

梭鱼和青鳉鱼 ER α 介导的雌激素活性比较研究

郝丽妮^{1,2}, 赵砚彬², 彭辉², 黄崇², 陈树林¹, 胡建英^{2*} (1.西北农林科技大学动物医学院, 陕西 杨凌 712100; 2.北京大学城市与环境学院, 北京 100871)

摘要: 为从物种雌激素受体(ER α)敏感性差异的角度探索辽东湾野生梭鱼雌雄同体高发生率的一个可能原因,从梭鱼肝脏 cDNA 中扩增出长 1113 bp 的梭鱼 ER α (sER α) DEF 区片段,并以此构建 pGBT9-sER α DEF 质粒,将其和 pGAD424-TIF2 质粒依次转入 Y190 酵母细胞中,建立了 sER α 物种特异性的酵母双杂交筛选系统.在此系统中测试了 4 种环境中主要的雌激素雌酮(E1)、17 β -雌二醇(E2)、雌三醇(E3)及 17 α -炔雌醇(EE2)对梭鱼 ER α 的诱导活性,半数雌激素活性浓度(EC₅₀)为 3.7、2.4、1698.7、1.2nmol/L,分别是青鳉鱼 ER α 活性的 4.6、2.3、3.4、3.3 倍,说明梭鱼 ER α 对 E1、E2、E3、EE2 具有较高的敏感性,这为解释辽东湾梭鱼雌雄同体的高发生现象提供了重要线索.

关键词: ER α ; 梭鱼; 酵母双杂交测试; 物种敏感性

中图分类号: R994.6 文献标识码: A 文章编号: 1000-6923(2010)11-1490-06

Comparison of ER α -mediated estrogenic binding activity between So-iuy mullet (*Mugil soiyu*) and medaka. HAO Li-ni^{1,2}, ZHAO Yan-Bin², PENG Hui², HUANG Chong², CHEN Shu-Lin¹, HU Jian-ying^{2*} (College of Animal Medicine, Northwest A&F University, Yangling 712100, China; 2.Department of Urban and Environmental Sciences, Peking University, Beijing 100871, China). *China Environmental Science*, 2010,30(11): 1490~1495

Abstract: To explore a possible reason why the wild So-iuy mullet of Liaodong Bay has high frequency of intersex from the point of view of specie-specific ER α binding sensitivity, a cDNA fragment of 1113 bp encoding So-iuy mullet (sER α) estrogen receptor DEF domain was amplified and used to construct plasmid pGBT9-sER α DEF. pGBT9-sER α DEF was transfected into Y190 yeast cells together with plasmid pGAD424-TIF2 for establishing the sER α -specific *in vitro* system in yeast. Then we tested the sER α agonistic affinity of four major environmental estrogenic chemicals including estrone (E1), 17 β -estrogen (E2), estrodial (E3) and ethylestrodial (EE2). Their half maximal concentrations (EC₅₀) were calculated to be 3.7, 2.4, 1698.7, 1.2 nmol/L, which are 4.6, 2.3, 3.4, 3.3 times lower than those of Medaka ER α -binding activity, respectively. These results indicate that So-iuy mullet was more sensitive to E1, E2, E3, EE2 than medaka based on their ER α agonistic activity, providing an important clue to elucidate its remarkable occurrence of intersex in Liaodong Bay.

Key words: So-iuy mullet; estrogen receptor alpha; yeast two-hybrid; species-specific sensitivity

环境雌激素类物质(EES)能够模拟鱼体内激素的作用模式,干扰鱼类内分泌系统的正常功能,从而影响鱼类的性腺分化,导致多种鱼雌雄同体现象发生^[1-3].EES的一种重要的作用模式是通过与雌激素受体(ER)结合,调控生长发育相关基因的表达^[4].其中雌激素受体(ER)介导的化学物质如 17 β -雌二醇(E2)、雌酮(E1)、雌三醇(E3)、17 α -炔雌醇(EE2)等天然和人工合成的 ER 均能在实验室暴露中诱导模式鱼类如青鳉鱼雌雄同体的发生^[5-6].然而在野外调查中发现,许多鱼类在低于实验室暴露浓度的条件下就发生雌雄同体现象,其中可能的原因有:(1)实际环境中的暴露

是多物质多途径的暴露过程;(2)实验动物和野生鱼类对污染物的敏感性不同^[7].

