

双酚 A 诱导雄性中国林蛙肝细胞雌激素受体 表达和卵黄蛋白原合成

白 瑶, 张育辉*, 翟丽丽, 李忻怡, 杨 君, 洪燕燕

(陕西师范大学 生命科学学院, 陕西 西安 710062)

摘要: 为探讨双酚A(bisphenol A, BPA)对雄性两栖动物肝细胞中雌激素受体(estrogen receptor, ER)表达和卵黄蛋白原(vitellogenin, VTG)合成的影响, 将中国林蛙(*Rana chensinensis*)雄性成体分别持续暴露于 10^{-7} 、 10^{-6} 、 10^{-5} mol/L BPA水体中 10、20、30 d, 设 10^{-9} 、 10^{-8} mol/L 雌二醇(E_2)为阳性对照。用原位杂交技术检测ER mRNA在肝细胞中的表达定位, 用免疫组织化学技术检测肝细胞中ER和VTG蛋白的表达。结果显示, 各BPA和 E_2 处理组肝细胞中均有ER mRNA阳性反应, ER和VTG蛋白的表达相对值均显著高于空白对照组。在同一暴露时间, ER和VTG表达值是随着BPA浓度的增加呈增高趋势。在同一BPA浓度, VTG表达值是随暴露时间的延长呈增高趋势, 而ER表达值则无显著性变化。这些表明BPA可以通过诱导雄性中国林蛙肝细胞的ER上调导致VTG合成, 但其效应远低于 E_2 。

关键词: 双酚 A; 肝细胞; 雌激素受体; 卵黄蛋白原; 中国林蛙

中图分类号: X174; Q959.53 文献标志码: A 文章编号: 0254-5853-(2011)03-0317-06

Estrogen receptor expression and vitellogenin synthesis induced in hepatocytes of male frogs *Rana chensinensis* exposed to bisphenol A

BAI Yao, ZHANG Yu-Hui*, ZHAI Li-Li, LI Xin-Yi, YANG Jun, HONG Yan-Yan

(College of Life Science, Shaanxi Normal University, Xi'an 710062, China)

Abstract: The effects of bisphenol A (BPA) on estrogen receptor (ER) and vitellogenin (VTG) in hepatocytes of male amphibians have attracted significant attention in recent years. Adult male frogs *Rana chensinensis* were exposed to different concentrations of 10^{-7} , 10^{-6} and 10^{-5} mol/L BPA consecutively for 10, 20, and 30 d, respectively. We used 10^{-9} , 10^{-8} mol/L 17β -estradiol (E_2) as positive controls. The expressions of ER mRNA in the hepatocytes were detected by *in situ* hybridization, and ER and VTG protein were detected by immunohistochemistry. The results showed that positive effects of ER mRNA were detected in all BPA and E_2 treatment groups. Compared with the control group, the expression level of ER and VTG protein increased significantly in the hepatocytes of *R. chensinensis*. Both ER and VTG expression exhibited BPA dose-dependence for the same exposure time. For the same concentration of BPA treatment, VTG synthesis markedly increased with prolonged treatment, whereas the expression of ER did not significantly fluctuate. It is suggested that BPA caused the synthesis of VTG by inducing ER up-regulation in the hepatocytes of male *R. chensinensis*, but its estrogenic activity was much lower than E_2 .

Key words: Bisphenol A; Hepatocytes; Estrogen receptor; Vitellogenin; *Rana chensinensis*

内分泌干扰物(endocrine disrupting chemicals, EDCs)是指干扰机体正常的内分泌机能, 并影响其生长、发育、繁殖和行为的外源性化学物质。EDCs可通过影响激素的合成、分泌、包装、结合和转运等影响人和动物体内的稳态、生殖、发育和行为。双酚 A(bisphenol A, BPA)作为化工原料, 被广泛应

用于聚碳酸酯、环氧树脂等高分子材料的生产过程中。已有研究报道, BPA 属于环境内分泌干扰物之一。

雌激素受体(estrogen receptor, ER)与雌激素结合参与启动雌激素应答元件转录, 使雌激素发挥效应。ER 的水平也可间接反映外源性化学物质是否具有雌激素效应(Yamaguchi et al, 2005)。在卵生脊

椎动物,卵黄蛋白原(vitellogenin, VTG)受内源性雌激素的调节,在肝细胞中合成并释放到血液中。雄性卵生脊椎动物在外源雌激素的诱导下也可合成VTG。因此,雄性动物体内卵黄蛋白原的异常生成可作为一种生物标志物检测环境化学污染的雌激素效应(Andrew et al, 2007)。

