

文章编号: 1004-7271(2006)02-0239-04

·研究简报·

两种温度下壬基酚(4-NP)对雌鲫 血清雌二醇水平的影响

刘青, 魏华

(上海水产大学生命科学与技术学院, 上海 200090)

摘要:研究两种温度下(6℃和17℃)壬基酚(4-NP)对雌鲫血清雌二醇(E_2)水平的影响。对雌鲫(卵巢处于第Ⅲ期)腹腔注射100 mg/kg体重的4-NP,分别在24 h和48 h提取血清,采用荧光免疫法测定 E_2 浓度。结果显示,在6℃和17℃条件下,4-NP均能使 E_2 水平下降。在6℃条件下,4-NP处理组 E_2 浓度在24 h与对照组比较有显著性下降($P < 0.05$),在48 h有极显著性下降($P < 0.01$)。在17℃条件下,对照组 E_2 浓度与6℃条件下的对照组相比有极显著增加($P < 0.01$),4-NP处理组 E_2 浓度和对照组比较,在24 h和48 h有极显著性下降($P < 0.01$)。结果表明,100 mg/kg 4-NP在两种温度下能有效降低血清 E_2 水平,为4-NP对雌鲫内分泌扰乱效应的研究提供实验支持,而温度变化造成 E_2 水平变化的幅度很大,因此,进行4-NP对鲫内分泌扰乱的研究应当考虑温度以及鲫性腺所处的发育期这两个因素。

关键词: 鲫; 壬基酚; 雌二醇; 温度; 内分泌扰乱

中图分类号: S917 文献标识码: A

The effects of 4-nonylphenol(4-NP) on level of serum 17 β -estradiol of female *Carassius auratus* at two temperatures

LIU Qing, WEI Hua

(College of Aqua-life Science and Technology, Shanghai Fisheries University, Shanghai 200090, China)

Abstract: The effects of 4-nonylphenol(4-NP) on level of serum 17 β -estradiol (E_2) of female *Carassius auratus* at 6℃ and 17℃ respectively were investigated in this paper. We took intraperitoneal injection of 4-NP in female *Carassius auratus* whose ovary is at stage III with the dose of 100 mg/kg. The concentration of E_2 in serum was measured by fluorescent immunoassay in 24 h and 48 h after injection. The results show that in 4-NP treatment group the concentration of E_2 was decreased significantly at 24 h ($P < 0.05$) and 48 h ($P < 0.01$) at 6℃; compared with that of control group at 6℃, the concentration of E_2 of control group increase significantly ($P < 0.01$) at 17℃, and in 4-NP treatment group the concentration of E_2 was decreased significantly both at 24 h and 48 h ($P < 0.01$) at 17℃. These results indicate that 100 mg/kg 4-NP can decrease the level of E_2 of female *Carassius auratus* at 6℃ and 17℃, and they would provide evidence of 4-NP's endocrine disruption effects in

收稿日期: 2005-07-14

基金项目: 农业部海洋与河口渔业重点开发实验室资助(开-2-04-05)和上海市重点学科建设项目资助(Y1101)

作者简介: 刘青(1981-),男,贵州安顺人,硕士研究生,专业方向为水生生物生理学。E-mail: q-liu@stmail.shfu.edu.cn

通讯作者: 魏华, Tel: 021-65710525; E-mail: hwwei@shfu.edu.cn

Carassius auratus. Yet the change of temperature can result in great change of the level of E_2 , thus the temperature and the maturity of ovary should be considered as important factors in research of 4-NP's endocrine disruption in *Carassius auratus*.

Key words: *Carassius auratus*; 4-nonylphenol (4-NP); 17β -estradiol (E_2); temperature; endocrine disruption

环境激素(environmental hormone),又称为内分泌扰乱化学物(endocrine disrupting chemicals, EDCs),是指农业或化工所排放的具有雌激素效应的有害化学物质总称,它可影响和干扰人和动物内分泌系统,使雄性动物雌性化、生殖器官异常,并使生殖能力下降,后代的健康与成活率下降等^[1,2]。壬基酚(4-nonylphenol, 4-NP 或 p-NP)是一种环境激素,近来研究发现其具有雌激素样效应,能使雌激素应答元件(estrogen responsive elements, EREs)表达发生变化^[3]。由于 EREs 表达主要受体内雌二醇(17β -estradiol 或 E_2)水平的调控^[4,5],因此 4-NP 可能通过影响 E_2 水平来实现内分泌扰乱效应。4-NP 对淡水鱼类内分泌扰乱的研究刚刚起步,有关此研究的文献中所涉及的实验温度并不一致,而温度是影响鱼类体内激素水平变化的重要因素^[6,7]。为了研究 4-NP 对鲫雌激素效应以及温度的变化可能对实验结果带来的影响,本文研究了在 6 °C 和 17 °C 下 4-NP 对鲫血清 E_2 水平的影响。

