

利用食蚊鱼目标基因转录水平评价四会市 邓村河雌/雄激素物质污染现状

侯丽萍¹, 舒 琥^{1*}, 李 强¹, 应光国², 方展强³

(1. 广州大学生命科学学院, 广州 510006; 2. 中国科学院广州地球化学研究所有机地球化学国家重点实验室, 广州 510640;
3. 华南师范大学生命科学学院, 广东省高等学校生态与环境科学重点实验室, 广州 510631)

摘 要: 利用西部食蚊鱼(*Gambusia affinis*) 的雌/雄激素受体(*ER α /AR α*)基因和卵黄蛋白原(*VTG α*)基因的转录水平为生物学指标, 对广东省四会市邓村河的雌/雄激素物质污染现状进行评价。结果显示, 与未受造纸废水污染的对照点 REF 相比, 受造纸废水污染位点 A、B、C 中雌性食蚊鱼臀鳍中的雄激素受体 *AR α* mRNA 转录水平均比对照点显著升高 ($P < 0.05$), 雄性食蚊鱼臀鳍的雌激素受体 *ER α* 转录水平不明显 ($P > 0.05$)。造纸废水暴露位点 A、B、C 中雄性食蚊鱼肝脏中的 VTG 受体 *VTG α* mRNA 转录水平均比对照点显著升高 ($P < 0.05$)。结果表明, 生活在受造纸废水污染的邓村河中的食蚊鱼受雌/雄激素物质干扰明显, 且受雄激素物质污染更严重。鱼类肝脏 *VTG α* 基因和臀鳍 *AR α* 基因转录水平可适合作为监测水体环境雌/雄激素物质的生物标志物。

关键词: 卵黄蛋白原基因; 雌/雄激素受体基因; mRNA 转录水平; 环境雌/雄激素物质; 食蚊鱼; 造纸废水
中图分类号: X793 文献标识码: A 文章编号: 1672-352X (2015)01-0152-07

Evaluation of estrogen/androgen pollution by using the mosquitofish target gene expression in Dengcun River, Sihui city

HOU Liping¹, SHU Hu¹, LI Qiang¹, YING Guangguo², FANG Zhanqiang³

(1. School of Life Science, Guangzhou University, Guangzhou 510006;

2. State Key Lab of Organic Geochemistry, Guangzhou Institute of Geochemistry, Chinese Academy of Sciences, Guangzhou 510640 ;

3. Key Laboratory of Ecology and Environmental Science in Guangdong Higher Education, College of Life Science, South China Normal University, Guangzhou 510631)

Abstract: The expression levels of the vitellogenin (*VTG α*) and estrogen/androgen receptor (*ER α /AR α*) genes in mosquitofish (*Gambusia affinis*) were determined to monitor the pollution status of the estrogen/androgen substances in Dengcun River, Sihui city. The results showed that: compared with the control site of REF, the *VTG α* mRNA transcript levels in liver of the male mosquitofish from sampling sites A, B and C were significantly increased to 4.51, 3.31, and 3.63 folds, respectively ($P < 0.05$ and $P < 0.01$), while the *ER α* mRNA transcript levels in anal fin of the male mosquitofish were not significant ($P > 0.05$). The *AR α* mRNA transcript levels in anal fin of the female mosquitofish in sampling sites A, B and C along Dengcun River were 8.12, 6.21, and 8.33 times of the control point of REF, respectively. The results indicated that mosquito fish in Dengcun River was significantly interfered by the estrogen and androgen materials and the androgen effect was more significant; therefore, mRNA transcript levels of the *VTG* and anal fin *AR* genes in fish liver were suitable biomarkers for monitoring the aquatic environment of estrogen/androgen substances.

Key words: *VTG α* gene; *ER α /AR α* gene; mRNA transcription level; environmental estrogen/androgen substances; *Gambusia affinis*; paper waste

收稿日期: 2014-04-24

基金项目: 广东省教育厅科技计划“育苗工程”(2012LYM0100), 广州市市属高校科技计划(2012A040)共同资助。

作者简介: 侯丽萍, 博士, 讲师。E-mail: 2724066698@qq.com

* 通信作者: 舒 琥, 教授。E-mail: 973796605@qq.com

近年来, 世界各国相继报道了受造纸废水污染的河流水体和底泥具雌/雄激素效应。Orn 等^[1]发现瑞典一造纸厂出水同时具有雌激素和雄激素活性, 暴露于其中的斑马鱼出现两性现象。Jenkins^[2]等在受造纸废水污染的水体和底泥中也检测出雄烯二酮和孕酮的存在。室内研究表明, 受污染水体中雌激素类物质的低浓度长期暴露能引起活体生物的雌性化效应^[3], 雄鱼血液中卵黄蛋白原(VTG)诱导^[4-6], 性激素水平异常^[7-8]。雄激素物质长期暴露则可诱导雄激素受体基因 AR 的表达, 如 Sone 等^[9]用群伯龙(17 β -trenbolone, TB)对食蚊鱼进行暴露, 证明雄激素群伯龙也可以使雌性食蚊鱼的臀鳍延长, 并成功克隆了雄激素受体 AR 基因。

