

DOI: 10.7524/AJE.1673-5897.20231007001

张硕, 韩颖楠, 李娜, 等. 水环境样品体外生物测试效应触发值的研究进展[J]. 生态毒理学报, 2024, 19(1): 17-30

Zhang S, Han Y N, Li N, et al. Research progress on effect-based trigger values for *in vitro* bioassays of environmental water samples [J]. Asian Journal of Ecotoxicology, 2024, 19(1): 17-30 (in Chinese)

水环境样品体外生物测试效应触发值的研究进展

张硕^{1,2,3}, 韩颖楠^{1,2}, 李娜^{1,2}, 马梅^{1,2,3,*}

1. 中国科学院生态环境研究中心中国科学院饮用水科学与技术重点实验室, 北京 100085

2. 中国科学院生态环境研究中心环境水质学国家重点实验室, 北京 100085

3. 中国科学院大学, 北京 100049

收稿日期: 2023-10-07 录用日期: 2023-12-28

摘要: 水环境样品综合毒性的体外生物测试可以直接获得水环境中众多污染物共存状态下的生物毒害信息, 已成为水环境污染评估和诊断的重要手段之一。但由于目前没有用于判定水质优劣的毒性效应限值标准, 导致其很难被用于水质管理。为此, 越来越多的研究聚焦于推导体外生物测试的效应触发值(effect-based trigger value, EBT)。本文综述了 EBT 建立的背景和推导原则, 并总结了以健康保护为目标和以生态保护为目标的多种 EBT 推导方法, 其中针对饮用水水质的 EBT 以保护人体健康为前提, 主要基于每日容许摄入量(allowable daily intake, ADI)、体内安全浓度、癌症发病率增加 10% 的每日剂量(TD₁₀)和环境质量标准(environmental quality standard, EQS)中的水质指导值(guideline value, GV)推导, 针对地表水的 EBT 以生态保护为目标, 依据地表水 EQS 中的 GV 值和物种敏感度分布(SSD)曲线中的第 5 个百分位数的危险浓度(hazardous concentration, HC₅)推导。本文系统比较了不同方法推导出的体外生物测试 EBT 值和特征, 总结了 EBT 在水环境中的应用, 以期高通量体外生物测试用于水质评估提供理论依据和技术支撑。

关键词: 效应触发值; 体外生物测试; 毒作用模式; 内分泌干扰效应; 遗传毒性; 基线毒性

文章编号: 1673-5897(2024)1-017-14 中图分类号: X171.5 文献标识码: A

Research Progress on Effect-Based Trigger Values for *in vitro* Bioassays of Environmental Water Samples

Zhang Shuo^{1,2,3}, Han Yingnan^{1,2}, Li Na^{1,2}, Ma Mei^{1,2,3,*}

1. Key Laboratory of Drinking Water Science and Technology, Research Center for Eco-Environmental Sciences, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100085, China

2. State Key Laboratory of Environmental Aquatic Chemistry, Research Center for Eco-Environmental Sciences, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100085, China

3. University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China

Received 7 October 2023 accepted 28 December 2023

Abstract: *In vitro* bioassays can directly obtain the toxicity information of numerous coexisting pollutants in water environment, and has become one of the important means for toxic effect evaluations and diagnosis. However, due to the lack of toxicity effect limit standards for determining the water quality, it is difficult to use bioassays for wa-

基金项目: 国家自然科学基金重点项目(52030003); 国家自然科学基金青年基金(42007227); 国家自然科学基金面上项目(41977208)

第一作者: 张硕(1997—), 男, 博士研究生, 研究方向为水生态毒理学, E-mail: shozhang_st@rcees.ac.cn

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

ter quality management. Therefore, more and more research is focusing on deriving the effect-based trigger values (EBTs) of *in vitro* bioassays. This paper reviews the establishment background and derivation principles of EBTs, and summarizes a variety of derivation methods of EBTs. At present, the methods of derivation of EBTs are divided into two categories according to the protection objectives, one is the health protection objective and the other is the ecological protection objective. EBTs for drinking water are based on the premise of protecting human health and are based on allowable daily intake (ADI), *in vivo* safe concentration, daily dose of 10% increase in cancer incidence (TD_{10}) and guideline values (GV) in environmental quality standard (EQS). While, EBTs for surface water, aiming at ecological protection, were derived based on GV values in the EQS and hazardous concentrations at the 5th percentile (HC_5) of the species sensitivity distribution (SSD). Derivation of EBTs from GV and HC_5 are two widely used frameworks. The former is dedicated to reading EBT values from GV of EQS and trying to establish derivation methods that can be widely applied to various toxicity endpoints. The latter is to obtain HC_5 values of positive compounds from the species sensitivity curve. At the same time, combined with the background parameters of the water body to be measured, the EBT value of the protection ecosystem was derived. This paper compares the EBT values and characteristics derived from different methods for *in vitro* bioassays and summarizes the application of EBTs in water environments in order to provide theoretical basis and technical support for high-throughput *in vitro* bioassays for water quality assessment.

Keywords: effect-based trigger values; *in vitro* bioassay; mode of action; endocrine disruption; genotoxicity; baseline toxicity

根据美国化学文摘数据库 (Chemical Abstract Service Database), 截至 2023 年 9 月, 世界范围内备案登记的化合物数量已经接近 2.8 亿种, 每年增加的化学物质数量数以万计, 随着城市化和工业化进程的迅速发展, 每年有超过 3 亿 t 化合物随工农业用水、生活用水和地面径流等途径汇入环境水体^[1]。水环境中检出的化合物种类繁多^[2-7], 这些低浓度化合物以复杂的混合物形式存在于水环境中, 长期低剂量暴露会对人体健康和生态安全造成显著威胁^[8-10], 仅依靠化学分析可能会低估不利影响。生物测试聚焦特定毒性终点的效应化合物, 可以得到混合组分的综合毒性效应信息^[11-14], 综合考虑化合物的生物有效性、构建化合物组分与不良生物影响间的相关性^[15]。随着 3R 原则 (Reduction, Replacement, Refinement)^[16]的提出和高通量测试的发展, 已开发出大量体外生物测试方法替代动物实验, 体外生物测试逐渐成为今后水质评估的重要补充手段^[17-19]。

应用体外生物测试量化水环境样品的生物效应时, 通常使用生物当量浓度 (bioanalytical equivalents, BEQ) 表征多组分联合毒作用, 使得相同毒作用模式 (mode of action, MoA) 的生物测定之间的效果具有可比性^[20]。何种效应水平的毒性当量可以接受, 这个问题制约了体外测试的推广与应用。目前, 体外

生物测试阈值的建立逐渐成为毒理学领域的热点关注问题^[21-24], 有必要推导出针对水环境样品的体外生物测试阈值^[25], 即效应触发值 (effect-based trigger values, EBT)。通过比较特定终点的 BEQ 与 EBT 值, 可以帮助我们在一定程度上确定水体在该终点的安全性, 同时有助于体外生物测试在今后水质评估中使用和推广^[26]。

目前研究推导 EBT 的方法按照保护目标分为两大类, (1) 健康保护目标, (2) 生态保护目标。其中针对饮用水的 EBT 以保护人体健康为前提, 基于每日容许摄入量 (allowable daily intake, ADI)、体内安全浓度、癌症发病率增加 10% 的每日剂量 (TD_{10}) 和环境质量标准 (environmental quality standard, EQS) 中的水质指导值 (guideline values, GV) 推导。天然水体的 EBT 值依据地表水 EQS 中的 GV 和物种敏感度分布 (species sensitive distribution, SSD) 曲线中的第 5 个百分位数的危险浓度 (hazardous concentration, HC_5) 推导, 以生态健康保护为目标。根据 EQS 中 GV 值和 SSD 曲线中的 HC_5 值推导 EBT 是目前应用广泛的 2 种方法框架, 前者致力于依据 EQS 中的 GV 值作为数据基础推导 EBT 值, 并试图建立可以广泛适用于各种毒性终点的推导方法^[24], 后者从物种敏感度分布曲线中获得阳性化合物的 HC_5 值, 同时结合待测水体的背景参数, 推导出保护生态系

统的 EBT 值^[27-28]。本文依据当前 EBT 的研究需要,总结了 EBT 概念的提出与发展过程中取得的进展,综述了近年来水环境样品体外生物测试 EBT 的推导和计算方法,并概述了 EBT 在水环境中的应用,试图为今后体外生物测试形成系统的 EBT 制定方法提供参考。

1 效应触发值的影响因素 (Influence factors of effect-based trigger values)

