

文章编号:1000-0615(2007)01-0007-08

## 壬基酚对雌鲫受体表达和雌二醇水平的影响

刘青, 魏华, 张高峰, 吴楠

(上海水产大学生命科学与技术学院, 上海 200090)

**摘要:**研究了环境激素壬基酚(4-NP)在雌鲫体内的对雌激素受体的表达和雌二醇水平的影响。雌鲫腹腔注射1、50、100 mg·kg<sup>-1</sup>的4-NP或1 mg·kg<sup>-1</sup>的E<sub>2</sub>,分别在24 h和48 h提取肝脏RNA用RT-PCR查看α型雌激素受体(ER-α)和CYPIA的表达情况和提取血清用荧光免疫法测定E<sub>2</sub>浓度。结果表明:1 mg·kg<sup>-1</sup> E<sub>2</sub>处理组的ER表达在24 h和48 h有显著性增加( $P < 0.01$ )。1 mg·kg<sup>-1</sup> 4-NP处理组在24 h ER表达与对照组比较有极显著性增加( $P < 0.01$ ),在48 h有显著性增加( $P < 0.05$ ),E<sub>2</sub>浓度在24 h与对照组比较有显著性下降( $P < 0.05$ ),但在48 h后有所回升;CYPIA表达在处理24 h有显著上调( $P < 0.05$ ),在48 h后有极显著上调( $P < 0.01$ )。50 mg·kg<sup>-1</sup> 4-NP处理组在24 h ER表达与对照组比较有极显著性增加( $P < 0.01$ ),在48 h有显著性增加( $P < 0.05$ ),E<sub>2</sub>浓度在24 h和48 h与对照组比较有极显著性下降( $P < 0.01$ );CYPIA表达在处理24 h有显著上调( $P < 0.05$ ),在48 h后有极显著上调( $P < 0.01$ )。100 mg·kg<sup>-1</sup> 4-NP处理组ER表达在24 h和48 h与对照组比较有极显著性增加( $P < 0.01$ ),E<sub>2</sub>浓度在24 h与对照组比较有显著性下降( $P < 0.05$ ),在48 h有极显著性下降( $P < 0.01$ );CYPIA表达有极显著上调( $P < 0.01$ )。随着4-NP注射量的增加,ER表达也逐渐增加,而E<sub>2</sub>浓度逐渐减少。ER表达上调效应:E<sub>2</sub> > 100 mg·kg<sup>-1</sup> 4-NP > 50 mg·kg<sup>-1</sup> 4-NP > 1 mg·kg<sup>-1</sup> 4-NP,100 mg·kg<sup>-1</sup>的4-NP对ER表达的上调效果接近于1 mg·kg<sup>-1</sup> E<sub>2</sub>的效果。E<sub>2</sub>下降效应:100 mg·kg<sup>-1</sup> 4-NP > 50 mg·kg<sup>-1</sup> 4-NP > 1 mg·kg<sup>-1</sup> 4-NP。NP对CYPIA表达有上调作用,并且表达随注射浓度上升而增强(具剂量-依赖效应)。以上结果表明,4-NP具有弱雌激素样效应,并且能抑制鲫鱼血清中E<sub>2</sub>的水平并使ER表达上调,为4-NP在鲫鱼体内通过ER途径实现内分泌扰乱效应的可能性提供了支持。

**关键词:**壬基酚;α型雌激素受体;内分泌扰乱;雌激素样效应;内分泌干扰物

中图分类号:X 503.225

文献标识码:A

## Effects of 4-nonylphenol on expression of estrogen receptor and level of 17β-estradiol *in vivo* of female *Carassius auratus*

LIU Qing, WEI Hua, ZHANG Gao-feng, WU Nan

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

**Abstract:** The estrogen-like effects of 4-nonylphenol (4-NP) *in vivo* of female *Carassius auratus* were investigated in this paper. We gave intraperitoneal injection in female *Carassius auratus* with the dose of 1

收稿日期:2006-03-14

资助项目:农业部海洋与河口渔业重点开放实验室资助(开-2-04-05);上海市重点学科建设项目资助(Y1101)

作者简介:刘青(1981-),男,贵州安顺人,硕士研究生,主要从事鱼类环境内分泌干扰研究。Tel:021-65710525, E-mail:q-liu@stmail.shfu.edu.cn

