

雌激素受体亚型介导的荧光素酶报告 基因试验方法的建立及应用*

刘 杨¹, 黄小明^{1,2}, 曲绍娟¹, 黄 洁¹, 刘运夏¹, 钟灵毓¹, 陈 奕¹, 李 云^{1△}

1. 四川大学华西公共卫生学院 营养食品卫生与毒理系(成都 610041);

2. 四川医科大学公共卫生学院 食品卫生与营养系(泸州 646000)

【摘要】 目的 建立人源性雌激素受体(hER α / β)介导的荧光素酶报告基因试验方法,比较不同雌激素受体亚型介导的报告基因试验的反应性和灵敏度,为检测内分泌干扰物拟雌激素活性提供研究工具。**方法** 以恒河猴肾细胞(LLC-MK2)为转染细胞,以萤火虫荧光素酶基因(*Luc*)为报告基因,利用瞬时转染的方法,将表达 hER α /hER β 的质粒与重组 *Luc* 报告基因质粒 pERE-minP-*Luc2P*、内对照质粒 pGL4. 74 共转染 LLC-MK2 细胞,建立由 hER α / β 介导的 *Luc* 报告基因试验方法。以雌二醇(E₂)、己烯雌酚(DES)作为阳性受试物,以 10⁻⁵ mol/L 雌激素拮抗剂(ICI 182,780)和不同浓度的 E₂ 共同染毒,观察 *Luc* 表达的变化。用双酚 A(BPA)和染料木黄酮(GS)对方法的有效性进行检验并比较雌激素受体两亚型反应性、灵敏度和特异性。**结果** hER α 报告基因系统对 E₂ 的最低检测限为 1.9×10⁻¹¹ mol/L,在 10⁻⁸ mol/L 处获得最高诱导倍数,是对照组的 30.7 倍。hER β 报告基因系统对 E₂ 的最低检测限为 2.2×10⁻¹¹ mol/L,在 10⁻⁸ mol/L 处获得最高诱导倍数,是对照组的 14.4 倍。ICI 182,780 在 10⁻⁵ mol/L 浓度下能显著抑制两个报告基因系统 E₂ 的雌激素活性。未转染受体表达载体 hER-pcDNA3.1 的 LLC-MK2 细胞用不同浓度 E₂ 诱导,两个报告基因系统均与 E₂ 无明显反应。BPA 和 GS 在以上两个不同的报告基因系统中均能诱导 *Luc* 表达,但同一受试物在不同雌激素亚型介导的报告基因系统中表达倍数不同。**结论** 本研究建立 ER 不同亚型的报告基因试验有较高的灵敏度和重复性。hER α 介导的报告基因试验灵敏度高于 hER β ,在 hER α 系统中 BPA 雌激素活性强于 GS,在 hER β 系统中 GS 雌激素活性强于 BPA。

【关键词】 内分泌干扰物 雌激素受体 报告基因试验

Estrogen Receptor Subtype-mediated Luciferase Reporter Gene Assays for Determining (anti) Estrogen Effect of Chemicals LIU Yang¹, HUANG Xiao-ming^{1,2}, QU Shao-juan¹, HUANG Jie¹, LIU Yun-xia¹, ZHONG Ling-yu¹, CHEN Yi¹, LI Yun^{1△}. 1. Department of Nutrition and Food Hygiene and Toxicology, West China School of Public Health, Sichuan University, Chengdu 610041, China; 2. Department of Food Hygiene and Nutrition, Public Health of Sichuan Medical University, Luzhou 646000, China

