

环境雌激素的识别与评价

陈海燕, 王心如

(南京医科大学公共卫生学院, 江苏 南京 210029)

摘要: 近年来, 越来越多的研究表明野生动物和人类的生殖、发育和行为异常以及某些肿瘤发生率在上升, 全世界许多科学家正致力于环境内分泌干扰物 (EEDs) 的研究。EEDs 引起的许多不良效应与环境雌激素 (EEs) 有关。为了描述 EEs 的毒效应及其作用机制, 建立了许多体内、体外试验方法, 本文就 EEs 的识别与评价作一综述。

关键词: 环境雌激素; 体内试验; 体外试验

中图分类号: R12 文献标识码: A 文章编号: 1002-221X (2001)06-0369-05

Identification and assessment of environmental estrogens

CHEN Hai-yan, WANG Xin-ru

(School of Public Health, Nanjing Medical University, Nanjing 210029, China)

Abstract: In the past few years, more and more studies reported there are apparent increases in reproductive, developmental and behavioral abnormalities incidences as well as some cancers incidences in wild lives or human beings which resulted in a worldwide intensification of research for the effect of environmental endocrine disruptors (EEDs). Not a few adverse effects of EEDs identified have been attributed to environmental estrogens (EEs), and a lot of assays *in vivo* and *in vitro* have been developed not only to characterize EE but also to define its mechanisms. The authors reviewed the methods for assessing and identifying EEs.

Key words: Environmental estrogens; *In vivo* assay; *In vitro* assay

在过去几十年间, 大量人工合成的化学品释放入环境中。目前, 越来越多的证据证实了许多化学物可以干扰正常激素调节的生理过程, 从而对野生动物、实验动物和人类的发育和/或生殖功能产生不良影响。这些环境污染物可以通过模拟或抑制内源性激素, 影响激素受体家族, 干扰内源性激素的产生, 从而改变内分泌与生殖系统的正常功能。美国环境保护组织内分泌干扰物筛选测试咨询委员会 (Endocrine Disruptor Screening and Testing Advisory Committee, EDSTAC) 将这些能通过干扰激素功能, 引起个体或人群可逆性或不可逆性生物学效应的环境化合物称为“环境内分泌干扰物” (Environmental Endocrine Disruptors, EEDs)。EEDs 的主要作用机制是与类固醇激素受体 [雌激素受体 (estrogen receptor, ER)、雄激素受体 (androgen receptor, AR)、孕激素受体 (progesterone receptor, PR) 等] 结合, 其他包括对激素合成与代谢的影响、参与神经中枢与垂体的调节、改变血浆激素结合蛋白的功能等。由于绝大部分的 EEDs 具有干扰雌激素的作用, 故有学者将这些具有干扰雌激素作用的化学物称为环境雌激素 (Environmental Estrogens, EEs)。

1996年, 美国国会通过了食品质量保护法 (Food Quality Protection Act, FQPA) 和安全饮用水法修正案 (Safe Drinking Water Act, SDWA)。这些法律致使 EPA 建立一组筛选方案以评价 EEs 干扰内分泌系统所引起的相关危害。同时, EEs 所引起

的危害在中国也日益受到重视。因此, 对 EEs 的识别与评价显得尤为重要。作者结合自己的研究工作就此作一综述。

1 雌激素调节反应实验 (estrogen-regulated response assay)

