

#### DOI: 10.7524/AJE.1673-5897.20231121002

郭美莎, 李钰静, 梁延鹏, 等. 对羟基苯甲酸丙酯(PrP)对雌性食蚊鱼的组织损伤及相关基因表达的影响[J]. 生态毒理学报,2024, 19(3): 373-386 Guo M S, Li Y J, Liang Y P, et al. Tissue injuries and related genes expression changes of female mosquitofish (*Gambusia affinis*) induced by propylparaben (PrP) [J]. Asian Journal of Ecotoxicology, 2024, 19(3): 373-386 (in Chinese)

# 对羟基苯甲酸丙酯(PrP)对雌性食蚊鱼的组织损伤及 相关基因表达的影响

郭美莎1,李钰静1,梁延鹏23,马雲1,王海琴1,车佳祥1,宋晓红123.\*

桂林理工大学环境科学与工程学院,桂林 541006
 广西环境污染控制理论与技术重点实验室,桂林 541006
 广西岩溶地区水污染控制与用水安全保障协同创新中心,桂林 541006
 收稿日期:2023-11-21
 录用日期:2024-02-07

**摘要**: 对羟基苯甲酸丙酯(propylparaben, PrP)作为防腐剂,广泛添加于食品、药品和个人护理品中,其大量使用对水环境构成了 潜在威胁。本研究以野生来源的食蚊鱼(Gambusia affinis)雌鱼为研究对象,开展了不同浓度 PrP (0.15、6.0 和 240.0 μg·L<sup>-1</sup>)的 4 d 和 16 d 暴露实验,以鱼体大脑、鱼鳃和肝脏的组织切片为毒性效应指标,分析了食蚊鱼抗氧化与内分泌功能相关基因 mRNA 的表达变化。结果表明,不同暴露时间 PrP 对食蚊鱼的鱼鳃、肝脏组织均造成不同程度的损伤。随着暴露时间延长,大脑的抗 氧化相关基因表达量上调,但鱼鳃的抗氧化相关基因和肝脏的 cat、cyp4501a 基因表达量下调,氧化应激反应逐渐减弱。PrP 暴露 4 d 后,随暴露剂量的增加,大脑组织的内分泌相关基因呈现先升高后下降的趋势;暴露 16 d 后,大脑组织的内分泌相关 基因相对于对照组呈现升高的趋势。PrP 暴露 4 d 后,与对照组相比,肝脏组织的内分泌相关基因中,低浓度处理组(0.15 μg· L<sup>-1</sup> PrP) vtgB 基因和高浓度处理组(240.0 μg·L<sup>-1</sup> PrP)的 afβ 基因表达量有显著差异,其他处理组无显著变化;暴露时间延长至 16 d 时,各处理组肝脏组织样品的 erα、erβ、arα、arβ、vtgC 和 vtgB 基因的表达量上调,表明 PrP 对食蚊鱼具有雌激素效应。本 研究从鱼体组织损伤和关键功能基因 mRNA 表达变化,揭示 PrP 对食蚊鱼的毒性损伤、氧化应激和内分泌干扰作用,为 PrP 的潜在健康风险评估和安全应用提供了科学依据。

关键词:对羟基苯甲酸丙酯;食蚊鱼;内分泌干扰;雌鱼;组织损伤 文章编号:1673-5897(2024)3-373-14 中图分类号:X171.5 文献标识码:A

# Tissue Injuries and Related Genes Expression Changes of Female Mosquitofish (*Gambusia affinis* ) Induced by Propylparaben (PrP )

Guo Meisha<sup>1</sup>, Li Yujing<sup>1</sup>, Liang Yanpeng<sup>2,3</sup>, Ma Yun<sup>1</sup>, Wang Haiqin<sup>1</sup>, Che Jiaxiang<sup>1</sup>, Song Xiaohong<sup>1,2,3,\*</sup>

1. College of Environmental Science and Engineering, Guilin University of Technology, Guilin 541006, China

2. The Guangxi Key Laboratory of Theory and Technology for Environmental Pollution Control, Guilin 541006, China

3. Guangxi Collaborative Innovation Center for Water Pollution Control and Water Safety in Karst Area, Guilin 541006, China

Received 21 November 2023 accepted 7 February 2024

基金项目:国家自然科学基金项目(42307371);桂林理工大学科研启动金资助项目(GUTQDJJ6614039)

第一作者:郭美莎(1999—),女,硕士研究生,研究方向为环境毒理学,E-mail: gmeisha@163.com

<sup>\*</sup> 通信作者(Corresponding author), E-mail: sxh215@163.com

Abstract: Propylparaben (PrP) is widely applied in food, pharmaceuticals and personal care products as preservatives, and the extensive usage of PrP has posed potential threat to aquatic ecosystem. In this study, wild-sourced female mosquitofish were treated with different concentrations of PrP (0.15, 6.0 and 240.0  $\mu g \cdot L^{-1}$ ) for 4 d and 16 d respectively. The tissue sections as well as mRNA expression changes of antioxidant and endocrine-related genes from the brain, gills and liver, were analyzed to investigate the toxicological effects of PrP on mosquitofish. The results showed that different PrP exposure time resulted in varying degrees of damage to the gills and liver of mosquitofish. With the extension of exposure time, the expression of antioxidant-related genes in the brain was up-regulated, whereas the expression of antioxidant-related genes in the gills, as well as cat and cyp4501a genes in the liver, were down-regulated, and the oxidative stress response in the gills and liver gradually weakened. When female mosquitofish were exposed to PrP for 4 d, the endocrine-related genes in the brain increased firstly and then decreased with increasing PrP dose, while in the 16-d-PrP-exposure groups, the genes showed an increased trend compared with that of the control. After 4 d of PrP exposure, a significant difference was observed in the expression of the vtgB gene within liver tissues between the 0.15  $\mu$ g·L<sup>-1</sup> PrP group and the control group, as well as in the expression of the ar $\beta$  gene within liver tissues between the 240.0  $\mu$ g·L<sup>-1</sup> PrP group and the control group; however, no significant differences were found in other endocrine-related genes among different PrP groups and the control group. When the exposure time was extended to 16 d, the expression of  $er\alpha$ ,  $er\beta$ ,  $ar\alpha$ ,  $ar\beta$ , vtgC and vtgB genes in the liver was all up-regulated in the three treatment groups, indicating that PrP had estrogenic effects on mosquitofish. This study revealed the toxic damage, oxidative stress and endocrine disrupting effects of PrP on mosquitofish, through the phenotypic variations in tissues and changes in mRNA expression of key functional genes, which will provide a scientific basis for the potential health risk assessment and safe application of PrP.

**Keywords**: propylparaben; mosquitofish; endocrine disruption; female fish; tissue injuries

对羟基苯甲酸酯(parabens)是一类烷基脂化合 物,包括对羟基苯甲酸甲酯(MeP)、对羟基苯甲酸乙 酯(EtP)、对羟基苯甲酸丙酯(PrP)、对羟基苯甲酸异 丙酯(IPP)、对羟基苯甲酸丁脂(BuP)等[1],随着对羟 基苯甲酸酯烷基侧链长度的增加,这类化合物的抗 菌活性、疏水性和雌激素活性增强<sup>[2-3]</sup>。Parabens 具 有优异的防腐和抗菌性能,广泛应用于食品、药品和 个人护理品中[4]。目前研究发现,其具有生殖和发 育毒性、致癌性以及内分泌干扰等影响<sup>61</sup>,被列为新 型污染物。其中,对羟基苯甲酸丙酯(propylparaben, PrP)是使用最广泛的 parabens 之一,我国 PrP 的生 产量为>10 000 t·月<sup>-1</sup>,原卫生部建议食物中 MeP、 EtP 和 PrP 最高允许浓度为 0.5 g·kg<sup>-16</sup>。PrP 在室 内灰尘、地表水、土壤和生物体内也常被检出<sup>[7]</sup>。例 如,巴西地表水中检测到的 PrP 最大浓度为 52.1 µg ·L<sup>-1[8]</sup>:法国污水处理厂排放区检测到 PrP 的最大浓 度为3.98 µg·L<sup>-1[9]</sup>; PrP 在鱼类、无脊椎动物、海草 和红树等动植物体内检出的质量浓度范围为<0.024  $\sim 1 \ 140 \ \text{ng} \cdot \text{g}^{-1}$ 

