

DOI: 10.7524/AJE.1673-5897.20130203001

吴宗凡, 刘兴国, 王高学. 重金属与有机磷农药二元混合物对卤虫联合毒性的评价及预测[J]. 生态毒理学报, 2013, 8(4): 602-608

Wu Z F, Liu X G, Wang G X. Evaluating and Modeling the Toxicity of Binary Mixtures of Heavy Metals and Organophosphate Pesticides to *Artemia salina* [J]. Asian Journal of Ecotoxicology, 2013, 8(4): 602-608(in Chinese)

## 重金属与有机磷农药二元混合物对卤虫联合毒性的评价及预测

吴宗凡<sup>1</sup>, 刘兴国<sup>1,\*</sup>, 王高学<sup>2</sup>

1. 农业部渔业装备与工程技术重点实验室 中国水产科学研究院渔业机械仪器研究所, 上海 200092

2. 动物科技学院 西北农林科技大学, 陕西 712100

**摘要:** 重金属和有机磷农药污染物在水域环境中普遍存在。以卤虫(*Artemia salina*)为受试生物, 采用固定浓度比法, 研究了重金属 Zn、Cd 与辛硫磷和敌百虫 2 种农药以毒性单位比为 4:1、3:2、1:1、2:3 和 1:4 构成的二元混合体系对卤虫的联合毒性, 采用等效线图法判定毒物间的相互作用类型。同时, 基于单一化合物的浓度-效应曲线, 运用浓度加和(CA)和独立作用(IA) 2 种模型对不同配比二元混合物的联合毒性进行预测。结果表明, Zn-Cd 混合物联合毒性随 Zn 比例的增加而增强。低 Zn 比例的混合物(1:4、2:3)表现为拮抗效应, 中、高 Zn 比例的混合物(1:1、3:2 和 4:1)为加和效应。5 种不同配比的有机磷农药混合物均表现为加和效应。金属-农药混合物则均为拮抗作用。模型预测结果表明, CA 能够较好地预测辛硫磷与敌百虫二元混合物的联合毒性, 而 IA 则更适用于对金属-农药混合物联合毒性的预测。以上结果表明, 混合体系中各组分比例是影响联合毒性的因素之一, 毒性评估时应该充分考虑其影响。CA 及 IA 模型同样适用于评估和预测包含相同或完全独立作用机制组分的混合物对非单细胞生物体(如卤虫)的联合毒性。

**关键词:** 联合毒性; 毒性预测; 浓度加和; 独立作用; 卤虫

文章编号: 1673-5897(2013)4-608-07 中图分类号: X171.5 文献标识码: A

## Evaluating and Modeling the Toxicity of Binary Mixtures of Heavy Metals and Organophosphate Pesticides to *Artemia salina*

Wu Zongfan<sup>1</sup>, Liu Xingguo<sup>1,\*</sup>, Wang Gaoxue<sup>2</sup>

1. Key Laboratory of Fishery Equipment and Engineering, Ministry of Agriculture, Fishery Machinery and Instrument Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Shanghai 200092, China

2. College of Animal Science and Technology, Northwest A&F University, Shanxi 712100, China

Received 3 February 2013 accepted 16 April 2013

**Abstract:** Aquatic ecosystems are often suffered with a wide variety of chemical pollutants including heavy metals and pesticides. This study aimed to experimentally evaluate the joint toxicity of binary mixtures (prepared in predefined ratios of 4:1, 3:2, 1:1, 2:3 and 1:4) of heavy metals (Zn and Cd) and organo-

收稿日期: 2013-02-03 录用日期: 2013-04-16

基金项目: "十二五" 国家科技支撑项目"淡水养殖池塘生态工程化调控技术研究/2012BAD25B01"; 公益性行业(农业)科研专项"淡水池塘工程化改造与环境修复技术与示范 201203083"

作者简介: 吴宗凡(1988-), 男, 硕士, 研究方向为毒理学, E-mail: wuzfan6@126.com;

