海河地区部分水体雌激素活性的初步调查

邵晶 时国庆 金星龙 宋茂勇 史建波 江桂斌*

(中国科学院生态环境研究中心, 北京 100085; 北京科技大学应用科学学院, 北京 100083; 天津理工大学环境科学与安全工程学院, 天津 300191. * 联系人: E-mail: gbjiang@mail.rcees.ac.cn)

摘要 以野生鱼血清中的卵黄蛋白原(Vtg)为雌激素活性生物标记物, 对海河流域部分(子牙河, 入海口)水体中污染物的雌激素活性进行了初步调查, 并测定了水样中双酚 A(BPA)、辛基酚(OP)和壬基酚(NP)的浓度. 结果显示, 在不同季节, 不同采样点的野生雌鱼和雄鱼血清中都有较高浓度的 Vtg 检出, 表明这些水体中存在一定程度的雌激素活性化合物污染. 采样点水体中均能检测到 BPA, NP 和 OP, 但浓度远低于导致鱼 Vtg 生成的最低显效浓度.

关键词 内分泌干扰物 天津海河地区 野生鱼类 卵黄蛋白原 生物标志物

近年来, 大量的研究报告指出环境中的某些化合物, 能够模拟或干扰动物内分泌系统的正常功能, 导致内分泌功能紊乱、胚胎发育异常、生殖能力下降等现象. 这些物质一般被统称为内分泌干扰物, 其中大部分是具有雌激素活性的物质.

卵黄蛋白原(Vtg)是卵生脊椎动物体内经雌激素诱导产生的特异性蛋白, 通常, 只有发育成熟的雌性动物繁殖前在肝脏里产生. 但是, 体内和体外实验都已证明, 雄性卵生脊椎动物体内也有Vtg基因, 在雌激素或类雌激素的诱导下, 也可以合成Vtg^[1,2], 因而Vtg被认为是一种理想的环境雌激素或类雌激素生物标志物^[3~5]. 通过检测雄性动物体内卵黄蛋白原的异常生成或雌性动物体内卵黄蛋白原的变化可以指示环境中类雌激素的污染.

对于水环境中环境内分泌干扰活性的研究, 鱼类是理想的实验动物. 因为其生活环境的特殊性, 除摄食外, 鱼的呼吸和渗透调节等基本生理活动都会增加环境内分泌干扰物质对其身体器官与组织的暴露^[6]. 大量的研究都已证明, 生活污水和工业废水中的一些物质可以导致鱼体内的许多变化, 包括下丘脑和垂体异常、生长代谢异常、肝功能异常、两性鱼、雄鱼或幼鱼中产生雌性特异性蛋白(卵黄蛋白原、卵壳蛋白)等^[5,7,8]. 其中, Vtg是最常用的雌激素效应的生物标记物. 例如, Purdom等^[2]发现, 在英格兰生活污水中笼养的雄性虹鳟鱼产生了很高浓度的Vtg(147 mg/mL), 其浓度甚至比成熟雌鱼血清中的Vtg浓度还要高. Harries 等人^[9]以Vtg为雌激素效应生物标记物, 研究了英国的几条河流中污水处理厂排水口及其下游水体中的雌激素效应. 结果发现排水口附近笼养

的雄性鲑鱼血清Vtg都有明显和迅速的增加, 并且Vtg的浓度随离污染源的距离的增加而迅速下降.

海河流经天津后进入渤海, 是天津市的一条重要河流, 而且上游的子牙河作为天津城市的备用饮用水源之一, 兼有供水等功能. 近年来, 随着天津市工业、农业及生活污水的排入, 海河遭到了严重的污染^[10,11]. 2003年4月, 我们在海河入海口处采集的绵鳊(俗称海鲇鱼)样品中发现所有雄鱼血清中都检测出了Vtg^[12]. 同时, 在相同地段采集的水样中双酚A、壬基酚和辛基酚偏高, 其中双酚A浓度高达 8.30 $\mu\text{g/L}$ ^[13]. 而利用MCF-7人乳腺癌细胞实验证明, BPA具有雌激素活性的最低作用浓度是 2~5 $\mu\text{g/L}$ ^[14]. 为进一步了解海河地区水体受雌激素活性化合物污染的现状, 我们选取海河上游的子牙河和各支流最终的汇集地海河入海口这两个典型地点, 于 2003 年 7 月、9 月、11 月 3 次采样, 考察了牙河上野生鲫鱼以及海河入海口野生绵鳊血清中Vtg和水样中具有雌激素活性的物质(双酚A, 壬基酚和辛基酚)之间的联系.

