

环境雌激素联合处理对雄性斑马鱼繁殖行为的影响*

张盈盈, 李英文, 刘智皓

(重庆师范大学 生命科学学院 水生态健康与环境安全研究中心, 重庆 401331)

摘要:为探究环境雌激素(environmental estrogens, EES)联合处理在环境剂量下对雄性斑马鱼(*Danio rerio*)繁殖行为的影响,设置对照组(水体中无EES)、EE2-low组(水体中含 $5.55 \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$ 乙炔基雌二醇(17α -ethinylestradiol, EE2))、EE2-high组(水体中含 $11.1 \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$ EE2)和EES组(水体中含 $62.2 \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$ 壬基酚、 $250 \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$ 双酚A、 $4.56 \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$ 雌酮、 $5.53 \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$ 雌二醇和 $39.6 \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$ 雌三醇,上述所有EES质量浓度均为环境剂量),对雄性斑马鱼连续进行EES暴露处理60 d,然后引入未经EES暴露处理的雌性斑马鱼与之进行配对繁殖,最后对它们与繁殖行为相关的指标进行比较。结果显示:与对照组相比,EE2-low组雌、雄性斑马鱼单独和同时进入产卵区的时间及追逐频次均无统计学意义上的差异,EES-high组和EES组雌、雄性斑马鱼的上述指标则均有统计学意义上的减少($p < 0.05$)。研究表明,多种环境剂量的EES联合处理与具有相同雌激素效应的 $5.55 \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$ EE2处理相比具有更强的生殖毒性,与 $11.1 \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$ EE2处理的生殖毒性基本相当并均能明显抑制雄性斑马鱼的繁殖行为。

关键词:环境雌激素;斑马鱼;繁殖行为

中图分类号:Q492.5

文献标志码:A

文章编号:1672-6693(2024)01-0020-06

环境雌激素(environmental estrogens, EES)是指环境中存在的可干扰动物内源激素合成、分泌、运输、结合、代谢等过程,激活或抑制内分泌系统功能的类雌激素样物质^[1-3]。EES按自身性质可被分为2个大类即天然雌激素和人工合成雌激素。天然雌激素包括雌酮(estrone, E1)、雌二醇(17β -estradiol, E2)、雌三醇(estriol, E3)等,常见的人工合成雌激素则包括乙炔基雌二醇(17α -ethinylestradiol, EE2)、壬基酚(4-nonylphenol, 4-NP)、双酚A(bisphenol A, BPA)等。EES来源多样、分布广泛且具有生物毒性^[4];它还具有滞留性、难降解等特性,在一定条件下可经食物链放大或被生物富集于体内^[5]。大量研究表明,EES最终汇聚于水体中,对水生生物造成极大影响^[6]。因此,EES对水生生物的影响已成为世界上内分泌干扰研究的热点问题之一^[7-8]。研究表明,EES会引起模式动物斑马鱼(*Danio rerio*)雄性性激素水平异常并破坏精子发生,从而造成雄性斑马鱼生殖障碍^[6,9];EES甚至会引起斑马鱼的神经功能障碍且导致斑马鱼死亡^[10-12]。

鱼类的成功繁殖不仅有赖于正常的配子发生,也有赖于雌雄之间的繁殖行为。鱼类的繁殖行为包括求偶、交配、育幼等一系列活动^[13]。繁殖行为由中枢神经系统和内分泌系统共同参与调控^[14]。有研究发现,性激素如雌激素、雄激素等能以负反馈方式调节鱼类的大脑神经系统,进而对雄性繁殖行为如求偶、追逐、引导、交配等进行调控^[14-15]。目前,关于EES的研究多集中于EES对鱼类配子生成的影响^[16-17],但有关EES影响鱼类繁殖行为的研究极少。斑马鱼的繁殖行为包括雌、雄鱼之间的身体触碰和追逐、雄鱼身体颤动、对雌鱼进行引导、雌鱼产卵等^[14,18-19]。鱼类的繁殖行为与温度、光周期等环境因子密切相关^[20-21]。有研究发现,较高剂量的持久性有机污染物如三丁基锡^[14]、菲^[22]、氨基酚^[18]、重金属^[23]等均能抑制雄性斑马鱼的繁殖行为。由于水体中的EES通常以低剂量多种混合物的形式存在,因此有关多种EES联合处理对鱼类繁殖行为的影响非常值得研究,但目前此类报道相当罕见^[5,8]。

