

DOI:10.7524/AJE.1673-5897.20210429002

杨娜, 谭婷, 杨超超, 等. 菲对泥鳅(*Misgurnus anguillicaudatus*)肝性腺指数和卵黄蛋白原转录水平的影响[J]. 生态毒理学报, 2022, 17(5): 497-506  
Yang N, Tan T, Yang C C, et al. Effects of phenanthrene on hepatic gonadal index and vitellogenin gene expression in *Misgurnus anguillicaudatus* [J]. Asian Journal of Ecotoxicology, 2022, 17(5): 497-506 (in Chinese)

## 菲对泥鳅 (*Misgurnus anguillicaudatus*) 肝性腺指数和卵黄蛋白原转录水平的影响

杨娜<sup>1,2</sup>, 谭婷<sup>1,2</sup>, 杨超超<sup>1,2</sup>, 吴航利<sup>1,2</sup>, 王佳<sup>1,2</sup>, 雷忻<sup>1,2,\*</sup>

1. 延安大学生命科学学院, 延安 716000

2. 延安市生态恢复重点实验室, 延安 716000

收稿日期: 2021-04-29 录用日期: 2021-06-19

**摘要:** 为探究菲(phenanthrene, PHE)对鱼类的内分泌干扰效应及生殖毒性损伤, 将泥鳅(*Misgurnus anguillicaudatus*)暴露于菲浓度为 1.33、1.77、2.36 和 3.13 mg·L<sup>-1</sup> 的水体中 28 d, 分别于 7、14 和 28 d 取样, 采用称重法测定肝脏指数、性腺指数; qRT-PCR 法检测卵黄蛋白原基因(*vtg1*、*vtgc*) 在泥鳅肝脏和性腺的转录水平; 酶联免疫吸附法测定卵黄蛋白原(vitellogenin, VTG)含量。结果显示: (1) PHE 胁迫使雄性泥鳅肝脏指数升高、性腺指数下降; 高浓度 PHE 胁迫引起雌性泥鳅肝脏指数上升, 性腺指数升高; (2) PHE 胁迫导致泥鳅 *vtg1* 和 *vtgc* 表达量显著升高, 雄性泥鳅 *vtg1* 和 *vtgc* 转录水平与菲胁迫浓度之间呈现低浓度诱导、高浓度抑制的趋势; (3) PHE 暴露使泥鳅肝脏、性腺 VTG 含量显著升高, 且在 PHE 较高浓度组中尤为明显。这表明, 一定浓度 PHE 暴露可以导致泥鳅肝脏和性腺发育异常; 较低浓度 PHE 暴露可诱导肝脏和性腺 *vtg1*、*vtgc* 转录水平的表达, 而高浓度 PHE 则抑制上述基因表达, PHE 胁迫引起 *vtg1* 和 *vtgc* 表达水平存在差异; PHE 可以显著诱导肝脏和性腺 VTG 的产生。因此, 高浓度 PHE 干扰了泥鳅的性腺作用轴。

**关键词:** 菲; 泥鳅; 慢性毒性; 卵黄蛋白原

文章编号: 1673-5897(2022)5-497-10 中图分类号: X171.5 文献标识码: A

## Effects of Phenanthrene on Hepatic Gonadal Index and Vitellogenin Gene Expression in *Misgurnus anguillicaudatus*

Yang Na<sup>1,2</sup>, Tan Ting<sup>1,2</sup>, Yang Chaochao<sup>1,2</sup>, Wu Hangli<sup>1,2</sup>, Wang Jia<sup>1,2</sup>, Lei Xin<sup>1,2,\*</sup>

1. College of Life Sciences, Yan'an University, Yan'an 716000, China

2. Key Laboratory for Ecological Restoration in Yan'an, Yan'an 716000, China

Received 29 April 2021 accepted 19 June 2021

**Abstract:** To study the effects of phenanthrene (PHE) on fish endocrine disruption and reproductive toxicity, loach (*Misgurnus anguillicaudatus*) was exposed to 1.33, 1.77, 2.36 and 3.13 mg·L<sup>-1</sup> for 28 d. During the PHE treatment, the liver and gonad tissues of loach were collected on 7, 14 and 28 d. The hepatosomatic index (HSI) and gonadosomatic index (GSI) were measured by weighing method, the expression of vitellogenin 1 (*vtg1*) and vitellogenin c (*vtgc*) in the liver and gonad of *M. anguillicaudatus* was detected by qRT-PCR, and the content of vitellogenin

基金项目: 陕西省自然科学基金面上项目(2021JM-417); 延安市科技惠民计划项目(2017HM-05); 陕西省大学生创新创业训练计划项目(S201910719037)

第一作者: 杨娜(1997—), 女, 硕士, 研究方向为水生态毒理学, E-mail: yangna970618@126.com

\* 通讯作者(Corresponding author), E-mail: leizz66@126.com

(VTG) was determined by enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). The results showed that: (1) PHE stress significantly increased HSI and decreased GSI of male, and significantly increased HSI and GSI of female. (2) PHE stress caused significant increase of *vtg1* and *vtgc* expression in *M. anguillicaudatus*, and the expression of *vtg1* and *vtgc* in male *M. anguillicaudatus* showed a trend of low concentration induction and high concentration inhibition. (3) PHE exposure significantly increased VTG content in liver and gonad of *M. anguillicaudatus*, especially in the group with higher concentration of PHE. It is suggested that certain concentration of PHE could induce abnormal development of liver and gonad of *M. anguillicaudatus*. Additionally, the lower concentration of PHE could induce expression of *vtg1* and *vtgc* in liver and gonad, while the higher concentration of PHE could inhibit the expression of those two genes, and the expression of *vtg1* and *vtgc* were different under PHE stress. Moreover, PHE could induce the production of VTG in liver and gonad of loach. Therefore, the gonadal axis of *M. anguillicaudatus* was disturbed by PHE contamination.

