

DOI: 10.7524/AJE.1673-5897.20180628001

华江环, 韩建, 郭勇勇, 等. 孕激素左炔诺孕酮长期低剂量暴露对雄性斑马鱼的生殖毒性[J]. 生态毒理学报, 2019, 14(2): 176-186

Hua J H, Han J, Guo Y Y, et al. Reproductive toxicity in male zebrafish after long-term exposure to low concentrations of progestin levonorgestrel [J]. Asian Journal of Ecotoxicology, 2019, 14(2): 176-186 (in Chinese)

孕激素左炔诺孕酮长期低剂量暴露对雄性斑马鱼的生殖毒性

华江环^{1,*}, 韩建², 郭勇勇², 周炳升²

1. 湖北中医药大学基础医学院, 武汉 430065

2. 中国科学院水生生物研究所 淡水生态与生物技术国家重点实验室, 武汉 430072

收稿日期: 2018-06-28

录用日期: 2018-08-27

摘要: 孕激素是广泛使用的高生物活性药物, 其残留广泛存在于水环境中, 对水生生物造成潜在威胁。本研究孕激素左炔诺孕酮(LNG)长期暴露对雄性斑马鱼的生殖毒性。将斑马鱼胚胎暴露于环境相关浓度的 LNG(10, 33, 100 ng·L⁻¹)至性成熟(受精后 142 d), 得到 100% 的雄性斑马鱼。将得到的雄鱼与未暴露的雌鱼配对, 结果发现 100 ng·L⁻¹ LNG 处理组雄鱼使得未暴露雌鱼产卵的数量较对照组雄鱼使得未暴露雌鱼产卵的数量显著减少。33 和 100 ng·L⁻¹ 处理组雄鱼与未暴露雌鱼配对所得子代在受精后 7 d 内的存活率较对照组雄鱼与未暴露雌鱼配对所得子代的存活率显著降低。33 ng·L⁻¹ LNG 显著升高总活力、活跃精子活力、平均路径速度、直线运动速度、曲线运动速度等精子活力参数, 但其他浓度的 LNG 并不影响精子的活力。LNG 在 33 和 100 ng·L⁻¹ 的浓度下显著降低雄鱼血浆中 11-酮基睾酮(11-KT)的含量, 且在 3 个浓度下均显著降低雄鱼血浆中雌二醇(E2)的含量, 但对睾酮(T)无明显影响。此外, LNG 暴露可干扰雄鱼大脑和精巢中孕激素受体(*npr*, *mprα*, *mprβ*)、雌激素受体(*era*, *erβ*)以及雄激素受体(*ar*)的转录, 可能通过这些受体途径参与生殖调控。研究结果表明环境相关浓度的左炔诺孕酮长期暴露可导致雄性斑马鱼的生殖内分泌干扰效应, 并提示: 仅雄鱼单独受孕激素暴露影响, 也可能对鱼类种群的生殖产生深远影响。

关键词: 孕激素; 左炔诺孕酮; 斑马鱼; 生殖毒性; 内分泌干扰

文章编号: 1673-5897(2019)2-176-11

中图分类号: X171.5

文献标识码: A

Reproductive Toxicity in Male Zebrafish after Long-term Exposure to Low Concentrations of Progestin Levonorgestrel

Hua Jianghuan^{1,*}, Han Jian², Guo Yongyong², Zhou Bingsheng²

1. School of Basic Medical Sciences, Hubei University of Chinese Medicine, Wuhan 430065, China

2. State Key Laboratory of Freshwater Ecology and Biotechnology, Institute of Hydrobiology, Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430072, China

Received 28 June 2018

accepted 27 August 2018

Abstract: Synthetic progestins are widely used pharmaceutical agents with high bioactivity, and their residuals are frequently detected in the aquatic environment, posing potential threats to the aquatic organisms. In the present study, we investigated the reproductive toxicity of progestin levonorgestrel (LNG) at environmentally relevant con-

基金项目: 湖北省教育厅科学技术研究项目(项目编号: Q20182010)

作者简介: 华江环(1989-), 女, 博士, 研究方向为环境毒理学, E-mail: huajianghuan@163.com

centrations on zebrafish (*Danio rerio*). Embryos were exposed to LNG at environmentally relevant concentrations (10, 33 and 100 ng·L⁻¹) and allowed to develop until sexual maturity (142 days post fertilization), and 100% males were induced in all the treatment groups. Egg production of unexposed female zebrafish was significantly reduced when paired with male zebrafish exposed to 100 ng·L⁻¹ LNG, comparing with that of unexposed females paired with the control males. Survival rates of the offsprings from the unexposed females paired with males exposed to both 33 and 100 ng·L⁻¹ LNG were significantly decreased within 7 days after fertilization, comparing with the survival rate of offsprings from the unexposed females paired with the control males. Semen samples were analyzed for total motility (TM), progressive motility (PM), velocity average path (VAP), velocity straight line (VSL), and velocity curvilinear (VCL). All those parameters showed significant increase in males exposed to 33 ng·L⁻¹ when comparing with the control. However, no obvious changes were observed in other treatments. Plasma concentrations of 11-ketotestosterone (11-KT) or estradiol (E2) in males were significantly decreased after exposure to 33, 100 ng·L⁻¹ LNG, or all concentrations of LNG, respectively, while no effects were observed on plasma concentrations of testosterone (T). Besides, LNG exposure disrupted the transcription of progesterone receptors (*npr*, *mpr α* , *mpr β*), estrogen receptors (*er α* , *er β*) and androgen receptor (*ar*) in the brain and testes, which may indicate the regulating roles in reproduction through these receptors. The present study suggests that long-term exposure to environmentally relevant concentrations of LNG could result in reproductive endocrine disruption in zebrafish. The results also indicate that male exposure to progestin alone may also have profound effects on reproduction in fish populations that inhabit in progestin-contaminated aquatic environments.

Keywords: progestin; levonorgestrel; zebrafish; reproductive toxicity; endocrine disruption

左炔诺孕酮(levonorgestrel, LNG)是一种常用的人工合成孕激素,自1972年作为第二代避孕药被开发出来,已广泛应用于避孕药剂、紧急避孕药片、植入式避孕物等^[1-2]。随着LNG的大量使用,其被释放到环境中,目前已在包括中国在内的世界各地水环境(包括污水处理厂进出水、地表水、地下水等)中广泛检测到该种孕激素^[3-4],其浓度范围为0~213 ng·L⁻¹^[5-6],其中在地表水中检测到的浓度高达38 ng·L⁻¹^[4,7]。

研究表明,将虹鳉鱼置于含很低浓度(ng·L⁻¹级别)LNG的污水中,结果在短短几天内,LNG在其血液中的富集系数达数万倍,含量(8.5~1.2 ng·mL⁻¹)超过了人体用药水平^[8]。这说明LNG易在鱼体内富集,进而可能对鱼类的健康造成潜在威胁。由于LNG被用于人类避孕,毫无疑问,水环境中残留的LNG对鱼类的危害主要是对生殖的影响。LNG已被证实是一种活性很强的环境内分泌干扰物,在0.8 ng·L⁻¹的浓度下即可显著抑制黑头呆鱼(*Pimephales promelas*)的产卵^[9]。其他研究也显示LNG在较低的浓度可显著降低黑头呆鱼的产卵量^[10-11]。此外,低浓度LNG暴露还可干扰鱼类血浆中性激素的水平^[10-12]、损害性腺和配子发育^[9,12-13]、改变鱼类繁殖行为^[14-15]、影响精子活力^[15]等。作为一种结构与睾酮

