

曾晨,郭少娟,杨立新.汞、镉、铅、砷单一和混合暴露的毒性效应及机理研究进展[J].环境工程技术学报,2018,8(2):221-230.

ZENG C, GUO S J, YANG L X. Toxic effects and mechanisms of exposure to single and mixture of mercury, cadmium, lead and arsenic[J]. Journal of Environmental Engineering Technology, 2018, 8(2): 221-230.

汞、镉、铅、砷单一和混合暴露的毒性效应 及机理研究进展

曾晨,郭少娟,杨立新*

环境基准与风险评估国家重点实验室,中国环境科学研究院,北京 100012

摘要 汞、镉、铅和砷是自然界中毒性较强的金属,镉和砷已确定为致癌物,汞和铅为可能致癌物。人类活动过程的排放是汞、镉、铅和砷的主要污染来源,由这些金属污染物暴露导致的人类疾病已经引起了公众的广泛关注。研究汞、镉、铅和砷在环境中实际暴露水平,尤其是汞、镉、铅和砷复合暴露对人体健康和生态环境影响及毒性效应的机理极为重要。根据暴露途径、暴露剂量和暴露时间,汞、镉、铅和砷具有不同的代谢途径,产生不同的毒性效应,具有不同的毒性效应机理。在总结现有汞、镉、铅、砷单一和混合暴露的健康损害及毒性效应的基础上,回顾、归纳汞、镉、铅和砷诱导产生毒性效应的机理,讨论基因组、转录组、蛋白质组和代谢组学等技术在汞、镉、铅和砷单一、混合毒性效应及机理研究中的应用并探讨未来的研究方向。

关键词 汞;镉;铅;砷;单一;混合;毒性效应;毒性机理

中图分类号:X171.5 文章编号:1674-991X(2018)02-0221-10 doi:10.3969/j.issn.1674-991X.2018.02.030

Toxic effects and mechanisms of exposure to single and mixture of mercury, cadmium, lead and arsenic

ZENG Chen, GUO Shaojuan, YANG Lixin

State Key Laboratory of Environmental Criteria and Risk Assessment, Chinese Research Academy
of Environmental Sciences, Beijing 100012, China

Abstract Metals including mercury, cadmium, lead and arsenic in nature are harmful to wildlife and humans. Cadmium and arsenic and/or their related compounds are well-known carcinogens, while mercury and lead may even cause cancer. Human activities are the main sources of mercury, cadmium, lead and arsenic contamination. A group of human diseases are suspected to result from exposure to these metals, and have awakened the public conscious to pay more attention to the risk of these metals in human health. Extensive studies have demonstrated the associations between adverse health effects and exposure to these metals at high dose. However, there is a paucity of information on the adverse effects associated with chronic exposure to the environmentally relevant levels of individual metals and mixtures. The impacts of exposure to mixtures of these metals on human health need to be examined. Depending on exposure route, dose and exposure duration, mercury, cadmium, lead and arsenic differ in metabolic fate, mechanisms of transport and disposition in the body, and have the individual toxicological profiles. The adverse effects and potential molecular evidences associated with the exposure to single and mixture of mercury, cadmium, lead and arsenic were summarized. The applications and future research directions of omics technology, such as genomics, transcriptomics, proteomics, and metabolomics in understanding the mechanisms related to toxicities were also discussed.

收稿日期:2017-09-27

基金项目:人力资源和社会保障部高层次留学回国人员资助项目(2016YSKY-020)

作者简介:曾晨(1992—),女,硕士,主要从事毒理学研究,zengchenx@163.com

* 责任作者:杨立新(1966—),男,研究员,博士,主要从事分子毒理和神经生物学研究工作,yanglx@craes.org.cn

Key words mercury; cadmium; lead; arsenic; single; mixture; toxic effect; mechanism

汞、镉、铅和砷均为地壳元素,广泛存在于自然界。随着人类生产活动和工业化进程,如采矿、冶炼、加工和新型材料的生产和使用,电子垃圾的拆解等过程向环境中排放了大量的金属汞、镉、铅和砷及其化合物。人类活动过程每年向大气排放2 200 ~ 3 400 t 汞,据估算我国生产活动向环境中排放的汞从2000年356 t增加到2010年的538 t,年增长率为4.2%^[1]。2006—2012年,我国主要人为排放源(如发电厂、工业锅炉厂等燃煤,金属冶炼,废物燃烧等)向大气排放镉3 192 t,铅88 852.6 t,年增长率为1.5% ~ 7.2%,2012年我国向大气中排放砷2 529 t,年增长率为4.4%^[2-3]。汞、镉、铅和砷环境暴露导致的人类疾病事件时有发生,如1956年日本爆发的“水俣病”,发生在日本的“痛痛病”,含铅汽油污染事件和地下饮用水砷中毒导致的“黑足病”等。基于对汞、镉、铅和砷诱导产生生物学效应及人体健康损害的认识,美国国家环境保护局(US EPA)把汞、镉、铅和砷列为毒性效应最强的4种金属,国际癌症研究机构(IARC)将镉和砷列为人类致癌物,汞和铅为可能的人类致癌物^[4]。

污染源、食物、采矿、冶炼和皮革鞣制是汞、镉、铅和砷暴露的主要来源,过量暴露导致细胞损伤和凋亡、炎症反应、神经毒性、心血管功能异常和癌症。汞、镉、铅和砷通过不同的分子机理诱导产生细胞生物学效应和健康危害。为了保护生态环境和降低人体健康风险,依据不同单一金属的毒性效应,各国颁布了饮用水、地表水、土壤等介质中金属的浓度限值。研究揭示低于环境标准浓度的金属混合物,长期暴露仍可以造成雄性大鼠肾脏、肝脏和脑部结构变化,产生毒性效应^[5],表明环境实际浓度水平的污染物及其混合物长期暴露诱导的毒性效应及可能的健康危害需要关注,事实上其也已成为目前生态毒理和环境健康研究的重点领域。揭示金属及其复合物暴露如何导致毒性效应和健康危害的分子机理,研究基因表达水平变化与生理指标、健康结局之间的效应关系是目前需要解决的关键问题。本文将在系统分析、归纳汞、镉、铅和砷暴露及诱导产生的生物学效应的基础上,结合目前环境实际浓度水平及其混合物暴露导致生物学效应的研究进展,探讨表观遗传组学、转录组学和暴露组学等技术,在研究评价汞、镉、铅和砷单一及混合毒性机理和健康危害中的应用及发展前景。

