

青鳉鱼 $ERR\alpha$ 的克隆、序列分析、组织表达及其对不同 EDCs 暴露的响应

张照斌¹, 胡建英^{1*}, 赛思翔¹, 赵砚彬¹, 黄崇¹, 田小军²

(1. 北京大学城市与环境学院, 北京 100871; 2. 北京师范大学校医院, 北京 100875)

摘要: 内分泌干扰物质(EDCs)可以通过多种通道影响鱼类的生长、发育和繁殖, 而雌激素相关受体(ER)是一类目前没有被引起足够重视的潜在致毒信号通道。本研究克隆了青鳉鱼(*Oryzias latipes*) $ERR\alpha$ mRNA 全序列, 并通过实时定量 RT-PCR 方法对其在不同组织中的表达和不同 EDCs 暴露下的响应进行了分析。发现青鳉鱼 $ERR\alpha$ 与其它脊椎动物 $ERR\alpha$ 氨基酸序列有较高的同源性, 特别是 DNA 结合结构域(DBD)在从鱼类到哺乳类动物的进化过程中高度保守, 配体结合结构域(LBD)序列与哺乳动物的 LBD 有 66.4% ~ 67.0% 的序列相同。青鳉鱼 $ERR\alpha$ 与青鳉鱼雌激素受体 $ER\alpha$ 、 $ER\beta$ 和雄激素受体 $AR\alpha$ 、 $AR\beta$ 的 DBD 氨基酸数相同, 且有较高序列相似性, 但 LBD 的长度和序列差异较大。青鳉鱼 $ERR\alpha$ 基因有 5 个外显子组成, 位于第 14 号染色体。青鳉鱼 $ERR\alpha$ 基因在各组织中广泛表达, 其中在性腺、脑、脾脏、眼和肠中表达较高, 且在雌雄性腺中差异表达, 表明其在雌雄性别分化和性腺发育中发挥调控作用。暴露 200 ng/L 炔雌醇(EE2)、200 ng/L 雌酮(E1)、200 ng/L 己烯雌酚(DES)、100 μ g/L 阿特拉津(AT)和 200 ng/L 雌二醇(E2)后, 青鳉鱼精巢中 $ERR\alpha$ mRNA 水平分别显著下降至对照组的 0.54、0.56、0.61、0.63 和 0.65 倍($p < 0.05$), 但暴露 1 μ g/L 三丁基锡和 1 μ g/L 三苯基锡后上升至对照组的 1.34 和 1.35 倍($p > 0.05$), 表明 $ERR\alpha$ 可能参与外源 EDCs 影响鱼类性别分化和性腺发育的过程。此外, 在青鳉鱼 $ERR\alpha$ 基因上游没有发现类似哺乳动物 $ERR\alpha$ 基因上游的类固醇激素反应元件半位点, 说明鱼类 $ERR\alpha$ 基因的调控模式与哺乳类存在差异。

关键词: 内分泌干扰物; 雌激素相关受体; 青鳉鱼; 实时定量 PCR

中图分类号: X171.5 文献标识码: A 文章编号: 0250-3301(2008)11-3153-06

Gene Cloning, Sequence Analysis and Tissue Expression of Estrogen-Related Receptor α ($ERR\alpha$) in Japanese Medaka and Its Transcriptional Responses After Differential EDCs Exposure

ZHANG Zhao-bin¹, HU Jian-ying¹, SAI Si-xiang¹, ZHAO Yan-bin¹, HUANG Chong¹, TIAN Xiao-jun²

(1. College of Urban and Environmental Sciences, Peking University, Beijing 100871, China; 2. The Hospital Affiliated to Beijing Normal University, Beijing 100875, China)

