

文章编号: 1000- 0615(2004) 03- 0236- 05

17 β - 雌二醇对雄性金鱼卵黄原蛋白的诱导作用

邴 欣¹, 汝少国¹, Isoda Hiroko², 姜 明¹, 王 蔚¹, 王诗红¹

(1. 中国海洋大学海洋生命学院, 山东 青岛 266003; 2. 筑波大学农林工学系, 日本 筑波 305)

摘要: 采用腹腔注射 17 β - 雌二醇的方法诱导雄性金鱼卵黄原蛋白产生, 注射浓度为 0. 05 mg \cdot g⁻¹BW, 诱导 2 周后取尾静脉血, 离心分离血浆, 进行血浆常规聚丙烯酰胺凝胶电泳, 通过对卵黄原蛋白特性基团磷、脂和糖蛋白的染色, 确定了卵黄原蛋白在电泳图谱上的位置, 开发了一种简便、高效的定性卵黄原蛋白的聚丙烯酰胺凝胶电泳法。电泳结果表明, 在 0. 05 mg \cdot g⁻¹BW 的注射浓度下, 2 周后 17 β - 雌二醇诱导了雄性金鱼卵黄原蛋白产生, 并通过 ELISA 检测卵黄原蛋白的平均含量为 690. 2 ng \cdot mL⁻¹, 与对照组雄性金鱼平均含量为 10. 7 ng \cdot mL⁻¹ 的差异极显著 ($P < 0. 01$), 比雌性对照组检出量 285. 5 ng \cdot mL⁻¹ 高 1 倍多; 17 β - 雌二醇诱导组雄鱼血浆钙离子和血总蛋白含量明显增加。

关键词: 金鱼; 17 β - 雌二醇; 卵黄原蛋白

中图分类号: Q579. 1⁺ 3 **文献标识码:** A

The identification of vitellogenin induction by 17 β - estradiol in male *Carassius auratus*

BING Xin¹, RU Shaoguo¹, ISODA Hiroko², JIANG Ming¹, WANG Wei¹, WANG Shihong¹

(1. College of Marine Life Sciences, Ocean University of China, Qingda 266003, China;

2. Institute of Agricultural and Forest Engineering, University of Tsukuba, Tsukuba 305, Japan)

Abstract: The vitellogenin of male goldfish (*Carassius auratus*) was induced by intraperitoneal injection of 0. 05 mg \cdot g⁻¹BW of 17 β -estradiol dissolved in ethanol. After two weeks induction, the blood was collected from caudal vessel, then centrifuged at 8 000 r \cdot min⁻¹ for 5 min. After plasma native-PAGE, the gel was stained with the method of CBB G250, phosphor-, lipor- and glyco-staining respectively. the location of vitellogenin in the gel was identified. This method provides a practical and effective way of vitellogenin identification. The result of native-PAGE showed that, after the injection of 0. 05 mg \cdot g⁻¹BW of 17 β -estradiol for two weeks, the male fish can synthesize vitellogenin. The vitellogenin average content in E₂ group was 690. 2 ng \cdot mL⁻¹ by ELISA, it was significantly different from male control group ($P < 0. 01$), whose average content was 10. 7 ng \cdot mL⁻¹, and it was also much higher than that of the female control group, whose average content was 285. 5 ng \cdot mL⁻¹. Compared with control male group, the Ca²⁺ and plasma total protein content of the E₂ exposed male group was increased significantly. In control group, the Ca²⁺ contents in plasma of male and female control groups were 1. 6 mmol \cdot L⁻¹ and 1. 7 mmol \cdot L⁻¹, respectively. After two-weeks treatment of E₂, Ca²⁺ content of male groups was 50% higher

收稿日期: 2003-03-31

资助项目: 国家自然科学基金青年科学基金(3020211) 和国家 973 项目(2002CB412405) 联合资助

作者简介: 邴 欣(1977-), 男, 黑龙江哈尔滨人, 博士研究生, 主要从事环境内分泌扰乱化学物质研究

通讯作者: 汝少国(1967-), 男, 山东平阴人, 博士, 教授, 主要从事海洋污染生态学。Tel: 0532-2031962, E-mail: nusg@public.qd.

sl. cn

than that of male control group, which was 2.3 mmol·L⁻¹. The contents of total protein in the control male and female groups were 3253.1 mg·L⁻¹ and 7071.0 mg·L⁻¹, respectively. After two weeks treatment of E₂, the total protein content in plasma was 9616.6 mg·L⁻¹, which is 3-fold higher than that of the control male group. So E₂ not only can induce male goldfish to synthesize vitellogenin but also can alter the physical index of fish plasma.

