

对羟基苯甲酸甲酯对早孕小鼠子宫内膜蜕膜化的影响

田佳林^{1,2} 李伟轲² 杨成顺^{2*}

(¹重庆市开州区人民医院, 重庆 405400; ²重庆医科大学, 生殖生物学研究室, 重庆 400016)

摘要 该研究主要探讨对羟基苯甲酸甲酯(methylparaben, MP)对早孕小鼠子宫内膜蜕膜化的影响。从孕第1天开始, 每日经口灌胃给予CD1小鼠0、10.0、62.5、250.0、1 000.0 mg/kg浓度的MP后, 于孕第7天处死小鼠。采用酶联免疫法(ELISA)检测血清雌孕激素水平, 观察并计数着床胚胎数量, 采用免疫组化法和免疫印迹法检测子宫内膜蜕膜化标志物BMP2、MMP2、MMP9、HOXA10等蛋白的表达水平。结果显示, 在1 000.0 mg/kg MP暴露下, 小鼠孕第7天着床胚胎数量显著下降($P<0.05$)。免疫组化和免疫印迹结果显示, 与正常对照组相比较, 1 000.0 mg/kg组孕鼠蜕膜化标志物BMP2、MMP2、MMP9、HOXA10的蛋白表达水平显著降低。ELISA检测结果显示, MP暴露后孕鼠血清雌孕激素水平均明显下降($P<0.05$)。该研究提示, MP孕期暴露可能影响孕鼠子宫内膜蜕膜化。

关键词 早孕; 子宫内膜蜕膜化; 对羟基苯甲酸甲酯

Effects of Methylparaben on Endometrial Decidualization in Mice during Early Pregnancy

TIAN Jialin^{1,2}, LI Weike², YANG Chengshun^{2*}

(¹The people's hospital of Kaizhou district, Chongqing 405400, China;

²Laboratory of Reproductive Biology, School of Public Health, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

Abstract This study focused on whether MP (Methylparaben), the most widely used of PBs, had effects on endometriosis decidualization in early pregnancy, resulting in adverse pregnancy outcomes. In this study, on the first day of pregnancy, CD1 mice were given 0, 10.0, 62.5, 250.0 and 1 000.0 mg/kg of MP by continuous oral feeding. On the seventh day of pregnancy, mice were killed. Serum was collected for estrogen and progesterone level detection by ELISA. Uterine tissue was collected and embryo quantity and quality were observed. Protein expression levels of decidual markers such as BMP2, MMP2, MMP9 and HOXA10 were detected by immunohistochemistry and Western blot. Under 1 000.0 mg/kg MP exposure, the number of mice embryos decreased significantly on the seventh day of pregnancy ($P<0.05$), which suggested that a high dose of MP had adverse effects on the process of endometrial decidualization of mice during early pregnancy. Immunohistochemistry and Western blot results showed that the high dose (1 000.0 mg/kg) compared with 0 mg/kg group, protein expression of decidual markers BMP2, MMP2, MMP9, and HOXA10 significantly reduced. Serum estrogen and progesterone levels also decreased obviously by ELISA ($P<0.05$). Exposure to high dose (1 000.0 mg/kg) of MP in early pregnancy had adverse effects on endometrial decidualization function in mice, leading to adverse pregnancy outcome.

收稿日期: 2019-10-21 接受日期: 2020-04-23

国家自然科学基金(批准号: 31571190)资助的课题

*通讯作者。Tel: 023-65712050, E-mail: ycs76@163.com

Received: October 21, 2019 Accepted: April 23, 2020

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.31571190)

*Corresponding author. Tel: +86-23-65712050, E-mail: ycs76@163.com

URL: <http://www.cjcb.org/arts.asp?id=5262>

Keywords early pregnancy; endometrial decidualization; methylparaben

对羟基苯甲酸酯(paraben, PBs)是4-羟基苯甲酸的烷基酯, 根据酯基在C4位置的不同, 一般可分为7种类型(甲酯、乙酯、丙酯、异丙酯、丁酯、异丁酯和苯甲酸苄酯)^[1]。PBs主要在食品、饮料、化妆品、药物等中用作抗菌防腐剂^[2-3]。人们在长期摄入和接触该类化学物质后可能会在体内堆积, 并对某些组织器官或系统产生不良影响^[4]。欧盟允许在化妆品中使用最大的苯甲酸酯浓度为0.4%~0.8%(欧盟化妆品指令76/768/EEC), 每日摄入量为0~10 mg/kg。过去的十年里, 许多文章报道了人类与PBs的广泛接触导致了其在各种人类生物样品的广泛分布, 包括胎盘组织、脂肪、血清、母乳、羊水和尿液^[5]。流行病学研究表明, 尿液中的PBs和不良健康结果之间存在关联, 包括生殖毒性、乳腺癌、氧化应激、免疫调节等^[6]。值得注意的是, PBs的结构与雌激素相似, 被证明具有外源性雌激素作用, 属于一种内分泌干扰物(endocrine disrupting compounds, EDCs), 其可在低水平上模仿或阻断雌激素作用^[7-8]。PBs可能与雌激素受体结合, 刺激雌激素受体依赖性反应, 和/或影响雌激素应答基因的表达, 包括雌激素受体、孕激素受体和pS2^[9]。EDCs对女性生殖功能的干扰可能导致生育能力低下、不孕不育、激素分泌不当、和月经周期异常、无排卵和早衰等^[10]。对羟基苯甲酸甲酯(methylparaben, MP)是PBs中使用最为广泛的一个种类^[11], 是药品和食品中最常用的一种抗菌防腐剂^[12]。因此, 人们日益关注MP对人类健康和环境的可能影响。有文献报道, 在20例人类乳腺肿瘤中检测到了高浓度的MP, 这表明, MP的生物积累与肿瘤的发生密切相关^[13]。MP在人角质细胞中的长期暴露导致透明质酸合成酶的增殖和表达水平降低, 提示MP可诱导人角质细胞衰老, 减少角质细胞的分化^[14]。另有研究发现, 在环境剂量的MP作用下, MP对人中性粒细胞的功能有抑制作用, 使中性粒细胞氧合依赖的吞噬功能受到干扰, 可能导致人先天免疫反应受损^[15]。然而, MP在生殖健康方面的研究报道较少。

