

定量 RT-PCR 检测雌二醇诱导的青鳉鱼基因表达

侯彦峰^{1,2}, 张照斌¹, 胡建英^{1*}, 范光丽² (1. 北京大学环境学院, 北京 100871; 2. 西北农林科技大学动物科技学院, 陕西 杨凌 712100)

摘要: 采用实时定量RT-PCR(Q-RT-PCR)方法,对暴露60d雌二醇的雄性青鳉鱼肝脏内卵黄蛋白原(VTG)和卵壳前体蛋白(CHG)基因表达进行研究.结果表明,0.1, 1.0, 10.0, 100.0ng/L的雌二醇使肝脏内VTG-I,VTG-II,CHG-L和CHG-H基因表达被显著诱导.其中VTG-I显示出较好的剂量-效应关系,是较为理想的生物标记物基因.在0.1ng/L雌二醇暴露组中,VTG-I和VTG-II的表达量均显著高于对照组($P < 0.05$),表明本方法具有检测环境中低剂量雌二醇暴露的潜力.

关键词: 雌二醇; 青鳉鱼; 生物标志物; 实时定量RT-PCR; 卵黄蛋白原; 卵壳前体蛋白

中图分类号: R994.6 文献标识码: A 文章编号: 1000-6923(2006)05-0599-04

Gene expression in liver of male medaka (*Oryzias latipes*) induced by estradiol of low concentration examined, survived with real-time quantitative RT-PCR. HOU Yan-feng^{1,2}, ZHANG Zhao-bin¹, HU Jian-ying^{1*}, FAN Guang-li² (1.College of Environmental Science, Peking University, Beijing 100871, China; 2.College of Animal Science and Technology, Northwester Agriculture and Forestry University, Yangling 712100, China). *China Environmental Science*, 2006,26(5): 599~602

Abstract: The studies on the gene expression of vitellogenin protein origin and choriogenin in the liver of male medaka exposed estradiol for 60 days by real-time quantitative RT-PCR(Q-RT-PCR) technique indicated that the VTG-I, VTG-II, CHG-L and CHG-H, gene expression in liver was induced markedly by estradiol of 0.1, 1.0, 10.0 and 100.0ng/L, in which VTG-I showed a better dose response relation, which was more theoretical biomarker gene. In the exposed group of 0.1ng/L estradiol, the expression amount of VTG-I and VTG-II were higher markedly than those of the control group ($P < 0.05$), indicating that this technique possessed the potential to examine, survey the low dose estradiol exposure in the environment.

Key words: estradiol; medaka; biomarker; real-time quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction; vitellogenin; estradiol choriogenin

雌二醇是人类和其他脊椎动物体中最主要的天然雌激素.由于水产及畜牧业生产中的滥用,雌二醇污染在一些城市污水和天然水体中已被检测到^[1].大多数研究报道的雌二醇污染水平在1~10ng/L 范围内^[1].因此建立评价低浓度水平雌激素(雌二醇)的生物监测方法是一个重要的研究课题.

鱼类肝脏卵黄蛋白原(VTG),卵壳前体蛋白(CHG)等基因在外源雌激素作用下增强表达,已经成为EDCs生物监测的重要生物标记物.Lee C等^[2]认为雄性青鳉鱼肝脏内CHG比VTG对外源雌激素的灵敏度更高,但Inui等^[3]却发现同一浓度雌激素诱导下,雄性青鳉鱼肝脏VTG(VTG-I, VTG-II)基因表达增强的倍数显著高于CHG

(CHG-L,CHG-H),认为VTG基因的灵敏程度高于CHG基因.一项对大麻哈鱼的研究发现,注射5mg/kg雌二醇血浆中,VTG水平大于CHG,而其他研究发现注射10 μ g/kg雌二醇和暴露15, 50 μ g/L壬基酚的大麻哈鱼血浆CHG蛋白比VTG蛋白更灵敏^[4-6].在环境暴露水平下,对青鳉鱼肝脏内VTG (I&II)和CHG(H&L)基因表达目前还缺乏系统的研究.

本研究用定量RT-PCR方法监测低浓度雌二醇60d暴露下的雄性青鳉鱼肝脏中VTG-I, VTG-II,CHG-H和CHG-L基因表达量,分析各基因

收稿日期: 2006-01-10

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(20377002, 40021101)

* 责任作者, 教授, hujy@urban.pku.edu.cn

表达水平的变化,尝试建立评价低浓度雌激素(雌二醇)的生物监测方法。

1 材料与方法

1.1 材料

20日龄雄性青鳉鱼(*Oryzias latipes*, Medaka; Orange Red品系)已经驯化3代以上.17 β -雌二醇(E₂),二甲基亚砷(DMSO)和鱼定安(MS-222)购自Sigma公司,DNAase I试剂购自大连宝生物公司,Trizol,Oligo (dT),Rnase inhibitor和反转录试剂盒购自Invitrogen公司,SYBR® Green PCR Master Mix,96孔光学PCR板和光学透明塑料盖膜购自Applied Biosystems公司。

