

DOI:10.7524/AJE.1673-5897.20160811002

季晓亚, 李娜, 袁圣武, 等. 环境雌激素生物效应的作用机制研究进展[J]. 生态毒理学报, 2017, 12(1): 38-51

Ji X Y, Li N, Yuan S W, et al. Research progress in the mechanisms for biological effects of environmental estrogens [J]. Asian Journal of Ecotoxicology, 2017, 12(1): 38-51 (in Chinese)

## 环境雌激素生物效应的作用机制研究进展

季晓亚<sup>1</sup>, 李娜<sup>1</sup>, 袁圣武<sup>1</sup>, 黄超<sup>1</sup>, 饶凯锋<sup>1</sup>, 马梅<sup>1,2,\*</sup>, 王子健<sup>1</sup>

1. 中国科学院生态环境研究中心 中国科学院饮用水科学与技术重点实验室, 北京 100085

2. 中国科学院大学资源与环境学院, 北京 100190

收稿日期: 2016-08-11 录用日期: 2016-09-02

**摘要:** 环境雌激素(environmental estrogens, EEs)种类繁多, 来源多样且分布广泛, 大量工业添加剂、食品添加剂和农药类物质已被证实具有雌激素活性。EEs 对人体生殖、神经、免疫等系统的生物毒性已经引起了公众的普遍关注。近年来的研究表明, EEs 不仅结合雌激素核受体(nuclear estrogen receptor, nER), 还可以活化雌激素膜受体(membrane estrogen receptor, mER), 干扰正常的雌激素信号通路。本文总结了 EEs 通过 nER、mER 介导的多种雌激素基因组和非基因组信号途径及其产生的生物学效应, 综述了在其毒理学作用机理基础上发展的环境样品的雌激素活性评估和 EEs 混合物的联合作用研究, 以期为该污染物的筛查、风险评估和进一步的机制研究提供参考。

**关键词:** 环境雌激素; 核受体; 膜受体; 基因组; 非基因组; 信号通路

文章编号: 1673-5897(2017)1-038-14 中图分类号: X171.5 文献标识码: A

## Research Progress in the Mechanisms for Biological Effects of Environmental Estrogens

Ji Xiaoya<sup>1</sup>, Li Na<sup>1</sup>, Yuan Shengwu<sup>1</sup>, Huang Chao<sup>1</sup>, Rao Kaifeng<sup>1</sup>, Ma Mei<sup>1,2,\*</sup>, Wang Zijian<sup>1</sup>

1. Key Laboratory of Drinking Water Science and Technology, Research Center for Eco-Environmental Sciences, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100085, China

2. College of Resources and Environment, University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100190, China

Received 11 August 2016 accepted 2 September 2016

**Abstract:** Environmental estrogens (EEs) have a variety of types and sources. A great number of industrial additives, food additives and pesticides have been identified to have estrogenic activities. The potential reproductive toxicity, neurotoxicity and immunotoxicity resulted from estrogenic activities have attracted widespread attention. It was found in recent years that EEs disrupt normal estrogen signaling pathways by binding to nuclear estrogen receptor and membrane estrogen receptor. In this review, the biological effects resulted from nER and mER mediated multiple estrogen genomic and non-genomic signaling pathways were summarized. In order to provide better understanding for screening, risk assessment and mechanism studies of EEs, the research progress of the estrogen activity assessment of environmental samples and the combined effects of the EEs mixture were reviewed.

**基金项目:** 国家自然科学基金重点课题(No.51290283); 自然科学基金重点基金(No.21437006); 国家自然科学基金青年基金(No.21107131)

**作者简介:** 季晓亚(1992-), 女, 硕士研究生, 研究方向为水生态毒理学, E-mail: jxya1992@163.com

\* **通讯作者**(Corresponding author), E-mail: mamei@rcees.ac.cn

**Keywords:** environmental estrogens; nuclear receptor; membrane receptor; genomic; non-genomic; signaling pathways

内分泌干扰物(endocrine disrupting chemicals, EDCs)又称环境类激素(environmental hormones),是通过破坏或干扰生物体内天然激素合成、分泌、运输、代谢、结合和降解的过程,从而影响生物体稳定性和正常生长发育的一类外源性物质<sup>[1]</sup>。环境雌激素(environmental estrogens, EEs)是最早发现的典型环境内分泌干扰物,可以通过基因组或非基因组信号通路激活或抑制内源雌激素活性,从而产生抗/类雌激素效应,干扰内源雌激素正常的生理功能。研究表明,目前内分泌干扰物中有超过 200 种的化学物质已被证实具有雌激素活性<sup>[2]</sup>,这些雌激素类物质来源多样、分布广泛且具有生物毒性。因此 EEs 污染已经引起了公众的普遍关注。

传统的研究指向 EEs 的雌激素效应主要通过雌激素核受体(nuclear estrogen receptor, nER)介导,且基于对此信号通路的认识,目前已开发出多种环境雌激素类物质离体生物检测法<sup>[3-5]</sup>。这些方法具有高灵敏、高通量的特点。然而大量有关于 EEs 作用机制的研究表明其引发的信号途径的复杂性,除了 nER 经典的雌激素基因组信号通路,多种由结合雌激素膜受体(membrane estrogen receptor, mER)诱发快速雌激素非基因组信号转导途径的作用方式经过复杂的信号通路分析也被不断挖掘<sup>[6-9]</sup>,且 EEs 可通过这些信号通路对人体产生生殖毒性、神经毒性、免疫毒性和致癌性<sup>[10-13]</sup>。基于多种 EEs 离体生物检测法,大量环境样品被发现具有雌激素活性且存在多种不同浓度的 EEs<sup>[14-15]</sup>,已有研究表明,EEs 混合物的联合毒性可以因各组分浓度水平、作用位点、作用方式以及效应终点的不同而改变<sup>[16-17]</sup>,引起了科学界对 EEs 混合物联合作用的关注。本文综述了近年来环境雌激素类物质在生物效应作用机理方面研究的新进展,试图展现一个更为完整和复杂的 EEs 发挥雌激素效应的作用机制,并综述了在此基础上发展的环境样品的雌激素活性评估和 EEs 混合物的联合作用研究。

## 1 雌激素受体 (Estrogen receptor, ER)

EEs 主要通过结合 3 种不同的雌激素受体 ER $\alpha$ 、ER $\beta$  和 G 蛋白耦联受体 30(G protein-coupled receptor 30, GPR30)干扰内源雌激素功能。ER $\alpha$  和 ER $\beta$  是核受体超家族的成员,具有相似的结构和高

度的同源性<sup>[18]</sup>;而 GPR30 与核受体的结构完全不同,是一个 7 次跨膜的 G 蛋白耦联受体。3 种雌激素受体能够被配体激活介导多种雌激素信号途径发挥生物学功能。研究发现,EEs 可模拟内源雌激素成为激活雌激素受体的配体<sup>[3, 19]</sup>,典型 EEs 诱发的信号通路及其检测方法总结见表 1,且 EEs 与 3 种雌激素受体具有不同的结合能力<sup>[3, 20]</sup>,这意味着 EEs 可以结合不同的受体产生多种雌激素效应的形成途径。

### 1.1 雌激素核受体(nuclear estrogen receptor, nER)

ER $\alpha$ 、ER $\beta$  是 nER 的 2 种亚型,由不同的基因编码,都会在生殖器官、肺、骨、心脏、大脑的部分区域表达<sup>[21]</sup>,但其分布具有一定程度的组织特异性,ER $\alpha$  主要在子宫、肾脏、肝脏中表达,ER $\beta$  在前列腺和小脑中含量较高<sup>[22]</sup>。ER $\alpha$ 、ER $\beta$  的结构特点已经被大量的报道<sup>[23]</sup>,N 端到 C 端依次可分为 3 个功能域:非配体依赖的转录激活功能域 AF-1(activation function-1); DNA 结合域(DNA binding domain, DBD);配体结合结构域(ligand binding domain, LBD),其含有配体依赖的转录激活功能域 AF-2(activation function-2)。

EEs 通过结合 nER 导致靶基因表达的改变而产生雌激素效应总结见表 1。Robert 等<sup>[24]</sup>利用雌激素受体结合实验发现,在 188 种化合物中有 100 个化合物对 ER 具有亲和力,其中包括合成雌激素、烷基酚、有机氯杀虫剂、联苯衍生物等,且根据这些化合物的结构得出了环状结构对于化合物结合 ER 具有重要的作用。部分 EEs 还对特定核受体亚型表现出强烈的亲和力。Escande 等<sup>[25]</sup>在稳染 ER $\alpha$ 、ER $\beta$  的 Hela 细胞中,<sup>[3</sup>H] E2 受体结合实验表明,染料木黄酮、香豆雌酚等植物激素对 ER $\beta$  的亲和力较强,药物类乙炔基雌二醇(EE2)对 ER $\alpha$  的亲和力较强,特异性雌激素受体激动剂如 PPT、DPN 更说明了配体对 ER $\alpha$ 、ER $\beta$  亲和力的差异(RBA ER $\alpha$ /ER $\beta$ =84.4, 0.019)。