Abstract: Endocrine disrupting chemicals (EDCs) can bind or block nuclear receptors in the body and subsequently affect growth, development and reproduction of fish. Estrogen-related receptors (ERRs), belonging to the nuclear receptor superfamily, have been implicated in diverse physiological processes in estrogen signal pathway in mammals, while little is known about them in fishes. Complete mRNA sequence of $ERR\alpha$ from medaka (*Oryzias latipes*) was cloned, and the sequence is similar to those of other vertebrates, especially that the DNA-binding domain (DBD) of $ERR\alpha$ is highly conserved among the vertebrates (97.4%-100% sequence identities) and the ligand-binding domain (LBD) of medaka $ERR\alpha$ is 66.4%-67.0% sequence identities with those of mammals. The DBD of medaka $ERR\alpha$ is of the same length and has high sequence identity with those of estrogen receptor ($ER\alpha$ and $ER\beta$) and androgen receptor ($AR\alpha$ and $AR\beta$) of medaka, but much difference was found between the LBD of medaka $ERR\alpha$ with those of $ER\alpha$, $ER\beta$, $AR\alpha$ and $AR\beta$. $ERR\alpha$ gene is located in chromosome 14 and is consisted of 5 exons. The expressions of $ERR\alpha$ in different tissues and the transcriptional responses of $ERR\alpha$ in testis of medaka exposed differential EDCs were studied by quantitative real-time RT-PCR. $ERR\alpha$ is expressed at apparently high levels in gonad, brain, eye, spleen and intestine, though it was broadly expressed in tissues. Significant transcriptional difference was found between testis and ovary, implying $ERR\alpha$ would be involved in sex differentiation and gonad development in fish. After 3 weeks exposure of medaka to 200 ng/L ethynylestradiol (EE2), 200 ng/L estrone (E1), 200 ng/L diethylstilbestrol (DES), 100 μ g/L atrazine (AT) and 200 ng/L 17 β -estradiol (E2), transcripts of $ERR\alpha$ were significantly decreased to 0.54, 0.56, 0.61, 0.63 and 0.65 of control ($p < 0.05$) in the testes, respectively. And those in the 1 μ g/L tributyltin (TBT) and 1 μ g/L triphenyltin (TPT) exposure groups were up-regulated to 1.34 and 1.35 folds of control ($p > 0.05$), respectively. These results suggested that $ERR\alpha$ would take actions in the disruption of sex differentiation and gonad development in fish by EDCs. In addition, no multiple steroid hormone-response element half-sites was found in medaka, which were reported in the upstream of

收稿日期: 2007-11-20; 修订日期: 2008-01-24

基金项目: 国家自然科学基金项目(20607002, 40632009)

作者简介: 张照斌(1975~), 男, 博士, 讲师, 主要研究方向为环境毒理学和分子毒理学, E-mail: zhangzb@urban.pku.edu.cn

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

ERR α gene in mammals, indicating there would be different regulation patters of ERR α between teleost and mammal.

Key words: endocrine disrupting chemicals; estrogen-related receptor α (ERR α); medaka; Q-RT-PCR

内分泌干扰物质(EDCs)是近十几年来最受关注的一类化学物质. 这些物质可以通过模拟或拮抗天然激素, 干扰生物体内分泌平衡, 从而影响生物体的正常生长、发育和繁殖^[1~3]. 目前, 有关 EDCs 的研究主要集中在环境雌激素 (environmental estrogen), 如炔雌醇(EE2)、雌二醇(E2)、壬基酚(NP)和双酚 A (BPA)等. 这些物质通过与机体内雌激素受体(estrogen receptor, ER)结合, 进而导致机体内的一系列雌性化相关基因的应答, 最终在生理、组织甚至行为上表现出雌性化特征^[1~4]. 然而还有一些物质如阿特拉津虽然不能与 ER 结合, 但同样可以导致生物体产生严重的雌性化^[5], 不过其致毒信号通道至今还没有得到很好地阐释. 而解决这样的问题, 雌激素相关受体(estrogen-related receptor, ERR)是一个不应被忽视的研究内容.

