

DOI: 10.7524/AJE.1673-5897.20221126001

杨婧, 陈晓倩, 刘敏, 等. 鱼类急性毒性体外替代标准试验方法的应用与适用性评价[J]. 生态毒理学报, 2023, 18(4): 45-56

Yang J, Chen X Q, Liu M, et al. Application of standard *in vitro* alternative testing method for acute fish toxicity and evaluation on its applicability [J]. Asian Journal of Ecotoxicology, 2023, 18(4): 45-56 (in Chinese)

鱼类急性毒性体外替代标准试验方法的应用与适用性评价

杨婧^{*}, 陈晓倩[#], 刘敏, 沈璐, 赵华清, 殷浩文, 杨雪菲

上海市检测中心生物与安全检测实验室, 上海 201203

收稿日期: 2022-11-26 录用日期: 2022-12-16

摘要: 经济合作与发展组织(Organization for Economic Co-operation and Development, OECD)2021年颁布虹鳟鱼鳃上皮细胞系RTgill-W1急性毒性试验标准方法(OECD 249, 2021)作为鱼类急性毒性试验或其预试验的体外替代方法, 因试验体系小、通量高、周期短而具有良好的应用潜能。但方法被认为对神经毒物可能存在预测偏差, 尚无对金属化合物的应用报道。此外, 细胞毒性数据与鱼体内数据的相关性未知。目前尚无采用该标准方法的实际应用报道, 故方法实际适用性不明确。因此, 采用涵盖水生毒性试验常用参比物、金属化合物、神经毒物在内的10种化学品进行该方法应用评价研究。结果表明, 参照标准方法, 同一实验室结果具可重复性及再现性。除通过细胞凋亡途径导致毒性效应的多菌灵外, 其余化学品细胞急性毒性EC₅₀值与标准鱼种(OECD 203推荐鱼种及稀有鮕鲫)急性毒性LC₅₀值呈良好线性关系(相关系数(r^2)为0.7009~0.7975)。细胞急性毒性EC₅₀与鱼类急性毒性LC₅₀存在数值差异(差异在10倍以内), 但同一实验室采用标准方法建立化学品细胞毒性与标准鱼种的体内急性毒性良好转换关系后, 可通过细胞急性毒性准确预测鱼体内急性毒性。此外, OECD 249方法可拓展用于评估高分子量、难溶化学品是否可透过生物膜并产生毒性, 决定其登记申报时是否可豁免水生毒性试验。

关键词: 鱼类; 急性毒性; 体外替代试验; RTgill-W1

文章编号: 1673-5897(2023)4-045-12 中图分类号: X171.5 文献标识码: A

Application of Standard *in vitro* Alternative Testing Method for Acute Fish Toxicity and Evaluation on Its Applicability

Yang Jing^{*}, Chen Xiaoqian[#], Liu Min, Shen Lu, Zhao Huaqing, Yin Haowen, Yang Xuefei

Bioassay and Safety Assessment Laboratory, Shanghai Academy of Public Measurement, Shanghai 201203, China

Received 26 November 2022 accepted 16 December 2022

Abstract: As an alternative method of acute fish toxicity test or its range-finding test, a standard *in vitro* testing method by using gill epithelial cell lines of rainbow trout (OECD 249, 2021) has been published by Organization for Economic Co-operation and Development (OECD) in 2021. Due to the advantages of small test system, high throughput and short test period, this standard method showed good potential for application. However, it also has its limitations, e.g. maybe having predictive bias for neurotoxicants, and having no application for metal com-

基金项目: 上海市毒理学学会团体标准“化学品生物膜透性评估原则指南”(SHSOT-2020-B02); 上海市生态环境局“长三角生态绿色一体化发展示范区水乡客厅及周边区域环境质量调查和智能感知系统建设方案研究”(沪环科[2022]第22号)

第一作者: 杨婧(1982—), 女, 博士, 高级工程师, 研究方向为生态毒理学, E-mail: yangj@sapm-bsal.com

^{*} 通信作者(Corresponding author), E-mail: yangj@sapm-bsal.com

[#] 共同通信作者(Co-corresponding author), E-mail: chenxq@sapm-bsal.com

pounds. In addition, the correlation of cytotoxicity and acute fish toxicity, as well as its applicability in practical application is still unclear. Therefore, ten test chemicals including reference substance commonly used in aquatic toxicity test, metal compounds and neurotoxic substances have been used in this study to evaluate the applicability of OECD 249. The results indicated that RTgill-W1 cytotoxicity tests are repeatable and reproducible by using standard testing method (i.e. OECD 249) in the same laboratory. With the exception of carbendazim, which leads toxic effects in fish through the apoptotic pathway, there is a good linear relationship between the EC_{50} values of acute cytotoxicity of other chemicals and the LC_{50} values of acute toxicity by using standard fish species (i.e. test species recommended by OECD 203 and *Gobiocypris rarus*) (with the correlation coefficient (r^2) of 0.7009 to 0.7975). Although there were certain differences between EC_{50} values of cytotoxicity and LC_{50} values of acute fish toxicity (the difference was less than 10 folds), a good conversation relationship between cytotoxicity and *in vivo* acute toxicity by using standard fish species could still be established in the same laboratory, which means accurate prediction of fish LC_{50} maybe achieved by using EC_{50} of cytotoxicity. Furthermore, OECD 249 testing method can be also used to assess the possibility of toxicity produced by high molecular chemicals with limited water solubility and passing through biomembranes, and then determine whether *in vivo* aquatic toxicity tests can be waived for chemical registration.

Keywords: fish; acute toxicity; *in vitro* alternative test; RTgill-W1

2007 美国国家研究委员会(National Research Council, NRC)《21 世纪的毒性测试:愿景和策略》报告确定 21 世纪毒理学力推高通量、高灵敏度、低成本、预测能力强且准确的毒性测试策略主基调后,在欧美引领下迎来转化毒理学与体外替代技术数十年的迅猛发展。技术发展促进化学品管理法规与动物福利“3R 原则”进一步融合,国际化学品风险评估标准技术体系中体外替代测试方法的数量直线上升,标准化体外替代技术的关注对象亦从高等脊椎动物(如哺乳动物)逐渐扩展至所有脊椎动物,推动了生态毒理学领域的标准体外替代技术方法的研发。

OECD 于 2013 年颁布了鱼类胚胎急性毒性的标准技术方法^[1],并在欧盟化学品登记申报中成功替代部分鱼类急性毒性体内测试^[2]。2021 年,进一步推出虹鳉鱼鳃上皮细胞系 RTgill-W1 急性毒性标准试验方法(OECD 249, 2021)^[3]作为鱼类急性毒性试验或其预试验的体外替代标准方法,该方法为 ISO 标准(ISO 21115, 2019)^[4]的转化,相较胚胎急性毒性测试,体外细胞毒性试验方法进一步缩短试验周期、缩小试验体系、节约试验成本,提升测试通量,有利于应对不断涌现的新化学物质、新型污染物等给管理、测试及研究机构带来的巨大挑战。

然而,OECD 249 标准方法在化学品登记注册、风险评估与管理领域的应用与推广仍存在以下问题或局限:(1)方法相对较新,尚无采用该标准方法的实际应用报道,已有数据多源自方法开发机构的前

