

EE2 对稀有𬶋鲫和斑马鱼幼鱼体内卵黄蛋白原诱导的比较

廖 涛 徐 盈 钟雪萍 梁 勇 王剑伟

(中国科学院水生生物研究所;淡水生态与生物技术国家重点实验室,武汉 430072)

摘要:利用卵黄蛋白原(Vtg)作为类雌激素污染的生物标志物,比较研究了不同浓度的 17α -乙炔基雌二醇(EE2)对斑马鱼(*Brachydanio rerio*)和稀有𬶋鲫(*Gobiocypris rarus*)幼鱼体内Vtg的诱导。研究结果表明:5ng/L, 20ng/L 和 100ng/L EE2 分别暴露 5d 后, 稀有𬶋鲫幼鱼体内的 Vtg 即可显著诱导, 并且其含量随暴露时间的增加而增加, 在暴露 15d 时达到最大值; 而斑马鱼幼鱼虽然 100ng/L EE2 暴露 5d 时可显著诱导体内 Vtg 的生成, 但 20ng/L EE2 在暴露 10d 后, 5ng/L EE2 在暴露 15d 后, 才可显著诱导斑马鱼体内 Vtg 的生成。这一结果说明 EE2 暴露下对稀有𬶋鲫体内 Vtg 的诱导要比斑马鱼敏感。

关键词:稀有𬶋鲫; 斑马鱼; 乙炔基雌二醇; 卵黄蛋白原

中图分类号:Q176

文献标识码:A

文章编号:1000-3207(2005)05-0513-05

随着环境污染的加剧,大量的类雌激素通过不同途径不断释放入水环境中,对多种水生动物的生长、发育、生殖以及人类的健康都产生了巨大的影响。因此,研究类雌激素在生物体内的作用机制以及对其进行筛选与鉴定已成为当前环境科学的研究热点^[1-3]。但由于环境中类雌激素的浓度很低,采用常规的化学方法进行检测往往存在一些困难,因而需要寻求更高效灵敏的检测与筛选方法。目前卵黄蛋白原作为敏感的生物标志物已广泛应用于环境中类雌激素污染物的生物筛选^[4,5]。

稀有𬶋鲫是中国特有的一种小型鲤科鱼类,它具有生命力强、饲养简便、性成熟快、周年产卵^[6]等优点,已经有研究结果表明稀有𬶋鲫是一种敏感的实验动物^[7,8]。斑马鱼作为国际标准实验动物,生活周期短,周年产卵,且产卵量高,是美国 EPA 所推荐的内分泌干扰物研究的模式动物之一,但由于受环境适应性、养殖方法等因素的影响,使得在国内利用斑马鱼进行生物筛选受到制约。在本实验中,选择人工雌激素 EE2 作为类雌激素暴露的模型化合物,卵黄蛋白原作为指示类雌激素污染水平的生物标志物,比较研究了稀有𬶋鲫和斑马鱼在类雌激素生物筛选中的应用。旨在确立稀有𬶋鲫作为国内研究环境内分泌干扰物的模型动物地位,更好地应用

于国内环境内分泌干扰物研究。

1 材料和方法

1.1 实验动物与仪器 稀有𬶋鲫和斑马鱼的繁育均在实验室进行,鱼卵孵出 45d 后开始暴露。美国 Bio-Rad Mini-Protean III 电泳仪;日本 HITACHI CF-15R 高速冷冻离心机;EE2 购自美国 Sigma 公司,辣根过氧化物酶(HRP)标记的羊抗兔 IgG 购于华美公司,DMSO 为国产分析醇。

1.2 暴露实验 EE2(溶解于 DMSO)设置 3 个浓度:5ng/L, 20ng/L, 100ng/L, 对照组仅加入 DMSO(终浓度 < 0.01%)。暴露实验在 8L 玻璃缸中进行,每个暴露组随机加入 30 尾实验鱼,温度 20—22℃,光暗比 14h:10h,每隔 1d 更换全部暴露溶液,并记录鱼的死亡率。暴露 5d、10d、15d 后,随机取样,测定实验鱼的体长和体重,于 -80℃ 冰箱中冻存。

1.3 整体匀浆 于玻璃匀浆器中加入 1mL 冰预冷的磷酸盐缓冲液(PBS, pH 7.5),冰浴下将鱼整体匀浆。将匀浆液于 10,000r/min 下离心 15min, 收集上清液,分装后立即检测匀浆液中 VTG 的含量或于 -80℃ 冰箱中冻存。

