激素的关键分子,因此采用qRT-PCR检测孕D1~D4对照组和B(a)P组卵巢组织中的雌孕激素合成限速酶17 β -HSD1和P450SCC mRNA水平,发现17 β -HSD1和P450SCC mRNA水平在B(a)P组内较对照组下调明显(图1C和图1D)。上述结果证实,孕早期B(a)P暴露会下调小鼠卵巢中激素合成限速酶的表达从而导致雌孕激素水平下降。

2.2 B(a)P对血清褪黑素水平的影响

鉴于褪黑素在激素调控和胚胎植入过程中均发挥了重要的作用,为了明确B(a)P是否会对褪黑素产生影响,利用ELISA检测了孕D4对照组和B(a)P组孕鼠血清褪黑素水平。结果显示,与对照组相比,B(a)P处理组小鼠血清褪黑素水平明显升高($P < 0.01$)(图2),提示孕早期B(a)P暴露会影响褪黑素的正常水平。

2.3 B(a)P对小鼠卵巢褪黑素受体MT1和MT2蛋白质水平的影响

由于褪黑素主要通过与其高亲和力的受体结合从而发挥作用,为了进一步了解B(a)P对褪黑素的影响,分别采用Western blot和IHC检测了孕D1~D4对照组和B(a)P组卵巢褪黑素受体MT1、MT2蛋白质水平。Western blot结果显示,与对照组相比,B(a)P组MT1、MT2蛋白质水平下降($P < 0.05$)(图3A~图3C)。免疫组化结果发现,MT1、MT2在主要表达于卵巢黄体细胞,B(a)P组蛋白质水平趋势与Western

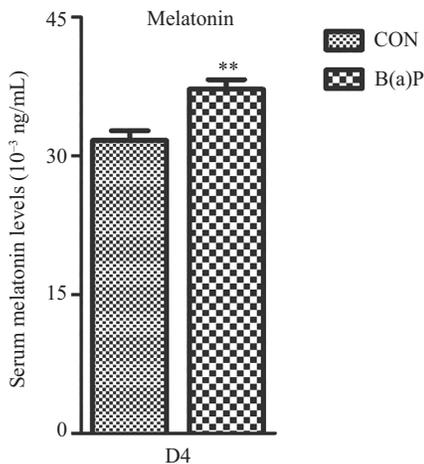


A: 雌激素水平; B: 孕激素水平; C: *17β-HSD1* qRT-PCR检测结果; D: *P450SCC* qRT-PCR检测结果; * $P<0.05$, ** $P<0.01$, 与对照组相比较。

A: estrogen levels; B: progesterone levels; C: the mRNA levels of *17β-HSD1*; D: the mRNA levels of *P450SCC*; * $P<0.05$, ** $P<0.01$ vs control group.

