

# EE2 抑制斑马鱼卵巢发育和卵母细胞发生\*

郭学鸣, 李英文, 尹盼, 刘智皓

(重庆师范大学生命科学学院 重庆市高校生物活性物质工程研究中心 重庆市高校动物生物学重点实验室, 重庆 401331)

**摘要:** 以斑马鱼 (*Danio rerio*) 雌性成鱼为研究对象, 用不同剂量 (0.1、1 和 10  $\mu\text{g L}^{-1}$ ) 的乙炔基雌二醇 (EE2, 17 $\alpha$ -ethynylestradiol) 对其进行暴露处理 20 d, 并采用组织学方法对卵巢发育进行观察。组织学结果表明, 不同剂量的 EE2 对斑马鱼卵巢发育均产生严重影响: 卵巢和卵母细胞发育停止, 减数分裂抑制, 并出现卵黄积累期生殖细胞退化现象。为探讨上述影响可能的机制, 采用半定量 RT-PCR 的方法检测了与斑马鱼卵子发育紧密相关基因 *vasa*、*scp3* 和 *igf3* 在 EE2 处理后的表达变化。研究结果表明, EE2 处理之后, *vasa* 基因的表达没有显著变化, 而基因 *scp3*、*igf3* 的表达明显下调, 且呈时间依赖性和剂量依赖性效应。因此研究推测 EE2 可能通过抑制 *igf3* 基因的表达和减数分裂抑制了斑马鱼卵子的发育和成熟。

**关键词:** 乙炔基雌二醇; 斑马鱼; 卵巢发育; 卵子发生; 基因表达

中图分类号: Q175

文献标志码: A

文章编号:

内分泌干扰物 (EDC, Endocrine Disrupting Chemicals), 能通过改变动物体内源激素的合成、转运、代谢、排泄或与激素受体结合, 影响激素功能, 干扰生物内分泌系统<sup>[1]</sup>。EDC 广泛存在于环境中<sup>[2]</sup>, 可通过生物富集<sup>[3]</sup>, 严重影响人类的生殖健康<sup>[4]</sup>。大量研究证明, EDC 能够干扰动物精子的产生和功能, 从而导致不育<sup>[5]</sup>。更多的研究表明, EDC 不仅对高等动物产生影响, 对低等脊椎动物 (包括鱼类) 同样危害极大。EDC 暴露的鱼类会发生性腺发育异常、生殖能力下降、配子发生障碍等<sup>[6]</sup>。近年来的研究表明, 我国水体 EDC 污染严重, 并持续恶化<sup>[7]</sup>。因此, 研究 EDC 对鱼类的影响迫在眉睫。

乙炔基雌二醇 (EE2, 17 $\alpha$ -ethynylestradiol), 是污染水体中典型的 EDC 之一<sup>[8]</sup>, 在我国大多数河流均有分布, 最高浓度达到 2.67 ng/L<sup>[7,9]</sup>。由于 EE2 具有较长的半衰期, 因此在鱼体中的富集浓度比环境中高 332 倍<sup>[3]</sup>。同时, 由于 EE2 分布广泛且具有强烈的雌激素效应 (比雌酮和雌二醇 (E2, 17 $\beta$ -estradiol) 高 10 倍<sup>[10]</sup>), 能严重影响鱼类的性别分化、性腺发育和配子功能, 导致繁殖障碍, 甚至性腺畸变<sup>[11-15]</sup>。

有研究表明, EE2 对雄性斑马鱼 (*Danio rerio*)<sup>[16]</sup> 和黑头呆鱼 (*Pimephales promelas*)<sup>[17]</sup> 处理之后, 会出现繁殖障碍, 性腺发育异常和性逆转的现象。由于 EE2 的强烈雌激素效应, 过去的研究大多集中在对雄性动物的影响, 而对雌性的研究极少。尽管对斑马鱼<sup>[15]</sup> 和青鳉<sup>[12]</sup> (*Oryzias melastigma*) 的研究显示, 不同剂量的 EE2 可抑制卵巢的发育和成熟, 抑制雌性排卵, 但其内在的分子机制却极不清楚。为此, 本研究用不同剂量的 EE2 (0.1、1 和 10  $\mu\text{g/L}$ ) 对斑马鱼雌性成鱼 (4 月龄) 进行了 20 天暴露处理, 通过组织学方法研究了 EE2 对斑马鱼卵巢发育及卵子发生的影响。为探讨其可能的分子机制, 本研究利用半定量 PCR 的方法, 检测了与斑马鱼卵巢发育、卵子发生和减数分裂密切相关的 *vasa*、*scp3* 和 *igf3* 的表达变化。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料与处理

