

DOI:10.7524/AJE.1673-5897.20170114001

李恺, 刘树深, 屈锐. 组合指数在环境混合物联合毒性研究中的初步应用[J]. 生态毒理学报, 2017, 12(3): 62-71

Li K, Liu S S, Qu R. Application of the combination index in the assessment of combined toxicity of environmental mixture [J]. Asian Journal of Ecotoxicology, 2017, 12(3): 62-71 (in Chinese)

组合指数在环境混合物联合毒性研究中的初步应用

李恺^{1,2}, 刘树深^{1,2,*}, 屈锐^{1,2}

1. 长江水环境教育部重点实验室, 上海 200092

2. 同济大学环境科学与工程学院, 上海 200092

收稿日期: 2017-01-14 录用日期: 2017-03-02

摘要: 化学品在实际环境中总是以组分繁杂多变的混合物形式存在, 其混合物的毒性评估与预测一直是环境毒理学研究重点。在环境毒理学领域, 浓度加和(concentration addition, CA)及独立作用(independent action, IA)是评估与预测化学混合物联合毒性的经典模型, 一般认为 CA 适用于作用模式相似的混合物体系而 IA 适用于作用模式相异的混合物体系, 但如何使用 CA 与 IA 一直存在争议。组合指数(combination index, CI)是在半数效应方程基础上发展起来的不依赖于作用模式的用于混合物联合毒性评估的混合物毒性指数, 具有坚实的理论基础, 不仅能定性地评估毒理学相互作用, 也能定量地评估相互作用的大小, 已在药物组合研究中得以广泛应用, 近年来已引起环境毒理学研究者兴趣。本文就组合指数及药物组合应用、进入环境毒理学领域、与 CA 及 IA 的关系、存在的问题等几个方面进行评述, 以期推进 CI 在化学混合物毒性评估与预测领域中的应用。

关键词: 组合指数; 药物组合; 联合毒性; UD-Ray; 置信区间

文章编号: 1673-5897(2017)3-062-10 中图分类号: X171.5 文献标识码: A

Application of the Combination Index in the Assessment of Combined Toxicity of Environmental Mixture

Li Kai^{1,2}, Liu Shushen^{1,2,*}, Qu Rui^{1,2}

1. Key Laboratory of Yangtze River Water Environment, Ministry of Education, Shanghai 200092, China

2. College of Environmental Science and Engineering, Tongji University, Shanghai 200092, China

Received 14 January 2017 accepted 2 March 2017

Abstract: Various chemicals always exist as complex mixtures in real environment. The assessment and prediction of toxicity for chemical mixtures has been the research focus in environmental toxicology. The concentration addition (CA) and independent action (IA) are the classic additive reference models for the toxicity assessment and prediction of chemical mixture. It is generally recognized that the IA model is suitable to estimate the toxicities of the mixtures of the components showing dissimilar modes of actions (MOA), and the CA to the mixtures consisting of the chemicals with similar MOA. But how to correctly use CA and IA has been controversial for a long time. Combination index (CI) has solid theory basis for the reason that it is based on the median-effect equation and inde-

基金项目: 国家自然科学基金(21377097, 21177097)

作者简介: 李恺(1986-), 男, 博士研究生, 研究方向为化学混合物毒理学, E-mail: lee2061@163.com;

* 通讯作者(Corresponding author), E-mail: ssluohl@263.net

pendent of the toxic MOA, and CI could qualitatively determine the toxicological interactions and quantitatively evaluate the degree of interaction. The CI has been widely used in drug combination. In recent years, CI is increasingly attracting interests of environmental toxicology researchers. In this review, the fundamental concepts and its application to drug combination and environmental toxicology field, the differences between CI and CA (or IA), and the existing problems are summarized, aiming to propel the applications of CI in mixture toxicity assessment and prediction.

Keywords: combination index; drug combination; combined toxicity; UD-Ray; confidence intervals

由不同来源及不同种类化学品组成的化学混合物普遍存在于实际环境体系中,产生的累积与毒性相互作用具有潜在的生态环境与健康风险^[1-2]。利用单个化学组分的浓度-效应信息评估或预测不同浓度组成混合物的毒性效应,是目前化学混合物毒性研究的流行方法^[3]。

目前,广泛应用的评估混合物联合毒性的加和模型主要是效应相加(effect summation, ES)、浓度加和(concentration addition, CA)和独立作用(independent action, IA)模型。由于ES模型无法解释“虚拟组合”现象^[4]以及将“无中生有”(something from nothing)现象解释为潜在协同作用^[2],因而逐渐淘汰。

一般认为,CA模型适用于具有相似作用模式的混合物体系,而IA模型则适用于具有相异作用模式的混合物体系^[1,5-7]。然而,这2种方法也存在不足,其一,不能直观定量地表征混合物毒性相互作用的强度;其二,由于很多物质作用模式尚未可知以及如何选择相异标准也是目前无法解决的难题,因而无法正确选择CA或IA^[8-9]。Chou等^[10-14]通过多年的理论研究与实验验证,提出了基于半数效应方程但不依赖于作用模式的组合指数(combination index, CI)来评估混合物毒性相互作用,并已广泛地应用于药物组合研究^[15-17]。近年来开始引起环境科学工作者的关注^[18-22]。不同于CA和IA,CI既能定性地评估化学混合物毒性的相互作用,也能定量地表征其相互作用的大小。本文将对CI的提出及应用进行回顾性评述,并且思考CI方法的优化策略,以期推进其在环境毒理学领域的发展。

1 组合指数与药物组合应用 (Combination index and application of drug combination)

自1960年代以来,Chou基于质量作用原理推导了近300个方程,发现药物(drug)剂量-效应关系符合类似规律^[12,23-24],这些方程可归纳统一为一个称为半数效应方程(median effect equation, MEE)的形式^[25]:

$$\frac{f_a}{f_u} = \left(\frac{D}{D_m} \right)^m \quad (1)$$

其中 D 是药物浓度; f_a 是浓度 D 时的效应, $f_u = 1 - f_a$; D_m 是半数效应浓度; m 是表征剂量-效应关系形状的系数, $m = 1, >1$ 或 <1 分别表示双曲线、S型曲线或扁平S型曲线。

