

嘉南藥理科技大學專題研究計畫成果報告

以青魚將魚探討二仁溪水仿雌激素活性

計畫類別：☒個別型計畫 ☐整合型計畫

計畫編號：CNEV-92-06

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 教授

共同主持人：無

計畫參與人員：陳宏正

執行單位：環境資源管理系

中華民國九十三年二月

嘉南藥理科技大學 92 年度教師研究計畫成果報告

以青魚將魚探討二仁溪水仿雌激素的活性

計畫編號:CNEV92-06

計畫執行時間:民國 92 年 1 月 1 日至 92 年 12 月 31 日

主持人:陳健民 嘉南藥理科技大學環境資源管理系

計畫參與人員:陳宏正 嘉南藥理科技大學環境工程與科學系

摘要

在科技發達的當下，化學產物不時的出現在週遭環境，因此人類在日常生活中可能直接或間接的接觸到許多的化學物質和產物，這些化學物質散佈於人類所處環境中，有些化學物質最主要會經由食物鏈對生態環境系統造成危害性。其中大量家庭汙水未經處理排放，中游的工業廢水汙染，對溪水及附近地下水水質的破壞。本計畫經由為期七天的暴露，將暴露於上游水樣、中游水樣、下游水樣、空白水樣的雄青魚將魚，比較其不同採樣點誘導所產生卵黃蛋白先質(VTG，vitellogenin)的量，而結果顯示污染較嚴重的中下游誘導所產生 VTG 也較明顯。

關鍵字：環境荷爾蒙、二仁溪、卵黃蛋白先質、青魚將魚

一、緣由與目的

環境荷爾蒙是最近幾年相當多科學家所關注的話題，大多數的環境荷爾蒙物質皆可在一般環境中被發現，由於此類物質有類似生物體內荷爾蒙的功能，因此會干擾原本正常的荷爾蒙分泌，造成內分泌的失調，進而影響生物體的本身生殖、發育、行為等。屬於環境荷爾蒙的化學物質很多，包含的種類也很廣泛，例如：殺蟲劑、除草劑、塑膠的塑化劑、人工合成之雌激素、界面活性劑、重金屬、有機錫等，其中有些皆被證實具有仿荷爾蒙的作用¹。許多研究報告皆指出環境荷爾蒙物質會干擾水生生物的內分泌功能，產生使魚類第二性徵不明顯、性

早熟、雌性化或雙性化等現象。

國科會集各領域專家費時三年調查研究完成，於民國 91 年 12 月 5 日公佈「永續台灣的願景與策略白皮書」指出，台灣嚴重污染河段的比例，過去十餘年來都在 10.3%~13.4%之間，未見改善，而最嚴重的北港溪、二仁溪、急水溪等河川，其污染比例居然超過 90%。主要的禍源，就是生活的污水。民國 91 年 4 月，國科會委託中央大學化學系調查指出，台灣 19 條主要河川水中的總壬基苯酚(Nonylphenol, NP)有機污染物的濃度，遠高於世界其他地區，將對於我們的健康與生態環境，造成重大衝擊。台灣每年生產及

使用這種石化原料—壬基苯酚類非離子型界面活性劑有四萬八千公噸。

在已知環境荷爾蒙物質的方面，Gray 及 Metcalfe 指出非離子性界面活性劑 p-nonylphenol 會造成雄魚之雙性化現象²；據 Blackburn & Waldock 在英國河川之調查報告，NP 之殘留濃度曾高達 330 $\mu\text{g/L}$ ³；Jobling 曾證實 NP 可以取代 β 雌激素(estradiol, E2)，固著於肝臟激素受體(estrogen receptor, ER) 導致 VTG 之累積⁴。

另外，在一般的環境污染方面，加拿大的研究學者發現暴露於漂白牛皮紙製造廠廢水的北美白鯉(*Catostomus commersoni*) 顯示出許多生殖上的異常，包括：雄魚與雌魚皆延遲其性成熟時間且有較小之生殖腺體、雌魚之生殖能力降低、雄魚之第二性徵不明顯等^{5,6}；而都市廢水中所含 alkylphenolethoxylates 及其衍生物則被認為是對魚類產生微弱雌激素作用之主要化合物⁷。因此，VTG 的誘導可做為魚類暴露於環境雌激素物質的生物指標。