1 汞、镉、铅和砷毒性效应及作用机理

1.1 汞

1.1.1 暴露及毒性效应

汞以金属汞、无机汞和有机汞3种形态存在。金矿冶炼和燃煤是其主要人为源,汞广泛用于医疗器械、汞合金及一些生活用品中。无机汞经微生物甲基化转化为甲基汞,进而在食物链中富集,高达 10^6 倍。食用富集甲基汞的海产品是人类甲基汞暴露的主要途径,如1956年日本的“水俣病”,患者均表现为运动、听力及语言障碍、肢端麻木;重者痉挛、死亡;孕妇暴露会导致婴幼儿智力发育缺陷;患者头发汞平均浓度为30 mg/L,最高可达920 mg/L^[6]。同时汞暴露损害心血管、消化、神经和泌尿系统的生理功能,并影响发育和免疫系统。

根据暴露时间、剂量和途径,3种形态的汞均诱导毒性效应,其中甲基汞神经毒性最强。现有证据支持汞具有神经、免疫、遗传、发育、心血管、肾脏毒性,同时可以通过干扰内分泌和代谢过程产生毒性效应,汞诱导淋巴细胞、小胶质细胞、单核细胞、神经细胞等的凋亡和坏死^[7]。汞中毒导致视野变窄,感觉、运动功能受损,与成年大脑相比,发育期的大脑更易受甲基汞的影响^[8]。汞通过干扰内分泌系统进而影响生殖,并影响免疫功能。甲基汞暴露导致母鼠肝脏总抗氧化活力(T-AOC)降低,肝脏中丙二醛(MDA)浓度增加;仔鼠T-AOC升高,MDA浓度增加,同时母鼠肝脏中有少量细胞肿大、胞质疏松透明和肝细胞坏死,仔鼠肝脏细胞无明显形态变化^[9]。氯化汞处理导致肾脏内汞浓度明显增加,生理指标发生变化并产生肾脏毒性^[10]。

1.1.2 毒性效应机理

甲基汞与半胱氨酸形成复合物,通过中性氨基酸载体进入细胞。汞通过与含巯基的蛋白质或多肽结合,进而影响与巯基有关的代谢过程,抑制酶活性,破坏氧化还原平衡,诱导产生活性氧种类(ROS)/氧化应激,造成细胞损伤,诱导细胞凋亡^[11]。甲基汞显著增加大脑皮层神经细胞内游离 Ca^{2+} 水平,影响钙稳态,进而影响细胞生理过程。甲基汞干扰线粒体呼吸链,诱导氧化应激,影响DNA修复并导致细胞凋亡^[8]。汞暴露青鳉(*Oryzias melastigma*)增加肝脏中过氧化物酶4和6的表达,降低超氧化物歧化酶(SOD)和谷胱甘肽转硫酶

(GST)活性,抑制脑中2种醛脱氢酶(ALDHs)活性^[12]。转录组和蛋白质组研究结果显示,汞暴露影响与胚胎发育、器官形成、能量代谢、蛋白质转运、糖脂代谢有关基因的表达,影响谷胱甘肽(GSH)、硫氧还蛋白(Trx)、谷氧还蛋白(Grx)及其还原酶和代谢酶(Cyp450)等与氧化还原和细胞凋亡相关基因的表达,同时影响细胞骨架、信号传导和蛋白质修饰^[12-13]。

1.2 镉

1.2.1 暴露及毒性效应

工业废水是水体中镉的主要来源,土壤中的镉主要来源于大气中镉的沉积和含镉废水。“痛痛病”是镉中毒导致的疾病,表现为神经痛、骨痛,四肢弯曲,骨质疏松等症状。镉主要导致肾脏损伤,慢性镉中毒患者可能出现神经、免疫和生殖系统损害及肿瘤发生。镉主要累积在骨骼、肺、肝脏、肾脏和神经组织,体内半衰期长达10~30 a,代谢半衰期为4~19 a。50 mg/L镉暴露导致大鼠食欲下降,体重减轻并影响生殖系统。200 mg/L镉暴露35 d后导致大鼠肾小管坏死和肾小球肿大。欧洲食品安全局(EFSA)规定人体可以接受膳食镉每周摄入量为2.5 μg/kg^[14]。对820名女性的研究显示,尿镉浓度与骨密度存在负相关,与骨吸收呈正相关,导致尿脱氧吡啶啉(U-DPD)浓度增加^[15]。镉暴露大鼠肝脏中镉的累积有剂量依赖性^[16]。血液镉浓度升高增加血液天冬氨酸转氨酶(AST)、丙氨酸转氨酶(ALT)和碱性磷酸酶(ALP)浓度,且肝功能显著异常^[17]。镉诱导肾脏损伤,对镉污染地区790人的研究结果显示,高、中污染区人群中尿N-乙酰-β-D-葡萄糖苷酶(NAG)、NAG同工酶B(NAG-B)、β₂-微球蛋白、视黄醇结合蛋白和白蛋白均显著增高,同时伴有不同程度的肾小球损伤^[18]。镉暴露导致小鼠睾丸坏死,且睾丸间质细胞的活性和分泌睾酮的能力显著下降^[19]。

1.2.2 毒性效应机理

镉在体内主要与金属硫蛋白(MT)结合,形成Cd-MT,其在肾小管被重吸收,在近曲小管的溶酶体中降解、分离并释放出游离的镉,干扰近曲小管上皮细胞线粒体的能量代谢和氧化磷酸化作用,导致肾细胞损伤和死亡^[20-21]。镉通过代替铁和铜,经芬顿反应增加未结合自由基数量或减少参加氧化应激反应的铜和铁离子数量,生成ROS并诱导氧化应激^[22]。Cd²⁺通过干扰Ca²⁺运输,替代含锌酶和锌指结构转录因子中的Zn²⁺,影响依赖Ca²⁺、Zn²⁺的

蛋白质生理功能,干扰氧化磷酸化途径来产生毒性效应^[21]。基因表达研究揭示,低剂量镉暴露诱导转录调控,锌指蛋白,热休克蛋白(hsp70、hsp90),氧化还原平衡(Gsta2、Gsta4、Noq1),抗氧化基因(Cyp450)和MT的表达。镉通过影响泛素蛋白酶(Uchl1、Ube2c),调控细胞周期基因(ccnb1、cdc2a、cdc25c),同时改变DNA甲基化,抑制甲基转移酶(DNMT)活性等产生细胞毒性^[23]。

1.3 铅

1.3.1 暴露及毒性效应

铅生产、加工过程和含铅汽油是铅的主要人为源。1990—2009年我国空气铅排放量81.9%来源于机动车尾气,禁用含铅汽油后,交通尾气中铅的排放减至5%^[24]。铅主要累积于肾脏、肝脏和中枢神经系统。铅影响认知能力,损害神经行为;对儿童的影响更加明显,诱导肠胃疾病,慢性肾功能衰竭和心血管疾病等。基于流行病学研究结果,世界卫生组织(WHO)将5 μg/dL血铅浓度定为限定值^[25]。对240名儿童长达10 a的追踪调查发现,当血铅浓度低于10 μg/dL时,血铅浓度与认知功能下降存在剂量效应关系,而且血铅浓度越低,智商(IQ)与血铅浓度负相关性就越好^[26]。低剂量铅暴露导致斑马鱼胚胎鱼鳔充气、脊柱弯曲、卵黄囊水肿等,并影响成年斑马鱼的学习和记忆能力^[27]。蚯蚓暴露在Pb浓度大于2 000 mg/kg之下其死亡率增加,体重显著下降,完全抑制繁殖^[28]。

