

DOI: 10.7524/AJE.1673-5897.20190822001

杨蓉, 马梅, 王子健. 雌激素干扰物的联合毒性研究进展 [J]. 生态毒理学报, 2020, 15(5): 18-27

Yang R, Ma M, Wang Z J. Recent research advances in joint toxicity of estrogenic disruptors [J]. Asian Journal of Ecotoxicology, 2020, 15(5): 18-27 (in Chinese)

雌激素干扰物的联合毒性研究进展

杨蓉¹, 马梅^{2,3,*}, 王子健²

1. 北京市南水北调水质监测中心, 北京 100093
2. 中国科学院生态环境研究中心, 中国科学院饮用水科学与技术重点实验室, 北京 100085
3. 中国科学院大学资源与环境学院, 北京 100190

收稿日期: 2019-08-22 录用日期: 2019-08-31

摘要: 生物体对雌激素高度敏感, 环境中的雌激素干扰物可以在低浓度下干扰内源雌激素的正常功能, 导致雌激素干扰物在数十年间都是环境科学的研究热点之一。所有生物均暴露在复杂的环境污染物中, 多种干扰物共同存在产生的混合物效应更应受到关注。为预测和评价环境雌激素干扰物的联合效应, 许多研究从数学模型、信号通路分析等方面提出了解决方法并加以应用, 本文综述了雌激素污染物混合作用联合毒性研究模型的发展和现存问题, 进而对未来的发展进行了展望。

关键词: 雌激素干扰物; 混合物; 联合作用; 加和模型; 作用机制

文章编号: 1673-5897(2020)5-018-10 中图分类号: X171.5 文献标识码: A

Recent Research Advances in Joint Toxicity of Estrogenic Disruptors

Yang Rong¹, Ma Mei^{2,3,*}, Wang Zijian²

1. Beijing Water Quality Monitoring Center for South-to-North Water Diversion, Beijing 100093, China
2. Key Laboratory of Drinking Water Science and Technology, Research Center for Eco-Environmental Sciences, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100085, China
3. College of Resources and Environment, University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100190, China

Received 22 August 2019 accepted 31 August 2019

Abstract: Organisms are highly sensitive to estrogens. Due to their ability of interfering with normal function of endogenous estrogen at very low concentration, they have been a research hotspot of environmental science for decades. Different from the toxicity test conducted under strictly controlled conditions, in reality all organisms are exposed to complex environmental pollutants, leading to particular concern on the mixture effects produced by the co-existence of estrogenic disruptors. In order to predict and evaluate the joint action of environmental estrogenic disruptors, mathematical models and signal pathway analysis have been developed and applied. This paper summarizes the traditional and recent prediction methods in this field, and discusses the future research directions for combined toxicity of estrogenic disruptors.

Keywords: estrogen disruptors; mixture; combined effects; additive model; mode of action

基金项目: 中国科学院饮用水科学与技术重点实验室专项经费资助项目(18K01KLDWST); 中国科学院前沿科学重点研究项目(QYZDY-SSW-DQC004); 国家自然科学基金重点项目(21437006)

第一作者: 杨蓉(1987—), 女, 博士, 研究方向为水生态毒理学, E-mail: ygrg1987@gmail.com

* 通讯作者(Corresponding author), E-mail: mamei@rcees.ac.cn

最近数十年来,合成及天然化合物干扰生物体内分泌系统这一问题已经受到越来越多的关注,分析测试技术的发展和持续不断的污染物排放也造成了水体中环境内分泌干扰物(endocrine disrupting chemicals, EDCs)的检出率和检出浓度越来越高^[1]。广泛的证据表明,EDCs会对野生生物乃至人类繁殖和发育产生不良效应,而生物体在环境浓度($\text{ng} \cdot \text{L}^{-1}$)的EDCs下长期暴露所受到的影响备受关注^[2-4]。

雌激素干扰物(estrogenic disruptors, EEs)是最先被研究的一类EDCs。由于生物体对内源雌激素高度敏感,雌激素在很低浓度下即可发挥作用,因此,环境中的EEs可以在低浓度下模拟或干扰雌激素的正常功能和生理过程,从而干扰免疫系统、神经系统和生殖系统等功能。EEs导致的人类生殖系统肿瘤、野生生物的双性化和雌性化、水生动物种群生存力和资源量下降很早就引起科学界和大众的关注。很多药品、农药、工业产品和副产品都被证明具有雌激素干扰效应,包括作为避孕药主要成分的乙炔基雌二醇、效应弱于天然激素但环境水平较高的双对氯苯基三氯乙烷(DDT)^[5-6]、塑料中常含有的双酚A^[7-8]、用作冷却剂和润滑剂的多氯联苯类化合物^[9]等。随着在全世界的广泛使用,EEs汇入或残留在环境中,对生态系统和人类健康造成威胁^[10]。

单一化合物由于其在环境中非常低的浓度和效应水平使得人们忽视其可能的环境和健康风险;然而,EEs通常不会在环境中单独存在,而是和不同来

源多种物质共存,这就意味着可能对生物造成与单独作用完全不同的联合毒性,造成所谓的“something from nothing(无中生有)”和“a lot from a little(积少成多)”现象。因此,监测和评价环境中EEs的影响,仅通过测定一种或几种典型污染物的浓度远远不够。需要跳出传统的毒性研究和环境管理思路,从整体毒性和联合效应的角度看待复合污染问题。近年来,出于对EEs混合物的重视,科学界从数学和生理生化等角度开展了大量研究。笔者总结和评述了这一领域常用的模型方法,并展望了未来的发展方向。

1 EEs与加和模型(EEs and additional models)

对环境中的EEs进行监测和评估,化学分析和生物测试都是常用的方法。化学分析能对样品中目标化合物进行准确定量,离体生物测试一般是对样品进行快速初筛,确定其中是否含有有效贡献物,活体生物测试一般用于提供化合物与生物体更复杂详细的相互作用信息。因此,化学分析和生物测试、不同的生物测试方法之间需要相互结合和互为补充,而对联合效应的探讨在其中起到桥梁的作用。

