



分子生态毒理学研究进展及其 在水环境保护中的意义

徐立红 张甬元 陈宜瑜

(中国科学院水生生物研究所, 武汉 430072)

THE ADVANCES OF MOLECULAR ECOTOXICOLOGY AND ITS SIGNIFICANCE IN WATER ENVIRONMENT PROTECTION

Xu Lihong, Zhang Yongyuan and Chen Yiyu

(Institute of Hydrobiology, The Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430072)

关键词 水环境, 分子生态毒理学, 水生动物, 指标, 早期报警

Key words Water environment, Molecular ecotoxicology, Aquatic animals, Indicators, Early warning

生态毒理学是七十年代发展起来的一门新兴的边缘学科, 主要是研究污染物-环境-机体三者之间的关系及有毒物质对生物在个体、种群、群落和生态系统水平上的毒性效应。水生态毒理学则是以水生态系统为研究对象。过去在毒性方面许多工作是用水生态系统食物链中各代表性生物如藻、蚤、鱼进行急、慢性实验, 并用这些结果作为评价环境化学物质的毒性强度及可能对生态系统造成影响的一种参数, 现在这些方法不少都已作为常规检测方法; 此外, 用微宇宙、受控野外水生态系统和实验池塘来研究污染物在水生态系统中的转移、归宿及对各种生物种群或群落的影响, 这些手段所得出的结果, 可较好地反映污染物对生态系统整体水平上的影响, 比较接近自然状况。这些在个体或系统水平上的研究, 对污染物的评价和筛选起到了重要作用, 但是, 依然存在很多问题。比如, 在系统水平上的研究耗时长, 花费大; 而生物死亡、生长受阻或繁殖受影响及最终导致生态系统结构破坏, 这些已是污染物造成的晚期影响, 由于不了解污染物作用的早期反应及作用的真正靶位, 以最终的影响作为参数的实验室结果外推到野外时, 二者之间存在很大的距离

国家自然科学基金资助, 编号 39400024。淡水生态与生物技术国家重点实验室资助。

1994年7月4日收到。

(Gap)。因此,水生生态毒理学研究迫切需要能反映污染物作用本质,并能对污染物早期影响进行检测的指标,这样,有可能对污染物环境影响做出更为准确的生态毒理学预测或早期报警 (Early warning)。

在进行新指标的研究中,许多研究者首先从生物化学方面探索能反应污染物对生物早期影响的参数。如有的采用生化测定 (Biochemical measurements) 来检测污染物对鱼引起的损伤,也有的用生化方法 (Biochemical approaches, biochemical methods) 或生物学标志 (Biological markers) 研究污染物对生物暴露的影响,还有的将生化监测 (Biochemical monitoring) 用到水质标准中。尽管所采用的名称不太一致,但其本质和内容是一样的,即研究污染物与生物体内的有关生化成分的反应,并用所产生的影响来反映污染物的作用。这种作用是以分子水平上的反应为基础,而且,各研究者的基本观点是相同的,认为无论污染物对生态系统的影响多复杂或最终的影响如何严重,最早的作用必然是从对个体内的这种分子水平上的作用开始的,然后逐步在细胞→器官→个体→种群→群落→生态系统各个水平上反映出来,这种最早期的作用在保护种群和生态系统上具有最大的预测价值 (predictive value)。总之,从这些类似的研究和近几年的发展趋势可以看到,随着生物技术的发展,一个新的学科——分子生态毒理学正逐步形成,即采用现代分子生物学方法与技术研究污染物及代谢产物与细胞内大分子,包括蛋白、核酸、酶的相互作用,找出作用的靶位或靶分子并揭示其作用机理,从而对个体、种群或生态系统水平上的影响作出预报,此外,由此产生的分子生态毒理学指标具有测定周期短,灵敏的特点,也可用于对化学品的筛选及其对可能造成的环境影响作出更为准确的预测。

分子生态毒理学在国外发展很快,并已受到越来越多的重视,从污染物作用方式及靶位来看,目前的研究主要可分为以下几个方面:(1)、研究用有关酶的活性作为机体功能和器官损伤的标志。这些酶主要是一些组织酶,胞内酶和血清中器官专一性的同工酶。(2)、研究用污染物对解毒系统基因活化,引起 mRNA,蛋白及酶活性的增加来反映特定化学物质的早期作用。主要是生物体的解毒系统的各种酶或蛋白。(3)、研究用环境化学物对 DNA 的化学修饰引起的 DNA 的改变来反映化学物的潜在致癌作用。

