

水生生物卵黄蛋白原在内分泌干扰物检测中的应用

顾海龙^{1,2}, 陈彩芳^{1*}, 林志华¹, 霍礼辉^{1,3}

(1.浙江万里学院 生物与环境学院, 浙江 宁波 315100; 2.上海海洋大学 水产与生命学院, 上海 201306;
3.宁波大学 海洋学院, 浙江 宁波 315211)

摘要: 卵黄蛋白原(Vitellogenin, Vg)作为卵生脊椎、无脊椎动物的卵黄蛋白前体, 是在激素的严格调控下合成的一种雌性特异性蛋白, 因具有广谱性、灵敏度高等优点, Vg 成为目前监测水环境中内分泌干扰物的良好生物标志物之一。然而, 水环境中的内分泌干扰物复杂多样, 诱导能力也随环境的不同而效果不一。因此, Vg 作为生物标志物在实际应用中面临巨大挑战。笔者主要对水生生物 Vg 在内分泌干扰物检测中的应用进行归纳总结, 并对今后 Vg 的研究方向及研究重点进行展望, 以期为 Vg 作为生物标志物的研究提供参考和借鉴。

关键词: 卵黄蛋白原; 环境雌激素; 内分泌干扰物; 生物标志物

中图分类号: X835

文献标志码: A

文章编号: 1001-5132 (2013) 02-0012-05

内分泌干扰物(Endocrine Disrupting Chemicals, EDCs)能改变机体的内分泌功能, 从而影响生物体的生长、发育、繁殖和行为等。识别内分泌干扰物, 研究其在生物体内的作用机制, 并对其进行监测控制已成为环境科学领域的研究热点。

目前, 用于监测 EDCs 的蛋白质主要有 6 种, 分别为: 卵黄蛋白原(Vitellogenin, Vg)、卵壳蛋白^[1]、应激蛋白质^[2]、血浆含磷蛋白质^[3]、乳铁传递蛋白和血浆铜蓝蛋白^[4]。卵壳蛋白的作用范围很小, 范围较大时, 灵敏度很低; 应激蛋白质具备作为生物标志物的可能性, 但关于它作为生物标志物的研究还停留在初期阶段; 血浆含磷蛋白质则是间接地以 Vg 作为指标; 乳铁传递蛋白和血浆铜蓝蛋白均为近几年才提出, 故研究较少。Vg 作为内分泌干扰物的生物标志物具有广谱性、灵敏度高、取材方便等优点, 目前已在实验室和野外试验中得到广泛论证。

1 卵黄蛋白原的合成与代谢

在卵黄形成过程中, 雌性卵生动物个体血浆

中大量存在的含糖、磷脂的大分子蛋白称为 Vg。其能为胚胎发育提供氨基酸、脂肪、碳水化合物、维生素等营养物质, 并与 Ca^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Fe^{2+} 等金属离子结合, 将其运送到卵母细胞内。Vg 的合成受激素严格控制, 可分为外源性合成与内源性合成 2 种。外源性合成主要分为合成、分泌、胞饮、裂解、卵黄发生等过程。内源性合成是卵黄在卵母细胞内的合成过程, 此过程与相关细胞器(主要有内质网、高尔基体和线粒体等)的变化密切相关。另外, 许多动物同时存在这 2 种合成方式, 且不同发育时期其合成部位也不同。Vg 的分解主要由卵巢中的组织蛋白酶 D 完成, 同时组织蛋白酶 B 在卵黄生成早期亦可能参与了此过程^[5]。

2 卵黄蛋白原的检测方法

Vg 的检测方法很多, 主要可分为蛋白检测和基因检测 2 大类: 蛋白检测是通过直接定量测定 Vg 蛋白来检测内分泌干扰物的污染情况, 包括酶联免疫吸附(ELISA)^[6]、放射性免疫(RIA)^[7]、化学发光免疫^[8]、免疫组织化学^[9]及蛋白印迹^[10]等; 基

因检测是通过定量分析 Vg mRNA 来对污染物进行检测,包括核糖核酸酶保护试验(RPA)^[11]、逆转录定量 PCR 法(QRT-PCR)^[12]、核酸杂交技术及原位杂交技术^[9]等。此外还有质谱法^[13]和间接定量 Vg 法。质谱法可分析完整的蛋白或多肽片段,建立蛋白质指纹识别数据库,是一种很有前途的 Vg 定量方法。同时, Vg 是含磷蛋白质,可通过测定磷含量而间接定量 Vg。

