

# 2,4-二氯苯酚低浓度长期暴露对鲫鱼肝脏抗氧化系统的影响

张景飞, 王晓蓉\* (南京大学环境学院 污染控制与资源化研究国家重点实验室, 南京 210093 E-mail: jingfeizhang@sina.com)

摘要: 在室内模拟条件下, 研究了低浓度 2,4-二氯苯酚(2,4-DCP) 长期暴露(40d) 对鲫鱼(*Carassius auratus*) 幼体肝脏抗氧化系统的影响。结果表明: 过氧化氢酶(CAT) 活性、谷胱甘肽过氧化物酶(Se-GPx) 活性、氧化型谷胱甘肽(GSSG) 含量可被显著诱导; 超氧化物歧化酶(SOD) 活性在 0.005 mg·L<sup>-1</sup> 2,4-DCP 污染胁迫下即被显著诱导; 还原型谷胱甘肽(GSH) 含量几乎持续受到抑制; 谷胱甘肽还原酶(GR) 活性则先受到抑制后逐渐回升; 谷胱甘肽硫转移酶(GST) 的活性变化较小, 仅在 2 个低浓度组中有轻微诱导。GR、GSH, 尤其是 SOD, 对 2,4-DCP 较为敏感, 可以作为水生生态系统中 2,4-DCP 污染的一项早期监测指标。

关键词: 鲫鱼; 2,4-二氯苯酚; 抗氧化防御系统; 酶活性测定

中图分类号: X18, R994.6 文献标识码: A 文章编号: 0250-3301(2003)05-05-0136

## Effects of Long term Exposure of Low level 2,4-Dichlorophenol on the Antioxidant Defense System in Liver of *Carassius auratus*

Zhang Jingfei, Wang Xiaorong(State Key Laboratory of Pollution Control and Resources Reuse, School of Environment, Nanjing University, Nanjing 210093, China E-mail: jingfeizhang@sina.com)

**Abstract:** Under the indoors simulant conditions, the effects of long-term exposure of low-level 2,4-Dichlorophenol on the antioxidant system of larval fishes were studied. The results showed that the activities of catalase (CAT), seldium-dependent glutathione peroxidase (Se-GPx) and the content of oxidized glutathione (GSSG) were induced significantly. The activity of superoxide dismutase (SOD) was induced remarkably when 2,4-Dichlorophenol level was at only 0.005 mg·L<sup>-1</sup>; the content of reduced glutathione (GSH) was almost suppressed continuously; the activity of glutathione reductase was inhibited firstly and then restored gradually; the activity of glutathione S-transferase (GST) had slight variances among groups. GR, GSH, especially SOD, can act as an early monitoring index of 2,4-Dichlorophenol pollution in aquatic ecosystem.

**Keywords:** *Carassius auratus*; 2,4-Dichlorophenol; antioxidant defense system; enzyme activity determination

氯代苯酚类化合物是化工生产中的重要原料, 其中 2,4-二氯苯酚(2,4-DCP) 是被列入中国环境优先污染物黑名单的重要污染物之一<sup>[1,2]</sup>。国内外关于氯酚类化合物影响鱼类生理生化指标的报道已有一些<sup>[3,4]</sup>, 但其对鱼类肝脏抗氧化防御系统的影响几乎未见报道。由于低浓度污染物对生物的危害在短期内很难观察到<sup>[5]</sup>, 因此本实验以幼龄鲫鱼为材料, 研究 2,4-DCP 的长期低浓度暴露对鲫鱼肝脏抗氧化防御系统的影响及可能的致毒机制, 并探讨鱼体肝脏抗氧化指标作为早期污染暴露生物标志物的可能性。

## 1 材料与方法

### 1.1 仪器与试剂

所用仪器: 岛津 UV-220 型分光光度计; 岛津 RF-5000 型荧光分光光度计; J2-HS 高速冷冻离心机( Beckman 公司)。试剂采用分析纯或超级纯试剂。

### 1.2 实验浓度设置

精确称取 1g 2,4-DCP(分析纯, 上海试剂

基金项目: 国家教育部高等学校博士点专项基金资助课题 (2000028424)

作者简介: 张景飞(1975~), 安徽歙县人, 博士生, 主要从事环境毒理学研究

收稿日期: 2002-12-22; 修订日期: 2003-03-18

\* 通讯联系人

一厂)溶于丙酮,定容至 1 L,制得  $1000 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  母液,4℃避光保存.逐级稀释后,各实验组的浓度配置为:0.005,0.01,0.05,0.1,0.5,1.0 mg/L.氯酚污染严重的水体中,2,4-DCP 浓度可达到  $0.1 \text{ mg} / \text{L}$ ,本实验中 2,4-DCP 的暴露浓度与其在水体中的实际浓度基本相当.