目前,上述许多研究结果及有关参数已被作为分子生态毒理学指标用于环境监测和早期预报,有的具有极好的应用前景。本文着重介绍近年来对水生生物方面研究最深入、最系统的领域及在水环境保护中的意义。

1. 酶作为水污染指标的研究

用特定反应中的关键酶的变化来证实污染物的影响,已有很长的历史,尽管早期工作远不及现在的研究这样全面、系统,但早期的工作为这个学科的形成、发展奠定了基础,而且在早期发展起来的指标现在依然为生态毒理学研究所采用。随着研究工作的深入,越来越多新的酶指标被发现和采用。

1.1 乙酰胆碱酯酶作为有机磷农药污染的指标

乙酰胆碱酯酶是一个很经典的毒理指标,五十年代末,Weiss 就提出对自然水环境中极低浓度的有机磷杀虫剂可用鱼脑或无脊椎动物的乙酰胆碱酯酶 (AchE) 活力抑制程度来检测,这个方法随即为许多学者接受,国内在这方面曾有报道。现在一般已确认,

20% 以上的 AchE 抑制证明暴露作用的存在, 50% 以上的 AchE 抑制表明对生物的存在有危害, 对于检测非急性毒性极为有用。多年来, 这项指标一直为生态毒理学研究所采用, 可以认为这是最早期的分子生态毒理学指标, 最近资料表明这项生化指标已被用到了定量结构-活性关系 (QSAR) 的研究, 近期这类工作较多地用水生无脊椎动物作为研究材料^[1,2]。

1.2 水生生物腺三磷酶作为多种水污染物胁迫的指标

腺三磷酶 (ATPase) 是生物体内重要的酶, 存在于所有的细胞中, 包括多种由不同离子活化及存在于不同细胞结构中的 ATPase, 在细胞的供能活动如离子平衡等之中起着重要作用。研究氯代烃农药的作用机制时, 人们发现 DDT 对 Na, K-ATPase, Mg-ATPase 有抑制作用, 并因此对多种污染物与生物体 ATPase 的关系作更广泛的研究。已发现多种水生生物包括鱼、虾、龟、乌贼、水生昆虫以及鱼的多种组织, 如鳃、肾、脑的多种 ATPase 对不同的污染物均有反应, 如有机氯农药、增塑剂、多氯联苯、金属、炼油废水等。尽管对不同生物、不同组织作用程度有异, 这可能是由于各种生物、各种器官的敏感性不同所致, 但这种作用的存在是毫无疑问的。无论是离体实验或活体暴露, 都表明有一定的剂量/效应关系存在, 有的还具有典型的毒性效应曲线。酶实验与生物体功能损伤的同时研究, 也证实了 ATPase 受抑制可以反映毒物对机体的影响。虽然毒物对 ATPase 作用的研究已进行了近三十年, 由于多种类型的水污染物对 ATPase 有显著的影响, 因此, 从分子生态毒理学的角度来看, ATPase 至今仍是一项评价污染压力的参数^[3-8]。最新研究发现, 由淡水水华产生的天然有毒物微囊藻毒素可抑制鱼鳃中的 ATPase, 这不仅证明 ATPase 可以反映多种物质的作用, 而且还有助于探讨在发生水华的水体中鱼大量死亡的原因^[9]。

1.3 用鱼血清的多种酶作为水环境污染的指标

在临床医学和兽医学上, 测定血液中组织专一性的酶, 是常用来诊断特定组织或器官损伤的方法, 在水生态毒理学研究中, 这些方法也被用于判断污染物的作用靶位, 如用转氨酶、脱氢酶来反映水污染物对鱼肝的损伤, 山梨醇脱氢酶仅存在于肝脏, 因而血中的山梨醇脱氢酶也被用于指示某些化学物对肝脏的亚致死作用, 碱性磷酸酶由于对金属盐敏感也被用作中毒指标^[10-12]。虽然这些酶不是污染物的直接作用靶位, 但由于能反映一般毒物所引起的专一性的器官损伤, 因而得到较为广泛的应用。Folmar 提出, 用一系列鱼血清中非专一性的生化指标包括酶、电解质和激素等可很好地指示化学污染物慢性暴露的影响^[13]。

