

己烯雌酚在斑马鱼胚胎中的生物蓄积及毒性机制研究

端正花¹, 朱琳^{1*}, 宫知远²

(1. 南开大学环境科学与工程学院, 环境污染过程与基准教育部重点实验室, 天津 300071; 2. Department of Biological Sciences, National University of Singapore 117543, Singapore)

摘要: 采用 HPLC 和斑马鱼胚胎发育方法, 测定了己烯雌酚(DES)在标准模式种斑马鱼胚胎体内的蓄积规律及胚胎毒性效应, 并利用定量活性-结构分析(QSAR)和基因芯片技术, 探讨了 DES 对斑马鱼胚胎的致毒机制. 结果表明, 在 0.2 mg/L DES 中暴露 24、48 和 72 h 后, 胚胎体内的 DES 含量分别为 (25.78 ± 4.95) 、 (54.88 ± 7.10) 和 $(71.93 \pm 10.55) \mu\text{g/g}$; 不同起始染毒时间(0 hpf 和 8 hpf)条件下, 亚致死最敏感指标均为 72 h 孵化率抑制, EC_{50} 分别为 (0.14 ± 0.09) 和 $(0.33 \pm 0.14) \text{mg/L}$, 说明胚胎在发育囊胚期(发育 8 h)前对 DES 暴露更为敏感. QSAR 研究发现, DES 相对其它酚类类雌激素对斑马鱼胚胎具有较高的毒性, 这与它具有较高的 TE 值(51.1217 eV)相关; 基因芯片研究发现, 5 $\mu\text{g/L}$ DES 暴露 21 d 后能导致斑马鱼成鱼部分基因表达异常. DES 对斑马鱼具有一定的胚胎毒性和遗传毒性, 而生化反应是致毒的关键步骤.

关键词: 己烯雌酚; 斑马鱼胚胎; 毒性; QSAR; 基因芯片

中图分类号: X171.5; X503.225 文献标识码: A 文章编号: 0250-3301(2009)02-0522-05

Bioaccumulation and Toxicity Test of Diethylstilbestrol to Zebrafish (*Danio rerio*) Embryo

DUAN Zheng-hua¹, ZHU Lin¹, GONG Zhi-yuan²

(1. Key Laboratory of Pollution Processes and Environmental Criteria, Ministry of Education, College of Environmental Science and Engineering, Nankai University, Tianjin 300071, China; 2. Department of Biological Sciences, National University of Singapore 117543, Singapore)

Abstract: The bioaccumulation regulation and the toxicity of diethylstilbestrol (DES) were studied on zebrafish (*Danio rerio*) embryos with the methods of HPLC and early life stage test, and the toxic mechanisms were also discussed with the techniques of quantitative structure-activity relationship (QSAR) and gene chips. After the zebrafish embryos exposed at 0.2 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ DES for 24, 48 and 72 h, the body levels of DES in zebrafish embryo were (25.78 ± 4.95) , (54.88 ± 7.10) and $(71.93 \pm 10.55) \mu\text{g/g}$, respectively. Even exposure started at different time (0 hpf and 8 hpf), the most sensitive sub lethal endpoints were both 72 h delayed hatch, and the EC_{50} values for them were (0.14 ± 0.09) and $(0.33 \pm 0.14) \text{mg/L}$, so that zebrafish embryo was more sensitive to the exposure of DES before the stage of gastrula (8 h after fertilization). QSAR studies found when compared with other phenol-endocrine disrupts, DES was much more toxic, and this related to its higher TE value (52.1217 eV). Meanwhile, when adult zebrafish exposed at 5 $\mu\text{g/L}$ DES for 21 d, it was found by the gene chips that parts of gene expressions would be changed and the genetic toxicity of DES was approved. DES was concluded to be developmental and genetic toxic to zebrafish, and the biochemical reaction-associated process might be the key parameter in determining the toxicity level.

