

乙烯利暴露对早孕小鼠子宫内膜蜕膜化的影响

黄春玲 陈雪梅 李芳芳 刘学庆 何俊琳 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 该研究主要探讨乙烯利(ethephon, ETH)暴露对早孕小鼠子宫内膜蜕膜化的影响。从孕第一天开始每天经口灌胃给予CD1小鼠0、71.25、142.5和285 mg/kg ETH后,于孕第七天处死小鼠。观察子宫胚胎着床数量,记录子宫重量及体重,采用酶联免疫吸附实验(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)检测孕鼠血清雌孕激素水平,RT-PCR、Western blot和免疫组化法(immunohistochemistry, IHC)检测HOXA10、COX2和BMP2等蜕膜化标记分子的mRNA和蛋白表达水平。构建假孕小鼠体内人工诱导蜕膜化模型,RT-PCR检测蜕膜化标记分子HOXA10、COX2和BMP2的mRNA表达水平。结果表明,在285 mg/kg ETH暴露下,小鼠孕第七天子宫胚胎着床数量显著降低($P<0.001$),其绝对子宫重量和相对子宫重量均显著低于对照组($P<0.001$)。RT-PCR结果显示,285 mg/kg ETH暴露组BMP2和HOXA10 mRNA表达水平显著低于对照组($P<0.001$),COX2表达水平显著高于对照组($P<0.001$)。Western blot结果显示,与对照组相比,285 mg/kg ETH暴露组其子宫内膜蜕膜化标记分子HOXA10蛋白表达水平显著降低,COX2、MMP9、PR表达水平显著升高。IHC结果显示,与对照组相比,285 mg/kg ETH暴露组其子宫内膜蜕膜化标记分子HOXA10和BMP2蛋白表达水平显著降低。ELISA检测结果表明,285 mg/kg ETH暴露组其血清孕激素水平显著降低($P<0.001$)。体内人工诱导蜕膜化模型检测结果显示,ETH暴露组人工诱导蜕膜化反应程度降低,诱导侧子宫重量与非诱导侧子宫重量之比显著低于对照组,蜕膜化标记分子HOXA10和BMP2 mRNA表达水平显著降低。该研究结果表明,孕早期ETH暴露会损害小鼠子宫内膜蜕膜化。

关键词 早孕; 子宫内膜蜕膜化; 乙烯利

Effects of Ethephon Exposure on Endometrial Decidualization in Mice during Early Pregnancy

HUANG Chunling, CHEN Xuemei, LI Fangfang, LIU Xueqing, HE Junlin, DING Yubin, WANG Yingxiong, GAO Rufeifei*
(Laboratory of Reproductive Biology, School of Public Health, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

Abstract This study focused on whether ETH exposure had adverse effects on endometriosis decidualization in early pregnancy. In this study, on GD1 (gestational day 1), CD1 mice were given 0, 71.25, 142.5, and 285 mg/kg of ETH by continuous oral feeding. On GD7, mice were killed. Uterine tissue was collected and the numbers of implanted embryo were observed. Serum was collected for estrogen and progesterone detection by ELISA. mRNA expression levels of decidual markers such as HOXA10, BMP2 and COX2 were detected by RT-PCR. Protein expression levels of HOXA10, BMP2 and COX2 were detected by immunohistochemistry and Western blot. The induced decidual-

收稿日期: 2021-03-16 接受日期: 2021-04-19

国家重点研究发展计划(批准号: 2018YFC1004401)资助的课题

*通讯作者。Tel: 023-68485008, E-mail: gao_ru_fei@cqmu.edu.cn

Received: March 16, 2021 Accepted: April 19, 2021

This work was supported by the National Key Research and Development Program of China (Grant No.2018YFC1004401)

*Corresponding author. Tel: +86-23-68485008, E-mail: gao_ru_fei@cqmu.edu.cn

URL: <http://www.cjcb.org/arts.asp?id=5527>

ization model of mice *in vivo* was established. mRNA expression levels of decidual markers were detected by RT-PCR. Under 285 mg/kg ETH exposure, the numbers of implanted embryos on GD7 were significantly decreased and the absolute and relative uterine weights on GD7 were significantly reduced. RT-PCR results showed *BMP2* and *HOXA10* mRNA expression were significantly reduced while *COX2* mRNA expression was significantly increased compared to control group in the 285 mg/kg ETH exposed group. Western blot result showed that compared with control group, the decidual markers of *HOXA10* protein expression was significantly down-regulated while *COX2*, *MMP9* and *PR* were significantly up-regulated under 285 mg/kg ETH exposed group. Immunohistochemistry result showed *HOXA10* and *BMP2* protein expression was significantly decreased under 285 mg/kg ETH exposed group. Artificial decidualization was detected in the uteri of the control, but weakened decidualization response was observed in the ETH-treated group. The decidual markers of *HOXA10* and *BMP2* mRNA were significantly decreased. Serum progesterone levels also decreased obviously by ELISA. Suggested exposure to ETH in early pregnancy had adverse effects on endometrial decidualization in mice.

