

低剂量镉暴露对雄性斑马鱼生殖内分泌的干扰*

安晶晶, 谢冬梅, 李英文, 陈启亮

(重庆师范大学 生命科学学院 重庆市高校动物生物学重点实验室, 重庆 401331)

摘要:【目的】评估低剂量镉(Cd)暴露对成年雄性斑马鱼(*Danio rerio*)生殖内分泌的影响。【方法】将成年雄性斑马鱼暴露于质量浓度为 $5 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 镉离子(Cd^{2+})30 d后,分析精巢组织学结构、血浆11-酮基睾酮(11-KT)质量浓度、下丘脑-垂体-性腺(HPG)轴以及减数分裂关键基因转录水平的变化。【结果】与对照组相比,Cd暴露组精巢组织出现早期生殖细胞增多、精子数量减少和空隙等变化;血浆11-KT质量浓度与对照组相比有统计学意义上的增加($p < 0.05$);此外,Cd暴露上调了视黄酸合成酶基因 *aldh1a2* 和 HPG 轴关键基因 *gnrh2*, *fsh β* , *lh β* , *fshr*, *lhr*, *ar* 的表达水平,下调了联合复合体蛋白3基因 *syncp3* 的表达水平,这些差异具有统计学意义($p < 0.05$),而 HPG 轴关键基因 *gnrh3*、DNA 减数分裂重组酶1基因 *dmcl* 和视黄酸降解酶基因 *cyp26b1* 的表达水平与对照组相比没有统计学意义上的差异。【结论】低剂量 Cd 暴露通过调节 HPG 轴和减数分裂关键基因的表达水平干扰成年雄性斑马鱼生殖内分泌。

关键词: 斑马鱼; 低剂量镉暴露; HPG 轴; 减数分裂; 生殖内分泌

中图分类号: Q175

文献标志码: A

文章编号: 1672-6693(2019)02-0024-06

镉(Cd)是一种非必需有毒重金属,对人体健康有严重危害^[1]。近些年来工业的快速发展导致水环境中 Cd 污染越来越严重,对水生生态系统构成威胁^[2]。鱼类是水生生态系统的重要组成部分,它们的内分泌系统与其他脊椎动物相似,因而被作为检测环境危害的指示生物^[3]。由于 Cd 具有生物难降解性,暴露在 Cd 污染水体中的鱼类的组织或器官容易富集 Cd,进而导致体内的生物学反应受到干扰^[4-5],甚至导致生殖发育受到影响^[6-8]。减数分裂是有性生殖的基础和物种保持稳定性的前提,具有重要的生物学意义;而鱼类的性腺发育和配子形成受到下丘脑-垂体-性腺(HPG)轴的调节^[9]。已有研究表明,Cd 暴露可损害鱼类生殖腺并影响配子发生^[6,10-11]。中国渔业水质标准对水体中 Cd 的质量浓度限值为 $5 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$,因此目前许多研究主要关注高于这一限值的 Cd 暴露诱导的鱼体损伤,而关于 $5 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ Cd 暴露对鱼体生殖内分泌的影响研究较少。

斑马鱼(*Danio rerio*)具有繁殖周期短、体外受精、胚胎透明等优点^[12],是毒性研究的理想模式动物^[3]。在本研究中,将成年雄性斑马鱼分别暴露在含 0(对照)和 $5 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 镉离子(Cd^{2+})的水体中 30 d,随后观察精巢组织学结构,检测血浆 11-酮基睾酮(11-KT)质量浓度、HPG 轴及减数分裂关键基因的表达水平,从而了解低剂量 Cd 暴露对鱼类生殖的潜在影响,为重金属对鱼类的风险评估提供基础资料。

1 材料与方法

1.1 材料和试剂

实验用成年雄性斑马鱼(AB 系,120 d 龄)购自国家斑马鱼资源中心;分析纯 CdCl_2 购自上海国药集团;11-KT 酶联免疫吸附测定试剂盒购自 Cayman 公司;RNAiso plus 以及反转录试剂盒购自 TaKaRa 公司。

1.2 Cd 暴露处理

实验鱼在室内恒温(约 $28 \text{ }^\circ\text{C}$)循环水养殖系统中暂养并适应 14 d 后,挑选 120 尾规格一致、体质量为 $(0.34 \pm 0.03) \text{ g}$ 的健康雄鱼,放入规格一致($50 \text{ cm} \times 20 \text{ cm} \times 30 \text{ cm}$)的 6 个缸中,每缸 20 尾,每缸盛水 20 L。其

* 收稿日期:2018-09-26 修回日期:2018-11-21 网络出版时间:2019-03-15 07:00

资助项目:重庆市基础与前沿研究计划项目(No. cstc2015jcyjA80012);重庆师范大学校级基金项目(No. 15XLB012);重庆师范大学研究生科研创新项目(No. YKC17009)

