

研究论文

增塑剂邻苯二甲酸二(2-乙基己基)酯(DEHP)对绒毛外滋养层细胞侵袭和迁移的影响

李瑞¹ 于超² 丁裕斌¹ 陈雪梅¹ 刘学庆¹ 黄霏¹ 王应雄^{1,2} 何俊琳^{1*}¹重庆医科大学公共卫生学院生殖生物学研究室, 重庆 400016; ²重庆医科大学生命科学院, 重庆 400016)

摘要 为了探讨邻苯二甲酸二(2-乙基己基)酯(DEHP)对人绒毛外滋养层细胞HTR-8/Svneo侵袭和迁移的影响及机制, 分别采用MTT法和流式细胞术确定DEHP的作用浓度, Transwell小室检测DEHP对细胞侵袭和迁移能力的影响, Real-time PCR和Western blot检测侵袭与迁移相关因子表达的变化。研究结果显示: 100 $\mu\text{mol/L}$ 及以上浓度的DEHP可促进HTR-8/Svneo细胞侵袭、迁移及MMP-2、MMP-9的表达, 并上调p38、JNK的磷酸化, 而DEHP的作用受p38与JNK的抑制剂拮抗。由此证明DEHP可通过p38、JNK信号通路上调MMP-2、MMP-9的表达, 进而促进HTR-8/Svneo细胞侵袭和迁移。

关键词 DEHP; 绒毛外滋养层细胞; 侵袭; 迁移

邻苯二甲酸二(2-乙基己基)酯(DEHP)作为增塑剂及化妆品添加剂, 在生活中被大量使用, 目前已经成为全球最为严重的化学污染物之一。DEHP一旦释放到环境中, 可随食品或空气经口吸入人体, 也可通过皮肤吸入, 对人体产生危害。例如其雌激素样活性, 可干扰机体内分泌^[1-2]; 肝肾毒性主要通过激活PPAR γ 信号通路, 增强肝脏细胞的侵袭和迁移性, 导致癌症^[3]; 雄性生殖毒性可造成睾丸受损, 通过激活MMP-2使精子发生产生障碍^[4-5]; 雌性生殖毒性可降低妊娠率, 增加流产率^[6]等。女性由于广泛使用化妆品和洗涤用品, 因而比男性暴露于DEHP的几率更高, 因此DEHP对雌性生殖系统的损害已成为当今环境医学关注的热点。目前认为DEHP引起雌性妊娠失败的原因可能是通过影响内分泌代谢, 导致卵巢受损、排卵功能障碍^[7]。对于排卵正常, 因胚胎植入失败所致的异常妊娠, 其机理尚不清楚。胚胎的正常植入是妊娠成功的关键因素, 该过程中胎盘绒毛外滋养层细胞的适度侵袭发挥了极重要的作用。因此, 本文以正常绒毛外滋养层细胞HTR-8/Svneo为模型, 探讨DEHP对滋养层细胞侵袭和迁移能力的影响及分子机制, 为寻找安全有效的防护措施提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

RPMI 1640培养基(美国HyClone, SH30809), 胎牛血清(杭州四季青生物工程有限公司, 090214), FITC-Annexin V/PI双染试剂盒(南京凯基生物科技发展有限公司, KGA106), 胰蛋白酶(美国Gibco), Transwell小室(美国Costar, 3422), Trizol裂解液(宝生物工程(大连)有限公司, D9108BL)和逆转试剂盒(宝生物工程(大连)有限公司, DRR047A), DEHP(美国Sigma, D201154)、DMSO(美国Sigma, D8418), p38抑制剂SB203580(碧云天生物技术研究所, S1863), ERK抑制剂PD98(Invitrogen, PHZ1164), c-JNK抑制剂SP600125、兔抗人 β -actin单克隆抗体(美国Cell Signaling Technology, #4970), 兔抗人MMP-2(南京Bioworld, BS1236)和MMP-9单克隆抗体(南京Bioworld, BS1241), 鼠抗人t-ERK单克隆抗体(美国Santa Cruz), 兔抗人p-ERK(美国Millipore, #DAM1703493)、t-p38、p-p38单克隆抗体(美国Millipore),

收稿日期: 2011-06-12 接受日期: 2011-08-29

重庆市人口和计划生育技术研究院项目(No.0905)和重庆市教委(No.KJ100304)资助项目

*通讯作者。Tel: 023-68485926, E-mail: hejunlin_11@yahoo.com.cn

鼠抗人p-JNK单克隆抗体(碧云天生物技术研究所, AJ516)。二抗均购自北京中杉金桥生物技术有限公司。其余试剂为国产分析纯。

1.2 细胞培养和DEHP处理

人绒毛外滋养层细胞HTR-8/Svneo(加拿大多伦多大学Graham教授惠赠)以含10%灭活胎牛血清、100 U/mL青霉素、100 mg/L链霉素的RPMI 1640培养基, 在37 °C、5% CO₂条件下培养, 用0.125%的胰酶消化, 2~3天传代一次, 取对数生长期细胞实验。实验组给予不同浓度DEHP处理24 h, DEHP以低于0.05%的DMSO为溶剂, 对照组给予0.05%的DMSO处理24 h。