### 1.2 雌激素膜受体 (Membrane estrogen receptor, mER)

mER 已经被证实介导快速的雌激素非基因组信号通路<sup>[26-28]</sup>。根据它们的结构可以分为 mER $\alpha$ 、mER $\beta$ 、GPR30、ER $\alpha$  和 ER $\beta$  的变异体(ER-X、ER- $\alpha$ 36),其中 mER $\alpha$  和 mER $\beta$  是核受体经过棕榈酰化定位在细胞膜上小窝蛋白的膜受体<sup>[29]</sup>。近年来,许

多研究发现 GPR30 在下丘脑、垂体、肾上腺、卵巢等组织中高表达<sup>[22, 30]</sup>, 而多种 EEs 如农药类、烷基酚、植物激素类等物质与之结合会干扰其正常的生理功能总结见表 1, 因此引起了研究者的广泛关注。

Thomas 等<sup>[31]</sup>利用<sup>[35S]</sup>GTP $\gamma$ S 受体结合实验发现他莫昔芬(TAM)、ICI、o,p'-DDE 可以结合且活化 SKBR3 细胞中的 GPR30; 除此之外, 还说明了稳转 GPR30 的 HEK293 与 SKBR3 细胞类似。所以他们利用此细胞研究 EEs 对 GPR30 的亲和能力<sup>[3]</sup>, <sup>[3H]</sup>E2 受体结合实验表明双酚 A(BPA)、壬基酚(NP)、染料木黄酮、十氯酮、p,p'-DDT、o,p'-DDE 等 EEs 对 GPR30 具有不同的结合能力。值得注意的是, BPA 与 nER 的结合能力很低(RBA = 0.315<sup>[32]</sup>), 但与 GPR30 的结合能力却相反(RBA = 2.83<sup>[31]</sup>), 且能大幅度提高 cAMP 的浓度, 说明 BPA 主要通过 GPR30 产生雌激素效应, 这意味着仅通过检测 EEs 与 nER 的作用能力来反映其雌激素效应的方法是不全面

的; 染料木黄酮既与 ER $\beta$  有强烈的结合能力, 还与 GPR30 有较强的亲和力, 表明其可能根据细胞环境选择受体, 也可能结合多种受体调控多种胞内信号途径发挥其雌激素活性。综上说明环境中多种 EEs 共同存在将直接增加它们引发的雌激素信号通路的复杂性。

## 2 EEs 生物效应的作用机制

经典的雌激素基因组信号通路是 nER 直接或间接调节靶基因表达的信号途径。EEs 通过结合 nER 而发挥雌激素效应的分子机制已经很明确, 但其不仅限于调节 nER 依赖的雌激素基因组信号通路, 还可以结合 mER 引发多种快速的非基因组信号转导途径。这是目前 EEs 在雌激素受体方面对内分泌干扰新的研究热点, 其通过基因组和非基因组多种作用途径所造成的内分泌干扰的复杂性是研究的难点。

表 1 典型环境雌激素引发的雌激素信号通路及检测方法

Table 1 The estrogen signaling pathways mediated by typical environmental estrogens and detection methods

环境雌激素 Environmental estrogens	信号通路 Signaling pathway	细胞类型和生物效应 Cell and function	检测方法 Detection method	文献来源 Literature
雌酮 Estrone	ER $\alpha$ , ER $\beta$	Hela, GH3 细胞增殖 Hela and GH3 cell proliferation	信号通路分析, 受体结合试验, 报告基因检测	[25, 33]
雌二醇 Estradiol	mER/ERK		Signaling-pathway analysis, receptor-binding assay, reporter-gene assay	
雌三醇 Estriol	mER/Ca <sup>2+</sup>			
农药类 Pesticides				
六氯酚 Hexachlorophene	ER	MCF-7 细胞 MCF-7 cell	受体结合试验, 报告基因检测 Receptor-binding assay, reporter-gene assay	[34]
十氯酮 Kepone 林丹 Lindane	ER	MCF-7 细胞、重组人雌激素 受体基因酵母细胞 MCF-7 cell and recombinant hER gene yeast	受体结合试验, 酵母双杂交测试 Receptor-binding assay, yeast two-hybrid assay	[4]
狄氏剂 Dieldrin	ER $\alpha$ , ER $\beta$ GPR30/ERK GPR30/PI3K/Akt	GH3, MCF-7 细胞增殖 GH3 and MCF-7 cell proliferation	细胞增殖实验, 受体结合试验, 信号通路分析 Cell proliferation assay, receptor-binding assay, signaling-pathway analysis	[5-6]
阿特拉津 Atrazine	ER $\alpha$ GPR30/MAPK/ERK	BG-1 细胞增殖 BG-1 cell proliferation	信号通路分析 Signaling-pathway analysis	[7]
甲氧滴滴涕 Methoxychlor	ER/Cyclin D1/Ras/Bax ER/ERK	BG-1 细胞增殖 BG-1 cell proliferation	信号通路分析 Signaling-pathway analysis	[35-36]
p,p'-DDE, o, p'-DDT, $\beta$ -HCH	ER/ c-Src/ERK	MCF-7 细胞增殖 MCF-7 cell proliferation	信号通路分析 Signaling-pathway analysis	[10]

续表1

环境雌激素 Environmental estrogens	信号通路 Signaling pathway	细胞类型和生物效应 Cell and function	检测方法 Detection method	文献来源 Literature
药物类 Pharmaceuticals				
己烯雌酚 Diethylstilbestrol	GPR30/PKA/ERK/CREB	调节引带细胞 Regulate gubernaculum cells	信号通路分析 Signaling-pathway analysis	[11]
氟西汀 Fluoxetine	ER	MCF-7 细胞 MCF-7 cell	动物试验,报告基因检测 Animals test, reporter-gene assay	[37]
氟维司群 Fulvestrant	ER/c-Src GPR30/ERK	抗 T47D 细胞增殖、粘附 Inhibit T47D cell proliferation and adhesion	信号通路分析 Signaling-pathway analysis	[38-39]
雷洛昔芬 Raloxifene	GPR30/Akt/Bal-2 mER/ERK/ caspase-3	保护多巴胺神经, 抗软骨细胞凋亡 Protect dopamine neurons and inhibit chondrocytes apoptosis	信号通路分析 Signaling-pathway analysis	[40-41]
他莫西芬 Tamoxifen	ER ER $\alpha$ /IGF-1R/EGFR/MAPK	抑制 HeLa 细胞、MCF-7 细胞增殖 Inhibit HeLa and MCF cell proliferation	细胞增殖实验, 信号通路分析 Cell proliferation assay, signaling-pathway analysis	[42-43]
磺脲类 Sulfonylurea	mER/K <sup>+</sup> pathway	胰岛 $\beta$ 细胞胰岛素分泌 Promote $\beta$ -cell insulin secretion	信号通路分析 Signaling-pathway analysis	[8]
马烯雌酮 Equilin	ER/eNOS/NO	保护动脉内皮细胞 Protect endothelial cells	信号通路分析 Signaling-pathway analysis	[44]
乙炔基雌二醇 Ethinyl estradiol	ER $\alpha$ ER/MAPK	HeLa 细胞增殖 HeLa cell proliferation	受体结合试验, 报告基因检测, 蛋白定量, 信号通路分析 Receptor-binding assay, reporter-gene assay, protein assay, signaling-pathway analysis	[25, 45]
邻苯二甲酸酯类 PAEs				
邻苯二甲酸丁苄酯 BBP	ER	GH3、MCF-7 细胞增殖 GH3 cell and MCF-7 cell proliferation	细胞增殖实验, 报告基因检测 Cell proliferation assay, Reporter-gene assay	[46-47]
邻苯二甲酸二丁酯 DBP	ER	GH3、MCF-7 细胞增殖 GH3 cell and MCF-7 cell proliferation	细胞增殖实验, 报告基因检测, 转录分析 Cell proliferation assay, reporter-gene assay, transcription assay	[46-47]
邻苯二甲酸二乙酯 DEP	ER	MCF-7 细胞增殖 MCF-7 cell proliferation	细胞增殖实验 Cell proliferation assay	[47]
重金属类 Heavy metals				
Cd	GPR30/ERK ER/ERK	SKBR3 细胞增殖 SKBR3 cell proliferation	细胞增殖实验, 蛋白定量, 信号通路分析 Cell proliferation assay, protein assay, signaling-pathway analysis	[27, 48]
Cu, Pb, Ni, Hg, Sn	ER $\alpha$	MCF-7 细胞增殖 MCF-7 cell Proliferation	受体结合试验, 细胞增殖实验 Receptor-binding assay, cell proliferation assay	[49]
Se	ER $\alpha$	MCF-7 细胞 MCF-7 cell	受体结合试验, 蛋白定量, 报告基因检测, 基因定量 Receptor-binding assay, protein assay, reporter-gene assay, transcription assay	[50]

