

阿特拉津对泥鳅性腺及性别分化相关基因的影响

王坡, 王芳, 张瑞华, 梁婷婷, 常重杰, 杜启艳

(河南师范大学 生命科学学院, 河南 新乡 453007)

摘要:以泥鳅为材料,首先确定了阿特拉津对泥鳅的急性毒性.在此基础上采用组织学切片和实时荧光定量 PCR(qRT-PCR)的方法研究了阿特拉津长期处理对泥鳅性腺形态和性别分化相关基因表达模式的影响,以期准确评估阿特拉津的环境毒性和对水生生物生殖发育的作用.结果表明:阿特拉津对泥鳅的 24 h、48 h、96 h 的半数致死浓度(LC₅₀)分别为 31.60 mg/L、26.82 mg/L、18.98 mg/L,安全质量浓度(SC)为 5.8 mg/L.随着阿特拉津浓度的增加和处理时间的延长,泥鳅的死亡率明显的升高.通过组织学研究发现高浓度的阿特拉津(2.68 mg/L)处理泥鳅 21 d 能够抑制泥鳅精巢精子的发生,促进卵巢细胞的发育.同时 qRT-PCR 结果显示:与对照组相比不同剂量的阿特拉津(2.68 mg/L, 0.268 mg/L, 0.0268 mg/L)能够显著的诱导细胞色素 P450 芳香化酶基因(*cyp19a*),类固醇生成因子(*sf1*)的表达,对抗缪勒氏管激素(*amh*)有显著的抑制效应.因此,阿特拉津对泥鳅有明显的外源雌激素效应;通过干扰类固醇激素合成基因的表达影响生殖细胞的生成;也通过某种未知的机制干扰性别分化上游基因的表达,从而影响性腺分化.

关键词:阿特拉津;泥鳅;急性毒性;*cyp19a*;*sf1*;*amh*

中图分类号:Q344.2

文献标志码:A

阿特拉津(atrazine)是三氮苯类除草剂,主要用于林果地和玉米田中杀灭一年生禾本科杂草和阔叶杂草的防治^[1].自 20 世纪 50 年代在世界范围内广泛推广应用以来,在各个国家使用的面积不断扩大.在我国中南部的丘陵和山区地带,通常把玉米和水稻一起种植,在地势较高处种植玉米,在地势低洼处种植水稻,因此阿特拉津施入玉米田后就可能会经雨水冲刷进入到稻田中,从而对水稻造成一定的药害^[2].近年来,有部分研究人员报道在地表水体如湖泊、池塘以及河流中检测到阿特拉津;同时,由于阿特拉津性质稳定,不易降解,残效期长,其可能的生态效应受到了人们的高度重视.而因其又具有内分泌干扰作用的特点,因此受到了人们的广泛关注^[3].赛林霖^[4]等用阿特拉津暴露青鳉鱼后发现阿特拉津可以导致青鳉发育畸形,其精巢发育迟缓,并出现雌雄同体现象.因此,阿特拉津可能的环境激素效应有可能对水生生物和人类健康构成潜在的威胁.Sara^[5]等认为阿特拉津之所以能够对哺乳动物的生殖和鱼类性别分化产生影响,是通过影响下丘脑-垂体-性腺(HPG)轴中一些基因的表达产生的.

在哺乳动物中由于 Y 染色体上的性别决定基因 SRY 决定了雌雄个体的形成.鱼类是低等脊椎动物,全世界大约存在 20 000 余种不同的鱼类,到目前为止,除了在少数物种中发现了性别决定基因之外,在绝大多数鱼类中均未发现类似 SRY 这样的基因.与其他脊椎动物相比,鱼类的性别决定机制更加复杂多样.在部分鱼类性腺分化过程中,遗传因素起着决定性作用;在另外一些鱼类中,性别决定和性别分化则主要由环境因素决定,这些环境因素包括温度、pH、种群密度、光线、食物供应和外源激素等^[6-9].随着人类社会的发展,各种新合成的化合物层出不穷,鉴别化学物质是否是环境内分泌干扰物质(Endocrine Disrupting Chemicals, EDCs),对于生态环境的人类健康都具有重要意义.由于鱼类性腺分化的可塑性和多样性使得鱼类成为研究

收稿日期:2016-10-20;修回日期:2017-04-01.

基金项目:河南省重点科技攻关计划项目(172102110098;172102210048).

作者简介:王坡(1992-),男,河南驻马店人,河南师范大学在读硕士研究生,研究方向:分子细胞遗传.

通信作者:杜启艳,教授,硕士生导师,E-mail:041019@edu.htu.cn.

环境雌激素效应的最合适材料。

泥鳅(*Misgurnus anguillicaudatus*)是一种小型鱼类,属鱼纲、鲤形目、鳅科、泥鳅属,广泛分布于东亚的大部分地区,在稻田、池塘、河流及湖泊等水体都是极常见的鱼类,具有一定的经济价值。目前,随着现代农业的发展,在稻田中套养泥鳅成为一种广受欢迎的生态种养殖模式。室内条件下又极易饲养,常常作为水生生物试验材料使用^[10]。本研究以泥鳅为材料,通过检测阿特拉津对泥鳅的急性毒性和内分泌干扰效应,为生产实际中阿特拉津的科学使用提供科学的依据;同时对于理解阿特拉津对水生生物性腺发育作用的分子机制提供了一定的理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物与试剂

本实验所用泥鳅 300 尾,购自河南省新乡市农贸市场,挑选发育正常、体长 10.5~12.5 cm,体重 13~15 g/尾的个体,暂养在本实验室养殖基地,进行 7 d 的驯养。

mRNA 提取试剂盒、反转录试剂盒以及荧光定量试剂盒均购自 TaKaRa 宝生物工程(大连)有限公司。阿特拉津购自上海源叶生物科技有限公司。本实验所用的其他试剂均为分析纯或超级纯。

