

环境污染物对人体生物有效性测定的胃肠模拟研究现状

张东平, 余应新*, 张帆, 王德庆, 吴明红, 盛国英, 傅家谟

上海大学环境与化学工程学院环境污染与健康研究所, 上海 200072;

上海大学环境与化学工程学院上海射线应用研究所, 上海 200444;

中国科学院广州地球化学研究所, 有机地球化学国家重点实验室, 广东省环境资源利用与保护重点实验室, 广州 510640

* 联系人, E-mail: yuyingxin@staff.shu.edu.cn

2008-05-28 收稿, 2008-09-17 接受

国家重点基础研究发展计划(批准号: 2008CB418205)、国家自然科学基金(批准号: 20807026)和上海市高校优秀青年教师后备人选项目资助

摘要 环境污染物对人体健康产生了巨大的危害, 污染物的生物利用度是人体健康风险评估中的关键因子。本文系统介绍了模拟胃肠消化系统测定污染物对人体生物有效性的实验方法、主要控制条件、影响生物有效性的因素及其在健康风险评估研究中的应用。同时对其在开展有机污染物的生物有效性及其代谢研究、Caco-2 细胞在该类研究中的应用以及体外模拟方法的验证方面进行了展望。

关键词

体外实验

胃肠道

生物有效性

健康风险评价

全球范围内的环境污染对人体健康的危害已受到越来越多的关注, 由化学物质引起的癌症约占各种引发因素的 90%。致癌化学物中有相当一部分是环境污染物, 如持久性有机污染物(POPs)、重金属等, 这些污染物主要通过食物链、经口的无意摄入(如儿童玩耍玩具后将手放入口内)、呼吸系统及体表接触等途径进入人体。从口摄入的污染物经口腔、食道、胃、小肠、大肠被人体所消化、吸收、转化或排出体外, 小肠是物质吸收的主要场所, 被小肠吸收的物质进入肝脏最终进入人体内循环, 这些污染物及其代谢产物在人体内通过蓄积、代谢和排泄三种方式进行迁移转化。为了评估特定剂量的污染物对人体造成损害的可能性及其程度大小, 常采用人体健康风险来描述人体暴露于污染物后, 出现不良健康效应的特征。在评价污染物对人体的健康风险时, 污染物对人体的生物利用度(bioavailability)是这一评估过程中最为关键的因子。

在人体健康风险评价中, 生物利用度和生物有效性(bioaccessibility)是两个常用的评估因子, 生物利用度的定义在国际学者之间有一定的细微差别^[1~3]。本文采用英国环保署使用的定义^[1], 即生物利用度分为绝对生物利用度(absolute bioavailability)和

相对生物利用度(relative bioavailability), 绝对生物利用度是指进入人体后能够通过消化道吸收最终到达血液或淋巴组织内(即进入人体内循环)的污染物占摄入总量的比例, 简称生物利用度; 相对生物利用度是指污染物的不同形态之间, 或同一污染物存在于不同基质之间的绝对生物利用度之间的相对比值。生物有效性是指污染物在胃肠道消化过程中从基质(如土壤、食物等)释放到胃肠液中的量与总量的比值, 表示了基质中污染物能被人体吸收的相对量, 也是人体可能吸收的最大量, 也有国内学者称为生物可给性。生物利用度测定一般通过动物或人体的活体实验(*in vivo*)得到, 但实验周期长、费用高, 对于污染物的人体研究存在风险, 并带来伦理方面的问题。由于污染物的生物有效性与其生物利用度之间存在一定的相关性, 且可以通过体外实验(*in vitro*, 或称模拟实验)得到。通过模拟人体消化系统(口腔、食道、胃、小肠、大肠等各种消化器官), 采用与人体生理条件一致或相接近的人工合成消化液(唾液、胃液、小肠液等)来浸提不同基质中的污染物, 测定其溶出量, 分析计算污染物在人体消化系统内的生物有效性, 研究各种污染物在模拟人体内的迁移转化过程和可吸收程度, 再通过活体实验的验证分析, 建立污染物对

人体生物利用度的评估体系,用于人体健康风险评估.由于体外实验的分析时间短、实验费用低廉、结果重现性好、易于复杂实验的简单化设计,并适合大批量样品的快速测定,因此胃肠系统的体外模拟实验成为一种非常有效的评估污染物生物有效性的方法,且方法学上日趋成熟.目前受到国外许多研究工作者的重视^[4~11],而我国在这方面的研究才刚刚起步^[12~19].

1 胃肠模拟方法

1.1 模拟方法及其应用

环境中污染物对人体的生物有效性胃肠体外实验始于营养学研究食物中铁元素对人体的生物有效性^[20],然后应用到环境研究中,从重金属离子生物有效性测定逐渐应用到有机污染物对人体生物有效性测定和对污染物的暴露风险评估研究方面.最初是采用简单的化学浸提法(chemical extraction test),即采用酸性溶液浸提重金属离子^[21],使用有机试剂提取有机污染物^[22],如欧洲玩具安全标准(European standard for safety of toys, EN71-3:1994+A1:2000),即采用pH值为1.0~1.5的盐酸溶液模拟胃液,测定玩具材料中8种可溶性元素(锑、砷、钡、镉、铬、铅、汞、硒)的生物有效性.这些方法尽管比较简单易行,但与人体消化系统的生理条件有很大的差别,得到的生物有效性数值与人的实际状况相差甚大.在此基础上逐渐发展到基于人体胃肠生理学环境的胃肠道模拟法(gastro or gastrointestinal analogue test).目前国际上有十多种胃肠模拟方法,下面就国内外比较成熟的、基于人体胃肠生理学环境的胃肠系统体外模拟方法及其应用作一介绍,并进行了简要比较(表1).

(1) 生理原理提取法(PBET). PBET(the physiologically based extraction test)方法最先由Ruby等人^[4]提出,在模拟胃时,加入胃蛋白酶和各种有机酸,在模拟小肠时则加入胆汁和胰酶,使得实验条件较化学浸提法更接近人体真实的胃肠生理条件.该方法已对土壤中金属离子的生物有效性开展了广泛的研究^[23~26],成效显著.与动物活体实验结果比较,该方法对铅的结果较好,对砷则较差,适于测定土壤中铅的生物有效性^[21].另外,研究者对该法进行改进,并对土壤中二噁英(PCDDs)的生物有效性做了一定研究^[27~29].除了土壤样品外,研究者还采用该方法研究了道路降尘^[30]、庭院降尘^[31]、汽车净化尾气^[30]以及

蔬菜^[32]中金属离子对人体的生物有效性.在我国,研究者采用该方法研究了环境土壤样品中铅、砷、多环芳烃(PAHs)等物质对人体的生物有效性,并进行了风险评估^[13~15,18,33,34].

