文章编号:1000-5404(2010)01-0001-04

论著

基于ERC-PCR的环境内分泌干扰物检测体系研究

谭文婷,罗 霄,晏泽辉,但芸婕,毛 青,邓国宏 (400038 重庆,第三军医大学西南医院全军感染病研究所)

[摘要] **目的** 利用雌激素与雌激素受体α(estrogen receptor α,ERα)间基于配体受体激活效应的生物学原理和探针的定量PCR扩增-实时荧光检测技术,建立痕量环境内分泌干扰物(endocrine disrupting compounds, EDCs)的快速检测体系。**方法** 以2条含雌激素反应元件(estrogen response elements,ERE)并与ERα有高亲和力的DNA序列COX7RP-ERE和VitA2-ERE,作为结合探针,进行ERα体外受体-配体特异结合,形成配体-ERα-DNA探针复合体(ERα-DNA probe complex,ERC),荧光定量检测ERE含量,并考察17β-雌二醇(E_2)、雌酮(E_1)、己烯雌酚(DES)及邻苯二甲酸二甲酯(DMP)的结合情况。**结果** 与VitA2-ERE相比,人源性COX7RP-ERE在ERα体外受体-配体结合过程中具有更好的结合效应;E_1、E_2、DES、DMP 4种雌激素类化合物对COX7RP-ERE的结合存在明显的剂量-效应关系,其对COX7RP-ERE结合效应的半数有效浓度(EC_{50})分别为0.89 nmol/L、19.9 pmol/L、0.79 nmol/L、6.31 pmol/L。**结论** 检测体系中结合探针的结合量存在明显的雌激素剂量依赖性,这种基于ERα激活效应的ERC-PCR定量检测体系可以用于监测化合物和EDCs的类雌激素活性。

[关键词] 内分泌干扰物;雌激素受体;雌激素反应元件;荧光定量PCR
[中图法分类号] R12; R392-33; R977.1 **[文献标志码]** A

ERC-PCR based detection for environmental endocrine-disrupting compounds

Tan Wenting, Luo Xiao, Yan Zehui, Dan Yunjie, Mao Qing, Deng Guohong (Institution of Infectious Diseases, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400038, China)

[Abstract] **Objective** To develop a rapid and high-throughput screening system to detect trace environmental endocrine disrupting compounds (EDCs) *in vitro* based on the estrogen-dependent binding of estrogen receptors α (ERα) with estrogen response element (ERE). **Methods** Two DNA sequences, COX7RP and VitA2 gene promoter which contained ERE and were of high affinity to the ERα, were used as combination probes to measure the estrogenic concentration in the estrogen-dependent ERα-ERE binding process. The combination probe was detected by real-time fluorescent quantitative PCR. Five compounds, 17β-estradiol (E_2), estrone (E_1), diethylstilbestrol (DES) and dimethylphthalate (DMP) at the final concentration of 10^{-14} to 10^{-6} mol/L were detected by the present method. **Results** Compared with the VitA2-ERE, human-derived COX7RP-ERE had a better combination with the probe during estrogen-dependent ERα-ERE binding process *in vitro*. Our present detection system provided sensitive estrogen-dependent dose-response curves for E_1, E_2, DES and DMP, with median effective concentration (EC_{50}) at 0.89 nmol/L, 19.9 pmol/L, 0.79 nmol/L, and 6.31 pmol/L, respectively. **Conclusion** Our detection system based on ERC-PCR strategy is a sensitive, simple, and rapid tool for the detection of EDCs.

[Key words] endocrine disrupting compounds; estrogen receptors α; estrogen response element

Supported by the National High Technology Research and Development Program of China (863 Program, 2006AA06Z421). Corresponding author: Deng Guohong, Tel: 86-23-68754475-8020, E-mail: ghdengsnp@hotmail.com

随着工业污染加剧,环境内分泌干扰物(endocrine disrupting compounds,EDCs)成为继工业革命带来的煤烟污染及汽车工业带来的光化学烟雾污染之后的第3代环境污染物,将对人类健康产生重要影响,如影响乳腺癌的发生[1]。经典雌激素-受体信号转导理论认为,内源性雌激素与雌激素受体α(estrogen receptor α,