### 1.3 实验材料及染毒条件

实验对象为太湖区域重要的养殖鱼类——鲫鱼的幼体,捕自江苏省南京市水产研究所禄口养殖基地,平均体长为  $(11.1 \pm 0.73) \text{ cm}$  左右,平均体重为  $(21.8 \pm 0.92) \text{ g}$ . 养鱼用水为除氯后的自来水.

鲫鱼幼体买来后,先在曝气自来水中驯养 7 d,然后随机分出 7 组,每组 7 条鱼,放入玻璃缸(实验前用稀硝酸浸泡 2d)中,分别暴露于上述 7 组含油清水中,即设一个对照组和 6 个浓度组.暴露时间为 40d,期间用曝气机连续充气,每天投喂饵料,并采用静态置换法更新一半的 2,4-二氯苯酚溶液;水温控制在  $(25 \pm 2) \text{ }^\circ\text{C}$ ; pH 值稳定在  $7.0 \pm 0.1$ ,硬度约为  $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ . 驯养及实验期间幼鱼生长无异常.

### 1.4 取样和样品预处理

暴露 40d 后取样:将鲫鱼活体解剖,取出肝脏,用冰生理盐水清洗其中血液,滤纸吸干,迅速称取适量置于冰浴中,加入冰冷的 Tris-蔗糖缓冲液( $0.01 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  Tris,  $0.25 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  蔗糖,  $0.1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  EDTA, pH = 7.5), 体积为 10:1 (V/W),用玻璃匀浆器匀浆,将匀浆液于 4℃,  $10000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$  下离心 15 min,取上清液置于  $-80 \text{ }^\circ\text{C}$  冰箱内保存.另称取适量肝组织,加入预冷的 EDTA 溶液和稀  $\text{HClO}_4$  溶液,按上述方法匀浆离心,所得上清液用于 GSH 测量,  $-80 \text{ }^\circ\text{C}$  冰箱内保存待用.

### 1.5 GSH 含量及酶活性的测定

GSH 含量测定<sup>[6]</sup>:取  $100 \mu\text{L}$  匀浆液,加入  $2.8 \text{ mL } 0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  磷酸缓冲液(pH 8.0)及  $100 \mu\text{L}$  邻苯二甲醛的乙醇溶液( $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ),混匀.室温放置 10 min 后以 343 nm 为激发光(Ex),在 425 nm 处测荧光强度.

GSSG 含量测定<sup>[6]</sup>:将  $250 \mu\text{L}$  匀浆液与

$200 \mu\text{L } 0.04 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  NEM 溶液混匀,取  $100 \mu\text{L}$  加入  $2.8 \text{ mL } 0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  NaOH 及  $100 \mu\text{L}$  ( $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) OPT 荧光试剂,充分混合.室温放置 10 min 后以上述波长测定荧光强度.

CAT 活性测定<sup>[7]</sup>:在室温( $25 \text{ }^\circ\text{C} \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ )下,分别将  $50 \mu\text{L}$  酶样加入含  $3.0 \text{ mL}$  磷酸盐缓冲液的参比池和含  $3.0 \text{ mL } \text{H}_2\text{O}_2$ -磷酸盐缓冲液的样品池中,用 UV-220 型紫外分光光度计连续记录吸光度  $A_{250}$  在 100s 内的变化.

SOD 活性测定<sup>[8]</sup>:反应溶液为  $9 \text{ mL}$  Tris-HCl 缓冲液(pH 8.2)  $0.1 \text{ mL}$  邻苯三酚和  $10 \mu\text{L}$  酶样,反应温度为  $(25 \pm 1) \text{ }^\circ\text{C}$ ,测定波长为 325 nm,邻苯三酚的自氧化速率控制在  $0.07 \text{ OD} \cdot \text{min}^{-1}$  左右.酶活性单位定义为每 mL 反应液中,每 min 抑制邻苯三酚自氧化速率达 50% 的酶量.

