

实时定量 RT-PCR 方法评价壬基酚的雌激素效应

赛林霖^{1,2}, 张照斌¹, 胡建英^{1*}, 侯彦峰¹, 赛道建²

(1. 北京大学环境学院, 北京 100871; 2. 山东师范大学生命科学学院, 济南 250014)

摘要:壬基酚是 1 种环境雌激素物质, 以血清卵黄蛋白原作为生物标记物检测壬基酚的最低雌激素效应浓度高于 10 $\mu\text{g/L}$. 利用亚成体青鳉鱼进行不同浓度的 (1、10、50、100 $\mu\text{g/L}$) 壬基酚暴露实验, 运用实时定量 RT-PCR 方法, 从分子水平上, 对青鳉鱼 VTG、VTG⁻、CHG-H 和 CHG-L 的基因表达进行了研究, 并对低浓度壬基酚的环境雌激素效应进行了分析. 结果表明: 1 $\mu\text{g/L}$ 浓度的壬基酚暴露组青鳉鱼肝脏的 VTG、VTG⁻、CHG-H、CHG-L 基因表达均被显著诱导, 说明实时定量 RT-PCR 能够检测 1 $\mu\text{g/L}$ 壬基酚的环境雌激素效应, 具有在现实环境中的应用前景.

关键词:实时定量 RT-PCR; 壬基酚; 卵黄蛋白原; 基因表达

中图分类号: X174 文献标识码: A 文章编号: 0250-3301(2006)09-1825-04

Evaluation of Estrogenic Activity for Nonylphenol Using Quantitative Real-Time RT-PCR Method

SAI Lin-lin^{1,2}, ZHANG Zhao-bin¹, HU Jian-ying¹, HOU Yan-feng¹, SAI Dao-jian²

(1. College of Environmental Science, Peking University, Beijing 100871, China; 2. College of Life Science, Shandong Normal University, Ji'nan 250014, China)

Abstract: It has been demonstrated that nonylphenol (NP) exerts estrogenic activity. Quantitative real-time reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) was used to study the VTG, VTG⁻, CHG-H and CHG-L genes expression in the liver of juvenile medaka exposed to NP at 1, 10, 50, 100 $\mu\text{g/L}$ for 60 days. The results show that the VTG, VTG⁻, CHG-H and CHG-L genes expression in the liver of juvenile medaka are induced even at 1 $\mu\text{g/L}$ significantly. It should be noted that the lowest observed effect concentration (LOECs) based on the hepatic vitellogenin (VTG) induction is about 1 $\mu\text{g/L}$, suggesting that quantitative real-time RT-PCR can detect the estrogenic activity of NP at relatively low concentration, and there is a potential application in evaluating the estrogenic activity of NP in aquatic environment.

Key words: quantitative real-time RT-PCR; nonylphenol; vitellogenin; gene expression

卵黄蛋白原 (VTG) 是在雌二醇的作用下肝脏中生成的一种蛋白, 是卵黄蛋白的前体, 通常只能在雌鱼的血液中检出, 雄鱼血液中很低或者很难检出^[1]. VTG 作为评价壬基酚 (NP) 等内分泌干扰物质雌激素活性的生物指标已经得到广泛应用^[2-4]. 另外, 已有研究表明, 卵壳前体蛋白 (CHG) 也是重要的环境内分泌干扰物质的生物标记物^[5]. VTG 和 CHG 分别包括 VTG、VTG⁻ 和 CHG-H、CHG-L 2 个基因. NP 是非离子表面活性剂壬基酚聚氧乙烯醚 (NPEOs) 的合成材料和代谢产物, 是一种广泛存在于各种环境介质中具有雌激素活性的物质. Masanor 等采用了基于蛋白水平的酶联免疫分析 (ELISA) 方法, 研究表明 NP 诱导青鳉鱼卵黄蛋白原的最低影响浓度 (LOECs) 为 11.6 $\mu\text{g/L}$ ^[6]. 虽然 ELISA 相对于高效液相色谱 (HPLC) 灵敏度较高, 但是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^[7,8], 在评价低浓度暴露下 NP 的雌激素活性时仍然存在一些问题. 近年来, 实时定量

RT-PCR 方法的建立, 使从分子水平上进行基因表达准确定量成为毒理学研究的便捷工具, 从而使环境浓度水平的 NP 雌激素活性研究成为可能. 本文以青鳉鱼为实验动物, 运用实时定量 RT-PCR 方法, 以 VTG、VTG⁻、CHG-L 和 CHG-H 基因 mRNA 表达作为指标, 研究不同浓度 NP 的雌激素活性.