**Keywords:** phenanthrene; *Misgurnus anguillicaudatus*; chronic toxicity; vitellogenin

菲(phenanthrene, PHE)属于多环芳烃类化合物(polycyclic aromatic hydrocarbons, PAHs)中典型化合物,是煤焦油中含量较高的组分,约占煤焦油的5%<sup>[1]</sup>。据报道,PHE会影响鱼类生长,改变机体的激素合成与代谢,诱导或阻断某些生理反应,影响繁殖和一些内分泌过程<sup>[2]</sup>。目前在我国许多水域都检测出PHE,已经严重污染水体环境,威胁水生生物的生存<sup>[3]</sup>。近年来,采用Person相关性指标评价延河水质各因子的污染指数中,石油类污染指数已有所缓解,但水质仍处于轻度污染状态,石油类污染因子仍需严格监控<sup>[4-5]</sup>。

研究表明,PHE对河蚬(*Corbicula fluminea*)、中华绒螯蟹(*Eriocheir sinensis* H. Milne-Edwards)、双齿围沙蚕(*Perinereis aibuhitensis*)、红鳍笛鲷(*Lutjanus erythropterus*)和斑马鱼(*Danio rerio*)等水生生物均有潜在毒性<sup>[6-9]</sup>。急性毒性静水实验表明,PHE对中华绒螯蟹、河蚬等淡水重要经济水产动物具有高毒性<sup>[6-7]</sup>。一定剂量的PHE会导致红鳍笛鲷肝脏中超氧化物歧化酶活性、丙二醛含量及乙酰胆碱酯酶活性发生显著变化,通过氧化损伤对机体进行毒害作用<sup>[8]</sup>。但这些研究涉及分子水平的并不多。泥鳅(*Misgurnus anguillicaudatus*)属于鳅科(Cobitidae)泥鳅属(*Misgurnus*),是生活在水底淤泥内的一类淡水硬骨鱼,其适应范围广泛、钻泥性强,具有较高的经济价值和环境价值,在实验室条件下易于驯养<sup>[10-11]</sup>。卵黄蛋白原(vitellogenin, VTG)作为雌激素效应的敏感生物标志物,是在内源性雌激素或外源性雌激素作用下,作用于卵生动物肝细胞的雌激素受体后在肝细胞中合成,经血液运输至性腺,为卵子的发生及幼体的孵化和发育提供营养和功能性物质<sup>[12-13]</sup>。硬骨鱼VTG可分为

VTGAa、VTGAb和VTGC这3个分支,其中VTGA普遍存在于硬骨鱼中,属*vtg1*基因编码产物,VTGC存在于大多数鱼类中<sup>[14-15]</sup>。本研究以泥鳅为实验材料,检测分析PHE胁迫下性腺指数(gonadosomatic index, GSI)、肝脏指数(hepatosomatic index, HSI)和2种*vtg*(*vtg1*、*vtgc*)mRNA表达以及VTG水平的影响,探讨PHE对泥鳅的雌激素毒性效应,以为多环芳烃类污染物PHE的环境评价提供科学依据。

## 1 材料与方法 (Materials and methods)

### 1.1 实验动物

选取6月龄泥鳅(*Misgurnus anguillicaudatus*)为实验动物,平均体质量为 $(3.24 \pm 0.43)$  g,平均体长为 $(8.5 \pm 1.1)$  cm,购自陕西省水产动物养殖基地。在实验室条件下驯养2周。使用自然晾晒96 h的脱氯自来水(pH值7.5),水温 $(24 \pm 2)$  °C,正常光照,期间喂食少量面包屑并及时更换水。在驯养期间密切观察泥鳅健康情况,及时去除体色异常、受伤受损及死亡的泥鳅。取样的前3 d停止投食,挑取体格强健活跃的泥鳅进行实验。

### 1.2 染毒实验

根据预实验,在安全浓度之下设置4个PHE(纯度>95%,源叶生物)浓度处理组:1.33、1.77、2.36和 $3.13 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ,同时设置对照组,每组设3个平行处理组,进行28 d染毒实验。每桶配制3 L PHE溶液,每桶放入20尾泥鳅(雌雄比4:6)。暴露期间每天更换全部药液以保持PHE浓度的稳定。

### 1.3 性腺指数、肝脏指数的测定

在28 d染毒周期内,分别于7、14和28 d进行取样,并称量所取出的泥鳅肝脏、性腺质量,计算GSI、HSI。并取肝脏、精巢和卵巢组织约50~100

mg,液氮保存待提取 RNA。

1.4 *vtg1*、*vtgc* mRNA 表达的检测

采用 PCR 和 qRT-PCR 方法分别进行定性、定量检测。使用 Torizol 试剂盒提取总 RNA,并检测所提取样品总 RNA 纯度( $A_{260}/A_{280}$ :1.8 ~ 2.2)与浓度,将其稀释到 200 ~ 500 ng·μL<sup>-1</sup>左右,取 1 μL 进行去 gDNA 和反转录(反转录试剂盒,宝生物工程(上海)有限公司)。使用 Primer 6 软件设计引物序列(表 1),合成操作由生工生物工程(上海)股份有限公司完成。按照试剂盒说明书完成 qRT-PCR 实验,根据公式:倍数变化 =  $2^{-\Delta\Delta C_t} = 2^{-[(C_{t\text{处理组目的基因}} - C_{t\text{处理组内参基因}}) - (C_{t\text{对照组目的基因}} - C_{t\text{对照组内参基因}})]}$  计算。

1.5 VTG 含量的测定

取肝脏、性腺,以 1 : 19 的体积比加入 PBS 缓冲液,在 4 ℃ 3 000 r·min<sup>-1</sup>离心 15 min 后,采用鱼类卵黄蛋白原(VTG)ELISA 检测试剂盒(上海酶联生物科技有限公司,中国)测定泥鳅肝脏、性腺中 VTG 含量,每个平行处理组测定 3 次,试剂盒检测范围 30 ~ 480 ng·mL<sup>-1</sup>。

1.6 数据处理

采用 SPSS20.0、Origin 统计软件进行显著性分析与制图,数据均用平均值±标准差(Mean±SD)表示,采用 *T* 检验验证该组数据是否符合正态分布,各组间的差异采用单变量方差分析及 Duncun 多重比较, $P<0.05$ 、 $P<0.01$  为差异显著。

2 结果 (Results)

2.1 菲胁迫下泥鳅肝脏指数、性腺指数的变化

图 1(a)中,随着 PHE 浓度的升高,雄性泥鳅 HSI

呈上升趋势,且胁迫时间越长,上升趋势越显著。在 2.36 mg·L<sup>-1</sup>、3.13 mg·L<sup>-1</sup> 组,HSI 显著升高( $P<0.05$ )。在相同浓度、不同暴露时间之间,雄性泥鳅 HSI 无显著变化。

图 1(b)中,随着 PHE 浓度的升高,雌性泥鳅 HSI 呈上升趋势。在暴露 14 d,雌性泥鳅 HSI 随暴露剂量的升高而上升,但与对照组相比无显著差异;而 7 d、28 d,在 3.13 mg·L<sup>-1</sup> 组雌性泥鳅 HSI 显著升高( $P<0.05$ )。

图 2(a)中,随着 PHE 浓度的升高,雄性泥鳅 GSI 呈显著下降趋势。同一 PHE 浓度组,随着暴露时间的延长雄性泥鳅 GSI 呈下降趋势。在 1.33 mg·L<sup>-1</sup> 组 PHE 胁迫下,GSI 在 7、14 和 28 d 均发生显著变化( $P<0.05$ )。与对照组相比,其他 3 个 PHE 暴露组,雄性泥鳅 GSI 也呈显著性差异( $P<0.05$ )。

