

# 环境科学

(HUANJING KEXUE)

ENVIRONMENTAL SCIENCE

第33卷 第6期

Vol.33 No.6

**2012**

中国科学院生态环境研究中心 主办  
科学出版社 出版



目次

我国湖泊富营养化效应区域差异性分析 ..... 曹金玲,许其功,席北斗,李小平,杨柳燕,江立文,魏自民,吴献花(1777)

基于“源”“汇”景观格局指数的海河流域总氮流失评价 ..... 孙然好,陈利顶,王伟,王赵明(1784)

云蒙湖流域土地利用变化对非点源氮污染负荷的影响 ..... 孟晓云,于兴修,泮雪芹(1789)

深圳市沿岸表层海水中全氟化合物的残留特征及其分布规律 ..... 陈清武,张鸿,柴之芳,沈金灿,杨波(1795)

典型电器工业区河涌沉积物中多环芳烃的分布、来源和潜在生态风险 ..... 邓代永,邱孟德,孙国萍,郭俊,张宏涛,张琴,许玫英(1801)

珠江下游河段沉积物中重金属含量及污染评价 ..... 谢文平,王少冰,朱新平,陈昆慈,潘德博,洪孝友,尹怡(1808)

扎龙湿地南山湖沉积岩芯重金属污染特征及来源判别 ..... 苏丹,臧淑英,叶华香,孙丽,贾晓丹,李苗(1816)

汕头湾沉积物磷的形态分布与季节变化特征研究 ..... 赵建刚,乔永民(1823)

氮磷比对东海浮游植物群落生长影响的微宇宙实验 ..... 黄伟,朱旭宇,曾江宁,寿鹿,陈全震,江志兵(1832)

春季福建北部海域浙闽沿岸流消亡期浮游桡足类种类组成及其分布 ..... 王彦国,林景宏,王春光,林茂(1839)

滩涂红树林种植-养殖耦合系统中多环芳烃含量水平分析 ..... 陈冠秋,李耀初,黄晋沐,南燕,林茂宏(1846)

四溴双酚 A 在 5 种巢湖鱼类体内的组织分布与生物浓缩因子研究 ..... 杨苏文,王圣瑞,闫振广,张普青(1852)

五氯酚对稀有鮑姆卵黄蛋白原及 p53 的诱导效应 ..... 熊力,马永鹏,张晓峥,金帮明,李伟,苏永良,毛思予,刘堰(1858)

全氟辛烷磺酸 (PFOS) 对斑马鱼卵黄蛋白原 mRNA 水平的影响 ..... 程艳,崔媛,党志超,谢文平,李海山,殷缓缓,陈会明(1865)

水溶性有机物电子转移能力与荧光峰强度的关系研究 ..... 陶亚,袁田,周顺桂,袁勇,庄莉,王辉亮(1871)

MIEX 中试实验对二级出水中有机物去除的 3DEEM 解析 ..... 杨建,高金华,常江(1878)

XDLVO 理论解析钙离子对腐殖酸反渗透膜污染的影响机制 ..... 姚淑娣,高欣玉,郭本华,包南,谢慧君,梁爽(1884)

栅藻 LX1 在水产养殖废水中的生长、脱氮除磷和油脂积累特性 ..... 马红芳,李鑫,胡洪管,于茵,巫寅虎(1891)

氯化铁用于反硝化同步化学生物絮凝工艺研究 ..... 王宏杰,董文艺,刘莉莎,韩贵超(1897)

合成氨废水短程反硝化特性研究 ..... 李妍,李泽兵,马家轩,王晓毅,赵白航,李军(1902)

基于新型反应器的好氧颗粒污泥的稳定性控制 ..... 李志华,杨帆,李胜,谢磊,王晓昌(1907)

采用非生长能量代谢参数表征颗粒污泥稳定性 ..... 李志华,吴军,李胜,谢磊,王晓昌(1913)

酸-碱预处理促进剩余污泥厌氧消化的研究 ..... 袁光环,周兴求,伍健东(1918)

小回流比条件下污泥浓度分区试验研究 ..... 史思,王素兰,李瑞,邢传宏(1923)

非离子表面活性剂对污泥调理脱水效果的影响 ..... 侯海攀,濮文虹,时亚飞,于文华,樊明明,刘欢,杨昌柱,李野,杨家宽(1930)

中国空气污染指数变化特征及影响因素分析 ..... 李小飞,张明军,王圣杰,赵爱芳,马潜(1936)

南京 3 类不同大气污染过程下气溶胶水溶性无机离子的特征研究 ..... 张秋晨,朱彬,苏继峰,王红磊(1944)

深圳市郊区大气中 PM<sub>2.5</sub> 的特征分析 ..... 戴伟,高佳琪,曹罡,欧阳峰(1952)

餐饮业油烟的颗粒物分析 ..... 谭德生,邝元成,刘欣,戴飞鸿(1958)

Fe-MnO<sub>x</sub>-CeO<sub>2</sub>/ZrO<sub>2</sub> 低温催化还原 NO 性能研究 ..... 刘荣,杨志琴(1964)

自然型氨基酸及其钾盐的 CO<sub>2</sub> 吸收和再生特性 ..... 晏水平,陈竞翔,徐明亮,艾平,张衍林(1971)

耕作方式对紫色水稻土农田生态系统 CH<sub>4</sub> 和 N<sub>2</sub>O 排放的影响 ..... 张军科,江长胜,郝庆菊,唐其文,程炳红,李辉,陈璐豪(1979)

垄作覆膜条件下田间氨挥发及影响因素 ..... 上官宇先,师日鹏,李娜,韩坤,李会科,王林权(1987)

添加不同 N 源条件下典型除草剂对土壤呼吸和 N<sub>2</sub>O 排放的影响 ..... 孙青,史淳星,石坤,言儒斌,蒋静艳,吴以中(1994)

某石墨阳极法氯碱生产场地二噁英污染特征分析 ..... 余立凤,魏文侠,田亚静,吴广龙,李培中,赵丹(2000)

脱硫石膏对酸化森林土壤短期修复效果的研究 ..... 罗遥,康荣华,余德祥,谭炳全,段雷(2006)

岩溶山地土壤氧化铁形态及其与成土环境的关系 ..... 张治伟,朱章雄,傅瓦利,文志林(2013)

废弃尾矿库 15 种植物对重金属 Pb、Zn 的积累和养分吸收 ..... 施翔,陈益泰,王树凤,李江川(2021)

铬胁迫对 3 种草本植物生长及铬积累的影响 ..... 王爱云,黄姗姗,钟国锋,徐刚标,刘志祥,申响保(2028)

湘西花垣矿区主要植物种类及优势植物重金属蓄积特征 ..... 杨胜香,田启建,梁士楚,周耀渝,邹慧成(2038)

增施 CO<sub>2</sub> 对 C3 和 C4 植物根际氯氰菊酯残留浓度的影响 ..... 慕楠,刁晓君,王曙光,王鹏腾,李攀峰(2046)

生物强化去除吡啶的特性及微生物种群动态变化分析 ..... 乔琳,赵宏,王建龙(2052)

A/O MBR 处理生活污水效率与菌群多样性的关系 ..... 邝斌宇,史青, Montcho Leon Monthero,丁嫄,温东辉(2061)

石油污染土壤生物修复过程中氮循环功能基因的动态检测 ..... 吴彬彬,卢滇楠,刘铮(2068)

武汉市儿童多途径铅暴露风险评估 ..... 郝汉舟,陈同斌,吴基良,雷梅,田辉,祖文普,钟学斌(2075)

电子鼻预处理装置的开发及适用性研究 ..... 卜凡阳,文晓刚,万梅,刘锐,陈吕军,张永明(2083)

ToxTell 生物传感器在 Cu<sup>2+</sup>、Cd<sup>2+</sup> 冲击活性污泥系统分析中的应用 ..... 王学江,王鑫,刘免,吴真,杨连珍,夏四清(2090)

环境样品免疫检测基质效应分析与控制 ..... 盛建武,何苗,施汉昌(2095)

热等离子体熔融固化模拟医疗废物的研究 ..... 张璐,严建华,杜长明,陆胜勇,李晓东(2104)

城市生活垃圾组分低温干燥特性及模型研究 ..... 吴亚娟,刘红梅,陆胜勇,严建华,李晓东(2110)

厌氧-准好氧联合型生物反应器填埋场产气规律的研究 ..... 韩智勇,刘丹,李启彬(2118)

处理垃圾渗滤液的 Fe/C 空气阴极 MFC 性能研究 ..... 唐玉兰,彭漫,于燕,何亚婷,傅金祥,赵玉华(2125)

