

· 论 著 ·

多氯联苯对小鼠雌激素受体 mRNA 表达的影响*

莫晓川¹, 梁小兵^{2△}, 郑娅萍¹, 张凯琳¹

(1. 贵阳医学院生物化学与分子生物学教研室, 贵阳 550004; 2. 中国科学院地球化学研究所环境地球化学国家重点实验室, 贵阳 550002)

摘要:目的 观察不同剂量多氯联苯(PCBs)(Aroclor1254)对小鼠体内雌激素受体 α 、 β (ER α 、 β) mRNA 表达的影响。方法 分别用 20、100、500 $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 3 种不同浓度的 PCBs 对小鼠进行腹腔注射, 连续注射 30 d 后, 采用逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)检测小鼠子宫中 ER α 、 β mRNA 的表达情况。结果 PCBs 对小鼠 ER α 、 β mRNA 的表达均有抑制作用, 且呈剂量依赖性。结论 ER 基因表达的改变可能是 PCBs 实现内分泌干扰作用的机制之一。

关键词:多氯联苯 1254; 雌激素受体 α ; 雌激素受体 β ; 逆转录聚合酶链反应; 小鼠

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2011.36.005

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2011)36-3652-03

Effects of polychlorinated biphenyls on expression of estrogen receptor mRNA in mice*

Mo Xiaochuan¹, Liang Xiaobing^{2△}, Zheng Yaping¹, Zhang Kailing¹

(1. Department of Biochemistry and Molecular Biology, Guiyang Medical University, Guiyang, Guizhou 550004, China;

2. State Key Laboratory of Environmental Geochemistry, Institute of Geochemistry Chinese Academy of Sciences,

Guiyang, Guizhou 550002, China)

Abstract: Objective To observe the effects of different dose of polychlorinated biphenyls(PCBs)(Aroclor1254) on mRNA expression of estrogen receptor(ER) α 、 β (ER α 、 β) in mice. **Methods** Mice were injected intraperitoneally with three different concentrations (20、100、500 $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$) of PCBs, respectively. Reverse transcriptase-polymerase chain reaction(RT-PCR) was used to detect ER α and ER β mRNA expression in mice uterus after 30 days of continuous injection. **Results** The mRNA expression of both ER α and ER β were inhibited by PCBs in a dose-dependent manner. **Conclusion** The change of ER gene expression may be one of the mechanism for PCBs exerting their endocrine-disrupting effect.

Key words: aroclor 1254; estrogen receptor alpha; estrogen receptor beta; reverse transcriptase polymerase chain reaction; mice

多氯联苯(polychlorinated biphenyls, PCBs)是一系列氯代苯环的烃类同系物的总称, 属于持久性有机污染物(persistent organic pollutants, POPs), 可通过内分泌干扰作用引起生殖系统损害, 产生潜在的致癌生物效应^[1-2]。雌激素受体(ER)是雌激素依赖性转录因子, 具有 ER α 和 ER β 两种亚型, 在介导雌激素与靶基因上的雌激素反应元件(estrogen response element, ERE)特异性结合、激活靶基因转录、发挥雌激素的生物学效应中扮演重要角色^[3]。目前, 针对 PCBs 在生殖系统肿瘤中的内分泌干扰作用机制的研究主要集中在 PCBs 诱导下的依赖雌激素的靶细胞增殖、胚胎的植入与分化、子宫增质量以及配体与受体结合等实验^[4-7], 而 PCBs 对 ER 基因表达影响的研究鲜见报道。本研究选择雌激素信号传导中的转录因子 ER α 和 ER β 作为研究 PCBs 内分泌干扰作用的切入点, 通过观察 PCBs 暴露与小鼠体内 ER 转录水平变化的相关性, 探讨 PCBs 在雌激素依赖的内分泌性生殖系统疾病发生中可能的机制。

1 材料与方法

1.1 材料 实验动物: 1⁺月龄昆明种小鼠, 雌性, 体质量 17.3~21.8 g(贵阳医学院动物实验中心提供); 主要试剂: PCBs(Aroclor1254, AccuStandard); Trizol(Invitrogen); TaqDNA 聚合酶(华美); M-Mulv 反转录酶(Promega); DNA Marker(SABC); 引物及内参(上海生工合成), ER α : 上游 5'-GAG AAA GGA AAC ATG ATC ATG GA-3', 下游 5'-TTC ATC ATG CCC ACT TGG TAA C-3'^[8]; ER β : 上游 5'-TTC CCA

