

壬基酚和雌二醇干扰罗氏沼虾卵黄蛋白原 VTG 基因表达的效应

吴楠 张毅 李惠云 张高峰 刘青 魏华*

(上海水产大学生命科学与技术学院 上海 200090)

摘要:对刚孵化后的罗氏沼虾 (*Macrobrachium rosenbergii*) 亲虾用高低两个浓度的壬基酚 (nonylphenol, NP, 100 $\mu\text{g/L}$ 和 0.01 $\mu\text{g/L}$) 和雌二醇 (estradiol, E_2 , 1 $\mu\text{g/L}$ 和 0.01 $\mu\text{g/L}$) 进行浸泡处理, 分别于 3 d 和 5 d 对罗氏沼虾肝胰腺和卵巢中卵黄蛋白原 (vitellogenin, VTG) 基因表达变化进行半定量分析。结果显示, NP 和 E_2 能够提高罗氏沼虾肝胰腺和卵巢中卵黄蛋白原 VTG 基因的表达。100 $\mu\text{g/L}$ NP 对罗氏沼虾表现出雌激素效应, 0.01 $\mu\text{g/L}$ NP 作用效果不明显, 而 E_2 则在 1 $\mu\text{g/L}$ 和 0.01 $\mu\text{g/L}$ 两个浓度下均对罗氏沼虾有较强的雌激素效应。在 100 $\mu\text{g/L}$ NP 作用下, 卵巢 VTG 表达量 3 d 和 5 d 均保持较高水平, 无明显下降, 其他实验组均是 3 d VTG 基因表达量升高, 5 d 后表达量较 3 d 表达量有所降低。结果表明, 与其他动物一样, NP 对罗氏沼虾具有内分泌干扰作用。

关键词: EDC; VTG; 罗氏沼虾; RT-PCR

中图分类号: Q786 **文献标识码:** A **文章编号:** 0250-3263(2007)04-01-07

Endocrine Disruption Effects of 4-Nonylphenol and Estradiol on Vitellogenin Gene Expression *in vivo* in *Macrobrachium rosenbergii*

WU Nan ZHANG Yi LI Hui-Yun ZHANG Gao-Feng LIU Qing WEI Hua*

(College of Aqua-life and Technology, Shanghai Fisheries University, Shanghai 200090, China)

Abstract: After spawning, the female bighead prawns (*Macrobrachium rosenbergii*) were exposed to different concentrations of nonylphenol (NP, 100 $\mu\text{g/L}$ and 0.01 $\mu\text{g/L}$) and estradiol (E_2 , 1 $\mu\text{g/L}$ and 0.01 $\mu\text{g/L}$). A semi-quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) technique was used to determine the change of vitellogenin (VTG) gene expression in the bighead prawn hepatocytes and ovary at the 3rd day and 5th day, respectively. The results showed that VTG gene expression increased following treatment with NP or E_2 . 100 $\mu\text{g/L}$ NP had an estrogenic effect while 0.01 $\mu\text{g/L}$ NP did not. Both concentrations (1 $\mu\text{g/L}$ and 0.01 $\mu\text{g/L}$) of E_2 had strong estrogenic effects. The results also showed that VTG gene expression in most treated groups increased in 3 days, and somewhat decreased in 5 days except the high gene expression in ovary during the entire experimental process after treatment with 100 $\mu\text{g/L}$ NP. The results indicate that NP has an endocrine disruption effects in *M. rosenbergii* as in other animals.

Key words: EDC; VTG; *Macrobrachium rosenbergii*; RT-PCR

内分泌干扰物质 (endocrine disrupting chemicals, EDCs) 是指干扰生物体正常的内分泌机能, 并影响生物体或其后代发育、繁殖和行行为的外源性化学物质, 由于它往往具有类雌激素作用, 故又称为环境雌激素^[1] (ecoestrogen)。

基金项目 上海市重点学科水产养殖学项目 (Y1101);

* 通讯作者, E-mail: jhwei@shfu.edu.cn;

第一作者介绍 吴楠, 女, 硕士研究生; 研究方向: 水生生物学, E-mail: shirleyxuw@yahoo.com.cn.

