

Effects of Cu^{2+} on SOD and POD Enzymatic Activities in *Danio rerio*

Jingjun Guo

Qingdao No. 2 Middle School of Shandong Province, Qingdao Shandong
Email: environzane@163.com

Received: Apr. 7th, 2018; accepted: Apr. 21st, 2018; published: Apr. 28th, 2018

Abstract

Effects of Cu^{2+} on the body weight, body length, SOD and POD enzyme activities of *Danio rerio* under different water hardness were studied. Results showed that there was no significant effect of different Cu^{2+} concentrations on body length and weight either at water hardness of 50 mg/L or 250 mg/L. However, there were effects of Cu^{2+} concentrations on SOD and POD enzymatic activities of *Danio rerio*. SOD enzymatic activity was induced at low Cu^{2+} concentrations and was inhibited at high Cu^{2+} concentrations after 2-day exposure. POD enzymatic activity was first inhibited, then induced and then inhibited at low concentrations, while it was first inhibited and then induced at high concentrations.

Keywords

Cu^{2+} , *Danio rerio*, Enzymatic Activity, SOD, POD

Cu^{2+} 对斑马鱼SOD及POD酶活的影响研究

郭京君

山东省青岛第二中学, 山东 青岛
Email: environzane@163.com

收稿日期: 2018年4月7日; 录用日期: 2018年4月21日; 发布日期: 2018年4月28日

摘要

以斑马鱼(*Danio rerio*)为研究对象, 研究了不同硬度条件下 Cu^{2+} 对斑马鱼体长体重、SOD和POD酶活性的影响。结果表明, 在硬度为50 mg/L与250 mg/L条件下, 不同的 Cu^{2+} 浓度, 对斑马鱼的体长体重无明显影响。另一方面, Cu^{2+} 对斑马鱼SOD和POD活性有不同的影响, 其中斑马鱼SOD活性在暴露2天后呈现

低浓度诱导高浓度抑制的状态。POD活性表现为低浓度为抑制-诱导-抑制效应,高浓度为抑制-诱导效应。

关键词

铜, 斑马鱼, 酶活, SOD, POD

Copyright © 2018 by author and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

重金属铜是生命必需的微量元素, 作为氧化还原催化剂或氧的载体参与生物体内 30 多种酶的组成, 但超过一定浓度就会产生毒性[1] [2]。在淡水中的背景值一般为 0.20~0.30 $\mu\text{g/L}$, 但其进入水环境的途径相当多, 在水产养殖中常使用硫酸铜防治疾病及灭杀藻类[3] [4], 如鱼类养殖中常用 0.7 mg/kg CuSO_4 防治车轮虫、口丝虫等原生动植物疾病并可杀死复口吸虫、甲壳类等寄生虫, 蛙类养殖中也常用 0.7 mg/kg CuSO_4 防治体表寄生虫病等[5]。

铜是水产养殖中常用的药物, 可以防治鱼病, 也可作除藻剂, 杀死除去丝状藻等浮游植物。同时, 较多的鱼用药物添加了铜以增加药效, 且以硫酸铜为主要形式, 研究表明溶解态铜对水生生物的毒性最强[6]。铜导致鱼类产生行为回避反应, 这主要是由于铜可损害鱼类的神经生理功能, 破坏嗅觉上皮结构, 减少嗅觉中受体数目。同时铜也可影响鱼类的血液生理, 这进一步影响了耗氧率[7]。

目前, 水环境的污染日趋严重, 引起了人们的广泛重视[8]。水环境重金属污染的来源除了自然因素之外, 更主要的是人类活动造成的。污染重金属可以通过积累作用蓄积在水生动、植物体内, 并通过食物链最终传递给人类[9]。尽管被铜污染的水体, 很少导致水生生物急性中毒[10]。但慢性中毒会经常发生而影响水生生物的生长、繁殖和抗病能力。研究重金属对水生生物的活性胁迫作用, 对于水产品养殖及环境治理乃至人类自身都具有重要的意义[11]。本文以标准试验材料斑马鱼为试验生物, Cu 作为目标污染物, 进行斑马鱼的 21 天延长试验, 研究其 SOD、POD 酶活变化, 为揭示 Cu 的毒性机理提供科学依据。

