

酵母双杂交法筛检酚类物质的内分泌干扰作用

谢国红^{1,2}, 胡建英^{2*}, 李 功², 马兴杰², 刘国光¹ (1.河南师范大学化学与环境科学学院,河南 新乡 453002; 2.北京大学城市与环境学系,北京 100871)

摘要: 利用酵母双杂交系统对 4 种天然和合成的雌激素, 4 种植物性激素以及 14 种常用于自来水供水系统中的酚类物质进行了内分泌干扰作用的筛检测定. 结果表明, 这些物质的作用强度与其结构有很大的关系. 14 种人工合成的化学物质中, 有 8 种显示出 β -半乳糖苷酶诱导活性. 从与雌激素受体结合活性值的比较结果可以推测, 没有显示出 β -半乳糖苷酶诱导活性的物质可能具有抗雌激素(antagonist)作用.

关键词: 酵母双杂交; 内分泌干扰物质; 酚类物质; 植物性激素; 雌激素受体结合活性

中图分类号: X131 文献标识码: A 文章编号: 1000-6923(2002)03-0249-05

Screening of phenolic endocrine disrupting compounds with yeast two-hybrid system. XIE Guo-hong^{1,2}, HU Jian-ying², LI Gong², MA Xing-jie², Liu Guo-guang¹ (1.College of Chemistry and Environmental Science, Henan Normal University, Xinxiang 453002, China; 2.Department of Urban and Environmental Sciences, Peking University, Beijing 100871, China). *China Environmental Science*. 2002,22(3): 249~253

Abstract: The endocrine disrupting functions of 4 natural and synthetical estrogens, 4 phytoestrogens, 14 phenols widely used in the tap water supply system were detected using yeast two-hybrid technique. Results show that the function of these compounds is dependant on their structure. Of 14 synthetical compounds, in which 8 compounds have inductivity for β -galactosidase; and from the comparing result, it could be inferred that the other 6 compounds without inductivity for β -galactosidase might have antagonism to estrogen.

Key words: yeast two-hybrid; endocrine disrupting compounds; phenols; phytoestrogens; estrogen receptor binding affinity

文献表明以壬基酚等为代表的酚类物质显示出内分泌干扰作用^[1]. 这些物质被广泛地用作涂料、塑料的抗氧化剂及树脂的原材料, 并在食物或自来水中被检出^[2-4]. 目前筛检这类物质是否具有内分泌干扰作用的体外方法主要有雌激素受体结合活性法, 细胞增殖法, 重组受体/报告基因表达培养细胞和酵母法^[5]及酵母双杂交法等^[6,7]. 酵母双杂交法具有测试时间短, 重现性好, 能区分协同或拮抗作用等优点, 目前被30多个研究团体所采用.

本文利用酵母双杂交法测试了常被使用于自来水管材和储水槽表面涂料中的14种酚类物质, 并和雌激素受体结合活性值比较, 对被测物质可能的作用模式进行了探讨. 为了比较, 本文还测试了天然及人工合成雌激素以及植物性激素的作用强度.

1 材料与方法

1.1 试剂与仪器

实验用培养基为去除了亮氨酸和色氨酸的SD培养基, 双杂交酵母基因工程菌株Y190由日本大坂大学西川淳一博士惠赠; 表1中的对象物质等标准物质均购买于日本东京化成和林纯药公司; 二甲基亚砷(DMSO, ACS级, AMRESCO); 无氨基酸氮源和氨基酸(Sigma); 显色剂 *o*-nitrophenol- β -D-galactopyranoside(ONPG, 东京化成); 溶菌酶Zymolyase (20T; 生化学工业, 日本); BIO-RAD550酶标仪; Nunc96孔两条可拆酶标板; Jouan MR 18.22冷冻离心机.

