

土霉素对日本锦鲤肝脏抗氧化防御系统的影响

孟文娜, 刘舒婷, 王晓蓉, 高士祥

(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)

摘要:土霉素(Oxytetracycline, 简称 OTC)是养殖业中广泛使用的药物之一,由于大量使用,已在水环境中不断被检出,其对水生生物及人类可能产生的影响已经引起人们广泛关注。采用室内染毒实验方法,研究了土霉素对典型淡水鱼类日本锦鲤肝脏抗氧化防御系统的影响,分析暴露于不同浓度(0、0.01、0.05、0.1、0.5、1.0、5.0、10 mg·L⁻¹)的 OTC 溶液 15 d 后鱼体肝脏中 ROS、MDA、SOD、CAT 和谷胱甘肽等指标,探讨其潜在的致毒机制。结果表明,ROS 信号强度在高浓度组(5 mg·L⁻¹ 和 10 mg·L⁻¹)与对照相比分别减少 44.2%和 32.5%,呈显著性差异;MDA 含量在 0.1 mg·L⁻¹ 和 5 mg·L⁻¹ 下显著减少,分别减少 41.7%和 52.3%;SOD 活性在 0.01 mg·L⁻¹ 下显著性增加 32.4%,CAT 和 GST 活性呈低浓度被诱导、高浓度被抑制的趋势;GSH 和 GSSG 含量的变化趋势相似,呈先减少后增加的趋势($P<0.05$)。上述结果表明低浓度 OTC 对日本锦鲤产生氧化应激,诱导了肝脏抗氧化防御系统,但高浓度下清除氧自由基的作用大于其氧化应激毒性,从而使得鱼体氧化应激程度减轻。抗氧化防御系统酶活性的变化只能间接反映污染物对生物造成应激效应的程度,要弄清楚 OTC 的致毒机制仍需进一步研究。

关键词:土霉素;日本锦鲤;抗氧化防御系统

中图分类号:X503.225 **文献标志码:**A **文章编号:**1672-2043(2010)05-0833-06

Antioxidant Responses in Liver of *Carassius auratus* Under Oxytetracycline Exposure

MENG Wen-na, LIU Shu-ting, WANG Xiao-rong, GAO Shi-xiang

(State Key Laboratory of Pollution Control and Resources Reuse, School of Environment, Nanjing University, Nanjing 210093, China)

Abstract: Oxytetracycline (OTC) is being used commonly for medical treatments in farming industry, but the associated potential effects of OTC is an increasing concern in the aquatic environment. In this paper, the effects of OTC on the antioxidant defense system of the liver of fish (*Carassius auratus*) were investigated. After the fish was exposed for 15 d to different concentrations of 0, 0.01, 0.05, 0.1, 0.5, 1.0, 5.0, 10 mg·L⁻¹ OTC, respectively, ROS, MDA, SOD, CAT, GSH and GSSG in the fish liver were analyzed to study the possible oxidative damage mechanism. The study showed that ROS signal intensity in the fish liver decreased by 44.2% and 32.5%, respectively, compared with the control when the fish was exposed to 5 mg·L⁻¹ and 10 mg·L⁻¹ of OTC. MDA contents decreased by 41.7% and 52.3% when exposed to 0.1 mg·L⁻¹ and 5 mg·L⁻¹, respectively. SOD activity markedly increased by 32.4% at the exposure concentration of 0.01 mg·L⁻¹. CAT and GST activities were induced at low concentrations but inhibited at high concentrations and the contents of GSH and GSSG had the similar change as well ($P<0.05$). These results suggested that low concentrations of OTC generated oxidative stress to *Carassius auratus* and triggered antioxidant defense, however, higher concentrations of OTC eliminated part of the ROS, and therefore reduced the degree of oxidative stress. Activity changes of anti-oxidation enzymes can only indirectly reflect the degree of pollutant stress to the organism and further studies are needed to understand the toxicity mechanism clearly.