蛋白检测法是长期暴露实验中最合适的检测方法。大量实验表明, Vg 合成是基于体内蛋白水平的升高开始,而 Vg 会在雄性个体内积累,破坏其体内蛋白水平稳定性,因此,通过检测体内蛋白水平的变化可以准确检测污染物在时间和剂量上的变化。而对于短期暴露实验而言,蛋白检测不能反映机体产生 Vg 的即时状态,而基因检测可以通过检测微量 mRNA 表达来快速、可靠地分析机体即时表达变化,具有高度特异性。因此,在实际应用中,必须针对不同的情况合理选择检测方法。

ELISA 法因其快速、敏感、简便、易于标准化等优点,成为当前环境科学领域最常用的检测方法,也是最适合我国国情的方法。其基本原理是利用酶标记的抗原或抗体,在固相载体上进行定量测定。但 ELISA 法又存在杂质干扰和耗时间长等缺点,这在一定程度上限制了该法的普及。有学者发现, Au-Fe₃O₄(金掺杂的四氧化三铁纳米粒子)纳米材料具有易修饰性、良好的生物相容性、超顺磁性等特点,能够简便高效地富集分离目标物,若将该材料应用于样品的前处理中,可有效提高 ELISA 法的准确度和灵敏度。目前此材料在检测卵黄蛋白原样品的应用中已取得了一定的研究成果。

3 水生生物卵黄蛋白原在内分泌干扰物检测中的应用

一般情况下, Vg 只存在于雌性生物体内,由性成熟的雌性生物在雌激素(如雌二醇)的刺激下合成,然后释放到血液,最后储存于卵母细胞中。因其合成过程受雌激素或类雌激素的严格调控,故合成量与雌激素或类雌激素之间存在较好的剂量效应关系。然而,研究显示,在内分泌干扰物(特别是类雌激素)的诱导下,幼体和雄性生物体内也能

合成大量的 Vg,由于缺乏相关酶类的有效清除, Vg 将在其血液内保持很长一段时间。因此,通过检测幼体或雄性生物体内 Vg 水平,来对环境中的内分泌干扰物进行监测,已成为一条较好的监测途径。

3.1 对激素和农药类的监测

激素类内分泌干扰物主要有:(1)甾体雌激素,包括天然存在的雌二醇(E₂)、雌三醇(E₃)和雌激素酮(E₁)以及人工合成的乙炔雌二醇(EE₂)和炔雌醇甲醚(MES)等。(2)非甾体合成雌激素化合物,包括壬基苯酚(NP)、壬基苯酚醚(NPEs)、壬基苯酚羟化物(NPCs)、辛基苯酚(OP)、辛基苯酚醚(OPEs)、双酚 A(BPA)等。农药主要包括硫丹、DDT、狄氏剂、草不绿、莠去津、除草醚等^[14]。大量实验表明,这些化学物对机体的内分泌系统影响显著, Vg 水平变化明显。

吴翠琴等^[15]将真鲷(*Pagrosomus major*)幼鱼分别暴露于一系列浓度的 17 α -EE₂中,42 d 后,幼鱼血浆中检测出 Vg,且在一定浓度范围内呈现较好的剂量效应关系。宫向红等^[16]亦发现 10 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 以上辛基酚对鲤(*Cyprinus carpio*)有明显的雌激素效应,并在一定浓度范围内呈现明显的剂量效应关系。在 BPA 的雌激素效应研究中,以 E₂为阳性对照,结果显示, BPA 和 E₂对雄性中国林蛙(*Rana chensinensis*)均有明显的雌激素效应, Vg 合成与 BPA、E₂均呈较好的剂量效应关系,同一 BPA 浓度条件下, Vg 表达呈时间效应关系^[17]。刘萍等^[18]通过实验得出, E₂、NP、OP 和 BPA 诱导雄性金鱼 Vg 合成的最低效应浓度各不相同,后三者诱导呈明显的剂量效应关系,雌激素活性强弱顺序为 OP>BPA>NP,说明不同激素的诱导能力之间存在差异。吕雪飞等^[19]的研究进一步证实,不同激素的诱导活性存在差异,而且混合雌激素对雄性泥鳅(*misgurnus anguillicaudatus*)Vg 的诱导能力比 2 种雌激素分别作用时的简单相加还要高。

在激素和农药类内分泌干扰物的研究中, Vg 可以作为良好的内分泌干扰物生物标志物,但不同雌激素之间在诱导浓度和时间上存在差异,在实际应用中需区别对待。

3.2 对石油类的监测

石油烃能破坏细胞膜的正常结构和透性,干

扰生物体的酶系,进而影响生物体的正常生理、生化过程.刘睿智等^[20]以雌性褐菖鲉(*Sebastiscus marmoratus*)为研究对象探讨了0#柴油水溶性成分的雌激素效应.结果显示,84 d后,雌性褐菖鲉血浆Vg水平和肝脏雌激素受体水平均降低,说明Vg可以作为0#柴油水溶性成分的监测指标.而Pereira等^[21]则指出,低污染环境下的生物体内Vg含量高于无污染区域的生物,但随着污染的加重,其Vg含量急剧下降.17 β -蔡黄酮雌激素的研究亦证实,暴露在低浓度下的虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)体内Vg合成受到促进,而在高浓度下Vg的合成则被抑制^[22].

