

乙炔基雌二醇短期暴露损伤斑马鱼雌性成鱼渗透压调节^{*}

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】考察乙炔基雌二醇(17 α -ethinylestradiol, EE2)短期暴露对斑马鱼(*Danio rerio*)雌性成鱼渗透压调节的影响。【方法】用10和100 ng·L⁻¹ EE2暴露性斑马鱼雌性成鱼7 d, 同时设立不含EE2的对照组, 然后测量斑马鱼体质量、体长并计算肥满度, 测定全血量、血浆量和红细胞数量, 观察鳃与肾的组织结构。【结果】与对照组相比, 受100 ng·L⁻¹ EE2短期暴露处理后的斑马鱼雌性成鱼出现眼球突出、体表充血、鳞片竖起等症状, 肥满度明显增加全血量和血浆量明显升高, 红细胞数量则明显下降。此外, 经EE2短期暴露处理的斑马鱼雌性成鱼的鳃出现上皮细胞水肿、血管扩张等症状, 而肾脏则出现小管上皮水肿、多发性出血等症状。【结论】EE2短期暴露导致斑马鱼雌性成鱼渗透压调节出现明显失衡, 对该鱼具有强烈的渗透压毒性。

关键词:乙炔基雌二醇; 斑马鱼雌性; 短期暴露; 渗透压调节

中图分类号:Q492.5

文献标志码:A

文章编号:1672-6693(2019)04-0044-05

乙炔基雌二醇(17 α -ethinylestradiol, EE2)是一种广泛分布于地表水环境中的环境干扰物质(Endocrine disrupting chemicals), 也是一种具有强烈雌激素效应的人工合成雌激素^[1]。许多研究发现, EE2对鱼类的性腺分化、发育、配子发生和繁殖都具有强烈毒性^[2-4]。经EE2处理的雄鱼出现明显雌性化, 如卵黄蛋白(Vitellogenin)大量合成、性激素分泌失衡、性比改变、间性性腺、少精症等^[2-4]。此外, 较高剂量的EE2短期暴露也能严重干扰雌性斑马鱼(*Danio rerio*)卵巢发育和卵子发生, 导致早期和后期滤泡比例改变, 后代存活率降低, 甚至丧失生育能力^[5]。最近的研究发现, EE2所致卵巢发育障碍与下丘脑-垂体-性腺(Hypothalamic-pituitary-gonadal, HPG)轴功能异常及配子发生程序性失控密切相关^[6]。然而, EE2是否对鱼类具有渗透压毒性尚不清楚。为此, 本研究用10和100 ng·L⁻¹的EE2对斑马鱼雌性成鱼进行了7 d暴露处理, 并在处理结束后, 对斑马鱼的形态结构、肥满度、全血量、血浆量、红细胞数量和主要的渗透压调节器官(鳃和肾)的组织结构进行了分析。

1 材料与方法

1.1 主要试剂和仪器

EE2和助溶剂二甲基亚砜(DMSO)均购自Sigma公司。Eclipse 90i型光学显微镜购自Nikon公司, KD-3358型石蜡切片机购于科迪仪器设备有限公司。

1.2 实验设计与材料收集

实验用AB系120 d龄斑马鱼雌性成鱼购于国家斑马鱼资源中心(武汉), 平均体质量为(0.52±0.08) g。实验鱼在循环养殖系统中驯养7 d, 驯养水源为曝气除氯的自来水, 水温控制在(28±0.5)℃, 光照周期为14 h光照:10 h黑暗, 硝酸盐、亚硝酸盐、硬度、pH等水质参数都控制在正常范围内, 溶氧量大于或等于6.8 mg·L⁻¹。

通过预备实验发现, 斑马鱼雌性在100 ng·L⁻¹的EE2中暴露10 d即可出现明显的病理学变化, 并有个体死亡, 因此将这一质量浓度的EE2用于本研究的高剂量暴露处理(EE2-high)。此外, 本研究还设置1个水体中不含EE2但其中DMSO质量分数为0.05%的对照处理(Control)和1个水体中EE2质量浓度为10 ng·L⁻¹的低剂量暴露处理(EE2-low)。因此, 随机取81尾雌性实验鱼并随机平均分为3组, 进行上述处理。每个处理组

