

## 17 $\alpha$ -甲基睾酮对食蚊鱼形态雄性化及目标基因表达的影响

范俊杰<sup>1</sup>, 徐少群<sup>1</sup>, 方展强<sup>1\*</sup>, 温茹淑<sup>2</sup>

(1. 华南师范大学生命科学学院, 广东省高等学校生态与环境科学重点实验室, 广东 广州 510631;

2. 嘉应学院生命科学学院, 广东 梅州 514015)

**摘要:** 为研究 17 $\alpha$ -甲基睾酮(17 $\alpha$ -methyltestosteron, MT)对生长发育期间的雌性食蚊鱼形态雄性化及目标基因表达的影响,并探讨臀鳍雄激素受体基因(*AR $\alpha$* ) mRNA 表达水平作为监测养殖水体雄激素类污染物的有效生物学标记的可行性,使用浸浴法以 0.5、5、50 和 500 nmol/L 4 个 MT 浓度为雌性食蚊鱼幼鱼染毒,设置对照组和平行组,暴露实验持续 21 d,定量测定了幼鱼体长(BL)、体质量(BW)、身体健康指数(CF)以及臀鳍第 3 鳍条长度(FL)、分节数(FJ)和最宽处宽度(FW);*AR $\alpha$*  mRNA 的表达水平。结果显示:与对照组相比,雌性幼鱼暴露 21 d 后 BL、CF 均没有显著变化,只有高浓度组(50 和 500 nmol/L)食蚊鱼的 BW 有显著下降( $P < 0.05$ );雌性幼鱼臀鳍第 3 鳍条 FJ 显著增加,FL 随之延长,并且 FW 也出现显著增宽( $P < 0.05$ );雌性幼鱼暴露于 MT 21 d 之后,*AR $\alpha$*  mRNA 表达水平呈现与剂量相关的上升( $P < 0.05$ )。MT 的雄激素效应明显,导致雌鱼在生长发育过程中出现形态雄性化;*AR $\alpha$*  基因 mRNA 表达水平可作为监测养殖水体雄激素类污染物有效的生物标记。

**关键词:** 食蚊鱼; 17 $\alpha$ -甲基睾酮; *AR $\alpha$*  基因; 形态雄性化; 雌性幼鱼

**中图分类号:** Q 786; S 917.4

**文献标志码:** A

如今,生活在造纸废水排污口下游水域的食蚊鱼出现了高比率的雄性化个体,这表明造纸废水排出的水体中含有雄激素活性的物质<sup>[1-4]</sup>。但是,造纸厂废水流入的水体不是唯一含有这些雄激素活性物质的地方,在城市污水水体中也检测出这些化合物。对北京的 7 个污水处理厂水体研究表明,在所有进厂水中雄激素类物质占有激素类物质的比例高达 96%,而在出厂水体中,雄激素类物质占有激素类物质的比例仍能达到 60%,其次是孕激素类达 24% 和雌激素类达 16%<sup>[5]</sup>。

雄激素类物质(天然与合成)是一类典型的内分泌干扰物<sup>[6-7]</sup>。环境雄激素主要包括天然雄激素与合成雄激素。天然雄激素包括睾酮(testosterone)以及其衍生物雄酮(androsterone)、雄烯二酮(androstenedione)等。环境雄激素干扰水生生物正常的内分泌系统,引起某些水生生物雄

性比例偏高、雌鱼出现雄性第二性征、生长卵精巢、卵黄蛋白原的诱导受抑制、生殖能力下降<sup>[8-10]</sup>,还会引起哺乳动物出现雄性化特征<sup>[11-13]</sup>,雄激素类物质在环境介质间的迁移扩大了环境雄激素的污染范围,将可能对生态环境构成严重威胁。因此,开展环境雄激素类物质对水生动物的生态毒理方面的研究十分必要。

17 $\alpha$ -甲基睾酮(17 $\alpha$ -methyltestosteron, MT),又名甲基睾丸素或甲基睾丸酮,是一种人工合成的白色或乳白色的结晶性粉末状的雄性激素,作为激素的替代品,它能促进雄性性器官发育成熟和第二性征的形成和维持。早在 20 世纪 70 年代,许多学者就开始对 MT 进行深入研究,已经证明,不同浓度的 MT 对不同鱼类有不同的生物学效应<sup>[14]</sup>。低浓度 MT 可促进鱼类生长,然而高浓度 MT 则导致鱼类的畸形和死亡<sup>[15]</sup>。近年关

