

DOI:10.7524/AJE.1673-5897.20190610001

马栋栋, 蒋宇霞, 杨雷, 等. 雄激素 1,4-雄烯二酮和雄烯二酮对斑马鱼胚胎昼夜节律和下丘脑-垂体-性腺轴通路中基因转录表达的影响[J]. 生态毒理学报, 2020, 15(2): 29-38

Ma D D, Jiang Y X, Yang L, et al. Effect of androstadienedione and androstenedione on transcription of genes in circadian rhythm and hypothalamic-pituitary-gonadal axis in zebrafish embryos [J]. Asian Journal of Ecotoxicology, 2020, 15(2): 29-38 (in Chinese)

雄激素 1,4-雄烯二酮和雄烯二酮对斑马鱼胚胎昼夜节律和下丘脑-垂体-性腺轴通路中基因转录表达的影响

马栋栋¹, 蒋宇霞², 杨雷², 应光国^{1,*}, 史文俊^{1,#}

1. 华南师范大学环境研究院, 广东省化学污染与环境安全重点实验室, 华南师范大学环境理论化学教育部重点实验室, 广州 510006

2. 中国科学院广州地球化学研究所有机地球化学国家重点实验室, 广州 510640

收稿日期: 2019-06-10 录用日期: 2019-07-12

摘要: 雄激素 1,4-雄烯二酮(androstadienedione, ADD)和雄烯二酮(androstenedione, AED)主要用于人类和牲畜疾病的预防和治疗。近年来, ADD 和 AED 的大量使用导致其在河流中广泛检出, 甚至在多种鱼类体内亦有检出, 且浓度较高。ADD 和 AED 已被证实对鱼类具有生殖毒性和发育毒性, 但 ADD 和 AED 在转录水平上对鱼类的影响鲜有报道。为探究 ADD 和 AED 分子水平毒性, 本研究考察了斑马鱼胚胎暴露于 ADD(4.48, 30.0 和 231 ng·L⁻¹)和 AED(3.64, 21.7 和 230 ng·L⁻¹)144 h 后, 对其昼夜节律和下丘脑-垂体-性腺轴(hypothalamic-pituitary-gonadal axis, HPG axis)通路中基因转录表达的影响。结果表明, 所有浓度的 ADD 都显著上调了昼夜节律通路中生物钟基因(*per1b*)、核受体亚族 1 的 D 群基因(*nr1d2b*)、隐花色素基因(*cry5*)和 *si:ch211-132b12.7* 的转录水平, 30.0 和 231 ng·L⁻¹ 的 ADD 下调了时钟节律调节因子基因(*clocka*)和芳香烃受体核转录蛋白样基因(*arntl2*)的转录水平。3.64 ng·L⁻¹ AED 显著增强了 *per1b* 和 *nr1d2b* 的转录表达。此外在 HPG 轴中, 30.0 ng·L⁻¹ ADD 显著降低了促黄体生成素 V 亚基基因(*lhb*)的转录表达水平, 而 3.64 ng·L⁻¹ AED 显著上调了 *lhb* 的转录表达水平。值得注意的是, 4.48 ng·L⁻¹ ADD 和 3.64 ng·L⁻¹ AED 均显著降低了细胞色素 P450 的 11 亚族基因(*cyp11b*)的转录表达水平。上述研究表明, ADD 和 AED 对昼夜节律和 HPG 轴中相关基因的转录表达有显著性影响, 对斑马鱼具有潜在的内分泌干扰风险。

关键词: 1,4-雄烯二酮; 雄烯二酮; 斑马鱼胚胎; 内分泌干扰; 昼夜节律; 下丘脑-垂体-性腺轴

文章编号: 1673-5897(2020)2-029-10 中图分类号: X171.5 文献标识码: A

Effect of Androstadienedione and Androstenedione on Transcription of Genes in Circadian Rhythm and Hypothalamic-pituitary-gonadal Axis in Zebrafish Embryos

Ma Dongdong¹, Jiang Yuxia², Yang Lei², Ying Guangguo^{1,*}, Shi Wenjun^{1,#}

1. Environmental Research Institute, Guangdong Provincial Key Laboratory of Chemical Pollution and Environmental Safety & MOE Key Laboratory of Environmental Theoretical Chemistry, South China Normal University, Guangzhou 510006, China

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(41807480); 中国博士后科学基金面上项目(2018M643116); 华南师范大学研究生创新计划资助项目(2018LKXM018)

作者简介: 马栋栋(1991—), 男, 硕士研究生, 研究方向为环境毒理学, E-mail: madong9110@163.com

* 通讯作者 (Corresponding author), E-mail: guangguo.ying@m.scnu.edu.cn

共同通讯作者 (Co-corresponding author), E-mail: wenjun.shi@m.scnu.edu.cn

2. State Key Laboratory of Organic Geochemistry, Guangzhou Institute of Geochemistry, Chinese Academy of Sciences, Guangzhou 510640, China

Received 10 June 2019 accepted 12 July 2019

Abstract: Androgen 1,4-androstenedione (ADD) and androstenedione (AED) are mainly used for the prevention and treatment of human and livestock diseases. ADD and AED have been frequently detected in the surface waters at concentrations in the range of $\text{ng} \cdot \text{L}^{-1}$, and rarely up to $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$. In addition, high concentrations of ADD and AED were also detected in a variety of fish. So far, several studies have shown that AED can cause masculinization in female fathead minnow and in mosquitofish and even lead to sex reversal in zebrafish. ADD can reduce the fin length of fish, decrease the egg production and adversely affect the gonadal development. These studies indicate that ADD and AED have reproductive toxicity at physiological level. However, little study focused on the effect of ADD and AED on transcription of genes in the related systems of fish, such as circadian rhythm and hypothalamic-pituitary-gonadal (HPG) axis. Therefore, the aim of the present study was to investigate the effect of ADD and AED on transcription of genes involved in circadian rhythm and HPG axis in zebrafish embryos by qPCR analysis. The zebrafish embryos were exposed to three concentrations of ADD (4.48, 30.0 and $231 \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$) and AED (3.64, 21.7 and $230 \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$) for 144 h post fertilization (hpf), respectively. The data of qPCR analysis showed that exposure to all three concentrations of ADD significantly increased the transcription of period circadian clock 1b (*per1b*), nuclear receptor subfamily 1, group D, member 2b (*nrl2b*), cryptochrome circadian regulator 5 (*cry5*) and *si:ch211-132b12.7* in the circadian rhythm network. The fold change of *per1b*, *nrl2b* and *si:ch211-132b12.7* even reached to 3.19, 2.72 and 3.63 at $4.48 \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$, respectively. Exposure to $30 \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$ and $230 \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$ of ADD suppressed the transcription of *clocka* (fold change, ~ 1.29) and aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator-like 2 (*arntl2*) (fold change, ~ 1.29). In addition, exposure to $3.64 \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$ of AED enhanced the transcription of *per1b* and *nrl2b*. For the effect of ADD and AED on HPG axis, exposure to $30 \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$ of ADD significantly decreased the transcription of luteinizing hormone, beta polypeptide (*lhb*), while exposure to $3.64 \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$ of AED increased the transcription of *lhb*. It is noted that exposure to both $4.48 \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$ of ADD and $3.64 \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$ of AED significantly down-regulated the transcription of cytochrome P450, family 11, subfamily C, polypeptide 1 (*cyp11b*), which participates in androgen synthesis. Taken together, the results indicated that ADD and AED could affect the transcription of genes belonging to the HPG axis and circadian rhythm after 144 hpf exposure, and suggested that ADD and AED might have potential endocrine disruption effect in fish.