期研究,接种细胞数及操作过程均与标准方法存在一定差异,故标准方法在实际应用中的适用性有待评估;(2)方法开发^[5]时缺少金属化合物的毒性测试数据,可能局限其在该类物质毒性评估中的应用;(3)方法验证报告^[5]中大量引用非标准测试的文献结果,并通过个别化学品的细胞毒性结果与鱼体内急性毒性结果的偏离,得出方法对通过特定作用方式(如离子通道或脑组织受体)产生神经毒性作用的化学品不敏感^[3]的结论,而验证报告中诸如乙醇^[6]、六氯酚^[7]、鱼藤酮^[8]等通过特定离子通道及受体产生神经毒性物质的细胞毒性试验结果并不支撑上述结论;(4)验证报告^[5]中使用文献中的细胞急性毒性数据(即非标准方法获取的数据)与来自不同研究机构单一鱼种的一个或多个鱼类急性毒性试验数据进行线性拟合,拟合数据选取具较大不确定性,通过其拟合回归方程亦难于判断细胞急性毒性试验结果与鱼急性毒性数据的相关程度,局限了细胞急性毒性试验对鱼类急性毒性试验结果直接转化及准确预测。

针对上述问题,采用 OECD 249 标准方法基础上,使用方法推荐参比物质 3,4-二氯苯胺验证标准方法体系的稳定性及重现性,进一步研究 3,4-二氯苯胺、五水硫酸铜、重铬酸钾、2,3,6-三甲基苯酚、二苯甲酮、多菌灵、重铬酸钾、1,2-苯并异噻唑啉-3-酮、三氯生、三唑酮和三氯卡班等涵盖重金属、工业化学品、农药在内的化学品对 RTgill-W1 细胞的多终点急性毒性效应,其中,二苯甲酮^[9]、多菌灵^[10]、1,2-苯

并异噻唑啉-3-酮^[11]、三氯生^[12-13]、三氯卡班^[14]等通过特殊作用方式致神经毒性化学品。关注上述 10 种化学品体外细胞测试结果与鱼体内急性毒性数据的相关性,初步建立细胞急性毒性数据与标准鱼种急性毒性数据的转换关系,评价方法的适用性并探讨可能应用方向,以期为基于鱼细胞体外替代方法在化学品毒性评估中的应用提供参考。

1 材料与方法 (Materials and methods)

1.1 细胞系

虹鳟鱼鳃上皮细胞系 RTgill-W1 (ATCC® CRL-2523™)购自吉泰生物科技有限公司。

1.2 受试化学品和主要试剂

受试化学品 3,4-二氯苯胺 (98%)、重铬酸钾 (99.5%)购自西格玛奥德里奇(上海)贸易有限公司,五水硫酸铜(99%)、多菌灵(98%)购自国药集团化学试剂有限公司,2,3,6-三硝基苯酚(98%)、二苯甲酮

(99.5%)、1,2-苯并异噻唑啉-3-酮 (98%)、三氯生 (97%)、三唑酮(98%)和三氯卡班(98%)购自上海麦克林生化科技有限公司,以上化学品均为分析纯。受试化学品详细信息见表 1。

主要化学试剂二甲基亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO;HPLC 级)及生化试剂阿尔玛蓝细胞活性试剂(alarmarBlue™)、5-羧基荧光素二乙酸酯乙酰氧基甲酯(5-carboxyfluorescein diacetate, acetoxymethyl ester, 5-CFDA, AM)和中性红(Neutral Red)均购自赛默飞世尔科技(中国)有限公司。

1.3 主要仪器

恒温培养箱(美墨尔特 IPPplus 260,德国),全能酶标仪(美谷分子 Spectra Max M5,美国)。

1.4 细胞毒性试验

试验依照 OECD 249^[3]及 ISO 21115^[4]方法进行,同时测定比较 alamarBlue、5-CFDA,AM 及 Neutral Red 等 3 种分别指示线粒体代谢活性、细胞质膜

表 1 受试化学品信息
Table 1 Information for test chemicals

化学品名称 Chemical name	CAS 号 CAS No.	分子式 Molecular formula	水溶解度 Water solubility	辛醇水分配系数(lgK _{ow})
3,4-二氯苯胺(3,4-DCA) 3,4-dichloroaniline (3,4-DCA)	95-76-1	C ₆ H ₅ Cl ₂ N	580 mg·L ⁻¹ (20 ℃)	2.7
五水硫酸铜(CSP) Copper sulfate pentahydrate (CSP)	7758-99-8	CuSO ₄ · 5H ₂ O	220 g·L ⁻¹ (25 ℃)	—
2,3,6-三甲基苯酚(2,3,6-TMP) 2,3,6-trimethylphenol (2,3,6-TMP)	2416-94-6	C ₉ H ₁₂ O	1.42 g·L ⁻¹ (25 ℃)	2.72 (25 ℃)
二苯甲酮(BP) Benzophenone (BP)	119-61-9	C ₁₃ H ₁₀ O	23.9 mg·L ⁻¹ (20 ℃)	3.18 (25 ℃)
多菌灵(CBD) Carbendazim (CBD)	10605-21-7	C ₉ H ₉ N ₃ O ₂	8 mg·L ⁻¹ (pH=7, 24 ℃)	1.51 (pH=7, 25 ℃)
重铬酸钾(PD) Potassium dichromate (PD)	7778-50-9	K ₂ Cr ₂ O ₇	29.4 g·L ⁻¹ (20 ℃)	—
1,2-苯并异噻唑啉-3-酮(BIT) 1,2-benzothiazol-3-one (BIT)	2634-33-5	C ₇ H ₅ NOS	1.695 g·L ⁻¹ (pH=7, 20.1 ℃)	0.7 (pH=7, 20 ℃)
三氯生(TCS) Triclosan (TCS)	3380-34-5	C ₁₂ H ₇ Cl ₃ O ₂	6.5 mg·L ⁻¹ (pH=5, 20 ℃)	4.9 (pH=5, 20 ℃)
三唑酮(TAM) Triadimefon (TAM)	43121-43-3	C ₁₄ H ₁₆ ClN ₃ O ₂	71.7 mg·L ⁻¹ *	2.77*
三氯卡班(TCC) Triclocarban (TCC)	101-20-2	C ₁₃ H ₉ Cl ₃ N ₂ O	0.624 mg·L ⁻¹ (25 ℃)	3.63(25 ℃)

注:除“*”标注数据源自美国环境保护局 CompTox Chemical Dashboard 数据库,其余信息均源自欧洲化学品管理局登记注册卷宗;“—”表示无数据。

Note: All the information were collected from register dossier of European Chemicals Agency (ECHA), except data marked with “*” were collected from CompTox Chemical Dashboard of U.S. Environmental Protection Agency (US EPA); no date available marked with “—”.

完整性及溶酶体活性的荧光染料荧光信号在不同受试化学品暴露组与无受试化学品的对照组荧光差异,确定受试化学品暴露对 RTgill W1 细胞活性的影响,从而判断受试化学品的细胞急性毒性效应。

受试化学品的母液浓度为最高受试浓度的 200 倍,其中 3,4-二氯苯胺及五水硫酸铜的母液以灭菌去离子水配制,其余受试化学品的母液以 DMSO 作为溶剂。根据前期试验结果设置不同受试化学品的细胞毒性试验浓度组(表 2),每个浓度组设置 3 个生物学重复。以受试化学品 3,4-二氯苯胺作为阳性参比物,分别对 3 年内 5 个不同批次培养的细胞进行毒性试验,其余受试化学品仅用单一批次细胞进行毒性试验。

1.5 统计分析

依照 OECD 249^[3]方法进行数据计算,并采用 ToxRat Professional (Version 3.3)软件各终点半数效应浓度(median effect concentration, EC_{50})。采用 Origin 2018 软件进行剂量-效应曲线绘制、鱼类急性毒性 LC_{50} 及 RTgill-W1 细胞 EC_{50} 值的线性拟合。

2 结果 (Results)

