

稀有 鲫生命早期的己烯雌酚暴露对生长发育与繁殖的影响

钟雪萍 徐 盈 梁 勇 廖 涛 王剑伟

(中国科学院水生生物研究所, 淡水生态与生物技术国家重点实验室, 武汉 430072)

摘要:研究了己烯雌酚(DES)对稀有 鲫(*Gobiocypris rarus*)生命早期暴露的影响。经 10Lg/L 和 100Lg/L 己烯雌酚暴露 26d 后, 稀有 鲫死亡率升高, 生长发育迟缓, 鱼体内卵黄蛋白原(VTG)的诱导明显。经过一段时间清水养殖后, 暴露组中雌鱼比例增加, 雌雄鱼生长较对照组有显著变化。雌鱼性腺发育及产卵量与对照组相比虽无显著差异, 但暴露组成鱼所繁育后代与对照组相比受精率、孵化率显著下降, 死亡率、畸形率明显上升。这些结果说明己烯雌酚生命早期暴露影响稀有 鲫的生长发育及生殖, 稀有 鲫生命早期暴露实验可以用于评价水生生态系统中内分泌干扰物的生态影响。

关键词: 稀有 鲫; 己烯雌酚; 生命早期; 内分泌干扰物

中图分类号: Q176 **文献标识码:** A **文章编码:** 1002-3207(2005)06-0662-06

环境雌激素是指环境中存在的、能通过模仿天然荷尔蒙的作用而干扰人类或野生动物内分泌系统诸环节并导致异常效应的物质。环境雌激素的种类较多, 包括有机氯农药、表面活性剂、增塑剂及一些人工合成雌激素等。随着环境污染的加剧, 这些物质从相应的生产过程不断释放, 通过饮食、接触等途径进入生物体内, 对人类的健康及生物的生存产生巨大影响。近年来, 人们认为许多现象的发生均与环境雌激素有关, 例如: 人类隐睾症与尿道下裂等疾病发病率提高, 男性平均精子数量减少, 女性不孕明显上升, 水生动物出现雌性化现象, 及某些鸟类出现行为反常和生育能力丧失^[1,2]。鉴于环境雌激素深远的负面效应, 有关环境雌激素的污染监控及其生态环境安全评价已成为当今环境科学研究的前沿和热点。

己烯雌酚(DES)是一种医用人工雌激素, 早期被用于治疗流产、前列腺癌等疾病, 后来由于与阴道癌、子宫癌和乳腺癌等的发生有关而在许多国家被禁止使用。但是, 在国内一些地区的淡水养殖中 DES 仍被用作生长促进剂, 并且在生活污水中该化合物可被检出。因此, DES 的污染监控及生态环境安全评价研究具有重要意义。

稀有 鲫(*Gobiocypris rarus*)是中国特有的一种小型鲤科鱼类, 具有生命力强、饲养简便、性成熟快、

周年产卵等优点^[5]。目前, 已有研究表明他是一种敏感的实验动物^[6,7]。因此, 本文选择 DES 作为模型化合物, 以稀有 鲫作为受试动物, 利用鱼类生殖生长的相关指标以及卵黄蛋白原、甲状腺激素等生物标志物, 研究环境雌激素生命早期暴露对水生生物生命各时期和后代的影响, 同时也为稀有 鲫成为筛选和评价内分泌干扰物的活体实验模型提供一些实验依据。

1 材料和方法

1.1 实验动物 稀有 鲫的繁育在实验室内进行, 鱼卵孵出后 8h 开始暴露。实验温度控制在 24-26℃。光暗比 14h: 10h。

1.2 仪器及药品 日本 HITACHIA CF215R 冷冻高速离心机; 美国安捷伦公司 HP8453 分光光度计; 美国 Tecan 酶标仪; 美国 ABBOTTAXSYM SYSTEM PLUS 全自动免疫发光仪。DES 和 17 β -乙炔基雌二醇(EE₂)购于 Sigma 公司。DEAE2Sephrose CL26B 购于 Pharmacia 公司。辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG 购于华美公司。

1.3 暴露实验 DES(溶解于乙醇)设置 2 个浓度: 10 和 100Lg/L, 对照组仅加入乙醇(终浓度 < 0.01%)。试验容器采用 500mL 玻璃缸。鱼卵收集后即分为 3 组, 每组 3 个平行, 每个平行 100 颗卵。