据研究发现, 广东省四会市受竹子制浆造纸废水污染的邓村河道中食蚊鱼的种群、个体和组织发生了改变, 表明该区域河流可能受到竹子制浆造纸废水中有毒有机物的污染, 对当地生态环境造成潜在影响^[10]。但是目前有关邓村中类雄激素物质污染程度的监测和生物效应方面的研究尚属空白。鉴于目前水环境中雌/雄激素物质污染可能造成对水生动物种群及人类生存的高危性, 及时开展对本地区城市污水排放可能导致当地水环境雌/雄激素物质污染的研究十分迫切。

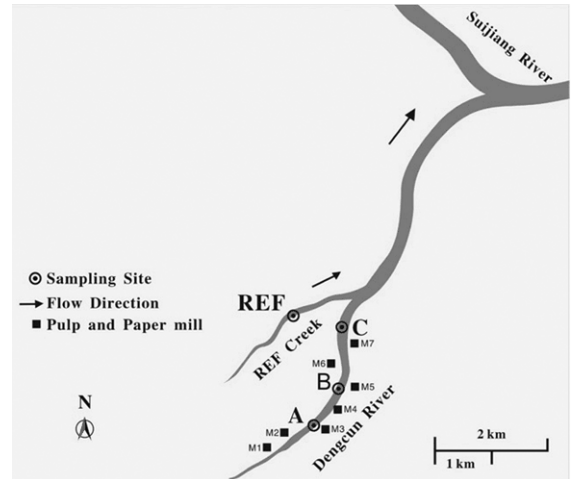
本课题选取受造纸废水污染的邓村河流为研究对象, 通过废水对西部食蚊鱼(*Gambusia affinis*)毒性影响的监测, 研究受污染的水环境中存在的雌、雄激素活体生物效应。使用受试实验鱼 VTG α 、ER α 和 AR α mRNA 等与激素效应相关的目标基因转录水平作为生物标志物, 对生活在富含废水河流中的食蚊鱼所受内分泌干扰的生物效应进行评价。

1 材料与方法

1.1 采样点

本研究选取了 REF、A、B、C 等 4 个采样点, A、B、C 采样点分别位于邓村造纸作坊的下游, 对照点(REF)为不受造纸废水污染的地点。调查区域为受竹子制浆造纸废水污染的广东省四会市邓村河(见图 1)。调查区域段的邓村河沿岸有 7 家造纸作坊(造纸作坊 M1 与 M2、M3 与 M4、M4 与 M5 均相距约 400 m, M2 与 M3、M5 与 M6、M6 与 M7 分别相距约 800、500、300 m)。该地造纸作坊均为民间造纸作坊, 均以竹子为原料, 采用“小苏打浸泡法”制浆, 每个作坊的纸产品产量约为 5 t \cdot a⁻¹。造纸废水主要为碎竹和洗浆过程中产生的废水, 并未经过现代的水处理技术系统进行处理, 废

水只经过滤简单处理即直接排入邓村河, 废水的排放量约为 40 m³·d⁻¹。采样地点如图 1 所示。按照《国家地表水标准 3838-2002》的指标, 研究位点的水质参数包括 pH、电导率、溶解氧、水温和水质等多个指标(见表 1)。



REF 点为不受造纸废水污染的对照位点; A、B、C 为受造纸废水污染的邓村河流上的采样位点, M1、M2...M7 为位于邓村河流上的造纸作坊; “→”为河流的水流方向

REF represents the control site; A, B and C represent the sampling sites in the polluted Dengcun River from paper-making wastewater, and M1, M2...M7 mean the location of the paper maker; “→” means water flow direction

图 1 四会市邓村河各采样位点^[10]

Figure 1 Location of the sampling sites on the Dengcun River, Sihui city

1.2 实验动物

1.2.1 实验鱼采集 实验鱼用大型密集型水族网(网孔尺寸约为 10 mm)进行捕捞, 每个位点采集目大于 500 条, 采集时间为 2009 年 8 月。每个塑料桶盛装 10 L 原采样点的河水, 用吉印双孔充电气泵(功率为 15 W)进行充氧, 并在桶中放入适量的蜈蚣草(学名 *Eremochloa ciliaris*), 以降低运程中水的冲力, 减少食蚊鱼在运输过程中造成的损伤, 食蚊鱼和水样于当日运回实验室进行各组实验。