2.1 试验体系的稳定性及结果可重复性研究

开展参比样品 3,4-二氯苯胺对 3 年内 5 个不同

批次培养的 RTgill-W1 细胞急性毒性试验, alamarBlue、5-CFDA、AM 及 Neutral Red 等 3 个终点的平均 EC_{50} 值分别为 (35.4 ± 2.7) 、 (36.9 ± 5.3) 及 (41.9 ± 3.7) $mg \cdot L^{-1}$ (表 3),与 OECD 249(3 个终点平均 EC_{50} 值分别为 (43.6 ± 6.1) 、 (62.5 ± 18.9) 及 (58.6 ± 18.6) $mg \cdot L^{-1}$)及 ISO 21115(3 个终点平均 EC_{50} 值分别为 (42.9 ± 5.7) 、 (62.6 ± 24.9) 及 (48.8 ± 10.0) $mg \cdot L^{-1}$)结果具可比性,平均值在水生急性毒性危害分级^[15]层面无差异。然而,RTgill-W1 急性毒性方法验证报告^[5]中 6 家比机构对于 3,4-二氯苯胺暴露下 alamarBlue、5-CFDA、AM 及 Neutral Red 等 3 个终点毒性进行了 3 次测试,剔除异常 EC_{50} 值后上述 3 个终点的实验室内变异范围分别为 4.3% ~ 29%、3.7% ~ 25% 及 1.2% ~ 41.5%、实验室间变异分别为 22.4%、44.0% 及 25.8%,表明 RTgill-W1 细胞急性毒性试验在不同实验室间的结果存在较大变异性,因此方法^[3-4]规定的可接受质控范围在 3 个终点平均 EC_{50} 值 2.5 倍 SD 范围内,绝对值可跨 1 个数量级,可能导致危害分级上的差异。本研究中 5 个不同批次培养细胞 3 个终点的变异在较小范围内,分别为 7.6%、14.4% 及 8.8%(表 3),表明同一实验室在标准方法及规范操作下长期开展 RTgill-W1 急性毒性试验,有利于保证试验的可重复性及结果再现性。

表 2 受试化学品试验浓度组设置

Table 2 Test concentrations for test chemicals

受试化学品 Test chemicals	配制浓度/($mg \cdot L^{-1}$) Nominal concentration/($mg \cdot L^{-1}$)	实测浓度/($mg \cdot L^{-1}$) Measured concentration/($mg \cdot L^{-1}$)
3,4-DCA ¹	0, 3.13, 6.25, 12.5, 25.0, 50.0, 100	—
CSP	0, 0.781, 1.56, 3.13, 6.25, 12.5, 25.0	—
2,3,6-TMP ²	0, 1.56, 3.13, 6.25, 12.5, 25.0, 50.0	—
BP ²	0, 1.56, 3.13, 6.25, 12.5, 25.0, 50.0	0, 1.20, 2.38, 4.90, 9.90, 19.6, 35.0
CBD ³	0, 0.205, 0.410, 0.820, 1.64, 3.28, 6.55	—
PD ¹	0, 50.0, 128, 205, 328, 525, 840	—
BIT ²	0, 1.53, 2.44, 3.91, 6.25, 10.0, 16.0	0, 1.53, 2.56, 3.93, 6.32, 10.0, 16.0
TCS ²	0, 0.150, 0.243, 0.394, 0.638, 1.03, 1.68	0, 0.180, 0.246, 0.345, 0.564, 0.800, 1.72
TAM ¹	0, 2.37, 3.55, 5.33, 8.00, 12.0, 18.0	—
TCC ²	0, 0.0338, 0.0507, 0.0760, 0.114, 0.171, 0.256	0, 0.0261, 0.0420, 0.0588, 0.0893, 0.138, 0.212

注:1 表示前期试验或已有文献证实化学品试验期间浓度可稳定维持可用配制浓度表述试验结果,“—”表示不进行浓度实测;2 表示受试化学品不稳定,试验结果以试验 0 h 及 24 h 实测浓度的几何平均值表示;3 表示受试化学品 24 h 内稳定但溶解度有限,最高浓度溶液经 0.22 μm 滤膜过滤后稀释成各试验浓度,以最高浓度组的初始实测浓度外推稀释试验系列浓度。

Note: 1 represents the test concentrations can be maintained and the nominal concentrations can be used to express the test results based on preliminary tests or existed studies, “—” means measured concentrations are not necessary; 2 represents test chemicals are unstable, and test results were expressed as the geometric mean values of the measured concentrations at 0 h and 24 h; 3 represents test chemical is stable within 24 h but its solubility is limited, the highest test solution was filtered by 0.22 μm filter membrane and then diluted to each test concentration, and the initial measured concentration of the highest test group was used to extrapolate the concentrations of the dilution test series.

表 3 3,4-二氯苯胺对 RTgill-W1 细胞的急性毒性
Table 3 Acute toxicity of 3,4-dichloroaniline to RTgill-W1 cell

效应终点 Endpoint	次数 No.	EC ₅₀ /(mg·L ⁻¹)	平均值±标准差/(mg·L ⁻¹) $\bar{x}\pm s$ /(mg·L ⁻¹)	变异系数(CV)/% Coefficient of variation (CV)/%
代谢活性 Metabolism activity (alamarBlue)	1	37.5	35.4±2.7	7.6
	2	37.7		
	3	35.8		
	4	31.0		
	5	35.0		
细胞质膜完整性 Plasma membrane integrity (5- CFDA,AM)	1	38.4	36.9±5.3	14.4
	2	38.4		
	3	40.5		
	4	27.5		
	5	39.8		
溶酶体功能 Function of lysosomes (Neutral Red)	1	41.8	41.9±3.7	8.8
	2	42.2		
	3	43.6		
	4	36.0		
	5	45.9		

2.2 10 种化学品对 RTgill-W1 细胞 3 个终点急性毒性效应研究

OECD 249^[3]方法综合考虑成本、操作便利度等因素选择了 alamarBlue、5-CFDA,AM 及 Neutral Red 等 3 种荧光染料作为细胞活性指示剂(见 1.4),以期从代谢活性、质膜完整性及溶酶体功能不同角度揭示化学品对 RTgill-W1 细胞的毒性作用。参与方法验证的 5 家实验室对 6 种化学品开展上述 3 个终点 RTgill-W1 细胞急性毒性测试,其中 2,2,2-三氯乙醇及马拉硫磷暴露下不同终点 EC₅₀ 值差异较大,上述 2 种化学品最敏感终点均为 alamarBlue^[5,16]。上述结果提示,因暴露化学品毒性作用的差异,可能导致终点效应的差异。本研究 10 种化学品暴露下,亦观察到了不同终点的效应差异,尽管细胞 3 个毒性终点的剂量-效应曲线趋势相似(图 1),但部分化学品 3 个终点的敏感性差异较大。如在五水硫酸铜及多菌灵暴露下,Neutral Red 这一终点较其他 2 个终点更为敏感。通常认为 Neutral Red 仅在活细胞中功能正常的溶酶体内积累,该荧光染料在活细胞存留还可反映质膜完整性及细胞代谢能量的充足性,涵盖了 alamarBlue 及 5-CFDA,AM 这 2 种染料关注的终点效应^[17]。一项关于铜对鲤鱼损害的研究表明,铜多分布于鲤鱼细胞的溶酶体中^[18]。虽无多菌灵暴露对鱼体溶酶体功能影响的相关报道,但有研究表明多菌灵暴露后雄性大鼠主要表现出富含溶酶体的

肝、肾组织功能异常^[19],已有研究证实作用于肝肾的药物会聚集在试验动物肝肾溶酶体内引发其功能异常^[20],溶酶体功能正常则可防止药物产生肾脏毒性^[21],由此可推测多菌灵造成肝肾异常可能与其对溶酶体功能的破坏有关。上述研究为五水硫酸铜及多菌灵暴露下 Neutral Red 这一染料指示终点更为敏感提供了依据,提示体外细胞急性毒性试验终点效应差异较大时,其敏感终点可能揭示化学品体内毒性机理。此外,3 个终点效应产生的实质均为化学品透过生物膜产生的毒性效应,可反映生物膜的完整性,我国《新化学物质环境管理登记指南》规定可豁免不可透过生物膜的难溶化学品的水生毒性试验,但未提供相应的生物膜透性评估方法,因此可采用 OECD 249 方法通过 RTgill-W1 细胞 3 个终点的响应,判断大分子量、难溶化学品透过生物膜产生毒性的可能,为该类化学品是否可豁免水生毒性试验提供判断依据。

