

4 种环境雌激素对淡水鱼卵黄蛋白原诱导的混合物效应研究

张晖^{1,3}, 孔繁翔^{2*}, 王世和¹, 于洋², 张民², 陈美军², 谭啸², 钱善勤²

(1. 东南大学市政工程系, 南京 210096; 2. 中国科学院南京地理与湖泊研究所湖泊与环境国家重点实验室, 南京 210008; 3. 东南大学劳动与环境卫生系, 南京 210009)

摘要:在个体水平上阐明环境雌激素类化合物对易受影响生物的联合毒性作用, 探讨混合污染物联合作用和环境风险评价的研究方法. 通过对鲫鱼血清卵黄蛋白原含量的相对变化和暴露浓度的非线性回归分析得出 17 α -乙炔基雌二醇(EE₂)、17 β -雌二醇(E₂)、双酚 A(BPA)、辛基苯酚(OP)及其等毒性混合物产生雌激素效应的剂量-反应关系, 应用联合作用指数和相加作用模型研究 4 种环境雌激素的联合作用. 各化合物非线性回归分析结果均以 Weibull 函数拟合效果最好, 决定系数 $R^2 \geq 0.92$; 效应浓度值及其 95% 置信限通过自举抽样法得出, 其中半效应浓度值 EC₅₀ 及其 95% 置信区间分别为 0.007 9(0.006 8 ~ 0.010 0)、0.098 7(0.090 0 ~ 0.111 0)、63.50(56.58 ~ 70.62)和 250.59(228.46 ~ 271.99) $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$. 4 种环境雌激素混合物效应通过相加作用模型预测在全剂量范围内与实验结果相一致, 呈现相似联合作用. 相加作用模型是在各个浓度反应水平上展示化合物联合作用的性质, 是切实可行的联合作用研究方法, 而混合物效应通过联合作用指数评价存在许多不确定性.

关键词:环境雌激素; 卵黄蛋白原; 联合作用; 混合物毒性指数; 浓度相加; 独立作用

中图分类号: X171.5 文献标识码: A 文章编号: 0250-3301(2008)07-2005-07

Mixture Effects to Vitellogenin Induction by Four Environmental Estrogens in Freshwater Fish

ZHANG Hui^{1,3}, KONG Fan-xiang², WANG Shi-he¹, YU Yang², ZHANG Min², CHEN Mei-jun², TAN Xiao², QIAN Shan-qin²

(1. Department of Municipal Engineering, Southeast University, Nanjing 210096, China; 2. State Key Laboratory of Lake and Environment, Nanjing Institute of Geography and Limnology, Chinese Academy of Sciences, Nanjing 210008, China; 3. Department of Occupational and Environmental Hygiene, Southeast University, Nanjing 210009, China)

Abstract: Combined effects of estrogenic compounds to high risk life-form were demonstrated, and the study method on combined effects of environmental contaminant mixture and environmental risk assessment were also discussed. A nonlinear aggression was determined on the changes of plasma vitellogenin concentration in crucian carp via the environmental pollutant exposure concentration, and the concentration-response relationship was determined for the single chemical of estradiol, ethynylestradiol, bisphenol A, and octylphenol, and that of the mixed compounds at equipotent concentrations. The combined effects of the four xenoestrogens were tested using indices of mixture toxicity and the biomathematical models of concentration addition or independent action. Weibull function was indicated as the best-fit function ($R^2 \geq 0.92$) with curve estimation, the 95% confidence limits of effect concentration was achieved using the bootstrap method, the media effective concentration (EC₅₀) with 95% confidence interval was 0.007 9(0.006 8-0.010 0), 0.098 7(0.090 0-0.111 0), 63.50(56.58-70.62) and 250.59(228.46-271.99) $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ respectively. Results suggested that estrogenic chemicals acted together in an additive manner and the combined effects can be accurately predicted in whole range of exposure concentration by the concept of similar joint action or concentration addition. It is proved as a scientific and feasible method to apply the model of joint action whereas the outcome of indices with a great deal of indetermination.

