

國立臺灣大學生物資源暨農學院農業化學系



碩士論文

Department of Agricultural Chemistry  
College of Bioresources and Agriculture  
National Taiwan University  
Master Thesis

環境流布濃度之鄰苯二甲酸二(2-乙基己基)酯

對青鱗魚生殖毒性探討

Environmental Relevant Concentrations of  
Di(2-ethylhexyl)phthalate Cause Reproductive Toxicity in  
Medaka Fish (*Oryzias Latipes*)

林明慧

Ming-Huei Lin

指導教授：陳佩貞 博士

Advisor: Pei-Jen Chen, Ph.D.

中華民國 103 年 7 月

July, 2014

## 誌謝

首先感謝指導教授陳佩貞老師，在大學時期即擔任我的導師，四年級時開始指導我進行學術研究，老師在研究方面總有許多新穎的想法，也全力提供實驗各方面的協助，讓我能順利完成碩士論文。感謝顏瑞泓老師、洪傳揚老師和林乃君老師大方提供實驗室的空間和儀器，讓我的實驗能夠順利進行，也感謝口試委員吳蕙芬老師、生工系廖秀娟老師、環工所吳先琪老師以及東華大學海生所陳德豪老師給予的建議，讓這篇論文更臻完善。

感謝實驗室一起奮鬥的伙伴，教導我許多實驗技巧的均鴻和小米，在實驗遭遇瓶頸時總是認真和我討論分析，讓我能順利度過難關；感謝認真貼心的學弟們聖翔、朱曜和景昕，在我忙亂的時候總會主動幫忙，讓人非常感動。謝謝治平學姐，喜歡實驗室一起喝茶聊天吃點心的時光，沖淡了實驗不順時的負面情緒。也十分感謝已畢業的學長姐，子毅、峻蔚學長和思泓、宛霖、秋菊學姊，對剛踏入實驗室有許多事還不甚熟悉的我，都非常親切有耐心的指導。

感謝同在研究所的朋友祖祺、嫵婷、育歆、承翰、博元、廷方、日皓、許宸和幽默，有些煩惱和迷惘只有同為研究生的你們才能了解。也感謝大學B97的朋友們，若昕、莊琳、珈安、若涵、庭安、政勳、庭毓、裕仁、秉儒、昶君、廷浩、嘉榮和君典，轉眼間已經認識六年，每次一起吃飯玩耍總是非常放鬆自在，認識你們真的很幸運。特別感謝我的摯友育婷，感謝你的知心與貼心，陪我度過人生許多困境和低潮，喜歡我們之間的默契。

感謝人生路上認識很久，一直彼此互相關心和支持的仁君、桂宇、孟璇、子雅、泓雅、佳穎、維珊和傳穎，每次和妳們見面總會想起許多快樂的回憶，在在提醒自己初衷；感謝我的家人，我是個容易緊張和累積壓力的人，感謝父親和弟弟在生活上聽我訴苦並全力支持我，讓我無後顧之憂的完成論文。

最後，將最深的感謝獻給我的母親。感謝您一直如此溫柔、勇敢和堅強，感謝您從小對我無微不至的照顧，感謝您二十四年來的陪伴，雖然來不及看著我畢業，但我會將所有回憶，和您告訴我的話，永遠銘刻在心底。

研究生生涯即將畫下句點，希望這篇研究能對這世界有一點點幫助，如此才不負社會的資源和學校的栽培，再次謝謝幫助我、關心我的每一個人。

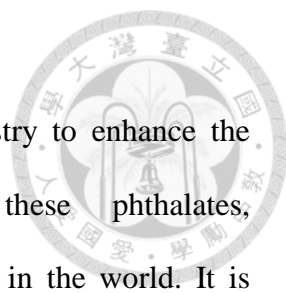
## 中文摘要

鄰苯二甲酸酯類為全世界工業製造常用之塑化劑，添加至塑膠製品中可增加塑膠聚合物的柔軟度和延展性。其中，又以鄰苯二甲酸二(2-乙基己基)酯 [Di(2-ethylhexyl)phthalate, DEHP] 的使用量最大且最普遍。在世界各地包括臺灣水體環境中都會偵測到 DEHP 的流布。近年來有文獻指出 DEHP 對小鼠或水生生物具有內分泌干擾效應，可能影響生殖器官的發育及功能，但前人研究多以高於環境流布濃度之劑量暴露模式生物，無法反映 DEHP 對環境生物之影響，此外 DEHP 之確切作用機制尚未釐清，不同研究之間解釋方向仍有歧異。本研究目的為探討環境流布濃度之 DEHP 暴露對青鱗魚生殖能力的影響及可能的毒性作用機制。實驗以 FLFII (Female leucophore free II) 品系之青鱗魚 (*Oryzias latipes*) 作為模式生物，將成魚暴露於環境相關濃度 (20-200  $\mu\text{g/L}$ ) 之 DEHP 達 21 天後，觀察其生殖能力變化，並量測內分泌及氧化壓力相關指標，包含性荷爾蒙含量、抗氧化酵素活性和基因表現。結果顯示，暴露 DEHP 達 21 天會顯著降低青鱗魚產卵量，並抑制肝臟中 *cyp1a*、*cyp3a40* 等代謝外源化合物的一期 (Phase I) 酵素基因表現，以及鰓中 CAT、GST 等抗氧化酵素活性，其中 GST 也負責外源污染物的二期 (Phase II) 代謝，顯示 DEHP 會對青鱗魚造成生殖毒性外，也會影響青鱗魚代謝 DEHP 此類親脂污染物的能力。除此之外，青鱗魚肝臟中抗氧化酵素的基因表現也受到 DEHP 干擾，雌魚的 *cat* 表現被誘導，*gpx* 則受到抑制，顯示雌魚肝臟中可能產生過氧化氫，且主要由過氧化氫酶 (Catalase) 負責清除；雄魚則是 *sod* 和 *gpx* 基因表現皆受到抑制，可能影響雄魚清除活性氧物種的能力。實驗也測量了性腺中抗氧化酵素的基因表現，結果顯示只有雌魚卵巢的基因表現受到干擾，其 *sod* 被誘導，*cat*、*gpx* 則受到抑制，顯示卵巢組織可能產生氧化壓力，影響雌魚生理功能，進而造成產卵量下降。綜上所述，環境流布濃度之 DEHP 會造成青鱗魚產卵量下降，且影響抗氧化酵素活性及相關基因表現，並可能干預青鱗魚排除外源污染物的能力並造成氧化壓力，損害正常生理功能。由於 DEHP 在環境中廣泛存在，因此對環境生物和生態的潛在衝擊不容忽視。

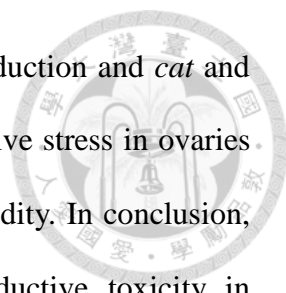
關鍵字：鄰苯二甲酸二(2-乙基己基)酯 [Di(2-ethylhexyl)phthalate, DEHP]、環境相關濃度 (Environmental relevant concentration)、生殖毒性 (Reproduction toxicity)、氧化壓力 (Oxidative stress)、青鱒魚 (Medaka, *Oryzias latipes*)



## ABSTRACT



Phthalates are synthetic plasticizers commonly used in industry to enhance the flexibility and softness of plastic products. Among these phthalates, di(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP) is the most common plasticizer in the world. It is easily leached into the environment and ubiquitously detected in surface water in many countries including Taiwan. Recent studies have indicated that DEHP is an endocrine disrupting chemical (EDC) in experimental animals. It is considered that DEHP exposure will retard development of reproductive organs and impair physiological function. However, studies directly linking to environmental relevant concentrations are still limited. The impact and associated toxic mechanism of DEHP on environmental aquatic life is unclear at present. The objective of the study is to investigate the toxic effect of DEHP on fish reproduction using medaka (*Orzyias latipes*) fish as the model organism. We have treated pairs of sexually matured adults of female leucophore free II (FLFII) medaka with DEHP at environmentally relevant concentrations 20, 100 and 200  $\mu\text{g/L}$  for a 21-day aqueous exposure and assess their reproduction performance. Fish were used for analyses of plasma concentrations of sex hormone at the end of exposure, activities of antioxidant enzymes and gene expression in different organs. Our results show that DEHP at 20-200  $\mu\text{g/L}$  decreased fecundity, and also inhibited the expression of phase I enzymes (*cyp1a* and *cyp3a40*) in liver. In gill, antioxidant enzymes such as catalase (CAT) and glutathione S-transferase (GST), the phase II enzyme, activities were decreased with 100-200  $\mu\text{g/L}$  DEHP. DEHP may interfere xenobiotics metabolism of medaka through inhibiting expression of both phase I and phase II enzymes. Furthermore, gene expression of *sod*, *cat* and *gpx* were interfered in liver and gonads with DEHP treatments (20-200  $\mu\text{g/L}$ ). In female liver, *cat* was induced, but *gpx* was inhibited. On the other hand, both *sod* and *gpx* were inhibited in male liver, suggesting



the defense against oxidative stress was altered. In addition, *sod* induction and *cat* and *gpx* inhibition were observed in ovaries. The DEHP-induced oxidative stress in ovaries may obstruct female reproductive function, and then decrease fecundity. In conclusion, environmentally relevant concentrations of DEHP caused reproductive toxicity in medaka. The activities and gene expression of antioxidant enzymes were altered by DEHP exposure in liver, gill and gonad, indicating oxidative stress and interference of xenobiotics metabolism. DEHP is an ubiquitous environment contaminant of emerging concern, so it is important to evaluate the risk to ecosystem.

Key words: Di(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP), Environmental relevant concentration, Reproduction toxicity, Oxidative stress, Medaka (*Oryzias latipes*)

## 縮寫對照表



全名	中文翻譯	縮寫
Acetylcholinesterase	乙醯膽鹼酯酶	AChE
Analysis of variance	變異數分析	ANOVA
Bicinchoninic acid		BCA
Bovine serum albumin	小牛血清蛋白	BSA
Catalase	過氧化氫酶	CAT
1-Chloro-2,4-dinitrobenzene	1-氯-2,4-二硝基苯	CDNB
Cortical-alveolar oocyte	表層囊泡期	CO
Cytochrome P450	細胞色素 P450	CYP
Deoxyribonucleic acid	去氧核糖核酸	DNA
Di(2-ethylhexyl)phthalate	鄰苯二甲酸二(2-乙基己基)酯	DEHP
Diethyl pyrocarbonate		DEPC
17 $\alpha$ , 20 $\beta$ -Dihydroxy-4-pregnen-3-one		17,20 $\beta$ P
Dimethyl sulfoxide	二甲基亞砜	DMSO
Dissolved oxygen	溶氧量	DO
5,5'-Dithiobis-(2-nitrobenzoic acid)		DTNB
Early vitellogenic oocyte	卵黃生成前期	EV
Embryo rearing medium	胚胎培養液	ERM
Endocrine disrupting compounds	內分泌干擾物	EDC
Enzyme linked immunosorbent assay	酵素連結免疫吸附分析	EIA or ELISA
Ethylenediaminetetraacetic acid disodium salt	乙二胺四乙酸二鈉鹽	EDTA-2Na

17 $\beta$ -Estradiol	雌二醇	E2
Female leucophore free II		FLFII
Glutathione peroxidase	穀胱甘肽過氧化酶	GPx
Glutathione reductase	穀胱甘肽還原酶	GR
Glutathione sulfur-transferase	穀胱甘肽轉化酶	GST
Gonadosomatic index	生殖腺指數	GSI
Hematoxylin and eosin staining	蘇木紫與伊紅染色	H&E
Hepatosomatic index	肝體比	HSI
High performance liquid chromatography	高效液相層析儀	HPLC
Hydroxysteroid dehydrogenase		HSD
Institution animal care and use committee	國立台灣大學動物實驗管理組	IACUC
11-Ketotestosterone		11-KT
Late vitellogenic oocyte	卵黃生成後期	LV
Luteinizing hormone	黃體成熟激素	LH
Mature oocyte	成熟卵子	MO
Maturation-inducing steroid	促成熟激素	MIS
Mono(2-ethylhexyl)phthalate	鄰苯二甲酸(2-乙基己基)酯	MEHP
Multidrug resistance-related protein	藥物阻抗蛋白	MRP
$\beta$ -Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate	菸鹼醯胺腺嘌呤二核苷酸磷酸	$\beta$ -NADP <sup>+</sup>
$\beta$ -Nicotinamide adenine dinucleotide 2'-phosphate reduced tetrasodium salt hydrate	菸鹼醯胺腺嘌呤二核苷酸磷酸	$\beta$ -NADPH





Nitrotetrazolium blue chloride	四唑氮藍	NBT
Neutral buffered formalin solution	中性福馬林溶液	NBF
Organochlorine pesticides	有機氯農藥	OCPs
Oxidized glutathione	氧化態穀胱甘肽	GSSG
P450 side-chain cleavage	P450 側鏈截切酵素	P450 <sub>sc</sub>
Perinucleolar oocyte	週邊核仁期	PO
Peroxisome proliferator-activated receptor	過氧化酶體增生活化受體	PPAR
Phenylmethylsulfonyl fluoride	苯甲基磺氟	PMSF
Phosphate buffered saline	磷酸緩衝溶液	PBS
Photodiode array detector	光二極體陣列檢測器	PDAD
Phthalates or Phthalate esters	鄰苯二甲酸酯類	PAEs
Polychlorinated biphenyl	多氯聯苯	PCBs
Polycyclic aromatic hydrocarbons	多環芳香烴	PAHs
Polyvinyl chloride	聚氯乙烯	PVC
Reactive oxygen species	活性氧物種	ROS
Reduced glutathione	還原態穀胱甘肽	GSH
Ribonucleic acid	核糖核酸	RNA
Sodium dodecyl sulfate	十二烷基硫酸鈉	SDS
Solid phase extraction	固相萃取	SPE
Spermatids	精細胞	ST
Spermatocyte	精母細胞	SC
Spermatogonia	精原細胞	SG
Spermatozoa	精子	SZ



---

Standard deviation	標準差	SD
Standard error	標準誤	SE
Steroidogenic acute regulatory protein		StAR
Superoxide dismutase	超氧歧化酶	SOD
Testosterone	睪固酮	T
<i>United States Environmental Protection Agency</i>	美國環境保護署	USEPA
Vehicle control	溶劑控制組	VC
Vitellogenin	卵黃前質蛋白	VTG

---



# 目錄

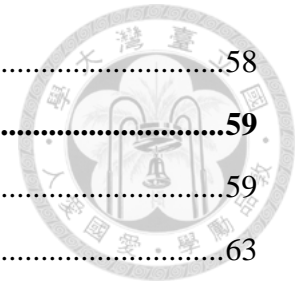


口試委員會審定書 .....	#
誌謝 .....	i
中文摘要 .....	ii
ABSTRACT .....	iv
縮寫對照表 .....	vi
目錄 .....	x
圖目錄 .....	xiii
表目錄 .....	xiv
<b>1. 前言 .....</b>	<b>1</b>
1.1 研究源起 .....	1
1.2 研究動機 .....	2
<b>2. 文獻回顧 .....</b>	<b>3</b>
2.1 鄰苯二甲酸二(2-乙基己基)酯 (DEHP) 簡介 .....	3
2.1.1 DEHP 的物化特性 .....	5
2.1.2 DEHP 的環境宿命 .....	7
2.2 DEHP 在環境中的流布濃度 .....	9
2.2.1 國內流布情形 .....	9
2.2.2 國外流布情形 .....	14
2.3 DEHP 對脊椎生物之生殖毒性效應 .....	16
2.3.1 對哺乳類之生殖毒性效應 .....	17
2.3.2 對魚類之生殖毒性效應 .....	19
2.4 DEHP 對脊椎生物之可能毒性作用機制 .....	23
2.4.1 內分泌干擾效應 .....	23
2.4.2 氧化壓力與抗氧化防禦機制 .....	27
2.5 模式生物——青鱒魚 .....	30
2.6 研究目的 .....	31
<b>3. 材料與方法 .....</b>	<b>32</b>
3.1 研究架構說明 .....	32
3.2 實驗器材 .....	33



3.2.1	藥品與試劑.....	33
3.2.2	儀器設備.....	35
3.3	青鱈魚飼養與繁殖條件.....	36
3.4	青鱈魚暴露 DEHP 實驗設計.....	38
3.4.1	生殖毒性暴露實驗.....	38
3.4.2	青鱈魚生殖能力評估.....	39
3.5	性荷爾蒙含量分析.....	40
3.5.1	血清萃取.....	40
3.5.2	性荷爾蒙濃度測定.....	41
3.6	氧化壓力試驗.....	43
3.6.1	樣本均質與總蛋白質濃度分析.....	43
3.6.2	超氧歧化酶活性分析.....	44
3.6.3	過氧化氫酶活性分析.....	44
3.6.4	穀胱甘肽還原酶活性測試.....	45
3.6.5	穀胱甘肽硫轉移酶活性測試.....	45
3.7	基因表現量分析.....	46
3.7.1	總 RNA 萃取.....	46
3.7.2	RNA 純化.....	46
3.7.3	RNA 電泳.....	46
3.7.4	反轉錄.....	47
3.7.5	即時定量聚合酶鍊鎖反應.....	47
3.8	組織病理分析.....	50
3.8.1	石蠟切片製作.....	50
3.8.2	石蠟切片染色.....	51
3.8.3	切片觀察.....	52
3.9	暴露溶液濃度分析.....	56
3.9.1	暴露溶液樣品配製.....	56
3.9.2	樣品前處理及固相萃取.....	56
3.9.3	高效液相層析儀分析條件.....	57
3.9.4	檢量線之建立.....	57

3.10 統計分析.....	58
<b>4. 結果與討論.....</b>	<b>59</b>
4.1 暴露溶液濃度分析結果.....	59
4.2 生殖能力指標結果.....	63
4.3 內分泌相關指標結果.....	68
4.3.1 肝體比 (HSI).....	68
4.3.2 血清中性荷爾蒙含量分析結果.....	70
4.3.3 內分泌相關基因表現量.....	73
4.4 氧化壓力指標結果.....	77
4.4.1 鰓中抗氧化酵素活性變化.....	77
4.4.2 肝臟中抗氧化酵素相關基因表現量.....	80
4.4.3 性腺中抗氧化酵素相關基因表現量.....	83
4.5 組織病理變化.....	85
4.6 綜合討論.....	88
<b>5. 結論.....</b>	<b>89</b>
<b>6. 參考文獻.....</b>	<b>90</b>



## 圖目錄

圖 2-1	DEHP 之生物降解途徑 .....	8
圖 2-2	河川環境底泥樣本 PAEs 濃度分布圖 .....	12
圖 2-3	河川魚體樣本 PAEs 濃度分布圖 .....	12
圖 2-4	河川環境底泥樣本 DEHP 濃度分布圖 .....	13
圖 2-5	河川魚體樣本 DEHP 濃度分布圖 .....	13
圖 2-6	世界各國環境水體及底泥中 DEHP 濃度比較.....	15
圖 2-7	DEHP 對人體、動物和植物之可能毒性效應 .....	16
圖 2-8	硬骨魚性腺中性荷爾蒙合成途徑.....	25
圖 2-9	硬骨魚生殖週期之性荷爾蒙濃度變化.....	26
圖 2-10	細胞內主要的抗氧化防禦機制和作用途徑.....	29
圖 2-11	FLFII 青鱗魚成魚及螢光顯微鏡下胚胎 .....	30
圖 3-1	研究架構.....	32
圖 3-2	ACE <sup>TM</sup> competitive EIA 作用原理 (Cayman).....	42
圖 3-3	乙醯膽鹼脂酶之催化反應 (Cayman).....	42
圖 3-4	BCA 原理示意圖.....	43
圖 3-5	青鱗魚雌魚卵巢組織形態.....	53
圖 3-6	青鱗魚雄魚睪丸組織形態.....	54
圖 3-7	不同發育階段生殖細胞形態變化.....	55
圖 3-8	固相萃取所使用之管柱和玻璃萃取匣 (Waters).....	56
圖 4-1	DEHP 暴露溶液之高效液相層析圖譜 .....	60
圖 4-2	經液相層析分離之 DEHP 溶液以光二極體陣列檢測器檢測之吸光圖譜 .....	61
圖 4-3	青鱗魚暴露 DEHP 之累積產卵量變化 .....	65
圖 4-4	青鱗魚暴露 DEHP 第 21 日單日產卵量 .....	66
圖 4-5	青鱗魚暴露 DEHP 21 天後肝臟或性腺內分泌相關基因表現量.....	76
圖 4-6	青鱗魚暴露 DEHP 21 天後鰓中抗氧化酵素活性.....	79
圖 4-7	青鱗魚暴露 DEHP 21 天後肝臟中抗氧化酵素相關基因表現量.....	82
圖 4-8	青鱗魚暴露 DEHP 21 天後性腺中抗氧化酵素相關基因表現量.....	84
圖 4-9	雌魚暴露 DEHP 21 天後卵巢經 H&E 染色之組織形態 .....	86
圖 4-10	雄魚暴露 DEHP 21 天後睪丸經 H&E 染色之組織形態 .....	87

## 表目錄

表 2-1	毒性化學物質分類管理架構.....	4
表 2-2	DEHP 基本物理化學特性 .....	6
表 2-3	臺灣地區河川環境水體樣品 DEHP 濃度含量分析結果 .....	10
表 2-4	不同地區環境底泥中 DEHP 濃度 .....	15
表 2-5	DEHP 之魚類毒性相關文獻 .....	20
表 3-1	青鱈魚飼養之水質條件 .....	36
表 3-2	胚胎培養液 (ERM, 1X) 成分配製表.....	37
表 3-3	血液緩衝液配製方法 (1X) .....	40
表 3-4	RNA 電泳使用之試劑配方 .....	47
表 3-5	引子序列.....	48
表 3-6	StepOne™ Real-Time PCR Systems 預設之即時定量聚合酶連鎖反應條件.....	49
表 3-7	自動儀器處理組織時間及步驟.....	50
表 3-8	自動儀器進行 H&E 染色步驟 .....	51
表 4-1	DEHP 之檢量線 .....	62
表 4-2	DEHP 暴露溶液濃度分析結果 (HPLC/PDA) .....	62
表 4-3	青鱈魚暴露 DEHP 第 16 至 21 日期間之子代受精率、孵化率及性別比例 平均表現.....	67
表 4-4	青鱈魚暴露 DEHP 21 天後之肝體比.....	69
表 4-5	青鱈魚暴露 DEHP 21 天後血清中性荷爾蒙濃度.....	72



# 1. 前言

## 1.1 研究源起

在環境污染物的研究中，新興污染物 (Emerging contaminants) 的環境宿命近年來備受關注。新興污染物往往和生活息息相關，在工業製造和日常用品中廣泛使用，但對環境和人體健康卻存在許多尚待釐清的風險。鄰苯二甲酸酯類 (Phthalates or Phthalate esters, PAEs) 就屬於新興污染物之一，做為工業上常見的塑化劑，全世界每年皆大量生產和使用 (Peijnenburg and Struijs, 2006)，且由於 PAEs 為親脂性、無色、無氣味、安定存在的液體 (Clara, et al., 2010)，加上 PAEs 與塑膠聚合物之間並非共價鍵結，因此在工業製造、使用、廢水放流和廢棄物掩埋的過程極易滲漏至環境 (Heudorf, et al., 2007)。如今，PAEs 已經是環境中廣泛存在的污染物。

2011 年五月，臺灣發生令社會震驚的塑化劑食品污染事件，起因是不肖業者將工業用的 PAEs 取代成本較高的植物油，違法添加至食品中作為起雲劑，這起事件使得 PAEs 的生物毒性再度引起關注。以哺乳類為主體的研究中，發現 PAEs 具有內分泌干擾 (Endocrine disrupting) 效應 (Halden, 2010, Weiss, 2011)，且可能進一步造成生殖系統損傷。然而，雖然世界各地的環境流布調查中頻繁發現 PAEs 的存在，但對環境生物的效應仍了解甚少，且已發表的研究結果彼此之間常出現歧異，使得 PAEs 的確切作用機制至今仍不明確。

臺灣環保署的流布調查報告中指出，PAEs 廣泛存在臺灣河川中的水體、底泥和魚體中 (見 2.2.1 節)，顯示污染的情形普遍存在，對環境生態已構成潛在威脅，因此 PAEs 對環境生物的影響是個急待釐清的問題。以水體環境中主要的脊椎動物魚類為例，前人研究中，多參考哺乳類研究結果進行假設，探討單一性別的內分泌干擾效應；或是以較高劑量暴露模式生物，未考量 PAEs 在環境中的溶解度，因此所測得之生物效應較無法真實反映環境污染的情形。

近年來 PAEs 的生物研究越來越多，從細胞、小鼠、魚類、貝類、無脊椎動物甚至植物皆囊括其中，生物指標也越來越龐雜。如何統整和歸納研究結果，以及進一步釐清 PAEs 的分子作用機制，會是未來重要的研究方向。



## 1.2 研究動機

鄰苯二甲酸酯類已是台灣環境中廣泛存在的污染物，其中，鄰苯二甲酸二(2-乙基己基)酯 [Di(2-ethylhexyl)phthalate, DEHP] 是全世界最普遍使用的塑化劑，在台灣水體環境中，DEHP 也是流布濃度最高的鄰苯二甲酸酯類 (Yuan, et al., 2002)。由於前人研究在 DEHP 對水生生物的毒性效應方面仍無一致結論，且生殖作用對生物族群和生態平衡皆具重要意義，因此本研究希望透過青鱗魚做為模式生物，以了解環境流布濃度之 DEHP 對青鱗魚的生殖毒性效應，並探討此類化合物可能的分子作用機制，可作為未來深入研究和環境風險評估的參考。

## 2. 文獻回顧

### 2.1 鄰苯二甲酸二(2-乙基己基)酯 (DEHP) 簡介

鄰苯二甲酸二(2-乙基己基)酯 (DEHP) 是全世界化工製造最普遍使用的塑化劑之一 (Stales, et al., 1997)。DEHP 添加至聚氯乙烯 (Polyvinyl chloride, PVC) 製品能增加塑膠聚合物的柔軟度和延展性，使產品更易於加工且更耐用，除此之外，DEHP 也會做為染色用的溶劑 (Thomas and Thomas, 1984)。由於 DEHP 的廣泛使用，目前已在多種製品中偵測到，如化妝品、個人保健用品 (Personal care products) (Koniecki, et al., 2011)、油漆 (Chen, et al., 2008)、血袋和輸血膠管等醫療用品以及實驗室設備 (ATSDR, 2002)。除此之外，PVC 製品如建材、包材、線材，或是非 PVC 製品的合成橡膠、用於汽車擋風玻璃的聚乙烯醇縮丁醛 (Polyvinyl butyral, PVB)，都有添加 DEHP (Magdouli, et al., 2013, Teil, et al., 2007)。大量塑膠製品的使用，也增加了生物暴露和環境汙染的風險。

全世界每年生產超過兩百萬噸的 DEHP (Koch, et al., 2003)。在歐盟，每年生產約一百萬噸的鄰苯二甲酸酯類，其中 DEHP 所佔比例約 50% (Lin, et al., 2009)。以德國為例，年產量二十五萬噸的鄰苯二甲酸酯類中，DEHP 佔 60%，每年約有十萬噸的 DEHP 可能隨著廢棄物進入環境。由於 DEHP 和塑膠聚合物之間並非共價鍵結，因此容易在製造、運輸或儲存過程中，從塑膠表面透過揮發或溶解釋出至環境 (Sirivithayapakorn and Limtrakul, 2008)。也可能透過直接接觸、蒸發、滲漏或磨損而從塑膠製品汙染食物 (Sioen, et al., 2012)。此外，人類排放之廢水、汗水處理場之放流水 (Lee, et al., 2006)、土壤 (Muller and Kordel, 1993)、室內粉塵 (Abb, et al., 2009)、玩具 (Wittassek, et al., 2011) 以及植物體 (Du, et al., 2009) 都曾檢出 DEHP。由此可知，DEHP 與我們日常生活息息相關，且每年製造和使用量龐大，使 DEHP 成為一個不容忽視的汙染源。

由於 2011 年 5 月發生震驚臺灣社會的塑化劑食品汙染事件，行政院環境保護署毒管處已於 2011 年 7 月 20 日調整法規以加強 DEHP 之管理，將 DEHP 由原先第四類毒性化學物質改列為第一類及第二類毒性化學物質管理，增訂相關標準檢驗方法，並禁止使用於製造 14 歲以下兒童玩具及兒童用品。我國毒性化學物質之分類管理架構如表 2-1 所示，內容節錄自環保署網站。

表 2-1 毒性化學物質分類管理架構

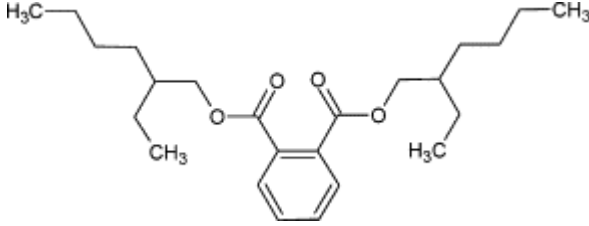
毒化物類別	第一類 (難分解物質)	第二類 (慢毒性物質)	第三類 (急毒性物質)	第四類 (疑似毒化物)
特性	在環境中不易分解或因生物蓄積、生物濃縮、生物轉化等作用，致污染環境或危害人體健康者。	有致腫瘤、生育能力受損、畸胎、遺傳因子突變或其他慢性疾病等作用者。	化學物質經暴露，將立即危害人體健康或生物生命者。	非前三類而有污染環境或危害人體健康之虞者。
運作權之獲得	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. 許可證 (運作量達大量運作基準之製造、輸入、販賣行為)。</li> <li>2. 登記文件 (使用、貯存、廢棄行為)。</li> <li>3. 核可文件 (運作量低於大量運作基準之製造、輸入、販賣、使用、貯存、廢棄運作行為)。</li> </ol>			不需取得許可證、登記文件、核可文件等證照，但須於運作前向當地主管機關申報毒理相關資料(包括物質安全資料表及防災基本資料表)。
標示(含MSDS)	要	要	要	—
專責人員	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. 製造、使用、貯存場所運作量達大量運作基準以上。</li> <li>2. 單次運送氣體達 50 公斤、液體達 100 公斤、固體達 200 公斤以上者。</li> <li>3. 應設置專責人員等級、人數，依規定設置。</li> </ol>			—
申報毒理相關資料	—	—	—	於運作前申報物質安全資料表及防災基本資料表。
維持防止排放、洩漏設施正常操作	運作量達大量運作基準以上者			—

### 2.1.1 DEHP 的物化特性

DEHP 為人工合成的塑化劑，是鄰苯二甲酸的酯化產物。其基本性質如表 2-2 所示。由於擁有較多碳數之側鏈，屬於分子量較大的鄰苯二甲酸酯類，在常溫常壓下為無色無味之油狀液體。其蒸氣壓較低，故常溫下不易揮發，水溶解度較低且 Log Kow 值較高，顯示 DEHP 親脂 (Hydrophobic) 的特性，因此在環境中 DEHP 傾向吸附土壤或底泥。前人研究中也發現 DEHP 可能累積在魚體組織中，且易吸附於懸浮微粒，進而影響動物或人體的健康 (Adeniyi, et al., 2011, Huang, et al., 2008)。

文獻回顧過程中，發現 DEHP 之物理化學參數在不同報告中略有差異，例如水中溶解度範圍在  $1.9 \times 10^{-3}$  到 0.4 mg/L 之間，Log Kow 則在 4.89 到 8.32 之間 (Cousins and Mackay, 2000)。本研究主要參考美國環保署發布之 Technical Fact Sheet on: Di(2-Ethylhexyl)Phthalate (DEHP)。

表 2-2 DEHP 基本物理化學特性

中文名稱	鄰苯二甲酸二(2-乙基己基)酯
英文名稱	Di(2-ethylhexyl)phthalate, DEHP
其他同義名稱	Bis(2-ethylhexyl)phthalate Dioctylphthalate
CAS 編號	117-81-7
分子量	390.56 g/mole
分子式	$C_{24}H_{38}O_4$
結構式	
外觀	無色油狀液體
熔點	-50°C
沸點	230°C (5 mmHg)
蒸氣壓	1.32 mmHg (200°C)
辛醇/水分配係數 (Kow)	Log Kow = 4.89
密度	0.99 (20°C)
溶解度	0.285 mg/L (24°C)，微溶於水
土壤吸附係數	Log Koc = 4-5，土壤中移動性低
生物濃縮係數 (BCF)	Log BCF = 2-4 (魚類)
安定性	常溫常壓下安定

(USEPA, 2002)

### 2.1.2 DEHP 的環境宿命

如 2.1 節所述，由於塑膠製品的大量使用需求，DEHP 在產品製造、運輸或儲存過程中容易滲漏至環境，另外，塑膠廢棄物的掩埋和工廠廢水的排放，也可能汙染土壤和水源，且 DEHP 具親脂性，在水體環境中傾向吸附於懸浮微粒或底泥。

前人研究中指出，DEHP 在酸性水體環境下照射陽光使其光解 (Photolysis)，其半生期可達 390 天；若在中性環境下，半生期甚至達到 1600 天。在有氧環境下，DEHP 生物降解約需一週至一個月；若處於無氧環境則 DEHP 半生期超過一個月。(Lertsirisopon, et al., 2009)，顯示 DEHP 在水體環境中安定不易分解。