关于 ER 物种敏感性差异的问题,已有较多研究^[7-13].Matthews 等^[8]研究发现双酚 A、*t*-辛基酚(OP)及 o, p-DDT 与虹鳟 ER α 的结合能力约比人和老鼠 ER α 受体高 10 倍,Hiroshi 等^[9]发现壬基酚(NP)、OP 与鳉(*Mummichog*)的 ER α 结合活性是人的 50 倍.基于这些研究背景,最近 OECD

收稿日期: 2010-03-11

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(40632009);国家“973”项目(2007CB407304)

* 责任作者, 教授, hujy@urban.pku.edu.cn

正考虑将不同鱼类 ERs 的体外试验方法列入内分泌干扰物质的环境管理和风险评价中^[14]。梭鱼 (*So-iuy mullet, Mugil soiyu*) 是沿海地区一种重要的经济鱼类, 对我国辽东湾野生梭鱼的性腺切片观察统计发现其雌雄同体的发生率高达 54.5%, 远高于其他调查鱼种^[15]。因此有必要建立梭鱼 ER 物种特异性的体外测试方法, 从 ER 物种敏感性差异的角度对辽东湾梭鱼雌雄同体现象高发的成因进行解析。

酵母双杂交技术是一套采用报告基因来检测蛋白质间相互作用的技术^[16]。与哺乳动物细胞试验相比, 酵母细胞培养成本低, 稳定性好, 是 OECD 推荐使用的一种比较理想的高通量环境污染初筛工程菌^[14]。因此本研究通过克隆梭鱼 ER α (sER α), 建立了 sER α 活性物质物种特异性的酵母双杂交筛选方法。并在此酵母系统中比较了 4 种环境中普遍存在的典型雌激素活性物质 (E1, E2, E3 和 EE2) 对 sER α 和青鲮鱼 ER α (mER α) 诱导活性的差异, 以期从雌激素受体物种敏感性差异的角度探讨梭鱼雌雄同体发生率高的原因。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

实验用梭鱼为辽东湾野生梭鱼; Y190 酵母菌株、pGAD424-TIF2 质粒、改造多克隆位点的 pGBT9 质粒 (*EcoR* I, *Sac* I, *Bam* I, *Nde* I, *Hind* III, *Cla* I, *Not* I, *Pst* I)、青鲮鱼 ER α -TIF2 酵母由日本 Gifu Pharmaceutical 大学 Tsuyoshi Nakanishi 教授惠赠; 雌激素 E1、E2、E3、EE2 均购买于日本东京化成, 测试前用二甲基亚砷 (DMSO, ACS 级, AMRESCO) 配成 100mmol/L 储备液备用。

1.2 梭鱼 ER α DEF 片段的分子克隆

1.2.1 梭鱼 ER α 基因 cDNA 部分片段的克隆
快速分离梭鱼肝脏组织, 利用 Trizol 法提取梭鱼肝脏总 RNA。以所提总 RNA 为模板, oligo(dT)₁₅ 为逆转录引物, 使用 MMLV(INVOTROGEN) 反转录酶, 反转录得到梭鱼 cDNA。根据与梭鱼在形态学分类上相近的其他鱼种的已知 ER α 基因序列, 在 ER α 基因 DBD(DNA-binding domain) 区和

LBD(Ligand-binding domain) 区分别选择氨基酸保守区设计简并引物 sER1, sER1' 及 sER2, sER2' (引物序列见表 1)。以反转录的 cDNA 为模板, 使用 KOD PLUS 高保真 DNA 聚合酶 (TOYOBO), 用 sER1, sER1' 引物进行 PCR 扩增, 反应条件为: 94°C 2min, 然后 94°C 15s、53°C 30s, 68°C 1min 进行 35 个循环, 反应体积为 50 μ L。以上述 PCR 产物为模板, sER2, sER2' 为引物, 再次进行 PCR 扩增, 反应条件同上, 退火温度变为 58°C。用 1% 琼脂糖凝胶电泳鉴定扩增产物, 切胶回收、纯化约 820bp 的片段, 测序。

