DOI:10.16016/j.1000-5404.2004.19.022
第26卷第19期 第三军医大学学报 Vol. 26, No. 19
2004年10月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Oct. 2004

文章编号:1000-5404(2004)19-1751-04

论著

长江流域某市饮用水雌激素污染物初步研究

田怀军,舒为群,邱志群,陈济安,赵 清 (第三军医大学预防医学院环境卫生学教研室,重庆 400038)

提 要:目的 了解饮用水雌激素污染物污染状况。方法 应用气相色谱/质谱(GC/MS)分析技术、人乳腺癌(MCF/7)细胞增殖试验和子宫湿重实验,对某市饮用水雌激素污染物进行检测。结果 GC/MS分析表明,水源水中有机污染物100余种,出厂水中80余种;其中作为可疑雌激素物质的邻苯二甲酸二(2-甲基丙基)酯、邻苯二甲酸二丁酯检出率分别为100%和90%。此外,还检出2,4-二甲基酚等酚类物质。嘉陵江水源污染重于长江,出厂水均为丰水期污染重于枯水期,而以C厂和E厂出厂水水质较好。生物学评价结果显示,水源水、出厂水有机提取物均刺激MCF/7细胞增殖和大鼠子宫生长,而且这种作用可被tamoxifen抑制。丰水期水源水水质比枯水期水源水水质好;丰水期水质是长江优于嘉陵江,枯水期水质则是嘉陵江优于长江。丰水期水源水经水厂处理后,对MCF/7细胞增殖的刺激作用均增加,而枯水期则相反。枯水期A厂和B厂的出厂水水质是较好的。结论 某市饮用水中存在雌激素污染物,但尚不构成对人体的危害。

关键词:饮用水;有机污染物;MCF/7细胞;雌激素
中图法分类号:R123.1;R977.12 文献标识码:A

Primary study of estrogenic pollutants in drinking water in a city on the Yangtze River

TIAN Huai-jun, SHU Wei-qun, QIU Zhi-qun, CHEN Ji-an, ZHAO Qing (Department of Environmental Hygiene, College of Preventive Medicine, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To investigate the state of estrogenic pollutants in drinking water. Methods The organic pollutants were extracted from drinking water with solid-phase extraction (SPE). The estrogenic activity was evaluated with MCF/7 cell proliferation assay and uterotrophic assay, and estrogenic pollutants were detected by gas chromatography-mass spectrometric (GC/MS) analysis. Results The results by GC/MS analysis showed there were more than 100 kinds of pollutants in raw water, and more than 80 in treated water. The detected rates of bis (2-methylpropyl) phthalate and dibutyl phthalate which were the suspect estrogen were higher than 90%. In addition, the phenols (for example: 2,4-dimethyl phenol) were found in water samples. The organic pollution of raw water in Jialingjiang River was more severe than that in Yangtze River, and the organic pollution of treated water in summer was more severe than that in winter. The quality of treated water in C and E waterworks was better. The biological evaluation showed that the organic pollutants in raw water and treated water stimulated the proliferation of MCF/7 cells and the growth of uterine in rats, and tamoxifen suppressed the proliferation induced by the organic pollutants. The quality of raw water in summer was better than that in winter, and that in Yangtze River was better than that in Jialingjiang River in summer, and the contrary in winter. The effects of pollutants on MCF/7 cells proliferation in treated water were stronger than those in raw water in summer, but weaker in winter. The quality of treated water in A and B waterworks in winter was better. Conclusion The study implies that there are estrogenic pollutants in the drinking water in this city, but they are not harmful enough to the citizens.

Key words: drinking water; organic pollutant; MCF/7 cell; estrogen

某市位于长江流域,为西南地区的重要经济和文化中心,随着经济的快速发展,环境污染问题也更加突出。饮用水水质关系到全市市民的健康,同时又与经济发展密切相关。该市以长江和嘉陵江为饮用水水源,我们对该市饮用水有机污染物进行了气相色谱/质谱(gas chromatography/mass spectrometry, GC/MS)分析,发现饮用水水源已经受到有机物污染,且存在雌激素污染物,为了较全面地评价该市饮用水有机污染物的