圖 2-1 說明了 DEHP 在有氧和無氧環境下的微生物降解途徑 (Magdouli, et al., 2013)。在有氧環境，革蘭氏陽性菌 (Gram positive) 和革蘭氏陰性菌 (Gram negative) 會分別透過間位裂解 (Meta-cleavage) 和鄰位裂解 (Ortho-cleavage) 途徑代謝鄰苯二甲酸 (Phthalic acid, PA) (Liang, et al., 2008)，主要是利用雙氧酶 (Dioxygenase) 將鄰苯二甲酸的環打開 (Amir, et al., 2005)。另一方面，無氧情況下鄰苯二甲酸會藉由  $\beta$ -氧化作用 ( $\beta$ -oxidation) 先被轉化為 Benzoate，再進一步分解為氫氣、二氧化碳和醋酸鹽 (Liu and Chi, 2003)。除了細菌以外，真菌酵素也被發現具有降解 DEHP 的能力，如酵母菌酯酶 (Esterase) 和真菌之角質分解酶 (Cutinase) (Kim, et al., 2003)。

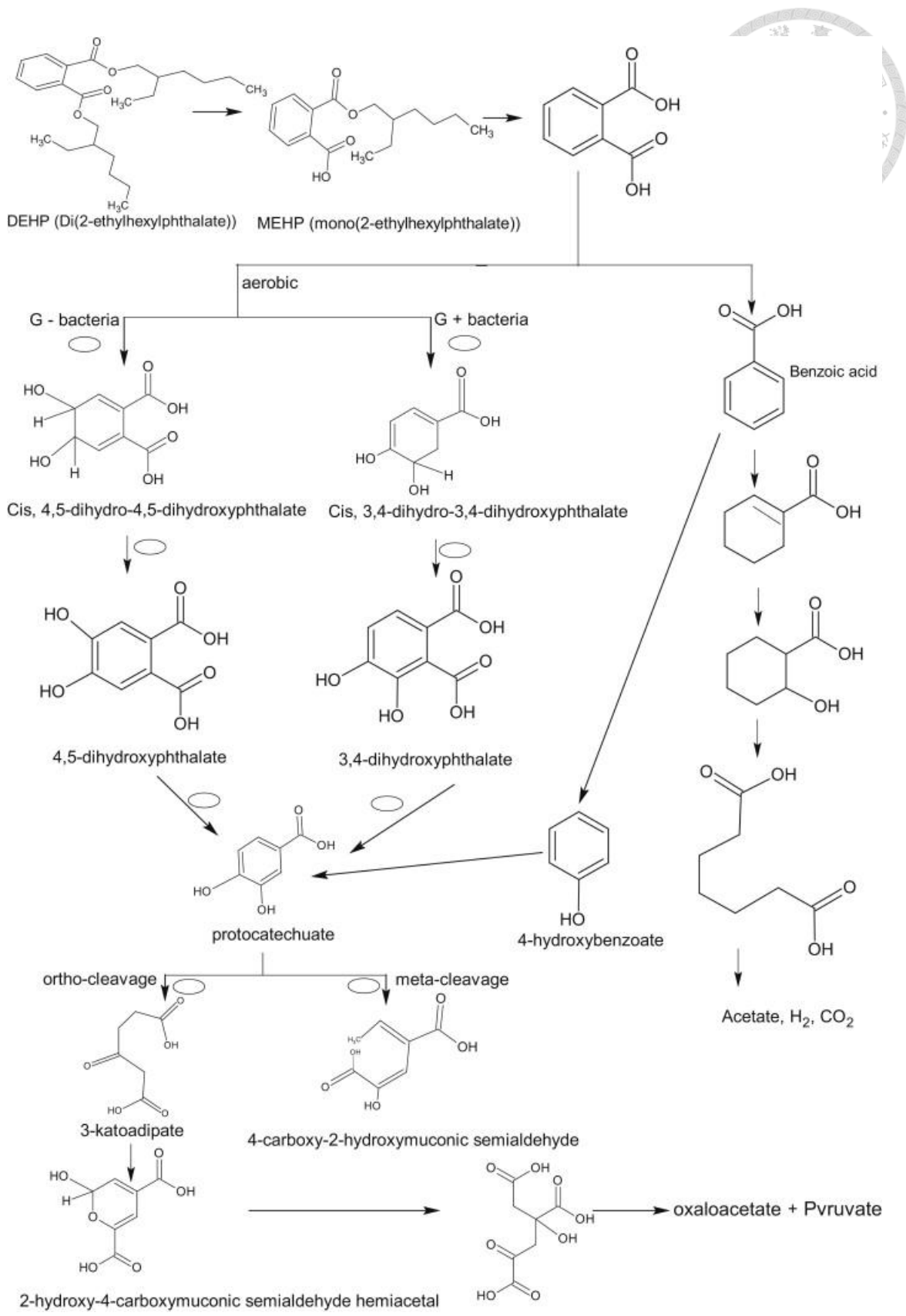


圖 2-1 DEHP 之生物降解途徑

(Magdoui, et al., 2013)



## 2.2 DEHP 在環境中的流布濃度

### 2.2.1 國內流布情形

民國 90 年之毒性化學物質環境流布暴露調查，分析了臺灣地區淡水河等七條河川水體樣品中 DEHP 含量，分析結果如表 2-3 所示。由表可知七條河川中以二仁溪之 DEHP 含量最高，其上、中、下游之水體 DEHP 平均含量分別為 2.3、9.9、17.6  $\mu\text{g/L}$ ，下游最高之測值可達 81.7  $\mu\text{g/L}$ 。其他河川之水體中 DEHP 平均含量均在 0.2-2.0  $\mu\text{g/L}$  之間，顯示河水中 DEHP 濃度不高，這與 DEHP 在水中之溶解度低有關。整體而言，中、下游水中 DEHP 濃度均較上游為高（國立成功大學環境微量毒物研究中心, 2001）。另一於 2002 年發表的研究，分析臺灣 14 條河川的表面水（深度 0-20 公分）樣品，所測得之 DEHP 濃度平均值為 9.3  $\mu\text{g/L}$ ，濃度範圍為 ND-18.5  $\mu\text{g/L}$  (Yuan, et al., 2002)。根據上述兩篇文獻，所測得之水體 DEHP 濃度最大值分別為 81.7  $\mu\text{g/L}$  和 18.5  $\mu\text{g/L}$ 。因此，本實驗設計之暴露溶液濃度選用 100  $\mu\text{g/L}$  和 20  $\mu\text{g/L}$  作為環境流布濃度之代表。




表 2-3 臺灣地區河川環境水體樣品 DEHP 濃度含量分析結果

河名 \ 河段	上游	中游	下游
淡水河	0.4 ± 0.6 (ND~0.9)	3.2 ± 1.7 (ND~3.4)	1.0 ± 1.7 (ND~3.5)
頭前溪	0.89 ± 0.076 (0.8~0.95)	0.46 ± 0.065 (0.4~0.5)	1.3 ± 1.3 (0.17~3.2)
濁水溪	0.3 ± 0.2 (ND~0.6)	ND	0.3 ± 0.1 (ND~0.4)
大甲溪	0.6 ± 0.7 (0.1~1.0)	0.6 ± 1.1 (ND~2.8)	0.2 ± 0.2 (ND~0.4)
二仁溪	2.3 ± 2.2 (0.5~5.5)	9.9 ± 23.4 (ND~57.7)	17.6 ± 31.9 (0.7~81.7)
高屏溪	ND	0.4 ± 0.5 (ND~0.7)	ND
蘭陽溪	0.9 ± 0.7 (ND~1.7)	2.2 ± 2.0 (0.8~3.6)	2.0 ± 3.7 (ND~7.5)
合計	0.8 ± 1.2 (ND~5.5)	3.9 ± 13.1 (ND~57.7)	5.2 ± 17.1 (ND~81.7)

註：濃度單位  $\mu\text{g/L}$ ；以平均值 $\pm$ 標準偏差（濃度範圍）表示。

（國立成功大學環境微量毒物研究中心, 2001）



除了河川水體的流布以外，環保署發行的毒性化學物質環境流布調查成果手冊中也公布了民國 90 年迄今的河川環境底泥和魚體調查結果。調查結果中顯示，不論是河川底泥或魚體中之 PAEs 濃度，每年濃度最高者皆為 DEHP (圖 2-2、圖 2-3)。雖然每年調查河川不盡相同，可能對年平均值略有影響，但整體而言，魚體樣本中 PAEs 濃度自 97 年起有下降的趨勢。

歷年河川底泥中 DEHP 平均濃度分布如圖 2-4 所示，相同河川不同年度的測值並列表示。近五年河川底泥中 DEHP 平均濃度介於  $<0.05$ - $13.1$  mg/kg dw，測值範圍則為 ND- $29.2$  mg/kg dw，有多數河川底泥 DEHP 平均濃度高於底泥品質指標下限值  $1.97$  mg/kg。歷年平均濃度最高為 95 年將軍溪  $47.3$  mg/kg dw，已高於底泥品質指標上限值  $19.7$  mg/kg。根據 30 條河川最近一次 (95-101 年) 調查結果，底泥 DEHP 平均濃度仍高於底泥品質指標下限值  $1.97$  mg/kg 之河川，包括淡水河本流、大漢溪、新店溪、基隆河、南崁溪、客雅溪 (含三姓公溪)、將軍溪、二仁溪、鹽水溪及東港溪 (行政院環境保護署, 2013)。

歷年河川魚體中 DEHP 平均濃度分布如圖 2-5 所示，相同河川不同年度的測值並列表示。近五年河川魚體 DEHP 平均濃度介於  $<0.025$ - $0.803$  mg/kg ww。測值範圍為  $<0.025$ - $1.68$  mg/kg ww。比較同河川不同年度之 DEHP 濃度平均值，可發現魚體中 DEHP 濃度有逐年下降的趨勢 (行政院環境保護署, 2013)。

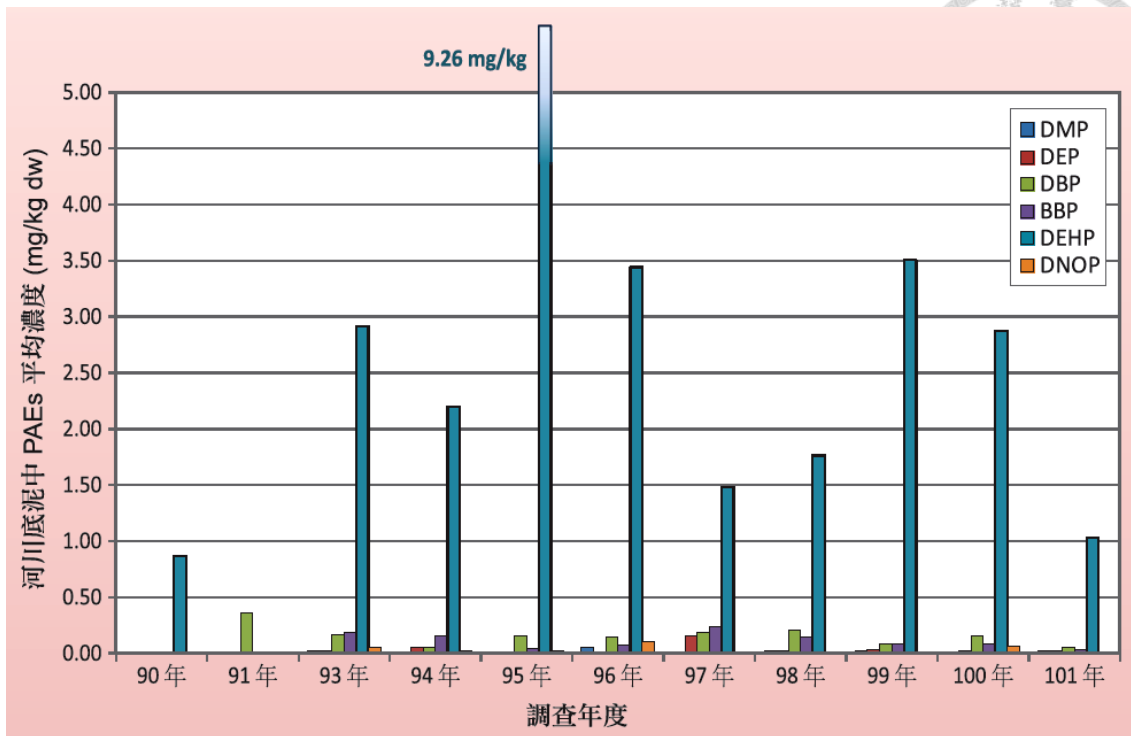


圖 2-2 河川環境底泥樣本 PAEs 濃度分布圖

(行政院環境保護署, 2013)

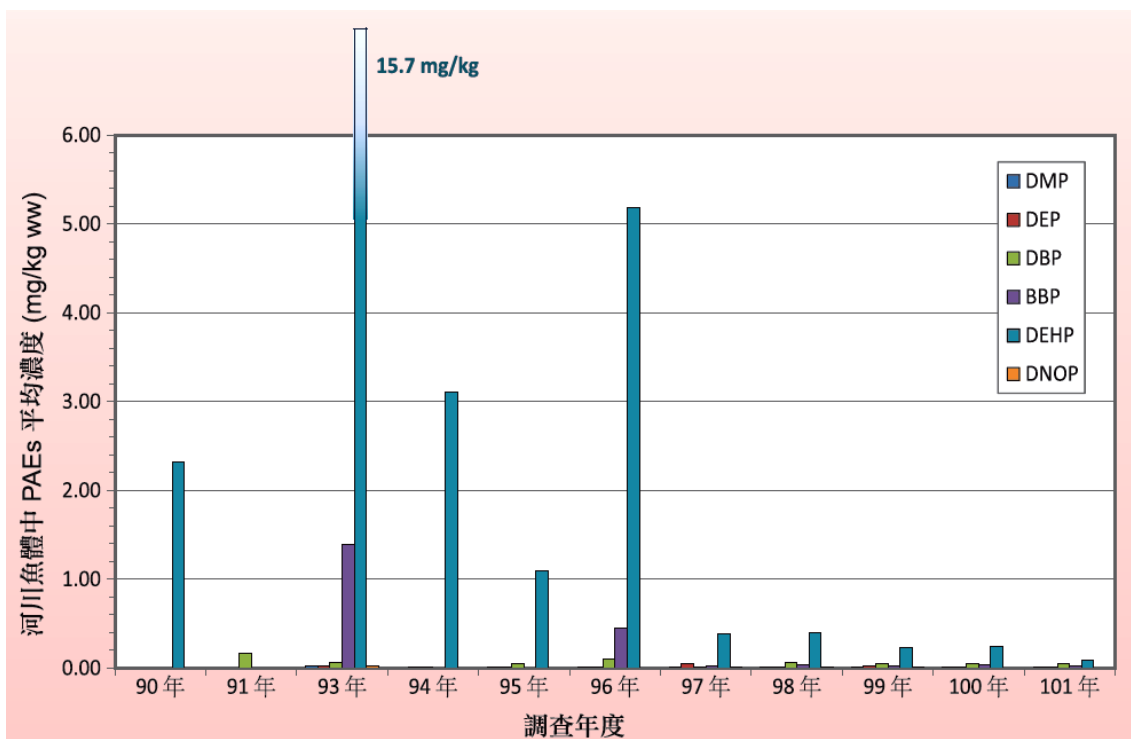


圖 2-3 河川魚體樣本 PAEs 濃度分布圖

(行政院環境保護署, 2013)

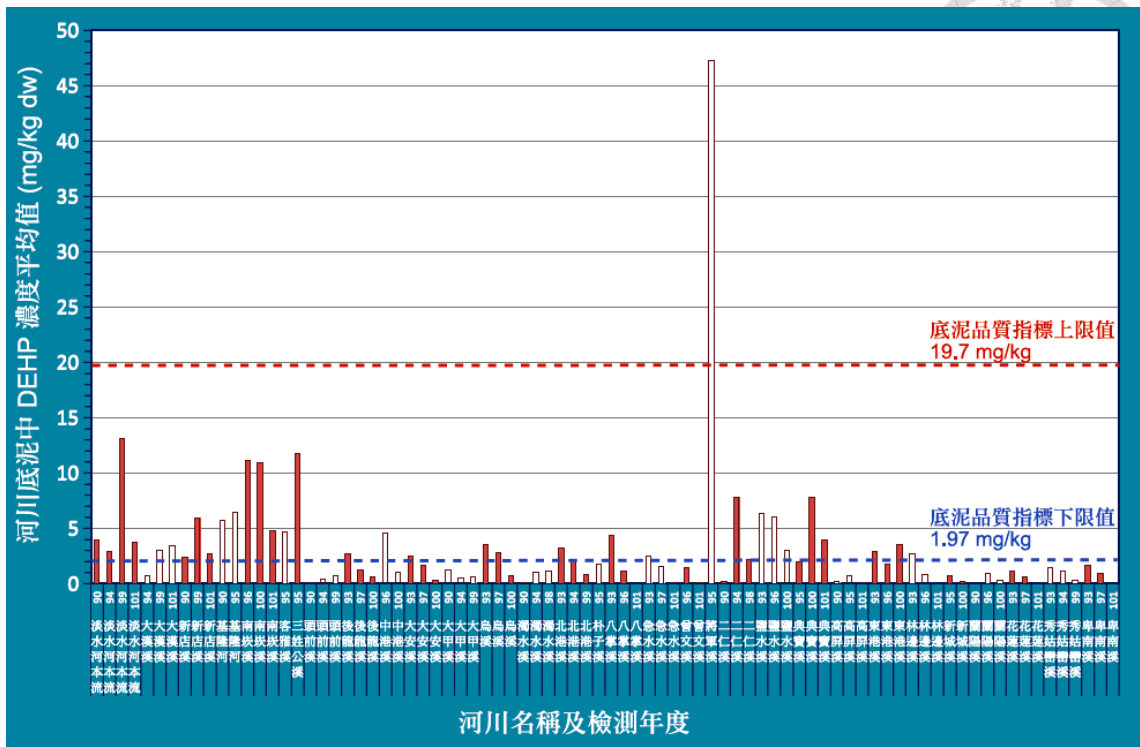


圖 2-4 河川環境底泥樣本 DEHP 濃度分布圖

(行政院環境保護署, 2013)

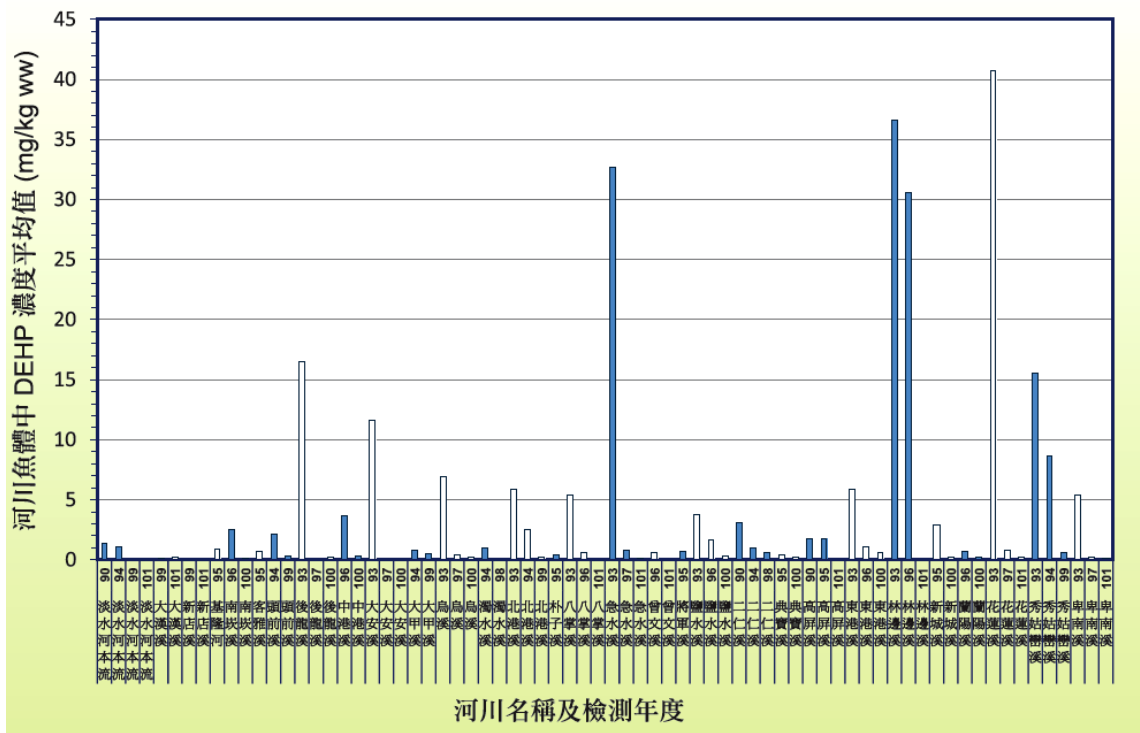



圖 2-5 河川魚體樣本 DEHP 濃度分布圖

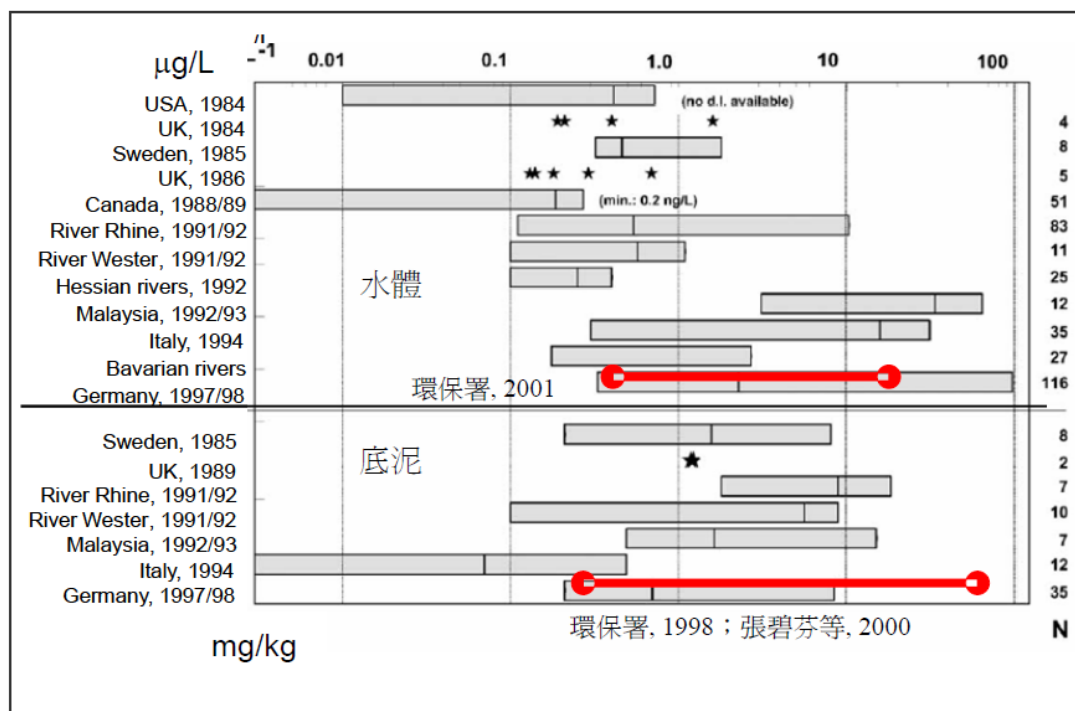
(行政院環境保護署, 2013)

## 2.2.2 國外流布情形



環保署 97 年度的毒性化學物質環境流布調查報告中，比較了國內外環境水體和底泥中 DEHP 之濃度，如圖 2-6 所示。最早在 1977 年即有學者於荷蘭之河川底泥及水體中偵測到 DEHP 的濃度，分別為 1.5 mg/kg dm 和 0.4-4.0  $\mu\text{g/L}$ 。而在 1980-2000 年間，美國、英國、德國、瑞典、加拿大、義大利及馬來西亞等國的環境水體或底泥中也發現 DEHP 的存在，顯示 DEHP 已廣泛流布於世界各地。一項在德國於 1997 年收集了 115 個水體和 35 個底泥樣本所進的調查研究指出，德國河川水體 DEHP 濃度之中位數為 2.27  $\mu\text{g/L}$ ，濃度範圍為 0.33~97.87  $\mu\text{g/L}$ ；而河川底泥中 DEHP 濃度之中位數為 0.7 mg/kg，濃度範圍為 0.21~8.44 mg/kg (Fromme, et al., 2002)。與其他國家的研究相比，德國環境水體或底泥中 DEHP 的濃度皆屬於偏高的範圍。若進一步和臺灣的環境流布調查結果比較，可發現臺灣水體或底泥中 DEHP 濃度與工業化程度較高的德國相近，顯示 DEHP 已遍布臺灣的生態環境，且污染程度不可忽視 (財團法人成大研究發展基金會, 2008)。此外，日本也有相關研究指出，河川表面水偵測到 8-25  $\mu\text{g/L}$  DEHP，甚至在沉水植物中也能分析到 DEHP 的存在 (Yuwatini, et al., 2006)。

另一臺灣學者於 2009 年發表的研究，調查了臺灣南部後勁溪底泥中 DEHP 之濃度，並將數據和不同國家河川底泥的 DEHP 濃度做比較 (表 2-4)。在表列的資料中，只有英國的 Aire River (7.89-115 mg/kg dw) 和 Trent River (0.84-31.0 mg/kg dw) 兩條河川底泥的 DEHP 濃度高於後勁溪，其餘皆相近或低於後勁溪 (Lin, et al., 2009)。



註： min or d.l. max ; ★ raw data ; 國內資料

圖 2-6 世界各國環境水體及底泥中 DEHP 濃度比較

(財團法人成大研究發展基金會, 2008)

表 2-4 不同地區環境底泥中 DEHP 濃度

River and estuaries	DEHP of sediment (mg/kg dry weight)
Aire River (UK)	7.89-115
Trent River (UK)	0.84-31.0
Klang River (Malaysia)	0.49-15.0
Various rivers in central (Italy)	0.058-0.487
Nueces Estuary (Texas)	0.04-16.0
Mersey Estuary (UK)	1.20
Rhine (Westphalia, Germany)	0.21-8.44
Furu River (Toyama, Japan)	1-2
Zhonggang, Keya, Erren, Gaoping, Donggang, Danshui Rivers (Taiwan)	0.5-23.9
Houjing River (Taiwan)	0.10-20.22

(Lin, et al., 2009)

### 2.3 DEHP 對脊椎生物之生殖毒性效應

由於 DEHP 普遍存在於世界各國的環境中，因此 DEHP 的生物毒性越來越受到重視，然而，目前對於 DEHP 的潛在毒性效應尚未有一致結論。圖 2-7 彙整了大多數文獻所討論的 DEHP 之生物毒性效應 (Magdouli, et al., 2013)。DEHP 可能影響人類荷爾蒙生成、引起發炎反應；實驗動物研究則發現，DEHP 會造成胚胎死亡、生殖器官畸形、精子品質下降和誘發氧化壓力。近年來越來越多 DEHP 的相關研究發表，所探討之生物指標也越來越多樣化，本研究將主要針對探討生殖毒性的文獻進行回顧。

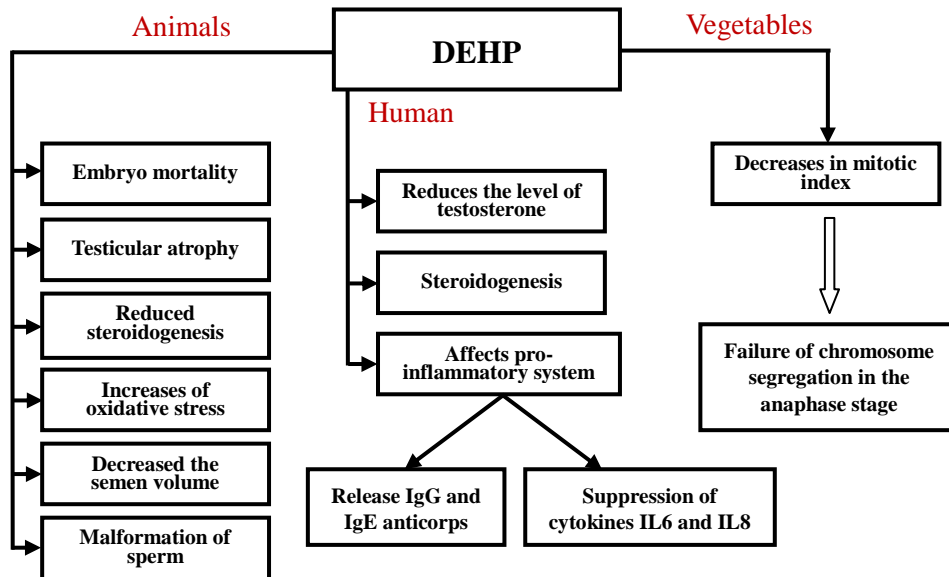


圖 2-7 DEHP 對人體、動物和植物之可能毒性效應

(Magdouli, et al., 2013)


### 2.3.1 對哺乳類之生殖毒性效應

前人研究指出 DEHP 對生物較無急毒性，往往在長期暴露後才會出現毒性效應，原因可能與 DEHP 代謝物毒性較高有關。人類暴露 DEHP 的途徑主要是經由呼吸（吸入有 DEHP 吸附的粉塵或懸浮微粒）和靜脈注射（長期使用點滴袋和輸液膠管），少數會透過攝食（食用被塑化劑污染的食物和水源）或皮膚接觸 (Shea, 2003)。人類攝入 DEHP 後，DEHP 會立刻被肝臟和血液中的酯酶 (Esterase) 代謝為 Mono(2-ethylhexyl)phthalate (MEHP)。MEHP 會進一步被水解成 Mono(2-ethyl-5-hydroxyhexyl)phthalate (5OH-MEHP)，接著再代謝形成 Mono(2-ethyl-5-oxohexyl)phthalate (5OXO-MEHP)；除此之外，MEHP 也會被  $\omega$  氧化形成 Mono(2-ethyl-5-carboxy-pentyl)phthalate (5CX-MEPP) (Koch, et al., 2005)。而 DEHP 的代謝產物如單酯類 (Monoester) 或醣基化結合物 (Glucorinated conjugates) 最後會隨著尿液排出 (Fromme, et al., 2011)。在人類和老鼠體內都曾發現這些代謝物 (Silva, et al., 2006)，因此，檢測尿液中是否存在此類代謝物已經是評估 DEHP 暴露情形的重要生物指標。

DEHP 對人類的毒性效應多以流行病學研究為主。有研究指出若母親奶水中含有 DEHP，則透過哺乳可能影響男嬰的生殖發育和內分泌系統 (Main, et al., 2006)。另一研究分析男性精液中的 PAEs 濃度和多項生物指標，發現不孕男性其精液中 PAEs 濃度顯著高於一般男性，此外，精液中 DEHP 濃度也和多項生殖損傷指標相關，如精子數目較少、精子活動力較弱、產生較多活性氧物種、脂質過氧化程度較高和 DNA 損傷等 (Pant, et al., 2008)。另一臺灣學者發表的研究也發現，暴露於空氣中存在 DEHP 之工作環境的男性勞工，其精子 DNA 損傷程度較高且精子活動力較弱 (Huang, et al., 2011)。在性荷爾蒙的相關研究方面，也有研究指出男性尿液中的 DEHP 代謝物濃度越高，血液中的睪固酮 (Testosterone) 濃度有越低的趨勢 (Meeker, et al., 2009)。雖然流行病學的研究與動物實驗的結果相近，但由於無法直接量測 DEHP 對人類的毒性效應，且對人類暴露程度的評估方法仍不夠精確，因此 DEHP 對人類的生殖毒性尚存在部分爭議 (Matsumoto, et al., 2008)。

DEHP 對老鼠的毒性相關研究數量較多，目前已發現的的生殖毒性效應有：阻礙固醇類荷爾蒙生成 (Steroidogenesis)、胎鼠 (Fetal rat) 睪丸中的生殖細胞 (Germ cells) 減少、精子畸形比例提高以及精液體積減少，且在雌鼠孕期和胎鼠性別分化





時期對 DEHP 暴露特別敏感 (Gray Jr, et al., 2000, Moore, et al., 2001)。目前認為 DEHP 主要的作用標的是雄鼠睪丸中的 Sertoli cell 和 Leydig cell，這兩類細胞分別和精子發育、睪固酮 (Testosterone) 分泌密切相關，若功能受到干擾則可能引起一系列生殖毒性反應 (Martino-Andrade and Chahoud, 2010)。雌鼠的毒性研究相對較少，有研究將雌鼠以灌胃方式暴露 DEHP 後，發現雌鼠動情週期改變、卵巢中閉鎖卵子 (Atretic follicles) 比例增加，並且出現粒層細胞 (Granulosa cells) 凋亡的情形 (Xu, et al., 2010)。除了生殖毒性以外，也有研究指出 DEHP 暴露會消耗大鼠肝臟中還原態穀胱甘肽 (Reduced glutathione, GSH) 和抗壞血酸等抗氧化物質 (Jain, et al., 2009)，或是在肌肉組織中產生過氧化氫、氫氧自由基 (Hydroxyl radicle) 等活性氧物種，並造成脂質過氧化程度提高 (Srinivasan, et al., 2011)。

由以上回顧可以發現，DEHP 對哺乳類的主要毒性效應為損害生殖功能，此外，DEHP 引起的氧化狀態失衡也逐漸受到關注。

### 2.3.2 對魚類之生殖毒性效應

表 2-5 列出了近年來探討 DEHP 對魚類毒性的相關文獻，15 篇研究的暴露方法和觀察之生物效應列於表格中。其中，最常使用的模式生物為斑馬魚 (Zebrafish, *Danio rerio*) 和青鱒魚 (Japanese medaka, *Oryzias latipes*)；暴露的生長階段以性成熟之成魚居多，幼魚和胚胎實驗相對較少，少數文獻使用魚類細胞進行實驗；暴露方法以水體暴露為主，暴露時間則從短期的 5 天到 28 天，以及長期的 3 個月至 6 個月皆有；DEHP 暴露濃度方面，水體暴露濃度範圍包含 0.01-500  $\mu\text{g/L}$ ，腹腔注射之 DEHP 暴露濃度為 0.5-5000  $\text{mg/kg}$ ，餌料暴露濃度則為 400-1500  $\text{mg/kg}$ 。