Key words: environmental estrogens; vitellogenin; combined effects; indices of mixture toxicity; concentration addition; independent action

环境污染物影响的特点是: 低浓度、长期性、多因素联合作用、危害广泛、环境中变化复杂和健康损害的多样性. 环境危险因素对生态系统和人类健康的有害效应并不是单一污染物作用的结果, 而是各种污染物的相互作用, 在某种条件下可以产生化合物在单独存在时不能产生的效应, 表现为相加性、协同性和拮抗性作用^[1~3]. 相加性是联合作用定量分

析的前提和基础, 有 Loewe 相似作用和 Bliss 独立作用^[4,5], 前者表示联用化合物作用机制相似, 有对数剂量-概率单位平行, 联用效应相当于同一物质的几

收稿日期: 2007-07-25; 修订日期: 2007-10-08

基金项目: 国家自然科学基金项目(40671068, 40471045)

作者简介: 张晖(1968~), 女, 博士研究生, 讲师, 主要研究方向为生态毒理学和环境健康学, E-mail: zh6862@seu.edu.cn

* 通讯联系人, E-mail: fvkong@niglas.ac.cn

个不同剂量合用,即浓度相加(concentration addition, CA),也称相互排斥性作用;而后者指联用化合物作用机制不同,一化合物对另一化合物产生的作用不影响或影响很小,即独立作用或反应相加(independent action or response addition, IA),也称非排斥性作用.协同性是联用后超过原来化合物相加的作用;拮抗性则是减弱原来的相加作用.现行的只对单一化合物进行的环境风险评价不能真实反映复合污染的环境风险,需要应用多学科的研究方法对混合物的环境风险进行评价.

环境内分泌干扰物的环境影响是目前科学界研究的热点,其中环境雌激素类化合物生态学意义最突出,研究也较多.由于水生态系统是许多环境污染物的最终汇,有关内分泌干扰物对野生生物产生不良影响的报道多集中在水生生物中,比如鱼类^[6].由于这类化合物产生的生物效应是低剂量的,而且剂量-反应关系呈非单调的倒“U”型或“S”型曲线,联合作用的判定不能依据简单的代数和相加^[7,8].本研究通过鱼类卵黄蛋白原(vitellogenin, VTG)诱导实验,在对剂量-反应关系进行非线性回归分析的基础上应用联合作用指数和相加作用模型,探讨了环境雌激素混合物对整体动物生物效应指标的影响,探寻出一种适用的联合作用方法,以期科学地指导环境管理,保护生态环境和人类健康.

1 材料与方法

1.1 测试化合物、测试生物及实验条件

内源性雌激素(17 β -雌二醇, E₂),人工合成的雌激素(17 α -乙炔基雌二醇, EE₂),环境污染物:双酚 A(Bisphenol A, BPA),辛基苯酚(4-tert-octylphenol, OP),纯度均 $\geq 97\%$,购于 Sigma Aldrich 公司.

选择同一代、大小相近的雄性鲫鱼(Crucian Carp),由江苏省淡水水产研究所养殖基地提供.平均体重(100.3 $\pm$ 11.81) g,平均体长(14.5 $\pm$ 0.82) cm.实验中,设定各化合物及其混合物暴露组,同时设 1 个溶剂对照组、1 个空白对照组和 1 个阳性对照组,以丙酮(终浓度 $\leq 0.01\%$)为溶剂配制,阳性对照组为 E₂ 浓度最高组.实验容器为 40 L 玻璃鱼缸,将实验用鱼经 3% 的 KMnO₄ 消毒后放入脱氯的自来水中驯养 2 周,实验中每缸随机放入 3 尾鱼并作上标记.每天更换三分之二水量确保药物浓度的稳定,持续空气泵充氧,自然光照,水温(18 $\pm$ 2)℃.实验重复 3 次,数据合并在一起分析结果.

1.2 血样的采集及 VTG 浓度测量

暴露结束后采集血样,用经 1 000 U·mL⁻¹ 肝素生理盐水溶液润洗后的 1 mL 一次性注射器从鱼尾脊柱处穿刺取血,置于内含蛋白酶抑制剂的 2 mL Eppendorf 管中,血液在 4℃ 下静置 1 h 后,在 5 000 r/min, 4℃ 离心 10 min 以分离血浆,置 -80℃ 保存备用.

鱼血浆卵黄蛋白原(VTG)浓度采用酶联免疫吸附法(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)测定^[9].流程参照 Brion 等^[10]的方法,采用间接法测定鱼血浆 VTG 浓度.鲤鱼 VTG 标准抗原(Carp Vitellogenin Standard)和单克隆抗体(Mouse anti-carp Vitellogenin Monoclonal antibody)购自 Cayman Chemical 公司,最佳工作浓度根据产品说明和预试验确定.鱼血浆样品检测值通过标准曲线的线性回归方程计算得到.