续表1

环境雌激素 Environmental estrogens	信号通路 Signaling pathway	细胞类型和生物效应 Cell and function	检测方法 Detection method	文献来源 Literature
植物、真菌类雌激素 Phytoestrogens and fungi-estrogens				
布雷菲德菌素 A Brefeldin A	ER/ERK ER/PI3K/Akt	MCF-7 细胞 MCF-7 cell	信号通路分析 Signaling-pathway analysis	[51]
雌马酚 Equol	ER $\alpha$ /ERK GPR30/EGFR/ERK GPR30/EGFR /Akt	MCF-7 细胞增殖, 保护静脉内皮细胞 MCF-7 cell proliferation and protect endothelial cells	信号通路分析 Signaling-pathway analysis	[52-53]
染料木黄酮 Genistein	GPR30/MAPK ER $\beta$ ER $\alpha$ /IGF-1R/Akt ER $\alpha$ /MAPK/NF- $\kappa$ B	调节 PDL 细胞炎症, 抑制 BG-1 细胞增殖, 调节成骨细胞分化 Regulate PDL cell inflammation, inhibit BG-1 cell proliferation, regulate osteoblasts differentiation	信号通路分析, 受体结合实验, 报告基因检测 Signaling-pathway analysis, receptor- binding assay, reporter-gene assay	[54-56]
葛根素 Puerarin	mER/PI3K/Akt/eNOS/NO ER/ERK ER/PI3K/Akt	心肌保护 MG-63 细胞增殖 Cardioprotection and MG-6 cell proliferation	信号通路分析 Signaling-pathway analysis	[57-58]
茶多酚 Tea polyphenol	ER $\alpha$ /ERK ER $\alpha$ /Akt ER/MAPK/Akt/caspase-3	阿尔兹海默病 Ishikawa 细胞凋亡 Alzheimer's disease and Ishikawa cell apoptosis	动物试验, 信号通路分析 Animals test, signaling-pathway analysis	[59-60]
白藜芦醇 Resveratrol	ER $\alpha$ , ER $\beta$ /MAPK/ NO ER/NO/cGMP GPR30/cAMP/PKC/K <sup>+</sup> ER $\alpha$ / cAMP	保护血管内皮细胞, 成骨细胞分化 Protect endothelial cell and osteoblastic differentiation	信号通路分析 Signaling-pathway analysis	[61-64]
工业酚类 Industrial phenol				
BPA	GPR30/ERK/c-fos GPR30/cGMP/PKG GPR30/cAMP/PKA	BG-1, JKT-1, GC-1 细胞增殖 BG-1, JKT-1, GC-1 cell proliferation	细胞增殖实验, 报告基因检测, 信号通路分析 Cell proliferation assay, reporter-gene assay, signaling-pathway analysis	[26, 36, 65]
NP, OP	ER/ERK	BG-1 细胞增殖 BG-1 cell proliferation	细胞增殖实验, 信号通路分析 Cell proliferation assay, signaling-pathway analysis	[36]
卤代芳烃 Aryl halide				
PCBs	ER $\alpha$	MCF-7 细胞增殖 MCF-7 cell proliferation	细胞增殖实验, 酵母双杂交测试 Cell proliferation assay, yeast two-hybrid assay	[66]
二噁英 Dioxins	AhR/ER $\alpha$	T47D 细胞 T47D cell	信号通路分析 Signaling-pathway analysis	[67]
PAHs				
蒽 Anthracen 苯并芘 Benzopyrene 菲 Phenanthrene	ER	MCF-7 细胞 MCF-7 cell	受体结合试验, 报告基因检测 Receptor-binding assay, Reporter-gene assay	[12, 68]
甲基胆蒽 Methylcholanthrene	AhR/ER $\alpha$ , ER $\beta$	HC11 细胞 HC11 cell	信号通路分析 Signaling-pathway analysis	[69]
PBDEs	ER	T47D 细胞 T47D cell	ER-CALUX	[70]



## 2.1 雌激素基因组信号通路

农药类、邻苯二甲酸酯类、重金属类、多溴联苯醚、多氯联苯等可以模拟内源雌激素结合 nER 形成 nER-EEs 复合物,随后直接结合靶基因启动子上的雌激素反应元件(EREs)或利用蛋白质间的相互作用间接结合启动子从而调控靶基因的表达,作用方式见图 1。在此途径中,nER-EEs 复合物可以不直接和靶 DNA 结合,而与转录因子相互作用,表现出激活或抑制下游靶基因的表达。此外,核受体通过募集不同的辅助因子,包括共激活因子(coactivator)和共抑制因子(corepressor)<sup>[71]</sup>赋予其功能的多样性。因此,EEs 在此途径中可以根据转录因子和辅助因子的可获得性而表现出多种雌激素效应。

大量的研究表明,EEs-nER 复合物可以结合 ERE 发挥雌激素活性,且根据 nER 途径中 ERE 的作用不同学者开发了一系列方法,如 Routledge 等<sup>[72]</sup>开发了重组酵母雌激素筛选法(yeast estrogen screen, YES),Legler 等<sup>[73]</sup>利用稳转 pERetata-Luc 的 T47D 细胞开发了 ER-CALUX 法。这些方法反映了 EEs 通过依赖 ERE 的基因组信号通路发挥雌激素效应,例如,Xavier 等<sup>[74]</sup>采用 YES 法发现,金属 Cd、Cu、Zn 不能直接激活 ERE,但与内源雌激素共存时,却明显降低了 E2 通过 ERE 产生的雌激素效应。对持久性化合物多溴联苯醚(PBDEs)及其同系物进行 ER-CALUX 法检测,发现 11 种 PBDEs 具有雌激素活性<sup>[70]</sup>,EC<sub>50</sub>为 2.5 ~ 7.3  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ,HO-PBDE 的 EC<sub>50</sub>超出了 E2 的 50 000 倍。同时在稳转 ER $\alpha$ 、ER $\beta$  和 pERetata-Luc 的 HEK293 细胞中发现,相对 ER $\alpha$  而言,HO-PBDE 通过 ER $\beta$  产生的雌激素效应较强<sup>[70]</sup>,其诱导率是 E2 的 35~40 倍。这说明 EEs 可通过不同的 nER 亚型直接结合 ERE 产生雌激素效应。

### 2.1.1 转录因子对 EEs 生物效应的影响

nER-EEs 复合物除了与靶启动子的直接结合,还可以与转录因子(Sp、AP-1、NF-kB 等)相互作用改变靶基因表达。Wu 等<sup>[75]</sup>在转染 ER $\alpha$  报告基因质粒的 MCF-7 细胞中,采用 Sp1、Sp3、Sp4 的 RNAi 发现 NP、BPA、开蓬、辛基酚(OP)可以选择性地激活不同类型的 Sp 产生强度各异的雌激素活性,说明 EEs 与不同的转录因子相互作用导致了它们功能的差异性。

### 2.1.2 辅助因子对 EEs 生物效应的影响

在基因组信号通路中,EEs 与 LBD 的结合导致受体构象的改变,从而暴露了 1 个辅助因子结合位点,随后募集不同的辅助因子,如共激活因子 SRC-1、

SRC-2、SRC-3 等或共抑制因子 NCoR、SMRT 等,最终产生多种应答。不同类型的共激活因子对 EEs 雌激素效应具有重要的作用。在转染 ER $\alpha$ 、ER $\beta$  和 SRC-1、TIF2 的 HeLa 细胞中<sup>[76]</sup>,BPA、4-tert-OP 都具有募集 SRC-1、TIF2 的能力,但在 HeLa-ER $\beta$  中对共激活因子 TIF2 的募集能力最强(相对募集能力 RRA > 0.05)且与它们的雌激素活性相符。Shang 等<sup>[71]</sup>的研究发现,TAM 在 MCF-7 细胞中通过募集共抑制因子 NCoR、SMRT 抑制 nER 介导的细胞增殖,但其在 Ishikawa 细胞中募集共激活因子 SRC-1 促进细胞增殖,且 SRC-1 在 Ishikawa 中高表达,说明 EEs 可以在不同的细胞环境中根据辅助因子的类型和可获得性表现出不同的雌激素效应。

本实验室构建的重组人雌激素受体基因酵母检测体系<sup>[77]</sup>则是根据 nER 途径中配体对共激活因子 GRIP1 的募集而建立的雌激素物质筛查方法,可以评估 EEs 的类/抗雌激素活性。刘芸等<sup>[78]</sup>根据体系构建的原理和实验结果分析酚类化合物的雌激素活性及其在体内的干扰途径,得出对苯基苯酚、丁基酚(4-tert-OP)、五氯酚(PCP)在体内与 E2 竞争性结合 nER 后,募集共激活因子产生应答,故同时表现出类/抗雌激素活性;氨基酚(4-AP)、BPA 具有模拟 E2 的能力,故表现出类雌激素活性;2-tert-BP 只与 E2 竞争结合 nER,但不调控下游基因的表达,故表现出抗雌激素活性。在全氟辛基磺酸(PFOS)及其替代品的内分泌干扰效应的研究中<sup>[79]</sup>,酵母双杂交测试并结合大鼠肝脏微粒体酶系统 S9 代谢方法的结果表明,它们在体内代谢活化后表现出雌激素受体拮抗效应。

