

酵母双杂交系统测定抗雌激素物质¹⁾

胡建英²⁾ 谢国红

(北京大学环境学院资源与环境地理系,北京,100871)

摘要 建立了用酵母双杂交系统筛选具有抗雌激素作用物质的生物测试法,并对 6 种工业用酚类物质(4-*n*-壬基酚, 2-*sec*-丁基酚, 2-羟基联苯, 3-叔丁基酚, 2-叔丁基酚和 4-乙基-2,6-二叔丁基酚)及氯化三苯基锡的抗雌激素作用进行了测试。结果表明:氯化三苯基锡显示出极强的抗雌激素作用,强度超过了抗乳腺癌剂三苯氧胺及其代谢产物 4-羟基三苯氧胺。可以推测出有机锡造成软体动物的雄性化作用可能是由其抗雌激素作用引起的。6 种酚类物质中,除 4-乙基-2,6-二叔丁基酚外,其他 5 种显示出弱抗雌激素作用。值得注意的是:当 4-壬基酚显示出雌激素促进作用时,4-*n*-壬基酚却显示出抗雌激素作用。

关键词 酵母双杂交系统; 抗雌激素作用; 雌激素促进作用; 壬基酚; 有机锡
中图分类号 X 17

越来越多的研究表明一些人工合成的化学物质进入生物体之后,显示出内分泌干扰作用,影响野生生物的生殖发育。具有内分泌干扰作用的化学物质中,其中一些是通过和雌激素受体结合而影响生物体生殖机能和生殖器发育的。目前筛选能和雌激素受体结合的化学物质的体外实验方法有受体结合活性法和将雌激素受体基因克隆到酵母和培养细胞的方法。受体结合活性法只表示了待测物质和受体相结合的活性,但无法区别化学物质通过和受体结合而诱导雌激素作用的促进作用和化学物质通过和受体结合而抑制内源性雌激素和受体结合的所谓抗雌激素作用^[1]。而利用了克隆有雌激素受体基因的酵母和培养细胞的实验系统的原理是:待测物质通过和受体结合后,在细胞内由发现基因传达情报,最后通过测定酶的诱导活性或细胞繁殖等与雌激素作用的信号,能够区分促进和抗雌激素作用的方法。但是到目前为止,利用体外生物检测法对内分泌干扰物质进行筛选的工作中,往往着眼于雌激素促进作用而很少有关抗雌激素作用的研究报道^[2]。

本研究建立了用酵母双杂交体系筛选物质的抗雌激素作用的方法,并用此方法对氯化三苯基锡^[3]及 4-*n*-壬基酚、2-*sec*-丁基酚、2-羟基联苯、3-叔丁基酚、2-叔丁基酚以及 4-乙基-2,6-二叔丁基酚等 6 种酚类物质(结构如表 1)的抗雌激素作用进行了测试。

1) 国家杰出青年科学基金(49925103)、国家自然科学基金委员会试点创新研究群体科学基金(40024101)和环保“863”(2001AA646010-5)资助项目

2) 通讯联系人, E-mail: hujy@urban.pku.edu.cn

收稿日期: 2003-03-07; 修回日期: 2003-04-21

1.3 毒性的测定方法

为了区分待测物质对雌二醇的 β -半乳糖苷酶诱导活性的抑制作用,是由于化学物质自身的致死毒性引起酵母菌的死亡所造成的,还是化学物质的抗雌激素作用引起的,本实验同时还建立了待测物质对酵母菌急性毒性的实验方法。毒性测试实验中用醋酸锂法导入 GAL4AD 和鼠类 p53 的融合基因 pVA3, GAL4AD 和 SV40large T antigen 的融合基因 pTD1 的酵母 Y190 菌株 (YIOX)^[2]。在酵母双杂交系统中, p53 和 SV40large T antigen 之间显示出很强的相互作用,因此导入 pVA3 和 pTD1 的酵母菌,即使在没有雌二醇的情况下,也能观测到 β -半乳糖苷酶诱导活性,而且其活性强度取决于酵母菌的浓度。具体操作步骤同前,其毒性的大小是以待测物质对 β -半乳糖苷酶诱导活性的抑制来表示,并按式(1)计算。

2 结果与讨论

2.1 方法的建立

抗乳癌剂三苯氧胺及其代谢产物 4-羟基三苯氧胺是典型的抗雌激素物质(结构如表 1)^[5]。首先采用上述的抗雌激素筛选方法尝试了对此 2 种物质的抗雌激素作用活性的测试。图 1 表示了三苯氧胺及 4-羟基三苯氧胺的剂量-效应曲线。从图中可以看出当三苯氧胺的浓度在 10^{-5} mol/L 时开始显示抗雌激素作用,在 10^{-4} mol/L 时的抗雌激素作用几乎达到 100%,其对 β -半乳糖苷酶诱导活性的抑制达到一半时对应的浓度 (IC₅₀) 对数值为 -4.73。而 4-羟基三苯氧胺的浓度在 10^{-7} mol/L 时开始显示抗雌激素作用,在 10^{-6} mol/L 左右时的抗雌激素作用达到了 100%,其 IC₅₀ 的对数值则为 -5.98。

