

利用离体方法评价典型污染土壤的芳烃受体干扰效应和甲状腺受体干扰效应

李 莉^{1,2}, 李 娜¹, 周建国^{2*}, 饶凯峰³

(1.中国科学院高能物理研究所, 北京 100049; 2.河南师范大学化学与环境科学学院, 河南 新乡 453007; 3.中科院生态环境研究中心, 北京 100085)

摘 要:利用大鼠肝癌细胞 H4IIE 离体生物测试(EROD 测试)以及重组甲状腺受体基因酵母法分别评估了我国湖南省、四川省、辽宁省的典型污染土壤的芳烃受体干扰效应和甲状腺干扰效应。研究表明,13 个土样的芳烃受体干扰物质的 TEQ 水平为 4.2~23.9 $\text{pg}\cdot\text{g}^{-1}$ 干土;13 个土样均未检出甲状腺激素诱导效应,但有 4 个土样具有显著的甲状腺抑制效应(其污染水平值为 51~183 $\mu\text{gNH}_3\cdot\text{g}^{-1}$ 干土)。据研究结果发现部分地区这两种污染可能同时存在,联合应用 EROD 测试和 TR 酵母测试可以对复杂环境样品进行有效的毒理评价。

关键词:芳烃受体干扰效应;甲状腺受体干扰效应;EROD 测试;重组基因酵母测试

中图分类号:X825 **文献标志码:**A **文章编号:**1672-2043(2012)09-1759-06

Toxicity Assessment of Typical Contaminated Soil Based on AhR Disruptors and TR Disruptors in Vitro

LI Li^{1,2}, LI Na¹, ZHOU Jian-guo^{2*}, RAO Kai-feng³

(1.Institute of High Energy Physics, China; Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China; 2.College of Chemistry and Environmental Sciences, Henan Normal University, Xinxiang 453007, China; 3.Research Center for Eco-environmental Sciences, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100085, China)

Abstract:The AhR disrupting effect and TR disrupting effect of 13 typical pollution soils from three provinces (Hunan Province, Sichuan Province, Liaoning Province) were assessed by using the ethoxyresorfin O-deethylase bioassay and receptor bioassay. The results showed the AhR disrupting effect of 13 typical pollution soil ranged from 4.2 $\text{pg}\cdot\text{g}^{-1}$ to 23.9 $\text{pg}\cdot\text{g}^{-1}$ 2,3,7,8-TCDD;None of them showed thyroid receptor inductive activities,but four samples showed thyroid receptor antagonistic activities (the TR disrupting effect ranged from 51~183 $\mu\text{gNH}_3\cdot\text{g}^{-1}$ dry soil). Two kinds of contamination might exist in the same area. Combined EROD test and TR yeast test can be an effective way to assess the potential ecological risks of complex environmental samples.

Keywords:AhR disrupting effect; TR disrupting effect; EROD bioassay; recombinant gene yeast bioassay

随着国家工业化和现代农业的发展,土壤污染日益加剧。土壤作为一种重要的环境介质,污染物在土壤中累积会产生极大的影响并且具有反馈功能^[1-2]。在土壤中各种污染物可能被植物根系吸收,并能在植物体内迁移、代谢和积累,进而通过食物链危害人类健

康^[3]。传统的土壤污染评价方法,单纯依靠对土壤中少数已知污染物进行化学分析测定,在很多情况下无法量化复合污染土壤的综合毒性,不能科学地评价土壤生态系统的健康状况。由于具有明显生物效应的污染物种类繁多,而现有的化学分析手段十分有限,环境样品中能够被鉴定的污染物仅占实际存在污染物的很少部分,大多数污染物不能被鉴定,不能根据浓度数据推断其毒性效应和排除样品未被检测出的污染物的潜在毒性效应。许多污染物同时具有多种生物毒理效应,联合进行生物测试评价,有利于发现潜在的生态风险。

收稿日期:2012-02-20

基金项目:国家高技术研究发展计划(863 计划)(2009AA06Z402);国家自然科学基金(40801204,20871042);高等学校博士学科点专项科研基金(20104104110004)

