

卵黄蛋白原在剑尾鱼体内不同组织的分布及雌激素作用对其表达的影响

李建寅^{1,2}, 李凯彬¹, 刘春¹, 常藕琴¹, 吴淑勤¹

(1. 中国水产科学研究院 珠江水产研究所, 广东 广州 510380; 2. 上海海洋大学, 上海 200090)

摘要: 为研究卵黄蛋白原(Vitellogenin, Vg)在剑尾鱼(*Xiphophorus helleri*)不同组织器官的表达情况,以及了解雌激素对不同组织中Vg表达的诱导作用,将成年雌、雄剑尾鱼及幼鱼暴露于50 μg/L的17β-雌二醇(E₂)溶液中20 d,未暴露的剑尾鱼作对照,采用免疫组化法对各处理组剑尾鱼进行Vg的组织定位研究。结果表明,剑尾鱼Vg主要分布于成熟雌鱼的肝脏、脾脏和肠的血管、淋巴管,在正常幼鱼及雄鱼的以上各组织中均不表达。17β-雌二醇暴露下,剑尾鱼雌、雄成鱼和幼鱼的肝脏以及肾、脾、肠等组织的血管及淋巴管均呈Vg阳性。但Vg颗粒只在肝实质细胞中观察到,在其他组织中如脾脏、肠固有结缔组织等, Vg颗粒仅出现于血管,在细胞内未观察到。以上结果表明,剑尾鱼Vg在肝细胞中合成,通过血液循环到达其他组织;雌激素可诱导雌、雄剑尾鱼及幼鱼肝组织中Vg的表达。剑尾鱼幼鱼及雄鱼Vg的非正常表达可应用于环境雌激素效应评价。[中国水产科学,2009,16(5):705-711]

关键词: 剑尾鱼; 卵黄蛋白原; 免疫组织化学; 雌激素

中图分类号: S91

文献标识码: A

文章编号: 1005-8737-(2009)05-0705-07

环境雌激素是一类天然或人工合成化合物,它们能够模拟生物体内源性雌激素的生理、生化作用,干扰人和动物体内激素的合成、释放、运输、代谢、激素与受体的结合等一系列生理过程,从而扰乱人和动物内分泌系统、神经系统和免疫系统的机能,甚至对其后代生殖功能具有潜在影响^[1-2]。随着工业的快速发展,大量化学物质排放导致水生生态系统受到环境雌激素的严重污染,导致雄鱼生殖腺发生退化、幼鱼出现变态发育等不良现象^[3-6]。鱼类卵黄蛋白原(Vitellogenin, Vg)在成熟雌鱼体内由雌激素刺激合成,正常情况下在雄鱼和幼鱼体内不合成;当受雌激素刺激时,雄鱼和幼鱼也会合成Vg^[7],由于没有卵巢的有效清除,会造成体内Vg累积。因此,雄鱼和幼鱼Vg的非正常表达可作为生物指标用于对水环境中雌激素污染状况的监测。

剑尾鱼(*Xiphophorus helleri*)属花鲈科(Poeciliidae)

剑尾鱼属(*Xiphophorus*),具有体型小、繁殖周期短、易饲养管理、可在实验室条件下纯化培育等特点,是中国最早进行系统实验动物化研究的鱼类,其代表品系RR-B系为中国首个通过全国水产原良种审定委员会审定的鱼类实验动物品系^[8]。剑尾鱼在环境雌激素污染物的监测方面具有一定的优势,通过研究汞(Hg)、硒(Se)、取代芳烃、多氯联苯(PCBs)和壬基苯酚等污染物对剑尾鱼生化等指标的影响^[9-12],发现壬基苯酚对雄性剑尾鱼性腺发育的影响具有明显剂量-效应关系,且剑尾鱼雌雄个体间形态差异大,易于判别性别,说明剑尾鱼是一种适合于实验室开展毒性研究的实验生物,在环境雌激素效应相关研究中有较好的应用前景。

本研究采用免疫组化法研究Vg在不同年龄及性别剑尾鱼各种组织中的分布情况,并了解17β-雌二醇(E₂)暴露对Vg表达的影响,为利用剑尾鱼作为生物标记物监测环境雌激素的研究提供基础资料。

收稿日期: 2008-11-24; 修订日期: 2009-02-25.

基金项目: 科技部公益项目(2004DIB1J029).

