动物科学

DOI:10.11721/cqnuj20190604

低剂量镉对雌性斑马鱼卵子发生的影响*

谢冬梅，曾　征，易循娥，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】考察低剂量镉(Cd)暴露对斑马鱼(*Danio rerio*)雌鱼卵子发生的影响。【方法】将成年雌性斑马鱼分为两组，分别于不添加 Cd^{2+}(对照组)和 Cd^{2+} 质量浓度为 5 $\mu g \cdot L^{-1}$(实验组)的水体中处理 30 d，而后取实验鱼卵巢进行组织学分析，并检测雌二醇(E2)的含量以及下丘脑-垂体-性腺(HPG)轴和减数分裂中相关基因的表达量。【结果】1) 与对照组相比，实验组的卵巢中早期卵母细胞减少而成熟期卵母细胞增多；2) 实验组血浆中 E2 含量与对照组相比有明显下降，且两者差异具有统计学意义($p<0.05$)；3) 与对照组相比，实验组 HPG 轴中 *gnrh2*，*gnrh3*，*fshβ*，*lhβ*，*fshr* 及 *lhr* 基因的表达上调，但 *cyp19a1b* 和 *cyp19a1a* 基因的表达下调；4) 实验组与对照组相比，卵巢中减数分裂标记基因 *dmc1* 及减数分裂起始相关基因 *aldh1a2* 的表达量均具有统计学意义上的上升($p<0.05$)。【结论】研究所设置的 Cd 暴露条件能干扰成年雌性斑马鱼卵子发生过程关键调控基因的表达，并影响性激素水平及卵母细胞的正常发育。

关键词:低剂量镉；雌性斑马鱼；卵巢；雌二醇；卵子发生

中图分类号:Q175 **文献标志码:**A **文章编号:**1672-6693(2019)06-0041-06

镉(Cd)是一种难降解且具有高毒性的重金属，对生物体有广泛而复杂的危害[1]，是生态环境保护重点防控的环境污染物之一。由于人们在生产和使用颜料、电池、杀虫剂等活动后将含 Cd 的工业和生活废料、废水排入环境水体中，因而使之遭受不同程度的 Cd 污染，并威胁到鱼类的生存和生长[1]。水体中的 Cd 主要通过鱼类的呼吸、进食及体表渗透进入鱼体中[2]。因 Cd 在生物体内的半衰期长达 10～30 a 且排出速率极低[3]，所以 Cd 容易在生物体内富集。鱼体内富集的 Cd 可与高分子有机化合物的羟基、氨基等侧基形成复合物来抑制酶的活性，进而影响细胞的正常功能，对鱼类的生长发育和生殖带来不利影响[4-7]。

鱼类的生殖主要受到下丘脑-垂体-性腺(HPG)轴的调控[8]。下丘脑分泌的促性腺激素释放激素(GnRH)促进脑下垂体前叶分泌促卵泡激素(FSH)和促黄体生成素(LH)这两种重要的促性腺激素(GTH)[9]。在鱼类生殖调控过程中，FSH 和 LH 通过血液循环到达性腺，并与之特异性受体结合，从而调控性腺发育和配子发生[10]。这些激素作为 HPG 轴的关键信息因子与其他因子一起共同参与调控鱼类的发育和生殖[9]。此外，减数分裂是鱼类配子形成和遗传信息稳定传递的重要机制[11]。目前虽已有大量关于 Cd 暴露损害鱼类生殖功能的研究报道，但有关低剂量 Cd 暴露对鱼类 HPG 轴及减数分裂关键基因表达的影响研究较为缺乏。

斑马鱼(*Danio rerio*)是毒理学研究的模式生物，可用于一般毒性测试和毒性机制研究[12]。本研究将成年雌性斑马鱼分为两组，一组为不添加 Cd^{2+} 的对照组，另一组为 Cd^{2+} 暴露质量浓度为 5 $\mu g \cdot L^{-1}$ 的实验组。在 Cd 暴露 30 d 后，解剖实验鱼取卵巢进行组织病理观察，并检测雌二醇(E2)的含量以及 HPG 轴调控基因(*gnrh2*，*gnrh3*，*fshβ*，*lhβ*，*cyp19a1b*，*fshr*，*lhr* 和 *cyp19a1a*)和减数分裂相关基因(*dmc1*，*sycp3*，*aldh1a2* 和 *cyp26b1*)的表达量，以初步揭示低剂量 Cd 暴露对鱼类生殖功能的潜在负面影响。