BPA对水生动物ER和VTG的影响已有报道,将非洲爪蟾(*Xenopus laevis*)蝌蚪暴露于BPA水体可诱导雌性比例升高,体内ER mRNA表达上调(Levy et al, 2004)。鱼类在一定浓度范围的BPA水体暴露后,肝脏ER mRNA表达水平也增高(Yamaguchi et al, 2005; Seo et al, 2006)。这些均表明BPA可诱导肝细胞ER的表达增加。另外,在雄性爪蟾(*X. laevis*)和欧洲林蛙(*Rana temporaria*)BPA暴露处理后(Bogi et al, 2003),给雄性东方铃蟾(*Bombina orientalis*)注射BPA后(Gye & Kim, 2005),动物肝细胞中VTG mRNA的表达量均增加。在鱼类也有相似的研究结果(Sohoni et al, 2001; Lindholm et al, 2003)。上述研究结果可见,BPA诱导雄性卵生动物肝细胞的VTG合成可能与高调ER相关,但这些报道对VTG和ER的检测大多数都不在同一动物完成。本实验将雄性中国林蛙(*Rana chensinensis*)暴露于BPA水体后,同时检测肝细胞中ER和VTG表达,探讨BPA对雄性两栖动物肝细胞中ER和VTG表达的影响及其两者之间的关系,从而深入理解BPA对雄性两栖动物产生的雌激素效应。

1 材料与方法

1.1 材料

BPA的纯度>98%(上海化学试剂公司);E₂为17β-雌二醇(Sigma公司);ER一抗为ERα兔抗鼠多克隆抗体(Santa Cruz公司);VTG一抗为兔抗鱼多克隆抗体、SABC试剂盒、DAB显色剂(Boster公司);碱性磷酸酶偶联抗DIG抗体、NBT/BCIP显色剂(Roche公司);焦碳酸二乙酯(DEPC)、山羊血清(Sigma公司)。

中国林蛙(*Rana chensinensis*)于2008年10月采自秦岭北坡的西安市长安大峪水库附近。选取雄性成体育龄蛙108例,体重为6.72~7.21g。

1.2 暴露实验

按照爪蟾的BPA暴露浓度(Iwamuro et al, 2003),将雄性林蛙随机分为6组,包括10⁻⁷、10⁻⁶、10⁻⁵ mol/L BPA,用10⁻⁹和10⁻⁸ mol/L E₂处理作为阳性对

照组,用自来水作为空白对照。每组放置6例,设3个重复。实验室水族箱饲养,每箱加曝气72 h以上的自来水2 L,水深浸没全部蛙体,每48 h换水一次。用面包虫饲喂,每日保证12 h光照。

分别暴露10、20、30 d后,每组每次取6例麻醉后剖腹,取部分肝脏用中性福尔马林溶液固定24 h,供ER和VTG的免疫组织化学检测;另取部分肝脏用4%多聚甲醛溶液固定24 h,供ER的原位杂交检测。常规石蜡切片,厚8 μm,裱在涂有0.05%多聚赖氨酸处理的载玻片上,室温干燥24 h,37 ℃烘片48 h,4 ℃保存备用。

1.3 原位杂交检测

依据美洲豹蛙(*Rana pipiens*)雌激素受体α(estrogen receptor α)(DQ398027)和非洲爪蟾(*X. laevis*)雌激素受体α1(estrogen receptor α1)(LOC398734)基因的保守区域设计地高辛标记的探针,反义探针序列为:5'-CATTCCCCTTCATAGCATTCTGAGTCGGCAGGCTTGACA-3'。

主要步骤:常规脱蜡、复水;0.1% DEPC处理;0.1 mol/L甘氨酸/PBS漂洗;0.3% TritonX-100/PBS浸片;2.5 mg/mL胃蛋白酶37 ℃消化;4%多聚甲醛固定;0.25%乙酸酐浸片;37 ℃预杂交液孵育;0.2 × SSC漂洗;42 ℃杂交24 h;4 × SSC 42 ℃漂洗;37 ℃分别用2 × SSC、1 × SSC、0.5 × SSC漂洗;缓冲液-1(0.1 mol/L Tris-HCl, 0.1 mol/L NaCl, pH7.5)漂洗;山羊血清封闭液37 ℃孵育;抗地高辛-抗血清碱性磷酸酶复合物37 ℃孵育;缓冲液-2(0.1 mol/L Tris-HCl, 0.1 mol/L NaCl, 0.05 mol/L MgCl₂, pH7.5)漂洗;缓冲液-3(0.1 mol/L Tris-HCl, 0.1 mol/L NaCl, 0.05 mol/L MgCl₂, pH9.5)漂洗;加显色液避光显色;缓冲液-4(0.01 mol/L Tris-HCl, 0.001 mol/L EDTA, pH8.1)漂洗;常规脱水、透明、封片、镜检、拍照。阴性对照采用正义探针的稀释液代替探针孵育,其余步骤相同。