相关的激素类化合物,LNG可结合并激活鱼类的雄激素受体(Androgen receptor, AR)^[16-17]。这使得LNG对鱼类的影响还表现为一定的雄激素效应。在斑马鱼早期性别分化重要阶段,用环境相关浓度的LNG(≥ 5.5 ng·L⁻¹)暴露斑马鱼,可诱导其全部逆转为雄鱼^[18]。低浓度LNG暴露可诱导雌鱼出现雄性化特征,如雌性黑头呆鱼出现“婚节”和色素积累的现象^[9,13-14],雌性食蚊鱼(*Gambusia holbrooki*)出现臀鳍延长的现象^[14,19],且这种延长臀鳍的效应可被抗雄激素氟他胺、群勃龙、米非司酮等消除^[19]。

虽然现有研究从鱼类个体的形态学、行为学、激素水平、繁殖力等方面研究了环境孕激素LNG对鱼类的毒性效应,但多数研究集中在短期暴露实验,且较少有研究从雄鱼的角度探讨LNG对生殖的影响。本文以斑马鱼为模型,选择全生命周期为暴露窗口期,考察暴露雄鱼使得未暴露雌鱼产卵的能力及所获子代的存活率以及暴露雄鱼的精子活力、血浆性激素水平、下丘脑-垂体-性腺轴(HPG轴)相关受体基因的转录水平等指标,以期从雄鱼的角度研究LNG长期低剂量暴露对斑马鱼生殖的影响。研究结果将揭示孕激素对雄鱼的生殖毒性效应,为环境孕激素的风险评估提供新的科学依据。

1 材料与方法 (Materials and methods)

1.1 试剂

左炔诺孕酮(levonorgestrel, LNG; CAS 797-63-7; purity ≥ 99%)、二甲基亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO; CAS 67-68-5; purity ≥ 99.5%)购于 Sigma-Aldrich 公司(Fluka, Shanghai, China)。氘代同位素内标左炔诺孕酮-2,2,4,6,6,10-d6 (LNG ((-)-Norgestrel-2,2,4,6,6,10-d6 or LNG-d6; CAS 797-63-7; purity ≥ 98%) 购于加拿大 CDN isotopes 公司(Pointe Claire, Quebec, Canada)。LNG (1 mg·mL⁻¹)和 LNG-d6 (20 mg·mL⁻¹)的储备液分别保存在 DMSO 和 40% 甲醇中,并分别置于 4 ℃ 和 -20 ℃ 保存。HBSS 300 溶液(配制方法:0.8 g 氯化钠、0.4 g 氯化钾、0.16 g 二水氯化钙、0.2 g 七水硫酸镁、0.06 g 磷酸氢二钠、0.06 g 磷酸二氢钾、0.35 g 碳酸氢钠、1.0 g 葡萄糖溶于 1 000 mL 去离子水中,调 pH 7.5)现配现用。其他化学试剂均为分析纯。

1.2 斑马鱼的饲养与暴露

成年斑马鱼(AB strain)的养殖及暴露参考已有文献^[20]。将野生型 4 月龄的斑马鱼养殖于活性炭过滤后的自来水中,pH 7.0 ~ 7.4,水温控制在(28±0.5) ℃,光照周期为 14 h:10 h(光照:黑暗)。每天喂食 2 次,间隔喂食刚孵化的丰年虫和片状饲料。收集鱼卵的前一天晚上将雄鱼和雌鱼以 1:1 的比例置于同一缸中,次日灯光刺激产卵并收集所产鱼卵。用活性炭处理 24 h 的过滤水清洗鱼卵,剔除异物。在解剖镜下取发育正常的囊胚期斑马鱼胚胎(2 hour post fertilization, 2 hpf)300 颗,随机分配置于盛有 800 mL 暴露液的 1 L 规格的玻璃结晶皿中。LNG 的暴露浓度依次为 10、33 和 100 ng·L⁻¹,其中 DMSO 浓度均为 0.01% (V/V),并设置 0.01% DMSO (V/V)为对

照组。每个浓度设置 3 个平行,每天更换暴露液。在 15 dpf(day post fertilization, dpf)时,随机挑选 250 条仔鱼到盛有 4 L 暴露液的 5 L 规格的鱼缸中;在 30 dpf 时,随机挑选 200 条稚鱼到盛有 9 L 暴露液的 10 L 规格的鱼缸中;在 63 dpf 时,随机挑选 20 ~ 25 条鱼到盛有 16 L 暴露液的 20 L 规格的鱼缸中直至暴露结束(142 dpf)。

1.3 性别比例

暴露结束后,在显微镜下解剖斑马鱼的性腺,辨别雌雄,并统计斑马鱼的性别比例。

1.4 暴露雄鱼使未暴露雌鱼产卵的能力及所获子代的存活率

在暴露期最后一周,每天从每个平行缸中随机取 8 条雄鱼,按照 1:1 的比例与同批次的未暴露的雌鱼在清水(未投药的过滤自来水)中进行配对,持续统计雌鱼一周的累积产卵量。将所得到的斑马鱼子代胚胎置于清水中饲养一周,统计其存活率。

1.5 暴露雄鱼精子活力测定

为研究雄鱼精子的质量,暴露结束后,每组随机取 9 条雄鱼,取出精巢,按照 1:20 的质量/体积比(*m:V*)加入 HBSS 300 溶液,制成精子悬浮液,置于冰上待用^[21]。利用计算机辅助精子分析系统(IVOS ver 12.0, Hamilton Thorne Bioscience)按照已建立好的方法对制备好的精子悬浮液进行测定^[22],测定参数包括总活力(total motility, TM)、活跃精子活力(progressive motility, PM)、平均路径速度(average path velocity, VAP)、直线运动速度(straight-line velocity, VSL)、曲线运动速度(curvilinear velocity, VCL)和直线性(linearity)几个参数,各参数代表含义详见表 1。每组检测 9 个精子悬浮液样本,每个样本 6 个视野。

表 1 本研究中斑马鱼精子活力参数
Table 1 Parameters of zebrafish sperm motility detected in this study

精子活力参数 Parameters of sperm motility	含义 Explanation
总活力 (Total motility, TM)	活精子数量所占百分比率 (Percentage of motile sperm, %)
活跃精子活力 (Progressive motility, PM)	快速向前运动的精子数量所占百分比率 (Percentage of motile sperm that expressed vigorous swimming, %)
平均路径速度 (Average path velocity, VAP)	精子运动的平均路径距离与所用时间的比值 (The total distance along the average path for each sperm divided by the time elapsed, μm·s ⁻¹)
直线运动速度 (Straight-line velocity, VSL)	精子运动的起点与终点间的直线距离与所用时间的比值 (The straight-line distance between the beginning and the end of the track divided by the time elapsed, μm·s ⁻¹)
曲线运动速度 (Curvilinear velocity, VCL)	精子运动的曲线长度与所用时间的比值 (The total curvilinear distance for a given sperm divided by the time elapsed, μm·s ⁻¹)
直线性 (Linearity)	精子运动路径偏离直线的偏离情况,在数值上等于 VSL/VCL (The departure of the sperm track from a straight line, it is numerically the ratio of VSL/VCL, %)

