

环境污染物对水生生物产生氧化压力的 分子生物标志物

王丽平,郑丙辉,孟 伟

(中国环境科学研究院 河流与海岸带环境研究室,北京 100012)

摘要: 为了能够建立一种简单、快速、准确的环境污染监测预警体系,人们进行了广泛的研究,其中有关环境污染物对分子生物标志物的影响已成为研究热点。生物体内的氧自由基和其它活性氧分子(ROS)对组织和细胞成分造成的伤害,称之为氧化压力。环境中的有毒物质能够对生物体产生不同程度的氧化压力。生物体内的强氧化剂或体外因素(如环境污染物)引起的强氧化剂与抗氧化防御系统之间的平衡能够用于评估环境压力对生物体产生影响的程度,尤其适合于评估不同种化学物质引起氧化损伤的程度。这些抗氧化防御系统及其对氧化压力的敏感性在环境毒物学研究中占有非常重要的地位。大量研究结果表明:过渡金属、多环芳烃、有机氯和有机磷农药、多氯联苯、二氧芑和其它异型物质都能够对生物体产生氧化压力。这些有毒物质能够引起各种有害影响,如对膜脂、DNA 和蛋白产生损伤,改变抗氧化酶的活性等。总结了这种氧化压力的研究进展情况,并讨论了这些分子生物标志物在水生生物中的应用。

关键词: 环境污染物;抗氧化防御系统;水生生物;自由基

文章编号:1000-0933(2007)01-0380-09 中图分类号:Q938.X171 文献标识码:A

Molecular biomarkers in aquatic organisms in relation to the oxidative stress imposed by environmental pollutants

Wang Liping, Zheng Binghui, Meng Wei

River&Coastal Environment Research Center, Chinese Research Academy of Environmental Sciences, Beijing 100012, China

Acta Ecologica Sinica 2007 27 (1) 0380 ~ 0388.

Abstract: The molecular biomarkers in relation to environmental pollutants have become imperative research topic for environmental toxicology studies. In order to set up a series of simple, sensitive and exact monitoring systems for environmental pollution, several studies were carried out. The potential of oxygen free radicals and other reactive oxygen species (ROS) to damage tissues and cellular components in organisms was called oxidative stress. The balance between pro-oxidant endogenous and exogenous factors (i. e., environmental pollutants) and anti-oxidant defenses in biological systems has been used to assess the adverse effect of environmental pollutants, especially for oxidant damage of the different chemicals. The anti-oxidative defense systems and their sensitivity for oxidative stress are of great importance in environmental toxicology. Numerous studies on the effects of oxidative stress to organisms imposed by environmental pollutants were performed. The results indicated that the transition metals, polycyclic aromatic hydrocarbons, organophosphate and organochlorine pesticides, polychlorinated biphenyls, dioxins, and other xenobiotics could cause oxidative stress to organisms. These toxicants can stimulate a variety of toxicity effects, such as oxidative damage to

基金项目:国家重点基础研究发展规划“973”资助项目(2002CB412409)

收稿日期:2006-05-08;修订日期:2006-11-16

作者简介:王丽平(1974~),女,河北省滦平县人,博士,主要从事生态毒理研究。E-mail:wanglp74@yahoo.com.cn

Foundation item: The project was financially supported by National Basic Research and Development Program of China (No. 2002CB412409)

Received date: 2006-05-08; **Accepted date:** 2006-11-16

Biography: Wang Liping, Ph. D., mainly engaged in ecological toxicology. E-mail:wanglp74@yahoo.com.cn

membrane lipid ,DNA and protein and changes to antioxidant enzymes. This review summarizes the current knowledge and advances in understanding such oxidative stresses. And the application of related molecular biomarkers in aquatic organisms was also discussed.

Key Words : environmental pollutants ; antioxidant defense systems ; aquatic organisms ; free radicals

1 自由基的来源和作用

氧和氮自由基对于维持细胞功能而言是必不可少的,它们在活细胞中持续产生。需氧生物细胞的基本代谢就会产生氧自由基和活性氧分子(ROS)。大量的实验研究也表明生物体的正常代谢需要超氧阴离子(O_2^-)、过氧化氢(H_2O_2)、氧化氮基($NO\cdot$)等自由基和活性氧分子。在生物体中,只有维持自由基产生和氧化还原作用之间的动态平衡才能维持机体的生理健康。但是在正常代谢过程中仍会有2%~3%的自由基没有被机体利用或代谢,因此生物体在长期进化过程中发展了抗氧化防御系统来保护自身免受自由基的氧化伤害。如果生物体产生的ROS没有被抗氧化系统完全消除,就可能会对机体组织和细胞产生伤害,这种不利影响称之为氧化压力^[1]。对氧化压力的研究已经成为生物毒物学研究的一个重要方面。另外,还存在一些内源性自由基,如某些生物体内的黄嘌呤氧化酶、细胞色素P450降解酶等氧化酶能够产生 O_2^- ,而鸟苷酸环化酶、葡萄糖氧化酶等能产生 H_2O_2 ^[2]。

2 活性氧分子的种类及其产生的氧化压力

O_2^- 能够使具抗氧化能力的维生素(维生素E和抗坏血酸盐)、儿茶酚胺和硫醇以及各种具一定惰性的酶(过氧化氢酶CAT和过氧化酶POD)发生氧化^[3,4]。超氧阴离子和羟基都能对重要的细胞生物分子产生氧化损伤^[5],它们是两种重要的活性氧分子(ROS)。过氧化氢基($\cdot OH$)只有极其短暂的几毫微秒的寿命,但却是一种非常重要的自由基,它对细胞分子具有很强的氧化潜能,而且没有选择性,能够使如生物膜脂双层、酶蛋白和DNA等各种生物分子发生氧化损伤^[6,7]。细胞膜和DNA属阴性,因此极易与金属阳离子结合,在它们之间发生反应的同时也会发生氧化损伤并产生羟基^[8]。