镜检阳性反应产物的标准:在胞质和核膜上蓝色颗粒为阳性,阴性对照为无色。

1.4 免疫组织化学检测

常规SABC法:切片常规脱蜡、复水;3% H₂O₂浸片10 min;0.01 mol/L枸橼酸盐缓冲液(pH=6.0)微波修复15 min;PBS漂洗3 × 5 min;山羊血清室温封闭20 min;分别加ER或VTG一抗,湿盒中4 ℃孵育过夜;PBS漂洗3 × 5 min;滴加生物素化羊抗兔IgG,37 ℃孵育30 min;PBS漂洗3 × 5 min;滴加SABC复合

物, 37 °C 孵育 30 min; PBS漂洗 4×5 min; DAB显色 5 min。常规脱水、透明、封片、镜检、拍照。阴性对照用抗体稀释液代替一抗孵育, 其余步骤相同。

镜检阳性反应产物的标准: 胞质和胞核内棕黄色颗粒明显深于背景底色为阳性, 阴性对照为无色。

1.5 数据采集与统计分析

每组取 6 例样本, 每例做 3 张切片, 用 Leica CAMER 图像采集系统(Lecia Qwin V3)采集图像。用 Image-Pro Plus 6.0 软件对免疫组织化学阳性产物进行半定量检测, 测定视野中 30 个细胞阳性免疫反应的光密度值, 着色程度越深, 光密度值越大。以光密度值作为阳性反应产物表达相对值。

用Kolmogorov-Smirnov检验所得数据符合正态分布后, 将BPA和E₂的浓度作为处理因子进行单因素方差分析(one way-ANOVE), 显著性水平设置为 $\alpha=0.05$ 。同一浓度不同处理时间的多重比较采用

Duncan检验。各组数据均用Mean±SD表示, 所有数据处理和制图均使用SPSS 16.0 软件。

2 结 果

2.1 BPA 暴露后 ER mRNA 及 ER 在肝细胞的表达

2.1.1 ER mRNA在肝细胞的表达 原位杂交法检测显示, BPA和E₂处理后肝细胞核膜和胞质中均存在ER阳性反应, 呈蓝色。对照组胞质中阳性反应着色很浅, 胞核无阳性反应(图 1-1)。BPA处理组 中ER阳性反应着色相对较浅(图 1-2), 而E₂处理组胞核和胞质中阳性颗粒相对较多, 颜色较深(图 1-3)。

2.1.2 ER在肝细胞的表达 免疫组织化学检测显示, 对照组肝细胞中ER阳性反应较弱(图 1-4), 在各BPA处理组的肝细胞中ER阳性反应产物呈较浅的棕黄色片状或颗粒状(图 1-5), 在E₂处理组, 肝细胞的ER阳性反应产物为较深的棕黄色(图 1-6)。