Keywords: Oxytetracycline; *Carassius auratus*; antioxidant defense

随着集约化畜牧业的发展,兽用药物的使用量也日渐增加,其中抗生素用量的增加尤为明显。在各环

境介质中都发现了抗生素及其代谢物的残留、积累。在美国一家污水处理厂抗生素的残留量达 6 μg·L⁻¹,一养猪场养殖废水中抗生素含量高达 700 μg·L⁻¹[1-2]。进入环境中的抗生素及其残留物通过食物链对生态环境产生毒害作用,影响植物、动物和微生物的正常生命活动,最终将对人类健康产生影响[3-4]。国外于 20 世纪 70 年代就已开始关注抗生素在动物体内的残

收稿日期:2009-10-20

基金项目:国家重点基础研究发展计划(2008CB418102)

作者简介:孟文娜(1985—),女,山东淄博人,在读硕士,主要从事持久性有机污染物的环境行为、毒性效应的研究。

E-mail:mengwenna123@163.com

通讯作者:王晓蓉 E-mail:ekxr@nju.edu.cn

留问题。近年来国内外在兽药对生态环境中生物的影响已开始广泛研究,取得了许多重要的成果,特别是在药物饲料添加剂所产生的细菌耐药性及其机理,以及残留在动物食品中的抗菌药对人体健康的影响方面^[5-7]。

抗氧化防御系统是需氧生物体内非常重要的活性氧清除系统,主要包括酶性清除剂,如超氧化物歧化酶 SOD、过氧化氢酶 CAT、谷胱甘肽硫转移酶 GST 等,同时也包括如还原型谷胱甘肽 GSH、维生素 C、维生素 E 等小分子物质。抗氧化防御系统在维持机体正常代谢功能上起着十分重要的作用,其合成和减少受基因控制,在外源因子(如化学毒物)的刺激下,机体组织中自由基生成量会大量增加,从而诱导抗氧化酶的合成,这种应激补偿效应在动植物中普遍存在。已有研究表明^[8-10],许多污染物及其代谢产物会对生物体产生与氧化胁迫相关的毒性作用。因此,弄清新型污染物对生物体是否产生氧化胁迫作用非常必要。

在农用抗生素中,土霉素是水产养殖业中广泛且大量使用的四环素类抗生素的一种。最近几年,国内外对四环素在水生生态系统方面的研究报道迅速增多^[11-12],但在水生动物方面尤其是鱼类还鲜见报道,本实验以幼龄日本锦鲤为材料,研究土霉素暴露对日本锦鲤肝脏抗氧化防御系统的影响及可能的致毒机制,为进一步研究环境中四环素类抗生素的生态效应提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

UV 1600 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);Agilent 1100 高效液相色谱仪带二极管阵列检测器(DAD);Bruker 公司的 EMX 10/12 型电子顺磁共振仪。

试剂为分析纯及分析纯以上,其中 α -苯基-N-叔丁基甲亚胺-N-氧化物(α -phenyl-N-tert-butylnitron, PBN)及 OTC 购自 Sigma 公司,HLB 小柱(500 mg·6 mL⁻¹)购自 Waters 公司。

1.2 染毒条件

选取健康的体表无损伤的幼龄日本锦鲤作为实验材料,其平均体长为(10.8±0.34)cm,平均体重为(16.7±0.53)g,养鱼用水为经过空气泵曝气 2 d 的自来水,实验前将实验用鱼驯养 10 d。

根据预实验结果及实际环境中的浓度设定 OTC 暴露浓度梯度为:0.01、0.05、0.1、0.5、1、5、10 mg·L⁻¹

(以 DMSO 作为分散相)。选取健康的无体表损伤的幼龄日本锦鲤作为实验用鱼,随机分为对照组和实验组。对照组暴露于除氯自来水和只有溶剂的自来水,实验组暴露于以上浓度梯度的水中。采用 40 L 的玻璃缸,盛水 35 L。随机将 8 条鱼投入鱼缸,微量曝气,每日更换一半溶液,暴露时间为 15 d。pH 值为 7.3±0.3,水温(22.2±0.1)℃,DO>4 mg·L⁻¹,硬度约 100 mg·L⁻¹。驯养及实验期间日本锦鲤生长正常。

1.3 取样和样品预处理

暴露 15 d 后分别取对照组和实验组样品($n=6$)。用蒸馏水冲洗,擦干,量体长,称重。活体解剖,取出肝脏,用预冷生理盐水清洗血液,滤纸吸干,迅速称取适量置于冰浴中,加入预冷的体积比为 10:1 的 Tris-蔗糖缓冲液(pH=7.5),用玻璃匀浆器匀浆,将匀浆液于 4℃下 10 000 r·min⁻¹,离心 30 min,取上清液,置于-50℃冰箱内保存留待测酶、谷胱甘肽和蛋白。另称取适量肝组织,加入预冷的 EDTA 溶液和稀 HClO₄ 溶液,按上述方法匀浆离心,所得上清液用于 GSH、GSSG 测量,-50℃的冰箱内保存待用。

