

文章编号: 1004-7271(2005)02-0192-05

·综述·

环境激素对鱼类的毒害

Toxicological effects of environmental hormones on fish

陶贤继, 魏 华

(上海水产大学生命科学与技术学院, 上海 200090)

TAO Xian-ji, WEI Hua

(College of Aqua-life Science and Technology, Shanghai Fisheries University, Shanghai 200090, China)

关键词: 鱼类; 环境激素; 雌激素受体; 7-乙氧基-3-异吩恶唑酮-脱乙酰酶

Key words: fish; environmental hormone; estrogen receptor; 7-ethoxyresorufin-O-deethylase

中图分类号: X 52; S 917 文献标识码: A

环境激素 (environmental hormones) 又称内分泌干扰物 (endocrine disrupting chemical, 简称 EDCs) 是指干扰维持动物机能平衡和调节发育过程的天然激素的产生、释放、运输、代谢、结合、作用或排出的外源因子^[1]。它包括具有雌激素活性的化学物质、合成雌激素、植物雌激素及真菌类的雌激素等。这些污染物在动物和人体内蓄积, 可与激素受体结合起到激素样作用, 引起内分泌紊乱, 使生殖机能失常, 给动物和人类带来极大的危害^[2], 如多氯联苯 (polychlorinated biphenyls, PCBs)、乙炔基雌二醇、染料木黄酮、二羟基苯甲酸内酯等。环境激素易在水体环境中汇集, 对水生生物导致严重的危害^[3-7]。它们可产生类二恶英效应, 引起类固醇激素、甲状腺素低下和内分泌紊乱^[8]; 影响生殖系统形态与功能, 如性反转、生殖器官异常、乳腺癌、前列腺癌、卵巢癌等^[9], 导致免疫缺陷, 从而使神经-内分泌-免疫系统网络破坏。鱼类在水生生态系统和食物链中处于重要位置, 因此在环境激素生态风险评价中具有重要价值。

1 环境激素对鱼类的毒害

环境激素对鱼类毒性的研究主要集中在环境激素对鱼体的代谢过程包括鳃、血液、肝、肾, 以及性腺的影响。

1.1 环境激素对鱼体代谢过程的影响

环境激素从进入鱼体到排出体外各相关器官都造成危害, 特别是对鱼类与外界接触的器官及和解毒相关器官的损伤特别明显。张凤君等^[10]研究 PCBs 对斑马鱼的损伤时, 发现暴露组的鳃丝结构异常, 鳃小片的表面呼吸上皮细胞呈现残损状态, 表面不平滑舒展, 并可见大量表皮细胞的碎块, 柱细胞异形, 分泌物显著增多。环境激素进入血液运输到鱼体各处, 对血液中电解质有影响。生物体中电解质的平衡是维持细胞内外渗透压及内环境稳定的必要条件, 它一方面将直接影响其生理变化及健康状况, 另一方面也反映了机体受有机污染物损伤的程度。习志群等^[11]研究发现受 PCB 污染的鲫鱼, 血清中 K⁺、

收稿日期: 2004-01-12

基金项目: 上海市教委发展基金 (02NK03)

作者简介: 陶贤继 (1975-), 男, 湖南浏阳人, 硕士研究生, 专业方向为水生动物生理学。E-mail: geny001@sohu.com

通讯作者: 魏 华 (1962-), 男, 上海市人, 教授, 主要从事水生生物生理学研究。Tel: 021-65710021, E-mail: hwei@shfu.edu.cn

Na⁺的平衡受到了破坏, Na⁺含量明显高于正常值, K⁺含量低于正常值, 推测可能是肝脏和肾脏受损。Norrgen^[12]发现肝脏中炎症浸润现象, 部分肝细胞核萎缩变形并偏离中心而被挤向边缘, 细胞质中可见大量脂滴和脂褐素, 部分细胞质中线粒体的内嵴脱落崩裂, 内质网断裂呈片断化。Engwall^[13]和袁秀平^[14]及张凤君^[10]等在研究对肝脏的损伤时也得到同样的结果。此外, 肾脏是 PCB 代谢物的排泄通道, 也是受损伤严重的地方。Per-Erik 等^[15]用 PCBs 对斑马鱼的研究发现在肾小管壁中有细胞死亡, 并且发现有不完整的核和核的碎片。这些影响最终导致对鱼类生长发育的影响和机体的毒害。