1.6 暴露雄鱼血浆性激素的抽提与测定

暴露结束后,麻醉实验鱼,断尾取血,每 3 尾鱼的血混合后作为一个平行样本。混合血样于 4℃、7 000 r·min⁻¹的条件下离心 5 min 后,取上清(10 μL)用于抽提和测定。激素抽提方法参考已发表论文^[23]。每个样品(10 μL)加入 390 μL Milli-Q 水,涡旋混匀,加入 2 mL 乙醚,混匀器混匀后于 4℃、5 000 r·min⁻¹条件下离心 10 min,取上清,再用 2 mL 乙醚按照上述方法抽提一次,将 2 次抽提上清收集于洁净的离心管内,氮气吹干后保存于-80℃。吹干后的样品加入 EIA Buffer (Cayman Chemical 公司的 ELISA 试剂盒内提供)复溶,按照试剂盒说明书测定样品中雌二醇(E2)、睾酮(T)和 11-酮基睾酮(11-KT)的含量。3 种性激素的检测限分别为:19 pg·mL⁻¹(E2),6 pg·mL⁻¹(T)和 1.3 pg·mL⁻¹(11-KT)。

1.7 暴露雄鱼大脑和精巢中受体基因的转录水平

本论文研究了暴露雄鱼大脑和性腺中重要受体基因(*npr*, *mprα*, *mprβ*, *erα*, *erβ*, *ar*)的转录水平。每 3 条雄鱼的精巢或脑混合后作为一个平行样本。按照 Han 等^[24]的方法提取 RNA、将 RNA 逆转录为 cDNA 及进行 RT-PCR 检测。采用 Trizol (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)提取总 RNA,使用 NanoDrop-2000 微量分光光度计(Nanodrop Technologies Inc., Wilmington DE, USA)测定总 RNA 的浓度,使用 Prime-Script® reagent Kit (TaKaRa Bio, Shiga, Japan)合成 cDNA。在定量检测之前使用在线工具(<http://www.>

[leonxie.com/referencegene.php](http://www.leonxie.com/referencegene.php))评估常用的 5 个内参基因(*rpl8*, *18s*, *β-actin*, *gapdh*, *ef1α*)在 LNG 暴露下转录的稳定性,并选取转录稳定性最好的 *rpl8* 作为内参基因。荧光定量 PCR 采用日本 Toyobo 公司 (Osaka, Japan)的 SYBR Green 试剂盒,于 ABI 7300 (Applied Biosystems, Foster City, CA)进行检测。扩增程序为:95℃×10 min 变性,95℃×30 s,60℃×15 s,72℃×45 s,35 个循环。实验中所用的基因引物序列采用在线引物设计软件 Primer 3 program (<http://frodo.wi.miT.edu/>)设计,引物序列见表 2。目的基因转录水平的相对变化使用 2^{-ΔΔCT} 法进行计算处理。

1.8 化学分析

在斑马鱼 3 个不同的发育阶段(胚胎期、稚鱼期、成鱼期),分别在换水前(*T*₂₄)和换水后(*T*₀)取各缸中水样 500 mL,用于测定暴露水中 LNG 的实际浓度,样品前处理和测定方法参考已发表的论文^[20]。

1.9 数据处理与分析

所有数据均使用 SPSS 13.0 软件(SPSS, Chicago, IL, USA)进行处理和分析,用平均值±标准误(SEM)表示。分别 Kolmogorov-Smirnov 和 Levene's 检验方法对数据的正态分布和方差齐性进行检验。采用单因素方差分析(One-way ANOVA) Tukey's 多重比较法对各组均值之间的显著性水平进行分析。当 *P*<0.05 即认定为具有显著性差异。

表 2 本研究所用引物信息
Table 2 Gene primer sequences used in the present study

基因名全称 Full name	基因名简称 Abbreviation	引物序列(5'-3') Primer sequence (5'-3')	基因库收录号 Gene bank accession No.
Ribosomal protein L8	<i>rpl8</i>	Forward: ttgttggtgtgttgctggt Reverse: ggatgctcaacagggtcat	NM_200713
Nuclear progesterone receptor	<i>npr</i>	Forward: gggccactcatgtctcgtcta Reverse: tctccactctgaaaatatgtgacttt	NM_001166335
Membrane progesterone receptor alpha	<i>mprα</i>	Forward: cgctcaagtgcgaactttt Reverse: cgtacttgccatagcagcag	NM_183345
Membrane progesterone receptor beta	<i>mprβ</i>	Forward: acgtcaagccacagtacacg Reverse: tctgatgcactggacgata	NM_183344
Estrogen receptor alpha	<i>erα</i>	Forward: tgagcaacaagaatggag Reverse: gtgggtgtagatggagggttt	NM_152959
Estrogen receptor beta	<i>erβ</i>	Forward: tgattagctggcggaaga Reverse: tatccagccagcagcatt	AJ414566
Androgen receptor	<i>ar</i>	Forward: atctgtgcgctagcaggaat Reverse: caactgcgagtggaaagtca	NM_001083123

2 结果 (Results)

2.1 化学分析

在斑马鱼 3 个不同的发育阶段(胚胎期、稚鱼期、成鱼期)各选择一个取样时间点,检测换水后 0 h (T_0)和 24 h (T_{24})暴露水体中 LNG 的实际浓度。结果对照组未检出 LNG。处理组中, T_0 时刻测得暴露水中 LNG 的浓度分别为 $9.4 \sim 14.0 \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$, $35.3 \sim 36.6 \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$, $103.6 \sim 110.0 \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$, 均十分接近其理论浓度;而 T_{24} 时刻测得浓度在 T_0 基础上有所下降,分别为 $8.3 \sim 11.5 \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$, $31.1 \sim 33.2 \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$, $84.3 \sim 92.2 \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$ [20]。本论文中,所有结果均用理论浓度表示。

2.2 性别比例

统计结果显示,斑马鱼胚胎经各浓度($10 \sim 100 \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$)LNG 暴露 142 d 后,所有鱼均表现为雄鱼 [20]。

2.3 暴露雄鱼使未暴露雌鱼产卵的能力及所获子代的存活率

将暴露的雄性斑马鱼与同批次的未暴露的雌性斑马鱼进行配对,考察前者使得未暴露雌鱼产卵的能力是否发生变化,结果发现 $100 \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$ 处理组雄鱼使得未暴露雌鱼产卵的数量较对照组雄鱼使得未暴露雌鱼产卵的数量显著减少(图 1)。进一步研究发现,33 和 $100 \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$ 处理组雄鱼与未暴露雌鱼配对所得子代在受精后 7 d 内的存活率较对照组雄鱼与未暴露雌鱼配对所得子代的存活率显著降低(图 2)。

2.4 暴露雄鱼的精子活力

精子活力是雄鱼生殖能力的一个重要指标,在 $33 \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$ LNG 暴露组中,斑马鱼精子的总活力(图 3A)、活跃精子活力(图 3B)、平均路径速度(图 3C)、直线运动速度(图 3D)、曲线运动速度(图 3E)等表示精子活力的参数较对照组均显著升高,而其他浓度组中这些参数均无显著性变化。各浓度组中精子运动的直线性这个指标则均无明显变化(图 3F)。

