

赣江赣州段水体有机提取物的雌激素活性观察

胡恭华¹, 李锋¹, 李思思¹, 熊跃玲¹, 黄海燕², 庄志雄²

(1. 赣南医学院预防医学系, 江西 赣州 341000 2 深圳市疾病预防控制中心, 广东 深圳 518020)

摘要: 目的 了解赣江水体环境内分泌干扰物的污染状况, 从而为赣江水体污染的防治提供科学的依据。方法 分别于丰水期及枯水期从赣江赣州段的上游、中游和下游各3个断面的水体采集水样, 采用XAD-2大孔树脂对水样中的有机物进行浓缩提取, 然后利用人乳腺癌MCF-7细胞增殖实验检测有机提取物的雌激素活性。结果 各水样有机提取物均显示出雌激素活性, 其中上游高于下游, 江边高于江心, 丰水期高于枯水期。结论 赣江水体已受到环境内分泌干扰物的污染, 制定相应的防治对策已刻不容缓。

关键词: 环境内分泌干扰物; MCF-7细胞增殖实验; 赣江

中图分类号: R123.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1002-221X(2009)03-0184-04

Survey on the estrogen activity in organic extracts of water body from the Ganzhou reach of Ganjiang River
HU Gong-hua, LI Feng, LI Si-si, XIONG Yue-ling, HUANG Hai-yan², ZHUANG Zhi-xiong²

(1. Department of Preventive Medicine, Gannan Medical College, Ganzhou 341000 China; 2. Shenzhen Municipal Center for Disease Control and Prevention, Shenzhen 518020 China)

Abstract Objective To comprehend the pollution status by endocrine disrupting chemicals in Ganjiang River, thereby provide a scientific basis for the prevention and control of the pollution in Ganzhou River. Methods Water samples were collected at three sites located at the upstream, midstream and downstream from the Ganzhou reach of Ganjiang River in high and low-water season respectively. The organic substances were extracted, separated and condensed by macroporous resin XAD-2, then measure the activity of estrogen using cell proliferation assay in MCF-7 cells. Results The estrogen were found in all the water samples from the Ganzhou reach of Ganjiang River, the activity was higher in the midstream and upstream than in the downstream, which were higher in river side and high-water season than that in the river center and low-water season, respectively. Conclusions The results suggested that the water body in Ganjiang River has been polluted by endocrine disrupting chemicals, and it should be quite urgent formaking a corresponding prevention and control strategy.

Key words: Endocrine disrupting chemicals; MCF-7 cell proliferation assay; Ganjiang River

环境内分泌干扰物(endocrine disrupting chemicals, EDCs)又称环境荷尔蒙或环境激素, 是指一类能够干扰体内正常激素的合成、贮存、分泌、运输、结合以及清除等过程, 从而激活或抑制内分泌系统的功能, 并对个体或子代的健康造成危害的环境化学物质。目前, EDC被认为是继臭氧层空洞和地球变暖之后又一新的地球环境污染问题, 其所引起的环境与健康问题已经引起国际环境保护组织、各国政府和民众的高度关注, 并成为生态学、毒理学和流行病学研究的热点^[1,2]。EDCs广泛存在于环境尤其是水环境当中, 因而成为水环境污染的一个重要方面。EDCs直接或间接进入水环境会导致人和动物正常激素功能和生理状况的改变^[3]。虽然水体中EDCs多为纳克或微克级物质, 浓度很低, 但是其对人类及生物乃至他

们后代的内分泌系统的影响却是潜在和显著的, 即使在“可接受”的低浓度下, 这些化合物仍可对各生态系统造成显著影响^[4]。据报道, 世界上许多国家和地区的水体如欧洲的北海、易北河及其支流^[5]、韩国的蔚山海湾^[6]、美国的路易安娜州庞恰特雷恩湖和密西西比河^[7]等均检测出多种EDCs。我国的部分海域^[8]、珠江三角洲水系^[9]以及长江、嘉陵江流域^[10,11]等也发现了EDCs。因此, 本研究采用人类乳腺癌MCF-7细胞增殖实验对赣江水体中有机提取物的雌激素活性进行检测, 旨在了解赣江水体赣州段环境内分泌干扰物的污染状况及其分布特征。