1.2.2 实验鱼性别鉴定 食蚊鱼雌雄鉴别及其性成熟的鉴定方法参照 Leusch^[11]的描述: A. 未成年雄性, 体长<20 mm, 臀鳍的第 3 鳍条长度有延长, 基部宽度加宽, 但是生殖足尚未发育完全; B. 成年雄性, 体长 \geq 20 mm, 鳍条生殖足端部出现钩; C. 未成年雌性, 体长<20 mm, 第 3 鳍条长度未见加长, 基部宽度未见加宽; D. 成年雌性, 体长 \geq 20 mm, 第 3 鳍条长度未见加长, 基部宽度未见加宽; E. 怀

孕雌鱼,通过腹部下端所出现的黑色孕斑来识别。

1.2.3 实验鱼取样 分别筛选成年雄性食蚊鱼和成年雌性食蚊鱼,设定各试验组,并在当天解剖提取样品鱼的目标器官(肝脏、臀鳍)装入有标签的离心管,迅速放入液氮中速冻后统一转入 -80°C 超低温冰箱中暂存,直至RNA提取试验。提取肝脏RNA时每组实验至少取出9条食蚊鱼,每3条食蚊鱼肝脏合装一个离心管;提取臀鳍RNA时每组至少取12条食蚊鱼,每4条食蚊鱼臀鳍合装一个离心管。

1.3 仪器与试剂

仪器:低温高速离心机(Sigma,德国)、超低温冰箱(Revco,美国)、Nanodrap-1000型分光光度计(Thermo Fisher Scientific,美国)、PCR仪

(Bio-rad,美国)、7500 Quantitative Realtime-PCR仪(ABI,美国)、水平电泳仪(北京六一)。试剂:RNAiso Plus(TaKaRa公司)、DNase/RNase-Free ddH₂O(TIANGEN公司)、TaKaRa FirstStrand cDNA Synthesis Kit(TaKaRa公司)、SYBRPremix Ex Taq Kit(TaKaRa公司)。其他生化试剂均为符合实验规格要求国产试剂。

1.4 实验方法

引物设计:登录NCBI网站,找到西部食蚊鱼(*Gambusia affinis*)的VTGa、ERa、ARa cDNA的序列,利用Primer 3软件(<http://frodo.-wit.Edu/>),由生物工程(上海)公司合成需要的引物。本研究相关基因扩增引物名称及其序列见表3。

表1 采样点水质的理化指标及国家地表水的基本项目指标^[10]

Table 1 Water quality parameters of the Dengcun River and reference river population survey sites

采样点 Sampling site	REF	A	B	C
位置 (GPS) Location	N23°32' 75' E112°58' 05'	N23°31' 10' E112°58' 23'	N23°31' 57' E112°58' 60'	N23°32' 46' E112°58' 68'
水温/ $^{\circ}\text{C}$ Water temperature	24.5±0.1	24.3±0.2	24.1±0.3	24.2±0.2
电导性/ $\mu\text{s}\cdot\text{cm}^{-1}$ Electric conductivity	114.6±2.7	163.8±0.1	150.9±0.1	156.5±0.1
pH	7.9±0.2	7.6±0.1	7.8±0.1	7.5±0.1
溶解氧/ $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ DO	1.8±0.1	1.1±0.3	1.4±0.2	1.3±0.1
高锰酸盐指数 Permanganate index	2	2	3	3
化学需氧量(COD)	16	18	20	25
五日生化需氧量(BOD5)	3	3	4	6
氨氮($\text{NH}_3\text{-N}$)	0.16	1.2	1.5	1.8
总磷(以P计) TP	0.05	0.3	0.4	0.45
总氮(湖、库,以N计) Total N	0.1	1.2	1.3	1.5
铜 Cu				
锌 Zn	0.01	0.01	0.02	0.01
氟化物(以F ⁻ 计) Fluoride(calculated by F ⁻)	0.06	0.05	0.04	0.05
硒 Se	0.8	0.7	0.7	0.6
砷 As	0.05	0.06	0.04	0.05
汞 Hg	0.02	0.03	0.02	0.01
镉 Cd	≤0.00005	≤0.00005	≤0.00005	≤0.00005
铬(六价) Cr	≤0.001	≤0.001	≤0.001	≤0.001
铅 Pb	0.004	0.005	0.003	0.002
氰化物 Cyanide	0.004	0.003	0.002	0.004
挥发酚 Volatile penol	0.003	0.002	0.001	0.003
石油类 Petroleum	0.001	0.001	0.001	0.002
硫化物 Slufide	0.030.03	0.020.04	0.020.03	0.030.02
粪大肠菌群/个 $\cdot\text{L}^{-1}$ Fecal coliform	150	170	160	175

注:数据用“平均数±标准差”的形式表示。Note: the data in the table are showed as “mean±SD”.