第一作者简介:安晶晶,女,研究方向为水生毒理学,E-mail:annjingjing947@163.com;通信作者:陈启亮,男,副教授,博士,E-mail:xncql@126.com

网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1165.N.20190315.0056.002.html>

中 3 个缸的实验鱼为对照组,驯养水体中 Cd^{2+} 质量浓度为 0;其余 3 个缸的实验鱼为 Cd 暴露组,驯养水体中加入预先配好的 CdCl_2 母液,使 Cd^{2+} 质量浓度为 $5 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。处理时间为 30 d。实验期间,每日喂食 3 次商业饲料,并更换缸中 1/2 体积的水,同时 Cd 暴露组驯养水体中还补充相应的 CdCl_2 母液以保证 Cd^{2+} 质量浓度维持在 $5 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。实验期间两个组的水温、溶解氧质量浓度和 pH 分别为 $(28 \pm 0.5) \text{ }^\circ\text{C}$, $(6.84 \pm 0.45) \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 7.70 ± 0.23 ,光照周期为 14 h 光照 : 10 h 黑暗。

1.3 指标测定

1.3.1 组织学分析 实验处理结束后取材,每缸随机取出 3 尾实验鱼,用 $0.1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 MS-222 进行麻醉后,取出精巢组织置于波恩氏液中固定 24 h。固定材料经梯度乙醇溶液中脱水并包埋于石蜡中,经 $5 \mu\text{m}$ 矢状切片和苏木精-伊红(HE)染色,置于徕卡仪器有限公司生产的 UB203I 型光学显微镜下观察并拍照。

1.3.2 11-KT 质量浓度测定 每缸随机取 10 尾实验鱼,采用断尾法取血。将血液置于含有肝素钠的离心管中,并将 10 尾鱼的血浆样本合并为 1 个测定样品。将样品以 $1000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 的速度于 $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 下离心 10 min,取上清液以 $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ 保存,之后用于 11-KT 质量浓度测定。11-KT 质量浓度测定方法严格按照 11-KT 酶联免疫吸附测定试剂盒说明书进行。

1.3.3 基因表达分析 每缸随机取 3 尾实验鱼,用 $0.1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 MS-222 麻醉后,立即取出脑和精巢置于装有 1 mL RNAiso plus 试剂的离心管中,液氮速冻后保存于 $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ 。参照 Chen 等人^[13]的方法,通过实时荧光定量 PCR (qPCR)检测基因的表达水平。样品总 RNA 提取按照 RNAiso plus 试剂盒说明书进行操作。用核酸检测仪检测总 RNA 的 $A_{260/280}$ 值为 $1.8 \sim 2.0$,并用质量分数为 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测总 RNA 的完整性。然后,取总 RNA 用 PrimeScript[®] RT 试剂盒 (TaKaRa) 进行逆转录合成 cDNA,并以此为模板使用 SYBR Premix Ex Taq[™] 试剂盒 (TaKaRa) 进行 qPCR 分析。qPCR 的反应条件为: $95 \text{ }^\circ\text{C}$ 预变性 30 s; 40 个循环的 $95 \text{ }^\circ\text{C}$ 变性 5 s, $60 \text{ }^\circ\text{C}$ 退火 30 s, $72 \text{ }^\circ\text{C}$ 延伸 30 s。相关引物由擎科生物公司合成,引物序列具体信息见表 1。以 *efl α* 作为内参,用 $2^{-\Delta\Delta C_T}$ 方法进行定量结果分析^[14]。

1.4 数据分析

所有实验数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示。使用 SPSS 17.0 软件,采用独立样本 *t* 检验检测 Cd 暴露组和对照组数据的差异;当 $p < 0.05$ 时,差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 精巢组织学结构