1.3 测定单个化学物及其混合物对鱼 VTG 诱导的效应

在预试验的基础上,对每种化学物设定 7 个浓度梯度,其中 EE₂ 为 0、0.1、0.4、1、4、10 和 40 ng·L⁻¹; E₂ 为 0、5、15、30、100、150 和 500 ng·L⁻¹; OP 为 0、5、10、30、50、100 和 150 μ g·L⁻¹; BPA 为 0、20、50、100、200、500 和 2 000 μ g·L⁻¹,持续暴露 14 d.分析受试物浓度与 VTG 诱导作用之间的关系,分析时对水中化合物浓度进行对数变换取对数值;对 VTG 诱导效应进行标准化,即阳性对照 VTG 浓度为最大效应(100%, 1),阴性对照中 VTG 浓度为最小效应(0).

$$x = (\text{某受试物某浓度下血浆 VTG 浓度} - \text{阴性对照组血浆 VTG 浓度}) / (\text{阳性对照组血浆 VTG 浓度} - \text{阴性对照组血浆 VTG 浓度}) \times 100\% \quad (1)$$

式中, x 为 VTG 诱导效应.

混合物浓度采用等效效应固定浓度比(fixed-ratio)设计,初始混合物按每种化学物效应大小等效效应浓度(EC₅₀)比例混合, EE₂: E₂: OP: BPA = 0.1: 1: 666: 2 547,依次稀释不同倍数,各化学物在混合物中所占的组成比例始终不变.混合物浓度依次为 0、8、40、80、160 和 320 μ g·L⁻¹.将混合物视为单个物质进行实验.

应用非线性回归法分析各化学物及其混合物暴露浓度与卵黄蛋白原(VTG)诱导效应的关系,绘制浓度-效应曲线,由非线性方程及其反函数计算得出效应浓度值(effect concentration, EC),通过 Bootstrap 自举抽样法估计效应浓度的 95% 置信区间(confidence interval, CI)^[11].使用计算机软件 Microsoft Excel、SPSS13.0、SAS 9.1、Origin 7.5,进行数据处理、

统计分析和图形绘制.

1.4 联合作用指数的评价方法^[12]

(1)毒性单位法 毒性单位(toxic unit, TU)由 Sprague 等^[13]提出, Marking 等^[14]将这一概念推广到混合物的相加作用.毒性单位中规定混合物中第 i 组分的毒性单位为:

$$TU_i = c_i/ECx_i \quad (2)$$

式中, c_i 为混合物在产生 x 效应时第 i 组分的浓度, ECx_i 为第 i 化合物单独作用时产生 x 效应的浓度.适用于以浓度相加的相似性联合作用^[15].混合物的毒性单位等于各组分的毒性单位之和(M),即 $M = \sum TU_{\max}$,若令 $M_0 = M/TU_{\max}$ ($TU_{\max}$ 表示混合物中毒性单位最大者),根据 M 值和 M_0 值可以评价混合物的作用类型,具体评价标准为:当 $M = 1$ 时,为简单相加作用;当 $M > M_0$ 时,为拮抗作用;当 $M < 1$ 时,为协同作用;当 $M = M_0$ 时,为无相加或独立作用;当 $M_0 > M > 1$ 时,为部分相加作用.

(2)相加指数法 相加指数(AI)由 Marking 提出^[14],它是在毒性单位概念的基础上发展起来的. Marking 将 AI 定义为:当 $M \leq 1$ 时, $AI = 1/M - 1$;当 $M > 1$ 时, $AI = 1 - M$. AI 的评价标准是:当 $AI = 0$ 时,为简单的相加作用;当 $AI < 0$ 时,为拮抗作用;当 $AI > 0$ 时,为协同作用.

(3)混合毒性指数法 1981 年, K  nemann^[16]首次使用混合毒性指数(MTI)评价多元混合物对鱼的联合毒作用. K  nemann 将 MTI 定义为: $MTI = 1 - \lg M/\lg M_0$. MTI 的评价标准为:当 $MTI = 1$ 时,为简单相加作用;当 $MTI < 0$ 时,为拮抗作用;当 $MTI > 1$ 时,为协同作用;当 $MTI = 0$ 时,为独立作用;当 $0 < MTI < 1$ 时,为部分相加作用.

(4)预期和实测毒性比值法 分别测定各化学物的 ECx_i ;将化学物按等毒性比例混合;测定混合物的 $ECx_{\max}$;按公式(4)求出混合物的预期 $ECx_{\max}$.根据混合物的预期 $ECx_{\max}$ 值与实测的 $ECx_{\max}$ 值两者的比值(toxicity ratio, TR)来判断联合作用的类型.评价标准以 $\pm 15\%$ 为相加作用的应用误差范围,推荐: $TR < 0.55$ 为明显拮抗, $0.55 \sim 0.85$ 为拮抗, $0.85 \sim 1.15$ 为单纯相加, $1.15 \sim 2.0$ 为增强, $TR > 2.0$ 为明显增强^[17, 18].