1.4 卵黄蛋白原的电泳检测 SDS-PAGE 电泳参照 Liang 等的方法^[9,10],浓缩胶和分离胶的浓度分别为 4% 和 7%,样品适当稀释后,于 100V 恒压条件下电

收稿日期:2004-03-10;修订日期:2005-05-20

基金项目:中国科学院方向性资助项目(KZCX2-414);国家自然科学基金(30170174, 30123004)资助

作者简介:廖涛(1979—),男,汉族,湖北仙桃人;硕士;研究方向为水生态毒理学

通讯作者:徐盈,xuying@ibn.ac.cn

泳分析;凝胶用考马斯亮蓝 R-250 染色,脱色后,用凝胶成像系统拍照保存。

1.5 点杂交 将斑马鱼雄鱼和雌鱼的匀浆液样品分别稀释成一定倍数,吸取 15 μ L 稀释后的匀浆液直接点在硝酸纤维素膜上。用封闭液(含 3% BSA 的 PBS)封闭 40min;用 TPBS(含 0.05% Tween-20 的 PBS)洗涤 4 次。加入鲤 Vtg 的多克隆抗体(TPBS 稀释 100 倍)孵育 40min, TPBS 洗涤 4 次。再加入辣根过氧化物酶(HRP)标记的羊抗兔 IgG(TPBS 稀释 100 倍)孵育 40min, TPBS 洗涤 4 次。然后加底物 DAB 显色。

1.6 免疫印迹 SDS-PAGE 电泳分离样品后,在缓冲液(25mmol/L Tris pH8.3, 192mmol/L 甘氨酸, 20% 甲醇)中将凝胶中的蛋白质电转移到硝酸纤维素膜上(恒压 100V, 1h)。电转移后,硝酸纤维素膜用丽春红预染,以检查电转移的效率。漂洗后,用封闭液于 4℃ 封闭过夜。然后将膜转移到鲤 Vtg 的多克隆抗体(TPBS 稀释 500 倍)中,30℃ 下缓慢摇动 40min。TPBS 洗膜后,将膜转移到 HRP 标记的羊抗兔 IgG

(TPBS 稀释 200 倍)中,30℃ 下缓慢摇动 40min。最后加新鲜配制的 DAB 显色液显色,重蒸水停止反应,待干后拍照保存。

1.7 卵黄蛋白原含量的测定 用鲤 Vtg 作标准蛋白,用抗鲤 Vtg 的抗体作第一抗体。将稀有𬶋鲫的整体匀浆液和 Vtg 标准用 PBS 缓冲液稀释成实验倍数,以 100 μ L/孔添加到 96 孔酶标板中,4℃ 孵育过夜。次日用含 3% BSA 的 PBS 以 350 μ L/孔封闭,4℃ 孵育过夜。用 TPBS 洗板后以每孔 100 μ L 加入 c-Vtg 抗体,32℃ 孵育 1h。TPBS 洗板后加入 HRP 标记的羊抗兔 IgG,32℃ 孵育 1h。最后加入底物显色,32℃ 孵育 20min 后以每孔 50 μ L 加入 2mol/L 硫酸终止反应。然后用酶标仪在 490nm 处测定光密度值。

