

# 甲状腺激素受体介导的荧光素酶报告基因 试验筛查内分泌干扰化学物质\*

王丹<sup>1</sup>, 陆葵青<sup>1</sup>, 包骥林<sup>1</sup>, 胡景清<sup>1</sup>, 宋杰<sup>1,2</sup>, 周明明<sup>1</sup>,  
周林桦<sup>1</sup>, 单靖焱<sup>1</sup>, 曾香<sup>1</sup>, 李云<sup>1△</sup>

1. 四川大学华西公共卫生学院 营养食品卫生与毒理学系(成都 610041); 2. 四川大学华西第二医院 临床营养科(成都 610041)

**【摘要】** 目的 采用人源性甲状腺激素受体(TR $\alpha/\beta$ )的荧光素酶报告基因试验系统筛查内分泌干扰化学物质(EDCs), 评估双酚 A(BPA)、甲萘威和 1-萘酚(1-NAP)的拟/抗甲状腺激素活性。方法 以恒河猴肾细胞(LLC-MK2)作为转染细胞, 通过瞬时转染的方法分别构建基于 pGL3-promega 和 pGL4. 27 的 TR $\alpha/\beta$  的报告基因试验。用三碘甲状腺氨酸(T3)、甲状腺氨酸(T4)作为阳性受试物评价两个检测系统的灵敏性, 并检测 BPA、甲萘威和 1-NAP 的拟/抗甲状腺激素活性。结果 基于 pGL3-promega 的 TR $\beta$  的报告基因试验, T3 的最低检测限为  $1.216 \times 10^{-11}$  mol/L, 在  $7.482 \times 10^{-6}$  mol/L 时诱导荧光素酶(Luc)的表达倍数是对照组的 5.98 倍, 半数有效浓度(EC<sub>50</sub>)为  $3.327 \times 10^{-8}$  mol/L; T4 最低检测限为  $1.622 \times 10^{-8}$  mol/L, 最大诱导 Luc 表达的倍数为 3.4 倍, EC<sub>50</sub> 为  $2.213 \times 10^{-7}$  mol/L。基于 pGL4. 27 的 TR $\beta$  的报告基因试验中, T3 的最低检测限为  $9.863 \times 10^{-12}$  mol/L, 在  $1.671 \times 10^{-6}$  mol/L 时产生最大诱导 Luc 表达的倍数为对照组的 8.57 倍, EC<sub>50</sub> 为  $3.327 \times 10^{-8}$  mol/L; T4 最低检测限为  $1.349 \times 10^{-9}$  mol/L, 最大诱导 Luc 表达的倍数是 4.6 倍, EC<sub>50</sub> 为  $4.074 \times 10^{-7}$  mol/L。用 TR $\beta$  的报告基因试验系统评价 BPA、甲萘威和 1-NAP 都无甲状腺受体激动剂活性, 甲萘威和 1-NAP 有一定受体拮抗性。结论 本研究建立的基于 pGL3-promega 和 pGL4. 27 的 TR $\beta$  的报告基因试验都有较高的灵敏性, pGL4. 27 相对更高, 可以用来筛查内分泌干扰化学物质, 检测化学物质的拟/抗甲状腺激素活性。

**【关键词】** 甲状腺激素受体 内分泌干扰化学物质 受体报告基因试验 荧光素酶报告基因

**The Thyroid Hormone Receptor Mediated Luciferase Reporter Gene Assays Screening for EDCs** WAND Dan<sup>1</sup>, LU Kui-qing<sup>1</sup>, BAO Qi-lin<sup>1</sup>, HU Jing-qing<sup>1</sup>, SONG Jie<sup>1,2</sup>, ZHOU Ming-ming<sup>1</sup>, ZHOU Lin-hua<sup>1</sup>, SHAN Jing-yan<sup>1</sup>, ZENG Xiang<sup>1</sup>, LI Yun<sup>1△</sup>. 1. Department of Nutrition Food Hygiene and Toxicology, West China School of Public Health, Sichuan University, Chengdu 610041, China; 2. Department of Clinical Nutrition, West China Second University Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, China