作者简介: 李建寅(1982-),男,硕士研究生,主要从事水产动物免疫方面的研究. E-mail: nhljy2006@163.com

通讯作者: 吴淑勤. E-mail: wushuqin001@21.cn.com

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 成鱼为RR-B系4月龄剑尾鱼雌鱼及雄鱼,体长4.5 cm左右;幼鱼为RR-B系半月龄剑尾鱼,体长1.2 cm左右,为珠江水产研究所培育。

1.1.2 仪器和试剂 泰维TB-718D2型生物组织自动包埋机为北京医疗设备厂产品;RM2135型切片机为Leica公司产品;Olympus显微镜为Olympus公司产品;Mshot™数码成像系统为明美科技有限公司产品;多聚赖氨酸,即用型SABC免疫组化染色试剂盒,DAB显色试剂盒均为武汉博士德产品;17 β -雌二醇(E₂),二甲亚砜(DMSO)等试剂为Sigma公司产品;兔抗剑尾鱼卵黄蛋白原血清为本实验室制备。

1.2 实验方法

1.2.1 样品制备 对照组剑尾鱼20尾,雌、雄各10尾,分别解剖取肝、脾、肾、肠、脑、肌肉组织,迅速用4%多聚甲醛缓冲液固定;剑尾鱼幼鱼10尾用4%多聚甲醛缓冲液整体固定。

剑尾鱼雌、雄成鱼和幼鱼各20尾,分别暴露于质量浓度为50 μ g/L的17 β -雌二醇溶液中,每隔1 d更换全部暴露液,实验期间正常投喂饵料。20 d后,成鱼解剖取肝、脾、肾、肠、脑、肌肉等组织,使用4%多聚甲醛缓冲液固定,幼鱼整体固定。

1.2.2 切片 样品固定24 h,脱水、透明、浸蜡和包埋,5 μ m连续切片。

1.2.3 SABC法染色 经多聚赖氨酸处理玻片,切片常规脱蜡至水,3%双氧水孵育10 min以去除内源性过氧化物酶,蒸馏水洗涤3次;热修复抗原:将切片浸入枸橼酸盐缓冲液中,微波炉加热至沸腾后断电,间隔10~15 min,反复1~2次。冷却后PBS洗涤1~2次。滴加5% BSA封闭液室温封闭20 min,甩去多余液体,不洗;滴加兔抗卵黄蛋白原血清,4 $^{\circ}$ C过夜,PBST洗涤3次,每次2 min;滴加生物素化山羊抗兔IgG,室温孵育20 min,PBST洗涤2 min,重复3次;滴加SABC复合物,室温下孵育20 min,PBST洗涤5 min,重复4次;DAB显色:取1 mL蒸馏水,加试剂盒中A、B、C试剂各1滴,混匀后加至切片。室温显色,

镜下控制显色时间为5 min左右,显色终止用蒸馏水洗涤;苏木素轻度复染,脱水、透明、封片,显微镜观察并拍照。用PBS代替一抗,其他步骤相同,作为阴性对照。

2 结果与分析

2.1 Vg在对照组剑尾鱼体内的分布

2.1.1 Vg在雌性成鱼体内的分布 显微镜观察,Vg免疫反应阳性结构为棕黄色。低倍镜下对照组雌性成鱼肝细胞排列紧密,细胞核明显。细胞质颜色较淡,细胞质中分布有棕黄色颗粒。高倍镜下可见肝细胞呈近圆形,形状较规则,细胞界线清晰。具单个细胞核,胞核大,多为圆形或椭圆形,核仁明显。细胞质中可观察到大小不一的棕黄色颗粒(图版I-1)。油镜下观察,细胞结构清晰,细胞大多呈不规则椭圆形,部分细胞的细胞质中分布着棕黄色颗粒,这些颗粒大多分布在细胞核附近(图版I-2)。其他组织如脾脏血管中出现黄色(图版I-3),肠固有结缔组织也被染成黄色(图版I-4);高倍镜下可观察到,阳性反应只出现于脾脏血管及肠固有层,实质细胞内并未发现黄色颗粒。肾脏(图版I-5)、肌肉(图版I-6)和脑无Vg阳性反应(图版I-7)。