* 收稿日期:2018-06-28 修回日期:2019-05-07 网络出版时间:2019-07-15 12:30

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;No. 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);淡水生态与生物技术国家重点实验室开放课题(No. 2019FB03)

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.20190715.1230.012.html>

均设置 3 个平行缸(容积为 60 L 的玻璃缸,加曝气自来水 50 L),每缸随机放入 9 尾实验鱼。处理期间,每日对实验鱼喂食 3 次、整体换水 1 次,并对水体持续充氧,维持水温和光照周期与处理前一致。7 d 暴露处理结束后,从每缸中随机取 4 尾实验鱼,测定体质量(单位:g)、体长(单位:cm),并用公式“ $\text{肥满度} = \frac{\text{体质量}}{\text{体长}^3}$ ”计算肥满度(单位: $\text{g} \cdot \text{cm}^{-3}$);再从每缸中随机取 2 尾实验鱼,取下鳃和肾脏,经波恩氏液固定后,用于组织学切片;最后从每缸中取剩下的 3 尾实验鱼,收集血液,用于全血量、血浆量和红细胞数量检测。

1.3 全血量、血浆量和红细胞数量测定

从每个处理组取实验鱼 9 尾,用 Babaei 等人^[7]描述的方法进行断尾,并用毛细采血管进行取血。取血后比较各处理组实验鱼全血量的差异。随后,将上述血液在 4 ℃ 下按 $10\,000\text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 15 min,取出上清液,对比各组血浆体容量。每组另取 3 尾鱼的全血,用生理盐水稀释 200 倍后,用血细胞计数器在光镜下对红细胞数量(单位: $\text{个} \cdot \text{L}^{-1}$)进行统计。计算公式为“ $\text{红细胞数量} = 5 \text{ 个方格中红细胞总数} \times 25/5 \times 10 \times 10^6 \times 200$ ”,其中 200 为稀释倍数。

1.4 组织学观察

取实验鱼的鳃和肾脏,于波恩氏液中室温固定 18 h。经梯度酒精脱水、二甲苯透明 3 次后,用 60 ℃ 的石蜡在包埋盒中包埋。在切片机上对包埋材料进行切片,切片厚度为 4 μm。切片经脱蜡、复水后,经苏木素-伊红(HE)染色后,在 Eclipse 90i 型光学显微镜上拍照。

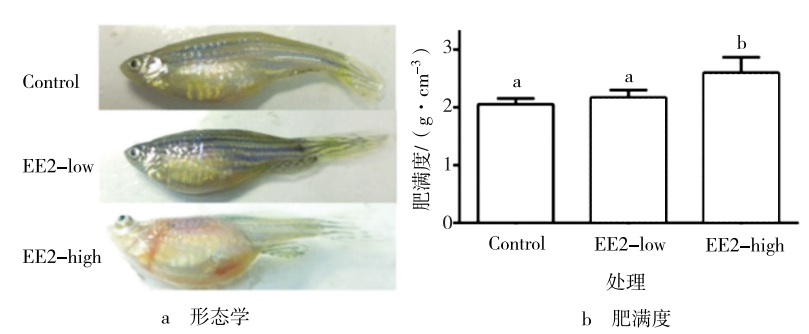
1.5 数据分析

实验数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示。用 SPSS 13.0 软件对实验数据进行单因素方差分析多重比较(Tukey 法),当 $p < 0.05$ 时,分析结果具有统计学意义。展示实验数据的柱形图用 GraphPad Prism 6.0 软件进行绘制。

2 结果

2.1 形态学和肥满度

图 1a 显示,经 EE2 短期暴露后,与 Control 组相比,EE2-low 组实验鱼的形态没有明显变化,而 EE2-high 组实验鱼则出现了眼球突出、鳞片竖起、体表充血、毛细血管扩张等现象。研究结果还显示,EE2-low 组与 Control 组的实验鱼肥满度不具有统计学意义上的差异,而 EE2-high 组较 Control 组而言,实验鱼肥满度明显上升,且与后者的差异具有统计学意义($p < 0.05$)(图 1b)。