1.1 保护目标

目前,高通量体外生物测试已经应用于饮用水、再生水和污水等不同类型的水体^[17,19,29-30],由于水质保护目标不同,推导出的 EBT 存在差异,例如 ADI 作为人体摄入某种化学物质的安全浓度,推导得到的 EBT 可作为保护人体健康的依据;而 HC₅ 作为生态风险中的概念,基于 HC₅ 得到的 EBT 值适用于水生生物的保护,应当根据不同水体和保护目标选择适用的 EBT 值^[31]。同时,不同地区水体背景值存在差异,建议在当地参考点采取具有针对性的背景研究,或在一定范围内(国家或地区)采集多个背景点位的数据,以这些背景 BEQ 的平均值作为推导 EBT 的参考^[32]。

1.2 毒性终点

目前水环境样品的体外生物测试方法涉及多种毒性终点^[33],分为特异性终点和非特异性终点,其中非特异性终点还包括反应性毒性终点和基线毒性终点。不同毒性终点的 BEQ 无法相互比较,因此在推导 EBT 时,需要对不同类型的终点分别建立推导方法。研究发现对于特异性毒性终点,如雌激素(ER)和雄激素(AR)等效应,通常存在几个高度生物活性的分子(天然激素或合成药物),它们的毒性加和很大程度上可以解释水样的混合效应^[34-35],因此针对特异性终点的 EBT 推导,仅参考阳性化合物的数据得到的 EBT 值与使用多个活性化合物数据推导出的 EBT 值相近^[24,36],在缺乏效应化合物数据时,可以仅使用阳性化合物数据替代计算 EBT 值。而对于氧化应激、遗传毒性等反应性终点和基线毒性等非特异性终点,研究表明目前已知的效应化合物计算的效应也只能解释极小部分混合效应,通常 < 1%^[21,37],所以针对反应性终点和非特异性终点,使用少数效应化合物无法代表混合物的整体毒性效应,可以采用额外的混合因子来估算这类生物测定的体外生物测试 EBT^[24]。

2 效应触发值的推导方法 (Methods of deriving effect-based trigger values)

目前研究推导 EBT 的方法按照保护目标分为两大类,(1)健康保护目标,包括 ADI 推算法,体内安全浓度推算法,癌症发病率可接受剂量法和环境质量标准法。(2)生态保护目标,包括环境质量标准法和物种敏感度分布曲线法。依据不同毒性数据推导 EBT 值的路线如图 1 所示。

2.1 基于人体健康保护的效应触发值

每日容许摄入量(allowable daily intake, ADI)是根据一组动物毒性试验中得出的无观测效应浓度(NOEC)推断出的化合物经口摄入安全阈值^[38-40],大量研究使用阳性化合物 ADI 值推导饮用水经口摄入的浓度阈值,其中主要的方法是将阳性化合物的 ADI 转化为 BEQ,并作为对应终点的 EBT,目前该方法推导出的 EBT 值仅涉及人体健康相关的“内分泌干扰效应”。Been 等^[41]针对内分泌干扰效应的 CALUX 测试,根据阳性化合物及多种效应化合物的 ADI 计算出各化合物的 BEQ,并通过体外生物测试的相对效力(relative effect potencies, REPs)转化为阳性化合物的 BEQ。由于活体与体外生物测试 REP 的差异,导致依据不同化合物 ADI 得到的 BEQ 差异较大,筛选出 BEQ/EC₅₀(或 LOEC)<0.1 的数据,以减少活体与体外生物测试的 REP 差异,最终对 BEQ 进行对数正态分布拟合,取拟合的第 5 个百分点数作为该终点的 EBT 值。

此外,部分研究基于化合物内暴露安全剂量等同于体外测试暴露安全剂量的假设,提出参考体内安全浓度(*in vivo* safe concentration)的 EBT 推算方法。Brand 等^[42]基于体内安全浓度推导 EBT,考虑到人体对不同化合物吸收和代谢过程的差异,分别对阳性化合物和未知效应化合物使用对应的吸收分数与蛋白未结合分数,其中未知效应化合物的吸收分数与蛋白未结合分数取值为除阳性化合物外的已知典型活性化合物参数的最大值,最终将阳性化合物的体内安全浓度转化为对应终点的 EBT 值。

对于遗传毒性化合物,不符合毒性加和模型,但可以使用致癌效力数据库(CPDB, 2019)中报告的 TD₁₀ 值来确定(TD₁₀ 值是指有毒物质导致实验动物癌症发病率增加 10% 的每日剂量)推导 EBT^[43]。但是,鉴于数据库中可参考的致癌效力数据较少,基于该方法估算遗传毒性体外生物测试 EBT 值的工作受限。

综上所述,目前基于 ADI 和体内安全浓度已推导出多种内分泌干扰效应 CALUX 测试的 EBT 值。这 2 种推导方法的结果总体差异较小,例如对于 AR-CALUX、PR-CALUX 和 GR-CALUX 内分泌干扰效应检测方法,2 种方法推导结果的差异可控制在一个数量级以内;但是对于 ER-CALUX,不同测试方法间的差异较大,与 Been 等^[41]依据 ADI 推导的 ER-CALUX 的 EBT 值 $0.25 \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$ (以 EEQ 计)相比,Brand 等^[42]依据体内安全浓度得到的 EBT 值为 $3.8 \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$ (以 EEQ 计),差距在一个数量级以上,可能的原因是体内安全浓度法对未知效应化合物的结合分数和蛋白未结合分数按照已知效应化合物的最大值计算,而 ADI 法则综合考虑所有符合条件的效应化合物的影响,雌激素活性化合物相关的数据量大,目前体内安全浓度法的参数取值没有反映出雌

激素效应化合物的平均水平,因此造成 2 种方法得到的 EBT 值差异显著。综上所述,依据 ADI 推算法、体内安全浓度法和癌症发病率可接受相关剂量法得到的 EBT 聚焦于保护人体健康,可以作为饮用水体外生物测试的阈值标准,但需要大量的化合物 ADI、 TD_{10} 、REP 和 ADME(吸收、分布、代谢和排泄)参数作为数据基础。

2.2 基于环境质量的效应触发值

环境质量标准(environmental quality standard, EQS)规定了环境中化学物质水质指导值(guide-line values, GVs),是适用于不同国家或地区的针对性指标,是推算水环境样品体外生物测试 EBT 值的重要数据来源。

以雌激素效应检测为例,Kunz 等^[36]针对地表水中的雌激素化学物质,提出将阳性化合物 17β -雌二

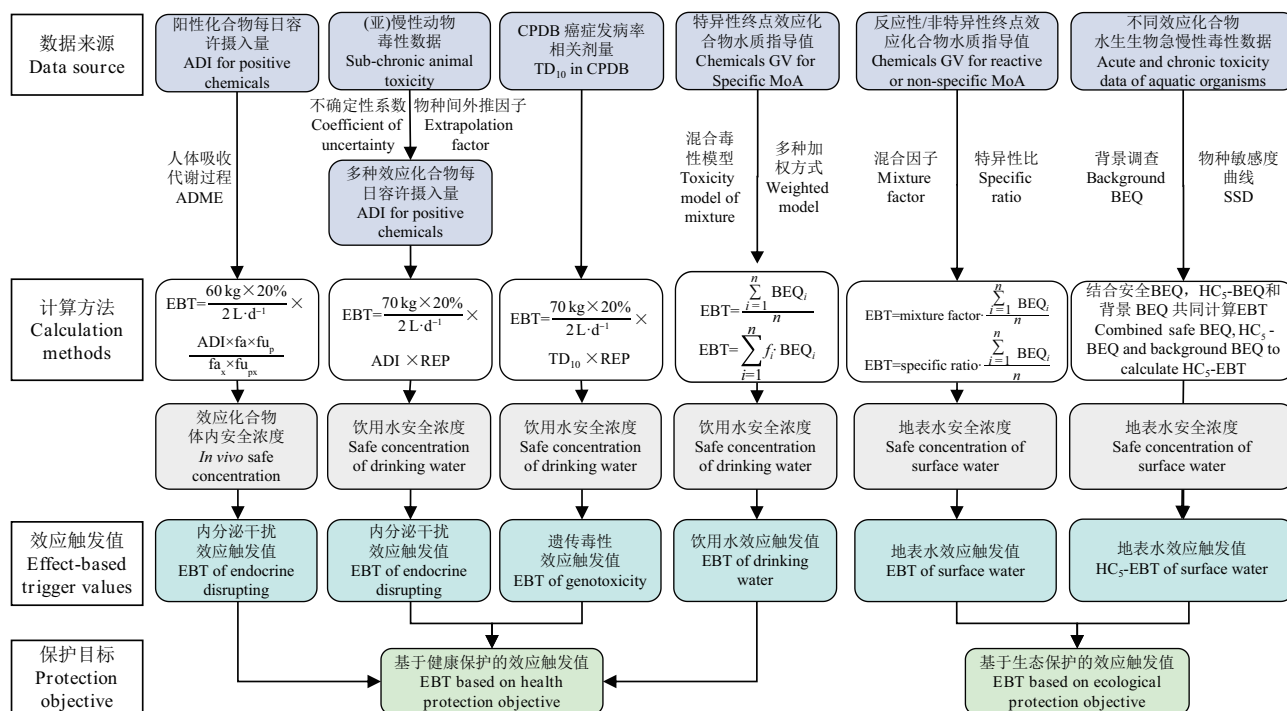


图 1 基于不同数据的效应触发值推导方法

注:EBT 代表效应触发值;ADI 代表每日容许摄入量;MoA 代表毒性作用模式;SSD 代表物种敏感度分布;GV 代表水质指导值;

f_a 代表阳性化合物的吸收分数; f_{up} 代表阳性化合物的蛋白未结合分数;

f_{ax} 代表其他活性化合物的吸收分数; f_{upx} 代表其他活性化合物的蛋白未结合分数;REP 代表相对效力;