1.2 方法

实验用鱼共分5组,每组18尾,分别暴露于DMSO(0.005%,V/V),0.1, 1.0, 10.0, 100.0ng/L的雌二醇水中.每天投喂2次,饲料为新孵化的活体卤虫.试验期间,水温25 \pm 1 $^{\circ}$ C,水硬度8.0mg/L,pH 7.5~7.8,溶解氧8.0~9.0mg/L,光暗比为16:8.持续暴露60d后采样.采样时,试验鱼首先用MS-222(100mg/L)麻醉,然后解剖分离肝脏,肝脏用液氮速冻保存。

总RNA提取采用Trizol试剂.总RNA经DNAase I处理及纯化后,采用Super III反转录酶合成cDNA.每组随机选取6个样品进行研究。

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).VTG-I, VTG-II, CHG-H, CHG-L,RPL-7基因的引物见表1,由大连宝生物公司合成.PCR反应液:SYBR® Green PCR Master Mix 10 μ L,25mM正义和反义引物各0.4 μ L,cDNA反应液1 μ L,加双蒸馏水至20 μ L.PCR反应条件为50 $^{\circ}$ C保持2min,95 $^{\circ}$ C保持10min,40个循环:95 $^{\circ}$ C 15s, 60 $^{\circ}$ C 60s.在最后一个循环结束后做熔解曲线,确定PCR反应质量.各个基因的标准品来源于普通PCR产物,制备标准曲线^[7]。

实验结果以目标基因与内参基因(RPL-7)的mRNA拷贝数比值表示,各组间比较采用独立样

品t检验, $P<0.05$ 差异显著。

表1 实时定量PCR引物

Table 1 Primer pairs of SYBR® Green real-time PCR

基因	PCR引物序列	产物 bp
VTG-I	5'-CTCCAGCTTTGAGGCCATTTAC-3'	81
	5'-ACAGCACGGACAGTGACAACA-3'	
VTG-II	5'-CCAAGACCAAAGACCTGAACC-3'	167
	5'-TAAGATTAGGGAACCAGTAGT-3'	
CHG-H	5'-TACTTTCCTGCTACTTATTGC-3'	189
	5'-TTCCACGACCAGATTTCAC-3'	
CHG-L	5'-CAACATCTGCTGCTTATCCCC-3'	257
	5'-GACATCGCCTCCCATCCAG-3'	
RPL-7	5'-CGCCAGATCTTCAACGGTGTAT-3'	72
	5'-AGGCTCAGCAATCCTCAGCAT-3'	

2 结果与分析

2.1 低浓度雌二醇暴露对雄性青鳉鱼肝脏内VTG基因表达的影响

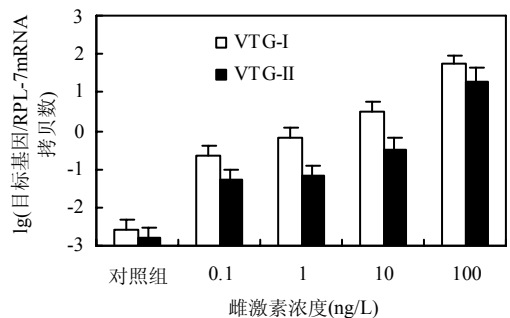


图1 不同浓度雌二醇暴露青鳉鱼肝脏VTG-I和VTG-II基因表达定量结果。

Fig.1 VTG-I and VTG-II gene expression in livers of medaka in E2 exposed groups

VTG-I(AB064320)和VTG-II(AB074891)是青鳉鱼中2个重要的卵黄蛋白原基因.从图1可见,与对照组相比,雌二醇暴露各组VTG-I和VTG-II的mRNA水平均显著升高($P<0.05$).雌二醇暴露组表达水平随暴露浓度升高呈现明显的上升趋势.对照组雄鱼肝脏VTG-I的mRNA水平为0.23 \pm 0.09(VTG-I/RPL-7mRNA的拷贝数比值,下同).雌二醇最低浓度(0.1ng/L)诱导VTG-I达到36.03 \pm 23.99,约为对照组的157倍;1和10ng/L雌

二醇暴露组的表达水平分别为 85.96 ± 92.42 , 142.1466 ± 125.55 , 分别是对照组的 375 倍, 620 倍. 雌二醇最高浓度暴露组 (100ng/L) VTG-I mRNA 水平为 7883.19 ± 4188.04 , 约是对照组的 34374 倍.