雖然不同文獻使用的暴露條件和方法不一，但綜觀各文獻觀察到的生物效應，可歸納出幾個要點：首先，不論雌魚或雄魚，許多文獻都觀察到生殖損傷的現象，如成熟生殖細胞比例下降或產卵量減少 (Carnevali, et al., 2010, Corradetti, et al., 2013, Kim, et al., 2002, Uren-Webster, et al., 2010, Ye, et al., 2014)；其次，雄魚和雌魚的生物效應不完全相同，如固醇類荷爾蒙合成相關基因表現、性荷爾蒙受體相關基因表現 (Maradonna, et al., 2013, Wang, et al., 2013, Ye, et al., 2014)；再來，由於 DEHP 在水中溶解度較低，且大多數研究未檢測暴露溶液之濃度，因此模式生物實際暴露劑量不得而知；最後，多項生物指標在不同篇研究中出現不一致甚至完全相反的結論，如性荷爾蒙濃度變化、卵黃前質蛋白 (Vitellogenin, VTG) 含量變化或其他相關基因表現等 (Carnevali, et al., 2010, Chikae, et al., 2004, Crago and Klaper, 2012, Kim, et al., 2002, Wang, et al., 2013, Ye, et al., 2014)。

除了生殖作用和內分泌相關指標以外，也有一些文獻延伸探討其他方面的生物指標，如生殖細胞之 DNA 損傷 (Corradetti, et al., 2013)、脂質代謝相關基因表現 (Uren-Webster, et al., 2010)、過氧化酶體增生活化受體 (Peroxisome proliferator-activated receptors, PPARs) 基因表現 (Maradonna, et al., 2013)、脂質過氧化 (Mankidy, et al., 2013)、內源和外源物質代謝 (Crago and Klaper, 2012, Thibaut and Porte, 2004) 等等。

整體而言，DEHP 對魚類造成的生殖毒性與哺乳類之毒性效應相近，但其他生物指標卻沒有一致的趨勢。因此，有必要再深入探討 DEHP 對魚類的生殖毒性效應及其作用機制。

表 2-5 DEHP 之魚類毒性相關文獻

Fish species	Fish stage	Effect	Dosing concentration	Methods	Reference
Zebrafish ( <i>Danio rerio</i> )	Male adult	Embryo production ↓ DNA fragmentation in sperm cells ↑	0.2, 20 µg/L	Aquatic exposure, 3 weeks	Corradetti, et al., 2013
	Male adult	Fertilization, sperm maturation ↓ <i>vtg, acox1, ehhadh</i> expression ↑	0.5, 50, 5000 mg/kg	Intraperitoneal injection, twice during 10 days	Uren-Webster, et al., 2010
	Female adult	Embryo production ↓ Plasma VTG ↑ <i>lhr, mprβ, ptgs2</i> expression ↓	0.02, 0.2, 2, 20 and 40 µg/L	Aquatic exposure, 3 weeks	Carnevali, et al., 2010
	Adult	Female offspring % ↑	2 mL DEHP in 110 L water	Aquatic exposure, 3 months	Lee and Liang, 2011
	Primary hepatocyte cultures	<i>era, erβ1, erβ2</i> expression ↓ (male) <i>erβ1, erβ2</i> expression ↑ (female) VTG, <i>ppara, pparβ, pparγ</i> ↑	0.05, 0.1, 1, 10 and 100 nM	Cell culture, 96 hours	Maradonna, et al., 2013
Guppy fish ( <i>Poecilia reticulata</i> )	Fry	Body length, body weight ↓	0.1, 1 and 10 µg /l	Aquatic exposure, 91 days	Zanotelli, et al., 2010

Japanese medaka ( <i>Oryzias latipes</i> )	Fry	Body weight, male adult GSI ↓	0.01, 0.1, 1, and 10 µg/L	Aquatic exposure, 3 weeks	Chikae, et al., 2004
	Embryo	Mortality, hatching time ↑ Body weight ↓	0.01, 0.1, 1, and 10 µg/L	Aquatic exposure	Chikae, et al., 2004
	Adult	GSI, VTG, mature oocyte ↓ (female)	10, 50, 100 µg/L (acute) 1, 10, 50 µg/L (chronic)	Aquatic exposure 5 days (acute) 3 months (chronic)	Kim, et al., 2002
Fathead minnows ( <i>Pimephales promelis</i> )	Embryo	Mortality, lipid peroxidation level ↑	1 mg/L	Aquatic exposure, 96 hours	Mankidy, et al., 2013
	Male adult	T, E2 ↓ <i>fshβ</i> , <i>cyp3a4</i> , <i>sult2a1</i> , <i>pxr</i> expression ↑	12 µg/L	Aquatic exposure 28 days	Crago and Klaper, 2012
Marine medaka ( <i>Oryzias melastigma</i> )	Larvae to adult	Hatching time, fertilization, embryo production ↓ ; GSI, female offspring% ↑ VTG, E2 ↑ ; <i>ldlr</i> , <i>star</i> , <i>cyp17a1</i> , <i>17βhsd</i> , <i>cyp19a</i> , spermatozoa ↓ (male) T, E2, <i>ldlr</i> , atretic follicles ↑ (female)	0.1, 0.5 mg/L	Aquatic exposure, 6 months	Ye, et al., 2014

Chinese rare minnow ( <i>Gobiocypris rarus</i> )	Adult	T, E2 ↑ , <i>cyp17a1</i> , <i>cyp19a</i> , <i>vtg</i> ↑ (male) T ↑ , E2 ↓ , <i>cyp17a1</i> , <i>vtg</i> ↑ , <i>cyp19a</i> ↓ (female)	3.6, 12.8, 39.4, and 117.6 µg/L	Aquatic exposure, 21 days	Wang, et al., 2013
Salmon ( <i>Salmo salar</i> )	Fry	Intersex, ovo-testis	400, 800, and 1500 mg/kg	Diet exposure, 4 weeks	Norman, et al., 2007
Carp ( <i>Cyprinus carpio</i> )	Liver and testicular microsome	5α-reductase activity ↓ (testicular microsome) E2-UGT activity ↓ (liver microsome)	100 µM / 1 mM (testicular / liver microsome)	Incubation, 10-30 mins	Thibaut and Porte, 2004



## 2.4 DEHP 對脊椎生物之可能毒性作用機制

### 2.4.1 內分泌干擾效應

內分泌系統由生物體內各個分泌激素的器官所構成。激素（又稱荷爾蒙）是一種長期的生理訊號，能因應不同生長時期和環境狀態調控生物體多項生理功能，如生長發育、體內恆定和性別分化等。其中，性腺所分泌的性荷爾蒙和生殖作用息息相關，也是許多內分泌干擾物的作用目標。所有會干擾內分泌系統作用的物質，影響荷爾蒙的合成、分泌、傳輸、結合、作用及排除者，被稱為內分泌干擾物 (Endocrine disrupting compounds, EDC)。由 2.3 節之文獻回顧可知 DEHP 對性荷爾蒙的影響是多篇研究探討之核心，因此本節將介紹性荷爾蒙生成之途徑，主要參考文獻為 *Hormones and Their Receptors in Fish Reproduction* 一書 (Melamed and Sherwood, 2005)。

性成熟之脊椎動物體內會產生三種和生殖相關的固醇類荷爾蒙，分別是雌激素 (Estrogen)、雄激素 (Androgen) 和助孕素 (Progestogens)，由性腺中不同的特化細胞所分泌，能調控生殖細胞和器官的發育，甚至影響行為來達成交配繁衍的目的。這些荷爾蒙的合成主要是由一系列酵素將膽固醇進行衍生和修飾而來，最先作用的酵素是位於粒線體內膜的 P450 側鏈截切酵素 (P450 side-chain cleavage, P450<sub>scc</sub>，又稱 CYP11A1)，P450<sub>scc</sub> 會水解膽固醇上第 20 和 22 號碳 (C<sub>20</sub>、C<sub>22</sub>)，移除 6 個碳的側鏈 (C<sub>22-27</sub>)，產生 Pregnenolone (圖 2-8)。而膽固醇需要透過 StAR (Steroidogenic acute regulatory protein) 運輸才能抵達粒線體內膜，此步驟才是 Pregnenolone 生合成的速率決定步驟。

Pregnenolone 是固醇類荷爾蒙的基礎分子，能夠被 P450<sub>17</sub> 作用，P450<sub>17</sub> (又稱 CYP17A) 具有 17 $\alpha$ -羥基化酶 (17 $\alpha$ -hydroxylase) 和 17-20 裂解酶 (C<sub>17-20</sub> lyase) 兩種酵素活性，由於裂解酶可能在不同號數的碳上產生雙鍵 (C<sub>5-6</sub> 或 C<sub>4-5</sub>)，因此會有 Dehydroepiandrosterone 或 Androstenedione 兩種雄激素產物。在魚類中，P450<sub>17</sub> 主宰了雄激素或助孕素的分泌比例，因此腦垂腺 (Pituitary) 分泌的黃體成熟激素 (Luteinizing hormone, LH) 對 P450<sub>17</sub> 的調控十分重要 (圖 2-8)。若再經由 3 $\beta$ -HSD (3 $\beta$ -Hydroxysteroid dehydrogenase) 和 20 $\beta$ -HSD 酵素作用，則會形成 17 $\alpha$ , 20 $\beta$ -Dihydroxy-4-pregone-3-one (17, 20 $\beta$ -P)，此化合物在大多數魚類體內為促成成熟激素 (Maturation-inducing steroid, MIS)，和生殖細胞的發育成熟相關 (圖 2-8)。

另一方面，雌激素的合成，則是透過 P450 芳香轉化酶 (P450 aromatase, P450arom) 將睾固酮 (Testosterone) 的 A 環轉化成苯環，並移除 19 號碳 (C<sub>19</sub>) 上的甲基而形成 (圖 2-8)。雌激素影響雌魚的生理功能，也負責調控卵生脊椎動物中卵黃生成 (Vitellogenesis) 的過程。卵黃生成的前期，雌激素含量會增加，但有些魚類在卵黃生成後期雌激素會顯著下降，包含鮭魚 (Salmonids)、青鱗魚 (Medaka) 和金魚 (Goldfish) (圖 2-9)。

在雄魚性腺或部分雌魚體內會產生 11-Ketotestosterone (11-KT) 這種特別的雄激素，需要 P450 11 $\beta$ -hydroxylase (P450<sub>11 $\beta$</sub> ) 在 11 號碳 (C<sub>11</sub>) 加上羥基，並經由 11 $\beta$ -HSD 的氧化作用，才能形成 11-KT (圖 2-8)。

雄激素、雌激素、助孕素和相關衍生物，能夠藉由酵素在固醇類荷爾蒙之合成途徑內相互轉換，在魚體內，3 $\beta$ -HSD、17 $\beta$ -HSD 和 20 $\beta$ -HSD 這三個酵素就扮演了這樣的角色 (圖 2-8)。由此可知，性荷爾蒙之調控十分細緻且複雜，DEHP 如何和性荷爾蒙或相關酵素進行交互作用，還需要更深入的探討。

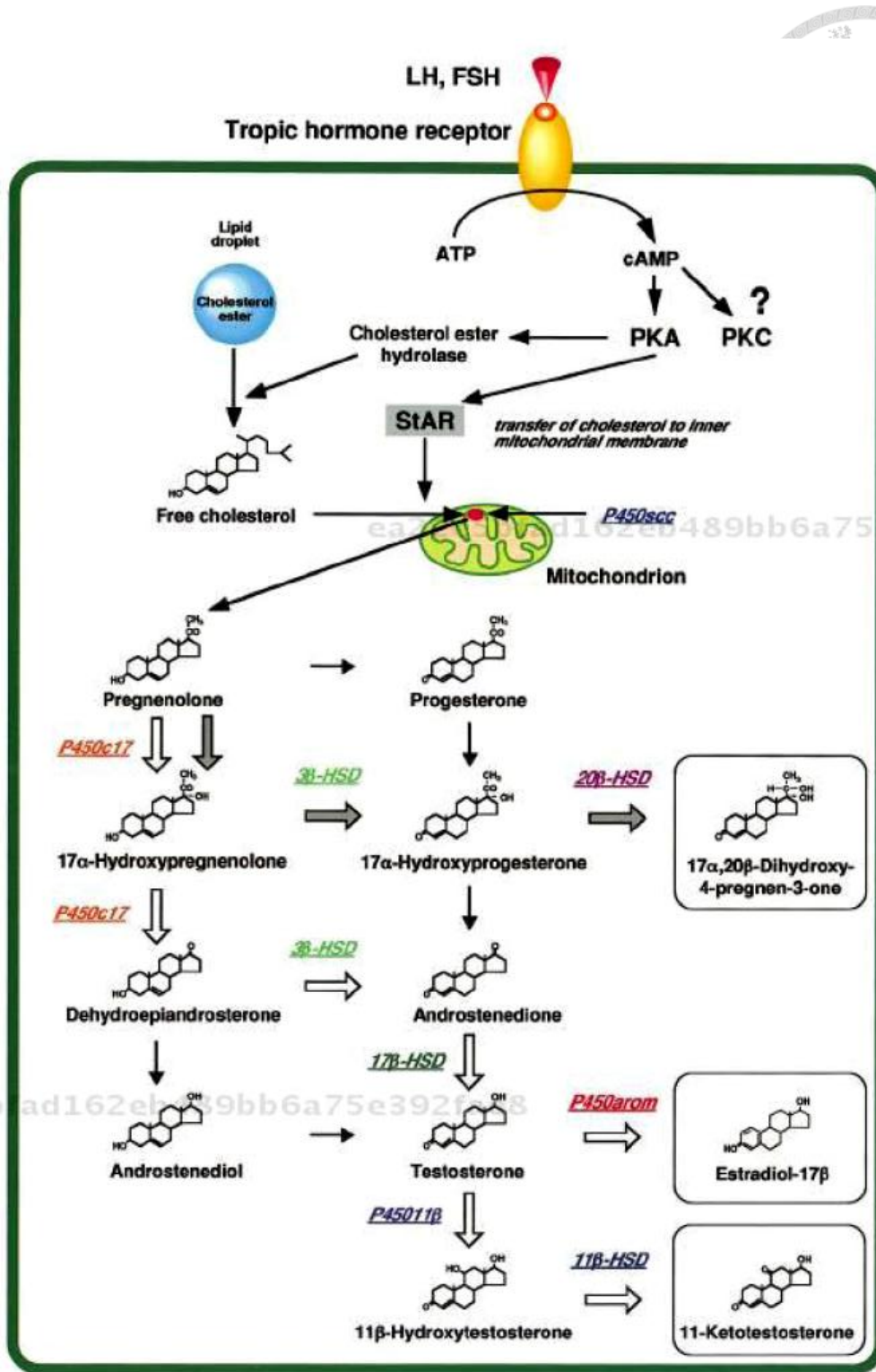


圖 2-8 硬骨魚性腺中性荷爾蒙合成途徑

圖中白色箭頭為雄激素偏好之合成途徑，灰色箭頭為助孕素偏好之合成途徑。

(Melamed and Sherwood, 2005)



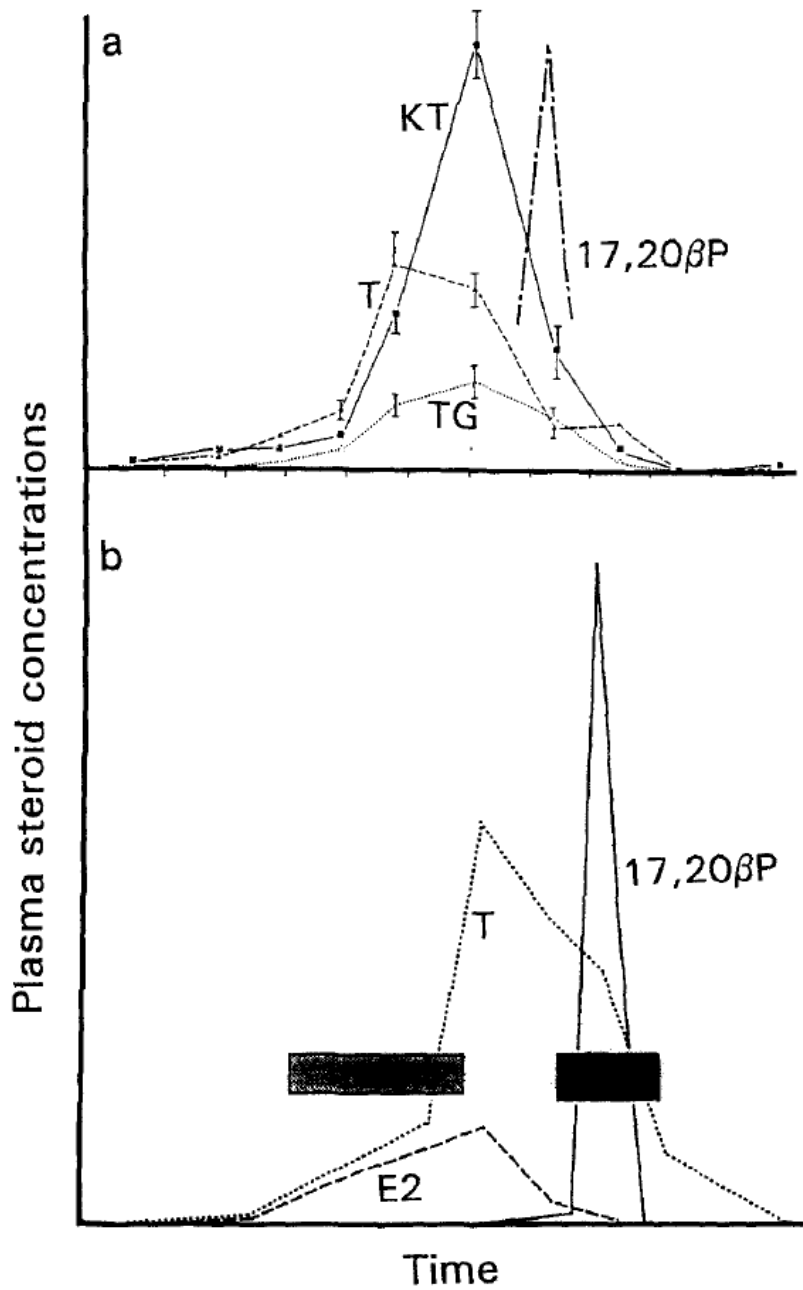


圖 2-9 硬骨魚生殖週期之性荷爾蒙濃度變化

(a) 雄魚 (b) 雌魚；黑色長條分別代表雌魚的卵黃生成 (Vitellogenesis) 和排卵 (Ovulation) 時期。縱軸未標示是因為不同物種之性荷爾蒙濃度有所差異，例如鮭魚 (Salmonids) 濃度最高可達 200 ng/mL，但在其他物種卻可能低於 5 ng/mL。

(E2: estradiol; KT: 11-ketotestosterone; T: testosterone; TG: testosterone glucuronide; 17,20βP: 17α, 20β-dihydroxy-4-pregnen-3-one)

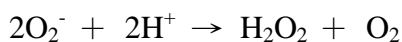
(Kime, 1993)

## 2.4.2 氧化壓力與抗氧化防禦機制

氧氣是所有好氧 (Aerobic) 生物賴以維生的重要物質，然而，當粒線體和微粒體 (Microsome) 進行如磷酸化、電子傳遞鏈等參與有氧代謝的細胞反應，氧被逐步還原成水的過程中會自然產生活性氧物種 (Reactive oxygen species, ROS)。主要的 ROS 包含單線態氧 (Singlet oxygen,  $^1\text{O}_2$ )、超氧陰離子 (Superoxide anion,  $\text{O}_2^-$ )、過氧化氫 (Hydrogen peroxide,  $\text{H}_2\text{O}_2$ ) 和氫氧自由基 (Hydroxyl radical,  $\text{HO}\cdot$ )，這些化合物也能夠快速反應形成其他 ROS 如 Peroxynitrite ( $\text{HOONO}$ )、Hypochloric acid ( $\text{HOCl}$ )、Peroxyl radical ( $\text{ROO}\cdot$ ) 和 Alkoxy radical ( $\text{RO}\cdot$ )。

一般情形下，細胞內的抗氧化防禦機制都能有效抵禦產生的 ROS。抗氧化防禦機制包含許多小分子的抗氧化物質，又稱清除者 (Scavengers)，以及具專一性的抗氧化酵素，彼此交互作用形成一個精密的網絡 (圖 2-10) (Regoli and Giuliani, 2014)。清除者能夠直接中和細胞質的 ROS 或阻斷細胞膜的脂質過氧化。還原態穀胱甘肽 (Reduced glutathione, GSH) 是細胞質中含量最多的清除者，GSH 和 ROS 作用後會氧化形成 GSSG (Oxidized glutathione)，除此之外，GSH 也是許多抗氧化酵素反應的輔因子 (Cofactor)。其他如抗壞血酸 (Ascorbic acid, 維他命 C)、生育醇 ( $\alpha$ -tocopherol, 維他命 E)、類胡蘿蔔素 (Carotenoid) 等都是細胞中常見的清除者。

抗氧化酵素和清除者相比具有較高的受質專一性。超氧歧化酶 (Superoxide dismutase, SOD) 負責清除超氧陰離子，反應並形成過氧化氫，其淨反應式如下：

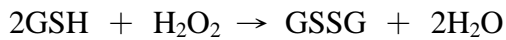


不同結構之 SOD 其中心金屬原子不同，Mn-SOD 主要存在於粒線體中，而 Cu/Zn-SOD 則存在於細胞質和過氧化酶體 (Peroxisome) 中 (Nordberg and Arnér, 2001)。儘管超氧陰離子被 SOD 所清除，但其產物過氧化氫仍屬於活性氧物種，因此，仍需要過氧化氫酶 (Catalase, CAT) 和穀胱甘肽過氧化酶 (Glutathione peroxidase, GPx) 這兩種能將過氧化氫還原的酵素 (圖 2-10)。CAT 為活性極高之酵素，主要存在於過氧化酶體 (Peroxisome)，能以兩分子的過氧化氫進行氧化還原反應，其淨反應式如下：





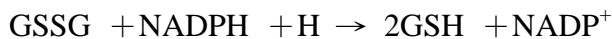
除了 CAT 以外，GPx 也能利用 GSH 作為電子供給者，催化過氧化氫的還原反應，其反應式如下：



GPx 和某些穀胱甘肽硫轉移酶 (Glutathione S-transferase, GST) 還能將細胞膜上的過氧化脂質還原成醇，伴隨著 GSH 氧化成 GSSG (圖 2-10)，反應式如下：



上述反應中所生成的 GSSG 能夠藉由穀胱甘肽還原酶 (Glutathione reductase, GR) 的作用還原為 GSH，重新發揮清除者和輔因子的作用 (圖 2-10)，其反應式如下：



GR 能夠確保細胞中的 GSH/GSSG 比例維持恆定，因此，雖然不是直接與活性氧物種作用，也對細胞中的氧化平衡有重要的貢獻。若 GSSG 的比例過高，GR 來不及完全反應，細胞中的藥物阻抗蛋白 (Multidrug resistance-related protein 1, MRP1) 也會將多餘的 GSSG 排出細胞外。

生物體在代謝外源汙染物時可分成一期代謝 (Phase I metabolism) 和二期代謝 (Phase II metabolism)，其中一期代謝負責將物質加上極性官能基以增加親水性，如細胞色素 P450 (Cytochrome P450, CYP) 酵素家族中的 CYP1A 和 CYP3A 是魚類體內主要負責一期代謝的酵素；二期代謝則將一期代謝產物加上極性的內生分子，除能增加極性外，也可預防生物活化 (Bioactivation) 作用。而 GST 除了參與抗氧化防禦機制以外，也是二期代謝的酵素之一，主要負責將外源汙染物接上 GSH 產生穀胱甘肽結合物 (GS-X)，GS-X 則能透過 MRP1 排出細胞 (圖 2-10)，而 MRP1 的作用也稱為三期代謝。

目前 DEHP 對魚類抗氧化防禦機制的影響仍不明確，相關文獻也較少，但細胞實驗中已有觀察到 DEHP 誘發 ROS 和 DNA 損傷的現象 (Ambruosi, et al., 2011, Erkekoglu, et al., 2010)，故 DEHP 和抗氧化防禦機制的交互作用也是值得深入探討的領域。

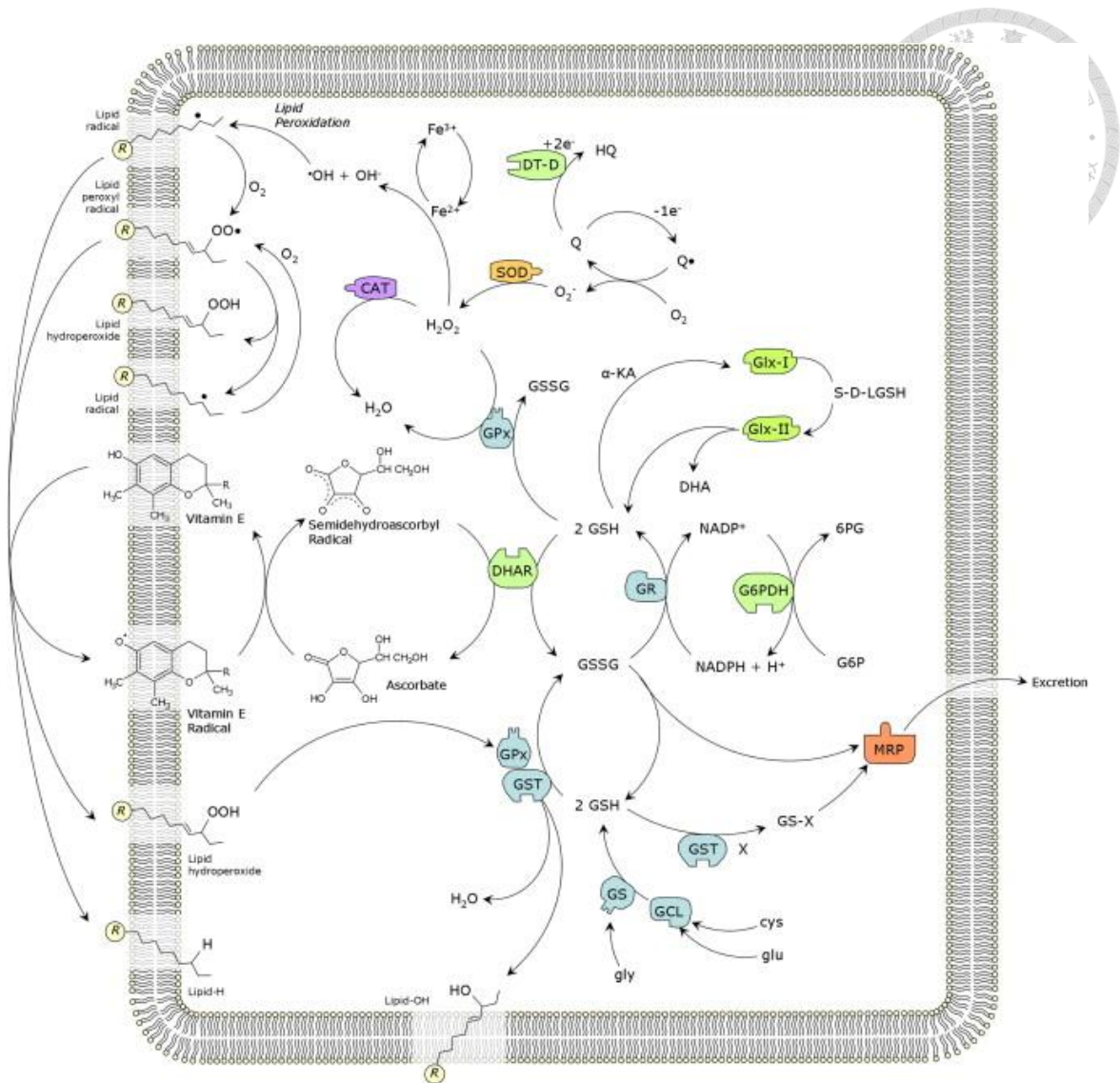


圖 2-10 細胞內主要的抗氧化防禦機制和作用途徑

代號縮寫依字母排序，6 PG: 6-phosphogluconate; CAT: catalase; cys: cysteine; DHA: D-hydroxyacid; DHAR: dehydroascorbate reductase; DT-D: DT-diaphorase; G6P: glucose 6-phosphate; G6PDH: glucose 6-phosphate dehydrogenase; GCL: g-glutamylcysteine synthetase; Glx-I: glyoxalase I; Glx-II: glyoxalase II; GPx: glutathione peroxidases; GR: glutathione reductase; gly: glycine; glu: glutamic acid; GS: glutathione synthetase; GSH: reduced glutathione; GSSG: oxidized glutathione; GST: glutathione S-transferases; GS-X: GSH conjugated xenobiotic; HQ: hydroquinone; aKA: a-keto aldehydes; MRP: multidrug resistance-related protein; Q: quinone; Q: semiquinone radical; S-D-LGSH: S-D-Lactoylglutathione; SOD: superoxide dismutase; X: xenobiotics

(Regoli and Giuliani, 2014)

## 2.5 模式生物——青鱈魚

本研究選用青鱈魚 (*Medaka, Oryzias latipes*) 作為模式生物。青鱈魚屬於輻鰭魚綱 (Actinopterygii) 鶴鱖目 (Beloniformes) 異鱈亞目 (Adrianichthyoidei) 異鱈科 (Adrianichthyidae) 青鱈屬 (*Oryzias*) 之小型卵生淡水魚類，體長約為 3 - 4 公分。原生於日本、韓國與中國東部等東南亞水域，因早期於日本稻田中被發現，故又被稱作稻米魚 (Rice fish)。青鱈魚已被廣泛地應用於脊椎動物的生理、胚胎與基因學研究中，近年來也開始應用於藥物篩選及毒性物質測試等方面的研究。利用青鱈魚為模式生物的優點包含：(1) 體型小，(2) 性成熟 (約 6-8 週) 及世代交替快，(3) 胚胎的外殼透明且為體外發育，故利於觀察各個發育階段的生長情形，(4) 青鱈魚在早期發育階段對許多外來物質或毒化物具高度敏感性，(5) 所需的養殖及管理費用遠低於老鼠或細胞培養，(6) 為亞洲地區之原生物種 (Kinoshita, et al., 2009)。

本研究使用 FLFII (female leucophore free II) 青鱈魚 (圖 2-11) 進行實驗，FLFII 為日本學者所發表之特殊品系青鱈魚 (Wakamatsu, et al., 2003)，特點為雄魚之中保留原有的自體螢光色素 Leucophore，但雌魚體內則不會形成該色素，因此在胚胎發育至一定階段後 (受精後五到七天)，便可以觀察是否有螢光色素形成來判斷胚胎之性別，正常胚胎於 25-28°C 下約 7-10 天可孵化為魚苗。



圖 2-11 FLFII 青鱈魚成魚及螢光顯微鏡下胚胎

(Wakamatsu, et al., 2003)

## 2.6 研究目的

人類大量使用塑膠製品，導致塑化劑在環境中無所不在，環境流布調查之結果也顯示 DEHP 在台灣水體環境中廣泛存在，其汙染程度不容忽視。前人研究較少探討環境生物暴露風險，且 DEHP 對水生生物的生殖毒性效應目前仍無一致結論，基因層級之作用機制也尚未釐清。因此本研究的目的包含以下三點：

1. 了解環境流布濃度之 DEHP 對青鱒魚之生殖毒性效應。
2. 從內分泌系統和抗氧化防禦機制兩方面探討 DEHP 可能之作用機制。
3. 比較 DEHP 對雌魚和雄魚的生物效應。