1 材料和方法

1.1 主要实验药品与仪器

4-NP,购于 Sigma 公司;市售精制大豆油;无水乙醇(分析纯),上海振兴化工一厂;Sigma 冷冻离心机。

1.2 实验动物及处理

雌鲫,2005 年 1 月上旬购于上海嘉定望兴水产养殖场,性腺发育处于 III 期。体长(21.61 ± 5.71) cm, 体重(230.49 ± 23.81) g。设(6 ± 1) °C(室温)和(17 ± 0.5) °C(放恒温器)两个温度组别。两个组别下又分对照组和 NP 处理组,每组 12 尾鱼。各组暂养于 100 L 水箱中 1 周。光照周期 12 h。NP 处理组注射 4-NP。4-NP 用无水乙醇溶解,之后用大豆油稀释(体积比 1:10),采用腹腔注射,注射量为 100 mg/kg 体重。空白对照组注射无水乙醇、大豆油混合液。注射前,每组鱼进行尾部静脉抽血。注射后 24 h,每组各取 6 尾鱼,酒精麻醉,尾部静脉抽血。48 h 后,每组各取另外 6 尾鱼进行抽血。

1.3 血清提取及雌二醇(E_2)水平测定

尾部静脉抽血 1~2 mL,放入 5 mL 离心管中,4 °C 静置 4 h,4 °C 下 5 000 r/min 离心 10 min。取血清,保存于 -70 °C 冰箱。样品送至瑞金医院,使用 Beckman Coulter Immunoassay System 采用免疫荧光法测定 E_2 浓度。

1.4 数据处理与统计

实验数据经 Excel 进行统计分析,用平均值 \pm 标准差($\bar{X} \pm s$)表示。组间数据两两比较采用 *t* 检验法。

2 结果及分析

2.1 4-NP 在 6 °C 下对鲫血清 E_2 水平的影响

结果如图 1 所示,在 48 h 内,100 mg/kg 4-NP 能抑制鲫血清 E_2 水平。4-NP 处理后 24 h 与对照组比较有显著性下降($P < 0.05$),48 h 与对照组比较有极显著下降($P < 0.01$)。

2.1 4-NP 在 17 °C 下对鲫血清 E_2 水平的影响

对照组鲫在 17 °C 环境下放养一周后,其血清 E_2 水平与 6 °C 对照组相比有极显著增加($P < 0.01$)

(图 2)。同 6 °C 的结果一样, 4-NP 能抑制鲫血清 E₂ 水平, 处理后 24 h、48 h 与对照组比较有极显著下降 ($P < 0.01$) (图 3), 同时可以看出, 温度变化造成 E₂ 水平变化的幅度很大, 17 °C 下 4-NP 对 E₂ 水平的抑制更为显著。

3 讨论

雌激素应答元件表达受 E₂ 水平调控, 因此 E₂ 对鱼的卵黄形成、性腺发育和卵细胞成熟等方面有重要作用。近来研究发现 4-NP 具有雌激素效应。4-NP 处理雄性老鼠 24 h 后, 睾丸和附睾重量明显减少^[8]。用 4-NP 处理过的未成年 SD 雌性大鼠子宫湿重、子宫/体重值、平滑肌厚度和官腔上皮高度与对

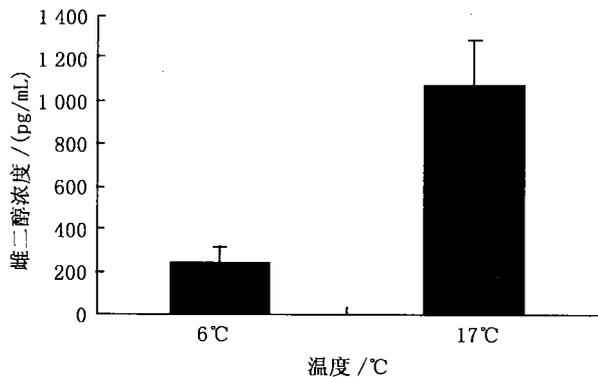


图 2 对照组鲫在 17 °C 放养一周后血清 E₂ 水平与 6 °C 环境下 E₂ 水平比较结果

Fig. 2 The difference of E₂ level in *Carassius auratus*'s blood serum of control group between 17 °C and 6 °C after one week

