

孕激素暴露致食蚊鱼形态雄性化的生物学效应

范俊杰^{1,2}, 黎紫兰¹, 徐少群¹, 何文婷¹, 黎美媚¹, 闫月明^{1,2}, 方展强^{1,2}

(1. 华南师范大学生命科学学院, 广州 510631;

2. 广东高校城市水环境生态治理与修复工程技术研究中心, 广州 510006)

【摘要】 目的 研究不同浓度孕酮(PRO)暴露对雌性食蚊鱼(*Gambusia affinis*)的形态雄性化生物学效应。**方法** 将性未成熟的雌性食蚊鱼个体分别静水暴露于0.5、5、50和500 nmol/L不同浓度的PRO实验组中,并设置对照组和平行组。持续暴露42 d后观察与测定食蚊鱼的体长、体重、臀鳍第3鳍条和第14、15、16椎肋骨形态雄性化变化等指标,同时观察卵巢发育状况。**结果** 食蚊鱼暴露42 d后,与对照组相比,50和500 nmol/L实验组食蚊鱼的体长(BL)有极显著减少(分别 $P < 0.01$);无论是低浓度组还是高浓度组,暴露实验后体重(BW)都有显著性或极显著下降($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$);PRO暴露对食蚊鱼身体健康指数(CF)的影响,只有在5 nmol/L浓度时差异有显著性($P < 0.05$);500 nmol/L浓度处理后,第3臀鳍条分节数(FJ)、长度(FL)和最宽处宽度(FW)差异有显著性($P < 0.05$),表明形态雄性化变化明显;其他浓度组则无明显区别($P > 0.05$);500 nmol/L PRO实验组中,雌性食蚊鱼的第14、15、16椎肋骨的L值、D值和L:D值都出现极显著性差异(分别 $P < 0.01$),表明形态雄性化变化明显;组织切片观察揭示,暴露组食蚊鱼卵巢中的卵母细胞发育受到不同程度的抑制,II、III时相卵母细胞胞核发生肿胀现象。**结论** 孕激素暴露诱导雌性食蚊鱼形态雄性化的生物效应十分明显。

【关键词】 食蚊鱼;孕激素;雄性化;组织形态学

【中图分类号】 R994.6 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2014) 04-0031-06

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2014.04.008

Progesterone induces morphological masculinization in immature female mosquitofish (*Gambusia affinis*)

FAN Jun-jie^{1,2}, LI Zi-lan¹, XU Shao-qun¹, HE Wen-tin¹, LI Mei-me¹, YAN Yue-ming^{1,2}, FANG Zhan-qiang^{1,2}

(1. College of Life Science, South China Normal University, Guangzhou 510631, China;

2. Guangdong Technology Research Center for Ecological Management and Remediation of Urban Water System, Guangzhou 510006, China)

【Abstract】 Objective The aim of this study was to investigate the masculinizing effects of progesterone (PRO) exposure at different concentrations on the morphology of female mosquitofish (*Gambusia affinis*). **Methods** Immature female *G. affinis* individuals were put into static water with 0.5, 5, 50 and 500 nmol/L progesterone ($n = 56$), respectively. In addition, control group and parallel groups were set up. After 42-day-long exposure, we measured four main indexes of the *G. affinis*: the body length, body weight, morphological changes in the anal fin 3rd fin and the 14, 15 and 16 vertebral ribs. We also observed the state of ovarian development. **Results** The body lengths (BL) of experimental groups exposed at concentration of 50 and 500 nmol/L progesterone for 42 d showed significant differences, respectively ($P < 0.01$ for both), when compared with those of the control group. The body weights (BW) of experimental groups exposed to progesterone at all concentrations were significantly or very significantly decreased ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). Only the proges-

