

## T2.25 浅谈水生生物急性毒性限度实验浓度设计与我国 GHS 国标分类标准

杨彩霞<sup>1</sup>, 张霞<sup>2</sup>

(1. 苏州安评化学品技术服务有限公司, 江苏 苏州 215000; 2. 上海天祥质量技术服务有限公司, 上海 200233)

**摘要:**我国环保部新化学物质环境管理办法(7 号令)申报过程中,要求利用物质本身或其配制品的水生生物急性毒性测试结果,根据我国 GHS 国标进行分类。本文根据水生生物急性毒性 OECD 测试导则中关于限度实验浓度设置的要求和实测浓度与理论浓度的偏差,就目前申报过程中遇到的分类问题进行探讨。对于水生生物急性毒性实验,根据 OECD 和化学品测试方法,当预实验的结果表明物质在浓度  $100 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  或者其在实验用水中的最大溶解度时无毒,那么应进行浓度为  $100 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  (活性成分)或者饱和溶解度的限度实验,以确定  $\text{LC}_{50}/\text{EC}_{50}$  是否大于  $100 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 。实验室的操作是配制理论浓度为  $100 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  (活性成分)的实验液或理论浓度为  $100 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  的饱和溶液进行限度实验。然而在依据限度实验结果进行危害分类时,根据要求,急性毒性  $\text{LC}_{50}/\text{EC}_{50} > 100 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  时,物质分类为低毒;如需实测浓度达到  $100 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ,那么在进行限度实验时,需要根据物质的水溶解度、在水中的稳定性等特性重新计算限度实验的设置浓度。如对于溶解度大于  $100 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  且在实验条件下稳定的化学物质,限度实验处理组浓度可设置为  $130 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ;那么如果物质在水中的溶解度  $< 100 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ,限度实验时只能以理论浓度为  $100 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  的实验介质中的饱和溶液进行。实验期间,实测浓度必定小于  $100 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ,那么此时以实测  $100 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  进行分类就可能判定为中等毒性。OECD 201 (2006) 第 39 条和 OECD 202(2004) 第 23 条以及化学品测试方法中均指出,如果有证据表明在测试过程中,受试物的实际浓度能维持在理论浓度或初始测定浓度的 20% 范围内,则可以基于理论浓度或初始测定浓度进行结果分析。如果受试物实际浓度和理论浓度或初始测定浓度的偏差超过 20%,则应基于整个测试过程中的几何平均浓度或根据物质的浓度衰减模型进行结果分析。值得注意的是,当实验结果表明受试物对水生生物有毒性,并得到了相应的半数致死浓度或效应,根据实测浓度进行分类是科学的。但如果实验结果表明受试物对水生生物无毒性,那么若依据限度实验的实测浓度进行结论,就有可能高估化学物质的毒性进而需要将水生生物急性分类为中等毒性(类别 3)。根据新化学物质危害性鉴别导则环境管理类别划分,水生生物急性毒性类别 1~3 均作为危险类化学物质进行管理,这样必将加重管理部门的工作负担和造成企业的人力物力资源的浪费。因此,在此建议相关专家考虑受试物的实际浓度偏差在 20% 之内即可依据理论浓度进行 GHS 分类的处理方式。

E-mail: lisa.yang@cserc.com.cn, rainbow.zhang@intertek.com

## T2.26 微囊藻毒素-LR 对小鼠肝组织 DNA 甲基化的影响

农清清, 何灏逾, 韦宏旷, 陆继培, 李春宏, 范 誉

(广西医科大学公共卫生学院职业卫生与环境卫生学教研室, 广西 南宁 530021)

**摘要:**目的 研究微囊藻毒素-LR (Microcystin-LR, MCLR) 短期重复暴露对小鼠肝组织 DNA 总体甲基化水平、DNA 甲基转移酶 (DNA methyltransferase, DNMT) mRNA 表达的影响。方法 80 只健康昆明小鼠,随机分为 2 批,每批 4 组,每组 10 只,即对照组(含  $0.02\%$  二甲基亚砷的生理盐水  $0.005 \text{ ml}\cdot\text{g}^{-1}$ )、MCLR 低( $5 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ )、中( $10 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ )、高( $20 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ )剂量组,每日经腹腔注射染毒,分别染毒 10 和 20 d。提取并水解小鼠肝组织 DNA,采用高效液相色谱法测定 DNA 总体甲基化水平;提取肝组织总 RNA,逆转录成 cDNA,用实时荧光定量 PCR 法测定 DNMT1, DNMT3a, DNMT3b 的 mRNA 表达水平。结果 染