TD_{10} 代表导致实验动物癌症发病率增加 10% 的每日剂量;BEQ 代表生物当量浓度;mixture factor 代表混合因子;specific ratio 代表特异性比。

Fig. 1 Derivation of effect-based trigger values from different data sources

Note: EBT stands for effect-based trigger values; ADI stands for allowable daily intake; MoA represents mode of action; SSD represents species sensitivity distribution; GV stands for guideline value; f_a represents the absorption fraction of positive compounds; f_{up} represents the protein unbound fraction of positive compounds; f_{ax} represents the absorption fraction of other active compounds; f_{upx} represents the protein unbound fraction of other active compounds; REP stands for the relative effect potencies; TD_{10} represents the daily dose that caused a 10% increase in cancer incidence; BEQ stands for biological equivalent concentration.

醇(17 β -estradiol, E2)的GV直接换算为雌激素体外生物测试的BEQ,得到所有雌激素测试的EBT为0.4 ng·L⁻¹(以EEQ计)。该方法仅使用E2的GV推导雌激素效应的体外生物测试阈值,同时对所有雌激素效应的测试方法如ER-CALUX和YES等采用同一EBT值。

为了进一步推导更精确的雌激素EBT值,Jarošová等^[44]研究确定当地废水出水中4种最有效的雌激素活性化合物为雌酮(estrone, E1)、E2、17 α -乙炔基雌二醇(17 α -ethynylestradiol, EE2)和雌三醇(estriol, E3),考虑到雌激素化合物的加和效应,收集4种化合物的GV并转化为对应体外生物测试的生物当量BEQ,再通过REP换算为E2的BEQ,最终选择其中最小的BEQ作为雌激素效应的EBT值。另外,已有研究发现不同测试雌激素效应测试方法之间存在灵敏性差异^[45-46],为此Jarošová等^[47]根据5种雌激素效应测试方法的实验数据得到不同活性化合物的REP值,并推导出酵母雌激素活性筛选试验(YES)的EEQs范围为0.2~0.4 ng·L⁻¹(以EEQ计),MELN为0.2~0.3 ng·L⁻¹(以EEQ计),ER-CALUX为0.2~0.4 ng·L⁻¹(以EEQ计),E-Screen为0.1~0.3 ng·L⁻¹(以EEQ计),MVLN为0.1~0.3 ng·L⁻¹(以EEQ计)。使用该方法可得到多种雌激素效应体外生物测试方法的EBT值,但是由于大部分毒性终点仍缺乏活性化合物数据,目前尚未推广到其他的毒理学终点。

Escher等^[23-24]结合此前的研究成果提出基于欧洲水环境质量标准的框架,构建用于推导适用于所有毒性终点EBT值的通用方法,以期甄别水中复杂低水平混合物的综合影响^[48]。对于特异性终点,研究发现水体中有限的高活性化合物毒性加和可以在很大程度上代表整体的毒性效应,但是不同效应化合物的占比仍会影响最终的结果,因此有必要针对不同测试终点分别确定加权方式。如针对雌激素效应终点,已有研究根据对欧洲33个地表水样品的观察,确定欧洲地区地表水高效雌激素化合物的组成比例为11% E2、9% EE2和80% E1,在推导雌激素效应的EBT时,可以借助该比例对雌激素效应的EBT值进行加权计算,有针对性地提出适用于欧洲水体的EBT值^[49]。而对于大多数其他的特异性终点,尚不明确地表水或饮用水中高效化合物的比例组成,可以使用阳性化合物的GV转化为EBT,或可采用几种明确的高效化学品GV进行平均加权获得

最终的EBT值。总而言之,针对特异性终点的生物测试,只要有足够的毒性数据明确EQS中化合物的毒性终点,则可以通过EQS中化合物的GV值推导对应特异性生物测试的EBT值^[5]。雌激素效应测试技术较为成熟且活性化合物数据量大,目前推导得出的EBTs已经相对成熟,在一定程度上可以用于指导水环境样品体外生物测试,但对于雄激素和糖皮质激素等大部分其他测试终点而言,缺乏高活性化合物的数据,目前得到的EBTs可能仍存在较大误差,需要继续累积化合物测试数据。

对于氧化应激效应等反应性终点和基线毒性等非特异性终点,对水样的检测结果难以用其中多种污染物的效应总和来解释^[50-51],使用效应化合物推导的EBT值与水体实际情况不符,难以实际应用。为此Escher等^[24]提出一个简单的方法是使用混合因子(mixture factor),设受体介导的测试终点混合因子为100,其他终点的混合因子为1 000,将推导的BEQ除以混合因子确定最终的EBT值。目前通过混合因子的方法获得了部分反应性终点和非特异性终点的EBT值,其中基线毒性以苯酚(phenol)作为阳性化合物,得到的EBT值为1 264 μ g·L⁻¹(以Phenol-EQ计),AhR-CALUX方法以苯并[a]芘(benzo[a]pyrene, BaP)作为阳性化合物获得的EBT值为6.21 ng·L⁻¹(以BaP-EQ计),anti-AR-CALUX以氟他胺(flutamide, Flut)作为阳性化合物得到的EBT为14.4 μ g·L⁻¹(以Flut-EQ计),总体与ADI推算法得到的EBT值相差不大。此外,Escher和Neale^[52]还针对氧化应激提出了一种特殊的加权方法,通过所有活性化合物的特异性比来推导不同反应性终点的EBT值。特异性比是化合物的基线毒性与其测量的特定终点之间的效应浓度比率。通过特异性比的对数正态分布的中位数对EBT进行缩放,以得出每个生物测定的EBT值。与混合因子的统一缩放相比,该方法可以针对任一终点得到特异性比,从而获得更有参考价值的EBT值。使用特异性比方法得出AREc32以敌敌畏(dichlorvos, DDVP)作为阳性化合物的EBT值为1.4 mg·L⁻¹(以DDVP-EQ计),与添加混合因子方法得到的156 μ g·L⁻¹(以DDVP-EQ计)差别在一个数量级以内。

2.3 物种敏感度分布曲线法推导生态保护效应触发值

物种敏感度分布(SSD)曲线是依据单一化合物的多个物种的毒性数据而得到的拟合曲线^[53-54],研

究常用 SSD 曲线来确定第 5 个百分位数的危险浓度(5% hazardous concentration, HC_5),它代表对 5% 的物种产生毒害效应的污染物浓度,可认为是该污染物的水生生物生态风险阈值^[55],因此 HC_5 值可以作为推导体外生物测试 EBT 的基础。大量研究借助 SSD 曲线推导出阳性化合物的 HC_5 值并作为对应测试终点的 EBT 值。Zeng 等^[56]收集到 ECOTOX 数据库中 4-硝基喹啉 1-氧化物(4-nitroquinoline N-oxide, 4-NQO)的 4 个毒性数据,提出对于 *umu*/SOS 测试的 EBT 值为 $0.95 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ (以 4-NQO EQ 计),Xu 等^[57]使用 12 个物种 4-NQO 的毒性数据,得到 *umu*/SOS 测试的 EBT 值为 $0.64 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ (以 4-NQO EQ 计)。Ma 等^[28]得到发光细菌毒性试验的基线毒性 EBT 值为 $6.04 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ (以 Phenol-EQ 计)。