实验用斑马鱼雌性成鱼 (4 月龄) 为研究组自行繁殖获得, 随机选取健康的雌性斑马鱼 100 尾, 平均体重 0.600  $\pm$  0.062 g。处理前用曝气除氯后的自来水暂养于恒温循环水养殖系统中 (28  $\pm$  1 $^{\circ}\text{C}$ )。

2012 年的研究表明, 在我国六大水系中, EE2 主要分布在长江流域, 其浓度最高可达 2.59 ng/L<sup>[7]</sup>, 为了在短期内对斑马鱼形态学变化进行观察并对其相关机制进行研究, 我们选择远高于水体浓度的 EE2 对雌性斑马鱼进行处理。实验组分为对照组 (C, 0.05% DMSO) 和 EE2 处理组: E1 (0.1  $\mu\text{g/L}$ )、E2 (1  $\mu\text{g/L}$ ) 和 E3 (10  $\mu\text{g/L}$ )。每组 25 尾养于 20 L 水中, 每天喂食 3 次, 持续增氧, 处理期为 20 天, 每天换水 1 次。水体温度控制在 28  $\pm$  1 $^{\circ}\text{C}$ , 光照周期为 14 h: 10 h (光暗比)。

处理后 12 和 20 天, 对实验鱼进行解剖取材, 每组取 6 尾实验鱼卵巢, 用于组织学观察。同时取 6 尾实验鱼卵巢, 液氮速冻后, 于 -80 $^{\circ}\text{C}$  保存备用。

上述实验共重复 3 次。

### 1.2 组织学研究

\* 收稿日期: 修回日期:

基金项目: 重庆市科委项目 (cstc2012jjA20006); 重庆市教委项目 (KJ130622); 重庆师范大学校级项目 (13XLZ08、12xlb005)

作者简介: 郭学鸣, 女, 研究方向为鱼类生殖生理和分子内分泌, E-mail: 312850078@qq.com; 通讯作者: 刘智皓, 副教授, E-mail: minenut@163.com

解剖斑马鱼, 取其卵巢样品, 用4% PFA (pH 7.4) 4°C固定过夜, 梯度酒精脱水, 二甲苯透明, 石蜡包埋 (56-58°C), 5 $\mu$ m连续切片, HE染色, 中性树胶封片后拍照。

### 1.3 斑马鱼 *vasa*、*scp3* 和 *igf3* 部分序列的克隆

从斑马鱼成鱼卵巢中提取总RNA, 测定总RNA浓度。取1 $\mu$ g总RNA按照PrimeScript RT reagent Kit (TaKaRa) 说明书进行反转录, 合成第一链cDNA。

用生物信息学方法获得斑马鱼 *vasa* (NM\_131057)、*scp3* (NP\_001035440) 和 *igf3* (NM\_001115050) 的cDNA序列 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), 设计引物 (引物序列见表1)。利用已合成的第一链cDNA扩增相应cDNA的部分序列。扩增条件为: 94°C 3min; 94°C 30s, 53°C 30s, 72°C 30s, 35个循环; 延伸7min。扩

增片段在1.0%的琼脂糖凝胶上电泳, 溴化乙锭 (EB) 染色后, 在凝胶成像系统上分析。PCR产物经回收 (Geneview)、连接 (pMD19-T, TaKaRa)、转化后测序验证 (北京华大生物技术公司)。

### 1.4 斑马鱼 *scp3* 和 *igf3* 的组织表达模式

将同批次未经处理的斑马鱼解剖后迅速取出精巢 (T)、卵巢 (O)、脑 (B)、肝脏 (L)、肠 (I)、肾 (K)、心脏 (H)、肌肉 (M) 和脾 (SP) 组织, 提取总RNA, 测定浓度。取1 $\mu$ g总RNA按照PrimeScript RT reagent Kit (TaKaRa) 说明书进行反转录, 合成第一链cDNA。用斑马鱼 *scp3* 和 *igf3* 引物扩增相应的中间片段, 研究各基因在斑马鱼中的组织表达模式, 以 *ef1a* 作为内参, 并以相应基因的质粒和蒸馏水为模板扩增的产物分别作为阳性和阴性对照。*scp3* 和 *igf3* 的扩增条件为: 94°C 3min;

94°C 30s, 53°C 30s, 72°C 30s, 30个循环; 延伸7min。*ef1a* 扩增条件为: 94°C 3min; 94°C 30s, 60°C 30s, 72°C 30s, 23个循环; 延伸7min。PCR产物在1.0%的琼脂糖凝胶上电泳, 溴化乙锭 (EB) 染色后, 在凝胶成像系统上进行分析。

