

17 β -雌二醇、壬基酚及其混合物对雄性泥鳅的雌激素效应

吕雪飞 周群芳 宋茂勇 江桂斌* 邵晶

(环境化学与生态毒理学国家重点实验室, 中国科学院生态环境研究中心, 北京 100085. * 联系人, E-mail: gjiang@rcees.ac.cn)

摘要 以卵黄蛋白原(Vtg)为生物标志物, 采用半静水式暴露体系, 研究了17 β -雌二醇(E2)、壬基酚(NP)及其混合物对雄性泥鳅的雌激素效应. 结果表明, 与对照组相比, 0.5 μ g/L E2在21 d之内可诱导雄性泥鳅体内Vtg含量的增加, 呈现时间-效应关系; NP也能诱导雄性泥鳅体内产生Vtg, 呈明显的时间累积和剂量-效应关系, 但其雌激素活性相对较弱; E2与NP混合物对雄性泥鳅体内Vtg的诱导也呈时间和剂量相关, 其诱导能力显著性地强于单一化合物, 且混合物对Vtg的诱导量高于两种物质分别作用时Vtg诱导量的简单加和.

关键词 17 β -雌二醇 混合暴露 卵黄蛋白原 内分泌干扰 泥鳅 壬基酚

环境内分泌干扰物主要包括天然和人工合成的雌激素、烷基酚、有机氯农药及邻苯二甲酸酯等化合物^[1], 它们的存在会干扰人类及野生动物内分泌系统的诸多环节, 从而导致异常效应的产生. 其中, 壬基酚(NP)由于大规模的生产和使用而备受关注. 壬基酚是壬基酚聚氧乙烯醚的降解产物, 主要存在于污水处理后的水体中, 体内及体外研究均表明其具有弱的雌激素活性^[2-9].

卵黄蛋白原(Vtg)是一种理想的雌激素或类雌激素效应的生物标志物. 通常, 只有发育成熟的雌性卵生脊椎动物体内才会产生Vtg, 而雄性动物体内则没有Vtg, 但在外界雌激素或类雌激素物质的诱导下, 雄性动物的肝脏中也可以合成Vtg. 因此, 通过检测雄性动物体内Vtg的异常生成可以指示环境中雌激素或类雌激素物质的污染状况^[10-13].

本实验选用泥鳅(*misgurnus anguillicaudatus*)作为研究对象. 泥鳅在我国南北方分布广泛, 体形适中, 雌雄容易辨认, 能够在实验室内大规模饲养^[14]. 这些生物学上的特点使它具备了作为模型动物的可能性. 前期研究表明, 泥鳅对17 β -雌二醇(E2)很敏感^[15]. 虽然很多研究已经证明NP对不同的实验鱼种均具有雌激素效应, 例如, 比目鱼^[16]、日本青鳉^[17]、斑马鱼^[16]以及虹鳟鱼^[17]等等, 然而, 到现在为止, 还未见利用泥鳅作为模型动物来研究NP雌激素效应的报道.

目前, 大部分内分泌干扰物的研究工作均是针对单一化合物的模拟暴露, 然而, 实际环境体系包括一系列具有不同雌激素活性的化合物. 所以, 基于单种物质的毒理学数据很难对生态风险进行正确的评估. 研究混合物的雌激素活性比研究单种物质更符合实际环境所存在的状态. 现有的研究结果已经证明, 由不可见效应浓度(NOEC)的几种类雌激素物质组成的混合物具有明显的雌激素活性^[18-22]. 并且酵母雌激素筛选实验(yeast estrogen screen, YES)结果表明在17 β -雌二醇的存在下, 弱雌激素活性物质双酚A(BPA)对混合物的雌激素活性仍有一定的贡献^[23]. 然而, 在17 β -雌二醇的存在下, 烷基酚类化合物对混合物雌激素活性的贡献如何却有待于进一步的研究.

本研究采用半静水式暴露体系, 以雄性泥鳅为模型动物, 以血清中Vtg作为测定终点, 在实验室内进行了NP与E2单一化合物及其混合物的模拟暴露, 以期研究它们对雄性泥鳅的雌激素活性并揭示这两种污染物共存时的复合内分泌干扰特性.