2. 材料与方法

2.1. 实验材料

试验用鱼为斑马鱼(*Danio rerio*), 为国际上公认的标准试验鱼, 已被广泛应用于药物毒理学、生态毒理学、环境监测以及疾病研究等科研领域[12] [13]。本实验用鱼体长为 2.71 ± 0.81 cm, 体重为 0.11 ± 0.10 g。

硫酸铜($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, AR)为北京化学试剂三厂生产。配制时, 先用蒸馏水配制成质量浓度为 320 mg/L 的 Cu^{2+} 的母液, 在实验中所用的质量浓度由其稀释而成。

缓冲液: 含 0.25 mol/L 蔗糖、6 mmol/L EDTA- Na_2 , 10 mmol/L Tris, pH 值为 7.14。

超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化物酶(POD)酶活力检测试剂盒购自南京建成生物工程研究所。BCA 蛋白浓度测定试剂盒为北京鼎国昌盛生物技术有限责任公司生产。

实验用水为标准稀释水, 由 CaCl_2 、 MgSO_4 、 NaHCO_3 、KCl 和去离子水配置而成。实验水温为 $(22 \pm 1)^\circ\text{C}$ 。

2.2. 实验方法

2.2.1. 预实验

选定4个间隔较大的质量浓度范围进行预实验,与此同时,设不加毒物的空白组对照,观察24、48、72、96 h斑马鱼反应,并按50 mg/L和250 mg/L两种硬度设置每组不同的浓度梯度。

具体浓度设计如下: 1) 50 mg/L: 2, 8, 32, 128 $\mu\text{g/L}$; 2) 250 mg/L: 8, 32, 128, 512 $\mu\text{g/L}$ 。根据半静态生物试验法,实验期间每24 h更换一次实验液,每浓度放5尾斑马鱼,在实验中观察其行为和中毒症状。中毒后,经多次刺激无反应则判断为死亡,将死亡斑马鱼从水中捞出并记录死亡数。根据预实验所得出的质量浓度范围来确定正式实验的质量浓度。

2.2.2. 正式实验

本实验参考鱼类14天延长毒性试验的标准方法[14],分别在硬度为50 mg/L和250 mg/L条件下,按1.5倍浓度梯度设置6个质量浓度组。 Cu^{2+} 质量浓度设计如下: 1) 50 mg/L: 2, 3, 4.5, 6.75, 10.13, 15.19 $\mu\text{g/L}$; 2) 250 mg/L: 6, 9, 13.5, 20.25, 30.38, 45.56 $\mu\text{g/L}$ 。每组设1个空白对照组,同时设3个平行组,试验温度 $22 \pm 1^\circ\text{C}$ 。试验容器为2 L烧杯(盛试液1.6 L),随机放入大小均一的斑马鱼10条,每隔24 h换试液一次,试验开始时连续观察供试斑马鱼的中毒症状,记录死亡数量并及时清出死亡个体。同时加设一套同样的试验,检测不同暴露时间的鱼体酶活。实验期间每日喂食1次,试验光暗比为12 h:12 h。分别在暴露2、4、8、14与21 d时,每个梯度各平行组烧杯中随机选取3尾幼鱼,用预冷双蒸水洗净,滤纸吸干后,于 -20°C 保存。测定各暴露时间下斑马鱼的SOD和POD酶活。21天试验完毕后,用游标卡尺测出不同硬度下不同浓度组的每条鱼的体长,用纸吸干鱼身上的水分后用分析天平测出斑马鱼体重。

2.2.3. 酶液制备

取整条斑马鱼,用预冷蒸馏水($0\sim 4^\circ\text{C}$)洗净,滤纸吸干。按每克组织加9 mL冰冷酶提取液(0.125 mmol/L蔗糖,6 mmol/L EDTA- Na_2 ,10 mmol/L Tris, $\text{pH} = 7.14$),用玻璃匀浆器在冰浴中匀浆。匀浆液在高速冷冻离心机中于10,000 r/min离心20 min,取上清,测定酶活力。多余酶液 -20°C 冷冻保存。

2.2.4. 酶活力的测定

样品上清液中蛋白含量的测定采用考马斯亮蓝比色法,SOD测定采用黄嘌呤氧化法改进的方法-羟胺法,POD测定采用一般分光光度法。酶活检测试剂盒按照操作说明进行[15]。