1 实验

() 仪器与试剂. 高效离子交换膜色谱系统由强阴离子交换膜(SartobindTM MA15Q, 德国), 高流速HPLC泵(Allitech 426, 美国)和紫外检测器(SPD-10A VP, 岛津, 日本)组成; 高效体积排阻色谱系统(HPGPC)由 Agilent1100 型高效液相色谱(二元泵, 紫外检测器), 凝胶过滤色谱柱(TSKG3000SW_{XL}, 30 cm $\times$ 7.8 mm(I.D.), TOSOH 日本)和 HPLC 工作站组成. 冷冻离心机 MR1822(JOUAN, 法国), 电泳仪(北京六一).

17 β -雌二醇购自 Sigma 公司(美国), 抑肽酶购自

Boehringer 公司(德国), 牛胸腺球蛋白(640 kD), 铁蛋白(440 kD), 免疫球蛋白(158 kD), 牛血清白蛋白(BSA, 66 kD)和肝素钠均为国产, 电泳标准蛋白(Pharmacia 公司, 英国), 其他化学试剂为分析纯. 缓冲溶液和样品溶液使用前均用 0.2 μm 微孔滤膜过滤.

() 样品采集与处理. 我们分别于 2003 年 7 月 12~13 日, 9 月 6~7 日和 11 月 15~16 日, 在子牙河上采集野生鲫鱼; 在海河入海口捕获绵鲢样品.

血液样品为现场采集, 用肝素钠处理的一次性注射器从鱼的尾静脉取血, 然后移入预先加有 2 μL 抑肽酶(2.5 TIU)的 1.5 mL 离心管中, 轻轻颠倒混匀后放入保温冰盒内. 样品到达实验室后, 在 4 $^{\circ}\text{C}$, 3000 r/min 离心 30 min, 取上层血清, 保存于 -80°C 冰箱中, 待测.

用杆秤称量鱼总重量, 然后计算鱼平均体重. 鱼类的雌雄通过现场解剖由性腺来判别.

() Vtg 的检测. 用二步色谱法检测血清稀释液中 Vtg 浓度^[12], 根据稀释倍数计算鱼血清 Vtg 的含量.

2 结果与讨论

2.1 鱼血清样品中 Vtg 的鉴定

我们根据以下两点来判断鲫鱼血清的 Vtg 色谱峰: (1) 用 17 β -雌二醇诱导雄性鲫鱼血清, 经阴离子交换膜色谱纯化后, 在 HPGPC 色谱图上有一保留时间为 7.2 min 的色谱峰(图 1-1), 而雄鱼对照血清在此位置没有色谱峰(图 1-2). 以牛胸腺球蛋白、铁蛋白、免疫球蛋白和牛血清白蛋白为标准蛋白, 计算其分子量约为 418 kD, 与报道的其他硬骨鱼 Vtg 的分子量相近^[15,16]. (2) 将纯化的 Vtg 做 SDS-PAGE 凝胶电泳分析 (7.5% 的分离胶和 4% 的浓缩胶, 考马斯亮蓝

的关系, 纯化的 Vtg 在 160 kD 处有一主要蛋白条带, 这与文献报道的鲫鱼 Vtg 的 SDS-PAGE 分析结果一致^[17]. 绵鲢血清 Vtg 的鉴定参见文献^[12].

2.2 野生鱼血清中 Vtg 含量的调查

对采自子牙河的野生鲫鱼及海河入海口的野生绵鲢血清样品进行 Vtg 含量分析, 结果如表 1 所示.

