

王琪, 黄崇, 张照斌, 等. 2008 实时定量 RT-PCR 方法检测雌二醇诱导原代培养青鳉鱼肝细胞的基因表达 [J]. 环境科学学报, 28 (12): 2568 - 2572

Wang Q, Huang C, Zhang ZB, *et al* 2008. Gene expression in primary cultures of male medaka (*Oryzias latipes*) hepatocytes induced by 17 β -estradiol with quantitative real-time RT-PCR [J]. Acta Scientiae Circumstantiae, 28 (12): 2568 - 2572

实时定量 RT-PCR 方法检测雌二醇诱导原代培养青鳉鱼肝细胞的基因表达

王琪^{1, 2}, 黄崇², 张照斌², 胡建英^{2, *}, 张仁陟¹

1. 甘肃农业大学资源与环境学院, 兰州 730070

2. 北京大学城市与环境学院, 北京 100871

收稿日期: 2008-01-09 修回日期: 2008-04-30 录用日期: 2008-08-22

摘要: 利用原代培养的雄性青鳉鱼肝细胞进行了相同雌二醇 (E2) 浓度 (100 nmol·L⁻¹) 下的不同时间 (2、4、6、8d) 和相同暴露时间 (4d) 下的不同浓度 (1、10、100、1000、10000 nmol·L⁻¹) 的雌二醇 (E2) 实验, 采用实时定量 RT-PCR 方法对青鳉鱼 VTG-I、VTG-II、CHG-H、CHG-L 和 ER 的基因表达进行了研究. 结果表明, VTG-I、VTG-II、CHG-H、CHG-L 和 ER 的基因表达与 E2 的暴露浓度呈现很好的剂量-效应关系, 且 1 nmol·L⁻¹ E2 暴露就能显著诱导肝细胞内 VTG-I、VTG-II、CHG-H、CHG-L 和 ER 的基因表达. 作为生物监测雌激素活性的 *in vitro* 方法, 实时定量 RT-PCR 的灵敏度高于其它已经发表的方法. 因此, 实时定量 RT-PCR 方法与原代培养青鳉鱼肝细胞相结合的方法在环境雌激素效应的评价上具有很大地应用潜力.

关键词: 实时定量 RT-PCR; 雌二醇; 原代培养肝细胞; 卵黄蛋白原; 青鳉鱼

文章编号: 0253-2468(2008)12-2568-05 中图分类号: X171.5 文献标识码: A

Gene expression in primary cultures of male medaka (*Oryzias latipes*) hepatocytes induced by 17 β -estradiol with quantitative real-time RT-PCR

WANG Qi^{1, 2}, HUANG Chong², ZHANG Zhaobin², HU Jianying^{2, *}, ZHANG Renzhi¹

1. College of Environmental Sciences, Gansu Agriculture University, Lanzhou 730070

2. College of Environmental Sciences, Peking University, Beijing 100871

Received 9 January 2008; received in revised form 30 April 2008; accepted 22 August 2008

Abstract: A method of applying quantitative real-time RT-PCR to cultures of male medaka hepatocytes was developed to evaluate estrogenic activity. Primary cultures of male medaka (*Oryzias latipes*) hepatocytes were exposed to 17 β -estradiol (E2) at 100 nmol·L⁻¹ for 2, 4, 6, 8-day exposure, and 1, 10, 100, 1000 and 10000 nmol·L⁻¹ E2 for 4 days. The VTG-I, VTG-II, CHG-H, CHG-L and ER gene expressions were determined using quantitative real-time reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR). It was found that dose-dependent VTG-I, VTG-II, CHG-H, CHG-L and ER gene expressions in hepatocytes were induced, and obvious expressions were observed even at 1 nmol·L⁻¹ of E2. This method is more sensitive compared with other *in vitro* methods for evaluating estrogenic activity. Thus, applying quantitative real-time RT-PCR to primary cultures of male medaka hepatocytes has potential application in the evaluation of estrogenic activity of endocrine disrupting chemicals or environmental samples.