成功的妊娠取决于胚胎着床、蜕膜化以及胎盘形成等过程的顺利发生^[16], 任何一个环节出现差错, 都会导致妊娠结局的失败。其中, 子宫内膜蜕膜化对于成功的着床和妊娠的维持是必需的。囊胚附着

于子宫腔上皮, 围绕囊胚的基质细胞发生广泛的增殖和分化, 形成蜕膜细胞, 启动蜕膜化过程, 使胚胎植入顺利进行^[17]。胚胎与子宫之间的正常对话主要依靠卵巢雌孕激素的协调^[18]。MP作为一种外源性雌激素, 其可能在妊娠早期干扰胚胎着床、蜕膜化等过程, 从而发生不良妊娠结局。然而, 近年来在小鼠模型中有关MP对生殖以及子宫内膜蜕膜化影响的研究较少。因此, 本研究着重探讨MP对早孕小鼠子宫内膜蜕膜化的影响。

1 材料与方法

1.1 试剂

对羟基苯甲酸甲酯(H5501)购自美国Sigma公司, 用玉米油配置成0、10.0、62.5、250.0、1 000.0 mg/kg浓度后常温干燥保存。兔抗BMP2、兔抗MMP2、兔抗MMP9购自美国Abcam公司; 鼠抗HOXA10购自美国Santa cruz公司; 山羊抗兔IgG和山羊抗鼠IgG购自武汉博士德生物工程有限公司; 兔SP试剂盒、鼠SP试剂盒以及DAB显色试剂盒购自北京中杉金桥生物技术有限公司; 其余试剂均为国产分析纯。

1.2 动物及给药方式

选取7~8周龄的健康CD1雌性小鼠, 与成熟CD1雄性小鼠合笼后, 次日清晨查栓, 发现阴栓则记作孕第1天。将获取的孕鼠分成5个剂量组: 0、10.0、62.5、250.0和1 000.0 mg/kg浓度组, 每组至少3只, 每只小鼠按照0.1 mL/10 g体质量的剂量进行灌胃。从孕第1天起连续经口灌胃给予相应浓度的MP, 孕第7天麻醉后处死小鼠, 记录小鼠体重和子宫重量, 计算子宫脏器指数(子宫重量/小鼠体重×100%)。收集子宫内膜组织并冻存于-80 °C, 用于后续免疫印迹法检测蛋白表达。收集子宫组织浸泡于多聚甲醛固定和梯度酒精脱水后石蜡包埋, 用于后续免疫组化法检测蛋白表达。收集血清样本并冻存于-80 °C用于后续检测。所有动物实验均通过重庆医科大学伦理委员会批准。

1.3 HE染色法观察小鼠子宫着床点形态学变化

新鲜子宫组织用4%多聚甲醛固定6 h, 75%、85%、95%和100%酒精梯度脱水和55 °C条件下浸泡于软蜡4~6 h后, 将子宫组织嵌入硬蜡中, 切成5 μm厚度薄片, 贴于载玻片上烤干备用。切片在55 °C条件

下用二甲苯脱蜡,梯度酒精水化后,伊红染液染色20 s,苏木精染液染核2 min,脱水透明后封片,在显微镜下观察并拍照。

1.4 免疫印迹法检测蜕膜化标志因子的表达

子宫内膜组织用含有蛋白酶抑制剂和磷酸酶抑制剂(bimake)的组织蛋白RIPA裂解液(上海碧云天生物技术有限公司)裂解,在5×十二基硫酸钠(SDS)缓冲液(上海碧云天生物技术有限公司)中煮沸5 min变性,获得的蛋白样本立即置于-80 °C保存。各蛋白样本在SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳凝胶上进行电泳,然后在聚偏氟乙烯(PVDF)膜上(Bio-Rad)进行电转。在37 °C条件下,用5%脱脂牛奶或牛血清白蛋白(BSA)封闭PVDF膜90 min,孵育相应抗体至膜上,于4 °C冰箱过夜。实验中使用到的抗体如下: BMP2兔多克隆抗体(1:600)、MMP2兔多克隆抗体(1:1 000)、MMP9兔多克隆抗体(1:1 000)、HOXA10鼠单克隆抗体(1:500)。β-actin(1:1 000)作为内参。用化学发光法检测免疫印迹条带。灰度分析由Quantity One version 4.5.0 analysis software (Bio-Rad)进行定量。