RNA制备与总RNA提取:将肝组织匀浆,臀鳍条则研磨成粉末,分别加入约1 mL的IsoplusRNA(RNAiso Plus)提取液(Takara)进行总RNA提取。

RNA提取后进行基因组DNA的去除,并检测RNA浓度及其完整性,保证 A_{260}/A_{280} 的比值在1.8~2.0(TakaRa)。

RNA 反转录成 cDNA: 使用 TakaRa Code: DRR037 PrimeScriptTMRT reagents Kit (Perfect RealTime) 产品。RT 反应液配置如下: 5× PrimeScriptBuffer (2 μL), PrimeScript PT Enzyme Mix I (0.5 μL), Random 6 mers (100 μmol·L⁻¹, 0.5 μL), Oligo dTPrimer (50 μmol·L⁻¹, 0.5 μL), Total RNA (1 μL), Rnase-free dH₂O (5.5 μL), 总共 10 μL。反转录反应条件如下: 37℃ 15 min -cDNA 合成), 85℃ 5 s (酶失活)。

实时荧光定量: 使用 TakaRa Code: DRR081-ASYBR®Premix Ex Taq™ II (2×)10.0 μL, 正反向引物(10 μmol·L⁻¹)各 0.8 μL, ROX References Dye I (50 ×) or ROX References Dye II (50 ×) 0.4 μL, cDNA 模板 2.0 μL, H₂O(灭菌)6.0 μL, 总共 20.0 μL。按照两步法 PCR 扩增标准程序进行 RT-PCR 反应。

表 2 食蚊鱼雌激素效应相关基因扩增引物名称及其序列
Table 2 DNA sequences of primers used to isolate AR and Vtg partial cDNA fragments and quantify their relative expression in Western mosquitofish. All DNA sequences are presented in the 5' to 3' direction

Gene Name		Sequence
AB181835	F	5'-gaaaacgggtgcctacatccaa-3'
<i>VTGα</i>	R	5'-aacctccatctccaatctctcaac-3'
AB295655	F	5'-caactctgtgctgtttcttct-3'
<i>ARα</i>	R	5'-atgtactgagcagcagcgaag-3'
AB182330	F	5'-caccttctacaatgagctccgt-3'
<i>β-actin</i>	R	5'-gcaggagtgtgaaggctctcaa-3'

RT-PCR 扩增结果数据的处理采用相对定量法, 内参基因选用 *β-actin*。通过标准曲线对对照样品、待测样品的目的基因及管家基因进行定量, 然后根据计算公式求得相对值即为相对表达量。校正值=目的基因定量结果/管家基因定量结果; 相对值=待测样品的校正值/对照样品的校正值。

1.5 数据统计与处理

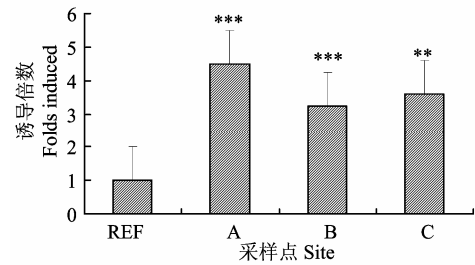
使用 SPSS16.0 统计软件对所得数据进行统计学分析。采用单因素方差分析(One way-ANOVA)法对数据进行差异性分析。用 Excel 2003 做柱形图。设置 $P < 0.05$ 时, 表示差异显著; 当 $P < 0.01$ 时, 表示差异极其显著。

2 结果与分析

2.1 RNA 完整性检验

经过 RNase-free 的 DNase 处理, RNA 经电泳凝胶成像系统下拍照, 可见条带 28S rRNA、18S rRNA 清晰, 且没有出现拖带, 表明 RNA 没有降解,

可继续下一步实验。对所用引物的合理性进行检验, 发现所有的引物都只出现一个单峰, 而且出现单峰位置的温度与引物设计时计算的 T_m 值相对应。证明引物是合理有效的。



所得数据用算术平均值±标准差表示, 分别以“*”表示差异显著, $P < 0.05$; “***”表示差异极显著, $P < 0.01$ 。下同

The data in the figure are the values of mean±SD. “*” means significant difference at the 0.05 level, and “***” represents significant difference at the 0.01 level. The same below
图 2 邓村河各采样点所采集的雌性食蚊鱼臀鳍中 *ARα* mRNA 转录水平

Figure 2 Quantitative real-time PCR analysis of *ARα* mRNA expression in the anal fin of adult female mosquitofish in different sampling sites from Dengcun River

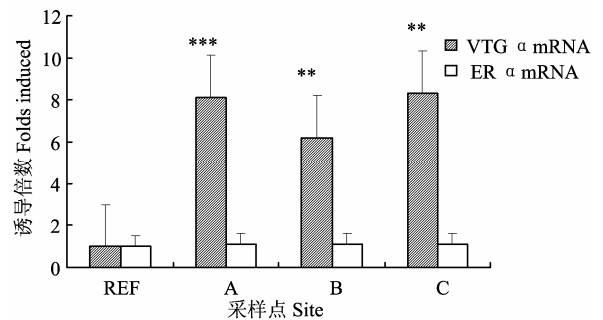


图 3 邓村河各采样点所采集的雄性食蚊鱼肝脏中 *VTGα* mRNA、*ERα* mRNA 表达水平

Figure 3 Quantitative real-time PCR analysis of *VTGα* mRNA expression in the liver of adult male mosquitofish in different sampling sites from Dengcun River

