

EE2和Flu影响斑马鱼精巢发育和精子发生的差异性机制*

尹盼^{1,2}, 张群芳¹, 李英文¹, 刘智皓¹

(1. 重庆师范大学 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. 西南大学 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 150 ng · L⁻¹ 环境雌激素乙炔基雌二醇 (17 α -ethinylestradiol, EE2)、300 μ g · L⁻¹ 环境抗雄激素氟他胺 (Flutamide, Flu) 单独处理以及 150 ng · L⁻¹ EE2 与 300 μ g · L⁻¹ Flu 联合处理对斑马鱼 (*Danio rerio*) 雄性成鱼进行了 30 d 浸浴处理, 并用组织学的方法检测了上述物质对斑马鱼精巢发育和精子发生的影响; 同时, 采用定量 RT-PCR 的方法研究了 EE2 和 Flu 影响斑马鱼精子发生的分子差异。组织学结果显示, EE2 处理后斑马鱼精巢壁变厚, 生殖细胞大量丢失; Flu 处理后精子细胞数量下降, 出现空腔, 早期生殖细胞数量有增加的趋势; 联合处理组斑马鱼精巢生殖细胞数量急剧减少, 空腔化严重。定量 RT-PCR 结果显示, 所有药物处理均能显著下调鱼类发育和繁殖相关转录因子基因 (*dmrt1*、*sfl*) 和生殖细胞标记基因 (*dmcl*、*nanos1*) 的表达 ($p < 0.05$); EE2 单独处理、EE2 与 Flu 联合处理还能显著下调鱼类类固醇合成酶基因 *p450-11 β* 、*cyp19a1a*、*cyp17a1* 和 *cyp17a2* 的表达 ($p < 0.05$), Flu 单独处理只显著下调了 *p450-11 β* 的表达水平 ($p < 0.05$), 表现出一定的分子差异。研究提示 EE2、Flu 及两者联合处理均严重干扰斑马鱼精子发生过程, 导致生殖细胞数量明显下降; 上述药物对斑马鱼类固醇合成及配子发生相关基因表达的影响既有相似之处, 也有明显不同。

关键词:乙炔基雌二醇; 氟他胺; 斑马鱼; 精巢发育; 精子发生; 基因表达

中图分类号: Q175

文献标志码: A

文章编号: 1672-6693(2016)04-0015-07

内分泌干扰物 (Endocrine-disrupting chemicals, EDCs) 是指能模拟内源性激素的功能、干扰动物体正常内分泌活动的化合物^[1-5], 包括类雌激素、类雄激素、抗雌激素、抗雄激素等。水环境能接受许多来自工厂、农业、城市的废水^[6-7], 因此 EDCs 对终生生活在水体中的生物尤其是鱼类的影响极为严重。

目前主要研究的 EDCs 有两类: 环境雌激素 (雌激素受体激动剂) 和环境抗雄激素 (竞争性雄激素受体结合)。大量研究表明, 不仅雌激素能影响雄性动物精巢发育, 抗雄激素也能产生与雌激素相似的效应^[8], 如血浆雌激素浓度上升^[9-10]、精巢体积减小、精子发生延缓^[10-11]、雄性个体雌性化^[12]、雌性性比升高^[13-14]等。尽管雌激素和抗雄激素能产生相似效应, 但已有研究表明雌激素和抗雄激素影响鱼类精巢发育和精子发生的分子机制可能具有一定差异^[15-16]。

为深入研究雌激素和抗雄激素诱导鱼类精巢发育和精子发生的差异性机制, 本研究用环境雌激素乙炔基雌二醇 (17 α -ethinylestradiol, EE2)、环境抗雄激素氟他胺 (Flutamide, Flu) 单独处理以及两者联合处理对雄性成年斑马鱼 (*Danio rerio*) 进行 30 d 浸浴处理, 并用组织学和定量 RT-PCR 的方法探讨 EE2 和 Flu 影响斑马鱼精巢发育和精子发生的差异性机制, 为最终消除水生环境中 EDCs 的危害提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验试剂及仪器

EE2 和 Flu 购自美国 Sigma 公司; 总 RNA 提取试剂盒 (Trizol) 购于 Invitrogen 公司; 逆转录试剂盒 (Prime-Script RT reagent Kit) 型号为 RR047A, 购于日本 TaKaRa 公司; DMSO、石蜡、苏木精、伊红等其余试剂为国产分析纯。切片机型号为 KD3358, 购于科迪仪器设备有限公司; 光学显微镜为型号为 UB203i, 购于澳浦光电技术