1.1 整体动物试验

根据雌激素的生物活性, 可以通过整体动物试验检测化学物的拟雌激素活性。整体动物试验中观察终点有很多。目前许多评价方法集中于观察 EEs 对雌性生殖器官的作用, 例如: 青春期前啮齿类动物子宫增重实验; 卵巢切除成年啮齿类动物子宫增重实验; 卵巢切除成年啮齿类动物阴道细胞角化实验; 青春期前啮齿类动物阴道开放实验; 子宫组织生化检测 (胸腺嘧啶核苷酸掺入, 孕酮受体的诱导, 特定基因产物如 pS2 和组织蛋白酶 B 等的表达); 子宫组织学; 阴道组织学; 动情周期的周期性和妊娠丢失等。在这些整体动物拟雌激素活性分析中, 子宫增重法和阴道细胞角化试验是应用时间最长的^[1]。子宫增重法将青春期前或卵巢切除大 (小) 鼠暴露于受试物中 3~4 天, 然后处死动物, 测定其子宫质量。同时使用不同浓度的受试物和参考雌激素 (例如乙炔雌酚 DES, E₂) 进行染毒, 可用于建立剂量-反应关系, 以估计相对参考雌激素的雌激素活性。使用未成熟或卵巢切除大鼠可以减少内源性雌激素的干扰, 从而提高方法的灵敏度。因为高剂量的孕激素也可以引起子宫质量增加^[2], 本方法在特异性方面不如阴道细胞角化实验。后者采用动情周期为 4 天的大 (小) 鼠进行染毒, 观察阴道上皮细胞的形态学变化^[3]。当内源性雌激素水平较高而孕酮水平较低时, 也即在动情周期的卵泡期, 上皮细胞有角化特征。大鼠或小鼠切除卵巢 12 周内阴道细胞较稳定, 不发生角化, 在这段时间内进行染毒, 通

收稿日期: 2001-02-22; 修回日期: 2001-05-14

基金项目: 国家自然科学基金项目 (39640006)

作者简介: 陈海燕 (1974-), 女, 江苏省启东市人, 博士生, 主要从事生殖内分泌毒理学研究。

过观察阴道细胞学变化以检测角化特征(给予雌激素后在48~72小时内发生角化)。该法特异性较高,但与子宫增重法相比,灵敏度不高。

除了对雌性生殖器官的作用外,也有一些研究通过以下的实验来评价EEs的拟雌激素活性。例如:EEs长期作用于大鼠,可以通过作用于中枢神经系统引起一系列行为改变,包括大鼠食物摄入量/体质量增加比(尤其是在雌性大鼠切除卵巢后)和性行为等;通过检测垂体功能和血清相关内分泌激素的水平观察EEs对下丘脑-垂体-性腺轴激素合成与调控的影响;通过检测雄性大鼠染毒后附睾功能、精子发生、附属性腺器官的大小等观察EEs对雄性生殖器官的作用;通过观察雌性大鼠阴道开放时间与雄性大鼠包皮分离时间、生殖器官质量以及精子生成量等研究EEs对啮齿类动物性分化和青春发育的影响。

以上这些实验中,绝大多数的反应终点为非特异性的,而且与体外研究相比,费用较高且耗时。但是由于其代表了一种活体状态,综合了血浆结合和毒物代谢动力学等多种因素。其中子宫质量增加与阴道细胞角化试验被认为是拟雌激素活性评价的金标准^[4]。

1.2 离体细胞试验

1.2.1 细胞增殖实验

研究雌激素受体(estrogen receptor, ER)信号转导通路,其最终目的在于阐明细胞反应。目前已建立了一系列体外试验方法以检测细胞反应终点。Lippman等于1976年首先揭示了MCF-7细胞的生长对雌激素有特异性反应,近几年将使用这种效应终点来评价拟雌激素活性的方法称为E-Screen^[5]。人乳腺癌MCF-7细胞增殖试验是评价拟雌激素活性的较为敏感的方法之一^[5]。用这种方法可以区分为激动剂和拮抗剂。但MCF-7细胞能否或在多大程度上将拟雌激素前体物转换成拟雌激素物,目前尚不清楚。尽管许多研究报道了MCF-7细胞培养条件,但雌激素对这种细胞生长的促进作用机制目前尚不清楚。一些报道认为血清中具有一种细胞生长的抑制因子,而这种因子可以被雌激素灭活。另外一些研究表明雌激素介导的细胞增殖是受ER介导的一系列级联反应的结果。也有学者认为这是两种机制同时作用的结果。观察细胞增殖的终点很多,如用计数器进行细胞及细胞核计数、使用增殖指标(MTT, alamar BlueTM代谢)、氚标记胸苷掺入的DNA分析^[6]或者用sulfohodamine-B进行固定细胞的蛋白染色。

