2011 年 第 6 卷
第 4 期,415-421

生 态 毒 理 学 报
Asian Journal of Ecotoxicology

Vol. 6, 2011
No. 4, 415-421

17β-雌二醇对西伯利亚鲟幼鱼的雌激素效应

张涛[1]，田美平[2]，章龙珍[1,*]，马境[3]，侯俊利[1]，赵峰[1]，庄平[1]

1. 中国水产科学院东海水产研究所 农业部海洋与河口渔业资源及生态重点开放实验室，上海 200090
2. 上海海洋大学水产与生命科学学院，上海 201306
3. 华东师范大学生命科学学院，上海 200062

摘要： 为了研究以及评估在利用 17β-雌二醇(estradiol-17β，E2)混饲投喂进行人工诱导西伯利亚鲟(*Acipenser baerii*)性别逆转过程中，外源雌激素处理对西伯利亚鲟幼鱼的雌激素效应以及激素残留风险。实验选取健康的 2 月龄西伯利亚鲟 840 尾，设置 E2 在饲料中的投喂剂量为 1 mg·kg^{-1}(C 组)和 10 mg·kg^{-1}(D 组)的处理组，以及对照组(B 组)和空白组(A 组)进行实验，每组 3 个平行，每个平行 70 尾幼鱼，日投饵率为 5%，实验持续 90 d。利用全自动生化分析仪以及化学发光免疫分析仪分别测定雌激素处理前后血清磷以及 E2 含量变化；并采用半定量 RT-PCR 方法，分别检测卵黄蛋白原 Vtg 基因在不同 E2 处理组的鱼肝脏组织中的表达情况。研究结果表明：添加 E2 的实验组中，西伯利亚鲟血清中 E2 浓度显著升高($p<0.05$)，停止 E2 处理 2 月后血清中 E2 浓度返回正常水平；Vtg 基因在 A 组和 B 组未见表达，而在 E2 处理组被显著表达，且 D 组中 Vtg/β-actin 值为 1.22±0.02，极显著($p<0.01$)高于 C 组的 0.11±0.00。

关键词： 西伯利亚鲟；幼鱼；雌二醇；血清；卵黄蛋白原
文章编号： 1673-5897(2011)6-415-07　　**中图分类号：** X503.225　　**文献标识码：** A

Estrogenic Effect of Estradiol-17β on Juvenile Siberian Sturgeon *Acipenser baerii*

Zhang Tao[1], Tian Meiping[2], Zhang Longzhen[1,*], Ma Jing[3], Hou Junli[1], Zhao Feng[1], Zhuang Ping[1]

1. East China Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Key and Open Laboratory of Marine and Estuarine Fisheries Resources and Ecology, Ministry of Agriculture, Shanghai 200090, China
2. College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China
3. School of Life Science, East China Normal University, Shanghai 200062, China

Received 14 December 2010　　**accepted** 23 July 2011

Abstract: To study the estrogenic effect of estradiol-17β (E2) on the Siberian sturgeon (*Acipenser baerii*) and risk of estrogenic residue, 840 healthy Siberian sturgeons of two months old were randomly stocked into 12 tanks with 70 individuals per tank and fed with 4 kinds of diets containing various dosages of E2 (0, 1, 10 mg·kg^{-1}) and equal ethanol. The E_2 containing diet was administrated at 5% of the body weight per day for 90 days. The concentration changes of phosphorus and E2 in serum were determined by biochemistry analyzer and chemiluminescence immunoassay, and the Vtg (vitellogenin) gene expression in liver tissue was detected by RT-PCR. Results showed that the concentrations of E2 in serum in the treated groups were significantly higher than that in control and blank groups, and the concentration of E2 in serum regressed to normal levels after E_2 was removed from the diet for 2 months. The Vtg gene signal was not detec-

收稿日期： 2010-12-14　　**录用日期：** 2011-07-23
基金项目： 公益性行业科研专项经费项目(201003055-07)；农业科技成果转化资金项目(2008GB23260408)；中央级公益性科研院所基本科研业务费专项(2007M01)
作者简介： 张涛(1976-)，男，副研究员，研究方向为鱼类繁育生物与鱼类生态学，E-mail：zhangtaoyfi@163.com；* 通讯作者(Corresponding author)，E-mail：longzhen2885@hotmail.com

ted in liver tissue of Siberian sturgeon in the control and blank groups, but the Vtg gene was strongly expressed in the liver in the groups treated with E_2. The ratio of Vtg/β-actin reached the value of 1.22 ±0.02 in the 10 mg·kg^{-1} (E_2/diet) treated groups, which was significantly higher than 0.11 ±0.00 in the 1 mg·kg^{-1} group.

