

行政院國家科學委員會補助專題研究計畫成果報告

環境中干擾內分泌之污染物 (EDC) 對國內水棲 生物之混合毒性效應

The combined effects of environmental endocrine
disrupting chemical (EDC) in marine organism

計畫類別： 個別型計畫 整合型計畫

計畫編號：NSC 91-2211-E-009-034

執行期間：91 年 8 月 1 日至 92 年 10 月 31 日

計畫主持人：陳重元

共同主持人：

計畫研究人員：傅耕彥

成果報告類型(依經費核定清單規定繳交)： 精簡報告 完整報告

本成果報告包括以下應繳交之附件：

赴國外出差或研習心得報告一份

赴大陸地區出差或研習心得報告一份

出席國際學術會議心得報告及發表之論文各一份

國際合作研究計畫國外研究報告書一份

處理方式：除產學合作研究計畫、提升產業技術及人才培育研究計畫、
列管計畫及下列情形者外，得立即公開查詢

涉及專利或其他智慧財產權， 一年 二年後可公開查詢

執行單位：國立交通大學環境工程研究所

中華民國 93 年 1 月 30 日

中文摘要

環境荷爾蒙的研究是近年來新興且熱門的研究課題，其中，全球各地陸續出現的雄魚雌性化現象最被廣泛研究及探討，相關的篩選方法及影響評估正在建立，以作為日後管制放流水的依據。

本研究為三年期計畫，首先獲取本土溪流魚類(苦花)雌性激素受體基因，利用基因重組技術，將雌性激素受體基因殖入適當酵母菌中，以建構一套受體-環境荷爾蒙作用機制的生體外實驗來模擬魚類內分泌系統，藉由測量 β -galactosidase 活性快速偵測疑似環境荷爾蒙物質，可作為單一污染物對本土性魚種內分泌干擾效應及強度分析研究。另外以較易取得的本土溪流魚類(土鯽魚)進行活體實驗，以卵黃前質做為生物指標，進行多項常見污染物的單一及混合效應研究，進而探討污染物對環境的衝擊。

實驗結果共獲取苦花兩種雌性激素受體基因($ER\alpha$ & $ER\beta$)，其中 $ER\alpha$ 的轉譯區(coding region)為 1704bp，可轉譯出 568 個胺基酸， $ER\beta$ 的轉譯區為 1836bp，可轉譯出 612 個胺基酸。將 $ER\alpha$ 、 $ER\beta$ 轉殖到 YM4271 (CLONTECH) 酵母菌株並進行 11 種污染物分析，發現僅 17β -estradiol (E2)、bisphenol A (BPA)、4-nonylphenol (4-NP)、4-tert-octylphenol (4-t-OP) 可誘發轉錄活性(transcription)，另外探討污染物對兩種酵母菌株的實驗參數(ligand efficiency and ligand potency) 之意義。

在土鯽魚活體實驗方面，取 17β -estradiol、bisphenol A、4-nonylphenol 進行單一暴露實驗，水體暴露兩星期後求取與卵黃前質生成的劑量反應關係，之後兩兩混合進行混合效應探討，結果顯示為加成作用，與 Arukwe et al. 及 Thorpe et al. 等實驗結果有異，有待進一步的分析研究。

關鍵詞：環境荷爾蒙、基因重組、雌性激素受體、卵黃前質

ABSTRACT

The increasing concern of environmental hormone has become new studying object in the last year. These compound resulted in the feminization of male fish were extensively investigated. The related screen methods and risk assessment were established and can be used for the discharge control.

This study is a three-year plan and first we try to get the fish (*Varicorhinus barbatulus*) estrogen receptor gene. Then we construct a rapid screen method using the gene-transfer technology to establish a recombinant yeast system. Based on such a simple and rapid test, we may screen a large number of various environmental hormones and establish a useful database for these toxicants. Another, the more easy obtained fish (*Carassius auratus*) was used for in vivo test and quantified vitellogenin protein as the biomarker. The single and combined effects were analyzed with different contaminants and explored the risk assessment to the environment.

The result showed that different isoforms of estrogen receptor (ER α and ER β) were cloned. The coding region of estrogen receptor alpha (ER α) cDNA has 1704bp and can be translating 568 amino acid residues and estrogen receptor beta (ER β) has 1836bp and should be translating 612 amino acid residues. The recombinant yeasts with both isoforms were screen for 11 contaminants and only four chemicals such as 17 β -estradiol (E2), bisphenol A (BPA), 4-nonylphenol (4-NP), 4-tert-octylphenol (4-t-OP) can induce transactivation. The ligand efficiency and ligand potency were discussed for both isoform estrogen receptor and contaminants.

In vivo test, we use *Carassius auratus* to detect the single response effects to three compounds (17 β -estradiol, bisphenol A, 4-nonylphenol). After two weeks exposure experiments, the concentration-response relationships could be gained used vitellogenin as the response end point. Then mixtures with two compounds, it showed the addition effects in this study. But they showed different effects by Arukwe et al. and Thorpe et al., it would be further investigated.

Keywords : environmental hormone, gene-transfer technology, estrogen receptor, vitellogenin

目 錄

中文摘要.....	I
ABSTRAT.....	II
目錄.....	III
表目錄.....	IV
圖目錄.....	IV
第一章 緒論.....	1
1.1 研究緣起.....	1
1.2 研究目的.....	1
第二章 文獻回顧.....	2
第三章 研究方法.....	3
3.1 酵母菌轉殖株篩選實驗.....	3
3.1.1 實驗材料與物種.....	3
3.1.2 雌性激素受體基因之選殖.....	3
3.1.3 建構基因重組酵母菌.....	3
3.1.4 酵母菌轉錄活化測定.....	3
3.1.5 污染物對酵母菌轉錄活化實驗相關參數.....	6
3.2 土鯽魚活體實驗.....	6
3.2.1 實驗材料與物種.....	6
3.2.2 卵黃素純化.....	6
3.2.3 建立土鯽魚卵黃素酵素免疫分析法.....	6..
3.2.4 不同濃度受測物之浸泡實驗.....	8
第四章 結果與討論.....	10
4.1 苦花雌性激素受體基因選殖.....	10
4.2 重組酵母菌株轉譯活化實驗.....	10
4.4 土鯽魚活體單一浸泡實驗.....	11
4.4 土鯽魚活體混合浸泡實驗.....	11
4.5 結論與建議.....	12
第五章 計畫成果自評.....	13

參考文獻.....	14
-----------	----

表目錄

表 1	日本環境廳公佈之疑似內分泌干擾物質一覽表.....	26
表 2	環境荷爾蒙混合效應相關文獻.....	28
表 3	E2, 4-NP, 4-t-OP, BPA 對不同酵母菌轉殖株參數(ligand potency and ligand efficiency)整理.....	28
表 4	土鯽魚活體實驗溶劑控制組卵黃前質生成平均值、標準差、變異係數.....	28
表 5	土鯽魚活體實驗浸泡 E2、BPA、4NP 兩星期後卵黃前質生成平均值、標準差、變異係數.....	29
表 6	土鯽魚活體實驗混合浸泡實驗(E2+BPA、E2+4NP、BPA+4NP)兩星期後卵黃前質生成平均值、標準差、變異係數.....	29
表 7	土鯽魚活體實驗混合浸泡實驗(E2+BPA、E2+4NP、BPA+4NP)預測加成反應卵黃前質生成量.....	30

圖目錄

圖 1	環境荷爾蒙的分子作用機制.....	17
圖 2	雌性激素受體基因全長之選殖流程圖.....	18
圖 3	苦花(<i>Varicorhinus barbatulus</i>) 雌性激素受體 alpha (ER α) 的核酸序列及轉譯出蛋白質.....	19
圖 4	苦花(<i>Varicorhinus barbatulus</i>) 雌性激素受體 beta (ER β) 的核酸序列及轉譯出蛋白質.....	20
圖 5	E2, 4-NP, 4-t-OP, BPA 對 ER α 酵母菌轉殖株之濃度-反應關係圖...21	21
圖 6	E2, 4-NP, 4-t-OP, BPA 對 ER β 酵母菌轉殖株的濃度-反應關係圖...21	21
圖 7	土鯽魚活體實驗溶劑控制組 (solvent control) 之卵黃前質生成量長條圖.....	22
圖 8	土鯽魚活體實驗 E2 之卵黃前質生成量長條圖.....	22
圖 9	土鯽魚活體實驗 BPA 之卵黃前質生成量長條圖.....	23
圖 10	土鯽魚活體實驗 4NP 之卵黃前質生成量長條圖.....	23
圖 11	土鯽魚活體實驗 E2+BPA 之卵黃前質生成量長條圖.....	24
圖 12	土鯽魚活體實驗 E2+4NP 之卵黃前質生成量長條圖.....	24
圖 13	土鯽魚活體實驗 BPA+4NP 之卵黃前質生成量長條圖.....	25

第一章、 緒 論

1.1 研究緣起

環境荷爾蒙的研究是近年來新興且熱門的研究課題，國外的調查顯示，野生生物遭受環境荷爾蒙危害的著名例子有牡蠣的雄性化現象(imposex)、魚類的雌雄同體、鳥類蛋殼變薄或生育失敗、雄鱷魚的性器短小及卵的孵化率下降，其中，雄魚體內卵黃前質(vitellogenin)及性荷爾蒙的異常變化引起廣泛的研究[1,2]。相較之下，國內目前關於環境荷爾蒙的研究文獻尚少，因此本研究針對本土溪流中常見魚類(苦花、土鯽魚)的內分泌干擾情形與環境荷爾蒙之間的關係進行三年期研究，以便有效檢測及評估環境荷爾蒙對國內溪流魚類的衝擊。

雄魚的雌性化機制(圖 1)，主要是由於環境荷爾蒙會與雌性激素受體(estrogen receptor)首先結合成一複合體，接著附著於標的基因(target gene)並啟動了基因的不正常表現所致，因此實驗首先以基因重組的技術，將雌性激素受體基因及標的基因的結合區域(estrogen response element)共同殖入酵母菌中，藉由指標基因(galactosidase reporter gene)所表現的酵素活性來定量環境荷爾蒙干擾效應的潛力(potency)，建構的重組酵母菌測試法之實驗參數最佳化後，再進行環境荷爾蒙測試，以便能對國內常見污染物中進行雌性激素干擾效應之初步篩選，並作為下一步驟體內實驗之受測化合物選取的參考依據。

另外在活體實驗方面，則選取河川中常見的污染物，觀察對本國河川溪流中土鯽魚的單一及混合效應，藉由卵黃前質等指標蛋白的測定來瞭解這些污染物對本土河川可能造成的衝擊。

1.2 研究目的

環境荷爾蒙會危害人類以及環境中生物，因此各先進國家皆投入人力、經費進行相關研究以評估其危害，並逐步納入放流水或飲用水管制[3,4,5,6]，相較之下，國內相關的研究則還在起步階段。目前環境賀爾蒙在混合效應的研究較少且缺乏預測的模式，因此本實驗欲達成的具體目標：

