

环境剂量的多种环境雌激素长期暴露阻断斑马鱼成鱼精子发生*

王雅琴¹, 王德寿², 李英文¹, 刘智皓¹

(1. 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;
2. 西南大学 淡水鱼类资源与生殖发育教育部重点实验室, 重庆 400715)

摘要:【目的】研究多种环境雌激素长期暴露对斑马鱼精子发生的影响。【方法】联合使用环境剂量的雌二醇(E2)、乙炔基雌二醇(EE2)、己烯雌酚(DES)、4-叔辛基苯酚(4-t-OP)、4-壬基苯酚(4-NP)、双酚 A(BPA)等 6 种环境雌激素以及单独使用低剂量(5.65 ng·L⁻¹)EE2 连续暴露斑马鱼(*Danio rerio*)雄性成鱼 60 d。【结果】单独使用 EE2 暴露处理对斑马鱼性腺成熟度、精巢质量、精子数量和精巢的组织结构均无统计学意义上的影响;而联合使用 6 种环境雌激素暴露处理则降低了斑马鱼精子数量,与不进行环境雌激素处理的对照组的精子数量相比差异具有统计学意义($p < 0.05$),并改变了精巢组织结构。单独使用 EE2 暴露处理上调了基因 *20β-hsd* 和 *cyp26a1* 的表达;联合使用 6 种环境雌激素暴露处理则上调了雌激素和孕激素合成相关基因 *cyp17a1*, *cyp17a2*, *cyp19a1a* 和 *20β-hsd* 的表达,并明显抑制雄激素合成酶基因 *cyp11b2* 的表达。联合使用 6 种环境雌激素暴露处理还上调了减数分裂起始相关基因 *aldh1a2* 和 *cyp26a1* 和减数分裂标记基因 *sycp3* 的表达,表明这一处理抑制减数分裂起始,并增强减数分裂。【结论】多种环境雌激素的实际雌激素效应可能远强于各种环境雌激素效应的叠加。与单种环境雌激素相比,环境雌激素混合物可能具有更强的生殖风险。

关键词:环境雌激素;长期联合暴露;斑马鱼;精子发生;减数分裂;基因表达

中图分类号:Q175

文献标志码:A

文章编号:1672-6693(2018)01-0023-08

大量研究发现,人类活动产生的多种化合物能通过干扰动物内源激素的合成、分泌、代谢和功能,影响动物的内环境稳态、个体发育、繁殖和行为,因而被称为内分泌干扰物(Endocrine disrupting chemicals, EDCs)^[1-2]。其中,由于环境雌激素具有强烈的雌激素效应,且多数汇聚于水中,使鱼类的发育和繁殖面临极大风险。有研究表明,环境雌激素乙炔基雌二醇(17 α -ethinylestradiol, EE2)和己烯雌酚(Diethylstilbestrol, DES)等单独暴露均能导致鱼类出现性腺发育障碍、精子数量下降^[3-5],如果作用于幼体则会导致雌性化、精卵巢,甚至性反转^[6-7]。尽管环境雌激素对鱼类的影响极大,但它们在自然水域中的含量极低,并常以混合物的形式存在。2012 年的研究发现,在长江中,雌激素效应最强的区域位于长江中下游的静水水体如湖泊、水库中。其中,雌二醇(17 β -estrodial, E2)、EE2 和 DES 的质量浓度范围仅为 1.07~2.98 ng·L⁻¹,而雌激素效应较低的 4-叔辛基苯酚(4-t-OP)、4-壬基苯酚(4-NP)、双酚 A(BPA)的最高质量浓度仅为(276.97±20.48) ng·L⁻¹^[8]。有研究表明,多种环境雌激素联合处理能明显影响鱼类多种类固醇合成酶基因的表达,但对鱼类性腺发育和精子发生的影响极小^[9]。然而,环境雌激素长期联合暴露如何影响鱼类精子仍不得而知。为此,本研究用环境剂量^[8]的 E2, EE2, DES, 4-t-OP, 4-NP 和 BPA 对斑马鱼(*Danio rerio*)雄性成鱼联合暴露 60 d,并用 5.65 ng·L⁻¹的 EE2(与联合暴露组雌激素效应相当)对实验鱼进行单独暴露;然后通过组织切片检测上述药物长期暴露对斑马鱼精子产生的影响。同时,本研究用定量 PCR(Quantitative RT-PCR, qRT-PCR)的方法,检测参与鱼类性激素合成相关基因(*cyp17a1*, *cyp17a2*, *cyp11b2*, *cyp19a1a* 和 *20β-hsd*)、减数分裂相关基因(*sycp3*, *aldh1a2* 和 *cyp26a1*)及细胞凋亡相关基因(*bax* 和 *bcl-2*)的 mRNA 转录水平,以初步探讨多种环境雌激素诱导斑马鱼精子发生障碍的分子机理。

* 收稿日期:2017-03-31 修回日期:2017-06-12 网络出版时间:2018-01-18 15:21

资助项目:重庆市基础科学与前沿技术研究专项基金(No. cstc2016jcyjA1032);淡水鱼类资源与生殖发育教育部重点实验室开放课题(No. FFRD-2015-02);第十五届“挑战杯”全国大学生课外科技作品竞赛校级项目(No. 201602098);重庆师范大学校级基金(No. 13XLZ08)

第一作者简介:王雅琴,女,研究方向为动物学, E-mail: 1940768599@qq.com;通信作者:刘智皓,副教授, E-mail: minnut@163.com

网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1165.N.20180118.1521.008.html>