1 材料和方法

1.1 试剂与仪器

1.1.1 主要试剂 DMEM培养基(美国GIBCO公司), 胰蛋白酶(美国AMRESCO公司), 小牛血清(杭州四季青), 二甲基亚砜(DMSO)、噻唑蓝(MTT)、17 β -雌二醇、青霉素和链霉素(美国Sigma公司), 葡聚糖4万(北京化学试剂公司)。其他试

收稿日期: 2008-11-17 修回日期: 2009-02-01

基金项目: 江西省教育厅科学技术研究项目(No.赣教技字[2007]302号)

作者简介: 胡恭华(1972-), 男, 副教授, 硕士, 主要从事环境医学及毒理学研究。

© 1994-2017 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. <http://www.cnki.net>

剂均为国产分析纯。

1.1.2 主要仪器 BP1211 S型电子天平（德国赛多利斯有限公司），HF212 uv型 CO₂恒温培养箱和 HF safe-1200型生物安全柜（上海力申科学仪器公司），XDS1B型倒置生物显微镜（重庆光学仪器厂），TDL5-A型低速离心机（上海安亭科学仪器厂），安伯莱特 XAD-2大孔树脂（美国 SigmaAldrich公司），MilliQ Bioco型超纯水系统装置（法国 MILLIPORE公司），HVE-50高压灭菌器（日本 HIRAYAMA公司），SUT-6120热空气消毒箱（德国 Heraeus公司），MM-I型微量振荡器（上海精科实业有限公司），Power wave型酶标仪（美国 BD-TEK公司）。

1.1.3 细胞 人乳腺癌 MCF-7细胞由深圳市疾病预防控制中心毒理学研究室惠赠。

1.2 方法

1.2.1 水样采集 采样断面和采样点的选择参照有关水体污染的监测方案，分别在赣江赣州段的上游、中游和下游确定3个采样断面为调查现场。在各断面上分别于岸边及江心处设3个采样点，采样点水层深度设为水面以下0.5 m处。于2007年8月（丰水期，夏季）和2008年1月（枯水期，冬季）于各采样点上采集水样。比较各采样断面水样雌激素活性的纵向分布差异时，将同一采样断面各采样点水样混合成一个总水样；比较各水样雌激素活性的横向分布差异时，将江心处上、中、下各采样点的水样混成1个总水样，并将江边两侧上、中、下游各采样点的水样分别混成2个总水样。

1.2.2 水样处理 用XAD-2大孔树脂提取各水样中的有机污染物。将10 L各水样用装有4 g XAD-2树脂的玻璃柱（25 cm×1.5 cm）浓缩，过柱流速为15 ml/min。过柱前树脂需用有机溶剂清洗干净，吸附在树脂上的有机物用50 ml的30%甲醇丙酮洗脱液洗脱，洗脱液置于45℃水浴中挥干后，将残量用DMSO定容至1 ml（即使1 ml的DMSO溶解液所含的水样有机提取物相当于10 L原水样），过滤除菌后于-20℃保存备用^[12]。

1.2.3 去激素小牛血清的制备 在新生小牛血清中加入葡聚糖0.25 mg/ml，待其完全溶解后再加入活性炭2.5 mg/ml，在55℃的水浴中作用45 min，接着3 000 r/min离心10 min，取上清液。连续处理2次以除去小牛血清中的雌激素。处理之后的血清用金属过滤器（0.45 μm和0.22 μm两层滤膜）过滤除菌，最后于-20℃保存备用^[11]。

1.2.4 人乳腺癌 MCF-7细胞的培养 培养基采用含

10%小牛血清的DMEM并加入胰岛素（0.20 μg/ml）、青霉素（100×10³ U/L）和链霉素（100 mg/L）。将人乳腺癌MCF-7细胞用37℃、体积分数为5%的CO₂细胞培养箱培养。用含0.25%胰酶和0.02%EDTA的消化液消化细胞并传代，取对数生长期细胞进行实验。

