

乙炔基雌二醇短期暴露诱导斑马鱼卵巢损伤的恢复机制*

刘智皓, 兰雪溶, 李英文

(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 重庆市高校生物活性物质工程研究中心, 重庆 401331)

摘要:【目的】探讨乙炔基雌二醇(17 α -ethinylestradiol, EE2)短期暴露诱导斑马鱼(*Danio rerio*)卵巢损伤的恢复机制。【方法】用100 ng·L⁻¹的EE2暴露性成熟斑马鱼雌鱼6 d, 随后放入清水中自然恢复21 d; 还设立1个不进行EE2暴露的对照组进行同步处理。测定此期间实验鱼的体质量、性腺质量、GSI、子代存活率、激素水平和相关基因表达的变化。【结果】与对照组的情况相比, EE2短期暴露后的斑马鱼雌性成鱼卵巢质量、性腺成熟度(GSI)和后代存活率明显下降, 斑马鱼卵子发生受到严重损伤, 血浆雌二醇(E2)的质量浓度下降, 肝脏 *vtg1* 基因的表达有所上调, 性腺轴中参与卵子发生的 *cyp19a1b*, *gnrh-III*, *fsh β* , *lh β* , *fshr*, *lhr*, *cyp19a1a*, *cyp17a1*, *20 β -hsd* 和 *era* 基因的表达受到明显抑制。在自然恢复期间, 经过EE2短期暴露处理的实验鱼的卵巢质量、GSI和后代存活率均逐渐恢复, 卵巢的组织学损伤也随之恢复; 在恢复21 d后, 上述实验鱼血浆E2质量浓度、肝脏 *vtg1* 基因表达和性腺轴中参与卵子发生的一系列基因的表达均恢复到正常水平。【结论】EE2短期暴露导致斑马鱼的卵巢损伤是可逆的, 但恢复所需时间远长于暴露时间, 体现出损伤恢复的时滞性。

关键词:乙炔基雌二醇; 斑马鱼; 短期暴露; 卵巢损伤; 恢复机制。

中图分类号: Q492.5

文献标志码: A

文章编号: 1672-6693(2018)05-0033-08

乙炔基雌二醇(17 α -ethinylestradiol, EE2)是一种广泛存在于中国地表水环境中的内分泌干扰物(Endocrine disrupting chemicals, EDCs)^[1], 具有强烈的雌激素效应, 对鱼类的性腺发育、配子发生和繁殖都带来严重影响^[2]。大量研究发现, 雄鱼在暴露于EE2后, 明显出现雌性化倾向, 出现卵黄蛋白(Vitellogenin, VTG)大量合成、性激素分泌紊乱、性别比例改变、精子数量下降等现象^[2-4]。然而, 有关EE2对雌鱼性腺干扰作用的研究较少。最近的研究发现, 较高剂量的EE2短期暴露能严重阻断雌鱼正常的卵巢成熟和卵子发生过程, 导致卵巢中早期滤泡比例升高, 后期滤泡和成熟滤泡比例下降, 并导致后代存活率(Survival rate)明显降低, 甚至使之丧失生育能力^[5-7]。有研究发现, EE2导致的卵巢发育障碍可能与下丘脑-垂体-性腺(Hypothalamic-pituitary-gonadal, HPG)轴的紊乱以及配子发生相关基因的表达异常有密切关系^[7]。然而, EE2短期暴露所致的卵巢发育障碍能否恢复? 如能恢复, 恢复的具体机理是什么? 目前看来, 尚未有明确的答案。为此, 笔者用100 ng·L⁻¹的EE2对雌性斑马鱼(*Danio rerio*)成体进行了6 d暴露, 在暴露后自然恢复21 d, 并设立1个不进行EE2暴露的对照组进行同步处理。然后对EE2恢复过程中的实验鱼的体质量、卵巢质量、性腺成熟度(Gonadosomatic index, GSI)、与正常雄性交配后子代的存活率和卵巢组织结构进行了分析; 为进一步研究EE2短期暴露诱导斑马鱼卵子发生障碍后的相关恢复机制, 用定量PCR(Quantitative RT-PCR, qRT-PCR)对暴露后及恢复后参与HPG轴调控的相关基因的表达进行了检测。本研究将为深入研究环境雌激素损伤鱼类生殖能力及生殖毒性的可逆性提供基础资料。

1 材料与方法

1.1 试剂和仪器

主要试剂: EE2和助溶剂二甲基亚砜(DMSO)购自Sigma公司; 总RNA提取试剂RNAiso、反转录试剂盒

* 收稿日期: 2018-04-10 修回日期: 2018-05-23 网络出版时间: 2018-09-26 13:26

资助项目: 重庆市基础科学与前沿技术研究专项基金(No. cstc2016jcyjA1032); 重庆市教育委员会科学技术研究项目(No. KJ130622, KJ1600308); 重庆师范大学校级基金项目(No. 13XLZ08); 淡水鱼类资源与生殖发育教育部重点实验室开放课题基金项目(No. FFRD-2015-02)

第一作者简介: 刘智皓, 男, 副教授, 博士, 研究方向为鱼类生理学, E-mail: minenut@163.com

网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1165.N.20180926.1325.028.html>

PrimeScript RT reagent Kit 购自大连宝生物(TaKaRa)公司。主要仪器:Eclipse 90i 型光学显微镜购自 Nikon 公司;CFX96™型实时定量 PCR 仪购自 Bio-Rad 公司;Nano-Drop 2000 型微量分光光度计购自 Thermo 公司;KD-3358 型石蜡切片机购自科迪仪器设备有限公司。

1.2 实验处理与材料收集

实验用野生型斑马鱼雌性成鱼(AB系,120 d龄)购自中国科学院水生生物研究所的国家斑马鱼资源中心,平均体质量(0.54 ± 0.03) g。进行实验前,将实验鱼置于恒温循环水养殖系统驯养 14 d,驯养水源为曝气自来水,水温为(28 ± 0.5) °C,光周期为 14 h 光照:10 h 黑暗。硝酸盐含量、亚硝酸盐含量、硬度、pH 等水质参数都控制在正常范围内,溶氧质量浓度大于或等于 $6.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