表 1 梭鱼 ER α 基因扩增及测序引物

Table 1 PCR and sequencing primers for cloning of So-iuy mullet sequences

| 引物名称 | 引物序列 |
|-------------------|--|
| sER1 ^a | 5'-GYTGCCAGGCWGTGYCGYCTYA-3' |
| sER1 ^b | 5'-GRIGYTCCATRCCTTTGTTGC-3' |
| sER2 | 5'-TGATGAARGGAGGTRTKCGHAARG-3' |
| sER2' | 5'-GRTGYTCCATRCCTTTGTTGC-3' |
| sER3-1 | 5'-GTGACTAACCTGCCTCCAGAC-3' |
| sER3-2 | 5'-CAACTCTGGTGCCTTTTCTTT-3' |
| sER4 | 5'-GACAGAGACGAGGTTGCCAAAGA-3' |
| sER4' | 5'-CAGAGTGCCACGGGTAATAAATGA-3' |
| sER5 | 5'-GAGCCGGAATTCGAGGTTGCCAAAGATCCAGAG A-3' (下划线为 EcoRI 酶切位点) |
| sER5' | 5'-TGTACCATCGATCCTCATAAGATGTGGGTGCAGT C-3' (下划线为 Cla I 酶切位点) |
| P1 | 5'-AGCATAGAATAAGTGCGACATCATC-3' |
| P1' | 5'-AGAGGTGTGGTCAATAAGAGCGA-3' |
| P2 ^a | 5'-GACAGCAAAGGGCAGACCAAAC-3' |
| P2 ^b | 5'-TCTCCTCCAGGCCATCAAAATTC-3' |
| P3 | 5'-CGTTTGAATCACTACAGGGA-3' |
| P3' | 5'-TGGCCAAGATTGAAACTTAGAG-3' |

注: a: 正向引物; b: 反向引物;

1.2.2 梭鱼 ER α 基因 3'端 cDNA 扩增 在已测序的梭鱼 ER α 基因序列中设计 2 个 3'-RACE 上游引物 sER3-1 和 sER3-2, 下游引物记为 SER3' 由试剂盒提供 (3'-Full RACE Core Set, Takara)。首先以加接头的 oligodT-3' 为引物反转录梭鱼总

RNA,并以转录出的 cDNA 为模板,sER3-1,sER3' 为引物进行第一轮 PCR,接着以第一轮 PCR 的产物为模板,sER3-2,sER3'为引物,进行第二轮扩增,两轮 PCR 反应的条件均为:94°C 2min,然后 94°C 15 s,55°C 30 s,68°C 2min 循环 35 次。1%琼脂糖凝胶电泳鉴定扩增产物,切胶回收约 840bp 的片段,测序。

1.2.3 梭鱼 ER α 基因 DEF 片段扩增 根据已测序的梭鱼 ER α 基因的序列,设计引物 sER4, sER4' 及加接头引物 sER5,sER5'。用两对引物依次进行 PCR 扩增,反应条件为:94°C 2min,然后 94°C 15 s,退火温度(第一轮 53°C,第二轮 62°C) 30 s,68°C 1.5 min 做 35 个循环,PCR 纯化试剂盒(碧云天生物试剂公司)纯化第二轮扩增出的片段,得到约 1100bp 的梭鱼 ER α 基因 DEF 片段。用 *EcoR* I 和 *Cla* I 内切酶(NEB)在 37°C 下双酶切 5h 后,纯化得到带黏性末端的梭鱼 ER α 基因 DEF 片段。

