

微囊藻毒素-LR 对罗非鱼肝脏活性氧自由基含量及相关抗氧化酶活性的影响

陈家长^{1,2}, 宋超¹, 胡庚东¹, 瞿建宏¹, 孟顺龙¹, 范立民¹

(1.中国水产科学研究院淡水渔业研究中心,中国水产科学研究院内陆渔业生态环境和资源重点开放实验室,江苏 无锡 214081;

2.南京农业大学无锡渔业学院,江苏 无锡 214081)

摘要:通过腹腔注射的方式研究了微囊藻毒素-LR(MC-LR)对罗非鱼肝脏活性氧自由基含量(ROS)及相关抗氧化酶,如超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)活性的影响。实验设计了5个剂量组(对照组、50、100、250、500 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ MC-LR),并在2、12、24、36、84 h检测了ROS含量、SOD和CAT酶活性的变化。结果表明,在MC的作用下,肝脏组织能够产生大量的ROS。SOD和CAT这两种抗氧化酶在清除过量ROS的过程中发挥了不同的作用,SOD酶动态变化的过程表现为在36 h突然上升后恢复的趋势,而CAT酶活性在24 h和84 h有两个高峰。实验结果为以抗氧化酶如SOD、CAT作为监测MC-LR引起罗非鱼毒性作用的生物标志物提供了可行性的依据,为进一步从抗氧化系统的角度研究MC对鱼类的毒性作用机制奠定了基础。

关键词:微囊藻毒素;罗非鱼;活性氧自由基;抗氧化酶

中图分类号:X503.225 **文献标志码:**A **文章编号:**1672-2043(2011)08-1521-05

Effects of Microcystin-LR on Antioxidant Enzymes and Reactive Oxygen Species in Tilapia Fish

CHEN Jia-zhang^{1,2}, SONG Chao¹, HU Geng-dong¹, QU Jian-hong¹, MENG Shun-long¹, FAN Li-min¹

(1. Key Open Laboratory of Ecological Environment and Resources of Inland Fisheries, Freshwater Fisheries Research Center, Chinese Academy of Fishery Sciences, Wuxi 214081, China; 2. Wuxi Fishery College, Nanjing Agricultural University, Wuxi 214081, China)

Abstract: This paper firstly focused on the variation of reactive oxygen species (ROS) and antioxidant enzymes, such as superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT), to tilapia in exposed to microcystin-LR (MC-LR) by intraperitoneal. In this experiment, five treatments (control, 50, 100, 250, 500 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ MC-LR) were designed, the value of ROS, SOD, CAT were detected at time 2, 12, 24, 36, 84 h. The results showed that surplus ROS were generated in liver in exposed to MC-LR by intraperitoneal. SOD and CAT played a different role in eliminating the surplus ROS, dynamic process of SOD showed that it had a sudden increase in 36 h, and dynamic process of CAT showed that it had two peaks respectively in 24 h and 84 h. The experiment was to certify that antioxidant enzymes could be used as biomarkers in monitoring the toxic effect of tilapia in exposed to MC in liver, due to their dose and time-response effect variation. The experiment makes a progress in studying the toxic mechanism of microcystin in terms of the antioxidant defence system.

Keywords: microcystin; tilapia; reactive oxygen species; antioxidant enzymes

近年来,池塘与湖泊富营养化(eutrophication)日益严重,由富营养化造成的蓝藻水华(algae bloom)已经成为危害水产养殖业发展的重要因素之一。氮、磷等营养元素输入过多引起的蓝藻水华不仅会极大地降低养殖水质,引起水体大面积缺氧(hypoxia)^[1],蓝藻生长期间释放的次级代谢产物微囊藻毒素(microcystin,简称MC)更会通过食物链等方式进入鱼体内

并富集,这对养殖鱼类的毒性影响及质量安全不容忽视。罗非鱼作为重要的出口鱼类之一,主要在我国南方地区养殖,这里是蓝藻水华的高发地区。也有学者利用罗非鱼的杂食性特性及对蓝藻强大的消化能力来进行水华控制^[2]。但关于罗非鱼对微囊藻毒素的忍耐力却没有具体的评价,因此,研究微囊藻毒素对罗非鱼的毒性影响显得尤为必要。