GR 活性测定:采用 Bergmeyer 法<sup>[9]</sup>,略加修改.最终  $3 \text{ mL}$  反应液中含  $0.1 \text{ mmol} / \text{L}$  磷酸缓冲液(pH 7.8),  $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$   $\text{Na}_2\text{EDTA}$ ,  $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  GSSG,  $0.2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$   $\text{NADPH} \cdot \text{Na}_4$  及  $140 \mu\text{L}$  酶液.用紫外分光光度计连续记录吸光度  $A_{340}$  的变化,计算 GR 活性.

GPx 活性测定:参考 Hafeman 法<sup>[10]</sup>,加以改进.GPx 特异性地催化 GSH 与  $\text{H}_2\text{O}_2$  的氧化反应,根据底物 GSH 浓度的改变可测定 GPx 的活力.在合适的 pH 条件下,2-硫代-2-硝基苯甲酸(DTNB)与 GSH 反应生成浅黄色 5-硫代-2-硝基苯甲酸阴离子,在 412 nm 处有最大吸收,其颜色深浅在一定浓度范围、一定时间内与剩余 GSH 的浓度成正比,即与 GPx 的活力成反比.一个 GPx 活力单位定义为:每 mg 蛋白质,扣除非酶反应,每 min 使 GSH 浓度下降  $1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ .

GST 活性测定:采用 Habig 法<sup>[11]</sup>,加以改进.GST 具有催化 GSH 与底物 1-氯-2,4-二硝基苯(CDNB)结合的能力,在一定反应时间内,其活性高低与反应前后底物浓度的变化呈线性关系,通过检测 GSH 浓度的变化便可得 GST 的活性大小.一个 GST 活力单位定义为:每 mg 蛋白质,扣除非酶反应,每 min 使 GSH 浓度下

降  $1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

## 1.6 总蛋白测定

蛋白质含量用 Bradford 方法测定,以牛血清白蛋白(BSA)为标准蛋白<sup>[12]</sup>。

## 1.7 统计学分析

实验结果表示为平均数 ± 标准误差 (Mean ± SDE)。使用 SPSS 统计软件和单边 ANOVA 法对组间数据进行差异性显著分析,  $p < 0.05$  表明差异显著,  $p < 0.01$  表明差异极显著。

## 2 结果与讨论

### 2.1 鲫鱼肝脏 CAT 活性的变化

暴露 40d 后,鲫鱼幼体肝脏 CAT 活性的变化如表 1 所示。单边 ANOVA 分析表明,II 组中幼体的 CAT 活性与对照组相比无显著性差异,说明  $0.005 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  的低浓度污染对 CAT 没有明显激活作用;从 III 组开始 2,4-DCP 对幼体肝脏 CAT 活性表现出了显著的诱导作用 ( $p < 0.05$ ),CAT 活性开始被激活,其中 V 组中 CAT 活性受到最大诱导,激活率达到 277%。2 个高浓度组 CAT 活性逐渐下降,但仍然比对照组高,反映了  $\text{H}_2\text{O}_2$  在鱼体内积累量的增多,但还不足以使 CAT 产生中毒性反应。另外,低浓度时(前 5 组)的 CAT 活性( $y$ )和暴露浓度( $x$ )之间呈现出较好的剂量-效应关系(图 1),回归方程为:  $y = 668.44x + 25.419$ ,  $R^2 = 0.9733$ 。

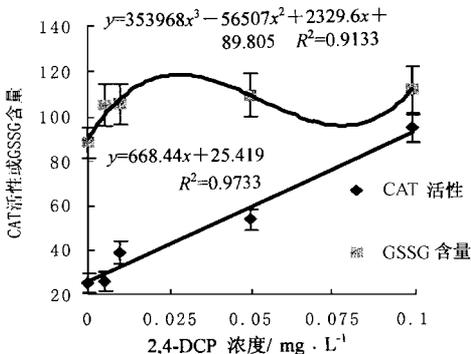


图 1 CAT 活性 GSSG 含量与暴露浓度间的剂量效应关系

Fig.1 The concentration-response relationship between CAT activity and exposure concentration

### 2.2 鲫鱼肝脏 SOD 活性的变化

如表 1 所示,经过 40d 的暴露,II 组中 2,4-

-DCP 污染对鲫鱼肝脏 SOD 活性表现出了极显著的诱导作用 ( $p < 0.01$ ),SOD 活性达到对照组的 1.8 倍,说明此时鱼体内产生了大量的  $\text{O}_2^-$ ;II 组中 SOD 活性继续受到轻微诱导 ( $p < 0.05$ )。随着暴露浓度的增加,SOD 活性逐渐受到抑制,这可能是由于鱼体内抗氧化防御系统其它成分的介入,消除了部分活性氧浓度,也可能是由于肝脏中该酶代谢外源化合物的能力被饱和,使鱼出现中毒反应,致使其浓度降低。结合 CAT 活性的变化, $0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  有可能是鲫鱼幼体对 2,4-DCP 污染的适应性反应到中毒性反应的阈值。

