

毒理学研究新方法 有害结局路径 **AOP**的基本内涵 与研究进展

刘济宁 王 蕾 党志超 主编



DULIXUE YANJIU XINFANGFA
YOUHAI JIEJU LUJING DE
JIBEN NEIHAN
YU YANJIU JINZHAN

毒理学研究新方法：有害结局路径 (AOP) 的基本内涵与研究进展

刘济宁 王 蕾 党志超 主编

中国环境出版社·北京

图书在版编目 (CIP) 数据

毒理学研究新方法: 有害结局路径 (AOP) 的基本内涵与研究进展/刘济宁, 王蕾, 党志超主编. —北京: 中国环境出版社, 2016.5

ISBN 978-7-5111-2640-5

I. ①毒… II. ①刘…②王…③党… III. ①毒理学—研究 IV. ①R99

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2015) 第 304933 号

出版人 王新程
责任编辑 张维平
责任校对 尹芳
封面设计 宋瑞

出版发行 中国环境出版社
(100062 北京市东城区广渠门内大街 16 号)
网 址: <http://www.cesp.com.cn>
电子邮箱: bjgl@cesp.com.cn
联系电话: 010-67112765 (编辑管理部)
010-67113412 (教材图书出版中心)
发行热线: 010-67125803, 010-67113405 (传真)

印 刷 北京中科印刷有限公司
经 销 各地新华书店
版 次 2016 年 5 月第 1 版
印 次 2016 年 5 月第 1 次印刷
开 本 787×1092 1/16
印 张 8
字 数 170 千字
定 价 30.00 元

【版权所有。未经许可, 请勿翻印、转载, 违者必究。】

如有缺页、破损、倒装等印装质量问题, 请寄回本社更换

本书编委会

主 编 刘 济 宁 王 蕾 党志超

编 委 翁 丹 汪 贞 吉贵祥 吴晟旻

杨先海 范德玲 杨 倩 周林军

张圣虎 郭 敏 石利利

序

化学品自其使用之初即是为了便利人类的生产和生活，化学工业的发展水平从一定水平上反映了人类生产和生活水平。因此在急切追求物质文明的利益驱使下，化学工业在西方工业革命早期得到了毫无限制性地飞跃式发展。然而，随着 20 世纪 30—80 年代日本痛痛病和水俣病事件、洛杉矶光化学烟雾事件、伦敦烟雾事件、意大利塞维索事故、印度毒气泄漏事件等的陆续出现，人类逐渐意识到化学品在为人类创造福利的同时也会对人类健康和环境安全造成毁灭性打击。化学品管理也随之被欧美等发达国家提上重要日程，识别高危害化学品并限制其生产使用成为化学品管理的重要内容。

然而随着欧盟《化学品的注册、评估、授权和限制》(REACH) 法规、美国《有毒物质控制法》(TSCA) 等化学品管理法规的实施，化学品管理在全球范围得到了空前的强化：所有流通于市场的化学品均需提供其对人类健康和环境安全危害性的数据信息。根据 REACH 化学品注册最新数据，目前市场上流通的化学品大约 14 万种。高成本、长周期、高生物损耗的传统生物测试技术已无力承担如此众多化学品的毒性数据需求，这一问题给传统毒理学带来了前所未有的困难和挑战。

在尝试化解这一难题的众多策略中，有害结局路径 (AOP) 概念框架以其全面系统的设计理念和开放性的组织结构脱颖而出。AOP 全面整合了体外试验、体内试验、计算机模型以及临床数据等所产生的化学品毒性数据，构建了从分子起始事件 (MIE) 到关键事件 (KEs)，再到有害结局 (AO) 等不同生物组织水平的反应事件或毒性效应之间的联系，从而为化学品危害评估和管理决策提供有力证据。因此，AOP 不仅适用于人体健康风险评估，也为环境风险评估提供了基于毒性作用机制的数据参考；AOP 不仅适用于毒性通路完全已知的化学品，也为部分机制不完全清楚的化学品信息提供了应用于特定管理用途的方法；AOP 不仅充分考虑现有毒性数据，也为未来新数据的引入提供了接口；