1.5 免疫组化法检测蜕膜化标志因子的表达

新鲜子宫组织用4%多聚甲醛固定6 h,75%、85%、95%和100%酒精梯度脱水和55 °C条件下浸泡于软蜡4~6 h后,将子宫组织嵌入硬蜡中,切成5 μm厚度薄片,贴于载玻片上烤干备用。切片在55 °C条件下二甲苯脱蜡,梯度酒精水化后,用柠檬酸盐缓冲液(PH7.3)抗原热修复15~20 min,并自然冷却至室温。子宫组织切片经过过氧化氢消除内源性干扰、山羊血清封闭后,4 °C抗体孵育过夜。次日于37 °C二抗孵育、辣根过氧化物酶处理后,DAB显色法检测棕色反应。苏木精染液染核2 min后,梯度酒精脱水,二甲苯透明组织,最后中性树脂胶封片,于显微镜下观察并拍照。实验中使用到的抗体如下: BMP2兔多克隆抗体(1:100)、MMP9兔多克隆抗体(1:100)、HOXA10鼠单克隆抗体(1:100)。免疫组化结果由ImageJ软件进行分析。

1.6 酶联免疫法(ELISA)检测血清雌孕激素水平

设置标准品孔和样本孔,标准品孔各加不同浓度的标准品50 μL。待测样本孔先加待测样本10 μL,再加样本稀释液40 μL。随后标准品孔和样本孔中每孔加入辣根过氧化物酶标记的检测抗体100 μL,用封板膜封住反应孔,在37 °C水浴锅或恒温箱中温育60 min。

弃去液体,吸水纸上拍干,每孔加满洗涤液,静置1 min,甩去洗涤液,吸水纸上拍干,如此重复洗板5次(也可用洗板机洗板)。每孔加入底物A、B各50 μL,于37 °C避光孵育15 min。每孔加入终止液50 μL,15 min内,在450 nm波长处测定各孔的D值。

1.7 统计分析

所有实验均独立重复至少3次。数据以平均值±标准差($\bar{x}\pm s$)表示。采用单因素方差分析(One-Way ANOVA)或*t*检验来评估实验数据显著性差异。采用GraphPad Prism 7.0和SPSS 17.0统计软件进行统计分析。 $P<0.05$ 表示具有显著性差异, $P<0.01$ 表示具有极显著性差异。

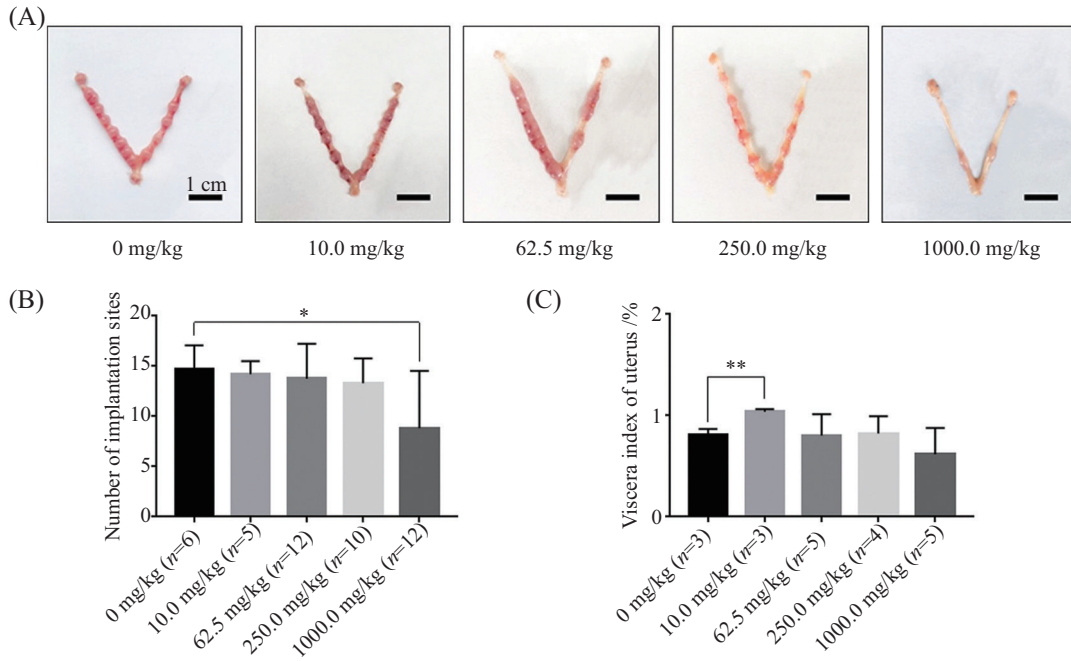
2 结果

2.1 孕期MP暴露后早孕小鼠胚胎着床异常

分别经口灌胃给予早孕小鼠0、10.0、62.5、250.0、1 000.0 mg/kg浓度的MP后,孕第7天时收集小鼠子宫组织,观察胚胎着床数量情况。结果显示,与对照组相比较,随着MP浓度的增加,10.0、62.5、250.0、1 000.0 mg/kg组胚胎着床数量逐渐减少,且1 000.0 mg/kg浓度组的胚胎着床数量显著减少($P<0.05$)(图1A和图1B)。统计子宫脏器指数发现,10.0 mg/kg组较对照组子宫脏器指数明显增高($P<0.01$)(图1C)。结果提示,高剂量(1 000.0 mg/kg)MP摄入可能会影响早孕小鼠胚胎着床。