基于冗余分析的典型喀斯特山区土壤-石漠化关系研究 ..... 龙健,廖洪凯,李娟,陈彩云(2131)

北京市能源消费与经济增长关系的协整检验分析 ..... 陈操操,张妍,刘春兰,王海华,李铮(2139)

《环境科学》征稿简则(1877) 《环境科学》征订启事(1890) 信息(1822,1857,1896,2138)

## 五氯酚对稀有鮡鲫卵黄蛋白原及 p53 的诱导效应

熊力<sup>1</sup>, 马永鹏<sup>2</sup>, 张晓峥<sup>1</sup>, 金帮明<sup>1</sup>, 李伟<sup>1</sup>, 苏永良<sup>1</sup>, 毛思予<sup>1</sup>, 刘堰<sup>1\*</sup>

(1. 西南大学生命科学学院, 淡水鱼类资源与生殖发育教育部重点实验室, 三峡库区生态环境教育部重点实验室, 水产科学重庆市市级重点实验室, 重庆 400715; 2. 重庆市第三人民医院检验科, 重庆市临床检验中心, 重庆 400016)

**摘要:** 采用中国特有鱼种稀有鮡鲫为实验动物, 研究五氯酚(PCP)对其肝脏卵黄蛋白原(VTG)、VTG 基因及抑癌基因 p53 的诱导效应, 评价 PCP 的内分泌干扰作用, 并从蛋白和基因表达水平上筛选 PCP 检测的敏感生物标志物. 1.5、15、40、80、120、150、160  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  PCP 暴露稀有鮡鲫, 同时设置空白、溶剂对照和 17 $\alpha$ -雌二醇(EE2)阳性对照, 运用 SDS-PAGE, ELISA 法检测经 PCP 暴露后稀有鮡鲫肝脏 VTG 蛋白的表达差异; 克隆稀有鮡鲫新的 VTG 和 p53 基因序列片段, 运用实时荧光定量 PCR 方法检测 PCP 暴露对基因表达的影响. 结果表明, 40、80、120、160  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  PCP 均能诱导雌雄稀有鮡鲫肝脏 VTG 蛋白的表达, 具有显著的浓度-效应关系; 1.5、15、150  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  PCP 暴露后, 雄性稀有鮡鲫肝脏 VTG 和 p53 基因表达均明显升高, 具有显著的浓度-效应和时间-效应关系. 证明 PCP 具有雌激素效应, 稀有鮡鲫肝脏的 VTG 蛋白、VTG 及 p53 基因可作为 PCP 检测的敏感分子生物标志物.

**关键词:** 五氯酚; 稀有鮡鲫; VTG; p53; 分子生物标志物

中图分类号: X171.5 文献标识码: A 文章编号: 0250-3301(2012)06-1858-07

### Induction Effects of Pentachlorophenol on Vitellogenin and p53 in Chinese Rare Minnow (*Gobiocypris rarus*)

XIONG Li<sup>1</sup>, MA Yong-peng<sup>2</sup>, ZHANG Xiao-zheng<sup>1</sup>, JIN Bang-ming<sup>1</sup>, LI Wei<sup>1</sup>, SU Yong-liang<sup>1</sup>, MAO Si-yu<sup>1</sup>, LIU Yan<sup>1</sup>

(1. Key Laboratory of Freshwater Fish Reproduction and Development (Ministry of Education), Key Laboratory of Eco-environments in Three Gorges Reservoir Region (Ministry of Education), Key Laboratory of Aquatic Science of Chongqing, School of Life Science, Southwest University, Chongqing 400715, China; 2. Clinical Laboratory Center of Chongqing, Laboratory of The Third People's Hospital of Chongqing, Chongqing 400016, China)

**Abstract:** Taking the Chinese rare minnow (*Gobiocypris rarus*) as the test animal, the studies were designed to investigate induction effects of pentachlorophenol (PCP) on vitellogenin (VTG) protein, VTG gene and tumor suppressor p53 gene in the liver of *Gobiocypris rarus*. The endocrine disrupting of PCP was evaluated by detecting VTG, and sensitive biomarkers of PCP were screened at both protein and mRNA levels. *Gobiocypris rarus* were exposed to PCP at 1.5, 15, 40, 80, 120, 150, 160  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  respectively, while setting blank, solvent control and 17 $\alpha$ -ethynylestradiol (EE2) as positive control. Using sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE), enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), VTG protein expression differences were detected in the liver of *Gobiocypris rarus* after exposure to PCP. Cloning the VTG and p53 gene new fragments of *Gobiocypris rarus* based on conserved regions, mRNA expression levels of VTG and p53 gene in the liver of *Gobiocypris rarus* were determined by quantitative real-time PCR assay after PCP treatment. The results showed that 40, 80, 120, 160  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  PCP induced the liver of male and female *Gobiocypris rarus* to produce VTG protein, and had a significant concentration effect. VTG and p53 mRNA levels significantly increased in the liver of *Gobiocypris rarus* after exposure to 1.5, 15, 150  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  PCP, and had remarkable concentration and time effects. The studies suggested that PCP had estrogenic effects, and VTG protein, VTG and p53 gene in the liver of *Gobiocypris rarus* could be used as candidate sensitive biomarkers for detecting PCP.

**Key words:** pentachlorophenol; *Gobiocypris rarus*; vitellogenin; p53; molecular biomarker

五氯酚(pentachlorophenol, PCP)是一种典型的持久性有机污染物(POPs), 属于环境优先检测的内分泌干扰物之一, 并被列为可能的人类致癌物<sup>[1]</sup>. 由于 PCP 曾在中国乃至世界范围内长期使用<sup>[2,3]</sup>, 并具有强环境持久性和难降解性, 水环境中大量的 PCP 残留, 对鱼类 96 h LC<sub>50</sub> 值在 32 ~ 205  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ <sup>[4]</sup>. 目前, 采用化学分析法能对水中的 PCP 定量<sup>[5]</sup>, 然而通过合适的生物标志物反映水环

境污染则更有意义<sup>[6]</sup>. 本研究选用中国特有鱼种, 一种新兴的水生模式生物稀有鮡鲫为实验对象, 首次通过肝脏组织匀浆, SDS-PAGE 联合 ELISA 以及

收稿日期: 2011-03-30; 修订日期: 2011-12-27

基金项目: 国家自然科学基金项目(21147002); 国家重点基础研究发展规划(973)项目(2012CB723205, 2010CB134405); 重庆市自然科学基金项目(CSTC.2009BB1131)

作者简介: 熊力(1985~), 男, 硕士研究生, 主要研究方向为生物化学与分子生物学, E-mail: xionglivip@163.com

\* 通讯联系人, E-mail: liuyan@swu.edu.cn

实时荧光定量 PCR 法研究不同浓度 PCP 暴露对其肝脏 VTG 蛋白和 VTG、p53 基因的诱导,进一步证明 PCP 具有雌激素效应,并率先确定稀有鮡鲫肝脏 VTG 蛋白、VTG、p53 基因可作为敏感的分子生物标志物,对环境 PCP 污染进行有效的生物监测。

VTG 蛋白在雄鱼和幼鱼体内的异常生成,可作为一种灵敏的生物标志物应用于环境内分泌干扰物的筛选鉴定、毒理学及污染监测的研究<sup>[7]</sup>,并以此研究了多氯联苯对古氏鲮鱼,17 $\alpha$ -雌二醇(E<sub>2</sub>)对斑马鱼和稀有鮡鲫幼鱼的影响<sup>[8,9]</sup>;Luo 等<sup>[10]</sup>以稀有鮡鲫血浆 VTG 蛋白为生物标志物,用 ELISA 法定量环境中微量的 17 $\beta$ -雌二醇(E<sub>2</sub>);Wang 等<sup>[11]</sup>发现暴露于乙烯雌酚(DES)、双酚 A(BPA)等环境雌激素中的斑马鱼幼鱼在孵出 7 d 就能检测到 VTG 基因的表达;Jung 等<sup>[12]</sup>将石斑鱼暴露于 4-壬基酚(4-NP)也可检测到 VTG 基因表达明显升高;Zhang 等<sup>[13]</sup>克隆稀有鮡鲫 VTG2 (GenBank 登录号:EF095728)基因序列,以 VTG2 基因为敏感标志物利用实时荧光定量 PCR 检测环境中的 NP、E<sub>2</sub>;赵立群<sup>[14]</sup>利用重组基因酵母技术证明 PCP 具有雌激素效应;Zhao 等<sup>[15,16]</sup>以 VTG 蛋白为雌激素污染的生物标志物,对金鱼幼鱼的研究得出 PCP 具有弱雌激素效应,然而以金鱼幼鱼原代培养细胞的 VTG 蛋白为生物标志物,发现 PCP 具有抗雌激素效应。目前,以稀有鮡鲫 VTG 蛋白及基因的诱导检测 PCP 的雌激素效应及其分子生物标志物的研究尚未见。抑癌基因 p53 与肿瘤的产生有关,但研究大多限于哺乳动物。Zhao 等<sup>[17]</sup>研究发现斑马鱼的 p53 信号通路与人类调控机制极其一致;Shi 等<sup>[18]</sup>研究发现斑马鱼胚胎暴露于致癌物全氟辛烷磺酸可引起 p53 基因表达明显增加;Cooper 等<sup>[19]</sup>研究发现 PCP 具有潜在的致癌性,同时 Yin 等<sup>[20]</sup>发现 PCP 暴露可引起斑马鱼 p53 基因点突变。本文首次研究稀有鮡鲫 p53 基因的表达上升能否作为 PCP 检测的新分子标志物。关于 PCP 的致癌性与鱼类 p53 基因表达的关系尚需进一步研究。

