17 β -雌二醇对雄性唐鱼卵黄蛋白原的诱导及性腺发育的影响

温茹淑^{1,2}, 方展强^{1,*}, 陈伟庭¹

(1. 华南师范大学 生命科学院, 广东省高等学校生态与环境科学重点实验室, 广东 广州 510631; 2. 嘉应学院生物系, 广东 梅州 514015)

摘要: 以 17 β -雌二醇 (E_2) 诱导雄性唐鱼产生卵黄蛋白原 (Vtg), 采用 Sephacryl S-300 凝胶过滤层析柱提纯了雄鱼整体匀浆液的 Vtg。结果显示, 已确定被纯化的唐鱼 Vtg 在 4%—7.5% Native—PAGE 电泳中分子量为 440 kD 左右, 能同时被考马斯亮蓝、糖蛋白、磷蛋白、脂蛋白染色方法同时染色, 是一种富含糖、磷、脂的蛋白。与对照组作比较, 17 β -雌二醇暴露组其体重明显下降 ($P<0.01$), 精巢发育滞后。结果表明, 17 β -雌二醇能够诱导雄性唐鱼产生大量的 Vtg, 并影响到其生长及精巢发育。雄性唐鱼 Vtg 可作为环境雌激素监测的有效生物学标记物。

关键词: 17 β -雌二醇; 卵黄蛋白原; 精巢; 发育; 唐鱼

中图分类号: Q492 **文献标识码:** A **文章编号:** 0254-5853-(2008)01-0043-06

Effects of 17 β -estradiol on Vitellogenin Inducement and Gonad Development in Male *Tanichthys albonubes*

WEN Ru-shu^{1,2}, FANG Zhan-qiang^{1,*}, CHEN Wei-ting¹

(1. Key Laboratory of Ecology and Environmental Science in Guangdong Higher Education, College of Life Science, South China Normal University, Guangzhou 510631, China; 2. Department of Biology, Jiaying University, Meizhou 514015, China)

Abstract: Vitellogenin (Vtg) was purified from whole body homogenate (WBH) of estradiol-17 β (E_2) treated male *Tanichthys albonubes* by gel filtration (Sephacryl S-300). The results showed that the Vtg appeared to exist as homotrimer of approximately 440kD through native polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE). Vtg was characterized as a phospholipoglycoprotein by native-PAGE and staining of gels for CBB R-250, for carbohydrates with periodic acid-schiff reagent, for phosphorus with methyl green and for lipids with sudan black B. Body weight decreased ($P<0.01$) and the development of sperm was delayed after E_2 treatment when compared with the control group of male fish. The results indicated that E_2 can induce male fish to produce large quantities of Vtg and have a negative effect on its growth and gonad development. It also indicated that Vtg of the male *T. albonubes* could be as a valid biomarker for environmental estrogens.

Key words: 17 β -estradiol; Vitellogenin; Sperm; Development; *Tanichthys albonubes*

环境雌激素 (environmental estrogen) 对人类和野生动物的有害效应已引起了人们的广泛关注。目前检测环境雌激素的方法有仪器检测和生物检测, 前者能准确地检测各种环境介质中已知物质, 而后者可以检测环境中各种物质的综合作用效应。性腺发育观察和卵黄蛋白原检测是环境雌激素生物标记物检测中最为常用的指标, 已经得到广泛地应用。卵黄蛋白原 (vitellogenin, Vtg) 是卵生动物繁殖前成熟雌鱼的特有蛋白, 但是暴露在类雌激素物质水环境中的雄鱼及幼鱼体内也会被诱导产生

Vtg。因此可以通过检测鱼体内是否存在 Vtg 来评价生物受环境雌激素暴露影响的程度 (Ankley et al, 2001)。同时, 实验室暴露结果还表明, 一定量的雌激素类物质会引起雄鱼体内各种组织病变 (Ma et al, 2004)。近年来, 有关环境雌激素对野生动物造成危害的报道, 以水生动物居多, 主要表现为生殖器官、生殖机能和生殖行为异常 (Stoker et al, 2000; Kwak et al, 2001; Foster et al, 2001; Latchoumycandane & Mathur, 2002; Takahashi & Oishi, 2003; Hsu et al, 2004)。