### 3. 材料與方法

#### 3.1 研究架構說明

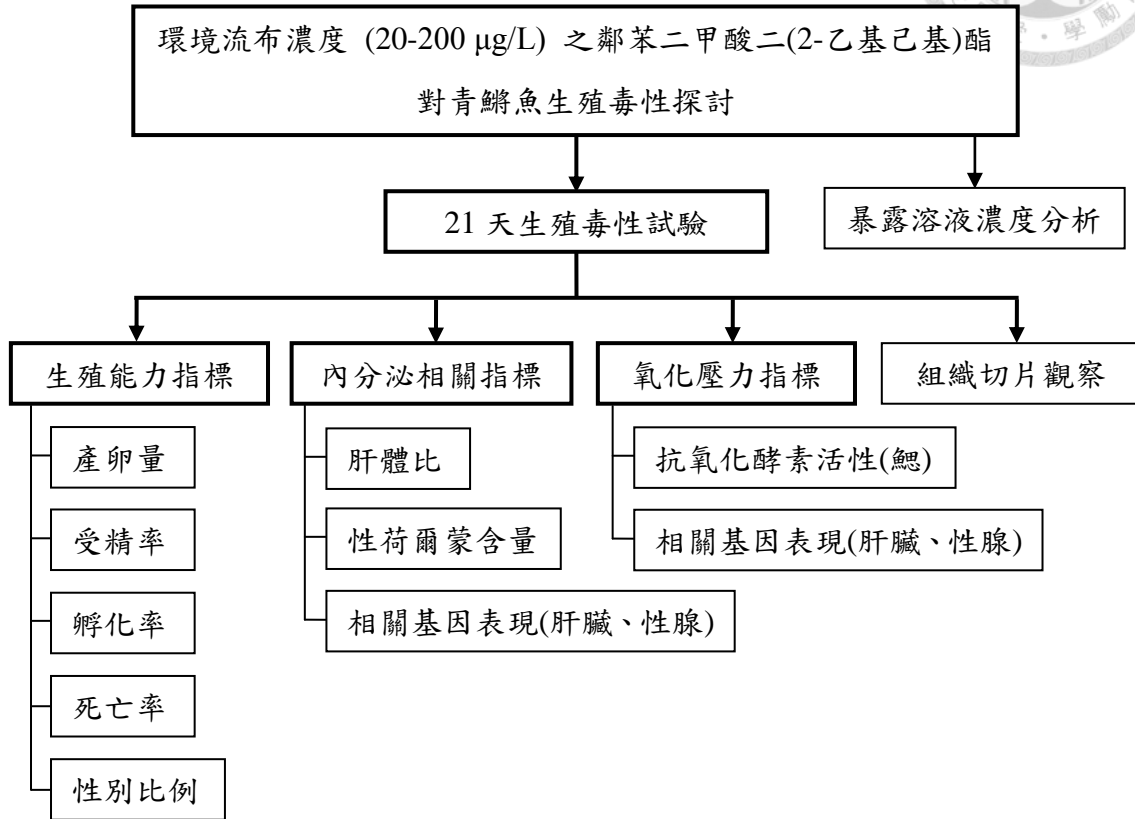


圖 3-1 研究架構

本研究主軸為 DEHP 對青鱒魚成魚的 21 天生殖毒性試驗。生物效應主要分成四個面向探討，生殖能力指標將不同處理組中每對魚的產卵情形進行量化，有助於了解環境流布之 DEHP 對魚類族群及生態層次的影響；內分泌相關指標包含直觀的性荷爾蒙濃度分析和微觀的基因表現，嘗試釐清 DEHP 的內分泌干擾效應及其環境荷爾蒙的定位；氧化壓力指標為前人研究中較少探索之機制，本研究欲了解 DEHP 和氧化壓力的關係，因而測定不同器官中的抗氧化酵素活性和基因表現；組織學結果則為生物效應中最直接之證據。此外，本研究也進行了暴露溶液濃度分析，以確保 DEHP 暴露劑量符合環境流布濃度之範圍。



## 3.2 實驗器材

### 3.2.1 藥品與試劑

#### 藥品

鄰苯二甲酸二(2-乙基己基)酯 [Di(2-ethylhexyl)phthalate]、蛋白酶抑制劑 (Aprotinin from bovine lung)、乙二胺四乙酸 (Ethylenediaminetetraacetic acid, EDTA)、乙二胺四乙酸二鈉 (Ethylenediaminetetraacetic acid disodium salt dehydrate)、氧化態穀胱甘肽 (L-Glutathione oxidized)、甘油 (Glycerol)、過氧化氫 (Hydrogen peroxide)、甲硫胺酸 (DL-Methionine)、輔酶 II [NADPH ( $\beta$ -NAD phosphate, reduced form tetrasodium)]、四唑氮藍 (Nitrotetrazolium blue chloride)、磷酸氫二鈉 (Sodium phosphate dibasic dehydrate)、乙二醛 (Glyoxal)、乙醇 (Ethanol)、1-溴-3-氯丙烷 (1-Bromo-3-chloropropane, BCP)、異丙醇 (Isopropanol)、苯甲基磺氟 (Phenylmethylsulfonyl fluoride, PMSF)、肝素-鋰 (Heparin-Li)、焦碳酸二乙酯 (Diethyl pyrocarbonate, DEPC)、Bis-tris free base 皆購自美國 Sigma-Aldrich。氯化鎂 (Magnesium chloride 6-hydrate)、磷酸氫二鉀 (Potassium phosphate dibasic)、磷酸二氫鉀 (Potassium phosphate monobasic monobasic)、磷酸二氫鈉 (Sodium phosphate monobasic monobasic, monohydrate)、二甲基亞砜 (dimethyl sulfoxide, DMSO)、PIPES [Piperazine-N,N'-bis(2-ethanesulfonic acid)] 皆購自美國 J.T. Baker。RNAlater<sup>®</sup>、TRI Reagent<sup>®</sup> Solution、Power SYBR<sup>®</sup> Green PCR Master Mix、Nuclease-Free Water 皆購自美國 Applied Biosystems。瓊脂糖 (Agarose) 購自美國 Thermo Fisher Scientific。

氯化鈣 (Calcium chloride dihydrate)、氯化鉀 (Potassium chloride)、氯化鈉 (Sodium chloride) 皆購自加拿大 Bioshop。10% 中性福馬林溶液 (Formaldehyde solution 10% in aqueous phosphate buffer)、氫氧化鈉 (Sodium hydroxide) 購自加拿大 Mallinckrodt。溴化乙錠 (Ethidium Bromide, EtBr)、甲醇 (Methanol)、丙酮 (Acetone)、二氯甲烷 (Dichloromethane) 皆購自德國 Merck。甲烯藍 (Methylene blue) 購自德國 Riedel-de Haën。硫酸鎂 (Magnesium sulfate 7-hydrate)、碳酸氫鈉 (Sodium hydrogen carbonate) 購自西班牙 Panreac。



## 商業套組

Estradiol EIA kit、Testosterone EIA kit、11-Ketotestosterone EIA kit 皆購自美國 Cayman chemical company。

Pierce<sup>®</sup> BCA Protein Assay Kit 購自美國 Thermo Fisher Scientific。

TURBO DNA-free<sup>™</sup> kit、High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit 皆購自美國 Applied Biosystems。



### 3.2.2 儀器設備

1. 電磁加熱攪拌器 (Stirring hot plate) 購自美國 Barnstead。
2. 精密電子天秤 (Electronic balance) 購自瑞士 Mettler-Toledo 與美國 Denver Instrument。
3. 光學顯微鏡製造商為德國 Zeiss。
4. 酸鹼值測定儀 (pH meter) 購自瑞士 Mettler-Toledo。
5. 溶氧量測定儀 (DO meter) 購自美國 Thermo Fisher Scientific。
6. 多功能微量盤分析儀 (Infinite<sup>®</sup> 200 PRO Microplate reader) 製造商為瑞士 Tecan。
7. 離心機 (Force 1418 Microcentrifuges) 製造商為美國 Select BioProducts。
8. 桌上型低溫離心機 (Centrifuge) 製造商為德國 Eppendorf。
9. 恆溫培養箱製造商為裕德。
10. 超純水系統 (Ultrapure water) 購自美國 Thermo Fisher Scientific。
11. 熱循環反應器 (Tpersonal Thermocycler) 製造商為德國 Biometra。
12. 核酸即時定量聚合酶鏈鎖反應系統 (StepOne<sup>™</sup> Real-Time PCR Systems) 製造商為美國 Applied Biosystems。
13. 固相萃取管柱 (Oasis HLB cartridge)、玻璃萃取匣 (Extraction manifold) 購自美國 Waters。
14. 高效液相層析儀/光二極體陣列檢測器 (HPLC/PDAD) 製造商為日本 Hitachi。



### 3.3 青鱗魚飼養與繁殖條件

本研究選用的模式生物為青鱗魚 (Medaka fish, *Oryzias latipes*)，由日本國立環境研究所 (National Institute for Environmental Studies, NIES) 的 Yoshio Sugaya 教授提供，並依照國立臺灣大學動物實驗管理組 (Institution animal care and use committee, IACUC) 及使用委員會所訂定之管理辦法和標準程序進行飼養。

本實驗選用的青鱗魚品系為 FLFII (Female leucophore free II)，飼育繁殖條件如下：  
(1) 每日光週期為 14 小時光照/10 小時黑暗，(2) 平均飼養水溫維持  $27 \pm 1^\circ\text{C}$ ，(3) 每日餵食市售乾飼料 (Otohime  $\beta$ 1) 兩至三次及相當於魚體重 1% 之豐年蝦 (*Artemia* sp.) 一次，(4) 每日以去氯曝氣自來水替換水循環系統中三分之一水量，且飼養缸均每週清洗一次以除去綠藻、多餘餌料以及排泄物，(5) 每週監測循環系統中之水質，以維持適宜水質條件，水質條件的濃度範圍如表 3-1 所示。

3 月齡以上成魚的飼養缸 (3 L/缸) 之飼育密度維持 15 隻/缸 (公母比 6:9)，以微弱水流循環並以風管插入液面打氣維持溶氧量充足；魚苗則是飼養於大型飼養缸 (30 L/缸)，飼養密度為 50 隻/缸。

表 3-1 青鱗魚飼養之水質條件

水質監測條件	濃度範圍
溶氧量 (Dissolving oxygen, DO)	8 mg/L
硝酸鹽 (Nitrate, $\text{NO}_3^-$ )	< 5 mg/L
亞硝酸鹽 (Nitrite, $\text{NO}_2^-$ )	< 0.5 mg/L
氨態氮 ( $\text{NH}_3$ )	< 0.5 mg/L
總硬度	~ 17.9 mg/L
碳酸鹽硬度	6 - 15 mg/L
殘餘氯含量	< 0.5 mg/L
pH	6.8 - 7.0

魚苗的孵育方法，則是收集受精胚胎並去除卵殼表面絨毛膜 (Chorion) 上的纖毛後，將胚胎培養於含有甲烯藍 (Methylene blue, 4 mg/L) 之胚胎培養液 (Embryo rearing medium, ERM, pH 7.2-7.4)，配製方法如表 3-2。胚胎孵育條件為每日光週期 16 小時光照/8 小時黑暗，溫度維持  $25 \pm 1^\circ\text{C}$ ，於恆溫胚胎孵化箱中以 30 rpm 震盪孵育，每日替換含有甲烯藍之 ERM 直到胚胎孵化後，即可將孵出之魚苗移入大型飼養缸中生長，待生長至成魚 (3 月齡以上) 再移至上述水循環系統。

表 3-2 胚胎培養液 (ERM, 1X) 成分配製表

化合物	濃度 (mg/L)
氯化鈉 (NaCl)	1000
硫酸鎂 ( $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ )	163
氯化鈣 ( $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ )	40
氯化鉀 (KCl)	30
甲烯藍 (Methylene blue)	4



### 3.4 青鱈魚暴露 DEHP 實驗設計

#### 3.4.1 生殖毒性暴露實驗

DEHP 暴露溶液之配製簡述如下，首先精秤 DEHP 於棕色玻璃樣品瓶中並加入丙酮 (Acetone)，再以丙酮進行序列稀釋，配製濃度為 0.2、1 及 2 mg/mL 之原液 (Stock solution)，再將此原液以去氯自來水稀釋 10000 倍，利用電磁攪拌器攪拌 30 分鐘使溶液混合均勻，則完成 20、100 和 200  $\mu\text{g/L}$  DEHP 之暴露溶液。本實驗共有溶劑控制組 (0.01% acetone, vehicle control, VC) 及 DEHP 處理組 (20、100 和 200  $\mu\text{g/L}$ )。

為確保實驗用魚的生殖能力正常且穩定，於暴露實驗開始前一個月預先挑選性成熟之四月齡 FLFII 青鱈魚進行配對，每 3 L 壓克力魚缸隨機放入兩對雌雄青鱈魚，總計共 32 對雌雄青鱈魚。每日觀察交配及產卵情形至少兩週，確認每對青鱈魚每日產卵情況穩定。

將 32 對雌雄青鱈魚隨機平分為四組，於暴露實驗開始當日置入裝有 1000 mL 暴露溶液之 2 L 燒杯中，每杯置入一對雌雄青鱈魚，故溶劑控制組及三組 DEHP 處理組皆以八重複進行。實驗持續 21 天，每日餵食飼料 Otohime  $\beta$ 1 及豐年蝦各兩次，於每日下午更換 80% 暴露溶液並去除殘餘餌料及排泄物，每 3 天更換一次暴露用之燒杯避免藻類繁殖影響水質。每日光週期為 14 小時光照/10 小時黑暗，溫度為  $26\pm 1^\circ\text{C}$ ，適應及實驗期間皆以風管插入液面打氣以維持溶氧，在暴露第 16-21 天期間收集每日每對青鱈魚所產下之胚胎並計算其生殖能力指標 (如 3.4.2 所述)。

暴露實驗結束當日進行採樣，秤量魚隻體重，並以玻璃毛細管採集魚尾部血管之血液進行血清萃取，以量測血清中性荷爾蒙含量 (如 3.5 所述)；犧牲魚隻取出肝臟，將肝臟浸泡於 RNAlater<sup>®</sup> 樣品保存液，以五位數天秤精秤肝重後，依 RNAlater<sup>®</sup> 原廠操作手冊所述，將樣品於  $4^\circ\text{C}$  冷藏隔夜後置於  $-80^\circ\text{C}$  冰箱保存，待後續基因表現量分析 (如 3.7 所述)；另外，同一性別每兩隻魚的魚鰓合併為一樣品，解剖取下後立刻置入液態氮中急速冷凍，再移至  $-80^\circ\text{C}$  冰箱保存，供氧化壓力試驗使用 (如 3.6 所述)；最後取下青鱈魚之性腺，一隻雌魚之性腺即為一樣品，兩隻雄魚之性腺合併為一樣品，將其浸泡於保存於 RNAlater<sup>®</sup> 樣品保存液，於  $4^\circ\text{C}$  冷藏隔夜後置於  $-80^\circ\text{C}$  冰箱中留待基因表現量分析 (如 3.7 所述)；控制組與各處理組皆取兩隻雄魚及雌魚之軀幹浸泡於 10% 中性福馬林，並移置  $4^\circ\text{C}$  冰箱保存，以便進

行組織病理分析 (如 3.8 所述)。

秤得之魚隻肝重和體重用於計算肝體比 (Hepatosomatic index, HSI), 計算方式為  $HSI = (\text{肝重}/\text{體重}) \times 100$ 。



### 3.4.2 青鱈魚生殖能力評估

生殖暴露實驗在暴露第 16-21 天期間, 每天早上餵食青鱈魚後, 中午收集燒杯底部及母魚腹部所產出之胚胎, 除去披覆於胚胎絨毛膜上之絲狀物後, 置於裝有含甲烯藍之 ERM 的 12 孔盤, 以 3.3 所述條件孵化。每日記錄各處理組每對青鱈魚之產蛋量、受精率及死亡率, 並更換 ERM。在受精後第七天, 以螢光解剖顯微鏡觀察胚胎脊椎位置是否有螢光出現 (如圖 2-11) 以分辨性別, 將不同性別之胚胎分開並計算胚胎的性別比例, 繼續培養直到胚胎孵化, 並計算孵化率。計算方式如下:

$$\text{受精率} = \text{受精胚胎數} \div \text{產卵數}$$

$$\text{死亡率} = \text{死亡胚胎數} \div \text{受精胚胎數}$$

$$\text{孵化率} = \text{孵化胚胎數} \div \text{受精胚胎數}$$



### 3.5 性荷爾蒙含量分析


#### 3.5.1 血清萃取

將魚隻置於冰上使其失去知覺，用擦手紙拭乾魚體表面殘餘的暴露溶液後，接著使用天平測量體重，再以解剖刀切斷魚隻的尾部，用 800 U/mL 肝素—鋰潤洗過的刻度毛細管 (Heparin-Li coated micro capillary tubes) 收集流出的血液並記錄血液體積，接著將血液放入含有 20  $\mu$ L 血液緩衝液 (配製方法如表 3-3) 的樣品管中，置於碎冰塊中暫時保存，直至魚隻解剖程序結束，將血液樣品以 10000g 離心 10 分鐘讓血球沉澱，取其上清液 (血清) 放入樣品管中放入  $-80^{\circ}\text{C}$  冰箱保存。

表 3-3 血液緩衝液配製方法 (1X)

化合物	濃度	
Aprotinin from bovine lung	0.2 $\mu\text{g/mL}$	
Phenylmethanesulfonyl fluoride (PMSF)	1 mM	
Phosphate buffered saline, PBS (0.5 mg/mL)	NaCl	137 mM
	KCl	2.7 mM
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1.76 mM
	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	8.08 mM

### 3.5.2 性荷爾蒙濃度測定



青鱈魚血清的性荷爾蒙濃度以 Estradiol EIA kit、Testosterone EIA kit 及 11-keto Testosterone EIA kit 進行測定，分析原理如下述。商業套組內含對 Estradiol (E2)、Testosterone (T) 和 11-ketotestosterone (11-KT) 具專一性之免疫血清 (Antiserum)，以及帶有乙醯膽鹼酯酶 (Acetylcholinesterase, AChE) 標記之 E2、T 或 11-KT 分子作為追蹤劑 (tracer)。依序將樣品、免疫血清和追蹤劑，加入有抗體 (IgG) 固著 (coating) 之 96 孔盤反應後，由於孔盤上的抗體與免疫血清結合，其對抗原之專一性結合位有限，樣品中所含之 E2、T 或 11-KT 會與追蹤劑競爭免疫血清的結合位置 (圖 3-2)。之後洗去未鍵結的追蹤劑，並進行呈色反應，在孔盤中加入含 5,5'-二硫雙 (2-硝基苯甲酸) [5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid), DTNB] 和 Acetylthiocholine (AtCH) 的 Ellman's reagent 進行反應，此時追蹤劑上連結之乙醯膽鹼酯酶會將 AtCH 水解，生成物 Thiocholine 會進一步與 DTNB 反應，形成黃色化合物 5-thio-2-nitrobenzoic acid (TNB)，於波長 412 nm 具有最大吸光值 (圖 3-3)。本研究分別以 E2、T 或 11-KT 做為標準品，序列稀釋後依各濃度吸光值求得標準曲線，再將樣品之反應吸光值代回標準曲線後，計算青鱈魚血清中不同性荷爾蒙的濃度。

實驗步驟如下，在 96 孔盤中依序加入 50  $\mu$ L 標準品或樣品、50  $\mu$ L 免疫血清和 50  $\mu$ L 追蹤劑，混合均勻後依原廠操作手冊之條件進行反應 (E2 EIA：22 $^{\circ}$ C，1 小時；T EIA：22 $^{\circ}$ C，2 小時；11-KT EIA：4 $^{\circ}$ C，18 小時)，反應完成後以清洗緩衝液 (Wash buffer) 清洗五次，再加入 200  $\mu$ L Ellman's reagent 於 22 $^{\circ}$ C 在振盪器上輕微震盪，進行避光反應 (E2 EIA：60 分鐘；T EIA：60 分鐘；11-KT EIA：90 分鐘)，反應結束後以微量盤式分光光譜儀分析波長 420 nm 下之吸光值變化。



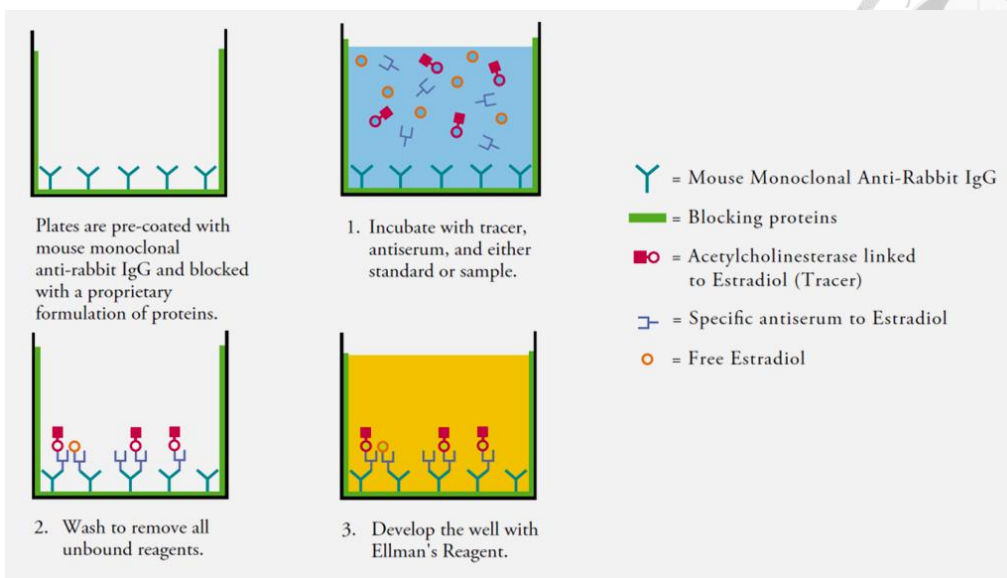


圖 3-2 ACE™ competitive EIA 作用原理 (Cayman)

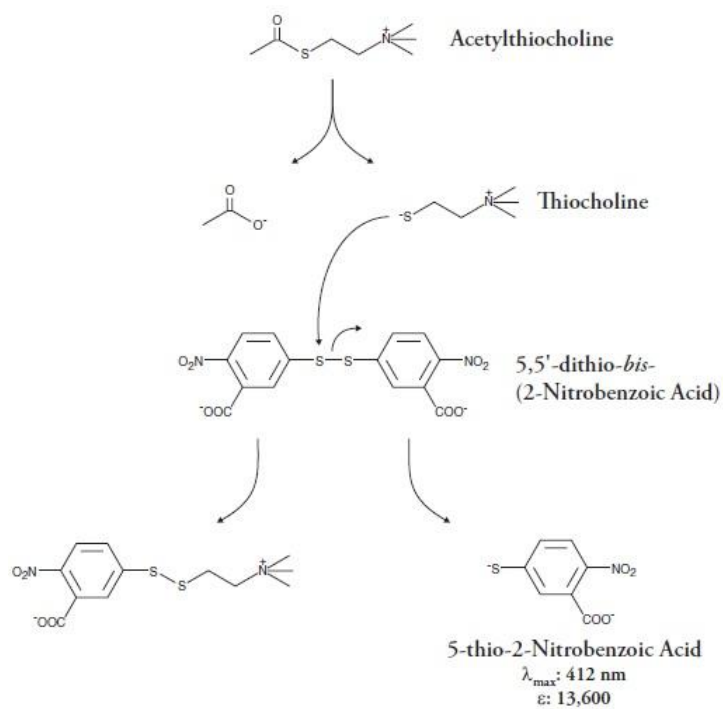


圖 3-3 乙醯膽鹼脂酶之催化反應 (Cayman)



### 3.6 氧化壓力試驗

#### 3.6.1 樣本均質與總蛋白質濃度分析

將先前採集之魚鰓樣品自  $-80^{\circ}\text{C}$  冰箱取出，轉移至 1.5 mL 微量離心管並置於冰上，加入 200  $\mu\text{L}$  冰冷的均質用緩衝溶液 (50 mM Phosphate buffered saline, 0.5 mM EDTA-2Na, pH 7.0)、0.2  $\mu\text{L}$  苯甲基磺氟 (Phenylmethylsulfonyl fluoride, PMSF) 作為蛋白酶抑制劑，以及 20  $\mu\text{L}$  的甘油 (Glycerol) 防止冰晶形成破壞蛋白質而影響酵素的活性。以電動均質器將魚鰓徹底均質後，於 12,000 g、 $4^{\circ}\text{C}$  下離心 30 分鐘，取上清液進行分裝並保存於  $-80^{\circ}\text{C}$  以利進行魚鰓總蛋白質濃度定量，以及後續的酵素活性分析。

本實驗參照 BCA<sup>TM</sup> Protein Assay Kit<sup>®</sup> 原廠操作手冊之方法進行魚鰓的總蛋白質濃度分析。藉由樣品中之蛋白質在鹼性環境下，會將二價銅離子  $\text{Cu}^{2+}$  還原成一價銅離子  $\text{Cu}^{+}$ ，而  $\text{Cu}^{+}$  會繼續與 BCA (Bicinchoninic acid) 形成藍紫色螯合物，其在波長 562 nm 下具有最大吸光值。反應原理如圖 3-4 所示：

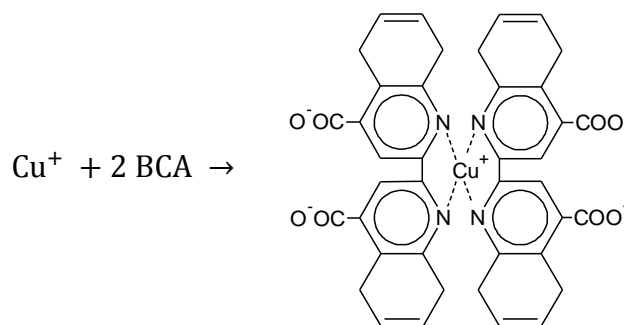
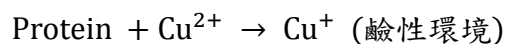


圖 3-4 BCA 原理示意圖

### 3.6.2 超氧歧化酶活性分析

SOD 測定方法是參考前人文獻並加以修改。在本實驗中 SOD 活性定義為，能進行超氧陰離子歧化反應以抑制四唑藍 (Nitrotetrazolium blue chloride, NBT) 還原的能力 (Beauchamp and Fridovich, 1971, Spitz and Oberley, 1989)。取蛋白質濃度為 10  $\mu\text{g}$  之樣品均質液 (以均質用緩衝溶液調整體積至 50  $\mu\text{L}$ ) 加入透明 96 孔盤中，再依序加入 100  $\mu\text{L}$  PBS (0.15 M, pH 7.8)、30  $\mu\text{L}$  EDTA-2Na (1 mM)、30  $\mu\text{L}$  甲硫胺酸 (Methionine, 130 mM) 以及 30  $\mu\text{L}$  NBT (0.63 mM)。而後在避光環境下加入 60  $\mu\text{L}$  維生素 B<sub>2</sub> (Riboflavin, 7.5  $\mu\text{M}$ )，並以強光照射 15 分鐘使其反應，最後於波長 560 nm 下測定吸光值。空白對照組僅加入均質用緩衝溶液 (50  $\mu\text{L}$ ) 及上述各反應試劑。另外，以 SOD 標準品配製檢量線，以均質用緩衝溶液調整 SOD 標準品體積至 30  $\mu\text{L}$ ，並額外添加 20  $\mu\text{L}$  已加熱失活之魚鰓樣品均質液來校正基質干擾，之後實驗步驟同上所述。每組樣品、空白對照組及 SOD 標準品均進行兩重覆。SOD 的比活性 (Units  $\text{mg}^{-1}$  protein) 定義為一毫克蛋白質所含之 SOD 抑制 50% NBT 還原的能力，由 SOD 標準品之反應吸光值得到檢量線後，將樣品吸光值代回檢量線，求得魚鰓中 SOD 之比活性。

### 3.6.3 過氧化氫酶活性分析

CAT 活性分析原理是利用 CAT 能夠代謝 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>，反應生成氧氣與水，藉由測定 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 於波長 240 nm 下的吸光值變化以推算 CAT 之活性。測定方法乃參考前人文獻方法 (Beers and Sizer, 1952, Preuss, et al., 2000) 並加以修改。取蛋白質濃度為 2  $\mu\text{g}$  之樣品均質液加入 96 孔可透 UV 平底盤，以均質用緩衝溶液調整體積至 10  $\mu\text{L}$ ，再依序加入 190  $\mu\text{L}$  PBS (0.1 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7.0) 及 100  $\mu\text{L}$  H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0.1 M)，混合均勻並於 240 nm 波長下測定一分鐘內吸光值變化量 ( $\Delta A_{240}$ )，另測定空白對照組以校正數值。CAT 的比活性 (Units  $\text{mg}^{-1}$  protein) 定義為一毫克的蛋白質所含之 CAT 在一分鐘內清除 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 之速率。

### 3.6.4 穀胱甘肽還原酶活性測試

GR 的分析方法是參考前人文獻方法並加以修改 (Foster and Hess, 1980)，活性分析原理為 GR 藉由  $\beta$ -NADPH 輔助，將氧化態穀胱甘肽 (Oxidized glutathione, GSSG) 還原成還原態穀胱甘肽 (Reduced glutathione, GSH)。取蛋白質濃度為  $10 \mu\text{g}$  之樣品加入 96 孔可透 UV 平底盤，以均質用緩衝溶液調整體積至  $25 \mu\text{L}$ 。再依序加入  $125 \mu\text{L}$  PBS ( $0.4 \text{ M}$ ,  $\text{pH } 7.5$ )、 $25 \mu\text{L}$   $\text{MgCl}_2$  ( $15 \text{ mM}$ )、 $25 \mu\text{L}$  EDTA-2Na ( $2 \text{ mM}$ ) 和  $25 \mu\text{L}$  GSSG ( $2.5 \text{ mM}$ )。最後加入  $25 \mu\text{L}$   $\beta$ -NADPH ( $0.25 \text{ mM}$ ) 混合均勻，並於波長  $340 \text{ nm}$  下測定三分鐘內吸光值之變化量 ( $\Delta A_{340}$ )，另測定空白對照組以校正數值。GR 之比活性 ( $\text{Units mg}^{-1} \text{ protein}$ ) 定義為一毫克的蛋白質所含之 GR 於三分鐘內消耗  $\beta$ -NADPH 之速率。

### 3.6.5 穀胱甘肽硫轉移酶活性測試

GST 活性分析原理是藉由 GST 能夠催化還原態之穀胱甘肽與 1-氯-2,4-二硝基苯 (1-Chloro-2,4-dinitrobenzene, CDNB) 共軛生成 2,4-二硝基穀胱甘肽 (S-2,4-Dinitrophenylglutathione)，以此 GSH 結合物 (Glutathione conjugate) 之生成量多寡計算 GST 活性 (Ching, et al., 2009, Grundy and Storey, 1998)。取蛋白質濃度為  $10 \mu\text{g}$  之樣品均質液加入 96 孔可透 UV 平底盤，以均質緩衝溶液調整體積至  $50 \mu\text{L}$ ，再依序加入  $200 \mu\text{L}$  PBS ( $75 \text{ mM}$ ,  $\text{pH } 6.5$ )、 $30 \mu\text{L}$  EDTA-2Na ( $10 \text{ mM}$ )、 $10 \mu\text{L}$  GSH ( $30 \text{ mM}$ )，最後加入  $10 \mu\text{L}$  CDNB ( $30 \text{ mM}$ ) 混合均勻後，測定  $340 \text{ nm}$  波長下一分鐘內吸光值的變化量 ( $\Delta A_{340}$ ) 另測定空白對照組以校正數值。GST 比活性 ( $\text{Units mg}^{-1} \text{ protein}$ ) 定義為一毫克蛋白質所含之 GST 於一分鐘內生成多少  $\mu\text{mole}$  之 GSH 結合物。



### 3.7 基因表現量分析

將青鱈魚肝臟樣品進行 *cyp1a*、*cyp3a38* 和 *cyp3a40* 等外源汙染物一期代謝相關基因，以及 *sod*、*cat*、*gpx* 和 *gst* 等抗氧化酵素相關基因之表現量分析，且雌魚肝臟樣品額外分析卵黃前質蛋白 *vtg* 之基因表現量；另一方面，青鱈魚性腺樣品進行性荷爾蒙合成酵素 *cyp17* 基因，以及 *sod*、*cat*、*gpx* 和 *gst* 等抗氧化酵素相關基因之表現量分析。

#### 3.7.1 總 RNA 萃取

將樣品自  $-80^{\circ}\text{C}$  冰箱中取出解凍，移去 *RNAlater*<sup>®</sup> 溶液後，使用 *TRI Reagent*<sup>®</sup> *Solution* 萃取青鱈魚肝臟或性腺中之總 RNA (除因樣品較小而將試劑操作體積減半以外，實驗步驟如原廠操作手冊)。萃取出之總 RNA 回溶於 50  $\mu\text{L}$  DEPC 水並置於  $-20^{\circ}\text{C}$  冰箱保存。RNA 濃度測定以 DEPC 水為空白樣品校正後，取 2  $\mu\text{L}$  RNA 樣品置於 *Infinite*<sup>®</sup> 200 PRO NanoQuant Plate<sup>™</sup>，測量波長 260 nm 和 280 nm 之吸光值並由軟體估算 RNA 濃度。

#### 3.7.2 RNA 純化

自總 RNA 樣品取出 5  $\mu\text{g}$  RNA，以 *TURBO DNA-free*<sup>™</sup> kit 移除 RNA 樣品中的 DNA，控溫步驟使用 *Tpersonal Thermocycler* (實驗步驟詳見原廠操作手冊)。純化後之 RNA 同樣以 *Infinite*<sup>®</sup> 200 PRO NanoQuant Plate<sup>™</sup> 測量 260 nm 和 280 nm 之吸光值，並由軟體估算 RNA 濃度，最後將純化之 RNA 樣品置於  $-20^{\circ}\text{C}$  冰箱保存。

#### 3.7.3 RNA 電泳

利用瓊脂糖 (*Agrose*) 電泳確認純化後之 RNA 品質，首先以 *BTPE* 緩衝溶液 (表 3-4) 調整瓊脂糖濃度至 1%，微波後倒入製膠台，待冷卻凝固後製成瓊脂糖膠片。再取 2  $\mu\text{L}$  RNA 和 4  $\mu\text{L}$  *Glyoxal reaction mix* (表 3-4)、1.2  $\mu\text{L}$  6X DNA loading dye 混合均勻並離心，再使用 *Tpersonal Thermocycler* 以  $60^{\circ}\text{C}$  加熱 30 分鐘。加熱完成後，將樣品載入製備完成之瓊脂糖膠片中，在製膠台加入 *BTPE* 緩衝溶液使其液面高度高過瓊脂糖膠片，在 100V 進行電泳分析 30-40 分鐘。電泳分析