1.2 对鱼类性腺细胞和后代的影响

对鱼类的最大危害是对鱼类生殖的影响。它造成性腺的不正常和生殖力的低下; 促使性腺出现卵黄磷脂蛋白水平和卵重量下降; 卵母细胞畸形增加; 雄性的精液减少、甚至有了雌雄同体等现象^[3-7]。Per-Erik 等^[15]在研究 PCBs 对斑马鱼的毒害时发现, 鱼的怀卵量虽然没有减少, 但是卵黄吸收期前孵化率明显降低, 且卵黄吸收后的发育速度明显降低且死亡率很高。有的试验组在孵化 14 d 后, 甚至仅有 6% 的成活率, 即使是孵化后, 也表现出卵黄囊浮肿和体弱。也发现雄鱼精巢的发育受到阻碍。Larsson 等^[16]对瑞士城市生活污水处理厂排水进行研究, 得出避孕药剂和伴随来的乙炔基雌二醇等环境激素的释放可能是出现这些雌雄同体鱼的真正原因。英国 Purdon 等^[17]认为在城市污水处理厂下游的泻湖中捕获具有雌雄两性特征的斜齿鲃 (*Rutilus rutilus*), 也是此原因。

2 环境激素的作用机制

环境激素的作用机制存在多种^[18-24], 较为大家所接受的理论有两种: 一种是与雌激素受体 (estrogen receptor, ER) 结合从而激活转录的基因, 称为受体介导理论; 另一种是雌激素生物合成过程中的酶被干扰, 较典型的是通过混合功能氧化酶系, 关键是其限制性酶 7-乙氧基-3-异吩恶唑酮-脱乙酰酶 (7-ethoxyresorufin-O-deethylase, EROD) 的作用, 影响雌激素合成的途径。

2.1 受体介导理论

环境激素分子作为配体 (ligand) 与雌激素受体结合, 引起一系列的雌激素刺激或抑制雌激素的生理效应。这种理论研究较多, 现在比较公认^[25]。环境激素的受体也就是雌激素受体^[26], 属于核受体, 分为 ER α 和 ER β 两个受体。ER α 和 ER β 都是由三个明显的结构域组成的调节蛋白——氨基端、中央控制区和羧基端。氨基端结构域 (A/B) 是最少保守区域, 该区域存在一个可被环境激素激活的基因转录活性功能区 (Activator Factor, AF-1)。A/B 区为转录激活 AF-1 区, 当 DNA 结合区 (DNA binding district, DBD) 与 DNA 结合时, AF-1 可激活转录。ER 的中央控制区包含两个基因启动子区域并能够使之与特异性 DNA 序列结合的锌指基序。羧基端的结构区域包含构成受体基本功能的配体结合区域 (ligand binding district, LBD), 该配体结合域包含与雌激素类化合物结合的口袋结构、雌激素受体二聚体及与辅调蛋白交互作用的区域。此外, 还包含受雌激素约束的基因的激活与应答功能区 (AF-2)。ER α 和 ER β 两种配体结合区域仅有 50% 同源性, 其结合区域中的不同氨基酸组成, 成为 ER α 和 ER β 两种亚型各自具有独特转录作用的关键。这样导致 ER α 和 ER β 具有不同调节基因转录活性, 最终导致发挥不同的作用。研究发现 ER α 在激活基因转录上比 ER β 作用显著, 而 ER β 在抑制基因转录上比 ER α 作用强^[27]。因此, ER α 主要是作为基因转录的激动剂, 而 ER β 主要是作为基因转录的抑制剂。环境激素结合这两个不同作用点, 从而导致了两种不同的作用: 雌性化作用和抑制雌性化作用。