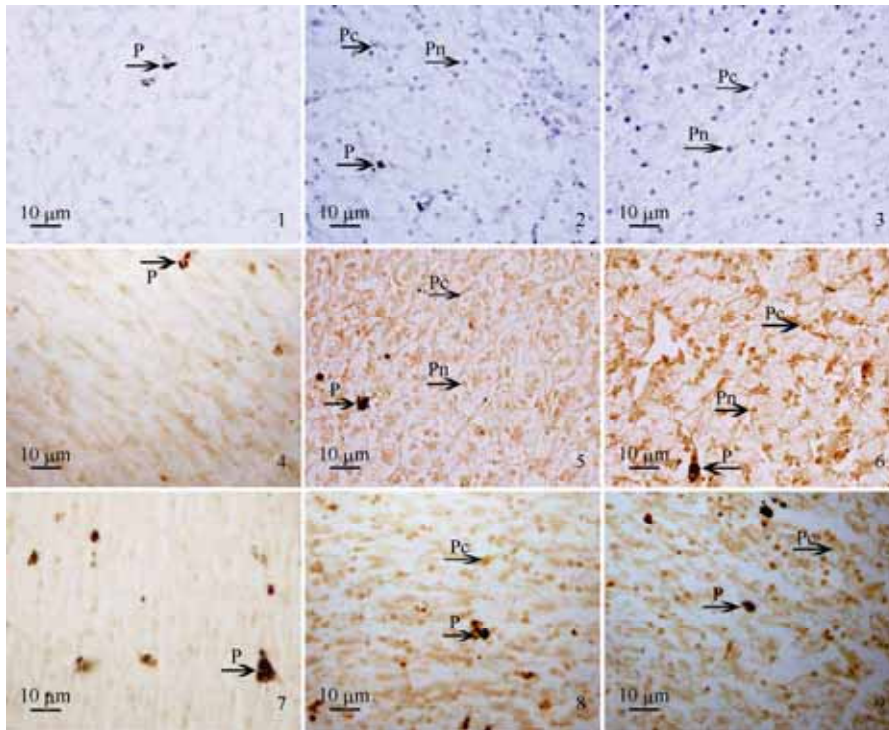


图 1 林蛙双酚 A 暴露后雌激素受体和卵黄蛋白原在肝细胞的阳性反应

Fig. 1 Positive effect of ER and VTG on hepatocytes of *Rana chensinensis* exposed to BPA

1-3, ER mRNA在肝细胞的阳性反应(原位杂交): 1, 对照; 2, 10⁻⁵ mol/L BPA处理 20 d; 3, 10⁻⁸ mol/L E₂处理 10 d。4-6, ER在肝细胞的阳性反应(免疫组化): 4, 对照; 5, 10⁻⁶ mol/L BPA处理 20 d; 6, 10⁻⁹ mol/L E₂处理 20 d。7-9, VTG在肝细胞的阳性反应(免疫组化): 7, 对照; 8, 10⁻⁵ mol/L BPA处理 30 d; 9, 10⁻⁸ mol/L E₂处理 20 d。P, 色素颗粒; Pn, 胞核的阳性反应; Pc, 胞质中的阳性反应; 标尺=10 μm。

1-3, positive effect of ER mRNA on hepatocytes (*in situ* hybridization): 1, control; 2, 10⁻⁵ mol/L BPA for 20 d; 3, 10⁻⁸ mol/L E₂ for 10 d. 4-6, positive effect of ER in hepatocytes (immunohistochemistry): 4, control; 5, 10⁻⁶ mol/L BPA for 20 d; 6, 10⁻⁹ mol/L E₂ for 20 d. 7-9, positive effect of VTG in hepatocytes (immunohistochemistry): 7, control; 8, 10⁻⁵ mol/L BPA for 30 d; 9, 10⁻⁸ mol/L E₂ for 20 d. P: pigment; Pn: positive effect on nucleus; Pc: positive effect in cytoplasm. Bar=10 μm.

ER阳性反应表达相对值的半定量统计结果显 示(图 2), 与相同处理时间的对照组相比, 10⁻⁷ mol/L

BPA处理组中肝细胞的ER表达相对值显著增高 ($P < 0.05$), 10^{-6} 、 10^{-5} mol/L BPA和 E_2 处理组的ER增高极显著 ($P < 0.01$), 即BPA和 E_2 在处理时间相同时, ER随着BPA和 E_2 浓度的升高显著上调。

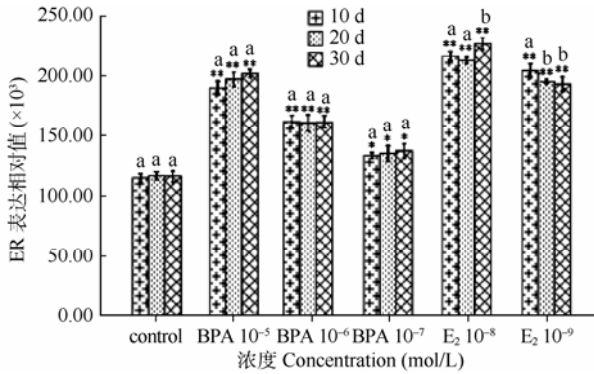


图2 双酚A暴露后林蛙肝细胞中雌激素受体表达相对值的比较

Fig. 2 Comparisons on relative intensity of ER expression in hepatocytes of *Rana chensinensis* exposed to BPA

ER: 雌激素受体(estrogen receptor); BPA: 双酚A (bisphenol A); E_2 : 雌二醇(17 β -estradiol).