收稿日期:2012-06-17 修回日期:2012-09-23

资助项目:广东省科技计划项目(2009B030600006);国家科技支撑计划项目(2009BADB2B0401-02)

通信作者:方展强,E-mail:fangzhang@scau.edu.cn

于该化合物内分泌干扰效应的研究结果还发现, MT 能改变鱼类的性别, 导致雌鱼雄性化<sup>[16]</sup>。

食蚊鱼 (*Gambusia affinis*) 原产于北美洲, 属 鲤 形 目 (Cyprinodontiformes), 胎 鲤 科 (Poeciliidae), 食蚊鱼属 (*Gambusia*)。食蚊鱼两性性状明显, 雄鱼具有的“交配足”由臀鳍特化形成, 在与雌鱼交配时由其将精子输入雌鱼体内, 受精卵在体内发育成仔鱼产出, 为卵胎生鱼类。食蚊鱼的入侵性非常强, 其体形小、食性杂、繁殖周期短, 产仔量大, 对其所在的生态系统具有关键的生物效应<sup>[17]</sup>。食蚊鱼已经广泛分布在华南地区淡水水域, 其对温度和盐度的变化有较强的适应能力, 由于容易捕捞和实验室驯养, 目前已被广泛用于生物指示实验动物<sup>[18]</sup>。

本研究根据实验室建立的鱼类实验动物和环境内分泌干扰物的慢性毒性检测方法, 模拟自然环境, 对人工合成的化学物质 17 $\alpha$ -甲基睾酮进行内分泌效应和慢性毒性生物测试, 及其对鱼类形态雄性化转变的影响。通过人工诱导的方式, 在实验室条件下, 将性未成熟的雌鱼幼体暴露在含有 17 $\alpha$ -甲基睾酮的水体中, 测量和记录其在生长发育过程中臀鳍形态学发生的变化、臀鳍鳍条雄激素受体基因 AR $\alpha$  mRNA 表达水平, 在组织形态学水平和分子水平上选择适当的生物标志物, 积累基础性实验数据, 探讨食蚊鱼第二性征变化作为监测水环境雄激素物质污染的有效生物学标记的可能性。

## 1 材料与方法

### 1.1 化学试剂

**暴露试剂** 17 $\alpha$ -甲基睾酮 (MT) 购自 Dr. Ehtentorfer 公司。由于其在水中的溶解度极低, 因此需要用高纯度的二甲基亚砜 (dimethyl sulfoxide, DMSO 99.8%, sigma) 配制成保存液。DMSO 在本实验中用作对照, 先前的预实验已证明其对实验结果没有明显的影响。

**分子试剂** RNAiso Plus (TaKaRa, Dalian, China), Dnase (RQ1 Rnase-Free DNase, Promega, Madison, WI, USA), TaKaRa First Strand cDNA Synthesis Kit (TaKaRa, Dalian, China), SYBR Premix Ex Taq Kit (TaKaRa, Dalian, China)。

### 1.2 实验用鱼

食蚊鱼幼鱼于 2011 年 5 月采自广州市华南师范大学石牌校区水塘, 该水塘已被检测证明没

有受雌、雄激素类物质污染。食蚊鱼幼鱼在水族箱驯养一周。雄性食蚊鱼通常在产出后 40 d 接近性成熟, 雌性个体在产出后 45 ~ 50 d 达到性成熟<sup>[19]</sup>。雄鱼平均体长 35 mm, 具有生殖鳍 (交配足), 鳍上具钩的为性成熟个体, 不具钩的为性未成熟的个体 (雄性幼鱼)。雌鱼个体较大, 体长 35 ~ 60 mm, 不具生殖鳍结构, 具有胎斑的为性成熟的怀孕个体, 不具胎斑的为雌性幼体。本实验选取已发生性别分化的雌性幼鱼作为实验动物。食蚊鱼产出 18 d 后可以区分出雌、雄个体, 将挑选出的雌性幼鱼投放在实验鱼缸中, 7 d 适应期稳定后使每个实验鱼缸保持 25 尾实验鱼。实验鱼随机从实验鱼缸中取出, 最终每个浓度组鱼缸投入 50 尾。

### 1.3 实验设计

设置 0.5、5、50 和 500 nmol/L MT 实验组和空白对照组, 另设 DMSO (0.01%, V/V) 控制组, 所有实验都设一个平行组。将实验鱼 (产出后大约 25 d) 分别投入容积为 10 L 的大鱼缸中进行暴露实验, 采用静水更新的实验模式。因为激素容易降解, 实验药液每天更换一次, 以保持稳定。实验期间, 食蚊鱼生活在经过曝气的自来水, 水温维持在 (25  $\pm$  2)  $^{\circ}$ C, 光周期为 14 h: 10 h 昼夜。每天喂食 2 次, 分别在 10:00 和 16:00, 所用鱼饵购自广州花鸟鱼市场, 经过检测已被证明未含雌、雄激素类物质<sup>[20]</sup>。暴露时间持续 21 d。