2.1.1 环境激素雌性化的作用机制

环境激素分子作为一种配体 (ligand) 和雌激素受体 (ER- α) 结合, 导致原结合于受体上的热休克蛋白-90 (hsp90) 从受体上解离下来; 结合了配体的雌激素受体发生构象改变并同型二聚体化 (homodimerize), 这种同型二聚体复合物和 DNA 上雌激素反应元件 (estrogen receptor element, ERE) 具有高度亲和能力 (雌激素反应元件为位于 5' 端雌激素诱导基因调节区域的特异 DNA 序列)。ER β 也可和 ER α 形成异源二聚体, 它也可以与 ERE 结合^[28]。当这种亲和发生时, 同型或者异型二聚体复合物将使

转录子聚集到靶基因启动子上,并促发基因转录的增强,转录出 mRNA 并翻译成蛋白质,从而表现出各种生理效应。最终导致了诸多的生物现象^[29-31]:雌激素与受体结合、基因的转录和细胞的增殖、以及短期内的子宫增重。己烯雌酚、DDT^[32]等都是靠这种机制来干扰生物体的生殖和发育。

2.1.2 环境激素的抑制作用机制

雌激素分子也可以与 ER- β 结合,并以和 ER- α 相反的介导模式,通过 DNA 上的 AP-1 反应原件影响 ER 介导的基因转录活性。如 17 β 雌二醇和 ER- α 结合后通过 DNA 上的 AP-1(一条雌激素的作用途径)反应元件激活并提高报告基因的转录,然而和 ER- β 结合则抑制转录。选择性雌激素受体调节剂^[33](selective estrogen receptor modulator, SERMs)是环境激素中的一类,三苯氧胺^[34]、植物雌激素中各种异黄酮^[35]就是其代表物。它们在不同靶组织可以表现为雌激素激动剂和(或)拮抗剂的作用,并与体内激素水平有关^[36]。某些 SERMs 在雌激素受体反应(ERE)路径上转录调节作用与雌激素不同,不能通过 ERE 路径激活转录,而是完全阻断雌激素在 ERE 路径上的作用^[37]。SERMs 与 ER α 和 ER β 具有高度的亲和性,且 SERMs 也可致伴侣蛋白的游离、ERs 二聚体的形成以及 ERs 与 ERE 的结合。SERMs 的拮抗作用是在雌激素受体与启动子区域结合的最后一步发生,阻断配体结合区域(ligand binding distriction, LBD)的移动和功能性 AF-2 表面的出现,从而抑制转录。其拮抗作用的分子机制已被 ER α 和 ER β 的配体结合区域结晶化证明^[38]:SERMs 包含一个 estradiol 缺乏的大侧链,SERMs 不能使 ERs 形成功能性 AF-2 表面,阻止了 ER 与辅调节蛋白的结合,因而激活途径突然被终止,从而达到抑制的效果。鱼类和其他的脊椎动物存在这两种受体,环境激素可以通过这两者进行作用,从鱼体表现出雌性化或者抑制作用。

2.2 通过 7-乙氧基-3-异吩恶唑酮-脱乙酰基酶(7-ethoxyresorufin-O-deethylase, EROD)的作用

近来的一些研究显示,环境激素的代谢对于鱼体 EROD 酶有影响,被广泛地应用作为 PCBs、多氯代苯并二恶英(PCDDs)和多氯代苯并呋喃(PCDFs)污染的生物指标^[6]。鱼类中 EROD 的活性反应是具代表性的混合功能氧化酶的典型反应^[39]。EROD 以细胞色素 P450 依赖性单加氧酶为典型,它是合成雌激素过程中一种极为重要的酶。在正常的环境中,生物体内混合功能氧化酶的活性相对较低。但在某些特定外来污染物的诱导下,活性异常增高。因此,可以将生物体内混合功能氧化酶活性作为环境中特定污染物的监测指标^[9]。霍传林等^[4]研究表明,环境中的某些特定污染物,如 PCBs、多环芳香烃(PAHs)、二恶英对鱼类中的 EROD 酶中细胞色素 P450(主要是 P450-LA1)依赖性单加氧酶活性具有很强的诱导能力。