△ Corresponding author, E-mail: liyun\_611@163.com

**【Abstract】 Objective** This study in order to use report gene assay based on the thyroid hormone receptor (TR)  $\alpha/\beta$  from human origin for screening endocrine disruptors chemicals (EDCs), evaluating the thyroid hormone activity of Bisphenol (BPA), 1-Naphthaleny methyl carbamate and 1-naphthol (1-NAP). **Methods** Using Rhesus monkey kidney cells (LLC-MK2) as transfection cell to establish the gene report assay system based on pGL3-promega and pGL4. 27 of TR $\alpha/\beta$  through the method of transient transfection. Using T3 and T4 as positive subjects to evaluation the effectiveness of two detection systems and detect the thyroid hormone activity of BPA, 1-Naphthaleny methyl carbamate, 1-NAP. **Results** The TR $\beta$  LLC-MK2 report gene assay based on pGL3-promega, the minimum detectable limit of T3 is  $1.216 \times 10^{-11}$  mol/L, the largest induction multiple was shown at  $7.482 \times 10^{-6}$  mol/L, the expression multiple of induced Luciferase was 5.98-fold that of the vehicle control, the EC<sub>50</sub> was  $3.327 \times 10^{-8}$  mol/L; The minimum detectable limit of T4 was  $1.622 \times 10^{-8}$  mol/L, the largest induction Luc expression was 3.4-fold of vehicle control, the EC<sub>50</sub> was  $2.213 \times 10^{-7}$  mol/L. The TR $\beta$  LLC-MK2 report gene assay based on pGL4. 27, the minimum detectable limit of T3 was  $9.863 \times 10^{-12}$  mol/L, the largest induction Luc expression as shown at  $1.671 \times 10^{-6}$  mol/L, resulting in 8.57-fold of vehicle control, the EC<sub>50</sub> is  $3.327 \times 10^{-8}$  mol/L. The minimum detectable limit of T4 was  $1.349 \times 10^{-9}$  mol/L, the largest induction Luc expression was 4.6-fold of vehicle control, the EC<sub>50</sub> is  $4.074 \times 10^{-7}$  mol/L. There was no thyroid hormone activity by using TR $\beta$  report gene assay to evaluate BPA, 1-Naphthaleny methyl carbamate or 1-NAP, but 1-Naphthaleny methyl carbamate and 1-NAP have some degree receptor antagonism. **Conclusion** The TR $\beta$  LLC-MK2 report gene assay based on pGL3-

\* 国家自然科学基金(No. 81030053)资助

△ 通信作者, E-mail: liyun\_611@163.com

promega and pGL4. 27 show highly sensitive (pGL4. 27 relatively higher), can be used to screen for EDCs and test chemical thyroid hormone activity effectively.

**【Key words】** Thyroid hormone receptors Endocrine disrupting chemicals Receptor reporter gene assay Luciferase report gene

内分泌干扰化学物(EDCs)是一种外源性干扰内分泌系统的化学物质,在环境中天然存在或由环境污染造成,可模拟生物体内激素的生理、生化作用,从而干扰生物体内分泌系统功能,如KRONBORG等<sup>[1]</sup>研究显示EDCs能够影响甲状腺功能,因此,建立一种快速、灵敏、高特异度筛查EDCs的方法非常重要。

受体介导是EDCs干扰内分泌系统的主要作用机制。甲状腺激素(TH)进入细胞核内与甲状腺激素受体(TR)相结合,解除TR对TH反应元件(TRE)的转录抑制作用,诱导靶基因转录而发挥作用<sup>[2]</sup>。因此,EDCs可能通过与TR结合干扰TH的生理作用。核受体介导的信号转导机制是受体报告基因试验方法的技术基础,此方法能够检测化学物与受体的结合能力,还可以检测结合后引起的生物学效应<sup>[3]</sup>。报告基因是一种编码易被检测的酶或蛋白的基因,通过检测与目的基因结合后的表达产物来反映目的基因的表达调控<sup>[4]</sup>,是公认的评价化学物对基因表达影响的合适的工具。针对TH在靶位点启动效应基因转录的干扰作用,需要采用TR介导的报告基因试验来研究<sup>[5]</sup>。

本研究采用基于人源性的甲状腺激素受体 $\alpha$ 、 $\beta$ (TR $\alpha$ / $\beta$ )的荧光素酶报告基因试验系统筛查EDCs,建立TR两种不同亚型( $\alpha$ 、 $\beta$ )的报告基因系统,用三碘甲状腺氨酸(T3)、甲状腺氨酸(T4)评估双酚A(BPA)、甲萘威和1-萘酚(1-NAP)的拟/抗甲状腺激素活性。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料、试剂与仪器

恒河猴肾细胞(LLC-MK2,中国科学院上海生命科学研究院细胞资源中心);pGL3-promega、pRL-tk、pGL4. 74、pGL4. 27[luc2P/minP/Hygro1](Promega);pcDNA3. 1(+) $\alpha$ / $\beta$ -TR-pcDNA3. 1(美国Clontech);pTRE-sv40-Luc(上海生工);pTRE-minP-Luc2P(Promega);DH5 $\alpha$ 感受态细胞(北京华越洋生物科技有限公司);RPMI-1640(成都哈里生物);二甲基亚砜(DMSO)(Amresco);质粒小提试剂盒(美国Omega-Bio-Tek);TaqDNA聚合

