文章编号: 1001-0580(2004)10-1271-03　中图分类号: R994.6　文献标识码: A

【综　述】

环境内分泌干扰物的雌激素受体毒性研究进展

黄雅卿(综述),张文昌(审校)

环境内分泌干扰物(environmental endocrine disruptors, EEDs)对机体的影响可由于内源性激素的分泌改变,也可继发于受体作用机制的改变,或者是来源于相应器官的损害等。以下主要介绍 EEDs 对机体的影响是继发于受体作用机制的改变。已知的 EEDs 所影响的受体较多,但目前研究比较多的还是集中于雌激素受体(estrogen receptor, ER)。本文就 EEDs 与 ER 作用的相关蛋白、作用机制,受体毒性研究方法等进行论述。

1　EEDs 与 ER 作用的相关蛋白

性激素如何作用于内分泌系统被认为是一个复杂的过程。主要包括以下环节:多器官调控、性激素的生物合成、血浆结合蛋白、细胞表面受体、细胞内信号、蛋白之间的相互作用、蛋白和 DNA 的作用、信号在各途径的交叉、受体磷酸化、受体亲和力和活性、不同受体亚型、共辅活因子、共抑制因子、不同配体转录活性。EEDs 与 ER 作用的相关蛋白主要包括受体、配体、伴侣分子、共激活因子、肽类生长因子[1]。

1.1　受体　体内 ER 存在形式的复杂多变和 EEDs 化学结构的多样化预示着 EEDs 存在着多种未知的内分泌干扰途径。

1.1.1　受体亚型及组织分布　至今发现 ER 亚型有 3 种即 ERα、ERβ、ERγ,但目前所研究的大多集中于 ERα 和 ERβ,两种受体亚型的主要不同点在于羧基端的配体结合区和氨基端的转录激活区域。而且它们在人体内的组织分布也不大相同,ERα mRNA 主要高表达在子宫、睾丸、脑下垂体、卵巢、肾、附睾和肾上腺[2];ERβ mRNA 主要高表达在前列腺、卵巢、肺、膀胱、脑、子宫和睾丸。而对 ERγ 的研究报道较少,第一次发现它是在水生的硬骨鱼上,而且在睾丸上高表达,因此,有学者怀疑 EEDs 引起雄性机体包括鱼类的雌性化有可能通过这一受体介导[3]。ERγ 在其他脊椎动物的存在还有待于进一步研究。关于利用 ERα 基因敲除(ERα knockout, ER KO)小鼠研究儿茶酚雌激素和甲氧氯的雌激素活性报道表明,它们仍可促进子宫细胞增生和乳铁蛋白的生成,提示有第 3 种受体存在的可能性[4]。不同受体亚型及其特异的组织分布,将影响 EEDs 对机体的效应程度和范围。

1.1.2　ER 在细胞超微结构的分布　以往认为 ER 只存在于细胞核和细胞质中,现今发现在脑垂体、子宫、卵巢、肝脏和神经组织的雌激素靶细胞膜上有膜雌激素受体(membrane estrogen receptor, mER),并被认为可介导快速的非基因转录作用(nongenomic effects)的雌激素信号通路。mER 是 G 蛋白偶联的,并参与 17α 雌二醇对正常靶细胞的生物功能调节。Nadal A[5]报道某些 EEDs 也可激活 mER,提出一个新的环境激素内分泌干扰通路。此外,Chen and Yager[6]发现雌激素靶细胞的线粒体上也有 ERα 和 ERβ。ER 在细胞超微结构分布的多样性又使 EEDs 与 ER 作用机制的研究更加复杂。