收稿日期: 2001-08-11

基金项目: 国家杰出青年科学基金资助项目(49925103); 国家自然科学基金委员会试点创新研究群体科学基金资助项目(40024101)

* 通讯联系人

1.2 酵母双杂交测试方法

用接种针挑取 2~3 环酵母菌放入有培养液的培养瓶中,在 30 的条件下培养 14~16h(对数生长期).取上述培养液 50mL 加入有 200mL 培养液的小管中,再添加 2.5mL 的样品溶液(DMSO 溶解液),震荡摇匀.置于 DNA 混合器上培养 4h (30).移取 150mL 上述培养液于酶标板(96 孔)中,于 595nm 波长下测定菌液的吸光度值(以加入 DMSO 的培养液为参照空白).余下的溶液离心 5min(15000r/min),弃去上清液后,加入 200mL 含 1mg/mL 溶菌酶 Zymolyase 的 Z buffer(0.1M 的碳酸钠缓冲溶液(pH=7.0),10mM 的 KCl,1mM 的 MgSO₄)溶液,震荡混匀后,静置反应 20min(30).加入含 4mg/mL 的 ONPG 缓冲溶液(0.1M 的 Na₂HPO₄和 KH₂PO₄)40mL 于上述溶液中,震荡混匀,再于 30 条件下静置反应至溶液产生黄色,

记录反应时间,加入 100mL 的 1M Na₂CO₃ 溶液使反应停止.离心 5min(15000r/min),吸取上清液 150mL 于 96 孔酶标板中,分别于 415nm 和 570nm 波长下测定吸光度值(以加入菌液的培养液为参照空白).最后用下式计算β-半乳糖苷酶诱导活性.

β-半乳糖苷酶诱导活性

$$=1000(A_{415}-1.75 A_{570})/(t v A_{595})$$

式中:t 为加入 ONPG 到溶液出现黄色时的反应时间;v 为菌液体积(0.05mL);A₅₉₅、A₄₁₅、A₅₇₀ 分别为 595、415 和 570nm 波长下的吸光度值.

2 结果与讨论

2.1 作用强度

实验的对象物质是 4 种天然和人工合成的雌激素,4 种植物性激素和 14 种工业用人工合成的酚类物质,这 22 种物质的结构如表 1 所示.

表 1 对象物质的种类和结构

Table 1 The variety and structure of objective compounds

种类	结构			
天然合成雌激素				
酚类物质				

用酵母双杂交法所测的这些对象物质的剂量和反应曲线见图 1.从图 1 中可看出,衡量对象物质的内分泌干扰作用活性的大小,不仅决定其显示诱导β-半乳糖苷酶活性时的浓度,还决定其作用的强弱.为了全面反映各物质的内分泌干扰作用的活性强度,本文选用诱导β-半乳糖苷酶的活性达到浓度为 $10^{-7}M$ 的雌二醇的β-半乳糖甘

酶诱导活性(为最高诱导活性)的 10%时的各物质的浓度表示为相对作用浓度(以 REC10 表示)^[8],各物质的最高β-半乳糖苷酶诱导活性与雌二醇的最高活性的比值表示为活性相对值.本文采用式(1)中的作用强度^[9]来作为衡量各对象物质的内分泌干扰活性大小的综合指标:

$$\text{作用强度} = \text{REC10} / \text{活性相对值} \quad (1)$$

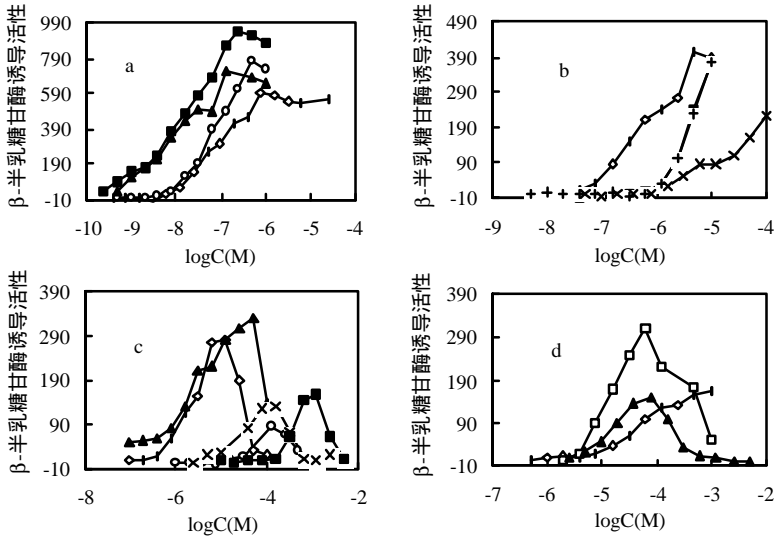


图 1 对象物质的剂量-反应活性关系

Fig.1 Dose-response curves of objective compounds

a 中——雌酮——己烯雌酚——雌三醇——雌二醇; b 中——玉米烯酮——4',7-二羟基异黄酮
 ——4',5,7-三羟基异黄酮——鸡豆黄素; c 中——4-壬基酚——4-t-辛基酚——4-叔丁基酚
 ——4-仲丁基酚——4-乙基酚; d 中——双酚 A——对联苯酚——4-羟基联苯

图 2 为 REC10 和活性相对值之间的关系,两者之间基本上呈现出较好的相关性.

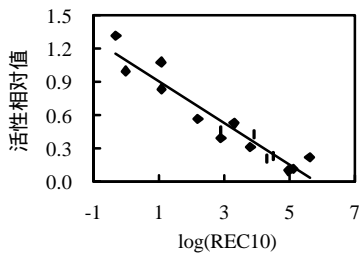


图 2 log(REC10)值与活性相对值的比较

Fig.2 Correlation between log(REC10) and relative activity

糖苷酶诱导活性则越强.但是其中也有例外,如 4-乙基酚的 REC10 值虽比 4-叔丁基酚高,但前者的β-半乳糖苷酶诱导活性却较后者强.己烯雌酚和雌二醇也同样发生了类似的现象.

2.2 物质结构和作用强度的关系

表 2 列出了对象物质的作用强度的对数值.从表 2 中可以看出,人工合成及天然激素类物质的作用强度最强,其中己烯雌酚的作用强度高于天然激素雌二醇,在对象物质中显示出最高的作用强度.雌三醇和雌酮的作用强度比较相近,约比雌二醇低一个数量级.其次为植物性激素类物质,其中,玉米烯酮的作用强度最高,其对数值为 2.44, 4',7-二羟基异黄酮和 4',5,7-三羟基异黄酮的作

从图 2 中可以发现,REC10 值越低,其β-半乳

用强度比较接近,分别为 3.55 和 3.57.上述结果和雌激素受体结合活性法测定的结果比较相似^[10].

14 种酚类物质中作用强度最高的物质为 4-t-辛基酚,其作用强度的对数值为 3.21;作用强度最低的为 4-乙基酚(6.27).在烷基酚类物质中,当烷基数目为 1~8 时,随着烷基炭数的增加,其作用强度也显示出增加的趋势,超过 8 以后,作用强度随着烷基炭数的增加而减少.这一现象和 Routledge 等^[11]用重组受体/报告基因表达酵母法测定的结果比较一致.但是值得注意的是,对于同样为丁基酚,烷基的分支程度高的 4-叔丁基酚的作用强度低于分支程度低的 4-仲丁基酚的作用强度,这一结果不同于重组受体/报告基因表达酵母法的测定结果.在本实验中还对壬基为直链的 4-n-壬基酚的作用强度也进行了测试,发现同样为壬基酚,而直链的 4-壬基酚则并没有表现出 β -半乳糖苷酶诱导活性,烷基链长度和分支程度较大地影响了它的作用强度.另外,在双酚 A 和联苯酚类物质中,在对位含有两个羟基的对联苯酚显示出了较高的作用强度,但是整体说来此类物质的作用强度比 4-壬基酚和 4-t-辛基酚要小 1~2 个数量级.

