

# 草甘膦对青鳉鱼卵黄蛋白原的诱导及其潜在分子机理

夏爽<sup>1,2</sup>, 赵砚彬<sup>2</sup>, 杨鸣琦<sup>1</sup>, 胡建英<sup>2\*</sup> (1.西北农林科技大学动物医学院, 陕西 杨凌 712100; 2.北京大学城市与环境学院, 北京 100871)

**摘要:** 为了研究草甘膦潜在的雌激素效应, 将 1~3d 的雌雄青鳉幼鱼暴露于不同浓度 (0.2, 2, 20, 200, 2000 $\mu\text{g/L}$ ) 的草甘膦 5 周, 发现雌雄鱼肝脏卵黄蛋白原(VTG I)基因表达分别在 0.2, 2, 20 $\mu\text{g/L}$  浓度(雌鱼)和 2, 20, 200 $\mu\text{g/L}$  浓度(雄鱼)下受到显著诱导, 但在高浓度下(雌鱼, 200 $\mu\text{g/L}$  和 2000 $\mu\text{g/L}$ ; 雄鱼, 2000 $\mu\text{g/L}$ )恢复到正常水平。草甘膦诱导雌激素效应的机理存在雌雄差异: 雌鱼中雌激素效应主要由于草甘膦诱导了脑部 FSH 和性腺 CYP19A 基因, 从而增加了雌激素合成能力。雄鱼中主要由于草甘膦抑制肝脏中雌激素代谢酶 (CYP1A、CYP1B 和 CYP3A) 而显示雌激素效应。

**关键词:** 草甘膦; 雌激素效应; 卵黄蛋白原; 雌激素合成和代谢

**中图分类号:** X503.2      **文献标识码:** A      **文章编号:** 1000-6923(2013)09-1656-08

## Induction of vitellogenin gene expression in medaka exposed to glyphosate and potential molecular mechanism.

XIA Shuang<sup>1,2</sup>, ZHAO Yan-Bin<sup>2</sup>, YANG Ming-Qi<sup>1</sup>, HU Jian-Ying<sup>2\*</sup> (1.College of Animal Medicine, Northwest A&F University, Yangling 712100, China; 2.College of Urban and Environmental Sciences, Peking University, Beijing 100871, China). *China Environmental Science*, 2013,33(9): 1656~1663

**Abstract:** To demonstrate the estrogenic activities of glyphosate and clarify the underlying molecular mechanism, 1~3days old Japanese medaka were exposed to 0.2, 2, 20, 200, 2000 $\mu\text{g/L}$  of glyphosate for 5weeks. Transcription levels of vitellogenin (VTG I) and enzyme genes involved in 17 $\beta$ -E2biosynthesis and metabolism were measured by Q-RT-PCR. While glyphosate markedly up-regulated VTG transcription levels in both female and male fish, the upward trend was inhibited at the high glyphosate concentrations (at 200 $\mu\text{g/L}$  and 2000 $\mu\text{g/L}$  for female, at 2000 $\mu\text{g/L}$  for male). The gender specific molecular mechanism was observed. In female fish, VTG induction would be due to the increase of transcription levels of FSH gene in brain and CYP19A gene in the gonad, and therefore enhancing the biosynthesis of 17 $\beta$ -E2. However in male fish, the inhibited CYP1A, CYP1B and CYP3A transcription levels which would inhibit 17 $\beta$ -E2metabolism would be the reasonable explanation.

**Key words:** glyphosate; estrogenic activities; vitellogenin; biosynthesis and metabolism of 17 $\beta$ -E2

有机磷类化合物在农业生产中被逐渐广泛应用。近年来,随着一系列低毒有机磷农药<sup>[1-2]</sup>、阻燃剂<sup>[3]</sup>等有机磷化合物的开发和市场化,有机磷类化合物在人类生活以及工农业生产中占的地位越来越重要,其毒性也随之受到人们的重视。

长久以来,人们对有机磷化合物毒性的关注大多只集中在急性神经毒性上<sup>[4]</sup>,对其内分泌干扰作用如雌激素效应,则研究甚少。体外实验表明有机磷化合物并不能通过结合雌激素受体而引起雌激素效应。如 Chen 等<sup>[5]</sup>通过 MCF-7 细胞体外增殖实验和雌激素受体体外结合活性实验证明,辛硫磷、马拉硫磷、乐果和久效磷 4 种有机

磷农药并不显示雌激素效应; Kojima 等<sup>[6]</sup>也利用体外雌激素受体结合实验证明久效磷等有机磷农药不能引起雌激素效应。近年来也有文献报道了有机磷类物质对脑垂体促性腺激素具有一定的干扰作用。如 Esmail 等<sup>[7]</sup>将二嗪磷暴露雄性小鼠,导致其血清中促黄体生成素(LH)和卵泡刺激素(FSH)含量升高;Joshi 等<sup>[8]</sup>将雄性大鼠暴露于乙酰甲胺磷,也同样观察到血清中 LH、FSH 含量的上升,显示有机磷可影响脑垂体促性腺激素的合

收稿日期: 2013-01-18

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(41171385,20977002)