图1 B(a)P对雌孕激素的影响

Fig.1 Effect of B(a)P on the levels of estrogen and progesterone



** $P<0.01$, 与对照组相比较。

** $P<0.01$ vs control group.

图2 ELISA检测B(a)P对血清褪黑素的影响

Fig.2 Effect of B(a)P on the levels of serum melatonin detected by ELISA

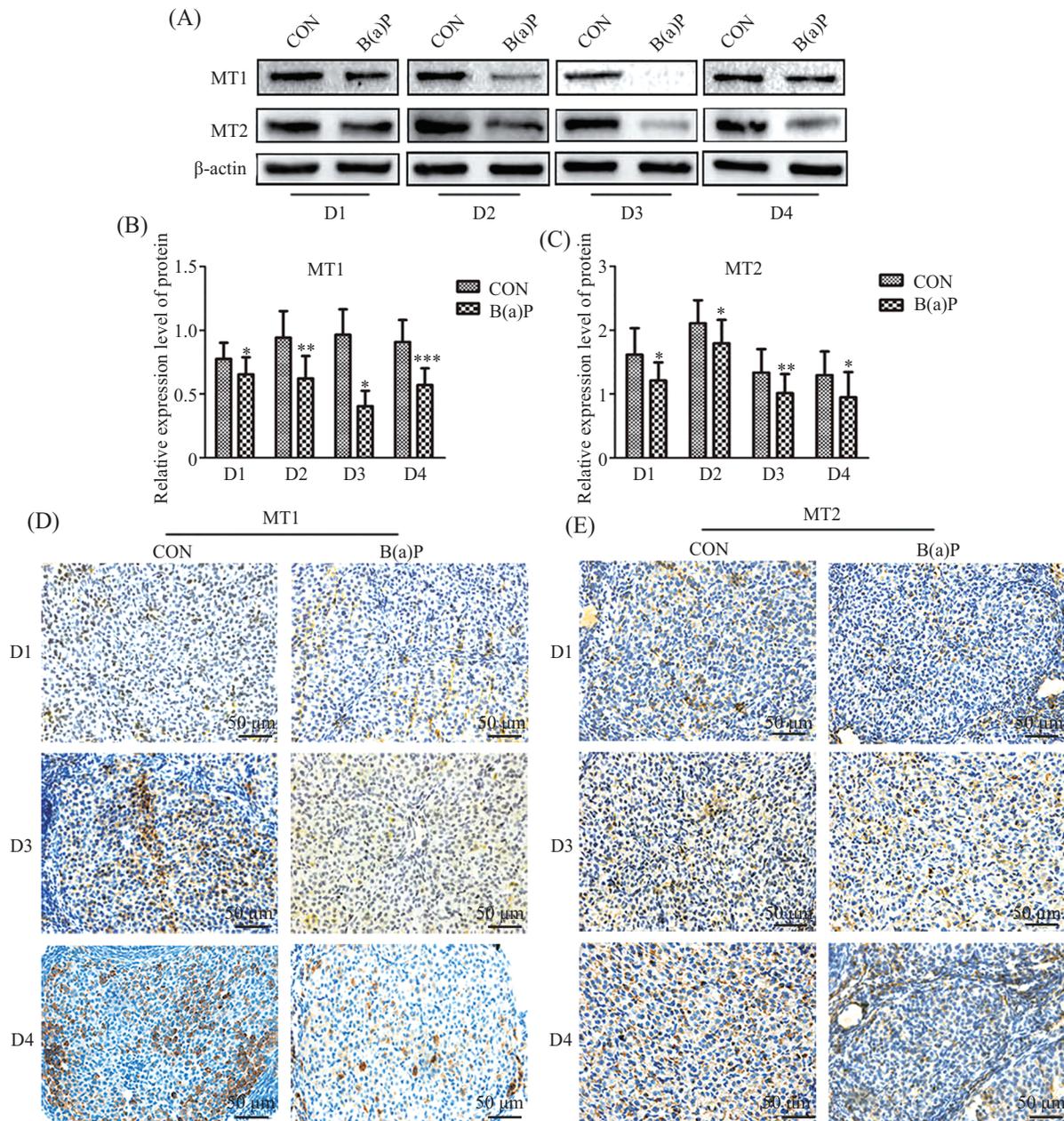
blot结果一致(图3D)。

3 讨论

PAHs是一类种类繁多、存在广泛、污染范围广泛的环境污染物的总称。暴露于PAHs会诱发多种病理反应的发生,包括炎症、心血管和肺部疾病甚

至癌症的发生^[14]。B(a)P是PAHs的代表性化合物。研究证实, B(a)P是一种EDCs, 具有远距离扩散、生物蓄积等特点, 造成体内类固醇激素分泌异常, 诱发多囊卵巢综合征、子宫内膜异位症等疾病的发生, 导致不孕、流产、早产等结局的出现^[3,15]。已知B(a)P与不良妊娠结局有密切联系, 且课题组前期也证实B(a)P会影响早孕小鼠胚胎着床^[5]。孕早期, 卵巢合成的雌孕激素对子宫内膜容受性建立、胚胎植入等过程能否正常进行具有重要调控作用, 但目前关于孕早期B(a)P暴露是否影响卵巢功能尚不明确。

胚胎着床是正常妊娠的先决条件。成功的胚胎着床需要有植入能力的囊胚和处于容受态的子宫间精密的相互作用, 这一过程被母体的激素水平, 特别是卵巢雌孕激素水平精确调控^[16-17]。在胚胎着床前妊娠第4天, 小鼠卵巢会出现雌孕激素的分泌高峰, 升高的雌孕激素调节子宫内膜细胞的增殖和分化, 使其进入容受性状态, 为胚胎植入做好准备。临床研究发现, 近75%的早期妊娠失败是源于胚胎植入异常^[18], 这其中除了胚胎本身的因素, 卵巢激素对子宫微环境的调节也是一个重要原因。收集孕D4小鼠血清, ELISA检测发现, B(a)P暴露会导致雌激素、



A: Western blot检测褪黑素受体的表达; B: MT1蛋白的相对表达水平; C: MT2蛋白的相对表达水平; D: MT1免疫组化结果; E: MT2免疫组化结果; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, 与对照组相比较。

A: the expression of melatonin receptors detected by Western blot; B: relative expression level of MT1 protein; C: relative expression level of MT2 protein; D: IHC analysis shows the expression of MT1; E: IHC analysis shows the expression of MT2; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs control group.

