

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^{*}

张群芳^{1,2}, 尹盼¹, 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. 淡水鱼类资源与生殖发育教育部重点实验室, 重庆 400715)

摘要:用 E2、EE2、DES、4-t-OP、4-NP、BPA 等 6 种环境雌激素暴露雄性斑马鱼(*Danio rerio*)成鱼 120 d。对暴露后斑马鱼精巢的组织学观察发现,其中精子的发生被明显抑制,精子大量丢失,出现空腔;早期生殖细胞大量增生。采用半定量 RT-PCR 对暴露后斑马鱼精巢发育和精子发生相关基因的表达进行研究,结果表明联合处理后,斑马鱼精巢中雄激素合成酶基因 *P450 11 β* 、*cyp17a1* 的表达显著下调($p < 0.05$),而孕激素合成酶基因 *20 β -hsd* 和雌激素合成酶基因 *cyp19a1a* 的表达量没有显著变化,但雌激素受体基因 *esr1* 的表达则显著上调($p < 0.05$);减数分裂标记基因 *dmcl* 没有显著变化,而 *scp3* 基因的表达则显著下调($p < 0.05$)。另外,视黄酸(Retinoic acid, RA)合成酶基因 *aldh1a2* 的表达显著上调($p < 0.05$),而 RA 降解酶基因 *cyp26b1* 的表达则无显著变化。研究推测多种环境雌激素的联合处理可能通过下调雄激素合成酶的表达、上调雌激素效应和增强减数分裂起始并抑制减数分裂后期过程诱导斑马鱼成鱼精子发生障碍;因此多种环境雌激素低剂量联合暴露对渔业资源造成的生殖风险值得警惕。

关键词:环境雌激素;斑马鱼;精子发生障碍;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(2016)03-0020-07

环境雌激素是一类能影响和扰乱动物机体内分泌系统的外源雌激素样化学物质^[1],广泛分布于水体中,在主要海域、江河、湖泊均可检测到环境雌激素污染^[2-7]。2012 年 Jiang 等人调查发现,在中国松花江、辽河、海河、长江、淮河、珠江等主要六大江系中均存在不同程度的环境雌激素污染^[8],且有持续恶化的态势^[9]。但多种环境雌激素(低剂量)联合暴露对鱼类生殖风险的研究尚未见报道。

过去,人们一直认为环境雌激素在自然水平下含量极低,不足以对鱼类配子发生造成严重的影响。为研究多种环境雌激素(低剂量)联合处理对鱼类配子发生的影响,本研究以雄性斑马鱼(*Danio rerio*)成鱼为研究对象,用与长江某区段雌激素种类及含量最大值相同的环境雌激素联合暴露 120 d,用组织学方法检测斑马鱼精巢的变化。为研究其中分子机制,采用半定量 RT-PCR,对精巢发育和精子发生相关基因在药物处理后的表达水平进行了检测。这些基因包括:雄激素合成酶基因(*P450 11 β* 、*cyp17a1*)、孕激素合成酶基因(*20 β -hsd*)、雌激素相关基因(*cyp19a1a*、*esr1*)、减数分裂标记基因(*dmcl*、*scp3*)和视黄酸(Retinoic acid, RA)合成与降解相关基因(*aldh1a2*、*cyp26b1*)。本研究对于揭示多种环境雌激素联合暴露对渔业资源造成的生殖风险具有重要意义。

1 材料与方法

1.1 实验试剂和仪器

实验所用药品和仪器主要有:雌二醇,17 β -estradiol(E2);乙炔基雌二醇,17 α -ethinylestradiol(EE2);己烯雌酚,diethylstilbestrol(DES);4-t-辛基酚,4-t-octylphenol(4-t-OP);4-壬基酚,4-nonylphenols(4-NP);双酚 A, bisphenol A (BPA)(Sigma 公司);总 RNA 提取试剂盒 Trizol(Invitrogen 公司);逆转录试剂盒(TaKaRa 公司);光学显微镜(Leica 公司);My cycler PCR 仪(Bio-Rad 公司);NanoDrop 2000 微量分光光度计 2000(Thermo 公司);GelDoc2000 凝胶成像系统(Bio-Rad 公司)。

