

成潜,张瑾,张颖,等.3种非甾体抗炎药对Q67的联合毒性效应及作用机理[J].环境科学与技术,2025,48(1):10-21. Cheng Qian, Zhang Jin, Zhang Ying, et al. Combined toxic effects and mechanism of three non-steroidal anti-inflammatory drugs on Q67[J]. Environmental Science & Technology, 2025,48(1):10-21.

3种非甾体抗炎药对Q67的联合毒性效应及作用机理

成潜¹, 张瑾^{1,2*}, 张颖¹, 桂一心¹,
赵远帆¹, 申慧彦^{1,2}, 郭馨悦¹

(1.安徽建筑大学环境与能源工程学院,安徽省水污染控制与废水资源化重点实验室,安徽 合肥 230601;
2.安徽省水污染控制与废水资源化重点实验室,安徽 合肥 230601)

摘要:随着非甾体抗炎药(NSAIDs)在环境中频繁检出,其对生物体的毒性效应成为研究的热点。文章以双氯芬酸钠(DIC)、布洛芬钠(ibu)、萘普生钠(NAP)等常见NSAIDs为目标污染物,以淡水发光菌青海弧菌 *Vibrio cyanobacteria* sp.-Q67 (Q67)为受试生物,采用直接均分和均匀设计射线法分别设计了3个二元混合体系体系和1个三元混合体系。采用浓度加和和绝对残差2种模型定性和定量分析混合物的毒性相互作用,并结合热图法分析其变化规律,用剂量减小指数(DRI)来评估混合物中各组分对整体毒性的贡献,同步测定Q67在实验暴露终点时的生理生化指标,以及扫描电镜观察NSAIDs及其混合物作用前后Q67细胞结构和形态的变化。结果表明,3种NSAIDs及其混合物对Q67的毒性具有一定的浓度和时间依赖性,浓度-效应曲线呈现为“S”型,3种NSAIDs在暴露时间12 h的毒性强弱的排序均为 DIC>NAP>IBU,而混合物的毒性与各组分在混合体系中的浓度比密切相关,即混合物表现出组分比依赖的毒性。除少部分射线呈部分协同和加和作用外,其余混合射线均呈现出时间依赖性拮抗作用,最强的拮抗作用出现在暴露时间为12 h时的DIC-IBU-R1射线,dca值为0.58。依据DRI,DIC、IBU和NAP三个组分对拮抗作用的贡献度可能为NAP>IBU>DIC。在NSAIDs及其代表性混合物的作用下,Q67细胞出现表面皱缩、黏连甚至破裂的现象,并且相较于单一药物,混合物对细胞结构的破坏程度更为明显。污染物通过诱导细胞内过氧化物的过量累积,过氧化物进一步导致细胞膜脂质过氧化,进而破坏生物膜的完整性,细胞内电导液外泄和蛋白质溶出量增加加剧了细胞损伤,最终导致细胞死亡。

关键词:非甾体抗炎药; 微板毒性分析法; 毒性效应; 青海弧菌Q67; 生理生化影响

中图分类号:X171.5 **文献标志码:**A **doi:**10.19672/j.cnki.1003-6504.1367.24.338 **文章编号:**1003-6504(2025)01-0010-12

Combined Toxic Effects and Mechanism of Three Non-steroidal Anti-inflammatory Drugs on Q67

CHENG Qian¹, ZHANG Jin^{1,2*}, ZHANG Ying¹, GUI Yixin¹,
ZHAO Yuanfan¹, SHEN Huiyan^{1,2}, GUO Xinyue¹

(1. Key Laboratory of Water Pollution Control and Wastewater Resource of Anhui Province,
College of Environment and Energy Engineering, Anhui Jianzhu University, Hefei 230601, China;
2. Key Laboratory of Water Pollution Control and Wastewater Resource of Anhui Province, Hefei 230601, China)

Abstract: With the frequent detection of non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) in the environment, their toxic effects on organisms have become a hot research topic. Common NSAIDs such as diclofenac sodium (DIC), ibuprofen sodium (IBU), and naproxen sodium (NAP) were selected as the target contaminants, using Q67 (*Vibrio cyanobacteria* sp.-Q67, Q67) as the test organism, and three binary mixture systems and one ternary mixture system were designed by using the direct equipartition and uniform design ray methods. The concentration addition (CA) and absolute residual (dCA) models were used to qualitatively and quantitatively analyze the toxicity interactions in mixture systems, using heat map method to analyze the changing trends of interaction intensity. The dose reduction index (DRI) was used to assess the contribution of each component to the overall toxicity of the mixture. The physiological and biochemical indexes of Q67 at the endpoint of the experimental exposure were determined synchronously. Changes in the structure and morphology of Q67 cells before and after

the effects of NSAIDs and their mixtures were observed by electron microscopy. The results showed that the toxicity of the three NSAIDs and their mixtures on Q67 exhibited an “S” shaped with significant time- and concentration-dependent inhibition. The order of the toxicity of the three NSAIDs at the endpoint exposure time of 12 h was DIC>NAP>IBU. Toxicity of binary and ternary mixtures was closely related to the concentration ratio of each component in the mixture system, and showed component ratio-dependent toxicity. Except for a few rays, which showed partial synergistic and additive effects, the rest of the mixture rays showed time-dependent antagonistic effects. The strongest antagonistic effect appeared in DIC-IBU-R1 rays with a dCA value of 0.58 at the exposure time of 12 h. According to DRI, the contributions of the three components to the antagonistic effect may be ranked as NAP>IBU>DIC. In the presence of NSAIDs and their representative mixtures, Q67 cells showed surface crumpling, adhesion and even rupture, and the mixtures showed a more pronounced degree of disruption of the cellular structure compared to single drugs. By inducing excessive accumulation of intracellular peroxides, the peroxides further lead to lipid peroxidation of the cell membrane, which in turn disrupts the integrity of the biofilm. The cellular damage is exacerbated by the leakage of intracellular conductive fluid and increased protein solubilization, which further exacerbated cellular damage and ultimately caused cell death.

Key words: non-steroidal anti-inflammatory drugs; microplate toxicity analysis method; toxic effects; *Vibrio cyanobacteria* sp.-Q67; physiological and biochemical effects

非甾体抗炎药(non-steroidal anti-inflammatory drugs, NSAIDs) 是一类不含类固醇的药物,具有抗炎和镇痛的效果^[1,2],已在全球范围内广泛用于慢性和急性肌肉骨骼以及炎症疾病,并在预防心脑血管疾病方面发挥重要作用^[3,4]。由于 NSAIDs 的广泛使用,这些药物通过多种途径进入环境,如尿液、粪便、填埋场渗滤液和制药废水等^[5],不仅可能对环境造成污染或引起生态风险等问题^[6],还对生物体和人体健康构成潜在威胁^[7],如 NSAIDs 在水体或土壤中的存在会影响微生物群落的结构和功能,进而破坏生态系统的平衡^[8];双氯芬酸已被发现对鱼类的肝脏和肾脏造成损伤^[9],并影响其生殖系统,而布洛芬和萘普生等其他 NSAIDs 也显示出类似的生态毒理效应,包括发育异常和氧化还原平衡受损^[10];这些药物还可能影响中枢神经系统、消化道及肝肾功能等,进一步加重其环境危害^[11]。因此,NSAIDs 在环境中的广泛检出和持续存在引起科学界和环保组织的广泛关注^[12]。研究 NSAIDs 在生物和生态系统中的潜在风险尤为重要,以便更好地管理和控制其在环境中的释放,从而减少对生态环境和人类健康的不良影响。

目前,有关 NSAIDs 对生物的毒性已有报道^[13],但现有的研究主要集中在单一 NSAID 的毒性效应,对其在复合污染条件下的联合毒性研究相对较少^[14]。而环境中的污染物以多种形式和浓度共存,存在方式丰富多样且复杂,这种共存状态可能导致累积毒性和相互作用,从而增加其潜在风险。DIC、IBU 和 NAP 等常见的 NSAIDs 在多个水体中被同时检测到,浓度从 ng/L 到 μg/L 不等^[15]。这些共存的 NASIDs 污染物,很可能对其暴露的生物产生联合作用风险。如使用