1 实验

() 仪器. 高效离子交换膜色谱系统由弱阴离子交换膜(SartobindTM MAD15X, 德国)、高流速HPLC泵(Allitech 426, 美国)和紫外检测器(SPD-10A VP, 岛津, 日本)组成; 冷冻离心机MR1822(Jouan,

2007-03-02 收稿, 2007-06-18 接受

国家高技术研究发展计划(批准号: 2006AA06Z424)、国家重点基础研究发展计划(批准号: 2003CB415001)、国家自然科学基金(批准号: 40503014)、中国科学院知识创新项目(批准号: KZCX3-SW-431)和中国科学院知识创新工程重要方向项目(批准号: KJCX2-SW-H06)资助

法国); 酶标仪(TECAN, 奥地利).

() 试剂. 17β-雌二醇(E2, 纯度 98%)购于美国 Sigma 公司; 4-壬基酚(NP, 各支链壬基酚的混合物)购于日本 Tokyo Kasei Kogyo 公司; 蛋白酶抑制剂(aprotinin)购自德国 Boehringer 公司; 牛血清白蛋白(BSA)第 1 组分购自德国 Roche 公司; 辣根过氧化物酶(HRP)标记羊抗兔抗体购自北京军事医学科学院; 邻苯二胺(OPD)购自美国 Amresco 公司. 实验中其他所用化学试剂均为分析纯, 购自北京市化学试剂公司.

() 实验鱼. 实验鱼为成熟的雄性泥鳅, 购自北京市四道口水产大厅. 将健康的泥鳅(平均体重(9.13±1.69) g, 平均体长(12.61±0.70) cm)饲养于不锈钢桶中, 暴露前于实验室条件下驯养至少两周, 所用水为曝气脱氯的自来水. 实验鱼生活水质参数如下: pH 为 6.9~7.9; 氧浓度为 5~7 mg/L; 水温控制在 22.5~25.5 范围内; 白天/黑夜循环时间为 12 h/12 h.

() 实验设计. E2 和 NP 母液用甲醇做溶剂配制, 工作液为母液经超纯水(EASY pure LF)稀释而成, 所有溶液均于 4℃ 密封保存备用. 暴露开始时, 对泥鳅进行随机分组, 分别置于 12 L 的透明玻璃缸中(工作体积为 5 L). 实验共设 11 个组, 且每个暴露浓度设两个平行组, 分别为: E2(表观浓度为 0.5 μg/L), NP(表观浓度为 50, 200, 500 和 1000 μg/L), E2 与 NP 混合物(表观浓度为(0.5+50) μg/L, (0.5+200) μg/L, (0.5+500) μg/L 及(0.5+1000) μg/L), 溶剂对照和空白组中分别加入 0.02%甲醇和曝气脱氯自来水. 采用半静水式暴露, 隔天喂食, 隔天换水, 暴露时间为 42 d.

() 样品采集. 在实验进行的第 7, 14, 21, 28, 35 和 42 天取样, 每个暴露浓度随机取样 4 条. 取样前, 泥鳅先用硫酸喹啉(40 mg/L)麻醉, 然后, 用肝素钠处理过的一次性注射器, 从鱼的尾部静脉取血, 加入到预先加入蛋白酶抑制剂的 1.5 mL 塑料离心管内, 4℃ 下 3000 r/min 离心 30 min, 取上层血清分装后于 -20℃ 保存.

