

DOI: 10.7524/AJE.1673-5897.20201024002

田明明, 彭颖, 张睿, 等. 定量有害结局路径(qAOP)评估环境化学物质毒性的研究进展 II: 类二噁英物质及 AhR-qAOP[J]. 生态毒理学报, 2021, 16(4): 1-16

Tian M M, Peng Y, Zhang R, et al. Research advance of quantitative adverse outcome pathway (qAOP) in environmental chemicals toxicity assessment II: Dioxin-like compounds and AhR-qAOP [J]. Asian Journal of Ecotoxicology, 2021, 16(4): 1-16 (in Chinese)

定量有害结局路径 (qAOP) 评估环境化学物质毒性的研究进展 II: 类二噁英物质及 AhR-qAOP

田明明¹, 彭颖^{1,2,*}, 张睿³, 张瀚心⁴, 张效伟^{1,#}

1. 污染控制与资源化研究国家重点实验室, 南京大学环境学院, 南京 210023

2. 流域环境生态工程研发中心, 北京师范大学自然科学高等研究院, 珠海 519087

3. 济南大学水利与环境学院, 济南 250022

4. 生态环境部固体废物与化学品管理技术中心化学品部, 北京 100029

收稿日期: 2020-10-24

录用日期: 2021-01-06

摘要: 环境中不断检出具有二噁英结构并存在潜在生物毒性的新型污染物类二噁英物质(dioxin-like compounds, DLCs), 识别并评估其生态与人体毒性对化学品风险防控具有重要意义。传统的化学品毒性测试方法已不能满足评估大批环境化学物质风险的需求, 基于芳香烃受体(aryl hydrocarbon receptor, AhR)的有害结局路径(adverse outcome pathway, AOP)为准确评估潜在 DLCs 的生态与健康风险提供了新的策略。为指导预测新型 DLCs 的毒性, 需在定性 AhR-AOP 基础上发展定量 AOP。本文综述了 AhR-AOP 的研究现状, 并总结了“AhR 激活-胚胎毒性”定量 AOP 的最新进展, 包括定量模型的开发、相关体外测试技术、对新型 DLCs 和不同物种的危害评估的适用性等。最后探讨了 AhR-qAOP 发展过程中的问题与潜在解决方案, 对其应用于 DLCs 生态危害与风险评价的前景进行了展望。

关键词: 类二噁英物质; 生态风险评估; 预测毒理学; 定量有害结局路径; 物种敏感性

文章编号: 1673-5897(2021)4-001-16 **中图分类号:** X171.5 **文献标识码:** A

Research Advance of Quantitative Adverse Outcome Pathway (qAOP) in Environmental Chemicals Toxicity Assessment II: Dioxin-like Compounds and AhR-qAOP

Tian Mingming¹, Peng Ying^{1,2,*}, Zhang Rui³, Zhang Hanxin⁴, Zhang Xiaowei^{1,#}

1. State Key Laboratory of Pollution Control & Resource Reuse, School of the Environment, Nanjing University, Nanjing 210023, China

2. Research and Development Center for Watershed Environmental Eco-Engineering, Advanced Institute of Natural Sciences, Beijing Normal University, Zhuhai 519087, China

3. School of Water Conservancy and Environment, University of Jinan, Jinan 250022, China

4. Solid Waste and Chemicals Management Center, Ministry of Ecology and Environment, Beijing 100029, China

Received 24 October 2020

accepted 6 January 2021

基金项目: 国家重点研发计划课题(2018YFC1801606, 2018YFC1801605); 国家自然科学基金资助项目(21707069, 21806052)

第一作者: 田明明(1994—), 男, 博士研究生, 研究方向为环境功能基因组学, E-mail: tianzhuangm@126.com

*** 通讯作者 (Corresponding author),** E-mail: pengying2009@live.cn

共同通讯作者 (Co-corresponding author), E-mail: zhangxw@nju.edu.cn

Abstract: Emerging dioxin like compounds (DLCs) with the structure similar to dioxin and potential biological toxicity have been continuously detected in the environment. It is important to assess their ecological health risks for the management of chemical risk. Conventional approaches of toxic tests have failed to meet the demand of chemicals risk assessment. The adverse outcome pathways (AOPs) based on the aryl hydrocarbon receptor (AhR) provided a new strategy for accurately assessing the ecological health risks of potential DLCs, which can guide the toxicity prediction of emerging pollutants and the establishment of environmental benchmarks for the protection of ecological species. However, to achieve this goal, it is necessary to develop quantitative AOP on the basis of the improvement and development of qualitative AhR-AOP. This paper reviewed the research advance of AhR-AOP, and summarized the latest development of the quantitative AOP (qAOP) based on embryo mortality owing to AhR activation, including the development of quantitative models, the *in vitro* bioassay technology, as well as the applicability for diverse species in hazard assessment of emerging DLCs. Finally, the most important issues and potential solutions in the development of AhR-qAOP were discussed, and its application in the assessment of ecological hazard and ecological risks of DLCs was prospected in this review.

Keywords: dioxin-liked compounds; ecological risk assessment; predictive toxicology; quantitative adverse outcome pathway; species sensitivity

二噁英及类二噁英物质(dioxin-like compounds, DLCs)通常具有高毒性,通过激活芳香烃受体(aryl hydrocarbon receptor, AhR),进而引起生物体的生殖发育毒性、免疫毒性、肝毒性及致癌等生物毒性^[1-3]。环境中不断检出具有二噁英结构并存在潜在生物毒性的新型类二噁英物质,评估其生态与健康风险对化学品风险防控具有重要意义。传统的化学品毒性测试已不能满足当前化学品风险评估的需求,针对环境中大量具有明显类二噁英结构的新型污染物和未知污染物,其生态危害和风险具有很高的不确定性,缺乏系统的毒性评估,急需对现有的化学物质毒性评估方法和策略进行创新。

在对 DLCs 致毒机制的研究基础上,基于芳香烃受体(aryl hydrocarbon receptor, AhR)的有害结局路径(adverse outcome pathway, AOP)(AhR-AOP)的发展为准确评估潜在 DLCs 的生态与健康风险提供了新的策略,可指导预测新型类二噁英污染物的毒性及建立以生态物种保护为目标的环境基准^[2]。但要实现该目的,首先要在发展成熟定性的 AhR-AOP 基础上进一步发展定量 AOP。定量 AOP(quantitative AOP, qAOP)可在化学品风险评估中提供从描述性知识到预测有害结局的桥梁,它是有一个或多个基于生物学的计算模型组成,通过计算模型描述分子启动事件(molecular initiative events, MIEs)、关键事件(key events, KEs)与有害结局(adverse outcomes, AOs)之间的关键事件的关联(key events relationships, KERs),并提供定量的剂量响应和时间信息,

能为毒害污染物的健康和生态风险管控提供有效的决策依据^[4]。构建的定量关系不仅包括分子水平,也包括个体、种群及以上水平。Perkins 等^[4]认为 qAOP 可用于解决 2 类主要问题:(1)理解和评估新的、未经测试的化学品对特定物种的风险;(2)了解和评估某一特定(组)化学物质对未经检验的新物种的风险。

本文在课题组前期研究的基础上,综述了 AhR-AOP 的最新研究进展,总结了 DLCs 及“AhR 激活-胚胎毒性”定量 AOP 的最新进展,并探讨了 AhR-qAOP 发展过程中的问题与潜在解决方案,对其在 DLCs 生态危害与生态风险评价的应用进行了展望。

1 DLCs 的生态危害与风险评估 (Ecological hazards and risk assessment of DLCs)

DLCs 的致毒机理主要通过激活 AhR 受体通路进行调控。正常情况下存在于细胞质中的 AhR 处于不活跃状态,当外源性配体如二噁英及 DLCs 进入细胞后,与 AhR 结合。接着进入细胞核,AhR 从 Hsp 90 复合体上解离下来,再与 AhR 核转位因子(aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator, ARNT)形成异质二聚体结构。而由于 Hsp 90 复合体的解离使得 AhR 的 DNA 结合位点暴露出来,此 DNA 结合位点可特异性地识别结合 DNA 上的二噁英响应元件(dioxin response element, DRE),从而 AhR/ARNT 异质二聚体结合在 DRE 上并启动下游靶基因的表达,如编码 CYP1A1、醌还原酶的基因表达,由此诱导相应的生物毒性^[5-6]。值得关注的是,

AhR 受体具有物种差异性,进而导致 DLCs 对生物体毒性效应的物种差异性。在无脊椎动物中并没有结合二噁英及 DLCs 的能力,但在脊椎动物中,二噁英及 DLCs 可以作为配体结合并激活 AhR 受体。人类和哺乳动物体内只有 AhR1,而其他脊椎动物有多种其他 AhR 受体^[7-8]。例如,鸟类具有 AhR1、AhR1 beta 和 AhR2,但只有 AhR1 行使主要功能^[9]。鱼类一般至少具有 3 种 AhR 受体,即 AhR1、AhR2 和 AhR3,且由于进化过程中保守程度较低,鱼类每种 AhR 受体均包含多种亚型^[10-11]。