1.3 MTT法检测细胞活力

取对数生长期细胞, 调整细胞为 7.5×10^3 /孔, 每孔200 μ L培养液接种于96孔培养板, 培养24 h后, 处理组改用含不同浓度的DEHP (25, 50, 100, 500, 1 000 μ mol/L)培养基, 对照组分为空白培养基和含0.05% DMSO的培养基两组, 作用24 h。吸去培养液, 每孔加100 μ L含MTT (1 mg/mL)的培养基, 继续培养3 h。吸弃上清液, 每孔加入150 μ L DMSO, 振荡10 min, 用酶标仪在492 nm波长下测定吸光值(*D*)。实验重复3次。按公式计算细胞活力, 细胞存活率(%)=(实验组平均*D*值/对照组平均*D*值)×100%。

1.4 流式细胞术检测细胞凋亡

用0.05% DMSO或不同浓度的DEHP (25, 100, 400 μ mol/L)处理HTR-8/Svneo细胞24 h, 收集细胞, 加入5 μ L标记有异硫氰酸荧光素(FITC)的膜联蛋白V (annexin V)、2 μ L PI, 37 °C避光温育15 min, 加入400 μ L缓冲液, 用流式细胞仪(FACSVantage SE, 美国BD公司)测定细胞凋亡情况。

1.5 Transwell小室检测细胞侵袭和迁移能力

侵袭实验小室上层预铺基质胶, 每孔接种细胞 1×10^5 个, 迁移实验小室未铺基质胶, 每孔接种细胞 5×10^4 个。小室直径65 mm, 孔径8 μ m, 处理组每孔下室加入600 μ L含10% FBS及不同浓度的DEHP (25, 100, 400 μ mol/L)或相应抑制剂(SB203580, 10 μ mol/L; PD980590, 25 μ mol/L; SP600125, 20 μ mol/L)的培养基, 对照组下室加入含10% FBS及0.05% DMSO的培养基。上室均加入100 μ L无血清细胞悬液, 培养24 h。取出小室, 用棉签擦去膜上层细胞, 将小室放入4%多聚甲醛中固定15 min, 用PBS洗涤3次, 置苏木精中染色30 min, PBS洗净背景色。Nikon TE 2000-U显

微镜在100倍镜下, 每孔随机选取4个非重叠视野照相, 并进行细胞计数, 统计结果。

1.6 Real-time PCR检测侵袭和迁移相关基因表达

细胞培养同前, 分组为对照组(0.05% DMSO)及不同浓度DEHP (25, 100, 400 μ mol/L)组, 处理24 h。根据Trizol试剂盒说明书抽提细胞总RNA; TaKaRa试剂盒逆转录合成cDNA, 反应条件为: 37 °C 15 min, 85 °C 5 s; 荧光定量PCR扩增MMP-2、MMP-9基因产物, 反应体系: SYBR green mix 5 μ L, 上下游引物各0.3 μ L, cDNA 1 μ L, RNase-free H₂O 3.4 μ L。反应条件: 95 °C 3 min; 95 °C 10 s, 60 °C 30 s, 循环40次, 65~95 °C的条件下检测溶解曲线。引物: MMP-2, 上游: 5'-CGA ATC CAT GAT GGA GAG GC-3', 下游: 5'-TCC GTC CTT ACC GTC AAA GG-3', 产物87 bp; MMP-9, 上游: 5'-TCT TCC CCT TCA CTT TCC TG-3', 下游: 5'-CCC ACT TCT TGT CGC TGT C-3', 产物114 bp; β -actin, 上游: 5'-CCG TCT TCC CCT CCA TCG-3', 下游: 5'-GTC CCA GTT GGT GAC GAT GC-3', 产物155 bp。

1.7 Western blot检测侵袭和迁移相关蛋白表达

细胞培养、DEHP或抑制剂处理方法同前。收集细胞, 加入160 μ L裂解液(含10% Tyr抑制剂、10% Thr/Ser抑制剂、10% PMSF), 冰上裂解30 min, 12 000 g离心15 min, 收集上清。BCA方法测定蛋白浓度, 调整蛋白浓度一致, 加5×蛋白上样缓冲液混匀, 沸水变性10 min。采用8% (MMP-2与MMP-9)或12% (p38、ERK、JNK、 β -actin)聚丙烯酰胺凝胶电泳分离后, 转印到0.45 μ m PVDF膜上, 5%脱脂奶粉室温条件振荡封闭1 h, 磷酸化抗体采用5% BSA封闭1 h, 孵育一抗4 °C过夜。一抗稀释比例为MMP-2抗体: 5%奶粉封闭液=1:800, MMP-9抗体: 5%奶粉封闭液=1:800, p-ERK抗体: 5%BSA封闭液=1:100, p-p38抗体: 5%NSA封闭液=1:100, t-p38抗体: 5%奶粉封闭液=1:100, β -actin抗体: 5%奶粉封闭液=1:1 000, p-JNK抗体: 5%BSA封闭液=1:750, t-ERK抗体: 5%奶粉封闭液=1:5 000。PBS漂洗3次, 每次5 min, 于室温孵育二抗(1:3 000) 1 h, PBS漂洗3次, 每次5 min。ECL发光显影。

