饮用水中有机提取物的雌激素活性分析

张徐军^{1,2}, 吕锡武¹

(1. 东南大学 环境工程系, 江苏 南京 210096 2 东南大学 公共卫生学院, 江苏 南京 210009)

摘要: 采用人类乳腺癌 (MCF-7) 细胞增殖试验和子宫增重试验研究饮用水源水及自来水中有机提取物的雌激素活性。结果表明, 水源水提取物对 MCF-7 细胞的增殖效应表现出剂量-效应关系, 高剂量的水样有机提取物在体外试验中可引起病理变化的毒性作用, 从而导致细胞死亡; 自来水提取物对 MCF-7 细胞的增殖指数基本稳定, 没有表现出增殖效应。水源水及自来水的有机提取物均可导致子宫增重, 高剂量的水样有机提取物有一定的发育毒性。饮用水源水及自来水的有机提取物具有雌激素活性。

关键词: 饮用水; 有机提取物; 雌激素活性; 细胞增殖试验; 子宫增重试验

中图分类号: TU991 **文献标识码:** C **文章编号:** 1000-4602(2009)17-0063-03

Analysis of Estrogenic Activity of Organic Extracts from Drinking Water

ZHANG Xu-jun^{1,2}, LV Xi-wu¹

(1 Department of Environmental Engineering, Southeast University, Nanjing 210096 China;

2 Public Health College, Southeast University, Nanjing 210009 China)

Abstract MCF-7 cell proliferation test and uterotrophic test were used to study the estrogenic activity of the organic extracts from drinking source water and tap water. The results show that the effect of the organic extracts from drinking source water on MCF-7 cell proliferation has a dose-response relationship, and high-dose organic extracts from water samples in vitro can cause the toxic effects with pathological changes which can induce cell death. The proliferation index of MCF-7 cell by the organic extracts from tap water is basically stable, showing no proliferative effect. The organic extracts from drinking source water and tap water both can induce an increase in uterine weight, and the high-dose organic extracts from water samples have a certain developmental toxicity. The organic extracts from drinking source water and tap water both have estrogenic activity.

Key words drinking water; organic extracts; estrogenic activity; cell proliferation test; uterotrophic test

环境内分泌干扰物通过干扰机体的正常代谢和生殖发育等, 可导致人类精子的数量和质量降低, 出现隐睾、尿道下裂和生殖内分泌相关肿瘤发病率上升等^[1]。环境雌激素是环境内分泌干扰物中最主

要的一类, 通过模拟雌激素的作用, 可产生明显的遗传毒性、生殖毒性、免疫毒性以及致癌、致畸、致突变等作用^[2-4]。其进入动物和人体的重要途径就是对水的摄取, 虽然饮用水中环境雌激素的浓度很低, 但

基金项目: 国家高技术研究发展计划 (863) 项目 (2002AA601130)

低浓度长期作用后导致不良影响正是环境雌激素作用的特点。南京市位于长江流域,为了解该市饮用水源水及自来水中内分泌干扰物的活性水平,笔者分别采用人类乳腺癌 MCF-7 细胞增殖试验和大鼠子宫增重试验对饮用水源水及自来水中有机提取物的雌激素活性进行分析。

1 材料与方 法

1.1 试验材料

Amberlite XAD-2 树脂、DMEM 培养基、MTT、 17β -雌二醇、二甲亚砜(DMSO)、市售精制花生油。

1.2 试验方法

1.2.1 水样的采集和处理

2008年7月于南京市某水厂采集水源水、自来水各 200 L。水样经过装有 XAD-2 树脂的玻璃柱(2.0 m × 20 cm)浓缩,过柱流速为 30~40 mL/min,吸附在树脂上的有机物用体积为 3 倍柱体积的甲醇-丙酮洗脱液洗脱,洗脱液置于 45℃ 的水浴中挥发蒸干,用 DMSO 定溶至 2 mL。过滤除菌,于 -20℃ 下保存备用。

