

DEHP诱导自噬抑制原始卵泡发育

张妍 穆欣艺 耿艳清 何俊琳 刘学庆 陈雪梅 丁裕斌 王应雄 高茹菲*
(重庆医科大学公共卫生与管理学院生殖生物学实验室/教育部生殖与发育国际合作联合实验室, 重庆 400016)

摘要 该文探讨了自噬在邻苯二甲酸二(2-乙基己)酯[Di (2-ethylhexyl) phthalate, DEHP]所引起来的围产期卵巢原始卵泡发育异常这一过程中的作用。将BALB/C鼠随机分为对照组、DEHP组、DEHP与3-MA联合处理组、DEHP与Rapa联合处理组。新生鼠连续腹腔注射5天, 孕16.5天(days post coitum, dpc)胎鼠卵巢体外培养6天后收集卵巢组织。H&E染色发现, 与对照组相比, DEHP组原始卵泡比例明显减少, 卵泡体卵母细胞增多。TME检测发现, DEHP组存在明显的自噬小体。Western blot发现, DEHP组自噬标志分子LC3和Beclin1蛋白质水平表达显著升高, 提示自噬增强。进一步干预自噬发现, DEHP与自噬抑制剂3-MA联合处理后, 原始卵泡比例较DEHP单独处理组得到一定程度的恢复。而DEHP与自噬诱导剂Rapa联合处理后, 原始卵泡比例进一步减少。该研究结果提示, 围产期DEHP暴露可通过诱导自噬抑制原始卵泡发育。

关键词 DEHP; 原始卵泡; 自噬; 卵巢

Di (2-ethylhexyl) Phthalate Inhibited Primordial Follicle by Inducing Autophagy in Mice Ovary

Zhang Yan, Mu Xinyi, Geng Yanqing, He Junlin, Liu Xueqing, Chen Xuemei, Ding Yubin, Wang Yingxiong, Gao Rufeif*
(Laboratory of the Reproductive Biology, School of Public Health and Management, Chongqing Medical University/Joint International Research Laboratory of Reproduction & Development, Chongqing 400016, China)

Abstract To investigate the effect of autophagy on Di (2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) inhibited primordial folliculogenesis in perinatal mice ovaries, the BALB/C mice were randomly divided into control group, DEHP group, DEHP and 3-MA combinative treatment group, and DEHP and Rapa combinative treatment group. The neonatal female mice were injected once a day from birth to 5 days postpartum (5 dpp), and 16.5 days post coitum (dpc) fetal mice ovaries were cultured for 6 days. The results showed that the percent of primordial follicles decreased significantly and the percent of cyst-oocytes increased obviously in DEHP group, compared with control group. Furthermore, DEHP activated autophagy in the ovary, with increased autophagy-related gene expressions and recognizable autophagosomes, however, inhibition of autophagy by 3-MA attenuated the adverse impact of DEHP on primordial folliculogenesis, moreover, induction of autophagy by Rapa strengthened the adverse impact. This study demonstrated that perinatal exposure to DEHP induces autophagy to inhibit primordial folliculogenesis in mice ovary.

Keywords DEHP; primordial follicle; autophagy; ovary

收稿时间: 2017-12-25 接受日期: 2018-02-02

国家自然科学基金(批准号: 31571554)和重庆市教委研究生科研创新项目(批准号: CYS16141)资助的课题

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

Received: December 25, 2017 Accepted: February 2, 2018

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.31571554) and the Research and Innovation Projects of Chongqing Municipal Education Commission (Grant No.CYS16141)

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

网络出版时间: 2018-05-15 18:07:36 URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20180515.1807.004.html>