酶、双荧光素酶报告基因检测系统Dual-Luciferase<sup>®</sup> Reporter Assay System(美国Promega);BPA、甲萘威和1-NAP(德国Dr. Ehrenstorfer);转染试剂X-tremeGENE HP(ROCHE),板式化学发光检测系统(德国Berthold),倒置相差显微镜(德国LEICA),普通PCR仪(美国Bio-Rad),定时定量PCR仪(7900HT)(美国ABI),全自动酶标仪(ELX808)(美国Bio-Tek),-80℃超低温冰箱(中国海尔集团),台式高速微量离心机(美国THERMO),紫外分光光度计(日本SHIMADZU),凝胶成像系统(美国BIO-RAD),电泳仪(美国BIO-RAD),GloMax<sup>®</sup>-Multi+多功能检测仪(美国Promega)。

### 1.2 转染细胞的选择和培养

本研究选择TR阴性的LLC-MK2作为转染细胞。用含酚红的PRMI-1640培养基,加入100 mL/L小牛血清,在37℃、体积分数为5%CO<sub>2</sub>的培养箱中培养。细胞覆盖瓶底80%,胰酶消化和不含酚红的PRMI-1640培养基重悬细胞,按比例接种到96孔板。

### 1.3 受试物的细胞毒性试验

采用MTT法检验受试物的细胞毒性,确定受试物的染毒浓度。将对数期细胞以每孔10 000个接种到96孔板培养24 h,用1 mL/L DMSO无酚红培养基、参照文献<sup>[5-6]</sup>,受试物浓度最大不超过10<sup>-4</sup> mol/L,将受试物(BPA、Carbaryl、1-NAP、T3、T4)浓度定为10<sup>-7</sup>~10<sup>-5</sup> mol/L,单独染毒或与2×10<sup>-7</sup> mol/L T3共同染毒(以0.1% DMSO无酚红培养基为空白对照)。在37℃、体积分数5%CO<sub>2</sub>条件下培养24 h,每孔加入20  $\mu$ L的5 mg/mL MTT避光培养4 h。吸尽孔内液体,加入DMSO 100  $\mu$ L/孔,震动10 min后于570 nm波长处测定吸光度A值。

### 1.4 荧光素酶报告基因试验的建立和检测

**1.4.1 瞬时转染** LLC-MK2细胞培养24 h后,用胰酶消化后制成细胞悬液,接种于96孔板,10 000细胞/孔,100  $\mu$ L/孔,在37℃、体积分数为5%CO<sub>2</sub>培养箱中培养12 h后进行共转染。共转染步骤如下:将5.472  $\mu$ g pTRE-sv40-Luc、2.784  $\mu$ g  $\alpha$ / $\beta$ -TR-

pcDNA3.1 与 1.344  $\mu\text{g}$  pRL-tk 稀释并加入到 900  $\mu\text{L}$  无酚红培养基 (RPMI-1640), 将此作为 A 液, 或将 6.816  $\mu\text{g}$  pTRE-minP-Luc2P/2.304  $\mu\text{g}$   $\alpha/\beta$ -TR-pcDNA3.1 和 0.48  $\mu\text{g}$  pGL4.74 稀释并加入到 900  $\mu\text{L}$  无酚红培养基 (RPMI-1640) 中作为 A 液, 将 30  $\mu\text{L}$  转染试剂 X-tremeGENE HP 加入到 A 液形成的转染复合物室温孵育 15 min, 按每孔 10  $\mu\text{L}$  加入到 96 孔培养板, 震荡混匀, 培养 12 h 后加入受试物 (BPA、Carbaryl、1-NAP、T3、T4) 染毒。

**1.4.2 受试物染毒** 以 0.1% DMSO 作为溶剂对照, 加入 100  $\mu\text{L}$  特定浓度培养基检测 TR 激动剂<sup>[6]</sup>, T3 设置浓度梯度为  $10^{-12} \sim 10^{-5}$  mol/L, T4 为  $10^{-10} \sim 10^{-5}$  mol/L; 加入  $2 \times$  目标浓度受试物 50  $\mu\text{L}$  和 50  $\mu\text{L}$   $2 \times 10^{-7}$  mol/L T3 共同作用检测 TR 拮抗剂 (单独染毒时 T3 在这个浓度下诱导反应最好, 检测拮抗剂的效果比较好, 乘以 2 是为了最终浓度跟单独染毒时一样, 以便对比)。

**1.4.3 荧光素酶报告基因的检测 TR** 用 Dual Luciferase Reporter Assay System 于染毒后 24 h 检测报告基因荧光素酶活性。用磷酸缓冲液 (PBS) 冲洗 2 次, 每孔加入 20  $\mu\text{L}$  PLB, 于室温下孵育