### 1.5 EE2 对斑马鱼 *vasa*、*scp3* 和 *igf3* 表达的影响

取-80°C备用的斑马鱼卵巢, 提取总RNA, 取1 $\mu$ g总RNA进行反转录, 合成第一链cDNA。用半定量RT-PCR (Semi-quantitative RT-PCR) 方法检测斑马鱼 *vasa*、*scp3* 和 *igf3* 在EE2处理后的表达变化, 并以 *ef1a* 作为内参, 反应条件参照“材料与方法1.4”。PCR产物在1.0%琼脂糖凝胶上电泳, 溴化乙锭 (EB) 染色后, 用凝胶成像系统成像, 并进行光密度分析 (Quantity One, Bio-Rad)。数据用6尾鱼的平均值 $\pm$ 标准误 (Means $\pm$ SE) 表示。结果用SPSS1310软件 (SPSS, Chicago) 进行方差分析和差异比较,  $P < 0.05$ , 差异显著。柱形图用GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, San Diego, CA) 进行绘制。

### 1.6 *vasa* 在滤泡发生过程中的表达变化

随机选取10尾雌性斑马鱼, 将其解剖后迅速取出卵巢, 在解剖镜下将初级生长期 (PG, primary growth)、卵黄生成前期 (PV, previtellogenic stage)、卵黄发生早期 (EV, early vitellogenic stage)、卵黄发生中期 (MV, midvitellogenic stage) 和成熟期 (FG, full-grown stage) 滤泡进行分离, 每组分离60枚, 各时期分离6组平行样本, 其分离标准参照Li et al (2011) [18]。提取总RNA, 测定浓度。取1 $\mu$ g总RNA进行反转录, 合成第一链cDNA。用半定量RT-PCR (Semi-quantitative RT-PCR) 的方法检测斑马鱼 *vasa* 在卵母细胞发生的各个时期的表达变化, 并以 *ef1a* 作为内参, 反应条件参照“材料与方法1.4”。PCR产物在1.0%琼脂糖凝胶上电泳, 溴化乙锭 (EB) 染色后, 用凝胶成像系统成像, 并进行光密度分析 (Quantity One, Bio-Rad)。数据分析参照“材料与方法1.5”。上述实验重复三次。

## 2、结果

### 2.1 EE2 对斑马鱼卵巢发育和卵子发生的影响

组织切片结果显示, 对照组卵巢中有各个不同发育时期的卵母细胞 (图1A和1B), 表明对照组卵巢和卵母细胞的发育正常。与对照组相比, 不同剂量的EE2处理12天后, 卵巢发育和卵子发生被明显抑制, 卵巢中只有极少数的卵母细胞处于EV、MV和FG期, 而其余大部分卵母细胞都集中在卵黄生成之前 (图1C、

表1 引物及其序列

Tab. 1 Primers and their sequences used in the present study.	
引物名称 Primer Names	引物序列 Primer sequences
<i>vasa</i> - F	TCCAACACCACCAGAGT
<i>vasa</i> - R	AAAGGAGGATTTGAGGC
<i>igf3</i> -F	GCTGCGTTCATCCTGC
<i>igf3</i> -R	TGTTGAGGAGGTTTGGGT
<i>scp3</i> -F	CTTTAGCGAAGTGATTTGGGTG
<i>scp3</i> -R	CCAATTTCTGAGTGCTGCCCTT
<i>ef1a</i> - F	GATCACTGGTACTTCTCAGGCTGA
<i>ef1a</i> -R	GCTGCTCCAGGTTTGCCTAT

E、G)。而 EE2 处理 20 天后, 卵黄生成期以后的卵母细胞 (EV、MV 和 FG 期) 完全退化, 只存在卵黄生成前的卵母细胞 (如: PG 和 PV 期), 并出现大量卵母细胞退化后形成的空腔。同时, 随着 EE2 处理剂量的增高, 卵巢中 PG 和 PV 期的卵母细胞的数量有减少的现象 (图 1D、F、H)。

## 2.2 斑马鱼 *scp3* 和 *igf3* 的组织表达模式

组织表达模式研究表明, *scp3* 和 *igf3* 仅在斑马鱼性腺 (精巢和卵巢) 中表达, 而不在其他非性腺组织中表达。各基因在精巢和卵巢中的表达水平没有性差。

## 2.3 EE2 对斑马鱼 *vasa*、*scp3* 及 *igf3* 表达的影响

半定量 RT-PCR 结果显示, 不同剂量的 EE2 对斑马鱼精巢中 *vasa* 的表达有下调的趋势, 但差异不显著 (图 3A)。不同的是, EE2 能显著抑制斑马鱼卵巢中 *scp3* 和 *igf3* 的表达: 处理 12 天后, *scp3* 的表达量仅在 E3 组中显著下调; 而在处理后 20 天, 各处理组中 *scp3* 的表达量均显著下调 (图 3B)。处理 12 天后, *igf3* 也有下调的趋势, 但差异不显著, 但在处理 20 天后, *igf3* 的表达被显著抑制 (图 3C)。

