

雌二醇、壬基酚、多氯联苯、镉和锌及其混合物对唐鱼的雌激素效应比较

杨丽丽, 张晶, 方展强*

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

摘要:以唐鱼卵黄蛋白原(Vtg)为检测指标,利用 Native-PAGE 电泳、唐鱼 Vtg 特异性脂蛋白染色和间接酶联免疫吸附(ELISA)技术分别检测了17 β -雌二醇(E₂)、壬基酚(NP)、多氯联苯(PCBs)、Cd²⁺、Zn²⁺及其混合物对唐鱼的雌激素效应。Native-PAGE 结果显示,10 μ g/L、50 μ g/L E₂水体暴露7、14 d均诱导雄性唐鱼体内合成了Vtg,E₂对唐鱼的雌激素效应具有时间累积效应,并随浓度升高而增强。而ELISA检测结果则显示0.1、0.5、1.0 μ g/L E₂7、14 d和200、300 μ g/L NP 14 d暴露使唐鱼合成了Vtg。结果表明,NP、Cd²⁺、Zn²⁺与不同浓度的E₂联合雌激素效应不同于单一毒物的雌激素效应,NP与E₂表现为协同促进作用。并讨论了环境雌激素的联合作用机制相关问题。

关键词:唐鱼;内分泌干扰物;卵黄蛋白原(Vtg);Native-PAGE 电泳

中图分类号:Q 176; X 171.5

文献标志码:A

内分泌干扰物(endocrine disrupting chemicals, EDCs)能够影响生物体正常的内分泌功能,它对生态环境和人类健康造成的巨大威胁引起了国际社会的普遍关注,是近年来各国研究的热点,主要侧重于探讨其检测方法、内分泌干扰效应。现已证实的环境雌激素约有70余种,随着工商业的发展,种类还在不断地增加,它们在生态系统中往往是同时存在、共同影响生物体内内分泌系统的平衡,因此研究这些污染物的联合作用毒性,更符合实际环境状态,对其生态风险评价及相应环保条例的制定也更具有意义。

以唐鱼(*Tanichthys albonubes*)卵黄蛋白原(Vtg)为生物标志物检测内分泌干扰物的研究已有一些报道,先后在唐鱼Vtg基因的克隆与分析^[1]、唐鱼Vtg的诱导、纯化与鉴定^[2]、唐鱼卵黄脂磷蛋白(Lv)的纯化与免疫原性分析^[3]等方面开展研究。建立了唐鱼卵黄蛋白原的间接ELISA检测方法,定量检测了有机氯农药滴滴涕(DDTs)诱导下雄性唐鱼体内Vtg的变化,证明

DDT对唐鱼具有雌激素效应^[4];采用Native-PAGE电泳技术结合糖、脂、磷蛋白特异性染色的方法,定性分析了食品中内分泌干扰物对唐鱼的雌激素效应。在这些研究的基础上,本实验选取雌二醇(E₂)、壬基酚(NP)、多氯联苯(PCBs)、Cd²⁺和Zn²⁺等5种具有代表性的物质为研究对象,将Native-PAGE电泳、唐鱼Vtg脂特异性染色和间接ELISA定性分析3种技术手段结合起来,简化检测方法,研究不同浓度的E₂、NP、PCBs、Cd²⁺和Zn²⁺作用不同时间,对唐鱼卵黄蛋白原的诱导效果;同时研究E₂、NP、PCBs、Cd²⁺、Zn²⁺按不同的浓度比例组合、水体暴露不同时间对唐鱼体内Vtg诱导的影响,并与单一化合物对它的诱导情况作比较,探索这些物质相互作用的方式,同时进一步补充以唐鱼卵黄蛋白原为生物标志物监测环境雌激素的实验数据,丰富鱼类卵黄蛋白原的检测方法,为分析野外实际环境中内分泌干扰物的危害效应提供有效的技术方法和资料,为水体环境污染的监控防治工作提供参考。

收稿日期:2011-03-06 修回日期:2011-04-20

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

通讯作者:方展强,E-mail:fangzqh@scnu.edu.cn

1 材料与方 法

1.1 主要试剂

17 β -雌二醇(E₂) (Sigma 公司),壬基酚(NP) (Sigma 公司),多氯联苯(PCBs, Aroclor 1248) (Sigma 公司),氯化镉(CdCl₂ · 2.5 H₂O) (广州化学试剂厂),七水合硫酸锌(ZnSO₄ · 7H₂O) (广州化学试剂厂),丙稀酰胺(Acr) (Promega 公司)等,所有试剂均为分析纯。唐鱼卵黄蛋白原和卵黄脂磷蛋白由本实验室提供。

1.2 试剂配制

暴露毒物配制 按常规方法配制。

样品缓冲液的配置 50 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0):Tris 0.605 7 g,1 mol/L HCl 2.92 mL,用双蒸水定容到 100 mL,调 pH 至 8.0,加入 2% 的 Aprotinin 溶液 1 mL,0.1 mol/L 的 PMSF 1 mL,4 °C 保存。

电泳相关试剂的配制 参照姚静等^[2-4]的方法。

ELISA 试剂的配制 参照姚静等^[4]的方法。

1.3 实验仪器

垂直平板电泳槽(北京六一仪器厂 DYCZ-30 型),电泳仪(北京六一仪器厂 DYY-7C 型),pH 计(HANNA pH211 型),酶标仪(BioRed680)。