2.5 暴露雄鱼的血浆性激素水平

在斑马鱼雄鱼中,低浓度 LNG 对血浆中 11-KT 的水平无显著影响,但 33 和 $100 \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$ LNG 暴露显著降低了血浆中 11-KT 的水平(图 4A)。LNG 在 3 个浓度下均显著降低了血浆中 E2 的水平,但对 T 的水平无明显影响(图 4B, 4C)。

2.6 暴露雄鱼大脑和精巢中受体基因的转录水平

图 5 表示了 LNG 暴露对雄鱼大脑和精巢中重要受体基因(*npr*, *mpr α* , *mp β* , *er α* , *er β* , *ar*)转录水平

的影响情况。除 $100 \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$ 处理组精巢中 *npr* 的转录水平未发生变化外,LNG 暴露可显著降低雄鱼大脑和精巢中 *npr* 的转录水平。 10 和 $33 \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$ LNG 暴露可显著降低雄鱼大脑中 *mpr α* 和 *mp β* 的转录水平,但任何浓度的 LNG 暴露均不影响雄鱼精巢中 *mpr α* 和 *mp β* 的转录水平。LNG 暴露在不同程度上

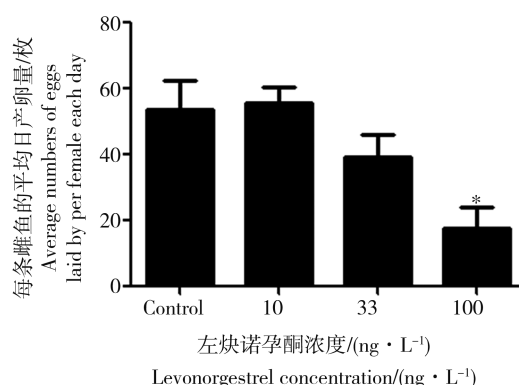


图 1 未暴露斑马鱼雌鱼与经左炔诺孕酮 (LNG) 暴露的雄鱼配对的产卵量变化情况

注:统计参数表示为暴露期内最后一周每条雌鱼每天的平均产卵量。数据表示为平均值 $\pm$ 标准误(mean $\pm$ SEM) ($n=3$)。* $P<0.05$ 表示与对照相比具有显著差异性差异。

Fig. 1 Changes in egg production of unexposed female zebrafish paired with males exposed to levonorgestrel (LNG)

Note: This statistical parameter is expressed as the mean numbers of eggs per day laid by per female fish during the last week of the exposure phase. Values are presented as mean $\pm$ SEM ($n=3$). * $P<0.05$ indicates the significant difference compared with the control.

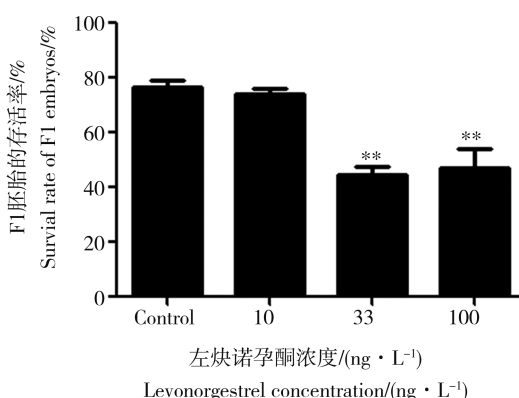


图 2 未暴露斑马鱼雌鱼与经 LNG 暴露的雄鱼配对后所得子代 (F1) 的存活率

注:数据表示为平均值 $\pm$ 标准误(mean $\pm$ SEM) ($n=3$)。* $P<0.01$ 表示与对照相比具有显著差异性差异。

Fig. 2 Survival rates of offsprings (F1) from the unexposed female zebrafish paired with the LNG exposed male fish

Note: Values are presented as mean $\pm$ SEM ($n=3$). ** $P<0.01$ indicates the significant difference compared with the control.

降低雄鱼大脑中 *erα* 和 *erβ* 的转录水平,其中对 *erα* 转录水平的抑制在 100 ng·L⁻¹ 的浓度下表现出显著差异,对 *erβ* 的转录水平的抑制则在 10 和 33 ng·L⁻¹ 的浓度下出现显著差异。LNG 对精巢中 *erα* 和 *erβ* 的转录水平的抑制作用则随着浓度的升高而增强,

其中 LNG 在 3 个浓度均可显著降低精巢 *erα* 的转录水平,但只在 100 ng·L⁻¹ 的浓度下显著降低精巢中 *erβ* 的转录水平。LNG 暴露并不影响雄鱼大脑中 *ar* 的转录水平,但在 100 ng·L⁻¹ 的浓度下显著降低精巢中 *ar* 的转录水平。