笔者所在研究团队在过去的研究中发现 $100 \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 EE2 暴露 6 d 即可导致雌性斑马鱼的卵巢出现严重损伤^[5],因此笔者将这一质量浓度作为本研究的 EE2 暴露剂量。设置 1 个对照组(CG),驯养水体中不含 EE2,只含有质量分数为 0.05%的 DMSO;同时设立 1 个 EE2 暴露-自然恢复实验组(EG),在 EE2 暴露处理期间驯养水体中含有 $100 \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 EE2 和质量分数为 0.05%的 DMSO。随机取 168 尾雌性实验鱼,随机平均分为以上 2 组,每组 3 个平行缸,每缸内饲养 28 尾实验鱼。每个玻璃缸的容积为 60 L,加曝气自来水 50 L。实验鱼每日喂食 3 次(单日总饲喂量为实验鱼平均体质量的 0.3%),整体换水 1 次,EE2 暴露处理进行 6 d。EE2 暴露处理过程中,连续向缸内充氧,并维持水温、光周期等与实验前的驯养条件一致。EE2 暴露处理结束后,先从每缸中随机取 2 尾实验鱼,测定体质量、性腺质量,计算 GSI(GSI=性腺质量/体质量);再从每缸中随机取 2 尾实验鱼卵巢,用于组织学切片;另从每缸中随机取 2 尾实验鱼的血液用于雌二醇(E2)检测,并同时取它们的脑和卵巢,液氮速冻后,于 -80 °C 保存,作为总 RNA 的提取材料。最后从每缸中随机取 2 尾实验鱼用于繁殖生物学实验。

将两个组剩余的每缸 20 尾的实验鱼均放入不含 EE2 的清水中进行自然恢复处理,喂食量及频次、换水量及频次、充氧方式、水温、光周期等仍保持与实验前的驯养条件一致。在恢复 7,14 和 21 d 后,均从每缸中随机取 2 尾实验鱼用于体质量和性腺质量的测定和 GSI 的计算;再从每缸中随机取 2 尾实验鱼卵巢进行组织学切片;另从每缸中随机取 2 尾实验鱼用于繁殖生物学实验。此外,在恢复 21 d 后,从每缸中随机取 2 尾实验鱼的血液用于 E2 检测,并同时取它们的脑和卵巢,液氮速冻后保存于 -80 °C 条件下,用于总 RNA 的提取。

1.3 繁殖生物学实验

将 EE2 暴露处理结束时以及自然恢复 7,14 和 21 d 后随机取出的实验鱼分别与未进行 EE2 暴露处理的雄性斑马鱼配对,按照 Baartrup 等人^[8]的方法进行繁殖实验。具体方法为:在规格为 $15 \text{ cm} \times 20 \text{ cm} \times 25 \text{ cm}$ 的方形鱼缸中,放入 3 L 曝气除氯的自来水,水温为(28 ± 0.5) °C,在缸底角落放入 1 个规格为 $7 \text{ cm} \times 7 \text{ cm}$ 的塑料方盘,该盘内装满直径为 5 mm 的透明玻璃球。随后放入 1 尾 CG 或 EG 组雌鱼和 1 尾已提前单性饲养未进行 EE2 暴露处理的雄鱼,饲养过夜。第 2 日清晨,用灯光照射鱼缸,刺激斑马鱼交配。交配结束后,收集产出的斑马鱼胚胎,在水温为(28 ± 0.5) °C 的光照培养箱中孵化,孵化 6 d 后,用公式“存活率=(存活数/出膜数)×100%”计算子代存活率。

1.4 组织学观察

用质量分数为 1%的 MS-222 将实验鱼麻醉后进行解剖,取出卵巢,于波恩氏液中固定 18 h。用不同体积分数的乙醇溶液进行梯度脱水,再经二甲苯透明,于 60 °C 进行石蜡包埋。在石蜡切片机上切片,厚度 $4 \mu\text{m}$,苏木素-伊红(HE)染色,中性树胶封片,用光学显微镜拍照。

1.5 血浆 E2 测定

用断头取血的方法,用毛细管收集斑马鱼雌性血液。在收集的血液中加入等体积的 $10 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 肝素钠溶液抗凝。将每 2 尾鱼的血液混合作为一个样品。抗凝后的血液样品在 4 °C 条件下, $5600 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 20 min,回收上清液。根据血清 E2 检测试剂盒(Cayman Chemical, USA)的说明书,通过酶联免疫法测定血浆中 E2 含量。

1.6 qRT-PCR

取实验鱼的脑和卵巢,加 1.0 mL 的 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,测得的 OD_{260} 与 OD_{280} 的比值在在 1.8~2.0 之间。取 500 ng 总 RNA 按照 PrimeScript RT reagent Kit (TaKaRa)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。

运用在线引物设计软件(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>)设计目的基因 *cyp19a1b*,

gnrh-III, *fshβ*, *lhβ*, *fshr*, *lhr*, *cyp17a1*, *cyp19a1a*, *20β-hsd*, *vtg1* 和 *era* 以及看家基因 *ef1α* 的 qRT-PCR 引物, 相关信息见表 1。qRT-PCR 反应体系包含 $0.3 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的引物, $1 \times \text{Sybr Green master mix}$ (TaKaRa), $2 \mu\text{L}$ 的 cDNA, 反应体积为 $20 \mu\text{L}$ 。qRT-PCR 反应参数为: $95 \text{ }^\circ\text{C}$ 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 和 $72 \text{ }^\circ\text{C}$ 延伸 10 s。反应时, 同时做阴性对照并检测溶解曲线, 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* 基因的表达不受 EE2 影响。随后, 用 qRT-PCR 检测上述基因的相对表达水平变化。本研究所用引物的扩增效率总体相似, 介于 97.2% 到 103.8% 之间。目的基因与 *ef1α* 的相对表达量用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 的方法进行计算^[9]。