### 1.4 制样方法

实验结束, 捞取实验鱼进行麻醉处理。分别测定其标准体长 (BL, mm) 和体质量 (BW, mg),

身体健康指数按以下公式计算:  $CF(\%) = \frac{BW}{BL} \times 100$ 。

用于做臀鳍 AR $\alpha$  mRNA 表达的个体其臀鳍条部位需要先拍照, 以便统计臀鳍条的长度 (FL)、分节数 (FJ)、最宽处宽度 (FW) 等指标。实验鱼骨骼标本制作用 1% KOH 进行处理。每浓度组捞取 6 条实验鱼进行分子生物学实验, 使用剪刀剪断头部脊柱的方法处理。实验鱼臀鳍被迅速取出装入冷冻管 (Axygen, Inc., Silicon Valley, USA) 中, 立即投入液氮罐, 最后放入 -80  $^{\circ}$ C 的超低温冰箱之中以备使用。

### 1.5 RNA 提取和反转录

**引物设计** 登陆 NCBI 网站, 找到食蚊鱼的 AR $\alpha$  cDNA 的序列, 利用 Primer 3 软件 (<http://frodo.-wi.mit.edu/>), 由生物工程 (上海) 公司合

成所需要的引物。本研究相关基因扩增引物名称及其序列见表1。

表1 用于分离食蚊鱼 *AR $\alpha$*  部分 cDNA 片段以及相关表达量的 DNA 引物序列

Tab.1 DNA sequences of primers used to isolate *AR $\alpha$*  partial cDNA fragments and quantify their relative expression in *G. affinis*

基因 gene	引物序列 primer sequence
AB295655	F 5'-CAACTCTGGTGCCTTTCTTCT-3'
<i>AR<math>\alpha</math></i>	R 5'-ATGTAAGTACGAGCAGGCAGCGAAG-3'
AB182330	F 5'-CGTGACCCATATCGGTTCAAG-3'
<i><math>\beta</math>-actin</i>	R 5'-AGATGAACTGTCCGGTGTGGA-3'

**RNA 制备** 将臀鳍条研磨成粉末,加入约 1 mL 的 Isoplus RNA (RNAiso Plus) 提取液 (TaKaRa) 进行总 RNA 提取。RNA 提取后进行基因组 DNA 的去除,并检测 RNA 浓度及其完整性,保证  $A_{260}/A_{280}$  的比值在 1.8 ~ 2.1 (TaKaRa)。

**RNA 反转录成 cDNA** 本实验使用 TaKaRa Code:DRR037 PrimeScript™ RT reagents Kit (Perfect Real Time) 产品。RT 反应液配置如下:5  $\times$  PrimeScript Buffer (2  $\mu$ L), PrimeScript RT Enzyme Mix I (0.5  $\mu$ L), Random 6 mers (100  $\mu$ mol/L) (0.5  $\mu$ L), Oligo dT Primer (50  $\mu$ mol/L) (0.5  $\mu$ L), Total RNA (1  $\mu$ L), RNase Free dH<sub>2</sub>O (5.5  $\mu$ L), Total (10  $\mu$ L)。反转录反应条件如下:37  $^{\circ}$ C 15 min (cDNA 合成), 85  $^{\circ}$ C 5 s (酶失活)。

### 1.6 实时荧光定量

本实验使用 TaKaRa Code:DRR081A SYBR® Premix Ex Taq™ II (Perfect Real Time) 产品。PCR 反应液配置如下:SYBR® Premix Ex Taq™ II (2  $\times$ ) 10.0  $\mu$ L, PCR Forward Primer (10  $\mu$ mol/L) 0.8  $\mu$ L, PCR Reverse Primer (10  $\mu$ mol/L) 0.8  $\mu$ L, ROX References Dye (50  $\times$ ) or ROX References Dye II (50  $\times$ ) 0.4  $\mu$ L, cDNA 模板 2.0  $\mu$ L, dH<sub>2</sub>O (灭菌