(2) Rodriguez体外胃肠法(IVG). 由于PBET方法用于砷的生物有效性时,与动物活体实验数据相关性较差,因此Rodriguez等人^[5]建立了IVG(*in-vitro* gastrointestinal method)方法用于对土壤中砷的生物有效性测定,并展开了深入的研究^[35~37].该方法与PBET的不同之处在于胃消化液中加入氯化钠,不含有机酸,胃肠的pH值较PBET法低,并在模拟过程加入作为食物成分的生面团.该方法对于土壤中砷和镉的生物有效性数据与动物活体实验的生物利用度数据的相关性较好,砷(胃 $R^2=0.83$,小肠 $R^2=0.82$)、镉(胃 $R^2=0.86$,小肠 $R^2=0.80$),而铅(胃 $R^2=0.76$,小肠 $R^2=0.56$)的结果较差^[5,7,38].

(3) 生物有效性简化提取法(SBET). SBET(simplified bioaccessibility exaction test)是Medlin等人发展起来专门用于研究土壤中铅的生物有效性的方法^[39~43].由于铅在中性环境下即形成沉淀,小肠环境的pH值约为7.0,因此SBET只模拟胃环境而不模拟小肠等其他消化道器官,得到的生物有效性数值较其他方法要高.由于该方法只有一个胃消化过程,便于大批样品的分析,且与采用动物活体实验(幼鼠和幼猪)取得的生物利用度数值相关性较好.对于其他金属离子和有机污染物的生物有效性测定,该模拟方法则显得太过简单,且得到的生物有效性数值与动物活体实验的相关性较差,较少采用^[6,44].Wang等人^[17]利用该方法研究了12个路侧土壤样品中多种金属(As, Pb, Cu, Zn, Ni, Co, Cr)对人体的生物有效性,发现Pb的生物有效性最高,达到了71.7%,Cr最小,只有5.6%.

(4) 荷兰公共卫生与环境国家研究院法(RIVM). 这是荷兰公共卫生与环境国家研究院开发出的一种方法,因此以该院荷兰语名称(Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieu, RIVM)命名.与前面三种模拟方法相比,该方法增加了对口腔的模拟,并且对胃和小肠采用了更低的pH值(胃中pH为1.1,小肠中pH为5.5)^[6],不仅可用于土壤中金属离子的生物有效性测定,也可用于有机物污染物的测定^[45~47].此外,Oomen等人^[48,49]利用Caco-2细胞单层模拟了小肠上皮细胞对于食糜中的有效态重金属的跨膜吸收

表 1 胃肠模拟方法及其应用比较

模拟方法	PBET	IVG	SBET	RIVM	MB& SR	DIN	TIM	SHIME
原理	基于人体生理学	基于人体生理学	人体生理机能的简化	与人体生理机能相符	基于人体生理学	与人体生理机能相符	动态模拟人体生理机能	动态模拟人体生理机能
模拟器官	胃、小肠	胃、小肠	胃	口腔、胃、小肠	口腔、胃、小肠	口腔(可选)、胃、小肠	胃、小肠(十二指肠、空肠、回肠)	胃、小肠、大肠
主要污染物	Pb, As, Cd, Pt, PAHs, PCDDs	Pb, As, Cd	P, As, C, Zn, N, Co, Cr	Pb, As, Cd, PCBs, 林丹	Pb, As, Cd, Cr, PCDDs	Pb, As, Cd, PAHs, PCBs	Pb, As, Cd, PAHs	Pb, As, Cd, PAHs
固液比	1:100	1:150	1:100	1:15(口腔) 1:37.5(胃) 1:97.5(小肠)	1:160(口腔) 1:2160(胃) 1:4770(小肠)	1:50(胃) 1:100(小肠)	1:30(胃) 1:51(小肠)	1:100(胃) 1:160(小肠)
混和方式	垂直混和	氦气鼓泡	氦气鼓泡	垂直混和	振荡	搅拌	蠕动	转子搅拌
温度/	37	37	37	37	37	37	37	37
口腔模拟	体积/mL 主要组分 pH 停留时间	— — — —	— — — —	— — — —	9 黏液素, 尿素, 淀粉酶, 无机盐 6.5 5 min	8 黏液素, 尿素, 无机盐 5.5 5 s	— — — —	— — — —
胃模拟	体积/mL 主要组分 PH 停留时间/h	40 胃蛋白酶 0.1%, 有机盐 2.0 1	600 胃蛋白酶 1%, 氯化钠 8.8% 1.8 1	— 0.4 mol/L 氨基乙酸 1.5 1	13.5 胃蛋白酶 0.1%, 黏液素 0.3%, 牛血清蛋白 0.1%, 无机盐 1.1 2	100 胃蛋白酶 0.3%, 氯化钠 2% 1.4±0.2 2	100 胃蛋白酶 1%, 黏液素 3%, 无机盐 2.0 2	250 胃蛋白酶 0.2%, 酶, 无机盐 从 5.0 降至 3.0 1.5
小肠模拟	体积/mL 主要组分 pH 停留时间/h	40 胰液素 0.02%, 胆汁 0.07% 7.0 1~3	600 胰液素 0.04%, 胆汁 0.4% 5.5 1	— — — —	36 胰液素 0.3%, 胆汁 0.6%, 牛血清蛋白 2.8%, 酶, 无机盐 5.5 2	100 0.2 mol/L 碳酸氢钠 6.5 4	100 胰液素 0.9%, 胆汁 0.9%, 胰岛素 0.3%, 无机盐 7.5 6	210 胰液素 10%, 胆汁 4%, 胰岛素 0.2%, 无机盐 6.5~7.2 6
基质	土壤、尾矿、蔬菜	土壤	土壤	土壤	土壤	土壤	土壤	土壤、尾矿、蔬菜
食物	不加	可选	不加	可选	不加	可选	加	可选
验证	幼猪、猴子 (Pb, As)	幼猪(As)	幼猪(Pb)	未验证	未验证	幼猪	未验证	未验证