1.2.2 定量分析雌激素诱导的内源性基因的表达水平

一些细胞具有雌激素调节基因,雌激素可以诱导这些特定基因表达。定量分析这些内源性基因的表达水平可用于评价EEs的拟雌激素活性。其中应用较多的是MCF-7细胞中的基因表达。雌激素诱导的内源性基因很多,本文简单介绍几种常见的基因标志物。pS2 mRNA的表达被广泛用作拟雌激素活性的标志物。雌激素可以诱导MCF-7细胞转录pS2mRNA,合成pS2蛋白。pS2蛋白分子量为9 kDa,属于trefoil(三叶草)型多肽家族^[7]。该多肽家族除可参与细胞增殖的调节外,三

叶草型蛋白还可以通过与表皮生长因子受体直接作用,激活Ras/MEK/MAP激酶信号转导通路^[20]。至今尚无文献报道非雌激素活性物质可以诱导MCF-7细胞中pS2的表达。人类pS2基因包含不完全雌激素反应元件(ERE),与回文结构(consensus palindromic)ERE(GGTCANNIGACC)相比,仅有一对碱基不同(GGTCACGGTG C₂CC)。在其余一些雌激素反应基因[如TGF α 、TGF β 、人组织蛋白酶(cathepsin)D、 α -ACT、大鼠孕酮受体]中也证实具有功能不全的EREs^[9~12],可能与所观察到的雌激素依赖性调节有关。

除上述的内源性基因以外,尚有其他拟雌激素活性的生物标志物,例如:trout(鲑鱼)的肝细胞体外培养中合成的vitellogenin(卵黄素),MCF-7细胞中孕酮受体和特殊雌激素诱导蛋白,子宫细胞原代培养中分泌的130 kDa分泌蛋白,牛子宫细胞培养中DNA合成和大鼠垂体分泌的催乳素等,采用内源性基因表达实验(endogenous gene expression assay),可用来检测通过包括ER在内的不同信号转导通路的基因诱导^[12,13]。

2 受体结合试验(receptor binding assay)

根据雌激素作用原理,雌激素与ER的结合是引起雌激素反应的开始。ER是在种系发生中较保守的细胞内受体家族成员之一。通过体外测定外源性化合物与受体亲和力的大小可判断雌激素活性大小。

目前,已建立了一些竞争性受体结合分析方法^[14,15]。由于大鼠子宫与MCF-7细胞富含ER,通过离心、匀浆、超声破碎细胞等一系列操作制备含ER的细胞提取液,体外将ER与³H-E₂以及不同浓度受试物共孵育,受试物与³H-E₂竞争结合ER位点。数小时后,采用葡聚糖活性碳饱和和分析法(DCC法)、羟基磷灰石法(HAP法)等去除游离的³H-E₂,通过液闪计数法检测结合的³H-E₂量,从而判断受试物与ER的结合力。同时,用未标记E₂作平行样,以检测该化合物的相对结合力(RBA, Relative Binding Affinity)^[16]。

ER竞争结合试验较为灵敏,可检测到50 fmol ER/mg蛋白,具有实验时间短、实验室间方法较易统一等优点。这种方法在评价体内暴露于外源性化合物后ER的分布与数目方面较有用。另外,这种方法可用于快速评价化合物与ER的结合能力,比较化合物的EC₅₀、K_d水平,初步估计化合物在体内条件下干扰ER功能的能力。受体结合实验耗费较少,但是由于拟雌激素活性决定于该化合物与ER的亲和力的大小以及维持核受体占有率的能力,单凭与ER的结合力并不能充分说明某一物质是否具有雌激素活性,所以这种方法对于阐明与ER结合以后引起的生物学效应的意义并不大。一些化合物的ER结合力较高,但雌激素生物试验(estrogen bioassays)中显示的活性较小,相反,一些化合物的ER结合力较低,但生物活性较高^[17]。此外,本试验方法不能区分激动剂和拮抗剂。目前,受体结合试验在EEs的拟雌激素活性研究中的应用较为普遍,但是由于以下一些因素,在大范围内筛选EEs仍有不足和困难如:(1)使用的受体往往是细胞或组织中的粗受体制品;(2)体外试验时,在生理温度下受体易变性,孵育温度低于