理论上如果已知所有活性化合物的毒性数据,可以精确地计算出各终点的 EBT 值,鉴于目前效应化合物的数据较少,得到的 EBT 值仍存在进一步完善的空间,为此 van de Oost 等^[27]结合 EBT 在实际水体的适用性,建立了基于 HC_5 -EBT 的方法框架。首先通过收集对应终点已知的全部效应化合物数据,使用 REP 转化为阳性化合物 BEQ,拟合出全物种所有已知化合物以阳性化合物 BEQ 表示的 SSD 曲线,取第 5 个百分位数的值作为 HC_5 -EBT。与特异性终点不同,利用 HC_5 方法推导 anti-AR 和氧化应激等反应性终点的 EBT 值会忽视该类毒性终点的混合效应^[58-59],考虑在 HC_5 -EBT 基础上增加安全系数,该解决方案与 Escher 等^[24]提出的混合因子概念类似。为确保最终的 EBT 取值不偏离实际清洁水体的背景值, van de Oost 等^[27]还依据待测水体附近的生态状况良好地点背景均值确定 clean-BEQ,以收集到的生态毒性数据中的最小 BEQ 作为 safe-BEQ,结合 HC_5 -BEQ、safe-BEQ 和 clean-BEQ 共同确定最终的 EBT 值。依据该方法体系得到 ER-CALUX 的 EBT 值为 $0.5 \text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$ (以 EEQ 计),GR-CALUX 以地塞米松(dexamethasone, DEX)作为阳性化合物的 EBT 值为 $100 \text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$ (以 DEX-EQ 计),PPAR γ -CALUX 为 $10 \text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$ (以 Ros-EQ 计),PAH-CALUX 为 $150 \text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$ (以 BaP-EQ 计)。

3 不同测试终点 EBT 及应用 (EBT of different endpoints and its application)

3.1 典型体外生物测试的 EBT 值

由于保护目标不同,以保护人体健康为目标的

饮用水 EBT 和以生态保护为目标的地表水 EBT 存在差别,无需相互比较。而体内安全浓度法和 ADI 推算法是以人体健康保护为目标的 2 种常用方法,它们得到的 EBT 值差异不大,仅针对 ER-CALUX 得到的 $3.8 \text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$ (以 EEQ 计)和 $0.25 \text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$ (以 EEQ 计)差距在一个数量级以上^[41-42],其他毒性终点如雄激素受体激活效应(AR)、孕激素受体激活效应(PR)和糖皮质激素受体激活效应(GR)等 EBT 值在一个数量级以内,原因在于体内安全浓度法主要参考的是阳性化合物 E2 的体内安全浓度,而 ADI 推算法是结合多种雌激素活性化合物的 ADI 数据推算,数据量更大,因此相比其他终点得到的 EBT 值差异更显著。就地表水 ER-CALUX 测试而言,使用 EQS 方法得到的值为 $0.1 \sim 0.5 \text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$ (以 EEQ 计),而基于 YES 测试, EQS 方法得到的 EBT 值为 $12 \text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$ (以 EEQ 计),与 ER-CALUX 的 EBT 有较大差异,其中不同体外生物测试的敏感度不同^[46],且不同测试方法的活性物质与阳性化合物之间的 REP 存在差异。因此在应用体外生物测试进行水质评估时,需要参考相同的测试方法对应的 EBT,同时最好在 EBT 的基础上结合受试水体所在国家地区的标准推导实际的指导值。

本文总结典型体外生物测试方法对应的 EBT 值,其中基于 EQS 的方法推导 EBT 值可以适用于多种水体和保护目标,与基于健康目标的推导方法和基于 HC_5 的方法相比, EQS 方法的适用性取决于所参考的 EQS 数据,如 EQS 中饮用水 GV 推导的 EBT 可作为保护人体健康的依据,适用于评估饮用水水质, EQS 地表水 GV 则可以推导出应用于生态保护的 EBT 值,可作为评估地表水的体外生物测试阈值标准。在这一方面,基于 EQS 的推导方法比其他推导方法应用范围更广。

3.2 EBT 值的应用

3.2.1 内分泌干扰效应

内分泌干扰效应作为水环境样品中重点关注的毒性效应,对应的 EBT 值见表 1。Brand 等^[42]通过体内安全浓度法得到 ER-CALUX 测试的 EBT 为 $3.8 \text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$ (以 EEQ 计);AR 的 EBT 为 $11 \text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$ (以 DHT-EQ 计);对于 GR, EBT 为 $21 \text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$ (以 DEX-EQ 计);对于 PR, EBT 为 $333 \text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$ (以 Org2058-EQ 计)。在研究得到的 EBT 基础上结合 CALUX 测试对荷兰某一饮用水厂的水质进行评估,检测到 ER 活性当量最高为 $0.49 \text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$ (以 EEQ 计),AR 当量最

表 1 特异性毒性体外生物测试方法阳性化合物及效应触发值
Table 1 The reference compounds and effect-based trigger values of specific MoA *in vitro* bioassays

测试方法 Bioassays	阳性化合物 Reference compounds	效应触发值 /(ng·L ⁻¹)(以 ref-EQ 计) Effect-based trigger values /(ng·L ⁻¹)(Based on ref-EQ)	推导方法 Methods	文献来源 Literature
雌激素受体激活(ER) Activation of estrogen receptor (ER)				
3d YES	17β-雌二醇 17β-estradiol (E2)	0.88	EQS	[24]
A-YES	17β-雌二醇 17β-estradiol (E2)	0.56	EQS	[24]
ER-CALUX	17β-雌二醇 17β-estradiol (E2)	0.25	ADI	[41]
ER-CALUX	17β-雌二醇 17β-estradiol (E2)	3.8	体内安全浓度 <i>in vivo</i> safe concentration	[42]
ER-CALUX	17β-雌二醇 17β-estradiol (E2)	0.1	EQS	[24]
ER-CALUX	17β-雌二醇 17β-estradiol (E2)	0.5	HC ₅	[27]
ER-CALUX	17β-雌二醇 17β-estradiol (E2)	0.2 ~ 0.4	EQS	[47]
ER-CALUX	17β-雌二醇 17β-estradiol (E2)	0.2	EQS	[23]
ER-GeneBLAzer	17β-雌二醇 17β-estradiol (E2)	0.34	EQS	[24]
ER-GeneBLAzer	17β-雌二醇 17β-estradiol (E2)	1.8	EQS	[23]
ERα-Luc-BG1	17β-雌二醇 17β-estradiol (E2)	0.62	EQS	[24]
E-SCREEN	17β-雌二醇 17β-estradiol (E2)	0.1 ~ 0.3	EQS	[47]
E-SCREEN	17β-雌二醇 17β-estradiol (E2)	0.9	EQS	[23]
hERα-HeLa-9903	17β-雌二醇 17β-estradiol (E2)	0.6	EQS	[23]
ISO-LYES (Sumpter)	17β-雌二醇 17β-estradiol (E2)	0.97	EQS	[24]
ISO-LYES (McDonnell)	17β-雌二醇 17β-estradiol (E2)	1.07	EQS	[24]
MELN	17β-雌二醇 17β-estradiol (E2)	0.37	EQS	[24]
MELN	17β-雌二醇 17β-estradiol (E2)	0.2 ~ 0.3	EQS	[47]
MVLN	17β-雌二醇 17β-estradiol (E2)	0.1 ~ 0.3	EQS	[47]
REACTIV (unspiked)	17β-雌二醇 17β-estradiol (E2)	0.8	EQS	[24]
SSTA ERα-HeLa-9903	17β-雌二醇 17β-estradiol (E2)	1.01	EQS	[24]
YES	17β-雌二醇 17β-estradiol (E2)	0.2 ~ 0.4	EQS	[47]
YES	17β-雌二醇 17β-estradiol (E2)	12	EQS	[23]
雄激素受体激活(AR) Activation of androgen receptor (AR)				
AR-CALUX	双氢睾酮 Dihydrotestosterone (DHT)	11	体内安全浓度 <i>in vivo</i> safe concentration	[42]
AR-CALUX	双氢睾酮 Dihydrotestosterone (DHT)	4.5	ADI	[41]
糖皮质激素受体激活(GR) Activation of glucocorticoid receptor (GR)				
GR-CALUX	地塞米松 Dexamethasone (DEX)	21	体内安全浓度 <i>in vivo</i> safe concentration	[42]
GR-CALUX	地塞米松 Dexamethasone (DEX)	47.9	ADI	[41]
GR-CALUX	地塞米松 Dexamethasone (DEX)	100	HC ₅	[27]
GR-CALUX	地塞米松 Dexamethasone (DEX)	150	EQS	[23]
孕激素受体激活(PR) Activation of progestogenic receptor (PR)				
PR-CALUX	孕酮 Progesterone (P4)	15.5	ADI	[41]
PR-CALUX	16α-ethyl-21-hydroxy-19-nor-4-pregnene-3,20-dione (Org2058)	333	体内安全浓度 <i>in vivo</i> safe concentration	[42]

注:EQS 表示环境质量标准,ADI 代表每日容许摄入量。
Note: EQS stands for environmental quality standards; ADI stands for allowable daily intake.