表 1 本研究所用引物
Tab. 1 Primers in the study

基因名称	引物序列(5'—3')	Genbank 登录号	长度/bp
<i>cyp19a1b</i>	F: ACTAAGCAAGTCCTCCGCTGTGTACC R: TTAAACATACCGATGCATTGCAGACC	NM_131642	100
<i>gnrh-III</i>	F: TTGGAGGTCAGTCTTTGCCAG R: CCTCATTTCACCAACGCTTC	NM_182887	76
<i>fshβ</i>	F: TGAGCGCAGAATCAGAATG R: AGGCTGTGGTGTGCGATTGT	NM_205624	105
<i>lhβ</i>	F: GGACACGCAGAGACACTT R: CACCGATACCGTCTCATT	NM_205622	168
<i>fshr</i>	F: GCATATCTACCGCACTGAGATTTCTT R: GGAGTACAGCGTCCCATCACTAGT	NM_001001812	85
<i>lhr</i>	F: GCCTTCAGGAAAGACGCTTGTAT R: CATCCGGTACAAGTTAGCTTTGCT	NM_205625	75
<i>cyp17a1</i>	F: TCTGATGAGCCTGGTGAG R: ATGAGCAGTTTGTGGGAG	XM_005156809	108
<i>cyp19a1a</i>	F: CGGATCGGGTCCTCGGTCGT R: CGGCTGCTGCGACAGGTTGT	XM_005173635	154
<i>20β-hsd</i>	F: TCATGCTCTTCTGCCGATAC R: CAAGGGACTTCTTGCTGACA	AAG23178	77
<i>era</i>	F: GACGAGGACCTGGGCTGATA R: GCTGTGATGGTCGTTGTGATG	KT832702	100
<i>vtg1</i>	F: CTCCCGAGTTCATTCAGA R: ATGACAACCTCACGCAGA	XM_009296387	133
<i>ef1α</i>	F: GATCACTGGTACTTCTCAGGCTGA R: GGTGAAAGCCAGGAGGGC	NM_131263	121

1.7 数据统计

实验所得数据均以“平均值±标准误”表示, 采用 Excel 2003 和 SPSS 13.0 对数据分别进行常规计算及统计学分析。使用 *t*-检验对 CG 组和 EG 组的数据差异进行统计学检验。当 $p < 0.05$ 时, 检验结果具有统计学意义。本文中的柱形图用 GraphPad Prism 6 (San Diego, CA) 进行绘制。

2 结果

2.1 对体质量、性腺质量、GSI 和子代存活率的影响

在 EE2 短期暴露处理结束时以及后续的自然恢复过程中, 两组实验鱼体质量的差异不具有统计学意义(图 1a)。在 EE2 短期暴露处理结束时和自然恢复 7, 14 d 后, 与 CG 的情况相比, EG 实验鱼的卵巢质量、GSI 和子代

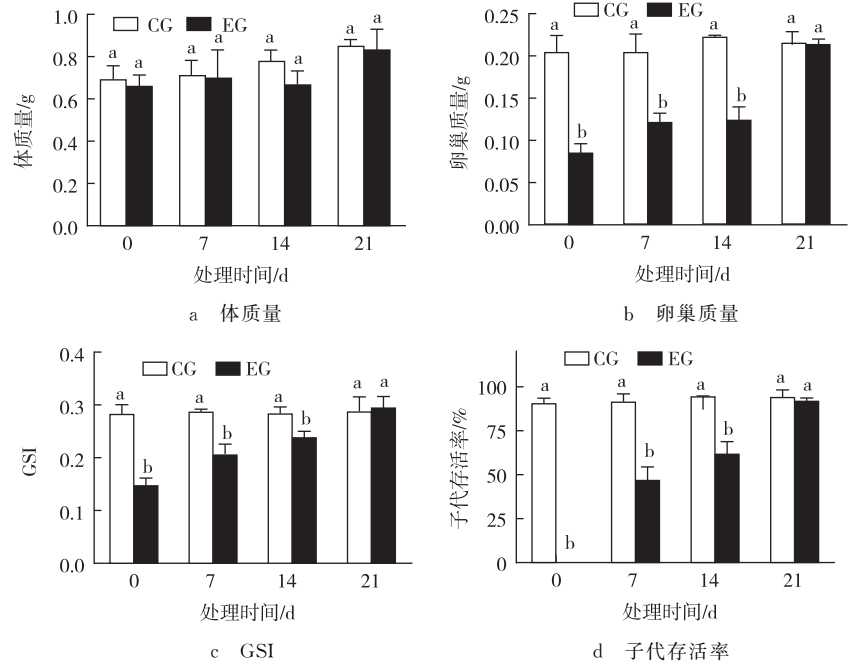
存活率均具有统计学意义上的下降($p < 0.05$);但两组实验鱼的上述指标差异在自然恢复 21 d 后则不具有统计学意义(图 1b,c,d)。

2.2 对卵巢结构的影响

EE2 短期暴露处理结束时,与 CG 实验鱼的卵巢结构(封二彩图 2a)相比,EG 实验鱼卵巢严重受损,出现卵母细胞与滤泡层分离的情况,间质中出现大量蛋白样液体,早期滤泡大量聚集(可能来自于卵原细胞增殖)(封二彩图 2b)。自然恢复 7 d 后,EG 实验鱼的卵巢结构情况与封二彩图 2b 展示的情况无明显差异,故本文不再另做展示。自然恢复 14 d 后,EG 实验鱼的卵巢中仍有卵母细胞与滤泡层分离的情况,间质中出现大量蛋白样液体,早期滤泡大量聚集(封二彩图 2c)。自然恢复 21 d 后,EG 实验鱼的卵巢中不再出现卵母细胞与滤泡层的分离,也未出现蛋白样液体和聚集的早期滤泡(封二彩图 2d)。