(5)相加概率法 根据金正均提出的应用联合作用的实测阳性概率 $x_{\max, \text{object}}$ 与预期阳性概率 $x_{\max, \text{predict}}$,即概率比值(Q)进行评价^[5].评价标准以 $\pm 15\%$ 为相加作用的应用误差范围,推荐: $Q < 0.55$

为明显拮抗, $0.55 \sim 0.85$ 为拮抗, $0.85 \sim 1.15$ 为单纯相加, $1.15 \sim 2.0$ 为增强, $Q > 2.0$ 为明显增强.其中:

$$x_{\max, \text{predict}} = 1 - \prod_{i=1}^n (1 - x_i) \quad (3)$$

式中, x_i 代表 i 化合物单独作用时的效应.本法只适合于以独立作用产生效应的化合物.

1.5 混合物毒性预测模型^[19~21]

(1)浓度相加(CA)模型

$$ECx_{\max} = \left(\sum_{i=1}^n \frac{p_i}{ECx_i} \right)^{-1} \quad (4)$$

式中, ECx_i 为单一化学物 i 单独作用产生 x 效应的浓度; $ECx_{\max}$ 为引起 x 效应的混合物预测总浓度; p_i 为混合物中化合物 i 的浓度占混合物总浓度的比例; n 为混合物中化学物的组分数.

(2)独立作用(IA)模型

$$x = 1 - \prod_{i=1}^n [1 - F_i(p_i \times ECx_{\max})] \quad (5)$$

式中, F_i 为单个化学物 i 的剂量-效应函数,对于给定混合物效应 x 可通过迭代算法计算.

2 结果与分析

2.1 暴露浓度-反应关系分析和效应浓度的估计

暴露结束时,各处理组死亡率 $< 5\%$,溶剂对照组血浆 VTG 浓度与空白对照组以及暴露前比较差异无统计学意义.应用非线性回归分析方法对 4 种环境雌激素及其固定浓度比例等毒性混合的混合物的实验数据进行模型拟合获取最佳浓度-效应曲线,结果表明,双参数 Probit、Logit 或 Weibull 函数以及 3 参数的广义 Logit I 函数和经 Box-Cox 变换的 Logit、Probit、Weibull 函数都能很好地描述 4 种化合物对鱼 VTG 诱导作用的“S”型剂量-效应曲线.依据统计学原理综合考虑“拟合度最优”和“模型简单”2 项要求,其中 Weibull 函数拟合效果都是最好的. Weibull 函数及其反函数表达式见式(6)和(7).各化合物拟合参数 $\hat{\beta}_1$ 和 $\hat{\beta}_2$,决定系数 R^2 , 50%、10%、90% 诱导率的浓度值 EC_{50} 、 EC_{10} 、 EC_{90} 及其 95% 置信区间综合列于表 1.单个化合物浓度-效应数据散点图和拟合的回归曲线及其 95% 置信区间如图 1,混合物的见图 2.

$$x = 1 - \exp \{ - \exp [\beta_1 + \beta_2 \times \lg (EC_x)] \} \quad (6)$$

$$EC_x = 10^{[\ln(-\ln(1-x)) - \beta_1] / \beta_2 } \quad (7)$$

式中, EC_x 为引起 x 效应的化合物浓度; $\hat{\beta}_1$, $\hat{\beta}_2$ 为待估计的模型的参数.

2.2 联合作用指数评价结果

表 1 环境雌激素对鲫鱼血浆 VTG 诱导作用的回归模型参数及诱导效力¹⁾/ $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$

分类		浓度-反应方程			EC ₁₀ (95% CI)	EC ₅₀ (95% CI)	EC ₉₀ (95% CI)
		$\hat{\beta}_1$	$\hat{\beta}_2$	R ²			
化合物	EE ₂	6.70	3.36	0.94	0.002 2(0.001 6 ~ 0.003 1)	0.007 9(0.006 8 ~ 0.010 0)	0.018 1(0.013 8 ~ 0.026 7)
	E ₂	3.64	3.98	0.92	0.033 1(0.026 3 ~ 0.046 7)	0.098 7(0.090 0 ~ 0.111 0)	0.197 2(0.164 9 ~ 0.239 7)
	OP	-5.44	2.82	0.94	13.52(10.17 ~ 16.96)	63.50(56.58 ~ 70.62)	167.82(137.63 ~ 200.22)
	BPA	-7.30	2.89	0.95	55.88(44.46 ~ 66.49)	250.59(228.46 ~ 271.99)	652.44(555.47 ~ 758.93)
混合物	实验结果	-5.84	2.91	0.96	17.12(12.78 ~ 23.07)	76.18(68.94 ~ 83.87)	196.55(168.27 ~ 229.94)
	CA 预测值				19.05(18.97 ~ 19.13)	73.72(71.82 ~ 73.83)	174.53(174.25 ~ 174.96)
	IA 预测值				27.80(27.67 ~ 27.95)	108.97(108.78 ~ 109.15)	260.35(259.80 ~ 261.02)