收稿日期: 2004-02-20; 修订日期: 2005-06-20

基金项目: 国家自然科学基金(302270174); 科技部 973 项目(NO. 2003CB 415005)资助

作者简介: 钟雪萍(1973), 女, 河南信阳人, 博士研究生, 研究方向为水生生态毒理学

通讯作者: 徐盈, E-mail: xuying@ihb.ac.cn

试验溶液每天更换一次。暴露 26d 各取 10- 20 尾鱼测量体长、体重, 并于- 80 e 保存, 用于测定鱼体总甲状腺素(TT₄)和卵黄蛋白原(VTG)含量。其余的鱼转入自动循环缸, 清水饲养5个月 after 取 15 尾测其体长、体重及 VTG 含量。从对照组和 100Lg/L 暴露组随机取 4 尾雄鱼与 4 尾雌鱼配对, 观察每对鱼的产卵情况, 从第一次产卵开始, 收集 10d 内所产卵, 孵化, 计算受精率和孵化率及 F₁ 代幼鱼的存活率和畸形率。

114 鲤卵黄蛋白原的诱导及分离纯化 实验鱼轻度麻醉后, 按 1mg/kg 体重的剂量将溶于豆油中的 EE₂ 注入鱼的腹腔。诱导 7210d 后, 用注射器从鱼的尾脊柱处穿刺取血。血液在 4e 条件下静置 2h, 于 4e 离心 15 min(8, 500r/ min), 取上清, 通过 DEAE2 Sepharose CL26B 阴离子交换液相层析柱技术来分离和纯化卵黄蛋白原^[8]。

115 鲤卵黄蛋白原多克隆抗体的制备 称取 1 mg 卵黄蛋白原冻干粉, 溶于 1mL 蒸馏水中, 加入 1mL 弗氏完全佐剂, 乳化后于新西兰大白兔背部皮内多点注射, 进行初次免疫。在 28、42、56d 加强免疫一次, 免疫剂量和免疫方式同前, 但采用弗氏不完全佐剂乳化抗原溶液。65d 后, 从兔耳缘静脉抽取少量血液测量抗体滴度。如果抗体效价较低, 可再加强免疫一次; 如果抗体效价高, 则从兔颈动脉放血, 制备卵黄蛋白原抗血清。

116 卵黄蛋白原的测定 将鱼解冻后, 加入 2mL 预冷的磷酸盐缓冲液(PBS, pH7.5), 于冰浴下匀浆。匀浆液 4 e 离心 15 min (10, 000 r/ min), 采用间接 ELISA 测定上清液中 VTG 含量^[9]。ELISA 具体操作步骤如下: 用鲤的 VTG 作标准蛋白, 用鲤 VTG 抗体作为第一抗体。在 96 孔酶标板中加入 PBS 稀释的

稀有 鲫整体匀浆液, VTG 标准样品、阴性标准品及试剂空白样品(100LL/well), 4 e 包被过夜。次日加入封闭液(360LL/well), 4 e 封闭孵育过夜。用洗涤液洗板后加入稀释液稀释的鲤 VTG 抗体(100LL/well), 32 e 孵育 1 h。弃去酶标板中 VTG 抗体, 洗涤液洗板后加入稀释液稀释的酶标记羊抗兔 IgG 抗体(100LL/well), 32 e 孵育 1h。弃去酶标记羊抗兔 IgG 抗体, 洗涤液洗板后加入显色底物(100LL/well), 室温暗处反应 10- 30 min, 待标准品呈现明显黄色后, 加入 50LL 反应终止液, 终止反应。用酶标仪在 490nm 处检测样品的吸光度, 根据样品的吸收强度通过标准曲线计算 VTG 浓度。

