

壬基酚对成体玫瑰无须鲃性腺的毒性效应

肖勤¹, 张士璀¹, 赵博生^{2*}

(1. 中国海洋大学海洋生命学院, 青岛 266003; 2. 山东理工大学生命科学院, 淄博 255049)

摘要:以成体玫瑰无须鲃(*Puntius conchoni*)为实验材料,通过半致死浓度(LC₅₀)、性腺指数以及组织病理学指标对壬基酚(NP)的毒性进行了评价.结果表明,在半静止条件下,壬基酚对成体玫瑰无须鲃 96 h 的 LC₅₀为(1.72 ± 0.06) μmol/L;在亚急性毒性(0.17、0.34 和 0.68 μmol/L)下成体玫瑰无须鲃暴露于壬基酚 21 d 后,其精巢指数(TSI)与卵巢指数(OSI)显著降低,并具有明显的剂量-效应关系;同时精巢与卵巢也发生了明显的组织病理学变化,精巢中支持细胞增生、生殖细胞数量减少;卵巢中卵泡发育迟缓、闭锁现象增加.结果说明壬基酚对玫瑰无须鲃的雌、雄性腺均具有毒性效应,干扰了精卵的发育成熟.另外,玫瑰无须鲃对壬基酚具有较高的敏感性,也是评价壬基酚毒性的一种理想模式鱼类.

关键词:壬基酚;玫瑰无须鲃;精巢;卵巢;毒性

中图分类号:X171.5 **文献标识码:**A **文章编号:**0250-3301(2007)11-2580-06

Toxic Effects of Nonylphenol on the Gonad of Adult Rosy Barb

XIAO Qin¹, ZHANG Shi-cui¹, ZHAO Bo-sheng²

(1. Department of Marine Biology, Ocean University of China, Qingdao 266003, China; 2. School of Life Sciences, Shandong University of Technology, Zibo 255049, China)

Abstract: Acute and sub-acute toxicities of nonylphenol (NP) on fish were investigated with adult rosy barb (*Puntius conchoni*). The acute toxicity of NP to adult rosy barb was determined in semi-static bioassays. Median lethal concentration (LC₅₀) value of NP was (1.72 ± 0.06) μmol/L for 96 h exposure. The effects of sub-toxicity of NP (0.17, 0.34 and 0.68 μmol/L) on the adult rosy barb were studied after 21 d exposure. It showed that testis somatic index (TSI) and ovary somatic index (OSI) were reduced significantly by NP in a dose-dependent manner. The histopathological examination showed that the gland structures were impaired by NP as evidenced by hypertrophied Sertoli cells, a loss of germinal cells in testis, retardation of eggs development and increase in atresia in the follicles of ovary. These suggest that NP exerts adverse effects on the testis and the ovary, and disturbs the development of sperm and eggs. In addition, due to rosy barb high sensitivity to NP, it is also possible to apply rosy barb as a potential fish model to the toxicity of NP.

Key words: nonylphenol; rosy barb; testis; ovary; toxicity

壬基酚(nonylphenol, NP)是烷基酚聚氧乙烯醚(alkylphenol ethoxylates, APEs)的降解产物. APEs 广泛用于塑料、纸张、杀虫剂、除菌剂、去污剂、化妆品的生产中^[1-6],世界年产量约在 50 万 t,其中 60%的 APEs 通过降解进入水生生态环境中^[7,8]. 壬基酚因其毒性强、不易降解等特点引起了人们的高度重视.

壬基酚的化学结构与动物的性激素结构相似,其最基本的作用模式是通过结合雌激素受体,干扰内分泌系统^[9,10]. 它可诱导雄鱼卵黄蛋白原的生成、睾丸退化、两性器官卵睾形成、雄鱼雌性化等^[11-15]. 但壬基酚对雌鱼的毒性效应却鲜见报道^[16,17].