注:样本量 $n=12$ 。不同字母表示处理组间数据差异具有统计学意义($p < 0.05$),下同

图 1 EE2 暴露对斑马鱼雌性成鱼形态学和肥满度的影响

Fig. 1 The influence of EE2 exposure on morphology and condition factor of zebrafish females

2.2 全血量、血浆量和红细胞数量

从图 2a 可知,与 Control 组相比,两个 EE2 处理组的实验鱼全血量呈剂量依赖性增加,且与前者的差异具有统计学意义($p < 0.05$),但两个 EE2 处理组实验鱼全血量不具有统计学意义上的差异。图 2b 则显示,EE2-low 组与 Control 组实验鱼血浆量不具有统计学意义上的差异,而与 Control 组相比,EE2-high 组实验鱼血浆量出现了统计学意义上的增加($p < 0.05$)。此外由图 2c 可见,与 Control 组相比,EE2-low 组实验鱼红细胞数量有下降的趋势,两组的这一指标差异不具有统计学意义,EE2-high 组较 Control 组而言,实验鱼红细胞数量出现了统计学意义上的减少($p < 0.05$)。

2.3 鳃和肾脏组织结构

EE2 暴露处理 7 d 后,对实验鱼鳃的组织学观察结果显示:Control 组实验鱼鳃丝排列整齐,鳃小片无损伤(图 3a,d);EE2-low 组实验鱼鳃则出现部分鳃小片脱落,上皮细胞肿胀的现象(图 3b,e);EE2-high 组斑马鱼上皮细胞肿胀、排列紊乱,并出现了毛细血管扩张的现象(图 3c,f)。同时,对实验鱼肾脏的组织学观察结果表明:Control 组实验鱼肾脏中肾小管和上皮细胞形态正常(图 4a,d);经 EE2-low 处理的实验鱼肾脏中有少量局部出

血(图 4b,e);经 EE2-high 处理的实验鱼肾脏出现多发性出血,肾小管上皮细胞肿胀,坏死(图 4c,f)。

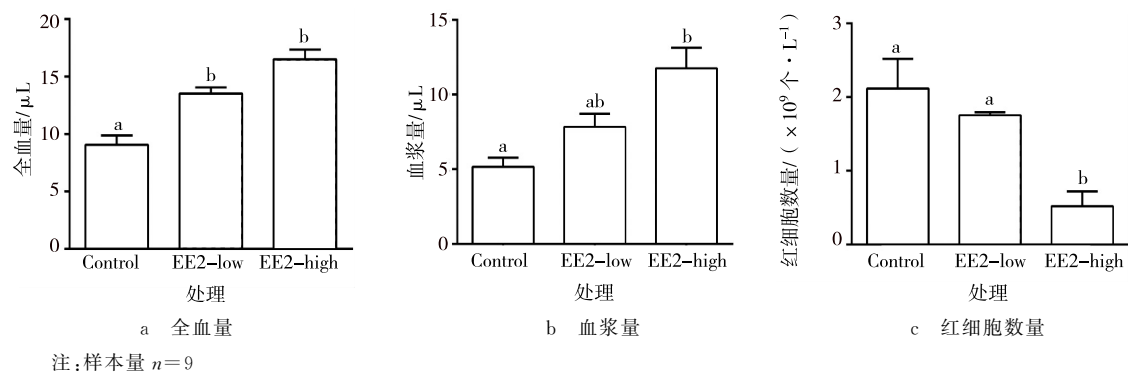


图 2 EE2 暴露对斑马鱼雌性成鱼全血量、血浆量和红细胞数量的影响

Fig. 2 The influence of EE2 exposure on blood, plasma, and red blood cell concentration volumes of zebrafish females