通讯作者:魏华, Tel:021-65710525; E-mail: hwei@shfu.edu.cn

mg · kg<sup>-1</sup>, 50 mg · kg<sup>-1</sup>, 100 mg · kg<sup>-1</sup> of 4-NP or 1 mg · kg<sup>-1</sup> of 17β-estradiol (E<sub>2</sub>) respectively. The expression of α type estrogen receptor (ER-α) and CYP1A in liver was evaluated by RT-PCR and the concentration of E<sub>2</sub> in serum was measured by fluorescent immunoassay in 24 h and 48 h of injection. The results show that 1 mg · kg<sup>-1</sup> of E<sub>2</sub> increased expression of ER significantly both in 24 h and 48 h ( $P < 0.01$ ). In 4-NP treatment group, the concentration of E<sub>2</sub> was decreased and the expression of ER was increased with the increase of 4-NP's level. In 1 mg · kg<sup>-1</sup> of 4-NP treatment group, there is a significant increase of expression of ER at 24 h ( $P < 0.01$ ) and 48 h ( $P < 0.05$ ), the concentration of E<sub>2</sub> was decreased at 24 h ( $P < 0.05$ ) yet returned slightly at 48 h, and CYP1A's expression is up-regulated at 24 h ( $P < 0.05$ ) and 48 h ( $P < 0.01$ ). In 50 mg · kg<sup>-1</sup> of 4-NP treatment group, there is a significant increase of expression of ER at 24 h ( $P < 0.01$ ) and 48 h ( $P < 0.05$ ), the concentration of E<sub>2</sub> was decreased significantly both at 24 h and 48 h ( $P < 0.01$ ), and CYP1A's expression is up-regulated at 24 h ( $P < 0.05$ ) and 48 h ( $P < 0.01$ ). In 100 mg · kg<sup>-1</sup> of 4-NP treatment group, there is a significant increase of expression of ER both at 24 h and 48 h ( $P < 0.01$ ), the concentration of E<sub>2</sub> was decreased significantly at 24 h ( $P < 0.05$ ) and 48 h ( $P < 0.01$ ), and CYP1A's expression is up-regulated ( $P < 0.01$ ). Effect of increasing of ER's expression is E<sub>2</sub> > 100 mg · kg<sup>-1</sup> 4-NP > 50 mg · kg<sup>-1</sup> 4-NP > 1 mg · kg<sup>-1</sup> 4-NP; effect of decreasing of concentration of E<sub>2</sub> is 100 mg · kg<sup>-1</sup> 4-NP > 50 mg · kg<sup>-1</sup> 4-NP > 1 mg · kg<sup>-1</sup> 4-NP. The effect of 100 mg · kg<sup>-1</sup> of 4-NP on ER's expression is close to that of 1 mg · kg<sup>-1</sup> of E<sub>2</sub>, this indicates that 4-NP has weak estrogen-like effects. And 4-NP can up-regulate the expression of CYP1A (dose-dependent). That increase in ER's expression and decrease in E<sub>2</sub> in 4-NP treatment group provide support of 4-NP's endocrine disruption via ER pathways in *Carassius auratus*.

**Key words:** 4-nonylphenol (4-NP); α type estrogen receptor (ER-α); endocrine disruption; estrogen-like effects; endocrine disruptors

内分泌干扰物(endocrine disruptors)是指农业或化工所排放的具有雌激素效应的有害化学物质总称,它可影响和干扰人和动物内分泌系统,使雄性动物雌性化、生殖器官异常,并使生殖能力下降,后代的健康与成活率下降等<sup>[1]</sup>。目前发现大部分的内分泌干扰物具有雌激素样效应<sup>[2-3]</sup>。

壬基酚(4-nonylphenol, NP, 4-NP 或 p-NP)是一种内分泌干扰物<sup>[4]</sup>,近来不论在陆生动物的体内体外实验中,还是在水生动物的体内体外实验中,均证实壬基酚具有雌激素效应。在陆生动物方面主要集中在 4-NP 对雄性或雌性动物生殖功能的影响、4-NP 对癌症细胞的增殖效应等方面。如研究发现 4-NP 在体外对癌细胞 MCF-7 有增殖效应<sup>[5]</sup>,并能诱导 MCF-7 细胞中的雌激素调控基因的表达<sup>[6]</sup>,说明了 4-NP 的雌激素活性。通过子宫营养试验,发现 4-NP 处理过的未成年雌性大鼠的子宫湿重、子宫/体重、平滑肌厚度和官腔上皮高度有明显升高<sup>[7]</sup>。妊娠 SD 大鼠进行 NP 口服染毒后,40 日龄子宫重比对照组高,并且初级和次级卵泡总数也显著多于对照组,说明 4-NP

能诱导卵泡和子宫的早期发育<sup>[8]</sup>。成年雄性大鼠经 NP 处理后,其精子计数和活力显著降低并且睾丸曲精管萎缩,生殖功能受到损害<sup>[9]</sup>。用 4-NP 处理雄性大鼠 24 h 后,睾丸、附睾重量以及精子数量明显减少,认为 4-NP 对大鼠生殖系统有氧化应激性损害作用<sup>[10]</sup>。在水生动物研究方面,卵黄蛋白原(vitellogenin, VTG)成为研究 NP 雌激素效应的指标性物质。周忠良等<sup>[11]</sup>在研究中对雌性鲫腹腔注射 4-NP 后,通过 ELISA 测定肝脏 VTG,发现一定浓度的 4-NP 对鱼类卵黄蛋白原具有诱导作用。除此之外,也有研究发现了 4-NP 与雌激素受体具有一定的亲和力,如用 4-NP 与<sup>3</sup>H 标记的 17β-雌二醇(17β-estradiol 或 E<sub>2</sub>)在体外与雌激素受体竞争结合,结果发现 4-NP 与受体有一定的结合力,为 E<sub>2</sub> 结合能力的 1/5000<sup>[12]</sup>。

目前关于 4-NP 对鱼类的雌激素作用机制尚不明确。为了解 4-NP 在淡水鱼体内的作用机制,我们以雌激素受体为研究切入点,并参考对外源毒物和体内激素代谢有作用的细胞色素 P450

(CYPIA)<sup>[13]</sup>,研究不同浓度的 4-NP 在 24 h 和 48 h 对雌鲫 (*Carassius auratus*) 肝脏 ER- $\alpha$  和 CYPIA 表达的作用,以及研究不同浓度的 4-NP 在 24 h 和 48 h 对雌鲫血清中雌二醇 (17 $\beta$ -estradiol, E<sub>2</sub>) 的影响,从而探明 4-NP 在雌鲫体内可能的作用机制,有助于我们了解环境激素是如何影响鱼类的生殖生理过程,研究结果对保护我们的环境有重要启示作用,也为生态保护研究提供相关依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 主要实验药品与仪器