15 min, 将 LARII 加入到 1 号加样器, Stop&Glo<sup>®</sup> 加到 2 号加样器, 板式化学发光检测系统检测荧光素酶 (Luc) 活性。Luc 诱导活性以受试物刺激的 Luc 表达相对于溶剂对照组 Luc 表达的倍数表示。诱导倍数: 荧光素酶报告基因 (n-fold) = (实验组 Luc 值/实验组海贤荧光素酶 RLuc 值)/(对照组 Luc 值/对照组 RLuc 值)。用 Graph PAD 计算受试物 TH 活性的半数有效浓度 ( $EC_{50}$ )。

### 1.5 统计学方法

计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示。采用  $F$  检验比较组间差异,  $\alpha = 0.05$ 。

## 2 结果

### 2.1 受试物的细胞毒性试验结果

见图 1。受试物在所使用的浓度范围内, 不同浓度受试物 (BPA、Carbaryl、1-NAP、T3、T4), 单独染毒或者与  $2 \times 10^{-7}$  mol/L T3 共同染毒均无细胞毒性。因此最高浓度设置在  $10^{-5}$  mol/L, 10 倍浓度间隔, T3 设置浓度梯度为  $10^{-12} \sim 10^{-5}$  mol/L, T4 为  $10^{-10} \sim 10^{-5}$  mol/L。

### 2.2 基于 TR $\alpha$ 的报告基因试验系统

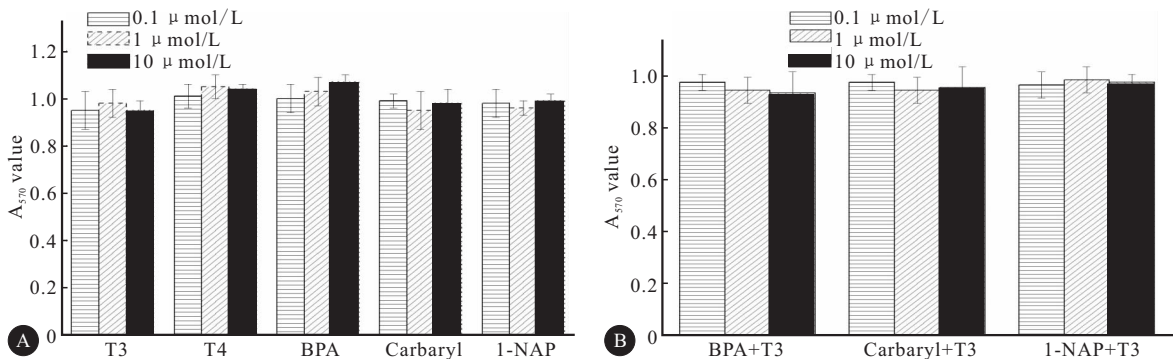


图 1 不同浓度各受试物单独(A)或与  $2 \times 10^{-7}$  mol/L T3 共同染毒(B)的细胞毒性

Fig 1 The cytotoxicity of various subjects at different concentrations

A: Subjects alone; B: Subjects with  $2 \times 10^{-7}$  mol/L T3

**2.2.1 基于 pGL3-promega 报告基因试验系统** 用不同浓度 T3、T4 诱导均未能诱导 Luc 表达 ( $P > 0.05$ )。见图 2。

**2.2.2 基于 pGL4.27 的报告基因试验系统** 用不同浓度 T3、T4 诱导, 结果检测, T3 浓度为  $10^{-9} \sim 10^{-5}$  mol/L、T4 浓度为  $10^{-6} \sim 10^{-5}$  mol/L 时能诱导 Luc 表达, 但结果没有剂量-效应关系 ( $P > 0.05$ )。见图 3。

### 2.3 基于 TR $\beta$ 的报告基因报告试验系统

#### 2.3.1 基于 pGL3-promega 报告基因试验系统

共转染了 TR $\beta$ -pcDNA3.1、pTRE-sv40-Luc 和 pRL-tk 3 种质粒后, 在 T3 浓度为  $10^{-8} \sim 10^{-5}$  mol/L 时呈明显的剂量反应关系 ( $P < 0.05$ ), T3 的最低检测限为  $1.216 \times 10^{-11}$  mol/L, 产生的最大诱导 Luc 表达倍数是对照组的 5.98 倍,  $EC_{50}$  为  $3.327 \times 10^{-8}$  mol/L, T4 的最大诱导 Luc 表达倍数为对照组的 3.4 倍 ( $P < 0.05$ )。见图 4。