1.2 阿特拉津试验浓度的确定

参照毒理学的方法,在预试验的基础上找出阿特拉津使泥鳅在 96 h 内全部存活的最大染毒浓度和全部死亡的最低染毒浓度,确定试验浓度区间。正式试验按照等对数间距将阿特拉津的质量浓度分别设置为 17.00 mg/L、20.40 mg/L、24.48 mg/L、29.38 mg/L、35.25 mg/L 等 5 个试验组和 1 个空白对照组,每组均随机投放 10 尾健康泥鳅,每 24 h 更换 1 次等体积、等质量浓度的阿特拉津稀释液。观察记录泥鳅 24 h、48 h、72 h、96 h 的死亡数量以及中毒和死亡症状,及时清除死亡个体,实验重复 3 次。采用改进寇氏法(Karber)^[11-12]来计算阿特拉津对泥鳅的半致死浓度(LC_{50})。计算公式: $\lg LC_{50} = X_m - i(\sum P - 0.5)$,式中 X_m 为死亡组最大剂量的对数, i 为相邻组浓度对数之差, P 为各组的死亡率, $\sum P$ 为各组死亡率的总和。按 Turabell 公式计算安全浓度(SC)^[13]: $SC = LC_{50}(48\text{ h}) \times 0.3 / [LC_{50}(24\text{ h}) / LC_{50}(48\text{ h})]^2$ 。

1.3 阿特拉津对泥鳅性腺影响的组织学实验及性别分化相关基因表达分析

根据急性毒性试验所测的阿特拉津 LC_{50} 值,取其 LC_{50} 值的 1/1000、1/100、1/10 依次分别作为低、中、高 3 个浓度组,即阿特拉津(0.026 8 mg/L、0.268 mg/L、2.680 mg/L)3 个处理组。在配制实验用阿特拉津时,以丙酮作为助溶剂,同时设溶剂对照组和空白对照组。每个处理组投入泥鳅 20 尾,并设一平行。为了保证阿特拉津的浓度,每隔 2 d 更换全部的实验用水,在实验期间每日早晚喂食。在 0,7,14,21 d 分别从各处理组中取雄鱼和雌鱼的脑和性腺,做基因表达分析;取泥鳅的精巢和卵巢做组织学分析。

1.3.1 组织学观察 常规石蜡切片,解剖取出精巢和卵巢,用多聚甲醛在室温下固定 24 h,然后经过梯度浓度的乙醇脱水,二甲苯透明,石蜡包埋,进行常规石蜡切片,切片厚 6 μm ,HE 染色,在正置显微镜(O-LYMPUS)下观察并拍照记录。

1.3.2 性别分化相关基因表达分析 对每个处理阶段所取的样品提取总 RNA,利用分光光度计测定 RNA 的总浓度。取 1 μg 总 RNA,反转录合成 cDNA, -20 $^{\circ}\text{C}$ 保存。参照 Real-time PCR 的方法使用 LightCycler 96 进行实时定量 PCR 实验。基因特异性引物,参照之前我们实验室研究所得到的泥鳅基因序列和 Genebank 数据库已发表的泥鳅基因序列,利用 Primer6.0(表 1)设计特异性引物,具体引物序列见表 1。选择 β -actin 作为内参基因,之后进行荧光定量 PCR 并记录该基因的表达数据。最后采用相对定量 $2^{-\Delta\Delta C_T}$ 分析方法^[14]对所有实验数据进行分析。计算公式: mRNA 相对表达量 = $2^{-\Delta\Delta C_T} \Delta\Delta C_i = [C_i(\text{目的基因}) - C_i(\text{内参基因})]_{\text{实验组}} - [C_i(\text{目的基因}) - C_i(\text{内参基因})]_{\text{对照组}}$ 。

1.4 数据分析

利用 SPSS 16.0 软件对所有数据进行单因素方差分析(One-way ANOVA)和 Graphpad Prism 6.0 进行作图,用最小显著差数法(LSD)进行多重比较, $P < 0.05$ 为差异显著, $P < 0.01$ 为差异极显著。

表1 检测泥鳅转录表达水平 Real-time PCR 所用引物

基因名称	引物序列 Primer sequence (5'-3')	扩增片段长度/bp
<i>cyp19a</i>	Forward: GACAGCCAGCAACTACTACAAC	107
	Reverse: ACACATGATACACAGCAGAAGAC	
<i>sf1</i>	Forward: GGACTACTCCTACGATGAAG	183
	Reverse: CGCTGGGTCTTGTCTATCTGA	
<i>amh</i>	Forward: AGAGCAGTCAGAGCGGATG	171
	Reverse: GAGGATGGCGTGGTTGTTG	
β -actin	Forward: GGCATCACACCTTCTACAA	216
	Reverse: CATCACCAGAGTCCATCAC	

2 结果与分析

2.1 阿特拉津对泥鳅的急性毒性

阿特拉津对泥鳅的急性毒性试验结果列入表2。阿特拉津对泥鳅24 h、48 h、96 h的 LC_{50} 分别为31.60 mg/L、26.82 mg/L、18.98 mg/L, SC为5.8 mg/L。在试验过程中发现试验组泥鳅行为异常,急促游动,而在高浓度试验组中异常现象更为明显,经过一段时间之后泥鳅开始出现反应迟钝,身体不规则弯曲,平衡能力丧失,出现腹面上翻,身体僵直,最后死亡。同时由表2可以看出,在同一浓度组中,阿特拉津处理时间长时,泥鳅的死亡率较高;同一时间段内,高浓度组中泥鳅死亡率明显升高。因此,泥鳅的死亡率与阿特拉津的浓度呈明显的时间剂量效应关系。

表2 阿特拉津对泥鳅的急性毒性试验结果

浓度/(mg·L ⁻¹)	死亡率/%			
	24 h	48 h	72 h	96 h
0	0	0	0	0
17.00	0	20	30	50
20.40	10	30	50	70
24.48	20	30	70	80
29.38	30	50	80	90
35.25	50	70	100	100