以上研究证实,Vg的合成与石油类雌激素的浓度存在密切关系.低浓度的石油类雌激素能够诱导生物体内Vg的合成,而高浓度下则抑制Vg的合成.由此可见,临界点研究也是将Vg作为生物标志物必须要考虑的一个重要课题.

3.3 对重金属类的监测

重金属污染是环境污染的重要组成部分.关于重金属类内分泌干扰物对Vg诱导的研究报道还不多,一些重金属的诱导效应还未有定论.梁岳等^[23]以条纹密鲈(*Colisa fasciata*)为实验对象,分别使用活体与离体的实验方法,检测了Cd²⁺暴露下Vg mRNA转录情况.结果发现,Cd²⁺仅在活体实验的低剂量组诱导了Vg mRNA表达,且Cd²⁺的雌激素效应显著弱于E₂和OP,而离体实验中并未发生明显的诱导效应.在多齿围沙蚕(*Perinereis nuntia*)^[24]和矮小拟镖剑水蚤(*Paracyclops nana*)^[25]的研究中亦发现,Cd²⁺能显著诱导Vg的合成,且分别呈剂量效应和时间效应.Sanders等^[26]则发现50~500 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 硫化镉(CdS)均不能诱导无鳞甲三刺鱼(*Gasterosteus aculeatus*)Vg mRNA的表达.还有学者报道,Cd²⁺的急性刺激能抑制Vg合成^[27],但低剂量、长时间的Cd²⁺暴露能诱导Vg合成^[28].

以上研究表明,重金属类内分泌干扰物能对部分物种体内Vg合成起到诱导或抑制作用,而对其他物种则无此效应.因此,在Vg作为重金属类内分泌干扰物生物标志物时,对物种和浓度的选择需谨慎.

3.4 对混合类内分泌干扰物的监测

随着污染的加剧,越来越多的污染呈现综合

性污染的特点,如未处理的城市废水、工业废水、畜禽粪便等,这对Vg作为内分泌干扰物生物标志物提出了很大的挑战.Gagné等^[29]发现软壳蚌(*Mya arenaria*)体内Vg的检测值随地域的不同而差异很大,城市下水道排水口附近的雌性贝类生殖器内Vg和Ca²⁺的水平最高.而将贻贝(*Mytilus*)暴露于浓度逐渐增加的城市污水稀释液(0%~50%)96 h后,雌、雄贝血淋巴和性腺内的Vg水平均显著上升,雌贝的变化强度略高于雄贝.梁勇等^[30]通过原代培养鲫鱼(*Carassius auratus*)肝细胞测定雌激素效应的研究发现,己烯雌酚(DES)与Vg之间也有很好的剂量效应关系,但2,3,7,8-四氯代二苯并二噁英(TCDD)和苯并芘(B[a]P)在一定浓度下可显著抑制DES的诱导效应.重金属(Cd²⁺、Zn²⁺)和类雌激素(E₂、NP、PCBs)的联合作用效应研究则表明诱导效应主要取决于类雌激素的浓度,单一重金属(Cd²⁺、Zn²⁺)的暴露产生的雌激素效应并不显著^[31].

多种内分泌干扰物混合污染逐渐成为环境污染的趋势,不同污染物之间往往存在多种关系,探讨Vg作为监测混合污染物污染的检测指标将是以后的研究重点.

4 结语

Vg与内分泌干扰物之间良好的剂量效应和时间效应为其作为生物标志物提供了较好的运用基础,Vg具有使用范围广,灵敏度高,样品简单易得,检测方法多样,特异性高等优点,已经成为近年来监测环境中内分泌干扰物污染状况的良好生物标志物之一.然而,由于容易受到多种生物、非生物因子(如内分泌干扰物的混合诱导效应、不同地域和不同物种间的差异性等)的影响,Vg作为内分泌干扰物生物标志物在实际应用中仍存在很大的局限性.因此,今后应在以下三方面进行着重研究:(1)大力发展更为简单、高效、灵敏的Vg检测方法,以弥补当前在Vg检测上存在的耗时长、灵敏度相对较低、重复性较差等不足,充分利用Vg作为内分泌干扰物监测指标的价值.(2)建立科学合理的判定方法以应对自然环境中存在的低浓度、多种类的污染物特征.目前有研究表明,使用不同的判定方法判定同一数据,得到的结果不同,因此,在对