基于上述研究背景,本研究将性成熟的雄性斑马鱼暴露于特定的EES混合物中60 d,并将经EES联合处理的雄性斑马鱼与正常雌性斑马鱼交配,通过分析斑马鱼在繁殖过程中的各项相关行为指标来探讨EES联合处理

* 收稿日期:2023-09-10 修回日期:2024-01-08 网络出版时间:2024-02-29T11:14

资助项目:国家自然科学基金青年科学基金项目(No. 31901183);重庆市自然科学基金项目(No. cstc2020jcyj-msxmX0805);重庆市基础科学与前沿技术研究专项基金(No. cstc2016cyjA1032);重庆市教育委员会科学技术研究项目(No. KJ1600308)

第一作者简介:张盈盈,女,研究方向为鱼类生理学,E-mail:2039464056@qq.com;通信作者:刘智皓,男,副教授,博士,E-mail:minenut@163.com

网络出版地址:https://link.cnki.net/urlid/50.1165.N.20240228.1309.002

对雄性斑马鱼繁殖行为的影响,以便为有关 EES 的生态毒理学和水生生物学研究提供参考。

1 实验材料与方法

1.1 实验试剂与设备

主要实验试剂中,纯度大于 95% 的 E1、E2、E3、EE2、4-NP 和 BPA 均为德国默克集团(Merck KGaA)的 Sigma-Adrich[®] 品牌产品,二甲基亚砜(DMSO)购自北京鼎国生物技术有限公司。主要实验设备为日本 Sony 公司出品的 SONY DSC-RX100 M4 型数码相机、从中山夜限商贸有限公司采购的 9 W 全光谱 LED 灯和湖南湘仪集团生产的 TG16-W 型常温离心机。

1.2 实验材料与处理

实验用 AB 系成年斑马鱼从武汉国家水生生物种质资源库国家斑马鱼资源中心购得。雌、雄性斑马鱼各 60 尾于恒温系统中以(28±0.5) °C 的水体温度、14 h 光照:10 h 黑暗的光照周期条件驯养 30 d。每 2 d 使用溶解氧质量浓度为 6.0~7.3 mg·L⁻¹、pH 为 7.1~7.8 的脱氯自来水更换 1 次驯养水体。每日 9:00、15:00 和 21:00 对实验鱼各喂食 1 次,每日总喂食量约为实验鱼体质量的 2%。

适应结束后,将雄性斑马鱼分为 4 个组,每组 15 尾;每组实验鱼放养于 3 个相同规格且装有 20 L 脱氯自来水(其中含质量分数为 0.001% 的 DMSO 助溶剂)鱼缸中,每缸 5 尾实验鱼。4 组实验鱼除 1 组作为对照组(水体中无 EES)外,其余 3 组分别为 EE2-low 组(水体中含 5.55 ng·L⁻¹ EE2)、EE2-high 组(水体中含 11.1 ng·L⁻¹ EE2)和 EES 组(水体中含 62.2 ng·L⁻¹ 4-NP、250 ng·L⁻¹ BPA、4.56 ng·L⁻¹ E1、5.53 ng·L⁻¹ E2 和 39.6 ng·L⁻¹ E3,总雌激素效应相当于水体中含 5.55 ng·L⁻¹ EE2)。文献[24]认为:淮河江苏段水体中的 BPA、4-NP 等 EES 为中高风险等级,已具有区域污染特征;然而截至目前还没有对整个淮河流域环境剂量 EES 对鱼类长期影响的研究。因此为了使实验更加贴近实际情况,本研究 EES 组中各类 EES 的质量浓度设置源自上述文献中提及的淮河流域各类 EES 的最高质量浓度。4 组实验鱼在各自对应的 EES 暴露条件下生活 60 d,此期间的饲养条件均与驯养期一致。