[基金项目] 国家高技术研究发展计划(863计划,2006AA06Z421)
[通信作者] 邓国宏,电话:(023)68754475-8020,E-mail:ghdengsnp@hotmail.com

ERα)结合后,受体发生磷酸化及二聚体化并暴露DNA结合区,使特异的DNA序列即雌激素反应元件(estrogen response elements,ERE)与之结合,刺激靶基因转录,表现出各种生理效应[2]。环境雌激素(即EDCs)主要以与内源雌激素类似的形式产生生理效应。

目前,各国多以气相色谱(GC)和气相色谱-质谱联用(GC-MS)法作为检测EDCs的标准方法。但由于EDCs通常以痕量混合物的形式存在,且环境中存在着大量化合物,截至2009年10月17日,在化学文摘社(CAS)登记的化学物达50 659 223种[3],面对如此多的化合物,传统的实验方法已无法满足需求,所以国内外学者致力于探索高通量筛选方法[4-6],但仍存在周期长、检测不稳定等局限。本研究采用对ERα有高亲和力的ERE DNA序列为结合探针,进行ERα体外受体-配体特异结合,荧光定量PCR检测ERE含量的方法,确立了ERC-PCR定量检测体系,用以检测和评估雌激素效应,为环境激素污染的检测和应用提供一种灵敏、快捷、高通量方法。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

17β-雌二醇(17β-estradiol,E_2)、雌酮(estrone,E_1)、己烯雌酚(diethylstilbestrol,DES)、邻苯二甲酸二甲酯(dimethylphthalate,DMP)、ERα、十二烷基硫酸钠(SDS)、鲑鱼精DNA购自美国Sigma公司,Dynal MPC® -S磁力架、羊抗兔IgG包被的Dynalbeads® M-280免疫磁珠购自Invitrogen公司,兔源anti-phospho-ERα (Ser^{167})购自Santa Cruz公司,Tris、EDTA、糖原、牛血清白蛋白(BSA)、蛋白酶K等购自Roche公司,酪蛋白激酶Ⅱ(casein kinase Ⅱ,CKⅡ)购自Calbiochem公司,酪氨酸激酶$p60^{C\text{-}src}$购自Millipore-Upstate公司,Gold *Taq* DNA聚合酶、含有AmpliTaq Gold® DNA Polymerase的荧光定量预混master购自美国ABI公司;其他为国产试剂,购自北京鼎国生物公司。结合缓冲液、洗涤液等的配置参照文献[5,7]进行。

1.2 结合探针筛选和检测探针的设计

参照文献[8],从GenBank中找到40余条含有全臂或半臂ERE的基因,并从中筛选出2条与ERα亲和力高的序列作为结合探针,其中一条为人源性的细胞色素c氧化酶Ⅶa亚单位相关蛋白基因(human cytochrome c oxidase subunit Ⅶa-related protein,COX7RP),另一条为来源于非洲爪蟾的卵黄蛋白原A2基因(xenopus laevis vitellogenin A2,VitA2),均含有全臂ERE核心序列5′-GGTCANNNTGACC-3′(N为任意核苷酸)。取COX7RP基因ERE核心序列共89 bp的核苷酸以及VitA2基因ERE核心序列共105 bp的序列核苷酸进行基因合成,合成由北京奥科生物公司完成,测序验证并测定浓度后,-20 ℃冻存做结合探针用;针对筛选的结合探针,采用ABI Primer Express 2.0软件设计了相应的MGB-TaqMan检测探针和引物,其报告基团为FAM标记的蓝色荧光基团,淬灭基团为不发荧光的MGB基团,由上海基康公司合成。序列见表1。

