

三氯生对雌性黄河鲤的激素效应及其影响机制

王 凡, 徐瑞杰, 王 薇

(洛阳师范学院, 河南 洛阳 471934)

摘要:为了探讨三氯生(TCS)对鱼类性激素的影响机制,通过半静态水质接触暴露法对雌性黄河鲤(*Cyprinus carpio*)进行处理,设置空白对照组和 3 个不同浓度(0.04 mg/L、0.08 mg/L、0.16 mg/L)的 TCS 处理组,处理 42 d 后,采用酶联免疫(ELISA)和实时荧光定量 PCR(qRT-PCR)法检测各组雌性黄河鲤血清睾酮(Testosterone, T)和雌二醇(Estradiol, E₂)的分泌水平及其卵巢中促性腺激素释放激素(CGnRH-ii-2)和雌激素受体(Er)的 mRNA 表达水平。结果显示,各浓度组的 T 水平无显著性差异($P>0.05$),而 0.16 mg/L 的 TCS 能使黄河鲤血清中的 E₂ 含量及 E₂/T 显著性升高($P<0.05$, $P<0.01$);TCS 各浓度组卵巢中 CGnRH-ii-2 mRNA 水平显著下降($P<0.01$);而 0.08 mg/L 和 0.16 mg/L 的 TCS 处理组 Er mRNA 水平显著升高($P<0.05$, $P<0.01$)。研究表明,TCS 有潜在雌激素效应,其机制与雌激素受体和促性腺激素释放激素基因表达调控相关。

关键词:三氯生;黄河鲤;雌二醇;睾酮;促性腺激素释放激素

中图分类号:Q579.1 **文献标志码:**A **文章编号:**1674-3075(2019)03-0126-05

三氯生(Triclosan, TCS)学名为二氯苯氧氯苄,是一种高效广谱抗菌剂和杀菌剂,主要添加于护理用品、清洁用品及洗漱用品中(徐海丽等, 2012)。TCS 过去曾被认为低毒而在日常生活中广泛使用,从而导致其存在于各类环境中。由于 TCS 具有生物蓄积性、不易降解性以及通过食物链传递等特点,在各种生物体内及其人体中已经被广泛检测到(黄珍茹等, 2015)。已有研究表明, TCS 具有致死、遗传、免疫等多种毒性效应,在一定的条件下可以转化为毒性更强的物质(陈建军等, 2013)。因此,关于 TCS 的毒理学研究已经引起了国内外环境科学、生态学、预防医学等领域专家的重视。

目前,关于 TCS 毒性的研究已有不少报道。TCS 对水生生物尤其是藻类产生较高的急性毒性,并且对生物体有较大的内分泌干扰效应(郑欣等, 2016); TCS 对羊角月牙藻的 96 h-EC₅₀ 为 0.112 mg/L,属于高毒;对羊角月牙藻体内抗氧化酶系中 GST 活性和 MDA 的含量也有显著影响(李义刚等, 2013);长期大剂量接触 TCS 能够导致肝脏和肾脏受损,而且可能对免疫系统造成一定程度的影响(姜淑卿等, 2006); TCS 对红白鲫具有潜在遗

传毒性,并且毒性效应在特定条件下随暴露浓度的增强而增强(刘飞等, 2016)。迄今关于 TCS 对生殖内分泌干扰的研究不多,且主要集中在哺乳类动物上。如不同浓度的 TCS 对孕前和孕早期的大鼠进行暴露处理,大鼠的阴道张开时间显著提前,表明 TCS 具有类似雌激素作用(Stoker et al, 2010); TCS 也可以抑制雌羊体内雌激素磺基转移酶的活性,从而损伤胎儿的脑组织发育(James et al, 2009);另外,体外实验还证实了 TCS 对人类乳腺癌细胞同时产生雌激素和雄激素效应(Gee et al, 2008)。上述体内和体外实验研究已经证实 TCS 具有生殖内分泌干扰性。