結束後以 UV box 觀察瓊脂糖膠片，若出現清晰之 28S rRNA 和 18S rRNA 兩條條帶 (Band)，則可確認 RNA 片段之完整。



表 3-4 RNA 電泳使用之試劑配方

BTPE (Bis-Tris, PIPES, EDTA) buffer (10 X)		Glyoxal reaction mix	
Bis-Tris	32.0408 g	DMSO	0.6 mL
PIPES	15.22175 g	Glyoxal (6 M)	0.2 mL
EDTA (0.5M, pH 8)	1 mL	BTPE buffer (10X)	0.12 mL
DEPC	0.5 mL	EtBr (10 mg/mL)	0.02 mL
以超純水定量至 500 mL， 37°C 下培養一小時後進行 autoclave		Glycerol	0.048 mL
		溶於 1 mL 去離子水	

### 3.7.4 反轉錄

自純化後之 RNA 樣品取出 1  $\mu$ g RNA，以 High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit 進行反轉錄，控溫步驟使用 Tpersonal Thermocycler (實驗步驟詳見原廠操作手冊)。反應完成後之 cDNA 樣品置於  $-20^{\circ}\text{C}$  冰箱中保存。

### 3.7.5 即時定量聚合酶鍊鎖反應

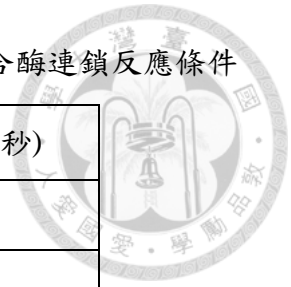
將 cDNA 樣品稀釋 10 倍後，以 Power SYBR<sup>®</sup> Green PCR Master Mix 及 StepOne<sup>™</sup> Real-Time PCR Systems 進行即時定量聚合酶連鎖反應 (除因樣品較少而將操作體積由 50  $\mu$ L 減少至 20  $\mu$ L 外，實驗步驟如原廠操作手冊)。本實驗共測定 1 個參考基因 (*rpl7*) 及 9 個目標基因，每樣品每基因測定二重複。使用之引子序列如表 3-5 所示。PCR 反應條件為 StepOne<sup>™</sup> Real-Time PCR Systems 預設程序，如表 3-6 所示。實驗結果以  $\Delta\Delta\text{CT}$  法計算所有處理組相較於控制組之表現倍數。

表 3-5 引子序列

基因	引子序列 (F: 前置、R: 後置, 5'→3')		來源
<i>rpl7</i>	F	CGCCAGATCTTCAACGGTGTAT	Zhang, et al., 2008
	R	AGGCTCAGCAATCCTCAGCAT	
<i>cyp17a</i>	F	CCCCTGGTTACAGATTTTCCC	Zhang, et al., 2008
	R	TGCAGCAGCTGGTCTCTAACTG	
<i>vtg1</i>	F	CTCCAGCTTTGAGGCCATTTAC	Zhang, et al., 2008
	R	ACAGCACGGACAGTGACAACA	
<i>cyp1a</i>	F	CAGGAGAGCCTTTGGACTTG	Hong, et al., 2007
	R	ATGCCATCGAATCTGACACA	
<i>cyp3a38</i>	F	AGGAAACAGAGATCCCCTTCGA	Zhang, et al., 2008
	R	AGGCACCAGCTTCAGAAAGATG	
<i>cyp3a40</i>	F	AGATGGATGTCCAGGGTTTCC	陳冠雯, 2011
	R	GGCGTGAGCTTCAGTTGGAT	
<i>sod</i>	F	CGTGCTTGCCTGGTGTGA	Woo, et al., 2009
	R	GCGATTCAGCCCCTGTGA	
<i>cat</i>	F	GCGGTACAACAGCGCAGATGAA	Woo, et al., 2009
	R	GGATGGACGGCCTTCAAGTTCT	
<i>gpx</i>	F	CATCATCACCAACGTTGCCTC	Woo, et al., 2009
	R	CTTACTGAACAGATCAAAATG	
<i>gst</i>	F	CACGGCCATCCTGAAATACCT	Woo, et al., 2009
	R	GTCAGCCGGGAACCAATGAT	

表 3-6 StepOne™ Real-Time PCR Systems 預設之即時定量聚合酶連鎖反應條件

步驟	溫度 (°C)	時間 (秒)
Holding	95	600
Cycling (40 cycles)	95	15
	60	60
Melting Temperature	95	15
	60	60
	95	15







### 3.8 組織病理分析

#### 3.8.1 石蠟切片製作

本研究將保存於 10% 中性福馬林之魚體軀幹樣本，委託國立臺灣大學獸醫學系切片室進行石蠟切片製作及染色。

後續石蠟切片製作包含脫水 (Dehydration)、透明 (Clearing)、浸潤 (Infiltration)、包埋和薄切片。首先以酒精除去組織內的水分，再藉與石蠟互溶的溶劑 (如二甲苯取代劑) 取代酒精，使組織成透明狀，經過處理後的組織再依序移入軟石蠟 (熔點 45-55°C) 和硬石蠟 (熔點 56-60°C) 浸潤，最後包埋成石蠟塊 (Paraffin block) 以便薄切，本實驗組織切片之厚度為 5  $\mu\text{m}$ 。以自動儀器處理組織時間及步驟如表 3-7。

表 3-7 自動儀器處理組織時間及步驟

1	水	30 分鐘	浸洗
2	70% 酒精	1 小時	脫水
3	80% 酒精	1 小時	脫水
4	95% 酒精	1 小時	脫水
5	95% 酒精	2 小時	脫水
6	100% 酒精	1 小時	脫水
7	100% 酒精	1 小時	脫水
8	100% 酒精	2 小時	脫水
9	二甲苯取代劑	1 小時	透明
10	二甲苯取代劑	2 小時	透明
11	石蠟	1 小時	浸潤
12	石蠟	2 小時	浸潤

### 3.8.2 石蠟切片染色

本實驗為觀察青鱈魚組織形態，選用蘇木紫與伊紅染色 (Hematoxylin and eosin staining, H&E) 協助觀察。H&E 染色利用蘇木紫及伊紅分別將細胞核及細胞質染色，可顯示魚體組織結構變化並保持細胞原有的形態。以自動儀器進行 H&E 染色步驟如表 3-8。

表 3-8 自動儀器進行 H&E 染色步驟

1	二甲苯取代劑	5 分鐘
2	二甲苯取代劑	5 分鐘
3	二甲苯取代劑	5 分鐘
4	100% 酒精	30 秒
5	100% 酒精	30 秒
6	95% 酒精	30 秒
7	80% 酒精	30 秒
8	清洗	1 分鐘
9	去離子水	30 秒
10	蘇木紫 (Hematoxylin)	1 分鐘
11	清洗	1 分鐘
12	碳酸鋰 ( $\text{LiCO}_3$ )	40 秒
13	清洗	5 分鐘
14	80% 酒精	30 秒
15	伊紅 (Eosin)	3 分鐘
16	95% 酒精	30 秒
17	100% 酒精	1 分鐘
18	100% 酒精	1 分鐘
19	100% 酒精	1 分鐘
20	二甲苯取代劑	2 分鐘
21	二甲苯取代劑	3 分鐘
22	二甲苯取代劑	5 分鐘

### 3.8.3 切片觀察

控制組和各濃度 DEHP 處理組各挑選兩隻雌魚和兩隻雄魚進行切片製作，以魚體軀幹進行縱切，於厚度 0.8 mm 至 2.25 mm 之間平均取 10 片切片進行染色。製備及染色完成之切片，參考前人文獻判定性腺組織形態變化 (Dietrich and Krieger, 2009)。性腺組織標準形態如圖 3-5 (雌魚卵巢)、圖 3-6 (雄魚睪丸) 所示，不同發育階段之卵巢卵泡和睪丸精細胞則如圖 3-7，雌魚卵泡發育順序依序為週邊核仁期 (Perinucleolar oocyte, PO)、表層囊泡期 (Cortical-alveolar oocyte, CO)、卵黃生成前期 (Early vitellogenic oocyte, EV)、卵黃生成後期 (Late vitellogenic oocyte, LV)、成熟卵子 (Mature oocyte, MO)，而排卵後之濾泡會形成黃體 (Corpus atreticum)。而雄魚生殖細胞發育順序依序為精原細胞 (Spermatogonia, SG)、精母細胞 (Spermatocyte, SC)、精細胞 (Spermatids, ST) 和精子 (Spermatozoa, SZ)。

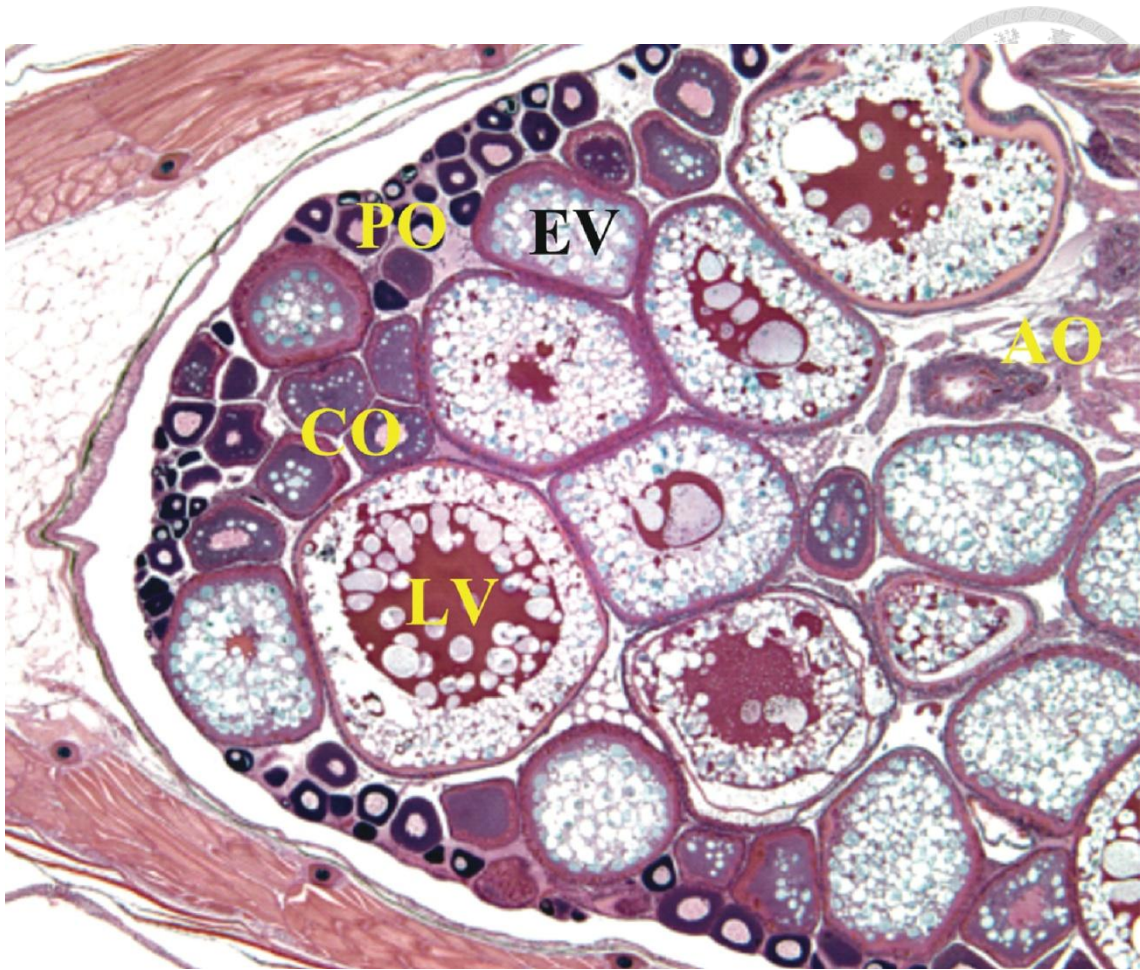


圖 3-5 青鱗魚雌魚卵巢組織形態

PO, perinucleolar oocyte; CO, cortical-alveolar oocyte; EV, early vitellogenic oocyte; LV, late vitellogenic oocyte; AO, atretic oocyte

(Dietrich and Krieger, 2009)

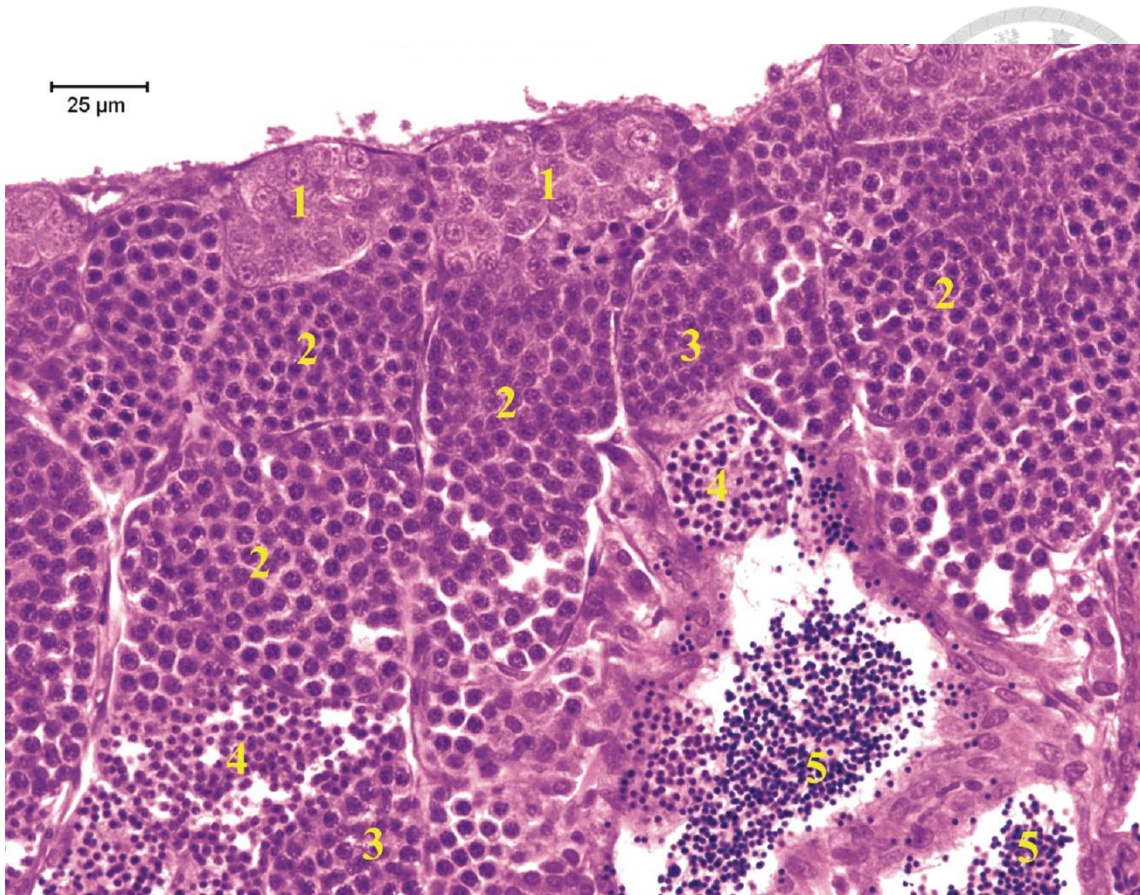


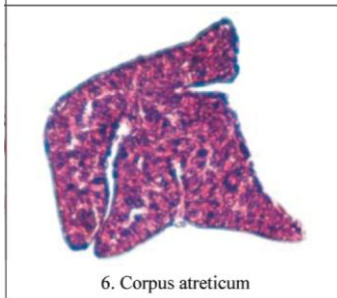
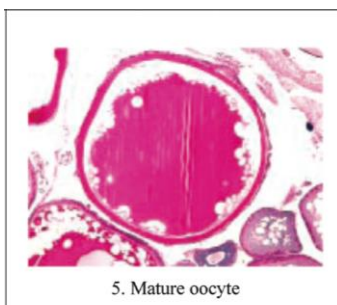
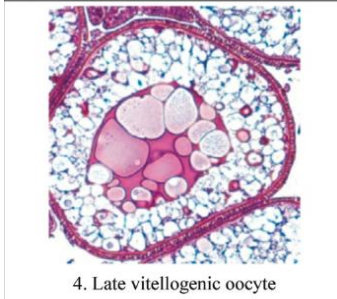
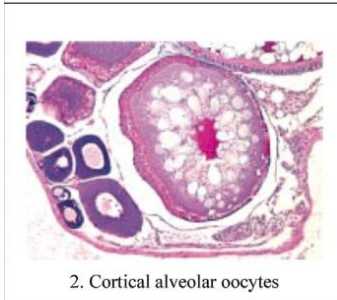
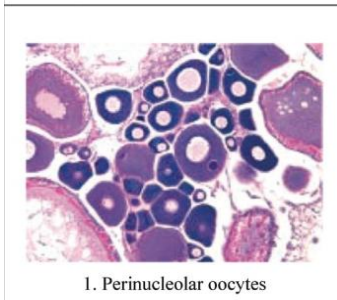
圖 3-6 青鱗魚雄魚睪丸組織形態

1, spermatogonia; 2, early primary spermatocyte; 3, late primary spermatocyte (dividing diplotene) or secondary spermatocyte; 4, spermatids; 5, spermatozoa

(Dietrich and Krieger, 2009)



(A)



(B)

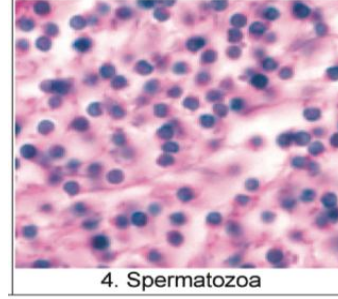
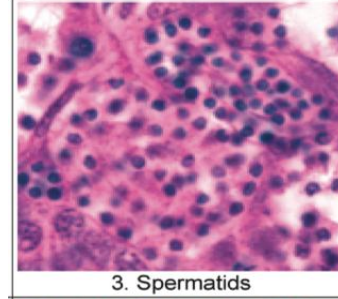
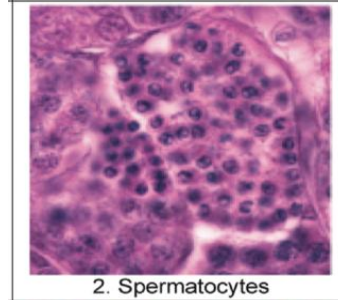
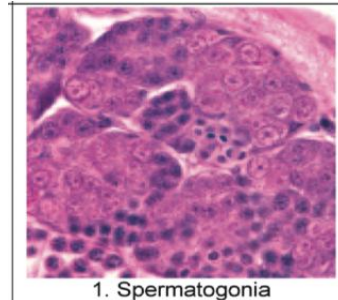


圖 3-7 不同發育階段生殖細胞形態變化

(A) 雌魚卵巢之卵泡

(B) 雄魚睪丸之生殖細胞

(Dietrich and Krieger, 2009)



### 3.9 暴露溶液濃度分析

#### 3.9.1 暴露溶液樣品配製

依 3.4.1 之方法配製 20、100 及 200  $\mu\text{g/L}$  之 DEHP 溶液，並在生殖毒性暴露實驗期間第一週和第二週各取樣一天，採取當日製備之暴露溶液作為水樣，每個濃度隨機採取兩重複，以確保青鱒魚暴露之 DEHP 濃度符合預期。採得之水樣先經固相萃取 (Solid phase extraction, SPE) 方法濃縮後，再以高效液相層析儀 (High-performance liquid chromatography, HPLC) 分析溶液中 DEHP 之濃度，詳細分析條件如下所述。

#### 3.9.2 樣品前處理及固相萃取

固相萃取步驟參考前人文獻及環檢所公告方法並加以修改 (Garrido Frenich, et al., 2009, 行政院環境保護署環境檢驗所, 2004)。先將 100 mL 水樣調酸至  $\text{pH} = 2.2$  備用，接著依序使用 5 mL 二氯甲烷 (Dichloromethane)、5 mL 甲醇和 4 mL 超純水來平衡及活化 Oasis HLB 固相萃尿管柱 (圖 3-8)，之後將已調酸水樣分次倒入固相萃尿管柱，以抽氣幫浦控制壓力，調節水樣流速至 10 mL/min，待所有水樣通過管柱後，持續抽氣使固相萃尿管柱乾燥 30 分鐘，接著依序利用 4 mL 甲醇和 4 mL 二氯甲烷將 DEHP 洗出 (Elution)，將收集之洗出液進行吹氮濃縮，最後以甲醇將濃縮之樣品定量至 5 mL。經固相萃取處理後之樣品其 DEHP 濃度為原水樣之 20 倍。



圖 3-8 固相萃取所使用之管柱和玻璃萃取匣 (Waters)

### 3.9.3 高效液相層析儀分析條件

使用固相萃取後之樣品進行上機，HPLC 分析條件參考前人文獻並加以修改 (Wang, et al., 2011)。分析之移動相 (Mobile phase) 比例為 95% 甲醇和 5% 超純水，流速為每分鐘 1 mL，層析管柱 (靜相, Stationary phase) 為 Purospher® STAR RP-18e 5 $\mu$ m 250-4 (Merck)，管柱溫度設定為 40°C，樣品注射體積為 20  $\mu$ L，每一樣品之分析時間為 10 分鐘。光二極體陣列檢測器 (Photodiode array detector, PDAD) 之測定波長為 190 – 400 nm，監測波長則為 228 nm。

### 3.9.4 檢量線之建立

以 100 % 甲醇將 DEHP 標準品序列稀釋為 0.1、0.25、0.5、1、2、5 mg/L 之標準溶液，作為檢量線標準品。以高效液相層析儀進行分析，DEHP 之峰值約在滯留時間 (Retention time) 6 分鐘時出現，由各濃度標準品所得之積分面積為 y 軸、濃度為 x 軸，求得線性迴歸方程式及決定係數 ( $R^2$ )，每次分析所使用之線性迴歸方程式其  $R^2$  均大於 0.995。暴露溶液則以 DEHP 峰值之積分面積代入檢量線後，推得 DEHP 濃度。



### 3.10 統計分析

本實驗以 Statistical product and service solutions (SPSS, version 17.0) 軟體進行。先以 Levene's test 同質性檢定確認變異數是否同質，若變異數同質則以單因子變方分析 (One-way analysis of variance, one-way ANOVA) 檢定組內是否有差異，若有顯著差異，則以 Dunnett's test 進行事後檢定來比較處理組和控制組之間的差異；若變異數不同質，則以 Welch ANOVA 檢定組內是否有差異，再以 Dunnett's T3 進行事後檢定。顯著水準定為  $*$ ： $p < 0.05$ ，圖表中未標示 $*$ 則代表處理組與控制組之間均無差異。實驗數據以平均值  $\pm$  標準誤 (Standard error, SE) 呈現。

## 4. 結果與討論



### 4.1 暴露溶液濃度分析結果

本研究以高效液相層析儀 (HPLC) 分析經固相萃取 (SPE) 濃縮 20 倍之暴露溶液，以確認溶液中 DEHP 濃度符合預期。觀察不同濃度 DEHP 標準品之波峰變化情況，可發現滯留時間 5.8 分鐘之波峰面積和 DEHP 濃度變化呈線性相關。圖 4-1 即為檢量線標準品及 DEHP 溶液之液相層析圖譜。除此之外，可藉由光二極體陣列偵測器 (Photodiode array detector, PDAD) 監測波長為 228 nm 下之吸收光圖譜，觀察滯留時間為 5.8 分鐘之訊號，發現 DEHP 溶液之吸收光圖譜與標準品一致 (圖 4-2)，更進一步確認後續 DEHP 定性定量之準確性。

在生殖毒性暴露實驗期間第一週和第二週各取樣一天進行 DEHP 濃度分析，由不同濃度標準品所得之積分面積為 y 軸、濃度為 x 軸，求得線性迴歸方程式及決定係數 ( $R^2$ )，兩批次所求得之決定係數皆大於 0.995 (表 4-1)。

20  $\mu\text{g/L}$  處理組中測得之 DEHP 濃度約 18  $\mu\text{g/L}$ ，100  $\mu\text{g/L}$  處理組測值約為 107  $\mu\text{g/L}$ ，200  $\mu\text{g/L}$  處理組則測得約 174  $\mu\text{g/L}$  DEHP (表 4-2)，分析結果和預測濃度十分相近，且符合文獻回顧中 DEHP 之環境流布濃度範圍。DEHP 在水體中安定不易揮發及水解，半衰期為數週至數月，且實驗設計每日更新 80% 暴露溶液，可確保實驗期間青鱗魚暴露劑量之穩定。

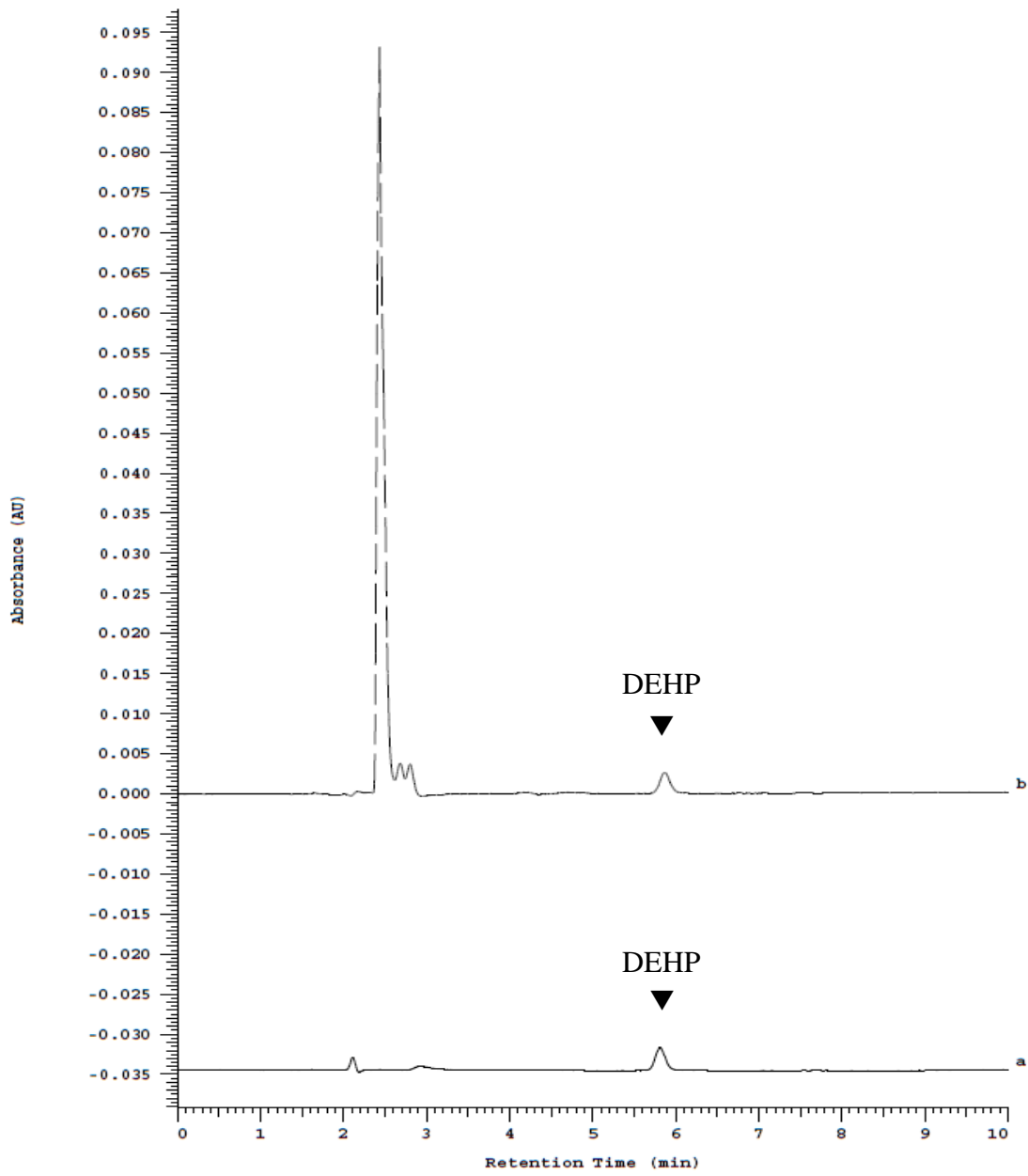


圖 4-1 DEHP 暴露溶液之高效液相層析圖譜

(a) 2 mg/L 標準品 (b) 經固相萃取濃縮 20 倍之 100 µg/L 暴露溶液樣品

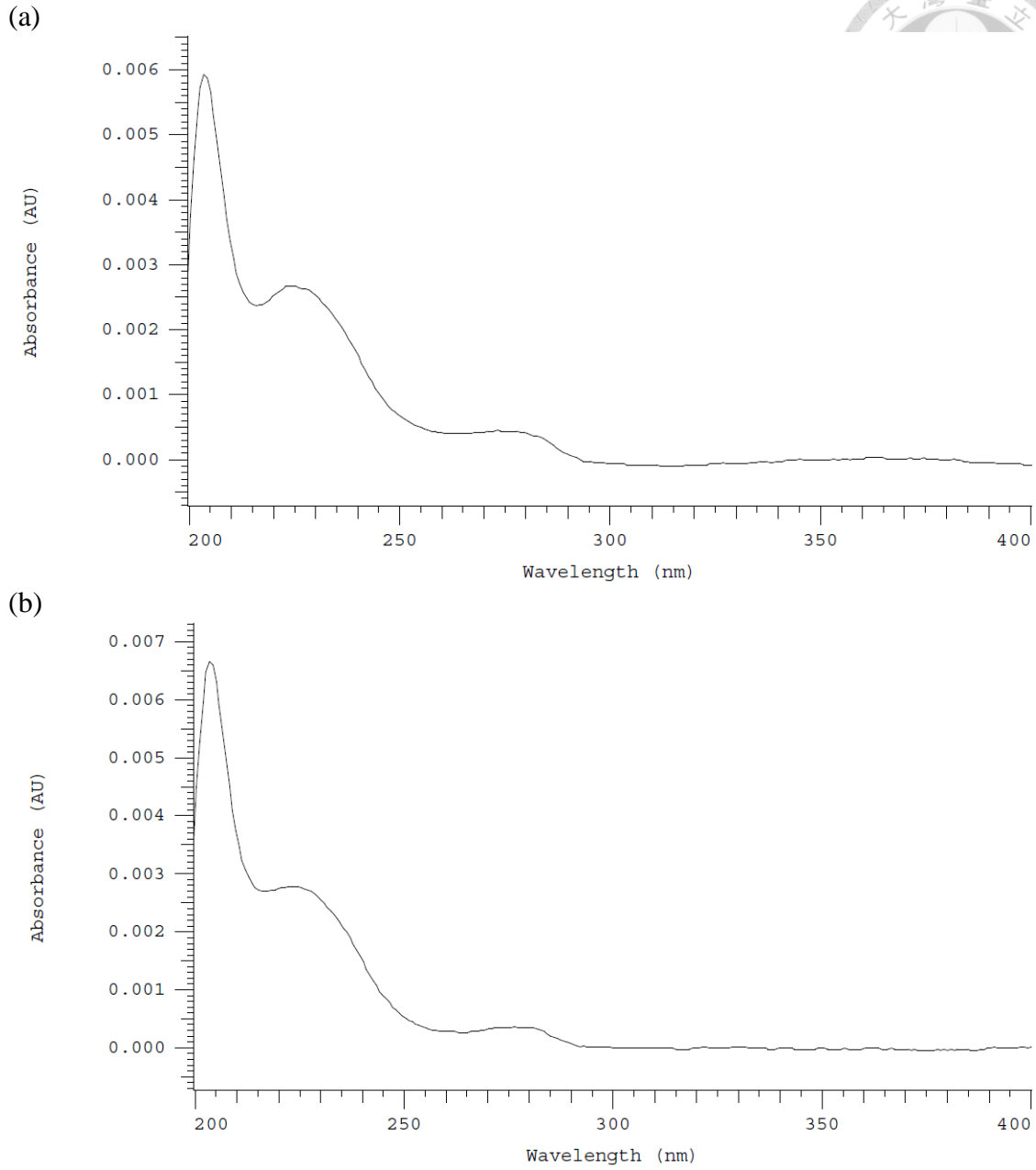


圖 4-2 經液相層析分離之 DEHP 溶液以光二極體陣列檢測器檢測之吸光圖譜

(a) 2 mg/L 標準品 (b) 經固相萃取濃縮 20 倍之 100 µg/L 暴露溶液樣品



表 4-1 DEHP 之檢量線

批次	線性迴歸方程式	決定係數 ( $R^2$ )
1	$y = 5793.1x + 341.78$	1
2	$y = 6048.6x + 344.76$	0.9995

y 為積分面積，x 為 DEHP 之濃度 (mg/L)

表 4-2 DEHP 暴露溶液濃度分析結果 (HPLC/PDA)

Nominal concentration ( $\mu\text{g/L}$ )	Measured concentration ( $\mu\text{g/L}$ )
VC	N.D.
20	$17.61 \pm 1.44$
100	$106.62 \pm 17.83$
200	$174.44 \pm 16.01$


Data shows as mean  $\pm$  SE ( $n = 4$ ); VC, vehicle control (0.01% acetone); N.D., not detected.