\* 责任作者, 教授, hujy@urban.pku.edu.cn

成。但是有机磷类物质是否能够通过对脑垂体促性腺激素的干扰作用产生雌激素效应还没有相关的报道。

草甘膦,由于高效、低毒、广谱、内吸传导非选择的特点,近年来成为全世界应用最广的有机磷除草剂<sup>[9]</sup>,具有较高的环境浓度。Sanchís 等<sup>[10]</sup>在西班牙检测了 140 个不同地区地下水样品中,有 41%检出了草甘膦,平均浓度为 200ng/L,最高浓度为 2.5 $\mu$ g/L;Popp 等<sup>[11]</sup>调查了奥地利 Vorarlberg 地区最主要的河流,草甘膦浓度大约为 0.67 $\mu$ g/L;Peruzzo 等<sup>[12]</sup>对阿根廷布宜诺斯艾利斯省某主要农产区河流调查显示,草甘膦甚至达到 0.70mg/L。但是目前对草甘膦毒性的研究集中于急性毒性上,没有关于草甘膦内分泌干扰作用方面的研究。

本研究以青鳉鱼为实验动物,通过定量 PCR 评估了草甘膦对肝脏 VTG 的潜在诱导作用,并通过分析调控雌激素合成的一系列脑垂体性腺轴关键基因和肝脏雌激素代谢酶基因的表达变化对其诱导机理进行了深入的解析。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

40wt.%草甘膦异丙胺盐水溶液,购自 sigma;trizol,购自 invirogen;M-MMLV 反转录套装,购自康维世纪;SYB @Green PCR Master mix,购自 invirogen。

### 1.2 实验用鱼饲养

青鳉鱼(Orange-Red strain)由本实验室繁殖并饲养,养殖用水为经活性碳过滤并曝气的自来水。水温控制在(25 $\pm$ 1) $^{\circ}$ C,水硬度(以 CaCO<sub>3</sub> 计)为(81.1 $\pm$ 1.2)mg/L, pH 值为 7.9 $\pm$ 0.1,溶解氧为(7.8 $\pm$ 0.3)mg/L。光周期为 16h: 8h(昼:夜),以丰年虫(*Artemia nauplii*)刚孵化出的幼虫为饵料,每天上午下午各喂食一次,并及时清除多余饵料和排泄物。

### 1.3 暴露实验

采用刚孵化出 1~3d(1~3dph)的鱼苗,进行暴露实验。共设置 5 个浓度梯度,每个梯度的草甘膦异丙胺盐浓度分别为 0.2,2,20,200,2000 $\mu$ g/L。以经活性碳过滤并曝气的自来水做空白对照。每日

全量换水。用超纯水稀释 40wt.%草甘膦异丙胺盐水溶液配制一系列浓度为 0.004,0.04,0.4,4,40 $\mu$ g/ $\mu$ L 的标样,取 200 $\mu$ L 的上述标样到对应的 4L 暴露池中,使暴露池终浓度分别为 0.2,2,20,200,2000 $\mu$ g/L。

暴露持续 5 周,在最后 1d,每组随机取雌雄鱼各 6 条,用冰块麻醉,然后每条鱼分别取肝脏、性腺和脑,做好标记,放入液氮中,用来提取总 RNA。

### 1.4 总 RNA 提取和 cDNA 第一链合成

采用 Trizol 试剂分别提取肝脏、脑、性腺组织总 RNA,然后对提取的总 RNA 进行 DNase I 处理和纯化。所得总 RNA 紫外光吸收 A260/280 大于 1.8。采用 HiFi-MMLV 逆转录酶和 OligodT15 引物合成 cDNA 第一条链。

### 1.5 荧光定量 PCR 检测

根据本实验室已建立的方法,用 ABI7500 型荧光定量 PCR 仪进行荧光定量 PCR 检测,RPL-7 用作内参基因校正实验误差<sup>[13]</sup>。Primer Premier 5.0(Premier Biosoft)设计所测基因的引物序列,设计时尽可能的跨越内含子,以降低 DNA 污染。引物具体序列列表 1,由北京三博远志生物技术公司合成。

表 1 实时定量 PCR 引物

基因	引物序列	Genebank NO.
FSH $\beta$	5'-GGGATGTCCAGTGGGTTTCA-3'	EF535801
	5'-GCCGCAGTATGTGGTTCTTGT-3'	
CYP19A	5'-GCGTAGAGCCCTTTTCGATGA-3'	D82968
	5'-TGCGGCCCGTATTCAAGAT-3'	
17 $\beta$ HSD I	5'-CTTGCTGGAATGAAAGCACA-3'	EF530597
	5'-TGAAAGGAAGCCCATGGAGTC-3'	
VTG I	5'-CTCCAGCTTTGAGGCCATTAC-3'	AB064320
	5'-ACAGCACGGACAGTGACAACA-3'	
CYP1A	5'-ATCGGCCTGAATCGAAATCC-3'	AY297923
	5'-TGTGTCCCTGTGTGTCAGTGT-3'	
CYP1B	5'-GCTGTTTCTCTCTGTGGCATT-3'	JF894387
	5'-CGATGTCATAGCGGTGAGGTTT-3'	
CYP3A	5'-GAGATAGACGCCACCTTCC-3'	AF105018
	5'-ACCTCCACAGTTGCCTTG-3'	
RPL-7	5'-CGCCAGATCTTCAACGGTGTAT-3'	DQ118296
	5'-AGGCTCAGCAATCCTCAGCAT-3'	

## 1.6 数据处理

定量 PCR 数据以  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  法计算基因的相对表达量.采用 SPSS 软件(Ver 11.5; Chicago, IL,美国)的独立样品  $t$  检验,来检验不同暴露组和对照组的基因表达差异的显著性, $P<0.05$  为差异显著.每个基因的不同浓度暴露组的基因表达量用对照组基因表达量的倍数表示.