1 材料与方法

1.1 实验材料

壬基酚 (NP, 技术级) 购自日本东京化学株式会社; 二甲基亚砜 (DMSO) 为美国 Sigma 公司产品. trizol 试剂、反转录酶试剂 (Superscript III) 为 Invitrogen 公司产品, 无 RNA 酶活性的 DNA 酶

收稿日期: 2005-09-21; 修订日期: 2005-10-14

基金项目: 国家自然科学基金项目 (20377002)

作者简介: 赛林霖 (1981~), 女, 硕士研究生, 主要研究方向为环境毒理学, E-mail: sailinlin2009@163.com

* 通讯联系人, E-mail: huji@urban.pku.edu.cn

和普通 PCR 试剂 (^{EX} Taq PCR 试剂盒) 以及引物合成服务购自大连宝生物公司; 实时定量 PCR 试剂 (SYBR^R Green I master mix) 购自美国应用生物系统公司。

青鳉鱼 (*Oryzias latipes*; Orange red 品系) 为孵化后 20 日龄的亚成体 (体长: 9.6 mm ± 1.7 mm; 体重: 94.2 mg ± 9.4 mg)。该品系获赠于日本国土环境研究所, 在本实验室已驯化 4 代以上。养殖和暴露期间条件控制: 水温 25 ~ 28, 水硬度 8.0 mg/L, pH 值 7.5 ~ 7.8, 溶氧 8.0 ~ 9.0 mg/L。光周期控制在昼/夜 = 16/8。饲料为新孵化的活体卤虫。

1.2 实验方法

根据文献 [6], NP 的雌激素的效应出现在 10 μg/L 附近。本文为了观测低浓度范围内的 NP 雌激素效应, 增加了 1 μg/L 的低暴露浓度。梯度配制 (2、1、0.2、0.02 mg/mL) 壬基酚 DMSO 溶液, 按照 0.005% (DMSO 溶液与水的体积分数) 的比例配制实验暴露组 (1、10、50、100 NP μg/L) 和对照组 (DMSO 试剂) 用水。暴露 60 d 后杀鱼取肝脏, 肝脏用液氮速冻保存至总 RNA 提取。

按照试剂说明, 将液氮冻存的肝脏加到 0.5 mL trizol (Invitrogen, Life Technologies) 试剂中匀浆, 提取总 RNA。总 RNA 进行 DNase (50 单位) 处理以去除可能残存的基因组 DNA。用 A₂₆₀/A₂₈₀ 检测 RNA 质量, 该值大于 1.8, 且 1% 的甲醛琼脂糖变性凝胶电泳证实总 RNA 没有明显降解; 记录 A₂₆₀ 值, 换算 RNA 浓度。按照 Superscript 试剂说明, 进行反转录反应, 合成 cDNA。

表 1 青鳉鱼基因实时定量 PCR 引物

Table 1 Primer pairs of SYBR^R Green Real-time PCR assay for medaka

基因	正反链引物	引物序列	PCR 产物/ bp
VTG	Forward	5'-CTCCAGCTTTGAGGCCATTTAC-3'	81
	Reverse	5'-ACAGCACGGACAGTGACAACA-3'	
VTG	Forward	5'-CCAA GACCAAA GACCTGAACC-3'	167
	Reverse	5'-TAA GATTAGGGAACCA GTAGT-3'	
CHG H	Forward	5'-TACTTTCCCGTCACTTATTGC-3'	189
	Reverse	5'-TTCCACGACCA GA GTTCAAC-3'	
CHG L	Forward	5'-CAACATCTGCTGCTTATCCCC-3'	257
	Reverse	5'-GACATCGCCTTCCCATTCAG-3'	

参照 trizol 试剂说明, 从提取 RNA 后剩余有机相中提取 DNA。采用引物 (正链 5'-CCTGAA GTGGTGGTGAA GAATG-3' 和反链 5'-CTGGACGATGAA GCA GA GTAGC-3') 进行普通 PCR 扩增。琼脂糖凝胶电泳, 0.1% 溴化乙锭染色,