DMSO, 0.1, 1.0, 10.0, 100.0ng/L 雌二醇暴露组 VTG-II 表达水平分别为 0.18 ± 0.08 , 7.76 ± 6.45 , 9.26 ± 9.02 , 16.05 ± 16.78 , 2176.71 ± 1730.80 , 均显著高于对照组 ($P < 0.05$). 其雌二醇暴露组 VTG-II 表达水平分别是对照组的 43, 52, 91, 12301 倍. 对照组 VTG-II 的表达水平 (0.18 ± 0.08) 与 VTG-I 表达水平 (0.23 ± 0.09) 接近; 同浓度雌二醇暴露组的 VTG-II 表达水平升高倍数显著小于 VTG-I.

2.2 低浓度雌二醇暴露对雄性青鲮鱼肝脏内 CHG 基因表达的影响

CHG-L (AF500194) 和 CHG-H (AF500195) 是青鲮鱼中 2 个重要的卵壳前体蛋白基因. 由图 2 可以看出, 雌二醇暴露各组 CHG-L 和 CHG-H 的 mRNA 均被诱导. CHG-L mRNA 水平对照组为 2362.40 ± 909.02 ; 雌二醇最高浓度暴露组 (100ng/L) CHG-L mRNA 水平为 71920.07 ± 16174.51 , 约为对照组的 30 倍; 雌二醇最低浓度暴露组 (0.1ng/L) CHG-L mRNA 水平 4021.86 ± 1677.11 , 约为对照组的 1.7 倍; 1, 10ng/L 雌二醇暴露组 CHG-L 表达水平分别为对照组的 4 倍和 8 倍.

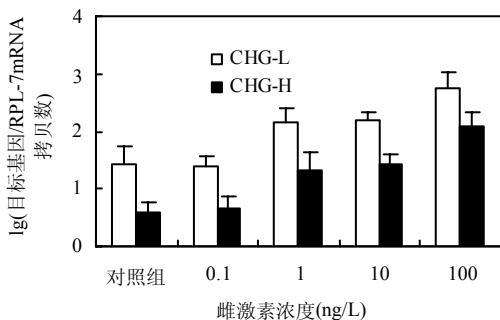


图 2 不同浓度雌二醇暴露青鲮鱼肝脏 CHG-L 和 CHG-H 基因表达定量结果

Fig.2 CHG-L and CHG-H gene expression in livers of medaka in E2 exposed groups

对照组雄鱼肝脏 CHG-H 的 mRNA 水平为 400.14 ± 103.67 . 暴露雌二醇 0.1, 1.0, 10.0, 100.0ng/L

组诱导 CHG-H mRNA 水平为分别为对照组的 2, 4, 7, 41 倍.

3 讨论

在卵生脊椎动物肝细胞中, 雌激素和雌激素受体 (ER) 特异性结合, 增强 VTG-I, VTG-II, CHG-H 和 CHG-L 基因转录, 合成卵黄蛋白和卵壳前体蛋白. 在正常情况下, 雄性动物和幼体 VTG, CHG 的表达量很低, 但在外源雌激素或类雌激素作用下, 体内 VTG 和 CHG 的基因转录被诱导.

以 20 日龄的雄性青鲮鱼幼鱼为实验动物, 连续暴露 60d 发现肝脏内 VTG-I, VTG-II, CHG-H 和 CHG-L 基因表达量与雌二醇浓度均呈现较好的剂量—效应关系. 从 VTG-I, VTG-II, CHG-L 和 CHG-H 各基因表达升高倍数看, 各组雄性青鲮鱼肝脏内 VTG-I 升高倍数大于 VTG-II, VTG-II 增加倍数高于 CHG-L, CHG-H, CHG-L 和 CHG-H 升高倍数相近. 所以暴露同一浓度雌二醇, 目的基因相对对照组升高的倍数顺序为 VTG-I > VTG-II > CHG-L ≈ CHG-H. Yamaguchi^[8], Inui 等^[3]报道的雄性青鲮鱼短期 (12h, 7d) 暴露较高浓度雌二醇时 VTG-II 的变化比 VTG-I 更灵敏, Lee C 等^[2]报道雄性青鲮鱼肝脏内内分泌干扰物生物标志物的灵敏度为 CHG-L > CHG-H > VTG (I&II). 这些不同之处可能与暴露时间、暴露鱼发育阶段不同有关, Yamaguchi, Inui 等是对成年雄性青鲮鱼短期暴露 100ng/L 以上的雌二醇进行研究. 此外, 实验方法不同也可能是造成差别的原因. Lee C 等是用半定量 PCR 方法对 VTG (I&II) 和 CHG (H&L) 基因表达量进行定量, 暴露雌二醇组 CHG-L, CHG-H 2 个基因电泳条带亮度显著强于 VTG-I, VTG-II, 因此认为 CHG 灵敏度较高. 用半定量方法确定基因初始量时误差较大, 依靠终点电泳条带亮度很难区分对照组 VTG 和 CHG 基因初始量的差异. 本研究用实时定量 RT-PCR 对各基因表达的初始水平准确定量, 以暴露组相对对照组升高的倍数进行灵敏度比较, 更具科学性.