AOP 不仅依赖于发达国家的毒理学研究成果、服务于发达国家的化学品管理,也为全球范围的化学品危害研究与评估协作提供了开放性平台、致力于支持国际化学品管理决策。

本书在引入 AOP 基本概念与术语的基础上,介绍了 AOP 构建方法和开发工具,阐述了 AOP 开发的具体案例及其在优先测试策略、危害鉴别与分类、风险评估、新 AOP 识别、新测试方法与 QSAR 模型开发、保护动物福利等方面的应用,综述了 AOP 对于提高 IATA 评估效率和置信度的贡献和应用,最后对 AOP 发展可能遇到的障碍、挑战以及相应的举措进行了展望。这一内容构架基本涵盖了 AOP 原理、开发、评估、应用和发展等多方面的技术内容,全文结构设计符合初学者对于 AOP 这一概念框架的认知、了解过程。

我国化学品管理起步较晚,但随着化学品事故的频发近年来也受到政府密切关注。2011 年实施的《危险化学品安全管理条例》(国务院 591 号令)和 2010 年实施的《新化学物质环境管理办法》(环保部 7 号令)在我国确立了危险化学品和新化学物质管理的基本框架,识别和筛选高危害化学品也成为我国化学品管理的重要内容。本书对 AOP 基本概念、构建方法和关键应用的系统阐述,有助于我国环境毒理学、卫生毒理学、化学品风险评估与管理等领域的管理者、科研工作者和学者全面了解 AOP 研究进展、发展动向,掌握 AOP 构建和研究的技术、工具,为我国化学品管理提供技术前导并为积极参与全球 AOP 发展计划奠定基础。同时本书也有助于我国化学品从业人员及行业协会理解 AOP 的内涵和功能,了解化学品评估最新技术工具,从而及早筹措应对未来全球化学品管理形势的新技术和新方法。

中国工程院院士

蔡道基

2015 年 10 月 25 日于南京

目 录

第 1 章 绪 论	1
1.1 前言	1
1.2 基本概念	3
第 2 章 AOP 概念框架的构建与开发	7
2.1 AOP 构建基本程序	7
2.2 AOP 有效性评估与可信度	11
2.3 建立 AOP 所需的基本信息	12
2.4 AOP 相关网络平台的发展	13
2.5 OECD 关于 AOP 开发、评审和认可的程序	15
第 3 章 AOP 编制模板、构建原则及示例	18
3.1 OECD 关于 AOP 规范化的编制模板	19
3.2 构建 AOP 需遵循的原则	20
3.3 AOP 构建示例	23
3.4 AOP 的应用	34
3.5 AOP 应用案例	38
第 4 章 基于 AOP 的整合测试与评估策略	44
4.1 IATA 和相关概念	45
4.2 基于 AOP 的 IATA 关键要素	46
4.3 基于 AOP 的 IATA 在管理中的应用	51
4.4 综合毒理学及其管理应用意义	55
第 5 章 结论与展望	58
附录 术 语	60
参考文献	66

第1章 绪论

1.1 前言

随着化学工业的迅速发展,各种化学品被广泛应用于工业、农业和社会活动的各个领域。据美国化学文摘登记号(CAS No.)发布的数据,截至2015年3月全世界约有1.007亿种化学物质,商用化学品8万多种,每天仍有近万种新化学物质商品化。这些化学品在为人们生活带来便利和产生社会、经济价值的同时,也对生态环境和人类健康造成潜在的风险与威胁。因此,化学品风险管理已成为全球关注的重大课题。

化学品风险评估作为重要的风险管理工具,是欧盟《化学品的注册、评估、授权和限制》(REACH)法规、美国《有毒物质控制法》(TSCA)、日本《化学物质控制法》(CSCL,简称化审法)等发达国家或地区实施化学品登记管理的技术基础。这一技术对包括健康毒性和生态危害在内的化学品基础数据具有较高要求。然而随着化学品风险管理要求的提高和化学物质数量的急剧增加,传统的标准化体内毒性测试方法(*in vivo toxicity tests*)已远不能满足化学品风险评估的数据需求。据经济合作与发展组织(OECD)估计,未来5年内欧共体国家需要进行测试评估的化学品数量高达20万种,对这些化学品全部进行传统的毒理学测试和评估既不现实也不可行。另外,随着生物、医学以及计算机等领域的快速发展,化学品风险评估和毒理研究面临着更多的挑战和机遇,包括:

(1) 如何应对成千上万新化学物质的测试需求

由于组合化学、计算机辅助药物设计以及代谢工程等的快速发展,使新化学物质的数量激增,新化学物质、现有化学物质暴露急剧增大,毒性测试任务十分艰巨。以欧盟为例,年产量为1~100 t的化学品超过30 000种,而人们仅掌握了其中少数化学品的毒理学特征,超过86%的化学品缺乏系统的毒理学数据。基于传统毒理学测试结果的风险评估方法,由于高昂的动物试验费用以及冗长的试验周期,严重制约了化学品风险评估的进展,也远远不能满足这些新化学物质、现有化学物质的测试需求。

(2) 如何实现试验动物替代方法

传统的化学品危害评估以动物毒性测试为主要数据来源,这与目前倡导的动物福利保

护和减少、替代、优化使用试验动物的“3R”^①原则相违背。此外，由于动物种属和个体差异等原因，动物试验模型难以反映真实的人体反应，将动物试验的结果外推到人体时存在不确定性。研究表明，能引起兔子发生皮肤刺激反应的化学品中仅有 40% 可在人体中引发类似反应。因此如何采用体外试验、低等生物和非生物载体等技术方法替代传统的动物试验也成为当下化学品风险评估与测试的重要挑战和发展方向。

（3）如何提供毒理机制方面的信息

传统的风险评估模式通常检测毒性终点（如存活、生长和繁殖等），不能提供化学品的毒理机制信息。随着生物学和毒理学研究的不断深入以及计算机技术和生物信息学、检测技术（如基因）以及分子毒理学的发展，基于个体、组织、细胞、蛋白、基因等不同水平的毒性数据大量产生，这些数据信息对理解及预测化学品的毒性作用具有重要意义。然而目前服务于管理的化学品风险评估数据基础仍主要局限于体内毒性测试结果，这一策略耗资之多、耗时之长与待评估化学品的巨大数量形成尖锐矛盾，也无法满足更快速、更准确的评估要求。正如 Bradbury 等所言，化学品风险评估实际情况的发展要求我们不能过度依赖体内毒性测试方法，而需要更充分地利用计算机技术、分子技术和体外测试技术。

针对上述挑战，2007 年美国国家研究院（NRC）在过去 20 年对有毒物质危害的系统表征和通路研究基础上发表了《21 世纪毒性测试（Toxicity Testing in the 21st Century, TT21C）：愿景与策略》。这一报告根据生命科学、生物技术、基因组学、生物信息学、系统生物学、信息及计算机技术的发展，提出了 21 世纪毒性测试的未来方向和发展战略：毒性测试策略将由传统的以整体动物为基础的毒性测试体系转向基于人体细胞为主的体外测试体系，通过研究细胞或细胞组分的变化，探究化学品对生物学基本过程的影响的“毒性通路”，从而预测化学品对生物的影响、评估化学品的安全。该报告为未来毒性测试的发展提供了十分重要的策略参考，提出未来毒性测试的主要内容包括化学物质的特性分析、含毒性通路和靶向测试的毒性测试以及剂量-反应与外推模型的研究。其中重点关注因素包括敏感测试终点的选择与评价、细胞-反应网络、高通量与中通量方法的构建与应用、作用机制与作用模式、毒性通路以及系统生物学效应等，TT21C 着力推进高通量、高灵敏度、低成本、预测能力强而且准确的毒性测试策略。

21 世纪基于“毒性通路”的毒性测试及安全评估的提出，在美国、欧洲和中国毒理学界产生了强烈反响，成为毒理学及其相关学科关注的焦点，实现 TT21C 愿景所需的研究项目也被列入优先发展领域并推动实施。但是由于 21 世纪毒性测试直接用人体细胞，减少了种间外推，所以仅适用于健康方面的风险评估，而不适用于环境方面的风险评估。如何将相似的概念应用于环境风险评估成为美国环保局考虑的重点问题。在此背景和基础之