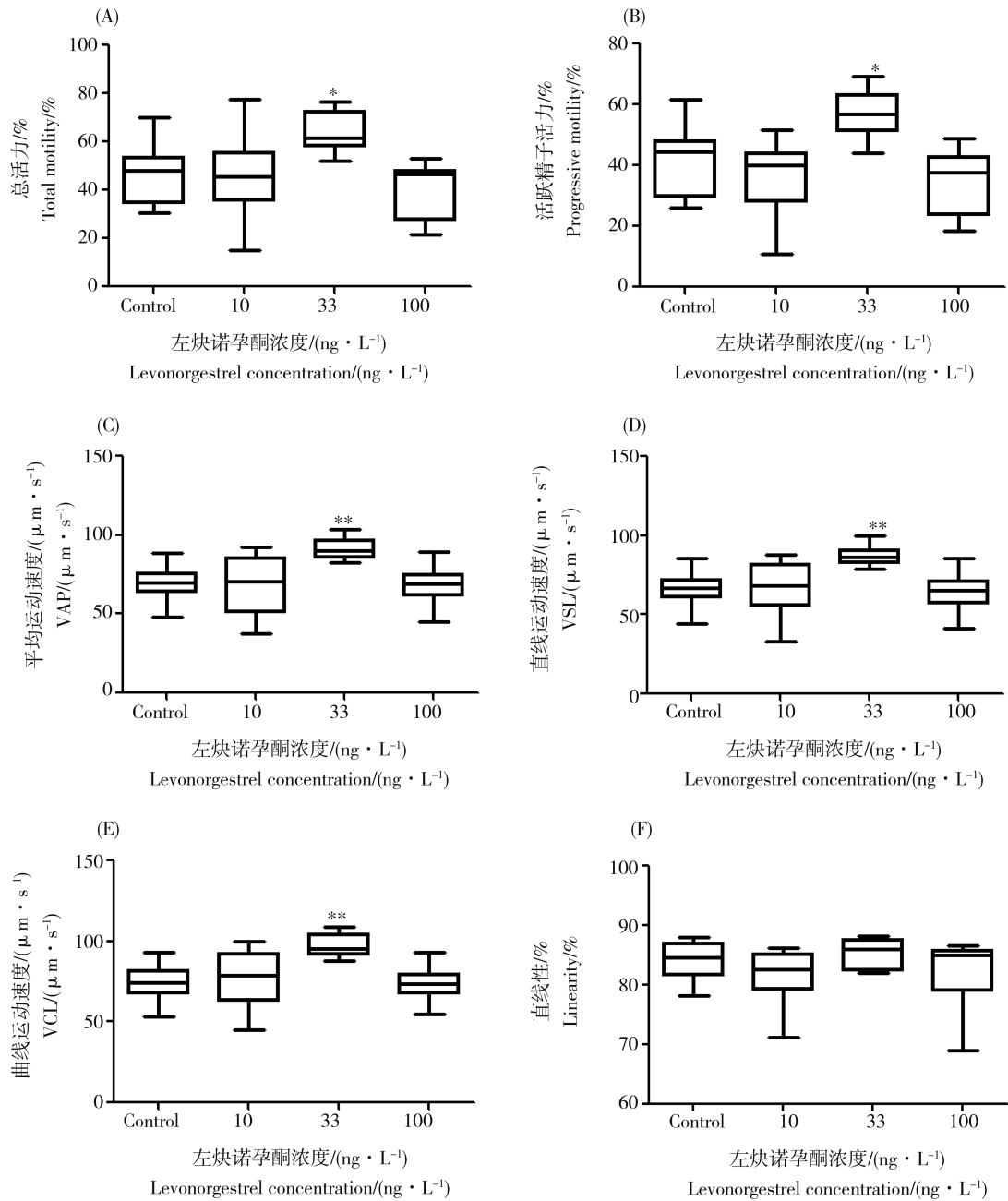


图 3 LNG 暴露对包括总活力 (A)、活跃精子活力 (B)、平均路径速度 (C)、直线运动速度 (D)、曲线运动速度 (E) 和直线性 (F) 等斑马鱼精子活力参数的影响

注:数据表示为平均值±标准误差(mean±SEM) (n=9)。* P<0.05 和 ** P<0.01 表示与对照组相比具有显著性差异。

Fig. 3 Effects of LNG exposure on zebrafish sperm motility parameters including total motility (TM) (A), progressive motility (PM) (B), velocity average path (VAP) (C), velocity straight line (VSL) (D), velocity curvilinear (VCL) (E) and linearity (LIN) (F)

Note: Values are presented as mean±SEM (n=9). * P<0.05 and ** P<0.01 indicate significant difference compared with the control.

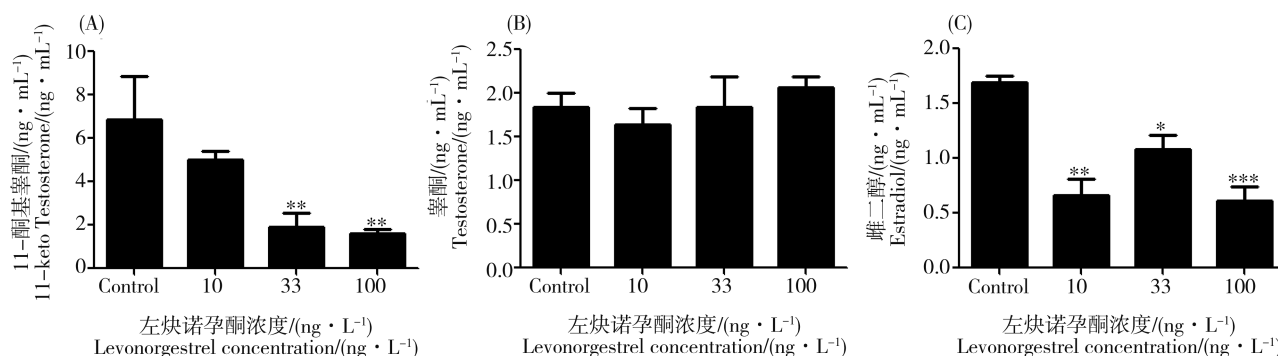


图4 LNG暴露对斑马鱼雄鱼血浆中11-酮基睾酮(11-KT) (A)、睾酮(T) (B)和雌二醇(E2) (C)含量的影响

注:数据表示为平均值±标准误($n=3\sim6$, 3条鱼的血混作一个样本)。* $P<0.05$, ** $P<0.01$ 和 *** $P<0.001$ 表示与对照组相比具有显著性差异。

Fig. 4 Effects on plasma concentrations of 11-ketotestosterone (11-KT) (A), testosterone (T) (B) and 17 β -estradiol (E2) (C) in male zebrafish after exposure to LNG

Note: Data are expressed as mean±standard error (SEM) ($n=3\sim6$, blood from 3 individual fish were pooled as one replicate sample).

* $P<0.05$, ** $P<0.01$ and *** $P<0.001$ indicate the significant difference compared with the control.

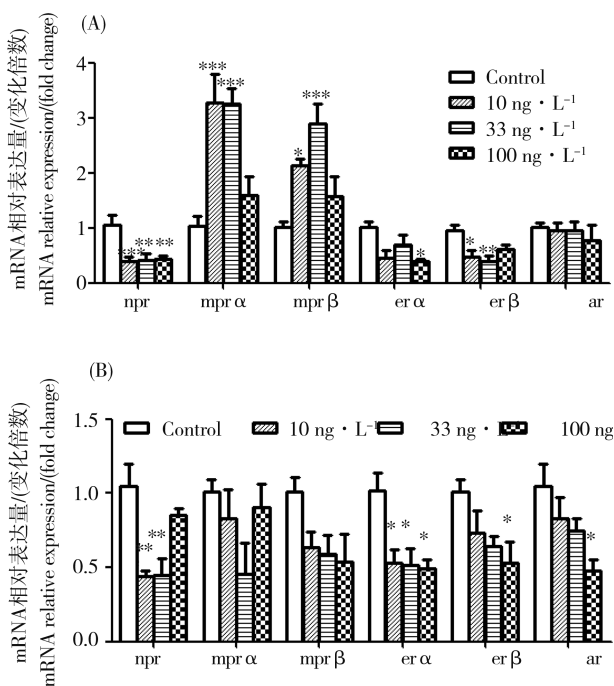


图5 LNG暴露对斑马鱼雄鱼大脑(A)和精巢(B)中受体基因转录水平的影响

注:数据表示为平均值±标准误($n=6$, 3条鱼的组织混合为一个平行样本)。* $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$ 表示对照组与处理组之间存在显著性差异。

Fig. 5 Effects on transcription of receptor genes in the brain (A) and testes (B) of male zebrafish after exposure to LNG

Note: Data are expressed as mean±standard error (SEM) ($n=6$, tissues from 3 individual fish were pooled as one replicate sample).

* $P<0.05$, ** $P<0.01$ and *** $P<0.001$ indicate the significant difference compared with the control.