鱼类具有和哺乳动物相似的生理特点,而水环境是 TCS 的主要分布区域。目前,已经监测到黄河受到不同程度 TCS 的污染,从而威胁到黄河水域生态系统平衡和人类健康(Zhao et al, 2013)。因此,本实验选用黄河鲤(*Cyprinus carpio*)为研究对象,探究不同浓度的 TCS 对雌性黄河鲤性激素及其生殖轴线相关基因表达的影响,旨在探讨 TCS 对鱼类的内分泌干扰效应,同时为环境保护和科学合理使用 TCS 提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 研究对象

本次实验用黄河鲤体长 7.8~9.9 cm,购自河南省黄河鲤良种场。黄河鲤暂养在 60 L 水族箱中,实

收稿日期:2017-06-13

基金项目: NSFC-河南人才培养联合基金(U1504303);河南省高等学校青年骨干教师培养计划项目(2016GGJS-119)。

作者简介:王凡,1976 年生,男,副教授,主要从事生态毒理学研究。E-mail: wangfan7677@163.com

验用水为曝气 3 d 的去氯自来水,水温(18±3)℃,并向水箱中持续充氧,按时喂食且及时处理残饵和粪便。

1.2 实验试剂和仪器

试剂包括三氯生(美国 Sigma)、二甲基亚砷溶剂(天津紫明化工有限公司)、鱼雌二醇(Estradiol, E₂)酶联免疫分析试剂盒、鱼睾酮(Testosterone, T)酶联免疫分析试剂盒(上海纪宁生物公司)、总 RNA 极速抽提试剂盒(上海飞捷生物技术有限公司)、反转录试剂盒(日本东洋纺生物科技有限公司)、Bestar SybrGreen qPCR mastermix(德国 DBI 公司)引物序列(华大基因合成)、无菌水等。

仪器包括 PCR 仪、实时荧光定量 PCR 仪、超微量分光光度计、高速冷冻离心机、高压灭菌锅、超净工作台、电热干燥箱、移液枪、电子天平、微波炉、电泳槽、水族箱等。

1.3 实验设计

黄河鲤暂养 7 d 后,选择生长状况良好的个体进行 TCS 染毒处理。根据相关报道(王晓南,2014)和前期实验,得出黄河鲤 96 h-LC₅₀ 为 0.8 mg/L。在此基础上,共计设置了 3 个 TCS 处理组,依次为 1/20 LC₅₀ (0.04 mg/L)、1/10 LC₅₀ (0.08 mg/L) 和 1/5 LC₅₀ (0.16 mg/L),同时设置空白对照组。每 24 h 换 50% 的 TCS 处理液,使 TCS 浓度基本保持不变。TCS 处理时间为 42 d。

1.4 样本制备

TCS 处理 42 d 后,从每实验组中各随机取 5 条雌性黄河鲤进行断尾取血,同时取其卵巢,保存在 -80℃ 冰箱中,用于相关基因表达的检测。血液在室温下放置 1 h,然后在 4℃ 的冰箱中放置过夜之后,以 3 500 r/min 离心 10 min 后仔细吸取上清液,即为血清,用于性激素的检测。

1.5 血清激素检测

雌性黄河鲤血清中 E₂ 和 T 浓度检测采用酶联免疫分析(ELISA)方法,在酶标仪中进行测定。

1.6 基因表达检测

1.6.1 引物序列 引物序列见表 1。根据黄河鲤促性腺激素释放激素(cGnRH-ii-2)基因序列设计特异性引物,并通过半定量 PCR 扩增及实时荧光定量 PCR(qRT-PCR)检测引物的特异性。经分析发现,其溶解曲线峰一致,目的条带单一明亮,引物特异性良好。β-actin(内参)和雌激素受体(Er)基因的引物序列参考相关报道(卢月娇等,2009;贾永芳等,2016)。

表 1 实时荧光定量 PCR 所用基因的特异性引物及其序列

Tab.1 Primer sequences used for quantitative real-time PCR amplification	
Gene	Primer sequence (5'-3')
cGnRH-ii-2	F: TCTCAGCACTGGTCTCAT
	R: GGCATCCAGCAGTATTGT
Er	F: TGGATAGGAGTGAAGGAGAA
	R: TGGATAGGAGTGAAGGAGAA
β-actin	F: GATGATGAAATTGC CGCACTG
	R: ACCAACCATGACACCCTGATGT