二噁英类物质对经典雌激素信号通路的影响是:不直接作用于 nER,而是间接与 nER 竞争共激活因子的结果,其与 AhR 结合后进入细胞核与 ARNT(芳香烃受体核转位蛋白)形成 AhR-ARNT 异源二聚体,然后结合二噁英应答元件调控下游基因表达产生应答<sup>[80]</sup>。在此过程中募集的共激活因子 SRC-1、SRC-2、SRC-3 等也是 nER 途径中所需的共激活因子,意味着进入细胞的二噁英类物质可以与内源雌激素竞争共激活因子,抑制内源雌激素效应,从而表现出抗雌激素作用。

## 2.2 雌激素非基因组信号通路

近年来,EEs 被证实可以结合 mER 在几分钟甚至几秒内导致细胞内第二信使 cAMP、cGMP 和离子浓度的快速变化,引发激酶级联反应和离子通道<sup>[7, 46, 48]</sup>见图 1,如 (1) MAPK、PI3K/Akt; EEs 活化定

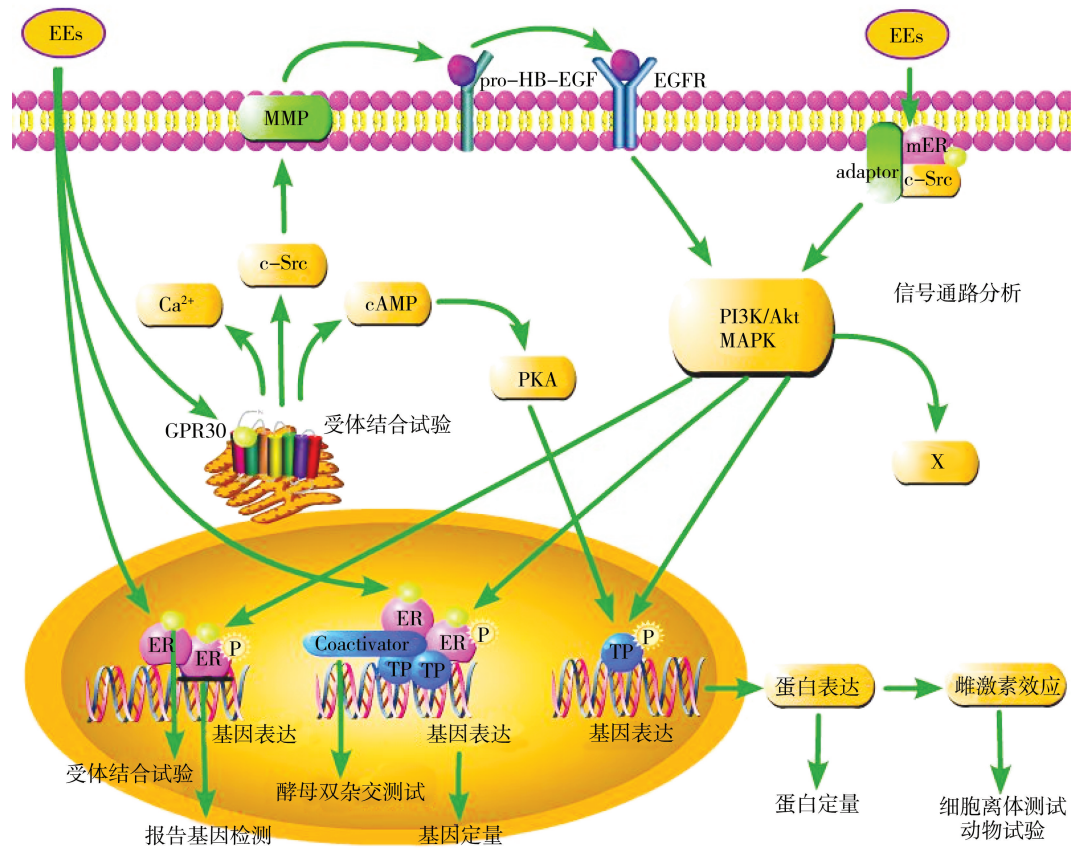


图1 环境雌激素引发的雌激素信号通路<sup>[81-82]</sup>

Fig. 1 Signaling pathway triggered by environmental estrogens<sup>[81-82]</sup>

位在细胞膜上的 mER, mER 通过与转接蛋白(adaptor)、信号分子如 c-Src 相互作用激活 MAPK、PI3K/Akt 快速激酶级联反应<sup>[81]</sup>; EEs 还可以结合内质网膜上的 GPR30, 随后 GPR30 活化下游的效应蛋白 c-Src, 从而激活基质金属蛋白酶(MMP), 导致肝素结合表皮生长因子的膜结合前体(proHB-EGF)分开, 释放自由的表皮生长因子(EGF)。EGF 反式激活表皮生长因子受体(EGFR), 最终引发 MAPK、PI3K/Akt 激酶信号转导途径<sup>[81]</sup>。(2) cAMP/PKA: EEs 与 GPR30 结合, 激活下游的效应蛋白腺苷酸环化酶(AC), 将 ATP 转化为环磷酸腺苷(cAMP), 导致胞内 cAMP 的增加, 活化依赖 cAMP 的 PKA 激酶<sup>[83]</sup>。(3) Ca<sup>2+</sup>通道: 被 EEs 激活的 GPR30 可以活化磷脂酶 C (PLC), 然后催化 4,5-二磷酸磷脂酰肌醇(PIP<sub>2</sub>)分解生成 1,4,5-三磷酸肌醇(IP<sub>3</sub>), 引发胞内钙动员<sup>[30]</sup>。

### 2.2.1 MAPK 信号转导途径

大量的 EEs 可以结合 mER 诱发 MAPK 激酶信号通路发挥雌激素效应。1 nmol·L<sup>-1</sup> 乙基酚 EP、丙

基酚 PP、辛基酚 OP、壬基酚 NP 在 GH3 细胞 2.5~5 min 内导致 p-ERK 的浓度达到峰值, 随后失活又在 60 min 达到另一个峰值, 但只有 NP 促进了 GH3 增殖<sup>[84]</sup>, 说明烷基酚可以引发 ERK 信号途径产生复杂的生物效应。Silva 等<sup>[10]</sup>在研究农药类 p,p'-DDE、o,p'-DDT、β-HCH 发挥雌激素效应的作用机制中发现已暴露的 MCF-7 细胞中, 磷酸化的 Src、ERK1/2 蛋白表达量、细胞增殖与这些农药的浓度具有明显的效应-剂量关系, 而加入 ERα、ERβ 的抑制剂 ICI 后, 磷酸化的 Src、ERK1/2 蛋白表达量、细胞数量大幅度减少, 表明 p,p'-DDE、o,p'-DDT、β-HCH 通过 mER/c-Src/ERK 促进了 MCF-7 乳腺癌细胞的增殖, 且具有不同的类雌激素活性。

TAM、Cd、BPA 可以通过 mER/c-Src/ERK 或 mER/EGFR/ERK 促进不同的人乳腺癌细胞系(MCF-7、SKBR3、T47D)的增殖<sup>[43, 85]</sup>; 阿特拉津在卵巢癌细胞 BG-1 和 SKBR3 中引发了 GPR30/ERK 而提高癌细胞的增殖能力, 还经此信号转导途径对癌相关成

纤维细胞(CAFs)产生生物效应<sup>[7]</sup>。

### 2.2.2 PI3K/Akt 信号转导途径

PI3K/Akt 激酶级联反应也是 EEs 发挥雌激素效应的主要信号通路, Briz 等<sup>[6]</sup>发现, 农药类狄氏剂、硫丹、林丹与皮质神经元(CN)和小脑颗粒细胞(CGC)中的 ER 具有不同的结合能力, 且狄氏剂可以大幅度上调 CGC 中磷酸化 Akt 的蛋白表达量。但是加入 GPR30 的抑制剂 G15 后, 蛋白表达量明显降低。值得注意的是, 利用暴露后的 CN 和 CGC 细胞提取物进行 MCF-7 细胞增殖实验的结果显示: 长时间暴露的细胞提取物具有较强的促癌细胞增殖能力。这说明狄氏剂、硫丹、林丹在 CN、CGC 细胞中具有类雌激素效应, 且狄氏剂可以结合 GPR30 对 CN、CGC 产生神经毒性。

### 2.2.3 其他信号转导途径

EEs 除了引发 MAPK、PI3K/Akt, 还具有其他多种雌激素效应形成途径: cAMP/PKA、cGMP/PKG、K<sup>+</sup>通道、Ca<sup>2+</sup>通道等。EP、PP、OP、NP 在 100 fmol·L<sup>-1</sup>~1 nmol·L<sup>-1</sup>浓度范围内可以调控 GH3 细胞内 Ca<sup>2+</sup>离子流浓度的改变, 且疏水性较强的 OP、NP 对 Ca<sup>2+</sup>浓度的影响更加明显<sup>[84]</sup>, 表明根据烷基酚类物质的疏水性可预测它们的生物效应。TAM、ICI、o,p'-DDE、BPA、NP、十氯酮可以结合 GPR30<sup>[3, 31]</sup>上调下游 cAMP 的表达从而发挥雌激素效应。己烯雌酚(DES)在引带细胞中通过 GPR30/cAMP/PKA 信号通路诱导细胞增殖<sup>[11]</sup>。低剂量的 BPA 和 DES 可以激活胰岛 α 细胞中的 GPR30 抑制 Ca<sup>2+</sup>通道<sup>[9]</sup>, 影响胰高血糖素的分泌, 从而干扰内分泌系统的平衡。

