

# 甲基汞通过miRNA对人胚胎神经干细胞细胞周期相关基因表达的调控

王新金, 常秀丽, 周志俊

**摘要:** [目的] 通过研究甲基汞对人胚胎神经干细胞miRNA表达的影响, 探讨低剂量甲基汞对神经干细胞细胞周期调控基因的调节作用。[方法] 以0、10、50 nmol/L甲基汞染毒人胚胎神经干细胞24h后, 用MTT法测定甲基汞对细胞活力影响, 应用逆转录多聚酶链反应(RT-PCR)检测甲基汞对细胞周期调控基因(*p16*、*p21*)的mRNA的表达水平影响, 利用实时荧光定量多聚酶链反应技术检测调控*p16*、*p21*的miRNA(miR-24、miR-106a)的表达情况。[结果] 50 nmol/L甲基汞染毒组细胞活力降低为对照组的53.5%, 差异有统计学意义( $P < 0.05$ ); *p16*与*p21*基因的mRNA表达水平随着甲基汞染毒浓度的升高而升高, 差异均有统计学意义( $P < 0.05$ ), 但10 nmol/L与50 nmol/L组的*p16*基因表达差异无统计学意义。miR-24、miR-106a的表达水平随着甲基汞染毒浓度的升高而降低, 差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。[结论] 50 nmol/L的甲基汞可以引起人胚胎神经干细胞增殖抑制, 并可能通过miRNA调节细胞周期调控基因的表达。

**关键词:** 人胚胎神经干细胞; 甲基汞; microRNA; 细胞周期调控基因; 细胞增殖

**Methylmercury Tunes Cell Cycle Regulated Gene Expressions in Human Embryonic Neural Stem Cells through miRNAs** WANG Xin-jin, CHANG Xiu-li, ZHOU Zhi-jun (School of Public Health/Key Lab of Public Health Safety of Ministry of Education/WHO Collaborating Center for Occupational Health, Fudan University, Shanghai 200032, China). Address correspondence to CHANG Xiu-li, E-mail: xlchang@shmu.edu.cn · The authors declare they have no actual or potential competing financial interests.

**Abstract:** [Objective] To investigate the impact on alteration of cell cycle regulated genes induced by low-level methylmercury via the expression of microRNAs of human embryonic neural stem cells. [Methods] After treatment with 0, 10, and 50 nmol/L methylmercury for 24h to human embryonic neural stem cells, cell viability was measured with methyl thiazolyl tetrazolium (MTT) assay. mRNA expressions of cell cycle regulated genes *p16* and *p21* were determined in human embryonic stem cells after the methylmercury exposure by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR). Expressions of miRNA (miR-24 and miR-106a) were determined using quantitative real time polymerase chain reaction (qRT-PCR) assay. [Results] Compared with the control group, the cell viability was significantly reduced by 53.5% in the 50 nmol/L methylmercury treatment group ( $P < 0.05$ ). Compared with the control group, RT-PCR analysis revealed significant methylmercury-induced up-regulations of *p16* and *p21* mRNA expressions ( $P < 0.05$ ), but no difference in *p16* expression level was found between the 10 nmol/L and the 50 nmol/L treatment. The expressions of miR-24 and miR-106a were significantly lower with the increases in methylmercury concentrations ( $P < 0.05$ ). [Conclusion] Methylmercury treatment at 50 nmol/L could restrain the self-renewal ability of neural stem cells and tune cell cycle regulators transcription through altering the expression of miRNAs.

