

# 北京市清河维 A 酸受体活性调查及原因物质解析

刘俊,沈路路,巫晓琴,胡建英\* (北京大学城市与环境学院,北京 100871)

**摘要:** 为了研究水环境中维 A 酸受体活性的成因,于 2009 年 3~7 月对清河河道进行了 4 次采样分析,利用固相萃取柱富集与重组基因酵母结合测试方法,研究了污水排放口上下游河段水样 RAR 活性的时空变化,并利用高效液相色谱分离活性馏分对原因物质进行了解析。结果发现,清河污水处理厂的上下游部分河段水样具有较高的 RAR $\alpha$  激活活性,但活性地点位置不稳定,随时间变化。同时,在对原因物质的解析中发现,all-trans-4-oxo-RA 和 13-cis-4-oxo-RA 只是极小部分原因物质,环境水样中依然存在大量的未知 RAR 活性物质。

**关键词:** 类维 A 酸物质; 维 A 酸受体(RAR); 清河; 酵母双杂交测试

**中图分类号:** X172, X835 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-6923(2010)08-1038-06

**Occurrence and identification of environmental retinoids in Qing River, Beijing.** LIU Jun, SHEN Lu-lu, WU Xiao-qin, HU Jian-ying\* (College of Urban and Environmental Sciences, Peking University, Beijing 100871, China). *China Environmental Science*, 2010,30(8): 1038~1043

**Abstract:** In order to investigate RAR agonistic activity in aqueous environment, water samples were collected from Qing River, Beijing in each month from March to July, 2009. Water samples were extracted by solid-phase extract cartridges and their RAR agonistic activities were tested by RAR $\alpha$  yeast two-hybrid bioassay. A further identification of environmental retinoids was carried out using high-performance liquid chromatography. Samples from some locations both upstream and downstream of the sewage treatment plant exhibited unexpectedly high RAR  $\alpha$  agonistic activities, and the variation of agonistic activity was random. Identification of causal chemicals suggested that all-trans-4-oxo-RA and 13-cis-4-oxo-RA contributed a small part to the RAR  $\alpha$  agonistic activity, and there are still unknown RAR $\alpha$  agonists in Qing River.

**Key words:** retinoids; retinoic acid receptor (RAR); Qing River; yeast two-hybrid assay

全反式维 A 酸(all-trans-RA)、9-顺式维 A 酸(9-cis-RA)和 13-顺式维 A 酸(13-cis-RA)是维 A 酸受体(RARs)和维 A 酸 X 受体(RXR $s$ )的内源性配体<sup>[1-4]</sup>,通过与这 2 类受体结合<sup>[5]</sup>,调控着脊椎和无脊椎动物组织生长和平衡<sup>[6-7]</sup>,体内的类维生素 A 过量或不足都可能引发动物的畸变<sup>[1,8-9]</sup>。在已知的维 A 酸受体的活性配体中,具有致畸作用的化学物质都能选择性地与 RAR 结合<sup>[1]</sup>。除了天然类维生素 A 外,大量人工合成化学物质如有机氯农药和一些化工原料也被检测出具有 RAR 活性<sup>[6,10]</sup>,但是这些人工合成物质诱导 RAR 活性远低于内源性配体(约 100~1000 倍)<sup>[10]</sup>。

环境中的 RAR 活性物质作为潜在的致畸物已经引起了科学家的关注<sup>[11-13]</sup>。2003 年, Gardiner 等<sup>[11]</sup>在明尼苏达和加利福尼亚有畸形青蛙出现的环境水样中检测到了 RAR 活性,他们怀疑导致

该地区青蛙畸形的可能是水中的一系列环境类维生素 A 物质,但是由于不知道诱导环境中 RAR 活性的具体化学物质,环境和青蛙畸形的关系至今还是一个谜。Inoue 等<sup>[12]</sup>在日本 4 条河道中也检测出较高的 RAR $\alpha$  活性,并发现河道中 RAR 活性物质可能比已知的雌激素受体(ER)活性物质污染状况更为严重。Zhen 等<sup>[13]</sup>利用 RAR $\alpha$  重组基因酵母生物测试与 HPLC 分割相结合的方法,首次在北京城污水样中鉴定出维 A 酸的 2 种代谢产物 all-trans-4-oxo-RA 和 13-cis-4-oxo-RA。到目前为止的研究,大多集中在河道水或者城市污水处理厂进出水中 RAR 活性强度的测试,原因物质的解析仅仅停留在城市污水,自然水体中是否存