* 收稿日期: 2015-06-02 修回日期: 2016-03-15 网络出版时间: 2016-07-07 16:32

资助项目: 重庆师范大学校级项目 (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 (No. FFRD-2015-02)

作者简介: 尹盼, 女, 研究方向为鱼类生殖生理和分子内分泌, E-mail: panyin123@yahoo.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.20160707.1632.018.html>

有限公司;PCR 仪型号为 iQ5,购于美国 Bio-Rad 公司。

1.2 实验动物

本研究所用 120 d 龄斑马鱼雄性成鱼购自沙坪坝区水产市场,平均体质量(0.52 ± 0.05) g,实验前暂养于恒温循环水系统中,水体温度为(28 ± 0.5) °C。

1.3 材料处理

随机选取健康的雄性成年斑马鱼 72 尾,设置 EE2 单独处理组(EE2 质量浓度为 $150 \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$)、Flu 单独处理组(Flu 质量浓度为 $300 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)以及 EE2 和 Flu 联合处理组(EE2 和 Flu 质量浓度分别为 $150 \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $300 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$),所有药物均用 0.05% DMSO 溶解。另设 1 组为对照组,仅加入 0.05% DMSO。EE2 的剂量为根据对斑马鱼的预实验(用 0.1,1,10 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ EE2 进行处理)结果所选择无致死效应的剂量。Flu 剂量的选取参照 Filby 等人^[16]的研究即 $320 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$,在该质量浓度以下范围内无致死效应,但有明显基因表达变化。每个组设 3 个平行缸,每缸 6 尾实验鱼养于 20 L 水中,每日喂食 4 次,持续增氧,每日换水 1 次。水体温度为(28 ± 0.5) °C,光照周期为 14 h 光照:10 h 黑暗。处理 30 d 后取材,每缸各解剖 3 尾鱼的精巢,匀浆后液氮速冻,−80 °C 备用。另各取 1 尾鱼精巢,波恩氏液固定、包埋,常规石蜡切片。

1.4 组织学研究

斑马鱼于冰上冷冻麻醉后,解剖出精巢,在波恩氏液中固定 24 h。材料固定后依次放入梯度乙醇和二甲苯中脱水、透明,于 60 °C 烘箱中包埋。材料经常规组织切片(厚度 5 μm)后,用苏木精/伊红染色(HE),中性树胶封片、拍照。

1.5 相关基因引物合成

根据 GenBank 上已经公布的斑马鱼类固醇合成酶相关基因 *p450-11 β* (FJ713105)、*cyp19a1a*(KF296362)、*cyp17a1*(KJ905722)、*cyp17a2*(NM_001105670),类固醇合成相关转录因子基因 *sf1*(HQ680985)、*dmrt1*(AF209095),生殖细胞标记基因 *dmcl*(NM_001020782)和 *nanos1*(NM_001305661)以及内参基因 *efla*(KC508618)的 mRNA 序列,设计基因特异性引物,并由 Invitrogen 公司合成。

表 1 引物序列

Tab. 1 Primer sequences

引物名称	引物序列(5'~3')	引物名称	引物序列(5'~3')
p450-11 β -F	CTGAGTTGGAACGTGTGAGA	sf1-R	GACGCATCTGATCGCCACCTT
p450-11 β -R	AGCACAGTCGAAACACTTC	dmrt1-F	GCAGTCGCTCCATGTTGTCT
cyp19a1a-F	CTGGGCCACACATCGAGAG	dmrt1-R	AGTGGGCTGGTAAAGGTTGT
cyp19a1a-R	AGCGAACGCGCAGAAATCC	dmcl-F	TCGGGATACCAAGATGAT
cyp17a1-F	TCTGATGAGCCTGGTGAG	dmcl-R	ATCTGGATGCCTTTCACC
cyp17a1-R	ATGAGCAGTTTGTGGGAG	nanos1-F	CTTGTTTGACGCATACCG
cyp17a2-F	GCAAAGAGGGTCAGGTGG	nanos1-R	GGCACCATAGGACTTTT
cyp17a2-R	AGCAGGAACGCTATGGTC	ef1 α -F	GATCACTGGTACTTCTCAGGCTGA
sf1-F	AAATCGCGACCCTCCAGCCTG	ef1 α -R	GGTGAAAGCCAGGAGGGC

1.6 药物处理后斑马鱼各基因表达量变化的检测

取−80 °C 备用的斑马鱼精巢匀浆材料,提取总 RNA,合成 cDNA,采用实时定量 PCR(qRT-PCR)检测斑马鱼类固醇合成酶相关基因 *cyp19a1a*、*p450-11 β* 、*cyp17a1*、*cyp17a2*,类固醇合成相关转录因子基因 *sf1*、*dmrt1* 和生殖细胞标记基因 *dmcl*、*nanos1* 的表达变化,以 *efla* 为内参。