PrP 结构与雌激素类似,具有雌激素效应<sup>[11]</sup>,可 干扰生物体的内分泌功能,如 PrP 可抑制精子发 生<sup>[12]</sup>,诱导虹鳟鱼肝脏和肌肉血浆中的卵黄原蛋白 合成水平升高<sup>[13]</sup>。PrP 能通过氧化应激诱导斑马鱼 脑细胞凋亡,致使鱼体出现焦虑行为<sup>[14]</sup>。此外,PrP 还能影响天然激素酶的活性,干扰类固醇的生成<sup>[15]</sup>。 PrP 还可影响斑马鱼的早期发育,出现心跳减弱、血 液循环减少、瘀血、心包水肿、脊索变形和卵黄囊变 形等现象<sup>[16]</sup>。PrP 对小鼠卵巢雌二醇分泌和排卵也 有不良影响,注射 PrP 后小鼠血清的雌二醇含量显 著升高,发情周期紊乱,卵母细胞数量显著减少[17]。 PrP 暴露4d后,斑马鱼的卵黄中性脂质减少,卵黄 囊内磷脂代谢受损<sup>[18]</sup>。PrP 对水生生物具有内分泌 干扰效应,故对其内分泌干扰能力的精确评估尤为 重要。

食蚊鱼(Gambusia affinis)是一种分布广泛的小 型卵胎生淡水鱼类,具有体型小、易捕捞等优势,常 被用做环境污染物的有效指示生物<sup>[19-20]</sup>。本课题组 前期研究发现, PrP 可诱导野生来源的食蚊鱼雄鱼 组织损伤、精子发生延迟、类固醇生成异常,具有雌 激素效应<sup>[21]</sup>,那么,PrP 对食蚊鱼雌鱼是否具有相似 的影响,还需进一步研究。

综上,本研究对比了不同 PrP 剂量(0.15、6 和

375

240 μg·L<sup>-1</sup>)和不同暴露时间(4 d、16 d)对食蚊鱼不同组织(大脑、肝脏和鱼鳃)的毒性损伤,基于食蚊鱼抗氧化相关基因与内分泌相关基因 mRNA 的表达变化,分析了 PrP 对食蚊鱼雌鱼抗氧化系统和内分泌系统的影响,为 PrP 的风险评估和安全应用提供科学依据和研究基础。

# 1 材料与方法(Materials and methods)

## 1.1 实验动物

食蚊鱼购自广西荔浦青山水产养殖场,于实验 室的水生生物养殖系统驯养2周。实验用水为连续 曝气48h以上的自来水,水温为(25±1)℃,pH为 (7.0±0.1),溶解氧>5 mg·L<sup>-1</sup>,光周期为14h:10h (白昼/黑暗),每日早晚定时投喂2次丰年虫和小型 鱼类专用饲料。挑选健康活泼、大小均一的雌鱼作 为实验用鱼,鱼体平均体质量为(0.16±0.05)g,平均 体长为(2.26±0.18) cm。

- 1.2 实验方法
- 1.2.1 PrP 暴露实验

采用半静态法对雌鱼进行 PrP 暴露实验,以 PrP 的环境浓度及其对食蚊鱼的 96 h-LC<sub>50</sub> (9.14 mg·L<sup>-1</sup>)为参考依据<sup>[22]</sup>,设置 3 个不同 PrP 浓度组(0.15、6 和 240 µg·L<sup>-1</sup>),并设二甲基亚砜(DMSO)对照组。按照实验需求配制母液,4 ℃避光保存,并逐级稀释 为不同剂量暴露液,暴露实验中 DMSO 的最终浓度 为 0.05%(V:V)。暴露实验在玻璃烧杯中进行,每 个实验组设置 4 组平行,每个平行中有 2 L PrP 溶液,各放入 9 尾雌鱼,暴露时间分为4 d 和 16 d(分别 代表急性毒性和亚慢性毒性暴露),每 24 h 更换 1/2 PrP 溶液,早晚固定喂食 2 次并及时吸出残饵和排 泄物,记录每个烧杯中食蚊鱼的死亡情况。

暴露结束后,分别记录实验用鱼的体长和体质 量。采用冰浴解剖,在体式显微镜下快速取出食蚊 鱼的大脑、鱼鳃、肝脏组织,每个平行组随机挑选4 尾鱼的组织置入 RNA 保存液(TaKaRa)中,4℃保存 过夜后于-20℃保存,用于提取 RNA;另随机挑选5 尾鱼,置于10%甲醛溶液中,用于开展组织病理切 片实验。

1.2.2 组织切片及 HE 染色

用 OCT 包埋剂(美国樱花 SAKURA)浸没食蚊 鱼不同组织后速冻,采用切片机(德国徕卡,LEICA CM1850)进行组织切片。用苏木精-伊红染色法 (HE)染色,使用中性树脂封片,置于显微镜下观察食 蚊鱼的组织变化,并拍照记录。

# 1.2.3 总 RNA 提取和 cDNA 合成

食蚊鱼大脑、肝脏和鱼鳃组织的总 RNA 提取 过程如下:样品中加入 RNAiso Plus 试剂(TaKaRa)和 经灭菌的研磨珠后,使用研磨机(XFSTPRP-48,上海 净信实业发展有限公司)进行低温匀浆,加入三氯甲 烷(分析纯,西陇科学有限公司)并离心使各成分相 分离,随之加入异丙醇(分析纯,西陇科学有限公 司),颠倒混匀后离心,得到凝胶状 RNA 沉淀;加入 预冷的 75% 乙醇(分析纯,西陇科学有限公司)洗涤 RNA 沉淀,最后加入无 RNase 的水,充分溶解 RNA,得到组织的总 RNA,使用微量分光光度计 (Quawell Q5000)检测 RNA 的质量和含量。用 Prime Script RT reagent Kit with gDNA Eraser 试剂盒 (TaKaRa)将 RNA 反转录为 cDNA,用于荧光定量 PCR 实验。

# 1.2.4 荧光定量 PCR 实验

选择抗氧化相关基因与内分泌相关基因,设计 qPCR 特异性引物(表1),引物由华大基因公司合成。 以各处理组和对照组样品 cDNA 为模板,食蚊鱼 gapdh 基因作为内参基因,使用 PowerUp<sup>™</sup> SYBR<sup>™</sup> Green Maser Mix 试剂盒(ABI,美国赛默飞世尔科技 公司),开展荧光定量 PCR 实验,每个样品重复 3 次,并设置阴性对照。

# 1.2.5 数据统计与分析

采用  $2^{-\Delta\Delta c_T}$  法计算目的基因的 mRNA 相对表 达量, qPCR 实验数据采用平均值±标准误差(Mean ±SEM)表示,并使用 GraphPad prism 9 软件进行绘 图。通过 t 检验分析对照组和每个处理组之间的差 异,以\*表示差异显著(P<0.05)。使用单因素方差分 析(One-Way ANOVA)和 Tukey 多重比较法对不同 的处理组进行统计分析。

#### 2 结果(Results)

PrP 暴露食蚊鱼雌鱼 4 d 和 16 d 后,各组(0、 0.15、6 和 240 μg·L<sup>-1</sup>)实验用鱼健康状况良好,未出 现死亡情况,表明本研究选取的 PrP 剂量对食蚊鱼 未产生急性毒性效应。

# 2.1 PrP 诱导食蚊鱼雌鱼的组织损伤

2.1.1 食蚊鱼大脑的组织损伤

大脑切片中,边缘层(SM),中央层(SC),视顶盖 周围层(PGZ),半圆环腹外侧核(TSvl)的结构如图 1 所示,边缘层由神经纤维和神经元组成,中央层含有 较多的神经细胞,视顶盖周围层(PGZ)含有致密的神 经元。不同浓度 PrP (0.15、6 和 240 µg·L<sup>-1</sup>)暴露食