过程, 结果表明释放到胃肠液中即具有生物有效性的铅, 只有其中的一部分可以通过小肠上皮细胞进入人体内循环; 食糜中自由态的铅含量很低, 而不稳定形态铅(如磷酸铅和铅的胆汁络合物)解离出的铅离子, 是通过小肠上皮细胞被吸收的铅的主要来源。

(5) 质量平衡与回收土壤法(MB & SR). MB & SR(mass balance & soil recapture method)方法是由美国药典中测定药物在胃肠道内的释放率方法发展而

来, 其胃肠模拟液参照美国药典USP (1990)中胃肠模拟液配方配制^[50], 该方法与RIVM方法的类似之处是样品在进行胃液消化前增加了口腔的模拟, 先经过偏中性的模拟唾液消化后再进行胃肠液消化, 但是其小肠液并不加入胰液和胆汁。生物有效性的计算则通过测定消化残渣中污染物的含量, 再根据质量守恒, 计算生物有效性^[51]。这种处理方法一方面避免了成分复杂的模拟液后处理过程, 另一方面因

为测定的是残渣中污染物的浓度,其浓度较模拟液中的要高,这样使得数据测定重现性好;但该方法操作步骤复杂,不适合大批量样品的测定.这种方法不仅能用于对土壤中金属离子(铅、砷)生物有效性的测定^[50], Wittsiepe等人^[52]还采用该法对土壤中PCDDs的生物有效性做了研究,夏建强等人^[16]采用该法模拟胃环境研究了城市大气灰尘中不同形态铅对人体的生物有效性.

(6) 德国标准研究院法(DIN). 该方法最初是Hack等人用于测定土壤中PAHs和多氯联苯(PCBs)的生物有效性^[53], 现已用于土壤样品中有机物和金属离子的生物有效性测定^[54], 目前已被德国标准研究院(deutsches institut fuer normung, DIN)采纳成为土壤中无机和有机污染物生物有效性测定的标准方法(DIN 19738-2004). 该方法包括了对口腔、胃和小肠的模拟, 为了更接近真实的人体胃肠生理条件和饮食的情况, 在模拟过程中加入了有机酸和多种无机盐以及奶粉等食物成分^[53]. 利用该方法测得土壤样品中金属离子的生物有效性数据与动物(幼猪)活体实验数据的相关性较差, 还需要进一步验证^[54].

(7) 荷兰应用科学研究院胃肠法(TIM). TIM(TNO gastrointestinal model)方法由荷兰应用科学研究院营养与食品研究所开发, 该方法实际是一套由计算机控制的动态胃肠道模拟装置^[6,55~58], 包括胃、十二指肠、空肠及回肠四个模块. 每个模块均由两个套管组成, 外层为玻璃材质, 内层为可变形材质; 内外层之间通水, 一方面可控制模块操作温度, 另一方面可通过对水加压使内管变形, 模拟人体胃肠的蠕动. 4个功能模块通过3个蠕动泵连接, 模拟食糜在胃肠消化道内的移动, 各模块的内管分别加入相应的模拟消化液. 与前面几种方法不同的是, 模拟胃液和十二指肠液并非一次性加入, 而是以 $0.5\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ 的速度逐渐加入, 胃和十二指肠的pH值调节也以动态方式进行, 即盐酸(调节胃溶液pH)和碳酸氢钠溶液(调节十二指肠溶液pH)分别以 $0.5\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ 和 $0.25\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ 的速度加入到各自模块中, 整个过程由计算机控制完成. 该方法更为真实地模拟了人体胃肠的消化过程, 采用药物进行活体实验与采用该方法实验验证, 其结果一致^[6]. 但此模拟方法耗时长, 实验装置搭建繁杂, 不易控制, 不适合大批量快速测试, 但可作为其他体外模拟方法的验证方法.

(8) 人体肠道微生物生态模拟系统(SHIME).

SHIME(simulator of human intestinal microbial ecosystem)方法由比利时根特大学Verstraete等人研制而成, 该系统主要由5个部分组成, 包括胃、小肠、升结肠、横结肠和降结肠, 由蠕动泵实现食物以及胃肠液的转移. 该方法与前面所有模拟方法最大的不同是增加了大肠环境模拟, 并引入了肠道微生物, 不仅能用于各种基质中金属离子的生物有效性测定^[6,9], 更能研究有机污染物在人体肠道系统内的代谢情况^[8,59]. 在人体胃肠道中, 大肠中具有比胃和小肠中数量和种类多得多的微生物, 据报道, 每克大肠内含物中约含 10^{11} 个微生物, 种类达1000种之多. 由于环境中的有机污染物不仅本身具有毒性, 在胃肠道微生物的作用下, 还可能发生代谢, 生成生物富集系数更高、毒性更大的代谢物, 如PAHs在大肠微生物作用下, 可产生雌激素类代谢物, van de Weile等人^[8,9,59]研究表明大肠微生物可以将苯并[a]芘代谢为7-羟基苯并[a]芘. 因此在评估有机污染物对人体的风险时, 不仅需要知道其生物有效性, 有机污染物在人体肠道系统的代谢也是一个不可忽略的因素, 只有对这两方面进行系统认识, 才能对该物质对人体健康风险做出准确的评估. 因此该方法在测定有机污染物的生物有效性及其在体内的代谢过程方面有着更为广泛的应用, 包括本实验室在内^[19], 目前有多家实验室在采用该系统进行相关研究^[6,9,58].

1.2 生物有效性测定影响因素

各种胃肠模拟方法在测定污染物对人体内的生物有效性时, 模拟方法、样品基质、实验条件等多种因素对生物有效性都有较大的影响.

(1) 模拟液pH值. 在这些体外实验中, 胃肠模拟液pH值的控制为生物有效性测定的关键因素之一, 污染物的生物有效性, 特别是重金属离子, pH值对其溶解析出有着很大的影响. 在各种模拟方法中, 口腔模拟唾液的pH值一般采用6.5; 胃环境在不同状态(空腹和饱腹)下有不同的pH值, 采用的pH值在空腹情况下一般用1.5~2.0, 饱腹为4.0~5.0; 而小肠的pH值一般为5.5~7.5左右^[22]. 采用不同pH值得得的生物有效性数值差别也较大, pH值越小, 金属离子的生物有效性随之增大, 如相同土壤样品中铅的生物有效性, 采用SHIME方法(胃pH 4.0)和SBET(胃pH 1.5)方法得到的数据分别为4%和91%^[6].