117 TT₄ 的测定 采用化学发光免疫技术测定鱼体 TT₄ 含量^[10]。

118 组织学观察 Bouin's 固定液中固定鱼性腺, 按常规方法包埋、切片、染色后在显微镜下观察。

119 数据的统计分析 用 Student's ttest 对数据进行统计分析, P < 0.05 定义为对照组和暴露组之间差异显著。

2 结 果

2.1 暴露阶段

用稀有 鲫受精未 24h 的卵进行实验, 所得孵化率、死亡率结果见表 1。从表 1 可知, 稀有 鲫卵的孵化率不受 DES 暴露影响, 但稀有 鲫幼鱼的存活率则随 DES 浓度的升高显著下降。在暴露 26d 后, 幼鱼的生长明显受到抑制, 10Lg/L 和 100Lg/L 暴露组幼鱼体长、体重显著下降, TT₄ 水平显著升高。采用间接 ELISA 测定各组鱼体 VTG 含量, 结果发现经 DES 暴露 26d 后, 10Lg/L 和 100Lg/L 暴露组幼鱼体内 VTG 均有明显诱导(图 1)。

表 1 己烯雌酚生命早期暴露对稀有 鲫孵化、存活及仔鱼生长的影响
Tab.1 Effects of DES exposure in early life stage on hatching rate, survival and growth of rare minnow after 26 days exposure

参数 Parameters	DES 浓度 Concentration		
	Control	10Lg/L	100Lg/L
孵化率 ^a Hatching rate (%)	85. 67? 8. 01	93. 30? 31. 82	821. 00? 01. 47
存活率 ^a Survival (%)	821. 22? 81. 22	641. 84? 71. 90*	371. 92? 13. 42*
体长 ^a Body length (cm)	7. 98? 0. 30	5. 73? 0. 46*	6. 72? 1. 23*
体重 ^a Body weight (mg)	3. 17? 0. 55	1. 07? 0. 28*	2. 25? 1. 07*
TT ₄ (ng/L)	12. 09	54. 92	20. 56

^aValues are means? SD. * P< 0. 05

2.2 生长阶段

在清水养殖期间, 各组死亡鱼数均较少。在清水养殖 5 个月 after, 性腺的形态学观察及组织切片观

察发现, 在 10Lg/L 和 100Lg/L 暴露组中雌鱼比例较对照组明显增加, 暴露组雌雄鱼的生长发生明显变化, 100Lg/L 暴露组雄鱼体长、体重显著下降, 而雌

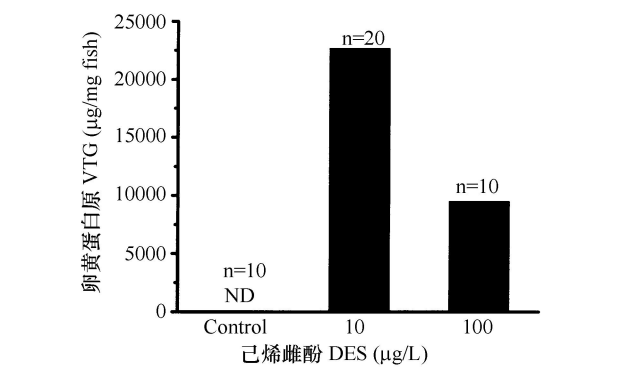


图1 DES 早期暴露对稀有 鲫幼鱼体内卵黄蛋白原含量的影响

Fig.1 Effects of DES exposure in early life stage on VTG levels of rare minnow larvae from control group and DESexposed groups

鱼体长、体重显著升高(表2)。采用间接 ELISA 测定各组肝脏 VTG 含量,结果发现除 10Lg/L 暴露组雌鱼外,各暴露组肝脏 VTG 含量与对照相比无明显

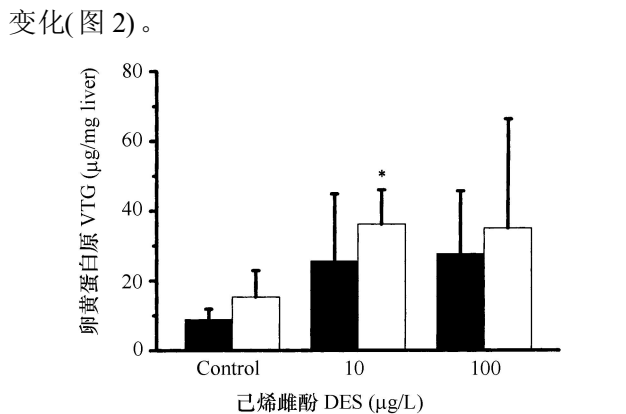


图2 DES 早期暴露对稀有 鲫成鱼体内卵黄蛋白原含量的影响

Fig.2 Effects of DES exposure in early life stage on VTG levels of adult rare minnows from control group and DESexposed groups. u , Male; t , Female. Values are means? SD. The asterisks denote significant difference from the control at P< 0.05