ERR 属于核受体超家族, 具有 3 种亚型, 即 ERR α (NR3B1)、ERR β (NR3B2) 和 ERR γ (NR3B3)^[6]. 虽然目前还没有发现 ERR 的天然配体, 且人类的 3 种类型 ERR 均不能与天然雌激素 E2 结合, 但研究发现人造雌激素——己烯雌酚(DES)、抗雌激素物质——他莫西芬(tamoxifen)、4-羟基他莫西芬(4-hydroxytamoxifen)和农药氯丹(chlordane)、毒杀芬(toxaphene)等与人类 ERR 有明显的结合活性^[7~10]. 另外, 已开展的研究证实 ERR 参与骨骼形成和乳腺癌发生过程的 ER 信号途径, 与 ER 信号通道交互作用(crosstalk)共同调控一些下游基因^[6]. 在结构方面, ERR 与 ER 等核受体一样, 也分为 A/B、C、D、E 和 F 结构域, 其中 C 域是 DNA 结合域(DNA binding domain, DBD), E 域是配体结合域(ligand binding domain, LBD), 它们分别负责靶 DNA 的结合和配体结合^[6]. ERR 的 DBD 与 ER 的 DBD 具有高度同源性, 如人类 ERR α 在 DBD 有 68% 的氨基酸序列与 ER α 相同. ERR 的反应元件也包含了雌激素反应元件(estrogen response element, ERE)(特征性序列为“AGGTCA”), 从而对一些传统雌激素调控基因也有调控作用, 如 CYP19 (P450arom)、CYP17 (17 α -hydroxylase/17, 20-lyase)、SULT2A1 (dehydroepiandrosterone sulfotransferase) 等基因^[11, 12]. 因此, 对 ERR 基因的研究不仅是 ER 信号通道研究的必要补充, 也是 EDCs 致毒信号通道研究的必要内容. 本研究以青鳉鱼(*Oryzias latipes*)为实验动物, 通过 ERR α 基因

克隆和基因表达分析, 以期从 ERR α 信号通道角度开展 EDCs 的鱼类毒理机制提供大量依据和数据支持.

1 材料与方法

1.1 化学试剂

炔雌醇 (17 α -ethynylestradiol, EE2) 和雌酮 (Esterone, E1) 购于 Fluka Chem (瑞士); 雌二醇 (17 β -estradiol, E2), 己烯雌酚 (Diethylstilbestrol, DES) 和二甲基亚砷 (Dimethyl Sulfoxide, DMSO) 购于 Sigma 公司 (St. Louis, MO, 美国); 阿特拉津 (Atrazine, AT) 购于 Chem Service (West Chester, PA, 美国); 氯代三丁基锡 (tributyltin Chloride, TBT-Cl) 和氯代三苯基锡 (tributyltin Chloride, TBT-Cl) 购自 Hayashi Pure Chem (东京, 日本). 上述试剂分别配制成 DMSO 溶液, 然后按照 DMSO 溶液/水为 0.005% (体积分数) 配制实验暴露用水.

1.2 实验动物

青鳉鱼 (*Oryzias latipes*) Orange Red 品系获赠于日本某研究所, 在本实验室已经驯化 4 a 以上. 养殖和暴露条件控制: 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 昼/夜 = 16/8. 饲料为新孵化的活体卤虫.

1.3 实验设计

青鳉鱼肝、脑、眼、肠、鳃、性腺、肌、皮肤和脾脏组织从孵化后 5 月龄的成熟个体 (n 为 6 ~ 9) 中得到, 样品采集后立即用液氮冻存, 直至总 RNA 提取. 不同内分泌干扰物质的暴露实验: 孵化后 5 月龄雄性成鱼分别暴露于 200 ng/L EE2、200 ng/L E2、200 ng/L E1、200 ng/L DES、100 μ g/L AT、1 μ g/L TBT-Cl 和 1 μ g/L TPT-Cl, 每组 6 尾于 2 L 水中. 0.005% (体积分数) DMSO 作为对照组. 各组每 24 h 换水 1 次. 暴露 3 周后采集性腺样品. 样品采集后立即用液氮冻存, 直至总 RNA 提取.