结果显示,在对照组斑马鱼的精巢中,可见生精小管内充满了早期生殖细

表 1 qPCR 引物

Tab. 1 Primers used for qPCR

| 基因 | 引物序列 | Genbank 序列号 |
|-------------------------------|-----------------------------------|--------------|
| <i>gnrh2</i> | F: 5'-GGTCTCACGGCTGGTATCCT-3' | NM181439 |
| | R: 5'-TGCCTCGCAGAGCTTCACT-3' | |
| <i>gnrh3</i> | F: 5'-TGGTCCAGTTGTTGCTGTTAGTT-3' | NM182887 |
| | R: 5'-CCTGAATGTTGCCTCCATTTC-3' | |
| <i>fshβ</i> | F: 5'-TGAGCGCAGAATCAGAATG-3' | AY424303 |
| | R: 5'-AGGCTGTGGTGTGCGATTGT-3' | |
| <i>lhβ</i> | F: 5'-GGACACGCAGAGACACTT-3' | AY424304 |
| | R: 5'-CACCGATACCGTCTCATT-3' | |
| <i>ar</i> | F: 5'-GCGAATGGATGGATGTAAC-3' | EF153102 |
| | R: 5'-TCATCAGAGCAGATTAGGC-3' | |
| <i>fshr</i> | F: 5'-ATGGATCCACTCGCTCTTT-3' | AY278107 |
| | R: 5'-GCATTACTGGGAATCCTCTCTAT-3' | |
| <i>lhr</i> | F: 5'-AAGGACGAGTCGCTGAAAC-3' | AY714133 |
| | R: 5'-GATTCATTGTGGCGTATTCA-3' | |
| <i>cyp11b2</i> | F: 5'-CTGGGCCACACATCGAGAG-3' | NM001080204 |
| | R: 5'-AGCGAACGGCAGAAATCC-3' | |
| <i>aldh1a2</i> | F: 5'-TCCAGGAAGCCGACAAGG-3' | NM131850 |
| | R: 5'-CCAGGGTAGCAAGGTAAGCA-3' | |
| <i>cyp26b1</i> | F: 5'-TGTCAGGAGGATACAGAATAGC-3' | NM212666 |
| | R: 5'-AGCCGAGGTGTCATGGGT-3' | |
| <i>sycp3</i> | F: 5'-GCGTTTGTGGTTGGATT-3' | NM001040350 |
| | R: 5'-CACCGTCAGTATGTTTGG-3' | |
| <i>dmcl</i> | F: 5'-GAGGCTGAAGGACATCG-3' | NM 001020782 |
| | R: 5'-TCCAGCCGTAATGGCAA-3' | |
| <i>eflα</i> | F: 5'-GATCACTGGTACTTCTCAGGCTGA-3' | FJ915061 |
| | R: 5'-GGTGAAAGCCAGGAGGGC-3' | |

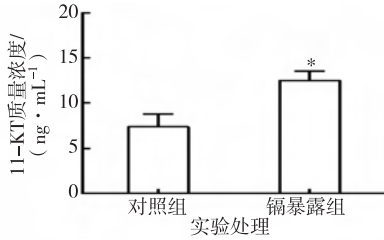
胞(精原细胞及精母细胞)和大量的精子(封二彩图 1a);而 Cd 暴露组可见早期生殖细胞增多、精子数量减少和空隙出现(封二彩图 1b)。

2.2 11-KT 质量浓度

Cd 暴露对斑马鱼血浆中 11-KT 质量浓度的影响如图 2 所示,可见 Cd 暴露组 11-KT 质量浓度比对照组更高,两者差异具有统计学意义($p < 0.05$)。

2.3 HPG 轴相关基因表达水平

如图 3a, b 所示,与对照组脑、精巢组织中的 HPG 轴相关基因表达水平相比, Cd 暴露组的 *gnrh2*, *fsh β* , *lh β* , *fshr*, *lhr*, *cyp11b2* 及 *ar* 基因表达水平均明显上调,且相关差异均具有统计学意义($p < 0.05$);而两个组的 *gnrh3* 基因表达水平无统计学意义上的差异。

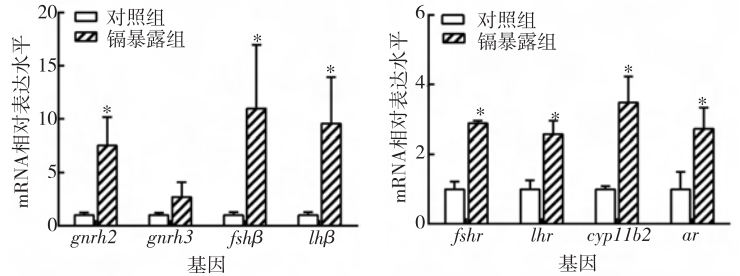


注: * 表示与对照组数据相比具有统计学意义上的差异($p < 0.05$),下同

图 2 Cd 暴露对雄性斑马鱼血浆 11-KT 质量浓度的影响

Fig. 2 Effects of cadmium exposure on

plasma 11-KT mass concentration of male zebrafish



a 对脑组织 HPG 轴相关基因的影响

b 对精巢组织 HPG 轴相关基因的影响

图 3 Cd 暴露对雄性斑马鱼 HPG 轴相关基因表达水平的影响

Fig. 3 The effect of cadmium exposure on the expression level of

HPG axis related genes in male zebrafish

2.4 减数分裂相关基因表达水平

图 4 显示,与对照组的减数分裂相关基因表达水平相比, Cd 暴露组的 *aldh1a2* 基因表达水平明显上调, *sy-cp3* 基因表达水平明显下调,且与对照组的这两个基因的表达水平相比均具有统计学意义上的差异($p < 0.05$);此外,两个组的 *dmc1* 和 *cyp26b1* 基因表达水平均无统计学意义上的差异。