1.2.5 人乳腺癌 MCF-7细胞增殖试验 将常规培养的人乳腺癌 MCF-7细胞转入去激素培养基（含10%经活性炭葡聚糖处理的小牛血清）中培养。待细胞生长至70%融合时，用0.25%胰酶（含0.02%EDTA）消化，之后用吸管吹打使之成单细胞悬液并调整细胞浓度为10⁴个/L，接种于96孔培养板中，置37℃、5%的CO₂培养箱中培养，培养48 h后，加入用培养液稀释的相当于原水25、50、100、200和400 ml等5个剂量的水样有机提取物，各剂量组所含的有机提取物依次为2.5、5、10、20和40 μl孔，以加入DMSO（0.1%）的无酚红DMEM培养液（内含10%经活性炭葡聚糖处理的小牛血清）为溶剂对照，另设10⁻⁸ mol/l的17-β雌二醇为阳性对照。使其终体积为200 μl继续培养。于第72小时各孔加入5 g/L的MTT液20 μl培养4 h弃去旧培养液。每孔加入150 μl的DMSO终止反应，室温下于微量振荡器上振荡10 min以溶解沉淀，然后用BIO-TEK酶标仪在492 nm处测定各孔的吸光度值（A值）。每种浓度各设6个平行样。实验数据分析采用增殖指数（proliferative index PI）表示促MCF-7乳腺癌细胞的增殖效应。PI=A/A₀（A₀实验组的吸光度值；A₀对照组的吸光度值）。

1.3 统计学分析

MTT实验所获得的PI以均值±标准差表示。实验数据使用SPSS14.0统计软件进行ANOVA方差分析。

2 结果

2.1 不同采样断面水样中有机提取物的雌激素活性分析

如表1所示，上游、中游和下游各采样断面的水样均检测到刺激人乳腺癌MCF-7细胞增殖的雌激素活性。在同一采样断面内，在25、50、100、200和400 ml原水量/200 μl培养液的有机提取物作用下，人乳腺癌MCF-7细胞增殖指数均具有随着有机提取物作用剂量的增加而升高的趋势，存在着一定的剂量反应关系。其中上游和中游水样有机提取物的雌激素活性明显地高于溶剂对照组，差别具有统计学意义（P<0.01），而对于下游水样，其有机提取物的雌激

素活性在 50、100、200 和 400 m^l原水量 /200 μ 培养液的剂量条件下, 明显高于溶剂对照组 ($P < 0.05$) 而在 25 m^l原水量 /200 μ 培养液的剂量条件下其差异则无统计学意义 ($P > 0.05$)。此外, 实验结果还显示, 各采样断面水样有机提取物的雌激素活性均显示出丰水期高于枯水期。

表 1 不同采样断面水样中有机提取物的雌激素活性检测结果
($\bar{x} \pm s$, n=6)

| 组别 | 剂量 (原水量 / 培养液体积) | MCF-7细胞增殖指数 | |
|----------------|-----------------------------|--------------|--------------|
| | | 丰水期 | 枯水期 |
| 溶剂对照 (DMSO) | | 1.00±0.00 | 1.00±0.00 |
| 上游采样断面水样 | 25 m ^l /200 μ l | 2.05±0.13** | 1.73±0.11** |
| | 50 m ^l /200 μ l | 2.53±0.16** | 1.96±0.25** |
| | 100 m ^l /200 μ l | 2.98±0.43** | 2.63±0.22** |
| | 200 m ^l /200 μ l | 4.52±0.19** | 3.92±0.18** |
| | 400 m ^l /200 μ l | 6.37±0.57** | 5.88±0.45** |
| 中游采样断面水样 | 25 m ^l /200 μ l | 1.87±0.12** | 1.62±0.17** |
| | 50 m ^l /200 μ l | 2.31±0.19** | 1.94±0.28** |
| | 100 m ^l /200 μ l | 2.53±0.31** | 2.44±0.16** |
| | 200 m ^l /200 μ l | 3.89±0.37** | 3.63±0.41** |
| | 400 m ^l /200 μ l | 5.82±0.47** | 5.61±0.55** |
| 下游采样断面水样 | 25 m ^l /200 μ l | 1.21±0.11 | 1.18±0.09 |
| | 50 m ^l /200 μ l | 1.42±0.41* | 1.39±0.28* |
| | 100 m ^l /200 μ l | 2.32±0.17** | 2.12±0.17** |
| | 200 m ^l /200 μ l | 3.48±0.16** | 3.35±0.25** |
| | 400 m ^l /200 μ l | 5.17±0.61** | 4.94±0.54** |
| 阳性对照 (17β 雌二醇) | | 12.79±0.99** | 12.79±0.99** |