10 种化学品 RTgill-W1 细胞急性毒性试验结果(表 4)表明,3 个终点的 EC₅₀ 值差异总体不具水生急性毒性危害分级^[15]差异。

2.3 RTgill-W1 细胞急性毒性数据与鱼类急性毒性数据的关联与转换

OECD 249^[3]标准方法推荐采用 3 种测试终点(见 2.1)EC₅₀ 值的最低值用于保守估计。而事实上,方法验证报告^[5]论述细胞与鱼体内数据相关性时,引

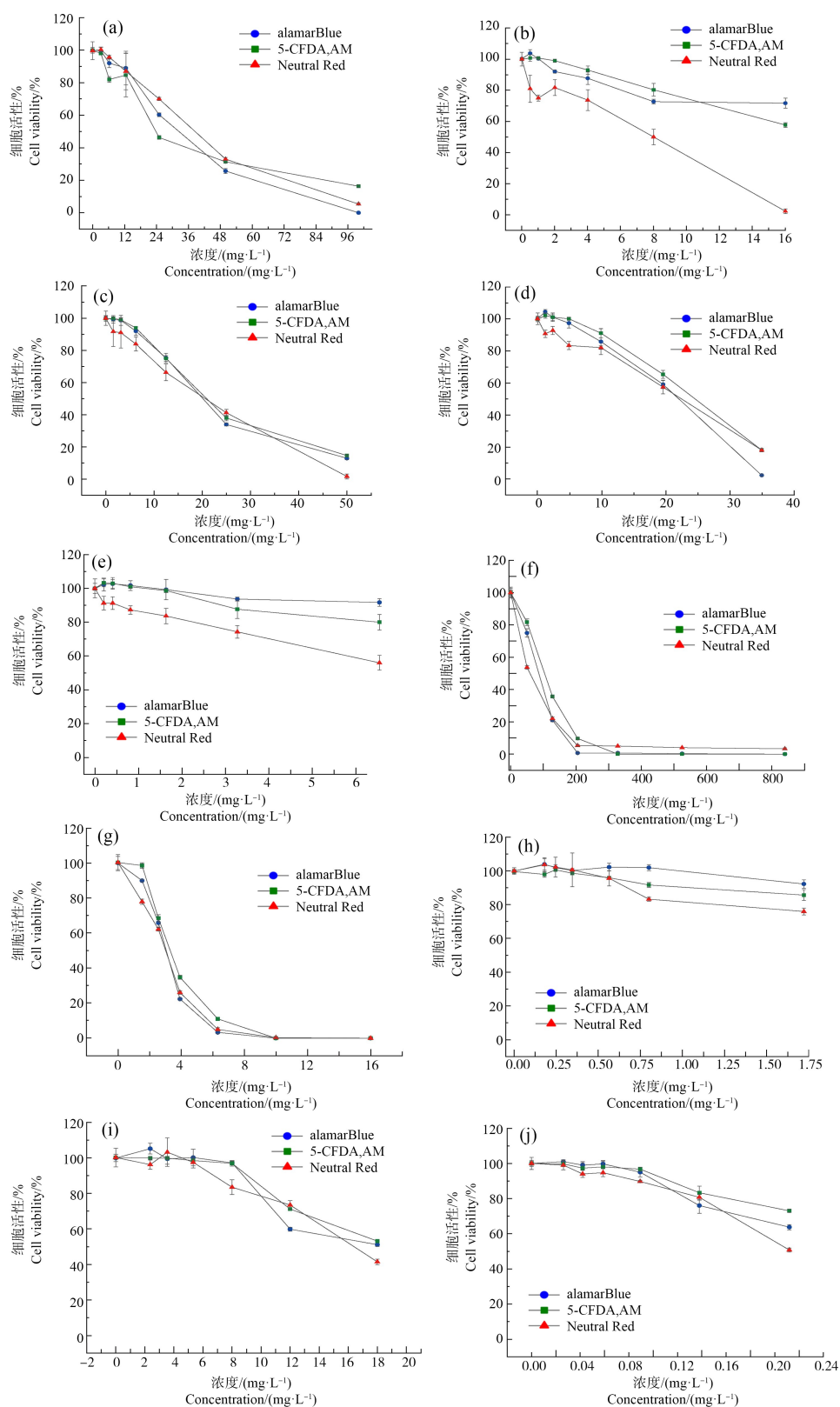


图1 3,4-DCA(a)、CSP(以CuSO₄计)(b)、2,3,6-TMP(c)、BP(d)、CBD(e)、PD(f)、BIT(g)、TCS(h)、TAM(i)及TCC(j)对RTgill-W1细胞的急性毒性效应

Fig. 1 Acute toxicity on RTgill-W1 cell lines induced by 3,4-DCA (a), CSP (concentration calculated by CuSO₄) (b), 2,3,6-TMP (c), BP (d), CBD (e), PD (f), BIT (g), TCS (h), TAM (i) and TCC (j)

表 4 受试化学品 RTgill-W1 细胞急性毒性测试结果
Table 4 Results of RTgill-W1 acute toxicity tests for test chemicals

受试化学品 Test chemicals	3 个测试终点 EC ₅₀ 值(95% 置信区间)/(mg·L ⁻¹) EC ₅₀ values (95% confidence interval) of three test endpoints/(mg·L ⁻¹)		
	alamarBlue	5-CFDA,AM	Neutral Red
3,4-DCA	31.0 (28.8 ~ 33.3)	27.5 (23.6 ~ 32.0)	36.0 (27.8 ~ 46.5)
CSP	23.9 (—)	13.0 (8.58 ~ 19.3)	8.13 (—)
2,3,6-TMP	19.6 (19.5 ~ 19.8)	20.5 (20.4 ~ 20.6)	19.7 (17.3 ~ 22.3)
BP	21.0 (16.7 ~ 26.1)	23.0 (20.5 ~ 25.8)	22.4 (17.2 ~ 29.2)
CBD	43.5 (—)	75.4 (—)	10.5 (4.13 ~ 25.6)
PD	76.1 (75.8 ~ 76.5)	96.2 (95.8 ~ 96.6)	55.1 (48.1 ~ 63.3)
BIT	2.97 (2.95 ~ 3.00)	3.24 (2.99 ~ 3.52)	2.81 (2.76 ~ 2.86)
TCS	1.92 (—)	>1.72 (—)	4.86 (—)
TAM	18.7 (16.1 ~ 21.9)	17.8 (13.8 ~ 23.0)	20.5 (16.8 ~ 25.0)
TCC	0.268 (0.204 ~ 0.349)	0.448 (—)	0.221 (0.186 ~ 0.261)

注:“—”表示软件计算结果无 95% 置信区间。
Note: “—” means 95% confidence interval cannot be calculated by software.