1.3.2 毒性效应机理

铅通过与蛋白质的巯基和Mg²⁺、Ca²⁺的活性位点不可逆的共价结合,影响蛋白质的功能,诱导毒性效应^[29]。如铅与Ca²⁺竞争受体,影响细胞内第二信使的活性,通过取代Zn²⁺与锌指蛋白结合,影响其功能^[30]。铅通过诱导产生ROS,消耗细胞中抗氧化物。细胞内可溶性的铅结合蛋白通过控制细胞内铅水平来调控δ-氨基-γ-酮戊酸脱水酶(ALAD)和谷胱甘肽还原酶(GR)活性产生氧化应激^[31]。铅抑制细胞活性,抑制抗细胞凋亡基因Bcl-2,激活半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶3(caspase-3),导致细胞凋亡^[32]。蛋白质组学研究揭示铅诱导包括谷胱甘肽转移酶、热休克蛋白、钙离子结合蛋白、内质网分子伴侣GRP78蛋白等多个蛋白质的表达变化。铅诱导App、BACE1、MBD1、NMDR等与甲基化和神经系统功能有关的基因表达变化。通过比较铅诱导的基因表达变化与人类致病基因数据,揭示铅暴露与智力缺陷、癌症、发育缺陷、内分泌和免疫疾病高度相

关,与现有流行病学研究结果一致^[23]。

1.4 砷

1.4.1 暴露及毒性效应

砷主要以有机和无机形式存在,无机砷毒性强且更易在生物体内累积。三价砷毒性最强;五价砷毒性较弱,抑制氧化磷酸化能力最强。饮用水是砷暴露的主要途径,WHO 规定饮用水中砷标准浓度应低于 10 $\mu\text{g/L}$ 。1968 年发生于中国台湾的黑足病,涉及约 15 万人^[33]。长期暴露于无机砷会导致皮肤损伤,膀胱癌,肝脏、肾脏和肺部疾病,糖尿病及生殖

和神经系统损伤。饮用水中砷浓度达到 100 mg/L 时,孕期大鼠及其子代鼠的学习能力及记忆功能均受损,且影响子代鼠的神经运动反射功能。低浓度砷可降低大鼠星形胶质细胞的生存能力,诱导 DNA 损伤,并呈现剂量反应关系^[34]。100 $\mu\text{mol/L}$ 的三价和五价砷导致斑马鱼胚胎死亡,影响其发育和声动反应行为,0.75 mmol/L 五价砷损伤斑马鱼的长期记忆^[35]。10 mg/L 砷干扰小鼠肠道微生物的组成,影响其肠道微生物群落丰度并干扰代谢功能^[36]。汞、镉、铅和砷单一毒性效应见表 1。

表 1 汞、镉、铅、砷单一暴露毒性效应

Table 1 Toxicity effects induced by single exposure of mercury, cadmium, lead and arsenic

金属	毒性效应	研究对象	观察现象	来源
	神经毒性	斑马鱼	肌原纤维解体,线粒体结构变化,代谢异常	文献[7]
		斑马鱼	感觉功能障碍,运动协调失常	文献[8]
Hg	肝脏毒性	斑马鱼	肝脏线粒体损伤;肝脏严重受损,肝细胞解体、内质网损伤	文献[7]
		ICR 母鼠	肝脏细胞肿大、胞质疏松透明、细胞坏死,少量淋巴细胞和单核细胞浸润	文献[12]
	肾脏毒性	小鼠	肾小管上皮细胞损伤,部分细胞死亡,肾小管扩张	文献[15]
	肝脏毒性	大鼠	活性氧自由基,细胞损伤	文献[19]
	骨骼毒性	女性	尿镉浓度与骨密度呈负相关,与骨吸收呈正相关,U-DPD 浓度增加	文献[18]
Cd	肾脏毒性	人	高、中污染区人群出现肾脏损伤,伴有不同程度的肾小球损伤	文献[21]
	生殖毒性	小鼠睾丸间质细胞	睾丸间质细胞活性和睾酮分泌能力显著下降,MDA 浓度和 GPx 活性显著升高,SOD 活性降低,DNA 损伤严重	文献[22]
	胚胎毒性	斑马鱼胚胎	胚胎畸形、脊柱弯曲、卵黄囊水肿等,影响成年斑马鱼的学习和记忆能力	文献[29]
Pb	肾脏毒性	人类肾皮质上皮细胞	抑制细胞活性,Bcl-2 下调,caspase-3 活化,细胞核浓缩,细胞凋亡	文献[34]
	生殖毒性	蚯蚓	死亡率增加,体重显著下降,抑制繁殖	文献[30]
	代谢功能	C57BL/6 小鼠	改变肠道微生物群落丰度,干扰代谢功能	文献[37]
As	神经毒性	大鼠	抑制血液中 ALAD 活性,增加 GSH/ZPP;增加肾脏和肝脏中 GSSG 和 TBARS 水平	文献[35]
	发育毒性	斑马鱼胚胎	五价砷导致斑马鱼胚胎卵黄囊水肿,心包积液,损伤斑马鱼的长期记忆;三价砷减少基于光诱导的反射行动,改变斑马鱼胚胎的神经功能	文献[36]

1.4.2 毒性效应机理

砷的毒性效应与砷的价态有关,五价砷通过取代磷酸盐来干扰机体代谢和血液运输功能^[37]。三价砷通过抑制细胞内酶的活性,影响葡萄糖的吸收、脂肪酸氧化、糖异生作用以及乙酰辅酶 A 的产生和 GSH 的合成^[38]。砷诱导产生 ROS 和活性氮(RNS),这些自由基通过激活氧化敏感信号通路,进而导致细胞损伤、死亡,甲基亚砷酸和二甲基砷酸都能导致 DNA 链断裂,并有剂量依赖关系^[39]。表观遗传组学研究揭示砷暴露诱导基因组、肝脏细胞、单核细胞 DNA 和特异基因,如肿瘤抑制基因 p15、

p16、p53 和 DAPK 等调控序列甲基化改变,抑制 DNMT 表达,同时砷诱导 miRNAs 表达变化。人群研究结果揭示砷暴露诱导 CpG 岛中 CpG 超甲基化并改变免疫细胞比例,尤其是增加 CD8 + T 型淋巴细胞数量^[23]。

2 混合暴露毒性效应及作用机理

混合污染物暴露导致的健康效应主要关注 2 个问题:1)混合污染物是否诱导新型的毒性效应,即混合污染物诱导的毒性效应不同于任何单一污染物;2)混合污染物诱导的毒性效应是否产生毒性协