**2.3.2 基于 pGL4.27 的报告基因试验系统** 共转染了 pTRE-minP-Luc2P、TR $\beta$ -pcDNA3.1 和 pGL4.74 建立的 TR $\beta$  检测系统, T3 的最低检测限

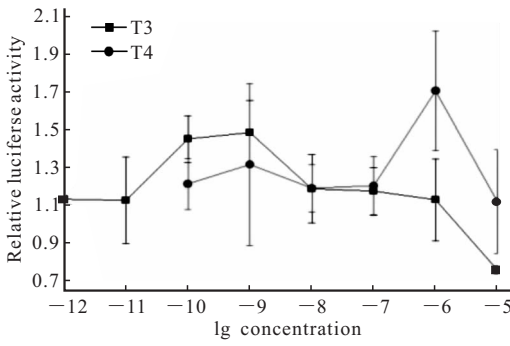


图 2 受试物对 pGL3-promega 报告基因试验的反应

Fig 2 The reaction of subjects to pGL3-promega report gene assay

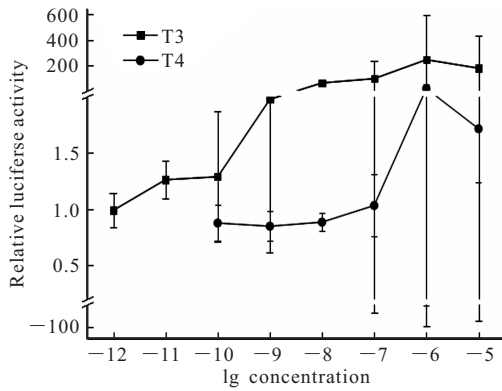


图 3 各受试物对 pGL4.27 报告基因试验的反应

Fig 3 The reaction of subjects to pGL4.27 report gene assay

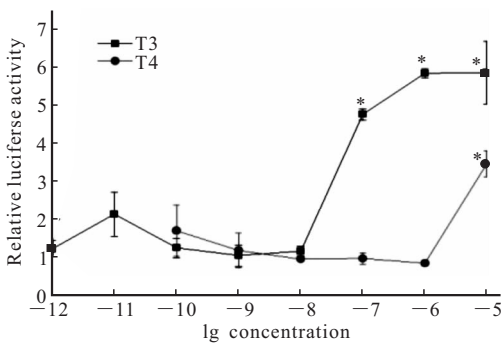


图 4 受试物对 pGL3-promega 报告基因试验的反应

Fig 4 The reaction of subjects to pGL3-promega report gene assay

\* P < 0.05, vs. other concentrations in the same subject

是  $9.863 \times 10^{-12}$  mol/L, 在 T3 浓度为  $1.671 \times 10^{-6}$  mol/L 时, 产生最大的诱导 Luc 表达倍数是对照组的 8.57 倍,  $EC_{50}$  为  $3.327 \times 10^{-8}$  mol/L, T4 的最大诱导 Luc 表达倍数为对照组的 4.6 倍 ( $P < 0.05$ )。见图 5。

### 2.3.3 TR 报告基因试验的应用

**2.3.3.1 基于 pGL3-promega 的 TRβ 报告基因系统** 用于检测 BPA、甲萘威、1-NAP 的拟甲状腺激

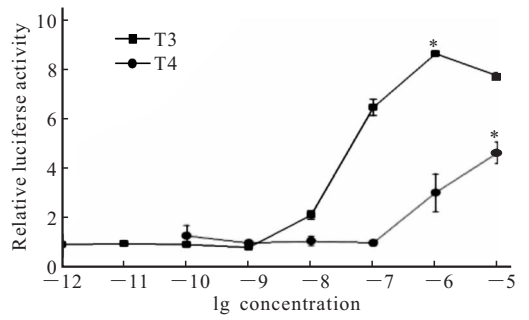


图 5 各受试物对 pGL4.27 的 TRβ 报告基因试验的反应

Fig 5 The reaction of subjects to pGL4.27 TRβ report gene assay

\* P < 0.05, vs. other concentrations in the same subject

素活性时, 单独染毒 3 个浓度 ( $5 \mu\text{mol/L}$ 、 $10 \mu\text{mol/L}$ 、 $50 \mu\text{mol/L}$ ) 均没有明显的诱导 Luc 表达。与  $2 \times 10^{-7}$  mol/L 的 T3 共同染毒时, 甲萘威 3 个浓度均可不同程度的抑制  $2 \times 10^{-7}$  mol/L T3 诱导报告基因 Luc 表达, 结果显示, 在  $5 \mu\text{mol/L}$  时所诱导的 Luc 表达与对照组相比差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ),  $10 \mu\text{mol/L}$  和  $50 \mu\text{mol/L}$  所诱导的 Luc 表达与处理组比较差异有统计学意义 ( $P < 0.01$ )。1-NAP 在  $10 \mu\text{mol/L}$  和  $50 \mu\text{mol/L}$  时可以抑制相同浓度的 T3 诱导的报告基因试验, 差异有统计学意义 ( $P < 0.01$ )。见图 6。