收稿日期: 2009-12-16

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(20777002, 20837003)

责任作者: 教授, hujy@urban.pku.edu.cn

在不同于城市污水厂的未知 RAR 活性物质依然不清楚.基于此,本研究于 2009 年 3~7 月在清河河道采样,利用固相萃取柱富集与重组基因酵母结合测试方法,研究了污水排放口上下游河段水样 RAR 活性的时空变化,并利用高效液相色谱分割活性馏分对原因物质进行了初步解析,以期为环境中 RAR 活性成因的研究提供基础.

## 1 材料与方 法

### 1.1 材料与仪器

全反式维 A 酸(99%, St Louis, USA);二甲基亚砜(DMSO,GC 级,北京宝希迪科技有限公司);显色剂 4-甲基伞形酮- $\beta$ -D-葡萄糖醛酸苷(ONPG, o-Nitrophenyl- $\beta$ -D-Galactopyranoside, 东京化工);溶菌酶 Zymolyase 20T(Seiagaku Corporation);SD

培养基(去除了 tryptophan,所有氨基酸都购自 sigma 公司);Yeast Nitrogen Base (购自 SIGMA);Bio-RAD 550 酶标仪(Thermo Electron Corporation), Nunc 96 孔酶标板;Jouan MR 18 22 冷冻离心机(购自 Sigma 公司);恒温培养箱;HPLC 级的甲醇,乙酸乙酯,正己烷(Fisher Chemical Co. USA);分析纯浓盐酸(购自北京化学试剂公司);Millipore 超纯水仪;OASIS HLB(500mg 6cc)固相萃取小柱(购自美国 waters 公司);玻璃纤维滤膜(Whatman 公司);KL512 型氨吹仪;LRH-150 生化培养箱(上海一恒科技有限公司).

### 1.2 样品的采集和前处理

在清河污水处理厂的上下游分别选取了 11 个采样点(从上游到下游,序号由小变大)(图 1),其中 6 号采样点为清河污水处理厂的出水口.

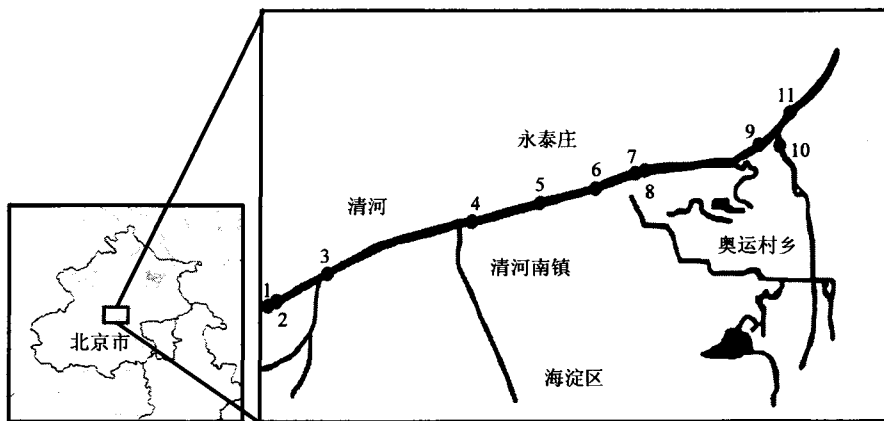


图 1 北京市清河采样点分布

Fig.1 Distribution of sampling sites in Qing River, Beijing

于 2009 年 3 月 31 日、5 月 9 日、6 月 25 日和 7 月 16 日采集清河河道水样品,采样时间尽可能错开下雨时间,采集后的河水样品当天进行处理.取 2L 水样,用盐酸调节 pH 值到 3.0,依次用 6mL 正己烷(HEX)、乙酸乙酯(EA)、甲醇(MeOH)和纯水活化 HLB 固相萃取小柱,然后以约 10mL/min 的速度上样.整个过程避光操作,富集结束后,HLB 固相萃取柱用微弱的  $N_2$  吹干,然后  $-20^{\circ}C$  冰箱保存.