玫瑰无须鲃(*Puntius conchoni*),是一种原产于印度、巴基斯坦、尼泊尔和孟加拉等南亚国家的淡水硬骨鱼. 玫瑰无须鲃因容易饲养,世代周期短(80 ~ 90 d)以及鱼卵体积大和透明等特点,已被广泛应用于生态毒理学研究中^[18-20]. 本研究以玫瑰无须鲃成体为实验材料,通过半致死浓度与性腺指数的测定以及组织病理学观察来探讨壬基酚对成体玫瑰无须

鲃的毒性效应,以期玫瑰无须鲃成为环境污染毒性检测中的模式鱼类提供理论依据.

1 材料与方法

1.1 化学试剂

实验用壬基酚均为对-壬基酚(4-NP)购自 Sigma-Aldrich 化学品公司,分子式为 C₁₅H₂₄O,分子量为 220.35. 将其溶于无水乙醇中用于配制不同暴露浓度的母液,无水乙醇在暴露液中的最终体积分数为 0.01%. 母液置冰箱中 4℃避光保存备用. 其他试剂均为分析纯.

1.2 实验动物

玫瑰无须鲃购于青岛市宠物市场,均为当年生性成熟个体. 雄性玫瑰无须鲃为明亮鲜艳的酒红色,

收稿日期:2006-12-19;修订日期:2007-05-29

基金项目:国家高技术研究发展计划(863)项目(2001 AA649040)

作者简介:肖勤(1968~),女,博士,主要研究方向为细胞毒理学, E-mail: xiaoqinjqf@yahoo.com.cn

* 通讯联系人, E-mail: zhaobosheng@sdut.edu.cn

身体近尾鳍部分有明显的黑色斑块,背鳍和腹鳍边缘有大片黑色斑块区,体重为 (1.92 ± 0.21) g,体长为 (4.53 ± 0.22) cm;雌鱼体色为淡黄色夹杂着银色光泽,背鳍的黑斑较浅,体重为 (2.36 ± 0.27) g,体长为 (4.68 ± 0.25) cm.将鱼运回实验室后,放入充气的 (25 ± 1) ℃水中饲养,给以 14 h/10 h 的光照/黑暗周期.每天喂食(tetra flake, Germany)2 次,每天喂食量为鱼体重的 0.5% 左右.实验用水为曝气 3 d 以上的自来水,每天更换约 1/5 体积的水,水体 pH 6.8 ~ 7.1.暂养 2 周后用于实验.

1.3 毒性实验

急性毒性实验:经过预实验确定壬基酚的浓度范围后,急性毒性实验设 6 个浓度暴露组(1.5、1.6、1.7、1.8、1.9 和 2.0 $\mu\text{mol/L}$)与 1 个溶剂对照组,每个浓度组设 2 个平行,溶剂无水乙醇在所有暴露组与对照组中的体积相同.实验用容器为 10 L 体积的玻璃缸,实验溶液体积为 4 L,每个浓度组随机放入 10 尾鱼(雌、雄各半).采用半静止换水的方式进行暴露,时间为 96 h.在整个暴露过程中的光照、温度等环境条件与暂养期的相同,但在进行急性毒性实验的前 1 d 和实验期间不喂食,每 24 h 更换实验溶液 1 次,以保持壬基酚浓度以及溶解氧在整个实验过程中一致.实验开始后的 1 ~ 6 h 内,对实验鱼的游动、呼吸及体色变化等中毒症状进行仔细观察,每 24 h 记录 1 次死亡鱼尾数并及时清除死鱼,96 h 后用急性毒性计算程序(trimmed spearman karber method, US EPA 提供)计算 96 h 的半致死浓度(LC_{50}).

亚急性毒性实验:根据急性毒性实验结果,设计 3 个 NP 浓度暴露组(0.17、0.34 和 0.68 $\mu\text{mol/L}$)与 1 个溶剂对照组.暴露实验条件同上述急性实验.但在整个暴露期间,每天喂食(tetra flake, Germany)1 次,暴露全过程为 21d.在结束前 5d 时,将雌鱼与雄鱼分开暴露,以免雌、雄鱼追尾使精卵排出.

1.4 取样处理

暴露结束后,将每组鱼逐一测量体重,随后分别取出性腺(雌、雄各 5 个)称重,最后将性腺固定,用于组织学检查.