经过简单变换,MEE可以线性化为:

$$\log \left(\frac{f_a}{f_u} \right) = m \cdot \log(D) - m \cdot \log(D_m) \quad (2)$$

从线性化的MEE可知,如果药物浓度 D 与效应 f_a 都足够精确,那么已知任意2组 D 与 f_a 数据即可通过求解二元一次方程组获得 m 和 D_m 值,即确定剂量-效应曲线方程,进而求得已知效应(f_a)下的浓度(D)或已知浓度下的效应。MEE已广泛应用于药理学研究^[26-32]。

1981年在半数效应方程研究取得成功的基础上,Chou提出了不依赖于组分作用模式(mode of action, MOA)的用于评估药物联合效应的组合指数方法。设混合物由 n 个组分组成,那么在混合物效应为 $x\%$ 时的该混合物的组合指数(CI) _{x} 定义如下:

$$(CI)_x = \sum_{j=1}^n \frac{(D_x)_{1-n} \{ (D)_j / \sum_1^n (D) \}}{(D_m)_j \{ (\hat{f}_x)_j / [1 - (\hat{f}_x)_j] \}^{1/m_j}} \quad (3)$$

式中 $(D_x)_{1-n}$ 是 $x\%$ 效应时的混合物总浓度, $(D)_j$ 是组分 j 在混合物射线中某一效应(不一定是 $x\%$)的浓度, $\sum_1^n (D)$ 是该效应下混合物中各组分的浓度之和,所以 $\{ (D)_j / \sum_1^n (D) \}$ 是混合物中第 j 个组分的浓度占混合物总浓度的浓度分数或比例,由半数效应方程(方程1)可知, $(D_m)_j \{ (\hat{f}_x)_j / [1 - (\hat{f}_x)_j] \}^{1/m_j} = (D_x)_j$,表示第 j 个组分单独存在时产生 $x\%$ 效应的浓度。应用CI指数可定量地评估药物混合物的毒性相互作用^[24]。当 $CI < 1, = 1$ 与 > 1 时,分别表示该混合物产生协同、加和与拮抗相互作用。同时,CI还能定量表征相互作用的大小,CI偏离1的多少即是相互

作用的程度^[19,24]。

CI已被药理学工作者广泛应用于药物组合研究中^[33-38]。例如CI曾被用来研究植物吲哚和异硫氰酸盐对HepG2-C8细胞的相互作用^[1],研究从植物中来的酚酸对肝毒性的影响作用^[39]。Gonzálezpleiter等^[40]以鱼腥藻和绿藻为测试生物,测定了羟氨基青霉素、红霉素、左氧氟沙星、诺氟沙星和四环素单独存在及混合物毒性,采用CI方法来分析混合物,大部分混合物都出现了协同,并对比了CI、CA和IA这3种方法来预测混合物的毒性,认为CI能更准确地预测加和效应的偏离。Santillo等^[41]应用CI研究了单胺氧化酶抑制类药物(MAO)混合物对PC12、MH1C1和HuH-7细胞的毒性,发现均为加和作用。del Rio等^[42]用CI来评估组胺和酪胺2种生物胺对肠细胞的联合毒性,实时分析研究显示两者有明显的协同效应。Smith等^[43]总结了用CI对自然共生的真菌毒素联合毒性所进行的研究,认为拮抗、加和或协同作用依赖于其种类、细胞模型、混合体系,并不一定是时间或剂量依赖。在药物组合研究方面,Berenguer-Daize等^[30]用CI评估对依维霉素、SN38及替莫唑胺3种抗肿瘤药物的不同组合下的联合作用。Chen等^[44]用CI来优化2种药物对肿瘤细胞化疗效果的最佳混合比例,得出Nav:DOX质量比为2:1时最优。

在CI得到学界认可的同时,为了考察多个组分构成的多元混合物中各个组分之间的各种相互作用情况,Chou^[45]创造性地提出了剂量减少指数(dose reduction index, DRI),来表征某组分在混合物引起混合物效应的浓度比单独存在时产生效应的浓度减少的倍数。DRI是度量在有协同效应的混合物体系中,在给定的效应水平下,每一种药物与其单独使用时的剂量相比可以减少多少倍。在临床条件下,DRI至关重要,剂量减少使得对宿主的毒性减少但治疗效率保持稳定(或不变)。与DRI一并创造性提出的,还有多边形等效线图的概念和构建方法,其形象地描述多元混合物中两两组分之间的相互作用及程度^[46]。多边形的概念来自于实际应用而非数学推导^[45]。然而,要系统、简洁地表达全部的组合及对应体系在某一混合比下的相互作用是一件非常繁复的事情。例如,即使5个药物两两组合就多达10种。多边形等效线图则可简单形象地在视觉上表现出这一系列的总体结果。在药物组合研究中,CI结合DRI与多边形等效线图的应用,可以更直观有效地

表征不同药物组合所得效果,以便比较并筛选出最佳药物组合。

2 进入环境毒理学领域(Into environmental toxicology field)

药物及化学品的使用会使它们最终流向实际环境。而实际环境体系中混合暴露是一种普遍规律。因此,CI在药物组合及药理学领域的应用研究也可为环境混合物联合毒性方面的研究提供理论依据及技术支持,一脉相承。这使得CI在环境科学领域的应用极具现实意义。