二、分析方法

1. VTG 測定

VTG 的測定主要是以西方點墨法(Western blot)為主要的分析方法。方法如下：則將暴露 7 日之成魚以麻醉、稱重(表一)、量測體長後，將其解剖，以西方點墨法，檢測其所含之卵黃蛋白先質含量(VTG)。由於雌激素可刺激魚體內肝臟而產生大量之此類蛋白質⁸，因此相當適合做為魚類暴露於類似物質之生化指標。我們所使用的抗體則購自挪威的 Biosense Laboratories 所研發的單株抗體(monoclonal anti-medaka)。

2. GSI 與 HSI 測定

則將暴露 7 日後的成魚先將其麻醉、稱魚體重(表一)、量測魚體長後，再將其魚體解剖，取出其肝臟及生殖腺重，以計算其肝體重(HSI, hepatosomatic index)(表二)及生殖腺體重指數(GSI, gonadosomatic index)(表三)，另外生殖腺並以福馬林加以保存以便日後組織病理分析。

3 暴露系統

我們將二仁溪水樣依實驗需求分成四種不同水樣(上游、中游、下游、空白)，在暴露前先將水樣過濾，以原水樣曝露，然後各取 3 隻成魚的雄青魚將魚，置於 20L 的玻璃缸中，每日餵以固定量豐年蝦(*Artemia salina*)及薄片飼料各一次。整個暴露時間為 7 天，暴露方式採靜止-更新式，即每兩天換一次水，每次換水量為 10L。

三、結果與討論

1 青將魚 VTG 誘導

在本實驗中所測出魚體內的 VTG 含量方面，對照組無 VTG 的反應(圖二)。而暴露在上游、中游、下游中之雄青魚將魚者皆有 VTG 的反應，且污染較明顯的中下游，其 VTG 誘導更趨明顯(圖二)。

2 GSI 與 HSI

我們將總計有 12 隻雄青魚將魚暴露在原水水樣中，在此實驗結束後(連續暴露 7 天)，我們將魚體解剖取出生殖腺與肝臟，以瞭解生殖腺重量的變化情形，並以生殖腺體重比(GSI)值表示。在和對照組比較下，結果發現：暴露於上游、中游、下游中之雄青魚將魚之 GSI 無明顯的差異(圖一)。HSI 的結

果皆顯示二仁溪水樣不會影響暴露魚體肝臟的重量 (圖一)。

四.計劃成果自評

1. 所有的暴露組和對照組其體重在曝露前後並沒有差異太大。故此曝露期間實驗動物的餵食皆正常。
2. 上游暴露組雄魚之 GSI 值比其他曝露組略低，因差異性並不大，並不能指出仿雌激素對魚體有何響。且由 (圖一) 上游和下游標準偏差 (Standard deviation, S.D) 並不能明顯的看出其差異性，故利用統計學 t-test 檢定上游和下游 GSI 值推估得知其平均值(mean)有顯著不同，但由 t 值看出上游和下游的 GSI 值沒有明顯的差異 (表四)。(p < 0.05)
3. 而中游 HSI 值跟其它暴露組比較有較大的差別。但其落差不大並無法表現其受雌激素的影響。
4. 未來，我們將使用同樣的測試程序來了解不同廢污水對青魚將魚的影響。

文獻回顧

- (1) 丁望賢、吳建誼。2000。環境荷爾蒙-壬基苯酚與雙酚 A 在台灣水環境中之分析與流布調查。環境檢驗雙月刊 33:12-21。
- (2) Gray MA and Metcalfe CD. 1997. Induction of testi-ova in Japanese medaka(*Oryzias latipes*) exposed to p-nonylphenol. *Environ. Toxicol. Chem.*16:1082-1086.
- (3) Blackburn MA, Waldock MJ. Concentrations of alkylphenols in

rivers and estuaries in England and Wales. *Water Research* 1995; 29:1623-9.

- (4) 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.
- (5) Purdom CE, Hardiman PA, Bye VJ, Eno NC, Tyler CR, Sumpter JP. 1994. Estrogenic effects of effluents from sewage treatment works. *Chem. Eco.*8:275-285.
- (6) McMaster ME, Portt CB, Munkittrick KR, Dixon DG. 1992. Mill characteristics, reproductive performance, and larval survival and development of white sucker exposed to bleached kraft mill effluent. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 23:103-117.
- (7) 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.
- (8) Ho S-M. 1991. Vitellogenesis.