2.2 MP暴露后早孕小鼠子宫内膜蜕膜化异常

为了进一步探究MP暴露对早孕小鼠子宫内膜蜕膜化的影响,我们首先观察了小鼠孕第7天着床点子宫内膜的形态学变化。HE染色结果显示,与对照组相比较,1 000.0 mg/kg暴露组着床点子宫横截面面积减小、蜕膜细胞体积减小、细胞核轮廓不清(图2),提示了小鼠子宫内膜蜕膜化过程可能发生异常改变。为了进一步验证MP暴露是否引起子宫内膜蜕膜化过程受损,我们采用免疫组化法和免疫印迹法检测了小鼠子宫内膜蜕膜化标志因子BMP2、MMP2、MMP9、HOXA10的蛋白表达情况。免疫组化结果显示,蜕膜化标志因子BMP2、MMP9、HOXA10蛋白表达水平在初级蜕膜区和次级蜕膜区均明显降低(图3)。免疫印迹结果显示,蜕膜化标志因子BMP2、MMP2、MMP9、HOXA10蛋白表达水平均明显下调(图4)。结果提示,高剂量(1 000.0 mg/kg)MP暴露后小鼠子宫内膜BMP2、MMP2、MMP9、HOXA10

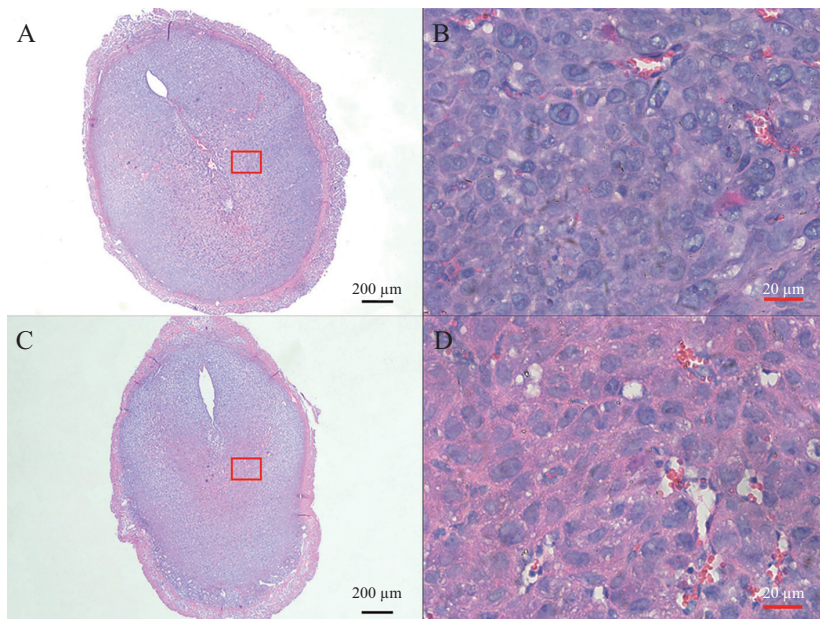


A: 各剂量MP暴露组小鼠孕第7天子宫形态(各剂量MP暴露组n=12); B: 各剂量MP暴露组小鼠孕第7天胚胎着床数量统计图; C: 各剂量MP暴露组小鼠孕第7天子宫脏器指数统计图。*P<0.05, **P<0.01。

A: the number of uterine embryo implantation in each dose of MP exposure group on the seventh day of pregnancy (n=12 for each dose of MP exposure group); B: statistical chart of embryo implantation number in each dose of MP exposure group on the seventh day of pregnancy; C: statistical chart of viscera index of uterus in each dose of MP exposure group on the seventh day of pregnancy. *P<0.05, **P<0.01.

图1 各剂量MP暴露组小鼠孕第7天胚胎着床情况

Fig.1 Embryo implantation in each dose of MP exposure group on the seventh day of pregnancy



A、B: 0 mg/kg暴露组孕第7天小鼠子宫着床点横截面形态; C、D: 1 000.0 mg/kg暴露组孕第7天小鼠子宫着床点横截面形态; 每组n=5; 红色方框表示放大区域。

A,B: the cross sectional morphology of implantation site in the 0 mg/kg exposure group on the seventh day of pregnancy; C,D: the cross sectional morphology of implantation site in the 1 000.0 mg/kg exposure group on the seventh day of pregnancy; n=5 for each dose of MP exposure group; the red box represented the enlarged area.