将固相萃取柱依次用 6mL 正己烷、乙酸乙酯、甲醇进行洗脱,洗脱液分别记作 HEX,EA,

MeOH 馏分,然后将洗脱液在微弱的氮气流下吹干,然后用 DMSO 定容到  $400\mu L$ ,水样的浓缩倍数为 5000 倍.

### 1.3 酵母双杂交活性测试

活性测试采用酵母双杂交方法,菌株为 *Saccharomyces cerevisiae* Y190,由日本大阪大学药学院 Nishikawa 博士馈赠,菌株上接有人类 RAR $\alpha$  片段的质粒和共激活因子 pGAAD424-TIF2 和半乳糖酶报告基因.具体操作按文献[13]报道的方法进行.

### 1.4 样品的 HPLC 分割

将 EA 溶解的样品用微弱  $N_2$  气流吹干后再用甲醇溶解,取  $100\mu\text{L}$  进样. Waters Symmetry Shield<sup>TM</sup> ( $4.6\text{mm}\times 250\text{mm}$ , 粒径  $5\mu\text{m}$ ) 色谱柱用于样品分离. 流动相为纯水和乙腈, 流速为  $1\text{mL}/\text{min}$ , 紫外检测器的波长为  $350\text{nm}$  和  $254\text{nm}$ . 实验采用梯度洗脱方法,  $0\sim 3\text{min}$  时保持纯水和乙腈分别为  $80\%$  和  $20\%$ , 随后在  $3\sim 30\text{min}$  逐步提高乙腈浓度至  $100\%$ , 并保持  $10\text{min}$  ( $30\sim 40\text{min}$ ), 最后在  $0.1\text{min}$  内将乙腈比率降至  $20\%$ , 淋洗柱子  $10\text{min}$  ( $40\sim 50\text{min}$ ) 直到下一次进样. 从  $0\text{min}$  开始, 每隔  $2\text{min}$  为一个时间段进行分割, 每个时间段的样品都保存在  $5\text{mL}$  的棕色瓶中, 一共  $25$  个样品, 具体分割方法参考文献 [13]. 然后在微弱的氮气流下吹掉乙腈后冻干. 再用 DMSO 定容到  $100\mu\text{L}$ , 然后用酵母双杂交方法测试每个馏分的活性.

## 1.5 UPLC-MS/MS 分析

用超高效液相色谱-双极质谱仪进一步分析 HPLC 分割后显示较高活性的  $15^{\#}$  馏分中 all-trans-4-oxo-RA 和 13-cis-4-oxo-RA 的浓度水平. 分离柱用 Waters 的 ACQUITYUPLC BEH C18 柱 ( $2.1\text{mm}\times 100\text{mm}$ , 粒径  $1.7\mu\text{m}$ ). 设置液相色谱柱的柱温为  $30^{\circ}\text{C}$ , 流速为  $0.2\text{mL}/\text{min}$ . 流动相 A 为  $0.1\%$  甲酸水溶液, 流动相 B 为乙腈, 乙腈比例为  $60\%$ , 检测离子对  $315>137$  (Collision Energy  $24\text{eV}$ ), 定性离子对  $315>241$  (Collision Energy  $15\text{eV}$ ),  $315>121$  (Collision Energy  $15\text{eV}$ ),  $315>121$  (Collision Energy  $30\text{eV}$ ), ESI 正离子 (ESI+) 模式分析.