生理温度（一般反应温度为 4℃）；（3）使用放射性物质；（4）游离和结合示踪剂的分离工作较为繁琐；（5）该分析方法适用于 ER 亲和力较高、水溶性的化合物，而对低亲和力以及脂溶性化合物不太适用。

针对以上不足，Cook ND 等对实验作了一些改进，建立了 scintillation proximity 分析法，将 ER 和闪烁液结合于固相载体上，因此只有与受体结合的放射性标记的 E₂ 才能激活闪烁液，而游离的 ER 配基则否。这个方法不需要将游离配基与结合配基分开，但是受体的固定可能会引起构型的变化，从而影响到化合物与 ER 的结合。Bolger R 等建立了一种新的雌激素受体结合实验，使用荧光偏振（fluorescence polarization, FP）技术检测化合物与高亲和力纯化重组人 ER 的能力，可以在室温下进行，无放射性物质污染。FP 通过检测荧光素标记分子的或在荧光分子的大小变化研究分子间相互作用。荧光分子与另一分子结合后其旋转速度改变，FP 正是通过检测这种旋转速率来反应分子大小的变化。当水平偏振光激发荧光分子溶液时，所有与偏振光平行的荧光分子被激发。如果在激发时间（如荧光素为 4ns）内，该分子保持静止，发射光保持高度偏振。通过 FP 可以直接检测出荧光分子的体积增大（与受体、抗体等结合）或体积减小（分解或酶降解）。所观察的偏振水平是结合和游离荧光分子的平均水平，偏振水平能直接转化成结合配基的浓度。本方法优点在于：（1）不使用放射性物质；（2）FP 检测在溶液中进行，使所研究的分子处于正常平衡液与温度中；（3）不需进行结合与游离配基的分离；（4）可以直接进行结合反应动态观察；（5）可以应用 96 孔板进行大规模检测。但为了使荧光分子与受体具有较高的结合百分率，对受体制剂的纯度要求相对较高。

总之，某一物质与雌激素受体发生结合反应仅能说明该物质可能具有雌激素活性，而不能提供充分证据说明该化合物能影响人类健康或环境质量。因而，需要进一步结合体内或其他体外试验来作综合评价。

3 受体激活试验（receptor activation assay）

雌激素可以通过受体机制影响基因表达及其相互作用。根据 ER 信号转导的模式，配体与 ER 结合可以导致受体蛋白构型的变化，但是配体与 ER 的激素结合域的结合仅仅为导致拟雌激素反应过程中的一步。这种“活化”受体与靶基因 5' 端特异 DNA 序列（雌激素反应元件，ERE），从而调节基因转录。实际上，雌激素正是通过调节雌激素反应基因转录来显示其生物活性。

3.1 酵母细胞中 ER 介导的转录实验

重组技术的发展使得在异种系统中表达部分生物构建物成为可能。Walter 等首先克隆了 ER cDNA，紧接着建立了 ER 的表达系统，例如 *Escherichia coli*^[18] 和酵母株 *Saccharomyces cerevisiae*^[19]。将哺乳动物 ER 导入酵母细胞株 *Saccharomyces cerevisiae* 后，可以成为雌激素依赖性的转录激活因子。Arnold 等^[20] 建立了酵母雌激素筛选实验（yeast estrogen screen assay, YES）来评价化合物的拟雌激素活性。YES 中，将两个基因引