## 4.2 生殖能力指標結果

本實驗觀察青鱒魚的親代產卵量、子代受精率、孵化率、死亡率作為生殖能力的代表指標。於暴露實驗第 16 天開始每日收集每對成魚之產卵量，逐日累積產卵量結果如圖 4-3 所示。控制組於第 16 天到第 21 天之累積產卵量為平均每對 64 顆，20  $\mu\text{g/L}$  處理組為平均每對 46 顆，100  $\mu\text{g/L}$  處理組為平均每對 35 顆，200  $\mu\text{g/L}$  處理組則為平均每對 37 顆。統計分析結果顯示，100  $\mu\text{g/L}$  和 200  $\mu\text{g/L}$  DEHP 處理組之累積產卵量顯著低於控制組，說明 DEHP 暴露會減少青鱒魚的產卵量。實驗期間觀察青鱒魚的產卵情形，發現同一對青鱒魚之產卵數量每日皆會變動。若隨機選取單日產卵量數據，仍可發現控制組產卵量顯著高於 DEHP 處理組，且控制組產卵數量之變動幅度較 DEHP 處理組小。以暴露實驗第 21 天之單日產卵量為例，控制組為平均每對 13 顆，20  $\mu\text{g/L}$  處理組為平均每對 9 顆，100  $\mu\text{g/L}$  和 200  $\mu\text{g/L}$  處理組皆為平均每對 6 顆。20  $\mu\text{g/L}$  處理組之產卵量約較控制組減少 30%，100  $\mu\text{g/L}$  和 200  $\mu\text{g/L}$  處理組約較控制組減少 50% (圖 4-4)。

每日收集之胚胎持續培養直至孵化，各處理組計算所得之受精率、孵化率、死亡率如表 4-3 所示。由於實驗使用之青鱒魚為 FLFII 品系，其雌魚體表缺少白色素細胞 (leucophore)，當胚胎發育五至七天，即可在螢光顯微鏡下觀察有無螢光產生以判定性別 (無螢光產生則為雌性)，計算子代性別比例 (表 4-3)。暴露實驗第 16 天到第 21 天總計分析胚胎數如下：控制組 512 顆 ( $n = 8$ )，20  $\mu\text{g/L}$  處理組 320 顆 ( $n = 7$ )，100  $\mu\text{g/L}$  處理組 276 顆 ( $n = 8$ )，200  $\mu\text{g/L}$  處理組 294 顆 ( $n = 8$ )。統計分析結果顯示，處理組之受精率、孵化率、死亡率和性別比例和控制組相比皆沒有顯著差異。

從文獻回顧中可以發現，DEHP 對生殖的影響是最早受到關注的生物效應，而生殖作用對物種的繁衍存續十分重要。本研究觀察到 DEHP 抑制魚類產卵量的現象，與許多前人文獻結果一致。水體暴露 0.02-40  $\mu\text{g/L}$  DEHP 三週的雌性斑馬魚 (Zebrafish, *Danio rerio*)，和未處理之雄魚配對兩週，結果發現產卵量顯著減少 50% 以上 (Carnevali, et al., 2010)。另一以雄性斑馬魚進行 0.2-20  $\mu\text{g/L}$  DEHP 水體暴露三週的實驗，暴露結束後和未處理之雌魚配對兩週，結果也觀察到產卵量減少的現象，但每日產卵數目變異極大 (Corradetti, et al., 2013)。以人造海水進行長期 DEHP 暴露的研究也有相同的發現，該實驗將孵化一週的海水青鱒魚 (Marine



medaka, *Oryzias melastigma*) 暴露 0.1、0.5 mg/L DEHP 或 0.1、0.5 mg/L MEHP (DEHP 之主要代謝產物) 達六個月，再選取雄魚和雌魚分別和未處理的雌魚和雄魚進行配對，並計算產卵數，結果顯示 DEHP 處理組之產卵量和控制組相比顯著減少約 1/3，MEHP 處理組則和控制組沒有顯著差異 (Ye, et al., 2014)。但上述研究皆未分析暴露溶液之濃度，且物種、性別和暴露條件的差異使得生物效應比較和作用機制探討更加複雜。

本研究結果發現 100 µg/L 和 200 µg/L DEHP 會顯著減少青鱒魚的產卵量，而 20 µg/L 的處理組雖然和控制組沒有顯著差異，但在暴露實驗期間，20 µg/L 的處理之平均單日產卵量皆少於控制組，顯示低濃度 DEHP 仍可能造成生殖毒性。由於 20 µg/L 和 100 µg/L 皆在 DEHP 的環境流布濃度範圍內，因此對魚類族群或環境生態的潛在危害不容忽視。

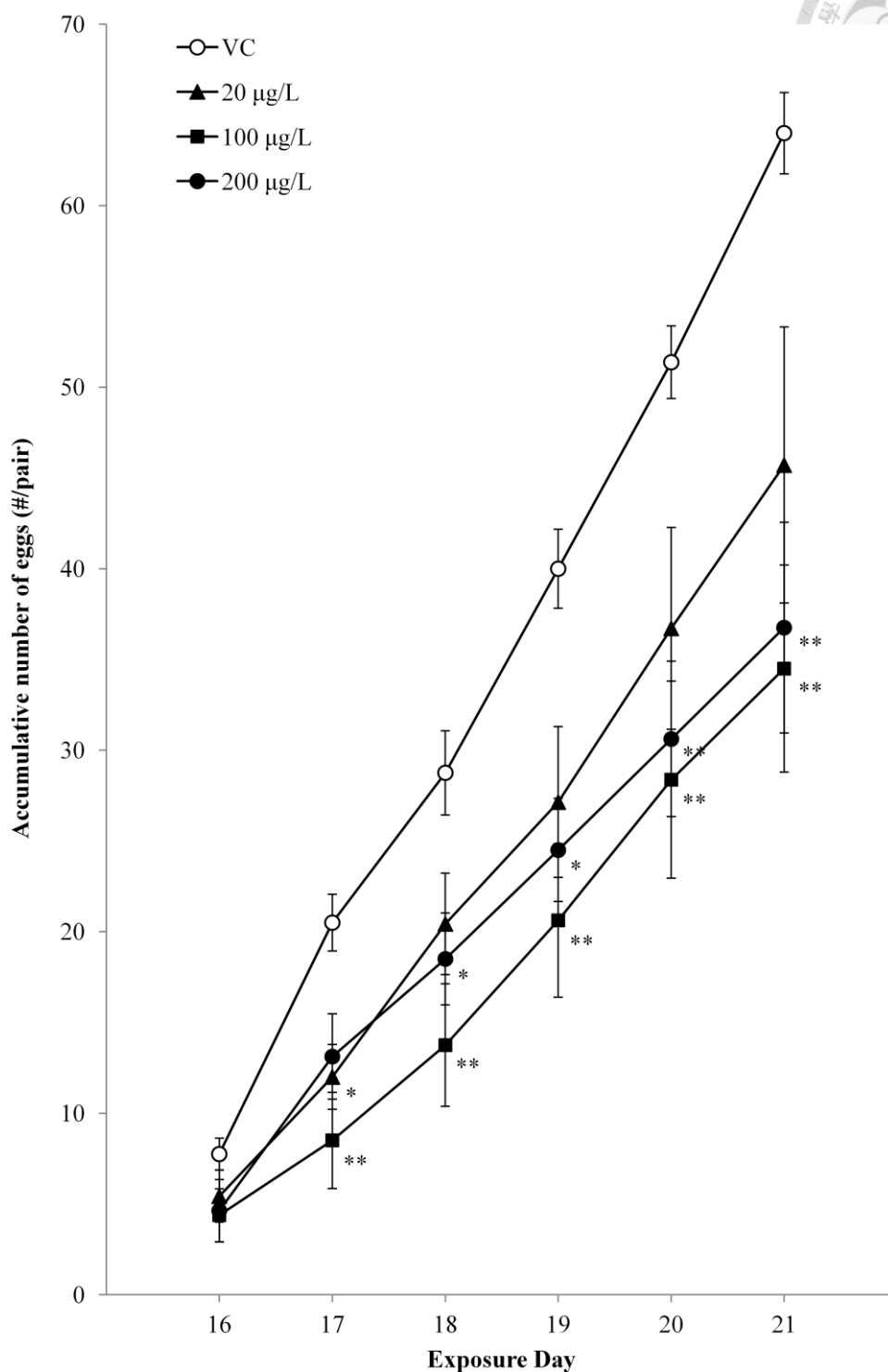


圖 4-3 青鱒魚暴露 DEHP 之累積產卵量變化

數據以 mean  $\pm$  SE ( $n = 7-8$ ) 呈現。\* 表示與當日控制組之累積產卵量有顯著差異

(\* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ )。



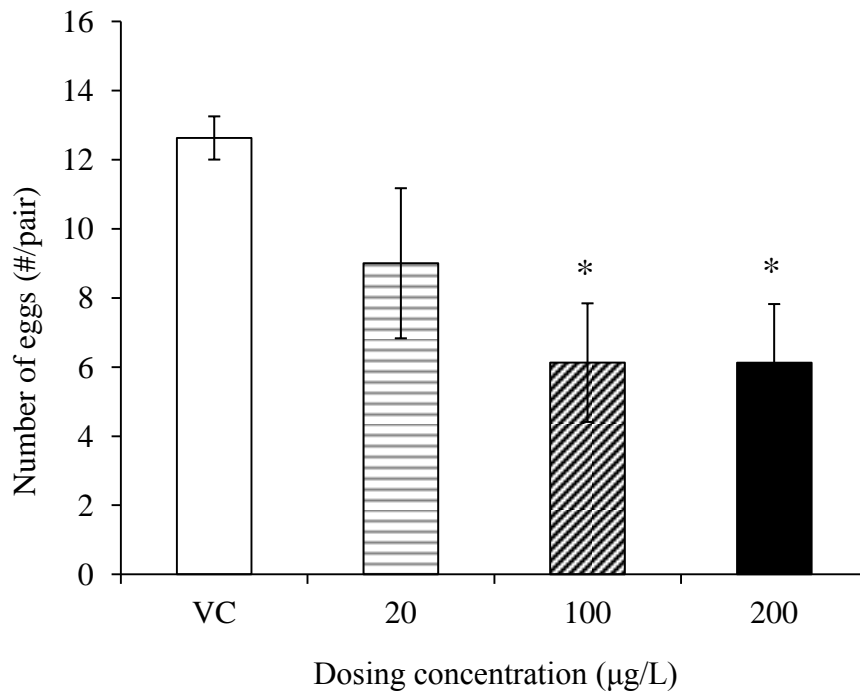
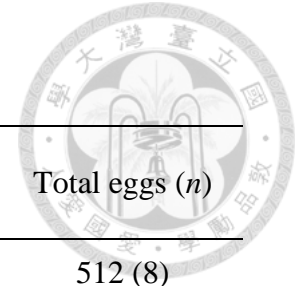


圖 4-4 青鱒魚暴露 DEHP 第 21 日單日產卵量

數據以  $\text{mean} \pm \text{SE}$  ( $n = 7-8$ ) 呈現。\*表示與控制組之產卵量有顯著差異 ( $*p < 0.05$ )。

表 4-3 青鱈魚暴露 DEHP 第 16 至 21 日期間之子代受精率、孵化率及性別比例平均表現



Concentration ( $\mu\text{g/L}$ )	Fertilization rate <sup>[1]</sup> (%)	Mortality rate <sup>[2]</sup> (%)	Hatchability <sup>[3]</sup> (%)	Female/Male ratio <sup>[4]</sup>	Total eggs ( <i>n</i> )
VC	85.10 $\pm$ 1.73	3.76 $\pm$ 1.50	96.24 $\pm$ 1.50	1.33 $\pm$ 0.02	512 (8)
20	83.47 $\pm$ 6.83	6.51 $\pm$ 2.69	93.49 $\pm$ 2.69	1.28 $\pm$ 0.03	320 (7)
100	71.04 $\pm$ 11.19	15.38 $\pm$ 7.67	84.62 $\pm$ 1.67	1.47 $\pm$ 0.01	276 (8)
200	92.05 $\pm$ 1.74	4.05 $\pm$ 1.98	95.95 $\pm$ 1.98	1.55 $\pm$ 0.07	294 (8)

Data shows as mean  $\pm$  SE (*n* = 7-8 pairs) during day 16-21; VC, vehicle control (0.01% acetone)

<sup>[1]</sup> Fertilized embryo / total embryos per pair

<sup>[2]</sup> Dead embryos / fertilized embryos per pair

<sup>[3]</sup> Hatchlings / fertilized embryos per pair

<sup>[4]</sup> The sex ratio of F1 generation is based on the total hatchlings of each group



### 4.3 內分泌相關指標結果

#### 4.3.1 肝體比 (HSI)

本研究於 21 天 DEHP 暴露實驗結束後，分別測量雌雄魚的肝臟重及體重並計算 HSI。結果顯示，雌魚之 HSI 皆高於雄魚，但無論雌魚或雄魚其 HSI 在所有處理組之間皆沒有顯著差異 (表 4-4)。

肝體比是常見的形態指標，定義為肝臟重量/魚隻體重  $\times 100$  (Slooff, et al., 1983)，當魚隻暴露到環境污染物而引起肝臟腫大或肝臟疾病時，即會反應在肝體比指標上。當肝體比增加，有可能是肝臟細胞體積增大或肝臟細胞數目增生，過去已有許多研究指出，暴露多氯聯苯 (Polychlorinated biphenyl, PCBs)、有機氯農藥 (Organochlorine pesticides, OCPs) 或多環芳香烴 (Polycyclic aromatic hydrocarbons, PAHs) 等污染物，會造成 HSI 顯著變化 (van der Oost, et al., 2003)。整體而言，HSI 指標較不敏感，也容易受污染源外的其他因子如季節、疾病、營養供給所影響，而幼魚由於體重較輕，其 HSI 指標反應會較成魚敏感。

在前人研究中，以腹腔注射暴露 5000 mg/kg DEHP 的雄性斑馬魚，其 HSI 顯著提升 (Uren-Webster, et al., 2010); 小鼠的暴露實驗中，以口服暴露 1% 或 2% DEHP 時，會出現肝臟腫大的現象，造成肝臟毒性 (Ishihara, et al., 2000)。本實驗中 HSI 無顯著變化，可能是使用之暴露劑量為環境相關濃度，遠低於前人使用之劑量，故 HSI 無明顯效應。

表 4-4 青鱈魚暴露 DEHP 21 天後之肝體比

(a) Female

Concentration (µg/L)	Body weight (mg)	Liver weight (mg)	HSI
VC	240.15 ± 4.40	7.27 ± 0.28	3.03 ± 0.10
20	233.94 ± 13.17	6.22 ± 0.65	2.63 ± 0.19
100	264.18 ± 13.34	7.42 ± 0.72	2.76 ± 0.18
200	245.29 ± 11.56	6.73 ± 0.71	2.70 ± 0.22

(b) Male

Concentration (µg/L)	Body weight (mg)	Liver weight (mg)	HSI
VC	234.45 ± 9.42	3.53 ± 0.27	1.49 ± 0.07
20	255.11 ± 7.37	4.19 ± 0.32	1.63 ± 0.09
100	250.50 ± 11.45	3.57 ± 0.42	1.42 ± 0.14
200	251.18 ± 13.10	4.39 ± 0.46	1.65 ± 0.13

Data shows as mean ± SE ( $n = 7-8$ ); VC, vehicle control (0.01% acetone)

HSI = liver weight / body weight × 100





#### 4.3.2 血清中性荷爾蒙含量分析結果


本研究測量了雌雄魚血清中的 Estradiol 和 Testosterone 濃度，以及雄魚血清中的 11-Ketotestosterone (表 4-5)，結果顯示，雌魚之 Estradiol 濃度約為雄魚之十倍以上，Testosterones 濃度在性別之間差異不大，而雄魚之 11-Ketotestosterone 濃度隨著 DEHP 暴露劑量些為提升。但統計分析結果顯示所有 DEHP 處理組的性荷爾蒙濃度與控制組皆沒有顯著差異。

性荷爾蒙屬於固醇類荷爾蒙，由生物體內的膽固醇 (Cholesterol) 經由一系列酵素的催化與修飾來合成，在性荷爾蒙合成途徑中，最先合成的為 Testosterone，而 Testosterone 經由不同細胞色素 P450 家族 (Cytochrome P450 family) 的酵素作用即可轉化為 Estradiol 或 11-Ketotestosterone，兩者分別為魚類最主要的雌激素和雄激素。

近年來，越來越多污染物被發現具有環境荷爾蒙的特性，根據美國環保署報告中所下之定義，「環境荷爾蒙」是指「干擾負責維持生物體內恆定、生殖、發育或行為的內生荷爾蒙之外來物質，影響荷爾蒙的合成、分泌、傳輸、結合、作用及排除」(Kavlock and Ankley, 1996)。性荷爾蒙為內分泌系統中重要的一環，生物體藉由性荷爾蒙的產生與作用來調控與生殖相關的各項生理功能，例如精細胞和卵細胞的發育，故污染物和性荷爾蒙的交互作用為毒理研究的重要項目之一。

回顧近年來探討 DEHP 暴露和魚類性荷爾蒙變化的文獻，不同文獻所發現的效應也不盡相同。利用雄性胖頭鱒魚 (Fathead minnow, *Pimephales promelas*) 暴露 12  $\mu\text{g/L}$  DEHP 一個月後，雄魚血清中 Estradiol 濃度顯著低於控制組，但 Testosterone 濃度沒有變化 (Crago and Klaper, 2012)。稀有鮎鯽 (Chinese rare minnow, *Gobiocypris rarus*) 暴露 DEHP 21 天後，39.4-117.6  $\mu\text{g/L}$  DEHP 處理的雌魚和雄魚其血清 Testosterones 濃度皆顯著高於控制組；但在血清 Estradiol 濃度方面，12.8-117.6  $\mu\text{g/L}$  DEHP 處理的雌魚其濃度顯著降低，39.4-117.6  $\mu\text{g/L}$  DEHP 處理的雄魚卻顯著提升 (Wang, et al., 2013)。暴露 0.1 和 0.5  $\text{mg/L}$  DEHP 六個月的海水青鱒魚 (Marine medaka, *Oryzias melastigma*)，雄魚血清中的 Estradiol 濃度顯著提升，Testosterone 則沒有變化；0.1  $\text{mg/L}$  DEHP 處理的雌魚其 Estradiol 同樣也顯著上升，但 0.5  $\text{mg/L}$  DEHP 處理的雌魚卻是 Testosterone 顯著提升 (Ye, et al., 2014)。

細胞試驗也同樣呈現分歧的結果。利用小鼠卵巢內的有腔濾泡進行培養，在培養基中添加 DEHP 培養 96 小時後，以酵素連結免疫吸附分析 (Enzyme-linked



Immunosorbent Assay, ELISA) 分析培養基中的 Estradiol 濃度,發現 10 和 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  DEHP 的處理測得之 Estradiol 顯著低於控制組,且呈劑量—反應關係 (Gupta, et al., 2010)。另一實驗以人類腎上腺皮質癌細胞株 (Human adrenocortical carcinoma cell, H295R), 此細胞株內含性荷爾蒙合成所需的完整酵素,同樣在培養基添加 DEHP 培養 48 小時後,以 ELISA 分析培養基中的 Estradiol 與 Testosterone, 結果顯示, 1-10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  DEHP 的處理測得之 Estradiol 濃度顯著高於控制組,且呈劑量—反應關係;而 0.01-10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  DEHP 的處理測得之 Testosterone 濃度皆顯著低於控制組 (Mankidy, et al., 2013)。

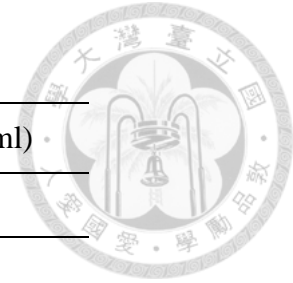
從上述文獻回顧可以發現,DEHP 對荷爾蒙的影響至今尚未釐清,不同文獻甚至指出完全相悖的結論。魚類血清中的性荷爾蒙在生殖週期 (Reproduction cycle) 內本來就會有濃度上的變化 (圖 2-9),以雌魚為例,卵黃發育 (Vitellogenesis) 時期 Estradiol 會逐漸上升,但在排卵 (Ovulation) 前 Estradiol 和 Testosterone 濃度皆會下降 (Kime, 1993)。在探討性荷爾蒙與生殖作用的關係時,應先確認該物種的生殖週期,時間因素有可能是上述文獻結果相異的原因之一。

本實驗中 DEHP 處理組之性荷爾蒙濃度與控制組沒有顯著差異,顯示 DEHP 不是藉由調控荷爾蒙濃度來影響青鱈魚生殖作用。除此之外,DEHP 對魚類主要雄激素 11-Ketotestosterone 的影響,目前的相關研究較少,本實驗之數據對魚類血清性荷爾蒙濃度提供了較全面的資訊。

表 4-5 青鱈魚暴露 DEHP 21 天後血清中性荷爾蒙濃度

Concentration ( $\mu\text{g/L}$ )	Estradiol (ng/ml)		Testosterone (ng/ml)		11-Ketotestosterone (ng/ml)
	Female	Male	Female	Male	Male
VC	$8.48 \pm 2.96$	$0.66 \pm 0.24$	$1.48 \pm 0.19$	$1.33 \pm 0.28$	$0.81 \pm 0.28$
20	$8.56 \pm 3.17$	$0.75 \pm 0.13$	$1.15 \pm 0.18$	$1.82 \pm 0.33$	$1.69 \pm 0.20$
100	$9.47 \pm 0.63$	$0.63 \pm 0.14$	$1.36 \pm 0.18$	$1.83 \pm 0.30$	$1.76 \pm 0.40$
200	$8.33 \pm 2.19$	$0.68 \pm 0.13$	$1.42 \pm 0.14$	$2.40 \pm 0.52$	$2.00 \pm 0.63$

Data shows as mean  $\pm$  SE ( $n = 3-4$ ; each sample contains blood from 2 fish); VC, vehicle control (0.01% acetone)





### 4.3.3 內分泌相關基因表現量

前述結果顯示 DEHP 會減少青鱈魚的產卵量，接著希望藉由內分泌相關基因表現的變化，來了解 DEHP 的可能作用機制或其他生理影響。

本研究分析了青鱈魚肝臟中 *cyp1a*、*cyp3a38* 和 *cyp3a40* 的基因表現量 (圖 4-5 A、B、C)，結果顯示，在暴露 100 和 200  $\mu\text{g/L}$  DEHP 21 天後，雌魚肝臟中 *cyp1a* 和 *cyp3a40* 的基因表現量皆被抑制 (200  $\mu\text{g/L}$  DEHP 處理的雌魚，其 *cyp3a40* 的基因表現量和控制組相比雖未達顯著，但 Dunnett's test 統計之  $p$  值達 0.075)，顯示 DEHP 暴露會抑制雌魚肝臟中一期代謝的酵素基因表現，影響雌魚代謝外源污染物的能力。雄魚的基因表現部分，除了 *cyp3a38* 的基因表現有受到抑制的趨勢 (Dunnett's test 統計之  $p$  值達 0.070) 以外，其餘基因表現和控制組相比沒有顯著差異，表示雄魚肝臟代謝污染物的能力也可能受到干擾，只是效應未達統計上之顯著。

當生物接觸到環境污染物時，體內有一系列解毒與代謝的機制來排除外源污染物 (Xenobiotics)。細胞色素 P450 (Cytochrome P450, CYP) 酵素家族中的 CYP1A 和 CYP3A 是魚類體內主要負責一期代謝 (Phase I metabolism) 的酵素，屬於單氧酶 (Monooxygenase)，能夠催化生物轉化反應，將外來分子加上一個羥基 (Hydroxyl group)，增加其親水性以利排出體外。除了代謝外源污染物以外，魚類的 CYP3A 家族也被發現具有代謝荷爾蒙的活性，以青鱈魚為例，CYP3A38 會在 Testosterone  $6\beta$  和  $16\beta$  的位置進行羥基化；CYP3A40 則是會在  $2\alpha$  和  $6\beta$  的位置進行羥基化 (Uno, et al., 2012)。

過去 CYP1A 廣泛作為偵測芳香族外源污染物的生物指標，如多環芳香烴 (Polycyclic aromatic hydrocarbons, PAHs)、多氯聯苯 (Polychlorinated biphenyl, PCBs)、戴奧辛 (2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin, TCDD) 或鹵化碳氫化合物 (Halogenated hydrocarbons) 等，這些化合物主要透過與芳香烴受體 (Aryl hydrocarbon receptor, AhR) 的交互作用來調控 CYP1A 的基因表現 (Regoli and Giuliani, 2014)。DEHP 的化學結構也有苯環，和 AhR 也可能具有相似或相異的交互作用，有研究將動物卵巢暴露 DEHP 後進行基因微陣列分析 (Microarray)，發現 AhR、CYP1B1 和環氧化物水解酶 (Epoxide hydrolase) 的基因會受到干擾，而這些指標也和氧化壓力反應相關 (Lovekamp-Swan and Davis, 2002)；另一細胞實驗也發



現 DEHP 具有相對較弱的 AhR 促效活性 (Agonistic activity) (Kruger, et al., 2008)。

而 CYP3A 的表現則受多個核內受體 (Nuclear receptor) 調控，當非平面結構之 PCBs 或有機氯農藥進入生物體內，會啟動類固醇 X 受體 (Pregnane X receptor, PXR) 或結構活化受體 (Constitutively active receptor, CAR)，而 PXR 或 CAR 進入細胞核後會和類視色素 X 受體 (Retinoid X receptor, RXR) 結合形成異二聚體 (Heterodimer)，此異二聚體便會結合在特定的 DNA 序列，以啟動下游目標基因的表現。PXR 和 CAR 能夠啟動許多一期、二期代謝的酵素，以及藥物運輸蛋白 (Drug transporter)，對生物體排除外源污染物十分重要 (Honkakoski and Negishi, 2000, Regoli and Giuliani, 2014)。一篇使用人類肝臟細胞進行的研究發現，DEHP 會透過啟動 PXR 來誘導 CYP3A4 的活性 (Cooper, et al., 2008)。但目前探討 DEHP、CYP 與核內受體之交互作用的文獻較少，未來需要深入研究才能釐清 DEHP 調控 CYP 的分子作用機制，除此之外，前人研究多以哺乳類細胞作為試驗對象，當 DEHP 流布在環境中，在生物個體層次的分布和代謝，有更多複雜因素需要考量，這也是值得深入研究的方向。

CYP 酵素家族除了與污染物代謝密切相關以外，也負責許多固醇類荷爾蒙的合成。CYP17 是參與性荷爾蒙生成的重要酵素，同時具有 17 $\alpha$ -羥基化酶 (17 $\alpha$ -hydroxylase) 和 17-20 裂解酶 (C<sub>17-20</sub> lyase) 的活性，在魚類性腺中，CYP17 負責黃體酮 (Progesterone) 與雄激素之間的轉換，因此對雌魚卵巢中卵細胞成熟的過程非常重要 (Bury and Sturm, 2007, Kazeto, et al., 2000)。本實驗分析了雌雄魚性腺中 *cyp17a* 基因表現 (圖 4-5 D)，結果所有 DEHP 處理組皆和控制組沒有顯著差異，也呼應前述性荷爾蒙分析的結果，DEHP 不是透過干擾性荷爾蒙來影響青鱈魚之產卵量。

本研究另外分析了雌魚肝臟中 *vtg* 的基因表現 (圖 4-5 E)。卵黃前質蛋白 (Vitellogenin, VTG) 是卵黃蛋白的前驅物，常見於鳥類、爬蟲類、兩棲類、魚類等卵生生物的雌性個體。性成熟的雌性個體體內會分泌雌激素，進而誘導肝臟細胞產生大量 VTG，之後透過血液運送至卵巢，經過一系列酵素作用後，參與卵的成熟。一般在雄性和未性成熟的個體中很少偵測到 (Kinoshita, et al., 2009)。由於在魚體的血液、肝臟、腹水等都能偵測到 VTG 的存在，故 VTG 已成為環境中評估內分泌干擾影響的重要生物指標。前人文獻指出，雌魚血清中的 VTG 濃度降低

和產卵量減少有關，甚至可能影響魚類族群的大小 (Celandier, 2011, Miller, et al., 2007)。從本實驗的結果看來，雖然青鱈魚的產卵量減少，但雌魚肝臟中 *vtg* 的基因表現在所有處理皆沒有顯著差異，再次說明了 DEHP 應是透過內分泌系統以外的其他作用機制來造成生殖毒性。

然而，在文獻回顧過程中，也發現 DEHP 對 VTG 的影響有分歧的結果。青鱈魚成魚暴露 1-50  $\mu\text{g/L}$  DEHP 三個月後，雌魚血清中的 VTG 蛋白量顯著減少，雄魚則是與控制組沒有變化 (Kim, et al., 2002)。暴露 0.02-40  $\mu\text{g/L}$  DEHP 三週的斑馬魚雌魚，其血清中 VTG 濃度隨 DEHP 暴露劑量顯著提升 (Carnevali, et al., 2010)。另一研究中，海水青鱈魚 (Marine medaka, *Oryzias melastigma*) 幼魚暴露 0.1 和 0.5  $\text{mg/L}$  DEHP 六個月後，雌魚肝臟中 VTG 濃度沒有顯著變化，但雄魚卻出現 VTG 蛋白被誘導表現的情形 (Ye, et al., 2014)。與性荷爾蒙的結果類似，目前 DEHP 和 VTG 的關係仍沒有一致的推論，尚待更多研究發表做更全面的探討。

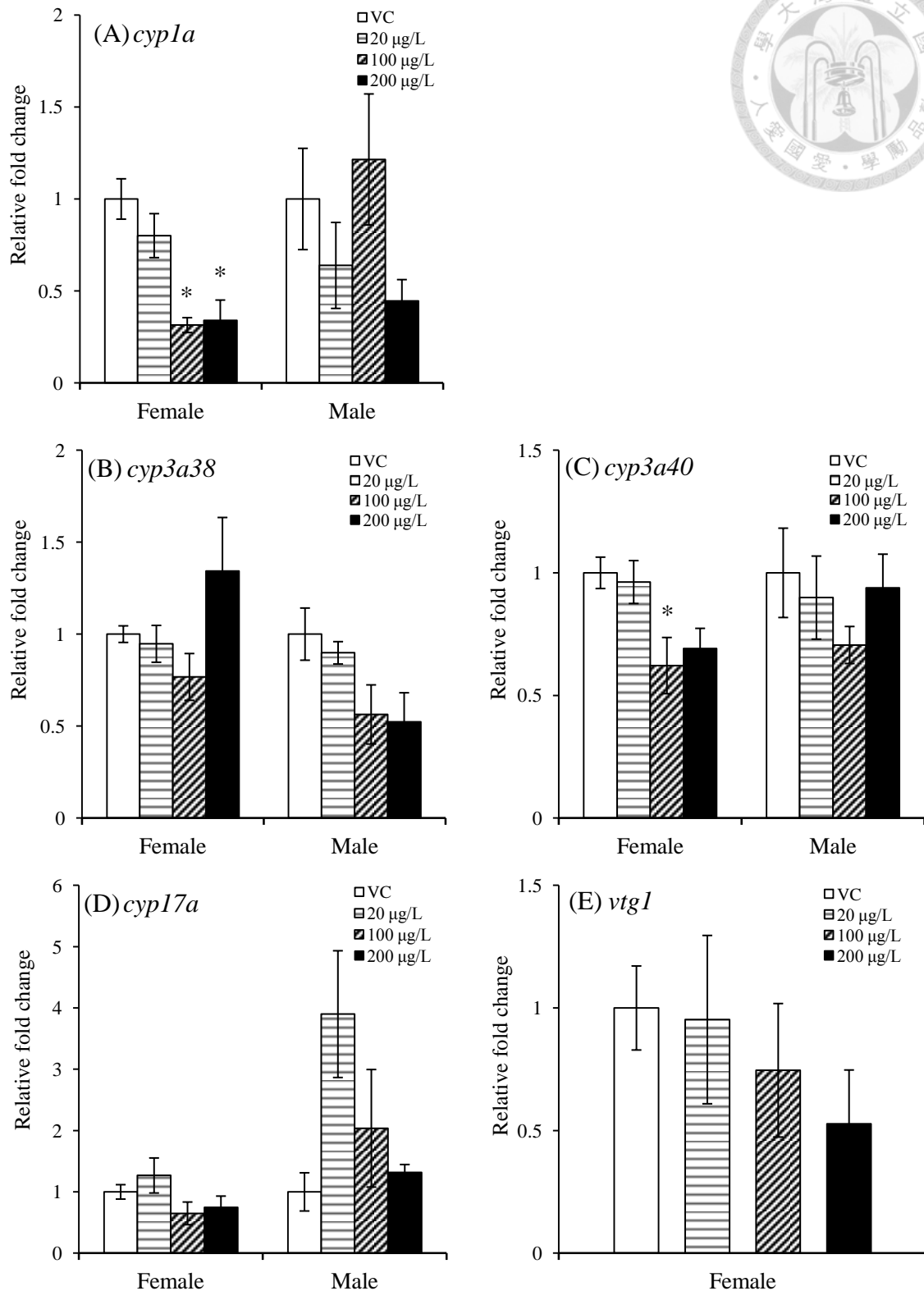


圖 4-5 青鱈魚暴露 DEHP 21 天後肝臟或性腺內分泌相關基因表現量

(A) 肝臟 *cyp1a* (B) 肝臟 *cyp3a38* (C) 肝臟 *cyp3a40* (D) 性腺 *cyp17a* (E) 肝臟 *vtg1*。  
 數據以相對於控制組的倍數變化  $\pm$  SE ( $n = 3-4$ ) 呈現。\*表示與控制組有顯著差異 ( $*p < 0.05$ )。