2.1.2 Vg在雄性成鱼体内的分布 对照组雄性成鱼肝(图版I-8)、脾、肾、肠、脑、肌肉组织内均未发现Vg特异性阳性反应。

2.1.3 Vg在幼鱼体内的分布 对照组幼鱼肝、脾、肾、肠、脑、肌肉组织内均未发现Vg特异性阳性反应(图版I-9)。

2.2 Vg在暴露组剑尾鱼体内的分布

2.2.1 Vg在雌性成鱼体内的分布 暴露组雌性成鱼肝脏切片在低倍镜下呈强阳性反应,肝细胞排列不规则,切片中出现空泡,细胞质颜色较深,其间分布着黄色颗粒(图版II-1)。高倍镜下细胞无固定形状,细胞质中出现大小不等的空泡,细胞核靠近细胞膜排列,细胞核附近分散着棕黄色颗粒(图版II-2)。油镜下细胞被空泡所占据,细胞质与细胞核被挤至一侧,细胞质中的黄色颗粒紧靠着细胞核,体积较细

胞核略小(图版II-3)。脾脏中分布着走向迂曲、无特定规则的黄色管道。肠固有结缔组织被染成棕黄色。暴露组雌性成鱼肾脏的肾小管、集合管呈阳性反应,呈现棕黄色(图版II-4)。肌肉和脑无特异性阳性反应。

2.2.2 Vg在雄性成鱼体内的分布 暴露组成年雄性剑尾鱼肝细胞排列不规则,在低倍(图版II-5)、高倍(图版II-6)及油镜(图版II-7)下细胞形态与暴露组雌鱼相似,细胞质内出现空泡,细胞核靠近细胞膜,细胞质内的棕黄色颗粒分布在细胞核附近。脾脏中布满了走向迂曲、无特定规则的黄色管道(图版II-8)。肾脏中肾小管、集合管呈阳性反应(图版II-9);肠固有层也出现阳性反应(图版II-10)。肌肉和脑无颜色反应。其肝、脾、肠、肾、脑、肌肉的免疫组化分析结果与雌性剑尾鱼类似。

2.2.3 Vg在幼鱼体内的分布 低倍镜下暴露组幼鱼肝(图版II-11)、脾、肾和肠(图版II-11)呈阳性反应。肌肉、脑呈阴性反应。高倍镜下观察,幼鱼肝脏也发生同样病变,肝细胞排列不整齐,细胞质内有空泡,且出现棕黄色颗粒。油镜下观察,与暴露组雌、雄剑尾鱼比较,肝细胞中棕黄色颗粒在数量上明显减少(图版II-12)。高倍镜下肾脏中肾小管、集合管(图版II-13),脾脏中的血管(图版II-14)及肠固有结缔组织(图版II-15)均呈棕黄色阳性反应。

3 讨论

通常情况下Vg在雄鱼和未成熟的雌鱼体内不存在或仅有极微量存在^[13],本实验采用免疫组化方法在对照组雄鱼和幼鱼体内均未检测出Vg, Vg只在对照组雌鱼肝脏实质细胞中有表达,在脾脏、肠固有结缔组织的血管及淋巴管中有分布。经E₂暴露后,雌、雄成年剑尾鱼及幼鱼的肝、脾、肾、肠等组织均呈阳性反应,这表明雌激素对剑尾鱼Vg的表达具有明显的诱导作用。

3.1 Vg在正常雌性剑尾鱼体内的分布

剑尾鱼是一种较低等的脊椎动物,其Vg通过外源性合成途径合成。本实验中,对正常雌性剑尾鱼的不同组织进行免疫组化分析,检测Vg在其体内的

分布情况。发现在雌性成鱼的肝脏、脾脏、肠等部位有Vg的分布。由肝脏切片可见,肝细胞排列紧密规则,肝细胞质中出现大小不一的黄色颗粒,它们分散在细胞核附近。肝脏的血管系统中也呈棕黄色,这些物质是被分泌到血液中的Vg^[14]。脾脏中分布有大量走向迂曲、无特定规则的黄色管道,这些管道是分布于脾脏中的血管和淋巴管^[15]。由于Vg存在于脾脏血液循环中,所以在DAB染色下脾脏中出现大面积的黄色反应。据报道,线虫Vg是在肠细胞内合成的^[16],而其他生物Vg的合成均未见类似的报道。剑尾鱼肠固有结缔组织呈阳性反应,可能是该组织中含有许多血管、淋巴管、小的游走细胞和从血液中渗出的白血细胞,造成肠固有层含大量的Vg。本实验中,对雌剑尾鱼的免疫组化检测结果发现,只在肝脏实质细胞中观察到Vg颗粒,其他组织如脾脏、肠固有结缔组织中仅有血液循环系统中呈阳性反应,而在这些器官组织的细胞质中无Vg颗粒出现,这表明剑尾鱼Vg是在肝细胞中合成的,然后分泌到血液中,通过血液循环而导致在其他组织也有分布。

