

科技部補助

大專學生研究計畫研究成果報告

* *****
* 計畫名稱：探討曝露雌性素後雄性米蝦體內卵黃前質素(vitellogenin)降解時間之變化
* *****

執行計畫學生：劉思鈺
學生計畫編號：MOST 106-2813-C-041-002-E
研究期間：106年07月01日至107年02月28日止，計8個月
指導教授：黃大駿

處理方式：本計畫涉及專利或其他智慧財產權，2年後可公開查詢

執行單位：嘉藥學校財團法人嘉南藥理大學環境資源管理系(含碩士班)

中華民國

107年03月23日

探討曝露雌性素後雄性鋸齒新米蝦(*Neocaridina denticulate*)

體內卵黃前質素(vitellogenin)降解時間之變化

1. 摘要

環境內分泌干擾物的環境影響問題在近年來受到極大的關注。環境內分泌干擾物又被稱為環境荷爾蒙，它們主要干擾動物體內之代謝、行為、生殖及性別分化等生理作用。環境內分泌干擾物中又以類雌性素物質類污染物質其研究最為重要。卵黃前質素(vitellogenin, Vtg)為目前研究水體中是否存在類雌性素物質類污染物質的重要生理指標，許多研究均指出雄性動物體曝露到雌二醇(17β -estradiol)後 6~10 天會誘發 Vtg 的形成，但是卻缺乏針對曝露類雌性素後，雄性生物個體內 Vtg 濃度降解的研究。因此，本研究利用雄性鋸齒新米蝦(*Neocaridina denticulate*)曝露於不同濃度的雌二醇 7、10 以及 14 天後，分別於 0、1、3、7 及 14 天利用 Enzyme immunoassay (EIA)測定雄蝦肝胰臟中 Vtg 之濃度，以探討停止雌二醇曝露後 Vtg 之降解狀態，以尋求利用 Vtg 來測定水域中雌性素當量之重要參數。經停止曝露實驗結果顯示，米蝦體內 Vtg 濃度再停止後仍有誘發的現象，並且於停止曝露雌二醇後 3~7 天米蝦體內 Vtg 濃度就會有開始下降趨勢。依據本研究結果顯示，若要利用鋸齒新米蝦誘發 Vtg 濃度當作檢測環境中是否存在雌性素污染物質，需額外採集水體回實驗室進行曝露試驗才能有更精確結果。

關鍵字:鋸齒新米蝦(*Neocaridina denticulate*)、卵黃前質素(vitellogenin, Vtg)、內分泌干擾物、生物降解

2. 研究動機與研究問題

生物體中內分泌系統 (endocrine system) 的分泌產物稱為激素或荷爾蒙 (hormones)，能精確的調控生理機制，支配生物體內的生長、發育、生殖、繁衍。然而，在水體環境中有某些化學物質，其分子結構擬似於動物體內分泌產生之激素，若此等物質一旦經由環境介質進入動物體內後，即與激素受體 (Hormone receptor) 錯誤結合，使得體內的基因控制系統，接受錯誤的指令，進而干擾動物體之代謝、行為、生殖及性別分化等生理作用。此等化學物質稱之為「外因性內分泌干擾物質」(endocrine disrupting chemicals, 簡稱: EDCs)，或稱之為「環境荷爾蒙」(environmental hormone; Sonnenschien et al., 1998)。

環境中常見的 EDCs 包括有機氯殺蟲劑 DDT、BHC、阿特靈與地特靈等，工業用化合物如 PCBs 與烷基酚類、溴化阻燃劑如多溴聯苯、燃燒或化學品製程之副產物如戴奧辛物質等化學物質(Soto and Fernandez, 1997)。水域生態系統是許多環境污染物的最終匯流處，其中許多化學物質被鑒定為環境雌激素類化合物(Sumpter, 2005)，它們可通過與雌激素受體結合而影響生殖和發育甚至造成水生生物多樣性群體的改變(Matthiessen et al., 1998; Nash et al., 2004)。環境內分泌干擾物的環境影響是目前科學界研究的熱點(hot points)，其中環境類雌性激素(xenoestrogen)是相關研究最多的化學物質(張等，2008)。目前對環境內分泌干擾物的檢測方法包括化學分析測試和生物檢測兩大類，不同種方法的適用範圍、方法敏感度存在差異。化學分析測試適用於已知內分泌干擾物，生物檢測適用於針對多個內分泌干擾物的綜合毒性(李等，2010)。

