

农药的内分泌干扰研究*

王鲁梅¹ 刘维屏^{1, 2*, *} 马云² 林坤德¹

(¹ 浙江大学环境科学研究所, 杭州, 310029 ² 浙江工业大学环境科学研究中心, 杭州, 310032)

摘 要 环境污染引起的内分泌干扰成为全球性环境问题之一。本文介绍了内分泌干扰物的检测方法, 并从除草剂、杀虫剂、杀菌剂等三个方面介绍了农药所引起的内分泌干扰现象。在此基础上, 简介手性农药内分泌干扰问题的重要性和研究现状, 并进行展望。

关键词 农药, 内分泌干扰, 环境内分泌干扰物。

现代农业对农药的过分依赖对环境造成了极大的污染^[1], 农药是一大类内分泌干扰物, 其内分泌干扰效应已经引起环境工作者的高度重视。在现今使用的农药中, 手性农药的比例愈来愈高, 手性农药的环境安全性问题已被提出^[2]。

本文介绍了环境内分泌干扰物的检测方法, 以及农药引起的内分泌干扰现象, 然后简介手性农药内分泌干扰问题的重要性和研究现状, 并进行展望。

1 内分泌干扰

1.1 环境内分泌干扰物

内分泌干扰物按其生物活性可分为类雌激素及抗雌激素、类雄激素及抗雄激素、类甲状腺素及抗甲状腺素等, 目前研究最多的是类雌激素^[3]。迄今已发现 100 多种具有内分泌干扰作用的化学物质, 大致可分为农药、防腐剂 (如五氯酚、三丁基锡等)、增塑剂 (如邻苯二甲酸二乙酯、DEP 和邻苯二甲酸二环己酯、DCHP 等)、洗涤剂 (如壬基苯酚、NP 和 4-辛基苯酚等)、副产物 (如二噁英类、苯并(a)芘等)、某些重金属 (如铅、汞等)、其它化合物 (如双酚 A 和多氯联苯类、PCBs 等) 等几类。其中农药又包括除草剂 (如阿特拉津、除草醚等)、杀虫剂 (如六六六、马拉硫磷等)、杀菌剂 (如苯菌灵、六氯苯等) 等^[3, 4]。

环境内分泌干扰物 (environmental endocrine disrupting chemicals, EEDCs) 大多数是脂溶性的, 且化学性质稳定, 可通过食物链富集, 进入机体以后半衰期较长, 可在机体内长期蓄积, 难以生物降解, 不易排出甚至不排出体外。环境内分泌干扰物具有毒物的一切性质, 即使微量也可对正常的激素作用产生影响, 干扰内分泌机能^[5]。主要体现在干扰生殖器官的成熟和功能, 对其它腺体也有不同程度的影响。无论动物还是人类都会受到这一类物质的干扰。环境内分泌干扰物除了生殖毒性外, 还可引起哺乳动物的病理性损伤。环境内分泌干扰物的种类繁多, 且分布范围广, 加之对物种性别平衡的影响, 势必会造成物种减少, 生态失衡, 甚至影响人类和动物的繁衍^[6]。内分泌干扰物对人类健康及生物种群的影响, 已引起各国政府、科研机构及公众的广泛关注, 成为当前公共卫生和环境保护研究工作中的一个热点^[3]。

环境内分泌干扰物种类多、数量大、含量较小 ($\text{ng} \cdot \text{L}^{-1}$ — $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 级), 并且大部分类雌激素的内分泌干扰物虽然能与天然 17β -雌二醇竞争雌激素受体 (estrogen receptor, ER), 产生雌激素样效应, 但在结构上与 17β -雌二醇没有相似性。这些都给环境内分泌干扰物的检测带来困难。随着研究的深入, 愈来愈多的环境内分泌干扰物被认定。目前国际上对环境内分泌干扰物中具有雌激素活性的物质的检测更为注重, 方法较多。现有的检测技术可分为物理检测技术和生物检测技术两大类^[6, 7]。为了全面而深入的研究内分泌干扰物并评价其对人类和动物界的危害, 在检测时选择多种方法以便综合分析是很有必要的^[8]。