考察在酵母双杂交法中没有显示出 β -半乳糖苷酶诱导活性的 6 种物质的结构特性,发现它们共同的结构特征在于烷基的取代位置不在对位,或者在对位及其他的位置上也有烷基取代的物质如 4-甲基-2,6-二叔丁基酚.

2.3 作用强度和受体结合活性值的比较

为了比较,表 2 中列出了 22 种对象物质的人体雌激素受体的结合活性值^[10].在雌激素受体结合活性法实验中,除了鸡豆黄素以外的其余 21 种对象物质都显示出明显的结合活性,但在酵母双杂交法测试中显示出 β -半乳糖苷酶诱导活性的只有包括鸡豆黄素在内的 16 种物质.图 3 为酵母双杂交法和雌激素受体结合活性法的测试中都显示出活性的 15 种对象物质的实验结果的相关性.其相关方程如下:

$$\text{作用强度} = -1.1825 \log(\text{IC}_{50}) + 4.0534,$$

$$r^2 = 0.9461 (n=15)$$

表 2 酵母双杂交法与雌激素受体结合活性法的比较
Table 2 Comparison of the results between yeast two-hybrid system and estrogen receptor binding affinity

	化学物质	log(作用强度)*	log(IC ₅₀)**
1	己烯雌酚	-0.44	0.80
2	雌二醇	-0.44	1.36
3	雌三醇	1.03	1.70
4	雌酮	1.16	2.52
5	玉米烯酮	2.44	2.85
6	4-t-辛基酚	3.21	4.15
7	4-壬基酚	3.29	3.98
8	4',7-二羟基异黄酮	3.55	3.63
9	4',5,7-三羟基异黄酮	3.57	2.96
10	对联苯酚	4.25	5.03
11	鸡豆黄素	4.27	>7.24
12	4-羟基联苯	4.96	5.63
13	双酚 A	5.13	5.04
14	4-仲丁基酚	5.74	5.76
15	4-叔丁基酚	6.02	6.01
16	4-乙基酚	6.27	6.23
17	4-n-壬基酚	n.d	3.98
18	4-甲基-2,6-二叔丁基酚	n.d	5.69
19	3-羟基联苯	n.d	5.79
20	2-羟基联苯	n.d	6.00
21	2-仲丁基酚	n.d	6.14
22	2-叔丁基酚	n.d	6.37

注: *酵母双杂交法测定; **雌激素受体结合活性法测定^[10] (浓度单位为 nM)

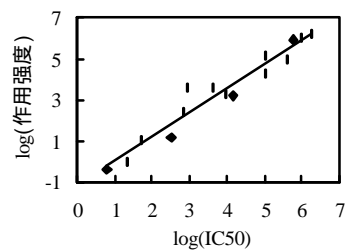


图 3 酵母双杂交法与雌激素受体结合活性法的相关性
Fig.3 Correlation of the results between yeast two-hybrid system and estrogen receptor binding assay

受体结合活性越高,其在酵母双杂交法测试中也显示出越高的 β -半乳糖苷酶诱导活性,对人体雌激素具有促进作用(agonist).

对于鸡豆黄素,虽没有显示结合活性,但在酵母双杂交法测试中显示出 β -半乳糖苷酶诱导活性.观测剂量-反应曲线的形状,也发现和同为

植物性激素的玉米烯酮,4',7-二羟基异黄酮和4',5,7-三羟基异黄酮有明显的不同,这可能和它们之间的结构有很大的关系,有待于进一步研究.

对于在酵母双杂交法中没有显示出 β -半乳糖苷酶诱导活性的6种物质,却发现和雌激素受体具有结合活性.因此推测这些物质可能具有抗雌激素作用(antagonist).有关这些物质是否具有抗雌激素作用,及其抗雌激素作用强度的大小将发表在相关的其他论文中.