Keywords: quantitative real-time RT-PCR; 17 β -estradiol; primary cultures hepatocytes; vitellogenin; medaka

1 引言 (Introduction)

鉴于内分泌干扰物质对人类健康和生态环境

的潜在危害, 目前已经有一系列内分泌干扰物的生物检测方法被开发和利用 (Crisp *et al*, 1998). 体外 (*in vitro*) 生物检测方法, 如激素受体结合法、报告

基金项目: 国家自然科学基金项目 (No. 40632009); 国家重点基础研究发展计划 (973) 项目 (No. 2007CB407304)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 40632009) and the Major State Basic Research Development Program of China (No. 2007CB407304)

作者简介: 王琪 (1982—), 女, E-mail: syw2001@sohu.com; *通讯作者 (责任作者), E-mail: hujy@urban.pku.edu.cn

Biography: WANG Qi (1982—), female, E-mail: syw2001@sohu.com; *Corresponding author, E-mail: hujy@urban.pku.edu.cn

基因法、类固醇生成测试法、雌激素响应基因表达和蛋白质合成细胞培养法等,因具有简便快捷的优点,尤其得到广泛应用。其中以卵黄蛋白原为生物标记物的鱼类原代肝脏细胞培养法不仅具有外源物质与细胞作用直接、反应速度快、条件控制严格、试验简便和操作成本低等传统 *in vitro* 生物检测方法的优点,而且保持了正常体内细胞的大部分活性,可直接模拟和反映动物肝脏组织中激素调控的各种反应过程 (Jose *et al*, 2006),因此,已经成为评价化学物质对鱼类潜在内分泌干扰作用的重要方法之一。

卵黄蛋白原 (VTG)是在雌二醇作用下肝脏中生成的卵黄前体蛋白,作为评价化学物质雌激素活性的生物指标已经得到广泛应用 (Metcalf *et al*, 2001; Lee *et al*, 2002)。目前基于原代培养肝脏细胞的 VTG评价方法已经有了许多研究,但大多采用了基于蛋白水平的酶联免疫 (ELISA)方法和基于卵黄蛋白原 mRNA表达的普通 RT-PCR方法。前者需要制备特异抗体,程序复杂,且相对于从分子水平进行的基因表达定量方法灵敏度仍有较大差距 (Islinger *et al*, 2002; Celius *et al*, 2000);而普通 RT-PCR方法在基因表达定量方面也存在准确性较差的缺点,不能有效地反映剂量效应关系。近年来,实时定量 RT-PCR (Q-RT-PCR)技术得到快速发展,已经能够准确定量基因表达拷贝数的细微差异。因此,本研究中通过青鳉鱼原代肝细胞暴露 E2,采用 Q-RT-PCR 检测青鳉鱼 VTG基因 (VTG-I和 VTG-II)及卵壳前体蛋白 (CHG-L和 CHG-H)和雌激素受体 (ER)的表达变化,期望建立较高灵敏度的环境雌激素效应评价方法。

2 材料与方法 (Materials and methods)

2.1 材料

17 雌二醇 (E2)、DMEM/F12细胞培养基、抗生素、胶原酶为 Signa公司产品; Trizol 反转录酶 (Superscrip III)购自 Invitrogen公司; 35mm培养皿、六孔培养板为 COSTAR公司产品;实时定量 PCR 试剂盒 (SYBR Green I master mix)购自美国应用生物系统公司 (Applied Biosystems)。

雄性青鳉鱼 (*Oryzias latipes*) Orange red品系获赠于日本国土环境研究所,在本实验室已驯化 3年以上。养殖条件:水温为 25~28℃,水硬度为 8.0 mg·L⁻¹, pH值为 7.5~7.8,溶解氧为 8.0~9.0

mg·L⁻¹,光周期控制在昼夜 = 16h 8h,饲料为新孵化的活体卤虫。

2.2 方法

2.2.1 鱼肝细胞的原代培养 将鱼麻醉,用 75%酒精对鱼体表消毒,解剖取肝脏组织,并迅速浸置于 Ca²⁺-free hepatocyte buffer (136.9 mmol·L⁻¹ NaCl, 5.4 mmol·L⁻¹ KCl, 0.81 mmol·L⁻¹ MgSO₄, 0.44 mmol·L⁻¹ KH₂PO₄, 0.33 mmol·L⁻¹ NaHPO₄, 5.0 mmol·L⁻¹ NaHCO₃, 100 U·mL⁻¹青霉素, 100 g·mL⁻¹链霉素, pH = 7.6) (Kim *et al*, 2002)中;多次漂洗肝脏组织后将其转至无菌培养皿中,用解剖剪将肝组织剪碎,用含 0.3 mg·mL⁻¹胶原酶消化液在室温下对剪碎肝小组织块消化 30min; 120目滤网过滤 2次, 1000r·min⁻¹下离心 3min收集肝细胞,弃上清液,加入含 1.5 mmol·L⁻¹ CaCl₂的 HB 反复漂洗 3次,最后用含双抗不含酚红的 DMEM/F12 培养基悬浮细胞,计数细胞密度使其达到 1 × 10⁶ cell·mL⁻¹,采用台盼兰染色法评估细胞活力达到 90%以上。