3 讨论

研究表明, Cd 暴露会损伤鱼类的精巢组织。例如,将食蚊鱼(*Gambusia affinis*)分别在 5, 20, 100 和 500 nmol · L⁻¹ 的 Cd 暴露环境中处理 21, 35 和 56 d 后,精子数量明显减少^[15];剑尾鱼(*Xiphophorus hellerii*)在 Cd²⁺ 质量浓度分别为 100 和 500 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的水体中暴露 5 d,出现了生精小管退化、精子发生起始以及初级次级精母细胞聚集等现象^[16];此外, Kumari 等人^[17]对无须魮(*Puntius sarana*)进行质量浓度为 2 000 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 Cd 暴露 30 d,发现精小叶出现组织损伤。本研究中,可以观察到质量浓度为 5 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 Cd 暴露处理使得斑马鱼精子数量减少而早期生殖细胞增多,这表明低剂量 Cd 暴露可能阻碍成年雄性斑马鱼的精子发生。另外,与对照组相比 Cd 暴露组中斑马鱼的精巢组织出现许多空隙,这可能是由于精子数量减少所致。

HPG 轴是鱼类重要的神经内分泌系统,参与调节一系列生殖活动,促进和控制生殖细胞的起源、性别分化、性腺的发育和成熟^[18-19]。和其他脊椎动物一样,硬骨鱼类的精子发生受性激素的调节^[20],垂体促性腺激素刺激间质细胞产生雄激素,并最终控制精子发生和精子形成^[21-24]。在本研究中,与对照组相比, Cd 暴露组的 *gnrh2*, *fsh β* , *lh β* , *fshr* 和 *lhr* 基因的表达水平明显上调。因此, Cd 暴露可能促使斑马鱼体上调 *gnrh2* 基因表达,促进促性腺激素释放激素(GnRH)的合成和分泌,进而提高 *fsh β* 及 *lh β* 基因的转录水平,促进卵泡刺激素(FSH)及促黄

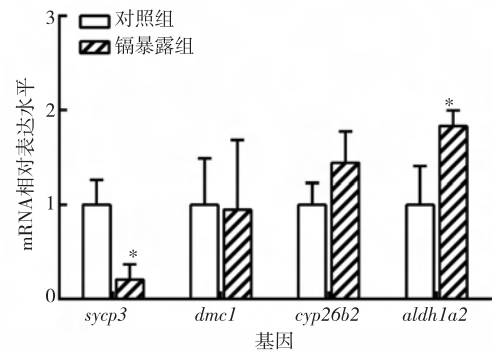


图 4 镉暴露对斑马鱼精巢减数分裂相关基因表达水平的影响

Fig. 4 The effect of cadmium exposure on the expression level of meiosis related genes in the testis of zebrafish

体生成素(LH)的合成和分泌,从而上调 *fshr* 及 *lhr* 基因的表达,最终促进性激素的合成。11-KT 是雄性硬骨鱼最主要的性激素^[25],本研究结果显示,与对照组相比,Cd 暴露组实验鱼血浆 11-KT 质量浓度明显上升,这与 Sellin 等人^[26]将雄性黑头呆鱼(*Pimephales promelas*)暴露于质量浓度为 $12.5 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 Cd^{2+} 中 21 d 后发现血浆 11-KT 质量浓度上升的结果相一致。类固醇合成酶基因 *cyp11b2* 在睾酮(T)转化为 11-KT 的过程中起着关键的调节作用。本研究中,与对照组相比,Cd 暴露导致实验鱼 *cyp11b2* 基因表达水平上调,可能促进了 T 向 11-KT 转化,从而最终导致实验鱼血浆中 11-KT 质量浓度上升,进而导致性激素受体基因 *ar* 表达水平升高。

雄鱼体内的 11-KT 在精子形成后期起着至关重要的作用^[27-28],血浆中 11-KT 质量浓度的上升可能会促进精子的成熟而引起精子数量增多。然而,这与本研究中组织学结构观察发现 Cd 暴露导致斑马鱼精巢中精子数量减少的结果相矛盾。这一方面可能与性激素和 HPG 轴形成的负反馈调节有关;而另一方面则可能是因为硬骨鱼和其他哺乳动物类似,生殖细胞的形成还受到减数分裂的调控^[29]。因此,本研究进一步检测了减数分裂中关键调控基因的表达水平。视黄酸的合成与降解则关系到减数分裂的起始时间^[29],它的含量变化由视黄酸-合成酶基因 *aldh1a2* 和视黄酸-降解酶基因 *cyp26a1* 的表达调控^[30]。硬骨鱼类中 *sycp3* 基因编码的联会复合体蛋白 3 和 *dmcl* 基因编码的 DNA 减数分裂重组酶 1 通常被认为是减数分裂前期标记物^[31-32],其中 *sycp3* 基因主要调节减数分裂细胞分裂,而 *dmcl* 基因对于减数分裂中染色体的同源联会起关键作用^[33-34]。在本研究中,与对照组相比,Cd 暴露组的 *aldh1a2* 基因表达水平明显上调,而两者的 *cyp26a1* 基因表达水平没有明显变化,这表明视黄酸在鱼体中的含量可能受到 *aldh1a2* 基因的调控而明显升高,进而导致减数分裂的起始加强^[35]。同时,Cd 暴露导致 *sycp3* 基因表达水平较对照组而言有明显下降,表明斑马鱼精子发生在减数分裂的早期阶段可能被阻断,从而引起早期生殖细胞增多和精子减少的组织学变化。因此,本研究表明,*aldh1a2* 基因上调和 *sycp3* 基因下调可能是 Cd 暴露导致精巢中早期生殖细胞增多而精子减少的重要原因。

