Eco-Environmental Knowledge Web

生态毒理学报
Asian Journal of Ecotoxicology

第 15 卷 第 5 期 2020 年 10 月
Vol. 15, No.5 Oct. 2020

DOI: 10.7524/AJE.1673-5897.20190424001
李聪, 代霖, 付朝旭, 等. 乙酸铅与邻苯二甲酸双(2-乙基己基)酯联合染毒对小鼠学习记忆能力的影响[J]. 生态毒理学报,2020, 15(5): 207-217
Li C, Dai L, Fu C X, et al. Effects of lead acetate combined with diethylhexyl phthalate on learning and memory ability in mice [J]. Asian Journal of Ecotoxicology, 2020, 15(5): 207-217 (in Chinese)

乙酸铅与邻苯二甲酸双(2-乙基己基)酯联合染毒对小鼠学习记忆能力的影响

李聪, 代霖, 付朝旭, 朱雯菲, 金银燕, 全昶林, 许妍姬*

延边大学医学院预防医学教研部,延吉 133002

收稿日期:2019-04-24　　**录用日期**:2019-09-04

摘要: 塑料包装制品中,邻苯二甲酸双(2-乙基己基)酯(DEHP)为重要的增塑剂,铅盐为必不可少的热稳定剂,二者单体毒性均得到证实。为探究两者的联合作用,采用效应相加模型对联合毒性方式进行评价。选择适龄昆明种小鼠染毒,DEHP 染毒浓度为 10、50 和 200 mg·kg^{-1},以 0.1 mL·(10 g)$^{-1}$ 的剂量灌胃染毒,铅组用 1 g·L^{-1} 乙酸铅通过自由饮水进行染毒,连续染毒 6 周,染毒后观察其行为学改变,测定其脑组织氧化损伤指标和神经递质类指标。结果表明,各组小鼠的肺脏、脾脏、心脏和肾脏系数,无明显差异;随着 DEHP 浓度增加,脑组织重量逐渐降低,肝脏重量在中剂量 DEHP 组降低,在高剂量组有所增加,表明 DEHP 对脑部发育有影响,且对肝脏具有毒性作用,并可能在肝脏产生富集作用。小鼠 Morris 水迷宫、跳台实验和避暗实验结果表明,随 DEHP 浓度增加,小鼠空间学习能力受到的损害更加严重,可导致空间记忆能力障碍。小鼠脑组织各生物学指标测定结果显示,随着 DEHP 浓度增加,脑组织中丙二醛(MDA)含量、一氧化氮(NO)含量、单胺氧化酶(MAO)和乙酰胆碱酯酶(AchE)活性逐渐增加,联合染毒组与铅组和对应剂量 DEHP 染毒组相比,上述 4 个指标值显著增加;随着 DEHP 浓度增加,脑组织中过氧化氢酶(CAT)活性、还原型谷胱甘肽(GSH)含量和总抗氧化能力逐渐降低,联合染毒组与铅组和对应剂量 DEHP 染毒组相比,上述二者明显降低。对铅和 DEHP 的联合毒性作用方式进行评价,表现为协同作用。

关键词: 乙酸铅;DEHP;联合作用;学习记忆能力
文章编号: 1673-5897(2020)5-207-11　　**中图分类号**: X171.5　　**文献标识码**: A

Effects of Lead Acetate Combined with Diethylhexyl Phthalate on Learning and Memory Ability in Mice

Li Cong, Dai Lin, Fu Chaoxu, Zhu Wenfei, Jin Yinyan, Quan Changlin, Xu Yanji*
Department of Preventive Medicine, Medical College, Yanbian University, Yanji 133002, China

Received 24 April 2019　　**accepted** 4 September 2019

Abstract: In plastic packaging products, diethylhexyl phthalate (DEHP) is an important plasticizer and lead salt is an essential thermal stabilizer. In order to explore the combined effects of DEHP and Pb, Kunming mice were selected to be treated with DEHP at a concentration of 10, 50 and 200 mg·kg^{-1}, with 0.1 mL·(10 g)$^{-1}$ dose by gavage. The lead group was treated with 1 g·L^{-1} lead acetate through free drinking water. The exposure last for 6 weeks. The results showed that there was no significant difference in the organ coefficients including lung, spleen,

基金项目:延边大学国家自然科学基金前期培育项目(延大合字 2016-08);吉林省中医药科技项目(2018-135)
第一作者:李聪(1992—),男,硕士,研究方向为神经毒理学,E-mail: 369569396@qq.com
* **通讯作者**(Corresponding author), E-mail: xuyanji@ybu.edu.cn

heart and kidney in each treatment group by comparing with the control. With the increase of DEHP concentration, the weight of brain tissue gradually decreased, while the weight of liver decreased at medium dose and became heavier at high dose. It is indicated that DEHP has an impact on brain development, and DEHP has a toxic effect on liver with an accumulation effect as well. The results of Morris water maze, platform jumping experiment and dark avoidance experiment showed that the spatial learning ability of mice was seriously impaired with the increase of DEHP concentration. The results showed that the contents of malondialdehyde (MDA) and nitric oxide (NO), and the activities of monoamine oxidase (MAO) and acetylcholinesterase (AchE) were increased gradually with the increase of DEHP concentration, and the combined exposure group increased more significantly compared with lead group and corresponding dose of DEHP exposure group. With the increase of DEHP concentration, catalase (CAT) activity, glutathione (GSH) content and total antioxidant capacity in brain tissues gradually decreased and the combined exposure group decreased more significantly compared with lead group and corresponding dose of DEHP exposure group. The effect of lead and DEHP was evaluated to be synergistic.

Keywords: lead; DEHP; combined effect; learning and memory ability

随着经济的高速发展,无论是生活还是生产方面,塑料制品得以大量使用[1-2]。在塑料制品的生产工艺中,为了增加塑料材质的延展性和可塑性,生产过程中往往需要添加邻苯二甲酸酯类(phthalates acid esters, PAEs)作为增塑剂。随着人类生活质量和安全意识的提高,增塑剂的毒性效应逐渐受到关注。增塑剂中,邻苯二甲酸双(2-乙基己基)酯(diethylhexyl phthalate, DEHP)是目前使用最为广泛的PAEs有机化合物,被广泛应用于涂料等建筑材料、食品包装材料、儿童玩具、办公用品、化妆品和医疗器材等塑料产品中[3-5]。研究发现,DEHP是一种环境内分泌干扰物(environmental endocrine disruptor, EED),对机体有生殖毒性、肝脏毒性、免疫毒性以及神经毒性等多种毒性作用,DEHP的毒性研究也越来越受到学者们的关注[6-12]。