1.1 常用的EEs联合效应研究方法及预测模型

目前,对于EEs的联合效应研究,离体(*in vitro*)和活体(*in vivo*)方法均有涉及(表1)。这些研究通过比较模型预测获得的和实验测定获得的混合物效应,评价预测模型的准确性,并考量所选模型的适用性^[11-24]。

表1 雌激素与类雌激素联合效应的研究

Table 1 Published researches on combined effects of estrogenic agonists

受试化合物 Test chemicals	受试生物 Test organism	测试终点 Endpoint	结果 Result	参考文献 Reference
2-(2-氯苯基)-2-(4-氯苯基)-1,1,1-三氯乙烷(<i>o,p'</i> -DDT)、染料木黄酮、4-正壬基酚、辛基酚	重组酵母	酶活性	浓度加和	[11]
2-(2-chlorophenyl)-2-(4-chlorophenyl)-1,1,1-trichloroethane (<i>o,p'</i> -DDT), genistein, 4-nonylphenol, 4- <i>n</i> -octylphenol	Recombined yeast	Enzyme activity	Concentration addition	[11]
羟基多氯联苯、对羟基苯甲酸酯、苯甲酮、双酚A、染料木黄酮	重组酵母	酶活性	浓度加和	[12]
Hydroxylated polychlorinated biphenyls, parabenes, benzophenones, bisphenol A, genistein	Recombined yeast	Enzyme activity	Concentration addition	[12]
17 β -雌二醇、雌酮、雌三醇、17 α -乙炔雌二醇、己烯雌酚、戊酸雌二醇、对特辛基苯酚、4-正壬基酚、双酚A	重组酵母	酶活性	浓度加和	[13]
17 β -estradiol, estrone, estriol, 17 α -ethynylestradiol, diethylstilbestrol, estradiol valerate, 4- <i>tert</i> -octylphenol, 4-nonylphenol, bisphenol A	Recombined yeast	Enzyme activity	Concentration addition	[13]

续表1

受试化合物 Test chemicals	受试生物 Test organism	测试终点 Endpoint	结果 Result	参考文献 Reference
<i>o p'</i> -DDT、2,2-双(4-氯苯基)-1,1,1-三氯乙烷(<i>p p'</i> -DDT)、 2,2-双(4-氯苯基)-1,1-二氯乙烯(<i>p p'</i> -DDE)、六六六(β -HCH) <i>o p'</i> -DDT, 2,2-bis(<i>p</i> -chlorophenyl)-1,1,1-trichloroethane (<i>p p'</i> -DDT), 2,2-bis(<i>p</i> -chlorophenyl)-1,1-dichloroethylene (<i>p p'</i> -DDE), β -hexachlorobenzene (β -HCH)	人乳腺癌细胞 MCF-7 cell	细胞增殖 Proliferation	浓度加和 Concentration addition	[14]
17 β -雌二醇、雌酮、双酚 A、邻苯二甲酸丁苯甲酯、 硫丹、甲氧滴滴涕、五氯酚 17 β -estradiol, estrone, bisphenol A, butylbenzyl phthalate, endosulfan, methoxychlor, pentachlorophenol	人乳腺癌细胞 MCF-7 cell	细胞增殖 Proliferation	协同、加和、弱拮抗 Synergism, addition, weak antagonism	[15]
17 β -雌二醇、17 α -乙炔雌二醇、染料木黄酮、 双酚 A、4-正壬基酚、对特辛基苯酚 17 β -estradiol, 17 α -ethinylestradiol, genistein, bisphenol A, 4-nonylphenol, 4- <i>tert</i> -octylphenol	人乳腺癌细胞 MCF-7 cell	细胞增殖 Proliferation	拮抗、浓度加和 Antagonism and concentration addition	[16]
内源性和人工合成激素(雌二醇、雌酮、雌三醇、 乙炔雌二醇等)、植物雌激素、农药、化妆品添加剂 Endogenous and synthetic steroidal hormones (estradiol, estrone, estriol, ethinylestradiol, etc.), phytoestrogens, pesticides, cosmetic additives	人乳腺癌细胞 MCF-7 cell	细胞增殖 Proliferation	浓度加和、弱拮抗 Concentration addition and weak antagonism	[17]
雌二醇、雌酮、乙炔雌二醇、壬基酚 Estradiol, estrone, ethinylestradiol, nonylphenol	虹鳟、重组酵母 Rainbow trout and recombined yeast	卵黄蛋白原和酶活性 Vitellogenin and enzyme activity	浓度加和 Concentration addition	[18]
17 β -雌二醇、4-正壬基酚、双酚 A 17 β -estradiol, 4-nonylphenol, bisphenol A,	日本青鳉 Japanese medaka	卵黄蛋白原 Vitellogenin	浓度加和 Concentration addition	[19]
乙炔雌二醇、染料木黄酮、双酚 A Ethinylestradiol, genistein, bisphenol A	尼罗罗非鱼 Nile tilapia	mRNA 表达 mRNA expression	浓度加和 Concentration addition	[20]
雌二醇、雌酮、雌三醇 Estradiol, estrone, estriol	海龟、重组酵母 Turtle and recombined yeast	性别发育、酶活性 Sex-reversal and enzyme activity	协同、浓度加和 Synergism and concentration addition	[21]
17 β -雌二醇、羟基多氯联苯 17 β -estradiol, hydroxylated polychlorinated biphenyls	小鼠、人乳腺癌细胞、 大鼠肝癌细胞、重组酵母 B6C3F1 mouse, MCF-7 cell, HepG2 cell, recombined yeast	子宫重量、细胞增殖、 生物发光、酶活性 Uterine weight, proliferation, bioluminescence and enzyme activity	浓度加和 Concentration addition	[22]
雌二醇、乙炔雌二醇、己烯雌酚、染料木黄酮、 壬基酚、双酚 A、甲氧滴滴涕 Estradiol, diethylstilbestrol, diethylstilbestrol, genistein, nonylphenol, bisphenol A, methoxychlor	小鼠 Mouse	子宫重量 Uterine weight	拮抗 Antagonism	[23]
17 β -雌二醇、雌酮、雌三醇、17 α -乙炔雌二醇、 己烯雌酚、戊酸雌二醇、 4-正壬基酚、对特辛基苯酚、双酚 A 17 β -estradiol, estrone, estriol, 17 α -ethinylestradiol, diethylstilbestrol, estradiol valerate, 4-nonylphenol, 4- <i>tert</i> -octylphenol, bisphenol A	人乳腺癌细胞 MCF-7 cell	细胞增殖 Proliferation	效应加和 Response addition	[24]