## 2 结果

### 2.1 肝脏卵黄蛋白原基因表达变化

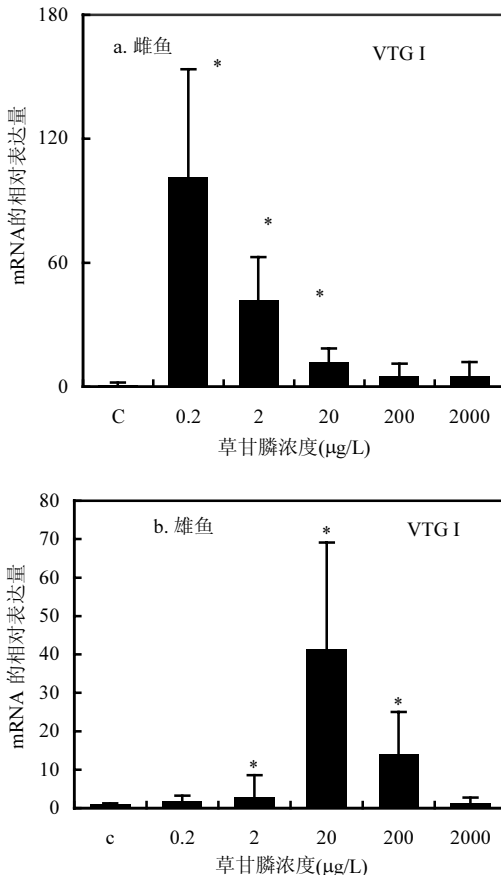


图1 草甘膦暴露对青鳉鱼肝脏中卵黄蛋白原(VTG I)表达量的影响

Fig.1 Vitellogenin gene expression in liver of medaka exposed to glyphosate

\* $P<0.05$ ,  $n=4-6$

在雌性幼鱼中,草甘膦在低浓度下(0.2µg/L)即可显著诱导雌鱼卵黄蛋白原基因表达 ( $P<$

0.05),但是随着暴露浓度的增加,VTG I 的表达量逐渐降低,呈现明显的剂量效应关系.随着暴露浓度的升高,VTG 各浓度组基因表达量分别为对照组的 101.36、41.76、11.92、5.26、5.34 倍(图 1a).在高浓度组(200,2000µg/L),和对照比 VTG I 基因表达虽仍有所增加,但并不显著.在雄鱼中,草甘膦对 VTG I 基因表达诱导呈现先升后降的趋势:浓度为 0.2、2、20µg/L 时,VTG I 基因表达量分别为对照组的 1.64、2.87、41.35 倍,浓度增加到 200、2000µg/L 时,VTG I 的表达量分别是对照组的 13.92 和 1.31 倍(图 1b).除最低暴露组(0.2µg/L)和最高暴露组(2000µg/L),其余各组 VTG I 均被显著诱导.

### 2.2 雌激素合成和代谢酶基因表达变化

2.2.1 脑垂体性腺轴基因表达变化 对垂体性腺轴中的 15 个基因进行了检测.其中 3 个下丘脑促性腺激素释放激素(cGnRH、mdGnRH、sGnRH)基因<sup>[14]</sup>和 3 个垂体促性腺激素亚基(GtH $\alpha$ 、FSH $\beta$ 、LH $\beta$ )基因<sup>[15-16]</sup>,分别调控垂体促性腺激素和性腺中性激素的合成分泌.另外,还涉及 9 个激素合成相关基因(StAR、HMGR、CYP11A、CYP11B、CYP17、CYP19A、3 $\beta$ -HSD、17 $\beta$ -HSD I、17 $\beta$ -HSDIII).在类固醇激素合成的早期步骤,胆固醇的合成主要由羟甲基戊二酰辅酶 A 还原酶(HMGR)这一酶调控<sup>[17]</sup>.类固醇急性调节蛋白(StAR)负责将胆固醇转运至线粒体内,启动类固醇激素的合成<sup>[18]</sup>.CYP11A 催化胆固醇生成孕烯醇酮,这是类固醇激素生物合成的起点,后经 3 $\beta$ -HSD 酶催化合成孕酮.CYP17 酶具有 17 $\alpha$ -羟化酶和 17,20-裂解酶两种活性,可分别催化生成 17 $\alpha$ -羟基孕酮和雄烯二酮,两个合成下游雌雄激素的前体物.CYP19A 和 CYP11B 分别调控雌激素雌二醇(E2)和雄激素 11-酮基睾酮(11-KT)的合成<sup>[19-20]</sup>.17 $\beta$ -HSD I 可使雌酮转化为生物活性更高的雌二醇.17 $\beta$ -HSDIII 为雄激素的代谢酶,使雄烯二酮还原为睾酮<sup>[21]</sup>.该 15 个基因基本涵盖了整个垂体性腺轴调控性激素合成过程<sup>[22]</sup>.本研究通过定量 PCR 检测,筛选出显著受到草甘膦影响的基因,以进一步解释草甘膦雌激素效应的分子机理.

