

文章编号: 1004 - 7271(2008)06 - 0641 - 06

双酚 A 对鲫雌激素受体表达和雌二醇水平的影响

李惠云, 刘鹏威, 魏 华

(上海海洋大学省部共建水产种质资源发掘与利用教育部重点实验室, 上海 201306)

摘 要:运用定量 PCR 技术和免疫荧光法研究了内分泌干扰物双酚 A (BPA) 对雌鲫的雌激素效应。以不同浓度的 BPA [质量分数分别为 1 mg/kg, 50 mg/kg, 100 mg/kg (注射剂量/鱼体重)] 对雌鲫进行腹腔注射, 然后分别于 24 h 和 48 h 检测肝脏中的 α 型雌激素受体 (ER α) mRNA 表达以及血清雌二醇 (E_2) 水平。结果表明 1 mg/kg 和 50 mg/kg BPA 处理组 ER α mRNA 水平与对照组相比在 48 h 内均没有明显变化; 100 mg/kg BPA 处理组 ER α mRNA 水平在注射后 24 h 显著上调 ($P < 0.05$), 48 h 时仍维持较高水平。1 mg/kg BPA 处理组 E_2 水平在 24 h 显著下降 ($P < 0.05$), 48 h 回升至正常水平; 50 mg/kg 和 100 mg/kg BPA 处理组 E_2 水平在 24 h 显著增加 ($P < 0.01$), 48 h 时仍维持较高水平。结果表明, BPA 具有雌激素样效应, 高浓度的 BPA 能够诱导雌鲫肝脏 ER α mRNA 表达和血清 E_2 水平的上升。

关键词:内分泌干扰物; 双酚 A; α 型雌激素受体

中图分类号: S 917 文献标识码: A

Effects of bisphenol-A on expression of estrogen receptor and level of 17 β -estradiol *in vivo* of female *Carassius auratus*

LI Hui-yun, LIU Peng-wei, WEI hua

(Key Laboratory of Exploration and Utilization of Aquatic Genetic Resources, Shanghai Ocean University, Ministry of Education, Shanghai 201306, China)

Abstract: The effects of bisphenol-A (BPA) on female *Carassius auratus* were investigated *in vivo*. Fishes were given intraperitoneal injection with the dose of 1 mg/kg, 50 mg/kg, 100 mg/kg of BPA. The expression of estrogen receptor alpha (ER α) mRNA in liver and the level of E_2 in serum were checked in 24 h and 48 h after injection. The results showed that there was no significant increase of expression of ER α mRNA both in 1 mg/kg and 50 mg/kg of BPA groups; in 100 mg/kg of BPA group, the expression of ER α mRNA increased significantly both in 24 h and 48 h ($P < 0.05$). The level of E_2 decreased significantly in 1 mg/kg of BPA group in 24 h, then went up to the normal level in 48 h. In 50 mg/kg and 100 mg/kg of BPA groups, the levels of E_2 increased significantly in 24 h and maintained at the high level in 48 h. These results indicated that BPA had estrogen-like effects. 100 mg/kg of BPA can up-regulate the expression of ER α mRNA in liver and the level of E_2 in serum of female *C. auratus*.

收稿日期: 2008-04-16

基金项目: 上海市水产养殖重点学科项目 (Y1101)

作者简介: 李惠云 (1983 -), 女, 浙江乐清人, 硕士研究生, 专业方向为水生生物学。E-mail: li-nina@hotmail.com

通讯作者: 魏 华, E-mail: hwei@shou.edu.cn

Key words: endocrine disrupting chemical; bisphenol-A (BPA); α type estrogen receptor (ER α)

内分泌干扰物(endocrine disrupting chemicals, EDCs)是指干扰生物体正常的内分泌机能,并影响生物体或其后代发育、繁殖和行为的外源性化学物质,由于它往往具有类雌激素作用,故又称为环境雌激素(ecoestrogen)^[1]。