2.2 阿特拉津处理泥鳅后的性腺组织形态学观察

在本研究中,处理7 d和14 d时,在泥鳅的卵巢和精巢组织中,未见明显的形态学变化。在处理21 d高浓度组中,雌性卵巢与对照组相比,观察到闭锁卵泡以及增多的初级卵母细胞(如图1(b)黑色箭头所示)。虽然组织学切片显示在所有雄性个体性腺中没有发现出现卵巢样特征,但是我们发现处理后的精巢与对照组相比,其小叶间间质的空隙逐渐增多(如图1(d)蓝色箭头所示),生精小管形状不规则并出现空腔(如图1(d)黄色箭头所示),支持细胞(如图1(c)和图1(d)红色箭头所示)和精子数量显著减少,精巢的功能出现损伤。

2.3 阿特拉津对 *sf1*, *cyp19a* 和 *amh* 基因 mRNA 表达的影响

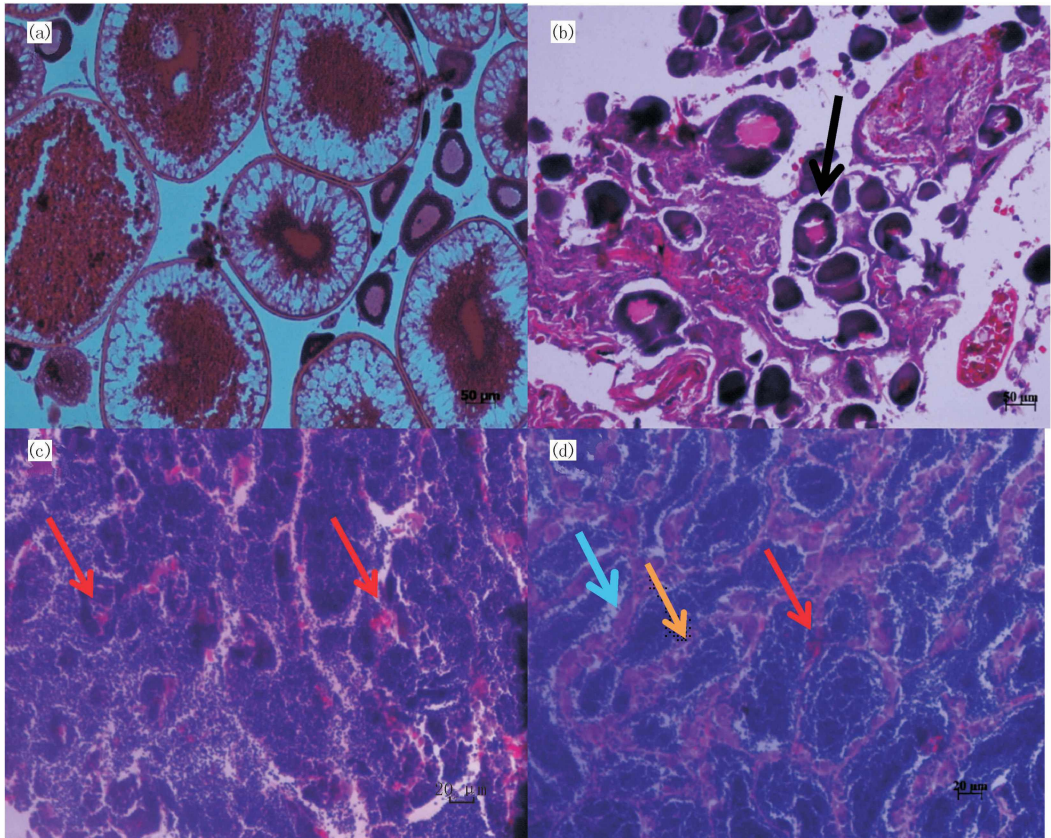
为了探讨阿特拉津对泥鳅性腺分化影响可能的分子机制,我们选择对性腺分化和发育关键基因 *sf1*、*cyp19a* 和 *amh* 等三个基因,检测了阿特拉津处理对它们表达的影响。

阿特拉津对 *sf1* mRNA 表达的影响如图2所示:在雄鱼脑中,*sf1* 的 mRNA 表达与对照组相比没有显著性改变,然而在精巢中,所有处理组 *sf1* 的表达均以浓度依赖性的方式增加并呈极显著差异。对于雌鱼,研究发现除了在处理7 d的脑中无显著性改变之外,在处理期间其余浓度组的脑和卵巢中 *sf1* 的 mRNA 表达均出现极显著上调。

阿特拉津对 *cyp19a* mRNA 表达的影响如图3所示:在脑中,无论雄性还是雌性 *cyp19a* 的表达均以浓度依赖性的方式显著上调。在精巢中,整个处理期间除了低浓度组(0.026 8 mg/L) *cyp19a* mRNA 的表达没

有出现显著改变外,其余各处理组 *cyp19a* mRNA 的表达均极显著上调.在卵巢中,除了低浓度组处理 7 d 时 *cyp19a* mRNA 的表达与对照组相比没有表现出显著性差异外,其余各处理组 *cyp19a* mRNA 的表达均升高,且具有极显著差异.

阿特拉津对 *amh* mRNA 表达的影响如图 4 所示:无论是在雄性还是雌性的脑中,与 *cyp19a* 的表达相反,*amh* 的表达在各个时间段和浓度组中与对照组相比均表现出极显著下调.在精巢中,除了在第 7 d 和低浓度组第 14 d 处理的时候没有表现出显著性差异外,第 14 d 中高浓度组(0.268 mg/L 和 2.68 mg/L)中 *amh* 的表达均表现出了显著性下降,第 21 d 所有浓度组中 *amh* 的表达都出现了极显著下调.*amh* 在卵巢中的表达与在精巢中有类似的表达模式,阿特拉津处理后各个浓度组均出现极显著下调.