1.5 性腺组织学检查

将性腺组织用 Bouin's 液固定 48 h 后,流水冲洗过夜,经系列乙醇脱水,二甲苯透明,石蜡包埋,6 μm 切片,苏木精和伊红染色(HE 染色),中性树胶封片.光学显微镜(Olympus BX51)观察,并进行显微数码相机照相.

2 结果与分析

2.1 急性毒性

在半静止条件下,壬基酚对玫瑰无须鲃成体具有急性毒性(表 1),96 h 的 LC_{50} 为 (1.72 ± 0.06) $\mu\text{mol/L}$.在急性毒性实验中,高浓度组的鱼暴露于壬基酚后,开始出现呼吸加快,急速游泳等症状,后来游泳缓慢,逐渐失去平衡,头渐渐向下倾斜,身体缓慢沉于水底,呼吸逐渐微弱,最终死亡.

表 1 壬基酚对成体玫瑰无须鲃 96 h 急性毒性实验结果

exposure to NP (96 h)			
实验浓度 $/\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	实验鱼数 /尾	死亡数 /尾	死亡率 /%
1.5	20	0	0
1.6	20	8	40
1.7	20	12	60
1.8	20	12	60
1.9	20	16	80
2.0	20	20	100

2.2 亚急性毒性中玫瑰无须鲃体色及性腺指数的变化

在亚急性毒性实验中,雄性玫瑰无须鲃体色由明亮鲜艳的酒红色逐渐变为灰白色,尾鳍、背鳍和腹鳍的黑色斑块变淡;雌鱼体色失去银色光泽.在此期间,没有鱼死亡的记录.

性腺指数的计算方法为:(性腺重/体重) $\times$ 100.性腺指数测试结果表明,与对照组相比,精巢与卵巢指数随着暴露浓度的增大而显著降低($p < 0.05$),并表现出明显的剂量-效应关系(表 2).

表 2 玫瑰无须鲃在不同浓度壬基酚暴露 21 d 后性腺指数的变化¹⁾(平均值 $\pm$ 标准差)

Table 2 GSI (gonadosomatic index) in rosy barb (<i>Puntius conchonius</i>) exposed to different concentrations of NP for 21 days (mean $\pm$ standard deviation)		
NP 浓度/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	精巢指数(TSI)	卵巢指数(OSI)
CK	3.050 ± 0.104	4.813 ± 0.154
0.17	$1.996 \pm 0.080^*$	$2.905 \pm 0.136^*$
0.34	$1.765 \pm 0.096^*$	$1.913 \pm 0.067^*$
0.68	$1.152 \pm 0.111^*$	$1.569 \pm 0.127^*$

1) 各浓度组与对照组的比较采用单因素方差分析(* 表示 $p < 0.05$)