SOD活性单位定义为每mg组织蛋白在1 mL反应液中,SOD抑制率达到50%时所对应的SOD量为1个活性单位(U) [16]; POD酶活性单位定义为,在 37°C 条件下,每毫克组织蛋白每分钟催化1 μg 底物的酶量定义为1个酶活力单位(U) [17]。酶蛋白含量用BCA蛋白浓度测定试剂盒测定。SOD酶活力单位采用U/(mg pr)表示,POD酶活力单位采用U/(mg pr)表示。

2.2.5. 数据处理

所有数据分析均采用单因素方差分析(One-factor analysis of variance)。数据分析与作图软件为SPSS18.0与Origin 9.0。

3. 结果与分析

3.1. 斑马鱼的中毒症状

斑马鱼在不同质量浓度 Cu^{2+} 中表现出不同程度的中毒症状,在最高浓度组,斑马鱼暴露24 h后开始出现异常现象,喜欢在水面附近活动,开始剧烈水平游动然后逐渐变得缓慢,最后躺卧死于水面,死亡

个体有轻微浮肿。

3.2. 对斑马鱼体长体重的影响

表 1 显示, 各 Cu^{2+} 处理组, 斑马鱼体长与体重与对照组相比, 无显著性差异($p > 0.05$)。说明在水体硬度 50 mg/L 且长期暴露于 Cu^{2+} 条件下, Cu^{2+} 对斑马鱼体长与体重的影响不显著。

表 2 显示, 各 Cu^{2+} 处理组, 斑马鱼体长与体重与对照组相比, 无显著性差异($p > 0.05$)。说明在水体硬度 250 mg/L 且长期暴露于 Cu^{2+} 条件下, Cu^{2+} 对斑马鱼体长与体重的影响不显著。

由以上可知, Cu^{2+} 对斑马鱼的体长体重无明显影响。

3.3. Cu^{2+} 对斑马鱼 SOD 活力的影响

图 1 显示, 当水体硬度为 50 mg/L 时, 斑马鱼的 Cu^{2+} 各处理组在 2 d 内组织 SOD 活性变化不明显, 但随着时间的延长, 到 4 d 后, Cu^{2+} 各处理组的变化趋于显著, 且低浓度组 SOD 的活性提高, 高浓度组 SOD 活性得到抑制。其中浓度为 2.00 $\mu\text{g/L}$ 和 3.00 $\mu\text{g/L}$ 的 Cu^{2+} 处理组, SOD 活性在开始均表现为增强, 后表现出抑制; 浓度为 4.50 $\mu\text{g/L}$ 组在 2~8 d 时间段呈现缓慢上升趋势, 14 d 后开始呈现显著下降趋势。10.13 $\mu\text{g/L}$ 和 15.19 $\mu\text{g/L}$ 组在 2~8 d 期间呈现下降趋势, 8 d 之后有上升趋势, 14 d 后趋于平稳。

图 2 表明, 当水体硬度为 250 mg/L 时, 整体上在前 4 d 内, 所有浓度组 SOD 活性均处于被抑制状态, 然后 SOD 活性逐渐上升。6.00 $\mu\text{g/L}$ 和 9.00 $\mu\text{g/L}$ Cu^{2+} 浓度组在 8 d 之后趋于稳定, 并且略有下降。而其他浓度组在 8 d 到 14 d 内有所下降, 14 d 后逐渐上升。

Table 1. Effects of Cu^{2+} on body length and body weight of zebrafish at the hardness of 50 mg/L

表 1. 50 mg/L 硬度下 Cu^{2+} 对斑马鱼体长与体重的影响

| Cu^{2+} 浓度($\mu\text{g/L}$) | 体长(cm) | 体重(g) |
|--|-----------------|-------------------|
| 对照 | 2.75 \pm 0.31 | 0.115 \pm 0.027 |
| 2.0 | 2.59 \pm 0.83 | 0.112 \pm 0.023 |
| 3.0 | 2.66 \pm 0.35 | 0.094 \pm 0.026 |
| 4.5 | 2.74 \pm 0.46 | 0.116 \pm 0.032 |
| 6.75 | 2.94 \pm 0.20 | 0.143 \pm 0.062 |
| 10.13 | 2.72 \pm 0.33 | 0.128 \pm 0.034 |
| 15.19 | 2.63 \pm 0.21 | 0.103 \pm 0.021 |

Table 2. Effects of Cu^{2+} on body length and body weight of zebrafish at the hardness of 250 mg/L