△ Corresponding author, E-mail: liyun_611@163.com

【Abstract】 Objective To establish gene assays for determining (anti) estrogen effect of environmental chemicals; and to compare the reactivity and sensitivity of two assays with different estrogen subtype. **Methods** Human estrogen receptor α (hER α) and hER β mediated reporter gene assays employing firefly luciferase (*Luc*) were developed. The expression plasmid hER α or hER β was constructed and transiently co-transfected into LLC-MK2 cells with pERE-minP-*Luc2P* reporter plasmid and the control plasmid pGL4. 74. Estradiol (E₂) and diethylstilbestrol (DES) served as positive test substances to verify the performance of the assays. The effectiveness of the assays for detecting anti-estrogenic activity was tested using 10⁻⁵ mol/L ICI 182,780 under different concentrations of E₂. The performance of the two subtype-mediated assays was verified and compared using bisphenol A (BPA) and genistein (GS). **Results** The hER α mediated assay found expression of reported gene at 1.9×10⁻¹¹ mol/L E₂; and the largest luciferase activity was shown at 10⁻⁸ mol/L E₂, resulting in 30.7-fold of vehicle control. The hER β mediated assay found expression of reporter gene at 2.2×10⁻¹¹ mol/L E₂, and the largest luciferase activity was shown at 10⁻⁸ mol/L E₂, resulting in 14.4-fold of vehicle control. ICI 182,780 inhibited estrogenic activity of E₂ significantly. In both assays, E₂ failed to induce luciferase activity without hER-pcDNA3.1. BPA and GS induced luciferase activity. **Conclusion** Both assays have high sensitivity and reproducibility for detecting (anti) estrogen effect. The pGL4-based hER β has lower sensitivity than the hER α -mediated reporter gene assay. BPA shows stronger estrogenic activity than GS in hER α mediated reporter gene assay; whereas, GS shows stronger estrogenic activity than BPA in hER β mediated reporter gene assay.

【Key words】 Endocrine disrupting chemicals Estrogen receptor Luciferase report gene assay

内分泌干扰物(endocrine disrupting chemicals, EDCs)是指可干扰生物体内分泌平衡,影响内源激素的产生、分泌、运输代谢及作用,从而影

* 国家自然科学基金(No. 81030053, No. 81072309)资助

△ 通讯作者, E-mail: liyun_611@163.com

响生物体的生长、发育及繁殖的物质。它们并不直接作为有毒物质给生物体带来异常影响,而是对生物体起类似雌激素作用^[1]。雌激素受体(estrogen receptor, ER)介导的报告基因试验正是基于这一机制对外源性化学物的拟雌激素效应进行体外检测。ER 分为 ER α 和 ER β 两种亚型,二者结构相似。Kuiper 等^[2]发现雌激素或抗雌激素物质与 ER α 和 ER β 的亲和力强弱有明显不同。有研究提示同一种化合物可能对雌激素不同亚型产生不同的作用模式^[3]。目前国内外对 ER 亚型介导的荧光素酶报告基因试验研究缺乏^[4],因此在研究 ER 介导的荧光素酶(*Luc*)报告基因试验中,有必要建立针对不同的 ER 亚型的报告基因实验模型。本研究以恒河猴肾细胞(LLC-MK2)为转染细胞,以萤火虫 *Luc* 为报告基因,利用瞬时转染的方法,建立人源性雌激素受体(hER α/β)介导的报告基因试验方法,并观察其特异性和灵敏性;并利用建立的方法评估双酚 A(BPA)、染料木黄酮(GS)的拟雌激素效应,验证雌激素受体介导的报告基因体外筛选系统有效性。

1 材料与方法

1.1 材料、试剂与仪器

LLC-MK2(中国科学院上海生命科学研究院细胞资源中心),pGL4. 27、pGL4. 74(Rluc/TK)和 pGEM-T(Promega 公司),二甲亚砜(DMSO)(Amereso 公司),大肠杆菌 DH5 α (TRANSGEN),BPA、GS(Dr. Ehrenstorfer),E₂、ER 激动剂 DES(Sigma-Aldrich),ER 拮抗剂 ICI 182,780(Tocris)。pEGFP-C1-ER β (ADDGENE),pDONR223-ER α 和 pcDNA3. 1(山东舟山生物公司)。质粒小提中量试剂盒(TIANGEN),X-treme HP(ROCHE),CO₂ 培养箱(THERMO),板式化学发光检测系统(Berthold)。