稀有鮡鲫是中国西南地区特有的一种小型鲤科鱼类,与国际上常用的实验动物斑马鱼相比,它同样具有性成熟快、繁殖力强、产卵频次高、饲养方便等特点<sup>[21]</sup>。同时稀有鮡鲫是我国特有物种,个体较斑马鱼稍大,实验操作容易,对化学品敏感且实验重复性更好<sup>[22]</sup>。马永鹏等<sup>[23]</sup>研究发现 PCP 可引起稀有鮡鲫血细胞和肝脏细胞的 DNA 损伤,具有遗传毒性;王辅明等<sup>[24]</sup>以稀有鮡鲫 SOD、GSH、HSP70

为生化指标,对 PCP 毒性作用进行了生物检测;房彦军<sup>[25]</sup>利用双向电泳技术检测稀有鮡鲫经 PCP 暴露后,肝脏出现 29 个差异蛋白点,但就稀有鮡鲫经 PCP 暴露的敏感分子生物标志物问题尚未涉及。因此本研究以稀有鮡鲫为实验对象,采用不同浓度的 PCP 暴露模拟水生环境中的污染状况,分别分析了 PCP 暴露对稀有鮡鲫 VTG 蛋白和 VTG、p53 基因的诱导效应,对于评价 PCP 的雌激素效应,并以筛选敏感分子生物标志物为目的,对 PCP 污染进行有效的监控具有重要的意义。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验仪器

微量高速冷冻离心机(德国 Hettich ZENTRIFUGEN 公司);紫外分光光度计(日本 SHIMADZU 公司);Mini-PROTEAN III 型电泳系统(美国 BIO-RAD 公司);Chromo 4™ Multicolor Real-Time PCR Detection System;PRO200 微量电动匀浆器(美国 PRO);酶标仪(美国 BIO-RAD 公司)

### 1.2 实验试剂

PCP(纯度 99%,购于 Chem. Service);雌二醇(17 $\alpha$ -Ethinylestradiol, EE<sub>2</sub>, 纯度 98%, 购于 Sigma);二甲基亚砜(DMSO)购于 Sanland-Chem;稀有鮡鲫卵黄蛋白原(VTG)酶联免疫试剂盒购于 Rapidbio(RB)公司;Total RNA 提取试剂(RNAiso Plus)、反转录试剂盒(Prime Script™ RT reagent kit)及实时定量 PCR 试剂盒(SYBR® Premix ExTaq™)购于 Takara 公司;Low Tube Strip WHT 及 Flat Cap Strips 购于美国 Bio-Rad;其它试剂均为国产分析纯。

### 1.3 实验动物

稀有鮡鲫种鱼购于中国科学院武汉水生生物研究所,在本实验室饲养繁殖,水温控制在 23 ~ 25℃,光照周期为白昼/黑夜 = 12/12 h。全部喂养盐水孵化的丰年虫。实验用鱼为 7 个月龄的健康成年鱼(体重 0.53 g  $\pm$  0.15 g, 体长 36.6 mm  $\pm$  3.7 mm)。实验前以连续曝气 24 h 的自来水[pH 7.6  $\pm$  1.5, DO > 5 mg·L<sup>-1</sup>, 总硬度为(7.8  $\pm$  0.7)德国度,水温(25  $\pm$  2)℃]驯化喂养 2 周。

### 1.4 PCP 暴露处理

PCP 设置不同的浓度组,分别为 1.5、15、40、80、120、150、160  $\mu$ g·L<sup>-1</sup>;同时设置空白对照组(曝气 24 h 的自来水);溶剂对照组(DMSO, 终浓度低于 0.01%);阳性对照组(EE<sub>2</sub>, 50 ng·L<sup>-1</sup>)。

暴露体系在 10 L 玻璃缸中进行, 每个暴露组随机放入 20 条健康的成鱼 (雌雄各半). 采用半静态水体暴露方法. 每天喂食孵化的丰年虫一次, 观察并记录.

### 1.5 SDS-PAGE 和 ELISA 法测定卵黄蛋白原

暴露 21 d 时, 分别取空白、溶剂、40、80、120、160  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  PCP、EE2 各组雌雄稀有鮡鱼, 冰浴麻醉, 解剖取肝脏组织, 称重. 按照肝重(g): 蛋白裂解液(mL)为 1:10 的比例与蛋白裂解液在冰浴条件下用玻璃匀浆器研磨匀浆. 匀浆液在 4℃ 下 13 000  $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$  离心 15 min. 离心后收集上清样品, 分装标记后 -20℃ 保存备用. 肝脏蛋白样品进行 SDS-PAGE 检测. 同时用 ELISA 方法测定肝脏样品中 VTG 浓度.

### 1.6 稀有鮡鱼 VTG 和 p53 基因片段的克隆及分析

取稀有鮡鱼肝脏组织约 50~100 mg, 加入适量 RNAiso Plus 匀浆提取总 RNA. 反转合成 cDNA 第一链. 查找 GenBank 上与稀有鮡鱼相近物种的 VTG 和 p53 基因序列进行比对, 根据保守序列利用 Primer Premier 5.0 设计兼并引物 (表 1), RT-PCR

反应扩增目的基因. 纯化 PCR 产物并连接到 pMD19-T 载体上, 转入感受态大肠杆菌 DH<sub>5</sub> $\alpha$  中, 培养并筛选出阳性克隆, 测序. 采用 ClustalX 软件将测序结果的氨基酸序列与 GenBank 公布的斑马鱼等 VTG 和 p53 的已知序列进行比对分析查找保守序列.

### 1.7 实时荧光定量 RT-PCR 方法

根据新克隆的 VTG 和 p53 基因 cDNA 序列中保守片段设计实时荧光定量 PCR 的特异性引物, 同时参照 GenBank 中公布的稀有鮡鱼  $\beta$ -actin 基因设计内参引物 (表 1). 分别于 7、14、21 d 取空白、溶剂、1.5、15、150  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  PCP、EE2 各组稀有鮡鱼雄鱼肝脏. 提取总 RNA 后反转得到 cDNA 第一链作为实时荧光定量 PCR 的模板. 为保证实时荧光定量 PCR 结果的准确性, 每个样品设置 3 个重复, 并进行 3 次重复实验. 采用双标准曲线法处理实时荧光定量 PCR 数据, 即对每一对引物分别作标准曲线, 求出标准曲线方程. 然后根据检测结果 (CT 值) 和标准曲线方程, 求出各基因的相对表达量.

表 1 PCR 引物序列

Table 1 PCR primers sequence

项目	基因	PCR 引物序列	产物/bp
兼并引物	VTG F	5'-TTGAGTA(C/T)GC(A/G/C/T)AA(C/T)GGTGT-3'	546
	R	5'-AGT(A/G/C/T)GC(A/G)AA(C/T)TC(A/G)TA(C/T)TG-3'	
	P53 F	5'-AAG(C/T)T(C/G)TTCTGCCAGTTGG-3'	380
	R	5'-CAG(A/G)GTGA(G/T)GATGTTGAGGAT-3'	
实时荧光定量 PCR 特异引物	VTG F	5'-AACTGCAAGAGGCTGGAGTTCA-3'	190
	R	5'-ATCAGACTCTTGACCCTCTCTGTGC-3'	144
	P53 F	5'-CCACCATGAGAGAACACCTGAT-3'	
	R	5'-GCTGAGGAGCTTCATAGAGAACC-3'	226
	$\beta$ -actin F	5'-CAGGGCGTGATGGTGGGAT-3'	
	R	5'-GGTTGCCTTGGGGTTGA-3'	

### 1.8 统计分析

运用 Origin 7.5 软件绘图, 用 SPSS 13.0 软件分析所得数据, 在方差齐性的情况下用 one-way ANOVA 和 Tukey 多重比较来检验相关数据的差异. 当  $P < 0.05$  认为差异显著,  $P < 0.01$  表示差异极显著. 所有数据均以平均值  $\pm$  标准偏差表示.