邻苯二甲酸酯类(phthalates, PAEs)是一类被广泛应用于塑料产品中作为增塑剂的环境内分泌干扰物(environmental endocrine disrupting chemicals, EDCs)^[1], 邻苯二甲酸二(2-乙基己)酯[Di(2-ethylhexyl) phthalate, DEHP]是其中运用最广的一种^[2]。食品包装材料、医疗产品、塑料生活用品及塑料办公制品中所添加的DEHP可通过消化道、呼吸道、皮肤等途径进入体内^[3], 且在环境中难以降解, 造成全球性的环境污染, 是人类健康的重要安全隐患^[4]。女性由于长期接触化妆品及洗涤用品造成更多的DEHP暴露, 作为一种环境类雌激素, DEHP可引起雌性生殖系统的损害, 包括青春期推迟、妊娠期缩短、乳房发育提前、生育率下降、排卵下降、子宫内膜异位症、流产率增加、孕中期流产以及胎儿畸形等^[5-6]。卵巢是DEHP的主要靶器官, 雌性体内卵母细胞总量是在胎儿时期就决定的, 而原始卵泡库的建立决定了雌性动物一生的生育能力^[7], 原始卵泡形成的异常可以直接导致雌性生殖能力的损害。课题组前期研究工作发现, DEHP可抑制原始卵泡的形成^[8]。

自噬(autophagy)是生物细胞内将蛋白质或细胞器包被进入囊泡、形成自噬溶酶体, 并降解包裹内容物的过程, 藉此“自我清除”的途径实现细胞本身的代谢需要和某些细胞器的更新, 维持细胞内环境的稳定。饥饿、高温、低氧等外界刺激可以提高细胞内自噬水平。有研究发现, 自噬过程在卵巢早期发育的调控中发挥了重要作用^[9-11]。首先, 自噬可以维持原始卵泡库建立前的卵母细胞的存活, Beclin1^{+/+}的新生小鼠卵巢卵母细胞数量下降56%^[9]。Shen等^[10]发现, Beclin1和微管轻链蛋白3(microtubule-associated protein 1A/1B-light chain 3, LC3)的高水平与癌症患者的预后相关, 在卵巢癌中, 自噬的上调可以减弱肿瘤的侵袭性。进一步的研究证实, 在卵巢良性肿瘤与交界性肿瘤的组织中, LC3和自噬基因Beclin1所调节的蛋白质水平显著高于上皮性卵巢癌^[11]。这些研究提示, 自噬可能与卵巢功能的正常维持有着密切的关系。虽然现有文献表明, 合理的自噬水平对卵巢早期正常发育必不可少^[12], 但自噬作为程序性细胞死亡的一种类型, 过度激活的自噬也将导致卵巢发育的异常。本研究拟初步探讨自噬在DEHP所引起的小鼠原始卵泡发育异常中的作用。

1 材料与方法

1.1 实验动物

健康成年清洁级BALB/C雌雄小鼠(6~8周龄, 25~30 g)购于重庆医科大学实验动物中心(动物许可证号: SCXK[渝]2012-0001)。饲养环境为SPF级动物寄养室, 饲养温度为(22±2) °C, 相对湿度为(55±10)%, 12 h光照, 自由饮水进食。将正常性成熟雌鼠与雄鼠3:1合笼交配, 次日查见阴栓记为孕0.5天(0.5 dpc), 小鼠出生第1天记为新生0天(0 dpp)。所有动物实验均通过重庆医科大学伦理委员会批准。

1.2 主要试剂

主要试剂包括: DEHP(40 mg/mL)和玉米油(均购于上海阿拉丁生化科技股份有限公司), 雷帕霉素(Rapa, 购于奥默生物技术有限公司), 3-MA、DMSO、胎牛血清DMEM/F12培养基(均购于美国Sigma公司), 兔单克隆LC3抗体、兔单克隆Beclin1抗体、小鼠单克隆β-actin抗体(均购于美国CST公司), HRP标记山羊抗兔抗体、HRP标记山羊抗小鼠抗体(均购于北京中杉金桥生物技术有限公司), PMSF蛋白酶抑制剂、RIPA蛋白质裂解液、BCA蛋白质浓度测定试剂盒、SDS-PAGE凝胶配制试剂盒、5XSDS-PAGE蛋白质上样缓冲液(均购于上海碧云天生物技术有限公司), 多聚甲醛(购于成都市科隆化学有限公司), H&E染液(购于南京建成科技有限公司)。

1.3 方法

1.3.1 新生鼠DEHP暴露模型构建 新生小鼠随机分为对照、DEHP、DEHP与3-MA联合注射、DEHP与Rapa联合注射4个组, 腹腔连续注射5天(0~4 dpp)。DEHP组: 0.6 mg/kg DEHP溶于玉米油^[13-14]; DEHP与3-MA联合注射组: 0.6 mg/kg DEHP与15 mg/kg 3-MA共溶于玉米油^[15]; DEHP与Rapa联合注射组: 0.6 mg/kg DEHP与2 mg/kg Rapa共溶于玉米油^[15]; 对照组: 注射等体积玉米油。于新生第5天(5 dpp)体式显微镜下收取卵巢组织。