1.4 实验方法

采用 Trizol 试剂 (Gibco BRL, Life Technologies, Gaithersburg, MA, 美国) 提取组织总 RNA, 然后对提取的总 RNA 进行 DNAase I (大连宝生物公司) 处理和纯化. 所得总 RNA 紫外光吸收 A260/A280 > 1.8, 0.8% 甲醛变性凝胶电泳证实无降解. 采用 Superscript III 反转录酶 (Invitrogen, Paisley, UK) 合成

cDNA 第一条链。

根据 NCBI(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)上已经发布的有关 $ERR\alpha$ 基因序列进行比对,利用 Primer Premier 5 设计兼并引物,PCR 反应扩增目标基因。纯化 PCR 产物并连接到 pMD 18-T 质粒(大连宝生物公司)上,转入感受态大肠杆菌扩增,通过 M13 引物测序获得 862 bp 的 $ERR\alpha$ 序列。采用 3'-RACE 和 5'-RACE 试剂盒(大连宝生物公司),按照试剂盒说明书,克隆 $ERR\alpha$ cDNA 的 3'端和 5'端序列,从而获得青鳉鱼 $ERR\alpha$ 的 mRNA 全序列。采用 Clustal X 软件^[13]将推算的青鳉鱼 $ERR\alpha$ 氨基酸序列和 NCBI 公布的氨基酸序列进行比对,采用 BioEdit 7.0.1 软件^[14] Identity Matrix 计算序列相同比例。基于氨基酸序列比对文件,在 PAUP 4.0 中采用邻接法(neighbor joining method, NJ)分析系统发生关系,构建 NJ 树。将获得的 cDNA 序列与青鳉鱼(HdrR 品系)基因组序列(<http://www.ensembl.org/Oryzias-latipes/>)进行比对,确定基因在染色体上的位置和基因结构。

定量 PCR 引物采用软件 Primer Express 2.0 设计,每对引物至少跨越一个内含子以减少基因组 DNA 的影响。 $ERR\alpha$ 引物序列为:上游 5'-CAAA CGAGTGCAGAAATCACCA-3',下游 5'-TCTAGACGCA CTCCTCCTTGA-3'。核糖体蛋白 L7(RPL-7)被用作内参基因^[15],其定量 PCR 引物序列为:上游 5'-AGCTCTCGGCAAATATGGCAT-3',下游 5'-GCAGGCT TGAAGT TCTTTCCAA-3'。cDNA 标准品为纯化的普通 PCR 产物。20 μ L 体系 PCR 反应液包括 SYBR[®] Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, 美国) 10 μ L, 25 μ mol/L 正义和反义引物各 0.4 μ L, 及 cDNA 和双蒸馏水。PCR 反应程序为 50 $^{\circ}$ C, 2 min; 95 $^{\circ}$ C, 10 min; 40 个循环: 95 $^{\circ}$ C 15 s, 60 $^{\circ}$ C 60 s; 在最后一个循环后做熔解曲线,确定 PCR 反应质量。仪器采用 ABI Prism[®] 7000 Sequence Detection System, Applied Biosystems (美国)。

1.5 统计分析

采用 SPSS 软件(Ver 11.5; Chicago, IL, USA)的 one-way ANOVA 和 Tukey 多重比较来检验相关数据的差异。当 $p < 0.05$ 时认为差异显著。所有数据和图表均以平均值 $\pm$ 标准偏差表示。

2 结果与讨论

2.1 $ERR\alpha$ 基因序列及分析

本研究克隆了青鳉鱼 $ERR\alpha$ mRNA 序列。它的

开放阅读框(open reading frame, ORF)由 1 302 个碱基组成,编码 433 个氨基酸,序列已公布在 NCBI GenBank (Accession No. EF544132)。青鳉鱼 $ERR\alpha$ 与斑马鱼(Zebrafish, NM_212955)、底鳉(killifish, DQ241376)、非洲爪蛙(*Silurana tropicalis*, NM_001079288)、挪威鼠(Norway rat, NM_001008511)、小鼠(house mouse, NP_031979)、狗(dog, NM_001002936)和人(human, NM_004451)的 $ERR\alpha$ 分别有 94.4%、96.0%、62%、62.3%、62.3%、62.5% 和 62.6% 的序列相同(图 1)。青鳉鱼 $ERR\alpha$ 蛋白质序列包括 76 个氨基酸组成的 C 域,即 DNA 结合结构域(zf-C4 型锌指结构)和 181 个氨基酸组成的 E 域,即配体结合结构域。 $ERR\alpha$ 的 DBD 在从鱼类到哺乳类动物的进化过程中高度保守,仅在 DBD 的