对乙酰氨基酚和布洛芬处理绿色氛虾(*Neocaridina denticulate*),可观察到急性毒性作用和氧化损伤^[16]。表明联合药物处理可对水生生物产生显著的毒性效应和氧化应激反应。因此,有必要更全面分析 NSAIDs 及其混合存在时的生物效应和潜在作用机制,以深入了解 NSAIDs 对生态系统的潜在危害。

综上,本研究以双氯芬酸钠(DIC)、布洛芬钠(IBU)、萘普生钠(NAP)等常见非甾体抗炎药(NSAIDs)作为目标污染物,以淡水发光菌青海弧 Q67(*Vibrio cyanobacteria* Q67, Q67)作为指示生物,应用直接均分射线法(EquRay)和均匀设计射线法(UD-Ray)设计 NSAIDs 及其混合物,运用时间毒性微板分析法(t-MTA)^[14,17]系统分析 NSAIDs 及其混合物在不同暴露时间下的毒性变化规律。采用浓度加和(CA)与绝对残差(dCA)模型定性和定量表征 3 种药物之间的联合毒性相互作用(协同或拮抗作用),用剂量减小指数(DRI)来评估混合物中各组分对整体毒性的贡献,并同步测定 Q67 的生理生化指标,以探究其可能的作用机制。研究结果可为 NSAIDs 及其混合物的环境毒性效应提供了重要参考,对环境保护和生物安全具有一定的启示作用。

1 材料与方法

1.1 试剂与仪器

选用 3 种 NSAIDs 作为实验目标污染物:双氯芬酸钠(DIC)、布洛芬钠(IBU)、萘普生钠(NAP),均购于上海麦克林生化科技有限公司,其理化性质见表 1。采用超纯水配制储备液,置于棕色瓶中,保存于 4 ℃冰箱中备用。本实验过程中用到的实验仪器参见文献[18]。

表 1 目标污染物的基本理化信息
Table 1 Basic physical and chemical information of the target pollutant

名称	简称	分子式	CAS-号	分子量	纯度/%	时间/h	α	β	RMSE	R	$EC_{50}/(mol \cdot L^{-1})$	pEC_{50}
双氯芬酸钠	DIC	$C_{14}H_{10}Cl_2NNaO_2$	15307-79-6	318.13	≥ 99.0	2	14.98	2.90	0.076	0.954 6	5.11E-06	5.29
						4	8.16	1.50	0.061	0.967 0	2.07E-06	5.68
						8	8.77	1.65	0.097	0.914 1	2.90E-06	5.54
						12	12.54	2.37	0.061	0.973 1	3.58E-06	5.45
布洛芬钠	IBU	$C_{18}H_{17}NaO_2$	31121-93-4	228.26	≥ 95.0	2	2.96	1.24	0.025	0.992 6	2.08E-03	2.68
						4	3.36	1.27	0.036	0.987 8	1.16E-03	2.93
						8	5.79	2.54	0.041	0.986 1	3.77E-03	2.42
						12	7.96	3.50	0.029	0.993 6	4.18E-03	2.38
萘普生钠	NAP	$C_{14}H_{13}NaO_3$	26159-34-2	252.24	≥ 99.0	2	3.54	1.25	0.024	0.994 5	7.50E-04	3.12
						4	4.85	1.84	0.058	0.981 1	1.46E-03	2.83
						8	6.64	2.74	0.059	0.984 1	2.77E-03	2.56
						12	5.53	2.19	0.026	0.995 6	2.03E-03	2.69

注:RMSE是均方根误差, R 是相关系数。

1.2 受试生物及菌种培养

实验菌种 Q67 购自上海麦克林生化科技有限公司,青海弧菌 Q67 的培养与保存方法参见文献[19]。

1.3 时间毒性微板分析法

采用白色不透明的 96 孔微板作为实验载体,具体操作参见文献[20]。

将加入 Q67 的微板置于 $(22 \pm 1)^\circ C$ 恒温培养箱中培养,在不同暴露时间(2、4、8、12 h)取出,用酶标仪(Synergy 2, BioTek Instruments, Inc., 美国)测其发光强度,计算不同浓度污染物对 Q67 的发光抑制率(x),具

体计算见式(1)。

$$x = \frac{I_0 - I}{I_0} \times 100\%$$

(1)

式中, I_0 表示空白组的平均发光单位, I 代表不同药物浓度作用后发光菌的平均发光单位。

1.4 混合物实验设计

采用直接均分射线法(EquRay)对二元混合物体系的浓度配比进行设计(p_i),采用均匀设计法(UD-Ray)设计三元混合物体系的浓度比(p_i)。混合体系各个混合物射线的组分构成及浓度比见表 2。

表 2 NSAIDs 混合体系的组分构成及浓度比
Table 2 Component composition and concentration ratio of the mixture system of NSAIDs

BM1	p_{DIC}	p_{IBU}	BM2	p_{DIC}	p_{NAP}	BM3	p_{IBU}	p_{NAP}	TM1	p_{DIC}	p_{IBU}	p_{NAP}
R1	4.27E-03	9.96E-01	R1	8.75E-03	9.91E-01	R1	9.11E-01	8.86E-02	R1	1.54E-03	3.27E-01	6.71E-01
R2	1.71E-03	9.98E-01	R2	3.52E-03	9.96E-01	R2	8.05E-01	1.95E-01	R2	2.66E-03	8.73E-01	1.24E-01
R3	8.57E-04	9.99E-01	R3	1.76E-03	9.98E-01	R3	6.73E-01	3.27E-01	R3	1.34E-03	6.00E-01	3.99E-01
R4	4.29E-04	1.00E+00	R4	8.82E-04	9.99E-01	R4	5.07E-01	4.93E-01	R4	1.52E-03	8.96E-01	1.03E-01
R5	1.71E-04	1.00E+00	R5	3.53E-04	1.00E+00	R5	2.92E-01	7.08E-01	R5	9.30E-04	7.22E-01	2.77E-01

1.5 浓度-效应曲线拟合

NSAIDs 对 Q67 的浓度-效应数据符合经典的“S”型,选用对该类数据拟合效果较好的双参数非线性函数 Weibull 和 Logit 对毒性效应进行数据拟合,具体拟合公式见式(2)和(3)。采用 APTox(assessment and prediction of mixture toxicity)软件进行数据拟合,生成实验观测数据的 95% 置信区间(observed confidence intervals, OCIs),同时计算各污染物的半数效应浓度(EC_{50})及其负对数(pEC_{50})。

Logit: $E = 1/(1 + \exp(-\alpha - \beta \log_{10} c))$

(2)

Weibull: $E = 1 - \exp(-\exp(\alpha + \beta \log_{10} c))$

(3)

式中, α 、 β 分别是位置参数和斜率参数, c 表示单一化合物或者混合物浓度; E 为生长抑制率。

1.6 混合物毒性相互作用评估

CA 模型可以对混合物组分间的相互作用情况进行合理分析,实验观测数据与 CA 预测结果之间的偏差反映了混合物之间的协同或拮抗作用。CA 模型的公式表达见式(4):

$$\sum_{i=1}^n \frac{c_i}{EC_{x,i}} = 1$$

(4)

式中, n 是混合组分的数目, $EC_{x,i}$ 表示混合物中第 i 组分单独作用时引起 $x\%$ 效应的浓度, c_i 表示混合物中第 i 组分的浓度。

dCA 模型能够反映预测结果与拟合结果之间的绝对偏差,从而定量评估混合体系的毒性相互作用强度,dCA 模型的表达式如式(5)所示。当 dCA 为正数时,

表示协同作用;当dCA为负数时,表示拮抗作用;当dCA为零时,表示加和作用。且绝对值大小反映出混合物间的毒性相互作用强弱。dCA的绝对值越大,毒性相互作用越强。

$$dCA=E_{OBS}-E_{PRE}$$

(5)