高为 $4.51 \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$ (以 DHT-EQ 计), 这些当量水平远低于各自的 EBT 值, 说明水质大概率不存在人体健康风险。Dehkordi 等^[60]在伊朗 Zayandeh Rood 河的饮用水厂进行评估, 使用 ER-CALUX 得到饮用水源中雌激素活性为 $0.74 \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$ (以 EEQ 计), 表明饮用水中雌激素对人类健康风险较小。Leusch 等^[61]研究发现饮用水样品中 ER 活性 $< 0.03 \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$ (以 EEQ 计), AR 活性 $< 1 \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$ (以 DHT-EQ 计), 远低于对应的 EBT 值, 可以认为不存在健康效应风险。目前研究发现饮用水的内分泌干扰效应在绝大多数情况下不会超过 EBT 值^[62-63], 可能的原因是对 EDCs 的认识充分, 从根本上减少了外源性 EDCs 进入水源。

在进行地表水体外生物测试时, 普遍采用地表水 EQS 或 HC_5 推导得到的 EBT 作为阈值参考^[64], Leusch 等^[61]应用 ER-GeneBLAzer、AR-GeneBLAzer、GR-CALUX 和 PR-CALUX 等多种体外测试, 以评估来自 6 个国家(德国、澳大利亚、法国、南非、荷兰和西班牙)的地表水样品中的内分泌活性。参考 van der Oost 等^[27]和 Jarošová 等^[44]研究得到的地表水 EBT 值, 大多数水样的内分泌活性低于定量限值, 仅有一个地表水样品 GR-CALUX 活性达到 $96 \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$ (以 DEX-EQ 计), 超过 EBT 值 $47.9 \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$ (以 DEX-EQ 计), 表明该环境水体可能对水生生物构成潜在危害。Müller 等^[65]在阿默尔河(德国西南部)分析的结果与 Leusch 等^[61]相似, 只有极少数水环境样品涉及到 ER 或氧化应激反应活性的超标。Houtman 等^[66]对地表水质进行评估, 在大多数监测样本中检测到抗孕激素和抗雄激素活性, 但普遍低于对应 EBT 值, 仅少数点位 anti-AR 活性超过对应的 EBT 值 $3.28 \sim 25 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ (以 Flut-EQ 计), 最高达到 $90 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ (以 Flut-EQ 计)。在水质管理相关领域, 针对地表水和循环水, 美国《清洁水法》已经授权使用体外生物测试 EBT 作为监管标准, 加利福尼亚州将水质的雌激素受体活性纳入水体监管范围, 其循环水质控制政策建议将雌激素效应的 EBT 值定为 $3.5 \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$ (以 EEQ 计)^[22]。

此外, 大量研究采用地表水 EBT 作为评价水处理工艺效果的阈值标准, 以评估其对受纳水体的生态风险^[67]。He 等^[68]在研究纺织废水中生物降解效能, 采用基于报告基因的 T47D-KBluc 生物测定法研究了 10 家污水处理厂(WWTPs)纺织废水的雌激素性。结果表明, 出水的雌二醇当量(范围为 $1.50 \sim 4.12 \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$ (以 EEQ 计))高于对应的 EBT 值 $0.5 \text{ ng} \cdot$

L^{-1} (以 EEQ 计), 表明出水导致环境水体的生态风险增加, 同时也表明了将内分泌干扰效应评估纳入纺织品废水风险评估的重要性。Simon 等^[69]使用 ER-CALUX 方法评估不同季节的多个点位的污水出水, 仅在参考 Escher 等^[24]得到的 $0.1 \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$ (以 EEQ 计)时存在少量点位超标的情况, 夏季的生物活性全部低于 EBT 值。

3.2.2 反应性毒性终点

遗传毒性测试和氧化应激效应作为体外生物测试中的重要评估手段, 其 EBT 值一直受到广泛关注, 本文总结的反应性和非特异性毒性 EBT 值见表 2。癌症发病率可接受剂量法和 EQS 方法可以用于推导遗传毒性 EBT, 然而缺乏效应化化合物的数据导致难以得到可靠结果, 目前遗传毒性 EBT 主要通过 HC_5 值推导, 其中参考 *umu*/SOS 测试的 EBT 值分别为 $0.95 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ (以 4-NQO EQ 计)^[56]和 $0.64 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ (以 4-NQO EQ 计)^[57]。氧化应激测试对应的 EBT 主要通过 EQS 和 HC_5 方法得到, 其中 Nrf2-CALUX 的 EBT 值为 $10 \sim 26 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ (以 Cur-EQ 计), AREc32 的 EBT 值为 $156 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ (以 Cur-EQ 计)和 $1.4 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ (以 Cur-EQ 计)以及 $220 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ (以 tBHQ-EQ 计), PPAR γ -CALUX 的 EBT 值为 $10 \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$ (以 Ros-EQ 计), PPAR γ -GeneBLAzer 的 EBT 值为 $36 \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$ (以 Ros-EQ 计), PAH-CALUX 的 EBT 值为 $6.21 \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$ (以 BaP-EQ 计)等。

Neale 等^[70]在饮用水处理厂处理后的水样中检测到 AREc32 活性为 $5.14 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ (以 tBHQ-EQ 计), 与未经消毒处理的水样相比, 出现 AREc32 活性, 但观察到的活性远低于 Escher 等^[71]得到的 EBT 值 $220 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ (以 tBHQ-EQ 计), 说明消毒工艺处理形成的 DBPs 导致氧化应激反应的增强, 但其存在潜在生态风险的可能性低, 证明了在生产高质量饮用水过程中及应用氧化应激等体外生物测试进行水质监测的价值。大量研究^[72-73]使用氧化应激相关的体外生物测试评估污水处理厂臭氧化和活性炭工艺毒性去除效果, 发现在经过活性炭处理后 PAH-CALUX 和 PPAR γ -CALUX 等活性与臭氧处理前相比变化不大, 仍在 $40 \sim 200 \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$ (以 BaP-EQ 计)和 $50 \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$ (以 Ros-EQ 计), 仍超过对应 EBT 值 $6.21 \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$ (以 BaP-EQ 计)和 $10 \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$ (以 Ros-EQ 计)的 5 倍以上。Alygizakis 等^[62]收集了多瑙河流域 9 个国家的 12 个废水样本, 使用多种 CALUX 测试对水质进行评估, 检测到的 Nrf2-CALUX 活性为 $51 \sim 162$

表 2 反应性毒性终点和基线毒性终点对应体外生物测试的效应触发值
Table 2 The reference compounds and effect-based trigger values of reactive and non-specific MoA *in vitro* bioassays