结果进行判定时,应使用多种数学模型从不同角度对数据进行综合分析。(3)无脊椎动物特别是贝类等迁移性较弱,能够更好地反应栖息地水域的环境状况。因此,应适当加大对贝类等无脊椎动物的研究,为水环境中内分泌干扰物的监测提供更好的指示生物和生物指标。

参考文献:

- [1] Arukwe A, Knudsen F R, Goksøyr A. Fish zona radiata (Eggshell) protein: A sensitive biomarker for environmental estrogens[J]. Health Perspect, 1997, 105: 418-422.
- [2] 胡炜, 汪亚平, 周永欣. Cu^{2+} 、 Zn^{2+} 诱导稀有鲫应激蛋白质的研究[J]. 水生生物学报, 2001, 25(1):50-53.
- [3] Emmersen B K, Petersen I M. Natural occurrence and experimental induction by estradiol-17- β of a lipophosphoprotein (vitellogenin) in flounder (*Platichthys flesus*, L.)[J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry, 1976, 54(4):443-446.
- [4] Ignar-Trowbridge D M, Pimentel M, Teng C T, et al. Cross talk between peptide growth factor and estrogen receptor signaling systems[J]. Environ Health Perspect, 1995, 103(7):35-38.
- [5] Camevali O, Carletta R, Cambi A, et al. Yolk formation and degradation during oocyte maturation in seabream (*Sparus aurata*) involvement of two lysosomal proteinases [J]. Biology of Reproduction, 1999, 60(1):140-146.
- [6] 丁科, 韩志华, 吴迪, 等. 2, 4'-DDT 对斑马鱼生长、繁殖力及卵黄蛋白原的影响[J]. 生态与农村环境学报, 2012, 28(5):532-538.
- [7] Copeland P A, Sumpter J P, Wlaker T K, et al. Vitellogenin levels in male and female rainbow trout at various stages of the reproductive cycle[J]. Comp Biochem Physiol B, 1986, 83:487-493.
- [8] 吴美琴, 田童典, 罗雯姝, 等. 梭鱼卵黄蛋白原的化学发光免疫检测法[J]. 水产学报, 2010, 34(4):572-580.
- [9] 王宏元, 巨荣菊, 白瑶. 壬基酚对雄性中国林蛙肝细胞中雌激素受体和卵黄蛋白原的影响[J]. 陕西师范大学学报: 自然科学版, 2011, 39(6):54-59.
- [10] 翟丽丽, 张育辉. 基于环境雌激素评估的卵黄蛋白原研究进展[J]. 生态毒理学报, 2009, 4(3):332-337.
- [11] Islinger M, Pawlowski S, Hollert H, et al. Measurement of vitellogenin-mRNA expression in primary cultures of rainbow trout hepatocytes in a non-radioactive dot blot RNase protection-assay[J]. Sci Total Environ, 1999, 233: 109-122.
- [12] 李媛媛, 蔡生力, 刘红. 实时荧光定量 PCR 检测凡纳滨对虾和罗氏沼虾卵黄蛋白原 mRNA 在卵巢和肝胰腺中的表达[J]. 水产学报, 2012, 36(11):1667-1684.
- [13] Reith M, Munholland J, Kelly J, et al. Lipovitellins derived from two forms of vitellogenin are differentially processed during oocyte maturation in haddock[J]. J Exp Zool, 2001, 291:58-67.
- [14] Valerio M, Francois G, Maria G M, et al. Vitellogenin as a biomarker of exposure to estrogenic compounds in aquatic invertebrates: A review[J]. Environment International, 2008, 34:531-545.
- [15] 吴翠琴, 袁东星, 刘宝敏. 乙炔基雌二醇对真鲷幼鱼的雌激素效应研究[J]. 海洋环境科学, 2009, 28(6):630-634.
- [16] 宫向红, 徐英江, 任利华. 辛基酚对鲤的雌激素效应[J]. 水产学报, 2010, 34(3):410-414.
- [17] 白瑶, 张育辉, 翟丽丽. 双酚 A 诱导雄性中国林蛙肝细胞雌激素受体表达和卵黄蛋白原合成[J]. 动物学研究, 2011, 32(3):317-322.
- [18] 刘萍, 李正炎, 李江玲. 酚类污染物对金鱼卵黄蛋白原诱导的雌激素效应研究[J]. 中国海洋大学学报, 2010, 40(11):134-140.
- [19] 吕雪飞, 周群芳, 宋茂勇. 17 β -雌二醇、壬基酚及其混合物对雄性泥鳅的雌激素效应[J]. 科学通报, 2007, 52(18):2122-2126.
- [20] 刘睿智, 李瑞霞, 左正宏. 0#柴油水溶性成分暴露对雌性褐菖鲉血浆卵黄蛋白原水平的影响[J]. 厦门大学学报: 自然科学版, 2007, 46(6):827-830.
- [21] Pereira J J, Ziskowski J, Mercaldo-Allen R, et al. Vitellogenin in winter flounder (*Pleuronectes americanus*) from Long Island Sound and Boston Harbor[J]. Estuaries, 1992, 15(3):289-297.
- [22] Anderson M J, Olsen H, Matsumura F, et al. In vivo modulation of 17 β -estradiol-induced Vitellogenin synthesis and estrogen receptor in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) liver cells by β -naphthoflavone [J]. Toxicol Appl Pharmacol, 1996, 137:210-218.
- [23] 梁岳, 方展强. 条纹密鲈卵黄蛋白原基因的克隆与检测[J]. 水产学报, 2011, 35(9):1281-1292.
- [24] Zheng S L, Chen B, Wang Z, et al. Reproductive toxic effects of sublethal cadmium on the marine polychaete *Perinereis nuntia*[J]. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2010, 73(6):1196-1201.
- [25] Hwang D S, Lee K W, Han J, et al. Molecular characterization and expression of vitellogenin (Vg) genes from the cyclopoid copepod, *Paracyclops nana* exposed to heavy metals[J]. Comparative Biochemistry