不同浓度组与对照组的比较. Comparisons of different BPA concentration to the control. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ (one way-ANOVA). 上标不同字母表示不同处理时间的差异显著(Duncan 检验). Letters represent statistical difference on different treat time. $P < 0.05$ (Duncan test).

比较不同处理时间的ER表达相对值, 对照组在 10、20 和 30 d的ER表达值差异不显著 ($P > 0.05$). BPA各处理组暴露 10、20、30 d后, ER表达值差异也不显著 ($P > 0.05$). 但在 10^{-8} mol/L E_2 组, 暴露 30 d与 10、20 d相比, ER表达值是显著增高 ($P < 0.05$); 在 10^{-9} mol/L E_2 组暴露 20、30 d, 与 10 d相比, ER表达值是显著降低 ($P < 0.05$). 从总体趋势上看, ER表达值不随暴露时间的延长而增加。

2.2 BPA暴露后VTG在肝细胞的表达

在各BPA和 E_2 处理组, 肝细胞中均有VTG表达, VTG阳性反应在胞质中呈棕黄色颗粒状或片层状(图 1-8, 9), 对照组无明显的阳性反应(图 1-7)。

VTG阳性反应表达相对值的半定量统计结果显示(图 3), 与相同处理时间的对照组相比, 各BPA和 E_2 处理组肝细胞的VTG阳性反应的表达值均显著增高。其中 10^{-7} mol/L BPA处理 10、20 d时, VTG表达值增高显著 ($P < 0.05$), 其余各组增高是极显著 ($P < 0.01$), 可见VTG表达随着BPA和 E_2 浓度的增高有增加趋势。

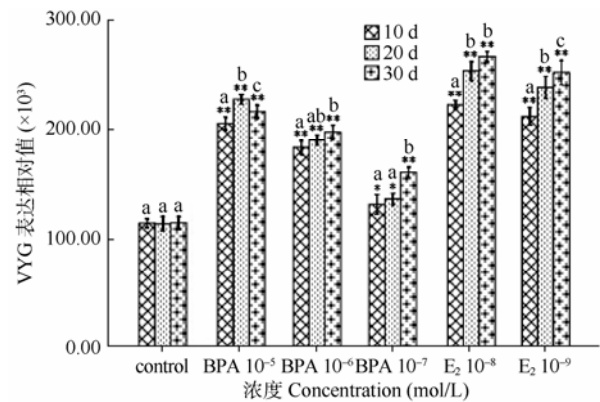


图3 双酚A暴露后林蛙肝细胞中卵黄蛋白原表达相对值比较

Fig. 3 Comparisons of the relative intensity of VTG expression in hepatocytes of *R. chensinensis* exposed to BPA

VTG: 卵黄蛋白原(vitellogenin); BPA: 双酚A(bisphenol A); E_2 : 雌二醇(17 β -estradiol).

不同浓度组与对照组比较(Comparisons on different concentration of BPA to the control), * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ (one way-ANOVA). 上标不同字母表示不同处理时间的差异显著(Duncan 检验) (Letters represent statistical difference on different treat time), $P < 0.05$ (Duncan test)。

在不同处理时间, 对照组在 10、20、30 d的VTG反应变化不显著 ($P > 0.05$). 在处理组, 10^{-5} mol/L BPA暴露 20 d, VTG表达相对值显著增加 ($P < 0.05$), 但在 30 d时又显著降低 ($P < 0.05$). 10^{-6} mol/L BPA暴露 30 d, VTG表达值较 10 d显著增加 ($P < 0.05$). 10^{-7} mol/L BPA暴露 30 d, VTG表达值较 10、20 d显著增加 ($P < 0.05$). 10^{-8} mol/L E_2 暴露 20、30 d, VTG表达值较 10 d显著增加 ($P < 0.05$); 10^{-9} mol/L E_2 组的VTG表达值均较前一时期显著增加 ($P < 0.05$).