Keywords: *Acipenser baerii*; juvenile; estradiol-17β; serum; vitellogenin

17β-雌二醇(estradiol-17β, E2)作为一种天然雌激素现已广泛应用于水产领域,借助 E_2 调控鱼类性别已在多种鱼类上获得成功[1-4]。但目前发现,采用性类固醇激素诱导生产单性鱼作为商品出售,可能会给人类健康和环境带来不利的影响,因此环境雌激素对人类和野生动物的效应已引起了人们的广泛关注[5-6]。卵黄蛋白原(vitellogenin, Vtg)是卵生脊椎动物繁殖前成熟雌鱼的特有蛋白,是卵黄蛋白(vitellin, Vn)的前体,Vtg 在雌激素的作用下由肝细胞合成,通过血液运输到卵巢。在自然条件下只有产卵的雌鱼 Vtg 基因才大量表达,而雄鱼和幼鱼不表达[7]。因在含有类雌激素物质的水环境中生存的雄鱼及幼鱼体内也会被诱导产生 Vtg,所以 Vtg 常被作为雌激素反应敏感标志物用于检测环境雌激素对生物体的效应[8]。

本研究以西伯利亚鲟(*Acipenser baerii*)幼鱼为实验对象,评价在采用 E2 混饲投喂实现人工逆转性别过程中,E2 对鱼体的雌激素效应和潜在的激素残留风险,评价雌激素性逆转西伯利亚鲟的安全性,并确定合适安全的 E2 处理剂量,为今后规模化西伯利亚鲟全雌诱导提供借鉴和参考。

1 材料与方法(Materials and methods)

1.1 实验材料

西伯利亚鲟 2 月龄幼鱼购自浙江省杭州千岛湖鲟龙科技开发公司,体长(5.17 ±0.38) cm,体重(1.17 ±0.18) g。实验期间水温为 22℃ ~28 ℃,水源为充分除氯曝气的自来水,溶氧 6 mg·L^{-1} 以上,非离子氨低于 0.01 mg·L^{-1},日投饵率为 5%。饲料购自山东升索饲料渔用饲料研究中心,17-β 雌二醇购自 sigma 公司(E-1024, Sigma-Aldrich, USA),Trizol 试剂、*Taq* 酶、凝胶 DNA 回收纯化试剂盒、M-MLV RTase cDNA Synthesis Kit 第一链 cDNA 合成试剂盒、pMD20-T 质粒购自宝生物工程(大连)有限公司,其他化学试剂均购自国药化学试剂有限公司。

1.2 实验分组及投喂管理

选取健壮无病幼鱼,设置空白组(A 组)、对照组(B 组)、1 mg·kg^{-1} 处理组(C 组)和 10 mg·kg^{-1} 处理组(D 组)共 4 个实验组,每组 3 个平行,每个平行 70 尾鱼。4 个实验组均用升索鲟鱼饲料作为基础饲料。将 E2 用无水乙醇溶解后,用喷雾器均匀喷涂于基础饲料上,制成 E2 含量分别为 1 mg·kg^{-1} 和 10 mg·kg^{-1} 的实验饲料,对照组饲料只喷洒等量的无水乙醇,空白组的饲料不做任何处理。喷拌好的饲料室温下干燥过夜置于密封塑料袋内,于 -20 ℃低温储藏备用。药饵投喂 90 d 后各实验组均转为投喂正常基础饲料,基础饲料投喂持续 60 d。

1.3 血清 E2 和磷检测

取 E2 处理 90 d 后和转投基础饲料 60 d 后的西伯利亚鲟幼鱼,每个平行随机取鱼 5 尾,每处理组 15 尾,用尾静脉采血 5 mL,置于 4 ℃条件下静置 2 h,待血液凝固分层后,1 000 g 下离心 10 min,收集血清。E2 的浓度采用 BHP9507 型化学发光免疫分析仪(倍爱康,北京),测定方法为化学发光免疫分析法(chemiluminescence immunoassay, CLIA),采用配套的 EKON-CLIA 磁微粒分离免疫测定试剂盒。血清磷的含量采用迈瑞 BS-200 全自动生化分析仪测定。

1.4 卵黄蛋白原 Vtg 基因半定量表达分析

RNA 的提取:取 E2 处理 90 d 后各实验组西伯利亚鲟幼鱼,MS-222 麻醉后置于冰盘上活体解剖,取肝脏组织立即放入液氮保存,随后转于 -80 ℃超低温冰箱保存以用于组织 RNA 提取。分别称取 0.1 g 各实验组西伯利亚鲟肝脏组织,利用 Trizol 试剂提取总 RNA。紫外分光光度法检测 RNA 的纯度与含量,10 g·L^{-1} 琼脂糖电泳检测其完整性。

