

应用重组孕激素基因酵母测定饮用水中内分泌干扰物的方法

李剑, 崔青, 马梅*, 饶凯锋, 王子健

(中国科学院生态环境研究中心环境水质学国家重点实验室, 北京 100085)

摘要: 研究了用重组孕激素受体基因酵母测定饮用水中内分泌干扰物的方法, 并利用该方法检测了南方某水厂不同处理工艺过程水样对孕激素受体活性的抑制水平. 结果表明, 重组孕激素受体基因酵母能够与孕激素专一性的结合, 诱导产生明显的剂量-效应关系, EC_{50} 值为 0.5 nmol/L , 具有较高灵敏度; 环境内分泌干扰物五氯酚和壬基酚具有孕激素受体抑制活性, 其 IC_{50} 值分别为 $2.4 \text{ } \mu\text{mol/L}$ 和 $3.7 \text{ } \mu\text{mol/L}$; 重组孕激素受体基因/报道基因的酵母技术是一种筛选和定量分析具有孕激素受体抑制活性的内分泌干扰物的快速、有效方法. 结合固相萃取的前处理技术, 重组孕激素受体基因酵母对水厂不同处理工艺水样检测出明显的孕激素受体抑制活性, 抑制率均大于 58%, 表明重组孕激素受体基因酵母检测技术能够快速监测和鉴别水样中具有抑制孕激素受体活性的物质.

关键词: 重组基因酵母; 内分泌干扰物; 饮用水; 生物测试

中图分类号: X524; X832.02 文献标识码: A 文章编号: 0250-3301(2006)12-2463-04

Recombinant hPR Gene Yeast for Assessing in Drinking Water

LI Jian, CUI Qing, MA Mei, RAO Kaifeng, WANG Zirjian

(State Key Laboratory of Environmental Aquatic Chemistry, Research Center for Eco-Environmental Sciences, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100085, China)

Abstract: A bioassay method using recombinant human progesterone receptor (hPR) gene yeast to evaluate the environmental endocrine disrupter effects was introduced. This method was used to determine the inhibition of hPR activity in pollutants emitted from a water works in the south China. The result showed that the recombinant gene yeast had steroid specificity and dose-response curve for progesterone with EC_{50} value of 0.5 nmol/L ; The estrogenic chemicals pentachlorophenol and *p*-nonylphenol inhibited the activity of hPR in the yeast which had IC_{50} values of $2.4 \text{ } \mu\text{mol/L}$ and $3.7 \text{ } \mu\text{mol/L}$, respectively. The results indicate that the recombinant progesterone gene yeast assay technique is an efficient and rapid method for screening and quantitatively analyzing the endocrine disrupters which can be the inhibitor of hPR activity. Combined with the solid-phase extraction (SPE) procedure, the yeast assay showed an obvious inhibition of hPR activity for water works sample and the inhibition rates were more than 58%. Therefore, it is reliable to use the recombinant hPR gene yeast for assessing the environmental endocrine disrupters.

Key words: recombinant yeast; endocrine disrupters; drinking water; bioassay

环境内分泌干扰物会引起野生生物生殖和生理特征的明显变化, 也会对人类生殖系统健康产生影响^[1,2], 因此对此类物质的检测与控制也越来越得到研究工作者的重视.

目前对于环境内分泌干扰物的生物检测研究还主要集中于对环境类雌激素物质的筛选和评价上, 特别是基于外源化合物和雌激素受体(ER)特异性结合的机理, 建立了雌激素受体竞争性结合实验(competitive ER binding)、细胞增殖实验(cell proliferation)、重组人雌激素受体基因报道基因酵母实验(yeast-based assays)等^[3]. 但是, 现有文献已经证明内分泌干扰物亦能够干扰雌性生物体内的孕激素受体, 研究证明, 在生物体内孕激素受体表达的抑制, 能够使雌激素受体的表达增强, 整体表现出类雌激素效应^[4]. 因此研究环境内分泌干扰物与孕激素

受体的作用, 不仅能够考察其对孕激素受体及其信号传导体系的影响, 还能够从生物体内分泌系统调节的角度解释体内雌激素活性产生的原因.