Keywords: androgen; 1,4-androstenedione; androstenedione; zebrafish embryo; endocrine disruption; circadian rhythm; hypothalamic-pituitary-gonadal (HPG) axis

类固醇激素根据作用受体不同可分为雄激素、糖皮质激素、盐皮质激素、孕激素和雌激素。类固醇激素已经在环境中频繁检出,由于它们具有潜在的内分泌干扰效应,日益成为人们关注的焦点^[1-4]。雄激素是一类重要的类固醇激素,经常被用于生长促进剂和动物疾病的预防和治疗^[5]。由于牲畜饲养过程中产生的内源性污染物粪便和尿液中含有雄激素类物质,并且所产生的粪肥常应用于农田或者直接排入自然河流,因此,在不同环境样本中已经检测出多种雄激素^[6-17]。其中,雄激素 1,4-雄烯二酮(androstadienedione, ADD)和雄烯二酮(androstenedione, AED)在各种受纳环境中被广泛检出,并且浓度较高。

在我国广东省污水处理厂出水中,检测出 ADD 的浓度可达 $13.8 \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$, AED 浓度为 $5.5 \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$ ^[10]。在我国北京市污水处理厂出水中,ADD 检测浓度达到 $18.9 \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$, AED 浓度最高也达到 $12 \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$ ^[8]。在瑞士和日本的污水处理厂出水中也检测出不同浓度的 ADD 和 AED^[6,13]。相比较于污水处理厂出水,本研究更关注 ADD 和 AED 在地表水中的浓度水平。研究发现,广东省河流中 ADD 和 AED 的浓度分别在 $8.2 \sim 17.9 \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $8.1 \sim 8.6 \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$ 范围内^[9],最高甚至可以达到 $548 \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $197 \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$ ^[14]。在北京市河流中 AED 浓度也可达到 $99 \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$ ^[7]。法国地表水中 AED 的浓度较低,为 $2.8 \text{ ng} \cdot$

L^{-1} [15]。除了在受纳水体环境中检测出 ADD 和 AED,多种鱼类体内也检测到较高浓度的 ADD 和 AED。Liu 等 [12] 发现在中国广东省的河流中 ADD 和 AED 富集在多种鱼类体内,该研究结果显示,鲢鱼血浆中 AED 浓度达到 $9.7 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$;在罗非鱼肝脏中 AED 浓度为 $2.8 \text{ ng} \cdot \text{g}^{-1}$,胆汁中 ADD 浓度达到 $12 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$,肌肉中 AED 浓度为 $0.44 \text{ ng} \cdot \text{g}^{-1}$;鲫鱼胆汁中 AED 浓度达到 $7.6 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。由于 ADD 和 AED 在环境介质中检出频率和浓度均较高,其可能对水生生物产生毒性效应。

目前研究表明,AED 是一种弱雄激素受体激动剂。AED 的雄激素效应比鱼类雄激素 11-酮基睾酮(11-KT)以及睾酮(T)弱 [18]。AED 可以引起斑马鱼性逆转,诱导雌性黑头呆鱼和食蚊鱼雄性化 [3,19-20]。另有研究表明,造纸废水中的 AED 可以诱导食蚊鱼雄性化 [21-22]。最新研究发现,斑马鱼胚胎短期暴露(120 h)于高浓度($6.56 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)AED,可增加细胞色素 P450 芳香化酶基因(*cyp19b* 和 *cyp2k7*)和硫酸基转移酶基因(*sult2st3*)的转录表达水平 [23]。此外,古明宗等 [24] 研究发现,ADD 可以增加食蚊鱼体长,减少雌鱼臀鳍长度以及减少体重、性腺和肝脏的重量;还影响食蚊鱼的卵巢发育,引起卵细胞形态学改变。这些结果表明,ADD 和 AED 对鱼类具有潜在的内分泌干扰效应,但是,目前研究主要集中在形态学方面,ADD 和 AED 对鱼类的分子水平的毒理效应研究较少,如昼夜节律通路和下丘脑-垂体-性腺轴(HPG 轴)相关通路。

下丘脑-垂体-性腺轴在内分泌系统中起着重要的作用 [25]。HPG 轴主要通过分泌人促黄体生成素(LH)和卵泡刺激素(FSH)来调节性腺功能以及激素水平并维持生物第二特征 [26]。此外,昼夜节律通路可以调控多个生物学过程,比如内分泌、细胞凋亡和眼睛发育等 [27]。昼夜节律和 HPG 轴通路在内分泌系统中起到关键作用,有很多研究已经报道了雌激素和孕激素对它们的影响 [1,28-29],但是雄激素 ADD 和 AED 对其影响的研究还很少。因此,有必要进一步研究 ADD 和 AED 对鱼类昼夜节律和 HPG 轴相关通路的影响。

本研究在 Shi 等 [28] 研究的基础上,以斑马鱼胚胎为受试生物,利用荧光定量 PCR 技术分析了 ADD 和 AED 短期暴露 144 h 后对斑马鱼胚胎昼夜节律相关基因(*cry5*、*per1b*、*per2*、*cry1ab*、*cry2ad6*、*clocka*、*arntl2*、*nrl2d2b* 和 *si:ch2il-132b12.7*)和 HPG 轴

相关基因(*ar*、*esr*、*vgt*、*cyp19a1a*、*cyp11b*、*hsd17b1*、*hsd17b2*、*hsd17b3*、*gnrh2*、*gnrh4*、*lhb*、*fshb*、*atf4b1*、*atf4b2*、*cyp11a1* 和 *cyp17a1*)通路表达的影响。本研究将为 ADD 和 AED 对鱼类的生态风险提供依据。

1 材料与方法(Materials and methods)

1.1 主要仪器和试剂

Smart SpecTM Plus 分光光度计购于美国伯乐公司,Applied BiosystemsTM QuantStudioTM 7 Flex 实时定量 PCR 仪购于美国赛默科技有限公司,1290 系列超高效液相色谱串联 G6495 三重四级杆质谱(UHPLC-MS/MS)购于美国 Agilent 公司。

1,4-雄烯二酮(分子式 $\text{C}_{19}\text{H}_{24}\text{O}_2$,分子量 284.39, CAS 号 897-06-3,纯度 98%)、雄烯二酮(分子式 $\text{C}_{19}\text{H}_{26}\text{O}_2$,分子量 286.41, CAS 号 63-05-8,纯度 98%),均购于上海安谱实验科技股份有限公司;二甲亚砜(dimethylsulfoxide, DMSO),HPLC 级,纯度 >99.9%,购于 Sigma 公司。FSQ-301qPCR 专用 RT 试剂盒和 QPS-201 荧光定量 THUNDERBIRDTM SYBR[®] qPCR Mix 均购于日本东洋纺试剂有限公司。