Key words: *Carassius auratus*; 17 β -estradiol; vitellogenin

鱼类卵黄原蛋白(vitellogenin, Vg)是卵黄蛋白的前体,是卵黄形成期雌激素刺激下由肝脏合成的一种大分子量的磷酸脂糖蛋白(phospholipoglycoprotein),通过血液运输到发育的卵巢中,被卵巢吸收,作为胚胎发育的营养源^[1],它是雌鱼的特异性蛋白。但是由于雄鱼的肝脏中也有卵黄原蛋白基因,因而雌激素也能诱导雄鱼肝脏合成和分泌卵黄原蛋白^[2]。除雌激素外,具有雌激素活性的内分泌扰乱化学物质(environmental disrupting chemicals, EDCs)也可以诱导雄鱼卵黄原蛋白的产生,因而卵黄原蛋白已成为内分泌扰乱化学物质筛选的理想生物标记物^[3]。卵黄原蛋白作为生物标记物的基础是目前能够成功地定性和定量卵黄原蛋白,特异性强的方法有:放射免疫测定法、酶联免疫吸附法(ELISA)和免疫印记法(Western blot),但这几种方法都需要抗原抗体的纯化,因而操作复杂且成本高。从操作的复杂性和成本考虑,常规聚丙烯酰胺凝胶电泳(native PAGE)和SDS聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)两种方法更易操作且更经济,但这两种方法的结果都不能准确地对卵黄原蛋白定性。由于卵黄原蛋白富含磷酸、脂和糖基团,作者根据卵黄原蛋白的这个性质,在常规聚丙烯酰胺凝胶电泳后,分别进行蛋白质、磷、脂和糖染色,通过比较确定了卵黄原蛋白在蛋白图谱上的位置,并结合ELISA法检测了卵黄原蛋白在血浆中的含量。

1 材料与方 法

1.1 实验药品与仪器

17 β -雌二醇(17 β -estradiol, E₂)购自Sigma公司(98%纯度,美国),丙烯酰胺和甲叉丙烯酰胺购自Fluka公司(电泳级,瑞士);卵黄原蛋白测定试剂盒购自Trans Genic公司(日本);钙离子测定试剂盒(甲基百里酚蓝比色法)和蛋白标准品(50g·L⁻¹)为南京建成生物工程研究所生产;其余药品皆为国产化学纯。分光光度计为UNICO公司产品(美国),酶标仪为芬兰Labsystem公司产品(Version

4.0型);电泳槽为北京六一仪器厂CYY-III型。

1.2 实验材料

金鱼(*Carassius auratus*)购自青岛南山花鸟鱼市场,于中国海洋大学海洋生态毒理实验室驯养2周后进行卵黄原蛋白诱导实验。金鱼体长7.78±0.67 cm,体重18.46±3.82 g。

1.3 卵黄原蛋白诱导实验

实验采用70 L玻璃水族箱,实验用水为连续曝气24 h的自来水,每个水族箱加入曝气后的自来水50 L,投雄鱼20尾,E₂注射量为0.05 mg·g⁻¹ BW,采用腹腔注射方式(100%酒精配制),注射一次,同时设雄鱼和雌鱼对照组,对照组注射相应量的酒精。采用剖腹探察生殖腺的方法最终确定金鱼的性别。

实验过程中每天换水20L,投喂0.5 g干饲料,连续充气,水温16±2℃,溶解氧7.0±0.1 mg·L⁻¹,pH 7.6±0.2。2周后,用1%肝素润洗的1 mL玻璃注射器从尾静脉取血,每组取3尾鱼,血样迅速离心(8000 r·min⁻¹,5 min),取上层血浆-80℃保存备用。为了防止卵黄原蛋白分解,所有实验在1周内完成。