2.3 组织病理学的变化

2.3.1 精巢的组织学变化

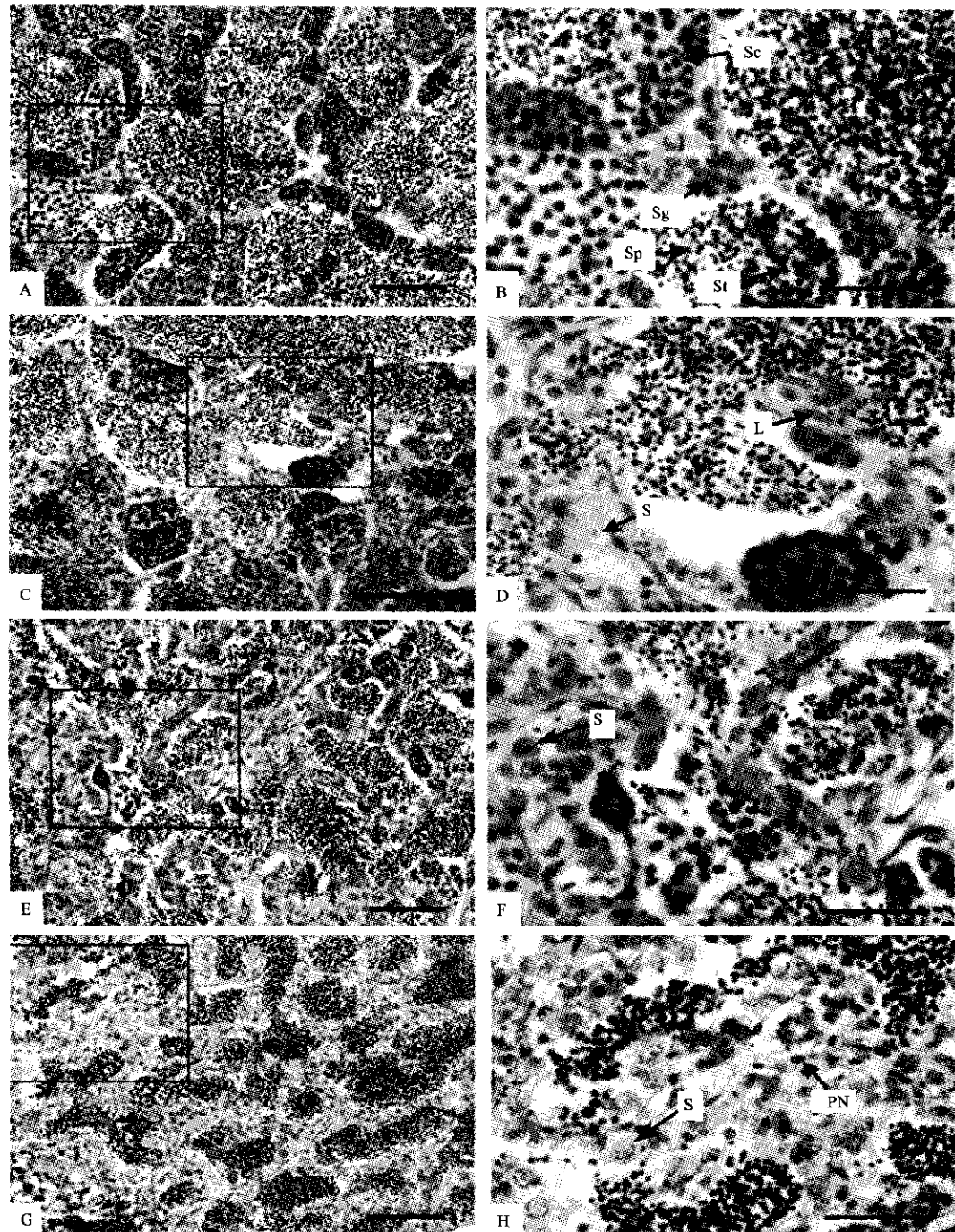
正常玫瑰无须鲃的精巢是由精原细胞(spermatogonia)、精母细胞(spermatocyte)、精细胞

(spermatid)、精子(spermatozoa)、支持细胞(sertoli cell)以及间质细胞(leydig cell)等组成(图 1 中 A 与 B)。与对照组相比,经壬基酚(0.17、0.34 和 0.68 $\mu\text{mol/L}$)处理后的玫瑰无须鲃的精巢组织发生显著变化.主要症状是:支持细胞肿大、增生,间质细胞出现凋亡现象.另外,精原细胞、精母细胞、精细胞以及

精子数量与对照组相比明显减少,并且在高浓度组(0.68 $\mu\text{mol/L}$)很少观察到精原细胞与精母细胞.壬基酚对精巢的损伤程度随着暴露浓度的增加而逐渐加深(图 1 中 C 与 D、E 与 F、G 与 H)。