1.8 统计学分析

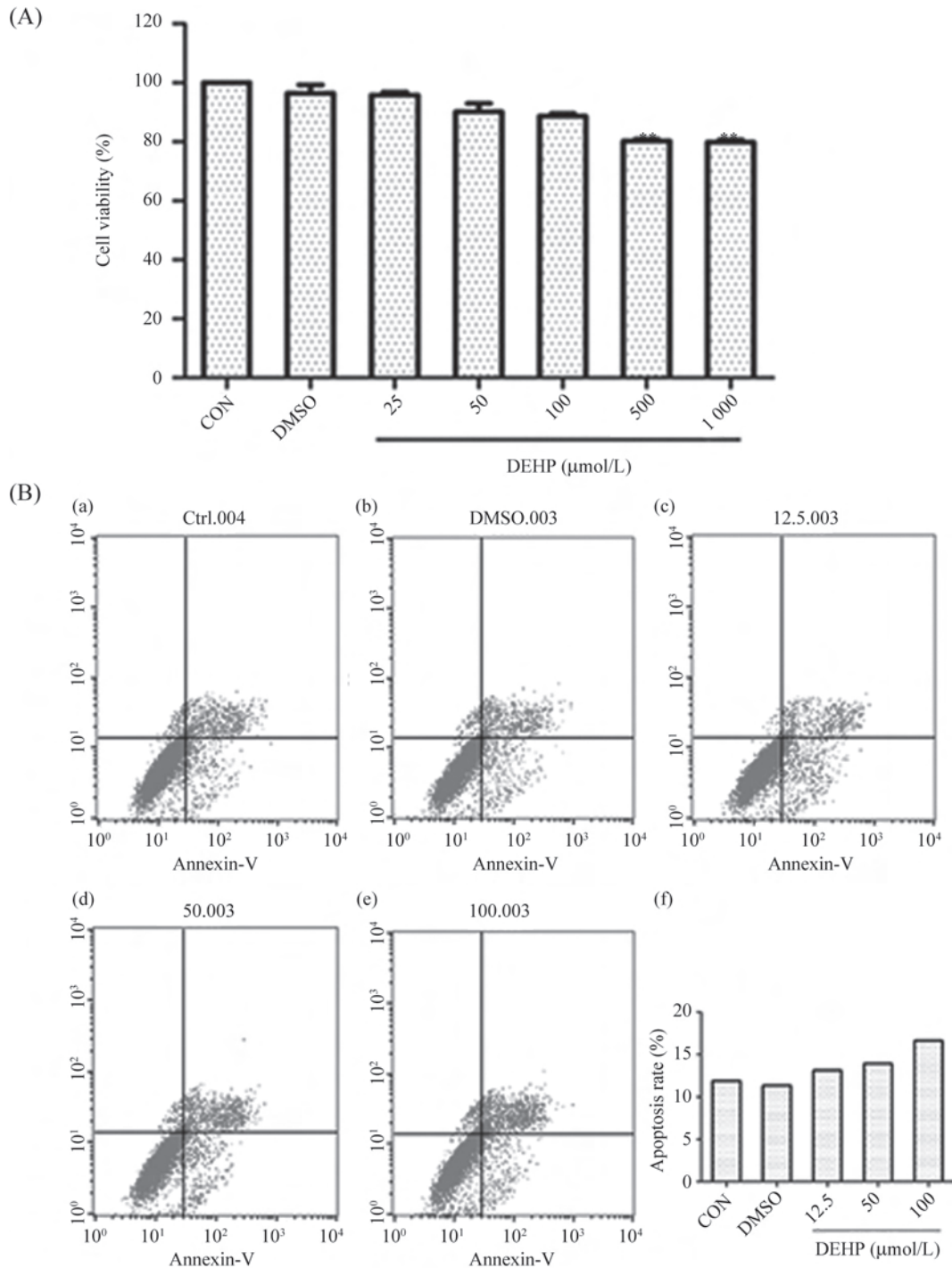
数据用平均数±标准差表示, 两组间比较采用 *t* 检验分析, 以 $P < 0.05$ 为显著差异, $P < 0.01$ 为极显著差异, 每个实验至少重复3次。

2 结果

2.1 DEHP对HTR-8/Svneo细胞活力和凋亡的影响

为了选择合适的DEHP浓度及防止细胞坏死对

后续侵袭和迁移实验的影响,采用MTT法和流式细胞术检测DEHP对细胞活力和凋亡的影响。结果显示:与对照组相比,DEHP在500 $\mu\text{mol/L}$ 和1 000 $\mu\text{mol/L}$



A: MTT检测DEHP处理HTR-8/Svneo后的细胞活力; B: 流式细胞术检测DEHP处理HTR-8/Svneo后细胞的凋亡(a: control; b: 0.05 % DMSO; c: 25 $\mu\text{mol/L}$ DEHP; d: 100 $\mu\text{mol/L}$ DEHP; e: 400 $\mu\text{mol/L}$ DEHP; f: quantity analysis of apoptosis ratio). ** $P < 0.01$, 与control组比较。

A: effect of DEHP on HTR-8/Svneo cells growth; B: effect of DEHP on HTR-8/Svneo cells apoptosis (a: control; b: 0.05 % DMSO; c: 25 $\mu\text{mol/L}$ DEHP; d: 100 $\mu\text{mol/L}$ DEHP; e: 400 $\mu\text{mol/L}$ DEHP; f: quantity analysis of apoptosis ratio). ** $P < 0.01$, compared with control group.

