

研究报告

8种多环芳烃联合暴露致大鼠肝脏毒性及BMDL推导

杨森^{1,2}, 卢宇翔¹, 曹鑫¹, 毛侃敏¹, 毛伟峰², 郝丽萍¹

1. 华中科技大学同济医学院公共卫生学院, 食品营养与安全湖北省重点实验室, 湖北 武汉 430030;
2. 国家食品安全风险评估中心, 北京 100022)

摘要:目的 探究8种多环芳烃(PAH8)联合暴露的大鼠肝脏毒性,利用基准剂量法(BMD)获得PAH8致肝脏毒性的基准剂量95%置信区间下限值(BMDL)。方法 雄性SD大鼠随机分为5组,每组10只,分别按照0、10、50、250和1000 $\mu\text{g}/\text{kg}\cdot\text{BW}$ 剂量的PAH8连续染毒30 d后处死大鼠,计算脏器系数,进行肝脏病理学检测和油红O染色,检测血清谷丙转氨酶、谷草转氨酶、丙二醛、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)、甘油三酯(TG)、总胆固醇(TC)的水平及肝脏TG、TC含量。选择具有统计学意义、毒理学意义和剂量效应趋势的肝脏毒性数据,利用BMDS 3.2软件进行BMD分析,选择最佳拟合模型得到BMDL值。结果 1000 $\mu\text{g}/\text{kg}\cdot\text{BW}$ 剂量组大鼠肝脏系数较对照组显著升高($P<0.05$)。PAH8染毒后部分大鼠肝脏出现细胞水肿、炎性浸润、脂肪变性等病理改变。10~250 $\mu\text{g}/\text{kg}\cdot\text{BW}$ 剂量组血清GSH-Px较对照组显著升高($P<0.01$),但1000 $\mu\text{g}/\text{kg}\cdot\text{BW}$ 剂量组GSH-Px显著降低($P<0.001$)。肝脏中TC含量呈现剂量效应趋势,1000 $\mu\text{g}/\text{kg}\cdot\text{BW}$ 剂量组较对照组显著升高($P<0.001$)。其他指标与对照组相比均无显著性差异($P>0.05$)。利用肝脏TC含量进行BMD分析,选择Hill模型得到PAH8致大鼠肝脏毒性的BMDL和BMD分别为47.61和213.52 $\mu\text{g}/\text{kg}\cdot\text{BW}$ 。根据肝脏TC含量得到PAH8的未观察到有害作用水平(NOEL)和观察到有害作用的最低水平(LOAEL)分别为250和1000 $\mu\text{g}/\text{kg}\cdot\text{BW}$ 。结论 PAH8联合暴露引起肝脏脂质异常蓄积,致大鼠肝脏毒性的BMDL为47.61 $\mu\text{g}/\text{kg}\cdot\text{BW}$,低于相应的NOEL/LOAEL值。

关键词:多环芳烃;联合暴露;肝脏毒性;基准剂量

中图分类号:R155 文献标识码:A 文章编号:1004-8456(2023)06-0813-07

DOI:10.13590/j.cjfh.2023.06.003

Hepatotoxicity and BMDL derivation in rats under combined exposure to eight kinds of polycyclic aromatic hydrocarbons

YANG Miao^{1,2}, LU Yuxuan¹, CAO Xin¹, MAO Kanmin¹, MAO Weifeng², HAO Liping¹

- (1. School of Public Health, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Hubei Key Laboratory of Food Nutrition and Safety, Huazhong University of Science and Technology, Hubei Wuhan 430030, China; 2. China National Center for Food Safety Risk Assessment, Beijing 100022, China)

Abstract: Objective To investigate the hepatotoxicity induced by the combined exposure of eight types of PAHs (PAH8) in rats, the lower limit of the 95% confidence interval of benchmark dose (BMDL) of PAH8-induced hepatotoxicity was determined using the benchmark dose (BMD) method. **Methods** Male SD rats were randomly divided into five groups (10 rats in each group) and were exposed to PAH8 at doses of 0, 10, 50, 250, and 1000 $\mu\text{g}/\text{kg}\cdot\text{BW}$, respectively. Rats were sacrificed after 30 d, and organ coefficients were calculated. Liver pathological examination and oil-red O staining were performed. Serum alanine aminotransferase, aspartate aminotransferase, malondialdehyde, glutathione peroxidase (GSH-Px), triglyceride (TG), total cholesterol (TC) levels, and liver TG and TC levels were measured. Hepatotoxicity data with statistical significance, toxicological significance, and dose-effect trend were selected. BMD analysis was performed using the BMDS 3.2 software. BMDL values of PAH8-induced hepatotoxicity in rats were obtained by choosing the optimal fitting model. **Results** The liver coefficient of the 1000 $\mu\text{g}/\text{kg}\cdot\text{BW}$ group was significantly higher than that in the

收稿日期:2022-10-06

基金项目:国家自然科学基金(81803241)