() 卵黄蛋白原的测定. 泥鳅血清中卵黄蛋白原用已建立的竞争酶联免疫吸附分析法(ELISA)进行测定^[14], 主要操作步骤包括: 用包被液(0.01 mol/L 碳酸盐缓冲液, pH 9.6)将纯化的卵黄蛋白原稀释至最佳工作浓度包被 96 孔板, 室温放置 2 h 后, 转入 4℃ 过夜放置; 用 PBST(0.2 mol/L 磷酸盐, pH 7.4, 包含 0.15 mol/L NaCl 和 0.05% Tween-20)洗板后, 加入 1% BSA,

37℃ 封闭 2 h; 洗板后, 加入抗血清和样品的混合物(提前预混合, 4℃ 过夜放置), 37℃ 孵育 2 h; 洗板后, 加入一定浓度的酶标二抗(辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG), 于 37℃ 孵育 1.5 h; 洗板后, 加入 OPD 底物显色液(20 mg 邻苯二胺溶于 50 mL 0.05 mol/L 的磷酸盐-柠檬酸缓冲液中, pH 5.0, 加入 80 μL H₂O₂ 混合后立即加入孔内), 于 37℃ 孵育 30 min 后, 加入 2 mol/L 盐酸终止反应; 用酶标仪于 490 nm 波长下进行测定. 方法检出限为 5.7 ng/mL, 板内变异系数和板间变异系数分别为 6.9%和 10.4%.

() 数据处理及统计分析. 所有的数据均用(平均值 ± 标准偏差)表示. ELISA 实验中标准曲线用 Boltzmann 方程 $y = a + b / \left[1 + \exp\left(\frac{x-c}{d}\right) \right]$ 拟合, 其中 x 为 log₁₀(Vtg 含量), y 为抑制结合率, a, b, c, d 为方程拟合参数. 暴露组与对照组之间的显著性差异用单因素方差分析(one-way ANOVA)进行分析, 置信度设为 $P < 0.05$.

2 结果与讨论

2.1 E2 和 NP 单一物质暴露对雄性泥鳅 Vtg 的诱导

E2(表观浓度为 0.5 μg/L)和 NP(表观浓度为 50, 200, 500 和 1000 μg/L)暴露组雄性泥鳅体内卵黄蛋白原的诱导情况如图 1 所示.

结果显示, 所有暴露组 Vtg 的浓度范围为未检测到(243.27±27.30) μg/mL (1000 μg/L NP 暴露 42 d), 空白组和溶剂对照组中 Vtg 的浓度范围为未检测到(26.94±6.87) μg/mL, 其中溶剂对照组的雄性泥鳅体内检出较高含量的 Vtg, 原因尚不清楚, 可能是在暴露过程中引入了雌激素活性物质. 0.5 μg/L E2 对 Vtg 的诱导呈时间-效应关系. 在整个暴露期间, Vtg 含量呈上升趋势, 第 21, 28, 35 和 42 天泥鳅体内 Vtg 的含量分别为(9.29±0.71) μg/mL, (19.98±6.85) μg/mL, (34.15±1.71) μg/mL 和(30.59±0.24) μg/mL. E2 对其他实验鱼种也具有明显的雌激素活性, 如 20 ng/L E2 21 d 即能诱导成年雄性斑马鱼和幼年虹鳟鱼体内 Vtg 含量的显著性升高($P < 0.001$)^[16]; 暴露于 30 ng/L E2 21 d 的雄性黑头呆鱼体内 Vtg 含量发生显著性升高($P < 0.01$)^[24].

NP 对雄性泥鳅表现出雌激素活性, 其对泥鳅体内 Vtg 的诱导呈时间累积和剂量-效应关系, 但其雌激素活性相对 E2 较弱. 在整个暴露期间(42 d), 除第 28 天外, 50 μg/L NP 均不能显著诱导雄性泥鳅体内产