表 2. 250 mg/L 硬度下 Cu^{2+} 对斑马鱼体长与体重的影响

| Cu^{2+} 浓度($\mu\text{g/L}$) | 体长(cm) | 体重(g) |
|--|-----------------|-------------------|
| 对照 | 2.60 \pm 0.26 | 0.101 \pm 0.022 |
| 6.0 | 2.29 \pm 0.24 | 0.108 \pm 0.031 |
| 9.0 | 2.64 \pm 0.36 | 0.115 \pm 0.034 |
| 13.5 | 2.74 \pm 0.30 | 0.116 \pm 0.040 |
| 20.25 | 2.61 \pm 0.34 | 0.108 \pm 0.025 |
| 30.38 | 2.71 \pm 0.31 | 0.103 \pm 0.037 |
| 45.56 | 2.61 \pm 0.31 | 0.107 \pm 0.043 |

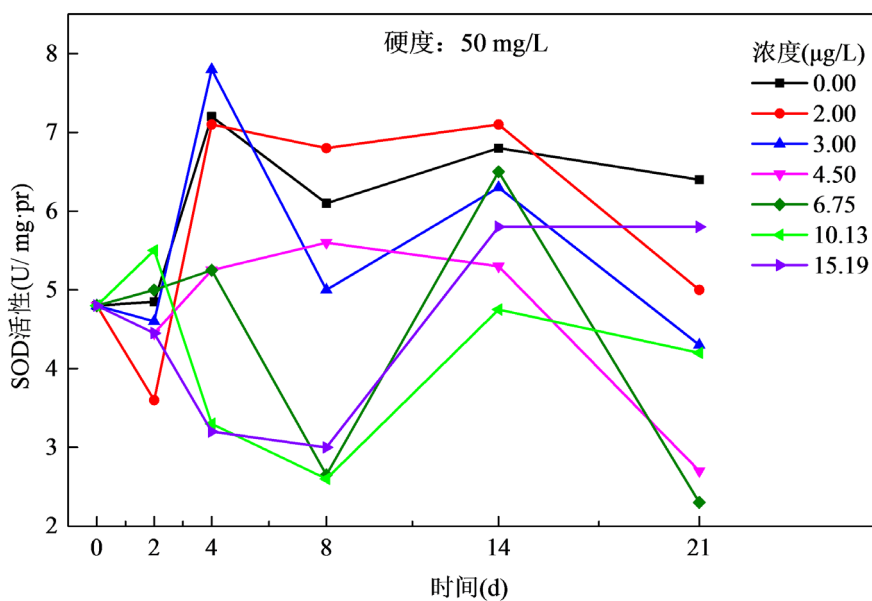


Figure 1. Relationship of SOD activities and exposure time of Cu^{2+} at the hardness of 50 mg/L
图 1. 水体硬度 50 mg/L 下斑马鱼 SOD 活性与 Cu^{2+} 暴露时间关系

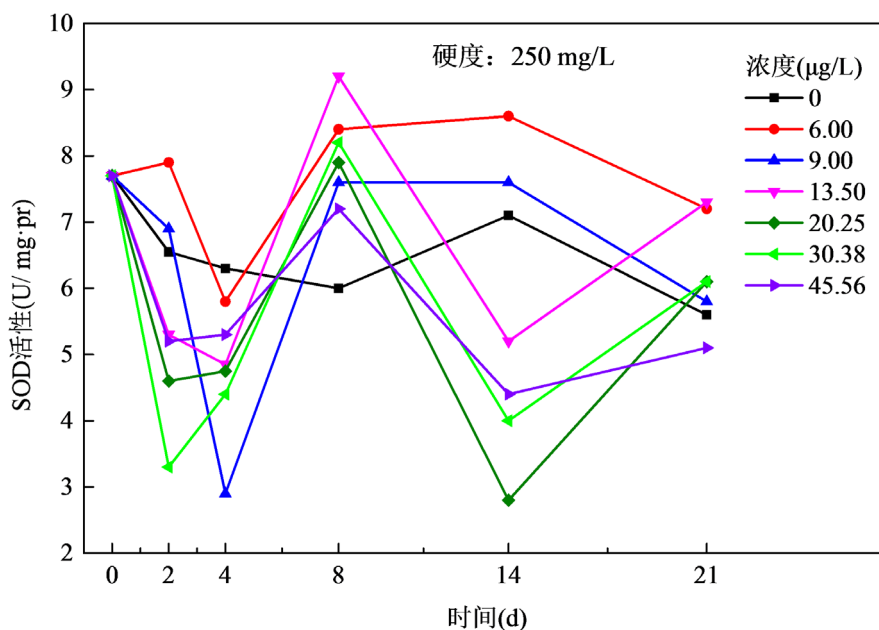


Figure 2. Relationship of SOD activities and exposure time of Cu^{2+} at the hardness of 250 mg/L
图 2. 水体硬度 250 mg/L 下斑马鱼 SOD 活性与 Cu^{2+} 暴露时间关系

