

行政院國家科學委員會專題研究計畫 成果報告

利用雄孔雀魚評估環境雌性激素之影響

計畫類別：個別型計畫

計畫編號：NSC91-2313-B-002-395-

執行期間：91年08月01日至92年07月31日

執行單位：國立臺灣大學地理環境資源學系暨研究所

計畫主持人：李美慧

計畫參與人員：王振勳

報告類型：精簡報告

處理方式：本計畫可公開查詢

中 華 民 國 92 年 10 月 13 日

行政院國家科學委員會專題研究計畫成果報告

利用雄孔雀魚評估環境雌性激素之影響

計畫編號：NSC 91-2313-B-002-395

執行期限：91 年 8 月 1 日至 92 年 7 月 31 日

主持人：李美慧 台灣大學地理環境資源學系

研究生助理：王振叡 台灣大學地理環境資源學系

一、中文摘要

本研究是利用孔雀魚來發展及建立一整合型的水生生物測試方法，用於檢測水中的環境雌性激素。在 1、2 或 3 周時間下，雄孔雀魚分別暴露壬基苯酚 10,60 或 150 μ /L。在各暴露時間的雌二醇組及壬基苯酚 150 μ /L 暴露組雄孔雀魚的卵黃前質誘發均與其控制組有顯著差異。其誘發反應持續增強至 14 天達到一個明顯的高峰。另外，在 21 天暴露下壬基苯酚 10 μ /L 暴露組雄孔雀魚的卵黃前質誘發也與其控制組有顯著差異。雄孔雀魚生殖腺成熟指數呈現隨暴露時間增長而降低的現象，但是其與壬基苯酚劑量並無明顯劑量與反應關係。另外，除了 21 天的壬基苯酚 60 μ /L 暴露組外，利用 Resazurin reduction assay 來測量雄孔雀魚的精子代謝活性可發現，不同暴露組與其控制組沒有顯著不同。由本研究結果可發現雄孔雀魚的卵黃前質是較敏感的生物指標反應暴露環境雌性激素。

關鍵詞：

內分泌干擾物質、生物指標、環境雌性激素、卵黃前質、孔雀魚

Abstract

Adult male guppies (*Poecilia reticulata*) were exposed to 4-nonylphenol (NP) at nominal concentrations of 10, 60 and 150 μ g/L for 7, 14 or 21 days of treatment. Significant induction of vitellogenin (VTG) were found in male guppies exposed to 1 μ g/L 17 estradiol, 60 μ g/L and 150 μ g/L NP after 7, 14 and 21 days of treatment

and were already at their maximum induction after 14 days of exposure treatment. On the other hand, significant induction of VTG in male guppies exposed to 10 μ g/L NP was only observed after 21 days exposure. A time-dependent tendency for reduction of gonadosomatic index (GSI) in male guppies treated with 17 β -estradiol or NP was observed, no concentration- dependent tendency of decreased GSI in male guppies was detected. There were also no differences in sperm metabolic activities measured by resazurin reduction assay of male fish treated with different concentrations of NP during different exposure periods, except for activity of guppy treated with 60 μ g/L NP after 21 days exposure . Preliminary data presented in this study strongly suggest that measurement of plasma VTG induction in male guppies is a suitable and rather sensitive indicator of exposure to estrogenic chemicals.

Keywords: Endocrine disruptor, biomarker, environmental estrogen, vitellogenin, guppy

二、計畫緣由與目的

本研究是利用孔雀魚來發展及建立一整合型的水生生物測試方法，用於檢測水中的環境雌性激素。選擇用孔雀魚(*Poecilia reticulata*)做為研究對象的原因，主要乃是孔雀魚且具生命週期短、體型小、耐污染、及容易飼養等優點。另外，國外許多毒理研究都曾使用孔雀魚為研究對象(Gallo et al. 1995; Bayley et al. 1999; Miliou et al. 1998; Widianarko et al. 2000)。