GCA GCA CCG GTA ACC-3', 下游 5'-TCC CTC TTG GCG CTT GGA CTA-3'^[9]; β -Actin: 上游 5'-GCC CAG AGC AAG ACA GGT AT-3', 下游 5'-GGC CAT CTC CTG CTC GAA GT-3'^[10]。

1.2 方法

1.2.1 PCBs 稀释液制备 商品用 PCBs(1 mg/mL), 用高压灭菌花生油分别稀释成浓度为 10、50、250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 注射液, 密封, 4℃避光保存备用。

1.2.2 实验动物分组及染毒 将小鼠随机分成对照组、染毒组[低剂量(20 $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$)、中剂量(100 $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$)、高剂量(500 $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$)组], 每组 10 只。各染毒组按每只 0.002 mL $\cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 分别腹腔注射 10、50、250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ PCBs 稀释液, 对照组给予等量灭菌花生油, 连续注射 30 d。

1.2.3 子宫组织总 RNA 提取 参照 Trizol 说明书操作, 将小鼠断颈处死, 立即分离出子宫。按 100 mg 子宫组织加 1 mL Trizol 充分匀浆。加氯仿 200 μL , 混合摇匀 60 s 4℃、16 000 r/min, 离心 15 min。取上清液加异丙醇 500 μL , 混匀, 4℃、16 000 r/min 离心 15 min。留沉淀, 用 1 mL 70% 预冷乙醇振荡洗涤, 4℃、16 000 r/min 离心 15 min。弃上清液, 加 50 μL RNase-free H₂O 溶解备用。

1.2.4 RNA 样品完整性及含量测定 取 5 μL RNA 样品, 于 1% 琼脂糖凝胶(MOPS 液配制)中电泳鉴定完整性。另取 5 μL RNA 样品, 测定 OD₂₆₀/OD₂₈₀ 比值。

* 基金项目: 贵州省科学技术基金资助项目(20033054); 贵州省卫生厅基金资助项目(G2005-4)。△ 通讯作者, Tel: (0851) 5891512; E-mail: liangxiaobing@vip.skleg.cn。

1.2.5 逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR) 取 RNA 样品 3 μg 反转录合成 cDNA(参照 M-Mulv Reverse Transcriptase 说明书操作),进行 PCR 扩增,经过预变性、变性、退火、延伸、再延伸,获得目的基因。PCR 反应体系(总体积 25 μL):dNTP(10 mmol/L)0.5 μL 、10 \times buffer 2.5 μL 、 Mg^{2+} (25 mM) 2 μL 、cDNA($\text{ER}\alpha$ 3.5 μL 、 $\text{ER}\beta$ 4.5 μL)、Taq 酶(3 U/ μL)0.5 μL 、Up primer(10 pmol/ μL) 0.5 μL 、Down primer(10 pmol/ μL) 0.5 μL 、ddH₂O 补足体积。

1.2.6 PCR 产物鉴定 用 1.5% 琼脂糖凝胶(含 EB 0.5 $\mu\text{g/mL}$),按每孔 10 μL PCR 产物加 2 μL 上样缓冲液,200 V 电泳 25 min,在凝胶成像分析系统上分析并记录。检测时以 β -Actin 为内参照,分别计算 $\text{ER}\alpha$ 、 β 基因与 β -Actin 基因扩增条带表达量光密度的比值作为 $\text{ER}\alpha$ 、 β 基因 mRNA 表达的相对水平。 $\text{ER}\alpha$ 扩增产物为 250 bp^[8], $\text{ER}\beta$ 扩增产物为 262 bp^[9], β -Actin 扩增产物为 513 bp^[10]。

1.3 统计学处理 采用 SPSS13.0 统计软件进行数据处理,结果以 $\bar{x}\pm s$ 表示,组间比较采用单因素方差分析,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 总 RNA 样品完整性结果 真核生物 RNA 经甲醛变性凝胶电泳后应出现 3 条区带,即 28S、18S、5S 种 rRNA,且 28S rRNA 的量是 18S rRNA 的 1.5~2.0 倍,5S rRNA 很少或没有。本实验提取的总 RNA 样品经电泳鉴定完整性好(图 1),可用于后续 RT-PCR 扩增反应。

