

DOI: 10.7524/AJE.1673-5897.20130206001

王慧, 田华, 汝少国. EEDs对鱼类性激素合成途径干扰作用研究进展[J]. 生态毒理学报, 2013, 8(3): 306-314

Wang H, Tian H, Ru S G. Research progress in disrupting effects of EEDs on steroid hormone biosynthesis pathway of fish [J]. Asian Journal of Ecotoxicology, 2013, 8(3): 306-314 (in Chinese)

## EEDs对鱼类性激素合成途径干扰作用研究进展

王慧, 田华, 汝少国\*

中国海洋大学海洋生命学院, 青岛 266003

**摘要:** 环境内分泌干扰物 (environmental endocrine disruptors, EEDs) 是一类可以改变生物体内激素的合成、释放、运输、代谢、结合、作用或清除等一系列生物过程的外源物质。性激素的生物合成需要一系列酶的参与, 体内和体外研究表明, 性激素合成途径中的类固醇生成酶是 EEDs 通过非性激素受体介导途径发挥内分泌扰乱作用的重要靶点。性激素合成途径的扰乱可能导致生物体生殖系统受损。本文综述了 EEDs 对鱼类性激素合成底物和类固醇生成酶的影响、信号转导机制及其生殖危害; 并对性激素合成途径中促性腺激素调控机理、多种转录因子间的相互作用、不同物种间类固醇生成酶的差异以及各内分泌轴线的相互作用研究进行了展望, 以期 EEDs 通过非性激素受体介导途径发挥内分泌干扰效应的机制研究提供思路。

**关键词:** 环境内分泌干扰物; 性激素; 类固醇生成酶; 鱼类

文章编号: 1673-5897(2013)3-306-09 中图分类号: X171.5 文献标识码: A

## Research Progress in Disrupting Effects of EEDs on Steroid Hormone Biosynthesis Pathway of Fish

Wang Hui, Tian Hua, Ru Shaoguo\*

Marine Life Science College, Ocean University of China, Qingdao 266003, China

**Received** 6 February 2013 **accepted** 15 March 2013

**Abstract:** Environmental endocrine disruptors (EEDs) are exogenous substances that interfere with the synthesis, secretion, transport, metabolism, binding, action, or elimination of natural hormones in the body. Sex hormone biosynthesis needs a series of steroidogenic enzymes, which are important targets for the actions of various EEDs, proved by in vivo and in vitro studies. Also, interferences of pathways of sex hormone biosynthesis may result in impaired reproductive system. A detailed description of EEDs' effects on the substrate of sex hormones and steroidogenic enzymes, as well as the exact signaling pathway mechanisms, and the harmful influences on fish reproduction are reviewed. In addition, mechanisms of gonadotropin regulation, the interactions between several transcription factors, differences of steroidogenic enzymes among different species, and chemical-induced effects on cross-talk among different axes of fish are discussed. This review will provide an idea to study the mechanisms of EEDs which don't interact with various sex hormone receptors exerting endocrine disrupting activities.

**Keywords:** environmental endocrine disruptors; sex hormone; steroidogenic enzyme; fish

收稿日期: 2013-02-06 录用日期: 2013-03-15

基金项目: 国家自然科学基金(31202001)

作者简介: 王慧(1988-)女, 硕士, 研究方向为生态毒理学 E-mail: huiw06@163.com;

\* 通讯作者( Corresponding author) E-mail: rusg@ouc.edu.cn

性激素在鱼类生殖系统发育中起着决定性的作用。性激素主要由性腺合成并分泌,可以通过血液循环运输到其他的靶组织,与细胞核内的雌激素受体、雄激素受体等核受体结合而发挥作用。许多环境内分泌干扰物如双酚 A (bisphenol A, BPA)、4-壬基酚、己烯雌酚 (diethylstilbestrol, DES)、o,p'-滴滴涕等具有与生物体内雌激素相类似的结构,可作为配体与雌激素受体结合<sup>[1-2]</sup>,通过性激素受体介导途径发挥类雌激素效应,这种作用方式被认为是环境内分泌干扰物 (environmental endocrine disruptors, EEDs) 发挥内分泌干扰作用的经典作用途径,这类化合物也被称为环境雌激素。此外,环境中还存在很多化学物质,虽然其结构与内源性激素并不相似,不能直接与激素受体相结合,但在体内实验中却也表现出内分泌干扰效应,这可能是其影响了生物体内性激素的合成、转运、代谢、清除等过程,从而影响了性激素的含量,这些作用被统称为非性激素受体介导途径<sup>[3]</sup>。近年来,研究发现,某些典型的环境雌激素如 17 $\alpha$ -炔雌醇 (17 $\alpha$ -ethinylestradiol, EE<sub>2</sub>)、BPA 也可以通过非性激素受体介导途径发挥内分泌干扰作用<sup>[4-5]</sup>。性激素的合成涉及到一系列的酶促反应,EEDs 对性激素合成途径的干扰可能是影响了性激素合成底物的含量,也可能是影响了类固醇生成酶 mRNA 的表达和/或活性。已经证实,芳香化酶抑制剂法倔唑、杀菌剂咪鲜胺、除草剂阿特拉津等可通过非受体介导途径,影响性腺性激素合成途径中相关酶的基因表达和/或活性<sup>[6]</sup>,导致性激素水平紊乱,进而干扰生物体的生殖和发育过程。本文综述了鱼类的性激素合成途径,EEDs 对性激素合成底物和类固醇生成酶的影响,EEDs 影响性激素合成的信号转导机制,以及 EEDs 对性激素水平的影响和生殖危害,以期 EEDs 发挥内分泌干扰效应的作用机制研究提供借鉴。

## 1 鱼类性激素合成途径

在垂体促性腺激素 (gonadotropins, GtHs) 包括卵泡刺激素 (follicle-stimulating hormone, FSH) 和促黄体激素 (luteinizing hormone, LH) 的调控下,性腺特化的体细胞分泌产生性激素,性激素对性腺发育、卵黄形成、卵细胞成熟、精子生成和精子排放等生理过程具有重要的调控作用。一般硬骨鱼体内发挥作用的主要性激素为 17 $\beta$ -雌二醇 (17 $\beta$ -estradiol, E<sub>2</sub>)、睾酮 (testosterone, T) 和 11-酮基睾酮 (11-ketotestosterone, 11-KT)<sup>[7]</sup>。LH 调控雄激素的合成和分泌,