(2) 基质类别. 人体摄入的污染物来源广泛, 比如食品、经口摄入的粉尘、呼吸的大气颗粒物等,

通过口腔、咽喉进入消化系统。研究表明, 污染物在不同基质下的生物有效性存在着显著的差异, 即使同一基质, 但由于其中存在不同成分, 如食物中的牛奶、面包、淀粉、土壤中的有机质等, 得出的生物有效性也有较大的差别; 此外, 由于不同基质、不同成分对污染物的吸附作用不同, 导致污染物在模拟胃肠液中的析出程度不同, 从而影响其生物有效性。如 Oomen 等人采用 RIVM 方法对三种土壤(美国标准与技术研究院的标准土壤 -Montana 2711、比利时 Flanders 地区的土壤和德国哈尔茨山地区的土壤 -Oker 11)中砷和铅的生物有效性进行了测定, 其结果分别为 59%, 95%, 19%和 11%, 66%, 29%^[6]。

(3) 模拟液成分。在早期的和简化的体外模拟方法中, 胃肠模拟液成分比较简单, 胃模拟液主要是胃蛋白酶和有机酸, 小肠模拟液是胰液和胆汁的混和物。为了使得样品的消化条件尽可能与人体生理条件一致, 后期模拟实验在系统内加入各种酶、有机酸以及无机盐, 模拟消化腺所分泌的消化液和溶液中的离子强度。如模拟口腔时加入了 α -淀粉酶、黏蛋白、尿素、尿酸、氯化钠、氯化钾以及磷酸二氢钠; 模拟胃时加入了胃蛋白酶、黏蛋白、葡萄糖、葡萄糖醛酸、氯化钠、氯化钾、氯化钙以及磷酸二氢钾等^[28]; 模拟小肠时加入了氯化钠、氯化钾、氯化钙及碳酸氢钠等无机盐以及胰液和胆汁。胰液是脂肪酶(分解脂肪)、蛋白酶(分解蛋白质)以及淀粉酶(分解碳水化合物)的混和物, 胆汁的用处在于有利于脂类和有机酸在小肠内转化吸收。这些物质可模拟胃肠环境将复杂的各种营养物质分解为简单化合物, 如糖类分解为单糖, 蛋白质分解为氨基酸, 脂类分解为甘油及脂肪酸, 达到最佳的模拟效果。研究表明由于胆汁及胰液素可以增大有机污染物的生物有效性, 因而有机污染物在小肠中的生物有效性高于胃中, 但不同动物的胆汁对生物有效性影响不大^[60]; 另外, Laird 等人^[9]采用 SHIME 研究发现, 模拟液中微生物的存在能增加砷对人体的生物有效性。

(4) 停留时间。在人体消化过程中, 口腔主要起咀嚼磨碎作用, 样品在口腔的停留时间较短, 约为 10 s 到 2 min 左右, 污染物的析出量很小, 对于生物有效性影响较小, 因而多数方法, 如 SHIME, SBET, PBET, IVG 以及 TIM, 并不包含对口腔的模拟。物质在人体胃中的停留时间根据物质性质的不同而不同, 比如单独摄入水果时, 水果停留于胃中不会超过 1 h,

淀粉类停留时间约为 2~3 h, 蛋白质类停留时间约为 4 h, 而脂肪类停留时间约需 6~8 h 以上。采用体外实验时, 样品在胃肠中的停留时间根据方法的不同则有较大差别, 一般在胃部的停留时间为 1~3 h, 小肠中的停留时间为 1~6 h, 采用 SHIME 研究时, 大肠中的停留时间通常为 18 h^[9]。一般认为停留时间越长, 污染物释放至模拟液中的量也越大, 其生物有效性也越高, 直至达到两相间的平衡。但对于基于生理学的体外实验, 其停留时间变化不大的话, 对最后生物有效性的值基本没有影响。

(5) 固液比。固液比是指样品与模拟液的比值, 根据方法的不同, 固液比变化较大, 从 1:2.5 至 1:5000, 可根据具体研究对象的不同选择适当的固液比, 比如 Ruby 等人^[61]认为对于研究经口摄入的土壤中金属离子在 2~3 岁儿童体内的生物有效性时, 固液比取 1:100 比较合适。固液比对污染物生物有效性有一定影响, 一般随着其比值的增大, 污染物的生物有效性下降, 如 van de Wiele 等人的研究表明, PAHs 在模拟胃肠中的生物有效性与其固液比成对数关系, 其相关系数 R^2 为 1^[8]。

2 发展前景

利用体外实验来评估污染物对人体的生物有效性方法发展至今不到三十年, 发展演化出十余种不同的方法, 已成为污染物生物有效性测定及人体健康风险评估的重要手段之一。在国外, 利用体外实验来评估污染物对人体的生物有效性受到高度重视, 并广泛开展。在土壤研究中, 可以用来快速筛选、甄别出污染程度较为严重、可能危害人体健康的土壤和快速检验土壤修复措施的有效性, 目前应用于土壤中铅、砷、镉等无机物离子的生物有效性评估方面已经卓有成效^[1,61]。相比金属离子, 由于有机物在人体消化道各种酶、微生物作用下可能发生代谢, 迁移转化过程相对复杂, 样品的处理和分析比金属离子更为困难, 因此体外模拟方法对于土壤、食物中有机污染物的研究相对较少, 通常在忽略这些作用下对其生物有效性进行评估。目前报道的主要有 PAHs^[8,13,53,59,60,62-65]、二噁英/呋喃(PCDD/Fs)^[27-29]、PCBs^[44,53,66]、石油烃(TPHs)^[67]、有机氯农药(OCPs)^[44,47,53,68-70]及有机磷农药(OPPs)^[70]等。但绝大多数研究仅限于有机污染物在模拟肠胃道内的释放, 分析其生物有效性, 对于有机污染物在人体肠道系统的代谢及采用 Caco-2 细胞研究吸收转运

的研究很少.