1.2.4 PCR 产物的鉴定及序列分析 需要测序的 PCR 产物经 1%琼脂糖凝胶电泳鉴定,纯化后,连接到平端载体上(pEASY-Blunt Cloning Vector,全式金生物技术公司)并转化 Trans1-T1 感受态细胞,用涂有 X-GAL、IPTG 的氨苄抗性平板筛选阳性克隆。选取 10 个菌落,扩增接入片段时所对应的引物,HSTM Taq DNA 聚合酶(东盛生物)进行菌落 PCR 扩增(反应条件为:首先预变性 94°C 10min,然后 94°C 30s, 55°C 30s, 72°C 1min(扩增时间按 900~1000bp/min 算)循环 45 次,最后 72°C 延伸 10min),进一步鉴定阳性克隆,并选 3 个克隆提取质粒测序。

1.3 pGBT9-sER α DEF 和 pGAD424-TIF2 双杂交酵母的构建

1.3.1 pGBT9-sER α DEF 诱饵质粒的构建 首先,用 *EcoR* I 和 *Cla* I 内切酶双酶切 pGBT9 载体(37°C,反应 5h),酶切产物经 1%琼脂糖凝胶电泳分离后,切胶回收(胶回收试剂盒, Promega 公司)约 5500bp 的片段,并连接(T4 DNA 连接酶,NEB)此回收产物与 sER α -DEF 片段,载体片段比例约为 0.03pmol:0.3pmol,25°C 反应 15min。最后用 10 μ L 连接产物转化感受态大肠杆菌 DH5 α ,测序鉴定。

1.3.2 pGAD424-TIF2 靶质粒的鉴定 用 1 μ L 靶质粒 pGAD424-TIF2 转化感受态大肠 DH5 α ,筛选阳性克隆,并用 P3、P3'引物测序鉴定。

1.3.3 双质粒依次转染酵母 Y190 细胞 Y190 酵母感受态细胞的制备及转染方法参考 Clontech PT3024-1 酵母操作手册。首先用 pGBT9-sER α 质粒转化 Y190 酵母感受态细胞,取 200 μ L 转化溶液涂布于色氨酸缺陷(*SD*/-Trp)选择平板上,于 30°C 培养 2~3 天待长出菌落后 PCR 鉴定转化菌株^[17]。从平板上挑取 1~8 号克隆至 *SD*/-Trp 液体培养基中,于 30°C,250r/min 培养 16~18h 后,取 1mL 菌液,以 12000r/min 离心 1min 弃上清,并在沉淀中加入 20 μ L 含 2.5mg/mL 溶菌酶的 Z buffer 溶液,震荡混匀,37°C 静置反应 5min;取其中 2 μ L 做模板,以 S5,S5'为引物,PCR 反应条件:预变性 94°C 10min;然后 94°C 30s,55°C 30 s,72°C 1.5min 做 50 个循环,最后 72°C 延伸 10min。扩增得到长约 1100bp 片段的克隆,记为 S1。

同上制备 S1 酵母感受态细胞,将 pGAD424-TIF2 质粒转入 S1 细胞中,转染液涂布于色氨酸、亮氨酸双陷平板(以下简称为 *SD*/-Trp-Leu)上,30°C 培养 2~3d 后,用 P2,P2'引物做 PCR 鉴定阳性克隆。