3.2 雌激素暴露对剑尾鱼Vg的影响作用

脊椎动物中,激素诱导产生Vg的实验在鱼类中进行的最为深入。Idler^[17]研究发现雌激素能促使雄鱼或未成熟雌鱼产生卵黄蛋白原;Boheman等^[18]证明虹鳟(*Salmo gairdneri*)的滤泡上皮细胞能产生雌激素;Kayo等^[19]在雌激素诱导的日本青鳉(*Oryzias latipes*)雄鱼肝脏中检测到卵黄蛋白原的产生。包括蛙和鱼类在内的大多数卵生脊椎动物,其雄性个体在雌激素的作用下能产生大量Vg到血液中,由于雄鱼和幼鱼没有卵巢有效地清除Vg,造成体内卵黄蛋白原浓度的升高。

本研究分别将剑尾鱼幼鱼和雌雄成年剑尾鱼暴露于E₂溶液,免疫组化检测结果显示,暴露组剑尾鱼的肝、脾、肾、肠中都呈现阳性反应,说明有Vg分布。Wahli等^[20]和Arukwe等^[21]分别对虹鳟与大西洋鲑进行E₂暴露的研究,发现肝细胞质中有棕黄色的Vg颗粒。Leo等^[14]对雄性斑马鱼进行E₂暴露,通过免疫组化方法在肝细胞质同样观察到了棕黄色的Vg颗

粒。本实验中, E₂暴露组雄鱼和幼鱼肝脏细胞质中出现V_g,与前人的研究结果相类似。暴露组雌鱼肾脏中出现阳性反应,与正常雌鱼明显不同。由于肾脏对血液起过滤作用,正常雌鱼的V_g在流经肾脏时经过肾小球的过滤作用和肾小管的重吸收作用而回到肾静脉血液中,肾小管及集合管中因为没有残存的V_g而呈阴性。暴露组雌鱼、雄鱼及幼鱼的肾脏都呈阳性反应,这有可能是由于E₂诱导肝脏合成大量的V_g,过量的V_g超出了肾脏的过滤能力而残留在肾小管和集合管内,经DAB显色后呈黄色。对照组肝细胞排列规则紧密,细胞完整无空泡;而暴露组肝细胞排列不规则,细胞核增大,细胞质中出现大小不一的空泡,这些空泡是因雌激素暴露使肝脏发生脂肪变性而形成的。引起肝脂肪变性的有毒物质还有四氯化碳、氯丙嗪、四环素、乙硫氨酸、口服避孕药(17-碳烷基类固醇)、类固醇性激素、乙醇等^[22]。肝脂肪变性是肝细胞内甘油三酯的异常积聚,是由于脂肪合成或输入过多,脂肪的氧化或利用机能受损,脂蛋白形成和输出障碍所造成的^[23]。

本研究通过免疫组化方法检测了V_g在正常雌鱼体内的分布情况,并且研究了雌、雄剑尾鱼及幼鱼经E₂诱导后体内V_g的产生及分布情况。剑尾鱼雄鱼或幼鱼体内卵黄蛋白原的非正常表达,可作为一种生物标记物来评价环境内分泌干扰物质对生物的影响。

参考文献:

- [1] 袁琳. 环境雌激素影响男性生殖缺陷的研究进展[J]. 国外医学泌尿系统分册, 2005, 25 (2): 216-219.
- [2] 邴欣, 汝少国, 姜明. 久效磷对金鱼的环境雌激素效应的研究[J]. 高技术通讯, 2006, 16 (11): 1 195-1 199.
- [3] Purdom C E, Hardiman P A, Bye V J, et al. Estrogenic effects of effluent from sewage treatment works [J]. Chem Ecol, 1994, 8: 275-285.
- [4] Harries J E, Sheahan D A, Jobling S, et al. A survey of estrogenic activity in United Kingdom island waters [J]. Environ Toxicol Chem, 1996, 15: 1 993-2 002.
- [5] Jobling S, Sheahan D, Osborne J A, et al. Inhibition of testicular growth in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) exposed to estrogenic alkylphenolic chemicals [J]. Environ Toxicol Chem, 1996, 15: 194-202.
- [6] Ma T W, Wang Z J, Chen J F, et al. Toxic effects of 17- α -ethinylestradiol to the kidney of rare minnow (*Gobiocypris rarus*) [J]. Acta Scientiae Ciumstantiae, 2004, 24 (3): 487-491.
- [7] 温茹淑, 方展强, 陈伟庭. 17 β -雌二醇对雄性唐鱼卵黄蛋白原的诱导及性腺发育的影响[J]. 动物学研究, 2008, 29 (1): 43-45.
- [8] 吴淑勤, 黄志斌, 石存斌, 等. 水生实验动物——剑尾鱼[M]. 北京: 中国农业出版社, 2005.
- [9] 王春风, 方展强. 汞和硒对剑尾鱼的急性毒性及其安全浓度评价[J]. 环境科学与技术, 2005, 28 (2): 32-34.
- [10] 杨伟华, 冯长君. 取代芳烃对剑尾鱼、稀有鮎鲫急性毒性的QSAR研究[J]. 有机化学, 2003, 23 (11): 1 267-1 270.
- [11] 方展强, 张凤君, 郑文彪, 等. 多氯联苯对剑尾鱼Na⁺/K⁺-ATPase活性的影响[J]. 水产学报, 2004, 28 (1): 89-92.
- [12] 王宏, 沈英娃. 对壬基苯酚的环境雌激素效应研究[C]. 首届水生实验动物专业委员会论文集, 2001: 18-22.
- [13] Goodwin A E, Grizzle J M, Bradley J T, et al. Monoclonal antibody-based immunoassay of vitellogenin in the blood of male channel catfish (*Ictalurus punctatus*) [J]. Comp Biochem Physiol, 1992, 101: 441-446.
- [14] Leo T, Henrik H, Martina F, et al. Vitellogenin expression in zebrafish *Danio rerio*: evaluation by histochemistry, immunohistochemistry and in situ mRNA hybridization [J]. Aquat Toxicol, 2003, 65: 1-11.
- [15] 王鸿鹤, 李长玲, 曹伏君, 等. 红笛鲷头肾和脾脏显微结构的观察[J]. 台湾海峡, 2006, 25 (3): 360-365.
- [16] Unuma T, Suzuki T, Kurokawa T, et al. A protein identical to the yolk protein is stored in the testis in male red sea Urchin, *Pseudocentrotis depressus* [J]. Biol Bull, 1998, 194: 92-97.
- [17] Idler D R. Gonadotropin stimulation of estrogen and yolk precursor synthesis in juvenile rainbow trout [J]. Gen Comp Endocrinol, 1980, 41: 384-391.
- [18] Bohemen V C, Glander J, Peute J. Annual changes in plasma and live in relation to vitellogenesis in the female rainbow trout, *Salmo gairdneri* [J]. Gen Comp Endocrinol, 1981, 44: 94-107.
- [19] Kobayashi K, Tamotsu S, Yasuda K, et al. Vitellogenin-immunohistochemistry in the liver and the testis of the medaka, *Oryzias latipes*, exposed to 17 β -estradiol and p-nonylphenol [J]. Zool Sci, 22 (4): 453-467.
- [20] Wahli T, Meier W, Segner H, et al. Immunohistochemical detection of vitellogenin in male brown trout from Swiss rivers [J]. Histochemistry, 1998, 30: 753-758.
- [21] Arukwe A, Nilsen B M, Berg K, et al. Immunohistochemical analysis of the vitellogenin response in the liver of Atlantic salmon exposed to environmental oestrogens [J]. Biomarkers, 1999, 4: 373-380.

[22] 史景泉, 陈意生, 卞修武. 超微病理学[M]. 北京: 化学工业出版社, 2005.

[23] 钟瑛, 黄丹, 孙哈笑, 等. 四氯化碳对动物肝脂肪变性的实验新设计[J]. 暨南大学学报, 2001, 22(4): 73-74.