综上所述, 单一 EEs 在细胞中可以结合 GPR30 引发 1 种或多种信号转导途径。这些不同作用途径造成了效应终点的复杂性, 直接成为检测 EEs 介导 GPR30 的关键限制性因素。而环境介质中的 EEs 是多种同时存在, 它们的作用靶点更加丰富, 引发的雌激素信号途径更为复杂、交错, 更加难以确定效应终点。

## 3 环境样品的雌激素活性研究

人类和其他动物暴露在多种 EEs 存在的环境中, 单一 EEs 的环境暴露并不存在。评价环境样品的雌激素活性、生态风险并甄别主要贡献因子一直是研究者关注的重点, 且根据 EEs 的作用靶点、作用方式和效应终点而开发的雌激素活性检测方法被广泛应用。

工业废水和生活污水的大量排放致使环境水体中的 EEs 大量累积, EEs 通过生物富集和放大, 危害生态安全和人类健康。因此, 环境水体的雌激素活性评估和主要贡献因子甄别有助于掌握 EEs 在环境水体的污染水平、分布特征等, 以及准确地探求污染源。Matsuoka 等<sup>[86]</sup>采用 MCF-7 细胞增殖检测法(E-SCREEN Assay)、Ishikawa 细胞-碱性磷酸酶(Ishikawa-ALP)、YES 这 3 种检测法对日本向日河的上、中、下游进行雌激素活性评估, 发现向日河的雌激素活性每天都有不同程度的改变, 夏季中游的雌激素活性最高, EEQ 为 32.9 ng·L<sup>-1</sup>。同时, 因水体的自净能力, E1、E2 可以在 5~7 d 内降解, 而 EE2 降解缓慢, 意味着天然雌激素易生物降解, 而人工合成雌激素易在环境水体中累积。此外, E-SCREEN、Ishikawa-ALP 检测的雌激素活性大致相同, 相比之下 YES 检测的 EEQ 低于检测限, 说明不同的检测方法具有不同的灵敏性。因此检测方法的选择对于环境样品的雌激素活性研究是非常重要的。

对于环境水体而言, 污水处理厂的出水是其雌激素污染物的主要来源之一, 污水处理厂的雌激素活性研究对污水处理工艺的技术改进和污水再生利用的风险评价具有重要意义。北京市 3 个城市污水处理厂工艺流程污水样品经 YES 法检测表明污水处理厂能较好地去除原污水中的雌激素类物质, 但出水仍有一定的雌激素活性, EEQ 为 2.6~16.0 ng·L<sup>-1</sup>, 且出水的雌激素活性主要来自于固醇类激素<sup>[15]</sup>。Valitalo 等<sup>[87]</sup>采用 ERα-CALUX 对芬兰 8 个城市污水处理厂的出水进行雌激素效应评估, 发现所有的出水都具有不同强度的雌激素活性, EEQ 为 0.8~29.7 ng·L<sup>-1</sup>, 同时结合 IC-MS 表明 E2 和 BPA 是出水主要的雌激素活性来源。这些意味着污水处理厂的出水排放仍具有一定的环境风险。

饮用水的雌激素活性评估和雌激素系统干扰物检测技术的应用有利于全面评价饮用水对人体健康的风险和饮用水处理厂对处理工艺的改进。本实验室发表的一篇文章中<sup>[14]</sup>表明中国 6 个主要水系 23 个水源水的 EEQ 为 0.08~2.40 ng·L<sup>-1</sup>, 雌激素效应主要来源于 E2、EE2、4-NP。哈尔滨市饮用水及周边松花江水经重组人雌激素受体基因酵母检测发现, 松花江哈尔滨段江水在夏秋两季的 EEQ 为 528~965 pg·L<sup>-1</sup>, 自来水厂的出厂水仍具有 298~718 pg·L<sup>-1</sup>的雌激素活性<sup>[88]</sup>。此外, 管网水的雌激素活性较出厂水可升高 44.9%。以上研究结果表明, 为了



降低 EEs 暴露产生的健康风险,不仅要加强水源水的管理,引入深度处理工艺来提高饮用水的质量,还要防止饮用水在配送过程中的二次污染。

在环境样品的雌激素活性研究中,虽然大多数研究对象是水环境,但有研究表明大气的 PM<sub>10</sub>中含有 PAHs、苯并[ $\alpha$ ]芘等 EEs<sup>[89]</sup>,且基于 EEs 作用机理开发的离体生物测试在大气样品的雌激素活性检测中也同样应用广泛。Croes 等<sup>[90]</sup>在佛兰德斯交通繁忙的街道设置 36 个 PM<sub>10</sub> 采样点,采用 ER-CALUX 检测发现 70% 的样品具有不同强度的雌激素活性,EEQ 的平均值为 50.7 fg·m<sup>-3</sup>。

对环境中的 EEs 进行检测并作出相应的生态和健康风险评价,旨在控制环境中 EEs 对人体产生的雌激素系统干扰。美国环保局(United States Environmental Protection Agency, US EPA)成立的内分泌干扰物筛检和测试顾问委员会(EDSTAC)在第一级筛选方案(Tier 1 screening)中基于 EEs 的作用靶点和作用方式推荐了 2 种体外试验用以筛查 EEs 并评估其雌激素活性:ER 结合和 ER 转录激活试验,其中 ER 结合试验可筛选对 nER 具有亲和力的 EEs,但不能区分 EEs 的类/抗雌激素效应。ER 转录激活试验可用于检测 EEs 通过 ERE 途径产生的雌激素效应,此外,本实验室开发的重组人雌激素受体基因酵母测试已成为评估 EEs 通过募集 GPCR1 产生的雌激素活性的有效方法。这些方法可筛查出基于 nER 作用途径产生雌激素效应的 EEs,但 EEs 还可以结合 GPR30 产生雌激素效应,而 GPR30 下游一系列复杂的激酶级联反应和离子通道大大增加了方法构建的难度。因此建立基于 GPR30 的 EEs 快速筛选方法和高通量的雌激素效应测试将是未来 EEs 生物检测法的发展方向。

#### 4 EEs 混合物的雌激素活性研究

多种 EEs 在环境中同时存在,它们可能具有不同的作用方式,意味着环境样品的雌激素活性并不能简单地通过组分浓度或雌二醇当量加和来描述,可能表现出相互影响、相互作用,会产生协同、拮抗或加和等联合毒性效应,尤其是 Something from “Nothing” 现象<sup>[91]</sup>的出现引起了研究者对 EEs 联合毒性作用的关注。生物体暴露在环境样品中,就是 EEs 混合物的作用对象。作为一个复杂的系统,EEs 混合物中各组分可以在其不同的靶位点通过不同的作用方式产生雌激素效应,且不同的作用靶点和作用方式之间还存在着交互影响。因此,决定受试生

物的类型、效应终点的选择和研究 EEs 混合物的种类同样重要。此外,根据各组分间是否存在相互作用,将联合作用分为相互作用和无相互作用。其中,浓度加和模型<sup>[92]</sup>(concentration addition, CA)和效应加和模型<sup>[93]</sup>(response addition, RA)可用于评价无相互作用的 EEs 混合物的联合雌激素作用,方法简单可靠,应用广泛。例如, Yang 等<sup>[16]</sup>采用等毒性配比和非等毒性配比设计的 31 个 EEs 混合物通过重组人雌激素受体基因酵母测试,表明当 EEs 混合物中各组分作用方式相同时,CA 模型是可靠的。

由于 EEs 在体内存在较多的雌激素效应形成途径,尤其是受试生物暴露在机制作用复杂的 EEs 混合物中,直接导致它们的联合作用因作用靶点和作用方式的繁杂更加难以分析和解释。例如, E2、EE2、BPA、4-NP、4-tert-OP、染料木黄酮的联合雌激素效应在 E-SCREEN 中与浓度加和模型产生偏离<sup>[94]</sup>。值得注意的是, E2、EE2、BPA、4-NP、4-tert-OP 混合物的联合作用呈现较明显的拮抗效应,而 E2、EE2、BPA、染料木黄酮四元混合物和 E2、EE2、染料木黄酮三元混合物的联合作用与浓度加和一致,只能说明 4-NP、4-tert-OP 与其他 EEs 具有对立的生物效应。因此,为了解释复杂 EEs 混合物的雌激素效应,研究者把重心转移到基于作用机制的研究上,关注的焦点是各雌激素受体、雌激素信号途径,最终在雌激素效应形成途径的各作用靶点、作用方式分析 EEs 混合物的作用机制,同时结合细胞和动物的整体效应评估它们的毒理学效应,从而预测造成的生态风险。