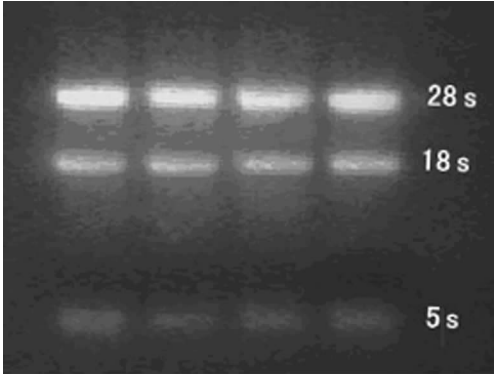
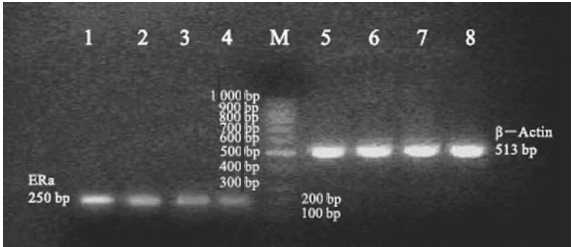


图 1 小鼠子宫总 RNA 提取物完整性鉴定

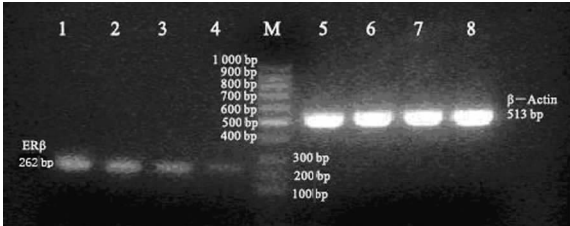
2.2 RNA 样品定量结果 经紫外分光光度计测定 OD260/OD280 值为 1.78~1.84,计算 RNA 浓度为 0.517~1.129 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$,该浓度适于后续 RT-PCR 扩增反应。



1~4:分别为 $\text{ER}\alpha$ 对照组、低剂量组、中剂量组、高剂量组; M:100 bp DNA 标记物;5~8:分别为 β -Actin 对照组、低剂量组、中剂量组、高剂量组。

图 2 小鼠子宫 $\text{ER}\alpha$ RT-PCR 结果

2.3 PCBs 对小鼠子宫 $\text{ER}\alpha$ 、 β mRNA 表达影响的结果 PCBs 对 $\text{ER}\alpha$ 、 β mRNA 表达均有抑制作用,且随着 PCBs 剂量增加, $\text{ER}\alpha$ 、 β mRNA 表达显著降低($P<0.05$),见图 2、3、表 1。



1~4:分别为 $\text{ER}\beta$ 对照组、低剂量组、中剂量组、高剂量组; M:100 bp DNA 标记物;5~8:分别为 β -Actin 对照组、低剂量组、中剂量组、高剂量组。

图 3 小鼠子宫 $\text{ER}\beta$ RT-PCR 结果

组别	PCBs 浓度 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	mRNA 相对表达量($\bar{x}\pm s$)	
		$\text{ER}\alpha$	$\text{ER}\beta$
对照组	0	0.502 \pm 0.036	0.356 \pm 0.066
低剂量组	20	0.461 \pm 0.052*	0.319 \pm 0.043
中剂量组	100	0.292 \pm 0.043*	0.219 \pm 0.035*
高剂量组	500	0.208 \pm 0.032*	0.093 \pm 0.025*

* : $P<0.05$,与对照组比较。

3 讨 论

PCBs 属于环境内分泌干扰物(endocrine disrupting chemicals,EDCs),可通过模拟天然激素作用或干扰天然激素在体内的合成、分泌、结合、代谢等过程,对人体的内分泌功能产生影响和危害,引起靶器官损害和致毒性^[11]。 $\text{ER}\alpha$ 、 β 属于配体诱导的转录因子超家族成员,广泛分布于生殖泌尿系统、心血管系统及免疫系统等。 $\text{ER}\alpha$ 的主要功能是激活相关基因转录,在介导雌激素作用下的细胞分裂、分化,促进生殖、发育方面有重要意义^[12]。 $\text{ER}\beta$ 的主要功能是抑制相关基因转录,推测可能是一种肿瘤抑制因子^[13-14],在肿瘤的发生、发展中起重要作用。