1.2 LLC-MK2 转染细胞的培养

LLC-MK2 细胞用含酚红的 RPMI-1640 培养基[Gibco, 按体积混合 100 mL/L 的胎牛血清(FBS)],置于 CO₂ 孵箱(37 °C、5% CO₂)中培养。当细胞生长到 80%时,胰酶消化,并用不含酚红的 RPMI-1640 培养基重悬细胞,再接种到培养瓶或者孔板中。

1.3 受试物的细胞毒性试验

采用 MTT 法对受试物的细胞毒性进行验证,并确定受试物的最终染毒浓度。在 T25 的培养瓶

中用 RPMI-1640 培养基和 100 mL/L FBS 培养 LLC-MK2 细胞 24 h,胰酶消化细胞,按每孔 10 000 个细胞移植到 96 孔板中并于 CO₂ 培养箱中孵育 24 h,然后用空白对照(含 1 mL/L DMSO 的培养基)、不同浓度的受试物单独染毒[E₂ 和 DES 设 1 个浓度即 10⁻⁷ mol/L,BPA 和 GS 分别设置 5 个浓度梯度(1 μ mol/L、10 μ mol/L、25 μ mol/L、50 μ mol/L 和 100 μ mol/L)]以及 10⁻¹² mol/L、10⁻¹¹ mol/L、10⁻¹⁰ mol/L、10⁻⁹ mol/L、10⁻⁸ mol/L E₂ 和 10⁻⁵ mol/L ICI 182,780 共同染毒,于 CO₂ 培养箱中孵育 24 h,此后每孔加入 25 μ L MTT(5 mg/mL)并在 37 °C 再培养 4 h,吸尽 MTT 并每孔加入 100 μ L DMSO 室温孵育 30 min,孵育结束后,在 570 nm 处测定吸光度值。

1.4 荧光素酶报告基因试验的建立

1.4.1 报告基因载体的构建 克隆人 hER α/β 的 cDNA 序列,将其插入真核表达载体 pcDNA3. 1 中,构建 ER 表达载体;全基因合成 3 $\times$ ERE 序列,将其插入荧光素酶报告基因载体 pGL4. 27 的启动子上游的 *Kpn* I 和 *Xho* I 酶切位点中,成功构建 ERE 调控的报告基因载体 pERE-minP-*Luc2P*。通过采用质粒小提中量试剂盒提取质粒(TIANGEN),并进行 DNA 序列分析。

1.4.2 瞬时转染 LLC-MK2 细胞在 CO₂ 孵箱的培养箱中培养 24 h,然后接种到 48 孔板中,每孔加入 250 μ L 细胞悬液(约 50 000 细胞/孔),培养 12 h。将质粒 15 μ g pERE-minP-*Luc2P*+5 μ g hER α (或 hER β)-pcDNA3. 1 + 1 μ g pGL4. 74 稀释于 1 000 μ L 培养基作为 A 液,将 50 μ L 转染试剂(X-treme HP)加 450 μ L 培养基稀释至 500 μ L 作为 B 液,将 B 液加入 A 液中混匀孵育 20 min,按每孔 30 μ L 将此混合物加入到 48 孔板中,振荡混匀,培养 12 h 后染毒。

1.4.3 受试物染毒及报告基因活性的检测 转染 12 h 后,对于 hER α 系统和 hER β 系统,染毒方案如下:1 mL/L DMSO 作为空白对照,E₂ 和 DES 设置 5 个浓度梯度(10⁻¹² mol/L、10⁻¹¹ mol/L、10⁻¹⁰ mol/L、10⁻⁹ mol/L、10⁻⁸ mol/L),设置 3 个复孔,每孔测试 3 次。用德国 Berthold 板式化学发光检测系统检测荧光素酶活性。待细胞裂解后取上清液,在 I 号进样管中加入 LAR II 以检测 Luc 活性,在 II 号进样管中加入 Stop & Glo 试剂以检测 Rluc 活性,每次检测时间 10 s,间隔 10 s 后再检测 Luc 或 Rluc 并记录荧光素酶读数。