Key words: diethylstilbestrol; zebrafish embryo; toxicity; quantitative structure-activity relationship (QSAR); gene chip

近年我国畜牧业的发展, 农药、兽药、饲料添加剂、动物激素等的使用, 为畜牧业生产和畜产品数量的增长发挥了一定作用, 同时也给畜产品安全带来了隐患. 己烯雌酚(diethylstilbestrol, DES)是人工合成雌激素, 始于 20 世纪 40 年代, 主要用于鸡、牛、羊等的增肉剂, 鱼类生长促进剂等^[1,2]. 它在生物体内不易降解, 通过食物链富集, 严重威胁着人类健康^[3]. Hendry 等^[4]发现长期食用己烯雌酚等人工合成雌激素, 易导致儿童早熟、男性生殖系统发育异常与病变、女性易发生乳腺癌等. Shukuwa 等^[5]研究表明 DES 会导致雄鼠催乳素细胞密度明显增加. 李和程等^[6]发现青春期较大剂量 DES 暴露可使大鼠性

成熟后睾丸生精细胞凋亡增加, 且随 DES 暴露剂量增加而有加强趋势.

国内外已有研究证明 DES 具有潜在的遗传毒性和胚胎毒性^[7]. 1998 年蒋义国等^[8]发现己烯雌酚可能是一种促癌因子, 可提高其它致癌物质的致癌性. Li 等^[9]研究发现孕期服用 DES 后会导致 DNA 甲基化异常, 影响胎儿生殖器官的发育, 同时也可能增加胎儿患生殖道癌症的风险.

收稿日期: 2008-03-09; 修订日期: 2008-05-12

基金项目: 国家自然科学基金项目(30470319)

作者简介: 端正花(1981~), 女, 博士研究生, 主要研究方向为生态毒理学, E-mail: duanzhenghua@mail.nankai.edu.cn

* 通讯联系人, E-mail: zhulin@nankai.edu.cn

目前,DES 毒性的研究报道主要侧重于对生殖系统的影响,而 DES 的胚胎发育毒性及致毒机制方面仍鲜有报道.为此,本实验以斑马鱼早期胚胎为生物模式种,研究了 DES 在鱼类胚胎内的蓄积规律,探讨了斑马鱼胚胎在发育过程中对 DES 的毒性敏感阶段,并从分子结构和基因水平上讨论了 DES 的致毒机制.

1 材料与方法

1.1 实验生物

实验室自养成年斑马鱼(雌雄比 1:2)饲养于水族箱中,每日喂 2 次冷冻摇蚊幼虫(来自非污染环境,经检测受试化合物低于检出限),(26±1)℃、光照/黑暗周期(14 h/10 h)条件下控制培养 1 个月开始收集鱼卵.饲养用水经生物过滤器过滤并充分曝气,pH 值保持 8.0 左右.

1.2 试剂

DES 购自 Sigma-Aldrich 公司(上海),优级纯.称取一定量 DES 粉末溶于重组水^[10]中,加入少量无水乙醇助溶(实际染毒溶液中乙醇的浓度不超过 0.01%),配制好的 DES 溶液作为储备液待用,实验过程中将储备液稀释至需要的浓度使用,本实验 DES 浓度范围为 0~1 mg/L.实验中所用的正己烷、甲醇、乙腈和乙醚为色谱纯,其余均为分析纯.

1.3 HPLC 测定

参照肖全伟等^[11,12]的方法,应用 HPLC 对不同暴露浓度和暴露时间条件下胚胎体内的 DES 含量进行测定,分别测定 0、0.05、0.10、0.20 和 0.30 mg/L DES 浓度下暴露 24 h 后胚胎体内 DES 含量以及 0.20 mg/L DES 浓度下暴露 0、24、48 和 72 h 后胚胎体内 DES 含量.本实验共有 8 个暴露组,每组分别加入 500 颗刚受精的(0 hpf)正常鱼卵于 200 mL 玻璃烧杯中进行染毒.暴露一定时间后取其中发育正常的 300 颗鱼卵作为一个实验样品(干重为 19.20 mg±1.65 mg),对其进行 DES 提取.提取步骤:将实验样品移入 5 mL 玻璃匀浆器,加甲醇-0.001 mol/L 醋酸钠(pH=4.5)(2:8,体积比)溶剂充分匀浆后移入 10 mL 玻璃离心管,用 2 mL 上述溶剂洗涤匀浆管并转入离心管,加 4 mL 正己烷-乙醚(7:3,体积比)混合,振荡 20 min 后以 3 000 r/min 离心 10 min 取上清液.重复提取 3 次,合并上清液,编号后置入 4℃ 冰箱备用,测试时每组设 3 个平行样.