(1) 鲫鱼. 第一次采样(2003 年 7 月): 在子牙河上捕捞到的所有鲫鱼血清中都检测出了 Vtg, 雄鱼和雌鱼体内 Vtg 的平均浓度分别为 336.7 和 1980.1 $\mu\text{g/mL}$. 第二次(2003 年 9 月)采集的鲫鱼样品: 测得的 Vtg 浓度变化幅度较大, 5 条雄性鲫鱼检出率为 60%, 阳性血清中 Vtg 平均浓度为 105.5 $\mu\text{g/mL}$, 10 条雌性鲫鱼检出率为 70%, 阳性血清中 Vtg 平均浓度为 359.3 $\mu\text{g/mL}$. 第三次采样(2003 年 11 月)采集到 12 条鲫鱼, 7 条雄鱼检出率为 85.7%, Vtg 平均浓度为 62.8 $\mu\text{g/mL}$, 5 条雌鱼全部检出, 血清中 Vtg 的平均浓度为 287.4 $\mu\text{g/mL}$.

鲫鱼对各种生态环境都具有很强的适应能力, 在我国分布广泛. 我们连续三次在子牙河中采集到的都是鲫鱼样品. 第一次采集的雌鱼血清中 Vtg 水平与文献报道的北京排污河天津段野生鲫鱼 Vtg 浓度 (284~5971 $\mu\text{g/mL}$)^[17]以及处于污水处理厂下游河段的野生鲤鱼体内 Vtg 水平 (24~29700 $\mu\text{g/mL}$)^[18]相近. 从分析结果看, 雌性鲫鱼血清中 Vtg 浓度的变化可能与产卵期有关(图 2(a)). 在北方, 一般鲫鱼的性成熟年龄为 2 龄以上, 产卵期从 3 月延至 8 月^[19]. 硬骨鱼血清中 Vtg 的含量一般在卵黄形成前期达到最高, 在产卵结束时迅速降低^[20]. 第一次采样时因为正值鲫鱼的产卵期, 雌鱼血清中 Vtg 的含量明显高于后两次采样. 第二和第三次采样时, 因产卵期已经结束, 雌性鲫鱼体内的 Vtg 水平呈显著降低趋势. 但是, 雌鱼血清中 Vtg 的检出率呈先降低后升高的趋势(图 3(a)), 与鱼的体重变化趋势相同. 第一次和第三次采样所得鱼的平均体重分别是 125 和 96 g, 第二次采样, 即 9 月份所捕获的鱼整体偏小, 平均体重仅为 50 g. 三次采样所得雄性鲫鱼血清中都有 Vtg 被检出, 且 Vtg 平均含量呈下降趋势, 雄鱼血清中 Vtg 的检出率也呈先降低后升高的趋势(图 2(a), 3(a)). 因为正常条件下, 雄性鲫鱼体内不合成 Vtg, 所以本实验结果说明我们所研究的水体中存在一定量具有雌激素活性的化合物. 而且, 个体较大的鲫鱼样品中, Vtg 的检出率也高.

图 1 鲫鱼血清的 HPGPC 色谱图
1, 纯化的鲫鱼 Vtg; 2, 雄性对照血清

R-250 染色), 根据蛋白分子量与其相对迁移率之间

表 1 野生鱼类血清中 Vtg 含量

	编号	性别	子牙河鲫鱼	性别	入海口绵鲢
			Vtg/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$		Vtg/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$
2003 年 7 月	1	雄	415.8	雄	ND*
	2	雄	340.1	雄	28.7
	3	雄	239.9	雄	ND
	4	雄	351	雄	34.1
	5	雌	1420.8	雄	48.2
	6	雌	2713	雄	ND
	7	雌	1204.1	雄	ND
	8	雌	2582.3	雄	ND
	9			雄	25.5
	10			雌	262.5
	11			雌	200.3
	12			雌	746.2
2003 年 9 月	1	雄	ND	雄	97.6
	2	雄	199.0	雄	74.7
	3	雄	ND	雄	90.1
	4	雄	42.8	雄	ND
	5	雄	74.7	雄	88.8
	6	雌	113.8	雄	145.7
	7	雌	170.5	雌	105.1
	8	雌	134.6	雌	116.3
	9	雌	629.0	雌	61.6
	10	雌	ND	雌	101.4
	11	雌	ND	雌	102.6
	12	雌	120.0	雌	668.2
	13	雌	ND	雌	158.6
	14	雌	824	雌	283.7
	15	雌	523	雌	90.1
	16			雌	ND
	17			雌	146.7
	18			雌	72.1
2003 年 11 月	1	雄	45.5	雄	36.9
	2	雄	68.2	雄	88.8
	3	雄	70.8	雄	74.1
	4	雄	53.6	雄	59.2
	5	雄	101.4	雄	97.3
	6	雄	ND	雌	583.6
	7	雄	37.2	雌	273.7
	8	雌	405.1	雌	776.2
	9	雌	88.8	雌	340.1
	10	雌	776.2	雌	458.4
	11	雌	98.9	雌	655.3
	12	雌	68.2	雌	500.5