2 结果

2.1 EE2 对体长、体重及存活的影响

在暴露实验中,没有观察到实验鱼死亡现象,EE2 暴露对稀有𬶋鲫幼鱼和斑马鱼幼鱼的生长没有显著影响(表 1)。

表 1 EE2 对斑马鱼和稀有𬶋鲫生长的影响

Tab. 1 Effects of waterborne EE2 on growth of zebrafish and rare minnow

暴露时间(day) Exposure time	EE2 浓度 Concentrations	稀有𬶋鲫 Rare minnow		斑马鱼 Zebrafish	
		体长(mm) Body length	体重(mg) Body weight	体长(mm) Body length	体重(mg) Body weight
5	Control	17.7 ± 2.1	61.7 ± 21.3	25.0 ± 2.6	135.6 ± 48.4
	5ng/L	17.3 ± 2.4	55.6 ± 22.8	25.3 ± 1.9	133.6 ± 26.6
	20ng/L	18.6 ± 3.9	83.0 ± 46.8	25.3 ± 2.6	140.1 ± 39.5
	100ng/L	17.6 ± 1.6	62.1 ± 17.9	25.3 ± 3.6	156.8 ± 67.2
10	Control	20.4 ± 1.1	93.6 ± 19.2	23.1 ± 3.1	103.1 ± 33.2
	5ng/L	18.3 ± 1.3	72.9 ± 13.8	23.6 ± 1.9	104.4 ± 24.2
	20ng/L	18.1 ± 2.7	76.0 ± 27.9	25.9 ± 3.0	159.4 ± 61.8
	100ng/L	17.0 ± 1.9	68.3 ± 22.3	27.9 ± 2.0	199.0 ± 41.2
15	Control	20.8 ± 2.9	94.5 ± 32.0	27.1 ± 3.0	153.0 ± 58.0
	5ng/L	19.3 ± 2.1	79.6 ± 25.4	27.3 ± 3.5	174.3 ± 75.9
	20ng/L	21.7 ± 1.5	115.2 ± 21.1	27.4 ± 2.3	174.6 ± 43.3
	100ng/L	20.5 ± 2.2	99.7 ± 30.3	25.7 ± 1.0	150.3 ± 31.4

2.2 电泳检测、斑马鱼 Vtg 的免疫印迹及点杂交

Vtg 是一种特异蛋白,但有文献报道,鲤 Vtg 的多克隆抗体可以识别多种鲤科鱼体内的 Vtg^[11,12],以前的实验结果也表明鲤 Vtg 多克隆抗体可特异识别稀有𬶋鲫体内的 Vtg^[13],本实验则考虑用鲤 Vtg 的多克隆抗体检测斑马鱼体内的 Vtg。

SDS-PAGE 结果(图 1)表明斑马鱼 Vtg 的亚基约为 140kDa 和 170kDa,这与 Henrik 等的结果相一致^[14],点杂交的结果(图 2)表明鲤 Vtg 的抗体可以识别斑马鱼雌鱼匀浆液中的 Vtg,但不与斑马鱼雄鱼体内的其他蛋白结合。Western blotting 结果(图 2)同样表明鲤 Vtg 的抗体可以识别 140kDa 和 170kDa

的蛋白,这些结果均说明鲤 Vtg 的抗体可以特异识别斑马鱼体内的 Vtg。

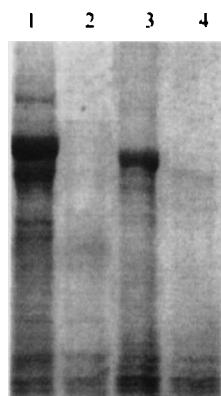


图 1 斑马鱼和稀有𬶋鲫的 SDS 电泳图谱

1. 斑马鱼雌鱼;2. 斑马鱼雄鱼;3. 稀有𬶋鲫雌鱼;4. 稀有𬶋鲫雄鱼

Fig.1 SDS-PAGE pattern of zebrafish and rare minnow

1. female zebrafish; 2. male zebrafish;
3. female rare minnow; 4. male rare minnow

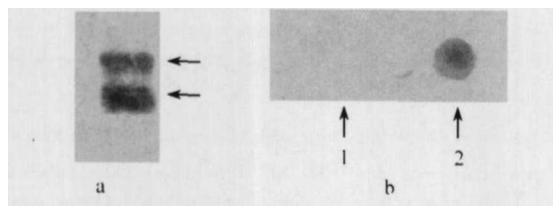


图 2 斑马鱼的免疫印迹和点杂交

图 a 中箭头所指为 c-Vtg 抗体能够特异性识别的卵黄蛋白原亚基分子。

图 b 中 1. 斑马鱼雄鱼 (1:100); 2. 斑马鱼雌鱼 (1:300)

Fig.2 Western blotting and dot western blotting of zebrafish.

Fig. a, the arrow indicating the sub-units of Vtg that c-Vtg antibody can recognize.