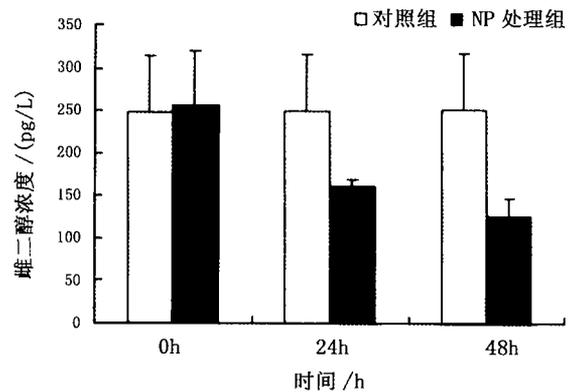


图 1 4-NP 在 6 °C 下 48 h 内对鲫血清 E₂ 水平的影响

Fig. 1 Effect of 4-NP on E₂ level in blood serum of *Carassius auratus* at 6 °C during 48 h

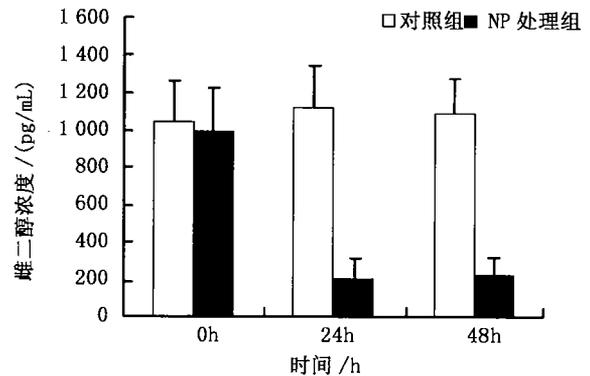


图 3 4-NP 在 17 °C 下 48 h 内对鲫血清 E₂ 水平的影响

Fig. 3 Effect of 4-NP on E₂ level in *Carassius auratus*'s blood serum at 17 °C during 48 h

照组相比均增高^[9]。在淡水鱼类, 近来发现 4-NP 能使鲫血浆卵黄蛋白原 (VTG) 含量显著升高, 而且随着 4-NP 注射量的增加这种效应逐渐增强^[10]。Baek 等^[11]在体外培养的长颌大口鲈虎鱼 (*Chasmichthys dolichognathus*) 卵巢组织中加入 4-NP, 结果发现 4-NP 导致了雌激素水平的上升。Kazeto 等^[12]研究发现斑点叉尾鲟 (*Ictalurus punctatus*) 和斑马鱼 (*Danio rerio*) 经 4-NP 诱导后, 其脑部和垂体的 P450 芳香化酶 (CYP19A2) 表达上调。由于 P450 芳香化酶具有将雄激素转换成雌激素的作用, 这暗示 4-NP 可能通过促进 P450 芳香化酶表达从而上调 E₂ 水平, 最终实现雌激素效应。然而, 本实验发现 4-NP 在鲫体内能降低 E₂ 的水平。因此, 内分泌干扰物的作用方式非常复杂, 其所产生的效应以及作用机制可能与不同组织、化学结构、作用浓度等因素有关。也可能 4-NP 类似二噁英能促进 CYP1A1 和 CYP1A2 的 mRNA 水平上升, 而 CYP1A1/A2 对 E₂ 具有羟化作用从而导致 E₂ 水平的下降^[13,14]。本文研究发现 NP 使雌激素水平下降, 则推测 4-NP 在体内能代替雌激素作用于雌激素受体 ER 实现 EREs 的表达, 最终实现雌激素效应。关于 4-NP 对 ER 的作用也是本实验室的研究工作之一, 目前发现 4-NP 能促进 ER 的表达 (论文待发表), 从而为这种推测提供依据。而 4-NP 对鲫的 CYP1A1/A2 基因的表达作用也是将来的工作之一, 其结果可为解释 4-NP 促使鲫血清 E₂ 水平的下降提供理论依据。

由于温度对鱼的代谢以及卵巢发育具有一定作用, 因此本实验设 17 °C 与 6 °C 组进行比较。结果发现温度从 6 °C 升高到 17 °C 雌鲫血清 E₂ 水平有极显著上升 ($P < 0.01$)。雌鲫性腺以 III 期过冬, 当进入春