双酚 A(bisphenol-A, BPA)是一种内分泌干扰物。近来不论在陆生动物的体内和体外实验中,还是在水生动物的体内和体外实验中,均证实 BPA 具有雌激素效应。在陆生动物方面的研究主要集中在 BPA 对动物生殖功能和性腺发育的影响。在水生动物研究方面,卵黄蛋白原(vitellogenin, Vtg)成为研究 BPA 雌激素效应的生物学指标。研究表明, BPA 能够诱导日本青鳉(*Oryzias latipes*)^[2]、鲤(*Cyprinus carpio*)^[3]、虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)和斑马鱼(*Danio rerio*)^[4]等 Vtg 的合成。Mandich 等^[3]用 1~1 000 $\mu\text{g}/\text{L}$ 不同浓度的 BPA 对鲤进行暴露处理,结果显示在此范围内的 BPA 浓度与雄性鲤血浆中 Vtg 含量呈正相关,并且 1 000 $\mu\text{g}/\text{L}$ BPA 诱导雄鱼和雌鱼的血浆 Vtg 水平显著增加。然而, BPA 对 Vtg 的诱导能力存在很多变数,以 59 $\mu\text{g}/\text{L}$ BPA 暴露三周后,雄性大西洋鳕(*Gadus morhua*)血浆 Vtg 含量显著增加,而大菱鲂(*Scophthalmus maximus*)却没有显著变化^[5]。体外实验同样证实 BPA 对 Vtg 诱导能力的差异性, 22.8 mg/L BPA 不能诱导欧鳊(*Abramis brama*)肝细胞合成 Vtg^[6]。研究表明这种差异可能与 BPA 作为配体与雌激素受体(estrogen receptor ER)的结合力有关。体外配体-受体结合试验发现 BPA 与大鼠 ER 的结合力约为 E_2 的 4.8×10^{-5} ^[7],与鲤 ER 和人 ER α 的结合力分别为 E_2 的 1.2×10^{-3} 和 8.0×10^{-5} ^[8-9]。另外, BPA 对 Vtg 诱导能力以及与受体结合力的差异性也可能是各种动物对 BPA 的敏感性不同所致。因此,有必要对 BPA 对各种动物作用展开更广泛的研究。

目前关于 BPA 对鱼类的雌激素作用机制尚不明确,为了解 BPA 在淡水鱼体内的作用机制,我们研究了 1 mg/kg, 50 mg/kg 和 100 mg/kg 三个浓度的 BPA 在 24 h 和 48 h 对经济鱼类雌鲫(*Carassius auratus*)肝脏 ER α 表达以及血清雌二醇(17β -estradiol, E_2)水平的影响,目的在于阐明肝脏 ER α 和血清 E_2 这两项与性成熟相关参数在 BPA 作用下的变化,有助于我们了解内分泌干扰物是如何影响鱼类的生殖生理过程。

1 材料和方法

1.1 仪器与药品

Bio-rad iQ5 Real Time PCR 扩增仪(Bio-rad 公司,美国);Eppendorf PCR 扩增仪(Eppendorf 公司,德国);BioPhotometer 生物分光光度计(Eppendorf 公司,德国);冷冻离心机(sigma 公司,美国);双酚 A(Sigma, 美国);Trizol 试剂(Invitrogen 公司,美国);RNase-free DNase I(日本 TaKaRa 公司);AMV 反转录酶(日本 TaKaRa 公司);SYBR Green(美国 Bio-Rad 公司);PCR 产物胶回收试剂盒(美国 Omega);18S 和 ER α 基因引物(上海生工生物工程有限公司合成)。

1.2 实验动物及处理

鲫鱼于 2007 年 10 月上旬购于上海市杨浦区图门路农贸市场,性腺发育处于 II 期。体质量(156.41 ± 13.01) g,体长(17.34 ± 0.87) cm。随机分为实验组和对照组,每组 10 尾,各组暂养于 160 L 水箱中 1 周,水温(21 ± 1) $^{\circ}\text{C}$ 。BPA 用无水乙醇助溶,之后用大豆油稀释(体积比 1:10)。采用腹腔注射,每尾 200 μL ,各处理组分别接受 1 mg/kg、50 mg/kg、100 g/kg 的 BPA,溶剂对照组注射无水乙醇和 大豆油混合液(体积比 1:10)。

注射前取 10 尾鱼作为初始对照,溶剂对照组和各处理组都在注射 24 h 和 48 h 后取样,每次每组取鱼 8 尾。尾部静脉抽血 1~2 mL 于 5 mL 离心管中,4 $^{\circ}\text{C}$ 静置分层,取血清保存于 -20 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱。解剖取肝脏约 50 mg 于 1.5 mL 离心管中,经液氮速冻后保存于 -70 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱;同时进行性别鉴定。