Keywords early pregnancy; endometrial decidualization; ethephon

随着现代科学技术的发展,大量的植物生长调节剂如乙烯利(ethephon, ETH)、赤霉素、脱落酸和细胞因子等被广泛用来提高农作物的产量^[1]。动物实验研究表明,过量使用这些植物生长调节剂可能会损害动物的肾、脑和肝^[2-4]。

ETH是一种常见的植物生长调节剂,它可以被用来增加农作物的抗倒伏性,促进蔬菜水果的成熟,促进植株的开花和分化,统一农作物的吐絮时间等^[5-7],在农业上应用非常的广泛。近年来许多不法商贩和果农为了追求更大的经济效益,在生产过程中存在大剂量违规使用植物生长调节剂的现象,有报道显示,大剂量违规使用ETH可使ETH在蔬菜水果上残留超标,而残留的ETH可以通过食物进入人体内对人体健康产生影响^[8]。研究者们发现,常规摄入人工催熟的水果可能会导致眩晕、虚弱、皮肤溃疡、心脏和肝脏等相关疾病发生^[9]。据报道,摄入ETH催熟的蔬菜和水果可能会刺激皮肤和胃肠功能,以及导致心脏功能失调,中枢神经系统、肝、肾等相关疾病的发生^[10]。除此之外,ETH还可以降低DNA和RNA的浓度,具有突变和致畸效应,并且能够抑制胆碱酯酶活性^[11]。ELDAIM等^[12]研究显示,用ETH处理白化大鼠会降低白化大鼠的精子数量和活力,以及卵泡刺激素水平。同样地, DUTTA^[13]的研究结果表明,用ETH处理白化大鼠后会降低白化大鼠的精子数量和活力以及精子的生存能力,导致精母细胞畸形,但是目前ETH对雌性生殖的影响却鲜有报道。

在哺乳动物中,一旦胚胎黏附到子宫内膜上,

子宫内膜基质细胞将启动一个特殊的形态和功能的改变叫做蜕膜化。子宫内膜蜕膜化是一个动态的过程,受雌孕激素的调节。子宫内膜蜕膜化是妊娠的一个关键环节,适宜的母体子宫内膜形态和功能的改变对于成功的蜕膜化是必不可少的,异常的蜕膜化可导致不孕、流产、先兆子痫、胎儿宫内发育迟缓、早产等^[14-16]。ETH作为一种应用非常广泛的植物生长调节剂,人们对其毒性的认识还很少,尤其是对妊娠过程中蜕膜化的影响还未见有文献报道,因此,本文主要研究妊娠早期乙烯利暴露对小鼠子宫内膜蜕膜化的影响。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

ETH购自上海麦克林生化科技有限公司,将其溶解于蒸馏水中配置成0、71.25、142.5和285 mg/kg浓度用于灌胃。兔抗BMP2购自Abcam公司;鼠抗HOXA10购自Santa Cruz公司;兔抗COX2、兔抗MMP9购自Cell Signaling Technology公司;兔抗PR购自Abcam公司;鼠抗 β -actin购自Sigma-Aldrich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;免疫组化试剂盒、DAB显色液购自北京中杉金桥有限公司;SDS缓冲液、RIPA裂解液、PMSF(phenylmethylsulfonyl fluoride)购自上海碧云天生物技术有限公司。

1.2 构建ETH染毒孕鼠模型

将健康的8周龄雄性CD1小鼠与雌性CD1小鼠进行交配,第二天早上检查阴栓,出现阴栓则标记

为怀孕第一天(GD1)。从孕第一天起每天给予0、71.25、142.5和285 mg/kg ETH灌胃。于孕第7天眼球取血后颈椎脱臼法处死小鼠,称量小鼠体重,将小鼠子宫取出,清洗干净后称重并拍照。将子宫内膜组织放入EP管中存放于-80 °C冰箱,用于后续RT-PCR和Western blot实验。另取一部分子宫组织包埋后用于IHC。所有动物实验均通过重庆医科大学伦理委员会批准。

1.3 构建假孕小鼠人工诱导蜕膜化模型

选取健康的8周龄CD1小鼠,于傍晚将雌性小鼠与输精管结扎的雄性小鼠按2:1比例合笼,次日早上检查阴栓。见阴栓视为假孕第一天,标记为PPD1,于假孕第四天一侧子宫角注射25 μ L玉米油诱导蜕膜化,对侧子宫作为对照,不做任何处理。实验组从假孕第一天开始每天给予285 mg/kg ETH灌胃,对照组给予等量蒸馏水。于假孕第八天处死小鼠,取子宫拍照后放入-80 °C冰箱保存,用于后续RT-PCR实验。