2.3.2 卵巢的组织学变化

正常玫瑰无须鲃的卵巢内有不同发育阶段的卵



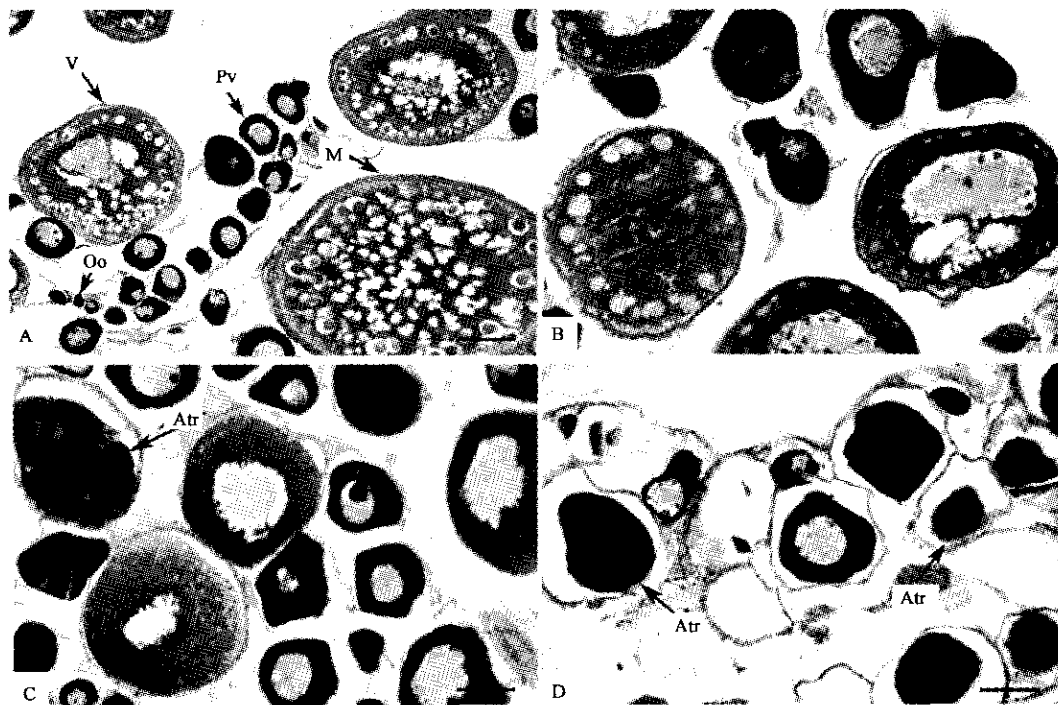
A、B:对照组;C、D:0.17 $\mu\text{mol/L}$ NP 组;E、F:0.34 $\mu\text{mol/L}$ NP 组;G、H:0.68 $\mu\text{mol/L}$ NP 组, Sg:精原细胞;Sc:精母细胞;St:精细胞;Sp:精子; L:间质细胞;S:支持细胞;PN:固缩核, A、C、E 和 G 的棒长 50 μm ;B、D、F 和 H 的棒长 25 μm , H&E 染色

图 1 玫瑰无须鲃正常与暴露于不同浓度 NP 21 d 后精巢的横切面组织结构

Fig.1 Light micrographs of transverse section of the testis of rosy barb fishes exposed to different concentrations of NP for 21 days

细胞,主要由卵原细胞(oogonia)、初级卵泡(previtellogenic follicle)、次级卵泡(vitellogenic follicle)以及成熟的卵泡(mature follicle)组成(图 2A),与对照组相比,经过壬基酚暴露 21d 后,玫瑰无须鲃卵巢

内卵泡的发育比相应的对照组迟缓,卵泡闭锁(follicular atresia)现象明显增多,这种趋势随着暴露浓度的增大而逐渐加深,在高浓度组很少观察到发育成熟的卵泡(图 2B~D)。



A:对照组;B:0.17 $\mu\text{mol/L}$ NP组;C:0.34 $\mu\text{mol/L}$ NP组;D:0.68 $\mu\text{mol/L}$ NP组。Oo:卵原细胞;Pv:初级卵泡;V:次级卵泡;M:成熟的卵泡;Atr:闭锁卵泡。棒长 50 μm ,H&E 染色

图 2 玫瑰无须鲃正常与暴露于不同 NP 浓度 21 d 后卵巢的横切面组织结构

Fig.2 Light micrographs of transverse section of the ovary of rosy barb fishes exposed to different concentrations of NP for 21 days