1.4.4 报告基因活性最低检测限(LOD)和重复性的检测 LLC-MK2 细胞转染后以 1 mL/L DMSO 为溶剂对照,E₂ 为阳性对照,计算各处理组的 Luc/Rluc 值,将剂量反应关系进行曲线拟合,获得的 Luc 诱导倍数上升处的拐点值即为 LOD。以 10⁻⁹ mol/L E₂ 进行染毒,在同一板上设置 6 个复孔,测定其 Luc 和 Rluc,和在 3 块不同孔板上测定的诱导倍数。

1.4.5 ER 两种亚型报告基因试验系统对 ER 激动剂 DES、拮抗剂 ICI 182,780 的检测 LLC-MK2 细胞转染后,如果检测 ER 激动剂 DES,加入 250 μL (10⁻¹² mol/L、10⁻¹¹ mol/L、10⁻¹⁰ mol/L、10⁻⁹ mol/L、10⁻⁸ mol/L)5 个浓度梯度受试物的不含酚红的培养基;如果检测 ER 拮抗剂 ICI 182,780,分别加入 2×(10⁻¹² mol/L、10⁻¹¹ mol/L、10⁻¹⁰ mol/L、10⁻⁹ mol/L、10⁻⁸ mol/L)5 个浓度梯度受试物和 2×10⁻⁹ mol/L E₂ 各 125 μL。用德国 Berthold 板式化学发光检测系统检测荧光素酶活性。

1.5 BPA 和 GS 的报告基因活性检测

运用已经建立的 hERα/β 报告基因试验方法,分别对 BPA 和 GS 的雌激素活性进行检测。以 1 mL/L DMSO 培养基溶液为对照,E₂ 作为阳性参照物,浓度设置为 10⁻¹² mol/L、10⁻¹¹ mol/L、10⁻¹⁰ mol/L、10⁻⁹ mol/L、10⁻⁸ mol/L,BPA 和 GS 浓度设置为 10⁻⁸ mol/L、10⁻⁷ mol/L、10⁻⁶ mol/L、10⁻⁵ mol/L、5×10⁻⁵ mol/L 5 个浓度梯度。实验设置 3 个复孔,每孔测试 3 次。用德国 Berthold 板式化学发光检测系统检测荧光素酶活性。

1.6 统计学方法

Luc 诱导活性以诱导倍数表示:荧光素酶活性 (n-fold)=(实验组 Luc 值/实验组 Rluc 值)/(对照组 Luc 值/对照组 Rluc 值),并用 GraphPad Prism 计算受试物雌激素活性的 EC₅₀ (受试物的半数有效浓度)。采用 F 检验比较组间差异,α=0.05。

2 结果

2.1 细胞毒性检测结果

如附表所示,E₂、DES 在试验浓度下均未表现出细胞毒性(所测得的吸光度值与对照组相比,差异无统计学意义,P>0.05);BPA 在最高浓度 100 μmol/L 处测得的吸光度值与对照组相比,差异有统计学意义(P<0.05),有一定的细胞毒性。

2.2 基于 hERα 的报告基因试验系统

2.2.1 LOD 本报告基因试验系统中对 E₂ 的

LOD 值为 1.9×10⁻¹¹ mol/L。

2.2.2 重复性 板内变异系数为 4.2%。在 3 块孔板上测定诱导倍数,其板间变异系数为 9.3%。

附表 MTT 试验检测的受试物细胞毒性(̄x±s)

Table MTT test for detection of cell toxicity (̄x±s)