1 材料与方法

1.1 实验鱼的来源与饲养

从国家斑马鱼资源中心(武汉)购得野生型成年雌性斑马鱼(约 120 d 龄)，于室内养殖系统中暂养 14 d，每日

* **收稿日期:**2019-04-23 **修回日期:**2019-08-29 **网络出版时间:**2019-11-25 10:35

资助项目:国家自然科学基金(No. 31901183)

第一作者简介:谢冬梅，女，研究方向为水生毒理学，E-mail: xiedongmei0211@163.com;**通信作者:**陈启亮，男，副教授，博士，E-mail:qlchen@cqnu.edu.cn

网络出版地址:http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1165.N.20191125.1034.040.html

定时投喂商业饲料3次。养殖用水为曝气后的自来水,水温为28 ℃左右,溶解氧质量浓度大于6.0 mg·L^{-1},光照周期为14 h光照∶10 h黑暗。

1.2 实验处理与采样

随机选取发育良好、体质量相近(约0.57 g)的斑马鱼置入6个规格为50 cm×20 cm×30 cm且盛有20 L水的玻璃缸中,每缸20尾。然后以中国渔业水质标准中Cd质量浓度小于或等于5 μg·L^{-1}为依据,向其中3个缸中加入$CdCl_2$溶液,使水体中Cd^{2+}质量浓度为5 μg·L^{-1},作为实验组;另外3个缸中不加$CdCl_2$溶液,作为对照组。每日更换缸内1/2体积的水并向实验组的缸中补充适量的$CdCl_2$溶液使其中Cd质量浓度保持在5 μg·L^{-1}。暴露期间斑马鱼的饲养条件同暂养期间一致。Cd暴露时间为30 d。

暴露处理结束后,用MS-222对所有鱼进行麻醉。从每缸随机选3尾鱼,解剖后取卵巢放入波恩氏液中固定,用于组织学分析;从每缸另取3尾鱼,置于冰上快速取出脑和卵巢并分别放入含有1 mL RNAiso Plus(TaKaRa)的离心管中,用液氮速冻并于-80 ℃保存,用于分析基因的表达水平;将每缸剩下的鱼断尾取血,血液置于含有肝素钠的离心管中,1 000 r·min^{-1},4 ℃离心10 min,并取上清液于-80 ℃保存以用于E2含量测定。

1.3 组织学分析

实验鱼的卵巢样品在波恩氏液中固定24 h后,用不同体积分数梯度(70%,80%,90%和100%)的乙醇进行脱水,然后用石蜡进行包埋。将包埋材料于切片机上切片,切片厚度为5 μm。然后用苏木精-伊红(HE)染色,最后用中性树胶封片。将对照组和实验组的切片各9张(每个切片对应1尾实验鱼)在光学显微镜(UB203I,徕卡仪器有限公司)下观察拍照,并统计卵巢中各时期的卵母细胞数量。

1.4 E2含量测定

将实验鱼血浆样本解冻后,采用Cayman公司的酶联免疫吸附(ELISA)试剂盒测定样本的E2含量,操作步骤严格按试剂盒说明书进行。

1.5 实时荧光定量PCR

依照RNAiso Plus试剂盒操作指南分别提取实验鱼脑和卵巢的总RNA。总RNA的完整性通过琼脂糖凝胶电泳检测,总RNA的浓度及OD260/OD280值用微量分光光度计(Nanodrop ND-2000)测定。以提取的总RNA为模板,采用PrimeScript® RT试剂盒(TaKaRa)将之反转录成cDNA。取1 μL cDNA(稀释10倍)在CFX96实时定量PCR仪(Bio-Rad)上使用SYBR Premix Ex Taq™试剂盒(TaKaRa)进行实时荧光定量PCR分析,反应总体积为10 μL,其中包含1 μL cDNA、0.4 μL正向/反向引物、3.2 μL双蒸水和5 μL SYBR Premix Ex Taq™,扩增条件为:95 ℃预变性30 s,40个循环的95 ℃变性5 s、60 ℃退火30 s和72 ℃延伸30 s。基因的相对表达量参照Livak等人[13]的方法计算,所有基因引物序列详见表1,选择*ef1α*作为内参基因。