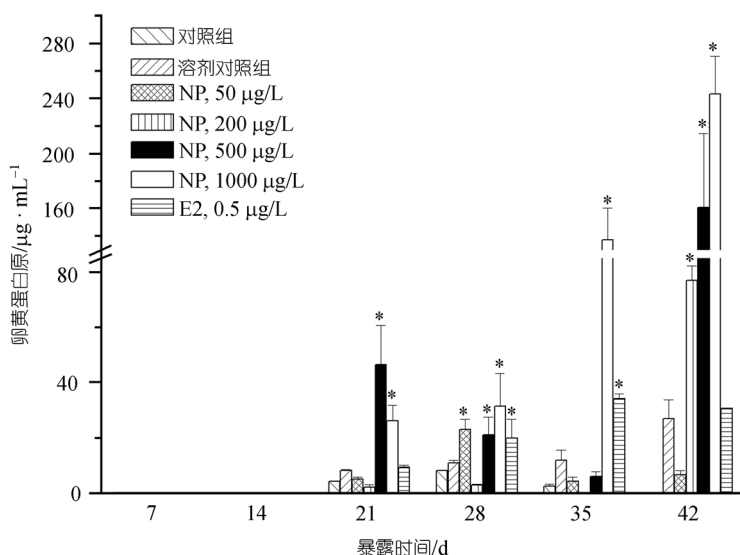


图1 E2及NP单一物质暴露对雄性泥鳅体内Vtg的诱导

*表示与对照组相比有显著性差异($P < 0.05$)

生Vtg. 200和500 μg/L NP经过42 d的暴露, Vtg含量显著性地高于空白组及溶剂对照组($P < 0.05$), 浓度分别为(77.13±5.26) μg/mL和(161.05±53.53) μg/mL. 1000 μg/L NP暴露条件下, 第21天Vtg含量((26.07±5.63) μg/mL)显著性地高于对照组($P < 0.05$), 从第28天到第42天, Vtg浓度从(31.47±11.92) μg/mL升高至(243.27±27.30) μg/mL. NP对其他的实验鱼种也表现出雌激素活性, 例如, 5 μg/L NP不能诱导性成熟的雄性鲤鱼体内Vtg的显著性升高 [25], 150 μg/L NP暴露的幼年虹鳟鱼, 在暴露的第9天Vtg浓度((1248 ± 382) μg/mL)显著性地高于对照组 [17]; 同时, 1 μg/L NP暴露1年的幼年虹鳟鱼, 与对照组相比, 体内Vtg含量也有显著性的升高 [26]. 可以看出, 与其他实验鱼种相比较, 泥鳅对E2和NP的敏感性略差, 这可能受到很多因素的影响. 首先, 实验鱼种所处成熟期的差别, 比如幼鱼较成鱼敏感; 其次, 暴露方式的影响, 流水体系比半静水体系能提供可靠的暴露物的浓度; 再者, 暴露所用试剂纯度对实验结果可能也会造成一定的影响, 因为有研究表明, 直链壬基酚与支链壬基酚的雌激素活性有很大差别 [17]; 还有实验鱼种本身可能也是决定其对内分泌干扰效应响应敏感度的关键因素.

2.2 E2和NP混合暴露对雄性泥鳅Vtg的诱导

本实验中研究了4个不同剂量E2与NP混合物(表观浓度为(0.5+50) μg/L, (0.5+200) μg/L, (0.5+500)

μg/L和(0.5+1000) μg/L)对雄性泥鳅的雌激素活性, 结果如图2所示. 可以看出, 在42 d的暴露时间内, E2与NP混合暴露组对雄性泥鳅体内Vtg的诱导呈明显的时间累积和剂量-效应关系. 各暴露组Vtg的浓度范围为未检到(1.93±0.25) mg/mL (0.5 μg/L E2 + 1000 μg/L NP暴露42 d).

0.5 μg/L E2+50 μg/L NP暴露组, 21 d内未能诱导雄性泥鳅体内产生Vtg, 从第28天到第42天, Vtg的含量从(17.4±3.68) μg/mL升高至(69.48±9.70) μg/mL; 0.5 μg/L E2+200 μg/L NP暴露条件下, 与对照组相比, 21 d内Vtg含量((114.13±35.06) μg/mL)发生显著性地升高($P < 0.05$), 到第42天, Vtg的含量升高为(427.06±175.33) μg/mL; 对0.5 μg/L E2+500 μg/L NP暴露组而言, 14 d内能诱导雄性泥鳅体内Vtg的生成, 但与对照组相比, 未见显著性差异($P > 0.05$). 第21天, Vtg的含量((97.44±33.64) μg/mL)同对照组相比有显著性的升高($P < 0.05$). 暴露42 d后, Vtg的含量达到最高值为(840.80±246.60) μg/mL, 是500 μg/L NP单一物质暴露42 d时Vtg诱导量的5倍; 虽然0.5 μg/L E2+1000 μg/L NP不能在7 d之内诱导Vtg的生成, 但在14 d内, 可显著性地诱导(36.2±1.23) μg/mL Vtg的生成($P < 0.05$), 42 d后, Vtg的诱导量达到最高为(1.93±0.25) mg/mL.