作者简介:杨森 男 硕士研究生 研究方向为食品安全风险评估 E-mail:1339277462@qq.com

通信作者:毛伟峰 女 副研究员 研究方向为食品安全风险评估 E-mail:maoweifeng@cfsa.net.cn

control group ($P < 0.05$). After PAH8 exposure, some rats showed pathological changes, such as cell edema, inflammatory infiltration, and liver steatosis. Serum GSH-Px in the 10-250 $\mu\text{g}/\text{kg}\cdot\text{BW}$ group was significantly higher than that in the control group ($P < 0.01$) but significantly decreased in the 1 000 $\mu\text{g}/\text{kg}\cdot\text{BW}$ group ($P < 0.001$). The TC content in the liver showed a dose-dependent trend and increased significantly in the 1 000 $\mu\text{g}/\text{kg}\cdot\text{BW}$ group ($P < 0.001$). No significant changes in other indexes were observed compared with the control group ($P > 0.05$). Liver TC content was used for BMD analysis, and the BMDL and BMD of PAH8 based on the Hill model were 47.61 and 213.52 $\mu\text{g}/\text{kg}\cdot\text{BW}$, respectively. The non-observed adverse effect level and lowest observed adverse effect level of PAH8 were 250 and 1 000 $\mu\text{g}/\text{kg}\cdot\text{BW}$, respectively.

Conclusion Combined exposure to PAH8 caused abnormal lipid accumulation in the liver, and the BMDL value of liver toxicity in PAH8 rats was 47.61 $\mu\text{g}/\text{kg}\cdot\text{BW}$, which was lower than the NOAEL/LOAEL.

Key words: Polycyclic aromatic hydrocarbons; combination exposure; hepatotoxicity; benchmark dose

多环芳烃 (Polycyclic aromatic hydrocarbons, PAHs) 是一类由两个或多个苯环组成的碳氢化合物, 主要来源于有机物的不完全燃烧或裂解^[1]。PAHs 属于典型的持久性有机污染物, 可在空气、土壤、水等多种环境介质中转移, 并可通过呼吸道、消化道、皮肤途径暴露于人体。在非吸烟、非职业暴露人群中, 膳食摄入是最主要的暴露途径^[2]。大量研究表明, PAHs 具有致癌、致畸、致突变的“三致作用”, 其中苯并[a]芘致癌性最强, 被国际癌症研究机构列为人类致癌物 (I 类), 其他多种 PAHs 如苯并[a]蒽、蒽、二苯并[a, h]蒽、二苯并[a, l]芘等被归为人类可能致癌物 (II 类)^[3]。除致癌性外, PAHs 还能引起肝毒性、神经毒性、生殖发育毒性、免疫毒性等多种非致癌毒性^[4]。

PAHs 种类繁多, 在目前发现的 200 多种 PAHs 中, 有 16 种被欧洲食品安全局 (European Food Safety Authority, EFSA) 列为食品中优先控制的 PAHs。其中苯并[a]芘致癌性强、研究数据充分, 因此通常以苯并[a]芘作为食品中总体 PAHs 替代指标进行 PAHs 风险管控。然而由于环境中 PAHs 以混合物形式存在并暴露于人体, 单一化合物不能代表整体 PAHs 的暴露, 因此利用 1 种化合物去评估总体 PAH 暴露并不科学^[5]。EFSA 于 2008 年对食品中 PAHs 进行重新评估后, 基于其在食品中较高的检出率和较强的毒性, 提出以 4 种多环芳烃 (PAH4, 包括苯并[a]芘、蒽、苯并[a]蒽、苯并[b]荧蒽) 或 8 种多环芳烃 (PAH8, 包括苯并[a]芘、蒽、苯并[a]蒽、苯并[b]荧蒽、苯并[k]荧蒽、二苯并[a, h]蒽、茚并[1, 2, 3-c, d]芘、苯并[ghi]芘) 作为总体 PAHs 替代指标更加合适^[6]。同时 EFSA 指出, 由于 8 种 PAHs 在体内/体外实验中均显示出致癌性和基因毒性, 并在致癌性煤焦油中被检出, 因此需要特别关注^[6]。

传统的毒理学研究主要针对单个 PAHs 化合物, 且主要集中于致癌性研究, 研究的靶器官多为肺, 而近年来对肺以外器官的研究逐渐增多。肝脏作为机体最大的解毒器官, 容易遭受有毒化合物的危害。

动物研究表明, PAHs 可诱导肝脏毒性^[7-9], 最近一篇人群研究也提示, PAHs 与非酒精性脂肪肝的发生存在相关性^[10]。此外, 目前尚缺乏对 PAHs 联合暴露的准确毒性参考阈值和剂量-反应关系研究。过去主要使用未观察到有害作用水平 (No observed adverse effect level, NOAEL) 和观察到有害作用的最低水平 (Lowest observed adverse effect level, LOAEL) 法推导化合物的毒性阈值, 然而 NOAEL/LOAEL 法存在较大局限性, 目前国际上推荐使用基准剂量法 (Benchmark dose, BMD) 法代替。BMD 是指引起某一特定水平不良反应发生时的剂量, 通常以 95% 置信区间的下限值 (Lower limit of 95% confidence interval of benchmark dose, BMDL) 作为 NOAEL 值的替代^[11]。相对 NOAEL/LOAEL, BMD 法用于推导化合物毒性参考阈值更加科学。因此, 本研究拟探究 PAH8 联合暴露的肝脏毒性, 并采用基准剂量法推导 PAH8 联合暴露的毒性参考阈值, 为进一步开展 PAHs 联合暴露毒性研究提供参考。