**Key Words:** human embryonic neural stem cell; methylmercury; microRNA; cell cycle regulated gene; cell proliferation

汞天然地存在于地球表面, 它可以通过火山爆发、人为排放等方式释放到空气中。气态汞可随大气

飘移, 沉降后可被水底或土壤中的微生物转化成剧毒的甲基汞<sup>[1]</sup>。人类可通过捕食被甲基汞污染的水产品而吸收甲基汞。甲基汞是已知的神经发育毒物, 体内外研究证实甲基汞可通过胎盘屏障进入中枢神经系统干扰神经干细胞(neural stem cells, NSCs)的增殖、迁移、分化等引起神经发育毒性<sup>[2-4]</sup>。尽管相关法律法规的颁布, 人类的排放有所减少, 但是甲基汞的危害依旧是个重要的公共卫生问题, Rose等<sup>[5]</sup>的研究

DOI: 10.13213/j.cnki.jeom.2015.14788

[基金项目] 国家自然科学基金项目(编号: 81472996)

[作者简介] 王新金(1988—), 女, 硕士生; 研究方向: 神经发育毒性;  
E-mail: 12211020063@fudan.edu.cn

[通信作者] 常秀丽, E-mail: xlchang@shmu.edu.cn

[作者单位] 复旦大学公共卫生学院, 教育部公共卫生安全重点实验室,  
上海 200032

显示, 极低剂量(2.5 nmol/L)的甲基汞可导致 NSCs 细胞周期调控基因 *p16*、*p21* 的表达增高, 并且这种改变可延续到子代细胞。*p16*、*p21* 是已知的细胞周期调控因子<sup>[6]</sup>, 所编码的 p16、p21 蛋白是周期素依赖性激酶(cyclin-dependent kinases, CDKs)的抑制物。不同 CDKs 被抑制将造成细胞周期的阻滞, 进而导致细胞的衰老、凋亡或者死亡。但目前对低剂量甲基汞引起细胞周期调控因子表达异常的可能机制尚待研究。

MicroRNAs(miRNAs)是一类内源性的, 长度约 22 个核苷酸的非编码 RNA, 可通过降解特定的 mRNA 或者抑制蛋白质的翻译进而调控基因的功能<sup>[7-8]</sup>。本研究拟以永生化的人胚胎神经干细胞系——ReNcell CX 细胞为研究对象, 通过观察甲基汞在细胞染毒后对 NSCs 的活力及对 miRNA 表达的影响, 以探讨甲基汞对细胞周期调控基因的可能调控机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 试剂与仪器

甲基汞(分析纯, 美国 Sigma 公司); 四甲基偶氮唑盐(MTT, 美国 Sigma 公司); ReNcell CX 细胞、ReNcell 维持培养基、Accutase 消化酶(美国 Millipore 公司); 人重组表皮生长因子(epidermal growth factor, EGF)、人重组碱性成纤维细胞生长因子(basic fibroblast growth factor, bFGF)(美国 Life Technologies 公司); DMEM/F12 培养基(美国 Gibco 公司); 层黏连蛋白、SYBR Green PCR Master Mix(美国 Invitrogen 公司); Tripure(美国 Roche 公司); 逆转录(RT)试剂盒(美国 Thermo Fisher 公司); PrimeScript TM RT reagent Kit(日本 TAKARA 公司); miR-24、miR-106a、U6 引物试剂盒(锐博生物技术有限公司); Rnase A 贮存液(天根生化科技有限公司); 无 RNA 酶水(碧云天生物技术研究所在); 二甲基亚砜(DMSO)、96 孔板(美国 Costar 公司); 倒置显微镜(型号 CK40, 日本 Olympus 公司); 血细胞计数板、Elx-800 酶标仪(美国 Bio-Tek 公司)。

### 1.2 人胚胎神经干细胞培养

ReNcell CX 细胞购自美国 millipore 公司, 预先用层黏连蛋白包被细胞培养皿, 在维持培养基中加入 bFGF(20 ng/mL)和 EGF(20 ng/mL)制备完全培养基进行 ReNcell CX 细胞的培养<sup>[9]</sup>。