1) CI(confidence interval)为置信区间,通过自举抽样计算得出; $\hat{\beta}_1, \hat{\beta}_2$ 为模型的参数; R^2 为拟合的模型的决定系数,值越大说明模型拟合得越好

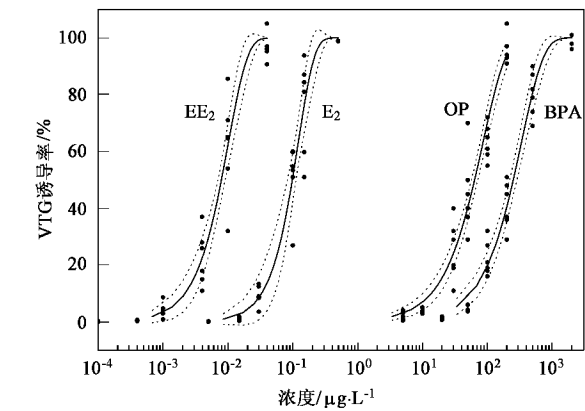


图 1 4 种环境雌激素对鲫鱼血浆 VTG 诱导的浓度-效应数据拟合曲线及其 95% 置信区间

Fig.1 Pooled concentration-response data and the best-fit regression curves with 95% confidence interval for the four oestrogens in the VTG induction in plasma of crucian carp

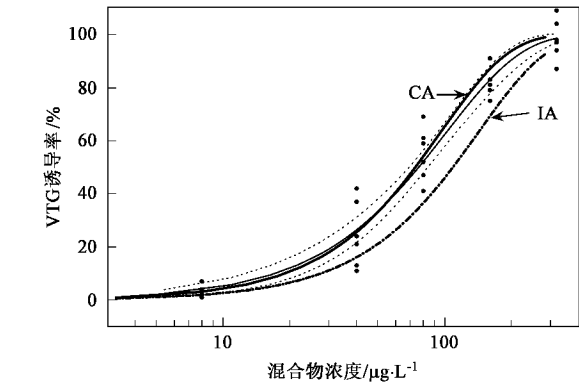


图 2 4 种环境雌激素混合物对鲫鱼血浆 VTG 诱导作用实验结果与相加作用模型预测结果

Fig.2 Comparison between the observed and CA or IA predicted mixture effects of four estrogenic chemicals in VTG induction in plasma of male crucian carp

4 种环境雌激素等毒性混合对鲫鱼 VTG 的诱导作用,以半效应浓度(EC_{50})及其下限、上限计算,结

果如下:当用毒性单位法评价时,混合物的 M 值为 1.030 4(0.932 5, 1.134 4),表现为部分相加作用;当用相加指数法评价时, AI 值为 -0.030 4(0.072 4, -0.134 4),判定为拮抗作用;当用混合毒性指数法评价时, MTI 值为 0.975 7(1.056 6, 0.897 8),表现为部分相加作用;当用毒性比值法评价时,其混合物的 TR 值为 0.977 7(1.081 9, 0.888 1),为相加作用.可见,毒性单位(TU)、混合毒性指数(MTI)、预期和实测 EC_{50} 对比法的评价结果较为一致,而相加指数法(AI)与前 3 种方法结果不同,表明了评价方法对联合作用结果有一定的影响.以 EC_{10} 计算,结果如下:混合物的 M 值为 0.908 2(0.678 1, 1.223 5),表现为协同作用; AI 值为 0.101 1(0.474 7, -0.223 5),判定为协同作用; MTI 值为 1.077 5(1.103 5, 0.847 4),表现协同作用;混合物 TR 值为 1.101 0(1.474 9, 0.817 2),判定为相加作用和加强作用.可见,在较低浓度时联合作用表现为协同作用.以 EC_{90} 计算,结果为:混合物的 M 值为 1.129 4(0.966 9, 1.321 2),表现为部分相加作用; AI 值为 -0.129 4(0.034 2, -0.321 2),判定为拮抗作用; MTI 值为 0.899 2(1.027 9, 0.769 2),表现为部分相加;混合物 TR 值为 0.885 4(1.034 2, 0.756 8),为相加作用和拮抗作用.可见,在较高浓度时联合作用表现为部分相加作用.当以混合物各效应浓度下限值计算指数时均判定为协同作用,而以混合物各效应浓度上限值计算指数时均判定为部分相加和拮抗作用.从以上结果可以看出:联合作用指数的不同方法判定的联合作用类型有时是不一致的.

