

乙炔基雌二醇对真鲷幼鱼的雌激素效应研究^{*}

吴翠琴^{1,2}, 袁东星², 刘宝敏²

(1 广州大学 环境科学与工程学院, 广东 广州 510006; 2 厦门大学 环境科学研究中心, 福建 厦门 361005)

摘要: 采用静态暴露方式研究 17 α -乙炔基雌二醇 (EE₂) 对真鲷 (*Pagrosomus major*) 幼鱼的雌激素效应。当真鲷幼鱼暴露于 0.01、0.1、0.5 μ g/L EE₂, 42 d 后, 真鲷幼鱼的肥满度极显著下降; 血浆中卵黄蛋白原 (V_{tg}) 被诱导产生, 肝胰脏指数 (HSI) 和血浆蛋白总量极显著升高; 血浆雌二醇 (E₂) 和睾酮 (T) 水平显著降低, 其中血浆雌二醇受 EE₂ 的干扰更显著, 降低的幅度更大。结果提示, 真鲷幼鱼的肥满度、肝胰脏指数、血浆蛋白总量、血浆性激素水平等可作为评估 EE₂ 等环境内分泌干扰物毒性效应的生物指标; 真鲷幼鱼血浆中的 V_{tg} 具有作为生物标志物, 用于监测海洋水体中 EE₂ 等环境内分泌干扰物的潜力。

关键词: 17 α -乙炔基雌二醇; 真鲷幼鱼; 卵黄蛋白原

中图分类号: X171 文献标识码: A 文章编号: 1007-6336(2009)06-0630-05

Study on estrogenic effects of 17 α -ethynylestradiol on juvenile *Pagrosomus major*

WU Cui-qin^{1,2}, YUAN Dong-xing², LIU Bao-min²

(1. School of Environmental Science and Engineering, Guangzhou University, Guangzhou 510006, China; 2. Environmental Science Research Center, Xiamen University, Xiamen 361005, China)

Abstract The estrogenic effects of 17 α -ethynylestradiol (EE₂) on the juvenile *Pagrosomus major* were studied via a static exposure experiment. After exposed to EE₂ at doses of 0.01, 0.1, 0.5 μ g/L for 42 d, the condition factors were significantly decreased, and plasma vitellogenins were induced. Hepatopancreatic index (HSI) and total plasma protein were significantly increased. The levels of plasma estradiol (E₂) and testosterone (T) were significantly decreased, and E₂ were more affected. The results showed that the condition factor, HSI, total plasma protein and plasma sex hormone levels of juvenile *Pagrosomus major* may be used as a biological index for evaluating the toxic effects of environmental endocrine disruptors such as EE₂. The vitellogenin in the plasma of juvenile *Pagrosomus major* is potential to be a biomarker for monitoring the marine environmental endocrine disruptors such as EE₂.

Key words 17 α -ethynylestradiol; juvenile *Pagrosomus major*; vitellogenin

17 α -乙炔基雌二醇 (EE₂) 是一种人工合成的类固醇雌激素, 为避孕药的主要成分, 在水环境中的降解性低于天然雌激素 17 β -雌二醇^[1]。早在 1985 年, 英国各界就开始关注进入英国河流中的合成雌激素, 尤其是在城市污水处理厂下游的泻湖中捕获具有雌雄两性特征的鱼之后, 世界各国的科学家对此纷纷进行研究。Purdom 等^[2]认为广泛使用避孕药剂和随之而来的乙炔基雌二醇的释放可能是出现这些雌雄同体鱼的真正原因。Temes 等^[3]测得德国和加拿大 2 个污水处理厂出水口中的 EE₂ 最大含量分别达到 15 ng/L 和 64 ng/L。

卵黄蛋白原 (V_{tg}) 是雌性特异性蛋白, 通常在雌激素调控下卵黄形成期间表达。正常情况下, 雄鱼和幼鱼体内几乎没有 V_{tg}, 但是在环境雌激素 (环境内分泌干扰物) 的诱导下, 它们的肝脏也可合成 V_{tg}^[1,2], 因此, V_{tg} 被认为是一种理想的环境内分泌干扰物的生物标志物。目前对 V_{tg} 的研究主要集中在淡水鱼类, 对海洋鱼类的研究较少。随着环境污染的加剧, 大量污染物被排入海洋, 使沿海污染日益严重, 因此针对我国海域, 从丰富的海洋鱼类资源中挑选一种或几种具有代表性的鱼类, 发展系统的海洋环境内分泌干扰物的筛选与测试体系是当今的研究