本实验结果显示,PCBs 对 $\text{ER}\alpha$ 、 β mRNA 表达均有抑制作用,且抑制作用呈显著剂量-效应依赖性,提示 PCBs 作为环境 EDCs,可能是通过直接抑制 $\text{ER}\alpha$ 、 β 表达的方式,降低靶器官对天然激素的敏感性,进一步发挥其内分泌干扰作用:(1) PCBs 通过抑制 $\text{ER}\alpha$ 在转录水平的表达,影响 $\text{ER}\alpha$ 对靶基因的转录活性,导致正常靶器官的正常细胞增殖分化受阻,从而引发性腺发育不良、精子发生异常、不孕不育等负面效应^[15-17];(2) PCBs 可通过抑制 $\text{ER}\beta$ 表达,使 $\text{ER}\beta$ 对靶器官细胞增殖的负调控降低,导致体内细胞异常过度增殖,引发肿瘤。

此外,由于 ER 含量与肿瘤内分泌治疗效果呈正相关,即 ER 越多,肿瘤对内分泌治疗越敏感^[18]。结合本实验结果推测,随着人群长期暴露在环境污染物中的机会增多,环境 EDCs 的破坏作用将导致生物体内靶器官中相应的激素受体减少或丢失,促使越来越多的激素依赖性肿瘤内分泌治疗效果下降,耐药概率增加。

总之,PCBs 对小鼠 $\text{ER}\alpha$ 、 β mRNA 表达均有抑制作用,且随剂量的增加,其抑制作用呈显著剂量-效应依赖性,表明 PCBs 的内分泌干扰作用机制之一可能是通过影响 ER 基因的表达,继而影响 $\text{ER}\alpha$ 、 β 的生理功能来实现的。

参考文献:

[1] Kavlock RJ,Daston GP,DeRosa C,et al. Research needs

- for the risk assessment of health and environmental effects of endocrine disruptors; a report of the U. S. EPA-sponsored workshop[J]. *Environ Health Perspect*, 1996, 104 Suppl 4: S715-740.
- [2] 胡家会. 持久性有机污染物 (POPs) 的研究进展[J]. *科技导报*, 2006, 7(24): 27-29.
 - [3] 赵晓民, 徐小民. 雌激素受体及其作用机制[J]. *西北农业科技大学学报*, 2004, 32(12): 83-84.
 - [4] 周景明, 秦占芬, 徐晓白, 等. 多氯联苯内分泌干扰作用及机理研究进展[J]. *科学通报*, 2004, 49(1): 34-39.
 - [5] 李剑, 徐飞, 李少旦, 等. 环境雌激素研究进展[J]. *现代预防医学*, 2006, 33(8): 1355-1359.
 - [6] 常青, 赵泽文, 李泽桂, 等. PCB153 诱导小鼠胚胎细胞凋亡对胚胎生长发育的影响[J]. *第三军医大学学报*, 2007, 29(19): 1838-1840.
 - [7] 周强, 许鹏飞, 赵晓娥, 等. Aroclor1254 对小鼠胚胎植入的影响[J]. *动物医学进展*, 2009, 30(7): 60-63.
 - [8] White R, Lees JA, Needham M, et al. Structural organization and expression of the mouse estrogen receptor[J]. *Mol Endocrinol*, 1987, 1(10): 735-744.
 - [9] Shen ES, Hardenburg JL, Meade EH, et al. Estradiol induces galanin gene expression in the pituitary of the mouse in an estrogen receptor alpha-dependent manner[J]. *Endocrinology*, 1999, 140(6): 2628-2631.
 - [10] Zhang QY, Dunbar D, Kaminsky LS. Characterization of mouse small intestinal cytochrome P450 expression[J]. *Drug Metab Dispos*, 2003, 31(11): 1346-1351.
 - [11] 李杰, 司纪亮. 环境内分泌干扰物质简介[J]. *环境与健康杂志*, 2002, 19(1): 154-158.
 - [12] 安胜军, 张永祥. 雌激素受体亚型及其配体调节基因转录机制的研究[J]. *生理科学进展*, 2002, 33(4): 309-312.
 - [13] Lazennec G. Estrogen receptor beta, a possible tumor suppressor involved in ovarian carcinogenesis[J]. *Cancer Lett*, 2006, 231(2): 151-157.
 - [14] 李杰萍, 张浩, 叶棋浓. 雌激素受体 β 与乳腺癌[J]. *生物技术通讯*, 2006, 17(4): 637-639.
 - [15] Guo YL, Hsu PC, Hsu CC, et al. Semen quality after pre-natal exposure to polychlorinated biphenyls and dibenzofurans[J]. *Lancet*, 2000, 356(9237): 1240-1241.
 - [16] Mol NM, SØrensen N, Weihe P, et al. Spermaturation and serum hormone concentrations at the age of puberty in boys prenatally exposed to polychlorinated biphenyls[J]. *Eur J Endocrinol*, 2002, 146(3): 357-363.
 - [17] Rozati R, Reddy PP, Reddanna P, et al. Role of environmental estrogens in the deterioration of male factor fertility[J]. *Fertil Steril*, 2002, 78(6): 1187-1194.
 - [18] 杨絮, 韩为冬, 赵亚力. 乳腺癌与雌激素及有关内分泌治疗[J]. *现代肿瘤学*, 2007, 15(5): 729-730.