铅是一种用途广泛的重金属,在生活和工业生产中处处可见。铅作为一种重要的成分参与塑料制品的生产过程。聚氯乙烯是一种极性高分子,受热易分解,产生氯化氢。为解决这个问题,就必须采用热稳定剂。常用的热稳定剂有铅盐类、金属皂类、有机锡类和复合稳定剂等。其中,因原料易得价廉、生产工艺简单,铅盐热稳定剂广泛应用[13]。随着铅的广泛应用,铅污染严重影响环境和人体健康,铅中毒主要表现为神经毒性。Pb和DEHP的单一毒性研究已经得到众多学者的研究证实[14-21]。

日常生活中,人体可以通过多种途径同时暴露于DEHP和Pb环境中,但现有的研究还仅局限于DEHP和Pb单一污染物对动物的毒性,缺乏二者联合毒性实验研究。因此,本实验将二者联合染毒,进一步研究DEHP和Pb的联合作用及机制。

1 材料与方法(Materials and methods)

1.1 实验动物

DEHP和Pb均采用体内染毒,选择80只健康雄性适龄SPF级昆明小鼠(8周龄,体重为(20±2) g),由延边大学动物科学实验中心提供。为减少实验动物个体差异,保证各组实验结果的均衡性和准确性,实验前按照初始体重进行平均分组。在延边大学医学院动物饲养房集中饲养,光、暗周期交替,保持清洁,无其他病原体环境,温度控制在22 ~ 25 ℃,相对湿度保持在40% ~ 70%,采用由延边大学动物科学实验中心提供的普通饲料喂养,小鼠可以自由饮水、饮食,每日记录其饮水量和饮食量。在实验正式开始前,将小鼠放在正常饲养环境3 d。

1.2 实验试剂与仪器

主要实验试剂:乙酸铅(纯度99.0%,天津市化学试剂三厂)、邻苯二甲酸双(2-乙基己基)酯(纯度99.0%,梯希爱(上海)化成工业发展有限公司)、吐温80(纯度99.0%,天津市科密欧化学试剂有限公司)。

主要实验仪器:YP600型电子天平(上海精科天平,上海)、SZ-93自动双重纯水蒸馏器(上海生化仪器厂,上海)、全模终端过滤独立送风净化笼具(苏州工业园区唯亭姑秀实验动物设备厂,江苏)、Morris水迷宫(上海洛维生物科技有限公司,上海)、小动物避暗穿梭仪与跳台记录仪(众实迪创(北京)科技发展有限责任公司,北京)。

1.3 暴露实验

1.3.1 试剂配制

将DEHP与吐温80(Tween-80)按照体积为1:1

助溶,并使用双蒸水配制成浓度为 10、50 和 200 mg·kg^{-1}的染毒液。将乙酸铅用双蒸水溶解配制成 1 g·L^{-1},用于铅组饮水染毒。

1.3.2　实验分组与模型建立

选用 80 只昆明种小鼠,雄性,体重为(20±2) g。实验前,为减少个体差异而影响实验分组差异,采取称量初始体重,按照体重大小平均分为 8 组,每组各 10 只,分组见表 1。

每天在固定的时间,DEHP 处理组按照 0.1 mL·(10 g)$^{-1}$ 的剂量对小鼠灌胃给药,CT 组和 Pb 组按照相同比例的剂量给予双蒸水(DDW)灌胃以作为安慰剂。铅组用 1 g·L^{-1}乙酸铅通过自由饮水进行染毒,CT 组和 DEHP 组采用双蒸水自由饮水。联合染毒处理组用 1 g·L^{-1}乙酸铅通过自由饮水染毒,且按照 0.1 mL·(10 g)$^{-1}$ 的剂量对小鼠灌胃给药 DEHP。所有各组均自由进食。连续染毒 6 周,实验周期共计 50 d。实验期间,每天观察小鼠的毛色、呼吸和状态,并记录各组小鼠体重、进食量以及饮水量。

1.4　动物行为学实验

1.4.1　小鼠 Morris 水迷宫实验

实验周期的第 6 周进行小鼠 Morris 水迷宫训练,训练期间照常按时给药。水迷宫由直径 1.2 m 的圆形水池构成,水池中安置有 9 cm 平台,由顶部摄像头进行录像拍摄,通过视频分析系统统计分析实验结果。设定水池分为 4 个象限,第一、第二和第三象限分别在池壁设置固定投放点,平台位于第四象限。水池水位位于平台上 1 cm,实验全程,保持水温在(25±1) ℃。

标点指引实验:分别从第一、第二和第三象限的固定位置将小鼠面朝水池壁,头朝上,投入水中,并同时启动摄像机录像功能,时间 60 s。记录小鼠从不同象限游上平台的时间,所测得的时间称逃避潜伏期。如果 60 s 内,小鼠未能成功游上平台,则需要通过引导棒引导小鼠上台,让小鼠停留在平台 10 s,增强学习记忆力。实验每隔 24 h 训练一次,连续训练 6 d,测定小鼠空间学习能力。

平台寻找实验:在连续训练 6 d 后,间隔 24 h,撤去平台,将小鼠从平台所在象限的对角象限第二象限固定点位置投放水中,同时启动摄像机录像系统记录数据。记录小鼠的游泳路线,统计穿台次数和目标象限停留时间,测定小鼠空间记忆能力[22-23]。

1.4.2　小鼠跳台实验

实验周期第 6 周末,进行小鼠跳台实验[24-25],分为记忆获得阶段和学习成绩阶段。记忆获得阶段:

表 1　实验分组

Table 1　Experimental grouping

组别 Groups	染毒方案 Ways of exposure	组名 Group name
CT	0 mg·(kg·d)$^{-1}$ DEHP+DDW	空白对照组 Control group
DEHP1	10 mg·(kg·d)$^{-1}$ DEHP+DDW	DEHP 低浓度染毒组 Low-dose group of DEHP
DEHP2	50 mg·(kg·d)$^{-1}$ DEHP+DDW	DEHP 中浓度染毒组 Medium-dose group of DEHP
DEHP3	200 mg·(kg·d)$^{-1}$ DEHP+DDW	DEHP 高浓度染毒组 High-dose group of DEHP
DEHP1+Pb	10 mg·(kg·d)$^{-1}$ DEHP+1 g·L^{-1} Pb	低浓度联合染毒组 Low-dose combined exposure group
DEHP2+Pb	50 mg·(kg·d)$^{-1}$ DEHP+1 g·L^{-1} Pb	中浓度联合染毒组 Medium-dose combined exposure group
DEHP3+Pb	200 mg·(kg·d)$^{-1}$ DEHP+1 g·L^{-1} Pb	高浓度联合染毒组 High-dose combined exposure group
Pb	0 mg·(kg·d)$^{-1}$ DEHP+1 g·L^{-1} Pb	铅染毒组 Dose group of Pb

注:每组均为 10 只;DEHP 表示邻苯二甲酸双(2-乙基己基)酯;DDW 表示双蒸水。

Note: Each group contains 10 mice; DEHP stands for diethylhexyl phthalate; DDW stands for double distilled water.