1.6.2 qRT-PCR RNA 的提取按照极速 RNA 提取试剂盒步骤操作,提取出来的 RNA 质量,用凝胶成像分析仪观察并分析 RNA 提取结果。在此基础上,选取 1.8<OD₂₆₀/OD₂₈₀<2.1 的样本用试剂盒进行反转录,对反转录后的 cDNA 用实时荧光定量 PCR 试剂盒,根据基因相应引物进行扩增定量,用 2^{-ΔΔCt} 法计算相关基因的相对表达量(Livak & Schmittgen, 2001),所用数据由随机附带软件获得。反应条件:95℃ 预变性 2 min;循环条件如下:95℃、10 s,55℃、30 s,72℃、30 s,同时检测荧光信号,40 个循环反应;融解曲线 95℃、1 min,55℃、1 min,55~98℃(10 s、0.5℃循环)86 个循环。

1.7 数据分析

数据用 SPSS 17.0 对实时荧光定量 PCR 结果进行分析,采用单因素方差分析法,数据用平均值±标准差(Mean±SD)表示。各个浓度组之间的差异采用 Duncan 法多重比较,P<0.05,表示对照组与处理组有显著差异;P<0.01,表示有极显著差异。

2 结果与分析

2.1 三氯生对雌性黄河鲤性激素的影响

不同浓度三氯生(TCS)处理 42 d 后对雌性黄河鲤激素的影响见图 1。TCS 各处理的血清睾酮(T)与对照相比无显著性差异(P>0.05)。随着 TCS 浓度的升高,黄河鲤血清中的雌二醇(E₂)含量逐渐增大,对照组 E₂ 含量为(6.81±0.44) pmol/L,0.16 mg/L 的 TCS 处理组中 E₂ 含量为(8.37±0.60) pmol/L,与对照相比显著升高(P<0.05),且升高了 22.7%。0.04 mg/L 和 0.08 mg/L 的 TCS 处理组中 E₂ 与 T 的比率(E₂/T)与对照相比有升高趋势,对照组 E₂/T 为(0.16±0.03);0.16 mg/L 的 TCS 处理组中 E₂/T 为(0.16±0.01),与对照对照组相比,升高了 35.7%(P<0.05)。以上实验结果可以推断,高浓度的 TCS 对雌性黄河鲤的 E₂ 及其 E₂/T 比率有显著性影响。