## 2 结果与分析

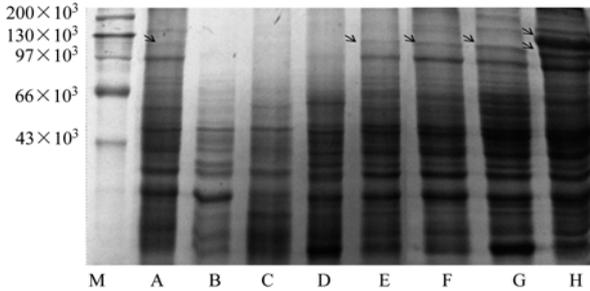
### 2.1 PCP 对稀有鮡鱼 VTG 蛋白的诱导

SDS-PAGE 结果显示如图 1, PCP 处理稀有鮡鱼雄鱼组有特异性条带生成, 与空白雌鱼和 EE2 诱导雄鱼产生的 VTG 条带在同一位置 (图 1 中红色箭头所示), 说明 PCP 可以诱导雄性稀有鮡鱼生成

VTG 蛋白. 随着 PCP 浓度增加, VTG 蛋白条带越明显说明其对 VTG 蛋白的诱导具有浓度效应. 因此, PCP 具有雌激素效应.

ELISA 法测定不同浓度的 PCP 暴露对稀有鮡鱼 VTG 蛋白的影响如图 2. 从图 2(a) 中可以看出, PCP 和 EE2 暴露组都能显著诱导稀有鮡鱼雄鱼肝脏中 VTG 蛋白的产生 ( $P < 0.01$ ). 随着 PCP 浓度的增加, VTG 蛋白的诱导效应也越明显. 40、80、120、160  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  的 PCP 暴露组中检测 VTG 平均含量分别为 84、140、186、277  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ , EE2 暴露组雄鱼中检测出 VTG 含量最高, 平均值达到 4 357  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ . 图 2(b) 中, PCP 和 EE2 暴露对稀有鮡鱼雌鱼肝脏中 VTG 蛋白的产生也有诱导效应, 并具

有浓度效应. 40、80  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  的 PCP 暴露组中检测出雌鱼肝脏中 VTG 平均含量为 384、401  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ , 诱导效应显著 ( $P < 0.05$ ). 120、160  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  的 PCP 和 EE2 暴露组中检测出雌鱼肝脏中 VTG 平均含量为 452、627、7 701  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ , 诱导效应极显著 ( $P < 0.01$ ).

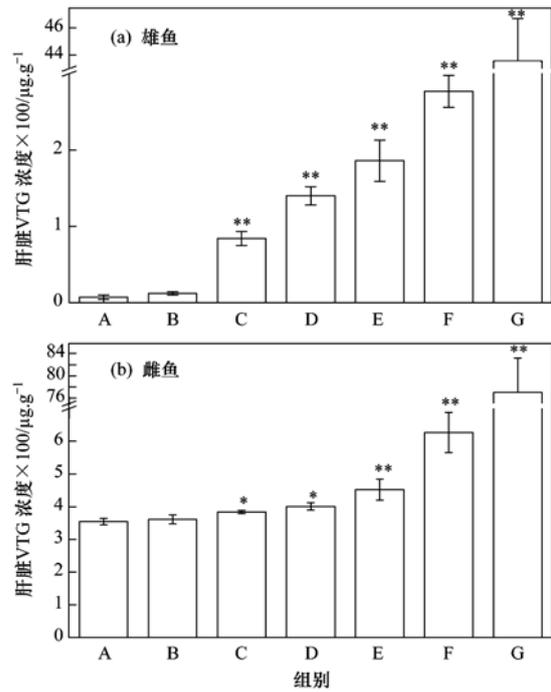
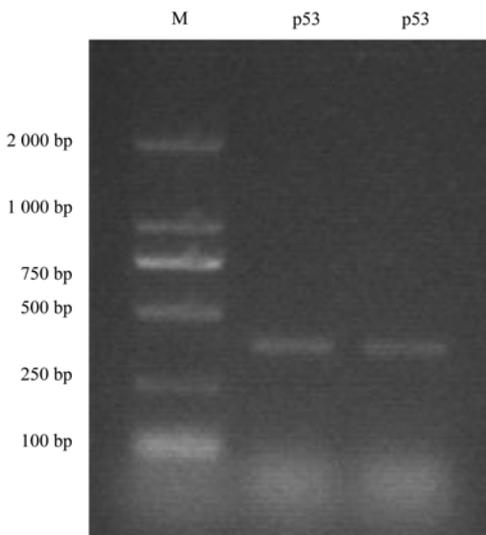


M: 次高分子量标准蛋白质; A: 空白组雌鱼; B: 空白组雄鱼; C: DMSO 组雄鱼; D: 40  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  PCP 组雄鱼; E: 80  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  PCP 组雄鱼; F: 120  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  PCP 组雄鱼; G: 160  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  PCP 组雄鱼; H: 50  $\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$  EE2 组雄鱼;  $\rightarrow$ :VTG 蛋白带

图 1 SDS-PAGE 检测 PCP 暴露对稀有鮕鲫肝脏蛋白的影响

Fig. 1 SDS-PAGE analysis of liver protein of *Gobiocypris rarus* exposure to PCP

2.2 稀有鮕鲫 VTG 和 p53 基因序列的克隆与分析  
利用兼并引物和 RT-PCR 技术克隆稀有鮕鲫 VTG 基因序列为 546 个碱基(图 3), 编码 182 个氨基酸, 在 GenBank 公布的序列号为 JN004056. 新克



A: 空白对照组; B: DMSO 溶剂组; C: 40  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  PCP;

D: 80  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  PCP; E: 120  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  PCP;

F: 160  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  PCP; G: 50  $\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$  EE2;

\* 表示与空白对照组相比,  $P < 0.05$ ;

\*\* 表示与空白对照组相比,  $P < 0.01$ , 下同

图 2 ELISA 检测不同处理组雄性和雌性稀有鮕鲫的 VTG 蛋白浓度

Fig. 2 VTG concentrations in liver samples of male and female *Gobiocypris rarus* in each treated group by ELISA

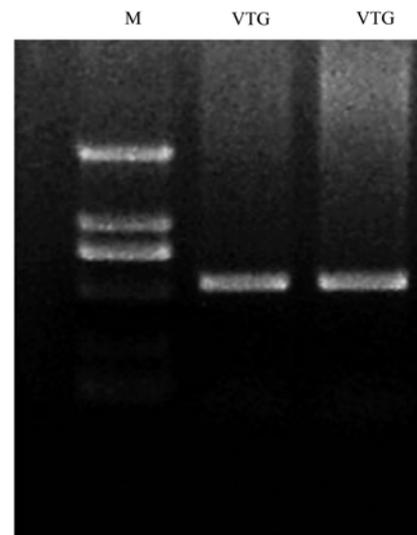


图 3 稀有鮕鲫 VTG 和 p53 基因电泳图

Fig. 3 Electrophoresis of VTG and p53 gene of *Gobiocypris rarus* by RT-PCR

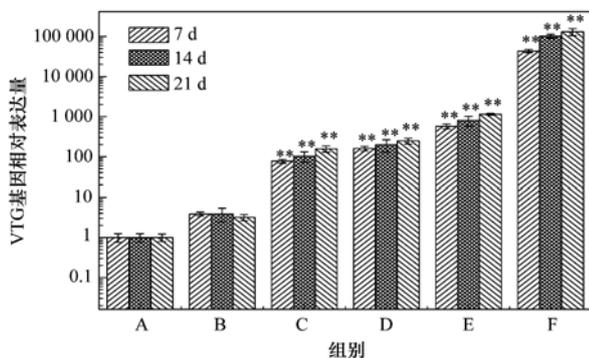
隆的稀有鮕鲫 VTG 基因氨基酸序列分别与鲤鱼 (*Cyprinus carpio*, BAF73406)、斑马鱼 (*Danio rerio*, CAK03614)、唐鱼 (*Tanichthys albonubes*,