1.7 数据统计

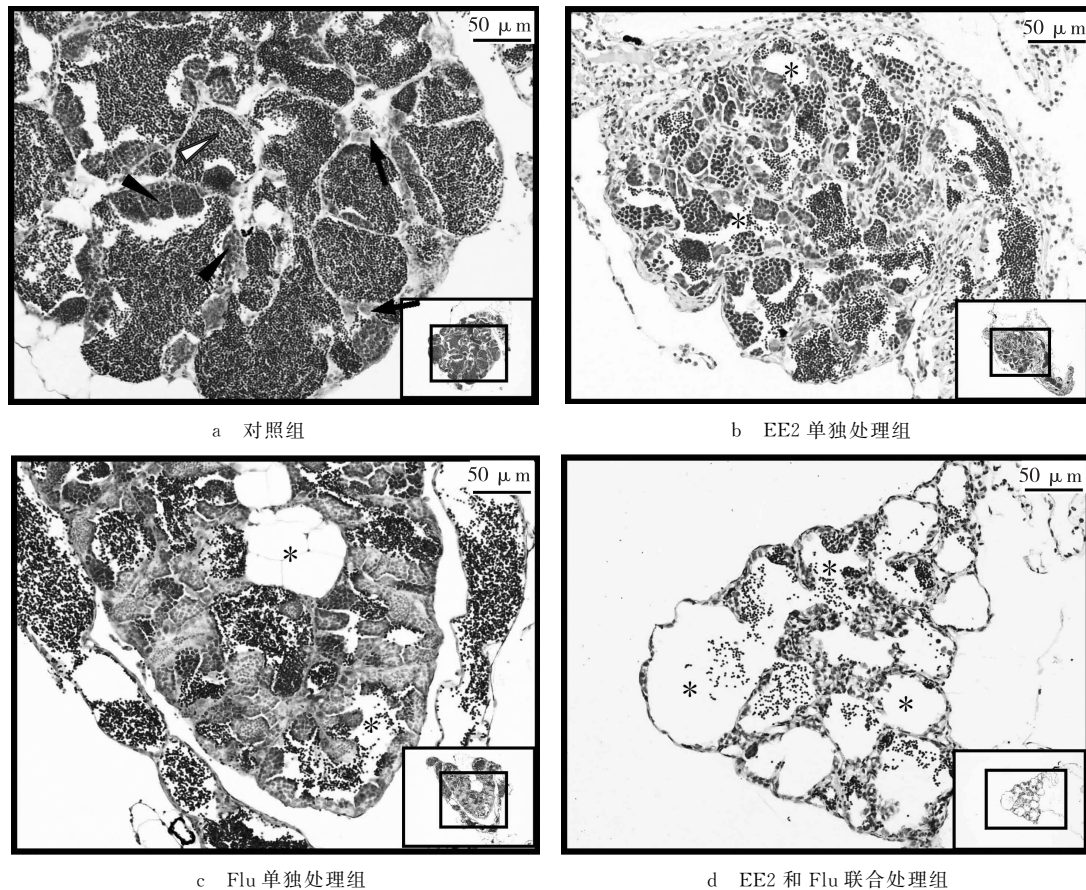
结果数据用“平均值±标准误”表示。结果用 SPSS 13.0 软件进行方差分析和差异比较,当 $p < 0.05$ 表示差异显著。柱形图用 GraphPad Prism 5 软件进行绘制。

2 结果

2.1 药物处理后对斑马鱼精巢的组织学影响

组织学结果表明,对照组斑马鱼精巢中充满发育不同时期的精小囊,囊内的生殖细胞均处于相同发育时期,

处于发育后期的生殖细胞所占比例很大(图1a)。而所有药物处理组均对斑马鱼精巢发育和精子发生造成不同程度影响。在EE2单独处理组斑马鱼精巢中,精巢壁增厚,精子数量极少,早期生殖细胞数量较多(图1b)。在Flu单独处理组斑马鱼精巢中,单倍体生殖细胞数量减少,出现精子丢失后形成的空腔,早期生殖细胞数量有增多的趋势(图1c)。同样,EE2和Flu联合处理组斑马鱼精巢发育明显受到抑制,早期生殖细胞和精子数量均急剧减少,空腔化严重(图1d)。



注:黑色箭头-初级精母细胞;黑色三角形-次级精母细胞;白色三角形-精子;星号-生殖细胞丢失形成的空腔。

图1 药物处理影响斑马鱼精巢发育和精子发生的组织学观察

Fig. 1 Influences of drugs on testicular development and spermatogenesis of zebrafish

