

嘉南藥理科技大學專題研究計畫成果報告

以吳郭魚探討二仁溪水仿雌激素活性的探討

計畫類別： 個別型計畫 整合型計畫

計畫編號：CNEV-92-05

執行期間：92年1月1日至92年12月31日

計畫主持人：陳健民

共同主持人：無

計畫參與人員：潘弋戎

執行單位：環境資源管理系

中華民國九十三年二月

以吳郭魚探討二仁溪仿雌激素活性的探討

計畫編號：CNEV92-05

計畫主持人：陳健民 嘉南藥理科技大學環境資源管理系

計畫參與人：潘弋戎 嘉南藥理科技大學環境工程與科學系

摘要

野外研究發現，人類活動規模較高的鄰近中下游河段，環境荷爾蒙的化學檢出值也較大。本研究想瞭解台灣水體環境中的此類壓力是否對魚類產生暴露危機。基於雜食性、繁殖力高、適應力強及能廣布不同棲地等特性，選擇雄性吳郭魚作為指標生物，並藉以驗證其能夠反應出環境荷爾蒙物質所造成的雌激素作用。本研究以台灣地區污染最嚴重之一的二仁溪作為研究區，選擇人為活動規模較高的鄰近下游河段分設採樣點。實驗中以西方點墨法（Western blot）量度雄性吳郭魚血清中卵黃蛋白先質（VTG）的誘發量，藉以代表魚體暴露環境荷爾蒙的程度多寡，並以生殖腺體重比（GSI）及肝臟體重比（HSI）指數提供魚類個體是否同時出現變化。研究初步結果發現，在短暴露時程（7天）二仁溪採樣點樣本中吳郭魚成魚有觀察到卵黃蛋白先質的誘發，生殖腺體重比（GSI）指數在上游及中游兩處有顯著差異，而肝臟體重比（HSI）指數並無明顯差異。

關鍵字：環境荷爾蒙、吳郭魚、卵黃蛋白先質、二仁溪

一、研究緣起及目的

隨著科技的發展各式各樣的合成化學物質被大量的製造和使用，這些雖然提升了我們的生活品質，但如果不當的使用及排放，將危害環境甚至威脅到人體的健康。近年來研究顯示，某些化學物質具有類似於生物體內荷爾蒙的功能，能抑制其正常的作用，改變生物體內免疫、神經和內分泌系統的正常運作，進而產生致癌、生殖或發育的影響。這些化學物質統稱為內分泌干擾物（Endocrine Disrupting Chemicals, EDCs）或環境荷爾蒙（王正雄，2000）。Colborn 博士於1996年出版之‘失竊的未來’（Our Stolen Future）一書中更明確的指出目

前環境中某些化學物質已經對人類及生態造成某種程度之傷害（Colborn, 1996）。除對人類的潛在健康效應外，許多報告亦顯示這些物質能使多種水生生物和野生生物體內正常的內分泌功能失常，進而產生不良的影響，包括：魚類和鳥類的甲狀腺功能和發育異常；減少貝、魚、鳥類和哺乳動物的生殖能力；降低魚類、鳥類和爬蟲動物的孵化率；造成魚、鳥、爬蟲動物和哺乳動物的去雄性化（Demasculinization）和雌性化（Feminization）；腹足動物、魚類和鳥類去雌性化（Defeminization）和雄性化（Masculinization），並減少子代的存

活率；改變鳥類和哺乳動物的免疫能力和行爲 (Colborn, 1993)。

天然雌激素及合成化學物質的仿雌激素都可能排放至自然水體。Shane A. 等人 (1999) 建立自然水體中環境雌激素活性分析方法研究發現，河川流域、下水道及廢污水處理廠排放水中顯示皆有雌激素活性，其中以下水道水中的雌激素活性最高。另外，王正雄等 (2001) 報告河川水質壬基苯酚 (nonylphenol) 濃度調查顯示台灣地區以南部河川受到壬基苯酚污染的濃度最高。二仁溪流域為國家河川污染整治的重點之一，依據測站資料分析得到其水質有逐年惡化的情形，目前已名列本省受污染河川之冠，主要的污染源是中上游的畜牧廢水 (養豬、養鴨) 佔全部污染源的 64%、下游的工業廢水，如燃燒廢五金、電鍍、酸洗、廢油等廢水的大量排入佔 28.1%，及家庭污水佔 7.9%，其中以三爺宮溪 (台南縣仁德鄉境內) 沿岸之工廠廢水及畜牧廢水與台南市灣里地區之廢五金酸洗最為嚴重 (行政院環保署網站統計資料)。有鑑於此，二仁溪流域水中雌激素活性調查為一重要污染指標。經過整體性的雌激素活性評估後可提供河川污染整治相關主關機關做為參考依據。