式中, E_{OBS} 为拟合效应, E_{PRE} 为CA预测效应。

剂量减小指数(DRI)^[21]用于评估混合物中各组分对整体毒性的贡献,第j个组分的DRI_j公式表达如式(6)所示。

$$DRI_j=\frac{EC_{x,j}}{c_j}$$

(6)

式中, $EC_{x,j}$ 表示第j个组分单独存在时能够产生x%效应的浓度; c_j 表示混合物中第j个组分的实际浓度。

1.7 生理生化指标测定

1.7.1 细胞形态观察

以代表性混合物射线为研究对象,在特征浓度(即半数效应浓度, EC_{50})和实验暴露终点(12 h)下结合暴露锥形瓶法采集样品,随后通过冷场发射扫描电子显微镜(AURIGA,Zeiss,德国)扫描进行细胞形态观察与分析。

1.7.2 蛋白质含量的测定

采用考马斯亮蓝法,根据蛋白质与染料结合的原理,测定样品中的蛋白质浓度,以评估细胞受损情况。

1.7.3 电导参数的测定

以代表性混合物射线为研究对象,在特征浓度(即半数效应浓度, EC_{50})和实验暴露终点(12 h)下结合暴露锥形瓶法采集样品,通过电导率仪测定锥形瓶中溶液的电导率,并记录相关数据^[22]。

1.7.4 氧化损伤程度的测定

采用购自 biosharp 生物公司的总 SOD 活性检测试剂盒(WST-8法)^[23]和脂质氧化(MDA)^[24]检测试剂盒

来检测 Q67 细胞样品中的 SOD 含量和 MDA 含量变化。具体测定方法参考说明书。

2 结果与讨论

2.1 NSAIDs对Q67的单一毒性

采用了双参数非线性函数 Weibull 和 Logit 函数对毒性效应进行非线性拟合,拟合结果见表 1。表 1 显示,Weibull 和 Logit 函数对 Q67 的毒性数据拟合结果较好($R>0.9$, $RMSE<0.1$)。为评估 DIC、IBU 和 NAP 三种非甾体抗炎药的毒性,以半数效应浓度(EC_{50})的负对数值(pEC_{50})作为毒性指标,绘制 pEC_{50} 随时间变化的热图(图 1)。在热图中,红色越深表示 pEC_{50} 值越大,即毒性越强^[25]。

从图 1 可以看出,3 种 NSAIDs 对 Q67 的毒性随时间的变化呈现出先增强后减弱的趋势,显示出一定的时间依赖性。这一现象在 DIC 和 IBU 中尤为明显,两者在 4 h 时的毒性达到最大值,随后逐渐减弱;而 NAP 的毒性在 2 h 时达到峰值,随后开始减弱。此外,随着 DIC、IBU 和 NAP 三种污染物浓度的增加,其对 Q67 的抑制作用愈发显著,表现出非常明显的浓度依赖性。3 种 NSAIDs 在整个暴露时间内对 Q67 的毒性强弱排序相同,以实验终点时间 12 h 为例,以 pEC_{50} 作为毒性指标,DIC、IBU 和 NAP 的毒性大小顺序为 $DIC(pEC_{50}=5.45)>NAP(pEC_{50}=2.69)>IBU(pEC_{50}=2.38)$ 。

2.2 NSAIDs混合物体系对Q67的毒性

采用 pEC_{50} 随时间变化的热图来表征 DIC-IBU、DIC-NAP、IBU-NAP 和 DIC-IBU-NAP 4 个混合体系的毒性效应,结果见图 1。从时间角度来看,3 种非甾体抗炎药的 4 种混合物体系对 Q67 的 pEC_{50} 值随暴露时间呈现出先增大后减小的趋势,并且在 4 h 的暴露时间内达到毒性峰值,表明这些混合体系的毒性效应均具有显著的时间依赖性。

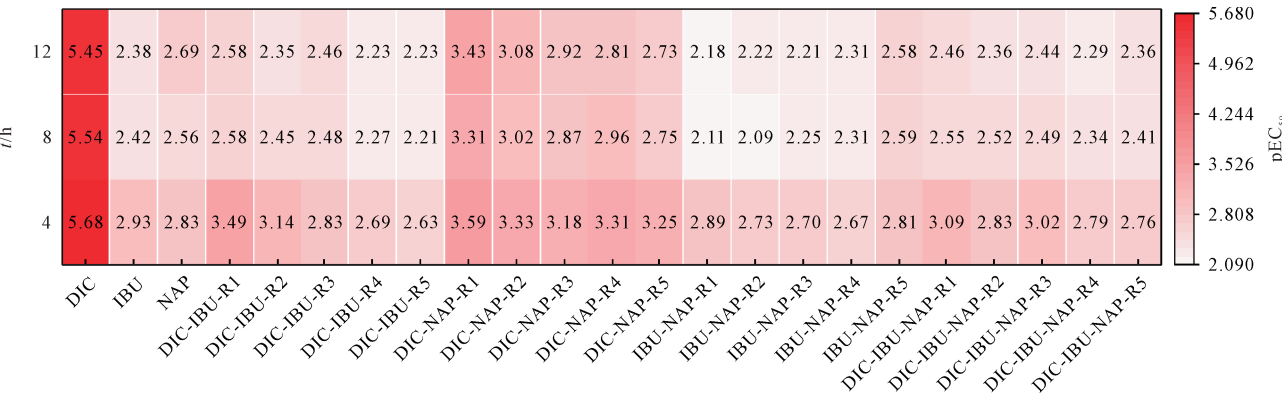


图1 3种NSAIDs及其混合体系pEC₅₀随时间变化的热图
Fig.1 Thermogram of pEC₅₀ versus time for three NSAIDs and their hybrid systems

从组分浓度角度来看,3种污染物的二元混合物毒性依赖于组分的浓度比,即不同的浓度比会显著影响混合物的毒性。对于DIC-IBU体系,随着DIC组分浓度比的减少及IBU组分浓度比的增加,污染物的毒性逐渐减弱。对于DIC-NAP体系,随着DIC组分浓度比的减少及NAP组分浓度比的增加,污染物的毒性逐渐减弱。在IBU-NAP体系中,4 h- pEC_{50} 与IBU和NAP在混合体系中的组分浓度比相关性较弱,在8 h和12 h时,随着IBU组分浓度比的减少及NAP组分浓度比的增加,污染物的毒性逐渐增强。对于DIC-IBU-NAP三元混合体系,其毒性在2~12 h内呈现先增强后减弱的趋势。5条射线对Q67在不同时间点的毒性强弱排序不同。以实验终点时间12 h为例,5条射线的 pEC_{50} 值排序为 $R1(pEC_{50}=2.46)>R3(pEC_{50}=2.44)>R2=R5(pEC_{50}=2.36)>R4(pEC_{50}=2.29)$ 。

2.3 NSAIDs混合物体系对Q67的毒性相互作用分析

2.3.1 NSAIDs二元混合物体系毒性相互作用分析

采用CA模型和dCA对NSAIDs二元混合物体系(DIC-IBU、DIC-NAP和IBU-NAP)的毒性相互作用进行分析^[22],通过dCA值定量评估混合物体系的毒性相互作用强度。热图能够直观地展示污染物相互作用强度随浓度和时间变化的规律,其中蓝色表示协同作用,红色表示拮抗作用,而白色则表示加和作用。颜色的深浅反映了dCA绝对值的大小,深蓝色或深红色指示较高的毒性相互作用强度。