^{*} 收稿日期:2015-10-30 修回日期:2015-11-20 网络出版时间:2016-04-29 18:37

资助项目:重庆师范大学校级基金(No. 13XLZ08);淡水鱼类资源与生殖发育教育部重点实验室项目(No. FFRD-2012-2)

作者简介:张群芳,女,研究方向为鱼类生理生化,E-mail: 13340213460@163.com;通信作者:刘智皓,副教授,E-mail: minenut@163.com

网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/50.1165.n.20160429.1837.022.html>

1.2 实验材料与处理

实验用雄性 AB 系斑马鱼成鱼购自上海热带观赏鱼养殖基地,平均体质量(0.360 ± 0.051) g,实验前于恒温循环水养殖系统中暂养,连续曝气,饲养水温(28 ± 1) $^{\circ}\text{C}$,光照周期为 14 h 光照:10 h 黑暗。

设置 1 个实验组,养殖水体中所含雌激素种类和剂量与表 1 中所列相同,并加入 0.05% DMSO 为助溶剂^[8];同时设立 1 个对照组,养殖水体中仅加入 0.05% DMSO。随机取 25 尾实验鱼放入 30 L 的玻璃缸中,每日换水 1 次,喂食 3 次,处理 120 d,每组设置 3 个平行缸。所有鱼缸连续适量充气,水体温度控制在(28 ± 1) $^{\circ}\text{C}$,光照周期为 14 h 光照:10 h 黑暗。处理结束后,每组取 6 尾(每缸 2 尾)实验鱼精巢用于组织学观察;同时,每组取 9 尾(每缸 3 尾)实验鱼精巢用于总 RNA 的提取。

表 1 长江某区段雌激素含量最大值
Tab.1 A section of the maximum concentration of estrogen in Yangtze river ng · L⁻¹

E2	EE2	DES	4-t-OP	4-NP	BPA
1.78±0.10	2.67±0.09	2.07±0.16	65.26±3.89	230.84±16.52	276.97±20.48

注:其中主要区段为江苏省南京市栖霞区到上海市宝山区,表中数据来自文献[8]。

1.3 组织学研究

实验鱼冷冻麻醉后解剖出精巢,波恩氏液固定 24 h。经梯度乙醇脱水和二甲苯中透明,60 $^{\circ}\text{C}$ 石蜡包埋。随后进行 4 μm 组织学切片,HE 染色,中性树胶封片后在 DM2700 M 光学显微镜上拍照。

1.4 半定量 RT-PCR

取-80 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用的实验鱼精巢,解冻后用 Trizol 匀浆,提取总 RNA。总 RNA 用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 完整性,微量分光光度计检测 RNA 纯度和浓度。取 1 μg 总 RNA 按照逆转录试剂盒(TaKaRa 公司)说明书去除基因组 DNA 并进行反转录,合成第一链 cDNA,1:3 稀释后于-20 $^{\circ}\text{C}$ 保存。随后,用半定量 RT-PCR 检测 *P450 11 β* 、*cyp17a1*、*cyp19a1a*、*20 β -hsd*、*esr1*、*dmcl*、*scp3*、*aldh1a2*、*cyp26b1* 基因的 mRNA 表达变化(上述基因扩增的循环数均在各自的线性增长期内),所用引物见表 2。本研究所用看家基因为 *ef1a*。目的基因扩增条件为:94 $^{\circ}\text{C}$ 、3 min;28~30 个循环的 94 $^{\circ}\text{C}$ 、30 s,60 $^{\circ}\text{C}$ 、30 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 、30 s;后延伸 7 min;*ef1a*:94 $^{\circ}\text{C}$ 、3 min,25 个循环的 94 $^{\circ}\text{C}$ 、30 s,60 $^{\circ}\text{C}$ 、30 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 、30 s;后延伸 7 min。PCR 产物在 1.0% 琼脂糖凝胶上电泳(EB 染色),成像后采用凝胶分析软件 Quantity One 进行光密度分析。