2.2 药物处理对斑马鱼类固醇合成酶相关基因表达的影响

qRT-PCR结果显示(图2),所有药物处理均能显著下调 *p450-11β* 的表达水平($p < 0.05$)。另外,EE2及联合处理均能显著下调 *cyp19a1a*、*cyp17a1*、*cyp17a2* 的表达水平($p < 0.05$),而Flu对 *cyp19a1a*、*cyp17a1*、*cyp17a2* 的表达水平没有显著影响。

2.3 药物处理对斑马鱼相关转录因子基因表达的影响

图3显示,所有药物处理均能显著下调斑马鱼精巢中类固醇合成相关转录因子基因 *dmrt1* 和 *sf1* 的表达水平($p < 0.05$)。

2.4 药物处理对生殖细胞标记基因表达的影响

从图4可知,所有药物处理均能显著下调斑马鱼精巢中生殖细胞标记基因 *dmcl* 和 *nanos1* 的表达水平($p < 0.05$)。

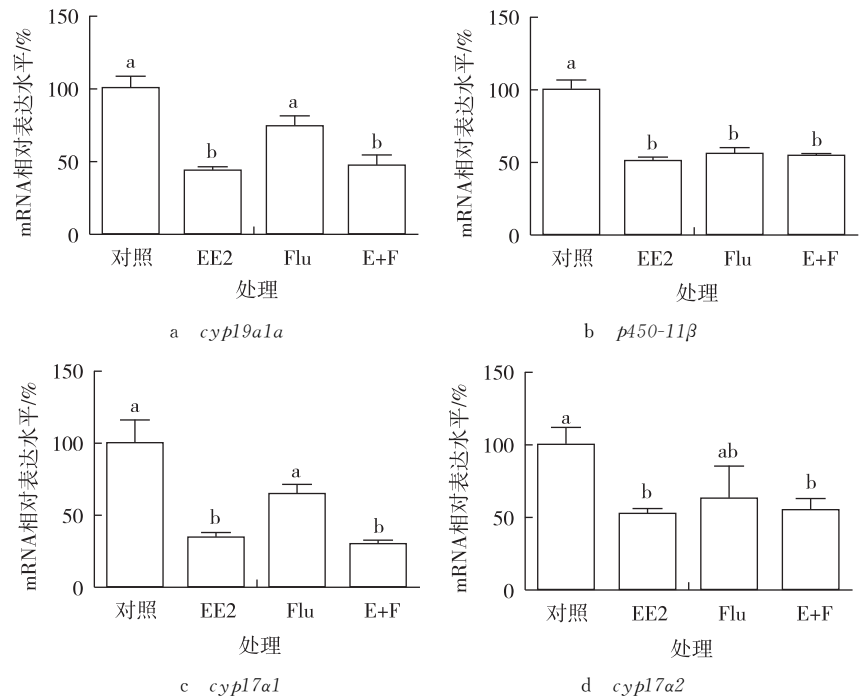
3 讨论

大量研究表明,环境雌激素和环境抗雄激素均能不同程度影响鱼类雄性的精巢发育和精子发生^[9-16],本研究结果也进一步证实了上述发现。同时,本研究还发现EE2和Flu联合处理对斑马鱼精巢发育和精子发生的影响比两者的单独处理更为严重。然而,雌激素和抗雄激素的分子结构明显不同,且作用的途径和分子通路也大相径

庭^[17-18],因此它们影响鱼类精巢发育和精子发生的分子机制很可能有巨大差异。

鱼类的精巢发育和精子发生是一个复杂的调控过程,且包含多种通路的相互作用等^[19]。其中,类固醇激素的合成及其调控、性别分化和发育相关转录因子的参与、生殖细胞的分化、减数分裂过程的调控等均在鱼类精巢发育和精子发生中起到重要作用^[17]。因此,为深入探讨环境雌激素和环境抗雄激素影响斑马鱼精巢发育和精子发生可能的分子差异,本研究进一步检测了各种药物处理后类固醇合成酶关键基因 *p450-11 β* 、*cyp19a1a*、*cyp17a1* 和 *cyp17a2*,相关转录因子基因 *dmrt1*、*sfl* 和生殖细胞标记基因 *dmcl*、*nanos1* 的表达情况。鱼类的精巢发育和精子发生受到雄性特异转录因子 *dmrt1* 的调控,*dmrt1* 不仅在鱼类性别分化过程中起重要作用^[20],对鱼类的精子发生过程也至关重要^[21]。在 *dmrt1* 基因敲除的罗非鱼 (*Oreochromis mossambicus*) 中,精巢发育障碍,精子数量减少,出现大量的生殖细胞凋亡^[22]。与罗非鱼的研究结果类似,本研究中 EE2、Flu 及两者联合处理均导致精巢发育障碍,精子数量减少。同时药物处理后,斑马鱼精巢中 *dmrt1* 基因的表达水平均出现显著下调 ($p < 0.05$),表明 *dmrt1* 基因可能也在斑马鱼精巢发育和精子发生过程中起重要作用。而转录因子基因 *sfl* 主要参与对大多数鱼类类固醇激素合成酶的直接调控^[23]。本研究发现,*sfl* 基因表达水平在所有药物处理组均出现显著下调 ($p < 0.05$),暗示各药物处理组中主要类固醇合成酶基因的表达水平可能均受到不同程度抑制。