卵黃前質是由肝臟在受到雌性激素刺激下所製造的蛋白質，透過血液運輸後到卵巢中被成長的卵子吸收，是重要的形成卵黃之前驅物。所以正值生殖季節的性成熟的雌魚之血液中會有很高含量的卵黃前質，相對而言，雄魚或未成熟的幼魚體內之卵黃前質含量非常的低，常常無法偵測出來。但是當雄魚暴露雌性激素或雌性激素干擾物質時，雄魚體的卵黃前質含量有非常明顯的升高現象，因此雄魚體的卵黃前質含量可被用來顯示魚體是否暴露到雌性激素或雌性激素干擾物質的生物指標(Kime et al. 1999; Nicolas 1999)。

目前，在世界各地不同的水生環境，如河流、海洋及河口附近等區域，都有利用雄魚體的卵黃前質含量來監測雌性激素干擾物質之相關研究。例如美國、德國、西班牙和英國河川中環境雌性激素污染現狀就是測量雄魚體的卵黃前質含量來顯示(Sumpter and Jobling 1995; Folmar et al. 1996; Harries et al. 1996; Hansen et al. 1998; Sole et al. 2000)。另外，在日本東京灣附近海域也利用魚體的卵黃前質含量來反映在該環境中環境雌性激素污染情狀(Hashimoto et al. 2000)。

針對上述之問題，本研究將利用壬基苯酚來發展及建立一整合型的

水生生物測試方法探討環境雌性激素的存在狀態，包括：(1)建立卵黃前質與壬基苯酚之反應與劑量關係；(2)建立精子活性與壬基苯酚之反應與劑量關係，以便正確地評估或預測雌性激素干擾物質之存在與影響。

三、結果與討論

生殖腺成熟指數：14 天的暴露下，雄孔雀魚生殖腺成熟指數與控制組相比，包括雌二醇及壬基苯酚 60 μ /L 暴露組，皆明顯有生殖腺被抑制的現象($p < 0.05$, Mann-Whitney U test)。大致上，雄孔雀魚生殖腺成熟指數呈現隨暴露時間增長而降低的現象，但是其與壬基苯酚劑量並無明顯劑量與反應關係(圖一)。

卵黃前質：經由膠體電泳法分析後的膠體影像如圖二所示，可以發現，分子量 116-205Kda 的範圍間，分別有兩行序列被視為是卵黃前質(VTGI, VTGII)。理由有下列兩項：首先，在雌魚參考樣本中可以看到此蛋白質，而在雄魚控制組中未發現相同的蛋白質。意指此蛋白質具有性別的專殊性。再者，加入雌二醇的組別明顯產生此蛋白質的誘發反應，這代表它的生成與雌二醇的刺激呈因果關係。

從膠體影像量化後所得的結果來看，如圖三所示，當以各組樣本與雌魚參考樣本的卵黃前質比例平均值作為比較數值時，雌魚參考樣本視為 1 單位，不同暴露時間歷程的其他各組的平均值範圍依序為雄魚控制組為 0.06-0.38；雌二醇組為 29.81-56.20；壬基苯酚 10 μ /L 暴露組為 0.82-0.89；壬基苯酚 60 μ /L 暴露組為 3.98-8.42；壬基苯酚 150 μ /L 暴露組為 34.57-58.36。

以暴露時間分群，利用單因子變異數分析的比較，不同暴露時間的組間差異均達顯著($p < 0.05$)。再從事後比較發現，各暴露時間下的雌二醇組及壬基苯酚 150 μ /L 暴露組均與其控制組有顯著差異($p < 0.05$, Mann-Whitney U test)，如圖三所示。這顯示，除了雌二醇之外，高劑量的壬基苯酚在 7 天後即可誘發卵黃前質，產生與雌二醇相似的作用。

就壬基苯酚的組群來看，顯示壬基苯酚的劑量與卵黃前質誘發反應大致呈現正相關。此外，以暴露時間為變數，觀察每一組卵黃前質誘發反應的轉變，當中發現雌二醇組在暴露 7 天後，誘發反應持續增強至 14 天達到一個明顯的高峰，再多暴露至 21 天仍維繫此誘發強度而無明顯再增強或削弱的現象。相似的現象也發生在壬基苯酚 150 μ /L 暴露組，同樣的在暴露 14 天達到誘發反應的高峰，而持續至 21 天。