【基金项目】 华南师范大学第8期大学生课外科研项目; 广东高校城市水环境生态治理与修复工程技术研究中心建设项目(2012gcxkA004)。

【作者简介】 范俊杰(1985年-),男,硕士。E-mail: 418498465@qq.com

【通讯作者】 方展强。E-mail: fangzhq@senu.edu.cn

terone at 5 nmol/L concentration showed significant effect on the body health index (CF) ($P < 0.05$). The section number (FJ) of the anal fin 3rd fin, the section length (FL) and the widest portion width (FW) in the experimental groups had significant difference ($P < 0.05$), respectively, showing significant changes in morphology after the exposure to 500 nmol/L progesterone. However, there was no significant difference between the values resulted by progesterone in other concentrations ($P > 0.05$). When exposed to 500 nmol/L PRO, the L, D and L:D values of the 14th, 15th and 16th vertebral ribs of the female *G. affinis* had very significant difference ($P < 0.01$ for all), respectively, indicating significant changes of morphological masculinization. Histological examination revealed that the developmental status of the ovaries of *G. affinis* in the experimental groups were to different degrees inhibited, and the nuclei appeared swelling in stage II and III oocytes.

Conclusions The results of this study indicate apparent masculinizing effects of progesterone on immature female mosquitofish.

【Key words】 Mosquitofish (*Gambusia affinis*); Progestation; Masculinization; Morphology

近年来,环境污染问题日益严重,许多人工化合物的研发与应用使得生命体赖以生存的水环境遭到严重的破坏。其中许多环境激素独特的物理化学性质使得其具有干扰动物内分泌系统的功能。广义上的环境激素是存在于环境之中,以某种方式干扰正常内分泌功能的天然或合成的化合物^[1]。鱼类是水生态环境中的重要组成部分,处于水生生态系统食物链的顶端。由于水体中有害化学物质的增多,已经对鱼类的生存和繁衍构成了严重的威胁,因此,研究环境内分泌干扰物对鱼类的影响具有重要的意义^[2]。化学测定表明城市污水中含有大量的雌激素、雄激素、孕激素等,这些污染物对生物的不利影响一直以来是科研工作者关心的焦点,因此,最近几十年来开展了大量利用淡水小型鱼类探索激素类污染物生物效应的研究,例如剑尾鱼(*Xiphophorus helleri*)^[3-7],唐鱼(*Tanichthys albonubes*)^[8-10],食蚊鱼(*Gambusia affinis*)^[11-13]等。以往国内外有关环境内分泌干扰物生物效应的研究更多地集中在雌激素方面,而对雄激素的生物效应的研究最近几年也开始逐渐增多,但有关孕激素(progesterone, PRO)的研究在国外较少,在国内更少甚至几乎空白。

食蚊鱼(*Gambusia affinis*)是一种小型卵胎生鱼类,隶属鲮形目(Cyprinodontiformes),胎鲮科(Poeciliidae),食蚊鱼属。作为灭蚊防治疟疾最有效的生物工具,于19世纪初便从北美和中部美洲引入到世界各地,从而成为了世界性分布的鱼类^[14]。食蚊鱼的入侵性非常强,并具有高繁殖力,对其所在的生态系统具有关键的生物效应。这个物种对温度和盐度的变化有较强的适应能力,这使其能在不同的生态环境中存活。由于以上的特性,食蚊鱼广泛分布于华南各地,容易捕捞,易于在实验室进行毒性暴露实验,因此被广泛用于生物指示种类。早在上个世纪

90年代,食蚊鱼就已经被选做监测造纸废水的环境指示生物^[14,15]。食蚊鱼是卵胎生鱼类,该鱼的第14、15、16椎肋骨具有二态性,雄性的第14、15、16椎肋骨明显区别于雌性,雌性的椎肋骨姿势与其它大多数部位的相似,但雄性的是变长并向前弯曲的,这样在交配时能为雄鱼的生殖足摆动提供支撑^[16]。雄鱼的第14、15、16椎肋骨的生长是受体内的雄激素控制的。因此可以推测,当把雌性食蚊鱼暴露于雄性激素物质之后,将会诱导出类似雄性食蚊鱼那样的肋骨结构(见图1A-E)。正常情况下,雌性和雄性食蚊鱼的臀鳍都是由10条鳍条组成,每个鳍条都分成若干节^[17]。雄性食蚊鱼通过使用由臀鳍-高度分化成的生殖足给雌性食蚊鱼输送精子。在雄性食蚊鱼体内,生殖足的发育是由雄激素决定的,但幼鱼和成熟的雌鱼暴露于外源性雄激素时也可以诱导出类似的生殖足^[17-20]。通常情况下,雌鱼的臀鳍条分节数要比雄性的少,但是当雌鱼暴露于雄激素时,它的臀鳍条长度将增加,并伴随着分节数也将增加^[21]。因此,臀鳍条的分节数是一个较好的指示雄激素特性的生物标志物(图1C)。(图1见彩插2)。