1.4 RT-PCR

水平刮取GD7天孕鼠和人工诱导蜕膜化诱导侧子宫内膜组织:摘取小鼠子宫,剔净脂肪和系膜组织,沿子宫纵轴切开子宫,机械刮取内膜组织,PBS清洗3次,备用。提取RNA检测BMP2、COX2和HOXA10的mRNA表达水平。提取RNA,反转录合成cDNA后,用RT-PCR法进行定量。引物由上海生工生物科技有限公司合成:小鼠HOXA10上游引物5'-CTG CCC TTA CAC GAA GCA C-3',下游引物5'-TTC AGT TTC ATC CTG CGA TT-3';小鼠BMP2上游引物5'-GGA CCC GCT GTC TTC TAG TG-3',下游引物5'-GTC TCT GCT TCA GGC CAA AC-3';小鼠COX2上游引物5'-CAG TAG CAT CAA ACC GAC CA-3',下游引物5'-AGT GGA ACC ATT TCT AGG ACA A-3';小鼠 β -actin上游引物5'-TCC TAT GTG GGT GAC GAG GC-3',下游引物5'-TAC ATG CCT GGG GTG TTG AAG TCT-3'。

1.5 Western blot

称量30 mg左右子宫内膜组织,放入匀浆器中,向匀浆器中加入适量RIPA裂解液和PMSF,冰上碾磨至无肉眼可见组织。上清液即为蛋白液,按蛋白液:5 \times 十二基硫酸钠(SDS)缓冲液=4:1的比例加入SDS缓冲液,煮沸10 min使蛋白变性,并将获得的蛋白样本置于-80 °C冰箱保存。将蛋白样本用10% SDS-PAGE进行电泳,电泳结束后转移至PVDF膜上

(BioRad)进行电转。37 °C、5%脱脂奶粉封闭PVDF膜90 min,4 °C冰箱过夜孵育一抗,一抗信息如下:COX2兔多克隆抗体(1:1 000)、鼠HOXA10单克隆抗体(1:800)、兔MMP9单克隆抗体(1:1 000)、兔PR单克隆抗体(1:1 000)。 β -actin(1:1 000)作为内参。37 °C孵育二抗(1:1 000)60 min。用凝胶成像系统(BioRad)成像。灰度值采用Quantity One分析。

1.6 免疫组化(immunohistochemistry, IHC)

取新鲜子宫组织放入4%多聚甲醛中固定4~6 h,然后分别放入75%、85%、95%和100%酒精中进行梯度脱水,脱水结束后放入55 °C的软蜡中浸泡4~6 h,后放入硬蜡中待其自然冷却凝固进行包埋切片。将含有组织的硬蜡切成5 μ m厚的薄片,贴于载玻片上烤干备用。切片放入二甲苯中,55 °C条件下进行脱蜡,梯度酒精水化后自来水冲洗,然后置于蒸馏水中浸泡,用柠檬酸盐缓冲液(pH7.3)煮沸,抗原热修复15~20 min后自然冷却至室温。加过氧化氢阻断剂消除内源性干扰后加入山羊血清封闭,封闭结束后滴加一抗4 °C冰箱孵育过夜。次日复温30 min,37 °C滴加二抗孵育、辣根过氧化物酶标记链酶卵白素工作液处理后,滴加DAB显色。苏木精染液染核2 min后,梯度酒精脱水,二甲苯透明组织,最后中性树脂封片,显微镜下观察、拍照。实验中使用到的抗体如下: BMP2兔多克隆抗体(1:100)、HOXA10鼠单克隆抗体(1:200)。免疫组化结果由ImageJ软件进行分析。

1.7 ELISA

采用眼球取血法收集ETH暴露组和对照组小鼠血液,置于干净的1.5 mL EP管中,室温放置2~4 h后,4 000 r/min离心15 min,收集上清,检测血清E2、P4水平。具体操作步骤如下:设置标准品孔、样本孔和空白孔,向标准品孔加50 μ L不同浓度的标准品,样本孔先加10 μ L待测样本,再加40 μ L样本稀释液,空白孔不加。除空白孔外,标准品孔和样本孔中每孔加入100 μ L辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase, HRP)标记的检测抗体,用封板膜封住反应孔,37 °C水浴锅或恒温箱温育30 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,重复洗板5次。每孔各加入50 μ L底物A、B,37 °C避光孵育15 min。每孔加入50 μ L终止液,15 min内在450 nm波长处测定各孔的D值。

1.8 统计分析

所有数据由SPSS 17.0软件统计,数据采用平均

值±标准误($\bar{x}\pm s$)来表示。采用独立样本 t 检验来评估两组数据之间是否具有显著性差异。所有实验均独立重复至少3次。 $P<0.05$ 表示差异显著, $P<0.01$ 表示差异极显著。