图3 B(a)P暴露对早孕小鼠卵巢褪黑素受体MT1、MT2蛋白质水平的影响

Fig.3 Effect of B(a)P on the protein level of melatonin receptors MT1 and MT2 in the ovarian tissues of early pregnant mice

孕激素水平降低。类固醇激素的生成起始于胆固醇的体内转化。胆固醇转移至卵巢颗粒细胞内,在线粒体酶P450 SCC的作用下生成孕烯醇酮,部分孕烯醇酮直接在其他酶的催化下生成孕激素;17 β -HSD1是17 β -羟类固醇脱氢酶家族(17 β -HSDs)的成员之一,能催化低生物活性的雌酮、雄烯二酮向高生物活性的雌二醇转化,调控其余部分孕烯醇酮和孕激素逐

渐转化为雌激素的过程^[15,19-20]。本研究发现, B(a)P处理后卵巢中雌孕激素合成的关键酶P450SCC和17 β -HSD1的mRNA水平均明显降低,证实了孕早期B(a)P暴露会下调激素合成酶的表达导致卵巢合成雌孕激素的功能异常。妊娠期卵巢的主要功能是分泌雌孕激素,以利于胚胎的植入和妊娠维持,因此, B(a)P诱导的卵巢功能异常会影响子宫内膜状态,导致胚胎

植入失败或流产的发生。

褪黑素是由松果体分泌的一种吲哚类激素,以色氨酸作为合成原料,在松果体经羟基化和脱羧等系列生化反应生成5-羟色胺,最终在限速酶芳烷基胺N-乙酰转移酶(arylalkylamine N-acetyltransferase, AANAT)催化下转变为褪黑素^[21]。人们熟知褪黑素的功能是参与昼夜节律的调节,但近年来的研究显示,褪黑素在生殖过程中也发挥了重要的作用^[10]。有文献报道,在哺乳动物中褪黑素在孕早期对囊胚发育、胚胎植入等过程有重要影响^[11-12]。切除松果体将导致褪黑素合成分泌障碍,造成胚胎植入失败的结局;而外源补充褪黑素能在很大程度上扭转切除松果体流产的后果^[12,22]。也有文献报道,在哺乳动物中内源性的褪黑素受到昼夜节律和下丘脑-垂体-性腺轴(hypothalamus-pituitary-gonad, HPG)的双重调节,能显著抑制促性腺激素释放激素(gonadotropin-releasing hormone, GnRH)的活动,参与对雌孕激素的调控^[7-9]。

为了明确褪黑素是否参与了孕早期B(a)P暴露导致的卵巢雌孕激素合成异常,我们测定了孕第4天小鼠血清中的褪黑素水平,发现B(a)P组褪黑素水平较对照组明显上升。已有研究证实,虹鳟鱼暴露于B(a)P会引发单胺能神经传导物质的代谢变化,改变日间松果体的内分泌活动,导致松果体分泌褪黑素增加^[13,23-24]。这提示,小鼠机体可能产生了应激反应,增加褪黑素的合成以减弱B(a)P所带来的不良影响。已知褪黑素在体内发挥作用主要是与细胞膜G蛋白偶联受体MT1、MT2结合,活化后形成MT1/MT2异二聚体,实现细胞内外褪黑素信号传递^[7,12,25-27]。因此,我们进一步检测了孕D1~D4小鼠卵巢组织中MT1、MT2的表达。Western blot结果显示,与对照组相比,B(a)P组MT1、MT2蛋白质水平降低,呈现出与血清褪黑素变化相反的趋势。免疫组化检测发现,孕D1~D4小鼠卵巢褪黑素受体MT1、MT2主要表达于卵巢黄体细胞,其在B(a)P组蛋白质水平降低,与Western blot结果趋势相一致。以上结果显示,孕早期B(a)P暴露后,虽然孕鼠血清中的褪黑素水平上升,但B(a)P会抑制孕早期小鼠卵巢褪黑素受体MT1、MT2水平,导致褪黑素与受体结合障碍,从而影响细胞内外褪黑素信号传递。