E2与NP混合暴露组雄性泥鳅体内的Vtg均高于两者分别暴露时所产生的Vtg. 图3显示了E2与NP混合物暴露42 d雄性泥鳅体内Vtg的浓度与E2

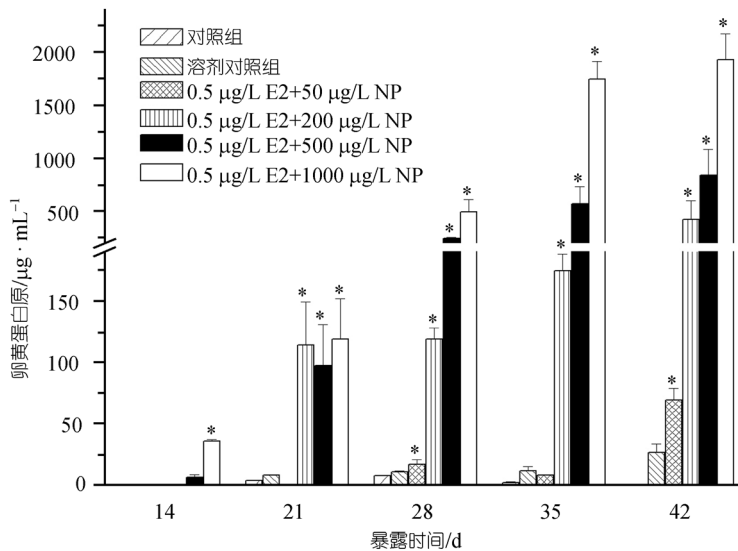


图 2 E2 与 NP 混合物暴露对雄性泥鳅体内 Vtg 的诱导

* 表示与对照组相比有显著性差异($P < 0.05$)

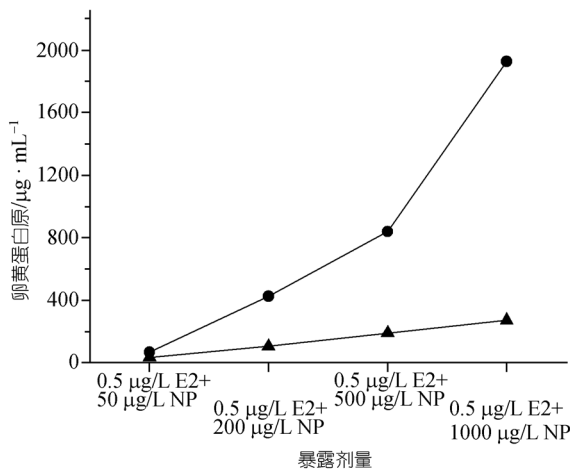


图 3 E2 与 NP 混合物暴露 42 d 后雄性泥鳅体内 Vtg 的诱导量()与 E2, NP 单一化合物分别暴露 42 d 后 Vtg 诱导量的加和()之间的比较

和 NP 单一化合物分别暴露 42 d Vtg 浓度加和之间的比较. 可以很清楚地看出, 暴露 42 d 后, 除 0.5 µg/L E2+50 µg/L NP 组外, 其他 3 个混合暴露组(0.5 µg/L E2+200 µg/L NP, 0.5 µg/L E2+500 µg/L NP 和 0.5 µg/L E2+1000 µg/L NP)对 Vtg 的诱导能力均显著性地高于两种物质分别暴露时 Vtg 诱导量的简单加和($P < 0.05$).