1.6 统计分析

实验数据均以$\bar{x}\pm s$表示。采用独立样本t检验分析对照组和实验组的数据差异是否在$p<0.05$水平上具有统计学意义。

2 结果

2.1 卵巢组织学

与对照组(封二彩图1a)相比,在实验组卵巢中未发现明显的组织学病变,但初级生长期(PG)卵母细胞分布减少,而成熟期(FG)卵母细胞分布增多(封二彩图1b)。进一步统计后发现,与对照组相比,实验组卵巢中的PG细胞减少,卵黄发生中期(MV)和FG细胞增多,且上述差异均具有统计学意义($p<0.05$)(封二彩图1c)。

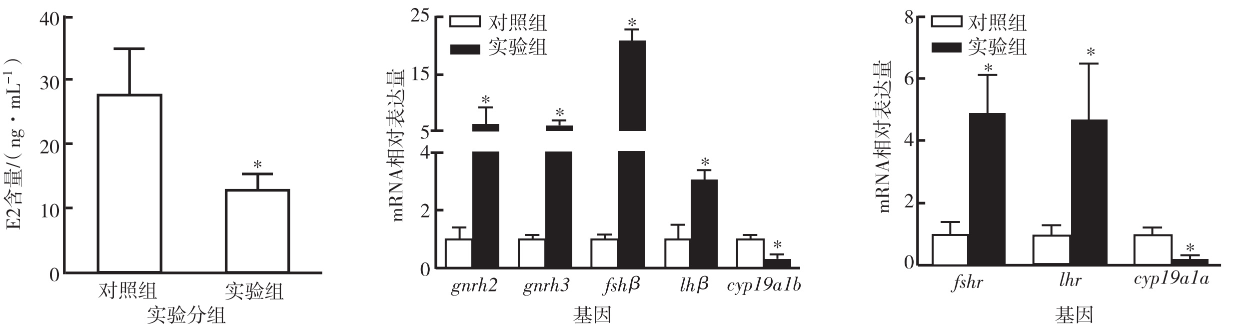
2.2 E2含量和HPG轴关键调控基因表达量

与对照组相比,实验组E2含量呈统计学意义上的减少($p<0.05$)(图2a)。较对照组而言,实验组脑组织中*gnrh2*,*gnrh3*,*fshβ*及*lhβ*基因的表达量均有所升高,但*cyp19a1b*基因的表达量则有所降低,以上差异均具有统计学意义($p<0.05$)(图2b)。此外,与对照组相比,实验组卵巢中*fshr*和*lhr*基因的表达量均明显升高,而*cyp19a1a*基因的表达量则明显降低,且上述差异均具有统计学意义($p<0.05$)(图2c)。

表 1　qPCR 引物序列

Tab. 1　Primers used for qPCR

基因	引物序列	Genbank 序列号	文献来源
gnrh2	F：5′-GGTCTCACGGCTGGTATCCT-3′ R：5′-TGCCTCGCAGAGCTTCACT-3′	NM181439	文献[14]
gnrh3	F：5′-TGGTCCAGTTGTTGCTGTTAGTT-3′ R：5′-CCTGAATGTTGCCTCCATTTC-3′	NM182887	文献[14]
fshβ	F：5′-TGAGCGCAGAATCAGAATG-3′ R：5′-AGGCTGTGGTGTCGATTGT-3′	AY424303	文献[15]
lhβ	F：5′-GGACACGCAGAGACACTT-3′ R：5′-CACCGATACCGTCTCATTT-3′	AY424304	文献[15]
cyp19a1b	F：5′-ACTAAGCAAGTCCTCCGCTGTGTACC -3′ R：5′-TTTAAACATACCGATGCATTGCAGACC -3′	AF183908	文献[15]
fshr	F：5′-ATGGATCCACTCGCTCTTT-3′ R：5′-GCATTACTGGGAATCCTCTCTAT-3′	AY278107	文献[15]
lhr	F：5′-AAGGACGAGTCGCTGAAAC-3′ R：5′-GATTCATTGTGGCGTATTCA-3′	AY714133	文献[15]
cyp19a1a	F：5′-CTGGGCCACACATCGAGAG-3′ R：5′-CTGAAAGGGCTCAGGACAA -3′	AF226620	文献[16]
aldh1a2	F：5′-TGGTCGATGGTGTCTGATG -3′ R：5′-CCAGGGTAGCAAGGTAAGCA-3′	NM131850	文献[17]
cyp26b1	F：5′-TGTCAGGAGGATACAGAATAGC-3′ R：5′-AGCCGAGGTGTCATGGGT-3′	NM212666	文献[17]
sycp3	F：5′-GCGTTTGTTTGTTGGATT-3′ R：5′-CACCGTCAGTATGTTTGG-3′	NM001040350	文献[17]
dmc1	F：5′-GAGGCTGAAGGACATCG-3′ R：5′-TCCAGCCGTAATGGCAA-3′	NM001020782	文献[17]
ef1α	F：5′-GATCACTGGTACTTCTCAGGCTGA-3′ R：5′-GGTGAAAGCCAGGAGGGC-3′	FJ915061	文献[9]