	1 1 1	1 1	
基因	正向引物序列 F (5'~3')	反向引物序列 R (5'~3')	参考文献
Gene	Forward primer sequence F (5' $\sim$ 3')	Reverse primer sequence R (5' $\sim$ 3')	Reference
gapdh	TTCACGCCATCACTGCCACA	TCAGGGATGACCTTGCCAACAG	[23]
cat	CCATCTTCTTCATCAGGGACGC	GGGTTTGAGGGTTTCGCTTCT	[20]
gst	TGCTCGCCATCAATCCCAGG	AAGCACCGTAGGACTCGTTCAG	[20]
<i>cyp4501a</i>	CCTCGCTGAAGATTTTGTCC	TGTTGAAGCGGTTGTTGAGG	[20]
$er\alpha$	CTTGCCGACTCAGGAAGTGTTAC	TGACGCCAGTCTGTCGTTTGT	[24]
eıβ	TTACTGACAGCCCATCATCCAT	GGTGGGTTTGGTTCATTGTAGAC	[24]
arα	GCTTCAGGCACGAGGATTTC	GGTGACCGCTCCGTAATGAC	[24]
arβ	CGATGCCCAGACCCAGATTAC	GAGGCGAGGTGATGAAAATGC	[24]
gnrh	TGTCGAAACGCTGACTCTGT	CAGTTCCCTCTTTCCGCCTG	[25]
gnrhr	TGACGTTTGTGGTGATGCCT	CAAGCTGATGACGACCAGGA	[25]
cyp19a1b	GAAGCTGGATGACGACCTTGACTT	GCTCCACCTTCGGGTTTTGTTT	[25]
vtgC	TGAGCGACAACACTTCAGTGC	AGCCTTTGGTCCTGGGTTATC	[25]
vtgB	TCCACCAGCATTCCATCTCAG	TAATGGCACGGACAAGGACTG	[25]
cyp19a	ATCACATAAGATATGTCACGGTTCG	GGATGATTTGTTGCCATAGGAGC	[26]
star	TAGTGGGACCGAGGGACTTT	ACACCTTTCTGCTCTGGCAT	[25]



Table 1 Specific primer sequences of Gambusia affinis used in the qPCR experiments





注:(a)~(h)分别表示对照组和不同 PrP 处理组(0.15、6 和 240 μg·L<sup>-1</sup>)暴露 4 d 和 16 d 后食蚊鱼雌鱼大脑组织切片; SM 代表边缘层, SC 代表中央层, PGZ 代表视顶盖周围层, TSvl 代表半圆环腹外侧核。

Fig. 1 Histological appearance of the female mosquitofish brain after propylparaben (PrP) exposure

with different concentrations for 4 d and 16 d

Note: (a) ~ (h) indicate the histological appearance of the female mosquitofish brain after 4 d and 16 d exposure in the control and PrP groups (0.15, 6 and 240  $\mu$ g·L<sup>-1</sup>); SM stands for stratum marginale; SC stands for stratum centrale, PGZ stands for stratum periventriculare tecti optici, and TSvl stands for ventrolateral nucleus of torus semicircularis.

蚊鱼雌鱼4d和16d后,组织切片显示脑组织切片 分层较为清晰,细胞排列紧密,脑组织未出现空泡 化、充血、黑化等病理病变(图1(a)~(h))。

2.1.2 食蚊鱼鱼鳃的组织损伤

鱼鳃组织切片显示,对照组鳃丝表面平缓舒展, 鳃小片分布均匀、梳状排列,且结构完整、长短均匀, 细胞均无损伤、脱落(图 2(a)、图 2(e))。随着暴露时 间的延长和 PrP 浓度的增加,鱼鳃的组织结构损伤 程度加重(图 2(b)~(d)、图 2(f)~(h))。PrP 处理组 (0.15、6和 240 μg·L<sup>-1</sup>)暴露 4 d 后出现轻度和中度 鱼鳃损伤,0.15 μg·L<sup>-1</sup> PrP 处理组鳃小片增生,肿胀 厚度明显增加,顶端膨大严重且呈棒状(图 2(b));6 μg·L<sup>-1</sup>处理组多数上皮细胞肿胀、肥大,损伤脱落, 受损程度有所增加(图 2(c));240 μg·L<sup>-1</sup>处理组损伤 较严重,少数鳃小片断裂,基部与鳃丝连接处出现粘 连,整体宽度增加,鳃丝上皮细胞明显增多且分布杂 乱,上皮细胞受损、脱落,相邻鳃小片之间相互接近, 末端鳃小片融合(图 2(d))。暴露 16 d 后,鱼鳃损伤 加重,0.15 μg·L<sup>-1</sup> PrP 处理组部分上皮细胞损伤脱 落严重,鳃小片顶端膨大严重,个别出现空泡化(图 2(f));6 μg·L<sup>-1</sup>处理组鳃小片严重扭曲、排列无序、 整体增厚、顶端明显膨大,并有较多上皮细胞受损 (图 2(g));240 μg·L<sup>-1</sup>处理组损伤较严重,出现少数 鳃小片断裂,基部与鳃丝连接处出现粘连,整体宽度 显著增加,鳃小片细胞肿胀、增生,且顶端明显膨大 且呈棒状(图 2(h))。

# 2.1.3 食蚊鱼肝脏的组织损伤

组织切片显示,对照组的肝细胞为多边形,细胞 间边界清晰,排列有序,大小均匀的圆形细胞核分布 在细胞中心,HE 染色评价基本正常(图 3(a),图 3 (e))。PrP 对肝细胞形态的损伤具有时间和剂量效 应(图 3(b)~(d)、图 3(f)~(h)),随着暴露时间的延长



注:(a)~(h)分别表示对照组和不同 PrP 处理组(0.15、6 和 240  $\mu$ g·L<sup>-1</sup>)暴露 4 d 和 16 d 后食蚊鱼雌鱼鱼鳃的组织切片;

PL 代表鳃丝;SL 代表鳃小片;BV 代表血管;红色箭头代表鳃小片顶端膨大严重且呈棒状;

黄色箭头代表上皮组织脱落;蓝色箭头代表上皮细胞水肿;黑色箭头代表次生片层融合。

Fig. 2 Histological appearance of the female mosquitofish gills after PrP exposure with different concentrations for 4 d and 16 d Note: (a) ~ (h) indicate the histological appearance of the female mosquitofish gills after 4 d and 16 d exposure in the control and PrP groups (0.15, 6 and 240  $\mu$ g·L<sup>-1</sup>); PL stands for primary lamella coverslip; SL stands for secondary lamella; BV stands for blood vessel; red arrows indicate apex of the gills was severely enlarged and rod-shaped; yellow arrows indicate epithelial lifting

and sloughing; blue arrows indicate intraepithelial oedema; black arrows indicate fusion of secondary lamellae.



图 3 不同 PrP 处理组暴露 4 d 和 16 d 后食蚊鱼雌鱼肝脏组织切片

注:(a)~(h)分别表示对照组和不同 PrP 处理组(0.15、6和240 μg·L<sup>-1</sup>)暴露4d和16d后食蚊鱼雌鱼肝脏组织切片; 黑色箭头代表肝血窦扩张充血;红色箭头代表细胞空泡化;蓝色箭头代表个别细胞核出现溶解;绿色箭头代表细胞核集中分布。 Fig. 3 Histological appearance of the female mosquitofish liver after PrP exposure with different concentrations for 4 d and 16 d Note: (a)~(h) indicate the histological appearance of female mosquitofish liver after 4 d and 16 d exposure in the control and PrP groups (0.15, 6 and 240 μg·L<sup>-1</sup>); black arrows indicate liver blood sinus expansion and congestion; red arrows indicate cell vacuolation; blue arrows indicate occasional nuclei dissolution; green arrows indicate nucleus centralized distribution.