由表1可知,虽然目前已有许多研究相互作用的方法被开发和报道,但实际上在雌激素和类雌激素联合作用的研究中,基本还是用最经典的浓度加和(concentration addition, CA)模型进行混合物毒性描述。很多研究证明,EEs的联合效应符合CA模型,这一点在测试酶活性的重组酵母实验和检测卵黄蛋白原含量的鱼类暴露实验中更加常见。然而,尽管CA模型在混合物毒性研究中广泛应用,它并不适用于所有情况。当生物过程涉及到多种作用方式(mode of action, MoA)时,例如以细胞增殖、性别决定和子宫增重作为测试终点,混合物会表现出非加和现象(non-additivity)。此时用CA模型预测联合效应会产生结果偏差,且偏离方向(协同作用或拮抗作用)与受试混合物中的组分有关。

例如,研究者发现使用雌激素、酚类、邻苯二甲酸酯和有机氯农药组成的二元混合物联合染毒MCF-7细胞时,雌二醇和双酚A具有明显的协同作用,而其他8个混合物呈现出弱协同、加和和弱拮抗作用^[15]。另一项针对天然雌激素、合成雌激素和酚类化合物的联合毒性研究表明,MCF-7细胞在包含雌二醇、乙炔雌二醇、染料木黄酮和双酚A的三元和四元混合物暴露下的增殖符合CA模型,但当添加了壬基酚和辛基酚时,观察到出现拮抗作用^[16]。因此,选择哪个效应终点开展生物测试,在一定程度上决定了模型是否适用。在多重MoA的情况下,可采用CA模型作为基准判断相互作用方向,但当研究中涉及混合物效应预测,对CA的使用应当谨慎。

尽管如此,CA模型依然在环境管理中得到了最广泛的应用。它的数据处理方式相对简单,而且会在一定程度上高估联合作用,有利于潜在风险的识别和预防,这些都是推广过程中的天然优势^[25]。与之相比,为深入阐释联合毒性开展的毒理学过程研究涉及过多的效应终点和MoA,形式复杂,目前基本限于实验室研究,距离解决实际问题还有很长的路要走。

1.2 CA模型的改进

在长久的实际应用中,研究人员也在根据实际需要,对CA模型进行修正。传统的CA模型及其衍生出的雌二醇当量(estradiol equivalent, EEQ)法建立在一个前提下:混合物各组分仅与单一的作用位点(target of action, ToA)发生作用,所有物质的剂量-效应曲线具有相同的最大作用效力和斜率,沿x轴互相平

行,仅在毒性强度上有所区别^[26]。因此,仅需得到不同组分的半数效应浓度(half-effective concentration, EC_{50}),即可通过下式计算雌激素效应^[27]:

$$EEQ = \sum_{i=1}^n \left(c_i \times \frac{EC_{xE_2}}{EC_{xi}} \right)$$

式中: c_i 表示第*i*个化合物在联合作用时的浓度, EC_{xE_2} 和 EC_{xi} 分别代表作为标准雌激素的17 β -雌二醇(E_2)和第*i*个组分在产生*x*%效应时的浓度,此处一般为 EC_{50} 。

这一前提在完全诱导物(如类固醇激素)上是适用的。然而,还存在大量的部分诱导物(如酚类化合物),它们在任何浓度下都达不到完全诱导物的最大效应,这种最大作用效力上的差异完全不在CA模型的考量之内,导致预测结果不够全面。为解决这个问题,广义浓度加和模型(generalized concentration addition, GCA)将最大作用效力也纳入考量,便可更准确地预测含有部分诱导物的混合物或环境样品的整体效应^[28]。其可表示为:

$$E_{mix} = \frac{\sum_{i=1}^n \frac{a_i c_i}{EC_{50i}}}{1 + \sum_{i=1}^n \frac{c_i}{EC_{50i}}}$$

式中: E_{mix} 表示混合物的联合毒效应, c_i 、 a_i 和 EC_{50i} 分别表示组分*i*的暴露浓度、最大作用效力和 EC_{50} 值^[29]。

在此基础上更进一步的是完全Logistic模型(full logistic model, FLM),它将剂量-效应曲线几乎所有拟合参数(包括混合物组分的最大和最小作用效力、 EC_{50} 、斜率)全部囊括其中。即使这些参数各不相同,FLM也能提供令人满意的预测结果^[30]。其可表示为:

$$E_{mix} = \sum_{i=1}^n \left[\left(\frac{Max_i - Min_i}{Max_i} \right) \times \left(\frac{c_i / EC_{50i}}{1 + \left(\sum_{i=1}^n \frac{c_i}{EC_{50i}} \right)^{p_i}} \right) \right]$$

式中: E_{mix} 表示混合物的联合毒效应, Max_i 、 Min_i 、 c_i 、 EC_{50i} 和 p_i 分别表示组分*i*的最大作用效力、最小作用效力、暴露浓度、 EC_{50} 值和曲线斜率。FLM甚至可以将模拟天然激素作用的诱导物和拮抗这一作用的拮抗物纳入一个体系,认为拮抗物是部分诱导物的极端情况(最大作用效力为零),只能结合受体,但无法启动后续生物过程^[31]。