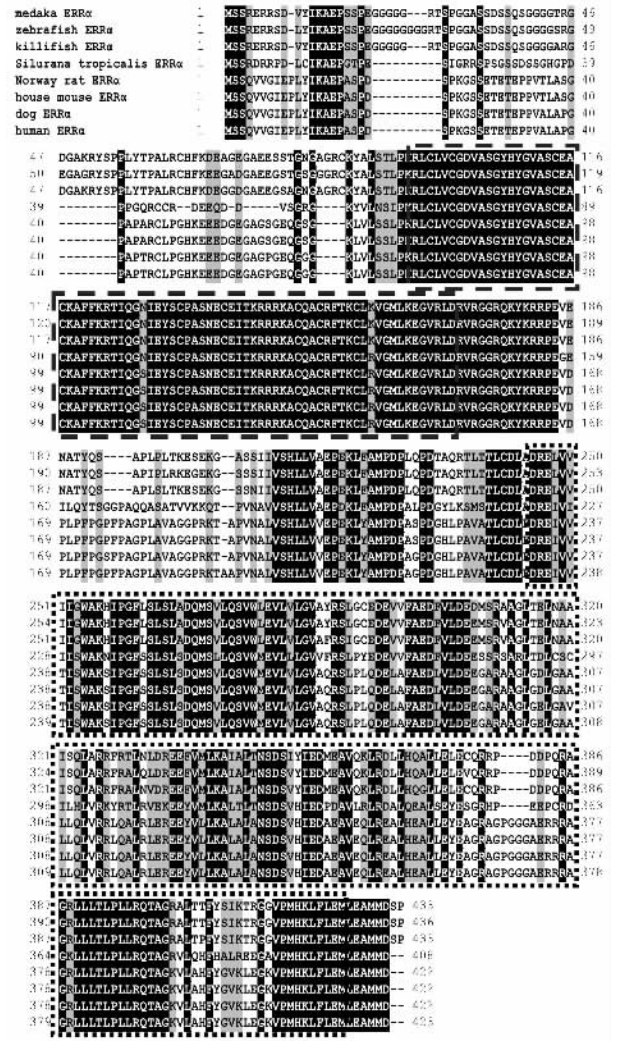
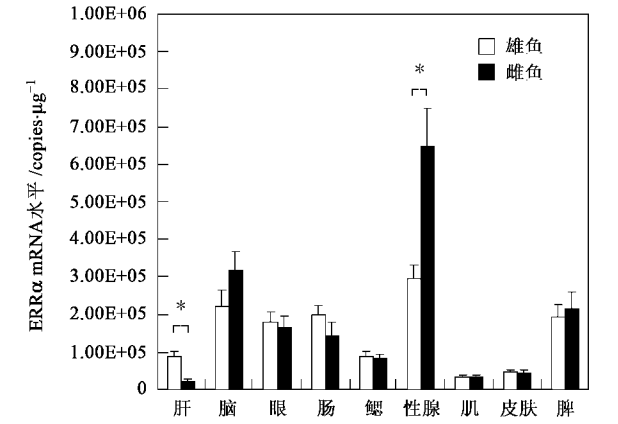


图 1 脊椎动物雌激素相关受体 α ($ERR\alpha$) 氨基酸序列比对
Fig. 1 Multiple amino acid sequence alignment of the estrogen related receptor α ($ERR\alpha$) from vertebrates

Fig.3 Analyses of the amino acid sequences of medaka (*Oryzias latipes*) ERR α , ERs and ARs