引物设计和合成:根据 GeneBank 中已发表的高首鲟(*Acipenser transmontanus*)Vtg 基因序列(GeneBank: U00455.1),设计了一对用于扩增西伯利亚鲟 Vtg 基因的特异引物。*β-actin* 基因引物参考施氏鲟(*Acipenser schrenckii*)*β-actin* 序列(GenBank: AY649619.1)合成的一对特异引物,用来做 RT-PCR 内参的特异性引物。所有引物均由生工生物工程(上海)有限公司合成(表 1)。

cDNA 第一链合成:以不同 E2 处理组西伯利亚鲟的 RNA 为模板,利用 M-MLV RTase cDNA Synthesis Kit 第一链 cDNA 合成试剂盒进行 cDNA 第一链合成。20 μL 反应体系中含 4 μL 5 × Buffer、1 μL M-

MLV 反转录酶混合液(200 U·μL^{-1})、2 μL Oligo(dT)$_{18}$引物、1 μL dNTP 混合物、1 μL RNase 抑制剂、2 μg 总 RNA,加 H_2O(RNAse Free)至 20 μL。反转录条件为 42 ℃孵育 1 h,迅速冰浴 2 min。反转录产物于 -20 ℃保存。

表 1　实验中所使用的引物

Table 1　Primers used in the experiment

引物	引物序列	退火温度/℃
VtgF	5′-CATATGAGCGATGGCTTACAGCAAGGTTAC-3′	55
VtgR	5′-GCCTCGAGCTATGATGAGTCAGTGAATGG-3′	55
β-actinF	5′-CGGTTTCGCTGGAGATGATG-3′	57
β-actinR	5′-TCAGTGAGCAGGACGGGGTG-3′	57

半定量 RT-PCR 检测: 以不同 E2 处理组的西伯利亚鲟经 RNA 转录得到的 cDNA 为模板,以 *β-actin* 基因作为内参进行 RT-PCR 实验。25 μL 反应体系,包括 1 μL 模板 cDNA 第一链、2.5 μL 10×PCR Buffer、2 μL dNTP(2.5 mmol·L^{-1})、0.125 μL *Ex Taq* DNA 聚合酶(5 U·μL^{-1})、引物各 1 μL(100 μmol·L^{-1}),加无菌 ddH_2O 补足至 25 μL。反应过程为: 94 ℃ 30 s,55 ~ 57 ℃ 30 s,72 ℃ 60 s,30 个循环,最后 72 ℃延伸 10 min。反应产物进行 10 g·L^{-1}琼脂糖凝胶电泳检测,Bio-Rod Gel Doc™ XR 凝胶成像仪扫描电泳条带灰度,以 Vtg 条带积分光密度值(integrated density value, IDV)与 *β-actin* 内参 IDV 比值(Vtg/*β-actin*)作为 Vtg 基因的相对表达量进行半定量分析。

PCR 产物克隆及测序: 扩增产物经 10 g·L^{-1}的琼脂糖凝胶电泳,切下目的片段,用 Agarose Gel DNA Purification Kit(Takara, Japan)对产物进行回收纯化,回收产物按 3∶1 的比例与 pMD20-T 载体连接构建重组质粒,转化感受态大肠杆菌 DH5α,根据蓝白斑原理,挑选白色菌斑,摇菌并经菌落 PCR 鉴定插入片段大小后,在华大基因(上海)测序。将所得序列登录 NCBI 用 BLAST 对测序结果进行同源性检索。

1.5　数据分析

数据采用 Excel 2003 和 SPSS 11.5 软件进行数据统计分析,利用方差分析(One-Way ANOVA)来检验各实验组指标间的差异显著性,利用最小极差法(LSD)进行多重比较,$p<0.05$ 为差异显著。

2　结果(Results)

2.1　血清 E2 和磷含量变化

从表 2 可看出,2 月龄西伯利亚鲟幼鱼经过 90 d 的投喂,E2 处理组(C 组和 D 组)的血清磷含量显著高于 A 组($p<0.05$),而 B 组的磷含量与 E2 处理组差异不显著($p>0.05$)。经过 90 d 的投喂,在 E2 处理组中均检测出较高的 E2 含量,而在 A 组和 B 组,E2 含量低于检测的下限(≤8 pg·mL^{-1})未被检测出。停喂 E2 并转投基础饲料 60 d 后,E2 处理组的血清 E2 均返回正常值。

