

环境科学

(HUANJING KEXUE)

ENVIRONMENTAL SCIENCE

第33卷 第11期

Vol.33 No.11

2012

中国科学院生态环境研究中心 主办
科学出版社 出版



目次

京津冀与长三角区域大气 NO ₂ 污染特征	王英, 李令军, 刘阳 (3685)
2008~2011 年夏季京津冀区域背景大气污染变化分析	杨俊益, 辛金元, 吉东生, 朱彬 (3693)
沧州市大气污染特征观测研究	王永宏, 胡波, 王跃思, 刘伟, 张武 (3705)
华北工业城市降水中金属元素污染特征及来源	李月梅, 潘月鹏, 王跃思, 王英锋, 李杏茹 (3712)
广州市交通主干道空气中苯系物的测量	叶丛雷, 谢品华, 秦敏, 凌六一, 郑尼娜, 刘文彬, 黄祖照 (3718)
基于实时交通信息的道路机动车动态排放清单模拟研究	黄成, 刘娟, 陈长虹, 张健, 刘登国, 朱景瑜, 黄伟明, 巢渊 (3725)
柴油轿车燃用煤基 F-T 合成油的排放特性	胡志远, 程亮, 谭丕强, 楼狄明 (3733)
九龙江口滨海湿地生源要素空间分布特征	余小青, 杨军, 刘乐冕, 田原, 余正, 王昌付 (3739)
南四湖水体氮、磷营养盐时空分布特征及营养状态评价	舒凤月, 刘玉配, 赵颖, 吴艳鹏, 李爱华 (3748)
天目湖流域湿地对氮磷输出影响研究	李兆富, 刘红玉, 李恒鹏 (3753)
北京市新建城区不透水地表径流 N、P 输出形态特征研究	李立青, 吕书丛, 朱仁肖, 刘泽权, 单保庆 (3760)
云阳宗海库的分布与来源	张玉玺, 向小平, 张英, 陈玺, 刘景涛, 王金翠, 张媛静, 孙继朝 (3768)
南方某城市地表水体中粪源性污染指示微生物的分布特征研究	孙傅, 沙婧, 刘彦华 (3778)
三峡库区大宁河藻细胞昼夜垂直迁移研究	张永生, 郑丙辉, 姜霞, 郑浩, 钟娜, 陈春宵 (3787)
江淮农村生态型排水系统构建及截污作用研究	单保庆, 李楠, 唐文忠 (3797)
人工湿地植物床-沟壕系统水质净化效果	汪仲琼, 张荣斌, 陈庆华, 魏宏斌, 王为东 (3804)
潜流人工湿地演变对废水中有机物、氮及磷去除的影响	魏泽军, 谢建平, 黄玉明 (3812)
人工湿地处理含盐生活污水的特性研究	高峰, 杨朝晖, 李晨, 金卫红, 邓一兵 (3820)
催化湿式氧化法降解水中的 β -萘酚	刘杰, 于超英, 赵培庆, 陈革新 (3826)
ZVI/EDDS/Air 体系降解水中 2,4-二氯酚的研究	孙倩, 周海燕, 曹梦华, 吴琳娜, 王琳玲, 陈静, 陆晓华 (3833)
微波改性 MWNTs/TiO ₂ 复合材料对 1,2,3-三氯苯的光催化降解研究	施周, 张茜, 张伟, 徐舜开, 张骅 (3840)
腐殖酸对生物炭去除水中 Cr(VI) 的影响机制研究	丁文川, 田秀美, 王定勇, 曾晓岚, 徐茜, 陈健康, 艾小雨 (3847)
臭氧氧化-活性污泥法处理含 PVA 工业废水的试验研究	邢晓琼, 黄程兰, 刘敏, 陈滢 (3854)
复合底物对颗粒化 EBPR 系统除磷特性的影响及优化试验研究	徐少娟, 孙培德, 郑雄柳, 董毅 (3859)
进水比例对水解反应器出水水质的影响研究	梁康强, 熊娅, 戚茂荣, 林秀军, 朱民, 宋英豪 (3868)
厌氧-好氧联合型生物反应器填埋场渗滤液水质水量变化规律的研究	韩智勇, 刘丹, 李启彬, 陈馨 (3873)
我国城市污水处理回用调查研究	郭宇杰, 王学超, 周振民 (3881)
快雌醇和壬基酚在土壤中的吸附-解吸特征	姜鲁, 王继华, 李建忠, 辛佳, 李森, 刘翔 (3885)
黄土丘陵区刺槐林深层土壤有机碳矿化特征初探	马昕昕, 许明祥, 杨凯 (3893)
半干旱黄土丘陵区土壤结皮的地表水文效应	卫伟, 温智, 陈利顶, 陈瑾, 吴东平 (3901)
广西大石围巨型漏斗土壤中多环芳烃与环境因素	孔祥胜, 祁士华, 蒋忠诚, 黄保健 (3905)
酸性条件下黄铁矿氧化机制的研究	王楠, 易筱筠, 党志, 刘云 (3916)
淋洗条件下砂土和粉土盐运移过程的监测研究	付腾飞, 贾永刚, 郭磊, 刘晓磊 (3922)
空气注射修复苯污染地下水模拟研究	樊艳玲, 姜林, 张丹, 钟茂生, 贾晓洋 (3927)
不同终点检测 5 种双酚 A 类化合物对 MCF-7 的细胞毒性	张帅帅, 刘堰, 刘树深, 朱祥伟 (3935)
上海世博园后滩湿地桤木类群落特征及其对环境因子的响应	陈立婧, 吴艳芳, 景钰湘, 王聪, 张饮江 (3941)
耐盐石油烃降解菌的筛选鉴定及其特性研究	吴涛, 谢文军, 依艳丽, 李小彬, 王君, 胡相明 (3949)
高效降酚菌株 <i>Ochrobactrum</i> sp. CH10 生长动力学和苯酚降解特性的研究	陈晓华, 魏刚, 刘思远, 孙江曼, 王芳芳, 李昊源, 刘宇军 (3956)
四溴双酚 A 好氧降解菌的筛选及其降解特性研究	钱艳园, 刘莉莉, 于晓娟, 丁丛, 王志平, 施玉衡, 李晨君 (3962)
长期施用有机和无机肥对黑土 <i>nirS</i> 型反硝化菌种群结构和丰度的影响	尹昌, 范分良, 李兆君, 宋阿琳, 朱平, 彭畅, 梁永超 (3967)
三氯乙烯在不同土壤中的吸附特性及其影响因素研究	何龙, 邱兆富, 吕树光, 逯志昌, 王治立, 隋倩, 林匡飞, 刘勇弟 (3976)
多菌灵在农田土壤中的降解及其影响因素研究	肖文丹, 杨肖娥, 李廷强 (3983)
硫化物对垃圾焚烧污泥焚烧飞灰高温过程中重金属挥发的影响	刘敬勇, 孙永裕 (3990)
关于医疗垃圾飞灰中二噁英在惰性气氛下的低温热脱附研究	纪莎莎, 李晓东, 徐旭, 陈彤 (3999)
第七届环境模拟与污染控制学术研讨会论文	
稻田气溶胶 NH ₃ 和气体 NO _x 排放在线测定研究	龚巍巍, 栾胜基 (4006)
一种可同时检测挥发性氯代烷烃和氯代烯烃的电子鼻的研制	文晓刚, 刘锐, 蔡强, 万梅, 汤灵容, 陈吕军 (4012)
基于被动采样技术的垃圾焚烧厂及周边大气中 PAHs 分布研究	孙少艾, 李洋, 周轶, 王海蛟, 孙英 (4018)
涪江流域农业非点源污染空间分布及污染源识别	丁晓雯, 沈珍瑶 (4025)
人工湿地不同区域基质磷含量的差异分析	曹雪莹, 种云霄, 余光伟, 仲海涛 (4033)
基于 RT-qPCR 选择性检测水中活性病原菌	林怡雯, 李丹, 吴舒旭, 何苗, 杨天 (4040)
消毒副产物生成的温度影响和动力学模型	张小璐, 杨宏伟, 王小仵, 付静, 解跃峰 (4046)
一种厌氧微观定量研究新方法	张仲良, 吴静, 蒋剑凯, 姜洁, 李怀志 (4052)
梧桐树叶作为反硝化碳源的研究	熊剑峰, 徐华, 阎宁, 张永明 (4057)
降解嗜盐菌 AD-3 的筛选、降解特性及加氧酶基因的研究	崔长征, 冯天才, 于亚琦, 董斐, 杨昕梅, 冯耀宇, 刘勇弟, 林汉平 (4062)
《环境科学》征订启事 (3711) 《环境科学》征稿简则 (3767) 信息 (3998, 4039, 4045, 4056) 专辑征稿通知 (4051)	