毒 10 d 后,各剂量组 DNA 总体甲基化水平未出现明显差异。染毒 20 d 中、高剂量组 DNA 总体甲基化水平为 $(2.26 \pm 0.60)\%$ 和 $(2.16 \pm 0.51)\%$ ,均低于对照组的 $(3.31 \pm 0.86)\%$ ,差异均有统计学意义( $P < 0.05$ )。染毒 10 d 高剂量组 DNMT1、DNMT3a 及 DNMT3b 的 mRNA 表达水平均下调( $P < 0.05$ ),染毒 20 d 后,中、高剂量组中 DNMT1, DNMT3a 及 DNMT3b 的 mRNA 表达水平与对照组比较均下降( $P < 0.05$ ),其中,中剂量组 DNMT1, DNMT3a 及 DNMT3b 的 mRNA 表达水平分别降至对照组的 38.3%, 59.9%, 21.5%,差异均有统计学意义( $P < 0.05$ )。肝组织 DNMT1, DNMT3a, DNMT3b mRNA 表达水平与 DNA 总体甲基化水平呈正相关关系( $r_{\text{DNMT1}} = 0.47, P < 0.01$ ;  $r_{\text{DNMT3a}} = 0.37, P < 0.01$ ;  $r_{\text{DNMT3b}} = 0.36, P < 0.05$ )。

**结论** MCLR 短期重复暴露可抑制小鼠肝组织 DNMT1、DNMT3a 和 DNMT3b 的 mRNA 表达,降低 DNA 总体甲基化水平。MCLR 引起的基因组总体 DNA 甲基化水平降低可能与 DNMT1, DNMT3a 和 DNMT3b 的表达下调有关。

**关键词:** 微囊藻毒素-LR; DNA 总体甲基化; DNMT1; DNMT3a; DNMT3b

E-mail: nnqq26@163.com

## T2.27 基于 EST 模型的全氟烷基化合物致心肌发育毒性作用及其蛋白组学研究

张莹莹, 汤磊磊, 黄玉洁, 郑 蓓, 朱丹雁

(浙江大学药学院 药理毒理与生化药学研究所, 浙江 杭州 310058)

**摘要:** **目的** 利用胚胎干细胞测试(EST)模型评价全氟烷基化合物全氟辛烷磺酸(PFOS),全氟辛酸(PFOA)和全氟丁基磺酸(PFBS)对小鼠胚胎干细胞(mESC)定向分化为心肌细胞的发育毒性作用。并利用氨基酸进行稳定同位素标记(SILAC)定量蛋白质组学探讨 PFOS 致心肌发育毒性作用机制。**方法** 利用悬滴培养法建立 EST 模型,检测 PFOS, PFOA 和 PFBS 对 mESC 定向心肌细胞分化的影响获得产生 50% mESC 细胞分化抑制作用的浓度  $ID_{50}D3$ ;采用 MTT 法检测受试物对 mESC 和 3T3 细胞产生 50% 细胞毒性作用的浓度  $IC_{50}D3$  和  $IC_{50}3T3$ ,并依据发育毒性判定标准评定受试物的发育毒性等级和构效关系。利用 SILAC 定量蛋白质组学考察 PFOS 干预 mESC 定向分化心肌细胞前后差异表达蛋白图谱,并根据每个鉴定蛋白至少包含两段鉴定多肽,且差异 1.5 以上的标准来筛选差异蛋白。用 GO 分析法对差异蛋白进行功能分类,通过网络数据分析确定蛋白功能,揭示 PFOS 致心肌发育毒性作用靶标。**结果** PFBS, PFOA 和 PFOS 的  $IC_{50}D3$  分别为 4139, 470 和 291  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ,  $IC_{50}3T3$  分别为 5980, 484 和 435  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ,  $ID_{50}D3$  分别为 808, 223 和 40  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ,心肌发育毒性等级分别为一级、二级、二级,且毒性强弱顺序为 PFOS > PFOA > PFBS。具有一定构效关系,即碳链越长心肌发育毒性越大,末端磺酰化心肌发育毒性大于未磺酰化。SILAC 标记蛋白组学显示,PFOS 作用组筛选出 176 个差异蛋白,其中 67 个蛋白上调和 109 个蛋白下调。对差异蛋白进行 GO 分析显示,在分子功能方面有 13 个分类,细胞定位方面有 12 个分类,细胞生物学过程方面有 10 个分类。KEGG 通路分析,共筛选到 31 个统计学上有显著意义的信号通路,主要涉及信号转导、脂代谢、能量代谢及酶代谢相关通路。在网络分析图中,差异蛋白对应基因与基因组中其他基因的相互作用共涉及到 118 个蛋白 1296 个相互作用。**结论** 基于 EST 模型全氟烷基化合物致心肌发育毒性强弱顺序为 PFOS > PFOA > PFBS。通过 SILAC 标记蛋白组学建立了 PFOS 对 mESC 定向分化为心肌细胞蛋白质差异表达图谱,共鉴定出 176 个差异蛋白,其中 67 个蛋白上调和 109 个蛋白下调。差异蛋白涉及 31 个生化和信号通路,蛋白质相互作用网络图中共包含 118 个蛋白 1296 个相互作用。

**基金项目:** 国家自然科学基金(30873068); 国家自然科学基金(30600762); 浙江省科技创新团队项目(2010R50047); 浙江省自然科学基金(Y13H310001)

**通讯作者:** 朱丹雁, E-mail: zdyzxb@zju.edu.cn