11-酮基睾酮(11-KT)在鱼类精子发生过程中起决定作用^[24-25],而 *p450-11 β* 蛋白在 11-KT 的合成中起重要作用^[26]。本研究发现,所有药物处理均显著下调 *p450-11 β* 基因的表达水平 ($p < 0.05$)。有研究发现,*sfl* 等转录因子基因是 *p450-11 β* 调控的直接上游基因,而 *sfl* 则受到雌激素的负调控^[17]。因此本研究推测,EE2 处理后



注: E+F; EE2 与 Flu 联合处理,不同小写字母表示差异显著 ($p < 0.05$),下同。

图 2 EE2、Flu 及两者联合处理对斑马鱼雄性成鱼相关类固醇合成酶基因表达的影响

Fig. 2 Influences of EE2, Flu, and their combination on genes responsible for steroidogenesis in male zebrafish adult

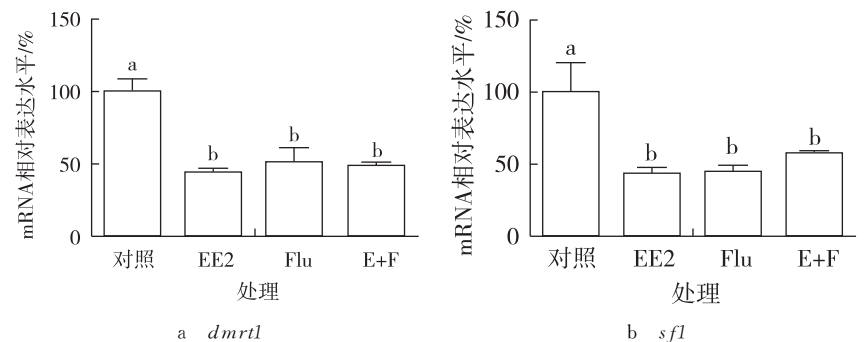


图 3 EE2、Flu 及两者联合处理对 *dmrt1* 和 *sfl* 基因表达的影响

Fig. 3 Influences of EE2, Flu, and their combination on *dmrt1* and *sfl*

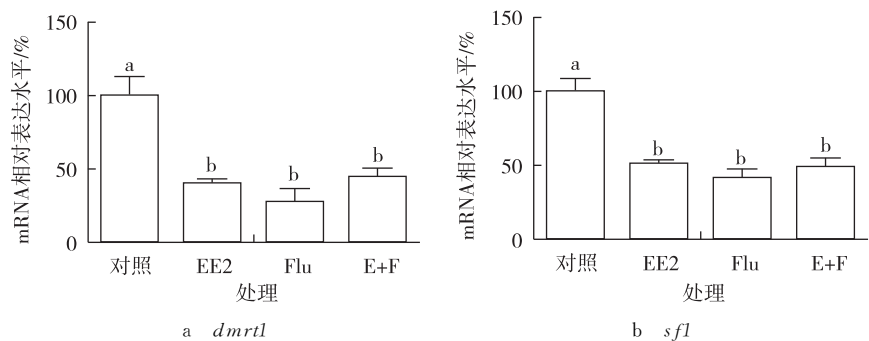


图 4 EE2、Flu 及两者联合处理对 *dmcl* 和 *nanos1* 基因表达的影响

Fig. 4 Influences of EE2, Flu, and their combination on *dmcl* and *nanos1*

p450-11β 基因表达水平下调可能是一种间接调控。尽管 Flu 是一种雄激素受体拮抗剂,但并无相关研究证实雄激素通过雄激素受体直接调控 *p450-11β* 基因的表达。本研究同时发现,Flu 也能显著下调 *p450-11β* 的调控因子基因 *sf1* 的表达水平($p < 0.05$)。因此,本研究发现的 Flu 下调 *p450-11β* 基因表达水平可能是一种间接作用。