2.3 对血浆 E2 和肝脏 *vtg1* 基因表达的影响

EE2 短期暴露处理结束时,与 CG 实验鱼血浆中 E2 含量相比,EG 实验鱼血浆中 E2 含量有统计学意义上的降低($p < 0.05$);自然恢复 21 d 后,CG 和 EG 实验鱼血浆中 E2 含量的差异则不具有统计学意义(图 3a)。EE2 短期暴露处理结束时,EG 与 CG 相比,前者实验鱼肝脏中 *vtg1* 基因相对表达水平有统计学意义上的升高($p < 0.05$);自然恢复 21 d 后,两组实验鱼肝脏中 *vtg1* 基因相对表达水平的差异则不具有统计学意义(图 3b)。



注:不同字母表示组间数据差异具有统计学意义,下同;处理时间 0 d 即为 EE2 显著暴露处理结束,处理时间 7,14,21 d 分别为自然恢复 7,14,21 d 后

图 1 EE2 短期暴露和自然恢复过程对体质量、卵巢质量、GSI 和子代存活率的影响

Fig. 1 Influences of EE2 exposure and recovery on the body mass, ovary mass, GSI, and survival rate of the offspring

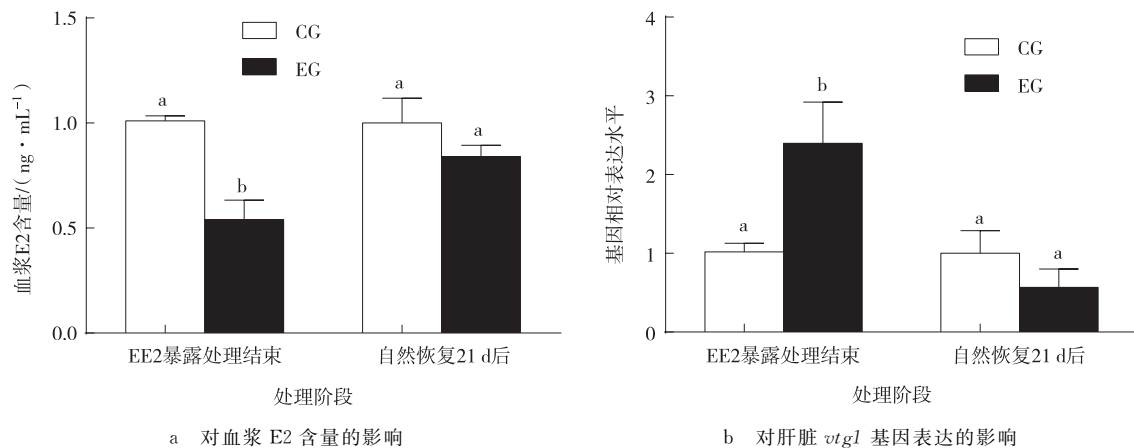


图 3 EE2 短期暴露和自然恢复对血浆 E2 含量和肝脏 *vtg1* 基因表达的影响

Fig. 3 Influences of EE2 exposure and recovery on plasma level of E2 and the expressions of *vtg1* in liver

2.4 对脑和卵巢内相关基因表达的影响

图 4a 显示:在 EE2 短期暴露处理结束时,与 CG 的情况相比,EG 实验鱼脑中 *cyp19a1b*, *gnrh-III*, *lhβ* 和 *fshβ* 基因的相对表达水平均有统计学意义上的降低($p < 0.05$);在自然恢复 21 d 后,两组实验鱼脑中上述相关基

因的相对表达水平差异均不具有统计学意义。类似地,在 EE2 短期暴露处理结束时,与 CG 的情况相比,EG 实验鱼卵巢中 *fshr*, *lhr*, *cyp17a1*, *cyp19a1a*, *20 β -hsd* 和 *era* 基因的相对表达水平均有统计学意义上的降低 ($p < 0.05$);而在自然恢复 21 d 后,两组实验鱼卵巢中上述相关基因的相对表达水平差异均不具有统计学意义(图 4b)。

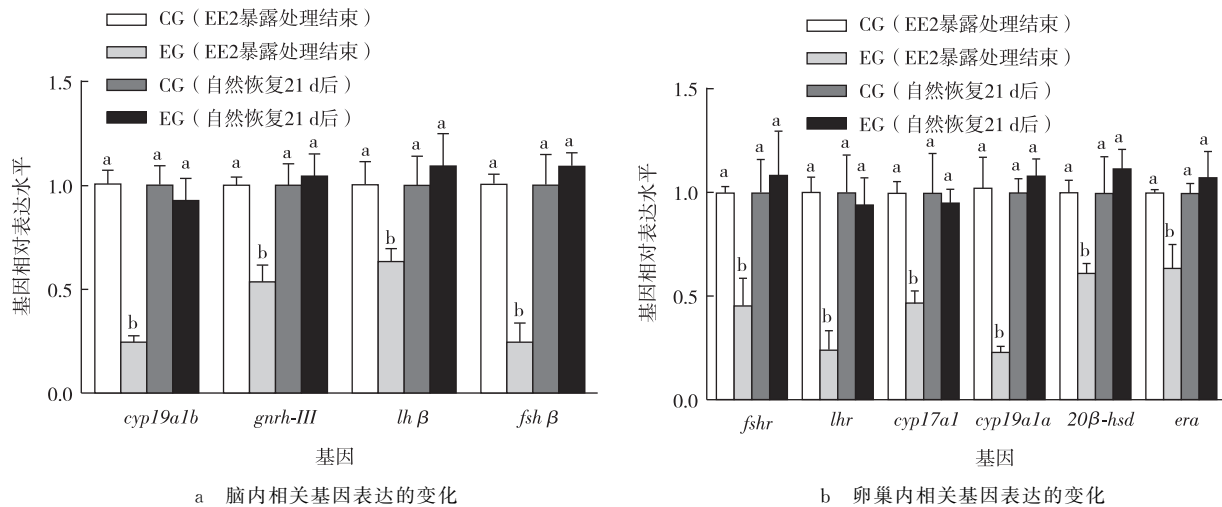


图 4 EE2 短期暴露和自然恢复对脑和卵巢内相关基因表达的影响

Fig. 4 Influences of EE2 exposure and recovery on related genes in brain and in ovary