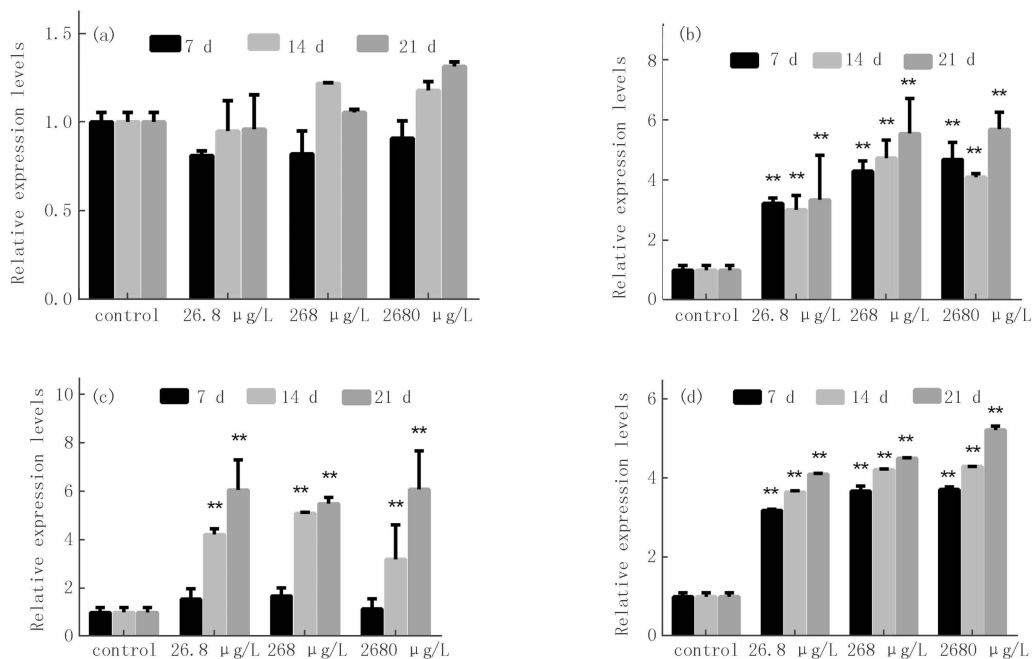


注:(a)对照组卵巢;(b)阿特拉津处理21 d时的卵巢,黑色箭头指示初级卵母细胞;(c)对照组精巢,红色箭头指示支持细胞;
(d)阿特拉津处理21 d时的精巢,蓝色箭头指示小叶间空隙,黄色箭头指示生精小管,红色箭头指示支持细胞.

图1 21 d 阿特拉津暴露下泥鳅对照组与处理组泥鳅的性腺组织学切片

3 讨论

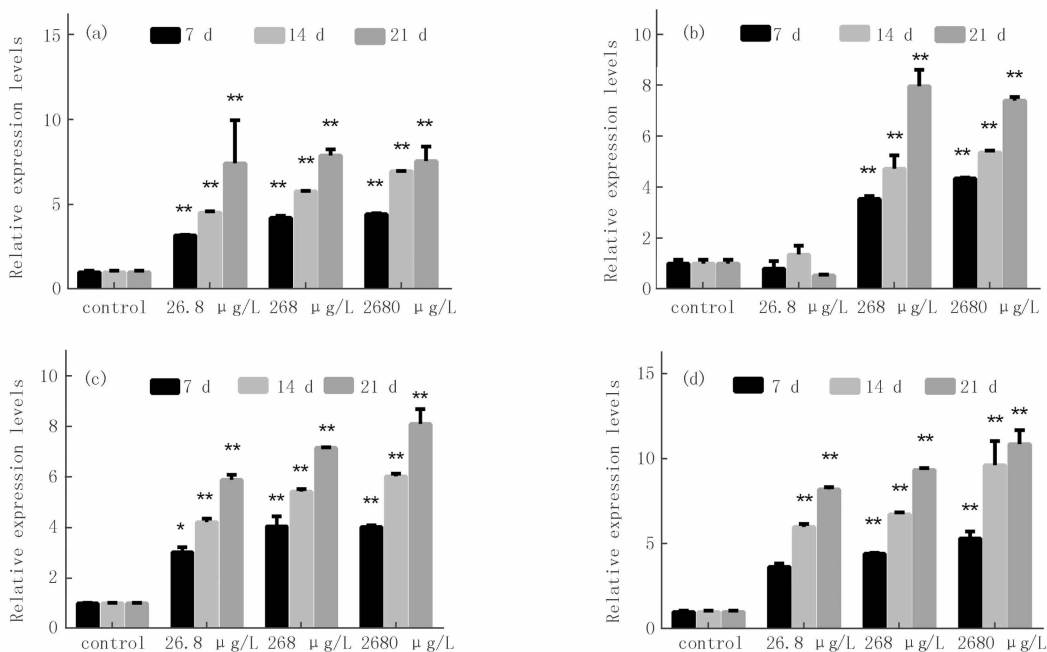
本研究以泥鳅为实验材料,首先检测了阿特拉津对泥鳅的急性毒性作用.根据中国《化学农药环境安全评价试验准则》^[15]的评价标准,当农药对鱼类 96 h 的 $LC_{50} > 10$ mg/L 时,说明该农药对鱼类属于低毒.由本试验结果可知,阿特拉津对泥鳅 96 h 的 LC_{50} 为 18.98 mg/L,说明阿特拉津对泥鳅为低毒.这与孟顺龙^[16]等对阿特拉津中鲫鱼的研究结果一致.急性毒性实验结果表明,随着阿特拉津浓度以及处理时间的增长,泥鳅的死亡率随之升高,但由于阿特拉津不易溶于水,其又属于低毒所以在野外环境中,可能对鱼类并不产生明显的急性毒性效应.这样,在低浓度阿特拉津存在的情况下,鱼类能够存活较长的时间,可能就会造成慢性的功能性损伤.邢厚娟^[17]发现阿特拉津及其代谢物可以在鲤鱼的肝脏中高度积累,而韩英等^[18]发现阿特拉津处理后鲤肝脏组织中阿特拉津残留量随着时间逐渐降低,在鲤鱼肝脏中无富集作用.两者的研究结果不同,可能是由于韩英处理鲤鱼的时间较长,由于处理时期的延长,鱼体自身产生了较强的适应性,肝脏的解毒能



