浓度加和模型在化学混合物毒性评估中的应用

刘树深* 刘玲 陈浮

(同济大学环境科学与工程学院长江水环境教育部重点实验室 上海 200092)

摘要 化学污染物总是以混合物形式存在于实际环境体系中。化学混合物的毒性评估与预测是环境化学领域当前的研究热点与难题。要评估与预测一个化学混合物的毒性效应,首先要证明其是否具有加和性。目前有 3 个加和参考模型即浓度加和模型(CA)、独立作用模型(IA)与效应相加模型(ES)用于化学混合物毒性的加和性检验。如果混合物效应明显偏离加和参考模型预测效应,则认为该混合物产生毒性相互作用,即协同或拮抗。选择不同的加和参考模型可能得出不同的相互作用结论。ES 模型最早广泛应用,但不能解释由同一化合物构成的所谓虚拟组合现象,应用已开始受到限制。IA 模型被认为适用于具有相异作用模式的化合物构成的混合物,而 CA 模型适用于相似作用模式化合物构成的混合物并能合理解释 ES 模型不能解释的虚拟组合现象,常常认为是化学混合物毒性预测的标准模型。然而,由于 CA 模型目前没有坚实的理论支持,也不能直接联系混合物毒性作用机理,同时在浓度-效应曲线的部分区域存在不能预测的所谓“预测盲区”,因此,CA 模型也只是一个工作模型,需谨慎使用。

关键词 化学混合物; 虚拟组合; 效应相加; 效应加和; 预测盲区

Application of the Concentration Addition Model in the Assessment of Chemical Mixture Toxicity

Liu, Shushen* Liu, Ling Chen, Fu

(Key Laboratory of Yangtze River Water Environment, Ministry of Education, College of Environmental Science and Engineering, Tongji University, Shanghai 200092)

Abstract Various chemical pollutants are always existing as mixtures in real environment. Currently, the assessment and prediction of chemical mixture toxicity is the hotspots and difficulties in environmental chemistry. To accurately assess and predict the toxicity of a chemical mixture, it is necessary to validate whether the toxicities of various components in the mixture is additive or not. Three common additive reference models, the effect summation (ES), concentration addition (CA), and independent action (IA), are available to determine the toxicity interaction. Synergism or antagonism between the components in a mixture can be identified if the observed toxicity of the mixture deviates from the prediction in terms of ES, CA, or IA. The resulting interaction type (synergism or antagonism) may be inconsistent according to those reference models applied. Although the ES model is the earliest application model proposed to assess and predict mixture toxicity, its application in environmental chemistry was affected due to its limit in the interpretation of the so-called sham combination constructed by the same compound. The IA model is suitable to model the toxicities of mixtures consisting of the components showing dissimilar modes of actions. The CA can predict the toxicities of the mixtures consisting of the chemicals with similar modes of actions and can rationally interpret the sham combination which is impossible to be depicted by the ES model. The CA is therefore often considered as a standard additive model for the toxicity prediction of a chemical mixture. However, the CA is only a pragmatic model because it has no solid theory basis and no direct connection with the mechanism of action resulting in toxicity. Furthermore, there are so-called predictive blind zones in some concentration intervals on the concentration-response curve where the toxicities of mixtures cannot be predicted by the CA. So, it is necessary to carefully use the CA model.

Keywords chemical mixture; sham combination; effect summation; response addition; predictive blind zone

1 引言

环境体系中化学污染物的联合效应评估与预测已逐渐成为环境化学领域的研究热点与难题之一^[1~4],具有挑战性。同样的化学污染物(以下简称化学物)组分可

以通过不同的组合方式构成多种多样的混合物,对生物体产生各种不同的毒性效应。这些毒性效应可能是加和的,也可能是非加和的(协同或拮抗)。要正确评估和预测某混合物体系在不同组成时的毒性效应必须首先选择合适的加和参考模型以确定其毒性是否具有加和性。

* E-mail: sslu@263.net

Received April 1, 2013; published June 13, 2013.