中 ERR α 相对表达较低,而在鳃中的相对表达较高^[16].在所研究组织中,青鲮鱼卵巢中 ERR α 表达水平 $[(6.47 \times 10^5 \pm 1.01 \times 10^5) \text{ copies}/\mu\text{g}]$ 最高 ($p < 0.05$),而精巢中表达水平则仅为 $(2.95 \times 10^5 \pm 3.45 \times 10^4) \text{ copies}/\mu\text{g}$;雌鱼肝脏中 ERR α 表达水平最低,为 $(2.25 \times 10^4 \pm 3.82 \times 10^3) \text{ copies}/\mu\text{g}$,显著低于雄鱼肝脏的 $(8.79 \times 10^4 \pm 1.30 \times 10^4) \text{ coies}/\mu\text{g}$ ($p < 0.05$).这种雌雄差异与底鲮的结果相似,但底鲮 ERR α 不同组织的相对表达只提供单个样品数据,没有差异显著性比较^[16].Bardet 等^[17]发现,斑马鱼胚胎发育过程中 ERR α 在后脑、骨骼肌、前肾管等组织中明显表达.哺乳动物中,ERR α 在老鼠的骨骼、褐色脂肪组织、肌肉、心脏、皮肤和中枢神经系统也广泛表达^[18,19].而 Shigeta 等^[20]发现 ERR α 在老鼠生殖系统表达更加明显,特别是在子宫、子宫颈和阴道中表达水平较高.ERR α 在人类的组织中均表达,其中在心脏和骨骼肌表达最高,在肾脏、胰腺、小肠和结肠中表达量次之^[21].



* 表示雌雄间存在显著差异, $p < 0.05$,下同

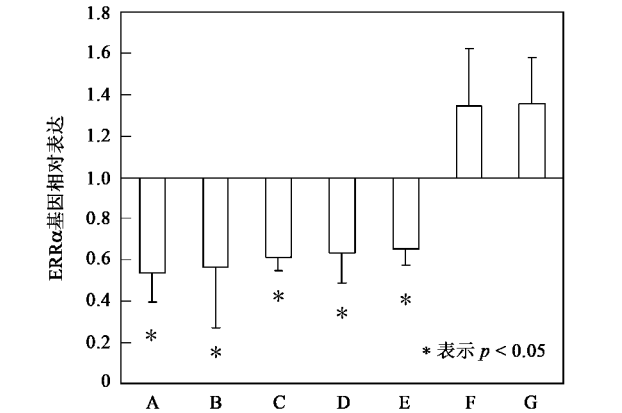
图4 青鲮鱼雌激素相关受体 α (ERR α) 基因在不同组织中的表达水平

Fig.4 Transcript level of ERR α in different tissues

2.3 暴露 EDCs 后青鲮鱼精巢中 ERR α 的表达变化

如图 5 所示,暴露 3 周后,200 ng/L EE2、200 ng/L E1、200 ng/L DES、100 $\mu\text{g/L}$ AT 和 200 ng/L E2 组青鲮鱼精巢中 ERR α mRNA 水平显著下降 ($p < 0.05$),分别降至对照组的 (0.54 ± 0.14) 、 (0.56 ± 0.29) 、 (0.61 ± 0.07) 、 (0.63 ± 0.15) 和 (0.65 ± 0.07) 倍,表明天然或人造雌激素对青鲮鱼精巢中 ERR α 基因表达有显著抑制作用.这些结果与 E2 饲料暴露的底鲮的研究结果吻合^[16],但与在哺乳动物中的一些研究结果相反.DES 或 E2 暴露老鼠后,其

子宫和心脏中 ERR α 的表达水平明显提高^[20,22].Liu 等^[22]发现在人类和老鼠 ERR α 基因上游存在多个类固醇激素反应元件半位点(steroid hormone-response element half-sites).本研究在青鲮鱼 ERR α 基因上游 5 000 个碱基范围内并没有发现类似哺乳动物中存在的类固醇激素反应元件半位点,仅在青鲮鱼 ERR α 起始密码子上游-734 bp 位置发现一个可能的类似人类 ERR α 基因上游存在的 SP1 结合位点(SP1-binding site),即 5'-CCCGCC-3'.这说明 ERR α 基因的调控模式在鱼类和哺乳类之间可能存在差异.本研究还发现 100 $\mu\text{g/L}$ AT 暴露组中青鲮鱼精巢 ERR α 基因表达也显著下降 ($p < 0.05$),表明其对 ERR 的调控可能与雌激素类似.这些雌激素活性物质引起的 ERR α 表达水平显著下降,显示了 ERR α 可能参与外源雌激素及其类似物影响鱼类性别分化和性腺发育的调控过程.在 1 $\mu\text{g/L}$ TBT 和 1 $\mu\text{g/L}$ TPT 暴露组,精巢 ERR α 基因表达呈现上升趋势 ($p > 0.05$),分别达到对照组的 (1.34 ± 0.28) 倍和 (1.35 ± 0.22) 倍(图 5).TBT 和 TPT 是对鱼类具有雄化效应的 2 种内分泌干扰物质^[23],它们暴露导致 ERR α 的表达响应趋势与环境雌激素的响应趋势相反,进一步表明 ERR α 可能参与内分泌干扰物影响鱼类性别分化和性腺发育的调控过程.