Caco-2 细胞(the human colon adenocarcinoma cell lines)来源于人类结肠癌及直肠癌细胞, 由于可形成与小肠上皮细胞相似的细胞极性和致密的单细胞层组织, 分化出绒毛面 AP 侧(Apical, 肠腔侧)和基底面 BL 侧(Basolateral, 肠内壁侧), 其形态、功能及渗透性等方面与人体的小肠上皮细胞相似. Caco-2 细胞最初用于药物在小肠吸收的评价和各种转运机制的研究中, 随着研究的深入, 由于药物通过 Caco-2 单细胞层的转运吸收量与人体口服吸收实验的结果表现出良好的相关性, 现已被广泛用来研究外源化学物, 特别是各种环境污染物, 包括金属离子^[48,49,71-82]、有机污染物^[47,83-91]等的吸收转运代谢情况. 但Caco-2 细胞在模拟小肠上皮细胞时存在缺乏分泌黏液的杯状细胞, 缺少小肠上皮中黏液层的模拟, Choi等人^[92]在利用 Caco-2 细胞时结合了 Hep G2 细胞层, 来模拟上皮中的黏液层, 取得较好的模拟效果. 通过 Caco-2 细胞模型研究可得到污染物在小肠上皮的摄取、转运机制及不同污染物在吸收过程中的相互作用, 如果将污染物的释放及 Caco-2 细胞模型的吸收结合, 从而进行真正意义上的活体暴露模拟, 如开展对金属的不同离子形态的吸收程度、离子间的相互作用对生物有效性的影响等研究, 将为人体健康风险评估提供更为可靠的科学依据. 国内这方面的研究较少, 研

究方法多采用模拟条件较为简单的 PBET, SBET 等模型, 不能真正反映污染物在人体胃肠内的消化吸收转运及代谢. 另外, 由于人体肠道系统具有丰富的微生物, 许多有机污染物可以在微生物作用下代谢生成高生物富集性、高毒性的代谢产物, 如果充分考虑到代谢物及其生物有效性, 将会使得进行风险评估更加合理科学, 该方面的研究也将是体外研究的热点之一.

尽管到目前已有十余种胃肠体外模拟方法, 但各种方法对同一样品测得的生物有效性变化较大^[6], 无法确定究竟哪种方法更准确, 国际上还没有真正确认一种国际通用的标准方法, 因此对各种模拟方法所得结果的验证显得尤为重要. 体外模拟方法的验证目前都采用比较体外实验数据和动物活体实验数据的相关性来判断. 已开展的动物活体试验包括幼猪^[10,40,93]、老鼠^[50]、兔子^[94,95]以及猴子^[96]等, 污染物主要为金属离子. 人体的消化系统与实验动物在生理条件上存在差别, 因此从动物活体实验获取的数据推广到对人体的生物有效性, 解释有一定困难, 大部分体外实验的结果难以得到验证, 因此如何准确方便地验证污染物在人体的生物有效性与胃肠体外的实验模拟方法得到的数据的一致性成为其发展的关键因素. 可以预期, 随着各种问题的解决, 体外模拟法将在国内外人体健康风险评价研究中具有广阔的应用前景.

参考文献

- 1 Wragg J, Cave M R. *In vitro* methods for the measurement of the oral bioaccessibility of selected metals and metalloids in soils: A critical review. Technical Report. Environmental Agency, UK. 2002
- 2 Oomen A G, Rempelberg C J M, Bruil M A, et al. Development of an *in vitro* digestion model for estimating the bioaccessibility of soil contaminants. *Arch Environ Contam Toxicol*, 2003, 44(3): 281—287[[doi](#)]
- 3 Gron C. Test for bioaccessibility of metals and PAH from soil. Technical Report. DHI Water Environ, 2005
- 4 Ruby M V, Davis A, Link T E, et al. Development of an *in-vitro* screening-test to evaluate the *in-vivo* bioaccessibility of ingested mine-waste lead. *Environ Sci Technol*, 1993, 27(13): 2870—2877[[doi](#)]
- 5 Rodriguez R R, Basta N T. An *in vitro* gastrointestinal method to estimate bioavailable arsenic in contaminated soils and solid media. *Environ Sci Technol*, 1999, 33(4): 642—649[[doi](#)]
- 6 Oomen A G, Hack A, Minekus M, et al. Comparison of five *in vitro* digestion models to study the bioaccessibility of soil contaminants. *Environ Sci Technol*, 2002, 36(15): 3326—3334[[doi](#)]
- 7 Schroeder J L, Basta N T, Casteel S W, et al. Validation of the *in vitro* gastrointestinal (IVG) method to estimate relative bioavailable lead in contaminated soils. *J Environ Qual*, 2004, 33(2): 513—521
- 8 van de Wiele T R, Verstraete W, Siciliano S D. Polycyclic aromatic hydrocarbon release from a soil matrix in the *in vitro* gastrointestinal tract. *J Environ Qual*, 2004, 33(4): 1343—1353
- 9 Laird B D, van de Wiele T R, Corriveau M, et al. Gastrointestinal microbes increase arsenic bioaccessibility of ingested mine tailings using the simulator of the human intestinal microbial ecosystem. *Environ Sci Technol*, 2007, 41(15): 5542—5547[[doi](#)]
- 10 Juhasz A L, Smith E, Weber J, et al. Comparison of *in vivo* and *in vitro* methodologies for the assessment of arsenic bioavailability in contaminated soils. *Chemosphere*, 2007, 69(6): 961—966[[doi](#)]
- 11 Wragg J, Cave M, Nathanail P. A Study of the relationship between arsenic bioaccessibility and its solid-phase distribution in soils