### 1.3 细胞染毒及细胞活力测定(MTT 法)

用 Accutase 酶消化对数生长期的细胞, 重悬细胞

调节细胞密度种板。调整活细胞密度为  $2 \times 10^5$  个/mL, 100  $\mu$ L/孔接种于层黏连蛋白包被的 96 孔板中, 24 h 后吸去培养基, 加入甲基汞染毒液, 并每孔补充完全培养基 100  $\mu$ L。甲基汞染毒液由 DMSO 进行配置, 调整甲基汞的终浓度为 0、10、50 nmol/L, 每组设 3 个复孔。37  $^{\circ}$ C、饱和湿度和 5%CO<sub>2</sub> 培养 20 h 后, 每孔加入 20  $\mu$ L MTT, 继续孵育 4 h, 在酶标仪 490 nm 波长下测定光密度值, 并计算细胞相对存活率(cell viability, CV) =  $(D_{\text{实验组}}/D_{\text{对照组}}) \times 100\%$ 。

### 1.4 mRNA 与 miRNA 的提取与逆转录

用 Accutase 酶消化对数生长期的细胞, 重悬细胞调节细胞密度种板。调整活细胞密度为  $1.75 \times 10^6$  个/mL, 500  $\mu$ L/孔接种于层黏连蛋白包被过的 6 孔板中, 并添加完全培养基至每孔体积 2.5 mL。24 h 后吸去培养基, 加入由 DMSO 配置的甲基汞染毒液, 调整甲基汞的终浓度为 0、10、50 nmol/L, 每组设 3 个复孔。培养 24 h 后, 用 Tripure 一步法提取总 RNA。取 2  $\mu$ g 总 RNA 按 RT-PCR 试剂盒逆转录得到 cDNA, 逆转录的反应程序为: 42  $^{\circ}$ C 60 min; 70  $^{\circ}$ C 10 min 50  $\mu$ L。miRNA 试剂盒由广州锐博生物技术有限公司提供, miRNA 的逆转录通过使用 PrimeScript TM RT reagent Kit, 取 500 ng 总 RNA、100 nmol/L 的 miRNA 茎环引物按照试剂盒说明书进行逆转录, 逆转录的反应程序为: 42  $^{\circ}$ C 60 min; 85  $^{\circ}$ C 5 s, 反应体系为 10  $\mu$ L。

### 1.5 逆转录多聚酶链反应(RT-PCR)

取 1  $\mu$ L 逆转录得到的 cDNA 进行 PCR 扩增, *p16*、*p21* 的 RT-PCR 选择  $\beta$ -actin 为内参基因, 目的基因引物序列通过 Primer Premier 5.0 设计由上海生工生物工程有限公司合成, 引物序列为  $\beta$ -actin 正向: CACGATGGAGGGGCCGACTCATC; 反向: TAAAGACCTCTATGCCAACACAGT; *p16* 正向: CCAGAAGTGAAGCCAAGGAG; 反向: GTGCGGTATTTGCGGTATCT; *p21* 正向: ACACGCTCCCAGACGTAGTT; 反向: AGCAAAGTATGCCGTCGTCT。扩增条件为: 94  $^{\circ}$ C 预变性 3 min, 94  $^{\circ}$ C 变性 30 s, 55  $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72  $^{\circ}$ C 延伸 1 min, 共 30 个循环。取扩增 5  $\mu$ L 进行琼脂糖凝胶电泳, 然后经凝胶成像仪分析。

### 1.6 实时荧光定量 PCR(qPCR)

取 1  $\mu$ L 逆转录得到的 miRNA cDNA 进行 qPCR 扩增, miR-24 与 miR-106a 的 qPCR 选择 U6 作为内参基因, 引物浓度为 200 nmol/L, 引物试剂盒来自广州锐博生物技术有限公司。融解曲线鉴定产物特异性, 每个

样品重复测定3次。反应体系如下: SYBR Green Mix 5  $\mu$ L, 上下游引物各 0.5  $\mu$ L, cDNA 1  $\mu$ L, 水 3  $\mu$ L。扩增条件为 95  $^{\circ}$ C 预变性 10 min, 95  $^{\circ}$ C 变性 15 s, 60  $^{\circ}$ C 退火延伸 1 min, 共 40 个循环。记录每个反应管中荧光信号到达设定的阈值时所经历的循环数即 Ct 值,  $2^{-(\Delta\Delta Ct)}$  法计算相对表达量。