2.2　RNA 完整性检测

用 Trizol 试剂抽提西伯利亚鲟肝脏组织中的总 RNA,用紫外分光光度法检测 A_{260nm}/A_{280nm} 为 1.87(>1.6),浓度为 0.223 g·L^{-1}。经 10 g·L^{-1}琼脂糖凝胶电泳检测,可观察到 18S、28S 和 5S rRNA 这 3 条明亮的条带,表明所提取的总 RNA 保持了完整性而未发生降解(图 1)。

2.3　Vtg 基因的克隆与序列分析

通过 RT-PCR 的方法,利用引物 VtgF 和 VtgR,在各 E2 处理组都扩增得到了预期大小的一段片段,测序结果表明,此段西伯利亚鲟 Vtg 基因 cDNA 序列长 1 133 bp。由核酸序列推演出的蛋白质含 377

表 2　血清雌二醇(E2)和磷含量

Table 2　Concentrations of estradiol-17β and phosphorus in serum

投喂方式	指 标	空白组	对照组	1 mg·kg^{-1} 处理组	10 mg·kg^{-1} 处理组
投喂 90 d 后	血清磷含量/(mmol·L^{-1})	4.19 ± 0.52 a	4.31 ± 0.30 ab	4.65 ± 0.42 b	4.64 ± 0.71 b
	血清 E2 含量/(pg·mL^{-1})	ND	ND	30.30 ± 3.60 a	36.54 ± 4.50 a
转食 60 d 后	血清 E2 含量/(pg·mL^{-1})	ND	ND	ND	ND

注: 同一行中参数后字母不同代表有显著差异($p<0.05$),字母相同则无显著差异; ND: ≤8 pg·mL^{-1}未检测出。投喂 90 d: 空白组,投喂正常基础饲料; 对照组,投喂无水乙醇处理后的饲料; 1 mg·kg^{-1}处理组,投喂含 1 mg·kg^{-1} E2 的饲料; 10 mg·kg^{-1}处理组,投喂含 10 mg·kg^{-1} E2 的饲料; 转食 60 d: 空白组,继续投喂正常基础饲料; 对照组,停止投喂无水乙醇处理后的饲料,转为投喂正常基础饲料; 1 mg·kg^{-1}处理组,停止投喂含 1 mg·kg^{-1} E2 的饲料转为投喂正常基础饲料; 10 mg·kg^{-1}处理组,停止投喂含 10 mg·kg^{-1} E2 的饲料转为投喂正常基础饲料。

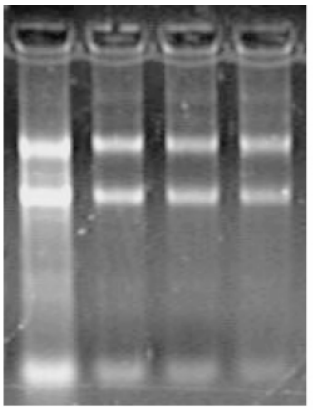

图 1 西伯利亚鲟肝脏总 RNA 电泳图

Fig. 1 Total RNA from liver of *Acipenser baerii* separated on agarose gel

个氨基酸残基，将片段测序结果登陆 NCBI 进行 Blast 分析，结果显示与 GeneBank 中已发表的高首鲟(GeneBank: AAA87392.1) 的 Vtg 氨基酸同源性为 96.82%(图 2) 。