- from Wellingborough, UK. *J Environ Sci Health, Part A*, 2007, 42(9): 1303—1315[[doi](#)]
- 12 唐翔宇, 朱永官, 陈世宝. *In vitro* 法评估铅污染土壤对人体的生物有效性. *环境化学*, 2003, 22(5): 503—506
- 13 Tang X Y, Tang L, Zhu Y, et al. Assessment of the bioaccessibility of polycyclic aromatic hydrocarbons in soils from Beijing using an *in vitro* test. *Environ Pollut*, 2006, 140(2): 279—285[[doi](#)]
- 14 Tang X Y, Zhu Y G, Shan X Q, et al. The ageing effect on the bioaccessibility and fractionation of arsenic in soils from China. *Chemosphere*, 2007, 66(7): 1183—1190[[doi](#)]
- 15 Ren H M, Wang J D, Zhang X L. Assessment of soil lead exposure in children in Shenyang, China. *Environ Pollut*, 2006, 144(1): 327—335[[doi](#)]
- 16 夏建强, 章明奎, 符娟林. 模拟胃酸环境下城市灰尘中铅的生物可给性. *科技通报*, 2006, 22(4): 482—486
- 17 Wang X S, Qin Y, Chen Y K. Leaching characteristics of arsenic and heavy metals in urban roadside soils using a simple bioavailability extraction test. *Environ Monit Assess*, 2007, 129(1-3): 221—226[[doi](#)]
- 18 Du X, Cui Y S, Weng L P, et al. Arsenic bioavailability in the soil amended with leaves of arsenic hyperaccumulator, Chinese brake fern (*Pteris vittata* L.). *Environ Toxicol Chem*, 2008, 27(1): 126—130[[doi](#)]
- 19 Yu Y X, Lu M, Jia W L, et al. Carbon isotope effects of DDTs in carrot during the digestion process using an *in vitro* test. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 2008, 22: 2803—2808[[doi](#)]
- 20 Miller D D, Schriker B R, Rasmussen R R, et al. An *in-vitro* method for estimation of iron availability from meals. *Am J Clin Nutr*, 1981, 34(10): 2248—2256
- 21 Basta N T, Gradwohl R. Estimation of Cd, Pb, and Zn bioavailability in smelter contaminated soils by a sequential extraction procedure. *J Soil Contam*, 2000, 9(2): 149—164
- 22 Dean J R, Scott W C. Recent developments in assessing the bioavailability of persistent organic pollutants in the environment. *TrAC-Trends Anal Chem*, 2004, 23(9): 609—618[[doi](#)]
- 23 Bruce S, Noller B, Matanitobua V, et al. *In vitro* physiologically based extraction test (PBET) and bioaccessibility of arsenic and lead from various mine waste materials. *J Toxicol Environ Health, Part A*, 2007, 70(19): 1700—1711[[doi](#)]
- 24 Chan D Y, Black W D, Hale B A. Cadmium bioavailability and bioaccessibility as determined by *in vitro* digestion, dialysis and intestinal epithelial monolayers, and compared to *in vivo* data. *J Environ Sci Health, Part A*, 2007, 42(9): 1283—1291[[doi](#)]
- 25 Furman O, Strawn D G, Heinz G H, et al. Risk assessment test for lead bioaccessibility to waterfowl in mine-impacted soils. *J Environ Qual*, 2006, 35(2): 450—458[[doi](#)]
- 26 Carrizales L, Razo I, Tellez-Hernandez J I, et al. Exposure to arsenic and lead of children living near a copper-smelter in San Luis Potosi, Mexico: Importance of soil contamination for exposure of children. *Environ Res*, 2006, 101(1): 1—10[[doi](#)]
- 27 Rotard W, Christmann W, Knoth W, et al. Investigations on the absorption availability of PCDD/PCDF from industriogenic soil: Model experiments on absorption assessment after oral ingestion. *Organohalogen Compd*, 1992, 10: 199—200
- 28 Wittsiepe J, Schrey P, Hack A, et al. Comparison of different digestive tract models for estimating bioaccessibility of polychlorinated dibenzo-p-dioxins and dibenzofurans (PCDD/F) from red slag 'Kieselrot'. *Int J Hyg Environ Health*, 2001, 203(3): 263—273[[doi](#)]
- 29 Ruby M V, Fehling K A, Paustenbach D J, et al. Oral bioaccessibility of dioxins/furans at low concentrations (50—350 ppt toxicity equivalent) in soil. *Environ Sci Technol*, 2002, 36(22): 4905—4911[[doi](#)]
- 30 Colombo C, Monhemius A J, Plant J A. The estimation of the bioavailabilities of platinum, palladium and rhodium in vehicle exhaust catalysts and road dusts using a physiologically based extraction test. *Sci Total Environ*, 2008, 389(1): 46—51
- 31 Rieuwerts J S, Searle P, Buck R. Bioaccessible arsenic in the home environment in southwest England. *Sci Total Environ*, 2006, 371(1-3): 89—98
- 32 Intawongse M, Dean J R. Use of the physiologically-based extraction test to assess the oral bioaccessibility of metals in vegetable plants grown in contaminated soil. *Environ Pollut*, 2008, 152(1): 60—72[[doi](#)]
- 33 Tang X Y, Zhu Y G, Cui Y S, et al. The effect of ageing on the bioaccessibility and fractionation of cadmium in some typical soils of China. *Environ Int*, 2006, 32(5): 682—689[[doi](#)]
- 34 崔岩山, 陈晓晨, 朱永官. 利用 3 种 *in vitro* 方法比较研究污染土壤中铅、砷生物可给性. *农业环境科学学报*, 2008, 27(2): 414—419
- 35 Beak D G, Basta N T, Scheckel K G, et al. Bioaccessibility of arsenic(V) bound to ferrihydrite using a simulated gastrointestinal system. *Environ Sci Technol*, 2006, 40(4): 1364—1370[[doi](#)]
- 36 Beak D G, Basta N T, Scheckel K G, et al. Bioaccessibility of arsenic bound to corundum using a simulated gastrointestinal system. *Environ Chem*, 2006, 3(3): 208—214[[doi](#)]
- 37 Basta N T, Foster J N, Dayton E A, et al. The effect of dosing vehicle on arsenic bioaccessibility in smelter-contaminated soils. *J Environ Sci Health, Part A*, 2007, 42(9): 1275—1281[[doi](#)]
- 38 Schroeder J L, Basta N T, Si J, et al. *In vitro* gastrointestinal method to estimate relative bioavailable cadmium in contaminated soil. *Environ Sci Technol*, 2003, 37(7): 1365—1370[[doi](#)]
- 39 Medlin E A. An *in vitro* method for estimating the relative bioavailability of lead in humans. Dissertation for the Doctoral Degree. Colorado: University of Colorado, 1997
- 40 Lee S W, Lee B T, Kim J Y, et al. Human risk assessment for heavy metals and as contamination in the abandoned metal mine areas, Korea. *Environ Monit Assess*, 2006, 119(1-3): 233—244[[doi](#)]
- 41 Drexler J W, Brattin W J. An *in vitro* procedure for estimation of lead relative bioavailability: With validation. *Hum Ecol Risk Assess*,