1. 建構酵母菌成為魚類內分泌系統的模式菌株，用以大量快速分析檢體並做為下一步體內實驗的依據
2. 建立本土溪流魚類與環境賀爾蒙關係的基本資料
3. 進行活體實驗單一及混合效應並探討其對河川可能的衝擊

第二章、 文獻回顧

環境賀爾蒙可能誘導人類癌症的發生(前列腺癌、睪丸癌以及女性乳癌)、精子數目及品質降低、生殖器官的變異，對胚胎或嬰兒的影響尤大，可能導致發育及智能上的缺陷，其影響涵蓋癌症、生殖、神經、免疫系統。另一方面，對野生動物的衝擊則包括族群縮小、癌症發生、生殖機能破壞及神經、免疫系統的變異等[1,2,7,8,9]。

日本環境廳在 1997 年的報告中列出了 67 種可能的環境賀爾蒙[4](表 1)，將再進行深入的研究，關於檢測環境賀爾蒙的內分泌干擾效應，目前已針對其作用機制及目的而有不同的測試方法[10]，一般可分為活體外(in vitro)及活體內(in vivo)實驗。活體外實驗包括 (1) 荷爾蒙受體競爭取代試驗：測定環境荷爾蒙對作用受體的結合力 (2) 基因重組酵母菌實驗：將受體基因轉殖送入酵母菌中，由特定指標(β -galactosidase、luciferase activities)測定其轉錄活化能力 (3) MCF-7 細胞增殖試驗(E-SCREEN)或魚類初級肝細胞培養試驗(liver primary culture)：由人類乳癌細胞 MCF-7 之增殖或魚肝細胞卵黃前質蛋白生成等生物指標測定來瞭解內分泌干擾效應，其中(2)(3)所得到的內分泌干擾效應相關訊息較多。在活體實驗方面，魚類常用的環境荷爾蒙生物指標有性別比率、孵化率、生殖腺指數(gonadosomatic index ; GSI)等，此外，魚血液或肝臟的卵黃前質蛋白、Zrp 蛋白、雄性激素與雌性激素、雄激素及雌激素受體蛋白、與荷爾蒙代謝有關的酵素如 P450 等，皆可作為內分泌干擾的指標，其中卵黃前質蛋白最為廣泛使用且相當敏感[11]。

關於環境賀爾蒙的混合效應方面，有雌性激素受體競爭取代實驗、基因重組酵母菌或細胞株的轉錄活性、人類乳癌細胞增殖(E-SCREEN)、魚體指標蛋白(Vitellogenin or Zrp)測定[12,13,14,15,16,20]，其混合實驗結果見表 2。其中，Arukwe et al. [14]以 Atlantic salmon 為實驗物種，nonylphenol 與 lindane 混合顯示對 vitellogenin 及 zona radiata protein 生成為拮抗作用，Thorpe et al.[20]結果顯示 E2+NP 雖為加成效應，但 E2+MXC 則產生拮抗效應。

第三章、 研究方法

3.1 酵母菌轉殖株篩選實驗

3.1.1 實驗材料與物種

選取出生未滿一年的苦花為實驗物種並進行馴養，測試的化學物質為 17 β -estradiol (E2), bisphenol A (BPA), 4-nonylphenol (4-NP), 4-tert-octylphenol (4-t-OP), Di-n-butylphenol, Butyl benzyl phthalate, DDT, DDD, DDE, PCB1248, PCB1260

3.1.2 雌性激素受體基因之選殖

苦花是向苗栗南庄溪流魚養殖業者購買，選取一年內的幼魚運回實驗室馴養兩週，加入雌性激素(40 μ g/l)於水中誘導受體產生，一週後將魚解剖擷取其肝臟並萃取 total RNA。使用 CLONTECH 公司的 SMART™ RACE cDNA amplification kit 進行受體基因全長(ER α & ER β)之選殖，實驗流程見圖 2。

3.1.3 建構基因重組酵母菌

使用 CLONTECH 公司的 MATCHMAKER One-Hybrid System，首先合成與雌性激素受體結合的反應元(response element)之 DNA 片段並連接於 pLacZi 載體的 MCS (multiple cloning site)，接著以 linear form 送入酵母菌 (YM4271)，以缺乏 Uracil 的 SD agar 篩選基因重組之酵母菌。接著，苦花選殖出的雌性激素受體基因(ER α 、ER β 、ER α +ER β)與 pGAD424 表現載體連接，再送入先前的重組酵母菌中，篩選在缺 Uracil 及 Leucine 的 SD agar 能生長的菌株，然後以 colony-lift filter assay 挑選 β -galactosidase 活性最強的分離菌株以進行實驗。

3.1.4 酵母菌轉錄活化測定

培養重組之酵母菌至 OD₆₀₀=0.5，取 1ml 菌液加入 2ml YPD 培養液及濃縮 (1000X)之標準品及待測物，以 30 恆溫培養 4 小時，測定半乳糖酶 β -galactosidase 活性(OD₄₂₀)及菌數(OD₆₀₀)，可由公式求得待測物轉錄活性。

詳細步驟參照 CLONTECH 的 Yeast Protocols Handbook (PT3024-1)

試劑及材料

①適當液體培養基

YPD medium

20 g/L Difco peptone

10 g/L Yeast extract

加水至 950 mL，滅菌釜滅菌(autoclave)後，待溫度冷卻至~55℃，加入 50 mL 已滅菌 40 % glucose

SD medium

6.7 g Yeast nitrogen base (不含 amino acid)

850 mL H₂O

100 mL 已滅菌 10X Dropout solution 並加入所需的 DO Supplement powder，此處為 SD medium (缺 Uracil 及 Leucine)

②50-ml culture tube

③Z buffer

Na₂HPO₄•7H₂O: 16.1 g/L

NaH₂PO₄•H₂O: 5.50 g/L

KCl: 0.75 g/L

MgSO₄•7H₂O: 0.246 g/L

調整 pH 至 7.0 並滅菌釜滅菌(autoclave)，可保存於室溫下一年

④Z buffer + β-mercaptoethanol

100 ml 的 Z buffer，加入 0.27ml 的β-mercaptoethanol

⑤ONPG(o-nitrophenyl β-D-galactopyranoside)

4 mg/ml in Z buffer，調整 pH 為 7 並均勻混合

⑥1 M Na₂CO₃

⑦液態氮

實驗步驟

1. 以 SD medium (缺 Uracil 及 Leucine) 隔夜培養 10 ml 的轉殖酵母菌液
 2. 實驗當時，配製 4 mg/ml 的 ONPG 在 Z buffer，搖晃 1-2 小時使之溶解
 3. 震盪隔夜培養酵母菌液使菌液均勻懸浮，取 8 ml 加入 32ml 的 YPD medium
 4. 在 30 °C 下培養 3-5 小時，直到生長為 mid-log 生長期，取 1ml 酵母菌液與 2ml YPD 培養液及濃縮(1000X)之標準品及待測物震盪培養 4 小時後，紀錄 OD₆₀₀ 吸光值
 5. 取 1.5 ml 培養液加入 1.5-ml 離心管中以 14,000rpm (10,000 x g) 離心 30 秒
 6. 移去上清液，加入 1.5ml Z buffer 並震盪使細胞均勻懸浮
 7. 在一次離心去除上清液，加入 300 µl Z buffer 使細胞均勻懸浮
 8. 取 0.1ml 細胞懸浮液放置於新的 1.5 ml 離心管
 9. 將離心管放入液態氮中 0.5-1 分鐘急速冷卻
 10. 再放入 37 °C 水浴槽中 0.5-1 分鐘急速溶解
 11. 重複冷卻/溶解步驟數次使細胞完全破碎
 12. 取離心管加入 100 µl z buffer 作為空白組實驗
 13. 加入 0.7 ml Z buffer + β-mercaptoethanol 到反應液及空白組中
 14. 計時，立刻加入 160 µl ONPG (in Z buffer) 到反應液及空白組中
 15. 放入 30 °C 恆溫培養槽
 16. 到呈現黃色時，加入 0.4 ml 1M Na₂CO₃ 終止反應並記錄所花費反應時間
 17. 以 14000 rpm 離心 10 分鐘
 18. 將上清液小心倒入乾淨的測量吸光值的石英管中
 19. 測量 OD₄₂₀ 吸光值
 20. 計算半乳糖酶 β-galactosidase 活性 (Miller unit)
- β -galactosidase units = 1000x OD₄₂₀ / (t x V x OD₆₀₀)
- t = 反應時間 (分鐘)
- V = 0.1 ml x 濃縮因子 (此處濃縮因子為 5，有時需調整使 OD₄₂₀ 在 0.02~1.0 線性區域內)

3.1.5 污染物對酵母菌轉錄活化實驗相關參數

加入不同濃度污染物,並記錄半乳糖酶 β -galactosidase 活性可得一濃度反應關係,根據以下公式進行轉換[16,17]

$$y = \frac{A - D}{1 + [C/x]^B} + D$$

其中 x : 受測物濃度

y : 半乳糖酶 β -galactosidase 活性 (Miller unit)

A : ligand efficiency 即為受測物可誘發最大半乳糖酶的活性

D : 最小半乳糖酶誘導活性

B : 經座標軸 log 轉換後濃度反應曲線的中間部分的斜率

C : ligand potency 達到最大半乳糖酶誘導活性一半時的受測物濃度,又稱為 EC_{50} .

3.2 土鯽魚活體實驗

3.2.1 實驗材料與物種

選取長度在 12-15 公分,重量在 25-35 公克的雄性土鯽魚,經馴養兩週後進行單一及混合暴露實驗,測試的化學物質為 17β -estradiol (E2), bisphenol A (BPA), 4-nonylphenol (4-NP), 養殖環境為溫度控制於 25-26 ,水源為自來水依序經 5micron, 1micron 濾材、活性碳除氯、離子交換等濾出水, pH 值 8-8.1, 光照期: 黑暗期為 12 小時: 12 小時,每日投餵一次適量福壽牌魚苗飼料(3 號)。

3.2.2 卵黃素純化

參照張清風老師之鯉魚方法,將土鯽魚卵巢取出並稱重後,以 8 倍體積之組織均質緩衝液(0.15 M NaCl, 0.5 M Tris-buffer, pH 7.2) 將卵巢於冰浴下磨碎, 3500 rpm 與 4 條件下、離心 30 分鐘,取上層液進行 Gel filtration。Ion exchange 純化,進行蛋白質電泳並以西方墨點法(Western blotting)確認,即製成標準品,每次分析時皆須將標準液以 2 倍之連續稀釋可得 250-3.9ng / 100 μ l 等 7 個標準濃度,再加上 1 組空白實驗(共八組,各 3 重複),作為該次分析之標準曲線(檢量線)。另外,樣品需先經過適當倍數稀釋,一般建議稀釋 1,000-5,000 倍(以 coating buffer 稀釋)以利所測得之數值能夠順利落於檢量線之內,方能準確測得較真實之數據。

3.2.3 建立土鯽魚卵黃素酵素免疫分析法

卵黃素一次抗體感謝張清風老師提供,並參照張清風老師的酵素連結免疫

反應 (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) 的方法[18], 首先, 將卵黃素之標準溶液 (即本研究利用 CL-2B 與 DEAE 膠體純化所得之土鯽魚卵黃素 30 μ g / ml, 濃度 3.90625 \rightarrow 250 ng / 100 μ l) 或適當稀釋倍數之土鯽魚血漿 (1 / 5000) coating 到 96 well microplate 上, 反應 16 小時後, 經 blocking、primary antibody (稀釋 10,000 倍) 與 secondary antibody (稀釋 5,000 倍) 反應, 加入呈色劑 pNPP (Pierce Co.) 等步驟, 含有卵黃素之 well 顏色會隨著含量升高而漸濃。將呈色反應結束後, 加入 2N NaOH 終止反應, 將 microplate 以 410 nm 波長測定其吸光值, 經過計算便可得到一標準曲線或土鯽魚血漿中卵黃素前質含量。

其設備、試劑、血漿採樣保存如下所述

設備：

- ①真空幫浦
- ②八爪微量分注器、微量分注器
- ③微量離心管、離心機
- ④恆溫培養箱
- ⑤分光光度儀 (微量分析盤專用, 405nm 光波長濾鏡)
- ⑥塑膠針筒
- ⑦冰筒
- ⑧Microplate : NUNC, F-16 MAXISORP LOOSE #469914
- ⑨wash buffer 分注器 : NUNC.