紫外观察 850bp 条带, 该条带为基因型雄性特有。实时定量 PCR 引物参照表 1。各基因的标准品制备和计算方法参照文献报道 [8,9]。将标准品梯度稀释制备标准曲线, 见图 1(A)。实时定量 PCR 反应液组成: SYBR^R Green I master mix 10 μL, 正反链引物 (20 μmol/L) 各 0.4 μL, 反转录反应液 (cDNA) 1 μL, 加双蒸水至 20 μL, 进行实时定量 PCR 反应。反应条件: 首先在 50 °C 下激活 UNG 酶活性 2 min, 其次在 95 °C 下灭活 UNG 酶活性并同时激活 Taq 酶活性 10 min, 最后从 95 °C, 15 s 变化成 60 °C, 60s, 循环 40 次。为了避免由非特异扩增第一步引起的假阳性结果, 在 PCR 反应完成后进行裂解曲线程序, 图 1(B) 为 VTG 基因的裂解曲线。

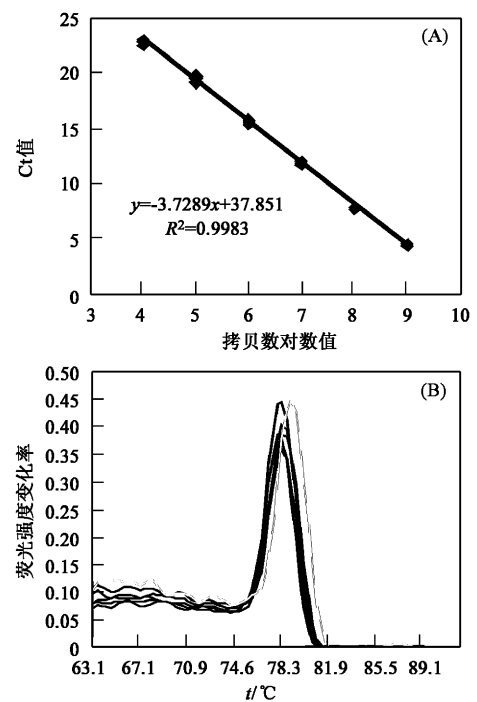


图 1 青鳉鱼 VTG 基因实时定量 PCR-SYBR^R Green 荧光染料法标准曲线 (A) 和裂解曲线 (B)

Fig. 1 Standard curves (A) and heat dissociation curves (B) for medaka VTG gene, by SYBR^R Green detection