1.4 实验动物

实验用唐鱼均为性成熟的成年个体,体长(2.940 ± 0.199) cm,体质量(0.240 ± 0.044) g,购自广州市花地湾花鸟鱼艺市场。购回后在实验室水族箱内驯养 2~4 周,待死亡率小于 2% 后区分雌雄,挑选形态健康饱满、反应灵敏的雄性个体作为实验鱼。

1.5 实验条件

实验用水 采用曝气 3 d 的自来水,水温(23 ± 3) °C,pH 为 6.8~7.2,溶氧量大于 6 mg/L,硬度约 2.4 度(德国度)。

实验方式 暴露实验在 2 000 mL 烧杯中进行,每个烧杯加入 1 500 mL 实验液,各放入雄性唐鱼 6 尾。实验采用半静态方式,自然光照,温度条件不设控制,隔天换水,隔天喂食,及时吸出残饵和排泄物。暴露浓度组设置见表 1 和表 2。

1.6 实验方法

唐鱼整体匀浆液的制备 暴露实验结束后,每条鱼编号,测量体长、体质量,放入匀浆器,

加入 1 mL 4 °C 预冷的匀浆缓冲液(50 mmol/L Tris-HCl,pH 8.0),冰浴条件下匀浆,匀浆液 4 °C,10 000 r/min 离心 20 min,上清液经 0.45 μm 微孔滤膜过滤后分装保存于 -80 °C。

表 1 单一化合物暴露浓度组设置
Tab.1 Setup of the exposure concentrations of single compounds

组别 group	暴露浓度 exposure concentration
空白对照组 blank control	-
丙酮溶剂对照组 acetone control	-
E ₂ 实验组/(μg/L)	0.1,0.5,1,1.0,10.0,50.0
NP 实验组/(μg/L)	50,100,150,200,300
PCBs 实验组/(μg/L)	25,50,75,100,300,600,1 000,1 500
Cd ²⁺ 实验组/(mg/L)	0.556,1.112,2.224
Zn ²⁺ 实验组/(mg/L)	2.037 5,4.075,8.150

注:每个浓度组设置 2 个平行,暴露总时间为 14 d,于第 7 天和第 14 天分别取样。

Notes: Two parallel experiments were set in each concentration group. The total exposure time was 14 d. Fishes were sampled in the first 7 d and 14 d, respectively.

表 2 混合化合物暴露浓度组设置
Tab.2 Setup of the exposure concentrations of mixed compounds

组别 group	暴露浓度 exposure concentration
空白对照组 blank control	-
溶剂对照组 acetone control	-
NP(μg/L) + E ₂ (μg/L) 实验组:	50 + 0.5, 50 + 1, 100 + 0.5, 100 + 1.0
NP(μg/L) + PCBs(μg/L) 实验组:	100 + 300, 200 + 300, 100 + 600, 200 + 600
Cd ²⁺ (mg/L) + E ₂ (μg/L) 实验组:	0.556 + 10, 2.224 + 10, 0.556 + 50, 2.224 + 50
Zn ²⁺ (mg/L) + E ₂ (μg/L) 实验组:	2.037 5 + 10, 8.15 + 10, 2.037 5 + 50, 8.15 + 50
Cd ²⁺ (mg/L) + Zn ²⁺ (mg/L) 实验组:	0.556 + 2.037 5, 1.112 + 4.075, 2.224 + 8.15
Cd ²⁺ (mg/L) + Zn ²⁺ (mg/L) + NP(μg/L) 实验组:	0.556 + 2.037 5 + 200, 2.224 + 8.15 + 200
Cd ²⁺ (mg/L) + Zn ²⁺ (mg/L) + PCBs(μg/L) 实验组:	0.556 + 2.037 5 + 600, 2.224 + 8.15 + 600

注:每个浓度组设置 2 个平行,暴露总时间为 14 d,于第 7 天和第 14 d 分别取样。

Notes: two parallel experiments were set in each concentration group. The total exposure time was 14 d. Fishes were sampled in the first 7 d and 14 d, respectively.

Native-PAGE 电泳 Native-PAGE 4% ~ 15% 分离胶和 Native-PAGE 4% 浓缩胶的配制见表 3、表 4。将梯度混匀仪置于磁力搅拌器上,关

上梯度混匀仪开关,用胶管连接蠕动泵和电泳槽。注入分离胶,室温放置过夜使凝胶充分聚合。

凝胶染色 (1) 考马斯亮蓝染色:凝胶经双蒸水冲洗后,放入 0.1% 考马斯亮蓝 R-250 染液中染色过夜,再用脱色液脱色至背景清晰,扫描成像。(2) 苏丹黑 B 染色:参照杨安钢等^[5]的方法,凝胶经双蒸水冲洗后,用 1% 苏丹黑 B 染色过夜,再用脱色液脱色至背景清晰后,扫描成像。

表 3 Native-PAGE 4% ~ 15% 分离胶的配制
Tab. 3 Native-PAGE 4% - 15% separating gel preparation