近年来,CI已经引起环境科学工作者的关注,有学者用CI评估次氯酸钠(NaOCl)、EDTA和氯己定(CHX)等3种根管冲洗液两两间二元混合物对MRC5细胞的联合毒性,结果显示单个物质对细胞呈时间依赖毒性特征,且NaOCl/CHX与NaOCl/EDTA二元混合物为拮抗作用,EDTA/CHX二元混合物呈现由加和转向拮抗的趋势^[47]。Yusoff等^[48]用CI评估SG-SBR与HG-SBR中苯酚的抑制效应,并以m值来判定拟合曲线的形状,其结果为 $m < 1$,为平坦的S型,拟合数据显示抑制效应与苯酚浓度呈正相关,即微生物的抑制效应随苯酚浓度的增加而增加。Mater等^[49]评估了医药废水及地表水中的环丙沙星、三苯氧胺和环磷酰胺的生态风险,指出观测到的协同及拮抗作用必须考察低浓度及不同的时间暴露混合物的生态毒性效应。Gonzálezpleiter等^[40]研究了5种抗生素及其混合物对水生光合生物的毒性,用CI、CA和IA这3个模型评估了混合物的相互作用,认为CI能更准确地预测。Ma等^[50]应用CI对12种在中国饮食中常见的农药及其混合物对肝癌细胞的联合毒性进行了评估,二元混合物在低浓度呈拮抗、中等浓度呈加和、高浓度为协同,三元混合物有多种相互作用现象,四元、五元及更多元混合物主要呈拮抗作用,而对于2个单个物质、1个二元混合物、3个多元混合物呈现显著的时间或剂量依赖毒性,其认为产生细胞毒性可能归因于这些农药会潜在引起细胞促氧化作用或诱导细胞凋亡。

CI不仅仅在水环境等相关研究中有所应用,还更多地聚焦于多种环境介质混合污染物的毒性相互作用评价^[18,20,40]。有学者^[51]运用CI法研究2个杀虫剂,高效氯氟氰菊酯和吡虫啉,与重金属镉对蚯蚓的相互作用,发现在人工滤土试验中,高效氯氟氰菊酯和镉在低效应时有轻微协同,在浓度高于某值时转为轻微拮抗,含有吡虫啉的二元混合物则呈现拮抗。

含有吡虫啉的三元混合物也对蚯蚓有拮抗。Feng等^[52]用CI评估了农药-离子液体-取代酚六元混合物体系对秀丽线虫的时间毒性,发现该混合物体系产生了时间协同作用。Tang等^[22]用CI评估重金属-农药-离子液体三元混合物体系的联合毒性,发现混合物中草甘膦的浓度分数增加时,其毒性呈现向加和甚至拮抗变化的趋势。Liu等^[21]用CI评估了不含J型组分混合物的毒性相互作用,表明除少数混合物射线在高效应水平疑似存在协同或拮抗外,其余所有混合物均为加和作用。Wang等^[51]运用CI评价了除草剂、杀虫剂和重金属三元混合物体系的联合毒性并显示出协同作用。Chen等^[53]运用CI评价了四元、五元、六元、七元及八元混合物体系的联合毒性,并将CI与CA和IA进行对比。

区别于药物组合与药理学领域,环境混合物联合毒性的研究对进行风险评价、改进环境标准和环境容量都有很强的推动作用和现实意义。环境混合物的复杂性使得研究人员不能只局限于在固定浓度比(或等效浓度比)下研究二元混合物,这也是CI在药物组合与环境混合物方面应用的差异。对于二元混合物的实验设计,Chou等^[54]提出的对角等比率组合设计能大大地减少实验需要的动物数量(即大大减少所需数据点的数量),与直接均分射线设计法^[55]一样,优化了固定浓度比射线法(fixed concentration ratio ray, FCRR)。对于多组分混合物,例如三元混合物,Chou^[9]推荐对其进行两两组合,简化计算。然而组分越多,即便简化也会大大增加工作量,还是需要优化实验设计。

在环境混合物联合毒性研究中,前文提及的DRI与多边形等效线图的应用鲜有问津,但对于研究多组分的环境混合物联合毒性及对环境生态风险进行评价而言,这2种方法可更加形象地表达关键组分对混合物联合毒性的贡献及混合物体系相互作用关系,值得拓展与深入研究。

3 与CA及IA的关系(The difference from CA or IA)

半数效应方程与组合指数最独特也是最重要的特点就是方程的每一项都是比值(方程1、方程3)。因此,对于化学品(或药物)实体,单位是可以抵消的,从而成为一个无量纲^[9]。此特点是它们可以广泛应用的核心内容,即不依赖于组分作用模式。而前已述及环境中的污染物往往以混合物的形式出现,混合物体系复杂多变,其组分的作用模式难以一

一考究,在选择模型过程中很难统一或者严格区分不同的作用模式,因此对CA与IA模型的使用前提一直是众多科研工作者争论的焦点之一^[7-8,56-58]。而CI避免了这种争论,就更具理论意义、更加适用于复杂混合污染物的毒性分析。

Cedergreen等^[58]指出,相较于IA,大多数情况下CA是更为保守的风险评估模型。所以从环境管理者及环境策略制定角度考虑,CA模型更适合应用于环境混合物联合毒性评估领域。大量研究也表明,CA模型是研究最多也是应用最广泛的化学混合物评估与预测模型之一^[1,59-62]。而对于组合指数,抛开半数效应方程,并将方程3中总浓度 $(D_x)_{1-n}$ 以 $c_{x,mix}$ 表示,药物在混合物中的浓度分数 $\{(D)_j / \sum_1^n (D)\}$ 以 p_j 表示,单个药物在效应 $x\%$ 时的效应浓度 $(D_m)_j \{(\hat{f}_x)_j / [1 - [1 - (\hat{f}_x)_j]]\}^{1/m_j} = (D_x)_j$ 以 $EC_{x,j}$ 表示,则组合指数变形为:

$$CI_x = \sum_{j=1}^n \frac{c_{x,mix} \cdot p_j}{EC_{x,j}} = \sum_{j=1}^n \frac{c_j}{EC_{x,j}} \quad (4)$$