1.3 统计分析

本文采用独立样本 *t* 检验进行数据差异状况比较。当 $p < 0.05$ 时, 认为差异显著。所有数据和图表均以平均值 ± 标准偏差形式。

2 结果和讨论

图 2 表示了 NP 诱导青鳉鱼肝脏 VTG、VTG、CHG H 和 CHG L 基因表达的剂量-效应关系。对照组的 VTG、VTG、CHG H 和 CHG L

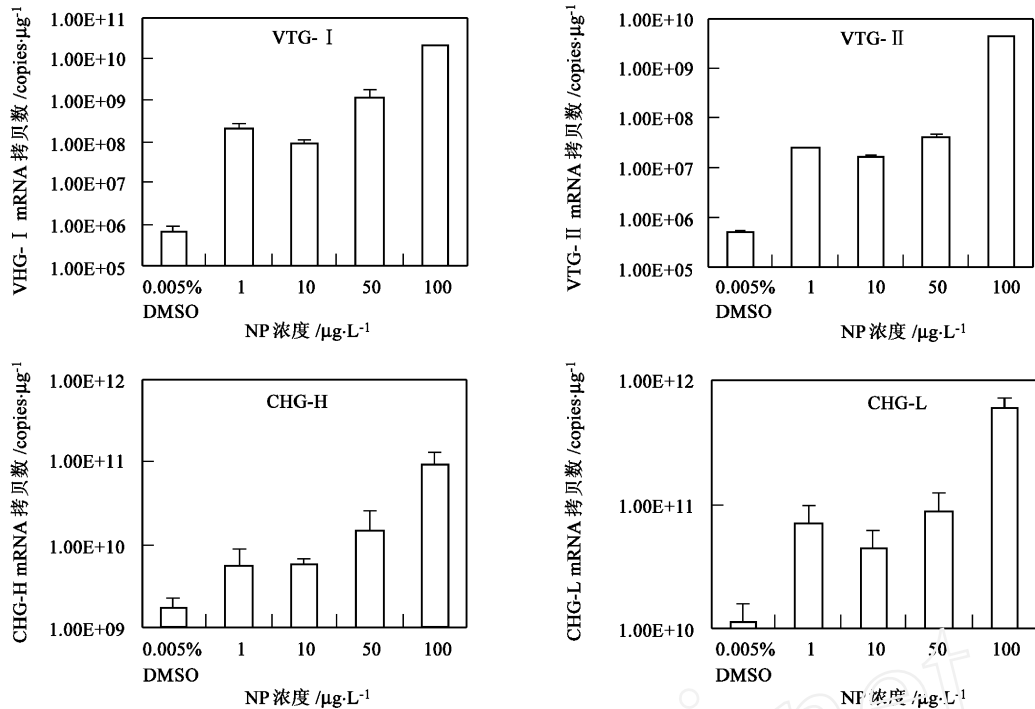


图2 实时定量 RT-PCR (SYBR Green 荧光染料法) 对对照组和壬基酚暴露组青鳉鱼肝脏 VTG-I、VTG-II、CHG-H 和 CHG-L 基因表达定量结果 (n=6, 平均值 ± 标准偏差)

Fig. 2 Quantifications of VTG-I, VTG-II, CHG-H and CHG-L gene expressions in livers of medaka in control and 4-NP exposed groups by real-time PCR, SYBR Green detection. (n=6, mean ± S. D.)

mRNA 的水平分别为 $(1.29 \times 10^5 \pm 5.34 \times 10^4)$ copies/ μg ; $(9.93 \times 10^4 \pm 4.82 \times 10^4)$ copies/ μg ; $(1.74 \times 10^9 \pm 4.84 \times 10^8)$ copies/ μg 和 $(1.13 \times 10^{10} \pm 4.44 \times 10^9)$ copies/ μg , NP 暴露各组 (1、10、50、100 $\mu\text{g/L}$) 的 VTG-I、VTG-II、CHG-H 和 CHG-L mRNA 均显著高于对照组 ($p < 0.05$), NP 浓度从 10 $\mu\text{g/L}$ 至 100 $\mu\text{g/L}$, VTG mRNA 和 CHG mRNA 的诱导量几乎呈对数直线上升。值得注意的是 1 $\mu\text{g/L}$ 的 NP 暴露组的各基因 mRNA 表达量都显著高于对照组的 ($p < 0.05$), 其中 VTG-I mRNA 水平是对照组的 325.7 倍; VTG-II mRNA 是对照组的 49.0 倍, CHG-H mRNA 是对照组的 3.2 倍, CHG-L mRNA 是对照组的 6 倍。如前言所述, Masanori 等利用 ELISA 方法, 对青鳉鱼进行 3.3 ~ 44.7 $\mu\text{g/L}$ 的 NP 毒理暴露研究, 发现 NP 的最低影响浓度 (LOECs) 为 11.6 $\mu\text{g/L}$; Ward 等对暴露 NP 的黑头呆鱼 (*Pimephales promelas*) 早期发育研究也只在 14 $\mu\text{g/L}$ (LOECs) 以上浓度检测到毒性效应, 这些 LOECs 均高于本研究中 NP 的最小浓度^[6,10]。这说明, 从基因表达角度, 特别是应用实时定量 RT-PCR 能够检测更低浓度水平的 NP 雌激素活性, 而在现实环境中 NP 的浓度经常在 0.11 ~ 3.08 $\mu\text{g/L}$

的范围检出^[11]。因此, 实时定量 RT-PCR 在现实环境 NP 的毒理研究领域具有广泛的前景。

另外, 在本研究中 1 $\mu\text{g/L}$ NP 暴露组的 VTG-I mRNA 表达量显著高于 10 $\mu\text{g/L}$ NP 暴露组的表达量 ($p < 0.05$), 而其他 3 个基因的表达水平虽然略高于 10 $\mu\text{g/L}$ NP 暴露组的表达量, 但无显著性差异 ($p > 0.05$)。这种近似 U 型的剂量效应关系在一些内分泌干扰物质 (如阿特拉津、双酚 A) 中曾经有大量报道^[12], 但目前 NP 中尚未见报道。Gaylor 等认为最低效应浓度的概念并不适用于内分泌干扰物质^[13], 并且这一设想得到了 Sheehan 等的实验证实, 并被 Crews 等列为内分泌干扰物质未来研究的主要主题之一^[14,15]。本研究设计了从 1 ~ 100 $\mu\text{g/L}$ NP 暴露实验, 在最低剂量仍然有较高的雌激素效应出现, 至于 NP 是否符合 Gaylor 等的理论, 还有待进一步研究。

3 结论

运用实时定量 RT-PCR 方法, 从基因表达角度, 以 VTG-I、VTG-II、CHG-H、CHG-L 作为生物标记物基因, 成功检测出 NP 在 1 $\mu\text{g/L}$ 的雌激素活性。同时, 发现暴露 NP 能够导致青鳉鱼 VTG-I 基

因表达的非典型剂量效应关系. 可见, 实时定量 RT-PCR方法是评价 NP 环境雌激素效应的有效方法.