1.3.2 卵巢组织体外培养 于体式显微镜下无菌分离孕16.5天(16.5 dpc)胚胎小鼠卵巢, 随机分为对照组与DEHP组。DEHP组: 50 μmol/L DEHP溶于DMSO后^[8], 加入胎牛血清DMEM/F12培养基中; 对照组: 在培养基中加入等浓度DMSO。5% CO₂、37 °C培养6天, 隔天换液, 第6天(相当于3 dpp)收取卵巢组织。

1.3.3 卵巢组织的形态学分析及卵泡计数 将收

集的卵巢用4%多聚甲醛固定、梯度酒精脱水、二甲苯透明、浸蜡、包埋后,按照试剂盒说明书进行常规H&E染色并制作为5 μm 全卵巢连续的石蜡切片。光学显微镜下对卵巢进行形态学分析,统计原始卵泡、单个卵母细胞以及合胞体卵母细胞数量,每间隔6个切面计数一次,总数乘6^[16-17]。

1.3.4 透射电镜观察卵母细胞自噬小体 将出生后第5天的小鼠卵巢组织从体视显微镜下取出之后,快速放于戊二醛溶液中固定。包埋、切片等标本制作由重庆医科大学生命科学研究院电镜室专业技术人员完成,用透射电子显微镜(transmission electron microscope, TEM Hitachi-7500)进行标本镜检观察。

1.3.5 组织蛋白质提取及Western blot 取20~25颗小鼠卵巢组织(取自10~13只鼠)于组织匀浆器中,加入80 μL 裂解液,3 μL PMSF冰上研磨30 min,后静置20 min,放入4 $^{\circ}\text{C}$ 低温离心机内,12 000 r/min离心15 min,BCA蛋白定量法测定总蛋白浓度。蛋白质样品按1:4溶于5X SDS-PAGE蛋白质上样缓冲液,沸水煮沸15 min,-20 $^{\circ}\text{C}$ 保存。按照目的蛋白质分子量配制分离胶以及浓缩胶,60 V恒压预电泳10 min后,根据蛋白质总量(约50 μg)确定各组上样体积,以 β -actin为内参蛋白质,进行蛋白质上样;80 V恒压充分电泳(约90 min),切胶,250 mA转膜至0.45 μm PVDF膜(Millipore公司);5%脱脂奶粉或5% BSA封闭70 min,孵育LC3、ATG5、Beclin1、 β -actin一抗(1:1 000,5%脱脂奶粉或5% BSA稀释),4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱过夜;次日用PBST清洗3次,50 r/min,15 min/次;山羊抗兔或山羊抗小鼠二抗(1:1 000,5%脱脂奶粉或5% BSA稀释)室温孵育70 min,30 r/min,之后用PBST清洗3次,50 r/min,15 min/次;化学发光ECL法显色,凝胶成像系统(Bio-Rad公司)成像。

1.4 统计学分析

使用SPSS 20.0软件进行数据分析,数据采用均值 \pm 标准差(mean \pm S.D.)表示,使用 t 检验或单因素方差分析评估组之间的差异, $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。所有实验至少重复3次以上。

2 结果

2.1 DEHP抑制原始卵泡发育

新生鼠连续5天腹腔注射DEHP,于第5天收集卵巢组织。H&E染色及统计结果显示,与对照组相比,DEHP暴露组原始卵泡比例显著减少(对照组:

75.00% \pm 4.73%; DEHP组: 48.33% \pm 0.88%; $P<0.01$),合胞体卵母细胞比例增多(对照组: 10.67% \pm 3.18%; DEHP组: 31.00% \pm 4.04%; $P<0.01$)(图1A和图1B),生殖细胞总数没有统计学差异(图1C)。