\* 通讯作者(Corresponding author), E-mail: liuxg1223@163.com

phosphate pesticides (phoxim and dipterex) to saltwater crustacean *Artemia salina*. Additionally, the predictability of toxicity of the studied mixtures was investigated by concepts of concentration addition (CA) and independent action (IA), Isobologram method was used to assess the types of interaction. Toxicity modeling was based on the concentration response curves of the single substances. The obtained results revealed that no synergism was found in any of the tested combinations except that the joint toxicity of Zn-Cd mixtures was enhanced with increasing Zn/Cd ratios. With the Zn to Cd ratios increased, the interaction types changed from antagonism at lower Zn to Cd ratios (1:4 and 2:3) to additivity at higher Zn to Cd ratios (1:1, 3:2 and 4:1). Five organophosphate pesticide mixtures showed additive effect, while that of the metal pesticide mixtures were antagonism. In the estimating mixture toxicity, CA accurately described the joint effect of phoxim and dipterex, and IA provided accurate predictions for the mixtures involving metals and organophosphate pesticides. These findings imply that mixture ratios should be taken into account as a factor in mixture toxicity studies. Additionally, CA and IA are reasonable tools for the predictive hazard assessment of mixtures that contain components with similar or completely independent action mechanism against complex organisms such as *A. salina*.

**Keywords:** joint toxicity; toxicity prediction; concentration addition; independent action; *Artemia salina*

传统意义上的毒性评估大多是基于单一化合物而进行的<sup>[1]</sup>。然而,环境中的生物体通常暴露于多组分污染物共存的混合体系,而非简单的单一体系。因此,不仅要研究单一化合物的生物毒性,对混合体系联合毒性的研究,尤其是判定体系毒性是否因为组分间的相互作用而增强(协同作用)、减弱(拮抗作用)或者未受影响(加和作用)同样具有重要的实用价值。在另一方面,用实验方法对环境中污染物的所有混合体系的生物毒性进行测定又是不现实的。因此,基于混合体系中各组分的单一毒性数据,利用数学模型预测联合毒性的方法逐渐发展起来。其中,应用最为广泛的是浓度加和(concentration addition, CA)模型和独立作用(independent action, IA)模型。CA模型适用于相似联合作用,即指混合物中各组分通过相同机制起作用,有相同的作用形式;IA模型则适用于独立联合作用,即指混合物中各组分产生的效应独立于其他的,作用形式也不同<sup>[2]</sup>。

水域环境中普遍存在重金属和有机磷农药污染物。关于它们之间联合毒性的研究也主要集中在重金属之间或者有机磷农药之间,很少有研究涉及金属和农药间的联合效应<sup>[3-4]</sup>。本文采用固定浓度比法,研究了重金属 Zn 和 Cd 与辛硫磷和敌百虫 2 种农药以毒性单位比为 4:1、3:2、1:1、2:3 和 1:4 构成的二元混合体系对卤虫(*Artemia salina*)的联合毒性,了解金属和农药间的相互作用规律。同时,应用 CA 及 IA 预测不同毒性单位比二元混合物的联合毒性,并与实际测定值相比较,以判定模型的预测能力。

## 1 材料与方法(Materials and methods)

### 1.1 主要试剂

ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O (CAS No. 7446-20-0)和 CdCl<sub>2</sub>·2.5 H<sub>2</sub>O (CAS No. 7790-78-5) 2 种重金属化合物均为分析纯,购自上海化学试剂公司。辛硫磷(CAS No. 14816-18-3)和敌百虫(CAS No. 52-68-6) 2 种有机磷农药均为标准品,购自 Chem-Service 公司。分别将重金属化合物和有机磷农药溶于去离子水和 100% 丙酮中,配制得一定浓度的母液,并存储于 4 °C 备用。实验前将各母液用人工海水倍比稀释得到相应浓度的试液。人工海水是将人工海盐(Sigma-Aldrich 公司)溶解于去离子水中配制而得,盐度为 35‰。

### 1.2 受试生物

实验以出膜 30 h 的卤虫无节幼体(II~III 龄)作为受试生物,该龄期的卤虫是检测毒物毒性的最佳龄期<sup>[5]</sup>。受试卤虫无节幼体均由休眠卵(金海湾生物科技有限公司)孵化而得,孵化方法如文献所述<sup>[5]</sup>。