收稿日期: 2007-10-15; 接受日期: 2008-01-04

基金项目: 广东省科技计划项目 (2004B40101015; 2006B36601008)

*通讯作者 (Corresponding author), Tel: 020-85211602, E-mail: fangzhanq@scnu.edu.cn

唐鱼 (*Tanichthys albonubes*) 隶属鲤科鱼丹亚科唐鱼属的一种小型鱼类, 是我国早期鱼类学家林书颜先生1932年在广州白云山发现并命名的, 并一直作为一种热带观赏鱼在世界各地被广泛饲养。唐鱼属国家二级保护动物, 曾一度被认为野生种群已经在原产地灭绝, 但近年报道在广州及珠江三角洲地区又发现野生种群 (Yi et al, 2004)。已有学者报道在越南北部某些地方也有唐鱼的自然分布 (Kottelat, 2001), 同属的另一种 *T. micagemmae* 主要分布在越南中部地区 (Freyhof & Herder, 2001)。近年, 华南师范大学生命科学学院一些学者致力于唐鱼的生物学特性及实验动物化研究 (Chen, 2005)。实验室条件下饲养观察发现, 唐鱼从受精卵孵化经胚胎和胚后发育, 50日龄进入幼鱼期, 77日龄开始有性成熟的雌雄个体产卵和排精, 一般80日龄的雌雄个体即可达性成熟 (Chen et al, 2004; Fang et al, 2006)。室内人工饲养良好条件下, 寿命可达800日龄 (Chen, 2005)。重金属和滴滴涕污染实验显示, 唐鱼对污染物敏感, 可应用于生态毒理学研究 (Wang et al, 2006; Yang et al, 2007)。本实验以唐鱼作为实验材料, 开展雌激素对雄性唐鱼的生殖毒性研究, 探讨雌激素对鱼类发育的影响, 确定其对雄性个体的内分泌干扰效应。

1 材料与方法

1.1 实验动物

实验用的唐鱼由华南师范大学生命科学学院生态毒理学实验室提供, 是同批孵化 80 日龄的性成熟雌、雄性个体, 体长(2.43±0.17)cm, 体重(0.24±0.05)g。置于水族箱(30cm×22cm×25cm, 加入水体积为 8L)暂养 2 周后进行实验。实验过程中 2 天换水 1 次, 实验用水为连续曝气 24h 的自来水, 水温 25±2℃, pH 为 6.8, 硬度为 2.4 度(德国度)。每天投喂 2 次饲料 (“欧开牌微胶囊饲料”, 为华南师范大学生命科学学院海洋生物研究所生产)。每组均用同样管径的气头连续充气。

1.2 药品与仪器

17-β 雌二醇 (E₂) 购自 Sigma 公司, 丙烯酰胺购自 Promega, N, N' 甲叉双丙烯酰胺购自天象人生物有限公司, 高分子量标准蛋白购自 Amersham Pharmacia, 北京六一仪器厂的 DYYIII-5 型电泳仪和 DYYIII-28A 电泳槽, LKB-NOVA 超薄切片机, 尼康数码相机。