## 4.4 氧化壓力指標結果


### 4.4.1 鰓中抗氧化酵素活性變化

由於魚鰓是魚類最先接觸水中污染物的器官，因此本研究分析了暴露 DEHP 21 天後之青鱒魚魚鰓的抗氧化酵素活性，包含 SOD、GR、CAT 和 GST。結果顯示，暴露 100  $\mu\text{g/L}$  DEHP 的雌魚其 CAT 活性顯著低於控制組，此外，100  $\mu\text{g/L}$  和 200  $\mu\text{g/L}$  DEHP 處理的雌魚 GST 活性也顯著低於控制組，且活性約只剩下控制組的 25% (圖 4-6 B、D)，而 SOD 和 GR 活性在所有處理皆沒有顯著差異 (圖 4-6 A、C)。CAT 主要負責清除過氧化氫，而 GST 能夠還原細胞膜上的過氧化脂質 (Regoli and Giuliani, 2014)，當這兩個酵素活性受到抑制，可能導致青鱒魚無法即時抵禦 ROS 造成的氧化傷害。除此之外，GST 也是二期代謝的重要酵素，GST 受到抑制也會影響青鱒魚排除 DEHP 此類親脂性污染物的能力。

另一方面，雄魚的抗氧化酵素活性中，除了 GST 受到影響以外，其餘皆和控制組沒有差異。暴露 20  $\mu\text{g/L}$  DEHP 的雄魚其 GST 活性顯著上升，但暴露 100  $\mu\text{g/L}$  和 200  $\mu\text{g/L}$  的處理其 GST 活性卻顯著低於控制組 (圖 4-6 D)。和雌魚的結果相比較，可以發現在 20  $\mu\text{g/L}$  DEHP 劑量下，GST 同樣都有些微提升的情形，但在較高劑量處理下 GST 皆大幅減少。可以推測暴露低濃度 DEHP 時，魚類會誘發抗氧化酵素活性以因應可能的氧化逆境，但當 DEHP 濃度高於 100  $\mu\text{g/L}$  時，魚鰓中的 GST 已被大量消耗，故測得之 GST 活性顯著低於控制組。低濃度暴露時抗氧化酵素活性補償性提升以因應氧化壓力，高濃度暴露時抗氧化酵素活性被大量消耗而減少，此種現象也在其他研究中被發現 (Regoli, et al., 2011, Regoli and Giuliani, 2014, Viarengo, et al., 2007)。

氧氣是所有好氧 (Aerobic) 生物賴以維生的重要物質，然而，在許多新陳代謝反應的電子傳遞鏈中，氧被逐步還原成水，過程中會不可避免地產生活性氧物種 (Reactive oxygen species, ROS)。ROS 會氧化細胞內的蛋白質、DNA 和類固醇，甚至將細胞膜上的不飽和脂質過氧化，而生物為了抵禦氧化傷害，也自然演化出一套防禦機制，包含維他命 C、維他命 E、類胡蘿蔔素和穀胱甘肽等第一線的抗氧化物質，以及對各種 ROS 具專一性的抗氧化酵素 (Martínez-Álvarez, et al., 2005)。

有機或重金屬污染物常隨廢水排放至環境中，而這些污染物大多屬於強氧化劑 (Avci, et al., 2005)。前人研究中歐洲鰻鱺 (European eel, *Anguilla anguilla*) 暴露



紙漿漂白廠之放流水後，發現其 CAT、GPx 及 GST 等抗氧化酵素活性在魚鰓、肝臟和腎臟皆顯著減少 (Santos, et al., 2004)。另一利用翠鱧 (Catfish, *Channa punctatus* Bloch) 暴露造紙廠放流水的研究，其肝臟的 CAT、GPx 和 GST 活性被誘導，但在魚鰓和腎臟中的抗氧化酵素活性卻受到抑制 (Ahmad, et al., 2000)。由此可知，抗氧化酵素活性是偵測環境污染物的重要指標，且在不同組織中可能有不同的反應。

目前探討 DEHP 對魚類產生氧化壓力的文獻較少，相關研究以細胞實驗居多。以小鼠睪丸間質細胞進行 DEHP 和 MEHP (DEHP 主要代謝產物) 暴露的結果指出，產生之 ROS 有隨暴露劑量增加的趨勢，且 GST 和 GPx 活性皆顯著被抑制 (Erkekoglu, et al., 2010)。一篇探討鄰苯二甲酸酯類對生物抗氧化酵素之影響的研究，對鯽魚 (*Carassius auratus*) 進行腹腔注射暴露 17 種不同的鄰苯二甲酸酯類十天，接著分析肝臟中抗氧化酵素活性，其中暴露 DEHP 的結果顯示，CAT 的活性顯著低於控制組，但 SOD 和 GPx 則沒有變化 (Zheng, et al., 2013)，與本研究結果的趨勢一致。

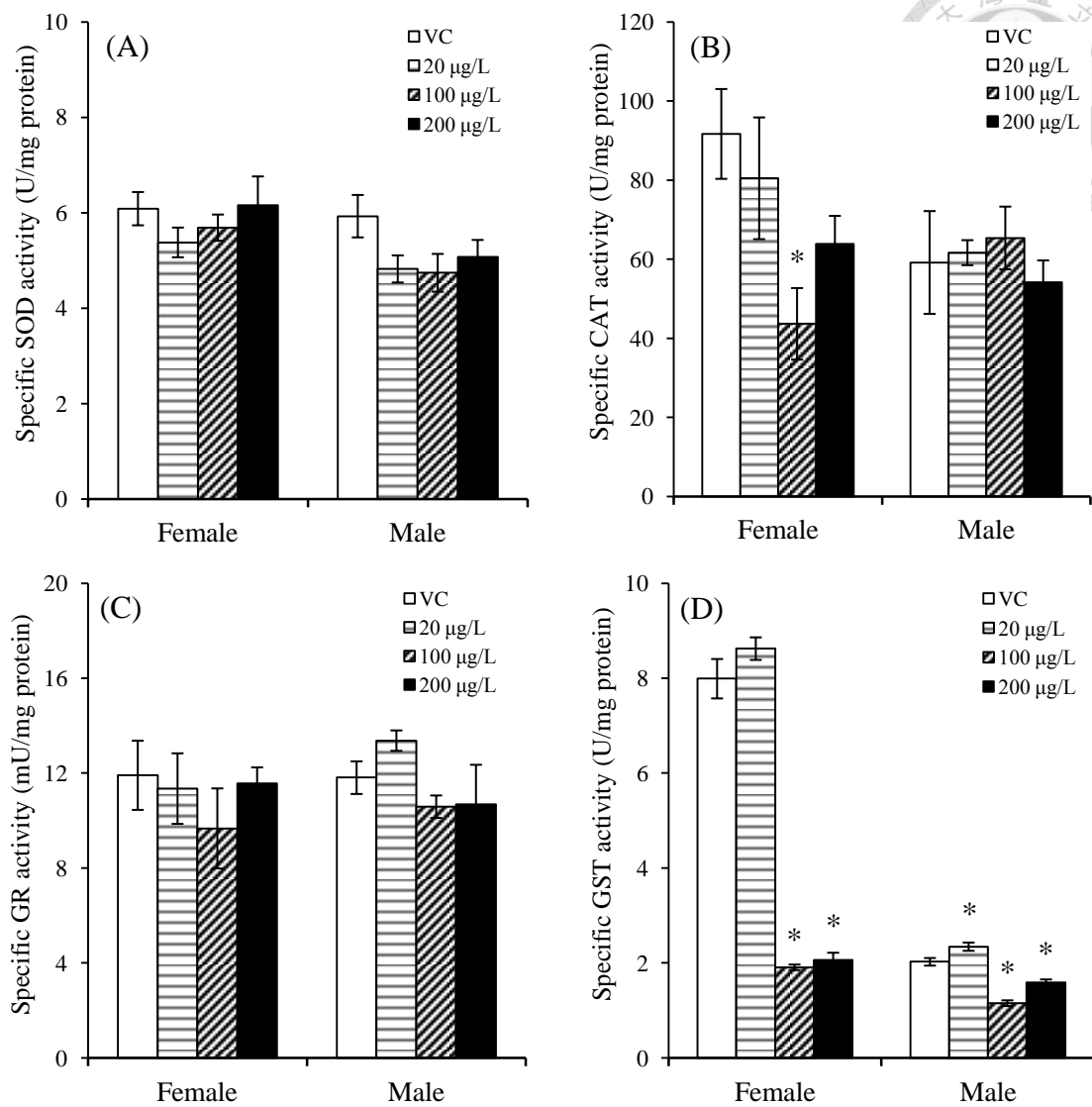
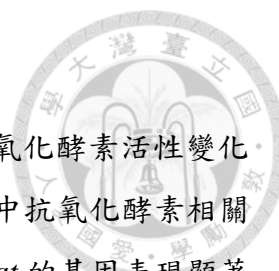


圖 4-6 青鱗魚暴露 DEHP 21 天後鰓中抗氧化酵素活性

(A) SOD 活性 (B) CAT 活性 (C) GR 活性 (D) GST 活性。數據以  $\text{mean} \pm \text{SE}$  ( $n = 4$ )

呈現。\*表示與控制組有顯著差異 ( $*p < 0.05$ )。



#### 4.4.2 肝臟中抗氧化酵素相關基因表現量

肝臟是魚類主要負責解毒的器官，因此除了了解魚鰓的抗氧化酵素活性變化以外，也想釐清肝臟的氧化平衡是否受到影響，故分析了肝臟中抗氧化酵素相關基因的表現。暴露 100  $\mu\text{g/L}$  和 200  $\mu\text{g/L}$  DEHP 的雌魚肝臟中，*cat* 的基因表現顯著增加，約為控制組的兩倍；*gpx* 的基因表現則顯著低於控制組，約只剩下控制組的 10% (圖 4-7 B、C)。CAT 和 GPx 在細胞中皆負責將過氧化氫還原成水，差別只在於 GPx 需要還原態穀胱甘肽 (Glutathione, GSH) 的相伴反應，因此可以推測雌魚肝臟中有過氧化氫產生，且主要由 CAT 負責清除，才導致 *cat* 表現顯著提升。

雄魚的生物反應和雌魚不同，暴露 100  $\mu\text{g/L}$  和 200  $\mu\text{g/L}$  DEHP 的雄魚肝臟中，*sod* 和 *gpx* 的基因表現被顯著抑制 (圖 4-7 A、C)。SOD 在細胞中負責進行超氧陰離子的歧化反應，使其轉化成過氧化氫，但過氧化氫也是 ROS 之一，有賴 CAT 或 GPx 進一步將過氧化氫還原，才能避免氧化壓力的產生。本研究發現 DEHP 暴露會降低雄魚肝臟 *sod* 和 *gpx* 的基因表現，且 *cat* 的基因表現也有隨著暴露劑量減少的趨勢 (圖 4-7 B)，表示雄魚可能無法即時清除 ROS，肝臟對氧化壓力的整體抵禦能力受到損害。

比較雌雄魚的肝臟基因表現結果，可以發現 *gpx* 皆有被抑制表現的現象 (圖 4-7 C)。*gpx* 受到抑制也可能源自細胞中 GSH 的缺乏，由於抗氧化酵素之間彼此並非獨立運作，氧化狀態往往是整個酵素系統動態平衡後的結果，若能進一步分析 GSH 和 GSSG (氧化態穀胱甘肽) 的比例，以及其他利用 GSH 做為輔因子之酵素的活性變化，將有助於對氧化平衡的整體了解。

有研究以小鼠卵巢有腔濾泡進行 DEHP 暴露後，發現濾泡生長受到抑制，且 SOD 酵素活性和 *sod* 表現量皆顯著低於控制組 (Wang, et al., 2012)。作者於文中有討論 DEHP 調控抗氧化酵素基因表現的可能機制，前人發現某些基因含有因應氧化壓力的 Antioxidant response element (ARE)，且 ROS 可能透過和 ARE 的交互作用來影響下游基因表現 (Knock and Ward, 2011)。除此之外，哺乳類中也發現 Nuclear factor  $\kappa\text{B}$  (NF- $\kappa\text{B}$ ) 和 Activator protein 1 (AP-1) 這兩類轉錄調控因子會參與氧化壓力反應 (Scandalios, 2005)。陸續有文獻指出，SOD、CAT 和 GPx 等抗氧化酵素基因的啟動子 (Promoter) 區域都有出現 ARE、NF- $\kappa\text{B}$  和 AP-1 的相應序列 (Banning, et al., 2005, Scandalios, 2005)。有趣的是，有研究發現 DEHP 會透過

ERK/MAPK 或 p38/MAPK 訊息傳遞路徑，來活化 NF- $\kappa$ B 或 AP-1 等轉錄調控因子，誘發氧化壓力進而造成肝臟細胞凋亡 (Apoptosis) (Ghosh, et al., 2010)。綜合上述討論，推測 DEHP 可能藉由和 ARE、NF- $\kappa$ B 和 AP-1 的交互作用來調控抗氧化酵素基因的表現。但抗氧化酵素的基因調控，和氧化壓力、細胞凋亡等現象，兩者的先後因果關係仍不明確，尚待更多研究投入來釐清。



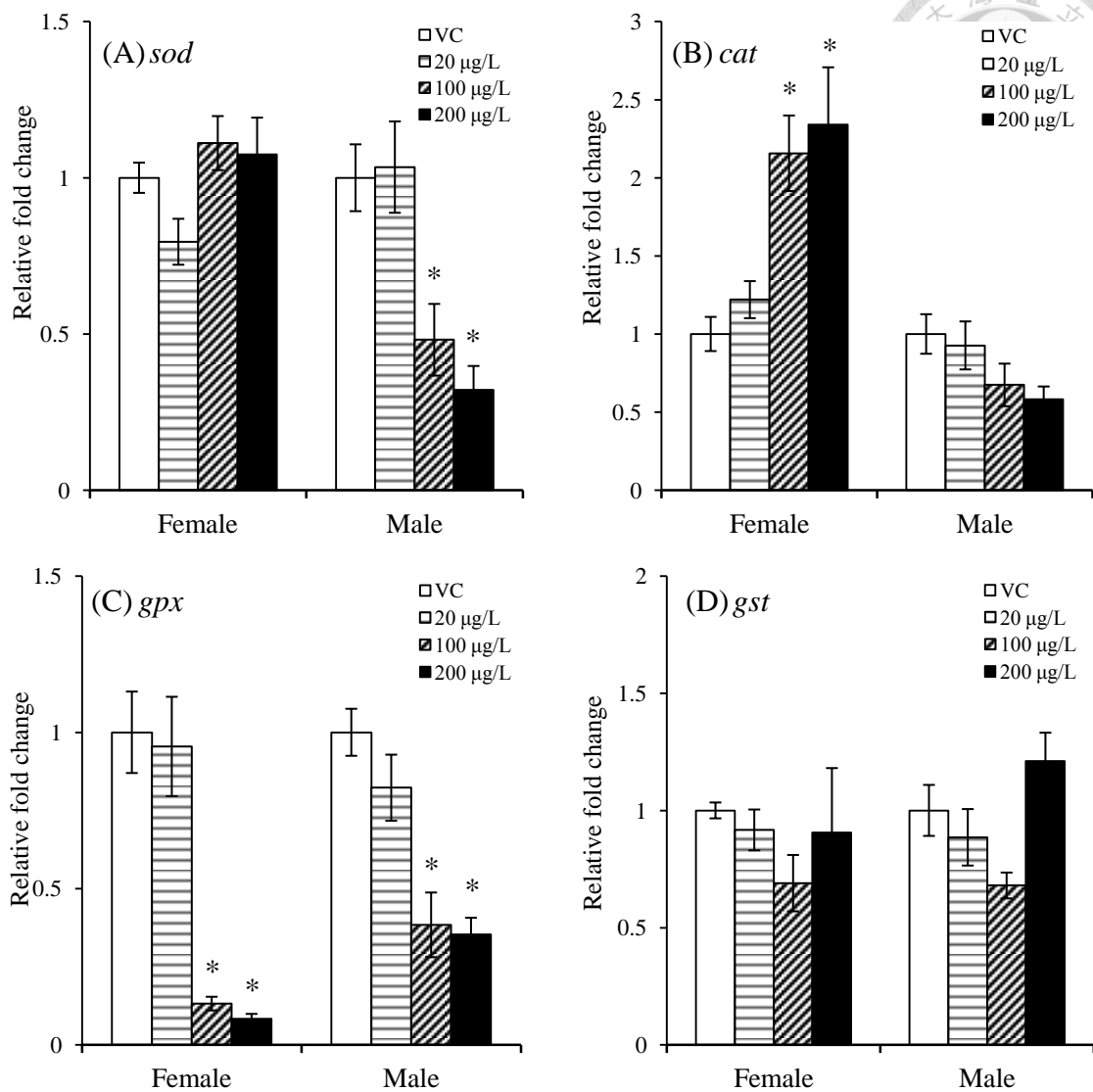


圖 4-7 青鱗魚暴露 DEHP 21 天後肝臟中抗氧化酵素相關基因表現量

(A) *sod* (B) *cat* (C) *gpx* (D) *gst*。數據以相對於控制組的倍數變化  $\pm$  SE ( $n = 4$ ) 呈現。

\*表示與控制組有顯著差異 ( $*p < 0.05$ )。

#### 4.4.3 性腺中抗氧化酵素相關基因表現量

本研究中觀察到 DEHP 暴露造成青鱈魚產卵量下降，且在魚鰓和肝臟可能誘發氧化壓力，如 4.4.2 所述，DEHP 產生的 ROS 可能透過 NF- $\kappa$ B 和 AP-1 等轉錄調控因子來影響抗氧化酵素基因的表現，而這些轉錄調控因子也會調控細胞凋亡的進程 (Seifried, et al., 2007)。若在生殖器官發生細胞凋亡的現象，可能造成卵細胞或精細胞無法正常發育，進而造成生殖毒性。本研究想要了解 DEHP 在性腺中是否會造成氧化壓力，故分析了青鱈魚的抗氧化酵素基因表現。

實驗結果如圖 4-8 所示。可以發現 DEHP 處理組和控制組中的 *sod*、*cat*、*gpx* 和 *gst* 等抗氧化酵素基因表現在雄魚睪丸皆沒有顯著差異 (圖 4-8)，但在雌魚卵巢中，200  $\mu$ g/L DEHP 處理會顯著誘導 *sod* 的表現，較控制組提升約 50%，20-200  $\mu$ g/L DEHP 處理則會顯著抑制 *cat*，此外，20  $\mu$ g/L 和 200  $\mu$ g/L 也會顯著降低 *gpx* 的表現量 (圖 4-8 A、B、C)。*sod* 被誘導表示雌魚卵巢中可能有超氧陰離子產生，生物體為了避免 ROS 的攻擊而增加 *sod* 的表現，但 *cat* 和 *gpx* 受到抑制顯示青鱈魚無法清除 SOD 進行歧化反應所生成的過氧化氫，可能導致過氧化氫累積在細胞中，造成細胞毒性。綜上所述，可以推測 DEHP 造成的氧化壓力可能是生殖毒性的成因之一。

前人研究利用 LNCaP 人類前列腺癌細胞株暴露 3 mM DEHP 24 小時後，細胞中即產生大量 ROS (Erkekoglu, et al., 2011)。類似的情形也發生在馬的卵細胞中，利用離體實驗讓馬的卵細胞暴露 DEHP 後，發現卵細胞凋亡使得卵細胞無法順利成熟，且卵細胞中 DNA 損傷程度提升，ROS 含量也有增加的趨勢 (Ambruosi, et al., 2011)。由上述文獻可發現，DEHP 會在細胞內產生 ROS，ROS 造成之細胞損傷或凋亡現象有可能是 DEHP 造成生殖毒性的途徑之一。

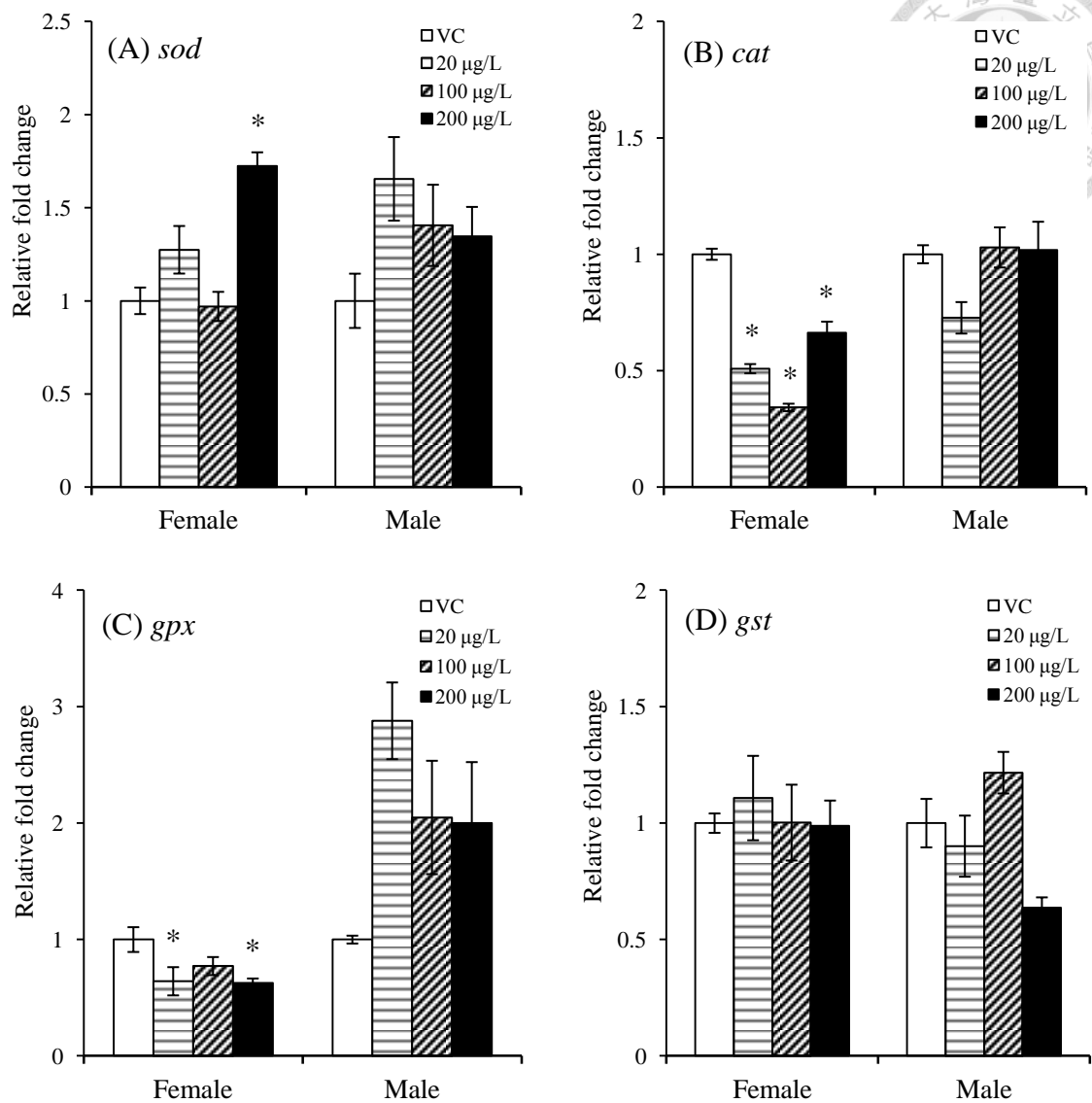


圖 4-8 青鱒魚暴露 DEHP 21 天後性腺中抗氧化酵素相關基因表現量

(A) *sod* (B) *cat* (C) *gpx* (D) *gst*。數據以相對於控制組的倍數變化  $\pm$  SE ( $n = 3-4$ ) 呈現。

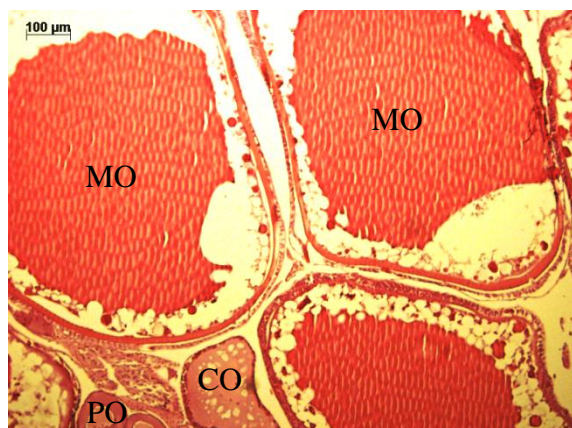
\*表示與控制組有顯著差異 ( $*p < 0.05$ )。

#### 4.5 組織病理變化

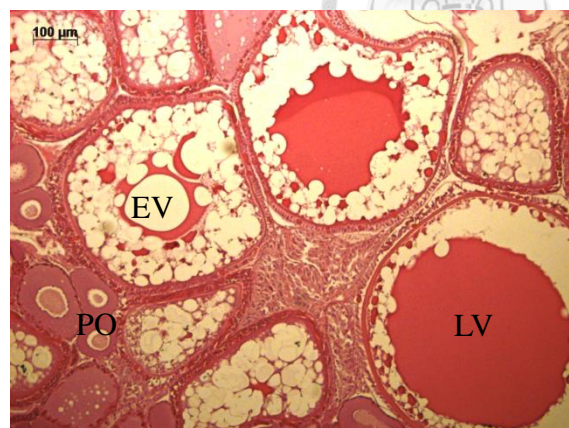
本研究藉由組織切片和 H&E 染色，觀察青鱈魚性腺組織形態。青鱈魚雌魚經 DEHP 暴露 21 天後，觀察控制組及 DEHP 處理組之卵巢組織，結果發現控制組和處理組 (100  $\mu\text{g/L}$  和 200  $\mu\text{g/L}$ ) 之雌魚卵巢形態並無明顯差異 (圖 4-9)。一般而言，性成熟之青鱈魚雌魚卵巢內皆有不同發育時期之卵泡，包含週邊核仁期 (Perinucleolar oocyte, PO)、表層囊泡期 (Cortical-alveolar oocyte, CO)、卵黃生成前期 (Early vitellogenic oocyte, EV)、卵黃生成後期 (Late vitellogenic oocyte, LV) 和成熟卵子 (Mature oocyte, MO)，各時期之卵泡比例和控制組相比也無明顯差異。

青鱈魚雄魚經 DEHP 暴露 21 天後，觀察控制組及 DEHP 處理組之睪丸組織，結果顯示控制組和處理組之雄魚睪丸皆包含精原細胞 (Spermatogonia, SG) 和精子 (Spermatozoa, SZ)。但 100  $\mu\text{g/L}$  DEHP 處理組雄魚睪丸中發現精細小管 (Seminiferous tubules) 之管腔 (Lumen) 擴大的現象 (圖 4-10 B、C)，管腔範圍明顯大於控制組 (圖 4-10 A)。前人研究中，暴露 Letrozole 之青鱈魚睪丸組織也出現了相似的形態變化 (Liao, et al., 2014, Sun, et al., 2007)。

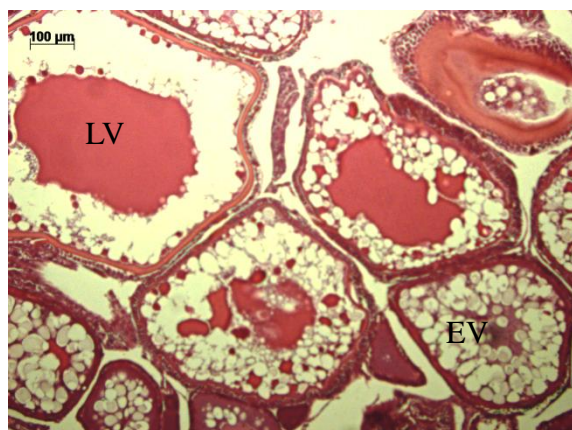
(A)



(B)



(C)



(D)

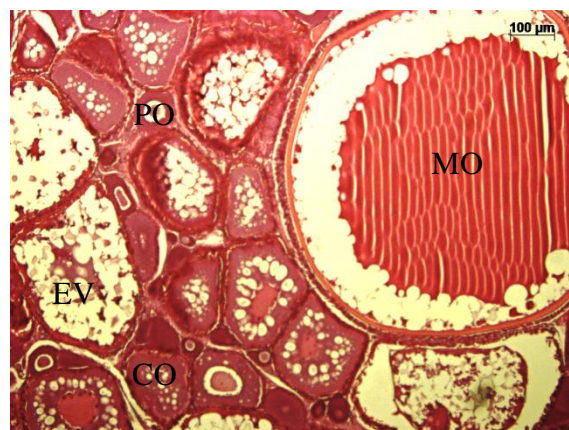


圖 4-9 雌魚暴露 DEHP 21 天後卵巢經 H&E 染色之組織形態

(A)、(B) 控制組；(C) 100 µg/L 處理組；(D) 200 µg/L 處理組

PO, Perinucleolar oocyte (週邊核仁期); CO, Cortical-alveolar oocyte (表層囊泡期);

EV, Early vitellogenic oocyte (卵黃生成前期); LV, Late vitellogenic oocyte (卵黃生成

後期); MO, Mature oocyte (成熟卵子)

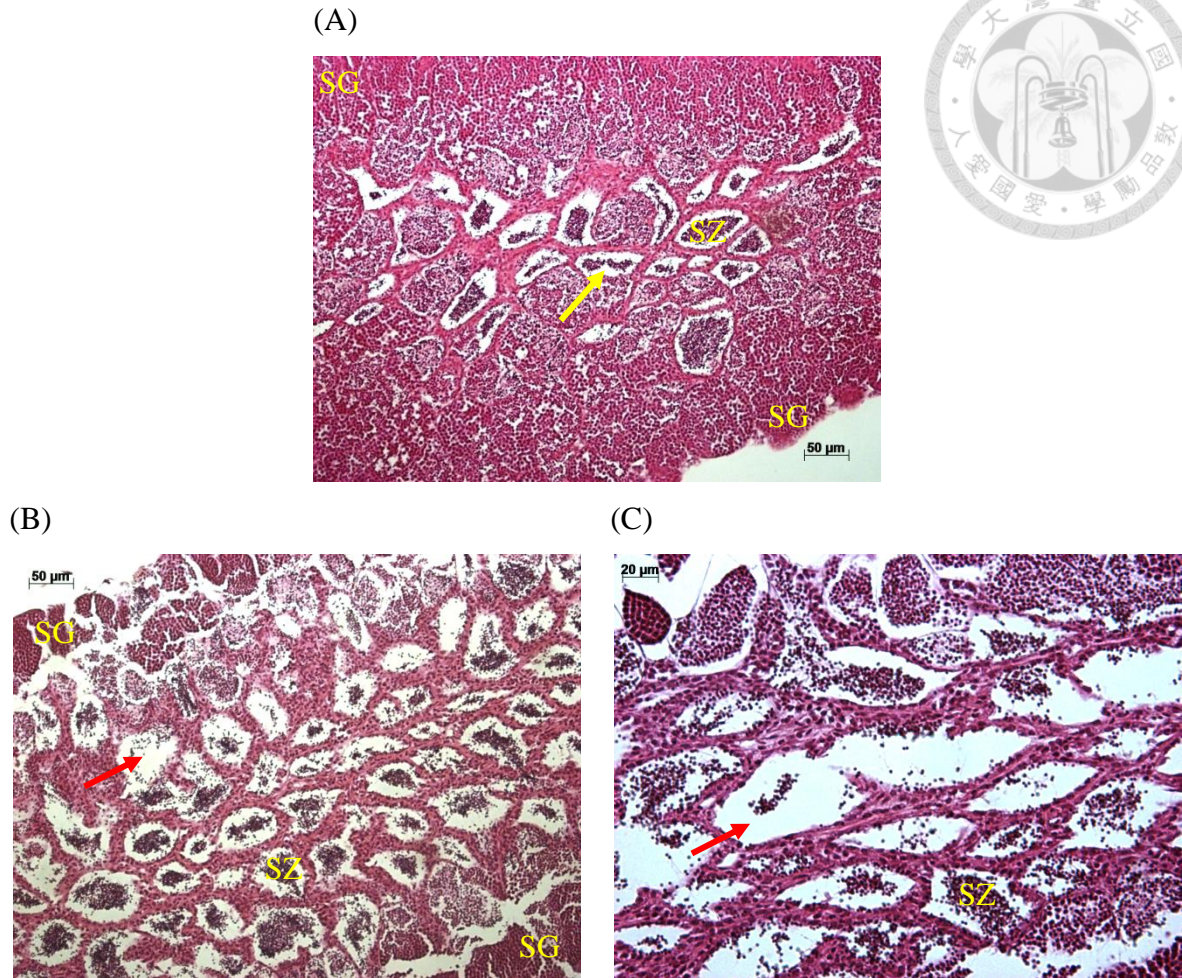


圖 4-10 雄魚暴露 DEHP 21 天後睪丸經 H&E 染色之組織形態

(A) 控制組；(B)、(C) 100  $\mu\text{g/L}$  處理組

SG, Spermatogonia (精原細胞); SZ, Spermatozoa (精子)。黃色箭頭所指位置為精細小管 (Seminiferous tubules) 之管腔 (Lumen)；紅色箭頭所指位置為精細小管 (Seminiferous tubules) 管腔 (Lumen) 擴大之形態。

## 4.6 綜合討論

本實驗發現環境相關濃度之 DEHP (20-200  $\mu\text{g/L}$ ) 暴露會降低青鱈魚的產卵量，且肝臟中 *cyp1a*、*cyp3a40* 等一期代謝酵素的基因表現受到抑制，魚鰓中 CAT、GST 等抗氧化酵素活性顯著下降，肝臟和性腺中 *sod*、*cat* 和 *gpx* 等基因表現受到干擾。

肝臟中 *cyp1a*、*cyp3a40* 的基因表現量下降以及魚鰓中 GST 活性被顯著抑制，代表一期和二期代謝的關鍵酵素都受到影響，顯示青鱈魚代謝外源汙染物的整體能力下降，DEHP 可能無法排出體外，因而更容易累積在魚體中造成毒性反應。