ABN13867)、鲫鱼 (*Carassius auratus*, ABG22139) 相似性较近, 为 94%、92%、88%、88%。克隆稀有鮕鲫抑癌基因 p53 的基因序列为 380 个碱基(图

3), 编码 126 个氨基酸, 在 GenBank 公布的序列号为 JN004057. 新克隆的稀有鮕鲫 p53 基因氨基酸序列分别与斑马鱼 (*Danio rerio*, AA085406)、黄颡鱼 (*Pelteobagrus fulvidraco*, AEB72290)、河鲀鱼 (*Ictalurus punctatus*, AAC26824) 的相似性较近, 为 86%、76%、76%. 通过比对显示, 克隆的稀有鮕鲫新 VTG 和 p53 基因片段正确, 保守性较高适合设计实时荧光定量 PCR 引物. 基于这些基因片段, 本研究建立了其 VTG 和 p53 基因表达的实时荧光定量 PCR 方法. VTG 基因标准曲线方程为:  $y = -3.263x + 33.23$ , 扩增效率为 1.025, 相关系数 1.0; p53 基因标准曲线方程为:  $y = -3.456x + 37.00$ , 扩增效率为 0.947, 相关系数 0.997; 内参  $\beta$ -actin 标准曲线方程为:  $y = -3.377x + 36.38$ , 扩增效率为 0.977, 相关系数 0.999.

### 2.3 PCP 对稀有鮕鲫 VTG 和 p53 基因表达的影响

实时荧光定量 PCR 方法检测 PCP 诱导稀有鮕鲫雄鱼肝脏中 VTG 基因表达效应如图 4. 与空白对照组相比, DMSO 溶剂对照组中 VTG 基因相对表达不明显, PCP 和 EE2 各组中诱导表达水平均显著升高 ( $P < 0.01$ ). 1.5、15、150  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  PCP 暴露 7 d 时, VTG 基因的相对表达量平均值分别为: 76.69、159.6、571.38; 暴露 14 d 时, 上升为: 102.25、197.81、799.04; 暴露 21 d 时, 上升为: 157.07、246.18、1 137.77. 随着 PCP 暴露浓度的增加和暴露时间的延长, VTG 基因的诱导效应越明显, 呈显著的浓度和时间效应. 50  $\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$  EE2 暴露 7、14、21 d, VTG 基因诱导效应更为显著, 分别为: 43 356.24、101 964.56、130 497.96, 也呈现明显时



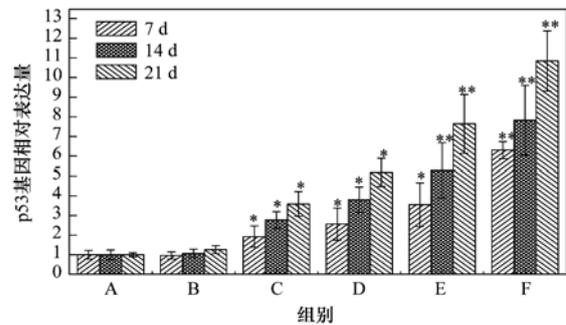
A: 空白对照组; B: DMSO 溶剂组; C: 1.5  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  PCP; D: 15  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  PCP; E: 150  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  PCP; F: 50  $\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$  EE2

图 4 不同浓度 PCP 暴露稀有鮕鲫肝脏 VTG 基因表达定量结果 ( $n=6$ )

Fig. 4 Expression of VTG gene in liver of *Gobiocypris rarus* exposed to different concentrations of PCP

间效应关系.

经 1.5、15、150  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  PCP 暴露 7、14、21 d 诱导稀有鮕鲫雄鱼肝脏中 p53 基因表达效应如图 5. 与空白对照组相比, DMSO 溶剂对照组 p53 基因无诱导表达, 但 PCP 和 EE2 暴露组 p53 基因的表达水平均显著升高 ( $P < 0.05$ ). 1.5、15、150  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  PCP 暴露 7 d 时, p53 基因的表达量分别为: 1.92、2.57、3.55; 暴露 14 d 时, 上升为: 2.77、3.8、5.29; 暴露 21 d 时, 上升为: 3.58、5.18、7.64. 同样随着 PCP 暴露浓度的增加和暴露时间的延长, p53 基因的诱导表达效应也越明显, 呈显著时间和浓度效应. 50  $\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$  EE2 处理 7、14、21 d 后, p53 基因的表达量分别为: 6.3、7.83 和 10.84, 诱导效应极显著 ( $P < 0.01$ ), 呈现时间效应关系.



A: 空白对照组; B: DMSO 溶剂组; C: 1.5  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  PCP; D: 15  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  PCP; E: 150  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  PCP; F: 50  $\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$  EE2

图 5 不同浓度 PCP 暴露稀有鮕鲫肝脏 p53 基因表达定量结果 ( $n=6$ )

Fig. 5 Expression of p53 gene in liver of *Gobiocypris rarus* exposed to different concentrations of PCP

## 3 讨论

### 3.1 PCP 对稀有鮕鲫 VTG 蛋白的诱导效应分析

有关 PCP 的内分泌干扰作用及其分子机制问题说法不一, 尤其是 PCP 具有雌激素活性还是抗雌激素活性以及 PCP 是通过受体还是非受体途径行使内分泌干扰作用还没有一致的定论. Flouriot 等<sup>[26]</sup>研究认为 PCP 能够抑制雌激素与雌激素受体的结合, 认为 PCP 具有抗雌激素效应; Danzo 等<sup>[27]</sup>在对豚鼠的体内实验中发现 PCP 具有一定的雌激素效应; Suzuki 等<sup>[28]</sup>通过 MCF-7 细胞增殖实验显示 PCP 具有弱雌激素活性; 赵兵等<sup>[15]</sup>在 PCP (100  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) 暴露金鱼的实验中发现 PCP 可以诱导金鱼体内 VTG 蛋白的产生, 但效应极弱. Luo 等<sup>[10]</sup>研究出 ELISA 法可以准确测定稀有鮕鲫血浆中 VTG

蛋白含量,并发现与其它水生模式生物斑马鱼、日本青鳉等相比,稀有鮡鲫对环境雌激素的暴露效应具有更高的敏感性<sup>[9]</sup>。但对于小型的实验用鱼如稀有鮡鲫,从鱼体内采血显得较为困难,Nishi<sup>[29]</sup>和 Zhong<sup>[30]</sup>等取鱼类肝脏或整体匀浆的方法检测鱼体内 VTG 蛋白的诱导效应获得良好的实验结果。VTG 蛋白的诱导生成作为检测环境中雌激素类外源化合物污染的生物标志物,已经在许多鱼类中有广泛的应用,但通过 SDS-PAGE 加 ELISA 法在稀有鮡鲫肝脏匀浆液中检测还未见报道<sup>[11,12]</sup>。本实验结果表明,PCP 可以同时诱导雌雄稀有鮡鲫肝脏中 VTG 蛋白的产生,并具有显著浓度效应。SDS-PAGE 可检测出雄鱼清晰的 VTG 蛋白条带。ELISA 法测得空白对照雄鱼肝脏 VTG 蛋白检测量仅为  $7 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ,雌鱼检测量为  $354 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ;然而  $160 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  PCP 暴露后雄鱼肝脏 VTG 蛋白高达  $277 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ,雌鱼高到  $627 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ 。 $50 \text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$  的阳性对照 EE2 暴露后,诱导雄鱼肝脏 VTG 蛋白达  $4357 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ,说明 PCP 对稀有鮡鲫肝脏 VTG 蛋白的诱导与 EE2 相比效应较弱,但它仍具有一定的雌激素效应。本实验中 PCP 对稀有鮡鲫肝脏中 VTG 蛋白的诱导效应比文献<sup>[15,16]</sup>的更为明显,再次说明稀有鮡鲫具有更高的敏感性,并且 PCP 对 VTG 诱导具有浓度效应,因此稀有鮡鲫肝脏匀浆液 VTG 蛋白可作为 PCP 检测的分子生物标志物。