① 减量化（reducing）、再利用（reusing）和再循环（recycling）。

上, 2010 年 Ankley 等结合已有的生态毒理概念框架及 21 世纪毒性测试的基本想法, 提出有害结局路径 (Adverse Outcome Pathway, AOP)。OECD 随即启动 “有害结局路径” 重大研究项目, 并衍生出 “源至效应路径” (Source to Outcome Pathway, S2OP) 这一风险评估新概念。

AOP 作为一个概念框架, 本身并非全新的毒性作用模式, 而是对来源于体外、体内或计算机系统的现有信息的整合。其目的是一方面为不同生物结构层次上的化学品危害数据提供科学、有针对性的选择性策略, 另一方面可以强化和完善预测技术在管理毒理学中的应用。本书将对 AOP 的定义与术语、开发与建立、应用与示例等方面进行系统全面的介绍。

1.2 基本概念

1.2.1 有害结局路径 (AOP)

有害结局路径 (AOP) 指根据已知信息描述分子起始事件 (如外源性物质和生物分子的分子间作用) 与生物组织水平的有害结局之间联系的概念性框架, 其中有害结局指与风险评估相关的危害效应 (见图 1-1)。因此, 从概念上讲, AOP 一般涵盖多级生物组织水平的一系列事件。基于推衍 AOP 或证实风险性的生物信息类型及范围的差异, AOP 的表达形式也是多样的。AOP 涉及的多级生物组织效应之间的联系包括因果性、机理性、推论性和相关性等, 而用于判断这种相关关系的基础信息包括体外试验、体内试验或计算毒理预测结果。因此, 对于毒理预测方法而言, AOP 的发展将为其在生态毒理学及生态风险评估中的应用奠定坚实的基础。

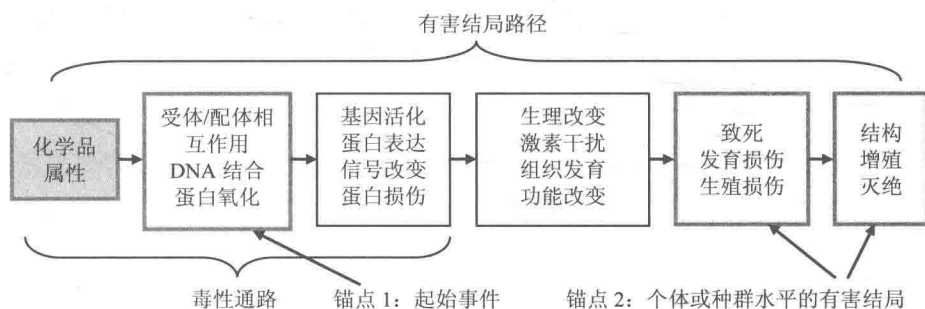


图 1-1 AOP 概念图

AOP 包括分子起始事件、作用靶点 (anchor 1) 及其导致的生物效应 (风险评估中的相关毒性, 如存活率、发育、生殖等, anchor2)。前三个框表示的是 NRC 定义的毒性通路相关参数。

“有害结局” (Adverse Outcome) 一词有别于 “毒性通路” (toxicity pathway)。根据美

国国家研究委员会（National Research Council, NRC）的定义，毒性通路是指在充分暴露条件下可能导致健康危害效应的细胞响应通路。它虽未明确有害结局和毒性通路的关系，但 NRC 强调毒性通路主要指体外试验可测定和模拟的分子起始事件及接近细胞水平的响应。因此 NRC 将毒性通路试验描述为离体试验，主要用于揭示致毒机理而不包括相关的毒性效应。而有害结局则指与风险评估相关的多种毒性效应，涉及体内试验和体外实验。因此，毒性通路虽特指细胞水平的毒性响应过程，但其与有害结局之间的关联性可作为阐述致毒机制的科学基础。

有害结局路径（AOP）和毒性通路根据相同的科学研究结果推衍而来，两者具有交叉性。然而，AOP 表达了风险评估中从分子起始事件到危害效应过程中的所有作用方式；而 AOP 一般用于在生态风险评估中推导具有统计学显著性的潜在种群效应量化终点。因此，AOP 实际上囊括并超越了 NRC 毒性通路的内涵（见图 1-1）。