### 1.7 统计分析

用 SPSS 16.0 对实验结果进行单因素方差分析和 LSD-*t* 法检验。实验数据用  $\bar{x} \pm s$  表示, 检验水准  $\alpha=0.05$ 。

## 2 结果

### 2.1 细胞活力

不同浓度甲基汞染毒处理细胞 24h 后, 染毒浓度为 10 nmol/L 时, ReNcell CX 细胞活力为对照组的 95.76%, 差异无统计学意义。当染毒浓度升高为 50 nmol/L 时, 细胞活力出现明显的抑制作用, 仅为对照组的 53.50% ( $P<0.05$ ), 且与染毒浓度为 10 nmol/L 组比较, 差异有统计学意义 ( $P<0.05$ )。见表 1。

表 1 甲基汞染毒 24h 后 ReNcell CX 细胞的活力

甲基汞浓度 (nmol/L)	细胞活力
0	100.00 $\pm$ 2.14
10	95.76 $\pm$ 2.47
50	53.50 $\pm$ 1.99**

[注]\*: 与对照组相比,  $P<0.05$ 。#: 与 10 nmol/L 组相比,  $P<0.05$ 。

### 2.2 *p16*、*p21* mRNA 表达的影响

ReNcell CX 细胞染毒 24h 后, 染毒浓度为 10 nmol/L 时, 细胞内 *p16* mRNA 表达水平上升, 为对照组的 124%; 浓度为 50 nmol/L 时为对照组的 130%, 差异均有统计学意义 ( $P<0.05$ )。甲基汞在 10 nmol/L 时细胞内 *p21* mRNA 表达水平上升, 为对照组的 110%; 浓度为 50 nmol/L 时为对照组的 120%, 且 50 nmol/L 组细胞内 *p21* mRNA 表达水平明显高于 10 nmol/L 组, 差异均有统计学意义 ( $P<0.05$ )。见表 2。

表 2 甲基汞染毒 24h 后 ReNcell CX 细胞中 *p16*、*p21* 的表达水平

甲基汞浓度 (nmol/L)	<i>p16</i>	<i>p21</i>
0	1.00 $\pm$ 0.04	1.00 $\pm$ 0.02
10	1.24 $\pm$ 0.10*	1.10 $\pm$ 0.05*
50	1.30 $\pm$ 0.03*	1.20 $\pm$ 0.01**

[注]\*: 与对照组相比,  $P<0.05$ 。#: 与 10 nmol/L 组相比,  $P<0.05$ 。

### 2.3 miR-24、miR-106a 的表达

甲基汞在 10 nmol/L 时细胞内 miR-24 表达水平下降, 为对照组的 84%; 浓度为 50 nmol/L 时为对照组的 18%, 同时 50 nmol/L 组细胞内 miR-24 表达水平明显低于 10 nmol/L 组, 差异均有统计学意义 ( $P<0.05$ )。甲基汞在 10 nmol/L 时细胞内 miR-106a 表达水平下降, 为对照组的 46%; 浓度为 50 nmol/L 时为对照组的 4%, 同时 50 nmol/L 组细胞内 miR-106a 表达水平明显低于 10 nmol/L 组, 差异均有统计学意义 ( $P<0.05$ )。见表 3。

表 3 甲基汞染毒 24h 后 ReNcell CX 细胞中 miR-24 与 miR-106a 的表达水平

甲基汞浓度 (nmol/L)	miR-24	miR-106a
0	1.00 $\pm$ 0.07	1.00 $\pm$ 0.17
10	0.84 $\pm$ 0.07*	0.46 $\pm$ 0.14*
50	0.18 $\pm$ 0.02**	0.04 $\pm$ 0.02**