3 讨论与结论

本研究发现,EE2 短期暴露处理对斑马鱼体质量没有明显影响,但明显降低了斑马鱼卵巢质量、GSI 和后代的存活率。这表明 EE2 能严重干扰斑马鱼卵巢成熟,具有极强的生殖毒性。组织学观察发现,EE2 短期暴露处理严重损伤了斑马鱼的卵巢结构,出现大量卵母细胞与滤泡层分离和早期滤泡的聚集,表明 EE2 能明显干扰斑马鱼的卵子发生,导致卵子发生障碍,这与前面 EE2 短期暴露处理导致斑马鱼卵巢质量和 GSI 明显降低的结果一致。

由于 EE2 具有强烈的雌激素效应,因此不同剂量的 EE2 暴露均能上调肝脏中 *vtg1* 基因的表达,并诱导 VTG 的大量合成^[10-12]。本研究发现,EE2 短期暴露处理能明显上调斑马鱼肝脏 *vtg1* 基因的表达,与其他相关研究结果一致^[12-14]。然而,与肝脏 *vtg1* 基因表达上调结果相反,斑马鱼血浆中 E2 的水平经 EE2 短期暴露处理后明显降低。内源雌激素,主要是 E2,在鱼类卵子发生中起重要作用^[14]。因此,鱼类内源 E2 含量的变化可能导致卵巢发育障碍或卵子发生异常^[15]。因此笔者推测,本研究中 EG 实验鱼血浆中 E2 含量的急剧下降,可能是 EE2 短期暴露处理后斑马鱼卵巢发育障碍和卵子发生受阻的主因之一。

性腺和脑是 E2 合成的主要器官^[16]。在脑中,脑型芳香化酶(*Cyp19a1b*)参与脑中 E2 的合成,而性腺中的卵巢型芳香化酶(*Cyp19a1a*)则主要参与性腺中 E2 的合成^[17]。性腺中 E2 的合成主要受到鱼类 HPG 轴的调控^[15-18]。其中,下丘脑中的促性腺激素释放激素(GnRH)是 HPG 轴的主要调控因子,它作用于垂体,控制垂体中促卵泡刺激素(FSH)和促黄体生成素(LH)的分泌^[19]。FSH 和 LH 通过循环系统作用于卵巢中卵泡上的受体(FSHR 和 LHR),调控性激素合成酶基因如 *cyp17a1*, *cyp19a1a* 和 *20 β -hsd* 的表达,从而调节雌激素和孕激素的合成^[19-21]。本研究发现,与 CG 实验鱼的情况相比,EE2 短期暴露处理导致 EG 实验鱼脑中 *cyp19a1b* 基因相对表达水平和 E2 含量明显降低,同时也导致该组实验鱼脑中 *gnrh-III* 基因、垂体中 *fsh β* 和 *lh β* 基因的表达均被明显抑制。与之相对应的是,与 CG 实验鱼的情况相比,EE2 短期暴露处理不仅导致 EG 实验鱼卵巢中 *fshr* 和 *lhr* 基因表达明显降低,性激素合成酶基因 *cyp17a1*, *cyp19a1a* 和 *20 β -hsd* 的表达也被明显抑制,表明雌激素的合成受阻,而这可能是 EG 实验鱼血浆中 E2 含量下降的原因。有趣的是,有研究发现,脑中 *cyp19a1b* 基因的启动子上有雌激素效应元件(Estrogen response element, ERE),因而雌激素能明显上调 *cyp19a1b* 基因的表达^[22]——这与本研究的结果截然不同。笔者推测,EE2 导致的鱼体内雌激素效应的升高可能通过负反馈调节系统引起 HPG 轴中相关基因的表达下降,以降低内源雌激素产生的雌激素效应,保持鱼体正常的生殖功能;然而

由于 EE2 产生的雌激素效应过强,造成了卵巢损伤^[23]。

大量研究发现,内分泌干扰物所导致的鱼类生殖功能障碍大多可逆^[24-27]。本研究发现,随着自然恢复时间的推移,EG 实验鱼的卵巢质量、GSI 和后代的存活率均逐渐恢复,并在自然恢复 21 d 后与 CG 实验鱼的对应指标基本一致。组织学观察结果显示:自然恢复 7 d 后的 EG 实验鱼卵巢结构与在 EE2 短期暴露处理结束时的卵巢结构无明显差异;自然恢复 14 d 后该组实验鱼的卵巢中仍能发现少数卵母细胞与滤泡层的分离和早期滤泡聚集;但在自然恢复 21 d 后,该组实验鱼卵巢中的上述现象完全消失。与之相对应的是,自然恢复 21 d 后 EG 实验鱼肝脏中 *vtg1* 基因表达和血浆中 E2 的含量也恢复到与 CG 实验鱼的这两个指标基本一致的水平。上述结果表明,自然恢复 21 d 后,经 EE2 短期暴露处理的斑马鱼的生殖功能已完全恢复。从基因表达上看,EG 实验鱼 HPG 轴的相关基因表达水平也在自然恢复 21 d 后与 CG 实验鱼的相关基因表达水平基本一致。总之,100 ng · L⁻¹ 的 EE2 短期暴露所导致的斑马鱼卵巢发育障碍和卵子发生是可逆的,这与其他关于内分泌干扰物的研究结果一致^[28-30]。