試劑：

緩衝溶液及藥品配方

- ①Coating buffer (0.05M, pH 9.8, 4) :
Na₂CO₃ : 0.05 M
NaH CO₃ : 0.05 M
- ②Phosphate buffer saline (PBS 0.01M, pH 7.3, 4) :
Na₂HPO₄ : 0.01 M
NaH₂PO₄ : 0.01 M
NaCl : 0.15 M
- ③PBS tween 20 (wash buffer 0.01 M, pH 7.3, 25) :

PBS : 1 liter

Tween 20 : 0.05 %NaN₃ : 0.2%

④Blocking buffer (0.01 M phosphate buffer with BSA, pH 7.3, 4) :

PBS : 1 liter

Bovine serum albumin (BSA) : 0.5 %

⑤Substrate solution (pH 9.6, 4) :

Diethanolamine (林純, 040-01015): 700 µl

MgCl₂ : 100 mg

Total volume : 1 liter

⑥Substrate buffer pH 9.6 (fresh, protect from light) :

p-Nitrophenol phosphate disodium salt (pNPP, Pierce, 34047) :

: 5mg / tab

Substrate solution : 5 ml

⑦Stop solution (in H₂O, 25) :

NaOH : 3N

NOTE :

1. Standard solution or sample diluted by Coating buffer
2. Antibodies diluted by Blocking buffer
3. Substrate (pNPP) diluted by substrate solution.

麻醉劑抽血時應於針筒中加少量抗凝血劑 (0.3M EDTA-2Na, dissolved in 0.9% NaCl solution)。

血漿採樣及保存 :

將鯉魚適當麻醉後，自尾柄附近抽取背大動脈之血液 (針筒內需加抗凝血劑)，以 3000rpm、4 之條件離心 10 分鐘後取得血漿 (上清液)，保存於-20 (短時間) -80 (可保存 1 年以上)，切勿將血漿原液凍結解凍太多次 (蛋白質易變質)。

3.2.4 不同濃度受測物之浸泡實驗

隨機選取土鯽魚三條，分別添加受測物，其濃度與組別為：①對照組(solvent control)，② 17β-estradiol ③ bisphenol A ④ 4-nonylphenol。將各標準物質分別溶於絕對酒精成 stock 液，再溶於受測魚缸過濾水中，E2 的濃度由低而高依序

為 1,5,10,20 nM, BPA 的濃度依序為 0.5,1,5,10 μ M, 4-NP 的濃度依序為 0.1,0.5,1,5 μ M ; 混合實驗則是單一濃度減半依序混合進行實驗, 每天更換一半新水與補充受測物至各組養殖缸中, 其後於第 14 天分別採取血漿以進行卵黃素酵素免疫分析。

第四章、 結果與討論

4.1 苦花雌性激素受體基因選殖

選取六種魚類，即gilthead sea bream.(AJ006039)、 Oryzias sp (D28954)) Oncorhynchus mykiss(AJ242740) channel catfish(AF061275) Atlantic croaker (AF298181) goldfish (AF061269) 比對後的高度演化保守區域(high conserved region)設計兩條核苷酸引子，再以三種魚3'RACE反應之first strand cDNA作為起始模版，經PCR擴增後進行2 % 凝膠電泳，經EtBr染色觀察到約0.9kb的位置有DNA亮帶，進行次選殖及DNA定序，可得到950bp的DNA序列，在NCBI網站進行基因比對，確定是雌性激素受體之基因片段，再以5'RACE反應之first strand cDNA作為起始模版，根據所獲得的DNA序列設計引子進行PCR，可觀察到約0.8kb處有DNA亮帶，進行次選殖及定序以獲得受體基因在5'端位置的DNA序列，同樣以3'RACE反應之first strand cDNA作為起始模版，已知950bp的DNA序列設計另一引子進行PCR，則在約1.3kb位置有DNA亮帶，接著進行次選殖及定序以獲得3'端位置的DNA序列，將三段基因比對組合以獲得受體基因全長之序列，共可獲得兩條苦花雌性激素受體基因全長，分別為estrogen receptor alpha (ER α)及 estrogen receptor beta (ER β)，其基因序列及轉譯的蛋白質見圖3及圖4。其中，苦花ER α 則可轉譯出568個胺基酸的蛋白質，分子量為63064。ER β 則可轉譯出612個胺基酸的蛋白質，分子量為68069。

4.2 重組酵母菌株轉譯活化實驗

接著設計含有限制酶切點(*EcoR* I and *Sal* I)的核苷酸引子，並以苦花5'RACE反應之first strand cDNA當作起始模版，以PCR反應增生出雌性激素受體DNA全長，並跑電泳確認，將全長接至酵母菌表現載體pGAD424中。另一方面，標的序列結合區域(target gene)亦與pLacZi載體結合，並定序加以確認，再以*Nco* I截切後轉形送入酵母菌YM4271中。然後再將重組的pGAD424表現載體轉形送入酵母菌，以colony-lift filter assay篩選出最具活性的分離菌落，加入不同濃度的受測物紀錄其轉錄活性(transactivation)，可得一濃度-反應關係圖(圖5 圖6)，經轉換並進行curve fitting可求得ligand efficiency及ligand potency; ligand efficiency即為受測物可誘發最大半乳糖酶的活性，ligand potency為達到最大半乳糖酶誘導活性一半時的受測物濃度，又稱為EC₅₀，ligand efficiency為雌性激素受體與轉錄複合體(transcription complex)的穩定有關，ligand potency則為受測物與雌性激素受體的親和力(affinity)有關，受測物對ER α 及ER β 的參數整理見表3，在ligand efficiency方面，不同受測物對ER α 酵母菌轉殖株的排序由強而弱依序為E2 > 4-NP > BPA > 4-t-OP，對ER β 酵母菌轉

殖株則有不同排序依序為 E2 > BPA > 4-t-OP > 4-NP，另外，同一受測物對 ER α 酵母菌轉殖株的 ligand efficiency 一般來說較 ER β 酵母菌轉殖株來的高；在 ligand potency 方面，E2 為最低，表示在 nM 即可敏感誘發轉錄活化，4-NP 及 4-t-OP 為同一等級，BPA 則最不敏感，同時，相同受測物對 ER α 及 ER β 酵母菌轉殖株的 ligand potency 則類似，且沒甚麼規律性。

4.3 土鯽魚活體單一浸泡實驗

表 4 為溶劑控制組，表 5 為浸泡 E2、BPA、4NP 等之實驗，所繪製的長條圖見圖 7~圖 10，由結果可知，溶劑控制組與最低浸泡濃度的卵黃前質生成量相近，且變動範圍都有 overlap，因此在不添加環境荷爾蒙時，雄魚本身可能有微量卵黃前質生成，故在極低量環境荷爾蒙添加後，本身的誘導量極微小而無法與溶劑控制組有顯著差異，另外的可能原因與抗體的專一性有關，導致仍有微量的非卵黃前質蛋白與抗體結合產生呈色反應。實驗結果顯示，低濃度時的變異係數，如單一浸泡實驗中最低濃度時的變異係數在 38~46%，大於最高濃度時的變異係數(15~20%)。在土鯽魚活體浸泡實驗，卵黃前質呈現隨濃度增加而遞增的關係，在四組浸泡實驗中，次低濃度下，一般可顯示有顯著差異，與溶劑控制組相較，約是溶劑控制組的 2.5~4 倍的差距，而次高濃度則為溶劑控制組的 4~8 倍的差距，最高浸泡濃度與溶劑控制組則有約 9~12 倍的差距。在更高濃度時，如 BPA 的浸泡濃度為 50 μ M 及 4NP 的濃度為 10 μ M 實則會造成土鯽魚的死亡，因此數據並不列出來，而 E2 的浸泡濃度由 20nM 提高到 50nM，卵黃前質的生成由 12192 μ g/ml 略微增加至 13650 μ g/ml，因此可知本實驗所取的暴露濃度已接近魚體可忍受的極限，一般河川中並不太可能存在如此大量污染物濃度，同時參照第一屆環境荷爾蒙與持久性有機污染物研討會丁研究群 [19] 的調查研究，所調查的五條河川中壬基苯酚的含量最高的為東港溪的 2.4 μ g/l，換算後濃度為 0.016 μ M，較本實驗 4NP 最低浸泡濃度 0.1 μ M 還低，在本實驗的最低濃度並沒有顯著的卵黃前質被誘導出來，因此推測河川受壬基苯酚的衝擊應該不大。

4.4 土鯽魚活體混合浸泡實驗

因為河川中魚類常是暴露於多種化學物質之水體，因此探討其混合效應是必要的，本實驗以 E2+BPA、E2+4NP、BPA+4NP 進行混合實驗，並繪製成圖表(表 6 及圖 11~13)，由結果可知，由預測其加成反應(表 7) 數據來看，大部分的混合效應為加成反應，只有 BPA+4NP 的混合呈現拮抗反應，但亦有可能是實驗在低濃度時所造成的誤差，因為在混合實驗中其變異係數在最低濃度混合時有 57~93% 的變動，本實驗與其他實驗的結果比較，如 knudsen et al. [12] 以 Rainbow trout 進行實驗，混合的物質為 octylphenol+butyl benzyl thalate、octyl phenol+estradiol 並偵測 zona radiata protein (Zrp) 為反應終點，結果顯示均為相加效應，而在 Arukwe et al. [14] 以 Atlantic salmon 為實驗物種，偵測的反應終點