2.4 E2 对 Vtg 基因表达的影响

利用 Quantity one 软件以 *β-actin* 作为内参进行 Vtg 基因相对表达分析，*β-actin* 基因在各处理组中均有表达，各组 *β-actin* 基因表达量灰度值均在1 000左右，可以进行后续评估。且 Vtg/*β-actin* 值在 A 组和 B 组均为 0，经过 E2 处理后，D 组 Vtg/*β-actin* 值为 1.22 ±0.02，极显著高于 C 组的 0.11 ±0.00($p<0.01$) ，说明 Vtg 基因可被 E2 诱导表达，且高剂量 E2 诱导 Vtg 基因表达量显著高于低剂量组(图 3) 。

```
Siberian  SDGLQQGYQVAAYTDNRVSRPRVQLLVTEIIEKSRWQICADAILPSNYKAVAIMGWGEEC  60
White     SDGLQQGYQVAAYTDNRVSRPRVQLLATEIIEKSRWQICADAILASNYKAMALMRWGEEC  60
          ************************.*****************.*****:*:* *****

Siberian  QDYKVAVNAVTGRLASHPSLQIKAKWSRIPRAAKQTQNILAEYVPGAAFMLGFSQKEQRN  120
White     QDYKVAVSAVTGRLASHPSLQIKAKWSRIPRAAKQTQNILAEYVPGAAFMLGFSQKEQRN  120
          *******.**************************************************

Siberian  PSKQFKIILAVTSPNTIDTLIKAPKITLFKQAVQIPVQIPMEPSDAERKSPGLASIMNEI  180
White     PSKQFKIILAVTSPNTIDTLIKAPKITLFKQAVQIPVQIPMEPSDAERRSPGLASIMNEI  180
          ************************************************:***********

Siberian  PFLIEEATKSKCVAQENKFITFDGVKFSYQMPGGCYHILAQDCRSKVRFMVMLKRASVSK  240
White     PFLIEEATKSKCVAQENKFITFDGVKFSYQMPGGCYHILAQDCRSKVRFMVMLKQASMSK  240
          ************************************************:**:**

Siberian  NLRAVNAKIYNKDIDILPTTKGSVRLLINNNEIPLSQLPFTDSSGNIHIKRADEGVSVSA  300
White     NLRAVNAKIYNKDIDILPTTKGSVRLLINNNEIPLSQLPFTDSSGNIHIKRADEGVSVSA  300
          ************************************************************

Siberian  QQYGLESLYFDGKTVQVKVTSEMRGKTCGLCGHNDGERRKEFRMPDGRQAKSPNVSPTPG  360
White     QQYGLESLYFDGKTVQVKVTSEMRGKTCGLCGHNDGERRKEFRMPDGRQARGPSVSPTPG  360
          ************************************************:.*.******

Siberian  LCLEKTATEAASFCVIM  377
White     LCLEKTATEAASFCVIM  377
          *****************
```

图 2 西伯利亚鲟与高首鲟的 Vtg 基因中间片段的氨基酸同源性比较

* 表示一致氨基酸; Siberian: 西伯利亚鲟(*Acipenser baerii*) ; White: 高首鲟(*Acipenser transmontanus*)

Fig. 2 Similarity of amino acid sequences of Vtg between *Acipenser baerii* and *Acipenser transmontanus*

* denotes identical amino acid; Siberian: *Acipenser baerii*; White: *Acipenser transmontanus*

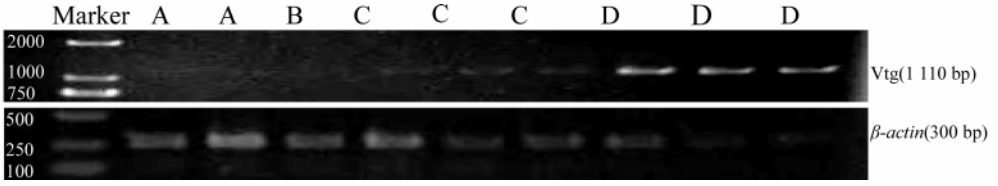

图 3 Vtg 基因表达水平差异

Marker: DNA 分子量标记; A: 空白组; B: 对照组; C: 含 1 mg·kg^{-1} E_2 饲料投喂组; D: 含 10 mg·kg^{-1} E_2 饲料投喂组

Fig. 3 Expression level of Vtg gene

Marker: DNA molecular markers; A: blank group; B: control group; C: group with diet containing 1 mg·kg^{-1} E_2; D: group with diet containing 10 mg·kg^{-1} E_2

3 讨论(Discussion)

3.1 E2 残留分析

自从性类固醇激素在鱼类性别分化过程中的作用机理被阐明后，通过外源雌激素人工诱导鱼类雌性化(feminization) ，生产全雌单性群体(monosex female stock) ，已在养殖鱼类中得到了广泛的应

用[1-4]，且主要有投喂法和浸泡法这 2 种方式，而常用的雌激素有 17β-雌二醇(E2) 、乙烯雌酚(diethylstilbestrol，DES) 、雌酮(oestrone，E1) 、17α-乙炔基雌二醇(17α-ethynyloestradiol，EE2) 和苯甲酸雌二醇(oestradiol benzoate，EB) 等[1-3]。然而，投喂雌二醇可能会造成雌二醇及其衍生物在鱼体内的残留，通过食物链危害人类健康; 同时，雌二醇作为一种环境内分泌干扰物(environmental endocrine disrupting chemicals，EDCs) ，会影响鱼类的生殖、免疫和神经系统的正常生理功能[9]。由于雌二醇在水产及畜牧业中的滥用，雌二醇在一些天然水体和城市污水中已被检测到[10]。因此出于对食品和环境安全的考虑，本文研究了利用人工投喂 17β-雌二醇的方法诱导西伯利亚鲟幼鱼性逆转过程中，E2 对鱼体雌激素效应和潜在的激素残留风险。