本研究以食蚊鱼为实验动物,将其暴露于不同浓度的孕酮(PRO)中进行染毒实验,观察和记录其在生长发育过程中组织形态学发生的变化,同时将体长、体重、第3鳍条、椎肋骨和卵巢发育等作为研究的指标,探讨孕激素其所具有的雄性激素方面的活性,检验孕激素暴露对食蚊鱼正常生长发育的潜在不利影响,同时也为环保部门提供环境激素污染治理的科学依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物

实验用的食蚊鱼(*Gambusia affinis*)采自华南师

范大学石牌校区鱼塘,该水塘不受激素类物质污染^[22,23]。在一定水温条件下(20~34℃),食蚊鱼仔鱼产出 18 d 后,雄鱼个体出现生殖足的分化并在 40 d 成熟,体长为 17 mm;45~50 d 雌鱼成熟,相应体长为 23~25 mm,体型已明显大于雄鱼^[24]。本实验对采集的实验鱼进行雌、雄鉴定,并挑选产出后 3~5 d 同批处于幼鱼期发育阶段的雌性幼鱼,其性腺尚处于发育前期阶段。将实验鱼置大鱼缸中驯养 7d,随后分投到各小鱼缸中。每个浓度组的实验鱼最终保持 70 尾。实验期间,食蚊鱼生活在经过曝气的自来水,每天定时更换实验药液,保证暴露浓度不变。水温保持(25±2℃),光周期为 14 h(昼):10 h(夜)。每天定时喂食 2 次冷冻红虫,所用鱼食购自广州花鸟鱼市场(经过检测已被证明是安全的)^[25]。实验鱼的使用及实验过程“参照实验动物使用的 3R 原则进行”^[26]。

1.2 药品与仪器

孕酮(natural progesterone, Damas-beta 公司; Basel, Switzerland); 1% KOH 水溶液; 石蜡切片制作相关试剂; 解剖镜, 光学显微镜, 数码相机等。

1.3 实验方法

1.3.1 实验分组

选用 560 尾雌性食蚊鱼进行实验,暴露时间持续 42 d。实验分组:二甲亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO)溶剂对照组(56 尾);孕酮(PRO)暴露实验组,设置 0.5、5、50 和 500 nmol/L 共 4 个实验组(助溶剂为 DMSO),每组 56 尾。再设一个平行组。实验缸(10L 规格)用 5 L 的药液进行暴露实验;养殖条件与驯养期一致,实验结束前一天实验鱼禁食。

1.3.2 观察指标

暴露实验结束,分别用游标卡尺和天平测量每条鱼的体长(BL)和体重(BW);实验鱼身体健康指数(CF)按如下公式计算【 $CF = 100 \cdot BW / BL^3$ 】。制作骨骼标本,拍照,并计算第 3 臀鳍条的分节数、长度和最宽处宽度值。取性腺并用 Bouin 氏液进行固定,用作组织切片观察。

1.3.3 鳍条和骨骼处理

将鱼体用蒸馏水冲洗几遍,然后放入新的蒸馏水中 24 h,通过逆渗透的方式来水化组织;将水化后的鱼体置于 1% 的 KOH 水溶液浸泡 4 d,每天更换新的 KOH 溶液;用解剖工具等将浸泡好的鱼体的软组织尽量剔除干净;用 0.1% 的甲基红溶液浸泡鳍

条和骨骼标本 0.5 h,镜检染色程度,并调整染色时间;将处理好的样品捞出,在显微镜下观察并拍照记录。

1.3.4 性腺组织切片制作

剖开实验鱼腹部迅速取卵巢样品置 Bouin 氏液固定 24 h,取出组织块用乙醇冲洗、脱水,经二甲苯透明,54~56℃ 石蜡包埋,制成 6~8 μm 切片,Delafield 苏木精-曙红(HE)染色,中性树脂封片后置显微镜下观察并拍照。