用文献研究的 67 种化学品^[22-23],多数化学品代谢活性(即 alamarBlue)终点的 EC₅₀ 值始终为最低值(即低于其他 2 个终点 EC₅₀ 值),少数化学品代谢活性 EC₅₀ 值与最低 EC₅₀ 值终点差异较小(即差异在 20% 内),提示方法验证所选化学品的细胞毒性表现可能相对单一,主要细胞毒性表现为代谢活性的抑制。因此,方法验证报告中仅采用代谢活性这一终点的数据探讨 RTgill-W1 细胞急性毒性数据与鱼体数据的相关性。此外,验证报告^[5]中 67 种化学品的 RTgill-W1 细胞急性毒性试验^[22-23]并未采用 OECD 249 标准方法,故获取的细胞 EC₅₀ 值存在不确定性,研究细胞 EC₅₀ 值与鱼体内急性毒性数据相关性时,鱼急性毒性 LC₅₀ 数据的选取并无统一规则:部分化学品采用了黑头软口鲮(*Pimephales promelas*)单一鱼种单个或多个数据^[22],其余则采用了涵盖斑马鱼(*Danio rerio*)、虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)或鲤鱼(*Cyprinus carpio*)等在内的不同鱼种的单一试验数据^[23]。因此,选取的鱼急性毒性 LC₅₀ 数值亦存在不确定性。因存在上述不确定性,验证报告进行细胞 EC₅₀ 及鱼急性毒性 LC₅₀ 线性回归拟合时,仅能采用适用数据有较大不确定性的戴明回归(Deming regression)获得拟合方程:鱼急性毒性 LC₅₀ 对数值 = (0.86±0.08)×细胞 EC₅₀ 对数值-(0.09±0.12),该回归不适合给出线性回归决定系数(coefficient of determination; R²),难于判断细胞急性毒性 EC₅₀ 值预测鱼急性毒性 LC₅₀ 的真实适用性。早在鱼类胚胎急性毒性标准方法^[1]研究中,已建立 X、Y 轴为定值且

相关性较好的体内与体外数据线性回归关系(即胚胎 LC₅₀ 对数值=(0.989×鱼急性毒性 LC₅₀ 对数值)-0.195, R²=0.92),如能通过研究建立与胚胎急性毒性相类似的 RTgill-W1 细胞与鱼类急性毒性的可靠转换关系,有利于推进 RTgill-W1 细胞急性毒性结果更好预测或替代鱼急性毒性试验结果^[24]。因此,尝试通过重复性好的标准操作体系、规范鱼急性毒性 LC₅₀ 值数据的选取方式降低回归拟合时细胞 EC₅₀ 值及鱼毒 LC₅₀ 值的不确定性,研究 RTgill-W1 细胞急性毒性 EC₅₀ 值数据与鱼类急性 LC₅₀ 的实际相关性以数据转换。

根据标准方法^[3]建议,采用 RTgill-W1 最敏感终点 EC₅₀ 值的对数作为线性拟合 X 轴数据点(即细胞 EC₅₀ 的对数值)。Y 轴数据点(即化学品鱼急性毒性 LC₅₀ 值)随鱼种不同存在一定差异,标准方法验证报告^[5]亦未统一鱼毒 LC₅₀ 数据选取方式。根据 ECHA 化学品安全评估系列指南文件^[25],当存在多个效应数据时,如数据均为同一物种的数据结果或各数据结果差异在 1 个数量级以内时可以采用多个效应数据的几何平均值,而通过检索美国环境保护局 ECOTOX 数据库及欧洲化学品管理局化学品登记注册卷宗发现本研究中 10 种化学品均有多个标准鱼种鱼类急性毒性 LC₅₀ 值,不同研究 LC₅₀ 值差异超过 1 个数量级,故需寻求几何平均值以外的多数据处理方式。OECD 249 验证报告^[5]引用的文献研究^[22-23]均表明,与各化学品 RTgill-W1 细胞急性毒性 EC₅₀

值相关性好的鱼体内急性毒性 LC_{50} 值总体处于所有标准鱼种数据的中间水平(即介于化学品不同鱼种鱼急性毒性 LC_{50} 值的最低值与最高值之间)。进一步分析 OECD 249 方法验证及多家实验室对比时引用的 6 种化学品^[5,17]鱼急性毒性 LC_{50} 值(表 5),均为黑头软口鲮的试验数据,而事实上 6 种化学有较多标准鱼种试验数据,数据差异可跨 1~2 个数量级,因此尝试分析各化学品对应所有标准鱼种 LC_{50} 的中位值。结果表明,除马拉硫磷外,其余 5 种化学品黑头软口鲮的 LC_{50} 值几乎与所有标准鱼种的 LC_{50} 的中位值相当,在危害分级^[15]上无本质差异。马拉硫磷所有标准试验鱼种的 LC_{50} 中位值 $2.23 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 与多数标准鱼种 96 h 鱼急性毒性 LC_{50} 水平^[26]相近,而马拉硫磷对黑头软口鲮的 LC_{50} 值($14.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)与多家实验室中马拉硫磷对 RTgill-W1 细胞的最低 EC_{50} 值($11.9 \pm 7.6 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)相近,推测细胞 EC_{50} 值与鱼毒 LC_{50} 值相近是 OECD 249 验证研究中选取线性拟合用鱼急性毒性 LC_{50} 的考虑因素之一。然而,RTgill-W1 细胞急性毒性试验开发的目的与意义为实现鱼类急性毒性 LC_{50} 值的预测或鱼体内试验的替代,因此在研究细胞 EC_{50} 与鱼急性毒性 LC_{50} 相关性时,不应根据细胞 EC_{50} 结果去选取适配的鱼急性毒性 LC_{50} 值,而应采用更为客观、相对统一方

式选取拟合用的鱼类急性毒性 LC_{50} 数据,相对而言,多鱼种的 LC_{50} 中位值比不同研究中单一鱼种单个或多个 LC_{50} 数据更有代表性及可操作性。综上,本研究采用美国环境保护局 ECOTOX 数据库及欧洲化学品管理局化学品登记注册卷宗收录的标准鱼种的急性毒性 LC_{50} 值中位值,对该值取对数后作为曲线拟合的 Y 轴数据点(即鱼毒 LC_{50} 的对数值)。

尽管涵盖 BP、CBD、BIT、TCS、TCC 等具神经毒性,RTgill-W1 细胞毒性试验可能存在预测偏差的化学品^[3-4],本研究中 10 种化学品的细胞 EC_{50} 值与国际标准鱼种的 LC_{50} 值仍具较好相关性, R^2 为 0.7009(图 2(a)),除多菌灵预测偏差较大外(细胞 EC_{50} 与鱼急性毒性 LC_{50} 的数值差异倍数达 31 倍),其余化学品细胞与鱼毒结果的差异均在 10 倍以内(0.939 倍~5.98 倍),细胞与鱼毒数据相关性优于 OECD 验证报告^[5]列举的源自文献[22]的主要验证数据(图 2(b)及(c))。上述结果表明,在标准方法下获取 RTgill-W1 细胞急性毒性数据,与国际标准试验鱼种的急性毒性 LC_{50} 具有较好相关性。

进一步比较 10 种化学品 RTgill-W1 细胞急性毒性 EC_{50} 与本实验室使用我国本土标准试验鱼种稀有鮕鲫及其胚胎获取的急性毒性 LC_{50} ^[27](图 3),细胞与稀有鮕鲫及其胚胎数据相关性较好, R^2 分别为

表 5 OECD 249 试验实验室对比中 6 种化学品对应的鱼类急性毒性 LC_{50} 值

Table 5 LC_{50} values of acute fish toxicity tests for six chemicals used in inter-laboratory comparison of OECD 249 testing method

化学品 Test chemicals	CAS 号 CAS number	鱼类急性毒性 LC_{50} 值($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)	
		LC_{50} values of acute fish toxicity tests($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)	
		黑头软口鲮 ¹ <i>Pimephales promelas</i> ¹	标准鱼种中位值 ² Median of all standard test species ²
2,2,2-三氯乙醇 2,2,2-trichloroethanol	115-20-8	298.1	202
1,2-二氯苯 1,2-dichlorobenzene	95-50-1	9.49	5.60
3,4-二氯苯胺 3,4-dichloroaniline	95-76-1	7.07	4.60
六氯酚 Hexachlorophene	70-30-4	0.021	0.0705
五氯酚 Pentachlorophenol	87-86-5	0.222	0.200
马拉硫磷 Malathion	121-75-5	14.1	2.23

注:1 表示 OECD 249 实验室对比研究^[5,17]引用数据,数据源自美国环境保护局黑头软口鲮数据库(U.S. EPA fathead minnow database)(<http://www.epa.gov/med/Prods Pubs/fathead minnow.htm>),如有 1 中化学品有多个 LC_{50} 值时,采用多个值的几何平均值;2 表示本研究调研的每种化学品不同鱼种 LC_{50} 数据的中位值,调研数据为美国环境保护局 ECOTOX 数据库及欧洲化学品管理局(European Chemicals Agency, ECHA)化学品登记注册卷宗中鱼类急性毒性标准方法推荐的所有标准鱼种数据。

Note: 1 represents data cited by validation and inter-lab comparison study^[5,17] of OECD 249, which collected from U.S. EPA fathead minnow database (<http://www.epa.gov/med/Prods Pubs/fathead minnow.htm>); if more than one LC_{50} value was available per chemical, the database lists the geometric mean; 2 represents median LC_{50} values of different test species for each chemical investigated in this study, all data were collected from U.S. EPA ECOTOX database and ECHA chemical registration dossier.