環境內分泌干擾物種類很多，其中有以類雌性素類污染物質最常被討論。目前許多研究均顯示曝露類雌性素污染物質時，雄性生物可以誘發原本不存在體內的蛋白質—卵黃前質素(vitellogenin, Vtg)。因此，Vtg 為目前研究水體中是否存在類雌性素物類污染物質的重要生理指標。近年來的研究更指出類雌性素污染物質與 Vtg 誘發量有明顯的關聯，並可利用 Vtg 來測定水域中雌性素當量

(estradiol equivalent concentration, EEQ)。利用 Vtg 來測定水域中雌性素當量，Vtg 在動物體內反應時間及維持的時間是作為環境監測中極為重要的參數。許多研究均指出雄性動物體曝露到雌二醇(17 β -estradiol)後 6~10 天會誘發 Vtg 的形成，但是卻缺乏研究針對曝露類雌性素後，於雄性生物個體體內 Vtg 可以維持的時間進行討論。

因此，本研究擬利用米蝦曝露於不同濃度的雌二醇 7、10 以及 14 天後，分別於 0、1、3、7 及 14 天測定米蝦肝胰臟中 Vtg 之濃度。並利用該試驗結果探討停止雌二醇曝露後 Vtg 之降解狀態，以尋求利用 Vtg 來測定水域中雌性素當量之重要參數。

3. 文獻回顧與探討

外因性內分泌干擾物 (endocrine disrupting chemicals, 簡稱: EDCs) 又稱為環境荷爾蒙 (environmental hormone), 係指會干擾負責維持生物體內恆定、生殖、發育或行為的內生荷爾蒙之外來物質, 是備受關注的環境污染物之一 (Huang et al., 2004)。環境中常見的 DEC 包括殺蟲劑 (如 DDT)、工業用化合物 (如 PCBs 與烷基酚類)、溴化阻燃劑 (如多溴聯苯)、燃燒或化學品製程之副產物 (如戴奧辛物質) 等種類繁多 (Sonnenschien et al., 1998)。當這類污染物質經由不同途徑進入到環境, 勢必會對環境生物造成影響。相關的 EDCs 研究主要以雌性激素干擾類群、雄性激素干擾類群及甲狀腺素干擾類群化學物質為主, 在不同類別之中又以雌激素干擾類群化學物質對環境生物造成的危害最為嚴重, 研究也相對的較多。特別是類雌性素對水中的生物影響, 更是近年來重視的方向。當此類物質由食物鏈進入到魚體內, 經生物累積作用 (bioaccumulation), 會破壞生物體內正常荷爾蒙的平衡狀態, 並造成個體生殖及發育之異常現象。雙酚 A (bisphenol A, BPA)、壬基苯酚 (nonylphenol, NP) 為水體中常被討論的類雌性素 (xenoestrogen) 之環境荷爾蒙。丁與吳 (2000) 研究指出雙酚 A 及壬基酚會使雄性魚類精子數目降低, 導致雄性個體喪失繁衍能力。除了雙酚 A 及壬基酚外, 近 80 種環境荷