- and Physiology, Part C: Toxicology and Pharmacology, 2010, 151(3):360-368.
- [26] Sanders M B, Sebire M, Sturve J, et al. Exposure of sticklebacks (*Gasterosteus aculeatus*) to cadmium sulfide nanoparticles: Biological effects and the importance of experimental design[J]. Marine Environmental Research, 2008, 66(1):161-163.
- [27] Cervera A, Maymo A C, Martinez-Pardo R, et al. Vitellogenesis inhibition in *Oncopeltus fasciatus* females (Heteroptera: Lygaeidae) exposed to cadmium[J]. Journal of Insect Physiology, 2005, 51(8):895-911.
- [28] Cervera A, Maymo A C, Martinez-Pardo R, et al. Vitellogenin polypeptide levels in one susceptible and one cadmium-resistant strain of *Oncopeltus fasciatus* (Heteroptera: Lygaeidae), and its role in cadmium resistance[J]. Journal of Insect Physiology, 2006, 52(2): 158-168.
- [29] Gagné F, Blaise C, Salazar M, et al. Evaluation of estrogenic effects of municipal effluents to the freshwater mussel *Elliptio complanata*[J]. Comp Biochem Physiol, 2001, 128C:213-225.
- [30] 梁勇, 黄港住, 徐盈, 等. 2,3,7,8-四氯代二苯并二噁英(TCDD)和苯并芘(B[a]P)对原代培养鲫鱼肝细胞中卵黄蛋白原诱导的影响[J]. 科学通报, 2004, 49(16):1605-1610.
- [31] 杨丽丽, 张晶, 方展强. 雌二醇、壬基酚、多氯联苯、镉和锌及其混合物对唐鱼的雌激素效应比较[J]. 水产学报, 2011, 35(6):838-845.

The Vitellogenin Application of Aquatic Organisms in Detecting Endocrine Disrupting Chemicals

GU Hai-long^{1,2}, CHEN Cai-fang^{1*}, LIN Zhi-hua¹, HUO Li-hui^{1,3}

(1.College of Biological and Environmental Sciences, Zhejiang Wangli University, Ningbo 315100, China;

2.College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China;

3.School of Marine Science, Ningbo University, Ningbo 315211, China)

Abstract: Vitellogenin is the major precursor of the egg-yolk proteins, vitellin. It is a female-specific protein which is synthesized under the strict regulation of the hormone. With the advantages of broad-spectrum and high sensitivity, Vg is a good biomarker for the monitoring of endocrine disrupting chemicals. However, the endocrine disruptors in the water are complex and diverse, and their induced effects vary according to the environment. Therefore, Vg in practical applications is facing enormous challenges to function as a biomarker. In this article, the Vitellogenin application of aquatic organisms in detecting endocrine disrupting chemicals is addressed in an effort to provide a reference for the study on Vg as a biomarker.

Key words: vitellogenin; environmental estrogens; endocrine disrupting chemicals; biomarker

(责任编辑 史小丽)