Chemical	Dose (μmol/L)	Absorbance value
Control		0.19±0.02
E ₂	0.1	0.19±0.04
DES	0.1	0.19±0.02
BPA	1	0.18±0.04
	10	0.18±0.04
	25	0.19±0.03
	50	0.19±0.02
	100	0.12±0.02*
GS	1	0.19±0.02
	10	0.20±0.01
	25	0.19±0.02
	50	0.19±0.02
	100	0.19±0.02
10 μmol/L ICI182,780+E ₂	10 ⁻⁶ △	0.20±0.02
	10 ⁻⁵ △	0.19±0.03
	10 ⁻⁴ △	0.20±0.01
	10 ⁻³ △	0.20±0.02
	10 ⁻² △	0.20±0.02

* P<0.05, vs. control; △ Dose of E₂

2.2.3 hERα 阳性对照 E₂ 对报告基因系统的有效性验证 未转染受体表达质粒 hERα-pcDNA3.1 的 LLC-MK2 细胞,在观察浓度内未见 E₂ 诱导 Luc 表达。而共转染 hERα-pcDNA3.1、pERE-minP-Luc2P 和 pGL4.74 三种质粒后用不同浓度 E₂ 染毒,结果显示 10⁻¹² mol/L 的 E₂ 开始诱导 Luc 的表达,在 10⁻¹¹ mol/L 浓度下所诱导的 Luc 表达与对照组相比差异有统计学意义(P<0.05)。随着染毒浓度的升高,E₂ 所诱导的 Luc 表达也在相应的增加,在 10⁻¹⁰~10⁻⁸ mol/L 浓度下所诱导的 Luc 表达与对照组相比差异有统计学意义(P<0.01)。在 10⁻⁸ mol/L 达到最大值,诱导倍数为溶剂对照的 30.7 倍,其 EC₅₀ 为 3.5×10⁻¹⁰ mol/L。见图 1。

2.3 基于 hERβ 的报告基因试验系统

2.3.1 LOD 本报告基因试验系统中对 E₂ 的 LOD 值为 2.2×10⁻¹¹ mol/L。

2.3.2 重复性 板内变异系数为 6.3%。在 3 块孔板上测定诱导倍数,其板间变异系数为 13.4%。

2.3.3 hERβ 阳性对照 E₂ 对报告基因系统的有效性验证 对未转染受体表达载体 hERβ-pcDNA3.1 的 LLC-MK2 细胞,在观察浓度内未见 E₂ 诱导 Luc 表达。而共转染 hERβ-pcDNA3.1、pERE-minP-

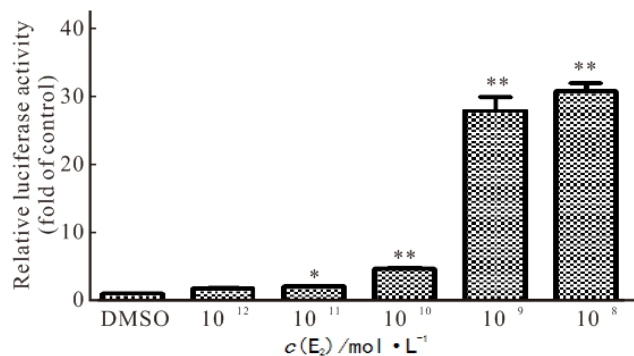


图 1 E_2 对 hER α 介导的报告基因系统 *Luc* 表达的影响

Fig 1 Effects of E_2 on hER α reporter gene luciferase activity

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, vs. DMSO group

Luc2P 和 pGL4.74 三种质粒后用不同浓度 E_2 染毒, 结果显示 10^{-12} mol/L 的 E_2 开始诱导 *Luc* 的表达, 在 10^{-11} mol/L 浓度下所诱导的 *Luc* 表达与对照组相比, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。随着染毒浓度的升高, E_2 所诱导的 *Luc* 表达也在相应的增加, 在 $10^{-10} \sim 10^{-8}$ mol/L 浓度下所诱导的 *Luc* 表达与对照组相比差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。在 10^{-8} mol/L 达到最大值, 诱导倍数为溶剂对照的 14.4 倍, 其 EC_{50} 为 2.6×10^{-10} mol/L。见图 2。

