

被动式采样器与原位鱼体暴露用于监测水体 Ah 受体效应的比较研究

柯润辉, 李剑, 许宜平, 王子健*

(中国科学院生态环境研究中心环境水质学国家重点实验室, 北京 100085)

摘要:采用被动式采样器 SPMD 结合 H4 II E 鼠肝癌细胞离体 EROD 测试的方法来评价水体中 Ah 受体效应物质的污染水平。以多环芳烃(PAHs)为目标化合物,在太湖梅梁湾地区选取了 5 个站点,同时放置 SPMD 采样器和笼养鲫鱼进行 32 d 的现场原位暴露实验,然后对 SPMD 样品提取液进行化学分析和离体 EROD 测试,对鱼肌肉样进行化学分析和对肝胰脏样进行活体 EROD 测试。结果表明,随着暴露时间的延长,SPMD 样品提取液诱导 EROD 酶的能力逐渐增强,经过 32 d 暴露的 SPMD 样品的提取液其诱导的 EROD 酶活相当于 TCDD 的毒性当量值为 3.8~6.2 pg/g,而且根据化学分析结果计算的 PAHs 相当于 TCDD 的毒性当量值与离体生物测试结果之间相关性很好($R^2 = 0.88$),说明 PAHs 是引起该地区水体 EROD 效应的一个重要诱导因子;根据化学分析结果而配制的模拟样品的离体 EROD 测试结果表明,多环芳烃类物质对梅梁湾地区水体 Ah 受体效应的贡献约为 40%~50%。研究还发现,SPMD 提取液离体 EROD 测试结果与同时暴露的鱼体肝胰脏的活体 EROD 测定结果之间也存在较好的相关性($R^2 = 0.62$)。因此认为,SPMD 结合离体 EROD 测试的方法能够很好的用于评价水体中 Ah 受体效应物质的污染水平,并能够用于揭示特定化合物与相应的生物效应之间的定量关系。

关键词:EROD; SPMD; 多环芳烃; TEQ; 太湖

中图分类号:X18 **文献标识码:**A **文章编号:**0250-3301(2006)11-2309-05

Comparison of the Methods for Assessing Ah Effects in Aquatic System by Semipermeable Membrane Device and Caged Fish

KE Run-hui, LI Jian, XU Yi-ping, WANG Zi-jian

(State Key Laboratory of Environmental Aquatic Chemistry, Research Center for Eco-Environmental Sciences, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100085, China)

Abstract: Semipermeable membrane devices (SPMDs) in combination with *in vitro* ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD) assay was used to assess the aryl hydrocarbon receptor (AhR) effects in aquatic system. In present work, polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) were selected as target compounds and SPMDs were deployed simultaneously with caged crucian carp for 32 days at five sites in Meiliang Bay, Taihu Lake. The concentrations of PAHs in the SPMD dialysates and fish tissues were analyzed by gas chromatography-mass spectrometry. In addition, the EROD activity of SPMD dialysates was assayed with H4IIE rat hepatoma cells and the induction of EROD activity in pancreas and liver of fish was also assayed. It was found that dialysates from SPMDs with longer exposures generally induced stronger activity and the toxic potency of dialysates expressed as bioassay-derived 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) equivalents ranged from 3.8 pg/g to 6.2 pg/g for 32 days exposure. A correlation of toxicity equivalency quantity (TEQ) with chemical analysis and *in vitro* bioassay-derived TEQ_{bio} of SPMD dialysates yielded an R^2 of 0.88, therefore, indicated that PAHs were one of the important AhR agonists in the water. Empirical evidence suggests that PAHs can account for about 40% to 50% of the potency observed. Moreover, a good correlation was observed between the results of EROD bioassay *in vivo* and EROD bioassay *in vitro* ($R^2 = 0.62$), thus reflected that these two methods can be complementarily each other. It is, therefore, suggested that the SPMD technique combined with chemical analyses and *in vitro* EROD assay might be a valuable monitoring tool to assess the levels and effects of AhR agonists in water ecosystem.