* 收稿日期: 2007-12-03 修订日期: 2008-02-27

基金项目: 国家自然科学基金 (20277030)

作者简介: 吴翠琴 (1977-), 女, 福建永定人, 讲师, 博士, 主要从事环境化学的研究, E-mail: cqwu@xmu.edu.cn

通讯作者: 袁东星, E-mail: yuandx@xmu.edu.cn

方向。

真鲷 (*Pagrosan us m ajor*) 又名加吉鱼, 属硬骨鱼纲, 鲈形目, 鲈亚目, 鲷科, 为近海暖水性底层鱼类。广泛分布于中国、日本、朝鲜、夏威夷、菲律宾、澳大利亚和印度沿海, 是一种名贵经济鱼类, 也是我国和日本重要的海水养殖种类之一。真鲷在我国北起渤海、南至北部湾均有分布, 是我国海域常见的本地鱼种。目前, 对真鲷生态毒理方面的研究主要集中在重金属、有机磷农药、多环芳烃污染物对真鲷幼鱼的急性毒性方面^[4, 5], 以及石油污染对真鲷幼鱼内脏组织超氧化物歧化酶 (SOD) 和过氧化氢酶 (Cat) 活性的影响^[6]。

因此, 本研究以真鲷幼鱼为实验对象, 通过较长时间的暴露实验, 从中毒症状、生长情况、V_g 的诱导情况、肝胰脏指数、血浆蛋白总量及血浆性激素水平的变化等方面, 研究 17 α -乙炔基雌二醇对该鱼的雌激素效应, 以获得用于评估 EE₂ 等环境内分泌干扰物的敏感生物指标, 为开发真鲷幼鱼作为一种毒理学研究的实验动物和近岸海洋环境污染的指示生物积累资料。

1 材料与方法

1.1 仪器和试剂

德国 Eppendorf 公司 5804R 型冷冻离心机; 美国 Waters 公司 510 恒流泵及梯度控制仪; 美国 New Era Pump System 公司 NE-501 注射泵; 美国 Rheodyne 公司 7725 i 型进样阀; 日本岛津公司 RF-10A XL 荧光检测器; 瑞典 Phamacia 公司的阴离子交换 Mini Q 柱 (4.6 mm \times 50 mm, 3 μ m); 柱后荧光衍生反应器, 由长 2 m, 内径 0.25 mm 的 PEEK 管按 coil 型自行编织而成, 置于天津奥特赛恩斯仪器有限公司的柱温箱内; 厦门分析仪器厂 722 智能分光光度计。

17 α -乙炔基雌二醇 (EE₂, 美国 Sigma 公司); 肝素钠 (上海伯奥生物科技有限公司); 苯甲磺酰氟 (PM SF, 进口分装, 上海源聚生物科技有限公司); 考马斯亮蓝 G-250 (瑞士 Fluka 公司); 牛血清蛋白 (电泳单点纯, 上海生工生物工程公司); 邻苯二甲醛 (OPA, 瑞士 Fluka 公司); 2-巯基乙醇 (MCE, 美国 Amresco 公司); CH₂Cl₂ (HPLC 级, 美国 Tedia 公司); 雌二醇和睾酮的放射免疫试剂盒 (北京福瑞生物工程公司); 其它普通试剂均为国产的优级纯试剂。

1.2 实验动物

实验所用真鲷 (*Pagrosan us m ajor*) 购自厦门翔安刘五店养殖场, 3 个月龄。体长 8~11 cm, 体重 17~30 g。

1.3 污染实验

EE₂ 先用无水乙醇配制成一定浓度的储备液, 于 4℃ 避光保存。实验前, EE₂ 用砂滤海水分别配成 0.01, 0.1, 0.5 μ g/L 3 种溶液, 分别对应于低、中和高浓度组; 溶剂对照组只加入相同量的无水乙醇, 浓度为 0.08 mL/L。