1.3 实验方法

17-β 雌二醇 (E₂) 暴露实验 实验设 1 个雄鱼空白对照组、1 个雌鱼空白对照组, 一个暴露于等体积混合液水体的雄鱼对照组及 2 个不同浓度 E₂ 的雄鱼试验组, 每组投入实验鱼 20 尾。同时设实验平行组。采用水体暴露的方法进行实验, E₂ 先用丙酮溶解配成 1mg/mL 的母液后, 每次换水时按不同的浓度将母液加入水中。暴露浓度和暴露时间参照 Peute et al (1985) 的方法作了修改, 使 2 个处理组水体中 E₂ 的最终浓度分别为: 1、10μg/L, 对照组加入同等体积的丙酮。Vtg 诱导时间为 16d, 随后持续暴露 50d 以检查个体生长和精巢发育状况。E₂ 暴露 16d 后分别取对照组和 1μg/L、10μg/L 实验组的雄性唐鱼制样, 先测量实验鱼体长、体重, 然后对唐鱼进行解剖, 观察生殖腺的变化。同时制备唐鱼整体匀浆, 将对照组和实验组的个体分组, 每一尾鱼用匀浆器进行匀浆, 加入 2 倍鱼体重量的 4℃预冷的匀浆缓冲液, 在 4℃下, 10 000 r/min, 离心 30min。上清液用滤器过滤后用于层析或保存在 -80℃备用。

卵黄蛋白原纯化及鉴定 用全自动快速蛋白质液相色谱仪 (FPLC) 进行凝胶过滤层析, 整个过程温度控制在 4℃。样品为经 10μg/L E₂ 诱导雄鱼的整体匀浆液。柱子为: Sephacryl S-300 HR (XK 16/70) (Amersham Pharmacia Biotech), 缓冲液为 50mM Tris (含 1mmol/L PMSF, pH 8.0)。设定的层析条件: 上样前先平衡 1 个柱体积, 上样量为 6mL, 洗脱 1.5 个柱体积。流速为 1 mL/min, 检测器波长 280nm, 每 1mL 进行收集, 各蛋白峰所对应的蛋白组分在 4%—7.5% Native-PAGE 电泳中进行 Vtg 的鉴定及检测分子量, 将含有目的蛋白 Vtg 的蛋白洗脱峰收集。

参照 Wang & Fan (2000) 的方法, 通过 4%—7.5% Native-PAGE 电泳来鉴定 Vtg 的纯度。分子量 Mark 采用 Pharmacia 的高分子量标准蛋白, 以鉴定 Vtg 的纯度及分子量。电泳起始电压为 120V, 待溴酚蓝前沿进入分离胶后调整电压为 200V, 当前沿跑至底部后再跑 1—2h 停止电泳。取出凝胶后将同一块胶分成 4 份切下来, 分别进行考马斯亮蓝、糖蛋白、磷蛋白和脂蛋白染色。糖蛋白和磷蛋白的检测参照 Sun & Zhang (2001) 的方法; 脂蛋白的检测参照 Yang et al (2001) 方法进行。

精巢的组织学观察 E₂ 暴露 50d 后, 分别取对

照组和 1、10μg/L 实验组的雄性唐鱼精巢进行常规的组织切片观察。样品用 Bouin 氏液固定 24h,各级乙醇冲洗,脱水,经二甲苯透明,54—56℃石蜡包埋,制成 7μm 切片,H.E.染色,中性胶封片后在显微镜下观察并拍照。

2 结果与分析

2.1 唐鱼卵黄蛋白原纯化及鉴定

通过 Sephacryl S-300 HR 凝胶过滤层析,可见 5 个洗脱峰(图 1),将各洗脱峰的组分进行 4%—7.5% Native-PAGE 电泳检测,同时进行含糖、磷、脂特性的鉴定。结果发现,第一个蛋白峰含有目的蛋白,电泳结果显示在分子量大小为 440kD 处有一条蛋白带,匀能被考马斯亮蓝、糖、磷、脂蛋白染色方法进行染色。且糖蛋白、磷蛋白、脂蛋白都在蛋白图谱的同一位置出现(图 2),根据卵黄蛋白原是一种大分子的磷酸脂糖蛋白(phospholipoglycoprotein)的特性(Mommsen & Walsh,1988),可以确定该蛋白即为提纯的唐鱼卵黄蛋白原,分子量为 440kD。此外,利用对照组的雄性唐鱼整体均浆液、诱导组雄性唐鱼整体均浆液进行 4%—7.5% Native-PAGE,结果表明,诱导雄鱼 440kD 处均有明显蛋