水) 6.0  $\mu$ L, Total 20.0  $\mu$ L。按照两步法 PCR 扩增标准程序进行 RT PCR 反应。

RT PCR 扩增结果数据的处理采用相对定量法,内参基因选用  *$\beta$ -actin*。通过标准曲线对对照样品、待测样品的目的基因及管家基因进行定量,然后根据计算公式求得相对值即为相对表达量。

校正值 = 目的基因定量结果 / 管家基因定量结果

相对值 = 待测样品的校正值 / 对照样品的校正值

$$F = 2^{-\left(\frac{\text{待测组目的基因}}{\text{平均}C_t\text{值}} - \frac{\text{待测组管家基因}}{\text{平均}C_t\text{值}}\right) - \left(\frac{\text{对照组目的基因}}{\text{平均}C_t\text{值}} - \frac{\text{对照组管家基因}}{\text{平均}C_t\text{值}}\right)}$$

$$\text{即倍数 (Folds)} = 2^{-\Delta\Delta C_t} = 2^{-[(C_{tA} - C_{tA \text{ actin}}) - (C_{tB} - C_{tB \text{ actin}})]}$$

式中,A 为溶剂对照组样品,B 为各实验组样品; $C_t$  值为阈值循环数。

### 1.7 数据处理和统计分析

所有的数据以平均值  $\pm$  标准差 (mean  $\pm$  SD) 的形式表示。体长 (BL) 和体质量 (BW);臀鳍第 3 鳍条长度 (FL)、分节数 (FJ) 和最宽处宽度 (FW);*AR $\alpha$*  mRNA 的表达水平使用方差分析来检验,而身体健康指数 (CF) 使用协方差分析。所有的统计检验都使用 SPSS 17.0 软件进行。

## 2 结果

### 2.1 17 $\alpha$ -MT 暴露对食蚊鱼体长、体质量、身体健康指数的影响

对照组鱼的体长 (BL)、体质量 (BW) 和身体健康指数 (CF) 数据分别是 (20.46  $\pm$  1.44) mm, (79.5  $\pm$  17.2) mg 和 (7.98%  $\pm$  1.43%)。除了 50、500 nmol/L 浓度组食蚊鱼的体质量和对照组相比时表现出明显的下降 ( $P < 0.05$ ) 以外,雄激素甲基睾酮 (MT) 暴露的实验组和对照组之间在体长和身体健康指数相比较时都没有表现出显著的差异 (表 2)。

表2 17 $\alpha$ -甲基睾酮 (MT) 暴露 21 d 后对雌性食蚊鱼体长 (BL)、体质量 (BW)、健康指数 (CF) 的影响  
Tab.2 The effects of 17 $\alpha$ -methyltestosterone (MT) on the body length (BL), body weight (BW) and physical health index (CF) in female *G. affinis* after exposed for 21 d

17 $\alpha$ -甲基睾酮浓度 / (nmol/L) MT concentration	总样本数 (死亡数) total samples (dead)	体长 / mm BL	体质量 / mg BW	身体健康指数 / % CF
对照组 control	50 (2)	20.46 $\pm$ 1.44	79.5 $\pm$ 17.2	7.98 $\pm$ 1.43
0.5	50 (5)	20.66 $\pm$ 1.78	74.2 $\pm$ 21.3	7.32 $\pm$ 1.56
5	50 (4)	20.50 $\pm$ 0.86	72.9 $\pm$ 11.4	7.38 $\pm$ 1.09
50	50 (8)	19.68 $\pm$ 2.20	68.49 $\pm$ 16.2 *	7.36 $\pm$ 1.36
500	50 (6)	19.31 $\pm$ 1.29	67.1 $\pm$ 11.2 *	7.17 $\pm$ 0.89

Notes: \*  $P < 0.05$ .

## 2.2 MT 暴露对臀鳍第 3 鳍条长度、分节数、最宽处宽度的影响

雌性幼体食蚊鱼暴露于 MT 21 d 之后,臀鳍第 3 鳍条长度呈现出与剂量相关的增加趋势。与空白对照组相比,最低浓度组(0.5 nmol/L)增加的差异显著( $P < 0.05$ ),而其他浓度组(5、50 和 500 nmol/L)显著( $P < 0.01$ )上升(图 1)。表明 MT 对雌鱼形态雄性化的诱导作用明显。