季,水温的上升将促使性腺的成熟最终实现排卵。本实验提高水温后,可能加速了性腺的成熟提早向第Ⅳ期过渡,从而导致 E₂ 水平的上升^[5,6]。结果显示温度的变化造成 E₂ 水平变化的幅度很大,17 ℃下 4-NP 对 E₂ 水平的抑制比 6 ℃条件下更为显著,因此,若以性腺发育期处于Ⅲ期~Ⅳ期的雌鲫为内分泌扰乱研究材料时,应当考虑温度因素对 E₂ 水平的影响。

本实验结果显示,100 mg/kg 4-NP 在 17 ℃和 6 ℃条件下都能有效抑制雌鲫血清 E₂ 水平,为 4-NP 对鲫内分泌扰乱效应研究提供实验支持,而其抑制 E₂ 水平机制和其他内分泌扰乱效应的作用机制还有待进一步探讨。

参考文献:

- [1] Petrovic M, Eljarrat E, Lopez de Alda M J, *et al.* Endocrine disrupting compounds and other emerging contaminants in the environment: a survey on new monitoring strategies and occurrence data[J]. *Anal Bioanal Chem*, 2004, 378: 549 - 562.
- [2] 陶贤继,魏 华.上海环境激素对鱼类的毒害[J].*上海水产大学学报*,2005,14(2):192 - 196.
- [3] Soto A M,Justicia H, Wray J W, *et al.* p-Nonylphenol: an estrogenic xenobiotic released from "Modified" polystyrene[J]. *Environmental Health Perspectives*, 1991, 92:167 - 173.
- [4] Weigel N L, Zhang Y X. Ligand-independent activation of steroid hormone receptors[J]. *Mol Med*, 1998, 76: 469 - 479.
- [5] Farzad Pakel, Feon S, Le Gac F, *et al.* *In vivo* estrogen induction of hepatic estrogen receptor mRNA and correlation with vitellogenin mRNA in rainbow trout[J]. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 1991, 75: 205 - 212.
- [6] 林浩然.鱼类生理学[M].广州:广东高等教育出版社,1999.183 - 202.
- [7] 刘 筠.中国养殖鱼类繁殖生理学[M].北京:农业出版社,1993.32 - 41.
- [8] Chitra K C, Latchoumycandane C, Mathur P P. Effect of nonylphenol on the antioxidant system in epididymal sperm of rats[J]. *Arch Toxicol*, 2002, 76: 545 - 551.
- [9] 黄毅娜,程薇波,徐培渝,等.子宫营养试验检测对一壬基酚的雌激素样活性[J].*现代预防医学*,2003,30(5):660 - 662.
- [10] 周忠良,李 康,于 静,等.壬基酚对鲫鱼(*Carassius auratus*)的雌激素效应研究[J].*环境科学研究*,2004,17(3):60 - 61,70.
- [11] Baek H J, Park M H, Lee Y D, *et al.* Effect of *in vitro* xenoestrogens on steroidogenesis in mature female fish, *Chasmichthys dolichognathus*[J]. *Fish Physiology and Biochemistry*, 2003, 28: 413 - 414.
- [12] Kazeto Y, Goto-Kazeto R, Place A R, *et al.* Aromatase expression in zebrafish and channel catfish brains: changes in transcript abundance associated with the reproductive cycle and exposure to endocrine disrupting chemicals[J]. *Fish Physiology and Biochemistry*, 2003,28: 29 - 32.
- [13] Asok K D, Barbara A B W, Amanda L T, *et al.* Demonstration of TCDD-attenuated P450 steroidogenic enzyme mRNA levels in rat granulosa cells *in vitro* using competitive RT-PCR[J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2000, 164:5 - 18.
- [14] 梁 勇,黄港住,徐 盈,等.2,3,7,8-四氯代二苯并二噁英(TCDD)和苯并芘(B[a]P)对原代培养鲫鱼肝细胞中卵黄蛋白原诱导的影响[J].*科学通报*,2004,49(16):1 605 - 1 610.

《上海水产大学学报(光盘版)》、《水产学报(光盘版)》再版发行

《上海水产大学学报(光盘版)》、《水产学报(光盘版)》将于 2006 年 4 月再版发行,新版本的
两刊光盘涵盖了从创刊到 2005 年底的所有文章的全文。欢迎从事水产科研、教学等相关领域的
读者订阅,每刊光盘定价:50 元(含邮费),需要者可直接汇款到编辑部,联系地址:上海市军工路
334 号上海水产大学 48 信箱,联系人:伍稷芳,邮编:200090,电话:021 - 65710232,同时请注明订
阅光盘的名称。另外,本刊对已经购买过两刊旧版光盘的读者只收取少量升级服务费和邮寄费
20 元,请读者主动和编辑部联系,并将原购买光盘的发票复印件和 20 元邮寄费寄到编辑部。