应用相加概率法评价,在各个浓度范围 Q 值均大于 1.15,判定为协同作用,表明该法与前 4 种方法判定出的结果差别很大.前 4 种方法都是建立在相似联合作用的基础上,由毒性单位概念推导而来,而相加概率法只适用于独立作用的混合物.研究结果

证明了两类概念的不同。

2.3 相加作用模型预测结果

应用浓度相加(CA)和独立作用(IA)模型对呈阳性反应的 4 种化合物的混合物进行联合毒性预测,利用本实验室自行设计的 ToxCa·IA 应用程序以单个化合物的最优化非线性回归模型为基础,分别计算从 1%~99% 的 35 个以上效应点在满足 CA 和 IA 模型条件下的效应浓度 $EC_{\text{mix, CA}}$ 和 $EC_{\text{mix, IA}}$,其中 EC_{50} 、 EC_{10} 、 EC_{90} 值及其 95% 置信限见表 1。混合物实验数据拟合的曲线以及 CA 和 IA 模型预测曲线如图 2,可知:应用 CA 模型预测出的混合物效应在任何反应水平上基本上落在混合物实测效应的 95% 置信区间内,证明了 4 种化合物在鱼 VTG 体内诱导实验中呈现相似联合作用,每个化合物依据其作用大小都会对总效应产生贡献,甚至在低于有效作用浓度下产生明确的混合物效应。CA 模型预测效应总是大于 IA 模型,即 CA 模型得出的效应浓度值较 IA 模型的为低。如果不考虑置信区间,通过将实验得出的浓度-效应观测数据与 CA 模型预测结果比较,可得出:在低剂量时,联合作用为协同作用;在高剂量时表现为拮抗作用。

3 讨论

因为人类活动而进入环境的许多化学合成物具有干扰动物和人类内分泌系统的潜在作用^[22,23]。这些化合物包括内源性雌激素、药物、植物雌激素及人工合成的一些化合物,例如:有机氯农药、烷基苯酚类、肽酸酯类、多氯联苯类化合物等,它们在环境中难以生物降解,在生态系统食物链里循环,蓄积在生物体内特别是脑和性腺等含脂肪多的组织内,损害生殖系统、干扰内分泌系统、破坏免疫系统功能。尤其可通过子宫内暴露和授乳影响胚胎和新生儿期的发育,从而对受激素调节的与性别相关联的性状的发育和脑的发育产生一些不可逆转的损害,造成后期的生殖异常、学习思维障碍、行为改变以及对环境压力的耐受力下降等不良影响,可在群体水平上使整个物种陷入危机,也将会侵蚀着全人类的潜在活力,在不知不觉中改变着人类固有的行为、智力和社会性。由于异常改变的多样性、发生的滞后性和因果关系的难确定性,使人们往往不能清醒认识这类化合物的潜在危害,更增加了比致癌性和种族灭绝都更严重的灾难性后果。

由于环境具有自净作用,环境中的污染物浓度都不是很高,但污染物种类繁多,生物体总是通过食

物和饮水、呼吸、皮肤同时或相继接触多种污染物,某种有害效应的发生并不是单一化合物作用的结果,不同的化合物彼此相互影响或共同作用,在某种条件下可以产生化合物在单独存在时不能产生的效应^[24]。特别是环境雌激素类污染物具有低剂量效应^[25],可能微妙的相互影响就会改变机体激素的作用水平^[26,27],所以更有必要探讨其联合毒性作用。