Fig. b, 1. male zebrafish (1:100); 2. female zebrafish (1:300)

2.3 EE2 对斑马鱼和稀有𬶋鲫幼鱼体内卵黄蛋白原的诱导

图 3 为斑马鱼抗原和鲤 Vtg 抗体的结合曲线, 从图中可以看出斑马鱼雌鱼的稀释曲线和鲤鱼 Vtg 标准的结合曲线有较好的相似性。图 4 为 EE2 对斑马鱼和稀有𬶋鲫幼鱼体内卵黄蛋白原的诱导, 从中可以看出, 在所测试浓度下的 EE2 均可显著诱导稀有𬶋鲫幼鱼体内卵黄蛋白原的生成; 而只有 100ng/L EE2 可以显著诱导斑马鱼体内 Vtg 的生成, 20ng/L EE2 在 10d 后取样时才有显著诱导, 5ng/L EE2 只在 15d 后取样时有显著诱导。

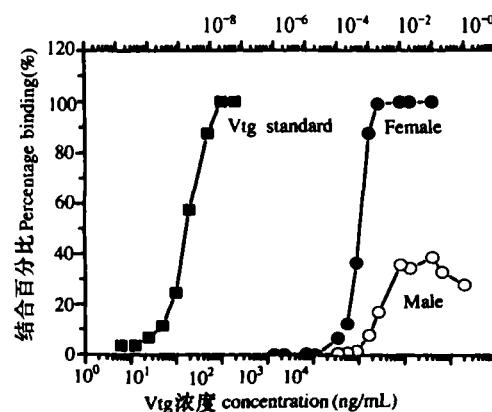


图 3 斑马鱼 Vtg 和鲤 Vtg 抗体的结合曲线 ■, 鲤 Vtg; ●, 斑马鱼雌鱼; ○, 斑马鱼雄鱼

Fig.3 Binding curve obtained with the following antigens: ■, serial dilution of common carp Vtg; ●, serial dilution of whole body homogenate from mature female zebrafish; ○, serial dilution of whole body homogenate from mature male zebrafish

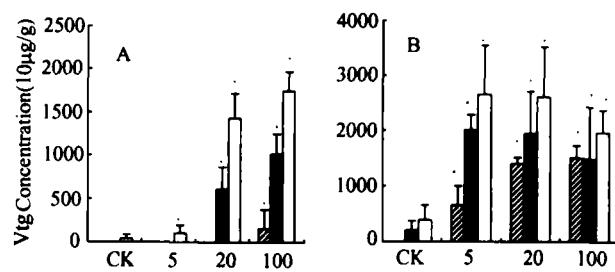


图 4 EE2 对斑马鱼和稀有𬶋鲫 Vtg 的诱导

Fig.4 Vtg concentrations in zebrafish and rare minnow exposed to EE2

3 讨论

斑马鱼 (*Brachydanio rerio*)、青鳉 (*Oryzias latipes*) 和胖头鮈 (*Pimephales promelas*) 为国际经济合作组织和美国环境保护局指定的作为内分泌干扰物筛选的三种实验模型鱼, 它们都具有个体小、生命力强和性成熟快的优点, 稀有𬶋鲫是特有的一种小型鲤科鱼类, 这种鱼不但个体小、性成熟快, 而且对温度(温度耐受性范围不小于 1—35℃), 溶氧等环境条件适应性强, 不易染病, 养殖条件下可周年产卵。本文则通过检测鱼体中 Vtg 的变化比较研究了国际标准实验动物斑马鱼和稀有𬶋鲫对 EE2 作用的效应。

小型鱼类, 由于采血困难, 不能提供大量的纯化抗原来制备特异性抗体, 因而 Vtg 的准确定量很难实行。国外一般采用鲤 Vtg 的多克隆抗体对一些小型鲤科鱼类进行 Vtg 含量的测定^[10,11]。本文用免疫

印迹和点杂交实验对斑马鱼予以验证。实验通过 SDS 电泳鉴定了斑马鱼和稀有𬶋鲫雌鱼体内卵黄蛋白原的分子量(图 1),并用 c-Vtg 的多克隆抗体进行免疫印迹,结果(图 2)显示,斑马鱼雌鱼血清中出现了两条很强的阳性带,它与 SDS-PAGE 电泳条带中的主带相一致,而在雄鱼的血清中没有出现;点杂交实验也说明了 c-Vtg 抗体能识别斑马鱼的卵黄蛋白原。另外,从图 3 中可以看出斑马鱼雌鱼的稀释曲线和鲤 Vtg 标准的结合曲线有较好的相似性,Zhong 等的结果中阐述了用鲤 Vtg 抗体测定稀有𬶋鲫卵黄蛋白原的有效性,上述结果说明了采用鲤 vtg 的多克隆抗体对稀有𬶋鲫和斑马鱼 Vtg 含量进行测定的可行性。由于斑马鱼性成熟快,为避免性成熟雌鱼的影响,选用同年龄段 45d 的稀有𬶋鲫和斑马鱼开始暴露实验,结果显示稀有𬶋鲫的各个浓度在所有取样时间都有显著诱导,这也提供了一种幼鱼短期暴露模式,为实验节约了时间和成本,可能比成鱼暴露更为敏感,可操作性更强。

