

嘉南藥理科技大學專題研究計畫成果報告

河川底泥間隙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-92-33

執行期間：92年1月1日至92年12月31日

計畫主持人：劉明昭

計畫參與人員：蘇于菁

執行單位：環境資源管理系

中華民國九十三年二月

河川底泥間隙水仿雌激素活性的探討

The Activity of Xenoestrogen in Interstitial water of River Sediments

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。本計畫採取二仁溪之樣品，以生物指標法(biomarker)探討底泥間隙水中仿雌激素之活性。以青將魚(Japanese Medaka, *Oryzias latipes*)為試驗生物，並以傳統之西方點墨法(Western Blotting)分析卵黃蛋白先質(VTG)之表現。實驗結果顯示暴露於底泥間隙水的青將魚並沒有被誘導出卵黃蛋白先質，亦即底泥間隙水並沒有表現出環境荷爾蒙物質對生物體之影響。

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. The purpose of this project was to evaluate the activity of xenoestrogen in

the porewater. Biomarker for fish exposed to xenoestrogen was used and the test species was Japanese medaka, *Oryzias latipes*. Vitellogen (VTG) can indicate the activity of xenoestrogen. So the analysis of VTG was necessary. The traditional western blotting method was applied. Results showed there was no significant appearance of VTG was observed which indicated porewater sampled in Er-Jen River did not show the effect in Japanese Medaka.

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。

本計畫之目的旨在以水中魚類的生物指標法(biomarker)探討底泥間隙水中仿雌激素之活性，藉此了解台灣河川底泥系統中仿雌激素存在之情形。

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. 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，留待生物毒性試驗之用。

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)。

四、結果與討論

試驗分成七組，包括對照組、上游 100%、上游 50%、中游 100%、中游 50%、下游 100% 及下游 50% 間隙水。經過五天的暴露期間，中游 100% 的魚體最後都死亡，可能的原因為間隙水的水質較差而導致魚體死亡。其他組別的魚體體重沒有因為暴露而產生明顯的變化。最後分別將各組魚體直接研磨作 VTG 分析，發現沒有明顯反應。圖二為蛋白質膠片的分離，其中 1 為 Marker，2、3、4 為 VTG 標準，5 為下游 50% 雄魚，6 為下游 100% 雄魚，7 為中游 50% 雄魚，8 為上游 50% 雄魚，9 為上游 100% 雄魚，10 為對照組雄魚。其後將膠片轉漬至 nitrocellulose 膜片後，以 X 光片使 VTG 呈現(如圖三)。結果顯示實驗組之 VTG 並沒有被誘導的情形；而標準蛋白質之 VTG 則呈現明顯的表現。亦即在二仁溪所採取之底泥間隙水沒有顯現出仿雌激素對卵黃蛋白先質之誘導，甚至於對魚體體重影響亦不明顯。