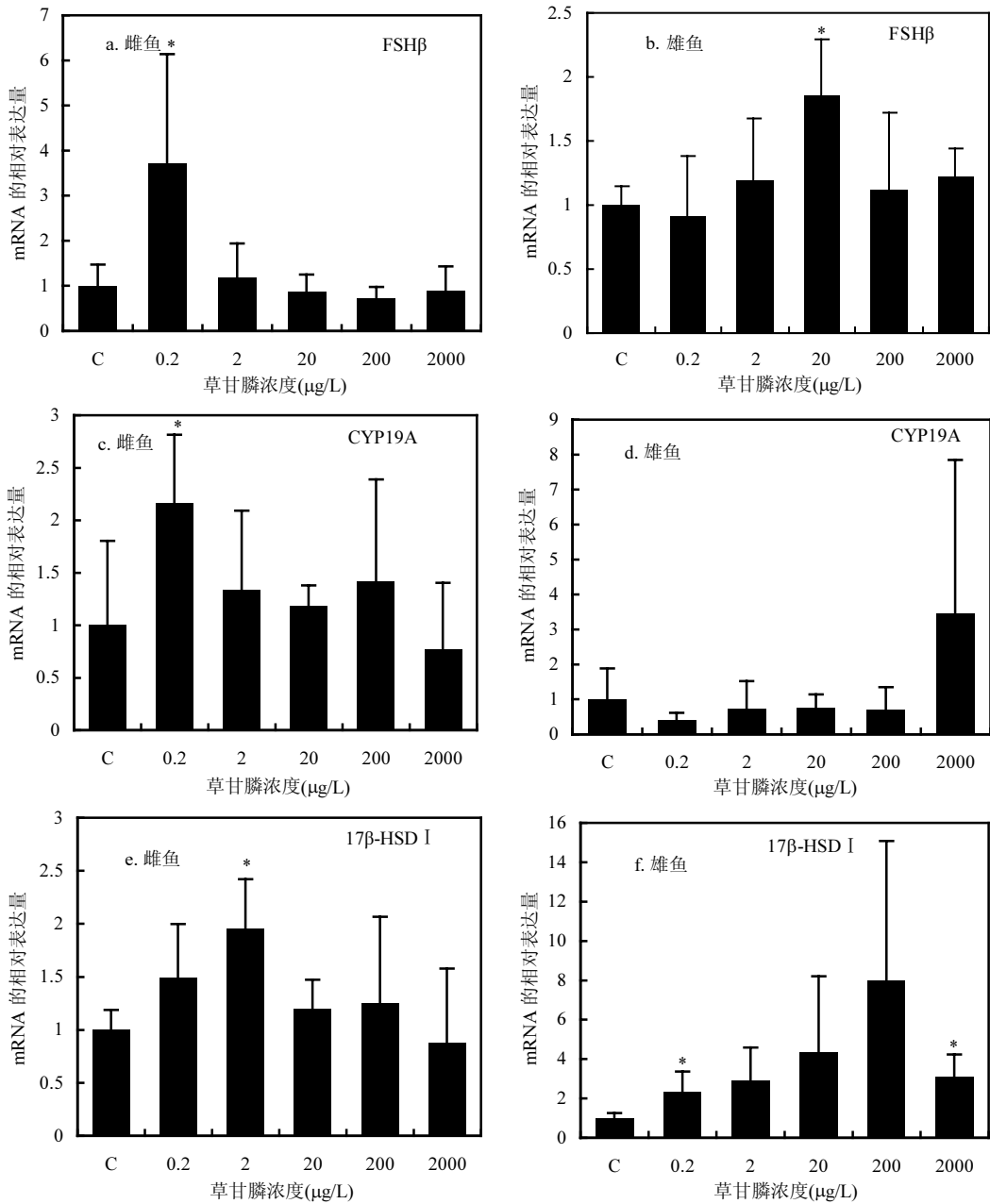


图 2 草甘膦暴露对青鲮鱼垂体性腺轴关键基因表达量的影响

Fig.2 Hypophysial-gonadal axis key genes expression of medaka exposed to glyphosate

\*,  $P < 0.05$ ;  $n = 4-6$

结果显示,在雌鱼中,从低浓度组到高浓度组,脑部 FSHβ mRNA 相对表达量分别为对照组的 3.71、1.19、0.87、0.72、0.90 倍.如图 2a,在 0.2μg/L 草甘膦暴露下,雌鱼的 FSHβ 表达显著上调( $P < 0.05$ ),其他各浓度组变化不显著;性腺 CYP19A 和

17β-HSD I 基因相对表达量分别为对照组的 2.16、1.33、1.18、1.42、0.77 倍(图 2c)和 1.49、1.95、1.19、1.25、0.87 倍(图 2e).CYP19A 基因在 0.2μg/L 草甘膦浓度下,被显著诱导( $P < 0.05$ ),而其他浓度组表达量相对对照组没有明显变化,

但随着浓度升高而逐渐下降.17β-HSDI 基因在 2μg/L 草甘膦浓度下被显著诱导( $P<0.05$ ),在其余各浓度组该基因表达并没有显著变化.