重组雌激素受体基因和报道基因的酵母检测方法由于其分子生物学原理简单、易于操作且经济快速得到了广泛的应用, 可以检测通过与雌激素受体结合而产生内分泌干扰效应的类雌激素物质. 但是, 水中具有抑制孕激素活性的物质同样能够导致生物体产生类雌激素响应. 因此, 同时应用重组雌激素和孕激素受体基因酵母, 可以更加准确筛选出环境样

收稿日期: 2005-12-28; 修订日期: 2006-02-22

基金项目: 国家自然科学基金项目(50378089); 国家高技术研究发展计划(863)项目(2002AA601120)

作者简介: 李剑(1980~), 女, 博士研究生, 主要研究方向为水环境生态毒理学, E-mail: 200328004201440@rcees.ac.cn

* 通讯联系人, E-mail: mamei@rcees.ac.cn

品中具有内分泌干扰活性的物质. 本研究采用的重组孕激素受体基因和报道基因酵母检测环境内分泌干扰物的方法, 原理是酵母中的孕激素受体基因被环境内分泌干扰物质诱导或是抑制, 其报道基因转录产生 β -半乳糖苷酶的活性也受到相对应的影响, 通过检测 β -半乳糖苷酶活性可以反映环境样品对于孕激素受体干扰的作用. 利用重组孕激素受体基因酵母细胞检测南方某水厂各工艺段出水, 一方面提供一种测试环境样品中极低浓度孕激素干扰效应的方法, 另一方面为全面评价饮用水生产工艺中内分泌干扰物对人体健康的风险性评价提供了基础数据.

1 材料与方法

1.1 样品的采集和前处理

2004-09 现场采集源水和各处理单元出水 40L, 水样保存在棕色玻璃瓶中并立即运回实验室. 经 0.7 μ m 玻璃纤维滤膜 (APFF, MILLIPORE, USA) 过滤后, 用 Oasis HLB 固相萃取小柱 (60mL, 500mg, Waters, USA) 富集, HLB 柱先用 5mL CH₂Cl₂ (HPLC Grade, Fisher, USA), 5 mL 甲醇 (HPLC Grade, Fisher, USA) 和 5mL 去离子水活化 (Milli-Q, MILLIPORE, USA). 调节水样过柱的流速恒定在 5mL/min, 富集完成后加入 15mL CH₂Cl₂ 分 3 次对柱子进行洗脱. 合并洗脱液, 高纯氮气吹至 1mL, 氮气吹干后溶解到 0.5mL 的 DMSO 中 (Sigma, USA), -20℃冰箱保存用作生物测试^[5, 6].

1.2 酵母菌种的培养

重组孕激素受体 (hPR) 基因酵母由 Gaido 赠送. 重组孕激素受体酵母培养基为补充 CuSO₄、腺嘌呤、赖氨酸、色氨酸的 SC 培养基, 室温避光保存^[7].

1.3 β -半乳糖苷酶活性的测定

选择指数生长期的酵母进行实验, 用分光光度计 (Spectrophotometer, Unico UV-2000, 上海) 测定 10 倍稀释的酵母菌株培养液在 600nm 波长处的吸光度值, 稀释后的读数要求落在 0.15~0.5 之间, 加入培养基调节原始吸光度值为 0.75.