上述处理结束后,将各处理组中每尾雄性斑马鱼分别置于 15 个长×宽×高均为 25 cm×15 cm×20 cm 且均加入 3 L 脱氯自来水的繁殖鱼缸中。每缸放入 1 尾未经 EES 暴露的成年雌性斑马鱼与上述雄性斑马鱼进行繁殖配对:首先使用宽×高为 15 cm×8 cm 的带孔挡板对雌、雄性斑马鱼进行隔离以阻挡它们身体接触,并在鱼缸正上方固定数码相机,适应过夜。然后在第 2 日 8:00(雌、雄性斑马鱼已适应环境 16 h)撤掉挡板,将装有产卵石且长、宽均为 7 cm 的产卵盒置于鱼缸中一处固定位置作为产卵区,待斑马鱼适应 5 min 后用数码相机进行 40 min 的视频拍摄(图 1)。选取拍摄开始 5 min 后的连续 30 min 视频片段进行分析并统计相关实验数据。参照文献[13,21]确定本研究斑马鱼繁殖行为的统计指标有雌、雄性斑马鱼相互追逐频次以及两者同时/单独进入产卵区域的时间。

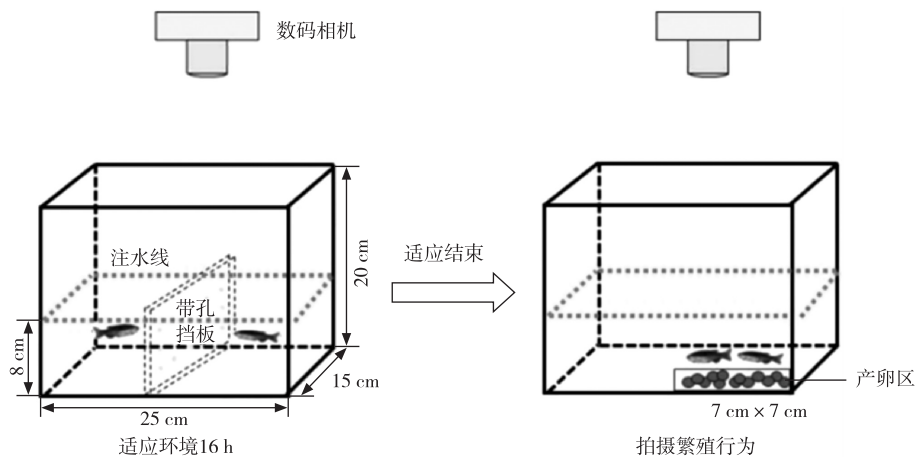


图 1 EES 暴露后对雌雄性斑马鱼进行繁殖行为实验示意图

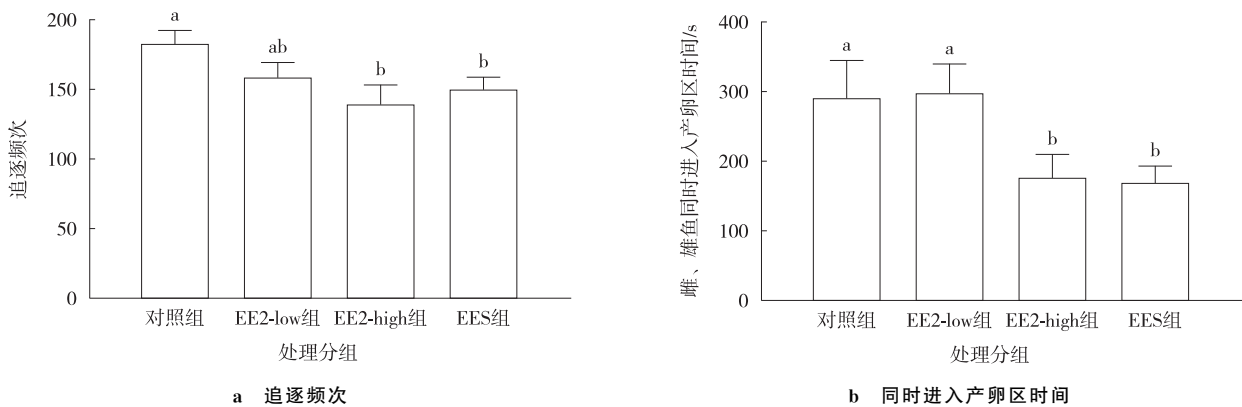
Fig. 1 Schematic representation of an experiment on reproductive behavior of female and male zebrafish exposed to environmental estrogens

1.3 数据统计

实验数据均以“平均值±标准误”表示。用 SPSS 26.0 软件对实验数据进行单因素方差分析后,用 Tukey 法对数据的组间差异进行多重比较;当 $p < 0.05$ 时,统计结果具有统计学意义。使用 Prism 6 软件绘制图表。