收稿日期 2006-11-28, 修回日期 2007-05-10

EDCs 的研究方法有多种,包括哺乳动物实验^[2-4]、鸟类实验^[5]、鱼类实验^[6]、两栖类实验^[7]等。其中卵黄蛋白原(vitellogenin, VTG)作为一种高效、特异、灵敏的生物标志物已经逐渐成为 EDC 研究的一个主要手段。VTG 是鱼、甲壳类等动物雌性性成熟时肝细胞合成的一种蛋白质,通过血液循环,运输到卵巢,合成卵黄蛋白,为卵细胞和胚胎的发育提供营养。在幼年非性腺成熟期或雄性动物体内 VTG 的含量甚低,在 EDC 作用下未成熟的雌性动物和雄性动物体内 VTG 会升高,故 VTG 可作为 EDC 污染的一个重要指标。目前实验方法可直接检测 VTG 蛋白^[8-12]水平或对 VTG 的 mRNA 水平进行半定量分析^[13,14]。

Lorenzen 等^[5]利用莫克雌醇和有机氯杀虫剂 DDT 处理小鸡(*Gallus domesticus*)及鲱鱼鸥(*Larus argentatus*)胚胎肝细胞,结果显示,1 nmol/L 浓度的甲氧基降孕三烯炔二醇(moxestrol)对鲱鱼鸥肝细胞 VTG mRNA 诱导水平相当于 10 nmol/L 的甲氧基降孕三烯炔二醇对小鸡胚胎肝细胞的诱导,而 DDT 活性较弱。Kloas 等^[7]研究了 E₂、NP 和双酚 A 对雄性非洲爪蛙(*Xenopus laevis*)原代肝细胞的 VTG mRNA 诱导的剂量依赖性关系和时间反应关系,3 种受试物的雌激素活性 E₂ > NP > 双酚 A。Van den Belt 等^[12]将雄性斑马鱼(*Danio rerio*)和虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)幼鱼暴露在多种 EDC(NP、辛基酚、双酚 A 和 17 β -雌二醇等)中。结果表明,NP、辛基酚、双酚 A 和 17 β -雌二醇对两种鱼均具有雌激素活性。Pawlowski 等^[14]分别在 14 $^{\circ}$ C、18 $^{\circ}$ C 对暴露在 17 β -雌二醇、NP 和双酚 A 的虹鳟鱼肝细胞 VTG 及雌激素受体的 mRNA 水平进行检测,结果表明,18 $^{\circ}$ C 下暴露于 17 β -雌二醇中 12 h 和 24 h 后 VTG 及雌激素受体的 mRNA 水平升高。

相对于脊椎动物,无脊椎动物 EDC 研究很少。虽然对甲壳动物卵黄发生的研究,已取得了显著的进展^[15],但利用虾进行 EDC 研究的报道不多见。无脊椎动物在自然界分布广泛,尤其是水生无脊椎动物极易受到 EDC 的作用,影响着生态稳定和人类生存安全,开展这方面研

究无疑有着重要意义。本实验以具有较高经济价值的罗氏沼虾(*Macrobrachium rosenbergii*)为受试生物,用不同浓度雌二醇(estradiol, E₂)和壬基酚(nonylphenol, NP)进行处理。通过 RT-PCR 技术分别对 3 d 和 5 d 后卵巢、肝胰腺组织中 VTG 基因表达的变化进行半定量分析。以期对甲壳动物的 EDC 作用有一些了解,并探讨 EDC 对甲壳动物作用与高等动物的不同之处。

对于高等动物而言, E₂ 一般不作为 EDC, 只作为 EDC 参比物,而甲壳动物与高等动物内分泌机制不同,并不是所有甲壳动物中体内都有雌二醇^[5,16-19],所以在本实验中也将其作为 EDC 进行研究。