3 讨论

本研究发现壬基酚对成体玫瑰无须鲃具有急性毒性,96 h 的 LC_{50} 为 1.72 $\mu\text{mol/L}$ (379 $\mu\text{g/L}$),壬基酚对鱼类、无脊椎动物以及藻类等都具有急性毒性,毒性范围在 17~3 000 $\mu\text{g/L}$ 之间^[21,22]。而鱼类的 96 h LC_{50} 值一般在 135~1 400 $\mu\text{g/L}$ 范围内^[22,23]。这说明玫瑰无须鲃对壬基酚是较为敏感的,另外,玫瑰无须鲃具有明显的性别特征,很容易区分雌雄,是检测环境激素类污染物——壬基酚毒性的理想模式鱼类之一。

壬基酚在水环境中的浓度范围在 $\mu\text{g/L}$ ~ mg/L 之间,如瑞士 Glatt 河中 NP 含量为 0.3~45.0 $\mu\text{g/L}$,加拿大一河流中壬基酚的浓度为 3~300 $\mu\text{g/L}$ ^[24],英国 Aire 河中所检测到的壬基酚的浓度为 2~330 $\mu\text{g/L}$ ^[25],而美国一排污口处壬基酚浓度高达 6.3 mg/L ^[26]。本研究所用壬基酚浓度范围在 0.17~0.68 $\mu\text{mol/L}$ (37.46~149.84 $\mu\text{g/L}$)之间,这与环境中的实际浓度相一致,经其处理后,玫瑰无须鲃的性腺指数

显著降低,并对精卵的发育成熟产生了不利影响,这说明水环境中的壬基酚足以影响到鱼类的生存繁衍。

壬基酚作为环境激素,其最基本的作用模式是通过结合雌激素受体,干扰内分泌系统,从而对雄性生殖系统产生不利影响^[9,10,27]。青鳉(*Oryzias latipes*)在暴露于 184 $\mu\text{g/L}$ NP 的 3 周后其精巢指数显著降低^[28],剑尾鱼(*Xiphophorus maculatus*)的精巢指数也随壬基酚暴露浓度的增加而降低,并呈现浓度依赖性^[29]。同时,壬基酚能够减低精子囊的数量,使支持细胞肿大增生^[30],以及诱导青鳉精巢内精母细胞、支持细胞以及间质细胞的凋亡^[31]。本研究结果表明壬基酚降低了玫瑰无须鲃的精巢指数,并引起了间质细胞的凋亡、支持细胞增生以及生殖细胞数量的减少,这与上述的报道相一致。

Sharpe 等^[32]指出环境激素类物质对动物的雌、雄生殖系统都具有影响。壬基酚对鱼类卵巢的影响也不例外。壬基酚能够降低斑马鱼的卵巢指数^[16],

暴露在 500 $\mu\text{g/L}$ 壬基酚下的斑马鱼卵巢指数比对照组降低 36.2%^[17]。本实验结果表明玫瑰无须鲃的卵巢指数随着壬基酚暴露浓度的增加也明显降低。同时,壬基酚延缓了卵泡的发育成熟,卵泡闭锁现象加剧。这与 Weber 等^[33]报道的壬基酚对斑马鱼卵巢的影响是一致的。Van 等^[16]指出,壬基酚可通过诱导雌性斑马鱼卵黄蛋白原水平的升高而引起卵巢的变化。本研究中壬基酚可能也是通过行使雌激素作用诱导大量卵黄蛋白原的产生,从而干扰了卵巢中卵泡的发育,这需要进一步的研究证实。

4 结论

(1)壬基酚对玫瑰无须鲃具有急性毒性,96 h 的 LC_{50} 为 $(1.72 \pm 0.06) \mu\text{mol/L}$ 。

(2)在亚急性毒性的壬基酚处理下,壬基酚显著降低了成体玫瑰无须鲃的精巢与卵巢指数,组织病理学观察发现精巢中支持细胞增生、生殖细胞数量减少;卵巢中卵泡发育迟缓、闭锁现象增加。这说明壬基酚对成体玫瑰无须鲃的雌、雄性腺均产生了不利影响,干扰了精卵的发育成熟。

(3)玫瑰无须鲃对壬基酚的毒性比较敏感,且玫瑰无须鲃具有很明显的性别特征,是评价环境激素类污染物——壬基酚毒性的理想模式鱼类之一。

参考文献:

- [1] Arukwe A, Kullman S W, Berg K, *et al.* Molecular cloning of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) eggshell zona radiata protein complementary DNA: mRNA expression in 17 β -estradiol- and nonylphenol-treated fish [J]. *Comp Biochem Phys B*, 2002, **132**: 315 ~ 326.
- [2] Bragadin M, Perin G, Iero A, *et al.* An *in vitro* study on the toxic effects of nonylphenols (NP) in mitochondria [J]. *Chemosphere*, 1999, **38**: 1997 ~ 2001.
- [3] Ferguson S A, Flynn K M, Delclos K B, *et al.* Effects of lifelong dietary exposure to genistein or nonylphenol on amphetamine-stimulated striatal dopamine release in male and female rats [J]. *Neurotoxicol Teratol*, 2002, **24**: 37 ~ 45.
- [4] Nimrod A C, Benson W H. Environmental estrogenic effects of alkylphenol ethoxylates [J]. *Crit Rev Toxicol*, 1996, **26**: 335 ~ 364.
- [5] Ying G G, Williams B, Kookana R. Environmental fate of alkylphenols and alkylphenol ethoxylates—a review [J]. *Environ Int*, 2002, **8**: 215 ~ 226.
- [6] You H J, Choi C Y, Jeon Y J, *et al.* Suppression of inducible nitric oxide synthase and tumor necrosis factor- α expression by 4-nonylphenol in macrophages [J]. *Biochem Bioph Res Co*, 2002, **294**: 753 ~ 759.
- [7] Renner R. European bans on surfactant trigger transatlantic debate [J]. *Environ Sci Technol*, 1997, **31**: 316 ~ 320.
- [8] Solé M, López de Alda M J, Castillo M, *et al.* Estrogenicity determination in sewage treatment plants and surface waters from the Catalanian area (NE Spain) [J]. *Environ Sci Technol*, 2000, **34**: 5076 ~ 5083.
- [9] Madsen L L, Korsgaard B, Bjerregaard P. Estrogenic effects in flounder *Platichthys flesus* orally exposed to 4-*tert*-octylphenol [J]. *Aquat Toxicol*, 2003, **64**: 393 ~ 405.
- [10] Sweeney T. Is exposure to endocrine disrupting compounds during fetal/post-natal development affecting the reproductive potential of farm animals? [J]. *Domest Anim Endocrin*, 2002, **23**: 203 ~ 209.
- [11] Christiansen T, Korsgaard B, Jespersen A. Effects of nonylphenol and 17- β estradiol on vitellogenin synthesis, testicular structure and cytology in male eelpot, *Zoarces viviparus* [J]. *J Exp Biol*, 1998, **201**: 179 ~ 192.
- [12] Gimeno S, Komen H, Jobling S, *et al.* Demasculinisation of sexually mature male common carp, *Cyprinus carpio*, exposed to 4-*tert*-pentylphenol during spermatogenesis [J]. *Aquat Toxicol*, 1998, **43**: 93 ~ 109.
- [13] Jobling S, Sheahan D, Osborne J A, *et al.* Inhibition of testicular growth in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) exposed to estrogenic alkylphenolic chemicals [J]. *Environ Toxicol Chem*, 1996, **15**: 194 ~ 202.
- [14] Pickford K A, Thomas-Jones R E, Wheals B, *et al.* Route of exposure affects the oestrogenic response of fish to 4-*tert*-nonylphenol [J]. *Aquat Toxicol*, 2003, **65**: 267 ~ 279.
- [15] Kobayashi K, Tamotsu S, Yasuda K, *et al.* Vitellogenin-immunohistochemistry in the liver and the testis of the Medaka, *Oryzias latipes*, exposed to 17 β -estradiol and *p*-nonylphenol [J]. *Zool Sci*, 2005, **22**: 453 ~ 461.
- [16] Van den Belt K, Berchmans 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.
- [17] Yang F X, Xu Y, Hui Y. Reproductive effects of prenatal exposure to nonylphenol on zebrafish (*Danio rerio*) [J]. *Comp Biochem Physiol C*, 2006, **142**: 77 ~ 84.
- [18] Gill T S, Tewari H, Pande J. *In vivo* and *in vitro* effects of cadmium on selected enzymes in different organs of the fish *Barbus conchionius* (rosy barb) [J]. *Comp Biochem Physiol C*, 1991, **100**: 501 ~ 505.
- [19] Shariff M, Jayawardena P A, Yusoff F M, *et al.* Immunological parameters of Javanese carp *Puntius gonionotus* (Bleeker) exposed to copper and challenged with *Aeromonas hydrophila* [J]. *Fish Shellfish Immun*, 2001, **11**: 281 ~ 291.
- [20] Xu Y Y, Zhang S C, Zhang Y Z, *et al.* Exposure of rosy barb (*Puntius conchionius*) sperm to abamectin as an *in vitro* assay of cytotoxicity [J]. *Toxicol Mech Method*, 2005, **15**: 351 ~ 354.
- [21] Servos M R. Review of the aquatic toxicity, estrogenic responses and bioaccumulation of alkylphenols and alkylphenol polyethoxylates [J]. *Water Qual Res J Can*, 1999, **34**: 123 ~ 177.
- [22] Staples C A, Weeks J, Hall J F, *et al.* Evaluation of aquatic toxicity and bioaccumulation of C8- and C9-alkylphenol ethoxylates [J]. *Environ Toxicol Chem*, 1998, **17**: 2470 ~ 2480.