爾蒙中，農藥就占了將近 40 種。依目前的研究顯示許多農藥會影響生物體的生殖內分泌系統、胚胎發生及甲狀腺等。農藥對內分泌的影響以 DDT、DDE 等有機氯農藥最為著名。二次大戰前後，美國大量使用 DDT 導致美國的金鷹蛋殼變薄。1980 年美國佛羅里達州 Apopka 湖泊附近化學工廠化學物質外洩，使得農藥 Kelthane（主要成分為 dicofol 及 DDT）洩漏出去，多年後水體中雖然已無法測出 dicofol 及 DDT 等環境污染物質，但是，在水生食物鏈最高階層的鱷魚，仍然可測相當濃度的 dicofol 及 DDT，也因此造成該地區鱷魚生殖器短小及精液品質下降等生殖的問題，也使得此區鱷魚數量急遽下降。另一個受人矚目的有機氯殺蟲劑為 DDE，DDE 是 DDT 主要代謝產物，它主要影響生殖機能發育過程，干擾了生殖荷爾蒙的作用，美國佛羅里達州 Apopka 湖就曾發現因 DDE 所造成非雄非雌的紅耳龜，也因此使得該地紅耳龜數量下降。經研究後發現 DDT、DDE 有類似雌性素（estradiol）的功能，嚴重影響魚類、爬蟲類、鳥類及哺乳類生殖週期（annual reproductive cycle）、生殖系統發育與生殖系統腫瘤的發生，並干擾雄性生殖系統發育或精子品質下降。除有機氯類農藥外，有機磷類農藥及其他非有機類殺蟲劑目前廣範使用於農作物及水產養殖業，但是這類化合物在環境中大量使用，也對生物造成了不少的影響，例如三丁基錫（Tributyltin：TBT）等有機錫化合物，其多為船底處理劑，主要防止藻類及附著性生物附著生存，當低濃度 TBT 慢慢的釋出至海洋中，即開始對海洋生物造成毒害，首先發現 TBT 會抑制牡蠣（*Crassostrea gigas*）、海藻、食用貽貝（*Mytilus edulis*）及蝦的生長，接著發現 TBT 會造成沿海軟體動物雌性雄化現象。Gibbs(1988)等人更指出 0.5ng/L 的 TBT 會誘導軟體動物產生覆蓋性轉變（Imposex）造成雌雄同體，此現象對雌體是一種不可逆的反應，將造成無法產卵、個體減少，最後造成物種的滅絕。目前世界各國大多禁用有機氯殺蟲劑，但由於有機氯殺蟲劑不易分解，所以經過數十年後，在環境介質中之河川底泥、魚體及貝類仍可檢測出其會影響生物健康的殘存量（Galindo et al., 1999）。

化學物質對生物影響有時會造成生殖狀態或表現的改變，這種變化亦可用

來討論物質對其族群及生態環境的影響。毒性物質造成生物體毒性的影響我們可以分成生理生化、個體表現兩個不同層次來討論。生理生化層次大多利用動物體受毒性物質影響後生理荷爾蒙（雄性素及雌性素）及其相關產物（卵黃前質素）的改變來探討。卵黃前質素（vitellogenin, Vtg）是形成卵黃蛋白（vitellin）的前驅物，一般而言只有雌性抱卵生物在繁殖時期體內才會產生。一旦水體環境中含有 1ng/L 的類雌性素，雄性或是未成熟的幼體就會誘發 Vtg 的生成(Purdom et al., 1994)。因此，Vtg 為目前研究水體中是否存在類雌性素物質環境荷爾蒙的重要生理指標（Huang and Sedlak, 2001; Lange et al., 2012）。不同於脊椎動物的生理機制，無脊椎動物進行 Vtg 的合成部位主要在肝胰臟，或是有部分物種會在肝胰臟及卵巢均有分泌的狀況(Celia et al., 2002)。一般正常情況下只有雌性成熟體擁有較多的雌性激素，而雄性及幼體則缺少雌性激素，並不會有 Vtg 的生成。若後兩者曝露到天然雌性素或類雌性素污染物質，雄性魚體或是未成熟的幼蝦就會誘發 Vtg 的生成(Purdom et al., 1994)。因此，Vtg 為目前研究水體中是否存在類雌性素物質環境荷爾蒙的重要生理指標(Huang and Sedlak, 2001; Lange et al., 2012)。