图 2(b)中,各处理组与溶剂对照组相比,雌性泥鳅 GSI 明显上升。在 1.33 mg·L<sup>-1</sup> 组,雌性泥鳅 GSI

表 1 目的基因和内参基因引物序列  
Table 1 Target gene and internal reference gene primer sequences

| 引物名称<br>Primer name | 序列(5' ~ 3')<br>Sequence (5' ~ 3') |
|---------------------|-----------------------------------|
| <i>vtg1</i> -F      | ATGAGAAAGTCGCCGCAATC              |
| <i>vtg1</i> -R      | GCCCATGACTTTCAAAGCCA              |
| <i>vtgc</i> -F      | CTGGATATGGCTGTTGGTGC              |
| <i>vtgc</i> -R      | ACTTGCAAGCAGTCGGAAG               |
| <i>β-actin</i> -F   | AGAGAGAAATTGTCCGTGAC              |
| <i>β-actin</i> -R   | GCCAATGGTGATGACCTGT               |

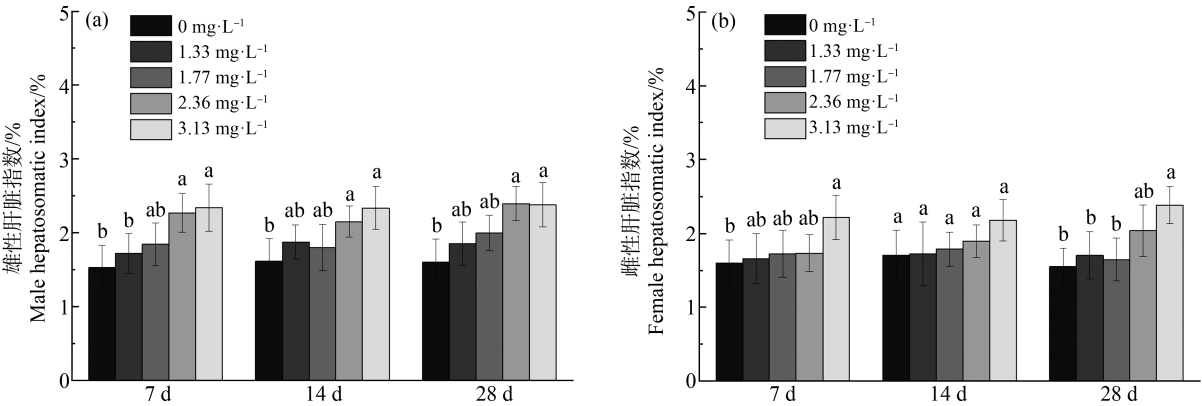


图 1 菲对泥鳅肝脏指数的影响

注:相同字母表示在相同时间下、不同浓度之间无显著差异,反之则存在显著差异;下同。

Fig. 1 Effect of phenanthrene on hepatosomatic index of *Misgurnus anguillicaudatus*

Note: The same letter means that at the same time, there is no significant difference between different concentrations, otherwise there is a significant difference; the same below.

没有发生显著变化。在  $1.77 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  组, 雌性泥鳅暴露 28 d 时 GSI 显著上升 ( $P < 0.05$ ), 在  $3.13 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  组 GSI 达到最大值。

## 2.2 菲胁迫下泥鳅卵黄蛋白原基因表达的变化

### 2.2.1 样品总 RNA 质量检测及 PCR 扩增验证

取肝脏、精巢和卵巢样品, 用 NanoDrop2000 测得各样品中总 RNA  $A_{260}/A_{280}$  和  $A_{260}/A_{230}$  比值都在 1.9 ~ 2.1 之间, 表明提取的总 RNA 污染较少, 纯度高, 可以进行后续实验。选取各处理组反转录样品进行 PCR, 目标条带清晰, 可以进行后续实验(图 3)。

### 2.2.2 菲胁迫下泥鳅 *vtg* mRNA 表达量的变化

#### 2.2.2.1 雄性泥鳅肝脏 *vtg* 表达量的变化

由图 4 可知, 雄性泥鳅肝脏 *vtg1* 和 *vtgc* mRNA 水平整体呈现升高的趋势。暴露 7 d, *vtg1* 和 *vtgc* mRNA 水平随 PHE 浓度上升呈上升趋势, 分别在

$3.13 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  组和  $1.77 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  组出现显著升高 ( $P < 0.05$ )。暴露 14 d, 雄性泥鳅肝脏 *vtg1* 表达量随 PHE 浓度升高呈先上升后下降的趋势, *vtgc* 表达量随 PHE 浓度升高而上升。暴露 28 d, 雄性泥鳅肝脏 *vtg1* 和 *vtgc* 表达量与剂量呈倒 U 型曲线关系。此外, 比较相同浓度不同时间 *vtg1* 和 *vtgc* 表达量变化, 在  $1.33 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $1.77 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  组暴露 14 d、28 d 时 *vtgc* 表达水平较 7 d 组显著升高 ( $P < 0.05$ ); 而  $3.13 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  组暴露 14 d、28 d 时 *vtg1* 和 *vtgc* 最高表达量达 3.41 倍和 6.71 倍, 且与 7 d 组相比显著上升 ( $P < 0.01$ )。

#### 2.2.2.2 雌性泥鳅肝脏 *vtg* 表达量的变化

由图 5 可知, 雌性泥鳅肝脏 *vtg1* 和 *vtgc* mRNA 水平随 PHE 胁迫浓度升高呈现上升趋势。暴露 7 d,  $2.36 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $3.13 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  组 *vtg1* 和 *vtgc* 表达量

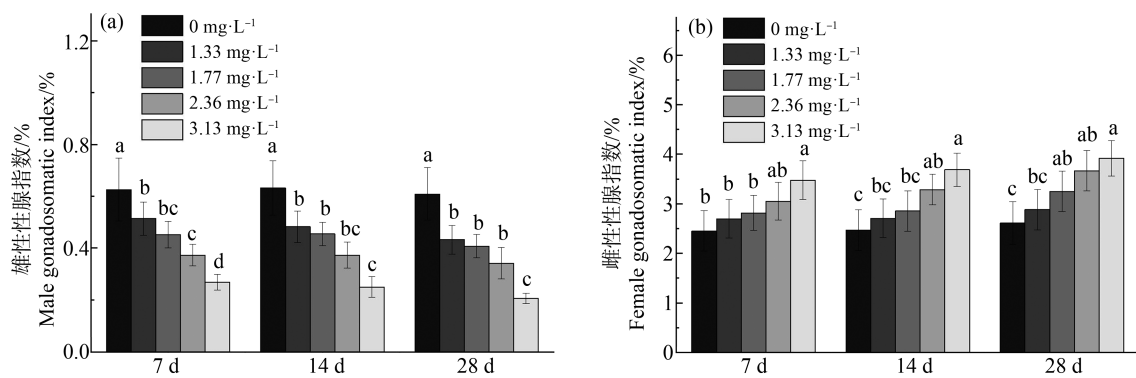


图 2 菲对泥鳅性腺指数的影响

Fig. 2 Effect of phenanthrene on gonadosomatic index of *Misgurnus anguillicaudatus*