	4% 分离胶	15% 分离胶
30% Acr-Bis	0.8 mL	3 mL
Native-PAGE 分离胶缓冲液	1.5 mL	1.5 mL
双蒸水 distilled water	3.7 mL	1.5 mL
10% AP	35 μ L	35 μ L
TEMED	6 μ L	6 μ L

表 4 Native-PAGE 4% 浓缩胶的配制
Tab. 4 Native-PAGE 4% stacking gel preparation

	4% 浓缩胶
30% Acr-Bis	0.8 mL
Native-PAGE 浓缩胶缓冲液	1.5 mL
双蒸水 distilled water	3.7 mL
10% AP	35 μ L
TEMED	6 μ L

间接 ELISA 方法检测唐鱼卵黄蛋白原按姚静等^[4]的方法进行。

1.7 数据处理

间接 ELISA 实验结果用比值法表示,比值(T)根据下列公式计算:

$$\text{比值}(T) = \frac{\text{测定标本 } A_{450} - \text{空白 } A_{450}}{\text{阴性对照 } A_{450} - \text{空白 } A_{450}} \geq 2.1$$

T 值大于或等于 2.1 即为阳性,小于 2.1 而大于 1.5 为可疑,小于 1.5 为阴性。运用 Excel 2003 软件计算各组数据的平均值,平均值大于或等于 2.1 的浓度组判为阳性组,1.5 ~ 2.1 为可疑组,小于 1.5 判为阴性组。

2 结果与分析

2.1 包被抗原、Lv 抗血清和兔抗大鼠 IgG-HRP 的最佳工作浓度

倍比稀释抗原、Lv 抗血清和兔抗大鼠 IgG-HRP,做棋盘滴定实验,选择阴性标本的吸光度值小于 0.08、阳性标本的吸光度值在 1.0 附近的稀

释倍数确定为各自的工作浓度。经棋盘滴定,确定抗原稀释度为 1:4 000, Lv 抗血清稀释度为 1:400,兔抗大鼠 IgG-HRP 稀释度为 1:2 000。

2.2 雌二醇、壬基酚、多氯联苯、镉和锌及其混合物对唐鱼的雌激素效应

卵黄蛋白原富含磷酸、脂和糖基团,在常规聚丙烯酰胺凝胶电泳后,只要再进行蛋白质的糖、脂、磷染色,就可以确定卵黄蛋白原在电泳图谱上的位置。本实验参照姚静等^[2]的研究结果,证明在分子量标准蛋白的第二条带 440 ku 附近能被脂、磷或糖蛋白任何一种特异染色的只有 Vtg 及其降解产物。电泳法具有简便、快速、经济的优点,并可定性反映、比较内分泌干扰物的影响程度,对于受污染较严重的样品可直接采用此方法检测。

2.3 17 β -雌二醇(E_2)对雄性唐鱼 Vtg 的诱导

Native-PAGE 电泳检测 5 个 E_2 浓度组处理雄性唐鱼 7、14 d,整体匀浆制得样品后经 Native-PAGE 电泳,考马斯亮蓝和苏丹黑 B 染色后,如图 1 所示, E_2 高浓度组(10 μ g/L、50 μ g/L) 7、14 d 均诱导雄性唐鱼合成出了 Vtg,见图 1 的 4、5、11、12 泳道,440 ku 下方的一条带,是 Vtg 热降解的产物。暴露时间从 7 d 延长到 14 d 时,两个浓度组的 Vtg 条带颜色都加深了,而且随着暴露浓度的升高,Vtg 条带从无到有,颜色由浅到深,说明诱导作用加强,Vtg 含量上升,这一现象表明 E_2 对唐鱼的雌激素效应具有时间累积效应,并与暴露浓度正相关。

间接 ELISA 方法检测 按照实验确定的稀释浓度取各组的样品稀释、包被,进行 ELISA 实验,每个样品设 3 个复孔,读出 A_{450} 后根据公式计算每条实验鱼的平均 T 值,然后求出每个浓度组的平均 T 值,数据如表 5,与电泳检测的结果基本趋势一致。 E_2 的诱导效应除 0.5 μ g/L 浓度组外都呈阳性,高浓度组的比值远超过 2.1,在电泳图谱上表现为条带颜色较深。

2.4 壬基酚(NP)、多氯联苯(PCB)、 Cd^{2+} 、 Zn^{2+} 对雄性唐鱼 Vtg 的诱导

Native-PAGE 电泳检测 在实验设置的暴露浓度下,NP、PCBs、 Cd^{2+} 、 Zn^{2+} 单独作用后的雄鱼整体匀浆液经 Native-PAGE 电泳、考马斯亮蓝和苏丹黑 B 染色,均未发现目标条带。

间接 ELISA 方法检测 检测结果显示 200 μ g/L、300 μ g/L NP 浓度组暴露 14 d Vtg 检出量

呈阳性,300 $\mu\text{g/L}$ NP 暴露 7 d、600 $\mu\text{g/L}$ PCBs 检测结果为阴性,实验结果的差异主要与这些物质暴露 14 d 的检出量为可疑, Cd^{2+} 、 Zn^{2+} 各浓度组质的雌激素活性强弱有关。