2.2.2 细胞培养及暴露实验 将鱼肝细胞悬浮液接种至六孔培养板中,置于 5% CO₂、25℃ 细胞培养箱中预培养 24h,待细胞贴壁生长后,吸去培养基,重新加入含不同浓度的 E2 或对照的培养基,每 2d 更换一次培养基,继续培养 96h 进行暴露实验。E2 溶于乙醇,溶剂的最终浓度不超过 0.1%。乙醇暴露组设为对照。时间梯度暴露研究采用 E2 浓度为 100 nmol·L⁻¹,暴露时间梯度: 2、4、6、8d。剂量效应关系研究暴露浓度梯度为 1、10、100、1000、10000 nmol·L⁻¹。

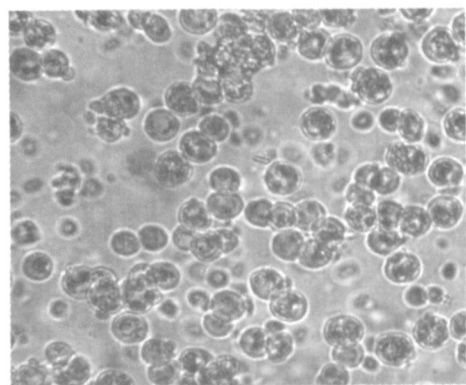


图 1 台盼兰染色后青鳉鱼肝细胞的显微观察 (×200)

Fig. 1 Microscopic observation of hepatocytes of medaka using the trypan blue exclusion method (×200)

2.2.3 实时定量 RT-PCR 暴露实验结束后吸去培养基,立即用 trizol试剂裂解贴壁生长的鱼肝细胞,提取细胞的总 RNA.采用 Superscrip III逆转录酶合成 cDNA 模板.实时定量 PCR 采用美国应用生物系统公司生产的 ABI Prism 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystems).目的基因的定量 PCR 引物序列见表 1 (Zhang *et al*, 2008),引物由上海生工公司合成. PCR 反应液: SYBR

Green PCR Master Mix 10 μL , 20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 正向和反向引物各 0.2 μL , cDNA 反应液 5 μL ,加双蒸馏水至 4.6 μL . PCR 反应条件为 50 2min; 95 10min; 40个循环: 变性 95 15s, 退火 60 60s 在最后 1个循环结束后做熔解曲线,确定 PCR 反应质量.以 RPL-7作为内参基因校正实验误差 (Zhang *et al*, 2007).

表 1 实时定量 PCR 引物

Table 1 Sequence of primers for quantitative real-time PCR

Accession number	基因	正反链引物	PCR 引物序列	产物 (bp)
DQ118296	RPL-7	Forward	5'-AGCTCTCGGCAAAATGGCAT-3	81
		Reverse	5'-GCAGGCTTGAA GTICTTTCCAA-3	
AB064320	VTG-I	Forward	5'-ACGCAAA GAACGAACTCCTTG-3	86
		Reverse	5'-TCC TGGA ICTTICCTTA TTGGCT-3	
AB074891	VTG-II	Forward	5'-TGCTCA GTGCA ICTTGGTCAAT-3	163
		Reverse	5'-CTCGTICTGTICTGCA GTTTGG-3	
AF500195	CHG-H	Forward	5'-TCGGCACTGTTGICA TGGAA GA-3	93
		Reverse	5'-ATAGCTCCAA GCGGTCCAATC-3	
AF500194	CHG-L	Forward	5'-TCGACCA GCTGAAAACAA GCT-3	82
		Reverse	5'-TGTA TGCA TACCA TTCCA CTG-3	
D28954	ER	Forward	5'-TGTA A GGT TGCGTCCCA TGAG-3	105
		Reverse	5'-GCCCTTTAA TCCA A GA GGA A G-3	

2.3 数据处理方法

目的基因表达数据采用 $2^{-\text{w}C_T}$ 相对表达定量方法分析获得,各组相对表达水平以下公式计算获得

$$C_T = (C_{T \text{ Target}} - C_{T \text{ RPL-7}})_{\text{Test}} - (C_{T \text{ Target}} - C_{T \text{ RPL-7}})_{\text{Control}}$$

式中, $C_{T \text{ Target}}$ 为目标基因 C_T 值, $C_{T \text{ RPL-7}}$ 为内参基因 RPL-7 的 C_T 值, $(C_{T \text{ Target}} - C_{T \text{ RPL-7}})_{\text{Test}}$ 为实验组相对表达水平, $(C_{T \text{ Target}} - C_{T \text{ RPL-7}})_{\text{Control}}$ 为对照组相对表达水平. $2^{-\text{w}C_T}$ 表示目标基因是对照组的表达倍数. 并采用 EXCEL 软件作图.