1.4 水中 OTC 实际浓度的测定^[13]

分别于换水前和换水后的 0、8、16、24 h 取水样,HPLC 分析发现 24 h 内水中 OTC 浓度波动范围为 70.3%~120%。因此基本上可以将设定浓度视为实际暴露浓度。

1.5 自由基的 PBN 捕获与 EPR 测定

将各实验组日本锦鲤取出 3 条,活体解剖,取出肝脏,采用罗义等^[14]的方法进行 PBN 的捕获与测定。

1.6 酶活性的测定

CAT 活性测定采用徐镜波等^[15]的方法。定义 25℃下、100 s 内使过氧化氢分解 1/2 时的酶蛋白量为 1 个 CAT 活性单位。

SOD 活性测定采用邻苯三酚自氧化法^[16]。酶活性单位定义为每毫升反应液中,每分钟抑制邻苯三酚自氧化速率达 50%的酶量。

GST 活性测定采用 Habig 法^[17]。一个 GST 活力单位[U·(mg Pr)⁻¹]定义为每毫克蛋白质,扣除非酶反应,每分钟使 GSH 浓度下降 1 μmol·L⁻¹。

GSH 和 GSSG 含量测定采用 Hissin 法^[18]。单位定义为每克肝脏含 GSH 的毫克数。

蛋白含量用 Bradford^[19]方法测定,以小牛血清白蛋白(BSA)为标准蛋白。

1.7 统计分析

实验结果表示为平均值±标准误差(mean±SDE,

$n=6$)。使用 SPSS 统计软件和 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。

2 结果与讨论

2.1 OTC 对日本锦鲤肝脏自由基信号强度的影响

从图 1 可以看出,与对照组相比,自由基信号强度总体上呈减少的趋势,单因素方差分析结果表明在低浓度下无明显变化,但是在高浓度组(5 和 10 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)显著($P<0.05$)减少,与对照相比分别减少 44.2% 和 32.5%。

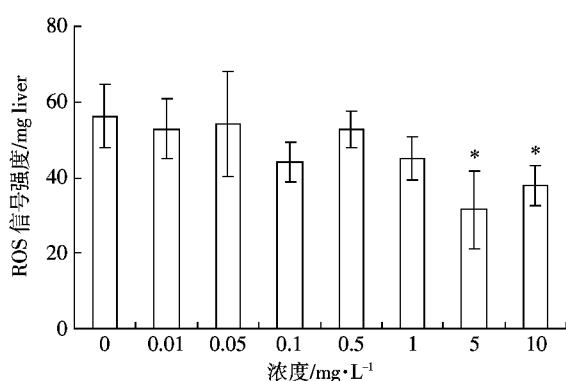


图 1 OTC 对日本锦鲤肝脏自由基信号强度的影响

Figure 1 The effects of OTC on the signal intensity of ROS in liver of *Carassius auratus*

2.2 OTC 对日本锦鲤肝脏 SOD 酶活性的影响

从图 2 中看出:与对照相比,日本锦鲤在 0.01 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 OTC 暴露下,其肝脏 SOD 活性出现了显著性诱导,与对照相比增加了 32.4%,在较高浓度下没有观察到明显变化,在 0.1 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 浓度时活性略有下降,可能是由于此时自由基减少所致。

2.3 OTC 对日本锦鲤肝脏 CAT 酶活性的影响

从图 3 可以看出,日本锦鲤肝脏 CAT 活性在

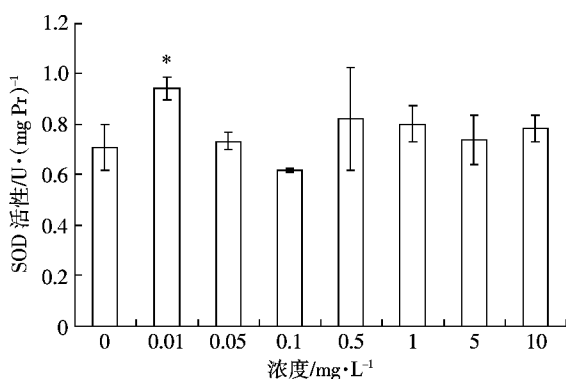


图 2 OTC 对日本锦鲤肝脏 SOD 的影响

Figure 2 The effects of OTC on the activity of SOD in the liver of *Carassius auratus*