## 2.4 *vasa* 在滤泡发生过程中的表达变化

*vasa* 在滤泡发生过程中的表达模式的研究表明, *vasa* 在滤泡发生早期 PG 期表达量最高, 而随着滤泡的发生, 其表达量逐渐降低, 并在 FG 期达到最低 (图 4)。

# 3、讨论

众所周知, EDC 能够作用于脊椎动物的内分泌系统, 干扰其正常功能, 影响生殖健康。作为低等脊椎动物的鱼类, 对 EDC 尤为敏感, 长期暴露会导致生物体生殖障碍, 配子发生异常以及性逆转<sup>[19,20]</sup>。

作为一种典型的 EDC, EE2 能够严重影响鱼类雄性性腺发育、分化和配子发生<sup>[21, 22]</sup>, 但研究其影响雌性动物 (包括鱼类) 的报道极少。仅有的研究表明, EE2 能诱导雌性海湾海龙 (*Syngnathus scovelli*) 发生生殖障碍<sup>[23]</sup>, 还能使雌性青鳞成熟的卵母细胞减少或消失, 严重限制了它的排卵<sup>[12]</sup>。在斑马鱼的研究发现, EE2 不仅对雄性性腺发育和配子发生有显著抑制作用, 还能抑制雌性排卵<sup>[15]</sup>。本研究的结果表明, EE2 暴露后的雌性斑马鱼, 其卵巢发育异常, 卵黄生成期生殖细胞退化; 同时, 新生卵母细胞发育受抑制, 出现卵母细胞同步化。因此, 我们认为, EE2 能够严重干扰斑马鱼卵巢发育和卵子发生, 必将导致其生殖能力完全丧失。

那么, 卵黄生成期的卵母细胞去哪了呢? 众所周知, 鱼类特有的 *igf3* (insulin like growth factor 3) 在斑马鱼卵母细胞发育和成熟过程中起重要作用<sup>[17, 24-25]</sup>。有研究表明, E2 能抑制罗非鱼 (*Oreochromis niloticus*) *igf3* 启动子活性, 从而使 *igf3* 的表达量下调<sup>[26]</sup>。本研究发现, EE2 处理之后, 斑马鱼卵巢中的 *igf3* 的表达明显下调。与此结果相对应的是, EE2 处理之后, 斑马鱼卵巢中卵母细胞的发育全部被抑制在卵黄蛋白原合成之前。因此, 我们推测 EE2 可能通过 *igf3* 的表达, 抑制了卵母细胞的继续发育和成熟。

半定量 RT-PCR 结果显示, EE2 处理 12 天和 20 天后, *vasa* 的表达均有下调但无显著变化。由于 *vasa* 主要在卵黄发生前的 PG 期滤泡表达, 而 EE2 处理后的斑马鱼卵巢中, PG 期滤泡数量并无明显变化。因此, 我们认为 EE2 处理后 *vasa* 的表达没有明显变化, 可能与其表达的时期有密切关系。

不同的是, 减数分裂标记基因 *scp3* 仅表达于减数分裂中的生殖细胞, 是编码联会复合体的重要结构蛋白<sup>[27-30]</sup>。EE2 处理 12 天后, E3 组 *scp3* 的表达明显降低; EE2 处理 20 天后, *scp3* 在各个剂量组的表达均显著下调; 同时, 组织切片结果显示, 各个剂量组都呈现出成熟卵母细胞全部消失, 卵母细胞都集中在卵黄积累早期 (PG 和 PV)。由于 *scp3* 在减数分裂过程中的重要作用, 其表达下调暗示减数分裂被抑制。