1.5 数据统计

实验结果用 SPSS 13.10 软件(SPSS, Chicago, IL, USA)进行差异比较,当 $p<0.05$ 时视为差异显著。柱形图用 Graph Pad Prism 5(San Diego, CA, USA)进行绘制。

表 2 引物及其序列
Tab.2 Primers and their sequences

引物名称	引物序列(5'~3')	序列号
P450 11 β -F	CTGGGCCACACATCGAGAG	FJ713105
P450 11 β -R	AGCGAACGGCAGAAATCC	
cyp17a1-F	TCTGATGAGCCTGGTGAG	KJ905722
cyp17a1-R	ATGAGCAGTTTGTGGGAG	
cyp19a1a-F	CGGATCGGGTCCTCGGTCGT	KF296362
cyp19a1a-R	CGGCTGCTGCGACAGGTTGT	
20 β -hsd-F	TCGTTTCATTCGTTGGGATA	EU918603
20 β -hsd-R	TGCCCTCCTCTGAAGC	
esr1-F	ACTCTACCCATGTACCCTAAGG	NM152959
esr1-R	CGGGTAGTATCCCCTGAAGC	
dmcl-F	GAGGCTGAAGGACATCG	NM001020782
dmcl-R	TCCAGCCGTAATGGCAA	
scp3-F	GCGTTTGTGTTGTTGGATT	AY601674
scp3-R	CACCGTCAGTATGTTTGG	
aldh1a2-F	TCCAGGAAGCCGACAAGG	AF288764
aldh1a2-R	CCAGGGTAGCAAGGTAAGCA	
cyp26b1-F	TGTCAGGAGGATACAGAATAGC	NM212666
cyp26b1-R	AGCCGAGGTGTCATGGGT	
ef1a-F	ACAACCCTGCCAGTGTTGC	AY422992
ef1a-R	GTACCGCTAGCATTACCTT	

2 结果

2.1 对精子发生的影响

对照组斑马鱼精巢形态正常:众多生精小管内有不同发育时期的生精小囊,囊内有同一发育时期的生殖细胞(图 1a)。联合处理 120 d 后,斑马鱼的精子发生被明显抑制:精细胞时期的生精小囊减少,精子大量丢失,出现空腔;早期生殖细胞(精母细胞)则大量增生(图 1b)。

2.2 对相关类固醇合成酶基因表达量的影响

半定量 RT-PCR 结果显示,联合处理 120 d 后,斑马鱼精巢中雄激素合成酶基因 *P450 11 β* 和 *cyp17a1* 的表达被显著抑制($p < 0.05$)(图 2a、b),尤其是 *P450 11 β* 的表达被下调了 1 倍。而雌激素合成酶基因 *cyp19a1a*(图 2c)和孕激素合成酶基因 *20 β -hsd*(图 2d)的表达则没有显著变化。