图1 MTT检测DEHP对HTR-8/Svneo细胞生长活力和凋亡的影响

Fig.1 Effect of DEHP on HTR-8/Svneo cells growth and apoptosis

浓度时可显著抑制HTR-8/Svneo的细胞活力(图1A)。在25~400 $\mu\text{mol/L}$ 浓度范围内, DEHP对HTR-8/Svneo细胞凋亡未见明显的诱导作用(图1B)。因此, 我们选择DEHP的三个浓度(25, 100, 400 $\mu\text{mol/L}$)进行后续实验, 在此浓度范围内, 细胞数目无显著性改变, 不影响后续侵袭和迁移实验。

2.2 DEHP对HTR-8/Svneo细胞侵袭和迁移能力的影响

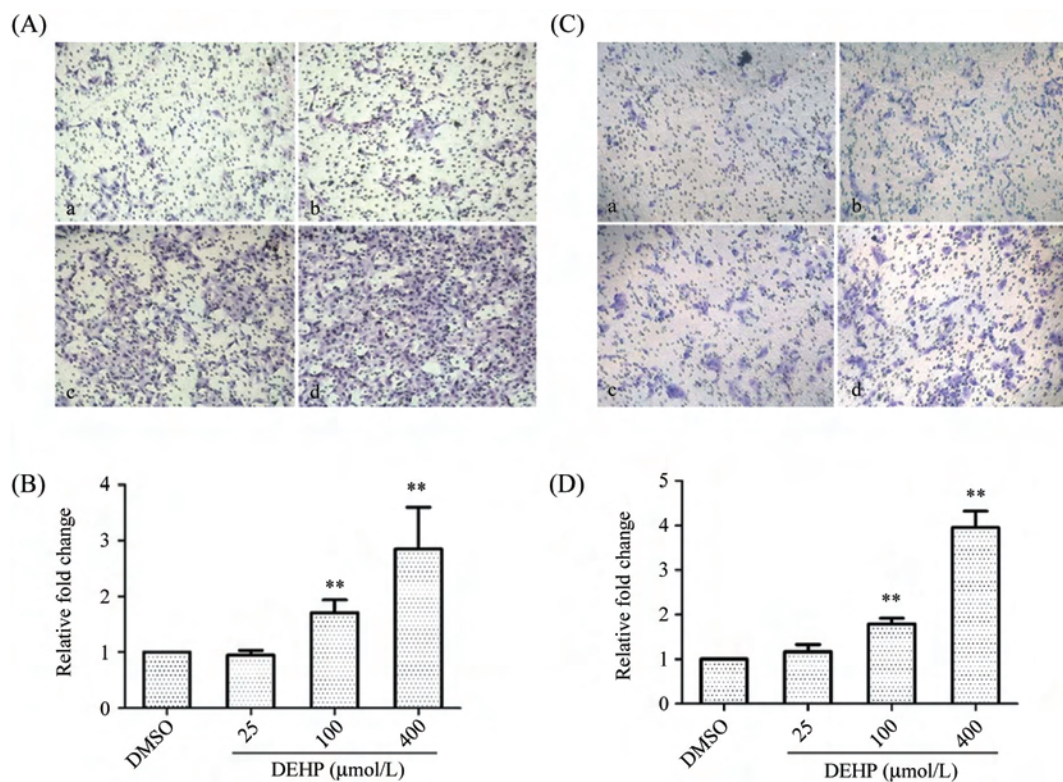
Transwell小室检测细胞侵袭和迁移能力。结果表明: DEHP在100 $\mu\text{mol/L}$ 与400 $\mu\text{mol/L}$ 浓度时可显著促进HTR-8/Svneo细胞的侵袭和迁移, 并呈浓度依赖关系(图2)。提示DEHP改变了绒毛外滋养层细胞HTR-8/Svneo的侵袭和迁移特性, 进而可能影响胚胎着床, 干扰正常妊娠。

2.3 DEHP对HTR-8/Svneo细胞侵袭和迁移相关因子表达的影响

通过Real time-PCR及Western blot方法, 分别从mRNA和蛋白水平上检测DEHP是否影响侵袭和迁移相关基因的表达。结果显示: 与对照组相比, 100 $\mu\text{mol/L}$ 及400 $\mu\text{mol/L}$ DEHP均可显著上调MMP-2、MMP-9的表达, 而低浓度的DEHP(25 $\mu\text{mol/L}$)对MMP-2、MMP-9表达无影响(图3)。

2.4 DEHP对HTR-8/Svneo细胞中MAPK信号通路相关蛋白表达的影响

通过Western blot检测DEHP对MAPK信号通路的影响, 发现100 $\mu\text{mol/L}$ 与400 $\mu\text{mol/L}$ DEHP可促进p38和JNK的磷酸化, 但对ERK的磷酸化无明显影响(图4)。因此推测p38和JNK信号通路可能参与了侵