Schlotz等^[32]用受体结合试验、细胞增殖试验和

计算机模拟比较了 CA、GCA 和 FLM 这 3 种方法的预测能力。结果表明,CA 模型更适合预测毒性强度 (EC_{50}),GCA 在预测最大作用效力上更有优势,而 FLM 在计算机模拟混合物毒性方面表现良好,且集合了 CA 和 GCA 的优点。我们经常探讨 CA 模型的适用性和适用范围,强调为特定情况选择合适的模型。但从另一个角度,不断发展和修正 CA,让这个在接近 100 年前提出的模型适应更多的实际情况,不断焕发出新的活力,这也具有非常重要的意义。

2 EEs 混合物暴露下的生物过程 (Action mechanisms under exposure to EEs mixture)

经过数十年的应用,CA 模型在环境管理的角度解决了混合物风险预测和评估的很多现实问题。然而,作为一个数学模型,CA 模型几乎不对生物体的复杂性进行描述。生物在其框架下只是一个黑箱,CA 模型负责在单一 MoA 的假设下给出计算结果。

当混合物毒性研究进一步发展,终归无法绕开对生物过程和信号通路的详细探索。研究者需要得知混合物中的每个组分在生物体内是如何影响通路和改变酶活性,进而改变生物大分子的浓度水平,最终影响测试终点的。

通常而言,EEs 可以通过以下几种作用方式在生物体内发挥作用:

(1) 与雌激素受体 (estrogen receptor, ER) 直接结合:可以模拟天然激素与 ER 相互作用的受体诱导物,称为雌激素或类雌激素^[33];

(2) 与天然激素竞争结合受体:同 ER 有亲和力,但结合受体后不进行后续生物过程、对基因转录没有明显影响的受体拮抗物,称为抗雌激素^[34];

(3) 影响受体的数量:某些 EEs (如酚类化合物)的存在会干扰 ER 的合成与分解代谢,从而导致受体体内水平的改变^[35];

(4) 影响激素的合成-分布-代谢-排出 (absorption-distribution-metabolism-excretion, ADME) 过程:不与受体发生作用,而是通过干扰信号调节、干扰受体合成、刺激激素或受体表达等过程影响内分泌系统;

(5) 影响内分泌系统与其他系统的调控作用:使神经系统、免疫系统等受到伤害,干扰神经发育过程,引发免疫毒性和致癌性,对认知功能、情感反应和应激反应均有影响,甚至导致脑组织形态发生变化^[36]。

经常有化合物同时具有几方面的作用机制,其本身就在体内多个靶位点上产生影响。这使混合物的作用更加复杂,若选择较为综合的效应终点,如致

死率、孵化率等,会大大增加解释和预测结果的难度。

2.1 抗雌激素的联合作用

抗雌激素可以干扰或阻断天然激素在体内与生物大分子的作用过程,抑制雌激素效应。在经典的基因组通路中,抗雌激素和天然激素竞争结合受体,但不具有激素的生理效应,降低了内源激素的作用^[34]。因此,雌激素和类雌激素在“具有相同的 MoA 和 ToA”的分类框架下属于同一类物质,而抗雌激素属于另一类^[37]。因此,绝大部分 EEs 联合作用研究的受试物都是雌激素和类雌激素。针对不同种类 EEs (如雌激素和抗雌激素)所组成的混合物的研究较少。

部分涉及抗雌激素联合作用的研究常使用特定浓度的雌激素和抗雌激素分别和共同暴露。在一篇 EEs 混合物对斑马鱼胚胎联合毒性的报道中,研究者考察了固定浓度的类雌激素 2-(2-氯苯基)-2-(4-氯苯基)-1,1,1-三氯乙烷 (*o,p'*-DDT) 和 3 个浓度梯度抗雌激素氟维斯群单独以及联合暴露时胚胎的孵化率、孵化时间、畸形率和相关基因转录水平的变化^[38];另一项研究采用了相似的实验设计,受试物是固定浓度的雌二醇和 3 个浓度梯度的来曲唑或他莫昔芬混合物,效应终点包括日本青鳉的孵化率、孵化时间、性别比、血浆卵黄蛋白原 (vitellogenin, VTG) 浓度和 *vtg1* 基因表达量^[39-40]。

这种雌激素浓度保持不变的实验设计更适用于研究和评估药效,描述抗雌激素药物如何降低生物体内特定雌激素水平。名为考察二者的联合效应,实际上重点考察了抗雌激素对雌激素效应的拮抗效果。实际环境中情况更加复杂,更常见的是随着样品浓缩和稀释,EEs 混合物的各组分浓度同比例变化。在这种实验设计下,重组基因双杂交酵母测试结果证明,抗雌激素的存在会改变测试结果的剂量效应曲线,当其与雌激素达到某一比例时能完全掩蔽雌激素的作用^[41]。因此,不仅是环境风险和人类健康,从环境监测和管理的角度看,对抗雌激素联合效应的评估也需要受到关注。

更进一步地,上文所述 FLM 方法从数学角度给出了更加普适的解决方案。雌激素和抗雌激素进入生物体内,第一步都是结合 ER,导致受体构象发生改变。二者区别在于第二步,配体-受体复合物暴露的结合位点可募集不同的辅助调节因子,影响靶基因的转录和表达^[42]:雌激素、ER 和共激活因子的复合物可增强转录,抗雌激素、ER 和共抑制因子的复

合物则可抑制转录。若从“受体亲和性”和“作用效力”2个维度考察 EEs, 它们的关系如图 1 所示。抗雌激素被看作“作用效力为零”的雌激素, 弱雌激素则可以在“作用效力和受体亲和性都比较低的雌激素”和“这 2 项均远低于雌二醇, 因此在体内共存时表现出一定拮抗能力”的 2 个角色之间转换, 全部通过 FLM 的体系进行预测和评价。