最近,微囊藻毒素对罗非鱼的毒性作用机理研究主要集中在抗氧化防御机制等方面^[3]。一般研究认为,生物体在进化过程中,逐渐从厌氧呼吸(anaerobic respiration)转变为有氧呼吸(aerobic respiration),在呼

收稿日期:2011-01-26

基金项目:现代农业产业技术体系(CARS-49)

作者简介:陈家长(1964—),男,硕士,研究员,主要从事渔业环境方面的研究工作。E-mail:chenjz@ffrc.cn

吸链的末端由于氧的加入使得电子传递与 ATP 的生成效率更高,同时电子泄露(electron leakage)也不可避免的发生,此时发生的 Fenton 反应会产生大量的活性氧自由基(reactive oxygen species,简称 ROS),通常有 H_2O_2 、 $O_2^{\cdot-}$ 、 $\cdot OH$ 等几种自由基^[4]。

ROS 一方面发挥着重要的生理功能,如细胞信号转导等;另一方面,如果过量产生也会对机体产生氧化损伤(oxidation damage),甚至造成机体组织损坏和死亡。抗氧化系统含有各种抗氧化酶,其中有超氧化物歧化酶(superoxide dismutase,简称 SOD)和过氧化氢酶(catalase,简称 CAT),这两种酶通过歧化等作用来清除机体内产生的各种自由基,使机体各组织能够达到氧化平衡。

近期在研究微囊藻毒素对罗非鱼的氧化胁迫机理方面,主要是将抗氧化酶作为生物标志物来揭示微囊藻毒素对罗非鱼的毒性作用,并没有反映抗氧化酶本身在毒性作用期间的动态变化和作为生物标志物的合理性^[5]。本试验通过腹腔注射方式来研究微囊藻毒素对罗非鱼肝脏组织活性氧自由基及相关抗氧化酶(SOD、CAT)的影响,为进一步从抗氧化系统的角度来研究微囊藻毒素对罗非鱼的毒性作用机理提供相关的资料,并为罗非鱼产业的质量安全问题研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试剂与仪器

试剂:MC 的一种亚型结构 MC-LR(纯度 $\geq 95\%$, HPLC),购自 ZEN-U Biotechnology Co., LTD(台湾)公司;超氧化物歧化酶(SOD)与过氧化氢酶(CAT)试剂盒,考马斯亮兰总蛋白试剂盒和标准蛋白均由南京建成生物工程研究所提供;活体组织氧化应激活性氧(ROS)初级绿色荧光测定试剂盒由上海杰美基因医药科技有限公司提供。其他试剂为分析纯,为上海化学试剂厂产品。

仪器:721 分光光度计,荧光分光光度计(Cary Eclipse, VARIAN),组织匀浆机(model PRO 200, Pro-scientific Inc Oxford. CT USA),恒温水浴锅,低温冷冻高速离心机(Sigma2-16K),超低温冰箱(Thermo Fisher scientific)。

1.2 实验鱼类和实验用水

试验用鱼为尼罗罗非鱼(*Oreochromis niloticus*),由中国水产科学研究院淡水渔业研究中心南泉养殖场提供,平均体长为 8.5 cm,平均体重为 40 g。试验前

经筛选并在水族箱中驯养 10 d 以上,没有出现异常死亡情况,驯养期间每日定时投自制的颗粒饵料。为防止饵料与试验物质反应,试验前 1 d 开始禁食。

试验用水为曝气 7 d 后除氯的自来水,具体水质参数见表 1。

表 1 试验期间试验用水的相关参数

Table 1 Parameters of water in experiment

参数	数值	参数	数值
pH	6.85~7.05	Fe	0.05 mg·L ⁻¹
总硬度	7.85~8.10(德国度)	Pb	未检出
溶氧	>5 mg·L ⁻¹	Cu	未检出
Zn	0.02 mg·L ⁻¹	Cd	未检出
COD	2.25~2.45 mg·L ⁻¹	水温	(20±1)℃