Project supported by the National Natural Science Foundation of China (Nos. 21177097, 20977065) and Specialized Research Fund for the Doctoral Program of Higher Education (Nos. 20120072110052).

项目受国家自然科学基金(Nos. 21177097, 20977065)和高等学校博士学科点专项科研基金(No. 20120072110052)资助。

如果混合物毒性与由选定的加和参考模型预测的毒性一致,则认为混合物毒性具有加和性,此时混合物体系的毒性可由该参考模型预测.如果混合物毒性偏离预测毒性,则认为该混合物具有毒性相互作用即协同(大于预测毒性)或拮抗(小于预测毒性),其毒性是非加和的,不能由加和模型预测.目前在化学混合物毒性研究中最流行的加和参考模型是浓度加和(concentration addition, CA)模型.另外,也常使用独立作用(independent addition, IA)与效应相加(effect summation, ES)模型^[5-7].

CA 也称 Bliss 加和(Bliss Addition)或剂量加和(dose addition).数学上 CA 模型可表示为:

$$\sum_{i=1}^m \frac{c_i}{EC_{x,i}} = 1 \quad (1)$$

式中 m 是混合物包含的组分数, c_i 为混合物效应为 x 时该混合物中第 i 个化学物组分的浓度; $EC_{x,i}$ 为第 i 个组分的等效效应浓度,即第 i 个组分单独存在时引起与混合物效应 x 相等效应时该组分的浓度.在很多经典文献中, (1)式中的 $(c_i/EC_{x,i})$ 称为第 i 个组分的毒性单位(Toxicity Unit, TU).因此,如果一个混合物的毒性是加和的,那么该混合物中各组分的毒性单位之和等于 1.由于 CA 模型可以合理地解释具有不同类型浓度-效应曲线(concentration-response curve, CRC)的化学物构成的混合物的毒性效应,所以 CA 模型广泛应用于化学混合物的环境毒理效应评估与预测^[8-12].

常常伴随 CA 模型广泛应用的另一个加和参考模型是独立作用模型 IA. IA 也称效应或响应加和(Response addition)与 Loewe 加和(Loewe Addition)^[13,14]. IA 模型可写为:

$$E(c_{\text{mix}}) = 1 - \prod_{i=1}^m (1 - E(c_i)) \quad (2)$$

式中 c_{mix} 是混合物的总浓度, $E(c_i)$ 是第 i 个组分独立存在且其浓度为 c_i 时产生的效应, $E(c_{\text{mix}})$ 是混合物的效应.这里混合物总浓度 c_{mix} 定义为该混合物中各个组分的浓度 c_i 之和,即

$$c_{\text{mix}} = \sum_{i=1}^m c_i \quad (3)$$

事实上,最早应用且最容易理解的加和模型是效应相加模型 ES. ES 认为,一个化学混合物的总效应等于其中各个组分效应的加和:

$$E(c_{\text{mix}}) = \sum_{i=1}^m E(c_i) \quad (4)$$

研究表明,很多环境污染物的毒理效应呈现非单调非线性的作用规律,既不是浓度线性的,也不是浓度对数线性的^[15-17].由式(4)可知,对于由具有非线性 CRC 特征的化学物构成的混合物,其效应加和性显然不能应

用经典的 ES 模型进行检验.正确地评估具有不同 CRC 特征的化学组分构成的混合物是否具有加和性,需要选择合适的加和参考模型.三种参考模型中,CA 模型适用于评估浓度线性和浓度对数线性 CRC 特征污染物的混合物效应,以及某些非线性非单调 CRC 特征污染物的混合物效应,因此已被美国环境保护署(US EPA)及欧盟等作为混合物的联合毒性效应评估的标准参考模型.然而,CA 模型现在仍只是一个工作模型,缺乏坚实的理论支持,也不直接与毒性机理相关,同时在 CRC 上的某些浓度区域还存在所谓的预测盲区,建议谨慎使用.