图 1 雄性唐鱼整体匀浆液Sephacryl S-300 HR凝胶过滤层析结果

Fig. 1 Gel filtration elution profiles of the supernatant of WBH from estradiol-17β treated male *T. albonubes* on Sephacryl S-300 HR column

样品为: 诱导后雄性唐鱼整体匀浆液,柱子为 Sephacryl S-300 HR (XK 16/70, Amershan Pharmacia,Biotech),洗脱液为 50 mmol/L Tris 含 1 mmol/L PMSF, pH8.0),流速为 1 mL/min 下洗脱,温度为 4℃,蛋白组分每 mL 进行收集,检测器波长 280nm。

Sample: WBH from estradiol-17β treated male. Column: Sephacryl S-300 HR (XK 16/70, Amershan Pharmacia Biotech). Elution buffer: 50 mmol/L Tris pH8.0. Flow rate: 1 mL/Min. Temperature: 4℃. The eluate was collected in 1 mL fractions while the UV absorbance at 280 nm was monitored.

图 2 E₂ 诱导组雄鱼整体匀浆 Native-PAGE 电泳后的凝胶进行考马斯亮蓝、糖、磷、脂蛋白染色

Fig. 2 The Vtg of male fish in E₂-treated groups was characterized as a phospholipolipoglycoprotein by native-PAGE and staining

M: 标准蛋白; 1: 考马斯亮蓝染色 R-250; 2: 糖蛋白染色; 3: 磷蛋白染色; 4: 脂蛋白染色(1: CBB R-250 staining; 2: carbohydrate staining; 3: phosphorus-staining; 4: lipoprotein-staining)。

白带,而对照雄鱼没有这条蛋白带(图 3),表明 E₂ 诱导后雄鱼产生了卵黄蛋白原。

2.2 17-β 雌二醇对雄性唐鱼个体生长的影响

实验前,唐鱼的平均体长为(2.43±0.17) cm,体重为(0.24±0.05) g。经 50 d 的暴露实验,与对照组比较,两个实验组的雄性唐鱼的体长、体重都降低(表 1),特别是体重降低极为显著,经 t 检验,与对照组比较 $P<0.01$ 。可见,实验组唐鱼的生长速度明显低于对照组。同时还发现,实验组雄性唐鱼一些个体外形呈明显的畸形(图 4),背部弯曲,游动不活泼,用手敲击玻璃缸,表现反应迟钝。在 10 μg/L 暴露实验组中此现象较 1 μg/L 暴露实验组更为突出。表明 17-β 雌二醇暴露对雄性唐鱼的生长造成一定的影响。

表 1 17-β 雌二醇对雄鱼个体生长的影响
Tab. 1 Effects of E₂ on the individual growth of male fish

	对照组 Control	实验组 E ₂ -treated groups (μg/L)	
		1	10
体长 Length (cm)	2.48±0.157	2.40±0.223	2.35±0.128
体重 Weight (g)	0.257±0.045	0.203±0.037**	0.197±0.031**

** $P<0.01$ (与对照比较); mean±SD, n=10.

2.3 17-β 雌二醇对雄性唐鱼精巢发育的影响

2.3.1 形态学观察 性成熟唐鱼精巢一对,左右各一,呈乳白色,长条状。起于前后鳔室连接处,紧贴背部肾脏所在位置分布,末端与泄殖腔相连。常

图 3 E_2 诱导后的雄鱼与对照组雄鱼整体匀浆液的 Native-PAGE 图谱

Fig. 3 Native-PAGE pattern of the whole fish homogenate of male fish in E_2 -treated groups and male fish in control groups

M: 标准蛋白; 1: 未诱导的雄鱼; 2: 受 E_2 诱导后的雄鱼 (M: Marker; 1: male control; 2: male treated with E_2)。