1.4 卵黄原蛋白常规聚丙烯酰胺凝胶电泳及染色

常规聚丙烯酰胺凝胶电泳采用4%浓缩胶和7.5%分离胶,电压400V,电泳时间4 h左右,上样量30 μ L。蛋白质的考马斯亮蓝染色采用江南等^[4]的方法,糖蛋白染色采用Zaccharias^[5]的方法;脂蛋白染色采用Prat^[6]的方法;磷蛋白染色采用Cutting^[7]的方法,因为在该染色方法中用到硝酸,因而引起凝胶的收缩,所以导致在磷蛋白染色中卵黄原蛋白带在位置上的差异,为了便于观察,把磷蛋白染色的照片向下移动,使卵黄原蛋白带处于同一位置上。

1.5 卵黄原蛋白ELISA测定

分别取对照组雄鱼、雌鱼和E₂诱导组雄鱼血浆样品,进行卵黄原蛋白ELISA测定,测定方法按照试剂盒说明进行,每个样品均设3个平行样,进行统计处理并进行显著性检验(*t*检验)。

1.6 血浆钙离子测定

分别取对照组雄鱼、雌鱼和 E₂ 诱导组雄鱼血浆样品, 进行钙离子测定。测定方法按照试剂盒说明书进行, 每个样品均设 5 个平行样, 进行统计处理和显著性检验(*t* 检验)。

1.7 血浆总蛋白含量测定

用福林酚法测定血浆总蛋白含量, 以蛋白标准液作标准曲线, 每个样品均设 5 个平行样, 测定 650 nm 时的吸光度, 进行统计处理和显著性检验(*t* 检验)。

2 结果与分析

2.1 17β-雌二醇(E₂)对雄性金鱼卵黄原蛋白的诱导作用

对对照组雄鱼、雌鱼和 E₂ 诱导组雄鱼血浆样品进行了常规聚丙烯酰胺凝胶电泳, 考马斯亮蓝染色结果(图 1-a)表明对照组雌鱼和 E₂ 诱导组(图 1-b)均有 1 条特异蛋白带, 而对照组雄鱼没有这条蛋白带。为了证明这条带就是卵黄原蛋白, 我们根据卵黄原蛋白富含磷酸、脂和糖基团的性质, 对对照组雄鱼、雌鱼和 E₂ 诱导组雄鱼血浆样品进行了常规聚丙烯酰胺凝胶电泳, 并分别进行考马斯亮蓝、磷、脂和糖染色, 经染色发现, 糖蛋白(图 1-c)、磷蛋白(图 1-d)和脂蛋白(图 1-e)都在蛋白图谱的同一位置出现, 没有发现可以被 3 种染色方法同时染色的其它蛋白带。根据以上电泳结果, 可以认定这一条蛋白带即为卵黄原蛋白。而且这条带和雌性对照组在考马斯亮蓝染色的凝胶上的蛋白带相对应。由此可见, 17β-雌二醇(E₂)能够诱导雄性金鱼卵黄原蛋白的产生。

2.2 E₂对雄性金鱼血浆卵黄原蛋白含量的影响

常规聚丙烯酰胺凝胶电泳及染色结果表明 17β-雌二醇能够诱导雄性金鱼卵黄原蛋白的产生, 同时采用 ELISA 法测定了对照组雄鱼、雌鱼和 E₂ 诱导组雄鱼血浆样品卵黄原蛋白的含量, 测定结果表明在对照组雄性金鱼体内卵黄原蛋白平均含量为 10.7 ng·mL⁻¹, 雌性对照组为 285.5 ng·mL⁻¹, E₂ 诱导组雄鱼为 690.2 ng·mL⁻¹(图 2)。由结果可见, 对照组雄鱼卵黄原蛋白含量极少, 而 E₂ 诱导组雄鱼卵黄原蛋白含量很高, 和雄性对照组差异极显著(*P* < 0.01), 是雌性对照组的平均含量的 1 倍还多。