a　血浆中 E2 含量　　b　脑中 HPG 轴关键调控基因表达量　　c　卵巢中 HPG 轴关键调控基因表达量

图 2　Cd^{2+} 暴露改变成年雌性斑马鱼 E2 含量和 HPG 轴中关键调控基因表达量

Fig. 2　Cd^{2+} exposure changes the content of E2 and the expression level of key regulation genes in HPG-axis in adult female zebrafish

2.3 卵巢中减数分裂标记基因和起始相关基因表达量

与对照组相比,实验组卵巢中减数分裂标记基因 *dmc1* 和减数分裂起始相关基因 *aldh1a2* 的表达量均呈统计学意义上的上调($p<0.05$)(图 3)。但对照组和实验组卵巢中标记基因 *sycp3* 和起始相关基因 *cyp26b1* 的表达量无统计学意义上的差异。

3 讨论

鱼类的配子发生是一个复杂的生理过程,是鱼类生存和生殖的必要保障,受到多种因素的调控。HPG 轴是

调控鱼类生殖的重要机制轴,参与调控性激素合成、性腺发育、配子发生、性别分化等过程[18-19]。在HPG轴调控系统中,下丘脑分泌GnRH作用于垂体,促进后者释放FSH和LH,这两种激素则进一步作用于性腺,促进性腺的发育和成熟[9]。此外,胆固醇经一系列调节转化生成性类固醇也是该系统的关键组分。

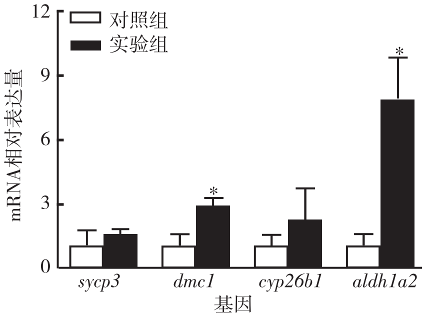


图3 Cd^{2+}暴露改变成年雌性斑马鱼卵巢中减数分裂标记基因和起始相关基因表达量

Fig. 3 Cd^{2+} exposure changes the expression level of meiosis marker and initial related genes in ovary of adult female zebrafish

HPG轴中调控类固醇合成的相关基因对环境污染物较为敏感[20]。在本研究中,与对照组相比,Cd^{2+}暴露导致斑马鱼脑中*gnrh2*,*gnrh3*,*fshβ*和*lhβ*基因以及卵巢中*fshr*和*lhr*基因表达有所上调,其中*gnrh2*和*gnrh3*基因表达的上调可能引起GnRH含量增加,进而促进FSH和LH的合成和分泌。在雌鱼中,FSH和LH与卵巢中相应受体结合,分别起到调节卵子发生和促进卵母细胞的成熟及排卵的作用[21]。上述基因表达量的提高可能导致相应蛋白合成分泌增多进而促进卵子发生和卵母细胞成熟过程,从而引起卵巢组织学中成熟期卵母细胞数量增加。E2是雌鱼中调控生殖功能的重要类固醇激素,可刺激脑垂体GTH的分泌细胞发育并进入分泌活动,从而促进卵巢发育[22]。HPG轴中*gnrh2*,*gnrh3*,*fshβ*和*lhβ*基因表达量上调可能会使GnRH和GTH合成增多,进而促进E2的合成,最终导致体内E2水平上升。Luo等人[23]的研究表明,雌性罗非鱼(*Oreochromis niloticus*)暴露于50,100和200 $\mu g \cdot L^{-1}$的Cd^{2+}中30 d后,血浆中E2水平明显升高。然而本研究结果显示,与对照组相比,实验组E2含量明显下降,这似乎与*gnrh2*,*gnrh3*,*fshβ*和*lhβ*基因表达量上调的结果相矛盾。推测可能的原因有以下两方面:一方面,Cd^{2+}暴露可能通过影响E2合成的关键酶——芳香化酶(CYP19)的活性而导致E2含量下降;另一方面,HPG轴中这些基因表达量的上调可能是由Cd^{2+}暴露引起E2水平下降的负反馈调节机制所导致。为了验证上述推测,本研究进一步检测了编码CYP19基因的表达量。CYP19可催化睾酮转化为E2,在大多数硬骨鱼中已经发现了两种不同表达模式的CYP19编码基因,即*cyp19a1a*和*cyp19a1b*;前者主要在卵巢中表达,而后者主要在脑中表达[24]。在本研究中,与对照组相比,Cd^{2+}暴露明显下调了斑马鱼脑中*cyp19a1b*和卵巢中*cyp19a1a*的表达量,这可能使得CYP19的合成减少,从而影响睾酮向E2的转化,最终导致了血浆中E2含量下降。