由图2可知,在DIC-IBU混合体系中, $R1\sim R5$ 射线对Q67的毒性相互作用在2~12 h内整体呈现由加和逐渐转变为拮抗的趋势,拮抗作用区域逐渐缩小并集中在中高浓度区域,且 $R1$ 、 $R2$ 射线的拮抗强度明显大于 $R3\sim R5$ 射线。除 $R3$ 射线的拮抗作用区域无明显变化外,其余射线的拮抗作用区域均逐渐缩小,并最终在12 h时集中在中高浓度区域。在DIC-NAP混合体系中, $R1\sim R3$ 射线对Q67的毒性相互作用在2~12 h内由加和转变为弱拮抗再转变为加和作用, $R4$ 、 $R5$ 射线则由加和转变为弱协同再转变为加和。在IBU-NAP混合体系中,除了 $R5$ 射线在整个暴露时间内对Q67表现为部分加和作用和协同作用外,其余射线的作用从加和转变为拮抗作用且拮抗作用主要集中在中高浓度区间。最强拮抗作用出现在DIC-IBU- $R1$ 体系,在暴露时间为12 h时,最强拮抗作用为0.58,其混合物浓度为 $1.46E-03$ mol/L;最强协同作用出现在DIC-NAP- $R5$ 体系,暴露时间为4 h时,协同强度为0.17,其混合物浓度为 $(3.16\sim 6.83)E-04$ mol/L。

综上所述,在2~12 h内,3种NSAIDs的二元混合物在不同时间点主要展现出不同强度的拮抗作

用以及微弱的协同作用。在DIC-IBU和IBU-NAP混合体系中,毒性相互作用均从加和效应转变为拮抗效应。这可能是因为暴露初期时,NSAID的混合体系通过相似的代谢途径和靶点共同作用,导致加和效应;而随着暴露时间的延长,生物体的防御机制,如抗氧化酶,可能会减弱化学物质的毒性效应,表现为拮抗或弱拮抗效应。在DIC-NAP混合体系中,不同射线的中期相互作用效应各异。对于 $R1\sim R3$ 射线,Q67的应激反应机制(抗氧化或修复机制)可能部分减弱了射线的毒性效应,表现为弱拮抗;而 $R4$ 、 $R5$ 射线的应激反应机制(细胞膜损伤或氧化应激)可能增强某些毒性效应,表现为弱协同效应。CA与dCA模型对3组二元混合体系的毒性相互作用分析结果一致。暴露时间和组分浓度比共同影响二元混合物(DIC-IBU、DIC-NAP和IBU-NAP)的dCA值。

2.3.2 NSAIDs的三元混合物体系毒性相互作用分析

DIC-IBU-NAP三元混合体系中,不同射线对Q67的作用表现出显著差异。 $R2$ 、 $R4$ 和 $R5$ 射线表现为拮抗作用, $R1$ 和 $R3$ 射线的作用则从加和作用开始,随后转变为轻微协同作用,最终变为拮抗作用。在同一时间下, $R4$ 、 $R5$ 射线产生的拮抗作用强度明显大于 $R1\sim R3$,这说明不同浓度配比的射线具有不同的相互作用强度。 $R2$ 、 $R4$ 和 $R5$ 混合射线的红色随时间增加逐渐加深,表明 $R2$ 、 $R4$ 和 $R5$ 射线的拮抗强度随时间(2~12 h)增强。12 h时dCA值达到最大,其中 $R4$ 射线在浓度 $4.34E-03$ mol/L时,其dCA值达0.37,显示出最强拮抗作用。同时间下, $R2$ 、 $R4$ 、 $R5$ 的最高拮抗强度(dCA值)分别为0.26、0.37、0.32。

结果分析显示,CA和dCA这2种模型在定性分析混合物毒性相互作用方面具有较高的一致性,但dCA热图能够进行更为细致的定量评估,从而可以更全面地评价混合污染物环境风险。

2.4 NSAIDs对其混合物体系毒性相互作用的贡献度分析

为了进一步分析混合物体系中各组分对毒性相互作用的贡献,采用剂量减小指数(DRI)确定每个组分对整体毒性相互作用的贡献度^[22],以识别出对毒性作用产生显著影响的成分,结果见图3。

2.4.1 二元混合物体系毒性相互作用的组分贡献度分析

结合图1和图3,在DIC-IBU体系中,DIC-IBU随着DIC组分浓度比的增加及IBU组分浓度比的减少,该混合体系的毒性逐渐增减弱,这一趋势与拮抗作用的增强密切相关,在2~4 h暴露时间内,混合体系毒性

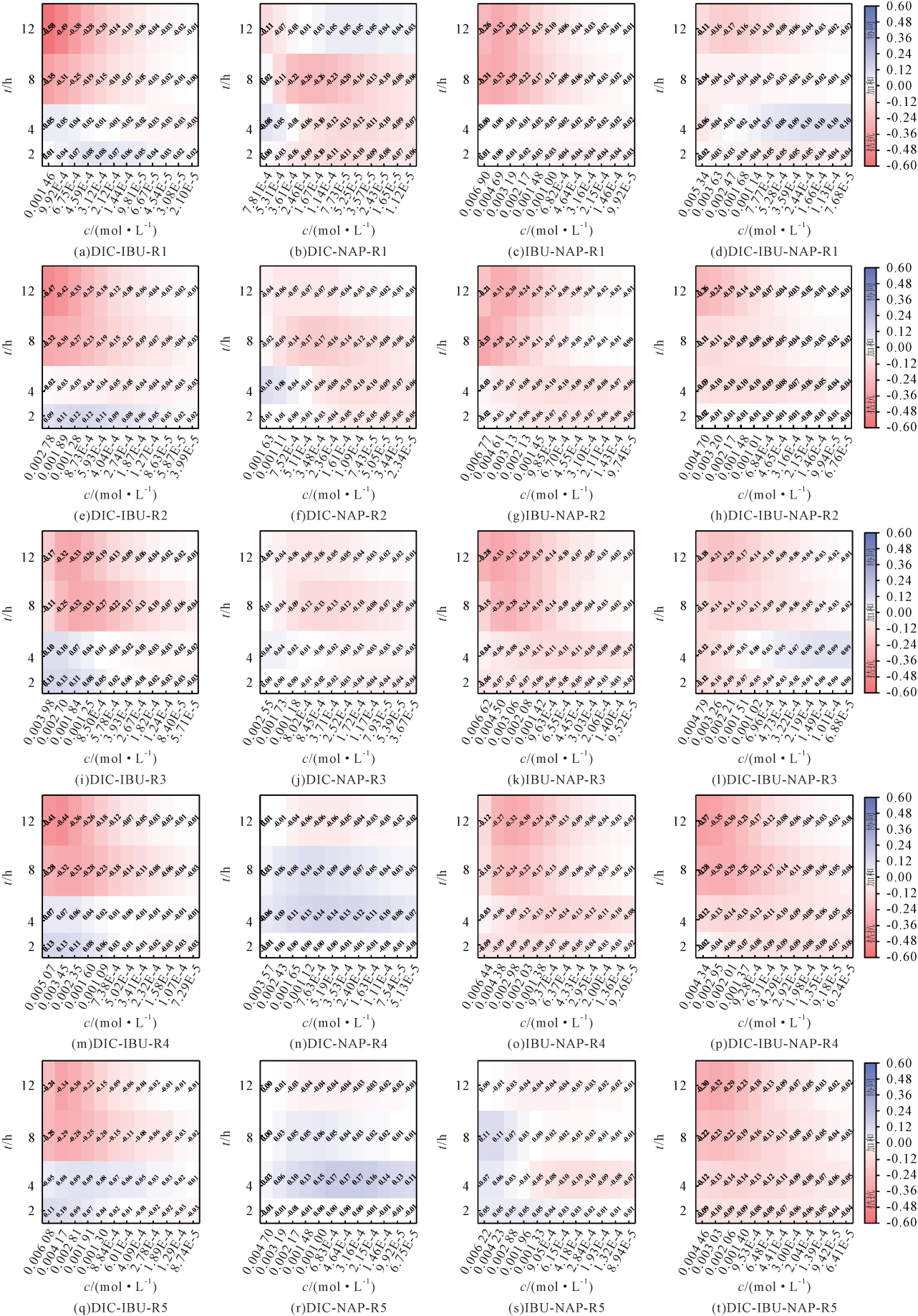


图2 3种NSAIDs二元和三元混合物体系dCA热图
Fig.2 dCA thermograms of binary and ternary mixture systems of three NSAIDs