1 材料与与方法

1.1 材料 实验材料为刚孵化后罗氏沼虾亲虾,购于上海申漕特种水产开发有限公司,运回上海水产大学生态楼在 100 L 的水箱中暂养 2~3 d,水温控制在(22 \pm 0.5) $^{\circ}$ C。依据罗氏沼虾卵巢不同发育时期^[20],取刚产过卵、卵巢尚未发育的虾进行实验,卵巢的外观颜色为灰白,体长(12.02 \pm 0.89)cm,体重(19.12 \pm 2.72)g,性腺指数 0.53 \pm 0.12,肝胰腺指数 2.64 \pm 0.58。参照吴垠等^[21]方法,随机分组,每组 6 只虾,浸泡处理 24 h 完全换水,并重新给药。分别于第 3 d、第 5 d 取虾卵巢和肝胰腺,并立即进行总 RNA 的提取。

NP、E₂ 购自 Sigma 公司, NP 给药浓度分别为 NP I 100 μ g/L 和 NP II 0.01 μ g/L; E₂ 给药浓度分别为 E₂ I 1 μ g/L 和 E₂ II 0.01 μ g/L,每次换水后维持药物浓度不变。

1.2 实验药品与仪器 Trizol 试剂(BBI, Canada), AMV 第一链 cDNA 合成试剂盒、PCR 扩增试剂盒,购于上海生工生物工程技术服务有限公司; DEPC, 上海捷备思基因技术有限公司; 雌二醇、壬基酚、氯仿(分析纯)、异丙醇(分析纯), 国药集团化学试剂有限公司; 75% 乙醇, 上海振兴化工一厂; Sigma 冷冻离心机; Amersham Ultraspec 2000 紫外分光光度仪;

Eppendorf 金属加热器; Eppendorf Mastercycler Gradient PCR 仪; Gene Genius 凝胶成像系统。

1.3 RNA 提取以及浓度、纯度和完整性鉴定

用 TRizol 试剂抽提罗氏沼虾卵巢和肝胰腺组织总 RNA, 具体步骤参考 TRizol 试剂使用说明。测定总 RNA OD 值, 得到 OD_{260}/OD_{280} 比值在 1.9 ~ 2.2 之间, 说明提取的 RNA 纯度高, 无蛋白质和 DNA 污染。用 1% TAE 琼脂糖凝胶电泳检测, 出现 28S、18S 和 5S 三条带。

1.4 cDNA 第一链合成 用 AMV 第一链 cDNA 合成试剂盒, 按试剂盒说明严格操作。加热均在 Eppendorf 金属加热器上完成。

1.5 序列比对和引物设计 根据已报道的罗氏沼虾卵黄蛋白原 VTG 基因全序列 (GenBank 序列编号为 AB056458) 以及分类地位接近的几种虾类的 VTG 序列: 长额虾 (*Pandalus hypsinotus*) (AB117524) 对虾 (*Penaeus semisulcatus*) (AY05131-8); 用 Clustalx 进行全序列比对, 得到 VTG 一段保守区域, 扩增位置为 VTG mRNA 序列的 1 240 ~ 1 490 位点附近。在此区域范围内, 用 Oligo 6 软件进行引物设计, 得到 VTG 引物:

上游引物: 5'-CCGACCATGCATTCCTCCG-TTGA-3'; 下游引物: 5'-TGTTGCCAAGGGACTTC-AGTAGAGC-3'。扩增片段长度为 251 bp, 引物合成委托上海生工生物工程技术服务公司进行。

根据 GenBank 查得包括罗氏沼虾在内的几种虾类的 18S 序列: 罗氏沼虾 (AY461599); 沼虾 (*M. potiana*) (DQ0797756); 长臂虾 (*Palaemon elegans*) (DQ079764); 秀丽白虾 (*Palaemonetes paludosus*) (DQ0797755)。用 Clustalx 进行全序列比对, 结果得到 18S 是一个比较保守的基因。扩增位置为 18S mRNA 序列的 171 ~ 312 位点附近。Oligo 6 软件设计引物:

上游引物: 5'-TGTTACGGGTGACGGA-3'; 下游引物: 5'-AATTACGCAGACTCGGAAGA-3'。扩增片段长度为 199 bp, 引物合成委托上海生工生物工程技术服务公司进行。

1.6 半定量 PCR 检测 采取罗氏沼虾不同时间段、不同组织 1 μ g 总 RNA, 在 AMV 逆转录酶

作用下合成 cDNA 第一链。25 μ l PCR 反应体系, 包括模板 cDNA 第一链 1 μ l, 10 \times PCR Buffer 2.5 μ l, dNTP (2 mmol/L) 2.5 μ l, MgCl₂ (25 mmol/L) 2 μ l, VTG 上游引物 (4.7 μ mol/L) 和下游引物 (3.7 μ mol/L) 分别 2.5 μ l 和 3.1 μ l, 18S rRNA 引物 (4.9 μ mol/L) 均为 2.5 μ l, 加 ddH₂O 至总体积为 25 μ l。反应过程为: 94.0 $^{\circ}$ C 预变性 2 min; 94.0 $^{\circ}$ C 40 s, 57.0 $^{\circ}$ C 40 s, 72.0 $^{\circ}$ C 40 s, 30 个循环, 72.0 $^{\circ}$ C 后延伸 10 min。

实验设三次重复, 扩增产物每管取 10 μ l 进行 1.5% TAE 琼脂糖凝胶电泳分析, EB 染色。表达结果通过 BANDSCAN 软件对条带灰度进行分析计算, 按目的基因条带光密度/18S 条带光密度计算, 使用 Excel 软件进行统计分析, 用平均值 \pm 标准差表示。

2 结果

2.1 RNA 电泳检测 总 RNA 提取之后, 紫外分光光度计测定 RNA OD 值, 得到 OD_{260}/OD_{280} 比值在 1.9 和 2.2 之间。取 RNA 3 μ l 与 2 μ l 溴酚蓝上样缓冲液混合, 经 1% TAE 琼脂糖凝胶电泳检测。结果如图 1 所示, 出现 28S、18S 和 5S 3 条带, 说明样品纯度合格。

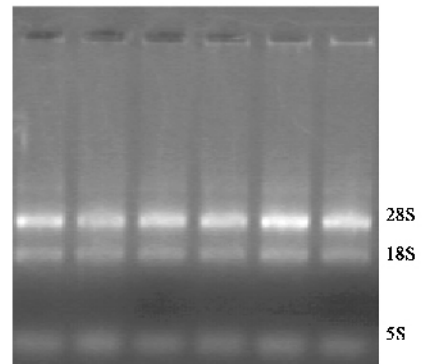


图 1 罗氏沼虾肝胰腺和卵巢总 RNA 电泳图

Fig. 1 Total RNA from liver and ovary separated on agarose gel in *Macrobrachium rosenbergii*

2.2 E₂ 和 NP 对不同组织中 VTG 基因表达的影响 RT-PCR 产物经电泳后, VTG 和 18S 内参基因分别在 251 bp 和 169 bp 处出现明显条带, 与预期条带大小一致, 如图 2a、b 和图 3a、b 所

示。图 4a、b 分别是在肝胰腺和卵巢中,根据电泳图中 VTG 和 18S 条带光密度比值进行统计分析所获得的 VTG 基因相对于 18S rRNA 基因的拷贝数,显示了目的基因在不同浓度 EDCs 的处理下表达水平的变化。

诱导效应, E₂ II (0.01 μg/L) 处理 5 d 后 VTG 表达量有下降,但仍高于对照组表达量。

2.2.2 卵巢中 VTG 基因表达的变化 结果如图 4b 所示,经 NP I (100 μg/L) 处理后,3 d 和 5 d 内 VTG 表达均上调且水平差异不大,经 NP II (0.01 μg/L) 处理后,3 d 后表达量上调,5 d 后回落,略高于对照组水平。经 E₂ I (1 μg/L) 处理后,卵巢中 VTG 基因表达在 3 d 和 5 d 内与对照组比较,均有明显上调,5 d 后的表达量比 3 d 后的表达量有所降低;经 E₂ II (0.01 μg/L) 处理后,3 d 内卵巢中 VTG 表达比对照组表达量高,5 d 后表达量有下降,略高于对照组。