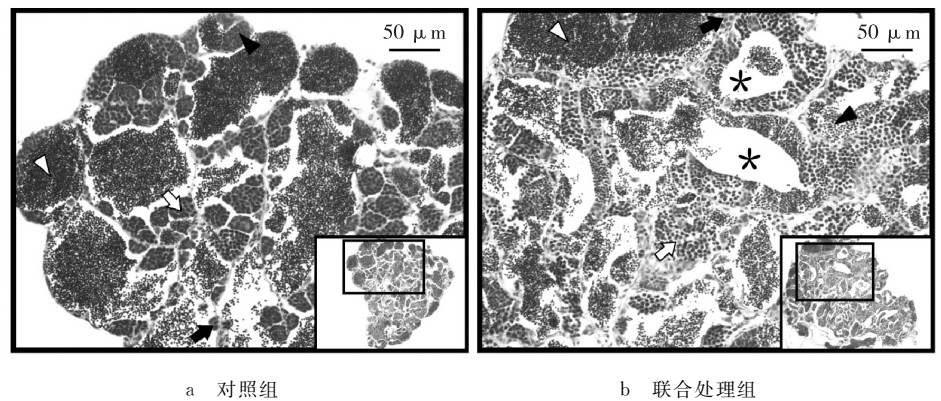
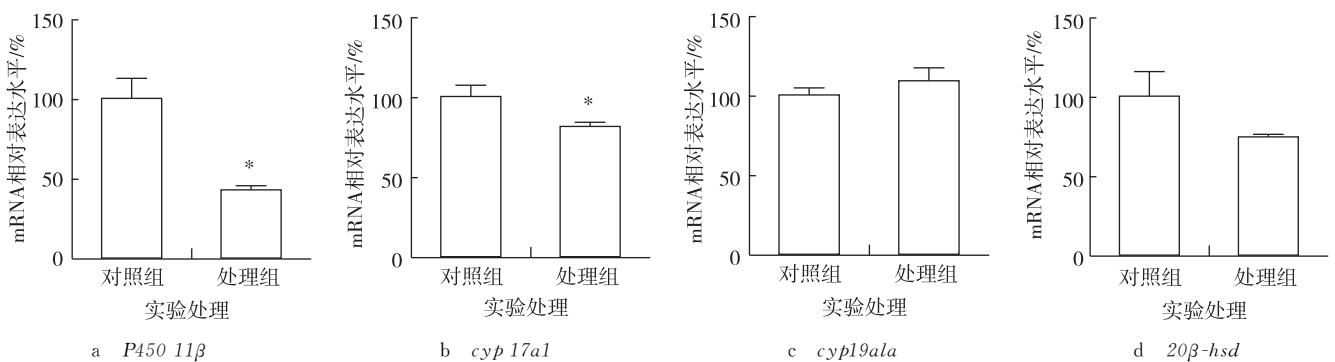


图 1 联合处理影响斑马鱼精子发生的组织学观察
注:黑色箭头-精原细胞;白色箭头-精母细胞;黑色三角形-精子细胞;白色三角形-精子;星号-生殖细胞丢失形成的空腔。

Fig. 1 Influences of combination treatment on spermatogenesis in zebrafish



注:星号表示差异显著($p < 0.05$),样本量 $n = 9$;下同。

图 2 联合处理对类固醇合成酶基因 *P450 11 β* , *cyp17a1*, *cyp19a1a* 和 *20 β -hsd* 表达量的影响

Fig. 2 Influences of combination treatment on the expressions of genes of steroidogenic enzymes
P450 11 β , *cyp17a1*, *cyp19a1a*, and *20 β -hsd*

2.3 对雌激素受体基因表达水平的影响

半定量 RT-PCR 结果显示,联合处理 120 d 后,斑马鱼雌激素受体基因 *esr1* 的表达显著上调($p < 0.05$)。

2.4 对减数分裂标记基因 *dmcl* 和 *scp3* 的影响

半定量 RT-PCR 结果显示,联合处理 120 d 后斑马鱼精巢中的减数分裂标记基因 *dmcl* 的表达没有显著变化(图 4a),而 *scp3* 的表达则被显著抑制($p < 0.05$)(图 4b)。

2.5 对 RA 合成与降解的影响

半定量 RT-PCR 结果显示,联合处理 120 d 后,斑马鱼精巢中 RA 合成酶基因 *aldh1a2* 的表达显著升高($p < 0.05$)(图 5a),而 RA 降解酶基因 *cyp26b1* 的表达则没有

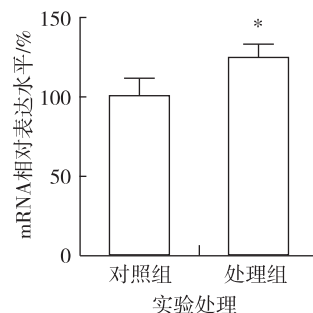


图 3 联合处理对雌激素受体(*esr1* 基因)表达水平的影响

Fig. 3 Influences of combination treatment on the expression of the estrogen receptor 1 (*esr1* gene)