精子活性：雄孔雀魚的精子活性是利用 Resazurin reduction assay 來測量其精子代謝活性。從圖四可發現，在不同暴露時間，不同暴露組與其控制組相比有較低的現象，但是除了 21 天的壬基苯酚 60 μ /L 暴露組外，均未達統計上的顯著差異。

四、計畫成果自評

達成預期目標情況:

本研究已達到預期完成之工作項目:

1. 建立卵黃前質與壬基苯酚之反應與劑量關係 ;
2. 建立精子活性與壬基苯酚之反應與劑量關係
3. 建立生殖腺成熟指數與壬基苯酚之反應與劑量關係

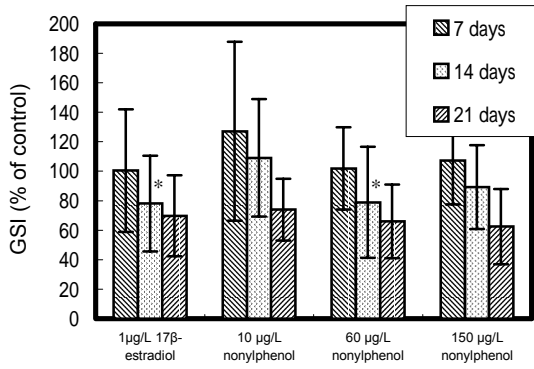
論文發表：研究成果已投稿到國際期刊上 (Environmental Safety and Ecotoxicology)。

人員訓練:參與本計畫的研究生助理王振叡先生同時獲得祐生研究基金會碩士論文獎學金之優等獎及台灣大學理學院院長獎。

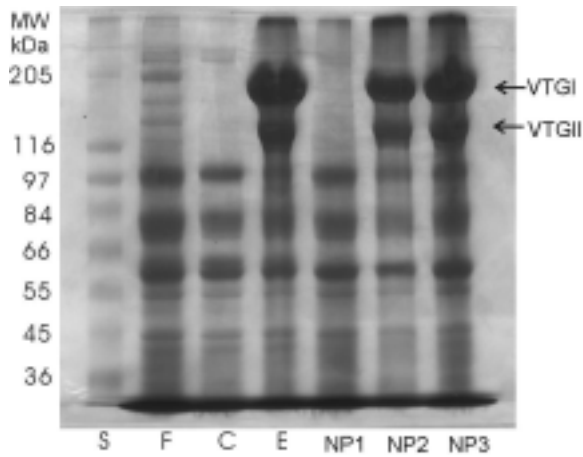
五、參考文獻

1. Bayley, M., Nielsen, J.R., Baatrup, E. 1999. Guppy sexual behavior as an effect biomarker of estrogen mimics. *Ecotoxicol Environ. Safety* 43:68-73.
2. Gallo, D., Merendino, A., Keizer, J., Vittozzi, L. 1995. Acute toxicity of two carbamates to the guppy (*Poecilia reticulata*) and the zebrafish (*Brachydanio rerio*). *Sci Total Environ.* 171:131-136.
3. Folmar, L.C., Denslow, N.D., Rao, V., Chow, M., Crain, D.A., Enblom, J. Marcino, J., Guillette, L.J. Jr. 1996. Vitellogenin induction and reduced serum testosterone concentrations in feral male carp (*Cyprinus carpio*) captured near a major metropolitan sewage treatment plant. *Environ. Health Perspect.* 104:1096-1101.
4. Hansen, P.-D., Dizer, H., Hock, B., Marx, A., Sherry, J., McMaster, M., Blaise, Ch. 1998. Vitellogenin-a biomarker for endocrine disruptors. *Trends Anal. Chem.* 17: 448-451.
5. Harries, J.E., Sheahan, D.A. Jobling, S., Matthiessen, P., Neall, P., Routledge, E.J., Rycroft, R., Sumpter, J.P., Tylor, T. 1996. A survey of estrogenic activity in united kingdom inland waters. *Environ Toxicol Chem* 15:1993-2002.
6. Hashimoto, S., Bessho, H., Hara, A., Nakamura, M., Iguchi, T., Fujita, K. 2000. Elevated serum vitellogenin levels and gonadal abnormalities in wild male flounder (*Pleuronectes yokohamae*) from Tokyo Bay, Japan. *Mar. Environ. Res.* 49:37-53.
7. Kime, D.E., Nash, J.P., and Scott, A.P. 1999. Vitellogenesis as a biomarker of reproductive disruption by xenobiotics. *Aquaculture* 177:345-352.
8. Miliou, H., Zaboukas, N., Moraitou-Apostolopoulou, M. 1998. Biochemical composition, growth, and survival of the guppy, *Poecilia reticulata*, during chronic sublethal exposure to cadmium. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 35:58-63.
9. Nicolas, J.-M. 1999. Vitellogenesis in fish and the effects of polycyclic aromatic hydrocarbon contaminants. *Aquatic Toxicol.* 45:77-90.
10. Sole, M., Lopez de Alda, M.J., Castillo, M., Porte, C., Ladegaard-Pedersen, K., and