#### 5 展望

EEs 在胞内可以同时产生多种雌激素信号通路,也可以激活其他受体如 AhR 等对 ER 作用途径产生交联作用,所以 EEs 引发的细胞信号途径的复杂性使我们很难绘制出其完整且详细的作用机制。这需要我们进一步利用基因组学和蛋白组学的方法来发掘更为详尽的 EEs 作用途径,从而更加完善地对其进行雌激素效应评价。

E-SCREEN 作为筛查 EEs 雌激素活性的离体测试模型<sup>[95]</sup>,是 EEs 通过多种作用方式对细胞整体呈现出的综合雌激素效应,其中涉及 nER 信号途径和快速的雌激素非基因组信号通路。基于对经典 nER 作用途径中 ERE、共激活因子 GRIP1 的认识,开发出的 EEs 生物学检测法 YES、ER-CALUX、重组人雌激素受体基因酵母测试等得到了广泛的应用<sup>[24, 79]</sup>。

这些方法具有高灵敏、高通量和低成本等特点,可以从不同的作用靶点检测 EEs 通过 nER 作用途径发挥的雌激素活性。然而,研究却发现有些 EEs 可以结合 GPR30 诱发多种非基因组信号途径 MAPK、PI3K/Akt、cAMP、Ca<sup>2+</sup> 等产生明显的雌激素效应。所以,仅利用上述的方法筛查 EEs 显然是不全面的,而 EEs 引发的由膜起始的快速非基因组信号转导途径如 MAPK、PI3K/Akt 等目前只能通过蛋白定量、基因定量等一系列方法组成的复杂信号通路分析判断得出。因此,开发出基于 GPR30 的环境雌激素类物质的快速筛查方法将是其生物检测法新的发展方向,同时在 EEs 引发的雌激素信号途径中进行多个作用靶点如 ER $\alpha$ 、ER $\beta$ 、GPR30 和多种作用方式的同步检测来解释其毒性作用机制,并结合细胞的整体效应更综合地评估其雌激素活性,从而建立简单、快速、灵敏、经济、完整的 EEs 多靶点离体测试流程。

在环境样品的雌激素活性研究中,将离体生物测试和化学分析相结合有助于对其雌激素效应评价和主要贡献因子甄别。当多种 EEs 共存,各组分的作用靶点和作用方式可能相差很大,且还存在着交互影响,这大大增加了研究环境样品雌激素效应和 EEs 混合物联合作用的难度。未来的工作不仅需要研究各组分间的相互作用,还需要对其在分子和细胞水平上进行多靶点分别、共同作用的评估来判断环境样品的生物效应或 EEs 混合物的联合作用。

在分子、细胞水平上的 EEs 雌激素效应检测可以研究 EEs 暴露诱发细胞毒性的分子作用机制,但无法在动物水平上解释 EEs 暴露是否最终导致组织器官损伤以及引发各种疾病的重要机理,所以需要将 EEs 暴露的细胞毒性与活体实验相结合,建立全面、完整的 EEs 毒理学效应评估体系。

通讯作者简介:马梅(1967-),女,博士,研究员,博士生导师,主要从事水生态毒理学研究。

#### 参考文献 (References):

- [1] Kavlock R J, Daston G P, DeRosa C, et al. Research needs for the risk assessment of health and environmental effects of endocrine disruptors: A report of the US EPA-sponsored workshop [J]. *Environmental Health Perspectives*, 1996, 104: 715-740
- [2] Tohyama S, Miyagawa S, Lange A, et al. Understanding the molecular basis for differences in responses of fish estrogen receptor subtypes to environmental estrogens [J]. *Environmental Science & Technology*, 2015, 49 (12): 7439-7447
- [3] Thomas P, Dong J. Binding and activation of the seven-transmembrane estrogen receptor GPR30 by environmental estrogens: A potential novel mechanism of endocrine disruption [J]. *Journal of Steroid Biochemistry*, 2006, 102 (1-5): 175-179
- [4] Petit F, Le Goff P, Cravedi J P, et al. Two complementary bioassays for screening the estrogenic potency of xenobiotics: Recombinant yeast for trout estrogen receptor and trout hepatocyte cultures [J]. *Journal of Molecular Endocrinology*, 1997, 19(3): 321-335
- [5] Manabe M, Kanda S, Fukunaga K, et al. Evaluation of the estrogenic activities of some pesticides and their combinations using MfT/Se cell proliferation assay [J]. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 2006, 209(5): 413-421
- [6] Briz V, Molina-Molina J M, Sanchez-Redondo S, et al. Differential estrogenic effects of the persistent organochlorine pesticides dieldrin, endosulfan, and lindane in primary neuronal cultures [J]. *Toxicological Sciences*, 2011, 120(2): 413-427
- [7] Albanito L, Lappano R, Madeo R A, et al. Effects of atrazine on estrogen receptor alpha- and G protein-coupled receptor 30-mediated signaling and proliferation in cancer cells and cancer-associated fibroblasts [J]. *Environmental Health Perspectives*, 2015, 123(5): 493-499
- [8] Nadal A, Rovira J M, Laribi O, et al. Rapid insulinotropic effect of 17 beta-estradiol via a plasma membrane receptor [J]. *Faseb Journal*, 1998, 12(13): 1341-1348
- [9] Alonso-Magdalena P, Laribi O, Ropero A B, et al. Low doses of bisphenol A and diethylstilbestrol impair Ca<sup>2+</sup> signals in pancreatic  $\alpha$ -cells through a nonclassical membrane estrogen receptor within intact islets of langerhans [J]. *Environmental Health Perspectives*, 2005, 113 (8): 969-977
- [10] Silva E, Kabil A, Kortenkamp A. Cross-talk between non-genomic and genomic signalling pathways — Distinct effect profiles of environmental estrogens [J]. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 2010, 245(2): 159-170
- [11] Zhang X, Li J H, Duan S X, et al. G protein-coupled estrogen receptor-protein kinase A-ERK-CREB signaling pathway is involved in the regulation of mouse gubernaculum testis cells by diethylstilbestrol [J]. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 2014, 67(1): 97-103
- [12] Gozgit J M, Nestor K M, Fasco M J, et al. Differential ac-

- tion of polycyclic aromatic hydrocarbons on endogenous estrogen-responsive genes and on a transfected estrogen-responsive reporter in MCF-7 cells [J]. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 2004, 196(1): 58-67
- [13] Incorvaia E, Sicouri L, Petersen-Mahrt S K, et al. Hormones and AID: Balancing immunity and autoimmunity [J]. *Autoimmunity*, 2013, 46(2): 128-137
- [14] Jiang W W, Yan Y, Ma M, et al. Assessment of source water contamination by estrogenic disrupting compounds in China [J]. *Journal of Environmental Sciences*, 2012, 24(2):320-328
- [15] 周海东, 黄霞, 王晓琳, 等. 北京市城市污水雌激素活性的研究[J]. *环境科学*, 2009, 30(12): 3590-3595  
Zhou H D, Huang X, Wang X L, et al. Evaluation of estrogenicity of sewage samples from Beijing, China [J]. *Environmental Science*, 2009, 30(12): 3590-3595 (in Chinese)
- [16] Yang R, Li N, Ma M, et al. Combined effects of estrogenic chemicals with the same mode of action using an estrogen receptor binding bioassay[J]. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 2014, 38(3): 829-837
- [17] Charles G D, Gennings C, Zacharewski T R, et al. Assessment of interactions of diverse ternary mixtures in an estrogen receptor-alpha reporter assay[J]. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 2002, 180(1): 11-21
- [18] Kumar R, Zakharov M N, Khan S H, et al. The dynamic structure of the estrogen receptor[J]. *Journal of Amino Acids*, 2011, 2011: 812540
- [19] Kojima H, Takeuchi S, Itoh T, et al. *In vitro* endocrine disruption potential of organophosphate flame retardants via human nuclear receptors [J]. *Toxicology*, 2013, 314(1): 76-83
- [20] Escande A, Pillon A A, Servant N, et al. Evaluation of ligand selectivity using reporter cell lines stably expressing estrogen receptor alpha or beta [J]. *Biochemical Pharmacology*, 2006,71(10): 1459-1469
- [21] Zhang D, Trudeau V L. Integration of membrane and nuclear estrogen receptor signaling [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A, Molecular & Integrative Physiology*, 2006, 144(3): 306-315
- [22] Shanle E K, Xu W. Endocrine disrupting chemicals targeting estrogen receptor signaling: Identification and mechanisms of action[J]. *Chemical Research in Toxicology*, 2011, 24(1): 6-19
- [23] Lee H R, Kim T H, Choi K C. Functions and physiological roles of two types of estrogen receptors, ERalpha and ERbeta, identified by estrogen receptor knockout mouse [J]. *Laboratory Animal Research*, 2012, 28(2): 71-76
- [24] Blair R M, Fang H, Branham W S, et al. The estrogen receptor relative binding affinities of 188 natural and xenobiotics: Structural diversity of ligands [J]. *Toxicological Sciences*, 2000, 54(1): 138-153
- [25] Escande A, Pillon A, Servant N, et al. Evaluation of ligand selectivity using reporter cell lines stably expressing estrogen receptor alpha or beta [J]. *Biochemical Pharmacology*, 2006, 71(10): 1459-1469
- [26] Sheng Z G, Zhu B Z. Low concentrations of bisphenol A induce mouse spermatogonial cell proliferation by G protein-coupled receptor 30 and estrogen receptor-alpha[J]. *Environmental Health Perspectives*, 2011,119(12):1775-1780
- [27] Yu X, Filardo E J, Shaikh Z A. The membrane estrogen receptor GPR30 mediates cadmium-induced proliferation of breast cancer cells [J]. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 2010, 245(1): 83-90
- [28] Dong S, Terasaka S, Kiyama R. Bisphenol A induces a rapid activation of Erk1/2 through GPR30 in human breast cancer cells [J]. *Environmental Pollution*, 2011,159(1): 212-218
- [29] Levin E R. Plasma membrane estrogen receptors [J]. *Trends in Endocrinology and Metabolism: TEM*, 2009,20(10):477-482
- [30] Prossnitz E R, Barton M. Signaling, physiological functions and clinical relevance of the G protein-coupled estrogen receptor GPER[J]. *Prostaglandins & Other Lipid Mediators*, 2009, 89(3-4): 89-97
- [31] Thomas P, Pang Y, Filardo E J, et al. Identity of an estrogen membrane receptor coupled to a G protein in human breast cancer cells[J]. *Endocrinology*, 2005,146(2):624-632
- [32] Olsen C M, Meussen-Elholm E T M, Samuelsen M, et al. Effects of the environmental oestrogens bisphenol A, tetrachlorobisphenol A, tetrabromobisphenol A, 4-hydroxybiphenyl and 4,4'-dihydroxybiphenyl on oestrogen receptor binding, cell proliferation and regulation of oestrogen sensitive proteins in the human breast cancer cell line MCF-7[J]. *Pharmacology and Toxicology*, 2003,92(4): 180-188
- [33] Watson C S, Jeng Y J, Kochukov M Y. Nongenomic actions of estradiol compared with estrone and estrin in pituitary tumor cell signaling and proliferation [J]. *FASEB Journal*, 2008, 22(9): 3328-3336
- [34] Jung J, Ishida K, Nishihara T. Anti-estrogenic activity of fifty chemicals evaluated by *in vitro* assays[J]. *Life Sciences*, 2004, 74(25): 3065-3074
- [35] Kim J Y, Yi B R, Go R E, et al. Methoxychlor and tri-