入了酵母中，一个为 ER，另一个为与 ERE 相连的 lacZ 基因。当雌激素加入培养基中与 ER 结合，受体-配体复合物迅速与 DNA 上 ERE 结合，加速 β-半乳糖苷酶的表达，通过测定 nitro-β-D-galactopyranoside 到 nitrophenol 的转化检测酶的活性，这一分析方法需 1 天。此方法已经用于许多 EEs 的拟雌激素活性研究，如 *o*, *p*'-DDT；辛基酚；壬基酚；双酚 A 等。在 YES 中，雌激素拮抗剂（如 ICI 164 384）也表现为激动作用。实际上，凡是在其他反应体系表现为雌激素激动或拮抗作用的化合物，在 YES 中均表现为激动作用。此方法简单，易于操作，试验所需的时间短，无同位素污染。但是，由于哺乳动物与酵母细胞对激素和毒物的代谢有很大的差异，且胞膜结构不同，可能会影响到化合物进入酵母细胞与 ER 的结合。

3.2 哺乳动物细胞中 ER 介导的转录实验

目前，该技术已广泛应用于多种哺乳动物细胞株（小鼠 L 纤维母细胞，Hela 细胞，MCF-7 细胞），建立了一系列哺乳动物报告基因实验。

MCF-7 细胞中具有许多雌激素调节基因（pS2, Cath D, PgR, TPA 等），如前所述，它们相应的基因产物可以作为雌激素作用的反应终点，然而，这些内源性基因受其他细胞内机制调节，并且对基因产物（mRNA）进行定量相对费时，且较难进行。因此，将人雌激素受体（human estrogen receptor, hER）调节的报告基因导入 MCF-7 细胞可以作为检测 ER 转录激活的常规方法。报告基因实验采用 MCF-7 细胞的 hER 调节报告基因的转录，报告基因所编码的酶可以通过检测进行定量。Korach's 等克隆了一个雌激素反应序列，并将其插入一个报告基因载体（reporter gene vector），这种构建物与细菌氯霉素乙酰基转移酶（bacterial chloramphenicol acetyltransferase, CAT）结合成为雌激素可诱导的启动子（inducible promoter），可用于转染细胞，评价雌激素有关基因活性。将这种受体特异性的报告基因构建物转染到 ER 阳性靶细胞（如 MCF-7 细胞），用雌激素处理后检测 CAT 的表达。在 ER 阴性细胞中转染，用雌激素处理不能诱导 CAT 的表达。由于它必须在 ER 存在的条件下才会诱导 CAT 的产生，该系统能检测 ER 介导的基因表达。

Massaad C 等^[21] 采用分子生物学技术，在体外培养的人细胞（肝癌细胞株 HepG2）中，用一个由两个重复 ERE（over ERE，两个 ERE 之间有 5 个碱基对，center to center）组成的雌激素反应序列调控报告基因，从而来评价化合物的拟雌激素活性。它能协同活化由雌激素和 EEs 引起的转录。这种重复 ERE 单位具有较高的灵敏性，与使用单个 ERE 相比，检测出拟雌激素活性化合物的浓度更低，即灵敏度更高。例如，使用 over ERE 检测到 iloxan 在 10⁻⁶M 时具有雌激素活性，而使用单个 ERE 时，在 iloxan 为 100⁻⁶M 时才有转录活性的升高。另外，一些化合物在使用单个 ERE 时，未显示出有雌激素活性，而在使用 over ERE 时，显示出活性（例如 Betanal）。

雌激素可以通过与受体的配体结合域结合而激活 ER，一些药物在体外可以通过 N-末端磷酸化而激活 ER。在 MCF-7 细胞中同时转染上 Gal4-hER 嵌合体（缺少 N-末端）和 Gal4 调节

的报告基因 17m5-g-Luc, 这种嵌合受体只具有 hER 的配体结合域, 可以用来检测化合物的拟雌激素活性, 同时避免 N-末端磷酸所引起的假阳性结果, 提高反应的特异性。

报告分子的种类很多, 例如荧光素酶 (luciferase, Luc), CAT 和半乳糖苷酶 (galactosidase) 等。报告基因的转激活的检测可以通过酶分析 (例如半乳糖苷酶或 CAT) 或者通过荧光素酶报告分子的化学发光进行定量。一些报告基因系统也采用细胞毒性标志物作为内控将 ER 活化的浓度与导致细胞毒性浓度相互关联。克隆报告基因构建物及将其转入细胞的技术要求较高, 但一旦稳定转染, 分析方法较简单、快捷和价廉。

