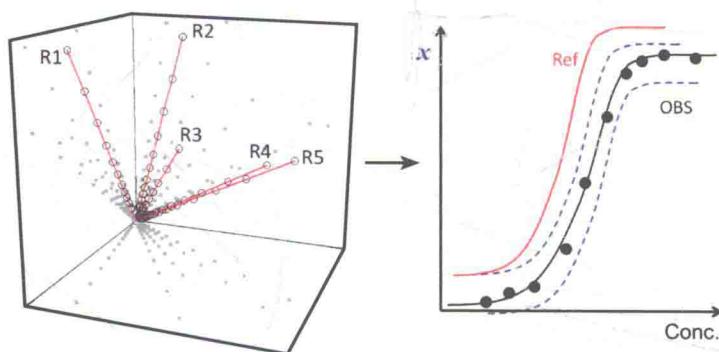


ASSESSMENT AND PREDICTION OF
TOXICITY OF CHEMICAL MIXTURES

化学混合物毒性评估 与预测方法

刘树深 著



科学出版社

化学混合物毒性评估 与预测方法

刘树深 著

科学出版社

北 京

内 容 简 介

污染物低剂量与混合暴露是一种普遍规律。由低剂量混合污染物引起的累积与联合毒性问题已成为环境科学领域的研究热点。目前,混合物联合毒性研究缺少必要的方法学与实用工具。本书是作者课题组近年从事化学混合物毒性测试与数据分析研究所取得的成果总结,从混合物体系、混合物射线和混合物点概念出发,强调通过多条混合物射线改进混合物毒性评估与预测,创建了直接均分射线法和均匀设计射线法,以混合物及其组分的剂量-效应曲线为主线,将混合物毒性单点评估拓展到整个剂量-效应曲线的多点评估,最后简介了 APTox 程序。

本书可为广大化学、药学及环境科学工作者提供药物组合、农药混配及混合污染物的毒性效应评估与预测的方法参考和实用工具。

图书在版编目(CIP)数据

化学混合物毒性评估与预测方法/刘树深著. —北京:科学出版社, 2017.9

ISBN 978-7-03-054512-1

I. ①化… II. ①刘… III. ①混合物-毒性-研究 IV. ①O642.5

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2017)第 225763 号

责任编辑:朱 丽 杨新政 / 责任校对:郭瑞芝

责任印制:张 伟 / 封面设计:耕者设计工作室

科学出版社出版

北京东黄城根北街 16 号

邮政编码:100717

<http://www.sciencep.com>

北京九州迅驰传媒文化有限公司 印刷

科学出版社发行 各地新华书店经销

*

2017 年 9 月第 一 版 开本: B5 (720×1000)

2017 年 10 月第二次印刷 印张: 10 1/4

字数: 200 000

定价: 68.00 元

(如有印装质量问题,我社负责调换)

前 言

实际环境体系中污染物低剂量和混合暴露是一种普遍规律。由低剂量混合污染物引起的累积与联合毒性问题已引起广泛关注，正逐渐成为环境科学领域的研究热点。要揭示混合污染物的毒性规律进而对联合毒性进行评估与预测，不仅需要测试其中各个组分不同浓度下的毒性变化并构建剂量-效应模型，同时还需要对不同浓度组成的混合物进行毒性测试并寻求混合物毒性与单个组分之间的定量关系。然而，由于环境混合物的组成与浓度多样性，混合物毒性变化不全是加和的，甚至相同组分构成的混合物在不同浓度比或不同浓度水平下均有不同的毒性变化规律，有的是加和的，有的是协同或拮抗的。几十年来，混合物毒性研究没有突破性进展，除了混合物的异常复杂性之外，作者认为最根本的问题是混合物毒性研究领域缺少相关方法学和实用软件工具。目前可供应用的软件有美国新泽西州立大学 Klein 提出与发展的 BioMol [它主要应用于经典的基于药代动力学 (PBPK) 的联合毒性研究] 以及德国分子生物工程研究所的 Dressler 提出的 CombiTool (它是用于分析经典混合物联合毒性效应的计算机工具，但只适用于分析两个活性物质之间的浓度加和与独立作用规律)。研究较为系统的只有二元混合物，对组分数大于等于 3 的多元混合物绝大部分均只涉及一种浓度比混合物比如 EC_{50} 比混合物，这是极不全面也不合理的。

2003 年，作者在高等学校全国优秀博士学位论文作者专项基金支持下开始混合污染物的毒性评估与预测方法学研究，后来又在“863”计划专题课题与国家自然科学基金项目支持下开展了系统深入研究，建立了开展多元混合物毒性评估与预测的方法学和实用软件。十余年来，作者领导的课题组建立了进行混合物毒性测试的多种高通量微板毒性分析法 (MTA)，创建了适用于二元混合物系统中不同浓度比设计的直接均分射线法 (EquRay) 以及适用于多元混合物系统中不同浓度比优化设计的均匀设计射线法 (UD-Ray)，从而能有效合理地设计多个代表性混合物，构建了剂量-效应曲线的观测置信区间，拓展了适用于多效应水平下评估混合物联合毒性的混合物毒性指数，增加了组合指数的观测置信区间，同时优化集成相关方法学成果，开发了用于研究混合物毒性评估与预测的应用软件——APT_{tox}。本书就是作者课题组十余年从事化学混合物毒性研究取得的些许成果小结，也是我们多年从事混合物毒性研究的心得与体会，但愿能对从事多元混合物联合毒性研究的工作者有所帮助或启发。