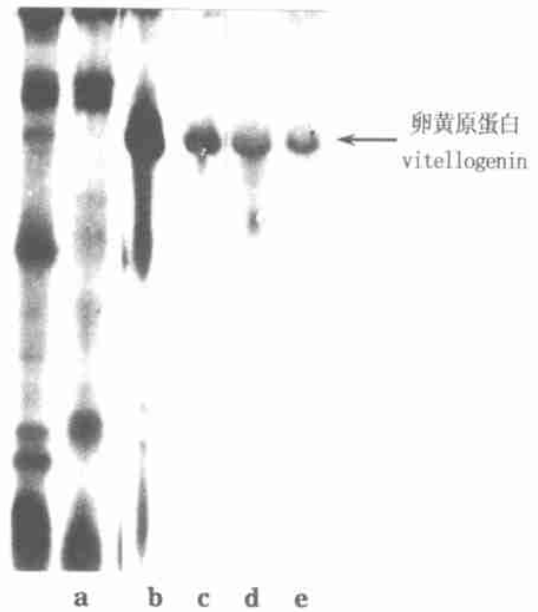


图 1 E₂ 诱导雄性金鱼血浆的聚丙烯酰胺凝胶电泳图谱
Fig. 1 The plasma profiles by native PAGE electrophoresis of male goldfish treated with E₂

a 考马斯亮蓝染色的雌性和雄性对照组; b 考马斯亮蓝染色的 E₂ 诱导组; c 糖染色的 E₂ 诱导组; d 磷染色的 E₂ 诱导组; e 脂染色的 E₂ 诱导组

a CBB G250 staining, female and male control group; b CBB G250 staining, E₂ treated group; c glycer staining, E₂ treated group; d phosphor staining, E₂ treated group; e lipor staining, E₂ treated group

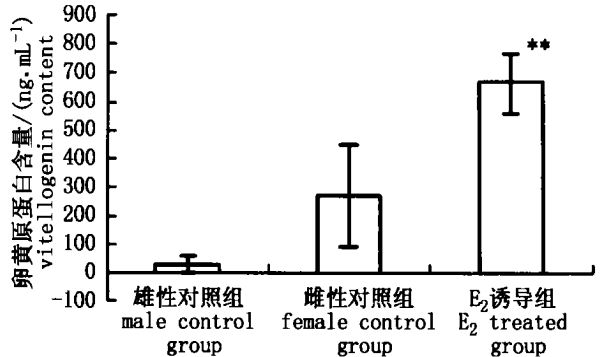


图 2 E₂ 对雄性金鱼血浆卵黄原蛋白含量的影响

Fig. 2 The effect of E₂ on vitellogenin content in the plasma of male goldfish

** *t* 检验差异极显著 *P* < 0.01

** *t*-test indicate extremely difference, *P* < 0.01

2.3 E₂对雄性金鱼血浆钙离子含量的影响

血浆钙离子测定结果(图 3)表明, 对照组雄鱼血浆钙离子平均含量(1.6 mmol·L⁻¹)比雌鱼(1.7 mmol·L⁻¹)低, 然而经过 E₂ 处理两周之后雄鱼血

浆钙离子平均含量为 $2.3 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, 比雄鱼对照组高 50%, 两者差异显著 ($P < 0.05$)。

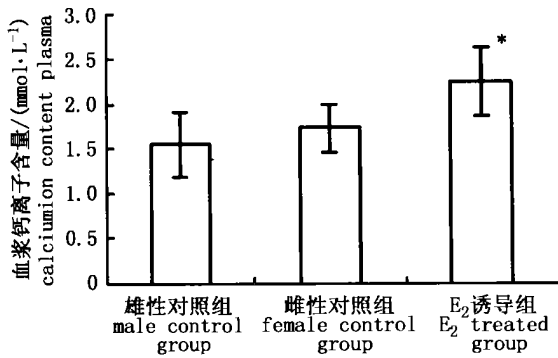


图3 E₂对雄性金鱼血钙含量的影响

Fig. 3 The effect of E₂ on Ca²⁺ content in plasma of male goldfish

* t 检验差异显著 $P < 0.05$

* t- test indicate difference, $P < 0.05$

2.4 E₂对雄性金鱼血浆总蛋白含量的影响

对照组雄性金鱼和雌性金鱼血浆总蛋白含量分别为 $3253.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $7071.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 经过 E₂ 暴露两周之后雄鱼血浆总蛋白含量为 $9616.6 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ (图4), 比对照组雄鱼高 3 倍, 两者差异极显著 ($P < 0.01$)。