在实验开始前,把小鼠先放入跳台测试仪中,使小鼠适应仪器密闭环境3 min。将电压设定在36 V的交流电上,将小鼠放在跳台仪中的平台上,然后开启仪器,记录数据。仪器自动记录小鼠第一次从绝缘平台跳下的时间,即为相应小鼠的潜伏期数据。连续记录5 min,小鼠从台上跳下受到电击的次数,即为错误次数。学习成绩阶段:记忆获得阶段结束24 h后进行,再次进行小鼠跳台实验,记录跳台潜伏期和5 min内跳台错误次数。

1.4.3 小鼠避暗实验

小鼠避暗实验分为记忆获得阶段和学习成绩阶段[26]。记忆获得阶段:实验正式开始记录前,将小鼠先放入明箱中使其适应仪器明箱环境3 min,暗箱不通电,小鼠可在明暗箱之间自由活动。适应结束后,将小鼠面部背朝洞口放入明箱中,将电压设定为36 V,启动仪器进行测定。记录小鼠第一次从明箱通过洞口到达暗箱受到电击所用的时间,即为潜伏期。持续记录5 min,记录小鼠从明室穿梭到暗室受到电击的次数,即为错误次数。学习成绩阶段:记忆获得阶段24 h后,再次进行实验,记录避暗潜伏期和5 min内避暗错误次数。

1.5 生物学指标的测定

1.5.1 实验动物处理

行为学实验周期结束后,将各组小鼠禁水禁食12 h,然后称量各小鼠体重,并采取颈椎脱臼法处死小鼠,解剖并称量小鼠脑组织(大脑)、心脏、肺、肝脏、脾脏和肾脏,计算其各脏器系数。

1.5.2 脑组织匀浆制备及蛋白含量的测定

通过机械扣脑方法,将小鼠大脑完整取出,置于冰上,去除脑组织表面血液,并准确称量脑组织重量,按照脑组织重量(g):体积(mL)=1:9的比例加入生理盐水,在冰浴条件下,用匀浆器机械匀浆,制备成10%的脑组织(大脑)匀浆液,放入低温离心机内,2 500 $r\cdot min^{-1}$离心10 min,收集上清液。

按照BCA蛋白浓度测定试剂盒的方法和步骤,准确操作,通过计算标准品的吸光度,制作蛋白标准曲线(R^2>0.99),通过蛋白标准曲线方程,计算各脑组织的蛋白浓度。

1.5.3 脑组织生化指标测定

按照试剂盒说明书,取适量脑组织匀浆液分别测定丙二醛(MDA)含量、过氧化氢酶(CAT)活性、还原型谷胱甘肽(GSH)含量、一氧化氮(NO)含量、总抗氧化能力、单胺氧化酶(MAO)活性和乙酰胆碱酯酶(AChE)活性。通过测定结果,推断各组小鼠脑组织损伤程度。

1.6 效应相加模型

本实验采用效应相加模型[27]进行联合毒性评价分析。该模型假设2种物质之间不相互作用,通过比较化合物混合处理后实测值与理论值之间的统计学差异(P值),判断2种化合物的联合效应。

理论值是指2种物质单独毒性效应之和,实测值为2种物质联合作用实际测得的毒性效应。对实测值和理论值进行单因素方差分析,当实测值与理论值之间没有显著性差异时(P>0.05),说明2种物质互不影响,联合作用表现为相加作用。当实测值与理论值之间具有统计学差异时(P<0.05),如果实测值显著低于理论值,则表示二者存在拮抗作用;如果实测值显著高于理论值,则表示二者为协同作用。

1.7 统计分析

使用SPSS17.0统计软件统计分析实验数据,以均数±标准差($\bar{x}\pm s$)形式表示。用单因素方差分析(One-way ANOVA)法进行多组间均值差异的比较,组间差异的多重比较采用LSD-t检验统计方法,检验水准α=0.05,以P<0.05为差异有统计学意义。

2 结果(Results)

2.1 小鼠体重及脏器系数

2.1.1 各组实验小鼠观察结果

各组小鼠经灌胃后,立即观察到,小鼠活动均减少,DEHP高剂量组小鼠部分出现胃痉挛和呕吐等现象。CT组和Pb组恢复正常活动的时间相对较短,随着DEHP浓度增高,小鼠恢复正常活跃度的时间延长。实验周期结束后,各组小鼠的皮毛光滑。整个实验周期中,小鼠大小便无异常,眼、鼻和口腔均无分泌物。通过灌胃染毒,小鼠没有发生运动失调等症状,呼吸和饮食饮水均正常,无死亡现象。将小鼠处死后,观察腹腔各脏器,各脏器均无明显异常。各组小鼠的摄食量和饮水量无明显差异(P>0.05)(表2)。

2.1.2 各组实验小鼠体重的变化

分别取实验周期中每周末小鼠体重,进行相互比较,无明显差异(P>0.05)(表3)。

2.1.3 各组实验小鼠脏器系数比较

处死小鼠前,称量小鼠体重,解剖小鼠,取脑、肺、肝、脾、心和肾,称量各脏器的重量,计算各脏器系数。比较各组小鼠的肺、脾、心和肾的脏器系数,无明显差异(P>0.05);各组小鼠脑组织重量,随着DEHP

浓度增加,逐渐降低,与 CT 组和 Pb 组相比,DEHP2+Pb 组和 DEHP3+Pb 组均有差异(P<0.05);随 DEHP 浓度升高,肝脏重量在中剂量 DEHP 处理组和中剂量联合处理组中降低,与 CT 组和 Pb 组相比,DEHP2 组和 DEHP2+Pb 组均有差异(P<0.05)。与单独染毒组相比,高浓度联合染毒组毒性效应显著增强,按效应相加模型对联合作用方式进行评价,实测值大于理论值,联合作用表现为协同作用(P<0.05)(表 4)。

表 2　各组实验观察结果

Table 2　Experimental observation results of each group

组别 Groups	灌胃给药/(0.1 mL·(10 g)$^{-1}$) Drug administration /(0.1 mL·(10 g)$^{-1}$)	饮水 Types of drinking water	摄食量/g Food ration/g	饮水量/mL Water intake/mL
CT	DDW	DDW	62.06±6.89	85.47±7.68
DEHP1	10 mg·kg^{-1} DEHP	DDW	60.95±7.06	83.43±8.11
DEHP2	50 mg·kg^{-1} DEHP	DDW	61.72±7.36	84.71±9.71
DEHP3	200 mg·kg^{-1} DEHP	DDW	62.41±8.53	85.48±7.33
DEHP1+Pb	10 mg·kg^{-1} DEHP	1 g·L^{-1} Pb	61.03±6.98	84.41±9.24
DEHP2+Pb	50 mg·kg^{-1} DEHP	1 g·L^{-1} Pb	62.92±8.31	83.74±8.07
DEHP3+Pb	200 mg·kg^{-1} DEHP	1 g·L^{-1} Pb	63.84±9.58	84.59±9.02
Pb	DDW	1 g·L^{-1} Pb	63.45±5.59	85.69±8.34