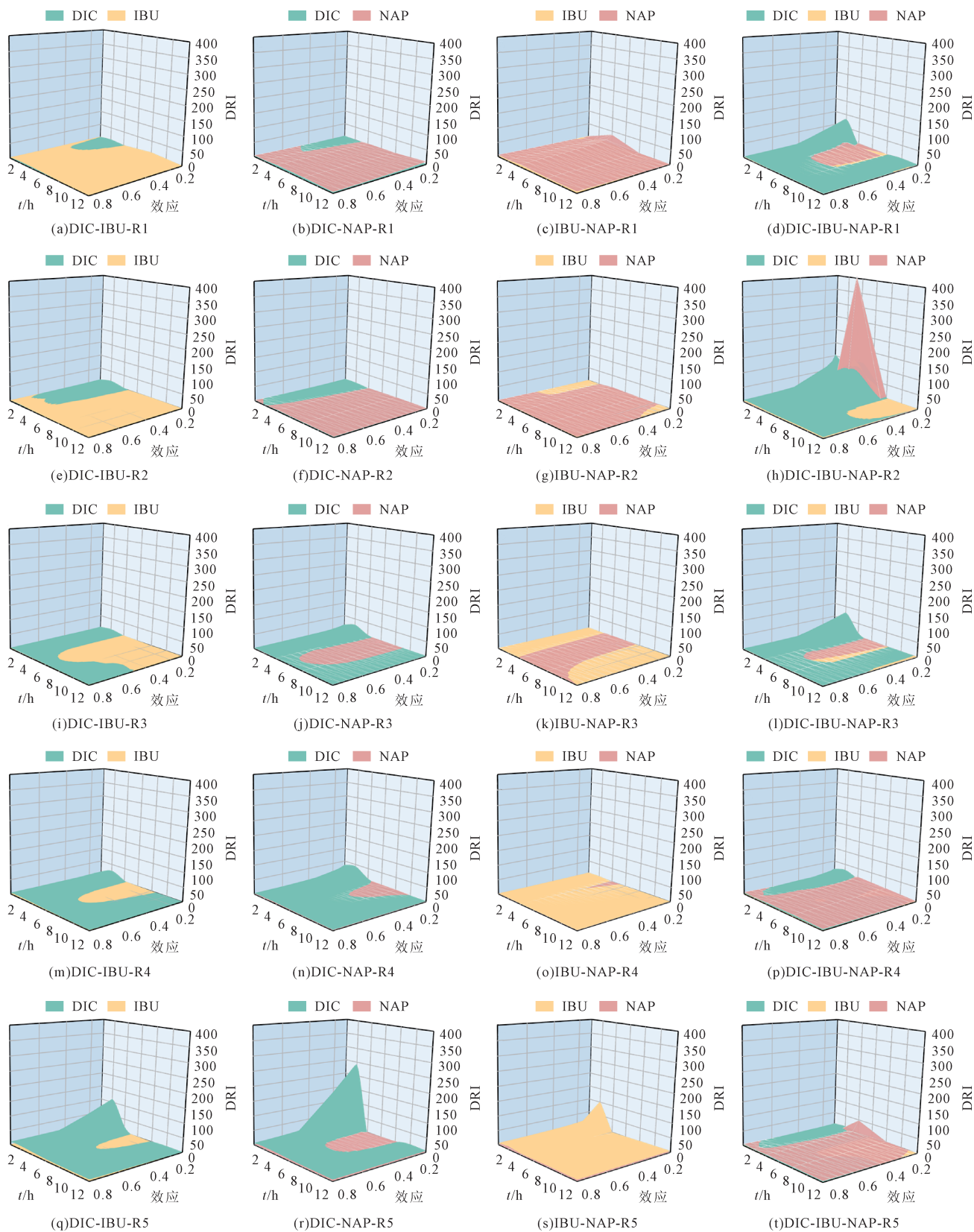


图3 3种NSAIDs二元和三元混合物体系剂量减小指数随时间和效应变化
Fig.3 Plot of dose reduction index (DRI) for binary and ternary NSAID mixtures over time and effect

相互作用表现为弱协同。在 R5 射线暴露时间为 2 h 时,DIC 的 DRI 变化值最大,达到 171.938,而 IBU 在 R1 射线暴露时间为 8 h 时 DRI 变化值最大为 10.56。这表明 DIC 的 DRI 幅度更大,说明在产生相同效应

时,DIC 的剂量降低倍数较高,其对协同作用的贡献度高于 IBU。
在 DIC-NAP 体系中,短时间暴露时,DIC 始终占主导地位。随着 DIC 组分浓度比的减小以及 NAP 组

分浓度比的增加,协同作用逐渐显现。DIC组分的DRI变化在R5射线暴露2 h时达到最大,值为389.503,NAP组分在R1射线暴露12 h时的DRI变化最大,为9.915。进一步表明,DIC在该混合物中产生相同效应时剂量降低的倍数最高,对混合物相互作用的贡献最大。尽管DIC组分浓度比减小,其贡献度反而增加,且在0.25 h时,R1~R5均表现为协同作用。因此,可以推测,DIC对协同作用的贡献度较大,而NAP对拮抗作用的贡献度较大,此结论与在DIC-IBU体系的结论一致。

在IBU-NAP体系中,随着NAP组分浓度比的增大及IBU组分浓度比的减少,R1射线暴露4 h时,NAP组分DRI变化最大,达到36.661。IBU组分在R5射线暴露时间为2 h时,DRI变化达到最大103.323。表明IBU在IBU-NAP混合体系中产生相同效应时剂量降低的倍数最大,对混合物相互作用的贡献应该最大。结合图2中R5表征协同效应的蓝色出现,进一步印证IBU对协同作用中的重要性。

综上所述,可以推测对拮抗效应的关键组分是NAP,有助于协同效应的关键组分是DIC和IBU。根据各组分的DRI变化及其在混合物中相互作用的表现,可以推测DIC、IBU和NAP三个组分对拮抗作用的贡献度可能为NAP>IBU>DIC,协同作用的则可能相反。这一推测基于各组分的DRI变化和它们在混