0.01 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ OTC 浓度下被诱导,但是与对照组相比无显著性差异。在其他浓度下表现为受到抑制,并且在 0.05、0.1、0.5 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时与对照组相比差异显著,分别减少了 38.8%、47.6%、38.3%。这说明此时鱼体内的 H_2O_2 明显减少,有可能是 SOD 和 OTC 清除了部分自由基引起的。

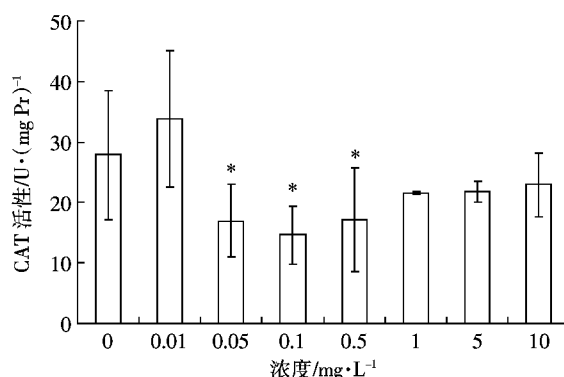


图 3 OTC 对日本锦鲤肝脏 CAT 的影响

Figure 3 The effect of OTC on the activity of CAT in the liver of *Carassius auratus*

2.4 OTC 对日本锦鲤肝脏 GST 的影响

从图 4 可以看出,OTC 暴露下日本锦鲤肝脏 GST 的活性先受到诱导后受到抑制:GST 在 0.01 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 0.05 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 低浓度时被轻微诱导,较高浓度下受到抑制,特别是在 0.1 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 10 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 浓度下被显著性抑制,与对照相比分别减少了 34.9%、25.2%。GST 的变化趋势说明鱼体内由外源性物质 OTC 引起的氧化应激程度在高浓度时有所减轻。

2.5 OTC 对日本锦鲤肝脏 MDA 含量的影响

图 5 表明,OTC 的暴露引起日本锦鲤肝脏 MDA 含量在低浓度下升高,高浓度下反而降低。暴露浓度

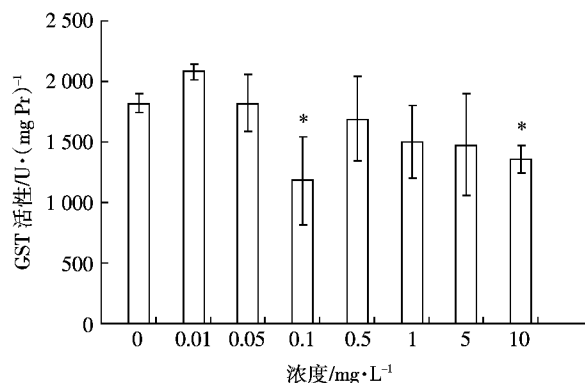


图 4 OTC 对日本锦鲤肝脏 GST 的影响

Figure 4 The effects of OTC on the activity of GST in the liver of *Carassius auratus*

在 $0.01 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,MDA 含量与对照组相比略有升高,但没有显著性差异,之后 MDA 含量减少,并且在 $0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时显著减少,与对照相比分别减少了 41.7%、52.3%。MDA 是膜脂过氧化程度的主要指标,其含量的显著减少说明机体的氧化损伤减轻。

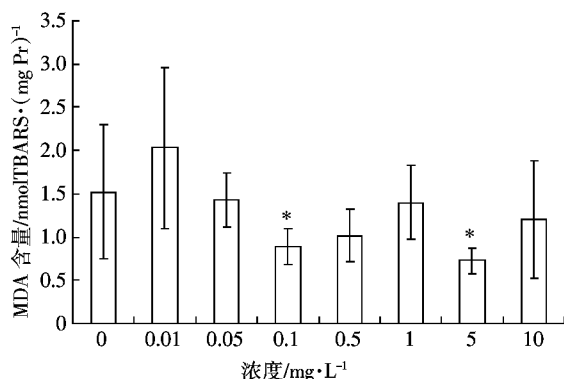


图 5 OTC 对日本锦鲤肝脏 MDA 含量的影响

Figure 5 The effect of OTC on the contents of MDA in the liver of *Carassius auratus*