3.4. Cu^{2+} 对斑马鱼 POD 酶活的影响

Cu^{2+} 对斑马鱼 POD 酶活影响的数据见图 3 和图 4, 在 50 mg/L 硬度组中, Cu^{2+} 浓度为 2.00 $\mu\text{g/L}$ 和 3.00 $\mu\text{g/L}$ 时, POD 活性在 2 d 内受到抑制, 在 2~4 d 内逐渐增强, 4 d 后又开始受到抑制, 8 d 之后趋于稳定。 Cu^{2+} 浓度为 4.50 $\mu\text{g/L}$ 和 6.75 $\mu\text{g/L}$ 组在 2~8 d 呈现缓慢下降趋势, 8 d 之后逐渐上升。10.13 $\mu\text{g/L}$ 和 15.19 $\mu\text{g/L}$ 组从第 2 d 到 14 d 呈现下降趋势, 14 d 后 10.13 $\mu\text{g/L}$ 浓度组趋于平稳, 15.19 $\mu\text{g/L}$ 浓度组略有上升。

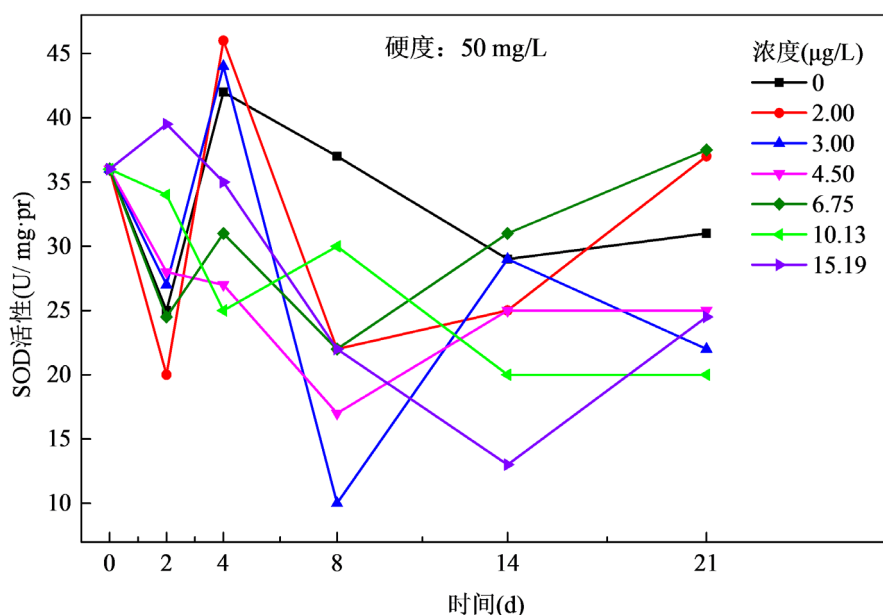


Figure 3. Relationship of POD activities and exposure time of Cu^{2+} at the hardness of 50 mg/L
图 3. 水体硬度 50 mg/L 下斑马鱼 POD 活性与 Cu^{2+} 暴露时间关系