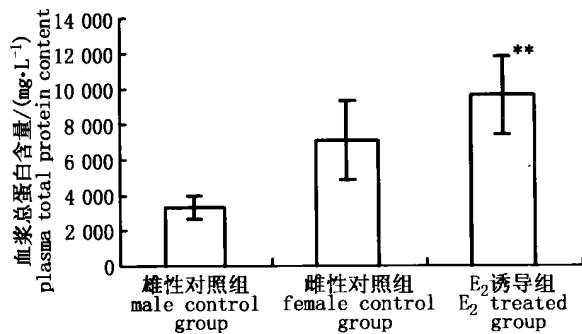


图4 E₂对雄性金鱼血血浆总蛋白含量的影响

Fig. 4 The effect of E₂ on plasma total protein content of male goldfish

** t 检验差异极显著 $P < 0.01$

** t- test indicate extremely difference, $P < 0.01$

3 讨论

雌激素特别是 17 β -雌二醇, 在雌性动物生长、发育, 尤其在性发育和性调节、生殖行为等多方面起到了重要的作用。已经有报道 E₂ 可以诱导多

种类卵黄原蛋白的产生, 在 E₂ 处理过的莫桑比克罗非鱼 (*Oreochromis mossambicus*)^[8] 和澳大利亚罗非鱼 (*O. aureus*)^[9] 以及尼罗罗非鱼 (*O. niloticus*)^[10] 等鱼类血浆中检测到了卵黄原蛋白的存在。E₂ 能够诱导鱼类卵黄原蛋白的产生, 主要是由于 E₂ 可以与肝脏中的雌激素受体 (estrogen receptor, ER) 结合, 形成受体蛋白复合物进入到细胞核中, 结合到染色体上使卵黄原蛋白基因转录并表达^[1]。

从卵黄原蛋白的生物学特性看, 卵黄原蛋白是由两个亚单位构成的二聚体蛋白, 一部分富含脂和磷酸, 另一部分则无脂^[11]。本文根据鱼类卵黄原蛋白含磷、脂和糖基团的特点, 利用磷、脂和糖蛋白的染色方法, 成功地利用常规聚丙烯酰胺凝胶电泳法确定了卵黄原蛋白在蛋白图谱上的位置。Victor 等^[12] 从雌性金鱼血浆中也检测到了卵黄原蛋白, 从卵黄原蛋白的生物学特性看, 我们的结果和 Victor 等的结果是一致的。Tyler 等^[13] 指出在雌激素的诱导下, 鱼类血浆中的卵黄原蛋白的含量可以放大 1000 倍 (由每毫升几十纳克放大到每毫升几十微克)。而目前对卵黄原蛋白的定性和定量主要采用基于抗原抗体反应发展起来的放射免疫测定、ELISA 和免疫印记等方法, 这些方法对实验条件的要求比较高, 而且花费大, 实验程序繁琐, 因为鱼种间的差异对每一种鱼都要进行抗体的纯化, 不适用于大规模的内分泌扰乱化学物质的筛选。本文利用了卵黄原蛋白含有磷酸、脂和糖基团的特点, 对常规聚丙烯酰胺凝胶电泳进行四种染色, 这种方法可以较为容易的确定卵黄原蛋白条带的位置, 且重复性好, 无干扰, 花费少, 适用于利用卵黄原蛋白进行大规模的内分泌扰乱化学物质的初步筛选。

此外, E₂ 还可以引起雄性金鱼血浆 Ca²⁺ 和血浆总蛋白含量的增加, 与李朝军等^[14] 用人工合成雌激素苯甲酸雌二醇, 诱导大阪鲫卵黄原蛋白合成时观察到的血浆 Ca²⁺ 累积的现象一致。由于卵黄原蛋白分子上结合了两个钙离子^[15], 因而 Ca²⁺ 在血浆中含量的增加, 可能与卵黄原蛋白的累积有关。卵黄原蛋白分子上除结合两个钙离子外, 还结合一个锌离子^[5], 因而其它重金属离子能够取代锌离子和钙离子而结合到卵黄原蛋白上。在生殖活跃的雌鱼体内, 卵黄原蛋白在血浆中的含量大约为总蛋白量的 20%^[16], 因而作为一个重要的脂库, 非常适合作为脂溶性污染物的载体, 可以富集大量的