从低浓度组到高浓度组,雄鱼脑部 FSHβ mRNA 相对表达量分别为对照组的 0.91、1.19、1.85、1.12、1.23 倍(图 2b),但是只有在 20μg/L

时,才被显著诱导( $P<0.05$ );雄鱼 17β-HSDI 基因相对表达量分别为对照组的 2.31、2.90、4.33、7.98、3.08 倍(图 2f).在 0.2μg/L 和 2000μg/L 浓度时,17β-HSD I 表达量显著上升( $P<0.05$ ),其余各组中 17β-HSD I 基因表达量呈现上升趋势,相对对照组均有 2 倍以上差异,但并不显著.

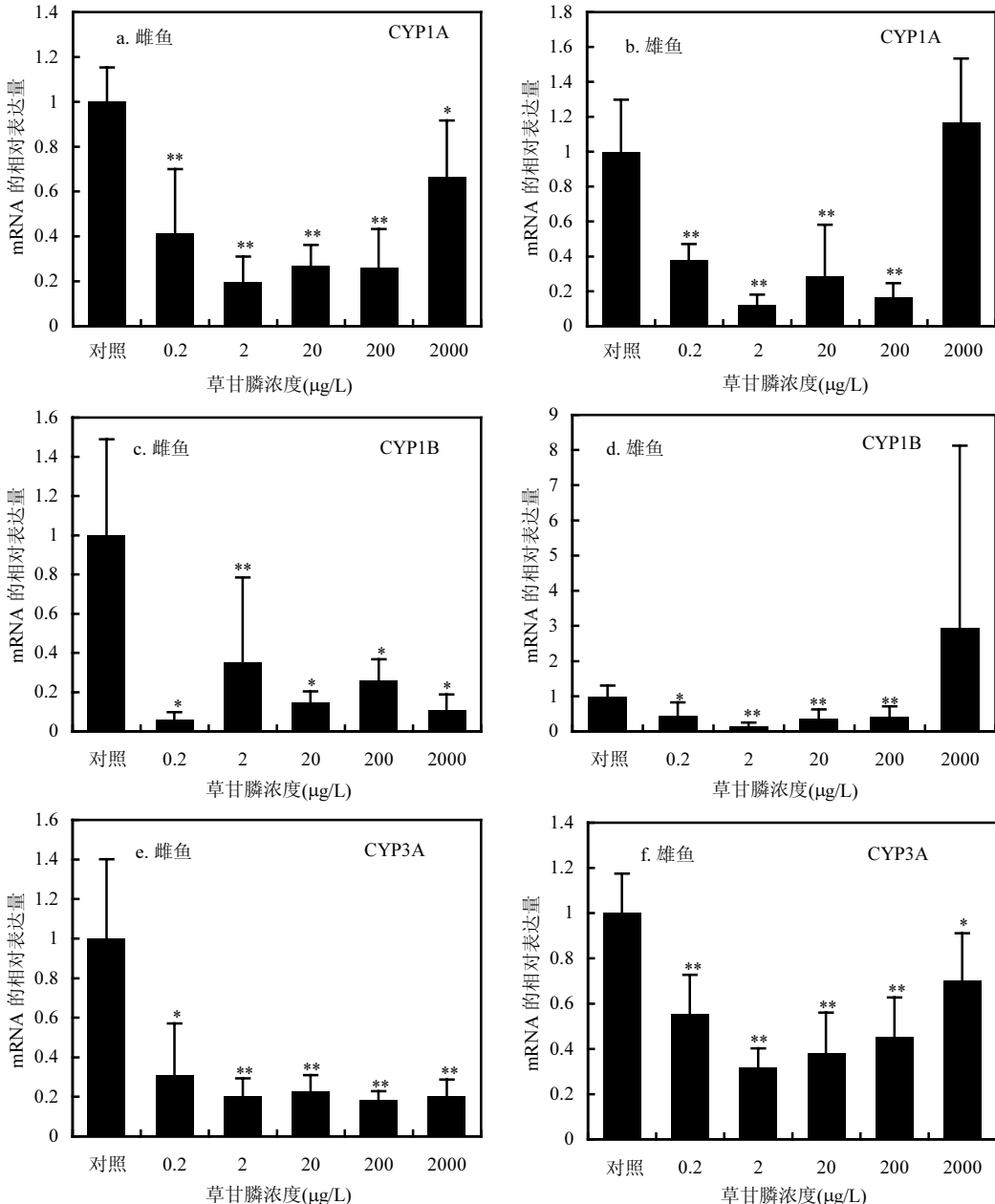


图3 草甘膦暴露对青鲮鱼肝脏中主要雌激素代谢酶 CYP1A、CYP1B 和 CYP3A 表达量的影响

Fig.3 Expression of estrogen-related metabolic genes in liver of medaka exposed to glyphosate