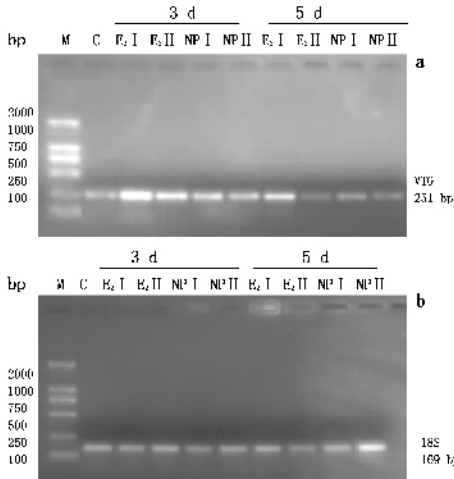


图 2 不同浓度的 E₂ 和 NP 对肝胰腺中 VTG 及 18S 基因表达的影响

Fig. 2 Effects of E₂ and NP on VTG and 18S gene expression in hepatocytes

a、b 分别为 VTG 和 18S RT-PCR 产物经 1.5% TAE 琼脂糖凝胶电泳结果; E₂ I、E₂ II 分别表示处理浓度为 1 μg/L 和 0.01 μg/L 的 E₂; NP I、NP II 分别表示处理浓度为 100 μg/L 和 0.01 μg/L 的 NP; M. DNA 分子量标记 DL2000; C. 对照组。

a、b represent VTG and 18S RT-PCR products separated by TAE-1.5% agarose gel respectively; E₂ I、E₂ II represent 1 μg/L and 0.01 μg/L of E₂; NP I、NP II represent 100 μg/L and 0.01 μg/L of NP; M. DNA Marker DL2000; C. Control group.

2.2.1 肝胰腺中 VTG 基因表达的变化 受试虾浸泡在不同浓度的 NP 和 E₂ 后,在 3 d 和 5 d 肝胰腺中 VTG 基因表达量与对照组相比较,结果如图 4a 所示。

NP I (100 μg/L) 处理后,3 d 内 VTG 表达量上调,处理 5 d 后 VTG 表达量与对照组比较差异不明显; NP II (0.01 μg/L) 处理后,VTG 表达量无明显变化。E₂ I (1 μg/L) 处理后,VTG 基因表达在 3 d 和 5 d 内与对照组比较,表达量明显上调; E₂ II (0.01 μg/L) 处理后,3 d 内 VTG 表达量上调,但明显低于 E₂ I (1 μg/L) 3 d 和 5 d

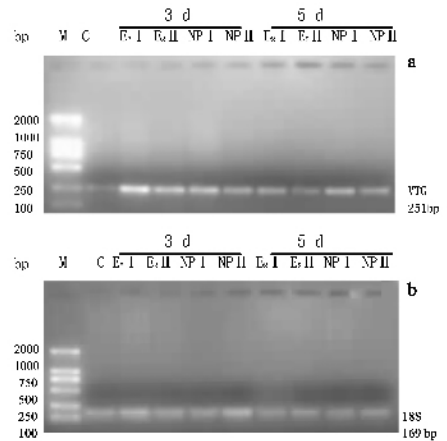


图 3 不同浓度的 E₂ 和 NP 对卵巢中 VTG 及 18S 基因表达的影响

Fig. 3 Effects of E₂ and NP on VTG and 18S gene expression in ovary

a、b 分别为 VTG 和 18S RT-PCR 产物经 1.5% TAE 琼脂糖凝胶电泳结果; E₂ I、E₂ II 分别表示处理浓度为 1 μg/L 和 0.01 μg/L 的 E₂; NP I、NP II 分别表示处理浓度为 100 μg/L 和 0.01 μg/L 的 NP; M. DNA 分子量标记 DL2000; C. 对照组。

a、b represent VTG and 18S RT-PCR products separated by TAE-1.5% agarose gel respectively; E₂ I、E₂ II represent 1 μg/L and 0.01 μg/L of E₂; NP I、NP II represent 100 μg/L and 0.01 μg/L of NP; M. DNA Marker DL2000; C. Control group.