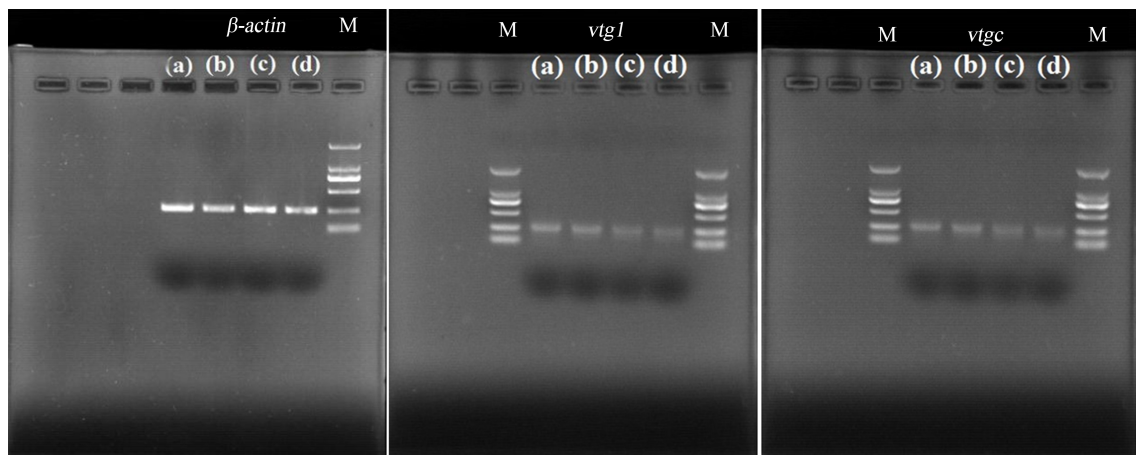


图 3 各组织样品普通 PCR 凝胶电泳图谱

注: 凝胶电泳条带上(a)~(d)分别代表卵巢、精巢、雌性肝脏、雄性肝脏。

Fig. 3 General PCR gel electrophoresis pattern of each tissue sample

Note: The gel electrophoresis bands (a) ~ (d) represent ovary, testis, female liver and male liver respectively.



发生显著变化( $P<0.05$ ),在  $3.13 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  组 *vtg1* 和 *vtgc* 表达量达到最高值,分别为 1.88 倍和 1.90 倍。暴露 14 d,  $3.13 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  组 *vtg1* 表达量显著上升( $P<0.05$ ),各浓度组 *vtgc* 表达量发生显著变化( $P<0.05$ )。暴露 28 d, *vtg1* 表达量除  $1.33 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  组外,其他 3 个浓度组都存在显著差异,各浓度组 *vtgc* 表达量显著上升( $P<0.05$ )。此外,比较相同浓度下不同时间雌性泥鳅肝脏 *vtg1* 和 *vtgc* 表达量发现,在 PHE 暴露 14 d、28 d,雌性泥鳅肝脏 *vtg* 表达量有显著升高。

### 2.2.2.3 泥鳅精巢 *vtg* 表达量的变化

图 6 中,泥鳅精巢在 PHE 暴露下 *vtg* 表达量随

着暴露浓度升高、暴露时间的延长整体呈上升趋势。在  $1.77$ 、 $2.36$  和  $3.13 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  组,泥鳅精巢 *vtg* 表达量显著升高。从时间尺度来看, *vtgc* 表达量在 7 d、28 d 随着 PHE 浓度的升高而显著上升( $P<0.05$ ), *vtg1* 在 7、14 和 28 d 暴露期表达量与暴露浓度呈倒 U 型曲线, *vtgc* 表达量变化在暴露 14 d 亦出现类似情形。在  $3.13 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  组,随着暴露时间的延长, *vtg1*、*vtgc* 表达量呈现上升的趋势, *vtg1* 在 28 d 时达到最高值为 3.21 倍, *vtgc* 表达量变化在暴露 28 d 达到最高 3.39 倍。随着时间的延长,  $2.36 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  组诱导 *vtg1*、*vtgc* 表达量上调趋势较为显著。

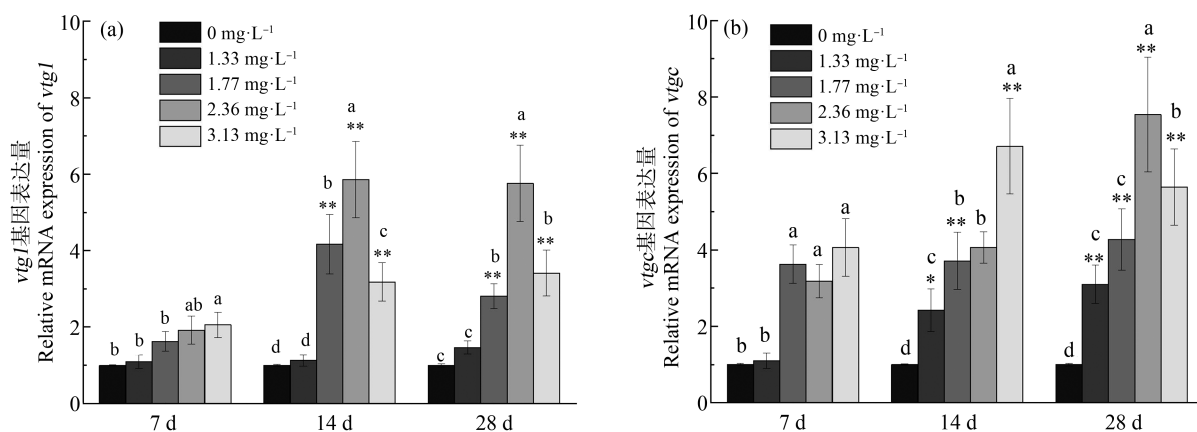


图 4 菲对雄性泥鳅肝脏 *vtg1* 和 *vtgc* 表达量影响

注:相同字母表示相同时间内、不同浓度之间差异显著,反之则存在显著差异;\*  $P<0.05$ 、\*\*  $P<0.01$ ,在同浓度下、不同暴露时间之间有显著差异;下同。

Fig. 4 Effects of phenanthrene on *vtg* expression in the liver of male *Misgurnus anguillicaudatus*

Note: The same letter indicating no difference between different concentrations within the same time, and vice versa;

\*  $P<0.05$ , \*\*  $P<0.01$  indicate that there is significant difference between different exposure times at the same concentration; the same below.