β -半乳糖苷酶活性的测定采用 Rehmann 报道的方法^[8], 适当修改后进行. 取 990 μ L 菌株培养液和 10 μ L 样品, 涡旋混匀成暴露培养液. 将 200 μ L 暴露培养液加入无菌的 96 孔培养板中 (Falcon, France), 微孔摇床 (Heidolph, incubator 1000, Germany) 800 r/min, 30℃, 振荡培养 2h. 酶标仪测定 D (595nm) 后 (Tecan, GENios, Austria), 将培养液转入 Eppendorf 管中, 加入 620 μ L 基础缓冲液和

50 μ L 氯仿 (北京化工厂, 分析纯) 封管, 涡旋振荡器最大转速振荡 Eppendorf 管 30s 破碎酵母细胞. 30℃水浴预热 5min, 加入 200 μ L σ -NPG (Sigma) 反应液, 30℃水浴恒温反应并计时至出现明显的黄色. 反应完成后加入 500 μ L 10.6% 质量浓度的碳酸钠溶液, 固定反应, 吸取 200 μ L 转移到酶标板中测定 D (420nm) 的值.

1.4 数据分析

β -半乳糖苷酶活性 U 的计算公式如下:

$$U = (A_S - A_B) / t \cdot V \cdot D \cdot OD_S$$

式中, U 为 β -半乳糖苷酶活性; t 为反应时间 (min); V 为测试体积 (mL); D 为稀释因子; OD_S 为测试样品 595nm 处的吸光度值; A_S 为测试样品在 420nm 处的吸光度值 D (420nm); A_B 为空白对照在 420nm 处的吸光度^[9]; 实验以孕酮作为阳性对照物, 孕激素抑制活性采用活性百分比和抑制率来表征.

$$\text{活性百分比 (Activity)} = u(s) / u(p) \times 100\%$$

$$\text{抑制率} = 1 - u(s) / u(p)$$

式中, $u(s)$ 为样品诱导孕激素受体酵母产生的酶活性, $u(p)$ 为孕酮诱导孕激素受体酵母产生的酶活性.

2 结果与讨论

2.1 重组孕激素受体酵母的激素专一性检测

重组人孕激素受体基因和 *lacZ* 报道基因酵母, 暴露到 3 种人体激素: 17 β -雌二醇 (E₂, Sigma); 睾酮 (T, Sigma) 和 孕酮 (Pg, MP biomedical, Germany) 中, 通过检测其 β -半乳糖苷酶活性, 考察不同激素与受体的结合情况. 结果如图 1 所示, 孕酮能够诱导产生 β -半乳糖苷酶, 此浓度下为对照组的 82~111 倍. 而雌二醇和睾酮与 DMSO 的对照组相比无显著性差异 ($p < 0.01$), 因此孕激素受体酵母对孕酮有专一性的结合.

2.2 孕酮诱导产生 β -半乳糖苷酶活性的剂量-效应关系

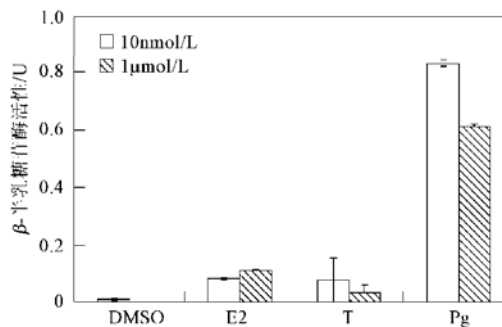


图 1 重组孕激素受体酵母激素专一性检验

Fig. 1 Steroid specificity of yeast strain hPR-PRE

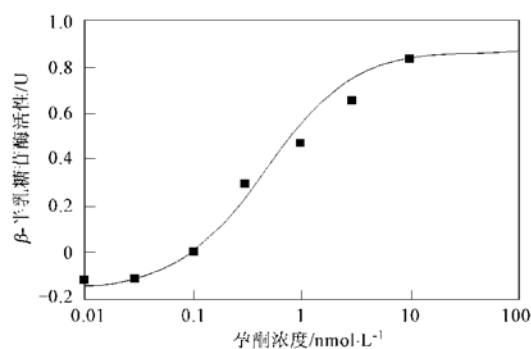


图 2 孕酮对重组孕激素受体酵母酶活性诱导的剂量-效应曲线

Fig. 2 Dose response curve for induction of β -galactosidase activity by Pg in the yeast strain hPR-PRE