综上所述, 本研究发现 EE2 能抑制斑马鱼卵母细胞发育, 可能是通过下调 *igf3* 的表达, 并抑制了卵母细胞减数分裂的发生所致。

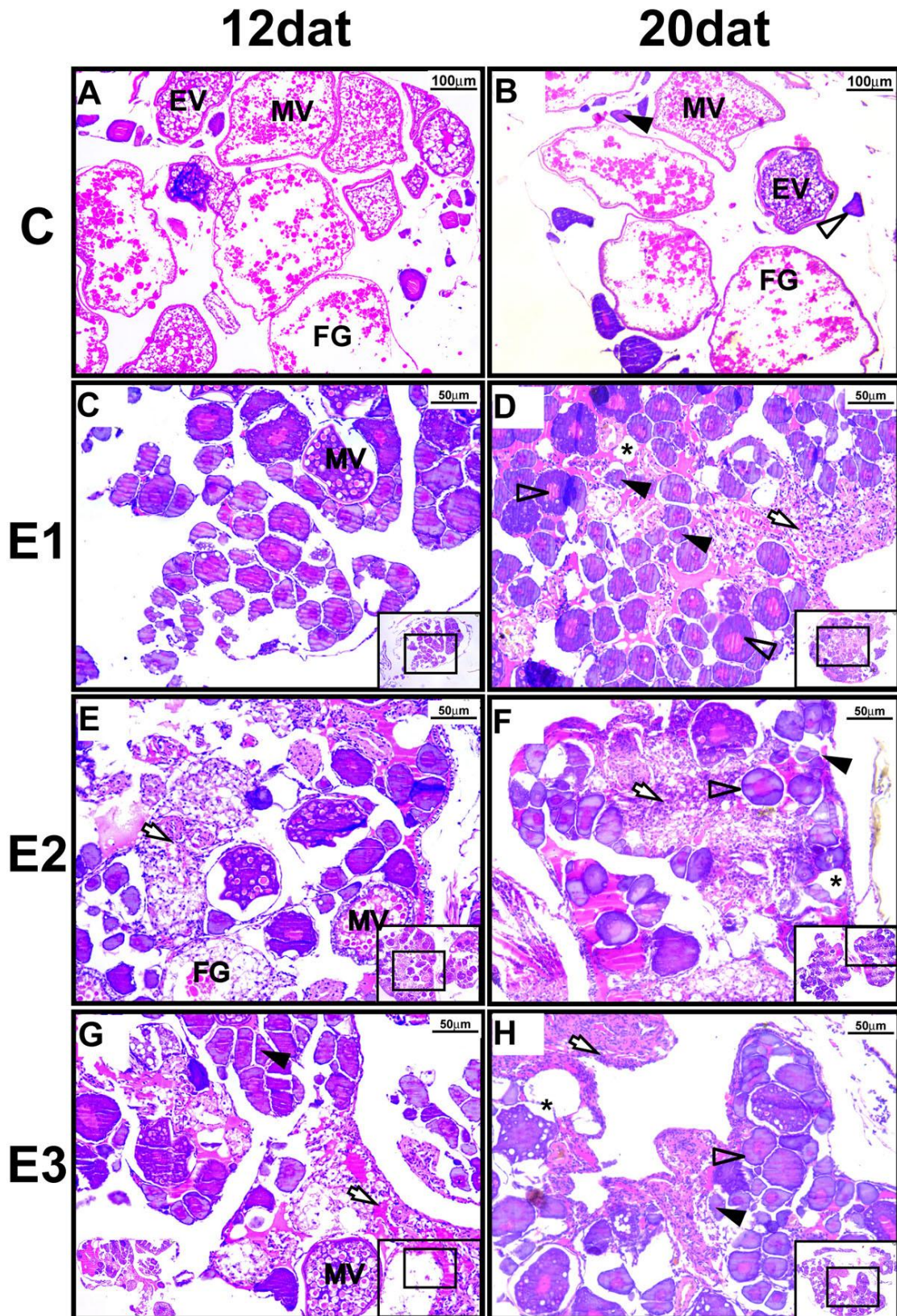


图 1 EE2 处理 12 和 20 天对斑马鱼卵巢发育和卵子发生的影响。A-B: 对照组; C-H: EE2 (0.1、1 和 10 µg/L) 处理组。EV: 卵黄发生早期; MV: 卵黄发生中期; FG: 成熟卵母细胞; 空心三角: 卵黄生成前期 (PV); 黑三角: 初级生长期 (PG); 白箭头: 增生的体细胞; \*: 卵母细胞凋亡形成的空腔。标尺: 100µm (A, B); 50µm (C-H)。

Fig. 1 Influences of EE2 on ovarian development and oogenesis in zebrafish. A,B, Control; C-H, EE2 (0.1, 1 and 10 µg/L). EV, Early vitellogenic stage; MV, Mid-vitellogenic stage; FG, Full-grown stage; open triangle, Pre-vitellogenic stage; black triangle, Primary growth stage; white arrow, somatic cell; asterisk, cavity resulting from oocyte apoptosis. Scale bar, A,B,100µm; C-H,50µm.

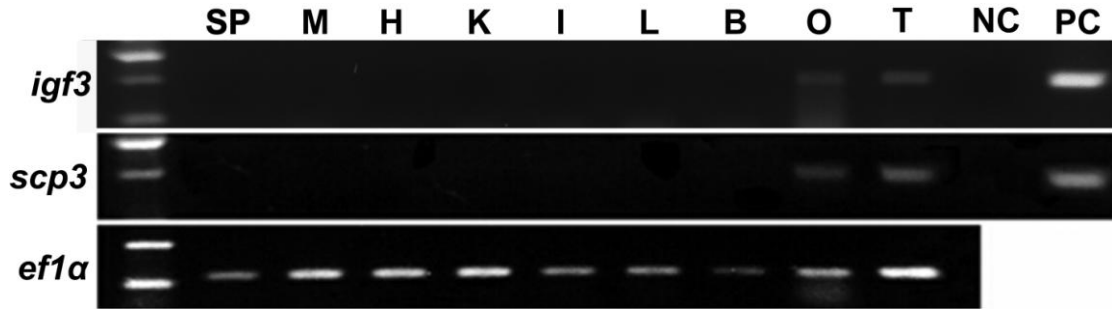


图 2 斑马鱼 *igf3* 和 *scp3* 的组织表达模式。T: 精巢、O: 卵巢、B: 脑、L: 肝脏、I: 肠、K: 肾脏、H: 心脏、SP: 脾脏、M: 肌肉、NC: 阴性对照、PC: 阳性对照、*ef1a* 为内参。