- 2007, 13(2): 383—401[[doi](#)]
- 42 Juhasz A L, Smith E, Weber J, et al. *In vitro* assessment of arsenic bioaccessibility in contaminated (anthropogenic and geogenic) soils. *Chemosphere*, 2007, 69(1): 69—78[[doi](#)]
- 43 Smith E, Naidu R, Weber J, et al. The impact of sequestration on the bioaccessibility of arsenic in long-term contaminated soils. *Chemosphere*, 2008, 71(4): 773—800[[doi](#)]
- 44 Shock S S, Bessinger B A, Lowney Y W, et al. Assessment of the solubility and bioaccessibility of barium and aluminum in soils affected by mine dust deposition. *Environ Sci Technol*, 2007, 41(13): 4813—4820[[doi](#)]
- 45 Oomen A G, Sips A, Groten J P, et al. Mobilization of PCBs and lindane from soil during *in vitro* digestion and their distribution among bile salt micelles and proteins of human digestive fluid and the soil. *Environ Sci Technol*, 2000, 34(2): 297—303[[doi](#)]
- 46 Versantvoort C H M, Oomen A G, van de Kamp E, et al. Application of an *in vitro* digestion model in assessing the bioaccessibility of mycotoxins in food. *Food Chem Toxicol*, 2005, 43(1): 31—40
- 47 Ljung K, Oomen A G, Duits M, et al. Bioaccessibility of metals in urban playground soils. *J Environ Sci Health, Part A*, 2007, 42(9): 1241—1250[[doi](#)]
- 48 Oomen A G, Tolls J, Kruidenier M, et al. Availability of polychlorinated biphenyls (PCBs) and lindane for uptake by intestinal Caco-2 cells. *Environ Health Perspect*, 2001, 109(7): 731—737[[doi](#)]
- 49 Oomen A G, Tolls J, Sips A, et al. *In vitro* intestinal lead uptake and transport in relation to speciation. *Arch Environ Contam Toxicol*, 2003, 44(1): 116—124[[doi](#)]
- 50 Ellickson K M, Meeker R J, Gallo M A, et al. Oral bioavailability of lead and arsenic from a NIST standard reference soil material. *Arch Environ Contam Toxicol*, 2001, 40(1): 128—135[[doi](#)]
- 51 Hamel S C, Ellickson K M, Lioy P J. The estimation of the bioaccessibility of heavy metals in soils using artificial biofluids by two novel methods: Mass-balance and soil recapture. *Sci Total Environ*, 1999, 244: 273—283[[doi](#)]
- 52 Wittsiepe J, Erlenkamper B, Welge P, et al. Bioavailability of PCDD/F from contaminated soil in young Goettingen minipigs. *Chemosphere*, 2007, 67(9): S355—S364[[doi](#)]
- 53 Hack A, Selenka F. Mobilization of PAH and PCB from contaminated soil using a digestive tract model. *Toxicol Lett*, 1996, 88(1-3): 199—210[[doi](#)]
- 54 Marschner B, Welge P, Hack A, et al. Comparison of soil Pb *in vitro* bioaccessibility and *in vivo* bioavailability with Pb pools from a sequential soil extraction. *Environ Sci Technol*, 2006, 40(8): 2812—2818[[doi](#)]
- 55 Minekus M, Marteau P, Havenaar R, et al. A multicompartmental dynamic computer-controlled model simulating the stomach and small-intestine. *ATLA-Altern Lab Anim*, 1995, 23(2): 197—209
- 56 Minekus M, Smeets-Peeters M, Bernalier A, et al. A computer-controlled system to simulate conditions of the large intestine with peristaltic mixing, water absorption and absorption of fermentation products. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1999, 53(1): 108—114[[doi](#)]
- 57 Dominy N J, Davoust E, Minekus M. Adaptive function of soil consumption: An *in vitro* study modeling the human stomach and small intestine. *J Exp Biol*, 2004, 207(2): 319—324[[doi](#)]
- 58 van de Wiele T R, Oomen A G, Wragg J, et al. Comparison of five *in vitro* digestion models to *in vivo* experimental results: Lead bioaccessibility in the human gastrointestinal tract. *J Environ Sci Health, Part A*, 2007, 42(2): 1203—1211[[doi](#)]
- 59 van de Wiele T R, Vanhaecke L, Boeckaert C, et al. Human colon microbiota transform polycyclic aromatic hydrocarbons to estrogenic metabolites. *Environ Health Perspect*, 2005, 113(1): 6—10
- 60 Oomen A G, Rempelberg C J M, van de Kamp E, et al. Effect of bile type on the bioaccessibility of soil contaminants in an *in vitro* digestion model. *Arch Environ Contam Toxicol*, 2004, 46(2): 183—188
- 61 Ruby M V, Davis A, Schoof R, et al. Estimation of lead and arsenic bioavailability using a physiologically based extraction test. *Environ Sci Technol*, 1996, 30(2): 422—430[[doi](#)]
- 62 Gron C, Oomen A G, Weyand E, et al. Bioaccessibility of PAH from Danish soils. *J Environ Sci Health, Part A*, 2007, 42(9): 1233—1239[[doi](#)]
- 63 Pu X, Lee L S, Galinsky R E, et al. Evaluation of a rat model versus a physiologically based extraction test for assessing phenanthrene bioavailability from soils. *Toxicol Sci*, 2004, 79(1): 10—17[[doi](#)]
- 64 Hurdzan C M, Basta N T, Hatcher P G, et al. Phenanthrene release from natural organic matter surrogates under simulated human gastrointestinal conditions. *Ecotoxicol Environ Saf*, 2008, 69(3): 525—530[[doi](#)]
- 65 Jurjanz S, Rychen G. *In vitro* bioaccessibility of soil-bound polycyclic aromatic hydrocarbons in successive digestive compartments in cows. *J Agric Food Chem*, 2007, 55(21): 8800—8805[[doi](#)]
- 66 Pu X, Lee L S, Galinsky R E, et al. Bioavailability of 2,3,4,4',5-pentachlorobiphenyl (PCB118) and 2,20,5,50-tetrachlorobiphenyl (PCB52) from soils using a rat model and a physiologically based extraction test. *Toxicology*, 2006, 217(1): 14—21[[doi](#)]
- 67 Holman H N, Goth-Goldstein R, Aston D, et al. Evaluation of gastrointestinal solubilization of petroleum hydrocarbon residues in soil using an *in vitro* physiologically based model. *Environ Sci Technol*, 2002, 36(6): 1281—1286[[doi](#)]
- 68 Scott W C, Dean J R. Selective extraction of persistent organic pollutants from environmental matrices. *J Environ Monit*, 2003, 5(5): 724—731[[doi](#)]
- 69 Scott W C, Dean J R. An assessment of the bioavailability of persistent organic pollutants from contaminated soil. *J Environ Monit*, 2005, 7(7): 710—715[[doi](#)]