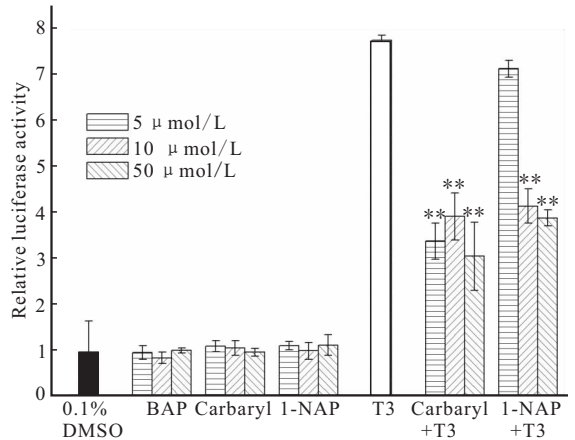


图 6 化学物对基于 pGL3-promega 的 TRβ 的报告基因试验的反应

Fig 6 The reaction of chemicals to pGL3-promega TRβ report gene assay

\* P < 0.05, \* \* P < 0.01, vs. T3 group. T3 was  $2 \times 10^{-7}$  mol/L in alone and combine groups

**2.3.3.2 基于 pGL4.27 的 TRβ 报告基因系统的应用** 见图 7。BPA、甲萘威和 1-NAP 单独染毒时,  $5 \mu\text{mol/L}$ 、 $10 \mu\text{mol/L}$ 、 $50 \mu\text{mol/L}$  3 个浓度都没有明显的诱导 Luc 表达。与  $2 \times 10^{-7}$  mol/L 的 T3 共同染毒时甲萘威在 3 个浓度都可抑制  $2 \times$

$10^{-7}$  mol/L T3 诱导的报告基因表达, 差异具有统计学意义 ( $P < 0.01$ )。1-NAP 在  $10 \mu\text{mol/L}$  和  $50 \mu\text{mol/L}$  时可诱导相同浓度的 T3 诱导的报告基因表达, 差异具有统计学意义 ( $P < 0.01$ )。

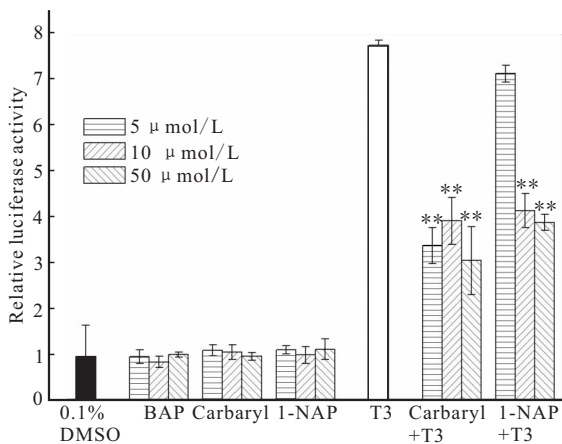


图7 化学物对基于 pGL4.27 的 TR $\beta$  的报告基因试验的反应

Fig 7 The reaction of chemicals to pGL4.27 TR $\beta$  report gene assay

\*\*  $P < 0.01$ , vs. T3 group. T3 was  $2 \times 10^{-7}$  mol/L in alone and combine groups

### 3 讨论

本研究建立一种基于人源性 TR $\alpha/\beta$  的报告基因试验系统来筛查 EDCs, 用 T3、T4 检测该系统的有效性并评估 BPA、甲萘威和 1-NAP 的甲状腺激素活性。目前常用的报告基因有氯霉素乙酰转移酶 (CAT)、 $\beta$ -半乳糖苷酶基因 ( $\beta$ -Gal)、荧光蛋白基因、荧光素酶基因等<sup>[7]</sup>。由于荧光素酶报告基因灵敏度更高, 线性范围很宽而得到广泛应用<sup>[8]</sup>。激素受体介导的转录激活是检测化学物潜在的内分泌干扰的机制<sup>[9]</sup>。因 TR 阳性细胞受体间可能互相干扰, 所以选择 TR 受体阴性细胞 LLC-MK2 作为转染细胞<sup>[10-12]</sup>。

以 T3、T4 为阳性受试物建立的 TR $\alpha$  报告基因系统中, 建立的基于 pGL3-promega 报告基因试验无明显诱导 Luc 表达, 基于 pGL4.27 的报告基因试验中 T3 的诱导倍数高于对照组, 但无剂量-效应关系, 诱导倍数低于 TR $\beta$  报告基因试验系统, 可能原因是 T3 对甲状腺激素的两种亚型亲和力不同有关, 与 OKA 等<sup>[13]</sup> 的结论一致。BALL 等<sup>[14]</sup> 研究显示了在体外翻译结合试验中, TR $\beta$  对 THs 的反应比 TR $\alpha$  更敏感。无论是基于 pGL3-promega 系列载体还是 pGL4.27 系列载体的 TR $\beta$  报告基因系统, 对 T3 都有较高的诱导, 呈明显的剂量-效应关系, 说明该方法有较高的灵敏度, 且 pGL4.27 比 pGL3-promega 灵敏度更高, 与刘峰等<sup>[6]</sup> 认为 pGL-4 系列载体构建的报告基因实验系统比 pGL-3 的灵敏度更高、诱导倍数更高的结论一