目前許多研究均已顯示曝露類雌性素可以誘發 Vtg 的形成，更有許多有關應用 Vtg 與類雌性素間良好的劑量效應和時間效應來監測環境中水域中雌性素當量(estradiol equivalent concentration, EEQ)(Chiu et al., 2017)。利用 Vtg 來測定水域中雌性素當量，Vtg 在動物體內反應時間及維持的時間是作為環境監測中極為重要的參數。許多研究均指出雄性動物體曝露到雌二醇(17 β -estradiol)後 7~10 天 Vtg 會有最高的誘發量，但是卻缺乏研究針對曝露類雌性素後，於雄性生物個體體內 Vtg 可以維持的時間進行討論(Villeneuve et al., 2013)。本研究為探討將米蝦曝露於雌二醇(17 β -estradiol)後，其肝胰臟中誘發卵黃前質素(vitellogenin, Vtg)後之降解時間進行探討。因此，本研究擬利用米蝦曝露於不同濃度的雌二醇 7、10 以及 14 天後，分別於 0、1、3、7 及 14 天測定米蝦肝胰臟中 Vtg 之濃度。並利用該試驗結果探討停止雌二醇曝露後 Vtg 之降解狀態，以尋求利用 Vtg 來測定

水域中雌性素當量之重要參數。

4. 研究方法及步驟

為了瞭解米蝦暴露在雌二醇(17β -estradiol)中受到誘發後，降解時間之長短進行研究。本試驗以鋸齒新米蝦(*Neocaridina denticulate*)為試驗生物，應用 0、100 及 1000ng/L 的雌二醇(17β -estradiol)進行 7、10 以及 14 日曝露後，於停止曝露後 0、1、3、7 及 14 天進行 Vtg 濃度測試，以瞭解 Vtg 誘發後的降解情況。本研究細部方式分述如下：

(1). 實驗器材、馴養水準備及實驗動物準備：

實驗之容器均依環檢所『水樣急毒性檢測方法中之玻璃器皿清洗法』清洗。步驟如下：(1)以自來水浸泡 15 分鐘後，用清潔劑清洗內壁，(2)以自來水沖洗二次，(3)以 10%硝酸清洗容器內部一次，(4)以去離子水沖洗二次，(5)以丙酮沖洗一次，(6)以去離子水沖洗三次。做毒性試驗前，測試容器需要以去離子水再次沖洗。

馴養水以曝氣設備曝氣，使溶氧維持在 5 mg/L 以上。馴養之水溫必須與毒性試驗溫度一致，即 $25 \pm 2^\circ\text{C}$ ，光照時間應維持在每天 16 ± 1 小時。試劑水保存時使用通氣設備曝氣，使溶氧維持在 5 mg/L 以上。

米蝦由水族館購買回研究室，試驗用米蝦全長為 1.1cm-1.3cm。放入內盛馴養水之馴養容器，於研究室馴養，缸內以通氣設備曝氣，待其穩定後進行後續試驗。試驗前將馴養後的試驗生物放置試劑水中進行 3~4 天的靜置試驗。前 3~4 天內，試驗動物之死亡率不得超過 10%。如果超過 10%，判斷試驗生物為不健康的狀況不用於後續試驗。

(2). 試驗藥品雌二醇(17β -estradiol)

雌二醇(17β -estradiol)(Sigma, USA)利用二甲基亞砜(dimethyl sulfoxide, DMSO)(Sigma, USA)為溶劑配製成 1000mg/L，並將其以棕色之試藥瓶，保存於 4°C 以下，等待後續試驗進行。

(3). 曝露試驗

試驗前挑選體長介於 1.1cm-1.3cm 的米蝦為試驗生物，排除因生長狀況導致實驗誤差，將試驗生物隨機放入 2000ml 的玻璃器皿中進行控制組(control)、加溶劑控制組(p-control)及雌二醇(17 β -estradiol)(0、100 及 1000ng/L)曝露實驗組共 9 個試驗，每組 20 隻 3 重複，進行 7、10 以及 14 日藥品曝露，並於停止曝露後 0、1、3、7 及 14 天後，每試驗組隨機取出 6 隻雄蝦進行 Vtg 實驗分析。試驗期間每 2 天餵食一次並進行換水，以維持水質狀況及雌二醇濃度。試驗進行期間為了避免水質產生變化，造成實驗誤差，發現死亡的試驗動物後立即移出試驗瓶。

(4). 生理生化值分析

萃取肝胰臟組織液，記錄米蝦體重後，直接置入微量離心管中，再加入 0.5ml 的 2X RIPA Buffer (冰)，以研磨棒磨碎，於 4°C 下進行均質。均質後使用離心機，以 4°C 10,000 轉之下進行 40 分鐘的離心過程。離心過後取出上清液，保存於-20°C 冰箱中，以供後續卵黃前質素含量分析。