显著变化(图 5b)。

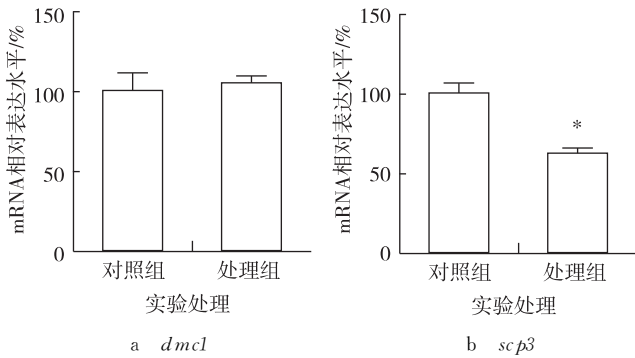


图4 联合处理对减数分裂标记基因 *dmcl* 和 *scp3* 的影响

Fig. 4 Influences of combination treatment on the expression of *dmcl* gene and *scp3* gene

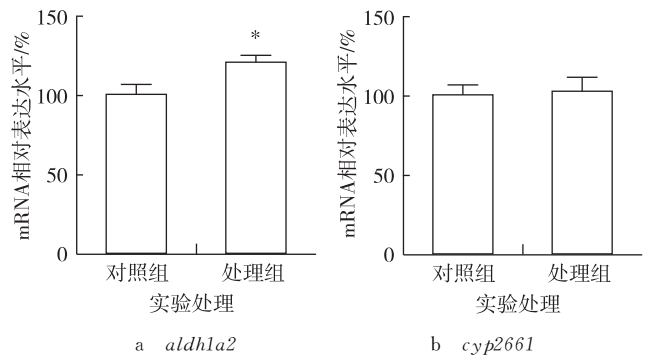


图5 联合处理对 *aldh1a2* 和 *cyp26b1* 基因的影响

Fig. 5 Influences of combination treatment on the expression of *aldh1a2* gene and *cyp26b1* gene

3 分析与讨论

大量研究表明,各种剂量的环境雌激素均可能严重干扰鱼类正常的精巢发育和精子发生^[10-15]。但与实验室研究不同,自然环境中的雌激素污染并非单一化合物造成。目前,已有学者用多种污染物(环境相当剂量)联合处理研究对鱼类性别的影响^[16],但尚无多种环境雌激素(低剂量)影响鱼类精子发生的报道。本研究用多种环境雌激素(E2、EE2、DES、4-t-OP、4-NP 和 BPA)^[8]对斑马鱼进行长期(120 d)暴露实验。尽管暴露剂量很低(相当于 $6 \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 EE2^[17]),但本研究发现,长期联合暴露仍能严重干扰斑马鱼的精巢发育及精子发生过程,主要表现为:精子大量减少、精巢空腔化及早期生殖细胞(精母细胞)明显增多。

雄激素(主要是 11-酮基睾酮(11-Ketotestosterone, 11-KT))在硬骨鱼类精子发生中起决定性作用^[18]。而 P450 11 β 是参与合成鱼类 11-KT 最重要的类固醇合成酶之一,该酶基因表达水平的高低决定着雄激素的分泌水平。有研究发现,雌激素暴露会降低斑马鱼精巢中雄激素的水平^[12,19]。本研究也发现,药物处理后斑马鱼精子发生被显著抑制;同时,不仅雄激素合成酶基因 P450 11 β 的表达被显著下调($p < 0.05$),合成雄激素前体的核心酶基因 *cyp17a1*^[20] 的表达也被显著抑制($P < 0.05$)。因此本研究推测,药物处理后,雄激素合成相关酶表达下调可能是斑马鱼精子发生障碍的直接原因。

芳香化酶是催化雌激素合成的关键限速酶,该酶基因 *cyp19a1a* 的表达水平与雌激素的合成水平呈正相关^[21-23]。有研究表明,雌激素暴露可促进精巢内 *cyp19a1a* mRNA 的表达^[24-25]。本实验中,*cyp19a1a* 基因的表达水平并未显著变化,表明联合处理后雌激素水平可能变化不大。然而,联合处理后斑马鱼精巢中雌激素受体基因 *esr1* 的水平显著上升($p < 0.05$)。已知雌激素主要与 I 型雌激素受体(*esr1*)直接结合发挥生理效应^[26-27],且外源雌激素可通过上调 *esr1* 基因的表达水平增强雌激素效应^[28]。因此,尽管药物处理后,斑马鱼内源雌激素水平可能没有显著变化,但雌激素受体基因表达的上调,可能增强了雌激素的总体效应,并可能随之诱发斑马鱼的精巢发育和精子发生障碍。