### 1.3 单一毒性实验

实验于 6 孔细胞培养板中进行,每孔注入 10 mL 试液,并随机放入 10 只健康的卤虫。试液浓度根据预实验结果确定,按等对数间距共设成 9 个梯度浓度,并设空白对照及溶剂对照(含 0.1% 丙酮,此为试液中丙酮的最高含量),每个浓度设置 5 个平行。将注入试液并放置卤虫的细胞培养板置于(25 ± 1) °C 恒温培养箱(上海精密仪器仪表公司)进行暴露实验,光暗比为 12 h : 12 h。暴露 24 h 后,在立体显微镜下记录卤虫死亡情况以计算半数致死浓度(LC<sub>50</sub>)。以解剖针触动卤虫,其触角 10 s 内保持

不动为死亡标准。

#### 1.4 联合毒性实验

根据各单一毒物的  $LC_{50}$  值,以毒性单位比为 4:1、3:2、1:1、2:3 和 1:4 的比例将受试毒物两两混合,组成不同配比的二元混合体系。根据预实验结果,按等对数间距设置 9 个浓度梯度,测定各混合体系对卤虫的联合毒性,实验步骤及方法与单一毒性的测定相同。二元混合物的总浓度为 2 个组分浓度之和。

#### 1.5 联合毒性的评价

在水生生物毒理研究中,通常采用浓度加和模型评价混合物的联合效应。等效线图解法<sup>[6-7]</sup>便是这种模型的可视化应用(如图 1)。在图中,二元混合物中的 2 个组分均用毒性单位(TU)表示,各组分的 TU 计算方法如下:

$$TU_A = \frac{C_A}{LC_{50,A}} \quad (1)$$

式中, $TU_A$ 为组分 A 的毒性单位, $LC_{50,A}$ 为单独测试组分 A 时的半数致死浓度( $LC_{50}$ ), $C_A$ 为混合物  $LC_{50}$ 中组分 A 的浓度。 $C_A$ 也等于混合物  $LC_{50}$ 乘以组分 A 所占的比率。

如图 1,以混合物中 2 个组分的 TU 为坐标轴建立坐标系。当毒物单独作用时,TU 为 1。连接 2 个组分单独的 TU 及 95% 置信区间可得到加和带(additivity belt),它表示混合物的加和相互作用<sup>[6-7]</sup>。当不同配比混合物的 95% 置信区间位于加和带右上方时,表示各组分间产生拮抗效应;当混合物 95% 置信区间位于加和带左下方时,表示各组分间产生协同效应;当混合物 95% 置信区间与加和带重叠时,则混合物表现为加和效应<sup>[7]</sup>。

#### 1.6 等效效应比混合物的毒性预测

##### 1.6.1 浓度-效应曲线拟合

应用 Logit<sup>[2]</sup>模型对毒物的观测数据进行非线性拟合,得到浓度-效应曲线。Logit 模型可用如下公式表示:

$$E = 1 / (1 + \exp(-\alpha - \beta \log_{10}(C))) \quad (2)$$

式中, $\alpha$ 和 $\beta$ 为模型的 2 个参数, $E$ 为毒物对卤虫的致死率, $C$ 为毒物的浓度。

##### 1.6.2 预测模型

依据单一化合物的浓度-效应曲线,可以采用 CA 和 IA 模型对等效效应比混合物的联合毒性进行预测。CA 模型<sup>[2]</sup>适用于相似联合作用,即指混合物中各组分通过相同机制起作用,有相同的作用形式,可以用如下公式表示:

$$EC_{x,mix} = (\sum_{i=1}^n \frac{P_i}{EC_{x,i}})^{-1} \quad (3)$$

式中, $EC_{x,mix}$ 为引起  $x\%$  效应的混合物预测总浓度, $EC_{x,i}$ 为组分  $i$  单独引起相同效应( $x\%$ )时的浓度, $P_i$ 为混合物中组分  $i$  的浓度占混合物总浓度的百分比。

IA 模型<sup>[2]</sup>则适用于独立联合作用,即指混合物中各组分产生的效应独立于其他的,作用形式也不同。其公式如下:

$$E(C_{mix}) = 1 - \prod_{i=1}^n [1 - E(C_i)] \quad (4)$$

式中, $E(C_{mix})$ 为包含  $n$  个组分的混合物在浓度为  $C_{mix}$  ( $C_{mix} = C_1 + \dots + C_n$ ) 时所产生的效应, $E(C_i)$ 为混合物中组分  $i$  在浓度为  $C_i$  时单独产生的效应。

