

以魚類肝臟初代細胞株探討環境中仿雌激素物質的可行性研究

子計畫(1): 都市處理廠放流水中仿雌激素活性之探討

子計畫(2): 人工濕地放流水仿雌激素活性之探討

子計畫(3): 底泥孔隙水中仿雌激素活性之探討

計畫類別：☐個別型計畫 ☒整合型計畫

計畫編號：CNEM-93-01

執行期間：93 年 1 月 1 日至 93 年 12 月 31 日

計畫主持人：陳健民、劉明昭

計畫參與人員：蘇于菁、梁任賢

執行單位：環境資源管理系

中華民國九十四年二月

一、中文摘要

由於界面活性劑、殺蟲劑及塑化劑等物質之運用，使全球各地水體皆發現有環境荷爾蒙物質，此類物質會有類似一般生物體內荷爾蒙物質之作用，改變正常功能，亦稱為內分泌干擾物(endocrine disrupting chemicals, EDCs)，其對生物及人類之影響已引起注意。在環境荷爾蒙物質中最常被討論的物質為仿雌激素，其亦常出現於污染水域環境中，逐漸蓄積於底泥系統間隙水中而成為一污染源，並藉由分佈平衡現象而釋出回到水體。因此，以生物指標方法檢視環境中的此類物質即成為目前環境污染凡至工作之重要課題之一。本整合計畫採取不同的環境樣本，即經人工濕地系統處理後之進流與放流水、都市處理廠放流水、污染河川底泥的孔隙水等三種環境水樣，以青將魚(Japanese Medaka, *Oryzias latipes*) 肝臟培養細胞中卵黃蛋白先質(vitellogenin, VTG)的表現檢視其雌激素的活性。實驗結果顯示除底泥間隙水水樣無法測試外，暴露於其他測試水皆有VTG的表現，並與暴露時間之長短有相關。

關鍵詞：仿雌激素，間隙水，底泥

Abstract

There are many EDCs found in the water around the world because of the usage of surfactants, pesticides and plasticizer. These chemicals can disrupt normal hormonal functions in human and other organisms. These effects have already caused a lot of attention. Xenoestrogen is one of EDCs can be found in polluted water as well as in the sediment-system. Once xenoestrogen are transported into the sediments, the system acts as a reservoir and xenoestrogen can be released back to the water because the partitioning effect. Therefore, developing biomarkers to

detect such EDCs in different environmental matrix became a major issue. The purpose of this project was to examine the activity of xenoestrogen in the different environmental samples, namely effluents from a constructed wetland, a municipal sewage treatment plant, and porewater extracted from sediment of a polluted river. We used expression of vitellogenin (VTG) from cultured primary hepatocytes from Japanese medaka, *Oryzias latipes*, as the biomarker. Results show that, except porewater could not have significant outcome due to contamination of the culture cells, other water samples tested led to expression of VTG in exposed hepatocytes, and the productions was time-dependent.

Keywords: xenoestrogen, interstitial water, sediment

二、緣由與目的

由於界面活性劑等之使用，在污染水域環境中常可發現仿雌激素的存在，其中水溶性大之物質直接溶於水體並影響水中生物，近年關於此方面之研究相當多國內外學者參與，如Ying等研究水體中環境荷爾蒙物質之吸附及分解(Ying *et al.* 2003)，台灣亦有丁望賢等分析台灣水環境中之環境荷爾蒙物質(丁望賢等，2000)；而水溶性小之物質逐漸沈降於底部並累積在底泥系統中。底泥系統包含固相的顆粒及液相的表面水、間隙水等三部份。底泥間隙水(interstitial water)是指存在底泥土壤顆粒間隙中的水份，又稱孔隙水(porewater) (Elderfield, 1981 及 Salomons *et al.* 1987)。蓄積於底泥系統中的污染物逐漸形成污染源，並藉由分佈平衡現象而釋出回到水體。有許多研究是關於底泥中環境荷爾蒙物質之探討：如Mira分析淡水中底泥的環境荷爾蒙含量(Mira *et al.* 2001)，Martina研究淡水底泥系統中