1.3 引物设计

通过 GenBank 获得鲫的 18S 序列和 ER α 序列,根据 cDNA 编码区设计引物,得到引物如下表 1:

表 1 用于实时荧光定量 RT-PCR 的引物
Tab.1 Sequence of primer pairs in real-time RT-PCR

名称	序列	序列号	片段长度
18S	上游 5' - TCCGATCAGAGAGGTAGTGACG - 3'	AF047349	158 bp
	下游 5' - ACCTTCATACGCAATTGGAGCTG - 3'		
ER α	上游 5' - CAGCTGTCTGCTCAGACAGA - 3'	AY055725	158 bp
	下游 5' - CTGAACCTTATCGTCAGAGAG - 3'		

1.4 总 RNA 提取及纯化

按照 Invitrogen 公司 Total RNA Isolation System 方法提取总 RNA,并通过 1% 的琼脂糖凝胶电泳以及总 RNA OD 值的测定来检测其质量和浓度。为了消除基因组 DNA 的污染,首先将总 RNA 用 RNase-free DNase I (TaKaRa) 处理,20 μ L 的体系包括 3.5 μ L (5 U/ μ L) RNase-free DNase I, 5 μ L 10 \times DNase I Buffer,0.5 μ L (40 U/ μ L) RNase Inhibitor,11 μ L DEPC H₂O 和 6 μ g 总 RNA,37 $^{\circ}$ C 30 min,去除 DNA,75 $^{\circ}$ C 10 min 使 DNA 酶失活。再以 18S 为引物通过 PCR 检测基因组 DNA 是否已被去除。PCR 反应体系为 25 μ L,其中 RNA 1 μ L,2 \times Master Mix 12.5 μ L,ddH₂O 9.5 μ L,18S 上、下游引物 (10 μ mol/L) 各 1 μ L。反应条件:94 $^{\circ}$ C 预变性 3 min;94 $^{\circ}$ C 30 s,58 $^{\circ}$ C 30 s,72 $^{\circ}$ C 30 s,30 cycles;72 $^{\circ}$ C 最终延伸 5 min。

1.5 实时荧光定量的样品及标准曲线的准备

取经酶处理后的 500 ng 总 RNA,利用 AMV 反转录酶和 Oligo (dT) primer (Takara 公司) 合成第一链 cDNA。18S 和 ER α PCR 产物经 2% 琼脂糖凝胶电泳后,割胶回收 (E. Z. N. A Gel Extraction Kit),用于标准曲线的制备。测定 OD 值,计算制备标准曲线 DNA 片断的初始浓度。将割胶纯化后的 DNA 用 ddH₂O 稀释,共设置 10 个浓度梯度:1,10⁻¹,10⁻²,10⁻³,10⁻⁴,10⁻⁵,10⁻⁶,10⁻⁷,10⁻⁸,10⁻⁹ 从中选取 4 个梯度做标准曲线。

1.6 Real-time RT-PCR 定量分析

Real-time RT-PCR 根据 QuantiTect SYBR Green PCR 试剂盒 (Bio-Rad) 手册进行。反应混合液 (25 μ L) 体系如下:SYBR Green mixture 12.5 μ L、18S 上下游引物 (10 μ mol/L) 各 0.5 μ L (ER α 上下游引物各为 0.3 μ L)、cDNA 模版 1 μ L,加 ddH₂O 至 25 μ L。扩增条件如下:18S: 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s,55 $^{\circ}$ C 退火 30 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 30 s,共 40 个循环;ER α : 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s,58 $^{\circ}$ C 退火 30 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 30 s,共 50 个循环。每次 PCR 扩增都采用未加模板的阴性对照,各处理组分别取 3 个样品,每个样品采用 2 个平行。观察各扩增曲线、融解曲线,标准曲线的线性回归系数 R 值,统计软件自动进行 PCR 反应中起始模板量的计算。以 18S 的起始模板量对 ER α 进行标化处理。