1 材料与amp;方法

1.1 实验试剂和仪器

所用主要试剂为购自 Sigma 公司 EE2, E2, 4-t-OP, DES, BPA 和 4-NP; 购自 TaKaRa 公司的总 RNA 提取试剂 RNAiso、反转录试剂盒。所用主要仪器有: Eclipse 90i 型光学显微镜(Nikon 公司)、IQ5 型实时定量 PCR 仪(Bio-Rad 公司)和 Nano-Drop 2000 型微量分光光度计(Thermo 公司)。

1.2 实验材料与处理

实验用野生型斑马鱼雄性成鱼(AB 系, 120 d 龄)购自国家斑马鱼资源中心(武汉), 平均体质量(0.371 ± 0.042) g。进行环境雌激素暴露前于恒温循环水养殖系统驯养 14 d, 饲养水温(28 ± 0.5) °C、光周期为 14 h 光照: 10 h 黑暗。水质参数如硝酸盐、亚硝酸盐、pH 等都控制在正常范围内, 水体中的溶氧饱和度大于或等于 80%。

设置 3 个实验组。其中 1 个为对照组, 驯养水体中不含有环境雌激素, 但与另外 2 个组一样含有质量分数为 0.05% 作为助溶剂的二甲基亚砷(DMSO); 另外 2 个组分别为 6 种环境雌激素联合暴露组(联合组)和 EE2 单独暴露组(EE2 组)。联合组所用环境雌激素的剂量均为 2012 年长江下游某水库中环境雌激素的环境剂量^[8], 即 E2, EE2, DES, 4-t-OP, 4-NP 和 BPA 的质量浓度分别为 1.78, 2.67, 2.07, 65.26, 230.84 和 276.97 ng · L⁻¹。根据联合组中各环境雌激素的相对雌激素效应总和^[9], EE2 组中 EE2 的质量浓度设置为 5.65 ng · L⁻¹。

随机取 90 尾实验鱼, 随机分配到以上 3 个组中, 每组 3 个平行缸。随机取 10 尾实验鱼放入 30 L 的玻璃缸中, 加水 25 L, 每天喂食 3 次、换水 1 次, 连续暴露 60 d。暴露过程中连续充氧, 并维持暴露实验进行前的水温和光照周期。实验结束后, 每缸随机取 2 尾斑马鱼, 测定体质量和性腺质量, 并计算性腺成熟系数(Gonadosomatic index)即性腺质量与体质量之比; 取 2 尾斑马鱼精巢, 经波恩氏液固定后, 用于组织学切片。取 2 尾斑马鱼精巢, 对精子的数量进行统计。取出每缸剩余的 4 尾斑马鱼的精巢, 将每 2 尾鱼的精巢作为 1 个样品, 则每组各有 6 个样品; 液氮速冻样品, 并于 -80 °C 保存, 用以提取总 RNA。

1.3 组织学观察

用质量分数为 1% 的 MS-222 将实验鱼麻醉后解剖出精巢, 于波恩氏液中固定 18 h。经梯度乙醇脱水和二甲苯透明, 于 60 °C 石蜡包埋。在型号为 KD-3358 的石蜡切片机上切出厚度为 4 μm 的切片, 苏木素-伊红(HE)染色, 中性树胶封片, 用光学显微镜拍照。

1.4 精子计数

按照已有的精子计数方法进行统计^[10]。将精巢样本放在 200 μL 的 Hank's 平衡缓冲液中, 然后用剪刀剪碎样本。将含有精子样本的平衡缓冲液加到 0.1 mm 规格的血球计数板(马林费尔德, 德国), 静置约 3 min; 待精子细胞全部沉降到计数室底部后, 将计数板放在载物台的中央; 先在低倍镜下找到计数室所在位置后, 再转换高倍镜观察、计数并记录。

1.5 定量 RT-PCR

取实验鱼精巢, 加 1.0 mL RNAiso 于玻璃匀浆器中匀浆, 提取总 RNA, 用质量分数为 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 样品的完整性, 并用 Nano-Drop 2000 核酸蛋白检测仪测定总 RNA 样品的纯度和浓度, 260, 280 nm 的 OD 值之比在 1.8~2.0 之间。取 500 ng 总 RNA 按照 PrimeScript RT reagent Kit(TaKaRa 公司)说明书去除基因组 DNA, 并进行反转录。合成的第一链 cDNA 稀释 5 倍后于 -20 °C 保存备用。

用在线引物设计软件(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>)设计目的基因 *cyp17a1*, *cyp17a2*, *cyp11β2*, *yp19a1a*, *20β-hsd*, *sycp3*, *aldh1a2*, *cyp26a1*, *bax*, *bcl-2* 和看家基因 *ef1α* 的定量 PCR 引物(表 1)。定量 PCR 反应包含浓度为 0.3 μmol · L⁻¹ 的引物, 1 × Sybr Green master mix (TaKaRa), 2 μL cDNA, 反应体积为 20 μL。定量 PCR 反应参数为: 95 °C 预变性 30 s; 95 °C 变性 5 s, 40 个循环; 60 °C 退火 30 s 和 72 °C 延伸 10 s。反应时, 同时做阴性对照并检测熔解曲线, 以保证每个样品中仅有 1 个 PCR 产物, 且 cDNA 未受污染。在实验前, 本研究已确认 *ef1α* 的表达不受所用药物影响。随后, 用 qRT-PCR 的方法检测上述基因相对表达水平变化。本研究所用引物的扩增效率总体相似, 介于 96.3% 到 105.1% 之间。目的基因与 *ef1α* 的相对表达量用 2-ΔΔCt 法进行计算^[11]。