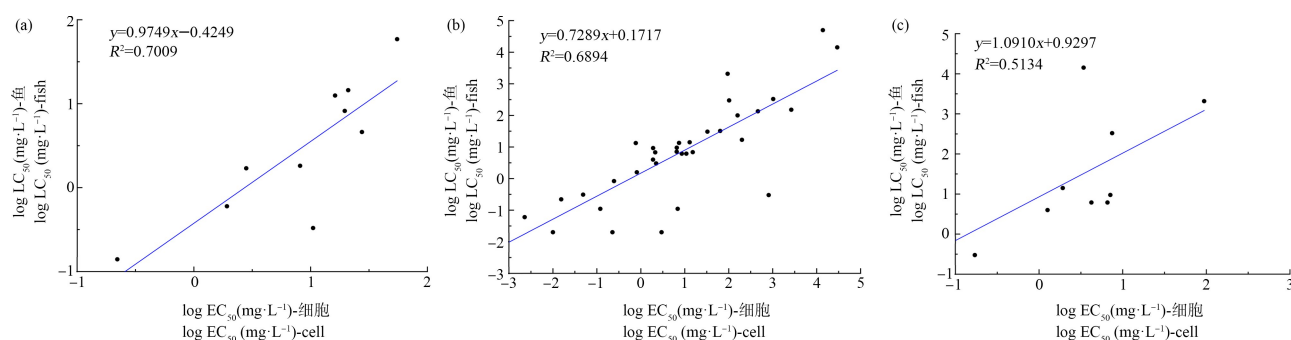


图2 本研究10种化学品(a)、OECD验证报告^[5]引用文献^[22]中的化学品(b)、OECD验证报告^[5]引用文献^[22]中随机(excel生成随机数)选取10个化学品(c)RTgill-W1细胞急性毒性试验最低EC₅₀值与标准鱼种鱼类急性毒性试验LC₅₀值的线性拟合

Fig. 2 Linear regression for the lowest EC₅₀ values of acute toxicity tests by using RTgill-W1 cell lines versus LC₅₀ values of acute fish toxicity tests by using standard test species with ten chemicals of this study (a), chemicals in research paper^[22] which cited by OECD validation report^[5] (b), ten chemicals randomly selected (random number generated by excel) from research paper^[22] which cited by OECD validation report^[5] (c)

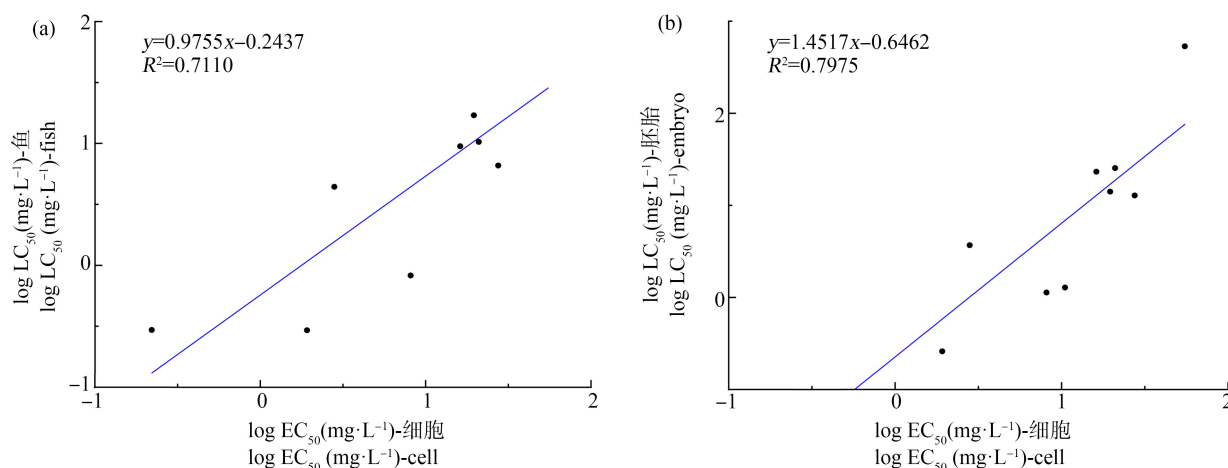


图3 本研究10种化学品对RTgill-W1细胞急性毒性试验最低EC₅₀值与对稀有鮕鲫^[27](a)、稀有鮕鲫胚胎^[27](b)急性毒性试验LC₅₀值的线性拟合

注:多菌灵暴露下,96 h内未观察到稀有鮕鲫死亡效应^[27],故该数据不用于曲线拟合。

Fig. 3 Linear regression for the lowest EC₅₀ values of acute toxicity tests by using RTgill-W1 cell lines versus LC₅₀ values of acute fish toxicity tests by using Chinese rare minnows (*Gobiocypris rarus*)^[27] (a) and its embryo^[27] (b) with ten chemicals of this study

Note: No mortality effect of Chinese rare minnows (*Gobiocypris rarus*) can be observed with exposure of carbendazim within 96 h^[27], and therefore, this data was excluded.

0.7110及0.7975,细胞EC₅₀与鱼及胚胎LC₅₀的倍数差异均在10倍以内(分别为0.478倍~9.84倍以及0.103倍~7.38倍)。已有文献证实^[27-29],多菌灵对不同标准试验鱼种的LC₅₀数值差异较大,结果可跨极毒(96 h-LC₅₀≤1 mg·L⁻¹)、高毒(96 h-LC₅₀为1~10 mg·L⁻¹)及中毒(96 h-LC₅₀为10~100 mg·L⁻¹)3个危害分级^[15]。本实验室研究(未发表)表明,多菌灵对稀有鮕鲫及斑马鱼具有延迟死亡效应,即死亡效应出现在96 h之后,一项多菌灵引起斑马鱼幼鱼

细胞凋亡的研究为2种鱼的死亡延迟提供了解释^[30]。同时,亦提示以代谢活性、质膜完整性及溶酶体功能为终点的RTgill-W1细胞急性毒性试验,在预测不对细胞活性产生急性毒性效应化学品的鱼类急性毒性LC₅₀上可能出现较大偏差,而具特定神经毒性作用的化学品可能不是导致结果偏差的主要原因。

3 讨论(Discussion)