1 材料与方法

1.1 主要仪器与试剂

电子天平 (中国英衡公司), 分析天平 (德国 Sartorius 公司), 超纯水仪 (美国 Millipore 公司), 超声波破碎仪 (美国 SCIENIZ 公司), 研磨匀浆仪 (武汉赛维尔生物科技有限公司), 多功能酶标仪 (瑞士 TECAN 公司), 光学显微镜 (广州明美光电技术有限公司)。

8 种多环芳烃样品 (美国 Sigma 公司), 谷丙转氨酶 (Alanine aminotransferase, ALT)、谷草转氨酶 (Aspartate aminotransferase, AST)、丙二醛 (Malondialdehyde, MDA)、谷胱甘肽过氧化物酶 (Glutathione peroxidase, GSH-Px) 检测试剂盒 (南京建成生物工程研究所), 甘油三酯 (Triglyceride, TG)、总胆固醇 (Total cholesterol, TC) 检测试剂盒 (中生北控生物科技股份有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 动物分组和染毒

50只7周龄雄性SD大鼠购于北京维通利华实验动物技术有限公司,许可证编号SCXK(京)2019-0010。动物饲养于华中科技大学同济医学院农药毒理研究中心,设施许可证号:SYXK(鄂)2019-0046,实验伦理批准号:S2954。环境温度(22±2)℃,相对湿度30%~50%,采用12h明暗交替光照系统,自由进食和饮水。大鼠适应性喂养1周,于第8周龄时根据体质量随机分为5组:溶剂对照组(玉米油)和4个剂量组(PAH8染毒剂量:10、50、250、1000 μg/kg·BW),每组10只。其中高剂量(1000 μg/kg·BW)约为EFSA确立的PAH8致癌效应BMDL₁₀(0.49 mg/kg·BW)的2倍^[6],既往研究发现,10 μg/kg·BW剂量的苯并[a]芘经口染毒即可引起大鼠血清甘油磷脂代谢异常^[12],因此本研究将10 μg/kg·BW作为低剂量,以一定倍数设置其他剂量。根据我国食品中8种多环芳烃的实际检出量,将8种多环芳烃按照一定比例(苯并[a]芘:苯并[a]蒽:蒽:苯并[b]荧蒽:苯并[k]荧蒽:二苯并[a,h]蒽:苯并[ghi]芘:茚并[1,2,3-cd]芘=0.99:2.92:2.68:1.68:0.67:0.71:0.81:0.60, m:m)配制成PAH8-玉米油溶液,采用倍比稀释法配制不同剂量PAH8溶液。每日以1 mL/kg的体积灌胃大鼠,连续染毒30 d。染毒结束后以10%水合氯醛腹腔注射麻醉大鼠,摘眼球取血,处死并解剖大鼠取脏器。

1.2.2 肝脏病理学检测

取新鲜肝脏组织块(大小约1 cm³)置于4%多聚甲醛固定,24 h后脱水、包埋、切片,然后进行H&E染色,光学显微镜下拍片观察并记录肝脏病理学改变。

1.2.3 肝脏油红O染色

取肝脏组织(大小约1 cm³),液氮速冻,由武汉赛维尔生物科技有限公司进行冰冻切片和油红O染色,光镜下拍片观察。利用Image-Pro Plus 6.0软件对油红O染色结果进行半定量分析。

1.2.4 生化指标检测

1.2.4.1 血清指标检测

大鼠血液取出后静置30 min,随后3000 r/min离心15 min,离心半径10 cm,取血清分装备用,采用试剂盒检测血清中ALT、AST、MDA、GSH-Px、TG和TC的水平。

1.2.4.2 肝脏TG、TC检测

准确称取50 mg肝脏样本置于2 mL离心管中,加入450 μL异丙醇,使用研磨仪匀浆后于4℃静置48 h,随后3500 r/min离心10 min,取上清液,采用

试剂盒测定肝脏中TG、TC的含量。

1.2.5 BMD分析

1.2.5.1 毒性数据筛选

参照吴智君等^[13]的方法,在试验设计合理,数据质量可靠的前提下,选择具有统计学意义、毒理学意义以及显著剂量效应趋势的毒性数据进行BMD分析。

1.2.5.2 模型选择与参数设置

采用美国环境保护署开发的BMDs 3.2软件进行BMD分析,BMDs 3.2软件基于频率论法和最大似然估计得到最终结果,最优模型需根据拟合度P值、残差、赤池信息标准(Akaike's information criterion, AIC)及视觉拟合效果进行选择^[14]。