1.4 酵母双杂交测试方法

具体操作按照文献报道的方法进行^[18]。EC₅₀ 值用 Graphpad Prism 4.0 软件计算。

2 结果与讨论

2.1 梭鱼 ER α 的分子克隆及鉴定

利用 RT-PCR 和 RACE 技术,PCR 扩增得到 1113bp 的基因片段,测序结果在 NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)上比对,证明所扩片段是梭鱼的 ER α 基因片段(图 1)。采用 Krust 等^[19]的划分方法,所扩梭鱼 ER α 基因片段可划分为 DEF 区。氨基酸序列同源比对结果表明,梭鱼 ER α 的 DEF 区与鲮鱼,青鲮鱼,人的同源性分别为 92%, 79%,50%。其中 E/F 区与青鲮鱼的同源性为 82% (人为 56%),D 区与青鲮鱼的同源性仅为 72% (人为 36%)(图 2),说明序列上的差异可能导致梭鱼、青鲮鱼和人 ER α 功能的差异。

```

1  ATGAAAGGAGGTGTGCGCAAAGACCGGGGTCGCGTTTTGCGGCGCGACAAGCGACGGGCCGGCGACAGAGACGAGGTTGC 80
   M K G G V R K D R G R V L R R D K R R A G D R D E V A
81  CAAAGATCCAGAGAACAAGCTTCAGCGCCCTTCAGGACGGGAGGAAACGCAGCAGCAGCTGGAGCAGCACCGGAGGAG 160
   K D P E N K A S A P L Q D G R K R S S S W S S T G G
161 GAGGAGGAGGAGGAGGAGGATCTTCTGTGACTAACCTGCCTCCAGACCAGGTGCTCCTCCTGCTCCAGGGAGCTGAGCCT 240
   G G G G G G S S V T N L P P D Q V L L L L Q G A E P
241 CCGATGCTTTGCTCCCGGCAAAGCTGAGCCGACCCTACACGGAGGTCACCATGATGACCCTGCTCACCAGCATGGCCGA 320
   P M L C S R Q K L S R P Y T E V T M M T L L T S M A D
321 CAAGGAGCTGGTGACATGATCGCCTGGGCCAAGAAGCTTCCAGGTTTCTGTCAGCTCTCCCTCCACGATCAGGTGCGAGC 400
   K E L V H M I A W A K K L P G F L Q L S L H D Q V Q
401 TGCTGGAGAGCTCGTGGCTGGAGGTGCTGATGATCGGGCTCATATGGAGGTCCACCCACTGTCTGGAAAACTCATCTTC 480
   L L E S S W L E V L M I G L I W R S T H C P G K L I F
481 GCACAGGACCTCATACTGGACAGGAGTGAAGGCGACTGCGTTGAGGGCATGGCTGAGATCTTTGACATGCTCCTGGCCAC 560
   A Q D L I L D R S E G D C V E G M A E I F D M L L A T
561 CGCGTCCCGTTTCCGATGCTCAAGCTCAAACCCGAGGAGTTCGTGTGTCTCAAAGCCATCATCTGCTCAACTCTGGTG 640
   A S R F R M L K L K P E E F V C L K A I I L L N S G
641 CCTTTTCTTCTGACCCGGCAGATGGAGCCCTCCACGACAACGTGGCCGTGCAGAACATGCTGGACACCATCACCGAC 720
   A F S F C T G T M E P L H D N V A V Q N M L D T I T D
721 GCGCTCATAACATCACATCGGCCAATCAGGGTTCTCGGCTCAGCAGCAGTCCAGGCGGCAGGCCAGCTGCTCCTGCTGCT 800
   A L I H H I G Q S G F S A Q Q Q S R R Q A Q L L L L L
801 CTCCCACATCAGGCACATGAGCAACAAGGCATGGAGCACCTCTACAGCATGAAGTGCAAGAACAAGTGCCCTCTGTACG 880
   S H I R H M S N K G M E H L Y S M K C K N K V P L Y
881 ACCTGCTGCTGGAGATGCTGGACGCTCACCGCCTCCACCGCCAGACAACTGGGCCAGTTCGGGTTCCAGGTGCGACAAA 960
   D L L L E M L D A H R L H R P D K L G Q F G F Q V D K
961 GACCCTCCGGCCACCACCAACAGCGACGGCGGTGCGAGCCGGGGGAGGCGGTTCCGGGACCTCGAGGCAGCCACGAGAGCCC 1040
   D P P A T T N S D G G A A G G G G S G P R G S H E S P
1041 GAGCAGACCCCTCTGGTCCGGGCGTTCTGTCAGTACGGAGGCCCCAGATCTGACTGCACCCACATCTTATGA 1113
   S R P P S G P G V L Q Y G G P R S D C T H I L *

```

图1 梭鱼 ER α DEF 区 cDNA 序列与对应的氨基酸

Fig.1 Nucleotide sequence of So-iuy mullet estrogen receptor DEF fragments and the deduced amino acid sequence

2.2 sER α -TIF2 双杂交酵母的构建及诱导活性测试

酵母双杂交系统已广泛应用于内分泌干扰物质的受体结合活性测试^[14],目前在关于受体 LBD 区的划分上仍然存在分歧,如将 D 区、E 区和部分 F 区划入受体的 LBD 区^[8],或者只将 E 区划入 LBD 区^[19].本研究中,首先仅将 E/F 区片段接入 sER α -TIF2 酵母系统,测试发现阳性对照物 E2 对此酵母并没有诱导活性,而改将 DEF 区接入酵母后,用 E2 测试具有良好的剂量-效应关系.所以本实验中所构建的 sER α -TIF2 酵母插入的是梭鱼 ER 的 DEF 区,并且通过测试所购建的酵母可以用于环境样品的筛选.