FSH 控制雄激素向雌激素的转化。性激素合成的反应底物为胆固醇,在类固醇激素合成急性调节蛋白 (steroidogenic acute regulatory protein, StAR)<sup>[8]</sup> 的作用下,胆固醇由线粒体外膜转运至内膜,然后在胆固醇侧链裂解酶 (cholesterol side chain cleavage enzyme, CYP11A1/P450<sub>scc</sub>) 的作用下,转化为孕烯醇酮。在滑面内质网中,3 $\beta$ -羟类固醇脱氢酶 (3 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase, 3 $\beta$ -HSD) 催化孕烯醇酮转化为孕酮,17 $\alpha$ -羟化酶 (又名 17,20-裂解酶, cytochrome P450 17 $\alpha$ -hydroxylase, 17,20-lyase, CYP17/P450<sub>c17</sub>/P450<sub>17 $\alpha$</sub> ) 催化孕烯醇酮和孕酮转化为雄激素。雄烯二酮转化为 E<sub>2</sub> 的合成途径有 2 条:一是芳香化酶 (cytochrome P450 aromatase, CYP19/P450<sub>arom</sub>) 催化雄烯二酮转化为雌酮,然后雌酮经 17 $\beta$ -羟类固醇脱氢酶 I (17 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase type I, 17 $\beta$ -HSD1) 催化转化为 E<sub>2</sub>;二是 17 $\beta$ -羟类固醇脱氢酶 III (17 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase type III, 17 $\beta$ -HSD3) 催化雄烯二酮转化为 T, T 再经芳香化酶催化转变为 E<sub>2</sub><sup>[9]</sup>。其中,芳香化酶是 E<sub>2</sub> 合成过程的限速酶,其所催化的雄激素向雌激素的转化过程对鱼类性腺发育是必不可少的。11 $\beta$ -羟化酶 (11 $\beta$ -hydroxylase, P450<sub>11 $\beta$</sub> ) 催化 T 向 11 $\beta$ -羟基睾酮的转化<sup>[10]</sup>,再经 11 $\beta$ -羟类固醇脱氢酶 II (11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase type II, 11 $\beta$ -HSD2) 作用生成 11-KT,这 2 种酶对鱼类精巢中 11-KT 的合成具有重要作用。各种酶类催化的反应过程如图 1 所示。

FSH 和 LH 通过激活 cAMP/PKA 信号转导途径,调节性激素的合成。类固醇生成酶基因启动子上的顺式作用元件是 cAMP/PKA 刺激类固醇生成酶基因转录的作用位点<sup>[11-12]</sup>。GtHs 与其膜受体结合后,激活 G 蛋白,活化腺苷酸环化酶合成 cAMP,细胞内 cAMP 浓度增加可激活蛋白激酶 A (protein kinase A, PKA),PKA 进而通过调节某些转录因子的磷酸化水平实现对类固醇生成酶转录水平的调控。目前已知与类固醇生成酶表达相关的转录因子有甾体生成因子 (steroidogenic factor 1, SF-1) 和 cAMP 应答元件结合蛋白 (cAMP response element binding protein, CREB) 等。研究证实 CREB 通过 133 位丝氨酸的磷酸化/去磷酸化作用调节 P450<sub>arom</sub> 基因启动子上的 cAMP 应答元件 (cAMP response element, CRE),从而起始 P450<sub>arom</sub> 基因的转录<sup>[13-14]</sup>。SF-1 是孤儿核受体超家族的一员,是许多 cAMP 依赖的靶基因包括 P450<sub>arom</sub>、CYP11A1、StAR

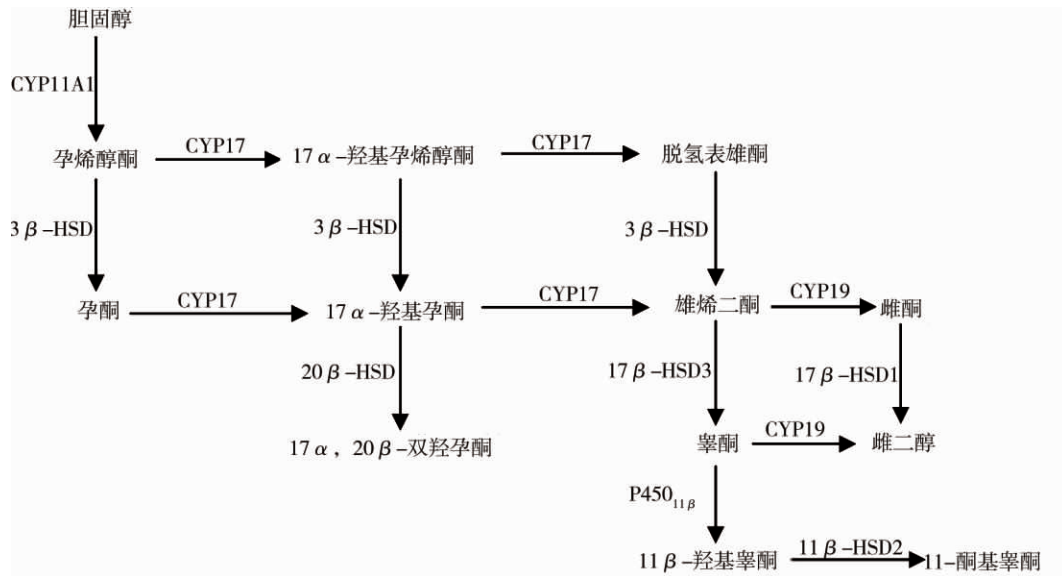


图1 鱼类性激素合成途径

Fig. 1 Sex hormone biosynthesis pathway in fish

等的转录因子。已有研究证实 SF-1 是 cAMP/PKA 途径的应答基因, SF-1 存在潜在的 PKA 磷酸化作用位点, 体外实验直接证实了 SF-1 磷酸化依赖于 PKA 的激活<sup>[15-16]</sup>。Michael 等<sup>[17]</sup>研究表明, cAMP 对人卵巢芳香化酶转录的刺激作用至少部分是由于 SF-1 水平升高及其与芳香化酶基因结合活性增强所致。