二、分析方法

1. VTG 測定

VTG 的測定則是以西方點墨 (Western blot) 為分析方法。主要方法是依據 Patyna 已發表之文獻報告 (Patyna et al., 1998、1999)。方法簡述如下：抽取無郭魚體內血清並以轉速 7000RPM

離心取上層液作為分析樣本，再以 SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, 6.25%) 將其所含之蛋白質分離。經轉移至 nitrocellulose 膜片後，陸續以主要 (mouse anti-VTG) 及次要 (Goat anti-mouse IgG 及 Horseradish Peroxidase Conjugate) 抗體使其結合，並以 streptavidin-biotinylated alkaline phosphatase complex 使其顯色。

2. GSI 及 HSI 測定

將暴露 7 天後的吳郭魚以 MS-222 麻醉後，稱重、量測體長，並以放大鏡或實體顯微鏡詳細觀察並記錄其第二性徵與對照組之差異。最後，將魚體解剖取出其肝臟及生殖腺稱重並計算其 HSI 及 GSI。

3. 暴露系統

吳郭魚各取三隻分別暴露於 20L 的魚缸中，魚缸分上中下游三組水樣，採靜止-更新式 (static-renewal) 方式進行短時程 (七天) 待測物之暴露。

三、結果與討論

1. 吳郭魚 VTG 誘導

吳郭魚 VTG 誘導實驗共做三個採樣點，每個採樣點分別暴露三隻雄性吳郭魚，血清 VTG 誘導分別取暴露前及暴露七天後之血清樣本進行分析。暴露前血清樣本經西方點墨所分析的結果顯示 (圖一) 血清中 VTG 誘導量呈現微量反應。而經過二仁溪三個採樣點水樣暴露七天後血清中 VTG 誘導量有明顯增加 (圖二)。由實驗結果可看出暴露前與暴露後雄性吳郭魚血清中 VTG 濃度的差異性極為明顯，這表示二仁溪水樣中含有足以使生物體體

內 VTG 被誘導出來的化學物質。

2. GSI 與 HSI

在實驗結束後（七天）我們將魚體解剖取出肝臟及生殖腺，以瞭解生殖腺及肝臟與體重的變化情形，並以生殖腺體重比（GSI）及肝臟體重比（HSI）指數表示（圖三）。另外，在暴露期間我們也記錄魚體的基本資料並每天觀察魚體健康狀況（表一）。GSI 指數經由分析結果顯示上游及中游兩組實驗在比較後有統計上顯著差異（ $P < 0.05$ ），其餘組別統計分析對照後並無明顯差異。在 HIS 數據方面，我們可以隱約看出上、中、下游都略高於對照組，這是否為誘導結果經血液循環而引導肝臟的雌性激素受體產生卵黃前質因而使肝臟重量略增，我們可能還要做長時程暴露才能瞭解。

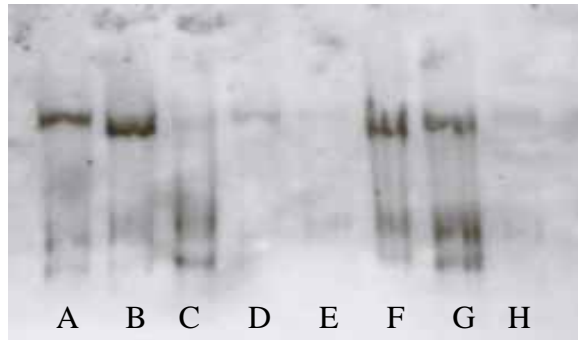
四、研究成果自評

以下幾點說明原計畫與研究執行的缺失及出入之處以及原因探討：

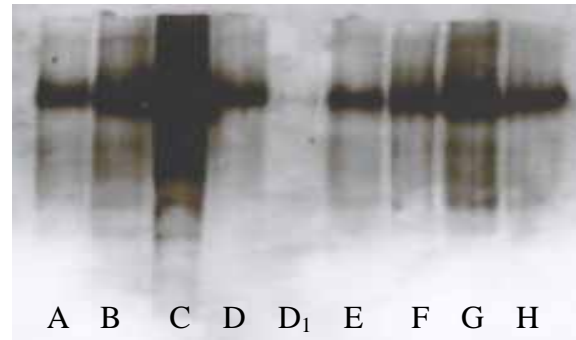
1. 暴露時期吳郭魚一隻死亡，未來在進行暴露時應注意魚體健康狀況並每天觀察魚在暴露水樣中存活情況。
2. 魚體內肝細胞 VTG 進行膠體電泳分析時數據表現並不如血清樣本，未來應注意解剖時避免肝細胞污染或保存及電泳分析程序上的干擾如：保存溫度、電泳分析操作程序、抗體結合條件等。
3. 生殖腺組織切片觀察因分析儀器不足，所以生殖腺以福馬林浸泡保存，未來可進行細胞組織切片，進一步觀察魚體生殖腺經環境荷爾蒙物質暴露後的變化情形。