实验鱼先在清洁砂滤海水中暂养 7 d, 然后随机选取分为 4 个浓度组。每组 32 尾鱼, 置于盛有 50 L 含有不同浓度 EE₂ 的污染海水的玻璃养殖箱 (35 cm \times 50 cm \times 40 cm) 中, 以充气机 24 h 充气。隔天投喂暂养过 2 d 的剁碎的文蛤 (*Meretrix meretrix*)。每天更换 40 L EE₂ 浓度与初始浓度相同的海水, 并清除排泄物。实验期间水温 25~26℃, pH 为 8.1~8.2 海水盐度 23.0~25.0, 暴污 42 d 后, 用经 1250 U/mL 肝素钠润洗后的一次性注射器从鱼的尾静脉取血, 置于 1.5 mL 冰浴离心管, 加入酶抑制剂 PM SF 和 EDTA, 使其最终浓度均为 1 mmol/L, 4℃ 保存待进一步的处理。称体重, 量体长, 解剖取出肝后, 称其重。

1.4 样品预处理

血液在 4℃、2 000 r/min 下离心 10 min 取血浆, 分装, -80℃ 保存备用。

1.5 血浆中卵黄蛋白原的测定

采用高分辨率的阴离子交换 Mini Q 柱分离, 柱后邻苯二甲醛 (OPA) 荧光衍生法进行分析测定^[7]。

1.6 血浆蛋白总量的测定

以牛血清蛋白为标准, 采用 Bradford 法测定血浆总蛋白^[8], 测定波长为 595 nm。

1.7 血浆中性激素水平的测定

血浆中性激素雌二醇 (E₂) 和睾酮 (T) 的萃取参照文献^[9], 各取 200 μ L 血浆, 加入 600 μ L CH₂Cl₂, 摇床上振荡 12 h, 静置, 吸取下层的 CH₂Cl₂ 层, 4℃ 保存。剩余部分再加入 400 μ L CH₂Cl₂, 同上操作, 合并 CH₂Cl₂ 溶液, 用小流量 N₂ 在室温下吹干, 4℃ 保存。

血浆中雌二醇和睾酮的浓度采用放射性免疫方法 (RIA) 测定, 按照放射免疫试剂盒操作说明书操作。

1.8 数据处理

实验数据用统计学方法进行处理, 采用 SPSS 软件。除了死亡鱼数, 图中各数据均用平均值 \pm 标准偏差 (Mean \pm SDE) 表示。用 *t* 检验法对各污染组及溶剂对照组进行显著性差异分析。当 $P < 0.05$, 认为是差异显著; 当 $P < 0.01$, 认为是差异极显著。

2 结果与讨论

2.1 行为观察

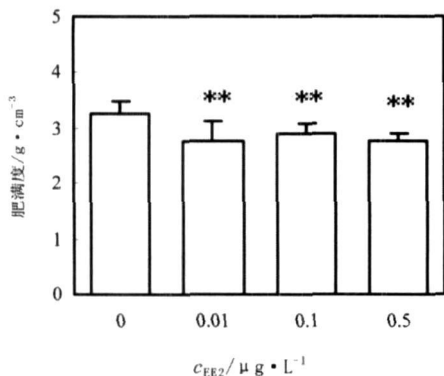
在整个实验过程中, 对包括实验鱼体色、呼吸、游动与摄食等在内的生活行为进行了详细观察。结果表明, 在第 1 周内各暴露组实验鱼与对照组表现相似, 其行为无明显变化, 没有出现急性中毒现象。然而在第 2 周和第 3 周, 中浓度组出现了较大量的死亡现象 (见表 1)。死亡的鱼眼球突出、眼眶出血、严重时眼球脱落。这种现象与 EE₂ 对稀有鮑鲫的影响相似^[10]。而低、高浓度组与溶剂对照组表现相似。暴污 42 d 后, 实验组死亡的鱼数比对照组多, 这也正说明 EE₂ 对真鲷幼鱼有毒性作用, 但是没有较好的剂量-效应关系。

表 1 EE_2 对真鲷幼鱼死亡数的影响Tab 1 Effects of EE_2 on number of dead juvenile *P. major*

$c_{EE_2} / \mu g \cdot L^{-1}$	死亡鱼数/尾						
	第1周	第2周	第3周	第4周	第5周	第6周	总数
0.01	0	1	1	0	0	4	6
0.1	1	6	4	2	2	0	15
0.5	0	1	1	0	0	6	8
溶剂对照组	0	1	0	1	3	0	5