按照 Shi 等 [30] 的方法配制胚胎培养液母液,浓度如下: $294.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{ CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、 $123.3 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{ MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、 $63.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{ NaHCO}_3$ 和 $5.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{ KCl}$ 。配制完成后,将母液按体积比 1 : 5 稀释,曝气 24 h 后,调节 pH 值到 7.8 ± 0.2 ,用于胚胎暴露实验。

1.2 斑马鱼饲养和胚胎收集

成年斑马鱼(*Danio rerio*)由华南师范大学广东省化学品控制和生物安全实验室提供。饲养于流动式循环系统中。在饲养期间,保持水的氧饱和度不低于 80%,pH 7~8,同时光照和黑暗周期设置为 14 h : 10 h,温度(27 ± 1) $^{\circ}\text{C}$ 。每隔 3 天换一次水。饲养期间,每天早晚各饲喂红虫和丰年虾一次,并清洗循环系统中残留的食物残渣和粪便,以保证循环水的洁净。产卵前一天傍晚将 1 只雌鱼和 2 只雄鱼放入斑马鱼交配盒中。雌鱼和雄鱼由一透明挡板隔开,并用黑色不透光塑料袋包裹交配盒以确保黑暗条件下过夜。第 2 天清晨缓慢去除塑料袋,小心抽出挡板,打开白炽灯均匀刺激交配盒中的斑马鱼。0.5 h 后,收集沉在交配盒底部的受精卵。用胚胎培养液缓慢冲洗胚胎中杂物,并剔除未正常受精的胚胎。再利用光学显微镜,收集发育正常的胚胎用于暴露实验。

1.3 暴露试验

根据 ADD 和 AED 在环境中检测到的浓度水

平^[7-14],均设置以下暴露浓度:5、50 和 500 $\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$ 。同时设置溶剂对照组。所有处理组中,DMSO 浓度均为 0.001% (V/V)。每个处理组包含有 4 个平行,暴露试验在 1 000 mL 烧杯中进行,每个烧杯中包含 100 个胚胎和 600 mL 暴露溶液,连续暴露 144 h。暴露液每天更新一次,并剔除未孵化的胚胎。暴露期间,温度保持在 $(27\pm 1)^\circ\text{C}$,光照和黑暗周期为 14 h : 10 h。暴露结束后,从每个烧杯中随机吸取 25 只幼鱼,放入 RNAlater 中,用于提取幼鱼中的 mRNA。

1.4 基因转录水平分析

根据笔者课题组前期已经建立好的方法^[31-32]进行 RNA 提取、cDNA 合成和实时荧光定量 PCR 分析。具体如下:利用 Trizol 方法提取胚胎中的 RNA;使用 Smart SpecTM Plus Spectrophotometer (Bio Rad, USA)检测 RNA 质量和浓度;所有 RNA 样品的 260 nm 和 280 nm 比值在 1.8 ~ 2.0。使用东洋纺试剂盒(ReverTra Ace[®] qPCR RT Master Mix with gDNA Remover, Japan)将 RNA 逆转录为 cDNA。目标基因引物均参考笔者课题组已发表的论文^[28,30,33-34]。引物设计和要求如下:使用 batchprimer3 设计跨越内含子的引物并利用 Primer-BLAST(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>)分析引物的特异性,再交由上海生工合成;引物的扩增效率均在 95% ~ 105% 之间。在 Applied BiosystemsTM QuantStudioTM 7 Flex 平台上进行荧光定量 PCR 分析。反应体系如下:总体积为 20 μL ,包括 10 μL THUNDERBIRD SYBR[®] qPCR Mix 试剂(Toyobo),0.4 μL 上游引物,0.4 μL 下游引物,2.5 μL cDNA 样品和 6.7 μL DEPC 水。反应条件:预变性后,在 $95^\circ\text{C}\times 15\text{ s}$ 、 $60^\circ\text{C}\times 60\text{ s}$ 进行 40 个循环。引物信息如表 1 中所示。Shi 等^[28]的研究已表明,斑马鱼长期暴露于去氢孕酮(dydrogesterone, DDG)后,*RpL13 α* 、*Actin- β* 和 *Ef1- α* 这 3 个内参基因表达均非常稳定。Liang 等^[29]的研究也表明,斑马鱼胚胎分别暴露于炔雌醇(17 α -ethinylestradiol, EE2)、甲炔诺酮(norgestrel, NGT)和 EE2+NGT 中 96 h 后,上述 3 个内参基因转录表达都非常稳定。因此,qPCR 的结果利用 *RpL13 α* 、*Actin- β* 和 *Ef1- α* 这 3 个内参基因转录表达水平的平均值对目标基因进行归一化分析。然后,采用 $-\Delta\Delta C_T$ 方法分析目标基因相对于内参基因的差异表达倍数^[35]。

1.5 暴露液中 ADD 和 AED 浓度测定

为了测定 AED 和 ADD 在暴露水中的实际浓

度,对溶剂对照组和各处理组中 ADD 和 AED 浓度进行了化学分析。由于暴露水溶液每天都更新,因此,从更换暴露液(T_0)到隔天更换暴露液前(T_{24})为一个周期。在暴露第 5 天,取每个处理组中 T_0 和 T_{24} 这 2 个时间点的水样。每个平行取 500 mL 水样,装入棕色玻璃瓶中。每个处理组 4 个平行。依照笔者课题组已经建立的方法^[9]对水样中的 ADD 和 AED 进行固相萃取和上机分析。操作流程简述如下:水样取好后,每个样品中加入 25 mL 甲醇和 0.2 mL 的 $\text{H}_2\text{SO}_4(2\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1})$;使用 0.7 μm 玻璃纤维滤膜(Whatman)过滤;完成后,每个水样中加入 50 μL 内标,充分摇匀;使用固相萃取柱(Oasis HLB,6 mL,500 mg)提取水样中的 ADD 和 AED;抽干柱子后,用 10 mL 色谱纯的乙酸乙酯洗脱固相萃取柱,氮气吹干,并用 0.5 mL 的甲醇(HPLC, Merck)定容,最后使用 1290 系列超高效液相色谱串联 G6495 三重四级杆质谱(UHPLC-MS/MS)上机检测^[9]。

1.6 数据分析

所有数据均利用 SPSS 进行差异性分析。利用单因素方差分析(One Way ANOVA)中的 Tukey 多重比较分析转录表达水平的显著性。当 $P<0.05$ 、 $P<0.01$ 和 $P<0.001$ 认为差异显著。利用 cluster3.0 对 qPCR 数据进行聚类分析。使用 Origin 绘制柱状图,图中所有结果均为平均值 $\pm$ 标准误差(SEM)。

2 结果(Results)