高艳丽等[5]对雌二醇诱导施氏鲟全雌化的研究表明，在 1 mg·kg^{-1}和 5 mg·kg^{-1}的给药范围内，雌二醇在肌肉和胃肠道中的残留量低，残留时间短，停药 230 d 后雌二醇不会在鱼体内造成累积效应，且通过后期的继续饲养或处理不会对人体产生危害。王念民等[11]对施氏鲟短期投喂雌二醇的研究也表明，投喂雌二醇含量分别为 1 mg·kg^{-1}和 5 mg·kg^{-1}的饲料 3 个月后停药 5 个月时，投喂组肠道和肝脏雌二醇含量较未处理组低，血清雌二醇含量无显著性差异，且各组肌肉检测均未发现雌二醇残留。方永强等[12]对鲻鱼(*Mugil cephalus*) 的研究结果也表明，投喂 10 mg·kg^{-1}和 50 mg·kg^{-1}剂量的雌二醇 5 个月后，投喂组肌肉、胃肠道和血液中雌二醇含量显著高于对照组，但停药 1 个月后各组织雌二醇含量明显下降，10 mg·kg^{-1}组与对照组无显著性差异，停药 2 个月后 2 个剂量投喂组与对照组各组织雌二醇含量均无显著性差异，说明雌二醇在鱼体内残留量低且残留时间很短。本研究结果显示，2 月龄西伯利亚鲟幼鱼投喂 E2 90 d 后，1 mg·kg^{-1}和 10 mg·kg^{-1}E2 处理组血液中 E2 含量显著高于对照组和空白组，而停药 60 d 后 E2 处理组血清 E2 含量均下降至正常水平，与空白组和对照组比较无显著性差异。根据高艳丽等[5]的研究结果显示，相对于血清来说肌肉 E2 含量极低，这表明利用投喂 E2 方法诱导西伯利亚鲟幼鱼性逆转，经过 60 d 的停药期后鱼体即可达到安全食用标准。

3.2　E2 对 Vtg 基因表达影响

卵黄蛋白原 Vtg 是一种大分子的脂磷糖蛋白，是卵生动物中卵黄蛋白的前体。Vtg 是卵生脊椎动物在雌二醇的诱导下由肝细胞合成，通过血液运输到卵巢，在卵母细胞中通过蛋白水解酶分解为卵黄蛋白，储存于卵黄颗粒中。Vtg 作为“雌性特异蛋白”，在性成熟的雌性动物卵子发育的卵黄生成期血液中含量较高，而在雄性和未成熟雌性血液中含量很低或没有[13-15]。但在外源雌激素或雌激素类化合物的诱导下，雄性和幼体动物的肝脏也能被诱导产生 Vtg，因此 Vtg 的水平可间接反映外源性化学物质是否具有雌激素或抗雌激素效应，Vtg 常被作为雌激素反应敏感标志物用于检测环境雌激素对生物体的效应[16-18]。

李洁斐等[8]研究发现，孵化后 20 d 的斑马鱼(*Brachydanio rerio*) 幼鱼和成鱼雄鱼暴露在 17α-乙炔基雌二醇 25 d 后，Vtg 基因被显著诱导表达，且 Vtg 基因的表达量随暴露浓度的增加而增高。温茹淑等[6]研究也显示雌二醇能诱导雄性唐鱼(*Tanichthys albonubes*) 产生大量的 Vtg，并影响其生长及精巢发育。侯彦峰等[19]采用定量 RT-PCR 的方法检测雌二醇诱导青鳉(*Oryzias latipes*) 的 Vtg 基因表达，研究发现 Vtg-I 的表达量与雌二醇剂量显示出较好的剂量-效应关系，是较为理想的生物标记物基因，0.1 ng·L^{-1}的雌二醇暴露组的 Vtg-I 的表达量即显著高于对照组。本研究中 2 月龄的西伯利亚鲟性腺尚未完成分化[20]，为未成熟的幼鱼，在 E2 处理组的肝脏中用半定量 RT-PCR 能检测到 Vtg 基因的表达，且 Vtg 基因表达量与 E2 浓度呈较好的剂量-效应关系，而在对照、空白组未检测到 Vtg 基因表达，表明外源雌激素能结合幼鱼肝脏中雌激素受体，从而诱导幼鱼肝脏中的 Vtg 基因表达。