作者简介:李 莉(1986—),女,河南新乡人,硕士研究生,主要从事光催化纳米材料研究。E-mail:lilimaterial@163.com

* 通信作者:周建国 E-mail:jgzhou@htu.cn

大鼠肝癌细胞 H4IIE 离体生物测试 (EROD 测试)方法已经广泛用于环境样品中二噁英类化合物的检测,如土壤、底泥、水体、大气等,与化学分析方法相比具有比较好的一致性^[4]。二噁英及二噁英类物质的毒性作用通过芳烃受体(AhR)等一系列信号分子介导表现,EROD 酶活力诱导表征具有芳烃受体(AhR)效应的有毒有机污染物,H4IIE 细胞以其富含 AhR,而且 EROD 酶活本底表达低,被广泛应用于检测 EROD 效应。最早使用 H4IIE-EROD 方法的是美国食品与药品管理局,其后采用微孔板技术等改进,实现了高通量、低检测限的突破。EROD 检测快速简单,在土壤的芳烃受体干扰效应评价方面应用广泛^[5],可快速筛选和甄别芳烃受体干扰效应物质污染的高风险区域。

重组甲状腺酵母法易操作、费用低、分子生物学原理简单,可以用来评估环境中甲状腺激素的干扰效应^[6]。目前,越来越多的环境污染物被检测出能够直接与甲状腺受体结合,包括多氯联苯、二噁英、溴代阻燃剂、酚类和一些酯类化合物^[7],这类环境污染物通称为甲状腺激素干扰物。甲状腺激素能够调节生物体的新陈代谢系统,并且影响胰岛素和生长激素等其他激素的活性,并调节细胞的分化和生物体的生长发育^[8-9]。活体实验证明持久性有机污染物的暴露能够影响鸟类、鱼类甚至人类血清中正常的甲状腺激素水平,诱导甲状腺组织病变^[10]。有机磷类污染物的甲状腺受体干扰效应已有报道^[11],但是研究得还比较少,由于甲状腺受体的危害逐渐引起关注,有机磷类污染物的甲状腺受体干扰效应也亟需引起重视。

有机磷污染被报道能引起甲状腺干扰效应,一些农药类残留会引起有机磷污染,造成男性和女性的生殖器官畸形,影响前列腺的重量和甲状腺的功能^[12],一些类二噁英污染物能够作用于生殖系统、甲状腺系统、免疫系统及神经系统,对器官和系统造成一系列影响^[13-14]。有机磷类污染物虽然不是芳烃受体的干扰物,但可能会是甲状腺受体的干扰物,因此需要对有机磷污染地区进行甲状腺受体干扰效应的检测,同时由于芳烃受体污染物在我国许多地区土壤的污染有广泛报道^[15-16],有机磷污染地区也可能存在芳烃受体的污染物,对此地区进行多指标生物效应的检测更有利于发现其潜在的生态风险。

本研究选取了 3 个省 6 个城市的有机磷污染类型和多环芳烃污染类型土壤样品,采用 EROD 检测法和重组甲状腺酵母检测法分别评价了土样的芳烃

受体干扰效应和甲状腺激素干扰效应。

1 材料与方法

1.1 药品与溶液配制

实验中所用化学试剂均为分析纯。MEM 细胞培养液 (Hyclone),胰蛋白酶消化液 0.05%(W/V)(Hyclone),胎牛血清(Hyclone),青链霉素(Hyclone)。考马斯亮蓝溶液配制:将 100 mg 的 G250 溶于 50 mL 95%的乙醇中,加 100 mL 85%磷酸,再加蒸馏水定容至 1000 mL。

1.2 仪器设备

酶标仪 (Spectra Fluor plus,TECAN,Austria),CO₂ 培养箱 (MCO-17AC,Sanyo,Japan),恒温振荡摇床 (HZQ-F,哈东联),恒温平板摇床 (Titramax 1000, Heidolph,Germany),百级超净工作台 (DL-CJ-1F,哈东联),旋涡混合器 (MS2,广州 IKA Works)等。

1.3 试验土壤、重组甲状腺酵母和鼠肝癌细胞

2011 年 4 月—5 月期间,采用全球卫星定位系统 GPS 定位,采集了湖南、四川、辽宁 3 个省的典型农业用地的表层土壤,其中益阳市农药厂附近农田有机磷污染潜在风险土壤样品 1 个(A),自贡市农药厂附近有机磷污染潜在风险土壤样品 1 个(B),长沙火电厂附近多环芳烃污染潜在风险土壤样品 1 个(C),鞍山市郊有机磷污染潜在风险土壤样品 1 个(D),大连市近郊多环芳烃污染潜在风险土壤样品 1 个(E),岷江成都段附近农田多环芳烃污染潜在风险土壤样品 1 个(F),并且以上 A、B、C、D、E 处取了 2 个土壤样品,F 处取了 3 个土壤样品,样品总计 13 个。对样品污染类型的定性(有机磷、多环芳烃)主要是按采样点附近的污染源类型来定义的。每个样点选择大约 10 m×10 m 的地块,在其中均匀布点采集 5 个表层土样(10 cm 深),各约 100 g,合并为 1 个混合样品,盛放于不锈钢制饭盒内,立刻送回实验室 -20℃贮存。