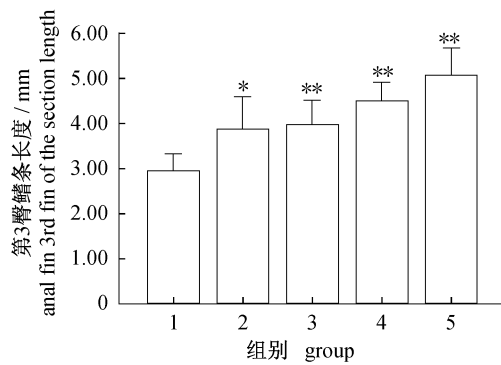


图 1 17 $\alpha$ -甲基睾酮暴露 21 d 后对雌性食蚊鱼臀鳍第 3 鳍条长度 (FL) 的影响

1. 空白对照组; 2. 0.5 nmol/L MT 暴露组; 3. 5 nmol/L MT 暴露组; 4. 50 nmol/L MT 暴露组; 5. 500 nmol/L MT 暴露组; \* 表示与空白对照组相比差异显著( $P < 0.05$ ); \*\* 表示与空白对照组相比差异极显著( $P < 0.01$ ),下同。

Fig. 1 The effects of 17 $\alpha$ -methyltestosterone (MT) on the anal fin 3rd fin of the section length (FL) in female *G. affinis* after exposed for 21 days

1. control group; 2. 0.5 nmol/L MT exposure group; 3. 5 nmol/L MT exposure group; 4. 50 nmol/L MT exposure group; 5. 500 nmol/L MT exposure group; \* indicates significantly different ( $P < 0.05$ ); \*\* indicates very significantly different ( $P < 0.01$ ).

雌性幼体食蚊鱼暴露于 MT 21 d 之后,臀鳍第 3 鳍条的分节数呈现出与剂量相关的增加趋势十分明显(图 2)。与空白对照组相比,各浓度组实验鱼第 3 鳍条的分节数的增加极显著( $P < 0.01$ )。此外,空白对照组和 DMSO 对照组之间不存在差异(图 3)。

雌性幼体食蚊鱼暴露于 MT 21 d 之后,臀鳍第 3 鳍条最宽处宽度呈现与剂量相关的上升趋势。与空白对照组相比,最低浓度组(0.5 nmol/L)没有引起明显差异,而 5 nmol/L 和 50 nmol/L 浓度组其宽度增加显著( $P < 0.05$ ),而高浓度组(500 nmol/L)其宽度增加差异极显著( $P < 0.01$ ) (图 3)。

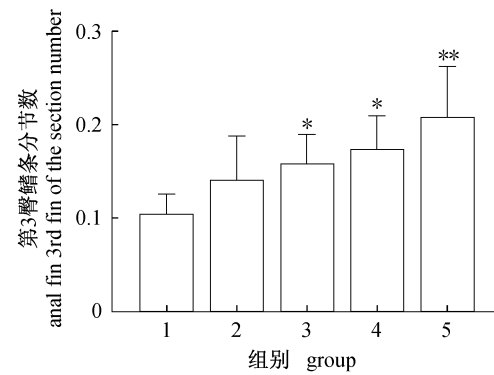


图 2 17 $\alpha$ -甲基睾酮暴露 21 d 后对雌性食蚊鱼臀鳍第 3 鳍条分节数 (FJ) 的影响

Fig. 2 The effects of 17 $\alpha$ -methyltestosterone (MT) on the anal fin 3rd fin of the section number (FJ) in female *G. affinis* after exposed for 21 d

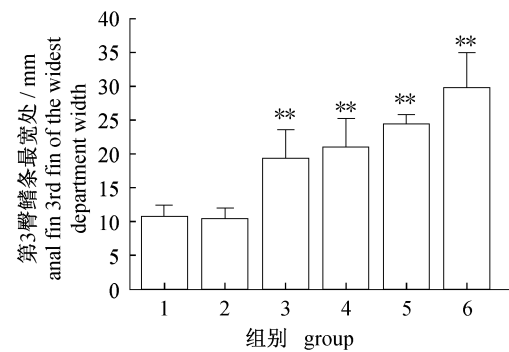


图 3 17 $\alpha$ -甲基睾酮暴露 21 d 后对雌性食蚊鱼臀鳍第 3 鳍条最宽处宽度 (FW) 的影响

Fig. 3 The effects of 17 $\alpha$ -methyltestosterone (MT) on the anal fin 3rd fin of the widest department width (FW) in female *G. affinis* after exposed for 21 d

## 2.3 MT 暴露对食蚊鱼臀鳍 AR $\alpha$ mRNA 表达的影响

雌性幼体食蚊鱼暴露于 MT 21 d 之后,位于臀鳍条的雄激素受体 AR $\alpha$  mRNA 表达水平都呈现出与剂量相关的上升。各浓度组与空白对照组相比差异极显著( $P < 0.01$ ) (图 4),其中最高浓度组(500 nmol/L) mRNA 表达水平是对照组的 3.2 倍。