图2 HE染色观察孕第7天小鼠子宫着床点形态学改变

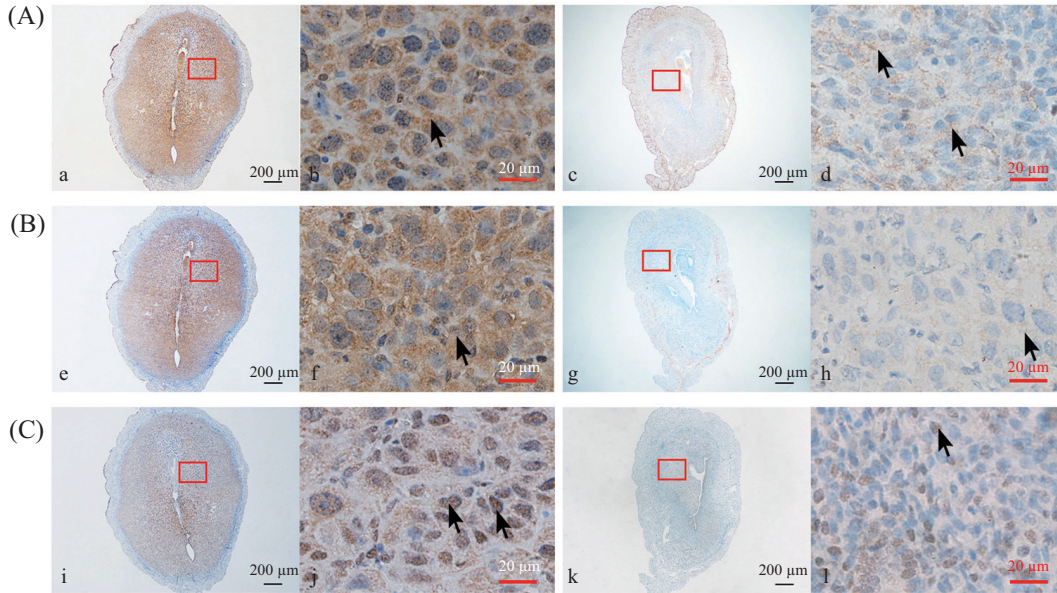
Fig.2 HE staining was used to observe the morphological changes of implantation site of mouse uterus on the seventh day of pregnancy

的蛋白表达水平显著降低, 子宫内膜蜕膜化异常。

2.3 MP暴露后早孕小鼠血清雌孕激素水平紊乱

妊娠是一个复杂的、不可逆的过程, 包括着床、

蜕膜、胎盘、分娩等过程。每个环节的顺利进行都是迈向下一阶段的关键, 这些过程主要由卵巢分泌的雌激素和孕激素来调控。检测小鼠血清雌孕激素水平发

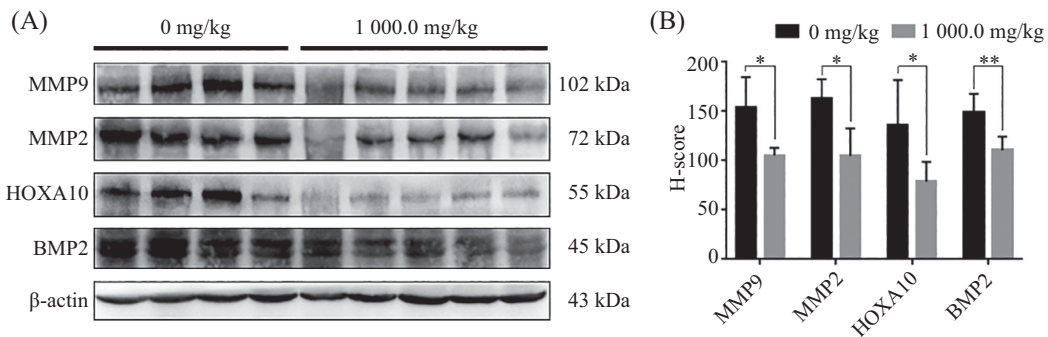


A: 免疫组化法检测0 mg/kg和1 000.0 mg/kg暴露组孕第7天着床点蜕膜化标志因子BMP2的表达情况, (a、b)为0 mg/kg暴露组, (c、d)为1 000.0 mg/kg暴露组; B: 免疫组化法检测0 mg/kg和1 000.0 mg/kg暴露组孕第7天子宫内膜蜕膜化标志因子MMP9的蛋白表达情况, (e、f)为0 mg/kg暴露组, (g、h)为1 000.0 mg/kg暴露组; C: 免疫组化法检测0 mg/kg和1 000.0 mg/kg暴露组孕第7天着床点蜕膜化标志因子HOXA10的表达情况, (i、j)为0 mg/kg暴露组, (k、l)为1 000.0 mg/kg暴露组; 每组n=5; 红色方框表示放大区域; 黑色箭头表示阳性表达部位。

A: the expression of decidual marker BMP2 at implantation site on the seventh day of pregnancy in the 0 mg/kg and 1 000.0 mg/kg groups was detected by immunohistochemistry, (a,b) is 0 mg/kg exposure group, (c,d) is 1 000.0 mg/kg exposure group; B: the protein expression of endometrial decidual marker MMP9 in the 0 mg/kg and 1 000.0 mg/kg groups was detected by immunohistochemistry, (e,f) is 0 mg/kg exposure group, (g,h) is 1 000.0 mg/kg exposure group; C: the protein expression of endometrial decidual marker HOXA10 in the 0 mg/kg and 1 000.0 mg/kg groups was detected by immunohistochemistry, (i,j) is 0 mg/kg exposure group, (k,l) is 1 000.0 mg/kg exposure group; n=5 for each dose of MP exposure group; the black arrows indicated the positive expression sites.