不同终点检测 5 种双酚 A 类化合物对 MCF-7 的细胞毒性

张帅帅^{1,2}, 刘堰¹, 刘树深^{2*}, 朱祥伟²

(1. 西南大学生命科学学院, 淡水鱼类资源与生殖发育教育部重点实验室, 重庆 400715; 2. 同济大学环境科学与工程学院, 长江水环境教育部重点实验室, 上海 200092)

摘要: 双酚 A (BPA) 及其类似物作为聚碳酸酯的主要合成原料, 一直是环境污染的重要问题. 其雌激素效应是当今科学研究的重点, 而毒性效应研究甚少. 为评估环境中 BPA 类物质的毒性效应, 实验采用四唑盐 (MTS) 比色法检测 5 种双酚 A 类化合物对人雌激素受体缺失乳腺癌细胞 MCF-7 (ER-) 增殖活性的影响, 2,4-二硝基苯肼法检测细胞乳酸脱氢酶 (LDH) 露出率, 单细胞凝胶电泳 (SCGE) 检测 DNA 损伤. 用非线性最小二乘法对 MTS 实验结果拟合剂量-效应曲线, 表明所有的剂量-效应曲线 (DRC) 均能用 Weibull 或者 Logit 函数有效表征. 以模型估算的半数效应浓度负对数值 ($-\lg EC_{50}$) 评估 5 种化合物的毒性大小依次为: BPB > BPC > TDP > BPE > BPA. LDH 检测以及 SCGE 检测受试化合物对 MCF-7 (ER-) 的损伤作用表明, 在效应浓度 EC_{20} 下, 细胞核 DNA 轻微损伤, 细胞增殖受轻微抑制; 在效应浓度 EC_{40} 下, 细胞核 DNA 损伤严重, 细胞增殖受到显著抑制, 从而导致细胞膜通透性显著改变, 使 LDH 大量露出.

关键词: 双酚 A (BPA); MCF-7; 细胞毒性; 单细胞凝胶电泳 (SCGE); 乳酸脱氢酶 (LDH)

中图分类号: X171.5 **文献标识码:** A **文章编号:** 0250-3301(2012)11-3935-06

Detecting the Cytotoxicities of Five Bisphenol A Analogues to the MCF-7 Human Breast Carcinoma Cell Line Through Different Endpoints

ZHANG Shuai-shuai^{1,2}, LIU Yan¹, LIU Shu-shen², ZHU Xiang-wei²

(1. Key Laboratory of Freshwater Fish Reproduction and Development, Ministry of Education, College of Life Science, Southwest University, Chongqing 400715, China; 2. Key Laboratory of Yangtze River Water Environment, Ministry of Education, College of Environmental Science and Engineering, Tongji University, Shanghai 200092, China)

Abstract: As the main synthetic raw materials of polycarbonate, bisphenol A (BPA) and its analogues have been important issues in environmental pollution. The current studies focus mainly on BPA's estrogen effects and little on their cytotoxic effects. To assess the cytotoxicities of the five BPA analogues, we employed the MTS assay to determine the inhibition toxicity to MCF-7 (ER-), 2,4-dinitrophenylhydrazine assay to determine the release rate of lactate dehydrogenase (LDH) escaping into cell culture medium, and single cell gel electrophoresis assay (SCGE) to detect DNA damage. The dose-response curves (DRC) between the observed inhibition toxicities and concentrations of the BPA compounds in MTS assay were fitted by using the nonlinear least squares (NLS) and the results showed that all the dose-response relationships were effectively described by the Weibull or Logit function. The toxicities expressed by $-\lg EC_{50}$ were BPB > BPC > TDP > BPE > BPA. LDH assay and SCGE assay showed that when the concentrations of BPA analogues were EC_{20} , the MCF-7 cell proliferation was slightly inhibited due to its little damaged DNA, and at EC_{40} the cell proliferations were significantly inhibited due to the seriously damaged DNA, leading to the damage of cell membrane and release of LDH.

Key words: BPA; MCF-7; cytotoxicity; SCGE; LDH

细胞毒性试验是生物学评价体系中最重要检测指标之一, 是体外检测待测物质暴露于受试生物后生化生理反应变化的重要手段. 目前分析细胞毒性和细胞活性的方法有很多种, 四甲基偶氮唑盐 (MTT) 比色法常用于直接检测细胞代谢活性. 与 MTT 法相比, 新型四唑氮衍生物 (MTS)^[1] 能被活细胞中线粒体脱氢酶降解而产生棕黄色水溶性的甲臌, 直接进行比色测定, 更加快捷, 而且 MTS 还原产物稳定性更好, 颜色更深, 吸光度值更大, 灵敏度更高, 结果更准确, 更适合大批量样品的分析^[2]. 乳酸

脱氢酶 (lactate dehydrogenase, LDH) 是存在于细胞浆内参与糖酵解最后一步即丙酮酸和乳酸相互转化时的一种催化酶^[3]. 作为细胞受损的一种标志性蛋白, 正常情况下, LDH 存在于细胞浆内, 不能透过细胞膜, 当细胞受到损伤时, 细胞膜通透性改变, LDH

收稿日期: 2012-01-10; 修订日期: 2012-03-12

基金项目: 国家重点基础研究发展规划 (973) 项目 (2010CB134405); 国家自然科学基金项目 (21147002, 20977065)

作者简介: 张帅帅 (1987 ~), 男, 硕士研究生, 主要研究方向为细胞毒理学, E-mail: zhang3175pm@163.com

* 通讯联系人, E-mail: ssluohl@263.net

就从细胞内释放至培养液中^[4,5],催化乳酸生成丙酮酸的过程中,使氧化型辅酶 I (NAD⁺) 变成还原型辅酶 (NADH₂),后者再通过递氢体吩嗪二甲酯硫酸盐 (PMS) 还原氯化硝基四氮唑蓝 (NBT) 形成甲基化合物^[5],通过光谱吸收检测产物吸收值以衡量细胞受损程度. 单细胞凝胶电泳 (single cell gel electrophoresis, SCGE) 又称彗星实验^[6],是一种在单细胞水平下检测 DNA 损伤的技术. 细胞 DNA 受损后产生大量 DNA 片断,在碱性条件下 DNA 解螺旋后,其断链释放出来,在电场中朝同一方向移动,形成彗星状拖尾影像. DNA 损伤越严重,彗星样细胞比例越多,拖尾越严重.