脂溶性污染物和重金属离子,并转移到鱼卵中,影响胚胎的发育、仔鱼的成活率,并最终影响种群的数量。

参考文献:

- [1] Mommensen T P, Walsh P I. Vitellogenesis and oocyte [A]. In fish physiology (Volume XI A) [M]. Edited by Hoar W S and Randall D J. New York: Academic Press, 1988. 347- 406.
- [2] Barbara H T, Tommey H M, Richard T D G. Octylphenol induces vitellogenin production and cell death in fish hepatocytes [J]. Environ Toxicol Chem, 1999, 18(4): 734- 739.
- [3] Bing X, Ru S G, Sheng L X. The advance of research on biological screening technology on environmental disrupting chemicals [J]. Research of Environmental Sciences, 2002, 15(5): 38- 42. [邴 欣, 汝少国, 盛连喜. 内分泌扰乱化学物质生物筛选技术研究进展 [J]. 环境科学研究, 2002, 15(5): 38- 42.]
- [4] Jiang N, Wu K L, Huang Q, *et al.* A simple method of protein staining with CBB G250 [J]. Pro Biochem Biophys, 2000, 27(5): 560- 561. [江 南, 吴开力, 黄 强, 等. 一种简便的考马斯亮蓝 G250 蛋白染色方法 [J]. 生物化学与生物物理进展, 2000, 27(5): 560- 561.]
- [5] Zacharias R M. Glycoprotein staining following electrophoresis on acrylamide gel [J]. Anal Biochem, 1969, 30(1): 148.
- [6] Prat J P, Lamy J N, Weill J D. Staining of lipoproteins after electrophoresis in polyacrylamide gel [J]. Bull Soc Chem Biol, 1969(51): 1367.
- [7] Cutting J A. In methods in enzymology [M]. New York: Academic Press, 1984. 104: 451.
- [8] Akihiro T, Byung H K. Effects of estradiol- 17 β treatment on *in vitro* and *in vivo* synthesis of two distinct vitellogenins in tilapia [J]. Comp Biochem Physiol, 2001, 129(A): 641- 651.
- [9] Ding J L, Hee P L, Lam T J. Two forms of vitellogenin in the plasma and gonads of male *Oreochromis aureus* [J]. Comp Biochem Physiol, 1989, 93(B): 363- 370.
- [10] Buerano C C, Inaba K, Natividad F F, *et al.* Vitellogenins of *Oreochromis niloticus*: identification, isolation, and biochemical and immunochemical characterization [J]. J Exp Zool, 1995, 273: 59- 69.
- [11] Lafleur D J, Byme B M, Kanungo J, *et al.* Fundulus heteroclitus vitellogenin: the deduced primary structure of a piscine precursor to noncrystalline liquid-phase yolk protein [J]. J Mol Evol, 1995, 41: 505- 521.
- [12] Victor L D, Wiley H S, Geroge D, *et al.* Goldfish (*Carassius auratus*) vitellogenin induction, isolation, properties and relationship to yolk proteins [J]. Comp Biochem Physiol, 1980, 67(B): 613- 623.
- [13] Tyler C R, van der Eerden B, Sumpter J P, *et al.* Measurement of vitellogenin, a biomarker for exposure to estrogen, in a wide variety of Cyprinids [J]. J Comp Physiol, 1996, 166: 418- 426.
- [14] Li C J, Liu R Z, Wang H, *et al.* The initial on the relationship between vitellogenin and calcium ion in *Carassius auratus auratus* [J]. J Fish China, 1993, 17(4): 297- 303. [李朝军, 刘荣臻, 王 浩, 等. 大阪鲫卵黄蛋白原和钙离子关系的初步研究 [J]. 水产学报, 1993, 17(4): 297- 303.]
- [15] Montorzi M, Falchuk K H, Vallee B L. *Xenopus laevis* vitellogenin is a zinc protein [J]. Biochem Biophys Res Commun, 1994, 200: 1407- 1413.
- [16] Tyler C R, Sumpter J P, Bromage N R. *In vitro* ovarian uptake and processing of vitellogenin in the rainbow trout, *Salmo gairdneri* [J]. J Exp Zool, 1988, 246: 171- 179.