1.3 腹腔注射

实验用 5 个水族箱,每个水族箱有 15 条鱼,其中 4 个水族箱中的鱼用来注射 MC-LR,注射剂量分别为 50、100、250、500 $\mu g \cdot kg^{-1} BW \cdot fish^{-1}$,注射体积为 0.2 mL,MC-LR 溶于 0.9%(W/V)的生理盐水中;剩余一个水族箱中的鱼用来做对照,每条鱼只注射 0.2 mL 的生理盐水。上述实验每组设 1 个平行。

注射剂量的选择根据文献所报道的引起罗非鱼急性毒性效应的 MC-LR 的剂量^[9]。实验期间未发现鱼死亡。

1.4 鱼体取样及组织前处理

取样时间分别为 2、12、24、36、84 h。每个时间点取样时从对照组和 4 个处理组中各取出 3 条鱼,连同平行实验中的鱼,每组共有 6 条鱼。用 MS-222 麻醉后,用纱布擦干鱼体表面,并取出其肝脏。将肝脏组织(约 0.2 g)放入冰冷的生理盐水中漂洗,除去血液,用滤纸拭干后称重,放入离心管中,用眼科剪刀尽快剪碎组织(室温大于 25℃时操作应在冰水浴中进行)。准确加入 0.9%的生理盐水(生理盐水的体积总量应是组织重量的 9 倍)于离心管中,随后用微量组织匀浆机(量程为 300 μL ~5 mL)使组织匀浆化。将制备好的 10%匀浆离心(3 000 r·min⁻¹, 15 min),取上清液放入-80℃冰箱中,测定时取出。

1.5 分析方法

将匀浆从 10%稀释为 1%,用试剂盒测定鱼体肝脏中超氧化物歧化酶(SOD)和过氧化氢酶(CAT)活性,并用考马斯亮兰总蛋白试剂盒和标准蛋白测定组织的蛋白质含量,测试方法均为比色法。SOD 和 CAT 活性的单位均为 U·mg⁻¹prot。在测定组织中 ROS 含量时,将肝脏组织匀浆稀释到最佳浓度,稀释倍数为 50

倍,随后用杰美基因提供的试剂盒进行测定,方法为荧光分光光度计比色法(激发波长 490 nm,散发波长 520 nm),结果均为相对值(RFU),处理组比色值若高于空白组,则为 ROS 升高并成正相关,反之亦然。

1.6 数据处理

实验使用 JMP 统计软件对数据进行统计处理。采用 *t*-test 进行显著性检验并用 LSD 法对数据进行多重比较。

2 结果与分析

2.1 不同注射时间和注射剂量下罗非鱼肝脏组织中活性氧自由基(ROS)含量的变化

图 1 表示在不同注射时间和注射剂量下罗非鱼肝脏组织中 ROS 含量的变化。可以看出,对照组生理盐水的注射使得 ROS 含量在 24 h 有了显著升高,但之后得到恢复。与对照组相比,低剂量 MC-LR ($50 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$) 的注射并没有引起显著的差异。当注射剂量达到 $100 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 以上时,ROS 含量出现了被诱导和被抑制的现象。在 12 h 和 24 h,ROS 得到了诱导,其中,在 12 h 时,较于同一对照组,100、250、 $500 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 剂量组 ROS 含量分别上升了 34.23%、47.90% 和 66.37%; 在 24 h 时,较于此时对照组,100、250、 $500 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 剂量组 ROS 含量分别上升了 32.61%、42.44% 和 55.91%。而在 2、36 h 和 84 h 时,ROS 得到了抑制。其中,在 2 h 时较于同一对照组,100、250、 $500 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 剂量组 ROS 含量分别下降了 18.88%、39.73% 和 49.56%; 在 36 h 时较于同一对照组,100、250、 $500 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 剂量组 ROS 含量分别下降了 18.80%、30.24% 和 39.23%; 在 84 h 时较于同一对照组,100、250、 $500 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 剂量组 ROS 含量分别下降了 19.84%、42.43% 和 48.71%。从 ROS 含量上升和下降的态势来看,ROS 受到作用程度与剂量存在明显的正相关关系。从注射