注: (a) 雄性大脑; (b) 精巢; (c) 雌性大脑; (d) 卵巢。以 β -actin 作为内参, 对基因的表达水平进行标准化。基因表达水平表示为三个重复的平均值 \pm S.E. 星号表示暴露组与对照组之间具有显著性差异: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

图2 阿特拉津对泥鳅大脑和性腺中 *sfl* 表达的影响

力也大大的增强。不过两人的研究结果都说明了鱼类可以通过细胞色素 P450 酶系统将阿特拉津转化和降解, 而且细胞色素 P450 酶系统可以用作一个有效的指标检测有毒物质对水生生物的毒害^[17-18]。

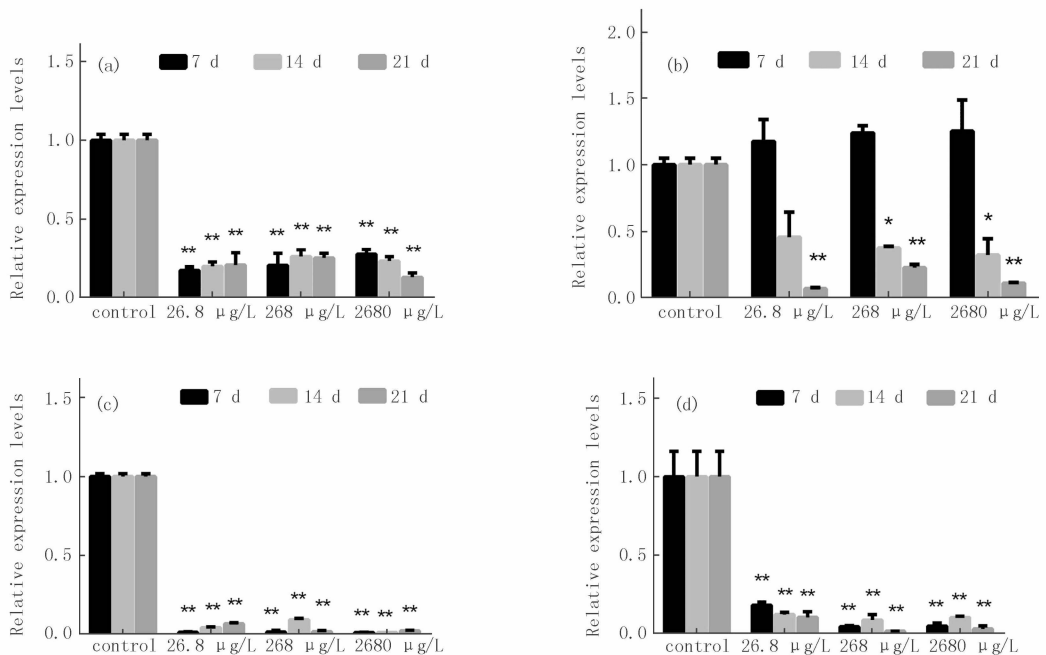


注: (a) 雄性大脑; (b) 精巢; (c) 雌性大脑; (d) 卵巢。以 β -actin 作为内参, 对基因的表达水平进行标准化。基因表达水平表示为三个重复的平均值 \pm S.E. 星号表示暴露组与对照组之间具有显著性差异: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

图3 阿特拉津对泥鳅大脑和性腺中 *cyp19a* 表达的影响

除了阿特拉津的毒性作用, 它还是一种环境雌激素类物质, 作为一种内分泌干扰物, 它可以影响动物的生殖发育^[19]。在本研究中我们用阿特拉津处理泥鳅 21 d, 组织学切片虽然没有发现雄性性腺出现雌性化特

征,但是我们发现阿特拉津处理后的精巢与对照组相比,其小叶间间质的空隙逐渐增多,支持细胞和精子显著减少,干扰其正常功能的发挥.在阿特拉津处理后的卵巢与对照相比,观察到初级卵母细胞数量的增多,说明在一定程度上促进了卵巢的发育.有研究表明用阿特拉津处理成年雄性非洲爪蟾发现阿特拉津抑制雄性交配行为,抑制睾酮和精子的产生,降低生殖能力,而且暴露组中有10%发育成为具有雌性性征和生殖功能的雌性个体^[20].在石首鱼中发现阿特拉津可以通过受体介导的机制,结合孕激素膜受体来抑制孕激素,调节卵细胞的成熟^[21].更有研究人员发现阿特拉津对雄性性腺的影响在整个脊椎动物亚门中几乎是一致的,用阿特拉津暴露的雄性硬骨鱼^[21],两栖动物^[20],爬行动物^[22]和哺乳动物^[23,24]的性腺都丧失部分或全部的雄性特征,包括睾丸形态减小,支持细胞数目减少,精子生成降低以及雄激素产生减少等,并向雌性化发育^[25].最近的一份研究提供的证据支持阿特拉津作为内分泌干扰物造成成年斑马鱼生殖功能障碍和引起相关的分子改变并且会造成它们的后代胚胎发育中形态发生变化^[26].不过对于哺乳动物有研究证明不论阿特拉津还是其代谢物在剂量水平上并不会对大鼠或者兔子的生殖以及胚胎造成显著性的影响^[27,28].