显然,当 $CI = 1$ 时就是浓度加和模型CA的表达式:

$$1 = \sum_{j=1}^n \frac{c_j}{EC_{x,j}} \quad (5)$$

单从数学层面而言,方程5左侧值可以看作方程4左侧CI值的归一化处理。需要强调的是,CI、CA或IA所表达的剂量效应关系本质上并不揭示机理。当表达协同(或拮抗)效应时,常常会涉及协同的机理是什么?这是一个很难回答的问题。事实上,我们对药物及化学品机理知之甚少。这里的一个论点是,所指的机理是什么,是药理学上的、生物化学的、细胞水平的、分子水平的、化学的、或量子力学水平上?细究机理时,我们还面对一个问题:当受试生物达到作用靶点时,我们实际上不知道其在达到作用靶点前有多少事件发生。这可能是几个阶段或数百个阶段。此外,当我们谈及2个或多个药物或化学品的协同或拮抗效应时被认为是相互的。虽然我们不知道单个组分在混合物中的剂量或效应贡献,但我们并不能定量地知道每一个药物或化学品对所导致观察到的协同或拮抗效应中机理贡献的比例^[9]。因此,有关CA模型适用于具有相似作用模式的混合物体系,而IA模型则适用于具有相异作用模式的混合物体系的理论基础并不稳固,还需验证^[57,63]。在选择评估模型对环境混合物体系进行相互作用评估时,应当将CI、CA或IA作为一个工作

模型来使用,将受试生物体看作黑箱,不必关注药物或化学品对受试生物的作用方式和作用位点。

那么,从数学角度并剔除 CI、CA 模型建立的理论基础讨论,半数效应方程的作用等同于用于毒性数据非线性拟合的 Hill 函数或 Logit 函数或 Weibull 函数(或其他函数),区别在于半数效应方程、Logit 函数及 Weibull 函数为两参数模型, Hill 函数为四参数模型。因此, CI 与 CA 本质上并无太多差异,或者说 CI 就是 CA,但 CI 不仅可直观地定性表达相互作用,而且可定量地表示毒性相互作用的大小。

回到模型的理论基础,值得一提的是组合指数基于质量作用定律,半数效应方程的重排或采用它的对数形式可推导出生物医学科学中的 4 个主要方程,即对于一阶酶动力学($m=1$)的 Michaelis-Menten 方程、用于主要配体占据生物受体的高阶 Hill 方程、用于配体-受体结合及解离的 Scatchard 方程,以及用于 pH 离子化的 Henderson-Hasselbalch 方程^[9]。这样,共用相同数学形式的方程可具有不同的物理化学意义,同时半数效应方程的两边是比值,这样等式中左右两侧的值是没有单位的,这比 CA 及 IA 模型的理论基础更为扎实,可完全避免作用模式异同的争论。

4 组合指数与混合物设计的优化策略 (Optimization)

环境混合物联合毒性研究是一项极具挑战的课题,在人力、物力、财力条件有限的情况下,如何更有效地对环境混合物联合毒性进行评估,同时兼顾实际环境体系的复杂性,值得研究者深思。而从混合物毒性相互作用的实验设计开始,不失为一个好的开端。

在此,我们有必要重申混合物体系与混合物射线的概念:具有明确化合物组分的一系列混合物称之为混合物体系,如二元混合物、三元混合物;混合物体系中的一系列具有固定浓度分数的混合物称之为混合物射线。每一个混合物体系中均包含了无数个不同固定比的混合物射线。只有从固定的混合物射线形成的剂量-效应曲线所得毒性大小才能与单个物质的毒性作比较,而非一个混合物体系。

实际环境混合物体系的复杂多变使得要全面研究所有混合物是不可能的,所以混合物的浓度组成或浓度配比必须进行优化设计。药物组合研究多为组分较少,毒性研究比较普遍,其设计方法相对完善的二元混合物。对于多元混合物的设计,环境科学

领域的学者多只用固定浓度比射线法与等效效应浓度比射线法 (equivalent effect concentration ratio ray, EECR),但两者都只是设计了一条混合物射线,而非系统完整的混合物体系,且 EECR 法是固定浓度比为某特定效应浓度(如 EC_{50})的 FCRR 法,是 FCRR 法的一种特例。这 2 种方法设计的混合物组分浓度比的分布范围较窄,不能反映混合物组分在整个多维浓度空间内不同浓度分数的混合,也不能代表环境实体的浓度分布,即使再多的等效效应浓度比混合物,也不可能完全探测到混合物的整体浓度空间。另外,虽有学者认为等毒性浓度比射线可以最大化估计毒性效应^[64],但此论断并不准确,因为并未考察全部的混合物浓度空间。混合物实验设计与混合物联合毒性评价密不可分,模型评价得到的混合物相互作用往往具有组成依赖性。例如在研究二元重金属对 *Tympanotonus fuscatus* 毒性时发现,锌铜比为 1:4 时,呈强拮抗,而锌铜等毒性比时则为相加^[65]。Cedergreen 等^[66]指出氯丙酸与特丁津的二元混合物对浮游植物 *Lemna minor* 的联合毒性与组成成分浓度有关,混合物中氯丙酸所占比例越高则拮抗作用越大。

为了有效合理地探索整个混合物浓度空间的毒性变化规律,刘树深教授课题组创造性地将我国数学家王元和方开泰^[67]提出的一种新的优化实验设计——均匀设计思想引入混合物联合毒性研究之中,提出了均匀设计射线法(uniform design ray, UD-Ray)^[68]。以 3 组分各 5 个浓度的实验体系为例,比较析因设计(factorial design, FD)、正交设计(orthogonal design, OD)和均匀设计(uniform design, UD)3 种优化试验设计方法所选择的三维浓度空间中有代表性的实验点,结果如图 1 所示。对于析因设计,当考察 3 个因素各 5 个水平时所需要的实验数为 $3^5 = 125$ 次(不考虑重复),而正交实验虽然只需要 25 次实验,仅为析因设计实验数的 1/5,但实验数仍是比较多的。显然,均匀设计所需代表性实验最少,仅需 5 次实验。