与溶剂对照组相比较, * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$

2.2 不同采样点水样中有机提取物的雌激素活性分析

如表 2 所示, 无论是江心水样, 还是江边水样, 各剂量组 (25、50、100、200 和 400 m^l原水量 /200 μ 培养液) 水样有机提取物作用于 MCF-7 细胞后, 随着有机提取物剂量的增加, 各剂量组细胞的增殖指数也随之升高。其中江边处 (包括左侧和右侧) 上述各剂量组水样有机提取物的增殖指数明显高于溶剂对照组, 差异具有统计学意义 ($P < 0.01$); 江心处水样有机提取物的雌激素活性只在 100、200 和 400 m^l原水量 /200 μ 培养液等剂量组明显高于溶剂对照组 ($P < 0.05$), 而其在 25 和 50 m^l原水量 /200 μ 培养液剂量组中雌激素活性与溶剂对照组比较则差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。此外, 本实验结果也发现丰水期各采样点水样有机提取物的雌激素活性均高于枯水期。

表 2 不同采样点水样中有机提取物的雌激素活性检测结果

($\bar{x} \pm s$, n=6)

| 组别 | 剂量 (原水量 / 培养液体积) | MCF-7细胞增殖指数 | |
|----------------|-----------------------------|--------------|--------------|
| | | 丰水期 | 枯水期 |
| 溶剂对照 (DMSO) | | 1.00±0.00 | 1.00±0.00 |
| 江心采样点水样 | 25 m ^l /200 μ l | 1.12±0.17 | 1.03±0.11 |
| | 50 m ^l /200 μ l | 1.19±0.12 | 1.08±0.19 |
| | 100 m ^l /200 μ l | 1.54±0.31* | 1.43±0.17* |
| | 200 m ^l /200 μ l | 3.48±0.28** | 3.25±0.24** |
| | 400 m ^l /200 μ l | 4.16±0.32** | 3.51±0.19** |
| 左侧江边采样点水样 | 25 m ^l /200 μ l | 1.98±0.28** | 1.94±0.11** |
| | 50 m ^l /200 μ l | 2.51±0.34** | 2.17±0.28** |
| | 100 m ^l /200 μ l | 2.56±0.19** | 2.50±0.23** |
| | 200 m ^l /200 μ l | 4.05±0.41** | 3.86±0.38** |
| | 400 m ^l /200 μ l | 6.42±0.65** | 6.39±0.45** |
| 右侧江边采样点水样 | 25 m ^l /200 μ l | 2.09±0.18** | 1.84±0.15** |
| | 50 m ^l /200 μ l | 2.46±0.25** | 2.08±0.22** |
| | 100 m ^l /200 μ l | 3.98±0.36** | 2.72±0.24** |
| | 200 m ^l /200 μ l | 4.34±0.48** | 4.05±0.38** |
| | 400 m ^l /200 μ l | 7.05±0.61** | 6.93±0.67** |
| 阳性对照 (17β 雌二醇) | | 12.79±0.99** | 12.79±0.99** |

与溶剂对照组相比较, * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$

3 讨论

赣江是江西省的第一大河流, 流域面积为 83 500 平方公里, 占全省面积的 51%; 流域内现有人口 1 700 余万, 约占全省总人口的一半。因此, 了解赣江水体的 EDC 污染状况, 对于制定赣江水体 EDC 污染防治对策, 乃至促进沿江居民的健康水平有着重要的意义。