同和增强效应。现有转录组学研究成果支持通过诱导表达基因的变化,不但能够揭示金属毒性效应的机理,区分不同金属的毒性效应,而且能够预测化学物质的毒性。

2.1 混合暴露及毒性效应

不同化学物质间的相互作用比较复杂,根据化学物质毒性效应模式,一般有协同、加和及拮抗效应。例如氯化汞、2,3-二巯基-1-丙磺酸(DMPS)、乙酰半胱氨酸(NAC)单独作用时不造成小鼠死亡和生理指标的显著变化,汞与DMPS和汞与NAC暴露,诱导小鼠死亡及生理指标显著变化^[40]。砷与莎稗磷混合暴露产生比砷与莎稗磷单独作用更显著的毒性效应,包括面裂、脑和眼畸形等^[40]。硒通过和汞形成化合物,增加汞代谢,提高含硒酶活性来降低汞的毒性效应^[42]。

2.1.1 2种金属混合暴露

铅和镉的毒性具有协同效应。大鼠铅和镉的半致死剂量分别为3 163和88 mg/kg,大鼠暴露于铅和镉混合物浓度依次为1 402 mg/kg 铅+34 mg/kg 镉、1 921 mg/kg 铅+47 mg/kg 镉、2 633 mg/kg 铅+64 mg/kg 镉、3 607 mg/kg 铅+87 mg/kg 镉和4 942 mg/kg 铅+120 mg/kg 镉,30 min后高剂量组大鼠出现行动缓慢,对声音极其敏感,抽搐等现象,最后全部死亡。计算得到的混合暴露的半致死浓度为2 696.54 mg/kg^[43]。大鼠暴露于铅和镉混合浓度依次为29.25 mg/kg 铅+0.71 mg/kg 镉、87.74 mg/kg 铅+2.14 mg/kg 镉、263.23 mg/kg 铅+6.42 mg/kg 镉(以干质量计),90 d后低剂量混合暴露会导致大鼠血液生理和生化参数显著改变,且呈剂量效应关系,大鼠肝细胞发生细胞核浓缩,中性粒细胞浸润,肾小管结构异常,且肾脏中发现大量炎症细胞^[43-44]。

铅、镉单独暴露,铅与镉混合物暴露均导致蛤蚧(*Ruditapes decussatus*)受精率(铅、镉及复合暴露半数效应浓度分别为5、18.6和10.8 $\mu\text{mol/L}$)显著下降,胚胎发育成功率(铅、镉及复合暴露半数效应浓度分别为1.24、5.08和2.68 $\mu\text{mol/L}$)下降^[45]。铅、镉及复合暴露96 h幼虫半致死剂量为2.2、7.8和4.3 $\mu\text{mol/L}$ 。根据AI(加和指数)法(0即表示加和性)计算的精子毒性、胚胎毒性和96 h幼虫死亡试验的添加毒性指数分别为0.01、0.08和0.18^[45]。

镉和砷暴露诱导钩虾(*Gammarus pulex*)死亡率呈拮抗效应。与单一金属效应比较,最低浓度镉和砷混合物(镉25%致死浓度为7.5 $\mu\text{g/L}$,砷10%、25%和50%致死浓度依次为274.7、534.6和

1 010.5 $\mu\text{g/L}$),导致钩虾死亡率和生物富集性下降,最高浓度导致生物富集下降而死亡率增加,表明试验浓度下的混合暴露对钩虾不产生更高的安全风险^[46]。产生拮抗现象的可能性有:1)砷和镉存在竞争性吸收途径;2)金属的络合作用;3)解毒过程的加强,如镉和砷暴露导致钩虾GSH含量和MT浓度增加, γ -谷氨酰半胱氨酸连接酶活性升高。

2.1.2 铅、镉和砷混合暴露

最低可观察效应浓度(LOEL)铅、镉和砷(25、10和5 mg/L)混合暴露导致雄性大鼠体内 δ -氨基乙酰丙酸(ALA)、铁和铜浓度上升。与单一金属作用相比,混合暴露增强了这一效应,且ALA的增加伴随着肾脏中铜水平上升^[47]。流行病学研究表明,职业暴露浓度铅、镉和砷(暴露浓度依次为4.8、2.0和2.4 $\mu\text{mol/L}$)混合暴露BALB/C 3T3细胞导致与细胞死亡、生长和增殖、炎症反应和癌症有关的基因和miRNAs显著变化,并发现3种金属暴露诱导的miRNAs可作为预测铅、砷和镉混合暴露导致疾病的生物标记物^[48]。用饮用水中实际浓度的砷、镉和铅混合物(印度饮用水中单一金属浓度为0.38、0.098和0.22 mg/L)暴露发育期大鼠,发现髓鞘碱性蛋白(MBP)、蛋白脂质蛋白、2',3'-环核苷酸-3'-磷酸二酯酶、髓鞘相关糖蛋白和神经丝蛋白(NF)等浓度下降,砷、镉和铅呈协同效应。砷、镉和铅混合物导致髓磷脂纤维区域减少,有泡状结构的轴突增加,在胼胝体区域更加明显。视神经中髓磷脂厚度和轴突密度减少,视网膜的神经纤维厚度、视网膜神经节细胞数量减少^[49]。

2.1.3 4种及多种金属混合暴露

汞、镉、铅和砷混合暴露诱导产生的小鼠毒性效应高于单一金属暴露。与金属单独作用相比,用GB 5749—2006《生活饮用水卫生标准》规定的最大允许限值汞(1 $\mu\text{g/L}$)、镉(5 $\mu\text{g/L}$)、铅(10 $\mu\text{g/L}$)和砷(10 $\mu\text{g/L}$)的混合物暴露导致小鼠脑、肝、肾中MDA显著增加,血液中ALT、AST、ALP和低密度脂蛋白(LDL)显著升高,脑、肝、肾脏中SOD活性显著下降^[50]。汞、镉、铅和砷混合暴露对斑马鱼胚胎的免疫系统产生毒性效应,单一金属通过影响先天性免疫基因的表达,混合物通过影响抗氧化基因表达产生毒性效应^[51]。通过影响斑马鱼胚胎神经系统基因的表达,诱导NMDA受体亚基2A、2B、2D和Bcl-2基因来影响斑马鱼的神经发育过程^[52]。