2.1 暴露浓度

由于暴露实验每 24 h 更新暴露液,每隔 24 h 为 1 个暴露周期。选取暴露的第 5 天收集暴露液样品,包括更换新鲜暴露液后样品(T_0)和更换暴露液前样品(T_{24}),分析 ADD 和 AED 的实际暴露浓度。检测分析发现,ADD 和 AED 的实际浓度在 T_0 时刻均与名义浓度较为接近。但是,经过 24 h 暴露后,除了低浓度组($5\text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$)外,其他 ADD 和 AED 的实际浓度均降低较多;其中,ADD 在 T_{24} 的实际浓度下降了 37.4% ~ 82.3%;AED 在 T_{24} 的实际浓度下降了 84.8% ~ 92.4%。暴露 24 h 内,ADD 的平均浓度分别为 4.48、30.0 和 231 $\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$,AED 的平均浓度分别为 3.64、21.7 和 230 $\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$ (表 2)。Fent 等^[23]的研究也表明,胚胎暴露于 AED 中 24 h 后,AED 有降解现象。这可能是由于 ADD 或 AED 吸附在暴露容器表面或斑马鱼体表造成的,也有可能是鱼缸内的微生物降解 ADD 或 AED 引起的。

表 1 用于 qPCR 分析的基因引物列表
Table 1 Primers used for real-time qPCR analysis

基因 Genes	基因号 Gene No.	上游序列(5'~3') Sense primer (5'~3')	下游序列(5'~3') Antisense primer (5'~3')	扩增长度/bp Product size/bp	扩增效率/% Efficiency/%
^a <i>clocka</i>	NM_130957	CACACGGTGGTCAGTTATGC	AACTGAGACTCGGAGCCAGA	119	99.6
^a <i>arntl2</i>	NM_131578	TCAAAGGAGCAACCAGCTCT	CACAGCCAACCACAAAGAGA	120	91.4
^a <i>per1b</i>	NM_212439	GGACAGGCCTCATCTAACCA	AGCAGGTCCAGCAGATCACT	119	93.8
^c <i>per2</i>	NM_182857.2	GGCAGCAAATCCACCACACT	CACGGCCACTGCGAAGATA	207	98
^a <i>nr1d2b</i>	NM_131065	AGCAGCTTTCAGTCTGCTC	GGAGAGTGATCGTGCTTTCC	117	94.8
^a <i>cry5</i>	NM_131788	CGGCATTAATCGATGGAGAT	GCTTTGGGAGAACCTCTGTG	119	94.2
^a <i>cry1ab</i>	NM_131790	CAGTTGCTTGCTTCCTCACA	ATCCAGCTTCTGCATTGAC	115	96.6
^a <i>si:ch211-132b12.7</i>	NM_001045055	CCGCTGCTCTGAGAAAGAC	CATGCAGAGATCCCTTGTG	119	95
^d <i>ar</i>	NM_001083123.1	CCACGAACCCCCGTTTATCT	TCCATCCATTGCCCCATCT	165	99
^d <i>esr1</i>	NM152959.1	ACTCTACCCATGTACCCTAAGG	CGGGTAGTATCCCACTGAAGC	151	100
^b <i>atf4b1</i>	NM_213233.1	AGGATGAGGAGAGCTCCGTG	GTCAGCAGGACATCTGACGG	139	96
^b <i>atf4b2</i>	NM_001103192.1	AGGTGAGGTGTTGTGGAAA	AAATCGTGGGAAAGGTAGGG	111	95
^d <i>gnrh2</i>	NM_181439.4	GGTCTCACGGCTGGTATCCT	TGCCTCGCAGAGCTTCACT	89	104
^d <i>lhb</i>	NM_205622.2	GGCTGGAATGGTGCTTCTT	GGAAAACGGGCTCTGTAAAC	202	99
^d <i>fshb</i>	NM_205624.1	GCAGGACTATGCTGGACAATG	CCACGGGGTACACGAAGACT	151	98
^d <i>hsd17b1</i>	NM_205584.1	GTCTGATGGGTCCTCTGGAA	TGCCGTGTCTCTTTTCTTCA	126	97
^d <i>hsd17b2</i>	NM_001040188.1	AAATCGTGCTTGGATGTGAA	GGACCTCTCCTGCCATACTG	118	100
^d <i>hsd17b3</i>	AY551081.1	ACATTACGGCTGAGGAGTTT	ATGCTGCCATACGTTTGGTC	74	102
^d <i>star</i>	NM_131663.1	GCCTGAGCAGAAGGGATTG	CCACCTGGGTTTGTGAAAGTAC	170	98
^d <i>cyp11a1</i>	AF527755.1	GAGGGGTGGACTCGGTTACTT	GCAATACGAGCGGCTGAGAT	109	99
^d <i>cyp19a1a</i>	NM_131154.2	CGGGACTGCCAGCAACTACT	TGAAGCCCTGGACCTGTGAG	264	103
^d <i>cyp11b</i>	DQ650710.1	CTGGGCCACACATCGAGAG	AGCGAACGGCAGAAATCC	171	106
^d <i>cyp17a1</i>	NM_212806.3	ATGAGGAGGGTGATGGTTTG	CACGCCAGGAAGAGAAAGAG	118	101
^d <i>vtg1</i>	NM_001044897.2	CCTTGAGAAAAATTGAGGCTATC	CTGAATGAACTCGGGAGTGGTA	161	107

注: ^a 引自 Shi 等^[28]; ^b 引自 Shi 等^[30]; ^c 引自 Liang 等^[33]; ^d 引自 Liang 等^[34]。

Note: ^a refer to Shi et al^[28]; ^b refer to Shi et al^[30]; ^c refer to Liang et al^[33]; ^d refer to Liang et al^[34].

表 2 ADD 和 AED 在暴露实验中名义浓度和实测浓度

Table 2 The nominal and measured concentrations of ADD and AED in the exposure experiment

化合物 Compounds	名义浓度/(ng·L ⁻¹) Nominal concentration/(ng·L ⁻¹)	实测浓度/(ng·L ⁻¹) Measured concentration/(ng·L ⁻¹)		
		<i>T</i> ₀	<i>T</i> ₂₄	均值 Average
ADD	SC	0	0	0
	5	4.55	4.41	4.48
	50	36.9	23.1	30.0
	500	393	69.5	231
AED	SC	1.97	1.55	1.76
	5	4.82	2.46	3.64
	50	37.6	5.70	21.7
	500	428	32.2	230

注: ADD 表示 1,4-雄烯二酮, AED 表示雄烯二酮; SC 表示溶剂对照组; *T*₀ 和 *T*₂₄ 表示取样时间(0 h 和 24 h); 实测浓度为平均值(*n*=2)。

Note: ADD stands for androstadienedione; AED stands for androstenedione; SC stands for solution control; *T*₀ and *T*₂₄ represents exposure time (0 h and 24 h); measured concentrations are given as mean (*n*=2 replicates).