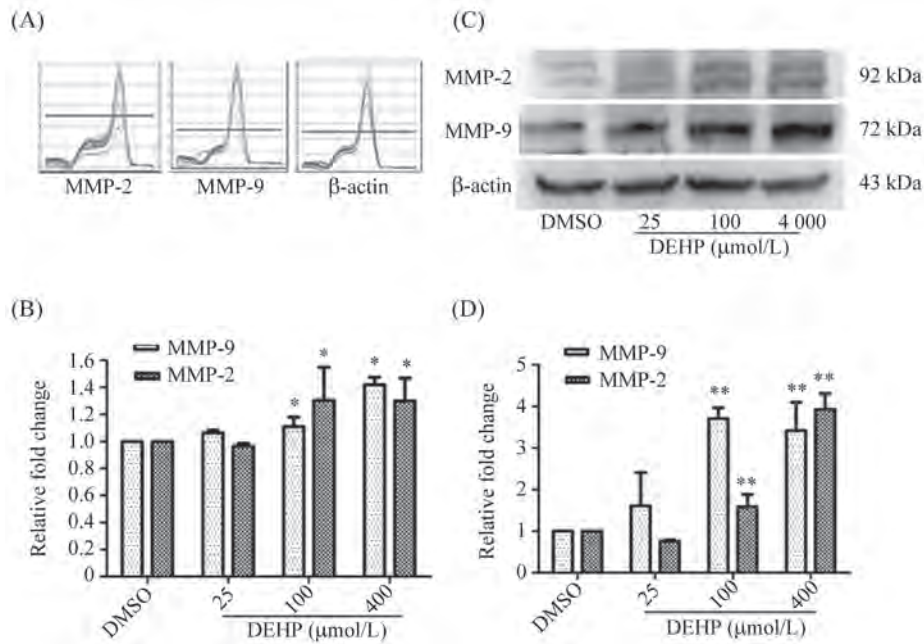


A: DEHP促进HTR-8/Svneo细胞侵袭(a: 0.05% DMSO; b: 25 $\mu\text{mol/L}$ DEHP; c: 100 $\mu\text{mol/L}$ DEHP; d: 400 $\mu\text{mol/L}$ DEHP); B: DEHP促进HTR-8/Svneo细胞侵袭的定量分析结果; C: DEHP促进HTR-8/Svneo细胞迁移(a: 0.05% DMSO; b: 25 $\mu\text{mol/L}$ DEHP; c: 100 $\mu\text{mol/L}$ DEHP; d: 400 $\mu\text{mol/L}$ DEHP); D: DEHP促进HTR-8/Svneo细胞迁移的定量分析结果。 ** $P < 0.01$, 与0.05% DMSO比较。

A: cell invasion assay (a: 0.05% DMSO; b: 25 $\mu\text{mol/L}$ DEHP; c: 100 $\mu\text{mol/L}$ DEHP; d: 400 $\mu\text{mol/L}$ DEHP); B: quantity analysis of cell invasion after exposed to DEHP; C: cell migration assay (a: 0.05% DMSO; b: 25 $\mu\text{mol/L}$ DEHP; c: 100 $\mu\text{mol/L}$ DEHP; d: 400 $\mu\text{mol/L}$ DEHP); D: quantity analysis of cell migration after exposed to DEHP. ** $P < 0.01$, compared with 0.05% DMSO.

图2 DEHP对HTR-8/Svneo细胞侵袭和迁移的影响(100 \times)

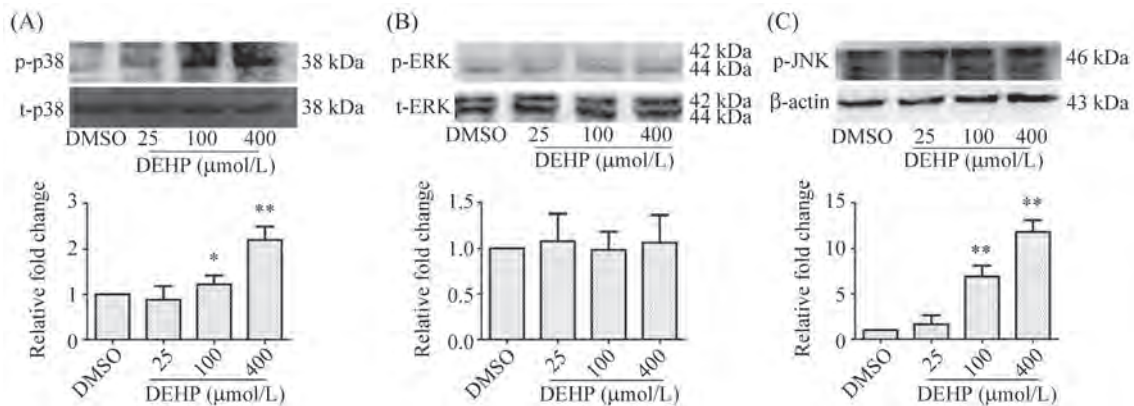
Fig.2 Effect of DEHP on HTR-8/Svneo cells invasion and migration (100 \times)



A: DEHP上调MMP-2和MMP-9基因表达; B: DEHP上调MMP-2和MMP-9基因表达的定量分析结果; C: DEHP上调MMP-2和MMP-9蛋白的表达; D: DEHP上调MMP-2和MMP-9蛋白表达的定量分析结果。* $P<0.05$, ** $P<0.01$, 与0.05% DMSO比较。

A: effect of DEHP on *MMP-2* and *MMP-9* mRNA expression; B: quantity analysis of *MMP-2* and *MMP-9* mRNA expression; C: effect of DEHP on *MMP-2* and *MMP-9* protein expression; D: quantity analysis of *MMP-2* and *MMP-9* protein expression. * $P<0.05$, ** $P<0.01$, compared with 0.05% DMSO.

图3 DEHP上调HTR-8/Svneo细胞侵袭与迁移相关基因和蛋白的表达
Fig.3 DEHP upregulates invasion and migration related genes and proteins



A: *p38*; B: *ERK*; C: *JNK*。* $P<0.05$, ** $P<0.01$, 与0.05% DMSO比较。

A: *p38*; B: *ERK*; C: *JNK*。* $P<0.05$, ** $P<0.01$, compared with 0.05% DMSO.