2.2 雌鱼臀鳍 *ARα* mRNA 转录水平的变化

图 2 示邓村河各采样点采集的雌性食蚊鱼臀鳍中的雄激素受体 *ARα* mRNA 转录水平的与 REF 位点的相对倍数。造纸废水暴露位点 A、B、C 中雌性食蚊鱼臀鳍中的雄激素受体 *ARα* mRNA 转录水平均比对照点显著升高 ($P < 0.05$)。其中, A 点为 REF 点的 4.51 倍, $P < 0.05$; B 点为 REF 点的 3.31 倍, $P < 0.05$; C 点为 REF 点的 3.63 倍, $P < 0.05$ 。

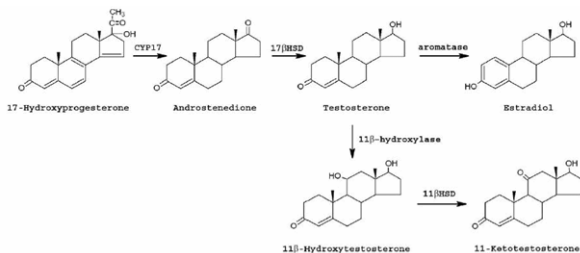
图 3 示邓村河各采样点采集的雄性食蚊鱼肝脏中的 VTG 受体 *VTGα* mRNA 转录水平的与 REF 位

点的相对倍数。造纸废水暴露位点 A、B、C 中雌性食蚊鱼肝脏中的 VTG 受体 *VTG α* mRNA 转录水平均比对照点显著升高 ($P<0.05$)。其中, A 点为 REF 点的 8.12 倍, $P<0.05$; B 点为 REF 点 6.21 倍, $P<0.05$; C 点为 REF 点 8.33 倍, $P<0.05$ 。ER α mRNA 各点变化不明显 ($P<0.05$)。

3 讨论

3.1 雄激素效应

研究表明, 环境中的化合物可通过以下两个途径引起生物的雄性化: 化合物直接作用于雄激素受体 AR, 诱发其产生系列的生理变化; 化合物影响生物体内雄激素合成, 从而引起雄性化。Kiyooki 等^[12]研究发现, 雌性食蚊鱼臀鳍中的雄激素受体 *AR α* mRNA 的转录水平与雄激素物质的含量之间具有较好的剂量效应关系, 造纸废水中食蚊鱼的雄性化可能通过配体结合的方式进行, 废水中可能存在着大量的环境雄激素物质, 这些化合物直接作用于雌性食蚊鱼臀鳍的 AR 受体, 从而引起了其臀鳍的延长, 表现出雄鱼的第二性征。此外, Yukiko^[13]还研究发现, 食蚊鱼臀鳍中的 *AR α* 、*AR β* 、*Shh* 和 *Ptcl* 基因对食蚊鱼臀鳍的延长起着重要的作用。经雄激素暴露后, 这几个基因的表达量都显著升高。



CYP17=17-hydroxylase cytochrome P450; HSD= hydroxysteroid dehydrogenase

图 4 鱼类激素代谢途径^[18]

Figure 4 Steroid metabolism pathway in teleosts

作者前期的研究工作^[10]已从形态水平评价造纸废水对食蚊鱼的雄激素效应, 本文则选取雌性食蚊鱼臀鳍中雄激素受体 *AR α* 的转录水平作为生物标志物, 在分子水平上进一步评价造纸废水各处采样点雌性食蚊鱼的雄激素效应。本研究的结果显示, 邓村河中各个采样点采集的雌性食蚊鱼样本臀鳍组织中 *AR α* mRNA 的表达规律与前期的研究结果^[10]所述形态水平变化的规律一致, 进一步证实邓村造纸废水中存在的某些化合物具有雄激素配体的结构, 直接与食蚊鱼的臀鳍中 AR 进行结合, 诱导其

发生表达, 从而引起了雌性食蚊鱼臀鳍的延长。植物甾醇素存在于用木材或其它植物做造纸制浆原材料的废水中。因此, 植物甾醇素被怀疑是造纸废水导致内分泌干扰的主要原因。植物甾醇素在细菌的分解下生成了 AED 和 ADD, 此两种化合物具有雄激素效应, 食蚊鱼臀鳍的延长与这两种化合物密切相关^[14-16]。Jenkins^[17]用化学分析的方法在造纸废水中检测到 AED 和 ADD 两种化合物, 进一步证实了它们有可能是造纸废水具雄激素作用的主要诱因。图 4 所示的是 AED 与其他激素的代谢关系图, AED 可以进一步芳香化为雌激素雌二醇, 也可以水解为雄激素 KT, 因此, 在生物体内可引起雌激素或雄激素复杂的效应。关于 AED 是否是导致造纸废水中食蚊鱼内分泌受到干扰的主要原因还有待进一步的研究。