2.2 ADD 和 AED 短期暴露对斑马鱼昼夜节律通路中基因转录表达的影响

如图1所示,ADD处理组中所有浓度均显著增大了 *per1b*、*nr1d2b*、*cry5* 和 *si:ch211-132b12.7* 的转录水平,4.48 ng·L⁻¹ 的 ADD 显著提高了 *per2* 的转录表达水平,30 ng·L⁻¹ 的 ADD 显著降低了 *arntl2* 的转录水平。3.64 ng·L⁻¹ AED 处理组显著增大了 *per1b*、*nr1d2b*、*cry5* 和 *si:ch211-132b12.7* 的转录水平,21.7 ng·L⁻¹ 的 AED 显著增大了 *per1b* 和 *nr1d2b* 的转录水平。230 ng·L⁻¹ 的 AED 显著降低了 *arntl2* 的表达水平($P<0.01$)。

2.3 ADD 和 AED 短期暴露对斑马鱼胚胎 HPG 轴中相关基因转录表达的影响

如图2(a)所示,231 ng·L⁻¹ ADD 暴露显著下调了 *gnrh2* 和 *atf4b2* 的转录水平;30 ng·L⁻¹ 的 ADD 暴露显著降低了 *fshb* 的转录水平;4.48 ng·L⁻¹ 和 231 ng·L⁻¹ 的 ADD 显著上调了 *esr* 的转录水平。如图2(b)所示,231 ng·L⁻¹ 的 ADD 显著下调了 *cyp17a1* 和 *vgtl* 的转录水平,30 ng·L⁻¹ 的 ADD 显著降低了 *cyp19a1a*、*hsd17b1* 和 *cyp11a1* 的表达水平,另外 4.48 ng·L⁻¹ 的 ADD 显著降低了 *cyp11b* 和 *hsd17b1* 的转录表达水平。在 AED 处理组中,3.64 ng·L⁻¹ 的 AED 显著上调了 *lhb* 的转录表达水平;230 ng·L⁻¹ 的 AED 显著下调了 *atf4b2* 的转录水平,并且显著上调了 *ar* 的转录水平(图2(c))。3.64 ng·L⁻¹ 和 21.7 ng·L⁻¹

的 AED 显著降低了 *cyp11b* 的转录水平($P<0.01$),230 ng·L⁻¹ 的 AED 显著降低了 *cyp11b* 和 *cyp19a1a* 的转录表达水平,3.64 ng·L⁻¹ 的 AED 显著降低了 *star* 的转录表达水平(图2(d))。

2.4 聚类分析

如图3所示,聚类分析结果表明,ADD-L、ADD-M 和 ADD-H 均被聚集到一起,AED-L 和 AED-M 聚类到一起。ADD 和 AED 对斑马鱼昼夜节律和胚胎 HPG 轴相关基因的影响具有物质依赖性。其次,昼夜节律通路中基因大部分被富集到聚类图中下面部分,HPG 轴相关基因被富集到聚类图中的上面部分,ADD 和 AED 对昼夜节律和 HPG 轴的影响差异较大。

3 讨论 (Discussion)

本研究分析了 ADD 和 AED 短期暴露对斑马鱼胚胎的影响。结果显示,ADD 和 AED 可以影响昼夜节律和 HPG 轴相关通路基因的转录表达,特别是影响了昼夜节律通路中基因的转录表达水平。

qPCR 的结果显示,斑马鱼胚胎暴露于 4.48 ng·L⁻¹ ADD 后, *per1b*、*nr1d2b* 和 *si:ch211-132b12.7* 转录表达水平分别上调了 3.19 倍、2.72 倍和 3.63 倍。而 3.64 ng·L⁻¹ AED 暴露后 *per1b*、*nr1d2b* 和 *si:ch211-132b12.7* 转录表达水平分别上调了 2.07 倍、1.83 倍和 1.09 倍。另外,低浓度处理下,ADD 暴露

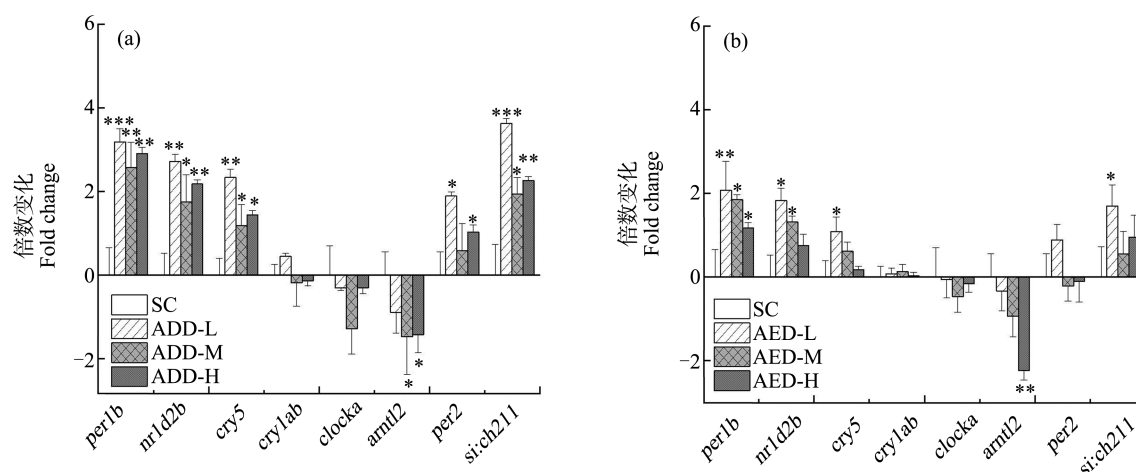


图1 ADD(a)和AED(b)短期暴露对斑马鱼胚胎昼夜节律相关基因转录表达的影响

注: ADD-L、ADD-M 和 ADD-H 处理组中 ADD 浓度分别为 4.48、30.0 和 231 ng·L⁻¹;

AED-L、AED-M 和 AED-H 处理组中 AED 浓度分别为 3.64、21.7 和 230 ng·L⁻¹;下同。

Fig. 1 Transcriptional alteration of genes related to circadian rhythm in zebrafish embryos exposed to ADD (a) and AED (b)

Note: The ADD concentrations in ADD-L, ADD-M and ADD-H treatment groups are 4.48, 30.0 and 231 ng·L⁻¹;

the AED concentrations in AED-L, AED-M and AED-H treatment groups are 3.64, 21.7 and 230 ng·L⁻¹; the same below.