1.7 血清性激素水平测定

使用 Beckman Coulter Immunoassay System 采用免疫荧光法测定 E₂ 浓度。

1.8 数据分析

应用 SPSS 13.0 (USA) 软件进行统计分析,以平均值 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm SD$) 表示。组间数据比较采用 ANOVA 分析 (LSD 法, $P < 0.05$ 为差异显著)。

2 结果和分析

2.1 总 RNA 完整性和纯度

总 RNA 提取之后,取 RNA 3 μ L 与 2 μ L 上样缓冲液混合,经 1% TAE 琼脂糖凝胶电泳检测,出现

28S、18S 和 5S 3 条带(图 1)。紫外分光光度计测定 RNA OD 值,得到 OD_{260}/OD_{280} 比值在 1.9 ~ 2.2 之间。说明总 RNA 完整性好,纯度高。然后将总 RNA 用 RNase-free DNase I (TaKaRa)处理,以消除基因组 DNA 的污染,再经 PCR 检测基因组 DNA 是否已经去除。PCR 产物经 1.8% TAE 琼脂糖凝胶电泳检测,结果显示没有出现条带,说明基因组 DNA 已经去除。

2.2 检测系统的可靠性和稳定性

18S 和 ER α 的 PCR 产物经 2% 的琼脂糖凝胶电泳,条带均出现在 158 bp 附近。自动绘制的标准曲线的相关系数均 >0.95。融解曲线显示 PCR 产物在温度升至 T_m 处呈现单一峰。同时测定各处理组 18S 的起始模板量无显著差异。

2.3 实时荧光定量 PCR 结果

雌鲫经腹腔注射后,溶剂组与空白组相比 48 h 内肝脏 ER α mRNA 水平没有显著变化,不同浓度的 BPA 处理组在 24 h 和 48 h 肝脏 ER α mRNA 水平与溶剂组相比较,结果如图 2 所示。48 h 内,1 mg/kg 和 50 mg/kg 处理组 ER α mRNA 水平与对照组相比均没有明显变化,而 100 mg/kg 处理组 ER α mRNA 水平在注射后 24 h 显著上调($P < 0.05$),48 h 时仍维持较高水平。然而,100 mg/kg 处理组的鲫在 24 h 内已出现少量死亡,其他组别无异常现象。可见,BPA 对雌鲫肝脏 ER α mRNA 的诱导能力较弱。

2.4 BPA 对血清 E₂ 水平的影响

雌鲫经腹腔注射后,溶剂组与空白组相比 48 h 内血清 E₂ 水平没有显著变化,不同浓度的 BPA 处理组在 24 h 和 48 h E₂ 水平与溶剂组比较,结果如表 2 所示。1 mg/kg 处理组 E₂ 水平在 24 h 显著下降($P < 0.05$),48 h 时回升至与对照水平无明显差异;50 mg/kg 和 100 mg/kg BPA 处理组 E₂ 水平在 24 h 显著增加($P < 0.01$),48 h 时仍维持较高水平。48 h 内,不同浓度的 BPA 处理组之间,血清 E₂ 水平随着 BPA 浓度的升高而显著增加($P < 0.01$)。结果表明血清 E₂ 水平只有在最低浓度(1 mg/kg)的 BPA 作用下短期内显著下降,其后又恢复;其它 BPA 浓度作用下血清 E₂ 水平均显著提高。

3 讨论

3.1 BPA 对 ER α mRNA 表达的影响

ER α 属于核内受体超家族,是一种转录激活因子,能以二聚体的形式与雌激素结合,启动雌激素应答元件转录,从而发挥雌激素效应^[10]。BPA 通常被认为是一种较弱的外源性雌激素,这主要是由于与 E₂ 作比较,引起雌激素效应的 BPA 的量通常为 E₂ 的量的 1 000 至 10 000 倍。并且在体外配体-受体结合试验中,除软体动物外,BPA 与 ER 的结合能力约为 E₂ 的 $10^{-3} \sim 10^{-5}$ ^[7-9]。目前关于 BPA 对鱼类 ER α mRNA 表达水平影响的报道很少。Seo 等^[11]以 600 $\mu\text{g/L}$ BPA 对鲮(*Rivulus marmoratus*)暴露 96 h,其脑部、性腺和肝脏中 ER α mRNA 水平均上升。Yamaguchi 等^[12]研究发现 0.01 $\mu\text{g/L}$ E₂ 和 8 000 $\mu\text{g/L}$ BPA 处理后 8 h,雄性青鳉(*O. latipes*)肝脏 ER α mRNA 和 Vtg II mRNA 水平显著上升,而 800 $\mu\text{g/L}$ (约为