致。T3 的最大诱导倍数都大于 T4, 这与 TOGASHI 等<sup>[15]</sup> 认为 T3 与 TR 的亲和力比 T4 高 10~15 倍的结论一致。在 TR $\beta$  报告基因试验中: 只转染了 pTRE-sv40-Luc 和 pRL-tk 或只转染了 pTRE-minP-Luc2P 和 pGL4.74 的 LLC-MK2 细胞用 T3 诱导未测到有效 Luc 值, 说明该方法有较高特异性。用基于 pGL3-promega 和基于 pGL4.27 的 TR $\beta$  检测系统分别检测 BPA、甲萘威、1-NAP 的拟甲状腺激素活性, 单独染毒时, 3 个浓度均没有明显诱导 Luc 表达, 说明这 3 种物质都没有拟甲状腺激素活性, 这之前研究表明环境化学物中很少有 TR 激活性的结论一致<sup>[16]</sup>; 与  $2 \times 10^{-7}$  mol/L 的 T3 共同染毒时, 基于 pGL3-promega 和基于 pGL4.27 的 TR $\beta$  检测系统在甲萘威均可以不同程度抑制  $2 \times 10^{-7}$  mol/L T3 诱导的报告基因表达, 1-NAP 在  $10 \mu\text{mol/L}$  和  $50 \mu\text{mol/L}$  时可以抑制相同浓度的 T3 诱导的报告基因试验, 说明甲萘威、1-NAP 有一定受体拮抗剂性质。据文献显示, BPA 在  $10^{-5} \sim 10^{-4}$  mol/L 浓度时会抑制 T3 诱导的蛙变态退尾<sup>[17]</sup>, 在哺乳动物双杂交系统中, BPA ( $10^{-5}$  mol/L) 结合核受体转录抑制因子 N-CoR 到 TR, 从而抑制 T3 活性<sup>[18]</sup>。以上两个研究结果对于 TR 介导的信号转导机制均是抑制作用, 没有激动剂性质, 因 BPA 能抑制 T3 活性, 常将其作为阳性的拮抗剂参照。1-NAP 在我们的研究中表现出拮抗 TH 的活性比甲萘威稍弱, 但是没有显著性差别, 说明代谢可能不能削弱甲萘威对 TH 的干扰活性, 这与孙宏等<sup>[5]</sup> 的研究结果一致。

本试验建立的基于人源性的 TR $\beta$  报告基因试验有较高灵敏度和特异性, 特别是 pGL4.27 报告基因试验。可以用来初步筛查 EDCs, 评估外源化学物的拟/抗甲状腺激素活性。本荧光素酶报告基因试验不能很好检测外源化学物基于 TR $\alpha$  的甲状腺激素活性, 还需对试验进一步完善。

### 参 考 文 献

- [1] KRONBORG TM, HANSEN JF, RASMUSSEN ÅK, *et al.* The flame retardant DE-71 (a mixture of polybrominated diphenyl ethers) inhibits human differentiated thyroid cell function *in vitro*. Plos One, 2017, 12(6): e0179858 [2017-09-16]. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0179858>.
- [2] YEN P, ANDO S, FENG X, *et al.* Thyroid hormone action at the cellular, genomic and target gene levels. Mol Cell Endocrinol, 2006, 246(1/2): 121-127.
- [3] 钟恩惠, 王艺磊, 王淑红. 受体报告基因实验及其在维甲酸和维甲酸 X 受体干扰物监测中的应用. 生态毒理学报, 2014, 9(2): 319-328. (下转第 909 页)