1.2　EEDs 的化学结构　ER 配体的化学结构非常多样化,目前已被证实或疑为内分泌干扰物的化学物已有上百种,包括邻苯二甲酸酯、多氯联苯、有机氯杀虫剂和除草剂、烷基酚、双酚化合物、金属以及植物雌激素和真菌雌激素等。而且某些雌激素样物质经常有 1～2 个苯环[1]或者包含氯原子,比如十氯酮,一种杀虫剂,有一结构限制,就是每一碳原子上(除了 1 个之外)包含氯原子,就含有雌激素样活性。但氯原子在雌激素样活性中的作用还不很清楚。滴滴涕、氯化烃和多氯联苯化合物已被证实其在体内和体外均有雌激素样活性,羟基化的程度和氯原子的定位及经基团则决定了它们生物活性的大小。还有比如甲氧滴滴涕的代谢物与 ERα 和 ERβ 的相互作用是不同的,对 ERα 和 ERβ 的激活和拮抗是与其代谢物的结构相关的[7]。

1.3　伴侣分子　ER 有热休克蛋白 90(heat shock protein90, Hsp90)、热休克蛋白 70(heat shock protein70, Hsp70)、P45、P55 和 P48 等辅助蛋白分子,这些蛋白质分子是 ER 与靶基因的雌激素反应元件(estrogen response element, ERE)最佳结合作用所必须的。其中 Hsp90 与 ER 结合在一起位于核内,与 DNA 紧密结合并调节其表达。激素受体 Hsp90 异聚体的组装是受体活性的激素调节所必需的。双酚 A(bisphenol-A, BPA)可以如同雌二醇一样增加 Hsp90 的表达水平和改变 Hsp90 的分布位置,尤其增加间质和子宫肌层的表达水平,从而表现出不完全被 ER 拮抗剂所抑制的雌激素样活性[8]。

1.4　共激活因子　一类可以明显提高核受体的转录激活作用的辅助因子称为共激活因子(coactivators)。与 ER 相关的共激活因子有受体结合蛋白 140(receptor-interacting protein140, RIP140),类固醇受体共激活因子 1(Steroid Receptor Coactivator-1, SRC-1),糖皮质激素受体结合蛋白 1(glucocorticoid receptor interacting protein 1, GRIP1),雄激素受体相关蛋白 70(androgen receptor associated protein 70, ARA70),p300, TIF1 和 TIF2 等。EEDs 可通过模拟雌二醇激活各种共激活因子来产生雌激素效应。如辛基苯氧(octylphenol, OP),BPA 和 o,p'-DDT 可模拟雌二醇与 RIP140 相互作用,使 ERE 依赖的转录活性将扩大会 100 倍[9]。

1.5　肽类生长因子　在一些雌激素作用的靶器官和靶细胞,雌激素在发挥原有作用的同时,还可促进肽类生长因子及其受体的表达,而这些肽类生长因子,如表皮生长因子(epidermal growth factor, EGF)和胰岛素样生长因子(insulin-like growth factor, IGF)又与雌激素的生物学作用密切相关。EGF 可以改变 ER 的生化特性,使细胞核中 ER 数目增加,同时增强受体对染色质的亲和力。EGF 可以刺激 ER 的转录活动。Klotz[10]等发现己烯雌酚、双酚 A、大豆异黄酮等可通过 ERα 的介导增加去除卵巢的成年雌性大鼠子宫中胰岛素样生长因子 1(insulin-like growth factor-1, IGF-1)的表达,诱导 IGF-1 受体酪氨酸磷酸化,刺激 IGF-1 受体信号复合物形成,

作者单位: 福建医科大学公共卫生学院职业与环境卫生学系,福州 350004
作者简介: 黄雅卿(1977-),女,福建泉州人,硕士在读,研究方向:生殖毒理与环境内分泌干扰物。