## 2 EEDs 对性激素合成途径的影响及其信号转导机制

### 2.1 EEDs 对性激素合成底物的影响

理论上, 性激素合成途径中的任何因子均可作为外源化合物作用的潜在靶位点。哺乳动物中, 性激素合成的底物——胆固醇的来源包括 3 个方面: ① 从头合成的胆固醇; ② 细胞内以胆固醇酯形式储存的胆固醇; ③ 脂蛋白从血浆中摄取的胆固醇<sup>[18]</sup>。在硬骨鱼类中, 类固醇合成的底物主要为从血浆中摄取的外源胆固醇<sup>[19]</sup>。在脂蛋白的作用下, 胆固醇经血液循环从合成或吸收部位运送到作用部位。在哺乳动物中, 低密度脂蛋白 (low density lipoprotein, LDL) 起主要作用, Becker 等<sup>[20]</sup>研究表明, 谷甾醇是一种治疗重度小儿家族性高胆固醇血症的药物, 同时具有内分泌干扰活性, 服用 3 个月后患者血清中 LDL 的浓度降低了 20%。而在鱼类中, 大多数的胆固醇转运过程由高密度脂蛋白 (high density lipoproteins, HDL) 负责完成<sup>[21]</sup>。Sharpe 等<sup>[19]</sup>研究表明, 雄性金鱼 (*Carassius auratus*) 暴露于  $10 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$   $\text{E}_2$  中 5 个月, 血浆中 HDL 和 T 显著降低。因此 EEDs 也可以通过降

低/提高鱼类血浆中 HDL 的含量, 影响运输到性腺细胞的胆固醇含量, 最终干扰性激素的合成。

胆固醇被转运至线粒体内膜才能启动性激素合成途径。研究发现, 胆固醇从线粒体外膜转运至内膜的跨膜转运是性激素合成的限速步骤<sup>[22]</sup>。StAR 是胆固醇的一种转运蛋白, 主要参与胆固醇的代谢。StAR 蛋白受损可导致性激素合成水平的急剧下降或性激素合成途径的中断, 此外 EEDs 也可能通过改变 StAR mRNA 表达水平, 导致性激素合成底物的减少。例如, 雄性金鱼 (*Carassius auratus*) 暴露于  $200 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  的  $\beta$ -谷甾醇 (纯度为 72.6%) 5 个月, 精巢中 StAR 的转录水平显著降低, 使进入线粒体内膜的胆固醇含量降低, 血浆中的 T 浓度显著减少<sup>[19]</sup>。

### 2.2 EEDs 对类固醇生成酶的影响

#### 2.2.1 体内实验检测 EEDs 对类固醇生成酶的影响

EEDs 可通过干扰性激素合成途径中类固醇生成酶的 mRNA 表达水平或活性, 干扰性激素的合成, 影响鱼类正常的生殖功能。不同的 EEDs 作用于不同的酶类, 例如法倔唑是一种典型的性腺 P450arom 抑制剂<sup>[23]</sup>, 曲洛司坦可选择性降低  $3\beta$ -HSD 的活性<sup>[24]</sup>, 氮鲁米特可特异性抑制 CYP11A1 的活性<sup>[25]</sup>。而某些外源化合物可同时作用于多种类固醇生成酶, 例如杀菌剂咪鲜胺可抑制性腺 P450arom 和 CYP17 的活性<sup>[26]</sup>, 查尔酮是性腺 P450arom 和  $17\beta$ -HSD 的抑制剂<sup>[27]</sup>, 而酮康唑是细胞色素 P450 酶 (cytochrome P450 enzymes, CYPs) 的非特异性抑制剂, 可降低脊椎动物性激素合成途径

中不同 CYPs 的活性,其中 CYP11A1 和 CYP17 为主要的靶点<sup>[28]</sup>。

类固醇生成酶基因表达的上调/下调会导致酶活性的增强/减弱,从而升高/降低鱼类体内的性激素水平。Ma 等<sup>[29]</sup>研究发现,2,4-二氯酚可减少雌性斑马鱼(*Danio rerio*)性腺 P450arom mRNA 表达量,进而降低 E<sub>2</sub> 浓度。但近年来,有研究表明,补偿效应可能会使类固醇生成酶 mRNA 水平与酶活性的变化趋势相反<sup>[30]</sup>。某些 EEDs 可降低性激素的合成,鱼类对这类 EEDs 的应答之一是通过提高类固醇生成酶 mRNA 的表达水平,增强自身性激素的合成<sup>[28]</sup>。Skolness 等<sup>[26]</sup>对雌性黑头呆鱼(*Pimephales promelas*)研究表明,咪唑胺减少了卵巢中 E<sub>2</sub> 的合成,但 CYP19 mRNA 和 CYP17 mRNA 的转录水平上调。Ankley 等<sup>[28]</sup>研究表明,酮康唑降低了雌雄黑头呆鱼(*Pimephales promelas*)性腺中 T 的合成及雌鱼中 E<sub>2</sub> 的合成,但 CYP11A1 mRNA 和 CYP17 mRNA 的表达增强。

### 2.2.2 体外实验证实 EEDs 对类固醇生成酶的直接影响

H295R 细胞系能够表达多种类固醇生成酶<sup>[31]</sup>, Sanderson 等<sup>[32]</sup>采用 H295R 细胞系研究发现,咪唑类杀菌剂可以抑制芳香化酶活性,乙烯菌核利和阿特拉津可通过增强细胞内的 cAMP 水平,诱导芳香化酶的转录和催化活性。Ma 等<sup>[33]</sup>研究发现,五氯酚和 2,4,6-三氯苯酚抑制了 H295R 细胞系 CYP11A1、CYP17、CYP19、3 $\beta$ -HSD 以及 17 $\beta$ -HSD mRNA 表达水平,从而显著降低了 T 和 E<sub>2</sub> 的含量。Villeneuve 等<sup>[34]</sup>分别采用 H295R 细胞系和黑头呆鱼(*Pimephales promelas*)卵巢组织离体培养方法,检测了法促唑、氯苯嘧啶醇、酮康唑、咪唑胺、乙烯菌核利和扑灭通对性激素合成的影响,发现这 6 种化学物质均能够显著影响 E<sub>2</sub> 和/或 T 的合成。

此外,可在共培养的条件下,以癌细胞系中特异性雌激素调控基因的转录水平来反映原代培养细胞中芳香化酶的表达情况。例如,人乳腺成纤维细胞和人乳腺癌细胞系(human breast adenocarcinoma cell line, MCF-7)共培养条件下,外源化学物质通过刺激乳腺成纤维细胞中芳香化酶活性导致雌激素合成增强,雌激素水平升高能够刺激 MCF-7 细胞雌激素调控基因 pS2 的表达,因此可用 pS2 基因的表达水平变化表征外源化合物的雌激素活性大小。Hewer 等<sup>[35]</sup>采用此体系检测了 E<sub>2</sub>、DES、BPA 和地

塞米松(dexamethasone, DEX)等化学物质的雌激素活性,其中 E<sub>2</sub>、DES 和 BPA 使 pS2 的转录水平呈现 3~7 倍增长。共培养体系中雌激素化合物如 BPA 显示出比仅在 MCF-7 细胞培养体系中更强的雌激素活性,即在较低的浓度下即可诱导 pS2 的表达<sup>[36]</sup>。