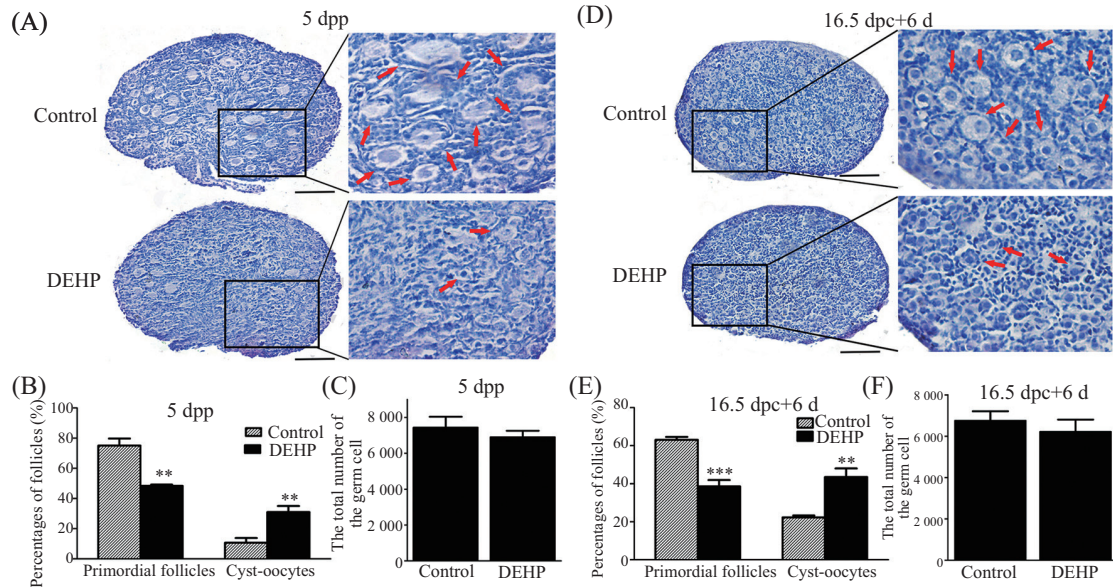
为进一步检测DEHP对卵泡发育的直接影响,收集孕16.5天胎鼠卵巢组织体外培养6天。H&E及统计结果显示,与对照组比较,DEHP暴露组原始卵泡比例显著减少(对照组: 63.12% \pm 1.49%; DEHP组: 38.56% \pm 3.40%; $P<0.001$),合胞体卵母细胞比例增多(对照组: 22.26% \pm 1.00%; DEHP组: 43.46% \pm 4.57%; $P<0.001$)(图1D和图1E),生殖细胞总数没有统计学差异(图1F)。

2.2 DEHP诱导新生鼠卵巢自噬

据课题组前期报道发现,自噬相关蛋白质ATG5及p62在DEHP引起的新生鼠卵泡发育异常过程中明显升高^[18]。为进一步验证DEHP是否诱导自噬,我们检测了DEHP暴露新生鼠卵巢中自噬小体和自噬关键蛋白质的水平。虽然自噬在正常生理情况下也存在,但一般很难在透射电镜下检测到自噬小体,而TME检测出DEHP暴露的新生鼠卵巢组织卵母细胞中存在明显的自噬小体(图2A)。Western blot检测结果显示,新生鼠DEHP暴露后,自噬关键蛋白质LC3-II/I和Beclin1的水平显著升高,差异具有统计学意义(图2B和图2C, $P<0.05$)。此结果提示,新生鼠DEHP暴露,诱导卵母细胞自噬。

2.3 DEHP诱导自噬抑制原始卵泡发育

为了探讨自噬是否参与DEHP抑制原始卵泡发育过程,我们利用自噬抑制剂3-MA及自噬诱导剂Rapa干扰自噬过程,进一步检测在抑制和诱导自噬的条件下DEHP对原始卵泡发育的影响。Western blot结果发现,在DEHP和3-MA联合注射后,LC3-II/I和Beclin1的水平较DEHP单独注射组降低,自噬被抑制(图3A)。在DEHP和Rapa联合注射后,LC3-II/I和Beclin1的水平较DEHP单独注射组进一步升高,自噬加强(图3B)。干扰模型构建成功。H&E及统计结果显示,DEHP联合3-MA腹腔注射后,原始卵泡比例得到一定程度的恢复(DEHP组: 48.67% \pm 1.20%; DEHP+3-MA组: 61.33% \pm 0.88%; $P<0.01$)(图3C和图3D),提示抑制自噬可一定程度上逆转DEHP对原始卵泡的抑制作用。DEHP联合Rapa腹腔注射后,原始卵泡比例进一步减少(DEHP组: 48.67% \pm 1.20%; DEHP+Rapa组: 24.00% \pm 0.57%; $P<0.001$)(图3C和图