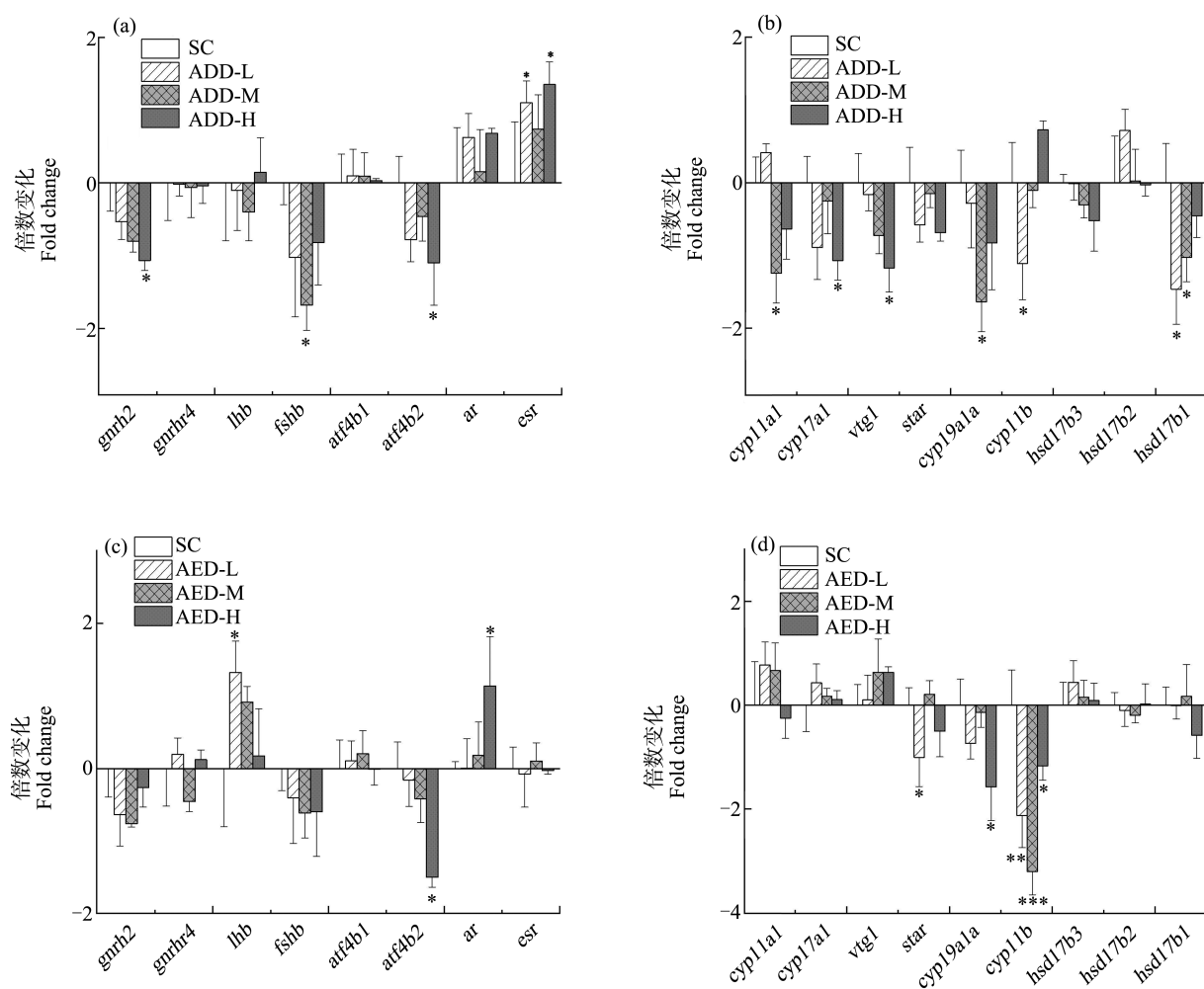


图2 ADD(a,b)和AED(c,d)短期暴露对斑马鱼胚胎下丘脑-垂体-性腺(HPG)轴相关基因转录表达的影响

Fig. 2 Transcriptional alteration of genes related to hypothalamic-pituitary-gonadal (HPG) axis in zebrafish embryos exposed to ADD (a, b) and AED (c, d)

对胚胎昼夜节律通路中基因转录表达的影响也较AED更强。目前,关于ADD和AED对斑马鱼昼夜节律相关通路中基因影响的相关研究很少。在本研究中,环境相关浓度ADD和AED短期暴露后,可以强烈影响斑马鱼昼夜节律通路中*per1b*、*nr1d2b*和*si:ch211-132b12.7*等基因的转录表达。同时,多项研究发现,低浓度的孕激素和雌激素单一暴露或者联合暴露均可显著影响昼夜节律相关通路中基因的转录表达^[1,28-29]。这些结果表明,昼夜节律通路中相关基因对类固醇类激素暴露较为敏感。

在昼夜节律通路中包含一个负反馈环和一个正反馈环。负反馈环主要包括生物钟基因(*per*)和隐花色素基因(*cry*)编码的PER和CRY蛋白通过作用时钟节律调节因子a基因(*clocka*)和芳香烃受体核转录蛋白样2基因(*arntl2*)编码的CLOCK和BMAL二

聚体,反馈抑制*per*和*cry*基因自身的转录^[27,36];正反馈环主要包括CLOCK和BMAL二聚体与含有E-box增强子反式作用元件结合调控*per*和*cry*的转录表达^[27,36]。在本研究中,雄激素ADD和AED均显著增加了昼夜节律通路中生物钟基因(*per1b*)、核受体亚族1的D群基因(*nr1d2b*)、隐花色素基因(*cry5*)和*si:ch211-132b12.7*的转录水平,却降低了*clocka*和*arntl2*的转录表达水平。Shi等^[28]的研究显示,*si:ch211-132b12.7*可负调控昼夜节律通路。高转录表达水平的*si:ch211-132b12.7*表示ADD和AED暴露后,昼夜节律通路可能主要以负反馈环应答为主。这与上调的*per*和*cry*以及下调的*clocka*和*arntl2*吻合。这些结果表明,ADD和AED暴露后,改变了斑马鱼胚胎中昼夜节律网络。昼夜节律是维持高等生物24 h节律的关键通路,可以调控睡

眠、内分泌、细胞凋亡甚至生殖发育等多个生物过程^[27]。比如,内源性节律生物钟可以调节啮齿动物生殖周期^[27]。本研究分析的昼夜节律相关基因也参与多种生物过程。此外,*nr1d2b* 是一类核受体,主要是与激素类信号分子结合,调控目的基因的转录表达^[36]。过度表达的 *nr1d2b* 则表示 AED 和 ADD 可能通过 *nr1d2b* 影响斑马鱼胚胎的激素应答效应。*cry* 和 *per* 基因均在维护眼睛正常的视觉功能方面具有重要的作用^[37-38]。上调的 *cry5* 和 *per1b* 基因转录表达表明,ADD 和 AED 可能会通过昼夜节律通路影响斑马鱼眼睛的正常功能^[39]。综上所述,昼夜节律的变化可能会影响多个下游通路,如激素应答等。

HPG 轴在内分泌系统中扮演着重要的角色^[25-27]。因此,本研究进一步分析了 ADD 和 AED 对斑马鱼 HPG 轴相关通路中基因转录表达的影响。通过研究发现,ADD 降低 *lhb* 和 *fshb* 的转录表达水

平,而 AED 增加 *lhb* 的转录表达水平。*lhb* 和 *fshb* 主要由下丘脑垂体释放,经过血液循环作用于性腺,调节性腺相关生理过程,如激素合成等^[25]。*lhb* 和 *fshb* 的转录表达变化则可能会对激素的生物合成造成一定的影响。在本研究中,ADD 和 AED 均降低 *cyp19a1a* 和 *cyp11b* 的转录表达水平。其中,4.48 ng·L⁻¹ 和 30.0 ng·L⁻¹ ADD 分别显著抑制 *cyp19a1a* 和 *cyp11b* 的转录表达。3.64、21.7 和 230 ng·L⁻¹ 的 AED 分别下调 *cyp19a1a* 和 *cyp11b* 的转录表达水平。Fent 等^[23]研究也发现,斑马鱼胚胎暴露于 AED 中 96 h 后,*cyp19a1a* 和 *cyp11b* 的转录表达被抑制。*cyp19a1a* 可表达并合成雌激素酶,主要催化雌激素生物合成的最后一步反应,*cyp11b* 则参与合成雄激素^[40-41]。低转录表达的 *cyp19a1a* 和 *cyp11b* 预示着 ADD 和 AED 可能会抑制雌激素和雄激素的生物合成。