Key words: EROD; SPMD; polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs); TEQ; Taihu Lake

芳香烃受体(aryl hydrocarbon receptor, AhR)效应指由共平面结构的芳香性外源化合物(如多氯联苯、多环芳烃和二噁英类化合物等)进入生物体后键联芳烃受体而诱导基因表达,改变激酶活性,改变蛋白质功能等起作用的。7-乙氧基异吩唑酮-脱乙基酶(EROD)属生物体内的混合功能氧化酶系统(MFO)中的细胞色素 P4501A 族,由于其对环境 Ah 受体

效应物质的作用非常敏感,且易于检测,已经成为检测这类污染物的有效生物指标。

收稿日期:2005-12-20;修订日期:2006-02-20

基金项目:国家自然科学基金重点项目(20337020);国家高技术研究发展计划(863)项目(2005AA641030)

作者简介:柯润辉(1980~),男,博士研究生,主要研究方向为环境化学。

* 通讯联系人, E-mail: wangzj@rcees.ac.cn

多环芳烃是指 2 个或 2 个以上的芳香环稠合在一起的一类化合物,具有致癌性和致突变性.在美国环保局公布的 109 种优先控制污染物中,有 16 种属于多环芳烃类化合物.近年来的研究表明,太湖梅梁湾的沉积物中有恒定浓度的多环芳烃类物质和其它 Ah 受体效应物质的检出^[1~3].沉积物中的多环芳烃由于一系列的生物和化学作用会逐渐释放到水体中,而梅梁湾是无锡市的主要水源地,因此正确评估该地区水体中多环芳烃类物质的污染水平具有重要意义.

SPMDs(semipermeable membrane devices)是 20 世纪 90 年代兴起的一种被动式采样器,由于其特殊的构造(低密度聚乙烯膜内涂中性生物脂肪的三明治结构)可以用来模拟生物富集水中生物有效态的疏水性有机污染物^[4,5].由于先前的工作已经证明梅梁湾地区沉积物中 Ah 受体效应的主要诱导因子是多环芳烃类物质^[6],而目前环境污染风险评价常用的活体动物监测的方法存在较多的缺陷,因此本研究以多环芳烃为目标化合物,尝试用被动式采样器 SPMD 结合化学分析和生物测试的方法来提供污染物的浓度信息 and 其所导致的生物效应的信息,这样就可为全面评价污染物在环境中的危害提供很好的依据.

1 材料与方法

1.1 实验设计与样品采集

太湖梅梁湾面积约 129.3 km²,平均水深约 2 m,是无锡市的主要水源地,同时又承纳了来自无锡与常州的部分污水,近年来水质不断恶化.本实验在该区域选取 5 个具有代表性的点位,实验时间为 2004-06-14~2004-07-17,选取的站点位置见图 1.

所选择的受试生物物种为在我国分布广泛的鲫鱼,这是一种底层杂食性鱼类,除水草、藻类以外,也以水生微生物和有机腐屑为食.实验用鲫鱼购自无锡中国水产科学院淡水鱼研究中心,其实验背景良好,鱼的体形大小基本一致,平均体长约 20 cm,平均体重约 180 g.

将厚度为 50~70 μm 的低密度聚乙烯薄膜制成双层长带,经正己烷浸泡 48 h 以除去杂质,并用 N₂ 吹干.夹层内均匀涂布中性三油酸甘油酯(triolein),四边塑封,立即密封冷冻保存(-20℃),具体操作见文献[4].上述操作在洁净实验室内进行.SPMD 采样器外部是洁净 PVC 板支撑结构,整体透水性良好.