图 1 雌鲫肝脏总 RNA 电泳图

Fig. 1 Total RNA from liver separated on agarose gel in female *C. auratus*

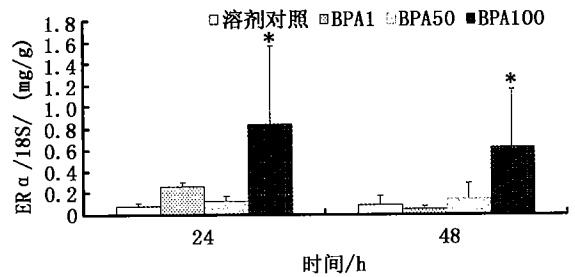


图 2 不同浓度 BPA 对雌鲫肝脏 ER α mRNA 水平的影响

Fig. 2 Effects of different doses of BPA on ER α mRNA expression in female *C. auratus*

注: BPA1, BPA50, BPA100 分别表示注射浓度为 1 mg/kg、50 mg/kg、100 mg/kg BPA; * 表示 $P < 0.05$

3.5×10^{-6} mol/L) BPA 不能诱导 ER α mRNA 和 Vtg II mRNA 的表达。然而, Hayashi 等^[13] 也以 E₂ 和 BPA 对青鳉进行暴露处理,发现在暴露后 1 d 10^{-10} mol/L 的 BPA 与 10^{-9} mol/L E₂ 均能够诱导雌性青鳉臀鳍 ER α mRNA 水平上调大约 3 倍,而更高浓度组 10^{-9} mol/L 和 10^{-8} mol/L 均不能诱导 ER α mRNA 水平继续上调。可见,ER α mRNA 对 BPA 的敏感性因物种、性别、组织分布或暴露时间的不同而表现出很大差异。

表 2 腹腔注射不同浓度 BPA 对雌鲫不同时间血清中 E₂ 水平的影响
Tab.2 Effects of different doses of BPA on E2 level in female *C. auratus*'s serum

w(BPA) (mg/kg)	时间 (h)		
	0	24h	48h
0	91 ± 21.62 (n=6)	84.7 ± 16.97 (n=7)	85.0 ± 9.77 (n=6)
1	91 ± 21.62 (n=6)	54.0 ± 4.58 *	77.2 ± 16.10 (n=6)
50	91 ± 21.62 (n=6)	119.3 ± 15.59 **	137.1 ± 26.74 ** (n=7)
100	91 ± 21.62 (n=6)	177.3 ± 14.43 **	153.3 ± 10.69 ** (n=3)

注:数据以平均值 ± 标准差表示; * 表示差异显著 ($P < 0.05$); ** 表示差异极显著 ($P < 0.01$)

刘青等^[14] 用 1 mg/kg E₂ 和不同浓度的对壬基酚 (4-NP) 对雌鲫进行注射,发现 24 h 和 48 h, 1 mg/kg、50 mg/kg、100 mg/kg 4-NP 均能诱导肝脏 ER α mRNA 水平显著增加;其中 1 mg/kg、50 mg/kg 的 4-NP 效应小于 1 mg/kg E₂, 100 mg/kg 的 4-NP 的效应接近 1 mg/kg E₂, 由此得出 4-NP 有弱雌激素效应。本实验结果显示,100 mg/kg BPA 能够诱导雌鲫肝脏 ER α mRNA 水平显著上升,而 1 mg/mg 和 50 mg/kg BPA 不能诱导肝脏 ER α mRNA 水平上升,说明 BPA 具有雌激素效应,但对雌鲫肝脏 ER α mRNA 的诱导能力比 4-NP 弱。这种较弱的诱导能力可能与 BPA 在鱼体内的代谢有关。如斑马鱼 (*D. rerio*) 相对于虹鳟 (*O. mykiss*) 对 BPA 的敏感性较低,其原因主要在于 BPA 在斑马鱼中的代谢较为迅速^[15]。