2 CA 的广泛应用

2.1 合理解释“虚拟组合”

ES 模型认为在加和情况下一个混合物的效应是该混合物中各个组分的效应之和^[5].由方程(4)可知,只有混合物中各个组分的 CRC 呈浓度线性关系即效应随浓度的变化是线性时才是正确的.如果 CRC 不是浓度线性关系,将 ES 模型应用于由同一个化学物构成的所谓“虚拟组合(Sham combination)”混合物,就有可能得出协同或拮抗作用而不是加和作用的错误结论.图 1 给出了由一个环境中普遍存在的具有 S 型 CRC 特征的化学物的虚拟组合示例.这里,假定混合物由两个浓度都为 C_1 的同一化学物(虚拟为 A 和 B)构成.从化学物 A 和 B 的 CRC 可知, A 和 B 单独存在且浓度为 C_1 时效应均为 0.2 (A 与 B 实际为同一化学物),虚拟混合物(总浓度为 $2C_1$)的效应为 0.85(图 1).因为这是一个虚拟混合物,不同浓度下的毒性效应应该具有加和性.然而,以 ES 模型对该虚拟混合物的效应进行评估时,其预测效应则为 $0.2 + 0.2 = 0.4$,明显低于混合物实际值(0.85),从而判别该虚拟混合物具有协同相互作用.显然,这个结论与事实(同一化学物)不符,是错误的.

图 1 假定由浓度为 C_1 的同一化学物构成的虚拟混合物,由 ES 模型判别有协同作用,由 CA 模型仍判定为加和作用

Figure 1 A sham mixture consisting of the same compound with the concentration of C_1 displays a synergism based on the effect summation and is still additive action based on the concentration addition

由式(4)可知,ES 模型只适宜于评估 CRC 曲线呈浓度线性关系(图 1 中虚线)的化学混合物.事实上,环境化学物的 CRC 只在某些特殊的情况下或很窄的浓度范

围才呈浓度线性关系,大多数呈浓度对数线性关系.近年来还发现多个化学污染物比如环境内分泌干扰物存在非单调的浓度-效应关系^[18~23].因此,ES 在环境化学物的混合毒理效应研究中开始受到质疑.

由式(1)表示的 CA 模型可知,如果一个混合物的毒性效应具有加和相互作用(也称无相互作用或无毒性相互作用),则其中各个组分浓度(c_i)与某参考效应浓度(比如半数效应浓度 EC_{50})的浓度分数之和等于 1.或者说混合物中各个组分的毒性单位(toxic unit, TU)之和等于 1. CA 虽然没有 ES 模型直接和易于理解,却被认为是到目前为止最为合理的加和参考模型之一.因为,CA 模型可以合理地解释虚拟组合(混合物)现象,不会得出同一种化学物存在协同或拮抗相互作用的错误结论.对于上述由浓度均为 C_1 的化学物 A 和 B 构成的虚拟混合物(浓度为 $2C_1$),直接选择 EC_{85} 为 CA 模型的参考效应浓度,则 A 与 B 在效应为 0.85 时的浓度均为 $2C_1$,代入式(1),有:

$$\frac{c_A}{EC_{85,A}} + \frac{c_B}{EC_{85,B}} = \frac{C_1}{2C_1} + \frac{C_1}{2C_1} = 1$$

结果 A 与 B 的毒性单位之和等于 1,判别为加和作用.

不难推断,不管化学物具有浓度线性或浓度对数线性的 CRC,还是具有非单调的 CRC,由相同化学物构成的所谓“虚拟组合”混合物的效应均可以用 CA 模型进行合理解释.因此,CA 被 US EPA 推荐为化学混合物效应评估的加和参考模型.