本研究结果显示,B(a)P导致的孕早期小鼠卵巢褪黑素受体MT1、MT2的表达下降主要发生于卵

巢黄体细胞,而卵巢黄体细胞正是妊娠期合成雌孕激素的主要细胞。研究发现,褪黑素会刺激黄体细胞分泌孕酮,但MT1和MT2通用拮抗剂(luzindole)及MT2特异性拮抗剂4-phenyl-2-propionamidotetralin (4P-PDOT)加入猪卵巢黄体细胞中进行联合培养后,会降低雌孕激素合成限速酶P450SCC mRNA水平,抑制褪黑素诱导的孕激素分泌^[28]。Soares等^[29]也发现,卵巢黄体中的MT1和MT2能通过c-AMP途径影响卵巢类固醇激素的合成。因此,我们推测,褪黑素及其受体可能参与了孕早期B(a)P暴露所导致的卵巢功能异常。但B(a)P如何影响褪黑素的分泌及其受体的表达,以及哪些受褪黑素调控的重要分子和信号通路参与了上述过程还不得而知,尚需进一步深入研究。

综上所述,本研究证实了在孕早期暴露于B(a)P会干扰卵巢合成雌孕激素的功能,从而影响子宫内膜容受性的建立。同时,本研究发现,B(a)P会干扰早孕小鼠褪黑素水平及其受体水平,推测褪黑素及其受体可能参与了孕早期B(a)P暴露所导致的卵巢功能异常。鉴于卵巢功能在胚胎着床及妊娠维持中的重要作用,本研究为进一步探索B(a)P影响胚胎着床的机制提供了新的线索,同时也为临床上不明原因早期流产的病因探索及采取有效的预防措施提供了新的方向。

参考文献 (References)

- 1 Archibong AE, Inyang F, Ramesh A, Greenwood M, Nayyar T, Kopsombut P, *et al.* Alteration of pregnancy related hormones and fetal survival in F-344 rats exposed by inhalation to benzo(a)pyrene. *Reprod Toxicol* (Elmsford, NY) 2002; 16(6): 801-8.
- 2 Tamura H, Nakamura Y, Korkmaz A, Manchester LC, Tan DX, Sugino N, *et al.* Melatonin and the ovary: physiological and pathophysiological implications. *Fertil Steril* 2009; 92(1): 328-43.
- 3 Einaudi L, Courbiere B, Tassistro V, Prevot C, Sari-Minodier I, Orsiere T, *et al.* *In vivo* exposure to benzo(a)pyrene induces significant DNA damage in mouse oocytes and cumulus cells. *Hum Reprod* (Oxford, England) 2014; 29(3): 548-54.
- 4 Younblai EV, Wu YJ, Foster WG. Reproductive toxicology of environmental toxicants: emerging issues and concerns. *Curr Pharm Design* 2007; 13(29): 3005-19.
- 5 Li X, Shen C, Liu X, He J, Ding Y, Gao R, *et al.* Exposure to benzo[a]pyrene impairs decidualization and decidual angiogenesis in mice during early pregnancy. *Environ pollut* (Barking, Essex: 1987) 2017; 222: 523-31.
- 6 陈琦, 彭洪英, 张莹, 雷丽, 曹宇静, 段恩奎. 胚胎植入研究的回顾和展望. *科学通报*(Chen qi, Peng Hongying, Zhang Ying, Lei Li, Cao Yujing, Duan Enkui. Retrospect and prospect of embryo research. *Chinese Science Bulletin*) 2009; 54(18): 2771-