分析肝胰臟中卵黃前質素(vitellogenin, Vtg)含量，萃取液中卵黃前質素主要利用 enzyme immunoassay (EIA)分析法，藉由相互競爭的原理，將生物組織液與已知 Vtg 蛋白先進行競爭，以利用抗原抗體間擁有專一性的特性，對於樣本的進行檢測並配合酵素連結進行呈色反應，最後檢測出單一蛋白質。

分析步驟如下：分析前一晚，於 ELISA plate 加入 100 μ L 5 μ g/mL Vtg 已知蛋白，再以保鮮膜封起後平放至 4°C 冰箱，放置一晚(16 \pm 4 小時)。隔天，從冰箱中取出，將液體倒出並於擦手紙上拍乾，加入 300 μ L 0.5% bovine serum albumin (BSA)，平放置於室溫下反應兩個小時。將液體倒出並於擦手紙上拍乾，並依序加入 100 μ L 序列稀釋之標準品(最高 50 μ g/mL)以及待測樣品，加入 100 μ L 0.05 μ g/mL Vtg 2343(R1)，平放置於室溫下產生競爭反應兩個小時。反應完以 Phosphate buffered saline with Tween (PBST)進行沖洗，加入 100 μ L Leadgene anti-rabbit IgG-HRP 1:5000，平放置於 37 度下反應一個小時。再

以 Phosphate buffered saline with Tween (PBST) 進行沖洗，加入 100 μ L Tetramethylbenzidine (TMB)，平放置於 37 度下反應十分鐘，最後加入 50 μ L 1N H₂SO₄ 停止繼續反應，以波長 450nm 進行 Vtg 之分析測定吸光值。

(5). 統計分析：

實驗數值以 two-way ANOVA 進行不同濃度及時間之卵黃前質素(Vtg)含量之比較，ANOVA 分析後有顯著差異者(p<0.05)，再以 Duncan 比較各組間的差異。

5. 結果

為了探討 Vtg 在米蝦體內反應時間及停止曝露雌二醇後 Vtg 之降解狀態，以尋求利用 Vtg 來測定水域中雌性素當量之重要參數。本試驗以鋸齒新米蝦 (*Neocaridina denticulate*) 為試驗生物並挑選雄性米蝦，隨機放入 2000ml 的玻璃器皿中曝露於三種濃度(0、100 及 1000ng/L)雌二醇(17 β -estradiol)進行 7、10 以及 14 日曝露後，在停止曝露後 0、1、3、7 及 14 天進行 Vtg 濃度分析。經各曝露試驗後，在不同濃度與天數都有明顯的差異；而在濃度與天數相互比較下，也有顯著差異。