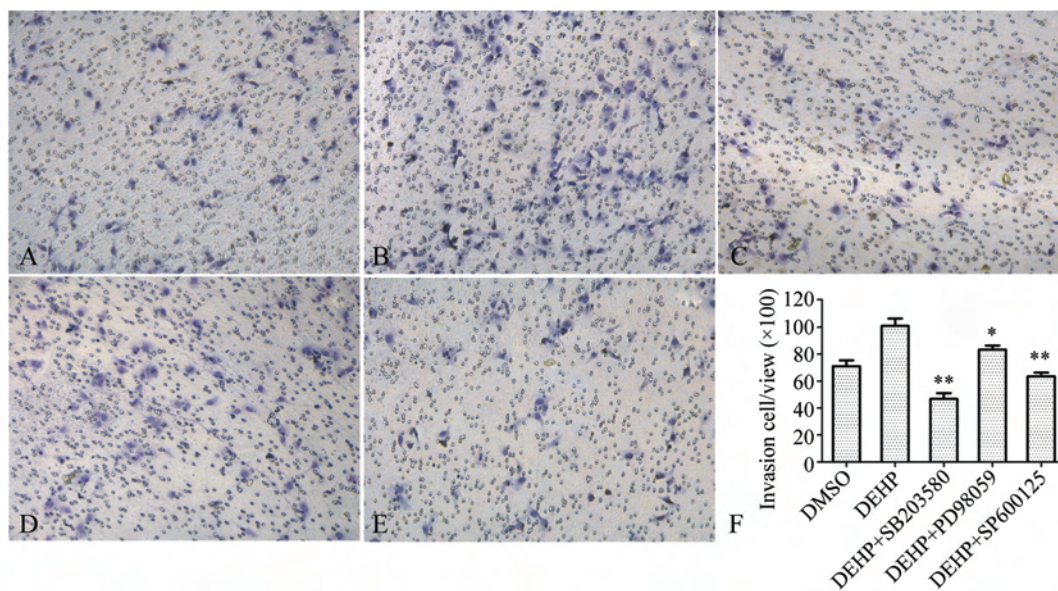
图4 DEHP对HTR-8/Svneo细胞MAPK信号通路相关蛋白磷酸化的影响
Fig.4 Effect of DEHP on the phosphorylation of *p38*, *ERK* and *JNK*

袭和迁移的信号传递。

2.5 MAPK相关抑制剂对HTR-8/Svneo细胞侵袭能力的影响

为进一步验证DEHP对HTR-8/Svneo细胞侵袭能力的影响是通过何种信号通路来调控的, 采用

MAPK相关抑制剂处理细胞, 经Transwell小室检测发现, *p38*、*JNK*抑制剂均可抑制DEHP对细胞侵袭的影响, 而*ERK*抑制剂无明显作用(图5)。实验表明DEHP可以通过作用于*p38*、*JNK*通路影响细胞的侵袭能力。

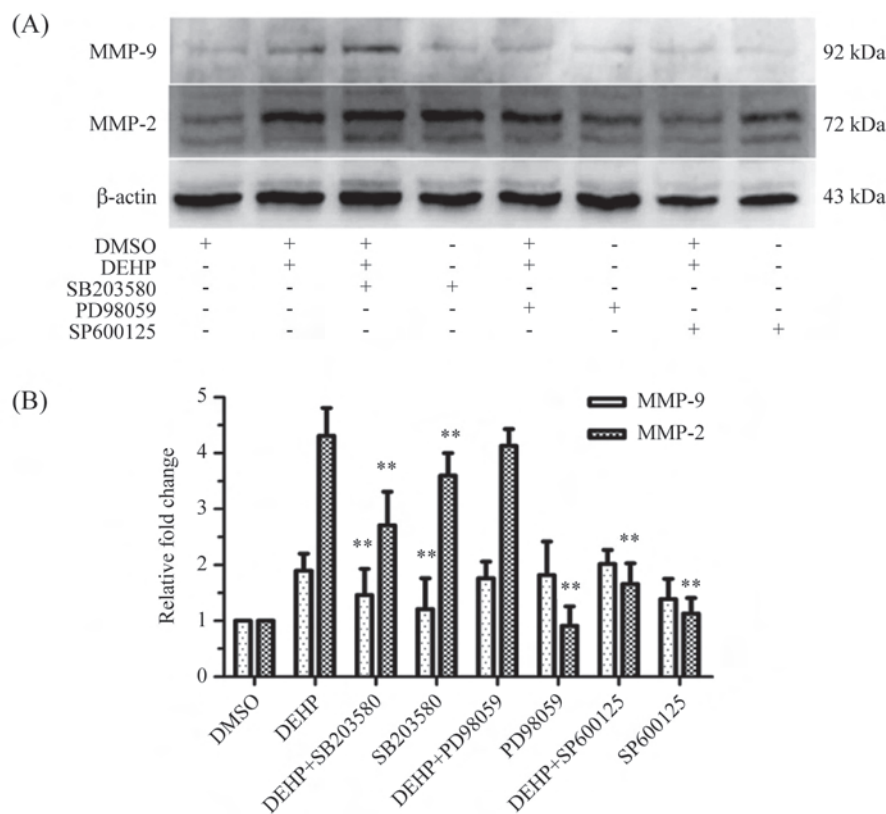


A: 0.05% DMSO; B: 400 μmol/L DEHP; C: 400 μmol/L DEHP+SB203580; D: 400 μmol/L DEHP+PD98059; E: 400 μmol/L DEHP + SP600125; F: 定量分析结果。* $P<0.05$, ** $P<0.01$, 与0.05% DMSO比较。

A: 0.05% DMSO; B: 400 μmol/L DEHP; C: 400 μmol/L DEHP+SB203580; D: 400 μmol/L DEHP+PD98059; E: 400 μmol/L DEHP+SP600125; F: quantity analysis of cell invasion. * $P<0.05$, ** $P<0.01$, compared with 0.05% DMSO.