表1 结合探针及检测探针序列

名称	序列(5′→3′)	长度及T_m值
结合探针		
COX7RP-ERE	GTCTGGCCTGGCGTGGAAGTTTGGTCTGGCTCACTG-CAGAGGTCAAGGTGACCCACGTAGTCACTTGTCTA-AAAGGGATGGTTTGTGTG	89 bp
检测探针及引物		
COX7RP-FP	TGGCCTGGCGTGGAAGT	17 bp, 59.8 ℃
COX7RP-RP	ACAAACCATCCCTTTTAGACAAGTG	25 bp, 58.6 ℃
COX7RP-MGB	FAM-TGGTCTGGCTCACTGC-Q-MGB	16 bp, 69.3 ℃
结合探针		
VitA2-ERE	AATAGTTTTCTGCATAGCCTCTTTGATTAGATTAAC-TGTCCAAAGTCAGGTCACAGTGACCTGATCAAAGT-TAATGTAACCTCAACCTGGACAAAGCTACTAGTT	105 bp
检测探针及引物		
VitA2-FP	CTGCATAGCCTCTTTGATTAGATTAACTGT	30 bp, 57.5 ℃
VitA2-RP	GCTTTGTCCAGGTTGAGGTTACATT	25 bp, 58.9 ℃
VitA2-MGB	FAM-TCACAGTGACCTGATCAAA-Q-MGB	19 bp, 67.6 ℃

下划线为ERE核心序列5′-GGTCANNNTGACC-3′(N为任意核苷酸);FP:正向引物;RP:反向引物;Q:淬灭基团

1.3 ERα体外受体-配体特异结合

用含5 g/L BSA和1 mg/ml鲑鱼精DNA的PBS封闭包被有羊抗兔IgG的免疫磁珠,4 ℃ 30 r/min轻摇12 h,以减少非特异性吸附。用Dynal MPC® -S磁力架收集磁珠,PBS洗涤3次。将1∶300稀释的兔源anti-phospho-ERα (Ser^{167})与封闭后的免疫磁珠于室温轻摇3 h,形成磁珠-二抗-pERα(Ser^{167})固相载体。磁力架收集磁珠固相载体,洗涤3次,备用。终浓度为1 nmo/L的ERα 20 μl与20 μl系列浓度的雌激素(终浓度从1.0×10^{-14}~1.0×10^{-6}mol/L)在结合缓冲液中4 ℃孵育1 h;加入ERα Ser^{167}特异性磷酸化酶CKⅡ mix 20 μl,37 ℃孵育20 min,加1 μl ERα Tyr^{537}特异性磷酸化酶$p60^{C\text{-}src}$(1 U/μl)催化15 min,促进ERα二聚体化和磷酸化,暴露受体DNA结合域,加入5 ng双链DNA结合探针ERE孵育10 min,形成ERC。不加雌激素作空白对照,受试样本均做复孔。将ERC加入已经处理好的磁珠固相载体,室温,30 r/min轻摇1 h,收集磁珠,即得磁珠-E_2-ERα-ERE复合物,洗涤3次,去除游离的ERE DNA。用含1% SDS洗脱液重悬磁珠,65 ℃ 5 min,期间于振荡器上剧烈振荡2次,使结合的ERE DNA充分洗脱。磁力架上收集上清,加入1 μg蛋白酶K,在55 ℃条件下孵育3 h,用酚-氯仿-异戊醇(25∶24∶1)抽提,以糖原为载体,用冰无水乙醇沉淀纯化ERE DNA,自然凉干,用10 μl的TE溶解管底的ERE DNA沉淀,-20 ℃保存备用。

1.4 荧光定量扩增

以纯化后的ERE DNA为模板进行10个循环的普通PCR预扩增,将结合探针适当放大。取1 μl预扩增产物进行荧光定量PCR,20 μl反应体系:20 μmol/L MGB-TaqMan探针0.2 μl、

20 μmol/L 正向引物(FP)和反向引物(RP)各0.4 μl、含有 AmpliTaq Gold® DNA Polymerase 的荧光定量预混 master 10 μl、DNA 模板1 μl、加去离子水至总体积20 μl。扩增条件:95 ℃预变性10 min,95 ℃变性10 s、60 ℃退火延伸1 min 并采集荧光,40 个循环。所采用的荧光定量 PCR 仪为美国 Stratagene 公司的 Mx-3000p,配备的 Mx-3000p 分析软件自行处理相关数据。以扩增中初始循环数(即 Ct 值)反映体系中原始模板的多少,以无雌激素的空白对照为本底,采用 $2^{-\triangle Ct}$ 算法,从而反映体系中雌激素的诱导效应,即 ERE 的相对结合量。相对结合量 = $2^{-\triangle Ct}$,式中 $\triangle Ct = Ct_{样本} - Ct_{空白对照}$。用 SPSS 9.0 统计软件进行剂量效应曲线拟合,并计算半数有效浓度(EC_{50})。