芳香化酶(为 *cyp19a1a* 基因所编码)是雄激素转化为雌激素的关键酶,在卵巢的分化过程中起至关重要的作用^[27-29]。最近的研究发现,雌激素在鱼类的精子发生过程中也起重要作用:内源雌激素水平过高或过低都会干扰正常的精子发生过程^[30]。本研究发现 EE2 单独处理及 EE2、Flu 联合处理显著下调了 *cyp19a1a* 基因的表达水平($p < 0.05$),而 Flu 单独处理则对该基因表达无显著影响。这与一些研究中所发现的 EE2 和 Flu 均能上调 *cyp19a1a* 基因表达水平的结果相反^[31-35],而与对虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)的研究结果相似^[20]。因此本研究推测实验中 *cyp19a1a* 基因表达受抑制可能的原因有:1) 本研究中 EE2 的剂量较大,可能对鱼体产生一定的毒性效应;2) 可能是药物处理使 *sf1* 基因表达显著下调而引起的负反馈结果。其中具体机制还有待研究。

本研究同时还发现 EE2 单独处理及 EE2、Flu 联合处理均能显著下调类固醇合成核心酶 *cyp17a1* 和 *cyp17a2* 基因的表达水平($p < 0.05$),这提示上述两种处理能通过下调 *cyp17a1* 和 *cyp17a2* 基因的表达水平,间接阻碍相关类固醇的合成,从而导致精巢发育和精子发生障碍;与之相比 Flu 单独处理在此方面并无明显作用。

鱼类的精巢发育和精子发生的正常进行必然伴随着早期生殖细胞的分化和减数分裂过程。而 *nanos1* 和 *dmc1* 基因分别在早期生殖细胞的分化和减数分裂过程起着至关重要的作用^[36-39]。本研究发现,所有药物处理均能显著下调生殖细胞标记基因 *nanos1* 和 *dmc1* 的表达水平($p < 0.05$)。因此可以推测,药物处理后抑制了斑马鱼的减数分裂,同时阻碍了新的生殖细胞的生成,导致了精巢中生殖细胞减少的现象。这与切片中观察到的生殖细胞的丢失现象相对应。

综上所述,EE2 和 Flu 在影响雄性成年斑马鱼精巢发育和精子发生的过程中有相似之处,但也有很大的区别,其中具体的分子机制有待进一步研究。

参考文献:

- [1] Huang Y, Wang X L, Zhang J W, et al. Impact of endocrine-disrupting chemicals on reproductive function in zebrafish (*Danio rerio*) [J]. *Reproduction in Domestic Animals*, 2015, 50(1): 1-6.
- [2] Shi X J, Liu C S, Yu K, et al. Toxicological research on environmental endocrine disruptors [J]. *Progress in Chemistry*, 2009, 21(2/3): 340-349.
- [3] Lai K M, Scrimshaw M D, Lester J N. Prediction of the bioaccumulation factors and body burden of natural and synthetic estrogens in aquatic organisms in the river systems [J]. *Science of the Total Environment*, 2002, 289(1): 159-168.
- [4] Scholz S, Mayer I. Molecular biomarkers of endocrine disruption in small model fish [J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2008, 293(1): 57-70.
- [5] 旷毓婵, 李英文, 谭号, 等. 内分泌干扰物对雄激素受体功能的干扰 [J]. *重庆师范大学学报: 自然科学版*, 2014, 31(2): 16-22.
Kuang Y C, Li Y W, Tan H, et al. Interference of the endocrine disrupting chemicals on androgen receptor function [J]. *Journal of Chongqing Normal University: Natural Science*, 2014, 31(2): 16-22.
- [6] Segner H, Eppler E, Reinecke M. The impact of environmental hormonally active substances on the endocrine and immune systems of fish [J]. *Justice System Journal*, 2004, 25(3): 253-286.
- [7] Leet J K, Gall H E, Sepúlveda M S. A review of studies on androgen and estrogen exposure in fish early life stages: effects on gene and hormonal control of sexual differentiation [J]. *Journal of Applied Toxicology*, 2011, 31(5): 379-398.
- [8] Sohoni P, Sumpter J P. Several environmental oestrogens are also anti-androgens [J]. *Journal of endocrinology*, 1998, 158(3): 327-339.
- [9] MacLatchy D L, Courtenay S C, Rice C D, et al. Development of a short-term reproductive endocrine bioassay using steroid hormone and vitellogenin end points in the estuarine mummichog (*Fundulus heteroclitus*) [J]. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 2003, 22(5): 996-1008.
- [10] Jensen K M, Kahl M D, Makynen E A, et al. Characterization of responses to the antiandrogen flutamide in a short-term reproduction assay with the fathead minnow [J]. *Aquatic Toxicology*, 2004, 70(2): 99-110.
- [11] Pawlowski S, Van Aerle R, Tyler C R, et al. Effects of 17 α -ethinylestradiol in a fathead minnow (*Pimephales promelas*) gonadal recrudescence assay [J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2004, 57(3): 330-345.
- [12] Nash J P, Kime D E, Van der Ven L T M, et al. Long-term exposure to environmental concentrations of the pharmaceutical ethinylestradiol causes reproductive failure in fish