AOP 通常按顺序来表示，从一个关键事件到另一个关键事件，而暂时忽略其中的补偿机制和反馈回路。大多采用所谓的“自下而上的策略”（bottom-up approach），即从已知的分子起始事件着手，建立其与高层次的生物效应之间的联系。但也可以采取“自上而下的策略”（top-down approach），即从目标有害结局开始，逐级确定低层次的关键事件并与特定的分子起始事件相联系。

简而言之，构建 AOP 的首要步骤是搜集已知信息并将相关信息按照固定的格式表示，进而发现缺失信息的环节。一般地，首先针对单个化学品进行个案分析，然后扩展到相似的一类化学品。确定了分子起始事件锚点和有害结局终点之后，即需着手填补这两点间的中间事件。

AOP 的结构是多元的。虽然 AOP 被描述为单一轴，如不同生物组织层次（见图 1-1），但毒性效应通常是多维度的（比如：性别，种类），因此分子起始事件（MIE）与有害结局（AO）之间的通路可以不同。由于有害结局是多个器官的相互作用（如皮肤过敏）、多个事件（如重复剂量毒性）及时间累积效应（如神经毒性）的结果，或是与生物体特定生命阶段（如发育毒性）相关联导致的结果，因此对于复杂的长期毒性效应，MIE 与 AO 之间存在更为显著的多元通路的现象。尽管如此，分子起始事件仍是所有后续事件的先决条件。因此 AOP 也可以理解为单个分子起始事件影响不同的信号通路，而这些信号通路又可能导致不同甚至相反的作用和效应。比如一个通路导致适应性，另一个通路则引起适应不良（caspase-3 蛋白表达降低，同时 caspase-6 蛋白活化）。

AOP 与作用机制（mechanism of action）、作用模式（mode of action）具有紧密关联。AOP 本身即是为了应对作用机制和作用模式概念应用过程中出现的不确定性问题而发展起来的。作用机制指“引发每个和每一步毒性结果的完整、具体的解释”，包括引发特定效应所有步骤之间因果关系和时间关系的具体解释。相反地，作用模式指“描述直接分子起始事件和有害结局之间的主要关系（不一定是全部的关系）的一系列常见生化、生理或

行为反应”。然而在实际应用中，作用机制仅用于描述分子起始事件与有害结局之间的一部分生物响应，而作用模式常限于某结局或某个分子起始事件的描述，很少同时将两者连贯起来。为了解决这一问题，AOP 要求在分子起始事件和对风险评估有重要意义的有害结局中同时设置锚点（见图 1-1），从而更加系统地揭示化学品致毒效应的整个过程。因此，从 AOP 与作用机制、作用模式的关联性角度而言，完整的、基于机制的 AOP 即符合作用机制的定义；当内部某些步骤间关联信息缺失时，或当内部某些具体机制未知或无须获知而只能以黑箱表示时，AOP 即与作用模式非常相似。

然而，由于 AOP 可以根据现有知识给出有害结局与分子起始事件的关联，因此比作用机制和作用模式更适用于风险评估。AOP 为整合不同生物学水平的现有生态毒理信息提供了基本框架，有利于提高这类数据信息的利用率、整合多样化信息、识别关键不确定性和研究需求，从而提高风险评估效率提供支撑。概念模型作为环境风险评估（ERA）的要素之一，描述了多种信息与评估目标之间的相关性；AOP 则是在 ERA 概念模型的基础上增加了更多的结构单元以整合更多类型生态毒理信息，并探索这些信息对生物个体和种群风险的关联，从而实现风险管理的目的。

1.2.2 分子起始事件（MIE）

AOP 框架中有两个关键锚点，即分子起始事件（MIE）和有害结局（AO）。目前 MIE 存在多种定义方式：

（定义 1）生物体中开启路径或化学-生物反应的起始点。

（定义 2）化学品与特殊生物分子的直接相互作用。

（定义 3）化学品诱导下生物系统中分子水平的扰动。

（定义 4）化学品与靶标生物分子的相互作用导致特殊的不利影响。

（定义 5）化学品与生物靶标的直接相互作用（如：DNA 结合、蛋白质氧化、受体-配体相互作用）。

由于不同研究领域关注的交互反应类型不同，因此对 MIE 的定义差异悬殊。其中一些忽略了路径或终点的联系，另一些则强调途径的不利影响，削弱了术语描述临床应用的作用。此外，还有些不区分初始分子间相互作用途径以及后续交互作用。为了利用现有文献建立 MIE 数据库，OECD 对不同 MIE 定义的内涵开展了相关讨论并提出了不同领域的统一定义：**分子起始事件（MIE）是化学品与生物分子或生物系统的初始相互作用，并通过特定通路或化学过程导致的有害结局相联系。**