二噁英及 DLCs 主要包括氯二苯并对二噁英(poly-*o*-chlorinated dibenzodioxin, PCDD)、多氯二苯并呋喃(polychlorinated dibenzofurans, PCDFs)、多氯联苯(polychlorinated biphenyls, PCBs)和多环芳烃(polycyclic aromatic hydrocarbons, PAHs)等持久性有机污染物。虽然从 20 世纪 70 年代开始,全球范围内开始禁止这些物质的生产和使用,但由于其环境持久性、亲脂性及高度的生物蓄积性,在环境介质中,尤其是沉积物中,二噁英及 DLCs 物质的污染仍较为严重。已有报道表明,全球 PCDD/Fs 和 PCBs 在沉积物中的检出浓度范围为 0.1 ~ 300 pg TEQ · g⁻¹(toxic equivalent, TEQ)^[12-13]。尽管已有大量针对此类物质的研究,环境中是否存在其他类似生物毒性的污染物仍然是广受关注的问题。新型有机污染物的种类和数量每年不断增长,随着仪器检测技术的发展,环境中越来越多的化学物质被发现具有类似二噁英的结构,如多氯代二苯硫醚(polychlorinated diphenyl sulfides, PCDPSs)、甲氧基化多溴联苯醚(methoxylated polybrominated diphenyl ethers, MeO-PBDEs)、羟基化多溴联苯醚(hydroxylated polybrominated diphenyl ethers, OH-PBDEs)等新型污染物,可随食物链在生物体内富集,造成生态风险^[14-16]。在全球水生环境中,PBDEs 的检出浓度范围为 0.01 ~ 69 300 ng · g⁻¹干质量(沉积物),0.03 ~ 1 380 ng · g⁻¹湿质量(鱼类),0.06 ~ 17.4 ng · L⁻¹(水)^[14]。已有研究发现 PCDPSs、MeO-PBDEs 和 OH-PBDEs 对大鼠、小鼠、鸟类和鱼类具有 AhR 活性,能在分子水平上激活 AhR,被认为是潜在的 DLCs^[17-18]。Zhang 等^[17]发现这 3 类物质中的部分化学品对于鸟类表现出显著的物种敏感性差异。PCDPSs 对鸡、环颈雉和日本鹌鹑的毒性效力均随着氯代水平的提高呈现上升趋势。部分 PCDPSs 和 MeO-/OH-PBDEs 的 AhR 活性的鸟类种间敏感性排序与典型二噁英的情况不同。

针对环境中大量具有明显类二噁英结构的新型污染物和未知污染物,其生态危害和风险具有很高的不确定性,对这类污染物开展毒性测试与生态风险评价具有重大研究意义。传统毒性评估方法和策略(动物实验)已经不能满足不断增加的未知毒性化学物质的风险评估,亟待对现有的化学物质毒性评估方法和策略进行创新。AOP 基于化学品的性质,从系统生物学的角度概括了化学品从所诱导的分子水平反应,细胞、组织、器官的响应和毒性效应,进而到个体、种群上的有害结局之间的时间先后和因果逻辑关系。近 10 年来,AOP 框架逐渐发展成熟,被认为是将生物信息组织成一种可用于人类健康和生态环境的化学品的安全评估的强大方法,其开发的最终目的是用于化学品的评估和监管工作,从化学品的优先级评估到危害性预测,最终实现风险评估并应用于管理决策^[4,19-20]。

2 基于 AhR 的定量有害结局路径研究进展 (Research advance of quantitative adverse outcome pathway based on AhR)

随着对 AhR 分子毒理学机制和二噁英及 DLCs 的致毒模式的深入研究,逐渐形成了二噁英及 DLCs 通过激活 AhR 受体诱导生物毒性的 AOP,可为预测新型类二噁英物质的毒性及建立以生物物种保护为目标的环境基准提供指导^[2]。已有的 AhR-AOP 框架把二噁英及 DLCs 通过激活 AhR 受体介导下游分子事件和在细胞、组织、器官和个体乃至群体水平上的有害结局联系起来,即二噁英及 DLCs 首先激活 AhR 受体,这是这类 AOPs 的共同 MIE,通过形成 AhR/ARNT 异源二聚体,诱导相关 I 相和 II 相代谢酶的表达,进而引起一系列分子级联响应,最终对器官和个体乃至整个种群产生毒害效应^[2,21]。定性 AOP 系统地构建了分子事件级联的知识,但不能实现准确的风险评估。因此仅仅有定性 AOP 是不够的,还需要发展定量 AOP,在明确的毒性机制信息和已有的 AhR-AOP 的基础上,通过构建分子启动事件、关键事件与有害结局之间的定量关系,才能实现通过体外测试新型类二噁英物质与受体的结合效力,预测其对生物个体、种群和群落水平的有害结局,为建立以生物物种保护为目标的环境基准提供指导。

2.1 AhR-AOPs 的发展现状及定量关联

近期,研究者达成共识,认为在短期内开发较多的 qAOP 是不合理的,未来 qAOP 的开发工作应该

将目标聚焦在已经具有完整信息的定性 AOP^[22]。完整的 qAOP 模型从数学上描述了关键事件之间的联系,将 MIE 激活的剂量-反应与 KERs 的反应-反应动力学以及有害结局的表现联系起来。qAOP 模型的原始结构(MIE、KE 和 KER 等)可以基于科学证据从头构建,也可以从 AOP 数据库中的定性 AOP 中获得。目前在 AOP wiki^[23](<https://aopwiki.org/>)中展示的与 AhR 相关的有害结局通路共有 7 条,每条 AOP 的状态、MIE、KE 和 AO 等信息汇总于表 1 中。AhR-AOP 框架总结了二噁英及 DLCs 通过 AhR 介导的分子效应以及在细胞、器官、个体或种群水平上观察到的有害结局。7 条 AOP 中已通过经济合作与发展组织(OECD)专家评审、开放引用与评论的有 3 条,可用于化学物质的筛选与生态风险评估,其 AOP ID 号分别为 21、150 和 131。

(1)AOP 21,受 AhR 调控的环氧化酶-2(cyclooxygenase 2, COX-2)表达上调,导致心血管发育和功能的改变,从而导致心脏泵血效率降低、血流减少,最终导致心脏衰竭和死亡。用于构建该 AOP 的大部分生物学证据是使用 COX-2 的选择性激动剂和拮抗剂,利用斑马鱼(*Danio rerio*)的 AhR、ARNT 或 COX-2 靶向敲除进行的机制研究获得的。有重要证据表明,至少 16 种不同鱼类和 8 种不同鸟类在多氯联苯、平面多氯联苯和多环芳烃暴露下,其心血管发育和功能改变的发生率、严重程度及随后的死亡率的剂量响应是一致的^[24],但是关于二噁英(TCDD)暴露与 COX-2 转录水平的剂量-反应关系的一致性尚不清楚。目前除了心血管发育和功能改变的共同表型外,没有可用的机制信息来推断跨物种的外推。

对于 AOP21, AhR 激活与早期死亡之间表现出较强的定量关系。PCDDs、PCDFs 和平面 PCBs 与 AhR 结合亲和力之间的定量构效关系与这些物质的毒性效力之间有着很强的定量关系。具有更大结合亲和力的同源物一般具有更大的毒性效力。这在一定程度上促进了毒性当量因子方法在风险评估中的成功开发。不同物种的 AhR 受体与 DLCs 之间的结合亲和力具有显著差异,这决定了 DLCs 的物种敏感性差异。携带不同 AhR 受体的鸟类对于 TCDD 的物种敏感性差异高达 40 倍。另一方面,COX-2 的上调表达与 TCDD 暴露导致青鳉心脏畸形发生率和严重程度之间具有定量关联。COX-2 的表达和心脏面积之间有较强的线性关系($r^2 = 0.88$),但仍然缺乏多化学品和多物种的相关信息。

(2)AOP 150,通过 AhR 激活,与 ARNT 二聚间接抑制血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)的表达,从而减少心肌细胞和内皮细胞的增殖,改变心血管形态学和减少心输出量,因此影响了正常血管的生成,最终导致充血性心力衰竭和早期生命死亡^[25]。

对于 AOP 150,每个关键事件之间的关联(KERs)的定量关系仍不清楚。但是,对于鸟类来说,AhR 激活(MIE)和胚胎死亡(AO)之间有很强的相关性。鸟类 AhR1 配体结合域(ligand-binding domain, LBD)序列可用于预测 DLCs 诱导的胚胎致死率。LBD 中 2 个关键位置的氨基酸(Ile324 和 Ser380)决定了 DLCs 的结合亲和力,进而决定了 AhR 激活的程度。

(3)AOP131 描述了化学物质通过激活 AhR 受体导致的啮齿动物肝脏尿卟啉症。AhR 的激活诱导了下游基因 I 相代谢酶-细胞色素 P450 1A2 的表达,导致尿卟啉原的过度氧化,产生一种抑制剂尿卟啉原脱羧酶(uroporphyrinogen decarboxylase, UROD)阻止尿卟啉原转化为共混卟啉原,并在正反馈回路中增加 UROD 抑制剂的合成;导致尿卟啉原积累,进而导致其优先氧化以及高羧酸化卟啉(highly carboxylated porphyrins, HCPs)在各器官的积累(尿卟啉症)^[26]。

AOP131 的定量关系只适用于哺乳动物,不适用于其他物种。目前已有定量模型可以预测各种化合物的 AhR 活性,但产生卟啉症所需的 AhR 激活程度尚不清楚。在哺乳动物中,UROD 活性至少要降低 70% 才能导致明显的尿卟啉症。此外,大量的体外测试方法已经开发出来,可以同时研究卟啉的积累和 UROD 的抑制,UROD 抑制与卟啉的积累之间具有强关联性。