3 讨论

3.1 BPA对雄性林蛙肝细胞ER表达的影响

ER是一种配体依赖性转录因子, 通过雌激素应答元件调节靶基因的转录。 E_2 在靶细胞中与ER结合为 E_2 -ER复合物, 再与雌激素反应元件结合, 可启动或改变基因的转录。 E_2 可诱导肝细胞ER mRNA的表达, 进而可诱导VTG雌激素反应元件的表达 (Pakel, et al, 1991; Klinge, 2001)。

BPA为环境内分泌干扰物, 具有雌激素样效应。BPA的雌激素效应与ER的活化相关, 其机制包括导致ER上调、雌激素结合蛋白以及内源雌激素的合成和分泌的改变, BPA又可通过与ER的结合改变雌激素反应的基因表达 (Bowman et al, 2002; Andrew et al, 2007)。在新生雄性大鼠, BPA可使精原

细胞或精母细胞内的ER表达,被认为是BPA诱导ER mRNA的表达水平升高(Takao et al, 2003)。BPA水体暴露可诱导爪蟾(*X. laevis*)蝌蚪体内ER mRNA的水平明显升高,蝌蚪雌性比例升高(Levy et al, 2004)。用不同浓度BPA暴露处理雄性青鳉(*Oryzias latipes*)和花斑溪鳉(*Rivulus marmoratus*),肝脏ER mRNA表达水平的上升依赖于一定范围的BPA浓度(Yamaguchi et al, 2005; Seo et al, 2006)。这些表明BPA可诱导ER的表达,从而发挥雌激素效应。在本实验,对雄性中国林蛙进行BPA和E₂暴露后,原位杂交检测结果显示的ER mRNA与免疫组织化学检测的ER表达细胞定位一致。对ER表达相对值的测定可见,在相同的处理时间,ER表达是随着BPA和E₂处理浓度的升高而显著上调,表明BPA和E₂诱导ER的表达高调的作用相似,可启动ER基因转录。随着BPA和E₂暴露时间的延长,肝细胞的ER表达未呈现一直增高的趋势。这说明机体在外源性激素或激素样化合物的作用下,ER的表达水平仍存在自身的调节机制,其合成不会无节制地增加(Bowman et al, 2002)。

比较BPA与E₂的雌激素活性,据报道,BPA与ER的结合能力仅是E₂的 1/2 000(Krishnan et al, 1993),BPA引起效应的量通常为E₂的 10³~10⁵倍(Matthews et al, 2001; Kloas et al, 2000)。本实验所采用的BPA浓度范围比E₂高 2~3 个数量级,而E₂处理组的ER表达值仍高于BPA 处理组,表明BPA虽然与E₂同样可上调ER表达,但BPA的雌激素效应远低于E₂。

3.2 BPA 对雄性林蛙肝细胞中 VTG 的影响

VTG是卵生动物卵黄蛋白的前体,VTG基因属于雌激素应答元件,E₂-ER结合可启动其转录(Pakel et al, 1991; Denslow et al, 2001)。正常雄性个体的体内很少或不产生VTG,但在外源性雌激素或类似物的诱导下,卵生动物的雄性个体或幼体的肝细胞也可合成VTG(Denslow et al, 1999; Mitsui et al, 2007)。用BPA处理雄性非洲爪蟾(*X. laevis*)的原代培养肝细胞,表明VTG mRNA的表达与BPA剂量和时间存在依赖关系(Kloas et al, 1999)。雄性东方铃蟾(*Bombina orientalis*)注射BPA,可诱导肝脏VTG mRNA的表达(Gye & Kim, 2005)。在鱼类,对雄性黑头呆鱼(*Pimephales promelas*)、虹鳟鱼(*Oncorhynchus mykiss*)进行BPA水体暴露,VTG合成量是随着暴露时间的延长而增加(Sohoni et al, 2001;

Lindholst et al, 2003)。本实验所选用BPA和E₂的暴露浓度为显著效应浓度,在短时间内能诱导雄性林蛙肝细胞中VTG的生成。对VTG表达相对值的测定可见,在相同的处理时间,VTG合成量是随BPA和E₂浓度的升高而增加,表明VTG的合成与BPA和E₂的作用密切相关。在处理浓度相同时,随着BPA和E₂暴露时间的延长,VTG在肝细胞中的表达量也呈现增高趋势。这些实验均显示,BPA可诱导雄性卵生动物肝细胞VTG的合成,其合成量对雌激素或类雌激素的剂量和处理时间存在依赖关系。但是,本实验中10⁻⁵ mol/L BPA组处理30 d后,VTG表达水平有所降低,可能是由于林蛙长时间处于较高浓度的BPA水体中,体内的BPA量积累较多,导致肝细胞受损,从而影响VTG合成功能。类似现象在尖头鲮(*Phoxinus oxycephalus*)的BPA暴露水体中也被报道(Park et al, 2003)。