表2 己烯雌酚生命早期暴露对稀有 鲫成鱼生长、性腺指数和性比的影响

Tab. 2 Effects of DES exposure in early life stage on growth, GSI and sex ratio of adult rare minnow after a five-month culture in DESfree water

参数 Parameters		浓度 Concentration		
		Control	DES 10Lg/ L	DES 100Lg/ L
雄鱼 Male	体长 ^a Body length(cm)	4.76? 0.09	4148? 1101	4136? 0116*
	体重 ^a Body weight(mg)	1.31? 0.11	1.25? 0.85	0.98? 0.18*
	性腺指数 ^a GSI(%)	6.38? 3.2	4.96? 2.5	6.18? 1.52
	体长 ^a Body length(cm)	4.41? 0.24	4.14? 0.63	5.08? 0.23*
	体重 ^a Body weight(mg)	1.13? 0.17	0.96? 0.55	1.71? 0.28*
雌鱼 Female	性腺指数 ^a GSI(%)	12.66? 5.49	10.49? 1.32	11.21? 0.11
	体长 ^a Body length(cm)	4.41? 0.24	4.14? 0.63	5.08? 0.23*
	体重 ^a Body weight(mg)	1.13? 0.17	0.96? 0.55	1.71? 0.28*
性比 Sex ratio	雄雌 ^a Male:female	46B54	31B69	33B67

^aValues are means? SD(n= 15). * P< 0.05

213 生殖阶段

从对照组和 100Lg/L 暴露组中各取 4 尾雄鱼和 4 尾雌鱼配对,从第一次产卵开始,收集 10d 内所产的卵。每对鱼每天所产卵数及每对鱼每批所产卵数见图3。从图中可知暴露组的产卵量与对照组相比没有明显差异。对照组和暴露组卵的受精率、孵化率、存活率及形态学变化结果见图3。从图中可知暴露组较对照组卵的受精率和孵化率明显降低,幼鱼的死亡率和畸形率明显升高。进一步研究表明,DES 早期暴露使 F₁ 代雌鱼比例明显增加,雌鱼体长、体重显著下降。

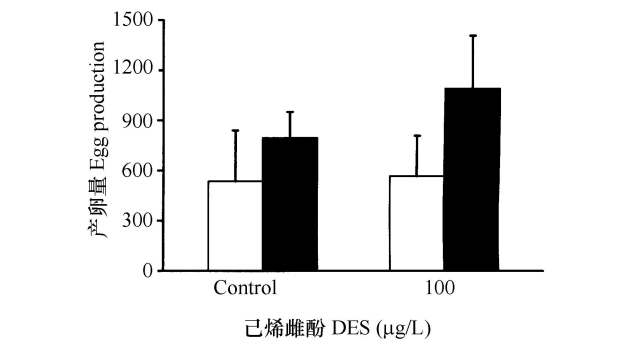


图3 己烯雌酚生命早期暴露对稀有 鲫产卵量的影响

Fig.3 Effects of DES exposure in early life stage on egg production of rare minnow. u , eggs per batch; t , eggs per female. Values are means? SD

3 讨论

内分泌系统的作用是调控人和动物的生长、发育、生殖及其行为。内分泌系统分泌的激素通过体液传递信息,调节蛋白质、糖和脂肪以及水盐代谢,促进细胞分裂和分化,促进生殖器官发育和成熟,影响中枢神经和植物性神经系统的发育和活动。生命早期是生物体生长发育的敏感阶段,在此阶段易受到内分泌干扰物的干扰(即使是轻微的干扰),引起生物体内分泌系统紊乱,进而对生物体产生严重影响^[11]。目前,已有相关文献报道了外源化合物生命早期暴露对生物体产生的多种影响。