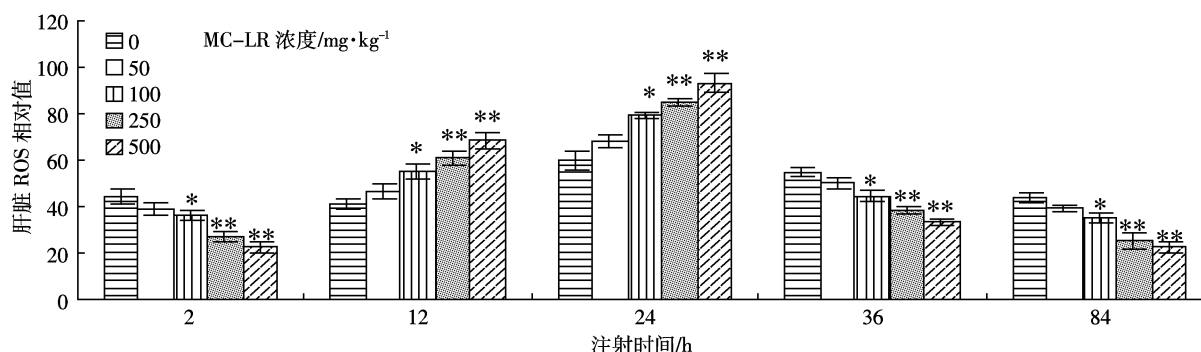
时间的变化中发现整个注射过程呈现 ROS 先抑制后升高之后又抑制的过程,其中,ROS 含量出现上升和下降两个突变的过程。

2.2 不同注射时间和注射剂量下罗非鱼肝脏组织中超氧化物歧化酶(SOD)活性的变化

图 2 表示了在不同注射时间和注射剂量下罗非鱼肝脏组织中超氧化物歧化酶活性的变化。可以看出,罗非鱼肝脏 SOD 活性在前段时间,与对照组相比,都没有明显的变化,只出现 2 h 时 $100 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 剂量组较与此刻对照组活性上升。但到 36 h 时,各剂量组肝脏 SOD 活性明显得到诱导,50、100、250、 $500 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 剂量组较与对照组活性分别上升了 89.55%、152.24%、174.98% 和 303.88%。从 SOD 活性变化趋势来看,此时效应与剂量之间存在明显的正相关。从整个暴露过程来看,罗非鱼肝脏中 SOD 活性呈现升高后又恢复正常值的趋势。

2.3 不同注射时间和注射剂量下罗非鱼肝脏组织中过氧化氢酶(CAT)活性的变化

图 3 表示了在不同注射时间和注射剂量下罗非鱼肝脏组织过氧化氢酶(CAT)活性的变化。可以看出,在 24 h 和 84 h 时 CAT 活性两次的诱导,其中在 24 h 时,50、100、250、 $500 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 剂量组较与对照组活性分别上升了 37.13%、50.01%、94.29% 和 133.25%; 在 84 h 时,50、100、250、 $500 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 剂量组较与对照组活性分别上升了 115.01%、134.48%、166.69% 和 216.47%。从 CAT 诱导阶段的态势看,其活性效应与剂量存在明显的正相关。而在 2、12 h 和 36 h 时,CAT 活性受到了抑制,其中在 2 h 时,50、100、250、 $500 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 剂量组比较与对照组活性分别下降了 70.71%、63.95%、51.81% 和 41.39%; 在 12 h 时,50、100、250、 $500 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 剂量组比较与对照组活性分别下降了 52.94%、46.14%、7.92% 和 4.27%; 在 36 h 时,



同一注射时间下的各处理组与对照组之间的比较, $P < 0.05$ 为差异显著,用 * 表示; $P < 0.01$ 为差异极显著,用 ** 表示,下同。

图 1 不同注射剂量下罗非鱼肝脏 ROS 活性随时间的变化

Figure 1 Dose- and time-dependent variation of reactive oxygen species(ROS) in the liver of tilapia