- 82.
- 7 Reiter RJ, Tan DX, Korkmaz A, Rosales-Corral SA. Melatonin and stable circadian rhythms optimize maternal, placental and fetal physiology. *Hum Reprod Update* 2014; 20(2): 293-307.
- 8 Dubocovich ML, Markowska M. Functional MT1 and MT2 melatonin receptors in mammals. *Endocrine* 2005; 27(2): 101-10.
- 9 Lawson NO, Wee BE, Blask DE, Castles CG, Spriggs LL, Hill SM. Melatonin decreases estrogen receptor expression in the medial preoptic area of inbred (LSH/SsLak) golden hamsters. *Biol Reprod* 1992; 47(6): 1082-90.
- 10 Chuffa LG, Seiva FR, Favaro WJ, Amorim JP, Teixeira GR, Mendes LO, *et al.* Melatonin and ethanol intake exert opposite effects on circulating estradiol and progesterone and differentially regulate sex steroid receptors in the ovaries, oviducts, and uteri of adult rats. *Reprod Toxicol (Elmsford, NY)*; 39: 40-9.
- 11 Wang F, Tian X, Zhang L, Tan D, Reiter RJ, Liu G. Melatonin promotes the *in vitro* development of pronuclear embryos and increases the efficiency of blastocyst implantation in murine. *J Pineal Res* 2013; 55(3): 267-74.
- 12 He C, Wang J, Li Y, Zhu K, Xu Z, Song Y, *et al.* Melatonin-related genes expressed in the mouse uterus during early gestation promote embryo implantation. *J Pineal Res* 2015; 58(3): 300-9.
- 13 Gesto M, Tintos A, Rodriguez-Illamola A, Soengas JL, Miguez JM. Effects of naphthalene, beta-naphthoflavone and benzo(a)pyrene on the diurnal and nocturnal indoleamine metabolism and melatonin content in the pineal organ of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Aquat Toxicol (Amsterdam, Netherlands)* 2009; 92(1): 1-8.
- 14 Mayati A, Podechard N, Rineau M, Sparfel L, Lagadic-Gossman D, Fardel O, *et al.* Benzo(a)pyrene triggers desensitization of beta2-adrenergic pathway. *Sci Rep* 2017; 7(1): 3262.
- 15 Patel S, Zhou C, Rattan S, Flaws JA. Effects of endocrine-disrupting chemicals on the ovary. *Biol Reprod* 2015; 93(1): 20.
- 16 Conneely OM, Mulac-Jericevic B, DeMayo F, *et al.* Reproductive functions of progesterone receptors. *Recent Prog Horm Res* 2002; 57: 339-55.
- 17 Curtis Hewitt S, Goulding EH, Eddy EM, *et al.* Studies using the estrogen receptor alpha knockout uterus demonstrate that implantation but not decidualization-associated signaling is estrogen dependent. *Biol Reprod* 2002; 67(4): 1268-77.
- 18 Norwitz ER, Schust DJ, Fisher SJ. Implantation and the survival of early pregnancy. *N Engl J Med* 2001; 345(19): 1400-8.
- 19 Qin L, Du ZH, Zhu SY, Li XN, Li N, Guo JA, *et al.* Atrazine triggers developmental abnormality of ovary and oviduct in quails (*Coturnix Coturnix coturnix*) via disruption of hypothalamo-pituitary-ovarian axis. *Environ Pollut (Barking, Essex: 1987)* 2015; 207: 299-307.
- 20 张翠玲. 17 β -羟类固醇脱氢酶1(17 β -HSD₁)和雌激素受体(ER)在子宫内膜息肉中的表达及其意义(硕士论文). 安徽医科大学(Zhang Cuiling. The expression and significance of 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase 1(17 β -HSD₁) and estrogen receptor (ER) in endometrial polyps (Master's thesis). Anhui Medical University), 2013.
- 21 Tamura H, Nakamura Y, Terron MP, Flores LJ, Manchester LC, Tan DX, *et al.* Melatonin and pregnancy in the human. *Reprodu Toxicol (Elmsford, NY)* 2008; 25(3): 291-303.
- 22 Dair EL, Simoes RS, Simoes MJ, Romeu LR, Oliveira-Filho RM, Haidar MA, *et al.* Effects of melatonin on the endometrial morphology and embryo implantation in rats. *Fertil Steril* 2008; 89(5 Suppl): 1299-305.
- 23 Gesto M, Tintos A, Soengas JL, Miguez JM. Effects of acute and prolonged naphthalene exposure on brain monoaminergic neurotransmitters in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Comp Biochem Phys C Toxicol Pharmacol* 2006; 144(2): 173-83.
- 24 Gesto M, Tintos A, Soengas JL, Miguez JM. beta-Naphthoflavone and benzo(a)pyrene alter dopaminergic, noradrenergic, and serotonergic systems in brain and pituitary of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Ecotox Environ Safe* 2009; 72(1): 191-8.
- 25 Galano A, Tan DX, Reiter RJ. On the free radical scavenging activities of melatonin's metabolites, AFMK and AMK. *J Pineal Res* 2013; 54(3): 245-57.
- 26 Jockers R, Maurice P, Boutin JA, Delagrang P. Melatonin receptors, heterodimerization, signal transduction and binding sites: what's new? *Brit J Pharmacol* 2008; 154(6): 1182-95.
- 27 Ng KY, Leong MK, Liang H, Paxinos G. Melatonin receptors: distribution in mammalian brain and their respective putative functions. *Brain Struct Funct* 2017; 222(7): 2921-39.
- 28 Zhang W, Wang Z, Zhang L, Zhang Z, Chen J, Chen W, *et al.* Melatonin stimulates the secretion of progesterone along with the expression of cholesterol side-chain cleavage enzyme (P450scc) and steroidogenic acute regulatory protein (Star) in corpus luteum of pregnant sows. *Theriogenology* 108: 297-305.
- 29 Soares JM Jr, Masana MI, Erşahin C, Dubocovich ML. Functional melatonin receptors in rat ovaries at various stages of the estrous cycle. *J Pharmacol Exp Ther* 2003; 306(2): 694-702.