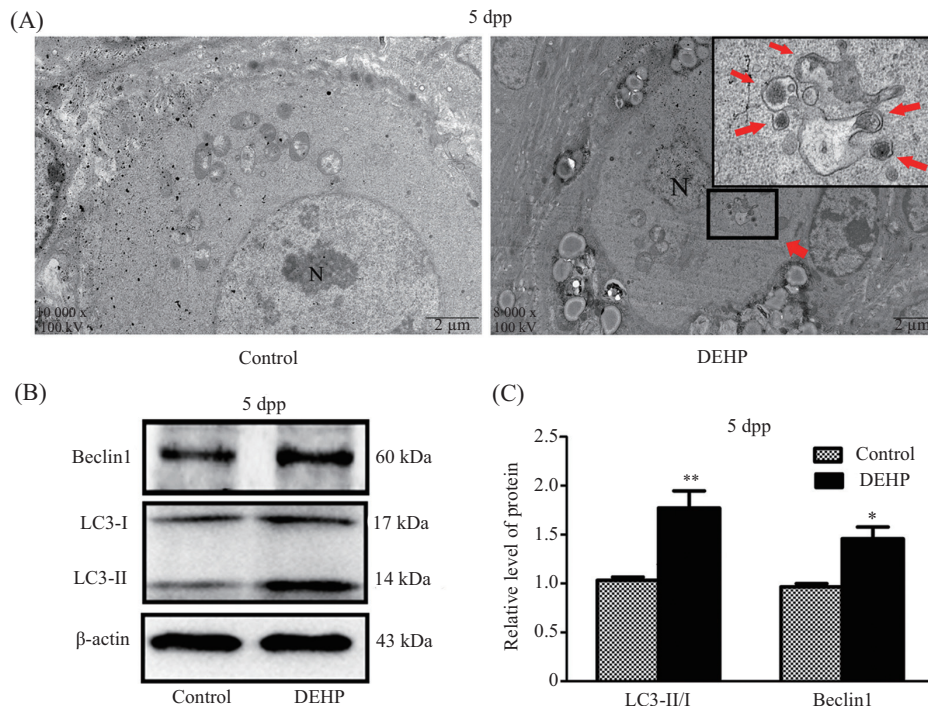


A: H&E染色观察DEHP对新生鼠卵巢组织原始卵泡形成的影响; B: 新生鼠各级卵泡所占比例统计图; C: 新生鼠生殖细胞总数统计图; D: H&E染色观察DEHP对胎鼠卵巢组织原始卵泡形成的影响; E: 胎鼠各级卵泡所占比例统计图; F: 胎鼠生殖细胞总数统计图。红色箭头代表原始卵泡。标尺=100 μ m, $n=3$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$, 与对照组比较。

A: representative histologic sections of neonatal mice ovaries; B: counting analysis of primary follicles and cyst-ppcytes in neonatal mice ovaries; C: counting analysis of the total number of the germ cell in neonatal mice ovaries; D: representative histologic sections of DEHP-cultured ovaries; E: counting analysis of primary follicles and cyst-ppcytes in DEHP-cultured ovaries; F: counting analysis of the total number of the germ cell in DEHP-cultured ovaries. Arrow (red): primordial follicle. Scale bars=100 μ m, $n=3$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$ vs control group.