虽然建立稳定转染的细胞株具有一定的难度, 目前已建立了一些 MCF-7 细胞来源的细胞株。MVLN 是 MCF-7 细胞来源的稳定转染了 Luc 的细胞株, 它包含一个人工合成基因, 其含有 ER 控制的卵黄素启动子的片段, 从而调节 Luc 的表达。这些细胞同时具有新霉素抗性的基因。因此, 所有的细胞具有报告基因, 可以高度敏感检测出雌激素调节的转录。优点: 由于稳定转染, 使用方便, 短期检测。另外, 适用于大量 EEs 的筛选, 通过 MVLN 细胞株可以区分雌激素激动剂与拮抗剂。

4 类固醇激素合成抑制试验 (assays for inhibition of steroid hormone synthesis)

EEs 不依赖于 ER 作用的其中一个重要的作用机制是抑制类固醇激素的合成。在非妊娠动物中, 主要依赖于卵巢膜细胞合成雄激素, 颗粒细胞合成雌激素与孕激素; 而在妊娠动物中, 黄体产生孕酮以维持妊娠。使用全卵巢组织培养 (whole ovary tissue culture) 可用于评价未成熟与成熟动物卵巢的激素合成。in vivo: 整体动物染毒, 在妊娠大鼠与动情周期一定阶段进行采血, 检测血液中类固醇激素水平。in vitro: 一些情况下, 可以通过短期试验检测切碎的卵巢组织中类固醇激素水平来分析。对于成熟大鼠, 观察动情周期, 选择动情周期规则 (一般为 4 天) 的动物。在动情周期的特殊阶段处死, 取出卵巢切碎并进行一系列孵育: (1) 未处理的培养基中孵育 1 小时; (2) 在含 hCG 培养基中孵育 1 小时; (3) 含 hCG 与受试物的培养基中孵育 1 小时, 重复 3 次。每次 1 小时孵育结束后, 收集培养基以分析雌二醇、孕酮与睾酮的水平^[23]。另外, 还可以通过体外培养人或大鼠卵巢颗粒细胞与膜细胞以深入分析雌激素合成抑制的阶段以及对特异性类固醇激素合成酶的作用。ex vivo: 与上述不同的是, 整体动物染毒而非切碎的组织直接染毒。这种方法考虑了毒物代谢动力学因素, 从而减少了因为化合物需代谢活化所引起的假阴性结果。因为妊娠时内分泌变化相对较小, 使用妊娠动物可以减少动情周期不同时期染毒所造成的差异 (Endocrine Screening Methods Workshop, Duke University, July, 1996)。与 in vivo 相比, in vitro 未考虑到机体对 EEs 的代谢, 但是具有实验中使用的动物量小的优点。而 ex vivo 正好集中了这两种试验的优点, 是 in vivo 与 in vitro 评价卵巢类固醇激素合成的桥梁。以上方法已被用于一些芳香化酶抑制剂 (例如氨基葡萄糖, fenarimol, 咪康唑, miconazole) 和一些化学

物^[21]对激素合成影响的研究。

5 其他方法

最近, Nishikawa 等建立了评价 EEs 活性的新方法——酵母 two-hybrid (二杂化物) 检测^[21], 即检测 ER 和辅激活蛋白之间的蛋白-蛋白相互作用, 因为雌激素激动剂与 ER 的结合可以导致辅阻遏物的分离和辅激活蛋白富集。本方法同时检测某化合物与受体结合以及富集辅激活蛋白的能力, 与简单的受体结合试验相比, 提供了更多的信息。由于拮抗剂一般不会置换辅阻遏物, 因此, 本方法可以用于区分激动剂与拮抗剂。

为了能综合评价某种物质或化合物可能的内分泌干扰活性, 需成套使用 in vivo 和 in vitro 实验。这种评价方案可以包括一系列方法: 第一阶段: 计算模型 [定量结构活性关系 (QSAR)]、in vitro 实验和短期 in vivo 实验; 第二阶段: 长期 in vivo 实验; 第三阶段: 多代繁殖实验。根据前一阶段的结果选择下一阶段的测试方法^[24]。