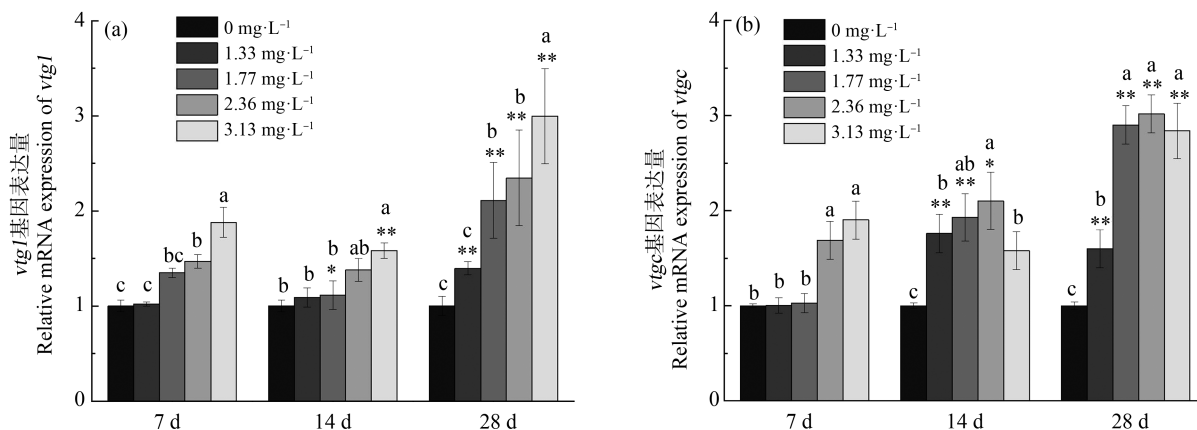


图 5 菲对雌性泥鳅肝脏 *vtg1* 和 *vtgc* 表达量影响

Fig. 5 Effects of phenanthrene on *vtg* expression in the liver of female *Misgurnus anguillicaudatus*



在  $1.77 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  组,随着胁迫时间的延长,雌性泥鳅肝脏 VTG 含量呈现先下降后上升的趋势,在 28 d 时出现显著性差异( $P<0.05$ )且达到最高值。

图 9(a)中,泥鳅精巢 VTG 含量随 PHE 浓度的升高以及暴露时间的延长而上升。暴露 7 d、14 d,  $1.33 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  组 PHE 暴露下引起精巢 VTG 含量上升,  $1.77 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  组 VTG 含量开始出现显著升高( $P<0.05$ )。暴露 28 d,泥鳅精巢 VTG 含量随 PHE 浓度

的升高而显著上升( $P<0.05$ )。

图 9(b)中,泥鳅卵巢 VTG 含量随着 PHE 胁迫浓度的升高而上升。暴露 7 d,在  $2.36 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  组泥鳅卵巢 VTG 含量出现显著上升( $P<0.05$ )。暴露 14 d,除  $1.33 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  组外,其他浓度组 VTG 含量上升趋势显著( $P<0.05$ )。暴露 28 d,VTG 含量随 PHE 浓度升高显著上升,且与对照组有显著差异( $P<0.05$ )。

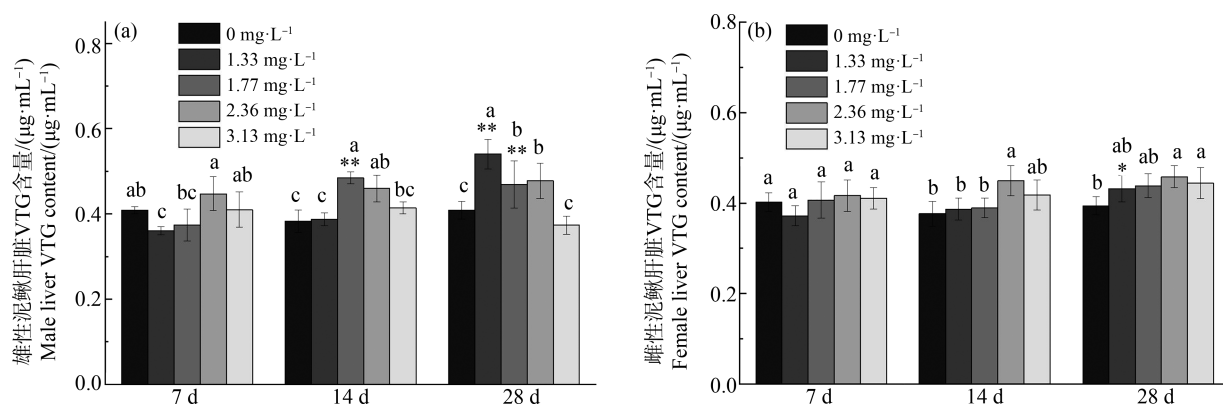


Fig. 8 Effects of phenanthrene on liver VTG content in *Misgurnus anguillicaudatus*

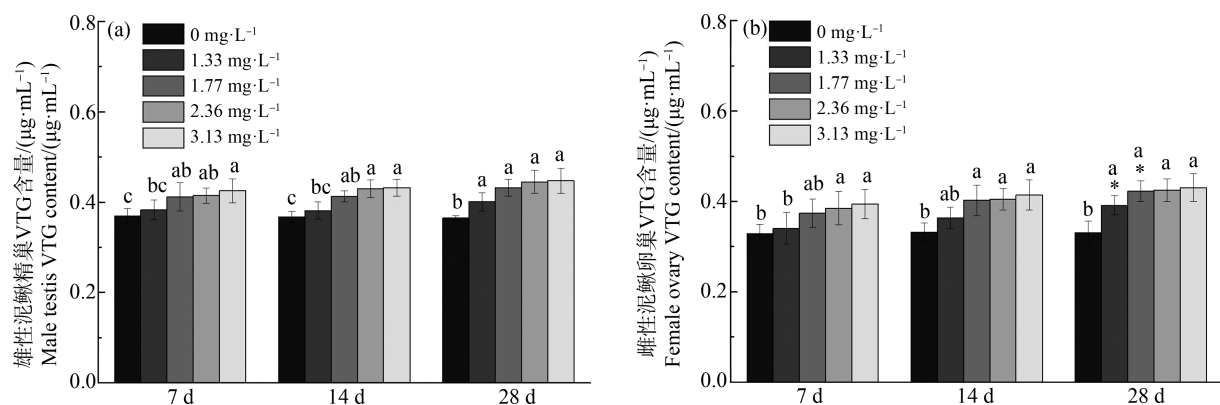


Fig. 9 Effects of phenanthrene on gonad VTG content in *Misgurnus anguillicaudatus*