## 2 结果与讨论

### 2.1 清河 RAR $\alpha$ 活性的时空变化

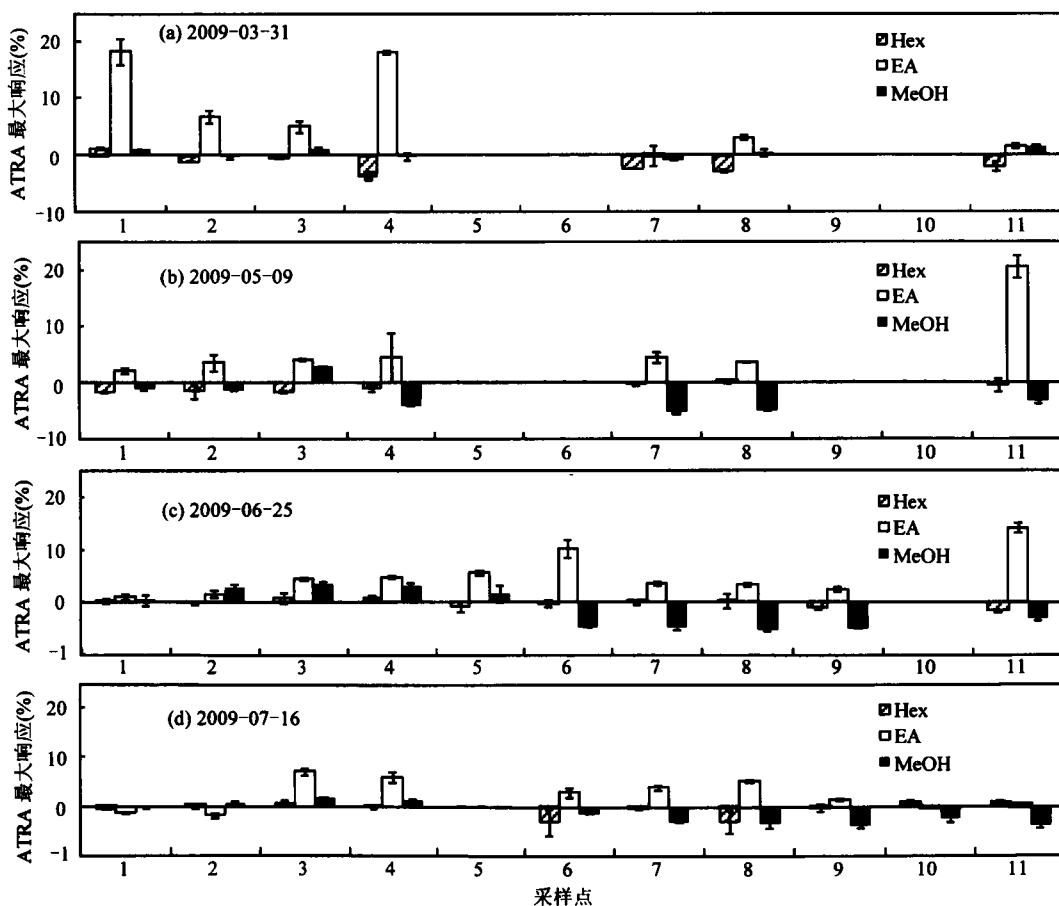


图2 清河 RAR $\alpha$  活性调查结果

Fig.2 RAR $\alpha$  agonistic activity of water samples from 11 sights in Qing River

样品浓缩倍数均为 5000

酵母双杂交活性测试体系以 *all-trans*-RA 作为阳性对照物,将样品的  $\beta$ -半乳糖苷酶值换算为当天 *all-trans*-RA 最大响应值的百分比,根据 origin 非线性拟合的标准曲线计算出 *all-trans*-RA 等当量浓度 ATRA-EQ<sub>bio</sub>,具体检测结果如图 2 所示。

由图 2 可见,采样期间所有采样点的 HEX(非极性)馏分都没有出现明显活性,活性最高的点均出现在 EA(中极性)馏分,这与 Zhen 等<sup>[13]</sup>的结果相似。其中,3 月 31 日采集的样品中,1 号和 4 号采样点出现了很高的 RAR 相对活性,分别达到 18.2%和 18.1%, ATRA-EQ<sub>bio</sub> 分别为 2.53,1.96ng/L; 5 月 9 日采集的样品中,11 号采样点的 RAR 相对活性达到了 20.6%, ATRA-EQ<sub>bio</sub> 为 3.86ng/L; 6 月 25 日的采集点中,6 号和 11 号采样点的相对活性分别达到了 12.0%和 16.6%, ATRA-EQ<sub>bio</sub> 分别为 1.76,3.02ng/L;但是在 7 月 16 日采集的样品中,RAR 相对活性普遍偏低,最高的 3 号点的 RAR 相对活性为 7.1%, ATRA-EQ<sub>bio</sub> 为 0.93ng/L,明显低于其他时间段,这可能与 7 月上旬北京连续降水导致活性物质浓度的降低有关。至于 MeOH 馏分,在部分采样点检测到了 RAR 活性较低,最高的发生在 6 月 25 日的 3 号采样点,RAR 相对活性仅为 3.4%,远远低于同组 EA 馏分活性的最高值。从 3~7 月的连续采样中,EA 馏分最高值出现的采样点不稳定,1 号、4 号、6 号和 11 号采样点均出现高值。其中污水处理厂(6 号点)近下游的采样点(7~9 号)诱导活性均不高,且较为稳定,这一现象日本最近的研究结果非常相似。Inoue 等<sup>[12]</sup>对日本 4 条河道河水中 RAR $\alpha$ 活性强度进行了检测,发现活性高值往往出现在污水处理厂的上游。这一个结果表明清河水体中的 RAR $\alpha$ 诱导活性物质不是由污水处理厂排放,而是来自郊区和农业污染源等的排放。同时 11 号点在 5 月 9 日和 6 月 25 日的采样中,连续 2 次出现最高值,而其上游位置检测活性非常低。并且根据对采样点的实地考察发现,11 号点水质非常浑浊,河水散发恶臭气味,怀疑该点的 RAR $\alpha$ 活性最高值可能与污染物的点源输入有关,但还需进一步调查。