A. 200 ng/L EE2; B. 200 ng/L E1; C. 200 ng/L DES;
D. 100 $\mu\text{g/L}$ AT; E. 200 ng/L 17 β -E2; F. 200 ng/L TBT;
G. 200 ng/L TPT

图5 暴露不同 EDCs 3 周后青鲮鱼精巢中雌激素相关受体 α (ERR α) 基因相对表达变化(与对照组的比值)

Fig.5 Transcript-level variation in testes of medaka exposed by different EDCs

3 结论

(1)本研究克隆了青鲮鱼 ERR α mRNA 全序列,

发现青鳉鱼 $ERR\alpha$ 与其它脊椎动物 $ERR\alpha$ 氨基酸序列有较高的同源性,特别是 DBD 在从鱼类到哺乳类动物的进化过程中仅在第 34 个氨基酸和第 65 个氨基酸有差异, LBD 序列与哺乳动物的 LBD 有 66.4%~67.0% 的序列相同. 青鳉鱼 $ERR\alpha$ 基因位于第 14 号染色体,有 5 个外显子组成.

(2) 青鳉鱼 $ERR\alpha$ 与 $ER\alpha$ 、 $ER\beta$ 、 $AR\alpha$ 和 $AR\beta$ 受体的 DBD 氨基酸数相同,且分别有 67.1%、65.7%、47.3% 和 48.6% 氨基酸序列相同,但 LBD 差异较大,仅有 39.3%、34.1%、26.3% 和 28.4% 的序列相同.

(3) 青鳉鱼 $ERR\alpha$ 基因在各组织中广泛表达,其中在性腺、脑、脾脏、眼和肠中表达水平较高($> 1.00 \times 10^5$ copies/ μ g). 青鳉鱼卵巢 $ERR\alpha$ 表达水平的显著高于精巢中的($p < 0.05$).

(4) 暴露 200 ng/L EE2、200 ng/L E1、200 ng/L DES、200 ng/L E2 和 100 μ g/L AT 3 周后的青鳉鱼精巢中 $ERR\alpha$ mRNA 水平显著下降($p < 0.05$),但暴露 1 μ g/L TBT 和 1 μ g/L TPT 后精巢 $ERR\alpha$ 基因表达呈现上升趋势. 青鳉鱼 $ERR\alpha$ 基因上游没有发现类似哺乳动物 $ERR\alpha$ 基因上游的类固醇激素反应元件半位点.

参考文献:

- [1] Segner H. Comment on "Lessons from Endocrine Disruption and Their Application to Other Issues Concerning Trace Organics in the Aquatic Environment"[J]. *Environ Sci Technol*, 2006, **40**: 1084-1085.
- [2] Sumpter J P. Endocrine disrupters in the aquatic environment: An overview[J]. *Acta Hydrochimica Et Hydrobiologica*, 2005, **33**: 9-16.
- [3] Sonnenschein C, Soto A M. An updated review of environmental estrogen and androgen mimics and antagonists[J]. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 1998, **65**: 143-150.
- [4] Foster W G. Endocrine Disruption and Human Reproductive Effects: An Overview[J]. *Water Qual Res J Canada*, 2001, **36**: 253-271.
- [5] Hayes T B, Haston K, Tsui M, *et al.* Herbicides: Feminization of male frogs in the wild[J]. *Nature*, 2002, **419**: 895-896.
- [6] Giguere V. To ERR in the estrogen pathway[J]. *Trends Endocrinol Metab*, 2002, **13**: 220-225.
- [7] Tremblay G B, Kunath T, Bergeron D, *et al.* Diethylstilbestrol regulates trophoblast stem cell differentiation as a ligand of orphan nuclear receptor ERR beta[J]. *Genes Dev*, 2001, **15**: 833-838.
- [8] Chao E Y H, Collins J L, Gaillard S, *et al.* Structure-guided synthesis of tamoxifen analogs with improved selectivity for the orphan $ERR\gamma$ [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2006, **16**: 821-824.
- [9] Coward P, Lee D, Hull M V, *et al.* 4-Hydroxytamoxifen binds to and deactivates the estrogen-related receptor gamma[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, **98**: 8880-8884.
- [10] Yang C, Chen S. Two organochlorine pesticides, toxaphene and chlordane, are antagonists for estrogen-related receptor alpha-1 orphan receptor[J]. *Cancer Res*, 1999, **59**: 4519-4524.
- [11] Chen S, Ye J J, Kijima I, *et al.* Positive and negative transcriptional regulation of aromatase expression in human breast cancer tissue[J]. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 2005, **95**: 17-23.
- [12] Seely J, Amigh K S, Suzuki T, *et al.* Transcriptional regulation of dehydroepiandrosterone sulfotransferase (SULT2A1) by estrogen-related receptor alpha[J]. *Endocrinology*, 2005, **146**: 3605-3613.
- [13] Thompson J D, Gibson T J, Plewniak F, *et al.* The CLUSTAL-X windows interface: Flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools[J]. *Nucleic Acids Research*, 1997, **25**: 4876-4882.
- [14] Hall T A. BioEdit: A user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT[J]. *Nucleic Acids Symposia Series*, 1999, **41**: 95-98.
- [15] Zhang Z B, Hu J Y. Development and validation of endogenous reference genes for expression profiling of medaka (*Oryzias latipes*) exposed to endocrine disrupting chemicals by quantitative real-time RT-PCR[J]. *Toxicol Sci*, 2007, **95**: 356-368.
- [16] Tarrant A M, Greytak S R, Callard G V, *et al.* Estrogen receptor-related receptors in the killifish *Fundulus heteroclitus*: diversity, expression, and estrogen responsiveness[J]. *J Mol Endocrinol*, 2006, **37**: 105-120.
- [17] Bardet P L, Obrecht-Pflumio S, Thisse C, *et al.* Cloning and developmental expression of five estrogen-receptor related genes in the zebrafish[J]. *Dev Genes Evol*, 2004, **214**: 240-249.
- [18] Bonnelye E, Vanacker J M, Spruyt N, *et al.* Expression of the estrogen-related receptor 1 ($ERR-1$) orphan receptor during mouse development[J]. *Mech Dev*, 1997, **65**: 71-85.
- [19] Bonnelye E, Vanacker J M, Dittmar T, *et al.* The $ERR-1$ orphan receptor is a transcriptional activator expressed during bone development[J]. *Mol Endocrinol*, 1997, **11**: 905-916.
- [20] Shigeta H, Zuo W, Yang N, *et al.* The mouse estrogen receptor-related orphan receptor alpha 1 molecular cloning and estrogen responsiveness[J]. *J Mol Endocrinol*, 1997, **19**: 299-309.
- [21] Shi H P, Shigeta H, Yang N Y, *et al.* Human estrogen receptor-like 1 (ESRL1) gene: Genomic organization, chromosomal localization, and promoter characterization[J]. *Genomics*, 1997, **44**: 52-60.
- [22] Liu D, Zhang Z, Gladwell W, *et al.* Estrogen stimulates estrogen-related receptor alpha gene expression through conserved hormone response elements[J]. *Endocrinology*, 2003, **144**: 4894-4904.
- [23] Shimasaki Y, Kitano T, Oshima Y, *et al.* Tributyltin causes masculinization in fish[J]. *Environ Toxicol Chem*, 2002, **22**: 141-144.