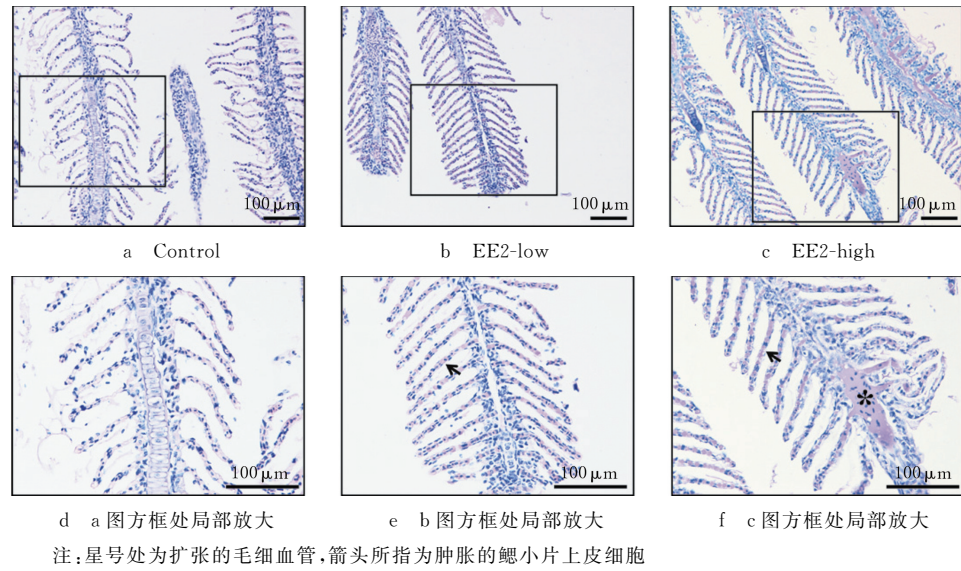


图 3 EE2 暴露对斑马鱼雌性成鱼鳃的影响

Fig. 3 The influence of EE2 exposure on gill of the zebrafish female adults

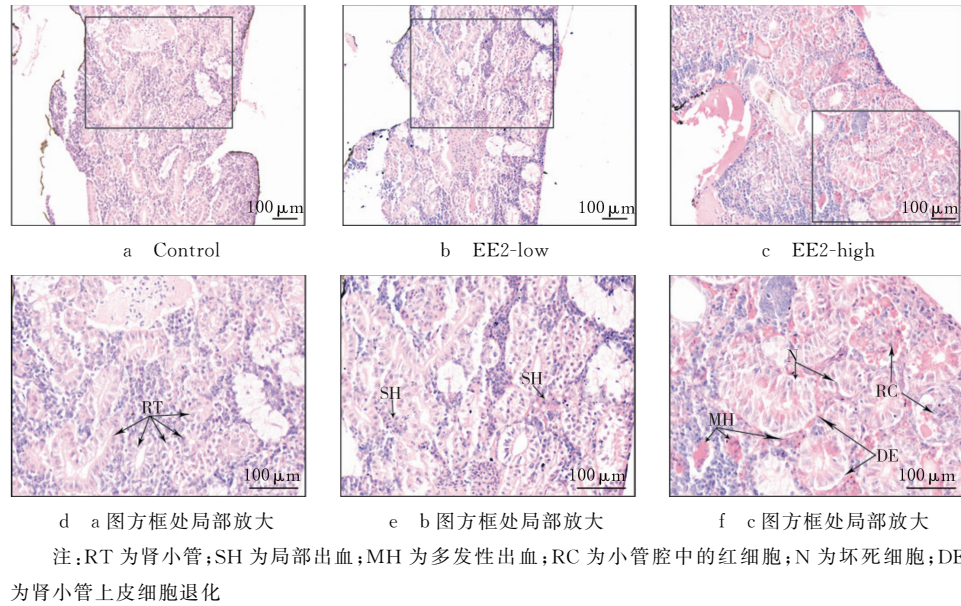


图 4 EE2 处理对斑马鱼雌性成鱼肾脏的影响

Fig. 4 The influence of EE2 exposure on kidney of the zebrafish female adults

3 讨论与结论

以往研究发现,100 ng · L⁻¹的 EE2 暴露对斑马鱼雌性成鱼的形态造成明显的病理学影响,如鳞片竖起、鳃丝充血、肝脏肿胀、颜色变浅等^[6]。与上述研究结果类似,本研究也发现经 EE2-high 处理的斑马鱼雌性的腹部血管扩张,眼球突出,且肥满度上升。有趣的是,与 Control 组相比,EE2-high 组斑马鱼的全血量明显升高。另外,本研究未展示的数据表明,EE2-high 组斑马鱼血细胞总体积无明显变化,但血浆量则明显增大。进一步研究发现,实验鱼的红细胞数量与 EE2 的质量浓度呈明显的负相关关系,这暗示实验鱼体内含水量上升可能是全血量增大的重要原因之一。总之,EE2 短期处理对斑马鱼雌性成鱼的水盐平衡可能造成了严重损害。