图1 DEHP抑制围产期原始卵泡发育

Fig.1 Perinatal exposure of DEHP inhibited primordial folliculogenesis in mice ovary

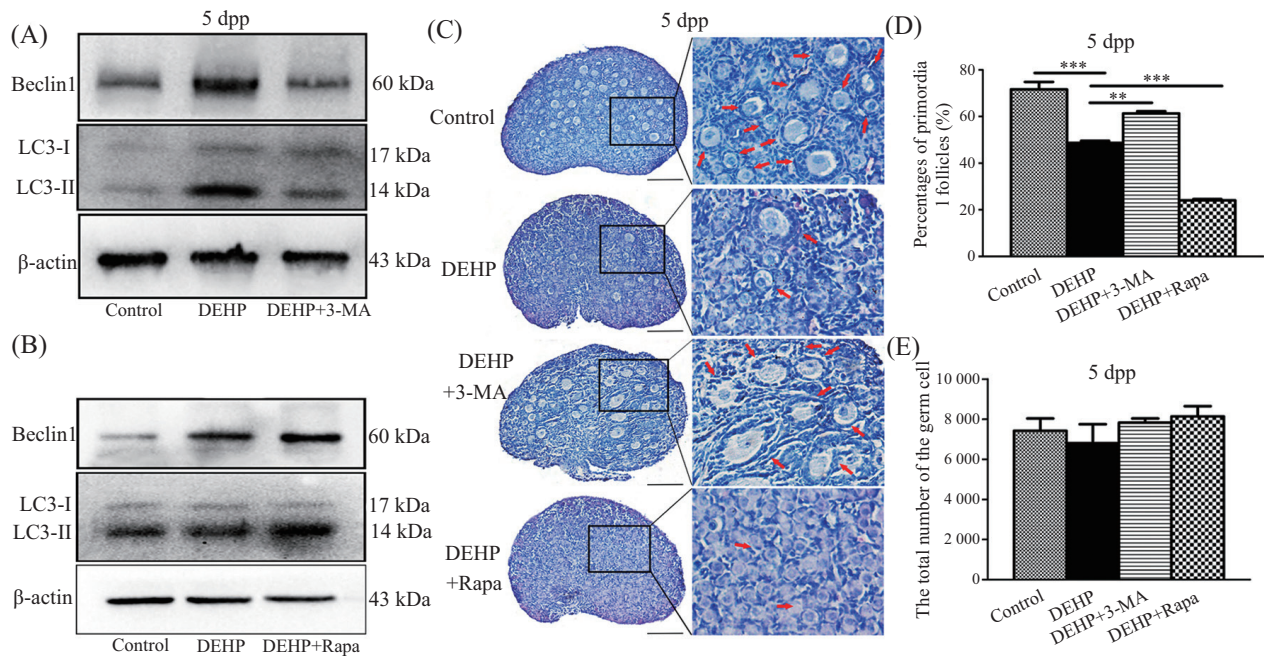


A: TEM检测新生鼠卵巢中自噬小体的存在, 红色箭头代表原始卵泡, N: 细胞核。B: Western blot检测新生鼠卵巢中自噬关键蛋白质水平。C: B图的统计图。 $n=3$, * $P<0.05$, ** $P<0.01$, 与对照组比较。

A: representative TEM images of neonatal mice ovaries. Arrow (red): autophagosomes, N: nucleus. B: the autophagy-related protein levels by Western blot in neonatal mice ovaries. C: counting analysis of figure B. $n=3$, * $P<0.05$, ** $P<0.01$ vs control group.

图2 DEHP诱导卵巢自噬

Fig.2 DEHP induce autophagy in mice ovary



A: Western blot检测DEHP与3-MA联合注射后, 新生鼠卵巢中自噬关键蛋白质水平。B: Western blot检测DEHP与Rapa联合注射后, 新生鼠卵巢中自噬关键蛋白质水平。C: H&E染色观察自噬抑制和诱导条件下, DEHP对新生鼠卵巢组织原始卵泡形成的影响, 红色箭头代表原始卵泡, 标尺=100 μ m。D: C图的统计图。E: 生殖细胞总数统计图。n=3, **P<0.01, ***P<0.001。

A: the autophagy-related protein levels by Western blot in DEHP and 3-MA combinative treatment neonatal mice ovaries. B: the autophagy-related protein levels by Western blot in DEHP and Rapa combinative treatment neonatal mice ovaries. C: representative histologic sections of neonatal mice ovaries. Arrow (red): primordial follicle, scale bars=100 μ m. D: counting analysis of primary follicles and cyst-oocytes in neonatal mice ovaries. E: counting analysis of the total number of the germ cell in neonatal mice ovaries. n=3, **P<0.01, ***P<0.001.