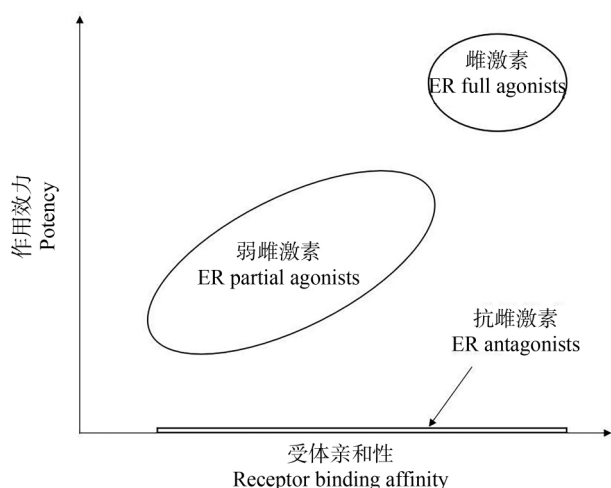


图 1 雌激素、弱雌激素和抗雌激素的关系

Fig. 1 Relationship between estrogen, weak estrogen and anti-estrogen

要注意的是, 抗雌激素并不是全部通过基因组作用发挥拮抗效力。例如, 与雌二醇竞争受体的他莫昔芬不同, 来曲唑可在体内抑制睾酮向雌二醇的转化, 降低雌激素浓度水平, 通过干扰激素的 ADME 过程引起雌激素调节紊乱^[39]。这种类型的拮抗用 FLM 方法是无法处理的。

2.2 生物体的复杂通路: 以 MCF-7 细胞为例

MCF-7 细胞增殖试验是一种识别雌激素活性物质的简单有效的方法, 被广泛用于各种化合物的雌激素效应评估^[43-44] 和环境样品的风险评价^[45-46], 可在细胞水平上反映 EEs 的作用。目前已有很多研究关注雌激素诱导 MCF-7 细胞增殖的机理, 大多数研究者相信雌激素是通过结合细胞核中的 ER α , 通过雌激素反应元件 (estrogen response element, ERE) 与 DNA 结合, 调节与细胞周期控制有关的关键基因, 从而导致细胞增殖。但除此之外, 也有报道指出人体内大约 1/3 能被 ER 调控的基因中并不含 ERE 片段, 说明 ER 还可通过其他机理调节基因表达^[47]。甚至有研究证明, 雌激素可以不直接通过受

体和 DNA 发挥作用, 而是通过抑制一些调控细胞凋亡的蛋白活性 (如 MLK3 和 NF κ B) 导致癌细胞失控生长^[48]。

增殖相关的主要 MoA 可分为以下 3 类: (1) ER 通过 ERE 与 DNA 直接结合; (2) ER 与 DNA 通过转录因子 (transcription factor, TF) 间接结合, 可与前者合称为基因组作用; (3) 非基因组作用, 雌激素配体受体复合物在细胞核外诱导一系列蛋白激酶的变化, 导致细胞增殖^[49]。后 2 个 MoA 扩充了传统上对 ER 的 MoA 的认知: 与 DNA 间接结合的发现说明不含 ERE 的基因也可受到 ER 调节, 使一大部分参与细胞增殖调节的基因进入我们的关注范围; 而非基因组作用说明 ER 和配体的复合物甚至不需要进入细胞核与 DNA 作用, 就可在细胞质里直接调控蛋白激酶的磷酸化和去磷酸化。因此, 细胞增殖是数量繁多的受体、酶和基因在配体的存在下相互作用的综合结果, 这加大了分析和预测 EEs 混合物诱导细胞增殖的联合作用的难度, 也预示着活体生物联合毒性研究的难度。

有研究者考察了 EEs 暴露对核受体、非核受体及 PI3K/AKT 通路相关基因表达的影响。发现以 17 β -雌二醇为代表的雌激素主要通过调节核受体 ER 发挥作用, 而以双酚 A 为代表的酚类化合物主要通过影响非基因组作用的 G 蛋白偶联受体 30 (G protein-coupled receptor 30, GPR30) 产生效应。当二者联合暴露时, 混合物对 PI3K/AKT 通路的数个基因显示出部分加和、部分等效、部分拮抗等复杂影响, 导致细胞增殖的结果偏离了 CA, 而效应加和模型能更好地描述其结果^[24]。但是就研究清楚 17 β -雌二醇和双酚 A 对 MCF-7 的增殖效应而言, 仅 PI3K/AKT 通路的数据还不够, 甚至转录组的数据都远远不够, 因此尚有大量的空白需要填补。

2.3 新方法的探索

环境中的 EEs 数量众多, 生物通过食物、饮水和呼吸等多种途径暴露其中。我们无法测试所有的污染物组合, 现有的完全混合物的毒性数据局限在有限数目的混合物上, 基于组分的评价方法也缺乏大量的毒性、剂量效应和 MoA 等基础资料。所以, 我们需要能提供更多信息并综合处理这些信息的实验方法和计算工具。

在这些新方法中, 毒代动力学、离体测试方法、组学 (包括转录组、蛋白组和代谢组) 和定量构效关系 (quantitative structure-activity relationship, QSAR)

等都可以补充缺乏的混合物暴露和毒性的数据资料。这些信息被综合到有害结局路径(adverse outcome pathway, AOP)的研究框架内,从每个混合物组分的分子起始事件(molecular initiating event, MIE)开始,通过一系列关键事件(key event, KE)导

向有害结局(adverse outcome, AO) (图2)^[50]。这种数据整合还可以逆向快速识别导致AO和联合效应的化合物组分,找到数据缺乏的位置,并计划之后的测试需求;也可用于基于MoA的化合物分组,这是混合物风险评价中的一个重点步骤。