参考文献:

- [1] Hashimoto S, Bessho H, Hara A, *et al.* Elevated serum vitellogenin levels and gonadal abnormalities in wild male flounder (*Pleuronectes yokohamae*) from Tokyo Bay, Japan [J]. *Mar. Environ. Res.*, 2000, **49**: 37 ~ 53.
- [2] Kime D E, Nash J O, Scott A P. Vitellogenesis as a biomarker of reproductive disruption by xenobiotics [J]. *Aquaculture*, 1996, **177**: 345 ~ 352.
- [3] Kloas W, Ilka L, Ralf E. Amphibians as a model to study endocrine disruptors: Estrogenic activity of environmental chemicals in vitro and in vivo [J]. *Sci. Total Environ.*, 1999, **225**: 59 ~ 68.
- [4] Schultz I P, Orner G, Merdink J L, *et al.* Dose-response relationships and pharmacokinetics of vitellogenin in rainbow trout after intravascular administration of 17- α -ethynylestradiol [J]. *Aquat. Toxicol.*, 2001, **51**(3): 305 ~ 318.
- [5] Lee C, Na J G, Lee K C. Choriogenin mRNA induction in male medaka, *Oryzias latipes* as a biomarker of endocrine disruption [J]. *Aquat. Toxicol.*, 2002, **61**(3-4): 233 ~ 241.
- [6] Masanori S, Hirofumi Y, Masanobu M, *et al.* Effects of 4-nonylphenol and 4-tert-octylphenol on sex differentiation and vitellogenin induction in medaka [J]. *Environ. Toxicol. Chem.*, 2002, **22**(7): 1507 ~ 1516.
- [7] 宋福永, 李杰. 应用卵黄蛋白原检测内分泌干扰物质的研究进展[J]. *环境与健康杂志*, 2004, **21**(4): 264 ~ 266.
- [8] Zhang Z B, Hu J Y, An W, *et al.* Induction of vitellogenin mRNA in juvenile Chinese sturgeon (*Acipenser sinensis Gray*) treated with 17 β -estradiol and 4-nonylphenol [J]. *Environ. Toxicol. Chem.*, 2005, **24**(8): 1944 ~ 1950.
- [9] Yin J L, Shackel N A, Zekry A, *et al.* Real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) for measurement of cytokine and growth factor mRNA expression with fluorogenic probes or SYBR Green I [J]. *Immunol. Cell Biol.*, 2001, **79**: 213 ~ 221.
- [10] Ward T J, Boeri R L. Early life stage toxicity of nonylphenol to the fathead minnow (*Pimephales promelas*) [A]. Report prepared for Chemical Manufactures Association by Resource Analysts [C]. Study No, 1991. 8979 ~ CMA.
- [11] Tsuda T, Takino A, Kojima M, *et al.* 4-Nonylphenol and 4-tert-octylphenol in water and fish from rivers flowing into Lake Biwa [J]. *Chemosphere*, 2000, **41**: 757 ~ 762.
- [12] Chen C W. Assessment of endocrine disruptors: Approaches, issues, and uncertainties [J]. *Folia Histochem. Cytol.*, 2001, **39**: 20 ~ 23.
- [13] Gaylor D W, Sheehan D M, Young J F, *et al.* The threshold dose questions in teratogenesis [J]. *Teratol.*, 1988, **38**: 389 ~ 391.
- [14] Sheehan D M, Willingham E, Gaylor D, *et al.* No threshold dose for estradiol induces sex reversal of turtles: how little is too much? [J] *Environ. Health Persp.*, 1999, **107**: 155 ~ 159.
- [15] Crews D, Willingham E, Skipper J K. Endocrine Disruptors: Present Issues, Future Directions [J]. *Q. Rev. Biol.*, 2000, **75**(3): 243 ~ 260.