#### 1.7 数据处理

采用概率单位法计算 24 h- $LC_{50}$  及其 95% 置信区间<sup>[8]</sup>。应用 SPSS 16.0 对观测数据进行非线性拟合。联合毒性预测及绘图是在 Matlab 7.5 中进行。

## 2 结果(Results)

### 2.1 单一化合物毒性

暴露 24 h 后,空白对照和溶剂对照组中卤虫的存活率均为 100%。重金属 Zn、Cd 及有机磷农药辛硫磷、敌百虫对卤虫的 24 h- $LC_{50}$  及其 95% 置信限分别为:352.73 (324.62~384.60)、150.08 (138.77~161.08)、25.50 (22.88~28.93) 和 139.03 (128.55~150.62)  $mg \cdot L^{-1}$ 。由于 Cd 和敌百虫的 95% 置信限存在重叠,故二者对卤虫的 24 h 急性毒性并不存在显著差异。4 种毒物对卤虫毒性从大到小顺序为:辛硫磷 > 敌百虫  $\approx$  Cd > Zn。

### 2.2 二元混合物联合毒性

如图 1 所示,Zn-Cd 混合物对卤虫的毒性随 Zn 比例的增加而增强。低 Zn 比例的混合物(1:4、2:3)其 95% 置信限位于加和带右上方,表现为拮抗作用;而中、高 Zn 比例的混合物(1:1、3:2、4:1)其 95% 置信限与加和带有重叠,表现为加和效应。5 种配比的辛硫磷-敌百虫混合物均表现为加和效应。金属-农药混合物的 95% 置信限均落在加和带右上方,为拮抗作用。

### 2.3 等效效应比混合物实验观测值与预测值的比较

#### 2.3.1 浓度-效应曲线拟合

用 Logit 模型拟合单一毒物及二元混合物的实验数据,得到非线性浓度-效应曲线。所得曲线参数  $\alpha$  位于 50.651~14.055 之间, $\beta$  位于 14.055~5.473 之间,相关系数( $r$ )值均高于 0.983,均方根误差(RMSE)均低于 0.0649,表明 Logit 模型对所有实验数据拟合度很好。