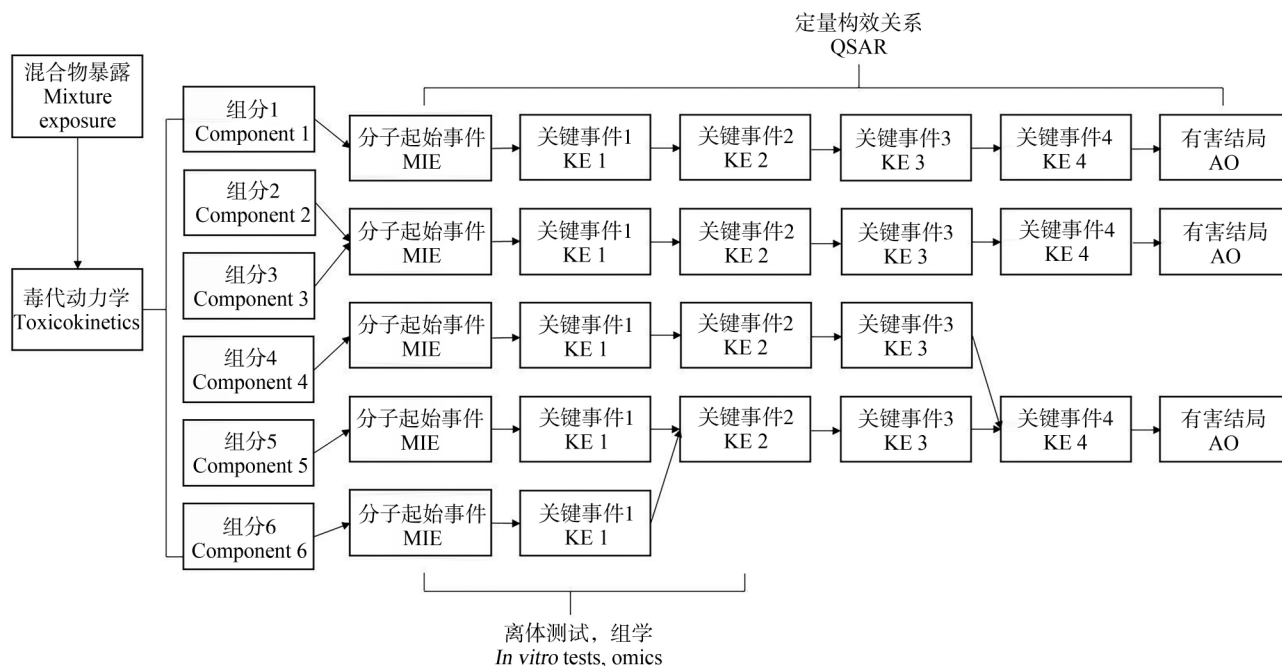


图2 有害结局路径(AOP)框架整合单一化合物的毒性信息

Fig. 2 Toxicity information of mixture components under the adverse outcome pathway (AOP) framework

Note: MIE stands for molecular initiating event; KE stands for key event; AO stands for adverse outcome;

QSAR stands for quantitative structure-activity relationship.

目前,环境组学、AOP和QSAR等方法还未得到足够的验证和充分的发展,而且缺乏政策和立法的推动^[51]。但即使如此,业界也普遍承认它们未来的价值。有研究者利用离体测试和毒代动力学数据推测双酚A、染料木黄酮和4-正壬基酚在活体测试中的雌激素效应,最后发现预测结果和实际结果有偏离。作者认为偏离的原因因为研究中仅考虑了肝脏清除速率,对ADME这一复杂过程考虑得不够全面^[52]。但这种尝试对推动EEs及EEs混合物风险评价是有益的,也符合综合组学、靶向测试技术和计算毒理学方法来取得突破性成果的研究方向。

3 展望(Perspective)

EEs的联合毒性研究是一个意义非凡而又极具挑战性的课题。一方面,对EEs混合物环境风险的研究早已广泛开展,无论是针对水体、土壤等环境样品的整体混合物方法还是以加和模型为代表的基于

组分的方法均有大量的研究和应用;另一方面,通过生物测试和模拟计算对EEs生物行为的详细探讨也取得了诸多成果,有利于深入了解组分之间的相互作用,以降低联合效应预测结果的偏离。

然而,现实中这两者经常是割裂的。由于体内代谢、靶位点和MoA等数据和资料的缺乏,与生物过程相关的联合效应预测和评价方法很少得到实际应用,且它们复杂的公式和计算工具令人望而生畏。因此,我们需要系统地、有计划地开展代表性EEs的生理毒理信息获取及汇总;同时,对新方法的研发需要更多地考虑其应用,仔细评价它与旧模型预测效果的差异,寻找推广的关键优势。不可否认,CA模型拥有简单易用的公式和在一定范围内完全可接受的预测效果,这种便捷有效在很大程度上冲淡了它的模糊粗糙等缺点,就算新方法的预测精度极高,一旦使用不易,CA还是很难被其替代。

在我国, 科学界对 EEs 的研究已有 20 多年, 在此期间就其环境分布、迁移转化、生物效应和风险评估等方面获得了大量数据。但目前 EEs 还未受到监测部门的关注, 我们面临的现状是相关国家标准如《地表水环境质量标准》(GB3838—2002)、《生活饮用水卫生标准》(GB5749—2006) 都是 10 多年前颁布的, 不能反映近年来对新型污染物的重视。另外, 我国的水质标准是建立在单一污染物的浓度限值之上, 而环境中工业、农业和生活来源的多种物质都具有内分泌干扰效应, 如何从复合污染的角度控制 EEs 排放, 保护人体健康, 也是管理部门需要思考的问题。对监测单位而言, 对 EEs 的管理和监控还需转变一味关注目标化合物的思路, 以效应为导向的方法结合主要贡献物识别和溯源可能是未来的发展方向。

通讯作者简介: 马梅(1967—), 女, 博士, 研究员, 博士生导师, 主要研究方向为水生态毒理学。

参考文献(References):