值得注意的是,6 d EE2 短期暴露所导致的斑马鱼卵巢损伤需要 21 d 左右才能完全恢复,说明恢复时间远远长于暴露时间。因此,水体中高剂量的污染所导致的具有非致死效应的鱼类损伤,在自然恢复条件下需要较为漫长的时期。这提示人们,在工业生产过程必须避免污染物的非正常排放(如偷排、漏排、事故排放等),否则污染物给鱼类带来的各种不利效应将持续较长时间^[30]。同时,这也提示一旦发生诸如事故排放一类的事件时,人们在环境污染评估中必须考虑鱼类损伤恢复的时滞性,才能更加真实反映污染物对渔业资源和水生态系统产生的不利影响。

综上所述,本研究发现:1) EE2 短期暴露能诱导斑马鱼一系列参与卵子发生的基因表达水平明显下调、血浆 E2 含量降低,还会抑制肝脏 *vtg1* 基因的表达,导致斑马鱼卵子发生障碍,引起卵巢质量、GSI 和后代存活率明显下降;2) EE2 短期暴露导致的斑马鱼卵子发生障碍是可逆的,其中伴随着一系列基因表达、血浆 E2 含量、卵子组织学改变、卵巢质量、GSI、后代存活率等指标的恢复;3) EE2 短期暴露后上述指标自然恢复所需时间远长于暴露时间,表现出损伤恢复的滞后性。

参考文献:

- [1] LÄNGE R, HUTCHINSON T H, CROUDACE C P, et al. Effects of the synthetic estrogen 17 α -ethinylestradiol on the life-cycle of the fathead minnow (*Pimephales promelas*) [J]. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 2001, 20 (6): 1216-1227.
- [2] BALCH G C, MACKENZIE C A, METCALFE C D. Alterations to gonadal development and reproductive success in Japanese medaka (*Oryzias latipes*) exposed to 17 α -ethinylestradiol [J]. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 2004, 23(3): 782-791.
- [3] COLMAN J R, BALDWIN D, JOHNSON L L, et al. Effects of the synthetic estrogen, 17 α -ethinylestradiol on aggression and courtship behavior in male zebrafish (*Danio rerio*) [J]. *Aquatic Toxicology*, 2009, 91(4): 346-354.
- [4] SALIERNO J D, KANE A S. 17 α -Ethinylestradiol alters reproductive behaviors, circulating hormones and sexual morphology in male fathead minnows (*Pimephales promelas*) [J]. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 2009, 28(5): 953-961.
- [5] 郭学鸣, 李英文, 尹盼, 等. EE2 抑制斑马鱼卵巢发育和卵母细胞发生 [J]. *重庆师范大学学报(自然科学版)*, 2015, 32 (3): 30-34.
GUO X M, LI Y W, YIN P, et al. The inhibition of 17 α -ethinylestradiol on zebrafish (*Danio rerio*) ovarian development and oogenesis [J]. *Journal of Chongqing Normal University (Natural Science)*, 2015, 32(3): 30-34.
- [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 [J]. *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 impacts on fish reproductive [J]. *Jiangsu Journal of Agricultural Sciences*, 2013, 29(1): 202-208.
- [7] 刘虹余, 蔡静, 饶剑军, 等. EE2 损伤雌性斑马鱼成鱼 (*Danio rerio*) 卵巢、肝脏和鳃的机理研究 [D]. 重庆: 重庆师范大学, 2016.
LIU H Y, CAI J, RAO J J, et al. Inhibitory Effect of EE2 on the expression of genes encoding steroidogenic enzymes responsible for estrogen production in zebrafish female [D]. Chongqing: Chongqing Normal University, 2016.
- [8] 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.
- [9] 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: 402-408.
- [10] KNOEBL I, BLUM J L, HEMMER M J, et al. Temporal gene induction patterns in sheepshead minnows exposed to 17β -estradiol[J]. *Journal of Experimental Zoology Part A Comparative Experimental Biology*, 2006, 305(9): 707-719.
- [11] TYLER C R, SUMPTER J P. Oocyte growth and development in teleosts[J]. *Reviews in Fish Biology & Fisheries*, 1996, 6(3): 287-318.
- [12] WANG H, TAN J T, EMELYANOV A, et al. Hepatic and extrahepatic expression of vitellogenin genes in the zebrafish, *Danio rerio* [J]. *Gene*, 2005, 356(1): 91-100.
- [13] XU H, YANG J, WANG Y, et al. Exposure to 17α -ethynylestradiol impairs reproductive functions of both male and female zebrafish (*Danio rerio*) [J]. *Aquatic Toxicology*, 2008, 88(1): 1-8.
- [14] BOSKER T, MUNKITTRICK K R, LISTER A, et al. Mummichog (*Fundulus heteroclitus*) continue to successfully produce eggs after exposure to high levels of 17α -ethynylestradiol [J]. *Environmental Toxicology & Chemistry*, 2016, 35(5): 1107-1112.
- [15] HUANG B, SUN W, LI X, et al. Effects and bioaccumulation of 17β -estradiol and 17α -ethynylestradiol following long-term exposure in crucian carp [J]. *Ecotoxicology & Environmental Safety*, 2015, 112: 169-176.
- [16] HINFRAY N, PALLUEL O, TURIES C, et al. Brain and gonadal aromatase as potential targets of endocrine disrupting chemicals in a model species, the zebrafish (*Danio rerio*) [J]. *Environmental Toxicology*, 2006, 21(4): 332-337.
- [17] 朱敏. DES 和 EE2 对黄颡鱼性腺发育和配子发生的影响 [D]. 重庆: 重庆师范大学, 2013.
ZHU M. The influence of DES and EE2 on the gonadal development and gametogenesis of yellow catfish [D]. Chongqing: Chongqing Normal University, 2013.
- [18] SCHNEIDER H P, McCANN S M. Release of LH-releasing factor (LRF) into the peripheral circulation of hypophysectomized rats by dopamine and its blockage by estradiol [J]. *Endocrinology*, 1970, 87(2): 249-253.
- [19] SAADE G, LONDON D R, CLAYTON R N. The interaction of gonadotropin-releasing hormone and estradiol on luteinizing hormone and prolactin gene expression in female hypogonadal (hpg) mice [J]. *Endocrinology*, 1989, 124(4): 1744-1753.
- [20] LIU X, JI K, JO A, et al. Effects of TDCPP or TPP on gene transcriptions and hormones of HPG axis, and their consequences on reproduction in adult zebrafish (*Danio rerio*) [J]. *Aquatic Toxicology*, 2013, 134/135(12): 104-111.
- [21] SHERMAN B M, WEST J H, KORENMAN S G. The menopausal transition: analysis of LH, estradiol, and progesterone concentrations during menstrual cycles of older women [J]. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 1976, 42(4): 629-636.
- [22] 相福生, 黄天晴, 谷伟, 等. 硬骨鱼脑芳香化酶的表达调节功能推测以及类固醇合成酶的研究进展 [J]. *水产学杂志*, 2018, 31(1): 42-51.
XIANG F S, HUANG T Q, GU W, et al. Research perspectives of expression regulation and putative functions of aromatase and steroidogenic enzymes in brain of teleost fish [J]. *Chinese Journal of Fisheries*, 2018, 31(1): 42-51.
- [23] SRIDEVI P, CHAITANYA R K, PRATHIBHA Y, et al. Early exposure of 17α -ethynylestradiol and diethylstilbestrol induces morphological changes and alters ovarian steroidogenic pathway enzyme gene expression in catfish, *Clarias gariepinus* [J]. *Environmental Toxicology*, 2013, 30(4): 439-451.
- [24] LEE P Y, LIN C Y, CHEN T H. Environmentally relevant exposure of 17α -ethynylestradiol impairs spawning and reproductive behavior in the brackish medaka *Oryzias melastigma* [J]. *Marine Pollution Bulletin*, 2014, 85(2): 338-343.
- [25] BAATRUP E. Measuring complex behavior patterns in fish: effects of endocrine disruptors on the guppy reproductive behavior [J]. *Human & Ecological Risk Assessment an International Journal*, 2009, 15(1): 53-62.
- [26] STAHLSCHEMIDT-ALLNER P, ALLNER B, ROMBKE J, et al. Endocrine disruptors in the aquatic environment [J]. *Environmental Science and Pollution Research International*, 1997, 4(3): 155-162.
- [27] 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.
- [28] NICOLOPOULOU STAMATI P, PITSOS M A. The impact of endocrine disruptors on the female reproductive system [J]. *Human Reproduction Update*, 2001, 7(3): 323-330.
- [29] GYLLENHAMMAR I. Endocrine Disruption in amphibians: developmental effects of ethynylestradiol and clotrimazole on the reproductive system [EB/OL]. [2018-04-10]. https://www.researchgate.net/publication/265673444_endocrine_disruption_in_amphibians_developmental_effects_of_ethynylestradiol_and_clotrimazole_on_the_reproductive_system.