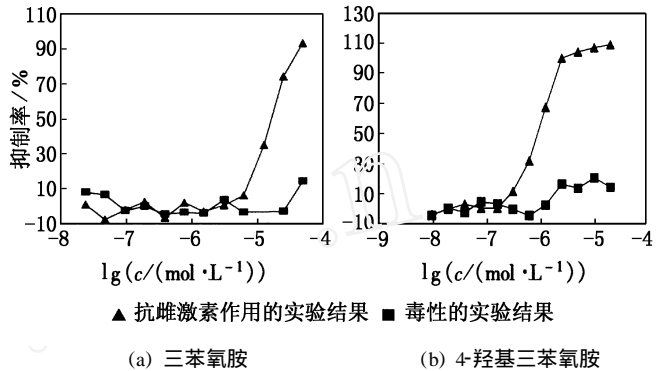


图 1 三苯氧胺和 4-羟基三苯氧胺的剂量-反应曲线

Fig. 1 The dose-response curve of tamoxifen and 4-hydroxytamoxifen

三苯氧胺和 4-羟基三苯氧胺的急性毒性的实验结果也表示在图 1 上。从它们的酵母毒性

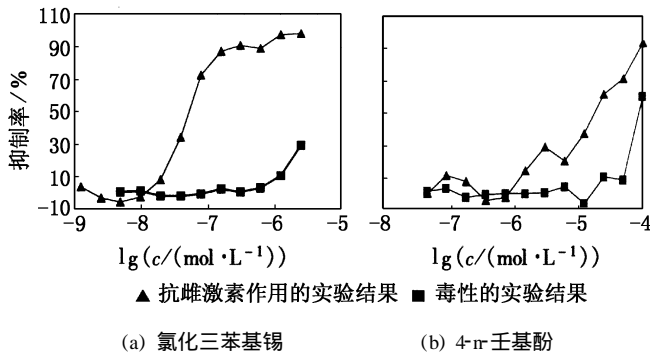


图 2 氯化三苯基锡和 4-n-壬基酚的剂量-效应曲线

Fig. 2 The dose-response curve of triphenyltin chloride and 4-n-nonylphenol

剂量-效应曲线可以发现三苯氧胺和 4-羟基三苯氧胺的半致死浓度 LC₅₀ 均大于其 IC₅₀。这样用本实验方法也证实了三苯氧胺及其代谢产物 4-羟基三苯氧胺的抗雌激素作用。

2.2 对象物质的抗雌激素作用活性

用同样的方法对氯化三苯基锡以及 6 种工业用的酚类物质的抗雌激素作用进行了测试。图 2(a) 表示了氯化三苯基锡的剂量-效应曲线。

从图中可以看出当氯化三苯基锡的浓度在 10^{-8} mol/L 时开始显示抗雌激素作用,在 10^{-7} mol/L 时的抗雌激素作用几乎达到 100%。其 IC₅₀ 的对数值为 -7.25, 远远低于酵母的半致死浓度 LC₅₀ 的对数值 (> -5.61), 表明氯化三苯基锡在极低的浓度范围内即具有抗雌激素作用。

实验和野外调查结果已经证明氯化三苯基锡可以造成软体动物的雄性化^[3], 从本实验结果可以推测其作用机理之一可能是由于氯化三苯基锡的强抗雌激素作用。

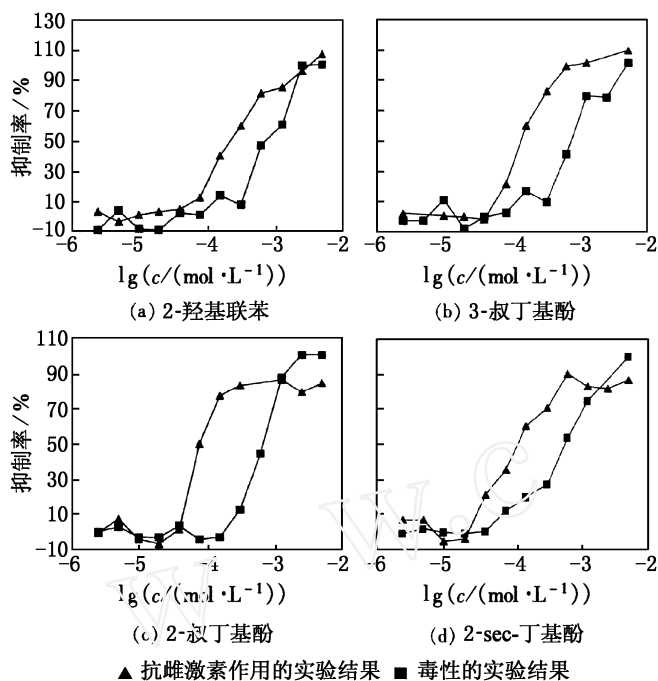


图 3 其他酚类物质的剂量-效应曲线

Fig. 3 Dose-response curve of other phenolic compounds

合活性法的结果进行了比较,预测了几种有雌激素受体结合活性但是没有显示雌激素促进作用的物质可能具有抗雌激素作用。表 2 列出了对象物质的抗雌激素作用活性,及雌激素受体结合活性值^[6]。结果发现,4-乙基-2,6-二叔丁基酚虽然显示出非常弱的雌激素受体结合活性,但既没有显示雌激素促进作用,也没有显示抗雌激素作用,表明该物质不具有内分泌干扰作用。相反,其他几种酚类物质虽然没有显示雌激素促进作用,但是都显示出相对较强的结合活性和抗雌激素作用。