基于以上定义，MIE 概念涵盖了健康毒理学与环境毒理学，并且直接与有害结局相联系。在健康毒理学领域，其关注的焦点虽然是有害结局，但并不排除 MIEs 在临床诊疗中的应用。例如，引起有益效应的分子起始事件与药理学临床解释相吻合，又与剂量过大导致有害结局的分子起始事件解释原理相似。由于导致何种效应是由使用剂量决定的，因此

有害结局与治疗效果之间的区别与 MIE 的适用性相比并不需要特殊强调。某特定化学品可能引起不同的分子起始事件或者该化学品与不同的分子起始事件相关，但这些分子起始事件描述的可能是不同剂量或者作用位点，因此还必须进行定量的剂量-反应动力学研究。推进 MIEs 的定量描述可同时促进 (Q) SARs 的发展，从而有助于更好地理解化学致毒过程，并更好地回答产生不利影响的剂量问题。MIE 包含共价交互作用，如 DNA 结合，但更多的是与生物系统交互作用的亚类型，如质子迁移导致的线粒体解偶联和基底细胞毒性的麻醉作用。这些交互作用须以毒理学的观点阐述，若将它们排除在 MIE 数据库外，将会导致基于 MIE 的 (Q) SAR 预测结果的毒性错漏。

第2章 AOP 概念框架的构建与开发

2.1 AOP 构建基本程序

2.1.1 AOP 概念框架的重要组成部分

针对 AOP 概念框架的构建, OECD 提出了“模块化”的概念, 以指导如何获取构建 AOP 所必需的主要信息和如何建立一个 AOP。该模板由三个部分构成: 分子起始事件 (MIE)、关键事件 (KE) 以及有害结局终点 (AO)。

AOP 的建立可以从分子起始事件 (MIE)、中间事件以及有害结局终点三者中任一部分开始, 这主要取决于具有哪些可利用的信息。但由于 AOP 具有两个固定的锚点, 即化学品/生物分子相互作用 (如分子起始事件) 和与管理相关的有害结局终点 (如重复剂量肝纤维化), 因此一般以分子起始事件或者有害结局终点作为构建 AOP 的起点。

作为 AOP 的两个固定锚点, 分子起始事件阐述化学品与生物 (大) 分子之间的相互作用, 可在现有数据的基础上描述具有类似作用的化学品分子结构; 有害结局终点的确定则能明确其中的机理信息以及相关的中间效应。其中有害结局终点通常与所选择的体内测试方法有关。分子起始事件与有害结局终点之间并非一对一的简单关联, 某一特定有害结局终点可能与一组分子起始事件有关, 某一特定分子起始事件也有可能与一组不同的有害结局终点相关。尽管如此, 每个 AOP 只能包含一个分子起始事件和一个有害结局终点。此外, 中间事件是构成 AOP 的第三个部分, 用以确定 AOP 涉及的关键事件。通过关键事件的检测 (体外试验方法 *in vitro methods*, 测试方法 *test methods*), 获取有关科学证据能够支持或者否定 AOP, 并增加相关证据权重。

AOP 的构建可基于不同类型的数据, 包括: 反映启动某一信号通路的化学品结构信息, 利用化学方法 (*in chemico methods*) 测定的相对反应活性或化学品-生物分子相互作用, 基于细胞反应的体外测试数据 (如基因表达), 体外或者体内机理测试数据, 以及管理法规要求的有害结局终点体内测试数据。这些信息可以用于确定 AOP 的关键事件, 提供支持 AOP 的试验证据。因此, AOP 能够为建立不同维度 (如不同生物组织层次) 的效应与最后效应终点之间联系提供科学依据。

AOP 的表达方法仍在研发过程中，目前已投入应用的有基于维基百科的工具（维基百科工具，AOP-Wiki）和基于网页的图解工具（Effectopedia）。两者对 AOP 相关信息的表达方式均主要基于图形路径方法。具体的 AOP 表达案例详见第 3 章的 AOP 构建示例。