图 4 E_2 暴露对雄鱼个体生长的影响

Fig. 4 Effects of E_2 exposure on the individual growth of male fish

A: 未诱导的雄鱼; B: 受 E_2 诱导后的雄鱼 (A: male control; B: male treated with E_2)。

有透明脂肪与之伴随 (Chen, 2005)。 E_2 暴露 50 d 后, 取 $10 \mu\text{g/L}$ E_2 暴露组及对照组的雄性唐鱼进行解剖, 分别取精巢进行对比观察, 结果表明实验组多数个体体内长条形的精巢囊严重萎缩, 生精细胞发育严重退化, 仅有少量分布在精巢囊边缘, 而部分精巢囊内生精细胞甚至几乎完全退化 (图 5)。 2.3.2 组织学观察 E_2 暴露 50 d 后, 取对照组和 1 、 $10 \mu\text{g/L}$ E_2 暴露实验组雄性唐鱼精巢组织切片进行观察, 结果表明: $10 \mu\text{g/L}$ E_2 暴露组精巢囊内未见有发育成熟的精子, $1 \mu\text{g/L}$ E_2 暴露组成熟精子数量明显少于对照组 (图 6)。

3 讨论

国际经济合作与发展组织 (OECD) 将卵黄蛋

图 5 E_2 暴露对雄鱼精巢发育的影响

Fig. 5 Effects of E_2 exposure on sperm development of male fish

A: 未诱导的雄鱼; B: 受 E_2 诱导后的雄鱼 (A: male control; B: male treated with E_2)。

白原 (vitellogenin, Vtg) 作为环境雌激素化学物理理想的暴露标志物 (Sumpter & Jobling, 1995)。内源性雌激素或外源性雌激素能刺激卵生动物肝细胞 (作用于肝雌激素受体) 产生 Vtg, 经血液运输到卵巢, 经过修饰后以卵黄蛋白形式储存于卵母细胞, 为胚胎的发育提供能量。在卵生脊椎动物中, Vtg 的合成依靠雌激素对肝细胞的诱导和刺激。雌性动物卵黄生成期可合成大量 Vtg, 而在其他生活周期及雄性动物体内的 Vtg 的含量却很低。雄性动物和幼年动物在人工雌激素或低剂量的类雌激素长期作用下, 都能诱导体内 Vtg 的生成。根据这一特性, 检测雄性卵生脊椎动物肝细胞的 Vtg 合成可以评价环境化学物的雌激素样作用。通过测定血浆 Vtg 可以评价环境内分泌干扰物的雌激素活性。本研究的结果已经证明, 17β -雌二醇 (E_2) 诱导了雄性唐鱼产生卵黄蛋白原 (Vtg), 被纯化的唐鱼 Vtg 在 4%—7.5% Native-PAGE 电泳中分子量为 440 kD 左右, 能同时被考马斯亮蓝、糖蛋白、磷蛋白、脂蛋白染色方法同时染色, 是一种富含糖、磷、脂的蛋白。已经证明, 除雌性卵生动物外, 雄性及幼鱼 (如斑马鱼、剑尾鱼、孔雀鱼等) 肝脏也存在卵黄蛋白原基因, 但只有在环境雌激素化学物的作用下才可以产生 Vtg (Li et al, 2006; Wen et al, 2007a; Zhan et al, 2007)。因此, 雄鱼或幼鱼经诱导产生的 Vtg 可作为一个敏感的环境雌激素暴露标记物。此外, 本实验为了解决实验鱼由于个体小, 难以取血的问题, 对样品进行整体匀浆取样测定所产生的 Vtg, 同样的实验方法已在其他小型实验鱼类进行, 也取得理想的结果 (Holbech et al, 2001; Wen et al, 2007a; Wen et al, 2007b; Wen et al, 2007c; Zhan et al, 2007), 表明该方法的可行性。

图 6 E₂暴露对雄鱼精巢组织学结构的影响Fig. 6 Effects of E₂ exposure on the histological structure of sperm in male fish

A: 受 E₂ (10 µg/L) 诱导后的雄鱼; B: 受 E₂ (1 µg/L) 诱导后的雄鱼; C: 未诱导的雄鱼 (标尺为 50 µm) [A: male treated with E₂ (10 µg/L E₂); B: male treated with E₂ (1 µg/L E₂); C: male control (bar: 50 µm)].