2.2 “无中生有”不是协同

ES 加和模型的经典协同或拮抗定义在许多环境毒理学研究中证明是有差异的.例如,多个处于无观测效应浓度(NOEC)甚至低于 NOEC 的化学物构成的混合物体系,根据 ES 模型分析时其混合物效应应该等于零,而实际效应却明显大于零,产生所谓“无中生有”的现象,即 ES 模型认为的经典“协同”作用. Silva 等^[24]在测定环境中 8 种双酚 A 类化学物全部在无观测效应浓度(NOEC)时构成的混合物的毒性效应时,发现混合物效应明显大于零(图 2A). Faust 等^[25]发现 18 种三嗪类农药在低于 NOEC(均为 EC_1)进行混合时,其毒性效应达 47.1% (图 2B). 如用 ES 模型来分析这两个混合物都判别为明显协同作用.然而,如果用 CA 模型来分析这两个所谓的“无中生有”混合物,其结果是典型的浓度加和作用,而不存在协同作用.我们^[26]在考察具有非单调 CRC 特征的 10 个离子液体混合物的毒性效应时也发现无中生有的现象,但它们均可以用 CA 模型进行解释.

2.3 等效线图分析毒性相互作用

等效线图(Isobologram)最早由 Loewe^[27]于 1953 年提出. 1981 年 Berebaum 给出了多种生物活性物质混合物的等效线图^[28],分析了混合物毒性相互作用,进而判别这些混合物是否产生协同、加和或拮抗作用.等效线图还可用于多种药物的联合效应及多种环境污染物的

图 2 无中生有示例(改编自文献[24, 25])

A: 8 种双酚 A 类化学物在无观测效应浓度(NOEC)时的混合物产生了明显的毒性效应; B: 18 种三嗪类农药在低于 NOEC(均为 EC_1)进行混合时其效应为 47.1%

Figure 2 Examples of something from nothing (adapted from the literatures [24, 25])

A: The mixture consisting of eight biphenol A analogs with the no observed effect concentration (NOEC) exhibited a significant toxicity; B: The mixture consisting of 18 triazine pesticides below the NOEC (EC_1) produced a toxicity of 47.1%

联合毒性检验^[29~31]. 图 3A 给出了由化学物 1 和化学物 2 组成的所有二元混合物在混合物效应为 50%时各组分的浓度分布. 如果这些浓度分布点都在一条对角直线(称 CA 加和线)上,则认为是(浓度)加和的,没有相互作用. 如果分布在直角线(称独立线)上,说明该混合物的效应只与其中某一组分的浓度有关. 若在 CA 线之下,则认为有协同作用. 若在独立线之外则认为存在拮抗作用. 若位于 CA 线与独立线之间则称为部分加和作用.

图 3 基于 CA 和独立概念的经典等效线图(A)与基于 CA, IA 和 ES 的等效线图(B)

Figure 3 Isobograms based on the concentration addition (CA) and the independent concept (A) and on CA, IA and ES (B)

应该指出,图 3A 中的独立线是基于药理学中相互独立的概念推导出来的,与 Loewe 定义的独立作用模型 IA(式(2))的预测线是完全不一样的. 基于相互独立概念的独立线是直角,而基于 IA 的加和线一般是曲线(图 3B). 分析药物或环境污染物的相互作用是否是协同或拮抗必须指明判别加和作用的参考模型,选择不同

的加和参考模型(CA, IA 或 ES)可能得到不同的相互作用结论.

2.4 应用置信区间分析混合物相互作用

化学污染物及其混合物的毒性实验存在随机误差, 浓度-效应曲线(CRC)拟合也会产生拟合误差, 因此合理表征浓度-效应曲线及其置信区间非常重要. 目前文献中存在两种形式的置信区间(Confidence interval, CI), 即拟合函数的置信区间(Function-based confidence interval, FCI)和基于实验观测值的置信区间(Observation-based confidence interval, OCI). 朱祥伟等^[32]在浓度-效应曲线非线性拟合的基础上, 给出了FCI和OCI的计算原理, 分析了FCI与OCI表征CRC曲线的利弊, 证明在讨论混合物协同、拮抗或加和作用时采用OCI表征比FCI更合理. 实验点及其95%置信区间位于参考模型预测的加和线的左边则为协同作用(如图4), 位于右边则为拮抗作用.