1.4 数据统计与分析

采用 SPSS 17.0 统计软件对数据进行各种检验和比较。实验组和对照组之间的显著性差异检验使用方差分析或者协方差分析。体长、体重、第 3 臀鳍条分节数、长度和最宽处宽度等使用方差分析来检验,而身体健康指数使用协方差分析。L 和 D 值以及它们的比值 L/D 的检验先使用方差分析,再采用 Tukey 的两两比较检验。当 $P < 0.05$ 时,差异有显著性。所有数据和图表均以平均值±标准差的方式表示。

2 结果与分析

2.1 PRO 暴露对食蚊鱼生长发育的影响

经孕酮暴露后,与对照组比较,50 和 500 nmol/L 浓度暴露组食蚊鱼的体长有极显著下降(分别 $P < 0.01$),而 0.5 和 5 nmol/L 浓度组则没有显著差异(分别 $P > 0.05$)。与对照组比较,无论是低浓度组还是高浓度组食蚊鱼的体重都显著下降,其中 5、50 和 500 nmol/L 浓度组有极其显著性差异($P < 0.01$)。但 PRO 对食蚊鱼身体健康指数的影响只有在 5 nmol/L 浓度时才出现明显下降($P < 0.05$),其他浓度差异无显著性($P > 0.05$)(表 1)。

2.2 PRO 暴露对第 3 臀鳍条的分节数、长度和最宽处宽度的影响

不同浓度 PRO 暴露 42 d 后,第 3 臀鳍条分节数(见图 2-A)、长度(图 2-B)以及最宽处宽度(图 2-C)出现了不同程度的形态变化。与对照组相比,500 nmol/L 暴露组雌鱼的第 3 臀鳍条分节数、长度和最宽处宽度都呈现明显变异($P < 0.05$),其他浓度组则无明显差异($P > 0.05$)。其中第 3 臀鳍条长度随着 PRO 暴露浓度上升而逐步上升,表明高浓度 PRO 有促进食蚊鱼雌性幼鱼形态雄性化的作用(图 2)。

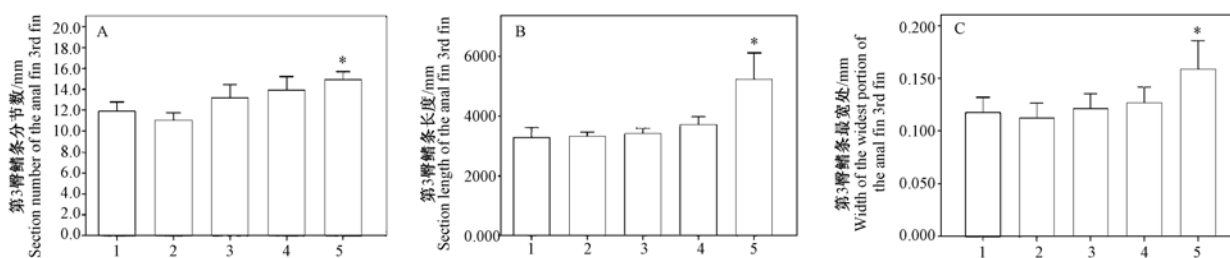
表 1 孕酮暴露 42 d 后对食蚊鱼体长、体重、身体健康指数的影响

Tab. 1 Effects of progesterone on the body length, body weight and physical health index in female *G. affinis* after PRO exposure for 42 days

孕酮/浓度/nmol/L PRO concentration	总样本数(死亡数) Total samples (died)	体长/mm BL	体重/mg BW	身体健康指数/% CF
对照组 Control	50(6)	28.19 ± 3.48	227.2 ± 95.2	9.52 ± 1.62
0.5	48(8)	25.83 ± 2.97	171.6 ± 54.8 *	9.69 ± 1.56
5	45(11)	26.50 ± 3.36	161.2 ± 71.4 **	8.22 ± 1.00 *
50	47(9)	24.68 ± 3.40 **	155.9 ± 66.2 **	9.88 ± 1.56
500	47(9)	24.3 ± 2.29 **	141.9 ± 41.1 **	9.81 ± 0.92

注:与对照组比, * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$ 。

Note. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$, vs. control group.