2 结果

图 2 显示:与对照组相比,EES 组和 EE2-high 组雌、雄性斑马鱼相互追逐频次有统计学意义上的减少,且两者同时进入产卵区的时间也有统计学意义上的减少($p < 0.05$);EE2-low 组与对照组的上述 2 个指标间没有统计学上的差异。此外,EES 组与 EE2-high 组的上述 2 个指标间也无统计学意义上的差异;但与 EE2-low 组相比,EE2-high 组雌、雄性斑马鱼同时进入产卵区的时间有统计学上的减少($p < 0.05$)。



注:不同小写字母表示组间差异具有统计学意义($p < 0.05$),下同。

图 2 EE2 和 EES 联合暴露后对雌、雄性斑马鱼互相追逐频次与同时进入产卵区时间的影响
Fig. 2 Effects of EE2 and EES combined exposure on the mutual chase frequency and the time of both male and female zebrafish in spawning area

由图 3 可知:与对照组相比,EE2-high 组和 EES 组斑马鱼雌、雄性单独进入产卵区的时间均有统计学意义上的减少($p < 0.05$);但 EE2-low 组与对照组的上述指标无统计学意义上的差异。此外,EE2-high 组与 EES 组雌、雄性斑马鱼单独进入产卵区的时间均无统计学意义上的差异;但与 EE2-low 组相比,EE2-high 组和 EES 组雌、雄性斑马鱼单独进入产卵区的时间均有统计学意义上减少($p < 0.05$)。

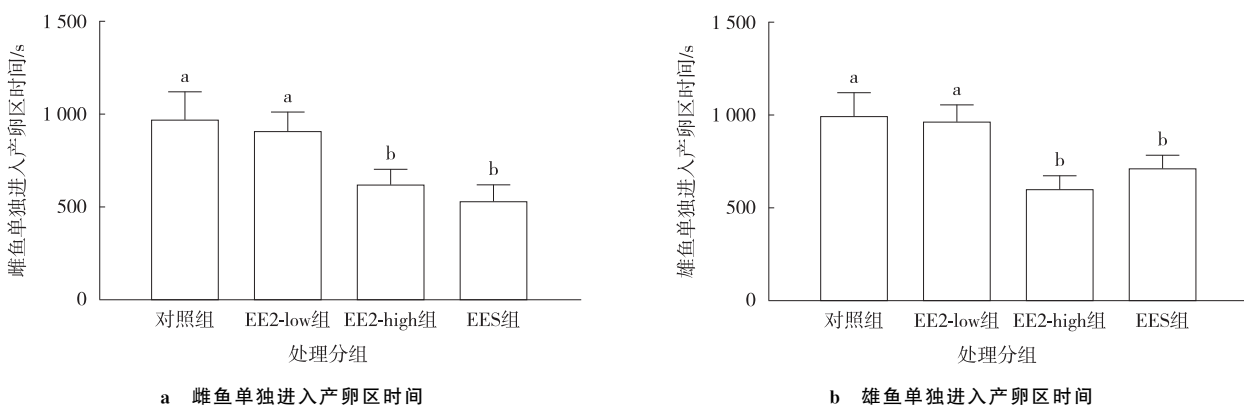


图 3 EE2 和 EES 联合暴露后对雌、雄性斑马鱼单独进入产卵区时间的影响

Fig. 3 Effects of EE2 and EES combined exposure on the time of male/female zebrafish entering spawning area

3 讨论

鱼类的繁殖活动是一个复杂的过程,两性正常的繁殖行为是繁殖成功的必要条件^[25]。本研究结果显示:与对照组相比,经过 $5.55 \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$ EE2 长期暴露后,虽然雄性斑马鱼的几项繁殖行为指标均无统计学意义上的变