本次BMD分析选择Exponential模型、Hill模型、Linear模型、Polynomial模型和Power模型拟合数据。根据EPA的指导原则,拟合模型需满足拟合度P>0.1,残差绝对值≤2,当多个模型推导出的BMDL相差很大时(>3倍),则选择其中最小的BMDL为最佳;当多个模型的BMDL值很接近(≤3倍)时,根据Akaike信息量准则,选择AIC最小的模型对应的BMDL值^[15]。在本次BMDL推导中,根据EPA的建议,各模型优先选择限值参数(Frequentist)。基准反应(Benchmark response, BMR)是指在生物学意义上可接受的变化水平(即不产生有害作用的水平),目前国际上没有确定统一的BMR值,各机构均认可BMR的选择范围为1%~10%,同时需将生物学意义的水平作为BMR的重要考量。对于连续型变量,在无法确定BMR时,EPA(2012)推荐使用与对照组平均值相差一个标准差(1SD)的水平作为BMR^[15]。因此,本次BMDL推导时,BMR选择为1SD。在参数设置中,将风险类型(Risk type)设为额外风险(Extra risk)。置信区间为95%,不良效应方向(Adverse direction)为“增加(up)”,背景参数为“估计(estimated)”,数据分布类型选择对数正态分布(Log-normal)。

1.3 统计学分析

采用SPSS 23.0软件进行统计学分析,满足参数检验的数据进行单因素方差分析,以平均值±标准差($\bar{x} \pm s$)进行统计描述,P<0.05表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 PAH8染毒对大鼠体质量和脏器系数的影响

如图1所示,PAH8染毒期间,各组大鼠体质量变化无显著性差异。由表1可知,PAH8染毒30 d后,1000 μg/kg·BW剂量组的肝脏系数(肝脏质量与体质量的比值)较对照组显著增加(P<0.05),其

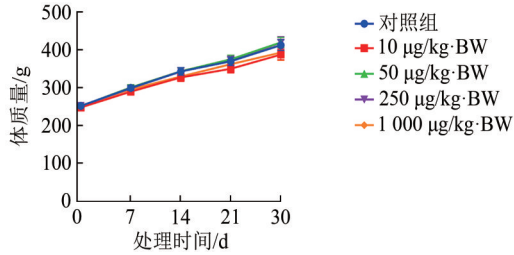


图1 PAH8染毒期间大鼠体质量变化

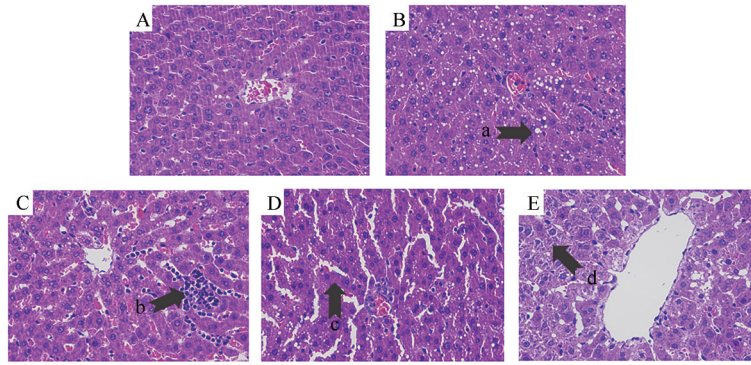
Figure 1 Changes of body weight of rats during PAH8 exposure

表1 PAH8染毒30 d后大鼠脏器系数(n=10,%)

Table 1 Organ coefficients of rats after PAH8 exposure for 30 d (n=10,%)

剂量/(μg/kg·BW)	脏器					
	心	肝	脾	肺	肾	睾丸
0	0.30±0.02	2.82±0.39	0.17±0.01	0.40±0.03	0.74±0.03	0.80±0.09
10	0.31±0.02	2.88±0.28	0.18±0.02	0.42±0.06	0.76±0.09	0.79±0.08
50	0.31±0.03	2.83±0.25	0.17±0.02	0.39±0.03	0.72±0.05	0.79±0.07
250	0.30±0.03	2.85±0.22	0.17±0.02	0.38±0.06	0.73±0.05	0.79±0.08
1 000	0.30±0.03	3.01±0.28*	0.18±0.04	0.45±0.10	0.75±0.06	0.83±0.13

注:*表示与对照组相比,P<0.05



注:A:对照组;B:10 μg/kg·BW;C:50 μg/kg·BW;D:250 μg/kg·BW;E:1 000 μg/kg·BW;
a:脂肪空泡;b:淋巴细胞浸润;c:肝细胞核固缩;d:细胞水肿

图2 PAH8染毒30 d后大鼠肝脏组织H&E染色(×400)

Figure 2 H&E staining of rats livers after PAH8 exposure for 30 d (×400)