Thorpe 等人 [27] 研究表明 4.9 ng/L E2 与 3.3 µg/L NP 的混合物可诱导幼年虹鳟鱼体内产生(8720±4370)

ng/mL Vtg, 是两种物质单独暴露时诱导量的 18 倍, 且通过浓度加和模型(concentration addition, CA)预测两者以一种加和模式相互作用. Brian 等人 [22] 以雄性黑头呆鱼为模型动物, 证明了几种雌激素活性物质的混合物(E2, EE2, NP, OP 和 BPA)也是以加和模式进行相互作用的. 本研究仅从体内实验的角度考察了 E2, NP 及两者混合物对雄性泥鳅体内 Vtg 的诱导情况, 虽然可以很明确的判断两者混合物的诱导能力比单一的化合物要强, 但从所获得的信息中不能确定 E2 与 NP 的作用模式是否是加和或是协同, 这需要通过进一步的实验来验证, 同时还需要通过浓度加和模型来进行预测.

3 结论

本文以雄性泥鳅为模型动物, 以卵黄蛋白原作为生物标志物, 研究了 E2, NP 及两者混合物的雌激素活性. 结果表明 E2 具有较强的雌激素活性, 在较低浓度下即可诱导雄性泥鳅体内产生 Vtg, 同时, NP 对雄性泥鳅具有较弱的雌激素活性. E2 与 NP 混合物对 Vtg 的诱导能力比单一化合物要强, 且混合物对 Vtg 的诱导能力比两种物质分别作用时所产生的 Vtg 的简单加和还要高, 表明在强雌激素活性物质(E2)的存在下, 弱雌激素活性物质仍对混合物的雌激素活性有一定贡献, 进而明确了基于单种物质的毒理学数据很难对生态风险进行正确的评估, 进行环境危