化,但是仍然有减少趋势,可见上述较低剂量的 EE2 暴露仍然对雄性斑马鱼的繁殖行为产生了一定的抑制作用,这与 Baatrup 等人^[26]的研究结果一致。此外,经过 EES 联合处理和 $11.1 \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$ EE2 长期暴露后雌、雄性斑马鱼相互追逐频次与对照组相比有统计学意义上的减少($p < 0.05$),表明上述 2 种处理对斑马鱼的求偶行为具有明显的抑制作用。同时,EES 组和 EE2-high 组雄性斑马鱼单独进入产卵区时间及雌、雄性斑马鱼同时进入产卵区的时间与对照组均出现了统计学意义上的减少($p < 0.05$),表明这 2 种处理明显降低了雄性斑马鱼的繁殖意愿。由此可见,EES 联合处理和 $11.1 \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$ EE2 的长期暴露明显抑制了雄性斑马鱼的繁殖行为,且 EES 联合处理所产生的生殖毒性与 $11.1 \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$ EE2 处理基本相当。值得注意的是,基于淮河流域实际情况而设置的 EES 联合处理的总雌激素效应仅相当于 $5.55 \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$ EE2 处理(正好是 EE2-low 组的 EE2 暴露剂量),但是前者对雄性斑马鱼的繁殖行为却可造成与 $11.1 \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$ EE2 暴露效果基本一致的干扰效应。因此,本研究结果证实了环境剂量的 EES 联合处理能够明显损害雄性斑马鱼的繁殖行为。

有研究发现,EES 在细胞内可同时激活多种雌激素信号通路,这些信号通路还可能产生协同、拮抗、叠加等联合毒性效应^[27]。由此可见,多种 EES 共存时,其中作用机制比单一 EES 更为复杂。同时可以推测,本研究中环境剂量的多种 EES 所产生的更强生殖毒性可能与各种 EES 产生协同或叠加效应密切相关;并且它在生殖毒性方面的表现远高于单种 EES 的简单叠加,因此环境剂量的多种 EES 的潜在危害更加值得人们警惕。

此外,本研究结果也显示当未经 EES 暴露的雌性斑马鱼与经历 EES 暴露的雄性斑马鱼配对后,前者的繁殖行为也被明显抑制。有研究表明,雄性斑马鱼在繁殖过程中占据主导地位(如引导雌鱼进入产卵区)^[23]。因此,本研究中雌性斑马鱼繁殖行为发生变化可能是雄性斑马鱼繁殖行为发生改变的结果。另有研究发现,雌、雄性斑马鱼会通过嗅觉感知性外激素,雄鱼产生的性外激素能促进雌鱼排卵^[28]。因此,经历 EES 暴露后的雄性斑马鱼与未经 EES 暴露的雄性斑马鱼的性外激素可能存在一定差异,而这种差异也可能是导致与之配对的雌性斑马鱼繁殖行为发生变化的一项重要原因。

综上所述,本研究中环境剂量的 EES 联合处理明显抑制了雄性斑马鱼的繁殖行为,多种 EES 联合处理产生的生殖毒性远远高于与之雌激素效应相当的较低剂量的 EE2 处理,也远高于单种 EES 生殖毒性的简单叠加。自然水体中的 EES 虽含量较低,但种类丰富、分布广泛、影响深远,因此这类物质潜在的生殖毒性需要引起人们的注意。

参考文献:

- [1] 王亚东,陈小玉. 环境雌激素与人类健康[J]. 河南预防医学杂志,2003,14(1):54-59.
WANG Y D, CHEN X Y. Environmental estrogen and human health[J]. Henan Journal of Preventive Medicine, 2003, 14(1): 54-59.
- [2] 宋丹. 环境雌激素研究进展[J]. 广东化工,2011,38(12):192-193.
SONG D. Research progress of environmental estrogens [J]. Guangdong Chemical Industry, 2011, 38(12): 192-193.
- [3] KAVLOCK R J. Overview of endocrine disruptor research activity in the United States[J]. Chemosphere, 1999, 39(8): 1227-1236.
- [4] 季晓亚,李娜,袁圣武,等. 环境雌激素生物效应的作用机制研究进展[J]. 生态毒理学报,2017,12(1):38-51.
JI X Y, LI N, YUAN S W, et al. Research progress in the mechanisms for biological effects of environmental estrogens[J]. Asian Journal of Ecotoxicology, 2017, 12(1): 38-51.
- [5] 胡媛媛. 典型内分泌干扰物的鱼类生物蓄积[D]. 上海:华东师范大学,2015.
HU Y Y. Bioaccumulation of typical endocrine disruptors in fish[D]. Shanghai: East China Normal University, 2015.
- [6] 王雅琴. 雌激素在斑马鱼精子发生中的作用及内在机制[D]. 重庆:重庆师范大学,2020.
WANG Y Q. The role and mechanisms of estrogen in spermatogenesis of zebrafish[D]. Chongqing: Chongqing Normal University, 2020.
- [7] 孙昊婉. 水环境中雌二醇的光降解行为与机制探究[D]. 北京:北京林业大学,2017.
SUN H W. Photodegradation behaviors and mechanism of 17β -estradiol in water environment[D]. Beijing: Beijing Forestry University, 2017.
- [8] 岳宗豪,赵欢,周一兵. 酚类环境雌激素对水生生物毒性效应的研究进展[J]. 生态毒理学报,2014,9(2):205-212.
YUE Z H, ZHAO H, ZHOU Y B. Research progress in toxic effects of phenolic environmental estrogens on aquatic organisms [J]. Asian Journal of Ecotoxicology, 2014, 9(2): 205-212.
- [9] 莫东灿,刘柳余,李肖玲,等. 模式生物斑马鱼在卒中研究中的应用[J]. 中国卒中杂志,2022,17(5):548-552.