2.2 EE_2 对真鲷幼鱼肥满度的影响

肥满度等于体重与体长立方的比值乘以 100, 它综合了体长和体重两个变量, 是反映鱼的能量状况的指标, 可用来全面考察毒物的作用和鱼在生理上对胁迫的响应^[11]。真鲷幼鱼暴露于 EE_2 各浓度组 42 d 后, 其肥满度与溶剂对照组比, 都极显著性减小(图 1)。这与 EE_2 对黑头呆鱼 (*Pimephales promelas*) 的影响相似^[12]。尽管鱼的肥满度与其生活环境和喂食状况有关^[13], 但是本实验所设的各实验组除了 EE_2 浓度不同, 其它的环境参数和喂食情况一致, 因此认为, 肥满度降低主要是由于 EE_2 引起的。分析其具体原因, 可能是因为 EE_2 对真鲷幼鱼有毒性, 产生胁迫作用, 导致它们新陈代谢加快, 肥满度降低。

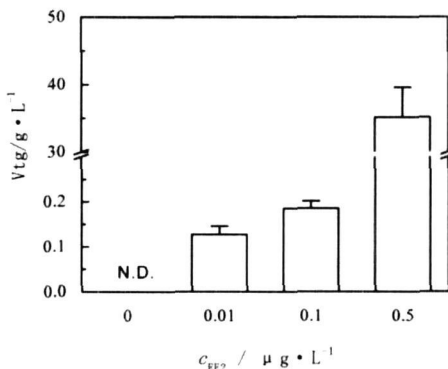
图 1 EE_2 对真鲷幼鱼肥满度的影响

(n = 15~24; *, P < 0.05; **, P < 0.01)

Fig 1 Effects of EE_2 on condition factor of juvenile *P. major*2.3 EE_2 对真鲷幼鱼血浆 V_{tg} 含量的影响

V_{tg} 一般在卵巢分泌的雌激素 E_2 调控下在肝脏合成, 本实验将真鲷幼鱼暴露于 0.01, 0.1, 0.5 $\mu g/L$ EE_2 , 42 d 后, 检测到血浆中 V_{tg} 量分别为 0.1273, 0.1854, 35.15 g/L , 而溶剂对照组未检测出 V_{tg} (图 2)。这一结果与国际上的相关研究基本一致。雌性斑马鱼 (*Danio rerio*) 暴露于一定量的 EE_2 , 21 d 发现 0.273, 0.545, 1.085 $\mu g/L$ EE_2 能够显著性地诱导血浆中 V_{tg} 产生, 诱导量达到 10 g/L 以上; 而 0.032, 0.136 $\mu g/L$ EE_2 未能够显著诱导 V_{tg} 产生; 在上述浓度范围内, V_{tg} 的量随着 EE_2 浓度的增大而增大, 有一定的剂量效应关系^[14]。稀有鮑鲫 (*Gobyocypis rarus*) 和斑马鱼 (*Brachydanio rerio*) 分别暴露于 5, 20, 100 ng/L EE_2 , 5 d 后, 3 个浓度的 EE_2 均可显著诱导稀有鮑鲫体内 V_{tg} 生成; 而对于斑马鱼, 100 ng/L EE_2 可以在 5 d 时显著诱导 V_{tg} 产生, 20 ng/L EE_2 在 10 d 后能显著诱导 V_{tg}

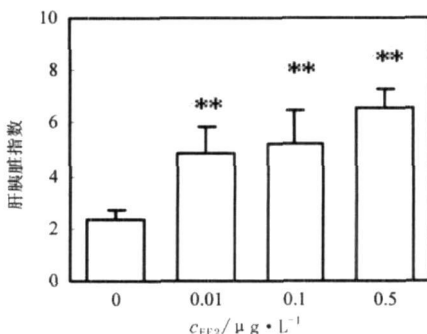
产生, 5 ng/L EE_2 只有在 15 d 后才能显著诱导 V_{tg} 产生; V_{tg} 量随着 EE_2 浓度的增加和诱导时间的延长而增大^[15]。雄性红鲈 (*Cyprinodon variegatus*) 暴露于 0.02, 0.1, 0.2 $\mu g/L$ EE_2 , 13 d 其体内 V_{tg} 量分别为 0.247, 2.564 g/L ^[16]。从以上的相关报道可看出, 不同种类的鱼对 EE_2 的敏感程度 (V_{tg} 的诱导量) 是不一样的, 本实验所选的真鲷幼鱼对 EE_2 较为敏感, 可望作为一种海洋实验动物, 用于监测环境内分泌干扰物对海洋水体的污染。