注: (a) 雄性大脑; (b) 精巢; (c) 雌性大脑; (d) 卵巢. 以 β -actin 作为内参, 对基因的表达水平进行标准化. 基因表达水平表示为三个重复的平均值 \pm S.E. 星号表示暴露组与对照组之间具有显著性差异: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

图4 阿特拉津对泥鳅大脑和性腺中 *Amh* 表达的影响

目前,尽管人们尚未完全揭示鱼类性腺分化的详细分子机制,但是已经确认了一些在此过程中起着十分重要作用的基因. *Cyp19a* 的主要作用是把雄烯二酮或睾酮转变为雌酮或雌二醇^[29]. *Cyp19a* 参与各种激素依赖性的调节过程包括性别分化、性行为、神经发育以及神经递质受体功能的调节等等对于鱼类的性别分化、卵巢发育和雌性性征的维持起十分重要的作用^[30]. 研究发现在一些人癌细胞系以及卵巢中,阿特拉津通过结合和抑制磷酸二酯酶来增加芳香化酶水平,导致 cAMP 水平升高,进而引起芳香化酶基因 *cyp19* 表达水平升高,最终使雌激素水平升高^[31,32]. *Sf1* 也被称为肾上腺 4 结合蛋白(Ad4BP),属于转录因子的核激素受体家族,其功能不仅包括调节类固醇激素合成酶基因和甾类羟化酶基因等的表达,还可调节肾上腺和性腺中许多基因的表达^[33]. 有研究表明在两栖动物脑组织中 *sf1* 能够调节 *cyp19a* 的表达^[34]. 此外,在许多物种中,在类固醇合成酶基因的启动子区域发现了可能的 *sf1* 结合位点,说明该基因也参与了内分泌的调节^[35,36]. 有研究发现作为 *sf1* 受体的配体,阿特拉津能够直接与 *sf1* 结合,诱导 *sf1* 依赖的芳香化酶启动子(ArPII)激活,增强芳香化酶基因的表达. *Amh* 也叫缪勒氏管抑制物,属于转化生长因子 β (TGF- β) 超家族,其主要生成位置包括原始睾丸的支持细胞和卵巢的颗粒细胞,调节卵泡的发育,与缪勒氏管退化有关^[37]. 在

amh 基因的调控序列上发现了 *sf1* 结合位点,因此 *sf1* 可以直接调控 *amh* 基因的表达,并控制雄性发育所需要的睾酮和 *amh* 的生成^[38,39]。正是由于这些基因具有不同的功能,以及与其他基因相互作用从而维持了机体内内分泌系统的稳定。

本实验研究发现用阿特拉津处理泥鳅后,雄性脑中 *sf1* 没有表现出显著改变,而在精巢以及雌性脑和卵巢中 *sf1* 水平均显著升高,推测其原因可能是泥鳅雄脑中 *sf1* 基因对阿特拉津并不敏感。*Cyp19a* 的表达水平除了在精巢中低浓度组中没有显著性改变之外,在中高浓度组中在精巢和卵巢中,其表达均显著升高,推测其原因可能是在精巢中 *cyp19a* 的表达本底水平就比较低,而低浓度组不足以诱导其水平的升高。不过总体实验结果说明了阿特拉津可以显著诱导泥鳅体内 *sf1* 和 *cyp19a* 的表达,进而增强芳香化酶的活性,使体内雌激素水平升高。在阿特拉津对牛蛙蝌蚪的研究中,发现 1 $\mu\text{g/L}$ 和 100 $\mu\text{g/L}$ 阿特拉津能够诱导其脑中 *cyp19* mRNA 的转录水平升高,而且在阿特拉津处理的个体中 *cyp19* 和 *sf1* 的表达呈现明显的正相关^[40]。对于 *amh* 基因,研究发现除了精巢中 7 d 处理的时候其表达没有表现出显著性差异外,其余各处理组无论雄性还是雌性其表达均极显著下调。虽然 *sf1* 能直接调控 *amh* 基因的转录,但 *sf1* 因子本身并不能激活 *amh* 基因的表达,这表明 *sf1* 因子只有与支持细胞特异性配体或是辅助分子相互作用才能发挥作用。有报道称,*sox9* 和 *sf1* 能够相互作用共同影响 *amh* 基因的表达^[41]。阿特拉津处理泥鳅后,泥鳅体内雌激素水平升高,抑制相关雄性基因的表达,这也就说明了尽管 *sf1* 的水平升高,但是并不能促进 *amh* 基因的表达。正是由于阿特拉津处理导致 *cyp19a* 和 *sf1* 基因的上调,*amh* 基因的下调,导致泥鳅体内雌激素水平升高,进而从分子水平上帮助我们了解组织学变化的机制即阿特拉津处理抑制泥鳅精巢精子的发生,促进卵巢细胞的发育。

近年来,国内外有许多关于阿特拉津对哺乳类动物肝脏毒性,类固醇激素合成和性腺发育的研究^[42],而对鱼类等低等生物的研究报道还不多,尤其是对鱼类生殖系统造成的影响更是鲜有报道。阿特拉津作为一种农药类环境雌激素物质,可以通过许多途径进入到水体环境中,这样对鱼类的生殖系统造成的影响是不能忽视的^[43]。而对于阿特拉津的内分泌干扰作用,以及作用于鱼类的分子机制目前仍不清楚。无论是作为农药产生的毒性作用,还是作为雌激素类物质产生的内分泌干扰作用,都需要进一步研究,以准确评估使用阿特拉津所带来的水生态环境风险。