### 3 讨论 (Discussion)

#### 3.1 菲胁迫对泥鳅 HSI、GSI 的影响

HSI 和 GSI 分别代表肝脏指数和性腺指数,反映动物肝脏和性腺器官发育情况、成熟程度<sup>[16]</sup>。有研究表明,高浓度的环境污染物会直接作用于鱼类的代谢作用进而影响鱼类生长的整体发育,导致 HSI 升高,HSI 大小与污染物暴露剂量成正比<sup>[17]</sup>。本实验中,PHE 暴露导致雄性泥鳅 HSI 上升,  $2.36 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $3.13 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  组对 HSI 影响较为显著,这表

明 PHE 胁迫会导致泥鳅肝脏发育异常。雌性泥鳅 HSI 随 PHE 胁迫浓度的升高呈现升高趋势,在  $3.13 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  组显著高于对照组,雌性泥鳅 HSI 响应 PHE 胁迫较为缓慢,这可能是由于雌性泥鳅肝脏对 PHE 胁迫代谢能力较雄性高,在较低浓度下没有明显的变化,但随着 PHE 胁迫浓度的升高,有毒物质不断累积,导致雌性泥鳅肝脏损伤。

同时,研究表明,环境雌激素类物质会引起鱼类性腺组织损伤。赵荧等<sup>[18]</sup>发现日本青鲈雄鱼暴露在

酞酸酯中会显著降低其 GSI,宫向红等<sup>[19]</sup>用不同浓度辛基酚胁迫鲤,结果表明,雄性 GSI 随胁迫浓度升高而减小,雌性 GSI 随胁迫浓度升高而增加。本研究中,PHE 胁迫对泥鳅 GSI 有显著影响,随着暴露浓度的升高和暴露时间的延长,雄性泥鳅 GSI 呈下降趋势,在  $3.13 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  组胁迫 28 d 达到最低。雌性泥鳅在 PHE 暴露下 GSI 显著升高,提示 PHE 可能具有一定的类雌激素效应,作用于雄性泥鳅时,干扰体内正常雄激素水平,导致精巢发育受阻,而作用于雌性则促使雌激素水平过高,导致卵巢发育异常。

### 3.2 非胁迫对泥鳅 VTG 的影响

VTG 通常是由雌性个体产生的,而当雄性个体中出现时,则表明生物体受到了雌激素内分泌干扰物的污染<sup>[20]</sup>。黄晔等<sup>[21]</sup>发现,雄性斑马鱼在壬基酚和双酚 A 胁迫下,引发肝脏 *vtg* mRNA 表达量明显上升,且具有明显的时间-剂量效应。付娟娟等<sup>[22]</sup>将稀有鮑鲫暴露在本并芘和邻苯二甲酸二酯下,发现稀有鮑鲫性腺和肝脏中 *vtg* 表达量显著上调,表现出生殖内分泌干扰效应。本研究结果表明,PHE 暴露引起泥鳅肝脏和性腺中 *vtg1* 和 *vtgc* mRNA 表达量水平上升,并随着 PHE 暴露剂量的升高,*vtg* 表达量呈现不同程度的升高,这说明 PHE 对泥鳅肝脏和性腺有明显的内分泌干扰作用,表现出类雌激素效应,而不同浓度、不同暴露时间对 *vtg* 表达影响存在差异,可能是由于 PHE 刺激机体肝脏解毒代谢,影响下丘脑-垂体-性腺轴的反馈调节机制,导致 *vtg* 表达量随浓度和时间而变化。不同的是,Sun 等<sup>[23]</sup>将海洋青鳉(*Oryzias melastigma*)暴露在  $60 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$  PHE 80 d 后检测到肝脏 *vtg1*、*vtg2* 表达量显著下调,这可能是因为暴露时间较长从而抑制基因表达,也可能是泥鳅属淡水鱼有别于海洋青鳉。同时,*vtg* 表达量变化在泥鳅肝脏、性腺中存在一定差异,肝脏中 *vtg* 表达量变化幅度较性腺大。类似的结果在其他文献中也有描述,陈亚文等<sup>[24]</sup>通过检测双酚 AF 胁迫下斑马鱼卵黄蛋白原基因表达发现, $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  BPAF 暴露下雄性斑马鱼肝脏 *vtg* 表达量显著升高,而性腺中 *vtg* 表达量升高但无显著差异。出现这种差异的原因可能是由于泥鳅不同组织对 PHE 吸收、代谢和分布不同,导致肝脏和性腺 *vtg* 表达量变化存在差异。

本研究还检测到,泥鳅 *vtg* 对 PHE 胁迫响应有一定的性别差异。在泥鳅肝脏 *vtg* mRNA 水平变化

中,雄性 *vtg1* 和 *vtgc* 表达量相对于雌性增幅较大,且在雄性肝脏、精巢中,*vtg* 表达量出现了明显的低浓度诱导、高浓度抑制的效应关系,呈现典型毒性物质刺激 Hormesis 效应,判断可能是类雌激素效应。精巢 *vtg1* 和 *vtgc* 表达水平上升幅度较卵巢大,主要体现在  $1.33 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  组精巢 *vtg1* 和 *vtgc* 表达量就存在显著升高,而卵巢 *vtg* 表达量显著上调普遍发生在  $2.36 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  组。在陈述<sup>[25]</sup>有关  $17\alpha$ -乙炔基雌二醇(EE2)调控稀有鮑鲫 *vtg* 基因表达中,也得到了相似的结果,即 EE2 使得稀有鮑鲫雄鱼 *vtg* 表达量变化远大于雌鱼。上述结果提示,一定浓度 PHE 胁迫对雌、雄性泥鳅 *vtg1* 和 *vtgc* 表达均具有诱导作用,对雄性泥鳅尤为显著。

此外,不同 *vtg* mRNA 水平响应 PHE 胁迫程度也不同,暴露 7 d,雄性泥鳅肝脏 *vtg1* 和 *vtgc* mRNA 水平与暴露剂量成正相关,*vtg1* 表达在  $3.13 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  组与对照组呈显著差异,*vtgc* 差异表达出现在  $1.77 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  组,而泥鳅精巢中则分别在  $1.77 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $2.36 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  组出现显著性差异,这说明在雄性泥鳅肝脏、性腺中,2 个基因在响应 PHE 胁迫的敏感浓度区不同。PHE 在引起泥鳅内分泌干扰效应中,*vtgc* 表达量变化较 *vtg1* 明显,在雄性中更为明显。提示 PHE 可以通过诱导泥鳅 *vtgc* 和 *vtg1* 表达发挥其雌激素效应,其中对 *vtgc* 的诱导作用更大。