1.4 蛋白磷酸酶作为促肿瘤物的检测指标

蛋白磷酸酶广泛存在于细胞中, 对任何一种蛋白进行脱磷酸化作用。蛋白磷酸化与脱磷酸化是细胞内无所不在的反应, 正是这两种反应的特定平衡协调着细胞内许多生化反应过程。若这两种酶任意一种改变了其活性, 则由之而来的将是细胞内一系列生化反应的紊乱, 包括肿瘤形成过程的促进。目前已发现, 促癌物豆蔻酸乙酸大戟二萜酯 (简称 TPA) 以蛋白激酶 C 为受体, 而蛋白磷酸酶 (Protein phosphatase, 简称 PP) 是逆转蛋白激酶 C 的主要酶, 因此, 激活蛋白激酶 C 和抑制蛋白磷酸酶均会对肿瘤形成有促进作用, 影响这两种酶的物质分别称为 TPA 型促肿瘤剂和大田软海绵酸型促肿瘤剂。在对

天然有毒物微囊藻毒素的作用机理研究中,人们发现它对 PP 的抑制作用远远超过了大田软海绵酸,是迄今最强的蛋白磷酸酶抑制剂^[4],因而是目前所发现的最强的大田软海绵酸途径的肿瘤促进剂。

微囊藻毒素是淡水水华的主要成分蓝藻的次生代谢产物,水体富营养化导致水华的发生已成为全球性的问题,因而微囊藻毒素是一种存在广的天然有毒物,由于微囊藻毒素毒性大,专一性作用于肝脏,因此,对它的研究受到广泛重视。多种检测方法已用于了微囊藻毒素的定量测定,而最新的研究发现,用蛋白磷酸酶活性来检测微囊藻毒素的量,其方法具有极高的灵敏度,可检测到浓度低于 1pg/100μl 的水样中的微囊藻毒素,一九九三年在英国召开的“第一届蓝藻毒素检测方法国际会议”上有人提出用蛋白磷酸酶作为指标,用对它的抑制实验来检测具有相同作用机制的促肿瘤物的总量,可以预期,这个新的指标对具有潜在的促肿瘤作用的物质的检测与预报将发挥重要作用。

2. 解毒系统的诱导 I——有机污染物与鱼体非生物物质代谢酶

有机体的非生物物质的转化包括两阶段:第一阶段,亲脂性底物被细胞色素 P450 依赖性的混合功能氧化酶 (Mixed function oxidase, 简称 MFO) 代谢,将氧引入底物分子;第二阶段,内源性分子如葡萄糖醛酸,硫酸盐,谷胱甘肽等与被氧化的非生物物质结合,形成低毒而且易于排出的产物。这是代谢非生物物质的一般方式。生物体内解毒系统一个重要的特征是参与许多关键性的解毒反应的酶是可通过暴露而诱导的,而许多环境污染物都是诱导物,因此,检测这种诱导作用并用作指标来反映污染物暴露对生物的影响就成了分子生态毒理学研究的一个重要方面。其中,对 MFO 研究尤为系统、深入,而不少方法已应用于环境监测,是近年来分子生态毒理学中最成功的例子之一。

2.1 MFO 作用、组成及特性

MFO 存在于所有的脊椎动物和大部分无脊椎动物中,其作用是代谢非极性的亲脂性有机化合物,包括生物物质和非生物物质。从生理作用来看,它参与体内的胆固醇、胆汁酸、类固醇、激素、维生素 D 的生物合成与代谢;从解毒作用来看,许多外源性的化学物,如多环芳烃和药物,都经该酶系统代谢,形成极性较大的产物而易于从体内排出。许多外源性非生物物质进入体内,经 MFO 的作用后发生各种变化,大多转化成低毒易溶的代谢物排出体外,而有的则变得更毒甚至变成致癌物,所以 MFO 又称为致毒/解毒系统^[15,16]。哺乳动物中存在的大多数生物转化反应在鱼的离体和活体实验中都得到了证实。在六十年代,已有研究表明鱼肝中有类似 MFO 的活力存在,鱼以与哺乳动物相类似的方式代谢外来物质。所有的真骨鱼,甲壳类,软体动物等都有 P450 及有关的酶。