表 3　各给药组实验小鼠体重的变化

Table 3　Changes in body weight of experimental mice in each drug-administered group

组别 Groups	初始体重/g Initial weight/g	给药后体重/g Weight after administration/g					
		1st weekend	2nd weekend	3rd weekend	4th weekend	5th weekend	6th weekend
CT	23.97±1.83	34.02±2.05	39.62±3.31	42.85±3.69	45.91±3.41	47.11±4.33	49.29±5.91
DEHP1	23.76±1.63	34.16±2.96	38.23±2.33	42.75±3.63	45.39±3.81	47.57±4.64	48.87±4.41
DEHP2	23.94±1.41	33.58±2.27	39.49±2.61	43.09±3.45	44.81±4.01	46.59±4.25	49.61±4.06
DEHP3	24.04±2.34	34.13±2.47	41.60±3.75	43.75±3.76	45.52±4.16	48.03±5.62	48.92±6.33
DEHP1+Pb	24.01±2.78	34.23±2.47	40.63±3.31	43.62±2.69	44.95±5.05	47.05±5.17	50.05±5.74
DEHP2+Pb	23.88±1.89	33.66±1.81	39.21±2.91	42.49±3.87	44.87±4.71	46.45±5.34	49.73±6.24
DEHP3+Pb	23.94±1.48	33.93±1.96	39.51±2.28	42.68±2.01	45.73±3.16	47.22±3.12	48.99±4.17
Pb	23.83±1.89	32.62±3.03	38.86±3.12	43.13±3.11	44.88±4.03	48.11±4.66	49.39±4.42

表 4　各组实验小鼠脏器系数比较

Table 4　Comparison of organ coefficients of experimental mice in each group

组别 Groups	脑/% Brain/%	肺脏/% Lungs/%	肝脏/% Liver/%	脾脏/% Spleen/%	心脏/% Heart/%	肾脏/% Kidney/%
CT	0.659±0.046	0.616±0.042	4.284±0.371	0.306±0.076	0.627±0.068	1.416±0.084
DEHP1	0.641±0.056	0.586±0.035	4.136±0.416	0.303±0.038	0.598±0.044	1.384±0.092
DEHP2	0.632±0.043	0.613±0.027	3.752±0.289$^{\#*}$	0.303±0.057	0.615±0.052	1.405±0.076
DEHP3	0.598±0.048	0.597±0.038	3.961±0.356	0.304±0.063	0.608±0.037	1.394±0.083
DEHP1+Pb	0.586±0.065	0.605±0.043	4.082±0.385	0.296±0.048	0.594±0.061	1.389±0.079
DEHP2+Pb	0.557±0.057$^{\#*}$	0.611±0.041	3.627±0.274$^{\#*}$	0.308±0.041	0.618±0.033	1.411±0.087
DEHP3+Pb	0.502±0.034$^{\#*}$	0.618±0.031	3.863±0.303	0.301±0.069	0.611±0.065	1.398±0.091
Pb	0.642±0.041	0.595±0.029	4.041±0.297	0.306±0.054	0.606±0.046	1.394±0.074

注:# 与 CT 组比较,P<0.05;* 与 Pb 组比较,P<0.05。

Note: # compared with the CT group, P<0.05; * compared with the Pb group, P<0.05.

2.2 行为学实验结果

2.2.1 小鼠 Morris 水迷宫实验结果

各处理组小鼠逃避潜伏期,与空白对照组相比,随着 DEHP 浓度增高,逐渐延长($P<0.05$);联合染毒组分别与 DEHP 组、Pb 组比较,可知联合染毒后小鼠逃避潜伏期延长明显($P<0.05$)。DEHP 和 Pb 染毒对小鼠空间学习能力有不同程度的损害(表 5)。

表 5 Morris 水迷宫实验各组小鼠逃避潜伏期

Table 5 The mice escape latency of each group in Morris water maze punctuation guide experiment

组别 Groups	实验时间/d Experimental time/d					
	1	2	3	4	5	6
CT	57.65±2.35	52.71±3.46	45.34±4.71	35.71±4.91	29.36±3.81	22.42±4.57
DEHP1	57.58±1.29	53.62±2.75	48.43±5.03	46.97±2.67$^{\#@}$	41.75±4.54$^{\#@}$	36.34±3.97$^{\#}$
DEHP2	58.03±1.65	53.76±1.82	50.33±3.25	47.82±5.25$^{\#}$	43.17±3.32$^{\#@}$	39.31±3.42$^{\#}$
DEHP3	58.78±1.22	54.32±1.68	52.91±4.03$^{\#}$	49.28±3.08$^{\#@}$	44.54±2.88$^{\#@}$	41.74±4.15$^{\#}$
DEHP1+Pb	57.51±2.49	53.73±2.91	51.17±4.72$^{\#}$	48.01±2.93$^{\#}$	45.91±4.24$^{\#*}$	41.33±6.65$^{\#*@}$
DEHP2+Pb	58.32±1.65	55.48±3.08	52.98±4.86$^{\#}$	52.75±4.99$^{\#*}$	48.12±2.85$^{\#*}$	44.73±3.69$^{\#*@}$
DEHP3+Pb	59.15±1.07	57.39±2.63$^{\#*}$	55.06±3.68$^{\#*}$	53.57±2.53$^{\#*}$	51.42±5.29$^{\#*}$	50.78±2.32$^{\#*@}$
Pb	58.03±1.74	53.27±2.24	48.92±5.04	45.08±5.73$^{\#}$	40.69±3.76$^{\#}$	35.54±2.13$^{\#}$

注:# 与 CT 组比较,$P<0.05$;* 与 Pb 组比较,$P<0.05$;@ 与相同剂量 DEHP 染毒组比较,$P<0.05$。

Note: # compared with CT group, $P<0.05$; * compared with Pb group, $P<0.05$; @ compared with the same dose group of DEHP, $P<0.05$.