* ND<20 $\mu\text{g}/\text{mL}$

这可能是因为脂溶性雌激素活性化合物在个体和鱼龄较大的鲫鱼中富集较多的缘故. Fossi等^[21]报道, 随着鱼龄的增加, 雄性地中海剑鱼血清中的Vtg浓度也显著增加, 其原因与内分泌干扰物质在体内的生物富集有关. 在呈阳性反应的雄鱼血清中, Vtg平均含量随采样时间呈下降趋势的原因可能有两点: () 在采样的时间范围内, 水体中的雌激素活性化合物浓度也呈下降趋势. 虽然Vtg的诱导相对于水体中内

分泌干扰物暴露来说具有滞后性, 但是因为我们三次采样的时间间隔较长, 所以Vtg的诱导量也可以大致反映出水体中雌激素活性化合物的变化趋势. () 可能与水体温度有关. Sabbh等^[22]发现, 一种热激蛋白(hsp90)可以影响雌激素受体与Vtg A2 基因上的雌激素响应因子(ERE)结合的能力. 在动物的生理温度时, hsp90 可以稳定雌激素受体的结合活性, 当环境温度偏离生理温度或受到其他环境胁迫时, hsp90 就

图 2 海河野生鱼类的 Vtg 浓度变化图

(a) 子牙河鲫鱼, (b) 海河入海口绵鲚 (图中 4 月份绵鲚的 Vtg 浓度摘自文献[12])

会干扰基于雌激素受体的基因转录。第一次采样时水温适宜(接近动物生理温度), 鲫鱼体内基于雌激素受体的基因转录活性高, 所以 Vtg 合成量大。而随水温降低, 鱼体内这部分活性受抑制, 所以 Vtg 合成量也降低。

(2) 野生绵鲚。我们对于 2003 年 4 月^[12]、7 月、9 月、11 月份分别采集的绵鲚样品进行了综合分析, 4 次采集绵鲚的平均体重分别是: 117, 41, 65, 91 g。与鲫鱼相比, 雄性绵鲚血清中 Vtg 的检出率(图 3(b))与平均体重的相关性更加明显。因为 7 月份采集的鱼样平均体重最小, 检出率很低(44%), 而 9 月份采集的绵鲚样品无论是鱼的个体还是检出率均高于 7 月份, 4 月份与 11 月份鱼的个体最大, Vtg 的检出率也达 100%。阳性雄鱼血清中 Vtg 的平均浓度分别是: 166, 34.1, 99.4, 71.3 μg/mL。雌性绵鲚样品保持很高的 Vtg 检出率, 只有一个样品未被检出。阳性雌鱼血清中 Vtg 的平均浓度分别为 3214.3, 402.9, 173.3, 512.5 μg/mL。