表 1 引物及其序列

Tab. 1 Primers and their sequences

引物名称	引物序列	Genbank 序列号	引物名称	引物序列	Genbank 序列号
cyp11 β 2-F	5'-CTGGGCCACACATCGAGAG-3'	FJ713105	sycp3-R	5'-CACCGTCAGTATGTTTGG-3'	AY601674
cyp11 β 2-R	5'-AGCGAACGGCAGAAATCC-3'		aldh1a2-F	5'-TCCAGGAAGCCGACAAGG-3'	AF288764
cyp19a1a-F	5'-CGGATCGGGTCTCGGTCGT-3'	KF296362	aldh1a2-R	5'-CCAGGGTAGCAAGGTAAGCA-3'	
cyp19a1a-R	5'-CGGCTGCTGCGACAGGTTGT-3'		cyp26a1-F	5'-TGTCAGGAGGATACAGAATAGC-3'	NM212666
20 β -hsd-F	5'-TCGTTTCATTCGTTGGGATA-3'	EU918603	cyp26a1-R	5'-AGCCGAGGTGTCATGGGT-3'	
20 β -hsd-R	5'-TGCCCTCCTCTGAAGC-3'		bcl-2-F	5'-CGGGTGTACGGGATGCTG-3'	NM001030253
cyp17a1-F	5'-TCTGATGAGCCTGGTGAG-3'	XM005156809	bcl-2-R	5'-GCTCTTCGGCCACGGTTAGA-3'	
cyp17a1-R	5'-ATGAGCAGTTTGTGGGAG-3'		bax-F	5'-AGGAGCACGTCATTAAGTGG-3'	NM131562
cyp17a2-F	5'-GCAAAGAGGGTCAGGTGG-3'	XM017353614	bax-R	5'-CCTGCTACTTCACATTTGCG-3'	
cyp17a2-R	5'-AGCAGGAACGCTATGGTC-3'		ef1 α -F	5'-ACAACCCTGCCAGTGTTC-3'	AY422992
sycp3-F	5'-GCGTTTGTGTTGTTGGATT-3'	AY601674	ef1 α -R	5'-GTACCGCTAGCATTACCCT-3'	

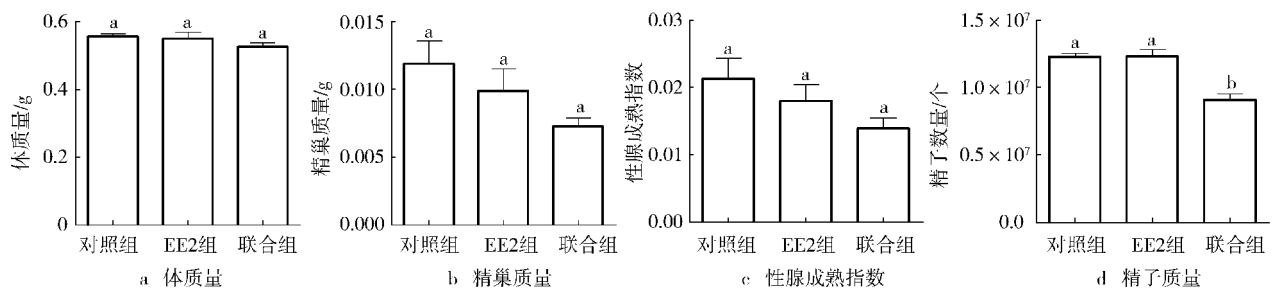
1.6 数据统计

研究结果采用“平均值 \pm 标准差”表示,用 SPSS 13.10 软件进行对结果数据进行统计分析。当 $p < 0.05$ 时,统计分析结果具有统计学意义。柱形图用 GraphPad Prism 6(San Diego, CA)进行绘制。

2 结果

2.1 对体质量、性腺质量、性腺成熟系数和精子数量的影响

结果显示,3 个组中实验鱼的体质量之间的差异无统计学意义(图 1a)。EE2 组和联合组实验鱼精巢质量和性腺成熟系数与对照组实验鱼的这两项指标相比均有下降趋势,但这两项指标在 3 个实验组间的差异也不具有统计学意义(图 1b-c)。EE2 组与对照组实验鱼的精子数量无统计学意义上的差异,而联合组实验鱼的精子数量与两者的该项指标相比有所减少,并且差异具有统计学意义($p < 0.05$)(图 1d)。



注:不同字母表示组间数据差异具有统计学意义($p < 0.05$),下同。

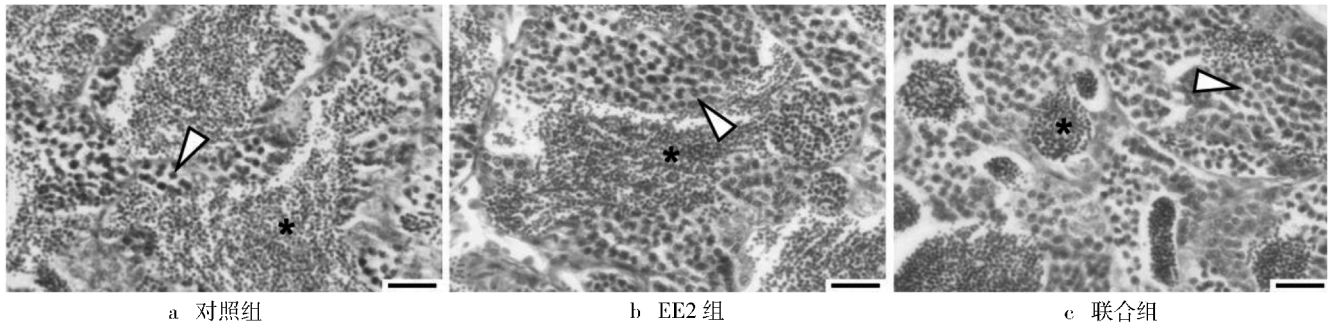
图 1 EE2 和联合处理对斑马鱼体质量、精巢质量、性腺成熟指数和精子数量的影响