化合物联合作用的性质和规律可通过数学公式和模型、受体学说、生物统计等方法阐明。后者只适合理论上的探讨,在实际运用中受到较大的限制。数学模型的方法科学、灵活、实用,各学科的学者分别设计了许多实用的联合作用指数和一些数学模型来判断联合作用的性质和类型。由于存在 2 种不同类型的联合作用,各指数和模型也有其适用范围^[5],例如:毒性单位、相加指数、相似性参数、混合毒性指数、预期与实测毒性比值以及浓度相加模型都是从毒性单位的概念出发,即如果引起某一效应的混合物中各个化合物的毒性单位和等于 1,那么混合物就是浓度相加效应,即在各组分作用相似的混合物中,其中一个组分的任何量都可以由另一个组分的与之成比例的量来代替,而不改变其效力,所以只适合于作用机理相同的化合物的相加应用;而相加概率法和独立作用模型是根据概率论中独立事件的概率相加公式推导出来的,适合于作用机理不同的几种化合物的相加计算。本研究表明:同一数据由于选择不同的方法,判定的结果往往是不同的。但实际情况是研究者往往不知道化合物毒性作用的机制,也不能够准确判断相加作用的类型和如何选择。所以在评价时,要应用 2 种类型的方法和模型根据计算结果综合分析评价。

本研究应用联合作用指数判定联合作用类型,并在此基础上应用化合物之间相互作用的浓度相加和独立作用模型对混合物效应进行定量预测,同时对联合作用的性质和类型进行验证,旨在为多组分混合污染物低剂量暴露的环境风险评价提供切实可行的分析方法。结果表明:通过联合作用指数判定联合作用方式与相加作用模型判定结果总体上是一致的。但联合作用指数判定结果存在许多不确定性,究其原因,可能是本研究中的 4 种化合物有共同的作用位点,低剂量时,对雌激素受体有一定的激活作用,它们共同作用于雌激素受体而表现为相加作用或协同作用,高浓度时,与雌激素受体结合达饱和状态后,同时竞争同一雌激素受体,彼此对受体产生竞争性抑制作用,故混合物高剂量时表现为拮抗作用。

联合作用指数多是选择表征化合物毒性的公认的指标即半效应浓度值(EC_{50}),在这一点上来判定联合作用类型,而联合作用的性质是随剂量变化的.另外,联合作用指数一般都没有系统地考虑可能存在的误差,没有给出计算的误差范围,在实际应用中使结果的判定非此即彼没有余地,容易出现错误的甚至相反的结果.相加作用模型则是在每一浓度下研究混合物效应,在每一效应水平下探讨联合作用大小,直观地展示观测值和预测值各自的剂量-效应关系,通过比较能够判定相加作用方式和联合作用类型.而且在做回归分析时考虑了误差项,另外,应用统计学上的 bootstrap 自举抽样法能够精确算出效应浓度的 95% 置信区间,结果的估计更科学和可靠.

4 结论

(1)混合物效应可应用联合作用指数和相加作用模型判定和预测.实际应用中应区分 2 种类型的相加作用,根据化合物的结构和作用机制选择正确的方法和模型综合判断和评价.

(2)相加作用和独立作用模型是在全剂量范围在任何反应水平上研究化合物的联合作用,同时能够给出效应及浓度的置信区间.混合物的风险可根据单个化合物的剂量-效应关系通过相加作用模型预测.通过混合物观测值与预测值数据相比较可在任意浓度范围判断联合作用的性质和类型.相加作用模型是探讨化合物联合作用规律的科学的方法,值得推广和应用.

(3)在对鱼类卵黄蛋白原诱导作用中,4 种环境雌激素等毒性混合物通过相加作用模型预测的结果在全剂量范围内与实验观测结果相一致,呈现相似联合作用.

致谢:实验中鱼类卵黄蛋白原检测得到东南大学发育与疾病相关基因教育部重点实验室沈传来老师帮助;江苏省淡水水产研究所为本实验提供了测试生物,特致谢忱!

参考文献:

- [1] Pickering A D, Sumpter J P. Comprehending endocrine disrupters in aquatic environments [J]. Environmental Science & Technology A-Pages, 2003, **37**(17): 331A-336A.
- [2] Payne J, Schoolze M, Kortenkamp A. Mixtures of four organochlorines enhance human breast cancer cell proliferation [J]. Environmental Health Perspectives, 2001, **109**(4): 391-397.
- [3] Mu X, Leblanc G A. Synergistic interaction of endocrine-disrupting chemicals: Model development using an ecdysone receptor antagonist and a hormone synthesis inhibitor [J]. Environmental Toxicology and