有关BPA的雌激素效应浓度,在BPA处理小鼠胚胎的实验表明,10⁻⁸~10⁻⁶ mol/L BPA可产生雌激素效应,而10⁻⁴ mol/L BPA却起抑制作用(Takai et al, 2000)。用10⁻⁴ mol/L BPA对欧洲林蛙(*R. temporaria*)原代培养的肝细胞处理后,其VTG的合成没有发生变化,其原因被解释为BPA与ER的结合能力很弱(Rouhani et al, 2005)。本实验中BPA水体暴露所采用的浓度范围为10⁻⁷~10⁻⁵ mol/L,与多数暴露实验所采用的BPA浓度及所得到的结果相近。可见BPA只有在一定的浓度范围内才可发挥较强的雌激素活性。而上述用10⁻⁴ mol/L BPA在细胞培养中没有引起相应的激素效应效果的原因,是属于处理方式的差异还是处理浓度过高,有待探讨。

有关BPA诱导ER表达高调和VTG异常合成的机制,通过对雄性虹鳟鱼(*Oncorhynchus mykiss*)肝细胞离体培养研究表明,外源雌激素可上调ER的表达,同时使VTG mRNA的表达增加,认为VTG mRNA的表达依赖于ER的水平(Flouriot et al, 1997)。通过BPA对MCF-7细胞的雌激素效应研究认为,BPA的作用途径主要通过ER介导,BPA浓度过高则与ER的结合达到饱和,将不能检测到浓度改变所引起的效应(Welshons et al, 2003)。本实验在一定的BPA浓度范围暴露处理雄性中国林蛙,肝细胞的ER表达和VTG合成均随BPA浓度增大呈现增高趋势,表明VTG的表达依赖于ER的水平,BPA可能通过诱导ER途径促使VTG合成。VTG可随着BPA暴露时间的延长增高,但ER的表达未随时间的延长

发生显著变化。BPA具有与E₂相似的雌激素效应,但其效应远低于E₂。

参考文献:

- Andrew CD, Marcus E, Taisen I, Susan J, Hans L, Gerald A, Le Blanc, Louis J, Guillette J. 2007. An ecological assessment of bisphenol A: Evidence from comparative biology[J]. *Reprod Toxicol*, **24**: 225-239.
- Bowman CJ, Kroll KJ, Gross TG, Denslow ND. 2002. Estradiol-induced gene expression in largemouth bass (*Micropterus salmoides*) [J]. *Mol Cell Endocrinol*, **196**(1-2): 67-77.
- Bogi C, Schwaiger J, Ferling H, Mallow U, Steineck C, Sinowatz F, Kalbfus W, Negele RD, Lutz I, Kloas W. 2003. Endocrine effects of environmental pollution on *Xenopus laevis* and *Rana temporaria* [J]. *Environ Res*, **93**: 195-201.
- Denslow ND, Chow MC, Kroll KJ, Green L. 1999. Vitellogenin as a bio-marker of exposure for estrogen or estrogenic mimics[J]. *Ecotoxicology*, **8**(5): 385-398.
- Denslow ND, Bowman CJ, Ferguson RJ, Lee HS, Hemmer MJ, Folmar LC. 2001. Induction of gene expression in sheeps head minnows (*Cyprinodon variegatus*) treated with 17 β -estradiol, diethylstilbetrol, or ethinylestradiol: the use of mRNA fingerprints as an indicator of gene regulation[J]. *Gen Comp Endocrinol*, **121**(3): 250-260.
- Flouriot G, Pakdel F, Ducouret B, Ledrean Y, Valotaire Y. 1997. Differential regulation of two genes implicated in fish reproduction: vitellogenin and estrogen receptor genes[J]. *Mol Reprod Dev*, **48**(3): 317-323.
- Gye MC, Kim DH. 2005. Bisphenol A induces hepatic vitellogenin mRNA in male *Bombina orientalis*[J]. *Bull Environ Contam Toxicol*, **75**: 1-6.
- Iwamuro S, Sskakibara M, Terao M, Ozawa A, Kurobre C, Shigeura T, Kato M, Kikuyama S. 2003. Teratogenic and anti-metamorphic effects of bisphenol A on embryonic and larval *Xenopus laevis*[J]. *Gen Comp Endocrinol*, **133**(2): 189-198.
- Klinge CM. 2001. Estrogen receptor interaction with estrogen response elements[J]. *Nucl Acids Res*, **29**(14): 2905-2919.
- Kloas W, Einspanier R, Lutz I. 1999. Amphibians as a model to study endocrine disrupters: II. estrogenic activity of environmental chemicals *in vitro* and *in vivo*[J]. *Sci Total Environ*, **225**(1-2): 59-68.
- Kloas W, Schrag B, Ehnes C, Segner H. 2000. Binding of xenobiotics to hepatic estrogen receptor and plasma sex steroid binding protein in the teleost fish, the carp (*Cyprinus carpio*) [J]. *Gen Comp Endocrinol*, **119**: 287-299.
- Krishnan AV, Stathis P, Permeth SF, Tokes L, Feldman D. 1993. Bisphenol A: an estrogenic substance is released from polycarbonate flasks during autoclaving[J]. *Endocrinology*, **132**: 2279-2286.
- Levy G, Lutz I, Krüger A, Kloas W. 2004. Bisphenol A induces feminization in *Xenopus laevis* tadpoles[J]. *Environ Res*, **94**(1): 102-111.
- Lindholm C, Wynne P M, Marriott P, Pedersen S N, Bjerregaard P. 2003. Metabolism of bisphenol A in zebrafish (*Danio rerio*) and rainbow trout (*Oncorhynchus Mykiss*) in relation to estrogenic response[J]. *Comp Biochem Physiol C: Toxicol Pharmacol*, **135**: 169-177.
- Matthews JB, Twomey K, Zacharewski TR. 2001. *In vitro* and *in vivo* interactions of bisphenol A and its metabolite, bisphenol A glucuronide with estrogen receptors alpha and beta[J]. *Chem Res Toxicol*, **14**: 149-157.
- Mitsui N, Tooi O, Kawahara A. 2007. Vitellogenin-inducing activities of natural, synthetic, and environmental estrogens in primary cultured *Xenopus laevis* hepatocytes[J]. *Comp Biochem Physiol C: Toxicol Pharmacol*, **146**: 581-587.
- Pakel F, Féon S, Gac FL, Menn FL, Valotaire Y. 1991. *In vivo* estrogen induction of hepatic estrogen receptor mRNA and correlation with vitellogenin mRNA in rainbow trout[J]. *Mol Cell Endocrinol*, **75**: 205-212.
- Park CB, Kim BH, Na OS, Choi YC, Lee YD, Baek HJ, Kim HB, Takemura A. 2003. Induction of *in vitro* vitellogenin synthesis by bisphenol A, nonylphenol and octylphenol in Chinese minnow (*Phoxinus oxycephalus*) hepatocytes[J]. *Korean J Biol Sci*, **7**: 227-235.
- Rouhani RT, Sanderson JT, Van HI, Van KP, Bosveld AT, Vanden BM. 2005. Effects of environmental and natural estrogens on vitellogenin production in hepatocytes of the brown frog (*Rana temporaria*) [J]. *Aquat Toxicol*, **71**: 97-101.
- Seo JS, Lee YM, Jung SO, Kim IC, Yoon YD, Lee JS. 2006. Nonylphenol modulates expression of androgen receptor and estrogen receptor genes differently in gender types of the hermaphroditic fish *Rivulus marmoratus* [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, **346**(1): 213-223.
- Sohoni P, Tyler CR, Hurd K, Caunter J, Hetheridge M, Williams T, Woods C, Evans M, Toy R, Gargas M, Sumpter JP. 2001. Reproductive effects of long-term exposure to bisphenol A in the fathead minnow (*Pimephales promelas*) [J]. *Environ Sci Technol*, **35** (14): 2917-2925.
- Takai Y, Tsutsumi O, Ikezuki Y, Hiroi H, Osuga Y, Momoeda M, Yano T, Taketani Y. 2000. Estrogen receptor-mediated effects of a xenoestrogen, bisphenol A, on preimplantation mouse embryos[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, **270**(3): 918-921.
- Takao T, Nanamiya W, Nazarloo HP, Matsumoto R, Asaba K, Hashimoto K. 2003. Exposure to the environmental estrogen bisphenol A differentially modulated estrogen receptor- α and- β immunoreactivity and mRNA in male mouse testis[J]. *Life Sci*, **72**(10): 1159-1169.
- Welshons WV, Thayer KA, Judy BM, Taylor JA, Curran EM, Vom Saal FS. 2003. Large effects from small exposures. I. Mechanisms for endocrine-disrupting chemicals with estrogenic activity[J]. *Environ Health Perspect*, **111**(8): 994-1006.
- Yamaguchi A, Ishibashi H, Kohra S, Arizono K, Tominaga N. 2005. Short-term effects of endocrine-disrupting chemicals on the expression of estrogen-responsive genes in male medaka (*Oryzias latipes*) [J]. *Aquat Toxicol*, **72**(3): 239-249.