- clostan stimulates ovarian cancer growth by regulating cell cycle- and apoptosis-related genes via an estrogen receptor-dependent pathway [J]. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 2014, 37(3): 1264-1274
- [36] Park S H, Kim K Y, An B S, et al. Cell growth of ovarian cancer cells is stimulated by xenoestrogens through an estrogen-dependent pathway, but their stimulation of cell growth appears not to be involved in the activation of the mitogen-activated protein kinases ERK-1 and p38 [J]. *Journal of Reproduction and Development*, 2009, 55(1): 23-29
- [37] Muller J C, Imazaki P H, Boareto A C, et al. *In vivo* and *in vitro* estrogenic activity of the antidepressant fluoxetine [J]. *Reproductive Toxicology*, 2012, 34(1): 80-85
- [38] Kirkegaard T, Hansen S K, Larsen S L, et al. T47D breast cancer cells switch from ER/HER to HER/c-*Src* signaling upon acquiring resistance to the antiestrogen fulvestrant [J]. *Cancer Letters*, 2014, 344(1): 90-100
- [39] Chen Y, Li Z, He Y, et al. Estrogen and pure antiestrogen fulvestrant (ICI 182 780) augment cell-matrigel adhesion of MCF-7 breast cancer cells through a novel G protein coupled estrogen receptor (GPR30)-to-calpain signaling axis [J]. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 2014, 275(2): 176-181
- [40] Bourque M, Morissette M, Di Paolo T. Raloxifene activates G protein-coupled estrogen receptor 1/Akt signaling to protect dopamine neurons in 1-methyl-4-phenyl-1, 2,3,6-tetrahydropyridine mice [J]. *Neurobiology of Aging*, 2014,35(10): 2347-2356
- [41] Hattori Y, Kojima T, Kato D, et al. A selective estrogen receptor modulator inhibits tumor necrosis factor- $\alpha$ -induced apoptosis through the ERK1/2 signaling pathway in human chondrocytes [J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2012, 421(3): 418-424
- [42] Obrero M, Yu D V, Shapiro D J. Estrogen receptor-dependent and estrogen receptor-independent pathways for tamoxifen and 4-hydroxytamoxifen-induced programmed cell death[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2002, 277(47): 45695-45703
- [43] Santen R J, Fan P, Zhang Z G, et al. Estrogen signals via an extra-nuclear pathway involving IGF-1R and EGFR in tamoxifen-sensitive and -resistant breast cancer cells [J]. *Steroids*, 2009, 74(7): 586-594
- [44] Novensa L, Selent J, Pastor M, et al. Equine estrogens impair nitric oxide production and endothelial nitric oxide synthase transcription in human endothelial cells compared with the natural 17 beta-estradiol [J]. *Hypertension*, 2010, 56(3): 405-411
- [45] Prifti S, Mall P, Rabe T. Synthetic estrogen-mediated activation of ERK 2 intracellular signaling molecule[J]. *Gynecological Endocrinology*, 2003, 17(5): 423-428
- [46] Ghisari M, Bonefeld-Jorgensen E C. Effects of plasticizers and their mixtures on estrogen receptor and thyroid hormone functions [J]. *Toxicology Letters*, 2009, 189(1): 67-77
- [47] Parveen M, Inoue A, Ise R, et al. Evaluation of estrogenic activity of phthalate esters by gene expression profiling using a focused microarray (EstrArray (R))[J]. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 2008, 27(6): 1416-1425
- [48] Ali I, Damdimopoulou P, Stenius U, et al. Cadmium-induced effects on cellular signaling pathways in the liver of transgenic estrogen reporter mice [J]. *Toxicological Sciences*, 2012, 127(1): 66-75
- [49] Martin M B, Reiter R, Pham T, et al. Estrogen-like activity of metals in MCF-7 breast cancer cells[J]. *Endocrinology*, 2003, 144(6): 2425-2436
- [50] Lee S O, Nadiminty N, Wu X X, et al. Selenium disrupts estrogen signaling by altering estrogen receptor expression and ligand binding in human breast cancer cells[J]. *Cancer Research*, 2005, 65(8): 3487-3492
- [51] Dong S, Furutani Y, Kimura S, et al. Brefeldin A is an estrogenic, Erk1/2-activating component in the extract of *Agaricus blazei mycelia* [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2013, 61(1): 128-136
- [52] Liu H Q, Du J, Hu C Y, et al. Delayed activation of extracellular-signal-regulated kinase 1/2 is involved in genistein- and equol-induced cell proliferation and estrogen-receptor- $\alpha$ -mediated transcription in MCF-7 breast cancer cells [J]. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 2010, 21(5): 390-396
- [53] Rowlands D J, Chapple S, Siow R C M, et al. Equol-stimulated mitochondrial reactive oxygen species activate endothelial nitric oxide synthase and redox signaling in endothelial cells roles for F-actin and GPR30 [J]. *Hypertension*, 2011, 57(4): 833-840
- [54] Maggiolini M, Vivacqua A, Fasanella G, et al. The G protein-coupled receptor GPR30 mediates c-fos up-regulation by 17 beta-estradiol and phytoestrogens in breast cancer cells [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2004, 279(26): 27008-27016
- [55] Hwang K A, Park M A, Kang N H, et al. Anticancer effect of genistein on BG-1 ovarian cancer growth induced by 17 beta-estradiol or bisphenol A via the suppression of the crosstalk between estrogen receptor  $\alpha$  and insulin-like growth factor-1 receptor signaling path-