将酵母细胞暴露到不同浓度的孕酮溶液中, 检测诱导产生的酶活性, 建立了孕酮对酶活性诱导的剂量-效应关系曲线(图 2)。结果表明, 重组酵母对孕激素类化合物有较高的灵敏度, EC_{50} 值为 0.5 nmol/L ; 10 nmol/L 浓度时, 孕酮对重组酵母酶活性的诱导值达到最大。

2.3 几种环境内分泌干扰物对重组酵母孕激素活性的抑制

本研究挑选了几种常见的环境内分泌干扰物: 五氯酚(PCP)、氯丹(CHL)、 γ -六六六(γ -HCH)、滴滴涕(DDT)和壬基酚(NP), 检测不同浓度下化合物对重组孕激素受体基因酵母的作用。图 3 表明 5 种物质在各个浓度点, 对于重组酵母的酶活性均没有明显的诱导作用($p < 0.01$)。

进一步检测了上述物质是否能够作为孕激素受体的抑制剂, 因此在上述体系中同时加入 10 nmol/L 的孕酮和分别为 $1.25 \mu\text{mol/L}$ 的各种化合物, 图 4 表明在此浓度条件下, 添加 PCP 和 NP 后孕酮诱导产生的酶活性分别减少了 25.9% 和 33.4%, 而其余物质对酶活性的影响均在 $\pm 10\%$ 的范围内, 无显著性变化($p > 0.05$)。这一结果表明 PCP 和

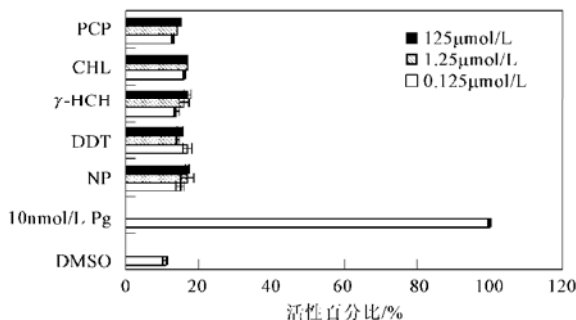


图 3 几种环境内分泌干扰物及孕酮对重组孕激素受体酵母诱导活性的检验

Fig. 3 Activity of Pg or various chemicals in the yeast strain hPR-PRE

NP 是潜在的孕激素受体抑制剂。

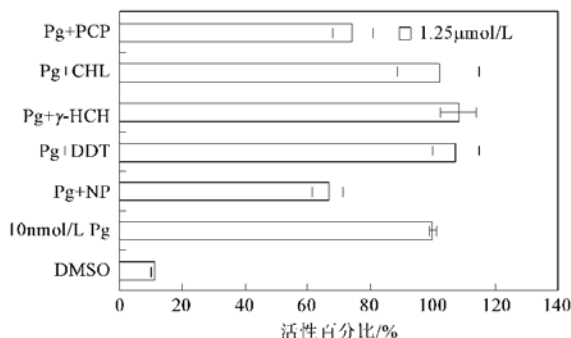


图 4 几种环境内分泌干扰物对重组孕激素受体酵母抑制活性的检验

Fig. 4 Inhibition of PR activity with various chemicals in the yeast strain hPR-PRE

考察不同浓度下 PCP 和 NP 2 种物质对酶活性抑制的影响。如图 5 所示, NP 和 PCP 为有效的孕激素活性抑制剂, 其对孕激素受体活性的抑制存在明显的剂量-效应关系。PCP 和 NP 的 IC_{50} 值分别为 $2.4 \mu\text{mol/L}$ 和 $3.7 \mu\text{mol/L}$ 。