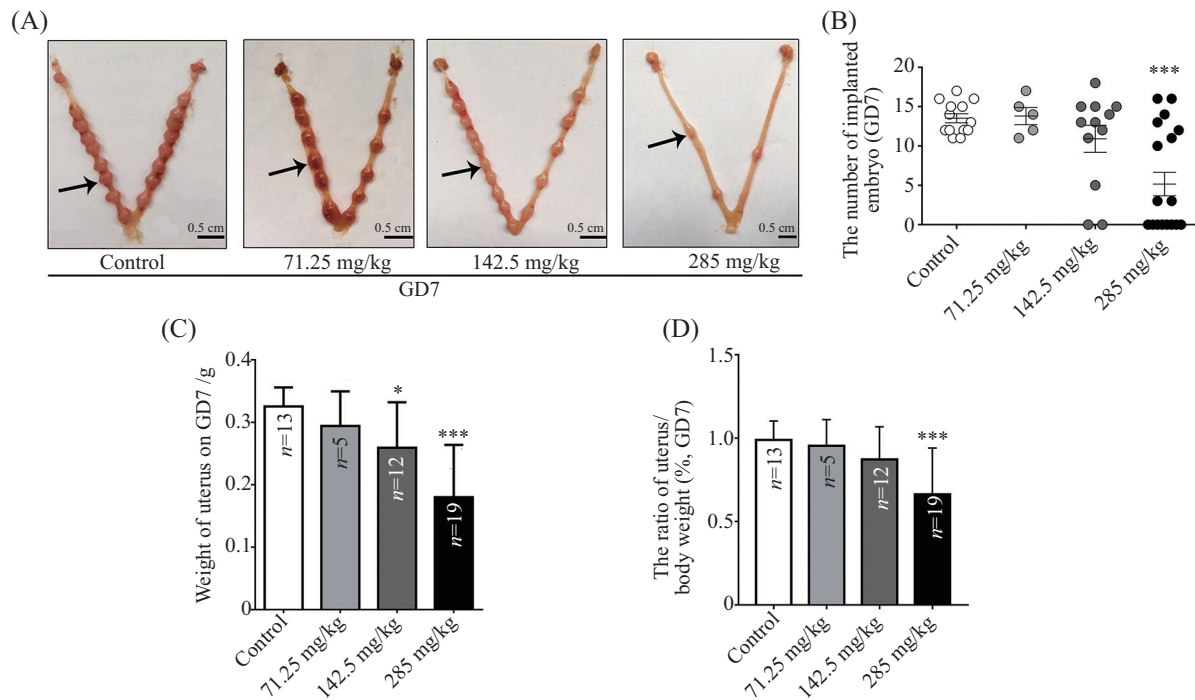
2 结果

2.1 孕早期ETH暴露使小鼠子宫胚胎着床数减少

为了研究ETH暴露对小鼠子宫胚胎着床的影响,分别采用不同浓度ETH灌胃怀孕小鼠,孕第7天时观察小鼠子宫胚胎着床情况。结果发现,71.25、142.5 mg/kg ETH暴露组其小鼠子宫胚胎着床数量与对照组相比无统计学差异,然而285 mg/kg ETH暴露组小鼠子宫胚胎着床数与对照组相比显著降低,差异具有统计学意义(图1A和图1B)。71.25 mg/kg ETH暴露组其绝对子宫重量和相对子宫重量与对照组相比无显著差异,然而285 mg/kg ETH暴露组其绝对子宫重量和相对子宫重量均显著低于对照组(图1C和图1D)。

2.2 孕早期ETH暴露使小鼠子宫内膜蜕膜化受损

上述研究结果提示,早孕时期ETH暴露会使小鼠子宫胚胎着床数减少,为了明确ETH暴露导致小鼠子宫胚胎着床数减少是否是由于蜕膜化异常造成的,我们采用RT-PCR检测孕第7天子宫内膜组织中蜕膜化相关标记分子BMP2、COX2和HOXA10 mRNA表达情况,结果发现与对照组相比,285 mg/kg ETH暴露组其子宫内膜BMP2和HOXA10 mRNA表达水平显著降低,COX2 mRNA表达水平显著升高(图2A)。为了进一步验证ETH暴露对蜕膜化的影响,我们采用Western blot和IHC检测了孕第7天子宫内膜组织中BMP2、COX2和HOXA10等蜕膜化标记分子蛋白的表达情况。Western blot结果显示,285 mg/kg ETH暴露组子宫内膜HOXA10蛋白表达水平显著低于对照组,COX2、MMP9、PR表达水平显著高于对照组(图2B)。IHC结果显示,与正常组相比,285 mg/kg ETH暴露组BMP2和HOXA10蛋白在基质细胞中的表达明显低于对照组(图2C)。



A: 各剂量ETH暴露组小鼠孕第7天总体子宫形态图,箭头指示的是着床的胚胎; B: 各剂量ETH暴露组小鼠孕第7天胚胎着床数量统计图; C: 各剂量ETH暴露组小鼠孕第7天子宫重量统计图; D: 各剂量ETH暴露组小鼠孕第7天子宫重量与体重之比统计图。* $P<0.05$, *** $P<0.001$,与control组相比。

A: gross morphology of uteri in each does of ETH exposure group on the seventh day of pregnancy. Arrows indicate implantation sites. B: statistical chart of embryo implantation number in each does of ETH exposure group on the seventh day of pregnancy; C: statistical chart of uterus weight in each does of ETH exposure group on the seventh day of pregnancy; D: statistical chart of uterus weight/body weight in each does of ETH exposure group on the seventh day of pregnancy. * $P<0.05$, *** $P<0.001$ vs control group.