包括鱼类在内的所有脊椎动物均须通过肾脏调节体内的渗透压,以维持细胞的水盐平衡,这对细胞正常的功能和活动至关重要^[8]。鱼类生活于水环境中,它们的渗透压调节的方式明显多样化。淡水鱼类的体液为高渗,而生活的水环境为低渗,鱼体易于从外界吸水。因此,淡水硬骨鱼如斑马鱼等具有发达的肾脏和数量众多的肾单位,以排出多余的水分(低渗尿)。其中,肾小球将大量体液滤至肾小管,其间重新吸收掉必须离子如 K⁺, Cl⁻ 等和糖类,然后排出多余的水分^[9]。因此肾小体和肾小管正常功能的维持在鱼类的渗透压调节中起重要作用。本研究结果显示,经 EE2 暴露处理的斑马鱼肾脏中出现管周多发性出血、肾小管上皮细胞肿胀和坏死等现象,表明肾脏受到严重损伤。这将严重影响鱼体对水盐平衡的调节并导致调节失衡。

除肾脏以外,鳃也是鱼类重要的渗透压调节器官^[10]。淡水鱼类中数量较少而海水鱼类中数量众多的氯细胞是鳃进行水和离子转运的重要场所^[11]。氯细胞膜上分布着数量不等的水通道蛋白和离子转运系统,且物种差异极大^[11]。离子转运系统主要分为离子通道和离子转运蛋白,在淡水鱼类中主要参与对离子的摄取^[13-14];而水通道蛋白则负责对水分子的摄入^[12]。因此,鳃丝的完整性和正常结构对维持鱼类的呼吸和渗透压调节均不可或缺^[15]。本研究发现,EE2 暴露处理对斑马鱼雌性成鱼的鳃造成了明显的形态学损伤,如鳃上皮细胞肿胀、排列紊乱、毛细血管扩张等。上述损伤不仅严重影响鱼类的呼吸,还可能直接干扰鱼体的水盐平衡调节。

综上所述,本研究推测,EE2 短期暴露所导致的斑马鱼雌性成鱼主要的渗透压调节器官鳃和肾脏组织结构的病变,可能诱导了斑马鱼渗透压调节失衡,致使斑马鱼全血量、血浆量增加,而红细胞数量则减少。因此,EE2 短期暴露对斑马鱼雌性成鱼具有明显的渗透压毒性,但其中毒理机制有待进一步深入研究。

参考文献:

- [1] 杨莹,刘秀红,王洪臣,等. 污水中 17 α -乙炔基雌二醇的去除及其机理研究进展[J]. 水处理技术,2016(5):45-50.
YANG Y,LIU X H,WANG H C,et al. Research progress on the removal and mechanism of 17 α -ethynylestradiol in waste water treatment[J]. Technology of Water Treatment, 2016(5):45-50.
- [2] WEBER L P,HILL R L,JANZ D M. Developmental estrogenic exposure in zebrafish (*Danio rerio*): II. Histological evaluation of gametogenesis and organ toxicity[J]. Aquatic Toxicology,2003,63(4):431-446.
- [3] MILLER H D,CLARK B W,HINTON D E,et al. Anchoring ethynylestradiol induced gene expression changes with testicular morphology and reproductive function in the medaka[J]. Plos One,2012,7(12):e52479.
- [4] PORSEYD T,REYHANIAN C N,VOLKOVA K,et al. Testis transcriptome alterations in zebrafish (*Danio rerio*) with reduced fertility due to developmental exposure to 17 α -ethynylestradiol[J]. General and Comparative Endocrinology,2018,262:44-58.
- [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.
- [6] GUO X M,LING Y W,YIN P,et al. The inhibition of 17 α -ethynylestradiol on zebrafish (*Danio rerio*) ovarian development and oogenesis[J]. Journal of Chongqing Normal University (Natural Science),2015,32(3):30-34.
- [7] 饶剑军. EE2 损伤雌性斑马鱼成鱼(*Danio rerio*)卵巢、肝脏和鳃的毒理机制[D]. 重庆:重庆师范大学,2016.
- [8] RAO J J. Toxicological mechanism of EE2 damage ovary, liver and gill in adult female zebrafish [D]. Chongqing: Chongqing Normal University,2016.
- [9] BABAEI F,RAMALINGAM R,TAVENDALE A,et al. Novel blood collection method allows plasma proteome analysis from single zebrafish[J]. Journal of Proteome Research,2013,12(4):1580-1590.
- [10] DONATO V,LACQUANITI A,CERNARO V,et al. From water to aquaretics: a legendary route[J]. Cell Physiology Biochemistry, 2014,33(5):1369-1388.
- [11] 谢志浩. 鱼类的渗透压调节[J]. 生物学通报,2002,37(5):22-23.
- [12] XIE Z H. Osmotic adjustment of fish[J]. Biology Bulletin, 2002,37(5):22-23.