需氧生物经过长期进化发展了抗氧化防御系统以保护自身不受活性氧分子ROS的氧化损伤。抗氧化酶控制着ROS和抗氧化防御能力间的关系,抗氧化酶的作用就是抑制活性氧分子的活力。另外,细胞外低分子量的抗氧化分子(如抗坏血酸盐、尿酸等)也能清除一部分自由基和ROS。但当生物体暴露在异物中,尤其是有毒化学污染物中时,可能会造成机体内源和外源ROS之间的不平衡并使机体抗氧化防御能力降低。因此会给生物体造成氧化压力,对组织造成损伤、炎症、疾病甚至衰老^[9,10]。但在一般情况下,生物体有能力合成和控制特定的酶系统,用以修复和移走损坏的蛋白、脂类和DNA^[11]。既然氧化压力的程度随时都可能发生变化,生物体就通过额外合成抗氧化酶的方式加以调节,以便缓解可能受到的氧化损伤^[12]。

2.1 脂质过氧化及其在生物体中的重要性

需氧生物的细胞膜磷脂分子不断受到氧化压力的攻击,同时发生过氧化的膜和脂质过氧化产物也会对细胞本身产生伤害。细胞中含有如维生素E等的抗氧化分子,这些分子能够阻止过氧化物的发生,并能够通过修复氧化损伤的脂分子来维持膜的完整性和动态平衡^[2,13]。脂质过氧化是由一系列链反应组成的,其中 $\cdot OH$ 等ROS是脂质过氧化作用的启动子,聚不饱和脂肪酸(具有双键)非常容易与这些活性氧分子发生氧化还原反应,其最终产物大多有毒或具有活性突变功能^[14]。脂质过氧化还能够产生DNA加合物,而这些产物又能够引起突变和改变基因的表达^[15]。发生过氧化的膜变得坚硬,失去透性和完整性。脂质过氧化的累积性影响可以导致人类和其它生物产生‘疾病’。

2.2 活性氧分子及其引起的DNA损伤

DNA分子具还原性,较易与金属离子和其它通过膜的渗透物结合并形成羟基^[16]。同时DNA分子含有多种碱基和糖苷,很容易受到羟基的攻击,其中糖苷受到攻击后,会导致嘌呤位点上碱基易位、脱氧核糖链断裂

和半糖氧化^[17,18]。最近研究表明各种 ROS 与 DNA 分子反应能够产生 100 多种不同的产物^[19]。因此细胞核内的 DNA 也是一种易被 ROS 氧化并发生氧化损伤的重要细胞分子。

自由基和 ROS 攻击 DNA 分子后,发生严重损伤的产物是 8-oxo-2'-deoxyguanosine (8-oxodG),研究者们将 8-oxodG 用作生物体受到氧化压力并产生 DNA 损伤的生物标志物^[20]。

2.3 自由基及其对细胞蛋白的氧化损伤

各种自由基和 ROS 引起蛋白氧化反应,其结果是导致氨基酸侧链发生氧化修饰、活性氧分子引起肽键裂解、肽键和脂类及糖类氧化产物发生反应、蛋白质形成碳酰基衍生物等。实验研究表明 ROS 对蛋白产生氧化损伤后,机体会累积氧化修饰蛋白^[21-22],促进机体衰老或发生疾病^[23-24],导致有机体降解氧化蛋白的能力降低,并影响转录和翻译的精确度^[25]。

3 有机体受到自由基氧化损伤的生物标志物

自从发现自由基伤害在许多环境污染物(异型物质)的致毒机制中所起的重要作用以来,人们将氧化压力作为生物标志物的研究越来越广泛^[26]。分子生物标志物用于测试实验生物因自由基引起氧化损伤和各种氧化压力的程度。除了用于测定因自由基损伤产生的初级和次级产物外,生物标志物还可以用来监测机体各种抗氧化防御系统抵抗自由基氧化的状态。

3.1 脂质过氧化作用的生物标志物

脂质过氧化作用是因自由基引发组织伤害研究中的一个重要因素,但由于直接分析脂质过氧化作用的产物比较复杂,一般都采用测定次级氧化产物(醛类和酮类)含量的方法。应用最广泛的是用硫代巴比妥酸法测定次级产物丙二醛的含量^[27-28]。其它测定脂质过氧化的分析方法还有测定由聚不饱和脂肪酸产生的二烯烃含量,但当含量较少时,这种方法相对不敏感^[29]。比较精确的方法是最近发展起来的利用色谱分析技术同时测定不同的脂质过氧化产物,如利用气象色谱-电子捕捉探测器测定 8 种不同的降解产物(如乙醛、正丁醛、己醛等)^[30]。

3.2 有机体内 DNA 发生氧化损伤的生物标志物

DNA 氧化损伤的生物标志物,主要是分析测试鸟嘌呤核苷·OH 的羟基化作用,产物为 8-OHdG 或 8-oxodG 及其碱基 8-羟基鸟嘌呤,这是从尿中测定因自由基造成氧化损伤的一种间接方法^[31]。大量研究也表明 8-OHdG 也是判断相关污染物对水生生物或其它动物造成氧化压力程度的一个有效的生物标志物^[32-34]。两种其它 DNA 氧化损伤的羟基化产物是胸腺嘧啶乙二醇和胸腺嘧啶脱氧核苷乙二醇。这些产物一经形成就从组织 DNA 中脱离,不再进一步代谢而是经血液直接排到尿液中^[35]。

这些生物标志物用于测定嘌呤和嘧啶的特定修饰和羟基化作用、脱氧核糖磷酸体和蛋白-DNA 交链产生的损伤。尽管在正常生理条件下这些过程也会发生(正常情况下尿中也存在氧化核苷),但可以通过各种方法测定出因异物引发的‘提高’的氧化损伤,从而判断异物的危害程度。

3.3 蛋白质氧化的生物标志物

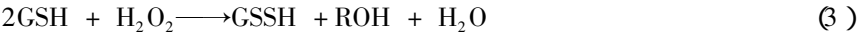
蛋白质氧化的生物标志物主要是测定蛋白质的碳酰基衍生物,尤其是苯丙氨酸和酪氨酸的氧化产物。酪氨酸发生氧化会形成二酪氨酸。实验证明,二酪氨酸是一种判断氧化压力的很有用的细胞或尿液标志物^[36]。这些由蛋白质氧化形成的物质能够被衍生成两种产物:γ-谷氨酰半醛和 2-氨基脂肪半醛,这两种物质在生物体内的含量都能够利用高压液相色谱和质谱方法测定^[37]。