2.3 梭鱼和青鲮鱼 ER α 介导的雌激素活性比较研究

用 E1、E2、E3、EE2 分别暴露 sER α -TIF2 和青鲮鱼-TIF2(mER α -TIF2)双杂交酵母,测试 4 种雌激素活性物质对两种酵母 β -半乳糖苷酶的诱导活性,剂量-效应关系如图 3 所示.

sER α 与 4 种物质结合的 EC₅₀ 分别为 3.7,2.4, 1.2,1699nmol/L(表 2).其中 EE2 的相对雌激素活性(RBA)最高,为 E2 的 2 倍,E1 和 E3 分别为 E2 的 0.66,0.0014 倍. mER α 与 4 种物质结合的 EC₅₀ 分别为 17,5.7,5858,4.0nmol/L(表 2),与 sER α 相比这 4 种目标物质同 mER α 的结合活性相对较低,分别是梭鱼 EC₅₀ 的 4.6,2.3,3.4,3.3 倍.这表明与青

鲮鱼相比,梭鱼 ER α 与某些雌激素活性物质可能具有更高的结合活性,所以 sER α 敏感性是使梭鱼在青鲮鱼不能发生雌雄同体的野外暴露浓度下,雌雄同体高发生的可能原因之一.

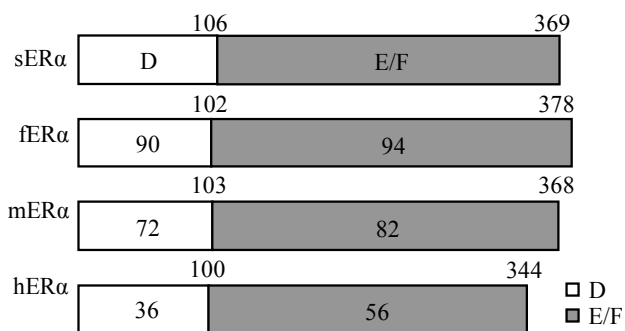


图2 梭鱼、鲮鱼、青鲮鱼、人 ER α 基因 DEF 区氨基酸序列同源比对分析

Fig.2 Comparison of So-iuy mullet ER α DEF amino acid sequence with flathead mullet, medaka and human “sER α ”代表梭鱼的 ER α ;“fER α ”代表鲮鱼的 ER α ;“mER α ”代表青鲮鱼的 ER α ;“hER α ”代表人的 ER α ;“106”表示梭鱼 D 区的氨基酸残基数目;“369”表示梭鱼 DEF 区的氨基酸残基数,其它鱼类依此类推;框中的数表示此片段与 sER α 对应片段的同源百分比