### 3.2 PCP 对稀有鮡鲫 VTG 和 p53 基因表达的诱导效应分析

以筛选 PCP 污染的敏感生物标志物为目的,对稀有鮡鲫 VTG 和 p53 基因诱导表达进行检测。Zhang 等<sup>[13]</sup>利用兼并引物克隆了稀有鮡鲫 VTG2 基因片段,并建立实时荧光定量 PCR 方法检测 NP、E2 暴露对稀有鮡鲫的影响,研究发现  $1250 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  NP 暴露雄性稀有鮡鲫,肝脏中 VTG 相对  $\beta$ -actin 基因表达率上升达 90 倍,而  $100 \text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$  E2 诱导表达率上升接近 20 倍。本实验克隆的稀有鮡鲫 VTG 片段与上述 VTG2 片段比对有较大差异,可能为稀有鮡鲫多种 VTG 基因中的一个新基因。利用该 VTG 基因建立的实时荧光定量方法具有更高的敏感性,用双标准曲线统计法,设定空白组稀有鮡鲫雄鱼表达量为 1 时,  $150 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  PCP 诱导 VTG 相对表达平均量达 1 137.77,而  $50 \text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$  EE2 暴露 7 d 即可诱导 VTG 相对表达量为 43 356.24。Zhao 等<sup>[17]</sup>研究水生模式生物斑马鱼的 p53 信号通路,在喜树碱、UV 等应激条件下,斑马鱼 p53 基因表达

会增强,可以作为一种应激反应的分子生物标志物。本实验空白和溶剂对照组稀有鮡鲫肝脏 p53 基因的表达水平较低,PCP 暴露可以显著诱导 p53 基因的表达,并随 PCP 暴露浓度增加和各暴露时间的延长表达水平随之上升,说明 PCP 暴露与稀有鮡鲫肝脏 p53 基因的表达具有浓度和时间效应,稀有鮡鲫肝脏 p53 基因可以作为 PCP 暴露的分子生物标志物。目前,已利用稀有鮡鲫相关基因的实时荧光定量 PCR 方法检测了氨基三唑、杀草胺、阿特拉津等内分泌干扰物的暴露效应<sup>[31,32]</sup>,但实时荧光定量 PCR 筛选 PCP 暴露的敏感分子生物标志物研究尚未涉及。本研究首次克隆稀有鮡鲫一个新的 VTG 基因和 p53 基因,建立了关于 PCP 的实时荧光定量 PCR 检测方法,证实它们可作为 PCP 的敏感分子生物标志物,对于 PCP 污染的评价检测和环境监控具有重要意义。

## 4 结论

(1) PCP 具有雌激素效应。经 SDS-PAGE 检测,PCP 能诱导雄性稀有鮡鲫产生 VTG 特异性条带,并且有浓度效应。

(2) 利用 ELISA 方法准确检测出,当 PCP 浓度为  $40$ 、 $80$ 、 $120$ 、 $160 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  时能够显著诱导雌雄稀有鮡鲫肝脏中 VTG 蛋白。PCP 暴露与稀有鮡鲫 VTG 蛋白诱导有明显浓度效应关系,稀有鮡鲫 VTG 蛋白可以作为 PCP 检测的分子生物标志物。

(3) 建立的稀有鮡鲫 VTG 和 p53 基因实时荧光定量 PCR 方法具有高的灵敏性,可以准确检测 PCP 对其表达的诱导效应。当 PCP 浓度为  $1.5$ 、 $15$ 、 $150 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  时,能显著诱导雄性稀有鮡鲫肝脏中 VTG 和 p53 基因的表达,并具有一定的时间和浓度效应。稀有鮡鲫 VTG 和 p53 基因同样可以作为 PCP 检测的敏感分子生物标志物。

### 参考文献:

- [1] Prevedouros K, Macleod M, Jones K C, *et al.* Modelling the fate of persistent organic pollutants in Europe: parameterisation of a gridded distribution model [J]. *Environmental Pollution*, 2004, **128**(1-2): 251-261.
- [2] Zimbron J A, Reardon K F. Continuous combined Fenton's oxidation and biodegradation for the treatment of pentachlorophenol-contaminated water [J]. *Water Research*, 2011, **45**(17): 5705-5714.
- [3] Wang X L, Li Y, Dong D M. Sorption of pentachlorophenol on surficial sediments; the roles of metal oxides and organic materials with co-existed copper present [J]. *Chemosphere*, 2008, **73**(1): 1-6.
- [4] Gao J J, Liu L H, Liu X R, *et al.* Levels and spatial distribution

- of chlorophenols-2,4-dichlorophenol, 2,4,6-trichlorophenol, and pentachlorophenol in surface water of China [J]. *Chemosphere*, 2008, **71**(6): 1181-1187.
- [ 5 ] 周颖, 吴显芳, 屈卫东, 等. 水中五氯酚测定方法的研究 [J]. *卫生研究*, 2007, **36**(3): 287-288.
- [ 6 ] López-Barea J, Pueyo C. Mutagen content and metabolic activation of promutagens by molluscs as biomarkers of marine pollution [J]. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 1998, **399**(1): 3-15.
- [ 7 ] Denslow N D, Chow M C, Kron K J, *et al.* Vitellogenin as a biomarker of exposure for estrogen or estrogen mimics [J]. *Ecotoxicology*, 1999, **8**(5): 385-398.
- [ 8 ] Vega-López A, Martínez-Tabche L, Domínguez-López M L, *et al.* Vitellogenin induction in the endangered goodeid fish *Girardinichthys viviparus*: vitellogenin characterization and estrogenic effects of polychlorinated biphenyls [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 2006, **142**(3-4): 356-364.
- [ 9 ] Liao T, Jin S W, Yang F X, *et al.* An enzyme-linked immunosorbent assay for rare minnow (*Gobiocypris rarus*) vitellogenin and comparison of vitellogenin responses in rare minnow and zebrafish (*Danio rerio*) [J]. *Science of the Total Environment*, 2006, **364**(1-3): 284-294.
- [ 10 ] Luo W R, Zhou Q F, Jiang G B. Development of enzyme-linked immunosorbent assays for plasma vitellogenin in Chinese rare minnow (*Gobiocypris rarus*) [J]. *Chemosphere*, 2011, **84**(5): 681-688.
- [ 11 ] Wang J X, Shi X J, Du Y B, *et al.* Effects of xenoestrogens on the expression of vitellogenin (*vtg*) and cytochrome P450 aromatase (*cyp19a* and *b*) genes in zebrafish (*Danio rerio*) larvae [J]. *Journal of Environmental Science and Health, Part A*, 2011, **46**(9): 960-967.
- [ 12 ] Jung J H, Shim W J, Addison R F, *et al.* Protein and gene expression of VTG in response to 4-nonylphenol in rockfish (*Sebastes schlegeli*) [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 2006, **143**(2): 162-170.
- [ 13 ] Zhang X Y, Zha J M, Wang Z J. Influences of 4-nonylphenol on doublesex-and *mab-3*-related transcription factor 1 gene expression and vitellogenin mRNA induction of adult rare minnow (*Gobiocypris rarus*) [J]. *Environment Toxicology and Chemistry*, 2008, **27**(1): 196-205.
- [ 14 ] 赵立群. 利用重组基因酵母技术研究七种环境雌激素的内分泌干扰效应 [D]. 长春: 东北师范大学, 2005. 18-25.
- [ 15 ] 赵兵, 刘征涛, 徐章法, 等. 酚类化合物对金鱼幼鱼的雌激素效应研究 [J]. *环境科学学报*, 2005, **25**(9): 1259-1264.
- [ 16 ] Zhao B, Yang J, Liu Z T, *et al.* Joint anti-estrogenic effects of PCP and TCDD in primary cultures of juvenile goldfish hepatocytes using vitellogenin as a biomarker [J]. *Chemosphere*, 2006, **65**(3): 359-364.
- [ 17 ] Zhao X Z, Liu M, Wu N, *et al.* Recovery of recombinant zebrafish p53 protein from inclusion bodies and its binding activity to p53 mRNA in vitro [J]. *Protein Expression and Purification*, 2010, **72**(2): 262-266.
- [ 18 ] Shi X J, Du Y B, Lam P K S, *et al.* Developmental toxicity and alteration of gene expression in zebrafish embryos exposed to PFOS [J]. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 2008, **230**(1): 23-32.
- [ 19 ] Cooper G S, Jones S. Pentachlorophenol and cancer risk: focusing the lens on specific chlorophenols and contaminants [J]. *Environmental Health Perspectives*, 2008, **116**(8): 1001-1008.
- [ 20 ] Yin D Q, Gu Y, Li Y, *et al.* Pentachlorophenol treatment *in vivo* elevates point mutation rate in zebrafish *p53* gene [J]. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 2006, **609**(1): 92-101.
- [ 21 ] 曹文宣, 王剑伟. 稀有鮡鲫——一种新的鱼类实验动物 [J]. *实验动物科学与管理*, 2003, **20**(z1): 96-99.
- [ 22 ] 廖涛, 徐盈, 钟雪萍, 等. EE2 对稀有鮡鲫和斑马鱼幼体内卵黄蛋白原诱导的比较 [J]. *水生生物学报*, 2005, **12**(5): 513-517.
- [ 23 ] 马永鹏, 王燕, 朱祥伟, 等. 基于 SCGE 的五氯酚对稀有鮡鲫 DNA 损伤的研究 [J]. *中国环境科学*, 2010, **30**(2): 269-274.
- [ 24 ] 王辅明, 朱祥伟, 马永鹏, 等. 低浓度五氯酚暴露对稀有鮡鲫体内 SOD 活性、GSH 和 HSP70 含量的影响 [J]. *生态毒理学学报*, 2009, **4**(3): 415-421.
- [ 25 ] 房彦军. 典型氯酚类化合物对稀有鮡鲫肝脏的毒性效应和机理研究 [D]. 北京: 中国人民解放军军事医学科学院, 2010. 41-58.
- [ 26 ] Flouriot G, Pakdel F, Ducouret B, *et al.* Influence of xenobiotics on rainbow trout liver estrogen receptor and vitellogenin gene expression [J]. *Journal of Molecular Endocrinology*, 1995, **15**(2): 143-151.
- [ 27 ] Danzo B J, Shappell H W, Banerjee A, *et al.* Effects of nonylphenol, 1, 1-dichloro- 2, 2-bis (*p*-chlorophenyl) ethylene (*p, p'*-DDE), and pentachlorophenol on the adult female guinea pig reproductive tract [J]. *Reproductive Toxicology*, 2002, **16**(1): 29-43.
- [ 28 ] Suzuki T, Ide K, Ishida M. Response of MCF-7 human breast cancer cells to some binary mixtures of oestrogenic compounds *in vitro* [J]. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 2001, **53**(11): 1549-1554.
- [ 29 ] Nishi K, Chikae M, Hatano Y, *et al.* Development and application of a monoclonal antibody-based sandwich ELISA for quantification of Japanese medaka (*Oryzias latipes*) vitellogenin [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 2002, **132**(2): 161-169.
- [ 30 ] Zhong X P, Xu Y, Liang Y, *et al.* Vitellogenin in rare minnow (*Gobiocypris rarus*): identification and induction by waterborne diethylstilbestrol [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 2004, **137**(3): 291-298.
- [ 31 ] Li W, Zha J M, Spear P A, *et al.* Changes of thyroid hormone levels and related gene expression in Chinese rare minnow (*Gobiocypris rarus*) during 3-amino-1,2,4-triazole exposure and recovery [J]. *Aquatic Toxicology*, 2009, **92**(1): 50-57.
- [ 32 ] Yang L H, Zha J M, Zhang X Y, *et al.* Alterations in mRNA expression of steroid receptors and heat shock proteins in the liver of rare minnow (*Gobiocypris rarus*) exposed to atrazine and *p, p'*-DDE [J]. *Aquatic Toxicology*, 2010, **98**(4): 381-387.

