

## 辛基酚对鲤的雌激素效应

官向红, 徐英江, 任利华, 张世娟, 张秀珍, 张利民\*

(山东省海洋水产研究所, 山东 烟台 264006)

**摘要:**研究了辛基酚对鲤的雌激素效应。经10、50、100、300和500  $\mu\text{g/L}$  辛基酚暴露32 d后, 鲤存活率和肥满度与对照组无差异;性腺指数变化明显,雌鱼性腺指数随暴露剂量的增大而增大,雄鱼性腺指数随暴露剂量的增大而减小;50  $\mu\text{g/L}$  及以上暴露组与对照组差异显著( $P < 0.05$ )。辛基酚能诱导鲤雄鱼产生卵黄蛋白原,暴露剂量为10  $\mu\text{g/L}$  组有部分雄鱼肝脏匀浆和血液中检出卵黄蛋白原,50、100和300  $\mu\text{g/L}$  组卵黄蛋白原含量随辛基酚浓度的增大而显著增大,500  $\mu\text{g/L}$  组卵黄蛋白原含量低于300  $\mu\text{g/L}$  组、高于100  $\mu\text{g/L}$  组,均为极显著差异( $P < 0.01$ )。

**关键词:**鲤;辛基酚;雌激素效应;卵黄蛋白原

**中图分类号:**X 503.225; S 965.116

**文献标识码:**A

环境雌激素(environmental estrogens, EE)是指能够模拟或干扰机体内天然雌激素的合成、分泌、转运、结合、排泄、生理作用等的一类外源性化学物质。环境雌激素的种类较多,包括有机氯农药、表面活性剂、增塑剂等<sup>[1]</sup>。随着工业化的发展,这些物质不断释放到环境中,通过饮食、接触等途径进入生物体内,对人类的健康及生物的生存产生巨大影响。近年来,人们认为许多现象的发生均与环境雌激素有关,例如人类隐睾症与尿道下裂等疾病发病率提高,男性平均精子数量减少,水生动物出现雌性化现象,以及某些鸟类出现行为反常和生育能力丧失<sup>[2-4]</sup>。鉴于环境雌激素深远的负面效应,有关环境雌激素的污染监控及其生态环境安全评价已成为当今环境科学研究的前沿和热点。

烷基酚类化合物(alkylphenols, APs)在塑料生产、洗涤用品方面应用极其广泛,已有报道在地面水、自来水、食品、饮料中发现APs污染。辛基酚(octylphenol, OP)是烷基酚类化合物中有代表性的环境污染物,国外目前已有的雌激素活性评估方法一致认为辛基酚是雌激素活性最强的烷基酚类化合物<sup>[5-6]</sup>。

卵黄蛋白原是雌性特异性蛋白,通常在雌激素调控下卵黄形成期间表达。正常情况下,雄鱼和幼鱼体内几乎没有卵黄蛋白原,但是在环境雌激素的诱导下,其肝脏也能合成卵黄蛋白原,因此,卵黄蛋白原是一种理想的环境雌激素的生物标志物<sup>[7-8]</sup>。利用雄鱼、幼鱼血清卵黄蛋白原水平变化作为水环境类雌激素化合物监测的生物标志物,已成为一种国际通行的研究方法,并且已建立了部分实验动物模型<sup>[9-11]</sup>,经济合作与发展组织(OECD)也将鱼类卵黄蛋白原作为可以选择的内分泌干扰试验终点。

本实验以山东省主要淡水鱼类品种鲤为试验材料,利用鱼类生殖生长的相关指标以及卵黄蛋白原的诱导来研究辛基酚的雌激素效应,为环境雌激素的生态和健康风险评价提供科学依据和技术支持。

### 1 材料与方法

#### 1.1 实验动物

水库养殖1龄鲤(*Gyrinus carpio*),平均体长20.8 cm,平均体重160 g。试验前先驯养1周,自然死亡率不大于5%,然后随机分组进行暴露实验。