本研究结果发现, 17 β -雌二醇 (E₂) 有效地诱导雄性唐鱼产生卵黄蛋白原, 同时对雄性唐鱼的生长发育造成一定的影响。暴露于 E₂ 的两个实验组的个体其体重比对照组显著下降 ($P < 0.01$), 也发现一些畸形的个体。E₂ 的暴露也造成精巢发育滞后, 高浓度组 (10 µg/L E₂) 个体的精巢发育停滞在精原细胞期—初级精母细胞期阶段; 低浓度组 (1 µg/L E₂) 精巢发育则处于精细胞阶段。而对照组精巢囊已有大量发育成熟的精子。由此可见, E₂ 暴露造成雄鱼精巢发育不正常, 成熟精子数量严重减少或不育, 从而表现出对雄性个体的生殖毒性影响。相类似的研究报道, 17- α 炔雌醇 (EE₂) 影响斑马鱼的生长发育, 诱导鱼体内合成大量 Vtg, 影响了性别比例, 并延缓其性腺成熟 (Li et al, 2006)。一些学

者认为, EE₂ 抑制性腺的发育可能是由于 EE₂ 的暴露诱导了鱼体内大量地合成 Vtg, 而 Vtg 的合成将消耗体内一定的能量, 因而使到原本应该用在性腺发育的能量大部分转向合成 Vtg, 而致使性腺出现明显滞后现象 (Länge et al, 2001)。Li & Wang (2005) 的研究发现, 孔雀鱼 (*Poecilia reticulata*) 雄鱼性腺系数 (GSI) 的下降幅度与雌激素处理的时间成正比, 并与 Vtg 生成量呈负相关。以上的研究表明, 雄性鱼类 Vtg 的含量, 身长体重及性腺发育的组织学检查等都可作为目前监测水体环境雌激素类物质暴露的有效终点指标, 而其中 Vtg 是较敏感和理想的指标之一。后续工作将进一步开展唐鱼卵黄蛋白原的 ELISA 检测及其应用研究, 以开发有效实用的 Vtg 定量检测技术。

参考文献:

- Ankley GT, Jensen KM, Kahl MD, Korte JJ, Makynen EA. 2001. Description and evaluation of short-term reproductive test with the fathead minnow (*Pimephales promelas*) [J]. *Environ Toxicol Chem*, **20** (6): 1276-1290.
- Chen GZ. 2005. Biological characteristics of *Tanichthys albonubes* and its prospect of being laboratory animal [D]. Master Dissertation, South China Normal University. [陈国柱. 2005. 唐鱼生物学特性及实验动物化研究. 华南师范大学硕士学位论文.]
- Chen GZ, Fang ZQ, Ma GZ. 2004. Embryonic development of *Tanichthys albonubes* [J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, **11**(6):489-496. [陈国柱, 方展强, 马广智. 2004. 唐鱼胚胎发育观察. 中国水产科学, 2004, **11**(6): 489-496.]
- Fang ZQ, Chen GZ, Ma GZ. 2006. Post-embryonic development of *Tanichthys albonubes* [J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, **13** (6): 869-877. [方展强, 陈国柱, 马广智. 2006. 唐鱼胚后发育研究. 中国水产科学, **13** (6): 869-877]
- Foster PM, Mylchreest E, Gaido KW, Sar M. 2001. Effects of phthalate esters on the developing reproductive tract of male rats [J]. *Hum Reprod Update*, **7**(3):231-235.
- Freyhof J, Herder F. 2001. *Tanichthys micagemmae*, a new miniature cyprinid fish from Central Vietnam (Cypriniformes: Cyprinidae) [J]. *Ichthyol Explor Freshwaters*, **12**(3): 215-220.
- Holbech H, Andersen L, Petersen GI, Korsgaard B, Pedersen KL, Bjerregaard P. 2001. Development of an ELISA for vitellogenin in whole body homogenate of zebrafish (*Danio rerio*) [J]. *Comp Biochem Physiol*, **130C**: 119-131.
- Hsu PC, Guo YL, Li MH. 2004. Effects of acute postnatal exposure to 3,3',4,4'-tetrachlorobiphenyl on sperm function and hormone levels in adult rats [J]. *Chemosphere*, **54**(5): 611-618.
- Kottelat M. 2001. A preliminary check-list of the fishes known or expected to occur in northern Vietnam with comments on systematics and nomenclature [A]. In: *Freshwater Fishes of Northern Vietnam* [M]. Washington: World Bank, 140.
- Kwak HI, Bae MO, Lee NH, Lee YS, Lee BJ, Kang KS, Chae CH, Sung HJ, Shin JS, Kim JH, Mar WC, Sheen YY, Cho MH. 2001. Effects of nonylphenol, bisphenol A, and their mixture on the viviparous swordtail fish (*Xiphophorus helleri*) [J]. *Environ Toxicol Chem*, **20**(4): 787-795.
- Latchoumycandane C, Mathur PP. 2002. Induction of oxidative stress in the rats testis after short-term exposure to the organochlorine pesticide methoxychlor [J]. *Arch Toxicol*, **76** (12): 692-698.
- Länge R, Hutchinson TH, Croudase CP, Siegmund F, Schweinfurth H, Hampe P, Panter GH, Sumpter JP. 2001. Effects of the synthetic estrogen 17- α -ethinylestradiol on the life-cycle of the fathead minnow (*Pimephales promelas*) [J]. *Environ Toxicol Chem*, 1216-1227.
- Li JF, Li WH, Yang J, Xu H, Jin TY, Ding XC. 2006. Effects of 17- α ethinylestradiol on vitellogenin and gonad development of zebrafish [J]. *Journal of Toxicology*, **20** (1): 9-13. [李洁斐, 李卫华, 杨健, 徐