### 2.3 EEDs 影响类固醇生成的信号转导机制

外源化合物之所以能在转录水平上影响鱼类类固醇生成酶基因的表达,与 cAMP、PKA、SF-1 等所介导的胞内信号转导途径有关。cAMP 和 PKA 活性增强是类固醇生成酶基因表达的第一步<sup>[37]</sup>,在人、大鼠、小鼠等哺乳动物中已经证实 EEDs 可通过影响 cAMP 和/或 PKA 浓度,造成孕酮、睾酮、雌激素水平异常。48 h 的 10 nmol·L<sup>-1</sup> 2,3,7,8-四氯二苯并二恶英(2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin, TCDD)暴露使人卵巢黄素化颗粒细胞(human luteinizing granulosa cells, LGCs)中 PKA 和孕酮的含量显著降低<sup>[38]</sup>; Qu 等<sup>[13]</sup>推测氰戊菊酯可能是通过减少 cAMP 的形成而抑制小鼠间质细胞瘤细胞(mouse Leydig tumor cells, MLTC-1)中人绒毛膜促性腺激素(human chorionic gonadotropin, hCG)诱导的孕酮分泌。Ronco 等<sup>[39]</sup>认为,林丹对大鼠精巢中睾酮生成的抑制作用(至少部分)是由间质细胞 cAMP 水平降低引起的。磷酸二酯酶 4(phosphodiesterase 4, PDE4)可特异性水解 cAMP, Kucka 等<sup>[40]</sup>证实, PDE4 抑制剂阿特拉津可以造成细胞内和细胞外 cAMP 的积累,进而激活 PKA。

cAMP 激活 PKA,引发一系列的信号级联放大,最终增强转录因子如 SF-1 的活性和类固醇生成酶基因的表达。EEDs 可能通过改变某些转录因子的表达,影响类固醇生成酶的 mRNA 表达水平或酶活性,进而干扰性激素的合成途径。斑马鱼(*Danio rerio*)脑芳香化酶基因 cyp19a2 包含一个雌激素应答元件(estrogen responsive element, ERE),对雌激素的应答有重要作用,而性腺芳香化酶基因 cyp19a1 包含 SF-1 转录调控元件,阿特拉津暴露导致斑马鱼 cyp19a1 表达上调,而 cyp19a2 表达无显著变化<sup>[41]</sup>,这表明阿特拉津是通过非性激素受体介导途径发挥内分泌干扰效应的。Govoroun 等<sup>[42]</sup>检测到虹鳟鱼(*Oncorhynchus mykiss*)经 E<sub>2</sub> 暴露后精巢中 3 $\beta$ -HSD、P450c17、P450<sub>11 $\beta$</sub>  mRNA 表达水平均降低,推测可能受同一个上游转录因子如 SF-1 的调控。这种“转录因子 SF-1 水平异常”与“性激素浓度紊乱”的相关关系已经在啮齿类、哺乳类中得到证实。如妊娠期暴露邻苯二甲酸二辛

酯( diethylhexyl phthalate , DEHP) 导致新生小鼠精巢中 SF-1 mRNA 表达水平降低,进而造成 StAR 和 P450<sub>scc</sub> 基因表达下调<sup>[43]</sup>; Du 等<sup>[44]</sup> 研究表明,全氟辛酸( perfluorooctanoic acid , PFOA) 能够显著降低人肾上腺皮质瘤 H295R 细胞中 SF-1 mRNA 和蛋白水平的表达,进而进一步抑制类固醇生成酶 CYP11A1 和 CYP17 mRNA 的表达。

### 3 EEDs 对性激素水平的影响及其生殖危害

EEDs 可通过对鱼类性激素合成途径的干扰作用改变性激素正常的合成和/或分泌水平,进而干扰鱼类正常的生殖功能<sup>[45]</sup>。如 Govoroun 等<sup>[42]</sup> 证实了外源雌激素暴露情况下,虹鳟鱼( *Oncorhynchus mykiss*) 精巢分化期和分化后期 P450<sub>c17</sub>、3 $\beta$ -HSD 和 P450<sub>11 $\beta$</sub>  mRNA 的表达水平受抑制与雄鱼雌性化有关; Yokota 等<sup>[46]</sup> 研究表明  $\geq 238 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$  4-叔戊基苯酚( 4-*tert*-pentylphenol , 4-PP) 暴露使基因型雄性青鳉( *Oryzias latipes*) 精巢中 P450<sub>11 $\beta$</sub>  的 mRNA 水平受到显著抑制,并导致性逆转现象;对于与 E<sub>2</sub> 结构差异较大的有机磷农药久效磷,体外实验证实其不能模拟 E<sub>2</sub> 与雌激素受体结合<sup>[47]</sup>,却能够通过促进性腺芳香化酶的表达造成雄性金鱼( *Carassius auratus*) 体内 E<sub>2</sub> 水平升高和 T 水平降低<sup>[48]</sup>,并诱导雄性孔雀鱼( *Poecilia reticulata*) 及斑马鱼( *Danio rerio*) 雌性化<sup>[49-50]</sup>。

EEDs 在环境中不易降解,一旦进入水体等环境介质,将会对鱼类造成生殖危害。早在 20 世纪 90 年代初 Purdom 等<sup>[51]</sup> 在英国污水处理厂出水口下游的泻湖中发现了具有雌雄两性特征的斜齿鳊鱼( *Rutilus rutilus*)。近年来研究表明,污水处理厂排水中含有 E<sub>2</sub>、17 $\alpha$ -炔雌醇、烷基酚和双酚 A,导致类固醇生成酶基因表达异常、体内性激素水平改变,从而诱导鱼类产生卵精巢兼性结构<sup>[52-54]</sup>。自然界中 EEDs 对鱼类的繁殖影响已非常普遍,对鱼类的生存和繁衍构成了严重的威胁。佛罗里达州的阿波普卡湖污染严重,抗雄激素污染物使雄性食蚊鱼( *Gambusia holbrooki*) 精子数目减少,生殖足变短<sup>[55]</sup>。密西西比河有机氯杀虫剂污染严重,其中 29% 的雄性密西西比铲鲟( *Scaphirhynchus platyrhynchus*) 出现雌雄同体现象<sup>[56]</sup>。