图3 DEHP诱导自噬抑制原始卵泡发育

Fig.3 DEHP induced autophagy to inhibit primordial folliculogenesis in mice ovary

3D), 提示诱导自噬可加强DEHP对原始卵泡的抑制作用。各处理组间生殖细胞总数无显著性差异(图3E)。此结果提示, DEHP通过诱导自噬抑制原始卵泡发育。

3 讨论

近年来, 我国女性不孕不育的患者数量显著上升, 主要病因为卵巢功能紊乱。与此同时, EEDs及其对人类健康的危害也逐渐受到高度关注。具有雌激素样活性的环境雌激素(environmental estrogens, EEs)是其中分布较广且具有生殖毒性的一种, 已有大量人群流行病学和动物实验研究表明, EEs可导致生殖系统变异、内分泌紊乱、胚胎发育异常等健康危害效应^[19]。DEHP是被作为增塑剂广泛添加在食品包装、日化用品、衣物、医疗器械以及各种塑料制品中的一种环境雌激素, 它不能与多聚物形成稳定的共价键, 可以从多聚物中游离并在环境中持续释放。在我国对7类共78种食品进行的调查中发现, 其

中污染最严重的是DEHP, 其最高含量达762 ng/g^[20]。由此可见, DEHP已造成严重和广泛的环境污染, 具有雌激素样活性的DEHP对卵巢发育和雌性生殖功能构成威胁。我们的研究发现, 围产期小鼠DEHP暴露导致原始卵泡形成明显受阻、卵母细胞仍处于细胞核分裂但胞质不完全分裂的合胞体状态^[8]。

有研究发现, 自噬可以维持原始卵泡库建立前的卵母细胞存活, 在已形成原始卵泡的卵母细胞中具有较高的自噬水平, 且自噬水平与卵母细胞丢失呈正相关^[9,21]。自噬是生物细胞内的“自我清除”途径, 主要包括自噬体形成、自噬溶酶体形成以及自噬溶酶体内的酶降解三个过程。细胞接受自噬诱导信号后, ATG5、Beclin1等信号发生变化, Atg复合体形成, 来源于内质网、高尔基体的细胞器膜发生脱落并将降解物包裹在内, 形成双层膜结构的圆形或椭圆形的自噬体。LC3是自噬体上的标志蛋白质, 可作为自噬标志物来估计自噬水平的高低。课题组已报道自噬相关蛋白质ATG5及p62在DEHP引起新生鼠卵

泡发育异常过程中表达增加^[18]。本研究进一步发现, DEHP暴露使自噬相关蛋白质LC3和Beclin1水平显著升高, TME检测到明显的自噬小体自噬水平明显上升, 原始卵泡比例下降。DEHP和自噬抑制剂3-MA的联合暴露一定程度上逆转了DEHP对自噬原始卵泡发育的抑制作用, 而DEHP和自噬诱导剂Rapa的联合暴露加强了DEHP的原始卵泡的抑制作用。

本研究发现, 围产期DEHP暴露可通过诱导卵巢自噬干扰卵巢早期发育。该研究从孕期暴露的角度探寻DEHP暴露对卵巢发育的影响, 将为防控该类增塑剂污染提供实验基础和理论依据, 为出生缺陷的预防和人类不孕不育的防治寻找新的线索。

参考文献(References)