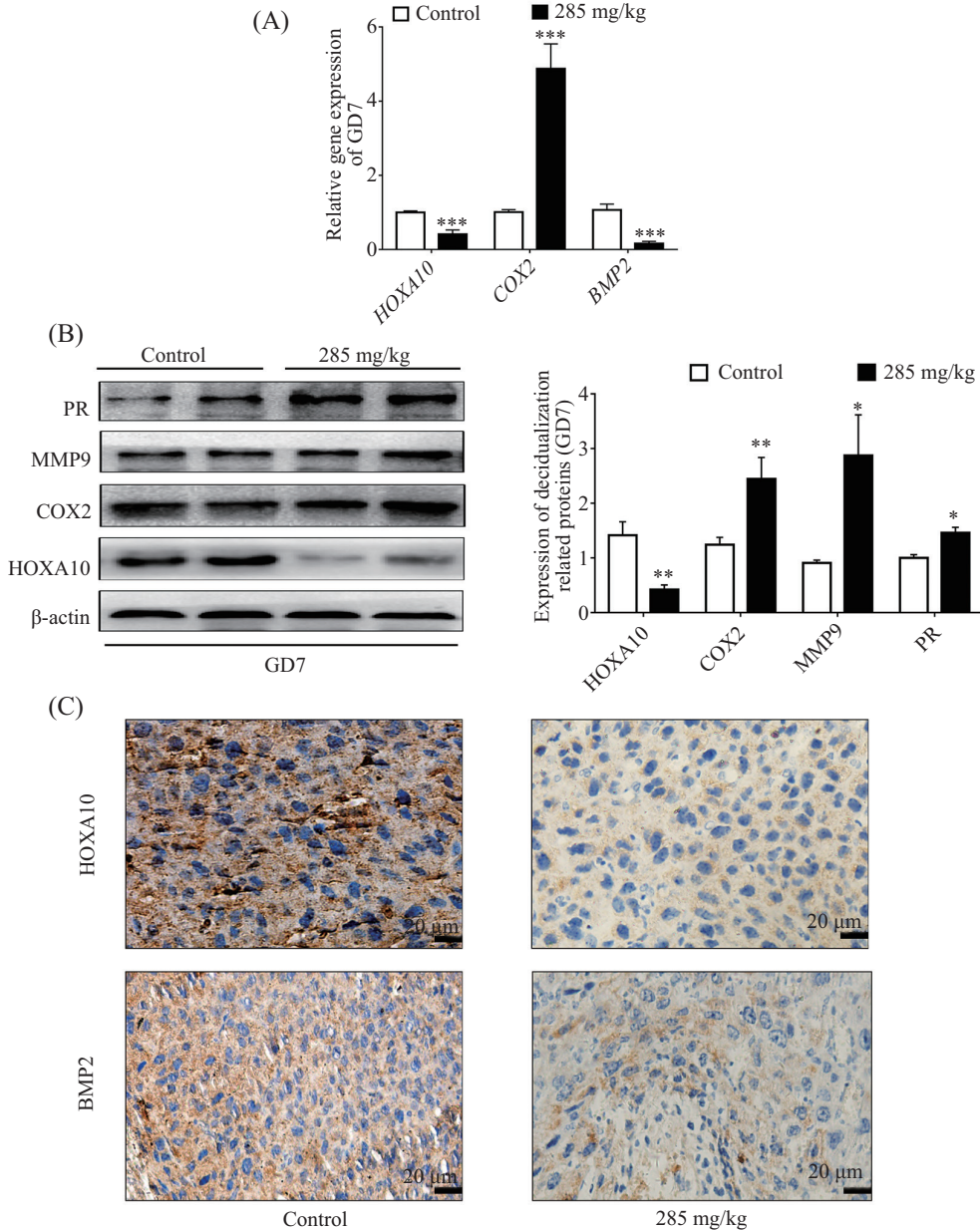
图1 不同浓度ETH暴露组孕第7天子宫胚胎着床情况

Fig.1 Embryo implantation in different dose of ETH exposure group on the seventh day of pregnancy

2.3 孕早期ETH暴露使体内人工诱导蜕膜化受损

为了进一步明确ETH暴露对小鼠子宫内膜蜕膜化的影响, 利用人工诱导蜕膜化的方法, 在妊娠第4天, 给予假孕鼠单侧子宫角玉米油刺激, 在妊娠第8天收集材料, 观察子宫形态。运用RT-PCR检测

蜕膜化标记分子的表达。形态观察结果显示, 对照组中诱导侧子宫表现为充血肿胀且体积明显大于未诱导侧子宫, 提示蜕膜化反应的发生。而在ETH暴露组中, 蜕膜化反应程度明显减弱(图3A)。除此之外, 与对照组相比, ETH暴露组诱导侧子宫重量