3 结果 (Results)

3.1 不同暴露时间对细胞基因表达的影响

对原代培养青鳉鱼肝细胞进行 $100 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ E2 暴露后发现,在暴露 2d 后, VTG-I VTG-II CHG-H、CHG-L 基因表达水平已明显升高,分别达到对照组的 407、109、17249、4033 倍. 暴露 4d 后, VTG-I VTG-II CHG-H、CHG-L mRNA 的表达量分别是对照组的 14702、3842、38994、9363 倍,明显高于 2d 暴露时的变化幅度. 暴露 6d 或 8d 后, VTG-I VTG-II CHG-H、CHG-L mRNA 的表达量虽然仍然在升高,但已经放缓,表明 E2 暴露 4d 后, VTG-I VTG-II

CHG-H、CHG-L 基因表达已达相对稳定水平 (图 2).

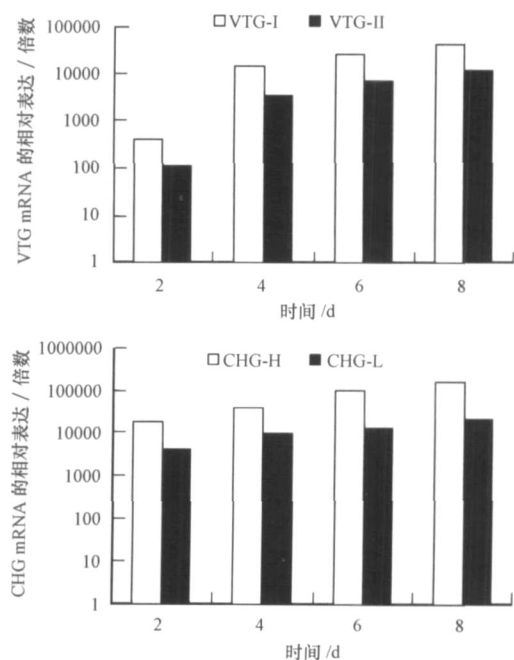


图 2 雌二醇 ($100 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$) 暴露青鳉鱼肝细胞 VTG 和 CHG 基因表达随时间的变化

Fig 2 VTG and CHG gene expression in medaka hepatocytes exposed to $100 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ E2 for different times

3.2 雌二醇暴露后基因表达变化的剂量效应关系

图 3表示了 E2暴露后青鳉鱼肝细胞 VTG-I和 VTG-II基因表达变化,其中在 1 ~ 1000 $\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 浓度范围内,VTG-I和 VTG-II的 mRNA 拷贝数随着 E2浓度的升高而升高,显示了极好的剂量-效应关系.与对照组相比,E2暴露各组 VTG-I和 VTG-II的 mRNA 水平均明显升高,其中 VTG-I在对照组的相对表达水平为 0.0002 (VTG-I/ RPL-7 mRNA 拷贝数比值,下同),在 1、10、100、1000、10000 $\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ E2暴露组为 0.0141、0.100、0.917、4.272、5.1447,分别为对照组的 234、1680、15290、71214 和 85745 倍;而 VTG-II在 1、10、100、1000 和 10000 $\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ E2暴露组相对表达水平分别为 0.012、0.103、0.961、5.874、9.724,均显著高于对照组表达水平 0.0003,且是对照组表达水平的 40、343、3203、19581、32413 倍.这表明,在 1 ~ 1000 $\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ E2暴露浓度范围内,VTG-I和 VTG-II均能够很好的反映雌激素暴露水平,可以用于环境样品浓缩后的雌激素活性监测.