以及增加子宫上皮细胞中增殖细胞核抗原(proliferating cell nuclear antigen,PCNA)的表达和有丝分裂细胞的数目。

2 作用机制

EEDs 及其代谢物,不管其结构与内源性雌激素是否相似,可与体内相应受体结合,这样就可模拟性激素的作用,导致受体激活和引发相应的生物效应,或者阻断以及减少体内性激素的受体结合力和生物活性。前者为激动剂,后者为拮抗剂。这种作用模式可由于受体后的细胞信号途径不同而不同,同时也可因影响到下丘脑垂体性腺轴或中枢神经系统的神经递质等改变而不同。此外还要考虑暴露时间、低剂量效应、协同作用和物种间差异。此外,还有报道某些物质不具有与 ER 结合的能力,仍可能通过非配体途径激活 ER 而调节靶基因转录。如三氮杂苯杀虫剂"莠去津"并不与 ER 结合,却在体外实验中产生类雌激素效应。EEDs 对 ER 的影响包括抑制受体与内源性雌激素相互作用;通过受体激活靶基因或抑制靶基因;占领受体,但不产生任何作用;改变 ER 的表达水平。

2.1 与 ER 的结合力 大多数外源雌激素除了己烯雌酚,与 ER 受体结合力只有内源性激素的 1/1 000～1/1 000 000,而且研究报道各种 EEDs 对两种受体亚型的亲和力不大相同。如植物雌激素、甲氧氯、双酚 A 对于 ERβ 的亲和力要大于 ERα[1]。有学者认为不同种类的 ERs 对不同的雌激素样物质有不同的亲和力,是由于它们各自的 ER 配体结合区域的氨基酸序列不同[12]。

2.2 对 ER 的拮抗和抑制 EEDs 可以是 ER 的激动剂、部分激动剂、拮抗剂或非激动非拮抗剂,它们可结合到配体结合区域的相同位点,产生不同的结合模式。另外,每一类配体将引起配体结合区的转录激活区域的不同构象,从而产生不同的受体结合效应,激活靶基因或抑制靶基因。如有机氯杀虫剂甲氧氯的代谢物二羟苯基三氯乙烷〔2,2 - bis - (p - hydroxyphenyl) - 1,1,1 - trichloroethane,HPTE〕,是 ERα 的激动剂,ERβ 的拮抗剂[7]。

2.3 改变 ER 表达水平 EEDs 可以改变 ER 表达水平。如四氯二苯二氧芑(Tetrachlorodienzodioxin,TCDD)可显著提高经 48 h 培养后的大鼠卵巢颗粒细胞内的芳香烃受体(aryl hydrocarbon receptor,AhR)和 ERβ mRNA 水平[13]。而金雀异黄素可以减少雄性大鼠前列腺的 ERα mRNA 和 ERβ mRNA 的表达[14]。Garcia[15]等发现镉在体外能够模拟雌二醇作用,引起人类乳腺癌细胞株 MCF - 7 增殖达 5.6 倍,ER 水平降低 58 %,EBmRNA 平行性下降 62 %。但 EEDs 对于不同组织不同 ER 亚型也有不同的影响效果。如甲氧滴滴涕的代谢物 HPTE 可减少子宫 ERα 表达,却可增加卵巢 ERβ 水平[16]。

3 受体毒性研究方法

目前,EEDs 的研究主要还是利用 ER 来甄别环境化学物内分泌干扰活性。EEDs 对于生物体内 ER 的毒性作用包括取表达的改变、受体结构的改变以及伴侣分子、共激活因子和肽类生长因子的改变等的研究还不多见,也未见比较成熟规范的方法用于这些方面的研究。因此下文主要介绍的是目前利用 ER 来甄别环境化学物内分泌干扰活性的方法。

3.1 ER 结合试验 主要包括 ER 竞争结合试验和 ER 竞争抑制法。前者包括闪烁迫近分析法(Scintillation proximity assay,SPA)和荧光偏振技术(fluorescence polanzation,FP);后者包括雌二醇 - ^{3}H 标记法和荧光极化法。ER 结合试验法快速、灵敏,但存在一些局限性,如不能分清激动剂和拮抗剂;体外可得到阳性结果的化学物的浓度远比体内高;不能反映机体对化学物的代谢以及化学物对受体的激活能力及跨膜能力,其结果也需要动物实验验证;只能测定配体一受体间相互的结合;如果体外基因转录活性测定方法已证实的话,受体结合实验就没有意义。