則為 Zrp 及 vitellogenin, 結果 NP 與 lindane (γ -HCH)有拮抗效應, 在 Thorpe et al. [20]進行 E2+NP、E2+methoxychlor(MXC)、MXC+NP 的混合實驗, 以 Rainbow trout 為實驗物種, Vitellogenin 為反應終點, 結果顯示 E2+NP 為加成效應, E2+MXC 為拮抗效應, 推測 NP 可能與 E2 經由相同的機制誘導 vitellogenin 生成, 而 MXC 則可能與 E2 誘導 vitellogenin 生成的機制不同。由以上文獻可知, 不同的反應終點或不同受測物種可能導致不同的混合效應, 如 Arukwe et al.結果顯示 NP 與 lindane (γ -HCH)混合甚至導致 Zrp 及 vitellogenin 拮抗反應; 在 Thorpe et al.以 Vitellogenin 為反應終點, E2+NP 雖為加成效應, 但 E2+MXC 則產生拮抗作用, 與本實驗兩種物質混合僅產生加成效應的結果不同, 可能從不同魚種之作用機制做進一步探討。另外, 因為在本實驗中三種污染物兩兩混合對土鯽魚並不會產生協同作用, 因此這三種污染物可能對土鯽魚等溪流魚的內分泌干擾效應危害較小。

4.5 結論與建議

本實驗所建立的實驗方法, 如酵母菌轉殖株篩選實驗, 土鯽魚活體實驗, 皆可敏感有效的偵測環境荷爾蒙物質, 在酵母菌轉殖株篩選實驗, 可知在 11 種受測物質中, 僅 17 β -estradiol, bisphenol A, 4-nonylphenol, 4-tert-octylphenol 可誘發轉錄活性(transactivation), 而且在相關參數 ligand efficiency 及 ligand potency 的分析, 其中, 相同的受測物對不同 isoform 的雌性激素受體 (ER α 、ER β), 其參數亦顯示不同的結果, 因此可知相同受測物在分子誘導機制上之不同, 而一般生物體除了有 α form、 β form 外, 近年來亦發現 γ form, 其在生理上所扮演的角色則待進一步調查加以釐清。另外在活體實驗方面, 單一浸泡實驗結果顯示 17 β -estradiol, bisphenol A, 4-nonylphenol 為隨濃度增加導致卵黃前質的生成隨之增加, 但在一般的河川其濃度並不太可能達到受測時的最低濃度, 然而河川中的影響因子太多, 如其他化學物質造成的混合效應, 物理, 化學因素的影響及生物體本身敏感性, 皆可能導致不同的結果, 因此河川中的環境荷爾蒙衝擊效應需更進一步調查以獲取更多的實驗數據才能對其衝擊效應有較明顯的評論, 在本實驗的混合效應的分析, 一般來說 E2+BPA、E2+4NP、BPA+4NP 呈現相加效應, 與 Arukwe et al.及 Thorpe et al.等實驗結果有異, 有待進一步的分析研究。

第五章、計畫成果自評

本實驗所建立的實驗方法，如酵母菌轉殖株篩選實驗，土鯽魚活體實驗，皆可敏感有效進行環境荷爾蒙的偵測，並可推廣到其他魚類的應用。酵母菌轉殖株篩選實驗除可用於疑似環境荷爾蒙的大量快速篩選，尚可仿效國外發表的文獻加以改良用於野外水體的快速測定；而在活體實驗方面，卵黃前質測定方法的建立可用於野外土鯽魚的長期監控，判別所採的環境樣品是否遭到環境荷爾蒙污染之依據，尚可與本實驗的結果進行比較分析而更瞭解環境荷爾蒙所造成的影響。

另外，苦花的雌性激素受體基因亦在 NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/submit/wetseq.cgi>) 網站註冊，11 種污染物對酵母菌轉殖株的轉錄活化分析亦在 IWA 的國際會議上[21]進行口頭報告，除了酵母菌轉殖株實驗結果，土鯽魚活體混合浸泡實驗兩兩混合皆為加成效應與 Arukwe et al.及 Thorpe et al.等實驗結果不同，將進行分析探討並投稿至國際期刊，綜上可知，本研究之成果基本上有達成預期目標，研究內容與計畫亦符合，研究成果亦有相當高的應用價值。

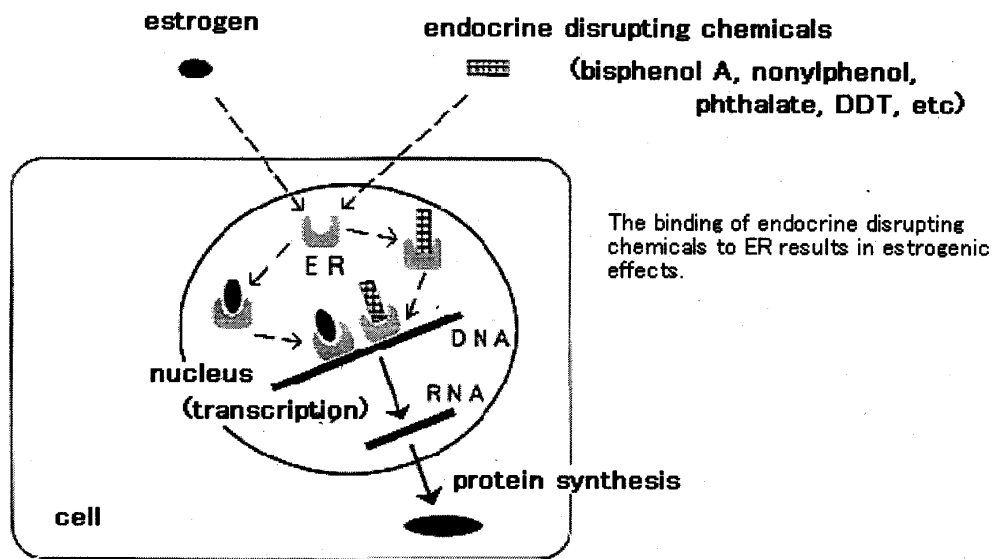
參考文獻

1. Harrison,P.T.C.,Holmes,P. and Humfrey,C.D.N. 1997. In: The Science Of The Total Environment, 205:97-106.
2. Menditto, A.and Turrio-Baldassarri, L. 1999. In: Chemosphere, 39:1301-1307.
3. Kavlock, R.J. 1999. Overview of endocrine disruptor research activity in the United States. Chemosphere. 39:1227-1236.
4. Japan Environment Agency [online] Available <http://www.eic.or.jp/eanet/e/end/sp98.html>, February 18, 2000.
5. US EPA. 1997. Special Report on environmental endocrine disruption: An effects assessment and analysis.
6. UK Environment Agency. 1998. Consultative Report: Endocrine-disrupting substances in the environment: What should be done?
7. Keith L.H.,Eds. 1997. Environmental endocrine disruptors: a handbook of property data. John wiley & sons, inc.
8. Younes, M. 1999. Specific issues in health risk assessment of endocrine disrupting chemicals and international activities. Chemosphere. 39:1253-1257.
9. Jimenez, B. 1997. Environmental effects of endocrine disruptors and current methodologies for assessing wildlife health effects. Trends In Analytical Chemistry. 16:596-606.
10. Sonnenschein, C., Soto, A.M. 1998. An updates review of environmental estrogen and androgen mimics and antagonists. J. Steroid. Biochem. Molec. Biol. 65:143-150.
11. Kime, D.E. 1999. A strategy for assessing the effects of xenobiotics on fish reproduction. Sci. Total Environ.225:3-11.
12. Knudsen, F.R., Arukwe, A. and Pottinger, T.G. 1998. The in vivo effect of

- combinations of octylphenol, butylbenzylphthalate and estradiol on liver estradiol receptor modulation and induction of zona radiata proteins in rainbow trout: no evidence of synergy. *Environ. Pollut.* 103:75-80.
13. Tully, D.B., Cox, V. T., Mumtaz, M.M., Davis, V.L. and Chapin, R.E. 2000. Six high-priority organochlorine pesticides, either singly or in combination, are nonestrogenic in transfected HeLa cells. *Reprod. Toxicol.* 14: 95-102.
 14. Arukwe, A., Celius, T., Walther, B.T. and Goksoyr, A. 2000. Effects of xenoestrogen treatment on *zona radiata* protein and vitellogenin expression in Atlantic salmon (*Salmo Salar*). *Aquat. Toxicol.* 49: 159-170.
 15. Stelzer, A. and Chan, H.M. 1999. The relative estrogenic activity of technical toxaphene mixture and two individual congeners. *Toxicology.* 138: 69-80.
 16. Graumann, K., Breithofer, A. and Jungbauer, A. 1999. Monitoring of estrogen mimics by a recombinant yeast assay: synergy between natural and synthetic compounds? *Sci. Total Environ.* 225:69-79.
 17. Rehmann K., Schramm K.W. and Kettrup A.A. 1999. Applicability of a yeast oestrogen screen for the detection of oestrogen-like activities in environmental samples. *Chemosphere.* **38**(14): 3303-3312.
 18. Chang, C. F., Lau, E. L., Lin, B. Y. and Jeng, S. R. 1996. Characterization of vitellogenin induced by estradiol-17 β in protandrous black porgy, *Acanthopagrus schlegeli*. *Fish Physiol. Biochem.* 15, 11-19.
 19. 環境荷爾蒙 - 壬基苯酚及其相關化學物質在臺灣水環境中之分析與調查. 丁望賢、吳建誼, 周瓊瑤, 王正雄, 2000 第一屆環境荷爾蒙與持久性有機污染物研討會: pp 153-155. 台大, 臺北
 20. Thorpe, K.L., Hutchinson, T.H., Hetheridge, M.J., Scholze, M., Sumpter, J.P. and Tyler, C.R. 2001. Assessing the biological potency of binary mixtures of environmental estrogens using vitellogenin induction in juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Environ Sci Technol.* 35(12): 2476-81.
 21. Fu K. Y. and Chen C. Y. 2003. Different effects of xenoestrogens by the recombinant yeast assays transformed by estrogen receptor alpha and estrogen

receptor beta gene. In: Proc. (Disc) IWA Conference on Environmental Biotechnology –Kuala Lumpur (Theme F05, oral).

The Mechanism of Estrogenic Effects



ER(estrogen receptor):it activates genes(DNA) by binding to estrogens.