基于此,等效效应浓度比或固定浓度比并不能很好地表达一个混合物体系的毒性,更难以模拟实际环境中化学混合物的多种浓度变化。对混合物毒性的评估与预测应当更多地应用 UD-Ray 进行混合物联合毒性研究的实验设计。该方法可使实验点在浓度范围内均匀散布的优化实验设计方法,具有能充分代表混合物中的各种浓度变化的样本校正集,能

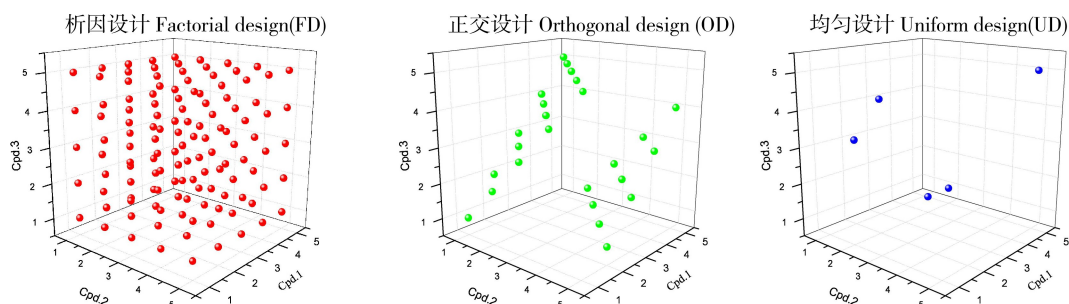


图1 析因设计(左)、正交设计(中)和均匀设计(右)中实验点空间分布^[2]

Fig. 1 Space distribution of experimental points in the factorial design (left), orthogonal design (middle), uniform design (right)^[2]

有效地选择有代表性的实验点,能更好地实现不同组成混合物联合毒性的真正预测。正因其独到的优势,已被多次应用在混合物毒性实验中^[3, 21-22, 50, 69]。

除却混合物设计优化方面的考量,另一个一直注意的问题是目下所有关于 CI 应用的文献都把它作为一个准确的参考标准来实施混合物毒性相互作用评价。事实上,所有毒性实验都存在实验误差,不同毒物或污染物具有不同的剂量-效应特征(如短长期毒性差异与含无效应组分等),剂量-效应曲线拟合也存在拟合误差,这些都会影响 CI 指数的不确定度。因此,必须考虑 CI 指数的置信区间。Liu 等^[21]综合考虑实验误差、不同剂量-效应特征与拟合误差对 CI 的影响,构建了基于观测置信区间的 CI 指数(combination index based on the confidence intervals, CI-Int),并将其应用在二元及多元混合物相互作用研究中,使其能够更加准确地评估混合物毒性。

组合指数结合 UD-Ray 及置信区间,对于在环境混合物联合毒性研究方面的应用必将是协同效应,正所谓宝鞍配良驹,宝玉配佳人。

5 融会贯通助推毒理学发展 (Development by correct understanding)

对组合指数开创性的拓展,使得其在环境混合物联合毒性研究领域的应用更趋完善,类似的拓展同样可以推广至药物组合及药理学研究中。公式的推导与拓展在使用层面上,更容易被学者接受和理解,但这并不意味着能用好对应的评估模型。

Liu 等^[70]在评论“The synergistic toxicity of the multi-chemical mixtures: Implications for risk assessment in the terrestrial environment”^[53]一文时谈及就 CI 而言,并不能预测混合物联合毒性,只能评估混合物相互作用。在此,有必要对 CA 与 CI 模型所涉及的 $EC_{x,mix}$ 的数学推导再次讨论说明。

对于方程推导,回顾方程 5,指定效应时,应用 CA 模型预测混合物浓度的公式为:

$$EC_{x,mix} = 1 / \left(\sum_{j=1}^n \frac{p_j}{EC_{x,j}} \right) \quad (6)$$

其中 $EC_{x,mix}$ 是 CA 预测的混合物产生 $x\%$ 效应时的浓度。Chen 等^[53]论文中依据 CA 的推导,在 CI 方程的基础上推导了一个预测方程:

$$EC_{x,mix} = 1 / \left(\sum_{j=1}^n \frac{p_j}{EC_{x,j} \times CI_{x,comp}} \right) \quad (7)$$

其中 $CI_{x,comp}$ 是混合物产生 $x\%$ 效应时由计算得到的 CI 值。对于 CA 模型,方程 6 根据单个组分的剂量-效应曲线以及其在混合物中的比例计算。而对于方程 7,首先需要计算得到 CI 值。简单的讲,方程 6 仅有一个变量,而方程 7 则为一个变量一个因变量。根据方程 3,在给定效应下计算 CI 值必须知道混合物的总浓度,即得到 $EC_{x,mix}$ 必须先获得混合物的剂量-效应曲线,从而拟合得到对应的浓度,这违背了“预测”一词的本意,显得本末倒置。值得注意的是,方程 6 与方程 7 有本质的区别,方程 6 在计算 $EC_{x,mix}$ 值仅需依据效应浓度 $EC_{x,j}$ 以及其在混合物射线中混合比 p_j ,无关于混合物射线的剂量-效应曲线。

同样的理解偏差,也存在其他一些学者的研究成果中。Gonzálezpleiter 等^[40]用 CI、CA、IA 这 3 个模型评估了 5 种抗生素混合物对水生光合生物联合毒性,认为 CI 能更准确地预测。Chen 等^[71]在人工土、滤纸上研究了 2 种除草剂(去草胺与阿特拉津)和一种杀虫剂(高效氯氟氰菊酯),对陆地非目标生物蚯蚓的单个及联合毒性,并比较 CI 与传统模型 CA 与 IA,认为 CI 可以在生态风险评估中准确地预测混合物毒性。Trombini 等^[72]分别用 CA、IA 及 CI 预测了扑热息痛、卡马西平、双氯芬酸及布洛芬 4 种