3 讨论

在 EDC 研究中,雌激素应答元件包括 VTG 基因、雌激素受体 ER 基因、绒毛膜促性腺激素基因(choriogenin gene)等一系列基因。目前在

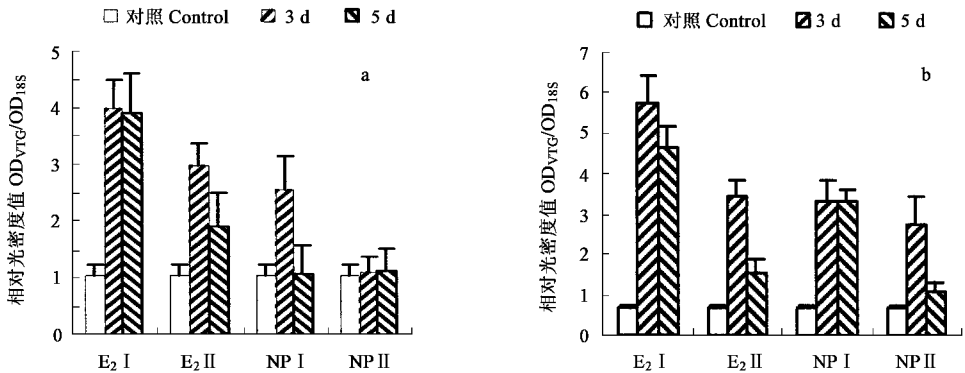


图 4 3 次半定量 RT-PCR 结果的统计分析

Fig. 4 Statistical analysis of semi-quantitative RT-PCR from 3 independent experiments

表达结果经 18S 进行矫正。a. 肝胰腺; b. 卵巢。

The data were normalized by the 18S gene expression. a. Hepatocytes b. Ovary.

无脊椎动物中,已证实 NP 和 E₂ 有一定的雌激素效应。Ghekiere^[22]等运用 ELISA 技术直接定量糖虾 (*Neomysis integer*) VTG 蛋白水平, NP 作用 96 h 后检测到了 VTG 蛋白量的变化。Shimizu 等^[23]发现,将藤壶 (*Balanus*) 幼体暴露在 NP 和 E₂ 中,藤壶的发育和附着都受到了 NP 的干扰。暴露在 NP 和 E₂ 27 h 和 48 h 后,附着率显著下降,而将藤壶幼体移至无 EDC 环境中 24 h 后发现 NP 和 E₂ 的干扰可逆。在脊椎动物中, NP 和 E₂ 的雌激素效应研究工作更加丰富。Pait^[24]等对注射 NP 和 E₂ 的雄鱼 (*Fundulus heteroclitus*) VTG 水平进行 0~32 d 的跟踪研究。结果表明,注射 NP 4 d 后 VTG 水平达到峰值,之后下降,12 d 后 VTG 水平达到第二个峰值且显著高于 4 d 后的峰值,之后下降,至 32 d 仍保持较低水平。注射 E₂ 8 d 后 VTG 水平达到峰值,之后下降,一直保持较低水平。说明 NP 对生物干扰的时间效应。Kloas^[7]等用 10⁻⁶ mol/L 的 E₂ 对非洲爪蛙原代培养的肝细胞进行诱导,结果表明,实验组在 48 h VTG mRNA 水平明显升高,72 h 降低。说明在体外 NP 也能够诱导 VTG 合成。