1.2 物理检测技术

* 国家杰出青年基金 (20225721) 及国家自然科学基金 (30500304) 资助项目。 * * 通讯联系人。

物理检测一般是用色谱仪器(如液相色谱和气相色谱)进行分析。色谱分析技术对样品的前处理过程要求非常高,需要从复杂的基质样品中将低浓度的目标化合物高效提取、纯化和浓缩。随着色谱技术与质谱技术的结合,检测分析的选择性和灵敏度得到很大提高,检测范围有所扩大。一般来说,做为色谱分析前处理的萃取只能提取一类或几类物理性质相似的环境内分泌干扰物,因此要完全分析样品,必须采用不同的萃取、纯化方法分别提取与分析,这样耗时较长,费用也较大^[6,9]。

1.3 生物检测技术

生物检测是建立在环境内分泌干扰物在体内的作用机制及产生的生物效应的基础之上的。生物检测包括体内实验(*In vivo Test*)与体外实验(*In vitro Test*)^[6]。

体内实验主要包括哺乳动物实验、非哺乳类脊椎动物实验(包括鸟类实验、两栖类实验和鱼类实验等)、无脊椎动物实验(包括蚤类实验、糖虾繁殖实验等)^[3]。

在哺乳动物实验中,目前所用的受试动物主要为啮齿类动物,如大鼠、小鼠(小鼠较大鼠敏感)等。方法有子宫肥大实验、睾丸摘除(Hershberger)实验、雌性动物青春期实验、雄性动物青春期实验、两代繁殖实验等。啮齿类动物子宫肥大实验是检测雌激素活性的经典方法,选用未成年或成年后切除卵巢的雌性大鼠或小鼠,连续皮下注射受试物或较长时间饲以含有受试物的食物,一段时间后处死动物,迅速剥离子宫,称取子宫的湿重和(或)干重,计算子宫脏器系数,测定子宫过氧化酶的活力,检测子宫血管渗透性等,用这些指标的变化大小综合评定受试物的雌激素样活性与强度^[3,6,8,10-16]。这种方法简单易行,较为经济,但在操作上要求较高,而且一些雌激素拮抗剂也可导致子宫肥大,因此,用其实验的结果外推到人类不一定合理^[6]。Hershberger实验是选用摘除睾丸的雄性大鼠,给予受试物处理,通过测定附属性器官重量,来筛选具有雄激素样作用的化合物^[17]。啮齿类动物青春期实验分别以未成熟的雄性^[17]或雌性动物^[18]暴露于化合物,通过检测雄性或雌性动物性器官和第二性征的发育,来评价化合物的雄激素、雌激素和甲状腺素活性。哺乳动物两代繁殖实验则是研究化合物对哺乳动物的剂量反应特性以及繁殖发育的负效应^[3]。

体外实验的设计主要是基于大部分环境内分泌干扰物在体内的作用机制,如类雌激素在体内与 17β 雌二醇竞争结合雌激素受体。体外实验主要有受体结合实验、体外芳香酶活性抑制实验、细胞培养实验、分子生物学检测技术等几种^[3,6]。

受体结合实验包括雌激素受体结合实验和雄激素受体结合实验,是从受体水平上判断某物质是否具有类激素活性及其活性强度^[3,19]。受体结合实验可以了解药物的作用是否经过受体所介导,但尚不能区分被测物是激素的激动剂还是拮抗剂^[13]。受体结合实验主要是选用组织匀浆,细胞培养实验是利用细胞对雌激素或具有雌激素样作用的物质可产生特异性反应,通过观察细胞生长曲线或测定特异性蛋白含量,来判断受试物的雌激素活性和强度。所用的细胞系有MCF-7细胞、T47D细胞、ZR-75-1细胞(此三者皆为人乳腺癌细胞系)、HeLa细胞(人宫颈鳞癌上皮细胞系)、大鼠子宫原代细胞、大鼠垂体原代细胞、鼠淋巴细胞经基因转染的Lec-9细胞等。其中细胞增殖常用的是MCF-7细胞^[15,20-22],它的优点在于能反映对人体的作用,并且操作简单、灵敏度较高。而细胞特异性产物测定常用的是卵黄蛋白原(vitellogenin, VTG)。由于卵黄蛋白原具有高度的特异性、高度的灵敏性及标本的取材灵活广泛等特点,所以在内分泌干扰物筛选中,可以作为很好的生物标志物(biomarker)^[3,6,7]。