## 1.2 仪器与试剂

德国 Biofuge Stratos 高速冷冻离心机;芬兰 MK3 酶标仪;电子天平。辛基酚购自 sigma 公司。苯甲磺酰氟(PMSF)进口。鲤卵黄蛋白原 ELISA 检测试剂盒(Goat Anti-Carp Vitellogenin)购自美国 ADL 公司(Adlitteram Diagnostic Laboratories, Inc)。

## 1.3 暴露实验

辛基酚用甲醇助溶,配贮备液于 4 ℃ 冰箱保存,助溶剂甲醇终浓度不大于 0.025%。实验中设置一个对照组、一个溶剂对照组(0.025% 甲醇),和 5 个试验组,暴露剂量分别为 10、50、100、300 和 500 μg/L。在 120 L 玻璃鱼缸内加水 60 L,放养鲤 15 尾,24 h 充气,半静态饲养,每天投喂不含辛基酚的商品饲料,自然光照,平均水温(18±1) ℃。为确保药物浓度和水质环境的稳定,每天换水 80%。暴露实验在 32 d 后结束。

## 1.4 样品采集和指标测定方法

**生长和组织学指标** 实验结束时将所有鱼称重、测体长,将鱼迅速解剖,取性腺称重。肥满度、性腺指数(GSI)的计算方法如下:

$$\text{肥满度}(\text{g}/\text{cm}^3) = \text{体重}/\text{体长}^3$$

$$\text{性腺指数}(\%) = \text{性腺重}(\text{g}) \times 100/\text{体重}(\text{g})$$

**生物标记物测定**

(1) 血液样品采集:实验鱼测体长、体重后,从尾静脉取血,4 ℃ 条件下静置 2 h 后,4 ℃ 条件下 1 000 × g 离心 15 min,分离出血清,加入适量蛋白酶抑制剂 PMSF 至最终浓度为 1 mmol/L,保存于 -80 ℃ 冰箱中备用。

(2) 肝脏样品采集:将鱼迅速解剖,取雄鱼肝脏 0.5 g,加缓冲液(0.14 mol/L NaCl, 0.015 mol/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.075 mol/L Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.027 mol/L KCl; pH 7.3) 2.5 mL,冰浴中研磨,4 ℃ 条件下 8 000 × g 离心 20 min,取上清液加入适量蛋白酶抑制剂 PMSF 至最终浓度为 1 mmol/L,保存于 -80 ℃ 冰箱中备用。

(3) 卵黄蛋白原测定:采用酶联免疫双抗体夹心法测定雄鱼血清及肝脏匀浆中卵黄蛋白原含量,鲤卵黄蛋白原 ELISA 检测试剂盒检测范围 0 ~ 400 ng/mL,检出限 1.0 ng/mL。标准溶液浓度 400 ng/mL,临用前用稀释缓冲液稀释,配制如下标准系列:0, 12.5, 25, 50, 100, 200, 400 ng/mL。向各微孔中加入 50 μL 标准或样品稀释液、50

μL 生物素标记的抗 Vtg 抗体溶液,混匀后 37 ℃ 孵育 1 h,洗板,向各孔中加入 80 μL 链霉亲和素-辣根过氧化物酶溶液,混匀后 37 ℃ 孵育 30 min,倾去孔中液体,向各孔中分别加入 50 μL 底物 A、底物 B,混匀后 37 ℃ 孵育 10 min,加入 50 μL 终止液,混匀,用酶标仪测定 450 nm 的吸光值,以吸光值为纵坐标,相应的标准溶液浓度为横坐标,求得相应的曲线,计算样品稀释液中 Vtg 浓度。