3 结论

3.1 用酵母双杂交法测定的各物质的 β -半乳糖苷酶诱导活性结果表明,越是在低剂量范围内显示作用强度的,其 β -半乳糖苷酶诱导活性呈现越强的趋势.

3.2 对象物质的作用强度和结构有非常大的相关性,结合酵母双杂交法测试的作用强度和雌激素受体结合活性法测定的结果,将为研究对象物质的作用模式提供一个有效的方法.

参考文献：

- [1] Jobling S, Hoare S A, Sumpter J P, *et al.* Environmental persistent alkylphenolic compounds are estrogenic [J]. *Endocrinology*, 1994, 135(1): 175-182.
- [2] Brotons J A, Olea Serrano M F, Villalabos M, *et al.* Xenoestrogens released from lacquer coatings in food can [J]. *Environ. Health Perspect*, 1995, 103:608-612.
- [3] Olea N, Pulgar R, Perez P, *et al.* Estrogenicity of resin-based composites and sealants used in dentistry [J]. *Environ. Health Perspect*, 1996, 104: 298-305.
- [4] Kunikane S. Human exposure to endocrine disrupting compounds from tap water [R]. Report of Ministry of Health and Welfare of Japan, 1999.
- [5] Routledge E J, Sumpter J P, Estrogenic activity of surfactants and some of their degradation products assessed using a recombinant yeast screen [J]. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 1996, 15(3):241-248.
- [6] Tim Zacharewski. In vitro bioassays for assessing estrogenic substances [J]. *Environmental Science and Technology*, 1997, 31: 613-623.
- [7] Nishikawa J, Saito K, Goto J, *et al.* New screening methods for chemicals with hormonal activities using interaction of nuclear hormone receptor with coactivator [J]. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*,

1999,154:76-83.

- [8] Tsutomu Nishihara, Nishikawa Jun Ichi, Tomohiko Kanayama, *et al.* Estrogenic activities of 517 chemicals by yeast two-hybrid assay [J]. *Journal of Health Science*, 2000, 46(4):282-298.
- [9] 日本厚生省科学研究.内分泌攪乱化学物質の水道からの暴露等に関する調査研究報告書(Z).1998.
- [10] Hu Jian Ying, Takako Aizawa, Shoyichi K. Quantitative structure-activity relationships for estrogen receptor binding affinity of phenolic compounds [A]. IWA PARIS 2000, Proceedings of 1st World Congress of the International Water Association IWA [C]. Paris, July 2000.
- [11] Routledge E J, Sumpter J P. Structural features of alkylphenolic chemicals associated with estrogenic activity [J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 1997, 272:3280-3288.

作者简介：谢国红(1968-),男,河南新乡人,北京大学城市与环境学系在读硕士生,主要从事酚类物质的内分泌干扰作用的生物筛检工作.发表论文8篇.

环保信息

全国辐射环境监测网络“十五”建成 1999年9月,日本燃料元件厂发生临界事故,国家环境保护总局紧急启动了辐射环境应急响应系统,组织部分省市进行了应急监测.据了解,“十五”期间,国家将加大对辐射环境监测和应急能力建设投入,2004年12月31日前将投入1亿多元完成“一网络两中心”即全国辐射环境监测网络、辐射环境监测技术中心、核与辐射事故应急技术中心的建设,使我国辐射环境监测能力接近或达到国际先进水平.

据国家环境保护总局核安全与辐射环境管理司副司长刘华介绍,依据总体规划、分步实施的原则,在今后10年内将分两个阶段完成全国辐射环境监测网络建设.第一阶段(“十五”期间)采用“填平补齐”的方式,形成基本网络,各级网站能承担辐射环境监测的基本任务;第二阶段(“十一五”期间)在第一阶段建设的基础上,全面提升各级网站的业务能力和仪器设备配置水平,使监测水平接近“核大国”的标准.国家计委已批准了第一阶段项目建议书.

摘自《中国环境报》

2002-04-29