测试方法 Bioassays	阳性化合物 Reference compounds	效应触发值 Effect-based trigger values	推导方法 Methods	文献来源 Literature
芳烃受体激活(AhR) Activation of arylhydrocarbon receptor (AhR)				
PAH-CALUX	苯并[a]芘 Benzo[a]pyrene	6.21 ng·L ⁻¹ (以 ref-EQ 计 Based on ref-EQ)	EQS	[24]
PAH-CALUX	苯并[a]芘 Benzo[a]pyrene	24.4 ng·L ⁻¹ (以 ref-EQ 计 Based on ref-EQ)	ADI	[41]
PAH-CALUX	苯并[a]芘 Benzo[a]pyrene	150 ng·L ⁻¹ (以 ref-EQ 计 Based on ref-EQ)	HC ₅	[27]
H4L1.1c4 AhR assay	苯并[a]芘 Benzo[a]pyrene	6.36 ng·L ⁻¹ (以 ref-EQ 计 Based on ref-EQ)	EQS	[24]
AhR-cisFACTORIAL	胺甲萘 Carbaryl	18 μg·L ⁻¹ (以 ref-EQ 计 Based on ref-EQ)	EQS	[23]
雄激素受体拮抗(Anti AR) Antagonistic activity on the androgen receptor (Anti AR)				
anti AR RADAR (spiked)	氟他胺 Flutamide (Flut)	3.63 μg·L ⁻¹ (以 ref-EQ 计 Based on ref-EQ)	EQS	[24]
anti AR-CALUX	氟他胺 Flutamide (Flut)	14.4 μg·L ⁻¹ (以 ref-EQ 计 Based on ref-EQ)	EQS	[24]
anti AR-CALUX	氟他胺 Flutamide (Flut)	4.8 μg·L ⁻¹ (以 ref-EQ 计 Based on ref-EQ)	ADI	[41]
anti AR-CALUX	氟他胺 Flutamide (Flut)	25 μg·L ⁻¹ (以 ref-EQ 计 Based on ref-EQ)	HC ₅	[27]
anti AR-GenBLAzer	氟他胺 Flutamide (Flut)	3.28 μg·L ⁻¹ (以 ref-EQ 计 Based on ref-EQ)	EQS	[24]
anti MDA-kb2	氟他胺 Flutamide (Flut)	3.46 μg·L ⁻¹ (以 ref-EQ 计 Based on ref-EQ)	EQS	[24]
孕激素受体拮抗(Anti PR) Antagonistic activity on the progestogenic receptor (Anti PR)				
anti PR-CALUX	硫丹 Endosulfan	1 967 μg·L ⁻¹ (以 ref-EQ 计 Based on ref-EQ)	EQS	[24]
孕 X 激素受体激活(PXR) Activation of pregnane X receptor (PXR)				
HG5LN-hPXR	邻苯二甲酸二乙基己酯 Di(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP)	16.3 μg·L ⁻¹ (以 ref-EQ 计 Based on ref-EQ)	EQS	[24]
PXR-CALUX	邻苯二甲酸二乙基己酯 Di(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP)	272 μg·L ⁻¹ (以 ref-EQ 计 Based on ref-EQ)	EQS	[24]
PXR-cisFACTORIAL	异丙甲草胺 Metolachlor	59 μg·L ⁻¹ (以 ref-EQ 计 Based on ref-EQ)	EQS	[23]
PXR-CALUX	尼卡地平 Nicardipine	3 μg·L ⁻¹ (以 ref-EQ 计 Based on ref-EQ)	HC ₅	[27]
氧化应激 Induction of oxidative stress response				
ARE GeneBLAzer	敌敌畏 Dichlorvos (DDVP)	392 μg·L ⁻¹ (以 ref-EQ 计 Based on ref-EQ)	EQS	[24]
AREc32	敌敌畏 Dichlorvos (DDVP)	156 μg·L ⁻¹ (以 ref-EQ 计 Based on ref-EQ)	EQS	[24]
AREc32	敌敌畏 Dichlorvos (DDVP)	1.4mg	EQS	[21]
AREc32	特丁基对苯二酚 tert-butylhydroquinone (tBHQ)	220 μg·L ⁻¹ (以 ref-EQ 计 Based on ref-EQ)	EQS	[71]
Nrf2-CALUX	敌敌畏 Dichlorvos (DDVP)	26 μg·L ⁻¹ (以 ref-EQ 计 Based on ref-EQ)	EQS	[24]
Nrf2-CALUX	姜黄素 Curcumin	10 μg·L ⁻¹ (以 ref-EQ 计 Based on ref-EQ)	HC ₅	[27]
过氧化物酶增殖物受体激活(PPARγ) Activation of peroxisome proliferator-activated receptor (PPARγ)				
PPARγ-CALUX	罗格列酮 Rosiglitazone (Ros)	10 ng·L ⁻¹ (以 ref-EQ 计 Based on ref-EQ)	HC ₅	[27]
PPARγ-GenBLAzer	罗格列酮 Rosiglitazone (Ros)	36 ng·L ⁻¹ (以 ref-EQ 计 Based on ref-EQ)	EQS	[24]
遗传毒性 Genotoxicity				
umu/SOS	4-硝基喹啉-N-氧化物 4-nitroquinoline N-oxide (4-NQO)	0.95 μg·L ⁻¹ (以 ref-EQ 计 Based on ref-EQ)	HC ₅	[56]
umu/SOS	4-硝基喹啉-N-氧化物 4-nitroquinoline N-oxide (4-NQO)	0.64 μg·L ⁻¹ (以 ref-EQ 计 Based on ref-EQ)	HC ₅	[57]
基线毒性 Baseline toxicity				
基线毒性 Baseline toxicity	苯酚 Phenol	1 264 μg·L ⁻¹ (以 ref-EQ 计 Based on ref-EQ)	EQS	[24]
发光细菌毒性试验 Luminescent bacteria toxicity test	苯酚 Phenol	6.04 mg·L ⁻¹ (以 ref-EQ 计 Based on ref-EQ)	HC ₅	[28]

$\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ (以 Cur-EQ 计), 超过 EBT 值 $10\ \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ (以 Cur-EQ 计), 而 PAH-CALUX 测试活性为 $52\sim 242\ \text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$ (以 BaP-EQ 计), 远超 $6.21\ \text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$ (以 BaP-EQ 计)的 EBT 值。上述研究表明氧化应激相关终点在水质评估中的灵敏性高, 易出现活性超标的情况, 可以作为评估和改进废水处理工艺效果的关键靶点。

3.2.3 基线毒性

基线毒性也称为麻醉, 是指化学物质与生物膜的非特异性结合, 导致膜结构丧失和膜相关过程(如线粒体呼吸)功能受损的非特异性毒性^[74-75], 在体外生物测试的细胞中, 基线毒性表现为细胞毒性。基线毒性的代表性测试方法是发光细菌毒性试验, 作为评价水生态风险的重要毒性指标, 目前已经推导出具有一定参考价值的 EBT 值^[62], 其中 Escher 等^[24]根据 EQS 中苯酚的 GV 值得到用于生物发光抑制测定的 EBT 为 $1.26\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ (以 Phenol-EQ 计)。Ma 等^[28]报告了基于 HC_5 值得到的发光细菌毒性试验的 EBT 为 $6.04\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ (以 Phenol-EQ 计)。已有报道以发光细菌基线毒性 EBT 作为参考指标^[76], 指导试点规模的浅层开放水域单元(SOWU)池塘建设, 得到池塘面积为 $3.6\sim 18.2\ \text{m}^2$, 最终工艺出水符合污水处理要求。今后仍需进一步完善基线毒性 EBT, 为体外生物测试指导水环境生态风险评估提供参考。

4 展望 (Outlooks)

针对水环境样品体外生物测试 EBT 值的推导过程中, 大部分使用活体动物实验阈值数据如 ADI 和 HC_5 等, 仅 REP 值参考了对应体外生物测试的数据, 由于活体和体外生物测试的 REP 存在差异^[77], 这种替代方法影响到目前得到的 EBT 值的准确性, 因此后续可以考虑使用体外/活体相互比较方法来完善和验证体外生物测试的 EBT^[32,78], 或考虑结合成组体外生物测试的一组端点对水质进行综合判定^[79-80]。

此外, 化学物质需要有相关的毒性数据才能被用于推导对应测试终点的 EBT 值, 大部分化学品的毒性不明确, 近年来, 随着 21 世纪组学技术的迅速发展, 高通量基因表达、酶和基于细胞的生物测定手段被广泛地应用在毒理学领域^[81-83], 通过 Tox21 等数据库可以获得化合物的高通量测试数据, 这将帮助我们明确化合物与毒性效应之间的关系, 同时得到不同化合物之间的 REP 数据, 这将为 EBT 推导

提供数据基础。大量数据的积累还可以帮助我们进一步完善混合物毒性模型, 为今后建立更合理的混合毒性模型提供参考。

受到毒理学数据集的限制, 目前不能针对所有体外生物测试终点得到对应的 EBT 值, 且不同推导方法得到的 EBT 值存在差异, 尚未形成系统可靠的 EBT 方法体系^[69,84], 今后的研究可以侧重于制定完善的推导体系, 进一步提高 EBT 值在水环境样品体外生物测试中的准确性与可靠性。

通信作者简介: 马梅(1967—), 女, 博士, 研究员, 博士生导师, 主要研究方向为应用体外生物测试开展污染物的毒理研究。

参考文献 (References):

- [1] Schwarzenbach R P, Escher B I, Fenner K, et al. The challenge of micropollutants in aquatic systems [J]. Science, 2006, 313(5790): 1072-1077
- [2] Ghisari M, Bonefeld-Jorgensen E C. Effects of plasticizers and their mixtures on estrogen receptor and thyroid hormone functions [J]. Toxicology Letters, 2009, 189(1): 67-77
- [3] Parveen M, Inoue A, Ise R, et al. Evaluation of estrogenic activity of phthalate esters by gene expression profiling using a focused microarray (EstrArray ©) [J]. Environmental Toxicology and Chemistry, 2008, 27(6): 1416-1425
- [4] Zhang Q, Lu M Y, Wang C, et al. Characterization of estrogen receptor α activities in polychlorinated biphenyls by *in vitro* dual-luciferase reporter gene assay [J]. Environmental Pollution, 2014, 189: 169-175
- [5] Ahmed S, Valen E, Sandelin A, et al. Dioxin increases the interaction between aryl hydrocarbon receptor and estrogen receptor alpha at human promoters [J]. Toxicological Sciences, 2009, 111(2): 254-266
- [6] Hercog K, Maisanaba S, Filipič M, et al. Genotoxic potential of the binary mixture of cyanotoxins microcystin-LR and cylindrospermopsin [J]. Chemosphere, 2017, 189: 319-329
- [7] Schriks M, Heringa M B, van der Kooy M M, et al. Toxicological relevance of emerging contaminants for drinking water quality [J]. Water Research, 2010, 44(2): 461-476
- [8] Carvalho R N, Arukwe A, Ait-Aissa S, et al. Mixtures of chemical pollutants at European legislation safety concentrations: How safe are they? [J]. Toxicological Sciences: An Official Journal of the Society of Toxicology, 2014, 141(1): 218-233