目前, 对于除 ER 以外的一些内分泌干扰作用机制尚不十分明确, EEs 可能通过与膜 ER 受体、新受体亚型 (如 ER β)^[25] 和寡受体的相互作用, 干扰内分泌系统。另外, 生长因子介导的信号通路也可以对 ER 的转录活性产生影响。因此, 目前比较迫切的是需要发展新的 in vivo 和 in vitro 实验来识别与评价一些新的 EEs。

附:

EDSTAC 制订的有关 EEDs 识别与评价方法

第一阶段: Screening

1. 推荐方法

in vitro assays: (1) 雌激素受体结合/报告基因试验; (2) 雄激素受体结合/报告基因试验; (3) 组织碎片的类固醇激素合成试验。

in vivo assays: (1) 啮齿类动物 3 天子宫增重实验; (2) 20 天青春期雌性啮齿类动物实验; (3) 啮齿类动物 5~7 天 Hershberger 实验; (4) 蛙蜕变实验; (5) 鱼性腺 Recrudescence 实验。

2. 替代方法

in vitro assays: 胎盘芳香化酶试验。

in vivo assays: (1) 改良啮齿类动物 3 天子宫增重实验; (2) 14 天雄性成年啮齿类动物实验; (3) 20 天雄性青春期啮齿类动物实验。

第二阶段: Testing

推荐方法

(1) 两代哺乳动物生殖毒性实验; (2) 鸟生殖实验; (3) 鱼生命周期实验; (4) Mysid 生命周期实验; (5) 两栖类动物发育与生殖实验。

参考文献:

- [1] Gray LE Jr, Kelce WR, Wiese T, et al. Endocrine Screening Methods Workshop report: detection of estrogenic and androgenic hormonal and antihomonal activity for chemicals that act via receptor or steroidogenic