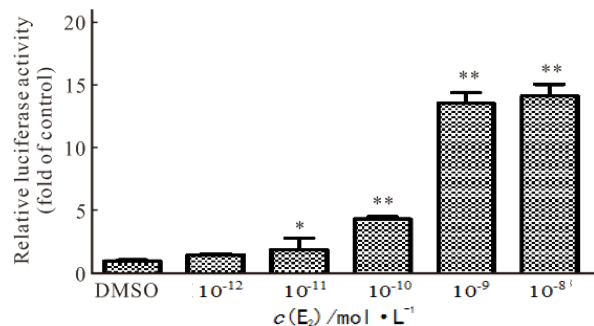


图 2 E_2 对 hER β 介导的报告基因系统 *Luc* 表达的影响

Fig 2 Effects of E_2 on hER β reporter gene luciferase activity

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, vs. DMSO group

2.4 ER 两种亚型报告基因试验系统对 ER 激动剂 DES、拮抗剂 ICI 182,780 的反应

如图 3 所示, 以 hER α 报告基因试验方法检测, DES 从 10^{-11} mol/L 起, 诱导的 *Luc* 表达逐渐增强, 在 10^{-8} mol/L 时的诱导倍数为对照组的 24.1 倍, 其 EC_{50} 为 3.7×10^{-10} mol/L。DES 诱导的 *Luc* 表达低于 E_2 诱导的 *Luc* 表达。已知的 ER 拮抗剂 ICI 182,780 在 10^{-5} mol/L 浓度下能完全抑制不同浓度 E_2 的表达。以 hER β 报告基因试验方法检测, 同浓度的 DES 诱导的 *Luc* 表达倍数低于 E_2 , DES 从 10^{-11} mol/L 起, 诱导的 *Luc* 表达逐渐增强, 在 10^{-8} mol/L 时的诱导倍数为对照组的 24.1 倍, 其

EC_{50} 为 3.6×10^{-10} mol/L; 10^{-5} mol/L 的 ICI 182,780 也能完全抑制不同浓度 E_2 的表达。

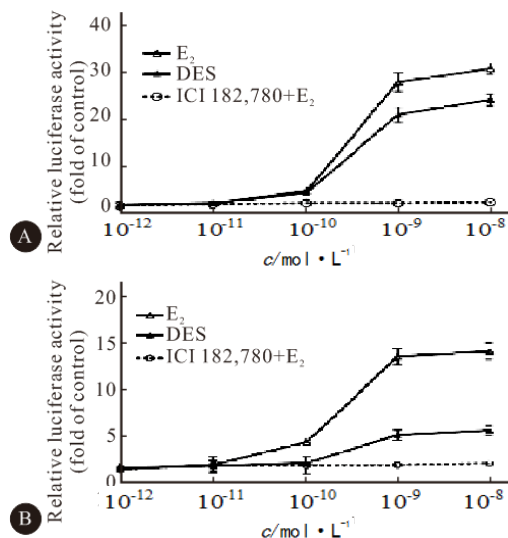


图 3 DES 和 ICI 182,780 对 hER α (A) 和 hER β (B) 报告基因系统 *Luc* 表达的影响

Fig 3 Effects of DES and ICI 182,780 on hER α (A) and hER β (B) reporter gene luciferase activity

2.5 基于 hER α 报告基因试验方法检测 BPA 和 GS 的拟雌激素活性

如图 4 所示, 可见在观察浓度范围内 BPA 和 GS 均可诱导 *Luc* 的表达, 且两种受试物均在浓度为 10^{-7} mol/L 时开始诱导 *Luc* 表达, 而在浓度为 5×10^{-5} mol/L (即 $10^{-4.3}$ mol/L) 处获得最大诱导倍数, 呈明显的剂量-反应关系。BPA 的雌激素活性强于 GS。