## 3 讨论

本研究采用静态更新水的方式,暴露时间持续 21 d。雌性食蚊鱼幼体经强雄激素 (MT) 处理 21 d 后与对照组相比,其生长发育过程中其体长 (BL) 和身体健康指数 (CF) 没有出现明显的差异,但高浓度组 (50 和 500 nmol/L) 暴露其体质量

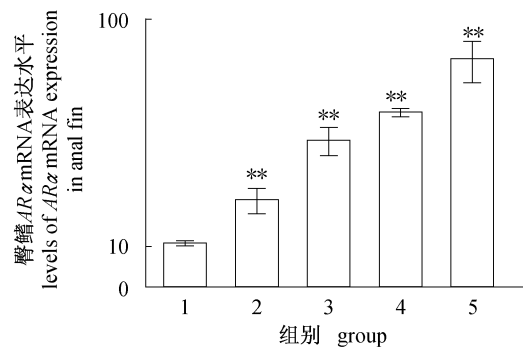


图 4 17 $\alpha$ -甲基睾酮暴露 21 d 后雌性食蚊鱼臀鳍 AR $\alpha$  mRNA 表达水平

Fig. 4 The effects of 17 $\alpha$ -methyltestosterone (MT) on the levels of AR $\alpha$  mRNA expression in female *G. affinis* after exposed for 21 d

(BW) 显示明显地下降。一般来说, 雄性食蚊鱼体长较雌鱼小, 为 14 ~ 27.5 mm, 雌鱼体长 16 ~ 45 mm。本研究结果显示, 虽然暴露组体长与对照组相比无明显差异 ( $P > 0.05$ ), 但体质量则显著下降, 表明雌鱼出现形态雄性化现象而导致其体质量的下降。

食蚊鱼的臀鳍条在室内、外的研究中被用于评价其个体形态雄性化的一项重要指标, 其中鳍条分节数发生的变动被用来作为标志去验证是否发生雄性化转变。通常雌性和雄性食蚊鱼的臀鳍都是由 10 条鳍条组成, 每条鳍条都分成若干节<sup>[21]</sup>。雄性个体通过使用由臀鳍高度分化形成的“交配足”(或被称为“生殖足”)给雌性食蚊鱼输送精子。一些研究已经证明, 生殖足的形成和发育是由雄鱼体内雄激素决定的, 但是幼鱼和性成熟雌鱼个体如果暴露于外源雄激素类物质时也会诱导出类似的生殖足<sup>[21-24]</sup>。此外, 雌鱼的臀鳍条分节数比雄性的少, 但是当雌鱼暴露于雄激素物质时, 它的臀鳍条长度将增加, 同时分节数也将增加, 并且其臀鳍条的最宽处宽度也会增加<sup>[21]</sup>。因此, 利用食蚊鱼臀鳍条的长度、分节数、最宽处宽度作为指示雄激素特性的生物标志物十分敏感和实用。本研究结果表明, 雌性食蚊鱼幼体在受 MT 处理 21 d 之后, 在生长发育过程中臀鳍条的长度出现显著增长, 分节数呈现出剂量相关的增加, 最宽处宽度也出现显著增宽, 表明 MT 能导致雌鱼形态雄性化, 是一种强雄激素物质。

食蚊鱼臀鳍鳍条体内 AR $\alpha$  和 AR $\beta$  两个雄激素受体基因已经被克隆并作了描述, 臀鳍的不同

区域雄激素受体基因的表达在臀鳍的形成过程中发挥着重要作用<sup>[24]</sup>。雄性食蚊鱼体内受到雄激素作用, 臀鳍中 AR $\alpha$  基因的表达, 促使臀鳍发育形成生殖足的结构; 同时臀鳍鳍条长度、分节数和最宽处宽度的增加也是依赖 AR $\alpha$  mRNA 表达水平的上升, 本研究的结果与其相一致, 证明这些形态雄性化特征的表现都是依赖于 AR $\alpha$  mRNA 表达水平的上升。已经有研究表明, 在食蚊鱼臀鳍中 AR $\alpha$  mRNA 的表达水平是 AR $\beta$  的 5 倍<sup>[24]</sup>, 因此在本研究中选择检测 AR $\alpha$  mRNA 的表达量来评价 MT 的雄激素生物效应, 其效果十分明显。雌性食蚊鱼的 AR $\alpha$  mRNA 表达水平明显地被雄激素 (MT) 所诱导并上调, 表明在鱼体内雄激素与雄激素受体原件结合, 进而发挥雄激素的作用<sup>[24]</sup>。通过对 AR $\alpha$  mRNA 表达水平的分子检测, 发现 AR $\alpha$  mRNA 表达水平呈与剂量相关的上升趋势。由此推断, AR $\alpha$  基因 mRNA 表达水平可作为监测养殖水体雄激素类污染物理理想的生物标记。