Morris 水迷宫实验各组小鼠游泳速度无明显差异($P>0.05$)。结果表明,排除各组小鼠的个体差异,染毒处理对各组小鼠体能无明显影响(表 6)。

Morris 水迷宫平台寻找实验结果显示,空白对照组的小鼠在目标象限停留时间最长,小鼠在目标象限的游泳距离占总游泳距离的比例最高,穿台次数最多;随着 DEHP 浓度的增高,上述实验数据值降低;高浓度联合染毒实验结果最低,空间记忆能力障碍明显($P<0.05$)。与单独染毒组相比,高浓度联合染毒组毒性效应显著增强,按效应相加模型对联合作用方式进行评价,实测值大于理论值,联合作用表现为协同作用($P<0.05$)(表 7)。

表 6 Morris 水迷宫实验各组小鼠游泳速度比较

Table 6 Comparison of swimming speeds of mice in the Morris water maze

组别 Groups	游泳速度/(mm·s^{-1}) Swimming speeds/(mm·s^{-1})
CT	161.27±36.02
DEHP1	157.32±40.34
DEHP2	163.27±33.41
DEHP3	159.62±50.49
DEHP1+Pb	163.69±43.32
DEHP2+Pb	158.23±33.43
DEHP3+Pb	155.56±46.83
Pb	163.95±51.56

表 7 Morris 水迷宫实验各组小鼠平台寻找实验结果

Table 7 The results of finding the platform in each group in Morris water maze experiments

组别 Groups	目标象限停留时间/s Target quadrant residence time/s	占总距离的百分比/% Percentage of total distance/%	穿台次数(t) Times of crossing the platform (t)
CT	27.89±1.86	40.13±3.54	6.7±2.84
DEHP1	25.16±2.65	35.21±4.47	5.2±1.62
DEHP2	24.78±2.98	30.42±3.07	4.4±1.58$^{\#}$
DEHP3	20.85±4.31$^{\#}$	27.69±2.55$^{\#}$	3.8±1.76$^{\#*}$
DEHP1+Pb	22.73±2.43	30.27±4.83	4.7±2.05
DEHP2+Pb	18.03±3.68$^{\#*}$	26.53±3.62$^{\#}$	3.2±1.34$^{\#*}$
DEHP3+Pb	13.77±4.07$^{\#*@}$	22.84±3.84$^{\#*@}$	2.4±1.13$^{\#*@}$
Pb	24.68±2.72	33.95±2.05	4.9±2.56$^{\#}$

注:# 与 CT 组比较,$P<0.05$;* 与 Pb 组比较,$P<0.05$;@ 与相同剂量 DEHP 染毒组比较,$P<0.05$。

Note: # compared with CT group, $P<0.05$; * compared with Pb group, $P<0.05$; @ compared with the same dose group of DEHP, $P<0.05$.

由小鼠在平台寻找实验中的游泳轨迹来看,空白对照组小鼠记忆能力最强,在水迷宫中目的性很强,游泳轨迹多集中于目标象限,并多次穿越目标平台;随着 DEHP 浓度的增高,小鼠的游泳轨迹逐渐变得无目的和不规则;高浓度联合染毒组小鼠的游泳轨迹则杂乱无章,多为无目的性探索(图 1)。

2.2.2　小鼠跳台实验结果

小鼠跳台实验结果显示,各组小鼠记忆获得所用时间无明显差异(P>0.05);各组小鼠学习成绩阶段所用时间,随 DEHP 浓度和联合染毒浓度的增高而降低(P<0.05)。高浓度染毒组小鼠的错误次数明显高于空白对照组,联合染毒组小鼠的学习记忆能力低于单一染毒组(P<0.05)(表 8)。

2.2.3　小鼠避暗实验结果

小鼠避暗实验结果显示,各组小鼠记忆获得潜伏期无明显差异(P>0.05);各组小鼠学习成绩潜伏期,随 DEHP 浓度和联合染毒浓度的增高而降低,差异明显(P<0.05)。高浓度染毒组小鼠的错误次数明显高于空白对照组,联合染毒组小鼠的学习记忆能力低于单一染毒组(P<0.05)。结果表明,联合染毒对小鼠的学习记忆能力影响更大(表 9)。

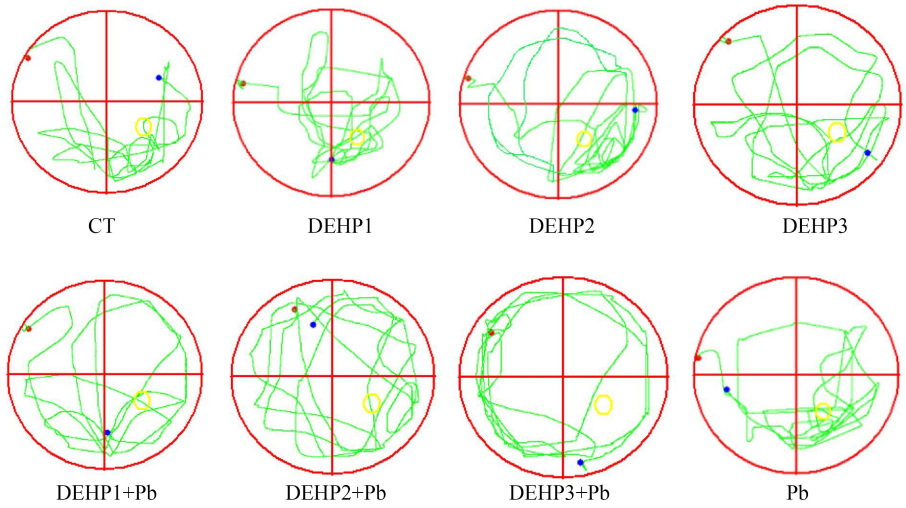

图 1　小鼠平台寻找实验的游泳轨迹

Fig. 1　The swimming trajectories of mice in platform finding task in Morris water maze experiments

表 8　各组小鼠跳台实验结果

Table 8　The experimental results of mice in each group of step down test

组别 Groups	潜伏期/s Incubation/s		错误次数(t) Error times (t)	
	记忆获得 Memory acquisition	学习成绩 Academic record	记忆获得 Memory acquisition	学习成绩 Academic record
CT	54.4±24.73	180.2±36.43	4.8±2.21	2.1±0.68
DEHP1	58.8±20.04	138.3±28.51	6.3±1.66	4.2±2.53
DEHP2	60.6±17.46	100.7±18.26	7.7±2.57	5.6±2.11$^{\#}$
DEHP3	56.5±26.98	83.8±31.21$^{\#}$	9.8±3.08$^{\#}$	7.1±3.03$^{\#}$
DEHP1+Pb	56.8±33.82	113.5±24.17	7.8±2.85	6.6±2.17
DEHP2+Pb	59.4±21.94	87.6±29.74$^{\#*}$	8.5±1.52	7.9±2.76$^{@}$
DEHP3+Pb	61.8±25.64	65.2±27.88$^{\#*@}$	13.2±3.32$^{\#*@}$	11.8±2.89$^{\#*@}$
Pb	54.2±16.53	155.1±33.16	6.4±2.28	5.4±1.16

注:# 与 CT 组比较,P<0.05;* 与 Pb 组比较,P<0.05;@ 与相同剂量 DEHP 染毒组比较,P<0.05。

Note: # compared with CT group, P<0.05; * compared with Pb group, P<0.05; @ compared with the same dose group of DEHP , P<0.05.