图3 免疫组化法检测蜕膜化标志因子的表达

Fig.3 Immunohistochemistry was used to detect the expression of decidual marker

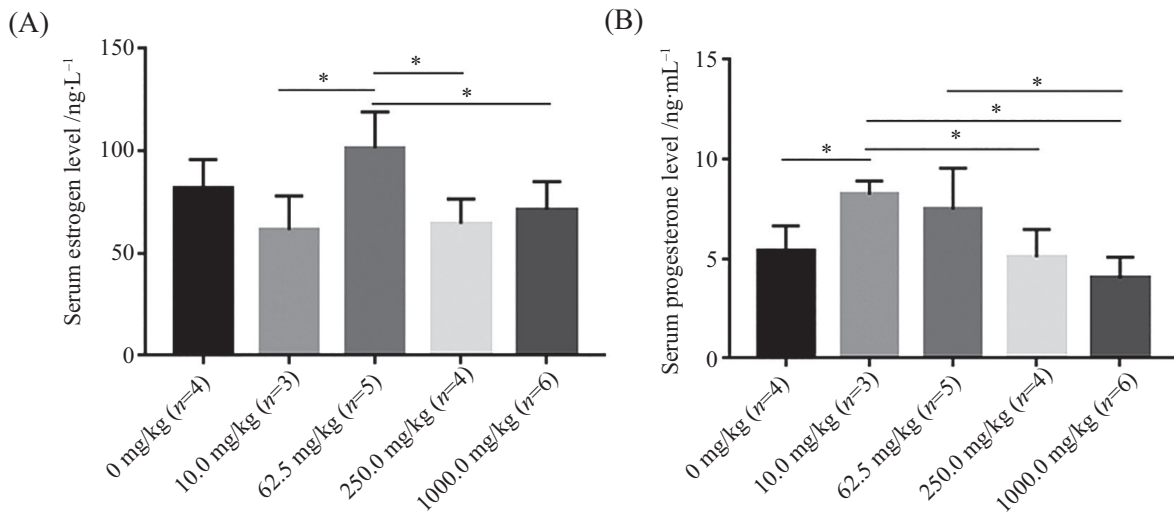


A: 免疫印迹法检测0 mg/kg(n=4)和1 000.0 mg/kg(n=5)暴露组孕第7天着床点蜕膜化标志因子MMP9、MMP2、HOXA10、BMP2的蛋白表达情况; B: 免疫印迹法检测0 mg/kg和1 000.0 mg/kg暴露组孕第7天着床点蜕膜化标志因子MMP9、MMP2、HOXA10、BMP2的蛋白表达水平统计图。*P<0.05, **P<0.01。

A: the protein expression of decidual markers MMP9, MMP2, HOXA10 and BMP2 was detected by Western blot in the 0 mg/kg (n=4) and 1 000.0 mg/kg (n=5) exposure groups on the seventh day of pregnancy; B: statistical graph of decidual markers MMP9, MMP2, HOXA10 and BMP2 protein expressions were detected by Western blot in the 0 mg/kg and 1 000.0 mg/kg exposure groups on the seventh day of pregnancy. *P<0.05, **P<0.01.

图4 免疫印迹法检测蜕膜化标志因子的表达

Fig.4 Western blot was used to detect the expression of decidual marker



A、B: 酶联免疫法检测各剂量MP暴露组孕小鼠第7天血清雌孕激素水平。* $P < 0.05$ 。

A,B: serum estrogen and progesterone levels were measured by ELISA in each dose of MP exposure group on the seventh day of pregnancy. * $P < 0.05$ 。

图5 酶联免疫法检测血清雌孕激素水平

Fig.5 Serum estrogen and progesterone levels were measured by ELISA

现, 10.0 mg/kg、62.5 mg/kg、250.0 mg/kg、1 000.0 mg/kg 组雌激素水平与0 mg/kg相比无差异, 但10.0 mg/kg、250.0 mg/kg、1 000.0 mg/kg组与62.5 mg/kg组相比有明显差异($P < 0.05$)(图5A)。孕激素水平则在0 mg/kg组与10.0 mg/kg组、62.5 mg/kg组和1 000.0 mg/kg组以及10 mg/kg与250 mg/kg、1 000.0 mg/kg组之间有显著差异($P < 0.05$)(图5B)。提示MP暴露可能干扰雌孕激素的正常水平。