- 刘淑敏, 常薇. 邻苯二甲酸酯致雌性生殖系统毒性及其机制的研究进展. 环境与健康(Liu Sumin, Cang Wei. Study on the toxicity and mechanism of phthalic esters to female reproductive system. *Environment and Health* 2013; 30(4): 374-7.
- Schmidt JS, Schaedlich K, Fiandanese N, Pocar P, Fischer B. Effects of di(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) on female fertility and adipogenesis in C3H/N mice. *Environ Health Perspect* 2012; 120(8): 1123-9.
- Lovekamp ST, Davis BJ. Mechanisms of phthalate ester toxicity in the female reproductive system. *Environ Health Perspect* 2003; 111(2): 139-45.
- Kwon JT, Hwang SK, Jin H, Kim DS, Minai TA, Yoon HJ, *et al.* Body distribution of inhaled fluorescent magnetic nanoparticles in the mice. *J Occup Health* 2008; 50(1): 1-6.
- Martino AJ, Chahoud I. Reproductive toxicity of phthalate esters. *Mol Nutr Food Res* 2010; 54(1): 148-57.
- Kaul AF, Souney PF, Osathanondh R. A review of possible toxicity of di-2-ethylhexylphthalate (DEHP) in plastic intravenous containers: effects on reproduction. *Drug Intell Clin Pharm* 1982; 16(9): 689-92.
- Kezele P, Skinner MK. Regulation of ovarian primordial follicle assembly and development by estrogen and progesterone: endocrine model of follicle assembly. *Endocrinology* 2003; 144(8): 3329-37.
- Mu XY, Liao XG, Chen XM, Li YL, Wang M, Shen C, *et al.* DEHP exposure impairs mouse oocyte cyst breakdown and primordial follicle assembly through estrogen receptor-dependent and independent mechanisms. *J Hazard Mater* 2015; 298: 232-40.
- Gawriluk TR, Hale AN, Flaws JA, Dillon CP, Green DR, Rucker EB. Autophagy is a cell survival program for female germ cells in the murine ovary. *Reproduction* 2011; 141(6): 759-65.
- Shen Y, Li DD, Wang LL, Deng R, Zhu XF. Decreased expression of autophagy-related proteins in malignant epithelial ovarian cancer. *Autophagy* 2008; 4(8): 1067-8.
- Hu YF, Lei X, Zhang HY, Ma JW, Yang WW, Chen ML, *et al.* Expressions and clinical significance of autophagy-related markers Beclin1, LC3, and EGFR in human cervical squamous cell carcinoma. *Oncol Targets Ther* 2015; 8: 2243-9.
- Klionsky DJ, Emr SD. Autophagy as a regulated pathway of cellular degradation. *Science* 2000; 290(5497): 1717-21.
- Wang X, Wang Y, Song Q, Wu J, Zhao Y, Yao S, *et al.* In utero and lactational exposure to di(2-ethylhexyl) phthalate increased the susceptibility of prostate carcinogenesis in male offspring. *Reprod Toxicol* 2017; 69: 60-7.
- Zhang XF, Zhang LJ, Li L, Feng YN, Chen B, Ma JM, *et al.* Diethylhexyl phthalate exposure impairs follicular development and affects oocyte maturation in the mouse. *Environ Mol Mutagen* 2013; 54(5): 354-61.
- Wu X, He L, Chen F, He X, Cai Y, Zhang G, *et al.* Impaired autophagy contributes to adverse cardiac remodeling in acute myocardial infarction. *PLoS One* 2014; 9(11): e112891.
- Wen J, Zhang H, Li G, Mao G, Chen X, Wang J, *et al.* PAR6, a potential marker for the germ cells selected to form primordial follicles in mouse ovary. *PLoS One* 2009; 4(10): e7372.
- Flaws JA, Hirshfield AN, Hewitt JA, Babus JK, Furth PA. Effect of bcl-2 on the primordial follicle endowment in the mouse ovary. *Biol Reprod* 2001; 64(4): 1153-9.
- 汪玉娟, 穆欣艺, 苏燕. 自噬相关蛋白Atg5及P62在DEHP引起新生鼠卵泡发育异常过程中的作用. 重庆医科大学学报(Wang Yuheng, Mu Xinyi, Su Yan. Effects of autophagy-associated proteins Atg5 and P62 on DEHP-induced follicular dysplasia in neonatal rats. *Journal of Chongqing Medical University*) 2016; 41(3): 223-7.
- Lyche JL, Gutleb AC, Bergman A, Eriksen GS, Murk AJ, Ropstad E, *et al.* Reproductive and developmental toxicity of phthalates. *J Toxicol Environ Health B Crit Rev* 2009; 12(4): 225-49.
- Guo Y, Zhang Z, Liu L, Li Y, Ren N, Kannan K. Occurrence and profiles of phthalates in foodstuffs from China and their implications for human exposure. *J Agric Food Chem* 2012; 60(27): 6913-9.
- Rodrigues P, Limback D, McGinnis LK, Plancha CE, Albertini DF. Multiple mechanisms of germ cell loss in the perinatal mouse ovary. *Reproduction* 2009; 137(4): 709-20.