五、計畫成果自評

對於此結果茲分以下幾點討論：

1. 青將魚暴露的時間太短，導致 VTG 無法如預期的被誘導。
2. 青將魚之幼魚由於體型較小，無法

取得血液樣本以進行VTG之測定，而必須犧牲動物數量。我們降低至五隻即可取得足夠之樣品做為VTG分析之用，減少動物犧牲之數量。

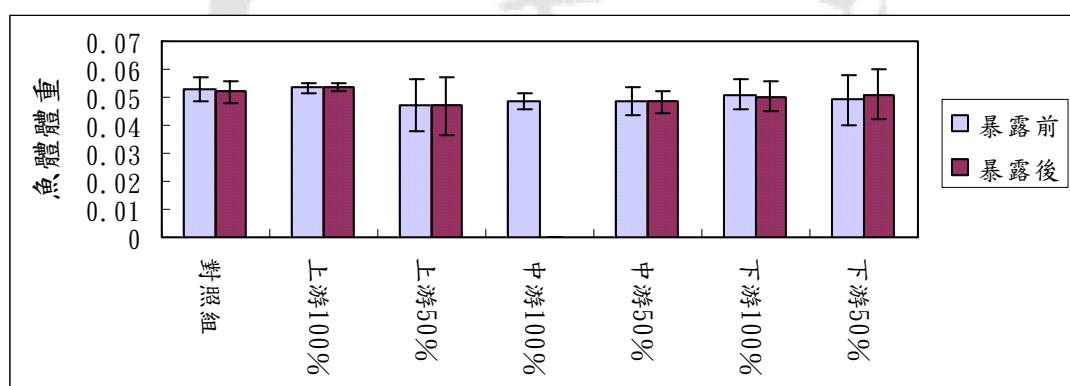
3. 未來研究工作將對都市或特定工廠廢污水之仿雌激素作用進行判定。

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
- 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.
- Elderfield H., 1981, Metal-organic associations in interstitial waters of Narragansett 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
- Guang-Guo Ying, Rai S. Kookana, Peter Dillon, Sorption and degradation of selected five endocrine disrupting chemicals in aquifer material, 2003, Water Research, 37, 3785-3791
- 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, Schreibman 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
- Leatherland JF. 1993. Field observations on reproductive and developmental dysfunction in introduced and native salmonids from the Great Lakes. J. Great Lakes Res. 19:737-751.
- Martina Duft, Ulrike Schulte-Oehlmann, Lennart Eeltje, Jichaela 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 prrtitioning in marine Sediments. Envir. Sci. Technol. Vol.15, pp.474-480.
- Patyna PJ, Davi RA, Parkerton TF, Brown RP, Cooper KR, 1999. A proposed multigeneration protocol for Japanese medaka (*Oryzias latipes*) to evaluate effects of

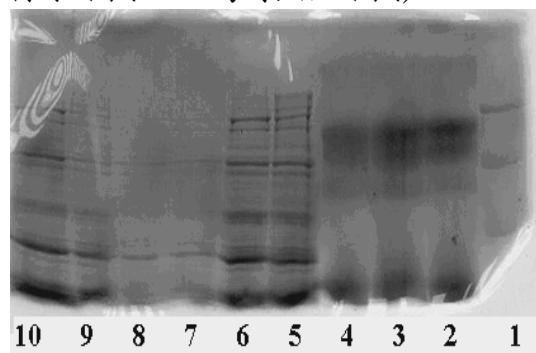
- endocrine disruptors. Sci Total Environ. 233:211-220.
- Patyna PJ, Parkerton TF, Davi RA, Thomas PE, Cooper KR. 1998, Evaluation of two phthalate ester mixtures in a three generation reproduction study using Japanese medaka (*Oryzias latipes*). Toxicol Sci. 42(1-S), March.
- Purdom CE, Hardiman PA, Bye VJ, Eno NC, Tyler CR, Sumpter JP. 1994. Estrogenic effects of effluents from sewage treatment works. Chem. Eco. 8:275-285.
- Sakata M., 1985, Diagenetic 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論文集，153-155。

圖一 暴露底泥間隙水前魚體的體重變化



圖二 暴露在底泥孔隙水之青將魚魚體蛋白質的表現

(1為Marker, 2、3、4為標準VTG, 5為下游50%底泥間隙水雄魚, 6為下游100%底泥間隙水雄魚, 7為中游50%底泥間隙水雄魚, 8為上游50%底泥間隙水雄魚, 9為上游100%底泥間隙水雄魚, 10為對照組雄魚)



圖三 暴露在底泥孔隙水之青將魚魚體VTG的表現

(1為Marker, 2、3、4為標準VTG, 5為下游50%底泥間隙水雄魚, 6為下游100%底泥間隙水雄魚, 7為中游50%底泥間隙水雄魚, 8為上游50%底泥間隙水雄魚, 9為上游100%底泥間隙水雄魚, 10為對照組雄魚)