- 绘, 金 泰, 丁训诚. 2006. 17- α 炔雌醇对斑马鱼的卵黄蛋白原及性腺发育的影响. 毒理学杂志, **20** (1): 9-13.]
- Li MH, Wang ZR. 2005. Effect of nonylphenol on plasma vitellogenin of male adult guppies (*Poecilia reticulata*)[J]. *Environmental Toxicology*, **20**(1): 53-59.
- Ma TW, Wang ZJ, Chen JF, Wang CX, Liu JK. 2004. Toxic effects of 17- α -ethinylestradiol to the kidney of rare minnow (*Gobiocypris rarus*)[J]. *Acta Scientiae Circumstantiae*, **24**(3):487-491. [马陶武, 王子健, 陈剑锋, 王春霞, 刘建康. 2004. 乙炔基雌二醇对稀有鮡鲫肾脏的毒性效应. 环境科学学报, **24**(3): 487-491.]
- Mommsen TP, Walsh PI. 1988. Vitellogenesis and oocyte[A]. In: Hoar WS, Randall DJ. *Fish Physiology* (Vol. XI A)[M]. New York: Academic Press, 347-406.
- Peute J, Huiskamp R, van Oordt PGWJ. 1985. Quantitative analysis of estradiol-17 β -induced changes in the ultrastructure of the liver of the male zebrafish, *Brachydanio rerio*[J]. *Cell and Tissue Research*, **242**: 377-382.
- Stoker TE, Laws SC, Guidici DL, Cooper RL. 2000. The Effect of atrazine on puberty in male Wistar rats: An evaluation in the protocol for the assessment of pubertal development and thyroid function[J]. *Toxicol Sci*, **58** (1): 50-59.
- Sumpter JP, Jobling S. 1995. Vitellogenesis as a biomarker for estrogenic contamination of the aquatic environment [J]. *Environmental Health Perspectives*, **103**: 173-178.
- Sun XT, Zhang SC. 2001. Purification and characterization of a putative vitellogenin from the ovary of amphioxus (*Branchiostoma belcheri tsingtaunense*)[J]. *Comp Biochem Physiol*, **129B**: 121-127.
- Takahashi O, Oishi S. 2003. Testicular toxicity of dietarily or parent rally administered bisphenol A in rats and mice[J]. *Food Chem Toxicol*, **41** (7): 1035-1044.
- Wang RL, Ma GZ, Fang ZQ. 2006. Safety assessment and acute toxicity of copper, cadmium and zinc to white cloud mountain minnow *Tanichthys albonubes*[J]. *Fisheries Science*, **25**(3): 117-120. [王瑞龙, 马广智, 方展强. 2006. 铜、镉、锌对唐鱼的急性毒性及安全浓度评价. 水产科学, **25** (3): 117-120.]