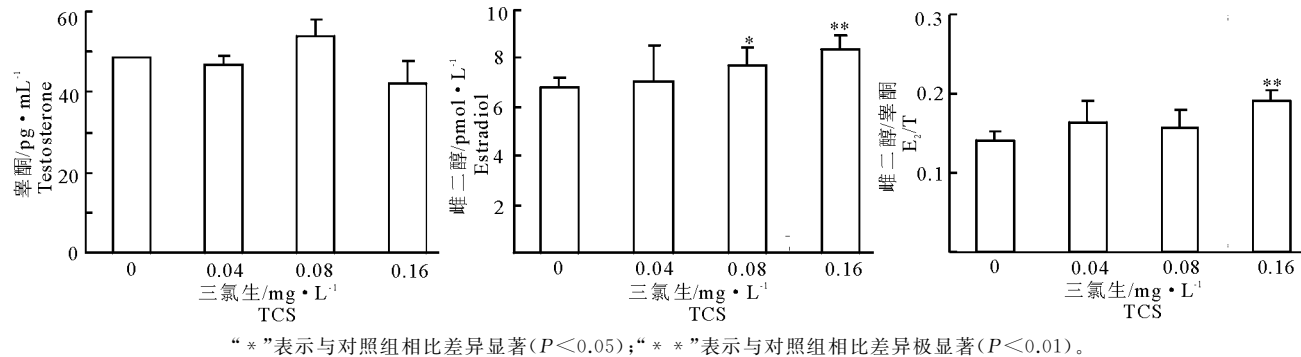


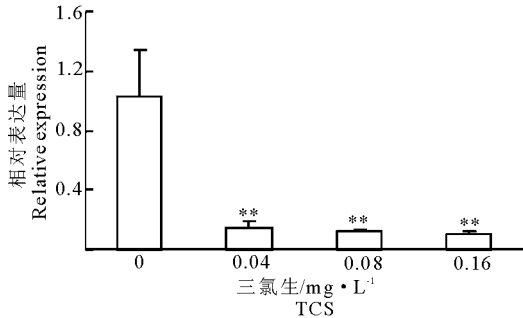
图1 不同浓度三氯生处理42 d后对雌性黄河鲤鱼性激素的影响

“*” indicates a significant difference compared to the control group ($P<0.05$);
“**” indicates a highly significant difference compared to the control group ($P<0.01$).

Fig.1 Effect of TCS on sex hormones in serum of female Yellow River carp

2.2 三氯生对鲤卵巢促性腺激素释放激素的影响

三氯生对雌性黄河鲤卵巢促性腺激素释放激素表达的影响见图2。对照组卵巢的CGnRH-ii-2 mRNA相对表达量为(1.02±0.32), 0.04、0.08、0.16 mg/L的相对表达量依次为(0.15±0.14)、(0.13±0.01)、(0.10±0.03), 与对照组相比极显著降低($P<0.01$)。结果显示,TCS显著影响了黄河鲤卵巢中促性腺激素释放激素的mRNA的表达。



“***”表示与对照组基因表达量相比差异极显著($P<0.01$)。

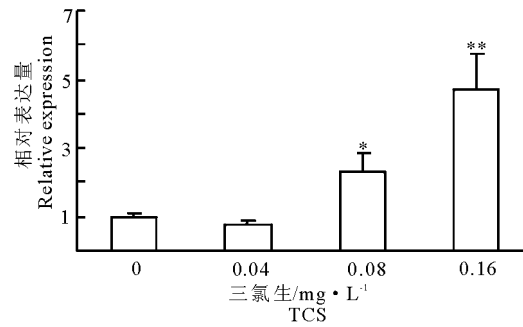
图2 三氯生对雌性黄河鲤卵巢促性腺激素释放激素表达的影响

“***” indicates a highly significant difference compared to the control group ($P<0.01$).

Fig.2 Effect of TCS on expression of CGnRH-ii-2 mRNA in ovary of female Yellow River carp

2.3 三氯生对鲤卵巢雌激素受体 mRNA 的影响

三氯生(TCS)对雌性黄河鲤卵巢雌激素受体(Er)mRNA相对表达的影响见图3。对照组卵巢的mRNA相对表达量为(1.00±0.10), 0.04 mg/L TCS处理组为(0.79±0.09), 与对照组相比差异不显著($P>0.05$);而0.08 mg/L和0.16 mg/L TCS处理组卵巢的雌激素受体mRNA相对表达依次为(2.29±0.54)和(4.72±1.04), 与对照相比显著升高($P<0.05$, $P<0.01$), 分别升高了128%和372%。



“*”表示与对照组基因表达量相比差异显著($P<0.05$);
“**”表示与对照组基因表达量相比差异极显著($P<0.01$).

图3 三氯生对雌性黄河鲤卵巢雌激素受体 mRNA 表达的影响

“*” indicates a significant difference compared to the control group ($P<0.05$); “**” indicates a highly significant difference compared to the control group ($P<0.01$).

Fig.3 Effect of TCS on expression of Er mRNA in the ovary of female Yellow River carp

3 讨论

环境污染物对内分泌的干扰已引起研究者的高度重视(杨淑贞等,2005;胡军等,2006;金瑛,2015)。本研究发现TCS能够显著增加雌性黄河鲤血清E₂的分泌量,且显著提高了E₂/T的比率;另外,本研究还发现TCS显著降低了雌性黄河鲤卵巢CGnRH-ii-2 mRNA表达,增加了Er mRNA表达。表明TCS对雌性黄河鲤具有潜在的雌激素效应,其对雌激素水平的影响可能是通过生殖轴线相关基因表达调控来实现的。