3.2 ER 激活试验[17] 包括酵母细胞 ER 介导的转录试验如酵母雌激素筛选试验(Yeast Estrogen Screen,YES)和哺乳动物细胞(小鼠 L 纤维母细胞,HeLa 细胞,MCF - 7 细胞、MVLN 细胞等)增殖试验。其中 YES 的原理是具有雌激素活性的化学物能刺激转化酵母有关基因的表达,从表达蛋白质的量来判定其雌激素活性。但该法的缺点在于不知道酵母对 EEDs 的代谢情况,也不能反映受试物在哺乳动物体内可能存在的代谢后使 EEDs 活化或失活的情况。因此,YES 系统的结果需用动物实验方法证实。而哺乳动物细胞增殖试验是利用哺乳动物细胞能特异地对雌激素或雌激素样化合物起反应而增殖,该方法灵敏,简单易行,而且可以区分激动剂和拮抗剂,其中以 MCF - 7 细胞最常用。MCF77 细胞是从放射和激素治疗后的转移性乳腺癌女患者的胸腔渗出物建立的细胞株。

3.3 三维结构特征与活性关系 目前,美国环保局将三维结构特征与活性关系(a three - dimensional quant,structure - activity relation,3D - QSAR)用于检测一系列结构多样化的天然的和人工合成的化学物的雌激素样活性。这种测定方法成功地证明了结构上多样化的配体的总体原子空间排列和静电特性对于描述它们的结合力是必要和充分的。这一方法对化学物和 ER 结合力的准确预测可使其在对一种新的可疑 EEDs 物质的确认过程中成为一种有效的补充[18]。

4 展望

近 10 年来,人们对 EEDs 的研究主要还是集中在环境化学物内分泌干扰活性的甄别。随着研究的进展和科学的进步,EEDs 暴露的人群流行病学调查和 EEDs 作用机制研究必将成为研究的热点。EEDs 的雌激素受体毒性的研究也是刚刚起步,作为 EEDs 的一个主要作用机制,也将成为进一步研究的课题。

参考文献:

〔1〕 John A McLachlan. Environmental Signaling: What Embryos and Evolution Teach Us About Endocrine Disrupting Chemicals[J]. Endocrine Reviews,2001,22(3):319 - 341.

〔2〕 Kuiper GGJM,Carlsson B,Grandien K,et al. Comparison of the ligand binding specificity and transcript tissue distribution of estrogen receptors α and β[J]. Endocrinology,1997,138:863 - 870.

〔3〕 Mary Beth Hawkins,Joseph W Thornton,David Crews,et al. Identification of a third distinct estrogen receptor and reclassification of estrogen receptors in teleosts[J]. Proc Natl Acad Sci,2000,97(20):10751 - 10756.

〔4〕 Das SK,Taylor JA,Korach KS,et al. Estrogenic responses in estrogen receptor - α deficient mice reveal a distinct estrogen signaling pathway[J]. Proc Natl Acad Sci,1997,94(1):2786 - 2789.

〔5〕 Nadal A. Ropero AB,Laribi O,et al. Nongenomic actions of estrogens and xenoestrogens by binding at a plasma membrane receptor unrelated to estrogen receptor α and estrogen receptor β[J]. Proc Natl Acad Sci,1997,11603 - 11608.

〔6〕 Chen J,Yager JD. Mitochondrial localization of estrogen receptor,(ER)s α and β[J]. Proc Am Assoc Cancer Res,2001,42:882.