减数分裂是鱼类卵巢发育和配子发生的必然生理活动,鱼类的生殖与生殖细胞的减数分裂密切相关[25]。在减数分裂过程中,视黄酸(RA)是硬骨鱼类减数分裂起始所必需的物质[26],它的含量受到RA降解酶(Cyp26)和RA合成酶(Aldh1a)的共同调控[26-27]。本研究发现,与对照组相比,Cd^{2+}暴露使斑马鱼卵巢中编码Aldh1a合成的基因*aldh1a2*表达量有明显升高,而编码Cyp26合成的基因*cyp26b1*的表达量虽然有升高的趋势但和对照组的这一基因表达量相比,差异不具有统计学意义。这一结果表明,实验组的斑马鱼RA的合成可能加强,进而增强卵母细胞减数分裂起始过程。另外,联会复合体蛋白3(SYCP3)和DNA减数分裂重组酶1(DMC1)分别在减数分裂中同源染色体联会和重组过程中发挥重要作用[28-29]。*sycp3*和*dmc1*是减数分裂前期的分子标记基因,并特异表达于生殖细胞中[30-31]。在本研究中,与对照组相比,Cd^{2+}暴露导致斑马鱼卵巢中*dmc1*基因的表达量明显上调,且*sycp3*基因的表达量也轻微上升,这暗示着斑马鱼卵母细胞减数分裂加强,从而呈现出早期卵母细胞数量较少而成熟期卵母细胞增多的组织学变化。当然,早期卵母细胞数量减少也有可能与Cd^{2+}暴露引起卵母细胞凋亡有关。

综上所述,本研究结果表明5 $\mu g \cdot L^{-1}$的Cd^{2+}暴露30 d能干扰成年雌性斑马鱼HPG轴和减数分裂相关基因的表达,并影响性激素水平及卵母细胞的正常发育,进而可能对该鱼的生殖构成潜在威胁。

参考文献:

[1] LU X F,LIU F Y,ZHOU X P,et al. Effects of cadmium, 17 beta-estradiol and their interaction in the male Chinese loach (*Misgurnus anguillicaudatus*)[J]. Chinese Science Bulletin,2012,57(8):858-863.

[2] HUO J F,DONG A,NIU X,et al. Effects of cadmium on oxidative stress activities in plasma of freshwater turtle *Chinemys reevesii*[J]. Environmental Science and Pollution Research,2018,25(8):8027-8034.

[3] JÄRUP L,BERGLUND M,ELINDER C G,et al. Health effects of cadmium exposure:a review of the literature and a risk estimate[J]. Scandinavian Journal of Work Environment & Health,1998,24(suppl 1):1-52.

[4] METWALLY A,FINKEMEIER I,GEORGI M,et al. Salicylic acid alleviates the cadmium toxicity in barley seedlings [J]. Plant Physiology,2003,132(1):272-281.

[5] 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.

[6] KIM S G,EOM K H,KIM S S,et al. Kinetics of Cd accumulation and elimination in tissues of juvenile rockfish (*Sebastes schlegeli*) exposed to dietary Cd[J]. Marine Environmental Research,2006,62(5):327-340.

[7] DRIESSNACK M K,JAMWAL A,NIYOGI S. Effects of chronic waterborne cadmium and zinc interactions on tissue-specific metal accumulation and reproduction in fathead minnow (*Pimephales promelas*)[J]. Ecotoxicology & Environmental Safety,2017,140:65-75.

[8] MA Y B,HAN J,GUO Y Y,et al. Disruption of endocrine function in *in vitro* H295R cell-based and in *in vivo* assay in zebrafish by 2,4-dichlorophenol[J]. Aquatic Toxicology,2012,106:173-181.