生殖轴线的多个位点包括促性腺激素释放激素(GnRHs)、促性腺激素(GtHs)或类固醇生成酶等均可作为外源化合物作用的潜在靶位点,最终其内分泌干扰作用表现为性激素水平的变化(田华,

2010)。作用机理是在生殖轴线中,GtHs的合成与分泌受到内分泌系统主要调节因子 GnRHs的调控。GnRH由下丘脑合成,作为生殖轴线的起始和关键信息分子,可刺激 GtHs的释放;同时,GtHs和性激素又可以通过反馈作用调节 GnRHs的水平。本研究发现,TCS使黄河鲤卵巢中的 CGnRH-ii-2 mRNA水平显著下调,表明 TCS干扰雌性黄河鲤 GtHs和 GnRHs对 E_2 的调节,从而改变性激素水平,最终使 E_2 及其 E_2/T 显著升高。多联氯苯可以导致下丘脑视前区、垂体中 GnRHs受体和血浆中促黄体生成素(LH)显著降低,推测 LH水平的降低是由于 GnRHs的释放受到抑制所致(Ma et al, 2012);该研究结果与本次结果类似。另外,雌激素受体介导反应途径是目前比较认可的环境激素作用机制之一,环境激素与雌激素受体结合时,会产生两种不同效应,一种为诱导下游基因的转录,使雌激素作用受到强化并超出正常范围,表现为雌激素亢进效应(类雌激素效应),如双酚 A、4-壬基酚、己烯雌酚等(Jung et al, 2012);另一种为阻断雌激素与受体结合,表现为雌激素拮抗效应(抗雌激素效应)。本研究同时还发现,TCS使 Er 基因 mRNA 表达量显著性上调,这一研究结果很好地验证了 TCS对生殖轴线上雌激素受体介导反应中雌激素亢进效应。

综上,三氯生对雌性黄河鲤产生了潜在的雌激素效应,其机理可能是通过生殖轴线相关基因的表达调控来实现的。研究结果可为黄河鲤生殖群落保护和水生生态系统平衡提供理论依据,同时对其健康养殖和食用安全具有一定的指导作用,还可为三氯生的生态风险评价提供参考。

参考文献

陈建军,豆晓飞,刘海津,等,2013. 三氯生致泥鳅生理及遗传毒性作用[J]. 中国公共卫生,29(7):1014-1016.

胡军,李杰,张奎卫,等,2006. 双巯基乙酸异辛酯二正辛锡(TMA)对大鼠生殖内分泌激素的影响[J]. 环境与健康杂志,23(3):1001-5914.

黄珍茹,王彩凤,田英,2015. 三氯生在环境与人体中的暴露情况研究进展[J]. 环境与职业医学,32(8):795-800.

贾永芳,张弯弯,张瑞华,2016. 黄河鲤性别决定时间和相关基因表达研究[J]. 水生生物学报,40(6):1121-1127.

姜淑卿,周蕾,李怡岚,等,2006. 三氯生亚急性经口毒性的研究[J]. 中国职业医学,33(6):432-434.

金瑛,2015. 三氯生诱导 HepG2 细胞凋亡及其介导的分子通

路研究[D]. 汕头:汕头大学.

李义刚,刘滨扬,彭颖,等,2013. 三氯生对羊角月牙藻生长及其抗氧化系统的影响[J]. 生态毒理学报,8(3):357-365.

刘飞,刘旭昊,王凡,等,2016. 三氯生对红白鲫的急性毒性及遗传毒性研究[J]. 水生生态学杂志,37(5):82-86.

卢月娇,胡炜,朱作言,2009. 鲤鱼发育早期 HPG轴和 GH/IGF轴相关因子的转录起始分析[J]. 水生生物学报,33(6):1126-1131.

田华,2010. 久效磷农药对金鱼(*Carassius auratus*)生殖轴线的研究[D]. 青岛:中国海洋大学.

王晓南,2014. 典型污染物水生生物基准关键技术研究[D]. 北京:北京师范大学.