图4 基于观测置信区间的混合物毒性相互作用分析. 如果加和参考模型预测CRC (Ref)位于实验CRC右边为协同, 如果位于左边为拮抗, 如果位于实验CRC置信区间内, 则为加和

Figure 4 Toxicity interaction analysis of a mixture based on the observation-based confidence intervals (OCI). It is synergistic if the CRC predicted by an additive reference model is located at the right side of the observed CRC, and antagonistic if located at the left side, and additive if located between the upper limit and lower limit of the OCI

●: experimental scatters; ---: 95% observation-based CI; —: fitted CRC

2.5 CA 与 IA 有不同的应用范围

相比ES模型, CA和IA作为加和参考模型近年来经常用于混合污染物的联合毒性评价^[33~38]. 例如, Zhang等^[39]以CA和IA模型为参考模型评估了离子液体与有机磷农药间产生的毒性相互作用; Backhaus等^[40]也曾用CA和IA模型对喹诺酮类物质构成的混合物体系进行毒性评估. 综合现有的文献报道, CA被认为适用于具有相似作用模式化学物的混合物, 而IA则适用于具有相异作用模式化学物的混合物. 例如, 由25种具有相似作用模式的除草剂构成的混合物, 其混合物毒性可用CA模型准确预测^[41]; 由16种相异作用模式的化学品构成的混合物可以用IA模型进行准确预测^[42]. 然而, 由于大多数污染物对相关靶标的作用机理尚不明确以及如何判定“相异”作用模式的难题无法解决, 何时应用CA或IA仍是悬而未决的问题.

在实际工作中, CA预测的CRC可能高于、低于或等于IA预测的CRC(图5), 这取决于混合物包含的组分数目、各组分浓度分数、组分CRC特征等多个因素. 16种相异作用物质^[42]、均三嗪除草剂混合物^[25]、25种除草剂相似作用物质^[41]以及4种多环芳烃相似作用物质^[43]等构成的混合物体系, 其CA模型预测CRC明显高于IA模型预测CRC. 苯酚及其衍生物^[44]和苯胺类^[45]混合物, 其CA预测CRC则小于IA预测. Payne等^[46]发现DDT、木黄酮、丁基酚与壬基酚的混合物, 其CA与IA预测CRC是相互交叉的. 宋晓青等^[47]则发现部分除草剂与重金属混合物体系中有3个混合物, 在总效应为40%以下时, 实验毒性与CA或IA预测的毒性基本一致, 但随总浓度增加, CA与IA预测的差别逐渐增大, 实验效应数据点更接近于CA预测曲线.

图5 CA预测CRC可能高于(A)或低于(B)IA预测CRC

Figure 5 The CRC predicted by CA may be higher (A) or lower (B) than that by IA

3 使用CA需谨慎

3.1 CA 只是一个工作模型

很多文献认为CA模型适用于评估具有相似作用模式化学物构成的混合物体系^[48~50]. 然而, 迄今为止大多数化学污染物对相关靶标的作用位点与作用模式是未知的, 作用模式的相似度(相似或相异)问题并没有一个严格、统一的评判标准. 事实上, 目前关于作用模式或机理的知识更多地适用于化学物具有浓度线性关系的混合物体系. 因此, CA仍只是一个工作模型^[51], 没有坚实的理论支持, 也不直接与作用机理相互关联.

3.2 CA 存在预测盲区

从CA模型(式(1))可以看出, 要应用CA模型预测某个效应的混合物总浓度, 就必须保证混合物中的各个组分单独存在时有此效应浓度. 如果其中某组分没有这一效应浓度, 就没法应用CA模型, 即CA模型可能存在某些预测盲区(图6). 图6A中效应在区间(0.60~0.85)内组分1有此效应浓度而组分2没有, 此区域即为CA的预测盲区; 图6B中效应在区间(-0.6~0.4)内组分2有此效应浓度而组分1没有, 在区间(0.5~0.9)内组分1有此浓度而组分2没有, 此两段区间也为CA预测盲区.