## 1.5 数据分析

用 SPSS 11.5 软件对数据进行分析处理,采用单因素方差分析,  $P < 0.05$  认为差异显著;  $P < 0.01$  认为差异极显著。

## 2 结果与分析

### 2.1 辛基酚对实验鱼生长发育的影响

在整个实验过程中,对实验鱼体色、呼吸、游动等行为进行观察,未发现实验鱼有急性中毒现象。至暴露实验结束时,各组间存活率、肥满度无差异。各实验组鱼的性腺指数与对照组差异显著,溶剂对照组与对照组无差异。雌鱼性腺指数随暴露剂量的增大而增大,雄鱼性腺指数随暴露剂量的增大而减小。性腺指数的变化与暴露剂量相关:暴露剂量为 10 μg/L 组雌鱼性腺指数与对照组无显著差异,但雄鱼性腺指数与对照组差异极显著;其余 4 个实验组与对照组无论雌鱼还是雄鱼差异都极显著( $P < 0.01$ ) (表 1)。

### 2.2 辛基酚对雄鱼卵黄蛋白原的诱导效应

本实验中分别检测了雄鱼血清及肝脏匀浆中卵黄蛋白原(Vtg)含量。肝脏匀浆中含量高于血清中含量,卵黄蛋白原含量与辛基酚暴露剂量相关,是一个先激活后抑制的过程。暴露剂量为 10 μg/L 的组有部分雄鱼肝脏匀浆和血清中检出卵黄蛋白原;50、100 和 300 μg/L 组卵黄蛋白原含量随辛基酚浓度的增大而显著增大[含量分别为(6.90 ± 1.04) μg/kg、(1.31 ± 0.36) μg/L; (25.2 ± 2.56) μg/kg、(3.09 ± 0.35) μg/L; (57.4 ± 7.12) μg/kg、(6.38 ± 1.15) μg/L], 500 μg/L 组卵黄蛋白原含量[含量分别为(45.7 ± 9.62) μg/kg、(4.85 ± 0.75) μg/L] 低于剂量为 300 μg/L 组、高于剂量为 100 μg/L 组,均为极显著差异( $P < 0.01$ )。对照组及溶剂对照组未检出卵黄蛋白原(图 1,图 2)。

表 1 辛基酚暴露浓度对鲤存活率、肥满度、性腺指数的影响  
Tab.1 Effects of OP exposure on survival, growth and GSI of carps

参数 parameters		浓度 concentration						
		对照组 control	甲醇对照组 methanol control	OP				
				10 $\mu\text{g/L}$	50 $\mu\text{g/L}$	100 $\mu\text{g/L}$	300 $\mu\text{g/L}$	500 $\mu\text{g/L}$
存活率 survival (%)		86.7	93.3	93.3	86.7	100	80.0	86.7
雌 female	肥满度 <sup>a</sup> growth ( $\text{g}/\text{cm}^3$ )	1.73 $\pm$	1.71 $\pm$	1.81 $\pm$	1.85 $\pm$	1.70 $\pm$	1.87 $\pm$	1.78 $\pm$
	性腺指数 <sup>a</sup> GSI (%)	0.355 $\pm$	0.361 $\pm$	0.532 $\pm$	0.740 $\pm$	0.964 $\pm$	1.127 $\pm$	1.378 $\pm$
		0.098	0.204	0.084	0.207 *	0.122 **	0.109 **	0.324 **
雄 male	肥满度 <sup>a</sup> growth ( $\text{g}/\text{cm}^3$ )	1.91 $\pm$	1.89 $\pm$	1.90 $\pm$	1.82 $\pm$	1.90 $\pm$	1.83 $\pm$	1.88 $\pm$
	性腺指数 <sup>a</sup> GSI (%)	7.33 $\pm$	7.67 $\pm$	5.95 $\pm$	5.32 $\pm$	4.31 $\pm$	3.05 $\pm$	2.21 $\pm$
		0.74	0.89	1.13 *	0.57 **	0.99 **	0.62 **	0.71 **

Notes: Values are means  $\pm$  SD ( $n=6$ ), \*  $P<0.05$ , \*\*  $P<0.01$ .