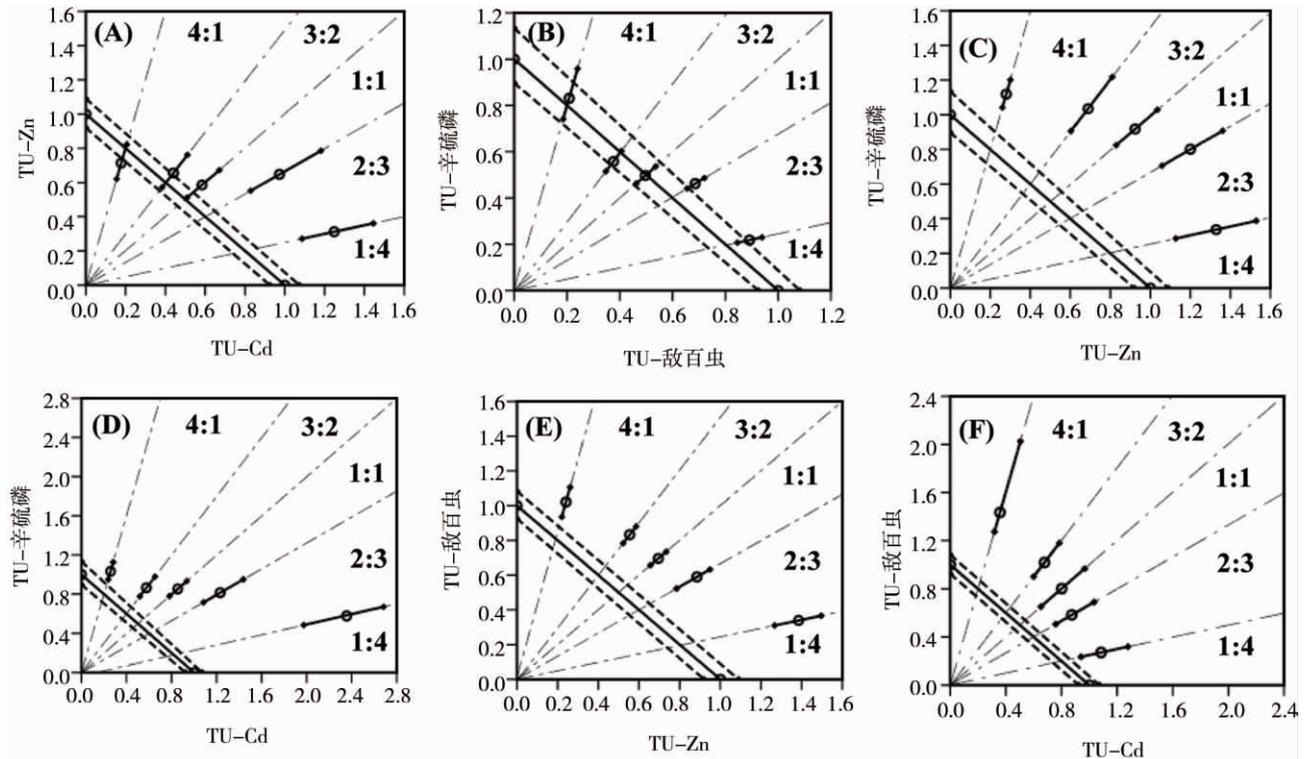


图 1 Zn、Cd、辛硫磷、敌百虫 4 种毒物二元混合物的联合毒性评价结果

注:数据为平均值±95%置信区间( $n = 5$ ),下同,(---)表示加和带

Fig. 1 Evaluation of binary mixture toxicity of Zn, Cd, phoxim and dipterex

Note: data are presented as mean ± 95% confidence interval ( $n = 5$ ), (---) indicates additivity belt.

### 2.3.2 联合毒性预测

应用 CA 及 IA 模型预测 4 种毒物的二元混合物联合毒性,并以预测曲线是否能够落在实验值的 95% 置信区间内来判断模型的预测能力。从图 2 可知,CA 及 IA 对 Zn-Cd 混合物的预测能力随 Zn/Cd 比例的变化而有所不同。IA 适合于预测低 Zn 比例 (1:4、2:3) Zn-Cd 混合物的联合毒性;而对于中、高 Zn 比例 (1:1、3:2、4:1) 的 Zn-Cd 混合物,CA 则更适合。CA 对 5 种不同配比的辛硫磷-敌百虫混合物联合毒性的预测效果均很好。对于金属-农药混合物,其实际的浓度-效应曲线与预测曲线的形状均有所不同,尤其是 Zn-敌百虫混合物的实际曲线较预测曲线更为陡峭,表明毒性增加更为快速。总体而言,IA 模型的预测曲线基本落在实验观测值的 95% 置信区间内,这表明 IA 模型基本适用于对所测定的金属-农药二元混合物联合毒性的预测。

### 3 讨论 (Discussion)

4 种毒物对卤虫的 24 h-LC<sub>50</sub> 值要比其在自然水域环境中被检出的浓度高出 5~6 个数量级<sup>[9]</sup>,并且所有测试的二元混合物都不存在协同效应。然

而,本研究仅仅致力于考察几种毒物在短期内 (24 h) 对卤虫存活情况的影响,基于这些数据的分析仅可作为毒物风险评估的第一步,并不能真实地反映毒物对水生动物长期的、潜在的威胁。几种毒物对水生动物亚致死指标的影响是否存在协同效应也尚待进一步判定。所以,对上述几种污染物的毒性评估要综合考虑其对水生动物长期的、慢性的亚致死效应,此方面研究仍需加强。

研究中发现,Zn-Cd 混合物的联合毒性依赖于各自的配比,表明混合物毒性研究中各组分比例是一个必须考虑的因素。其他学者的研究也发现类似的结果<sup>[3,10-12]</sup>。例如,Otitoloju<sup>[3]</sup>研究了几种重金属对玉黍螺 (*Tympanotonus fuscatus* var *radula*) 的急性毒性,发现随着 Cu 比例的提高,Cd-Cu 联合毒性增强;Wang 等<sup>[11]</sup>也发现 Cu 增强菲醌对费氏弧菌 (*Vibrio fischeri*) 的 60 min 急性毒性。