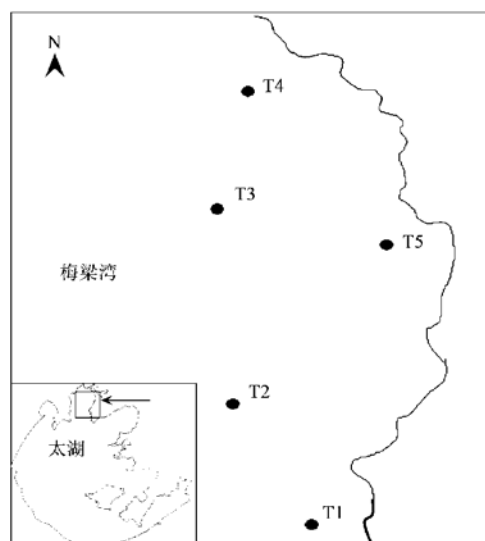


图 1 梅梁湾采样点位置

Fig. 1 Location of study sites in the Meiliang Bay, Taihu Lake

先将实验用鲫鱼在清洁的水体中放养 7 d,期间不投加饲料,然后将其放在充氧的容器中运至实验地点.在每个点位打 1 个木桩,然后往湖水中放置 1 个边长为 1 m 的立方体不锈钢丝笼,将笼子固定在木桩上,在 T1 点的笼子中放入 25 尾鲫鱼,同时在笼子周围悬挂 15 个 SPMD 采样器进行富集动力学实验(其余 4 个点只投放 15 尾鲫鱼和 3 个 SPMD 采样器),在暴露的第 2、4、8、16、32 d 分别采集 T1 点的样品,其余 4 个点则只采集第 32 d 的样品.采集的样品包括 SPMD 样(3 个平行样)、鱼的活体肝胰脏样和鱼体肌肉样(5 个平行样),肝胰脏样置于液氮中(-196℃)保存,SPMD 和鱼样密封后保存在低温冰箱中(约 5℃)带回实验室进行处理.在实验过程中没有人为投加饲料,实验装置均固定在水面下约 1 m 处.实验期间的水温变化为 19~23℃.

采集 3 尾未暴露的鱼的活体肝胰脏样和肌肉样作为实验对照样,另取 3 个只带到现场而未暴露的 SPMD 采样器作为野外空白样.

1.2 样品预处理

先将 SPMD 放入蒸馏水中冲洗 30 s,然后用索氏提取过的纱布轻轻擦洗,然后放入 1 mol/L HCl 中快速浸泡一下,速用蒸馏水冲洗并擦干,然后用纱布蘸正己烷擦洗,再用丙酮和异丙醇擦洗一下;风干后用索氏提取过的剪刀剪成碎条,放入 500 mL 锥形瓶中,加入 200 mL 正己烷振荡 24 h(18℃),然后置换成新 200 mL 正己烷,再振荡 24 h(避光),合并浓缩定容至 1 mL.取一部分浓缩液用氮气吹干后用 0.2 mL 的 DMSO(Sigma Aldrich, USA)溶解,-20℃保存

用于生物测试,另一部分浓缩液用于化学分析。

冷冻的鲫鱼样品在室温下融化后,取一定量的肌肉组织,剥去鱼鳞后将其切碎并匀浆,准确称取 12 g 放在研钵中与 40 g 无水硫酸钠均匀混合,研成干粉末。然后放入折好的滤纸中,加入回收率指示物,将其封好,放入蛇形索氏提取仪里,用 200 mL 正己烷/丙酮=50/50 提取 48 h。取一部分索氏提取液用差值法测定鱼脂肪含量,另一部分索氏提取液用于化学分析。

上述 SPMD 提取液和鱼样索提液用硅胶/氧化铝复合层析柱净化,分别用正己烷、二氯甲烷/正己烷(3:7)淋洗。淋洗液浓缩,然后加入内标六甲基苯后准确定容待测。

1.3 化学分析和质量控制

采用美国 Agilent 6890/5973 Network 型气相色谱质谱仪,配置 DB-5MS 弹性石英毛细管色谱柱(60 m×0.25 mm×0.25 μm),色谱条件:载气为纯度 99.999% 的氦气;流速恒定为 1 mL/min,线速度 26 cm/s;进样口 300 °C,气质传输线温度 300 °C,电子能量:70 eV;SIM 模式下程序升温:初始温度为 50 °C 保留 2 min,20 °C/min 升至 200 °C 保留 2 min,5 °C/min 升至 240 °C 保留 2 min,3 °C/min 升至 300 °C 保留 10 min;无分流进样 1 μL。