注:A, B, C: 1. 空白对照组;2. 0.5 nmol/L PRO 暴露组;3. 5 nmol/L PRO 暴露组;4. 50 nmol/L PRO 暴露组;5. 500 nmol/L PRO 暴露组; * 表示与空白组相比较差异有显著性($P < 0.05$)。

图 2 孕酮暴露 42 d 后对雌性食蚊鱼第 3 臀鳍条分节数、长度和最宽处宽度的影响

Note. A, B, C: 1. Control group; 2. 0.5 nmol/L PRO exposure group; 3. 5 nmol/L PRO exposure group; 4. 50 nmol/L PRO exposure group; 5. 500 nmol/L PRO exposure group; * indicates significant difference ($P < 0.05$).

Fig. 2 Effects of progesterone on the anal fin 3rd fin section number, section length and widest width in female *G. affinis* after exposure for 42 days

2.3 PRO 暴露对第 14,15,16 椎肋骨的 L 值、D 值和 L/D 值的影响

如图 3(彩插 3)所示,与对照组相比,500 nmol/L PRO 暴露组雌性食蚊鱼的第 14,15,16 椎肋骨的 L 值都明显增加($P < 0.05$)且分别达到到最大值(分别为 1.78 ± 0.50 、 1.85 ± 0.58 和 1.87 ± 0.57) (见图 3-A);D 值则减少且分别达到最低值(分别为 0.83 ± 1.88 、 0.85 ± 0.21 和 0.99 ± 0.26) (图 3-B)。此外,不同浓度暴露组与对照组相比,其 L:D 值都呈现一定程度的增加,而 500 nmol/L PRO 暴露组具有极显著性的差异($P < 0.01$) (图 3-C)。L 值、D 值以及 L/D 值的变化表明高浓度 PRO 暴露诱导雌性食蚊鱼发生了明显的形态雄性化逆转的生物效应。

2.4 PRO 暴露对性腺发育的影响

雌性食蚊鱼卵巢一个,外被一层黑色的结缔组织膜,性成熟个体其卵巢内一般含有成熟卵子 15 ~ 30 粒,卵巢通过生殖管与生殖孔接受精子、作为仔鱼产出的通道。根据卵子发生不同阶段的细胞形态特点,将卵母细胞的发生划分为 6 个时相,包括 I ~ VI 时相。本研究对卵巢组织切片的观察可见 II、III、IV 时相的各级卵母细胞(图 4A-E)。对实验鱼

卵巢发育的观察结果可见,对照组雌鱼在 42d 实验周期期间,其性腺发育正常,卵巢内分布各个不同时期的卵母细胞,其发育状态良好(图 4A)。但是 PRO 暴露组的雌鱼性腺发育呈现受到不同程度地抑制现象,组织切片的镜检中发现卵巢中的卵母细胞发育滞留在早期阶段居多,如 II 时相和 III 时相卵母细胞偏多(图 4B-D),高浓度组(500 nmol/L)在暴露处理 42 d 后卵巢出现不同程度的退化,多数卵母细胞发育停滞在 II ~ III 时相,并且出现大面积卵母细胞坏死(见图 4E)。(图 4 见彩插 3)。

3 讨论

本研究选用性未完全成熟的雌性食蚊鱼作为实验动物,研究孕酮(PRO)是否对食蚊鱼产生形态雄性化发育逆转的生物效应。一般来说,在自然条件下同一生长发育时期的雌性食蚊鱼个体要比雄性食蚊鱼的大,但若暴露在具有雄激素效应的 PRO 中的雌性食蚊鱼,由于鱼体发生形态雄性化逆转,食蚊鱼的体长、体重都有所下降。本实验结果已经证明这一点,各浓度暴露组的个体与对照组比较,体长、体重都有明显下降,显示其生长发育受到雄激素效

应的影响,各暴露组个体出现雄性化逆转,从而表明 PRO 对鱼类生长具有雄激素的生物效应。孕激素是由卵巢的黄体细胞分泌,以孕酮(黄体酮)为主^[27]。在肝脏中灭活成孕二醇后与葡萄糖醛酸结合经尿排出体外。一般认为,孕激素往往在雌激素作用基础上产生效用,主要生理功能包括抑制排卵,促使子宫内膜分泌,以利受精卵植入,并降低子宫肌肉兴奋度,保证妊娠的安全进行;促进乳腺腺泡的生长,为泌乳作准备;提高体温并使血管和消化道平滑肌松弛。以往的研究只关注孕激素的雌激素效应,而忽略其也具有雄激素效应。由于孕激素是雄激素、雌激素、肾上腺皮质激素等生物合成的重要中间体,在不同程度上具有上述各类激素的作用,因此在本实验中所呈现的雄激素生物效应也就不难理解了。