图 2 EE_2 对真鲷幼鱼血浆中 V_{tg} 的诱导

(n = 15~24; N.D., 未检出)

Fig 2 V_{tg} concentration in plasma of juvenile *P. major* exposed to EE_2 2.4 EE_2 对真鲷幼鱼肝胰脏指数 (HSI)的影响

在毒理学实验中, 通过监测实验动物的肝体指数常可获得靶器官病理性增生或萎缩的信息, 有助于初步判断毒物在生物体内的作用位点, 并能为深入研究其毒性作用机制提供思路。由于真鲷的肝脏与胰脏长在一起, 很难分开, 因此本研究通过将肝胰脏质量与鱼的总质量之比乘以 100 获得相应的肝胰脏指数, 用于指示污染物对肝脏的影响。暴露 42 d 后, 肝胰脏指数显著性地随污染物浓度的增大而增大, 且与溶剂对照有极显著性的差异(图 3), 说明 EE_2 对真鲷幼鱼具有毒性效应, 且浓度越大, 毒性效应越强。肝胰脏指数的增大可能是肝合成 V_{tg} 或(和)为了加强解毒功能的结果。这与 EE_2 对湖红点鲑 (*Salvelinus namaycush*) 的肝胰脏指数的影响^[17]一致。

图 3 EE_2 对真鲷幼鱼肝胰脏指数的影响

(n = 15~24; **, P < 0.01)

Fig 3 Effects of EE_2 on HSI of juvenile *P. major*

2.5 EE₂对真鲷幼鱼血浆蛋白总量的影响

溶剂对照组的血浆蛋白总量为 (24.47 ± 1.51) g/L, 此结果与 Sołk 等^[11]测定的鲤鱼对照组的结果 (22.2 ± 3.4) g/L 相似。实验发现, 暴露于各浓度的 EE₂ 42 d 后, 真鲷幼鱼血浆蛋白总量较溶剂对照组都极显著地增加, 且随 EE₂ 浓度增大而增大 (图 4)。血浆蛋白总量的增加是因为 EE₂ 诱导了 V_{tg} 的产生所致^[18]。