### 2.3 鲫鱼肝脏 GSH 含量的变化

暴露 40d 后,鲫鱼肝脏 GSH 含量的变化如表 1 所示。可看到,除了 VII 组中的 GSH 含量与对照组无显著性差异以外,其余各组中 GSH 的含量均受到了显著抑制 ( $p < 0.01$ )。

作为生物体内重要的抗氧化损伤防御系统的成分之一,GSH 与抗氧化酶一样,既可由污染的暴露而产生适应性诱导反应,也可由污染的毒性作用而产生中毒反应,即有机体内 GSH 含量降低<sup>[13]</sup>。本实验说明,经过 40d 的长期暴露, $0.005 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  的低浓度 2,4-DCP 已对鲫鱼构成了氧化胁迫甚至氧化损伤,使之呈现中毒性抑制反应。另外,在一定暴露浓度范围内,GSH 对 2,4-DCP 的适应性能力随着污染程度的增加而降低,而 2,4-DCP 对 GSH 的毒性效应则随着污染程度的增加而加大。当污染浓度达到一定程度时,GSH 含量又开始回升,这可能是由于别的解毒系统的参与。总之,GSH 对低浓度的 2,4-DCP 污染反应灵敏,适合作为一项监测指标。

### 2.4 鲫鱼肝脏 GSSG 含量的变化

如表 1 所示,对实验数据进行单边 ANOVA 分析表明:暴露 40d 后,各暴露组 2,4-DCP 污染暴露对幼体肝脏 GSSG 含量都表现出轻微的诱导作用 ( $p < 0.05$ )。这和表 1 中 GSH 含量的变化是基本相符的,表明了鱼体氧化应激过程中 GSH 向 GSSG 的转变趋势。此外,低浓度时(前 5 组)的 GSSG 含量( $y$ )和暴露浓度( $x$ )间呈现

出良好的剂量-效应关系(图 1), 回归方程为:

$$R^2 = 0.9133 .$$

$$y = 353968 c^3 - 56507 c^2 + 2329.6 c + 89.805 ,$$

### 2.5 鲫鱼肝脏 GR 活性的变化

表 1 2,4-DCP 对鲫鱼肝脏酶活性的影响(Pr) / U·mg<sup>-1</sup>

Table 1 Effects of 2,4-DCP on the hepatic enzyme activities of *Carassius auratus* / U·mg<sup>-1</sup>

2,4-DCP 浓度 / mg·L <sup>-1</sup>	CAT	SOD	GSH <sup>2)</sup>	GSSG <sup>2)</sup>	GR	GPx	GST
对照	24.99 ± 4.2	15.03 ± 1.2	24.67 ± 3.2	87.91 ± 6.9	2.04 ± 0.21	13.9 ± 0.91	11.2 ± 1.02
0.005	25.66 ± 4.1 <sup>1)</sup>	26.61 ± 1.7	16.47 ± 2.7	104.51 ± 9.3	0.75 ± 0.13	18.5 ± 1.49	10.9 ± 1.37 <sup>1)</sup>
0.01	38.82 ± 5.0	17.89 ± 0.9	11.35 ± 1.3	105.18 ± 8.7	1.17 ± 0.18	21.8 ± 1.82	14.2 ± 0.98
0.05	53.51 ± 4.7	14.71 ± 1.3 <sup>1)</sup>	11.70 ± 2.0	109.37 ± 9.8	2.14 ± 0.14 <sup>1)</sup>	18.6 ± 1.77	14.6 ± 0.89
0.10	94.41 ± 6.2	15.10 ± 1.7 <sup>1)</sup>	7.60 ± 0.9	111.65 ± 10.2	1.94 ± 0.23 <sup>1)</sup>	19.6 ± 1.23	12.6 ± 0.87 <sup>1)</sup>
0.50	63.92 ± 4.0	11.92 ± 0.8	10.54 ± 0.7	108.24 ± 8.3	2.22 ± 0.27	19.4 ± 1.65	10.3 ± 0.81 <sup>1)</sup>
1.00	45.26 ± 3.9	8.12 ± 0.9	23.37 ± 3.7 <sup>1)</sup>	114.41 ± 7.2	1.79 ± 0.3	18.1 ± 1.8	11.7 ± 1.48 <sup>1)</sup>