## CONTENTS

Regional Heterogeneity of Lake Eutrophication Effects in China .....	CAO Jin-ling, XU Qi-gong, XI Bei-dou, <i>et al.</i> (1777)
Correlating Landscape Pattern with Total Nitrogen Concentration Using a Location-weighted Sink-source Landscape Index in the Haihe River Basin, China .....	SUN Ran-hao, CHEN Li-ding, WANG Wei, <i>et al.</i> (1784)
Impact of the Land-use Change on the Non-point Source Nitrogen Load in Yunneng Lake Watershed .....	MENG Xiao-yun, YU Xing-xiu, PAN Xue-qin (1789)
Residue Characteristics and Distributions of Perfluorinated Compounds in Surface Seawater Along Shenzhen Coastline .....	CHEN Qing-wu, ZHANG Hong, CHAI Zhi-fang, <i>et al.</i> (1795)
Distribution and Potential Ecological Risk of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in the Sediments from Typical Electronics Industrial Zone .....	DENG Dai-yong, QIU Meng-de, SUN Guo-ping, <i>et al.</i> (1801)
Residues and Potential Ecological Risk Assessment of Metal in Sediments from Lower Reaches and Estuary of Pearl River .....	XIE Wen-ping, WANG Shao-bing, ZHU Xin-ping, <i>et al.</i> (1808)
Character and Sources Identification of Heavy Metals Contamination in Sediment from the Core Sediment in Nanshan Lake, the Zhalong Wetland .....	SU Dan, ZANG Shu-ying, YE Hua-xiang, <i>et al.</i> (1816)
Distribution Characteristics of Phosphorus Forms in Surface Sediments of the Shantou Bay in China .....	ZHAO Jian-gang, QIAO Yong-min (1823)
Microcosm Experiments on the Influence of Different N/P Ratios on Phytoplankton Community Growth in the East China Sea .....	HUANG Wei, ZHU Xu-yu, ZENG Jiang-ning, <i>et al.</i> (1832)
Species Composition and Distribution Characteristics of Pelagic Copepods in the Northern Sea of Fujian During Withdraw of Zhe-Min Coastal Current .....	WANG Yan-guo, LIN Jing-hong, WANG Chun-guang, <i>et al.</i> (1839)
PAHs Concentrations in Aquatic Products and Food Safety Evaluation in the Coupled Mangrove Planting-Aquaculture Ecological System .....	CHEN Guan-qiu, LI Yao-chu, HUANG Jin-mu, <i>et al.</i> (1846)
Tissue Distribution and Bioconcentration Factors of Tetrabromobisphenol A in Five Fishes in Lake Chaohu .....	YANG Su-wen, WANG Sheng-rui, YAN Zhen-guang, <i>et al.</i> (1852)
Induction Effects of Pentachlorophenol on Vitellogenin and p53 in Chinese Rare Minnow ( <i>Gobiocypris rarus</i> ) .....	XIONG Li, MA Yong-peng, ZHANG Xiao-zheng, <i>et al.</i> (1858)
Effects of Perfluorooctane Sulfonate (PFOS) Exposure on Vitellogenin mRNA Level in Zebrafish ( <i>Brachydanio rerio</i> ) .....	CHENG Yan, CUI Yuan, DANG Zhi-chao, <i>et al.</i> (1865)
Relationship Between Electron Transfer Capacity and Fluorescence Characteristics of Dissolved Organic Matter .....	TAO Ya, YUAN Tian, ZHOU Shun-gui, <i>et al.</i> (1871)
Characterization of the Change in DOM During Municipal Secondary Effluent Treatment with Magnetic Ion Exchange Resin by 3DEEM .....	YANG Jian, GAO Jin-hua, CHANG Jiang (1878)
Reverse Osmosis Membrane Fouling by Humic Acid Using XDLVO Approach; Effect of Calcium Ions .....	YAO Shu-di, GAO Xin-yu, GUO Ben-hua, <i>et al.</i> (1884)
Growth, Removal of Nitrogen and Phosphorus, and Lipid Accumulation Property of <i>Scenedesmus</i> sp. LX1 in Aquaculture Wastewater .....	MA Hong-fang, LI Xin, HU Hong-ying, <i>et al.</i> (1891)
Iron Chloride for Simultaneous Denitrification and Chemical-Biological Flocculation Process .....	WANG Hong-jie, DONG Wen-yi, LIU Li-sha, <i>et al.</i> (1897)
Characteristic Research of Shortcut Denitrification in Synthetic Ammonia Industrial Wastewater Treatment Process .....	LI Yan, LI Ze-bing, MA Jia-xuan, <i>et al.</i> (1902)
Stability Control of Aerobic Granules Using an Innovative Reactor .....	LI Zhi-hua, YANG Fan, LI Sheng, <i>et al.</i> (1907)
Description of the Stability of Granules Using Nongrowth-related Parameters .....	LI Zhi-hua, WU Jun, LI Sheng, <i>et al.</i> (1913)
Enhancement of Anaerobic Digestion of Excess Sludge by Acid-Alkali Pretreatment .....	YUAN Guang-huan, ZHOU Xing-qiu, WU Jian-dong (1918)
Pilot Validation of Sludge Concentration Partition at Small Reflux Ratio Condition .....	SHI Si, WANG Su-lan, LI Rui, <i>et al.</i> (1923)
Influence of Non-ionic Surfactants on Sludge Dewaterability .....	HOU Hai-pan, PU Wen-hong, SHI Ya-fei, <i>et al.</i> (1930)
Variation Characteristics and Influencing Factors of Air Pollution Index in China .....	LI Xiao-fei, ZHANG Ming-jun, WANG Sheng-jie, <i>et al.</i> (1936)
Characteristics of Aerosol Water-Soluble Inorganic Ions in Three Types Air-Pollution Incidents of Nanjing City .....	ZHANG Qiu-chen, ZHU Bin, SU Ji-feng, <i>et al.</i> (1944)
Characterization of Atmospheric PM <sub>2.5</sub> in the Suburb of Shenzhen .....	DAI Wei, GAO Jia-qi, CAO Gang, <i>et al.</i> (1952)
Analysis on Oil Fume Particles in Catering Industry Cooking Emission .....	TAN De-sheng, KUANG Yuan-cheng, LIU Xin, <i>et al.</i> (1958)
Low-Temperature Catalytic Reduction of NO over Fe-MnO <sub>x</sub> -CeO <sub>2</sub> /ZrO <sub>2</sub> Catalyst .....	LIU Rong, YANG Zhi-qin (1964)
CO <sub>2</sub> Absorption and Regeneration Performance of a Natural Amino Acid and Its Potassium Salt .....	YAN Shui-ping, CHEN Jing-ao, XU Ming-liang, <i>et al.</i> (1971)
Effects of Tillage-Cropping Systems on Methane and Nitrous Oxide Emissions from Agro-Ecosystems in a Purple Paddy Soil .....	ZHANG Jun-ke, JIANG Chang-sheng, HAO Qing-ju, <i>et al.</i> (1979)
Factors Influencing Ammonia Volatilization in a Winter Wheat Field with Plastic Film Mulched Ridges and Unmulched Furrows .....	SHANGGUAN Yu-xian, SHI Ri-peng, LI Na, <i>et al.</i> (1987)
Effects of Typical Herbicides on Soil Respiration and N <sub>2</sub> O Emissions from Soil Added with Different Nitrogen Fertilizers .....	SUN Qing, SHI Chun-xing, SHI Kun, <i>et al.</i> (1994)
Analysis of Characteristics of Dioxin Contamination in the Chlor-alkali Site that Uses Graphite Anode for Production .....	YU Li-feng, WEI Wen-xia, TIAN Ya-jing, <i>et al.</i> (2000)
Effect of Flue Gas Desulfurization Gypsum Application on Remediation of Acidified Forest Soil .....	LUO Yao, KANG Rong-hua, YU De-xiang, <i>et al.</i> (2006)
Morphology of Soil Iron Oxides and Its Correlation with Soil-Forming Process and Forming Conditions in a Karst Mountain .....	ZHANG Zhi-wei, ZHU Zhang-xiong, FU Wa-li, <i>et al.</i> (2013)
Pb, Zn Accumulation and Nutrient Uptake of 15 Plant Species Grown in Abandoned Mine Tailings .....	SHI Xiang, CHEN Yi-tai, WANG Shu-feng, <i>et al.</i> (2021)
Effect of Cr(VI) Stress on Growth of Three Herbaceous Plants and Their Cr Uptake .....	WANG Ai-yun, HUANG Shan-shan, ZHONG Guo-feng, <i>et al.</i> (2028)
Bioaccumulation of Heavy Metals by the Dominant Plants Growing in Huayuan Manganese and Lead/Zinc Mineland, Xiangxi .....	YANG Sheng-xiang, TIAN Qi-jian, LIANG Shi-chu, <i>et al.</i> (2038)
Effect of CO <sub>2</sub> Fertilization on Residual Concentration of Cypermethrin in Rhizosphere of C3 and C4 Plant .....	MU Nan, DIAO Xiao-jun, WANG Shu-guang, <i>et al.</i> (2046)
Bioaugmented Removal of Pyridine and the Microbial Community Dynamic Analysis .....	QIAO Lin, ZHAO Hong, WANG Jian-long (2052)
Relationship Between Sewage Treatment Efficiency and Bacterial Community Diversity in an A/O MBR .....	KUANG Bin-yu, SHI Qing, Montcho Leon Monthero, <i>et al.</i> (2061)
Dynamic Changes in Functional Genes for Nitrogen Cycle During Bioremediation of Petroleum-Contaminated Soil .....	WU Bin-bin, LU Dian-nan, LIU Zheng (2068)
Risk Assessment of Lead Exposure from Different Intake Pathways for Children in Wuhan City .....	HAO Han-zhou, CHEN Tong-bin, WU Ji-liang, <i>et al.</i> (2075)
Implementation of a Pretreatment Device for an Electronic Nose .....	BU Fan-yang, WEN Xiao-gang, WAN Mei, <i>et al.</i> (2083)
Copper and Cadmium Toxicities to Activated Sludge Investigated with ToxTell Biosensor .....	WANG Xue-jiang, WANG Xin, LIU Mian, <i>et al.</i> (2090)
Matrix Effect and Control of Immunoassay for Environmental Samples .....	SHENG Jian-wu, HE Miao, SHI Han-chang (2095)
Study on Vitrification of Simulated Medical Wastes by Thermal Plasma .....	ZHANG Lu, YAN Jian-hua, DU Chang-ming, <i>et al.</i> (2104)
Study on the Low Temperature Drying of Components of Municipal Solid Waste and Its Model Analysis .....	WU Ya-juan, LIU Hong-mei, LU Sheng-yong, <i>et al.</i> (2110)
Aerogenesis Evolution of the Anaerobic-semiaerobic Bioreactor Landfill .....	HAN Zhi-yong, LIU Dan, LI Qi-bin (2118)
Performance of Microbial Fuel Cells with Fe/C Catalyst Carbon Felt Air-Cathode for Treating Landfill Leachate .....	TANG Yu-lan, PENG Man, YU Yan, <i>et al.</i> (2125)
Relationships Between Soil and Rocky Desertification in Typical Karst Mountain Area Based on Redundancy Analysis .....	LONG Jian, LIAO Hong-kai, LI Juan, <i>et al.</i> (2131)
Energy Consumption and GDP Growth in Beijing: Cointegration and Causality Analysis .....	CHEN Cao-cao, ZHANG Yan, LIU Chun-lan, <i>et al.</i> (2139)