#### 参考文献:

- [1] Bortone S A, Davis W P. Fish intersexuality as indicator of environmental stress [J]. Bioscience, 1994, 44(3): 165 - 172.
- [2] Bortone S A, Cody R P. Morphological masculinization in Poeciliid females from a paper mill effluent receiving tributary of the St. Johns River, Florida, USA [J]. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, 1999, 63(2): 150 - 156.
- [3] Parks L G, Lambright C S, Orlando E F, et al. Masculinization of female mosquitofish in kraft mill effluent contaminated Fenholloway river water is associated with androgen receptor agonist activity [J]. Toxicological Sciences, 2001, 62(2): 257 - 267.
- [4] Leusch F D L, Chapman H F, Kay G W, et al. Anal fin morphology and gonadal histopathology in mosquitofish (*Gambusia holbrooki*) exposed to treated municipal sewage effluent [J]. Archives of Environmental Contamination and Toxicology, 2006, 50(4): 562 - 574.
- [5] Chang H, Wan Y, Wu S, et al. Occurrence of androgens and progestogens in wastewater treatment plants and receiving river waters: Comparison to estrogens [J]. Water Research, 2011, 45(2):

- 732 – 740.
- [ 6 ] Lee L S, Carmosini N, Sasman S A, *et al.* Agricultural contributions of antimicrobials and hormones on soils and water quality[J]. *Advance in Agronomy*, 2007, 93: 2 – 67.
- [ 7 ] Zheng W, Yates S R, Bradford S A. Analysis of steroid hormones in a typical dairy waste disposal system[J]. *Environmental Science and Technology*, 2008, 42(2): 530 – 535.
- [ 8 ] Soto A M, Calabro J M, Prechtl N V, *et al.* Sonnenschein androgenic and estrogenic activity in water bodies receiving cattle feedlot effluent in eastern Nebraska, USA [ J ]. *Environmental Health Perspectives*, 2004, 112(3): 346 – 352.
- [ 9 ] Orlando E F, Kolok A S, Binzick G A, *et al.* Endocrine-disrupting effects of cattlefeedlot effluent on an aquatic sentinel species, the fathead minnow [ J ]. *Environmental Health Perspectives*, 2004, 112(3): 353 – 358.
- [ 10 ] Orn S, Svenson A, Viktor T, *et al.* Male-biased sex ratios and vitellogenin induction in Zebrafish exposed to effluent water from a *Swedish pulpmill* [ J ]. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 2006, 51: 445 – 451.
- [ 11 ] Hotchkiss A K, Furr J, Makynen E A, *et al.* In utero exposure to the environmental androgen trenbolone masculinizes female Sprague-Dawley rats [ J ]. *Toxicology Letters*, 2007, 174: 31 – 41.
- [ 12 ] Hotchkiss A K, Lambright C S, Ostby J S, *et al.* Prenatal testosterone exposure permanently masculinizes anogenital distance, nipple development, and reproductive tract morphology in female Sprague-Dawley rats [ J ]. *Toxicological Sciences*, 2007, 96(2): 335 – 345.
- [ 13 ] Hotchkiss A K, Ostby J S, Vandenberg J G, *et al.* Androgens and environmental antiandrogens affect reproductive development and play behavior in the Sprague-Dawley Rat [ J ]. *Environmental Health Perspectives*, 2002, 110(3): 435 – 439.
- [ 14 ] Angus R A, Blanchard P, Howell W M, *et al.* A short-term *in vivo* screening system for endocrine disrupters using mosquitofish (*Gambusia affinis* and *G. holbrooki*) [ M ]. US Environmental Protection Agency, National Center for Environmental Research, Grant R826130, 1997.
- [ 15 ] 张利红, 张为民, 林浩然. 雄烯二酮和甲基睾酮对日本鳊血清睾酮和 17 $\beta$ -雌二醇含量的影响[J]. *水产学报*, 2001, 25(2): 107 – 111.
- [ 16 ] 高书堂, 刘垭, 邓青. 食蚊鱼的饲养、生长、生殖情况概述[J]. *淡水渔业*, 1995, 25(6): 17 – 19.
- [ 17 ] Pan J H, Zhong L, Zheng C Y. The freshwater fishes of Guangzhou, Guangdong Province [ M ]. Guangzhou: Guang Dong Science and Technology Press, 1991: 326 – 327.
- [ 18 ] Tolar J F, Mehollin A R, Watson R D, *et al.* Mosquitofish (*Gambusia affinis*) vitellogenin: identification, purification, and immunoassay [ J ]. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C: Toxicology & Pharmacology*, 2001, 128(2): 237 – 245.
- [ 19 ] 潘炯华, 苏炳之, 郑文彪. 食蚊鱼的生物学特性及其灭蚊利用的展望[J]. *华南师范学报: 自然科学版*, 1980, 12(1): 118 – 138.
- [ 20 ] 梁岳. 利用鱼类卵黄蛋白原基因作为生物标志物建立环境雌激素效应评价方法[D]. 广州: 华南师范大学, 2011.
- [ 21 ] Orlando E F, Bass D E, Caltabiano L M, *et al.* Altered development and reproduction in mosquitofish exposed to pulp and paper mill effluent in the Fenholloway River, Florida, USA [ J ]. *Aquatic Toxicology*, 2007, 84: 399 – 405.
- [ 22 ] Turner C L. A quantitative study of the effects of different concentrations of ethynyl testosterone and methyl testosterone in the production of gonopodia in females of *Gambusia affinis* [ J ]. *Physiological Zoology*, 1942, 15: 263 – 280.
- [ 23 ] Rosa-Molinar E, Proskocil B J, Hendricks S E, *et al.* A mechanism for anterior transposition of the anal fin and its appendicular support in the western mosquitofish, *Gambusia affinis affinis* (Baird and Girard, 1854) [ J ]. *Acta Anatomica*, 1998, 163: 75 – 91.
- [ 24 ] Sone K, Hinago M, Itamoto M, *et al.* Effects of an androgenic growth promoter 17 $\beta$ -trenbolone on masculinization of mosquitofish (*Gambusia affinis*) [ J ]. *General and Comparative Endocrinology*, 2005, 143: 151 – 160.