双酚 A (BPA) 类化合物作为环氧树脂、聚碳酸酯塑料以及阻燃剂等产品添加剂,在水杯、奶瓶、食品饮料容器、医疗设备等生产中被广泛使用. 这些制品在长期使用或者是高温、碱性条件下, BPA 都会缓慢释放到周围环境中,并且很容易在环境中积累,通过用水^[7,8]、空气、土壤和食品^[9,10]等对周围生物产生影响^[11]. 近年来,人类乳腺癌、卵巢癌及睾丸癌等^[12]发病率有明显上升的趋势,这一结果与环境中日益增加的类雌激素物质,如农药类^[13],双酚 A 类^[14,15],菊酯类^[16,17],重金属^[18]等都有密切关系. Soto 等^[19]建立的基于乳腺癌细胞增殖活性的 E-screen 法一直是检测环境雌激素的经典方法,多种化合物都被证明能够促进乳腺癌细胞 MCF-7 增殖,具有类雌激素效应. 另有研究表明环境雌激素会对 MCF-7 细胞核 DNA 以及细胞膜造成损伤而影响细胞增殖导致细胞凋亡^[20~22]. 为更全面研究双酚 A 类化合物的毒性效

应,本研究以雌激素受体缺失乳腺癌细胞 MCF-7 (ER-) 为对象,该细胞既具备了 MCF-7 的基本特性,也具有生长速度更快等优点,并且对雌激素不敏感^[24],有利于直接针对毒性效应进行研究. 通过观察 MCF-7 (ER-) 细胞暴露于不同浓度 BPA 类化合物后其形态学的变化与细胞核 DNA 损伤程度,测定细胞增殖抑制率与乳酸脱氢酶 (LDH) 漏出率等毒性指标,综合分析 5 种双酚 A 类化合物对 MCF-7 (ER-) 细胞的毒性效应.

1 材料与方法

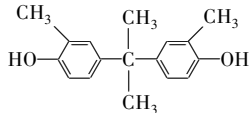
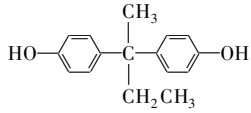
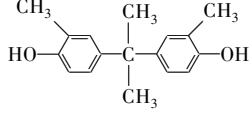
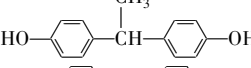
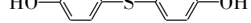
1.1 仪器与试剂

仪器:超净工作台 (德国 Heraeus 公司); 高压蒸汽灭菌锅 (上海医用核子仪器厂); CASY Model TT 细胞颗粒计数仪 (德国 Innovatis 有限公司); 二氧化碳培养箱 (德国路易斯企业有限公司 Binder C 系列); Heraeus Megafuge 1.0 通用离心机 (德国 Heraeus 公司); BioTek PowerWave XS2 型分光光度计 (美国 BioTek 公司); NIKON Eclipse 80i 生物显微镜 (日本 Nikon 公司).

试剂:无酚红 RPMI-1640、含酚红 RPMI-1640, 牛胰岛素、二甲亚砜 (DMSO) 购自 Sigma 公司; 胰蛋白酶、氯化硝基四氮唑蓝 (NBT)、氧化型辅酶 I (NAD)、低熔点琼脂糖 (LMA) 购自 Amresco 公司; MTS、PMS 购自 Promega 公司; 正常熔点琼脂糖 (NMA) 购自 Biowest 公司; 无支原体胎牛血清购自四季青生物工程有限公司; 5 种双酚 A 类化合物均购自梯希爱 (上海) 化成工业有限公司,其结构与基本性质见表 1.

表 1 5 种 BPA 类化合物的基本性质及结构图

Table 1 Physical properties and structures of the five BPA analogues

化合物	CAS	纯度/%	相对分子质量	分子结构
BPA	80-05-7	>99.0	228.29	
BPB	77-40-7	>98.0	242.31	
BPC	79-97-0	>98.0	256.34	
BPE	2081-08-5	>98.0	214.26	
TDP	2664-63-3	>98.0	218.23	

1.2 细胞培养

MCF-7 乳腺癌细胞购自中国科学院生化研究所细胞库(上海)。在长期培养过程中,由于基因微卫星不稳定、缺失突变等原因,阳性乳腺癌细胞会逐渐演变为阴性乳腺癌细胞^[23],此处标记为 MCF-7 (ER-)。MCF-7 (ER-) 细胞于含 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养基(含青霉素 100 U·mL⁻¹、链霉素 100 U·mL⁻¹、牛胰岛素 0.01 mg·mL⁻¹) 中传代培养,培养条件为 37℃、5% CO₂、饱和湿度。

实验中用含酚红 RPMI-1640 培养基(含青霉素 100 U·mL⁻¹、链霉素 100 U·mL⁻¹、牛胰岛素 0.01 mg·mL⁻¹) 为生长培养基;含 2% 胎牛血清的无酚红 RPMI-1640 培养基(含青霉素 100 U·mL⁻¹、链霉素 100 U·mL⁻¹、牛胰岛素 0.01 mg·mL⁻¹) 为贴壁培养基;含 10% 胎牛血清的无酚红 RPMI-1640 培养基(含青霉素 100 U·mL⁻¹、链霉素 100 U·mL⁻¹、牛胰岛素 0.01 mg·mL⁻¹) 为暴露培养基。

1.3 MTS 法测定细胞增殖抑制率

取对数生长期的 MCF-7 (ER-) 细胞,用 CASY Model TT 细胞颗粒计数仪计数后,用贴壁培养基将细胞浓度调整到 $6 \times 10^4 \cdot \text{mL}^{-1}$,每孔 50 μL 接种于 96 孔细胞培养板培养,周边 36 孔加无菌水 100 μL 以防止边缘效应。待 12 h 细胞贴壁后,每孔加 130 μL 暴露培养基,同时加入不同浓度的受试物 20 μL ,空白对照组加 20 μL 含 1% 的 DMSO 的无菌水,各孔 DMSO 终浓度为 0.1%,各剂量组设 3 个平行孔,染毒 24 h 后,每孔加 20 μL MTS/PMS [MTS (2 g·L⁻¹) 与 PMS (0.82 g·L⁻¹)] 混合液 (MTS:PMS = 20:1),培养箱中孵化 4 h,于 490 nm 波长测定吸光度(A)值,3 次重复实验。以测定的 12 个溶剂空白的平均值 A_0 与各浓度 4 个平行样的平均 A 值计算 BPA 类化合物在不同浓度时的增殖抑制率 $x(\%)$,计算公式如下:

$$x(\%) = (A_0 - A) / A_0 \times 100\%$$

1.4 2,4-二硝基苯胍检测胞外乳酸脱氢酶

取对数生长期 MCF-7 (ER-) 细胞,消化计数后,用生长培养基将细胞浓度调整到 $6 \times 10^4 \cdot \text{mL}^{-1}$,每孔 50 μL 接种于 96 孔细胞培养板培养,周边 36 孔加无菌水 100 μL 以防止边缘效应,12 h 细胞贴壁后,每孔加 130 μL 生长培养基,同时加入不同浓度的受试物 20 μL ,共设 5 浓度梯度组及 1 个自然释放对照组,加 20 μL 1% 的 DMSO,各孔 DMSO 终浓度为 0.1%,各剂量组设 9 个平行孔,染毒 24 h,最大释放孔在结束培养前加入终浓度为 0.8% 的