3 讨论 (Discussion)

在斑马鱼全生命周期的暴露实验中,我们发现 $\geq 10 \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 LNG 可诱导斑马鱼全部逆转为雄鱼。无独有偶, Svensson 等^[25] 选择 20 dpf 至 80 dpf 作为暴露窗口,发现 LNG 在 $\geq 5.5 \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$ 的浓度下可诱导 100% 的雄性斑马鱼。研究发现,鱼类早期发育阶段暴露于环境雄激素可导致雄性偏向的性别比^[26-27]。因此,我们的研究结果表明 LNG 是一种潜在的雄激素,且具有很强的雄激素活性。其实,在鱼类中,已不少研究表明 LNG 具有雄激素活性。比如, LNG 在较低浓度下可诱导雌鱼出现雄性化特征,如雌性黑头呆鱼出现“婚节”和色素积累的现象^[9,13-14], 雌性食蚊鱼出现臀鳍延长的现象^[14,19], 且这种延长臀鳍的效应可被抗雄激素氟他胺、群勃龙、米非司酮等消除^[19]。此外, LNG 在 $\geq 40 \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$ 的浓度下可诱导雌鱼肾脏中 *Spiggin* 糖蛋白基因的表达(正常生理条件下, *Spiggin* 只在雄鱼肾脏中表达,但在外源性雄激素的作用下可在雌鱼肾脏中表达,是一种雄激素效应的标志物),并抑制肝脏中 *Vtg* 基因的转录^[28]; 在 $\geq 6.5 \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$ 的浓度下干扰雄性三刺鱼雄激素依赖性的季节性繁殖周期,阻碍其由生殖周期向非生殖周期的转变^[29]。

在一定的浓度下,几乎所有孕激素均能抑制鱼类产卵^[4]。研究表明,在雌雄鱼同时暴露的情况下, LNG 在较低的浓度下可明显降低产卵量^[9,10-11]。例如,在 21 d 的成鱼暴露实验中, LNG 在 $0.8 \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$ 的浓度下即可显著降低黑头呆鱼(*Pimephales promelas*)

的产卵量^[9],在 $100 \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$ 的浓度下对黑头呆鱼 (*Pimephales promelas*) 产卵的抑制率可高达近 90%^[10]。在已有的研究中,人们往往关注雌鱼暴露对产卵能力的影响,然而忽视了雄鱼异常也可能导致雌鱼产卵受阻。本研究结果显示,经 LNG 暴露的雄性斑马鱼使得未暴露雌性斑马鱼的产卵能力降低。徐绘^[30]的研究发现,母代(F0)经 17α -炔雌醇 (EE2) 暴露所得到的雄性子一代(F1)使得正常雌鱼产卵的能力较对照组显著降低。乔坤^[31]用 $1.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的双酚 A (BPA) 暴露孵化后 20 d (20 dph) 的斑马鱼至 100 dph,让经双酚 A (BPA) 暴露的雄性斑马鱼与未暴露的正常雌鱼交配,结果发现产卵量较正常组显著下降。鱼类产卵的生殖行为一般都伴随着雄鱼追逐雌鱼等求偶行为的发生而启动。资料显示,雄性黑头呆鱼经孕激素($\geq 10 \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$ 的孕二烯酮)暴露 1 d 后,其求偶和交配行为的兴趣锐减^[4]。我们推测,孕激素可通过影响雄鱼的求偶和交配行为,进而降低雌鱼的产卵能力,这可能是本研究中与 $100 \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$ LNG 暴露雄鱼配对的正常雌鱼产卵量显著下降的原因。

目前,关于环境内分泌干扰物导致斑马鱼父系出生缺陷(如子代存活率降低)问题已有不少研究。例如,徐绘^[30]研究了雄性斑马鱼经 17α -炔雌醇 (EE2) 暴露后对子代发育的影响,结果发现子代死亡率较正常组显著升高。乔坤^[31]的研究发现,经双酚 A (BPA) 暴露的雄性斑马鱼与未暴露的正常雌鱼交配所获子代胚胎 12 h 内的死亡率较对照组相比增加了 $202.53\% \pm 6.21\%$ 。本研究发现雄性斑马鱼经 LNG 暴露后可影响其子代的存活率,然而相关机制尚未可知。大量人类、哺乳动物的研究表明,环境内分泌干扰物可通过表观遗传学机制引起跨代的毒性效应^[32]。在鱼类中,精子所携带的 DNA 甲基化的表观遗传信息可被传递到子代,参与调控子代的胚胎发育^[33]。我们的研究表明,孕激素 LNG 全生命周期低剂量暴露可导致成年雄性稀有鮑鲫精巢中全基因组低甲基化,并使得精巢中 *cyp19a1a* 某些 CpG 位点的甲基化水平显著升高^[34]。LNG 可能通过精子表观遗传学修饰的改变进而影响子代的生长发育,但尚待进一步研究。

计算机辅助精子分析(computer assisted sperm analysis, CASA)技术是一项定量研究鱼类精子运动参数的有效方法,目前已广泛应用于虹鳟、黑头呆鱼、鲤鱼、斑马鱼等^[35-38]。对于多数淡水鱼类来说,

其精子被激活后运动的时间较海水硬骨鱼类和哺乳类短^[39],在本实验中,我们尽量在较短的时间(30 s)内完成精子活力的测定。本研究结果显示, $33 \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$ LNG 显著升高斑马鱼精子的总活力(TM)、活跃精子活力(PM)、平均路径速度(VAP)、直线运动速度(VSL)、曲线运动速度(VCL),但 10 和 $100 \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$ LNG 对这些参数无显著影响。然而,Frankel 等^[15]用 10 和 $100 \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$ LNG 暴露雄性黑头呆鱼 14 d,结果 TM、VSL、VCL、VAP 等参数在精子被激活后的不同时间点较对照组明显降低。Murack 等^[40]用 $300 \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$ 的孕酮(一种天然孕激素)暴露黑头呆鱼一周,结果 VSL、VCL、VAP 等参数被显著抑制。这两项研究说明,孕激素 LNG 和孕酮暴露可抑制黑头呆鱼精子的活力。本研究中观察到 $33 \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$ LNG 暴露提高斑马鱼精子活力的结果似乎有悖于已有的研究结果,其具体原因尚不清楚,可能与 LNG 的孕激素活性有关。研究表明,在脊椎动物中,孕激素促进精子活力是一种普遍现象。孕激素往往通过可与精子膜上的孕激素受体(mpr α)结合,激活下游信号途径,从而增加精子活力^[41]。本研究中,LNG 在一定浓度下可能直接作用于精巢中的精子,从而起到促进精子活力的作用。

血浆性激素水平是鱼类对环境内分泌干扰物暴露反应较为敏感的指标。下丘脑-垂体-性腺轴(HPG 轴)是孕激素类污染物的作用靶点,因此,孕激素暴露可能导致鱼类血浆性激素水平的紊乱^[10]。本研究结果显示,LNG 长期低剂量暴露可使得雄性斑马鱼血浆中 11-KT 和 E2 的含量显著下降,但不影响 T 的含量。与本研究结果类似,Kroupova 等^[12]用 $31 \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$ LNG 暴露成年拟鲤鱼(*Rutilus rutilus*) 28 d 可显著降低雄鱼血浆中 11-KT 的含量,但不影响 T 的含量。然而 Runnalls 等^[10]用 $100 \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$ LNG 暴露成年黑头呆鱼 21 d,雄鱼血浆中 11-KT 和 T 的含量未发生明显变化。同样地,Runnalls 等^[11]用 $0.25 \sim 12.5 \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$ LNG 暴露成年斑马鱼 21 d,结果也发现并未对雄鱼血浆中 11-KT、T 和 E2 的含量产生任何影响。这些不同的研究结果可能归因于鱼类物种和暴露方式的差异。此外,作为类固醇类化合物,孕激素可作为类固醇类合成酶的作用底物,最终导致血浆中性激素的水平发生复杂的变化^[10]。环境内分泌干扰物可通过干扰性激素水平进而影响鱼类的生殖^[42]。本研究中,斑马鱼血浆中 11-KT 和 E2 水平的显著下降可能对其生殖造成一定的影响,这可能