3.4 抗氧化防御系统作为氧化压力的生物标志物

生物体内的抗氧化防御系统包括酶抗氧化剂和非酶抗氧化剂,前者主要指超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化物酶(POD)、过氧化氢酶(CAT)、谷胱甘肽过氧化物酶(GPx)、谷胱甘肽转移酶(GST)等抗氧化酶,后者主要指谷胱甘肽、维生素 C、维生素 E、抗坏血酸盐、β-胡萝卜素和尿酸盐等抗氧化物质。生物体受到有毒化学物质污染时,自身在代谢这些异物分子时,通常会产生一些有毒中间产物或活性氧分子,其体内的抗氧化防御系统可能会发生变化。下面以其中的抗氧化酶 SOD、CAT、GPx 以及抗氧化物谷胱甘肽(GSH)为例简要说明

机体调节 ROS 的机制。

机体正常代谢产生的 ROS 能够通过如下反应被消除：



其中 SOD 催化反应 (1)、CAT 催化反应 (2)、GPx 催化反应 (3)，机体主要通过这 3 种酶调节 ROS 的‘产生’和‘去除’间的平衡。当机体受到轻微胁迫时，抗氧化酶 SOD、CAT 或 GPx 的活性可能会增加，同时机体也加快 GSH 的合成，通过催化 (1)、(2) 和 (3) 的反应以清除因污染物胁迫产生的‘提高’的 ROS 量，这是机体正常的应激反应；当受到重度胁迫，产生的氧化压力超过机体的调节能力时，SOD、CAT 及 GPx 等抗氧化酶的活性不可能再提高，同时也不能再合成较多的抗氧化物质 (GSH 等)，此时，不能被及时清除的 ROS 就会对机体产生一定的损伤，如果受到的氧化压力持续不断或短时间内达到一定强度，生物体正常代谢受到一定程度的影响，抗氧化酶活性很可能会下降，甚至失活，同时抗氧化物质也可能会不断减少。当然，未受到污染胁迫的‘正常’生物体内的抗氧化防御系统也会因环境因素的变化 (如温度、盐度) 而发生一定的波动，但波动范围较小^[38]，因此在试验或应用过程中需要正确判断机体本身的正常波动范围。

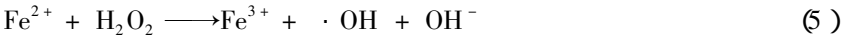
综上，分析生物体细胞内的抗氧化酶活性和抗氧化物质的含量能够预测有机体的抗氧化状态，它们可以作为判断机体受到氧化压力程度的生物标志物。但由于机体内抗氧化防御系统的变化程度与化学物质的种类、生物体本身的敏感性和环境条件等各种因素密切相关^[39]，所以单个因子对于理解污染物的作用方式和可能发生的分子相互作用是有意义的，也可以起到早期预警作用，但不能整体的预测生物体或环境的健康状态，需要多种生物标志物或将多种生物标志物应用到不同种生物中才能够对环境污染物产生的氧化压力进行正确的‘诊断’^[40]。

4 水中污染物对水生生物的氧化压力

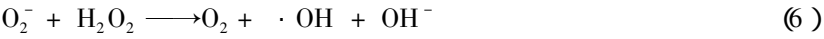
由于水生生物具有滤水能力、易于笼养以及在慢性或亚致死剂量污染物下易发生氧化损伤等特性，研究者们经常选择它们作为氧化压力测试物种。研究表明，水生生物可以为有关 ROS 如何损伤细胞成分、细胞如何响应和机体如何修复这种损伤以及氧化压力如何导致机体致病等的研究提供模型式的系统资料^[41-42]。水生生物也是研究恶性肿瘤与致癌污染物之间关系的良好实验材料^[43]。

先前对于水生生物的环境毒物学研究基本上都是以鲶鱼 (catfish)、虹鳟鱼 (rainbow trout)、比目鱼 (flatfish) 和贻贝 (mussel) 等的成体或幼体为实验材料，在生物体外研究参与氧化循环的物质对机体主要器官亚细胞片断 (微粒体) 的影响^[44-46]。直到最近，才有一些针对生物体内 ROS 产物方面的研究，但总存在一些技术上的难题。不过，可以通过测定贻贝等消化腺细胞中自由基的形成和 DNA 链断裂 (彗星分析) 等间接方法来研究 ROS 的产物^[47-49]。

大量研究表明，具氧化还原特性的异型物质 (如过渡金属、苯醌、染料、二吡啶基除草剂和含硝基的芳香族分子等) 以及多环芳烃、多氯联苯、有机磷和有机氯农药、金属、二氧芑等有毒化学污染物是导致生物体中过量 ROS 产生的重要根源。那些有氧化还原特性的物质能够通过催化或直接参与生物体内的一些氧化还原反应，对生物体产生很强的氧化压力^[50]，如铁离子能够催化·OH 的产生：



方程 (4) 和 (5) 合并既为：



方程 (6) 只有在合适催化剂存在下 (如铁离子) 才会发生。·OH 是一种非常重要的 ROS，它能够与许多重要的细胞大分子物质发生反应，可能会导致蛋白降解、酶失活、脂质过氧化作用增强、DNA 损伤甚至导致细胞死亡。许多亲脂性有机污染物能够通过渗入膜系统和干扰线粒体/内质网上的电子传递过程来刺激 ROS

的产生^[51]。

4.1 水生生物体内的脂质过氧化作用

脂质过氧化作用已经成功的用作异型物质诱导氧化压力的测定指标^[52-53]。近年来,人们对金属和有机污染物(镉、汞、铜、氯化三联苯等)对各种鱼体产生自由基损伤和氧化压力等方面进行了大量研究,结果表明污染物会导致鱼肝和卵巢内的MDA含量升高、影响鱼体生长、引起很多组织发生过氧化伤害^[54-57]。Pandey等^[58]通过对印度淡水鱼氧化压力的研究认为:氧化压力的各种测定指标都可以用作水体污染监测的生物标志物。Avcı等^[59]应用鱼体肌肉和肝脏组织中的过氧化作用(MDA含量)监测石油精炼厂对环境的污染程度。