综上所述,本研究结果表明,低剂量 Cd 暴露可通过调节 HPG 轴及减数分裂关键基因的表达水平引起斑马鱼精巢的组织学损伤和血浆雄激素质量浓度异常。尽管本研究所设 Cd 质量浓度符合国家渔业水质标准限值,但仍能干扰雄性斑马鱼的生殖内分泌。因此,低剂量 Cd 暴露对鱼类的生殖风险仍值得关注。

参考文献:

- [1] JIN Y, LIN Z, LIU F, et al. Embryonic exposure to cadmium (II) and chromium (VI) induce behavioral alterations, oxidative stress and immunotoxicity in zebrafish (*Danio rerio*) [J]. *Neurotoxicology and Teratology*, 2015, 48: 9-17.
- [2] MA W, WANG L, HE Y, et al. Tissue-specific cadmium and metallothionein levels in freshwater crab *Sinopotamon henanense* during acute exposure to waterborne cadmium [J]. *Environmental Toxicology*, 2008, 23(3): 393-400.
- [3] SPITSBERGEN J M, KENT M L. The state of the art of the zebrafish model for toxicology and toxicologic pathology research—advantages and current limitations [J]. *Toxicologic Pathology*, 2003, 31(suppl): 62-87.
- [4] 谢冬梅, 龚仕玲, 李英文, 等. 镉诱导斑马鱼肝脏的组织学损伤和氧化应激 [J]. *重庆师范大学学报(自然科学版)*, 2018, 35(4): 31-36.
XIE D M, GONG S L, LI Y W, et al. Cadmium induces histological damage and oxidative stress in the liver of zebrafish [J]. *Journal of Chongqing Normal University (Natural Science)*, 2018, 35(4): 31-36.
- [5] 梁晓敏, 曾凤, 张群芳, 等. 汞镉联合暴露对斑马鱼性腺组织学和抗氧化酶基因表达的影响 [J]. *重庆师范大学学报(自然科学版)*, 2018, 35(3): 58-63.
LIANG X M, ZENG F, ZHANG Q F, et al. Effects of combined exposure to mercury and cadmium on histology and the expression of antioxidative enzyme genes in gonads of zebrafish [J]. *Journal of Chongqing Normal University (Natural Science)*, 2018, 35(3): 58-63.
- [6] DIETRICH J, DIETRICH M, KOWALSKI K, et al. Exposure of rainbow trout milt to mercury and cadmium alters sperm motility parameters and reproductive success [J]. *Aquatic Toxicology*, 2010, 97(4): 277-284.
- [7] TILTON S C, FORAN C M, BENSON W H. Effects of cadmium on the reproductive axis of Japanese medaka (*Oryzias latipes*) [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 2003, 136(3): 265-276.
- [8] WITESKA M, JEZIEBSKA B, CHABER J. The influence of cadmium on common carp embryos and larvae [J]. *Aquaculture*, 1995, 129(1/2/3/4): 129-132.
- [9] ZHANG Q F, LI Y W, LIU Z H, et al. Reproductive toxicity of inorganic mercury exposure in adult zebrafish: histological damage, oxidative stress, and alterations of sex hormone and gene expression in the hypothalamic-pituitary-gonadal axis [J]. *Aquatic Toxicology*, 2016, 177: 417-424.
- [10] MEIER S, MORTON H C, ANDERSSON E, et al. Low-