- [10] GUH Y J, LIN C H, HWANG P P. Osmoregulation in zebrafish: ion transport mechanisms and functional regulation[J]. *EXCLI Journal*, 2015, 14: 627-659.
- [11] CRAIG P M, WOOD C M, Mc CLELLAND G B. Gill membrane remodeling with soft-water acclimation in zebrafish (*Danio rerio*) [J]. *Physiol Genomics*, 2007, 30(1): 53-60.
- [12] NIELSEN S, FRØKLÆR J, MARPLES D, et al. Aquaporins in the kidney: from molecules to medicine[J]. *Physiological Reviews*, 2002, 82(1): 205-244.
- [13] SHIGEHISA H, TOYOJY K, NOBUKE N, et al. Molecular biology of major components of chloride cells [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part B*, 2003, 36(4): 593-620.
- [14] 尹飞, 孙鹏, 彭士明, 等. 低盐度胁迫对银鲳幼鱼肝脏抗氧化酶、鳃和肾脏 ATP 酶活力的影响[J]. *应用生态学报*, 2011, 22(4): 1059-1066.
- YIN F, SUN P, PENG S M, et al. Effects of low salinity stress on the antioxidant enzyme activities in juvenile *Pampus argenteus* liver and the APTase activities in its gill and kidney [J]. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2011, 22(4): 1059-1066.
- [15] EVANS D H, PIERMARINI P M, CHOE K P. The multifunctional fish gill: dominant site of gas exchange, osmoregulation, acid-base regulation, and excretion of nitrogenous waste [J]. *Physiological Reviews*, 2005, 85(1): 97-177.

Animal Sciences

Short-Term Exposure of 17 α -ethinylestradiol (EE2) Impaired the Osmo-Regulation of Zebrafish Female Adults

LIU Zhihao, LAN Xuerong, LI Yingwen

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

Abstract: [Purposes] 17 α -ethinylestradiol (EE2) has been proved to impair oogenesis and ovarian maturation in fish. However, whether EE2 is capable of affecting the osmo-regulation of fish remained unknown. [Methods] Adult zebrafish (*Danio rerio*) females were exposed to two concentrations of EE2 (10 and 100 ng · L⁻¹) and control (without EE2) for 7 days. After exposure, the morphology, condition factor, total blood volume, plasma volume, concentration of red blood cell and the histology of gill and kidney of the fish were measured. [Findings] After exposure, morphological impairments, such as protopsis and trichangiectasis in the skin, as well as increased condition factor, were observed. In addition, elevated blood volume and plasma volume while decreased concentration of red blood cells were further present in exposed fish. Histological changes, such as swelling branchial epithelial cells and trichangiectasis in gill and swelling tubular epithelial cells and hemorrhage in interrenal tissues of kidney were observed. [Conclusions] Short-term exposure of EE2 impaired the osmo-regulation of zebrafish female adults, indicating the strong osmo-toxicity of EE2 on zebrafish females.

Keywords: 17 α -ethinylestradiol; female zebrafish; short-term exposure; osmo-regulation

(责任编辑 方 兴)