另外正在接受审查的 2 条 AOP 分别是 AOP 41 与 AOP 57。AOP 41 描述的是 DLCs 作为 AhR 配体与之绑定形成二聚体,持续的暴露(数周或数月)会导致 AhR 持续激活,导致啮齿动物肝脏肿瘤。AOP 57 则描述了通过 AhR 激活,引起一系列基因表达发生变化,如 CD36 上调、PCK1 下降、低密度脂蛋白受体(low density lipoprotein receptor, LDLR)上调导致的低密度脂蛋白增加等早期关键事件,进而导致了脂肪酸的累积,SCD-1 表达上调导致肝脏中甘油三脂增加,然后引起脂肪酸、甘油三脂的增加与线粒体脂肪酸 β 氧化受到抑制等生物学变化,最终导致最后的危害结局,形成脂肪肝。但该 AOP 正在进一

表 1 AOP Wiki 中由 AhR 介导的有害结局通路 (AOPs) mediated by AhR in AOP Wiki
Table 1 The adverse outcome pathways (AOPs) mediated by AhR in AOP Wiki

AOP 编号 AOP ID	AOP 名称 AOP name	应激源 Stressors 当前在 OECD 状态 Status in OECD	分子启动事件 (MIE)及其 ID Molecular initiative event (MIE) and its ID	关键事件(KE)及其 ID Key event (KE) and its ID	有害结局(AO)及其 ID Adverse outcome (AO) and its ID	物种适用性 Taxonomic applicability
21 https://aopwiki.org/aops/21	芳基羟受体(AhR)的激活, 通过增加 COX-2 导致生命早期死亡 Aryl hydrocarbon receptor (AhR) activation leading to early life stage mortality, via increased COX-2	二噁英(TCDD)	18: AhR 激活 18: AhR activation	944: AhR/ARNT 的二聚 944: Dimerization of AhR/ARNT 1269: COX-2 的表达增加 1269: Increase in COX-2 expression 317: 心血管发育/功能被改变 317: Altered cardiovascular development/function 947: 早期生命阶段死亡率增加 947: Increase in early life stage mortality	斑马鱼 <i>Danio rerio</i> 青鳉 <i>Oryzias latipes</i> 原鸡 <i>Gallus gallus</i>	
		Tetrachlorodibenzo- <i>p</i> -dioxin (TCDD) OECD 推荐 OECD endorsed				
150 https://aopwiki.org/aops/150	AhR 激活, 通过减少 VEGF 导致早期生命阶段死亡 AhR activation leading to early life stage mortality, via reduced VEGF	多氯联苯、多氯二苯并二噁英、多氯代二苯并呋喃 Polychlorinated biphenyl, polychlorinated dibenzodioxins, polychlorinated dibenzofurans OECD 推荐 OECD endorsed	18: AhR 激活 18: AhR activation	944: AhR/ARNT 的二聚 944: Dimerization of AhR/ARNT 945: ARNT/HIF1- α 二聚减少 945: Reduced dimerization of ARNT/HIF1- α 948: 内皮血管生长因子(VEGF)产生减少 948: Reduced production of vascular endothelial growth factor (VEGF) 110: 内皮细胞网络被影响 110: Impairment of endothelial network 317: 心血管发育/功能被改变 317: Altered cardiovascular development/function	原鸡 <i>Gallus gallus</i> 斑马鱼 <i>Danio rerio</i> 小鼠 <i>Mus musculus</i> 大鼠 <i>Rattus norvegicus</i>	
131 https://aopwiki.org/aops/131	AhR 活化导致尿卟啉症 AhR activation leading to uroporphyrin	二苯并二噁英、多氯联苯、六氯苯、多环芳烃 Dibenzo- <i>p</i> -dioxin, polychlorinated biphenyls, hexachlorobenzene, polycyclic aromatic hydrocarbons OECD 推荐 OECD endorsed	18: AhR 激活 18: AhR activation	850: CYP1A2/CYP1A5 被诱导 850: Induction of CYP1A2/CYP1A5 844: 尿卟啉原氧化 844: Oxidation of uroporphyrinogen 845: UROD 活性抑制 845: Inhibition of UROD 846: 高羧基化卟啉的积累 846: Accumulation of highly carboxylated porphyrins	小鼠 <i>Mus musculus</i> 大鼠 <i>Rattus norvegicus</i> 人 <i>Homo sapiens</i>	

续表1

AOP 编号 AOP ID	AOP 名称 AOP name	应激源 Stressors 当前在 OECD 状态 Status in OECD	分子启动事件 (MIE)及其 ID Molecular initiative event (MIE) and its ID	关键事件(KE)及其 ID Key event (KE) and its ID	有害结局(AO)及其 ID Adverse outcome (AO) and its ID	物种适用性 Taxonomic applicability
41 https://aopwiki.org/aops/41	持续的 AhR 激活导致啮齿动物肝脏肿瘤 Sustained AhR activation leading to rodent liver tumors	在评论中(可以引用和评价) Under review (open for citation and comment)	165: 长期激活 AhR 受体驱动直接和间接的基因表达改变	139: 肝毒性,肝病,包括一系列可观察到的效应 139: Hepatotoxicity, hepatopathy, including a constellation of observable effects	856: 形成肝细胞和胆管肿瘤 856: Formation of hepatocellular and bile duct tumors	小鼠 <i>Mus musculus</i> 大鼠 <i>Rattus norvegicus</i>
			165: Continuous activation of AhR induces direct and indirect expression changes of genes	853: 改变抑制细胞稳态和凋亡 853: Changes/inhibition of cellular homeostasis and apoptosis 854: 改变细胞增殖/增生 854: Alterations of cellular proliferation/hyperplasia		
57 https://aopwiki.org/aops/57	AhR 的激活导致脂肪变性 AhR activation leading to hepatic steatosis	在发展中(欢迎合作与评价) Under development (contributions and comments welcome)	18: AhR 激活 18: AhR activation	450: 超低密度脂蛋白(VLDL)的分泌受到抑制 450: Suppression of very low-density lipoprotein (VLDL) secretion 451: 线粒体脂脂肪酸-beta 氧化受到抑制 451: Inhibition of mitochondrial fatty acid-beta oxidation 327: 脂肪酸累积 327: Accumulation of fatty acid 216: PCK1 表达下降 216: Decreased PCK1 expression 291: 甘油三酯累积 291: Accumulation of triglyceride 54: 上调 CD36 54: Up-regulation of CD36 465: 脂肪酸总摄入增加 465: Increased fatty acid influx 466: 低密度脂蛋白受体(LDLR)上调 466: Up-regulation of low density lipoprotein receptor (LDLR) 467: 低密度脂蛋白摄取增加 467: Increased low density lipoprotein uptake 80: <i>CYP1A1</i> 上调 80: Up-regulation of <i>CYP1A1</i> 462: <i>SCD-1</i> 上调 462: Up-regulation of <i>SCD-1</i>	455: 肝脏脂肪累积 455: Accumulation of liver lipid	小鼠 <i>Mus musculus</i>

续表1

AOP 编号 AOP ID	AOP 名称 AOP name	应激源 Stressors 当前在 OECD 状态 Status in OECD	分子启动事件 (MIE)及其 ID Molecular initiative event (MIE) and its ID	关键事件(KE)及其 ID Key event (KE) and its ID	有害结局(AO)及其 ID Adverse outcome (AO) and its ID	物种适用性 Taxonomic applicability
151 https://aopwiki.org/aops/151	AhR 信号导致胎盘血管破裂	在发展中,没有开放评价和引用	无信息	无信息	无信息	
	AhR signaling leading to placental vascular disruption	Under development, not open for comment, or citation	No information	No information	No information	
310 https://aopwiki.org/aops/310	胚胎中 AhR 的激活通过表观遗传下调促性腺激素释放激素受体(GnRHR)导致生殖失败	来并[a]芘 Benzo [a] pyrene	944 : AhR/ARNT 二聚化 944 : Dimerization of AhR/ARNT 1697 : 增加 DNA 甲基转移酶的表达 1697 : Increase of DNA methyltransferase expression 1698 : 增加超甲基化的启动子区域的 GnRHR 1698 : Increase hypermethylation of the promotor region of GnRHR 1699 : 降低 GnRHR 的表达 1699 : Decrease in expression of GnRHR 3 : 减少卵巢颗粒细胞还原以影响 17beta-雌二醇的合成 3 : Reduction of 17beta-estradiol synthesis by ovarian cells reduction 219 : 降低血浆 17beta-雌二醇浓度 219 : Reduction of plasma 17beta-estradiol concentrations 285 : 减少肝内还原,卵黄生成素合成 285 : Reduction in vitellogenin synthesis in liver 221 : 降低血浆卵黄蛋白浓度 221 : Reduction in plasma vitellogenin concentrations 309 : 减少卵黄蛋白在卵母细胞中的积累和发育 309 : Reduction in vitellogenin accumulation into oocytes and oocyte growth/development	78 : 减少累积繁殖力和产卵 78 : Reduction of cumulative fecundity and spawning 360 : 种群减少 360 : Decrease in population trajectory	斑马鱼 <i>Danio rerio</i>	
	Embryonic activation of the AhR leading to reproductive failure, via epigenetic down-regulation of gonadotropin releasing hormone receptor (GnRHR)	在发展中,没有开放评价和引用 Under development, not open for comment, or citation	18 : AhR 激活 18 : AhR activation			

注: OECD 表示经济合作与发展组织, ARNT 表示尿卟啉原脱羧酶。
Note: OECD stands for Organization for Economic Co-operation and Development; ARNT stands for aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator; UROD stands for uroporphyrinogen decarboxylase.