## Target gene expression and morphological masculinization in mosquitofish (*Gambusia affinis*) exposed to 17 $\alpha$ -methyltestosterone

FAN Junjie<sup>1</sup>, XU Shaoqun<sup>1</sup>, FANG Zhanqiang<sup>1\*</sup>, WEN Rushu<sup>2</sup>

(1. Key Laboratory of Ecology and Environmental Science in Guangdong Higher Education,

College of Life Science, South China Normal University, Guangzhou 510631, China;

2. College of Life Sciences, Jiaying University, Meizhou 514015, China)

**Abstract:** The effects of 17 $\alpha$ -methyltestosterone (MT) on target gene expression and morphological masculinization in female mosquitofish (*Gambusia affinis*) during the growth and development is studied in order to test if the level of AR $\alpha$  mRNA expression in mosquitofish can be considered a valid biomarker for aquaculture androgen POPs. With juvenile female mosquitofish exposed to MT with 0.5, 5, 50 and 500 nmol/L for 21 d, the body length (BL), body weight (BW), body health index (CF), and the anal fin 3rd fin section length (FL), the section number (FJ), and the most wide department width (FW), as well as the level of AR $\alpha$  mRNA and VTG $\alpha$  mRNA expression were quantitatively determined by morphology and *in vitro* methods, and set the control group and the parallel groups. The results showed that the BL and CF in female juvenile exposed to different concentrations of MT for 21 d were not significantly different, only the BW in fish exposed to 50 and 500 nmol/L of high-dose groups was significantly decreased ( $P < 0.05$ ) when compared with the control group; the FJ in 3rd fin of anal fin showed a significant increase, FL was along with extending and FW also showed a significant increase in width ( $P < 0.05$ ); Female juveniles were exposed to different concentrations of MT after 21 d, AR $\alpha$  mRNA expression level was displayed dose-related increase significantly ( $P < 0.05$ ). The results indicated that the androgenic effects of MT was very significant, resulting in the morphological masculinization in female mosquitofish during the growth and development process; AR $\alpha$  mRNA expression levels could be used as the ideal biomarkers for monitoring the aquaculture water androgen pollutants.

**Key words:** *Gambusia affinis*; 17 $\alpha$ -methyltestosterone; AR $\alpha$  gene; morphological masculinization; female juveniles

**Corresponding author:** FANG Zhanqiang. E-mail: fangzhq@scnu.edu.cn