雌二醇 (E<sub>2</sub>), 4-NP, 购于 Sigma 公司; Trizol 试剂 (BBI, Canada)、AMV First Strand cDNA Synthesis Kit AMV 第 1 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有限公司; DEPC, 上海捷倍思基因技术有限公司; 氯仿 (分析纯)、异丙醇 (分析纯), 国药集团化学试剂有限公司; Sigma 冷冻离心机; Amersham Ultrospec<sup>TM</sup>2000 紫外分光光度仪; Eppendorf 金属加热器; Eppendorf Mastercycler Gradient PCR 仪; Biostep 凝胶成像系统; Beckman Coulter Immunoassay System。

### 1.2 实验动物及处理

雌鲫, 2005 年 1 月上旬购于上海嘉定望兴水产养殖场, 性腺发育处于 III ~ IV 期。体长 (21.61  $\pm$  5.71) cm, 体重 (230.49  $\pm$  23.81) g。随机分为实验组和对照组, 每组 6 尾, 各组暂养于 100 L 水箱中 1 周, 水温 (6  $\pm$  1)  $^{\circ}$ C。其中实验组分别注射 E<sub>2</sub> 或 4-NP。E<sub>2</sub> 或 4-NP 用无水乙醇溶解, 之后用大豆油稀释 (体积比 1 : 10)。采用腹腔注射, E<sub>2</sub> 注射量为 1 mg  $\cdot$  kg<sup>-1</sup>; 4-NP 注射量为 1、50、100 mg  $\cdot$  kg<sup>-1</sup>。空白对照组注射无水乙醇 : 大豆油 1 : 10 混合液。注射前, 每组鱼进行尾部静脉抽血。注射后 24 h、48 h, 每组各取 6 尾鱼, 酒精麻醉, 抽血和取肝脏提 RNA。

### 1.3 序列比对与引物设计

根据 GenBank 查得包括鲫在内的几种鱼类的 ER- $\alpha$  蛋白序列, 用 Clustalx 进行全序列比对, 结果得到 ER 的 DBD 区 (DNA binding domain) 是一个高度保守区, 以此区域为基础, 两端设计引物。根据 GenBank 以及 Swiss-Prot 数据库查得包括斑马鱼 (*Brachydanio rerio*) 在内的几种鱼类的

CYPIA mRNA 序列, 通过 Clustalx 序列比对结果, CYPIA 的引物设计的扩增位置为斑马鱼 CYPIA mRNA 序列中相对保守的 901 ~ 1 510 位点附近。鲫 ER mRNA 序列号 AY055725, 鲫 18 S rRNA gene 序列号 AF047349, 斑马鱼 CYPIA mRNA 序列号 AF210727。用 Oligo6 软件进行引物设计, 得到 ER primer: upper 5' - CCTCCAGCCCTCAGTTGTCC - 3', lower 5' - TTTCTTAGCCAG - GCAATCAT - 3', PCR 产物为 776 bp 的片段; CYPIA primer: upper 5' - ATC AACCA - CTGCGAAGACCG - 3', lower 5' - AGGATGGCCAGGAACAGGA - 3', PCR 产物为 569 bp 的片段; 18 S primer: upper 5' - TTCGA GGCCCTTTAATTGGAT - 3', lower 5' - CGGCCGTCCTCTTAATCAT - 3', PCR 产物为 389 bp 的片段。引物由上海生工生物工程技术有限公司合成。

### 1.4 RNA 提取

取肝脏约 100 mg 于 1.5 mL 离心管中, 加入 1 mL Trizol 试剂, 用小塑料研磨棒在管中研磨。4  $^{\circ}$ C, 12 000 r  $\cdot$  min<sup>-1</sup>, 离心 12 min。取上清液于新 1.5 mL 离心管中, 加入 250  $\mu$ L 氯仿, 震荡混匀, 冰浴静置分层 10 min, 4  $^{\circ}$ C, 12 000 r  $\cdot$  min<sup>-1</sup>, 离心 12 min。吸取上清液于新 1.5 mL 离心管中, 加入等体积异丙醇, 室温静置分层 5 min。4  $^{\circ}$ C, 12 000 r  $\cdot$  min<sup>-1</sup>, 离心 12 min, 得到 RNA 沉淀, 弃上清。加入 75% 乙醇洗 2 次, 每次加 1 mL, 每次离心, 4  $^{\circ}$ C, 12 000 r  $\cdot$  min<sup>-1</sup>, 5 min。之后打开盖子, 室温下挥发乙醇, 加入 DEPC 水 50  $\mu$ L, 水浴 50  $^{\circ}$ C 30 min 使 RNA 沉淀溶解。测定 RNA OD 值, 得到 260 nm/280 nm OD 比值在 1.7 和 2.0 之间。经琼脂糖凝胶电泳检测, 出现 28S、18S、5S 3 条带。

### 1.5 RT-PCR

cDNA 第 1 链合成 按照试剂盒上严格操作。加热均在 Eppendorf 金属加热器上完成。在 1.5 mL 离心管中加入 1  $\mu$ g 总 RNA, oligo-p (dT) 18 primer (0.5  $\mu$ g  $\cdot$   $\mu$ L<sup>-1</sup>) 1  $\mu$ L, 加 RNase-free ddH<sub>2</sub>O 至 12  $\mu$ L。离心混匀, 70  $^{\circ}$ C 加热 5 min, 冰浴 30 s。在冰浴中加入 5  $\times$  Reaction Buffer 4  $\mu$ L, dNTP Mix (10 mmol  $\cdot$  L<sup>-1</sup>) 2  $\mu$ L, RNase Inhibitor (20 U  $\cdot$   $\mu$ L<sup>-1</sup>) 1  $\mu$ L, 离心混匀, 37  $^{\circ}$ C 5 min 后, 加入 AMV Reverse Transcriptase (20 U  $\cdot$   $\mu$ L<sup>-1</sup>) 1