基金项目:国家教育部98"春晖计划"项目(1999-36);重庆市科技攻关项目(1999-5772);国家科技部攻关项目(2003BA869C和2003DA903B03-02)
Supported by the "Chunhui Projects" of State Education Ministry of China (1999-36), the Key Sci & Tech Research Foundation of Chongqing (1999-5772), and the Key Sci & Tech Research Foundation of State Ministry of Science and Technology (2003BA869C, 2003DA903B03-02)
作者简介:田怀军(1964-),男,四川省剑阁县人,博士,副教授,主要从事劳动卫生与环境卫生学方面的研究。现在高原军事医学系高原卫生学教研室工作。电话:(023)68752319, E-mail: huaijunt@yahoo.com
收稿日期:2003-07-01;修回日期:2004-03-23

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

雌激素活性，也为改善饮用水水质、防止饮用水污染提供科学依据，我们应用体外研究——MCF/7 细胞增殖试验和体内研究——子宫湿重实验对该市饮用水源水和水厂出厂水有机污染物的雌激素活性进行了评价。

1 材料与方法

1.1 水样采集和有机物提取

于 2000 年 8 月(丰水期)和 2001 年 1 月(枯水期)分别采集了某市自来水公司下属 5 个水处理厂(A、B、C、D、E)的水源水和出厂水，水厂位置如图 1 所示，水源水水样采自泵入水厂的江水(未加药)，出厂水水样采自各厂清水池。水样经 GDX-102 大孔树脂柱，流速为 3 倍柱体积/min，用二氯甲烷和甲醇洗脱树脂柱，洗脱液在 35 ℃条件下用氮气吹干。



Ⓐ— Ⓔ: Water factories

图 1 水样采集位置示意图

Fig 1 Sampling location of water

分析样品用二氯甲烷定容至: 0.4 ml/20 L 水样; 生物学评价用样品采用二甲基亚砜(DMSO)定容至: 1 ml/100 L 水样，备用。

1.2 有机污染物分析

采用 GC/MS 分析仪对有机污染物进行分析。色谱条件: 柱温 50 ℃(1 min) 5 ℃/min 220 ℃(22 min)共运行 57 min; 进样不分流，进样口温度 250 ℃，52.4 kPa，50.1 ml/min，净化 46.5 ml/min，2 min，节约气 20 ml/min，2 ml。质谱: 离子源温度 230 ℃，四极杆 150 ℃，倍增器 1 200 V，阈值 700，载气: He，99.99%。

采用外标法定量分析水样中目标有机污染物。

1.3 MCF/7 细胞培养

1.3.1 血清处理[1] 向新生小牛血清中加入葡聚糖(25 mg/100 ml)，待其完全溶解后再加入活性炭(250 mg/100 ml)，混匀，55 ℃水浴 45 min，3 000× g 离心 10 min，取上清液; 重复以上过程 1 次。处理后的血清经滤膜(0.22 μm)过滤除菌，－20 ℃保存备用。

1.3.2 四川大学(原华西医科大学)公共卫生学院环境卫生学教研室赠送人乳腺癌 MCF/7 细胞株。细胞在 DMEM 培养基中传代，实验前 1 周传至无酚红 DMEM＋10%处理血清培养基中。细胞培养于 24 孔培养板中，1 万个细胞/孔，经 24 h 预培养。染毒时间 6 d，染毒第 3 天换液，第 6 天计数细胞数。实验分 4 组: 空白对照(未加处理)、溶剂对照(5 μl DMSO/孔)、阳性对照(10～8 mol/L 雌二醇)和实验组(1、2、5、10、15 ml/孔)。

评价指标[2]: 增殖效应(proliferative effect，PE): 实验组最大增殖效应的细胞数/对照组细胞数; 相对增殖效应(relative proliferative effect，RPE): (实验组增殖效应－1)/(阳性对照组增殖效应－1)× 100%。

1.4 动物实验

21 d 龄雌性 Wistar 大鼠 70 只(第三军医大学实验动物中心提供)，体质量(42.1±7.28) g，饲养于昼/夜循环为 12/12 h 的环境，自由摄食和饮水。按体质量完全随机分空白对照(未加处理)、溶剂对照(0.5 L/20 g)、阳性对照(30 μg/kg 17β-estradiol，E_2，雌二醇)和实验组(0.5、2.5、5.0、25.0 L/kg)。每组 10 只。每天染毒 1 次，连续 3 d，腹腔给药，左右下腹交替进针。第 4 天断颈处死动物，分离子宫，记录子宫重量。