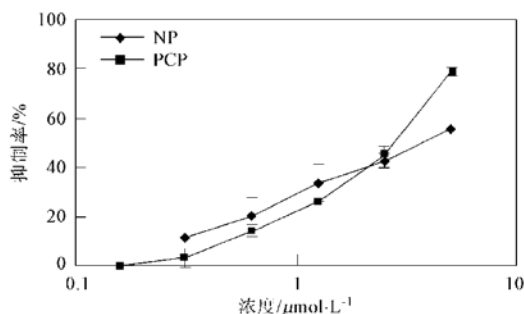


图 5 NP 和 PCP 对重组孕激素受体酵母酶活性抑制的剂量-效应曲线

Fig. 5 Dose response curve for inhibition of β -galactosidase activity by NP or PCP in the yeast strain hPR-PRE

本研究表明, 一些合成化学品能够直接抑制人孕激素受体的活性, 这和一些早期研究的结果一致。Hrdine 等已经证明 p, p' -DDE 能够抑制在动物体内由孕酮诱导产生的酶系^[10]。实验证实从鸭、鸡、兔等动物体内提取的孕激素受体能够和 o, p' -DDE 以及 p, p' -DDE 结合^[11]。此外, 1996 年 Dat 报道多种环境化合物能够与人的孕激素受体竞争性结合, 从而抑制受体介导的转录活性^[12]。

PCP 和 NP 除了已经提到的孕激素受体抑制活性外, 初步证明具有雌激素活性。这就表明一些合成的化合物可能不止具有一种激素活性, 例如: p, p' -DDE 在活体和离体实验中都被证实具有雄激素拮抗作用^[13]; p, p' -DDE 也已被报道具有类雌激素活性, 能够诱导 MCF-7 细胞增生^[14]; p, p' -DDE 以及

一系列的 DDT 代谢产物也同时被证明具有孕激素的抑制活性^[15]. 因此, 只有同时检测多种激素指标, 才能更真实全面的反映化合物对生物体整个内分泌系统的干扰作用.

同时, 生物体的内分泌系统是一个相互调节相互影响的整体. 大量的文献报道已经证实, 孕激素受体能够降低雌激素受体(ER)的转录活性^[16], 这就意味着在雌性的生殖系统内部存在着这样一个潜在的分子机制: 孕激素受体活性的抑制能够增强雌激素受体活性的表达. 因此 NP 和 PCP 通过作为孕激素受体活性的抑制剂, 就能够使得生物体产生类似雌激素的活性, 也就是说, 此类化合物的雌激素活性通过对孕激素受体活性的抑制而得到加强. 因此, 合成化合物对于孕激素受体活性的抑制提供了一个新的雌激素活性作用机制.

2.4 重组孕激素受体酵母检测环境水样中孕激素受体的抑制作用

将水厂各处理段的水样富集后进行的孕激素受体抑制活性检验结果见图 6, 采用蒸馏水样平行操作作为空白对照. 不同的处理工艺均检测出明显的孕激素受体抑制活性, 各点的抑制率均大于 58%, 与对照组相比存在显著性差异($p < 0.01$). 这可能与样品中含有外源性内分泌干扰物(如烷基酚)有关, 但需结合化学分析进一步证明. 目前这套工艺尚不能有效去除产生孕激素受体抑制效应的物质.

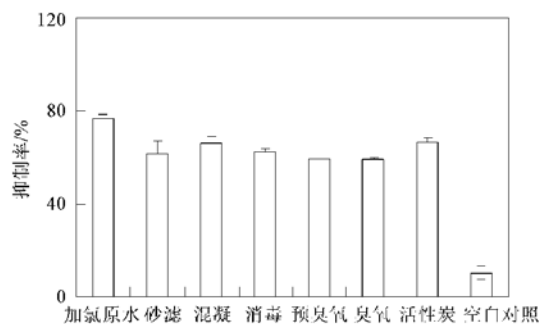


图 6 水厂不同工艺段水样对重组孕激素受体酵母酶活抑制检测结果

Fig. 6 Inhibition of PR activity of water works sample in the yeast strain hPR-PRE

3 结论

重组孕激素受体基因/报道基因的酵母检测方法是 1 种筛选环境内分泌干扰物的快速、有效的方法. PCP 和 NP 具有孕激素受体抑制作用, 提供了化合物对内分泌系统的新的干扰机制, 并从内分泌系

统调节的角度解释了雌激素活性可能产生的原因.