此外,本研究还分析了 ADD 和 AED 对雄激素受体(*ar*)、雌激素受体(*esr*)和卵黄蛋白(*vtg1*)基因的转录表达的影响。研究发现,230 ng·L⁻¹ AED 可以增加 *ar* 的转录表达水平;231 ng·L⁻¹ ADD 抑制 *vtg1* 的转录表达,却增加了 *esr* 的转录表达水平。Fent 等^[23]研究发现,6.56 μg·L⁻¹ AED 暴露 96 h 后,可增加斑马鱼胚胎的 *ar* 和 *esr* 的转录表达水平,并抑制 *vtg1* 的转录表达水平。多项研究表明,AED 能引起斑马鱼性逆转,并诱导雌性黑头呆鱼雄性化^[3,18-19]。因此,不难理解 AED 可以诱导斑马鱼胚胎中雄激素受体的转录表达。而 ADD 影响 *esr* 和 *vtg1* 的转录表达水平,这提示 ADD 对斑马鱼胚胎可能还有其他多种激素效应,仍需进一步研究。

综上所述,斑马鱼胚胎短期暴露于 ADD 和 AED 后,昼夜节律通路中 *per1b*、*nr1d2b* 和 *cry5* 的转录表达水平均显著增加,甚至环境相关浓度的 ADD 和 AED 暴露也可产生影响。ADD 和 AED 可能通过改变昼夜节律通路中的基因表达影响下游其他的生物过程和通路。此外,ADD 和 AED 影响了 HPG 轴中 *lhb* 和 *fshb* 的转录表达水平,同时也抑制了雌激素合成相关的 *cyp19a1a* 和雄激素合成相关的 *hsd11b* 的转录表达。这表明,ADD 和 AED 对斑马鱼胚胎具有潜在的内分泌干扰效应。由此可知,雄激素 ADD 和 AED 短期暴露 144 h 后,可影响斑马鱼胚胎内分泌相关的生物学通路中基因转录表达,对斑马鱼具有潜在的内分泌干扰效应。后续应研究环境相关浓度 ADD 和 AED 长期暴露后,对斑

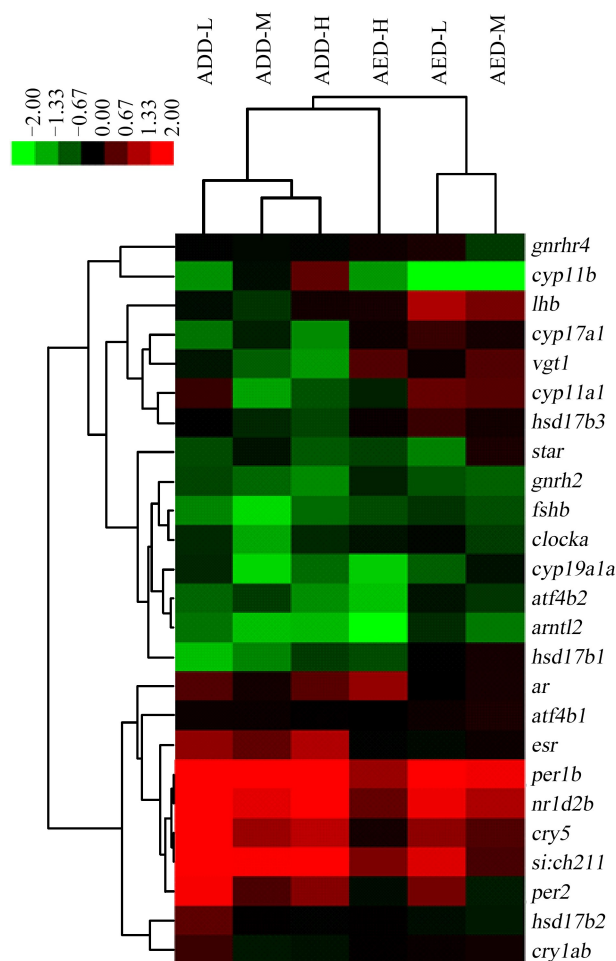


图3 聚类分析 HPG 轴和昼夜节律相关基因的 qPCR 数据
Fig. 3 Hierarchical clustering analysis of qPCR data for genes related to HPG axis and circadian rhythm

马鱼产生的激素效应。

通讯作者简介:应光国(1964—),男,研究员,主要研究方向为水土环境污染,重点研究抗生素、抗性基因、激素和农药等新型污染物的污染特征、环境行为与生态健康效应。

共同通讯作者简介:史文俊(1987—),男,环境科学博士,博士后,主要研究方向为环境毒理学。

参考文献 (References) :