圖 1、環境荷爾蒙的分子作用機制。內分泌干擾物（endocrine disrupting chemicals）會模擬雌性激素（estrogen）與雌性激素受體結合（ER），進而誘發不正常的基因表現

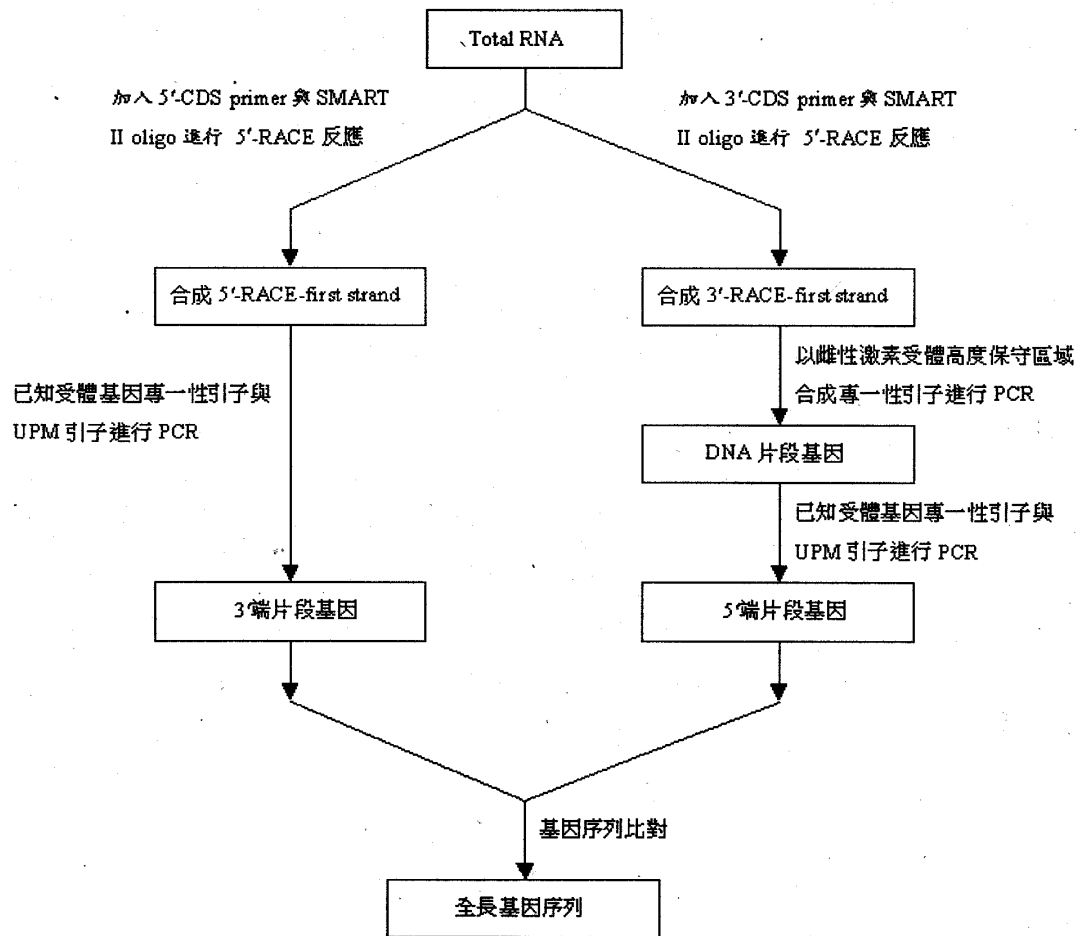


圖 2 雌性激素受體基因全長之選殖流程圖

1 ACGCGGGAG
11 AACAGGGGAGAGAGTTTGAGAAAGACAGTGGGAGGTAACAAAAAGACTGAGCTTAAAAAGACAGAAACGGTCTTTTGATGGTTGC
101 TTGTGAACAGATATTACCTTAAGTCATGCTGGCCCGTGTGTGTTCCATGGTGTATGTCTGGAGGGCAGACCGGTGGAGACTTCTGGT
191 GCCAGGCAGGACGCAAGACAGCCCGAGCCCGGAGAGAGAAAGACCTGGAGGGACTTTCCTTACCAACCCGCTGTCCATAAACTCTCGACT
281 ATGTACCCTAAGGAGGACACAGTGGGGGGGATCAGTTCTCTGTCAACTACCTTGATGGAGCCTATGAGTTCCCAAACCCACACAG
M Y P K E E H S A G G I S S S V N Y L D G A Y E F P N P T Q 30
371 ACCTACGGCACCTCATCACCACCGAGCCTGCCTCGGTGCGATACTACCCAGCTCCCCCGACCCCAACCGCCCGCTGTGAAGAACAT
T Y G T S S P T E P A S V G Y Y P A P P D P H A P P A E E H 60
461 CTGCAGACCTTAGGCACCGGATCTGGCAGCCCTCTCATGTTTGACCCCTCCAGCCCTCAGTTGTCCCGTACCTGAACCATCATGGGGGA
L Q T L G T G S G S P L M F A P S S P Q L S R Y L N H H G G 90
551 CACCACTCGAACCACAGGTGTCTACTAOCCTGGACAGCCCTTCTAGCACCGTCTACAGTCCAGTGTGTGTGTCTCAGCAGGCAGGT
H H S T H Q V S Y Y L D S P S S T V Y R S S V V C S Q Q A G 120
641 GTTGGTTTGTGTGAGGATCTGTGCAGTCCCACTGACAGACAGGAGTGTACTCTGGATCAAGAGCCGAGGAGGTTTGTATCAGAGAAG
V G L C E D L C S A T D R Q E L Y S G S R A A G G F D S E K 150
731 GAGACCGCTTCTGTGCAGTGTGCAGTACTATGCGTCTGGCTATCATTATGGAGTGTGTCTGTGAGGGATGCAAAGCTTTCTTCAAG
E T R F C A V C S D Y A S G Y H Y G V W S C E G C K A F F K 180
821 AGAAGCATTAAGTCAAACTGACTATGTTGTCCGGCAACCAACAGTGCCTATTGACAGAAACCGAGGAGAGCTGCCAAGCTTGC
R S I Q G H N D Y V C P A T N Q C T I D R N R R K S C Q A C 210
911 AGACTACGCAAGTCTATGAAGTAGGCATGATGAAAGGAGTATTOGTAAGGACCGGGGGCCGACTATCAGGCGTGACAGGAGGAGG
R L R K C Y E V G M M K G G I R K D R G G R T I R R D R R R 240
1001 AGCGCTAATGAAGATCGTGTCAAGTGTACAGTGCAGTCAAGCCGCAACTGTCTGAGAACAGTCTCTGTGAGGACAGGAGGAAGAAG
S A N E D R V K C Y S E Q S S R N C L R T A P L Q D R R K K 270
1091 AGCAGTAGTGTGTGGTCACTTATGATGCTCTGACAGGTCCTGGTGTGTCTGTGGGGCAGAGCCCGCCGCTGTCTCA
S S S G V V S A L C M R P D Q V L V L L L G A E P P A V C S 300
1181 CGACAGAAACACAGCCCGCTACACTGAGATCACCATGATGTCCTGCTCACAAACATGGCTGACAAAGAAGTCTGCCACATGATCGCC
R Q K H S R P Y T E I T M M S L L T N M A D K E L V H M I A 330
1271 TGGCTAAGAAAGTACCAGGCTTCCAGGATCTCTCTGACAGGATCAGGTTGAGTGTGGAGAGCTCTGGCTGGAGTGTGTGATGATC
W A K K V P G F Q D L S L H D Q V Q L L E S S W L E - V L M I 360
1361 GGCCATCATAGGAGTCTATTCACTACCTGGAAAACACTATCTTTGCTCAGGATCTCATCCTCGATAGGAGTGAAGGAGAATGTGTGAG
G L I W R S I H S P G K L I F A Q D L I L D R S E G E C V E 390
1451 GGGATGGCTGAGATTTTCGACATGCTCTTGGGACTGTGGCTCGCTTCGTAAGTCTCAAACCTCAAGCTGGAGGAGTTGTATGTCTCAAA
G M A E I F D M L L A T V A R F R S L K L K L E E F V C L K 420
1541 GCCATCACTTCTCAATTCGTGTGCAATTTTCACTTCTGCTCCAGTCCAGTGGAGCCCTTGATGGACAGCTTCAATGGTGCAGTGCATGCTG
A I I L L N S G A F S F C S S P V E P L M D S F M V Q C M L 450
1631 GACAACATCACTGATGGCCTCATTACTGCATCAGTAAATCGGGTGCCTCGCTGCAGCTGCAGGCCCGCCGACAGGCCAGCTCTGCTG
D N I T D G L I Y C I S K S G A S L Q L Q A R R Q A Q L L L 480
1721 CTGCTCTCACACATCAGACACATGAGCAACAAAGGAATGGAGCACTTATACCGAATGAAATGTAAGAATCGAGTCCCGCTGTATGACCTT
L L S H I R H M S N K G M E H L Y R M K C K N R V P L Y D L 510
1811 TTGTGGAGATGCTAGACCCCGGATTCATTTCTCAGAAAAGTGCAGCAGCGTGGGACAGAGTGAAGAAATCCCGCTGTATGACCTT
L L E M L D A Q R F H S S E K V Q R A W A Q S E K D P Q S T 540
1901 CCCACAACAGCAGCAGCCCTCCAGAGTCTGGGCGCATGCTGCCAAACATTCGCTGTACAGCAGAGTCCAGACCCCTGAGCT
P T T S S S S P S R G P G A M L P N I A C H D Q S P D P * 568
1991 GTGTACAATCCAACACTGAAGAATGTGAAGACTGTGAAGCAGTCACTAATCTGTCTAATAGTGTTTGAATGTGAATGAAGTCTC
2081 TCCTTGTGCCTTATCAAAGTCCCTTTAGATTTTGGAAAGCCATGTAGAAATTTAACCCCGTTAAAAATGTAAAAACATATCTGTAGAA
2171 ACGGACAGGTTAAGTCTTTTAACTAACTAACTAACCTTAAACCTTAAAGGTACAATATGTAAGATTTTCGTAATAAAAATATCCAAAA
2261 CTGAAAAAATAAAAAAAAAAAAAAAAAA

圖 3、苦花(*Varicorhinus barbatulus*) 雌性激素受體 alpha (ER α) 的核酸序列及轉譯出蛋白質

1
21 ATGAGCTCTTCCCTTGGTCCGGCTCTGCGTACGCCCCCTGCCATGGACTCCGGCAATGCCAATCGAGGGGACTCGCCTAACACCTTA
M S S S L G P A S A S A P P A M D S G N A N R G D S P N T L 30

111 CCCCATCTGTACAGTCCCGCTCGGCATGGACAGCCGACCATCTGCATTCCATCTCCGTATGTGGAAGCCTGTGAGGATTTATCCACCA
P H L Y T S P L G M D S R T I C I P S P Y V E A C Q D Y S P 60

201 CCGCATGGGGAGAGATCAGCCACGGAGCCTTAACGCTCTACAGCCCCGTCCACAGTGTGGGTACACTCATCCCCCGTGTCC
P H G G E I S H G A L T L Y S P V S S T V L G Y T H P P V S 90

291 GAAAGCTGGTCCCGCTCAGTCCGACAATCTTCTGGCCTCCCCACACCACACCCTCGCGTGTCTCTGCACTGCCACCTCCACTGGCC
E S L V P L S P T I F W P P H T T H P A L S L H C P P P L A 120

381 TACAGCGAAACACAGCACACCACCTGGGAGGACGCAAGACACATGATTAACCAGGGCAGCTCTGTCCCTACTCATGCAAGGCTG
Y S E T H A H T T W E D A K T H M I N Q G S S V L T H A K L 150

471 TTTGGGCGAAGTGGATGGTGGTGAATCCCTCACCAGGCGTTTGGGTAAAGGAGACGACACTTCTGTGCGGTGTGCCAT
F G Q Q L D G D G G L N P S P G V L G K G D A H F C A V C H 180

561 GACTACGCTCTGGGTATCACTATGGTGTCTGGTCAATGTAAGGGTGAAGGCTTCTTCAAACGGAGCATTCAAGGGCACAATGACTAT
D Y A S G Y H Y G V W S C E G C K A F F K R S I Q G H N D Y 210