1) 表示与对照组无显著差异( *p* > 0.05) 2) GSH、GSSG 含量 / mg·g<sup>-1</sup> (liver)

从表 1 看到, 经过 40d 的暴露, GR 活性在低浓度时受到抑制, 随着暴露浓度增加, GR 活性逐渐回升至对照组水平. GR 通过还原 GSSG 可以使得 GSH 再生, 在 GSH 循环和细胞抗氧化保护中扮演着重要角色. 如果 GSH 的消耗不能被新的谷胱甘肽分子合成所补充的话, GR 活性的降低可能使得 GSH 耗竭. 本实验中 GR 活性和 GSH 含量的变化趋势大体相同, 充分验证了这一点.

### 2.6 鲫鱼肝脏 Se-GPx 活性的变化

如表 1 所示, 40d 长期暴露过后, 各浓度组中 2,4-DCP 对鲫鱼幼体肝脏 Se-GPx 活性都表现出了显著的诱导作用( *p* < 0.01). 低浓度时 Se-GPx 活性呈现正诱导反应, 表明鱼体解毒系统的解毒能力随污染浓度的升高而升高; 从 0.01 mg·L<sup>-1</sup> 浓度组开始 Se-GPx 呈现负诱导反应, 鱼体解毒能力随污染程度增加而降低. 在 Se-GPx 催化 ROOH 的反应中, GSH 被转化成为 GSSG, 这为 GR 提供了底物, 而高的 GR 活性也就意味着高含量的 GSSG 以及高活性的 Se-GPx, 从表 1 中可发现三者的变化趋势在后几个浓度组中比较吻合, 低浓度组中三者缺乏规律性变化则是因为氧化应激打破了鱼体内固有的平衡. Se-GPx 作为生物体内主要的抗氧化酶之一, 在保护细胞膜免受过氧化损伤中有着特殊的意义, 其功能水平的下降可能造成活性氧的累积, 从而造成细胞膜的损伤. 本实验中

Se-GPx 活性总体上呈现适应性反应充分说明了其在鱼体抗氧化系统中扮演的重要角色. 经分析还发现, 高浓度时(对照组及后四组) Se-GPx 活性( *y*) 和暴露浓度( *x*) 之间存在着良好的剂量-效应关系(图 2), 回归方程为:  $y = 122.3 x^3 - 196.03 x^2 + 77.595 x + 14.271$ ,  $R^2 = 0.9403$ .

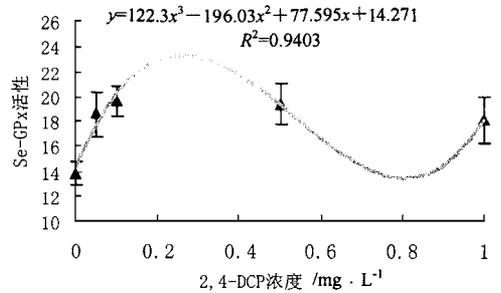


图 2 Se-GPx 活性与暴露浓度间的剂量-效应关系  
Fig.2 The concentration-response relationship between Se-GPx activity and exposure concentration

### 2.7 鲫鱼肝脏 GST 活性的变化

鲫鱼幼体肝脏中 GST 活性的变化如表 1 所示. 单边 ANOVA 分析表明, III、IV 组中 2,4-DCP 污染对鲫鱼肝脏 GST 活性表现出诱导作用( *p* < 0.05), 其余浓度组的 GST 活性与对照组相比则无显著差别. GST 作为生物体内一种重要的解毒酶, 其底物之一是自身也具有部分解毒功能的 GSH, 联系图 3 分析, 2,4-DCP 浓度很低时, 鱼体内正常的 GST 水平可以保证消除

脂质过氧化等带来的次级产物;随着污染胁迫的加重,GST 活性收到短暂激活,以消除更多的氧化产物;随着污染胁迫的进一步加重,GSH 严重耗竭,GST 活性重新下降至原来水平。