- 70 Kramer B K. Analytical methods for the determination of the bioaccessibility of pesticides in contaminated soils. Dissertation for the Doctoral Degree. Atlanta: Emory University, 2001. 1—126
- 71 查龙应, 许梓荣, 王敏奇, 等. 氯化铬和吡啶羧酸铬在 Caco-2 细胞中的摄取和转运. 细胞生物学, 2007, 29(1): 77—80
- 72 Eklund G, Linden A, Tallkvist J, et al. Bioavailability of cadmium from *in vitro* digested infant food studied in Caco-2 cells. J Agric Food Chem, 2003, 51(14): 4168—4174[doi]
- 73 Noel L, Huynh-Delerme C, Guerin T, et al. Cadmium accumulation and interactions with zinc, copper, and manganese, analysed by ICP-MS in a long-term Caco-2 TC7 cell model. Biometals, 2006, 19(5): 473—481[doi]
- 74 Zerounian N R, Redekosky C, Malpe R, et al. Regulation of copper absorption by copper availability in the Caco-2 cell intestinal model. Am J Physiol-Gastrointest Liver Physiol, 2003, 284(5): G739—G747
- 75 Linder M C, Zerounian N R, Moriya M, et al. Iron and copper homeostasis and intestinal absorption using the Caco2 cell model. Biometals, 2003, 16(1): 145—160[doi]
- 76 Linder M C, Mortya M, Whon A, et al. Vesicular transport of Fe and interaction with other metal ions in polarized Caco2 Cell monolayers. Biological Res, 2006, 39(2): 143—156
- 77 Laparra J M, Velez D, Barbera R, et al. An approach to As(III) and As(V) bioavailability studies with Caco-2 cells. Toxicol in Vitro, 2005, 19(8): 1071—1078[doi]
- 78 Laparra J M, Velez D, Barbera R, et al. Cytotoxic effect of As(III) in Caco-2 cells and evaluation of its human intestinal permeability. Toxicol in Vitro, 2006, 20(5): 658—663[doi]
- 79 Laparra J M, Velez D, Barbera R, et al. Bioaccessibility and transport by Caco-2 cells of organoarsenical species present in seafood. J Agric Food Chem, 2007, 55(14): 5892—5897[doi]
- 80 Laparra J M, Velez D, Barbera R, et al. As₂O₃-induced oxidative stress and cycle progression in a human intestinal epithelial cell line (Caco-2). Toxicol in Vitro, 2008, 22 (2): 444—449[doi]
- 81 Laparra J M, Tako E, Glahn R P, et al. Supplemental inulin does not enhance iron bioavailability to Caco-2 cells from milk- or soy-based, probiotic-containing, yogurts but incubation at 37 degrees C does. Food Chem, 2008, 109(1): 122—128[doi]
- 82 Cilla A, Laparra J M, Alegria A, et al. Antioxidant effect derived from bioaccessible fractions of fruit beverages against H₂O₂-induced oxidative stress in Caco-2 cells. Food Chem, 2008, 106(3): 1180—1187[doi]
- 83 Velarde G, Ait-Aissa S, Gillet C, et al. Use of transepithelial electrical resistance in the study of pentachlorophenol toxicity. Toxicol in Vitro, 1999, 13(4-5): 723—727[doi]
- 84 Klee S, Baumung I, Kluge K, et al. A contribution to safety assessment of veterinary drug residues: *in vitro/ex vivo* studies on the intestinal toxicity and transport of covalently bound residues. Xenobiotica, 1999, 29(6): 641—654[doi]
- 85 Ebert B, Seidel A, Lampen A. Identification of BCRP as transporter of benzo[a]pyrene conjugates metabolically formed in Caco-2 cells and its induction by Ah-receptor agonists. Carcinogenesis, 2005, 26(10): 1754—1763[doi]
- 86 Ebert B, Seidel A, Lampen A. Induction of phase-1 metabolizing enzymes by oltipraz, flavone and indole-3-carbinol enhance the formation and transport of benzo[a]pyrene sulfate conjugates in intestinal Caco-2 cells. Toxicol Lett, 2005, 158(2): 140—151
- 87 Sugihara N, Toyama K, Okamoto T, et al. Effects of benzo(e)pyrene and benzo(a)pyrene on P-glycoprotein-mediated transport in Caco-2 cell monolayer: A comparative approach. Toxicol Vitro, 2007, 21(5): 827—834
- 88 Vasiluk L, Pinto L J, Walji Z A, et al. Benzo[a]pyrene bioavailability from pristine soil and contaminated sediment assessed using two *in vitro* models. Environ Toxicol Chem, 2007, 26(3): 387—393[doi]
- 89 Schutte M E, Boersma M G, Verhallen D A M, et al. Effects of flavonoid mixtures on the transport of 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine (PhIP) through Caco-2 monolayers: An *in vitro* and kinetic modeling approach to predict the combined effects on transporter inhibition. Food Chem Toxicol, 2008, 46(2): 557—566
- 90 Vasiluk L, Pinto L J, Tsang W S, et al. The uptake and metabolism of benzo[a]pyrene from a sample food substrate in an *in vitro* model of digestion. Food Chem Toxicol, 2008, 46(2): 610—618
- 91 de Waard P W J, de Kok T M C M, Maas M, et al. Influence of TCDD and natural Ah receptor agonists on benzo[a]pyrene-DNA adduct formation in the Caco-2 human colon cell line. Mutagenesis, 2008, 23(1): 67—73
- 92 Choi S H, Nishikawa M, Sakoda A, et al. Feasibility of a simple double-layered coculture system incorporating metabolic processes of the intestine and liver tissue: application to the analysis of benzo[a]pyrene toxicity. Toxicol Vitro, 2004, 18(3): 393—402[doi]
- 93 Casteel S W, Cowart R P, Weis C P, et al. Bioavailability of lead to juvenile swine dosed with soil from the Smuggler Mountain NPL site of Aspen, Colorado. Fundam Appl Toxicol, 1997, 36(2): 177—187[doi]
- 94 Davis A, Ruby M V, Bergstrom P D. Bioavailability of arsenic and lead in soils from the Butte, Montana, Mining District. Environ Sci Technol, 1992, 26(3): 461—468[doi]
- 95 Freeman G B, Johnson J D, Killinger J M, et al. Bioavailability of arsenic in soil impacted by smelter activities following oral-administration in rabbits. Fundam Appl Toxicol, 1993, 21(1): 83—88[doi]
- 96 Freeman G B, Schoof R A, Ruby M V, et al. Bioavailability of arsenic in soil and house dust impacted by smelter activities following oral administration in cynomolgus monkeys. Fundam Appl Toxicol, 1995, 28(2): 215—222[doi]