651 ATTTGTCCAGCCACCAACCAGTGCACATTGACAAGAGCCGACGCAAGAGCTGCCAGGCTGTGCACTCCGCAAGTGTATGAAGTGGGC
I C P A T N Q C T I D K S R R K S C Q A C R L R K C Y E V G 240

741 ATGATGAAGTGTGGTGTGAGGGGAAAGCTGCAGTTACCGAGTGTCTCATCATCGCAACCCAGATCAGAGACAGCTCAGGCGGG
M M K C G V R R E R C S Y R G A R H H R N P Q I R D S S G G 270

831 GCGTTAGGGGTCAGACGTCATTCCCGCCTCAATTAGAAATTTCCCTCAGTCCCACTACTCCACTCTTCCCTCGGGGACAGAGCTGAG
A L G V R R R H S Q P Q L E F P L S P T H P L F P S G D R A E 300

921 GGGTGTGGCCGAGCCTCTCCAGAGCAGTTGGTCAACTGTATTCTGGAAGCGGAGCCTCCTCAGATTTACCTGAGAGGCCAATAAAG
G C G R S L S P E Q L V N C I L E A E P P Q I Y L R E P I K 330

1011 AAGCCATACACTGAGCCAGCATGATGATGTCACCTAACCAACCTCGCTGACAAGGAAGTGGTGTGATGATCAGCTGGCGAAGAAGATA
K P Y T E A S M M M S L T N L A D K E L V L M I S W A K K I 360

1101 CCAGGTTTGTGGAGCTGACTTGTGCAGATCAGGTGCATCTGTGGAAATGCTGTGGTGGATATAITGATGTTGGGACAGATGTGGAGA
P G F V E L T L S D Q V H L L E C C W L D I L M L G Q M W R 390

1191 TCCGTGGATCATCCCGGAAACTCATGTTCTCACCTGACCTCAAACCTCAACAGGGAGGAAGGAACTGTGTTGAAGGCATCATGGAGATC
S V D H P G K L M F S P D L K L N R E E G N C V E G I M E I 420

1281 TTTGACATGCTGTGCCACCACTCCAGATTCAGAGAAGTGAAGCTTCAGAGAGGAATACGCTGCGCTCAAAGCCATGATCCTTCTC
F D M L L A T T S R F R E L K L Q R E E Y V C L K A M I L L 450

1371 AACTCCAATAACTGTCAAGCTTGCCACAGACTCCTGAAGATGTGGAGAGCGTGAAGAGTTCTGAGGCTGTGACTCTGTGACTGAC
N S N N C S S L P Q T P E D V E S R R K V L R L L D S V T D 480

1461 GCTTTAGTTTGGACCATCTCCAGAACAGGCTTGTCTCACAGCAACAGTCCATCCGGCTCGCCCATTTGCTAATGCTGCTCACAATATT
A L V W T I S R T G L S S Q Q Q S I R L A H L L M L L S H I 510

1551 CGACACCTCAGCAACAAAGGCATCGAGCATCTGTCAACCATGAAGAGAAAAACGTTGGTGTGCTATATGATCTTCTGCTAGAGATGCTG
R H L S N K G I E H L S T M K R K N V V L L Y D L L L E M L 540

1641 GATGCCAACACATCCAGAGCAGCCGATGCTGGCGCTCACAGAAAGCCTCTCTCCAGTGGACACGCAACAGACCACAGAGATCCTC
D A N T S Q S S R M L A A H T E A S L Q S D T Q Q T T E I L 570

1731 CACACATCCAGACAGCGCTGCGCTGAAAGAGAGCTACCAGGAGCCCTGGCAGACTCCACAAGCTGAAGAGACAGTGATGATAAGATAITTA
H T S R Q Q P A L K E S Y Q E P W H S P Q A E E T V D K I L 600

1821 CATTGTAGTCTGCATCGAGTGGACATGGACACAGATTGACAGTATCCCTTCTGTGGGGTAAAAATCTCCCTGGATGCAGCATGGATATG
H C S L H R V D M D T D * 612

1911 AATCCAATTCCATGCCGCTTTTCCAATGTAGGGTACCGGGGATTCAAATCAGACCTGGAAAAAACTTAGATTACCAATGACAACCTG
2001 AACCGAACAGGGCTTTTAAATGGCGCTCAGTCTTGTCTTCAACACAATGCAGTTTGAACAGTGTGTTTTCTACTATGGCAACCTGAAGAGG
2091 AATCCTTATCAAACAGTCAATGTTTTCTGATTCAAGAAATCACAATGGAATCAATTTAATGGCTGGTCTATTAATGTGAAGTGGC
2181 TAAATTTCTGTGGTAACACAATAGAAAAGAAAACCGTTTGAACAAAAATCAAACACTTCCCACTCTGCCATTTCTCAGCAACCAAGTACG
2271 ACCACCCCTAAATCAGCCATTTGGTGTGCTTTTGGGCCATTCAAACAGATTCCCGAAATTAACAGCTGCACATTTAAATATTAGGTT
2361 TGCCATCCAAGTTGTCTGAGAACCTTCTGACTTAAACAATGACTGTTTTCTGGAAGACTGGCCAAAGTAAATGAAACGCACACTTCTAA
2451 TAGTTTATGCATTTTGTACTCTTGTGTCTGTGATTTGTAAGACATTGAAGTGTGCTGTTATTTGCTGTCTGTGTGCTTCTCGTGGTT
2541 TATTAACTACTGTACTGACAGTAAATGTAAGGCTTTTAAAAACATCGGGCGTGTGATGCTCTTTTCAAGATTTTCTTAAAGCCTG
2631 GCTTAGATGCACAATCTCAACATGAAAAGTGTATCAAATTAATATACTTTGTAATGTGTAATTACAGATACAGCTGAGTTTCTTGG
2721 TGCTACGAGTGTAAATAACGGTGCATCCTTGTGTAACGCTTCATATTCTGCACCTGAAGTGTCTGAGAAGCAGCAATTCATTAAGC
2811 TGCAGTGTCCAAAAAATAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