在环境污染物对双壳类软体动物的影响研究中,人们经常使用MDA含量作为氧化压力指标来测定生物标志物对细胞发生自由基伤害的响应情况^[60-62]。Company等^[63]研究了金属镉、铜和汞对贻贝*Bathymodiolus azoricus*脂质过氧化作用和氧化状态的影响,结果发现在这种贻贝的鳃内存在抗氧化酶保护系统。

4.2 水生生物和氧化DNA损伤

有关这方面的研究包括利用高压液相色谱-电化学方法测定8-OHdG及其氧化产物8-oxodG的含量^[64]、DNA蛋白交联反应^[65]和DNA修复效率^[66]。Nishimoto等^[67]发现呋喃妥英(一种氧化循环异型物质)使鱼体内肝细胞中的8-OHdG含量提高。Rodriguez-Ariza等^[62]研究表明鱼*Sparus aurata*体内染色体DNA中8-oxodG的含量可以用作测定城镇和工业环境污染所导致的氧化压力的生物标志物。De Almeida等^[64]测定了贻贝*Perna perna*消化腺和套膜组织中8-oxodG的含量,也认为8-oxodG可以作为测定环境污染物造成氧化压力程度的一个良好的指标。在野外的调查研究中,受污染位点贻贝体内8-oxodG的含量比未受污染位点贻贝体内的8-oxodG含量要高,且脂质过氧化作用明显增强^[68]。

单细胞凝胶电泳技术(彗星分析)被广泛用于定量测定水生有机体发生的DNA损伤,实验证明这是一种迅速、敏感的方法。含硝基的芳烃类物质和苯并[a]芘能够通过细胞色素P450的催化反应导致贻贝*Mytilus edulis*和比目鱼(flatfish)消化腺细胞内的DNA链发生断裂^[47-48, 69]。苯并[a]芘、多氯联苯1254和二氧芑能够导致欧洲鳗鲡*Anguilla anguilla*体内红细胞DNA链断裂和细胞编程性死亡,这些致癌物质都是通过氧自由基机制产生影响的^[70-71]。

在许多国家,都将贻贝用作重金属诱导氧化压力的监测物种,并采用基因毒性、碱性洗提和微核测试等方式评估这种压力的程度。铜和汞会导致DNA单链断裂、提高微核频率,而镉会引起DNA损伤^[72]。

4.3 水生生物体细胞的抗氧化防御系统

水生生物细胞内的抗氧化防御系统在保护机体免受异型物质引发的氧化损伤中起着重要的作用。到目前为止,有很多关于水生生物体内氧化压力生物标志物的研究。Regoli等^[73]测定了疏浚设备对羊鱼抗氧化反应和氧化压力的影响;Regoli^[74]研究了重金属污染对贻贝鳃和消化腺抗氧化酶的影响。Romero-Ruiz等^[75]通过移植双壳类(蛤*Scrobicularia plana*)的方法来测定西班牙黄铁矿有毒金属溢出物的毒害作用。Sayeed等^[76]通过测定类除虫菊酯杀虫剂对淡水鱼抗氧化酶和抗氧化物质的影响,来进行生态风险评估。Dorval等^[77]通过测定有机氯杀虫剂硫丹对虹鳟鱼肾上腺皮质细胞氧化压力生物标志物和抗氧化酶状态的研究,证实了抗氧化物在维持其肾上腺皮质细胞功能完整性中所起的重要作用。Company^[63]等测定了镉、铜和汞对贻贝鳃中抗氧化酶活性和脂质过氧化作用的影响。Bocchetti等^[78]通过测定地中海受痕量金属污染区域多毛类*Sabella spallanzanii*的抗氧化防御物质及其对氧自由基的清除能力,证实了抗氧化酶系统在生态毒理学研究中的重要作用。Manduzio等^[79]指出测定贻贝体内SOD的变化可以用于监测海洋环境的污染状况。Cheung等^[80]测定了苯并[a]芘和多氯联苯1254的混合物对绿嘴贻贝抗氧化酶的影响,一共监测了18d,结果表明特定的抗氧化生物标志物在评估海洋环境复杂污染物的影响程度中起着重要的作用。Wang等^[81]通过体内注射的方式研究了三丁基氯化锡和多环芳烃苯并[a]芘对鱼*Sebastiscus marmoratus*肝脏抗氧化防御系统的影响,结果表明两种有毒有机污染物对鱼体肝脏内的谷胱甘肽转移酶(GST)、谷胱甘肽过氧化物酶(GPx)活性以及谷胱甘肽(GSH)、丙二醛(MDA)含量都产生了不同程度的影响,降低了鱼体对氧化压力的抵抗力,

因此他们认为抗氧化防御系统可以用在环境污染监测体系中,起到预警作用。

另外,海洋无脊椎动物的抗氧化防御系统也已广泛用作污染监测的指示指标^[82-83]。Cossu 等^[84]通过移植培养方式研究了淡水双壳类 *Unio tumidus* 在不同污染区域的生物反应,他们认为将生物标志物应用到野外是一种进行环境监测有效的生物监测方法。Gorinstein 等^[82]测定了黑海海岸带两个区域(一个相对清洁区,另一个为受污染区域)贻贝 *Mytilus galloprovincialis* 体内的抗氧化物质,结果表明,受污染区域贻贝体内的抗氧化酶活性高于相对清洁区,所以该海域贻贝体内的抗氧化物酶可以作为环境污染监测的一个附加参数。Romeo 等^[85]将贻贝移植到地中海西北部受到不同程度污染的位点,通过测定抗氧化防御物质的变化来评估水体质量。De Luca-Abbott 等^[86]将贻贝 *Perna viridis* 和蛤 *Ruditapes philippinarum* 从‘清洁’水域经净化后转移到香港一个受化学污染的水域中,经过 14d 和 28d 之后,测定这些生物体内鳃和肝胰腺中的几种抗氧化参数。结果表明,蛤肝胰腺中的过氧化氢酶(CAT)和谷胱甘肽转移酶(GST)以及贻贝鳃和肝胰腺中的 CAT 与水体中的有机氯、多氯联苯具有明显的相关性,可以作为香港海岸水域中污染程度的生物标志物。