- [9] Brack W, Ait-Aïssa S, Burgess R M, et al. Effect-directed analysis supporting monitoring of aquatic environments: An in-depth overview [J]. *The Science of the Total Environment*, 2016, 544: 1073-1118
- [10] Silva E, Rajapakse N, Kortenkamp A. Something from “nothing”: Eight weak estrogenic chemicals combined at concentrations below NOECs produce significant mixture effects [J]. *Environmental Science & Technology*, 2002, 36(8): 1751-1756
- [11] Brack W, Escher B I, Müller E, et al. Towards a holistic and solution-oriented monitoring of chemical status of European water bodies: How to support the EU strategy for a non-toxic environment? [J]. *Environmental Sciences Europe*, 2018, 30(1): 33
- [12] Altenburger R, Walter H, Grote M. What contributes to the combined effect of a complex mixture? [J]. *Environmental Science & Technology*, 2004, 38(23): 6353-6362
- [13] Altenburger R, Ait-Aïssa S, Antczak P, et al. Future water quality monitoring: Adapting tools to deal with mixtures of pollutants in water resource management [J]. *The Science of the Total Environment*, 2015, 512-513: 540-551
- [14] Altenburger R, Scholz S, Schmitt-Jansen M, et al. Mixture toxicity revisited from a toxicogenomic perspective [J]. *Environmental Science & Technology*, 2012, 46(5): 2508-2522
- [15] Brack W, Aïssa S A, Backhaus T, et al. Effect-based methods are key. The European Collaborative Project SOLUTIONS recommends integrating effect-based methods for diagnosis and monitoring of water quality [J]. *Environmental Sciences Europe*, 2019, 31: 10
- [16] Schifferers M J, Blaauboer B J, Hendriksen C F, et al. Regulatory acceptance and use of 3R models: A multilevel perspective [J]. *ALTEX*, 2012, 29(3): 287-300
- [17] Busch W, Schmidt S, Kühne R, et al. Micropollutants in European Rivers: A mode of action survey to support the development of effect-based tools for water monitoring [J]. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 2016, 35(8): 1887-1899
- [18] Hebert A, Feliers C, Lecarpentier C, et al. Bioanalytical assessment of adaptive stress responses in drinking water: A predictive tool to differentiate between micropollutants and disinfection by-products [J]. *Water Research*, 2018, 132: 340-349
- [19] Escher B I, Allinson M, Altenburger R, et al. Benchmarking organic micropollutants in wastewater, recycled water and drinking water with *in vitro* bioassays [J]. *Environmental Science & Technology*, 2014, 48(3): 1940-1956
- [20] Escher B, Leusch F, Chapman H, et al. Introduction to Bioanalytical Tools in Water Quality Assessment [M]. London: Iwa Publishing, 2012: 1-22
- [21] Escher B I, van Daele C, Dutt M, et al. Most oxidative stress response in water samples comes from unknown chemicals: The need for effect-based water quality trigger values [J]. *Environmental Science & Technology*, 2013, 47(13): 7002-7011
- [22] Robitaille J, Denslow N D, Escher B I, et al. Towards regulation of endocrine disrupting chemicals (EDCs) in water resources using bioassays: A guide to developing a testing strategy [J]. *Environmental Research*, 2022, 205: 112483
- [23] Escher B I, Neale P A, Leusch F D L. Effect-based trigger values for *in vitro* bioassays: Reading across from existing water quality guideline values [J]. *Water Research*, 2015, 81: 137-148
- [24] Escher B I, Ait-Aïssa S, Behnisch P A, et al. Effect-based trigger values for *in vitro* and *in vivo* bioassays performed on surface water extracts supporting the environmental quality standards (EQS) of the European Water Framework Directive [J]. *The Science of the Total Environment*, 2018, 628-629: 748-765
- [25] Escher B I, Lamoree M, Antignac J P, et al. Mixture risk assessment of complex real-life mixtures-the PAN-ORAMIX project [J]. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 2022, 19(20): 12990
- [26] Brack W, Dulio V, Ågerstrand M, et al. Towards the review of the European Union Water Framework Directive: Recommendations for more efficient assessment and management of chemical contamination in European surface water resources [J]. *The Science of the Total Environment*, 2017, 576: 720-737
- [27] van der Oost R, Sileno G, Suárez-Muñoz M, et al. SIMONI (smart integrated monitoring) as a novel bioanalytical strategy for water quality assessment: Part I -model design and effect-based trigger values [J]. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 2017, 36(9): 2385-2399
- [28] Ma X Y, Wang Y K, Dong K, et al. The treatability of trace organic pollutants in WWTP effluent and associated biotoxicity reduction by advanced treatment processes for effluent quality improvement [J]. *Water Research*, 2019, 159: 423-433
- [29] Jia A, Escher B I, Leusch F D, et al. *In vitro* bioassays to evaluate complex chemical mixtures in recycled water [J]. *Water Research*, 2015, 80: 1-11
- [30] Neale P A, Altenburger R, Ait-Aïssa S, et al. Development of a bioanalytical test battery for water quality monitoring: Fingerprinting identified micropollutants and

- their contribution to effects in surface water [J]. *Water Research*, 2017, 123: 734-750
- [31] Besselink H, Brouwer B, van der Burg B. Validation and regulatory acceptance of bio-based approaches to assure feedstock, water & product quality in a bio-based economy [J]. *Industrial Crops and Products*, 2017, 106: 138-145
- [32] Brion F, De Gussem V, Buchinger S, et al. Monitoring estrogenic activities of waste and surface waters using a novel *in vivo* zebrafish embryonic (EASZY) assay: Comparison with *in vitro* cell-based assays and determination of effect-based trigger values [J]. *Environment International*, 2019, 130: 104896
- [33] König M, Escher B I, Neale P A, et al. Impact of untreated wastewater on a major European River evaluated with a combination of *in vitro* bioassays and chemical analysis [J]. *Environmental Pollution*, 2017, 220(Pt B): 1220-1230
- [34] Muschket M, di Paolo C, Tindall A J, et al. Identification of unknown antiandrogenic compounds in surface waters by effect-directed analysis (EDA) using a parallel fractionation approach [J]. *Environmental Science & Technology*, 2018, 52(1): 288-297
- [35] Hashmi M A K, Escher B I, Krauss M, et al. Effect-directed analysis (EDA) of Danube River water sample receiving untreated municipal wastewater from Novi Sad, Serbia [J]. *Science of the Total Environment*, 2018, 624: 1072-1081
- [36] Kunz P Y, Kienle C, Carere M, et al. *In vitro* bioassays to screen for endocrine active pharmaceuticals in surface and waste waters [J]. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2015, 106: 107-115
- [37] Neale P A, Munz N A, Aït-Aïssa S, et al. Integrating chemical analysis and bioanalysis to evaluate the contribution of wastewater effluent on the micropollutant burden in small streams [J]. *Science of the Total Environment*, 2017, 576: 785-795
- [38] Cunningham V L, Binks S P, Olson M J. Human health risk assessment from the presence of human pharmaceuticals in the aquatic environment [J]. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 2009, 53(1): 39-45
- [39] Houtman C J, Kroesbergen J, Lekkerkerker-Teunissen K, et al. Human health risk assessment of the mixture of pharmaceuticals in Dutch drinking water and its sources based on frequent monitoring data [J]. *The Science of the Total Environment*, 2014, 496: 54-62
- [40] Baken K A, Sjerps R M A, Schriks M, et al. Toxicological risk assessment and prioritization of drinking water relevant contaminants of emerging concern [J]. *Environment International*, 2018, 118: 293-303
- [41] Been F, Pronk T, Louisse J, et al. Development of a framework to derive effect-based trigger values to interpret CALUX data for drinking water quality [J]. *Water Research*, 2021, 193: 116859
- [42] Brand W, de Jongh C M, van der Linden S C, et al. Trigger values for investigation of hormonal activity in drinking water and its sources using CALUX bioassays [J]. *Environment International*, 2013, 55: 109-118
- [43] World Health Organization. Water quality: Guidelines, standards, and health: Assessment of risk and risk management for water-related infectious disease [R]. London: IWA Publishing, 2001
- [44] Jarošová B, Javůrek J, Adamovský O, et al. Phytoestrogens and mycoestrogens in surface waters: Their sources, occurrence, and potential contribution to estrogenic activity [J]. *Environment International*, 2015, 81: 26-44
- [45] Matsuoka S, Kikuchi M, Kimura S, et al. Determination of estrogenic substances in the water of Muko River using *in vitro* assays, and the degradation of natural estrogens by aquatic bacteria [J]. *Journal of Health Science*, 2005, 51(2): 178-184
- [46] Leusch F D, Neale P A, Hebert A, et al. Analysis of the sensitivity of *in vitro* bioassays for androgenic, progestagenic, glucocorticoid, thyroid and estrogenic activity: Suitability for drinking and environmental waters [J]. *Environment International*, 2017, 99: 120-130
- [47] Jarošová B, Bláha L, Giesy J P, et al. What level of estrogenic activity determined by *in vitro* assays in municipal waste waters can be considered as safe? [J]. *Environment International*, 2014, 64: 98-109
- [48] Dingemans M M, Baken K A, van der Oost R, et al. Risk-based approach in the revised European Union drinking water legislation: Opportunities for bioanalytical tools [J]. *Integrated Environmental Assessment and Management*, 2019, 15(1): 126-134
- [49] Kase R, Javurkova B, Simon E, et al. Screening and risk management solutions for steroidal estrogens in surface and wastewater [J]. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 2018, 102: 343-358
- [50] Neale P A, Braun G, Brack W, et al. Assessing the mixture effects in *in vitro* bioassays of chemicals occurring in small agricultural streams during rain events [J]. *Environmental Science & Technology*, 2020, 54(13): 8280-8290
- [51] Neale P A, Leusch F D L. Assessing the role of different dissolved organic carbon and bromide concentrations for disinfection by-product formation using chemical analysis and bioanalysis [J]. *Environmental Science and Pollution*