图5 DEHP及MAPK相关分子抑制剂对HTR-8/Svneo细胞侵袭的影响(100×)

Fig.5 Effect of DEHP and MAPK inhibitors on HTR-8/Svneo cells invasion (100×)



A: MMP-2及MMP-9的蛋白表达; B: 定量分析结果。** $P<0.01$, 与 400 μmol/L DEHP比较。

A: effect of DEHP and MAPK inhibitors on MMP-2 and MMP-9 protein; B: quantity analysis of protein expression. ** $P<0.01$, compared with 400 μmol/L DEHP.

图6 DEHP及MAPK相关分子抑制剂对HTR-8/Svneo细胞MMP-2及MMP-9蛋白表达的影响

Fig.6 Effect of DEHP and MAPK inhibitors on MMP-2 and MMP-9 proteins expression of HTR-8/Svneo

2.6 MAPK相关抑制剂对HTR-8/Svneo细胞侵袭和迁移相关蛋白表达的影响

为进一步验证MAPK信号通路与MMP-2、MMP-9表达的关系。用MAPK相关抑制剂处理细胞后经Western blot检测发现p38、JNK抑制剂可显著抑制DEHP对MMP-2和MMP-9蛋白表达的影响,而ERK抑制剂作用不明显(图6)。结果表明,DEHP可通过p38、JNK通路影响MMP-2和MMP-9蛋白表达,从而调控其生物学功能。

3 讨论

DEHP作为环境激素干扰物,对机体的危害毋庸置疑,目前已有报道。随着环境污染的日益严重和人们生殖能力的日渐下降,DEHP的生殖毒性,特别是对雌性生殖的影响越来越受到人们的关注。流行病学调查表明DEHP与青春期提前、子宫内膜异位症、排卵下降、流产率增加有明显关系^[6],但对于胚胎植入的影响研究未见报道。绒毛外滋养细胞对子宫内膜的适度侵袭是胚胎成功植入的重要环节,这种侵袭具有精确的“时限性”,异常的侵袭可导致妊娠相关的滋养细胞疾病,如侵袭不足可引发胎儿宫内发育受限,而滋养细胞的过度或失控侵袭可造成侵蚀性葡萄胎或绒毛膜癌等不良妊娠结局的发生。因此,本文选择妊娠过程中对胚胎植入有重要意义的绒毛外滋养层细胞HTR-8/Svneo作为研究对象,探讨环境污染物DEHP对其侵袭和迁移能力的影响及可能的作用机制。我们采用MTT法和流式细胞术确定了DEHP浓度的作用范围,并通过Transwell小室侵袭和迁移实验发现DEHP可明显增强HTR-8/Svneo细胞的侵袭和迁移能力。根据文献报道DEHP可促进肿瘤细胞如人神经细胞瘤SK-N-SH^[8]侵袭,我们由此推测DEHP可通过改变滋养层细胞的侵袭及迁移能力进而影响胚胎的正常植入。

细胞侵袭和迁移的过程复杂多样,有许多基因参与调控,其中基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinases, MMPs)家族几乎能降解细胞外基质中的各种蛋白成分,破坏细胞侵袭的组织学屏障,在肿瘤侵袭转移和胚胎植入过程中起着关键性作用,被认为是这些过程中主要的蛋白水解酶。目前研究最多的是MMP-2和MMP-9。有报道证明DEHP可降低雌二醇(E2)的表达水平^[9-10],而E2表达降低可促进MMP-2的表达^[11];DEHP可上调大鼠睾丸间质细胞总LIF的

表达^[12],LIF可促进早孕滋养层细胞中MMP-9的表达^[13];DEHP还可激活雄性小鼠支持细胞中MMP-2的表达,致睾丸受损,精子发生障碍^[5]。我们通过Real-time PCR和蛋白免疫印迹证实了DEHP可增强HTR-8/Svneo细胞中MMP-2和MMP-9基因及蛋白水平的表达,这与文献报道的结果具有一致性。MMP-2和MMP-9表达的受多条信号通路的影响,如STAT信号通路^[14]、MAPK信号通路^[15]、Wnt信号通路^[16]等。本实验证实DEHP可通过激活MAPK信号通路中的p38及JNK通路,而非ERK通路,促进MMPs表达,从而增强HTR-8/Svneo细胞的侵袭及迁移能力。当然,DEHP对HTR-8/Svneo细胞的作用机制也可能是多条信号通路发生交互作用,共同促进滋养层细胞的侵袭,这有待于我们进一步的研究。

综上所述,本研究证实了100 μmol/L及以上浓度的DEHP可通过MAPK信号通路上调MMP-2、MMP-9的表达,显著促进HTR-8/Svneo细胞的侵袭和迁移,导致绒毛外滋养层细胞过度侵入子宫内膜,从而破坏胚胎正常植入进程,并可能引起更加严重的不良妊娠结局发生如侵蚀性葡萄胎或绒毛膜癌等。这为DEHP的雌性生殖毒性提供了又一实验证据,也为更好针对DEHP的作用机理进行防护提供了相应的理论支持。

参考文献 (References)