徐海丽,林毅,孙倩,等,2012. 三氯生的生态效应及其在环境中的迁移转化[J]. 生态毒理学报,7(3):225-233.

杨淑贞,韩晓东,陈伟,2005. 五氯芬对生物体的毒性研究进展[J]. 环境与健康杂志,22(5):1001-5914.

郑欣,刘婷婷,王一喆,等,2016. 三氯生毒性效应及水质基准研究进展[J]. 生态环境学报,25(3):539-546.

Gee R H, Charles A, Taylor N, et al, 2008. Oestrogenic and androgenic activity of triclosan in breast cancer cells [J]. J Appl Toxicol, 28(1): 78-91.

James M O, Li W, Summerlot D P, et al, 2009. Triclosan is a potent inhibitor of estradiol and estrone sulfonation in sheep placenta[J]. Environ Int, 36(8): 942-949.

Jung E M, An B S, Yang H, et al, 2012. Biomarker Genes for Detecting Estrogenic Activity of Endocrine Disruptors via Estrogen Receptors[J]. Inter J Env Res Pub Heal, 9(3): 194-202.

Livak K J, Schmittgen T D, 2001. Analysis of relative gene expression data duing data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method[J]. Methods, 25(4):402-408.

Ma H B, Qin F, Wang H B, et al, 2012. Disruption of endocrine function in vitro H295R cell-based and in vivo assay in zebrafish by 2, 4-dichlorophenol [J]. Aquat Toxicol, 106(1): 173-181.

Stoker T E, Gibson E K, Zorrilla L M, 2010. Triclosan exposure modulates estrogen-dependent responses in the female wistar rat[J]. Toxicol Sci, 117(1): 45-53.

Zhao J L, Zhang Q Q, Chen F, et al, 2013. Evaluation of triclosan and triclocarban at river basin scale using monitoring and modeling tools: Implications for controlling of urban domestic sewage discharge[J]. Water Res, 47(1): 395-405.

(责任编辑 万月华)

Effect of Triclosan (TCS) Exposure on Sex Hormones of Female Yellow River
Carp(*Cyprinus carpio*) and Effect Mechanism

WANG Fan, XU Rui-jie, WANG Wei

(Luoyang Normal University, Luoyang 471934, P.R.China)

Abstract: Triclosan (TCS, 2,4,4'-trichloro-2'-hydroxydiphenylether), is a broad spectrum antimicrobial agent widely used in personal care products, household cleaning products and medical supplies. Studies have showed that TCS is not readily biodegraded and can accumulate, move up the food chain to humans and produce a variety of toxic effects. However, the effects of TCS on the reproductive endocrine system in fish are poorly understood. In this study, the effect of TCS exposure on the hormones of female Yellow River carp (*Cyprinus carpio*) and the effect mechanism were investigated. *C. carpio* of body length 7.8–9.9 cm were acclimated for one week in a glass aquarium (58 cm×28 cm ×36 cm). After acclimation, the test fish were randomly assigned to a control group and three TCS treatment groups (0.04 mg/L, 0.08 mg/L, and 0.16 mg/L) for a 42-day semi-static exposure under the following conditions: temperature (18±3)℃; DO, >5.0 mg/L; pH, (7.0±0.2). After the experiment, the levels of testosterone (T) and estradiol (E₂) in serum, and mRNA levels of CGnRH-ii-2 and estrogen receptor(Er) in the ovary were determined by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR). There was no significant difference in the level of testosterone (T) between the control group and any of the TCS treatment groups, but the estradiol (E₂) content and the ratio of estradiol to testosterone (E₂/T) in test fish serum markedly increased in the 0.16 mg/L TCS treatment group. The mRNA expression of gonadotropin-releasing hormone ii-2 (CGnRH-ii-2) decreased significantly in all treatment groups compared to the control, while mRNA expression of Er in the 0.08 mg/L and 0.16 mg/L TCS treatment groups increased significantly. Therefore, TCS has a potential estrogenic effect related to the regulation of CGnRH-ii-2 and Er in female Yellow River carp.

Key words: Triclosan; Yellow River carp; estradiol; testosterone; gonadotropin-releasing hormone