參考文獻

- 王正雄：環境荷爾蒙-地球村二十一世紀之熱門課題. 環境檢驗 2000；29：6-14.
- 王正雄、張小萍、黃壬瑰、李宜樺、王世冠、洪文宗、陳珮珊，2001，環境荷爾蒙－壬基苯酚殘留調查及其對雄鯉魚生理效應之研究。台灣衛誌 2001,Vol.20,NO.3
- Colborn T, Dumanoski D, Myers JP, 1996. *Our Stolen Future*, Plume Publisher; ISBN: 0452274141。
- Colborn T, vom Saal FS, Soto AM. 1993. Developmental effects of endocrine-disrupting chemicals in wildlife and humans. *Environ. Health Perspect.* 101:378-384.
- Patyna PJ, Parkerton TF, Davi RA, Thomas PE, Cooper KR. 1998, Evaluation of two phthalate ester mixtures in a three generation reproduction study using Japanese medaka (*Oryzias latipes*). *Toxicol Sci.* 42(1-S), March.
- Shane A. Snyder, Timothy L. Keith, David A. Verbrugge, Erin M. Snyder, Timothy S. Gross, Kurunthachalam Kannan, and John P. Giesy. 1999. Analytical Methods for Detection of Selected Estrogenic Compounds in Aqueous Mixtures. *Environ Sci. Technol.* 33：2814-2820



圖一. 吳郭魚暴露前血清中 VTG 濃度表現 (A~C 上游, D~E 中游, F~H 下游)



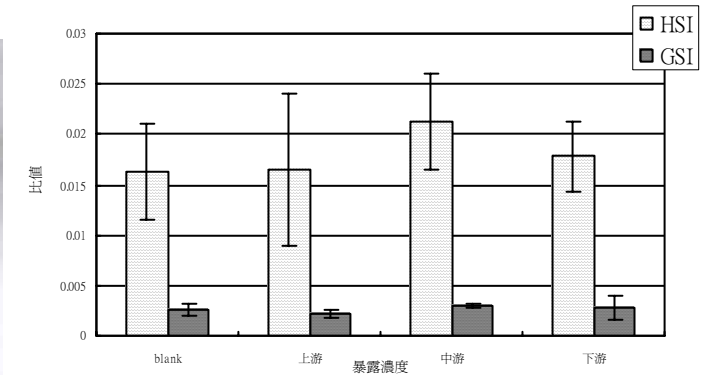
圖二. 吳郭魚暴露七天後血清中 VTG 濃度表現 (A~C 上游, D~E 中游, F~H 下游)

註: D₁ 為重複樣品

表一. 暴露時期吳郭魚基本資料及 GSI 與 HSI 值

暴露前					暴露後								
暴露濃度	編號	性別	身長 ¹	體重 ²	備註	身長 ¹	體重 ²	肝重 ²	生殖腺重 ²	HSI	GSI	HSI avg	GSI avg
blank	1	公	9.2	27.71		9.2	26.85	0.311	0.0512	0.01158286	0.00190689	0.016339687±0.0045	0.002618431±0.0006
blank	2	公	9.4	28.56		9.3	28.01	0.475	0.0815	0.01697608	0.00290967		
blank	3	公	9.7	31.58		9.7	30.21	0.618	0.0918	0.02046011	0.00303872		
上游	4	公	8.5	20.00		8.5	19.85	0.228	0.0358	0.01148614	0.00180352	0.016563246±0.0075	0.002156459±0.0004
上游	5	公	8.5	21.69		8.6	21.33	0.538	0.0542	0.02522269	0.00254102		
上游	6	公	9.6	29.43		9.6	29.32	0.380	0.0623	0.01298091	0.00212482		
中游	7	公	9.8	34.06		10.0	31.91	0.415	0.0981	0.01303039	0.00307427	0.016395651±0.0046	0.002916537±0.0002
中游	8	公	9.0	20.47	第三天死亡	-	-	-	-	-	-		
中游	9	公	10.0	39.78		10.5	38.06	0.752	0.1052	0.01976090	0.00275880		
下游	10	公	9.9	34.69		10.1	33.37	0.635	0.0819	0.01904105	0.00245431	0.017813088±0.0035	0.002712315±0.0011
下游	11	公	9.3	29.52		9.3	27.16	0.558	0.1083	0.02056332	0.00398748		
下游	12	公	8.0	21.47		8.5	20.47	0.283	0.0347	0.01383488	0.00169516		

註: 單位表示: 1. cm 2.g



圖三. 暴露在上中下游之吳郭魚 GSI 與 HSI 值及標準偏差