采用 HPLC 色谱仪(Waters 1525)和紫外检测器(Waters 2473)测试:检测波长 280 nm;色谱柱为 C18

柱(3.9 mm×150 mm, 5 μm, Waters);流动相为乙腈-0.001 mol/L醋酸钠(pH=4.5)(75:25,体积比),流速 1 mL/min;进样量 20 μL. DES 标准液浓度为 0.02、0.04、0.10、0.20 和 0.50 mg/L,以浓度(x , mg/L)对峰面积(y)作标准曲线,得到 $y = 17\,650x - 164.17$ ($R^2 = 0.998\,5$).利用未染毒胚胎进行加标回收分析,得到回收率为 80.02%±0.17%.

1.4 毒性实验

实验方法参照文献[13],DES 暴露浓度分别为 0、0.10、0.20、0.30、0.40、0.50、0.60、0.80 和 1.00 mg/L.

1.5 统计分析

采用 SPSS13.0 软件,每个实验组设 3 个平行样,由线性拟合法(linear fit)分析半致死浓度和半效应浓度;组内进行 student- t 检验,并用标准误差 SD 表示;组间用 one way-ANOVA 检验, $p < 0.05$ 表示有显著差异.

2 结果与分析

2.1 化学分析

HPLC 测试发现,斑马鱼、摇蚊幼虫及空白溶液中 DES 本底含量均未检出.如图 1 所示,在不同浓度 DES(0~0.3 mg/L)暴露 24 h 后,斑马鱼胚胎内 DES 含量与暴露浓度呈明显正相关关系($R^2 = 0.965\,1$),最高可达 39.01 μg/L.同时,暴露浓度越大,胚胎的蓄积倍数(胚胎体内含量/暴露浓度)在总体趋势上也越大,在 DES 浓度为 0.3 mg/L 时达到 130.3.

在相同暴露浓度下,胚胎内 DES 含量随着暴露

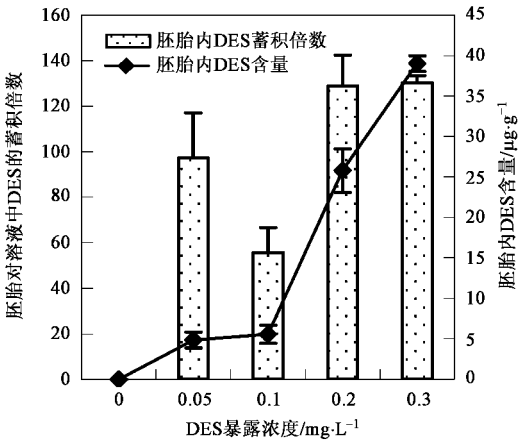


图 1 24 h 后胚胎在不同浓度暴露下对 DES 的吸收
Fig.1 Levels of DES in embryo exposed at different concentrations for 24 h

时间的延长而增大.如图 2 所示,胚胎内 DES 含量与暴露时间具有明显的线性关系($R^2 = 0.9898$).当 DES 浓度为 0.2 mg/L 时,24、48 和 72 h 暴露后,胚胎体内的含量分别为(25.78 ± 4.95)、(54.88 ± 7.10)和(71.93 ± 10.55) $\mu\text{g/g}$.

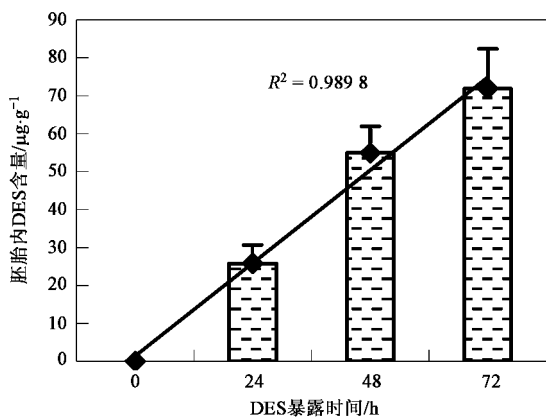


图 2 0.2 mg/L 染毒下胚胎在不同暴露时间对 DES 的吸收
Fig.2 Levels of DES in embryo exposed in 0.2 mg/L DES at time intervals

2.2 毒性实验

斑马鱼胚胎经 0 hpf 染毒实验,24 h LC_{50} 为(0.42 ± 0.09) mg/L,48 h LC_{50} 为(0.40 ± 0.15) mg/L.其中,DES 浓度 1.00 mg/L 以上染毒 24 h 后胚胎全部死亡,0.6 mg/L 以上染毒 48 h 后全部死亡.图 3 描述了 0 hpf 染毒下 DES 对胚胎的剂量-亚致死毒性效应.主要表现为:在 DES 浓度 0~0.4 mg/L 暴露过程中,胚胎 24 h 后出现躯干和尾部 20 s 内无自动,32 h 后出现无心跳现象,但在亚致死最高暴露浓度 0.4 mg/L