環境荷爾蒙物質對泥螺之影響 (Martina *et al.* 2003), 另 Ying 等亦對海水底泥系統中環境荷爾蒙物質有所研究 (Ying *et al.* 2003)。有關間隙水之研究在毒性方面亦已有所探討 (Henk and Ron, 1996), 然間隙水在環境荷爾蒙及仿雌激素上之研究相較之下較少。本整合計畫分為三個子計畫, 分別針對不同環境樣本進行離體 (*in vitro*) 的測試, 包括經人工濕地系統處理後之放流水、都市處理廠放流水、污染河川底泥的孔隙水。前兩子計畫由總主持人陳健民教授執行, 後一子計畫則由劉明昭助理教授執行。所得結果除能有助於吾人對環境荷爾蒙物質在環境中分佈狀況的瞭解外, 並對非活體之生物實驗更有正面的意義, 且能提升本校之環境生物學之研究能量。由於計畫經費有限, 此計畫部分工作與本人所承接之國科會與教育部計畫之工作項目有部分重疊之處, 特在此說明。

三、研究方法

本研究分別將青將魚曝露於 100% 及 50% 稀釋之間隙水, 再將整之魚體磨碎, 以西方點墨法 (Western Blotting) 分析卵黃蛋白先質之誘。

1. 放流水與間隙水萃取

採取二仁溪上、中、下游底泥之孔隙水, 於採樣地點採集後置於冰筒中冷藏帶回實驗室。將原始泥樣利用高速離心機於 11,000 rpm, 離心 20 分鐘, 將其通過 1 號濾紙過濾之。其中一部分做特性分析, 其餘以 4°C 冷藏, 留待生物試驗之用。

2. 試驗生物-青將魚

本計畫採用之青將魚 (Japanese medaka, *Oryzias latipes*) 為源於美國, 由日本引進之橙種 (orange strain)。本實驗室目前之馴養主要參考 Kirchen 和 West 在 1976 年之馴養方法及美國環保署於 1991 年公佈之養殖手冊。以連續流方式馴養於攝氏 23 至 28 度水溫之

魚缸中, 每日餵食三次, 並注意餵食之量, 以保持水質之清潔。雌雄魚之比例約為 3:2, 此亦為實驗之最佳產卵比例。

3. 卵黃蛋白先質之測定

卵黃蛋白先質 (VTG) 之測定是以西方點墨法 (Western blotting) 為分析方法。所使用的抗體購自於挪威 Biosense Laboratories 所研發的單株抗體 (monoclonal anti-medaka)。青將魚幼魚體內的 VTG 由魚體體細胞分離, 以西方點墨法確認。主要步驟是依據 Patyna 1998、1999 年之報告 (Patyna *et al.*, 1998、1999)。方法簡述如下:

- (1) 將體液細胞離心取得細胞質液 (cytosolic fraction)
- (2) 以 SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, 6.25%) 將其所含之蛋白質分離。
- (3) 將其轉移至 nitrocellulose 膜片後以主要抗體 (mouse anti-Medaka VTG) 及次要抗體 (Goat anti-mouse IgG 及 Horseradish Peroxidase Conjugate) 使其結合, 並以 streptavidin-biotinylated alkaline phosphatase complex 使其顯色 (詳見 Johnsen *et al.*, 1999)。

4. 肝臟初代細胞株之培養

將魚體麻醉後沿鰓與喉頭連接處切開放血, 並將已放血魚體浸泡於 1% Chlorox 溶液中 10 分鐘, 再經無菌水浸漬洗滌 3-4 次。以酒精消毒魚體側, 再切開體腔取出肝臟, 置入冰浴無菌培養皿中, 除去周圍之結締組織後, 並將其切成細小之組織碎片。將細組織碎片置入無菌 50 毫升離心管中, 加入 HBSS (Hank's Balanced Salt Solution) 溶液中懸浮組織碎片, 再經 700-800 x g 離心 5 分鐘後, 丟棄 HBSS 上清液加入 5 毫升 0.25% 胰蛋白酶消化液於懸浮組織碎片, 再將組織碎片懸浮液倒入無菌消化瓶中,