2 结果

2.1 ERα 体外受体-配体结合体系的建立

在结合体系的确立过程中,对各种条件进行了探索和优化,包括 ERα 浓度(探索了 100、50、10、1、0.1 nmol/L 等蛋白浓度)、受体配体结合时间(探索了 3、2、1、0.5 h)、双链 DNA 结合探针的种类和浓度(包括 COX7RP-ERE、VitA2-ERE 2 种结合探针,1 个 ERE 及 2 个 ERE 2 种拷贝,100、50、10、5、1、0.1 ng 6 种浓度)、一抗的选择(ERα 普通单克隆抗体、Ser^{167} 位特异性磷酸化抗体)、结合探针的分离(免疫沉淀法-磁珠法、酶联免疫吸附法-ELISA)、ERα 与一抗结合时间(实验过程中探索过 1、2、6、12 h 以及 37 ℃ 30 min)、洗脱液的选择以及分离的探针是否预扩增及循环次数等,最终确立了本研究 1.3 所述的结合体系。用终浓度 $10^{-13} \sim 10^{-7}$ mol/L 及 $10^{-12} \sim 10^{-6}$ mol/L 的 E_2,分别对非洲爪蟾来源的 VitA2-ERE 和人源性 COX7RP-ERE 进行了实验,以 E_2 浓度的对数为 x 轴,ERE 的相对结合量为 y 轴,结果如图1所示。结果显示,与 VitA2-ERE 相比,人源性 COX7RP-ERE 在 ERα 体外受体-配体结合过程中具有更好的亲和力,后续实验均采用 COX7RP-ERE 作为本检测体系的结合探针。

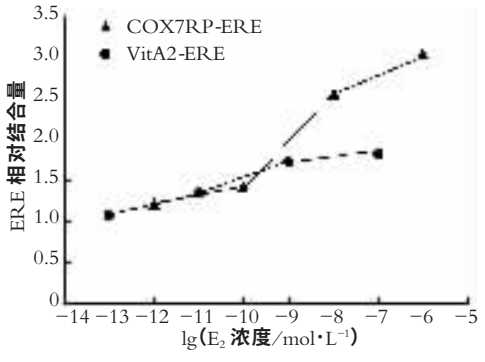


图1 2种来源的结合探针的剂量效应比较

2.2 环境激素类物质在 COX7RP-ERE 体系中的剂量结合效应

用系列浓度的环境激素类物质,包括 E_1、E_2、DES 及 DMP,在 COX7RP-ERE 体系中进行了实验,建立了激素类物质对 ERE 结合效应的剂量-效应曲线,结果显示,E_1、E_2、DES 和 DMP 4 种激素类物质对 ERE 的结合存在明显的剂量-效应关系(图2),4 类物质对 COX7RP-ERE 结合效应的半数有效浓度(EC_{50})分别为 0.89 nmol/L、19.9 pmol/L、0.79 nmol/L、6.31 pmol/L,最低检测限 E_1 和 DMP 可达 1×10^{-13} mol/L,E_2、DES 可达 1×10^{-12} mol/L。

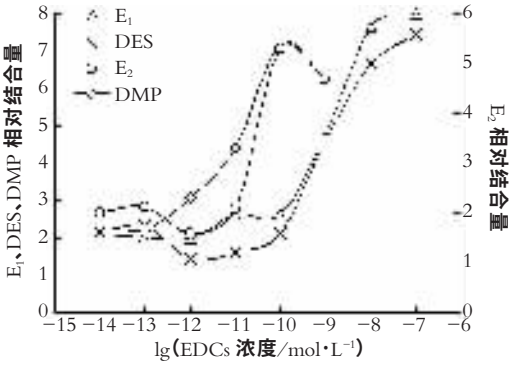


图2 激素类物质对 ERE 结合效应的剂量-效应曲线

3 讨论

EDCs 的监测及可能的生物学效应日益引起各国政府和学者的重视。美国环保局内分泌干扰物筛检测试咨询委员会(endocrine disruptor screening and testing advisory committee, EDSTAC)[9] 将 EDCs 定义为:能改变机体内分泌功能并对机体、后代或(亚)群引起有害效应的环境物质。1998 年,EDSTAC 推出《环境内分泌干扰物筛检程序》[10, 11],提出分层式筛选 EDCs,即分类(sorting)、优先权设定(priority setting)、第1级筛选(T1S)及第2级检测(T2S)4 阶段,其中包括 T1S 阶段的3项体外和5项体内实验以及 T2S 阶段的5项活体动物暴露实验。通过对已有资料和对87 000 种市售常用化学物的筛检研究,2008 年 U. S. EPA 公布确证或怀疑具有内分泌干扰作用的化合物目前共有 73 种[12]。