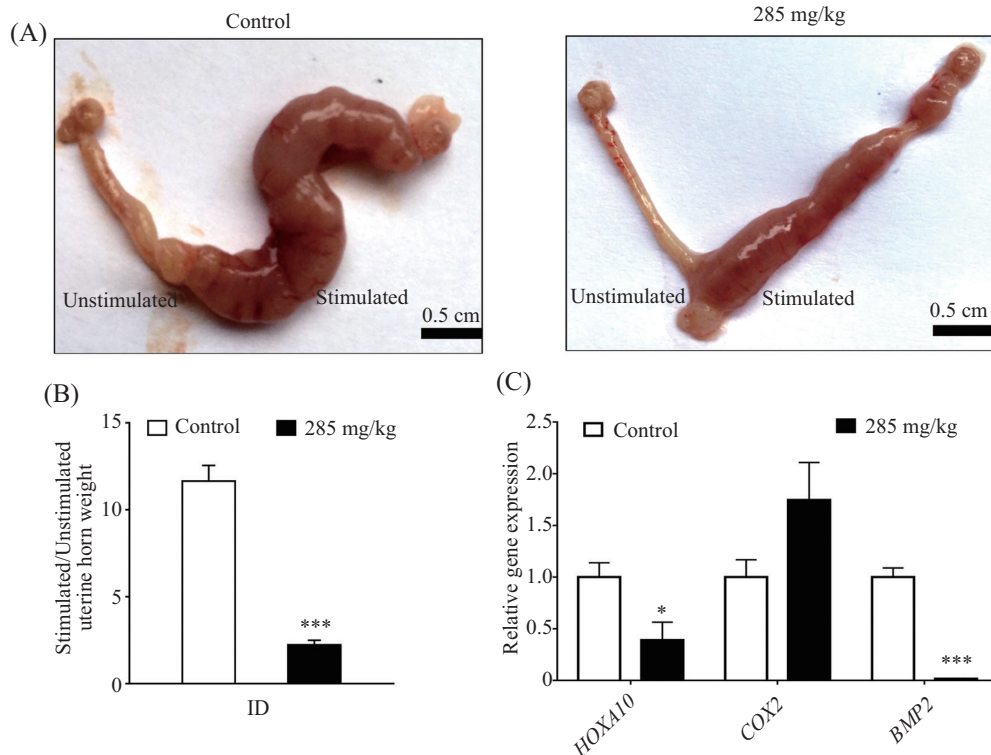


A: RT-PCR法检测control(n=4)和285 mg/kg(n=4) ETH暴露组孕第7天子宫内膜组织蜕膜化标记分子COX2、HOXA10和BMP2 mRNA表达情况; B: 免疫印迹法检测control(n=4)和285 mg/kg(n=4) ETH暴露组孕第7天子宫内膜组织蜕膜化标记分子HOXA10、COX2、MMP9和PR的蛋白表达情况; C: 免疫组化检测control(n=4)和285 mg/kg(n=4) ETH暴露组孕第7天着床点HOXA10和BMP2的表达。*P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001, 与control组相比。

A: RT-PCR analysis of COX2, HOXA10 and BMP2 mRNA expression in the control and 285 mg/kg ETH exposed group on the seventh day of pregnancy (n=4 for each group); B: Western blot analysis of HOXA10, COX2, MMP9 and PR expression in the control and 285 mg/kg ETH exposed group on the seventh day of pregnancy. n=4; C: HOXA10 and BMP2 were detected by immunohistochemistry on the seventh day of pregnancy in the control and 285 mg/kg ETH exposed group. n=4 for each group. *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001 vs control group.

图2 RT-PCR法、免疫印迹法和免疫组化法检测小鼠子宫内膜组织中蜕膜化相关分子的表达

Fig.2 The expression of decidual markers were detected by RT-PCR, Western blot and IHC



A: 人工诱导蜕膜化子宫总体形态图; B: 诱导侧与非诱导侧子宫湿重比($n=8$); C: RT-PCR检测ETH暴露组与对照组诱导侧蜕膜组织中 $HOXA10$ 、 $COX2$ 和 $BMP2$ mRNA的表达($n=4$)。* $P<0.05$, *** $P<0.001$, 与control组相比。

A: the gross morphology of artificially decidualized uterine horns; B: the fold change in stimulated/unstimulated uterine horn gross weight ($n=8$); C: RT-PCR analysis of $HOXA10$ 、 $COX2$ and $BMP2$ mRNA expression in the decidual stimulated endometrium ($n=4$). * $P<0.05$, *** $P<0.001$ vs control group.

图3 RT-PCR法检测体内人工诱导蜕膜化小鼠子宫内膜组织中蜕膜化相关分子的表达

Fig.3 The expression of decidual markers *in vivo* decidualization of artificial induced was detected by RT-PCR

与非诱导侧子宫重量之比显著降低, 差异具有统计学意义(图3B)。RT-PCR结果显示, ETH暴露组诱导侧子宫内膜组织中蜕膜化相关标记分子 $HOXA10$ 和 $BMP2$ mRNA的表达水平显著低于对照组(图3C)。