1.5 统计学分析

实验结果以 $\bar{x}\pm s$，采用单因素方差分析。

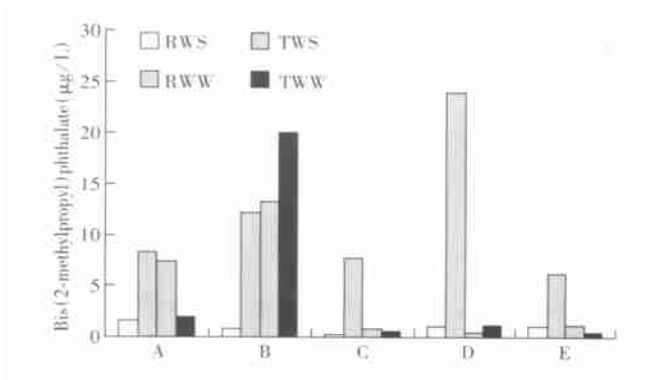
2 结果

2.1 有机污染物分析结果

分析结果表明: 嘉陵江水源为枯水期污染重于丰水期，长江则相反; 嘉陵江水源污染重于长江，水源水污染较重的是枯水期的 B 厂。出厂水比较: 除 B 厂外，其余水厂出厂水均为丰水期污染重于枯水期; 丰水期水源水经处理后，有机污染物含量有上升的趋势，枯水期水源水经处理后，出厂水有机污染物则有所减少; 在所检测的水样中以 C 厂和 E 厂出厂水水质较好。

质谱定性分析结果: 水源水中有机污染物 100 余种，出厂水中 80 余种。主要污染物包括: 邻苯二甲酸酯、磷酸酯、酯类、酮类、酚类、杂环和苯及其衍生物等。

邻苯二甲酸二(2-甲基丙基)酯和邻苯二甲酸二丁酯的检出率分别为 100%和 90%，在所有污染物中其检出率是最高的。应用外标法，对各水样中的邻苯二甲酸酯类进行了定量分析，结果见图 2。此外，在水样中还检测出 2,4-二甲基酚，2,6-二特丁基对甲酚，2,6-二(1,1-二甲基乙基)酚等酚类物质，以及 1-氯-4-硝基-苯，4-氯苯胺等氯苯类物质。



RWS: Raw water in summer; TWS: Treated water in summer; RWW: Raw water in winter; TWW: Treated water in winter

图 2 邻苯二甲酸二(2-甲基丙基)酯含量(μg/L)

Fig 2 The concentration of bis (2-methylpropyl) phthalate (μg/L)

2.2 体外实验研究结果

获赠的 MCF/7 细胞经实验验证，具有对雌激素的敏感性。

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

表 1 显示各水样有机污染物刺激 MCF/7 细胞增殖的能力。A 厂、C 厂和 E 厂的丰水期水源水在试验剂量范围内对 MCF/7 细胞产生毒性作用, 其余水样均刺激了 MCF/7 细胞的增殖。丰水期水源水经水厂处理后, 对 MCF/7 细胞增殖的刺激作用均增加, 而枯水期则相反。应用 MCF/7 细胞增殖试验评价结果表明: 丰水期水源水水质比枯水期水源水水质好; 丰水期水质是长江优于嘉陵江, 枯水期水质则是嘉陵江好于长江。C 厂和 E 厂出厂水水质是丰水期好于枯水期, A 厂、B 厂和 D 厂的枯水期出厂水水质则明显优于丰水期。枯水期 A 厂和 B 厂的出厂水水质是较好的。

表 1　各水样有机污染物刺激 MCF/7 细胞增殖的能力

Tab 1　MCF/7 cell proliferation stimulated by pollutants from water samples

Location	Sample	Concentration of maximal effect(ml/well)	PE	RPE
	DMSO	1 μl/well	1.00	
	E_2	10^{-8} mol/L	7.60	100.00
A	RWS	--	--	–
	TWS	2	2.67	25.30
	RWW	2	2.88	28.48
	TWW	10	1.48	07.27
B	RWS	1	3.83	42.88
	TWS	2	3.11	31.97
	RWW	10	2.64	24.85
	TWW	10	1.61	9.24
C	RWS	--	--	–
	TWS	1	1.77	11.67
	RWW	2	3.59	39.24
	TWW	1	2.90	28.79
D	RWS	2	1.54	08.18
	TWS	5	3.45	37.12
	RWW	5	2.82	27.58
	TWW	1	2.18	17.88
E	RWS	--	--	–
	TWS	1	1.81	12.27
	RWW	2	3.09	31.67
	TWW	1	2.33	20.15