- [1] Petrovic M, Eljarrat E, Lopez de Alda M J, et al. Endocrine disrupting compounds and other emerging contaminants in the environment: A survey on new monitoring strategies and occurrence data [J]. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2004, 378(3): 549-562
- [2] Hotchkiss A K, Rider C V, Blystone C R, et al. Fifteen years after “wingspread”—Environmental endocrine disruptors and human and wildlife health: Where we are today and where we need to go [J]. *Toxicological Sciences*, 2008, 105(2): 235-259
- [3] Vandenberg L N, Colborn T, Hayes T B, et al. Hormones and endocrine-disrupting chemicals: Low-dose effects and nonmonotonic dose responses [J]. *Endocrine Reviews*, 2012, 33(3): 378-455
- [4] Zha J M, Wang Z J, Wang N, et al. Histological alteration and vitellogenin induction in adult rare minnow (*Gobiocypris rarus*) after exposure to ethynylestradiol and nonylphenol [J]. *Chemosphere*, 2007, 66(3): 488-495
- [5] Kojima H, Takeuchi S, Nagai T. Endocrine-disrupting potential of pesticides via nuclear receptors and aryl hydrocarbon receptor [J]. *Journal of Health Science*, 2010, 56(4): 374-386
- [6] Mnif W, Hassine A I H, Bouaziz A, et al. Effect of endocrine disruptor pesticides: A review [J]. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 2011, 8(6): 2265-2303
- [7] Okada H, Tokunaga T, Liu X, et al. Direct evidence revealing structural elements essential for the high binding ability of bisphenol A to human estrogen-related receptor- γ [J]. *Environmental Health Perspectives*, 2008, 116(1): 32-38
- [8] Vom Saal F S, Myers J. Bisphenol A and risk of metabolic disorders [J]. *The Journal of the American Medical Association*, 2008, 300(11): 1353-1355
- [9] McGovern V. PCBs are endocrine disruptors: Mixture affects reproductive development in female mice [J]. *Environmental Health Perspectives*, 2006, 114(6): A368-A369
- [10] Peng X, Wang Z, Yang C, et al. Simultaneous determination of endocrine-disrupting phenols and steroid estrogens in sediment by gas chromatography-mass spectrometry [J]. *Journal of Chromatography A*, 2006, 1116(1-2): 51-56
- [11] Payne J, Rajapakse N, Wilkins M, et al. Prediction and assessment of the effects of mixtures of four xenoestrogens [J]. *Environmental Health Perspectives*, 2000, 108(10): 983-987
- [12] 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 and Technology*, 2002, 36(8): 1751-1756
- [13] Yang R, Li N, Ma M, et al. Combined effects of estrogenic chemicals with the same mode of action using an estrogen receptor binding bioassay [J]. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 2014, 38(3): 829-837
- [14] Payne J, Scholze M, Kortenkamp A. Mixtures of four organochlorines enhance human breast cancer cell proliferation [J]. *Environmental Health Perspectives*, 2001, 109(4): 391-397
- [15] Suzuki T, Ide K, Ishida M. Response of MCF-7 human breast cancer cells to some binary mixtures of oestrogenic compounds *in-vitro* [J]. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 2001, 53(11): 1549-1554
- [16] Rajapakse N, Silva E, Scholze M, et al. Deviation from additivity with estrogenic mixtures containing 4-nonylphenol and 4-*tert*-octylphenol detected in the E-SCREEN assay [J]. *Environmental Science and Technology*, 2004, 38(23): 6343-6352
- [17] Silva E, Rajapakse N, Scholze M, et al. Joint effects of heterogeneous estrogenic chemicals in the E-Screen-ex-

- ploring the applicability of concentration addition [J]. *Toxicological Sciences*, 2011, 122(2): 383-394
- [18] Thorpe K L, Gross-Sorokin M, Johnson I, et al. An assessment of the model of concentration addition for predicting the estrogenic activity of chemical mixtures in wastewater treatment works effluents [J]. *Environmental Health Perspectives*, 2005, 114(S1): 90-97
- [19] Sun L W, Zha J M, Wang Z J. Interactions between estrogenic chemicals in binary mixtures investigated using vitellogenin induction and factorial analysis [J]. *Chemosphere*, 2009, 75(3): 410-415
- [20] Ribeiro C, Urbatzka R, Castro L F C, et al. *In vitro* exposure of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) testis to estrogenic endocrine disrupting chemicals: mRNA expression of genes encoding steroidogenic enzymes [J]. *Toxicology Mechanisms and Methods*, 2012, 22(1): 47-53
- [21] Arnold S F, Bergeron J M, Tran D Q, et al. Synergistic responses of steroidal estrogens *in vitro* (yeast) and *in vivo* (turtles) [J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 1997, 235(2): 336-342
- [22] Ramamoorthy K, Vyhldal C, Wang F, et al. Additive estrogenic activities of a binary mixture of 2', 4', 6'-trichloro- and 2', 3', 4', 5'-tetrachloro-4-biphenylol [J]. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 1997, 147(1): 93-100
- [23] Tinwell H, Ashby J. Sensitivity of the immature rat uterotrophic assay to mixtures of estrogens [J]. *Environmental Health Perspectives*, 2004, 112(5): 575-582
- [24] Yuan S W, Huang C, Ji X Y, et al. Prediction of the combined effects of multiple estrogenic chemicals on MCF-7 human breast cancer cells and a preliminary molecular exploration of the estrogenic proliferative effects and related gene expression [J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2018, 160: 1-9
- [25] 杨蓉, 李娜, 饶凯锋, 等. 环境混合物的联合毒性研究方法 [J]. *生态毒理学报*, 2016, 11(1): 1-13
Yang R, Li N, Rao K F, et al. Review on methodology for environmental mixture toxicity study [J]. *Asian Journal of Ecotoxicology*, 2016, 11(1): 1-13 (in Chinese)
- [26] Loewe S. Die quantitativen probleme der pharmakologie [J]. *Ergebnisse der Physiologie*, 1928, 27: 47-187
- [27] Van den Berg M, Birnbaum L, Bosveld A T C, et al. Toxic equivalency factors (TEFs) for PCBs, PCDDs, PCDFs for humans and wildlife [J]. *Environmental Health Perspectives*, 1998, 106(12): 775-792
- [28] Howard G J, Schlezinger J J, Hahn M E, et al. Generalized concentration addition predicts joint effects of aryl hydrocarbon receptor agonists with partial agonists and competitive antagonists [J]. *Environmental Health Perspectives*, 2010, 118(5): 666-672
- [29] Brinkmann M, Hecker M, Giesy J P, et al. Generalized concentration addition accurately predicts estrogenic potentials of mixtures and environmental samples containing partial agonists [J]. *Toxicology in Vitro*, 2018, 46: 294-303
- [30] Ezechiáš M, Cajthaml T. Novel full logistic model for estimation of the estrogenic activity of chemical mixtures [J]. *Toxicology*, 2016, 359-360: 58-70
- [31] Ezechiáš M, Cajthaml T. Receptor partial agonism and method to express receptor partial activation with respect to novel full logistic model of mixture toxicology [J]. *Toxicology*, 2018, 393: 26-33
- [32] Schlotz N, Kim G J, Jäger S, et al. *In vitro* observations and *in silico* predictions of xenoestrogen mixture effects in T47D-based receptor transactivation and proliferation assays [J]. *Toxicology in Vitro*, 2017, 45: 146-157
- [33] Tapiero H, Nguyen Ba G, Tew K D. Estrogens and environmental estrogens [J]. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 2002, 56(1): 36-44
- [34] Wikipedia. Receptor antagonist [EB/OL]. (2015-4-28) [2019-08-22]. http://en.wikipedia.org/wiki/Receptor_antagonist
- [35] Min J, Lee S K, Gu M B. Effects of endocrine disrupting chemicals on distinct expression patterns of estrogen receptor, cytochrome P450 aromatase and p53 genes in *Oryzias latipes* liver [J]. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, 2003, 17(5): 272-277
- [36] Frye C, Bo E, Calamandrei G, et al. Endocrine disruptors: A review of some sources, effects, and mechanisms of actions on behaviour and neuroendocrine systems [J]. *Journal of Neuroendocrinology*, 2012, 24(1): 144-159
- [37] Kortenkamp A. Ten years of mixing cocktails: A review of combination effects of endocrine-disrupting chemicals [J]. *Environmental Health Perspectives*, 2007, 115: 98-105
- [38] 向霄, 王鲁梅, 钟铃盈, 等. 环境激素 *o,p'*-DDT 和抗雌激素氟维斯群对斑马鱼胚胎的复合效应 [J]. *生态毒理学报*, 2012, 7(3): 251-258
Xiang X, Wang L M, Zhong L Y, et al. Combined effects of environmental estrogen *o,p'*-DDT and antiestrogen fulvestrant on zebrafish (*Danio rerio*) embryos [J]. *Asian Journal of Ecotoxicology*, 2012, 7(3): 251-258 (in Chinese)