图6 单调CRC特征混合物体系(A)与非单调CRC混合物体系的预测盲区示例(CA不能预测双箭头所指效应)

Figure 6 Examples of predictive blind zones in the mixture systems where the chemicals and their mixture have monotonic CRCs (A) or non-monotonic CRCs (B) (The effects specified by the double-headed arrows cannot be predicted by CA)

4 总结

在化学混合物毒性评估与预测时, CA模型适用于具有不同浓度-效应曲线的化学物构成的混合物。由于CA被认为适用于评估相似作用模式化学物构成的混合物体系以及比IA评估风险更为保守, 故常作为化学混合物风险评估的默认模型。然而CA模型没有坚实的理论支持并在某些效应区域存在预测盲区, 因此仍是一个工作模型, 应该谨慎使用。

作者简介

刘树深, 博士, 教授、博士生导师。全国优秀博士学位论文获得者。长期从事化学计量学及其在环境科学中应用研究。近期主要研究方向为化学混合物分析毒理与分子模拟。主持国家自然科学基金、国家863项目专题课题、全国优秀博士学位论文作者专项、上海市重点基础研究计划、广西十百千人才计划等国家及省部级课题20余项。近年在国内外学术期刊发表论文100余篇, 其中SCI收录70多篇, SCI引用700余次, H影响因子15。出版有《基础化学计量学》和《有机物分子电性距离矢量表征及其应用》。获计算机软件著作权证书5个。已培养博士生7人, 硕士生20人。

References

- [1] Backhaus, T.; Faust, M. *Environ. Sci. Technol.* **2012**, *46*(5), 2564.
- [2] Vacchi, F. I.; Albuquerque, A. F.; Vendemiatti, J. A.; Morales, D. A.; Ormond, A. B.; Freeman, H. S.; Zocolo, G. J.; Zanoni, M. V. B.; Umbuzeiro, G. *Sci. Total Environ.* **2013**, *442*, 302.
- [3] Spurgeon, D. J.; Jones, O. A. H.; Dorne, J. L. C. M.; Svendsen, C.; Swain, S.; Sturzenbaum, S. R. *Sci. Total Environ.* **2010**, *408*(18), 3725.
- [4] Dominguez-Cortinas, G.; Diaz-Barriga, F.; Isabel Martinez-Salinas,