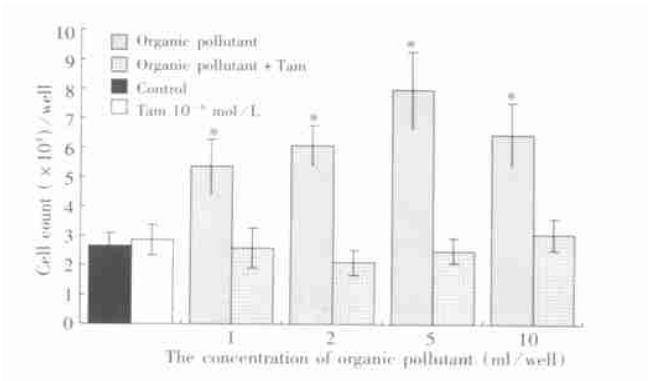
RWS: Raw water in summer; TWS: Treated water in summer; RWW: Raw water in winter; TWW: Treated water in winter. "--": Not detected

2.3　Tamoxifen 阻断有机污染物导致的细胞增殖

10^{-6} mol/L tamoxifen 对 MCF/7 细胞的增殖未产生显著影响, $F=0.354$, $P=0.568$ 与空白对照组比。有机污染物导致 MCF/7 细胞增殖显著, 10^{-6} mol/L tamoxifen 抑制了有机污染物刺激的细胞增殖(图 3)。

2.4　体内实验

应用初断乳的 Wistar 大鼠(21 d 龄), 腹腔给药测定了 D 厂枯水期水源水和出厂水有机污染物的雌激素活性, 皮下给以雌二醇(17β-estradiol, E_2)作为阳性对照。结果见表 2。水源水和出厂水都引起大鼠子宫重量的变化, 在同一剂量水平, 两组之间没有显著性差异($F=0.062$, $P=0.802$)。



*: $P<0.01$, *vs* control; $F=0.091$, $P=0.766$, organic pollutant+Tam, *vs* control; $F=91.507$, $P=0.000$, organic pollutant+Tam, *vs* organic pollutant

图 3　Tamoxifen 阻断有机污染物导致的细胞增殖

Fig 3　Tamoxifen blocked the proliferation induced by pollutants from drinking water

表 2　水源水和出厂水有机污染物对大鼠子宫湿重的影响($\bar{x}\pm s$)

Tab 2　Effects of pollutants from raw water and treated water on uterine wet weight in rat ($\bar{x}\pm s$)

Level (l/kg)	Raw water	Treated water
0.5	24.49±3.13	25.09±4.31
2.5	24.91±2.25	26.72±1.74 *
5.0	27.57±3.62 **	25.81±3.88 *
25.0	29.35±3.41 **	29.85±2.08 **
DMSO(i.p)	21.22±2.215	
E_2(30 μg/kg)	91.43±12.24 **	
Control	18.16±0.36	

*: $P<0.05$, **: $P<0.01$, *vs* DMSO

3　讨论

GC/MS 分析结果表明: 该市饮用水含有尚不构成对人体危害的有机物污染。邻苯二甲酸酯类是环境中比较明确的可疑雌激素物质[3], 在该市饮用水中存在较高的检出率, 因而在本研究中具有特殊意义; 此外, 在水样中还检测出可疑或高度可疑内分泌干扰物, 如: 2, 4-二甲基酚, 2, 6-二特丁基对甲酚, 2, 6-二(1, 1-二甲基乙基)酚等酚类物质, 以及 1-氯-4-硝基-苯, 4-氯苯胺等氯苯类物质。以上结果提示该市饮用水受到雌激素污染物的污染。

MCF/7 细胞来源于人乳腺癌, 是一种雌激素受体阳性细胞, 对雌激素或具有雌激素样作用的物质可产生特异性应答, 生成受雌激素调节的特异性蛋白, 因而对雌激素敏感, 常被用来检测外源性雌激素活性[4]。获赠细胞经本实验室测试, 对雌激素是敏感的。应用该细胞株对该市饮用水源水、出厂水有机污染物雌激素活性进行评价显示: 除 A 厂、C 厂和 E 厂的丰水期水源水在试验剂量范围内对 MCF/7 细胞产生毒性作用,

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

其余水样均刺激了MCF/7细胞的增殖,提示饮用水有机污染物具有潜在的雌激素活性。

丰水期水源水经水厂处理后,对MCF/7细胞增殖的刺激作用均增加,而枯水期则相反。GC/MS分析也表明,丰水期水源水经处理后,有机污染物含量有上升的趋势,枯水期水源水经处理后,出厂水有机污染物则有所减少。结果再次说明水源水水质对出厂水水质存在影响。丰水期水源水中有较多的腐殖质和富里酸,他们经氯化消毒后相应氯化副产物也较多,这可能是丰水期出厂水有机污染物增多和相对增殖效应增加的一个主要原因。虽然目前尚未证实氯化消毒副产物具有雌激素活性,但含氯有机物却是一类重要的外源性雌激素物质[5]。