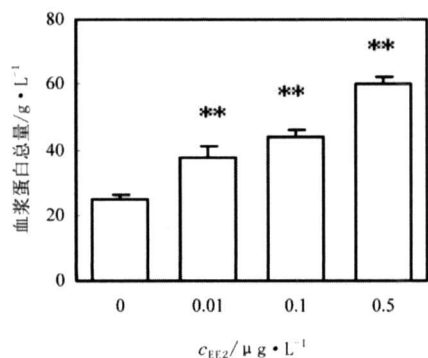


图 4 EE₂对真鲷幼鱼血浆蛋白总量的影响

n = 15~24; **, P < 0.01

Fig. 4 Effects of EE₂ on total plasma protein of juvenile *P. major*

2.6 EE₂对真鲷幼鱼血浆性激素水平的影响

图 5 结果显示, 当真鲷幼鱼受到 EE₂ 暴露 42 d 后, E₂

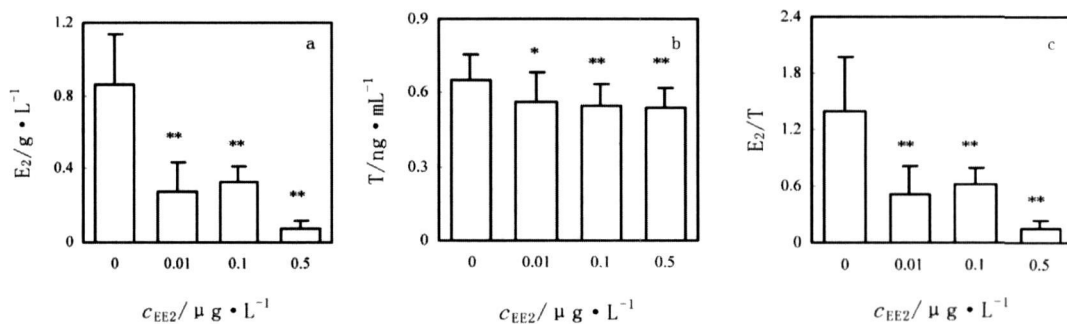


图 5 EE₂对真鲷幼鱼血浆性激素水平的影响

n = 15~24; *, P < 0.05; **, P < 0.01

Fig. 5 Effects of EE₂ on plasma sex hormone levels of juvenile *P. major*

3 结论

本研究结果显示, 真鲷幼鱼对 EE₂ 的毒性效应反应敏感, 在 0.01~0.5 μg/L EE₂ 较长时间的暴露下, 与溶剂对照组比, 肥满度显著减小、V_{tg} 被大量诱导、肝胰脏指数和血浆蛋白总量显著增大、血浆性激素水平显著降低。因此, 真鲷幼鱼的肥满度、肝胰脏指数、血浆蛋白总量、血浆性激素水平等可作为评估 EE₂ 等环境内分泌干扰物毒性效应的生物指标; 真鲷幼鱼血浆中的 V_{tg} 具有作为生物标志物, 用于监测海洋水体中 EE₂ 等环境内分泌干扰物的潜力。

参考文献:

[1] SOLÉ M, PORTE C, BARCELÓ D. Vitellogenin induction and

和 T 水平显著低于溶剂对照组。与 E₂ 和 T 相比, E₂/T 的比值是衡量性激素水平变化更敏感的指标^[19], 实验发现, 暴露组 E₂/T 的比值变化与 E₂ 浓度的变化一致, 与溶剂对照组比, 都极显著性减小, 说明 EE₂ 对 E₂ 的影响更显著。总之, EE₂ 影响了真鲷幼鱼血浆的性激素水平, 干扰了内分泌系统。性激素水平的下降可能是因为 EE₂ 与血浆中的性激素结合蛋白 (SBP) 有很强的亲和力, 与 E₂、T 竞争结合 SBP, 使得血浆中 SBP-E₂ (T) 复合物减少, 从而加快了 E₂ 和 T 的代谢清除速率, 使血浆中 E₂ 和 T 浓度降低; 或是合成性激素所必需的胆固醇减小导致 E₂ 和 T 浓度降低^[20]。中浓度组 (0.1 μg/L) 血浆 E₂ 降低的幅度没有低 (0.01 μg/L)、高 (0.5 μg/L) 浓度组降低的大, 原因还有待进一步的深入研究。外源性物质对鱼性激素水平的影响已有相关报道。性成熟的雄性斑马鱼 (*Danio rerio*) 暴露于 26.4 ng/L EE₂ 7 d 其血浆中 T 浓度与对照组比显著性地减小, E₂ 浓度也减小, 但没有显著性差异^[21]。此结果与本实验的结果不大一致, 可能原因是鱼种类的不同, 或者是鱼生长时期不同所致。类似的情况在其它研究中亦有报道: 4-壬基酚对大西洋鲑鱼 (*Salmo salar*) 幼鱼及性成熟的雄性鲤鱼 (*Cyprinus carpio*) 的性激素水平的影响也不相同^[22, 23]。

other biochemical responses in carp *Cyprinus carpio*, after experimental injection with 17 α -ethynyl estradiol [J]. Arch Environ Contam Toxicol 2000, 38: 494-500

[2] PURDOM C E, HARDMAN P A, BYE V J et al. Estrogenic effects of effluents from sewage treatment works [J]. Chem Ecol 1994, 8: 275-285

[3] TERNES T A, STUMPF M, MUELLER J et al. Behavior and occurrence of estrogens in municipal sewage treatment plants - I. Investigations in Germany, Canada and Brazil [J]. Sci Total Environ 1999, 225: 81-90

[4] 戴家银, 郑微云, 王淑红. 重金属和有机磷农药对真鲷和平鲷幼体的联合毒性研究 [J]. 环境科学, 1997, 18(5): 44-48

[5] 王春光, 李裕红, 林志勇, 等. 苯并 [a] 芘对真鲷 (*Pagrosomus major*) 血细胞 DNA 损伤的慧星实验研究 [J]. 农业环境科学