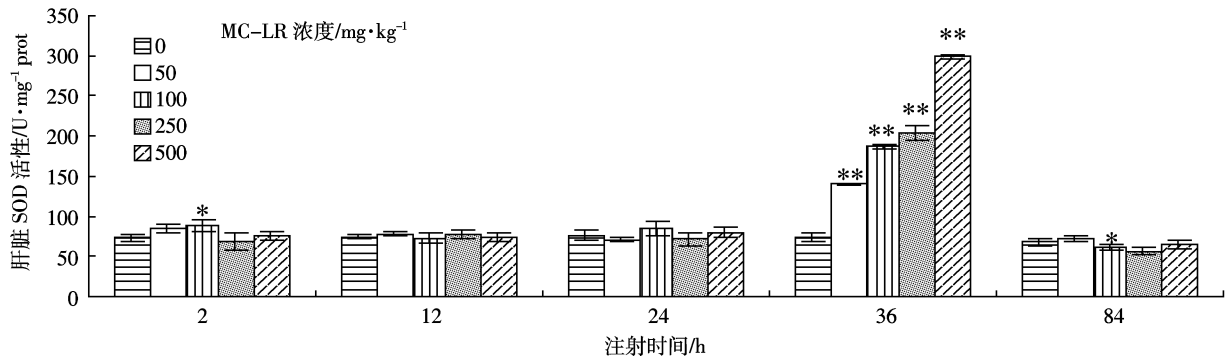


图 2 不同注射剂量下罗非鱼肝脏 SOD 酶活性随时间的变化

Figure 2 Dose- and time-dependent variation of superoxide dismutase (SOD) in the liver of tilapia

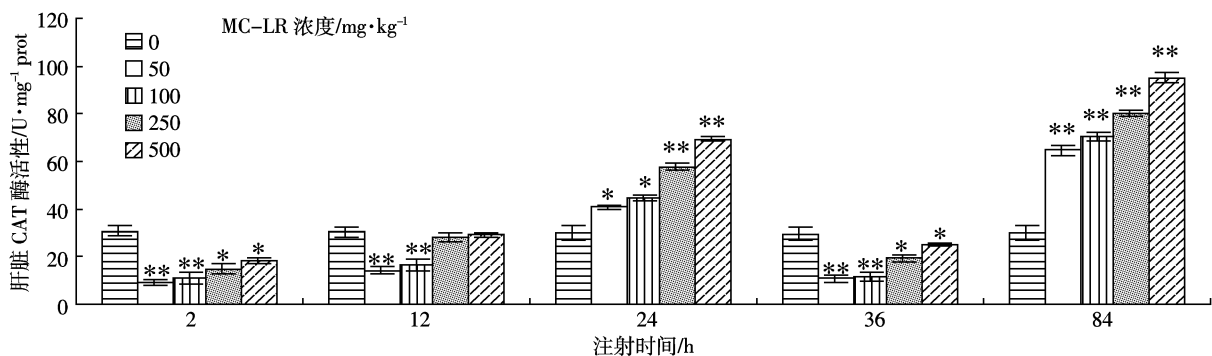


图 3 不同注射剂量下罗非鱼肝脏 CAT 酶活性随时间的变化

Figure 3 Dose and time-dependent variation of catalase (CAT) in the liver of tilapia

50、100、250、500 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 剂量组比较与对照组活性分别下降了 63.69%、59.80%、34.08%和 15.08%。在 CAT 活性受到抑制时,低剂量组注射(50、100 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$)时,其抑制作用更明显。从整个注射过程来分析,CAT 活性变化的曲线是多阶段的,表现出高浓度诱导作用强,低浓度抑制作用大的趋势。

3 讨论

由于鱼类和蓝藻的生长环境彼此吻合,伴随着长期的适应过程,鱼类对蓝藻释放的微囊藻毒素形成了极强的耐受性,并且远高于哺乳动物^[6-7]。所以当研究者在水华控制技术方面用鲢鳙鱼进行控藻试验时^[8]发现,鲢鳙鱼对 MC 的代谢能力很强,毒性效应也能很快得到恢复^[9]。考虑到罗非鱼的杂食特性和对蓝藻的强消化能力,有研究者将其用于小型湖泊的控藻试验^[2],由于罗非鱼繁殖能力强和不耐低温等特性带来的控藻后的生态风险,罗非鱼本身对 MC 是否有着与鲢鳙鱼同样的忍耐力,现在还未见到具体的评价。Prieto 在总结研究其他鱼类所用的 MC 剂量后,用 500 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 剂量的 MC-LR 和 MC-RR 来研究 MC 的两种亚型结构对罗非鱼毒性的差别时,并没有发现鱼