$\mu\text{L}$  离心混匀。42  $^{\circ}\text{C}$  1 h。之后 72  $^{\circ}\text{C}$  加热 10 min 灭活酶活性。-20  $^{\circ}\text{C}$  保存。

PCR 反应体系为 25  $\mu\text{L}$ ,  $\text{MgCl}_2$  (25  $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 1.5  $\mu\text{L}$ , dNTP (2  $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 2.5  $\mu\text{L}$ , 10  $\times$  Buffer 2.5  $\mu\text{L}$ , 引物 (5  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) upper 和 lower 各 1.5  $\mu\text{L}$ , cDNA 模板 1  $\mu\text{g}$ , Taq DNA polymerase (5  $\text{U} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ ) 0.2  $\mu\text{L}$ , 加 ddH<sub>2</sub>O 至总体积为 25  $\mu\text{L}$ 。反应条件: 94  $^{\circ}\text{C}$  预变性 3 min; 94  $^{\circ}\text{C}$  40 s, 59.1  $^{\circ}\text{C}$  40 s, 72  $^{\circ}\text{C}$  40 s, 33 cycles; 72  $^{\circ}\text{C}$  最终延伸 10 min。每个样本重复 3 次。PCR 产物经 1.5% TAE 琼脂糖凝胶电泳分析, EB 染色。用 BandScan 软件对电泳条带光密度进行计算。

### 1.6 血清提取及 E<sub>2</sub> 水平测定

尾部静脉抽血 1~2 mL, 放入 5 mL 离心管中, 4  $^{\circ}\text{C}$  静置 4 h, 4  $^{\circ}\text{C}$ 、5 000  $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$  离心 10 min。取血清, 保存于 -70  $^{\circ}\text{C}$  冰箱。使用 Beckman Coulter Immunoassay System 采用免疫荧光法测定 E<sub>2</sub> 浓度。

### 1.7 数据处理与统计

表达结果按目的基因条带光密度/18S 条带光密度计算。实验数据经 Excel 进行统计分析, 用平均值  $\pm$  标准差 ( $\bar{X} \pm \text{SD}$ ) 表示。组间数据两两比较采用 *t* 检验法。

## 2 结果和分析

### 2.1 RNA 电泳检测

总 RNA 提取后, 取 3  $\mu\text{L}$  与 2  $\mu\text{L}$  溴酚兰上样缓冲液混合, 经 1% TAE 琼脂糖凝胶电泳检测。结果如图 1 所示, 出现 28S、18S、5S 3 条带, 说明样品纯度合格。

### 2.2 4-NP 对 ER 和 CYP1A 表达的影响

雌鲫经腹腔注射 E<sub>2</sub>、NP 后, 在 24 h、48 h ER 和 CYP1A 表达上调 (图 2)。ER 表达经 E<sub>2</sub> 诱导后上调极显著 ( $P < 0.01$ )。1  $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  NP 处理后 24 h, ER 表达与对照组比较差异极显著 ( $P < 0.01$ ), 处理后 48 h 差异显著 ( $P < 0.05$ ); CYP1A 表达与对照组比较差异显著 ( $P < 0.05$ )。50  $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  4-NP 处理后 24 h, ER 表达与对照组比较差异极显著 ( $P < 0.01$ ), CYP1A 表达与对照组比较差异显著 ( $P < 0.05$ ); 处理 48 h 后, ER 表达与对照组比较差异显著 ( $P < 0.05$ ); CYP1A 表达与对照组比较差异极显著 ( $P < 0.01$ )。100  $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$

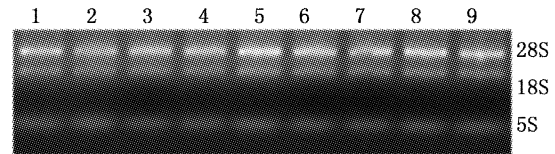


图 1 鲫肝脏总 RNA 电泳图  
Fig. 1 Total RNA of liver of *Carassius auratus* separated on agarose gel

1. 对照组; 2. E<sub>2</sub> 处理 24 h 组; 3. E<sub>2</sub> 处理 48 h 组; 4, 5, 6 分别为 1, 50, 100  $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  的 4-NP 在 24 h 的处理组; 7, 8, 9 分别为 1, 50, 100  $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  的 4-NP 在 48 h 的处理组  
1. control; 2. E<sub>2</sub> treatment group in 24 h; 3. E<sub>2</sub> treatment group in 48 h; 4, 5, 6 represent treatment with 1, 50 and 100  $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  of 4-NP in 24 h respectively; 7, 8, 9 represent treatment with 1, 50 and 100  $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  of 4-NP in 48 h respectively

4-NP 处理 24 h、48 h 后 ER 和 CYP1A 表达在与对照组比较差异极显著 ( $P < 0.01$ )。1、50  $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  4-NP 对 ER 表达的诱导效应小于 E<sub>2</sub>, 100  $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  4-NP 的效应接近 E<sub>2</sub>。另外, 在各实验组中, E<sub>2</sub> 或 NP 在 24 h 内对 ER 表达的影响比 48 h 明显。4-NP 对 CYP1A 表达有上调作用, 并且表达随注射浓度上升而增强 (具剂量-依赖效应)。