重组甲状腺激素受体基因双杂交酵母由中科院生态环境研究中心水生态毒理组构建。鼠肝癌细胞由北京协和医科大学基础医学院提供。

1.4 土壤样品前处理

将采集到的土壤样品冷冻干燥后,研磨过 1 mm 筛。取 20 g 用二氯甲烷:丙酮(体积比为 1:1)的混合液 200 mL,在索氏提取器中浸泡 24 h 后抽提 48 h,并用活化铜片脱硫。提取液在旋转蒸发仪上浓缩至约 1 mL,用 15 mL 正己烷将土壤提取液转移到 K-D 浓缩器中,用高纯氮气浓缩至 10 μL 后,加入 200 μL DM-

SO(二甲基亚砜)溶剂置换,-20℃以待生物测试。

1.5 芳烃受体干扰效应测定

采用96微孔板中固着细胞 EROD 酶活力诱导的二噁英生物测试方法,参照本实验室已有的实验方法^[17]。取生长良好的 H4IIE 细胞,用 0.05%胰蛋白酶将细胞从培养瓶瓶壁上洗脱后,用培养液调节细胞密度为 $2 \times 10^5 \cdot \text{mL}^{-1}$ 左右,每孔 100 μL 接种到 96 孔板,置 CO_2 培养箱中培养 24 h,待单层细胞铺满孔底面积 70%~80%后即可。弃去孔内培养液,加入含有待测样品与 2,3,7,8-TCDD 标准储备液的培养液。将加入样品的细胞置于培养箱内培养 72 h 后,弃去暴露液,每孔加入 100 μL EROD 反应液置 CO_2 培养箱中反应 60 min。60 min 后加入 130 μL 甲醇终止反应,室温下于 96 孔板摇床混匀,转移 100 μL 于酶标板中测 RF 的荧光强度(激发波长 535 nm,吸收波长 590 nm)。将 96 孔板中剩余的反应液吸出,每孔加入 120 μL 的 $0.3 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 NaOH 破碎细胞 10 min,于显微镜下观察细胞破碎情况,在细胞破碎后吸出 100 μL ,加入 G250 染液 200 μL 反应 10 min 后上酶标仪 595 nm 测蛋白。为保证实验数据的可靠性,所有样品均重复 3 次。样品的芳烃受体类物质总浓度水平用 2,3,7,8-TCDD 标定。通过将样品的 EROD 酶活与实验中测定的 TCDD 标准储备液的剂量-EROD 酶活关系曲线对比后得到毒性当量(TEQ)。TCDD 剂量-EROD 酶活关系曲线由以下方程用最小二乘法进行拟合:

$$y = \frac{A-D}{1+(c/x)^B} + D \quad (1)$$

式中: y 为 EROD 酶活性; x 为 2,3,7,8-TCDD 浓度,即诱导剂量; A 为 EROD 酶活性最高值; B 为回归曲线中点的斜率; c 为半数最大 EROD 酶活性时 2,3,7,8-TCDD 标准液浓度,即 EC_{50} 值; D 为 EROD 酶活性最低值。

1.6 甲状腺干扰效应测定

将过夜培养的菌液进行稀释,加入培养基调节其吸光度至 0.75 左右。将上述酵母菌液混匀,取 995 μL 菌液与 5 μL 的样品涡旋混匀。取 200 μL 的混合液加入到 96 孔板中,每个浓度至少设 3 个平行测试。同时每板设定阳性对照三碘甲状腺氨酸(T3)和阴性对照(DMSO)。为保证实验数据的可靠性,所有样品均重复 3 次。将 96 孔板置于微孔摇床上 30°C 、 $800 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 暴露培养 2 h。以上均为无菌操作。测定 OD_{595} 的值。将培养板中的菌液吸出 150 μL ,加入 120 μL 分析缓冲液(每 100 mL 的基础缓冲液中加入 3.33 mL 浓度为

0.1%的 SDS 溶液和 270 μL β -巯基乙醇)。基础缓冲液的配制:将 21.51 g 的 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 、6.22 g 的 $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、0.75 g 的 KCl 和 0.25 g 的 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 溶解并定容于 1 L 蒸馏水中。于 30°C 、 $800 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 继续培养 10 min 后加入 20 μL 氯仿,于摇床上 $1300 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 振荡 10 min 破碎酵母细胞。加入 40 μL ONPG($13.3 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$,溶解于基础缓冲液中启动酶反应,计时直至出现明显的黄色)。反应完成后加入 100 μL 碳酸钠($1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$)终止。吸取 200 μL 转移到酶标板中,测定 OD_{420} 值^[18]。