和 PrP 浓度的增加, 肝脏中的组织损伤愈发严重, 毒 性效应出现时间越早。PrP处理组(0.15、6和240 μg·L<sup>-1</sup>)暴露4d后,出现轻度和中度肝损伤,其中 0.15 μg·L<sup>-1</sup> PrP 处理组肝脏中肝细胞整体分布不均 匀,肝细胞周围出现较小的空泡(图 3(b));6 µg·L<sup>-1</sup> PrP 处理组出现少量空泡,个别肝血窦扩张程度加 重(图 3(c));240 μg·L<sup>-1</sup> PrP 处理组肝脏损伤较严 重,出现空泡化、核偏移且变形、胞质透明等异常的 肝细胞比例提高;严重的部位出现细胞核萎缩、偏 移、溶解、细胞间界限模糊,部分细胞坏死(图 3(d))。 PrP 暴露 16 d 后肝细胞损害加重,其中 0.15 μg·L<sup>-1</sup> PrP 处理组出现个别肝血窦扩张和空泡化,个别肝 细胞肿大现象(图 3(f));6 μg·L<sup>-1</sup>处理组肝血窦扩 张、充血严重,肝细胞水肿、气泡状空泡、细胞核萎 缩、变形以及偏移和淡染,胞质透明,细胞分布杂乱 无章且细胞个数显著减少(图 3(g));240 μg·L<sup>-1</sup> PrP 处理组肝脏损伤最严重,细胞排列杂乱无序,肝血窦 内红细胞增多,细胞水肿较严重,细胞核偏移、淡染、

细胞数目显著减少,且相邻肝细胞的细胞核聚集,坏 死细胞增多,形成肝组织局部病灶(图 3(h))。

# 2.2 PrP 对食蚊鱼抗氧化相关基因表达的影响

由图 4(a)和图 4(b)中可知, PrP 暴露 4 d 时, 各 处理组(0.15、6 和 240 µg·L<sup>-1</sup>)大脑组织中 *cat* 基因 的相对表达量无显著变化(*P*>0.05);240 µg·L<sup>-1</sup>处理 组 *gst* 和 *cyp4501a* 基因相对表达量显著上调(*P*< 0.05); PrP 暴露 16 d 时,240 µg·L<sup>-1</sup>处理组 *cat* 基因 相对表达量显著上调,0.15 µg·L<sup>-1</sup>和 240 µg·L<sup>-1</sup> PrP 处理组 *gst* 基因的相对表达量显著大于对照组 (*P*<0.05), 6 µg·L<sup>-1</sup>和 240 µg·L<sup>-1</sup> PrP 处理组 *cyp4501a* 基因的相对表达量都显著上调(*P*<0.05), 其均值分别为对照组均值的 3.29 倍和 2.47 倍。

由图 4(c)可知, PrP 暴露 4 d 时,各处理组(0.15、 6 和 240 μg·L<sup>-1</sup>)鱼鳃组织的 *cat* 基因相对表达量与 对照组无显著差异(*P*>0.05),但 0.15 μg·L<sup>-1</sup>处理组 显著<6 μg·L<sup>-1</sup>处理组(*P*<0.05);6 μg·L<sup>-1</sup>和 240 μg· L<sup>-1</sup>处理组 *gst* 基因相对表达量显著大于对照组和

 $(0.05)_{\odot}$ 

0.15 μg·L<sup>-1</sup>处理组(P<0.05);240 μg·L<sup>-1</sup>处理组 *cyp4501a*基因相对表达量显著大于对照组和其他 组(P<0.05);暴露时间延长至16 d时(图4(d)),0.15 μg·L<sup>-1</sup> PrP 处理组 *cyp4501a*基因相对表达量显著 小于对照组(P<0.05),6 μg·L<sup>-1</sup>和240 μg·L<sup>-1</sup> PrP





Fig. 4 Expression changes of antioxidant-related genes in different tissues of female mosquitofish

(brain, gills and liver) from different groups after PrP exposure for 4 d and 16 d

Note: The \*on the bars represent significant differences between the PrP groups (\* indicate P<0.05), the same as follows.

处理组 cat、gst 基因相对表达量显著小于对照组(P<

和 cyp4501a 基因的相对表达量与对照组无显著差异

由图 4(e)和图 4(f)可知, PrP 暴露 4 d 后,各处理 组(0.15、6 和 240 μg·L<sup>-1</sup>)食蚊鱼肝脏组织中 cat、gst (P>0.05)。PrP 暴露 16 d 后,各处理组肝脏组织中 cat 基因的相对表达量均显著小于对照组(P<0.05);6 μg·L<sup>-1</sup> PrP 处理组 gst 的相对表达量显著大于对照 组(P<0.05),其均值为对照组均值的 2.83 倍;6 μg· L<sup>-1</sup> PrP 处理组的 cyp4501a 基因相对表达量显著下 调(P<0.05),比对照组下降 74%。

综上可知, PrP 暴露 4 d 时, 6 μg·L<sup>-1</sup>和 240 μg· L<sup>-1</sup>处理组的鱼鳃 cat、gst 和 cyp4501a 基因的相对表 达量上调, 240 μg·L<sup>-1</sup>处理组大脑 gst 和 cyp4501a 基因相对表达量显著上调, 而肝脏组织的基因相对 表达变化不显著, 说明鱼鳃作为直接接触水中污染 物的器官, 反应最为灵敏迅速, 最先启动抗氧化防御 机制。暴露 16 d 后, 240 μg·L<sup>-1</sup>处理组的大脑中 cat、gst 和 cyp4501a 基因的相对表达量上调, 表明随 暴露时间的增加, 大脑组织调控各解毒器官的响应 谱, 以减少过量的活性氧导致生物体氧化应激损伤 的危害。鱼鳃和肝脏的 cat 和 cyp4501a 相对表达量 下降, 表明随暴露时间的延长, 鱼鳃和肝脏组织中氧 化应激反应逐渐减弱。 PrP 处理组中, gst 基因在鱼 鳃中的相对表达量下降, 在肝脏中上调, 说明在 16 d 时肝脏的应激抗氧化反应比鱼鳃强。

# 2.3 PrP 对食蚊鱼内分泌相关基因表达的影响

2.3.1 PrP 对大脑内分泌相关基因表达的影响

PrP 暴露食蚊鱼 4 d 后(图 5(a)),相比对照组, 0.15 μg·L<sup>-1</sup>处理组大脑中内分泌相关基因表达量 均保持上调趋势,其中 erα、erβ、arβ 的 mRNA 相对 表达量显著大于对照组(P<0.05);除 erα 基因外,240 μg·L<sup>-1</sup>处理组其他基因的相对表达量均显著小于 对照组(P<0.05);此外,6  $\mu$ g·L<sup>-1</sup>和 240  $\mu$ g·L<sup>-1</sup> PrP 处理组的基因表达量相对于 0.15  $\mu$ g·L<sup>-1</sup>处理组均 有下降趋势,其中  $er\alpha$ 、 $er\beta$ 、 $ar\alpha$ 、 $ar\beta$ 、gnrhr、cyp19a1b的基因相对表达量显著<0.15  $\mu$ g·L<sup>-1</sup>处理组。240  $\mu$ g·L<sup>-1</sup>处理组 gnrh 相对表达量显著<0.15  $\mu$ g·L<sup>-1</sup> PrP 处理组(P<0.05)。

PrP 暴露食蚊鱼 16 d 后,由图 5(b)可知,PrP 各 处理组(0.15、6 和 240 μg·L<sup>-1</sup>)的内分泌干扰相关基 因的相对表达量均呈现上调趋势,其中各处理组 *erβ、arα* 和 *arβ* 相对表达量均显著大于对照组(P < 0.05);同时,6 μg·L<sup>-1</sup>处理组 *erα* 基因表达量和 0.15 μg·L<sup>-1</sup>处理组 *gnrh* 基因表达量相对于对照组显著 上调,6 μg·L<sup>-1</sup> 和 240 μg·L<sup>-1</sup> 处理组 *gnrhr* 和 *cyp19a1b* 相对表达量也显著大于对照组。

综上可知,不同浓度 PrP 暴露食蚊鱼雌鱼 4 d 后,大脑组织中内分泌相关基因的相对表达量随暴 露浓度的增加呈现先升高后下降的趋势,说明 PrP 急性暴露对食蚊鱼雌鱼内分泌干扰效应呈抛物线型 变化;暴露 16 d 后,内分泌相关基因的相对表达量 呈现出升高的趋势,随时间的增加,PrP 对食蚊鱼大 脑组织的内分泌干扰效应加强。