以六甲基苯为内标,将 16 种多环芳烃混合标准样品(美国 Supelco 公司),即萘(Nap)、蒽(Ace)、芴(Flu)、菲(Phe)、蒎(Ant)、荧蒎(Flua)、芘(Pyr)、苯并[a]蒎(BaA)、 (Chr)、苯并[b]荧蒎(BbF)、苯并[k]荧蒎(BkF)、苯并[a]芘(BaP)、茚并[1,2,3-c,d]芘(IcdP)、二苯并[a,h]蒎(DahA)、苯并[g,h,i]芘(BghiP)。通过检索 NIST 质谱谱库和色谱峰保留时间进行定性分析,并采用内标峰面积法、5 点校正曲线定量。

鱼样提取时,每批样品都加入一个质量控制样,加入回收率指示物氘代菲,其回收率平均值为 75%~81%,对分析结果进行回收率校正。整个实验过程做 SPMD 的过程空白、方法空白、野外空白样,而表层水样和鱼样则做提取全流程的空白实验,以此来控制整个实验过程是否有人为因素污染,空白实验中仅检测到了极微量的低环多环芳烃,在定量分析中将其扣除。

1.4 EROD 酶活力诱导测定

将液氮中冰冻保存的鱼肝胰脏样品化冻后,进行 EROD 酶活力测定和蛋白质含量测定,测定方法参考 Pohl 等人^[7]报道的快速终止荧光光度法的方

法原理并根据实验室条件进行了改进^[8]。EROD 酶活单位(U)定义为单位时间(min)内每 g 蛋白所转化的底物的量(pmol),即用 $\text{pmol} \cdot (\text{min} \cdot \text{mg})^{-1}$ 来表征。

SPMD 提取液的 Ah 受体效应由离体 EROD 酶活性方法测定。实验所用大鼠肝癌细胞株(H4 IIE)购自武汉典型培养物保藏中心。参考文献报道方法^[9,10],进行离体 EROD 酶活性诱导的测定。

蛋白质含量用 Bradford 方法测定^[11]。

1.5 毒性当量 TEQ 的计算

按照 Hanberg 等人^[12]的方法计算生物测试方法的毒性当量(TEQ_{bio}),即以 1 组不同浓度的 2,3,7,8-TCDD 为标准化合物,通过测定其对 H4 IIE 鼠肝癌细胞 EROD 酶活力的诱导,作出相应的 TCDD 浓度与 EROD 酶活的剂量-效应关系曲线。样品中化合物的毒性效应以计算出的相应的 TCDD 毒性等价浓度(TEQ)为评价参数。

按照 Villeneuve 等人^[13]的方法计算化学分析结果的毒性当量,即以 2,3,7,8-TCDD 为对照,计算出具有 Ah 受体效应的每种多环芳烃相对于 TCDD 的毒性当量因子(TEF),然后根据 TEF 值计算出相应样品的 TCDD 毒性等价浓度(TEQ_{PAH})。

1.6 结果的统计分析

EROD 酶活分析结果表示成平均值±标准偏差的形式,对各采样点的数据和控制样的数据的标准偏差进行方差分析,发现各组数据的标准偏差两两之间没有显著性差异,然后再用双尾 *t* 检验法对各组数据进行点间差异分析。

2 结果与讨论

2.1 SPMD 和鱼体中多环芳烃浓度

梅梁湾地区所选取的 5 个站点采集的 SPMD 和笼养鲫鱼样中 16 种多环芳烃的总浓度见表 1。经过 32 d 暴露的各个点的 SPMD 中富集的多环芳烃总量为 716.9~1 007.8 ng/g(文中与 SPMD 相关的单位均以每 g SPMD 的量为基准单位),各个点的鱼体(文中提到的鱼重均指湿重)中的多环芳烃总量为 35.6~69.1 ng/g。在 T1 点进行的 32 d 的富集动力学实验结果表明,随着暴露时间的延长,SPMD 和鲫鱼中富集的多环芳烃浓度逐渐增加。SPMD 中的多环芳烃的总量从暴露 2 d 的 106.2 ng/g 上升至 32 d 的 716.9 ng/g,鱼体中的 PAHs 的总量从对照样的 14.8 ng/g 增加至 32 d 的 49.5 ng/g(表 1)。