VTG 作为卵生脊椎动物卵黄的前体蛋白,通过 ELISA 酶联免疫分析直接测定 VTG 含量也是反映环境干扰物雌激素效应的重要方法。杨倩等<sup>[26]</sup>采用 ELISA 法测定双酚 A 替代物胁迫下斑马鱼体内 VTG 含量,结果显示,双酚 A 及其常见替代物会引起斑马鱼体内 VTG 含量升高,且具有一定的剂量-效应关系。程艳等<sup>[27]</sup>在研究全氟辛烷磺酸(perfluorooctane sulfonate, PFOS)对斑马鱼的雌激素效应中也得到了类似的结果,并发现了斑马鱼对 PFOS 响应存在性别差异,雄鱼在 PFOS 暴露下呈现显著的低浓度诱导、高浓度饱和抑制的毒物刺激 Hormesis 效应。本研究结果,泥鳅肝脏 VTG 含量随着 PHE 胁迫剂量的升高和时间的延长,呈现先上升后下降的趋势,而性腺 VTG 含量随着 PHE 胁迫浓度的上升而增加,且性腺中 VTG 含量略低于肝脏,这可能是由于 VTG 的合成成本就是依赖于内源性或外源性雌激素对肝细胞的刺激,性腺中的 VTG 是由肝脏合成的 VTG 通过血液循环运输而来的,响应 PHE 胁迫会存在一定的时间滞后性。此外,PHE 暴露下雄



性泥鳅肝脏的高浓度饱和抑制点大致出现在  $2.36 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  组,而雌性则出现在  $3.13 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  组,这说明 PHE 不仅可以诱导泥鳅肝脏 VTG 的合成,且诱导作用在雄性中表现的更为显著。

综上,PHE 胁迫会导致泥鳅肝脏损伤、性腺发育异常,诱导泥鳅肝脏和性腺中 *vtg1* 和 *vtg* 表达量上调,使得 VTG 含量升高,干扰性腺作用轴且这种影响在雄性泥鳅中尤为显著。

通讯作者简介:雷忻(1972—),女,博士,教授,主要研究方向为水生生态毒理学。

#### 参考文献 (References):

- [1] 李爽,刘殷佐,刘入瑜,等. 浑河沈抚段多环芳烃的污染特征及风险评价[J]. 中国环境科学, 2019, 39(4): 1551-1559  
Li S, Liu Y Z, Liu R Y, et al. The pollution characteristics and risk assessment of polycyclic aromatic hydrocarbons of Shen-Fu section of the Hun River Basin [J]. China Environmental Science, 2019, 39(4): 1551-1559 (in Chinese)
- [2] de Campos M F, Lo Nostro F L, Da Cuña R H, et al. Endocrine disruption of phenanthrene in the protogynous dusky grouper *Epinephelus marginatus* (Serranidae: Perciformes) [J]. General and Comparative Endocrinology, 2018, 257: 255-263
- [3] 范博,王晓南,黄云,等. 我国七大流域水体多环芳烃的分布特征及风险评价[J]. 环境科学, 2019, 40(5): 2101-2114  
Fan B, Wang X N, Huang Y, et al. Distribution and risk assessment of polycyclic aromatic hydrocarbons in water bodies in seven basins of China [J]. Environmental Science, 2019, 40(5): 2101-2114 (in Chinese)
- [4] 裴晓龙,丁强,杨玉珍,等. 2013—2017 年延河水质变化及其影响因素[J]. 水土保持通报, 2019, 39(2): 115-117, 123  
Pei X L, Ding Q, Yang Y Z, et al. Change and influencing factors of water quality in Yanhe River from 2013 to 2017 [J]. Bulletin of Soil and Water Conservation, 2019, 39(2): 115-117, 123 (in Chinese)
- [5] 吴江涛. 延河流域水污染现状评价及管理建议[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2018: 9-30  
Wu J T. Assessment of present water pollution of Yanhe River and management suggestions [D]. Yangling: Northwest A & F University, 2018: 9-30 (in Chinese)
- [6] 蒋闰兰,肖佰财,张帆,等. 菲胁迫对中华绒螯蟹(*Eriocheir sinensis*)的急性毒性效应[J]. 应用与环境生物学报, 2015, 21(1): 108-114  
Jiang R L, Xiao B C, Zhang F, et al. Acute toxic effects of phenanthrene on Chinese mitten crab *Eriocheir sinensis* [J]. Chinese Journal of Applied and Environmental Biology, 2015, 21(1): 108-114 (in Chinese)
- [7] 肖佰财,蒋闰兰,李丹妮,等. 菲对河蚬的急性毒性效应[J]. 海洋渔业, 2015, 37(1): 60-67  
Xiao B C, Jiang R L, Li D N, et al. Acute toxicity effects of phenanthrene on *Corbicula fluminea* [J]. Marine Fisheries, 2015, 37(1): 60-67 (in Chinese)
- [8] 杨涛,陈海刚,蔡文贵,等. 菲胁迫对红鳍笛鲷急、慢性毒性效应的研究[J]. 水产学报, 2011, 35(2): 298-304  
Yang T, Chen H G, Cai W G, et al. Acute and chronic toxicity effects of phenanthrene in seawater on crimson snapper(*Lutjanus erythropterus*) [J]. Journal of Fisheries of China, 2011, 35(2): 298-304 (in Chinese)
- [9] 赵子涵. 苯并(a)芘和菲对沙蚕 CYP4 基因及其蛋白表达的影响[D]. 大连: 大连海洋大学, 2016: 6-36  
Zhao Z H. The expression of CYP<sub>4</sub> in *Perinereis aibuhitensis* under benzo(a)pyrene and phenanthrene exposure [D]. Dalian: Dalian Ocean University, 2016: 6-36 (in Chinese)
- [10] 陈玉明,卢少勇,朱旭,等. 泥鳅在污染物毒性评价中的应用[J]. 生态毒理学报, 2013, 8(4): 447-455  
Chen Y M, Lu S Y, Zhu X, et al. Review on application of loach to assessing toxicity of pollutants [J]. Asian Journal of Ecotoxicology, 2013, 8(4): 447-455 (in Chinese)
- [11] Wang J Q, Fu G H, Li W Y, et al. The effects of two free-floating plants (*Eichhornia crassipes* and *Pistia stratiotes*) on the burrow morphology and water quality characteristics of pond loach (*Misgurnus anguillicaudatus*) habitat [J]. Aquaculture and Fisheries, 2018, 3(1): 22-29
- [12] Amano H, Uno S, Koyama J, et al. Development of specific enzyme-linked immunosorbent assays for multiple vitellogenins in marbled sole, *Pleuronectes yokohamae* [J]. General and Comparative Endocrinology, 2019, 281: 67-72
- [13] 王天玉,曹谨玲,陈剑杰,等. 氟对斑马鱼生殖毒性研究[J]. 环境科学学报, 2020, 40(6): 2262-2270  
Wang T Y, Cao J L, Chen J J, et al. Study on reproductive toxicity by fluoride in zebrafish (*Danio rerio*) [J]. Acta Scientiae Circumstantiae, 2020, 40(6): 2262-2270 (in Chinese)
- [14] 王亚梅. 斑马鱼卵黄蛋白原受体基因的鉴定、表达和功能分析[D]. 兰州: 西北师范大学, 2020: 40-76  
Wang Y M. Identification, expression and functional analysis of zebrafish vitellogenin receptor gene [D]. Lanzhou: Northwest Normal University, 2020: 40-76 (in Chinese)
- [15] 马境. 西伯利亚鲟卵黄发生过程中的生理调节机制与