MFO 的组成包括:细胞色素 P450, NADPH-细胞色素 P450 还原酶(或 NADH-细胞色素 b₅ 还原酶),磷脂。MFO 引起的生物转化的反应特征相同,但底物、产物的化学特性差别很大,即具多种催化功能。MFO 是一般表达,根据其催化活性可以表示为:7-乙氧基异吩恶唑 0-脱乙基酶 (EROD), 7-乙氧基香豆素 0-脱乙基酶 (ECOD), 芳烃羟化酶 (AHH) 等。P450 是电子传递系统的末端氧化酶,是底物连接成分,因而决定反应的专一性。单、多克隆抗体 cDNA 探针已表明, P450 基因有多种形式,根据基因序列及染色体定位,确定了总族,族,亚族, P450 基因都属于 P450 总科,目前已确定

27 个 P450 基因族共 154 个基因^[17]。对于 MFO, 非生物物质既是底物又是诱导剂, 现在, 已可根据活化的 P450 基因的族或亚族对诱导剂即污染物进行分类^[18]。哺乳动物中研究最详细的是 P4501A 亚族的诱导反应, 基因的启动是通过胞内受体 Ah 作用。

2.2 水污染物对鱼 P450 的诱导作用

真骨鱼中均有多种 P450 形式存在, 近期研究表明, 鱼中也有 Ah 受体^[19,20], 鱼 P450 同功酶与相对应的哺乳动物的酶在底物专一性上有很大差别, 与哺乳动物比较, 环境条件对鱼的 MFO 活力的诱导影响很大, 影响最大的是性别和温度。由于许多水污染物都是诱导剂, 因而加速了鱼的 MFO 诱导作用的研究。大量实验室研究证明, 多种已知的 MFO 诱导剂和其它有机污染物可诱导鱼体中多种 MFO 酶活力。野外调查及监测也证明了鱼 MFO 受环境污染物的诱导。至今, 在所有研究过的鱼种类中均有 P4501A 亚族。虽然鱼体中 MFO 诱导过程尚未完全了解, 但哺乳动物 P4501A1 基因所编码的特有的酶活性 EROD 和 AHH, 在鱼中也可被典型的 MFO 诱导剂多环芳烃类 (PAH) 物质所诱导。

2.2.1 P450 诱导的检测 诱导反应是化学物质刺激基因转录使 mRNA 增加, 随之, P450 蛋白合成增加, 然后表现在酶活性增加, 因此, 目前可从上述不同水平上来证实污染物对 MFO 诱导的存在, 可以认为这是 MFO 研究的重要特色之一。

2.2.1.1 酶活性的测定 酶活力测定证明 MFO 诱导作用的存在是最早和最常采用的。在正常鱼中, 由于 EROD, AHH 活力很低, 有时无法测出, 因而, 检测 EROD, AHH 催化活力是确定鱼中诱导反应的最敏感的方法。对胚胎进行诱导剂微量注射可看到孵化后鱼苗中肝 EROD 的诱导^[21]。用酶活力测定证明诱导作用存在, 其方法较为成熟, 但是酶活性的表达需要酶蛋白的一定结构的维持及辅因子的存在。由于野外条件的限制, 诱导剂和内源性物质的存在, 这些都会影响酶活性的准确表达, 而且当样品量较小时 (如鱼卵、鱼苗), 酶活性测定较为困难。

2.2.1.2 酶蛋白量的测定 成功地从鱼中分离出 P4501A1 蛋白, 为开展免疫法检测 P450 蛋白提供了极好的条件。在 1986 年用蛋白免疫印迹技术 (Western Blot) 对一些鱼的污染负荷进行了测定。1991 年发展了用 ELISA 法测定鱼 MFO 蛋白的增加证明诱导的存在。当样品量少 MFO 活力测定困难、酶活性丧失或有抑制剂存在时, 用蛋白测定法尤为合适。例如, 鱼鳃及鳕鱼苗的 EROD 活力很难测出, 但用蛋白测定法成功地证明了诱导作用的存在。由于抗原性受蛋白变性的影响小, 此方法很适用于测定野外样品。Goksoyr 等人用野外采集鱼样和在实验室内用多氯联苯 (PCB) 暴露后的鱼样测定 EROD 未能反映诱导, 这可能是因为 PCB 对 EROD 活力测定有抑制, 然而用 ELISA 法很好证明了 P4501A1 蛋白的增加^[22], 而且该方法的另一优越性是可同时测大量样品。