二羟黄体酮(17 α ,20 β -DP,DHP)在鱼类精子的成熟和排精过程中起决定性作用^[29-30],20 β -hsd 是合成 DHP 的关键酶,催化 17-HP(17 α -hydroxyprogesterone)向 DHP 的转化^[31]。本研究结果显示,药物处理后,20 β -hsd 基因的表达并没有显著变化。因此可以推测,药物处理后,斑马鱼雄鱼精子发生障碍可能与 DHP 合成酶表达水平无关。

有研究表明,环境雌激素导致的鱼类精子发生障碍除与内源激素水平的变化有关之外,还与减数分裂被抑制密切相关^[32-33]。对斑马鱼的研究发现,DES 能显著抑制减数分裂标记基因 *dmcl* 的表达,从而抑制减数分裂^[32]。而本研究发现,联合处理后,斑马鱼精巢中 *dmcl* 的表达没有显著变化,这可能与本研究所用药物剂量较低有关。另有研究表明,2.72 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 E2 短期处理雄性斑马鱼能通过抑制 *scp3* 基因的表达阻碍斑马鱼的减数分裂^[12],这与本研究结果相似。因此,本研究推测联合处理能够通过抑制基因 *scp3* 而非 *dmcl* 的表达抑制斑马鱼的减数分裂,从而导致了精子数量急剧下降。

关于发育早期的生殖细胞数量为何增加,有研究认为 RA 为哺乳类、鸟类及两栖类减数分裂起始所必需^[34-38]。在哺乳动物的胚胎发育过程中 RA 的水平增高,减数分裂的起始便会提前,胚胎性腺便会朝着雌性方向发展,反之则朝雄性发展^[39]。脊椎动物(包括硬骨鱼类)的性腺中,RA 水平是由 RA 合成酶(主要是 *aldh1a2*)和降解酶(主要是 *cyp26b1*)协同作用完成的^[33,39]。本研究中,联合处理后 *aldh1a2* 基因的表达水平显著上升($p < 0.05$),而 *cyp26b1* 的表达则没有变化,表明 RA 的水平可能会明显升高,进而促进精原细胞的分化和精原细胞进入减数分裂的过程,并导致早期生殖细胞的大量增生。但由于减数分裂的后期过程被阻断(*scp3* 基因表达受抑制),因此斑马鱼正常的精子发生可能被阻断在减数分裂前期,并导致早期生殖细胞大量增生而精子大量减少。

综上所述,多种环境雌激素低剂量长期联合处理能严重抑制斑马鱼的精子发生。这种影响可能与药物处理后雄激素合成酶水平的下调、雌激素效应升高、减数分裂受到抑制和 RA 水平的增加密切相关。因此,环境雌激素诱导的斑马鱼精子发生障碍可能并非一个或少数几个基因的变化所致,而是一系列与精子发生相关基因表达变化的共同结果。

尽管江河中存在多种环境雌激素已成为共识,但由于这些物质各自的剂量较低,因此人们往往忽视了雌激素效应的叠加和长期作用影响鱼类配子发生的风险,使得这一类污染物的危害一直未能引起足够重视。而本研究证实,尽管自然水域中环境雌激素的水平很低,但各种环境雌激素剂量的累加和暴露时间的延长仍会对鱼类精子发生造成严重影响。因此,多种环境雌激素(低剂量)对鱼类的长期作用,仍可能对渔业资源造成危害,这种生殖风险值得警惕。

参考文献:

- [1] 吴伟恒,阮爱东,戴韵秋,等. 我国天然水体中环境雌激素的污染现状及其生态效应研究进展[J]. 四川环境, 2014, 33(5): 154-158.
Wu W H, Ruan A D, Dai Y Q, et al. Research progress of environmental estrogens pollution and ecological effects in national waters of China[J]. Sichuan Environment, 2014, 33(5): 154-158.
- [2] 谢观体,张臣,刘辉. 环境内分泌干扰物的研究进展[J]. 广东化工, 2007, 34(10): 69-72.
Xie G T, Zhang C, Liu H, Research progress on endocrine disrupting chemicals[J]. Guangdong Chemical Industry, 2007, 34(10): 69-72.
- [3] Tabata A, Kashiwa S. Estrogenic influence of estradiol-17 β , p-nonylphenol A on Japanese Medaka at detected environmental concentrations[J]. Water Sci Technol, 2001, 43(2): 109-116.
- [4] Kuster M, Azevedo D A, De Alda M J L, et al. Analysis of phytoestrogens, progestogens and estrogens in environmental waters from Rio de Janeiro (Brazil)[J]. Environment International, 2009, 35(7): 997-1003.
- [5] Ying G G, Kookana R S, Ru Y J. Occurrence and fate of hormone steroids in the environment[J]. Environment International, 2002, 28(6): 545-551.
- [6] Cargouet M, Perdiz D, Mouatassim-Souali A, et al. Assessment of river contamination by estrogenic compounds in Paris area (France)[J]. Science of the Total Environment, 2004, 324(1): 55-66.
- [7] Ying G G, Kookana R S, Kumar A, et al. Occurrence and implications of estrogens and xenoestrogens in sewage effluents and receiving waters from South East Queensland[J]. Science of the Total Environment, 2009, 407(18): 5147-5155.
- [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] 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.
- [10] 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.
- [11] 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 and Environmental Safety, 2008, 71(2): 400-411.
- [12] De Waal P P, Leal M C, García-López á, 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): 287-297.

- [13] 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(S1):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(S1): 59-64.
- [14] 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.
- [15] 钟雪萍,徐盈,梁勇,等. 稀有鮡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 P, 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.
- [16] 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: 28-35.
- [17] Segner H, Casanova-Nakayama A, Kase R, et al. Impact of environmental estrogens on Yfish considering the diversity of estrogen signaling [J]. General and comparative endocrinology, 2013, 191: 190-201.
- [18] 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.
- [19] Blüthgen N, Sumpter J P, Odermatt A, et al. Effects of low concentrations of the antiprogesterone mifepristone (RU486) in adults and embryos of zebrafish (*Danio rerio*): 2. Gene expression analysis and *in vitro* activity [J]. Aquatic Toxicology, 2013, 144: 96-104.
- [20] 陈彩芳,温海深. *P450c17s* 基因 mRNA 在雄性半滑舌鳎繁殖周期中的表达 [J]. 水产学报, 2012, 36(7): 1019-1025.
Chen C F, Wen H S. The characteristic analysis of *P450c17s* mRNA expression during the reproductive cycle in male *Cynoglossus semilaevis* Günther [J]. Journal of Fisheries of China, 2012, 36(7): 1019-1025.
- [21] Piferrer F, Blázquez M. Aromatase distribution and regulation in fish [J]. Fish Physiology and Biochemistry, 2005, 31(2/3): 215-226.
- [22] 黄波,杨小玉,戴奇,等. 芳香化酶抑制剂对暗纹东方鲀 CYP19A, DMRT1 基因表达及性腺分化的影响 [J]. 中国水产科学, 2013(1): 68-74.
Huang B, Yang X Y, Dai Q, et al. Effect of aromatase inhibitor on expression of CYP19A, DMRT1, and gonadal sex differentiation in *Takifugu obscurus* [J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2013(1): 68-74.
- [23] Guiguen Y, Baroiller J F, Ricordel M J, et al. Involvement of estrogens in the process of sex differentiation in two fish species: the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and a tilapia (*Oreochromis niloticus*) [J]. Molecular reproduction and development, 1999, 54(2): 154-162.
- [24] 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 mRNAs of enzymes responsible for sex steroid synthesis in the zebrafish (*Danio rerio*) exposed to nonylphenol [J]. Acta Scientiae Circumstantiae, 2011, 31(11): 2523-2529.
- [25] 云丹,刘晓丽,程乐华,等. 双酚 A 对斑马鱼精巢性激素生成酶基因表达的影响 [J]. 生态毒理学报 ISTIC, 2014, 9(1): 81-89.
Yun D, Liu X L, Cheng L H. Alterations in the mRNAs of enzymes responsible for sex steroidogenesis in the testis of zebrafish exposed to Bisphenol-A [J]. Asian Journal of Ecotoxicology, 2014, 9(1): 81-89.
- [26] Pentikäinen V, Erkkilä K, Suomalainen L, et al. Estradiol acts as a germ cell survival factor in the human testis *in vitro* 1 [J]. Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism, 2000, 85(5): 2057-2067.
- [27] Robertson K M, O'Donnell L, Jones M E E, et al. Impairment of spermatogenesis in mice lacking a functional aromatase (*cyp 19*) gene [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1999, 96(14): 7986-7991.
- [28] Cotter K A, Yershov A, Novillo A, et al. Multiple structurally distinct ER α mRNA variants in zebrafish are differentially expressed by tissue type, stage of development and estrogen exposure [J]. General and comparative endocrinology, 2013, 194: 217-229.
- [29] 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 and comparative endocrinology, 1985, 59(1): 24-30.
- [30] Sakai N, Ueda H, Suzuki N, et al. Steroid production by amago salmon (*Oncorhynchus rhodurus*) testes at different developmental stages [J]. General and comparative en-