[23] Holcombe G W, Phipps G L, Knuth M L, *et al.* The acute toxicity of selected substituted phenols benzenes and benzoic acid esters to fathead minnows, *Pimephales promelas* [J]. Environ Pollut Ser A, 1984, **35**: 367 ~ 381.

[24] O'Halloran S L, Liber K, Gangl J A, *et al.* Effects of repeated exposure to NP on the zooplankton community in littoral enclosures [J]. Environ Toxicol Chem, 1999, **18**: 386 ~ 393.

[25] Blackburn M A, Waldock M J. Concentrations of alkylphenols in rivers and estuaries in England and Wales [J]. Water Res, 1995, **29**: 1623 ~ 1629.

[26] Hale R C, Smith C L, De Fur P O, *et al.* Nonylphenols in sediments and effluents associated with diverse wastewater outfalls [J]. Environ Toxicol Chem, 2000, **19**: 946 ~ 952.

[27] Jobling S, Sumpter J P. Detergent components in sewage effluents are weakly oestrogenic to fish: An *in vitro* study using rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) hepatocytes [J]. Aquat Toxicol, 1993, **27**: 361 ~ 372.

[28] Kang I J, Yokota H, Oshima Y, *et al.* Effect of 17 β -estradiol on the reproduction of Japanese medaka (*Oryzias latipes*) [J]. Chemosphere, 2002, **47**: 71 ~ 80.

[29] Kinnberg K, Korsgaard B, Bjerregaard P. Concentration-dependent effects of nonylphenol on testis structure in adult platyfish *Xiphophorus maculatus* [J]. Mar Environ Res, 2000, **50**: 169 ~ 173.

[30] Kinnberg K, Korsgaard B, Bjerregaard P, *et al.* Effects of nonylphenol and 17 β -estradiol on vitellogenin synthesis and testis morphology in male platyfish *Xiphophorus maculatus* [J]. J Exp Biol, 2000, **203**: 171 ~ 181.

[31] Weber L P, Kiparissis Y, Hwang G S, *et al.* Increased cellular apoptosis after chronic aqueous exposure to nonylphenol and quercetin in adult medaka (*Oryzias latipes*) [J]. Comp Biochem Physiol C, 2002, **13**: 51 ~ 59.

[32] Sharpe R M, Skakkbaek N E. Are oestrogens involved in falling sperm counts and disorders of the male reproductive tract? [J]. Lancet, 1993, **341**: 1392 ~ 1395.

[33] Weber L P, Hill R L, Janz D M. Developmental estrogenic exposure in zebrafish (*Danio rerio*): II. Histological evaluation of gametogenesis and organ toxicity [J]. Aquat Toxicol, 2003, **63**(4): 431 ~ 446.