- Wang JZ, Fan M. 2000. *Handbook of Protein Technique*[M]. Beijing: Science Press, 77-122. [汪家政, 范 明. 2000. 蛋白质技术手册. 北京: 科学出版社, 77-122.]
- Wen RS, Fang ZQ, Jiang SG, Ma GZ, Xu J. 2007a. Induction of vitellogenin by 17 β -Estradiol in swordtail fish (*Xiphophorus helleri*)[J]. *Acta Laboratorium Animalis Scientia Sinica*, **15** (4): 280-284. [温茹淑, 方展强, 江世贵, 马广智, 徐 杰. 2007a. 17 β -雌二醇对雄性剑尾鱼卵黄蛋白原的诱导研究. 中国实验动物学报, **15** (4): 280-284.]
- Wen RS, Fang ZQ, Jiang SG, Xu J, Ma GZ. 2007b. Development of ELISA for detecting *Xiphophorus helleri* vitellogenin[J]. *Research of Environmental Sciences*, **20** (4): 144-149. [温茹淑, 方展强, 江世贵, 徐 杰, 马广智. 2007b. 剑尾鱼卵黄蛋白原的 ELISA 检测. 环境科学研究, **20** (4): 144-149.]
- Wen RS, Fang ZQ, Jiang SG, Ma GZ, Xu J, Yao J. 2007c. Purification and immune analysis of lipovitellin from *Xiphophorus helleri*[J]. *Journal of Fisheries of China*, **31** (5): 198-205. [温茹淑, 方展强, 江世贵, 徐杰, 马广智, 姚 静. 2007c. 剑尾鱼卵黄脂磷蛋白的纯化及免疫分析. 水产学报, **31** (5): 198-205.]
- Yang AG, Mao JF, Yao LB. 2001. *Experimental Technology of Biochemistry and Molecule Biology*[M]. Beijing: High Education Press, 40-42 [杨安钢, 毛积芳, 药立波. 2001. 生物化学与分子生物学实验技术. 北京: 高等教育出版社, 40-42.]
- Yang ZC, Yao J, Fang ZQ. 2007. Acute toxicity and safety assessment of DDTs to white cloud mountain minnow *Tanichthys albonubes* larval stages[J]. *Laboratory Animal and Comparative Medicine*, **27** (2): 123-126. [杨志聪, 姚静, 方展强. 2007. DDTs对唐鱼仔鱼的急性毒性及安全浓度评价. 实验动物与比较医学, **27** (2): 123-126.]
- Yi ZS, Chen XL, Wu JX, Yu SC, Huang CE. 2004. Rediscovering the wild population of white cloud mountain minnows (*Tanichthys albonubes* Lin) on Guangdong Province[J]. *Zool Res*, **25** (6): 551-555. [易祖盛, 陈湘舜, 巫锦红, 余顺昌, 黄慈恩. 2004. 野生唐鱼在广东的再发现. 动物学研究, **25** (6): 551-555.]
- Zhan CQ, Huang XJ, Fang ZQ, Ma GZ, Yao J. 2007. Induction and determination of vitellogenin in male guppies (*Poecilia reticulata*) after exposed to polychlorinated biphenyls [J]. *Asian Journal of Ecotoxicology*, **2**(3): 327-332. [詹翠琼, 黄絮洁, 方展强, 马广智, 姚 静. 2007. 孔雀鱼卵黄蛋白原的诱导与检测. 生态毒理学报, **2** (3): 333-338.]