圖 4、苦花(*Varicorhinus barbatulus*) 雌性激素受體 beta (ERβ) 的核酸序列及轉譯出蛋白質

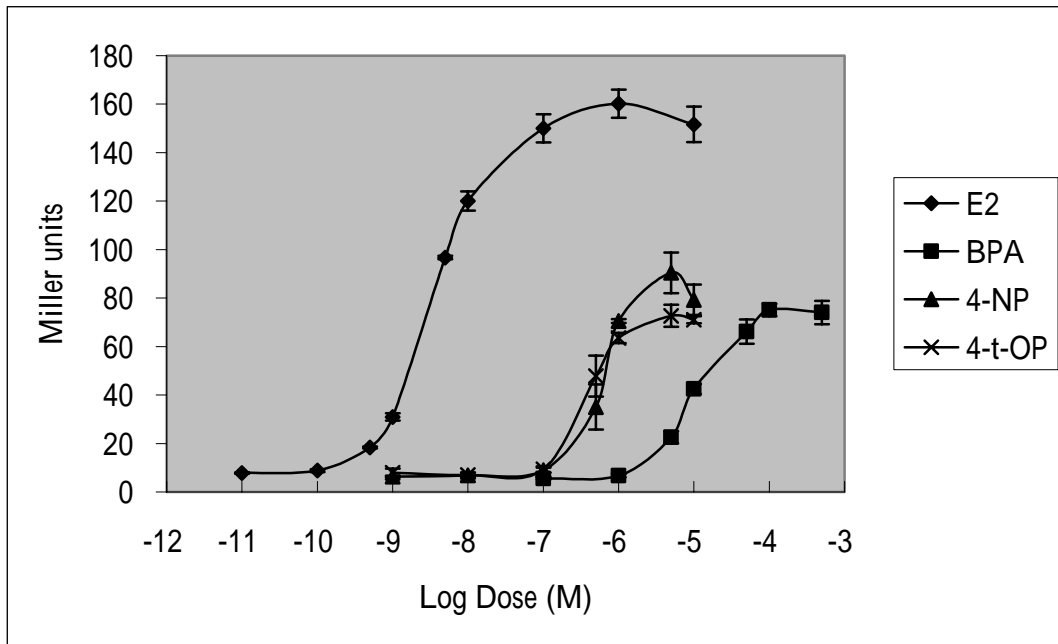


圖 5、E2 , 4-NP , 4-t-OP , BPA 對 ER α 酵母菌轉殖株之濃度-反應關係圖

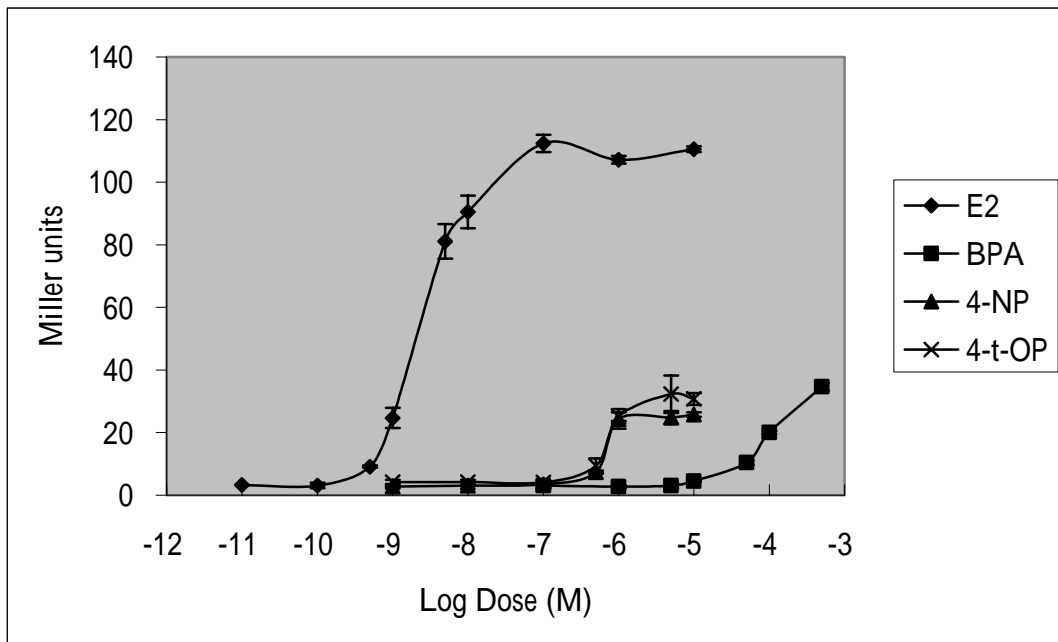


圖 6、E2 , 4-NP , 4-t-OP , BPA 對 ER β 酵母菌轉殖株之濃度-反應關係圖

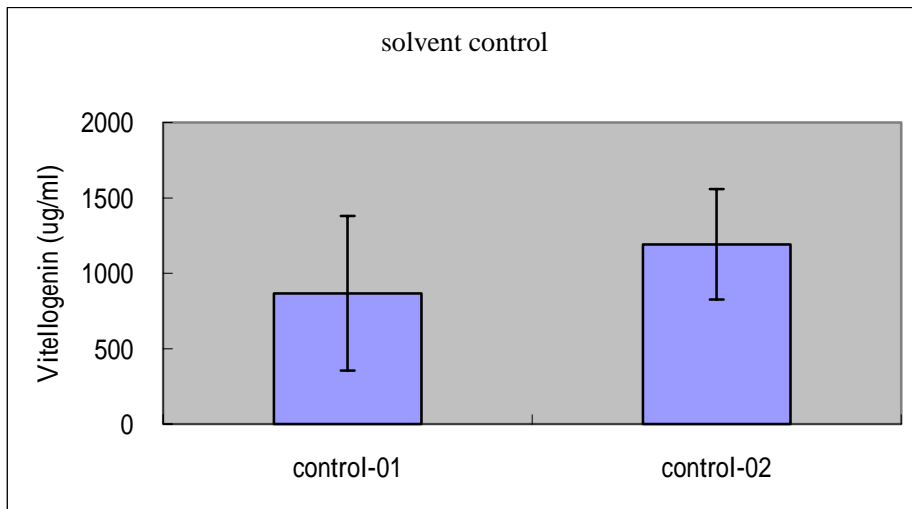


圖 7、土鯽魚活體實驗溶劑控制組 (solvent control) 之卵黃前質生成量長條圖

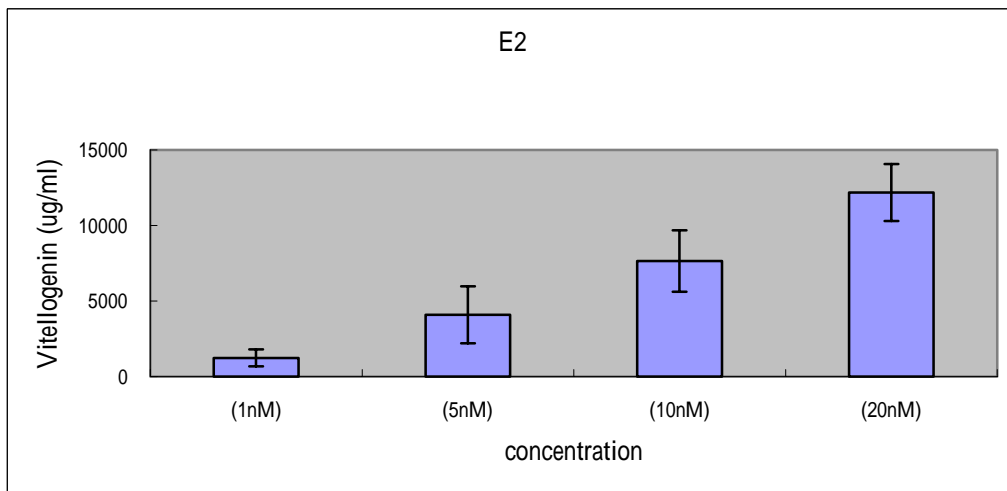


圖 8、土鯽魚活體實驗 E2 之卵黃前質生成量長條圖

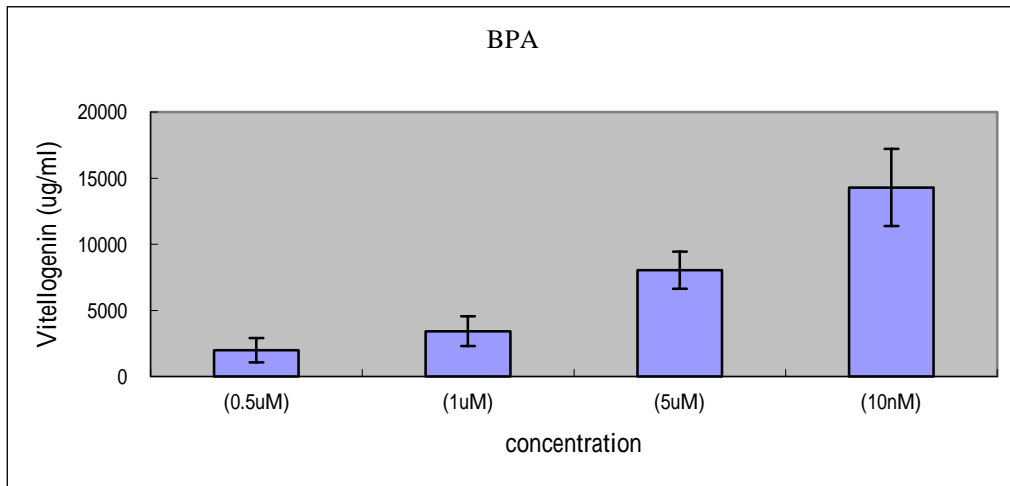


圖 9、土鯽魚活體實驗 BPA 之卵黃前質生成量長條圖

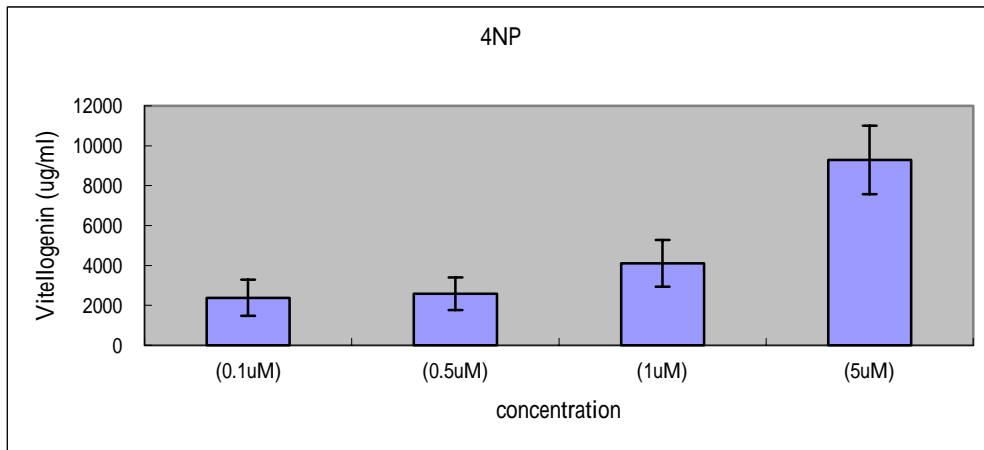


圖 10、土鯽魚活體實驗 4NP 之卵黃前質生成量長條圖

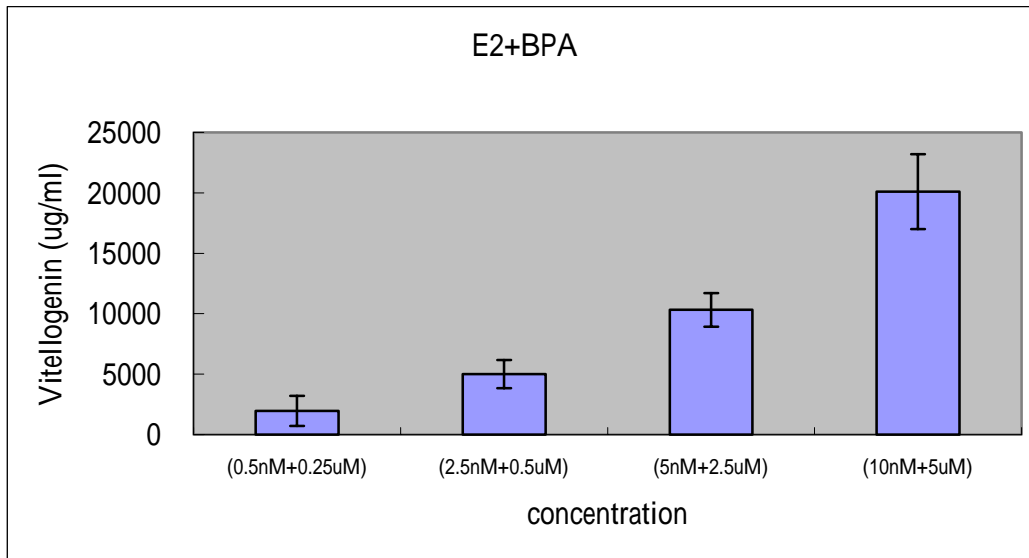


圖 11、土鯽魚活體實驗 E2+BPA 之卵黃前質生成量長條圖

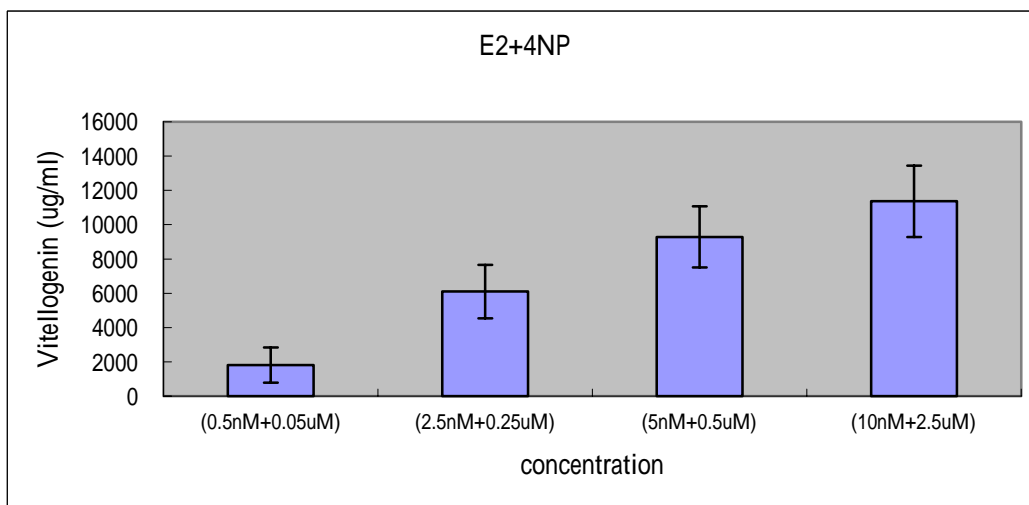


圖 12、土鯽魚活體實驗 E2+4NP 之卵黃前質生成量長條圖

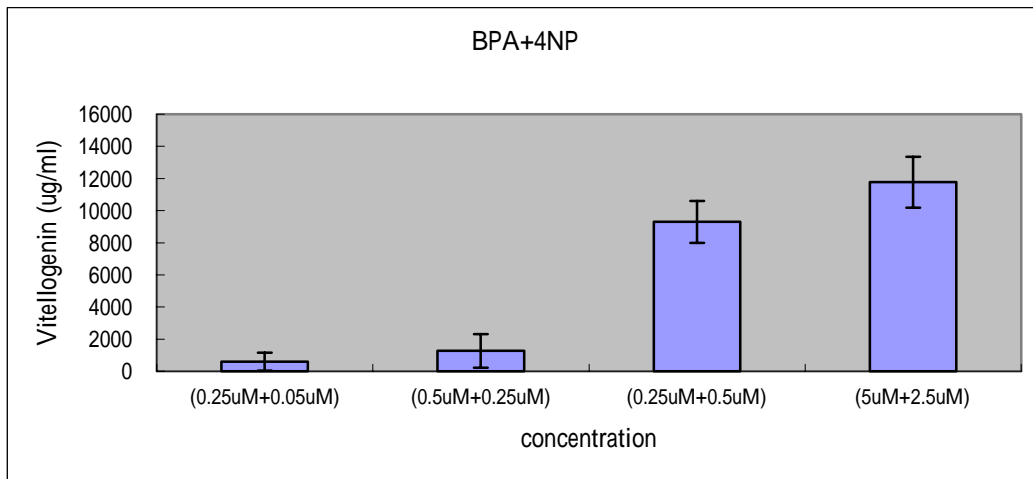


圖 13、土鯽魚活體實驗 BPA+4NP 之卵黃前質生成量長條圖

表 1、日本環境廳公佈之疑似內分泌干擾物質一覽表

編號	化學物質名稱	中文名稱	用途
1	Dioxins and furans	戴奧辛	非產品
2	Polychlorinated biphenyl(PCBs)	多氯聯苯	熱媒，變壓器
3	Polybromobiphenyl(PBB)		防火材料
4	Hexachlorobenzene(HCB)	六氯苯	殺菌劑、有機合成原料
5	Pentachlorophenol(PCP)	五氯酚	殺菌劑、除草劑、防腐劑
6	2,4,5-Trichlorophenoxyacetic acid	2,4,5-T	除草劑
7	2,4-Dichlorophenoxyacetic acid	2,4-地	除草劑
8	Amitrole		除草劑、樹脂硬化劑、disperse dye
9	Atrazine	草脫淨	除草劑
10	Alachlor	拉草	除草劑
11	Simazine(CAT)	草滅淨	除草劑
12	Hexachlorocyclohexane, Ethyl parathion	蟲必死	殺蟲劑
13	Carbaryl	加保利	殺蟲劑
14	Chlordane	可氯丹	殺蟲劑
15	Oxychlordane	Chlordane 之代謝中間產物	
16	Trans-Nonachlor		殺蟲劑
17	1,2-dibromo-3-chloropropane	二溴氯丙烷(DBCP)	殺蟲劑
18	DDT	滴滴涕	殺蟲劑
19	DDE and DDD	DDT之代謝中間產物	
20	Kelthane(Dicofol)	開路生(大克)	殺蟲劑
21	Aldrin	阿特靈	殺蟲劑
22	Endrin	安特靈	殺蟲劑
23	Dieldrin	地特靈	殺蟲劑
24	Endosulfan (Benzoepin)	安殺普	殺蟲劑
25	Heptachlor	飛佈達	殺蟲劑
26	Heptachlor epoxide	Heptachlor之代謝中間產物	
27	Malathion	馬拉松	殺蟲劑
28	Methomyl	納乃得	殺蟲劑
29	Methoxychlor		殺蟲劑
30	Mirex	滅蟻樂	殺蟲劑
31	Nitrofen	護谷	除草劑
32	Toxaphene (Campechlor)	毒殺芬	殺蟲劑
33	Tributyltin	三丁基錫	船底防污油漆、魚網之防腐劑
34	Triphenyltin	三苯基錫	船底防污油漆、魚網之防腐劑
35	Trifluralin	三福林	除草劑
36	Alkyl phenol (from C5 to C9)--Nonyl phenol、Octyl phenol	烷基酚--對壬基苯酚	Raw material for surface-active agents /decomposition product
37	Bisphenol A	雙酚A	Raw material for resins
38	Di-(2-ethylhexyl)phthalate	鄰苯二甲酸二(2-乙基己基)酯	塑膠之塑化劑

表 1、日本環境廳公佈之疑似內分泌干擾物質一覽表（接續）

編號	化學物質名稱	中文名稱	用途
39	Butyl benzyl phthalate	鄰-苯二甲酸丁酯苯甲酯	塑膠之塑化劑
40	Di-n-butyl phthalate	苯二甲酸二丁酯	塑膠之塑化劑
41	Dicyclohexyl phthalate	苯二甲酸二環己酯	塑膠之塑化劑
42	Diethyl phthalate	苯二甲酸二乙酯	塑膠之塑化劑
43	Benzo(a)pyrene	苯芯	非產品
44	Dichlorophenol	二氯酚	染料之中間產品
45	Diethylhexyl adipate	己二酸二(2-乙基己基)酯	塑膠之塑化劑
46	Benzophenone	二苯甲酮	Synthetic raw materials for medical products, perfume, etc.
47	4-Nitrotoluene	4-硝基苯	2,4-dinitrotoluene之中間產物
48	Octachlorostyrene		有機氯化物副產品
49	Aldicarb	得滅克	殺蟲劑
50	Benomyl	免賴得	殺菌劑
51	Kepone (Chlordecone)	十氣丹	殺蟲劑
52	Manzeb (Mancozeb)	鋅錳乃浦	殺菌劑
53	Maneb	錳乃浦	殺菌劑
54	Metiram	免得爛	殺菌劑
55	Metribuzin	滅必淨	除草劑
56	Cypermethrin	賽滅寧	殺蟲劑
57	Esfenvalerate	益化利	殺蟲劑
58	Fenvalerate	芬化利	殺蟲劑
59	Permethrin	百滅寧	殺蟲劑
60	Vinclozolin	免克寧	殺菌劑
61	Zineb	鋅乃浦	殺菌劑
62	Ziram	益穩	殺菌劑
63	Dipentyl phthalate	鄰苯二甲酸二苯酯	