绵鲚为近海底层鱼类, 通常栖息于水深 40~60 m 海区, 有些亦接近淡水, 一般不做远距离洄游。每年

图 3 海河野生鱼类 Vtg 检出率季节变化图

(a) 子牙河鲫鱼, (b) 海河入海口绵鲚

12 月至翌年 2, 3 月为绵鲚的产卵期, 分批产卵。从测定结果分析, 影响绵鲚血清 Vtg 含量的因素与鲫鱼相似。雄性绵鲚样品中有很高的 Vtg 检出率, 说明海河入海口附近海域内也存在一定程度的环境内分泌干扰物污染, 并且个体受暴露时间的长短将影响 Vtg 的检出率及含量。雌性绵鲚体内 Vtg 浓度的变化总体主要与产卵期有关, 4 月和 11 月的样品因处产卵期前后, 所以 Vtg 浓度较高。在 7 月所捕获的三条雌性绵鲚虽然个体明显小于 9 月所捕获绵鲚, 但是其血清 Vtg 浓度却比 9 月所采集样品高, 我们推测, 其原因可能是鱼体内的天然雌激素与水体中的雌激素活性污染物相互作用的结果, 因为同一时期, 同一位点的雄性绵鲚血清 Vtg 浓度并不高(图 2(b))。

2.3 水体中典型内分泌干扰物的考查

我们对相同采样点水体中典型类雌激素 OP, NP 和 BPA 进行了考查, 以期了解这些化合物与鱼体内 Vtg 的诱导是否相关。OP, NP 主要是烷基酚乙氧基 (alkylphenol ethoxylate, APE) 表面活性剂的代谢产物, BPA 是环氧树脂和聚碳酸酯塑料的增塑剂。体内和体

外实验都表明OP和NP具有雌激素活性,能使鱼和一些水生生物产生雌激素效应,出现Vtg的异常升高^[23],性腺萎缩或生精受到抑制^[24]等现象。最近的研究表明BPA能引起雌鼠卵母细胞染色体变异^[25]。采样点水体中OP, NP和BPA的测定条件参见文献^[13]。测定结果发现,子牙河水体中NP的浓度水平显著高于OP和BPA($P < 0.05$)(图 4(a))。随着采样时间的推移,河水中的OP, NP和BPA总体呈逐渐降低趋势,并且变化趋势和相同采样地点捕获的鲫鱼体内Vtg的变化趋势相同。海河入海口水样(图 4(b))中均能检测到BPA, NP和OP, 但浓度远低于导致鱼Vtg生成的最低显效浓度^[26,27]。其中OP和NP浓度变化幅度不大, NP显著高于OP($P < 0.05$); 而BPA浓度呈现较大幅度变化, 出现先降低后升高的趋势, 在11月达到最高(7846 ng/L)和4月份水样中BPA浓度(8300 ng/L)相近。可以看出海河入海口处主要受到NP和BPA的污染, 尤其是BPA的污染在4月份和11月份都在1000 ng/L以上, 这和绵鲢血清中Vtg平均浓度变化趋势及雄性绵鲢血清Vtg检出率变化趋势相近。

从本试验结果看, 不同采样点河水中 NP, OP 和 BPA 的季节变化趋势以及所含主要污染物类型不同。

图4 河水中 OP, NP 和 BPA 的浓度变化图

(a) 子牙河, (b) 海河入海口(图中4月份 OP, NP 和 BPA 的浓度摘自文献^[13])

雄性鲫鱼和绵鲢血清Vtg平均浓度及Vtg检出率都与NP或BPA的浓度具有一定的相关性,但是现有数据还无法得出NP或BPA是导致雄鱼体内合成Vtg的主要原因或原因之一的结论。因为采样点位置水样中的NP或BPA浓度远低于文献报道的可导致Vtg生成的最低显效浓度。比如,在流水暴露条件下, BPA诱导虹鳟鱼体内合成Vtg的最低显效浓度是 40~70 $\mu\text{g/L}$ ^[26]。对Medaka鱼口服饲喂BPA, OP, NP后,在雄鱼体内诱导Vtg生成的 50%效应浓度(EC50)值分别是: 1600, 2600, 940 $\mu\text{g/g}$ ^[27]。长期暴露实验表明, 暴露 71 天后, 导致黑头呆鱼Vtg生成的BPA最低显效浓度是 160 $\mu\text{g/L}$ ^[28]。我们也注意到, 实际环境中诸如温度、光周期、鱼龄、生长发育周期等影响因素众多, 除了NP, OP和BPA外, 还有天然雌激素(17 β -雌二醇, 雌酮等), PCB和PAH等多种化合物并存, 这些物质均被报道过具有雌激素活性能够诱导鱼体产生Vtg^[29,30]。因此应综合运用生物和化学方法对影响该地区水体雌激素活性的主要污染物以及各种污染物所做的具体贡献进行深入的调查研究。