2 农药引起的内分泌干扰现象

在已知的内分泌干扰物中,农药占了绝大部分。1999年世界自然基金会的《环境中被报告具有生殖和内分泌干扰作用的化学物质清单》报告中,共包含125种内分泌干扰物,其中农药就有86种,占68.8%^[23]。

细胞培养、动物实验和野生动物的暴露研究显示,内分泌干扰物类农药会影响动物的内分泌系统,主要是导致生殖和发育方面的畸形发展,如雌雄两性、生殖系统畸形、癌变和性行为异常等。其次,内分泌干扰物类农药也影响生物体的免疫和神经系统,对幼体影响更大^[24]。

2.1 除草剂所引起的内分泌干扰现象

我国当前使用的几种主要除草剂中,阿特拉津、乙草胺、甲草胺、草克净、杀草强等均是内分泌

干扰物^[23]。阿特拉津 (Atrazine) 曾经是美国或许世界上使用最普遍的除草剂。阿特拉津曾被认为是安全的, 因为它的半衰期短、生物积累和生物放大效应可以忽略。但 Cooper等^[25]研究后认为母体在阿特拉津中暴露, 会导致雌性后代的阴道发育延迟, 而雄性后代则为前列腺炎发生率较高。美国加州大学伯克利分校的发育内分泌学家 Hayes等^[26]在 2002年又发现, 长期暴露于环境中常见的阿特拉津浓度 (约 $0.1 \times 10^3 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$), 能够通过诱导更多的芳香化酶 (会将雄激素转为雌激素) 的形成而使雄性青蛙雌性化。这一研究令世人震惊, 因为它说明向环境中持续地投放各种化学物质, 哪怕只是一点点剂量, 也可以干扰生物的内分泌系统, 从而造成生物的性别发育障碍等重大问题。

至于作为我国第一大用量除草剂的乙草胺 (acetochlor), Crump等^[27]以非洲爪蛙为实验对象, 再次验证了乙草胺会影响甲状腺功能, 导致甲状腺素 (thyroid hormone, TH) 水平降低, 并从分子水平进行了机理阐释。

2.2 杀虫剂所引起的内分泌干扰现象

Sheby等^[8]运用体内、体外的联合方法, 验证了作为持久性有机污染物 (POPs) 的 DDT具有雌激素活性。赵炳顺等^[13]用小鼠子宫增重法, 检测到国产三氯杀螨醇也具有雌激素活性, 竞争结合雌激素受体所需浓度约为雌二醇的几千倍, 这与 Vonier等^[19]的研究结果基本一致。

毒死蜱 (chlorpyrifos) 是一种广谱的杀虫、杀螨剂, Dam等^[28]报道, 给予出生 1—4d 的小鼠 $1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 的毒死蜱, 小鼠大脑和前脑 DNA 的合成大量减少, 而小脑受到的影响相对较小。Whitney等^[29]发现出生 1—4d 或 11—15d 的小鼠暴露于毒死蜱下, 脑干和前脑中 RNA 的浓度发生变化。这都说明内分泌干扰物类农药也影响生物体的免疫和神经系统^[24]。

陈海燕等选用 5种有机磷农药和 4种拟除虫菊酯农药进行大鼠子宫雌激素受体竞争结合实验和 MCF-7细胞增殖实验, 结果显示, 氰戊菊酯、溴氰菊酯、氯氰菊酯及苄氰菊酯 4种拟除虫菊酯类农药可以通过激活雌激素受体显示出拟雌激素活性^[30]。