2.4 孕早期ETH暴露使小鼠血清孕激素水平降低

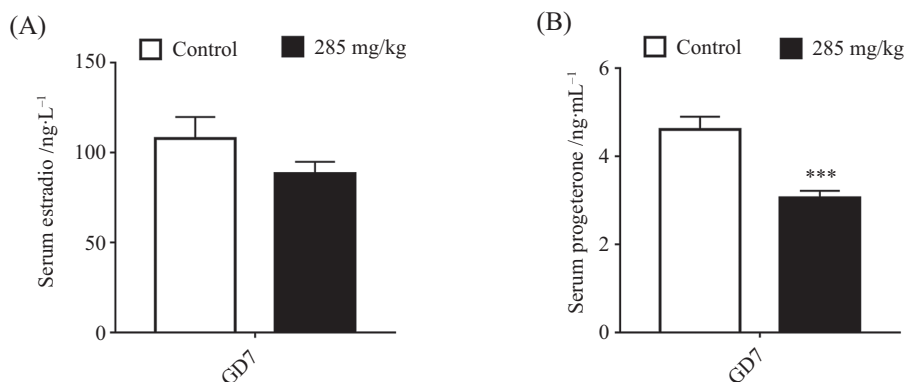
研究表明, 类固醇激素对于妊娠的维持非常重要, 类固醇激素水平紊乱会导致蜕膜化过程受损^[17]。为了进一步探究ETH暴露是否影响了类固醇激素水平进而导致蜕膜化受损, 我们采用ELISA检测了ETH暴露后孕鼠血清中雌二醇和孕激素水平的变化。如图4所示, 妊娠第7天ETH暴露组小鼠血清中E2表达水平与对照组相比无统计学差异(图4A), 但是P4表达水平显著低于对照组(图4B)。这说明ETH暴露干扰了孕激素的正常水平。

3 讨论

随着现代人类生活水平的提高, 人们对反季节食品的需求也日益增加, 为满足人们这一需求, 动植

物促生长剂应运而生, 其主要用于加快动植物的生长速度, 缩短生长周期。ETH是目前应用最广泛的植物生长调节剂中的一种, 主要用于促进蔬菜水果的成熟, 调节植物生长发育。在我国虽然农业农村部对登记的每一种植物生长调节剂的用药对象、用量大小、用药时机等都有明确的规定, 但是许多的农民为了能够使蔬菜水果提前上市卖个好价钱, 从而随意地加大用量以及不按说明使用, 喷药后即上市导致了蔬菜水果上ETH的残留量大大增加, 而残留的ETH会对怀孕造成什么样的影响还不清楚, 目前对ETH的毒性研究主要集中在ETH对动物的肝毒性、免疫毒性和肾毒性的影响上^[18-19]。然而, 还未见关于这种化学物质对怀孕初期影响的报道。

本研究的实验目的是探讨ETH暴露对早孕小鼠妊娠过程的影响。根据2002年国际化学品安全会议报道显示, 对大鼠观察到不良影响的最低ETH暴露剂量为200 mg/kg/天, 此浓度下大鼠的肝脏/体重之比显著降低^[20]。但是, 目前未有对小鼠不良影响的最



A、B: 酶联免疫吸附试验检测实验组和对照组小鼠血清雌激素和孕激素水平($n=7$)。*** $P<0.001$, 与 control 组相比。

A,B: serum estrogen and progesterone levels in the control and ETH-treated groups, as detected by ELISA. $n=7$ in each group. *** $P<0.001$ vs control group.

图4 酶联免疫吸附试验检测孕第7天小鼠血清雌激素和孕激素水平

Fig.4 Serum estrogen and progesterone levels on GD7 were measured by ELISA

低剂量报道, 在当前的研究中, 我们的实验结果表明, 从妊娠第一天开始到妊娠第七天每天给予71.25和142.5 mg/kg的ETH对小鼠子宫胚胎着床数没有显著影响。然而, 当给予285 mg/kg的ETH灌胃后, 观察到小鼠子宫胚胎着床数显著减少。在子宫内膜蜕膜化过程中, 基质细胞开始广泛增殖并分化为蜕膜细胞, 这是支持胚胎生长和维持早期妊娠的必要先决条件^[21]。整体子宫和植入位点重量的增加可反映蜕膜化的质量^[22]。我们的研究表明, 285 mg/kg ETH暴露组其绝对子宫重量和相对子宫重量都显著降低。通过检测蜕膜化相关标记分子mRNA和蛋白的表达发现, 285 mg/kg ETH暴露组其蜕膜化相关标记因子mRNA和蛋白表达水平显著低于对照组。这说明ETH暴露确实损害了小鼠子宫内膜蜕膜化。为了排除缺陷胚胎对蜕膜化的影响, 我们构建了一个假孕小鼠体内人工诱导蜕膜化模型, 即通过在假孕小鼠一侧子宫角注射玉米油诱导其蜕膜化。体内人工诱导蜕膜化结果显示, ETH暴露组降低了诱导侧子宫重量与非诱导侧子宫重量之比, 蜕膜化相关标记分子的表达也显著降低。检测血清雌孕激素水平发现, ETH暴露后其血清孕激素水平显著降低。由此我们推测, ETH暴露可能通过影响孕激素的正常代谢导致蜕膜化受损进而导致小鼠胚胎着床数降低, 但是ETH暴露影响蜕膜化的确切的机制还不清楚, 比如是否是影响了细胞的增殖与凋亡还不清楚, 有待进一步深入研究。

参考文献 (References)

[1] TOUSSON E, EI-ATRS H A, MANSOUR M, et al. Modulatory

effects of saussurea lappa root aqueous extract against ethephon induced kidney toxicity in male rats [J]. *Environ Toxicol*, 2019, 34(12): 1277-84.