- R.; Cossio, P.; Nelinho Pérez-Maldonado, I. *Environ. Sci. Pollut. Res.* **2013**, *20*(1), 351.
- [5] Berenbaum, M. J. *Theor. Boil.* **1985**, *114*, 413.
- [6] Cedergreen, N.; Christensen, A. M.; Kamper, A.; Kudsk, P.; Mathiassen, S. K.; Streibig, J. C.; Sorensen, H. *Environ. Toxicol. Chem.* **2008**, *27*(7), 1621.
- [7] Martin, H. L.; Svendsen, C.; Lister, L. J.; Gomez-Eyles, J. L.; Spurgeon, D. J. *Environ. Toxicol. Chem.* **2009**, *28*(1), 97.
- [8] Silva, E.; Rajapakse, N.; Scholze, M.; Backhaus, T.; Ermler, S.; Kortenkamp, A. *Toxicol. Sci.* **2011**, *122*(2), 383.
- [9] Porsbring, T.; Backhaus, T.; Johansson, P.; Kuylenstierna, M.; Blanck, H. *Environ. Toxicol. Chem.* **2010**, *29*(12), 2806.
- [10] Bosgra, S.; van Eijkeren, J. C. H.; Slob, W. *Crit. Rev. Toxicol.* **2009**, *39*(5), 418.
- [11] Fischer, B. D. *CNS Neurol. Disord.-Drug Targets* **2011**, *10*(5), 529.
- [12] Abendroth, J. A.; Blankenship, E. E.; Martin, A. R.; Roeth, F. W. *Weed Technol.* **2011**, *25*(3), 436.
- [13] Backhaus, T.; Arrhenius, A.; Blanck, H. *Environ. Sci. Technol.* **2004**, *38*(23), 6363.
- [14] Backhaus, T.; Faust, M.; Scholze, M.; Gramatica, P.; Vighi, M.; Grimme, L. H. *Environ. Toxicol. Chem.* **2004**, *23*(2), 258.
- [15] Liu, S. S.; Zhang, J.; Zhang, Y. H.; Qin, L. T. *Acta Chim. Sinica* **2012**, *70*, 1511. (刘树深, 张瑾, 张亚辉, 覃礼堂, 化学学报, **2012**, *70*, 1511.)
- [16] Liu, S. S.; Song, X. Q.; Liu, H. L.; Zhang, Y. H.; Zhang, J. *Chemosphere* **2009**, *75*, 381.
- [17] Wang, L. J.; Liu, S. S.; Yuan, J.; Liu, H. L. *Chemosphere* **2011**, *84*, 1440.
- [18] Rylee, P. D.; Stahlhut, R. W.; Ponzi, D.; vom Saal, F. S.; Taylor, J. A. *Reprod. Toxicol.* **2012**, *34*(4), 614.
- [19] Andrade, A. J. M.; Grande, S. W.; Talsness, C. E.; Gericke, C.; Grote, K.; Golombiewski, A.; Sterner-Kock, A.; Chahoud, I. *Toxicology* **2006**, *227*(3), 185.
- [20] Zhu, X. W.; Liu, S. S.; Qin, L. T.; Chen, F.; Liu, H. L. *Ecotox. Environ. Safety* **2013**, *89*, 130.
- [21] Conolly, R. B.; Lutz, W. K. *Toxicol. Sci.* **2004**, *77*, 151.
- [22] Jenkins, S.; Wang, J.; Eltoum, I.; Desmond, R.; Lamartiniere, C. A. *Environ. Health Perspect* **2011**, *119*, 1604.
- [23] Vandenberg, L. N.; Colborn, T.; Hayes, T. B.; Heindel, J. J.; Jacobs, D. R., Jr.; Lee, D. H.; Shioda, T.; Soto, A. M.; vom Saal, F. S.; Welshons, W. V.; Zoeller, R. T.; Myers, J. P. *Endocr. Rev.* **2012**, *33*, 378.
- [24] Silva, E.; Rajapakse, N.; Kortenkamp, A. *Environ. Sci. Technol.* **2002**, *36*(8), 1751.
- [25] Faust, M.; Altenburger, R.; Backhaus, T.; Blanck, H.; Boedeker, W.; Gramatica, P.; Hamer, V.; Scholze, M.; Vighi, M.; Grimme, L. H. *Aquat. Toxicol.* **2001**, *56*(1), 13.
- [26] Ge, H. L.; Liu, S. S.; Zhu, X. W.; Liu, H. L.; Wang, L. J. *Environ. Sci. Technol.* **2011**, *45*, 1623.
- [27] Loewe, S. *Arzneimittelforschung* **1953**, *3*, 285.
- [28] Berenbaum, M. C. *Adv. Cancer Res.* **1981**, *35*, 269.
- [29] Tallarida, R. J. *J. Pharmacol. Exp. Therap.* **2006**, *319*(1), 1.
- [30] Rodea-Palomares, I.; Petre, A. L.; Boltes, K.; Leganes, F.; Perdigon-Melon, J. A.; Rosal, R.; Fernandez-Pinas, F. *Water Res.* **2010**, *44*(2), 427.
- [31] Sorensen, H.; Cedergreen, N.; Skovgaard, I. M.; Streibig, J. C. *Environ. Ecol. Stat.* **2007**, *14*(4), 383.
- [32] Zhu, X. W.; Liu, S. S.; Ge, H. L.; Liu, Y. *China Environ. Sci.* **2009**, *29*(2), 113. (朱祥伟, 刘树深, 葛会林, 刘堰, 中国环境科学, **2009**, *29*(2), 113.)
- [33] Baldwin, W. S.; Roling, J. A. *Toxicol. Sci.* **2009**, *107*(1), 93.
- [34] Cedergreen, N.; Christensen, A. M.; Kamper, A.; Kudsk, P.; Mathiassen, S. K.; Streibig, J. C.; Sorensen, H. *Environ. Toxicol. Chem.* **2008**, *27*(7), 1621.
- [35] Wang, Z.; Chen, J. W.; Huang, L. P.; Wang, Y.; Cai, X. Y.; Qiao, X. L.; Dong, Y. Y. *Chemosphere* **2009**, *74*(5), 735.
- [36] Ermler, A. J.; Spurgeon, D. J.; Svendsen, C.; Griffin, J. L.; Swain, S. C.; Sturzenbaum, S. R.; Jones, O. A. H. *Ecotoxicology* **2012**, *21*(5), 1436.
- [37] Christen, V.; Crettaz, P.; Oberli-Schraemli, A.; Fent, K. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **2012**, *259*(2), 169.
- [38] Ermler, S.; Scholze, M.; Kortenkamp, A. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **2011**, *257*(2), 189.
- [39] Zhang, J.; Liu, S. S.; Zhang, J.; Qin, L. T.; Deng, H. P. *J. Hazard. Mater.* **2012**, *239*~240, 102.
- [40] Backhaus, T.; Scholze, M.; Grimme, L. H. *Aquat. Toxicol.* **2000**,