生物在正常生理条件下,体内各种活性氧自由基的产生与清除处于一种动态的平衡。但某些外源物质进入体内时,导致 EROD 酶活性增强,会打破这个平衡。研究表明^[31]外源性化合物进入生物细胞后会导致大量自由基产生,包括 O_2^- 、 H_2O_2 、 OH^- 等对机体和膜系统造成危害;许多化合物包括 PCBs 类的物质,对生物体的毒性机理都与诱导体内自由基反应有关,它诱导 EROD 酶活性的增强。TCDD 和 PCBs 类的物质诱导 EROD 酶分两个阶段^[33],阶段 I 酶活性增强可促进雌激素羟基化,阶段 II 酶活性增强可促进羟化的环境激素代谢。细胞色素 P450 受到损伤,将导致肾脏损伤。Kari Koponen 等^[40]从 Kerala 湖采来的沉积物和鱼肉样品中分析出主要的化学基因 PCBs,不仅是引起鱼肝而且是引起鱼肾细胞色素 P450 的重要诱因。环境激素进入体内后还可与芳烃受体(AhR)结合,诱导细胞色素 P450 酶系(CYP1A1/IA2),加快体内雄激素的降解^[41],从而使机体的内分泌失调,导致不正常的生殖及病理现象。

2.3 其它作用途径

还有一些环境激素的作用机制如抑制血液中的激素^[34]和睾丸中波形蛋白合成^[42,43]等也有提出。很多环境激素看来抑制血液中的甲状腺激素 T_4 ^[35],如 TCDD 类和非 TCDD 类都可以抑制说明环境激素影响血红素的淤积。环境激素根据鱼种类及作用的时间、地点和阶段而表现出不同的作用。PCBs 也可以间接地影响甲状腺的功能,它增加胆汁量或降低 T_4 的水平,通过从蛋白质上解离、代谢和排除。邓茂先等^[43]研究发现双酚 A 的可对成年 SD 大鼠睾丸支持细胞波形蛋白产生严重干扰,导致精原细胞和

支持细胞分离。

3 展望

环境雌激素对于鱼类危害严重,影响的途径也很多。在特定条件下是哪种机制起到主要的或关键的作用,会由于 PCBs 不同的种类和不同种鱼而不同,存在很大的危害隐患。为了更好的了解和避免环境激素对鱼发育和生殖危害,有待进一步研究以下几点。

3.1 危害检测研究

各种环境激素对各种鱼类和动物危害表现不尽相同。应当用短时间的暴露之后进行实测和进行长期或潜在效应的研究,建立比较完善的症状档案。研究方法要求敏感、快速、费用低,能够表达种的差异、性别差异以及生命阶段的差异。

3.2 作用机制研究

对环境激素的受体和非受体调节机理研究进行更加完善的研究和描述。作用机制不但要研究单种环境激素作用机制和混合环境激素间协同或者抑制作用机制,受体反应模型也需进一步地检验,因为单个受体可以激活许多相关的基因。同时,也要考虑多个影响作用机制因素:种的特异性、性别差异、及生命阶段差异等。

3.3 预测研究

建立起暴露的时间和剂量与效应间的预测模型,对环境毒物进行检测。采用实验室研究和野外研究相结合的方式进行研究,由野外研究得到的假设必须经实验室检测或受控条件下的野外实验检测,由实验室得出的结果也要根据具体的野外条件进行检测和分析。

研究环境激素在环境介质中的迁移、转化和积累的行为研究也十分薄弱。另一方面,环境激素容量研究尚未涉及,很难将之纳入环境定量监测评价中。未确定的环境激素物质比已经鉴别出来的环境激素物质具有更大的潜在危害性,环境激素物质的筛选有待进一步研究和深化。所有这些都已经成为当前国际环境科学及相关科学领域的研究前沿。

参考文献:

- [1] Kavelock R J. Research needs for risk assessment of health and environmental effects of endocrine disruptors : A report of the U. S. EPA - sponsored workshop[J]. *Environmental Health Perspective*, 1996, 1.4: 715 - 740.
- [2] Bernard A, Hermans C, Broeckaer F, *et al.* Food contamination by PCBs and dioxins[J]. *Nature*, 1999, 401: 231 - 232.
- [3] 方昌阁. 环境激素生殖毒性作用的研究进展[J]. *国外畜牧科学*, 2000, 27(2): 31 - 34.
- [4] 霍传林, 王菊英, 韩庚辰, 等. 鱼体内 EROD 活性对多氯联苯类的指示作用[J]. *海洋环境科学*, 2002, 21(1): 5 - 8.
- [5] Payne J F, Fancey A, Rahimtulad, *et al.* Review and perspective on the use of mixed function oxygenase enzymes in biological monitoring [J]. *Comp Biochem Physiol*, 1987, 86C: 233 - 245.
- [6] 邱东茹, 吴振斌. 环境雌激素对动物和人体的影响及作用的机制[J]. *水生生物学报*, 1997, 21(4): 365 - 374.
- [7] Galganif, Booquene G, Truquet P, *et al.* Monitoring of pollutant biochemical effects in marine organisms of the French coasts[J]. *Oceanologica Acta*, 1992, 15: 355 - 364.
- [8] Kendall R J, Dickerson R L. Principles and processes for evaluating endocrine disruption wildlife[J]. *Environ Toxicol Chem*, 1996, 15: 1253 - 1254.
- [9] Ahlborg U G, Lipworth L, Titus-Ernstoff L, *et al.* Organochlorine compounds in relation to breast cancer, endometrial cancer, and endometriosis: an assessment of the biological and epidemiological evidence[J]. *Critical Review Toxicology*, 1995, 25(6): 463 - 531.
- [10] 张凤君, 郑文彪, 方展强, 等. PCBs 对斑马鱼鳃及肝脏细胞超微结构的影响的初步研究[J]. *华南师范大学学报(自然科学版)*, 2001, (4): 112 - 114.
- [11] 习志群, 储少岗, 徐晓白, 等. 多氯联苯对鲫鱼血液电解质的影响[J]. *环境科学*, 1995, 16(2): 1 - 3.
- [12] Norrgren L, Andersson T, Biorck M. Liver morphology and cytochrome P450 activity in fry of rainbow trout after microinjection of lipid - soluble xenobiotics in the yolk - sac embryos [J]. *Aquatic Toxicology*, 1993, 2: 3. 07 - 316.
- [13] Engwall M, Brunstrom T, Broewer A, *et al.* Cytochrome P450A induction by a coplanar PCB, a PAH mixture, and PCB - cotaminated sediment