- MO D C, LIU L Y, LI X L, et al. Application of zebrafish model organism in stroke research[J]. Chinese Journal of Stroke, 2022, 17(5): 548-552.
- [10] ZHENG R Q, ZHANG Y, CHENG S J, et al. Environmental estrogens shape disease susceptibility[J]. International Journal of Hygiene and Environmental Health, 2023, 249: 114125.
- [11] CRIS T M, CLEEG E D, COOPER R, et al. Environmental endocrine disruption: an effects assessment and analysis[J]. Environmental Health Perspectives, 1998, 106(Suppl 1): 11-56.
- [12] 许海, 杨明, 吴明红. 水环境中双酚 A 污染及其对鱼类的毒性研究进展[J]. 上海大学学报(自然科学版), 2013, 19(4): 429-436.
XU H, YANG M, WU M H. Bisphenol A in the aquatic environment and its toxic effects on fish[J]. Journal of Shanghai University (Natural Science Edition), 2013, 19(4): 429-436.
- [13] 李娇, 公丕海, 常青, 等. 岩礁鱼类行为生态学研究进展[J]. 渔业科学进展, 2020, 41(6): 192-199.
LI J, GONG P H, CHANG Q, et al. Research progress on behavioral ecology of reef fish[J]. Progress in Fishery Sciences, 2020, 41(6): 192-199.
- [14] 肖伟洋. 三丁基锡(TBT)对斑马鱼成鱼配子发生和繁殖行为的影响研究[D]. 重庆: 重庆师范大学, 2019.
XIAO W Y. Effects of tributyltin on the gametogenesis and reproductive behaviors of zebrafish[D]. Chongqing: Chongqing Normal University, 2019.
- [15] WU M V, SHAH N M. Control of masculinization of the brain and behavior[J]. Current Opinion in Neurobiology, 2011, 21(1): 116-123.
- [16] 常菊花. 丁草胺对斑马鱼的内分泌干扰效应研究[D]. 南京: 南京农业大学, 2012.
CHANG J H. Endocrine disrupting effects of butachlor on zebrafish (*Danio Rerio*)[D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2012.
- [17] 谭号. DES 和 EE2 抑制类精子发生可能的分子机制[D]. 重庆: 重庆师范大学, 2015.
TAN H. Mechanisms underlying diethylstilbestrol and 17 α -Ethinylestradiol-induced inhibition of spermatogenesis in fish[D]. Chongqing: Chongqing Normal University, 2015.
- [18] 陈启亮, 段雨池, 马跃岗, 等. 氨氮胁迫对斑马鱼繁殖行为的影响[J]. 重庆师范大学学报(自然科学版), 2020, 37(6): 39-44.
CHEN Q L, DUAN Y C, MA Y G, et al. Effects of ammonia nitrogen stress on reproductive behavior of zebrafish[J]. Journal of Chongqing Normal University (Natural Science), 2020, 37(6): 39-44.
- [19] DARROW K O, HARRIS W A. Characterization and development of courtship in zebrafish, *Danio rerio*[J]. Zebrafish, 2004, 1(1): 40-45.
- [20] SHAHJAHAN M, KITAHASHI T, OGAWA S, et al. Corrigendum to "temperature differentially regulates the two kisspeptin systems in the brain of zebrafish" [Gen. Comp. Endocrinol. 193(2013)79-85][J]. General & Comparative Endocrinology, 2014, 201: 108.
- [21] 谢承婷, 李英文, 刘智皓. 光周期亚急性暴露干扰斑马鱼雄性繁殖行为及对正常雌性的协同干扰[J]. 重庆师范大学学报(自然科学版), 2021, 38(2): 32-37.
XIE C T, LI Y W, LIU Z H. Disruptive effect of subacute photoperiod on reproductive behaviors of male zebrafish and the synergistic disruptions of unexposed females[J]. Journal of Chongqing Normal University (Natural Science), 2021, 38(2): 32-37.
- [22] 黄菲, 胡莹莹, 焦艳, 等. 菲(PHE)短期暴露对斑马鱼(*Branchydanio rerio*)繁殖行为及产卵、受精、孵化和仔鱼死亡率的影响[J]. 北京师范大学学报(自然科学版), 2010, 46(1): 63-67.
HUANG F, HU Y Y, JIAO Y, et al. Effects of short-term phenanthrene exposure on reproductive behavior, spawning, fertilization, incubation and larva mortality of the zebra fish (*Branchydanio rerio*)[J]. Journal of Beijing Normal University (Natural Science), 2010, 46(1): 63-67.
- [23] 龚仕玲. 生命早期 Hg²⁺ 暴露对斑马鱼自发游泳和繁殖行为的影响研究[D]. 重庆: 重庆师范大学, 2020.
GONG S L. Effects of early life exposure to Hg²⁺ on spontaneous activity and reproductive behavior in zebrafish[D]. Chongqing: Chongqing Normal University, 2020.
- [24] HUANG Y, XIE X C, ZHOU L J, et al. Multi-phase distribution and risk assessment of endocrine disrupting chemicals in the surface water of the Shaying River-Huai River Basin, China[J]. Ecotoxicology & Environmental Safety, 2019, 173: 45-53.
- [25] 许嘉璐, 彭奕欣. 中国中学教学百科全书: 生物卷[M]. 沈阳: 沈阳出版社, 1990.
XU J L, PENG Y X. Encyclopedia of middle school teaching in China: biology volume[M]. Shenyang: Shenyang Press, 1990.
- [26] BAATRUP E, HENRIKSEN P G. Disrupted reproductive behavior in unexposed female zebrafish (*Danio rerio*) paired with males exposed to low concentrations of 17 α -ethinylestradiol (EE2)[J]. Aquatic Toxicology, 2015, 160: 197-204.