- [30] 杨再福,赵晓祥. 环境雌激素对水生动物的影响研究进展[J]. 生态环境学报,2005,14(1):108-112.
YANG Z F, ZHAO X X. Advance in the studies on effects of environmental estrogens on aquatic animals[J]. Ecology and Environment,2005,14(1):108-112.

Animal Sciences

The Recovery and the Mechanisms Underlying of the Impaired Oogenesis in Zebrafish Induced by Short-Term Exposure of 17α -Ethinylestradiol

LIU Zhihao, LAN Xuerong, LI Yingwen

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

Abstract: [Purposes] The present study aims to demonstrate the possible recovery of the toxicity of EE2 on zebrafish oogenesis and the underlying mechanisms involved. [Methods] Adult zebrafish females were exposed to $100 \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$ EE2 for 6 days, and then replaced into fresh water to recover for 21 days. After treatment and recovery, body weight, ovary weight, GSI, survival rate of the offspring, sex steroid level and mRNA levels of the genes involved were measured. [Findings] After the short-term exposure to EE2, the ovary weight, gonadosomatic index (GSI) and the survival rate of offspring decreased dramatically. Consistently, impaired oogenesis, declined E2 level in plasma and increased *vtg1* mRNA level in liver were also observed. Moreover, the transcriptions of genes involved in zebrafish oogenesis (*cyp19a1b*, *gnrh-III*, *fsh β* , *lh β* , *fshr*, *lhr*, *cyp19a1a*, *cyp17a1*, *20 β -hsd*, and *era*) were significantly suppressed after exposure. During recovery, the ovary weight, GSI and survival rate of the offspring, as well as histopathological impairments in ovary, were gradually recovered. At 21 days post recovery, E2 level in plasma, mRNA level of *vtg1* in liver and the expressions of genes involved in oogenesis showed no significant change compared with the control, indicating the recovered oogenesis of zebrafish females. [Conclusions] The impaired oogenesis induced by short-term exposure of EE2 is reversible. However, the duration for recovery is much longer than exposure, indicating the hysteretic nature of the recovery after EE2 exposure on zebrafish females.

Keywords: ethinylestradiol; zebrafish; short-term exposure; impaired oogenesis; mechanisms of recovery

(责任编辑 方 兴)

(接正文36页)

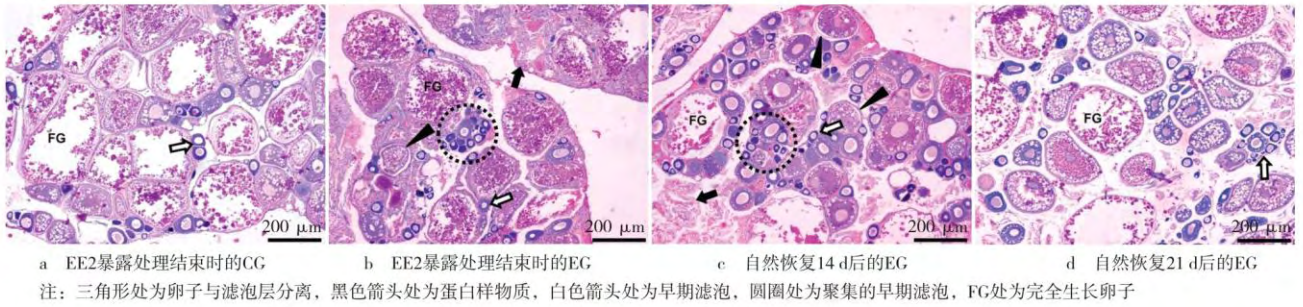


图2 斑马鱼雌性成鱼的卵巢结构

Fig. 2 Ovarian structure of zebrafish female adults

(接正文73~76页)