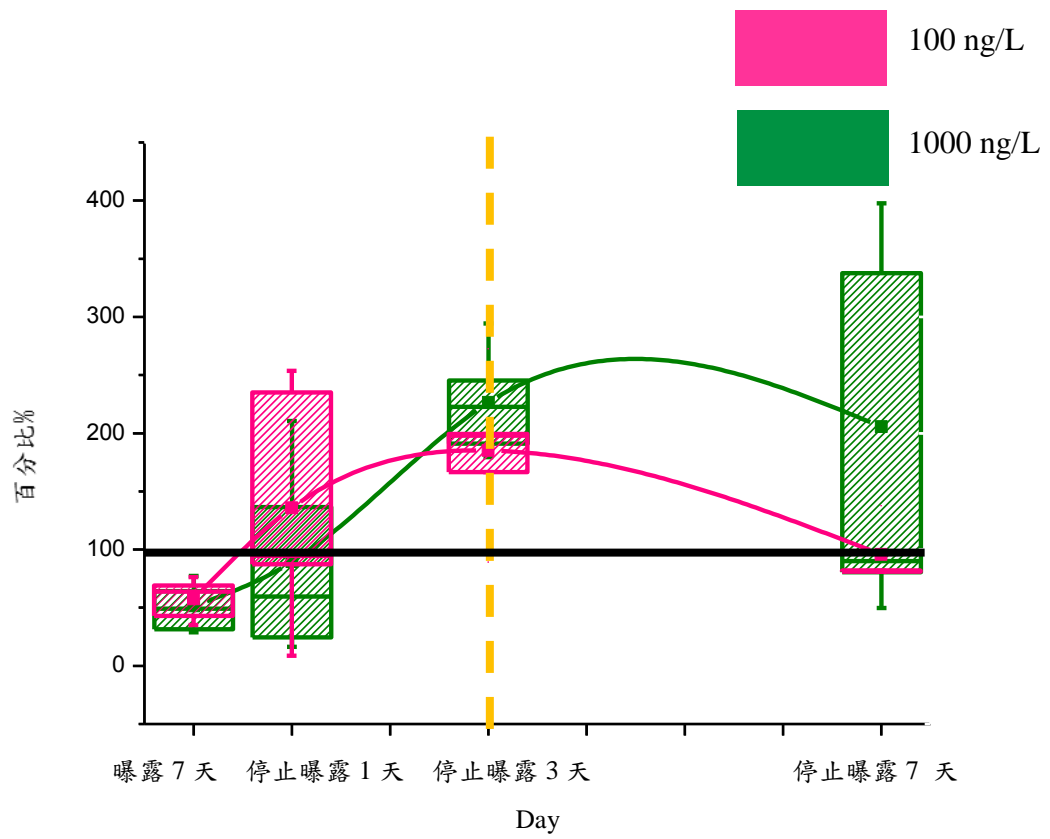
經停止曝露實驗結果顯示，停止曝露於 100 及 1000ng/L 雌二醇後 3~7 天米蝦體內 Vtg 濃度就會開始有下降趨勢(圖一~圖三)，而曝露藥品天數越久降解的濃度就越多。此外，還發現停止曝露於雌二醇後，米蝦體內 Vtg 濃度有持續被誘發的狀況，而誘發量與劑量有相對應關係。

因此綜合結果顯示，鋸齒新米蝦曝露於不同濃度之雌二醇，皆會誘發出不等量的 Vtg 濃度，其停止曝露雌二醇後於前 3~7 天出現降解狀況，可證實在預期結果中的推測，於 0~7 日內 Vtg 在米蝦體內降解，可說明雄性米蝦曝露到雌二醇後立即產生 Vtg，但是誘發出的 Vtg 也會快速於蝦體中降解。此等結果意味，Vtg 可以作為水域環境中的類雌性素的指標，但是該指標只能反應水體短時間的狀況。