#### 2.3.2 PrP 对肝脏内分泌相关基因表达的影响

由图 6(a)可知, PrP 暴露雌鱼 4 d 时, 各处理组 (0.15、6 和 240  $\mu$ g·L<sup>-1</sup>)肝脏组织中内分泌相关基因 ( $er\alpha$ 、 $er\beta$ 、 $ar\alpha$ 、vtgC、cyp19a 和 star)相对表达量与对 照组无显著差异(P>0.05), 但 240  $\mu$ g·L<sup>-1</sup>处理组  $ar\beta$ 表达量相对于对照组显著上调, 0.15  $\mu$ g·L<sup>-1</sup>处理组 vtgB 相对表达量显著小于对照组(P<0.05)。



图 5 不同 PrP 处理组暴露 4 d 和 16 d 对食蚊鱼雌鱼大脑内分泌相关基因表达的影响 Fig. 5 Expression changes of endocrine disrupting-related genes of female mosquitofish brain from different groups after PrP exposure for 4 d and 16 d





由图 6(b)可知, PrP 暴露雌鱼 16 d 时, 6 µg·L<sup>-1</sup> 和 240  $\mu g \cdot L^{-1}$ 处理组的  $er\alpha$  基因相对表达量均显著 大于对照组(P<0.05),其均值分为对照组均值的 13.73 倍和 26.95 倍。240 μg·L<sup>-1</sup> PrP 处理组 erβ 基 因相对表达量显著大于对照组和其他处理组(0.15 μg·L<sup>-1</sup>和6 μg·L<sup>-1</sup>)(P<0.05),为对照组均值的2.57 倍。各处理组 arα 基因表达量相对于对照组均显著 上调(P<0.05),0.15 µg·L<sup>-1</sup>和 240 µg·L<sup>-1</sup> PrP 处理组 arβ基因的相对表达量显著大于对照组(P<0.05),其 中 240 μg·L<sup>-1</sup>处理组 arβ 基因相对表达量也显著大 于其他处理组(P<0.05)。vtgB基因表达量均显著大 于对照组,其相对表达量均值分为对照组均值的 26.47 倍、19.48 倍和 155.83 倍。0.15 µg·L<sup>-1</sup>和 240 µg·L<sup>-1</sup> PrP 处理组 vtgC 基因相对表达量显著大于 对照组(P<0.05)。各处理组 cvp19a 和 star 基因的相 对表达量无显著变化(P>0.05)。

## 3 讨论(Discussion)

#### 3.1 PrP 暴露对食蚊鱼雌鱼鱼鳃组织的毒性影响

鱼鳃是鱼类主要的呼吸器官,鳃小片是鱼鳃上 进行气体交换的主要场所,可直接接触水中污染物, 反应灵敏。Flores-Lopes 和 Thomaz<sup>[27]</sup>的研究表明, 鱼鳃对水环境的变化较为敏感,流域水质恶化等会 引起鱼鳃病变。本研究中鱼鳃组织损伤随着 PrP 浓 度升高,损伤程度增强,毒性效应表现时间也越短; 同一浓度下,随着暴露时间的延长,鱼鳃组织结构损 伤程度也越严重,其中组织损伤主要表现为鳃小片 上皮细胞肿胀、增生、顶端膨大导致整体鳃小片增 厚,基部融合,具有支撑作用的柱细胞分布紊乱等。 鱼鳃的结构变化是对污染物的非特异性应激反应, 它担任着鱼类气体交换、渗透压调节和离子转运的 重要作用,同时与外界环境直接接触<sup>[28]</sup>。鱼鳃会通 过鳃丝、鳃小片上的细胞增生,以增加水体进入鱼鳃 内部的距离,减少与水体直接接触的有效面积,阻碍 水体中 PrP 进入鱼体,从而延缓和减轻毒性效应,对 鱼体起到一定的保护作用。在鱼鳃中观察到的组织 损伤可能是鱼鳃对 PrP 暴露的初始反应。这种反应 同时增加了吸收氧气、物质交换的难度,严重影响鱼 体的呼吸、排泄等功能,也破坏了离子平衡和渗透压 调节机制。研究发现 PrP 瞬时暴露和 96 h 急性暴 露食蚊鱼,鱼鳃细胞均向外排出 K<sup>+</sup>,且 K<sup>+</sup>外排量随 着浓度的升高而增大<sup>[21]</sup>,表明 PrP 对鱼体有一定的 毒性,会破坏鱼体内钠钾泵的离子转运功能。

引起鱼鳃组织结构的损伤原因可能是 PrP 诱导 产生的氧化应激反应。过氧化氢酶(cat)、谷胱甘肽 转移酶(gst)、细胞色素 P450 同工酶(cyp4501a)等基 因表达受污染物的影响,从而引起暴露生物的生理 变化。cat、gst、cyp4501a 基因是食蚊鱼解毒相关基 因,PrP 暴露4 d 和16 d 过程中,高、中、低浓度组间 鱼鳃组织中抗氧化基因表达量差异显著。本研究 中,6 μg·L<sup>-1</sup>和240 μg·L<sup>-1</sup>处理组鱼鳃组织中 cat 和 gst 的基因表达量随暴露时间的增加,相对于对照组 呈现出先上升后降低的趋势,这可能是鱼鳃暴露于 PrP 4 d 时具有一定的应激性,随着暴露时间的延长, 其应激性逐渐减弱,从而加剧了鱼鳃组织的损伤。

# 3.2 PrP 暴露对食蚊鱼雌鱼大脑组织的毒性影响

PrP 暴露 4 d 和 16 d 后,各处理组中食蚊鱼的 大脑切片均未发现明显的组织病理变化。PrP 暴露 食蚊鱼 16 d 后,各处理组大脑组织的解毒相关基因 相对表达量上调,鱼体通过调节 cat、gst 和 cyp4501a 的活性以应对 PrP 暴露引起的毒性作用,随着时间 的延长,大脑抗氧化系统适应了 PrP 暴露引起的氧 化损伤,这可能是大脑组织未发现明显的组织病变 的原因之一。这与 Silva 等<sup>[29]</sup>研究结果相似,尼罗罗 非鱼(Oreochromis niloticus)长时间(6 d 和 12 d)暴露 于亚致死浓度,尼罗罗非鱼对 PrP 抗性增加,表明 PrP 的暴露时间影响鱼类抗氧化系统的适应性。

PrP 暴露食蚊鱼4 d 时,随着浓度增加,大脑组 织中内分泌相关基因的 mRNA 表达量均呈现先升 高后下降的趋势,具有抛物线剂量-效应关系,研究 结果与李钰静等<sup>[30]</sup>相似。PrP 暴露后内分泌相关基 因表达表现为短时低浓度促进、高浓度抑制。PrP 暴露食蚊鱼 16 d 后,各处理组的内分泌相关基因 (erα、erβ、arα、arβ、gnrh、gnrhr 和 cyp19a1b)显著上 调,这可能是因为食蚊鱼雌鱼抵抗污染物的应激能 力随暴露时间增加而增加,鱼类大脑中抗氧化系统 适应了 PrP 的氧化损伤,大脑受 PrP 内分泌干扰作 用导致内分泌相关基因显著上调。

生物体的雌激素受体(ERs)的主要作用是调节 体内雌激素的含量,许多内分泌干扰物(EDCs)可以 作为配体与雌激素竞争 ERs 上的结合位点,影响其 转录活性,从而影响生物体的正常生命活动<sup>[31]</sup>。研 究表明 parabens (MeP、EtP、PrP 和 BuP 等)能竞争性 地结合 ERs<sup>[32]</sup>,并具有类似雌激素的干扰能力,影响 ERs 依赖性基因的表达<sup>[33]</sup>。本研究中,低浓度 PrP 组 $(0.15 \,\mu g \cdot L^{-1})$ 急性毒性暴露后,食蚊鱼雌鱼大脑 中 erα 和 erβ 基因表达量的上升也可能是 PrP 作用 于 ERs 上的结合位点的结果:长时间 PrP 暴露导致 各处理组食蚊鱼大脑中 erα 和 erβ 基因表达量均上 升,表明 PrP 具有内分泌干扰效应。这与 Kang 等<sup>[34]</sup> 的研究结果相似, EtP 暴露激活人类细胞系的 ERs, 低浓度的对羟基苯甲酸异丁酯诱导雌激素活性,表 明 parabens 能与雌激素受体 ERs 结合。生物体中雄 激素受体(ARs)的作用与 ERs 相似,性激素通过结合 并激活 ARs 发挥其功能, ARs 在鱼类的性别分化、 性别逆转和性成熟中发挥重要作用<sup>[25]</sup>。