目前, 水体中 EDC 的检测方法众多, 有化学分析法 (如高效液相色谱法、气相色谱法和质谱法等) 和生物分析法等。但是, 化学分析法所检测到的阳性水样中可能含有多种环境雌激素物质, 其活性效应不一; 而人乳腺癌 MCF-7 细胞增殖实验作为一种生物学评价方法, 则可测定多种环境雌激素的综合活性效应。为此, 本研究采用了人乳腺癌 MCF-7 细胞增殖实验对赣江上游赣州段水体的类雌激素活性进行了检测。人乳腺癌 MCF-7 细胞增殖实验是一种评价雌激素活性较为敏感的方法^[13]。其基本原理主要基于血清中存在着一种能特异性抑制雌激素敏感细胞增殖的物质, 雌激素可以通过中和此物质, 特异地清除其抑制效应, 从而诱导细胞增殖; 通过比较细胞生长变化来检测和评价受试物的雌激素活性。该方法的优点是敏感性较高; 所用细胞来源于人, 排除了由动物实验外推到人的不确定性, 其结果能可靠地预测雌激素对人体健康的影响; 简单易行, 应用广泛, 可以检测多种外源性雌激素或具有雌激素活性的外源化合物。但其也具有一定的缺点, 如细胞培养实验条件要求较高, 培养基和血清都有特殊要求等。因此, 在本研究中为了避免人乳腺癌 MCF-7 细胞增殖实验的缺点, 在实验过程中严格控制实验条件, 合理选择培养基,

并将小牛血清用活性炭、葡聚糖进行了相应的去激素处理，消除了血源雌激素的影响，从而保证了研究结果的可靠性和准确性。

本实验结果发现，赣江（赣州段）上游、中游和下游各采样断面的水样均具有刺激人乳腺癌 MCF-7细胞增殖的雌激素活性。但各水样的雌激素活性在江面的纵向及横向分布上存在着差异，基本上呈现上游高于下游、江边高于江心的特征。上游水样雌激素活性高于下游主要是由于赣江是由流经赣州市区的章江和贡江汇合而成的，因此在赣江的上游水体吸纳了市区排污口所排出的工业废水和生活污水，此后经过一段距离的水体稀释和自净作用后，水体中 EDC 的浓度呈现逐渐降低的趋势。而江边水样的雌激素活性高于江心则是由于江边较之江心更易受到岸上各种 EDCs（工业、农业及生活废弃物等）的污染，以及流速慢、污染物不易稀释，从而在岸边形成较高浓度污染带的缘故。此外，本研究还发现，丰水期水样的雌激素活性高于枯水期；其原因可能是在丰水期雨水充足，将沿江两岸的有机污染物带入赣江水体，导致水体中有机污染物的浓度增加；或者与各种污染源的季节性排污的差异性有关。总之，本研究提示，赣江赣州段水体已受到 EDCs 的污染，但是水体中的 EDC 到底是哪些物质、其污染源在哪、水体 EDC 的实际污染量能否对沿江人群的健康产生影响，这些问题还有待进一步的研究加以证实。

参考文献：

- [1] Kavlock R J. Overview of endocrine disruptor research activity in the

- United States [J]. Chemosphere 1999; 39 (8): 1227-1236.
- [2] Safe S. Endocrine disruptors and human health: is there a problem? [J]. Toxicology 2004; 205 (1-2): 3-10.
- [3] Amanatullah Meneds J J. The endocrine disruptors: a major medical challenge [J]. Food Chem Toxicol 2002; 40 (6): 781-788.
- [4] Magliulo L, Schreijer M P, Ceprano J, et al. Endocrine disruption caused by two common pollutants at "acceptable" concentrations [J]. Neurotoxicol Teratol 2002; 24 (1): 71-79.
- [5] Heemken O P, Reinecke H, Stachels B, et al. The occurrence of oestrogens in the Elbe river and the North Sea [J]. Chemosphere 2001; 45 (3): 245-259.
- [6] Kim J S, Lee K T, Kannan K, et al. Trace organic contaminants in sediment and water from Ulsan Bay and its vicinity, Korea [J]. Arch Environ Contam Toxicol 2001; 40 (2): 141-150.
- [7] Boyd G R, Grimm D A. Occurrence of pharmaceutical contaminants and screening of treatment alternatives for southeastern Louisiana [J]. Ann N Y Acad Sci 2001; 948: 80-89.
- [8] 沈钢, 张祖麟, 余刚, 等. 夏季海河与渤海湾中壬基酚和辛基酚污染的状况 [J]. 中国环境科学, 2005; 25 (6): 733-736.
- [9] 段菁春, 陈兵, 麦碧娴, 等. 洪季珠江三角洲水系烷基酚污染状况研究 [J]. 环境科学, 2004; 25 (14): 48-52.
- [10] 邵兵, 胡建英, 杨敏. 重庆流域嘉陵江和长江水环境中壬基酚污染状况调查 [J]. 环境科学学报, 2002; 22 (1): 12-16.
- [11] 朱毅, 田怀军, 舒为群, 等. 长江、嘉陵江(重庆段)源水有机提取物的类雌激素活性评价 [J]. 环境污染与防治, 2003; 25 (2): 65-67.
- [12] 解玮, 屈卫东, 朱惠刚. 自来水及水源水有机提取物类雌激素活性研究 [J]. 卫生研究, 2003; 32 (6): 541-543.
- [13] Soto A M, Sonnenschein C, Chung K L, et al. The E-screen assay as a tool to identify estrogens: an update on estrogenic environmental pollutants [J]. Environ Health Perspect 1995; 103 (Suppl): 113-122.