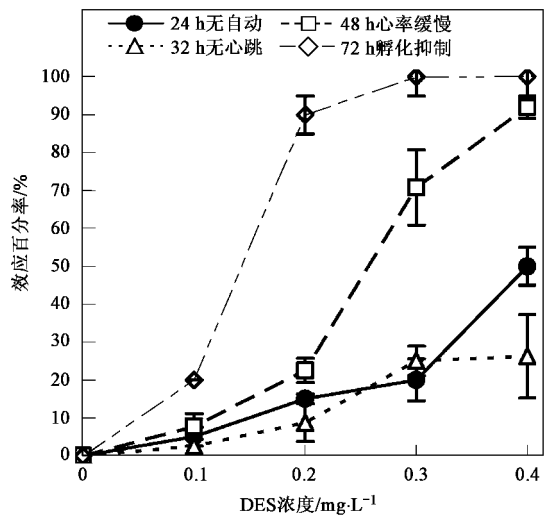


图 3 0 hpf 染毒胚胎亚致死敏感效应
Fig.3 Sublethal effects of embryo at 0hpf exposure

下,这 2 个毒理效应的百分率均 $< 50\%$;染毒 48 h 后,心率明显变缓(< 100 次/min), $\text{EC}_{50} = 0.27 \text{ mg/L} \pm 0.08 \text{ mg/L}$;染毒 72 h,抑制孵化率 $\text{EC}_{50} = 0.14 \text{ mg/L} \pm 0.09 \text{ mg/L}$.因此,胚胎亚致死最敏感效应表现为 72 h 孵化率抑制.

8 hpf 染毒 DES 对胚胎的剂量-亚致死毒性效应如图 4 所示,主要表现为:染毒 24 h 后胚胎躯干和尾部 20 s 内无自动, $\text{EC}_{50} = 0.53 \text{ mg/L} \pm 0.07 \text{ mg/L}$;染毒 32 h 后出现无心跳现象, $\text{EC}_{50} = 0.76 \text{ mg/L} \pm 0.14 \text{ mg/L}$;染毒 48 h 后,心率明显变缓(< 100 次/min), $\text{EC}_{50} = 0.46 \text{ mg/L} \pm 0.08 \text{ mg/L}$;染毒 72 h,抑制孵化率 $\text{EC}_{50} = 0.33 \text{ mg/L} \pm 0.14 \text{ mg/L}$.比较各毒理学终点的 EC_{50} 值发现,8 h 后染毒胚胎亚致死最敏感效应同样表现为 72 h 孵化率抑制.

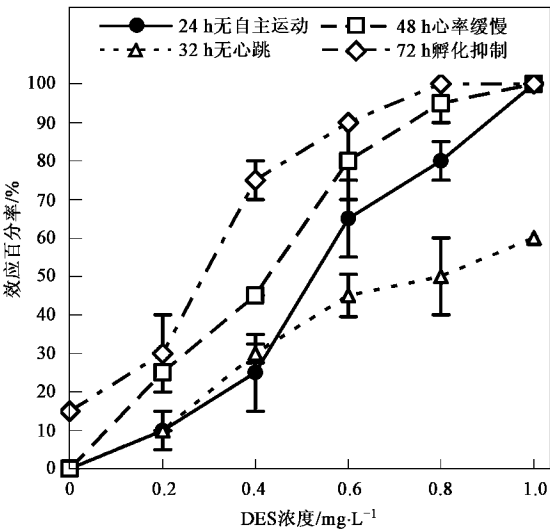


图 4 8 hpf 染毒胚胎亚致死敏感效应
Fig.4 Sublethal effects of embryo at 8hpf exposure

3 讨论

3.1 酚类雌激素化合物对斑马鱼胚胎的毒性比较
由上述实验结果可以得出,随着暴露时间和浓度的增大,斑马鱼胚胎内 DES 的含量增大.另外,从致死指标上看,DES 对斑马鱼胚胎的毒性也相应增大,表明化合物对生物体的毒性大小受污染物在体内积累量的影响,这与刘红玲等^[14]对双酚 A 的毒性研究结果相同.但是同类化合物在相同暴露浓度下,会表现出不同的毒性表现类型.