4.4 氧化压力的另外一种生物标志物:金属硫蛋白

金属硫蛋白(MT)也广泛地用作水生生物氧化压力的分子生物标志物,尤其是用于有毒金属的污染研究中^[87]。金属硫蛋白是低分子量、富含半胱氨酸的蛋白质,在哺乳动物、植物和微型生物以及几种海洋无脊椎动物中都能够通过金属诱导产生。金属硫蛋白是一种金属螯合剂,能够螯合细胞中过量的金属,因此在水生生物的金属代谢,尤其是在解毒机制中起着重要的作用^[88-90]。另外,金属硫蛋白还可以净化生物体内的氧自由基,以消除氧化压力带来的损伤^[91]。

5 结论

由于自由基反应和 ROS 在活有机体的生理过程和环境污染物的毒害机制中起着重要的作用,因此研究者在这方面开展了广泛的研究并将其应用到野外调查中。近年来,人们将脂类、DNA 和蛋白质的氧化损伤以及对生物体抗氧化物防御系统的影响作为生物标志物广泛地应用到环境污染物的监测中。

生物标志物是如何体现环境污染物对生物体产生的影响及其在环境管理中如何加以广泛应用,是人们关注的焦点。研究污染物对标准生物标志物的影响,确定其‘正常反应’范围并将各实验室的数据加以比较是非常重要的。由于生物标志物的反应受到环境因素如温度、盐度^[92]以及生物体自身特点如年龄等的影响^[93-94],因此需要应用多种生物标志物的反应对环境污染物产生的压力进行诊断,从而将污染物对生物生理上的影响与分子水平的损伤结合起来,并预测相关污染物对生态系统产生的影响。因此有人认为将氧化生物标志物与其它类型的生物标志物(如肝、基因毒性和血细胞免疫毒性)结合起来应用到大规模水体环境监测项目中,将会起到非常好的监测效果^[95-96]。

References :

- [1] Davies K J A. Oxidative stress , the paradox of aerobic life. In :Rice-Evans C , Halliwell B , Land G G eds. Free Radical and Oxidative Stress : Environment , Drugs and Food Additives. London : Portland Press , 1995. 1 — 31.
- [2] Vigo-Pelfrey C. Membrane Lipid Oxidation , vol 1. Boca Raton , FL : CRC Press , 1990.
- [3] Kono Y , Fridovich I. Superoxide radical inhibits catalase. J Biol Chem , 1982 , 257 : 5751 — 5754.
- [4] Blum J , Fridovich I. Inactivation of glutathione peroxidase by superoxide radical. Arch Biochem Biophys , 1985 , 240 : 500 — 508.
- [5] Sies H. Oxidative Stress. London : Academic Press , 1985.
- [6] Stadtman E R , Levine R L. Protein oxidation. Ann. NY Acad Sci , 2000 , 899 : 191 — 208.
- [7] Jackson A L , Loeb L A. The contribution of endogenous sources of DNA damage to the multiple mutations in cancer. Mutat Res , 2001 , 477 : 7 — 21.
- [8] Ercal N , Gurer-Orhan H , Aykin-Burns N. Toxic metals and oxidative stress part I : mechanisms involved in metal-induced oxidative damage. Curr Top Med Chem , 2001 , 1 : 529 — 539.
- [9] Sohal R S , Mockett R J , Orr W C. Mechanisms of aging : an appraisal of the oxidative stress hypothesis. Free Radicals Biol Med , 2002 , 33 : 575 — 586.
- [10] Finkel T , Holbrook N J. Oxidants , oxidative stress and the biology of aging. Nature , 2000 , 408 : 239 — 247.
- [11] Fenech M , Ferguson L R. Vitamins/minerals and genomic stability in humans. Editorial Mutat Res , 2001 , 475 : 1 — 6.
- [12] Martins E A L , Chubatsu L S , Meneghini R. Role of antioxidants in protecting cellular DNA from damage by oxidative stress. Mutat Res , 1991 ,

250 :95 — 101.