本书共分 7 章。第 1 章在简介化学混合物毒性研究基本概况后推出混合物体系、混合物射线与实体混合物点概念，并对混合物毒性与毒性相互作用、剂量-效应关系与剂量-效应数据采集等基本问题进行介绍。第 2 章在介绍剂量-效应曲线类型基础上，描述线性剂量-效应曲线的建模方法，讨论单调非线性剂量-效应曲线的常用非线性函数及常见建模方法，特别讨论了观测置信区间的构建。最后简单介绍无观测效应浓度 (NOEC) 概念与替代量。第 3 章混合物设计是本书最具特色的章节，重点介绍作者课题组提出的 EquRay 法和 UD-Ray 法的基本原理与应用实例，同时讨论文献中固定比射线设计法 (FRRD)。第 4 章将浓度加和、独立作用和效应相加等加和参考模型统一起来，集中讨论基于实验浓度与基于指定效应从单个组分剂量-效应信息求解加和模型预测效应与预测浓度，从而构建混合物预测剂量-效应曲线 (CRC) 的方法。第 5 章在第 4 章加和参考模型预测 CRC 基础上，从整条混合物 CRC 上分析不同浓度水平下混合物的毒性相互作用(协同、加和与拮抗)。同时给出评估混合物毒性的定量方法即组合指数方法，最后介绍等效线图。第 6 章将多种单效应水平的混合物毒性指数方法推广至多效应水平，包括以毒性单位法为基础的经典联合作用指数、浓度加和指数 (CAI) 与效应加和指数 (EAI)、基于浓度与效应的毒性相互作用指数。第 7 章简单介绍一下作者发展的化学混合物毒性评估与预测软件 APTox 的主要功能、最重要的输入数据文件以及举例说明如何利用原始毒性测定的剂量-效应数据绘制等效线图。

在本书付梓出版之际，特别感谢张亚辉、葛会林、王丽娟、张瑾、覃礼堂、张永红、朱祥伟、张晶、陈浮、屈锐和李恺博士，刘保奇、莫凌云、刘芳、宋晓青、黄伟英、邓辅财、肖菊、桑文静、仝娟、窦容妮、张丽芬、袁静、李晓磊、张帅帅、王成林、霍向晨、王猛超、刘玲、刘雪、余沫、唐含笑、樊烨和冯利硕士以及陈珏、高音旋、徐卿、张琼、王金承、朴英男、林楠、杨可、段欣甜和李彤同学在微板毒性分析方法、直接均分射线法、均匀设计射线法、浓度加和指数与效应加和指数、带置信区间的组合指数、整合浓度加和与独立作用模型、最小二乘支持向量回归等方法建立与应用研究中的创新劳动，没有他们的突出贡献，要完成本书是不可能的。

由于作者水平有限及混合物毒性研究的异常复杂性，书中错误之处在所难免，还请读者批评指正。

作 者

2017 年 6 月于同济大学明净楼



本书所涉及彩图及内容信息请扫描右侧二维码扩展阅读。

目 录

前言

第 1 章 绪论	1
1.1 引言	1
1.2 什么是化学混合物?	3
1.2.1 化学混合物的基本概念	3
1.2.2 混合物体系与混合物射线	3
1.3 混合物毒性	4
1.3.1 毒性终点、毒性指标和毒性效应	4
1.3.2 混合物毒性	5
1.3.3 毒性相互作用	7
1.4 剂量-效应关系	9
1.4.1 化学物质的剂量-效应关系	9
1.4.2 混合物的剂量-效应关系	10
1.5 剂量-效应数据采集	11
1.5.1 对照组与处理组在 96 孔微板上的分布	11
1.5.2 污染物发光抑制毒性测定	12
1.6 本书各章内容简介	15
第 2 章 剂量-效应模型	17
2.1 引言	17
2.2 剂量-效应曲线类型	17
2.2.1 线性型剂量-效应关系	18
2.2.2 “S”形剂量-效应关系	18
2.2.3 “J”形剂量-效应关系	22
2.2.4 其他类型剂量-效应关系	23
2.3 剂量-效应模型	24
2.3.1 线性模型	24
2.3.2 拟线性化模型	30
2.3.3 所有子集模型	34
2.3.4 从拟合函数计算效应浓度 (EC_x)	35