步开发过程中,可接受评价与建议。最新开发的2条目前只是处于提交后的状态,尚不接受引用与评价。AOP 310 描述的是 AhR 的激活导致 DNA 甲基转移酶、促性腺激素释放激素受体(gonadotropin releasing hormone receptor, GnRHR)启动子区高甲基化等关键事件的变化,因此导致一系列表观遗传变化,最终导致繁殖受损如累积繁殖力和产卵量减少导致种群数量下降等有害结局;AOP 51 是关于 AhR 信号传导和胎盘血管破裂之间的一系列事件。

在上述 AOP 中,研究较多且毒性机制信息最丰富的是 AOP 21、151 和 131,为后续 qAOP 模型开发提供基本信息与重要数据。

2.2 定量 AhR-AOPs 的研究进展

2.2.1 基于“AhR-胚胎毒性”定量 AOP 的开发

定量 AOP 的构建需要分子启动事件、关键事件和有害结局之间的定量响应数据对关键事件关系进行建模和参数化,且精确的 KERs 的模型开发需要详细的浓度-响应和响应-响应关系,以此建立数学统计模型。根据已有数据的可用性以及对 KERs 的了解程度,数学统计模型可以是简单的线性回归模型,也可以是一系列连续的非线性模型描述生物组织在不同水平的响应^[27]。在上述3条受到广泛认可的 AhR-AOPs 中,胚胎死亡或生命早期阶段的死亡是最受关注的末端终点(或有害结局),对物种的种群健康发展至关重要,这也是生态风险评估中的研究重点。而且,3条 AOPs 的分子启动事件均为 AhR 激活(ID:18),与关键事件或有害结局之间具有较强相关性的 KERs 包括 AhR 激活与胚胎死亡、UROD 活性水平与肝脏尿卟啉症的发生。在前期的研究中已在淡水、海洋硬骨鱼、非硬骨鱼以及鸟类中发现 AhR 激活与生命早期阶段死亡率之间存在直接或间接的关系^[28-29]。另外,UROD 的抑制与卟啉积累之间也存在定量关系,有研究证实在哺乳动物中 UROD 活性至少降低 70% 才能导致明显的尿卟啉积累^[30],该定量关系只适用于哺乳动物,且定量模型仅限于 UROD 的活性与卟啉积累之间的关联^[31],而分子启动事件与最终有害结局之间的定量关系还有待进一步研究。这些 KERs 内部之间的强相关性为后期 qAOP 的构建提供重要支撑。

在上述研究基础上,针对典型的二噁英及 DLCs (TCDD、四氯二苯并呋喃(TCDF)和共面 PCBs)以及 AhR 激活-胚胎毒性间的关联,Doering 等^[10, 27, 32]收集文献报道中这些物质在胚胎暴露实验和体外 AhR

活性测试中的浓度-响应数据,构建了用来描述 AhR 激活与间接导致鸟类和鱼类生命早期阶段死亡率的定量 AOP。并根据已发表文献中 DLCs 暴露浓度和死亡率的实际剂量响应曲线,对生命早期阶段死亡率的预测响应值进行了验证,定量 AOP 的预测结果与实验结果的平均比值为 2.2 基于“AhR-胚胎毒性”定量 AOP,实现了通过测试典型 DLCs 与受体的结合效力来预测鸟类或鱼类模式物种个体水平的有害结局的目的,但能够用于新型 DLCs 与非模式物种还需要进一步的研究。

2.2.2 AhR 活性的体外测试方法

与此同时,可测量分子启动事件(AhR 激活程度)的高通量检测方法也相应开发,如细胞色素 P450 亚酶 CYP1A1 (ethoxyresorufin-O-deethylase, EROD)诱导法和 AhR 受体报告基因法。高通量体外测试技术的发展为快速发现新型 DLCs 提供重要的技术支撑。

EROD 检测的原理是基于 DLCs 与 AhR 结合活化后,经过下游分子信号传递,诱导 EROD 酶表达。通过测定 EROD 酶的活性,来了解受试化学品激活 AhR 的能力。因为 EROD 酶不能由肝细胞内源表达,故其酶活性与二噁英的暴露量存在定量关系^[33]。

受体报告基因法是近年来根据 AhR 受体激活机制发展起来的体外细胞测试法,其原理是利用基因重组技术,从体外把合成的报告基因(哺乳动物细胞色素 P450 基因和萤火虫荧光酶)重组到真核细胞内。受体报告基因法可包括不同来源的 AhR 受体,如在大鼠肝癌细胞(H4IIE-luc)稳定转染报告基因的 H4IIE-luc 细胞受体报告基因法、在 COS-7 细胞瞬时转染 AhR 质粒的鸟类 AhR-荧光素酶报告基因法(luciferase reporter gene, LRG)和鱼类 AhR2-LRG 法,其中,鸟类 AhR-LRG 法的技术原理和检测流程如图1所示。在非洲绿猴肾成纤维细胞(COS-7 细胞)中瞬时转染鸟类 AhR1、鸬鹚 ARNT、鸬鹚 CYP1A5 报告基因质粒和 Renilla 荧光素酶报告基因质粒^[9, 33]。转染完成后, COS-7 细胞可以表达相应的 AhR1 受体和 ARNT。当对细胞进行 DLCs 暴露时, DLCs 与细胞质内的 AhR 受体结合,并转移至细胞核内, AhR 与 ARNT 形成异源二聚体,与荧光素酶报告基因上的二噁英响应元件(DRE)结合,启动荧光素酶基因的表达,荧光素酶的表达量与 AhR 激活的程度正相关^[33-34]。加入荧光素底物后,荧光素酶

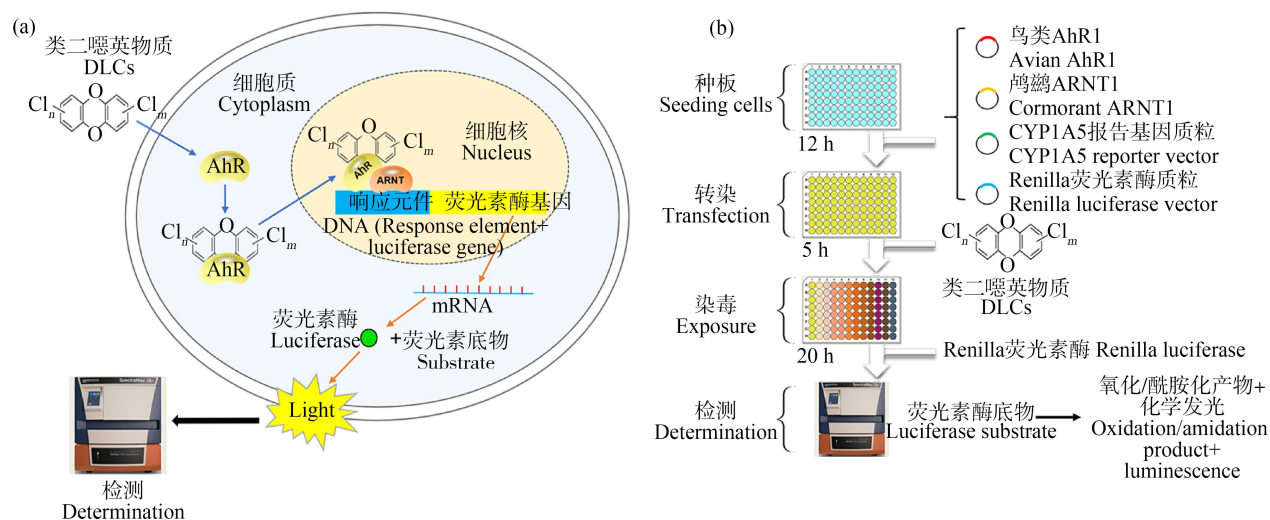


图1 鸟类 AhR1-荧光素酶报告基因法 (AhR1-LRG) 检测类二噁英 (DLCs) 物质芳香烃受体 (AhR) 活性的技术原理 (a) 和流程 (b)

注: ARNT 表示 AhR 核转位因子。

Fig. 1 The mechanism (a) and workflow (b) of potency test of arly hydrocarbon receptor (AhR) activation of dioxin-like compounds (DLCs) using avian AhR1-luciferase reporter gene (AhR1-LRG)

Note: ARNT stands for aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator.