- [J]. *Environmental Health Perspectives*, 2004, 112(17): 1725-1733.
- [13] Bayley M, Junge M, Baatrup E. Exposure of juvenile guppies to three antiandrogens causes demasculinization and a reduced sperm count in adult males[J]. *Aquatic Toxicology*, 2002, 56(4): 227-239.
- [14] Brion F, Tyler C R, Palazzi X, et al. Impacts of 17 α -estradiol, including environmentally relevant concentrations, on reproduction after exposure during embryolarval-juvenile- and adult-life stages in zebrafish (*Danio rerio*) [J]. *Aquatic Toxicology*, 2004, 68(3): 193-217.
- [15] Larkin P, Sabo-Attwood T, Kelso J, et al. Gene expression analysis of largemouth bass exposed to estradiol, nonylphenol, and p, p'-DDE [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 2002, 133(4): 543-557.
- [16] Moens L N, Van der Ven K, Van Remortel P, et al. Expression profiling of endocrine-disrupting compounds using a customized *Cyprinus carpio* cDNA microarray [J]. *Toxicological Sciences*, 2006, 93(2): 298-310.
- [17] Filby A L, Thorpe K L, Maack G, et al. Gene expression profiles revealing the mechanisms of anti-androgen- and estrogen-induced feminization in fish [J]. *Aquatic Toxicology*, 2007, 81(2): 219-231.
- [18] Martinović-Weigelt D, Wang R L, Villeneuve D L, et al. Gene expression profiling of the androgen receptor antagonists flutamide and vinclozolin in zebrafish (*Danio rerio*) gonads [J]. *Aquatic Toxicology*, 2011, 101(2): 447-458.
- [19] Schulz R W, de França L R, Lareyre J J, et al. Spermatogenesis in fish [J]. *Gen Comp Endocrinol*, 2010, 165(3): 390-411.
- [20] Depiereux S, Liagre M, Danis L, et al. Inter sex occurrence in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) male fry chronically exposed to ethynylestradiol [J]. *PLoS One*, 2014, 9(7): 17.
- [21] Matsuda M, Nagahama Y, Shinomiya A, et al. DMY is a Y-specific DM-domain gene required for male development in the medaka fish [J]. *Nature*, 2002, 417(6888): 559-563.
- [22] Li M H, Yang H H, Li M R, et al. Antagonistic roles of Dmrt1 and Foxl2 in sex differentiation via estrogen production in tilapia as demonstrated by TALENs [J]. *Endocrinology*, 2013, 154(12): 4814-4825.
- [23] Val P, Lefrançois-Martinez A M, Veyssi re G, et al. SF-1 a key player in the development and differentiation of steroidogenic tissues [J]. *Nuclear Receptor*, 2003, 1(1): 8.
- [24] Rasheeda M K, Kagawa H, Kirubakaran R, et al. Cloning, expression and enzyme activity analysis of testicular 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase during seasonal cycle and after hCG induction in air-breathing catfish *Clarias gariepinus* [J]. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 2010, 120(1): 1-10.
- [25] Miura T, Higuchi M, Ozaki Y, et al. Progesterin is an essential factor for the initiation of the meiosis in spermatogenic cells of the eel [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2006, 103(19): 7333-7338.
- [26] 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.
- [27] Amer M A, Miura T, Miura C, et al. Involvement of sex steroid hormones in the early stages of spermatogenesis in Japanese huchen (*Hucho perryi*) [J]. *Biol Reprod*, 2001, 65(65): 1057-1066.
- [28] Hess R A. Estrogen in the adult male reproductive tract: a review [J]. *Reprod Biol Endocrinol*, 2003, 1(25): 189-199.
- [29] Miura T, Miura C, Ohta T, et al. Estradiol-17 β stimulates the renewal of spermatogonial stem cells in males [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1999, 264(1): 230-234.
- [30] Takatsu K, Miyaoku K, Roy S R, et al. Induction of female-to-male sex change in adult zebrafish by aromatase inhibitor treatment [J]. *Scientific Reports*, 2013, 3(1): 486-489.
- [31] Caspillo N R, Volkova K, Hallgren S, et al. Short-term treatment of adult male zebrafish (*Danio Rerio*) with 17 α -ethinyl estradiol affects the transcription of genes involved in development and male sex differentiation [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 2014, 164: 35-42.
- [32] Rajakumar A, Singh R, Chakrabarty S, et al. Endosulfan and flutamide impair testicular development in the juvenile Asian catfish, *Clarias batrachus* [J]. *Aquatic Toxicology*, 2011, 110/111(1): 123-132.
- [33] Vizziano-Cantonnet D, Baron D, Mah  S, et al. Estrogen treatment up-regulates female genes but does not suppress all early testicular markers during rainbow trout male-to-female gonadal transdifferentiation [J]. *Mol Endocrinol*, 2008, 41(5): 277-288.
- [34] Kortner T M, Mortensen A S, Hansen M D, et al. Neural aromatase transcript and protein levels in Atlantic salmon (*Salmo salar*) are modulated by the ubiquitous water pollutant, 4-nonylphenol [J]. *General and comparative endocrinology*, 2009, 164(1): 91-99.
- [35] Kazeto Y, Place A R, Trant J M. Effects of endocrine disrupting chemicals on the expression of CYP19 genes in zebrafish (*Danio rerio*) juveniles [J]. *Aquatic Toxicology*, 2004, 69(1): 25-34.