2.4	CRC 置信区间	37
2.4.1	效应置信区间	38
2.4.2	效应浓度置信区间	42
2.5	NOEC 和替代指标	44
2.5.1	Dunnett 检验方法	44
2.5.2	效应浓度替代 NOEC	47
第 3 章	混合物设计	48
3.1	引言	48
3.2	直接均分射线法	49
3.2.1	基本原理	49
3.2.2	应用实例	53
3.3	均匀设计射线法	57
3.3.1	概述	57
3.3.2	均匀表与使用表	58
3.3.3	基本浓度组成	63
3.3.4	UD-Ray 基本步骤	66
3.3.5	应用实例	68
3.4	固定(浓度)比射线设计	73
3.4.1	基本原理	73
3.4.2	FRRD 设计实例	74
第 4 章	加和参考模型	76
4.1	引言	76
4.2	浓度加和模型	77
4.2.1	概述	77
4.2.2	CA 预测 CRC 的构建	78
4.2.3	CA 预测 CRC 实例	80
4.2.4	使用 CA 模型需谨慎	86
4.3	独立作用模型	87
4.3.1	概述	87
4.3.2	IA 预测 CRC 的构建	88
4.3.3	IA 预测 CRC 实例	89
4.3.4	CA 与 IA 的不同应用范围	92
4.4	效应相加模型	93
4.4.1	概述	93
4.4.2	ES 预测 CRC 的构建	94

4.4.3	ES 预测 CRC 实例	95
4.4.4	“无中生有”不是协同	97
第 5 章	混合物毒性评估与预测	100
5.1	引言	100
5.2	基于置信区间的 CRC 比较 (定性)	101
5.2.1	观测毒性与加和参考模型定性比较	101
5.2.2	CA 与 IA 加和参考模型分析比较	103
5.2.3	拟合归零与毒性相互作用的定量评估	104
5.3	基于置信区间的组合指数	107
5.3.1	半数效应方程与组合指数	108
5.3.2	包括置信区间的组合指数	109
5.3.3	组合指数在环境科学中的应用	112
5.4	等效线图	113
5.4.1	二元混合物的等效线图	113
5.4.2	多效应等效线图与三维等效线图	117
第 6 章	多效应混合物毒性指数	119
6.1	引言	119
6.2	经典联合作用指数	119
6.2.1	毒性单位法	120
6.2.2	加和指数法	120
6.2.3	混合毒性指数法	121
6.3	CAI 和 EAI 指数	126
6.4	基于浓度的毒性相互作用指数	129
6.5	基于效应的毒性相互作用指数	132
第 7 章	APTtox 程序简介	135
7.1	引言	135
7.2	APTtox 5.0 的主要功能	136
7.2.1	微板实验设计	137
7.2.2	构建 SCR 数据	138
7.2.3	CRC 数据模拟	139
7.2.4	混合毒性评估	139
7.2.5	其他分析方法	140
7.3	最重要的输入数据文件	141
7.4	应用举例	142
参考文献		147

第 1 章 绪 论

1.1 引 言

实际环境体系中污染物低剂量和混合暴露是一种普遍规律。由低剂量混合污染物引起的累积与联合毒性问题已引起广泛关注，正逐渐成为环境科学领域的研究热点。通常，混合污染物或称化学混合物可分为简单混合物（simple mixture）和复杂混合物（complex mixture）两个大类。简单混合物含有少数几种或十几种定性定量已知的化学物质，而复杂混合物则含有几十种或更多的且组成不是完全已知的复杂化学体系。尽管化学混合物或混合污染物联合毒性的研究已进行了几十年，但其进展并不令人满意，除了混合污染物本身毒作用机制的复杂性之外，缺乏方法学和通用测试与数据分析平台的研究是阻碍其发展的重要原因之一。因此，开展化学混合物毒性评估与预测方法学研究同时构建毒性数据分析平台具有重要理论意义。

综观混合污染物毒性研究进程，大致可分为二元混合物与多元混合物两个研究阶段。大约在 2000 年前，混合污染物毒性分析本质上研究的是两组分混合物即二元混合物，仅极少数为三组分混合物。对于 2 个以上组分构成的多元混合物，绝大多数采用等毒性浓度比法设计混合物，应用毒性单位法（TU）、相加指数法（AI）、混合毒性指数法（MTI）及相似性参数法等研究联合毒性（Lange and Thomulka, 1997; Thomulka and Lange, 1997）。可供应用的软件有 CombiTool 和 BioMol（Dressler et al., 1999; Klein et al., 2002），但它们本质上只能用于二元混合物的联合毒性评估。这个阶段除了混合物中组分数一般不超过 3 以外，一般只评估混合物在剂量-效应曲线上的一个或几个点的毒性相互作用信息（如 EC_{50} ），也很少考虑毒性实验固有的不确定性及拟合曲线的不确定性。基于单点或标量的研究方法得到的协同、拮抗与加和的毒性相互作用结论在其他点可能是不可靠的，甚至是完全错误的。直到 2000 年，德国不来梅大学的一个研究课题组（Scholze et al., 2001）应用非线性函数模拟剂量-效应曲线，采用回归策略代替传统点估计的方法求解低效应浓度，并将浓度加和（concentration addition, CA）与独立作用（independent action, IA）模型用于多组分混合物剂量-效应曲线的预测（Backhaus et al., 2000a; Backhaus et al., 2000b），混合污染物的联合