2.2 SPMD 提取液的离体 EROD 结果

表 1 梅梁湾各点位 SPMD 和鲫鱼样品化学分析结果及离体、活体 EROD 测试结果

Table 1 Results of EROD activities and chemical analysis in fish and SPMD samples from different sites in Meiliang Bay

时间/d	SPMD				鲫鱼		
	PAHs 总量 / ng·g ⁻¹	TEQ _{PAH} / pg·g ⁻¹	EROD 酶活 / U	TEQ _{bio} / pg·g ⁻¹	PAHs 总量 / ng·g ⁻¹	EROD 酶活 / U	TEQ _{PAH} / pg·g ⁻¹
对照样	— ¹⁾	—	4.5±1.9	< LOD ²⁾	14.8	20.7±3.0	0.02
2(T1 点)	106.2	0.5	4.4±2.0	< LOD	—	—	—
4(T1 点)	346.5	0.8	7.5±3.4	0.5	39.2	24.3±4.0	0.05
8(T1 点)	475.8	1.1	11.0±3.8	1.1	42.5	7.9±3.0	0.07
16(T1 点)	630.0	1.5	14.8±3.7	2.2	54.4	60.1±8.5	0.10
32(T1 点)	716.9	2.0	32.0±6.9	4.7	49.5	162.7±30.8	0.15
32(T2 点)	1 007.8	2.3	23.8±3.3	4.6	44.0	85.6±23.4	0.12
32(T3 点)	895.1	2.0	20.7±4.2	3.8	40.6	117.0±15.4	0.10
32(T4 点)	981.7	3.5	34.1±3.4	6.2	69.1	100.9±17.0	0.17
32(T5 点)	866.7	2.2	31.9±3.2	5.2	35.6	94.3±30.1	0.07

1) —表示值未得到; 2) LOD 表示最低检出限

各个暴露时间段 SPMD 样品的提取液均有明显的 EROD 效应, T1 点的动力学实验的结果表明, 随着 SPMD 暴露时间的延长其提取液 EROD 效应也逐渐增强(表 1), 其相应的毒性当量从暴露 4 d 的 0.5 pg/g 升到 32 d 的 4.7 pg/g(表 1), 可见其富集的 Ah 受体效应物质在逐渐增加. 各点经过 32 d 暴露的 SPMD 样品提取液的 EROD 酶活的 TCDD 当量值为 3.8~ 6.2 pg/g(表 1). 对 SPMD 提取液中 PAH 的 TEQ 与相应的 EROD 酶活(以 TCDD 毒性当量计)之间进行相关性分析, 结果表明两者之间有

很好的相关性($R^2=0.88$)(图 2a), 可见, SPMD 所富集的 PAHs 是引起 EROD 效应的一个重要因子. 为了确定多环芳烃类物质对所引起 EROD 效应的贡献, 根据暴露 32d 的 SPMD 样品提取液中各种多环芳烃的浓度用多环芳烃标样配制了一批相同浓度的模拟样品, 然后进行离体 EROD 测试, 结果表明, 多环芳烃所引起的效应约占总效应的 40%~ 50%, 由此可见在 SPMD 提取液中还有其它未分析但也具有 Ah 受体效应的物质.