Fig. 1 Influences of EE2 and mixture exposures on the body mass, testis mass, gonadosomatic index, and sperm count of zebrafish males

2.2 对精巢结构的影响

与对照组(图 2a)相似,EE2 组斑马鱼精巢也具有发育不同时期的精小囊,每个精小囊内的生殖细胞均处于相同发育时期,不同精小囊中的生殖细胞发育不同步(图 2b);在精巢中,发育早期生殖细胞(精原细胞和精母细胞)数量相对较少,而发育后期生殖细胞(精子细胞和精子)数量相对较多(图 2a-b)。与这 2 个组的情况不同的

是,在联合组的精巢中,精子细胞和精子数量大量减少,而发育早期生殖细胞(主要是精母细胞)数量有上升的趋势(图 2c)。



注:星号位置为精子;三角形位置为精母细胞;图中标尺为 100 μm 。

图 2 EE2 和联合处理对斑马鱼雄性成鱼精巢结构的影响

Fig. 2 Influences of drug exposures on spermatogenesis of zebrafish adults

2.3 对性激素合成相关基因表达的影响

图 3 显示:1) EE2 组与对照组实验鱼的 *cyp17a1*, *cyp19a1a*, *cyp17a2* 和 *cyp11b2* 基因表达水平均无统计学意义上的差异;EE2 组 *20 β -hsd* 基因的表达水平与对照组的该项指标相比则有所上调且差异具有统计学意义 ($p < 0.05$)。2) 联合组实验鱼 *cyp17a1* 基因的表达水平较对照组的该项指标而言呈上调趋势,但差异无统计学意义;联合组实验鱼 *cyp17a2*, *20 β -hsd*, *cyp19a1a* 基因的表达水平与对照组的这几项指标相比也均呈上调趋势,并且差异均具有统计学意义 ($p < 0.05$);而联合组实验鱼 *cyp11b2* 基因的表达水平与对照组的该项指标则有下调趋势,差异具有统计学意义 ($p < 0.05$)。

2.4 对与生殖细胞凋亡相关基因表达的影响

图 4 显示:1) EE2 组与对照组实验鱼的 *bax* 和 *bcl-2* 基因表达水平均无统计学意义上的差异。2) 联合组实验鱼 *bax* 和 *bcl-2* 基因的表达水平与对照组的这两项指标相比均有上调趋势,但两组实验鱼 *bax* 基因表达水平的差异无统计学意义,而 *bcl-2* 基因表达水平的差异具有统计学意义 ($p < 0.05$)。此外统计结果还显示,3 个组的 *bax* 与 *bcl-2* 基因表达水平的比值差异没有统计学意义上的差异。

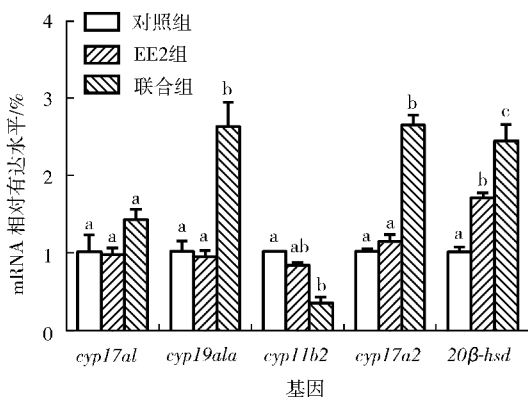


图 3 EE2 和联合处理对斑马鱼雄性成鱼精巢类固醇合成酶的影响

Fig. 3 Influences of EE2 and mixture exposures on the expressions of genes encoding steroidogenic enzymes in zebrafish males

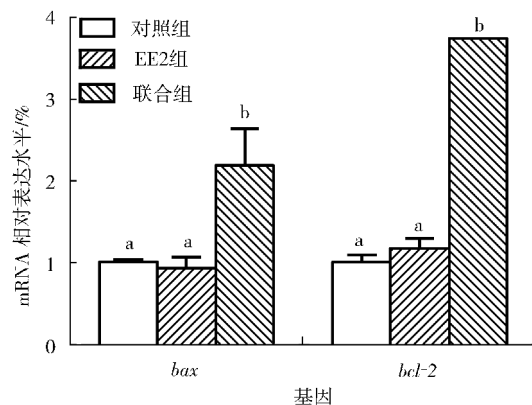


图 4 EE2 和联合处理对斑马鱼雄性成鱼精巢生殖细胞凋亡的影响

Fig. 4 Influences of EE2 and mixture exposures on the expression of genes in apoptosis of zebrafish males

2.5 对减数分裂的影响

从图 5 可知:1) EE2 组与对照组实验鱼的 *sycp3* 和 *aldh1a2* 基因表达水平无统计学意义上的差异;而 EE2 组实验鱼 *cyp26a1* 基因表达水平较对照组的该项指标有明显上调趋势(约为后者的 1.5 倍),差异具有统计学意义 ($p < 0.05$)。2) 联合组实验鱼 *sycp3*, *aldh1a2* 和 *cyp26a1* 基因表达水平较对照组的这几项指标均有统计学意义上的上调 ($p < 0.05$),其中联合组实验鱼 *cyp26a1* 基因表达水平是对照组该项指标的 5 倍左右。此外统计