[注]\*: 与对照组相比,  $P<0.05$ 。#: 与 10 nmol/L 组相比,  $P<0.05$ 。

## 3 讨论

自 20 世纪 60 年代日本水俣病得到广泛关注以来, 甲基汞污染一直是个重要的公共卫生问题<sup>[10]</sup>, 甲基汞可通过水生物的富集作用最终被人类捕食而影响人类的健康。一直以来普遍认为食用鱼、贝类水产品是造成人体甲基汞暴露的主要途径, 为了保护人群健康, 美国 EPA、欧盟 EFSA 等组织分别对人体可能承受的摄入量做出了限定范围<sup>[11]</sup>, 各个国家颁布了相关的法律法规, 但目前尚未对非水产品中甲基汞含量进行相关的规定。近年来研究发现, 我国部分地区非水产品(大米、玉米等)的甲基汞含量明显高于其他地区<sup>[12]</sup>。食用被甲基汞污染的食物将对人类健康产生危害。本研究通过对低浓度甲基汞的神经发育毒性研究, 以进一步阐释甲基汞神经毒性损伤机制以及寻找高通量生物标志物用于发现潜在神经毒物。

本研究观察了低浓度(10 nmol/L 与 50 nmol/L)甲基汞对 ReNcell CX 细胞的影响, 浓度低于 1998 年北欧人群研究对照组脐带血中的甲基汞含量 11.9  $\mu$ g/L<sup>[13]</sup>。MTT 实验结果显示甲基汞为 50 nmol/L 时即可抑制 ReNcell CX 细胞的活力并明显低于 10 nmol/L 组。同时, 实验结果发现甲基汞染毒后, *p16*、*p21* mRNA 表达水平都有不同程度的升高, 该实验结果与 Rose 等<sup>[5]</sup>的研究结果相一致。

已有大量研究证实 miRNA 调控着人类生长、发育、疾病和肿瘤, 并且已有一部分的 miRNA 作为生物

标志应用于临床疾病的诊断或筛查<sup>[8]</sup>。近年来研究发现 miRNA 参与神经细胞的增殖与分化、迁移, 突触的形成等神经系统发生发展的多个过程<sup>[14-15]</sup>。Pallocca 等<sup>[16]</sup>采用甲基汞染毒的 NT2 细胞系, 研究发现与神经发生发展相关的 miRNA (e.g. let-7, miR-125b, miR-302b 等) 表达异常。Fineberg 等<sup>[17]</sup>研究发现 miR-34a 调控神经前体细胞分化相关基因 *Numb1* 的表达。通过文献查找和软件的筛查, 我们发现 miR-24 参与细胞周期的调控作用, 可特异地结合在 *p16* 的 3'-UTR 区而抑制其表达以促进肿瘤细胞的增殖<sup>[18]</sup>; miR-106a 能够抑制 *p21* 的表达及细胞的衰老<sup>[19-20]</sup>。本研究通过低浓度甲基汞染毒后检测 miR-24, miR106a 的表达情况以探讨 miRNA 参与甲基汞调控细胞周期相关基因表达的影响。实时荧光定量 PCR 结果显示, 与对照组相比, 甲基汞染毒的细胞中 miR-24、miR-106a 均有不同程度的下降; 在 10 nmol/L 时, 细胞活力尚未出现改变, miRNA 的表达则出现降低, 且甲基汞为 50 nmol/L 组明显低于 10 nmol/L 组。MiRNA 的表达水平下降的同时 *p16*、*p21* mRNA 的表达水平升高。结果提示甲基汞可能通过抑制 miRNA 的表达, 上调细胞周期调控基因 *p16* 和 *p21* 的表达, 进而影响细胞周期, 导致细胞周期阻滞而引起细胞衰老<sup>[5]</sup>。

综上所述, 低浓度的甲基汞可引起 NSCs 活力受到抑制。随着剂量增加, 细胞周期调控因子基因表达水平不同程度的升高, 目标 miRNA 表达水平分别不同程度的降低。MiRNA 表达水平在细胞活力尚未明显改变剂量时即出现变化, 因此我们认为 miRNA 能够更加灵敏地反应甲基汞对细胞毒性的影响。因此, 我们初步认为 miRNA 可作为潜在的生物标志, 用于检测和监测低浓度神经发育毒物, 具有重要的公共卫生学意义, 但是应用于实际还有待人群流行病学研究进一步验证。