- [13] Dix T A , Aikens J. Mechanisms and biological relevance of lipid peroxidation initiation. *Chem Res Toxicol* ,1993 ,6 :18 — 62.
- [14] D'Iscia M , Constantini C , Prota G. Lipofuscin-like pigments by autoxidation of polyunsaturated fatty acids in the presence of amine neurotransmitters : the role of malondialdehyde. *Biochim Biophys Acta* ,1996 ,1290 :319 — 326.
- [15] Marnett L J. Lipid peroxidation-DNA damage by malondialdehyde. *Mutat Res* ,1999 ,424 :83 — 95.
- [16] Halliwell B , Aruoma O I. DNA damage by oxygen-derived species. Its mechanism and measurement in mammalian systems. *FEBS Lett* ,1991 ,281 :9 — 19.
- [17] Dizdaroglu M , Schulte-Frohlinde D , von Sonntag C. Strand breaks and sugar release by γ -irradiation of DNA in aqueous solution. *J Am Chem Soc* ,1975 ,97 :2277 — 2278.
- [18] Breen A P , Murphy J A. Reactions of oxyl radicals with DNA. Review. *Free Radicals Biol Med* ,1995 ,18 :1033 — 1077.
- [19] Dizdaroglu M. Chemistry of free radical damage to DNA and nucleoproteins. In : Halliwell B , Aruoma O I eds. *DNA and Free Radicals*. Chichester : Ellis Horwood Ltd ,1993. 19 — 39.
- [20] Kasai H. Analysis of a form of oxidative DNA damage 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine , as a marker of cellular oxidative stress during carcinogenesis. *Mutat Res* ,1997 ,387 :147 — 163.
- [21] Dean R T , Fu S , Stocker R , *et al.* Biochemistry and pathology of radical-mediated protein oxidation. *Biochem J* ,1997 ,324 :1 — 18.
- [22] Berlett B S , Stadtman E R. Protein oxidation in aging , disease , and oxidative stress. *J Biol Chem* ,1997 ,272 :20313 — 20316.
- [23] Goto S , Nakamura A. Age-associated oxidatively modified proteins : a critical evaluation. *Age* ,1997 ,20 :81 — 89.
- [24] Davies M J , Fu S , Wang H , *et al.* Stable markers of oxidant damage to proteins and their application in study of human disease. *Free Radicals Biol Med* ,1999 ,27 :1151 — 1161.
- [25] Duikan S , Farewell A , Ballesteros M , *et al.* Protein oxidation in responses to increased transcriptional or translation errors. *Proc Natl Acad Sci USA* ,2000 ,97 :5746 — 5749.
- [26] Scandalios J G. *Oxidative Stress and the Molecular Biology of Antioxidant Defenses*. New York : Cold Spring Laboratory Press ,1997.
- [27] Draper H H , Squires E J , Mahmooch H , *et al.* A comparative evaluation of thiobarbituric acid methods for determination of malondialdehyde in biological materials. *Free Radicals Biol Med* ,1993 ,15 :353 — 363.
- [28] Janero D R. Malondialdehyde and thiobarbituric acid-reactivity as diagnostic indices of lipid peroxidation and peroxidative tissue injury. *Free Radicals Biol Med* ,1990 ,9 :515 — 540.
- [29] Gutteridge J M C. Aspects to consider when detecting and measuring lipid peroxidation. *Free Radicals Res Commun* ,1986 ,1 :173 — 184.
- [30] De Zwart L L , Venhorst J , Groot M , *et al.* Simultaneous determination of eight lipid peroxidation degradation products in urine of rats treated with carbon tetrachloride using gas chromatography with electron-capture detection. *J Chromatogr* ,1997 ,694 :277 — 288.
- [31] Shigenaga M K , Ames B N. Assays for 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine : A biomarker of in vivo oxidative DNA damage. *Free Radicals Biol Med* ,1991 ,10 :211 — 216.
- [32] Rodriguez-Ariza A , Alhama J , Diaz-Mendez F M , *et al.* Content of 8-oxodG in chromosomal DNA of *Sparatus aurata* fish as biomarker of oxidative stress and environmental pollution. *Mutat Res* ,1999 ,438 :97 — 107.
- [33] Steinert S A. DNA damage as a bivalve biomarker. *Biomarkers* ,1999 ,4 :492 — 496.
- [34] De Almeida E A , Marques S A , Klitzke C F , *et al.* DNA damage in digestive gland and mantle tissue of the mussel *Perna perna*. *Comp Biochem Physiol Part C* ,2003 ,135 :295 — 303.
- [35] Cathcart R , Schwiens E , Saul R L , *et al.* Thymine glycol and thymidine glycol in human and rat urine : a possible assay for oxidative DNA damage. *Proc Natl Acad Sci USA* ,1984 ,81 :5633 — 5637.
- [36] Witko-Sarsat V , Friedlander M , Capeilliere-Blandin C , *et al.* Advanced oxidation protein products as a novel marker of oxidative stress in uremia. *Kidney Int* ,1996 ,49 :1304 — 1313.
- [37] Daneshvar B , Frandsen H , Autrup H , *et al.* γ -Glutamyl semialdehyde and 2-amino-adipic semialdehyde : biomarkers of oxidative damage to protein. *Biomarkers* ,1997 ,2 :117 — 123.
- [38] Gabryelak T , Piatkowska M , Leyko W , *et al.* Seasonal variations in the activities of peroxide metabolism enzymes in erythrocytes of freshwater fish species. *Comp Biochem Physiol* ,1983 ,75C ,383 — 385.
- [39] Winston G W , Di Giulio R T. Prooxidant and antioxidant mechanisms in aquatic organisms. *Aquat Toxicol* ,1991 ,19 :137 — 161.
- [40] Downs C A , Shigenaga G , Fauth J E , *et al.* Cellular physiological assessment of bivalves after chronic exposure to spilled *Exxon valdez* crude oil using novel molecular diagnostic biotechnology. *Environ Sci Technol* ,2001 ,36 :2987 — 2993.
- [41] Livingstone D R , Forlin L , George S. Molecular biomarkers and toxic consequences of impact by organic pollution in aquatic organisms. In : Sutcliffe D W ed : *Water Quality and Stress Indicators in Marine and Freshwater Systems : Linking Levels of Organization*. Ambleside , UK : Freshwater Biological Association ,1994. 1171 — 1254.
- [42] Lackner R. Oxidative stress' in fish by environmental pollutants. In : Braunbeck T , Hinton D E , Streit B eds : *Fish Ecotoxicology*. Basel : Birkhauser Verlag ,1998. 203 — 224.
- [43] Malins D C , McCain B B , Lindhal J T , *et al.* Neoplastic and other diseases in fish in relation to toxic chemicals : an overview. *Aquat Toxicol* ,1988 ,11 :43 — 67.