# 《环境科学》第6届编辑委员会

主 编: 欧阳自远

副主编: 赵景柱 郝吉明 田 刚

编 委: (按姓氏笔画排序)

万国江 王华聪 王凯军 王绪绪 田 刚 田 静 史培军  
朱永官 刘志培 汤鸿霄 陈吉宁 孟 伟 周宗灿 林金明  
欧阳自远 赵景柱 姜 林 郝郑平 郝吉明 聂永丰 黄 霞  
黄 耀 鲍 强 潘 纲 潘 涛 魏复盛

## 环 境 科 学

(HUANJING KEXUE)

(月刊 1976年8月创刊)

2012年6月15日 33卷 第6期

## ENVIRONMENTAL SCIENCE

(Monthly Started in 1976)

Vol. 33 No. 6 Jun. 15, 2012

主 管	中国科学院	Superintended	by	Chinese Academy of Sciences
主 办	中国科学院生态环境研究中心	Sponsored	by	Research Center for Eco-Environmental Sciences, Chinese Academy of Sciences
协 办	(以参加先后为序) 北京市环境保护科学研究院 清华大学环境学院	Co-Sponsored	by	Beijing Municipal Research Institute of Environmental Protection School of Environment, Tsinghua University
主 编	欧阳自远	Editor-in -Chief		OUYANG Zi-yuan
编 辑	《环境科学》编辑委员会 北京市2871信箱(海淀区双清路 18号, 邮政编码:100085) 电话:010-62941102, 010-62849343 传真:010-62849343 E-mail: hjkx@ rcees. ac. cn http://www. hjkx. ac. cn	Edited	by	The Editorial Board of Environmental Science ( HUANJING KEXUE) P. O. Box 2871, Beijing 100085, China Tel: 010-62941102, 010-62849343; Fax: 010-62849343 E-mail: hjkx@ rcees. ac. cn http://www. hjkx. ac. cn
出 版	科 学 出 版 社 北京东黄城根北街16号 邮政编码:100717	Published	by	Science Press 16 Donghuangchenggen North Street, Beijing 100717, China
印 刷 装 订	北京北林印刷厂	Printed	by	Beijing Bei Lin Printing House
发 行	科 学 出 版 社 电话:010-64017032 E-mail: journal@ mail. sciencep. com	Distributed	by	Science Press Tel: 010-64017032 E-mail: journal@ mail. sciencep. com
订 购 处	全国各地邮电局	Domestic		All Local Post Offices in China
国外总发行	中国国际图书贸易总公司 (北京399信箱)	Foreign		China International Book Trading Corporation (Guoji Shudian), P. O. Box 399, Beijing 100044, China

中国标准刊号: ISSN 0250-3301  
CN 11-1895/X

国内邮发代号: 2-821

国内定价: 70.00元

国外发行代号: M 205

国内外公开发行