害和生态风险评估时必须考虑化合物的混合作用。

参 考 文 献

- 1 Pillon A, Boussioux A M, Escande A, et al. Binding of estrogenic compounds to recombinant estrogen receptor- α : Application to environmental analysis. *Environ Health Perspect*, 2005, 113 (3): 278—284
- 2 Jobling S, Sumpter J P. Detergent components in sewage effluent are weakly estrogenic to fish: An in vitro study using rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) hepatocytes. *Aquat Toxicol*, 1993, 27 (3-4): 361—372[DOI]
- 3 Jobling S, Sheahan D, Osborne J A, et al. Inhibition of testicular growth in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) exposed to estrogenic alkylphenolic chemicals. *Environ Toxicol Chem*, 1996, 15(2): 194—202[DOI]
- 4 Tremblay L, van der Kraak G. Use of a series of homologous in vitro and in vivo assays to evaluate the endocrine modulating actions of β -sitosterol in rainbow trout. *Aquat Toxicol*, 1998, 43(2-3): 149—162[DOI]
- 5 Christensen L J, Korsgaard B, Bjerregaard P. The effect of 4-nonylphenol on the synthesis of vitellogenin in the flounder *Platichthys flesus*. *Aquat Toxicol*, 1999, 46(3-4): 211—219[DOI]
- 6 Schwaiger J, Mallow U, Ferling H, et al. How estrogenic is nonylphenol? A transgenerational study using rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) as a test organism. *Aquat Toxicol*, 2002, 59 (3-4): 177—189[DOI]
- 7 Chikae M, Ikeda R, Hasan Q, et al. Effect of alkylphenols on adult male medaka: Plasma vitellogenin goes up to the level of estrous female. *Environ Toxicol Phar*, 2003, 15(1): 33—36[DOI]
- 8 Pait A S, Nelson J O. Vitellogenesis in male *Fundulus heteroclitus* (killfish) induced by selected estrogenic compounds. *Aquat Toxicol*, 2003, 64(3): 331—342[DOI]
- 9 Kanno, S, Hirano S, Kayama F. Effects of phytoestrogens and environmental estrogens on osteoblastic differentiation in MC3T3-E1 cells. *Toxicology*, 2004, 196(1-2): 137—145[DOI]
- 10 Heppell S A, Denslow N D, Folmar L C, et al. Universal assay of vitellogenin as a biomarker for environmental estrogens. *Environ Health Perspect*, 1995, 103(Suppl 7): 9—15[DOI]
- 11 Sumpter J P, Jobling S. Vitellogenesis as a biomarker for estrogenic contamination of the aquatic environment. *Environ Health Perspect*, 1995, 103(Suppl 7): 173—178[DOI]
- 12 Kime D E, Nash J P, Scott A P. Vitellogenesis as a biomarker of reproductive disruption by xenobiotics. *Aquaculture*, 1999, 177(1-4): 345—352[DOI]
- 13 Marin M G, Matozzo V. Vitellogenin induction as a biomarker of exposure to estrogenic compounds in aquatic environments. *Mar Pollut Bull*, 2004, 48(9-10): 835—839[DOI]
- 14 Shao J, Shi G Q, Jin X L, et al. Development and validation of an enzyme-linked immunosorbent assay for vitellogenin in Chinese loach (*Misgurnus anguillicaudatus*). *Environ Int*, 2005, 31(5): 763—770[DOI]
- 15 Lv X F, Shao J, Song M Y, et al. Vitellogenic effects of 17 β -estradiol in male Chinese loach (*Misgurnus anguillicaudatus*). *Comp Biochem Physiol C*, 2006, 143(1): 127—133
- 16 van den Belt K, Verheyen R, Witters H. Comparison of vitellogenin responses in zebrafish and rainbow trout following exposure to environmental estrogens. *Ecotoxicol Environ Saf*, 2003, 56(2): 271—281[DOI]
- 17 Pedersen S N, Christiansen L B, Pedersen K L, et al. In vivo estrogenic activity of branched and linear alkylphenols in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Sci Total Environ*, 1999, 233(1-3): 89—96[DOI]
- 18 Payne J, Rajapakse N, Wilkins M, et al. Prediction and assessment of the effects of mixtures of four xenoestrogens. *Environ Health Perspect*, 2000, 108(10): 983—987[DOI]
- 19 Rajapakse N, Silva E, Kortenkamp A. Combining xenoestrogens at levels below individual no-observed-effect concentrations dramatically enhances steroid hormone action. *Environ Health Perspect*, 2002, 110(9): 917—921
- 20 Silva E, Rajapakse N, Kortenkamp A. Something from “nothing”—Eight weak estrogenic chemicals combined at concentrations below NOECs produce significant mixture effects. *Environ Sci Technol*, 2002, 36(8): 1751—1756[DOI]
- 21 Thorpe K L, Cummings R I, Hutchinson T H, et al. Relative potencies and combination effects of steroidal estrogens in fish. *Environ Sci Technol*, 2003, 37(6): 1142—1149[DOI]
- 22 Brian J V, Harris C A, Scholze M, et al. Accurate prediction of the response of freshwater fish to a mixture of estrogenic chemicals. *Environ Health Perspect*, 2005, 113(6): 721—728
- 23 Rajapakse N, Ong D, Kortenkamp A. Defining the impact of weakly estrogenic chemicals on the action of steroidal estrogens. *Toxicol Sci*, 2001, 60(2): 296—304[DOI]
- 24 Panter G H, Thompson R S, Sumpter J P. Intermittent exposure of fish to estradiol. *Environ Sci Technol*, 2000, 34(13): 2756—2760[DOI]
- 25 Villeneuve D L, Villalobos S A, Keith T L, et al. Effects of waterborne exposure to 4-nonylphenol on plasma sex steroid and vitellogenin concentrations in sexually mature male carp (*Cyprinus carpio*). *Chemosphere*, 2002, 47(1): 15—28[DOI]
- 26 Ackermann G E, Schwaiger J, Negele R D, et al. Effects of long-term nonylphenol exposure on gonadal development and biomarkers of estrogenicity in juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquat Toxicol*, 2002, 60(3-4): 203—221[DOI]
- 27 Thorpe K L, Hutchinson T H, Hetheridge M J, et al. Assessing the biological potency of binary mixtures of environmental estrogens using vitellogenin induction in juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Environ Sci Technol* 2001, 35(12): 2476—2481[DOI]