本研究结果表明, 0.1ng/L 雌二醇暴露组 VTG-I, VTG-II 的表达量均显著高于对照组.

($P < 0.05$).雌二醇在环境中的污染水平大多处于 1ng 以下^[1],因此采用 VTG-I,VTG-II 作为生物标记物,可以有效分析环境样品中微量雌激素物质.

4 结语

青鳉鱼幼鱼暴露 0.1,1.0,10.0,100.0ng/L 雌二醇 60d,肝脏内 VTG-I,VTG-II,CHG-L 和 CHG-H 4 个基因表达量显著升高,且 4 个基因表达量与雌二醇浓度均呈较好的剂量—效应关系,灵敏度为 VTG-I > VTG-II > CHG-L ≈ CHG-H.其中,0.1ng/L 雌二醇暴露组 VTG-I 和 VTG-II 的表达量均显著高于对照组($P < 0.05$).

参考文献:

- [1] Ying G G, Kookana R S, Ru Y J. Occurrence and fate of hormone steroids in the environment [J]. *Environment International*, 2002, 28(6):545-551.
- [2] Lee C, Jeon S H, Na J G, *et al.* Sensitivities of mRNA expression of vitellogenin, choriogenin and estrogen receptor by estrogenic chemicals in medaka [J]. *Journal of Health Science*, 2002,48(5): 441-445.
- [3] Inui M, Adachi T, Takenaka S, *et al.* Effect of UV screens and preservatives on vitellogenin and choriogenin production in male medaka [J]. *Toxicology*, 2003,194(1-2):43-50.
- [4] Fujita, Haruhisa Fukada, Munetaka Shimizu, *et al.* Quantitation of serum levels of precursors to vitelline envelope proteins (choriogenins) and vitellogenin in estrogen treated masu salmon [J]. *General and Comparative Endocrinology*, 2004,136(1):49-57.
- [5] Celius T, Haugen T B, Grotmol T, *et al.* A sensitive zonal genetic assay for rapid in vitro assessment of estrogenic potency of xenobiotics and mycotoxins [J]. *Environmental Health Perspectives*, 1999,107(1):63-68.
- [6] Valentina Meucci, Augustine Arukweb. Detection of vitellogenin and *zona radiata* protein expressions in surface mucus of immature juvenile Atlantic salmon (*Salmo salar*) exposed to waterborne nonylphenol [J]. *Aquatic Toxicology*, 2005,73(1): 1-10.
- [7] ZHANG Zhaobin, HU Jianying, AN Wei, *et al.* Induction of vitellogenin mRNA in juvenile Chinese sturgeon treated with 17 β -estradiol and 4-nonylphenol [J]. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 2005,24(8):1944-1950.
- [8] Akemi Yamaguchi, Hiroshi Ishibashi, Shinya Kohra, *et al.* Short-term effects of endocrine-disrupting chemicals on the expression of estrogen-responsive genes in male medaka [J]. *Aquatic Toxicology*, 2005,72(3):239-249.

作者简介: 侯彦峰(1979-),男,吉林长岭人,西北农林科技大学动物科技学院硕士研究生,主要从事环境毒理化学研究.发表论文1篇.

美国最大化学公司确定 2015 年环境目标

美国最大化学公司道(Dow)化学公司首席执行官 Andrew N.Liveris 2006 年 5 月在华盛顿特区一次向新闻媒介、管理人员、企业界和环境保护人士的吹风会上,介绍了该公司 2015 年要达到的环境目标,以 2005 年为基线,到 2015 年降低 75%环境、健康与安全指标,减少生产事故、消灭死亡事故;减少泄漏和破损;减少与生产流程有关的安全隐患.

Liveris 还承诺将能效提高 25%,每年削减温室气体排放 2.5%,相当于消减 300 万辆汽车排放的 CO₂.Liveris 承认道化学公司燃烧大量化石燃料,导致温室气体排放和气候变暖.他说:“有些人说我们公司大量使用化石燃料但我们似乎不再寻求解决问题,恰恰相反,世界上没有人比我们更强烈地意识到最终要改变我们对石油和天然气的依赖.”

但是削减温室气体排放不是一夜间可以做到的事.Liveris 说:“我们在今后 10~20 年肯定仍然要依赖化石燃料.为应付手头的有限资源,我们必须变得更聪明些,努力做到节约、高效和减少单位产品的能耗.”

江 年 摘自《Chemical & Engineering News》, May 29, 14(2006)