β -半乳糖苷酶活性 u 值据下式计算:

$$u = (\text{OD}_{420} - \text{OD}'_{420}) / t \cdot V \cdot D \cdot \text{OD}_{595} \quad (2)$$

式中: u 为 β -半乳糖苷酶活性, U/t 为酶反应时间, min; V 为反应体积, mL; D 为稀释因子; OD'_{420} 为阴性对照在 420 nm 处的吸光度值; OD_{420} 和 OD_{595} 分别为样品在 420 nm 和 595 nm 处的吸光度值。

样品的甲状腺激素干扰效应以诱导率和抑制率表征,公式如下:

$$\text{诱导率} = u(s)/u(p) \times 100\% \quad (3)$$

$$\text{抑制率} = [1 - u(s)/u(p)] \times 100\% \quad (4)$$

式中: $u(s)$ 为样品诱导酵母产生的酶活性值; $u(p)$ 为阳性对照(T3)诱导酵母产生的酶活性值^[19]。将生物测试得到的 NH_3 (标准抑制剂)毒性当量作为评价标准。

1.7 数据分析

芳烃受体干扰效应测试利用 Origin8.0 对数据进行统计分析,对各组数据进行剂量-效应曲线拟合,并由此作出 TCDD 剂量与 EROD 活力诱导的剂量-效应关系标准曲线,样品的毒性效应则可根据该标准曲线计算出的 TCDD 毒性等价浓度(TEQ)为评价参数。

甲状腺干扰效应测试利用四参数模型的方法进行拟合 Marquardt-Levenberg algorithm(Sigmaplot4.0, SPSS, Chicago, Illinois, USA)^[20], 对各组数据进行剂量-效应曲线拟合,建立三碘甲状腺氨酸(T3)对酶活性诱导的剂量-效应关系曲线,样品的毒性效应则可根据该标准曲线计算 NH_3 的毒性当量作为评价参数。

2 结果与分析

2.1 土样多环芳烃受体干扰效应检测

以一组浓度为 $0.05 \sim 140 \text{ pg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 2,3,7,8-TCDD 为标准化合物,通过测定其对 EROD 酶活力的诱导,作出相应的 TCDD 剂量与 EROD 活力诱导的剂量-效应关系标准曲线。样品的毒性效应则可根据

该标准曲线计算出的 TCDD 毒性等价浓度 (TEQ)为评价参数。由方程 (1) 计算出本实验中 2,3,7,8-TCDD 的 EC₅₀ 值为 0.16 ng·mL⁻¹ DMSO, 方法检测限为 18.5 fg·孔⁻¹ [21]。表 1 给出了通过 EROD 试验测试 13 个土壤样品中芳烃受体干扰效应的统计结果,环境中芳烃受体干扰效应物质用生物法测得的 2,3,7,8-TCDD 的等毒性当量 TEQ 来定量表示。

表 1 土壤样品芳烃受体干扰效应
Table 1 Statistical descriptions of the results of EROD bioassay

采样点	污染类型	土壤类型	TEQ/pg·g ⁻¹	SD
A1	有机磷	潮土	23.9	1.26
A2	有机磷	潮土	10.1	0.160
B1	有机磷	紫色土	8.14	0.425
B2	有机磷	紫色土	8.25	2.37
C1	多环芳烃	水稻土	7.09	0.422
C2	多环芳烃	水稻土	10.1	0.613
D1	有机磷	草甸土	14.4	1.15
D2	有机磷	草甸土	15.1	1.20
E1	多环芳烃	棕壤	4.20	0.244
E2	多环芳烃	草甸土	7.05	0.929
F1	多环芳烃	潮土	10.9	0.409
F2	多环芳烃	潮土	15.2	1.08
F3	多环芳烃	潮土	7.44	0.433

由表 1 可以看出,所有土样均表现出不同程度的芳烃受体干扰效应,其中土样 A1 和土样 F,土样 D1 和土样 D2,有明显的芳烃受体干扰效应。

2.2 土样甲状腺干扰效应检测

本实验室以往研究已证明本实验所用的重组人甲状腺激素受体基因酵母对三碘甲状腺氨酸 (T3)有专一性的结合。将酵母暴露到不同浓度的 T3 溶液中,检测诱导产生的酶活性,建立 T3 对酶活性诱导的剂量-效应关系曲线。结果表明,重组甲状腺激素基因酵母对 T3 有较高的灵敏度,EC₅₀ 值为 1.1×10⁻⁷ mol·L⁻¹,与本实验室以往报道结果一致[18]。表 2 表示应用重组甲状腺激素受体基因酵母对全部 13 个土样进行甲状腺激素诱导和抑制效应检测 (选择 NH₃ 作为甲状腺的标准抑制剂)。