可以催化底物反应,产生化学发光。使用微孔板酶标仪可检测其发光强度,进而实现对具有 AhR 活性的 DLCs 物质的高通量体外测试。

与 EROD 法相比,受体报告基因法具有以下优势:(1)更直接地检测 DLCs 物质对 AhR 的激活效应,因为报告基因法使用外源表达的 AhR 受体或者 CYP1A 报告基因,其检测的指标来源的分子效应比诱导 EROD 表达更早出现^[33]。因此,报告基因法灵敏度更高,检测限更低。(2)因为 EROD 法需要使用鸟类肝脏原代细胞,而报告基因法使用细胞系进行检测,因此,报告基因法检测周期更短,更适合高通量的化学品筛查。(3)因为 LRG 基于外源表达的 AhR 受体,因此可以预测不同物种的敏感性差异,为制定保护敏感物种的 DLCs 的生态安全阈值提供方法。近几年,LRG 法在环境介质如飞灰、沉积物和油砂污染区等的危害评估中已得到广泛应用,为 AhR 激活-胚胎致死 qAOP 应用于未来真实环境的化学物质危害识别与筛查提供技术基础。魏凤华等^[35]采用鸟类 AhR-LRG 和大鼠 H4IIE 报告基因法评估了垃圾焚烧飞灰样品有机提取物的类二噁英生物活性,垃圾焚烧飞灰样品的有机提取物能诱导显著的类二噁英活性,研究表明,利用化学检测仪器对 17 种 DLCs 进行的暴露分析不能全面反映环境介

质中有毒有害化学物质的类二噁英毒性情况;而鸟类 AhR-LRG 法不仅能反映样品的总类二噁英活性,还可通过多种物种实现对样品较全面的生态风险评估。夏洁^[36]使用大鼠 H4IIE-luc 报告基因法检测了长江和太湖水样、沉积物和生物样品提取物的 AhR 活性,并且结合化学分析方法,推断出沉积物中 PCDDs 的 AhR 活性贡献率达到 50%。Mundy 等^[37]将鸟类原代肝细胞暴露于油砂污染区环境样品中,通过测定 EROD 酶活性和 *Cyp1A4* mRNA 的表达来评估 AhR 活性,发现环境样品中的多环芳烃提取物能够显著诱导 AhR 活性增强,且可以根据体外测试结果对不同采样位点的环境样品的 AhR 活性进行排序。

研究者利用鸟类 AhR1-LRG 法开展了针对典型的 DLCs (TCDD、TCDF、五氯二苯并对二噁英 (PeCDF) 和 PCBs) 和新型 DLCs (OH-PBDEs) 的相关研究,发现这些 DLCs 激活 AhR 的效应浓度 (PC₂₀ 和 EC₅₀) 与鸡胚胎早期生命阶段致死 LD₅₀ 间具有强相关性 ($r^2 > 0.84$, $P < 0.01$)^[27, 38-39] (图 2)。以上结果说明了 AhR-LRG 体外检测方法在预测 DLCs 毒害效应的有效性,为构建以生物个体发育早期阶段死亡为有害结局终点的 AhR-qAOP 提供了可靠的体外检测方法。

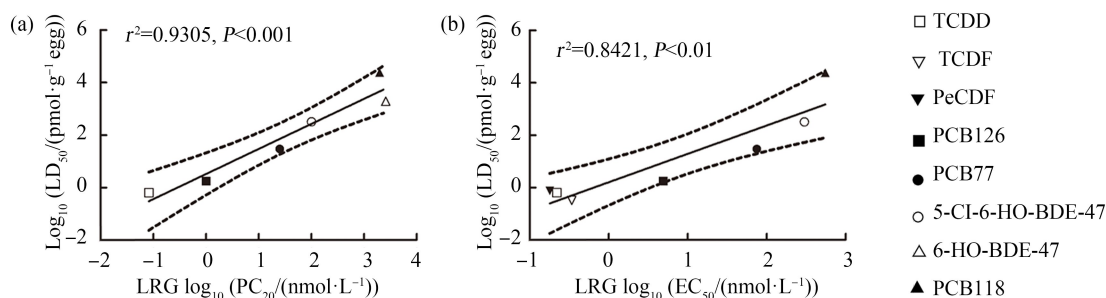


图2 AhR活性与野生型鸡胚胎致死LD₅₀的线性回归分析

注:EC₅₀表示引起50%最大效应的浓度,PC₂₀表示引起20%的阳性对照效应的浓度,LD₅₀表示半数致死浓度;TCDD表示二噁英,TCDF表示四氯二苯并呋喃,PeCDF表示五氯二苯并对二噁英,PCB表示多氯联苯,5-Cl-6-HO-BDE-47表示5-氯-6-羟基-溴代联苯醚-47,6-HO-BDE-47表示6-羟基-溴代联苯醚-47;PC₂₀和EC₅₀值来自LRG法测定的浓度-响应曲线。

Fig. 2 The linear relationship between AhR activity and LD₅₀ of wide-type chicken embryo

Note: EC₅₀ means the concentration for 50% of maximal effect; PC₂₀ means the concentration for 20% of positive control effect;

LD₅₀ means median lethal dose; TCDD means dioxin; TCDF means tetrachlorodibenzofuran; PeCDF means pentachlorodibenzo *p*-dioxin;

PCB means polychlorinated biphenyls; 5-Cl-6-HO-BDE-47 means 5-chloro-6-hydroxy-bromodiphenyl ether -47; 6-HO-BDE-47

means 6-hydroxy-bromodiphenyl ethers -47; the value of PC₂₀ and EC₅₀ were retrieved from dose-response curves of LRG tests.

2.2.3 基于“AhR-胚胎毒性”定量AOP对DLCs的风险评估

现有AhR-qAOP在对单一化学品暴露导致早期胚胎死亡的预测研究中,涵盖了典型的DLCs(TCDD、PeCDF、TCDF和共面PCBs)和一些新型DLCs(PBDEs、PCDPSs)。其中,低于四氯取代的PCDD/Fs和PCBs均不会激活AhR,PCDPSs诱导AhR活性的规律与PCDD/Fs和PCBs相似。此外,目前已发现羟基和甲氧基取代的PBDEs表现出显著的AhR活性,且5-Cl-6-HO-BDE-47的相对毒性效力(relative potency, ReP)最大,与八氯代二苯并二噁英(OCDD)和八氯代二苯并呋喃(OCDF)的毒性当量因子(toxic equivalency factor, TEF)相当;并且发现羟基官能团和甲氧基官能团相比,可以诱导更大的AhR活性^[15, 17, 36]。

Doering等^[38]和Manning等^[39-40]发现典型DLCs的鸟类AhR1/鱼类AhR2-LRG活性效应值与早期胚胎致死剂量之间具有强相关性。Manning等^[39-40]在COS-7细胞中转染了鸡、环颈雉和日本鹌鹑AhR1质粒,通过检测TCDD、PeCDF、PCBs 126, 77, 105和118的LRG响应,发现在AhR1 LBD区域的氨基酸残基324和380是决定不同鸟类对PCBs敏感性差异的因素。此外,AhR1-LRG响应(EC₅₀、EC_{threshold}和PC₂₀)与文献报道的PCBs对9种鸟类早期胚胎死亡的毒性数据(LD₅₀)显著相关($r^2 \geq 0.87$, $P < 0.0001$)^[39-40]。

近几年,本课题组针对前期研究中筛选出来的

高AhR活性的新型DLCs,基于AhR激活-胚胎致死的qAOP模型对其开展危害预测研究。利用体外高通量测试-鸟类AhR1-LRG法得到测试物质的AhR活性效应值,根据qAOP模型预测6-HO-BDE-47^[41]、5-Cl-6-HO-BDE(未发表数据)等高活性物质的胚胎致死效应,并通过胚胎注射测试验证了新型DLCs对鸟类胚胎的致死毒性,与转录水平上的分子响应如CYP1A4的表达上调,具有显著的剂量效应关系。以上这些研究结果拓展了利用AhR激活-胚胎致死的qAOP模型在新型毒害污染物的毒性评估方面的应用,从大量毒性未知的环境污染物中筛选出有毒物质,为PBDEs、PCDPSs等新型污染物的生态风险管理与控制提供了方法和数据支持。

2.2.4 基于“AhR-胚胎毒性”定量AOP对不同物种的适用性研究

不同物种的AhR受体对AhR受体激动剂的敏感性和效力有很大差异,以鸟类为例,其AhR配体结合域被分为低、中、高敏感性,分别为AhR 1(Ile324_Ser380)、AhR 2(Ile324_Alal380)和AhR 3(Val324_Alal380),其代表物种分别为鸡、环颈雉和日本鹌鹑^[39, 42-43],具有对DLCs亲和力较高的AhRs的鸟类比具有对DLCs亲和力较低AhRs的鸟类具有更高的敏感性^[44]。AhR在鸟类、鱼类的不同物种间的结合亲和力的差异和早期生命阶段死亡率对DLCs的敏感性差异也存在定量关系^[27, 39, 42-44],如

TCDD 对鸡或者其他鸟类的毒性至少相差一个数量级,TCDD 对湖红点鲑和斑马鱼早期生命阶段的致死毒性效应相差 40 倍^[45]。因此,在利用 AhR 激活导致生物早期死亡的 qAOP 模型时需要考虑物种间差异性的定量关系^[32]。

导致 AhR 活性物种敏感性差异的原因,目前主要认为是不同 AhR 亚型的蛋白序列和构象差异使得同样的 DLCs 与 AhR 受体结合能力不同,进而产生不同程度的下游分子事件^[42-44, 46]。对于鸟类来说,AhR1 的配体 LBD 区域的氨基酸序列差异是引起二噁英及 DLCs 效应产生鸟类种间敏感性差异的原因。研究发现,氨基酸位点 Ile324 和 Ser380 能够影响 86 种鸟的 AhR1 受体对 DLCs 的敏感性^[39, 42-43]。对于哺乳动物,研究人员发现人类的 AhR 受体 LBD 区的苯丙氨酸 318(Phe318)位点和缬氨酸 381(Val381)位点在对 TCDD 的敏感性差异上起着关键作用^[47-49]。相较于人类和鸟类,鱼类的情况较为复杂,目前还没有针对鱼类物种敏感性的机制解释。一般来说,鱼至少有 3 种 AhR 受体(AhR1、AhR2 和 AhR3),并且每个 AhR 均包括多个亚型。鱼类 AhR 受体在进化上的保守性较低,这也导致了鱼类较大的物种敏感性差异^[50]。Zhang 等^[51]提出了 PCDPs 会通过激活斑马鱼 AhR2 导致其致死毒性的假设。该研究通过体外测试-鱼类 AhR2-LRG 法、野生型和 *CYP1A* 转基因型斑马鱼胚胎暴露实验验证了 PCDPs 诱导的致死效应是通过激活斑马鱼 AhR2 的表达导致的,并结合分子动力学模拟提供了几种 PCDPs 在原子水平上激活 AhR2 的差异机制信息。综合来说,以上因素均会导致同样的 DLCs 与不同物种的 AhR 受体亲和力不同,导致分子启动事件的激活程度的差异,进而产生下游关键事件和最终有害结局的差异。因此,物种敏感性差异是 AhR-qAOP 后续发展及应用中一个亟待解决的重要问题。魏风华等^[2]总结了 DLCs 在不同物种间存在显著的敏感性差异,建议加强对我国本土物种的研究,获取本土物种的 DLCs 毒性数据以支持风险评价与基准研究,并进一步开展新型 DLCs 的毒性筛查工作等。