从表 1 可以看出,DES 是选择研究的 8 种酚类雌激素化合物中,对斑马鱼胚胎作用 48 h LC_{50} 最

表 1 酚类雌激素化合物及其对斑马鱼胚胎的毒性¹⁾

Table 1 Tested endocrine disrupts containing phenols and their toxicity data to zebrafish embryo

序号	名称	48 h LC ₅₀ (0 hpf)/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	$-\lg\text{LC}_{50}$ (0 hpf)/ $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$	$\lg P$	TE /eV
1	对氯酚	43.0 ¹⁾	1.37	2.43	-3.223 5
2	3,5 二氯苯酚	12 ²⁾	1.92	3.54	-2.052
3	2,4 二氯苯酚	72 ²⁾	1.14	3.26	-3.077 6
4	五氯酚	2.63 ³⁾	2.58	4.44	10.239 8
5	双酚 A	90.2 ³⁾	1.04	4.15	-1.329 5
6	己烯雌酚	1.49 ³⁾	2.827	4.63	51.121 7
7	对辛基酚	39.3 ¹⁾	1.406	5.05	1.903 7
8	对壬基酚	12.3 ¹⁾	1.91	5.47	2.541 2

1) 表示数据参考文献[15]; 2)表示数据参考文献[16]; 3)本实验数据

小、毒性最大的一种物质.为了从定量活性和结构关系这个角度找出 DES 毒性大于相对其他化合物的原因,笔者利用 Chemoffice 6.0 软件 AM1-MOPAC 算法计算了这类化合物的量子化学参数辛醇/水分配系数 $\lg P$ 和 TE 值.其中, $\lg P$ 表征了化合物的亲脂性,TE 为分子总能量,在一定程度上反映分子的活跃程度.分别以 $\lg P$ 和 TE 值对 48 h 斑马鱼胚胎的 $\lg\text{LC}_{50}$ 进行线性回归的 QSAR 分析,得到以下方程.与 $\lg P$ 关系:

$$-\lg \text{LC}_{50} = 1.019 + 0.187(\lg P) \tag{1}$$

$$R^2 = 0.195, p = 0.243 > 0.05$$

与 TE 关系:

$$-\lg \text{LC}_{50} = 1.552 + 0.029(\text{TE}) \tag{2}$$

$$R^2 = 0.621, p = 0.012 < 0.05$$

由方程(1)和(2)可以得出, $\lg \text{LC}_{50}$ 与 $\lg P$ 无相关性,而与 TE 有一定相关性($R^2 = 0.621$),因而推测 TE 是决定这组酚类雌激素化合物对斑马鱼胚胎毒性的主要参数.许高金等^[17]也发现苯酚类化合物的 TE 值与其对大型蚤的毒性呈相关性($R^2 = 0.820$).可以推测这类化合物对斑马鱼胚胎的致毒关键步骤是生

化反应,而不仅是亲脂性的传输分配过程.

3.2 斑马鱼胚胎对 DES 的敏感阶段及机制探讨

与 0 hpf 染毒相比,8 hpf 染毒 DES 的毒性下降很多($p < 0.05$),但是都表现出类似的亚致死效应.这与作者对其他类环境雌激素(五氯酚 PCP、双酚 A BPA)^[13]的研究相一致,胚胎发育早期对毒性暴露更为敏感.斑马鱼早期胚胎处于 DNA、RNA、染色体和纺锤体蛋白质等的合成时期以及与此类物质合成有关的酶的变化时期^[18,19],可能是造成这一结果的主要原因.因此,如果 DES 能影响到生物体内这些遗传物质的表达,相应的早期胚胎将会对 DES 更为敏感.

基因芯片技术能高效、快速且多参量地研究大量基因在不同条件的表达差异^[20],进而阐明化合物致毒的机制^[21].新加坡国立大学合作方通过全通量斑马鱼基因芯片技术并经 RT-PCR 验证发现,5 $\mu\text{g/L}$ DES 暴露 21 d 后会导致斑马鱼成鱼部分基因表达异常.如表 2 所示,在选择研究的 10 个基因中,斑马鱼成鱼的 VG3 等 9 个基因在表达为上调(up-regulated),而 CYP1A1 基因表达为下调(down-regulated).