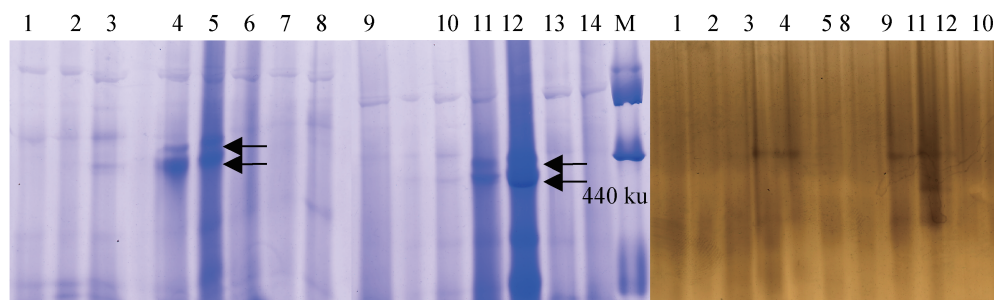


图1 E_2 诱导的雄性唐鱼整体匀浆液电泳图谱

Fig.1 Native-PAGE analysis of the whole body homogenate from E_2 treated male *T. albonubes*

7 d, Lane 1:0.1 $\mu\text{g/L}$ E_2 ; Lane 2:0.5 $\mu\text{g/L}$ E_2 ; Lane 3:1 $\mu\text{g/L}$ E_2 ; Lane 4:10 $\mu\text{g/L}$ E_2 ; Lane 5:50 $\mu\text{g/L}$ E_2 ; Lane 6:0; Lane 7: acetone control.

14 d, Lane 8:0.1 $\mu\text{g/L}$ E_2 ; Lane 9:1 $\mu\text{g/L}$ E_2 ; Lane 10:0.5 $\mu\text{g/L}$ E_2 ; Lane 11:10 $\mu\text{g/L}$ E_2 ; Lane 12:50 $\mu\text{g/L}$ E_2 ; Lane 13:0; Lane 14:acetone control.

表5 E_2 诱导组的 T 值

Tab.5 The T value of E_2 treated group

	7 d						14 d			
序号 no.	1	2	3	4	5	8	9	10	11	12
T 值	2.30	2.37	2.23	2.92	4.63	2.36	2.11	2.05	3.52	6.67

2.5 NP + E_2 对雄性唐鱼 Vtg 的诱导

Native-PAGE 电泳检测 由图 2 可知, NP + E_2 各浓度组作用 7、14 d 都可以诱导雄性唐鱼合成 Vtg, 经电泳、脂蛋白染色后, 条带颜色比

1.09 mg/mL Lv 蛋白染色后浅。50 $\mu\text{g/L}$ NP + 0.5 $\mu\text{g/L}$ E_2 浓度组 14 d 的电泳条带不清晰, 是由于 Vtg 含量低于其它 3 个组。

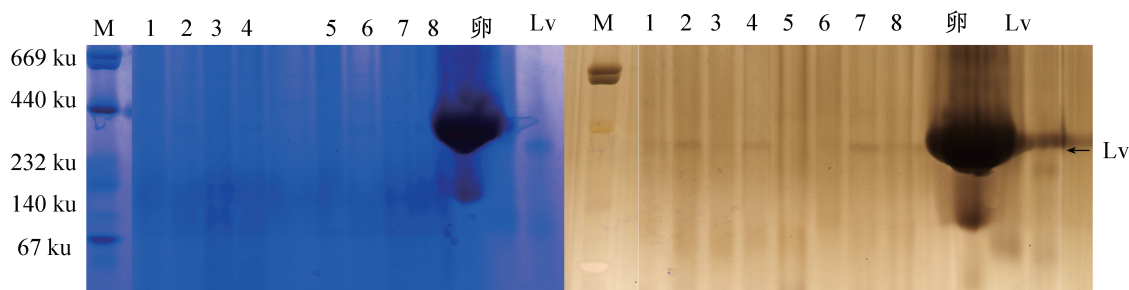


图2 NP + E_2 诱导的雄性唐鱼整体匀浆液电泳图谱

Fig.2 Native-PAGE analysis of the whole body homogenate from NP + E_2 treated male *T. albonubes*

7 d, Lane 1:50 $\mu\text{g/L}$ NP + 0.5 $\mu\text{g/L}$ E_2 ; Lane 2:50 $\mu\text{g/L}$ NP + 1 $\mu\text{g/L}$ E_2 ; Lane 3:100 $\mu\text{g/L}$ NP + 0.5 $\mu\text{g/L}$ E_2 ; Lane 4:100 $\mu\text{g/L}$ NP + 1 $\mu\text{g/L}$ E_2 .

14 d, Lane 5:50 $\mu\text{g/L}$ NP + 0.5 $\mu\text{g/L}$ E_2 ; Lane 6:50 $\mu\text{g/L}$ NP + 1 $\mu\text{g/L}$ E_2 ; Lane 7:100 $\mu\text{g/L}$ NP + 0.5 $\mu\text{g/L}$ E_2 ; Lane 8:100 $\mu\text{g/L}$ NP + 1 $\mu\text{g/L}$ E_2 .