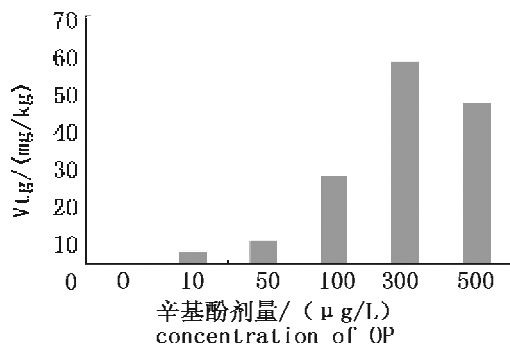


图 1 雄鱼肝脏匀浆中卵黄蛋白原含量

Fig.1 Vtg concentration in liver of males ( $n=6-9$ )

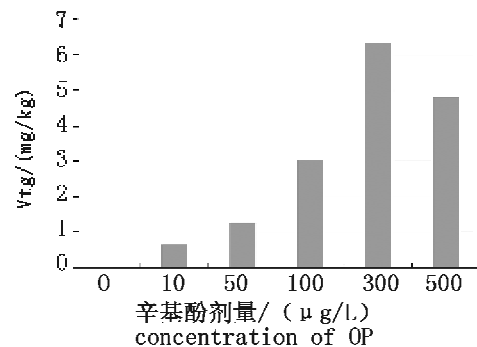


图 2 雄鱼血清中卵黄蛋白原含量

Fig.2 Vtg concentration in serum of males ( $n=6-9$ )

### 2.3 雌鱼血清卵黄蛋白原水平

本实验中还检测了雌鱼血清中卵黄蛋白原 (Vtg) 含量。各实验组与对照组及溶剂对照组间无差异。

## 3 讨论

肥满度综合了体长和体重两个变量来反映鱼的生长状况的指标以全面考察毒物的作用和鱼在生理上对胁迫的响应。本试验中各组存活率和肥满度均无显著差异,说明在本实验的暴露剂量下,鲤的生长状况未受到显著影响。

评价环境中化学物质是否具有雌激素活性,主要通过测定该化学物质诱导雌激素生理效应的能力来进行。性腺指数是鱼类性腺生理结构及功能状况的重要参考指数。在雌激素作用下,对雌鱼而言,肝脏合成的 Vtg 通过血液运送到卵巢,使卵巢活动增强并表现为 GSI 上升;但对雄鱼则使

精巢活动不活跃,表现为精子数量与活力下降,交配行为减少,精巢结构发生器质性改变,从而使 GSI 下降<sup>[12-14]</sup>。本实验结果表明,辛基酚对鲤性腺发育有显著影响,表现为随着暴露剂量的增加,雌鱼的性腺发育被显著促进,性腺指数增大,而雄鱼的性腺发育则被显著抑制,性腺指数减小,说明辛基酚具有环境雌激素活性。

已有研究表明,鱼类性腺发育的可塑性使其对内分泌干扰物更加敏感,环境雌激素暴露可导致雄鱼雌性化,并使性腺发育受损,随着雄鱼雌性化的加剧,导致一些鱼类繁育困难,出现加速灭绝现象。本实验所用鲤正处于性腺发育时期,因而对环境雌激素的作用非常敏感。实验发现水体中 10  $\mu\text{g/L}$  辛基酚已导致雄鱼性腺指数极显著降低。而雌鱼性腺指数与对照组无显著差异,这可能因为雌鱼体内具有一定量的内源性雌激素,其活性远远大于环境中的类雌激素物质,因此,低剂

量的类雌激素物质暴露不会影响高活性内源雌激素的调控作用,除非暴露超过一定阈值。

卵黄蛋白原是指环境雌激素暴露、测试环境雌激素效应的最为敏感的分子生物标志物之一。它是在雌激素作用下,由肝脏产生,经血液输送到卵巢,在卵巢转化为卵黄蛋白,所以正常情况下在雄鱼体内是检测不到卵黄蛋白原的。雄鱼肝脏中也有 Vtg 基因,因而在雌激素的作用下,也能诱导肝脏合成和分泌 Vtg。本实验研究发现,辛基酚能诱导鲤雄鱼产生 Vtg,因而辛基酚具有雌激素效应。辛基酚在 10  $\mu\text{g}/\text{L}$  时已能诱导雄鱼肝脏产生卵黄蛋白原,300  $\mu\text{g}/\text{L}$  时诱导产生的卵黄蛋白原含量最高,本实验中最高暴露剂量组(500  $\mu\text{g}/\text{L}$ )卵黄蛋白原含量低于 300  $\mu\text{g}/\text{L}$  组,暴露剂量与卵黄蛋白原含量呈颠倒的“U”字型,这与在金鱼、稀有鮰鲫中的研究结果基本一致<sup>[15-16]</sup>,可能由于高浓度的辛基酚对鱼有较强的毒性作用,限制了其雌激素效应的表现。