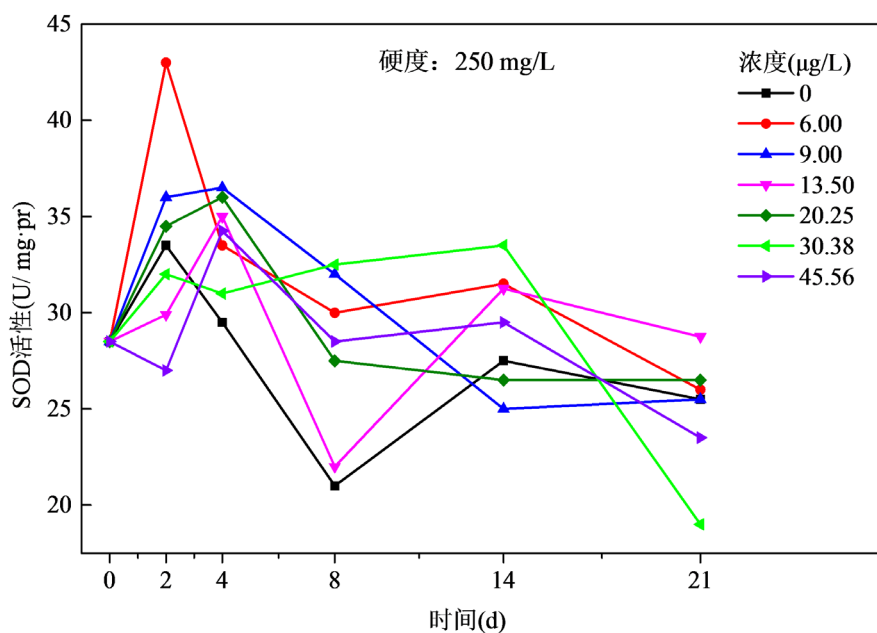


Figure 4. Relationship of SOD activities and exposure time of Cu^{2+} at the hardness of 250 mg/L
图 4. 水体硬度 250 mg/L 下斑马鱼 POD 活性与 Cu^{2+} 暴露时间关系

图 4 表明, 在 250 mg/L 硬度组中, 浓度为 6.00 $\mu\text{g/L}$ 组的 POD 活性在 2 d 增强, 其余浓度组 2 d 内基本无明显变化。2 d 后 6.00 $\mu\text{g/L}$ 组的 POD 活性开始受到抑制, 其后逐渐下降, 8 d 之后趋于稳定。9.00 $\mu\text{g/L}$ 组 4 d 后开始受到抑制, POD 活性随时间逐步降低。13.50 $\mu\text{g/L}$ 4 d 内趋于平稳, 4 d 后呈现抑制诱导状态, 14 天又趋于平稳。20.35 $\mu\text{g/L}$, 30.38 $\mu\text{g/L}$ 和 45.56 $\mu\text{g/L}$ 组 4 d 后呈现抑制状态。

4. 讨论

动物体在新陈代谢过程中,产生的超氧阴离子自由基(OH^- 、 O_2^- 等)可引发脂质过氧化,破坏膜的结构,进而引发DNA断裂、酶蛋白失活,甚至导致细胞、机体死亡。由于脂质过氧化物最终分解产物中有丙二醛(MDA),所以MDA含量可以作为自由基中毒损伤的指标。鱼体中SOD是一类金属酶,含Cu、Zn原子,能催化超氧阴离子自由基(O_2^-)转化为过氧化物,POD等酶类又进一步催化组织中低浓度的过氧化物氧化其他底物,清除过氧化物和 H_2O_2 ,从而降低自由基对机体的损害作用。因此,SOD和POD的活性也可以用来评价污染物对水生生物的影响[1]。

4.1. Cu^{2+} 对斑马鱼SOD酶活的影响

SOD是 O_2^- 的清除剂,它能专一清除生物经氧化产生的超氧阴离子自由基,将其歧化为 H_2O_2 和 O_2 ,是机体防御过氧化损害的关键酶之一。在正常生理状态下,由代谢产生的活性氧可为抗氧化防御系统所控制,但当某些污染物在体内进行生物转化时,同时产生氧化还原循环,生成大量活性氧,从而引起机体氧化应激反应,在这些活性氧的产生和转化中,SOD起着非常重要的作用[18]。

对于斑马鱼, Cu^{2+} 各处理组在2d内,组织SOD活性的变化不明显,但随着时间的延长, Cu^{2+} 各处理组的变化趋于显著。低浓度组提高了SOD的活性,高浓度组SOD活性得到抑制。

在低浓度或短时间内,鱼暴露在重金属中,鱼体内产生过量 O_2^- ,诱导鱼体SOD活性提高。重金属是离子通道的阻碍物,能阻碍各种离子通道,从而影响细胞内信号传导而导致体内各种酶活性的变化,对生物体产生毒害作用。当大量重金属离子进入体内,随着时间的延长,鱼体产生大量 O_2^- ,超过鱼体SOD清除能力时,就会对组织细胞造成损伤,影响鱼体的正常生理活动,使SOD活性降低和丧失,甚至导致细胞死亡[5]。高浓度显示出被抑制的趋势,这可能是由于铜离子浓度较低时,产生少量的 O_2^- ,在 O_2^- 的诱导下,SOD的合成能力增强。但SOD清除 O_2^- 的能力总是有限度的。