*gnrh*和 *gnrhr*分别在鱼体的下丘脑与垂体中特 异性表达,在 HPG 轴的稳态调节中发挥重要作 用<sup>[35]</sup>。PrP 暴露 4 d 后,低浓度组(0.15  $\mu$ g·L<sup>-1</sup>) *gnrh* 基因显著上调,中、高浓度组(6  $\mu$ g·L<sup>-1</sup>和 240  $\mu$ g· L<sup>-1</sup>)无显著变化,这与三氯生(TCS)暴露的黄河鲤鱼 gnth 基因的变化<sup>[36]</sup>结果相似,其原因可能为 PrP 浓度能导致鱼体产生应激反应,但无法引起生殖内分泌紊乱。同时,PrP 暴露 16 d时,中、高浓度组 gnthr 基因显著上调,而在低浓度组没有变化,表明长时间暴露下中、高浓度 PrP 可能导致生殖内分泌紊乱。

芳香化酶 cyp19al 是调节体内雌激素水平的关 键酶,可控制体内雌激素的产生速率。研究表明性 激素变化会对 cyp19alb 表达产生影响,其表达水平 的上升或下降均能影响雌激素的合成速率,从而导 致食蚊鱼的代谢失衡<sup>[25]</sup>。PrP 暴露时间为4 d 时,大 脑组织中的中、高浓度组雌激素受体 ERs 和 cyp19a1b显著下调;暴露时间延长至16 d时,各处 理组 cvp19a1b 基因的表达量均上调:可能是短时暴 露后中、高浓度 PrP 诱导 cyp19a1b 表达量下调,促 使雌鱼体内的激素水平降低,随着时间的延长,PrP 诱导雌鱼体内雄激素转化为雌激素,故 ARs 表达提 高,大脑组织各处理组中 arα 和 arβ 基因也呈上升 趋势。Fang 等<sup>[25]</sup>研究发现由于雄激素睾酮在食蚊 鱼大脑中的异构为雌激素雌二醇, cvp19a1b 基因受 影响上调。Pollock 等<sup>[37]</sup>的研究表明 PrP 和 BuP 能 改变代谢酶的变化,导致雌激素雌二醇水平升高。 3.3 PrP 暴露对食蚊鱼雌鱼肝脏组织的影响

肝脏组织是鱼类解毒的主要器官,外界毒物通 过鱼鳃或体表接触进入鱼体内,并通过血液运输到 体内各个组织器官,其中肝脏受到的毒性作用最大, 因此肝脏组织的形态学变化可以作为水体污染物毒 性作用的指标<sup>[38]</sup>。研究表明,当肝脏受到损伤后主 要表现为肝细胞水肿、空泡化、脂沉积、肝血窦扩张 充血、细胞核固缩偏移<sup>[38]</sup>,严重的损伤包括肝细胞溶 解、坏死,形成局部病灶<sup>[24]</sup>。本研究中,经过 PrP 暴 露4d和16d后,PrP处理组的食蚊鱼肝脏出现了 类似的损伤,不同处理组的肝脏组织切片呈现了不 同程度的组织结构变化,且随着 PrP 暴露浓度升高 损伤程度越严重,毒性效应表现时间也越早。

PrP 暴露 16 d 后, 肝脏组织中 cat 基因的表达量 下调, 表明 PrP 对鱼类肝脏中 cat 基因的表达有抑制 作用, 而 cat 表达量的下调可能导致鱼体肝脏组织 的抗氧化解毒能力降低, 导致肝脏组织内发生氧化 损伤。Bereketoglu 和 Pradhan<sup>[39]</sup>的研究表明 PrP 影 响了斑马鱼体内抗氧化基因的表达。Elmore 等<sup>[40]</sup> 研究也发现 parabens 暴露能增加斑马鱼胚胎的畸形 和死亡比例, 扰乱鱼体的氧化-抗氧化平衡, 降低其 运动活性, myca 和 cendl 等基因的表达上调, GST 活性和 NO 水平降低,并诱导细胞凋亡。本研究中, 食蚊鱼 cat 基因表达量下调引起的氧化应激可引起 DNA、蛋白质和脂膜的氧化损伤以及细胞分裂和细 胞活力的异常,这可能是导致肝脏细胞损伤的原因 之一。

PrP 暴露食蚊鱼 16 d 后, 肝脏组织中各处理组 era、erβ、ara、arβ、vtgC 和 vtgB 基因的表达显著上 调。erα主要存在于脂肪细胞、骨骼、肾脏、肝脏、免 疫细胞、心血管系统和生殖器官中<sup>[41]</sup>。PrP 暴露 16 d时, 肝脏组织中  $er\alpha$  基因的表达量显著上调, 肝脏 中 vtgC和 vtgB的 mRNA 表达被平行诱导。硬骨鱼 中雌激素可通过 ERs 介导刺激肝脏合成 Vtg,鱼体 的 Vtg 是一种卵黄蛋白,由肝脏合成和分泌,以响应 雌性鱼类中的雌激素[31];外源雌激素类化学物质也 能刺激肝脏细胞产生 Vtg,通过血液循环运至卵 巢<sup>[42]</sup>。研究证明, PrP 可以诱导虹鳟鱼合成卵黄原 蛋白,具有雌激素活性<sup>[43]</sup>。由此可知,当 PrP 进入鱼 体的肝脏时,与靶基因的雌激素反应元件结合以调 节其表达, PrP 与 erα 结合形成 erα 复合物, 随之过 量的  $er\alpha$  激活 vtgC 和 vtgB 转录。同时 PrP 增强下 丘脑的 gnrh 和垂体的 gnrhr 表达和分泌,导致生殖 内分泌紊乱,这也间接影响性类固醇水平以增加 Vtg 含量,同时反映出 PrP 具有雌激素效应。同时, PrP 引起食蚊鱼雌鱼雄激素受体 arα 和 arβ 上调可 能是 PrP 的雌激素活性降低导致雌激素水平下降, 负反馈使雄激素水平升高,间接促进了雄激素受体 基因 arα 和 arβ 上调。裴雪松等[44]在 PrP 暴露青春 前期雄性大鼠的实验中,也发现了血清雄激素水平 和睾丸组织中的雄激素水平显著升高的现象。

PrP 可以作为雌激素受体激活剂或雄激素受体 拮抗剂。雌性食蚊鱼暴露 16 d 后的肝脏组织 ERs、 ARs 和 Vtg 的相关基因表达量均上调,这些基因的 上调表明 PrP 可影响雌激素受体和雄激素受体的功 能。另外,与对照组相比,PrP 暴露 16 d 后雌性食蚊 鱼大脑中 ERs、ARs 和 cyp19a 相关基因的表达也呈 上调趋势。其中芳香化酶 cyp19a1 是调节体内雌激 素水平的关键酶,控制着体内雌激素的产生速率, *cyp19a* 基因的上调可能导致雌激素的产生速率增 加,从而导致 ERs 和 ARs 同步增加。此外,ERs 是 雌激素内分泌紊乱的标志物,不同 PrP 暴露剂量和 不同暴露时间下 *era* 和 *erβ* 基因表达量的变化也证 实了 PrP 对雌激素受体的影响,因此,这些发现表明 PrP 可能会导致 ERs 介导的转录信号通路调控失 衡<sup>[21]</sup>。组织病理学是评估外源物质对鱼类内分泌干扰的工具之一<sup>[45]</sup>。研究发现,雌性大鼠亚慢性暴露于聚苯乙烯微塑料(polystyrene microplastics, PS-MPs)后,由于激素失衡、氧化应激导致代谢和内分泌功能紊乱,肝脏组织出现轻微的纤维化、星状细胞被激活<sup>[46]</sup>。Zheng等<sup>[47]</sup>的研究结果也证明 B[a]P 干扰雌性菲律宾沙蚕内分泌系统,影响类固醇激素合成途径和雌激素信号通路,组织切片显示 B[a]P 严重阻碍了卵母细胞的正常发育和卵巢的成熟。因此,内分泌紊乱、组织损伤和抗氧化之间具有一定的关联。本研究中, PrP 诱导食蚊鱼雌鱼的组织损伤也是抗氧化系统和内分泌系统功能异常的表现。