鱼类卵黄蛋白原中脂和磷的质量分数分别为 20% 和 0.6%[21]，且含磷量与卵黄蛋白原的比例关系较为恒定，血清蛋白磷的含量可以间接反映卵黄蛋白原的变化[22-23]。张艳珍等[24]研究显示，能够以血清中蛋白结合磷磷的含量的变化间接地反映中华鲟(*Acipenser sinensis*) Vtg 的变化情况。而李云等[7]研究发现，雌二醇可诱导雄性瓦氏黄颡鱼(*Pelteobagrus vachelli*) 产生 Vtg，且 Vtg 和血清蛋白结合磷与雌二醇呈明显的剂量依赖关系，血液无机磷和总磷虽然也呈现相似的变化规律，但结果偏差较大。本研究中 E2 处理组中血清磷的含量显著高于空白组(A 组) ，与对照组(B 组) 差异不明显，而 1 mg·kg^{-1}处理组(C 组) 和 10 mg·kg^{-1}处理组(D 组) 间差异不

显著,表明血清磷可能容易受到营养状态等因素的影响,不宜作为 E2 的雌激素效应的检测指标[7]。

综上所述,外源投喂 E2 能影响西伯利亚鲟幼鱼的 Vtg 基因表达,而且较低剂量的 E2 就能够对鱼体表现出雌激素效应,且血清中磷伴随 Vtg 的改变而改变。同时对 E2 激素残留的评价分析也显示,停喂 E2 后 60 d 血液 E2 激素含量能够返回正常水平,表明采用投喂 E2 实现西伯利亚鲟性逆转具有食品安全性。由于 1 mg·kg^{-1}的 E2 处理组已表现出明显的雌激素效应,笔者建议在采用投喂 E2 人工诱导西伯利亚鲟性逆转的实践中,所用剂量应控制在 1 mg·kg^{-1}以下。

通讯作者简介:章龙珍(1954—),女,学士,研究员,主要研究方向为鱼类繁育生物学,发表学术论文 100 余篇。

参考文献:

[1] Yamazaki F. Sex control and manipulation in fish [J]. Aquaculture, 1983, 33(1-4): 329 - 354

[2] Hunter G A, Donaldson E M. Hormonal Sex Control and Its Application to Fish Culture [M] // Hoar W S, Randall D J, Donaldson E M. Fish Physiology. New York: Academic Press, 1983: 223 - 291

[3] Piferrer F. Endocrine sex control strategies for the feminization of teleost fish [J]. Aquaculture, 2001, 197(1-4): 229 - 281

[4] Devlin R H, Nagahama Y. Sex determination and sex differentiation in fish: An overview of genetic, physiological, and environmental influences [J]. Aquaculture, 2002, 208(3-4): 191 - 364

[5] 高艳丽,华育平,曲秋芝,等. 17β-雌二醇诱导施氏鲟全雌化后在鱼体内残留的研究 [J]. 黑龙江畜牧兽医, 2006(5): 86 - 87

[6] 温茹淑,方展强,陈伟庭. 17β-雌二醇对雄性唐鱼卵黄蛋白原的诱导及性腺发育的影响 [J]. 动物学研究, 2008, 29(1): 43 - 48
Wen R S, Fang Z Q, Chen W T. Effects of 17β-estradiol on vitellogenin inducement and gonad development in male *Tanichthys albonubes* [J]. Zoological Research, 2008, 29(1): 43 - 48 (in Chinese)

[7] 李云,朱志强,叶勤,等. 17β-雌二醇对雄性瓦氏黄颡鱼(*Pelteobagrus vachelli*)的雌激素效应 [J]. 海洋与湖沼, 2009, 40(2): 195 - 200
Li Y, Zhu Z Q, Ye Q, et al. Estrogenic effect of 17β-estradiol on male bagrid catfish *Pelteobagrus vachelli* [J]. Oceanologia Et Limnologia Sinica, 2009, 40(2): 195 - 200 (in Chinese)

[8] 李洁斐,李卫华,杨健,等. 17α-炔雌醇对雌激素反应基因表达的影响 [J]. 环境与职业医学, 2006, 23(2): 127 - 130
Li J W, Li W H, Yang J, et al. Effects of 17α-ethynylestradiol on the expression of estrogen-responsive genes [J]. Journal of Environment and Occupational Medicine, 2006, 23(2): 127 - 130 (in Chinese)

[9] 尹德玉,汝少国,田华. 环境内分泌干扰物对鱼类性别决定的影响研究进展 [J]. 生态毒理学报, 2009, 4(4): 467 - 474
Yin D Y, Ru S G, Tian H. Advances in effects of endocrine disrupting chemicals on sex determination of fish [J]. Asian Journal of Ecotoxicology, 2009, 4(4): 467 - 474 (in Chinese)

[10] Ying G G, Kookana R S, Ru Y J. Occurrence and fate of hormone steroids in the environment [J]. Environment International, 2002, 28(6): 545 - 551