为了研究 AhR-qAOP 在不同物种间适用性,在 AhR 激活导致鸟类生命早期阶段死亡的 qAOP 的基础上,研究了 TCDD 对其他脊椎动物如 9 种鱼类的 AhR 受体敏感性差异^[27, 52]。研究者在 COS-7 细胞中分别转染了鸟类 AhR1 和鱼类 AhR2 质粒,通

过分析 TCDD、TCDF、PeCDF 和 PCBs 126, 77 的 LRG 响应和对应 DLCs 导致鸟类或鱼类早期胚胎死亡的数据,发现显著的线性相关仅存在于鱼类 AHR2/鸟类 AHR1-LRG 活性效应值(EC_{50})与导致早期胚胎死亡的 DLCs 剂量(LD_0 、 LD_{10} 、 LD_{50} 和 LD_{100}),而不存在于鱼类 AhR1^[27, 32]。此外,研究者通过修正 AhR-qAOP 模型,将 TCDD、PCBs 126, 77, 105 的 LRG 效应浓度($EC_{threshold}$)作为输入值,预测对应 DLCs 导致早期胚胎死亡的 DLCs 剂量(LD_0 、 LD_{10} 、 LD_{50} 和 LD_{100}),获得了较好的线性相关性($r^2 \geq 0.92$, $P < 0.0001$)。该研究发现 AhR-qAOP 可适用于不同生态物种,甚至拓展至 10 000 种鸟类和 34 000 种鱼类^[38]。但是除 PCDDs、PCDFs 和共面 PCBs 之外,目前还没有研究表明这种跨物种 qAOP 是否适用于其他的 AhR 激动剂^[27, 38]。

3 总结与展望(Conclusion and perspectives)

3.1 当前 AhR-qAOP 的不足

尽管 AhR-AOP 已经获得了较多的关注,促进了从机制上理解 AhR 在跨化学物质、跨物种和跨类群方面的危害,但是与其他大部分 AOP 一样,对 MIE 与 KE、AO 之间的关联、下游的关键事件仍然缺乏足够的了解。然而 AhR 的激活能够导致多重响应,包括与多个潜在靶基因如 *CYP1A*、*Sox9b* 和 *HIF1a/VEGF* 的相互作用,这些 AOPs 可能与 *COX-2* 的表达增加同时发生,导致心血管发育和功能改变和导致早期生命阶段死亡^[53]。AOP 150 是在 AOP 21 的基础上开发出来,AhR 激活后通过 HIF1a/VEGF 信号通路最终导致早期生命阶段死亡^[54]。因此,阐明 AhR 激活与早期生命阶段死亡率之间的一系列关键事件是一个挑战。此外,目前对已有 KERs 的定量关系理解在很大程度上只局限于 AhR 激活和早期生命阶段死亡率之间的间接关系,这限制了其在化学品风险管控中的应用范围。

此外,由于生物体内 AhR 受体的变异和多样性,二噁英及 DLCs 在不同的物种间存在显著的敏感性差异。这同样给 AhR-qAOP 的应用提出了挑战。尤其是对于野生鱼类,鱼类往往同时具有 3 种 AhR 受体,且每种具有不同亚型。目前,AhR 受体已经被识别定型的鱼类只占有所有鱼类的极少部分,大部分鱼类体内的 AhR 亚型情况尚不清楚^[55]。因此,对野生物种的 AhR 受体的识别与定型是决定 AhR-qAOP 应用有效性的基础。

本文综述了 AhR-胚胎毒性 qAOP 在预测典型 DLCs 和新型 DLCs(PBDEs 和 PCDDs)对鸟类和鱼类毒害效应的应用。但环境中仍有大量未知毒性化学污染物以及混合污染物。这些未知毒性污染物的 AhR 活性以及对生态物种的胚胎毒性很可能具有显著差异,因此 AhR-qAOP 的计算模型需要不断修正,以满足不同 AhR 活性的污染物的检测要求。

3.2 基于 AhR-qAOP 的 DLCs 生态风险研究展望

为识别 DLCs 的危害并评价其生态风险,进一步构建与完善 AhR-胚胎毒性 qAOP,后续可重点关注以下几方面:

(1)目前构建的 qAOP 已经适合于在 TCDD、TCDF 和 PCBs 等典型的 DLCs,其对大量新型的和潜在未知的 DLCs 的适用性尚不可知,建议开展对其他新型类二噁英化学物质的研究,验证该 qAOP 的化学适用性。

(2)继续开发与完善 qAOP,尤其是构建下游 KE 与 AO 间的定量关系,提高预测信心与能力,能在更高阶的实际管理工作中得到应用。使用 AOP 进行危害识别和风险评估需要评估预测模型在 AOP 中的每个关键事件和关键事件关系上的性能。一般来说,关键事件越往有害结局的下游发展,利用相关关键事件的定量关系来预测有害结局的可信度就越强。生物个体与种群水平及以上的危害是化学物质

监管和决策的最终目标,同时考虑结合合适的种群模型,通过对个体生存和繁殖的影响去评估对种群动态和结构的影响,将 AO 拓展至种群及以上水平上的危害。

(3)开展该 qAOP 对不同物种的适用性研究,将其应用拓展至敏感物种、本土物种和濒危物种等管理上关心的目标物种,进而确定敏感物种以及制定保护本地敏感物种的环境安全阈值(图 3)^[52, 56]。已知鸟类和鱼类之间 AhR 的目标氨基酸的差异导致与 DLCs 结合亲和力的不同,由此造成 AhR 激活(MIE)的剂量-效应关系物种差异。通过修改 qAOP 模型中 AhR 激活的剂量-反应参数,可以推断该模型在不同物种的适用性,从而解释物种对 DLCs 的敏感性^[10]。物种间蛋白质序列的保守性可以用来推断物种之间的亲和力如何不同,或者感兴趣的物种与模型物种之间的敏感性如何不同^[57]。有研究者利用序列比对等方法分析几个或多个物种之间的目标基因和蛋白质的相似性,从而预测物种之间的易感性(sequence alignment to predict across species susceptibility, SeqAPass)^[58],只需要提供所选目标物种的 MIE 和 KERs 的物种特异性信息,利用 qAOP 模型就能得到感兴趣的化学物质的物种敏感性分布,支撑毒害化学物质的生态毒性基准与标准的制定研究。

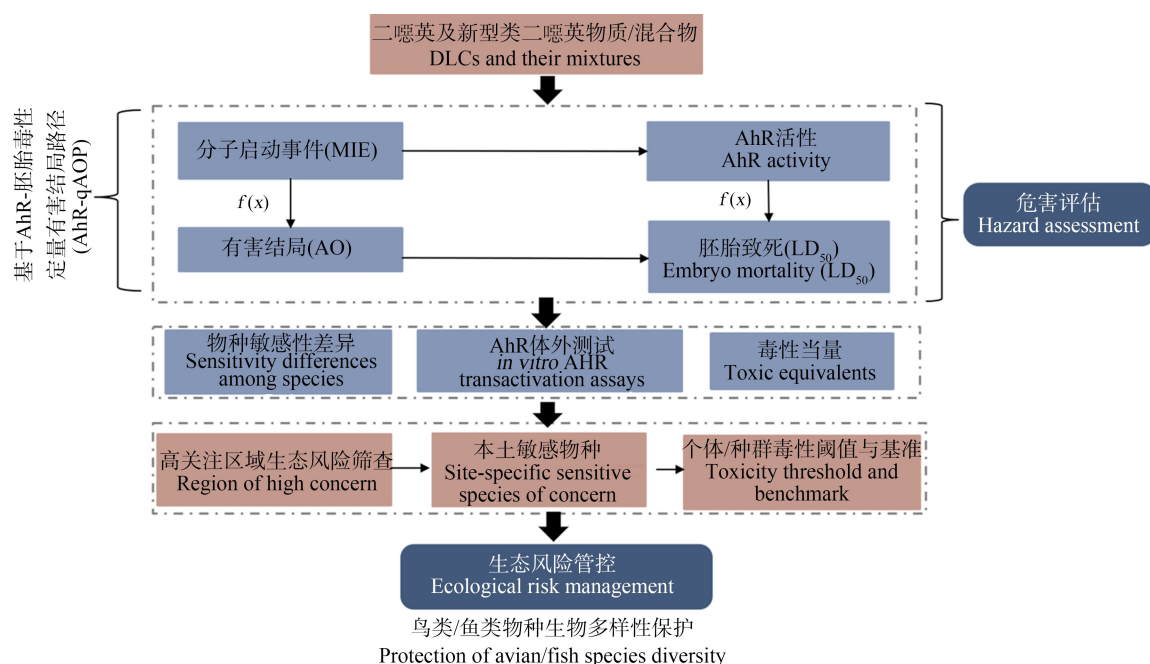


图3 利用 AhR-qAOP 对 DLCs 进行鸟类胚胎毒性评估以提供风险管控依据

Fig. 3 Avian embryo toxicity of DLCs was assessed using AhR-qAOP to provide evidence of risk management