毒性研究才算真正进入了多组分混合物研究领域。有一种观点认为,具有相似作用模式的污染物构成的混合体系其联合毒性可用 CA 模型进行评估或预测 (Altenburger et al., 2000; Junghans et al., 2003; Arrhenius et al., 2004; Junghans et al., 2006),而具有相异作用模式的混合污染物体系,其联合毒性则可用 IA 模型进行评价 (Faust et al., 2003; Backhaus et al., 2004)。然而,由于实际混合污染物的复杂性,大多数研究体系仅属于简单混合物范畴,混合物浓度空间探索还停留在 1 条或少数几条等毒性浓度比射线 (Meadows et al., 2002) 上。“射线”概念的定义具有革命性的意义,它将传统单点评价方法拓展至整个剂量-效应曲线。目前,绝大部分多元混合物就是采用固定比射线设计法研究混合物联合毒性的。Gennings 等以 5 种杀虫剂即乙酰甲胺磷、二嗪农、毒死蜱、马拉硫磷和乐果为混合物组分,利用固定比射线设计法评估五元混合物的联合毒性变化 (Gennings et al., 2004)。

然而,射线设计包括等毒性浓度比/等效应浓度比或固定(浓度)比射线设计,常常只选择其中一种浓度比,仅考察其中几个特殊混合物,很难模拟实际环境中各种浓度组成的化学混合物,因而不能预测其他浓度比的混合物。如何从实际环境体系中选择少量代表性混合物进行毒性测试并评估混合物的联合毒性变化规律,从而预测未知混合物毒性问题,就成为混合物毒性评估中有待解决的重要课题之一。例如, Narotsky 等 (1995) 用 $5 \times 5 \times 5$ 设计研究了乙炔化三氯、邻苯二甲酸二乙基乙酯和七氯等为组分构成的三元混合物,每个组分考察 5 个剂量水平共 125 个混合物的毒性。Charles 等 (2002) 应用雌激素受体试验研究了 3 个组分构成的三元混合物的毒性,其中每个组分都以 4 个浓度水平进行全因子设计,共完成 64 组实验。然而,当组分数和其浓度水平数增加时,析因设计的实验工作量呈指数幂方式增加,很难推广。10 年前,我们将均匀设计思想引入混合物毒性研究,并结合固定比射线设计创建了均匀设计射线法 (Zhang et al., 2008; Liu et al., 2009; 刘树深等, 2012; Liu et al., 2016b), 有效地将混合物联合毒性研究推向多组分混合物体系,使合理系统地分析五元、六元、八元甚至十五元混合物 (Zhang et al., 2010) 的毒性及毒性相互作用分析成为可能。

本书针对多元混合物的毒性评估与预测目前缺少相关方法学的问题,从混合物体系、混合物射线和实体混合物点 3 个重要概念出发,以混合物及其组分的剂量-效应曲线为主线,引进合理优化设计的多条混合物射线进行混合物毒性评估的新思路,以期推动混合物毒性研究有效合理地向多元混合物迈进的进程,具有重要学术价值。本章将首先对多元混合物毒性评估与预测研究的基本问题做一介绍。

1.2 什么是化学混合物?

1.2.1 化学混合物的基本概念

由多种化学物质 (chemical) 组成的物质称作化学混合物 (chemical mixtures) 或简称混合物。例如空气是由 O_2 、 N_2 、 CO_2 与 SO_2 等多种化学物质组成的混合物。这个化学物质是指一般化学教科书中的化合物 (compound) 与单质 (elementary substance), 即纯净物 (pure substance)。如 O_2 和 N_2 是单质, 而 CO_2 和 SO_2 则是化合物。纯净物是指化学元素原子通过化学键键合在一起的具有固定组成 (有明确的化学结构) 和固定理化性质的物质。混合物没有固定的组成 (没有明确的化学结构), 其中各种物质保持原有的理化性质, 各物质之间也没有发生化学反应。在空气混合物中, 各化学物质如 O_2 、 N_2 等在不同地区不同时间与空间的组成是不确定的 (包括各物质之间的比例与浓度都是不确定的), 但 O_2 与 N_2 等化学物质却保持这些物质单独存在时的理化性质, 相互之间也不发生化学反应而生成新的化学物质。如上海某地区空间的空气混合物与青藏高原中某地区的空气混合物可能都由 O_2 、 N_2 、 CO_2 与 SO_2 等组成, 各化学物质的配比与绝对浓度是不一样的, 但其中 O_2 与 N_2 的理化性质与单独存在时的 O_2 与 N_2 是完全相同的。如果化学物质之间发生了化学反应生成了新的化学物质, 那就不是原来的混合物, 而是新的另一种混合物了。实际环境中, 化学物质几乎都是以混合物形式存在的。例如一个化工产品、饮用水消毒副产物、商用农药、化妆品、面包等等。为了区别单个化学物质与存在于混合物中的化学物质, 将混合物中的化学物质称为混合物组分或组分 (components)。