- docrinology, 1989, 75(2): 231-240.
- [31] Hinfray N, Nobrega R H, Caulier M, et al. Cyp17a1 and Cyp19a1 in the zebrafish testis are differentially affected by oestradiol[J]. Journal of Endocrinology, 2013, 216(3): 375-388.
- [32] 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, 39(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.
- [33] 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, 2015, 5: 10131.
- [34] Bowles J, Knight D, Smith C, et al. Retinoid signaling determines germ cell fate in mice [J]. Science, 2006, 312(5773): 596-600.
- [35] 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.
- [36] Swain A. Sex determination: time for meiosis? the gonad decides[J]. Current Biology, 2006, 16(13): R507-R509.
- [37] 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.
- [38] 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.
- [39] 蒋汶洮. 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.

Animal Sciences

A Variety of Environmental Estrogens Lower Dose Combination Treatment Induces Spermatogenesis Dysplasia in Zebrafish (*Danio rerio*)

ZHANG Qunfang^{1,2}, YIN Pan¹, 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, Chongqing 400715, China)

Abstract: Male zebrafish exposed to 17 β -estradiol, 17 α -ethinylestradiol, diethylstilbestrol, 4-t-octylphenol, 4-nonylphenols and bisphenol for 120-days. Histology result showed that, the combination of these drugs seriously impaired the testicular development and spermatogenesis of zebrafish, including germ cell loss, cavity resulting from decreased sperm count and proliferation of spermatocytes. Semi-quantitative RT-PCR results showed that, the expressions of enzymes responsible for androgen production (*P450 11 β* , *cyp17a1*) were significantly inhibited, while the enzymes involved in progesterone (*20 β -hsd*) and estrogen (*cyp19a1a*) production remained unchanged. However, the expression of estrogen receptor 1 (*esr1*) was up-regulated. Besides, the expression of *scp3* (while not *dmcl*), the marker gene for meiosis, was dramatically suppressed. Furthermore, the expression of retinoic acid (Retinoic acid, RA) synthase (*aldh1a2*) was significantly elevated, while that of RA-degrading enzyme (*cyp26b1*) remained unchanged. In summary, we strongly suggested that the testicular dysplasia and spermatogenic arrest caused by combination treatment may result from reduced androgen enzyme level, enhanced estrogenic effect, and both improved meiotic prophase and arrested meiosis anaphase in adult male zebrafish. In a word, more attention needs to be paid to the possible reproductive risks caused by relevant concentrations of environmental estrogens in the nature waters.

Key words: environmental estrogens; zebrafish (*Danio rerio*); spermatogenic dysplasia; meiosis; gene expressions

(责任编辑 方 兴)