新型环境污染物的混合物对无节幼虫的毒性,认为 CA 和 IA 不能很好地预测药物混合物毒性,而 CI 可以。Chen 等、Trombini 等及 Gonzálezpleiter 等并未正确理解 CI 模型及“预测”这一概念。在此,我们强调对评估模型的透彻理解及正确使用,是进行环境混合物联合毒性研究的重要前提之一。

通讯作者简介:刘树深(1961—),男,博士,教授,博士生导师。全国优秀博士学位论文获得者。主要研究方向为化学混合物分析毒理与分子模拟,近年在国内外学术期刊发表论文 100 余篇,其中 SCI 收录 80 多篇。

参考文献(References):

- [1] Faust M, Altenburger R, Backhaus T, et al. Predicting the joint algal toxicity of multi-component S-triazine mixtures at low-effect concentrations of individual toxicants [J]. *Aquatic Toxicology*, 2001, 56(1): 13-32
- [2] 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
- [3] 王猛超, 刘树深, 陈浮. 拓展浓度加和模型预测三种三嗪类除草剂混合物的时间依赖毒性[J]. *化学学报*, 2014(1): 56-60
Wang M-C, Liu S-S, Chen F. Predicting the time-dependent toxicities of three triazine herbicide mixtures to *V. qinghaiensis* sp. Q67 using the extended concentration addition model [J]. *Chimica Sinica*, 2014(1): 56-60 (in Chinese)
- [4] 刘树深, 刘红玲, 陈浮. 浓度加和模型在化学混合物毒性评估中的应用[J]. *化学学报*, 2013(10): 1335-1340
Liu S-S, Liu H-L, Chen F. Application of the concentration addition model in the assessment of chemical mixture toxicity [J]. *Chimica Sinica*, 2013(10): 1335-1340 (in Chinese)
- [5] Altenburger R, Backhaus T, Boedeker W, et al. Predictability of the toxicity of multiple chemical mixtures to *Vibrio fischeri*: Mixtures composed of similarly acting chemicals [J]. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 2000, 19(9): 2341-2347
- [6] Backhaus T, Altenburger R, Boedeker W, et al. Predictability of the toxicity of a multiple mixture of dissimilarly acting chemicals to *Vibrio fischeri* [J]. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 2000, 19(9): 2348-2356
- [7] Spurgeon D J, Jones O A H, Dorne J-L C M, et al. Systems toxicology approaches for understanding the joint effects of environmental chemical mixtures [J]. *Science of the Total Environment*, 2010, 408(18): 3725-3734
- [8] Cleuvers M. Aquatic ecotoxicity of pharmaceuticals including the assessment of combination effects [J]. *Toxicology Letters*, 2003, 142(3): 185-194
- [9] Chou T-C. Theoretical basis, experimental design, and computerized simulation of synergism and antagonism in drug combination studies [J]. *Pharmacological Reviews*, 2006, 58(3): 621-681
- [10] Chou T-C. Preclinical versus clinical drug combination studies [J]. *Leukemia & Lymphoma*, 2008, 49(11): 2059-2080
- [11] Chou T-C. Drug combination studies and their synergy quantification using the Chou-Talalay Method [J]. *Cancer Research*, 2010, 70(2): 440-446
- [12] Chou T-C. The mass-action law based algorithms for quantitative econo-green bio-research [J]. *Integrative Biology*, 2011, 3(5): 548-559
- [13] Reis M A, Ahmed O B, Spengler G, et al. Jatrophone diterpenes and cancer multidrug resistance-ABCB1 efflux modulation and selective cell death induction [J]. *Phyto-medicine*, 2016, 23(9): 968-978
- [14] D'Ors A, Cortés A A, Sánchez-Fortún A, et al. Interference of heavy metals on the photosynthetic response from a Cr(VI)-resistant dictyosphaerium chlorelloides strain [J]. *Ecotoxicology*, 2016, 25(1): 15-21
- [15] Yamamoto Y, Hyodo I, Takigahira M, et al. Effect of combined treatment with the epirubicin-incorporating micelles (NC-6300) and 1,2-diaminocyclohexane platinum (II)-incorporating micelles (NC-4016) on a human gastric cancer model [J]. *International Journal of Cancer*, 2014, 135(1): 214-223
- [16] Saw C-L, Cintrón M, Wu T-Y, et al. Pharmacodynamics of dietary phytochemical indoles I3C and DIM: Induction of Nrf2-mediated phase II drug metabolizing and antioxidant genes and synergism with isothiocyanates [J]. *Biopharmaceutics & Drug Disposition*, 2011, 32(5): 289-300
- [17] Cazzola M, Calzetta L, Ora J, et al. Searching for the synergistic effect between acclidinium and formoterol: From bench to bedside [J]. *Respiratory Medicine*, 2015, 109(10): 1305-1311
- [18] Rodea-Palomares I, Petre A L, Boltes K, et al. Application of the combination index (CI)-isobologram equation to study the toxicological interactions of lipid regulators in two aquatic bioluminescent organisms [J]. *Water Research*, 2010, 44(2): 427-438
- [19] Gonzalez-Sanchez I, Lira-Rocha A, Navarrete A, et al. Synergistic anticancer activity of thiazolo 5,4-b quinoline