(4)针对一些低 AhR 活性的新型 DLCs 和未知毒性的化学品,可以比较不同的活性效应浓度(PC_{20} 、 EC_{50} 、 EC_{20} 或 $EC_{threshold}$ 等)作为计算模型输入值的计算结果,以获取优化的线性相关性。Zhang 等^[59]在检测 PBDEs 的 AhR 活性时,使用 PC_{20} 作为输入值, PC_{20} 为产生 TCDD 的最大 LRG 响应的 20% 时对应的 DLCs 的浓度,以此来计算低 AhR 活性的 DLCs 的相对效力。Doering 等^[38]在构建针对鸟类和鱼类 AhR-胚胎毒性 qAOP 过程中,对计算模型进行修正,采用 $EC_{threshold}$ 代替 EC_{50} ,对具有低 AhR 活性的 PCBs 的毒害效应进行预测,发现采用 $EC_{threshold}$ 作为输入值,可以获得较好的线性相关性。

(5)在上述研究基础上,考虑构建基于 AhR 激活的 AOP 网络,将 AO 从个体水平上拓展至种群及以上水平,进一步探究其对 DLCs 混合物、环境中 DLCs 混合物等暴露危害的预测能力,促进其最终应用于 DLCs 的风险管控工作。已有研究提出 AhR-AOP 可为风险评估提供有用信息,如环境中可结合 AhR 的 TCDD 结构类似物一般以混合存在,可用混合物浓度加和的方式对这类混合的复合毒性进行评估^[60]。Wei 等^[61]利用基于鸟类 AhR 的荧光报告基因法测试 TCDD、2,3,7,8-TCDF 和 2,3,4,7,8-PeCDF 这 3 种典型 DLCs 两两混合后的 AhR 活性,发现混合物诱导的鸟类 AhR 活性效力的联合效应是加和作用,进一步说明了利用该报告基因法在混合暴露危害评估中的应用潜力。但是否可利用该 AhR 活性结果去预测混合物暴露的胚胎致死效应尚不可知。因此未来可进一步研究该 qAOP 和 AOP 网络在多种 DLCs 混合物、环境中 DLCs 混合物暴露中的应用。

(6)可参考 Patlewicz 等^[62]提出的支持 AOP 管控的科学框架,探索利用现有的 AhR 相关的 qAOP 分层级地支持对 DLCs 风险管控工作中不同层次的应用。例如利用该 qAOP 进行化学品初级阶段的毒性筛查与优先评估,累积数据的同时优化该 qAOP;将 qAOP 的数学模型输出的结果与实验数据集(如人类临床数据集、合适的生态物种)进行基准测试,为未来 AOP 的实际应用提供科学依据和经验。

通讯作者简介:彭颖(1985—),女,博士,副研究员,主要研究方向为生态毒理学与生物地球化学。

共同通讯作者简介:张效伟(1978—),男,博士,教授,博士生导师,主要研究方向为生态毒理学和健康风险评估。

参考文献 (References):

- [1] Moura-Alves P, Faé K, Houthuys E, et al. AhR sensing of bacterial pigments regulates antibacterial defence [J]. Nature, 2014, 512(7515): 387-392
- [2] 魏风华, 张俊江, 夏普, 等. 类二噁英物质及芳香烃受体(AhR)介导的有害结局路径(AOP)研究进展[J]. 生态毒理学报, 2016, 11(1): 37-51
Wei F H, Zhang J J, Xia P, et al. Research progress on dioxin-like compounds and AhR-mediated adverse outcome pathway (AOP) [J]. Asian Journal of Ecotoxicology, 2016, 11(1): 37-51 (in Chinese)
- [3] Kennedy G D, Nukaya M, Moran S M, et al. Liver tumor promotion by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin is dependent on the aryl hydrocarbon receptor and TNF/IL-1 receptors [J]. Toxicological Sciences, 2014, 140(1): 135-143
- [4] Perkins E J, Ashauer R, Burgoon L, et al. Building and applying quantitative adverse outcome pathway models for chemical hazard and risk assessment [J]. Environmental Toxicology and Chemistry, 2019, 38(9): 1850-1865
- [5] Pavcek P, Dvorak Z. Xenobiotic-induced transcriptional regulation of xenobiotic metabolizing enzymes of the cytochrome P450 superfamily in human extrahepatic tissues [J]. Current Drug Metabolism, 2008, 9(2): 129-143
- [6] Fujii-Kuriyama Y, Kawajiri K. Molecular mechanisms of the physiological functions of the aryl hydrocarbon (dioxin) receptor, a multifunctional regulator that senses and responds to environmental stimuli [J]. Proceedings of the Japan Academy Series B, Physical and Biological Sciences, 2010, 86(1): 40-53
- [7] Hahn M E. Aryl hydrocarbon receptors: Diversity and evolution [J]. Chemico-Biological Interactions, 2002, 141(1-2): 131-160
- [8] Karchner S I, Franks D G, Powell W H, et al. Regulatory interactions among three members of the vertebrate aryl hydrocarbon receptor family: AHR repressor, AHR1, and AHR2 [J]. The Journal of Biological Chemistry, 2002, 277(9): 6949-6959
- [9] Koh D H, Hwang J H, Park J G, et al. The AHR1-ARNT1 dimerization pair is a major regulator of the response to natural ligands, but not to TCDD, in the chicken [J]. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2020, 201: 110835
- [10] Doering J A, Giesy J P, Wiseman S, et al. Predicting the sensitivity of fishes to dioxin-like compounds: Possible role of the aryl hydrocarbon receptor (AhR) ligand binding domain [J]. Environmental Science and Pollution Research International, 2013, 20(3): 1219-1224

- [11] Hahn M E. Dioxin toxicology and the aryl hydrocarbon receptor: Insights from fish and other non-traditional models [J]. *Marine Biotechnology*, 2001, 3 (Suppl. 1): S224-S238
- [12] Zhang S K, Peng P G, Huang W L, et al. PCDD/PCDF pollution in soils and sediments from the Pearl River Delta of China [J]. *Chemosphere*, 2009, 75(9): 1186-1195
- [13] Zhang T, Chen S, Li N, et al. Occurrence, sources and ecological risks of PCDD/Fs and DL-PCBs in surface sediments from rivers in city cluster in south Jiangsu Province, China [J]. *Environmental Chemistry*, 2014, 33 (9): 1445-1455
- [14] Klinčić D, Dvorčák M, Jagić K, et al. Levels and distribution of polybrominated diphenyl ethers in humans and environmental compartments: A comprehensive review of the last five years of research [J]. *Environmental Science and Pollution Research International*, 2020, 27(6): 5744-5758
- [15] Kanaya N, Bernal L, Chang G, et al. Molecular mechanisms of polybrominated diphenyl ethers (BDE-47, BDE-100, and BDE-153) in human breast cancer cells and patient-derived xenografts [J]. *Toxicological Sciences*, 2019, 169(2): 380-398
- [16] Zhang L, Jin Y R, Han Z H, et al. Integrated *in silico* and *in vivo* approaches to investigate effects of BDE-99 mediated by the nuclear receptors on developing zebrafish [J]. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 2018, 37 (3): 780-787
- [17] Zhang R, Zhang X W, Zhang J J, et al. Activation of avian aryl hydrocarbon receptor and inter-species sensitivity variations by polychlorinated diphenylsulfides [J]. *Environmental Science & Technology*, 2014, 48(18): 10948-10956
- [18] Zhang J J, Zhang X W, Xia P, et al. Activation of AhR-mediated toxicity pathway by emerging pollutants polychlorinated diphenyl sulfides [J]. *Chemosphere*, 2016, 144: 1754-1762
- [19] Ankley G T, Bennett R S, Erickson R J, et al. Adverse outcome pathways: A conceptual framework to support ecotoxicology research and risk assessment [J]. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 2010, 29(3): 730-741
- [20] Hecker M, LaLone C A. Adverse outcome pathways: Moving from a scientific concept to an internationally accepted framework [J]. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 2019, 38(6): 1152-1163
- [21] Poland A, Knutson J C. 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin and related halogenated aromatic hydrocarbons: Examination of the mechanism of toxicity [J]. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 1982, 22: 517-554
- [22] Conolly R B, Ankley G T, Cheng W Y, et al. Quantitative adverse outcome pathways and their application to predictive toxicology [J]. *Environmental Science & Technology*, 2017, 51(8): 4661-4672
- [23] Pittman M E, Edwards S W, Ives C, et al. AOP-DB: A database resource for the exploration of adverse outcome pathways through integrated association networks [J]. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 2018, 343: 71-83
- [24] Teraoka H, Okuno Y, Nijoukubo D, et al. Involvement of COX2-thromboxane pathway in TCDD-induced pericardiac edema in developing zebrafish [J]. *Aquatic Toxicology*, 2014, 154: 19-26
- [25] Lanham K A, Plavicki J, Peterson R E, et al. Cardiac myocyte-specific AHR activation phenocopies TCDD-induced toxicity in zebrafish [J]. *Toxicological Sciences*, 2014, 141(1): 141-154
- [26] Smith A G, Clothier B, Carthew P, et al. Protection of the Cyp1a2(-/-) null mouse against uroporphyrin and hepatic injury following exposure to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin [J]. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 2001, 173(2): 89-98
- [27] Doering J A, Wiseman S, Giesy J P, et al. A cross-species quantitative adverse outcome pathway for activation of the aryl hydrocarbon receptor leading to early life stage mortality in birds and fishes [J]. *Environmental Science & Technology*, 2018, 52(13): 7524-7533
- [28] Kim Y, Cooper K R. Toxicity of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) and polychlorinated biphenyls (PCBs) in the embryos and newly hatched larvae of the Japanese medaka (*Oryzias latipes*) [J]. *Chemosphere*, 1999, 39(3): 527-538
- [29] Handel C M, van Hemert C. Environmental contaminants and chromosomal damage associated with beak deformities in a resident North American passerine [J]. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 2015, 34(2): 314-327
- [30] Mylchreest E, Charbonneau M. Studies on the mechanism of uroporphyrinogen decarboxylase inhibition in hexachlorobenzene-induced *Porphyrin* in the female rat [J]. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 1997, 145(1): 23-33
- [31] James C A, Marks G S. Inhibition of chick embryo hepatic uroporphyrinogen decarboxylase by components of xenobiotic-treated chick embryo hepatocytes in culture [J]. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 1989, 67(3): 246-249
- [32] Doering J A, Wiseman S, Beitel S C, et al. Identification and expression of aryl hydrocarbon receptors (AhR1 and