由 E_2 对雄性唐鱼 Vtg 的诱导的实验结果可知, 0.5 $\mu\text{g/L}$ E_2 、1 $\mu\text{g/L}$ E_2 、50 $\mu\text{g/L}$ NP、100 $\mu\text{g/L}$ NP 单独作用时, Native-PAGE 电泳脂蛋白

染色都没有显示 Vtg 蛋白条带, 当与 NP 联合作用时, 在不同的暴露时间内发现了较明显的 Vtg 蛋白条带, 说明本实验条件下, NP 与 E_2 联合暴露

的雌激素效应明显强于单一毒物暴露结果。

间接 ELISA 方法检测 各浓度组 7、14 d 的 T 值均大于 2.1, 表明暴露引起了唐鱼 Vtg 的合成。

2.6 $Cd^{2+} + E_2$ 对雄性唐鱼 Vtg 的诱导

Native-PAGE 电泳检测 由图 3 可知, 雄鱼暴露于 0.556 mg/L $Cd^{2+} + 10 \mu\text{g/L } E_2$ 、2.224 mg/L $Cd^{2+} + 10 \mu\text{g/L } E_2$ 、0.556 mg/L $Cd^{2+} + 50 \mu\text{g/L } E_2$ 、2.224 mg/L $Cd^{2+} + 50 \mu\text{g/L } E_2$ 4 个联合作用组 7、14 d 后体内都合成了 Vtg, 0.556 mg/L Cd^{2+} 、2.224 mg/L Cd^{2+} 单组作用时, 雄鱼体内未检出 Vtg, 而 10 $\mu\text{g/L } E_2$ 、50 $\mu\text{g/L } E_2$ 单独作用 7、14 d 时可诱导雄鱼体内 Vtg 的产生, 表明它们的联合作用效应可能主要取决于 E_2 的浓度。此外, 由脂蛋白染色图可知, Cd^{2+} 诱导唐鱼体内合成了另一种未知蛋白, 也能被苏丹黑 B 染色, 分布在标准蛋白第 3 条带附近, 分子量明显小于 Vtg, 在 Cd^{2+} 诱导体外培养的剑尾鱼肝脏细胞时, 也有类似实验现象的报道^[6]。

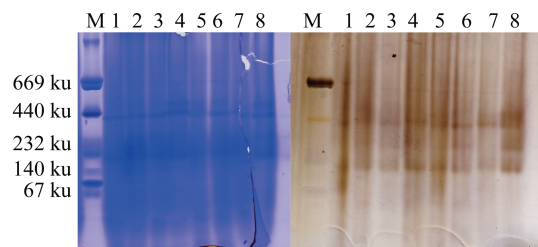


图 3 $Cd^{2+} + E_2$ 诱导的雄性唐鱼整体匀浆液电泳图谱

Fig. 3 Native-PAGE analysis of the whole body homogenate from $Cd^{2+} + E_2$ treated male *T. albonubes*

7 d, Lane 1: 0.556 mg/L $Cd^{2+} + 10 \mu\text{g/L } E_2$; Lane 2: 2.224 mg/L $Cd^{2+} + 10 \mu\text{g/L } E_2$; Lane 3: 0.556 mg/L $Cd^{2+} + 50 \mu\text{g/L } E_2$; Lane 4: 2.224 mg/L $Cd^{2+} + 50 \mu\text{g/L } E_2$.
14 d, Lane 5: 0.556 mg/L $Cd^{2+} + 10 \mu\text{g/L } E_2$; Lane 6: 2.224 mg/L $Cd^{2+} + 10 \mu\text{g/L } E_2$; Lane 7: 0.556 mg/L $Cd^{2+} + 50 \mu\text{g/L } E_2$; Lane 8: 2.224 mg/L $Cd^{2+} + 50 \mu\text{g/L } E_2$.

间接 ELISA 方法检测 T 值均大于 2.1, 结果呈阳性, 表示 Cd^{2+} 与 E_2 组合可诱导唐鱼 Vtg 产生。 $Cd^{2+} + E_2$ 浓度组的 T 值明显大于 NP + E_2 , 表明联合浓度组的雌激素效应主要受 E_2 浓度的影响, 另一种物质的作用效果不明显。

2.7 $Zn^{2+} + E_2$ 对雄性唐鱼 Vtg 的诱导

Native-PAGE 电泳检测 Zn^{2+} 与 E_2 组合

的 4 个浓度组暴露 7、14 d 后, 与对照组相比, 可引起雄鱼体内 Vtg 含量的上升, 组内蛋白条带颜色差异不明显, 它们的联合作用效应与 $Cd^{2+} + E_2$ 类似, 也主要取决于 E_2 (图 4)。

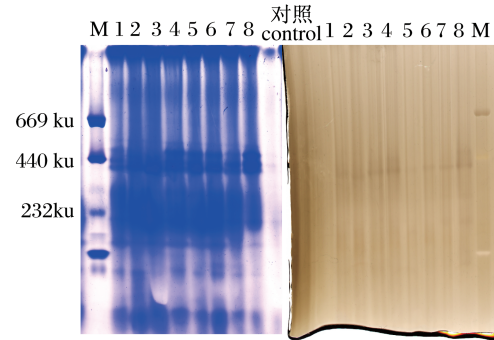


图 4 $Zn^{2+} + E_2$ 诱导的雄性唐鱼整体匀浆液电泳图谱

Fig. 4 Native-PAGE analysis of the whole body homogenate from $Zn^{2+} + E_2$ treated male *T. albonubes*