- derivative D3CLP in combination with cisplatin in human cervical cancer cells [J]. *Anticancer Research*, 2012, 32(12): 5159-5165
- [20] Rodea-Palomares I, Leganes F, Rosal R, et al. Toxicological interactions of perfluorooctane sulfonic acid (PFOS) and perfluorooctanoic acid (PFOA) with selected pollutants [J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2012, 201: 209-218
- [21] Liu L, Liu S-S, Yu M, et al. Application of the combination index integrated with confidence intervals to study the toxicological interactions of antibiotics and pesticides in *Vibrio qinghaiensis* sp.-Q67 [J]. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 2015, 39(1): 447-456
- [22] Tang H-X, Liu S-S, Li K, et al. Combining the uniform design-based ray procedure with combination index to investigate synergistic lethal toxicities of ternary mixtures on *Caenorhabditis elegans* [J]. *Analytical Methods*, 2016, 8(22): 4466-4472
- [23] Chou T-C. Comparison of mass-action law with power law, probit law and logit law in dose-effect analyses [J]. *Pharmacologist*, 1977, 19(2): 165
- [24] Chou T-C, Talalay P. Generalized equations for the analysis of inhibitions of Michaelis-Menten and higher-order kinetic systems with 2 or more mutually exclusive and non-exclusive inhibitors [J]. *European Journal of Biochemistry*, 1981, 115(1): 207-216
- [25] Chou T-C. Derivation and properties of Michaelis-Menten type and hill type equations for reference ligands [J]. *Journal of Theoretical Biology*, 1976, 59(2): 253-276
- [26] Chang T-T, Chou T-C. Rational approach to the clinical protocol design for drug combinations: A review [J]. *Acta Paediatrica Taiwanica*, 2000, 41(6): 294-302
- [27] Bence A K, Adams V R, Crooks P A. L-Canavanine as a radiosensitization agent for human pancreatic cancer cells [J]. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 2003, 244(1): 37-43
- [28] Xu M-J, Alberts D S. Potentiation of platinum analog cytotoxicity by hyperthermia [J]. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 1988, 21(3): 191-196
- [29] Pimenta F, Abreu A C, Simoes L C, et al. What should be considered in the treatment of bacterial infections by multi-drug therapies: A mathematical perspective? [J]. *Drug Resistance Updates*, 2014, 17(3): 51-63
- [30] Berenguer-Daize C, Astorgues-Xerri L, Odore E, et al. OTX015 (MK-8628), a novel BET inhibitor, displays *in vitro* and *in vivo* antitumor effects alone and in combination with conventional therapies in glioblastoma models [J]. *International Journal of Cancer*, 2016, 139(9): 2047-2055
- [31] Zimmer A, Katzir I, Dekel E, et al. Prediction of multidimensional drug dose responses based on measurements of drug pairs [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2016, 113(37): 10442-10447
- [32] Zhou X, Seto S W, Chang D, et al. Synergistic effects of Chinese herbal medicine: A comprehensive review of methodology and current research [J]. *Frontiers in Pharmacology*, 2016, 7: 201
- [33] Tanamatayarat P, Sotanaphun U, Poobrasert O. Thai plants from Doi Tung: Brine shrimp lethality, antioxidative activity and combination effect with L-ascorbic acid [J]. *Natural Product Research*, 2012, 26(10): 919-925
- [34] Du G-S, Pan J-Z, Zhao S-P, et al. Cell-based drug combination screening with a microfluidic droplet array system [J]. *Analytical Chemistry*, 2013, 85(14): 6740-6747
- [35] Zhu Y, Zhang Y-X, Cai L-F, et al. Sequential operation droplet array: An automated microfluidic platform for picoliter-scale liquid handling, analysis, and screening [J]. *Analytical Chemistry*, 2013, 85(14): 6723-6731
- [36] Chen T, Gu J, Zhang X, et al. System-level study on synergism and antagonism of active ingredients in traditional Chinese medicine by using molecular imprinting technology [J]. *Scientific Reports*, 2014, 4: 7159
- [37] Jiang C, Wu Z-Q, Liu L, et al. Synergy of herbal ingredients combination against *Dactylogyrus* spp. in an infected goldfish model for monogenean management [J]. *Aquaculture*, 2014, 433: 115-118
- [38] Ilkaya F, Yüce M, Ağrı A E, et al. The combination of agomelatine and ritanserin exerts a synergistic interaction in passive avoidance task [J]. *Human & Experimental Toxicology*, 2015, 34(8): 787-795
- [39] Liu Y, Flynn T J, Ferguson M S, et al. Use of the combination index to determine interactions between plant-derived phenolic acids on hepatotoxicity endpoints in human and rat hepatoma cells [J]. *Phytomedicine*, 2013, 20(5): 461-468
- [40] Gonzálezpleiter M, Gonzalo S, Rodea-Palomares I, et al. Toxicity of five antibiotics and their mixtures towards photosynthetic aquatic organisms: Implications for environmental risk assessment [J]. *Water Research*, 2013, 47(6): 2050-2064
- [41] Santillo M F, Liu Y, Ferguson M, et al. Inhibition of monoamine oxidase (MAO) by beta-carbolines and their interactions in live neuronal (PC12) and liver (HuH-7 and MH1C1) cells [J]. *Toxicology in Vitro*, 2014, 28(3): 403-410