2.2.1.3 mRNA 的测定 1988 年, 鱼的 CYP1A1 基因第一次克隆, cDNA 探针可检测到 CYP1A1 的翻译, 并可测到诱导过程中 mRNA 的上升^[23]。Pesonen 的研究不仅发现在萘黄酮、TCDD 诱导下硬头鳞的 P450 mRNA 迅速上升, 而且也测定出随后引起的 P4501A 蛋白和 EROD 活力增加, 由此可见, 在不同水平上进行测定所反应的诱导作用是一致的。Haasch 也在酶活性、蛋白、mRNA 几个水平上测定了被 PAH 和 PCB 污染的河水对鱼 CYP1A1 的诱导, 证明了这几种水平上的测定都可用于 P450 诱导作用

的测检^[24]。从几个水平上测定这种诱导作用,其优越性在于可互相补充证明诱导作用的存在^[25]。但是,ELISA 法目前只能用于半定量,尚需进一步改进。mRNA 诱导检测用于环境样品只能提供有限信息,而且测 mRNA 对样品贮存要求也较高。所以,作为将来的发展方向,尚待进一步研究、完善多水平测定 MFO 诱导的方法。

2.2.2 鱼 MFO 的诱导特性及作为指标的依据 由于具有下列特点,鱼的 MFO 可用作分子生态毒理学指标。(1) 许多研究表明鱼 MFO 的诱导反应极为灵敏。在污染水体中鱼的 EROD, AHH 活力都有明显升高。研究结果还证明鱼 MFO 对环境诱导的反应的敏感性与哺乳动物具可比性或高于后者^[26]。(2) MFO 诱导有很好的剂量/效应关系,这是作为指标的重要条件。如有报道指出,漂白纸浆废水使鱼肝 EROD 活力升高,而且与废水排放点的距离成反比。沉积物污染水平与诱导反应有很好的相关性。(3) 与哺乳动物比较,鱼的肝外组织的 MFO 活力有更明显的反应,不同组织间诱导存在一定的差别,由此可判断毒物作用的主要靶器官或毒物进入体内的方式。

2.3 鱼 MFO 诱导的生态毒理学意义

水中污染物质众多,有时含量也不高,用化学法往往无法检出,因而,污染水平与生物效应之间的关系也很难知道。而用生物转化酶诱导这种分子水平上的反应可给出污染水平的综合效应,包括生物可利用性,生物物质与污染物的相互作用,毒物之间的相互作用,机体的防御反应等等,对于反映水环境质量具有重要意义。与一般参数不同,体内高 MFO 不仅证明污染的存在,而且还表明了体内解毒机制的破坏,从而确切地指出对机体早期影响的存在,同时, MFO 活性偏高还反映出化学物的代谢增加并有可能活化了致癌物质,这些结果将对水生态系统中污染物早期影响的判断及水源保护提供重要信息。

有机污染物对鱼生物转化酶诱导作用的肯定使得有可能将这类生化指标用于水环境监测,有人提出鱼 MFO 可作为确定环境污染存在的早期报警系统。水生生物 CYP1A1 的典型反应 EROD 和 AHH 已被列入一些重要的监测项目。当诱导剂不确定时, CYP1A1 诱导反应可提供非常重要的信息。水生生物 P4501A 基因及产物可作为一个广谱的生物指标,反映许多有机污染物尤其是复杂的混和物的暴露程度。在考虑环境和生理因子的影响时,如温度,季节,食物,性别(激素)等, MFO 可作为一种很好的生物指标用于水环境监测。还有的研究表明底栖鱼的 EROD 诱导比其它的要敏感,这提示人们对易在沉积物中积累的亲脂性化合物进行监测时,用底栖鱼作为材料可提高方法的灵敏度。

综上所述,鱼的 MFO 诱导是一项有重要意义的生物指标。可以预期,随着今后多种检测手段的进一步完善及检测方法灵敏度的提高,将显示出广阔的应用前景。有的学者已经就作为指标如何提高方法的灵敏度展开了研究。所以,建立更稳定、重现性好的酶活力测定方法,进一步完善测 P450 蛋白和 mRNA 的方法,研究和明确环境变量对鱼 MFO 的影响,将是今后发展 MFO 分子生态毒理学指标的研究重点。