\*,  $P<0.05$ , \*\*,  $P<0.01$ ,  $n=4-6$

**2.2.2 雌激素代谢酶基因表达变化** 各浓度组草甘膦暴露均能显著抑制雌鱼体内雌激素代谢酶基因的表达( $P<0.05$ )。CYP1A、CYP1B 和 CYP3A mRNA 表达量,按浓度递增的顺序,分别为对照组的 0.42、0.19、0.27、0.26、0.66 (CYP1A)倍;0.06、0.35、0.15、0.26、0.11(CYP1B)倍和 0.31、0.20、0.23、0.18、0.21(CYP3A)倍(图 3a、3c 和 3e)。CYP1A 的表达量,随着暴露浓度的升高,呈现先降后升的 U 型变化趋势,而 CYP1B 和 CYP3A 各浓度组的表达量则相对稳定。

如图 3b、3d 和 3f,从低浓度到高浓度的各暴露组中,雄鱼 CYP1A mRNA 表达量分别为对照组的 0.38、0.12、0.27、0.17、1.16 倍;CYP1B 表达量分别为 0.44、0.15、0.36、0.42、2.94 倍;CYP3A 表达量分别为 0.55、0.32、0.38、0.45、0.70 倍。除了 CYP1A 和 CYP1B 在最高浓度组表达量和对照组无显著差异,雄鱼肝脏雌激素代谢酶的表达在其他浓度组均被显著抑制( $P<0.05$ ),并且随着暴露浓度的升高,均呈现出先降后升的 U 型表达模式。

### 3 讨论

本研究中,草甘膦暴露能够显著诱导雌雄青鲮鱼中 VTGI 基因的表达,并呈现一定的剂量效应关系(图 1),表明草甘膦具有一定的雌激素效应。并且雄鱼 VTGI 基因诱导能力明显小于雌鱼,这与 Bickley 等<sup>[23]</sup>的研究结果一致,即雌鱼对雌激素物质较雄鱼更加敏感。

Petit 等<sup>[24]</sup>通过酵母双杂交筛选实验,证明草甘膦本身并不具有雌激素受体结合活性,Hiroyuki Kojima 等<sup>[6]</sup>利用转染人雌激素受体和雌激素反应元件重组质粒的中国仓鼠肝细胞进行草甘膦雌激素受体结合活性实验,也得到相似的结果。这些实验结果说明草甘膦并不能直接介导雌激素受体而诱导肝脏 VTG 表达。大量文献<sup>[25-27]</sup>已经证明,鱼体内 VTG 合成主要依赖于血液中雌二醇(17 $\beta$ -E2)浓度水平,并受到 17 $\beta$ -E2 的直接调控,因此为了进一步分析草甘膦诱导 VTGI 表达的潜在机理,本研究测定了雌激素合成和代谢相关基因的表达变化。

芳香化酶(CYP19)和 17 $\beta$ -羟基类固醇脱氢酶(17 $\beta$ -HSDI)是促进性腺雌激素合成的两个重要酶,能够将睾酮(Testosterone,T)转化 17 $\beta$ -E2、雌酮(Estrone,E1)转化 17 $\beta$ -E2<sup>[28]</sup>。在草甘膦雌鱼 2 $\mu$ g/L 暴露组,性腺 17 $\beta$ -HSDI 显著表达( $P<0.05$ ),可能对 VTG 的上升具有一定贡献。而在脊椎动物中,肝脏细胞色素 450 酶(CYP450s)中的 CYP1A、CYP1B 和 CYP3A 是将 17 $\beta$ -E2 代谢为 2-羟雌二醇(2-OHE2)的主要酶<sup>[29]</sup>,研究表明,在鱼类中,CYP1A 在 17 $\beta$ -E2 代谢中起到的作用更大<sup>[30]</sup>。

结果显示,雌鱼脑部 FSH $\beta$  和性腺 CYP19A 在最低浓度下即被显著表达( $P<0.05$ ),而后随暴露浓度的升高,表达量呈现降低的趋势,显示出与雌鱼 VTG 相似的表达模式。这可能是由于脑部 FSH 可以提高性腺芳香化酶(CYP19A)的表达量和活性<sup>[31-32]</sup>,从而增加了性腺雌激素合成,最终导致 VTG 合成量升高。另一方面雌鱼肝脏雌激素代谢酶,在各暴露浓度组均被显著抑制( $P<0.05$ ),这种抑制作用与毒死蜱抑制 CYP1A 表达的报道类似<sup>[33-34]</sup>。

同雌鱼相似,雄鱼肝脏雌激素代谢酶表达也被显著抑制。另外,在 E2 代谢过程中起作用更大的 CYP1A,呈现 U 型的表达模式,和雄鱼 VTG 基因表达的倒 U 型的剂量效应关系一致。据 Anderson 等<sup>[35]</sup>以虹鳟鱼肝细胞进行的体外实验显示,CYP1A 表达同 VTG 的合成具有负相关性。因此,草甘膦抑制雄鱼体内雌激素代谢而诱导肝脏 VTG 基因表达。除了代谢因素,雄鱼脑部 FSH $\beta$  虽然具有和 VTG 相同的表达模式,但性腺 CYP19A 基因在各浓度组均未有显著变化。雄鱼 17 $\beta$ -HSDI 在最低和最高两个浓度组,均有显著表达( $P<0.05$ ),但是这两组的 VTG 表达量并没有显著变化,而在 VTG 表达量显著上升的实验组,雄鱼 17 $\beta$ -HSDI 均有两倍以上升高,不过由于组内差异较大,并没有显著性。说明雄鱼 17 $\beta$ -HSDI 在 VTG 上升过程中可能并不起关键作用。