表 2 基因芯片分析中的部分基因差异表达

Table 2 Selected gene expression changes investigated by DNA chip in zebrafish treated with DES

序号	基因库注册号	基因描述	扩增片段 /bp	表达差异 ¹⁾ ($\log_2^{\text{ratio}}$)	p 值 (t -test)	特征
1	AF254638	卵黄蛋白原 3 (vg3)	239	12.44	9.31E-05	上调
2	AF349412	雌激素受体 α (esr1)	151	4.60	1.82E-06	
3	BI427744	FK506 结合蛋白 11 (fkbp11)	162	3.31	3.40E-04	
4	BG891864	羧肽酶 N, 多肽 1 (cpn1)	201	2.88	1.68E-06	
5	BM082666	Zgc: 92744	205	1.97	4.91E-07	
6	BI896378	Zgc: 66313	187	1.65	4.36E-04	
7	BM182319	溶质载体族 31(传输铜)a1 (slc31a1)	246	1.40	4.23E-04	
8	BI885968	信号序列受体 δ (ssr4)	211	1.37	2.43E-03	
9	BI889078	高密度脂蛋白-结合蛋白 (hdlbp)	215	1.31	2.62E-04	
10	AW342687	细胞色素 1A1 (cyp1A1)	180	-1.19	3.63E-05	下调

1) ratio 为实验组基因荧光强度值/对照组基因荧光强度值, $\log_2^{\text{ratio}}$ 的域值设为(-1,1), >1 的是上调表达的基因, <-1 的是下调表达的基因

VG 族基因被报道为鱼类暴露在雌激素化合物下的标志基因(marker gene)^[22,23], VG3 基因的上调表达,证实了 DES 具有类雌激素效应。CYP1A1 广泛分布于肺、胃肠道、皮肤、胎盘及脑等肝外组织,主要参与多环芳烃类(polycyclic aromatic hydrocarbons, PHAs)的代谢^[24,25],具有芳香烃羟化酶(arylhydrocarbon hydroxylase, AHH)活性,可催化 DES 的羟基化反应^[26],所形成的亲电子的中间代谢产物与 DNA 共价结合,从而产生一系列毒性,使 DES 暴露下的斑马鱼胚胎会出现 48 h 心率明显变缓(< 100 次/min)、2 h 孵化抑制孵化,甚至死亡等现象。

4 结论

(1)0 hpf 暴露实验发现,斑马鱼胚胎内 DES 含量与暴露浓度(0~0.3 mg/L)及暴露时间(24、48 和 72 h)呈明显正相关关系。

(2)DES 对斑马鱼胚胎有明显的毒性作用,亚致死最敏感指标表现为 72 h 孵化率抑制。

(3)与 0 hpf 染毒相比,DES 在 8 hpf 染毒下对斑马鱼胚胎的毒性下降很多,因此胚胎囊胚前期对 DES 的污染更为敏感。

参考文献:

- [1] Stefanick M L. Estrogens and progestins: background and history, trend in use, and guidelines and regimens approved by the US Food and Drug Administration[J]. Am Med, 2005, **19**(118):64-73.
- [2] Yin Y, Lin C, Ma L. Mx2 promotes vaginal epithelial differentiation, Wolffian duct regression, and dampens the vaginal response to diethylstilbestrol [J]. Mol Endocrinol, 2006, **20**(7): 1535-1546.
- [3] 王凤菊,徐爱珍.己烯雌酚的临床应用[J].中国乡村医药杂志,2003,**10**(7):36~37.
- [4] Hendry W J, Weaver B P, Naccarato T R, et al. Differential progression of neonatal diethylstilbestrol-induced disruption of the hamster testis and seminal vesicle[J]. Reprod Toxicol, 2006, **21**(3):225-240.
- [5] Shukuwa K, Izumi S I, Hishikawa, Y, et al. Diethylstilbestrol increase the density of prolactin cells in male mouse pituitary by inducing proliferation of prolactin cells and transdifferentiation of gonadotropic cells[J]. Histochem Cell Biol, 2006, **126**(1): 111-123.
- [6] 李和程,陈琦,王子明,等.青春前期己烯雌酚暴露对大鼠性成熟后生精细胞凋亡的影响及其机制初探[J].中华男科学杂志,2006,**12**(9):814-821.
- [7] Sakakibara Y, Saito I, Ichinoseki K, et al. Effects of diethylstilbestrol and its methyl ethers on aneuploidy induction and microtubule distribution in Chinese hamster V79 cells[J]. Mutat Res, 1991, **263**(4):269-276.
- [8] 蒋义国,陈家,吴中亮,等.己烯雌酚对乌拉坦诱发小鼠肺肿瘤的促进作用[J].癌变·畸变·突变,1998,**10**(21):73-75.