### 2.3 4-NP 对血清中 E<sub>2</sub> 的影响

在 48 h 内, E<sub>2</sub> 水平随 4-NP 注射量增加而逐渐下降 (表 1)。1  $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  处理后 24 h 与对照组比较差异显著 ( $P < 0.05$ ), 但在 48 h 后有所回升; 50  $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  处理后 24 h、48 h 与对照组比较差异极显著 ( $P < 0.01$ ); 100  $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  处理后 24 h 对照组比较差异显著 ( $P < 0.05$ ), 48 h 与对照组比较差异极显著 ( $P < 0.01$ )。

## 3 讨论

### 3.1 4-NP 对 ER 表达的影响

$\alpha$  型雌激素受体 (ER- $\alpha$ ) 通路是雌激素作用的主要途径。ER- $\alpha$  属于核内受体超家族, 通常情况下, 受体以二聚体的形式与雌激素结合, 启动雌激素应答元件 (estrogen responsive elements, EREs) 转录, 从而实现雌激素作用<sup>[14]</sup>。雌激素应答元件包括卵黄蛋白原基因 (VTG gene)<sup>[15-16]</sup>, ER 基因<sup>[15,17]</sup>, 绒毛膜促性腺激素基因 (choriogenin gene)<sup>[17]</sup>, 等一系列基因。Pakel 等<sup>[15]</sup> 研究发现, 虹鳟注射 E<sub>2</sub> 后, 肝脏 ER mRNA 和 VTG mRNA 显著增加, 但在 15 d 后开始逐渐恢复到原来水平。说明 E<sub>2</sub> 短期内能诱导 ER 的

转录。而本实验结果也显示出 E<sub>2</sub> 对 ER-α 表达的诱导能力。

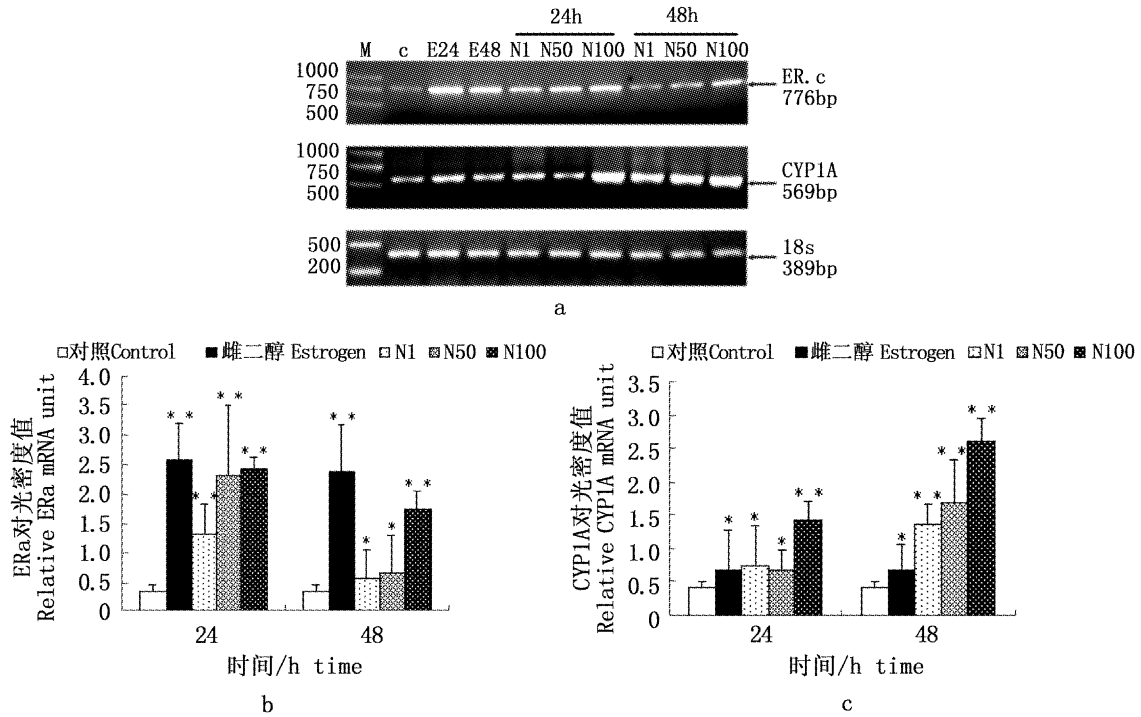


图 2 雌鲫腹腔注射不同浓度 4-NP 对 ER 以及 CYP1A 表达的影响

Fig. 2 Effect of 4-NP on ER and CYP1A expression in female *Carassius auratus*

a. RT-PCR 产物经 1.5% TAE 琼脂糖凝胶电泳结果, E24、E48 表示注射量为 1 mg · kg<sup>-1</sup> 的雌二醇在 24 h 和 48 h 的作用结果, N1、N50、N100 分别表示注射量为 1、50、100 mg · kg<sup>-1</sup> 的 4-NP; b. 三次 RT-PCR 结果的统计分析, ER 表达结果经 18S 进行矫正; c. 三次 RT-PCR 结果的统计分析, CYP1A 表达结果经 18S 进行矫正

a. Products of RT-PCR separated by TAE-1.5% agarose gel, E24 and E48 represent treatment with 1 mg · kg<sup>-1</sup> of E<sub>2</sub> in 24 h and 48 h respectively, N1, N50 and N100 represent 1, 50 and 100 mg · kg<sup>-1</sup> of 4-NP respectively; b. Statistical analysis of RT-PCR from 3 independent experiments, relative ER expression levels were adjusted by using the ratio of ER density to 18S density; c. Statistical analysis of RT-PCR from 3 independent experiments, relative ER expression levels were adjusted by using the ratio of CYP1A density to 18S density. \* P < 0.05, \*\* P < 0.01