Zn-Cd 混合物的联合毒性依赖于各自配比的作用机理尚不能完全确定,推测其可能跟活性氧自由

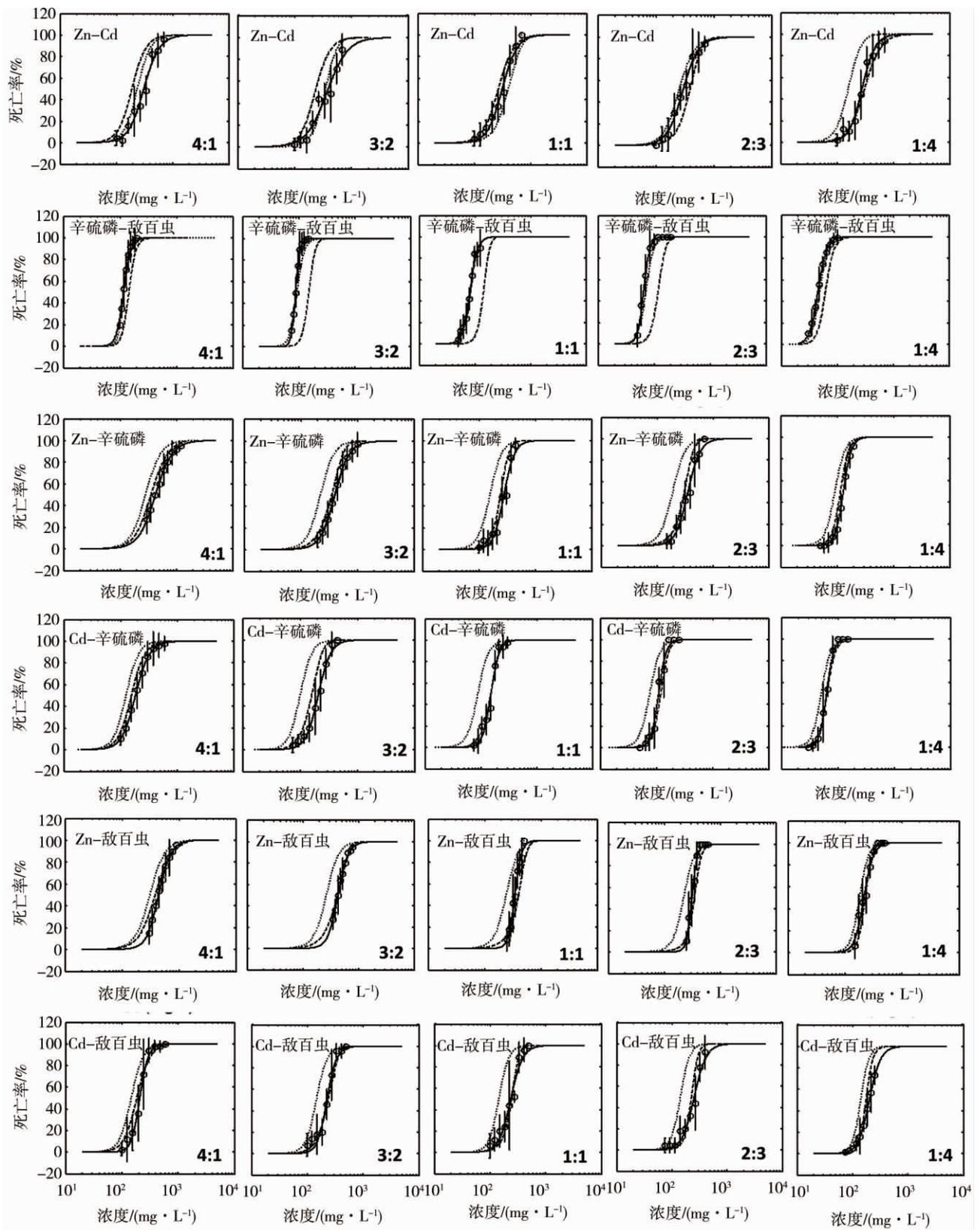


图2 Zn、Cd、辛硫磷、敌百虫4种毒物二元混合物实验观测值与模型预测值

Fig. 2 Observed and predicted toxicity of the binary mixtures of Zn, Cd, phosm and dipterex