- blind randomised controlled trial of folate treatment before conception to prevent recurrence of neural-tube defects. *Brit Med J*, 1981, 282(6275): 1509-1511.
- [8] RAH H, JEON YJ, CHOI Y, *et al.* Association of methylenetetrahydrofolate reductase (*MTHFR* 677C/T) and thymidylate synthase (*TSE*R and *TS* 1494 del6) polymorphisms with premature ovarian failure in Korean women. *Menopause*, 2012, 19(11): 1260-1266.
- [9] CHOI SW, MASON JB. Folate and carcinogenesis; an integrated scheme. *J Nutr*, 2000, 130(2): 129-132.
- [10] FERRARINI E, RUSSO L, FRUZZETTI F, *et al.* Clinical characteristics and genetic analysis in women with premature ovarian insufficiency. *Maturitas*, 2013, 74(1): 61-67.
- [11] GUÉANT-RODRIGUEZ RM, GUEANT JL, DEBARDR, *et al.* Prevalence of methylenetetrahydrofolate reductase 677T and 1298C alleles and folate status: a comparative study in Mexican, West African, and European populations. *Am J Clin Nutr*, 2006, 83(3): 701-707.
- [12] GULHAN I, BOZKAYA G, BILGIR F, *et al.* Serum homocysteine and asymmetric dimethylarginine levels in patients with premature ovarian failure: a prospective controlled study. *Gynecol Endocrinol*, 2011, 27(8): 568-571.
- [13] SHAHZAD K, HAI A, Ahmed A, *et al.* A Structured-based model for the decreased activity of Ala222Val and Glu429Ala methylenetetrahydrofolate reductase (*MTHFR*) mutants. *Bioinformatics*, 2013, 9(18): 929-936.
- [14] BOTTO LD, YANG Q. 5, 10-Methylenetetrahydrofolate reductase gene variants and congenital anomalies: a HuGE review. *Am J Epidemiol*, 2000, 151(9): 862-77.
- [15] OGINO S, WILSON RB. Genotype and haplotype distributions of *MTHFR*677C > T and 1298A > C single nucleotide polymorphisms; a meta-analysis. *J Hum Genet*, 2003, 48(1): 1-7.
- (2018-04-26 收稿, 2018-07-23 修回)  
编辑 吕熙

(上接第 885 页)

- [4] 薛秀花, 黄晨西. 荧光素酶基因的研究进展. *生物学通报*, 2013, 48(9): 1-4.
- [5] 孙宏. 核受体介导的环境化学物内分泌干扰效应研究. 南京: 南京医科大学, 2008: 78-95 [2017-09-16]. <http://cdmd.cnki.com.cn/Article/CDMD-10312-2008155414.htm>.
- [6] 刘峰, 黄小明, 李云. 基于 pGL\_4 载体的雌激素受体报告基因实验系统的建立与验证. *现代预防医学*, 2017, 44(10): 1846-1850.
- [7] 杨宇, 李江江, 王项, 等. 报告基因及其应用研究进展. *生命科学研究*, 2011, 15(3): 277-282.
- [8] XIE W, SILVERS R, OUELLETTE M, *et al.* A luciferase reporter gene system for high-throughput screening of  $\gamma$ -globin gene activators. *Methods Mol Biol*, 2016, 1439: 207-226 [2017-09-16]. [https://link.springer.com/protocol/10.1007/978-1-4939-3673-1\\_14](https://link.springer.com/protocol/10.1007/978-1-4939-3673-1_14). doi: 10.1007/978-1-4939-3673-1\_14.
- [9] SUN H, SI C, BIAN Q, *et al.* Developing in vitro reporter gene assays to assess the hormone receptor activities of chemicals frequently detected in drinking water. *J Appl Toxicol*, 2012, 32(8): 635-641.
- [10] HU W, LIU H, SUN H, *et al.* Endocrine effects of methoxylated brominated diphenyl ethers in three *in vitro* models. *Mar Pollut Bull*, 2011, 62(11): 2356-2361.
- [11] SHEN O, DU G, SUN H, *et al.* Comparison of *in vitro* hormone activities of selected phthalates using reporter gene assays. *Toxicol Lett*, 2009, 191(1): 9-14.
- [12] 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.
- [13] OKA T, MITSUI-WATANABE N, TATARAZAKO N, *et al.* Establishment of transactivation assay systems using fish, amphibian, reptilian and human thyroid hormone receptors. *J Appl Toxicol*, 2013, 33(9): 991-1000.
- [14] BALL SG, SOKOLOV J, CHIN WW. 3, 5-Diiodo-L-thyronine (T2) has selective thyromimetic effects *in vivo* and *in vitro*. *J Mol Endocrinol*, 1997, 19(2): 137-147.
- [15] TOGASHI M, NGUYEN P, FLETTERICK R, *et al.* Rearrangements in thyroid hormone receptor charge clusters that stabilize bound 3, 5', 5-triiodo-L-thyronine and inhibit homodimer formation. *J Biol Chem*, 2005, 280(27): 25665-25673.
- [16] LI J, MA M, WANG Z. A two-hybrid yeast assay to quantify the effects of xenobiotics on thyroid hormone-mediated gene expression. *Toxicol Lett*, 2008, 176(3): 198-206.
- [17] IWAMURO S, SAKAKIBARA M, TERAOKA M, *et al.* Teratogenic and anti-metamorphic effects of bisphenol A on embryonic and larval *Xenopus laevis*. *Gen Comp Endocrinol*, 2003, 133(2): 189-198.
- [18] MORIYAMA K, TAGAMI T, AKAMIZU T, *et al.* Thyroid hormone action is disrupted by bisphenol A as an antagonist. *J Clin Endocrinol Metab*, 2002, 87(11): 5185-5190.
- (2018-04-26 收稿, 2018-07-02 修回)  
编辑 沈进