- 49(1~2), 49.
- [41] Altenburger, R.; Backhaus, T.; Boedeker, W.; Faust, M.; Scholze, M.; Grimme, L. H. *Environ. Toxicol. Chem.* **2000**, 19(9), 2341.
- [42] Backhaus, T.; Altenburger, R.; Boedeker, W.; Faust, M.; Scholze, M.; Grimme, L. H. *Environ. Toxicol. Chem.* **2000**, 19(9), 2348.
- [43] Olmstead, A. W.; LeBlanc, G. A. *Aquat. Toxicol.* **2005**, 75(3), 253.
- [44] Mo, L. Y.; Liu, S. S.; Liu, H. L. *China Environ. Sci.* **2008**, 28(4), 334. (莫凌云, 刘树深, 刘海玲, 中国环境科学, **2008**, 28(4), 334.)
- [45] Ge, H. L.; Liu, S. S.; Liu, F. *Asian J. Ecotoxicol.* **2006**, 1(4), 295. (葛会林, 刘树深, 刘芳, 生态毒理学报, **2006**, 1(4), 295.)
- [46] Payne, J.; Rajapakse, N.; Wilkins, M.; Kortenkamp, A. *Environ. Health Perspect.* **2000**, 108(10), 983.
- [47] Song, X. Q.; Liu, S. S.; Liu, H. L.; Ge, H. L. *Asian J. Ecotoxicol.* **2008**, 3(3), 237. (宋晓青, 刘树深, 刘海玲, 葛会林, 生态毒理学报, **2008**, 3(3), 237.)
- [48] Villa, S.; Migliorati, S.; Monti, G. S.; Vighi, M. *Ecotoxicol. Environ. Safety* **2012**, 86, 93.
- [49] Barata, C.; Fernandez-San Juan, M.; Feo, M. L.; Eljarrat, E.; Soares, A. M. V. M.; Barcelo, D.; Baird, D. J. *Environ. Sci. Technol.* **2012**, 46(17), 9663.
- [50] Neuwoehner, J.; Fenner, K.; Escher, B. I. *Environ. Sci. Technol.* **2009**, 43(17), 6830.
- [51] Altenburger, R.; Nendza, M.; Schuurmann, G. *Environ. Toxicol. Chem.* **2003**, 22(8), 1900.

(Zhao, X.)