在暴露浓度相当于 4 mg 干土·孔⁻¹ 的时候,所有的土样均未检出甲状腺激素诱导效应,检出不同程度

的抑制效应,且抑制效应随着浓缩倍数的增高而增大。其中土样 C1 和 C2,F1 和 F2 表现出不同程度的甲状腺激素抑制效应,其中 F1、F2、F3 都是作为芳烃受体效应潜在风险采集的样品,但其芳烃受体效应差别较大,这可能和扩散作用以及未知污染源、人为排放等原因有关[22-24]。

3 讨论

本试验利用 H4IIE 细胞测定不同地区土样的芳烃受体干扰效应,并且用 TR 酵母细胞研究了土样的甲状腺干扰效应。环境样品中芳烃受体干扰效应物质一般以痕量水平(pg 级或更低)存在,加上环境样品基质复杂,因此环境中芳烃受体干扰效应物质的分析检测仍旧很有难度。有研究表明,四氯代二苯并对二噁英(2,3,7,8-TCDD)对大鼠染毒处理后,大鼠芳香烃受体基因表达上调,导致肿瘤发生[25]。流行病学调查也发现,职业接触或日常生活暴露于 TCDD 与肿瘤的发生有关联[26]。

国外近年来关于土壤多环芳烃的研究很多,主要集中在土壤中多环芳烃的含量和来源[23]、分布特征[27]和迁移转化[22]、多环芳烃的物理化学性质与其在土壤中行为的关系[28-29]、环境因子与多环芳烃行为的相互关系[30]、风险评价和管理等方面[31]。瑞典斯德哥尔摩北部的农用土壤中典型芳烃受体干扰效应物质 TEQ 水平在 0.5~2.0 pg·g⁻¹[32];湖北省鸭儿湖附近土壤的芳烃受体干扰效应物质 TEQ 水平在 1.8~2.3 pg·g⁻¹[33];而再生水灌溉土壤中芳烃受体干扰效应物质的毒性当量浓度最高达 97.4 pg·g⁻¹[15]。已报道的工业区的土壤芳烃受体物质水平相比农业土壤更严重,如天津地区的 41 个表层土壤的芳烃受体干扰效应,TEQ 值范围在 2.8~42.6 pg·g⁻¹[34];俄罗斯工业区 TEQ 值范围为 1~20 pg·g⁻¹,西班牙工业区 TEQ 值水平为 450 pg·g⁻¹,西德工业区 TEQ 值范围为 280~290 pg·g⁻¹,韩国釜山焚烧炉附近 TEQ 值水平为 23.78 pg·g⁻¹[35]。与加拿大、新西兰和瑞典等国家农业土壤的标准限值 4~10 pg·g⁻¹[36] 作比较,芳烃受体干扰效应测试显示(表 1),所测的 13 个土样均有一定程度的芳烃受体干扰效应,多数芳烃受体干扰效应水平在上述限值以内。土壤最高效

表 2 土壤样品甲状腺激素受体诱导活性和抑制活性(μgNH₃·g⁻¹ 干土)
Table 2 Thyroid hormone inductive activity and inhibitive activity of soil samples(μgNH₃·g⁻¹ dry soil)

甲状腺干扰效应(TEQ)	A1	A2	B1	B2	C1	C2	D1	D2	E1	E2	F1	F2	F3
诱导活性	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
抑制活性	—	—	—	—	60	51	—	—	—	—	183	99	—

应出现在土样 A 对照的位置,TEQ 达到 $23.9 \text{ pg} \cdot \text{g}^{-1}$, 其次为土样 F, 土样 D 及其对照已超过限值,TEQ 值分别为 15.2 、 15.1 、 $14.4 \text{ pg} \cdot \text{g}^{-1}$, 其余 9 个土壤样品均在 $4 \sim 10 \text{ pg} \cdot \text{g}^{-1}$ 的标准限值内。湖南省的土壤样品 TEQ 水平在 $7.09 \sim 23.9 \text{ pg} \cdot \text{g}^{-1}$, 四川省的土壤样品 TEQ 水平在 $7.44 \sim 15.2 \text{ pg} \cdot \text{g}^{-1}$, 辽宁省的土壤样品 TEQ 水平在 $4.2 \sim 15.1 \text{ pg} \cdot \text{g}^{-1}$, 3 省的农用土壤芳烃受体污染水平均高于发达国家农业标准,和天津地区的表层土壤水平接近。其中土样 A 对照超过限值的两倍,可能是由于土样 A 对照位于农药厂附近,农药生产过程中生产原料以及动力燃料、润滑油等的泄露现象普遍,生产原辅料如苯胺、甲苯,以及酚类均有可能进入土壤,这些原料中可能含有的多环芳烃也就随之进入土壤,同样取自农药厂附近的 B 样品农业土壤的 TEQ 水平在限值以内,反映控制的比较好。芳烃受体干扰物的组成分布将随当地的工农业布局和排放密切相关,应用符合实际情况的评价方法体系来表征芳烃受体干扰效应和因果分析是对受污染土壤进行风险评价与管理的前提条件。