### 4 结语

一定浓度范围内草甘膦可以诱导青鲮鱼

VTG 表达,显示雌激素效应.并且其雌激素效应的诱导机理在雌雄鱼中存在一定的差异.在雌鱼体内草甘膦通过上调脑部 FSH 表达,诱导 CYP19A 表达,从而加强了雌激素合成能力.而在雄鱼中,则主要通过抑制肝脏雌激素代谢酶(CYP1A 和 CYP3A),使体内  $17\beta$ -E2 浓度升高从而诱导 VTG 表达变化.

#### 参考文献:

- [1] 贺红武,刘钊杰.有机磷农药的发展趋势与低毒有机磷杀虫剂的开发和利用(上)[J]. 世界农药, 2001,23(3):1-5.
- [2] 贺红武,刘钊杰.有机磷农药的发展趋势与低毒有机磷杀虫剂的开发和利用(下)[J]. 世界农药, 2001,23(4):26-31.
- [3] 高峰,朱梦如.有机磷系阻燃剂的研究与应用[J]. 武警学院学报, 2009,25(4):9-12.
- [4] 杨再福,赵晓祥.环境雌激素对水生动物的影响研究进展[J]. 生态环境, 2005,14(1):108-112.
- [5] Chen Haiyan, Xiao Jigao, Hu Gang, et al. Estrogenicity of organophosphorus and pyrethroid pesticides [J]. Journal of Toxicology and Environmental Health, 2002,65:1419-1435.
- [6] Hiroyuki Kojima, Eiji Katsura, Shinji Takeuchi, et al. Screening for Estrogen and Androgen Receptor Activities in 200Pesticides by In Vitro Reporter Gene Assays Using Chinese Hamster Ovary Cells [J]. Environmental Health Perspectives, 2004,112(5):524-531.
- [7] Fattahi E, Parivar K, Jorsaraei S G A. The effects of diazinon on testosterone, FSH and LH levels and testicular tissue in mice [J]. Iranian Journal of Reproductive Medicine, 2009,7(2):59-64.
- [8] Joshi S C, Sharma P. Effect of acephate on sex hormones, sperm dynamics and fertility in male albino rats [J]. International Journal of Research in Pharmaceutical and Biomedical Sciences, 2012,3(1):286-292.
- [9] Gonzalo Luis Pérez, María Solange Vera, Leandro Andrés Miranda, et al. Effects of herbicide glyphosate and glyphosate-based formulations on aquatic ecosystems [J]. Herbicides and Environment, 2011,16:343-368.
- [10] Sanchis J, Kantiani L, Llorca M, et al. Determination of glyphosate in groundwater samples using an ultrasensitive immunoassay and confirmation by on-line solid-phase extraction followed by liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry [J]. Anal Bioanal. Chem., 2012,402(7):2335-2345.
- [11] Popp M, Hann S, Mentler A, et al. Determination of glyphosate and AMPA in surface and waste water using high-performance ion chromatography coupled to inductively coupled plasma dynamic reaction cell mass spectrometry (HPIC-ICP-DRC-MS) [J]. Anal Bioanal. Chem., 2008,391(2):695-699.
- [12] Peruzzo P J, Porta A A, Ronco A E. Levels of glyphosate in surface waters, sediments and soils associated with direct sowing soybean cultivation in north pampasic region of Argentina [J]. Environmental Pollution, 2008,156:61-66.
- [13] Zhang Z B, Hu J Y. Development and validation of endogenous reference genes for expression profiling of medaka (*Oryzias latipes*) exposed to endocrine disrupting chemicals by quantitative real-time RT-PCR [J]. Toxicol. Sci., 2007,95:356-368.
- [14] Kataaki Okubo, Masafumi Amano, Yasutoshi Yoshiura, et al. A Novel Form of Gonadotropin-Releasing Hormone in the Medaka, *Oryzias latipes* [J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2000,276:298-303.
- [15] Yoshitaka Nagahama, Masakane Yamashita. Regulation of oocyte maturation in fish [J]. Develop Growth Differ, 2008,50,S195-S219.
- [16] Schulz R W, Vischer H F, Cavaco J E B, et al. Gonadotropins, their receptors, and the regulation of testicular functions in fish [J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part B, 2001,129:407-417.
- [17] Hampton R, Dimster-Denk D, Rine J. The biology of HMG-CoA reductase: the pros of contra-regulation [J]. Trends in Biochemical Sciences, 1996,21(4):140.
- [18] Walsh L P, McCormick C, Martin C, et al. Roundup inhibits steroidogenesis by disrupting steroidogenic acute regulatory (StAR) protein expression [J]. Environmental Health Perspectives, 2000,108(8):769-776.
- [19] Baron D, Fostier A, Breton B, et al. Androgen and estrogen treatments alter steady state messenger RNA (mRNA) levels of testicular steroidogenic enzymes in the rainbow trout [J]. Mol. Reprod. Dev., 2005,71:471-479.
- [20] Fred Freking, Treza Nazairians, Barney A Schlinger, et al. The expression of the sex steroid-synthesizing Enzymes CYP11A1, 3 $\beta$ -HSD, CYP17, and CYP19in gonads and adrenals of adult and developing zebra fishes [J]. General and Comparative Endocrinology, 2000,119:140-151.
- [21] 倪鑫,唐晓露.17 $\beta$ -羟基类固醇脱氢酶[J]. 生理科学进展, 2002,33(2):173-175.
- [22] Daniel L Villeneuve, Patrick Larkin, Iris Knoebl, et al. A graphical systems model to facilitate hypothesis-driven ecotoxicogenomics research on the teleost brain pituitary gonadal axis [J]. Environ. Sci. Technol., 2007,41:321-330.
- [23] Bickley L K, Lange A, Winter M J, et al. Evaluation of a carp primary hepatocyte culture system for screening chemicals for oestrogenic activity [J]. Aquatic Toxicology, 2009,94(3):195-203.
- [24] Petit F, Le Goff P, Cravedi J P, et al. Two complementary bioassays for screening the estrogenic potency of xenobiotics: recombinant yeast for trout estrogen receptor and trout hepatocyte