表 1 腹腔注射不同浓度 4-NP 对雌鲫不同时间血清中 E<sub>2</sub> 水平的影响 (X̄ ± SD)

Tab. 1 Effect of 4-NP on E<sub>2</sub> level in female *Carassius auratus*'s blood serum mg · mL<sup>-1</sup>

	对照 control	壬基酚注射浓度 dose of injection of 4-NP		
		1 mg · kg <sup>-1</sup>	50 mg · kg <sup>-1</sup>	100 mg · kg <sup>-1</sup>
0 h	247.7 ± 66.87	245.63 ± 75.62	257.71 ± 65.92	255.29 ± 65.62
4 h	250.24 ± 65.85	167.75 ± 51.23 *	147.83 ± 14.44 **	161.33 ± 8.02 *
48 h	252.8 ± 66.43	193.5 ± 84.07	129.25 ± 46.55 **	127.67 ± 21.55 **

注: \* 差异显著 (P < 0.05); \*\* 差异极显著 (P < 0.01)

Notes: \* significant difference (P < 0.05); \*\* extremely significant difference (P < 0.01)

目前在鱼类的研究中, 已证实 4-NP 有一定的雌激素效应。Madsen 等<sup>[18]</sup> 用 E<sub>2</sub>、4-NP 对鲑鱼 (*Salmo salar*) 进行诱导, 发现 E<sub>2</sub> 和 4-NP 均能增加血浆中钙离子水平以及增强 VTG 的合成。

Chang 等<sup>[19]</sup> 在培养尖头鲃 (*Phoxinus oxycephalus*) 的肝细胞中加入 4-NP, 结果发现浓度为 10<sup>-5</sup> mol · L<sup>-1</sup> 时能显著增加肝细胞 VTG 的合成, 而在 4-NP 浓度为 10<sup>-4</sup> mol · L<sup>-1</sup> 时 VTG 合成能力下降, 4-

NP 浓度为  $10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  时肝细胞死亡,说明了 NP 的毒性;当同时加入 4-NP 和雌激素受体阻断剂三苯氧胺 (tamoxifen) 时,VTG 合成能力下降,说明在体外 4-NP 能作用于 ER 从而诱导 VTG 合成。目前通过体外实验发现 4-NP 能通过 ER- $\alpha$  途径促进马苏大马哈鱼 (*Oncorhynchus masou*) 促性腺激素 (GTH) 和黄体生成素  $\beta$  (LH- $\beta$ ) 的表达,但 4-NP 对促卵泡激素  $\beta$  (FSH $\beta$ ) 表达的诱导并不通过 ER- $\alpha$  途径<sup>[20]</sup>。

本实验结果显示, $E_2$ 、4-NP 在鲫体内 24 h 和 48 h 均能显著增加 ER- $\alpha$  的转录,呈剂量-依赖效应,说明 4-NP 与 ER- $\alpha$  表达的上调有一定关系。 $1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 、 $50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  4-NP 的效应小于  $1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} E_2$ , $100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  的 4-NP 的效应接近  $1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} E_2$ ,表明 NP 有弱雌激素效应。另外,结果显示 4-NP 24 h 内对 ER- $\alpha$  表达的影响比 48 h 明显,表明 4-NP 在短期内对 ER- $\alpha$  有明显作用。

### 3.2 4-NP 对 $E_2$ 水平以及 CYP1A 的影响

雌激素应答元件表达受  $E_2$  水平调控,因此  $E_2$  对鱼的卵黄形成、性腺发育和卵细胞成熟等方面有重要作用。近来研究发现 4-NP 对鱼类具有雌激素效应<sup>[21-22]</sup>。目前关于 4-NP 对  $E_2$  水平影响的研究的结果并不一致。Baek 等<sup>[23]</sup>在体外培养的长大颌口鳅虎鱼 (*Chasmichthys dolichognathus*) 卵巢组织中加入 4-NP,结果发现 4-NP 导致了雌激素水平的上升。Kazeto 等<sup>[24]</sup>研究发现斑点叉尾鲷 (*Ictalurus punctatus*) 和斑马鱼经 4-NP 诱导后,其脑部和垂体的 P450 芳香化酶 (CYP19A2) 表达上调。由于 P450 芳香化酶具有将雄激素转换成雌激素的作用,这暗示 NP 可能通过促进 P450 芳香化酶表达从而上调  $E_2$  水平,最终实现雌激素效应。然而,在雄性鲤的研究中发现,4-NP 并没有显著提高雄性鲤血浆中  $E_2$ 、睾酮 (testosterone) 和 VTG 水平<sup>[25]</sup>。Thibaut 等<sup>[26]</sup>研究发现,在体外培养的鲤性腺组织中,浓度为  $10 \sim 100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  的 4-NP 对  $E_2$  代谢有抑制作用。

结果显示,在 48 h 内 4-NP 能抑制雌鲫血清中  $E_2$  的水平,随着浓度的升高血清中  $E_2$  水平越低,同时本实验发现 4-NP 能促进 ER- $\alpha$  的表达,表明 4-NP 在体内能代替雌激素作用于雌激素受体 ER 实现 EREs 的表达,最终实现雌激素效应。

Yadetic 等<sup>[21]</sup>研究发现,4-NP 在幼年大西洋鲑 (*Salmo salar*) 体内能促进肝脏 ER、VTG 以及 Zrp 的表达,呈剂量-依赖效应,并且发现 4-NP 能抑制  $E_2$  与 ER 的结合,从而得出 4-NP 能通过 ER 途径诱导 ER、VTG 以及 Zrp 的表达的结论。我们的研究结果与之相一致。结合以上结果,我们得出结论,4-NP 在雌鲫体内通过 ER $\alpha$  途径实现雌激素效应。