[11] 王念民,张颖,曲秋芝,等. 短期投喂雌二醇对施氏鲟幼鱼生长的影响 [J]. 水产学杂志, 2005, 18(2): 11 - 15
Wang N M, Zhang Y, Qu Q Z, et al. Effects of 17-β estradiol mixed diets for a short period on growth *Acipenser schrenckii* juvenile [J]. Chinese Journal of Fisheries, 2005, 18(2): 11 - 15 (in Chinese)

[12] 方永强,翁幼竹,林君卓,等. 全雌鲻鱼培育的研究 [J]. 水产学报, 2001, 25(2): 131 - 135
Fang Y Q, Weng Y Z, Lin J Z, et al. Studies on the cultivation of all-female in *Mugil cephalus* [J]. Journal of Fisheries of China, 2001, 25(2): 131 - 135 (in Chinese)

[13] 张士璀,孙旭彤,李红岩. 卵黄蛋白原研究及其进展 [J]. 海洋科学, 2002, 26(7): 32 - 35
Zhang S C, Sun X T, Li H Y. Review on vitelloginin [J]. Marine Sciences, 2002, 26(7): 32 - 35 (in Chinese)

[14] 张年国,张颖,孙大江,等. 卵黄蛋白原的发生、结构及功能研究现状 [J]. 水产学杂志, 2007, 20(1): 97 - 106

[15] 丁健文,庄平,章龙珍,等. 西伯利亚鲟卵黄脂磷蛋白的分离纯化及性质 [J]. 动物学杂志, 2009, 44(3): 9 - 15
Ding J W, Zhuang P, Zhang L Z, et al. Purification and partial characterization of lipovitellin from *Acipenser baerii* [J]. Chinese Journal of Zoology, 2009, 44(3): 9 - 15 (in Chinese)

[16] Reis-Henriques M A, Cruz M M, Pereira J O. The modulating effect of vitellogenin on the synthesis of 17β-estradiol by rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) ovary [J]. Fish Physiology and Biochemistry, 1997, 16(3): 181 - 186

[17] Mitsui N, Tooi O, Kawahara A. Sandwich ELISAs for quantification of *Xenopus laevis* vitellogenin and albumin and their application to measurement of estradiol-17β effects on whole animals and

primary-cultured hepatocytes [J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology, 2003, 135(3): 305 – 313

[18] 翟丽丽, 张育辉. 基于环境雌激素评估的卵黄蛋白原研究进展 [J]. 生态毒理学报, 2009, 4(3): 332 – 337
Zhai L L, Zhang Y H. Review on vitellogenin based on estimating environmental estrogen [J]. Asian Journal of Ecoto-xicology, 2009, 4(3): 332 – 337 (in Chinese)

[19] 侯彦峰, 张照斌, 胡建英, 等. 定量 RT-PCR 检测雌二醇诱导的青鳉鱼基因表达 [J]. 中国环境科学, 2006, 26(5): 599 – 602
Hou Y F, Zhang Z B, Hu J Y, et al. Gene expression in liver of male medaka (*Oryzias latipes*) induced by estradiol of low concentration examined survived with real-time quantitative RT-PCR [J]. China Environmental Science, 2006, 26(5): 599 – 602 (in Chinese)

[20] 田美平, 庄平, 张涛, 等. 西伯利亚鲟性腺早期发生、分化、发育的组织学观察 [J]. 中国水产科学, 2010, 17(3): 496 – 506
Tian M P, Zhuang P, Zhang T, et al. Histological observation on early development and differentiation of gonad in Siberian sturgeon, *Acipenser baerii* [J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2010, 17(3): 496 – 506 (in Chinese)

[21] Yehezkel G, Chayoth R, Abdu U, et al. High-density lipoprotein associated with secondary vitellogenesis in the hemolymph of the crayfish *Cherax quadricarinatus* [J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology, 2000, 127(3): 411 – 421

[22] Mano Y, Lipmann F. Characteristics of phosphoproteins (Phosvitins) from a variety of fish roes [J]. The Journal of Biological Chemistry, 1966, 241(16): 3822 – 3833

[23] 林浩然, 刘晓春. 鱼类生理学实验技术和方法 [M]. 广州: 广东高等教育出版社, 2006: 64 – 67

[24] 张艳珍, 陈细华, 危起伟, 等. 中华鲟血清卵黄蛋白原水平的初步观察 [J]. 淡水渔业, 2008, 38(5): 10 – 14
Zhang Y Z, Chen X H, Wei Q W, et al. Variation in the serum vitellogenin levels of Chinese sturgeon (*Acipenser sinensis*) [J]. Freshwater Fisheries, 2008, 38(5): 10 – 14 (in Chinese) ◆