到目前为止,有关孕激素对暴露鱼类生长发育影响的研究尚少见报。已有研究发现雌性食蚊鱼暴露于人工合成的孕激素 21 d 后有明显可见的形态雄性化标志出现;而在暴露实验结束后,所有暴露于最高浓度组的雌鱼背鳍出现了雄鱼的第二性特征“黑点”^[28]。正常情况下,雌性和雄性食蚊鱼的臀鳍都是由 10 条鳍条组成,同时每条鳍条都分成若干节^[17]。雄性食蚊鱼通过使用由臀鳍高度分化成的生殖足给雌性食蚊鱼输送精子。在雄性食蚊鱼体内,生殖足的发育是由雄激素决定的,但幼鱼和成熟的雌鱼暴露于外源性雄激素时也可以诱导出类似的生殖足^[17-20]。通常情况下,雌鱼的第 3 臀鳍条分节数要比雄性的少,但是当雌鱼暴露于雄激素物质时,它的臀鳍条长度将增加伴随着分节数也将增加^[17]。在本次实验中发现 500 nmol/L PRO 处理 42 d 之后,食蚊鱼臀鳍第 3 鳍条的分节数明显增加,出现了形态雄性化的逆转趋势,表明 PRO 的确具有雄激素的活性,导致暴露的雌鱼出现雄鱼的第二性特征。因此,食蚊鱼的臀鳍条可以被作为鱼类发生形态雄性化的理想生物标志物。受到环境雄激素物质的影响,臀鳍第 3 鳍条的分节数、长度以及最宽处宽度出现不同程度的形态变化都可以作为验证食蚊鱼是否发生雄性化的标志^[17]。例如,雄鱼的第 3 鳍条分节数是要远大于雌鱼的,因此分节数的改变是雌性食蚊鱼形态雄性化的重要标志,这在本研究中也得到证明。

与其他椎肋骨相比,正常的雄性食蚊鱼的第 14、15、16 根椎肋骨较长、厚,并向前倾斜,且背部具有钩状结构,这 3 根椎肋骨与臀鳍相连。交配过程中,雄鱼这 3 根椎肋骨向前倾斜,从而带动臀鳍(生殖足)摆动^[16]。在食蚊鱼的性成熟过程中,椎肋骨

发生在臀鳍形成之前。第 14、15、16 根椎肋骨的发育受食蚊鱼体内雄激素的调控,最终的形成需要食蚊鱼体内雄激素的不断刺激才能正常形成^[18]。如果将雌性食蚊鱼幼体暴露于雄激素物质之后,也将会诱导形成类似雄性食蚊鱼的椎肋骨结构。在本实验中,雌性食蚊鱼暴露于 PRO 42 d 之后,对照组的雌性食蚊鱼的椎肋骨正常,而暴露组的雌性食蚊鱼第 14、15、16 根椎肋骨的 L 值、D 值和 L:D 值都出现了具有统计意义上的变异,L 值增加,D 值减少,L:D 值增加,显示出形态雄性化的特征,其向前移动的椎肋骨的长度是受雄激素类物质控制的,同时则表明 PRO 所具有的雄激素生物效应。

雌性动物体内的孕激素主要在卵巢中合成的^[27]。在人体内,孕激素和它的代谢物是控制雌性正常生殖功能的主要激素;而在鱼体内,它对刺激雌鱼卵巢的最后发育和成熟、刺激雄鱼的精子形成以及对启动雌雄鱼减数分裂都起着很重要的作用^[28]。已有研究报道认为,造纸废水对雄性化的雌性食蚊鱼的卵巢造成损伤^[29,30],其抑制野生鱼类性腺的发育^[31],使肝脏和肌肉储备更多的能量^[32]。本实验对 PRO 暴露的雌性食蚊鱼的卵巢组织切片进行观察,发现随着 PRO 剂量浓度的上升,食蚊鱼卵巢不同时相卵母细胞受到不同程度地抑制甚至出现严重退化的现象,但在组织切片中尚未能发现存在的精母细胞或精子的存在。这可能是因为切片制作的数量较少因而未能观察到;也可能与实验暴露时间、暴露浓度和实验方式可能有关;同时也可能说明 PRO 的雄性化作用尚弱。