64	Dihexyl phthalate	苯二甲酸二己酯	
65	Dipropyl phthalate	苯二甲酸二丙酯	
66	Styrenes	苯乙烯	Non-reacting substance of styrene-rubber plastic
67	n-Butylbenzene	n-丁基苯	Synthesis intermediate, for liquid crystal manufacture
68	cadmium	鎘	
69	lead	鉛	
70	mercury	汞	

表 2、環境荷爾蒙混合效應相關文獻

受測生物	毒性物種	體外實驗	體內實驗	實驗結果	參考文獻
Rainbow trout	octylphenol +butylbenzylthalate、 octylphenol+estradiol	雌性激素受體的競爭取 代試驗	偵測 zona radiata protein	均為相加效應	Knudsen et al. (1998)
Transfected HeLa cell	(4,4'-DDT、4,4'-DDD、4,4'-DDE 兩 兩混合)及(aldrin、dieldrin、 endrin 兩兩混合)	轉錄活化 (Transcription activity)		混合後並無雌性激素效 應	Tully et al. (2000)
Atlantic salmon	Nonylphenol (NP) 與 o,p'-DDT、 lindane(γ -HCH)、PCB mixture(A1254)、BPA 混合		偵測 Zona radiata protein 及 vitellogenin	無相加及相乘效應， NP+ γ -HCH 對 Vtg 有拮抗 效應；NP 與其餘三種物 質反應亦導致 Vtg 及 Zrp 減少	Arukwe et al. (2000)
MCF7-E3 human breast cancer cell	Toxaphene technical mixture (Tox)、T2、T12 兩兩混合及 PCB-136、p,p'-DDE 分別與 Tox、 T2、T12 混合	細胞增殖效應 (Proliferative effect)		呈現相加效應	Stelzer et al. (1999)
Recombinant yeast assay	殺蟲劑混合(endosulfan、 dieldrin、atrazine、 desethylatrazine、 desisopropylatrazine)及植物性 雌性激素(phytoestrogen)混合	轉錄活化 (Transcription activity)		無相乘作用(包括 endosulfan+dieldrin)	Graumann et al. (1999)

表 3、E2，4-NP，4-t-OP，BPA 對不同酵母菌轉殖株參數(ligand potency and ligand efficiency)整理

Chemical	Yeast contained ER α		Yeast contained ER β	
	Potency (M)	Efficiency (Miller units)	Potency (M)	Efficiency (Miller units)
E2	4.1×10^{-9}	160	2.9×10^{-9}	112
4-NP	6.4×10^{-7}	90	6.3×10^{-7}	26
4-t-OP	4.1×10^{-7}	73	7.5×10^{-7}	32
BPA	1.0×10^{-5}	75	9.1×10^{-5}	35

表 4、土鯽魚活體實驗溶劑控制組卵黃前質生成平均值、標準差、變異係數

控制組 solvent control	控制組 01	控制組 02
卵黃前質平均值 (ug/ml)	867	1192
標準差	513.160	366.217
變異係數(%)	59	31

表 5、土鯽魚活體實驗浸泡 E2、BPA、4NP 兩星期後卵黃前質生成平均值、標準差、變異係數

E2 (浸泡濃度)	1nM	5nM	10nM	20nM
卵黃前質平均值 (ug/ml)	1233	4088	7650	12192
標準差	563.656	1887.459	2031.971	1885.733
變異係數(%)	46	46	27	15
BPA (浸泡濃度)	0.5uM	1uM	5uM	10nM
卵黃前質平均值 (ug/ml)	1983	3421	8046	14296
標準差	910.729	1125.579	1404.976	2913.019
變異係數(%)	46	33	17	20
4NP (浸泡濃度)	0.1uM	0.5uM	1uM	5uM
卵黃前質平均值 (ug/ml)	2379	2588	4108	9296
標準差	902.110	819.680	1173.159	1716.571
變異係數(%)	38	32	29	18

表 6、土鯽魚活體實驗混合浸泡實驗(E2+BPA、E2+4NP、BPA+4NP)兩星期後卵黃前質生成平均值、標準差、變異係數

E2+BPA	0.5nM+0.25uM	2.5nM+0.5uM	5nM+2.5uM	10nM+5uM
卵黃前質平均值 (ug/ml)	1967	5000	10317	20108
標準差	1245.325	1166.905	1389.544	3098.219
變異係數(%)	63	23	13	15
E2+4NP	0.5nM+0.05uM	2.5nM+0.25uM	5nM+0.5uM	10nM+2.5uM
卵黃前質平均值 (ug/ml)	1817	6100	9283	11367
標準差	1027.538	1561.249	1778.576	2081.065
變異係數(%)	57	26	19	18
BPA+4NP	0.25uM+0.05uM	0.5uM+0.25uM	0.25uM+0.5uM	5uM+2.5uM
卵黃前質平均值 (ug/ml)	600	1267	9300	11767
標準差	556.776	1051.586	1302.881	1576.653
變異係數(%)	93	83	14	13

表 7、土鯽魚活體實驗混合浸泡實驗(E2+BPA、E2+4NP、BPA+4NP)預測加成反應卵黃前質生成量

E2+BPA	0.5nM+0.25uM	2.5nM+0.5uM	5nM+2.5uM	10nM+5uM
卵黃前質平均值 (ug/ml)	1608	3755	7848	13244
E2+4NP	0.5nM+0.05uM	2.5nM+0.25uM	5nM+0.5uM	10nM+2.5uM
卵黃前質平均值 (ug/ml)	1608	3746	5879	10744
BPA+4NP	0.25uM+0.05uM	0.5uM+0.25uM	0.25uM+0.5uM	5uM+2.5uM
卵黃前質平均值 (ug/ml)	2181	3005	6077	11796