- enzyme mechanisms [J] . *Reprod Toxicol*, 1997, 11 (5): 719-750.
- [2] Bolger R, Wiese TE, Ervin K, et al. Rapid screening of environmental chemicals for estrogen receptor binding capacity [J] . *Environ Health Perspect*, 1998, 106 (9): 551-557.
- [3] Holschneider DP, Kumazawa T, Chen K, et al. Tissue specific effects of estrogen on monoamine oxidase A and B in the rat [J] . *Life Sci*, 1998, 63 (3): 155-160.
- [4] Korach KS, McLachlan JA. Techniques for detection of estrogenicity [J] . *Environ Health Perspect*, 1995, 103 (S7): 5-8.
- [5] Soto AM, Sonnenschein G, Chung KL, et al. The E-SCREEN assay as a tool to identify estrogens: an update on estrogenic environmental pollutants [J] . *Environ Health Perspect*, 1995, 103 (S7): 113-122.
- [6] Mellanen P, Petanen T, Lehtimaki J, et al. Wood-derived estrogens: studies in vitro with breast cancer cell lines and in vivo in trout [J] . *Toxicol Appl Pharmacol*, 1996, 136 (2): 381-388.
- [7] Rio MC. What is/are the function (s) of trefoil peptides [J] . *Bull Cancer*, 1997, 84 (4): 443-446.
- [8] Taupin D, Wu DC, Jeon WK, et al. The trefoil gene family are coordinately expressed immediate-early genes: EGF receptor and MAP kinase-dependent interregulation [J] . *J Clin Invest*, 1999, 103 (9): 31-38.
- [9] El-Ashy D, Chrysogelos SA, Lippman ME, et al. Estrogen induction of TGF- α is mediated by an estrogen response element composed of two imperfect palindromes [J] . *J Steroid Biochem Mol Biol*, 1996, 59 (3-4): 261-269.
- [10] Wang F, Porter W, Xing W, et al. Identification of a functional imperfect estrogen-responsive element in the 5'-promoter region of the human cathepsin D gene [J] . *Biochemistry*, 1997, 36(25): 7793-7801.
- [11] Jorgensen M, Vendelbo B, Skakkebaek NE, et al. Assaying estrogenicity by quantitating the expression levels of endogenous estrogen-regulated genes [J] . *Environ Health Perspect*, 2000, 108 (5): 403-412.
- [12] Petit F, Le-Goff P, Cravedi JB, et al. Two complementary bioassays for screening the estrogenic potency of xenobiotics: recombinant yeast for trout estrogen receptor and trout hepatocyte cultures [J] . *J Mol Endocrinol*, 1997, 19 (3): 321-335.
- [13] Timann U, Schneider F, Tuchscherer A. Effects of organochlorine pesticides on DNA synthesis of cultured oviductal and uterine cells and on estrogen receptor of uterine tissue from heifers [J] . *Arch Toxicol*, 1996, 70 (8): 490-496.
- [14] Reel JR, Lamb IV JC, Neal BH. Survey and assessment of mammalian estrogen biological assays for hazard characterization [J] . *Fundam Appl Toxicol*, 1996, 34 (2): 288-305.
- [15] Shelby MD, Newbold RR, Tully DB, et al. Assessing environmental chemicals for estrogenicity using a combination of in vitro and in vivo assays [J] . *Environ Health Perspect*, 1996, 104 (12): 1296-1300.
- [16] Blair RM, Fang H, Branham WS, et al. The estrogen receptor relative binding affinities of 188 natural and xenobiotics: structural diversity of ligands [J] . *Toxicol Sci*, 2000, 54 (1): 138-153.
- [17] Hendry LB, Mahesh VB. A putative step in steroid hormone action involves insertion of steroid ligands into DNA facilitated by receptor proteins [J] . *J Steroid Biochem Mol Biol*, 1995, 55 (2): 173-183.
- [18] Vonum H, Liu X, Madsen P, et al. Molecular cloning of a cDNA encoding human calumenin, expression in escherichia coli and analysis of its Ca²⁺-binding activity [J] . *Biochim Biophys Acta*, 1998, 1386 (1): 121-131.
- [19] Balmelli-Gallacchi P, Schoumacher F, Liu JW, et al. A yeast-based bioassay for the determination of functional and non-functional estrogen receptors [J] . *Nucleic Acids Res*, 1999, 27 (8): 1875-1881.
- [20] Arnold SF, Robinson MK, Notides AC, et al. A yeast estrogen screen for examining the relative exposure of cells to natural and xenoestrogens [J] . *Environ Health Perspect*, 1996, 104 (5): 544-548.
- [21] Massaad C, Barouki R. An assay for the detection of xenoestrogens based on a promoter containing overlapping EREs [J] . *Environ Health Perspect*, 1999, 107 (7): 563-566.
- [22] Laskey JW, Berman E, Ferrell JM. The use of cultured ovarian fragments to assess toxicant alterations in steroidogenesis in the Sprague-Dawley rat [J] . *Reprod Toxicol*, 1995, 9 (2): 131-141.
- [23] Nishikawa J, Saito K, Goto J, et al. New screening methods for chemicals with hormonal activities using interaction of nuclear hormone receptor with coactivator [J] . *Toxicol Appl Pharmacol*, 1999, 154 (1): 76-83.
- [24] Zacharewski T. Identification and assessment of endocrine disruptors: limitations of in vivo and in vitro assays [J] . *Environ Health Perspect*, 1998, 106 (S2): 577-582.
- [25] Kuiper GG, Enmark E, Peltö-Huikko M, et al. Cloning of a novel receptor expressed in rat prostate and ovary [J] . *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, 93 (12): 5925-5930.

关于《中国工业医学杂志》增加主编及编委的启事

经中华预防医学会“预会发[2001] 152号”文件批准,增加沈阳市劳动卫生职业病研究所所长、法人代表王朝和同志(《中国工业医学杂志》编辑部法人代表)为本刊主编,沈阳市劳动卫生职业病研究所副所长阎波同志为编委会委员。