2.3 鱼体 EROD 效应结果

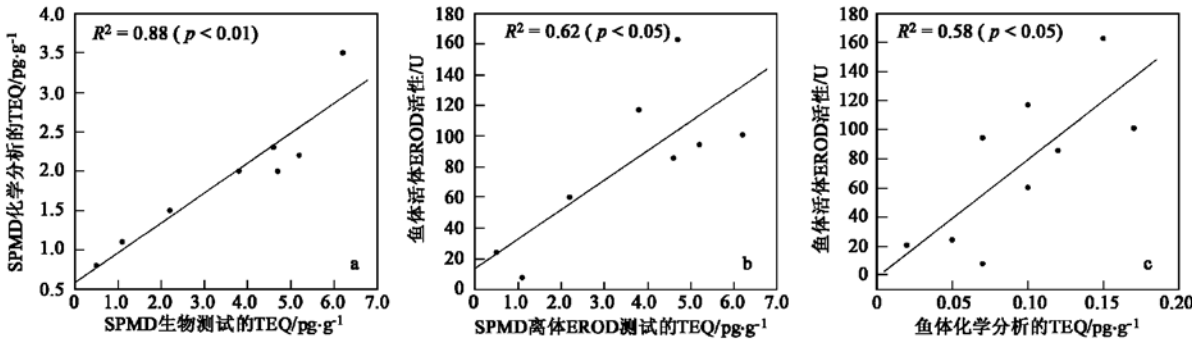


图 2 SPMD 和鱼体样品化学分析结果及生物测试结果之间线性关系

Fig. 2 Linear relationship between the results of chemical analysis and EROD assay for SPMD and caged crucian carp samples

在 32 d 的鲫鱼活体暴露实验中, 未观察到异常状况, 说明实验鲫鱼在笼养期间机体生理状态正常. 在 T1 点进行的动力学实验结果表明, 暴露在湖水中的鲫鱼的肝脏 EROD 酶活性先基本维持在一个较低的水平, 暴露 8 d 以后其活性逐渐被诱导, 暴露 16 d 和 32 d 的鲫鱼肝胰脏 EROD 酶活性相对于对照样被显著诱导($p < 0.01$)(表 1). 各个站点暴露 32 d 的鲫鱼肝胰脏 EROD 酶活性相对于对照样来说均被显著诱导($p < 0.01$)(表 1). 由此可见, 随着

鲫鱼在湖水中的暴露时间的延长, 其体内富集的 Ah 受体效应物质浓度逐渐增高, 导致其肝胰脏的 EROD 酶被诱导. 图 2b 为 SPMD 提取液离体 EROD 分析结果(以 TCDD 毒性当量计)与同时暴露的鲫鱼肝胰脏活体 EROD 分析结果的相关图, 由图可知, 离体 EROD 与活体 EROD 分析结果有很好的相关性($R^2=0.62$). 表明了 SPMD 结合 H4 IIE 鼠肝癌细胞离体 EROD 测试的方法与鱼体活体 EROD 方法具有很好的可比性. 因此, 与活体 EROD 方法

一样,SPMD 结合离体 EROD 方法也可作为评价水环境 Ah 受体效应的有效方法. 通过比较鲫鱼活体 EROD 分析结果与其肌肉化学分析结果的相关性,发现活体 EROD 分析结果与根据化学分析结果所计算的 TEQ 之间也存在很好的相关性($R^2=0.58$) (图 2c),说明暴露在野外条件下的鱼肝 EROD 酶活力能很好的反映水体的 Ah 受体效应化合物的毒性效应,同时也证明了 PAHs 是引起该地区水体 EROD 效应的重要因子. 由于鱼肝胰脏中活体 EROD 分析是在现场直接取样并及时测定所得,因而能真实反映水体 Ah 受体效应物质的毒性效应,但该方法受野外条件限制,许多因素会影响酶活性的表达,此外,该方法对时间和材料(活体)要求较高,一旦样品失活,其结果将毫无意义. 而离体 EROD 分析则对样品要求较低,而且其样品也易获得,因此,离体 EROD 方法是对活体 EROD 方法的一个很好的补充. SPMD 结合离体 EROD 测试的方法,能够将化学分析和生物效应相对应起来,这样就能够确定特定的化学物对所引起的 EROD 效应的贡献.