3 讨论

苯甲酸酯类化合物具有广泛的抗菌功能, 常用在化妆品、食品和药品中作为防腐剂^[19-20]。常见的对羟基苯甲酸酯包括MP、对羟基苯甲酸乙酯(ethylparaben, EP)、对羟基苯甲酸丙酯(propylparaben, PP)和对羟基苯甲酸丁酯(butylparaben, BP)等。其中, MP是目前使用最为广泛的一种苯甲酸酯类防腐剂, 人体主要通过摄入、吸入或皮肤吸收接触MP, 检测其在尿液中的浓度水平被认为是当前暴露情况的一个评价指标^[21]。评估人类暴露于苯甲酸酯的情况通常需要测量尿液中苯甲酸酯的结合物或游离物或其代谢产物^[2]。在哺乳动物中, 苯甲酸酯主要水解为对羟基苯甲酸, 并以共轭形式在尿液中排泄。2005年—2006年美国全国健康与营养调查(NHANES)中显示, 在超过92%的参与者的尿液中检测到MP和PP, 其中女性的含量是男性的5~10倍^[22]。

近年来, 越来越多的研究开始关注EDCs, 这是

一种外源性化合物, 可影响涉及男性和女性生殖系统发育和功能的激素通路^[23]。EDCs通过与激素受体相互作用, 干扰激素的作用或改变激素合成、运输或代谢过程, 从而破坏机体内分泌功能^[24]。EDCs的摄入、吸入和/或吸收可能通过扰乱排卵、卵母细胞质量以及精子形成和精子质量而直接影响卵巢和睾丸的功能, 或者通过影响下丘脑、垂体、性腺、肾上腺和/或甲状腺轴间接影响人类生殖能力, 导致免疫、内分泌、代谢、微生物、表观基因组的相互作用, 结果可能不仅影响性腺功能和配子, 还会影响子宫内膜容受性和其他生物衰老方面, 从而降低生殖力^[25]。在EDCs中, 苯甲酸酯类属于非持久性化学物质, 人体接触后数小时内从体内代谢和排出^[26]。虽然PBs不会在体内大量积聚, 但有研究发现, 乳腺组织和乳腺肿瘤中可检测到它们的存在^[27]。体内动物实验发现, PBs表现出较弱的雌激素活性以及抗雄激素和甲状腺作用^[9,28]。流行病学研究表明, 尿液中苯甲酸酯类浓度与性激素紊乱、女性月经周期缩短等有关^[10,29]。

本研究旨在探讨MP对早孕小鼠妊娠过程的影响, 通过经口灌胃的方式, 从孕第1天起连续给予小鼠0、10.0、62.5、250.0、1 000.0 mg/kg浓度的MP, 孕第7天收集小鼠子宫组织。结果发现, 随着MP浓度的增加, 胚胎着床数量逐渐减少, 其中1 000.0 mg/kg组下降趋势最为显著。子宫内膜蜕膜化是胚胎着床的必要条件, 因此猜想是否因为高浓度MP影响子宫

内膜蜕膜化的正常过程,从而阻碍了胚胎的顺利着床。基于此,通过形态学观察、免疫印迹法和免疫组化法检测发现,1 000.0 mg/kg组孕第7天小鼠子宫着床点蜕膜区形态学发生异常改变,蜕膜化标志因子蛋白水平表达下降。检测血清雌孕激素水平发现,1 000.0 mg/kg组小鼠的雌孕激素水平较低浓度组有所下降。由此我们推测,高剂量(1 000.0 mg/kg)的MP可能通过与子宫雌孕激素受体相互作用,影响雌孕激素的正常代谢过程,导致雌孕激素水平紊乱,从而影响子宫内膜蜕膜化过程。此外,小鼠孕早期连续摄入MP后,MP也可能通过在小鼠体内短暂积累,从而对子宫功能产生不良影响,主要表现为阻碍了子宫内膜蜕膜化过程,进而影响胚胎着床。综上所述,1 000.0 mg/kg组小鼠子宫内膜蜕膜化过程受损,表明高剂量的MP确实会在早孕时期影响小鼠子宫内膜蜕膜化的正常发生,继而导致小鼠胚胎着床失败,但其具体机制还需进一步研究。

参考文献 (References)