从不同的角度对水质进行评价,得出的结论不一致,这提示饮用水有机物污染潜在危害的复杂性。饮用水有机污染物种类多、含量低,有机物之间的相互作用复杂,因而其行为不同于单种化学物[6]。这可能是GC/MS分析和生物学评价结果相异的原因。

Tamoxifen作为一种雌激素受体拮抗剂,能与雌激素竞争性结合雌激素受体[7]。有机污染物对MCF/7细胞增殖的刺激作用被Tamoxifen抑制,提示水样有机污染物对MCF/7细胞增殖的刺激作用与雌激素受体有关。

子宫湿重试验是较早建立的检测雌激素活性的经典方法,通过测定外源性雌激素对动物是否具有促进子宫生长的作用来评价雌激素的活性,该试验可检测需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[8]。我们应用初断乳的Wistar大鼠(21天龄),腹腔给药测定了D厂枯水期水源水和出厂水有机污染物的雌激素活性。结果显示,水源水和出厂水都引起大鼠子宫重量的变化,在同一剂量水平,两组之间也没有显著性差异($F=0.062$, $P=0.802$)。

说明水源水和出厂水中有机污染物在经体内一系列代谢转化后,仍然具有雌激素活性;同时也说明目前的饮用水处理工艺尚难以祛除雌激素污染物。

(致谢:我室曹波、胡冉、朱毅、邱志群、刘孟刚、陈济安、郑克刚、姜伟、刘波、余志光等同志参与本研究水样的采集工作。在采样过程中重庆市自来水公司水质科王幼民科长、重庆市A厂蒋加受先生、B厂余红女士、C厂方晚霞女士、D厂吴承志先生、以及西南制药厂李勇先生给予了友好协作,重庆市卫生防疫站张学奎先生在分析工作中给予了大力支持,在此表示感谢!)

参考文献:

[1] Laws S C, Carey S A, Ferrell J M, *et al*. Estrogenic activity of octylphenol, nonylphenol, bisphenol A and aethoxychlor in rats[J]. Toxicological Sciences, 2000, 54(1): 154—167.

[2] Schlumpf M, Cotton B, Conscience M, *et al*. *In vitro* and *in vivo* estrogenicity of UV screens[J]. Environ Health Perspect, 2001, 109(3): 239—244.

[3] Jobling S, Reynolds T, White R, *et al*. A variety of environmentally persistent chemicals, including some phthalate plasticizers, are weakly estrogenic[J]. Environ Health Perspect, 1995, 103(6): 582—587.

[4] 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.

[5] Soto A M, Fernandez M F, Luizzi M F, *et al*. Developing a Marker of exposure to xenoestrogen mixtures in human serum[J]. Environ Health Perspect, 1997, 105 Suppl(3): 647—654.

[6] Crews D, Willingham E, Skipper J K. Endocrine disruptors: present issues, future directions[J]. Q Rev Biol, 2000, 75(3): 243—260.

[7] Coezy E, Borgna J L, Rochefort H. Tamoxifen and metabolites in MCF7 cells: correlation between binding to estrogen receptor and inhibition of cell growth[J]. Cancer Res, 1982, 42(1): 317—323.

[8] 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.

(编辑 刘洪娥)

关于数字的用法

在各种出版物上数字的用法总的原则是:凡是可以使用阿拉伯数字,而且又很得体的地方均应使用阿拉伯数字。以下两种情况必须使用阿拉伯数字:

1 公历世纪、年代、年、月、日和时刻 例如:公元前5世纪、20世纪90年代、1995年6月8日14时30分。

表示年份要写全称,1995年不能写成95年或'95年;1953—1958年不能写成1953—58年。年月日可以写成1995-06-08。时刻用":"分隔的形式。如:13时45分8秒可以写成13:45:08。

2 计数和计量(整数、小数、分数、百分数、均数)包括序数、编号 4位和4位以上的数字采用三位分节法,不用"千分撇",节与节之间留半个阿拉伯数字的空隙(如2 431改为2 431)。年份、部分代号、仪器型号等非计量数字不用分节,也不加千分撇。尾数"0"多,5位以上的数字,可以用"万""亿"表示,但不得以十、百、千、百万、十亿等汉字表示,例如3 579 000可写成357.9万但不能写成3百57万千或357万9千。

本刊编辑部

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net