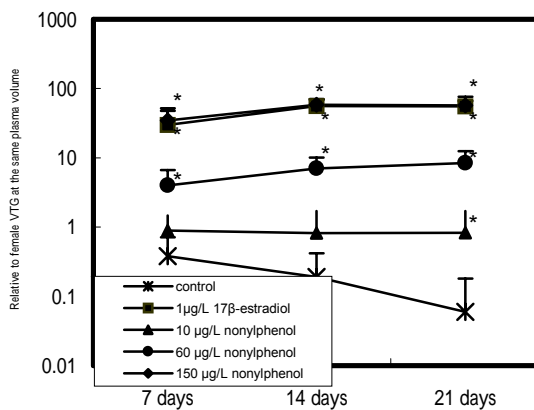
- Barcelo, D. 2000. Estrogenicity determination in sewage treatment plants and surface waters from the Catalonian Area (NE Spain). *Environ. Sci. Technol.* 34:5076-5083.
11. Sumpter, J.P., and Jobling, S. 1995. Vitellogenesis as a biomarker for estrogenic contamination of the aquatic environment. *Environ. Health Perspect.* 103(Suppl):173-8
 12. Widianarko, B., Van Gestel, C.A.M.m Verweij, R.A. and Van Straalen, N.M. 2000. Associations between trace metals in sediment, water, and guppy *Poecilia reticulata*(Peters), from urban streams of Semarang, Indonesia. *Ecotoxicol Environ. Safety* 46:101-107.



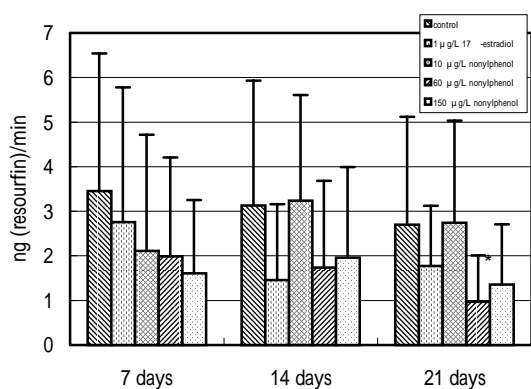
圖一 在暴露1、2或3周後，壬基苯酚及雌二醇對雄孔雀魚的生殖腺成熟指數之影響。*表示與同一暴露時間的控制組顯著不同(P < 0.05, Mann-Whitney U test)



圖二. 雄孔雀魚在暴露2周後，壬基苯酚及雌二醇對其卵黃前質誘發之 SDS-PAGE 電泳膠片。樣本排列依序皆為分子量標準品(S)、雌魚參考樣本(F)、控制組(C)、雌二醇(1 μg/L, E)以及三組高低濃度的壬基苯酚(10 μg/L, NP1; 60 μg/L, NP2; 150 μg/L, NP3)。



圖三 在暴露1、2或3周後，壬基本酚及雌二醇對雄孔雀魚的卵黃前質誘發之情形。*表示與同一暴露時間的控制組顯著不同(P< 0.05, Mann-Whitney U test)



圖四 在暴露1、2或3周後，壬基本酚及雌二醇對雄孔雀魚的精子代謝活性之影響。*表示與同一暴露時間的控制組顯著不同(P< 0.05, Mann-Whitney U test)