表2 PAH8染毒30 d后肝脏病理改变发生率

Table 2 Incidence of liver pathological alteration after PAH8 exposure for 30 d

病变类型	剂量/(μg/kg·BW)				
	0	10	50	250	1 000
水肿	1/10	1/10	1/10	1/10	2/10
脂肪变性	1/10	2/10	2/10	3/10	4/10
坏死	0	0	0	0	0
炎症反应	1/10	1/10	1/10	2/10	4/10

2.3 肝脏油红O染色

油红试剂能将细胞内的脂滴染成红色,如图3所示,各组大鼠肝脏中均出现不同程度的红色脂滴,1 000 μg/kg·BW 剂量组红色脂滴更为明显,但与对照组相比镜下脂滴所占面积比无显著性差异(P>0.05)。

2.4 生化指标检测结果

如表3所示,PAH8染毒30 d后,大鼠血清肝功能指标 ALT、AST 无显著性改变,氧化应激相关指

他脏器系数无显著改变(P>0.05)。

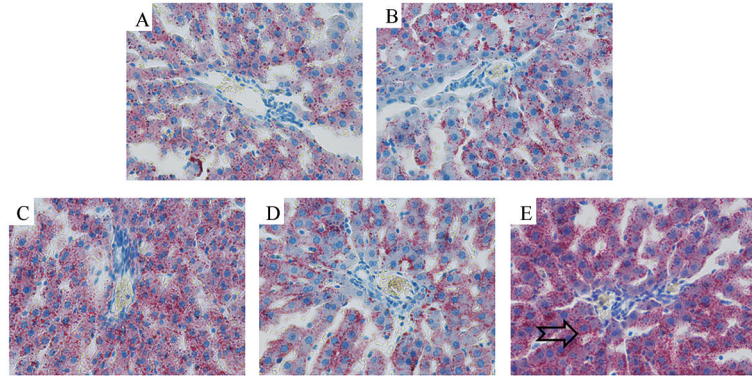
2.2 肝脏组织病理改变

如图2所示,PAH8染毒30 d后,与对照组相比,剂量组部分大鼠肝脏出现一定程度的病理损伤,包括肝细胞水肿、脂肪变性、核固缩、淋巴细胞浸润等。分析了各组大鼠肝脏病理改变的发生率^[16],如表2所示,各组大鼠肝脏病理改变的发生率无显著性差异(P>0.05)。

标中,10~250 μg/kg·BW 剂量组的 GSH-Px 活力显著高于对照组(P<0.01),1 000 μg/kg·BW 剂量组的 GSH-Px 活力显著低于对照组(P<0.001)。MDA 含量无显著改变。血清 TG 和 TC 含量及肝脏 TG 含量较对照组均无显著改变。肝脏 TC 含量呈现剂量反应趋势,与对照组相比,1 000 μg/kg·BW 剂量组肝脏 TC 含量显著升高(P<0.001)。

2.5 BMD分析

根据 1.2.5 数据筛选的原则,本研究中大鼠肝脏 TC 含量变化具有剂效应趋势,与对照组相比,1 000 μg/kg·BW 剂量组肝脏 TC 显著升高,差异具有统计学意义(P<0.001),且肝脏 TC 含量升高是肝脏脂肪变性的表现,具有毒理学意义。因此选择肝脏 TC 含量进行 BMD 分析,结果见表4。各拟合模型的拟合度 P 值均大于 0.1,残差绝对值均小于 2,同时各模型推导的 BMDL 差异大于 3 倍,因此选择最小的 BMDL(Hill 模型),得出 PAH8 致大鼠肝脏 TC 升高的



注:A:对照组;B:10 µg/kg·BW;C:50 µg/kg·BW;D:250 µg/kg·BW;E:1 000 µg/kg·BW;箭头所示为脂滴

图3 PAH8染毒30 d后大鼠肝脏油红O染色

Figure 3 Oil-red O staining of rats liver after PAH8 exposure for 30 d

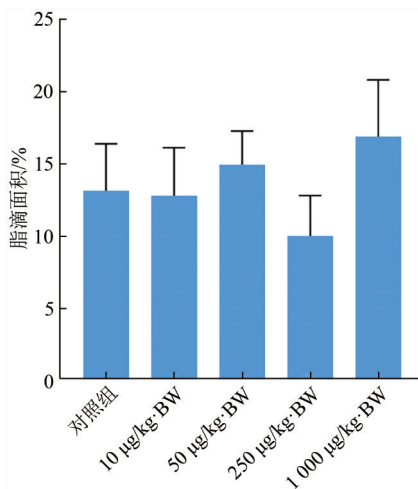


图4 肝脏油红O染色脂滴面积比

Figure 4 Area percentage of lipid droplets in livers with oil-red O staining

BMDL和BMD分别为47.61和213.52 µg/kg·BW。

2.6 NOAEL/LOAEL法

根据表3的结果,以肝脏TC含量变化为观察终点,得到PAH8联合暴露致大鼠肝脏毒性的NOAEL为250 µg/kg·BW,LOAEL为1 000 µg/kg·BW。