- Chemistry, 2004, **23**(4): 1085-1091.
- [4] 郭建友,霍海如,姜廷良. 衡量联合用药作用研究方法评价[J]. 中药药理与临床, 2005, **21**(3): 60-64.
- [5] Kortenkamp A, Altenburger R. Approaches to assessing combination effects of oestrogenic environmental pollutants [J]. Science of the Total Environment, 1999, **233**(1-3): 131-140.
- [6] Sumpter J P. Endocrine disrupters in the aquatic environment: an overview [J]. Acta hydrochimica et Hydrobiologica, 2005, **33**(1): 9-16.
- [7] Matthiessen P, Johnson I. Implications of research on endocrine disruption for the environmental risk assessment, regulation and monitoring of chemicals in the European Union [J]. Environmental Pollution, 2007, **146**(1): 9-18.
- [8] Kortenkamp A, Altenburger R. Synergisms with mixtures of xenoestrogens A re-evaluation using the method of isoboles [J]. Science of the Total Environment, 1998, **221**(1): 59-73.
- [9] Zhao B, Yang J, Liu Z T, et al. Joint anti-estrogenic effects of PCP and TCDD in primary cultures of juvenile goldfish hepatocytes using vitellogenin as a biomarker [J]. Chemosphere, 2006, **65**(3): 359-364.
- [10] Brion F, Nilsen B M, Eidem J K, et al. Development and validation of an enzyme-linked immunosorbent assay to measure vitellogenin in the zebrafish (*Danio rerio*) [J]. Environmental Toxicology and Chemistry, 2002, **28**(8): 1699-1708.
- [11] Rosen O, Cohen A. Constructing a bootstrap confidence interval for the unknown concentration in radioimmunoassay [J]. Statistic in Medicine, 1995, **14**(9-10): 935-952.
- [12] Altenburger R, Nendza M, Schuurmann G. Mixture toxicity and its modeling by quantitative structure-activity relationships [J]. Environmental Toxicology and Chemistry, 2003, **22**(8): 1900-1915.
- [13] Sprague J B, Ramsay B A. Lethal levels of mixed copper-zinc solutions for juvenile salmon [J]. Journal of Fisheries Research Board of Canada, 1965, **22**: 425-432.
- [14] Marking L L. Method for assessing additive toxicity of chemical mixtures Aquatic Toxicology and Hazard Evaluation [J]. ASTM Special Technical Publication, 1977, **634**: 99-108.
- [15] 徐端正. 药物联合作用评价[J]. 生理科学进展, 1992, **23**(3): 248-253.
- [16] Könnemann H. Fish toxicity tests with mixtures of more than two chemicals: A proposal for a quantitative approach and experimental results [J]. Toxicology, 1981, **19**: 229-238.
- [17] 朱心强,黄幸纾,钱军程. 两种农药联合毒性评价方法的比较[J]. 卫生毒理学杂志, 1993, **7**(1): 60-61.
- [18] 童建,冯致英. 环境化合物的联合作用[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1994. 1-16.
- [19] Faust M, Altenburger R, Backhaus T, et al. Joint algal toxicity of 16 dissimilarly acting chemicals is predictable by the concept of independent action [J]. Aquatic Toxicology, 2003, **63**(1): 43-63.
- [20] Altenburger R, Backhaus T, Boedeker W, et al. Predictability of the toxicity of multiple chemical mixtures to *Vibrio fischeri*: Mixtures composed of similarly acting chemicals [J]. Environmental Toxicology and Chemistry, 2000, **19**(9): 2341-2347.

- [21] Backhaus T, Altenburger R, Boedeker W, *et al*. Predictability of the toxicity of a multiple mixtures of dissimilarly acting chemicals to *Vibrio fischeri* [J]. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 2000, **19** (9): 2348-2356.
- [22] 西奥·科尔伯恩,黛安娜·杜迈洛斯基,约翰·彼得森·迈尔斯. 我们被偷走的未来[M]. 长沙:湖南科学技术出版社,2001.
- [23] Nash J P, Kime D E, Van der Ven L T M, *et al*. Long-term exposure to environmental concentrations of the pharmaceutical ethynylestradiol causes reproductive failure in fish [J]. *Environmental Health Perspectives*, 2004, **112**(17): 1725-1733.
- [24] Grimme L H, Faust M, Boedeker W, *et al*. Aquatic toxicity of chemical substances in combination: still a matter of controversy [J]. *Human and Ecological Risk Assessment*, 1996, **2**(3): 426-433.
- [25] 卫立,张洪昌,张爱茜,等. 环境内分泌干扰物低剂量-效应研究进展[J]. *生态毒理学报*, 2007, **2**(1): 25-31.
- [26] Rajapakse N, Ong D, Kortenkamp A. Defining the impact of weakly estrogenic chemicals on the action of steroidal estrogens [J]. *Toxicological Sciences*, 2001, **60**(2): 296-304.
- [27] Silva E, Rajapakse N, Kortenkamp A. Something from “nothing”-Eight weak estrogenic chemicals combined at concentrations below NOECs produce significant mixture effects [J]. *Environmental Science & Technology*, 2002, **36**(8): 1751-1756.