2.1.2 有害结局的确定

基于不同维度（如暴露时间、性别、物种种类）毒性数据得到的有害结局不同，AOP 涉及的有害结局终点一般基于个体或者种群水平。但当其他层次（如器官或组织水平）的效应差异很大时，有害结局路径也可不限于个体或者种群水平。如针对细胞增殖分化或者细胞能量变化等基础细胞反应的 AOP，最好在细胞或者组织水平上进行有害结局评估。但无论在哪种情况下，有害结局作为 AOP 的一个重要锚点，都应清楚、准确地加以定义。有害结局分为：①长期健康效应，由多个事件（如重复剂量毒性）或时间累积（如神经毒性）所致，或者与生物体的特定生命阶段相关（如发育毒性）；②局部效应，其中的分子起始事件很可能与体内效应密切相关（如皮肤过敏、皮肤和眼刺激性）。

2.1.3 分子起始事件的确定

化学品作用于生物系统时，可在分子水平上干扰生物系统。分子起始事件是 AOP 的最初锚点，也是构建 AOP 的基础。分子起始事件的研究有助于认识化学品对生物系统的作用特性，如生物利用度、结构特点（尤其对受体结合）和代谢转化等。此外，借助分子起始事件识别潜在的化学诱导剂对解析具有相似作用而暂时无法分类的化学品分子结构也很有参考价值。因此确定导致特定有害结局终点的分子起始事件具有重要的意义。

分子起始事件主要以有机化学反应为基础（比如亲电-亲核反应活性），以共价结合蛋白质和/或 DNA 来定义。相比之下，基于非共价相互作用的“受体结合”或与酶的结合则更具有特异性。大多数化学品能够与多个分子靶点相互作用，且对于不同靶点有不同的亲和性。当化学品与受体或酶的结合位点达到饱和状态时，可激活或抑制相关活性，进而可能产生毒性。

确定分子起始事件的同时还应了解可能导致起始事件的化学品类别及其发生作用的可能位点。由于受体的“构象”及其他特性决定了具有哪些结构的分子能与之结合，因此作用位点的确定对于某些毒性终点特别重要，如基于受体结合机制的毒性终点。以皮肤致敏性和肝纤维化为例，化学品进行代谢转化为亲电物质的过程可能是相同的，但发生作用的位点不同（分别为角质形成细胞和肝细胞）。然而许多有害结局终点的分子起始事件发生作用的点位很难确定（如重复剂量毒性）或无法准确确定（如鱼类麻醉作用），此时所建立的 AOP 虽未能确定作用位点，但仍具有一定意义。

2.1.4 有害结局关键事件的识别

有害结局关键事件指介于有害结局终点和分子起始事件之间的中间事件, 这些事件构成受体反应矩阵。理论上, 该反应矩阵应包括建立分子起始事件(锚点 1)和有害结局(锚点 2)之间因果联系所需的相对较少或最少数量的关键中间事件。由于体内试验终点与生物个体有害结局直接相关, 因此体内试验的相关过程必须列入 AOP 的中间事件。此外, 体外试验、高通量筛选测试(HTS)、高内涵筛选测试、各种组学甚至生物信息学方法, 都可为构建 AOP 提供支撑和数据。反应矩阵的规模各不相同, 但已有研究表明不同规模矩阵中相邻事件之间的关系一般均可确定。

在确定导致有害结局的中间事件之前, 了解 AOP 相关的正常生理学通路(如繁殖过程、肝功能等)将有助于识别有可能会被扰动的不同层次生物组织的复杂反应过程。发生在分子起始事件和有害结局中间的效应或事件, 需要经过试验验证和有效性评估才能作为关键事件。在确立关键事件的过程中, 可以充分利用现有文献资料并对相关数据进行系统分析总结, 尽可能多地获取潜在响应机制和导致最终效应的中间步骤的相关信息。虽然 AOP 并没有规定哪种类型的数据信息才可以用于验证或支持关键事件, 但必须确保这些数据信息的可靠性并与有害结局终点相关。对现有文献资料的分析总结方法由 AOP 开发者自行确定, 但其所采用方法须评估有关试验数据的可信度、相关性及所涉试验设计的关键参数(如暴露方法、暴露时间以及取样时间等), 否则无法与有害结局终点建立准确的联系。同时, 文献数据信息经有效性评估后可做适度精简, 这样有助于降低 AOP 中间事件的多样性和复杂性, 从而有利于构建不同物种间外推的 AOP。