2.6 OTC 对日本锦鲤肝脏 GSH 和 GSSG 含量的影响

不同浓度 OTC 对日本锦鲤肝脏 GSH、GSSG 含量影响如图 6 所示。与对照组相比,GSH 在 $0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时升高了 17.5%,并呈现显著性差异,其他浓度下受到轻微抑制。GSSG 在 0.01 、 0.05 、 0.5 、 $1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ OTC 暴露下显著减少,与对照相比分别减少了 28.8%、24.4%、25.9%、17.4%,但当暴露浓度为 $0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时由于 GSH 含量显著增加,GSSG 也显著增加了 29.6%,在 $5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 污染浓度下 GSSG 含量的变化不显著。虽然 GSH 和 GSSG 在某些浓度下均有显著性变化,但是其变化趋势相似,最终导致 GSH/GSSG 和总谷胱甘肽在对照组水平附近波动变化并不显著。

3 讨论

日本锦鲤在暴露于不同浓度的土霉素水溶液两周后,发现在所有实验浓度中日本锦鲤肝脏自由基信号强度均没有显著性增加,而且在 $5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 出现显著性减少,同时 MDA 含量在 $0.01 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时略有增加,其他浓度下有所降低,尤其是在 $0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时与对照组相比显著性减少。已有研究发现四环素类药物具有清除抗氧自由基的作用,可以使氧自由基减少^[20],由此可以推测土霉素在较高浓度下具有清除自由基的作用,使得日本锦鲤肝脏自由基信号强度显著降低。

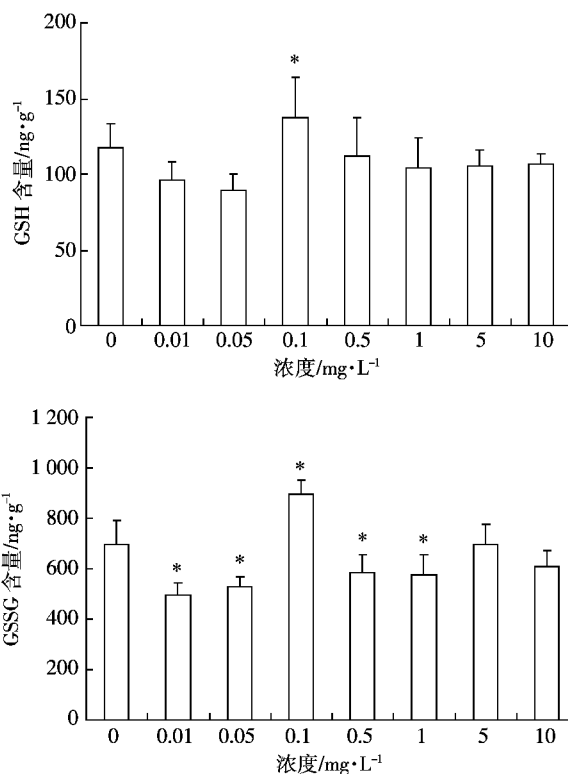


图 6 OTC 对日本锦鲤肝脏 GSH 和 GSSG 活性的影响

Figure 6 The effects of OTC on the contents of GSH and GSSG in liver of *Carassius auratus*

作为一种外源污染物,低浓度土霉素($0.01 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)暴露对日本锦鲤肝脏产生轻微氧化应激,诱导了抗氧化防御系统 SOD、CAT 和 GST 酶活性增加。SOD 活性增加可以清除多余的 $\text{O}_2 \cdot$ 生成 H_2O_2 , 同时以 H_2O_2 为底物的 CAT 酶活性也被诱导,与 GST 酶共同清除氧化产物。但在该浓度下日本锦鲤肝脏自由基信号强度并无显著增加,指示膜脂过氧化程度的主要指标 MDA 含量也无明显变化,说明机体通过调节抗氧化防御系统各种酶的活性基本清除了多余的自由基和其他氧化产物,从而未对机体造成氧化损伤。但是当 OTC 浓度大于 $0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 后,与对照组相比日本锦鲤肝脏自由基信号强度和 MDA 含量均呈降低趋势,SOD 酶活性虽没有显著性差异,但观察到在 $0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 也有轻微下降,CAT 酶活性在 0.05 、 0.1 和 $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的浓度下均被显著性抑制,GST 酶活性也在 0.1 和 $10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的浓度时被显著抑制,表明 OTC 在大于 $0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时能够清除机体产生的部分氧自由基,减轻鱼体的氧化应激程度。刘吉强等也发现了类似的现象:在实验的前 15 d 内低浓度四环素激活土壤转化酶和脲酶的活性,在高浓度下则抑制二者的活性^[21]。