参考文献:

- [1] Knörr S, Braunbeck T. Decline in reproductive success, sex reversal, and developmental alterations in Japanese Medaka (*Oryzias latipes*) after continuous exposure to octylphenol [J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2002, **51**: 187~ 196.
- [2] Toppari J, Larsen J C, Christiansen P, et al. Male reproductive health and environmental xenoestrogens [J]. *Environmental Health Perspectives*, 1996, **104**: 741~ 776.
- [3] Tim Z. *In vitro* bioassays for assessing estrogenic substances [J]. *Environmental Science and Technology*, 1997, **31**(3): 613~ 623.
- [4] Kraus W L, Weis K E, Katzenellenbogen B S. Inhibitory cross-talk between steroid hormone receptors: differential targeting of estrogen receptor in the repression of its transcriptional activity by agonist and antagonist-occupied progesterone receptors [J]. *Mol. Cell. Biol.*, 1995, **15**(4): 1847~ 1857.
- [5] 陈盈盈, 马梅, 赛道建, 等. 利用成组生物测试评估不同深度处理工艺出水的安全性 [J]. *环境科学*, 2005, **26**(1): 100~ 103.
- [6] Wu W Z, Wang J X, Zhao G F, et al. The emission soot of biomass fuels combustion as a source of endocrine disruptors [J]. *Environ. Sci. Health*, 2002, **A37**(4): 579~ 600.
- [7] Gaido R, Leonard L S, Lovell S, et al. Evaluation of Chemicals with Endocrine Modulating Activity in Yeast-Based Steroid Hormone Receptor Gene Transcription Assay [J]. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 1997, **143**(205): 205~ 212.
- [8] Rehmann R K, Schramm K W, Ketrup A A. Applicability of a yeast oestrogen screen for the detection of oestrogen-like activities in environmental samples [J]. *Chemosphere*, 1999, **38**(14): 3303~ 3312.
- [9] 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.
- [10] Hrdine P D, Signhal R S, Ling G M. DDT and related chlorinated hydrocarbon insecticides: pharmacological basis of their toxicity in mammals [J]. *Adv. Pharmacol. Chemother.*, 1975, **12**: 31~ 88.
- [11] Lundholm C, Kelce W R, Stone C R, et al. The effects of DDE, PCB and chlordane on the binding of progesterone to its cytoplasmic receptor in the eggshell gland mucosa of birds and the endometrium of mammalian uterus [J]. *Comp. Biochem. Physiol.*, 1988, **89**(2): 361~ 368.
- [12] Dat Q T, Diane M K, Beth L L, et al. Inhibition of progesterone receptor activity in yeast by synthetic chemicals [J]. *Biochemical and Biophysical Research Communication*, 1996, **229**(2): 518~ 523.
- [13] Kelce W R, Stone C R, Laws S C, et al. Persistent DDT metabolite *p*, *p'*-DDE is a potent androgen receptor antagonist [J]. *Nature*, 1995, **375**(6532): 581~ 585.
- [14] Soto A M, Sonnenschein C, Chung K L, et al. The E-screen assay as a tool to identify estrogens - an update on estrogenic environmental pollutants [J]. *Environ. Health Perspect.*, 1995, **103**: 113~ 122.
- [15] Diane M K, Beth L L, Peter M V, et al. *o*, *p'*-DDT and its metabolites inhibit progesterone dependent responses in yeast and human cells [J]. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 1997, **129**(1): 63~ 71.
- [16] Wen D X, Xu Y F, Mais D E, et al. The A and B isoforms of the human progesterone receptor operate through distinct signaling pathways within target cells [J]. *Mol. Cell Biol.*, 1994, **14**(12): 8356~ 8364.