是雄鱼使得未暴露雌鱼的产卵量下降的原因。

在鱼类中,孕激素可能激活孕激素受体(progesterone receptors, PRs)包括核孕激素受体(nPR)和膜孕激素受体(mPR),并参与生殖调控^[10]。在雄鱼中,*npr*参与大脑中孕激素诱导的生殖信息的调控以及精巢中类固醇类的合成和早期精子细胞的增殖^[43-44]。本研究中,LNG暴露可降低雄性斑马鱼大脑、精巢中*npr*的转录水平,该结果与孕激素醋酸甲地孕酮暴露斑马鱼的结果相同^[24]。*mp β* 参与启动精子的减数分裂,精子中*mpr α* 的表达则与精子的激活密切相关^[41,45]。然而精巢中这2种膜孕激素受体基因的转录水平并未发生明显变化,但是,我们观察到LNG暴露可升高雄性斑马鱼大脑中*mpr α* 和*mp β* 的转录水平,这与在黑头呆鱼稚鱼中观察到的结果相同^[45]。孕激素受体转录水平的变化意味着LNG暴露可能通过与这些孕激素受体作用,从而对斑马鱼生殖产生一定的影响,相关内容有待进一步深入研究。LNG本身不与雌激素受体结合,但是其代谢产物3- α 、5- α -LNG和3 β 、5- α -LNG可与雌激素受体结合^[46]。在成年拟鲤鱼的暴露实验中,高浓度的LNG表现出了雌激素效应。我们检测了斑马鱼大脑和精巢中雌激素受体*er α* 和*er β* 的转录水平,发现LNG暴露可以不同程度地抑制这2个受体基因的转录水平,表现出了抗雌激素效应,这一结果与在经LNG暴露过的黑头呆鱼稚鱼体内观察到的结果一致^[45]。LNG由睾酮衍生而来,在鱼类中,LNG可结合并激活鱼类的雄激素受体(AR)^[16-17]。考虑到LNG具有与雄激素受体(AR)结合的能力,我们也研究了雄激素受体*ar*的转录水平。本研究中,斑马鱼精巢中*ar*的转录被抑制,这一结果与在经LNG暴露后的斑马鱼胚胎/仔鱼^[47]、28及42 dpf的斑马鱼^[20]和黑头呆鱼稚鱼^[45]中观察到的结果一致。然而,Kroupova等^[12]的研究表明,LNG暴露并不影响处于青春期的雄性和雌性拟鲤鱼体内*ar*的转录水平。这些研究似乎说明LNG对*ar*的转录水平的影响取决于鱼类的发育阶段以及暴露时间的长短。

综上,仅雄鱼受LNG影响的情况下可导致斑马鱼的生殖能力下降,表现为受LNG暴露的雄鱼使得未暴露雌鱼的产卵能力显著降低以及二者交配获得的子代的存活率明显下降,但具体机制尚待进一步研究。LNG全生命周期的长期低剂量暴露可降低所得雄性斑马鱼的性激素水平(11-KT和E2),但在一定浓度下可提高精子的活力。LNG可干扰孕激

素受体、雌激素受体以及雄激素受体的表达,可能通过这些受体途径参与生殖调控。这些结果表明,环境相关浓度的左炔诺孕酮长期暴露可导致雄性斑马鱼的生殖内分泌干扰效应,并提示:仅雄鱼单独受孕激素暴露影响,也可能对鱼类种群的生殖产生深远影响。

通讯作者简介:华江环(1989—),女,博士,讲师,主要研究方向为环境毒理学。

参考文献 (References):

- [1] Ellestad L E, Cardon M, Chambers I G, et al. Environmental gestagens activate fathead minnow (*Pimephales promelas*) nuclear progesterone and androgen receptors *in vitro* [J]. Environmental Science & Technology, 2014, 48 (14): 8179-8187
- [2] Besse J P, Garric J. Progestagens for human use, exposure and hazard assessment for the aquatic environment [J]. Environmental Pollution, 2009, 157: 3485-3494
- [3] 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: 1367-1378
- [4] Fent K. Progestins as endocrine disrupters in aquatic ecosystems: Concentrations, effects and risk assessment [J]. Environment International, 2015, 84: 115-130
- [5] Liu Z H, Ogejo J A, Pruden A, et al. Occurrence, fate and removal of synthetic oral contraceptives (SOCs) in the natural environment: A review [J]. Science of the Total Environment, 2011, 409: 5149-5161
- [6] Al-Odaini N A, Zakaria M P, Yaziz M I, et al. Occurrence of synthetic hormones in sewage effluents and Langat River and its tributaries, Malaysia [J]. International Journal of Environmental Analytical Chemistry, 2013, 93: 1457-1469
- [7] Kumar V, Johnson A C, Trubiroha A, et al. The challenge presented by progestins in ecotoxicological research: A critical review [J]. Environmental Science & Technology, 2015, 49(5): 2625-2638
- [8] Fick J, Lindberg R H, Parkkonen J, et al. Therapeutic levels of levonorgestrel detected in blood plasma of fish: Results from screening rainbow trout exposed to treated sewage effluents [J]. Environmental Science & Technology, 2010, 44(7): 2661-2666
- [9] Zeilinger J, Steger-Hartmann T, Maser E, et al. Effects of synthetic gestagens on fish reproduction [J]. Environmen-