结果还显示,*aldh1a2* 与 *cyp26a1* 基因表达水平的比值在 EE2 组与对照组间的差异无统计学意义,而联合组中这一比值与前两者相比有所下降,差异具有统计学意义($p < 0.05$)。

3 讨论

研究结果发现,与对照组相比,EE2 组和联合组的暴露处理对斑马鱼体质量均无统计学意义上的影响,这可能是所用实验鱼为成鱼且已经完全生长的缘故。另外与对照组相比,尽管 EE2 组和联合组的暴露处理对斑马鱼性腺质量和性腺成熟系数均无统计学意义上的影响,但仍有下降的趋势,暗示环境雌激素暴露尤其是多种环境雌激素联合暴露可能对斑马鱼精巢发育和精子发生有一定影响。EE2 组与对照组相比,实验鱼的精巢结构没有明显变化;而联合组与对照相比,实验鱼的精子细胞和精子数量有减少的趋势而精母细胞则有增多的趋势。与之相对应的是,联合组较对照组而言,实验鱼的精子数量明显降低,这与性腺质量和性腺成熟系数的研究结果相吻合。上述结果表明,环境剂量的环境雌激素长期联合暴露明显抑制斑马鱼雄性成鱼的精子发生,这与类似研究^[2,12-17]的结果一致。

性激素(包括雄激素、雌激素和孕激素)在鱼类精子发生中均起着重要作用^[18]。一方面,雄激素(主要是 11-酮基睾酮,11-KT)在精子发生中起决定性作用^[19]。有研究发现,11-KT 可以诱导鳗鲡(*Anguilla marmorata*)精原细胞分化为可育的精子^[20];而 11-KT 水平的降低则与精子发生受阻和精子数量下降密切相关^[21]。另一方面,一定水平的雌激素对于维持鱼类精巢中 A 型精原细胞的更新和增殖有重要作用^[22],而较高剂量环境雌激素暴露通常会导致雌激素效应的升高,从而诱导生殖细胞数量的下降^[23]。本研究中,EE2 组与对照组实验鱼睾酮合成酶基因 *cyp17a1* 和 11-KT 合成关键酶基因 *cyp11b2* 的表达均无统计学意义上的差异;而联合组实验鱼的 *cyp11b2* 基因表达则被明显抑制,与对照组实验鱼这一基因表达的差异具有统计学意义($p < 0.05$)。这一结果暗示 EE2 组实验鱼 11-KT 的水平可能没有明显变化,而联合组实验鱼 11-KT 的水平则可能明显降低。这也与本研究精子计数结果相符。本研究结果还显示,EE2 组与对照组实验鱼 E2 合成酶基因 *cyp19a1a* 的表达无统计学意义上的差异,而联合组实验鱼 *cyp19a1a* 基因表达则明显上调,与对照组实验鱼这一基因表达的差异具有统计学意义($p < 0.05$)。该结果暗示联合组实验鱼 E2 水平可能升高。上述结果与联合组实验鱼早期生殖细胞增多且精子数量下降的结果一致。综上所述,笔者推测联合组实验鱼 *cyp11b2* 基因表达的下调和 *cyp19a1a* 基因表达的上调,以及由此可能导致的雄激素、雌激素合成水平的变化应是联合组中精子数量下降的一个主要原因。

除雌激素和雄激素外,孕激素在鱼类的配子发生中也起重要作用^[24-25]。二羟黄体酮(17 α ,20 β -DP,DHP)是鱼类主要的孕激素,参与生殖细胞的成熟、排卵和排精^[26-27]。本研究结果发现;与对照组相比,EE2 组和联合组实验鱼 DHP 合成关键酶基因 20 β -*hsd* 的表达均明显上调(联合组实验鱼 20 β -*hsd* 基因表达可达对照组实验鱼的 2.5 倍左右),与对照组实验鱼该基因表达的差异具有统计学意义($p < 0.05$)。这一结果暗示 DHP 的合成增加可能导致精子提前成熟和排精,这与联合组实验鱼精子数量减少的情况相吻合。

脊椎动物的精子发生是一个复杂的细胞生物学过程,包括了减数分裂起始、减数分裂、细胞凋亡、精子成熟等阶段。有研究表明,视黄酸(Retinoic acid,RA)是脊椎动物减数分裂起始中的重要因子^[28-31],它在体内的维持水平受到 RA 合成酶(主要是 *aldh1a2*)和降解酶(主要是 *cyp26a1*)的调节^[32-33]。本研究发现,EE2 单独暴露处理后,*aldh1a2* 基因表达水平与对照组该基因的表达水平相比无统计学意义上的变化,而 *cyp26a1* 基因表达则为对照组的 1.5 倍,但 *aldh1a2* 与 *cyp26a1* 基因表达水平的比值与对照组的这一比值相比没有统计学意义上的变化,暗示 EE2 对实验鱼 RA 的合成可能没有明显影响。与 EE2 单独暴露处理不同,联合组实验鱼 *aldh1a2* 基因表达为对照组的 2.5 倍,*cyp26a1* 基因表达则为对照组的 5 倍,且 *aldh1a2* 与 *cyp26a1* 基因表达水平的比值与对照组的相比明显降低且差异具有统计学意义($p < 0.05$)。这一结果暗示环境剂量的多种环境雌激素联合暴露可能导致实验鱼 RA 水平的降低,并最终引起进入减数分裂的精原细胞数量减少。*sycp3* 是标记减数分裂中精母细胞的分子标记。本研究结果显示,EE2 组与对照组实验鱼 *sycp3* 基因表达无统计学意义上的差异,而联合组较对照组而言,实验鱼 *sycp3* 基因表达有统计学意义上的上调($p < 0.05$)。这暗示联合组实验鱼体内处于减