CYP1A 属于细胞色素 P450 酶系超家族。哺乳类的 CYP1A 家族中 CYP1A1 和 CYP1A2 两种,而鱼类只有 CYP1A 一种形式<sup>[27]</sup>。CYP1A 受外源污染物 (如 TCDD 等) 的调控,对体内毒物代谢具有重要作用,为环境毒理学研究的一个重要指标<sup>[28]</sup>。研究发现 CYP1A 对  $E_2$  具有羟化作用,促进  $E_2$  的代谢<sup>[13]</sup>,能造成  $E_2$  水平的下降。因此我们推测 4-NP 能类似二噁英能促进 CYP1A 的 mRNA 水平上升,从而导致  $E_2$  水平的下降<sup>[29-30]</sup>。本实验结果发现,4-NP 对鲫的 CYP1A 基因的表达具有上调作用,并呈剂量-依赖效应。实验也证实,4-NP 可通过对 CYP1A 的诱导促使鲫血清  $E_2$  水平的下降。

结合本实验及其他研究者的结果,可以看出,内分泌干扰物的作用方式非常复杂,其所产生的效应以及作用机制可能与不同组织、化学结构、作用浓度等因素有关,因为本实验的研究条件 (如温度等)、实验材料等与之前其他的研究并不完全相同,因此可能会得出不同的结果。

本实验显示实验组经 4-NP 诱导后,ER- $\alpha$  和 CYP1A 表达增加,呈剂量-依赖效应。并且  $100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  的 4-NP 的效应接近  $1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} E_2$ ,表明 4-NP 有弱雌激素效应。另一方面,4-NP 能抑制雌鲫血清中  $E_2$  的水平。以上实验结果表明 4-NP 在鲫鱼体内通过 ER- $\alpha$  途径实现雌激素效应,并且 4-NP 通过诱导 CYP1A 表达促使鲫鱼血清  $E_2$  水平的下降。

目前,对于 4-NP 对淡水鱼类的内分泌扰乱作用的研究刚刚起步,其在淡水鱼类体内作用机制,诸如其是否能直接与受体结合,以及是否有其他因子参与,待进一步探讨。

### 参考文献:

- [1] Petrovic M, Eljarrat E, Lopez de Alda M J, et al. Endocrine disrupting compounds and other emerging

- contaminants in the environment: A survey on new monitoring strategies and occurrence data[J]. *Anal Bioanal Chem*, 2004, 378: 549–562.
- [2] Danzo B J. The effect of environmental hormones on reproduction [J]. *Cellular and Molecular Life Science*, 1998, 54:1249–1264.
- [3] 余楠,舒为群. 烷基酚类化合物雌激素效应的研究进展[J]. *环境与健康杂志*, 2004, 21(4):267–269.
- [4] Soto A M, Justicia H, Wray J W, *et al.* P-Nonylphenol: an estrogenic xenobiotic released from “Modified” polystyrene[J]. *Environmental Health Perspectives*, 1991, 92:167–173.
- [5] Andersen H R, Andersson A M, Arnold S F. Comparison of shortterm estrogenicity tests for identification of hormonedisrupting chemicals [J]. *Environmental Health Perspectives*, 1999, 17(suppl 1):89–108.
- [6] Jørgensen M, Vendelbo B, Skakkebak N E, *et al.* Assaying estrogenicity by quantitating the expression levels of endogenous [J]. *Environmental Health Perspectives*, 2000, 108(5):403–412.
- [7] 黄毅娜,程薇波,徐培渝,等. 子宫营养试验检测对-壬基酚的雌激素样活性[J]. *现代预防医学*, 2003, 30(5):660–662.
- [8] 邓茂先,吴德生,张立实,等. 壬基酚对雌性 SD 大鼠早期性发育的影响[J]. *中国公共卫生*, 2002, 18(2):147–148.
- [9] 张浩,曾祥贵,程薇波,等. 壬基酚对成年雄性 SD 大鼠生殖功能的影响[J]. *四川大学学报(医学版)*, 2003, 34(2):295–297.
- [10] Chitra K C, Latchoumycandane C, Mathur P P. Effect of nonylphenol on the antioxidant system in epididymal sperm of rats[J]. *Arch Toxicol*, 2002, 76: 545–551.
- [11] 周忠良,李康,于静,等. 壬基酚对鲫鱼 (*Carassius auratus*) 的雌激素效应研究[J]. *环境科学研究*, 2004, 17(3):60–61, 70.
- [12] Scippo M L, Argiris C, van de Weerd C, *et al.* Recombinant human estrogen, androgen and progesterone receptors for detection of potential endocrine disruptors [J]. *Anal Bioanal Chem*, 2003, 378:664–669.
- [13] Valentina M, Augustine A. The xenoestrogen 4-nonylphenol modulates hepatic gene expression of pregnane X receptor, aryl hydrocarbon receptor, CYP3A and CYP1A1 in juvenile Atlantic salmon (*Salmo salar*) [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C*, 2006, 142:142–150.
- [14] Weigel N L, Zhang Y X. Ligand-independent activation of steroid hormone receptors [J]. *Mol Med*, 1998, 76:469–479.
- [15] Pakel F, Féon S, Gac F L, *et al.* *In vivo* estrogen induction of hepatic estrogen receptor mRNA and correlation with vitellogenin mRNA in rainbow trout [J]. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 1991, 75:205–212.
- [16] Denslow N D, Bowman C J, Ferguson R J, *et al.* Induction of gene expression in sheepshead minnows (*Cyprinodon variegatus*) treated with 17 $\beta$ -estradiol, diethylstilbestrol, or ethinylestradiol: the use of mRNA fingerprints as an indicator of gene regulation [J]. *General and Comparative Endocrinology*, 2001, 121(3):250–260.
- [17] Larkin P, Sabo-Attworrd T L, Kelso J, *et al.* Gene expression analysis of largemouth bass exposed to estradiol, nonylphenol, and p,p'-DDE [J]. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*, 2002, 133(4):543–557.
- [18] Madsen S S, Mathiesen A B, Korsgaard B. Effects of 17 $\beta$ -estradiol and 4-nonylphenol on smoltification and vitellogenesis in Atlantic salmon (*Salmo salar*) [J]. *Fish Physiology and Biochemistry*, 1997, 17: 303–312.
- [19] Chang B P, Byung H K, Oh S N, *et al.* Induction of *in vitro* vitellogenin synthesis by bisphenol, nonylphenol and octylphenol in Chinese minnow (*Phoxinus oxycephalus*) hepatocytes [J]. *Korean J Biol Sci*, 2003, 7:227–235.
- [20] Sejung M, Yujung J, Eunju C. Expression of gonadotropin subunit genes following 4-nonylphenol exposure in masu salmon—effects on transcript levels and promoter activities via estrogen receptor alpha [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part B*, 142, 2005, 383–390.
- [21] Yadetie F, Arukwe A, Goksøyr A, *et al.* Induction of hepatic estrogen receptor in juvenile Atlantic salmon *in vivo* by the environmental estrogen, 4-nonylphenol [J]. *The Science of the Total Environment* 233, 1999, 201–210.
- [22] 吴伟,瞿建宏. 壬基酚在鱼体组织中的累积及对鱼类性腺的影响 [J]. *中国环境科学*, 2005, 25(4):420–423.
- [23] Baek H J, Park M H, Lee Y D, *et al.* Effect of *in vitro* xenoestrogens on steroidogenesis in mature female fish, *Chasmichthys dolichognathus* [J]. *Fish*