## 2.2 原因物质解析

清河 RAR $\alpha$  活性的调查结果显示,3 月 31 日 1 号、4 号样点和 5 月 9 日 11 号采样点均出现了活性高值。为了解析活性的原因物质,用 HPLC 将 EA 馏分重新细分割成多个馏分,并通过酵母双杂交实验对各馏分进行了活性测试,结果如图 3 所示。

由图 3 可见,3 个采样点都在 15<sup>#</sup>馏分显示明显活性,而 2009 年 3 月 31 日 4 号采样点的 14<sup>#</sup>馏分,2009 年 5 月 9 日 11 号采样点的 13<sup>#</sup>和 14<sup>#</sup>馏分也出现较高的活性,活性测试结果与 Gardiner 等<sup>[11]</sup>得到的活性最大值位于中段分割馏分的结果相一致。据 Zhen 等<sup>[13]</sup>的研究,15<sup>#</sup>馏分中的 *all-trans*-4-oxo-RA 和 13-*cis*-4-oxo-RA 是诱导北京市城污样品中 RAR 活性的主要原因物质。本研究中,15<sup>#</sup>馏分是清河水样的主要 RAR 活性馏分,但不同地点的活性馏分存在差异,有的采样点 13<sup>#</sup>或 14<sup>#</sup>馏分也出现较高活性,证明清河河道水存在 15<sup>#</sup>馏分外的其他活性物质。同时,以往研究<sup>[13]</sup>显示,污水处理厂出水活性物质集中于 15<sup>#</sup>馏分,但清河河道水与污水处理厂出水活性馏分差别较大,在 13<sup>#</sup>或 14<sup>#</sup>馏分中依然具有很高活性,表明其 RAR 活性物质还存在未知源,这可能与某些河段未知的点源污染输入有关,还需要开展进一步的调查。

为了检验 15<sup>#</sup>馏分 RAR 活性的原因物质,对 3 月 31 日 1 号、4 号采样点和 5 月 9 日 11 号采样点的 15<sup>#</sup>馏分进行了 LC-ESI-MS-MS 分析,并和标样 *all-trans*-4-oxo-RA 和 13-*cis*-4-oxo-RA 保留时间进行了对比,结果证实了这 2 种物质的存在。*all-trans*-4-oxo-RA 和 13-*cis*-4-oxo-RA 在 2009 年 3 月 11 日 1 号采样点中的化学检测浓度分别为 0.48, 0.28ng/L, 3 月 11 日 4 号采样点中的浓度分别为 0.58, 0.29ng/L, 5 月 9 日 11 号采样点中的浓度分别为 1.1, 1.3ng/L。据报道<sup>[13]</sup>, *all-trans*-4-oxo-RA 和 13-*cis*-4-oxo-RA 相对于 *all-trans*-RA 的等当量系数分别为 3.87 和 0.46, 通过该系数的换算,可以计算得到生物响应 ATRA-EQ<sub>cal</sub>。由表 1 可知,3 个采样点的 15<sup>#</sup>馏分的生物检测活性都高于化学检测得到的 *all-trans*-4-oxo-RA 和 13-*cis*-4-oxo-RA 两种物质的活性强

度总和,其中5月9日11号样点的生物活性最高达到了8.75ng/L.表明15<sup>#</sup>馏分的all-trans-4-oxo-RA和13-cis-4-oxo-RA只能解释样品中的一部分原

因物质, Inoue 等<sup>[14]</sup>对日本大阪地区的河道中RAR活性的最新研究也证实水环境中依然有大量未知活性RAR物质,有待进一步研究.