3 讨论

由于PAHs种类众多且主要以混合物的形式暴露于人体,对PAHs开展联合暴露毒性研究已成为国

际趋势。欧盟于2011年就已将4种多环芳烃(PAH4)作为指标纳入食品污染物限量标准中^[17],而我国现行《食品安全国家标准 食品中污染物限量》(GB 2762—2017)仅规定食品中苯并[a]芘的含量。由此可见我国涉及PAHs污染的食品安全标准与国际不符,很容易导致产品出口的壁垒限制,因此在国内开展PAHs联合暴露的毒性研究刻不容缓。因此,本研究在课题组前期对PAH4的研究基础上,进一步探究了PAH8联合暴露的大鼠肝脏毒性,并利用基准剂量法推导了PAH8联合暴露的毒性参考阈值,为开展PAHs联合毒性研究提供了数据。

在本研究中,PAH8连续染毒30 d后大鼠肝脏系数在1 000 µg/kg·BW组显著增加,病理学结果显示剂量组大鼠肝脏出现一定程度的脂肪变性、肝细胞水肿、肝小叶结构改变,说明PAH8联合暴露可能引起一定程度的肝脏损伤。然而,可能由于损伤程度较轻,并不能引起血清ALT、AST显著改变。GSH-Px是体内一种重要的过氧化物分解酶,其作用是催化谷胱甘肽参与过氧化反应,清除过氧化物和羟自由基,具有抗氧化作用^[18]。PAHs在体内代谢过程中可产生活性氧,引起氧化应激和炎症反应。本研究发现,GSH-Px活力在10~250 µg/kg·BW范围较对照组升高,说明PAH8染毒可能引起了一

表3 PAH8染毒30 d后大鼠生化指标改变(n=10)

Table 3 Alteration of serum biochemical indexes in rats after PAH8 exposure for 30 d (n=10)

指标	剂量/(µg/kg·BW)				
	0	10	50	250	1 000
ALT/(U/L)	9.95±1.85	12.43±3.34	11.66±3.52	10.53±2.88	11.63±3.09
AST/(U/L)	25.69±6.05	24.81±7.07	30.12±7.27	31.37±7.78	26.82±7.34
MDA/(µmol/L)	4.29±0.79	3.89±0.48	3.93±0.61	3.84±0.64	3.81±0.52
GSH-Px/(U/mL)	649.73±9.97	681.11±3.90***	663.03±4.92***	661.75±3.51**	632.33±5.58***
血清TG/(mmol/L)	1.24±0.24	1.44±0.34	1.79±0.38	1.35±0.56	1.48±0.47
血清TC/(mmol/L)	1.52±0.17	1.64±0.54	1.42±0.27	1.70±0.42	1.74±0.32
肝脏TG/(µmol/g)	13.63±2.39	12.53±0.94	12.79±2.65	13.92±1.71	14.51±4.94
肝脏TC/(µmol/g)	6.50±1.35	6.93±0.83	7.70±1.56	8.13±1.25	10.61±3.08***

注:*与对照组相比,P<0.05;**与对照组相比,P<0.01;***与对照组相比,P<0.001

表4 不同模型拟合PAH8染毒后大鼠肝脏TC含量

Table 4 TC content in rat liver fitted by different models

模型	BMDL	BMD	AIC	P
Exponential 2	367.06	493.75	189.81	0.29
Exponential 3	367.06	493.75	189.81	0.29
Exponential 4	88.62	232.53	190.14	0.35
Exponential 5	88.62	232.67	190.14	0.35
Hill	47.61	213.52	190.03	0.37
Polynomial Degree 4	301.67	430.87	189.31	0.35
Polynomial Degree 3	301.67	430.87	189.31	0.35
Polynomial Degree 2	301.69	430.87	189.31	0.35
Power	301.71	430.87	189.31	0.35
Linear	301.69	430.87	189.31	0.35

定的氧化应激,机体为对抗氧化反应导致GSH-Px代偿性升高,而1 000 $\mu\text{g}/\text{kg}\cdot\text{BW}$ 的PAH8染毒可能引起了GSH的过度消耗或合成不足,导致GSH-

Px的作用减弱,但具体机制还需进一步阐明。MDA水平未出现显著改变说明并未引起明显的脂质过氧化和组织细胞损伤。此外,PAH8染毒后肝脏中TC含量在1 000 $\mu\text{g}/\text{kg}\cdot\text{BW}$ 剂量组出现显著升高,说明PAH暴露可能引起大鼠肝脏出现脂质异常蓄积。既往研究表明,PAHs可引起肝脏脂肪变性,导致TG、TC含量升高,产生非酒精性脂肪肝的表现,其机制可能与激活芳香烃受体并调节脂质代谢相关基因如过氧化物酶增殖物激活受体的表达有关^[19-20]。本研究并未发现PAH8染毒后血清TG、TC的改变,说明肝脏的脂质变化可能较血清更为敏感,也可能是受到肝外组织(如脂肪组织)脂质代谢的影响,具体原因有待进一步探究^[19]。