综上所述,本研究评估了不同剂量 PrP 和不同 暴露时间对食蚊鱼雌鱼的毒性损伤,通过抗氧化和 内分泌相关基因的表达量变化明确了 PrP 对食蚊鱼 雌鱼的毒性作用和内分泌干扰效应。不同浓度的 PrP 暴露食蚊鱼4 d 和16 d 后,PrP 引起的抗氧化损 伤导致食蚊鱼鱼鳃、肝脏组织均出现不同程度的结 构损伤,且损伤程度与食蚊鱼抗氧化相关基因的表 达变化量有一定的相关性。内分泌相关基因的表达 变化显示,PrP 的暴露诱导食蚊鱼雌鱼雌激素 ERs、 卵黄蛋白原 Vtg 和 gnrh、gnrhr 的变化,表明 PrP 可 能介导食蚊鱼雌激素受体 ERs,影响其转录活性,干 扰雌激素的合成,从而产生雌激素效应。综上所述, PrP 对食蚊鱼具有毒性作用、雌激素效应和内分泌 干扰作用。本研究分析了 PrP 的毒性和内分泌干扰 机制,为 PrP 的安全应用提供了科学依据。

**致谢:**感谢广西农业面源污染综合治理工程研究中心、广西 生态环保现代产业学院对论文实验开展的支持。

通信作者简介:宋晓红(1990—),女,博士,高级实验师,主要 研究方向为污染物对水生生物的毒性机理研究。

#### 参考文献(References):

- [1] 宁晓盼,姚倩,许忠祥,等. 固相萃取-高效液相色谱法 测定水产调味品中 7 种对羟基苯甲酸酯类防腐剂[J]. 色谱, 2023, 41(6): 513-519
  Ning X P, Yao Q, Xu Z X, et al. Determination of seven paraben preservatives in aquatic seasoning using solidphase extraction coupled with high performance liquid chromatography [J]. Chinese Journal of Chromatography, 2023, 41(6): 513-519 (in Chinese)
- [2] Li Y W, Li S Z, Zhao M B, et al. Acid-induced tubular g- $C_3N_4$  for the selective generation of singlet oxygen by en-

ergy transfer: Implications for the photocatalytic degradation of parabens in real water environments [J]. The Science of the Total Environment, 2023, 896: 165316

- [3] Li C, Zhao Y, Liu S, et al. Exposure of Chinese adult females to parabens from personal care products: Estimation of intake via dermal contact and health risks [J]. Environmental Pollution, 2021, 272: 116043
- [4] 于博学. GC/MS 法测定食醋中对羟基苯甲酸乙酯、对羟基苯甲酸丙酯[J]. 黑龙江环境通报, 2011, 35(2): 40-43

Yu B X. Determining ethyl p-hydroxybenzoate and propyl p-hydroxybenzoate in vinegar by gas chromatographymass spectrometry [J]. Heilongjiang Environmental Journal, 2011, 35(2): 40-43 (in Chinese)

- [5] Hager E, Chen J G, Zhao L. Minireview: Parabens exposure and breast cancer [J]. International Journal of Environmental Research and Public Health, 2022, 19(3): 1873
- [6] Wei F, Mortimer M, Cheng H F, et al. Parabens as chemicals of emerging concern in the environment and humans: A review [J]. The Science of the Total Environment, 2021, 778: 146150
- [7] 林忠洋, 马万里, 齐迹, 等. 对羟基苯甲酸酯类防腐剂的人体暴露[J]. 化学进展, 2015, 27(5): 614-622
  Lin Z Y, Ma W L, Qi J, et al. Human exposure to parabens [J]. Progress in Chemistry, 2015, 27(5): 614-622 (in Chinese)
- [8] Vale F, Sousa C A, Sousa H, et al. Parabens as emerging contaminants: Environmental persistence, current practices and treatment processes [J]. Journal of Cleaner Production, 2022, 347: 131244
- [9] Gasperi J, Geara D, Lorgeoux C, et al. First assessment of triclosan, triclocarban and paraben mass loads at a very large regional scale: Case of Paris conurbation (France)
   [J]. Science of the Total Environment, 2014, 493: 854-861
- [10] Haman C, Dauchy X, Rosin C, et al. Occurrence, fate and behavior of parabens in aquatic environments: A review[J]. Water Research, 2015, 68: 1-11
- [11] Pedersen K L, Pedersen S N, Christiansen L B, et al. The preservatives ethyl-, propyl- and butylparaben are oestrogenic in an *in vivo* fish assay [J]. Pharmacology & Toxicology, 2000, 86(3): 110-113
- [12] Oishi S. Effects of propyl paraben on the male reproductive system [J]. Food and Chemical Toxicology: An International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association, 2002, 40(12): 1807-1813
- [13] Bjerregaard P, Andersen D N, Pedersen K L, et al. Estrogenic effect of propylparaben (propylhydroxybenzoate) in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* after exposure via

food and water [J]. Comparative Biochemistry and Physiology Toxicology & Pharmacology, 2003, 136(4): 309-317

- [14] Lite C, Guru A, Juliet M, et al. Embryonic exposure to butylparaben and propylparaben induced developmental toxicity and triggered anxiety-like neurobehavioral response associated with oxidative stress and apoptosis in the head of zebrafish larvae [J]. Environmental Toxicology, 2022, 37(8): 1988-2004
- [15] Nowak K, Ratajczak-Wrona W, Górska M, et al. Parabens and their effects on the endocrine system [J]. Molecular and Cellular Endocrinology, 2018, 474: 238-251
- [16] Merola C, Lai O, Conte A, et al. Toxicological assessment and developmental abnormalities induced by butylparaben and ethylparaben exposure in zebrafish early-life stages
   [J]. Environmental Toxicology and Pharmacology, 2020, 80: 103504
- [17] Jiao L W, Li S, Zhai J Y, et al. Propylparaben concentrations in the urine of women and adverse effects on ovarian function in mice *in vivo* and ovarian cells *in vitro* [J]. Journal of Applied Toxicology, 2021, 41(11): 1719-1731
- [18] Perugini M, Merola C, Amorena M, et al. Sublethal exposure to propylparaben leads to lipid metabolism impairment in zebrafish early-life stages [J]. Journal of Applied Toxicology, 2020, 40(4): 493-503
- [19] 钟林燕,谢勇平,赖静萍,等.3,4-苯并芘暴露对食蚊鱼 生长发育的毒性影响[J]. 江西农业学报,2014,26(4): 94-97

Zhong L Y, Xie Y P, Lai J P, et al. Toxic effects of 3, 4benzopyrene exposure on growth and development of mosquitofish [J]. Acta Agriculturae Jiangxi, 2014, 26(4): 94-97 (in Chinese)

[20] 熊甜甜,方展强. 雌二醇、双酚 A 和苯并[a]芘对食蚊鱼 目标基因表达的影响[J]. 生物学杂志, 2015, 32(5): 19-24

Xiong T T, Fang Z Q. Target gene expression in *Gambusia affinis* exposed to  $17\beta$ -estradiol, bisphenol A and benzo[a]pyrene [J]. Journal of Biology, 2015, 32(5): 19-24 (in Chinese)