合物中相互作用的表现,表明DIC在增强混合物毒性方面发挥了更为显著的作用。

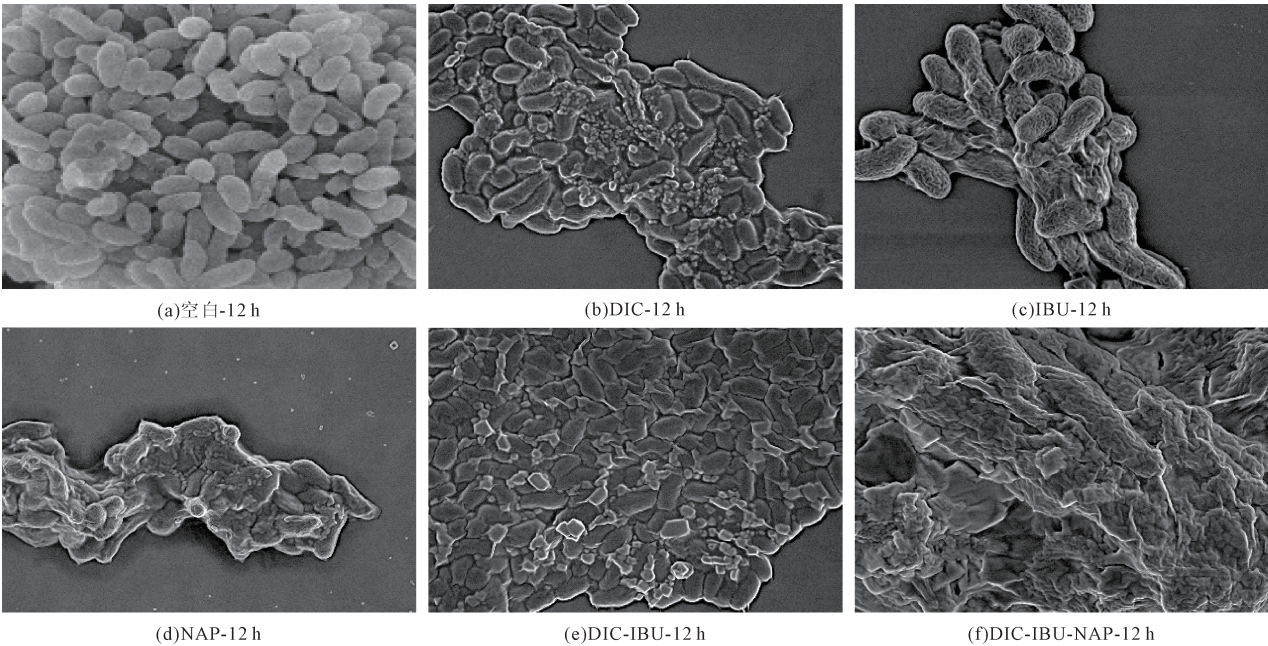
2.4.2 三元混合物体系毒性相互作用的组分贡献度分析

结合图3和dCA对相互作用的分析可知,在暴露时间初期,R1和R3成分表现出协同作用,此时DIC的贡献度最大, $DRI_{max,DIC} = 125.879$ 。同时,R2、R4和R5射线显示出拮抗作用,此时NAP在该混合物中产生相同效应时剂量降低的倍数最多,对混合物拮抗作用的贡献应该最大, $DRI_{max,NAP} = 376.954$ 。即DIC、IBU与NAP三个组分,对拮抗作用的贡献度大小的组分依次是NAP、IBU和DIC,这与二元混合物体系中的分析一致。

2.5 NSAIDs及其混合物代表射线对Q67的生理生化影响

2.5.1 NSAIDs及其混合物代表射线对Q67细胞形态的影响

暴露时间终点是能代表药物作用效果的关键时间点,选择12 h单一时间点可以减少变量干扰,有助于集中分析实验结果。实验选取了DIC-IBU-R1和DIC-IBU-NAP-R2(对Q67均具有显著的拮抗作用效果的代表性组合),进行SEM电镜扫描操作。观察EC₅₀-12 h条件下NSAIDs及其混合物代表射线作用Q67后的细胞形态变化,如图4所示。



注：倍数：20 000；加速电压：2 kV。

图4 NSAIDs及其混合物代表射线对Q67细胞结构的影响
Fig.4 Effect of NSAIDs and their mixtures representing rays on the structure of Q67 cells

由图4可知,NSAIDs及其混合物作用Q67前后,其细胞结构明显受损,但破损情况不同。正常的

Q67细胞在未受药物作用的情况下,其形态呈直杆状,菌体完整,边缘整齐。在DIC作用后,Q67菌体细

胞失去其原本的短粒状形态,内溶物外泄,部分细胞出现拉长并相互黏连,少部分细胞破碎,显示出明显的细胞损伤。相比之下,在IBU作用后,细胞表面变得粗糙、皱缩,出现凹凸不平现象,少数细胞轻微黏连,但仍可观察到细胞整体形态。与DIC作用相比,IBU引起的细胞损伤较轻微。在NAP作用后,细胞黏连现象更为严重,各细胞结构间界限模糊,部分细胞出现融合现象,破损程度介于DIC和IBU之间。单个药物对Q67细胞的破坏程度与毒性大小顺序一致(DIC>NAP>IBU)。在二元混合物DIC-IBU-R1作用后,菌体结构部分破裂,菌体外壁不完整,大量细胞破碎。在三元混合物DIC-IBU-NAP-R2作用后,菌体细胞完全破碎和融合,此时对细胞形态的破坏最为严重。

综上,NSAIDs及其混合物对Q67进行胁迫后,细胞结构均受到不同程度的破坏,出现细胞表面皱缩、边缘不清晰甚至融合和破碎的现象。这表明,单一成

分和混合物均可作用于Q67的细胞壁和细胞膜。单一药物破坏作用强度与其毒性大小的排序一致。然而,混合物的对细胞结构的破坏机制不仅仅依赖于单一成分,还涉及各成分之间复杂的相互作用。多种NSAIDs联合使用时,其对细胞的破坏程度超过单一成分的影响,特别是DIC-IBU-NAP-R2体系细胞破碎和融合现象最为严重。这可能是由于混合药物的成分共同影响膜通透性和内部稳态,形成复杂的混合物体系后,进一步加剧细胞损伤。

2.5.2 NSAIDs及其混合物代表射线对Q67上清液的电导率和电阻率的影响

选择了混合物毒性相互作用明显的代表体系DIC-IBU-R1和DIC-IBU-NAP-R2(对Q67均具有拮抗作用),在EC₅₀-12 h条件下进行电导率和电阻率相关机理实验。3种NSAIDs及其混合物代表射线对Q67上清液电导率和电阻率的影响结果如图5所示。

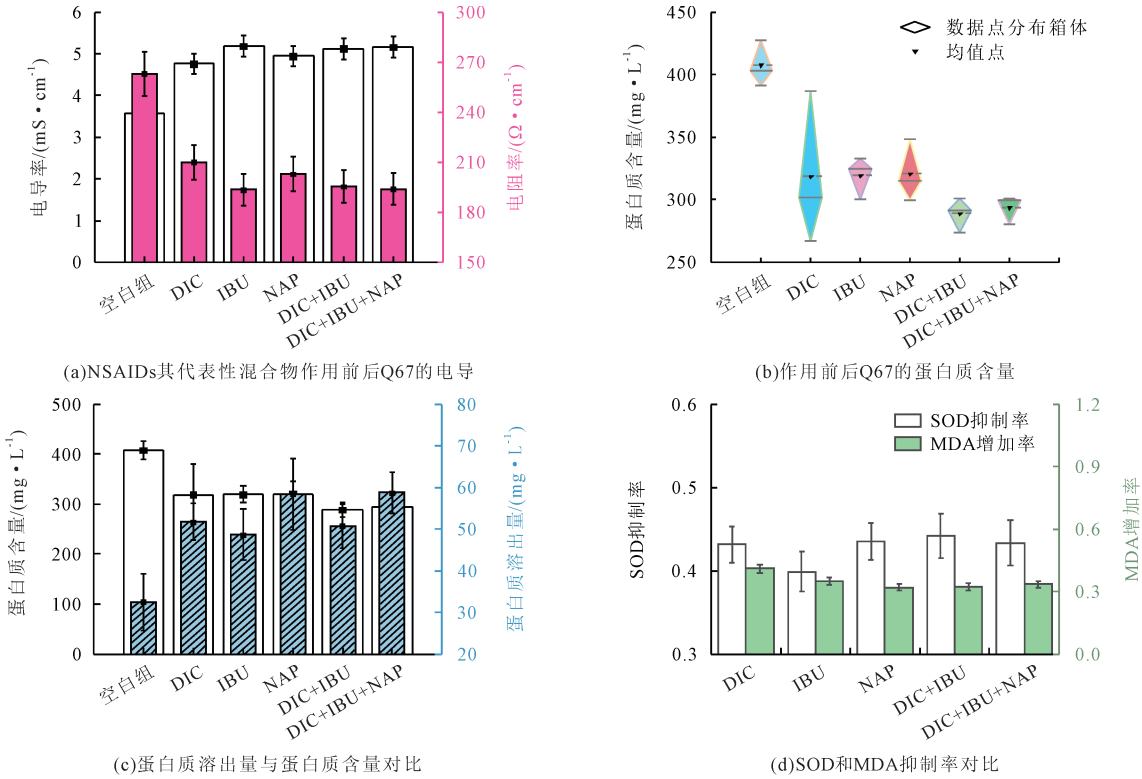


图5 NSAIDs及其混合物作用前后Q67生理生化指标的变化
Fig.5 The changing of physiological and biochemical indexes of Q67 before and after exposure to NSAIDs and their mixtures

从图5(a)可以看出,在NSAIDs及其混合物作用下,图中实验组各体系的电导率随着暴露时间的延长相较于空白组均有不同程度的提高。在暴露时间终点时,DIC、IBU、NAP、DIC-IBU-R1、DIC-IBU-NAP-R2体系的电导率最大值为5.185 mS/cm。电阻率的变化规律与电导率刚好相反。在药物作用后,实验组中各体系的电阻率大幅度减少,均低于空白组。