但是此筛检程序是以牺牲无数受试动物生命为代价,并需要耗费大量的人力物力和时间。而传统的单成分分析方法[13-16],受方法本身的限制,难以满足痕量、高通量的需要,如基于 GC/LC/MS 的传统检测方法,分析手段复杂、操作繁琐、设备昂贵、需要专门高级训练,并且很难达到所有痕量成分的完全解析。此外,全世界每天都在产生 4 000 多种新的化合物,传统的免疫学或生物学标志物检测显得力不从心,虽然免疫学技术检测灵敏度和通量较高,但仅能检测具备特异抗体的部分 EDCs。而传统的受体结合实验因为需要放射性同位素标记而使其应用受到了很大的限制。因此,许多学者致力于探索更快速灵敏的高通量环境激素测评体系,这些尝试包括激素依赖的细胞增殖法、重

组基因酵母测评体系、酵母双杂交体系、阵列玻片筛选技术等。

本研究就是基于建立高通量环境激素测评体系的设想,以含 ERE 并对 ERα 具有高亲和力的 DNA 序列作为结合探针,进行 ERα 体外受体-配体特异结合,荧光定量 PCR 检测 ERE 含量,确立了 ERC-PCR 检测体系,并考察不同 EDCs 的结合效能,结果显示,E_1、E_2、DES 及 DMP 4 种雌激素类物质对 ERE 的结合存在明显的剂量-效应关系。与目前国内外学者的不同测评方法研究结果进行比较,本检测体系有较高的灵敏度、较宽的线性范围和较高的检测效能,对 E_2 和 DMP 的检测可达到 pM 级,与 Pillon 等[7]采用 MELN 细胞系荧光素酶报告基因实验的结果相似(其 E_2 的 EC_{50} = 17.6 pmol/L,线性范围 1×10^{-12} ~ 1×10^{-10} mol/L),高于 Gaido 等[17]的重组酵母测评体系(其 E_2 的 EC_{50} = 225 pmol/L)及李剑等[18]的酵母双杂交体系(其 E_2 的 EC_{50} = 73 pmol/L),略低于 Kim 等[5]的阵列玻片筛选法(其 E_2 最低检测限达 1×10^{-13} mol/L)。而对 DES 和 E_1 的检测效能与 Gaido 等[17]采用酵母检测系统(其 DES 的 EC_{50} = 353 pmol/L,线性范围 1×10^{-10} ~ 1×10^{-9} mol/L),Pillon 等[7]采用荧光素酶报告基因实验(其 E_1 的 EC_{50} = 694 pmol/L,线性范围 1×10^{-10} ~ 1×10^{-9} mol/L)的结果相似。本研究方法也与 Van den Belt 等[19]采用的基于受体配体结合效应的酵母筛选法和基于 MVLN 细胞系筛选法结果相似(其酵母法筛选得到的 E_1、E_2 的 EC_{50} 分别为 390 pmol/L 和 153 pmol/L;其细胞系筛选法得到的 E_1、E_2 的 EC_{50} 分别为 15 pmol/L 和 78 pmol/L)。本检测体系为环境激素污染的检测和应用提供一种了新的思路和参考。

当然,我们目前的体系尚有待改进和优化,克服所有基于受体-配体激活原理的检测体系存在的共同问题,例如拓宽线性检测范围、降低背景结合量、增加特异性结合量、提高检测效能等。同时,发展评估环境复杂样品的雌激素样综合干扰效应和累加毒性当量,也是本研究需要进一步探索的方向。

参考文献:

[1] 彭俊华,糜漫天,朱俊东,等. 辛基酚和三羟异黄酮对二甲基苯蒽诱发大鼠乳腺肿瘤的影响[J]. 第三军医大学学报, 2005, 27(23): 2317 - 2320.