生态毒理学领域标准体外替代方法数量较少,

以鱼类胚胎急性毒性试验(OECD 236)^[1]应用最多,从 2013 年方法开发至今已应用于数千种化学品的研究,方法与鱼类急性毒性试验的数据相关性亦被不断证实。在动物福利“3R 原则”考虑的推动下,欧盟在化学品与化妆品管理中致力于避免不必要动物试验并将其作为化学品最后的评估手段,尽管胚胎急性毒性试验方法应用局限尚不明确(毒性被胚胎急性毒性低估的化学品中基线毒性物质与反应性毒性物质无规律性差异)^[31],胚胎急性毒性试验已从化学品整合测试与评估方法中(integrated approach to testing and assessment, IATA)的部分测试转变为特定化学品水生危害评估中替代鱼类急性毒性试验的关键试验。预计虹鳟鱼鳃 RTgill-W1 细胞急性毒性标准试验方法(OECD 249)^[3]在积累一定应用实例后,亦可能在化妆品原料评估中作为鱼类急性毒性试验的关键替代试验。目前,与 OECD 236 标准方法仅能从化学品理化性质(如化学品辛醇-水分配系数、空气-水分配系数等)角度提出方法的适用范围^[31]类似,OECD 249 方法亦从化学品理化性质角度规定了方法适用范围^[5],较胚胎急性毒性试验有更广的适用范围,可适用于疏水性、挥发性强的化学品。OECD 249 方法亦未从化学品毒作用机制角度阐明方法应用局限,其验证报告^[5]中毒性被低估的物质不仅有神经毒性物质,还包括基线毒性物质,仅 2 个具神经毒性的物质与鱼类急性毒性数据差异 > 10 倍,故被认为对此类物质可能存在预测偏差。而验证报告^[5]中其他神经毒性物质与本研究 5 种具特殊神经毒性物质的 RTgill-W1 细胞急性毒性试验结果均表明,特殊神经毒性化学品并非导致毒性被细胞急性毒性试验体系低估的本质原因。因此,需采用标准方法及规范操作已减少操作及试验条件的差异导致的结果偏差,在确保结果重现性基础上积累不同化学品的应用数据,从毒作用机制角度对毒性被低估的化学品进行分析,逐步明确毒性可能被低估的化学品类别。为实现上述目的,欧洲化学工业委员会(European Chemical Industry Council, CEF-IC)发起一项为期 2 ~ 3 年的研究项目,致力于明确胚胎及细胞急性毒性试验的应用域并推进其在法规层面的应用。目前,OECD 验证报告^[5]及本研究中采用 OECD 249 标准方法研究的化学品数量有限,尚不足以从毒作用机制角度得出具有规律性的结果,但仍可为标准方法在法规层面的应用评估提供有效数据支撑。同时,本研究亦为 OECD 249 方法

的进一步完善、应用与发展提供了一定思路。

标准方法中 3,4-DCA 暴露下细胞毒性 EC_{50} 值制定的依据为多家比对实验室的 EC_{50} 值,因此限值的允许范围较宽,存在数量级的差异。而本研究表明,同一实验室根据 OECD 249 标准方法操作,可建立稳定性、重复性好的试验体系:不同批次培养细胞在 3,4-DCA 暴露下的 RTgill-W1 细胞毒性 EC_{50} 值变异较小,可有效避免因 EC_{50} 结果波动而致危害分级出现差异。RTgill-W1 细胞急性毒性相关研究表明,OECD 249 方法测定的 alamarBlue、5-CFDA、AM 及 Neutral Red 等 3 个终点 EC_{50} 值与标准鱼种鱼类急性毒性 LC_{50} 值中位值相近^[22-23]。OECD 验证报告^[5]例举的多数化学品中,alamarBlue 均为 3 个细胞测定终点中的敏感终点,有研究表明^[32],该终点敏感性低于噻唑蓝(methylthiazolyldiphenyl-tetrazolium bromide, MTT)法。本研究中依据 OECD 249 标准方法采用细胞急性毒性最低 EC_{50} 值已与国外标准鱼种 LC_{50} 中位值具良好线性关系,方法 3 个终点对通过细胞凋亡途径至鱼体毒性的多菌灵的敏感性较低。上述结果提示,OECD 249 的 3 个细胞测定终点可能敏感性偏低,导致部分化学品的毒性被低估,后续研究可考虑开发更敏感终点。未来采用更敏感终点研究细胞 EC_{50} 值与鱼急性毒性 LC_{50} 的相关性时,可尝试用分位数方法对多个鱼急性毒性 LC_{50} 值进行分类处理。本研究 10 种化学品 RTgill-W1 细胞急性毒性试验结果表明,RTgill-W1 细胞急性毒性在对涵盖金属化合物及特殊神经毒性作用化学品的预测上与标准鱼种的鱼类急性毒性试验结果总体差异较小。在标准方法下建立稳定的细胞毒性试验体系后,细胞急性毒性最低 EC_{50} 值与国外标准鱼种 LC_{50} 中位值以及同一实验室常用标准试验鱼种(如稀有鮕鲫)的 LC_{50} 值具较好相关性,可在同一实验室数据基础上建立 RTgill-W1 细胞急性毒性 EC_{50} 值与标准鱼种急性毒性 LC_{50} 值之间良好的线性回归关系后,实现细胞急性毒性 EC_{50} 值至鱼类急性毒性试验的 LC_{50} 值相对准确的转化。

此外,尚未在实验室建立细胞急性毒性 EC_{50} 值与标准鱼种急性毒性 LC_{50} 值的转换关系时,依据 OECD 249 方法获取的单一细胞急性毒性试验结果仍具有一定应用价值:(1)可替代鱼类急性毒性试验的预试验,节约常规鱼类急性毒性试验的周期并减少试验用鱼数量;(2)可用于预测鱼类急性毒性试验的 LC_{50} ,尤其对预测软件应用域范围外的化学品,

RTgill-W1 细胞急性毒性的预测结果具有一定可靠性;(3)可通过3个细胞毒性终点对化学品的响应,评估分子量大的难溶化学品透过生物膜产生水生毒性的可能性,据此决定该化学品是否可在化学登记申报中豁免水生毒性试验,为我国《新化学物质环境管理登记指南》中的生物膜透性评估提供具体可行的技术手段。

综上,认为 OECD 249 方法具有良好应用前景及应用潜能,经应用数据积累,可实现鱼类急性毒性试验结果相对可靠的预测,但完全替代鱼类急性毒性试验应用于化学品登记注册法规层面尚需时日。

未来工作中,可对方法进行以下完善与发展:(1)开发更敏感且操作便捷的细胞急性毒性测定终点,提高细胞毒性检测的敏感性,以减少在细胞毒性评估中毒性被低估的化学品数量;(2)考虑不同鱼种细胞的敏感性差异^[33-34],建立源自我国本土鱼种稀有鮡鲫可稳定传代的细胞系,开展相应的标准化急性毒性研究;(3)在标准方法应用数据积累的基础上,进一步完善细胞急性毒性试验与标准鱼种急性毒性试验结果间的转换。通过上述工作为体外替代标准技术在我国化学品管理中的应用提供有力支撑,提升我国在国际化学品管理中的影响力及话语权。

通信作者简介:杨婧(1982—),女,高级工程师,主要研究方向为生态毒理学。

共同通信作者简介:陈晓倩(1975—),女,高级工程师,主要研究方向为生态毒理学。

参考文献(References):