在暴露时间终点,各个体系中IBU的电阻率最小,最小值为193.5 Ω/cm。

综上,NSAIDs及其混合物均会破坏Q67的生物细胞膜导致细胞膜的通透性提高,从而使其细胞内电解质外泄。电解质是电导液的主要成分,其外泄后使细胞外环境中的离子浓度增加,从而导致电导率上升。同时,由于细胞膜的电阻率与其完整性相关,膜

的破坏使其电阻率降低。结合 pEC_{50} 热图可知,毒性越大表明细胞膜受损越严重,电导率也随之增大,这点恰好和上述结论相符。

2.5.3 NSAIDs及其混合物对Q67的蛋白质含量和蛋白溶出量影响

在3种NSAIDs组成的二元及三元混合物体系中,选择了混合物毒性相互作用明显的代表体系DIC-IBU-R1和DIC-IBU-NAP-R2(对Q67均具有拮抗作用),在 EC_{50} -12 h条件下采用考马斯亮蓝法测定Q67细胞可溶性蛋白溶出量。

图5(b)展示了在实验终点时间 EC_{50} 浓度下NSAIDs其混合物代表射线对Q67细胞蛋白质含量的测定结果。实验观测蛋白质溶出量与蛋白质含量的对比如图5(c)所示,在药物的作用下,蛋白质的溶出量相较于空白组在大幅度增加。蛋白质含量最高的空白组反而溶出蛋白质最少,这表明正常环境下菌体的细胞膜完整,能够维系细胞膜内大分子动态平衡,保护细胞内部结构。与空白组对比,各实验组对Q67的蛋白质含量抑制率约为70%,可能是由于选定的 EC_{50} 浓度是基于Q67发光值测定所得的,较生长抑制率更为灵敏,导致两者之间存在一定的差异。

在NSAIDs及其混合物作用Q67后,培养液中的可溶性蛋白溶出含量均有所提升,表明药物破坏了细胞膜的完整性,导致细胞内大分子物质外泄和新陈代谢受损,细胞丧失保护,最终菌体死亡。在 EC_{50} -12 h浓度条件下,具有拮抗作用DIC-IBU-NAP-R2的可溶性蛋白溶出含量最多,为58.72 mg/L。

综上,NSAIDs及其混合物可能会通过干扰正常的细胞代谢过程来影响蛋白质合成或加速蛋白质降解,从而导致细胞内蛋白质总含量下降。这种变化通常与细胞损伤和应激反应相关,毒性物质的作用可能会激活细胞内降解途径,从而增加蛋白质降解。此外,NSAIDs及其混合物会破坏细胞膜,增加膜的通透性。蛋白质溶出量增加是细胞膜完整性受损的标志,表明有毒物质影响了细胞膜结构。

2.5.4 NSAIDs及其混合物对Q67的氧化损伤程度的影响

丙二醛(MDA)是脂质过氧化的最终产物,是衡量过氧化物累积水平的一个重要指标。MDA过量积累反映氧化损伤的程度,并可能激活抗氧化系统的关键酶,如超氧化物歧化酶(SOD)。SOD是抗氧化系统中重要的功能酶,负责清除细胞内的活性氧。为研究NSAIDs及其混合物对Q67的氧化应激反应的影响,对药物胁迫下Q67的氧化损伤程度以及其抗氧化损

伤能力等指标进行了系统分析。测定在最终暴露时间下Q67的SOD和MDA含量的变化,并绘制了相关图表(图5(d))。

由图5(d)可知,NSAIDs及其混合物作用前后,Q67呈现不同程度的氧化损伤,且细胞的抗氧化损伤能力变化与氧化损伤程度呈反比。具体表现为过氧化物醛基MDA明显增加,而SOD含量有不同程度的下降,抑制率最大可达到0.44。Q67细胞暴露在药物12 h后,MDA的含量普遍上升,表明在NSAIDs及其混合物胁迫下,Q67细胞内MDA不断累积。在药物作用前后的SOD均有明显下降,导致Q67细胞自身无法维持活性氧化物含量在正常范围内,推测可能由于过量的过氧化物破坏了细胞器膜,从而影响了抗氧化系统相关酶的合成。

综上所述,NSAIDs及其混合物通过增加细胞内MDA含量和降低SOD活性,加剧了Q67细胞的氧化损伤。其中,DIC对Q67的氧化损伤程度明显高于其余物质,但其对抗氧化损伤能力的影响与其他NSAIDs无明显差别。这可能是由于DIC引起更高水平的氧化应激,导致细胞膜损伤和MDA积累更加严重。这表明,虽然不同NSAIDs在氧化应激水平上可能存在差异,但其对细胞抗氧化系统的抑制作用是一致的。

3 结论

(1)在全程暴露过程中,3种NSAIDs对Q67的毒性呈现先增强后减弱的趋势,呈现一定的时间依赖性,且3种NSAIDs对Q67的毒性大小排序在各暴露时间均相同,以实验终点暴露时间12 h为例,毒性强弱的排序均为DIC>NAP>IBU。

(2)3种NSAIDs的混合体系均表现出组分比依赖毒性和时间依赖毒性,二元和三元混合体系对Q67的毒性随时间均呈现先增强后减弱的趋势,所有二元混合物在4 h时毒性达到顶峰,显示出最大的毒性效应。三元混合体系的毒性在不同时间点的毒性强弱排序不同,以实验终点时间(12 h)为例,三元混合物12 h- pEC_{50} 值排序为R1($pEC_{50}=2.46$)>R3($pEC_{50}=2.44$)>R2=R5($pEC_{50}=2.36$)>R4($pEC_{50}=2.29$)。

(3)除少部分射线呈部分协同和加和作用,其余NSAIDs的二元和三元混合体系对Q67的毒性相互作用主要为拮抗作用,呈现出的毒性相互作用强度不同且具有时间依赖性。在二元混合体系中,DIC-IBU-R1射线在暴露时间为12 h时的拮抗作用最明显,其浓度为 $1.46E-03$ mol/L,最强拮抗作用为0.58。在三元混合体系中,R4射线在12 h时对Q67产生最强

拮抗作用,其浓度为 $4.34\text{E}-03\text{ mol/L}$,其 dCA 值最高可达 0.37。

(4)依据 DRI 与 CA 模型,DIC、IBU 和 NAP 三个组分对拮抗作用的贡献度可能为 $\text{NAP}>\text{IBU}>\text{DIC}$,拮抗效应的关键组分是 NAP,对协同效应的关键组分是 DIC。

(5)在 NSAIDs 及其代表性混合物的作用下,Q67 细胞出现表面皱缩、黏连甚至破裂的现象,并且相较于单一药物,混合物对细胞结构的破坏程度更为明显。这些药物通过破坏菌体细胞膜,增加膜通透性,使细胞内过氧化物过量累积,破坏了细胞的抗氧化能力。因此,Q67 细胞中 MDA 大量积累同时 SOD 活性下降,加速了胞内电导液外泄和蛋白质溶出量增加,细胞损伤加剧。NSAIDs 及其代表性混合物对 Q67 细胞的致毒机制主要包括细胞膜损伤、过氧化物的过量积累、抗氧化能力的破坏以及细胞内外液体和物质的紊乱,以上这些机制共同作用引起细胞的结构和功能严重受损,最终导致细胞死亡。