1.2.2 混合物体系与混合物射线

具有一定化学组分 (或确定化学物质) 的化学混合物是一个复杂的系统, 其中包含无数个组分一定而各组分浓度各异的实体混合物。混合物组分可以通过测量其剂量-效应曲线来表征该组分的毒性特征从而获得某些特征浓度如半数效应浓度 (median effective concentration, 常用 EC_{50} 表示) 和无观测效应浓度 (no observed effect concentration, NOEC) 等。为了获得类似单个组分的混合物剂量-效应曲线或浓度-响应曲线 (concentration-response curve, CRC), 可采用固定各组分在混合物中的浓度分数 (concentration fraction) 或混合比 (mixture ratio) 或浓度比 (concentration ratio), 并逐步改变混合物总浓度的方法 (即逐渐稀释) 设计一系列混合物并测试其毒性效应, 进而构建混合物的 CRC。通过逐渐稀释法获得的这些实体混合物 (点) 在由各组分张成的浓度空间中分布在一条从原点出发的射线上, 因此把这些混合物 (点) 的集合称为混合物射线 (mixture ray)。为了

系统表征化学混合物，我们称具有一定化学组分的各种混合物的集合为混合物体系 (mixture system)，如二元混合物与三元混合物等都是混合物体系 (或混合物空间)。混合物体系中一系列具有固定浓度分数但具有不同浓度水平的混合物集合称为混合物射线 (通过测试 1 条混合物射线各个混合物点的毒性效应可构成混合物射线的 CRC)。混合物射线上具有相同浓度分数但具有不同浓度水平的点才是待测定毒性效应的真正的实体混合物。图 1.1 (a) 示例了由三种物质 (组分) 构成的三维浓度空间 (由 3 种化学物质的浓度轴构成)，其就是一个三元混合物体系，其中 3 条虚线代表 3 条三元混合物射线，这些射线上描绘了 6 个混合物点，是实体混合物 (王猛超等, 2014)。图 1.1 (b) 为溴化己基咪唑-吡虫啉-多黏菌素 B 三元混合物体系中 5 条不同混合比射线 (R1, R2, R3, R4 和 R5) 上 60 个实体混合物点 (每条射线上 12 个点) 之间的关系示意图。

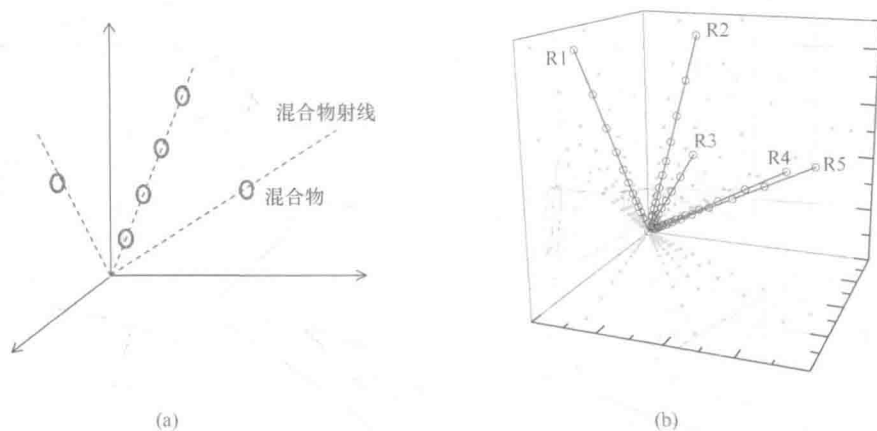


图 1.1 混合物体系 (空间)、混合物射线 (射线) 与实体混合物 (点) 相互关系

1.3 混合物毒性

1.3.1 毒性终点、毒性指标和毒性效应

广义地说，一种药物 (drug) 的活性 (activity) 或一种污染物/毒物 (pollutant/toxicant) 的毒性 (toxicity) 本质上是药物/毒物小分子与生物靶标大分子 (target) 相互作用的结果 (参见图 1.2)。因此要说明一种毒物的毒性，除说明该毒物 (化学物质之一) 外，还必须明确说明它所作用的靶是什么、毒性终点 (toxicity endpoint) 指什么、量测毒性效应 (effect) 的物理量以及比较毒性大小的毒性指标 (toxicity index) 是什么。例如，在敌敌畏的鱼类急性毒性实验中，毒物