並加入 15 毫升胰蛋白酶消化液。將消化瓶置於室溫 (20°C) 攪拌消化，每隔 30 分鐘收取細胞懸浮液，大約 3-8 小時組織碎片可完全消化成細胞懸浮液。將細胞懸浮液經離心並以 PBS(phosphate buffer saline)溶液洗滌 3-4 次後取其細胞，再加入初代細胞培養液以將細胞懸浮。將製備成之細胞懸浮液培養於細胞培養瓶中，再移至 25-30°C 之恆溫箱中。

四、結果與討論

圖一顯示肝臟培養細胞暴露於不同濃度之 17- β estrodial 在第 15 日之後，其產生 VTG 量的劑量反應關係。在低劑量時(濃度小於 10^{-6} mole/L)，由於西方點墨法之靈敏度較低之故，VTG 之產生無法檢出及定量。在較高濃度的暴露下(濃度大於 10^{-5} mole/L)，VTG 的產生則隨劑量增加而上升。在最高劑量的暴露下(10^{-3} mole/L)，其 VTG 的產生量與由雌魚肝臟所分離出之 VTG 量相當(數據未顯示)。值得一提的是，在只有暴露 5 日後，僅有最高劑量組才開始有 VTG 的表現，但第 10 日的檢測，此組卻無 VTG 的反應。

相較於參考毒物組(17- β estrodial)，暴露於一人工濕地進流水的培養細胞在第五日後，即有 VTG 的表現(表一)，但此現象僅發現於 8 月份的水樣，且暴露時間越長，VTG 之表現越弱，此可能是水中毒性所導致培養肝細胞死亡之故。不論如何，所有不同月份的水樣中，所有的放流水皆無 VTG 的表現，顯見人工濕地的確有相當的去除水中雌激素物質的效能。

本計畫亦採用同樣的方法檢測一都市污水處理廠放流水之雌激素活性。在 12 月所採水樣測試的結果如圖二。此圖也指出暴露時間越長，VTG 的產量也越多。另在 10 月的水樣測試中，僅在暴露 15 日之後，培養之肝細胞所產之 VTG 才能被檢出(數據未顯示)。

底泥樣本的檢測並無結果，主因應為樣本萃取後，未經適當稀釋導致毒性過高或微生物污染而造成細胞死亡。

總結本整合計畫不同子計畫之結果如下：

1. 培養肝臟細胞可反應雌激素(17- β estrodial)與環境樣本(包括人工濕地進流與放流水，以及一都市處理廠放流水)而產生 VTG。
2. 一般而言，暴露時間越長，則 VTG 反應越強烈。
3. 若樣本毒性較高，反而會導致細胞毒性，降低 VTG 產量。因此，有些樣本做離體試驗前，應做適當稀釋。例如子計畫(3)的底泥間隙水測試，由於水質較為複雜，未經適當前處理與測試極可能導致為有預期的結果產生。

五、計畫成果自評

對於此結果茲分以下幾點討論：

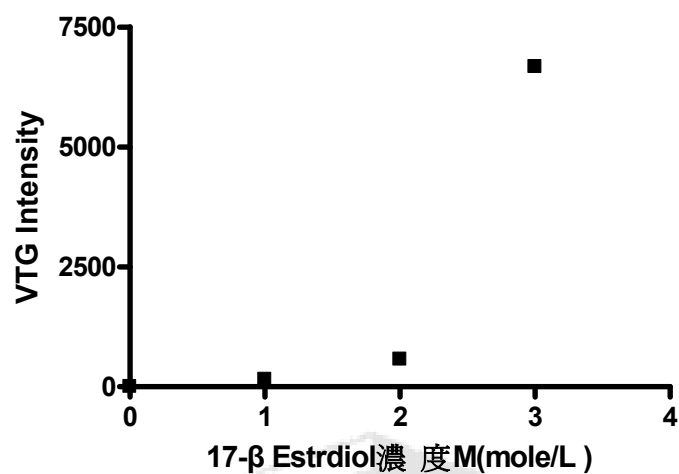
1. 青將魚暴露的時間若太短，將導致 VTG 無法如預期的被誘導。
2. 細胞培養需特別注重滅菌與污染防控工作，以免影響結果。
3. 由於都市廢水處理廠排放水仍有相當的 VTG 誘導作用，未來研究工作將對都市或特定工廠廢污水之仿雌激素作用進行判定。