本实验结果显示,罗氏沼虾表现出对 NP 浓度有剂量依赖关系,且 1 μg/L 和 0.01 μg/L E₂ 均表现了较强的雌激素效应,雌激素活性 E₂ >

NP,这与很多脊椎动物的环境雌激素效应研究结果一致^[7,25]。

在本实验中,100 μg/L NP 对罗氏沼虾表现出雌激素效应,而 0.01 μg/L NP 雌激素效应不明显。Ghekiere^[22]等实验结果表明,糖虾在 0.01 μg/L 的 NP 中,卵黄蛋白原水平显著上升,1 μg/L 和 100 μg/L NP 对卵黄蛋白原水平无明显影响。作者指出,由于对甲壳动物卵黄发生过程的激素调控机制尚不清晰,实验中所检测到 VTG 表达水平对干扰物质特异性和浓度特异性很难解释,有待对激素调控机理的进一步研究。相同浓度的 NP (0.01 μg/L) 对糖虾表现了明显的刺激作用,对罗氏沼虾的雌激素效应却不明显,而 100 μg/L NP 对罗氏沼虾表现了雌激素效应,但对糖虾的 VTG 水平无明显影响。这可能是由于甲壳动物生殖机理种间差异较大^[15],也可能由于 E₂ 是一些甲壳动物本身存在的雌激素所造成^[17-19]。所以,本实验也从另一个方面证明了 E₂ 在干扰罗氏沼虾生殖过程中的可能作用,至少效率要比其他 EDCs 要高。综合其他研究的结果与本实验,可以看出,EDCs 对于各种生物体的干扰是一个普遍现象,干扰有较长的时间效应。但对于不同动物,作用的时空过程是不一样的,不同物种对 EDCs 干扰表现出的应急反应时间和形式各不相同。所以对各种动物对 EDCs 效应的研究是一个较

为复杂的过程。

本实验对 VTG 的 mRNA 水平进行半定量检测,宋福永^[1]等认为,对于组织和血浆中 VTG mRNA 表达的分析可能是一种更有前途的 VTG 定量技术。这是由于 VTG mRNA 表达相对于组织和血浆中出现 VTG 蛋白而言,反应时间更短,同时分子实验相对于生化实验灵敏度进一步提高。结合本实验综合分析,甲壳动物卵黄发生有可能在 3 d 时属于 EDCs 作用开始时的瞬间反应(或应急反应),所以反应比较剧烈,而在经过 2 d 适应后,又趋于稳定,所以有所下降,但 5 d 以后是一直保持在这个水平,还是再继续下降,后续实验正在进行深入探究。

无脊椎动物分布特别广泛,在 EDCs 的研究领域中,经济价值高的甲壳类动物应该得到广大研究者的关注,因此甲壳动物的内分泌毒理学研究显得尤为重要。然而甲壳类生殖过程中的激素调控是一个不同于高等动物的过程,不能用高等动物的研究结论来简单推断,对于 EDCs 对甲壳动物的作用机制,还有待于不断深入研究。

参 考 文 献

[1] 宋福永,李杰.应用卵黄蛋白原检测内分泌干扰物质的研究进展.环境与健康杂志,2004,21(4):264~266.

[2] Ashby J,Tinwell H. Uterotrophic activity of bisphenol A in the immature rat. *Environ Health Perspect*,1998,106:719~720.

[3] Ashby J,Lefevre P A. The peripubertal male rat assay as an alternative to the Hershberger castrated male rat assay for the detection of antiandrogens, oestrogens and metabolic modulators. *J Appl Toxicol* 2000,20:35~47.

[4] Kim H S,Shin J H,Moon H J, et al. Evaluation of the 20-day pubertal female assay in Sprague-Dawley rats treated with DES, tamoxifen, testosterone, and flutamide. *Toxicol Sci*, 2002, 67:52~62.

[5] Lorenzen A,Casley W L,Moon T W. A reverse transcription-polymerase chain reaction bioassay for avian vitellogenin mRNA. *Toxicol Appl Pharmacol* 2001,176:169~180.

[6] Lattier D L, Reddy T V, Gordon D A, et al. 17 α -ethynylestradiol-induced vitellogenin gene transcription quantified in livers of adult males, larvae, and gills of fathead minnows. *Environ Toxicol Chem* 2002,21:385~393.