是敌敌畏、作用靶是鱼、鱼死亡为毒性终点、死亡率或死亡百分率为毒性效应而半数致死浓度 (median lethal concentration, 常用 LC_{50} 表示) 为毒性指标。又如, 在敌敌畏对发光菌的发光抑制实验中, 毒物是敌敌畏、作用靶是发光菌、发光率降低或发光抑制为毒性终点、发光降低或发光抑制百分率为毒性效应而半数抑制浓度 (median inhibitory concentration, 常用 IC_{50} 表示) 为毒性指标。因为不同毒性实验中选择毒性终点不同, 毒性所包含的意义也不同, 因此, 常常将药物的具体活性或毒物的具体毒性统一以效应表示。这样, 半数抑制浓度、半数致死浓度等都可以用半数效应浓度表示。某药物或毒物的 EC_{50} 越大, 它的活性或毒性就越小。一种优良的药物, 要求其对肿瘤细胞具有高的活性而对正常细胞具有低的毒性 (即高效低毒)。一种化学品对不同的生物靶可能具有不同的效应, 因而有抗肿瘤药物与抗炎药物之分。农药之所以有除草剂和杀虫剂等, 也是因为其作用靶及毒性终点的不同。因此, 在指明了化学物质和其作用的生物靶外, 还必须说明毒性终点、毒性指标及毒性效应才能明确其毒性的真正涵义。



图 1.2 化学物质 (chemical) 与靶 (target) 相互作用产生效应 (effect) 示意图

1.3.2 混合物毒性

单个化学物质或混合物组分对某生物靶的毒性可通过逐渐稀释的方法获得不同浓度水平进而进行毒性测试得到该物质的剂量-效应关系 (dose-effect relationship), 通过曲线拟合获得剂量-效应曲线 (CRC), 进而求解半数效应浓度确定其毒性指标, 从而确定其毒性大小。由于大多数化学物质的活性或毒性效应的大小与其浓度呈几何级数变化, 在不同浓度的毒性测试中常常根据初步实验确定合适的稀释因子 (dilution factor, DF) 来设计各个浓度梯度 (C_i)。例如一般生物化学实验中常常采用 $1/2$ 为稀释因子, 即 $DF = 0.5$ 。在这种情况下, 各浓度梯度为 $C_0, C_0/2, C_0/2^2, C_0/2^3, \dots, C_0/2^{n-1}$ 。

混合物毒性 (mixture toxicity) 也可采用类似单个组分的方法求解混合物的半数效应浓度。通过逐渐稀释方法获得一系列不同浓度的混合物溶液, 对各混合物溶液进行毒性检测, 获得混合物总剂量-效应关系, 经曲线拟合获得混合物 CRC, 进而求解混合物的半数效应浓度, 确定其毒性大小。在这里, 由 m 个组分形成的混合物的总浓度 (C_{mix}) 定义为该混合物中各个组分的浓度 ($C_i, i = 1, 2, 3, \dots, m$)

之和:

$$C_{\text{mix}} = \sum_{i=1}^m C_i \quad (1.1)$$

然而,在很多情况下,采用 0.5 (即 1/2) 为稀释因子往往不能使所有浓度梯度-效应数据点均匀地分布在 CRC 上,需要根据初步毒性检测结果计算合适的稀释因子,这样才能使所有浓度-效应点均匀地分布在 CRC 上 (参见图 1.3)。

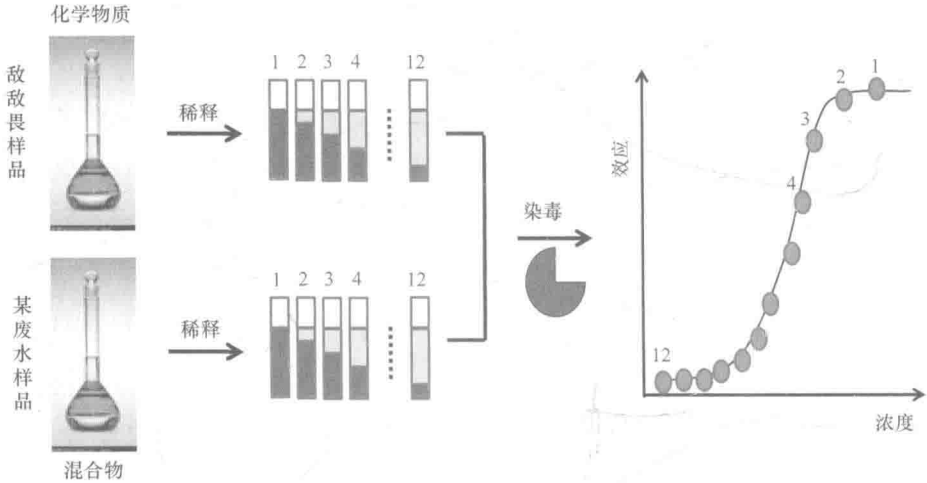


图 1.3 逐渐稀释法、浓度-效应曲线及稀释因子计算中不同浓度点编号示意图

单个化学物质或混合物的剂量-效应数据通常通过逐步稀释法从一个高浓度 (C_{max}) 溶液 (如储备液与样品原液等) 逐步稀释获得一系列不同浓度 (C_i) 的实验溶液。由于化学物质的 CRC 常常不是线性的,多数是对数线性的,因此常常通过合适的稀释因子得到具有几何分布的不同浓度梯度。为了适应不同化学物质或混合物射线可能具有不同的剂量-效应关系,需要计算合适的稀释因子 DF。