(收稿日期: 2011-03-09 修回日期: 2011-08-12)

(上接第 3651 页)

达成共识, 但大部分学者仍认为激素联合熊去氧胆酸治疗效果优于单用激素或熊去氧胆酸治疗。

总之, 对于不明原因肝脏功能损害的患者, 除了嗜肝病毒感染、药物损伤等因素外, 一定要反复多次筛查相关免疫指标, 并鼓励患者行肝脏穿刺肝组织病理学检查, 高度重视自身免疫性肝病早期诊断和及时恰当的相应治疗, 对自身免疫性肝病患者预后具有重要意义。

参考文献:

- [1] 李蕴铤. 自身免疫性肝病的诊断和治疗[J]. *继续教育*, 2006, 20(7): 52-55.
- [2] 吴传勇, 邓安梅, 仲人前. 原发性胆汁性肝硬化基因易感性的研究进展[J]. *肝脏*, 2007, 12(3): 207-209.
- [3] Manns MP, Czaja AJ, Gorham JD, et al. Diagnosis and management of autoimmune hepatitis[J]. *Hepatology*, 2010, 51(6): 2193-2213.
- [4] Heathcote EJ. Management of primary biliary cirrhosis. The American Association for the Study of Liver Diseases practice guidelines[J]. *Hepatology*, 2000, 31(4): 1005-1013.
- [5] Czaja AJ. Overlap syndrome of primary biliary cirrhosis and autoimmune hepatitis: a foray across diagnostic boundaries[J]. *J Hepatol*, 2006, 44(2): 251-252.
- [6] Beuers U. Hepatic overlap syndromes[J]. *J Hepatol*, 2005, 42 Suppl 1: S93-99.
- [7] Czaja AJ, Freese DK. Diagnosis and treatment of autoimmune hepatitis[J]. *Hepatology*, 2002, 36(2): 479-497.
- [8] Czaja AJ. Current concepts in autoimmune hepatitis[J]. *Ann Hepatol*, 2005, 4(1): 6-24.
- [9] Kumagi T, Heathcote EJ. Primary biliary cirrhosis[J]. *Orphanet J Rare Dis*, 2008(3): 1.
- [10] 王绮雯, 马雄. 自身免疫性肝病自身抗体研究进展[J]. *肝脏*, 2008, 13(6): 507-510.
- [11] Leung PS, Van de Water J, Coppel RL, et al. Molecular aspects and the pathological basis of primary biliary cirrhosis[J]. *J Autoimmun*, 1996, 9(2): 119-128.
- [12] Manns MP, Strassburg CP. Autoimmune hepatitis: clinical challenges[J]. *Gastroenterology*, 2001, 120(6): 1502-1517.
- [13] 邱德凯, 马熊. I 型自身免疫性肝炎患者的临床病理分析[J]. *中华消化杂志*, 2002, 22(5): 275-278.
- [14] 邱德凯, 马熊. 自身免疫性肝病的基础和临床[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 2006: 103-116.
- [15] 王宝恩. 重视原发性胆汁性肝硬化的研究[J]. *肝脏*, 2002, 7(3): 145.
- [16] 刘良余. 原发性胆汁性肝硬化研究进展[J]. *亚太传统医药*, 2009, 5(6): 151-152.

(收稿日期: 2011-05-09 修回日期: 2011-07-12)