Vitellogenin in *Xiphophorus helleri*: distribution and expression under 17β -estradiol exposure

LI Jian-yin^{1,2}, LI Kai-bin¹, GENG dong-yu¹, LIU Chun¹, CHANG Ou-qin¹, WU Shu-qin¹

(1. Pearl River Fisheries Institute, Chinese Academy of Fishery Science, Guangzhou 510380, China; 2. Shanghai Ocean University, Shanghai 200090, China)

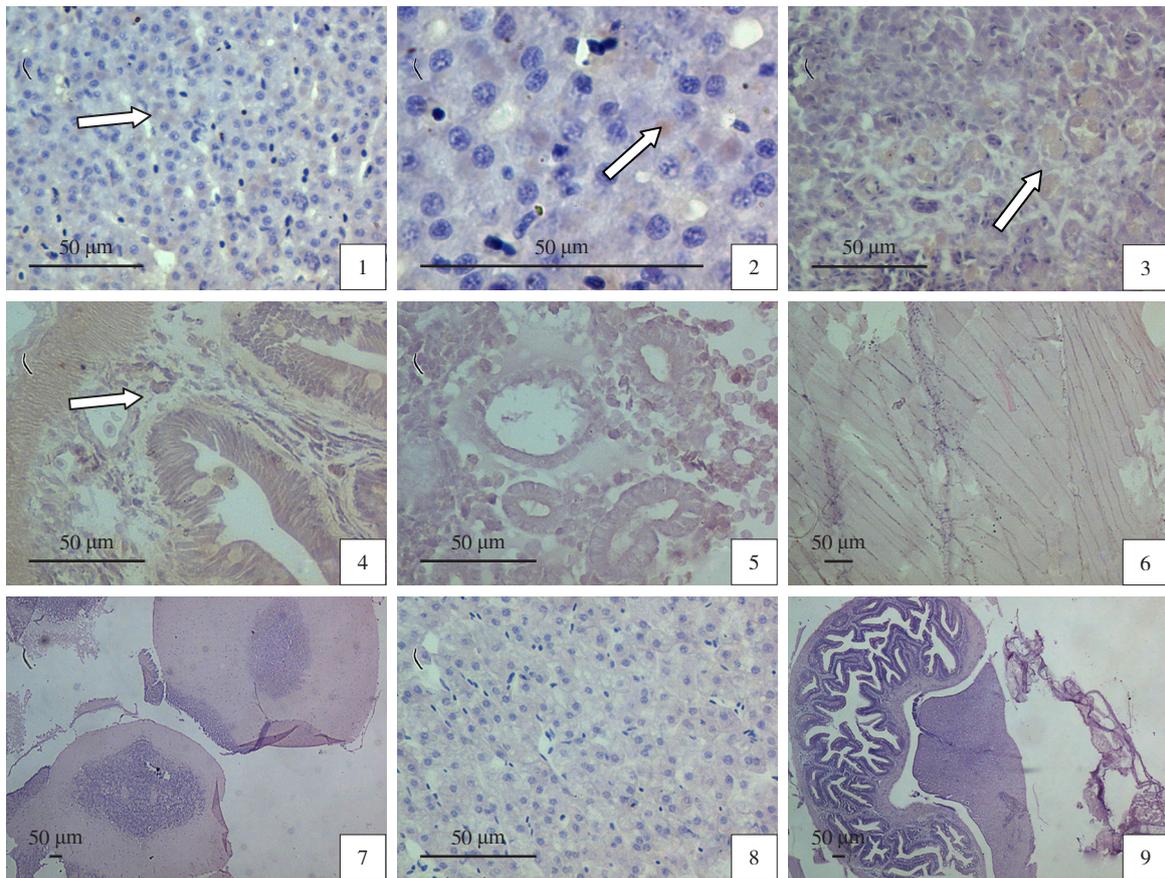
Abstract: Vitellogenin (Vg) plays an important role in development and reproduction of fish. In order to study the expression of Vg in different organs and tissues of swordtail fish (*Xiphophorus helleri*) and to study the induction effect of estrogen on Vg in swordtail fish, immunohistochemistry method was used to investigate the Vg histolocalization in major organs and tissues of sword fish. Mature female and male swordtail fish and juveniles fish were exposed to 50 $\mu\text{g/L}$ 17β -estradiol solution for 20 d. Then liver, spleen, kidney, intestine, brain and muscle of mature fish were sampled and fixed and juvenile fish were wholly fixed. Swordtail fish cultured in natural conditions were set as control. The results showed that Vg mainly distributed in liver, spleen and intestinal connective tissue proper of the mature female fish and could not be observed in the above tissues of male and juvenile fish in normal conditions. Liver, kidney, spleen and intestine connective tissue proper of female, male and juvenile swordtail fish all presented positive responses after they were exposed in 17β -estradiol (E_2). Vg particles were only observed in hepatic parenchymal cells, blood vessels of spleen, intestine connective tissue proper and other organs and tissues, but could not be observed in cells of these organs and tissues except liver. It can be concluded that Vg is synthesized in liver cells of swordtail fish, and reaches other tissues with blood stream and that estrogen can induce the expression of Vg in liver of male and female immature swordtail fish and juvenile fish. The abnormal expression of Vg in juvenile and male swordtail fish can be applied for environmental assessment of estrogen effects. [Journal of Fishery Sciences of China, 2009, 16(5): 705-711]