1.2.2 人类乳腺癌 MCF-7 细胞增殖

细胞在 DMEM 培养液中(内含 10% 的小牛血清、300 IU/L 的胰岛素),于 37℃、5% 的 CO₂ 培养箱中常规培养;细胞传代使用 0.25% 的胰酶消化;处于对数生长期的 MCF-7 细胞以 1×10^4 个细胞/孔接种于 96 孔培养板,经 24 h 预培养;试验组分别加入相当于源水体积为 10、30、90、270、810 和 2 430 mL 共 6 个不同浓度的水样提取物;阳性对照采用 $10^{-7} \sim 10^{-12}$ mol/L 的 17β -雌二醇;空白对照采用 DMSO。连续培养 72 h,各孔加入 20 μ L 的 MTT 溶液(5 mg/mL),继续培养 4 h 小心吸去孔内的培养液。加入 150 μ L 的 DMSO 终止反应,振荡 10 min 以溶解沉淀,用酶标仪在波长为 490 nm 处测定各孔的吸光度,并采用增殖指数(PI)评价雌激素活性。计算方法见式(1)。

$$PI = A_t / A_c \quad (1)$$

式中 A_t ——试验组的吸光度

A_c ——对照组的吸光度

1.2.3 子宫增重试验

新生 Wistar 大鼠,随机分为 8 组,每组 8 只,每天染毒一次。在 21 d 断奶后的第 1 天、第 2 天和第 3 天连续 3 d 腹腔注射相当于源水体积为 1.5、25 和 125 L/kg 的 4 个浓度组的水源水和自来水水样的有

机提取物;溶剂对照采用精制花生油;阳性对照采用 17β -雌二醇(200 μ g/kg)。第 4 天称重后,断颈处死动物,分离子宫,计算脏器系数,数据以子宫湿重/体重表示,结果采用 *t* 检验进行统计分析。

2 结果与讨论

2.1 17β -雌二醇对 MCF-7 细胞的增殖效应

MCF-7 细胞是一种雌激素受体表达阳性的细胞,对雌激素或具有雌激素作用的物质可产生特异性反应,对雌激素的作用敏感,常被用于检测外源性雌激素的活性^[5]。试验结果表明,当 17β -雌二醇的浓度为 $10^{-10} \sim 10^{-12}$ mol/L 时,可诱导 MCF-7 细胞增殖,其 PI 分别是对照组的 1.42、1.38、1.35 倍;当 17β -雌二醇的浓度为 10^{-8} mol/L 时, MCF-7 细胞的增殖效应最大,其 PI 为对照组的 2.56 倍;随 17β -雌二醇浓度的增加, MCF-7 细胞的增殖效应逐渐下降,出现细胞毒性反应。这表明被测样品在一定浓度范围内具有雌激素活性,一旦浓度超过该范围时可引起病理变化,出现毒性反应。结果表明, 17β -雌二醇存在剂量-效应关系。

2.2 提取物对 MCF-7 细胞的增殖效应

水源水提取物对 MCF-7 细胞的增殖效应与 17β -雌二醇的类似,也表现出剂量-效应关系,最大增殖效应出现在相当于源水体积为 270 mL 时的浓度。当源水浓度增加时出现细胞毒性作用。由试验结果还可知,水样有机提取物的雌激素体外作用剂量在源水体积为 90~810 mL 之间,高剂量的水样有机提取物在体外试验中可导致细胞死亡。自来水提取物在相当于源水体积为 10~2 430 mL 的浓度范围内时, MCF-7 细胞的增殖指数基本稳定,没有表现出增殖效应。

2.3 提取物对大鼠子宫重量的影响

试验结果表明,水样提取物在相当于源水体积为 5 L/kg 和 25 L/kg 剂量组时均可引起大鼠子宫重量的增加,经 *t* 检验,两个剂量组的子宫重量系数与对照组比较有统计学意义($p < 0.05$, $p < 0.01$)。子宫增重试验是最早建立的检测雌激素活性的整体试验方法,不仅可以测定外源性雌激素化合物的雌激素干扰作用,还可检测需要在体内经代谢活化才具有雌激素活性的物质和某些中间代谢产物,被称为雌激素检测的“金标准”^[6-8]。由试验结果可知,水样有机提取物的雌激素体内作用剂量为 5~125 L/kg,在体内试验中,高剂量的水样有机提取物对