- AhR2) provide insight in an evolutionary context regarding sensitivity of white sturgeon (*Acipenser transmontanus*) to dioxin-like compounds [J]. *Aquatic Toxicology*, 2014, 150: 27-35
- [33] Zhang R, Manning G E, Farmahin R, et al. Relative potencies of aroclor mixtures derived from avian *in vitro* bioassays: Comparisons with calculated toxic equivalents [J]. *Environmental Science & Technology*, 2013, 47(15): 8852-8861
- [34] Mandavia C. TCDD-induced activation of aryl hydrocarbon receptor regulates the skin stem cell population [J]. *Medical Hypotheses*, 2015, 84(3): 204-208
- [35] 魏凤华, 张效伟, 张睿, 等. 鸟类 AhR 报告基因法对垃圾焚烧炉飞灰中的类二噁英污染物的评估[J]. *中国科技论文*, 2016, 11(15): 1791-1796
- Wei F H, Zhang X W, Zhang R, et al. Assessment of the dioxin-like compounds in fly ash of the waste incinerator by avian AhR luciferase report gene assay [J]. *China Sciencepaper*, 2016, 11(15): 1791-1796 (in Chinese)
- [36] 夏洁. 二恶英类污染物的高通量生物检测技术研究及其在环境监测中的应用[D]. 南京: 南京大学, 2013: 21-31
- Xia J. Development of a high throughput bio-analytical method of dioxin-like compounds and its application in environmental monitoring [D]. Nanjing: Nanjing University, 2013: 21-31 (in Chinese)
- [37] Mundy L J, Williams K L, Chiu S, et al. Extracts of passive samplers deployed in variably contaminated wetlands in the athabasca oil sands region elicit biochemical and transcriptomic effects in avian hepatocytes [J]. *Environmental Science & Technology*, 2019, 53(15): 9192-9202
- [38] Doering J A, Dubiel J, Wiseman S. Predicting early life stage mortality in birds and fishes from exposure to low-potency agonists of the aryl hydrocarbon receptor: A cross-species quantitative adverse outcome pathway approach [J]. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 2020, 39(10): 2055-2064
- [39] Manning G E, Farmahin R, Crump D, et al. A luciferase reporter gene assay and aryl hydrocarbon receptor 1 genotype predict the LD50 of polychlorinated biphenyls in avian species [J]. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 2012, 263(3): 390-401
- [40] Manning G E, Mundy L J, Crump D, et al. Cytochrome P4501A induction in avian hepatocyte cultures exposed to polychlorinated biphenyls: Comparisons with AHR1-mediated reporter gene activity and *in ovo* toxicity [J]. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 2013, 266(1): 38-47
- [41] Peng Y, Xia P, Zhang J J, et al. Toxicogenomic assessment of 6-OH-BDE47-induced developmental toxicity in chicken embryos [J]. *Environmental Science & Technology*, 2016, 50(22): 12493-12503
- [42] Farmahin R, Wu D M, Crump D, et al. Sequence and *in vitro* function of chicken, ring-necked pheasant, and Japanese quail AHR1 predict *in vivo* sensitivity to dioxins [J]. *Environmental Science & Technology*, 2012, 46(5): 2967-2975
- [43] Farmahin R, Manning G E, Crump D, et al. Amino acid sequence of the ligand-binding domain of the aryl hydrocarbon receptor 1 predicts sensitivity of wild birds to effects of dioxin-like compounds [J]. *Toxicological Sciences*, 2013, 131(1): 139-152
- [44] Karchner S I, Franks D G, Kennedy S W, et al. The molecular basis for differential dioxin sensitivity in birds: Role of the aryl hydrocarbon receptor [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2006, 103(16): 6252-6257
- [45] Cohen-Barnhouse A M, Zwiernik M J, Link J E, et al. Sensitivity of Japanese quail (*Coturnix japonica*), Common pheasant (*Phasianus colchicus*), and White leghorn chicken (*Gallus gallus domesticus*) embryos to *in ovo* exposure to TCDD, PeCDF, and TCDF [J]. *Toxicological Sciences*, 2011, 119(1): 93-103
- [46] Head J A, Hahn M E, Kennedy S W. Key amino acids in the aryl hydrocarbon receptor predict dioxin sensitivity in avian species [J]. *Environmental Science & Technology*, 2008, 42(19): 7535-7541
- [47] Goryo K, Suzuki A, Carpio C A D, et al. Identification of amino acid residues in the Ah receptor involved in ligand binding [J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2007, 354(2): 396-402
- [48] Ema M, Ohe N, Suzuki M, et al. Dioxin binding activities of polymorphic forms of mouse and human arylhydrocarbon receptors [J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 1994, 269(44): 27337-27343
- [49] Pandini A, Denison M S, Song Y J, et al. Structural and functional characterization of the aryl hydrocarbon receptor ligand binding domain by homology modeling and mutational analysis [J]. *Biochemistry*, 2007, 46(3): 696-708
- [50] Abnet C C, Tanguay R L, Hahn M E, et al. Two forms of aryl hydrocarbon receptor type 2 in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): Evidence for differential expression and enhancer specificity [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1999, 274(21): 15159-15166
- [51] Zhang R, Wang X X, Zhang X S, et al. Polychlorinated diphenylsulfides activate aryl hydrocarbon receptor 2 in

- zebrafish embryos: Potential mechanism of developmental toxicity [J]. *Environmental Science & Technology*, 2018, 52(7): 4402-4412
- [52] White D H, Hoffman D J. Effects of polychlorinated dibenzo-*p*-dioxins and dibenzofurans on nesting wood ducks (*Aix sponsa*) at Bayou Meto, Arkansas [J]. *Environmental Health Perspectives*, 1995, 103(Suppl.4): 37-39
- [53] Fujisawa N, Nakayama S M M, Ikenaka Y, et al. TCDD-induced chick cardiotoxicity is abolished by a selective cyclooxygenase-2 (COX-2) inhibitor NS398 [J]. *Archives of Toxicology*, 2014, 88(9): 1739-1748
- [54] Dong W, Matsumura F, Kullman S W. TCDD induced pericardial edema and relative COX-2 expression in medaka (*Oryzias latipes*) embryos [J]. *Toxicological Sciences*, 2010, 118(1): 213-223
- [55] Doering J A, Farmahin R, Wiseman S, et al. Differences in activation of aryl hydrocarbon receptors of white sturgeon relative to lake sturgeon are predicted by identities of key amino acids in the ligand binding domain [J]. *Environmental Science & Technology*, 2015, 49(7): 4681-4689
- [56] Tillitt D E, Buckler J A, Nicks D K, et al. Sensitivity of lake sturgeon (*Acipenser fulvescens*) early life stages to 2, 3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin and 3,3',4,4',5-pentachlorobiphenyl [J]. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 2017, 36(4): 988-998
- [57] Gunnarsson L, Jauhainen A, Kristiansson E, et al. Evolutionary conservation of human drug targets in organisms used for environmental risk assessments [J]. *Environmental Science & Technology*, 2008, 42(15): 5807-5813
- [58] LaLone C A, Villeneuve D L, Lyons D, et al. Editor's highlight: Sequence alignment to predict across species susceptibility (SeqAPASS): A web-based tool for addressing the challenges of cross-species extrapolation of chemical toxicity [J]. *Toxicological Sciences*, 2016, 153(2): 228-245
- [59] Zhang R, Zhang J J, Zhang X W, et al. *In vitro* dioxin-like potencies of HO-and MeO-PBDEs and inter-species sensitivity variation in birds [J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2016, 126: 202-210
- [60] Walker M K, Cook P M, Butterworth B C, et al. Potency of a complex mixture of polychlorinated dibenzo-*p*-dioxin, dibenzofuran, and biphenyl congeners compared to 2, 3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin in causing fish early life stage mortality [J]. *Fundamental and Applied Toxicology: Official Journal of the Society of Toxicology*, 1996, 30(2): 178-186
- [61] Wei F H, Li J Y, Zhang R, et al. Relative sensitivities among avian species to individual and mixtures of aryl hydrocarbon receptor-active compounds [J]. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 2016, 35(5): 1239-1246
- [62] Patlewicz G, Simon T W, Rowlands J C, et al. Proposing a scientific confidence framework to help support the application of adverse outcome pathways for regulatory purposes [J]. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 2015, 71(3): 463-477
- ◆