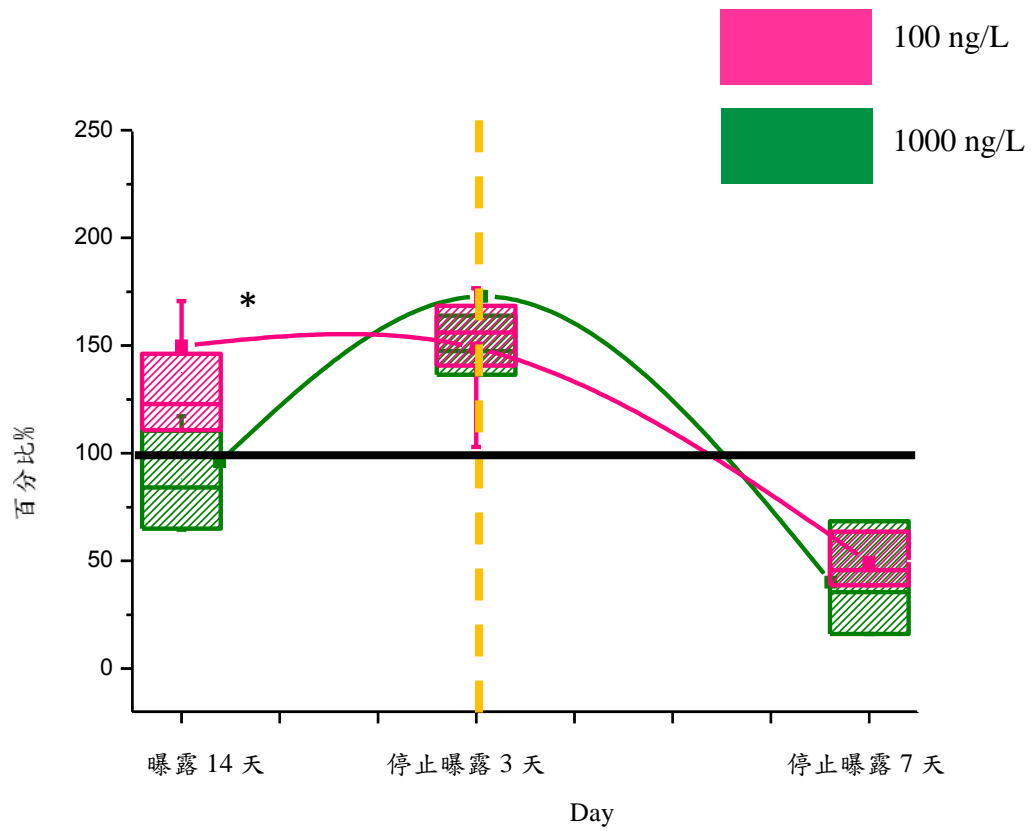
6. 參考文獻

- (1).Celia, G., Boucard, V., Levy, P., Ceccaldi, H.J. and Brogen, C.H.(2002)Developmental changes in concentrations of vitellin, vitellogenin, and lipids in Hemolymph hepatopancreas and ovaries form different ovarian stages of Indian white prawefenneropenaeusindicus .Joornal of the American Society for Mass Spectrometry. 281:63-75.
- (2).Locatelli M, Sciascia F, Cifelli R, Malatesta L, Bruni P, Croce F. (2016)Analytical methods for the endocrine disruptor compounds determination in environmental water samples. J Chromatogr A. Volume 1434, 19 February 2016, Pages 1-18.
- (3).Huang, C.-H., Sedlak, D.L.(2001)Analysis of estrogenic hormones in municipal wastewater effluent and surface water using enzyme-linked immunosorbent assay and gas chromatography/tandem mass spectrometry. Environ. Toxicol. Chem. 20, 133-139.
- (4).Huang B, Sun W, Li X, Liu J, Li Q, Wang R, Pan X(2015) Effects and bioaccumulation of 17β -estradiol and 17α -ethynylestradiol following long-term exposure in crucian carp. Ecotoxicol Environ Saf. Feb;112:169-76
- (5).Matthiessen, P., and P. E. Gibbs. (1998) Critical appraisal of the evidence For tributyltin-mediated endocrine disruption in mollusks.Environmental Toxicologyand Chemistry. 17(1), 37-43.
- (6).Nash, J. P., D. E. Kime, L. T.Van der Ven, P. W. Wester, F. Brion, G. Maack, P. Stahlschmidt-Allner, and C. R. Tyler.(2004) Long-term exposure to environmental concentrations of the pharmaceutical ethynyl estradiol causes reproductive failure in fish. EnvironmentalHealth Perspectives. 112(17), 1725-1733.