甲状腺激素干扰物的危害研究相对较少,目前正受到越来越多的关注。近年来,各种离体和活体实验结果表明甲状腺是内分泌干扰的重要作用位点,甲状腺激素属于生物体最重要的新陈代谢的调节物,不仅直接增强经耗氧调节的新陈代谢作用,而且影响其他激素的活性,如胰岛素、胰高血糖素、生长激素、肾上腺素等^[6]。甲状腺激素在组织细胞的分化和生长中也起着重要的作用,比如影响性腺和骨骼的发育等^[7-8]。有报道使用重组甲状腺酵母法有效检测底泥、饮用水等的甲状腺干扰效应^[21,37],而应用到土壤中的报道还不多。本实验室的双杂交甲状腺酵母的实验原理是考察化合物对甲状腺受体与共激活因子结合的干扰作用, NH_3 被报道有甲状腺受体抑制效应的专一结合性,并通过抑制甲状腺受体与其共激活因子的结合发挥作用^[33],因此选择 NH_3 作为甲状腺的标准抑制剂进行测试。对土样中甲状腺干扰效应进行测定,需要转化成 NH_3 的毒性当量。

甲状腺激素干扰效应测试显示(表 2),所测的 13 个土壤均未检出甲状腺诱导效应(目前能够已知的能够引起甲状腺诱导效应的有机化合物很少),检出了不同程度的抑制效应,且抑制效应随着浓缩倍数的增高而增大,4 个有显著甲状腺抑制效应的污染水平值为 51 、 60 、 99 、 $183 \mu\text{gNH}_3 \cdot \text{g}^{-1}$ 干土。其中土样 C 及其对照来自火电厂附近,火电厂的燃烧发电、废线路板、电

容、变压器、电力设备的清洗液、电力设备中倾倒出的介质油、绝缘油、冷却油及传热油等都很可能造成 PCBs、PBBs 和 PBDEs 超标,造成甲状腺干扰效应。因此,应该特别关注这些化合物对甲状腺系统的损害^[38]。

4 结论

本试验利用 H4IIE 细胞测定不同地区土样的芳烃受体干扰效应,结合 TR 酵母研究土样甲状腺干扰效应进行比较。土壤中典型芳烃受体干扰效应物质 TEQ 水平在 $(4.2 \sim 23.9 \text{ pg} \cdot \text{g}^{-1})$;土样均未检出甲状腺激素诱导效应,但是检出了不同程度的甲状腺激素抑制效应,且个别地区抑制效应明显。许多芳烃受体干扰物同时也是甲状腺受体的干扰物,因此联合应用 EROD 测试和 TR 酵母测试可以对复杂环境样品进行全面的毒理评价。对于污染区域首先用生物效应方法进行效应筛选,再进一步确定导致效应发生的环境污染物特征,应是区域污染健康风险评价的一条有效途径。

参考文献:

- [1] Debus R, Hund K. Development of analytical methods for the assessment of ecotoxicological relevant soil contamination Part B: Ecotoxicological analysis in soil and soil extracts[J]. *Chem*, 1997, 35(1-2):239-261.
- [2] Wahle U, Kordel W. Development of analytical methods for the assessment of ecotoxicological relevant soil contamination Part A: Development and improvement of soil extraction methods for the determination of the bioavailable parts of contaminants[J]. *Chemosphere*, 1997, 35(1-2):223-237.
- [3] Jones K C. Contaminated trends in soils and crops[J]. *Environment Pollution*, 1991, 69:311-325.
- [4] Behnisch P A, Hosoe K. Bioanalytical screening methods for dioxins and dioxin-like compounds: A review of bioassay/biomarker[J]. *Technology Environment International*, 2001, 27(5):413-439.
- [5] 禹 果, 吴文勇, 刘洪禄, 等. 利用化学分析和生物测试方法比较研究污染土壤中芳烃受体效应物质的积累 [J]. *环境科学*, 2006, 27(9):1820-1824.
YU G, WU W Y, LIU H L, et al. Comparative study on accumulation of Ah-receptor agonists in contaminated soil based on EROD bioassay and chemical analysis[J]. *Environmental Science*, 2006, 27(9):1820-1824.
- [6] 李 剑, 饶凯峰, 马 梅, 等. 核受体超家族及其酵母双杂交检测技术[J]. *生态毒理学报*, 2008, 3(6):521-532.
LI J, RAO K F, MA M, et al. Nuclear receptor superfamily and yeast two-hybrid system[J]. *Asian Journal of Ecotoxicology*, 2008, 3(6):521-532.
- [7] 李 剑, 崔 青, 马 梅, 等. 应用重组孕激素基因酵母测定饮用水中内分泌干扰物的方法[J]. *环境科学*, 2006, 27(12):2463-2466.
LI J, CUI Q, MA M, et al. Recombinant hPR gene yeast for assessing in drinking water[J]. *Environmental Science*, 2006, 27(12):2463-2466.
- [8] Cooke P S, Holsberger D R, Witorsch R J, et al. Thyroid hormone, glucocorticoids, and prolactin at the nexus of physiology, reproduction, and