本研究结果发现, 造纸废水中雌性食蚊鱼的臀鳍 *AR α* mRNA 表达量比对照点的显著升高, 提示造纸废水中可能存在雄激素物质, 与食蚊鱼臀鳍的受体相结合, 引起其 mRNA 表达量的上升。可见食蚊鱼臀鳍的延长可作为检测水环境受雄激素污染的生物标志物。

3.2 雌激素效应

VTG 是一种存在于雌性脊椎动物体内的蛋白质, 是卵黄蛋白形成的前体物质, 在正常的雄性动物或者幼年的雌性动物体内几乎是不存在的, 因此检测环境中雄鱼血液及肝脏中 VTG 含量, 或者 *VTG* mRNA 的存在能够证明环境中存在雌激素物质。更重要的是这二者之间还有可靠的剂量效应关系。*VTG* mRNA 的出现比 VTG 出现更早, 而且与环境中雌激素类物质之间的剂量效应关系也越好。除了对组织、血浆中 VTG 水平可以进行直接定量分析外, 对肝脏中 *VTG* mRNA 表达的分析可能是一种更有前途的 VTG 定量技术。这是由于 *VTG* mRNA 表达相对于血浆中出现 VTG 蛋白而言, 它的反应时间更短, 同时分子生物学试验相对于生化试验来说, 灵敏度进一步提高。目前已经有许多研究人员用不同鱼种的 VTG 作为生物标志物对环境雌激素效应进行检测^[19-21], 也有一些研究者用 *VTG* mRNA 做为生物标志物研究化合物或环境的雌激素效应^[22-24]。

在本研究中, 造纸废水排放口下游的所有采样点的雌性食蚊鱼肝脏的 *VTG α* 转录水平较之选取的对照点都呈显著升高。这表明造纸废水水环境与对照点相比出现不同程度的雌激素效应, 同时也说明 *VTG α* 转录水平具有较高的灵敏度。在邓村河选取的 5 处采样点中, 造纸废水暴露位点 A、B、C 中

雄性食蚊鱼肝脏中的 VTG 受体 *VTG α* mRNA 转录水平平均比对照点显著升高。其中, A 点为 REF 点的 8.12 倍; B 点为 REF 点的 6.21 倍; C 点为 REF 点的 8.33 倍。揭示在这些位点的河水中含有大量的雌激素类物质, 此类物质能诱导长期生活于该河流中的雄性食蚊鱼肝脏中大量转录 *VTG α* mRNA 进而形成 VTG, 导致雌激素效应。ER α M μ ag 各点变化不明显, 本研究结果表明只能用它的数值来说明雌激素效应, 适合结合 *VTG α* mRNA 一起作为一个参考数据。研究表明, 不同类型的造纸废水对水生生物 VTG 的影响不一样, 这与废水中的成分和所暴露鱼种类密切相关^[25-26]。造纸废水中存在的类雄激素物质在水环境中很容易被转化为雌激素物质, 从而引起了鱼类类似雌激素作用的效应, 诱发雄鱼 VTG 的表达^[27]。

造纸废水对鱼类 VTG 的影响的机理尚不明确。国外学者对造纸废水中大量存在的植物甾醇 (Phytosterols) 进行了研究, 并主要集中于谷甾醇 (sitosterol) 和豆甾烯醇 (stigmastanol) 这两种化合物上。有人用豆甾烯醇对虹鳟鱼进行室内暴露实验发现, 子代虹鳟鱼的性别比例发生了改变, 雌性虹鳟鱼出现了雄性虹鳟鱼的第二性征, VTG 的表达也发生了诱导。研究表明, 谷甾醇转化为雄烯二酮, 而雄烯二酮同时具有雌激素效应和雄激素效应(图 5)。造纸废水引起的内分泌干扰效应的机理相当复杂, 显示出雄激素效应, 雌激素效应和抗雌激素效应, 且这几种效应还可能同时存在。这些效应与造纸厂所采取的工艺、造纸废水中生物暴露的浓度、鱼种类密切相关^[28]。

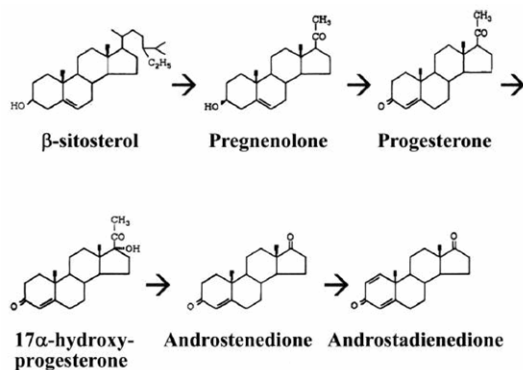


图 5 造纸废水中植物甾醇素、孕激素、雄激素可能的转换途径^[28]