- extracts following microinjection of rainbow trout sac - fry [J]. *Aquatic Toxicology*, 1994, 30:311 - 324.
- [14] 袁秀平, 吴文忠, 徐盈, 等. 2,3,7,8-TCDD对鲍鲫幼体超微结构影响的观察[J]. *水生生物学报*, 1999, 23(2): 185 - 186.
- [15] Per - Erik Olsson, Liseotte Westerlund, Swee J. *et al.* The effects of maternal exposure to estrogen and PCB on different life Stages of zebrafish [J]. *Ambio*, 1999, 28(1): 100 - 106.
- [16] Larsson D C J, Adolfsson-Erici M, Parkkonen J, *et al.* Ethinyloestradiol-an undesired fish contraceptive [J]. *Aquatic Toxicol*, 1999, 45:91 - 97.
- [17] Purdon C E, Hardiman P A, Bye V J, *et al.* Estrogenic effects of effluents from sewage treatments works[J]. *Chem Ecol*, 1994, 8:275 - 285.
- [18] Pacch K, Webb P, Kuiper G, *et al.* Differential ligand activation of estrogen receptors ER - alpha and ER - beta at AP1 sites[J]. *Science*, 1997, 277:1508 - 1510.
- [19] Zacharewski T. In vitro bioassays for assessing estrogen substances[J]. *Environmental Science and Technology*, 1997, 31:613 - 623.
- [20] Evans R M. The steroid and thyroid hormone receptor superfamily[J]. *Science*, 1998, 240:889 - 895.
- [21] Mosselman S, Polman J, Dijkama R. ERB: identical and characterization of a novel human estrogen receptor [J]. *FSBS Lett*, 1996, 392:4.
- [22] Korach K S, Mclachlan J A. Techniques for detection of estrogenicity[J]. *Environ Health Perspect*, 1995, 103 (Suppl 7): 5 - 8.
- [23] Makela S, Poutanen M, Lehtimaki J, *et al.* Estrogen - specific 17 β - hydroxysteroid oxidoreductase type 1 (E.C.1.1.1.62) as a possible target for the action of phytoestrogens[J]. *Proc Soc Exp Biol Med*, 2008:51 - 59.
- [24] Bradlow H L, Michnovicz J J, Telang N T, *et al.* Effects of dietary indole - 3 - carbinol on estradiol metabolism and spontaneous mammary tumor in mice [J]. *Carcinogenesis*, 12(9):1571 - 1574.
- [25] 杜克久, 徐晓白. 环境雌激素的研究进展[J]. *科学通报*, 2000, 45(21):2241 - 2251.
- [26] Katzenellenbogen J A, O Malley B W, Katzenellenbogen B S. Transcription steroid hormone receptor pharmacology: interaction with multiple effector sites as a basis for the cell and promoter - specific action of these hormones[J]. *Mol Endo*, 1996, 10:119 - 131.
- [27] An J, Ribeiro R C, Webb P, *et al.* Estrodiol repression of tumor necrosis factor-alpha Transcription requires estrogen receptor activation function-2 and is enhanced by coactivators[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, 96:15161 - 15166.
- [28] MacGregor J I, Jordan V C. Basic guide to the mechanisms of antiestrogen action [J]. *Pharmacol Rev*, 1998, 50:151 - 196.
- [29] Pike A C, Brzozowski A M, Hubbard R E, *et al.* Structure of the ligand - binding domain of estrogen receptor - beta in the presence of a partial agonist and a full antagonist[J]. *EMBO J*, 1999, 18:4608 - 4618.
- [30] Karin M, Liu Z. AP-1 function and regulator [J]. *Curr Opin Cell Biol*, 1997, 9:240 - 246.
- [31] Feng W, Ribeiro R C, Wagner R L, *et al.* Hormone - dependent coactivator binding to a hydrophobic cleft on nuclear receptors [J]. *Science*, 1998, 280:1747 - 1749.
- [32] 李杰, 司纪亮. 内分泌干扰物质简介[J]. *中国公共卫生*, 2002, 18(2):241 - 242.
- [33] Bryant H U, Dere W H. Selective estrogen receptor modulators: an alternative to hormone replacement therapy [J]. *Proc Soc Exp Bio Med*, 1998, 217:45.
- [34] 张杰. 选择性雌激素受体调节剂[J]. *中国新药杂志*, 2000, 9(10):676 - 680.
- [35] 安胜军, 张永祥. 雌激素受体亚型及其配体调节基因转录机制的研究[J]. *生理科学进展*, 2002, 33(4):309 - 312.
- [36] Mitalak B H, Cohen F J. Selective estrogen receptor modulators look ahead[J]. *Drugs*, 1999, 57(5):653 - 663.
- [37] Mei-Hui Li, Larry G. Enzyme Induction and Acute Endocrine Effects in Prepubertal Female Rats Receiving Environmental PCB/PCDF/PCDD mix Handen [J]. *Environmental Health Perspectives*, 1996. 14, 712 - 722.
- [38] Pike A C, Brzozowski S M, Hubbard R E, *et al.* Structure of the ligand - binding domain of estrogen receptor - beta in the presence of a partial agonist and a full antagonist[J]. *EMBO J*, 1999, 18:4608 - 4618.
- [39] 方允中, 李文杰. 自由基与酶[M]. 北京: 科学出版社, 1989. 94.
- [40] Kari Koponen, Marks S M, Ossi Ritola, *et al.* 受多氯联苯污染的淡水湖泊野生鱼类的组织病理学[J]. *AMBIO(中文版)*, 2001, 30(3): 122 - 126.
- [41] Weisz A, Ricardo R. Identification of an estrogen response element upstream of human c - fos gene that binds the estrogen receptor and the AP-1 transcription factor[J]. *Nucleic Acids Research*, 1990, 18:5097 - 5106.
- [42] Richburg J H, Beekelheide K. Mono - (2 - ethylhexyl)phthalate rapidly alters bothsertoli cell vimentin filaments and germ cell apoptosis in young rat testes. *Environ Health Perspect*[J]. *Appl Phamarchcol*, 1996, 137:42 - 50.
- [43] 邓茂先, 吴德生, 李立. 环境雌激素双酚 A 的生殖毒性研究[J]. *环境和健康杂志*, 2001, 134 - 136.