TritonX-100 20 μL ,作用 45 min。

从对应的培养板中取上清 100 μL 加入新的 96 孔板中,37℃ 孵育 10 min 后,加新鲜配制的 100 μL LDH 底物溶液 (NBT 4 mg; NAD 10 mg; PMS 1 mg; 蒸馏水 2 mL 溶解混匀后加 1 mol·L⁻¹ 乳酸钠 0.5 mL,再加 0.1 mol·L⁻¹ PBS 至 12.5 mL; 现配现用),室温下避光反应 15 min。每孔加入 1 mol·L⁻¹ 柠檬酸终止液 30 μL ,以终止酶促反应。用酶标仪在 490 nm 波长下读取各孔 D 值,与自然对照组相比,分析 LDH 漏出水平。

1.5 单细胞凝胶电泳检测细胞 DNA 损伤

实验为避免细胞毒性过大引起的细胞凋亡干扰结果,本实验研究了 5 种 BPA 类化合物的 EC₄₀、EC₂₀ 和 EC₁₀ 等 3 个效应浓度对 MCF-7 细胞染毒 24 h 后的 DNA 损伤情况。过程主要参考 Singh 等^[6]的方法并适当改进。第一层铺质量分数 0.6% 正常熔点琼脂糖 (NMA),待其凝固后铺第二层为 70 μL 质量分数 0.7% 的低熔点琼脂糖 (LMA) 与 30 μL 细胞悬液的混合液,盖上盖玻片,置 4℃ 冰箱固化 10 min 后,移去盖玻片,将载玻片水平浸入新配制并预冷的细胞裂解液 (2.5 mol·L⁻¹ NaCl, 100 mmol·L⁻¹ EDTA-2Na, 100 mmol·L⁻¹ Tris, 1% Triton X-100, 10% DMSO) 中避光裂解 2 h。然后将载玻片取出用 PBS 漂洗 1 min,置于水平电泳槽中,将新配制的碱性电泳缓冲液 (1 mmol·L⁻¹ EDTA-2Na, 300 mmol·L⁻¹ NaOH, pH 13) 加入电泳槽中,约覆盖过载玻片胶面 0.25 cm, 4℃ 下避光静置 20 min 使双链 DNA 充分解螺旋。稳定电压 25 V,通过调节电泳缓冲液液面高度使电流为 300 mA 的条件下,避光电泳 20 min。电泳结束后将载玻片用 PBS (pH 7.4) 缓冲液中和 25 min 后,取出晾干,滴加 30 μL 4 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 溴化乙锭到胶体表面,盖上盖玻片染色 20 min,用荧光显微镜观察,数码相机拍照。

每份样本随机取 50 个细胞计算细胞拖尾百分率,并用 CASP 软件^[14] 分析彗星尾部 DNA 百分率以评价 DNA 的损伤程度。

2 结果与分析

2.1 5 种 BPA 类化合物对 MCF-7 (ER-) 的毒性效应

实验分别测定了 5 种 BPA 类化合物对 MCF-7 (ER-) 细胞的增殖抑制率,并应用非线性最小二乘法对剂量-效应数据进行曲线拟合, DRC 拟合曲线如图 1 所示。结果表明所有 5 种化合物的剂量-效应曲

线都可以用 Weibull 函数有效表征. 优化模型、相关统计量及估计的半数效应浓度的负对数值 (pEC_{50}) 等列入表 2. 5 种受试物的效应拟合值与实验值之间的相关系数 R 均大于 0.98, 均方根误差均

在 0.06 以下, 拟合统计性显著. 5 种化合物的拟合参数相差较大, α 值在 6.19 ~ 9.15 范围内, 说明毒性差异较大. 毒性差异可以从 pEC_{50} 值的变化反映出来, 其中 BPB 最大, BPA 最小.

表 2 5 种 BPA 类化合物对 MCF-7 (ER-) 细胞的剂量-效应曲线参数及毒性值

Table 2 Dose-response curves and the pEC_{50} values of the five BPA analogues to MCF-7 (ER-)

化合物	模型	α	β	R	RMSE	pEC_{50}
BPA	Weibull	8.05	2.54	0.995 1	0.027 5	3.308
BPB	Weibull	7.41	2.06	0.980 2	0.059 8	3.770
BPC	Weibull	8.34	2.37	0.985 2	0.047 9	3.675
BPE	Weibull	6.19	1.95	0.996 8	0.020 8	3.368
TDP	Weibull	9.15	2.76	0.992 6	0.034 7	3.444

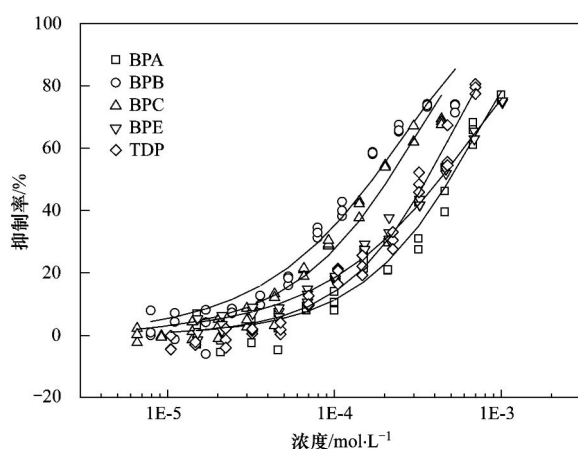


图 1 5 种双酚 A 类化合物对 MCF-7 (ER-) 的剂量-效应曲线

Fig. 1 Dose-response curves of the five BPA analogues to MCF-7 (ER-)

2.2 LDH 露出实验结果

结果表明, 每种 BPA 类化合物在不同浓度下对 MCF-7 (ER-) 细胞造成的 LDH 绝对露出值 (以 D 表示) 均可用 Logit 函数拟合表征 (见图 2), 其拟合相关系数 R 均大于 0.99. 各染毒浓度组与空白对照组间均存在显著性的差异 ($P < 0.05$), 随着受试物浓度的增加, LDH 漏出值逐渐增大. MCF-7 (ER-) 细胞对不同 BPA 类化合物的敏感程度不同, BPA、BPB 及 BPC 较为敏感, 其高浓度染毒组造成的 MCF-7 细胞 LDH 漏出达到了对照组的 4 倍, 并且陡度很大, 说明其毒性随浓度增加最快; 而 BPE 及 TDP 较不敏感, 其最高浓度染毒组造成的 MCF-7 细胞 LDH 漏出仅达到了对照组的 2 倍.