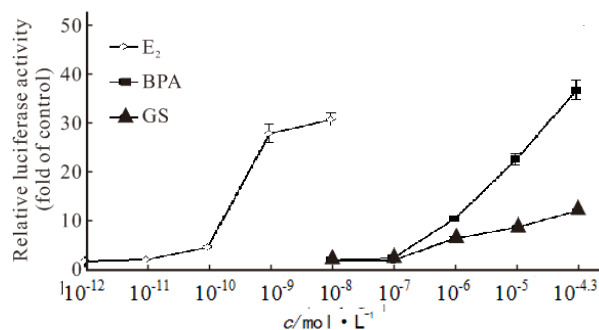


图 4 BPA 和 GS 对 hER α 介导的报告基因系统 *Luc* 表达的影响

Fig 4 Effects of BPA and GS on hER α reporter gene luciferase activity

2.6 基于 hER β 报告基因试验方法检测 BPA 和 GS 的拟雌激素活性

如图 5 所示, 可见在观察浓度范围内 BPA 和 GS 均可诱导 *Luc* 的表达, 在 5×10^{-5} mol/L (即 $10^{-4.3}$ mol/L) 浓度处获得最大诱导倍数, 两种受试

物均在 10^{-7} mol/L 时开始诱导 *Luc* 表达。BPA 的雌激素活性低于 GS。

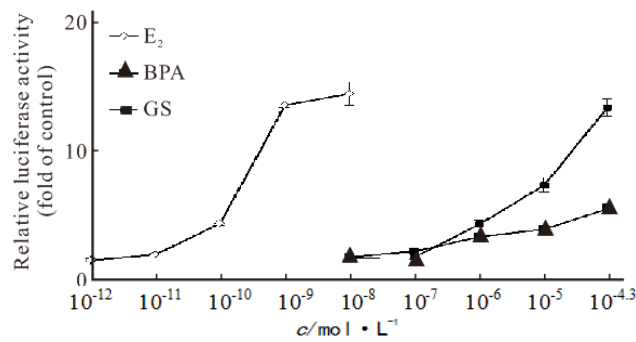


图 5 BPA 和 GS 对 ER β 介导的报告基因系统 *Luc* 表达的影响
Fig 5 Effects of BPA and GS on hER β reporter gene luciferase activity

3 讨论

EDCs 种类繁多,建立快速、灵敏、特异性高的内分泌干扰物筛检方法具有重要意义。简单、灵敏、无损伤性的报告基因试验已经广泛应用于基因表达的调控、受体特性、药物筛选等研究。近年来,基于报告基因的体外细胞检测系统逐渐受到重视,但雌激素受体亚型的报告基因研究较少。本研究建立的 hER α/β 介导的荧光素酶报告基因试验具有极高的灵敏度, 2.2×10^{-11} mol/L E₂ 即可诱导报告基因 *Luc* 的表达,在 10^{-9} mol/L 时进入高水平表达平台期,高于 Kojima 等^[5] 通过中国仓鼠卵巢细胞建立的 hER α 介导的受体报告基因试验的最低检测限 (2.72×10^{-10} mol/L)。这可能是由于以往的荧光素酶报告基因试验中广泛采用的是 pGL3 系列报告基因载体,本试验采用的是近几年发展起来的 pGL4 系列报告基因载体,其荧光素酶报告基因 *Luc* 通过改造和编码优化,提高在哺乳动物细胞中的表达效率,提高了反应的灵敏度。另外,转染细胞选择的是 ER 阴性的哺乳动物细胞 LLC-MK2,在受体表达基因和报告基因共转染后,仅有单一受体表达,排除了其它受体可能存在的交叉反应^[6],更有利于报告基因的表达。同时瞬时转染方法的应用,灵敏度较高,更好的控制变异,提高实验的重复性。