2.3 脑组织生化指标测定结果

小鼠脑组织各生物学指标测定结果显示,与 CT 组和 Pb 组相比,单独 DEHP 处理组中,CAT 活性、GSH 含量和总抗氧化能力随着 DEHP 浓度增加逐渐降低,联合染毒组与 Pb 组和对应剂量 DEHP 染毒组相比明显降低,差异有统计学意义($P<0.05$,表 10)。单独 DEHP 处理组与对照组比较,随着 DEHP 浓度增加 NO 含量、MDA 含量、MAO 活性和 AchE 活性逐渐增加,联合染毒组与 Pb 组和对应剂量 DEHP 染毒组比较上述 4 个生化指标明显增加,差异有统计学意义($P<0.05$,表 11)。与单独染毒组相比,中、高浓度联合染毒组毒性效应显著增强,按效应相加模型对联合作用方式进行评价,实测值大于理论值,联合作用表现为协同作用($P<0.05$)。

3 讨论(Discussion)

DEHP 是目前使用最为广泛的增塑剂,铅盐作为重要的热稳定剂被广泛应用于塑料制品的生产过程中。人体可以通过多种途径暴露于 DEHP 和 Pb 环境中,但是现有的研究还仅局限于 DEHP 和 Pb 单一污染物对动物的毒性[28-35],缺乏二者联合毒性研究。因此,研究两者的联合毒性效应及其发生机制具有重要意义。

本研究发现,DEHP 和 Pb 染毒对小鼠体重、每日摄食量和每日饮水量影响不明显。各处理组中小鼠的肺脏、脾脏、心脏和肾脏无明显损伤;随着染毒

表 9 各组小鼠避暗实验结果

Table 9 The experimental results of mice in each group of darkness test

组别 Groups	潜伏期/s Incubation/s		错误次数(t) Error times (t)	
	记忆获得 Memory acquisition	学习成绩 Academic record	记忆获得 Memory acquisition	学习成绩 Academic record
CT	62.2±25.56	189.7±33.55	4.5±1.73	2.2±2.06
DEHP1	65.5±32.01	158.4±23.68	6.3±2.51	4.1±1.41
DEHP2	52.2±33.85	111.5±28.37	7.7±0.96	5.9±2.31
DEHP3	58.3±20.27	92.7±30.83$^{\#}$	11.5±2.65$^{\#}$	6.2±1.26$^{\#}$
DEHP1+Pb	62.7±26.95	104.4±25.23	8.7±3.12	7.7±1.89
DEHP2+Pb	56.4±22.28	83.1±39.19$^{\#*}$	10.4±2.06$^{\#*@}$	9.3±0.71$^{\#*@}$
DEHP3+Pb	57.3±27.06	68.3±24.24$^{\#*}$	13.3±2.51$^{\#*@}$	11.8±1.83$^{\#*@}$
Pb	63.2±18.54	134.9±35.94	5.5±2.88	4.5±2.94

注:# 与 CT 组比较,$P<0.05$;* 与 Pb 组比较,$P<0.05$;@ 与相同剂量 DEHP 染毒组比较,$P<0.05$。

Note: # compared with CT group, $P<0.05$; * compared with Pb group, $P<0.05$; @ compared with the same dose group of DEHP, $P<0.05$.

表 10 小鼠脑组织抗氧化指标测定结果

Table 10 Results of antioxidant index in mouse brain tissue

组别 Groups	CAT 活性/(units·mg^{-1}) CAT activity/(units·mg^{-1})	GSH 含量/(μmol·g prot^{-1}) GSH content/(μmol·g prot^{-1})	总抗氧化能力/(mmol·g^{-1}) Total antioxidant capacity/(mmol·g^{-1})
CT	2.86±0.31	96.89±3.96	1.93±0.58
DEHP1	2.61±0.34	86.93±5.58	1.75±0.41
DEHP2	2.34±0.46	83.17±6.15$^{\#}$	1.64±0.16$^{\#*}$
DEHP3	1.86±0.32$^{\#*}$	79.67±5.07$^{\#*}$	1.59±0.33$^{\#*}$
DEHP1+Pb	2.11±0.48$^{\#}$	82.08±5.43$^{\#@}$	1.62±0.29$^{\#*}$
DEHP2+Pb	1.96±0.34$^{\#*@}$	77.18±6.92$^{\#*@}$	1.47±0.34$^{\#*@}$
DEHP3+Pb	1.26±0.37$^{\#*@}$	68.61±7.87$^{\#*@}$	1.27±0.18$^{\#*@}$
Pb	2.54±0.22	87.53±4.66	1.73±0.27

注:CAT 表示过氧化氢酶,GSH 表示还原型谷胱甘肽;# 与 CT 组比较,$P<0.05$;* 与 Pb 组比较,$P<0.05$;@与相同剂量 DEHP 染毒组比较,$P<0.05$。

Note: CAT stands for calatase; GSH stands for glutathione; # compared with CT group, $P<0.05$; * compared with Pb group, $P<0.05$; @ compared with the same dose group of DEHP, $P<0.05$.

表 11　小鼠脑组织 NO、MDA、MAO 和 AChE 活力测定结果

Table 11　Results of NO, MDA, MAO and AChE activity in mouse brain tissue

组别 Groups	NO 含量/(μmol·g prot^{-1}) NO content/(μmol·g prot^{-1})	MDA 含量/(nmol·mg prot^{-1}) MDA content/(nmol·mg prot^{-1})	MAO 活性/(U·mg prot^{-1}) MAO activity/(U·mg prot^{-1})	AchE 活性/(U·mg prot^{-1}) AchE activity/(U·mg prot^{-1})
CT	0.24±0.09	0.63±0.21	1.93±0.65	1.81±0.27
DEHP1	0.61±0.22$^{\#}$	1.13±0.55	2.72±0.41	2.28±0.34
DEHP2	0.72±0.25$^{\#}$	1.85±0.86$^{\#}$	3.18±0.31	3.09±0.14$^{\#}$
DEHP3	0.84±0.32$^{\#*}$	2.61±0.57$^{\#*}$	3.96±0.47$^{\#}$	3.49±0.25$^{\#*}$
DEHP1+Pb	0.75±0.21$^{\#@}$	3.21±1.13$^{\#*@}$	3.15±0.27$^{\#*@}$	2.94±0.22$^{\#@}$
DEHP2+Pb	0.83±0.19$^{\#*@}$	3.43±0.86$^{\#*@}$	4.07±0.45$^{\#*@}$	3.11±0.07$^{\#*}$
DEHP3+Pb	0.96±0.28$^{\#*@}$	4.26±1.21$^{\#*@}$	4.86±0.39$^{\#*@}$	4.54±0.42$^{\#*@}$
Pb	0.63±0.11	1.17±0.42	3.27±0.34	2.52±0.24

注:NO 表示一氧化氮,MDA 表示丙二醛,MAO 表示单胺氧化酶,AchE 表示乙酰胆碱酯酶;# 与 CT 组比较,P<0.05;* 与 Pb 组比较,P<0.05;@ 与相同剂量 DEHP 染毒组比较,P<0.05。

Note: NO stands for nitric oxide; MDA stands for malondialdehyde; MAO stands for monoamine oxidase; AchE stands for acetylcholinesterase; # compared with CT group, P<0.05; * compared with Pb group, P<0.05; @ compared with the same dose group of DEHP, P<0.05.