的死亡^[5],本实验据此剂量进行腹腔注射,实验中也并没有发现鱼的死亡。

研究认为,MC 对鱼类毒性作用的靶器官是肝脏,MC 与肝脏组织中还原型谷胱甘肽(GSH)的结合是其解毒作用的第一步^[9]。这个过程会产生大量的活性氧自由基。图 1 显示了 MC 作用下肝脏产生大量的活性氧自由基。从一般毒理学理论来看,只要有外来物质进入机体,都会引起组织中 ROS 的异常增加,试验中也发现,生理盐水作为对照注射到罗非鱼体内,也使得肝脏中 ROS 的含量在 24 h 有了明显的升高。当低剂量 ($\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$)MC-LR 注射时,ROS 含量的升高并没有显著区别于对照组,但是当剂量达到 100 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 时,肝脏中 ROS 含量显著增加,例如,在 500 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 的剂量注射时,在 12 h 和 24 h 时,ROS 含量是分别较于对照组上升了 66.37%和 55.91%。ROS 含量的升高呈现抑制-诱导-抑制的变化过程,其原因可能与 MC 特殊的环七肽结构有关^[10],在这个环形结构中,存在很多的烯醇式变化结构,这是一个既能容纳多余电子的结构,也是一个能释放电子的结构。

ROS 的过量产生必然会引起机体内部抗氧化防御系统的作用。抗氧化防御系统发生作用首先是引起

谷胱甘肽系统的反应,同时也会引起 SOD 与 CAT 酶活性的变化。

SOD 与 CAT 两种酶作为机体内抗氧化防御系统的一部分,对不同的活性自由基的歧化作用起着重要的催化作用。SOD 主要催化反应是: $2 O_2 \cdot + 2H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2$, 而 CAT 主要催化反应: $2H_2O_2 \rightarrow O_2 + 2H_2O$ 。由此可见,这两种酶对不同活性氧自由基的清除各自发挥着不同的作用,并且 CAT 对自由基的最终清除起到关键作用^[7]。图 2 和图 3 分别显示了 MC 作用下 SOD 和 CAT 酶活性的动态变化过程。本实验中 SOD 活性在 36 h 显著地升高,呈现诱导后得到恢复的趋势,而 CAT 活性则在 24 h 和 84 h 两个阶段得到诱导,出现两次高峰。可能是因为 CAT 酶在清除完由 MC 作用产生的 H_2O_2 之后又出现了由 SOD 酶从 $O_2 \cdot$ 催化而来的 H_2O_2 , 使肝脏出现两次 H_2O_2 的高峰,相应地,出现了两次 CAT 酶活性变化的高峰。

在总结其他研究者进行污染物引起机体抗氧化酶变化的研究时发现^[12],抗氧化酶的变化并不一定是一种简单的动态变化趋势,在多数情况下其动态变化曲线是多阶段的^[13],既有诱导,又有抑制,这与污染物的毒性作用机制的类型有关。本试验中,CAT 酶活性呈现多阶段的变化曲线,并且高浓度诱导作用强,低浓度抑制强度大,可见抗氧化酶活性变化的复杂性。研究者在将抗氧化酶作为生物标志物来监测污染物毒性效应时,正是利用了其剂量-效应关系和时间-效应关系^[14]。本试验中,CAT 和 SOD 虽然变化曲线不一,但是在某个注射时间都存在明显的剂量-效应关系,这说明在微囊藻毒素的胁迫下,将肝脏中的这两种抗氧化酶作为生物标志物来监测其毒性效应是可行的。

4 小结

前人对抗氧化防御系统的研究较多,但是从此角度来研究微囊藻毒素对罗非鱼的毒性作用相对较少,一般研究只是将众多抗氧化酶作为间接表明微囊藻毒素对罗非鱼毒性的指示剂,也没有考虑将抗氧化酶作为监测微囊藻毒素作用于罗非鱼的生物标志物。

从本实验的研究来看,在微囊藻毒素对罗非鱼的毒性作用过程中,在肝脏中产生了大量的 ROS,在清除 ROS 的过程中,SOD 和 CAT 这两种抗氧化酶发挥了重要的作用。从 SOD 和 CAT 在 MC 作用下的动态变化过程中也可以看出,SOD 和 CAT 活性在特定注射时间下具有明显的剂量-效应关系,将 SOD 和 CAT