本研究 hER β 介导的报告基因试验系统中, E₂ 可诱导 14.4 倍于溶剂对照组的 *Luc* 表达,明显低于 hER α 报告基因系统。应用本试验建立的报告基因系统检测 BPA 和 GS, hER α 系统中, BPA 最大可诱导 36.7 倍于溶剂对照组的 *Luc* 表达,高于 GS 的 11.9 倍; hER β 系统中, BPA 最大可诱导 5.5 倍于溶剂对照组的 *Luc* 表达,低于 GS 的 13.3 倍。可能原因是雌激素受体两亚型有类似的雌激素反应元件 (ERE),有利于辅助激活因子的募集和转录输出,但

在羟基末端配体结合域以及氨基末端反式激活域有一定程度的差别,因此造成了受试物对不同的雌激素受体亚型有不同的结合力和诱导作用。本研究结果与 Frigo^[7], 关于 BPA 的雌激素干扰效应有赖于两种雌激素受体以及细胞的类型的观点相符合。另外,在 hER α 报告基因系统中, BPA 在最高观察浓度时的诱导倍数超过 E₂, 且达到 E₂ 最高诱导倍数 (10^{-8} mol/L) 的 120%, 出现了明显的“超限”现象。Sun 等^[8] 也曾观察到 BPA 在 10^{-5} mol/L 以下就出现了“超限”。究其原因可能是, BPA 与人源性 ER α 受体有别于 E₂ 的经典信号传递途径和非经典传递途径以外的其他信号传递方式,这方面的机制研究仍不完全,有待进一步的研究。

本研究通过建立雌激素受体 hER α/β 介导的荧光素酶报告基因试验,并用于检测 BPA 和 GS 的拟雌激素活性,比较了外源化合物对这两种亚型介导的报告基因试验的灵敏度。但是本研究只将建立的报告基因试验系统用于标准物质的内分泌干扰活性检测,尚未用于检测分离纯化后的食物样品和水样的内分泌干扰活性,结果存在一定的局限性,需要进一步实验研究。本研究验证了 pGL4 系列报告基因受体的灵敏度,用于筛选 EDCs 并进一步研究外源性化学物质对雌激素受体不同亚型的干扰作用,同时对外源性化合物的拟雌激素活性大小的检测提供了可靠的途径。

参 考 文 献

- 1 Changa HS, Chooa KH, Lee B, *et al.* The methods of identification, analysis, and removal of endocrine disrupting compounds (EDCs) in water. *J Hazrd Mater*, 2009; 172(1): 1-12.
- 2 Kuiper GG, Enmark E, Pelto-Huikko M, *et al.* Cloning of a novel receptor expressed in rat prostate and ovary. *Proc Nat Acad Sci U S A*, 1996; 93(12): 5925-5930.
- 3 Gaido KW, Leonard LS, Maness SC, *et al.* Differential interaction of the methoxychlor metabolite 2, 2-bis-(p-hydroxyphenyl)-1, 1, 1-trichloroethane with estrogen receptors alpha and beta. *Endocrinology*, 1999; 140(12): 5746-5753.
- 4 卢安根, 黄志标, 杜寒春等. 基于荧光素酶报告基因 HeLa 细胞雌激素检测方法的建立及其在水产品检测中的应用. *分析测试学报*, 2012; 31(11): 1455-1459.
- 5 Kojima H, Katsura E, Takeuchi S, *et al.* Screening for estrogen and androgen receptor activities in 200 pesticides by in citron reporter gene assays using chinese hamster ovary cells. *Environ Health Perspect*, 2004; 112(5): 524-531.
- 6 Taoda N, Shinji E, Nishii K, *et al.* Fucoidan inhibits parainfluenza virus type 2 infection to LLCMK2 cells. *Biomed Res*, 2008; 29(6): 331-334.
- 7 Frigo DE, Burow ME, Mitchell KA, *et al.* DDT and its metabolites alter gene expression in human uterine cell lines through estrogen receptor-independent mechanisms. *Environ Health Perspect*, 2002; 110(12): 1239-1245.
- 8 Sun H, Xu XL, Qu JH, *et al.* 4-Alkylphenols and related chemicals show similar effect on the function of human and rat estrogen receptor α in reporter gene assay. *Chemosphere*, 2008; 71(3): 582-588.