非单调剂量一效应关系是当前内分泌干扰物风险评价面临的一大问题<sup>[17]</sup>。当前的生态风险评价是基于传统毒理学对高剂量检测的结果,并通过线性阈值模型进行外推以获得化合物的安全阈值。该种评价模式将暴露剂量与效应的关系简化为线性关系,而对通过受体介导产生作用的环境激素而言,线性推导会错误地低估低剂量一效应。考虑到目前环境中内分泌干扰物质呈现长期、低剂量和多种类联合作用等暴露特征,对低剂量一效应带来的生态风险进行研究与综合评价就显得尤为迫切。经典毒理学理论认为,有毒化合物浓度低于其无可见不良效应浓度(NOAE)或由线性推导得出的安全浓度以下时不会对机体健康构成风险,然而,最新的一些研究发现,环境内分泌干扰物在低于其 NOAE 或对应的安全剂量时仍会诱发生物学效应,有研究表明,有的物质诱发内分泌毒性所需剂量远小于诱发常规毒性的剂量,但是危害却更大<sup>[17]</sup>。

综合以上实验结果表明,辛基酚对鲤的性腺发育有显著影响,并且可诱导雄鱼产生卵黄蛋白原,具有明显的雌激素效应。水体中低浓度的辛基酚虽然未影响鲤的生长,但已显示出较强的内分泌干扰作用,其最低可观察效应浓度及其低剂量一效应还有待进一步研究。

#### 参考文献:

- [1] 孙胜龙. 环境激素与人类未来[M]. 北京:化学工业出版社, 2005:6-8.
- [2] 刘永梅,陈伟,李敦海,等. 三氯杀螨醇对大型蚤的毒性和环境雌激素效应[J]. 水生生物学报, 2004, 28(3):330-332.
- [3] 杜克久,徐晓白. 环境雌激素研究进展[J]. 科学通报, 2000, 45:2241-2251.
- [4] 李莉,马陶武,吴振斌. 生活污水对稀有鮰鲫的毒性效应研究[J]. 水生生物学报, 2004, 28(1):40-44.
- [5] Jobling S, Sheenan D, Osborne J A, et al. Inhibition of testicular growth in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) exposed to alkylphenolic chemicals[J]. Environ Toxicol Chem, 1996, 15(1):194-202.
- [6] Routledge E J, Sumpter J P. Structural features of alkylphenolic chemicals associated with estrogenic activity[J]. Biol Chem, 1997, 272:3280-3288.
- [7] Christiansen L B, Pedersen K L, Korsgaard B, et al. Estrogenicity of Xenobiotics in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) using *in vivo* synthesis of Vitellogenin as a biomarker [J]. Marine Environmental Research, 1998, 46(1-5):137-140.
- [8] Kime D E, Nash J P, Scott A P. Vitellogenesis as a biomarker of reproductive disruption by xenobiotics[J]. Aquaculture, 1999, (177):345-352.
- [9] Andersen L, Goto-kazeto R, Trant J M, et al. Short-term exposure to low concentrations of the synthetic androgen methyltestosterone affects Vitellogenin and seroid levels in adult male zebrafish (*Danio rerio*)[J]. Aquatic Toxicology, 2006, 76:343-352.
- [10] Miyuki C, Ryuzoh I, Quamrul H, et al. Effect of alkylphenols on adult male medaka; Plasma vitellogenin goes up to the level of estrous female[J]. Environmental Toxicology and Pharmacology, 2003, 15:33-36.
- [11] 邴欣,汝少国,Isoda H,等. 17 $\beta$ -雌二醇对雄性金鱼卵黄蛋白原的诱导作用[J]. 水产学报, 2004, 28(3):236-240.
- [12] Bayley M, Jacob R, Nielsen J R. Guppy sexual behavior as an effect biomarker of estrogen mimic [J]. Ecotoxicology and Environmental Safety, 1999, 43:68-73.
- [13] Kinnberg K, Toft G. Effects of estrogenic and an-