AOP 一般包括多个关键事件, 而相同的关键事件也可能出现在不同 AOP 中。因此当一个关键事件出现在不同的 AOP 中时, 不同的 AOP 可以共享这些信息。一个 AOP 中关键事件数量没有特定值, 主要取决于有害结局终点出现的生物组织水平, 如器官水平或种群水平或多个生物组织水平。一般而言, 不同生物组织水平的关键事件比同一组织水平的多个事件具有更高的证据权重。但是当反应从一种细胞类型传递到另一种细胞类型, 或者反应发生在不同组织中并最终导致更高层次生物组织的有害结局时, 情况可能有所不同, 此时须根据实际情况确定。

2.1.5 数据总结

分子起始事件、关键事件以及有害结局终点等所有相关信息汇总后, 须对所有信息进行系统分析并报告结果。

首先, 利用获取的数据尽可能逐步逐级呈现整个有害结局路径, 通过暴露途径(如水、皮肤、蒸汽)和化学品基本性质的简单描述来确定分子起始事件和作用点位。然后确定与之相关的生物大分子、细胞/组织、器官、生物个体和种群或生态系统水平的反应; 最后描

述最初确定的、发生在某个生物组织层次的有害结局。需要说明的是，虽然吸收、分布、代谢和排泄的相关药代动力学（PBPK）模型和毒代动力学等生理学信息并不包含于 AOP 中，但在应用 AOP 进行风险评估之前应先进行相关研究。

AOP 框架中每一个关键事件的支撑性试验数据及其有效性评估是 AOP 实用性评价的第一步，其分析评估结果对 AOP 的构建有着重要影响。其中的支撑性数据包括标准化生物试验和非标准化的科学研究。为了确保实验数据分析评估过程的规范化和结果的可比性，建立证据权重评估标准非常必要。证据权重评估的一般原则包括：体内试验数据优于体外试验，靶标效应终点优于替代终点，须同时考虑阳性结果和阴性结果。然而为了确定关键事件的证据权重，尚需解决许多基本问题。从广义上讲，试验证据应源于与关键事件相关的定性或定量试验。对试验证据进行评估时须考虑以下四个问题：

- （1）试验方法的适用性。
- （2）试验数据与最终有害结局相关性是直接的还是间接的（如替代方法）。
- （3）试验方法的可重复性。
- （4）试验方法的可再现性。

为了阐明上述问题，应从以下两方面考虑：

- （1）科研/监管部门对该试验方法的接受水平？
- （2）该试验方法对证明关键事件和有害结局终点的因果关系的说服力。

表 2-1 给出了对特定关键事件或者试验方法的证据权重进行评估的分类建议。

表 2-1 证据权重的分类建议

证据权重	关键事件/中间效应试验方法的标准化程度	关键事件和效应终点之间的关系
非常强	OECD 测试导则或者试验方法已经通过了预验证。具有支持关键事件和终点之间关系试验结果的大量数据	关系清楚且明确机制
强	有成熟的检测方法，可以提交进行预验证。具有支持关键事件和终点之间关系的试验数据	普遍认为两者之间存在很强的联系，且有已知机理作为基础
适中	通过同行评审的可靠方法。具有支持关键事件和终点之间关系的试验数据	两者之间可能存在联系，且可能有机理基础
弱	有待发展和完善的可用方法。具有支持关键事件和终点之间关系的少量试验数据	有一些证据表明可能存在关系，也可能有机理基础
非常弱	已经确定了关键事件但还没有检测或试验方法	仅仅基于假设或文献

鉴于不同化学品可获取数据量具有较大差异，AOP 的最初描述一般以少数研究数据充分的代表性有毒物质为模板，然后再综合其他化学品数据信息进行明确的定性分析总结。该分析过程所涉及的关键事件及其支撑性试验数据和文献、对数据证据权重的主观评价均需最终报告中列出，如表 2-2 所示。