2.4 解毒系统第二阶段酶作为指标的研究

近年来关于解毒系统第二阶段的酶也有不少研究,如谷胱甘肽硫转移酶(GST),葡萄糖醛酸转移酶(UDPGT)等。有报告指出,当大型蚤暴露于几种氯酚中时均可诱导 GST。100 μ g/L Cd 的暴露使虾的中肠 GST 活性降低,但也有的研究发现污染物暴露对 GST

并没有显著诱导。对 UDPGT 也有一些研究^[27,28],总的来看,远不及对 MFO 的研究那样系统、全面,而且结论也不太一致^[29,30],可能是测定方法、取样时间及所采用的底物不同。目前,虽然鱼的 GST 还不能象 MFO 那样作为一项可靠的生物指标,但它的指示作用已引起了人们的注意。GST 在鱼体中参与的非生物物质的解毒作用是人们很需要了解的,而对解毒系统两阶段酶的同时检测也可以提供非常重要的信息,例如两阶段酶诱导的不同步是否会引起代谢物的积累等,两者的结合研究将更全面反映解毒系统的状态及毒物对机体影响的大小。随着对鱼的 GST 基因的诱导、调节的表达过程的更多了解,GST 测定有可能成为非常有用的生物监测手段,因此,可以预期,对鱼解毒系统第二阶段酶的研究必将受到越来越多的重视。

3. 解毒系统的诱导 (II)——水生生物金属硫蛋白与金属污染

金属硫蛋白 (Metallothionein, 简称 MT) 首次在马肾中被分离,它是一种位于胞浆的低分子蛋白,半胱氨酸含量极高,约 30%,分子量一般在 6000—7000 道尔顿,对热稳定,金属含量高,目前已发现这种蛋白广泛存在于原生动、真菌、植物和所有的无脊椎动物、脊椎动物中。水生生物中的金属硫蛋白最早是七十年代中期报道的,现在发现至少有 80 种鱼和水生无脊椎动物有 MT 存在,目前,仅有 8 种 MT 的一级结构被证明,其中包括三种鱼,一种棘皮动物,两种软体动物,两种甲壳动物^[31]。水生动物 MT 多存在于肝(或无脊椎动物中与之相应的器官)、肾、鳃、肠中,与高等动物类似,其中对鱼肝、鳃、无脊椎动物消化腺或胰腺的 MT 研究较多,也有用整体动物进行研究的。哺乳动物中根据等电点和氨基酸成分,可分为两种同功蛋白,MT-I 和 MT-II,而在迄今研究的鱼中,仅在硬头鲮中发现有两种 MT: MT-A 和 MT-B,其它鱼中仅一种 MT。

由于 MT 对二价金属离子有极高的亲和力,因而在细胞内起着贮存必需的微量金属如 Zn, Cu 和结合有毒金属如 Cd, Hg 的作用,它与必需金属的结合起着调节这些金属在细胞内的浓度的作用,而与有毒金属的结合则可以保护细胞器免受金属毒性影响。它的一个重要特点是可在转录水平上被环境中的金属所诱导,而且这种诱导与环境中的金属浓度有相关性,可以反映环境中的金属的水平,因而也成为了一种重要的分子生态毒理学指标。

MT 的诱导发生在转录水平上,因此,可从几个水平对诱导作用进行检测。如可分别用 MT 库中金属含量的增加,MT 蛋白的增加和相应的 mRNA 的增加作为指标。每个指标反映的是不同细胞调节水平上的情况,而几个指标又可互相补充、印证。现代分析及分子生物学方法的发展也为不同水平上 MT 的测定提供了有利的条件,如示差脉冲极谱法可对 MT 的含量进行测定; HPLC, FPLC, HPLC-ICP-MS 可用于 MT 同功蛋白的分离及金属检测,免疫化学和电化学法可直接分析总 MT; RNA 印迹技术可用于定量测定暴露于不同环境条件的鱼组织中 MT 的 mRNA 的变化;用一种鱼的 MT 制备的抗血清可识别多种鱼的 MT,因而 ELISA 和 RIA 已可用于 MT 的定量测定^[32,33]。

由于许多金属也是水环境的一类主要污染物,所以对水生生物 MT 的研究受到广泛重视。70 年代末即有人提出组织中 MT 的含量可作为水生生物金属暴露的指标。长期以来,关于这方面的研究一直在进行并且越来越多的结果证明了 MT 是一项极有意义的