### 3 结论

早有研究报道,生物体内抗氧化成分会因污染胁迫的存在而改变。本次研究结果显示,不同浓度组中,鱼体肝脏抗氧化指标都呈现出较大变化,表明肝脏是 2,4-DCP 毒性作用的重要靶器官之一。而各实验组中 GSH 含量的显著降低、GSSG 含量的显著上升以及 Se-GPx 活性总体上的诱导趋势,则提示长期暴露引起肝脏的氧化应激,可能是肝脏中毒机制之一。

前人曾经做过 2,4-DCP 短期暴露影响水生生物酶学指标的研究。在 Petushok 等人的研究中,贻贝分别暴露于 0.15 mg/L 和 0.20 mg/L 2,4-DCP 72h 后,其消化腺中 GST 活性受到了显著诱导<sup>[3]</sup>;在 Shao Yang 等人的研究中,硅藻暴露于 6.0 mg/L 的 2,4-DCP 96h 后,SOD、GST 的活性受到了显著诱导,而 1 mg/L 和 3 mg/L 的 2,4-DCP 并不能引起 2 种酶活性的改变<sup>[4]</sup>。在本研究中,部分浓度暴露组 GST 和 SOD 活性也出现了诱导,这和前人结果相一致。不同的是,本研究发现,0.005 mg·L<sup>-1</sup>的低浓度 2,4-DCP 即能显著诱导肝脏 SOD 活性以及使 GR 活性和 GSH 含量受到显著抑制,这充分说明低浓度污染物对水生生物的长期效应不容忽视。

总之,生物体内的抗氧化防御指标有可能快速指示水体中污染物的存在。在本次慢性暴露实验中,SOD 活性对 2,4-DCP 异常敏感,而 GR、GSH 对低浓度 2,4-DCP 也较为敏感,这三项指标从分子水平上反映了污染物对鱼体肝细胞的损伤,可考虑作为水环境中 2,4-DCP 早期污染的生物标志物。另外,CAT 活性、GSSG 含量、Se-GPx 活性和暴露浓度之间存在着良好的剂量-效应关系,也可作为监测污染水体中 2,4-DCP 浓度的生化指标。至于这些抗氧化指标内在的变化机理,则牵涉到 2,4-DCP 作用于肝脏

的靶分子问题,这将是下一步在分子水平上的研究重点。

### 参考文献:

- 1 奚旦立,孙裕生,刘秀英.环境监测(修订版)[M].北京:高等教育出版社,1995.6~7.
- 2 金相灿著.有机化合物污染化学-有毒有机物污染化学.北京:清华大学出版社,1990.10~20;250~265.
- 3 Petushok N, Gabryelak T, Palecz D et al. Comparative study of the xenobiotic metabolising system in the digestive gland of the bivalve molluscs in different aquatic ecosystems and in aquaria experiments. *Aquat Toxicol.*, 2002, **61**: 65~72.
- 4 Shao Yang, Rudolf SS W, Richard YC K. Biodegradation and enzymatic responses in the marine diatom *Skeletona costatum* upon exposure to 2,4-dichlorophenol. *Aquat Toxicol.*, 2002, **59**: 191~200.
- 5 Qiming Yu, Yupadee Chaisuksant, Des Connell. A model for non-specific toxicity with aquatic organisms over relatively long periods of exposure time. *Chemosphere*, 1998, **38**(4): 909~918.
- 6 Hissin P J, Hilf R. A fluorometric method for determination of oxidized and reduced glutathione in tissues[J]. *Anal. Biochem.*, 1976, **74**(1): 214~226.
- 7 徐镜波,袁晓凡,郎佩珍.过氧化氢酶活性及活性抑制的紫外分光光度法测定.环境化学,1997,16(1):73~76.
- 8 邹国林,桂兴芬,钟晓凌等.一种 SOD 的测活方法——邻苯三酚自氧化法的改进.生物化学与生物物理进展,1986,4:71~73.
- 9 Bergmeyer H U. Methods of enzymatic analysis[M]. New York and London: Academic Press, 1963. 875~879.
- 10 Habig WH, Pabst MJ, Jakoby WB. Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J Biol Chem.*, 1974, **249**:7130~7139.
- 11 Hafeman DG, Sunde R A, Hoekstra WG. Effect of dietary selenium and erythrocyte and liver glutathione peroxidase in the rat. *J Nutr.*, 1973, **104**:580.
- 12 Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, 1976, **72**: 248~254.
- 13 Di Giulio R T, Washburn P C, Wenning R J et al. Biochemical responses in aquatic animals: a review of determinants of oxidative stress. *Environ Toxicol and Chem.*, 1989, **8**: 1103~1123.