Fig. 2 Tissue expression patterns of *igf3* and *scp3* in zebrafish. T, testis; O, ovary; B, brain; L, liver; I, intestines; K, kidney; H, heart; Sp, spleen; M, muscle; NC, negative control; PC, positive control; *ef1a*, internal control.

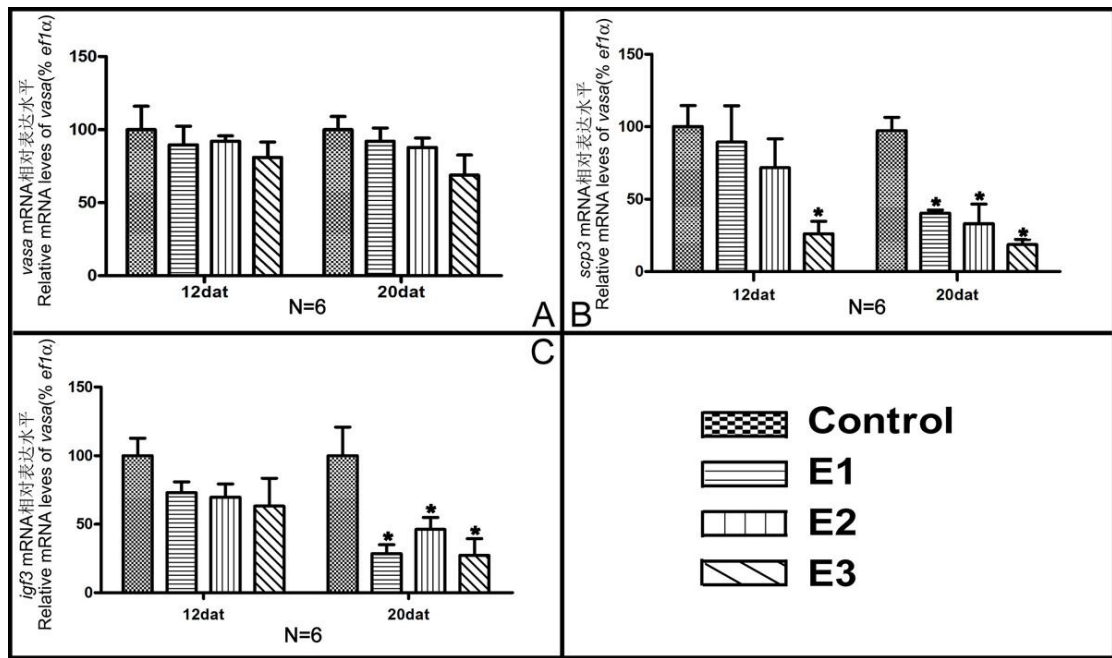


图 3 EE2 对斑马鱼 *vasa* (A)、*scp3* (B) 及 *igf3* (C) 表达的影响。\*: 差异显著 ( $P < 0.05$ ) ; N=6。

Fig.3 Influences of EE2 on the expressions of *vasa* (A), *scp3* (B) and *igf3* (C) in zebrafish. Asterisk, significant difference ( $P < 0.05$ ); N=6.

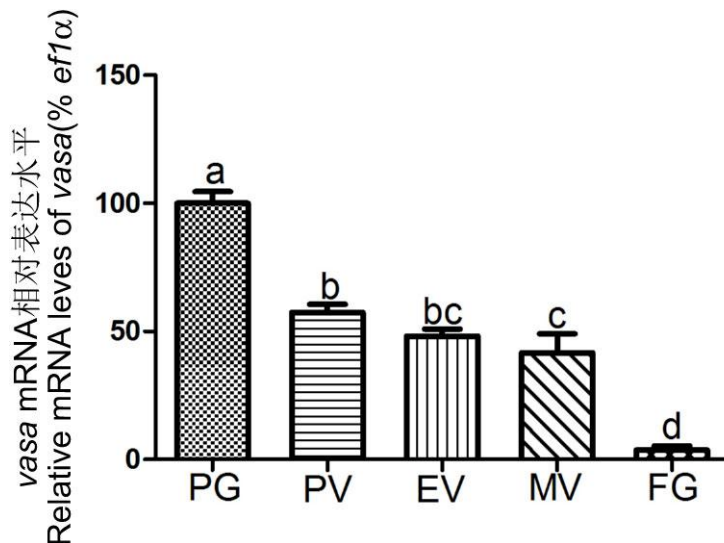


图 4 *vasa* 在斑马鱼滤泡发生过程中表达的变化。PG: 初级生长期; PV: 卵黄生成前期; EV: 卵黄发生早期; MV: 卵黄发生中期; FG: 成熟卵母细胞; \*: 差异显著 ( $P < 0.05$ ) ; N=6。