2.3 彗星实验结果

以彗星样细胞所占的比例^[24]及相对 DNA 迁移长度作为评价核 DNA 损伤程度的指标. 图 3 为 TDP 染毒 24 h 引起 MCF-7 (ER-) 细胞核 DNA 的损伤结果. 拖尾率实验结果如表 3 中所示, 5 种 BPA

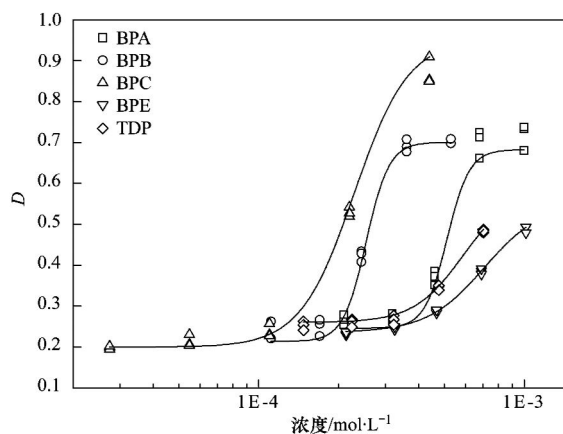


图 2 5 种 BPA 类化合物对 MCF-7 (ER-) 的 LDH 影响

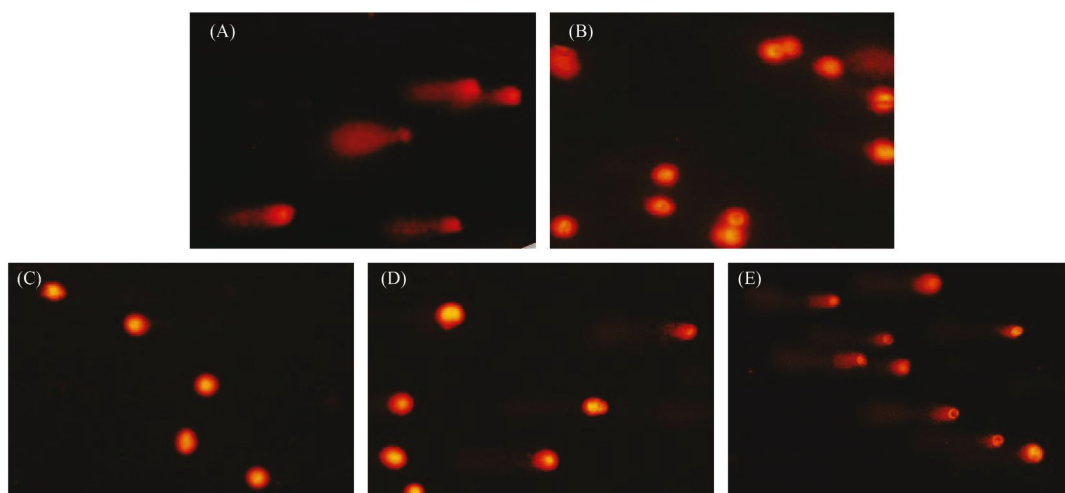
Fig. 2 LDH release induced by the five BPA analogues to MCF-7 (ER-)

类物质对 MCF-7 细胞染毒 24 h 后, 与对照组相比, 除 BPA、BPE、TDP 的 EC_{10} 效应浓度组无显著性差异外, 其他各染毒组拖尾细胞百分率均明显高于对照组 ($P < 0.05$). 在受试物效应浓度达到 EC_{10} 时, 实验结果和阴性对照不存在显著性差异; 在受试物效应浓度达到 EC_{20} 时, 镜检发现细胞生长受到抑制, 拖尾细胞百分率增加, DNA 损伤明显, 其中 BPE

表 3 不同效应浓度下 5 种受试物对 MCF-7 (ER-) 细胞拖尾率的影响

Table 3 Tailed cell frequencies from MCF-7 (ER-) exposed to different concentrations of BPA analogues

效应浓度	观察细胞数 /个	拖尾细胞率/%		
		EC_{40}	EC_{20}	EC_{10}
BPA	50	42	6	1
BPB	50	78	34	16
BPC	50	84	54	12
BPE	50	60	24	2
TDP	50	90	26	6
阳性对照	50	50		
阴性对照	50	1		



A: 阳性对照($2 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1} \text{H}_2\text{O}_2$); B: 阴性对照; C: EC_{10} 剂量组; D: EC_{20} 剂量组; E: EC_{40} 剂量组

图 3 TDP 作用 MCF-7(ER-) 24 h 引起 MCF-7(ER-) 细胞的 DNA 损伤图像($\times 100$)

Fig. 3 DNA damage induced by TDP exposed to MCF-7 (ER-) for 24 h ($\times 100$)

对细胞造成的拖尾率最高达到 54%; 在受试物效应浓度达到 EC_{40} 时, 细胞生长受到严重抑制, 少量细胞死亡, 拖尾细胞百分率显著增加, TDP 对细胞造成的拖尾率达 90%, 对 DNA 损伤最为敏感. 与阳性对照组相比, 各实验组 DNA 迁移长度差异不明显.

3 讨论

人乳腺癌 MCF-7 细胞在体外长期培养后发生雌激素受体丢失^[23], 但细胞形态未变, 与正常乳腺细胞有相同的生物学活性, 有研究发现 MCF-7 (ER-) 生长速度更快, 与正常 MCF-7 细胞共同转接入小鼠体内后, 成瘤速度也更快^[25], 这可能是由于其增殖依赖于与雌激素阳性 MCF-7 细胞不同的信号通路^[26]所致. 本实验用 MCF-7(ER-) 作为指示生物, MTS 法快速检测细胞增殖活性, 拟合得到 5 种受试化合物的各个效应浓度, 如 EC_{10} 、 EC_{50} 等. 以 pEC_{50} 为毒性指标, 5 种受试物的毒性顺序依次为 $\text{BPB} > \text{BPC} > \text{TDP} > \text{BPE} > \text{BPA}$. 与 Kitamura 等^[27]所研究的 19 种 BPA 类化合物雌激素效应结果相比, 由于 BPA 类化合物对 MCF-7(ER-) 的毒性作用可能不依赖于雌激素受体的存在, 本研究结果中各受试物毒性效应 EC_{50} 值与引起雌激素效应的 EC_{50} 值差异很大.

通过 LDH 检测以及 SCGE 检测, 发现 LDH 实验结果与 MTS 接近, 随受试物浓度增加, LDH 露出值越来越高, 而 DNA 损伤程度在低浓度染毒水平下变化不明显, 在受试物效应浓度从 EC_{20} 增加到 EC_{40} 时, 拖尾细胞百分率显著增加, 这种情况可能是因为

少量细胞凋亡引起 DNA 的损伤, 对遗传毒性影响有一定的干扰. 杜鹃等^[28]以小鼠为实验模型研究发现, $10^{-5} \text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 双酚 A 已对小鼠睾丸细胞造成严重的遗传毒性, 比体外 MCF-7(ER-) 细胞检测更为敏感. Iso 等^[20]应用单细胞凝胶电泳方法检测发现 BPA 对 MCF-7 细胞核 DNA 的损伤依赖于雌激素受体的存在. 本研究中细胞损伤机制可能与正常 MCF-7 细胞不同, 检测用 MCF-7 细胞雌激素受体缺失, 敏感性显著降低, 双酚 A 类化合物对其造成的损伤主要在于低浓度时 BPA 的类雌激素作用干扰了胞内酶活性及细胞代谢活性, 影响了细胞分裂造成细胞增殖受限; 高浓度时, BPA 与细胞膜及遗传物质 DNA 直接发生作用, 引起细胞膜损伤, 胞内乳酸脱氢酶露出, 同时造成 DNA 单链断裂, 形成彗星样细胞; 当受试物浓度继续增加时因急性毒性过大而引起细胞大量坏死, 损伤研究无意义.