- 1 Svechnikova I, Svechnikov K, Söder O. The influence of di-(2-ethylhexyl) phthalate on steroidogenesis by the ovarian granulosa cells of immature female rats. *J Endocrinol* 2007; 194(3): 603-9.
- 2 Parrks LG, Ostby JS, Lambright CR, Abbott BD, Klinefelter GR, Barlow NJ, *et al.* The plasticizer diethylhexyl phthalate induces malformations by decreasing fetal testosterone synthesis during sexual differentiation in the male rat. *Toxicol Sci* 2000; 58(2): 339-49.
- 3 Takashima K, Ito Y, Gonzalez FJ, Nakjima T. Different mechanisms of DEHP-induced hepatocellular adenoma tumorigenesis in wild-type and Ppar alpha-null mice. *J Occup Health* 2008; 50(2): 169-80.
- 4 Chauvigné F, Menuet A, Lesné L, Chagnon MC, Chevrier C, Regnier JF. Time- and dose-related effects of di-(2-ethylhexyl) phthalate and its main metabolites on the function of the rat fetal testis *in vitro*. *Environ Health Perspectives* 2009; 117(4): 515-21.
- 5 Yao PL, Lin YC, Richburg JH. Mono-(2-Ethylhexyl) phthalate-induced disruption of junctional complexes in the seminiferous epithelium of the rodent testis is mediated by MMP2. *Biol Reprod* 2030; 82(3): 516-27.
- 6 Kaul AF, Souney PF, Osathanondh R. A review of possible toxicity of DEHP in plastic intravenous containers: Effects on repro-

- duction. *Drug Intell Clin Pharm* 1982; 16(9): 689-92.
- 7 Takai R, Hayashi S, Kiyokawa J, Iwata Y, Matsuo S, Suzeki M, *et al.* Collaborative work on evaluation of ovarian toxicity two- or four-week repeated dose studies and fertility study of di-(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) in female rats. *J Toxicol Sci* 2009; 34(Suppl 1): 111-9.
- 8 Zhu H, Zheng J, Xiao X, Zheng S, Dong K, Liu J, *et al.* Environmental endocrine disruptors promote invasion and metastasis of SK-N-SH human neuroblastoma cells. *Oncol Rep* 2010; 23(1): 129-39.
- 9 李 玲, 田晓梅, 宋琦如, 张鹏举, 董桂清, 胡志平, 等. 邻苯二甲酸二丁酯和邻苯二甲酸二(2-乙基己基)酯联合染毒对雌性大鼠的生殖毒性. *环境与健康杂志* 2010; 27(10): 857-60.
- 10 Davis BJ, Maronpot RR, Heindel JJ. Di-(2-ethylhexyl) phthalate suppresses estradiol and ovulation in cycling rats. *Toxicol Appl Pharmacol* 1994; 128: 216-23.
- 11 Mahmoodzadeh S, Dworatzek E, Fritschka S, Pham TH, Regitz-Zagrosek V. 17beta-Estradiol inhibits matrix metalloproteinase-2 transcription via MAP kinase in fibroblasts. *Cardiovasc Res* 2010; 85: 719-28.
- 12 Lin H, Ge RS, Chen GR, Hu GX, Dong L, Lian QQ, *et al.* Involvement of extracellular matrix growth factors in fetal Leydig cell aggregation after exposure to phthalate in utero. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008; 105: 20.
- 13 宋恩学, 张 炜, 刘银坤, 周剑萍, 杜国平. 白血病抑制因子对人早孕滋养细胞 MMP-2、MMP-9和TIMP-1表达的调节. *生殖与避孕* 2007; 27: 7.
- 14 Lash GE, Hornbuckle J, Brunt A, Kirkley M, Searle RF, Robson SC, *et al.* Effect of low oxygen concentrations on trophoblast-like cell line invasion. *Placenta* 2007; 28: 390-8.
- 15 裘正军, 黄 陈, 刘 俊, 朱 麟, 江 弢, 张 放. 胰腺癌中 STAT3信号通路与MMP-2表达的相关性研究. *中华普通外科杂志* 2007; 12: 22.
- 16 Sonderegger S, Haslinger P, Sabri A, Leisser C, Otten JV, Fiala C, *et al.* Wingless (Wnt)-3A induces trophoblast migration and matrix metalloproteinase-2 secretion through canonical Wnt signaling and protein kinase B/AKT activation. *Endocrinology* 2010; 151(1): 211-20.

The Effect of Plasticizer DEHP on Invasion and Migration of Human Extravillous Trophoblast Cells

Li Rui¹, Yu Chao², Ding Yubin¹, Chen Xuemei¹, Liu Xueqing¹, Huang Pei¹, Wang Yingxiong^{1,2}, He Junlin^{1*}

(¹Laboratory of Reproductive Biology, School of Public Health, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China;

²Institute of Life Science, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

Abstract This article aims to investigate the effect and mechanism of di-(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) on invasion and migration of human extravillous trophoblast HTR-8/Svneo cells. We used MTT assay and flow cytometry to determine the optimum concentration of DEHP treating to HTR-8/Svneo cells. Cell invasion and migration were measured by Transwell chambers. The transcription level of mRNA and expression level of protein which related to cell invasion and migration were detected by Real-time PCR and Western blot. The results showed that DEHP enhanced HTR-8/Svneo cells invasion and migration as well as up-regulated expression level of MMP-2 and MMP-9. We also determined that DEHP increased the phosphorylated of p38 and JNK protein. In addition, p38 and JNK inhibitors treated with HTR-8/Svneo cells resulted in decreased cell invasion which can be increased by DEHP. In conclusion, our findings suggested that DEHP can enhance the invasion and migration of HTR-8/Svneo cells, which is, at least, partly regulated by phosphorylated p38 and JNK activation and relevant with MMP-2 and MMP-9 expression.

Key words DEHP; extravillous trophoblast cell; invasion; migration

Received: June 12, 2011 Accepted: August 29, 2011

This work was supported by Population and Family Planning Institution of Chongqing (No.0905) and Chongqing Education Commission (No. KJ100304)

*Corresponding author. Tel: 86-23-68485926, E-mail: hejunlin_11@yahoo.com.cn