- [42] del Rio B, Redruello B, Linares D M, et al. The dietary biogenic amines tyramine and histamine show synergistic toxicity towards intestinal cells in culture [J]. *Food Chemistry*, 2017, 218: 249-255
- [43] Smith M-C, Madec S, Coton E, et al. Natural co-occurrence of mycotoxins in foods and feeds and their *in vitro* combined toxicological effects [J]. *Toxins*, 2016, 8(4): 94
- [44] Chen B, Dai W, Mei D, et al. Comprehensively priming the tumor microenvironment by cancer-associated fibroblast-targeted liposomes for combined therapy with cancer cell-targeted chemotherapeutic drug delivery system [J]. *Journal of Controlled Release*, 2016, 241: 68-80
- [45] Chou T-C. Assessment of synergistic and antagonistic effects of chemotherapeutic agents *in vitro* [J]. *Contributions to Gynecology and Obstetrics*, 1994, 19: 91-107
- [46] Chou T-C, Chou L H. Computerized indexing of drug combinations: Prediction of synergism and antagonism of more than two drugs by polygonogram [J]. *Faseb Journal*, 1998, 12(4): A143-A143
- [47] Vouzara T, Koulaouzidou E, Ziouti F, et al. Combined and independent cytotoxicity of sodium hypochlorite, ethylenediaminetetraacetic acid and chlorhexidine [J]. *International Endodontic Journal*, 2016, 49(8): 764-773
- [48] Yusoff N, Ong S-A, Ho L-N, et al. Evaluation of biodegradation process: Comparative study between suspended and hybrid microorganism growth system in sequencing batch reactor (SBR) for removal of phenol [J]. *Biochemical Engineering Journal*, 2016, 115: 14-22
- [49] Mater N, Geret F, Castillo L, et al. *In vitro* tests aiding ecological risk assessment of ciprofloxacin, tamoxifen and cyclophosphamide in range of concentrations released in hospital wastewater and surface water [J]. *Environment International*, 2014, 63: 191-200
- [50] Ma M, Chen C, Yang G, et al. Combined cytotoxic effects of pesticide mixtures present in the Chinese diet on human hepatocarcinoma cell line [J]. *Chemosphere*, 2016, 159: 256-266
- [51] Wang Y, Chen C, Qian Y, et al. Ternary toxicological interactions of insecticides, herbicides, and a heavy metal on the earthworm *Eisenia fetida* [J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2015, 284: 233-240
- [52] Feng L, Liu S-S, Li K, et al. The time-dependent synergism of the six-component mixtures of substituted phenols, pesticides and ionic liquids to *Caenorhabditis elegans* [J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2017, 327: 11-17
- [53] Chen C, Wang Y, Qian Y, et al. The synergistic toxicity of the multiple chemical mixtures: Implications for risk assessment in the terrestrial environment [J]. *Environment International*, 2015, 77: 95-105
- [54] Chou T-C, Talalay P. Quantitative-analysis of dose-effect relationships—The combined effects of multiple-drugs or enzyme-inhibitors [J]. *Advances in Enzyme Regulation*, 1984, 22: 27-55
- [55] Dou R-N, Liu S-S, Mo L-Y, et al. A novel direct equipartition ray design (EquRay) procedure for toxicity interaction between ionic liquid and dichlorvos [J]. *Environmental Science and Pollution Research*, 2011, 18(5): 734-742
- [56] Altenburger R, Nendza M, Schuurmann G. Mixture toxicity and its modeling by quantitative structure-activity relationships [J]. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 2003, 22(8): 1900-1915
- [57] Baas J, Van Houte B P, Van Gestel C A, et al. Modeling the effects of binary mixtures on survival in time [J]. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 2007, 26 (6): 1320-1327
- [58] Cedergreen N, Sorensen H, Svendsen C. Can the joint effect of ternary mixtures be predicted from binary mixture toxicity results? [J]. *Science of the Total Environment*, 2012, 427: 229-237
- [59] Backhaus T, Faust M, Scholze M, et al. Joint algal toxicity of phenylurea herbicides is equally predictable by concentration addition and independent action [J]. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 2004, 23(2): 258-264
- [60] Howard G J, Schlezinger J J, Hahn M E, et al. Generalized concentration addition predicts joint effects of aryl hydrocarbon receptor agonists with partial agonists and competitive antagonists [J]. *Environmental Health Perspectives*, 2010, 118(5): 666-672
- [61] Baylay A J, Spurgeon D J, Svendsen C, et al. A metabolomics based test of independent action and concentration addition using the earthworm *Lumbricus rubellus* [J]. *Ecotoxicology*, 2012, 21(5): 1436-1447
- [62] Gregorio V, Chevre N, Junghans M. Critical issues in using the common mixture toxicity models concentration addition or response addition on species sensitivity distributions: A theoretical approach [J]. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 2013, 32(10): 2387-2395
- [63] Jonker M J, Svendsen C, Bedaux J J M, et al. Significance testing of synergistic/antagonistic, dose level-dependent, or dose ratio-dependent effects in mixture dose-response analysis [J]. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 2005, 24(10): 2701-2713
- [64] Lin Z, Ping Z, Kong D, et al. The ratios of individual chemicals in a mixture determine the degree of joint effect: The climax hypothesis [J]. *Archives of Environ-*

- mental Contamination and Toxicology, 2005, 49(1): 1-8
- [65] Otitoloju A A. Evaluation of the joint-action toxicity of binary mixtures of heavy metals against the mangrove periwinkle *Tympanotonus fuscatus var radula* (L.) [J]. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2002, 53(3): 404-415
- [66] Cedergreen N, Kudsk P, Mathiassen S K, et al. Reproducibility of binary-mixture toxicity studies [J]. Environmental Toxicology and Chemistry, 2007, 26(1): 149-156
- [67] 王元, 方开泰. 关于均匀分布与试验设计(数论方法)[J]. 科学通报, 1981, 26(2): 65-70
Wang Y, Fang K-T. A note on uniform distribution and experimental design [J]. Chinese Science Bulletin, 1981, 26(2): 485-489 (in Chinese)
- [68] Liu S-S, Xiao Q-F, Zhang J, et al. Uniform design ray in the assessment of combined toxicities of multi-component mixtures [J]. Science Bulletin, 2016, 61(1): 52-58
- [69] Zhang J, Liu S-S, Yu Z-Y, et al. The time-dependent hormetic effects of 1-alkyl-3-methylimidazolium chloride and their mixtures on *Vibrio qinghaiensis* sp.-Q67 [J]. Journal of Hazardous Materials, 2013, 258: 70-76
- [70] Liu S-S, Li K, Li T, et al. Comments on "The synergistic toxicity of the multi chemical mixtures: Implications for risk assessment in the terrestrial environment" [J]. Environment International, 2016, 94: 396-398
- [71] Chen C, Wang Y, Zhao X, et al. Combined toxicity of butachlor, atrazine and lambda-cyhalothrin on the earthworm *Eisenia fetida* by combination index (CI)-isobologram method [J]. Chemosphere, 2014, 112: 393-401
- [72] Trombini C, Hampel M, Blasco J. Evaluation of acute effects of four pharmaceuticals and their mixtures on the copepod *Tisbe battagliai* [J]. Chemosphere, 2016, 155: 319-328 ◆