- [36] Hu J, Sun S, Guo M, et al. Use of antagonists and morpholinos in loss-of-function analyses: estrogen receptor ESR2a mediates the effects of 17 α -ethinylestradiol on primordial germ cell distribution in zebrafish[J]. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 2014, 12(1): 40.
- [37] Sato S, Seki N, Hotta Y, et al. Expression profiles of a human gene identified as a structural homologue of meiosis-specific recA-like genes[J]. *DNA Research*, 1995, 2(4): 183-186.
- [38] Draper B W, McCallum C M, Moens C B. nanos1 is required to maintain oocyte production in adult zebrafish [J]. *Developmental Biology*, 2007, 305(2): 589-598.
- [39] Matsudy Y, Habu T, Hori T, et al. Chromosome mapping of the mouse homologue of DMC1, the yeast meiosis-specific homologous recombination gene [J]. *Chromosome Research*, 1996, 4(3): 249-250.

Animal Sciences

Differential Mechanisms of 17 α -ethinylestradiol and Flutamide on Spermatogenesis of Male Zebrafish (*Danio rerio*)

YIN Pan^{1,2}, ZHANG Qunfang¹, LI Yingwen¹, LIU Zhihao¹

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

2. Key Laboratory of Freshwater Fish Reproduction and Development, Southwest University, Chongqing 400715, China)

Abstract: In this study zebrafish (*Danio rerio*) males were exposed to 17 α -ethinylestradiol (EE2, 150 ng \cdot L⁻¹), flutamide (Flu, 300 μ g \cdot L⁻¹) and their combination (EE2, 150 ng \cdot L⁻¹ + Flu, 300 μ g \cdot L⁻¹) for 30 days, and the influences of these drugs on spermatogenesis of zebrafish males were analyzed by histology. Meanwhile, we used quantitative RT-PCR (qRT-PCR), to shed light on the possible differential mechanisms involved. Histological results showed thickened testicular epithelium and considerable loss of germ cells after EE2 treatment; decreased and increased number of spermatozoa and early stages of germ cell, respectively, after Flu treatment and sharply decreased number of all stages of germ cells in combination group. Moreover, qRT-PCR results showed dramatically reduced expression of transcription factors involved in steroidogenesis regulation (*dmrtl*, *sfl*) and germ cell marker genes (*dmcl*, *nanos1*) in all exposed groups ($p < 0.05$). qRT-PCR results also showed down-regulated expression of gene responsible for 11-KT (11-keto testosterone) production (*p450-11 β*) in all treated groups ($p < 0.05$), and reduced expressions of genes involved in estrogen (*cyp19a1a*), androgen (*cyp17a1*) and progesterone (*cyp17a2*) productions after EE2 and combination treatment ($p < 0.05$). However, the expressions of *cyp19a1a*, *cyp17a1* and *cyp17a2* remained unchanged after Flu treatment ($p < 0.05$). The study suggested that EE2, Flu and their combination seriously disrupted spermatogenesis in zebrafish, resulting in dramatically decline of germ cell number; therefore, both similar and differential mechanisms were involved in disrupted spermatogenesis of zebrafish treated with the drugs above, respectively.

Key words: 17 α -ethinylestradiol; flutamide; zebrafish; testicular development; spermatogenesis; gene expressions

(责任编辑 方 兴)