本研究表明 DES 生命早期暴露可明显抑制稀有鲫幼鱼生长,并使其死亡率显著上升。这与国际上的相关报道非常一致。Lange 等研究发现 EE₂ 暴露使胖头 (*Pimphales promelas*) 幼鱼生长明显受到抑制,死亡明显增加^[12]。同样, EE₂, 2,2',4,4'-tetrachlorodiphenylphenol, Octylphenol 暴露也引起青 (*Oryzias latipes*) 的死亡,并导致生长迟缓^[13,14]。在本实验中幼鱼死亡发生在孵化 7d 以后,且死亡率随暴露时间的延长以较高速率增加,而稀有鲫体内 VTG 含量在 DES 暴露 26d 后显著增加。由于在幼鱼阶段进行 VTG 合成会消耗大量能量,并由此对肝、肾等器官产生损害,因此 VTG 合成可能是引起幼鱼死亡和生长迟缓的一个重要原因^[14,15]。

有研究表明类雌激素可干扰那些调节鱼类生长的荷尔蒙的作用。虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*) 幼鱼经 E₂ 暴露后体内三碘甲状腺氨酸(T₃)、甲状腺素(T₄)水平降低^[16]。胖头 经甲氧氯(Methoxychlor)和甲基睾酮(Methyltestosterone)暴露后雌二醇(E₂)和睾酮(T)的分泌紊乱^[17]。在本实验中,稀有鲫经过 DES 暴露 26d 后幼鱼体内 TT₄ 水平上升,稀有鲫生命早期暴露引起雌鱼生长促进,雄鱼生长抑制,以及肝脏内 VTG 含量变化,均可能与稀有鲫体内激素分泌紊乱相关。

鱼在孵化数星期后开始性别分化,而性激素在性别分化和发育过程中起重要作用。已有研究表明,高浓度雌激素生命早期暴露于可导致鱼雌性化,并使性腺发育受损^[18,19]。青 和鲤(*Cyprinus carpio*) 的生殖细胞即使在性腺分化以后仍然具有双向性,成熟雄鱼暴露于高浓度雌激素仍可出现雌性化^[20,21]。因此,鱼类性腺发育的可塑性使其对内分泌干扰物更加敏感。在本实验中,两个暴露组稀有鲫雌鱼的数量分别提高了 13% 和 15%。这说明

DES 生命早期暴露同样也影响稀有鲫的性别分化。另外,暴露组雌鱼的产卵量以及雌雄鱼的性腺发育较对照组虽然无显著变化,但暴露组 F₁ 代孵化率、受精率显著下降,死亡率、畸形率显著上升(表 3)。由于成功的胚胎孵化和发育依赖于配子的质量以及卵子内的营养量,因此配子质量下降可能是稀有鲫生殖健康受损的一个重要表现。

DES 生命早期暴露对后代也产生了影响,使雌鱼比例显著增加,且体长、体重显著下降。后代生长受到抑制可能是内分泌紊乱引起。本实验室已证实长期低剂量暴露可使后代体内的 TT₃, TT₄ 及性激素水平发生改变^[22]。Schwaiger 等^[23]也发现, NP 暴露使虹鳟后代中雌鱼体内睾酮的含量增加 13 倍,雄鱼体内雌二醇的含量增加 2 倍。DES 早期暴露导致后代性比发生明显改变,但具体原因尚不清楚。国外曾有文献报道亲鱼受到雌激素暴露后后代兼性鱼比例增加,但多数研究者认为类雌激素暴露不会影响后代的性别比例。因此,这一问题有待进一步深入探讨。

从以上结果可知, DES 生命早期暴露可使稀有鲫死亡率升高,生长发育迟缓,并通过影响配子质量而影响稀有鲫的生殖。生命早期是鱼类生长发育的敏感阶段,易受到环境雌激素的干扰,因此稀有鲫生命早期暴露实验可用于评价水生生态系统中内分泌干扰物的生态影响。