3 结论

本文以野生鱼血清中卵黄蛋白原作为水体中污染物雌激素效应的生物标志物, 对子牙河鲫鱼和海河入海口绵鲢血清中 Vtg 水平以及河水中 NP, OP 和 BPA 污染状况进行了初步的调查研究。捕捞到的大部分雄鱼血清中能够检出 Vtg, 显示水体中存在一定程度的雌激素或类雌激素物质的污染。采样点水体中均能检测到 BPA, NP 和 OP, 并且, 主要的污染物 NP 和 BPA 与雄性鱼类体内 Vtg 的检出率及平均浓度具有某种相关性, 但浓度远低于导致鱼 Vtg 生成的最低显效浓度。

致谢 本工作为国家“863”计划(批准号: 2003AA640610)和国家自然科学基金(批准号: 20137010)资助项目, 以及中国科学院创新工程重要方向性项目(批准号: KZCX2-414)。

参 考 文 献

- 1 Copeland P A, Sumpter J P, Walker T K, et al. Vitellogenin levels in male and female rainbow trout (*Salmo gairdneri* Richardson) at various stages of the reproductive cycle. *Comp Biochem Physiol*, 1986, 83B: 487~493
- 2 Purdom C E, Hardiman P A, Bye V J, et al. Estrogenic effects of effluent from sewage treatment works. *Chem Ecol*, 1994, 8: 275~285
- 3 Denslow N D, Chow M J, Kroll K J, et al. Vitellogenin as a bio-