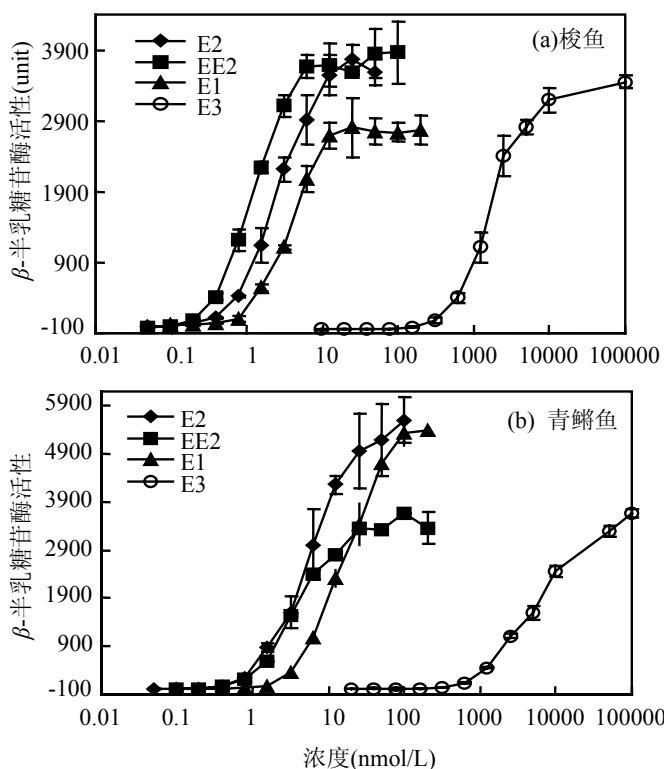


图3 酵母系统中梭鱼和青鲮鱼 ER α 介导的雌激素活性比较(n=3)

Fig.3 Comparison of ER α -mediated estrogenic binding activity between So-iuy mullet and medaka in yeast(n=3)

表2 4种雌激素的梭鱼、青鲮鱼 ER α 诱导活性的比较
Table 2 Comparison of estrogenic activities of four estrogens mediated by sER α and mER α in yeast two-hybrid system

| 雌激素 | sER α | | mER α | |
|-----|---------------------------|------|---------------------------|--------|
| | EC ₅₀ (nmol/L) | RBA | EC ₅₀ (nmol/L) | RBA(%) |
| E2 | 2.4 ± 0.095 | 100 | 5.7 ± 0.6 | 100 |
| EE2 | 1.2 ± 0.044 | 200 | 4.0 ± 0.3 | 142 |
| E1 | 3.7 ± 0.185 | 66 | 17.0 ± 2.2 | 33 |
| E3 | 1698.7 ± 305.9 | 0.14 | 5858.3 ± 768.5 | 0.097 |

注:EC₅₀:half maximal concentration,结果用3次重复的平均值±标准偏差表示;RBA(相对雌激素活性)=(化学物质的EC₅₀/E2的EC₅₀)

为研究 mER α 与 sER α 结合活性的差异,本文在构建双杂交酵母时使用的是人的 TIF2 共激活因子^[18,20],此系统可以在一定程度上反映不同雌激素活性物质与 mER α 和 sER α 结合活性的差异.但生物体本身是一个复杂的系统,体内 ER 的转录激活功能需要多种共激活因子的参与^[18],所以为模拟鱼类体内的真实环境,需要进一步采用鱼类细胞报告基因测试方法、原代细胞培养甚至活体暴露等方法,最终证明 ER 物种敏感性与梭鱼雌雄同体高发率的关系.本酵母双杂交体系中几种典型雌激素物质与 sER α 和 mER α 结合活性差异性结果为深化该研究提供了基础数据.

3 结语

通过构建梭鱼 ER α 酵母双杂交筛选系统,证明了 E1、E2、E3、EE2 和梭鱼 ER α 的结合活性均高于青鲮鱼 ER α ,这一结果为探索辽东湾野生梭鱼雌雄同体高发生率的原因提供了重要的信息.

参考文献:

- [1] Orn S, Holbech H, Madsen T H, et al. Gonad development and vitellogenin production in zebrafish (*Danio rerio*) exposed to ethinylestradiol and methyltestosterone [J]. Aquatic Toxicology, 2003,65(4):397-411.
- [2] Sumpter J P. Endocrine disrupters in the aquatic environment: An overview [J]. Acta Hydrochimica Et Hydrobiologica, 2005,33(1): 9-16.
- [3] Rempel M A, Schlenk D. Effects of environmental estrogens and antiandrogens on endocrine function, gene regulation, and health