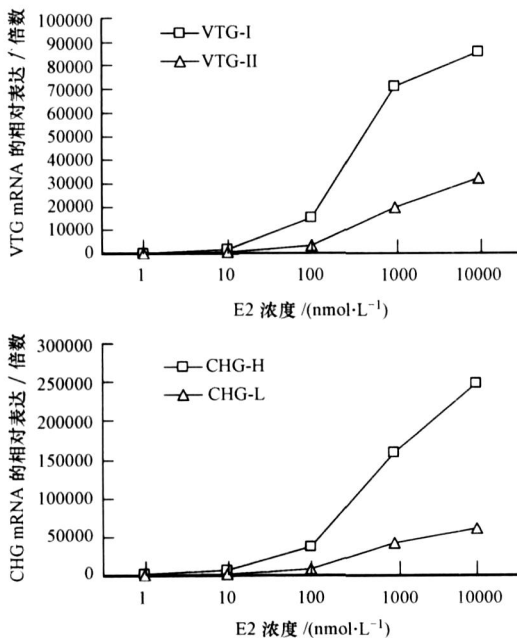


图 3 不同浓度雌二醇暴露雄性青鳉鱼肝细胞 VTG和 CHG 基因表达结果

Fig 3 VTG and CHG gene expression in hepatocyte of male medaka in E2 exposed groups

图 3中也表示了 E2诱导青鳉鱼肝细胞 CHG-H和 CHG-L基因表达的剂量-效应关系. CHG-L在对照组的相对表达水平为 0.0013,在 1、10、100、1000、10000 $\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ E2暴露组为 0.466、2.321、12.022、

55.996,分别为对照组的 359、1785、9248 和 43074 倍; E2 最高浓度暴露组 10000 $\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ CHG-L mRNA 水平为 80.108,约为对照组的 61622 倍.对照组 CHG-H的 mRNA 水平为 0.0006. E2暴露浓度为 1、10、100、1000、10000 $\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 诱导 CHG-H mRNA 水平为分别为对照组的 2226、6649、37045、15934、246236 倍.这表明,在 1 ~ 1000 $\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ E2暴露浓度范围内,CHG-H和 CHG-L也能够很好地反应雌激素暴露水平,可以用于环境样品浓缩后的雌激素活性监测.

本研究结果显示,在 1、10、100、1000、10000 $\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 浓度 E2暴露下,ER mRNA 水平明显升高,分别达到对照组的 10、11、53、142、292 倍 (图 4),具有明显的剂量效应关系.

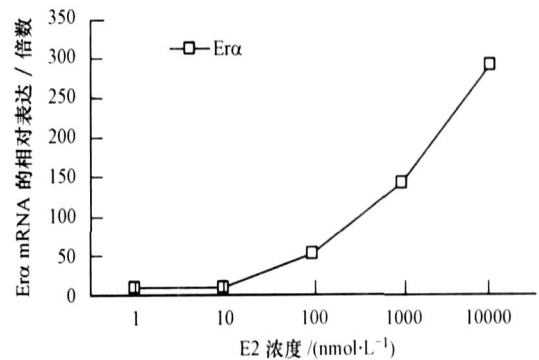


图 4 雌二醇暴露青鳉鱼肝细胞 ER 基因表达的剂量效应关系

Fig 4 Dose response of ER gene expression in medaka hepatocytes exposed to E2

4 讨论 (Discussion)

一般认为,外源物质暴露时间对细胞中基因表达有重要影响 (Latonnelle *et al*, 2000). 本研究结果表明,在暴露第 4 ~ 8d 各基因表达水平已经达到相对稳定水平.从实验效果和效率考虑,本研究选择 4d 作为在后期试验的细胞暴露时间.

VTG是鱼类卵黄 (yolk) 合成的前体,由于其基因上游存在雌激素反应元件 (estrogen response element, ERE),对雌激素暴露反应敏感而直接,因此,被广泛用于环境雌激素的生物检测 (Min *et al*, 2003). CHG-H和 CHG-L是青鳉鱼中 2 个重要的卵壳前体蛋白基因,也常被用于环境雌激素的生物检测. ER 是青鳉鱼肝脏中的主要雌激素受体,是肝脏中雌激素调控雌激素响应基因 (如 VTG和 CHG) 的主要信号通道 (Knowlden *et al*, 2000). 本研究结

果表明,在 $1 \sim 1000 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ E2暴露浓度范围内,VTG-I、VTG-II、CHG-H和CHG-L均能够很好地反映雌激素暴露水平,可以用于环境样品浓缩后的雌激素活性监测。值得注意的是,在 $1 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ E2的浓度水平上青鳉鱼肝细胞中VTG-I mRNA的拷贝数是对照组的234倍,而CHG-H mRNA的拷贝数是对照组的2226倍,甚至高于VTG-I的表达,显示出非常高的灵敏度。Okoumassoun等(2002)采用酶联免疫方法(ELISA)和普通RT-PCR方法对E2诱导虹鳉鱼(*Oncorhynchus mykiss*)肝细胞VTG的研究发现,ELISA可以监测到 $10 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ E2暴露下的VTG蛋白水平升高,而普通RT-PCR最低监测水平仅在 $100 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ E2以上。这些结果表明,采用实时定量RT-PCR与体外培养肝细胞相结合的 *in vitro* 雌激素活性分析方法可能比ELISA或普通RT-PCR与体外培养肝细胞相结合的 *in vitro* 雌激素活性分析方法更加灵敏,值得进一步研究和推广。