[9] ZHANG Q F,LI Y W,LIU Z H,et al. Reproductive toxicity of inorganic mercury exposure in adult zebrafish: histologicaldamage,oxidativestress,and alterations of sex hormone and gene expression in the hypothalamic-pituitary-gonadal axis[J]. Aquatic Toxicology,2016,177:417-424.

[10] PALERMO R. Differential actions of FSH and LH during folliculogenesis[J].Reproductive Biomedicine Online,2007,15(3):326-337.

[11] YAMASHITA M. Molecular mechanisms of meiotic maturation and arrest in fish and amphibian oocytes[J]. Seminars in Cell & Developmental Biology,1998,9(5):569-579.

[12] 王佳佳,徐超,屠云杰,等. 斑马鱼及其胚胎在毒理学中的实验研究与应用进展[J]. 生态毒理学报,2007,2(2):123-135.

WANG J J,XU C,TU Y J,et al. Experimental research and application of zebrafish and embryos in toxicology[J]. Asian Journal of Ecotoxicology,2007,2(2):123-135.

[13] 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.

[14] LIANG Y Q,HUANG G Y,LIU S S,et al. Long-term exposure to environmentally relevant concentrations of progesterone and norgestrel affects sex differentiation in zebrafish (*Danio rerio*)[J]. Aquatic Toxicology,2015,160:172-179.

[15] HOU J,LI L,WU N,et al. Reproduction impairment and endocrine disruption in female zebrafish after long-term exposure to MC-LR:a life cycle assessment[J]. Environmental Pollution,2016,208:477-485.

[16] HOFFMANN J L,ORIS J T. Altered gene expression: a mechanism for reproductive toxicity in zebrafish exposed to benzo [a] pyrene[J]. Aquatic Toxicology,2006,78:332-340.

[17] 安晶晶,谢冬梅,李英文,等. 低剂量镉暴露对雄性斑马鱼生殖内分泌的干扰[J]. 重庆师范大学学报(自然科学版),2019,36(2):24-29.

AN J J,XIE D M,LI Y W, et al. The interference of low dose of cadmium exposure on the reproductive endocrine of male zebrafish[J]. Journal of Chongqing Normal University (Natural Science),2019,36(2):24-29.

[18] 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.

[19] 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.

[20] SU Y J,LI L,HOU J,et al. Life-cycle exposure to microcystin-LR interferes with the reproductive endocrine system of male zebrafish[J]. Aquatic Toxicology,2016,175:205-212.

[21] MOLES G,CARRILLO M,MAÑANÓS E,et al. Temporal profile of brain and pituitary GnRHs,GnRH-R and gonadotropin mRNA expression and content during early development in European sea bass (*Dicentrarchuslabrax* L.)[J]. General & Comparative Endocrinology,2007,150(1):75-86.

[22] 方永强,张为民,翁幼竹. 17β-雌二醇促进鲻鱼性腺发育的作用机制:雌激素受体的定位[J]. 应用海洋学学报,2003,22(4):422-425.

FANG Y Q,ZHANG W M,WENG Y Z. Action mechanisms of esttradiol-17β to promote gonadal development of grey mullet: localization of estrogen receptors[J]. Journal of Applied Oceanography,2003,22(4):422-425.

[23] LUO Y J,SHAN D,ZHONG H,et al. Subchronic effects of cadmium on the gonads,expressions of steroid hormones and sex-related genes in tilapia *Oreochromis niloticus*[J]. Ecotoxicology,2015,24(10):2213-2223.

[24] CHIANG E F,YAN Y L,TONG S K,et al. Characteriza-

tion of duplicated zebrafish *cyp*19 genes[J]. Journal of Experimental Zoology,2001,290(7):709-714.

[25] 刘燕明. 减数分裂与有性生殖[J]. 生物学通报,1995,30(11):15-17.
LIU Y M. Meiosis and sexual reproduction[J]. Biological Bulletin,1995,30(11):15-17.

[26] 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.

[27] 王雅琴,王德寿,李英文,等. 环境剂量的多种环境雌激素长期暴露阻断斑马鱼成鱼精子发生[J]. 重庆师范大学学报(自然科学版),2018,35(1):23-30.
WANG Y Q,WANG D S, LI Y W,et al. Long-term exposure to internal relevant levels of environmental estrogens induced arrested spermatogenesis in zebrafish adults [J]. Journal of Chongqing Normal University (Natural Science),2018,35(1):23- 30.

[28] TSUI S,DAI T,ROETTGER S,et al. Identification of two novel proteins that interact with germ-cell-specific RNA-binding proteins DAZ and DAZL1[J]. Genomics,2000,65(3):266-273.