参 考 文 献

- [1] 叶新强,鲁岩,张恒. 除草剂阿特拉津的使用与危害[J]. 环境科学与管理,2006,31(8):95-97.
- [2] 张家俊. 土壤中除草剂毒草胺的迁移行为和阿特拉津对水稻幼苗生物毒性的研究[D]. 南京:南京农业大学,2012.
- [3] Graymore M, Stagnitti F, Allinson G. Impacts of atrazine in aquatic ecosystems [J]. Environ Int, 2001,26(7):483-495.
- [4] 赛林霖. 环境雌激素西玛津和阿特拉津对青鳉鱼发育影响的分子毒理学研究[D]. 济南:山东师范大学,2006.
- [5] Sara E W, Jennifer L F. Atrazine exposure and reproductive dysfunction through the Hypothalamus-Pituitary-Gonadal (IIPG) axis[J]. Toxics, 2015,3(4):414-450.
- [6] Devlin R II, Nagahama Y. Sex determination and sex differentiation in fish; an overview of genetic, physiological, and environmental influences[J]. Aquaculture, 2002,208(3):191-364.
- [7] 王德寿,吴天利,张耀光. 鱼类性别决定及其机制的研究进展[J]. 西南师范大学学报(自然科学版),2000,25(3):296-304.
- [8] 夏晓华,张林霞,司松波,等. 高效氯氟菊酯对泥鳅的急性毒性及生理毒性[J]. 江苏农业科学,2013,41(6):270-272.
- [9] 南平,肖珍,陈建军,等. 敌敌畏农药的极性暴露对泥鳅的遗传毒性及生理影响[J]. 河南师范大学学报(自然科学版),2011,39(5):137-140.
- [10] 史改花,杜启艳,张晓亚,等. 大鳞副泥鳅性腺发生和分化的组织学研究[J]. 河南师范大学学报(自然科学版),2008,36(6):163-166.
- [11] 张毓琪,陈叙龙. 环境生物毒理学[M]. 天津:天津大学出版社,1993.
- [12] 惠秀娟. 环境毒理学[M]. 北京:化学工业出版社,2003.
- [13] Wang J S, Groopman J D. DNA damage by mycotoxins[J]. Mutat Res, 1999,424(1/2):167-181.
- [14] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ method[J]. Methods, 2001,25(4):402-408.
- [15] 国家环保局. 化学农药环境安全性评价试验准则[J]. 农药科学与管理,1990(2):1-5.
- [16] 孟顺龙. 除草剂阿特拉津对鲫鱼的毒性影响研究[D]. 南京:南京农业大学,2007.
- [17] 邢厚娟. 阿特拉津和毒死蜱单一及联合暴露对鲤鱼毒理作用的研究[D]. 黑龙江:东北农业大学,2010.

- [18] 韩英,郝其睿,魏菁,等. 毒死蜱和阿特拉津对鲤肝脏的影响[J]. 东北农业大学学报,2015,46(3):67-73.
- [19] Kathryn L G R, Turk R. Atrazine alters expression of reproductive and stress genes in the developing hypothalamus of the snapping turtle, *Chelydra serpentina* [J]. Toxicology, 2016, 366/367: 1-9
- [20] Tyrone B II, Vicky K, Anne N, et al. Atrazine induces complete feminization and chemical castration in male African clawed frogs (*Xenopus laevis*) [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010, 107(10): 4612-4617.
- [21] Peter T, Jennifer S. Interference by atrazine and bisphenol-A with progesterin binding to the ovarian progesterin membrane receptor and induction of oocyte maturation in Atlantic croaker [J]. Mar Environ Res, 2008, 66(1): 1-2.
- [22] Rey F, González M, Zayas M, et al. Prenatal exposure to pesticides disrupts testicular histoarchitecture and alters testosterone levels in male Caiman latirostris [J]. Gen Comp Endocrinol, 2009, 162 (3): 286-292.
- [23] Victor-Costa A B, Bandeira S M C, Oliveira A G, et al. Changes in testicular morphology and steroidogenesis in adult rats exposed to atrazine [J]. Reprod Toxicol, 2010, 29 (3): 323-331.
- [24] Camila M L, Ivana S C, Gabriela R S, et al. Effects of atrazine on growth and sex differentiation, in juveniles of the freshwater crayfish *Cherax quadricarinatus* [J]. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2016, 131: 96-103.
- [25] Tyrone B II, Lloyd L A, Val R B, et al. Demasculinization and feminization of male gonads by atrazine: Consistent effects across vertebrate classes [J]. J Steroid Biochem Mol Biol, 2011, 127 (1/2): 64-73.
- [26] Sara E W, Gregory J W, Maria S S, et al. An embryonic atrazine exposure results in reproductive dysfunction in adult zebrafish and morphological alterations in their offspring [J]. Sci Rep, 2016, 6(1): 21337.
- [27] Anthony R S, John M D, Charles B. Developmental Toxicity Studies with Atrazine and its major metabolites in rats and rabbits [J]. Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol, 2014, 101(3): 199-214.
- [28] John M D, Anthony R S, Tacey E K W, et al. Multigeneration reproduction and male developmental toxicity studies on atrazine in rats [J]. Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol, 2014, 101(3): 237-253.
- [29] Guiguen Y, Fostier A, Piferrer F, et al. Ovarian aromatase and estrogens: A pivotal role for gonadal sex differentiation and sex change in fish [J]. Gen Comp Endocrinol, 2010, 165(3): 352-366.
- [30] Piferrer F, Blazquez M. Aromatase distribution and regulation in fish [J]. Fish Physiol Biochem, 2005, 31(2/3): 215-226.
- [31] Sanderson J T, Boerma J, Lansbergen G W A, et al. Induction and inhibition of aromatase (*Cyp19*) activity by various classes of pesticides in H295R human adrenocortical carcinoma cells [J]. Toxicol Appl Pharmacol, 2002, 182(1): 44-54.
- [32] Roberge M, Iakki II, Larsen G. Atrazine is a competitive inhibitor of phosphodiesterase but does not affect the estrogen receptor [J]. Toxicol Lett, 2004, 154(1/2): 61-68.
- [33] Hammer G D, Ingraham II A. Steroidogenic factor-1: its role in endocrine organ development and differentiation [J]. Front Neuroendocrinol, 1999, 20(3): 199-223.
- [34] Kuntz S, Chesnel A, Flament S, et al. Cerebral and gonadal aromatase expressions are differently affected during sex differentiation of *Pleurodeles waltl* [J]. J Mol Endocrinol, 2004, 33(3): 717-727.
- [35] Tanaka M, Fukada S, Matsuyama M, et al. Structure and promoter analysis of the Cytochrome-P-450 aromatase gene of the teleost fish Medaka (*Oryzias Latipes*) [J]. J Biochem, 1995, 117(4): 719-725.
- [36] Sugawara T, Kiriakidou M, McAllister J M, et al. Regulation of expression of the steroidogenic acute regulatory protein (StAR) gene: a central role for steroidogenic factor 1 [J]. Steroids, 1997, 62(1): 5-9.
- [37] Visser J A, Durlinger A L, Peters I J, et al. Increased Oocyte Degeneration and Follicular Atresia during the Estrous Cycle in Anti-Müllerian Hormone Null Mice [J]. 2007, 148(5): 2301-2308
- [38] Fan W Q, Toshihiko Y, Hidetaka M, et al. Atrazine-induced aromatase expression is sf-1 dependent: implications for endocrine disruption in wildlife and reproductive cancers in humans [J]. Environ Health Perspect, 2007, 115(5): 720-727.
- [39] Sawyer S J, Gerstner K A, Callard G V. Real-time PCR analysis of cytochrome P450 aromatase expression in zebrafish: gene specific tissue distribution, sex differences, developmental programming, and estrogen regulation [J]. Gen Comp Endocrinol, 2006, 147(2): 108-117.
- [40] Mark P G, Nik V, Rachel C S, et al. Effect of low dose exposure to the herbicide atrazine and its metabolite on cytochrome P450 aromatase and steroidogenic factor-1 mRNA levels in the brain of premetamorphic bullfrog tadpoles (*Rana catesbeiana*) [J]. Aquat Toxicol, 2011, 102 (1/2): 31-38.
- [41] DeSanta B P, Bonneaud N, Boizet B, et al. Direct interaction of SRY-related protein Sox9 and steroidogenic factor 1 regulates transcription of the human anti-Müllerian hormone gene [J]. Mol Cell Biol, 1998, 18(11): 6653-6665.
- [42] Sara E W, Jennifer L F. Atrazine exposure elicits copy number alterations in the zebrafish genome [J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology, 2017, 194: 1-8.
- [43] Sara E W, Gregory J W, Maria S S, et al. Developmental origins of neurotransmitter and transcriptome alterations in adult female zebrafish exposed to atrazine during embryogenesis [J]. Toxicology, 2015, 333(3): 156-167