7 d, Lane 1: 2.037 5 mg/L $Zn^{2+} + 10 \mu\text{g/L } E_2$; Lane 2: 8.15 mg/L $Zn^{2+} + 10 \mu\text{g/L } E_2$; Lane 3: 2.037 5 mg/L $Zn^{2+} + 50 \mu\text{g/L } E_2$; Lane 4: 8.15 mg/L $Zn^{2+} + 50 \mu\text{g/L } E_2$.
14 d, Lane 5: 2.037 5 mg/L $Zn^{2+} + 10 \mu\text{g/L } E_2$; Lane 6: 8.15 mg/L $Zn^{2+} + 10 \mu\text{g/L } E_2$; Lane 7: 2.037 5 mg/L $Zn^{2+} + 50 \mu\text{g/L } E_2$; Lane 8: 8.15 mg/L $Zn^{2+} + 50 \mu\text{g/L } E_2$.

间接 ELISA 方法检测 免疫实验检测结果与电泳实验结果相同, T 值大于 2.1, 各联合浓度组均不同程度的诱导了唐鱼 Vtg 的合成。

2.8 NP + PCB、 $Cd^{2+} + Zn^{2+}$ 、 $Cd^{2+} + Zn^{2+} + NP$ 、 $Cd^{2+} + Zn^{2+} + PCB$ 对雄性唐鱼 Vtg 的诱导

Native-PAGE 电泳检测 唐鱼在上述几种物质的联合作用下, 暴露 7、14 d, 整体匀浆液经 Native-PAGE 电泳、考马斯亮蓝和苏丹黑 B 染色后未检出 Vtg 条带, 电泳检测结果呈阴性。

间接 ELISA 方法检测 200 $\mu\text{g/L } NP + 600 \mu\text{g/L } PCB$ 、200 $\mu\text{g/L } NP + 300 \mu\text{g/L } PCB$ 14 d 检出结果呈阳性, 7 d 检出结果为可疑, 其余浓度组的检出结果均为阴性。

3 讨论

3.1 使用 Native-PAGE 电泳技术检测雄性唐鱼体内 Vtg 的可行性

卵黄蛋白原是内分泌扰乱化学物质筛选的理想生物标记物, 广泛应用于检测、衡量各种潜在内分泌干扰物质的雌激素效应。常用的 Vtg 测定方

法有酶联免疫吸附试验(ELISA)、放免试验(RA)和免疫印记法(Western-blotting),这些方法的特异性较高,但操作复杂、成本高^[7-8]。相比之下,常规聚丙烯酰胺凝胶电泳(Native-PAGE)和SDS聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)这两种方法操作简便、成本较低^[3]。如果已知目标条带在电泳图谱上的相对位置,可直接运用这两种方法鉴别,如果对目标蛋白性质不了解,单独使用电泳方法就无法准确定位蛋白,另外对于一些性质不稳定,容易降解的蛋白,仅用电泳条带的位置来鉴别蛋白是否存在,会产生一些误差,需要其它辅助方法来进行校正,提高准确度。

卵黄蛋白原富含磷酸、脂和糖基团,根据卵黄蛋白原的这一性质,在常规聚丙烯酰胺凝胶电泳后,只要再进行蛋白质的糖、脂、磷染色,就可以确定卵黄蛋白原在电泳图谱上的位置,还可以进一步分析蛋白含量。这种鉴别方法已在金鱼(*Carassius auratus*)^[9]、真鲷(*Pagrosomus major*)^[6]、孔雀鱼(*Xiphophorus helleri*)^[10]、剑尾鱼^[11]和唐鱼^[12]卵黄蛋白原的性质分析和纯化鉴定实验中运用比较成熟。已知唐鱼的Vtg分子量是440 ku,使用高分子量标准蛋白做Marker时,与M2在同一水平位置,而且在4%~15%的Native-PAGE梯度胶中,唐鱼的整体匀浆液中处于这一位置的蛋白只有Vtg,但Vtg受热容易降解,降解产物与Lv条带的位置接近,因此鉴别时需要辅以蛋白特异染色的方法^[2]。在分子量标准蛋白的第二条带附近能被脂、磷或糖蛋白任何一种特异染色的也只有Vtg及其降解产物^[2],因此本实验只选取了脂蛋白特异染色辅助Native-PAGE电泳鉴别雄性唐鱼体内的Vtg,在不影响实验结果准确性的前提下简化检测方法。

3.2 间接ELISA方法用于定性分析的结果记录

ELISA是检测Vtg最常用的方法,其基本原理是利用酶标记的抗原或抗体,在固相载体上进行抗原或抗体的测定,常用的有间接法、双抗体(夹心)法和抗原竞争法^[13]。本实验探索利用间接ELISA实验定性分析唐鱼体内是否有Vtg诱导产生。ELISA的定性结果可以用肉眼观察颜色的深浅做出判断,目视标本无色或近于无色者判为阴性,显色清晰者为阳性,目视法简捷明了。也可以用分光光度计做精确测定,先读出标本、阳性对照和阴性对照的吸光值,然后进行计算,记录结果。