用印度饮用水中最常检测到的砷、镉、铅、汞、铬、锰、铁和镍8种金属,按照WHO标准规定的最

高允许浓度制备 1 倍模式浓度混合物,并按照 0(纯净水)、1、10、100 倍单个金属的模式浓度制备的混合物暴露雄性大鼠 90 d。30 d 暴露不产生明显的生理指标变化,60 d 后 100 倍,90 d 后 10 和 100 倍模式浓度混合物诱导大鼠体内 AST、ALP、BUN 水平升高,Scr 活性增加,血清总蛋白和白蛋白水平降低。经 90 d 暴露,1 倍模式浓度不影响大鼠心脏、肝脏、肾脏和大脑中 LPO、GSH、SOD、CAT、GPx 和 GR 水平,10 和 100 倍混合物增加肾脏、肝脏和大脑中的 LPO,降低 GSH,抑制抗氧化酶活性,对肾脏的影响最显著^[5,53]。大鼠造血和免疫系统对混合物敏感,10 和 100 倍模式浓度混合物暴露导致大鼠贫血、抑制体液和细胞介导的免疫应答^[54]。综上,8 种金属

WHO 最高允许浓度混合物 90 d 暴露,虽然没有诱导大鼠产生可检测的生理指标的显著变化,但是 10 和 100 倍模式浓度导致明显的变化及氧化损伤。因此在评估环境污染事件导致的水环境单一金属污染暴露所造成的生态效应和健康损害时,需要关注金属混合物暴露所产生的效应。例如用铅、镉和砷的 LOEL 混合物暴露大鼠,虽然细胞保护系统能够缓冲铅、镉和砷混合物 90 d 暴露所诱导的氧化应激,但是 180 d 暴露诱导显著的氧化应激反应和生理指标的变化^[55]。因此,在目前制订的最高允许金属浓度环境标准条件下,需要关注金属混合物整个生命周期暴露可能带来的生态效应和健康风险。汞、镉、铅和砷混合毒性效应见表 2。

表 2 汞、镉、铅、砷多元暴露毒性效应

Table 2 Mixture exposure toxic effects of mercury, cadmium, lead and arsenic

金属	毒性效应	研究对象	观察现象	来源
Pb + Cd	发育毒性	蛤蚧	受精率显著下降,胚胎成活率下降	文献[45]
As + Cd	死亡率	钩虾	死亡率和生物富集均下降,GSH 含量减少, γ -谷氨酰半胱氨酸连接酶活性,MT 浓度下降	文献[46]
Pb + Cd	肝脏/肾脏损伤/ 炎症反应	SD 大鼠	肝细胞发生细胞核浓缩,中性粒细胞浸润;肾小管结构异常,出现大量炎症细胞	文献[43-44]
Pb + Cd + As	氧化应激	SD 大鼠	ALA、铁、铜水平增加,ALA 增加伴随着肾脏中铜水平上升	文献[47]
Pb + Cd + As	神经毒性	大鼠	MBP、脂质蛋白、2',3'-环核苷酸-3'-磷酸二酯酶、髓鞘相关糖蛋白和 NF 等水平下降;髓磷脂纤维区域减少,有液泡的轴突增加;视神经中髓磷脂厚度和轴突密度减少;神经纤维厚度、RGC 数量减少	文献[49]
Pb + Cd + As + Hg	神经/肾脏/ 肝脏毒性	小鼠	脑、肝、肾中 MDA 显著增加,血液中 ALT、AST、ALP、LDL 显著升高	文献[50]
Pb + Cd + As + Hg	神经发育	斑马鱼胚胎	NMDA 受体亚基 2A、2B、2D 和 Bel-2 基因上调	文献[52]
As + Cd + Pb + Hg + Cr + Mn + Fe + Ni	神经/肾脏/ 肝脏毒性	雄性 Wistar 大鼠	体内 AST、ALP、BUN 水平和 Scr 的活性增加,血清总蛋白和白蛋白水平降低	文献[53]
As + Cd + Pb + Hg + Cr + Mn + Fe + Ni	免疫毒性	雄性 Wistar 大鼠	大鼠贫血、抑制体液和细胞介导的免疫应答	文献[54]

2.2 混合暴露毒性效应机理

金属诱导细胞毒性的机理有待阐明,尤其是缺少直接的分子水平的证据。现有研究证据支持金属及其混合物可以通过改变细胞内氧化还原平衡状态影响细胞呼吸链,诱导氧化应激/产生 ROS 种类,导致脂质氧化、DNA 损伤,进而影响细胞分裂和分化、诱导细胞凋亡,产生细胞毒性效应。例如 8 种金属影响大鼠器官中 LPO、GSH 含量,超氧化物歧化酶、过氧化氢酶及 GPx 和 GR 活性^[5,56]。通过干扰细胞内必需金属的稳态及其正常的生物学功能,影响代

谢、细胞信号传导过程,产生细胞毒性效应。汞、镉、铅和砷混合物暴露诱导神经系统中 Cu^{2+} 、 Mg^{2+} 浓度上升, Zn^{2+} 浓度下降^[57]。氧化应激和 ROS 的产生激活 Nrf2 介导的细胞氧化应激反应系统,调节抗氧化多肽、抗氧化蛋白、细胞解毒和转运蛋白基因的表达,影响 DNA 修复、细胞分裂和分化。同时通过激活,抑制 NF- κ B、MAPKs、PI3K、HIF-1、细胞生长因子受体、G-蛋白等细胞信号传导和转录因子活性,诱导下游基因的表达,影响细胞增殖、分化,细胞凋亡和癌变^[58]。汞、铅、镉和砷复合暴露诱导斑马鱼胚

胎 158 个基因表达发生显著变化,大约是汞、铅、镉和砷单一金属相同浓度诱导表达基因的 2 倍;同时转录组结果显示,复合暴露诱导表达基因除呈加和、协同效应外,还诱导新基因的表达^[59]。基于毒理基因组学研究结果显示,环境水平金属浓度暴露诱导的基因表达变化涉及 HNF-4、NF- κ B、p38 MAPKs 信号通路。细胞癌变、细胞分化、死亡,炎症和氧化应

激基因 CNR2、IL1RN、LIN28、AFAP1L2、S100A2、SFRP1 和 ST3GAL1 可作为潜在的金属毒性效应标记基因。人外周血中 miRNA-222 和 miRNA21 表达量升高与含砷、铁、镍、铅、镉、铬和锰的粉尘暴露有关,而尿中砷和铅浓度升高,则抑制 miRNA-222 和 miRNA21 表达^[60]。汞、镉、铅和砷的毒性效应机理见图 1。