- [21] Ma Y, Li Y J, Song X H, et al. Endocrine disruption of propylparaben in the male mosquitofish (*Gambusia affinis*): Tissue injuries and abnormal gene expressions of hypothalamic-pituitary-gonadal-liver axis [J]. International Journal of Environmental Research and Public Health, 2023, 20(4): 3557
- [22] 闫小雨, 曾鸿鹄, 宋晓红, 等. 对羟基苯甲酸丙酯对食 蚊鱼(Gambusia affinis)鳃和表皮 K<sup>+</sup>流速的影响[J]. 生 态毒理学报, 2021, 16(3): 291-301

Yan X Y, Zeng H H, Song X H, et al. Effect of propylparaben (PrP) on K<sup>+</sup> velocity in skin and gills of mosquito fish (*Gambusia affinis*) [J]. Asian Journal of Ecotoxicology, 2021, 16(3): 291-301 (in Chinese)

- [23] 欧瑞康,武小燕,库培佳,等. 食蚊鱼(Gambusia afinis) cat、gapdh和 gst基因的克隆及其在生态毒理学中的应 用[J]. 生态毒理学报, 2015, 10(3): 83-92
  Ou R K, Wu X Y, Ku P J, et al. Cloning of cat, gapdh and gst genes of Gambusia affinis and its application in ecotoxicology [J]. Asian Journal of Ecotoxicology, 2015, 10 (3): 83-92 (in Chinese)
- [24] Zhong L S, Liang Y Q, Lu M X, et al. Effects of dexamethasone on the morphology, gene expression and hepatic histology in adult female mosquitofish (*Gambusia affinis*)
   [J]. Chemosphere, 2021, 274: 129797
- [25] Fang G Z, Huang G Y, Ying G G, et al. Endocrine disrupting effects of binary mixtures of 17β-estradiol and testosterone in adult female western mosquitofish (*Gambusia affinis*) [J]. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2021, 208: 111566
- [26] Hou L P, Chen S D, Chen H X, et al. Rapid masculinization and effects on the liver of female western mosquitofish (*Gambusia affinis*) by norethindrone [J]. Chemosphere, 2019, 216: 94-102
- [27] Flores-Lopes F, Thomaz A T. Histopathologic alterations observed in fish gills as a tool in environmental monitoring [J]. Brazilian Journal of Biology, 2011, 71(1): 179-188
- [28] 李豫, 黄建盛, 陈有铭, 等. 低温胁迫对军曹鱼幼鱼鳃 组织抗氧化能力、细胞凋亡和组织结构的影响[J]. 南 方水产科学, 2023, 19(3): 68-77
  Li Y, Huang J S, Chen Y M, et al. Effect of low temperature stress on antioxidant stress, apoptosis and histological

structure of gills in cobia (*Rachycentron canadum*) [J]. South China Fisheries Science, 2023, 19 (3): 68-77 (in Chinese)

- [29] Silva D C, Serrano L, Oliveira T M A, et al. Effects of parabens on antioxidant system and oxidative damages in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) [J]. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2018, 162: 85-91
- [30] 李钰静,黎昕,马雲,等. 对羟基苯甲酸丙酯对大型溞 (Daphnia magna)的毒性作用及其分子机制[J]. 生态毒 理学报, 2022, 17(2): 317-326
  Li Y J, Li X, Ma Y, et al. Toxic effects and its molecular mechanism of propylparaben (PrP) on Daphnia magna [J]. Asian Journal of Ecotoxicology, 2022, 17(2): 317-326 (in Chinese)
- [31] 孙欠欠. 戊唑醇对斑马鱼成鱼 HPG 轴的内分泌干扰效

应[D]. 杭州: 浙江大学, 2017: 1-2

Sun Q Q. Endocrine disruption of tebuconazole on the HPG axis of adult zebrafish [D]. Hangzhou: Zhejiang U-niversity, 2017: 1-2 (in Chinese)

- [32] Byford J R, Shaw L E, Drew M G, et al. Oestrogenic activity of parabens in MCF7 human breast cancer cells [J]. The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology, 2002, 80(1): 49-60
- [33] Lillo M A, Nichols C, Perry C, et al. Methylparaben stimulates tumor initiating cells in ER+ breast cancer models
   [J]. Journal of Applied Toxicology, 2017, 37(4): 417-425
- [34] Kang H M, Kim M S, Hwang U K, et al. Effects of methylparaben, ethylparaben, and propylparaben on life parameters and sex ratio in the marine copepod *Tigriopus japonicus* [J]. Chemosphere, 2019, 226: 388-394
- [35] 孙静, 孙爱, 吴立新, 等. 鱼类促性腺激素释放激素 3 (GnRH3)来源、进化及功能研究进展[J]. 农业生物技术 学报, 2019, 27(4): 735-742
  Sun J, Sun A, Wu L X, et al. Research advances in the source, evolution and function of gonadotropin releasing hormone 3 (GnRH3) in fish [J]. Journal of Agricultural Biotechnology, 2019, 27(4): 735-742 (in Chinese)
- [36] Wang F, Guo X M, Chen W G, et al. Effects of triclosan on hormones and reproductive axis in female Yellow River carp (*Cyprinus carpio*): Potential mechanisms underlying estrogen effect [J]. Toxicology and Applied Pharmacology, 2017, 336: 49-54
- [37] Pollock T, Weaver R E, Ghasemi R, et al. Butyl paraben and propyl paraben modulate bisphenol A and estradiol concentrations in female and male mice [J]. Toxicology and Applied Pharmacology, 2017, 325: 18-24
- [38] Song X H, Wang X G, Li X, et al. Histopathology and transcriptome reveals the tissue-specific hepatotoxicity and gills injury in mosquitofish (*Gambusia affinis*) induced by sublethal concentration of triclosan [J]. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2021, 220: 112325
- [39] Bereketoglu C, Pradhan A. Comparative transcriptional analysis of methylparaben and propylparaben in zebrafish[J]. Science of the Total Environment, 2019, 671: 129-139
- [40] Elmore S E, Cano-Sancho G, La Merrill M A. Disruption of normal adipocyte development and function by methyland propyl- paraben exposure [J]. Toxicology Letters, 2020, 334: 27-35
- [41] Bronowicka-Kłys D E, Lianeri M, Jagodziński P P. The role and impact of estrogens and xenoestrogen on the development of cervical cancer [J]. Biomedicine & Pharmacotherapy, 2016, 84: 1945-1953
- [42] 胡志伟, 钟爱华. 炔雌醇和菲2种环境内分泌干扰物对

斑马鱼的影响研究进展[J]. 安徽农业科学, 2014, 42 (35): 12539-12541

Hu Z W, Zhong A H. Research advance of ethinyl estradiol and phenanthrene effect on the zebrafish (*Brachydanio rerio*) [J]. Journal of Anhui Agricultural Sciences, 2014, 42(35): 12539-12541 (in Chinese)

- [43] Bjerregaard P, Andersen D N, Pedersen K L, et al. Estrogenic effect of propylparaben (propylhydroxybenzoate) in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* after exposure via food and water [J]. Comparative Biochemistry and Physiology Toxicology & Pharmacology, 2003, 136 (4): 309-317
- [44] 裴雪松. 典型内分泌干扰物对大鼠青春期生殖内分泌 系统的影响及其机制研究[D]. 北京: 中国疾病预防控 制中心, 2007: 43-44

Pei X S. Effect of typical endocrine disruptors on reproductive endocrine system in adolescent rats and its mechanism [D]. Beijing: Chinese Center for Disease Control and Prevention, 2007: 43-44 (in Chinese)

- [45] van der Ven L T M, Wester P W, Vos J G. Histopathology as a tool for the evaluation of endocrine disruption in zebrafish (*Danio rerio*) [J]. Environmental Toxicology and Chemistry, 2003, 22(4): 908-913
- [46] Saeed A, Akhtar M F, Saleem A, et al. Reproductive and metabolic toxic effects of polystyrene microplastics in adult female Wistar rats: A mechanistic study [J]. Environmental Science and Pollution Research, 2023, 30 (22): 63185-63199
- [47] Zheng X, Tang J, Song A M, et al. Study on reproductive endocrine disturbance and DNA damage mechanism of female *Ruditapes philippinarum* under benzo [a] pyrene stress [J]. Environmental Pollution, 2024, 340 (Pt 2): 122844