Effects of Atrazine on Sex Differentiation and Expression Pattern of Related Genes in Loach

Wang Po, Wang Fang, Zhang Ruihua, Liang Tingting, Chang Zhongjie, Du Qiyang

(College of Life Sciences, Henan Normal University, Xinxiang 453007, China)

Abstract: We used loach as experimental materials to confirm the acute toxicity of atrazine firstly. In order to correctly estimate the environmental toxicity of atrazine and the effects on aquatic organisms reproductive development, we explored the long-term treatment effects of atrazine on gonad shape and sex differentiation related gene expression by histology and real-time quantitative PCR (qRT-PCR). On the basis of acute toxicity experiment, the experimental results showed that: 24 h, 48 h and 96 h LC₅₀ of atrazine were 31.60 mg/L, 26.82 mg/L and 18.98 mg/L, respectively and the safety concentration (SC) was 5.8 mg/L. With the increase of concentration of atrazine and the extension of exposure time, the mortality rates of loach significantly increased. We found that loach was exposed to high concentration of atrazine (2.68 mg/L) for 21 d could inhibit the occurrence of spermatogenesis and promote the development of ovarian cells by histological experiments. At the same time, the results of qRT-PCR showed that: different doses of atrazine (2.68 mg/L, 0.268 mg/L, 0.0268 mg/L) could significantly promote the expression of cytochrome P450 aromatase gene (*cyp19a*), steroidogenic factor (*sfl*) in comparison with the control group, and had a significant inhibitory effect on Anti-Müllerian hormone (*amh*). In conclusion, atrazine had obvious acute toxic effects on loach and also had function of exogenous estrogen to inhibit a male sex key gene *amh* and promote the expression of ovarian marker gene *cyp19a*. Therefore, atrazine had significant exogenous estrogen effect produced on loach. It affected the production of germ cells by disturbing the expression of steroidogenic genes. It also interfered with the expression of upstream genes in sex differentiation by some unknown mechanism, which can affect the differentiation of gonad.

Keywords: atrazine; loach; acute toxicity; *cyp19a*; *sfl*; *amh*

[责任编辑 王凤产]

(上接第 108 页)

- [12] 张磊,林娅,王京,等. 新型噻唑并[3,2-*a*]噻啉衍生物的合成及其抗肿瘤活性[J]. 有机化学, 2015, 35: 497-504.
- [13] 杨金凤,陶晶,李炳奇. 芳基吡唑啉及其双杂环化合物的合成与抗菌活性[J]. 合成化学, 2009, 17(2): 151-154.
- [14] 谭成侠,沈德龙,王成,等. 含 1*H*-吡唑和咪唑的新型双杂环化合物的合成与生物活性[J]. 合成化学, 2005, 13(4): 372-374.
- [15] XU Guangfang, SONG Baoan, Bhadury, P S, et al, Synthesis and antifungal activity of novel S-substituted 6-fluoro-4-alkyl(aryl) thioquinazoline derivatives[J]. Bioorg Med Chem, 2007, 15(11): 3768-3774.
- [16] 武现丽,朱春风,吕志丹,等. 含 1,3,4-恶二唑和 1,3,4-噻二唑的硫醚类化合物的合成[J]. 有机化学, 2011, 31(6): 824-831.
- [17] 安悦,周光华,邢永恒,等. 5-苯基-1*H*-3-吡唑酮化合物的合成及其结构表征[J]. 应用化学, 2008, 25(5): 539-542.

Synthesis and Fluorescent Properties of 2-alkylthio-5-[5-phenyl-1*H*-pyrazole-3-yl]-1,3,4-oxadiazole Derivatives

Wang Zhiling, Li Yong

(College of Chemistry and Environment, Henan Institute of Education, Zhengzhou 450046, China)

Abstract: Based on the starting material 5-phenyl-1*H*-pyrazole-3-carbohydrazide by cyclization and thioetherification five novel 2-alkylthio-5-(5-phenyl-1*H*-pyrazole-3-yl)-1,3,4-oxadiazole derivatives were synthesized. Their structures were characterized by IR and ¹H NMR. Its UV absorption spectrum and fluorescent properties were investigated. The results indicates these compounds have good fluorescent properties, and the maximum emission wavelength is in 344-347 nm range.

Keywords: pyrazole; 1,3,4-oxadiazole; synthesis; spectrum properties

[责任编辑 王凤产]