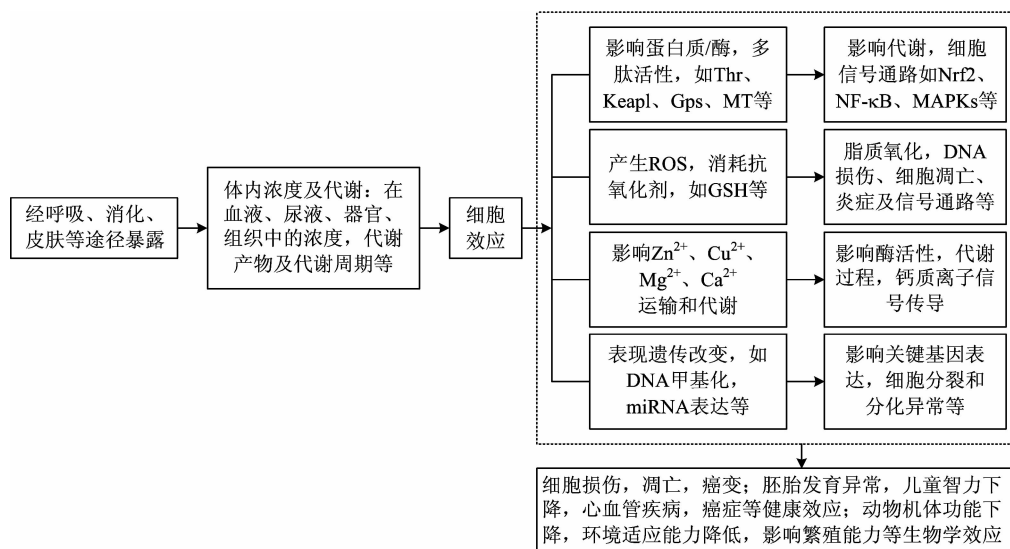


图 1 汞、镉、铅和砷的毒性效应机理

Fig. 1 The mechanism of mercury, cadmium, lead and arsenic toxicity

3 小结

自然界的生命有机体普遍暴露于多种金属污染物中,现有研究证据支持单一金属无可观察效应浓度 (NOEC) 混合物长期暴露仍然导致生态效应和健康损害,同时研究发现欧洲国家人群红细胞中镉、铅和汞的浓度虽然在逐年下降,但是仍然有部分人群处于有害水平,处于安全浓度的镉、铅和汞是否带来健康效应有待进一步研究^[61]。事实上,目前多用基于金属暴露导致实验动物致死、非致死状态下所产生的,细胞水平组织器官形态变化为依据的作用机制建立的 3 种模型来预测金属混合物的毒性效应。但是由于金属相互作用的复杂性,如生物可利用性、在细胞内的转运、代谢动力学和毒性效应等特性的差别,再加上环境温度、pH 和水的硬度对金属毒性效应的影响,以及在自然环境条件下,动物和人类金属暴露的浓度、暴露的时间不易甚至不可能进行有效的控制等原因,导致目前对环境水平金属及其混合物长期暴露是否带来生态效应,并导致人类疾病的认识不一致。为了解决这一问题,需要建立新的

方法来全面、系统研究,获取金属污染物诱导产生生物学效应,造成健康损害的直接证据,尤其是可以揭示金属及其混合物暴露诱导产生毒性效应机理的分子证据。在此基础上,建立基于诱导表达基因、蛋白质、代谢产物,表观遗传变化和 miRNA 为生物标记基因的,特异性高,可定量评价单一金属及混合物毒性效应的方法,提高目前基于形态变化和死亡率为指标的评价金属毒性效应的准确性,实现通过定量分析标记基因表达水平来评价金属毒性效应。

4 展望

组学技术,如转录组学、表观遗传组学、蛋白质组学、代谢组学等能够获取与金属污染物暴露诱导产生的生物学效应、健康结局有关的分子水平的精细变化,并能够快速提供在细胞、组织水平上全面系统反映毒性效应的分子水平变化的相关信息,已经成为化学物质安全性评价及预测新型化学物质毒性效应的关键技术。如毒理基因组学提供了一种全面定量分析金属污染物诱导基因的表达水平,表观遗传组学、蛋白质组学、代谢组学则揭示金属诱导的表

观遗传改变,蛋白质和代谢产物变化与其毒性效应和健康结局的相关性。这些方法为系统揭示金属及其混合物暴露诱导产生的生物效应和人类疾病与可能的分子证据提供了可能。事实上基于毒理基因组学方法研究环境污染物、药物和农药及混合物对人类胚胎干细胞、斑马鱼胚胎等基因表达变化的结果揭示,通过分析诱导表达基因的变化,可以评价、区分不同化学物质、化学物质混合物的毒性效应和可能的健康危害。组学技术,尤其是以揭示整个生命周期环境因素影响生命过程的暴露组学研究将为金属及其混合物的毒性效应,健康损害的评价和预测提供一种新的途径,为从分子水平上建立环境水平金属污染物长期暴露与疾病,细胞癌变的剂量效应关系提供技术保障。事实上,欧洲和美国已经在建立基于组学技术的化学物质风险评估方法和体系。