- ways[J]. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 2013, 272(3): 637-646
- [56] Liao M H, Tai Y T, Cherng Y G, et al. Genistein induces oestrogen receptor-alpha gene expression in osteoblasts through the activation of mitogen- activated protein kinases/NF-kappa B/activator protein-1 and promotes cell mineralisation[J]. *British Journal of Nutrition*, 2014, 111(1): 55-63
- [57] Hwang Y P, Kim H G, Hien T T, et al. Puerarin activates endothelial nitric oxide synthase through estrogen receptor-dependent PI3-kinase and calcium-dependent AMP-activated protein kinase [J]. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 2011, 257(1): 48-58
- [58] Wang Y, Wang W L, Xie W L, et al. Puerarin stimulates proliferation and differentiation and protects against cell death in human osteoblastic MG-63 cells via ER-dependent MEK/ERK and PI3K/Akt activation[J]. *Phytomedicine*, 2013, 20(10): 787-796
- [59] Fernandez J W, Rezai-Zadeh K, Obregon D, et al. EGCG functions through estrogen receptor-mediated activation of ADAM10 in the promotion of non-amyloidogenic processing of APP [J]. *FEBS Letters*, 2010, 584(19): 4259-4267
- [60] Park S B, Bae J W, Kim J M, et al. Antiproliferative and apoptotic effect of epigallocatechin-3-gallate on ishikawa cells is accompanied by sex steroid receptor downregulation[J]. *International Journal of Molecular Medicine*, 2012, 30(5): 1211-1218
- [61] Klinge C M, Blankenship K A, Risinger K E, et al. Resveratrol and estradiol rapidly activate MAPK signaling through estrogen receptors alpha and beta in endothelial cells[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2005, 280(9): 7460-7468
- [62] Song L H, Pan W, Yu Y H, et al. Resveratrol prevents CsA inhibition of proliferation and osteoblastic differentiation of mouse bone marrow-derived mesenchymal stem cells through an ER/NO/cGMP pathway [J]. *Toxicology in Vitro*, 2006, 20(6): 915-922
- [63] Dong W H, Chen J C, He Y L, et al. Resveratrol inhibits K(v)2.2 currents through the estrogen receptor GPR30-mediated PKC pathway [J]. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 2013, 305(5): C547-C557
- [64] Nwachukwu J C, Srinivasan S, Bruno N E, et al. Resveratrol modulates the inflammatory response via an estrogen receptor-signal integration network [J]. *Elife*, 2014, 3(3): e02057
- [65] Bouskine A, Nebout M, Brucker-Davis F, et al. Low doses of bisphenol A promote human seminoma cell proliferation by activating PKA and PKG via a membrane G-protein-coupled estrogen receptor [J]. *Environmental Health Perspectives*, 2009, 117(7): 1053-1058
- [66] Zhang Q, Lu M Y, Wang C, et al. Characterization of estrogen receptor alpha activities in polychlorinated biphenyls by *in vitro* dual-luciferase reporter gene assay [J]. *Environmental Pollution*, 2014, 189: 169-175
- [67] Ahmed S, Valen E, Sandelin A, et al. Dioxin increases the interaction between aryl hydrocarbon receptor and estrogen receptor alpha at human promoters [J]. *Toxicological Sciences*, 2009, 111(2): 254-266
- [68] Schmidt J M, Mercure J, Tremblay G B, et al. De novo design, synthesis, and evaluation of novel nonsteroidal phenanthrene ligands for the estrogen receptor [J]. *Journal of Medicinal Chemistry*, 2003, 46(8): 1408-1418
- [69] Swedenborg E, Ruegg J, Hillenweck A, et al. 3-methylcholanthrene displays dual effects on estrogen receptor (ER) alpha and ER beta signaling in a cell-type specific fashion [J]. *Molecular Pharmacology*, 2008, 73(2): 575-586
- [70] Meerts I A T M, Letcher R J, Hoving S, et al. *In vitro* estrogenicity of polybrominated diphenyl ethers, hydroxylated PBDEs, and polybrominated bisphenol A compounds[J]. *Environmental Health Perspectives*, 2001, 109(4): 399-407
- [71] Shang Y F, Brown M. Molecular determinants for the tissue specificity of SERMs[J]. *Science*, 2002, 295(5564): 2465-2468
- [72] Routledge E J, Sumpter J P. Estrogenic activity of surfactants and some of their degradation products assessed using a recombinant yeast screen[J]. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 1996, 15(3): 241-248
- [73] Legler J, van den Brink C E, Brouwer A, et al. Development of a stably transfected estrogen receptor-mediated luciferase reporter gene assay in the human T47D breast cancer cell line [J]. *Toxicological Sciences*, 1999, 48(1): 55-66
- [74] Denier X, Hill E M, Rotchell J, et al. Estrogenic activity of cadmium, copper and zinc in the yeast estrogen screen [J]. *Toxicology in Vitro*, 2009, 23(4): 569-573
- [75] Wu F, Khan S, Wu Q, et al. Ligand structure-dependent activation of estrogen receptor alpha/Sp by estrogens and xenoestrogens [J]. *Journal of Steroid Biochemistry*, 2008, 110(1-2): 104-115
- [76] Routledge E J, White R, Parker M G, et al. Differential effects of xenoestrogens on coactivator recruitment by estrogen receptor (ER) alpha and ER beta [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2000, 275(46): 35986-35993

- [77] 李剑, 马梅, 饶凯锋, 等. 酵母双杂交技术构建重组人雌激素受体基因酵母[J]. 生态毒理学报, 2008, 3(1): 21-26
- Li J, Ma M, Rao K F, et al. Construction of the recombinant human estrogen receptor (hER) gene yeast using two-hybrid yeast technique [J]. Asian Journal of Ecotoxicology, 2008, 3(1): 21-26 (in Chinese)
- [78] 刘芸, 李娜, 马梅, 等. 酚类化合物雌激素效应的比较研究[J]. 中国环境科学, 2009, 29(8): 873-878
- Liu Y, Li N, Ma M, et al. Comparative study of phenolic compounds estrogenic and anti-estrogenic activities [J]. China Environmental Science, 2009, 29(8): 873-878 (in Chinese)
- [79] 杨蓉, 李娜, 马梅, 等. 全氟辛基磺酸及其替代产品的内分泌干扰效应评价[J]. 生态毒理学报, 2013, 8(5): 702-707
- Yang R, Li N, Ma M, et al. Hormonal activity assessment of PFOS and its substitutes [J]. Asian Journal of Ecotoxicology, 2013, 8(5): 702-707 (in Chinese)
- [80] 黄超, 陈凝, 杨明嘉, 等. 二噁英类化合物的毒性作用机制及其生物检测方法[J]. 生态毒理学报, 2015, 10(3): 50-62
- Huang C, Chen N, Yang M J, et al. Review on the toxic mechanisms and bioassay approaches for dioxin-like compounds [J]. Asian Journal of Ecotoxicology, 2015, 10(3): 50-62
- [81] Prossnitz E R, Barton M. Estrogen biology: New insights into GPER function and clinical opportunities [J]. Molecular and Cellular Endocrinology, 2014, 389(1-2): 71-83
- [82] Wang D, Hu L, Zhang G, et al. G protein-coupled receptor 30 in tumor development [J]. Endocrine, 2010, 38(1): 29-37
- [83] Meyer M R, Haas E, Prossnitz E R, et al. Non-genomic regulation of vascular cell function and growth by estrogen [J]. Molecular and Cellular Endocrinology, 2009, 308(1-2): 9-16
- [84] Kochukov M Y, Jeng Y J, Watson C S. Alkylphenol xenoestrogens with varying carbon chain lengths differentially and potently activate signaling and functional responses in GH(3)/B-6/F10 somatomammotropes[J]. Environmental Health Perspectives, 2009, 117(5): 723-730
- [85] Yu X Y, Filardo E J, Shaikh Z A. The membrane estrogen receptor GPR30 mediates cadmium-induced proliferation of breast cancer cells [J]. Toxicology and Applied Pharmacology, 2010, 245(1): 83-90
- [86] Matsuoka S, Kikuchi M, Kimura S, et al. Determination of estrogenic substances in the water of Muko River using *in vitro* assays, and the degradation of natural estrogens by aquatic bacteria [J]. Journal of Sport and Health Science, 2005, 51(2): 178-184
- [87] Valitalo P, Perkola N, Seiler T B, et al. Estrogenic activity in Finnish municipal wastewater effluents[J]. Water Research, 2016, 88: 740-749
- [88] 邵晓玲, 文刚, 马军. 松花江及哈尔滨市饮用水雌激素活性的调查与分析[J]. 环境科学, 2009, 30(5): 1362-1367
- Shao X L, Wen G, Ma J. Survey of estrogenic activity of Songhua River water and drinking water of Harbin [J]. Environmental Science, 2009, 30(5): 1362-1367
- [89] Clemons J H, Allan L M, Marvin C H, et al. Evidence of estrogen- and TCDD-like activities in crude and fractionated extracts of PM10 air particulate material using *in vitro* gene expression assays [J]. Environmental Science & Technology, 1998, 32(12): 1853-1860
- [90] Croes K, Debaillie P, Van den Bril B, et al. Assessment of estrogenic activity in PM10 air samples with the ERE-CALUX bioassay: Method optimization and implementation at an urban location in Flanders (Belgium) [J]. Chemosphere, 2016, 144: 392-398
- [91] Silva E, Rajapakse N, Kortenkamp A. Something from "nothing" - Eight weak estrogenic chemicals combined at concentrations below NOECs produce significant mixture effects [J]. Environmental Science & Technology, 2002, 36(8): 1751-1756
- [92] Loewe S. Die quantitativen probleme der Pharmakologie [J]. Ergebnisse der Physiologie, 1928, 27(1): 47-187
- [93] Bliss C I. The toxicity of poisons applied jointly[J]. Annals of Applied Biology, 1939, 26(3): 585-615
- [94] Rajapakse N, Silva E, Scholze M, et al. Deviation from additivity with estrogenic mixtures containing 4-nonylphenol and 4-tert-octylphenol detected in the E-SCREEN assay[J]. Environmental Science & Technology, 2004, 38(23):6343-6352
- [95] Soto A M, Sonnenschein C, Chung K L, et al. The E-screen assay as a tool to identify estrogens — An update on estrogenic environmental-pollutants [J]. Environmental Health Perspectives, 1995, 103: 113-122 ◆