## 4 研究展望

### 4.1 重视生殖轴线多个位点的正负反馈调节机制

性激素的调控是一个复杂的过程,涉及到生殖轴线上多个位点的正负反馈调节机制。因此,体内实验中所表现出的类固醇生成酶 mRNA 表达和/或

活性的变化,既可能是外源化合物对性腺组织的直接作用,也可能是上游生殖内分泌系统扰乱的间接体现。例如,酮康唑可以直接作用于性激素合成途径中的 CYP11A1 和 CYP17,是类固醇生成酶的抑制剂<sup>[28]</sup>,Villeneuve 等<sup>[57]</sup> 研究表明,酮康唑( 400  $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 暴露可导致雄性黑头呆鱼( *Pimephales promelas*) FSH- $\beta$  mRNA 表达水平升高, LH- $\beta$  mRNA 表达水平降低,进一步增强其对性激素合成的抑制效应。Tian 等<sup>[48, 58]</sup> 研究表明,久效磷农药暴露造成雄性和雌性金鱼( *Carassius auratus*) 体内 FSH 水平升高,同时 LH 水平降低,从而进一步强化性腺芳香化酶基因表达升高所造成的雄雌激素比例失衡。性激素的合成与分泌受到 GtHs 的调节,同时性激素水平的变化对上游激素的合成与分泌调控也具有反馈作用,从而维持生殖轴线中各种激素的正常水平<sup>[59]</sup>。因此,某些 EEDs 是否通过影响 GtHs 间接干扰性激素合成,需要结合 GtHs 与性激素的合成与分泌水平以及 GtHs mRNA 表达水平等进行综合探讨。

### 4.2 明确性激素合成途径中多种转录因子间的相互作用

信号转导通路涉及多个转录因子,这些转录因子并不是唯一和独立的,可能是彼此联系、相互调节、协同或拮抗的。已有研究证实了 SF-1 和 CREB 的相互作用<sup>[60]</sup>,其相互作用包括直接和共激活作用<sup>[61]</sup>,也有研究认为 cAMP 途径可能是通过磷酸化作用增加 SF-1 的转录活性,但 Zheng 等<sup>[62]</sup> 的研究表明, SF-1 的磷酸化作用不是其与 CREB 共同作用的关键。Lan 等<sup>[63]</sup> 建立了 3 个常见转录因子同源结构域相互作用蛋白激酶 3( homeodomain-interacting protein kinase 3 , HIPK3)、c-Jun 氨基末端激酶( c-Jun N-terminal kinase , JNK) 和 c-Jun 与 SF-1 作用间的联系。研究表明,在 cAMP 刺激下, HIPK3 使转录因子 c-Jun 和 JNK 磷酸化,此过程对 SF-1 的活性和 CYP11A1 的表达具有重要作用。采用哺乳动物细胞系实验证实,阿特拉津不直接与 SF-1 结合发挥内分泌干扰作用,而是通过激活 SF-1 的磷酸化作用、增强 SF-1 配体的产生、促进 cAMP 的产生等 3 种途径间接影响 SF-1 的表达,导致性腺芳香化酶过量表达<sup>[41]</sup>。可见, EEDs 对类固醇生成酶基因表达水平的影响可能与上游的多种转录因子、多个调节途径有关,其精细的分子调控机制有待于进一步研究。

### 4.3 探讨性激素合成途径的物种差异

黑头呆鱼( *Pimephales promelas*)、斑马鱼( *Danio*

erio) 和日本青鳉 (*Oryzias latipes*) 被认为是内分泌干扰物筛选和测试的模式生物<sup>[64]</sup>。不同硬骨鱼类的性激素合成步骤大致相同,但在类固醇生成酶及其所调控性激素的类别、时空分布及活性方面略有差异。例如,在虹鳉鱼 (*Oncorhynchus mykiss*) 中,仅存在一个  $3\beta$ -HSD 基因<sup>[65]</sup>; 而 Kazeto 等<sup>[66]</sup> 从日本鳗鲡 (*Anguilla japonica*) 卵巢中克隆得到了 2 种  $3\beta$ -HSD 亚型,即  $3\beta$ -HSDI 和  $3\beta$ -HSDII,这 2 种亚型的核苷酸和氨基酸序列高度同源, $3\beta$ -HSDI 活性高于  $3\beta$ -HSDII。在精子发生的不同阶段,某些类固醇生成酶的表达情况存在差异。例如,精子发生早期, $P450_{11\beta}$  的表达水平较低,精子形成期急剧上升并最终达到最高水平<sup>[67]</sup>。而同一种类固醇生成酶在不同物种间所发挥的催化作用也不尽相同。例如,在日本鳗鲡 (*Anguilla japonica*)、斑马鱼 (*Danio rerio*) 和尼罗罗非鱼 (*Oreochromis niloticus*) 中, $17\beta$ -HSDI 的功能主要是高效地催化从雌酮到  $E_2$  的反应,但尼罗罗非鱼  $17\beta$ -HSDI 是一种多功能的酶,还能催化雄烯二酮和睾酮之间的反应,只是其催化效率较低<sup>[68]</sup>。此外,发挥主要生殖调节作用的性激素种类也具有一定的物种特异性,在大多数鱼类中  $11$ -KT 是最主要的雄激素,但对雄性食蚊鱼 (*Gambusia holbrooki*) 和孔雀鱼 (*Poecilia reticulata*) 等花鱂亚科鱼性征发育起主要调控作用的是睾酮<sup>[69]</sup>。这些差异可能会导致 EEDs 对不同物种、同一物种不同发育时期性激素合成干扰效应的不同。因此,在设计 EEDs 非受体介导机制实验、解释结果并进行物种间外推时,应充分考虑到上述因素。

#### 4.4 证实各个内分泌轴线间的交互作用

鱼类生殖不仅受生殖轴线的调控,而且受生殖轴线、甲状腺轴和肾间腺轴的协同调控。正是由于各个轴线间存在着复杂的交互作用,使得环境中的某些化学物质可同时引起靶向多个内分泌系统的复合毒性效应。一方面,EEDs 对类固醇生成途径的影响可引起甲状腺轴和/或肾间腺轴的相关变化。例如:芳香化酶抑制剂法屈唑处理不仅可使黑头呆鱼 (*Pimephales promelas*) 和日本青鳉 (*Oryzias latipes*) 血浆中  $E_2$  浓度降低,产卵量下降,还可调节甲状腺激素相关基因的表达<sup>[70-71]</sup>。另一方面,在体内实验中 EEDs 引起的类固醇生成酶的变化也可能是甲状腺轴和/或肾间腺轴扰乱的间接效应。Nelson 等<sup>[72]</sup> 研究表明,体内三碘甲腺原氨酸 ( $3,3',5$ -triiodo-L-thyronine,  $T_3$ ) 处理能够下调金鱼 (*Carassius auratus*)