Fig.4 The expressions of *vasa* during follicleogenesis in zebrafish. PG, Primary growth stage; PV, Pre-vitellogenic stage; EV, Early

vitellogenic stage; MV, Mid-vitellogenic stage; FG, Full-grown stage; Asterisk, significant difference ( $P < 0.05$ );  $N = 6$ .

### 参考文献:

- [1] Ropero A B, Alonso-Magdalena P, Ripoll C, et al. Rapid endocrine disruption: environmental estrogen actions triggered outside the nucleus [J]. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*, 2006, 102(1): 163-169.
- [2] Liu J, Wang R, Huang B, et al. Distribution and bioaccumulation of steroidal and phenolic endocrine disrupting chemicals in wild fish species from Dianchi Lake, China [J]. *Environmental pollution*, 2011, 159(10): 2815-2822.
- [3] Lai K M, Scrimshaw M D, Lester J N. Prediction of the bioaccumulation factors and body burden of natural and synthetic estrogens in aquatic organisms in the river systems [J]. *Science of the Total Environment*, 2002, 289(1): 159-168.
- [4] Giesy J P, Kannan K. Global distribution of perfluorooctane sulfonate in wildlife [J]. *Environmental science & technology*, 2001, 35(7): 1339-1342.
- [5] Schiffer C, Müller A, Egeberg D L, et al. Direct action of endocrine disrupting chemicals on human sperm [A]. *EMBO reports*, 12 May 2014.
- [6] 孟顺龙, 宋超, 范立民, 等. 水体中环境内分泌干扰物 (EDCs) 污染现状及其对鱼类的生殖危害. *江苏农业学报*, 2013, 29(1): 202-208.
- Meng S L, Song C, Fan L M, et al. Source water pollution by environmental endocrine disruptors (EDCs) and the serious impact on fish reproductive [J]. *Jiangsu Journal of Agricultural Sciences*, 2013, 29(1): 202-208.
- [7] Jiang W, Yan Y, Ma M, et al. Assessment of source water contamination by estrogenic disrupting compounds in China [J]. *Journal of Environmental Sciences*, 2012, 24(2): 320-328.
- [8] Desbrow C, Routledge E J, Brighty G C, et al. Identification of estrogenic chemicals in STW effluent. 1. Chemical fractionation and in vitro biological screening [J]. *Environmental Science & Technology*, 1998, 32(11): 1549-1558.
- [9] Stanback J. Perspectives on Local Manufacture of Contraceptives in Developing Countries [J]. *Family Health International*, 1997.
- [10] Thorpe K L, Cummings R I, Hutchinson T H, et al. Relative potencies and combination effects of steroidal estrogens in fish [J]. *Environmental science & technology*, 2003, 37(6): 1142-1149.
- [11] Reyhanian Caspillo N, Volkova K, Hallgren S, et al. Short-term treatment of adult male zebrafish (*Danio Rerio*) with 17 $\alpha$ -ethynylestradiol affects the transcription of genes involved in development and male sex differentiation [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 2014, 164: 35-42.
- [12] Lee P Y, Lin C Y, Chen T H. Environmentally relevant exposure of 17 $\alpha$ -ethynylestradiol impairs spawning and reproductive behavior in the brackish medaka *Oryzias latipes* [J]. *Marine pollution bulletin*, 2014.
- [13] Hill Jr R L, Janz D M. Developmental estrogenic exposure in zebrafish (*Danio rerio*): I. Effects on sex ratio and breeding success [J]. *Aquatic toxicology*, 2003, 63(4): 417-429.
- [14] Weber L P, Hill Jr R L, Janz D M. Developmental estrogenic exposure in zebrafish (*Danio rerio*): II. Histological evaluation of gametogenesis and organ toxicity [J]. *Aquatic toxicology*, 2003, 63(4): 431-446.
- [15] Xu H, Yang J, Wang Y, et al. Exposure to 17 $\alpha$ -ethynylestradiol impairs reproductive functions of both male and female zebrafish (*Danio rerio*) [J]. *Aquatic toxicology*, 2008, 88(1): 1-8.
- [16] Orban L, Sreenivasan R, Olsson P E. Long and winding roads: testis differentiation in zebrafish [J]. *Molecular and cellular endocrinology*, 2009, 312(1): 35-41.
- [17] Kidd K A, Blanchfield P J, Mills K H, et al. Collapse of a fish population after exposure to a synthetic estrogen [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2007, 104(21): 8897-8901.
- [18] Li J, Liu Z, Wang D, et al. Insulin-like growth factor 3 is involved in oocyte maturation in zebrafish [J]. *Biology of reproduction*, 2011, 84(3): 476-486.
- [19] Reinecke M. Insulin-like growth factors and fish reproduction [J]. *Biology of reproduction*, 2010, 82(4): 656-661.
- [20] Kime D E. *Endocrine disruption in fish* [M]. Springer, 1998.
- [21] Tokumoto T, Tokumoto M, Thomas P. Interactions of diethylstilbestrol (DES) and DES analogs with membrane progesterin receptor- $\alpha$  and the correlation with their nongenomic progesterin activities [J]. *Endocrinology*, 2007, 148(7): 3459-3467.
- [22] Paul-Prasanth B, Shibata Y, Horiguchi R, et al. Exposure to diethylstilbestrol during embryonic and larval stages of medaka fish (*Oryzias latipes*) leads to sex reversal in genetic males and reduced gonad weight in genetic females [J]. *Endocrinology*, 2011, 152(2): 707-717.
- [23] Rose E, Paczolt K A, Jones A G. The effects of synthetic estrogen exposure on pre-mating and post-mating episodes of selection in sex-role-reversed Gulf pipefish [J]. *Evolutionary applications*, 2013, 6(8): 1160-1170.
- [24] Wood A W, Duan C, Bern H A. Insulin-like growth factor signaling in fish [J]. *International review of cytology*, 2005, 243: 215-285.
- [25] Wang D S, Jiao B, Hu C, et al. Discovery of a gonad-specific IGF subtype in teleost [J]. *Biochemical and biophysical research communications*, 2008, 367(2): 336-341.
- [26] Li M, Wu F, Gu Y, et al. Insulin-like growth factor 3 regulates expression of genes encoding steroidogenic enzymes and key transcription factors in the Nile tilapia gonad [J]. *Biology of reproduction*, 2012, 86(5): 163.
- [27] 胡重江. 罗非鱼和南方鲇生殖细胞几种标记基因的克隆和