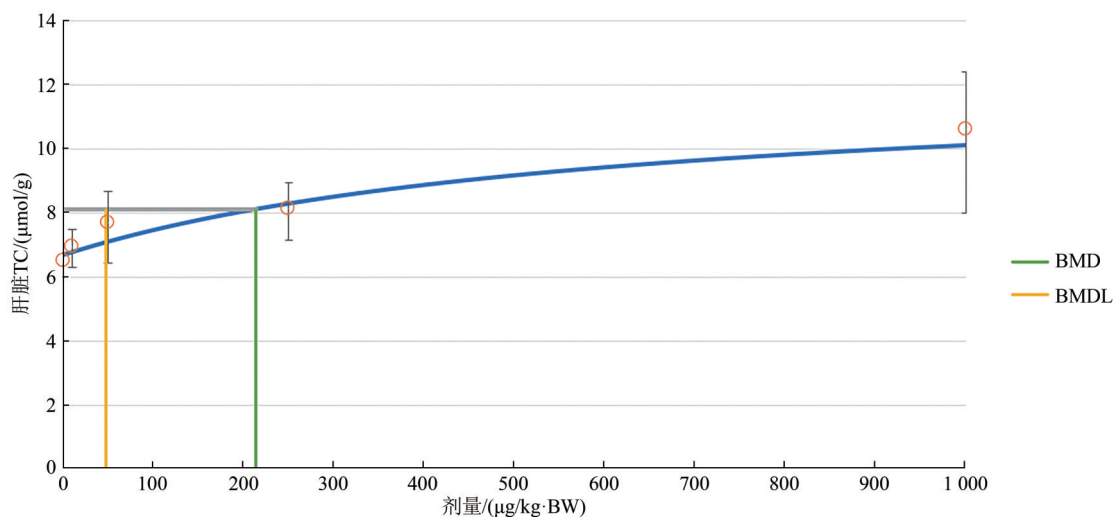


图5 Hill模型拟合PAH8染毒后大鼠肝脏TC含量的剂量-效应关系

Figure 5 Dose-effect relationship between liver TC and PAH8 exposure fitted by Hill model

传统的用于推导化合物毒性参考阈值的NOAEL/LOAEL法具有较大局限性,如NOAEL/LOAEL值是基于单个剂量得到,高度依赖试验剂量的选择,结果具有较大的不确定性。相对NOAEL/LOAEL而言,BMD利用了剂量-效应关系,对剂量-反应数据中的不确定性进行了量化,因此得到的毒性参考值更为准确^[13-14]。在本研究中,以肝脏TC含量升高为毒性结局,利用BMD法得到PAH8引起肝脏毒性的BMDL为47.61 $\mu\text{g}/\text{kg}\cdot\text{BW}$,该值小于获得的PAH8致大鼠肝脏毒性的NOAEL和LOAEL值,说明本研究得到的BMDL值较NOAEL值更加敏感。此外,与EFSA确立的PAH8基于致癌效应的BMDL₁₀相比,本研究的BMDL远远偏小,这说明PAH8引起脂质异常蓄积的肝损伤效应可能较其致癌效应更为敏感。该结论与CHEPELEV等^[21]的研究结果相似,他们发现苯并[a]芘致大鼠神经毒性的BMDL值(0.025 $\text{mg}/\text{kg}\cdot\text{BW}$)远小于引起胃癌的BMDL₁₀值(0.54 $\text{mg}/\text{kg}\cdot\text{BW}$),因此得出苯并[a]芘

暴露后的神经毒性可能比致癌毒性更为敏感。越来越多的证据显示PAHs与多种非致癌性慢性疾病之间存在相关性。因此,未来对PAHs的风险评估需要进一步关注其非致癌毒性效应。

参考文献

- [1] YEBRA-PIMENTEL I, FERNÁNDEZ-GONZÁLEZ R, MARTÍNEZ-CARBALLO E, et al. A critical review about the health risk assessment of PAHs and their metabolites in foods[J]. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2015, 55(10): 1383-1405.
- [2] SINGH L, VARSHNEY J G, AGARWAL T. Polycyclic aromatic hydrocarbons' formation and occurrence in processed food[J]. *Food Chemistry*, 2016, 199: 768-781.
- [3] ZHANG Y J, CHEN X Q, ZHANG Y. Analytical chemistry, formation, mitigation, and risk assessment of polycyclic aromatic hydrocarbons: From food processing to *in vivo* metabolic transformation[J]. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 2021, 20(2): 1422-1456.
- [4] MALLAH M A, CHANGXING L, MALLAH M A, et al.