基(ROS)的产生有关。有研究表明,重金属 Cd 能够刺激动物<sup>[13]</sup>和细菌<sup>[14]</sup>机体过度产生 ROS 从而引发毒性。金属 Zn 本身是动物体内所必须的微量元素,是构成众多抗氧化酶及 Zn-依赖因子的重要组成部分<sup>[15]</sup>。它能够保护蛋白质的巯基并且阻止体内金属离子与 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 和超氧化物反应形成·OH,从而在体内充当抗氧化剂<sup>[16]</sup>。当卤虫暴露于低 Zn 配比的 Zn-Cd 混合物时,机体内的 Zn<sup>2+</sup> 转移因子、金属硫蛋白及其他的 Zn-结合蛋白能够与吸收的 Zn 离子结合并将其转移<sup>[17]</sup>。低浓度的 Zn 刺激超氧化物歧化酶(SOD)及其他抗氧化酶的激活,发挥抗氧化剂作用,阻止体内过度产生 ROS。所以,低 Zn 配比的 Zn-Cd 混合物表现为拮抗效应。然而,高浓度的 Zn 离子对机体也造成伤害。过量的 Zn 能够通过还原型辅酶Ⅱ(NADPH)-依赖的机制钝化谷胱甘肽还原酶(GR),从而增加氧化型谷胱甘肽/谷胱甘肽(GSSG/GSH)的比率<sup>[18]</sup>。GSH 在清除 ROS 方面具有重要作用,其减少必然会间接导致 ROS 水平增加,从而加强 Cd 对卤虫的毒性。

许多研究成功地证明了 CA 能够准确预测包含相同或相似作用机制组分的混合物的联合毒性,而对于那些包含相对独立作用机制组分的混合物,IA 则更为实用<sup>[19-20]</sup>。然而,也有学者提出,这些研究大多都只是针对单细胞生物进行,由于复杂生物体具有更为复杂的组织结构和致毒机理,因此将这些结论从单细胞生物外推到复杂生物体上并不恰当<sup>[21-22]</sup>。本研究发现,CA 能够准确预测辛硫磷-敌百虫混合物的联合毒性,IA 也基本适用于对金属-有机磷农药混合物联合毒性的预测,这表明在复杂生物(如卤虫)体内,辛硫磷与敌百虫通过相同作用位点、作用机理起作用,符合剂量加合原理(CA);而 2 种金属(Zn、Cd)和 2 种农药(辛硫磷、敌百虫)则通过相对独立的作用机制致毒。此外,CA 及 IA 2 种模型对不同配比 Zn-Cd 混合物联合毒性的预测能力不同,表明在不同配比情况下,Zn-Cd 混合物作用机理有所不同。

通讯作者简介:刘兴国(1965—),男,博士,研究员,主要从事水域生态毒理学、养殖水域环境控制、池塘生态工程等方面的研究。

#### 参考文献:

- [1] Van der Geest H G, Greve G D, Boivin M E, et al. Mixture toxicity of copper and diazinon to larvae of the mayfly (*Ephoron virgo*) judging additivity at different effect levels [J]. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 2000, 19(12): 2900—2905
- [2] Faria M, Lopez M A, Fernandez-Sanjuan M, et al. Comparative toxicity of single and combined mixtures of selected pollutants among larval stages of the native freshwater mussels (*Unio elongatulus*) and the invasive zebra mussel (*Dreissena polymorpha*) [J]. *Science of the Total Environment*, 2010, 408: 2452—2458
- [3] Otitoloju A A. Evaluation of the joint toxicity of binary mixtures of heavy metals against the mangrove periwinkle *Tympanotonus fuscatus* var *radula* (L.) [J]. *Ecotoxicology and Environment Safety*, 2002, 53(3): 404—415
- [4] Xu X, Li Y, Wang Y, et al. Assessment of toxic interactions of heavy metals in multi-component mixtures using sea urchin embryo-larval bioassay [J]. *Toxicology in Vitro*, 2011, 25(1): 294—300
- [5] 陈日明, 魏文志. 卤虫在毒物急性毒性评价中的应用 [J]. *水产养殖*, 2008, 29(4): 38—40
- Chen R M, Wei W Z. Application of brine shrimp in toxicity evaluation of toxicants [J]. *Aquaculture*, 2008, 29(4): 38—40 (in Chinese)
- [6] Koutsaftis A, Aoyama I. Toxicity of four antifouling biocides and their mixtures on the brine shrimp *Artemia salina* [J]. *Science of the Total Environment*, 2007, 387(1—3): 166—174
- [7] Boillot C, Perrodin Y. Joint-action ecotoxicity of binary mixtures of glutaraldehyde and surfactants used in hospitals: Use of the Toxicity Index model and isoblogram representation [J]. *Ecotoxicology and Environment Safety*, 2008, 71(1): 252—259
- [8] 贾春生. 利用 SPSS 软件计算杀虫剂的 LC<sub>50</sub> [J]. *昆虫知识*, 2006, 43(3): 414—417
- Jia C S. Calculating the LC<sub>50</sub> of insecticides with software SPSS [J]. *Chinese Bulletin Entomology*, 2006, 43(3): 414—417 (in Chinese)
- [9] Haynes D, Johnson J E. Organochlorine, heavy metal and polyaromatic hydrocarbon pollutant concentrations in the great barrier reef (Australia) environment: A review [J]. *Marine Pollution Bulletin*, 2000, 41(7—12): 267—278
- [10] 曹维, 陈建孟, 马建义, 等. MTBE 与雌二醇对螺旋鱼腥藻的联合毒性 [J]. *生态毒理学报*, 2007, 2(4): 450—455
- Cao W, Chen J M, Ma J Y, et al. Joint toxicity of MTBE and estradiol to *Anabaena spiroides* [J]. *Asian Journal of Ecotoxicology*, 2007, 2(4): 450—455 (in Chinese)
- [11] Wang W, Lampi M A, Huang X D, et al. Assessment of mixture toxicity of copper, Cd, and phenan-