精巢和卵巢中  $P450_{arom}$  mRNA 表达水平;丙基硫氧嘧啶 (propylthiouracil, PTU) 为临床上最常用的一种治疗甲状腺功能亢进症的药物,Liu 等<sup>[73]</sup> 对成熟的雌性斑马鱼 (*Danio rerio*) 的研究表明,PTU 暴露引起的甲状腺素 ( $L$ -thyroxine,  $T_4$ ) 和  $T_3$  浓度降低可进一步导致 FSH 和 LH 分泌升高,进而促进类固醇合成;Kirby 等<sup>[74]</sup> 认为,肾上腺轴和生殖轴线在多个层面存在相互作用,研究表明,应激所诱导的大鼠肾上腺糖皮质激素含量增加可以导致血浆 LH 浓度降低。由此可见,EEDs 可能通过复杂的交互作用机制影响鱼类内分泌系统,这也为 EEDs 非性激素受体介导机制研究提出了新的难题,需要结合更多的体内和体外实验进行综合探讨。

通讯作者简介:汝少国(1967—),男,博士,教授,博士生导师,主要从事污染生态学和环境内分泌干扰物研究。

#### 参考文献:

- [1] Lee H R, Jeung E B, Cho M H, et al. Molecular mechanism(s) of endocrine-disrupting chemicals and their potent oestrogenicity in diverse cells and tissues that express oestrogen receptors [J]. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 2013, 17(1): 1-11
- [2] Jung E M, An B S, Yang H, et al. Biomarker genes for detecting estrogenic activity of endocrine disruptors via estrogen receptors [J]. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 2012, 9(3): 698-711
- [3] 史熊杰,刘春生,余珂,等. 环境内分泌干扰物毒理学研究[J]. *化学进展*, 2009, 21(2-3): 340-349  
Shi X J, Liu C S, Yu K, et al. Toxicological research on environmental endocrine disruptors [J]. *Progress in Chemistry*, 2009, 21(2-3): 340-349 (in Chinese)
- [4] Liu S Z, Qin F, Wang H P, et al. Effects of  $17\alpha$ -ethinylestradiol and bisphenol A on steroidogenic messenger ribonucleic acid levels in the rare minnow gonads [J]. *Aquatic Toxicology*, 2012, 122-123: 19-27
- [5] Rhee J S, Kim B M, Lee C J, et al. Bisphenol A modulates expression of sex differentiation genes in the self-fertilizing fish, *Kryptolebias marmoratus* [J]. *Aquatic Toxicology*, 2011, 104(3-4): 218-229
- [6] Sanderson J T. The steroid hormone biosynthesis pathway as a target for endocrine-disrupting chemicals [J]. *Toxicological Sciences*, 2006, 94(1): 3-21
- [7] Thibaut R, Porte C. Effects of endocrine disrupters on sex steroid synthesis and metabolism pathways in fish [J]. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Bi-*

- ology, 2004, 92(5): 485–494
- [8] Miller W L. Steroidogenic acute regulatory protein (StAR), a novel mitochondrial cholesterol transporter [J]. *Biochimica et Biophysica Acta—Molecular and Cell Biology of Lipids*, 2007, 1771(6): 663–676
- [9] Miller W L. Minireview: Regulation of steroidogenesis by electron transfer [J]. *Endocrinology*, 2005, 146(6): 2544–2550
- [10] Zhang W L, Zhou L Y, Senthilkumaran B, et al. Molecular cloning of two isoforms of 11 $\beta$ -hydroxylase and their expressions in the Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* [J]. *General and Comparative Endocrinology*, 2010, 165(1): 34–41
- [11] Stocco D M. StAR protein and the regulation of steroid hormone biosynthesis [J]. *Annual Review of Physiology*, 2001, 63: 193–213
- [12] Ascoli M, Fanelli F, Segaloff D L. The lutropin/choriogonadotropin receptor, a 2002 perspective [J]. *Endocrine Reviews*, 2002, 23(2): 141–174
- [13] Qu J H, Hong X, Chen J F, et al. Fenvalerate inhibits progesterone production through cAMP-dependent signal pathway [J]. *Toxicology Letters*, 2008, 176(1): 31–39
- [14] Gonzalez G A, Montminy M R. Cyclic AMP stimulates somatostatin gene transcription by phosphorylation of CREB at serine 133 [J]. *Cell*, 1989, 59(4): 675–680
- [15] Carlone D L, Richards J S. Evidence that functional interactions of CREB and SF-1 mediate hormone regulated expression of the aromatase gene in granulosa cells and constitutive expression in R2C cells [J]. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 1997, 61(3-6): 223–231
- [16] Jacob A L, Lund J. Mutations in the activation function-2 core domain of steroidogenic factor-1 dominantly suppresses PKA-dependent transactivation of the bovine CYP17 gene [J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 1998, 273(22): 13391–13394
- [17] Michael M D, Kilgore M W, Morohashi K I, et al. Ad4BP/SF-1 regulates cyclic AMP-induced transcription from the proximal promoter (P1) of the human aromatase P450(CYP19) gene in the ovary [J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 1995, 270(22): 13561–13566
- [18] Sharpe R L, Drolet M, MacLachy D L. Investigation of de novo cholesterol synthetic capacity in the gonads of goldfish (*Carassius auratus*) exposed to the phytosterol beta-sitosterol [J]. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 2006, 4(1): 60–70
- [19] Sharpe R L, Woodhouse A, Moon T W, et al.  $\beta$ -Sitosterol and 17 $\beta$ -estradiol alter gonadal steroidogenic acute regulatory protein (StAR) expression in goldfish, *Carassius auratus* [J]. *General and Comparative Endocrinology*, 2007, 151(1): 34–41
- [20] Becker M, Staab D, Bergmann K V. Treatment of severe familial hypercholesterolemia in childhood with sitosterol and sitostanol [J]. *The Journal of Pediatrics*, 1993, 122(2): 292–296
- [21] Babin P J, Vernier J M. Plasma lipoproteins in fish [J]. *Journal of Lipid Research*, 1989, 30: 467–489
- [22] Jefcoate C R, Mcnamara B C, Artemenko I, et al. Regulation of cholesterol movement to mitochondrial cytochrome P450<sub>scc</sub> in steroid hormone synthesis [J]. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 1992, 43(8): 751–767
- [23] Villeneuve D L, Mueller N D, Martinovi D, et al. Direct effects, compensation, and recovery in female fathead minnows exposed to a model aromatase inhibitor [J]. *Environmental Health Perspectives*, 2009, 117(4): 624–631
- [24] Ankley G T, Cavallin J E, Durhan E J, et al. Temporal evaluation of effects of a model 3 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase inhibitor on endocrine function in the fathead minnow [J]. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 2011, 30(9): 2094–2102
- [25] Moore R W, Jefcoate C R, Peterson R E. 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin inhibits steroidogenesis in the rat testis by inhibiting the mobilization of cholesterol to cytochrome P450<sub>scc</sub> [J]. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 1991, 109(1): 85–97
- [26] Skolness S Y, Durhan E J, Garcia R N, et al. Effects of a short-term exposure to the fungicide prochloraz on endocrine function and gene expression in female fathead minnows (*Pimephales promelas*) [J]. *Aquatic Toxicology*, 2011, 103(3-4): 170–178
- [27] Bail J L, Pouget C, Fagnere C, et al. Chalcones are potent inhibitors of aromatase and 17 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase activities [J]. *Life Sciences*, 2001, 68: 751–761
- [28] Ankley G T, Cavallin J E, Durhan E J, et al. A time-course analysis of effects of the steroidogenesis inhibitor ketoconazole on components of the hypothalamic-pituitary-gonadal axis of fathead minnows [J]. *Aquatic Toxicology*, 2012, 114(115): 88–95
- [29] Ma Y B, Han J, Guo Y Y, et al. Disruption of endocrine function in in vitro H295R cell-based and in vivo assay in zebrafish by 2,4-dichlorophenol [J]. *Aquatic Toxicology*, 2012, 106–107: 173–181
- [30] Ankley G T, Jensen K M, Kahl M D, et al. Ketoconazole in the fathead minnow (*Pimephales promelas*): Reproductive toxicity and biological compensation [J]. *Environment*