Key words: *Xiphophorus helleri*; vitellogenin; immunohistochemistry; estrogen

Corresponding author: WU Shu-qin. E-mail: wushuqin001@21.cn.com

李建寅等：卵黄蛋白原在剑尾鱼体内不同组织的分布及雌激素作用对其表达的影响

LI Jian-yin et al: Vitellogenin in *Xiphophorus helleri*: distribution and expression under 17β -estradiol exposure

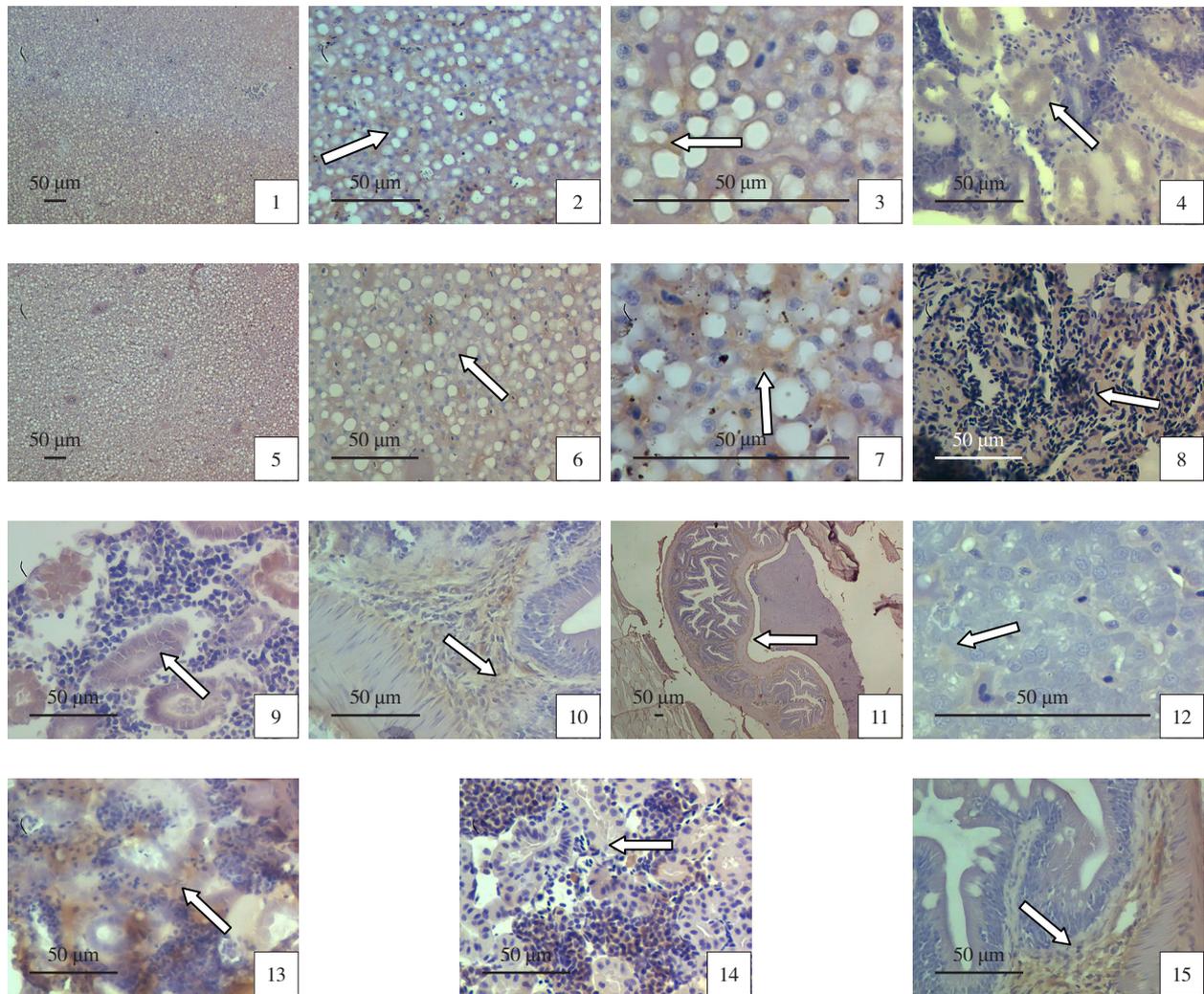


图版 I 对照组剑尾鱼免疫组化结果

1. 雌鱼肝细胞排列规则, 细胞质中有棕黄色 Vg 颗粒 (箭头所示). 2. 鱼肝细胞结构清晰, Vg 颗粒靠近细胞核, 略小于细胞核 (箭头所示). 3. 雌鱼脾脏呈棕黄色阳性反应 (箭头所示). 4. 雌鱼肠固有结缔组织呈棕黄色阳性反应 (箭头所示). 5. 雌鱼肾脏呈阴性反应. 6. 雌鱼肌肉呈阴性反应. 7. 雌鱼脑呈阴性反应. 8. 雄鱼肝细胞排列规则, 呈阴性. 9. 幼鱼肝、肠呈阴性.

Plate I Immunohistochemical staining results of the control swordtail fish

1. The female liver cells regularly align, with brown Vg particles in cytoplasm (arrow). 2. The female liver cell's structure is clear, with Vg particles close to nucleus and slightly smaller than nucleus (arrow). 3. The female spleen blood vessels are positive (arrow). 4. The female intestinal connective tissue proper is positive (arrow). 5. The Female kidney is negative. 6. The female muscle is negative. 7. The female brain is negative. 8. The male liver cells align regularly, negative. 9. Liver and intestine of juvenile swordtail fish are negative.



图版 II 17β -雌二醇暴露组剑尾鱼免疫组化检测结果

1. 雌鱼肝细胞,有空泡,呈阳性. 2. 雌鱼肝细胞排列不规则,细胞质中分布有棕黄色 Vg 颗粒(箭头所示). 3. 雌鱼肝细胞被空泡占据,细胞核被挤至细胞边缘, Vg 颗粒靠近细胞核(箭头所示). 4. 雌鱼肾小管、集合管呈阳性(箭头所示). 5. 雄鱼肝细胞排列不紧密,有空泡,呈阳性. 6. 雄鱼肝细胞排列不规则,细胞质中分布有棕黄色 Vg 颗粒(箭头所示). 7. 雄鱼肝细胞被空泡占据,细胞核被挤至细胞边缘, Vg 颗粒靠近细胞核(箭头所示). 8. 雄鱼脾脏呈棕黄色阳性反应(箭头所示). 9. 雄鱼肾小管、集合管呈阳性(箭头所示). 10. 雄鱼肠固有结缔组织呈阳性(箭头所示). 11. 幼鱼部分切片,肝、肠呈阳性. 12. 幼鱼肝细胞出现少量空泡,细胞质中分布有 Vg 颗粒(箭头所示). 13. 幼鱼肾小管、集合管呈阳性(箭头所示). 14. 幼鱼脾脏中血管呈阳性(箭头所示). 15. 幼鱼肠固有结缔组织呈阳性(箭头所示).