图 2(b) 表示了 4-*n*-壬基酚的剂量-效应曲线,其 LC₅₀ 和 IC₅₀ 的对数值分别为 -4.08 和 -4.72, 两者的比值为 4.42, 表明 4-*n*-壬基酚显示抗雌激素作用。以往的实验已经证明支链的 4-壬基酚显示一定的雌激素促进作用^[4], 壬基的分枝程度很大地影响了壬基酚的作用模式。

除了 4-乙基-2,6-二叔丁基酚以外,其他 4 种物质也同样显示出抗雌激素作用,图 3 表示了这几种酚类物质的剂量-效应曲线,在三种丁基酚中,2-叔丁基酚显示出相对较强的抗雌激素作用活性。

2.3 与雌激素受体结合活性法的比较

前人工作建立了用酵母双杂交系统对具有雌激素促进作用的物质的筛检方法^[5], 并与雌激素受体结

表 2 对象物质的抗雌激素作用活性及毒性

Table 2 The estrogenic antagonist activity and toxicity of objective compounds

对象物质	lg(IC ₅₀)	lg(LC ₅₀)	lg(IC ₅₀)*
4-乙基-2,6-二叔丁基酚	-	-7.25	-3.31
2-羟基联苯	-3.54	-3.17	-3.00
3-叔丁基酚	-3.83	-3.11	-2.64
2-sec-丁基酚	-3.86	-3.21	-2.86
2-叔丁基酚	-4.11	-3.15	-2.63
4- <i>n</i> -壬基酚	-4.72	-4.08	-5.02
三苯氧胺	-4.73	> -4.31	-
4-羟基三苯氧胺	-5.98	> -4.70	-
氯化三苯基锡	-7.25	> -5.61	-

注: 浓度单位是 mol L⁻¹; * 雌激素受体结合活性法测定结果^[6]。

3 结 论

建立酵母双杂交系统筛选抗雌激素作用物质的方法,并通过对几种物质的筛选获得直链的4-n-壬基酚具有抗雌激素作用;烷基不在对位的苯酚类物质显示出抗雌激素作用的结论。

参 考 文 献

- 1 Tim Zacharewski. In Vitro Bioassays for Assessing Estrogenic Substances. Environmental Science and Technology, 1997, 31: 613 ~ 623
- 2 白石不二雄,白石宽明,西川淳一,等. 酵母を用いたエストロゲン・アンタゴニストアツ・イ系の開発と有機スズへの応用. 环境化学, 2001, 11(1): 65 ~ 73
- 3 Horiguchi T, Shiraishi H, Shimizu M, et al. Effects of Triphenyltin Chloride and Five Other Organotin Compounds on the Development of Imposex in the Rock Shell. Thais clavigera, Environ Pollut, 1997, 95: 85 ~ 91
- 4 谢国红,胡建英,李功,等. 酵母双杂交法筛检酚类物质的内分泌干扰作用. 中国环境科学, 2002, 22(3): 249 ~ 253
- 5 Hedden A, Müller V, Jensen E V. A New Interpretation of Antiestrogen Action. Ann N Y Acad Sci, 1995, 761: 109 ~ 120
- 6 Hu Jianying, Takako AIZAWA. Quantitative Structure-Activity Relationships for Estrogen Receptor Binding Affinity of Phenolic Chemicals, Water Research, 2003, 37(6): 1 213 ~ 1 222

Determination of Chemical Compounds Using Antagonist Assay Based on Yeast Two-Hybrid System

HU Jianying XIE Guohong

(Dept. of Resource and Environmental Geosciences, College of Chemistry and Environmental Sciences, Peking University, Beijing, 100871)

Abstract The estrogenic antagonist activities of triphenyltin chloride and 6 phenolic compounds (4-n-nonylphenol, 2-sec-butylphenol, 2-hydroxybiphenol, 3-tert-butylphenol, 2-tert-butylphenol and 4-methyl-2,6-di-tert-butylphenol) used in the coating of concrete tanks and lining of still pipe in water supply system were detected using antagonist assay based on yeast two-hybrid system. It was found that triphenyltin chloride elicits strong antagonist activity of which is even higher than those of tamoxifen and its metabolized product, 4-hydroxytamoxifen. Of six phenolic compounds, five objective phenolic compounds elicited weaker estrogen antagonist activity except for 4-methyl-2,6-di-tert-butylphenol. It should be noted that 4-n-nonylphenol elicited antagonist activity, while the 4-nonylphenol elicited agonist activity.

Key words Yeast two-hybrid system; estrogenic antagonist; estrogenic agonist; nonylphenol; organotin