SOD清除 O_2^- 的能力与其含量和活性有关,许多研究表明,当生物体受到轻度逆境胁迫时,SOD活性往往升高;而当受到重度逆境胁迫时,SOD活性通常降低,使生物体内积累过量的活性氧,从而导致生物体受到伤害。本实验结果同样发现,低浓度铜胁迫下,斑马鱼体内的SOD活性升高[19]。

毒物在低浓度下出现的这种现象,是其在无毒情况下的应激反应,这一现象称为“毒物兴奋效应”。到目前为止,许多研究证明,“毒物兴奋效应”具有普遍性;高浓度 Cu^{2+} 胁迫下,斑马鱼体内SOD活性极显著性下降,因此, Cu^{2+} 胁迫下SOD活性的降低,造成斑马鱼的活性氧伤害很可能是 Cu^{2+} 对斑马鱼形成毒害的重要原因之一[20]。

4.2. Cu^{2+} 对斑马鱼POD活力的影响

POD存在于真核生物细胞的过氧化物酶体中,以铁卟啉为辅基,能催化过氧化氢、氧化酚类等有毒物质和调节氧含量使细胞免受高浓度氧毒害。它利用 H_2O_2 氧化供氢体,它对 H_2O_2 要求专一而对供氢体要求广泛,能够反映生物体产生和消除自由基的能力以及细胞代谢的强度。SOD是生物体防御氧化损伤的重要酶类,它能催化 O_2^- 发生歧化反应,生成 H_2O_2 和 O_2 [21]。

有研究表明生物在轻度逆境胁迫时,POD会升高来抵御外界刺激,但在重度逆境胁迫下超过机体抵御能力,POD会降低,生物积累大量活性氧自由基导致机体受损。

Cu^{2+} 暴露对斑马鱼POD活性表现为低浓度为抑制-诱导-抑制效应,高浓度为抑制-诱导。暴露初期斑马鱼机体产生POD清除含氧自由基,抵抗外界刺激机体增强自身防御,但此时POD产生和清除含氧自由基平衡已打破,表现为POD活性降低。而 Cu^{2+} 随暴露时间增加,POD活性降低。这是因为斑马鱼机体受到损伤,含氧自由基浓度增大,超出POD清除能力,机体清除含氧自由基机制严重失衡的表现,导

致 POD 活性急剧下降[22]。

Cu²⁺各处理组中低浓度组 Cu²⁺暴露时,对斑马鱼体长体重无显著影响,而短期内斑马鱼 SOD 活性变化不明显,但随着时间的延长,SOD 活性提高,导致“毒物兴奋效应”。高浓度 Cu²⁺暴露时,随着时间的延长和浓度的增加,SOD 的活力抑制明显。而 POD 活性表现为低浓度为抑制-诱导-抑制效应,高浓度为抑制-诱导。

5. 结论

Cu²⁺对斑马鱼体长体重无显著影响,Cu²⁺各处理组 SOD 活性表现为低浓度诱导-抑制,高浓度抑制。而 POD 活性表现为低浓度为抑制-诱导-抑制效应,高浓度为抑制-诱导。