Plate II Immunohistochemical staining results of exposing swordtail fish in 17β -estradiol

1. The female liver cells loosely align, with vacuoles, positive. 2. The female liver cells align irregularly, with Vg particles in cytoplasm (arrow). 3. Female liver cells are occupied by vacuoles. Cell nucleus is squeezed to the edge of cell and Vg particles distribute close to the cell nucleus (arrow). 4. The female uriniferous tubules and collecting tubules are positive (arrow). 5. The male liver cells loosely align, with vacuoles, positive. 6. The male liver cells align irregularly, with Vg particles in the cytoplasm (arrow). 7. Male liver cells are occupied by vacuoles, cell nucleus is squeezed to the edge of the cell and Vg particles are close to nucleus (arrow). 8. The male spleen blood vessels are positive (arrow). 9. The male uriniferous tubules and collecting tubules are positive (arrow). 10. The male intestinal connective tissue is positive (arrow). 11. Slices of part of juvenile, liver and intestine are positive. 12. A few vacuoles in juvenile fish liver cells, with Vg particles distributing in cytoplasm (arrow). 13. The juvenile uriniferous tubules and collecting tubules are positive (arrow). 14. The blood vessels in juvenile spleen is positive (arrow). 15. The juvenile intestinal connective tissue is positive (arrow).