大鼠有一定的发育毒性。

3 结论

① 通过体外和体内试验的组合, 以混合物为整体进行环境雌激素的检测, 能较准确、全面地反映水样有机提取物的雌激素活性。

② 水源水提取物对 MCF-7 细胞的增殖效应表现出剂量-效应关系, 高剂量的水样有机提取物在体外试验中可引起病理变化的毒性作用, 从而导致细胞死亡; 自来水提取物对 MCF-7 细胞的增殖指数基本稳定, 没有表现出增殖效应。

③ 水源水及自来水的有机提取物均可导致子宫增重, 高剂量的水样有机提取物有一定的发育毒性。这表明水源水和自来水中的有机物在经过体内一系列代谢转化后, 仍然具有雌激素活性; 同时也说明目前常规的饮用水处理工艺尚难以去除水体中具有雌激素活性的有机物。

参考文献:

- [1] 肖羽堂, 张晶晶, 吴鸣, 等. 我国水资源污染与饮用水安全性研究 [J]. 长江流域资源与环境, 2001, 10(1): 51-59.

- [2] Carlsen E, Giverran A, Keiding N, *et al*. Evidence for decreasing quality of semen during past 50 years [J]. *J British Medical* 1992, 305(6854): 609-613.
- [3] Deroo B, J Korach K S. Estrogen receptors and human disease [J]. *J Clinical Invest* 2006, 116(3): 561-570.
- [4] Fakoner IR, Chapman H E, Moore M R, *et al*. Endocrine-disrupting compounds: A review of their challenge to sustainable and safe water supply and water reuse [J]. *Environ Toxicol* 2006, 21(2): 181-191.
- [5] 刘兆平. 环境雌激素活性物质的检测 [J]. 国外医学卫生学分册, 2000, 27(2): 96-100.
- [6] 常艳, 朱心强. 外源性雌激素的检测方法 [J]. 中国公共卫生, 1999, 15(3): 252-254.
- [7] 范奇元, 丁训诚. 用子宫增重试验检测壬基酚的雌激素样作用 [J]. 劳动医学, 2000, 17(4): 196-197.
- [8] 赵炳顺, 储少岗. 小鼠子宫增重法检测国产三氯杀螨醇的雌激素生物活性 [J]. 环境科学学报, 2000, 20(2): 244-247.

电话: 13851582798

E-mail: zhangxujun@sina.com

收稿日期: 2009-03-06

(上接第 62 页)

3 结论

① 从某炼油厂排污口的污泥中筛选、分离得到一株汽油降解菌 X, 经形态学特征及生理生化特性鉴定, 确定其为假单胞菌属; 该菌降解汽油的最佳温度为 37℃、pH 值为 8.0, 摇床转速为 180 r/min, 在此条件下对汽油的降解率为 80% 左右。

② 重金属 Cu^{2+} 对 X 菌株降解汽油的影响是双重的, 当 Cu^{2+} 浓度 $< 0.1 \text{ mg/L}$ 时, Cu^{2+} 对汽油的降解有一定的促进作用; 但当 Cu^{2+} 浓度 $> 0.1 \text{ mg/L}$ 时, Cu^{2+} 对 X 菌株的生长有明显的抑制作用。

③ 当表面活性剂 SDS 浓度 $\leq 100 \text{ mg/L}$ 时, 可促进 X 菌株对汽油的降解; 但当 SDS 浓度 $> 100 \text{ mg/L}$ 时, 会对汽油的降解产生抑制作用。

④ X 菌株可重复利用多次, 且前两次对汽油的降解率均较高。

参考文献:

- [1] 陈文新. 土壤与环境微生物学 [M]. 北京: 北京农业

大学出版社, 1990.

- [2] 韩力平, 王建龙, 施汉昌, 等. 生物强化技术在难降解有机物处理中的应用 [J]. 环境科学, 1999, 20(6): 100-102.
- [3] Simon M A, Bonner J S, Page C A, *et al*. Evaluation of two commercial bioaugmentation products for enhanced removal of petroleum from a wetland [J]. *Ecol Eng* 2004, 22(4-5): 263-277.
- [4] 东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册 [M]. 北京: 科学出版社, 2001.
- [5] Rahman K S M, Banat I M, Thahira J *et al*. Bioremediation of gasoline contaminated soil by a bacterial consortium amended with poultry litter, coir pith and thanolipid biosurfactant [J]. *Bioresour Technol* 2002, 81(1): 25-32.

电话: 13782462906

E-mail: zjt240@163.com

收稿日期: 2009-03-13