ELISA结果记录可采用下列4种方法:(1)“+”或“-”:所有超过规定的OD值的标本均为阳性。此规定的OD值是阴性标本的上限,根据事先测定大量阴性标本取得。或者以一组阴性标本OD平均值加2~3个标准差作为阳性阈值。用此法判断结果要求实验条件十分恒定,试剂的制备必须标准化,阳性和阴性的对照品应符合一定的规格;(2)直接以OD值来表示:OD值越大,阳性反应越强。但此数值是在固定实验条件下得到的结果,而且每次实验都要有参考标本做对照;(3)以终点滴度表示:将标本做连续稀释,最高稀释度能出现阳性反应者即为该标本的滴度;(4)以比值表示:在实验条件较难保证恒定的情况下,这种判断法较为合适。在得出标本和阴性对照的A值后,计算比值。本实验选择比值法记录结果。

3.3 17 β -雌二醇、壬基酚、多氯联苯、Cd²⁺、Zn²⁺及其混合物对唐鱼的雌激素效应比较

Native-PAGE实验发现高浓度的E₂ 7 d即可诱导唐鱼卵黄蛋白原的合成,诱导作用效果随暴露时间的延长而增强,具有时间积累效应,并与暴露浓度正相关。间接ELISA方法检测结果显示,中低浓度的E₂暴露7、14 d基本也都引起Vtg的合成,表明E₂对唐鱼有十分强烈的雌激素效应。与之相比,壬基酚、多氯联苯、Cd²⁺、Zn²⁺对唐鱼的雌激素效应较小,Native-PAGE实验未显示明显的Vtg条带,这除了与暴露药物有关,与暴露实验方式、受试生物的种类也有密切联系。KORSGAARD等^[14]研究了妊娠期的雌鱼暴露于雌激素类化学物质壬基酚(NP),发现暴露与血浆Vtg水平之间具有剂量依赖性关系。KORDES等^[13]研究了雌激素对雄性鳟鱼原代培养肝细胞的Vtg诱导合成,用药6 d后就能检测出Vtg合成,且能维持1个月以上。Zn²⁺不在明确提到的内分泌干扰物名单之内,但MARTIN等^[15]的研究表明,1 000和3 000 $\mu\text{g}/\text{L}$ 的Zn²⁺能诱导克氏原螯虾体内的Vtg含量上升并造成组织病理学的损伤。

本实验结果显示不同浓度的NP与较低浓度的E₂联合雌激素效应强于单一毒物各自的雌激素效应,二者表现为协同促进作用,表明在强雌激素活性物质的存在下,弱雌激素活性物质对混合物的雌激素活性也有一定贡献。这与其它学者的研究结果一致,吕雪飞等^[16]研究了E₂与NP混合物对雄性泥鳅的雌激素效应,发现这两种物质的

联合诱导能力显著高于单一化合物,且混合物对 Vtg 的诱导量高于两种物质分别作用时 Vtg 诱导量的简单加和。类似的协同作用效应在其他药物中也有报道, SUMPTE^[17] 用 OP、NP、DDT、BPA、Arodor 1221 处理虹鳟 (*Oncorhynchus mykiss*) 肝细胞,发现 Vtg 的水平明显比相同条件下同浓度单一化合物刺激时高。Cd²⁺、Zn²⁺ 与较高浓度的 E₂ 联合作用于唐鱼,都能诱导 Vtg 产生,与同浓度的 Cd²⁺、Zn²⁺ 单独作用效果不同, ELISA 定性分析表明,联合作用效果更接近于 E₂ 单独作用时的效果,表明这两种重金属与 E₂ 的联合雌激素效应主要依赖于 E₂ 的浓度,很可能是因为 NP 的雌激素活性仅相当于 E₂ 的 10⁻⁵ 倍,PCB 稍低一些,重金属的雌激素效应更低,因此它们与 E₂ 组合后,联合作用效果受 E₂ 影响更大。因此,环境雌激素的协同作用不仅表现在与雌激素受体结合的亲和力提高,也表现在雌激素所调节的生物反应活性提高^[18]。同时,一些环境雌激素与受体结合时,他们之间的协同作用会因组合不同而产生不同的作用,即使环境雌激素的浓度较低,也可能绕过血液的自我保护而与受体结合,还有些环境雌激素并不直接与受体结合,但对内源雌激素也可产生影响,具体作用机制有待作深入探讨。

参考文献:

- [1] WANG R, GAO Y, ZHANG L, *et al.* Cloning, expression, and induction by 17 β -estradiol (E₂) of a vitellogenin gene in the white cloud mountain minnow *Tanichthys albonubes* [J]. *Fish Physiology and Biochemistry*, 2010, 36(2): 157-164.
- [2] 姚静,方展强,徐杰. 唐鱼卵黄蛋白原的诱导、纯化与鉴定[J]. *生态毒理学报*, 2008, 3(2): 155-161.
- [3] 姚静,方展强,徐杰,等. 唐鱼卵黄脂磷蛋白的纯化与免疫原性分析[J]. *应用与环境生物学报*, 2008, 14(1): 69-73.
- [4] 姚静,方展强. 唐鱼卵黄蛋白原的 ELISA 检测方法的建立[J]. *中国实验动物学报*, 2010, 18(3): 242-246.
- [5] 杨安钢,毛积芳,药立波. *生物化学与分子生物学实验技术* [M]. 北京: 高等教育出版社, 2001: 40-42.
- [6] 吴翠琴,袁东星,林庆梅. 真鲷卵黄蛋白原的诱导、纯化及初步鉴定[J]. *厦门大学学报: 自然科学版*, 2005, 44(5): 688-692.
- [7] SUN B, PANKHURST N W, WATTS M. Development of an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for vitellogenin measurement in greenback flounder *Rhombosolea tapirina* [J]. *Fish Physiology and Biochemistry*, 2003, 29: 13-21.
- [8] TYLER C R, VAN A R, NILSEN M V, *et al.* Monoclonal antibody enzymelinked immunosorbent assay to quantify vitellogenin for studies on environmental estrogens in the rainbow trout [J]. *Environmental Toxicology Chemistry*, 2002, 21: 47-54.
- [9] 邴欣,汝少国, ISODA H, 等. 17 β -雌二醇对雄性金鱼卵黄蛋白原的诱导作用[J]. *水产学报*, 2004, 28(3): 236-240.
- [10] 詹翠琼,黄絮洁,方展强,等. 多氯联苯对孔雀鱼卵黄蛋白原的诱导与检测[J]. *生态毒理学报*, 2007, 2(3): 333-338.
- [11] 温茹淑,方展强,江世贵,等. 17 β -雌二醇对雄性剑尾鱼卵黄蛋白原的诱导研究[J]. *中国实验动物学报*, 2007, 15(4): 280-284.
- [12] 温茹淑,方展强,陈庭伟. 17 β -雌二醇对雄性唐鱼卵黄蛋白原诱导及性腺发育的影响[J]. *动物学研究*, 2008, 29(1): 43-48.
- [13] KORDES C, RIEBERB E P, GUTZEITA H O. An *in vitro* vitellogenin bioassay for oestrogenic substances in the medaka (*Oryzias latipes*) [J]. *Aquatic Toxicology*, 2002, 58: 151-164.
- [14] KORSGAARD B, PEDERSEN K L. Vitellogenin in *Zoarcetes viviparus*: purification, quantification by ELISA and induction by estradiol-17 beta and 4-nonyphenol [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology*, 1998, 120: 159-166.
- [15] MARTIN M L, DIAZ S R, TUBERTY C L, *et al.* The use of bioaccumulation, biomarkers and histopathology diseases in *Procambarus clarkia* to establish bioavailability of Cd and Zn after a mining spill [J]. *Environmental Monitoring and Assessment*, 2006, 116: 169-184.
- [16] 吕雪飞,周群芳,宋茂勇,等. 17 β -雌二醇、壬基酚及其混合物对雄性泥鳅的雌激素效应[J]. *科学通报*, 2007, 52(18): 2122-2126.
- [17] SUMPTE J P, JOBLING S. Vitellogenesis as a biomarker for estrogenic contamination of the aquatic environment [J]. *Environmental Health Perspectives*, 1995, 103: 173-178.
- [18] 邱东茹,吴振斌. 环境雌激素对动物和人体的影响及其作用机制[J]. *水生生物学报*, 1997, 21(4): 365-374.

Comparative study of estrogenic effects of estradiol, nonylphenol, polychlorinated biphenyls, cadmium, zinc and its mixtures on *Tanichthys albonubes*

YANG Li-li, ZHANG Jing, FANG Zhan-qiang *

(Key Laboratory of Ecology and Environmental Science in Guangdong Higher Education, College of Life Science, South China Normal University, Guangzhou 510631, China)

Abstract: Environmental endocrine disrupting chemicals (EDCs) can affect the normal endocrine system of organism. Its huge threat to the environment and the health of human beings arouses international attention, which has been the hot topic in environmental research. Vitellogenin (Vtg) production in male and juvenile fish can provide a sensitive biomarker of reproductive disruption to indicate and estimate estrogenicity of EDCs. It has been proved that the vitellogenin of *Tanichthys albonubes* is a perfect biomarker to be used to monitor EDCs in environment. The objective of the present study was to detect the estrogenic responses of estradiol-17 beta (E_2), nonylphenol (NP), polychlorinated biphenyls (PCBs), Cd^{2+} , Zn^{2+} and its mixture in *T. albonubes*. Native-polyacrylamide gel electrophoresis (Native-PAGE), lipo-staining method, indirect enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) were used to analyze the whole body homogenate from treated male *T. albonubes*. The results of Native-PAGE showed that after exposure to 10 $\mu\text{g/L}$ E_2 , 50 $\mu\text{g/L}$ E_2 for 7 days or 14 days, the male *T. albonubes* could synthesize Vtg. It also showed that the more time, the more vitellogenin and the higher the concentration of E_2 , the more Vtg. The results of ELISA showed that the male *T. albonubes* could be induced to synthesize Vtg after exposure to 0.1, 0.5, 1.0 $\mu\text{g/L}$ E_2 for 7, 14 days or exposure to 200, 300 $\mu\text{g/L}$ NP for 14 days. The combined effects of NP, PCB, Cd^{2+} or Zn^{2+} together with different level E_2 were dissimilar with their individual effects. The interaction of NP and E_2 was synergism action. This article also discussed the combined effects of environmental estrogen mechanism.

Key words: *Tanichthys albonubes*; environmental endocrine disrupting chemicals (EDCs); vitellogenin (Vtg); Native-polyacrylamide gel electrophoresis (Native-PAGE)

Corresponding author: FANG Zhan-qiang. E-mail: fangzhq@scnu.edu.cn