- cultures [J]. *Journal of Molecular Endocrinology*, 1997,19(3): 321-335.
- [25] Kim B H, Takemura A. Culture conditions affect induction of vitellogenin synthesis by estradiol-17 $\beta$  in primary cultures of tilapia hepatocytes [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 2003,135:231-239.
- [26] Akihiro Takemura, Byung H Kim. Effects of estradiol-17 $\beta$  treatment on in vitro and in vivo synthesis of two distinct vitellogenins in tilapia [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 2001,129:641-651.
- [27] Maitre J, Valotaire Y, Guguen-Guillouzo C. Estradiol-17 $\beta$  stimulation of vitellogenin synthesis in primary culture of male rainbow trout hepatocytes [J]. *In Vitro Cell. Dev. Biol.*, 1986, 22:337-343.
- [28] Daniel L Villeneuve, Patrick Larkin, Iris Knoebl, et al. A Graphical Systems Model to Facilitate Hypothesis-Driven Ecotoxicogenomics Research on the Teleost Brain Pituitary Gonadal Axis [J]. *Environ. Sci. Technol.*, 2007,41,321-330.
- [29] Lee A J, Cai M X, Thomas P E, et al. Characterization of the oxidative metabolites of 17 $\beta$ -estradiol and estrone formed by 15 selectively expressed human cytochrome p450 isoforms [J]. *Endocrinology*, 2003,144:3382-3398.
- [30] Scornaienchi M L, Thornton C, Willett K L, et al. Cytochrome P450-mediated 17 $\beta$ -estradiol metabolism in zebrafish (*Danio rerio*) [J]. *Journal of Endocrinology*, 2010,206(3):317-325.
- [31] Nagahama Y, Yamashita M. Regulation of oocyte maturation in fish [J]. *Development, Growth and Differentiation*, 2008,50(s1): S195-S219.
- [32] Montserrat N, González A, Méndez E, et al. Effects of follicle stimulating hormone on estradiol-17 $\beta$  production and P-450aromatase (CYP19) activity and mRNA expression in brown trout vitellogenic ovarian follicles in vitro [J]. *General and Comparative Endocrinology*, 2004,137(2):123-131.
- [33] Hreljac I, Filipič M. Organophosphorus pesticides enhance the genotoxicity of benzo (a) pyrene by modulating its metabolism [J]. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 2009,671(1):84-92.
- [34] Wheelock C E, Eder K J, Werner I, et al. Individual variability in esterase activity and CYP1A levels in Chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) exposed to esfenvalerate and chlorpyrifos [J]. *Aquatic Toxicology*, 2005,74(2):172-192.
- [35] Anderson M J, Miller M R, Hinton D E. In vitro modulation of 17 $\beta$ -estradiol-induced vitellogenin synthesis: Effects of cytochrome P4501A1 inducing compounds on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) liver cells [J]. *Aquatic Toxicology*, 1996, 34(4):327-350.

**作者简介:** 夏爽(1988-),男,河南许昌人,西北农林科技大学动物医学院硕士研究生,主要从事鱼类雌激素效应机理研究.发表论文1篇.

## 《中国环境科学》获评“2012 中国最具国际影响力学术期刊”

2012 年 12 月,《中国环境科学》被评为“2012 中国最具国际影响力学术期刊”。

“中国最具国际影响力学术期刊”是中国科学文献计量研究中心、清华大学图书馆依据《CAJ 国际引证报告》,按 2011 年度中国学术期刊被 SCI 期刊、SSCI 期刊引用的总被引频次排序并经 40 多位期刊界专家审议,遴选出的 TOP5% 期刊.获评“中国最具国际影响力学术期刊”的科技类期刊共 156 种.统计分析结果表明,从定量分析的角度看,“中国最具国际影响力学术期刊”的国际影响力已经达到国际中等以上水平,跨入了国际品牌学术期刊行列。

《中国环境科学》编辑部