由浓度 (C_i) 与稀释因子 (DF) 的关系式

$$C_i = C_{\text{max}} \cdot \text{DF}^{i-1} \quad (i = 1, 2, \dots, n) \quad (1.2)$$

可知

$$\begin{aligned} C_H &= C_{\text{max}} \cdot \text{DF}^{H-1} \\ C_L &= C_{\text{max}} \cdot \text{DF}^{L-1} \end{aligned} \quad (1.3)$$

解联立方程

$$\text{DF} = \left(\frac{C_H}{C_L} \right)^{1/(H-L)} \quad (1.4)$$

式中, C_H 为高效应浓度, C_L 为低效应浓度, H 与 L 为高低效应浓度点的序号(CRC上最高效应浓度点序号为 1, 最低效应浓度点序号为 n)。例如在图 1.3 中, 可用最高浓度 C_1 和最低浓度 C_{12} 来计算稀释因子。

分布在一条混合物 CRC 上的所有点的浓度分布, 在混合物多维浓度空间中构成一条从坐标原点出发的射线。在这条射线上, 虽然混合物总浓度是不断变化的, 但其中各组分浓度占混合物总浓度的分数却是不变的。即当总浓度逐渐减少时, 各组分浓度都同倍数减少, 刚好与实验操作中的逐渐稀释结果一致。尽管在一个多元混合物体系中有很多的实体混合物, 但其中只有具有固定浓度比(固定浓度分数)的混合物射线才对应混合物的 CRC, 才对应半数效应浓度, 才能与某单个化学物质进行毒性大小的比较。所以, 1 条混合物射线可认为是一种“假”组分, 是一种具有某种浓度比(浓度分数)或混合比的混合物射线(一个多元混合物体系中有许多条这样的射线, 即很多假组分), 因此, 有些文献中提及的“混合物的毒性大于某单个化学物质”的说法是不科学和片面的, 不指明浓度分数或者混合比, 就没有确定的毒性指标(EC_{50}), 就没法与单个物质比较毒性大小。

对在某位点采集的某实际混合物样品(原液)进行逐渐稀释时, 该样品总浓度逐渐降低, 但混合物中任意组分(无论其中有多少个组分)占总浓度的浓度分数是固定不变的, 各个稀释的浓度梯度正好构建一条混合物射线。在二元混合物研究中, 可用两组分之间的浓度比表示, 依此类推, 多元混合物中也可用各组分之间的浓度比或混合比表示。然而, 作者认为, 对于多元混合物, 用浓度分数比用浓度比更加科学, 更易于程序化。因为浓度分数是对某一组分来说的, 不必指明其他组分, 而浓度比则必须指明其他组分, 所以下述所指的浓度比或混合比其意义就是浓度分数。

应当指出, 由于化学混合物的复杂性和研究的局限性, 混合物毒性常常使用 mixture toxicity、combined toxicity 或 joint toxicity 等来表征。从目前文献看, 这三个词都可以用来表示某一个具体混合物的毒性效应大小, 也可以用来表示混合物中存在的毒性相互作用, 即协同(synergism)、拮抗(antagonism)与加和(additive action)。它们有何异同目前无统一说法。作者认为 mixture toxicity 统一表示某实体混合物的毒性效应大小, 而 combined toxicity 与 Joint toxicity 则用于表示混合物毒性相互作用比较合适。在目前情况下, 最好在使用前明确其含义。

1.3.3 毒性相互作用

混合物是由多个化学物质组分构成的, 根据混合物毒性与单个组分毒性之间的关系来识别混合物毒性是否具有毒性相互作用。无毒性相互作用则称为加和作用(additive action), 有毒性相互作用则称为协同或拮抗。所以, 要识别混合物毒

性相互作用，首先要定义什么是加和作用。目前，定义加和作用有 3 个常用假设或参考标准，即浓度加和（concentration addition, CA）、独立作用（independent action, IA）和效应相加（effect summation, ES）（刘树深等，2013）。当某实体混合物在某一浓度水平下的实验效应大于加和参考模型的预测效应时，则认为混合物存在协同相互作用；当小于预测效应时则认为是拮抗相互作用；而当与预测效应不存在显著性差异时，则认为不存在毒性相互作用（即加和作用）（刘树深等，2012）。所以，毒性相互作用一般是指协同或拮抗，无相互作用就是加和作用。广义说，毒性相互作用是协同、加和作用与拮抗的统称。

由于毒性实验带有实验误差，CRC 非线性拟合有拟合误差，要比较加和模型预测 CRC 与实验 CRC，必须考虑 CRC 的预测置信区间。即要有效合理地识别毒性相互作用，必须分析比较预测效应与观测值的置信区间上下限（参见图 1.4）。在图 1.4 中，若以 EC_{50} 为评价点，（a）图所示混合物实验效应的置信上限小于参考模型预测效应，为拮抗相互作用；（b）图所示混合物实验效应的置信下限大于参考模型预测效应，为协同相互作用；（c）图所示混合物预测效应位于实验效应的置信区间上下限之间，与实验效应没有显著性差异，为加和作用。