3.2 BPA 对血清 E₂ 水平的影响

E₂ 是导致鱼类性腺发育的一个关键因素,研究表明鱼类 E₂ 水平也受 EDCs 的影响,但 BPA 在不同鱼体上对鱼类 E₂ 水平的影响不完全相同。如在活体实验中, Mandich 等^[3] 用不同浓度 (1 ~ 1 000 $\mu\text{g/L}$) 的 BPA 对鲤进行暴露,发现 14 d 后, 1 $\mu\text{g/L}$ 和 10 $\mu\text{g/L}$ 处理组血清 E₂ 浓度显著下降, 100 $\mu\text{g/L}$ 和 1 000 $\mu\text{g/L}$ 处理组与对照相比无明显变化。并且血浆中 Vtg 水平与血清 E₂ 水平没有相关性,而与 BPA 浓度呈正相关。然而对于性成熟雄性鲫, BPA 能够诱导其血浆 E₂ 水平上升^[16]。另外, Lee 等^[17] 研究发现雌雄同体的鳊经 600 $\mu\text{g/L}$ BPA 诱导后,其脑部、性腺和肝脏中的细胞色素酶 (CYP1A) mRNA 水平均下降。由于 CYP1A 对 E₂ 具有羟化作用能促进 E₂ 代谢,这提示 BPA 可能通过抑制 CYP1A 表达从而阻碍 E₂ 代谢,导致 E₂ 水平上升。在体外实验中, Baek 等^[18] 在体外培养的长颌大口鰕虎鱼 (*Chasmichthys dolichognathus*) 卵母细胞中加入 100 ng/mL BPA, 结果发现 BPA 导致雌激素水平略微下降。

本实验结果显示, 1 mg/kg BPA 处理 24 h, 雌鲫血清 E₂ 水平有显著下降, 48 h 又恢复至正常水平; 50 mg/kg BPA 和 100 mg/kg BPA 处理 24 h 和 48 h 后, E₂ 水平均显著增加。表现为低浓度 BPA 暴露导致血清 E₂ 水平下降、高浓度 BPA 暴露导致 E₂ 水平上升。这种现象可能是由于 BPA 在高、低浓度下对 E₂ 代谢的影响不同造成的。如 Jurgella 等^[19] 发现体外培养的湖鱒 (*Salvelinus namaycush*) 肝脏和肾脏组织中, 0.1 $\mu\text{mol/L}$ BPA 显著提高肝脏和肾脏组织中 E₂ 代谢, 而 100 $\mu\text{mol/L}$ BPA 则对 E₂ 代谢起抑制作用。

刘青等^[14] 研究表明, 在 48 h 内 4-NP 能抑制雌鲫血清 E₂ 水平, 同时促进 ER α mRNA 表达, 从而说明 4-NP 能作用于雌激素受体 ER, 最终实现雌激素效应。而本实验中, 血清 E₂ 水平除在 1 mg/kg BPA

处理组中有短暂下降外,在 50 mg/kg BPA 和 100 mg/kg BPA 处理组中均显著上升;肝脏 ER α mRNA 水平仅在 100 mg/kg BPA 处理组中显著上升,在其他处理组中没有明显变化。可见,与 4-NP 不同,血清 E₂ 对 BPA 比肝脏 ER α mRNA 对 BPA 更为敏感。同时,结果表明高浓度的 BPA 能够诱导雌鲫肝脏 ER α mRNA 表达和血清 E₂ 水平的上升。另外,BPA 也可能通过影响血清 E₂ 水平从而对肝脏 ER α mRNA 水平产生影响,最终实现雌激素效应。

目前,关于 BPA 对淡水鱼类的内分泌干扰作用,研究相对较多的是 BPA 对鱼类性别决定和性腺发育以及 VTG 的影响。而对其在鱼体内的内分泌干扰机制知之甚少,诸如 BPA 在鱼体内是否直接与受体结合、有无其他因子参与,以及结合不同组织或不同种类的受体其作用有何不同,与内源性激素的代谢又有何种关系等,都需要进一步的探讨。

参考文献:

- [1] 吴楠,张毅. 壬基酚和雌二醇干扰罗氏沼虾卵黄蛋白原 VTG 基因表达的效应[J]. 动物学杂志,2007,42(4):1-7.
- [2] Tabata A, Watanabe N, Yamamoto I, et al. The effect of bisphenol A and chlorinated derivatives of bisphenol A on the level of serum vitellogenin in Japanese medaka (*Oryzias latipes*) [J]. Water Science and Technology, 2004, 50:125-132.
- [3] Mandich A, Bottero S, Benfenati E, et al. In vivo exposure of carp to graded concentrations of bisphenol A [J]. General and Comparative Endocrinology, 2007, 153:15-24.
- [4] Vanden B K, Verheyen R, Witters H. Comparison of vitellogenin responses in zebrafish and rainbow trout following exposure to environmental estrogens [J]. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2003, 56:271-281.
- [5] Larsen B K, Bjornstad A, Sundt R C, et al. Comparison of protein expression in plasma from nonylphenol and bisphenol A-exposed Atlantic cod (*Gadus morhua*) and turbot bot (*Scophthalmus maximus*) by use of SELDI-TOF [J]. Aquatic Toxicology, 2006, 78:25-33.
- [6] Rouhani R T, Sanderson J T, Van H I, et al. Effects of natural and synthetic estrogens and various environmental contaminants on vitellogenesis in fish primary hepatocytes: comparison of bream (*Abramis brama*) and carp (*Cyprinus carpio*) [J]. Toxicological Sciences, 2004, 81:90-102.
- [7] 黄毅娜,程微波,徐培渝,等. 双酚 A 和对-壬基酚雌激素受体的竞争性结合 [J]. 中国公共卫生,2004,20(5):559-561.
- [8] Kloas W, Schrag B, Ehnes C, et al. Binding of xenobiotics to hepatic estrogen receptor and plasma sex steroid binding protein in the teleost fish, the carp (*Cyprinus carpio*) [J]. General and Comparative Endocrinology, 2000, 119:287-299.
- [9] Matthews J B, Twomey K, Zacharewski T R. In vitro and in vivo interactions of bisphenol A and its metabolite, bisphenol A glucuronide, with estrogen receptors alpha and beta [J]. Chemical Research in Toxicology, 2001, 14:149-157.
- [10] Weigel N L, Zhang Y X. Ligand-independent activation of steroid hormone receptors [J]. Molecular Medicine, 1998, 76:469-479.
- [11] Seo J S, Lee Y M, Jung S O, et al. Nonylphenol modulates expression of androgen receptor and estrogen receptor genes differently in gender types of the hermaphroditic fish *Rivulus marmoratus* [J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2006, 346:213-223.
- [12] Yamaguchi A, Ishibashi H, Kohra S, et al. Short-term effects of endocrine-disrupting chemicals on the expression of estrogen-responsive genes in male medaka (*Oryzias latipes*) [J]. Aquatic Toxicology, 2005, 72:239-249.
- [13] Hayashi H, Nishimoto A, Oshima N, et al. Expression of the estrogen receptor alpha gene in the anal fin of Japanese medaka *oryzias latipes* by environmental concentrations of bisphenol A [J]. The Journal of Toxicological Sciences, 2007, 32(1):91-96.
- [14] 刘青,魏华,张高峰,等. 壬基酚对雌鲫受体表达和雌二醇水平的影响 [J]. 水产学报,2007,31(1):7-14.
- [15] Lindholm C, Wynne P M, Marriott P, et al. Metabolism of bisphenol A in zebrafish (*Danio rerio*) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in relation to estrogenic response [J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology, 2003, 135:169-177.
- [16] 黄天达. 双酚 A 和壬基酚对鲫生殖内分泌的联合毒理作用研究 [D]. 广州:中山大学, 2007:25.
- [17] Lee Y M, Seo J S, Kim I C, et al. Endocrine disrupting chemicals (bisphenol A, 4-nonylphenol, 4-tert-octylphenol) modulate expression of two distinct cytochrome P450 aromatase genes differently in gender types of the hermaphroditic fish *Rivulus marmoratus* [J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2006, 345:894-903.
- [18] 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.
- [19] Jurgella G F, Marwah A, Malison J A, et al. Effects of xenobiotics and steroids on renal and hepatic estrogen metabolism in lake trout [J]. General and Comparative Endocrinology, 2006, 148:273-281.