参考文献

- [1] ZHANG L, WANG S X, WANG L, et al. Updated emission inventories for speciated atmospheric mercury from anthropogenic sources in China [J]. *Environmental Science & Technology*, 2015, 49(5) : 3185-3194.
- [2] TIAN H Z, ZHU C Y, GAO J J, et al. Quantitative assessment of atmospheric emissions of toxic heavy metals from anthropogenic sources in China: historical trend, spatial variation distribution, uncertainties and control policies [J]. *Atmospheric Chemistry & Physics*, 2015, 15(8) : 12107-12166.
- [3] WANG Y, CHENG K, WU W, et al. Atmospheric emissions of typical toxic heavy metals from open burning of municipal solid waste in China [J]. *Atmospheric Environment*, 2016, 152. 10. 1016/j. atmosenv. 2016. 12. 017.
- [4] TCHOUNWOU P B, YEDJOU C G, PATLOLLA A K, et al. Heavy metals toxicity and the environment [J]. *Experientia Supplementum*, 2012, 101 : 133-164.
- [5] JADHAV S H, SARKAR S N, TRIPATHIT H C. Cytogenetic effects of a mixture of selected metals following subchronic exposure through drinking water in male rats [J]. *Indian Journal of Experimental Biology*, 2006, 44(12) : 997-1005.
- [6] EKINO S, SUSU M, NINOMIYA T, et al. Minamata disease revisited: an update on the acute and chronic manifestations of methyl mercury poisoning [J]. *Journal of the Neurological Sciences*, 2007, 262(1/2) : 131-144.
- [7] GENTÉS S, MAURYBRACHET R, FENG C, et al. Specific effects of dietary methylmercury and inorganic mercury in zebrafish (*Danio rerio*) determined by genetic, histological and metallothionein responses [J]. *Environmental Science & Technology*, 2015, 49(24) : 14560-14569.
- [8] HO N Y, YANG L, LEGRADI J, et al. Gene responses in the central nervous system of zebrafish embryos exposed to the neurotoxicant methyl mercury [J]. *Environmental Science & Technology*, 2013, 47(7) : 3316-3325.
- [9] 王丽, 贾光, 闫蕾, 等. 母鼠低剂量甲基汞染毒致亲、仔代肝脏的氧化损伤 [J]. *环境与职业医学*, 2005, 22(6) : 495-497.
WANG L, JIA G, YAN L, et al. Effects of maternal exposure to low-level methylmercury on the growth of offspring and lipid peroxidation in liver [J]. *Journal of Labour Medicine*, 2005, 22(6) : 495-497.
- [10] 陈敏, 谢吉民, 曹友清, 等. 氯化汞对小鼠肾脏的急性毒性机制探讨 [J]. *中国工业医学杂志*, 2001, 14(5) : 266-267.
CHEN M, XIE J M, CAO Y Q, et al. Studies on mechanism of acute renal toxicity of mercury chloride in mice [J]. *Chinese Journal of Industrial Medicine*, 2001, 14(5) : 266-267.
- [11] 徐乐焱, 王毅, 邱炳源, 等. 锌金属硫蛋白拮抗甲基汞对红细胞膜损伤的作用 [J]. *卫生研究*, 2000, 29(2) : 80-82.
XU L Y, WANG Y, QIU B Y, et al. The protective effects of zinc metallothionein against erythrocyte membrane damage induced by methylmercury [J]. *Journal of Hygiene Research*, 2000, 29(2) : 80-82.
- [12] MINGHUA W, YUYU W, JUAN W, et al. Proteome profiles in medaka (*Oryzias melastigma*) liver and brain experimentally exposed to acute inorganic mercury [J]. *Aquatic Toxicology*, 2011, 103(3/4) : 129-139.
- [13] WANG Y Y, WANG D Z, LIN L, et al. Quantitative proteomic analysis reveals proteins involved in the neurotoxicity of marine medaka *Oryzias melastigma* chronically exposed to inorganic mercury [J]. *Chemosphere*, 2015, 119 : 1126-1133.
- [14] ALEXANDER J, BENFORD D, COCKBURN A, et al. Scientific opinion of the panel on contaminants in the food chain on a request from the European Commission on cadmium in food [J]. *Efsa Journal*, 2009, 7(3) : 1-139.
- [15] ÅKESSON A, PER B, THOMAS L, et al. Cadmium-induced effects on bone in a population-based study of women [J]. *Environmental Health Perspectives*, 2006, 114(6) : 830-834.
- [16] MADEJCZYK M S, BAER C E, DENNIS W E, et al. Temporal changes in rat liver gene expression after acute cadmium and chromium exposure [J]. *Plos One*, 2015, 10(5) : e0127327.
- [17] KAHKASHAN R, KRISHNENDU S, SIL P C. An update on oxidative stress-mediated organ pathophysiology [J]. *Food & Chemical Toxicology An International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association*, 2013, 62(12) : 584-600.
- [18] JIN T, WU X, TANG Y, et al. Environmental epidemiological study and estimation of benchmark dose for renal dysfunction in a cadmium-polluted area in China [J]. *Biomaterials An International Journal on the Role of Metal Ions in Biology Biochemistry & Medicine*, 2004, 17(5) : 525-530.
- [19] YANG J M, AMUSH M, CHEN Q Y, et al. Cadmium-induced damage to primary cultures of rat Leydig cells [J]. *Reproductive Toxicology*, 2003, 17(5) : 553-560.
- [20] OHTA H, CHERIAN M G. Gastrointestinal absorption of cadmium and metallothionein [J]. *Toxicology & Applied Pharmacology*, 1991, 107(1) : 63-72.

- [21] JOMOVA K, VALKO M. Advances in metal-induced oxidative stress and human disease [J]. *Toxicology*, 2011, 283 (2/3): 65-87.
- [22] WÄTJEN W, BEYERSMANN D. Cadmium-induced apoptosis in C6 glioma cells: influence of oxidative stress [J]. *Biomaterials*, 2004, 17(1): 65-78.
- [23] KOEDRITH P, KIM H, WEON J I, et al. Toxicogenomic approaches for understanding molecular mechanisms of heavy metal mutagenicity and carcinogenicity [J]. *International Journal of Hygiene & Environmental Health*, 2013, 216(5): 587-598.
- [24] 徐进, 徐立红. 环境铅污染及其毒性的研究进展 [J]. *环境与职业医学*, 2005, 22(3): 271-274.
- XU J, XU L H. Environmental lead pollution and progress in the study of lead toxicity [J]. *Journal of Labour Medicine*, 2005, 22(3): 271-274.
- [25] LANDRIGAN P, NORDBERG M, LUCCHINI R, et al. The declaration of Brescia on prevention of the neurotoxicity of metals June 18, 2006 [J]. *American Journal of Industrial Medicine*, 2007, 50(10): 709.
- [26] CANFIELD R L, JR H C, CORY-SLECHTA D A, et al. Intellectual impairment in children with blood lead concentrations below 10 microg per deciliter [J]. *New England Journal of Medicine*, 2003, 348(16): 1517-1526.
- [27] CHEN J, CHEN Y, WEI L, et al. Developmental lead acetate exposure induces embryonic toxicity and memory deficit in adult zebrafish [J]. *Neurotoxicology & Teratology*, 2012, 34(6): 581-586.
- [28] LUO W, VERWEIJ R A, GESTEL C A M V. Determining the bioavailability and toxicity of lead contamination to earthworms requires using a combination of physicochemical and biological methods [J]. *Environmental Pollution*, 2014, 185(1): 1-9.
- [29] 蒋晓红. 铅的毒性和致癌性研究进展 [J]. *职业卫生与应急救援*, 2003, 21(3): 122-124.
- JIANG X H. Progress study on toxicity and carcinogenicity of lead [J]. *Occupational Health and Emergency Rescue*, 2003, 21(3): 122-124.
- [30] SUSZKIW J B. Presynaptic disruption of transmitter release by lead [J]. *Neurotoxicology*, 2004, 25(4): 599-604.
- [31] ERCAL N, GURERORHAN H, AYKINBURNS N. Toxic metals and oxidative stress: part I. mechanisms involved in metal-induced oxidative damage [J]. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 2001, 1(6): 529-539.
- [32] EUGENIO G, ANGELA A, RENATA P, et al. A proteomic approach to investigate the effects of cadmium and lead on human primary renal cells [J]. *Metallomics*, 2014, 6(3): 587-597.
- [33] MUKHERJEE A, SENGUPTA M K, HOSSAIN M A, et al. Arsenic contamination in groundwater: a global perspective with emphasis on the Asian scenario [J]. *Journal of Health, Population and Nutrition*, 2006, 24(2): 142-163.
- [34] GUPTA R, FLORA S J S. Effect of centella asiatica, on arsenic induced oxidative stress and metal distribution in rats [J]. *Journal of Applied Toxicology* *Jat*, 2006, 26(3): 213-222.
- [35] OLIVARES C I, FIELD J A, SIMONICH M, et al. Arsenic (III), Vanadium (III), and gallium (III) toxicity to zebrafish embryos using a high-throughput multi-endpoint in vivo developmental and behavioral assay [J]. *Chemosphere*, 2016, 148: 361-368.
- [36] LU K, ABO R P, SCHLIEPER K A, et al. Arsenic exposure perturbs the gut microbiome and its metabolic profile in mice: an integrated metagenomics and metabolomics analysis [J]. *Environmental Health Perspectives*, 2014, 122(3): 284-291.
- [37] HUGHES M F, BECK B D, CHEN Y, et al. Arsenic exposure and toxicology: a historical perspective [J]. *Toxicological Sciences*, 2011, 123(2): 305-332.
- [38] DELNOMDEDIEU M, BASTI M M, STYBLO M, et al. Complexation of arsenic species in rabbit erythrocytes [J]. *Chemical Research in Toxicology*, 1994, 7(5): 621-627.
- [39] VALKO M, MORRIS H, CRONIN M T M, et al. Toxicity and oxidative stress [J]. *Current Medicinal Chemistry*, 2005, 12(10): 1161.
- [40] BRANDAO R, SANTOS F, ZENI G J, et al. DMPS and N-acetylcysteine induced renal toxicity in mice exposed to mercury [J]. *Biomaterials*, 2006, 19(4): 389-398.
- [41] AGGARWAL M, WANGIKAR P B, SARKAR S N, et al. Effects of low-level arsenic exposure on the developmental toxicity of anilofos in rats [J]. *Journal of Applied Toxicology*, 2010, 27(3): 255-261.
- [42] CARVALHO C M, LU J, ZHANG X, et al. Effects of selenite and chelating agents on mammalian thioredoxin reductase inhibited by mercury: implications for treatment of mercury poisoning [J]. *Faseb Journal Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 2011, 25(1): 370-381.
- [43] YUAN G, DAI S, YIN Z, et al. Toxicological assessment of combined lead and cadmium: acute and sub-chronic toxicity study in rats [J]. *Food & Chemical Toxicology*, 2014, 65(1): 260-268.
- [44] 卢洪可, 戴书俊, 殷中琼, 等. 实验性急性大鼠铅镉联合中毒对骨骼损伤的研究 [J]. *中国兽医科学*, 2012(12): 1278-1282.
- LU H K, DAI S J, YIN Z Q, et al. Study on damage of bone in rat induced by experimental acute combined exposure to lead and cadmium [J]. *Chinese Veterinary Science*, 2012(12): 1278-1282.
- [45] FATHALLAH S, MEDHIOUB M N, KRAIEM M M. Combined toxicity of lead and cadmium on embryogenesis and early larval stages of the European clam *Ruditapes decussatus* [J]. *Environmental Engineering Science*, 2013, 30(7): 357-364.
- [46] VELLINGER C, PARANT M, ROUSSELLE P, et al. Antagonistic toxicity of arsenate and cadmium in a freshwater amphipod (*Gammarus pulex*) [J]. *Ecotoxicology*, 2012, 21(7): 1817-1827.
- [47] WHITTAKER M H, WANG G, CHEN X Q, et al. Exposure to Pb, Cd, and As mixtures potentiates the production of oxidative stress precursors: 30-day, 90-day, and 180-day drinking water studies in rats [J]. *Toxicology & Applied Pharmacology*, 2011, 254(2):