- marker of exposure for estrogen or estrogenic mimics. *Ecotoxicology*, 1999, 8: 385~398[DOI]
- 4 Jones P D, De Coen W M, Tremblay L, et al. Vitellogenin as a biomarker for environmental estrogens. *Wat Sci Technol*, 2000, 42: 1~14
- 5 Sumpter J P, Jobling S. Vitellogenins as a biomarker for estrogenic contamination of the aquatic environment. *Environ Health Perspect*, 1995, 103 (Suppl 3): 173~178
- 6 Van Der Kraak G J, Hewitt M, Lister A, et al. Endocrine toxicants and reproductive success in fish. *Hum Ecol Risk Assess*, 2001, 7: 1017~1025[DOI]
- 7 De Metrio G, Corriero A, Desantis S, et al. Evidence of a high percentage of intersex in the Mediterranean swordfish (*Xiphias gladius* L). *Marine Pollution Bulletin*, 2003, 46: 358~361[DOI]
- 8 Arukwe A, Knudsen F R, Goksyr A. Fish zona radiata (eggshell) protein: A sensitive biomarker for environmental estrogens. *Environ Health Perspect*, 1997, 105: 418~422
- 9 Harries J E, Sheahan D A, Jobling S, et al. Estrogenic activity in five United Kingdom rivers detected by measurement of vitellogenesis in caged male trout. *Environ Toxicol Chem*, 1997, 16: 534~542[DOI]
- 10 Liu G H, Fu B J, Yang P. Quality of aquatic environment at Haihe River and the pollutant fluxes flowing into sea. *Chinese J Environ Sci*, 2001, 22: 46~50
- 11 Zhao J, Wang D R, Cui S Z. Model analysis of dissolved oxygen in the water of Haihe River, Tianjin. *Chinese J Agro-Environ Protection*, 1996, 15: 29~31
- 12 Shao J, Shi G, Liu J, et al. A rapid two-step chromatographic method for the quantitative determination of vitellogenin in fish plasma. *Anal Bioanal Chem*, 2004, 378: 615~620[DOI]
- 13 Jin X L, Jiang G B, Huang G L, et al. Determination of 4-tert-octylphenol, 4-nonylphenol and bisphenol A in surface waters from the Haihe River in Tianjin by gas chromatography-mass spectrometry with selected ion monitoring. *Chemosphere*, 2004, 56: 1113~1119[DOI]
- 14 Krishnan A V, Stathis P, Permuth S F, et al. Bisphenol-A: An estrogenic substance is released from polycarbonate flasks during autoclaving. *Endocrin*, 1993, 132: 2279~2286[DOI]
- 15 Parks L G, Cheek A O, Denslow N D, et al. Fathead minnow (*Pimephales promelas*) vitellogenin: Purification, characterization and quantitative immunoassay for the detection of estrogenic compounds. *Comp Biochem Physiol*, 1999, 123 C: 113~125
- 16 Yamanaka S, Arizono K, Masuda Y, et al. Development and application of an effective detection method for fish plasma vitellogenin induced by environmental estrogens. *Biosci Biotechnol Biochem*, 1998, 62: 1196~1200[DOI]
- 17 胡建英, 安立会, 孙晓航, 等. 天津野生鲫鱼卵黄蛋白原的研究. *中国环境科学*, 2003, 23: 281~284
- 18 Snyder E M, Snyder S A, Kelly K L, et al. Reproductive responses of common carp (*Cyprinus carpio*) exposed in cages to influent of the Las Vegas Wash in lake Mead, Nevada, from late winter to early spring. *Environ Sci Technol*, 2004, 38: 6385~6395
- 19 蔡仁远, 戈贤平. 淡水养殖技术手册. 上海: 上海科学技术出版社, 1999
- 20 Lomax D P, Roubal W T, Moore J D, et al. An enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for measuring vitellogenin in English sole (*Pleuronectes vetulus*): development, validation and cross-reactivity with other pleuronectids. *Comp Biochem Physiol*, 1998, 121B: 425~436
- 21 Fossi M C, Casini S, Ancora S, et al. Do endocrine disrupting chemicals threaten Mediterranean swordfish? Preliminary results of vitellogenin and *Zona radiata* proteins in *Xiphias gladius*. *Marine Environ Res*, 2001, 52: 477~482[DOI]
- 22 Sabbh M, Radanyi C, Redeuilh G, et al. The 90 kDa heat-shock protein (hsp90) modulates the binding of the oestrogen receptor to its cognate DNA. *Biochem J*, 1996, 314: 205~213
- 23 Schwaiger J, Mallow U, Ferling H, et al. How estrogenic is nonylphenol? A transgenerational study using rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) as a test organism. *Aquat Toxicol*, 2002, 59: 177~189[DOI]
- 24 Jobling S, Sheahan D, Osborne J A, et al. Inhibition of testicular growth in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) exposed to estrogenic alkylphenolic chemicals. *Environ Toxicol Chem*, 1996, 15: 194~202[DOI]
- 25 Hunt P A, Koehler K E, Susiarjo M, et al. Bisphenol A exposure caused meiotic aneuploidy in the female mouse. *Curr Biol*, 2003, 13: 546~553[DOI]
- 26 Lindholm C, Pedersen K L, Pedersen S N. Estrogenic response of bisphenol A in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquatic Toxicol*, 2000, 48: 87~94[DOI]
- 27 Chikae M, Ikeda R, Hasan Q, et al. Effect of alkylphenols on adult male medaka: Plasma vitellogenin goes up to the level of estrous female. *Environ Toxicol Pharm*, 2003, 15: 33~36[DOI]
- 28 Sohoni P, Tyler C R, Hurd K, et al. Reproductive effects of long-term exposure to bisphenol A in the Fathead Minnow (*Pimephales promelas*). *Environ Sci Technol*, 2001, 35: 2917~2925[DOI]
- 29 Klein R, Bartel M, He X, et al. Is there a linkage between bioaccumulation and the effects of alkylphenols on male breams (*Abramis brama*). *Environ Res*, 2005, 98: 55~63[DOI]
- 30 Murphy C A, Rose K A, Thomas P. Modeling vitellogenesis in female fish exposed to environmental stressors: predicting the effects of endocrine disturbance due to exposure to a PCB mixture and cadmium. *Reproductive Toxicology*, 2005, 19: 395~409[DOI]

<https://engine.scichina.com/doi/10.1360/972005-113> (2005-01-18 收稿, 2005-03-26 收修改稿)