从图 4 可以看到不同浓度的 EE2 均可显著诱导稀有𬶋鲫体内 Vtg 的生成;而只有 100ng/L EE2 可以显著诱导斑马鱼体内 Vtg 的生成,20ng/L EE2 在 10d 后取样时才有显著诱导,5ng/L EE2 只在 15d 后取样时有显著诱导。这说明在环境雌激素诱导卵黄蛋白原时,稀有𬶋鲫也可作为一种较为理想的模式生物。随着浓度升高和时间的推移,Vtg 的诱导还表现出明显的时间和浓度依赖关系。斑马鱼同浓度组随着取样时间的推移,Vtg 的诱导量在增加;同时间组随着浓度的增加,Vtg 的诱导量也在不断增加;稀有𬶋鲫同浓度组随着取样时间的推移,Vtg 的诱导量也在增加;在 5d 取样时随浓度增加,Vtg 诱导量在不断增加;在 10d,15d 取样时,5ng/L 和 20ng/L 对 Vtg 的诱导量无显著差异,但在 100ng/L 时,对 Vtg 的诱导量还反而减少了,这说明鱼体 Vtg 诱导达到一定量以后,EE2 浓度的增加还有一定的抑制作用。稀有𬶋鲫在 5d,10d,15d 取样时的最低观察效应浓度为 5ng/L(或更小);而斑马鱼在 5d 取样时,最低观察效应浓度为 100ng/L;在 10d 取样时,最低观察效应浓度为 20ng/L;在 15 天取样时,最低观察效应浓度为 5ng/L。

比较研究了不同浓度的 EE2 对斑马鱼和稀有𬶋鲫幼鱼体内 Vtg 的诱导。结论如下:所测试浓度下的 EE2 均可显著诱导稀有𬶋鲫幼鱼体内卵黄蛋白原的生成;而只有 100ng/L EE2 可以显著诱导斑马鱼体内 Vtg 的生成。这说明稀有𬶋鲫在评价类雌激素污染时可作为一种理想的模式生物。

参考文献:

- [1] Liu Y M, Chen W, Li D H, et al. Reproduction toxicity and estrogenic effects of dicofol to DAPHNIA MAGNA [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*. 2004, 28:330—332[刘永梅,陈伟,李敦海,等.三氯杀螨醇对大型蚤的毒性和环境雌激素效应.水生生物学报,2004,28:330—332]
- [2] Scholz S, Kordes C, Hamann J, et al. Induction of vitellogenin in vivo and in vitro in the model teleost medaka (*Oryzias latipes*): comparison of gene expression and protein levels [J]. *Mar. Environ. Res.* 2004, 57:235—244
- [3] Stefan örn, Henrik H, Madsen T H, et al. Gonad development and vitellogenin production in zebrafish (*Danio rerio*) exposed to ethynodiol diacetate and methyltestosterone [J]. *Aqua. Toxicol.* 2003, 65: 397—411
- [4] EDF2, Draft report from the 2nd OECD Expert consultation on Endocrine Disrupters Testing in Fish [R]. Tokyo, 15th—16th March, 2000
- [5] Miyuki C, Ryuzoh I, Quamrul H, et al. Effect of alkylphenols on adult male medaka: plasma vitellogenin goes up to the level of estrous female [J]. *Environmental Toxicology and Pharmacology*. 2003, 15: 33—36
- [6] Wang J W. Spawning performance and development of oocytes in *Gobiocypris rarus* [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*. 1999, 23: 161—166[王剑伟.稀有𬶋鲫产卵频次和卵子发育的研究.水生生物学报,1999,23:161—166]
- [7] Li L, Ma T W, Wu Z B. Toxic effect of domestic sewage on Rare minnow (*Gobiocypris rarus*) [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*. 2004, 28: 40—44[李莉,马陶武,吴振斌.生活污水对稀有𬶋鲫的毒性效应研究.水生生物学报,2004,28:40—44]
- [8] Lu L, Shen Y W. Acute toxicity of phenol, alkylbenzene, nitrobenzene and water sample to sword fish (*Xiphorus helleri*) and rare minnow (*Gobiocypris rarus*) [J]. *Res. Environ. Sci.* 2002, 15: 57—59
- [9] Liang Y, Xu Y, Yang F X, et al. Separation and purification of vitellogenin from two teleost fish species: Common carp (*Cyprinus carpio*) and Wuchang bream (*Megalobrama amblycephala* Yih) [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*. 2002, 26: 317—321[梁勇,徐盈,杨方星,等.鲤和团头鲂幼鱼卵黄蛋白原的诱导、纯化及电泳比较.水生生物学报,2002,26:317—321]
- [10] Li W, Xu Y. Extraction and purification of zona radiata proteins (ZRPs) from bluntose black bream (*Megalobrama amblycephala* Yih) [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*. 2003, 27: 132—135[黎雯,徐盈.团头鲂卵壳蛋白的分离与纯化.水生生物学报,2003,27:132—135]
- [11] K. Van den Belt, R. Verheyen, H. Witters. Comparison of vitellogenin responses in zebrafish and rainbow trout following exposure to environmental estrogens [J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 2003, 56:271—281
- [12] Tyler C R, Van der Eerden B, Jobling S, et al. Measurement of vitellogenin, a biomarker for exposure to oestrogenic chemicals, in a wide variety of cyprinid fish [J]. *Comp. Biochem. Physiol. B* 1996, 166: 418—426