4 结论

(1) Weibull 或 Logit 函数均能较好描述 MTS 法以及 LDH 法检测得到的 5 种双酚 A 类化合物对 MCF-7(ER-) 毒性的 DRC 曲线, 以 MTS 法实验结果 pEC_{50} 为毒性指标, 5 种受试化合物的毒性顺序为 $\text{BPB} > \text{BPC} > \text{TDP} > \text{BPE} > \text{BPA}$.

(2) LDH 检测及 SCGE 检测 5 种双酚 A 类化合物对 MCF-7(ER-) 的损伤作用, 在效应浓度 EC_{20} 下, 细胞核 DNA 轻微损伤, 细胞增殖受轻微抑制; 在效应浓度 EC_{40} 下, 细胞核 DNA 损伤严重, 细胞增殖受到显著抑制, 细胞膜通透性显著改变, LDH 大量露

出,细胞出现大量坏死。

(3) 3 种方法相比,MTS 法更为快速、方便、灵敏,且能更好地反映不同受试物的完整 DRC 曲线,得到各效应浓度,便于分析比较。

参考文献:

- [1] Malich G, Markovic B, Winder C. The sensitivity and specificity of the MTS tetrazolium assay for detecting the *in vitro* cytotoxicity of 20 chemicals using human cell lines[J]. *Toxicology*, 1997, **124**(3): 179-192.
- [2] 王琳,贾琴,范能全. 评价细胞毒性方法的探讨[J]. 泸州医学院学报, 2005, **28**(2): 132-134.
- [3] 洪庆涛,宋岳涛,唐一鹏,等. 细胞培养液乳酸脱氢酶漏出率的比色测定及其应用[J]. 细胞生物学杂志, 2002, **26**(1): 89-92.
- [4] Lobner D. Comparison of the LDH and MTT assays for quantifying cell death: validity for neuronal apoptosis? [J]. *Journal of Neuroscience Methods*, 2000, **96**(2): 147-152.
- [5] Shuaib A, Sochocka E, Ishaqzay R, *et al.* Protective effect of hypothermia during ischemia in neural cell cultures [J]. *Neurochemical Research*, 1993, **18**(6): 663-665.
- [6] Singh N P, McCoy M T, Tice R R, *et al.* A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells[J]. *Experimental Cell Research*, 1988, **175**(1): 184-191.
- [7] Howdeshell K L, Peterman P H, Judy B M, *et al.* Bisphenol A is released from used polycarbonate animal cages into water at room temperature [J]. *Environmental Health Perspectives*, 2003, **111**(9): 1180-1187.
- [8] Isidori M, Bellotta M, Cangiano M, *et al.* Estrogenic activity of pharmaceuticals in the aquatic environment [J]. *Environment International*, 2009, **35**(5): 826-829.
- [9] Schecter A, Malik N, Haffner D, *et al.* Bisphenol A (BPA) in US Food[J]. *Environmental Science & Technology*, 2010, **44**(24): 9425-9430.
- [10] Cao X L, Perez-Locas C, Dufresne G, *et al.* Concentrations of bisphenol A in the composite food samples from the 2008 Canadian total diet study in Quebec City and dietary intake estimates[J]. *Food Additives & Contaminants: Part A*, 2011, **28**(6): 791-798.
- [11] Staples C A, Dome P B, Klecka G M, *et al.* A review of the environmental fate, effects, and exposures of bisphenol A [J]. *Chemosphere*, 1998, **36**(10): 2149-2173.
- [12] 阴海鹏,张玲,李翠玲,等. 双酚 A 对人卵巢癌 3AO 细胞,前列腺癌 DU145 细胞及子宫内膜癌 HHUA 细胞增殖活性的影响[J]. 环境与健康杂志, 2011, **28**(1): 29-32.
- [13] Chen H Y, Xiao J, Hu G, *et al.* Estrogenicity of organophosphorus and pyrethroid pesticides [J]. *Journal of Toxicology and Environmental Health Part A*, 2002, **65**(19): 1419-1435.
- [14] Sugiura-Ogasawara M, Ozaki Y, Sonta S, *et al.* Exposure to bisphenol A is associated with recurrent miscarriage[J]. *Human Reproduction*, 2005, **20**(8): 2325-2329.
- [15] Vandenberg L N, Hauser R, Marcus M, *et al.* Human exposure to bisphenol A (BPA) [J]. *Reproductive Toxicology*, 2007, **24**(2): 139-177.
- [16] Jin M Q, Li L, Xu C, *et al.* Estrogenic activities of two synthetic pyrethroids and their metabolites [J]. *Journal of Environmental Sciences*, 2010, **22**(2): 290-296.
- [17] 邴欣,汝少国. 四种拟除虫菊酯类农药的环境雌激素活性研究[J]. 中国环境科学, 2009, **29**(2): 152-156.
- [18] 周巧巧,熊丽,刘德立,等. 镉,汞,锌 3 种重金属的雌激素样作用[J]. 生态毒理学报, 2009, **4**(5): 688-692.
- [19] Soto A M, Sonnenschein C, Chung K L, *et al.* The E-SCREEN assay as a tool to identify estrogens: an update on estrogenic environmental pollutants [J]. *Environmental Health Perspectives*, 1995, **103**(Suppl 7): 113-122.
- [20] Iso T, Watanabe T, Iwamoto T, *et al.* DNA damage caused by bisphenol A and estradiol through estrogenic activity [J]. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 2006, **29**(2): 206-210.
- [21] 彭俊华,张全华,张峰,等. 环境雌激素致乳腺癌细胞 DNA 损伤作用[J]. 中国公共卫生, 2007, **23**(8): 935-937.
- [22] Benachour N, Aris A. Toxic effects of low doses of Bisphenol-A on human placental cells [J]. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 2009, **241**(3): 322-328.
- [23] Sommer S, Fuqua S A W. Estrogen receptor and breast cancer [J]. *Seminars in Cancer Biology*, 2001, **11**(5): 339-352.
- [24] Sasaki Y F, Tsuda S, Izumiya F, *et al.* Detection of chemically induced DNA lesions in multiple mouse organs (liver, lung, spleen, kidney, and bone marrow) using the alkaline single cell gel electrophoresis (Comet) assay [J]. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 1997, **388**(1): 33-44.
- [25] 许炜茹,林洪生,陈信义,等. 不同来源 MCF-7 细胞系的增殖速度及 ER α 表达上的差异[J]. 中国细胞生物学学报, 2010, **32**(1): 121-125.
- [26] Bartucci M, Morelli C, Mauro L, *et al.* Differential insulin-like growth factor I receptor signaling and function in estrogen receptor (ER)-positive MCF-7 and ER-negative MDA-MB-231 breast cancer cells[J]. *Cancer Research*, 2001, **61**(18): 6747-6754.
- [27] Kitamura S, Suzuki T, Sanoh S, *et al.* Comparative study of the endocrine-disrupting activity of bisphenol A and 19 related compounds [J]. *Toxicological Sciences*, 2005, **84**(2): 249-259.
- [28] 杜鹃,周涌,宋春梅,等. 单细胞凝胶电泳法检测双酚 A 对小鼠睾丸细胞 DNA 损伤[J]. 吉林医药学院学报, 2007, **28**(3): 135-137.