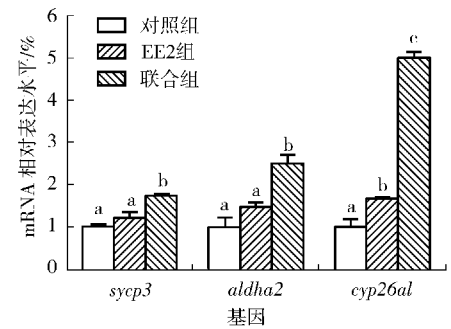


图 5 EE2 和联合处理对斑马鱼雄性成鱼精巢减数分裂的影响

Fig. 5 Influences of EE2 and mixture exposures on the expressions of genes in meiotic regulation of zebrafish males

数分裂的精母细胞数量将会增多,组织学观察结果印证了这一点。令人惊奇的是,在联合组实验鱼体内进入减数分裂的精原细胞减少的情况下,为何减数分裂中的精母细胞数量反而增加?已有研究显示,雄激素在精母细胞分化为精子细胞的过程中起关键作用^[34]。本研究中发现联合组实验鱼 11-KT 水平可能降低,由此精母细胞向精子细胞的分化将可能被抑制,从而导致减数分裂被阻断在精母细胞阶段,故最终致使精母细胞数量增多。

有研究显示,环境雌激素暴露可能通过 Cytochrome c/bax/caspase 途径诱导精母细胞发生凋亡,导致精子数量下降^[35]。本研究发现,3 个组实验鱼凋亡因子 *bax* 的表达均无统计学意义上的差异。尽管联合组实验鱼凋亡抑制因子 *bcl-2* 的表达较对照组的该项指标有统计学意义上的上调($p < 0.05$),但 EE2 组和联合组实验鱼 *bax* 与 *bcl-2* 的 mRNA 相对表达水平的比值同对照组的该项比值比较而言无统计学意义上的差异。上述结果表明,EE2 单独暴露、6 种环境剂量的环境雌激素联合暴露均未诱导精母细胞发生细胞凋亡,因此本研究发现的环境雌激素暴露后实验鱼精子数量下降可能与细胞凋亡无关。

本研究中,EE2 单独暴露 60 d 并未对斑马鱼精巢质量、性腺成熟系数、精巢结构和精子数量产生明显影响。有趣的是,尽管本研究中 6 种环境雌激素联合暴露的总雌激素效应与 EE2 暴露的雌激素效应相当,但前者对斑马鱼精巢结构和精子数量均造成明显影响。这一结果暗示,多种环境雌激素联合暴露可能产生强烈的叠加效应(Additive effect),因而实际雌激素效应可能明显高于多种环境雌激素效应的总和。这种叠加效应也反映在相关基因的转录水平。定量 RT-PCR 结果显示,EE2 单独暴露明显上调了 *20 β -hsd* 和 *cyp26a1* 的表达,但对类固醇合成酶基因(*cyp19a1a*, *cyp11b2* 和 *cyp17a2*)和减数分裂关键基因(*sycp3*, *aldh1a2*)的表达无明显影响,仅表现为较弱的内分泌干扰效应。这可能与本研究所用 EE2 质量浓度较低有关。相反,6 种环境雌激素联合暴露不仅诱导了 *20 β -hsd* 和 *cyp26a1* 基因的上调,还明显抑制 *cyp11b2* 基因的表达,并上调 *cyp19a1a*, *cyp17a2*, *sycp3* 和 *aldh1a2* 基因的表达。上述结果暗示:在联合组中,尽管除 EE2 之外的其他环境雌激素即 E2, DES, BPA, -t-OP 和 4-NP 对雌激素效应的贡献较小,它们也可能分别通过与 EE2 不同的调控途径(转录因子或核受体)诱导上述基因表达水平的改变^[9]。

基于以上结果,笔者推测:多种环境雌激素联合暴露对水生动物精子发生和生殖功能的影响可能远大于雌激素效应相当的单种环境雌激素,具有更强的生态风险。鉴于水体中环境雌激素总是以混合物的形式存在^[34-35],在环境风险评估中用各种雌激素的效应及简单的叠加无法反映水体中多种环境雌激素的真实效应;因此,在有关环境雌激素对水生动物影响的研究中,更应关注某一水体多种环境雌激素对水生动物造成的实际影响,且考虑到它们存在产生叠加效应的可能。此外,还应深入研究单种环境雌激素产生效应的分子通路,并以此为基础构建多种环境雌激素效应的叠加模型,这将为水环境风险评估提供有力依据。

参考文献:

- [1] WHITEHEAD S A, RICE S. Endocrine-disrupting chemicals as modulators of sex steroid synthesis[J]. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism*, 2006, 20(1): 45-61.
- [2] 贾向阳, 刘智皓, 李英文, 等. EDCs 对鱼类种群与生物多样性的影响[J]. *水生态学杂志*, 2012, 33(4): 147-152.
JIA X Y, LIU Z H, LI Y W, et al. The impact of EDCs on fish population and biodiversity[J]. *Journal of Hydroecology*, 2012, 33(4): 147-152.
- [3] de WAAL P P, LEAL M C, GARCÍA-LÓPEZ A, et al. Oestrogen-induced androgen insufficiency results in a reduction of proliferation and differentiation of spermatogonia in the zebrafish testis[J]. *Journal of Endocrinology*, 2009, 202(2): 287.
- [4] 谭号, 李英文, 尹盼, 等. 己烯雌酚抑制斑马鱼精子发生及其可能的分子机制[J]. *水生生物学报*, 2015(2): 331-338.
TAN H, LI Y W, YIN P, et al. Mechanism underlying diethylstilbestrol-induced inhibition of spermatogenesis in zebrafish (*Danio rerio*) [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2015, 39(2): 331-338.
- [5] 尹盼, 张群芳, 李英文, 等. EE2 和 Flu 影响斑马鱼精巢发育和精子发生的差异性机制[J]. *重庆师范大学学报(自然科学版)*, 2016, 33(4): 15-21.
YIN P, ZHANG Q F, LI Y W, et al. Differential mechanisms of 17 α -ethinylestradiol and flutamide on spermatogenesis of male zebrafish (*Danio rerio*) [J]. *Journal of Chongqing Normal University (Natural Science)*, 2016, 33(4): 15-21.
- [6] DEPIEREUX S, LIAGRE M, DANIS L, et al. Intersex occurrence in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) male fry chronically exposed to ethinylestradiol[J]. *Plos One*, 2014, 9(7): e98531.
- [7] LANGE A, PAULL G C, COE T S, et al. Sexual reprogramming and estrogenic sensitization in wild fish exposed

- to ethinylestradiol[J]. *Environmental Science & Technology*, 2009, 43(4):1219-1225.
- [8] 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.
- [9] URBATZKA R, ROCHA E, REIS B, et al. Effects of ethinylestradiol and of an environmentally relevant mixture of xenoestrogens on steroidogenic gene expression and specific transcription factors in zebrafish[J]. *Environmental Pollution*, 2012, 164(1):28-35.
- [10] PRADHAN A, OLSSON P E. Inhibition of retinoic acid synthesis disrupts spermatogenesis and fecundity in zebrafish[J]. *General & Comparative Endocrinology*, 2015, 217/218:81.
- [11] LIVAK K J, SCHMITTGEN T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-delta delta C(T)} method[J]. *Methods*, 2001, 25(4):402-408.
- [12] 黄晔, NP, BPA 和 B[a]P 联合暴露对斑马鱼 (*Danio rerio*) 体内雌激素/抗雌激素效应的研究[D]. 上海: 东师范大学, 2008.
- HUANG Y. Study on combined estrgen/anti-estrogen effect of NP, BPA and B[a]P in zebrafish (*Danio rerio*) [D]. Shanghai: East China Normal University, 2008.
- [13] PAULPRASANTH 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.
- [14] YANG L, LIN L, WENG S, et al. Sexually disrupting effects of nonylphenol and diethylstilbestrol on male silver carp (*Carassius auratus*) in aquatic microcosms[J]. *Ecotoxicology & Environmental Safety*, 2008, 71(2):400.
- [15] 沈万赞, 周忠良, 李祥军. 双酚 A 和壬基酚长期暴露对斑马鱼繁殖的影响[J]. *水产学报*, 2007, 31(B09):59-64.
- SHEN W Y, ZHOU Z L, LI X J. Effects of long term exposure to bisphenol A and nonylphenol on the reproduction of zebrafish (*Danio rerio*) [J]. *Journal of Fisheries of China*, 2007, 31(B09):59-64.
- [16] 吴玲玲, 明玺, 陈玲, 等. 长江口水域菲含量及对斑马鱼组织结构的影响[J]. *环境科学与技术*, 2007, 30(7):13-15.
- WU L L, MING X, CHEN L, et al. Phenanthrene in waters of the Yangtze estuary and its histopathological effect on zebrafish [J]. *Environmental Science & Technology*, 2007, 30(7):13-15.
- [17] 钟雪萍, 徐盈, 梁勇, 等. 稀有鮰鲫生命早期的己烯雌酚暴露对生长发育与繁殖的影响[J]. *水生生物学报*, 2005, 29(6):667-672.
- ZHONG X, XU Y, LIANG Y, et al. Effects of diethylstilbestrol exposure in early life stage on development and reproduction in rare minnow, *Gobiocypris rarus* [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2005, 29(6):667-672.
- [18] 尹德玉, 汝少国, 田华. 环境内分泌干扰物对鱼类性别决定的影响研究进展[J]. *生态毒理学报*, 2009, 4(4):467-474.
- YIN D Y, RU S G, TIAN H. Advances in effects of endocrine disrupting chemicals on sex determination of fish [J]. *Asian Journal of Ecotoxicology*, 2009, 4(4):467-474.
- [19] MIURA T, YAMAUCHI K, TAKAHASHI H, et al. Hormonal induction of all stages of spermatogenesis in vitro in the male Japanese eel (*Anguilla japonica*) [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1991, 88(13):5774-5778.
- [20] 周雯伊, 黄海, 尹绍武, 等. 人工诱导花鳗鲡的精巢发育成熟及其精子的生物学特性[J]. *水产学报*, 2009, 33(1):53-59.
- ZHOU W Y, HUANG H, YIN S W, et al. Artificial induction of testicular maturation and biological character of spermatozoa in marble eels (*Anguilla marmorata*) [J]. *Journal of Fisheries*, 2009, 33(1):53-59.
- [21] 刘晓丽, 汪奇, 贾林芝, 等. 壬基酚对斑马鱼精巢组织及性激素合成酶基因表达的影响[J]. *环境科学学报*, 2011, 31(11):2523-2529.
- LIU X L, WANG Q, JIA L Z, et al. Alterations in testicular histology and the m RNAs of enzymes responsible for sex steroid synthesis in the zebrafish *Danio rerio* exposed to nonylphenol [J]. *Acta Scientiae Circumstantiae*, 2011, 31(11):2523-2529.
- [22] 宋海霞, 翁幼竹, 方永强. 17β-雌二醇激发鳗早期精子发生的作用机制[J]. *中国水产科学*, 2010, 17(6):1192-1199.
- SHONG H X, WENG Y Z, FANG Y Q. Stimulating mechanism of estradiol-17β in early spermatogenesis of grey mullet, *Mugil cephalus* [J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2010, 17(6):1192-1199.
- [23] 陈江. 027 雌激素和精子发生[J]. *环境卫生学杂志*, 2003, 30(2):74-79.
- CHEN J. Estrogen and spermatogenesis [J]. *Foreign Medical Sciences (Section of Hygiene)*, 2003, 30(2):74-79.
- [24] BYLANDER A. Progesterone's effect on factors that influence gamete transport in the fallopian tube [D]. Gothenburg, Sweden: University of Gothenburg, 2014.
- [25] LIU G, LUO F, SONG Q, et al. Blocking of progestin action disrupts spermatogenesis in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) [J]. *Journal of Molecular Endocrinology*, 2014, 53(1):57-70.
- [26] UEDA H, KAMBEGAWA A, NAGAHAMA Y. Involvement of gonadotrophin and steroid hormones in spermiation in the amago salmon, *Oncorhynchus rhodurus*, and