- Research, 2019, 26(17): 17100-17109
- [52] Escher B I, Neale P A. Effect-based trigger values for mixtures of chemicals in surface water detected with *in vitro* bioassays [J]. Environmental Toxicology and Chemistry, 2021, 40(2): 487-499
- [53] Zwart D, Sterkenburg A. Toxicity-based assessment of water quality [J]. Species Sensitivity Distributions in Ecotoxicology, 2002, 1: 383-402
- [54] Raimondo S, Montague B J, Barron M G. Determinants of variability in acute to chronic toxicity ratios for aquatic invertebrates and fish [J]. Environmental Toxicology and Chemistry, 2007, 26(9): 2019-2023
- [55] Li H Z, Cheng F, Wei Y L, et al. Global occurrence of pyrethroid insecticides in sediment and the associated toxicological effects on benthic invertebrates: An overview [J]. Journal of Hazardous Materials, 2017, 324(Pt B): 258-271
- [56] Zeng S Y, Huang Y Q, Sun F, et al. Probabilistic ecological risk assessment of effluent toxicity of a wastewater reclamation plant based on process modeling [J]. Water Research, 2016, 100: 367-376
- [57] Xu J Y, Zhao C T, Wei D B, et al. A toxicity-based method for evaluating safety of reclaimed water for environmental reuses [J]. Journal of Environmental Sciences (China), 2014, 26(10): 1961-1969
- [58] Bittner M, Saul N, Steinberg C E W. Antiandrogenic activity of humic substances [J]. Science of the Total Environment, 2012, 432: 93-96
- [59] Saebelfeld M, Minguez L, Griebel J, et al. Humic dissolved organic carbon drives oxidative stress and severe fitness impairments in *Daphnia* [J]. Aquatic Toxicology, 2017, 182: 31-38
- [60] Dehkordi S K, Paknejad H, Blaha L, et al. Instrumental and bioanalytical assessment of pharmaceuticals and hormone-like compounds in a major drinking water source: Wastewater receiving Zayandeh Rood River, Iran [J]. Environmental Science and Pollution Research, 2022, 29(6): 9023-9037
- [61] Leusch F D L, Neale P A, Arnal C, et al. Analysis of endocrine activity in drinking water, surface water and treated wastewater from six countries [J]. Water Research, 2018, 139: 10-18
- [62] Alygizakis N A, Besselink H, Paulus G K, et al. Characterization of wastewater effluents in the Danube River Basin with chemical screening, *in vitro* bioassays and antibiotic resistant genes analysis [J]. Environment International, 2019, 127: 420-429
- [63] Tousova Z, Oswald P, Slobodnik J, et al. European demonstration program on the effect-based and chemical identification and monitoring of organic pollutants in European surface waters [J]. The Science of the Total Environment, 2017, 601-602: 1849-1868
- [64] Ekman Drew R, Ankley Gerald T, Blazer Vicki S, et al. Environmental reviews and case studies: Biological effects – based tools for monitoring impacted surface waters in the great lakes: A multiagency program in support of the great lakes restoration initiative [J]. Environmental Practice, 2013, 15(4): 409-426
- [65] Müller M E, Werneburg M, Glaser C, et al. Influence of emission sources and tributaries on the spatial and temporal patterns of micropollutant mixtures and associated effects in a small river [J]. Environmental Toxicology and Chemistry, 2020, 39(7): 1382-1391
- [66] Houtman C J, Brewster K, Ten Broek R, et al. Characterisation of (anti-) progestogenic and (anti-) androgenic activities in surface and wastewater using high resolution effectdirected analysis [J]. Environment International, 2021, 153: 106536
- [67] Johann S, Esser M, Nüßler L, et al. Receptor-mediated estrogenicity of native and chemically dispersed crude oil determined using adapted microscale reporter gene assays [J]. Environment International, 2020, 134: 105320
- [68] He X W, Qi Z D, Gao J, et al. Nonylphenol ethoxylates biodegradation increases estrogenicity of textile wastewater in biological treatment systems [J]. Water Research, 2020, 184: 116137
- [69] Simon E, Riegraf C, Schifferli A, et al. Evaluation of three ISO estrogen receptor transactivation assays applied to 52 domestic effluent samples [J]. Environmental Toxicology and Chemistry, 2022, 41(10): 2512-2526
- [70] Neale P A, Feliers C, Glauch L, et al. Application of *in vitro* bioassays for water quality monitoring in three drinking water treatment plants using different treatment processes including biological treatment, nanofiltration and ozonation coupled with disinfection [J]. Environmental Science: Water Research & Technology, 2020, 6(9): 2444-2453
- [71] Escher B I, Dutt M, Maylin E, et al. Water quality assessment using the AREc32 reporter gene assay indicative of the oxidative stress response pathway [J]. Journal of Environmental Monitoring, 2012, 14(11): 2877-2885
- [72] Phan L T, Schaar H, Reif D, et al. Long-term toxicological monitoring of a multibarrier advanced wastewater treatment plant comprising ozonation and granular activated carbon with *in vitro* bioassays [J]. Water, 2021, 13(22): 3245

- [73] Völker J, Stapf M, Miehe U, et al. Systematic review of toxicity removal by advanced wastewater treatment technologies via ozonation and activated carbon [J]. *Environmental Science & Technology*, 2019, 53(13): 7215-7233
- [74] Escher B I, Glauch L, König M, et al. Baseline toxicity and volatility cutoff in reporter gene assays used for high-throughput screening [J]. *Chemical Research in Toxicology*, 2019, 32(8): 1646-1655
- [75] Escher B I, Henneberger L, König M, et al. Cytotoxicity burst? Differentiating specific from nonspecific effects in Tox21 *in vitro* reporter gene assays [J]. *Environmental Health Perspectives*, 2020, 128(7): 77007
- [76] Wang Y K, Wang X C, Ma X Y. Micropollutants and biological effects as control indexes for the operation and design of shallow open-water unit ponds to Polish domestic effluent [J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2021, 418: 126306
- [77] van Ede K I, van Duursen M B M, van den Berg M. Evaluation of relative effect potencies (REPs) for dioxin-like compounds to derive systemic or human-specific TEFs to improve human risk assessment [J]. *Archives of Toxicology*, 2016, 90(6): 1293-1305
- [78] Serra H, Brion F, Chardon C, et al. Estrogenic activity of surface waters using zebrafish- and human-based *in vitro* assays: The Danube as a case-study [J]. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 2020, 78: 103401
- [79] Daniels K D, VanDervort D, Wu S M, et al. Downstream trends of *in vitro* bioassay responses in a wastewater effluent-dominated river [J]. *Chemosphere*, 2018, 212: 182-192
- [80] Conley J M, Evans N, Cardon M C, et al. Occurrence and *in vitro* bioactivity of estrogen, androgen, and glucocorticoid compounds in a nationwide screen of United States stream waters [J]. *Environmental Science & Technology*, 2017, 51(9): 4781-4791
- [81] Harrill J, Shah I, Setzer R W, et al. Considerations for strategic use of high-throughput transcriptomics chemical screening data in regulatory decisions [J]. *Current Opinion in Toxicology*, 2019, 15: 64-75
- [82] Bourdon-Lacombe J A, Moffat I D, Deveau M, et al. Technical guide for applications of gene expression profiling in human health risk assessment of environmental chemicals [J]. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 2015, 72(2): 292-309
- [83] Krewski D, Acosta D Jr, Andersen M, et al. Toxicity testing in the 21st Century: A vision and a strategy [J]. *Journal of Toxicology and Environmental Health Part B, Critical Reviews*, 2010, 13(2-4): 51-138
- [84] Schuijt L M, Peng F J, van den Berg S J P, et al. (Eco) toxicological tests for assessing impacts of chemical stress to aquatic ecosystems: Facts, challenges, and future [J]. *The Science of the Total Environment*, 2021, 795: 148776 ◆