·作者声明本文无实际或潜在的利益冲突。

## 参考文献

- [1] Tamm C, Duckworth J, Hermanson O, et al. High susceptibility of neural stem cells to methylmercury toxicity: effects on cell survival and neuronal differentiation[J]. *J Neurochem*, 2006, 97(1): 69-78.
- [2] Atchison W D, Hare M F. Mechanisms of methylmercury-induced neurotoxicity[J]. *Faseb J*, 1994, 8(9): 622-629.
- [3] Johansson C, Castoldi A F, Onishchenko N, et al. Neurobehavioural and Molecular Changes Induced by Methylmercury Exposure During Development[J]. *Neurotox Res*, 2007, 11(3/4): 241-260.
- [4] Farina M, Rocha J B, Aschner M. Mechanisms of methylmercury-induced neurotoxicity: evidence from experimental studies[J]. *Life Sci*, 2011, 89(15/16): 555-563.
- [5] Bose R, Onishchenko N, Edoff K, et al. Inherited effects of low-dose exposure to methylmercury in neural stem cells[J]. *Toxicol Sci*, 2012, 130(2): 383-390.
- [6] Paik J H, Jeon Y K, Park S S, et al. Expression and prognostic implications of cell cycle regulatory molecules, p16, p21, p27, p14 and p53 in germinal centre and non-germinal centre B-like diffuse large B-cell lymphomas[J]. *Histopathology*, 2005, 47(3): 281-291.
- [7] Lewis B P, Shih I H, Jones-Rhoades M W, et al. Prediction of Mammalian MicroRNA Targets[J]. *Cell*, 2003, 115(7): 787-798.
- [8] Etheridge A, Lee I, Hood L, et al. Extracellular microRNA: A new source of biomarkers[J]. *Mutat Res*, 2011, 717(1/2): 85-90.
- [9] 窦婷婷, 常秀丽, 吕文, 等. 百草枯对人胚胎神经干细胞分化过程中 Wnt 通路分子表达的影响[J]. *环境与职业医学*, 2013, 30(6): 411-415.
- [10] Grandjean P, Landrigan P J. Developmental neurotoxicity of industrial chemicals[J]. *Lancet*, 2006, 368(9553): 2167-2178.
- [11] Pirrone N, Aas W, Cinnirella S, et al. Toward the next generation of air quality monitoring: Mercury[J]. *Atmos Environ*, 2013, 80: 599-611.
- [12] 武晓燕, 战景明, 林海鹏, 等. 非水产品类食物中甲基汞含量及其分析方法概述[J]. *环境与职业医学*, 2014, 31(11): 887-890.
- [13] Grandjean P, Weihe P, White R F, et al. Cognitive Performance of Children Prenatally Exposed to "Safe" Level of Methylmercury[J]. *Environ Res*, 1998, 77(2): 165-172.
- [14] Motti D, Bixby J L, Lemmon V P. MicroRNAs and neuronal development[J]. *Semin Fetal Neonatal Med*, 2012, 17(6): 347-352.
- [15] Meza-Sosa K F, Valle-García D, Pedraza-Alva G, et al. Role of microRNAs in central nervous system development and pathology[J]. *J Neurosci Res*, 2012, 90(1): 1-12.
- [16] Pallocca G, Fabbri M, Sacco M G, et al. miRNA expression