魚鰓、肝臟和性腺中抗氧化酵素之活性或基因表現皆有被干擾的情形，顯示 DEHP 在不同組織皆有可能誘發氧化壓力，魚鰓是魚類最先接觸水中汙染物的器官，抗氧化酵素變化顯示魚體確實接觸到水體中的 DEHP；肝臟為魚類主要負責解毒的器官，雌魚和雄魚肝臟中抗氧化酵素相關基因表現皆有被誘導或抑制的情形，但雌魚和雄魚之反應不完全相同，前人研究也發現在許多生物指標中，雌雄魚呈現不同的反應（見表 2-5），但確切成因目前仍不得而知。而 *gpx* 基因表現量下降是雌雄魚皆有的反應，顯示 DEHP 確實進入青鱈魚體內並且對肝臟細胞造成影響；性腺為主宰生殖作用之器官，在雌魚卵巢中 *sod*、*cat* 和 *gpx* 基因表現皆受到干擾，雄魚睪丸則未發現基因表現變化。SOD、CAT 和 GPx 負責清除超氧陰離子和過氧化氫等 ROS，雌魚卵巢若累積過多 ROS，則可能造成 DNA 損傷或細胞凋亡，進而影響雌魚之卵細胞發育。此結果顯示青鱈魚產卵量下降，主因可能是青鱈魚雌魚之卵巢累積過量 ROS，導致卵細胞品質下降。

由本研究結果可知，暴露 DEHP 之青鱈魚血清中 Estradiol、Testosterone 和 11-Ketotestosterone 等性荷爾蒙濃度和控制組相比沒有顯著差異，再加上性腺中負責性荷爾蒙生合成之 *cyp17a* 基因表現沒有變化，表示環境相關濃度之 DEHP 不會干擾性荷爾蒙生合成。此外，偵測環境荷爾蒙常用的生物指標 VTG，在肝臟中 *vtg* 基因表現也沒有變化，顯示 DEHP 可能不會仿效雌激素之功能，也應不會干預雌激素之作用。

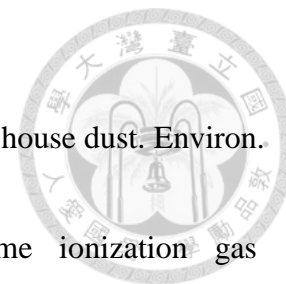
整體而言，本研究發現環境相關濃度之 DEHP 可能透過干擾抗氧化防禦機制造成 ROS 累積，進而損傷細胞導致青鱈魚生殖能力下降，與前人研究主要探討 DEHP 之內分泌干擾效應不同。

## 5. 結論

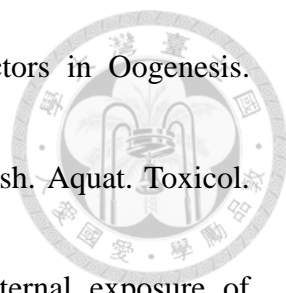
1. 環境相關濃度之 DEHP (20-200  $\mu\text{g/L}$ ) 暴露會降低青鱒魚的產卵量，造成生殖毒性，但對子代受精率、孵化率、死亡率和性別比例等生物指標沒有影響。
2. 環境相關濃度之 DEHP (20-200  $\mu\text{g/L}$ ) 暴露不會影響青鱒魚血清中 Estradiol、Testosterone 和 11-Ketotestosterone 等性荷爾蒙濃度，且性腺中 *cyp17a* 基因表現和肝臟中 *vtg* 基因表現皆沒有變化，顯示 21 天之環境流布濃度 DEHP 暴露應不是藉由內分泌干擾機制造成青鱒魚生殖毒性。
3. 環境相關濃度之 DEHP (100-200  $\mu\text{g/L}$ ) 暴露會顯著抑制青鱒魚雌魚肝臟中 *cyp1a*、*cyp3a40* 等一期代謝酵素的基因表現，造成雌魚無法有效排除體內 DEHP 等親脂污染物。
4. 環境相關濃度之 DEHP (20-200  $\mu\text{g/L}$ ) 暴露會干擾青鱒魚雌魚和雄魚之魚鰓 CAT、GST 等抗氧化酵素活性以及肝臟與性腺中 *sod*、*cat* 和 *gpx* 等基因表現，顯示 DEHP 會對青鱒魚組織造成氧化壓力，ROS 若無法即時清除則可能造成生殖細胞凋亡或損傷，導致生殖能力下降。
5. 整體而言，環境相關濃度之 DEHP (20-200  $\mu\text{g/L}$ ) 暴露對雌魚的生物效應較雄魚顯著。

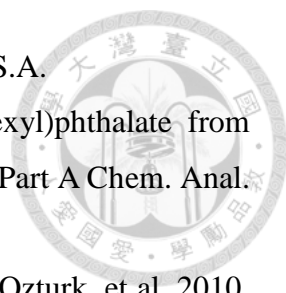



## 6. 參考文獻

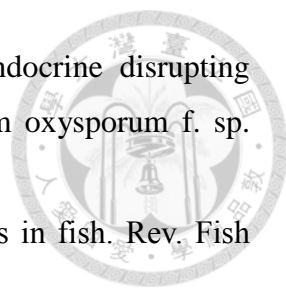


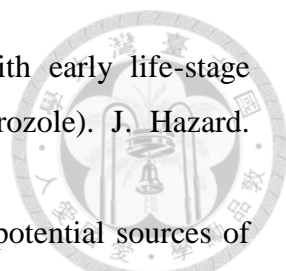
- Abb, M., T. Heinrich, E. Sorkau and W. Lorenz. 2009. Phthalates in house dust. *Environ. Int.* 35: 965-970.
- Adeniyi, A.A., O.O. Okedeyi and K.A. Yusuf. 2011. Flame ionization gas chromatographic determination of phthalate esters in water, surface sediments and fish species in the Ogun river catchments, Ketu, Lagos, Nigeria. *Environ. Monit. Assess.* 172: 561-569.
- Ahmad, I., T. Hamid, M. Fatima, H.S. Chand, S.K. Jain, M. Athar, et al. 2000. Induction of hepatic antioxidants in freshwater catfish (*Channa punctatus* Bloch) is a biomarker of paper mill effluent exposure. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* 1523: 37-48.
- Ambrosi, B., M. Filioli Uranio, A.M. Sardanelli, P. Pocar, N.A. Martino, M.S. Paternoster, et al. 2011. In vitro acute exposure to DEHP affects oocyte meiotic maturation, energy and oxidative stress parameters in a large animal model. *PLoS One* 6: e27452.
- Amir, S., M. Hafidi, G. Merlina, H. Hamdi, A. Jouraiphy, M. El Gharous, et al. 2005. Fate of phthalic acid esters during composting of both lagooning and activated sludges. *Process Biochem.* 40: 2183-2190.
- ATSDR. 2002. Toxicological Profile for Di(2-ethylhexyl)phthalate. Department of Health and Human Service. Public Health Service. Agency for Toxic Substances and Diseases Registry, U.S.A.
- Avcı, A., M. Kaçmaz and İ. Durak. 2005. Peroxidation in muscle and liver tissues from fish in a contaminated river due to a petroleum refinery industry. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 60: 101-105.
- Banning, A., S. Deubel, D. Kluth, Z. Zhou and R. Brigelius-Flohe. 2005. The GI-GPx gene is a target for Nrf2. *Mol. Cell. Biol.* 25: 4914-4923.
- Beauchamp, C. and I. Fridovich. 1971. Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Anal. Biochem.* 44: 276-287.
- Beers, R.F., Jr. and I.W. Sizer. 1952. A spectrophotometric method for measuring the breakdown of hydrogen peroxide by catalase. *J. Biol. Chem.* 195: 133-140.
- Bury, N.R. and A. Sturm. 2007. Evolution of the corticosteroid receptor signalling pathway in fish. *Gen. Comp. Endocrinol.* 153: 47-56.
- Carnevali, O., L. Tosti, C. Speciale, C. Peng, Y. Zhu and F. Maradonna. 2010. DEHP

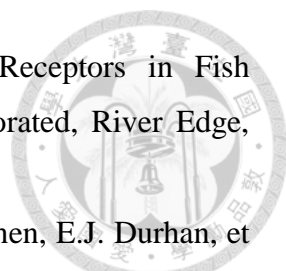
- 
- Impairs Zebrafish Reproduction by Affecting Critical Factors in Oogenesis. PLoS One 5: e10201.
- Celander, M.C. 2011. Cocktail effects on biomarker responses in fish. *Aquat. Toxicol.* 105: 72-77.
- Chen, M.L., J.S. Chen, C.L. Tang and I.F. Mao. 2008. The internal exposure of Taiwanese to phthalate-An evidence of intensive use of plastic materials. *Environ. Int.* 34: 79-85.
- Chikae, M., Y. Hatano, R. Ikeda, Y. Morita, Q. Hasan and E. Tamiya. 2004. Effects of bis(2-ethylhexyl) phthalate and benzo[a]pyrene on the embryos of Japanese medaka (*Oryzias latipes*). *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 16: 141-145.
- Chikae, M., R. Ikeda, Y. Hatano, Q. Hasan, Y. Morita and E. Tamiya. 2004. Effects of bis(2-ethylhexyl) phthalate, gamma-hexachlorocyclohexane, and 17beta-estradiol on the fry stage of medaka (*Oryzias latipes*). *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 18: 9-12.
- Ching, B., S.F. Chew, W.P. Wong and Y.K. Ip. 2009. Environmental ammonia exposure induces oxidative stress in gills and brain of *Boleophthalmus boddarti* (mudskipper). *Aquat. Toxicol.* 95: 203-212.
- Clara, M., G. Windhofer, W. Hartl, K. Braun, M. Simon, O. Gans, et al. 2010. Occurrence of phthalates in surface runoff, untreated and treated wastewater and fate during wastewater treatment. *Chemosphere* 78: 1078-1084.
- Cooper, B.W., T.M. Cho, P.M. Thompson and A.D. Wallace. 2008. Phthalate induction of CYP3A4 is dependent on glucocorticoid regulation of PXR expression. *Toxicol. Sci.* 103: 268-277.
- Corradetti, B., A. Stronati, L. Tosti, G. Manicardi, O. Carnevali and D. Bizzaro. 2013. Bis-(2-ethylhexyl) phthalate impairs spermatogenesis in zebrafish (*Danio rerio*). *Reprod. Biol.* 13: 195-202.
- Cousins, I. and D. Mackay. 2000. Correlating the physical-chemical properties of phthalate esters using the 'three solubility' approach. *Chemosphere* 41: 1389-1399.
- Crago, J. and R. Klaper. 2012. A mixture of an environmentally realistic concentration of a phthalate and herbicide reduces testosterone in male fathead minnow (*Pimephales promelas*) through a novel mechanism of action. *Aquat. Toxicol.* 110-111: 74-83.
- Dietrich, D.R. and H.O. Krieger. 2009. Histological Analysis of Endocrine Disruptive

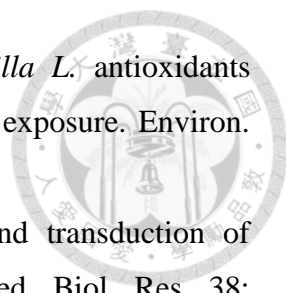
- 
- Effects in Small Laboratory Fish John Wiley & Sons, Inc., U.S.A.
- Du, Q.Z., X.W. Fu and H.L. Xia. 2009. Uptake of di-(2-ethylhexyl)phthalate from plastic mulch film by vegetable plants. *Food Addit. Contam. Part A Chem. Anal. Control Expo. Risk Assess.* 26: 1325-1329.
- Erkekoglu, P., W. Rachidi, O.G. Yuzugullu, B. Giray, A. Favier, M. Ozturk, et al. 2010. Evaluation of cytotoxicity and oxidative DNA damaging effects of di(2-ethylhexyl)-phthalate (DEHP) and mono(2-ethylhexyl)-phthalate (MEHP) on MA-10 Leydig cells and protection by selenium. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 248: 52-62.
- Erkekoglu, P., W. Rachidi, O.G. Yuzugullu, B. Giray, M. Ozturk, A. Favier, et al. 2011. Induction of ROS, p53, p21 in DEHP- and MEHP-exposed LNCaP cells-protection by selenium compounds. *Food Chem. Toxicol.* 49: 1565-1571.
- Foster, J.G. and J.L. Hess. 1980. Responses of superoxide dismutase and glutathione reductase activities in cotton leaf tissue exposed to an atmosphere enriched in oxygen. *Plant Physiol.* 66: 482-487.
- Fromme, H., L. Gruber, E. Seckin, U. Raab, S. Zimmermann, M. Kiranoglu, et al. 2011. Phthalates and their metabolites in breast milk - Results from the Bavarian Monitoring of Breast Milk (BAMBI). *Environ. Int.* 37: 715-722.
- Fromme, H., T. Kuchler, T. Otto, K. Pilz, J. Müller and A. Wenzel. 2002. Occurrence of phthalates and bisphenol A and F in the environment. *Water Res.* 36: 1429-1438.
- Garrido Frenich, A., M. de las Nieves Barco Bonilla, J.C. Lopez Martinez, J.L. Martinez Vidal and R. Romero-Gonzalez. 2009. Determination of di-(2-ethylhexyl)phthalate in environmental samples by liquid chromatography coupled with mass spectrometry. *J. Sep. Sci.* 32: 1383-1389.
- Ghosh, J., J. Das, P. Manna and P.C. Sil. 2010. Hepatotoxicity of di-(2-ethylhexyl)phthalate is attributed to calcium aggravation, ROS-mediated mitochondrial depolarization, and ERK/NF- $\kappa$ B pathway activation. *Free Radical Biol. Med.* 49: 1779-1791.
- Gray Jr, L.E., J. Ostby, J. Furr, M. Price, D.N.R. Veeramachaneni and L. Parks. 2000. Perinatal exposure to the phthalates DEHP, BBP, and DINP, but not DEP, DMP, or DOTP, alters sexual differentiation of the male rat. *Toxicol. Sci.* 58: 350-365.
- Grundy, J.E. and K.B. Storey. 1998. Antioxidant defenses and lipid peroxidation damage in estivating toads, *Scaphiopus couchii*. *J. Comp. Physiol., B* 168: 132-142.

- 
- Gupta, R.K., J.M. Singh, T.C. Leslie, S. Meachum, J.A. Flaws and H.H.C. Yao. 2010. Di-(2-ethylhexyl) phthalate and mono-(2-ethylhexyl) phthalate inhibit growth and reduce estradiol levels of antral follicles in vitro. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 242: 224-230.
- Halden, R.U. 2010. Plastics and health risks. *Annu. Rev. Public Health.* p. 179-194.
- Heudorf, U., V. Mersch-Sundermann and J. Angerer. 2007. Phthalates: Toxicology and exposure. *Int. J. Hyg. Environ. Health* 210: 623-634.
- Hong, H.N., H.N. Kim, K.S. Park, S.-K. Lee and M.B. Gu. 2007. Analysis of the effects diclofenac has on Japanese medaka (*Oryzias latipes*) using real-time PCR. *Chemosphere* 67: 2115-2121.
- Honkakoski, P. and M. Negishi. 2000. Regulation of cytochrome P450 (CYP) genes by nuclear receptors. *Biochem. J.* 347: 321-337.
- Huang, L.P., C.C. Lee, P.C. Hsu and T.S. Shih. 2011. The association between semen quality in workers and the concentration of di(2-ethylhexyl) phthalate in polyvinyl chloride pellet plant air. *Fertil. Steril.* 96: 90-94.
- Huang, P.C., C.J. Tien, Y.M. Sun, C.Y. Hsieh and C.C. Lee. 2008. Occurrence of phthalates in sediment and biota: Relationship to aquatic factors and the biota-sediment accumulation factor. *Chemosphere* 73: 539-544.
- Ishihara, M., M. Itoh, K. Miyamoto, S. Suna, Y. Takeuchi, I. Takenaka, et al. 2000. Spermatogenic disturbance induced by di-(2-ethylhexyl) phthalate is significantly prevented by treatment with antioxidant vitamins in the rat. *Int. J. Androl.* 23: 85-94.
- Jain, G.C., H. Pareek, B.S. Khajja, K. Jain, S. Jhalani, S. Agarwal, et al. 2009. Modulation of di- (2- ethylhexyl) phthalate induced hepatic toxicity by *Apium graveolens* L. seeds extract in rats. *Afr. J. Biochem. Res.* 3: 222-225.
- Kavlock, R.J. and G.T. Ankley. 1996. A perspective on the risk assessment process for endocrine-disruptive effects on wildlife and human health. *Risk Anal.* 16: 731-739.
- Kazeto, Y., S. Ijiri, T. Todo, S. Adachi and K. Yamauchi. 2000. Molecular cloning and characterization of Japanese eel ovarian P450c17 (CYP17) cDNA. *Gen. Comp. Endocrinol.* 118: 123-133.
- Kim, E.-J., J.-W. Kim and S.-K. Lee. 2002. Inhibition of oocyte development in Japanese medaka (*Oryzias latipes*) exposed to di-2-ethylhexyl phthalate. *Environ. Int.* 28: 359-365.

- 
- Kim, Y.H., J. Lee and S.H. Moon. 2003. Degradation of an endocrine disrupting chemical, DEHP [di-(2-ethylhexyl)- phthalate], by *Fusarium oxysporum* f. sp. *psi* cutinase. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 63: 75-80.
- Kime, D. 1993. 'Classical' and 'non-classical' reproductive steroids in fish. *Rev. Fish Biol. Fish.* 3: 160-180.
- Kinoshita, M., K. Murata, K. Naruse and M. Tanaka. 2009. *Medaka: Biology, Management, and Experimental Protocols.* Wiley-Blackwell, U.S.A.
- Knock, G.A. and J.P. Ward. 2011. Redox regulation of protein kinases as a modulator of vascular function. *Antioxid. Redox Signal.* 15: 1531-1547.
- Koch, H.M., H.M. Bolt, R. Preuss and J. Angerer. 2005. New metabolites of di(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP) in human urine and serum after single oral doses of deuterium-labelled DEHP. *Arch. Toxicol.* 79: 367-376.
- Koch, H.M., B. Rossbach, H. Drexler and J. Angerer. 2003. Internal exposure of the general population to DEHP and other phthalates - Determination of secondary and primary phthalate monoester metabolites in urine. *Environ. Res.* 93: 177-185.
- Koniecki, D., R. Wang, R.P. Moody and J. Zhu. 2011. Phthalates in cosmetic and personal care products: Concentrations and possible dermal exposure. *Environ. Res.* 111: 329-336.
- Kruger, T., M. Long and E.C. Bonefeld-Jorgensen. 2008. Plastic components affect the activation of the aryl hydrocarbon and the androgen receptor. *Toxicology* 246: 112-123.
- Lee, J.T. and H.H. Liang. 2011. Preliminary study on zebra fish's DNA exposure to di-2-ethylhexyl phthalate effects. *JWS.* 1: 65-73.
- Lee, S.M., S.B. Lee, C.H. Park and J. Choi. 2006. Expression of heat shock protein and hemoglobin genes in *Chironomus tentans* (Diptera, chironomidae) larvae exposed to various environmental pollutants: A potential biomarker of freshwater monitoring. *Chemosphere* 65: 1074-1081.
- Lertsirisopon, R., S. Soda, K. Sei and M. Ike. 2009. Abiotic degradation of four phthalic acid esters in aqueous phase under natural sunlight irradiation. *J. Environ. Sci. (China)* 21: 285-290.
- Liang, D.W., T. Zhang, H.H. Fang and J. He. 2008. Phthalates biodegradation in the environment. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 80: 183-198.
- Liao, P.-H., S.-H. Chu, T.-Y. Tu, X.-H. Wang, A.Y.-C. Lin and P.-J. Chen. 2014.

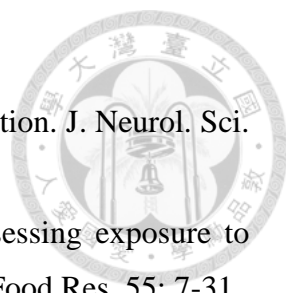
- 
- Persistent endocrine disruption effects in medaka fish with early life-stage exposure to a triazole-containing aromatase inhibitor (letrozole). *J. Hazard. Mater.*
- Lin, C., C.J. Lee, W.M. Mao and F. Nadim. 2009. Identifying the potential sources of di-(2-ethylhexyl) phthalate contamination in the sediment of the Houjing River in southern Taiwan. *J. Hazard. Mater.* 161: 270-275.
- Liu, S.M. and W.C. Chi. 2003. CO<sub>2</sub>-H<sub>2</sub>-dependent anaerobic biotransformation of phthalic acid isomers in sediment slurries. *Chemosphere* 52: 951-958.
- Lovekamp-Swan, T. and B.J. Davis. 2002. Mechanisms of phthalate ester toxicity in the female reproductive system. *Environ. Health Perspect.* 111: 139-145.
- Magdoui, S., R. Dagherir, S.K. Brar, P. Drogui and R.D. Tyagi. 2013. Di-2-ethylhexylphthalate in the aquatic and terrestrial environment: A critical review. *J. Environ. Manage.* 127: 36-49.
- Main, K.M., G.K. Mortensen, M.M. Kaleva, K.A. Boisen, I.N. Damgaard, M. Chellakooty, et al. 2006. Human breast milk contamination with phthalates and alterations of endogenous reproductive hormones in infants three months of age. *Environ. Health Perspect.* 114: 270-276.
- Mankidy, R., S. Wiseman, H. Ma and J.P. Giesy. 2013. Biological impact of phthalates. *Toxicol. Lett.* 217: 50-58.
- Maradonna, F., M. Evangelisti, G. Gioacchini, B. Migliarini, I. Olivotto and O. Carnevali. 2013. Assay of vtg, ERs and PPARs as endpoint for the rapid in vitro screening of the harmful effect of Di-(2-ethylhexyl)-phthalate (DEHP) and phthalic acid (PA) in zebrafish primary hepatocyte cultures. *Toxicol. In Vitro* 27: 84-91.
- Martínez-Álvarez, R., A. Morales and A. Sanz. 2005. Antioxidant defenses in fish: biotic and abiotic factors. *Rev. Fish Biol. Fish.* 15: 75-88.
- Martino-Andrade, A.J. and I. Chahoud. 2010. Reproductive toxicity of phthalate esters. *Mol. Nutr. Food Res.* 54: 148-157.
- Matsumoto, M., M. Hirata-Koizumi and M. Ema. 2008. Potential adverse effects of phthalic acid esters on human health: A review of recent studies on reproduction. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 50: 37-49.
- Meeker, J.D., A.M. Calafat and R. Hauser. 2009. Urinary metabolites of Di(2-ethylhexyl) phthalate are associated with decreased steroid hormone levels in adult men. *J. Androl.* 30: 287-297.

- 
- Melamed, P. and N. Sherwood. 2005. *Hormones and Their Receptors in Fish Reproduction* World Scientific Publishing Company, Incorporated, River Edge, NJ, USA.
- Miller, D.H., K.M. Jensen, D.L. Villeneuve, M.D. Kahl, E.A. Makynen, E.J. Durhan, et al. 2007. Linkage of biochemical responses to population-level effects: A case study with vitellogenin in the fathead minnow (*Pimephales promelas*). *Environ. Toxicol. Chem.* 26: 521-527.
- Moore, R.W., T.A. Rudy, T.M. Lin, K. Ko and R.E. Peterson. 2001. Abnormalities of sexual development in male rats with in utero and lactational exposure to the antiandrogenic plasticizer Di(2-ethylhexyl) phthalate. *Environ. Health Perspect.* 109: 229-237.
- Muller, J. and W. Kordel. 1993. Occurrence and fate of phthalates in soil and plants. *Sci. Total Environ.*: 431-437.
- Nordberg, J. and E.S.J. Arnér. 2001. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. *Free Radical Biol. Med.* 31: 1287-1312.
- Norman, A., H. Borjeson, F. David, B. Tienpont and L. Norrgren. 2007. Studies of uptake, elimination, and late effects in Atlantic salmon (*Salmo salar*) dietary exposed to Di-2-ethylhexyl phthalate (DEHP) during early life. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 52: 235-242.
- Pant, N., M. Shukla, D. Kumar Patel, Y. Shukla, N. Mathur, Y. Kumar Gupta, et al. 2008. Correlation of phthalate exposures with semen quality. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 231: 112-116.
- Peijnenburg, W.J.G.M. and J. Struijs. 2006. Occurrence of phthalate esters in the environment of the Netherlands. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 63: 204-215.
- Preuss, M., G.D. Girnun, C.J. Darby, N. Khoo, A.A. Spector and M.E. Robbins. 2000. Role of antioxidant enzyme expression in the selective cytotoxic response of glioma cells to gamma-linolenic acid supplementation. *Free Radical Biol. Med.* 28: 1143-1156.
- Regoli, F., M. Benedetti and M.E. Giuliani. 2011. *Antioxidant Defenses and Acquisition of Tolerance to Chemical Stress. Tolerance to Environmental Contaminants.* CRC Press. p. 153-173.
- Regoli, F. and M.E. Giuliani. 2014. Oxidative pathways of chemical toxicity and oxidative stress biomarkers in marine organisms. *Mar. Environ. Res.* 93: 106-117.

- 
- Santos, M.A., M. Pacheco and I. Ahmad. 2004. *Anguilla anguilla* L. antioxidants responses to *in situ* bleached kraft pulp mill effluent outlet exposure. Environ. Int. 30: 301-308.
- Scandalios, J.G. 2005. Oxidative stress: molecular perception and transduction of signals triggering antioxidant gene defenses. Braz. J. Med. Biol. Res. 38: 995-1014.
- Seifried, H.E., D.E. Anderson, E.I. Fisher and J.A. Milner. 2007. A review of the interaction among dietary antioxidants and reactive oxygen species. J Nutr Biochem 18: 567-579.
- Shea, K.M. 2003. Pediatric exposure and potential toxicity of phthalate plasticizers. Pediatrics 111: 1467-1474.
- Silva, M.J., E. Samandar, J.L. Preau Jr, L.L. Needham and A.M. Calafat. 2006. Urinary oxidative metabolites of di(2-ethylhexyl) phthalate in humans. Toxicology 219: 22-32.
- Sioen, I., T. Fierens, M. Van Holderbeke, L. Geerts, M. Bellemans, M. De Maeyer, et al. 2012. Phthalates dietary exposure and food sources for Belgian preschool children and adults. Environ. Int. 48: 102-108.
- Srivithayapakorn, S. and S. Limtrakul. 2008. Distribution coefficient and adsorption-desorption rates of di (2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) onto and from the surface of suspended particles in fresh water. Water, Air, Soil Pollut. 190: 45-53.
- Slooff, W., C.F. Van Kreijl and A.J. Baars. 1983. Relative liver weights and xenobiotic-metabolizing enzymes of fish from polluted surface waters in the Netherlands. Aquat. Toxicol. 4: 1-14.
- Spitz, D.R. and L.W. Oberley. 1989. An assay for superoxide dismutase activity in mammalian tissue homogenates. Anal. Biochem. 179: 8-18.
- Srinivasan, C., A.I. Khan, V. Balaji, J. Selvaraj and K. Balasubramanian. 2011. Diethyl hexyl phthalate-induced changes in insulin signaling molecules and the protective role of antioxidant vitamins in gastrocnemius muscle of adult male rat. Toxicol. Appl. Pharmacol. 257: 155-164.
- Stales, C.A., D.R. Peterson, T.F. Parkerton and W.J. Adams. 1997. The environmental fate of phthalate esters: A literature review. Chemosphere 35: 667-749.
- Sun, L., J. Zha, P.A. Spear and Z. Wang. 2007. Toxicity of the aromatase inhibitor letrozole to Japanese medaka (*Oryzias latipes*) eggs, larvae and breeding adults.



- 
- Comp. Biochem. Physiol., C: Toxicol. Pharmacol. 145: 533-541.
- Teil, M.-J., M. Blanchard, C. Darnat, K. Larcher-Tiphagne and M. Chevreuil. 2007. Occurrence of phthalate diesters in rivers of the Paris district (France). *Hydrol. Process.* 21: 2515-2525.
- Thibaut, R. and C. Porte. 2004. Effects of endocrine disrupters on sex steroid synthesis and metabolism pathways in fish. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 92: 485-494.
- Thomas, J.A. and M.J. Thomas. 1984. Biological effects of di-(2-ethylhexyl)phthalate and other phthalic acid esters. *Crit. Rev. Toxicol.* 13: 283-317.
- Uno, T., M. Ishizuka and T. Itakura. 2012. Cytochrome P450 (CYP) in fish. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 34: 1-13.
- Uren-Webster, T.M., C. Lewis, A.L. Filby, G.C. Paull and E.M. Santos. 2010. Mechanisms of toxicity of di(2-ethylhexyl) phthalate on the reproductive health of male zebrafish. *Aquat. Toxicol.* 99: 360-369.
- USEPA. 2002. Technical Fact Sheet on: Di (2-Ethylhexyl) Phthalate (DEHP). Ground Water and Drinking Water. U.S. Environmental Protection Agency, U.S.A.
- van der Oost, R., J. Beyer and N.P.E. Vermeulen. 2003. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 13: 57-149.
- Viarengo, A., D. Lowe, C. Bolognesi, E. Fabbri and A. Koehler. 2007. The use of biomarkers in biomonitoring: A 2-tier approach assessing the level of pollutant-induced stress syndrome in sentinel organisms. *Comp. Biochem. Physiol., C: Toxicol. Pharmacol.* 146: 281-300.
- Wakamatsu, Y., C. Inoue, H. Hayashi, N. Mishima, M. Sakaizumi and K. Ozato. 2003. Establishment of new medaka (*Oryzias latipes*) stocks carrying genotypic sex markers. *Environ. Sci.* 10: 291-302.
- Wang, L., X. Gao, J. Guo and P. Ye. 2011. Determination of four phthalate esters in surface water by solid-phase extraction and simplified mobile phase HPLC. *Bioinformatics and Biomedical Engineering, (iCBBE) 2011 5th International Conference, 10-12 May 2011.*
- Wang, W., Z.R. Craig, M.S. Basavarajappa, R.K. Gupta and J.A. Flaws. 2012. Di (2-ethylhexyl) phthalate inhibits growth of mouse ovarian antral follicles through an oxidative stress pathway. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 258: 288-295.
- Wang, X., Y. Yang, L. Zhang, Y. Ma, J. Han, L. Yang, et al. 2013. Endocrine disruption by di-(2-ethylhexyl)-phthalate in Chinese rare minnow (*Gobiocypris rarus*).

- 
- Environ. Toxicol. Chem. 32: 1846-1854.
- Weiss, B. 2011. Endocrine disruptors as a threat to neurological function. *J. Neurol. Sci.* 305: 11-21.
- Wittassek, M., H.M. Koch, J. Angerer and T. Brüning. 2011. Assessing exposure to phthalates - The human biomonitoring approach. *Mol. Nutr. Food Res.* 55: 7-31.
- Woo, S., S. Yum, H.S. Park, T.K. Lee and J.C. Ryu. 2009. Effects of heavy metals on antioxidants and stress-responsive gene expression in Japanese medaka (*Oryzias javanicus*). *Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol.* 149: 289-299.
- Xu, C., J.A. Chen, Z. Qiu, Q. Zhao, J. Luo, L. Yang, et al. 2010. Ovotoxicity and PPAR-mediated aromatase downregulation in female Sprague-Dawley rats following combined oral exposure to benzo[a]pyrene and di-(2-ethylhexyl) phthalate. *Toxicol. Lett.* 199: 323-332.
- Ye, T., M. Kang, Q. Huang, C. Fang, Y. Chen, H. Shen, et al. 2014. Exposure to DEHP and MEHP from hatching to adulthood causes reproductive dysfunction and endocrine disruption in marine medaka (*Oryzias melastigma*). *Aquat. Toxicol.* 146: 115-126.
- Yuan, S.Y., C. Liu, C.S. Liao and B.V. Chang. 2002. Occurrence and microbial degradation of phthalate esters in Taiwan river sediments. *Chemosphere* 49: 1295-1299.
- Yuwatini, E., N. Hata and S. Taguchi. 2006. Behavior of di(2-ethylhexyl) phthalate discharged from domestic waste water into aquatic environment. *J. Environ. Monit.* 8: 191-196.
- Zanotelli, V.R., S.C. Neuhauss and M.U. Ehrenguber. 2010. Long-term exposure to bis(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP) inhibits growth of guppy fish (*Poecilia reticulata*). *J. Appl. Toxicol.* 30: 29-33.
- Zhang, Z., J. Hu, H. Zhen, X. Wu and C. Huang. 2008. Reproductive inhibition and transgenerational toxicity of triphenyltin on medaka (*Oryzias latipes*) at environmentally relevant levels. *Environ. Sci. Technol.* 42: 8133-8139.
- Zheng, Q., M. Feng and Y. Dai. 2013. Comparative antioxidant responses in liver of *Carassius auratus* exposed to phthalates: an integrated biomarker approach. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 36: 741-749.
- 行政院環境保護署. 2013. 毒性化學物質環境流布調查成果手冊. Taiwan (R.O.C.).
- 行政院環境保護署環境檢驗所. 2004. 固相萃取方法 (NIEA M188.OOC).

Taiwan(R.O.C).

財團法人成大研究發展基金會. 2008. 97 年度毒性化學物質環境流布背景調查資料  
計畫期末報告. EPA-97-J103-02-204. 行政院環境保護署, Taiwan (R.O.C).

國立成功大學環境微量毒物研究中心. 2001. 毒性化學物質環境流布暴露調查分析  
期末報告. 行政院環境保護署九十年科技研究發展計畫. Taiwan (R.O.C.).

陳冠雯. 2011. 康唑類殺菌劑和人造雌激素混合暴露干擾青鱈魚內分泌作用相關基  
因表達之研究. 臺灣大學.