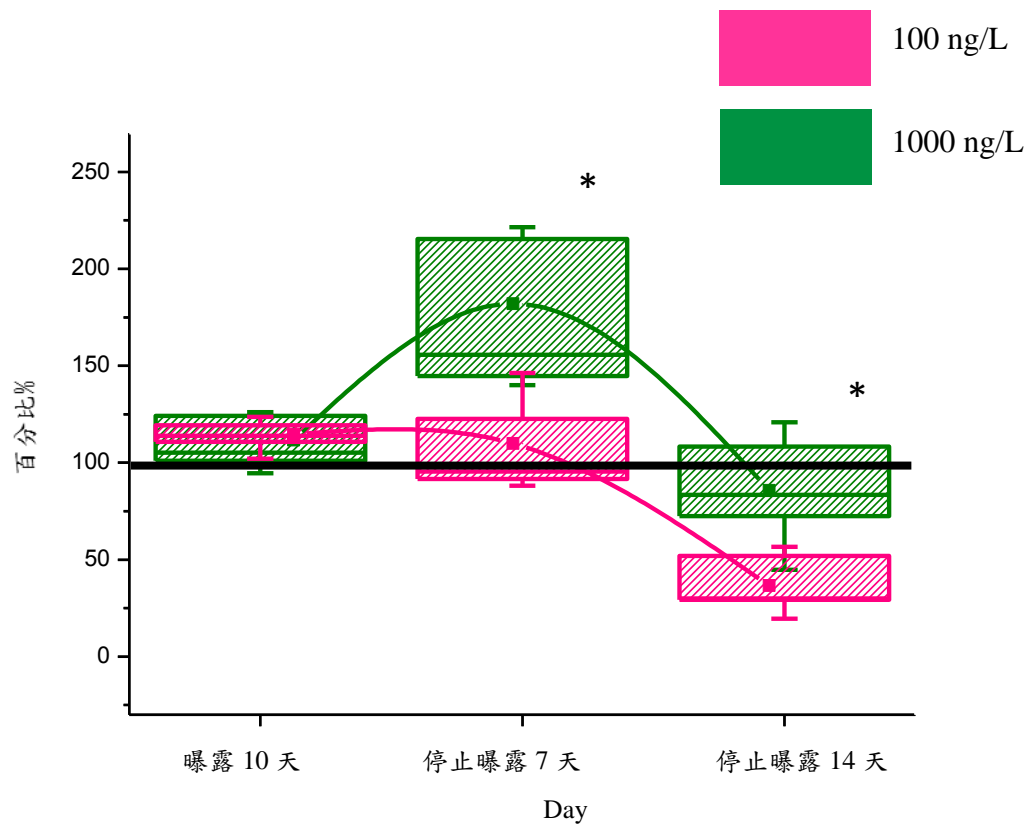
- (7).Huang GY, Liu YS, Chen XW, Liang YQ, Liu SS, Yang YY, Hu LX, Shi WJ, Tian F, Zhao JL, Chen J, Ying GG(2016)Feminization and masculinization of western mosquitofish (*Gambusia affinis*) observed in rivers impacted by municipal wastewaters. *Scientific Reports* 6, Article number: 20884.
- (8).Sonnenschien, C.,andA.M.Soto.(1998)An updated review of environmental estrogen and androgen mimics and antagonists.*Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*. 65(1-6), 143-150.7.
- (9).Katarzyna Kozłowska-Tylingo , Jacek Namieśnik & Tadeusz Górecki.(2010)Determination of Estrogenic Endocrine Disruptors in Environmental Samples—A Review of Chromatographic Methods, *Critical Reviews in Analytical Chemistry* Volume 40, Issue 3
- (10). Villeneuve, D. L., M. Breen, D. C. Bencic, J. E. Cavallin, K. M. Jensen,E. A.Makynen,L. M. Thomas, L. C. Wehmas, R. B. Conolly, and G. T. Ankley. (2013) Developing Predictive Approaches to Characterize Adaptive Responsesof the Reproductive Endocrine Axis to Aromatase Inhibition: I. DataGeneration in a Small Fish Model.*Toxicological sciences*. 133(2), 225–233.
- (11). 李劍、馬梅、王子健。2010。環境內分泌干擾物的作用機理及其生物檢測方法。環境監控與預警。2(3)：18-22 頁。
- (12). 張暉、孔繁翔、王世和、于洋、張民、陳美軍、譚嘯。2008。多種環境雌激素對淡水魚聯合毒性作用的預測和評價。環境科學學報。28(6)：1178-1185 頁。
- (13). 顧海龍、陳彩芳、林志華、霍禮輝。2013。水生生物卵黃前質蛋白在內分泌干擾物檢測中的應用。寧波大學學報(理工版)。第 26 卷第 2 期。



圖一、雄性鋸齒新米蝦曝露不同濃度雌二醇7天，停止曝露後0、1、3、7天Vtg降解狀況



圖二、雄性鋸齒新米蝦曝露不同濃度雌二醇14天，停止曝露後0、3、7天Vtg降解狀況



圖三、雄性鋸齒新米蝦曝露不同濃度雌二醇10天，停止曝露後7、14天Vtg降解狀況