- tiandrogenic compounds on the testis structure of the adult guppy (*Poecilia reticulata*) [J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2003, 54: 16 – 24.
- [14] Toft G, Baatrup E. Altered sexual characteristics in guppies (*Poecilia reticulata*) exposed to 17 $\beta$ -estradiol and 4-tert-octylphenol during sexual development [J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2003, 56: 228 – 237.
- [15] 赵兵,刘征涛,徐章法,等. 酚类化合物对金鱼幼鱼的雌激素效应研究[J]. *环境科学学报*, 2005, 25(9): 1259 – 1264.
- [16] 廖涛,金士威,惠阳,等. 城市污水处理厂进出水中类雌激素暴露影响评价[J]. *环境化学*, 2007, 26(6): 819 – 822.
- [17] 卫立,张洪昌,张爱茜,等. 环境内分泌干扰物低剂量-效应研究进展[J]. *生态毒理学报*, 2007, 2(1): 25 – 31.

## Estrogenic effects of octylphenol on carp (*Cyprinus carpio*)

GONG Xiang-hong, XU Ying-jiang, REN Li-hua, ZHANG Shi-juan, ZHANG Xiu-zhen, ZHANG Li-min\*  
(*Marine Fisheries Research Institute of Shandong Province, Yantai 264006, China*)

**Abstract:** The aim of the study was to investigate the estrogenic effects of octylphenol (OP) on carp (*Cyprinus carpio*). Vitellogenin (Vtg) and the parameters of growth and development were determined as biomarkers. The one-year-old carp from a large reservoir were kept in the laboratory for 7 days. Then they were exposed to OP under semi-static conditions for 32 days. They were fed once a day. The water temperature was (18  $\pm$  1)  $^{\circ}$ C during the experiment. Five concentrations of OP at 10, 50, 100, 300 and 500  $\mu$ g/L were selected for this study. The mortality, abnormal behavior and appearance of the carp were recorded during the exposure. At the end of the exposure, fish were sampled to measure body weight, body length and gonadal weight, then plasma and liver homogenates were prepared for the determination of Vtg concentration by ELISA. The data were analysed with SPSS 11.5. At the end of exposure, it was found that there was no significant difference in the survival and growth of the fish. The exposure to OP caused obvious changes in gonadosomatic index (GSI). In accordance with the increase of the OP concentration, the GSIs of female carp increased, while that of male carp decreased. OP at 10  $\mu$ g/L caused the GSIs of male carp decreased significantly ( $P < 0.05$ ). The GSIs of female carp increased significantly when the OP concentration reached 50  $\mu$ g/L ( $P < 0.05$ ). OP induced the synthesis of Vtg in male carp. Vtg was not detected in plasma or liver homogenates in control groups, and it was detected in some of the samples in 10  $\mu$ g/L group. The Vtg levels increased greatly when the OP concentration reached 50  $\mu$ g/L ( $P < 0.05$ ). The Vtg levels in 500  $\mu$ g/L group were significantly lower than those in 300  $\mu$ g/L ( $P < 0.01$ ), but significantly higher than those in 100  $\mu$ g/L group ( $P < 0.01$ ). The results indicated that octylphenol (OP) has obvious impact on the gonadal development of carps. It can induce Vtg synthesis in male carps. OP has visible estrogenic effects on carp (*Cyprinus carpio*) although it did not affect the growth of the fish at low exposure concentrations.

**Key words:** *Cyprinus carpio*; octylphenol; estrogenic effect; vitellogenin

**Corresponding author:** ZHANG Li-min. E-mail: zhanglimin@126.com