2.3 杀菌剂所引起的内分泌干扰现象

乙烯菌核利 (vincbazolin) 是一种杀真菌剂, Gray等^[31]通过动物实验发现, 子代雄鼠在出生前后染毒乙烯菌核利后, 会出现肛门与生殖器间距离缩短、尿道下裂等现象, 进行更长时间的观察可以发现许多生殖畸形, 如异位睾丸、睾丸鞘囊、附睾肉芽肿等, 但未出现任何雌激素样改变, 这表明乙烯菌核利具有抗雄激素作用^[32]。

3 手性农药的内分泌干扰研究现状及展望

环境中存在的手性农药, 如酰胺类除草剂、苯氧酸类除草剂、有机磷类杀虫剂、拟除虫菊酯类杀虫剂等, 它们潜在的生物效应如毒性、致癌性、致突变性和内分泌干扰性等大都具有对映体选择性^[33]。尽管预知不同对映体可能具有完全不同的生物活性, 但目前生产和使用的大部分手性农药仍为外消旋体。手性物质进入生态环境被生物摄取后, 其各个对映体在生物体内的活性、代谢和毒性存在着很大差异, 它们在环境中的持久性通常也存在着差异。长期以来, 在研究手性农药的环境行为、生态效应、潜在毒性、副作用时, 都把外消旋体农药视为单一化合物。在对映体水平上研究手性污染物 (如手性农药) 是科学发展到今天的必然, 同时它也将促进环境科学向更微观和纵深发展。

在现已确定或已怀疑具有内分泌干扰作用的化合物中, 至少有一半以上是农药。而现在所使用的农药中大约有 25% 是手性的, 并且随着结构更复杂的化合物的投入使用, 这个比率还呈增长趋势^[34]。因此, 搞清楚农药每一个对映体的内分泌干扰效应, 是非常重要的。

在持久性有机污染物中, 有很多是手性化合物, 且具有对映体特异性的生物性质。具体到内分泌干扰方面, Hoekstra等^[35]经大鼠实验研究发现, 对于 $a p'$ -DDT, 其左旋的对映体 ((-)- $a p'$ -DDT) 具有比其右旋的对映体 ((+)- $a p'$ -DDT) 强的类雌激素活性。(+)- $a p'$ -DDT 与人类雌激素受体 (human estrogen receptor, hER) 几乎不结合。而且, 当 (+)- $a p'$ -DDT 以相对较高的浓度存在时, 还会降低 (-)- $a p'$ -DDT 的转录活性。

一些具有或怀疑具有内分泌干扰作用的手性农药, 如酰胺类的异丙甲草胺 (metolachlor), 芳氧羧酸类的禾草灵 (diclofop methyl)、噁唑禾草灵 (fenoxaprop ethyl), 有机磷类的苯线磷 (fenamiphos)

phos)、溴苯磷 (leptophos)、地虫硫磷 (fonofos)、丙溴磷 (pionofos), 拟除虫菊酯类的联苯菊酯 (bifenthrin)、氯菊酯 (permethrin) 等. 通过拆分或合成得到对映异构体, 然后进行 MCF-7 T47D 等细胞增殖、细胞周期分析、雌激素受体水平测定实验、小鼠子宫增重、子宫组织过氧化物酶活力测定、ER 竞争结合等实验, 以及运用卵黄蛋白原、雌激素受体重组酵母系统等方法来研究它们的内分泌干扰效应.

对映体选择性可能极大地影响手性农药在非靶标环境中的内分泌干扰效应. 且由于对映体的选择性生物降解, 特定的对映体可在生态环境中得到富集. 通过以上实验, 希望能在手性农药各对映体的内分泌干扰差别方面有较大的发现与突破.