(上接第 183 页)

暴露测量发现，3 种司机 $L_{Aeq,40}$ 均小于 85 dB (A)，未超标。3 个作业区在山顶露天作业，噪声源为车辆的电机。通过现场调查发现这 3 个作业区白天多为设备检修时间，司机很少接触噪声，夜间司机作业时间也不稳定，所以虽然司机操作室环境噪声超标，但工人实际噪声暴露 $L_{Aeq,40}$ 未超标。

传统的环境测量方法仅仅是测量并记录环境有害因素的强度/水平，而在生产环境中工作的工人的工作位变动、工作姿势变动，有害因素发生源位置变动，有害因素发生源本身发出有害因素的强度/水平的变化等因素决定了在许多情况下工人的环境有害因素的暴露是不稳定的，选取任何地点和时间测量的环境有害因素强度/水平的数值与工人的真实暴露之间可能存在很大的差异。个体噪声暴露测量以工人为测量的主体，实现了环境的实际暴露与健康评价主体的一致性，为进一步建立环境暴露与健康效应关系的评价奠定了可靠的基础^[8,9]。

参考文献：

- [1] 柴栋良, 吕旌乔, 曾琳, 等. 冷轧厂工人个体噪声暴露测量的初步分析 [J]. 中华预防医学杂志, 2006; 40 (2): 93-96.
- [2] 周盛林, 成小如, 张超彦, 等. 两组空压工个体噪声暴露的测量及评价 [J]. 中国工业医学杂志, 2000; 13 (4): 203-205.
- [3] 成小如, 黄爱群, 王演燕, 等. 某织布厂工人个体噪声暴露水平的测量与评价 [J]. 中华劳动卫生职业病杂志, 2001; 19 (3): 217-218.
- [4] 陈山松, 成小如, 李玉秦, 等. 同一车间中冲压工和下料工个体噪声暴露的测量与评价 [J]. 中国职业医学, 2003; 30 (4): 6-8.
- [5] 黄云兰, 祝文杰, 邵良洪, 等. 机场机坪地勤人员噪声暴露的测量与评价 [J]. 工业卫生与职业病, 2003; 29 (6): 326-328.
- [6] 李玉秦, 杨进伟, 陈山松, 等. 郑州市巡警个体噪声暴露的测量与分析 [J]. 环境与职业医学, 2004; 21 (1): 71-73.
- [7] 成小如, 陈山松, 李玉秦, 等. 两种测量方法评价稳态噪声暴露与高频听力损伤的剂量-反应关系 [J]. 中国工业医学杂志, 2001; 14 (5): 263-265.
- [8] 赵一鸣. 对噪声个体暴露测量与评价的思考和探索 [J]. 中华预防医学杂志, 2001; 35 (4): 272-273.
- [9] 赵一鸣, 陈山松, 成小如. 噪声个体计量仪的工作原理及其在噪声暴露评价中的应用 [J]. 中华预防医学杂志, 2000; 34: 238-240.