- 中华鲟 EST 文库的生物信息学分析[D]. 上海: 华东师范大学, 2011: 40-68
- Ma J. The physiological regulation of *Acipenser baerii* vitellogenesis and annotation and analysis of *Acipenser sinensis* ESTs [D]. Shanghai: East China Normal University, 2011: 40-68 (in Chinese)
- [16] 詹翠琼, 黄絮洁, 方展强, 等. 多氯联苯对孔雀鱼卵黄蛋白原的诱导及检测[J]. 生态毒理学报, 2007, 2(3): 333-338
- Zhan C Q, Huang X J, Fang Z Q, et al. Induction and determination of vitellogenin in male guppies (*Poecilia reticulata*) after exposed to polychlorinated biphenyls [J]. Asian Journal of Ecotoxicology, 2007, 2(3): 333-338 (in Chinese)
- [17] 岳南南, 王汨, 闫玉莲, 等. 饲料中不同浓度菲对中华倒刺鲃几种血液学指标和肝胰脏的影响[J]. 水生生物学报, 2014, 38(2): 304-311
- Yue N N, Wang M, Yan Y L, et al. Effects of dietary phe exposure on the haematological indexes and hepatopancreas of *Spinibarbus sinensis* [J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 2014, 38(2): 304-311 (in Chinese)
- [18] 赵荧, 李媛, 陈永柏. 双酚 A 和酞酸酯对鱼类内分泌干扰效应及繁殖毒性研究[J]. 水生态学杂志, 2017, 38(6): 1-10
- Zhao Y, Li Y, Chen Y B. Research progress of endocrine-disrupting effects and reproductive toxicity of bisphenol A and phthalic acid esters on fish [J]. Journal of Hydroecology, 2017, 38(6): 1-10 (in Chinese)
- [19] 宫向红, 徐英江, 任利华, 等. 辛基酚对鲤的雌激素效应[J]. 水产学报, 2010, 34(3): 410-414
- Gong X H, Xu Y J, Ren L H, et al. Estrogenic effects of octylphenol on carp (*Cyprinus carpio*) [J]. Journal of Fisheries of China, 2010, 34(3): 410-414 (in Chinese)
- [20] Li X Q, Liu X F, Jia Z Z, et al. Screening of estrogenic endocrine-disrupting chemicals in meat products based on the detection of vitellogenin by enzyme-linked immunosorbent assay [J]. Chemosphere, 2021, 263: 128251
- [21] 黄晔, 任华, 孙竹筠, 等. 壬基酚和双酚 A 对雄性斑马鱼(*Danio rerio*)卵黄蛋白原 mRNA 的诱导效应[J]. 生态毒理学报, 2008, 3(3): 274-279
- Huang Y, Ren H, Sun Z Y, et al. Vitellogenin mRNA expression in male zebrafish (*Danio rerio*) induced by nonylphenol and bisphenol-A [J]. Asian Journal of Ecotoxicology, 2008, 3(3): 274-279 (in Chinese)
- [22] 付娟娟, 郭勇勇, 韩建, 等. 苯并芘和邻苯二甲酸二(2-乙基己基)酯复合暴露对稀有鮕鲫的内分泌干扰效应研究[J]. 生态毒理学报, 2019, 14(6): 93-103
- Fu J J, Guo Y Y, Han J, et al. Endocrine disruption effects of benzo(a) pyrene and di-2-ethylhexyl phthalate on Chinese rare minnow (*Gobiocypris rarus*) [J]. Asian Journal of Ecotoxicology, 2019, 14(6): 93-103 (in Chinese)
- [23] Sun L B, Zuo Z H, Chen M, et al. Reproductive and transgenerational toxicities of phenanthrene on female marine medaka (*Oryzias melastigma*) [J]. Aquatic Toxicology, 2015, 162: 109-116
- [24] 陈亚文, 杨洋, 唐天乐, 等. 双酚 AF 对雄性斑马鱼卵黄蛋白原水平与芳香化酶基因表达的影响[J]. 生态毒理学报, 2015, 10(6): 320-327
- Chen Y W, Yang Y, Tang T L, et al. Effects of bisphenol AF on level of vitellogenin and expressions of cytochrome P450 aromatase (cyp 19a and b) in male zebrafish [J]. Asian Journal of Ecotoxicology, 2015, 10(6): 320-327 (in Chinese)
- [25] 陈述. BPA 和 EE2 调控稀有鮕鲫 vtg 基因表达的分子机制研究[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2016: 30-89
- Chen S. Study on the molecular mechanism of the expression of vtg gene exposed by BPA and EE2 in rare minnow *Gobiocypris rarus* [D]. Yangling: Northwest A & F University, 2016: 30-89 (in Chinese)
- [26] 杨倩, 杨先海, 刘济宁, 等. 双酚 A 替代物对雄性斑马鱼性激素及卵黄蛋白原水平的影响[J]. 南京工业大学学报(自然科学版), 2018, 40(5): 6-13
- Yang Q, Yang X H, Liu J N, et al. Effects of bisphenol A and its substitutes on levels of steroid hormone and vitellogenin in adult male zebrafish [J]. Journal of Nanjing Tech University (Natural Science Edition), 2018, 40(5): 6-13 (in Chinese)
- [27] 程艳, 崔媛, 何平, 等. 全氟辛烷磺酸(PFOS)对斑马鱼血浆和组织匀浆中卵黄蛋白原含量的影响[J]. 生态毒理学报, 2012, 7(1): 65-70
- Cheng Y, Cui Y, He P, et al. Effect of perfluorooctane sulfonate (PFOS) on vitellogenin levels in blood plasma and tissue homogenate of zebrafish (*Brachydanio rerio*) [J]. Asian Journal of Ecotoxicology, 2012, 7(1): 65-70 (in Chinese)