GSH 能调节生物体内自由基浓度的平衡,在细

胞抗活性氧自由基损伤的解毒代谢中起着重要作用,GST能催化GSH与许多次级底物结合,包括脂质过氧化的次级产物,从而解除内源性或外源性毒物的毒性。在本实验中,随着OTC暴露浓度的升高,GST活性总体上呈先诱导后抑制的变化趋势,即在低浓度下,GST短暂激活,催化GSH与包括脂质过氧化的次级产物在内的多种底物结合,从而解除外源性毒物OTC的毒性,这与实验中GSH的含量降低的结果一致;在高浓度OTC处理下,GST活性降低,同时GSH的含量也回升至对照水平。以往研究^[8]发现污染物通过引起GSH减少GSSG增加从而使得GSH/GSSG比值降低,说明污染物可能对生物产生了氧化应激甚至是损伤。但本实验发现,在0.01和0.05 mg·L⁻¹浓度下GSH和GSSG与对照组相比均有明显减少,随着土霉素暴露浓度的升高,GSH和GSSG含量逐渐增加至对照组水平,在0.1 mg·L⁻¹时GSH和GSSG含量与对照相比分别增加17.5%和29.6%,其具体原因及是否存在其他致毒机制还有待于进一步研究。另外,土霉素不同于其他持久性有机污染物,在高浓度暴露下会对各种抗氧化酶产生毒害,从而导致各种酶活性降低和氧化损伤出现^[8-9]。本实验所分析的各种酶活性的变化和其他指标如ROS和MDA甚至是GSSG含量也没有明显的增加,说明OTC可能并不具有明显的氧化应激毒性作用,甚至可能具有消除自由基的作用。至于OTC是否存在其他致毒途径和致毒机制尚有待于进一步研究。

4 结论

(1)鱼体肝脏中CAT和GST酶活性对0.01 mg·L⁻¹ OTC暴露都非常敏感。CAT和GST酶活性变化趋势总体上相似,随着暴露浓度的增加,表现出先诱导后抑制的趋势。GSH和GSSG含量则总体上先减少后回升。大多数指标在OTC为0.1 mg·L⁻¹时变化明显,由此推测0.1 mg·L⁻¹可能是OTC发生作用的一个转折点。

(2)低浓度OTC对日本锦鲤抗氧化防御系统有一定的干扰作用,但要探明土霉素对水生生物尤其是鱼类的慢性毒性效应还需要研究其他致毒机制和新指标,并结合长期的野外实验进行论证。

参考文献:

- [1] Kemper N. Veterinary antibiotics in the aquatic and terrestrial environment[J]. *Ecological Indicators*, 2008, 8:1-13.
- [2] Yang S, Cha J, Carlson K. Quantitative determination of trace concentrations of tetracycline and sulfonamide antibiotics in surface water using solid-phase extraction and liquid chromatography ion trap tandem mass spectrometry rapid commun[J]. *Mass Spectrom*, 2004, 18:2131-2145.
- [3] Kim S C, Carlaon K. Temporal and spatial trends in the occurrence of human and veterinary antibiotics in aqueous and river sediment matrices [J]. *Environ Sci Technol*, 2007, 41:50-57.
- [4] Kostich M S, Lazorchak J M. Risks to aquatic organisms posed by human pharmaceutical use[J]. *Science of the Total Environment*, 2008, 389:329-339.
- [5] Isidori M, Lavorgna M, Nardelli A, et al. Toxic and genotoxic evaluation of six antibiotics on non-target organisms[J]. *Science of the Total Environment*, 2005, 346:87-98.
- [6] Kong W D, Zhu Y G, Liang Y C, et al. Uptake of oxytetracycline and its phytotoxicity to alfalfa (*Medicago sativa* L.) [J]. *Environmental Pollution*, 2007, 147:187-193.
- [7] Kim Y H, Choi K, Jung J Y, et al. Aquatic toxicity of acetaminophen, carbamazepine, cimetidine, diltiazem and six major sulfonamides, and their potential ecological risks in Korea[J]. *Environment International*, 2007, 33:370-375.
- [8] 张景飞, 王晓蓉. 2, 4-二氯苯酚低浓度长期暴露对日本锦鲤肝脏抗氧化系统的影响[J]. *中国环境科学*, 2003, 23(5):531-534.
ZHANG Jing-fei, WANG Xiao-rong. Effects of long term exposure of low level 2, 4-Dichlorophenol on the antioxidant defense system in liver of *Carassius auratus* [J]. *China Environmental Science*, 2003, 23(5):531-534.
- [9] 罗义, 纪靛靛, 苏燕, 等. 2, 4-二氯苯酚诱导日本锦鲤活性氧(ROS)的产生及其分子致毒机制[J]. *环境科学学报*, 2007, 27(1):129-134.
LUO Yi, JI Liang-liang, SU Yan, et al. Reactive oxygen species generation and the molecular toxic mechanism induced by 2, 4-dichlorophenol in *Carassius auratus* [J]. *Acta Scientiae Circumstantiae*, 2007, 27(1):129-134.
- [10] 王晓蓉, 罗义, 施华宏, 等. 分子生物标志物在污染环境早期诊断和生态风险评价中的应用[J]. *环境化学*, 2006, 25:320-325.
WANG Xiao-rong, LUO Yi, SHI Hua-hong, et al. Application of molecular biomarkers in early diagnosis and ecological risk assessment for water and soil[J]. *Environmental Chemistry*, 2006, 25:320-325.
- [11] Brain R A, Wilson C J, Johnson D J, et al. Effects of a mixture of tetracyclines to *Lemna gibba* and *Myriophyllum sibiricum* evaluated in aquatic microcosms[J]. *Environmental Pollution*, 2005, 138:425-442.
- [12] Pomati F, Netting A G, Calamari D, et al. Effects of erythromycin, tetracycline and ibuprofen on the growth of *Synechocystis* sp and *Lemna mino* [J]. *Aquatic Toxicology*, 2004, 67:387-396.
- [13] Brown K D, Kulis J, Thomson B, et al. Occurrence of antibiotics in hospital, residential, and dairy effluent, municipal wastewater, and the Rio Grande in New Mexico[J]. *Science of the Total Environment*, 2006, 366:772-783.
- [14] 罗义, 施华宏, 王晓蓉, 等. 2, 4-二氯苯酚诱导鲫鱼肝脏自由基的产生和脂质过氧化[J]. *环境科学*, 2005, 26(3):29-32.
LUO Yi, SHI Hua-hong, WANG Xiao-rong, et al. Free radical generation and lipid peroxidation induced by 2, 4-dichlorophenol in liver of *Carassius auratus* [J]. *Environmental Science*, 2005, 26(3):29-32.

- [15] 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[J]. 环境化学, 1997, 16(1):73-76.
XU Jing-bo, YUAN Xiao-fan, LANG Pei-zhen. The determination of enzymic activity and its inhibition on catalase by ultraviolet spectrophotometry[J]. *Environmental Chemistry*, 1997, 16(1):73-76.
- [16] 赵云斌,刘敏,余忠谊. 邻苯三酚自氧化法测定血中超氧化物歧化酶的活性[J]. 中国卫生检验杂志, 2001, 11(4):287-288.
ZHAO Yun-bin, LIU Min, YU Zhong-yi. Determination of superoxide dismutase activity in blood by method of pyrogallol autoxidation[J]. *Chinese Journal of Health Laboratory Technology*, 2001, 11(4):287-288.
- [17] Habig W H, Pabst M J, Jakoby W B. Glutathione S-transferases the first enzymatic step in mercapturic acid formation[J]. *Anal Biochem*, 1974, 249:7130-7139.
- [18] 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.
- [19] Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding[J]. *Anal Biochem*, 1976, 72:248-254.
- [20] 杨森,冯艺戎,等. 四环素类药物抗氧自由基作用的研究[J]. 中国药理学通报, 1999, 15(5):472-473.
YANG Sen, FENG Yi-rong, et al. A study of the effects on reactive oxygen species interfering with tetracyclines[J]. *Chinese Pharmacological Bulletin*, 1999, 15(5):472-473.
- [21] 刘吉强,诸葛玉平,崔丽娜. 外源四环素对土壤酶活性和油菜品质的影响[J]. 应用生态学报, 2009, 20(4):943-948.
LIU Ji-qiang, ZHUGE Yu-ping, CUI Li-na. Effects of exogenous tetracycline on rape soil enzyme activity and rape quality[J]. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2009, 20(4):943-948.