- tal Toxicology and Chemistry ,2007 ,26( 6) : 1214 – 1223
- [31] Sanderson J T , Seinen W , Giesy J P , et al. 2-Chloro-s-triazine herbicides induce aromatase ( CYP19) activity in H295R human adrenocortical carcinoma cells: A novel mechanism for estrogenicity? [J]. Toxicological Sciences ,2000 ,54( 1) : 121 – 127
- [32] Sanderson J T , Boerma J , Lansbergen G W , et al. Induction and inhibition of aromatase ( CYP19) activity by various classes of pesticides in H295R human adrenocortical carcinoma cells [J]. Toxicology and Applied Pharmacology ,2002 ,182( 1) : 44 – 54
- [33] Ma Y B , Liu C S , Lam P K S , et al. Modulation of steroidogenic gene expression and hormone synthesis in H295R cells exposed to PCP and TCP [J]. Toxicology ,2011 ,282( 3) : 146 – 153
- [34] Villeneuve D L , Ankley G T , Makynen E A , et al. Comparison of fathead minnow ovary explant and H295R cell-based steroidogenesis assays for identifying endocrine-active chemicals [J]. Ecotoxicology and Environmental Safety ,2007 ,68( 1) : 20 – 32
- [35] Heneweer M , Muusse M , Dingemans M , et al. Co-culture of primary human mammary fibroblasts and MCF-7 cells as an in vitro breast cancer model [J]. Toxicological Sciences ,2005 ,83( 2) : 257 – 263
- [36] Heneweer M , Berg M , Geest M C , et al. Inhibition of aromatase activity by methyl sulfonyl PCB metabolites in primary culture of human mammary fibroblasts [J]. Toxicology and Applied Pharmacology ,2005 ,202( 1) : 50 – 58
- [37] Simpson E R , Waterman M R. Regulation of the synthesis of steroidogenic enzymes in adrenal cortical cells by ACTH [J]. Annual Review of Physiology ,1988 ,50: 427 – 440
- [38] Enan E , Lasley B , Stewart D , et al. 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin ( TCDD) modulates function of human luteinizing granulosa cells via cAMP signaling and early reduction of glucose transporting activity [J]. Reproductive Toxicology ,1996 ,10( 3) : 191 – 198
- [39] Ronco A M , Valdós K , Marcus D , et al. The mechanism for lindane-induced inhibition of steroidogenesis in cultured rat Leydig cells [J]. Toxicology ,2001 ,159( 1-2) : 99 – 106
- [40] Kucka M , Majkic K P , Fa S , et al. Atrazine acts as an endocrine disrupter by inhibiting cAMP-specific phosphodiesterase-4 [J]. Toxicology and Applied Pharmacology ,2012 ,265( 1) : 19 – 26
- [41] Suzawa M , Ingraham H A. The herbicide atrazine activates endocrine gene networks via non-steroidal NR5A nuclear receptors in fish and mammalian cells [J]. PLoS ONE ,2008 ,3( 5) : e2117
- [42] Govoroun M , Mcmeel O M , Mecherouki H , et al. 17 $\beta$ -Estradiol treatment decreases steroidogenic enzyme messenger ribonucleic acid levels in the rainbow trout testis [J]. Endocrinology ,2001 ,142( 5) : 1841 – 1848
- [43] Borch J , Metzdorff S B , Vinggaard A M , et al. Mechanisms underlying the anti-androgenic effects of diethylhexyl phthalate in fetal rat testis [J]. Toxicology ,2006 ,223( 1-2) : 144 – 155
- [44] Du G Z , Huang H Y , Hu J L , et al. Endocrine-related effects of perfluorooctanoic acid ( PFOA) in zebrafish , H295R steroidogenesis and receptor reporter gene assays [J]. Chemosphere ,2013 , http://dx. doi. org/10. 1016/j. chemosphere. 2013. 01. 012
- [45] Arukwe A. Cellular and molecular responses to endocrine modulators and the impact on fish reproduction [J]. Marine Pollution Bulletin ,2001 ,42( 8) : 643 – 655
- [46] Yokota H , Abe T , Nakai M , et al. Effects of 4-tert-pentylphenol on the gene expression of P450 11 $\beta$ -hydroxylase in the gonad of medaka ( *Oryzias latipes*) [J]. Aquatic Toxicology ,2005 ,71( 2) : 121 – 132
- [47] Chen H , Xiao J , Hu G , et al. Estrogenicity of organophosphorus and pyrethroid pesticides [J]. Journal of Toxicology and Environmental Health , Part A: Current Issues ,2002 ,65( 19) : 1419 – 1435
- [48] Tian H , Ru S , Bing X , et al. Effects of monocrotophos on the reproductive axis in the male goldfish ( *Carassius auratus*) : Potential mechanisms underlying vitellogenin induction [J]. Aquatic Toxicology ,2010 ,98( 1) : 67 – 73
- [49] Tian H , Li Y , Wang W , et al. Exposure to monocrotophos pesticide during sexual development causes the feminization/demasculinization of the reproductive traits and a reduction in the reproductive success of male guppies ( *Poecilia reticulata*) [J]. Toxicology and Applied Pharmacology ,2012 ,263( 2) : 163 – 170
- [50] Zhang X , Gao L , Yang K , et al. Monocrotophos pesticide modulates the expression of sexual differentiation genes and causes phenotypic feminization in zebrafish ( *Danio rerio*) [J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology ,2013 ,157( 1) : 33 – 40
- [51] Purdom C E , Hardiman P A , Bye V J , et al. Estrogenic effects of effluents from sewage treatment works [J]. Chemistry and Ecology ,1994 ,8( 4) : 275 – 285
- [52] Vajda A M , Barber L B , Gray J L , et al. Reproductive disruptions in fish downstream from an estrogenic wastewater effluent [J]. Environmental Science & Technology ,2008 ,42( 9) : 3407 – 3414
- [53] Vigan L , Benfenati E , Botteroc S , et al. Endocrine modulation , inhibition of ovarian development and hepatic alterations in rainbow trout exposed to polluted river water [J].