[29] BISHOP D K,PARK D,XU L,et al. DMC1:a meiosis-specific yeast homolog of *E. coli* recA required for recombination,synaptonemal complex formation,and cell cycle progression[J]. Cell,1992,69(3):439-456.

[30] KAJIURAKOBAYASHI H,KOBAYASHI T,NAGAHAMA Y. Cloning of cDNAs and the differential expression of A-type cyclins and Dmc1 during spermatogenesis in the Japanese eel,a teleost fish[J]. Developmental Dynamics,2005,232(4):1115-1123.

[31] LAU E L,LEE M F,CHANG C F. Conserved sex-specific timing of meiotic initiation during sex differentiation in the protandrous black porgy *Acanthopagrus schlegelii*[J]. Biology of Reproduction,2013,88(6):150-164.

Animal Sciences

Effect of Low Dose of Cadmium on Oogenesis of Female Zebrafish

XIE Dongmei, ZENG Zheng, YI Xune, LI Yingwen, CHEN Qiliang

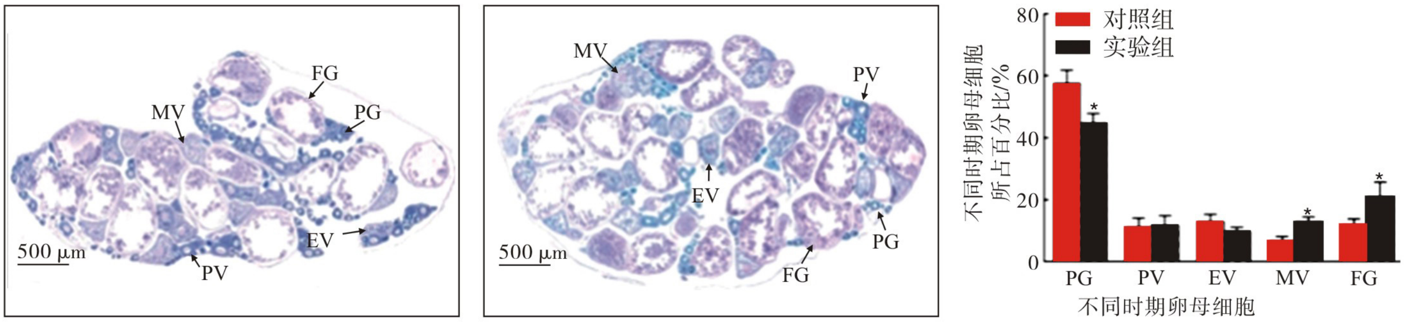
(Chongqing Key Laboratory of Animal Biology, College of Life Sciences, Chongqing Normal University, Chongqing 401331, China)

Abstract: [**Purposes**]To investigate the effect of low dose cadmium (Cd) exposure on oogenesis of female zebrafish (*Danio rerio*). [**Methods**]Fish were divided into two groups and exposed to water with Cd^{2+} concentration of 0 (the control group) and 5 $\mu g \cdot L^{-1}$ (the test group), respectively. After 30 days, ovaries were taken for histological analysis, and the level of estradiol (E2) as well as expressions of genes related hypothalamic-pituitary-gonadal (HPG) axis and meiosis were detected. [**Findings**]Compared with the control group: 1) decreased early oocytes and increased mature oocytes in zebrafish ovaries were observed in the test group; 2) the content of E2 in plasma decreased significantly ($p<0.05$); 3) expressions of *gnrh2*, *gnrh3*, *fshβ*, *lhβ*, *fshr*, and *lhr* in HPG axis were up-regulated, while expressions of *cyp19a1b* and *cyp19a1a* were down-regulated; 4) the expression levels of meiosis marker and initial related genes (*dmc1* and *aldh1a2*) in ovary were significantly increased ($p<0.05$). [**Conclusions**]The Cd exposure condition set by the study could interfere the expression of key regulation genes involved inoogenesis in adult female zebrafish, and affect sex hormone levels and normal development of the ovary.