- [1] Organization for Economic Cooperation and Development (OECD). OECD guidelines for the testing of chemicals. Section 2: Effects on biotic systems test No. 236: Fish embryo acute toxicity (FET) test [S]. Paris: OECD, 2013
- [2] Organization for Economic Cooperation and Development (OECD). OECD guidelines for the testing of chemicals. Section 2: Effects on biotic systems test No. 203: Fish, acute toxicity test [S]. Paris: OECD, 2019
- [3] Organization for Economic Cooperation and Development (OECD). OECD guidelines for the testing of chemicals. Section 2: Effects on biotic systems test No. 249: Fish cell line acute toxicity: The RTgill-W1 cell line assay [S]. Paris: OECD, 2021
- [4] International Standardization Organization (ISO). ISO 21115, Water quality-Determination of the acute toxicity of water samples and chemicals to fish gill cell line (RT-gill-W1) [S]. Geneva: ISO, 2019
- [5] Organization for Economic Cooperation and Development (OECD). Series on testing and assessment, No. 334: Validation report for the test guideline 249 on fish cell line acute toxicity-the RTgill W1 cell line assay [S]. Paris: OECD, 2021
- [6] Lovinger D M, White G, Weight F F. Ethanol inhibition of neuronal glutamate receptor function [J]. *Annals of Medicine*, 1990, 22(4): 247-252
- [7] Zheng Y M, Zhu X J, Zhou P Z, et al. Hexachlorophene is a potent KCNQ1/KCNE1 potassium channel activator which rescues LQTs mutants [J]. *PLoS One*, 2012, 7(12): e51820
- [8] Pal R, Monroe T O, Palmieri M, et al. Rotenone induces neurotoxicity through Rac1-dependent activation of NADPH oxidase in SHSY-5Y cells [J]. *FEBS Letters*, 2014, 588(3): 472-481
- [9] Wnuk A, Rzemieniec J, Lasoń W, et al. Benzophenone-3 impairs autophagy, alters epigenetic status, and disrupts retinoid X receptor signaling in apoptotic neuronal cells [J]. *Molecular Neurobiology*, 2018, 55(6): 5059-5074
- [10] Zhang W J, Fan R Q, Luo S L, et al. Antagonistic effects and mechanisms of carbendazim and chlorpyrifos on the neurobehavior of larval zebrafish [J]. *Chemosphere*, 2022, 293: 133522
- [11] Kim D, Kim E H, Bae O N. Comparative study of two isothiazolinone biocides, 1,2-benzisothiazolin-3-one (BIT) and 4,5-dichloro-2-n-octyl-isothiazolin-3-one (DCOIT), on barrier function and mitochondrial bioenergetics using murine brain endothelial cell line (bEND.3) [J]. *Journal of Toxicology and Environmental Health Part A*, 2021, 84(22): 932-943
- [12] Wang D T, Wang X D, Huang H S, et al. Triclosan regulates alternative splicing events of nerve-related genes through RNA-binding protein CELF₂ to induce zebrafish neurotoxicity [J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2021, 413: 125414
- [13] Szychowski K A, Wnuk A, Rzemieniec J, et al. Triclosan-evoked neurotoxicity involves NMDAR subunits with the specific role of GluN2A in caspase-3-dependent apoptosis [J]. *Molecular Neurobiology*, 2019, 56(1): 1-12
- [14] Kajta M, Rzemieniec J, Wnuk A, et al. Triclocarban impairs autophagy in neuronal cells and disrupts estrogen receptor signaling via hypermethylation of specific genes [J]. *The Science of the Total Environment*, 2020, 701: 134818
- [15] 中华人民共和国环境保护部. 新化学物质危害评估准

- 则: HJ/T 154—2004 [S]. 北京: 中国环境科学出版社, 2004
- [16] Fischer M, Belanger S E, Berckmans P, et al. Repeatability and reproducibility of the RTgill-W1 cell line assay for predicting fish acute toxicity [J]. *Toxicological Sciences: An Official Journal of the Society of Toxicology*, 2019, 169(2): 353-364
- [17] Dayeh V R, Schirmer K, Lee L E J, et al. Rainbow Trout Gill Cell Line Microplate Cytotoxicity Test [M]// Blaise C, Féraud J F. *Small-scale Freshwater Toxicity Investigations*. Berlin/Heidelberg: Springer-Verlag, 2005: 473-503
- [18] 王利, 汪开毓. 铜对鲤损害的电镜 X 射线显微分析[J]. *水生生态学杂志*, 2009, 30(5): 67-70
- Wang L, Wang K Y. Studies on electron probe X-ray microanalysis of copper in poisoned *Cyprinus carpio* [J]. *Journal of Hydroecology*, 2009, 30(5): 67-70 (in Chinese)
- [19] Selmanoglu G, Barlas N, Songür S, et al. Carbendazim-induced haematological, biochemical and histopathological changes to the liver and kidney of male rats [J]. *Human Experimental Toxicology*, 2001, 20(12): 625-630
- [20] Schneider P. Drug-induced lysosomal disorders in laboratory animals: New substances acting on lysosomes [J]. *Archives of Toxicology*, 1992, 66(1): 23-33
- [21] 郭晓燕, 杨陈, 刘华锋. 溶酶体与肾脏疾病[J]. *中华肾脏病杂志*, 2019, 35(8): 635-640
- Guo X Y, Yang C, Liu H F. Lysosomes and kidney diseases [J]. *Chinese Journal of Nephrology*, 2019, 35(8): 635-640 (in Chinese)
- [22] Tanneberger K, Knöbel M, Busser F J, et al. Predicting fish acute toxicity using a fish gill cell line-based toxicity assay [J]. *Environmental Science & Technology*, 2013, 47(2): 1110-1119
- [23] Natsch A, Laue H, Haupt T, et al. Accurate prediction of acute fish toxicity of fragrance chemicals with the RTgill-W1 cell assay [J]. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 2018, 37(3): 931-941
- [24] Belanger S E, Rawlings J M, Carr G J. Use of fish embryo toxicity tests for the prediction of acute fish toxicity to chemicals [J]. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 2013, 32(8): 1768-1783
- [25] European Chemicals Agency (ECHA). Guidance on information requirements and chemical safety assessment: Chapter R.10: Characterisation of dose [concentration]-response for environment [S]. Helsinki, Finland: ECHA, 2008
- [26] Deka S, Mahanta R. Malathion toxicity on fish-A review [J]. *International Journal of Current Research*, 2016, 8(12): 44120-44128
- [27] 王绿平, 张京佶, 赵华清. 稀有鮡鲫作为鱼类胚胎急性毒性试验受试鱼种的敏感性研究[J]. *生态毒理学报*, 2021, 16(5): 102-112
- Wang L P, Zhang J J, Zhao H Q. Sensitivity of Chinese rare minnows (*Gobiocypris rarus*) for fish embryo acute toxicity test [J]. *Asian Journal of Ecotoxicology*, 2021, 16(5): 102-112 (in Chinese)
- [28] Palawski D U, Knowles C O. Toxicological studies of benomyl and carbendazim in rainbow trout, channel catfish and bluegills [J]. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 1986, 5(12): 1039-1046
- [29] University of Hertfordshire. Pesticide Properties DataBase (PPDB): Carbendazim (Ref: BAS 346F) [EB/OL]. (2021-06-01) [2021-02-02]. <http://sitem.herts.ac.uk/aeru/ppdb/en/Reports/116.htm>
- [30] Jiang J H, Wu S G, Wang Y H, et al. Carbendazim has the potential to induce oxidative stress, apoptosis, immunotoxicity and endocrine disruption during zebrafish larvae development [J]. *Toxicology in Vitro*, 2015, 29(7): 1473-1481
- [31] Scholz S, Klüver N, Kühne R. Analysis of the relevance and adequateness of using fish embryo acute toxicity (FET) test guidance (OECD 236) to fulfil the information requirements and addressing concerns under REACH [R]. Helsinki, Finland: European Chemicals Agency, 2016
- [32] di Nunzio M, Valli V, Tomás-Cobos L, et al. Is cytotoxicity a determinant of the different *in vitro* and *in vivo* effects of bioactives? [J]. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 2017, 17(1): 453
- [33] Wang Y C, Chaung R H, Tung L C. Comparison of the cytotoxicity induced by different exposure to sodium arsenite in two fish cell lines [J]. *Aquatic Toxicology*, 2004, 69(1): 67-79
- [34] Bermejo-Nogales A, Fernández-Cruz M L, Navas J M. Fish cell lines as a tool for the ecotoxicity assessment and ranking of engineered nanomaterials [J]. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 2017, 90: 297-307 ◆