Figure 5 Proposed pathway for bioconversion of sitosterol and progesterone to androgens in paper mill effluent

3.3 邓村河水体的雌/雄激素物质检测

本研究组对受造纸废水污染的广东四会邓村河

水体中存在的类雌/雄激素物质的数量和种类进行监测, 以确定造成生活在邓村河水域的食蚊鱼发生性逆转的目标化合物^[29]。采用 LC-MS/MS 方法, 于 2011 年夏季对邓村河设置包括对照点在内的 4 个检测点, 对水体中的 5 种雌激素物质和 10 种雄激素物质的含量作了定量检测。结果显示, 雌激素物质中雌二醇 (17 α -estradiol, E2)、雌三醇 (estriol, E3)、炔雌醇 (17 β -ethinylestradiol, EE2) 和己烯雌酚 (diethylstilbestrol, DES) 在各检测点均未检出, 仅检出雌酮 (estrone, E1) 1.97~5.09 ng·L⁻¹; 雄激素类物质中 1,4 雄烯二酮 (androstadienedione, ADD)、17 α -勃酮 (17 α -boldenone)、17 β -勃酮 (17 β -boldenon)、雄烯二酮 (androstenedione, AED)、睾酮 (testosterone)、炔诺孕酮 (norgestrel)、反式雄酮 (epi-androsterone)、雄酮 (androsterone)、孕酮 (progesterone)、羟甲雄烷吡唑 (stanozolol) 均有检出, 其含量分别为 13.47~30.46、1.50~3.69、1.50~3.69、1.89~6.77、0.89~1.43、1.97~2.57、6.29~18.93、3.58~12.05、1.42~2.86、0.69~0.70 ng·L⁻¹。各采样点被检出的雌/雄激素物质含量均高于对照点 (REF) 的含量, 其中 E1 在各个点都有检出, 最高含量为 5.29 ng·L⁻¹; 采样点 A 的 ADD、AED 和 Progesterone 含量最高, 分别为 30.46、6.77、2.86 ng·L⁻¹。结果表明, 邓村河水主要被 E1、ADD、AED 和 Progesterone 污染, 在引起该水域生活的食蚊鱼雌/雄激素生物效应中起到重要作用。

参考文献:

- [1] Orn S, Svenson A, Viktor T, et al. Male-biased sex ratios and vitellogenin induction in Zebrafish exposed to effluent water from a Swedish pulp mill[J]. Archives of Environmental Contamination and Toxicology, 2006, 51(3): 445-451.
- [2] Jenkins R, Angus R A, Natt H M, et al. Identification of androstenedione in a river containing paper mill effluent[J]. Environmental Toxicology and Chemistry, 2001, 20(6): 1325-1331.
- [3] Jobling S, Nolan M, Tyler C R, et al. Widespread sexual disruption in wild fish [J]. Environmental Science & Technology, 1998, 32(17): 2498-2506.
- [4] Folmar L C, Denslow N D, Rao V, et al. Vitellogenin induction and reduced serum testosterone concentrations in feral male carp (*Cyprinus carpio*) captured near a major metropolitan sewage treatment plant [J]. Environmental Health Perspectives, 1996, 104(10): 1096-1101.
- [5] Tyler C R, Routledge E J. Oestrogenic effects in fish in English rivers with evidence of their causation [J]. Pure and Applied Chemistry, 1998, 70(9): 1795-1804.
- [6] Ma T, Wan X, Huang Q, et al. Biomarker responses and reproductive toxicity of the effluent from a Chinese large