[2] Hall J M, Couse J F, Korach K S. The multifaceted mechanisms of estradiol and estrogen receptor signaling[J]. J Biol Chem, 2001, 276(40): 36869 - 36872.

[3] CAS. The latest CAS registry Number and substance count [EB/OL]. [2009-10-17] http://www.cas.org/cgi-bin/cas/regreport.pl.

[4] Passos A L S, Pinto P I S, Power D M, *et al*. A yeast assay based on the gilthead sea bream (teleost fish) estrogen receptor β for monitoring estrogen mimics[J]. Ecotoxicol Environ Saf, 2009, 72(5): 1529 - 1537.

[5] Kim S B, Ozawa T, Umezawa Y. A screening method for estrogens using an array-type DNA glass slide[J]. Anal Sci, 2003, 19(4): 499 - 504.

[6] Li F, Chen J W, Wang Z J, *et al*. Determination and prediction of xenoestrogens by recombinant yeast-based assay and QSAR[J]. Chemosphere, 2009, 74(9): 1152 - 1157.

[7] Pillon A, Boussioux A M, Escande A, *et al*. Binding of estrogenic compounds to recombinant estrogen receptoR-alpha: application to environmental analysis[J]. Environ Health Perspect, 2005, 113(3): 278 - 284.

[8] Klinge C M. Estrogen receptor interaction with estrogen response elements[J]. Nucleic Acids Res, 2001, 29(14): 2905 - 2919.

[9] U.S. EPA. Endocrine Disruptor Screening and Testing Advisory Committee (EDSTAC). Plenary Meeting. February 3-4, Washington, D.C. Draft Meeting Summary [EB/OL]. [2009-11-10] http://www.epa.gov/oscipoly/scpendo/pubs/edsparchive/sumry2_3.html.

[10] U.S. EPA. Endocrine disruptor screening program. Part Ⅰ: Endocrine disruptor screening program[J]. Fed Reg, 1998, 63: 42852 - 42855.

[11] U.S. EPA. Endocrine disruptor screening program. Part Ⅱ: Statement of policy and priority-setting workshop[J]. Fed Reg, 1998, 63: 71542 - 71568.

[12] U.S. EPA. Contaminant Candidate List 3, Chemicals: Identifying the Universe. EPA 815-R-08-002, Draft, February, 2008 [EB/OL]. [2009-11-10] http://www.epa.gov//safewater/ccl/pdfs/report_ccl3_chemicals_universe.pdf.

[13] Ternes TA, Andersen H, Gilberg D, *et al*. Determination of estrogens in sludge and sediments by liquid extraction and GC/MS/MS[J]. Anal Chem, 2002, 74(14): 3498 - 3504.

[14] 陈旭,朱琳,孙红文. 3 种环境雌激素检测和筛选方法的比较[J]. 安全与环境学报,2004,4(6):33 - 37.

[15] 杜会芳,闫慧芳,李晔,等. 蔬菜中内分泌干扰物 4-壬基酚和双酚 A 的 GC-MS 检测方法研究[J]. 卫生研究,2007,36(3):369 - 371.

[16] 陈于,韩令力,丁莉,等. 职业性内分泌干扰物对女工生殖系统影响的研究[J]. 重庆医科大学学报, 2009, 34(6): 811 - 813.

[17] Gaido K W, Leonard L S, Lovell S, *et al*. Evaluation of chemicals with endocrine modulating activity in a yeast-based steroid hormone receptor gene transcription assay[J]. Toxicol Appl Pharmacol, 1997, 143(1): 205 - 212.

[18] 李剑,马梅,饶凯锋,等. 酵母双杂交技术构建重组人雌激素受体基因酵母[J]. 生态毒理学报, 2008,3(1):21 - 26.

[19] Van den Belt K, Berckmans P, Vangenechten C, *et al*. Comparative study on the *in vitro/in vivo* estrogenic potencies of 17β-estradiol, estrone, 17α-ethynylestradiol and nonylphenol [J]. Aquat Toxicol, 2004, 66(2): 183 - 195.

(**收稿**:2009-10-10;**修回**:2009-11-10)

(编辑 王 红)