基金项目

青岛二中教师发展基金项目(EZ2016010)资助。

参考文献

- [1] 柳敏海, 罗海忠, 陈波, 等. 铜、镉对鳊鱼幼鱼鳃丝 Na⁺-K⁺-ATPase 和肝脏 SOD 酶活性的影响[J]. 安全与环境学报, 2007, 7(4): 5-8.
- [2] 周新文, 朱国念, Mwalilino J., 等. Cu、Zn、Pb、Cd 及其混合重金属离子对鲫鱼(*Carassius auratus*) DNA 甲基化水平的影响[J]. 中国环境科学, 2001, 21(6): 549-552.
- [3] Flemming, C.A. and Trevors, J.T. (1989) Copper Toxicity and Chemistry in the Environment: A Review. *Water, Air and Soil Pollution*, **44**, 143-158. <https://doi.org/10.1007/BF00228784>
- [4] 王振, 金小伟, 王子健. 铜对水生生物的毒性: 类群特异性敏感度分析[J]. 生态毒理学报, 2014, 9(4): 640-646.
- [5] 鲁双庆, 刘少军, 刘红玉, 等. Cu²⁺对黄鳝肝脏保护酶 SOD、CAT、GSH-PX 活性的影响[J]. 中国水产科学, 2002, 9(2): 138-141.
- [6] 周剑, 杜军, 刘光迅, 等. 4 种常用药物对长薄鳅幼鱼的急性毒性试验研究[J]. 西南农业学报, 2012, 25(5): 1920-1924.
- [7] Linder, M.C. and Hazeghazam, M. (1996) Copper Biochemistry and Molecular Biology. *American Journal of Clinical Nutrition*, **63**, 797S.
- [8] 吴寅, 吴永贵, 马岚, 等. 水体酸化条件下 Cu(II)对斑马鱼胚胎的毒性效应[J]. 生态毒理学报, 2013, 8(3): 389-394.
- [9] 聂志娟, 徐钢春, 张守领, 等. 铜对刀鲚幼鱼的急性毒性及对肝抗氧化酶活性与组织结构的影响[J]. 中国水产科学, 2014, 21(1): 161-168.
- [10] 韩建, 彭维兵, 韩利文, 等. 铜、汞和铅对斑马鱼仔鱼肝脏发育的影响[J]. 山东科学, 2016, 29(5): 54-59.
- [11] Mcgeer, J.C., Szebedinszky, C., McDonald, D.G. and Wood, C.M. (2000) Effects of Chronic Sublethal Exposure to Waterborne Cu, Cd or Zn in Rainbow Trout. 1: Iono-Regulatory Disturbance and Metabolic Costs. *Aquatic Toxicology*, **50**, 231-243. [https://doi.org/10.1016/S0166-445X\(99\)00105-8](https://doi.org/10.1016/S0166-445X(99)00105-8)
- [12] Dai, Y.J., Jia, Y.F., Chen N., et al. (2014) Zebrafish as a Model System to Study Toxicology. *Environmental Toxicology & Chemistry*, **33**, 11-17. <https://doi.org/10.1002/etc.2406>
- [13] 任文娟, 汪贞, 王蕾, 等. 双酚 A 及其类似物对斑马鱼胚胎及幼鱼的毒性效应[J]. 生态毒理学报, 2017, 12(1): 184-192.
- [14] OECD (1984) Test No. 204: Fish, Prolonged Toxicity Test: 14-Day Study. Organization for Economic Co-Operation and Development.
- [15] 张鼎元, 曹潇, 郭春阳, 等. 乙酸铜对银鲳幼鱼急性毒性及抗氧化酶活性的影响[J]. 生态毒理学报, 2016, 11(4): 280-286.
- [16] 袁勤生. 超氧化物歧化酶的分析测定[J]. 中国医药工业杂志, 1989, 20(10): 473-477.
- [17] 张薇, 徐长君, 吴杨, 等. 采油污水对斑马鱼 POD 酶的影响[J]. 浙江农业科学, 2015, 56(2): 285-287.
- [18] 吴红松. 长期钡喂养对鲤鱼肝胰脏、肾脏抗氧化酶活性的影响[J]. 核农学报, 2017, 31(1): 201-207.

-
- [19] 孔强, 赵岩, 付荣恕. 3种重金属联合对孔雀鱼肝脏抗氧化酶系统的影响[J]. 供水技术, 2010, 4(6): 10-13.
- [20] 姚志峰, 章龙珍, 庄平, 等. 铜对中华鲟幼鱼的急性毒性及对肝脏抗氧化酶活性的影响[J]. 中国水产科学, 2010, 17(4): 731-738.
- [21] 张贵生. 稀土元素对鲤鱼肝胰脏多种酶及MDA含量的影响[J]. 生物技术, 2008, 18(2): 36-38.
- [22] 张贵生. 镉对鲤鱼肾和鳃抗氧化性和酯酶同工酶的影响[J]. 生态学杂志, 2008, 27(8): 1337-1340.

知网检索的两种方式:

1. 打开知网页面 <http://kns.cnki.net/kns/brief/result.aspx?dbPrefix=WWJD>
下拉列表框选择: [ISSN], 输入期刊 ISSN: 2164-5507, 即可查询
2. 打开知网首页 <http://cnki.net/>
左侧“国际文献总库”进入, 输入文章标题, 即可查询

投稿请点击: <http://www.hanspub.org/Submission.aspx>

期刊邮箱: hjas@hanspub.org