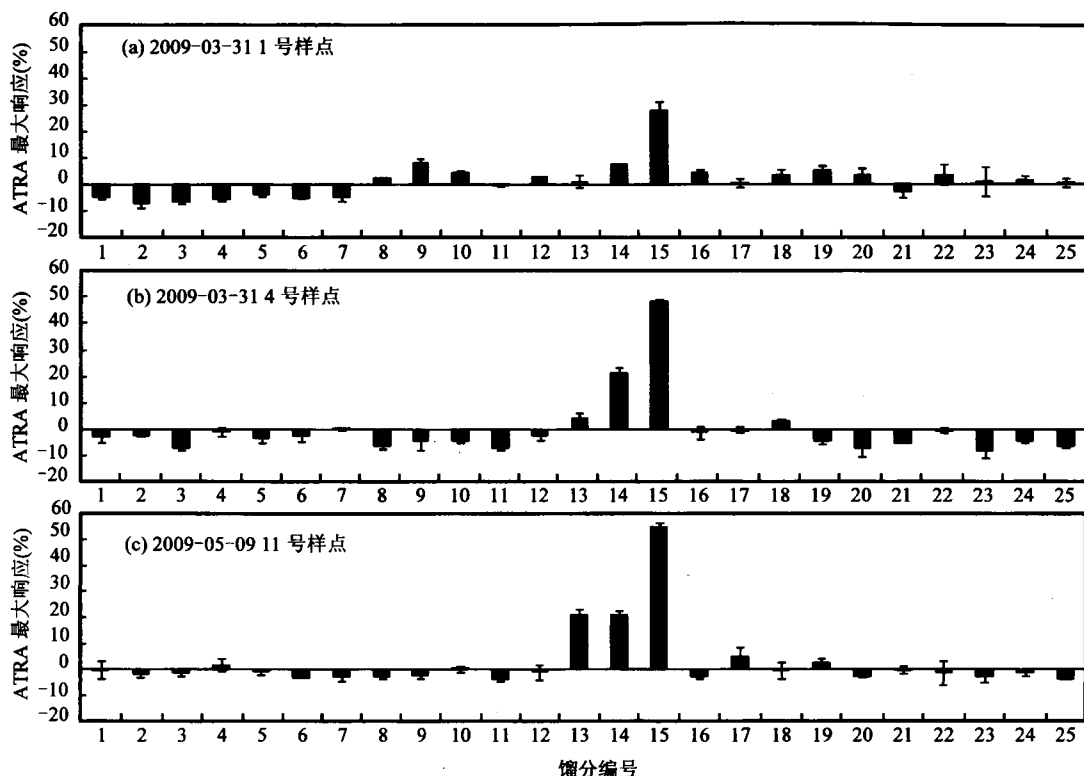


图3 2009年3月31日1号、4号采样点和2009年5月9日11号采样点水样的F2馏分经HPLC分割后的RARα活性测试结果

Fig.3 RARα agonistic activity profiles produced from F2 fractions of three samples(Site 1 on March 31<sup>th</sup>, 2009, Site 4 on March 31<sup>th</sup>, 2009, Site 11 on May 9<sup>th</sup>, 2009) using a bioassay-directed HPLC fractionation method

表1 15<sup>#</sup>馏分的化学活性和生物检测活性比较

Table 1 Comparison of Chemical-Derived all-trans-RA Equivalents (ATRA-EQ<sub>cal</sub>) and the corresponding ATRA-EQ<sub>bio</sub> values derived from bioassay

样品	浓度(ng/L)			生物活性
	all-trans-4-oxo-RA	13-cis-4-oxo-RA	ATRA-EQ <sub>cal</sub>	ATRA-EQ <sub>bio</sub> (ng/L)
3月31日1号样点	0.48	0.28	1.99	3.33
3月31日4号样点	0.58	0.29	2.38	6.77
5月9日11号样点	1.10	1.32	4.86	8.75

### 3 结语

对清河污水处理厂上下游11个采样点的RARα活性调查结果显示,具有较高RARα活性

的样点位置不固定,对all-trans-RA等当量活性的ATRA-EQ<sub>bio</sub>最高可达3.86ng/L.与污水处理厂出水不同,清河河道水样EA馏分经HPLC分割后,除15<sup>#</sup>外,13<sup>#</sup>和14<sup>#</sup>馏分也能诱导较强RARα

活性,证明清河河道水中大部分活性物质不是来自污水处理厂出水,还有很多未知活性物质.在对原因物质解析中发现,15<sup>#</sup>馏分中的 all-*trans*-4-oxo-RA 和 13-*cis*-4-oxo-RA 只是一小部分 RAR $\alpha$  活性的贡献物质,其中还有大量未知活性物质有待解析.