- [2] SELLEM A A, HUSSEIN B H M. Synthesis and effect of a new terbium gibberellic complex on the histopathological alteration induced by gibberellic acid on liver and kidney of mice mus musculus [J]. *Chem Biol Drug Des*, 2018, 92(1): 1288-300.
- [3] DUTTA U, DEKA M. Protective activity of bambusa balcooa roxb. against repeated exposure to ethephon induced haematological alteration in albino rat [J]. *Toxicol Lett*, 2015, 238(16): S84-5.
- [4] XU C S, JIANG Z, SHEN W, et al. Toxicological characteristics of plant growth regulators and their impact on male reproductive health [J]. *Zhonghua Nan Ke Xue*, 2018, 24(4): 370-5.
- [5] MOUSTAKIME Y, HAZZOUIMI Z, JOUTEI K A. Effect of ethephon application on the cellular maturity of olea europaea L. and on the extractability of phenolic compounds in virgin olive oil [J]. *Chem Biol Technol Agric*, 2018, 5: 2.
- [6] TAHERI A, CLINE J A, JAYASANKAR S, et al. Ethephon-induced abscission of "redhaven" peach [J]. *American Journal of Plant Sciences*, 2012, 3: 295-301.
- [7] FERRARA G, MAZZEO A, MATARRESE A M S, et al. Ethephon as a potential abscission agent table grapes: effects on pre-harvest abscission, fruit quality, and residue [J]. *Front Plant Sci*, 2016, 30(7): 620.
- [8] ALBRAKATI A. Aged garlic extract rescues ethephon-induced kidney damage by modulating oxidative stress, apoptosis, inflammation, and histopathological changes in rats [J]. *Environ Sci Pollut Res Int*, 2021, 28(6): 6818-29.
- [9] BHADORIA P, NAGAR M, BAHRIKE V, et al. Effect of ethephon on the liver in albino rats: a histomorphometric study [J]. *Biomed J*, 2015, 38(5): 421-7.
- [10] LIYASOVA M S, SCHOPFER L M, KODANI S, et al. Newly observed spontaneous activation of ethephon as a butyrylcholinesterase inhibitor [J]. *Che Res Toxicol*, 2013, 26(3): 422-31.
- [11] EL-OKAZY A M. The effects of combination of gibberellic acid-3 (GA3) and ethephon (2-chloroethyl phosphonic acid) (plant growth regulators) on some physiological parameters in

- mice [J]. *J Egypt Public Health Assoc*, 2008, 83(1/2): 67-86.
- [12] ELDAIM M A A, TOUSSON E, TANTAWY I E, et al. Ameliorative effects of saussurea lappa root aqueous extract against ethephon-induced reproductive toxicity in male rats [J]. *Environ Toxicol*, 2019, 34(2): 150-9.
- [13] DUTTA U. Evaluation of ethephon induced oxidative stress to gonadal disorder and its amelioration by ethanolic extract of shoot of bambusa balcooa roxb. in albino rat [J]. *Toxicol Lett*, 2015, 238: 269-70.
- [14] GELLERSEN B, BROSENS J J. Cyclic decidualization of the human endometrium in reproductive health and failure [J]. *Endocr Rev*, 2014, 35(6): 851-905.
- [15] SALKER M, TAKLENBURG G, MOLOKHIA M, et al. Natural selection of human embryos: impaired decidualization of endometrium disables embryo-maternal interactions and causes recurrent pregnancy loss [J]. *PLoS One*, 2010, 5(4): e10287.
- [16] 马珍子, 李世杰, 严云勤, 等. 蜕膜细胞早熟衰老与早产[J]. *中国细胞生物学学报*(MA Z Z, LI S J, YAN Y Q, et al. Decidual cells premature senescence and premature birth [J]. *Chinese Journal of Cell Biology*), 2015, 37(7): 1004-12.
- [17] FRANCO H L, JEONG J W, TSAI S Y, et al. *In vivo* analysis of progesterone receptor action in the uterus during embryo implantation [J]. *Semin Cell Dev Biol*, 2008, 19(2): 178-86.
- [18] WANG S, JIN H, TANG Q, et al. The effect of ethephon on immune system in male offspring of mice [J]. *Environ Toxicol Pharmacol*, 2017, 49: 119-23.
- [19] BHADORIA P, NAGAR M, BAHRIOKE V, et al. Effect of ethephon on the liver in albino rats: a histomorphometric study [J]. *Biomed J*, 2015, 38(5): 421-7.
- [20] International Programme on Chemical Safety (inchem) (2002) pesticide residues in food-2002-JointFAO/WHO meeting on pesticide residues. ethephon. available from: [<http://www.inchem.org/documents/jmpr/jmpmono/2002pr05.htm>]. [2014-07-25]
- [21] TAN J, RAJA S, DAVIS M K, et al. Evidence for coordinated interaction of cyclin D3 with p21 and cdk6 in directing the development of uterine stromal cell decidualization and polyploidy during implantation [J]. *Mech Dev*, 2002, 111(1/2): 99-113.
- [22] YU D, LIU Q, QIAO B, et al. Exposure to acrylamide inhibits uterine decidualization via suppression of cyclin D3/p21 and apoptosis in mice [J]. *J Hazard Mater*, 2020, 388: 121785.