- in fish [J]. International Review of Cell and Molecular Biology, 2008, 267:207-252.
- [4] 伍吉云, 万祎, 胡建英. 环境中内分泌干扰物的作用机制 [J]. 环境与健康杂志, 2005, 22(6):494-496.
- [5] Kishi K, Kitagawa E, Iwahashi H, et al. Advanced Environmental Monitoring [M]. Springer Netherlands, 2008:363-375.
- [6] Metcalfe C D, Metcalfe T L, Kiparissis Y, et al. 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, 2001, 20(2):297-308.
- [7] Scholz S, Kluver N. Effects of Endocrine Disruptors on Sexual, Gonadal Development in Fish [J]. Sexual Development, 2009, 3(2/3): 136-151.
- [8] Matthews J, Celius T, Halgren R, et al. Differential estrogen receptor binding of estrogenic substances: a species comparison [J]. Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology, 2000, 74(4):223-234.
- [9] Urushitani H, Nakai M, Inanaga H, et al. Cloning and characterization of estrogen receptor alpha in mummichog, *Fundulus heteroclitus* [J]. Molecular and Cellular Endocrinology, 2003, 203(1/2): 41-50.
- [10] Tollefsen K E, Mathisen R, Stenersen J. Estrogen mimics bind with similar affinity and specificity to the hepatic estrogen receptor in Atlantic salmon (*Salmo salar*) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) [J]. Gen. Comp. Endocrinol., 2002, 126: 14-22.
- [11] Sumida K, Ooe N, Saito K, et al. Limited species differences in estrogen receptor alpha-mediated reporter gene transactivation by xenoestrogens [J]. Steroid Biochem. Mol. Biol., 2003, 84:33-40.
- [12] Nishizuka M, Heitaku S, Maekawa S, et al. Development of standardized in vitro assay system to estrogen receptors and species specificity of binding ability of 4-nonylphenol and p-octylphenol [J]. Health Sci., 2004, 50:511-517.
- [13] Denny J S, Tapper M A, Schmieder P K, et al. Comparison of relative binding affinities of endocrine active compounds to fathead minnow and rainbow trout estrogen receptors [J]. Environ. Toxicol. Chem., 2005, 24:2948-2953.
- [14] Draft detailed review paper on environmental endocrine disruptor screening: the use of receptor binding and transactive assays in fish [R]. OECD Environment, Health and Safety Publications, 2010.
- [15] 安立会. 鲫鱼和梭鱼卵黄蛋白原(Vitellogenin, Vtg)生物检测方法建立与应用 [D]. 北京:中国科学院生态环境研究中心, 2006.
- [16] Brückner A, Polge C, Lentze N, et al. Yeast two-hybrid, a powerful tool for systems biology [J]. International Journal of Molecular Sciences, 2010, 10(6):2763-2788.
- [17] Ling M F, Merante F, Robinson B H. A rapid and reliable DNA preparation method for screening a large number of yeast clones by polymerase chain reaction [J]. Nucleic Acids Research, 1995, 23(23):4924-4925.
- [18] 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]. Toxicology and Applied Pharmacology, 1999, 154:76-83.
- [19] Krust A, Green S, Argos P, et al. The chicken oestrogen receptor sequence: homology with v-erbA and the human oestrogen and glucocorticoid receptors [J]. EMBO J, 1986, 5(5):891-897.
- [20] Voegel J J, Heine M J, Zechel C et al. TIF2, a 160 kDa transcriptional mediator for the ligand-dependent activation function AF-2 of nuclear receptors [J]. EMBO J, 1996, 15(14):3667-3675.

致谢: 感谢 Tsuyoshi Nakanishi 教授惠赠 Y190 酵母菌株, pGAD424-TIF2 质粒和 pGBT9 质粒。

作者简介: 郝丽妮(1986-), 女, 山西吕梁人, 西北农林科技大学动物医学院硕士研究生, 主要从事神经内分泌物质研究。发表论文 1 篇。

关于《中国环境科学》网上投稿的通知

《中国环境科学》编辑部为提高稿件处理的网络化水平和采编工作的效率, 及时让作者了解稿件的处理情况, 自 2008 年 3 月 1 日起已开通网上投稿查稿系统, 请登陆网址: <http://www.zghjcx.com.cn> 点击“作者在线投稿”进行注册后再按要求投稿, 点击“作者在线查稿”进行查询。本刊不再接受纸件投稿和电子版稿件的 E-mail 投稿。特此通知。