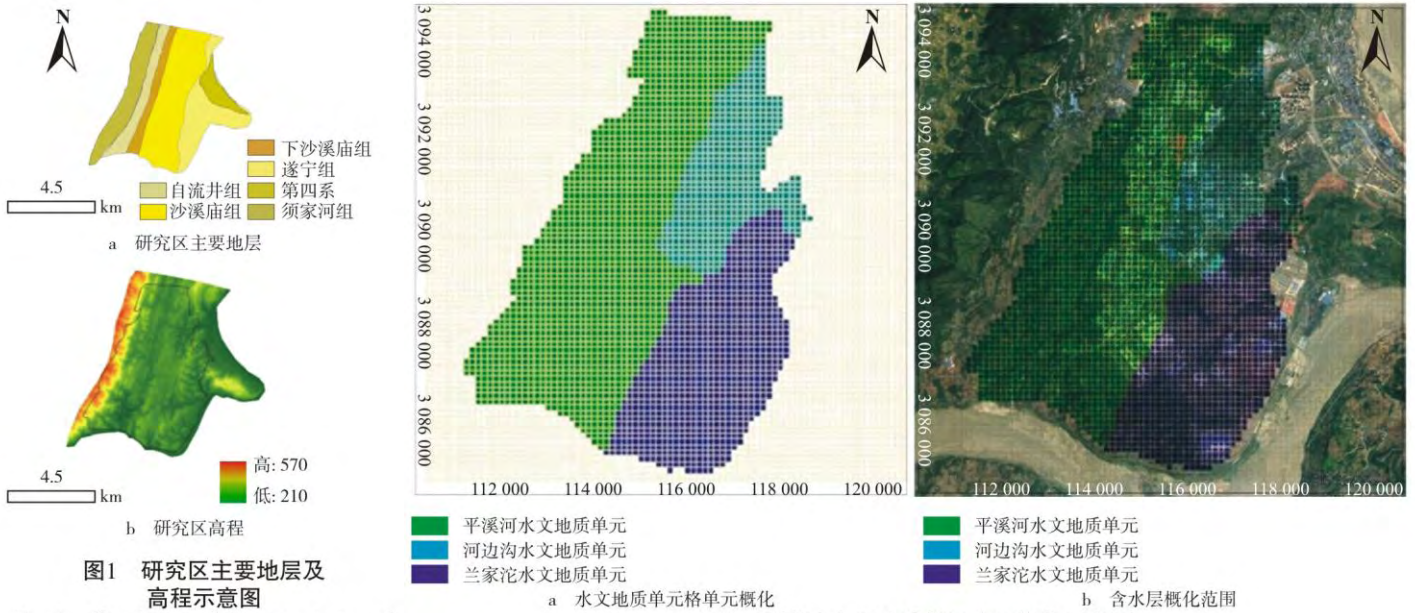


图1 研究区主要地层及高程示意图

Fig. 1 Sketch map of the main strata and elevation of the study area

图4 研究区水文地质单元分区概化示意图

Fig. 4 Sketch map of hydrogeological unit zoning in study area

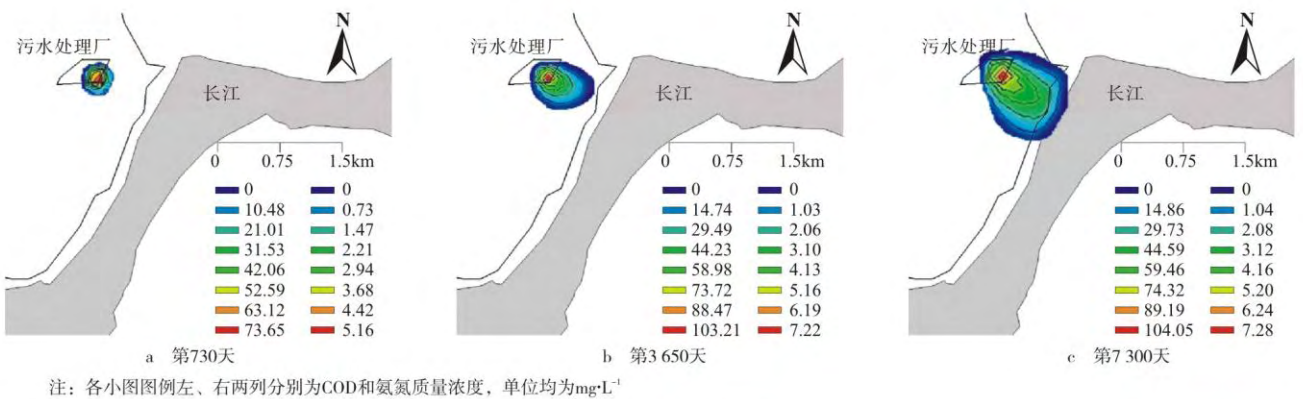


图6 污染物运移平面图

Fig. 6 The pollutant transport plan

(接正文117~118页)



图1 活体半叶枯斑法实验结果

Fig. 1 Results of *in vivo* half-leaf method



注: 左半叶为对照, 右半叶为施药处理

图2 馏分Fr6离体半叶枯斑法活性结果

Fig. 2 Results of *in vitro* half-leaf method of fraction Fr6