- [1] Fent K. Progestins as endocrine disrupters in aquatic ecosystems: Concentrations, effects and risk assessment [J]. *Environment International*, 2015, 84: 115-130
- [2] Willi R A, Salgueiro-González N, Faltermann S, et al. Environmental glucocorticoids corticosterone, betamethasone and flumethasone induce more potent physiological than transcriptional effects in zebrafish embryos [J]. *Science of the Total Environment*, 2019, 672: 183-191
- [3] Hou L P, Yang Y, Shu H, et al. Masculinization and reproductive effects in western mosquitofish (*Gambusia affinis*) after long-term exposure to androstenedione [J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2018, 147: 509-515
- [4] Wang X, Hill D, Tillitt D E, et al. Bisphenol A and 17 α -ethinylestradiol-induced transgenerational differences in expression of osmoregulatory genes in the gill of medaka (*Oryzias latipes*) [J]. *Aquatic Toxicology*, 2019, 211: 227-234
- [5] Streck G. Chemical and biological analysis of estrogenic, progestagenic and androgenic steroids in the environment [J]. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 2009, 28(6): 635-652
- [6] Chang H, Wu S, Hu J, et al. Trace analysis of androgens and progestogens in environmental waters by ultra-performance liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry [J]. *Journal of Chromatography A*, 2008, 1195(1-2): 44-51
- [7] Chang H, Wan Y, Hu J. Determination and source apportionment of five classes of steroid hormones in urban rivers [J]. *Environmental Science & Technology*, 2009, 43(20): 7691-7698
- [8] Chang H, Wan Y, Wu S, et al. Occurrence of androgens and progestogens in wastewater treatment plants and receiving river waters: Comparison to estrogens [J]. *Water Research*, 2011, 45(2): 732-740
- [9] Liu S, Ying G G, Zhao J L, et al. Trace analysis of 28 steroids in surface water, wastewater and sludge samples by rapid resolution liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry [J]. *Journal of Chromatography A*, 2011, 1218(10): 1367-1378
- [10] Liu S, Ying G G, Zhao J L, et al. Occurrence and fate of androgens, estrogens, glucocorticoids and progestagens in two different types of municipal wastewater treatment plants [J]. *Journal of Environmental Monitoring*, 2012, 14(2): 482-491
- [11] Liu S, Chen H, Xu X R, et al. Steroids in marine aquaculture farms surrounding Hailing Island, South China: Occurrence, bioconcentration, and human dietary exposure [J]. *Science of the Total Environment*, 2015, 502: 400-407
- [12] Liu S, Xu X R, Qi Z H, et al. Steroid bioaccumulation profiles in typical freshwater aquaculture environments of South China and their human health risks via fish consumption [J]. *Environmental Pollution*, 2017, 228: 72-81
- [13] Zhang K, Fent K. Determination of two progestin metabolites (17 α -hydroxypregnanolone and pregnanediol) and different classes of steroids (androgens, estrogens, corticosteroids, progestins) in rivers and wastewaters by high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (HPLC-MS/MS) [J]. *Science of the Total Environment*, 2018, 610: 1164-1172
- [14] Zhang J N, Ying G G, Yang Y Y, et al. Occurrence, fate and risk assessment of androgens in ten wastewater treatment plants and receiving rivers of South China [J]. *Chemosphere*, 2018, 201: 644-654
- [15] Vulliet E, Cren-Olivé C. Screening of pharmaceuticals and hormones at the regional scale, in surface and groundwaters intended to human consumption [J]. *Environmental Pollution*, 2011, 159(10): 2929-2934
- [16] Fan Z, Wu S, Chang H, et al. Behaviors of glucocorticoids, androgens and progestogens in a municipal sewage treatment plant: Comparison to estrogens [J]. *Environmental Science & Technology*, 2011, 45(7): 2725-2733
- [17] 韩伟, 李艳霞, 杨明, 等. 环境雄激素的危害、来源与环境行为[J]. *生态学报*, 2010, 30(6): 1594-1603
Han W, Li Y X, Yang M, et al. Effects, sources and behaviors of environmental androgens [J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2010, 30(6): 1594-1603 (in Chinese)
- [18] Bain P A, Ogino Y, Miyagawa S, et al. Differential ligand selectivity of androgen receptors α and β from Murray - Darling rainbowfish (*Melanotaenia fluviatilis*) [J]. *General and Comparative Endocrinology*, 2015, 212: 84-91
- [19] Stanko J P, Angus R A. *In vivo* assessment of the capacity of androstenedione to masculinize female mosquitofish (*Gambusia affinis*) exposed through dietary and static renewal methods [J]. *Environmental Toxicology and Chem-*

- istry, 2007, 26(5): 920-926
- [20] 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
- [21] Jenkins R, Angus R A, McNatt H, et al. Identification of androstenedione in a river containing paper mill effluent [J]. *Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal*, 2001, 20(6): 1325-1331
- [22] Parks L G, Lambright C S, Orlando E F, et al. Masculinization of female mosquitofish in agonist activity [J]. *Toxicological Sciences*, 2001, 62(2): 257-267
- [23] Fent K, Siegenthaler P F, Schmid A A. Transcriptional effects of androstenedione and 17 α -hydroxyprogesterone in zebrafish embryos [J]. *Aquatic Toxicology*, 2018, 202: 1-5
- [24] 古明宗, 曾科, 杨华杰, 等. 反式雄烯二酮对食蚊鱼的生长发育和第二性征的影响[J]. *湖南农业科学*, 2017 (1): 63-67
- Gu M Z, Zeng K, Yang H J, et al. The toxic effects of androgen trans-androstenedione on the growth and the secondary sex characteristic of *Gambusia affinis* [J]. *Hunan Agricultural Sciences*, 2017(1): 63-67 (in Chinese)
- [25] 常菊花. 丁草胺对斑马鱼的内分泌干扰效应研究[D]. 南京: 南京农业大学, 2012: 1-113
- Chang J H. Endocrine disrupting effects of butachlor on zebrafish (*Danio rerio*) [D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2012: 1-113 (in Chinese)
- [26] Ruf F, Sealfon S C. Genomics view of gonadotrope signaling circuits [J]. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 2004, 15(7): 331-338
- [27] Gachon F, Nagoshi E, Brown S A, et al. The mammalian circadian timing system: From gene expression to physiology [J]. *Chromosoma*, 2004, 113(3): 103-112
- [28] Shi W J, Jiang Y X, Huang G Y, et al. Dihydroprogesterone causes male bias and accelerates sperm maturation in zebrafish (*Danio rerio*) [J]. *Environmental Science & Technology*, 2018, 52(15): 8903-8911
- [29] Liang Y Q, Huang G Y, Zhen Z, et al. The effects of binary mixtures of estradiol and progesterone on transcriptional expression profiles of genes involved in hypothalamic-pituitary-gonadal axis and circadian rhythm signaling in embryonic zebrafish (*Danio rerio*) [J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2019, 174: 540-548
- [30] Shi W J, Ying G G, Huang G Y, et al. Transcriptional and biochemical alterations in zebrafish eleuthero-embryos (*Danio rerio*) after exposure to synthetic progesterone and dihydroprogesterone [J]. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 2017, 99(1): 39-45
- [31] Huang G Y, Ying G G, Liang Y Q, et al. Hormonal effects of tetrabromobisphenol A using a combination of *in vitro* and *in vivo* assays [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 2013, 157(4): 344-351
- [32] Huang G Y, Ying G G, Liang Y Q, et al. Effects of steroid hormones on reproduction-and detoxification-related gene expression in adult male mosquitofish, (*Gambusia affinis*) [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 2013, 158(1): 36-43
- [33] Liang Y Q, Huang G Y, Zhao J L, et al. Transcriptional alterations induced by binary mixtures of ethinylestradiol and norgestrel during the early development of zebrafish (*Danio rerio*) [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 2017, 195: 60-67
- [34] Liang Y Q, Huang G Y, Liu S S, et al. Long-term exposure to environmentally relevant concentrations of progesterone and norgestrel affects sex differentiation in zebrafish (*Danio rerio*) [J]. *Aquatic Toxicology*, 2015, 160: 172-179
- [35] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta C_T$ method [J]. *Methods*, 2001, 25(4): 402-408
- [36] Ko C H, Takahashi J S. Molecular components of the mammalian circadian clock [J]. *Human Molecular Genetics*, 2006, 15(suppl2): R271-R277
- [37] Tamai T K, Young L C, Whitmore D. Light signaling to the zebrafish circadian clock by Cryptochrome 1a [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2007, 104(37): 14712-14717
- [38] Huang D, Wang M, Yin W, et al. Zebrafish lacking circadian gene *per2* exhibit visual function deficiency [J]. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 2018, 12: 53
- [39] Frøland Steindal I A, Whitmore D. Circadian clocks in fish—What have we learned so far? [J]. *Biology*, 2019, 8 (1): 17
- [40] Busby E R, Roch G J, Sherwood N M. Endocrinology of Zebrafish: A Small Fish with a Large Gene Pool [M]// *Fish Physiology*. Academic Press, 2010, 29: 173-247
- [41] Tokarz J, Möller G, de Angelis M H, et al. Zebrafish and steroids: What do we know and what do we need to know? [J]. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 2013, 137: 165-173