浓度增加,脑组织重量逐渐降低,且联合染毒组更明显;肝脏重量随着 DEHP 浓度升高,在中剂量时降低,在高剂量时有所增加,提示 DEHP 对肝脏具有毒性作用,并可能在肝脏产生富集作用。行为学实验结果表明,染毒处理对小鼠的空间学习能力损害明显,导致小鼠空间记忆能力障碍。联合染毒组神经毒性作用明显高于各单一染毒组,用效应相加模型进行评价,表现为协同作用。

为探究其毒性增加是否和氧化损伤相关,分别对 MDA、NO、CAT、GSH 和总抗氧化能力等氧化损伤指标和 MAO、AchE 等神经递质类指标进行测定。随着 DEHP 浓度增加,脑组织中 MDA 含量、NO 含量、MAO 活性和 AchE 活性逐渐增加,联合染毒组 MDA 含量、NO 含量、MAO 活性和 AchE 活性增加明显,脑组织中 CAT 活性、GSH 含量和总抗氧化能力逐渐降低,联合染毒组与 Pb 组和对应剂量 DEHP 染毒组相比,CAT 活性、GSH 含量和总抗氧化能力降低明显。可见,染毒处理导致小鼠脑组织中活性氧增加,清除速率降低,且活性氧作用被放大,抗氧化能力降低,引起细胞代谢及功能障碍,甚至死亡;联合染毒后细胞损伤明显,中枢神经系统脑血流量调节障碍,并引发组织细胞产生神经毒性作用,脑组织发生氧化应激反应,从而降低学习记忆能力。MAO 和 AchE 是分解单胺类神经递质和乙酰胆碱类神经递质的活性酶,染毒处理可影响 MAO 和 AchE 活性,从而导致脑组织中单胺类神经递质和乙酰胆碱神经递质减少,导致学习记忆能力障碍。DEHP 和 Pb 联合染毒的毒性效果增加,用效应相加模型进行评价,表现为协同作用。

相关研究表明,DEHP 和甲醛联合染毒,小鼠学习和记忆能力较单一染毒组受损明显,其联合毒性具有一定的增强作用[36]。DEHP 能影响外周葡萄糖和胰岛素稳态,导致海马胰岛素代谢紊乱,与阿尔茨海默病存在潜在关联[37]。本实验结果表明,DEHP 可导致学习记忆能力障碍,当与铅联合染毒后,脑组织氧化损伤加重,导致学习记忆能力障碍更为明显。

所有实验结果,应用效应相加模型进行评价,结果表明,DEHP 和 Pb 联合毒性并非简单的相加作用,表现为协同作用。由于两者在生活中极易接触,二者的联合作用还需要从分子毒理学的角度进行深入研究。

目前,联合作用的评价方法大多数采用 2 个基本模型,包括效应相加模型[38]与剂量相加模型[39]。本研究采用的效应相加模型评价方法,统计学分析方法简单,实验操作简便易行。方法中将实测值和理论值进行直观比较,进一步保证了结果的可靠性。但该方法也有不足之处,完全基于受试物某个特定浓度点产生的单独及联合效应值的统计学比较,缺少一定的浓度效应关系依据。国内外对于联合作用的评价方式尚不统一,联合毒性作用具有特异性,因此,采用不同的评价方式进一步开展研究并从分子学角度进行验证很有必要的。

通讯作者简介:许妍姬(1973—),女,博士,副教授,硕士研究

生导师,主要研究方向为神经毒理学。

参考文献(References):

[1] 戴永伟, 俞群英. 从十九大报告看食品安全快检产业的机遇与发展[J]. 食品安全导刊, 2018(Z1): 78-79

[2] 高珊. 食品包装发展趋势[J]. 中国果菜, 2016, 36(9): 35-36

[3] 王宏. 增塑剂的生产及研发现状[J]. 化学工程与装备, 2011(9): 190-192

[4] 王克智. 塑料加工助剂发展趋势[J]. 塑料助剂, 1998(5): 1-3, 14

[5] Xu Y, Cohen H E A, Clausen P A, et al. Predicting residential exposure to phthalate plasticizer emitted from vinyl flooring: A mechanistic analysis [J]. Environmental Science and Technology, 2009, 43(7): 2374-2380

[6] 朱丽, 季强, 宋建恒. 增塑剂的增塑机理及其安全性探讨[J]. 中国医疗器械信息, 2017, 23(3): 38-39, 73
Zhu L, Ji Q, Song J H. Study on the mechanism and safety of plasticizer [J]. China Medical Devices Information, 2017, 23(3): 38-39, 73 (in Chinese)

[7] 王二蕾, 黄镭, 熊汉国. 塑化剂 DEHP 的来源及其对机体健康的危害[J]. 中国食品, 2011(13): 8-11

[8] Wu W, Hu J, Wang J, et al. Analysis of phthalate esters in soils near an electronics manufacturing facility and from a non-industrialized area by gas purge microsyringe extraction and gas chromatography [J]. Science of the Total Environment, 2015, 508: 445-451

[9] Jager R J, Ruibin R J. Migration of a phthalate ester plasticizer from polyvinyl chloride blood bags into stored human blood and its localization in human tissues [J]. New England Journal of Medicine, 1972, 287: 1114-1118

[10] 周佩, 蒋子奇, 钏茂巧, 等. DEHP 暴露对小鼠神经行为学及脑脂质过氧化物的影响[J].环境科学学报, 2012, 32(9): 2339-2345
Zhou P, Jiang Z Q, Chuan M Q, et al. Effect of di-(2-ethylhexyl)-phthalate exposure on neurobehavioral and lipid peroxidation of mice [J]. Journal of Environmental Sciences, 2012, 32 (9): 2339-2345 (in Chinese)

[11] 陈莉, 李学彬, 杨光涛, 等. 邻苯二甲酸二乙基己酯(DEHP)对金鲫鱼脑细胞 DNA 的损伤[J]. 生态毒理学报, 2008, 3(2): 144-148
Chen L, Li X B, Yang G T, et al. DNA damage in brain cells of gold crucian carp induced by di-(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) [J]. Asian Journal of Ecotoxicology, 2008, 3(2): 144-148 (in Chinese)

[12] Andrade A J, Grande S W, Talsness C E, et al. A dose-response study following in utero and lactational exposure to di-(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP): Non-monotonic dose-response and low dose effects on rat brain aromatase activity [J]. Toxicology, 2006, 227(3): 185-192