〔7〕 Gaido KW,Maness SC,McDonnell DP,et al. Interaction of methoxychlor and related compounds with estrogen receptor α and β,and androgen receptor: structure - activity studies[J]. Mol

Pharmacol ,2000 ,58(4) :852 - 858.
〔8〕 Andriana D Papaconstantinou ,Benjamin R Fisher , Thomas H Umbreit ,et al. Effects of β- Estradiol and Bisphenol A on Heat Shock Protein Levels and Localization in the Mouse Uterus Are Antagonized by the Antiestrogen ICI 182 , 780 [J]. Toxicological Sciences ,2001 ,63 :173 - 180.
〔9〕 Sheeler CQ ,Dudly MW , Khan SA ,et al , Environmental estrogens induce transcriptionally active estrogen receptor dimers in yeast : activity potentiated by the coactivator RIP140[J]. Environ Health Perspect ,2000 ,108(2) :97 - 103.
〔10〕 Klotz DM , Hewitt SC , Korach KS ,et al. Activiation of a uterine insulinlike growth factor I signaling pathway by clinical and environmental estrogens ,requirement of estrogen receptor - alpha[J]. Enodocrinology ,2000 ,141(9) :3430 - 3439.
〔11〕 Enmark E ,Pelto Huikko M , Grandien K,Lagerkrantz S ,et al. Human estrogen receptor beta - gene structure ,chromosomal localisation and expression pattern [J]. Journal of clinical endocrinology and metabolism ,1997 ,82(12) :4258 - 4265.
〔12〕 Matthews JB ,Celius T , Halgren R ,et al. Differential estrogen receptor binding of estrogenic substances : a comparison across species[J]. Journal of steroid biochemistry and molecular biology , 2000 ,74(4) :223 - 234.
〔13〕 Dasmahapatra AK , Wimpee BAB , Trewin AL ,et al. 2 ,3 ,7 ,8 - Tetrachlorodibenzo - p - dioxin increases steady - state estrogen receptor - β mRNA levels after CYP1A1 and CYP1B1 induction in rat granulosa cells *in vitro*[J]. Mol Cell Endocrinol ,2001 ,182 (1) :39 - 48.
〔14〕 Fritz WA ,Wang J ,Eltoum IE ,et al. Dietary genistein down - regulates androgen and estrogen receptor expression in the rat prostate[J]. Mol Cell Endocrinol ,2002 ,386(1) :89 - 99.
〔15〕 Garcia Morales P , Saceda M , Kenney N ,et al. Effect of cadmium on estrogen receptor levels and estrogen - induced responses in human breast cancer cells[J].J Biol Chem ,1994 ,269 (24) :16896 - 16901.
〔16〕 Waters Katrina M ,Safe Stephen , Gaido Kevin W ,et al. Differential gene expression in response to methoxychlor and estradiol through ERα, ERβ and AR in reproductive tissues of female mice [J]. Toxicological Sciences ,2001 ,63(1) :47 - 56.
〔17〕 王心如. EEDs 研究的几个重点问题[J]. 中国毒理学通讯, 2002 ,6(1) :8 - 10.
〔18〕 Waller CL ,Oprea TI ,Chae K,et al. Ligand - Based Identification of environmental estrogens[J]. Chem Res Toxicol , 1996 ,9 (8) : 1240 - 1248.

收稿日期: 2004-02-28 (宋艳萍编辑 孔繁学校对)

文章编号: 1001-0580(2004) 10-1273-01 **中图分类号**: R155. 5 **文献标识码**: B

【基层公共卫生】

市售蜂蜜卫生状况调查

张香馥[1] ,张宏[1] ,杨梅[1] ,罗若荣[2] ,吕玉琼[2] ,张晶[2]

为了解市场销售蜂蜜质量状况 ,加强对蜂蜜的卫生质量监督 ,我们在多家市场销售点进行随机采样。共采集 46 份来自不同厂家的蜂蜜 ,检测 6 项理化卫生指标。现将检测结果报告如下。