- tal Toxicology and Chemistry, 2009, 28(12): 2663-2670
- [10] Runnalls T J, Beresford N, Losty E, et al. Several synthetic progestins with different potencies adversely affect reproduction of fish [J]. Environmental Science & Technology, 2013, 47(4): 2077-2084
- [11] Runnalls T J, Beresford N, Kugathas S, et al. From single chemicals to mixtures—Reproductive effects of levonorgestrel and ethinylestradiol on the fathead minnow [J]. Aquatic Toxicology, 2015, 169: 152-167
- [12] Kroupova H K, Trubiroha A, Lorenz C, et al. The progestin levonorgestrel disrupts gonadotropin expression and sex steroid levels in pubertal roach (*Rutilus rutilus*) [J]. Aquatic Toxicology, 2014, 154: 154-162
- [13] Frankel T, Yonkos L, Frankel J. Exposure effects of levonorgestrel on oogenesis in the fathead minnow (*Pimephales promelas*) [J]. Environmental Toxicology and Chemistry, 2017, 36(12): 3299-3304
- [14] Frankel T E, Meyer M T, Orlando E F. Aqueous exposure to the progestin, levonorgestrel, alters anal fin development and reproductive behavior in the eastern mosquitofish (*Gambusia holbrooki*) [J]. General and Comparative Endocrinology, 2016, 234: 161-169
- [15] Frankel T, Yonkos L, Ampy F, et al. Exposure to levonorgestrel increases nest acquisition success and decreases sperm motility in the male fathead minnow (*Pimephales promelas*) [J]. Environmental Toxicology and Chemistry, 2018, 37(4): 1131-1137
- [16] Ellestad L E, Cardon M, Chambers I G, et al. Environmental gestagens activate fathead minnow (*Pimephales promelas*) nuclear progesterone and androgen receptors *in vitro* [J]. Environmental Science & Technology, 2014, 48(14): 8179-8187
- [17] Bain P A, Kumar A, Ogino Y, et al. Nortestosterone-derived synthetic progestogens do not activate the progesterone receptor of Murray-Darling rainbowfish (*Melanotaenia fluviatilis*) but are potent agonists of androgen receptors alpha and beta [J]. Aquatic Toxicology, 2015, 163: 97-101
- [18] Svensson J, Mustafa A, Fick J, et al. Developmental exposure to progestins causes male bias and precocious puberty in zebrafish (*Danio rerio*) [J]. Aquatic Toxicology, 2016, 177: 316-323
- [19] Brockmeier E K, Scott P D, Denslow N D, et al. Transcriptomic and physiological changes in eastern mosquitofish (*Gambusia holbrooki*) after exposure to progestins and anti-progestagens [J]. Aquatic Toxicology, 2016, 179: 8-17
- [20] Hua J, Han J, Guo Y, et al. The progestin levonorgestrel affects sex differentiation in zebrafish at environmentally relevant concentrations [J]. Aquatic Toxicology, 2015, 166: 1-9
- [21] Jing R, Huang C, Bai C, et al. Optimization of activation, collection, dilution, and storage methods for zebrafish sperm [J]. Aquaculture, 2009, 290: 165-171
- [22] Wang X, Wang F, Wu X, et al. The use of cryomicroscopy in guppy sperm freezing [J]. Cryobiology, 2010, 61: 182-188
- [23] Hua J, Han J, Wang X, et al. The binary mixtures of megestrol acetate and 17 α -ethinylestradiol adversely affect zebrafish reproduction [J]. Aquatic Toxicology, 2016, 213: 776-784
- [24] Han J, Wang Q, Wang X, et al. The synthetic progestin megestrol acetate adversely affects zebrafish reproduction [J]. Aquatic Toxicology, 2014, 150: 66-72
- [25] Svensson J, Mustafa A, Fick J, et al. Developmental exposure to progestins causes male bias and precocious puberty in zebrafish (*Danio rerio*) [J]. Aquatic Toxicology, 2016, 177: 316-323
- [26] Örn S, Holbech H, Madsen T H, et al. Gonad development and vitellogenin production in zebrafish (*Danio rerio*) exposed to ethinylestradiol and methyltestosterone [J]. Aquatic Toxicology, 2003, 65: 397-411
- [27] Holbech H, Kinnberg K, Petersen G I, et al. Detection of endocrine disruptors: Evaluation of a fish sexual development test (FSDT) [J]. Comparative Biochemistry and Physiology, Part C: Toxicology & Pharmacology, 2006, 144(1): 57-66
- [28] Svensson J, Fick J, Brandt I, et al. The synthetic progestin levonorgestrel is a potent androgen in the three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus*) [J]. Environmental Science & Technology, 2013, 47(4): 2043-2051
- [29] Svensson J, Fick J, Brandt I, et al. Environmental concentrations of an androgenic progestin disrupts the seasonal breeding cycle in male three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus*) [J]. Aquatic Toxicology, 2014, 147: 84-91
- [30] 徐绘. 17 α -炔雌醇对斑马鱼生殖系统的影响及其机理的研究[D]. 上海: 复旦大学, 2008: 24-34
- Xu H. Effects of 17 α -ethinylestradiol exposure on development and reproduction of zebrafish and its corresponding mechanisms [D]. Shanghai: Fudan University, 2008: 24-34 (in Chinese)
- [31] 乔坤. 双酚对雄性斑马鱼生殖毒性及其表观遗传学机理研究[D]. 上海: 复旦大学, 2011: 9-19
- Qiao K. Reproductive toxicity of BPA on male zebrafish and its epigenetic mechanism [D]. Shanghai: Fudan University, 2011: 9-19 (in Chinese)

- [32] Xin F, Susiarjo M, Bartolomei M S. Multigenerational and transgenerational effects of endocrine disrupting chemicals: A role for altered epigenetic regulation? [J]. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 2015, 43: 66-75
- [33] Jiang L, Zhang J, Wang J J, et al. Sperm, but not oocyte, DNA methylome is inherited by zebrafish early embryos [J]. *Cell*, 2013, 153(4): 773-784
- [34] 华江环. 孕激素左炔诺孕酮和醋酸甲地孕酮对鱼类的内分泌干扰效应[D]. 北京: 中国科学院大学, 2017: 85-120
- Hua J H. Endocrine disrupting effects of progestins levonorgestrel and megestrol acetate on fish [D]. Beijing: University of Chinese Academy of Sciences, 2017: 85-120 (in Chinese)
- [35] Lahnsteiner F, Berger B, Kietzi M, et al. Effect of bisphenol A on maturation and quality of semen and eggs in the brown trout, *Salmo trutta f. fario* [J]. *Aquatic Toxicology*, 2005, 75: 213-224
- [36] Runnalls T J, Hala D N, Sumpter J P. Preliminary studies into the effects of the human pharmaceutical clofibrate on sperm parameters in adult fathead minnow [J]. *Aquatic Toxicology*, 2007, 84: 111-118
- [37] Toth G P, Christ S A, McCarthy H W, et al. Computer-assisted motion analysis of semen from the common carp [J]. *Journal of Fish Biology*, 1995, 47: 986-1003
- [38] Wilson-Leedy J G, Ingermann R L. Development of a novel CASA system based on open source software for characterization of zebrafish sperm motility parameters [J]. *Theriogenology*, 2007, 67: 661-672
- [39] Browne R K, Kaurova S A, Uteshev V K, et al. Sperm motility of externally fertilizing fish and amphibians [J]. *Theriogenology*, 2015, 83: 1-13
- [40] Murack P J, Parrish J, Barry T P. Effects of progesterone on sperm motility in fathead minnow (*Pimephales promelas*) [J]. *Aquatic Toxicology*, 2011, 104: 121-125
- [41] Tubbs C, Thomas P. Functional characteristics of membrane progesterin receptor alpha (mPR α) subtypes: A review with new data showing mPR α expression in seatrout sperm and its association with sperm motility [J]. *Steroids*, 2008, 73(9-10): 935-941
- [42] Ankley G T, Bencic D C, Breen M S, et al. Endocrine disrupting chemicals in fish: Developing exposure indicators and predictive models of effects based on mechanism of action [J]. *Aquatic Toxicology*, 2009, 92(3): 168-178
- [43] Hanna R N, Daly S C, Pang Y, et al. Characterization and expression of the nuclear progesterin receptor in zebrafish gonads and brain [J]. *Biology of Reproduction*, 2010, 82: 112-122
- [44] Scott A P, Sumpter J P, Stacey N. The role of the maturation-inducing steroid, 17,20 beta-dihydroxypregn-4-en-3-one, in male fishes: A review [J]. *Journal of Fish Biology*, 2010, 76: 183-224
- [45] Overturf M D, Overturf C L, Carty D R, et al. Levonorgestrel exposure to fathead minnows (*Pimephales promelas*) alters survival growth, steroidogenic gene expression and hormone production [J]. *Aquatic Toxicology*, 2014, 148: 152-161
- [46] Santillán R, Pérez-Palacios G, Reyes M, et al. Assessment of the oestrogenic activity of the contraceptive progesterin levonorgestrel and its non-phenolic metabolites [J]. *European Journal of Pharmacology*, 2001, 427: 167-174
- [47] Zucchi S, Castiglioni S, Fent K. Progestins and antiprogestins affect gene expression in early development in zebrafish (*Danio rerio*) at environmental concentrations [J]. *Environmental Science & Technology*, 2012, 46(9): 5183-5192 ◆