六、參考文獻

- Chen C-M, Yu S-H, Liu M-C, 2001a, Use of Japanese medaka (*Oryzias latipes*) and Tilapia (*Oreochromis mossambicus*) in Toxicity Tests on Different Industrial Effluents in Taiwan Arch.Environ. Contam. Toxicol. 40(3): 363-370
- Elderfield H., 1981, Metal-organic associations in interstitial waters of Narraagansett Bay Sediments. Am. J. Sci. Vol. 281, pp.1184-1196.
- Guang-Guo Ying and Rai S. Kookana,

- 2003, Degradation of Five Selected Endocrine-Disrupting Chemicals in Seawater and Marine Sediment, *Environ. Sci. Technol.*, 37, 1256-1260
- Henk Hedia and Ron van der Oost, 1996, Sediment Pore Water Toxicity Testing, *Wat. Sci. Tech.* Vol.34, No.7-8, pp.109-116
- Ho S-M. 1991. Vitellogenesis. In: Pang PKT, Schreiberman MP, editors. Vertebrate endocrinology: fundamentals and biomedical implications. Vol. 4, Part A, Reproduction. New York: Academic. p91-126.
- Johsen HK, Tveiten H, Willassen NP, Arnesen AM, 1999, Arctic charr (*Salvelinus alpinus*) vitellogenin: development and validation of an enzyme-linked immunosorbent assay. *Comp. Biochem. Physiol. Part B* 124:355-362.
- Jobling S and Sumpter JP. 1993. Detergent components in sewage effluents are weakly oestrogenic to fish: an in vitro study using rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) hepatocytes. *Aquat. Toxicol.* 27:361-372.
- Kirchen, R.V., and West, W.R. 1976. The Japanese medaka, Its care and development. Carolina Biological Co., Burlington, NC. pp. 1-36
- Martina Duft, Ulrike Schulte-Oehlmann, Lennart Eeltje, Jichaella Tillmann, Jorg Oehlmann, Stimulated embryo production as a parameter of estrogenic exposure via sediments in the freshwater mudsnail *Potamopyrgus antipodarum*, 2003, *Aquatic Toxicology*, 64, 437-449
- Mira. Petrovic', Ethel Eljarrat, Maria J. Lo'pez de Alda, Damia' Barcelo', Analysis and environmental levels of endocrindisrupting compounds in freshwater sediments, 2001, *Trends in Analytical Chemistry*, Vol.20, No. 11
- Oakley S. M., P.O. Nelson and K.J. Williamson, 1981, Model of trace-metal prtitioning in marine Sediments. *Envir. Sci. Technol.* Vol.15, pp.474-480.
- 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.
- Sakata M., 1985, Digenetic remobilization of Manganese, iron, copper and lead in anoxic sediment of a freshwater pond. *Wat. Res.* Vol. 19, pp.1033-1038.
- Salmons W., de Rooij N. M., H. Kerdiuk and J. Bril, 1987, Sediments as a source for contaminants *Hydrobiologia* Vol. 149, pp.13-3
- 丁望賢、吳健誼、周瓊瑤、王正雄，2000，環境荷爾蒙-壬基苯酚及其相關化學物質在臺灣水環境中之分析調查。第一屆環境荷爾蒙與持久性有機污染物研討會會論文集，153-155。

圖一、青將魚肝臟細胞經暴露於 17- β estradiol 於第 15 天 VTG 的誘導表現



表一、二行社區人工溼地水樣經離體測試後之 VTG 表現(相對強度)

天數	7 月		8 月		9 月		10 月	
	進流	放流	進流	放流	進流	放流	進流	放流
5day	×	×	1502.7	×	×	×	×	×
10day	713.5	×	681.0	×	215.8	×	×	×
15day	1078.3	×	290.7	×	×	×	112.1	×

×代表無 VTG 表現

圖二、12 月份安平污水廠放流水經離體試驗後之 VTG 表現(相對強度)