- profiling in a human stem cell-based model as a tool for developmental neurotoxicity testing[J]. Cell Biol Toxicol, 2013, 29(4): 239-257.
- [17] Fineberg SK, Datta P, Stein CS, et al. MiR-34a represses Numbl in murine neural progenitor cells and antagonizes neuronal differentiation[J]. Plos One, 2012, 7(6): e38562.
- [18] Giglio S, Cirombella R, Amodeo R, et al. MicroRNA miR-24 promotes cell proliferation by targeting the CDKs inhibitors p27Kip1 and p16INK4a[J]. J Cell Physiol, 2013, 228(10): 2015-2023.
- [19] Li G, Luna C, Qiu J, et al. Alterations in microRNA expression in stress-induced cellular senescence[J]. Mech Ageing Dev, 2009, 130(11/12): 731-741.
- [20] Hackl M, Brunner S, Fortschegger K, et al. miR-17, miR-19b, miR-20a, and miR-106a are down-regulated in human aging[J]. Aging Cell, 2010, 9(2): 291-296.
- (收稿日期: 2014-12-26)  
(英文编辑: 汪源; 编辑: 王晓宇; 校对: 郑轻舟)
- 
- (上接第454页)
- [3] 胡飞飞, 周倩倩, 张正东, 等. 某铅酸蓄电池企业周围土壤铅污染水平及儿童健康状况[J]. 环境与职业医学, 2013, 30(1): 10-14.
- [4] 中华人民共和国卫生部. WS/T 18—1996 尿中铅的石墨炉原子吸收光谱测定方法[S]. 北京: 中国标准出版社, 1996.
- [5] 杜炎. 铅对脑发育的影响及与智力关系分析[J]. 广东微量元素科学, 2001, 8(9): 56-57.
- [6] 金海丽. 铅毒性的研究进展[J]. 广东微量元素科学, 2004, 11(10): 9-14.
- [7] 郝守进, 茹炳根, 戚其平, 等. 铅的毒性机理及其解铅毒的研究进展[J]. 医学研究通讯, 2001, 30(3): 32-35.
- [8] 郜振彦. 铅对儿童健康的影响[J]. 中国儿童保健杂志, 2013, 21(10): 1058-1060.
- [9] 聂静, 段小丽, 王红梅, 等. 儿童铅暴露健康风险防范对策国内外概况[J]. 环境与可持续发展, 2013, 38(5): 60-63.
- [10] 张建军, 吴丽萍, 罗家逸, 等. 汕头市7~13岁小学生尿铅的参考值及多因素分析[J]. 卫生研究, 2008, 37(6): 663-665.
- [11] 孟菊华. 3016名儿童血铅状况及其影响因素分析[J]. 中国民康医学, 2014, 26(4): 105-106.
- [12] 高代全, 张书岭. 低浓度铅对儿童健康的影响[J]. 微量元素与健康研究, 2001, 18(1): 76.
- [13] 曹秀珍, 曾婧. 我国食品中铅污染状况及其危害[J]. 公共卫生与预防医学, 2014, 25(6): 77-79.
- [14] 蒋玉艳, 刘展华, 程恒怡, 等. 动物性食品铅污染连续监测与评价[J]. 中国卫生检验杂志, 2014, 24(24): 3581-3583.
- [15] 唐晓璇, 李双, 王晓华, 等. 膨化食品给儿童带来的“铅中毒”[J]. 山东食品发酵, 2014(3): 49-52.
- [16] 张领弟, 林春丽, 杨增, 等. 吸烟过程香烟中铅和镉挥发性的研究[J]. 中国卫生检验杂志, 2001, 11(5): 520-521.
- [17] 赵薇, Markowitz M, Clement I, 等. 补钙对中度铅中毒儿童的治疗效果: 随机双盲临床对照研究[J]. 中华儿科杂志, 1998, 36(3): 146-147.
- [18] 徐玉霞, 卢静鸣, 丛冕. 多种营养素对铅中毒儿童治疗效果的比较[J]. 中国现代医学杂志, 2004, 14(5): 129, 141.
- [19] 黄金祥. 铅中毒的实验室检查指标[J]. 中国医刊, 2000, 35(7): 12-14.
- (收稿日期: 2014-10-15)  
(英文编辑: 汪源; 编辑: 洪琪; 校对: 王晓宇)