CONTENTS

Characteristics of Atmospheric NO ₂ in the Beijing-Tianjin-Hebei Region and the Yangtze River Delta Analyzed by Satellite and Ground Observations	··· WANG Ying, LI Ling-jun, LIU Yang (3685)
Variation Analysis of Background Atmospheric Pollutants in North China During the Summer of 2008 to 2011	····· YANG Jun-yi, XIN Jin-yuan, JI Dong-sheng, <i>et al.</i> (3693)
Characteristics of Atmospheric Pollutants in Cangzhou	····· WANG Yong-hong, HU Bo, WANG Yue-si, <i>et al.</i> (3705)
Chemical Characteristics and Sources of Trace Metals in Precipitation Collected from a Typical Industrial City in Northern China	····· LI Yue-mei, PAN Yue-peng, WANG Yue-si, <i>et al.</i> (3712)
BTX Monitoring Nearby Main Road Traffic in Guangzhou	····· YE Cong-lei, XIE Pin-hua, QIN Min, <i>et al.</i> (3718)
Dynamic Road Vehicle Emission Inventory Simulation Study Based on Real Time Traffic Information	····· HUANG Cheng, LIU Juan, CHEN Chang-hong, <i>et al.</i> (3725)
Emission Characteristics of a Diesel Car Fueled with Coal Based Fischer-Tropsch (F-T) Diesel and Fossil Diesel Blends	····· HU Zhi-yuan, CHENG Liang, TAN Pi-qiang, <i>et al.</i> (3733)
Spatial Variations of Biogenic Elements in Coastal Wetland Sediments of the Jiulong River Estuary	····· YU Xiao-qing, YANG Jun, LIU Le-mian, <i>et al.</i> (3739)
Spatio-Temporal Distribution of TN and TP in Water and Evaluation of Eutrophic State of Lake Nansi	····· SHU Feng-yue, LIU Yu-pei, ZHAO Ying, <i>et al.</i> (3748)
Impact on Nitrogen and Phosphorous Export of Wetlands in Tianmu Lake Watershed	····· LI Zhao-fu, LIU Hong-yu, LI Heng-peng (3753)
Nitrogen and Phosphorus Composition in Urban Runoff from the New Development Area in Beijing	····· LI Li-qing, LÜ Shu-cong, ZHU Ren-xiao, <i>et al.</i> (3760)
Distribution and Sources of Arsenic in Yangzonghai Lake, China	····· ZHANG Yu-xi, XIANG Xiao-ping, ZHANG Ying, <i>et al.</i> (3768)
Occurrence of Fecal Indicator Bacteria in Urban Surface Water: A Case Study in Southern China	····· SUN Fu, SHA Jing, LIU Yan-hua (3778)
Vertical Migration of Algal Cells in the Daning River Bay of the Three Gorges Reservoir	····· ZHANG Yong-sheng, ZHENG Bing-hui, JIANG Xia, <i>et al.</i> (3787)
Construct of Yangtze-Huai River Rural Areas Ecological Drainage System and Its Retention Effect on Pollutants	····· SHAN Bao-qing, LI Nan, TANG Wen-zhong (3797)
Water Treatment Efficiency of Constructed Wetland Plant-Bed/Ditch Systems	····· WANG Zhong-qiong, ZHANG Rong-bin, CHEN Qing-hua, <i>et al.</i> (3804)
Effect of the Subsurface Constructed Wetland Evolution into Free Surface Flow Constructed Wetland on the Removal of Organic Matter, Nitrogen, and Phosphorus in Wastewater	····· WEI Ze-jun, XIE Jian-ping, HUANG Yu-ming (3812)
Treatment Characteristics of Saline Domestic Wastewater by Constructed Wetland	····· GAO Feng, YANG Zhao-hui, LI Chen, <i>et al.</i> (3820)
Degradation of β -Naphthol by Catalytic Wet Air Oxidation	····· LIU Jie, YU Chao-ying, ZHAO Pei-qing, <i>et al.</i> (3826)
Degradation of 2,4-Dichlorophenol in Aqueous Solution by ZVI/EDDS/Air System	····· SUN Qian, ZHOU Hai-yan, CAO Meng-hua, <i>et al.</i> (3833)
Study on Photocatalytic Degradation of 1,2,3-Trichlorobenzene Using the Microwaved MWNTs/TiO ₂ Composite	····· SHI Zhou, ZHANG Qian, ZHANG Wei, <i>et al.</i> (3840)
Mechanism of Cr(VI) Removal from Aqueous Solution Using Biochar Promoted by Humic Acid	····· DING Wen-chuan, TIAN Xiu-mei, WANG Ding-yong, <i>et al.</i> (3847)
Research on the Treatment of Wastewater Containing PVA by Ozonation-Activated Sludge Process	····· XING Xiao-qiong, HUANG Cheng-lan, LIU Min, <i>et al.</i> (3854)
Effects of Composite Substrates on the Phosphorus Removal in Granule-based EBPR System and Its Optimization Experiment	····· XU Shao-juan, SUN Pei-de, ZHENG Xiong-liu, <i>et al.</i> (3859)
Research of Input Water Ratio's Impact on the Quality of Effluent Water from Hydrolysis Reactor	····· LIANG Kang-qiang, XIONG Ya, QI Mao-rong, <i>et al.</i> (3868)
Evolution of Leachate Quantity and Quality in the Anaerobic-semiaerobic Bioreactor Landfill	····· HAN Zhi-yong, LIU Dan, LI Qi-bin, <i>et al.</i> (3873)
National Survey of Urban Sewage Reuse in China	····· GUO Yu-jie, WANG Xue-chao, ZHOU Zhen-min (3881)
Sorption and Desorption of 17 α -Ethinyl Estradiol and 4- <i>n</i> -Nonylphenol in Soil	····· JIANG Lu, WANG Ji-hua, LI Jian-zhong, <i>et al.</i> (3885)
Soil Organic Carbon Mineralization of Black Locust Forest in the Deep Soil Layer of the Hilly Region of the Loess Plateau, China	····· MA Xin-xin, XU Ming-xiang, YANG Kai (3893)
Effects of Soil Crusts on Surface Hydrology in the Semiarid Loess Hilly Area	····· WEI Wei, WEN Zhi, CHEN Li-ding, <i>et al.</i> (3901)
Environmental Factors on Distribution of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Soils from Dashiwei Karst Giant Doline (Tiankeng) in Guangxi, China	····· KONG Xiang-sheng, QI Shi-hua, JIANG Zhong-cheng, <i>et al.</i> (3905)
Investigation on Mechanism of Pyrite Oxidation in Acidic Solutions	····· WANG Nan, YI Xiao-yun, DANG Zhi, <i>et al.</i> (3916)
Monitoring of Water and Salt Transport in Silt and Sandy Soil During the Leaching Process	····· FU Teng-fei, JIA Yong-gang, GUO Lei, <i>et al.</i> (3922)
Simulation on Remediation of Benzene Contaminated Groundwater by Air Sparging	····· FAN Yan-ling, JIANG Lin, ZHANG Dan, <i>et al.</i> (3927)
Detecting the Cytotoxicities of Five Bisphenol A Analogues to the MCF-7 Human Breast Carcinoma Cell Line Through Different Endpoints	····· ZHANG Shuai-shuai, LIU Yan, LIU Shu-shen, <i>et al.</i> (3935)
Response of Copepod Community Characteristics to Environmental Factors in the Backshore Wetland of Expo Garden, Shanghai	····· CHEN Li-jing, WU Yan-fang, JING Yu-xiang, <i>et al.</i> (3941)
Isolation, Identification and Characterization of Halotolerant Petroleum-degrading Bacteria	····· WU Tao, XIE Wen-jun, YI Yan-li, <i>et al.</i> (3949)
Growth Kinetics and Phenol Degradation of Highly Efficient Phenol-degrading <i>Ochrobactrum</i> sp. CH10	····· CHEN Xiao-hua, WEI Gang, LIU Si-yuan, <i>et al.</i> (3956)
Isolation of Aerobic Degrading Strains for TBBPA and the Properties of Biodegradation	····· QIAN Yan-yuan, LIU Li-li, YU Xiao-juan, <i>et al.</i> (3962)
Influences of Long-term Application of Organic and Inorganic Fertilizers on the Composition and Abundance of <i>nirS</i> -type Denitrifiers in Black Soil	····· YIN Chang, FAN Fen-liang, LI Zhao-jun, <i>et al.</i> (3967)
Characteristics and Influencing Factors of Trichloroethylene Adsorption in Different Soil Types	····· HE Long, QIU Zhao-fu, LÜ Shu-guang, <i>et al.</i> (3976)
Degradation of Carbendazim in Paddy Soil and the Influencing Factors	····· XIAO Wen-dan, YANG Xiao-e, LI Ting-qiang (3983)
Effects of Sulphur Compounds on the Volatile Characteristics of Heavy Metals in Fly Ash from the MSW and Sewage Sludge Co-combustion Plant During the Disposal Process with Higher Temperature	····· LIU Jing-yong, SUN Shui-yu (3990)
Low-temperature Thermal Treatment of Dioxin in Medical Waste Fly Ash Under Inert Atmosphere	····· JI Sha-sha, LI Xiao-dong, XU Xu, <i>et al.</i> (3999)
Hourly Measurement on Aerosol NH ₃ and Gas NO _x Emission in the Rice Field	····· GONG Wei-wei, LUAN Sheng-ji (4006)
Implementation of an Electronic Nose for Rapid Detection of Volatile Chloroalkane and Chloroalkene	····· WEN Xiao-gang, LIU Rui, CAI Qiang, <i>et al.</i> (4012)
Pilot Study on PAHs of the Atmosphere Around the Refuse Incineration Plant Based on the Technology of Passive Sampling	····· SUN Shao-ai, LI Yang, ZHOU Yi, <i>et al.</i> (4018)
Spatial Distribution and Pollution Source Identification of Agricultural Non-Point Source Pollution in Fujian Watershed	····· DING Xiao-wen, SHEN Zhen-yao (4025)
Difference of P Content in Different Area Substrate of Constructed Wetland	····· CAO Xue-ying, CHONG Yun-xiao, YU Guang-wei, <i>et al.</i> (4033)
Selective Detection of Viable Pathogenic Bacteria in Water Using Reverse Transcription Quantitative PCR	····· LIN Yi-wen, LI Dan, WU Shu-xu, <i>et al.</i> (4040)
Formation of Disinfection By-products; Temperature Effect and Kinetic Modeling	····· ZHANG Xiao-lu, YANG Hong-wei, WANG Xiao-mao, <i>et al.</i> (4046)
A Novel Quantitative Approach to Study Dynamic Anaerobic Process at Micro Scale	····· ZHANG Zhong-liang, WU Jing, JIANG Jian-kai, <i>et al.</i> (4052)
Leaves of <i>Platanus orientalis</i> as the Carbon Source for Denitrification	····· XIONG Jian-feng, XU Hua, YAN Ning, <i>et al.</i> (4057)
Isolation, Characterization of an Anthracene Degrading Bacterium <i>Martellella</i> sp. AD-3 and Cloning of Dioxygenase Gene	····· CUI Chang-zheng, FENG Tian-cai, YU Ya-qi, <i>et al.</i> (4062)