4 结论

雌性食蚊鱼经 PRO 暴露 42 天后,其体长、体重、身体健康指数、第 3 臀鳍条分节数、长度和最宽处宽度均有不同程度的变化;在 500 nmol/L PRO 暴露作用下,雌性食蚊鱼的 14、15、16 椎肋骨的 L 值、D 值和 L:D 值都出现显著差异;组织切片观察显示,暴露组雌性食蚊鱼卵巢的卵母细胞发育已出现不同程度的退化。由此表明 PRO 对食蚊鱼具有的雄激素生物效应。本实验结果已表明孕激素具有雄性化的生物效应,但相关的作用机理机制仍不清楚。今后进一步的研究工作有必要去澄清其作用机制,并还应密切关注其对水生野生动物的生殖毒性影响。

(本文图 1 见彩插 2,图 3、4 见彩插 3。)

参 考 文 献

- [1] Arcand H, Lias D, Benson WH. Fish reproduction: An ecologi-

- cally relevant indicator of endocrine disruption [J]. Environ Toxicol Chem, 1998, 17:49–57.
- [2] 刘阿朋, 王卫民. 内分泌干扰物对鱼类的影响 [J]. 水生生态学杂志, 2007, (1):1–4.
- [3] 方展强, 张凤君, 郑文彪, 等. 多氯联苯对剑尾鱼超氧化物歧化酶活性的影响 [J]. 中国实验动物学报, 2004, 12(2):96–99.
- [4] 梁岳, 马广智, 方展强. 剑尾鱼肝细胞原代培养 [J]. 中国比较医学杂志, 2006, 16(3):185–187.
- [5] 温茹淑, 方展强, 江世贵, 等. 17β -雌二醇对雄性剑尾鱼卵黄蛋白原的诱导研究 [J]. 中国实验动物学报, 2007, 15(4):280–284.
- [6] 韩建, 许言, 余逸敏, 等. 17α -甲基睾酮对剑尾鱼的影响 [J]. 中国实验动物学报, 2010, 18(6):484–488.
- [7] 张晶, 方展强. 全氟辛烷磺酰基化合物 (PFOS) 对剑尾鱼抗氧化酶活性的影响 [J]. 中国实验动物学报, 2013, 21(4):61–67.
- [8] 杨志聪, 姚静, 方展强. DDTs 对唐鱼仔鱼的急性毒性及安全浓度评价 [J]. 实验动物与比较医学, 2007, 27(2):123–126.
- [9] 姚静, 方展强. 唐鱼卵黄蛋白原的 ELISA 检测方法的建立 [J]. 中国实验动物学报, 2010, 18(3):242–246.
- [10] 杨丽丽, 方展强. 雌二醇、壬基酚、多氯联苯、镉和锌暴露对唐鱼体内超氧化物歧化酶活性的影响 [J]. 中国实验动物学报, 2012, 20(1):38–46.
- [11] 范俊杰, 徐少群, 方展强, 等. 17α -甲基睾酮对食蚊鱼形态雄性化及目标基因表达的影响 [J]. 水产学报, 2013, 37(1):9–15.
- [12] Wen R, Xie Y, Wan C, et al. Estrogenic and androgenic effects in mosquitofish (*Gambusia affinis*) from municipal effluent contaminated streams in Guangzhou, China [J]. Aquat Toxicol, 2013, 132–133:165–172.
- [13] 谢勇平, 方展强. 利用食蚊鱼目标基因转录水平评价东莞寒溪河雌/雄激素物质污染现状 [J]. 水生生物学报, 2013, 37(4):691–697.
- [14] Cody RP, Bortone SA. Masculinization of mosquitofish as an indicator of exposure to kraft mill effluent [J]. Bull Environ Contam Toxicol, 1997, 58:429–436.
- [15] Davis WP, Bortone SA. Effects of kraft mill effluent on the sexuality of fishes: an environmental early warning? [D]. In: Colborn TC, Clement C, editors. Volume 21, Chemically-induced alterations in sexual and functional development: the wildlife/human connection. In: Mehlman M A, editor. Advances in modern environmental toxicology. Princeton: Princeton Scientific Publishing. 1992. 113–127.
- [16] Rosen DE, Gordon M. Functional anatomy and evolution of male genitalia in Poeciliid fishes [J]. Zoologica, 1953, 38:1–52.
- [17] Orlando EF, Guillette Jr LJ. Sexual dimorphic responses in wildlife exposed to endocrine disrupting chemicals [J]. Environ Res, 2007, 104:163–173.