- [44] Garcia Martinez P, Livingstone D R. Benzo [a] pyrene-dione stimulated oxyradical production by microsomes of digestive gland of the common mussels, *Mytilus edulis* L. Mar Environ Res, 1995, 39 :185 — 189.
- [45] Lemarie P, Livingstone D R. Aromatic hydrocarbon quinone-mediated reactive oxygen species production in hepatic microsomes of the flounder (*Platichthys flesus* L.). Comp Biochem Physiol C, 1997, 117 :131 — 139.
- [46] Sjölin A M, Livingstone D R. Redox cycling of aromatic hydrocarbon quinones catalysed by digestive gland microsomes of the common mussel (*Mytilus edulis* L.). Aquat Toxicol, 1997, 38 :83 — 99.
- [47] Mitchelmore C L, Birmelin C, Chipman J K, et al. Evidence for cytochrome P450 catalysis and free radical involvement in the production of DNA strand breaks by involvement in the production of DNA strand breaks by benzo [a] pyrene and nitroaromatics in mussel (*Mytilus edulis* L.) digestive gland cells. Aquat Toxicol, 1998, 41 :193 — 212.
- [48] Mitchelmore C L, Birmelin C, Livingstone D R, et al. Detection of DNA strand breaks in isolated mussel (*Mytilus edulis* L.) digestive gland cells using the comet assay. Ecotoxicol Environ Saftey, 1998, 41 :51 — 58.
- [49] Livingstone D R, Nasci C, Sole M, et al. Apparent induction of a cytochrome P450 with immunochemical similarities to CYP1A in digestive gland of the mussel (*Mytilus galloprovincialis* L.) with exposure to 2,2',3,4,4',5'-hexachlorobiphenyl and Arochlor 1254. Aquat Toxicol, 1997, 38 :205 — 224.
- [50] Kappus H, Sies H. Toxic drug effects associated with oxygen metabolism, redox cycling and lipid peroxidation. Experientia, 1981, 37 :1233 — 1241.
- [51] Livingstone D R. Contaminant-stimulated reactive oxygen species production and oxidative damage in aquatic organisms. Mar Poll Bull, 2001, 8 :656 — 666.
- [52] Lucasoli F, Fraga C G. Oxidative damage to lipids and DNA concurrent with decrease of antioxidants in rat testes after acute iron intoxication. Arch Biochem Biophys, 1995, 316 :567 — 571.
- [53] Reinheckel T, Wiswedel I, Noack H, et al. Electrophoretic evidence for the impairment of complexes of the respiratory chain during iron/ascorbate induced peroxidation in isolated rat liver mitochondria. Biochem Biophys Acta, 1995, 1239 :45 — 50.
- [54] Thomas P, Wofford H W. Effect of cadmium and Arochlor 1254 on lipid peroxidation, glutathione peroxidase activity, and selected antioxidants in Atlantic croaker tissues. Aquat Toxicol, 1993, 27 :159 — 178.
- [55] Berntsen M H, Aatland A, Handy R D. Chronic dietary mercury exposure causes oxidative stress, brain lesions, and altered behaviour in Atlantic salmon (*Salmo salar*) parr. Aquat Toxicol, 2003, 65 :55 — 72.
- [56] Romeo M, Bennani N, Gnassia-Barelli M, et al. Cadmium and copper display different responses towards oxidative stress in the kidney of the sea bass *Dicentrarchus labrax*. Aquat Toxicol, 2000, 48 :185 — 194.
- [57] Baker R T M, Martin P, Davies S J. Ingestion of sub-lethal levels of iron sulphate by African catfish affects growth and tissue lipid peroxidation. Aquat Toxicol, 1997, 40 :51 — 61.
- [58] Pandey S, Parvez S, Sayeed I, et al. Biomarkers of oxidative stress : a comparative study of river Yumuna fish Wallago attu (Bl. & Schn.). Sci Tot Environ, 2003, 309 :105 — 115.
- [59] Avci A, Kacmaz M, Durak I. Peroxidation in muscle and liver tissues from fish in a contaminated river due to a petroleum refinery industry. Ecotoxicol Environ Saf, 2005, 60 :101 — 105.
- [60] Geret F, Jouan A, Turpin V, et al. Influence of metal exposure on metallothionein synthesis and lipid peroxidation in two bivalve mollusks : the oyster (*Crassostrea gigas*) and the mussel (*Mytilus edulis*). Aquat Living Resour, 2002, 15 :61 — 66.
- [61] Geret F, Serafin A, Barreira L, et al. Effects of cadmium on antioxidant enzyme activities and lipid peroxidation in the gills of the clam *Ruditapes decussates*. Biomarkers, 2002, 7 :242 — 256.
- [62] Romeo M, Gnassia-Barelli M. Effect of heavy metals on lipid peroxidation in the Mediterranean clam *Ruditapes decussates*. Comp Biochem Physiol C, 1997, 118 :33 — 37.
- [63] Company R, Serafin A, Bebianno M J, et al. Effect of cadmium, copper and mercury on antioxidant enzyme activities and lipid peroxidation in the gills of the hypothermal vent mussel *Bathymodiolus azoricus*. Mar Environ Res, 2004, 58 :377 — 381.
- [64] Kasai H. A new automated method to analyze urinary 8-hydroxydeoxyguanosine by a high-performance liquid chromatography-electrochemical detection system. J Radiat Res, 2003, 44 :185 — 189.
- [65] Altman S A, Zastawny T H, Randers-Eichhorn L, et al. Formation of DNA protein cross-links in cultured mammalian cells upon treatment with iron ions. Free Radicals Biol Med, 1995, 19 :897 — 902.
- [66] Pruski A M, Dixon D R. Effects of cadmium on nuclear integrity and DNA repair efficiency in the gill cells of *Mytilus edulis* L. Aquat Toxicol, 2002, 57 :127 — 137.
- [67] Nishimoto M, Roubal W T, Stein J E, et al. Oxidative DNA damage in tissues of English sole (*Parophrys vetulus*) exposed to nitrofurantoin. Chem Biol Interact, 1991, 80 :317 — 326.
- [68] Torres M A, Testa C P, Gaspari C, et al. Oxidative stress in the mussel *Mytella guyanensis* from polluted mangroves on Santa Catarina Island, Brazil. Mar Pollut Bull, 2002, 44 :923 — 932.
- [69] Mitchelmore C L, Chipman J K, Garcia Martinez P, et al. Normal status of hepatic 7-ethoxyresorufin O-deethylase (EROD) activity, antioxidant enzymes and DNA oxidation in turbot (*Scophthalmus maximus*) and other flatfish species following exposure to nitroaromatic compounds. Mar