- 学报, 2006, 25(6): 1446-1449
- [6] 余群, 郑微云, 翁妍, 等. 石油污染对真鲷幼体中超氧化物歧化酶和过氧化氢酶的毒理效应 [J]. 厦门大学学报 (自然科学版), 38(3): 429-434
- [7] WU C Q, YUAN D X, LIU B M. Rapidly determination of vitellogenin in fish plasma by anion exchange high performance liquid chromatography using postcolumn fluorescence derivatization with o-phthalaldehyde [J]. Anal Sci 2006 22 (12): 1593-1596.
- [8] BRADFORD M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein-dye binding [J]. Anal Biochem, 1976 72 248-254
- [9] SUSCA V, CORRIERO A, BRUDGES C R, et al Study of the sexual maturity of female bluefin tuna purification and partial characterization of vitellogenin and its use in an enzyme-linked immunosorbent assay [J]. J Fish Biol 2001 58 815-831
- [10] 马陶武, 王子健, 陈剑锋, 等. 乙炔基雌二醇对稀有鮕鲫肾脏的毒性效应 [J]. 环境科学学报, 2004 24(3): 487-491
- [11] JØRGENSEN E H, BALM P H M, CHRISTIANSEN J S, et al Influence of o' p-DDD on the physiological response to stress in Arctic charr (*Salvelinus alpinus*) [J]. Aquat Toxicol 2001 54: 179-193
- [12] JOBLING S, CASEY D, RODGERS-GRAY T, et al Comparative responses of molluscs and fish to environmental estrogens and an estrogenic effluent [J]. Aquat Toxicol 2003 65: 205-220
- [13] TVEITEN H, JOHNSEN H K, JOBLING M. Influence of maturity status on the annual cycles of feeding and growth in Arctic charr reared at constant temperature [J]. J Fish Biol 1996 48: 910-924
- [14] VAN DEN BELT K, BERCKMANS P, VANGENECHTEN C, et al Comparative study on the in vitro/in vivo estrogenic potencies of 17 β -estradiol, estrone, 17 α -ethynylestradiol and nonylphenol [J]. Aquat Toxicol 2004 66: 183-195
- [15] 廖涛, 徐盈, 钟雪萍, 等. EE₂对稀有鮕鲫和斑马鱼幼鱼体内卵黄蛋白原诱导的比较 [J]. 水生生物学报, 2005, 29: 513-517
- [16] FOIMAR L C, HEMMER M J, DENSLow N D, et al A comparison of the estrogenic potencies of estradiol, ethynylestradiol, diethylstilbestrol, nonylphenol and methoxychlor in vivo and in vitro [J]. Aquat Toxicol 2002 60 101-110
- [17] WERNER J, WAUTIER K, EVANS R E, et al Waterborne ethynylestradiol induces vitellogenin and alters metallothionein expression in lake trout (*Salvelinus namaycush*) [J]. Aquat Toxicol 2003 62 321-328.
- [18] MAAN S E, ZANUY A, LEMENN E, et al Sea bass (*Dicentrarchus labrax*) vitellogenin I -induction, purification and partial characterization [J]. Comp Biochem Physiol B, 1994 107: 205-216
- [19] FOIMAR L C, DENSLow N D, RAO V, et al Vitellogenin induction and reduced serum testosterone concentrations in female carp (*Cyprinus carpio*) captured near an agricultural metropolitan sewage treatment plant [J]. Environ Health Perspect 1996 104: 1096-1101
- [20] TOLLEFSEN K E. Interaction of estrogen mimics singly and in combination with plasma sex steroid-binding proteins in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) [J]. Aquat Toxicol 2002 56 215-225.
- [21] ANDERSEN I, GOTO-KAZETO R, TRANT J M, et al Short-term exposure to low concentrations of the synthetic androgen methyltestosterone affects vitellogenin and steroid levels in adult male zebrafish (*Danio rerio*) [J]. Aquat Toxicol 2006 76 343-352
- [22] ARUKWE A, FORLIN L, GOKSOYR A. Xenobiotic and steroid biotransformation enzymes in Atlantic salmon (*Salmo salar*) liver treated with estrogenic compound, 4-nonylphenol [J]. Environ Toxicol Chem, 1997, 16 2576-2583
- [23] VILLENEUVE D L, VILLALOBOS S A, KEITH T L, et al Effects of waterborne exposure to 4-nonylphenol on plasma sex steroid and vitellogenin concentrations in sexually mature male carp (*Cyprinus carpio*) [J]. Chemosphere 2002 47 15-28