- [27] SILVA E, RAJAPAKSE N, KORTENKAMP A. Something from “nothing”? eight weak estrogenic chemicals combined at concentrations below NOECs produce significant mixture effects[J]. *Environmental Science & Technology*, 2002, 36(8):1751-1756.
- [28] van den HURK R, SCHOONEN W G, van ZOELLEN G A, et al. The biosynthesis of steroid glucuronides in the testis of the zebrafish, *Brachydanio rerio*, and their pheromonal function as ovulation inducers[J]. *General and Comparative Endocrinology*, 1987, 68(2):179-188.

Animal Sciences

Effects of Combined Environmental Estrogen Treatment on Male Reproductive Behavior of Zebrafish

ZHANG Yingying, LI Yingwen, LIU Zhihao

(Laboratory of Water Ecological Health and Environmental Safety, School of Life Sciences, Chongqing Normal University, Chongqing 401331, China)

Abstract: Investigate the effects of combined environmental estrogens (EES) treatment on reproductive behaviors of male zebrafish (*Danio rerio*). Four groups were set as follow: Control (without EES in water), EE2-low (with EE2: 5.55 ng L^{-1} in water), EE2-high (with EE2: $11.1 \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$ in water) and EES (water containing 4-NP: $62.2 \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$, BPA: $250 \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$, E1: $4.56 \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$, E2: $5.53 \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$, E3: $39.6 \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$). Adult male zebrafish were exposed to the drugs mentioned above for 60 d and then paired with unexposed adult females individually. Reproductive behaviors of both male and female were counted and analyzed thereafter. The results showed that compared with the control group, there was no significant difference in the time and chasing frequency of single and simultaneous entry into the spawning area between the EE2-low group and the male zebrafish. However, the EES-high group and EES group showed a significant decrease in the above four indicators for both female and male zebrafish ($p < 0.05$). The research results indicate that the combined treatment of multiple environmental doses of EES has stronger reproductive toxicity compared to $5.55 \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$ with the same estrogenic effect, and the reproductive toxicity of $11.1 \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$ EE2 is basically equivalent and can significantly inhibit the reproductive behavior of male zebrafish.

Keywords: environmental estrogens; zebrafish; reproductive behavior

(责任编辑 方 兴)