In:Pang PKT, Schreibman MP,
editors. Vertebrate endocrinology:
fundamentals and biomedical

implications. Reproduction. New
York: Academic. pp91-1

表一、曝露前後的青魚將魚平均體重值 單位：g

曝露前	上游	中游	下游	對照組
1	0.1785 g	0.1772 g	0.1793 g	0.17752 g
2	0.1801 g	0.1741 g	0.1755 g	0.17574 g
3	0.1742 g	0.1692 g	0.1743 g	0.1736 g
平均體重	0.177333g	0.173667 g	0.1763 g	0.1764 g
曝露後	上游	中游	下游	對照組
1	0.1789 g	0.1778 g	0.1797 g	0.17754 g
2	0.1808 g	0.1747 g	0.1757 g	0.17576 g
3	0.1749 g	0.1697 g	0.1746 g	0.1737 g
平均體重	0.17767g	0.17378 g	0.1768 g	0.1767 g

表二、青魚將魚 HSI 值

曝露後 HSI 值×100	上游	中游	下游	對照組
1	7.5607	6.9790	7.8212	6.7416
2	7.075	6.5607	7.5429	7.2316
3	7.3517	7.6523	7.6437	6.7598
平均 HSI 值	7.3294	7.1973	7.6692	6.9536
標準偏差	0.2433	0.467	0.1409	0.297

表三、青魚將魚 GSI 值

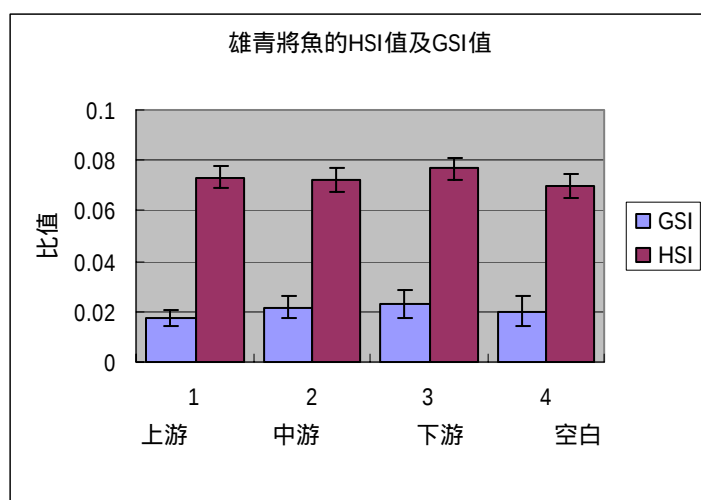
曝露後 GSI 值×100	上游	中游	下游	對照組
1	1.369	2.1073	2.2402	1.968
2	1.9337	2.1615	2.248	2.0367
2	1.7816	2.2195	2.3747	1.9162
平均 GSI 值	1.74	2.168	2.291	2.0037
標準偏差	0.02922	0.0561	0.0755	0.0605

表四 t-test 檢定結果 (p < 0.05)

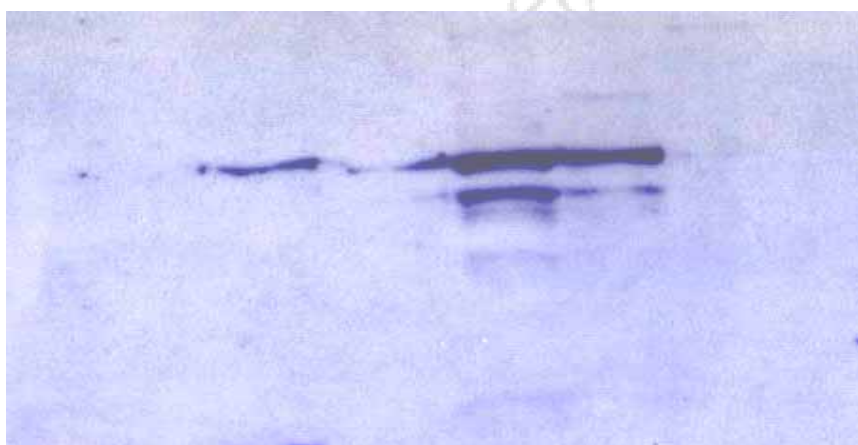
GSI	mean	S.D	N
上游 1	0.016948	0.0002922	3
下游 3	0.022876	0.00075	3

mean：中位數、Std.dv：標準偏差、N：樣本數、

圖一 暴露於二仁溪水樣之青魚將魚GSI值和HSI值與標準偏差



圖二. 暴露於二仁溪水樣之青魚將魚肝臟內VTG 的表現(1 為marker，2 為純化Vtg，3 暴露於二仁溪上游水樣雄魚，4 為暴露在二仁溪中游水樣的雄魚，5 為暴露在暴露於二仁溪下游水樣的雄魚，6 為暴露在對照組的雄魚，



1 2 3 4 5 6