5 结论 (Conclusions)

1)成功建立了实时定量RT-PCR与原代培养青鳉鱼肝细胞相结合的 *in vitro* 环境雌激素效应评价方法,且显示出较高的灵敏度。

2)VTG-I、VTG-II、CHG-H、CHG-L和ER在体外培养青鳉鱼肝细胞中均与雌激素暴露呈现较好的剂量效应关系,其中VTG-I、VTG-II、CHG-H、CHG-L作为检测雌激素的生物标记物基因可优先选择。

责任作者简介:胡建英(1965—),女,博士。北京大学环境学院教授,主要的研究内容是环境毒理和环境风险评价。
E-mail: hujy@urban.pku.edu.cn

References:

- Celius T, Matthews B J, Giesy P J, *et al* 2000. Quantification of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) zona radiata and vitellogenin mRNA levels using real-time PCR after *in vivo* treatment with estradiol-17 β or α -zearalenol[J]. *Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology*, 75: 109—119
- Crisp T M, Clegg E D, Cooper R L, *et al* 1998. Environmental endocrine disruption: An effects assessment and analysis [J]. *Environ Health Perspect*, 106(1): 11—56
- Islinger M, Pawlowski S, Hollert H, *et al* 1999. Measurement of vitellogenin mRNA expression in primary cultures of rainbow trout hepatocytes in non-radioactive dot blot/RNAse protein-assay[J]. *Sci Total Environ*, 233: 109—122
- Kim B H, Takemur A. 2002. *In vitro* vitellogenin synthesis in primary cultures of tilapia hepatocytes[J]. *Fish Sci*, 68: 123—131
- Knowlden J M, Gee J M, Robertson J F, *et al* 2000. A possible divergent role for the oestrogen receptor α and β subtypes in clinical breast cancer[J]. *Int J Cancer*, 89(2): 209—212
- Latonnelle K, Le Menn F, Bennetau-Pelissero C. 2000. *In vitro* estrogenic effects of phytoestrogens in rainbow trout and Siberian sturgeon[J]. *Ecotoxicology*, 9: 115—125
- Lee C, Na J G, Lee K C. 2002. Choriogenin mRNA induction in male medaka, *Oryzias latipes* as a biomarker of endocrine disruption[J]. *Aquat Toxicol*, 61(324): 233—241
- Metcalf C D, Metcalf T L, Koparissis Y. 2001. Estrogenic potency of chemicals detected in sewage treatment plant effluents as determined by *in vivo* assays with Japanese medaka (*Oryzias latipes*) [J]. *Environ Toxicol Chem*, 20: 297—308
- Min J, Lee S K, Gu M B. 2003. Effects of endocrine disrupting chemicals on distinct expression patterns of estrogen receptor, cytochrome P450 aromatase and p53 genes in *Oryzias latipes* liver [J]. *Biochem Molecular Toxicology*, 17(5): 272—277
- Navasa J M, Segner H. 2006. Vitellogenin synthesis in primary cultures of fish liver cells as endpoint for *in vitro* screening of the (anti) estrogenic activity of chemical substances [J]. *Aquatic Toxicology*, 80: 1—22
- Okoumassoun L E, Averill-Bates D, Gagne F, *et al* 2002. Assessing the estrogenic potential of organochlorine pesticides in primary cultures of male rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) hepatocytes using vitellogenin as a biomarker [J]. *Toxicology*, 178(3): 193—207
- Zhang Z B, Hu J Y. 2007. Development and validation of endogenous reference genes for expression profiling of medaka (*Oryzias latipes*) exposed to endocrine disrupting chemicals by quantitative real-time RT-PCR [J]. *Toxicological Sciences*, 95(2): 356—368
- Zhang Z B, Hu J Y. 2008. Effects of *p,p'*-DDE exposure on gonadal development and gene expression in Japanese Medaka (*Oryzias latipes*) [J]. *Journal of Environmental Sciences*, 20: 347—352