- dose exposure to alkylphenols adversely affects the sexual development of Atlantic cod (*Gadus morhua*): acceleration of the onset of puberty and delayed seasonal gonad development in mature female cod[J]. *Aquatic Toxicology*, 2011, 105(1/2):136-150.
- [11] GEOFFROY-SIRAUDIN C, PERRARD M H, GHALAMOUN-SLAIMI R, et al. *Ex-vivo* assessment of chronic toxicity of low levels of cadmium on testicular meiotic cells[J]. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 2012, 262(3):238-246.
- [12] 刘昌盛, 穆宇, 杜久林. 斑马鱼在生命科学研究中的应用[J]. *生命科学*, 2007, 19(4):382-386.
LIU C S, MU Y, DU J L. Application of zebrafish in life science research[J]. *Life Science*, 2007, 19(4):382-386.
- [13] CHEN Y Y, CHAN K M. Regulation of vitellogenin (*vtg1*) and estrogen receptor (*er*) gene expression in zebrafish (*Danio rerio*) following the administration of Cd²⁺ and 2, 3, 7, 8- tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) [J]. *Chemosphere*, 2016, 147:467-476.
- [14] LIVAK K J, SCHMITTGEN T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the method[J]. *Methods*, 2001, 25(4):402-408.
- [15] 骆晓燕, 谢勇平, 方展强. 镉暴露对食蚊鱼生长发育的影响[J]. *天津农业科学*, 2013, 19(10):1-6.
LOU X Y, XIE Y P, FANG Z Q. Effects of cadmium exposure on the growth and development of mosquito fish [J]. *Tianjin Agricultural Science*, 2013, 19(10):1-6.
- [16] YÖNN D, AKBULUT C, KAYMAK G, et al. Histopathological effects of cadmium exposure on testis tissue of swordtail fish, *Xiphophorus helleri* (Pisces: Poeciliidae) [J]. *Fresenius Environmental Bulletin*, 2015, 24(6 A):2133-2137.
- [17] KUMARI M, DUTT N H G. Cadmium-induced histomorphological changes in the testis and pituitary gonadotrophic hormone secreting cells of the cyprinid *Puntius sarana* [J]. *Italian Journal of Zoology*, 1991, 58(1):71-76.
- [18] HACHFI L, COUVRAY S, SIMIDE R, et al. Impact of endocrine disrupting chemicals (EDCs) on hypothalamic-pituitary-gonad-liver (HPGL) axis in fish[J]. *World Journal of Fish and Marine Sciences*, 2012, 4(1):14-30.
- [19] ACHERMANN J C, JAMESON J L. Fertility and infertility: genetic contributions from the hypothalamic-pituitary-gonadal axis[J]. *Molecular Endocrinology*, 1999, 13(6):812-818.
- [20] MIURA T, MIURA C I. Molecular control mechanisms of fish spermatogenesis[J]. *Fish Physiology and Biochemistry*, 2003, 28(1/2/3/4):181-186.
- [21] BILLARD R, FOSTIER A, WEIL C, et al. Endocrine control of spermatogenesis in teleost fish[J]. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 1982, 39(1):65-79.
- [22] NAGAHAMA Y. Endocrine regulation of gametogenesis in fish[J]. *International Journal of Developmental Biology*, 2002, 38(2):217-229.
- [23] NAGAHAMA Y. Gonadal steroid hormones: major regulators of gonadal sex differentiation and gametogenesis in fish[C]//Norberg B, Kjesbu O S, Taranger G L, et al. Proceedings of the 6th international symposium on the reproductive physiology of fish; 2000 July 4-9. Bergen, Norway; John Grieg A/S, 2000:211-222.
- [24] SCHULZ R W, DE FRANCO A L R, LAREYRE J J, et al. Spermatogenesis in fish[J]. *General and Comparative Endocrinology*, 2010, 165(3):390-411.
- [25] BORG B. Androgens in teleost fishes[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology*, 1994, 109(3):219-245.
- [26] SELLIN M K, KOLOK A S. Cd exposures in fathead minnows; effects on adult spawning success and reproductive physiology[J]. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 2006, 51(4):594-599.
- [27] SCOTT A P, BYE V J, BAYNES S M, et al. Seasonal variations in plasma concentrations of 11-ketotestosterone and testosterone in male rainbow trout, *Salmo gairdnerii* Richardson[J]. *Journal of Fish Biology*, 1980, 17(5):495-505.
- [28] FOSTIER A, BILLARD R, BRETON B. Plasma 11-oxotestosterone and gonadotrophin in relation to the arrest of spermiation in rainbow trout (*Salmo gairdnerii*) [J]. *General and Comparative Endocrinology*, 1984, 54(3):378-381.
- [29] FENG R, FANG L, CHENG Y, et al. Retinoic acid homeostasis through *aldh1a2* and *cyp26a1* mediates meiotic entry in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) [EB/OL]. [2018-09-26]. https://www.researchgate.net/publication/276357510_Retinoic_acid_homeostasis_through_aldh1a2_and_cyp26a1_mediates_meiotic_entry_in_Nile_tilapia_Oreochromis_niloticus.
- [30] KAJIURA-KOBAYASHI H, KOBAYASHI T, NAGAHAMA Y. Cloning of cDNAs and the differential expression of A-type cyclins and Dmcl during spermatogenesis in the Japanese eel, a teleost fish[J]. *Developmental Dynamics*, 2005, 232(4):1115-1123.
- [31] YOSHIDA K, KONDOH G, MATSUDA Y, et al. The mouse *reca*-like gene *dmcl* is required for homologous chromosome synapsis during meiosis[J]. *Molecular Cell*, 1998, 1(5):707-718.
- [32] LAUE L, LEE M F, CHANG C F, et al. Conserved sex-specific timing of meiotic initiation during sex differentiation in the protandrous black porgy *Acanthopagrus schlegelii*

[EB/OL]. [2018-09-26]. <https://academic.oup.com/biolreprod/article/88/6/150,%201-13/2514346>.