《环境科学》第6届编辑委员会

主 编: 欧阳自远

副主编: 赵景柱 郝吉明 田 刚

编 委: (按姓氏笔画排序)

万国江 王华聪 王凯军 王绪绪 田 刚 田 静 史培军
朱永官 刘志培 汤鸿霄 陈吉宁 孟 伟 周宗灿 林金明
欧阳自远 赵景柱 姜 林 郝郑平 郝吉明 聂永丰 黄 霞
黄 耀 鲍 强 潘 纲 潘 涛 魏复盛

环 境 科 学

(HUANJING KEXUE)

(月刊 1976年8月创刊)

2012年11月15日 33卷 第11期

ENVIRONMENTAL SCIENCE

(Monthly Started in 1976)

Vol. 33 No. 11 Nov. 15, 2012

主 管	中国科学院	Superintended	by	Chinese Academy of Sciences
主 办	中国科学院生态环境研究中心	Sponsored	by	Research Center for Eco-Environmental Sciences, Chinese Academy of Sciences
协 办	(以参加先后为序) 北京市环境保护科学研究院 清华大学环境学院	Co-Sponsored	by	Beijing Municipal Research Institute of Environmental Protection School of Environment, Tsinghua University
主 编	欧阳自远	Editor-in -Chief		OUYANG Zi-yuan
编 辑	《环境科学》编辑委员会 北京市2871信箱(海淀区双清路 18号, 邮政编码:100085) 电话:010-62941102, 010-62849343 传真:010-62849343 E-mail: hjkx@ rcees. ac. cn http://www. hjkx. ac. cn	Edited	by	The Editorial Board of Environmental Science (HUANJING KEXUE) P. O. Box 2871, Beijing 100085, China Tel: 010-62941102, 010-62849343; Fax: 010-62849343 E-mail: hjkx@ rcees. ac. cn http://www. hjkx. ac. cn
出 版	科学出版社 北京东黄城根北街16号 邮政编码:100717	Published	by	Science Press 16 Donghuangchenggen North Street, Beijing 100717, China
印刷装订	北京北林印刷厂	Printed	by	Beijing Bei Lin Printing House
发 行	科学出版社 电话:010-64017032 E-mail: journal@ mail. sciencecp. com	Distributed	by	Science Press Tel: 010-64017032 E-mail: journal@ mail. sciencecp. com
订 购 处	全国各地邮电局	Domestic		All Local Post Offices in China
国外总发行	中国国际图书贸易总公司 (北京399信箱)	Foreign		China International Book Trading Corporation (Guoji Shudian), P. O. Box 399, Beijing 100044, China

中国标准刊号: ISSN 0250-3301
CN 11-1895/X

国内邮发代号: 2-821

国内定价: 70.00元

国外发行代号: M 205

国内外公开发行