参考文献

- [1] Colborn T. Environmental estrogens: Health implications for humans and wildlife[J]. Environ. Health Perspect., 1995, 103: 135-136
- [2] Liu YM, Chen W, Li DH, et al. Reproduction toxicity and estrogenic effects of dicofol to *Daphnia magna* [J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 2004, 28: 330-332 [刘永梅, 陈伟, 李敦海, 等. 三氯杀螨对大型蚤的毒性和环境雌激素效应. 水生生物学报, 2004, 28: 330-332]
- [3] Du K J, Xu X B. A review on environmental estrogens[J]. Chinese Science Bulletin, 2000, 45: 2241-2251 [杜克久, 徐晓白. 环境雌激素研究进展. 科学通报, 2000, 45: 2241-2251]
- [4] Li L, Ma T W, Wu Z B. Toxic effect of domestic sewage on Rare minnow (*Gobiocypris rarus*) [J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 2004, 28: 40-44 [李莉, 马陶武, 吴振斌. 生活污水对稀有鲫的毒性效应研究. 水生生物学报, 2004, 28: 40-44]
- [5] Wang J W. Spawning performance and development of oocytes in *Gobiocypris rarus* [J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 1999, 23: 161-166 [王剑伟. 稀有鲫产卵频次和卵子发育的研究. 水生生物学报, 1999, 23: 161-166]
- [6] Zhou Y X, Cheng S P, Hu W, et al. A new fish toxicity test organism *Gobiocypris rarus* [J]. Zool. Res. 1995, 16: 59-63 [周永欣,

成水平, 胡伟, 等. 稀有 鲫))) 一种新的鱼类毒性试验材料. 动物学研究 1995, 16:59) 63]

[7] Yuan X P, Wu W Z, Xu Y, et al. Ultrastructural observation of rare minnow sac2fry exposed to 2, 3, 7, 8TCDD[J]. Acta Hydrobiologica Sinica. 1999, 23: 185) 186 [袁秀平, 吴文忠, 徐盈, 等. 2, 3, 7, 8 TCDD 对稀有 鲫幼体超微结构影响的观察. 水生生物学报, 1999, 23: 185186]

[8] Lang Y, Xu Y, Yang F X, et al., Induction, purification and elec2trophoretic comparison of vitellogenin from two cyprinid fish species: carp (Cyprinus carpio) and wuchang fish (Megalobrama amblycephala2layih) [J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 2002, 26(4):317) 321[梁勇, 徐盈, 杨方星, 王剑伟. 鲤鱼和团头鲂卵黄蛋白原的诱导, 纯化及电泳比较. 水生生物学报 2002, 26: 317) 321]

[9] Zhong X P, Xu Y, Liang Y, et al. Vitellogenin in rare minnow (Gobio2pristurus): identification and induction by waterborne di2ethylstilbestrol[J]. Comp. Biochem. Physiol. C, 2004, 137: 291) 298

[10] Christofides N D, Sheehan N P. Enhanced chemiluminescence la2beled2antibody immunoassay (Amerlite MAB) for free thyroxine: de2sign, development and technical validation[J]. Clin. Chem, 1995, 41:17) 23

[11] Aerle R V, Pounds N, Hutchinson T H, et al. Window of sensitivity for the estrogenic effects of ethinylestradiol in early life2stage of fat2head minnow, Pimphales promelas [J]. Ecotoxicology, 2002, 11: 423) 434

[12] L2nge R, Hutchinson T H, Croudace C P, et al. Effects of the syn2thetic estrogen 172B2ethinylestradiol on the life2cycle of the fathead minnow (Pimphales promelas) [J]. Environ. Toxicol. Chem, 2001, 20: 1216) 1227

[13] Kn2err S, Braunbeck T. Decline in reproductive success, sex reversal, and developmental alterations in Japanese medaka (Oryzias latipes) after continuous exposure to octylphenol[J]. Ecotoxicol. Environ. Safety, 2002, 51: 187) 196

[14] Gray M A, Teather K L, Metcalfe C D. Reproductive success and behavior of Japanese medake (Oryzias latipes) exposed to 42ter2octylphenol [J]. Environ. Toxicol. Chem, 1999, 18: 2587) 2594

[15] Nimrod A, Benson W H. Reproduction and development of Japanese medaka following an early life stage exposure to xenoestrogens[J]. Aquat. Toxicol, 1998, 44: 141) 156

[16] Holloway A C, Leatherland J F. Effect of gonadal steroid hormones on plasma growth hormone concentrations in sexually immature rain2bow trout, Onchorhynchus mykiss. Gen. Comp. Endocrinol, 1997, 105: 246) 254

[17] Ankely G T, Jensen K M, Kahl M D, et al. Description and evalua2tion of a short2term reproduction test with the fathead minnow (Pimephales promelas) [J]. Environ. Toxicol. Chem, 2001, 20: 1276) 1290