Keywords: low dose cadmium; female zebrafish; ovary; estradiol; oogenesis

(责任编辑 方 兴)

（接正文42页）



a　对照组卵巢组织学结构　　b　实验组卵巢组织学　　c　卵巢中不同时期的卵母细胞所占百分数

注：PG: 初级生长期；PV: 卵黄发生前期；EV: 卵黄发生早期；MV: 卵黄发生中期；FG: 成熟期；*表示组间数据差异具有统计学意义(p<0.05)。下同。

图1　Cd^{2+}暴露影响成年雌性斑马鱼卵巢发育

Fig. 1　Cd^{2+} exposure affects development of ovary in adult female zebrafish

（接正文48页）

注：底图来源于重庆市规划和自然资源局网站“重庆市标准地图服务”提供的“城口县行政区划”，审图号:渝S2016)062号。

图1　城口县蝴蝶样本采集分布地

Fig. 1　The distribution of butterfly specimencollected in Chengkou county

（接正文53页）

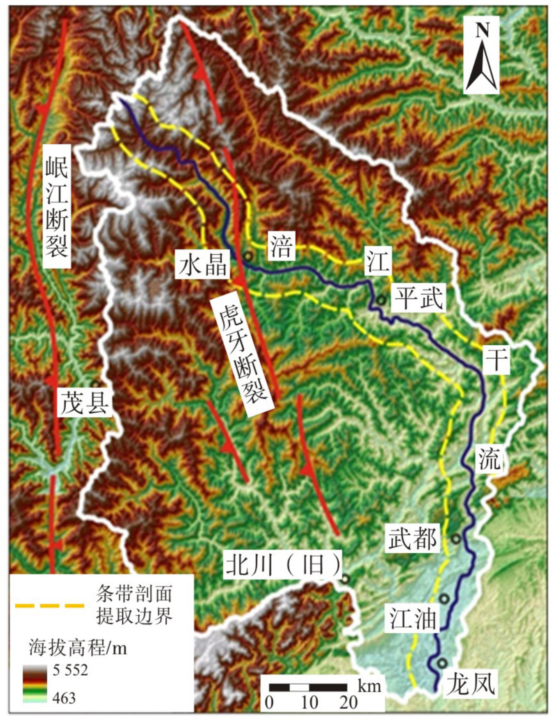


图1　涪江上游流域条带剖面提取位置

Fig. 1　The chart location of swath profile in the upper reaches basin of Fujiang river

（接正文107页）

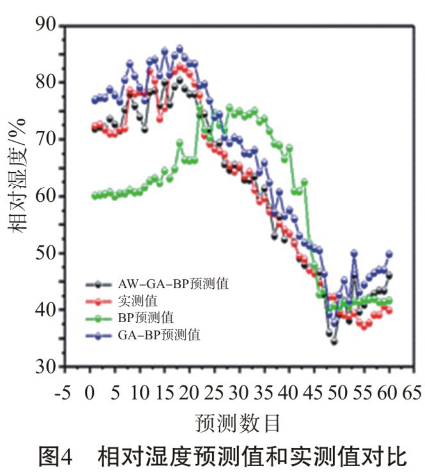


图4　相对湿度预测值和实测值对比

Fig. 4　Comparison based on predicted and measured values of relative humidity

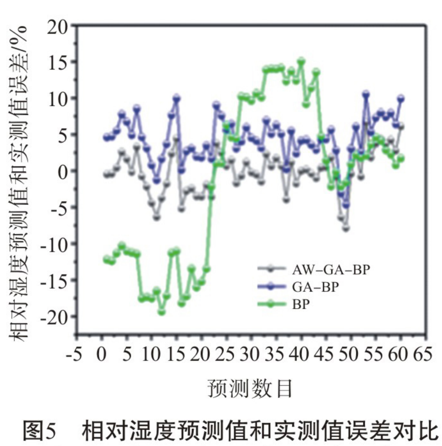


图5　相对湿度预测值和实测值误差对比

Fig. 5　Comparison of errors based on predicted and measured values of relative humidity

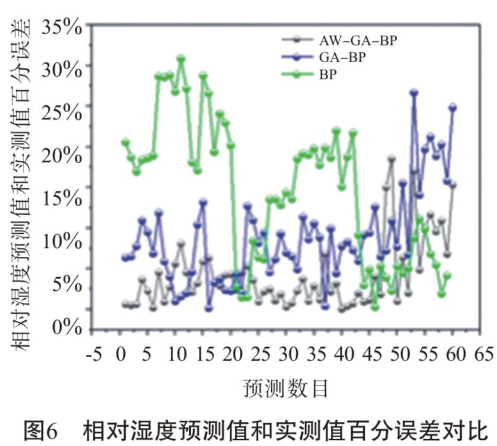


图6　相对湿度预测值和实测值百分误差对比

Fig. 6　Percentage error comparison based on predicted and measured values of relative humidity