- [1] HANDA O, KOKURA S, ADACHI S, et al. Methylparaben potentiates UV-induced damage of skin keratinocytes [J]. *Toxicology*, 2006, 227(1/2): 62-72.
- [2] YE X, BISHOP A M, REIDY J A, et al. Parabens as urinary biomarkers of exposure in humans [J]. *Environ Health Persp*, 2006, 114(12): 1843-6.
- [3] SONI M G, CARABIN I G, BURDOCK G A. Safety assessment of esters of p-hydroxybenzoic acid (parabens) [J]. *Food Chem Toxicol*, 2005, 43(7): 985-1015.
- [4] MOOS R K, ANGERER J, DIERKES G, et al. Metabolism and elimination of methyl, iso- and n-butyl paraben in human urine after single oral dosage [J]. *Arch Toxicol*, 2016, 90(11): 2699-709.
- [5] HU P, KENNEDY R C, CHEN X, et al. Differential effects on adiposity and serum marker of bone formation by post-weaning exposure to methylparaben and butylparaben [J]. *Environ Sci and Pollut R*, 2016, 23(21): 21957-68.
- [6] WATKINS D J, FERGUSON K K, ANZALOTA DEL TORO L V, et al. Associations between urinary phenol and paraben concentrations and markers of oxidative stress and inflammation among pregnant women in Puerto Rico [J]. *Int J Hyg Envir Heal*, 2015, 218(2): 212-9.
- [7] MA W L, ZHAO X, LIN Z Y, et al. A survey of parabens in commercial pharmaceuticals from China and its implications for human exposure [J]. *Environ Int*, 2016, 95: 30-5.
- [8] BOBERG J, TAXVIG C, CHRISTIANSEN S, et al. Possible endocrine disrupting effects of parabens and their metabolites [J]. *Reprod Toxicol*, 2010, 30(2): 301-12.
- [9] VO T T, YOO Y M, CHOI K C, et al. Potential estrogenic effect(s) of parabens at the prepubertal stage of a postnatal female rat model [J]. *Reprod Toxicol*, 2010, 29(3): 306-16.
- [10] RATTAN S, ZHOU C, CHIANG C, et al. Exposure to endocrine disruptors during adulthood: consequences for female fertility [J]. *J Endocrinol*, 2017, 233(3): R109-29.
- [11] NASSAN F L, COULL B A, GASKINS A J, et al. Personal care product use in men and urinary concentrations of select phthalate metabolites and parabens: results from the Environment and Reproductive Health (EARTH) Study [J]. *Environ Health Persp*, 2017, 125(8): 087012.
- [12] KIM M J, KIM C H, SEO Y J, et al. Transcriptome dynamics of alternative splicing events revealed early phase of apoptosis induced by methylparaben in H1299 human lung carcinoma cells [J]. *Arch Toxicol*, 2020, 94(1): 127-40.
- [13] DARBRE P D, ALJARRAH A, MILLER W R, et al. Concentrations of parabens in human breast tumours [J]. *J Appl Toxicol*, 2004, 24(1): 5-13.
- [14] ISHIWATARI S, SUZUKI T, HITOMI T, et al. Effects of methyl paraben on skin keratinocytes [J]. *J Appl Toxicol*, 2007, 27(1): 1-9.
- [15] NOWAK K, JABLONSKA E, RADZIOWON P, et al. Identification of a novel target for the action of endocrine disrupting chemicals: inhibitory effect of methylparaben on human neutrophil functions [J]. *Environ Sci and Pollut R*, 2020, 27(6): 6540-8.
- [16] WANG H, DEY S K. Roadmap to embryo implantation: clues from mouse models [J]. *Nat Rev Genet*, 2006, 7(3): 185-99.
- [17] DAS S K. Cell cycle regulatory control for uterine stromal cell decidualization in implantation [J]. *Reproduction*, 2009, 137(6): 889-99.
- [18] DEY S K, LIM H, DAS S K, et al. Molecular cues to implantation [J]. *Endocr Rev*, 2004, 25(3): 341-73.
- [19] DUBEY D, CHOPRA D, SINGH J, et al. Photosensitized methyl paraben induces apoptosis via caspase dependent pathway under ambient UVB exposure in human skin cells [J]. *Food Chem Toxicol*, 2017, 108(Pt A): 171-85.
- [20] GUO Y, KANNAN K. A survey of phthalates and parabens in personal care products from the United States and its implications for human exposure [J]. *Environ Sci Technol*, 2013, 47(24): 14442-9.
- [21] ARTACHO-CORDON F, ARREBOLA J P, NIELSEN O, et al. Assumed non-persistent environmental chemicals in human adipose tissue; matrix stability and correlation with levels measured in urine and serum [J]. *Environ Res*, 2017, 156: 120-7.
- [22] CALAFAT A M, YE X, WONG L Y, et al. Urinary concentrations of four parabens in the U.S. population: NHANES 2005-2006 [J]. *Environ Health Persp*, 2010, 118(5): 679-85.
- [23] ROGERS J A, METZ L, YONG V W. Review: endocrine disrupting chemicals and immune responses: a focus on bisphenol-A and its potential mechanisms [J]. *Mol Immunol*, 2013, 53(4): 421-30.
- [24] GORE A C, CHAPPELL V A, FENTON S E, et al. EDC-2: the endocrine society's second scientific statement on endocrine-disrupting chemicals [J]. *Endocr Rev*, 2015, 36(6): E1-50.
- [25] HIPWELL A E, KAHN L G, FACTOR-LITVAK P, et al. Exposure to non-persistent chemicals in consumer products and fecundability: a systematic review [J]. *Hum Reprod Update*, 2019, 25(1): 51-71.
- [26] GORE A C, CHAPPELL V A, FENTON S E, et al. Executive summary to EDC-2: the endocrine society's second scientific

- statement on endocrine-disrupting chemicals [J]. *Endocr Rev*, 2015, 36(6): 593-602.
- [27] BARR L, METAXAS G, HARBACH C A, et al. Measurement of paraben concentrations in human breast tissue at serial locations across the breast from axilla to sternum [J]. *J Appl Toxicol*, 2012, 32(3): 219-32.
- [28] CHEN J, AHN K C, GEE N A, et al. Antiandrogenic properties of parabens and other phenolic containing small molecules in personal care products [J]. *Toxicol Appl Pharm*, 2007, 221(3): 278-84.
- [29] AKER A M, WATKINS D J, JOHNS L E, et al. Phenols and parabens in relation to reproductive and thyroid hormones in pregnant women [J]. *Environ Res*, 2016, 151: 30-7.