- Physiology and Biochemistry, 2003, 28:413-414.
- [24] Kazeto Y, Goto-Kazeto R, Place A R, *et al.* Aromatase expression in zebrafish and channel catfish brains: changes in transcript abundance associated with the reproductive cycle and exposure to endocrine disrupting chemicals[J]. Fish Physiology and Biochemistry, 2003, 28:29-32.
- [25] Villeneuve D L, Villalobosa S A, Keith T L. Effects of waterborne exposure to 4-nonylphenol on plasma sex steroid and vitellogenin concentrations in sexually mature male carp [J]. Chemosphere, 2002, 47:15-28.
- [26] Thibaut R, Porte C. Effects of endocrine disrupters on sex steroid synthesis and metabolism pathways in fish [J]. Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology, 2004, 92:485-494.
- [27] Stegeman J J. Nomenclature for hydrocarbon-inducible cytochrome P450 in fish [J]. Marine Environmental Research, 1992, 34:133-138.
- [28] 冷欣夫 邱星辉. 细胞色素 P450 酶系的结构功能与应用前景[M]. 北京:科学出版社,2001:56-70.
- [29] 梁勇,黄港住,徐盈,等. 2,3,7,8-四氯代二苯并二噁英(TCDD)和苯并芘(B[a]P)对原代培养鲫鱼肝细胞中卵黄蛋白原诱导的影响[J]. 科学通报,2004,49(16):1605-1610.
- [30] Asok K D, Barbara A B W, Amanda L T, *et al.* Demonstration of TCDD-attenuated P450 steroidogenic enzyme mRNA levels in rat granulosa cells *in vitro* using competitive RT-PCR [J]. Mol Cell Endocrinol, 2000, 164:5-18.

## 量和单位的使用

1. 应严格执行 GB 3100~3102—93 规定的量和单位的名称、符号和书写规则。
2. 量的符号通常是单个拉丁字母或希腊字母,有时带有下标或其他的说明性标记。无论正文的其他字体如何,量的符号必须采用斜体印刷(pH 例外),符号后不附加圆点(正常语法句子结尾标点符号除外)。
3. 在表达量值时,在公式、图、表和文字叙述中,一律使用单位的国际符号,且无例外地用正体。单位符号与数值间要留适当间隙。据此,必须指出,在表示摄氏温度时,摄氏度的符号℃的前面应留空隙。惟一例外的是平面角的单位度、分、秒,数值与单位符号间不留空隙。
4. 不许对单位符号进行修饰,如加缩写点、角标、复数形式,或在组合单位符号中插入化学元素符号等说明性记号,比如,mgN·L<sup>-1</sup>,等。
5. 在插图中用特定单位表示量的数值时,应采用量与单位相比的形式,如,浓度/(mg·L<sup>-1</sup>)。
6. 不能把 ppm、ppb、ppt 及 rpm 等缩写作单位使用。
8. 词头的符号应当用正体印刷,它与单位符号间不留空隙,词头不得独立使用,也不能重叠使用。如 μm,不能单独用 μ;mg 不能写成 μkg。
9. 组合单位的分母中一般不加词头,一般也不在分子分母同时加词头。如 kJ·mol<sup>-1</sup>,不能写成 J·mmol<sup>-1</sup>,mg·g<sup>-1</sup>不能写成 μg·mg<sup>-1</sup>。
10. 不用废弃单位,如原子的质量单位符号是 u,而不是 Da,D,也不能用 kD。换算 1 u = 1 D。