- 154-166.
- [48] MARTÍNEZ-PACHECO M , HIDALGO-MIRANDA A , ROMERO-CÓRDOBA S , et al. mRNA and miRNA expression patterns associated to pathways linked to metal mixture health effects[J]. *Gene*,2014,533(2) :508-514.
- [49] MALMQUIST S J, ABRAMSSON A, MCGRAW H F, et al. Exposure to As, Cd and Pb-mixture impairs myelin and axon development in rat brain, optic nerve and retina [J]. *Behaviour Research & Therapy*,2013,273(2) :242-258.
- [50] COBBINA S J, CHEN Y, ZHOU Z, et al. Toxicity assessment due to sub-chronic exposure to individual and mixtures of four toxic heavy metals[J]. *Journal of Hazardous Materials*,2015,294 :109-120.
- [51] COBBINA S J, XU H, ZHAO T, et al. A multivariate assessment of innate immune-related gene expressions due to exposure to low concentration individual and mixtures of four kinds of heavy metals on zebrafish (*Danio rerio*) embryos[J]. *Fish & Shellfish Immunology*,2015,47(2) :1032-1042.
- [52] COBBINA S J, MAO G, ZHAO T, et al. Modulation of N -Methyl-D-aspartate receptors (NMDAR), Bcl-2 and c-fos gene expressions on exposure to individual and mixtures of low concentration metals in zebrafish (*Danio rerio*) [J]. *Archives of Environmental Contamination & Toxicology*, 2017, 72 (3) : 418-427.
- [53] JADHAV S H, SARKAR S N, PATIL R D, et al. Effects of subchronic exposure via drinking water to a mixture of eight water-contaminating metals: a biochemical and histopathological study in male rats[J]. *Archives of Environmental Contamination & Toxicology*,2007,53(4) :667-677.
- [54] JADHAV S H, SARKAR S N, RAM G C, et al. Immunosuppressive effect of subchronic exposure to a mixture of eight heavy metals, found as groundwater contaminants in different areas of India, through drinking water in male rats[J]. *Archives of Environmental Contamination & Toxicology*,2007,53(3) :450-458.
- [55] FOWLER B A, WHITTAKER M H, LIPSKY M, et al. Oxidative stress induced by lead, cadmium and arsenic mixtures: 30-day, 90-day, and 180-day drinking water studies in rats: an overview [J]. *Biometals*,2004,17(5) :567-568.
- [56] JADHAV S H, SARKAR S N, KATARIA M, et al. Subchronic exposure to a mixture of groundwater-contaminating metals through drinking water induces oxidative stress in male rats[J]. *Environmental Toxicology & Pharmacology*, 2007, 23 (2) : 205-211.
- [57] COBBINA S J, CHEN Y, ZHOU Z, et al. Low concentration toxic metal mixture interactions: effects on essential and non-essential metals in brain, liver, and kidneys of mice on sub-chronic exposure[J]. *Chemosphere*,2015,132 :79-86.
- [58] LEONARD S S, HARRIS G K, SHI X. Metal-induced oxidative stress and signal transduction [J]. *Free Radical Biology & Medicine*,2004,37(12) :1921-1942.
- [59] YANG L, KEMADJOU J R, ZINSMEISTER C, et al. Transcriptional profiling reveals barcode-like toxicogenomic responses in the zebrafish embryo[J]. *Genome Biology*,2007,8(10) :1-17.
- [60] MARSIT C J. Influence of environmental exposure on human epigenetic regulation[J]. *Journal of Experimental Biology*,2015,218(1) :71-79.
- [61] CERNÁ M, KRŠKOVÁ A, CEJCHANOVÁ M, et al. Human biomonitoring in the Czech Republic: an overview [J]. *International Journal of Hygiene & Environmental Health*, 2012, 215(2) :109-119. ▷