值得注意的是，在同一条混合物射线上，不同浓度水平的混合物点即实体混合物的毒性相互作用可能是不同的。图 1.4 中所表达的只是特殊情况，即几乎所有浓度下都为协同、拮抗或加和作用。此外，具有不同浓度分数的不同混合物射线中各不同混合物的毒性相互作用也可能是不同的。所以，对于一个多元混合物体系而言，其毒性或毒性相互作用具有混合比（浓度分数）依赖性和浓度水平依

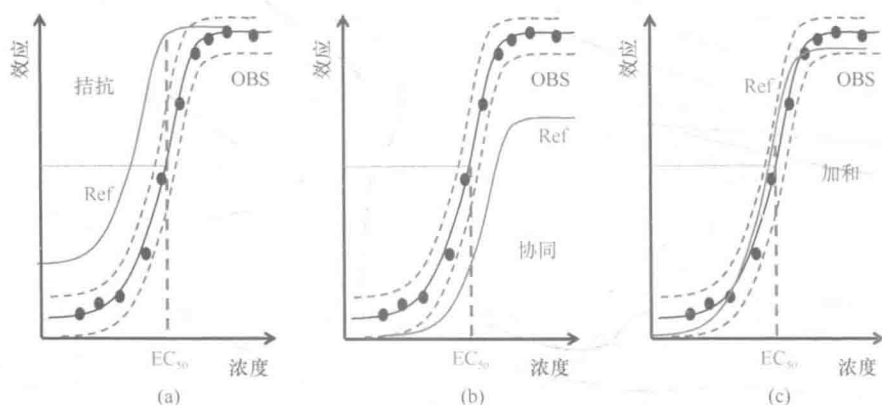


图 1.4 毒性相互作用（协同、拮抗与加和）识别示意图*

黑点为实测点、黑实线为观测数据（OBS）拟合线、红实线为加和（Ref）参考模型预测线、蓝色虚线为置信区间

* 可扫描封底二维码查看原彩图示意。此后彩图同此说明。

赖性，描述混合物毒性或毒性相互作用时应明确说明混合比与浓度水平。

在混合物毒理学研究历史上，还有一个毒性相互作用概念——无加和（no addition），其是混合物毒性相互独立（independence）的意思。换句话说，是指混合物的毒性仅由其中某一个组分的毒性来决定，而与其他组分的毒性无关（Altenburger et al., 2003）。值得指出的是，这个相互独立的概念与加和参考模型中的独立作用（IA）是两个完全不同的概念。

1.4 剂量-效应关系

1.4.1 化学物质的剂量-效应关系

化学物质的剂量-效应关系（dose-effect relationship）是反映化学物质毒性特征的基本关系，也是获得化学物质毒性指标（ EC_{50} ）和阈值浓度的基础。在药理学中，剂量是决定外源化合物对机体造成损害作用的最主要因素，一般指机体接触化学毒物的量或给予机体化学毒物的量。剂量的单位通常以单位体重接触的外源化学物数量（mg/kg）表示。在环境毒理学中，剂量常用环境中的浓度（ mg/m^3 空气或 mg/L 水）来表示。本书中剂量均以浓度表示。

效应（effect）是指化学毒物与机体接触后引起的生物学改变，又称生物学效应。反应（response）是指一定剂量的外源化合物与机体接触后，出现某种效应的个体数量在群体中占有的比率，一般用百分比和比值表示，如死亡率、反应率、肿瘤发生率。本书均用效应来表示。可以连续变化的物理量表示的效应，称为量反应或量效应（graded response/effect）。有些效应只能用全或无，阳性或阴性表示，称为质反应（all-or-none response 或 quantal response），如死亡与生存、抽搐与不抽搐等，必须用多个动物或多个实验标本，以阳性率表示。

剂量-效应关系表示化学物质的剂量或浓度与生物靶（包括各个生物学水平）发生的效应之间的关系。剂量-效应关系可用剂量-效应曲线（dose/concentration-effect/response relationship, CRC）表示，即以效应或反应为纵坐标，以剂量或浓度为横坐标作图。在环境毒理学中，很多化学物质或污染物的效应常常与浓度的对数呈线性关系，因此，浓度坐标常常以浓度的常用对数表示。从 CRC 可以直观地观测到某种生物学效应与化学物质浓度之间的变化关系，并通过数学模拟等方法获得某些特征毒性参数，如半数效应浓度（median effective concentration, EC_{50} ）、最小有效浓度或最低可观测效应浓度（lowest-observed effective concentration, LOEC），最大无观测效应浓度或无观测效应浓度（no-observed effect concentration, NOEC）等。半数效应浓度还可因效应表示的量不同而有不同的表示，如酶抑制