作为抗氧化生物标志物是可行的。

参考文献:

- [1] Wu S. S. Rudolf. Hypoxia from molecular responses to ecosystem responses[J]. *Marine Pollution Bulletin*, 2002, 45:35-45.
- [2] 陆开宏,金春华,王扬才. 罗非鱼对蓝藻的摄食消化及富营养化水体水华的控制[J]. *水产学报*, 2005, 29(6):811-818.
LU Kai-hong, JIN Chun-hua, WANG Yang-cai. Control of cyanobacterial blooms in eutrophication lakes by tilapia[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2005, 29(6):811-818.
- [3] MacKintosh C, Beattie K A, Klumpp S, et al. Cyanobacterial microcystin-LR is a potent and specific inhibitor of protein, Phosphatases 1 and 2 A from both mammals and higher plants [J]. *FEBS Lett*, 1990, 264:187-192.
- [4] IRS F F Benzie. Evolution of antioxidant defence mechanisms [J]. *Eur J Nutr*, 2000, 39:53-61.
- [5] Prieto A I, Jos A, Pichardo S, et al. Differential oxidative stress responses to microcystins LR and RR in intraperitoneally exposed tilapia fish (*Oreochromis sp.*) [J]. *Aquatic Toxicology*, 2006, 77:314-321.
- [6] Zurawell R W, Chen H, Burke J M, et al. Hepatotoxic cyanobacteria: A review of the biological importance of microcystins in freshwater environments[J]. *J Toxicol Environ Health*, 2005 (B 8):1-37.
- [7] Carmichael W W, Azevedo S M F O, An J S, et al. Human fatalities from cyanobacteria: chemical and biological evidence for cyanotoxins[J]. *Environ Health Perspect*, 2001 (109):663-668.
- [8] 刘建康,谢平. 揭开武汉东湖蓝藻水华消失之谜[J]. *长江流域资源与环境*, 1999, 8(3):312-319.
LIU Jian-kang, XIE Ping. Unraveling the enigma of the disappearance of water bloom from the east lake (Lake Donghu) of Wuhan[J]. *Resources and Environment in the Yangtze Basin*, 1999, 8(3):312-319.
- [9] 谢平. 水生动物体内的微囊藻毒素及其对人类的潜在威胁[M]. 北京:科学出版社, 2006:2-72.
XIE Ping. Microcystin in aquatic animals with potential risk to human health[M]. Beijing: Science Press, 2006:2-72.
- [10] Yoshizawa S, Matsushima R, watanabe M F, et al. Inhibition of protein phosphatases by microcystins and nodulin associated with hepatotoxicity[J]. *J Cancer Res Clin Oncol*, 1990(116):609-614.
- [11] Harada K I, Matsuura K, Suzuki M, et al. Isolation and characterization of the minor components associated with microcystins LR and RR in the cyanobacterium (blue-green algae) [J]. *Toxicon*, 1990, 28:55-64.
- [12] 孟顺龙,陈家长,胡庚东,等. 低浓度阿特拉津对鲫鱼超氧化物歧化酶(SOD)活性的影响[J]. *农业环境科学学报*, 2007, 26(1):170-174.
MENG Shun-long, CHEN Jia-zhang, HU Geng-dong, et al. Effects of low concentration of atrazine on superoxide dismutase in *Carassius auratus* [J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2007, 26(1):170-174.
- [13] 李效宇,刘永定,宋立荣,等. 鲤肝细胞抗氧化系统对微囊藻毒素毒性的反应[J]. *水生生物学报*, 2003, 27(5):472-475.
LI Xiao-yu, LIU Yong-ding, SONG Li-rong, et al. Responses of antioxidant systems in the hepatocytes of common carp (*Cyprinus carpio* L.) to the toxicity of microcystin-LR [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2003, 27(5):472-475.
- [14] Lam K. S Paul, John S Gray. The use of biomarkers in environmental monitoring programmes [J]. *Marine Pollution Bulletin*, 2003, 46:182-186.