材料与方法 (1) 样品 :从市场各销售点和批发部门随机采集 46 份样品 ,均为定型包装(玻璃瓶装) ,分为天然蜂蜜、营养蜂蜜等。蜂蜜的产地为福州、上海、北京、河北、杭州等 19 个省市。(2) 检测方法 :按中华人民共和国出入境检验检疫行业标准〔1〕(进出口蜂蜜检验方法理化部分) ST/ T0852 - 2000。①试样制备 :按 SN/ T0852 - 2000 中 3. 1 制备。②还原糖 :按 SN/ T0852 - 2000 3. 8. 2 中铁氰化钾法。③蔗糖 : 按 SN/ T0852 - 2000 39. 2 中铁氰化外法。④酸性 :按 SN/ T0852 - 2000 中 3. 5 试验。⑤淀粉酶活性 :按 SN/ T0852 - 2000 中 3. 6 试验。⑥羟甲基糠醛 :按 SN/ T0852 - 2000 中 3. 7 试验。⑦灰分 :按 GB/ T5009. 4 - 1985 试验。

结果与讨论 46 份蜂蜜还原糖合格率为 56. 5 %(26/ 46) ;蔗糖合格率 80. 4 %(37/ 46) ;淀粉酶合格率 52. 2 %(24/ 46) ;酸度和羟甲级糠醛全部合格。还原糖含量在 33. 6 %～46. 7 %的 12 份 ,51. 1 %～62. 9 % 8 份。蔗糖含量在 5. 3 %～8. 2 % 5 份 ,11. 6 %～20. 0 % 4 份。还原糖、蔗糖是蜂蜜的主要成分 ,约占蜂蜜总量的 3/ 4 ,纯蜂蜜还原糖含量在 65 %～80 %之间 ,蔗糖在 5 %以下 ,在此范围之内 ,大多数是掺假蜂蜜。本次检测发现淀粉酶活性的合格率偏低 ,酶值含量 < 2 的有 13 份 ,含量在 3. 05～6. 79 的有 9 份 ,含量在 8. 01～35. 59 的有 24 份。淀粉酶活性是评价蜂蜜质量的主要指标之一 ,可反映蜂蜜的酿造成熟度。造成淀粉酶值活性低的原因有 : (1) 蜂蜜的成熟度不够 ,天然的蜂蜜需要一定的时间 ,部分蜂农为了提高蜂蜜产量 ,往往提前采蜜 ,人为缩短了蜂蜜的成熟过程 ,导致蜂蜜的熟化过程不能完成。(2) 加工过程中高温加热处理 ,会损失蜂蜜的营养成分 ,使酶值降低。(3) 储存不当过久的蜂蜜 ,酶值也会受到破坏。(4) 掺假也是酶值降低的一个主要原因。(5) 还原糖、蔗糖与淀粉酶活性之间的统计学关系 :蜂蜜中的酶会对蔗糖起转化作把蔗糖转化成还原糖 , 从而消耗了蜂蜜中的转化酶 ,致使酶值下降。对本次测定数据作统计分析可见 ,还原糖和淀粉酶活性 2 个指标间有很强的相关性 ,相关系数为 0. 527 ;还原糖和蔗糖之间呈现强迫负相关 ,相关系数为 - 0. 501 ;但是蔗糖和淀粉酶活性之间没有相关性。在扣除了蔗糖的影响后发现还原糖和淀粉酶活性之间的相关强度有所下降 ,相关系数为 0. 496。本次检测的蜂蜜 ,产地几乎分布全国各地。综合判断合格的样品数是 24 份 ,合格率为 52. 2 %。说明市售蜂蜜存在着一定的质量问题。

作者单位: 1. 河北省石家庄市卫生防疫站理化检验科 ,050011 ;
2. 深圳市疾病预防控制中心
作者简介: 张香馥(1960 -) ,女 ,河北石家庄人 ,主管检验师 ,大专 ,主要从事环境污染物分析研究。

参考文献:
〔1〕 中华人民共和国出入境检验检疫行业标准[S]. 进出口蜂蜜检验方法.

收稿日期: 2004-03-12 (任旭红编辑 孔繁学校对)