- toxicology[J]. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 2004, 194:309–335.
- [9] Abu E O, Bord S, Horner A, et al. The expression of thyroid hormone receptors in human bone[J]. *Bone*, 1997, 21:137–142.
- [10] Colborn T. Clues from wildlife to create an assay for thyroid system disruption[J]. *Environmental Health Perspectives*, 2002, 110:363–367.
- [11] 李春风, 郭小刚, 杨蕾, 等. 急性有机磷中毒患者血浆甲状腺激素水平的动态变化及意义[J]. 中国急救医学, 2001, 21(10):584–585. LI C F, GUO X G, YANG L, et al. Clinical significance of changes of plasma thyroid hormone concentrations in patients with AOPP[J]. *Chin J Crit Care Med*, 2001, 21(10):584–585.
- [12] Johnson D E, Seidler F J, Slotkin T A. Early biochemical detection of delayed neurotoxicity resulting from developmental exposure to chlorpyrifos[J]. *Brain Research Bulletin*, 1998, 45:143–147.
- [13] Ben Jonathan N, Cooper R L, Foster P, et al. An approach to the development of quantitative models to assess the effects of exposure to environmentally relevant levels of endocrine disruptors on homeostasis in adults[J]. *Environmental Health Perspectives*, 1999, 107(4):605–611.
- [14] Kavlock R J, Daston G P, DeRosa C, et al. Research needs for the risk assessment of health and environmental effects of endocrine disruptors: A report of the U. S. EPA-sponsored workshop[J]. *Environmental Health Perspectives*, 1996, 104(4):714–740.
- [15] 杨蕾, 骆坚平, 王春霞, 等. 电子垃圾处理地土壤中芳烃受体效应物质的分布规律[J]. 环境科学学报, 2008, 28(6):1131–1135. YANG L, LUO J P, WANG C X, et al. Distribution of Ah-receptor agonists in soils contaminated by electronic waste recycling[J]. *Acta Scientiae Circumstantiae*, 2008, 28(6):1131–1135.
- [16] 李丽和, 曹云者, 李秀金, 等. 典型石油化工污染场地多环芳烃土壤指导限值的获取与风险评价[J]. 环境科学研究, 2007, 20(1):30–35. LI L H, CAO Y Z, LI X J, et al. Deriving of soil guideline values and risk assessment of polycyclic aromatic hydrocarbons at a typical petrochemical-contaminated site[J]. *Research of Environmental Sciences*, 2007, 20(1):30–35.
- [17] Ma M, Wang C X, Wang Z. Assessing toxicities of hydrophobic organic pollutants in Huaihe River by using two types of sampling and bioassays[J]. *J Environmental Science and Health (A)*, 2005, 40(2):331–342.
- [18] LI J, MAM, LIU Y, et al. A rapid two-hybrid yeast assay to quantify functional potentiating, antagonistic and thyroid hormone-like activities of a series of xenobiotics[J]. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 2008, 27:196–205.
- [19] 庄丽丽, 马梅, 饶凯锋, 等. 天津市污水以及再生水处理过程中的雌/孕激素干扰效应[J]. 生态毒理学报, 2010, 5(2):222–228. ZHUANG L L, MA M, RAO K F et al. Estrogen and progesterone interference effect of sewage and reclaimed water treatment process in Tianjin[J]. *Asian Journal of Ecotoxicology*, 2010, 5(2):222–228.
- [20] Rehmann K, Schramm K W, Kettrup A A. Applicability of a yeast oestrogen screen for the detection of oestrogen-like activities in environmental samples[J]. *Chemosphere*, 1999, 38:3303–3312.
- [21] Qiao M, Chen Y, Zhang Q, et al. Identification of Ah receptor agonists in sediment of Meiliang Bay, Taihu Lake, China[J]. *Environ Sci Technol*, 2006, 40:1415–1419.
- [22] Bakker M I, Casado B, Koerselman J W. Polycyclic aromatic hydrocarbons in soil and plant samples from the vicinity of an oil refinery[J]. *Science of the Total Environment*, 2000, 263:91–100.
- [23] Trapido M. Polycyclic aromatic hydrocarbons in Estonian soil: Contamination and profiles[J]. *Environmental Pollution*, 1999, 105:67–74.
- [24] Sang-Jo Kim, Gon Ok, Young-Kyo Kim, et al. Polychlorinated Dibenzo-p-dioxins and Dibenzofurans in soil samples from urban and industrial areas of Korea[C]. Dioxin 2001 (Environmental Levels II, Poster). 116.
- [25] Li W, Harper P, Tang B. Regulation of cytochrome p450 enzymes by arylhydrocarbon receptor in human cells: CYP1A2 expression in the LS180 colon carcinoma cell line after treatment with 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin or 3-methylcholanthrene[J]. *Biochemical Pharmacology*, 1998, 56:599–612.
- [26] Baccarelli A, Pesatori A, Masten S. Aryl-hydrocarbon receptor-dependent pathway and toxic effects of TCDD in humans: A population-based study in Seveso, Italy[J]. *Toxicology Letters*, 2004, 149:287–293.
- [27] Witter B, Francke W, Franke S. Distribution and mobility of organic micropollutants in River Elbe floodplains[J]. *Chemosphere*, 1998, 37:63–78.
- [28] Kottler B D, Alexander M. Relationship of properties of polycyclic aromatic hydrocarbons to sequestration in soil[J]. *Environmental Pollution*, 2001, 113:293–298.
- [29] Krauss M, Wilcke W, Zech W. Polycyclic aromatic hydrocarbons and polychlorinated biphenyls in forest soils: Depth distribution as indicator of different fate[J]. *Environmental Pollution*, 2000, 110:79–88.
- [30] Wilcke W, Zech W, Kobza J. PAH-pools in soils along a PAH-deposition gradient[J]. *Environmental Pollution*, 1996, 92:307–313.
- [31] Carlon C, Critto A, Marcomini A. Risk based characterization of contaminated industrial site using multivariate and geostatistical tools[J]. *Environmental Pollution*, 2001, 111:417–427.
- [32] Broman D, Naf C, Zebuhr Y. Analysis of polychlorinated dibenzop-dioxins (PCDD) and polychlorinated dibenzofurans (PCDF) in soil and digested sewage sludge from Stockholm, Sweden[J]. *Chemosphere*, 1990, 21(10211):1213–1219.
- [33] 徐盈, 吴文忠, 张甬元. 利用 EROD 生物测试法快速筛选二噁英类化合物[J]. 中国环境科学, 1996, 16:279–284. XU Y, WU W Z, ZHANG Y Y. Rapid quantitative screening of dioxin like compounds by EROD induction bioassay [J]. *China Environ Sci*, 1996, 16:279–284.
- [34] Xiao R Y, Wang Z, Wang C X, et al. Soil screening for identifying ecological risk stressors using a battery of in vitro cell bioassays [J]. *Chemosphere*, 2006, 64(1):71–78.
- [35] 李常清, 陈生, 李伟, 等. 土壤中的二噁英类物质污染及其污染源[J]. 地球与环境, 2004, 32(2):63–69. LI C Q, CHEN Z S, LI W, et al. Source and level of dioxins in the soil environment[J]. *Earth and Environment*, 2004, 32(2):63–69.
- [36] Leung A, Luksemburg W J, Wong A S, et al. Spatial distribution of polybrominated diphenyl ethers and polychlorinated dibenzo-p-dioxins and dibenzofurans in soil and combusted residue at Guiyu, an electronic waste recycling site in southeast China[J]. *Environ Sci Technol*, 2007, 41:2730–2737.
- [37] Grover G J, Dunn C, Nguyen N H, et al. Pharmacological profile of the thyroid hormone receptor antagonist NH₃ in rats[J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2007, 322(1):385–390.
- [38] Li Na, Wang Donghong, Zhou Yiqi, et al. Dibutyl phthalate and diethylhexyl phthalate contribute to the thyroid receptor antagonistic activity in the drinking water processes[J]. *Environmental Sci Technol*, 2010, 44(17):6863–6868.