- [18] Turner CL. A quantitative study of the effects of different concentrations of ethynyl testosterone and methyl testosterone in the production of gonopodia in females of *Gambusia affinis* [J]. Physiol Zool, 1942, 15:263–280.
- [19] Rosa-Molinar E, Proskocil BJ, Hendricks SE, et al. A mechanism for anterior transposition of the anal fin and its appendicular support in the western mosquitofish, *Gambusia affinis affinis* (Baird and Girard, 1854) [J]. Cells Tissues Organs, 1998, 163:75–91.
- [20] Sone K, Hinago M, Itamoto M, et al. Effects of an androgenic growth promoter 17β -trenbolone on masculinization of mosquitofish (*Gambusia affinis*) [J]. Gen Comp Endocrinol, 2005, 143:151–160.
- [21] Stanko JP, Angus RA. In vivo assessment of the capacity of androstenedione to masculinize female mosquitofish (*Gambusia affinis*) exposed through dietary and static renewal methods [J]. Environ Toxicol Chem, 2007, 26:920–926.
- [22] 苏方, 谢勇平, 方展强. 苯并[a]芘和镉暴露对食蚊鱼求偶行为的影响 [J]. 生物学杂志, 2013, 30(4):5–10.
- [23] 钟林燕, 谢勇平, 张晓婵, 等. 3,4-苯并芘暴露对食蚊鱼生长发育的毒性影响 [J]. 江西农业学报, 2014, 26(4):94–97.
- [24] 陈国柱, 林小涛, 陈佩. 食蚊鱼 (*Gambusia* spp.) 入侵生态学研究进展 [J]. 生态学报, 2008, 28(9):4476–4485.
- [25] 梁岳. 利用鱼类卵黄蛋白原基因作为生物标志物建立环境雌激素效应评价方法 [D]. 华南师范大学博士学位论文. 2011.
- [26] 贺争鸣, 李冠民, 邢瑞昌. 3R 理论的形成、发展及在生命科学中的应用 [J]. 实验动物科学与管理, 2000, 17(3):43–47.
- [27] Conneely OM, Mulac-Jericevic B, DeMayo F, et al. Reproductive functions of progesterone receptors [J]. Recent Prog Hormone Res, 2002, 57:339–355.
- [28] Paulos P, Runnalls TJ, Nallani G, et al. Reproductive responses in fathead minnow and Japanese medaka following exposure to a synthetic progestin, norethindrone [J]. Aquat Toxicol, 2010, 99:256–262.
- [29] Howell WM, Black D, Bortone SA. Abnormal expression of secondary sex characters in a population of mosquitofish, *Gambusia affinis holbrooki*: evidence for environmentally-induced masculinization [J]. Copeia 1980, 4:676–681.
- [30] Ellis BJ, Bates JE, Dodge KA, et al. Does father absence place daughters at special risk for early sexual activity and teenage pregnancy? [J]. Child Dev. 2003, 74(3):801–821.
- [31] Lowell JL, Wagner DM, Atshabar B, et al. Identifying sources of human exposure to plague [J]. J Clin Microbiol 2005, 43:650–656.
- [32] Munkittrick KR, Van Der Kraak, GJ, McMaster ME, et al. Survey of receiving water environmental impacts associated with discharges from pulp mills. 2. Gonad size, liver size, hepatic EROD activity and plasma sex steroid levels in white sucker [J]. Environ Toxicol Chem, 1994, 13:1089–1101.