- Environmental Pollution ,2010 ,158 ( 12) : 3675 –3683
- [54] Vajda A M , Barber L B , Gray J L , et al. Demasculinization of male fish by wastewater treatment plant effluent [J]. Aquatic Toxicology ,2011 ,103( 3-4) : 213 –221
- [55] Toft G , Edwards T M , Baatrup E , et al. Disturbed sexual characteristics in male mosquitofish ( *Gambusia holbrooki*) from a lake contaminated with endocrine disruptors [J]. Environmental Health Perspectives ,2003 ,111( 5) : 695 –701
- [56] Harshbarger J C , Coey M J , Young M Y. Intersexes in Mississippi River shovelnose sturgeon sampled below Saint Louis , Missouri , USA [J]. Marine Environmental Research ,2000 ,50( 1-5) : 247 –250
- [57] Villeneuve D L , Miracle A L , Jensen K M , et al. Development of quantitative real-time PCR assays for fathead minnow ( *Pimephales promelas*) gonadotropin  $\beta$  subunit mRNAs to support endocrine disruptor research [J]. Comparative Biochemistry and Physiology , Part C ,2007 ,145( 2) : 171 –183
- [58] Tian H , Ru S , Wang W , et al. Effects of monocrotophos on the reproductive axis in the female goldfish ( *Carassius auratus*) [J]. Comparative Biochemistry and Physiology , Part C ,2010 ,152( 1) : 107 –113
- [59] Nett T M , Turzillo A M , Baratta M , et al. Pituitary effects of steroid hormones on secretion of follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone [J]. Domestic Animal Endocrinology ,2002 ,23( 1-2) : 33 –42
- [60] Manna P R , Eubank D W , Lalli E , et al. Transcriptional regulation of the mouse steroidogenic acute regulatory protein gene by the cAMP response-element binding protein and steroidogenic factor 1 [J]. Journal of Molecular Endocrinology ,2003 ,30: 381 –397
- [61] Jacob A L , Lund J , Martinez P , et al. Acetylation of steroidogenic factor 1 protein regulates its transcriptional activity and recruits the coactivator GCN5 [J]. The Journal of Biological Chemistry ,2001 ,276( 40) : 37659 –37664
- [62] Zheng W C , Jefcoate C R. Steroidogenic factor-1 interacts with cAMP response element-binding protein to mediate cAMP stimulation of CYP11B1 via a far upstream enhancer [J]. Molecular Pharmacology ,2005 ,67( 2) : 499 –512
- [63] Lan H C , Li H J , Lin G , et al. Cyclic AMP stimulates SF-1-dependent CYP11A1 expression through homeodomain-interacting protein kinase 3-mediated Jun N-terminal kinase and c-Jun phosphorylation [J]. Molecular and Cellular Biology ,2007 ,27( 6) : 2027 –2036
- [64] Ankley G T , Johnson R D. Small fish models for identifying and assessing the effects of endocrine-disrupting chemicals [J]. ILAR Journal ,2004 ,45( 4) : 469 –483
- [65] Sakai N , Tanaka M , Takahashi M , et al. Ovarian  $3\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase/ $\Delta 5 - \Delta 4$  isomerase of rainbow trout: Its cDNA cloning and properties of the enzyme expressed in a mammalian cell [J]. FEBS Letters ,1994 ,350( 2-3) : 309 –313
- [66] Kazeto Y , Ijiri S , Matsubara H , et al. Molecular cloning and characterization of  $3\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase/ $\Delta 5 - \Delta 4$  isomerase cDNAs from Japanese eel ovary [J]. Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology ,2003 ,85( 1) : 49 –56
- [67] Maugars G , Schmitz M. Gene expression profiling during spermatogenesis in early maturing male Atlantic salmon parr testes [J]. General and Comparative Endocrinology ,2008 ,159( 2-3) : 178 –187
- [68] Zhou L Y , Wang D S , Senthilkumaran B , et al. Cloning , expression and characterization of three types of  $17\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenases from the Nile tilapia , *Oreochromis niloticus* [J]. Journal of Molecular Endocrinology ,2005 ,35: 103 –116
- [69] Borg B. Androgens in teleost fishes [J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology , Toxicology and Endocrinology ,1994 ,109( 3) : 219-245
- [70] Ankley G T , Kahl M D , Jensen K M , et al. Evaluation of the aromatase inhibitor fadrozole in a short-term reproduction assay with the fathead minnow ( *Pimephales promelas*) [J]. Toxicological Sciences ,2002 ,67( 1) : 121 –130
- [71] Zhang X , Hecker M , Park J W , et al. Real-time PCR array to study effects of chemicals on the Hypothalamic-Pituitary-Gonadal axis of the Japanese medaka [J]. Aquatic Toxicology ,2008 ,88( 3) : 173 –182
- [72] Nelson E R , Allan E R , Pang F Y , et al. Thyroid hormone and reproduction: Regulation of estrogen receptors in goldfish gonads [J]. Molecular Reproduction and Development ,2010 ,77( 9) : 784 –794
- [73] Liu C S , Zhang X W , Deng J , et al. Effects of prochloraz or propylthiouracil on the cross-talk between the HPG , HPA , and HPT axes in zebrafish [J]. Environmental Science & Technology ,2011 ,45( 2) : 769 –775
- [74] Kirby E D , Geraghty A C , Ubuka T , et al. Stress increases putative gonadotropin inhibitory hormone and decreases luteinizing hormone in male rats [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America ,2009 ,106( 27) : 11324 –11329 ◆