【参考文献】

- [1] Khan H Y, Parveen S, Yousuf I, et al. Metal complexes of NSAIDs as potent anti-tumor chemotherapeutics: mechanistic insights into cytotoxic activity *via* multiple pathways primarily by inhibition of COX-1 and COX-2 enzymes[J]. Coordination Chemistry Reviews, 2022,453:214316.
- [2] Sharma P, Kaur P, Ghanghas P, et al. Selenium ameliorates ibuprofen induced testicular toxicity by redox regulation running head: Se protects against NSAID induced testicular toxicity[J]. Reproductive Toxicology, 2020,96:349-358.
- [3] 汤晓航,宋会林,姚丽莹,等. 基于聚乙烯亚胺修饰磁性纳米粒的分散固相萃取/高效液相色谱法测定水中非甾体抗炎药[J]. 中国药科大学学报, 2024,55(4):485-492.
Tang Xiaohang, Song Huilin, Yao Liying, et al. Determination of non-steroidal anti-inflammatory drugs in the environmental water samples by a polyvinylimide-modified magnetic nanoparticles-based solid phase extraction coupled with high-performance liquid chromatography[J]. Journal of China Pharmaceutical University, 2024, 55(4): 485-492.
- [4] Pirlamarla P, Bond R M. FDA labeling of NSAIDs: review of nonsteroidal anti-inflammatory drugs in cardiovascular disease[J]. Trends in Cardiovascular Medicine, 2016,26(8): 675-680.
- [5] 巢铸,谭伟强,司静宜,等. 中国 3 种非甾体抗炎药的淡水水质基准与生态风险研究[J]. 环境污染与防治, 2024,46(5): 694-700.
Chao Zhu, Tan Weiqiang, Si Jingyi, et al. Freshwater quality criteria of 3 non-steroidal anti-inflammatory drugs and their ecological risk assessment in China[J]. Environmental Pollution & Control, 2024,46(5):694-700.
- [6] 王环. 典型非甾体抗炎药对斜生栅藻和水稻的毒性效应及分子应答机制研究[D]. 杭州:浙江工商大学, 2021.
Wang Huan. Study on Toxic Effects and Molecular Response Mechanism of Typical Non-steroidal Anti-inflammatory Drugs on *Scenedesmus obliquus* and Rice[D]. Hangzhou: Zhejiang Gongshang University, 2021.
- [7] Świacka K, Michnowska A, Maculewicz J, et al. Toxic effects of NSAIDs in non-target species: a review from the perspective of the aquatic environment[J]. Environmental Pollution, 2021,273:115891.
- [8] Junaid M, Wang Y, Hamid N, et al. Prioritizing selected PPCPs on the basis of environmental and toxicogenetic concerns: a toxicity estimation to confirmation approach[J]. Journal of Hazardous Materials, 2019,380:120828.
- [9] 高亮,许玉洁,陈进林,等. 双氯芬酸和醋氨酚对稀有鮡鲫早期生活阶段的毒性效应[J]. 环境科学学报, 2020,40(2): 734-740.
Gao Liang, Xu Yujie, Chen Jinlin, et al. Toxicity effects of diclofenac and acetaminophen to the early-life stage of Chinese Rare Minnow (*Gobiocypris rarus*)[J]. Acta Scientiae Circumstantiae, 2020,40(2):734-740.
- [10] Wang J, Meng X Y, Chen X Y, et al. Cinchophen induces RPA1 related DNA damage and apoptosis to impair ENS development of zebrafish[J]. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2024,272:116032.
- [11] Korkmaz N E, Caglar N B, Aksu A, et al. Occurrence, bioconcentration, and human health risks of pharmaceuticals in biota in the Sea of Marmara, Türkiye[J]. Chemosphere, 2023,325:138296.
- [12] Du J, Mei C F, Ying G G, et al. Toxicity thresholds for diclofenac, acetaminophen and ibuprofen in the water flea *Daphnia magna*[J]. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, 2016,97(1):84-90.
- [13] Madikizela L M, Tavengwa N T, Chimuka L. Applications of molecularly imprinted polymers for solid-phase extraction of non-steroidal anti-inflammatory drugs and analgesics from environmental waters and biological samples[J]. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2018,147:624-633.
- [14] 刘树深,张瑾,张亚辉,等. APTox: 化学混合物毒性评估与预测[J]. 化学学报, 2012,70(14):1511-1517.
Liu Shushen, Zhang Jin, Zhang Yahui, et al. APTox: assessment and prediction on toxicity of chemical mixtures[J]. Acta Chimica Sinica, 2012,70(14):1511-1517.
- [15] Dos S Grignet R, Barros M G A, Panatta A A S, et al. Medicines as an emergent contaminant: the review of microbial biodegradation potential[J]. Folia Microbiologica, 2022,67(2): 157-174.

[16] Sung H H, Chiu Y W, Wang S Y, et al. Acute toxicity of mixture of acetaminophen and ibuprofen to Green Neon Shrimp, *Neocaridina denticulate*[J]. Environmental Toxicology and Pharmacology, 2014,38(1):8–13.

[17] 朱祥伟,刘树深,张琼,等. 杀虫剂及抗生素对发光菌的短期毒性与长期毒性[J]. 环境科学研究, 2009,22(5):589–594.

Zhu Xiangwei, Liu Shushen, Zhang Qiong, et al. Short-term and long-term toxicities of selected insecticides and antibiotics on photobacteria[J]. Research of Environmental Sciences, 2009,22(5):589–594.

[18] 周娜娜,张瑾,曹家乐,等. 3 种尼泊金酯类防腐剂对发光菌 Q67 联合毒性相互作用的定量评估[J]. 生态毒理学报, 2022,17(2):164–177.

Zhou Nana, Zhang Jin, Cao Jiale, et al. Quantitative evaluation of combined toxicity interaction of three Para-bens to luminescent bacteria Q67[J]. Asian Journal of Ecotoxicology, 2022,17(2):164–177.

[19] Zhang J, Liu S S, Dong X Q, et al. Predictability of the time-dependent toxicities of aminoglycoside antibiotic mixtures to *Vibrio qinghaiensis* sp.-Q67[J]. RSC Advances, 2015,5 (129):107076–107082.

[20] 董欣琦. 部分典型环境污染物对青海弧菌 Q67 联合毒性作用的时间特征研究[D]. 合肥:安徽建筑大学, 2017.

Dong Xinqi. Study on Time Characteristics of Joint Toxicity of Some Typical Environmental Pollutants to *Vibrio qinghaiensis* Q67[D]. Hefei: Anhui Jianzhu University, 2017.

[21] Chou T C, Otter G M, Sirotnak F M. Schedule-dependent synergism of taxol or taxotere with edatrexate against human breast cancer cells *in vitro*[J]. Cancer Chemotherapy and Pharmacology, 1996,37(3):222–228.

[22] 桂一心,张瑾,张颖,等. 3 种 N-DBPs 对青海弧菌 Q67 的联合毒性作用及贡献度[J]. 中国环境科学, 2024,44(5):2742–2753.

Gui Yixin, Zhang Jin, Zhang Ying, et al. Combined toxicity interactions and contribution of three N-DBPs to *Vibrio qinghaiensis* sp.-Q67[J]. China Environmental Science, 2024, 44(5):2742–2753.

[23] 王继庆,任毅,时晓磊,等. 小麦籽粒超氧化物歧化酶(SOD)活性全基因组关联分析[J]. 中国农业科学, 2021,54(11): 2249–2265.

Wang Jiqing, Ren Yi, Shi Xiaolei, et al. Genome-wide association study of superoxide dismutase (SOD) activity in wheat grain[J]. Scientia Agricultura Sinica, 2021, 54(11): 2249–2265.

[24] 胡钰,张齐杰,傅纤雯,等. 梔子花乙酸乙酯萃取物对副溶血性弧菌抑菌活性及机理研究[J]. 食品与发酵工业, 2024,50 (21):51–59.

Hu Yu, Zhang Qijie, Fu Xianwen, et al. Bacteriostatic activity and mechanism of ethyl acetate extract from *Gardenia jasminoides* Ellis flower against *Vibrio parahaemolyticus*[J]. Food and Fermentation Industries, 2024,50(21):51–59.

[25] 张颖,张瑾,周娜娜,等. 3 种增塑剂对发光菌 Q67 联合毒性作用定量评估[J]. 生态毒理学报, 2023,18(3):465–477.

Zhang Ying, Zhang Jin, Zhou Nana, et al. Quantitative evaluation of combined toxicity interactions of three plasticizers on photobacterium Q67[J]. Asian Journal of Ecotoxicology, 2023,18(3):465–477.