表达研究. 2008, 西南大学.

Hu C J, Molecular cloning and expression of several germ cell markers of the Nile tilapia *Oreochromis niloticus* and Southern catfish, *Silurus meridionalis*. 2008, southwest university.

[28] Lammers J H, Offenberg H H, Van Aalderen M, et al. The gene encoding a major component of the lateral elements of synaptonemal complexes of the rat is related to X-linked lymphocyte-regulated genes [J]. *Molecular and Cellular Biology*, 1994, 14(2): 1137-1146.

[29] Lasala C, Carr  Eus  be D, Picard J Y, et al. Subcellular and

molecular mechanisms regulating anti-Müllerian hormone gene expression in mammalian and nonmammalian species [J]. *DNA and cell biology*, 2004, 23(9): 572-585.

[30] Kl ver N, Pfennig F, Pala I, et al. Differential expression of anti - Müllerian hormone (amh) and anti - Müllerian hormone receptor type II (amhrII) in the teleost medaka [J]. *Developmental Dynamics*, 2007, 236(1): 271-281.

## Animal Sciences

### The inhibition of 17 -ethynylestradiol on zebrafish (*Danio rerio*) ovarian development and oogenesis

GUO Xueming, LI Yingwen, YIN Pan, LIU Zhihao \*

(School of Life Sciences, Chongqing Normal University, Chongqing Engineering Research Center of Bioactive Substances, Chongqing Key Laboratory of Animal Biology, Chongqing 401331, China)

**Abstract:** To investigate the influences of 17 -ethynylestradiol (EE2) on fish ovarian development and oogenesis, female zebrafish (*Danio rerio*) adults were exposed to EE2 (0.1, 1 and 10 g/L) for 20 days. Histological results demonstrated that all doses of EE2 gave rise to serious impacts on zebrafish ovarian development and oogenesis. In order to elucidate the possible mechanisms involved, the expression levels of *vasa*, *scp3* and *igf3* genes, which closely related to ovarian development and meiosis in zebrafish, in response to different doses of EE2 were examined by semi-quantitative RT-PCR. Results revealed that the expressions of *scp3* and *igf3* were dramatically down-regulated after EE2 exposure in dose- and time-dependent manners, while the expression of *vasa* remained relative stable. Therefore, we speculated that EE2 inhibited zebrafish ovarian development and oogenesis, possibly by the inhibition on *igf3* expression and meiosis.

**Keywords:** 17 -ethynylestradiol; *Danio rerio*; ovarian development; oogenesis; gene expressions