- Polycyclic aromatic hydrocarbon and its effects on human health: an updated review[J]. *Chemosphere*, 2022: 133948.
- [5] JARVIS I W H, DREIJ K, MATSSON Å, et al. Interactions between polycyclic aromatic hydrocarbons in complex mixtures and implications for cancer risk assessment [J]. *Toxicology*, 2014, 321: 27-39.
- [6] LARSEN J. Scientific opinion of the panel on contaminants in the food chain on a request from the European commission on polycyclic aromatic hydrocarbons in food: Question N° EFSA-Q-2007-136[S]. European Food Safety Authority, 2008.
- [7] TAO L P, LI X, ZHAO M Z, et al. Chrysene, a four-ring polycyclic aromatic hydrocarbon, induces hepatotoxicity in mice by activation of the aryl hydrocarbon receptor (AhR) [J]. *Chemosphere*, 2021, 276: 130108.
- [8] YANG H, SHI Z, WANG X X, et al. Phenanthrene, but not its isomer anthracene, effectively activates both human and mouse nuclear receptor constitutive androstane receptor (CAR) and induces hepatotoxicity in mice [J]. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 2019, 378: 114618.
- [9] ZHANG X J, SHI Z, LYV J X, et al. *Pyrene* is a novel constitutive androstane receptor (CAR) activator and causes hepatotoxicity by CAR [J]. *Toxicological Sciences*, 2015, 147 (2): 436-445.
- [10] HU Z, LI Y, YANG Y, et al. Serum lipids mediate the relationship of multiple polyaromatic hydrocarbons on non-alcoholic fatty liver disease: A population-based study [J]. *Science of the Total Environment*, 2021, 780: 146563.
- [11] 张林, 陈诗奇, 马文彦, 等. 基准剂量法评估低剂量氯乙烯亚慢性染毒致肝毒性的生物接触限值[J]. *环境与职业医学*, 2018, 35(5): 384-388.
- ZHANG L, CHEN S Q, MA W Y, et al. Estimating biological exposure limits of sub-chronic hepatotoxicity induced by low-concentration vinyl chloride using benchmark dose method [J]. *Journal of Environmental & Occupational Medicine*, 2018, 35 (5): 384-388.
- [12] WANG X X, ZHANG J, HUANG Q Y, et al. Serum metabolomics analysis reveals impaired lipid metabolism in rats after oral exposure to benzo (a) pyrene [J]. *Molecular BioSystems*, 2015, 11(3): 753-759.
- [13] 吴智君, 赵文锦, 郑敏, 等. 基准剂量法在90d经口毒性试验中的应用[J]. *毒理学杂志*, 2016, 30(3): 205-209.
- WU Z J, ZHAO W J, ZHENG M, et al. The application of benchmark dose method in repeated dose 90-day oral toxicity study [J]. *Journal of Toxicology*, 2016, 30(3): 205-209.
- [14] 唐语, 曹佩, 李国君, 等. 基准剂量法推导3-氯丙醇及其酯的肾小管增生效应的BMDL值[J]. *中国食品卫生杂志*, 2022, 34(5): 907-915.
- TANG Y, CAO P, LI G J, et al. Deduction of BMDL of 3-MCPD and its esters for renal tubular hyperplasia effect based on BMD method [J]. *Chinese Journal of Food Hygiene*, 2022, 34 (5): 907-915.
- [15] JEFF G, DAVIS A, BLESSINGER T, et al. Benchmark dose software (BMDS), user guide, version 3.2 [M]. Washington: United States Environmental Protection Agency, 2020.
- [16] YANG H, JIA X. Safety evaluation of Se-methylselenocysteine as nutritional selenium supplement: Acute toxicity, genotoxicity and subchronic toxicity [J]. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 2014, 70(3): 720-727.
- [17] EU. Commission regulation No 835/2011 of 19 August 2011 amending Regulation (EC) No 1881/2006 as regards maximum levels for polycyclic aromatic hydrocarbons in foodstuffs: 1881/2006[S]. Official Journal of the European Communities, 2011.
- [18] 周登峰, 苏艳伟, 邬堂春. PAHs相关肺癌患者血浆GSH-Px/MDA、P21蛋白水平的研究[J]. *工业卫生与职业病*, 2011, 37 (4): 221-224.
- ZHOU D F, SU Y W, WU T C. Study of serum GSH-px, MDA and P21 protein in lung cancer patients induced by PAHs [J]. *Industrial Health and Occupational Diseases*, 2011, 37 (4) : 221-224.
- [19] JIN Y, MIAO W, LIN X, et al. Sub-chronically exposing mice to a polycyclic aromatic hydrocarbon increases lipid accumulation in their livers [J]. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 2014, 38(2): 353-363.
- [20] YU X, LV K, GUAN S, et al. Long-term exposure to phenanthrene at environmental-level induces intestinal dysbiosis and disrupted hepatic lipid metabolism in mice [J]. *Environmental Pollution*, 2021, 268: 115738.
- [21] CHEPELEV N L, MOFFAT I D, BOWERS W J, et al. Neurotoxicity may be an overlooked consequence of benzo [a] pyrene exposure that is relevant to human health risk assessment [J]. *Mutation Research Reviews in Mutation Research*, 2015, 764: 64-89.