- Environ Res ,1996 ,42 :329 — 333.
- [70] Nigro M , Frenzilli G , Scarcelli V , *et al.* Induction of DNA strand breakage and apoptosis in the eel *Anguilla anguilla*. Mar Environ Res ,2002 , 54 :517 — 520.
- [71] Regoli F , Winston G W , Gorbi S , *et al.* Intergrating enzymatic responses to organic chemical exposure with total oxyradical absorbing capacity and DNA damage in the European eel *Anguilla anguilla*. Environ Toxicol Chem ,2003 , 22 :2120 — 2129.
- [72] Bolognesi C , Landini E , Roggieri P , *et al.* Genotoxicity biomarkers in the assessment of heavy metal effects in mussels experimental studies. Environ Mol Mutag , 1999 , 33 :287 — 292.
- [73] Regoli F , Pellegrini D , Winston G W , *et al.* Application of biomarkers for assessing the biological impact of dredged materials in the Mediterranean : the relationship between antioxidant responses and susceptibility to oxidative stress in the red mullet (*Mullus barbatus*). Mar Pollut Bull ,2002 , 44 :912 — 922.
- [74] Regoli F. Trace metals and antioxidant enzymes in gills and digestive gland of the Mediterranean mussel *Mytilus galloprovincialis*. Arch Environ Contam Toxicol ,1998 ,34 :48 — 63.
- [75] Romero-Ruiz A , Amezcua O , Rodriguez-Ortega M J , *et al.* Oxidative stress biomarkers in bivalves transplanted to the Guadalquivir estuary after Aznalcollar spill. Environ Toxicol Chem ,2003 , 22 :92 — 100.
- [76] Sayeed I , Parvez S , Pandey S , *et al.* Oxidative stress biomarkers of exposure to deltamethrin in freshwater fish , *Channa punctatus* Bloch. Ecotoxicol Environ Saf ,2003 , 56 :295 — 301.
- [77] Dorval J , Hontela A. Role of glutathione redox cycle and catalase in defense against oxidative stress induced by endosulfan in adrenocortical cells of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Toxicol Appl Pharmacol ,2003 , 192 :191 — 200.
- [78] Bocchetti R , Fattorini D , Gambi M C , *et al.* Trace metal concentrations and susceptibility to oxidative stress in the polychaete *Sabella spallanzanii* (Gmelin) (Sabellidae) : potential role of antioxidants in revealing stressful environmental conditions in the Mediterranean. Arch Environ Contam Toxicol ,2004 , 46 :353 — 361.
- [79] Manduzio H , Monsinjon T , Rocher B , *et al.* Characterization of an inducible isoform of the Cu/Zn superoxide dismutase in the blue mussel *Mytilus edulis*. Aquat Toxicol ,2003 , 64 :73 — 83.
- [80] Cheung C C C , Siu W H L , Richardson B J , *et al.* Antioxidant responses to benzo [a] pyrene and Arochlor 1254 exposure in the green-lipped mussel , *Perna viridis*. Environ Pollut ,2004 , 128 :393 — 403.
- [81] Wang C G , Zhao Y , Zheng R H , *et al.* Effects of tributyltin , benzo [a] pyrene , and their mixture on antioxidant defense systems in *Sebastiscus marmoratus*. Ecotoxicol Environ Saf ,2006 , In press.
- [82] Gorinstein S , Moncheva S , Katrich E , *et al.* Antioxidants in the black mussel (*Mytilus galloprovincialis*) as an indicator of black sea coastal pollution. Mar Pollut Bull ,2003 , 46 :1317 — 1325.
- [83] Brown R J , Galloway T S , Lowe D , *et al.* Differential sensitivity of three marine invertebrates to copper assessed using multiple biomarkers. Aquat Toxicol ,2004 , 66 :267 — 278.
- [84] Cossu C , Doyotte A , Babut M , *et al.* Antioxidant biomarkers in freshwater bivalves , *Unio tumidus* , in response to different contaminants profiles of aquatic sediments. Ecotoxicol Environ Saf ,2000 , 45 (2) :106 — 121.
- [85] Romeo M , Hoarau P , Garello G , *et al.* Mussel transplantation and biomarkers as useful tools for assessing water quality in the NW Mediterranean. Environ Pollut ,2003 , 122 (3) :369 — 378.
- [86] De Luca-Abbott S B , Richardson B J , McClellan K E , *et al.* Field validation of antioxidant enzyme biomarkers in mussels (*Perna viridis*) and clams (*Ruditapes philippinarum*) transplanted in Hong Kong coastal waters. Mar Pollut Bull ,2005 , 51 :694 — 707.
- [87] Andrews G K. Regulation of metallothionein gene expression by oxidative stress and metal ions. Biochem Pharmacol ,2000 , 59 :95 — 104.
- [88] Bebianno M J , Serafim M A. Comparison of metallothionein induction in response to cadmium in the gills of the bivalve mollusks *Mytilus galloprovincialis* and *Ruditapes decussates*. Sci Tot Environ ,1998 , 214 :123 — 131.
- [89] Kalpaxis D L , Theos C , Xaplanteri M A , *et al.* Biomonitoring of Gulf of Patras N. Peloponnesus , Greece. Application of a biomarker suite including evaluation of translation efficiency in *Mytilus galloprovincialis* cells. Environ Res ,2003 , 37 :1 — 8.
- [90] Cavalento M , Ghezzi A , Burlando B , *et al.* Effect of hydrogen peroxide on antioxidant enzymes and metallothionein level in the digestive gland of *Mytilus galloprovincialis*. Comp Biochem Physiol C ,2002 , 131 :447 — 455.
- [91] Viarengo A , Burlando B , Ceratto N , *et al.* Antioxidant role of metallothioneins : a comparative overview. Cell Mol Biol ,2000 , 46 :407 — 417.
- [92] Hauton C , Hawkins L E , Hutchinson S. The use of the neutral red retention assay to examine the effects of temperature and salinity on haemocytes of the European flat oyster *Ostrea edulis* (L.). Comp Biochem Physiol (B) ,1998 , 119 :619 — 623.
- [93] Depledge M H. Ecotoxicology : a science or a management tool. Ambio ,1993 , 22 :51 — 52.
- [94] Sukhotin A A , Abele D , P rtner H O. Growth , metabolism and lipid peroxidation in *Mytilus edulis* : age and size effects. Mar Ecol Prog Ser ,2002 , 226 :223 — 234.
- [95] Celso A , Bainy D , Marques M R F. Global analysis of biomarker responses in aquatic organisms exposed to contaminants. Commun Toxicol ,2003 , 9 :271 — 278.
- [96] Monserrat J M , Geracitano L A , Bianchini A. Current and future perspectives using biomarkers to assess pollution in aquatic ecosystems. Commun Toxicol ,2003 , 9 :255 — 269.