[13] 彭湘莲. 食品纸塑复合包装材料中重金属的检测及迁移规律研究[D]. 长沙: 中南林业科技大学, 2015: 46-60
Peng X L. Determination and migration of heavy metals in food paper-plastic composite packaging materials [D]. Changsha: Central South University of Forestry Science and Technology, 2015: 46-60 (in Chinese)

[14] Flora G, Gupta D, Tiwari A. Toxicity of lead: A review with recent updates [J]. Interdisciplinary Toxicology, 2012, 5(2): 47-58

[15] 林珠梅, 朱莉琪, 陈哲. 血铅对儿童发展的影响及其特点[J]. 心理科学进展, 2013, 21(1): 77-85
Lin Z M, Zhu L Q, Chen Z. The effects of blood lead on child development and its characteristics [J]. Advances in Psychological Science, 2013, 21(1): 77-85 (in Chinese)

[16] Pang Y Z, Zhao D M, Zhao S J, et al. Effection of lead poisoning and new castle disease vacine on development of egg yellow feather quail [J]. Animal Husbandry and Feed Science, 2011, 3(2): 29-33, 48

[17] Mongolu S, Sharp P. Acute abdominal pain and constipation due to lead poisoning [J]. Acute Medicine, 2013, 12(4): 224-226

[18] Rosin A. The long-term consequences of exposure to lead [J]. Israel Medical Association Journal, 2009, 11(11): 689-694

[19] 虞敏, 周金鹏, 杜建伟. 乙酸铅对雄性成年小鼠生殖系统的毒性作用[J]. 环境与健康杂志, 2011, 28(4): 318-321
Yu M, Zhou J P, Du J W. Toxic effects of lead acetate on reproductive system in mature male mice [J]. Journal of Environment and Health, 2011, 28(4): 318-321 (in Chinese)

[20] 刘忠慧, 王凤山. 铅神经毒性细胞机制的研究进展[J]. 环境与健康杂志, 2007, 24(2): 122-123
Liu Z H, Wang F S. The progress of study on cell mechanism of lead neurotoxicity [J]. Journal of Environment and Health, 2007, 24(2): 122-123 (in Chinese)

[21] Whitehead L S, Buchanan S D. Childhood lead poisoning: A perpetual environmental justice issue? [J]. Journal of Public Health Management and Practice, 2019, 25: 115-120

[22] 周娇娇, 阙建宇, 于雯雯, 等. Morris 水迷宫检测动物学习记忆水平的方法学[J]. 中国老年学杂志, 2017, 37(24): 6274-6277

[23] Morris R G M. Spatial localization does not depend on presence of local cues [J]. Learning Motivation, 1981, 12: 239-260

[24] 任汝静, 许瀞予, 王敏, 等. 康力康呆灵对 SAMP8 小鼠学习记忆能力及 SOD、MDA 的影响[J]. 中国中医基础医学杂志, 2018, 24(10): 1380-1383, 1397
Ren R J, Xu J Y, Wang M, et al. Effects of Kanglikang Dailing on learning and memory ability and SOD and MDA in SAMP8 mice [J]. Journal of Basic Chinese Medicine, 2018, 24(10): 1380-1383, 1397 (in Chinese)

[25] 中华人民共和国卫生部. 保健食品检验与评价技术规范[S]. 北京: 中华人民共和国卫生部, 2003: 1-63
Ministry of Health of China. Technical Standards for Testing & Assessment of Health Food [S]. Beijing:Ministry of Health of China, 2003: 1-63 (in Chinese)

[26] 司茹, 郑梦思, 邹莉波. 美藤果油辅助改善小鼠记忆的功效[J]. 食品科学, 2017, 38(9): 202-206
Si R, Zheng M S, Zou L B.Effect of *Sacha inchi* oil on improving memory in mice [J]. Food Science, 2017, 38 (9): 202-206 (in Chinese)

[27] Lau K, MeLean W G, Williams D P, et al. Synergistic interactions between commonly used food additives in a developmental neurotoxicity test [J]. Toxicological Science, 2006, 90(1): 178-187

[28] 王晓南, 张瑜, 王婉华, 等. 邻苯二甲酸二乙基己酯(DEHP)污染及其毒性研究进展[J].生态毒理学报, 2017, 12(3): 135-150
Wang X N, Zhang Y, Wang W H, et al. Environmental pollution and toxicity of DEHP [J]. Asian Journal of Ecotoxicology, 2017, 12(3): 135-150 (in Chinese)

[29] Guyton K Z, Chiu W A, Bateson T F, et al. A reexamination of the PPAR alpha activation mode of action as a basis for assessing human cancer risks of environmental contaminants [J]. Environmental Health Perspectives, 2009, 117(11): 1664-1672

[30] Swan S H. Environmental phthalate exposure in relation to reproductive outcomes and other health endpoints in humans [J]. Environmental Research, 2008, 108(2): 177-184

[31] 孙春云. 儿童玩具中环境雌激素的溶出行为研究[D]. 成都: 四川大学, 2005: 21-33
Sun C Y. Study on the migration behavior of environmental estrogens from toys [D]. Chengdu: Sichuan University, 2005: 21-33 (in Chinese)

[32] 刘华. 研究发现 PVC 材料含铅杀手[J]. 包装世界, 2005 (2): 57

[33] Flora G, Gupta D, Tiwari A. Toxicity of lead: A review with recent updates [J]. Interdisciplinary Toxicology, 2012, 5(2): 47-58

[34] 汪慧琼, 黄永平, 刘建文, 等. 铅神经毒性机制及神经保护药物的研究进展[J]. 毒理学杂志, 2015, 29(3): 222-226

[35] 岳茜岚, 霍娇, 曹梦思, 等. 铅的神经行为学毒性研究进展[J]. 食品安全质量检测学报, 2018, 9(14): 3567-3572
Yue Q L, Huo J, Cao M S, et al. Research progress in neurobehavioral toxicity of lead [J]. Journal of Food Safety and Quality, 2018, 9(14): 3567-3572 (in Chinese)

[36] 陆林洁, 蔡洁, 安结然, 等. 甲醛与 DEHP 联合染毒对小鼠学习记忆能力的影响[J]. 中国环境科学, 2017, 37 (12): 4751-4762
Lu L J, Cai J, An J R, et al. Joint toxic effect of formaldehyde and DEHP on learning and memory of mice [J]. China Environmental Science, 2017, 37(12): 4751-4762 (in Chinese)

[37] Xu J, Zhou L T, Wang S Y, et al. Di-(2-ethylhexyl)-phthalate induces glucose metabolic disorder in adolescent rats [J]. Environmental Science and Pollution Research, 2018, 25(4): 112-131

[38] Bliss C I. The toxicity of poisons applied jointly [J].Annals of Applied Biology, 1939, 26: 585-615

[39] Loewe S. The problem of synergism and antagonism of combined drugs [J]. Arzneimittelforschung, 1953, 3(6): 285-290 ◆