- [13] Zhong X P, Xu Y, Liang Y, et al. Vitellogenin in rare minnow (*Gobio-cypris rarus*): identification and induction by waterborne diethylstilbestrol [J]. *Comp. Biochem. Physiol. C* 2004, 137: 291—298
- [14] Henrik H, Lene A, Gitte I P, et al. Development of an ELISA for vitellogenin in whole body homogenate of zebrafish (*Danio rerio*) [J]. *Comp. Biochem. Physiol. C* 2001, 130: 119—131

COMPARATIVE VITELLOGENIC RESPONSES IN ZEBRAFISH(*BRACHYDANIO RERIO*) AND RARE MINNOW(*GOBIOCYPRIS RARUS*) EXPOSED TO 17 α -ETHINYLESTRADIOL

LIAO Tao, XU Ying, ZHONG Xue-Ping, LIANG Yong and WANG Jian-Wei

(Institute of Hydrobiology, The Chinese Academy of Sciences; State Key Laboratory of Freshwater Ecology and Biotechnology, Wuhan 430072)

Abstract: In this study, the response of zebrafish and rare minnow to 17 α -ethinylestradiol (EE2) was studied using vitellogenin (Vtg) as a biomarker. Juvenile rare minnow and zebrafish were exposed to waterborne EE2 at 5ng/L, 20ng/L and 100ng/L EE2 in laboratory aquaria. After the exposure of 5, 10, 15 days, the fish were sampled to measure Vtg in whole body homogenates (WBH). The results showed that Vtg levels in juvenile rare minnow increased significantly at 5ng/L, 20ng/L and 100ng/L EE2 after 5 days exposure and reached a maximal level on the day 15th. Although Vtg concentration in juvenile zebrafish increased significantly in 100 ng/L EE2 exposure group after 5 days, a significant increase of Vtg in 5ng/L and 20ng/L treatment was just found on the day 15th and on the day 10th respectively. These indicate that rare minnow is more sensitive than zebrafish in Vtg induction to 17 α -ethinylestradiol.

Zebrafish Vtg was identified in this study. After being separated by SDS-PAGE, zebrafish Vtg produced two protein bands with molecular weights of 140 kDa and 170kDa. Because the development of species-specific methods for its quantification has been hampered due to problems such as the small blood volume and the lack of sufficient pure antigen and specific antibodies, a polyclonal antibody raised against carp Vtg was used as first antibody to measure Vtg in whole body homogenates of zebrafish and rare minnow in this study. The results of western blotting showed that the carp Vtg antibodies cross-reacted with zebrafish Vtg and could be used to measure zebrafish Vtg.

Key words: Rare minnow; Zebrafish; 17 α -ethinylestradiol; Vitellogenin