参 考 文 献

- [1] 杜克久, 徐晓白, 环境雌激素研究进展. 科学通报, 2000, **45** (21): 2241—2251
- [2] Liu W P, Gan J Y, Schenk D et al, Environmental Effects of Chiral Pesticides. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, **102** (3): 517—518
- [3] 宋福永, 李杰, 应用卵黄蛋白原检测内分泌干扰物质的研究进展. 环境与健康杂志, 2004, **21** (4): 264—266
- [4] 梁超, 邓慧萍, 水中内分泌干扰物质的研究现状及趋势. 城市公用事业, 2005, **19** (3): 17—20, 45
- [5] 堤治, 张东, 周吉海译, 由环境激素引起的生殖障碍. 日本医学介绍, 2001, **22** (1): 30—31
- [6] 王涛, 高志贤, 环境内分泌干扰物质的检测. 中国卫生检验杂志, 2004, **14** (4): 390—392
- [7] 周庆祥, 江桂斌, 卵黄蛋白原的分离测定及其在环境内分泌干扰物质筛选中的应用. 化学进展, 2003, **15** (1): 67—73
- [8] Shelby M D, Newbold R R, Tully D B et al, Assessing Environmental Chemicals for Estrogenicity Using a Combination of *In Vitro* and *In Vivo* Assays. *Environ. Health Perspect.*, 1996, **104** (12): 1296—1300
- [9] Günther K, Dübbeck H W, Keist E et al, Endocrine Disrupting Nonylphenols—Ultra Trace Analysis and Time Dependent Trend in Mussels from the German Bight. *Fresenius J. Anal. Chem.*, 2001, **371** (6): 782—786
- [10] Ashby J, Tinwell H, Uterotrophic Activity of Bisphenol A in the Immature Rat. *Environ. Health Perspect.*, 1998, **106** (11): 719—720
- [11] Spearow J L, Doemeny P, Sera R et al, Genetic Variation in Susceptibility to Endocrine Disruption by Estrogen in Mice. *Science*, 1999, **285** (5431): 1259—1261
- [12] Yanasaki K, Savaki M, Takatsuki M, Immature Rat Uterotrophic Assay of Bisphenol A. *Environ. Health Perspect.*, 2000, **108** (12): 1147—1150
- [13] 赵炳顺, 邹继超, 储少岗等, 小鼠子宫增重法检测国产三氯杀螨醇的雌激素生物活性. 环境科学学报, 2000, **20** (2): 244—247
- [14] 范奇元, 申立军, 丁训诚等, 用子宫增重试验检测壬基酚的雌激素样作用. 劳动医学, 2000, **17** (4): 196—197
- [15] 解玮, 蒋颂辉, 屈卫东等, DEHP, DBP 内分泌干扰活性的实验研究. 中国环境科学, 2004, **24** (1): 45—48
- [16] 陈小玉, 王亚东, 吴逸明等, 氯化汞雌激素样作用及其机制的实验研究. 中国职业医学, 2004, **31** (4): 10—12
- [17] Ashby J, Lefevre P A, The Peripubertal Male Rat Assay as an Alternative to the Hershberger Castrated Male Rat Assay for the Detection of Antiandrogens, Oestrogens and Metabolic Modulators. *J. Appl. Toxicol.*, 2000, **20** (1): 35—47
- [18] Kim H S, Shin J H, Moon H J et al, Evaluation of the 20-Day Pubertal Female Assay in Sprague Dawley Rats Treated with DES, Tamoxifen, Testosterone, and Flutamide. *Toxicol. Sci.*, 2002, **67** (1): 52—62
- [19] Vonier P M, Crain D A, McLachlan J A et al, Interaction of Environmental Chemicals with the Estrogen and Progesterone Receptors from the Oviduct of the American Alligator. *Environ. Health Perspect.*, 1996, **104** (12): 1318—1322
- [20] Zacharewski T, *In Vitro* Bioassays for Assessing Estrogenic Substances. *Environ. Sci. Technol.*, 1997, **31** (3): 613—623
- [21] Soto A M, Sonnenschein C, Chung K L et al, The E-SCREEN Assay as a Tool to Identify Estrogens: An Update on Estrogenic Environmental Pollutants. *Environ. Health Perspect.*, 1995, **103** (suppl 7): 113—122
- [22] Payne J, Jones C, Lakhani S et al, Improving the Reproducibility of the MCF-7 Cell Proliferation Assay for the Detection of Xenoestrogens. *Sci. Total Environ.*, 2000, **248** (1): 51—62
- [23] 刘德英, 张剑波, 丁剑, 我国农药类环境内分泌干扰物使用现状和对策. 环境保护, 2005, (6): 45—50
- [24] 任晋, 蒋可, 内分泌干扰剂的研究进展. 化学进展, 2001, **13** (2): 135—144
- [25] Cooper R L, Goldman J M, Stoker T E, Neuroendocrine and Reproductive Effects of Contemporary Use Pesticides. *Toxicol. Ind. Health*, 1999, **15** (1—2): 26—36
- [26] Hayes T B, Collins A, Lee M et al, Hemaphroditic, Demasculinized Frogs after Exposure to the Herbicide Atrazine at Low Ecologically Relevant Doses. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, **99** (8): 5476—5480
- [27] Cump D, Werry K, Veldhoen N et al, Exposure to the Herbicide Atrazine Alters Thyroid Hormone Dependent Gene Expression and Metamorphosis in *Xenopus laevis*. *Environ. Health Perspect.*, 2002, **110** (12): 1199—1205
- [28] Dan K, Seidler F J, Sotkin T A, Developmental Neurotoxicity of Chlorthalidone: Delayed Targeting of DNA Synthesis after Repeated