- [39] Sun L W , Shao X , Hu X , et al. Transcriptional responses in Japanese medaka (*Oryzias latipes*) exposed to binary mixtures of an estrogen and anti-estrogens [J]. *Aquatic Toxicology* , 2011 , 105(3) : 629-639
- [40] Sun L W , Zha J M , Wang Z J. Effects of binary mixtures of estrogen and antiestrogens on Japanese medaka (*Oryzias latipes*) [J]. *Aquatic Toxicology* , 2009 , 93(1) : 83-89
- [41] Yang R , Li N , Rao K F , et al. Combined action of estrogen receptor agonists and antagonists in two-hybrid recombinant yeast *in vitro* [J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety* , 2015 , 111: 228-235
- [42] 季晓亚 , 李娜 , 袁圣武 , 等. 环境雌激素生物效应的作用机制研究进展 [J]. *生态毒理学报* , 2017 , 12(1) : 38-51
- Ji X Y , Li N , Yuan S W , et al. Research progress in the mechanisms for biological effects of environmental estrogens [J]. *Asian Journal of Ecotoxicology* , 2017 , 12(1) : 38-51 (in Chinese)
- [43] Okubo T , Yokoyama Y , Kano K , et al. ER-dependent estrogenic activity of parabens assessed by proliferation of human breast cancer MCF-7 cells and expression of ER α and PR [J]. *Food and Chemical Toxicology* , 2001 , 39(12) : 1225-1232
- [44] Okubo T , Yokoyama Y , Kano K , et al. Estimation of estrogenic and antiestrogenic activities of selected pesticides by MCF-7 cell proliferation assay [J]. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* , 2004 , 46(4) : 445-453
- [45] Bicchi C , Schilirò T , Pignata C , et al. Analysis of environmental endocrine disrupting chemicals using the E-screen method and stir bar sorptive extraction in wastewater treatment plant effluents [J]. *Science of the Total Environment* , 2009 , 407(6) : 1842-1851
- [46] Körner W , Bolz U , Süßmuth W , et al. Input/output balance of estrogenic active compounds in a major municipal sewage plant in Germany [J]. *Chemosphere* , 2000 , 40(9-11) : 1131-1142
- [47] O' Lone R , Frith M C , Karlsson E K , et al. Genomic targets of nuclear estrogen receptors [J]. *Molecular Endocrinology* , 2014 , 18(8) : 1859-1875
- [48] Rangasamy V , Mishra R , Mehrotra S , et al. Estrogen suppresses MLK3-mediated apoptosis sensitivity in ER+ breast cancer cells [J]. *Cancer Research* , 2010 , 70(4) : 1731-1740
- [49] Bjornstrom L , Sjoberg M. Mechanisms of estrogen receptor signaling: Convergence of genomic and nongenomic actions on target genes [J]. *Molecular and Cellular Endocrinology* , 2005 , 19(4) : 833-842
- [50] Bopp S K , Kienzler A , Richarz A N , et al. Regulatory assessment and risk management of chemical mixtures: Challenges and ways forward [J]. *Critical Reviews in Toxicology* , 2019 , 49(2) : 174-189
- [51] Bopp S K , Berggren E , Kienzler A , et al. Scientific methodologies for the assessment of combined effects of chemicals—A survey and literature review [R]. Luxembourg: European Union , 2015
- [52] Punt A , Brand W , Murk A J , et al. Effect of combining *in vitro* estrogenicity data with kinetic characteristics of estrogenic compounds on the *in vivo* predictive value [J]. *Toxicology in Vitro* , 2013 , 27(1) : 44-51 ◆