#### 参考文献:

- [1] Collins, M D, Mao G E. Teratology of retinoids [J]. Annual Review of Pharmacology and Toxicology, 1999,39:399-430.
- [2] Idres N, Marill J, Flexor M A, et al. Activation of retinoic acid receptor-dependent transcription by all-*trans*-retinoic acid metabolites and isomers [J]. Journal of Biological Chemistry, 2002,277(35): 31491-31498.
- [3] Novak J, Benisek M, Hilscherova K. Disruption of retinoid transport, metabolism and signaling by environmental pollutants [J]. Environment International, 2008,34(6):898-913.
- [4] Veal G J, Errington J, Redfern C R, et al. Influence of isomerisation on the growth inhibitory effects and cellular activity of 13-*cis* and all-*trans* retinoic acid in neuroblastoma cells [J]. Biochemical Pharmacology, 2002,63(2):207-215.
- [5] Wang F, Kwak H S R, Elbuluk N, et al. Retinoic acid 4-hydroxylase inducibility and clinical response to isotretinoin in patients with acne [J]. Journal of the American Academy of Dermatology, 2009,61(2):252-258.
- [6] Lemaire G, Balaguer P, Michel S, et al. Activation of retinoic acid receptor-dependent transcription by organochlorine pesticides [J]. Toxicology and Applied Pharmacology, 2005,202(1):38-49.
- [7] Reichrath J, Lehmann B, Carlberg C, et al. Vitamins as hormones [J]. Hormone and Metabolic Research, 2007,39(2):71-84.
- [8] Elmazar M M A, Reichert V, Shroot B, et al. Pattern of retinoid-induced teratogenic effects: Possible relationship with relative selectivity for nuclear retinoid receptors RAR alpha, RAR beta, and RAR gamma [J]. Teratology, 1996,53(3):158-167.
- [9] Zile M H. Function of vitamin A in vertebrate embryonic development [J]. Journal of Nutrition, 2001, 131(3): 705-708.
- [10] Kanayama T, Kobayashi N, Mamiya S, et al. Organotin compounds promote adipocyte differentiation as agonists of the peroxisome proliferator-activated receptor gamma/retinoid x receptor pathway [J]. Molecular Pharmacology, 2005,67(3):766-774.
- [11] Gardiner D, Ndayibagira A, Grun F, et al. Deformed frogs and environmental retinoids [J]. Pure and Applied Chemistry, 2003, 75(11/12):2263-2273.
- [12] Inoue D, Nakama K, Matsui H, et al. Detection of agonistic activities against five human nuclear receptors in river

environments of Japan using a yeast two-hybrid assay [J]. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, 2009, 82(4):399-404.

- [13] Zhen H J, Wu X, Hu J, et al. Identification of retinoic acid receptor agonists in sewage treatment plants [J]. Environmental Science and Technology, 2009,43(17):6611-6616.
- [14] Inoue D, Nakama K, Sawada K, et al. Contamination with retinoic acid receptor agonists in two rivers in the Kinki region of Japan [J]. Water Research, 2010,44(8):2409-2418.

作者简介: 刘 俊(1987-),女,四川郫县人,北京大学城市与环境学院本科生,研究方向为环境科学.

#### 环保信息

开展低碳产品认证,引导可持续消费 伴随全球大力发展绿色低碳经济的热潮,中国政府也非常重视并启动了绿色低碳经济的推进工作.当前,我国在可持续消费法律制度和经济政策建设方面已经取得了积极进展,可持续消费政策框架基本形成.促进消费观念的转变,倡导可持续消费模式是我国未来一段时间环境保护工作的重点.

中国环境标志低碳产品认证可以帮助生产商和销售商更好地传播产品在保护气候方面的信息,同时帮助消费者在消费过程中进行判断和选择,推动我国气候友好和可持续消费,引导消费者为保护气候做出应有的贡献.

摘自《中国环境报》

2010-07-16