- Administration *Dev Brain Res*, 1998, **108** (1-2): 39-45
- [29] Whitney K D, Seidler F J, Sobotkin T A, Developmental Neurotoxicity of Chlorpyrifos: Cellular Mechanisms *Toxicol Appl Pharmacol*, 1995, **134** (1): 53-62
- [30] 陈海燕, 王心如, 肖继皋等, 有机磷与拟除虫菊酯农药的拟雌激素活性研究. 中华劳动卫生职业病杂志, 2001, **19** (4): 274-277
- [31] Gray L E, Osby J S, Kelce W R, Developmental Effects of an Environmental Antiandrogen—The Fungicide Vinclozolin Alters Sex-Differentiation of the Male Rat *Toxicol Appl Pharmacol*, 1994, **129** (1): 46-52
- [32] 张国军, 环境抗雄激素影响及机制. 国外医学卫生学分册, 2003, **30** (2): 79-83
- [33] Lewis D L, Garrison A W, Wammack K E et al, Influence of Environmental Changes on Degradation of Chiral Pollutants in Soils *Nature*, 1999, 401 (6756): 898-901
- [34] Liu W P, Gan J Y, Schlenk D et al, Enantioselectivity in Environmental Safety of Current Chiral Insecticides *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, **102** (3): 701-706
- [35] Hoekstra P F, Bunison B K, Neheli T et al, Enantiomer-Specific Activity of *o,p*-DDT with the Human Estrogen Receptor *Toxicol Lett*, 2001, **125** (1-3): 75-81

STUDY ON ENDOCRINE DISRUPTION OF PESTICIDES

WANG Lum¹ LIU Weiping^{1, 2} MA Yun² LIN Kun-de¹

(1 Institute of Environmental Science, Zhejiang University, Hangzhou 310029, China)

(2 Research Center of Environmental Science, Zhejiang University of Technology, Hangzhou 310032, China)

ABSTRACT

The endocrine disruption of environmental pollutants has been one of the global environmental concerns. The present review described some characteristics of the environmental endocrine disrupting chemicals and their measuring and assaying methods. More attentions were given to endocrine disrupting impacts of agrochemicals such as insecticides, herbicides and fungicides, especially chiral pesticides.

Keywords pesticides, endocrine disruption, environmental endocrine disrupting chemicals