- threnequinone to the marine bacterium *Vibrio fischeri* [J]. *Environmental Toxicology*, 2009, 24(2): 166–177
- [12] 张瑾, 刘树深. 离子液体与有机磷农药间的毒性相互作用[J]. *生态毒理学报*, 2012, 7(4): 408–414
- Zhang J, Liu S S. Toxicity interaction between ionic liquids and organophosphate pesticides [J]. *Asian Journal of Ecotoxicology*, 2012, 7(4): 408–414 (in Chinese)
- [13] Xie F L, Koziar S A, Lampi M A, et al. Assessment of the toxicity of mixtures of copper, 9,10-phenanthrenequinone, and phenanthrene to *Daphnia magna*: Evidence for a reactive oxygen mechanism [J]. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 2006, 25(2): 613–622
- [14] Achard-Joris M, Moreau J L, Lucas M, et al. Role of metallothioneins in superoxide radical generation during copper redox cycling: Defining the fundamental function of metallothioneins [J]. *Biochimie*, 2007, 89(12): 1474–1488
- [15] Gaither L A, Eide D J. Functional expression of the human hZIP2 zinc transporter [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2000, 275: 5560–5564
- [16] Powell S R. The antioxidant properties of Zn [J]. *Journal of Nutrition*, 2000, 130(5): 1447S–1454S
- [17] Jacob C, Maret W, Vallee B L. Control of Zn transfer between thionein, metallothionein, and Zn proteins [J]. *The Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 1998, 95(7): 3489–3494
- [18] Bishop G M, Dringen R, Robinson S R. Zn stimulates the production of toxic reactive oxygen species (ROS) and inhibits glutathione reductase in astrocytes [J]. *Free Radical Biology and Medicine*, 2007, 42(8): 1222–1230
- [19] Altenburger R, Backhaus T, Boedeker W, et al. Predictability of the toxicity of multiple chemical mixtures to *Vibrio fischeri*: Mixtures composed of similarly acting compounds [J]. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 2000, 19(9): 2341–2347
- [20] Backhaus T, Altenburger R, Boedeker W, et al. Predictability of the toxicity of a multiple mixture of dissimilarly acting chemicals to *Vibrio fischeri* [J]. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 2000, 19(9): 2348–2356
- [21] Barata C, Baird D J, Nogueira A J A, et al. Life-history responses of *Daphnia magna* Straus to binary mixtures of toxic substances: Pharmacological versus ecotoxicological modes of action [J]. *Aquatic Toxicology*, 2007, 84(4): 439–449
- [22] Bellas J. Prediction and assessment of mixture toxicity of compounds in antifouling paints using the sea-urchin embryo-larval bioassay [J]. *Aquatic Toxicology*, 2008, 88(4): 308–315 ◆