- [9] Li S, Hursting S D, Davis B J, et al. Environmental exposure, DNA methylation, and gene regulation: lessons from diethylstilbestrol-induced cancers [J]. Ann N Y Acad Sci, 2003, **983**: 161-169.
- [10] Nagel R, Dar T. The embryo test with the Zebrafish *Danio rerio*-a general model in ecotoxicology and toxicology[J]. ALTEX, 2002, **19**(Suppl 1):38-48.
- [11] 肖全伟,黎源倩,张浩,等.高效液相色谱法测定大鼠血清 4-壬基酚和双酚 A[J].四川大学学报(医学版),2004,**35**(2):271-273.
- [12] 肖全伟,黎源倩,吴德生.高效液相色谱法测定大鼠组织中 4-壬基酚和双酚 A 浓度[J].色谱,2004,**22**(6):579-582.
- [13] 端正花,郑敏,朱琳.五氯酚和双酚 A 联合作用对斑马鱼胚胎发育的毒性[J].中国环境科学,2006,**26**(z1):121-124.
- [14] 刘红玲,刘晓华,王晓祎,等.双酚 A 和四溴双酚 A 对大型和斑马鱼的毒性[J].环境科学,2007,**28**(8):1784-1787.
- [15] 刘红玲,周宇,许妍,等.氯代酚和烷基酚类化合物对斑马鱼胚胎发育影响的研究[J].安全与环境学报,2004,**4**(4):3-6.
- [16] 朱琳,史淑洁.斑马鱼胚胎发育技术在毒性评价中的应用[J].应用生态学报,2002,**13**(2):252-254.
- [17] 许高金.苯酚、苯胺类化合物定量结构与毒性的 QSAR 研究[D].杭州:浙江大学,2003.23-24.
- [18] 章龙珍,刘宪亨,鲁大椿,等.鱼类胚胎冷冻保存前几个因子对其成活率影响的研究[J].淡水渔业,1992,**22**(1):20-24.
- [19] Hallare A V, Köhler H R, Triebkorn R. Developmental toxicity and stress protein responses in zebrafish embryos after exposure to diclofenac and its solvent, DMSO[J]. Chemosphere, 2004, **56**(7): 659-666.
- [20] 程金平,袁涛,冀秀玲,等.基因芯片筛选氯化汞对大鼠脑神经毒性差异表达基因[J].环境科学,2006,**27**(4):779-782.
- [21] Zeng Z, Shan T, Tong Y, et al. Development of estrogen-responsive transgenic medaka for environmental monitoring of endocrine disrupters [J]. Environ Sci Technol, 2005, **39**(22):9001-9008.
- [22] Vetillard A, Bailhache T. Effects of 4-n-Nonylphenol and Tamoxifen on Salmon Gonadotropin-releasing hormone, estrogen receptor, and vitellogenin gene expression in Juvenile Rainbow Trout[J]. Toxicol Sci, 2006,**92**(2):537-544.
- [23] Miracle A, Ankley G, Lattier D. Expression of two vitellogenin genes (vg1 and vg3) in fathead minnow (*Pimephales promelas*) liver in response to exposure to steroidal estrogens and androgens [J]. Ecotoxicol Environ Saf, 2006,**63**(3):337-342.
- [24] Sidorova Y A, Grishanova A Y, Lyakhovich V V. Rat hepatic CYP1A1 and CYP1A2 induction by menadione [J]. Toxicology Letters, 2005, **155**(2):253-258.
- [25] Vega-López A, Jiménez-Orozco F A, Ramón-Gallegos E, et al. Estrogenic effects of polychlorinated biphenyls and relation to cytochrome P4501A activity in the endangered goodeid fish *Ameioblennius* [J]. Environ Toxicol Chem, 2008, **27**(4):963-969.
- [26] Yang F, Xu Y, Pan H, et al. Induction of hepatic cytochrome P4501A1/2B activity and disruption of thyroglobulin synthesis/secretion by mono-ortho polychlorinated biphenyl and its hydroxylated metabolites in rat cell lines[J]. Environ Toxicol Chem, 2008, **27**(1):220-225.