3 结论

(1)SPMD 提取液离体 EROD 结果与鲫鱼肝胰脏活体 EROD 结果之间相关性很好($R^2=0.62$),说明 SPMD 结合离体 EROD 测试方法可作为活体 EROD 方法的一个补充,用于评价水体 Ah 受体效应物质的毒性效应.

(2)SPMD 样品提取液的化学分析结果和其离体 EROD 生物测试的结果相关性很好($R^2=0.88$),说明梅梁湾水体中的 PAHs 是引起 EROD 效应的一个重要因子,这与鱼体活体暴露实验得到的结论相一致. 根据暴露 32 d 的 SPMD 样品提取液中 PAHs 浓度而配制的模拟样品的离体 EROD 测试结果表明,梅梁湾表层水中多环芳烃类物质对其 Ah 受体效应的贡献为 40%~50%.

参考文献:

- [1] Qiao M, Wang C X, Huang S B, *et al.* Compositions, sources, and potential toxicological significance of PAHs in the surface sediments of the Meiliang Bay, Taihu Lake, China[J]. *Environ. Int.*, 2006, **32**: 28~33.
- [2] Qu W H, Mike D, Fan C H, *et al.* Distribution, sources and potential toxicological significance of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in Taihu Lake sediments, China[J]. *Hydrobiologia*, 2002, **485**: 163~171.
- [3] Zhang Q H, Jiang G B. Polychlorinated dibenzo-*p*-dioxins/furans and polychlorinated biphenyls in sediments and aquatic organisms from the Taihu Lake, China[J]. *Chemosphere*, 2005, **61**: 314~322.
- [4] Huckins J N, Manuweera G K, Petty J D, *et al.* Lipid-containing semipermeable membrane devices for monitoring organic contaminants in water[J]. *Environ. Sci. Technol.*, 1993, **27**: 2489~2496.
- [5] Wang Z J, Wang Y, Ma M, *et al.* Use of triolein semipermeable membrane devices to assess the bioconcentration and sediment sorption of hydrophobic organic contaminants in the Huaihe River, China[J]. *Environ. Toxicol. Chem.*, 2002, **21**: 2378~2384.
- [6] Qiao M, Chen Y Y, Zhang Q H, *et al.* Identification the Ah receptor agonists in sediment of Meiliang Bay, Taihu Lake, China[J]. *Environ. Sci. Technol.*, 2006, **40**: 1415~1419.
- [7] Pohl R J, Fouts J R. A rapid method for assaying the metabolism of 7-ethoxyresorufin by microsomal subcellular fraction[J]. *Anal. Biochem.*, 1980, **107**: 150~155.
- [8] Ma T W, Wan X Q, Huang Q H, *et al.* Biomarker responses and reproductive toxicity of the effluent from a Chinese large sewage treatment plant in Japanese medaka (*Oryzias latipes*) [J]. *Chemosphere*, 2005, **59**: 281~288.
- [9] Donato M T, Castell J V, Gómez-Lechón J. A rapid and sensitive method of measuring monooxygenase activities in hepatocytes cultured in 96-well plates[J]. *J. Tissue Cult. Meth.*, 1992, **14**: 153~158.
- [10] Wang C X, Wang Y, Kiefer F, *et al.* Ecotoxicological and chemical characterization of selected treatment process effluents of municipal sewage treatment plant[J]. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 2003, **56**: 211~217.
- [11] Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding[J]. *Anal. Biochem.*, 1976, **72**: 248~254.
- [12] Hanberg A, Stahlberg M, Georgellis A, *et al.* Swedish dioxin survey: evaluation of the H4 II E bioassay for screening environmental samples for dioxin-like enzyme induction[J]. *Pharmacol. Toxicol.*, 1991, **69**: 442~449.
- [13] Villeneuve D L, Khim J S, Kanna K, *et al.* Relative potencies of individual polycyclic aromatic hydrocarbons to induce dioxin-like and estrogenic responses in three cell lines [J]. *Environ. Toxicol.*, 2002, **17**: 128~137.