[7] Kloas W,Lutz I,Einspanier R. Amphibians as a model to study

endocrine disruptors: II. estrogenic activity of environmental chemicals *in vitro* and *in vivo*. *Sci Total Environ*,1999,225:59~68.

[8] Kordes C,Rieber E P,Gutzeit H O. An *in vitro* vitellogenin bioassay for oestrogenic substances in the medaka. *Aqua Toxicol* 2002,58:151~164.

[9] Huang R K,Wang C H. The effect of two alkylphenols on vitellogenin levels in male carp. *Proc Natl Sci Counc Repub China B* 2001,25:248~252.

[10] Heppell S A,Denslow N D,Flomar L C, et al. Universal assay of vitellogenin as a biomarker for environmental estrogens. *Environ Health Perspect*,1995,103:9~15.

[11] Copeland P A,Sumptner J P,Walker T K, et al. Vitellogenin levels in male and female rainbow trout at various stages of the reproductive cycle. *Comp Biochem Physiol B*,1986,83:487~493.

[12] Van den Belt K, Verheyen R, Witters H. Comparison of vitellogenin responses in zebrafish and rainbow trout following exposure to environmental estrogens. *Ecotoxicology and Environmental Safty* 2003,56:271~281.

[13] Islinger M,Pawlowski S,Hollert H, et al. Measurement of vitellogenin mRNA expression in primary cultures of rainbow trout hepatocytes in a non-radioactive dot blot/RNase protection-assay. *Sci Total Environ*,1999,233:109~122.

[14] Pawlowski S, Islinger M, Voelkl A, et al. Temperature-dependent vitellogenin mRNA expression in primary cultures of rainbow trout hepatocytes at 14 and 18°C. *Toxicol In Vitro*, 2000,14:531~540.

[15] 穆淑梅,康现江,牛建章等.甲壳动物卵黄发生及其激素调控研究进展.海洋科学,2004,28(6):66~70.

[16] Danzo B J. The effects of environmental hormones on reproduction. *Cell Mol Life Sci*,1998,54:1249~1264.

[17] Couch E F,Hagno N, Lee W, et al. Changes in estradiol and progesterone immunoreactivity in tissues of the lobster, *Homarus americanus*, with developing and immature ovaries. *Comp Biochem Physiol A*,1987,87(3):765~770.

[18] 赵维信,贾江,安苗.外源激素和眼柄提取物对罗氏沼虾卵母细胞的离体诱导作用.上海水产大学学报,1996,5(4):221~225.

[19] 蔡生力,杨丛海.体外注射激素对中国对虾卵巢发育的影响.中山大学学报(自然科学版),2000,39(增刊):91~95.

[20] 姜乃澄,卢建平,袁保京.罗氏沼虾初级卵母细胞在卵黄形成期超微结构的变化.东海海洋,2001,19(1):35~40.

[21] 吴垠,孙建明,周遵春.中国对虾亲虾生殖周期中消化酶活性及组织生化成分的变化.水产学报,2003,27(6):

550 ~ 557.

- [22] Ghekiere A ,Verslycke T ,Janssen C. Effects of methoprene , nonylphenol ,and estrone on the vitellogenesis of the mysid *Neomysis integer*. *General And Comparative Endocrinology* , 2006 ,**147** :190 ~ 195.
- [23] Shimizu K ,Satuito C G ,Saikawa W ,et al . An energy storing protein from cyprid larvae of the barnacle ,*Balanus amphitrite* : biochemical ,and functional similarities to vitellin. *Journal of*

Experimental Zoology ,1996 **276** 87 ~ 94.

- [24] Pait A S ,Nelson J O. Vitellogenesis in male *Fundulus heteroclitus* (killifish) induced by selected estrogenic compounds. *Aquatic Toxicology* 2003 **64** 331 ~ 342.
- [25] Depledge M H ,Billingham Z. Ecological significance of endocrine disruption in marine invertebrates. *Marine Pollution Bulletin* ,1999 **39** 32 ~ 38.