[18] Pandian T J, Sheela S G. Hormonal induction of sex reversal in fish [J]. Aquaculture, 1995, 138: 1) 22

[19] Papoulias D M, Noltie D B, Tillitt D E. An in vivo model fish system to test chemical effects on sexual differentiation and development: ex2posure to ethinyl estradiol[J]. Aquat. Toxicol, 1999, 48:37) 50

[20] Shibata N, Hamaguchi S. Evidence for the sexual bipotentiality of spermatogonia in the fish, Oryzias latipes[J]. J. Exp. Zool, 1998, 245: 71) 77

[21] Gimeno S, Komen H, Gerritsen A G M, et al. Feminisation of young males of common carp, Cyprinus carpio, exposed to 42ter2pentylph2enol during sexual differentiation[J]. Aquat. Toxicol, 1998, 43: 77) 92

[22] Zhong X P, Xu Y, Liang Y, et al. The Chinese rare minnow as an in vivo model for endocrine disruption in freshwater teleosts: a full life2cycle test with diethylstilbestrol[J]. Aquat. Toxicol, 2005, 71: 85) 95

[23] Schwaiger J, Mallow U, Ferling H, et al. How estrogenic is nonylphenol? a transgenerational study using rainbow trout (On2corhynchus mykiss) as a test organism[J]. Aquat. Toxicol, 2002, 59:177) 189

EFFECTS OF DIETHYLSTILBESTROL EXPOSURE IN EARLY LIFE STAGE ON DEVELOPMENT AND REPRODUCTION IN RARE MINNOW, *Gobiocypris rarus*

ZHONG Xue²Ping, XU Ying, LIANG Yong, LIAO Tao and WANG Jian²Wei

(Institute of Hydrobiology, the Chinese Academy of Sciences;

State Key Laboratory of Freshwater Ecology and Biotechnology, Wuhan 430072)

Abstract: Rare minnow, *Gobiocypris rarus*, is a Chinese cyprinid. It has many attractive features that make it a suitable organism in aquatic toxicity tests, including small size, wide temperature range, easily being cultured in laboratory, large amount of eggs and short life cycle. It has also been reported this species is susceptible to heavy metals and other xenobiotics. However, little has been known about the endocrine disruptions of xenoestrogens in this native Chinese species. The aim of the study was to investigate the effects of diethylstilbestrol (DES) exposure in early life stage on development and reproduction of rare minnow.

Rare minnow were raised in the laboratory. They were maintained in a light/dark cycle of 14B10 h at 23±2°C and fed once a day. To start the test with DES, embryos (< 8 h postfertilization) were collected from at least three spawnings as required by standard protocol. Based on a 28 days preliminary exposure study, nominal concentrations of DES at 10 and 100 µg/L were selected for this study. Rare minnow were exposed to these two concentrations of DES from newly fertilized embryos to 23 days posthatch. The mortality, abnormal behavior and appearance of the larvae were recorded during the exposure. At the end of exposure, fish were sampled to measure body weight, body length and then stored at -80°C for VTG analysis and Total T₄ (TT₄) measurement. At 24 days posthatch, rare minnow were transferred to clean water. At 175 days posthatch, 15 fish were sampled to measure body weight, body length and then stored at -80°C for VTG analysis. Four mating pairs were selected from control group and DES-exposed groups for examination of fecundity and fertility.

At the end of exposure, it was found that exposure to DES caused an increase in mortality and vitellogenin (VTG) levels. Growth was significantly inhibited in the fish exposed to DES. After a five-month period culture in clean water, the sex ratio (male: female) observed was changed from 46: 54 in controls to 31: 69 at 10 µg/L DES and 33: 67 at 100 µg/L DES. Reproductive capability was depreciated in the DES-treated fish as measured by fertility of eggs, hatchability of eggs and survival of F₁ larvae. The growth and VTG level had a significant change in the DES-treated fish when compared to the control group. The results indicate that exposure to DES in early life stage can cause adverse effects on development and reproduction. It suggests that rare minnow is suitable for early life stage test in assessing the environmental impact of endocrine-disrupting chemicals.

Key words: Diethylstilbestrol; Endocrine-disrupting chemicals; Early life stage; Rare minnow