- goldfish, *Carassius auratus* [J]. General & Comparative Endocrinology, 1985, 59(1): 24-30.
- [27] SAKAI N, UEDA H, SUZUKI N, et al. Steroid production by amago salmon (*Oncorhynchus rhodurus*) testes at different development stages [J]. General & Comparative Endocrinology, 1989, 75(2): 231.
- [28] KOUBOVA J, MENKE D B, ZHOU Q, et al. Retinoic acid regulates sex-specific timing of meiotic initiation in mice [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2006, 103(8): 2474-2479.
- [29] SWAIN A. Sex determination; time for meiosis? the gonad decides [J]. Current Biology, 2006, 16(13): R507-R509.
- [30] SMITH C A, ROESZLER K N, BOWLES J, et al. Onset of meiosis in the chicken embryo; evidence of a role for retinoic acid [J]. BMC Developmental Biology, 2008, 8(1): 85.
- [31] WALLACIDES A, CHESNEL A, CHARDARD D, et al. Evidence for a conserved role of retinoic acid in urodele amphibian meiosis onset. [J]. Developmental Dynamics, 2009, 238(6): 1389-1398.
- [32] FENG R, FANG L, CHENG Y, et al. Retinoic acid homeostasis through *aldh1a2* and *cyp26a1* mediates meiotic entry in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) [J]. Scientific Reports, 2014, 5: 10131.
- [33] 蒋汶洸. RA 在硬骨鱼类减数分裂起始中作用的初步研究 [D]. 重庆: 西南大学, 2012.
- JIANG W T. The role of RA in teleosts meiosis onset [D]. Chongqing: SouthWest University, 2012.
- [34] 李亚琳. 北方山溪鲵精巢中性类固醇激素的免疫细胞化学研究 [J]. 西北农业学报, 2008, 17(1): 27-30.
- LI Y L. A Study on immunocytochemistry of sex steroid hormones of testis in *Batrachuperus tibetanus* [J]. Journal of Northwest Agriculture, 2008, 17(1): 27-30.
- [35] 刘姗姗. 环境雌激素对小鼠睾丸支持细胞的影响及分子机制的研究 [D]. 哈尔滨: 东北农业大学, 2008.
- LIU S S. A study of effect and molecular mechanism on male mouse sertoli cells induced by environmental estrogen [D]. Harbin: Northeast Forestry University, 2008.

Animal Sciences

Long-Term Exposure to Environmental Relevant Levels of Environmental Estrogens Induced Arrested Spermatogenesis in Zebrafish Adults

WANG Yaqin¹, WANG Deshou², LI Yingwen¹, LIU Zhihao¹

(1. Chongqing Engineering Research Center of Bioactive Substances,

Chongqing Key Laboratory of Animal Biology, Chongqing Normal University, Chongqing 401331;

2. Key Laboratory of Freshwater Fish Reproduction and Development (Ministry of Education), Southwest University, Chongqing 400715, China)

Abstract: [Purposes] To investigate effect of long-term exposure to environmental estrogens on spermatogenesis in zebrafish. [Methods] Environmentally-relevant concentrations of E2, EE2, DES, 4-t-OP, 4-NP, and BPA in mixture and single dose of EE2 (5.65 ng · L⁻¹) were exposed to zebrafish male adults for 60 days. [Findings] Single dose of EE2 exposure did not statistically significant gonadosomatic index, testis weight, sperm count and histological structure of the fish testis. The mixture of estrogens altered the sperm count, compared with the control group, the sperm count is not statistically significant ($p < 0.05$), and the testicular structure of the fish. Single dose of EE2 significantly up-regulated the mRNA levels of *20β-hsd* and *cyp26a1*, while mixture of estrogens significantly altered mRNA levels of genes involved in steroidogenesis, meiotic initiation and meiotic regulation. [Conclusions] These results revealed much stronger actual estrogenic effect of the combined estrogens than the total estrogenic effect of each estrogen. Therefore, combined mixture of environmental estrogens may have greater reproductive risk than a single environmental estrogen.

Keywords: environmental estrogens; long-term combined exposure; zebrafish; spermatogenesis; meiosis; gene expressions

(责任编辑 方 兴)