- sewage treatment plant in Japanese medaka (*Oryzias latipes*)[J]. Chemosphere, 2005, 59: 281-288.
- [7] Rempela M A, Reyes J, Steinert S, et al. Evaluation of relationships between reproductive metrics, gender and vitellogenin expression in demersal flatfish collected near the municipal wastewater outfall of Orange County, California, USA [J]. Aquatic Toxicology, 2006, 77: 241-249.
- [8] Sole M, Raldua D, Piferrer F, et al. Feminization of wild carp, *Cyprinus carpio*, in a polluted environment: plasma steroid hormones, gonadal morphology and xenobiotic metabolizing system[J]. Comparative Biochemistry Physiology Part C: Toxicology and Pharmacology, 2003, 136(2): 145-156.
- [9] Sone K, Hinago M, Itamoto M, et al. Effects of an androgenic growth promoter 17 β -trenbolone on masculinization of Mosquitofish (*Gambusia affinis affinis*) [J]. General and Comparative Endocrinology, 2005, 143(2): 151-160.
- [10] Hou L P, Xie Y P, Ying G G, et al. Developmental and reproductive characteristics of western mosquitofish (*Gambusia affinis*) exposed to paper mill effluent in the Dengcun River, Sihui[J], South China[J]. Aquatic Toxicology, 2011, 103(3/4): 140-149.
- [11] Leusch F D L, Vanden Heuvel M R, Laurie A D, et al. Quantification of vitellogenin mRNA induction in mosquitofish (*Gambusia affinis*) by reverse transcription real-time polymerase chain reaction (RT-PCR) [J]. Biomarkers, 2005, 10(6): 429-438.
- [12] Sone K, Hinago M, Itamoto M, et al. Effects of an androgenic growth promoter 17 β -trenbolone on masculinization of Mosquitofish (*Gambusia affinis affinis*) [J] General and Comparative Endocrinology, 2005, 143: 151-160.
- [13] Ogino Y, Katoh H, Yamada G. Androgen dependent development of a modified anal fin, gonopodium, as a model to understand the mechanism of secondary sexual character expression in vertebrates[J]. FEBS Letters, 2004, 575: 119-126.
- [14] Marsheck W J, Kraychy S, Muir R D. Microbial degradation of sterols[J]. Appl Microbiol, 1972, 23: 72-77.
- [15] Conner A H, Nagaoka M, Rowe J W, et al. Microbial conversion of tall oilsterols to C19 steroids[J]. Appl Environ Microbiol, 1976, 32(2): 310-311.
- [16] Denton T E, Howell W M, Allison J J, et al. Masculinization of female mosquitofish by exposure to plant sterols and Mycobacterium smegmatis[J]. Bull Environ Contam Toxicol, 1985, 35: 627-632.
- [17] Jenkins R, Angus R A, McNatt H, et al. Identification of androstenedione in a river containing paper mill effluent[J]. Environ Toxicol Chem, 2001, 20: 1325-1331.
- [18] Stanko J P, and Angus R A. In vivo assessment of the capacity of androstenedione to masculinize female mosquitofish (*Gambusia affinis*) exposed through dietary and static reewal methods[J]. Environmental Toxicology and Chemistry, 2007, 26(5): 920-926.
- [19] Porter C M, Janz D M. Treated municipal sewage discharge affects multiple levels of biological organization in fish [J]. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2003, 54: 199-206.
- [20] Purdom C E, Hardiman P A, Bye V J, et al. Estrogenic effects of effluent from sewage treatment works [J]. Chemistry and Ecology, 1994(8): 275-285.
- [21] Lye C M, Frid C L J, Gill M E, et al. Abnormalities in the reproductive health of flounder *Platichthys flesus* exposed to effluent from a sewage treatment works [J]. Marine Pollution Bulletin, 1997, 34: 34-41.
- [22] Huang Y, Ren H, Sun Z Y, et al. Vitellogenin mRNA expression in male Zebrafish (*Danio rerio*) induced by Nonylphe-nol and Bisphenol-A [J]. Asian Journal of Ecotoxicology, 2008, 3(3): 274-279.
- [23] Augustine A, Kjersti R. Molecular and cellular detection of expression of vitellogenin and zona radiata protein in liver and skin of juvenile salmon (*Salmo salar*) exposed to nonyl-phenol[J]. Cell Tissue Research, 2008, 331: 701-712.
- [24] Han J, Fang Z. Estrogenic effects, reproductive impairment and developmental toxicity in the ovoviparous swordtail fish(*Xiphophorus hellerii*) exposed to perfluorooctane sulfonate(PFOS) [J]. Aquatic Toxicology, 2010, 99(2): 281-290.
- [25] Van Der Kraak G J, Munkittrick K R, et al. Exposure to bleached kraft pulp mill effluent disrupts the pituitary-gonadal axis of white sucker at multiple sites[J]. Toxicol Appl Pharmacol, 1992, 115: 224-233.
- [26] Sherry J, Gamble A, Fielden M, et al. An ELISA for brown trout (*Salmo trutta*) vitellogenin and its use in bioassays for environmental strogens[J]. Sci Total Environ, 1999, 225: 13-31.
- [27] Orlando E F, Davis W P, Guillette L J. Aromatase activity in the ovary and brain of the easter nmosquitofish (*Gambusia holbrooki*) exposed to papermill effluent[J]. Environ Health Perspect, 2002, 110: 429-433.
- [28] Roy P K, Khan A W, Basu S K. Transformation of sitosterol to androsta-1, 4-diene-3,17-dione by immobilized Mycobacterium cells[J]. Indian J Biochem Biophys, 1991, 28: 150-154.
- [29] 侯丽萍, 刘珊, 方展强, 等. 广东四会邓村水体中雌/雄激素物质的含量及分布[J]. 农业环境科学学报, 2013, 32(1): 135-140.