[33] SYRJÄNEN J L, PELLEGRINI L, DAVIES O R. A molecular model for the role of *syncp3* in meiotic chromosome organisation[EB/OL]. [2018-09-26]. <https://elifesciences.org/articles/02963>.

[34] LI G, CAO Z, LAN D, et al. Spatial variations in grain size distribution and selected metal contents in the Xiamen bay, China[J]. *Environmental Geology*, 2007, 52(8): 1559-

1567.

[35] 张群芳, 尹盼, 李英文, 等. 多种环境雌激素低剂量联合处理诱导斑马鱼精子发生障碍[J]. *重庆师范大学学报(自然科学版)*, 2016, 33(3): 20-26.

ZHANG Q F, YIN P, LI Y W. Combined treatment of low dose of environment estrogens induced spermatogenic dysplasia in zebrafish[J]. *Journal of Chongqing Normal University (Natural Science)*, 2016, 33(3): 20-26.

Animal Sciences

The Interference of Low Dose of Cadmium Exposure on the Reproductive Endocrine of Male Zebrafish

AN Jingjing, XIE Dongmei, LI Yingwen, CHEN Qiliang

(Chongqing Key Laboratory of Animal Biology, College of Life Sciences, Chongqing Normal University, Chongqing 401331, China)

Abstract: [Purposes] To evaluate the effects of low dose cadmium exposure on reproductive endocrine of adult male zebrafish (*Danio rerio*). [Methods] Adult male zebrafish were exposed to $5 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ cadmium ion (Cd^{2+}) for 30 days, and the histological structure of testis, plasma mass concentration of 11-ketotestosterone (11-KT), hypothalamic-pituitary-gonad(HPG) axis, and transcriptional levels of key genes in meiosis were analyzed. [Findings] Compared with the control group, the testis tissue of the cadmium exposed group showed changes such as increase of early germ cells, decrease of sperm quantity and lacuna. Plasma 11-KT level increased compared with the control group and statistical significance ($p < 0.05$). In addition, cadmium exposure raised the expression of retinoic acid synthetase gene *aldh1a2* and HPG axis key gene *gnrh2*, *fsh β* , *lh β* , *fshr*, *lhr*, *ar* level, decreased the synaptonemal complex protein 3 *syncp3* gene expression level, the differences statistically significant ($p < 0.05$), while the HPG axis key gene *gnrh3*, DNA meiosis recombinant enzyme 1 gene *dmc1* and retinoic acid degradation enzyme gene *cyp26b1* were not statically different from that of the control group. [Conclusions] Low dose cadmium exposure interferes with the reproductive endocrine of adult male zebrafish by regulating the expression level of HPG axis and key genes of meiosis.

Keywords: zebrafish; low dose cadmium exposure; HPG axis; meiosis; reproductive endocrine

(责任编辑 方 兴)

(接正文20页)

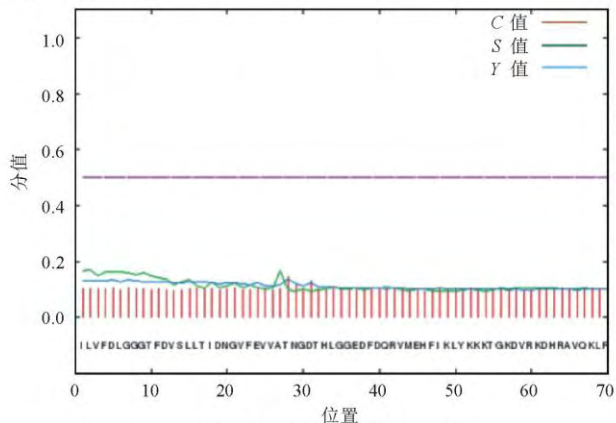


图4 鲫GRP78信号肽分析

Fig. 4 The signal peptide prediction of GRP78 in *C. auratus*

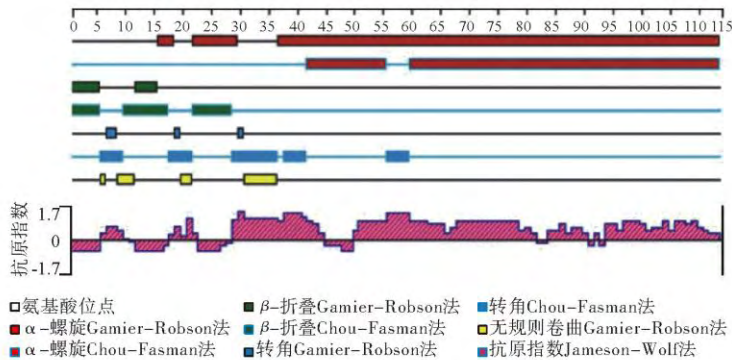
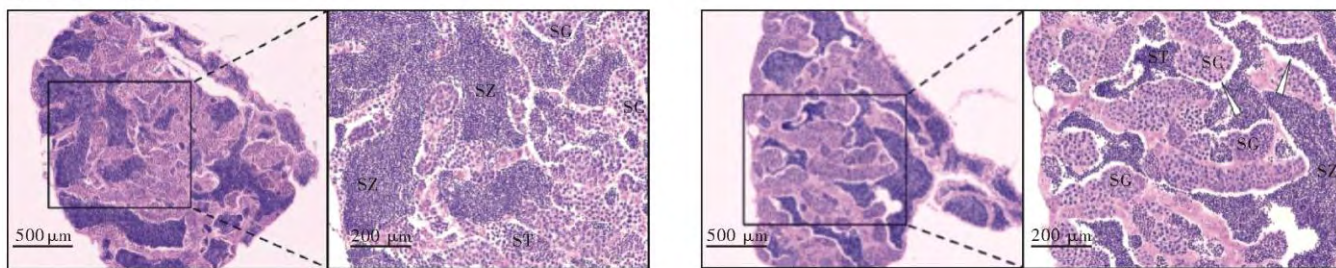


图5 鲫GRP78二级结构和抗原性预测

Fig. 5 The prediction of the secondary structure and the antigenicity of GRP78 in *C. auratus*

(接正文26页)



a 对照组精巢

b 镉暴露组精巢

注: SG为精原细胞; SC为精母细胞; SZ为精子; 白色三角符为空隙

图1 镉暴露对斑马鱼精巢组织学的影响

Fig. 1 Effects of cadmium exposure on the histology of zebrafish testis

(接正文45页)

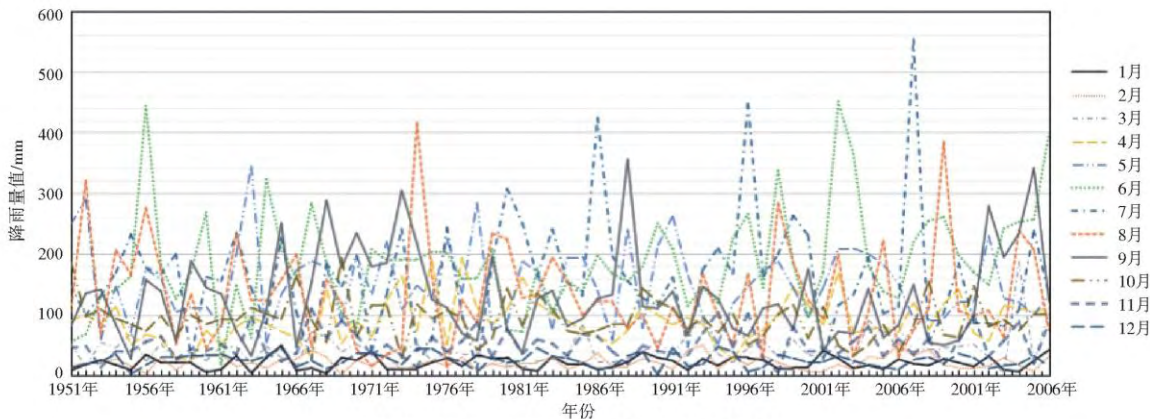


图2 1951—2016年重庆月均降雨量曲线

Fig. 2 Monthly rainfall curves of Chongqing from 1951 to 2016

(接正文135~136页)

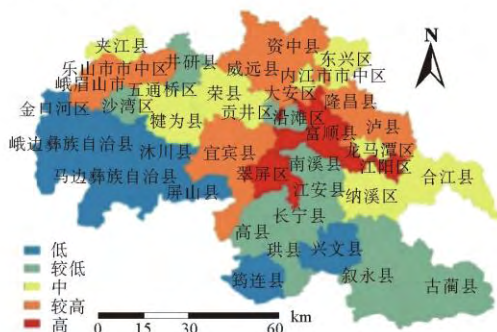


图1 川南城市群县域产业增长分享份额

Fig. 1 The share of industrial growth in the county area of southern Sichuan city

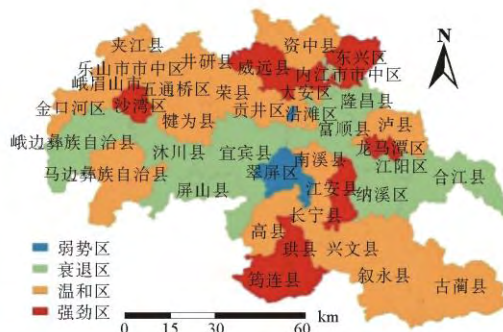


图3 川南城市群县域产业竞争力偏离份额

Fig. 3 The deviation of the industrial competitiveness of the county area in the southern Sichuan city group