指标。鱼经腹腔注射和水体暴露, Zn, Cu, Cd 均可诱导 MT 的合成, 高金属含量区域的生物 MT 的诱导已在无脊椎动物和鱼中得到了证实。水体暴露后的检测表明, 鱼肝 MT 量与水中金属量相关性极好, 而且也与肝中金属量相关, 可以反映暴露的程度。翻车鱼暴露于 Cd 后肝 MT 及 Cd 浓度增加并具正相关。对贝类的研究发现, Cd 积累与 MT 有关, MT 在胞内 Cd 解毒中有重要作用, 对 MT 的测定可决定生物对 Cd 污染的亚致死反应, 是决定 Cd 污染的生物效应的有效手段^[34]。拟鲤暴露于水体中浓度为 100 $\mu\text{g/L}$ 的 Cd 时, 肝中的 MT 和 Cd 浓度均增加^[35]。Roesijadi 认为用 MT 来评价个体暴露于金属的状况时, Cd-MT 较为合适, 因为生物过程中 Cd 是非必需金属, 正常组织中 Cd 的浓度低, Cd-MT 反应专一。

早期 MT 研究重点是它在细胞内金属调节中的生理功能, 而现在更多探讨的是金属及其它环境因子的诱导作用。近年的研究表明, 除了金属, 尚有许多内外因子都可以诱导金属硫蛋白, 对它的机理尚不很清楚, 但对于参与必需金属的调节和非必需金属的解毒是肯定的。由于对水生生物 MT 的结构、功能及环境因子对其影响的了解还很有限, 因而, 在用作指标时要谨慎。

4. 化学物对 DNA 损伤的研究

化学物进入生物体内后, 经体内的酶系统活化, 产生中间代谢物, 这类具有强亲电性的代谢物可与脂类、蛋白、RNA 或 DNA 的亲核中心发生反应, 形成稳定的或不稳定的加合物。脱氧核糖核酸 (DNA) 是生物体内重要的大分子, 也是生物体重要的遗传物质, 若 DNA 发生变化, 如形成加合物或甲基化比例改变, 当体内不能及时修复时, 其特有的遗传学性质就会受到影响。有毒物质与细胞 DNA 相互作用形成共价结合物被认为是化学致癌/致突变过程启动的关键步骤, DNA 与化学物之间的作用反映了化学物的遗传学毒性, 许多具有化学致癌作用和致突变作用的物质都可以引起不同类型的 DNA 损伤, 所以, DNA 损伤是一项可用于评价环境化学物的遗传毒性的有意义的参数。因此, DNA 损伤的检测也是分子生态毒理学研究的重要内容。

近年来, 人们在不断发展灵敏、完善的技术来检测化学物与 DNA 的作用, 已经发现 DNA 损伤与致癌作用存在很好的相关性, 靶器官 DNA 加合物水平可反映致癌物的致癌能力, 因而, 加合物的量、甲基化比例的改变等已成为 DNA 损伤的重要指标。

4.1 水生生物中 DNA 损伤的检测

DNA 加合物的研究早就已经引起了人们的注意, 尤其是与一些已知的致癌物的共价连接, 如 PAH 类物质, 黄曲霉素等, 最常采用的方法主要有免疫法、高效液相色谱法、³²P 后标记法等。由于在污染水体中鱼的病变大量发生, 而已知的致癌物广泛存在于水环境中, 这提示污染物与肿瘤的形成有一定联系, 因此水生生态毒理学家认为将鱼作为材料研究作用模式和用于监测是十分有意义的。近年来人们用不同的鱼进行了这类研究, 并与哺乳动物的结果进行比较, 证明了人们的预测。早期用标记化合物来进行此类研究, 现在已发展了较多的新方法, 近年在水生生物进行的研究中经常用到的有以下几种方法。

4.1.1. 酸水解法定量测定加合物 Shugart 等人发展了酸水解法检测蓝鳃太阳鱼中的苯并芘 (BaP) 加合物, 将 BaP 加合物从 DNA 分子上除去, 使其以具强荧光吸收的呔喃

形式游离出来,然后用高效液相色谱 (HPLC)/荧光检测方法定性定量测定,该方法不仅可以测到 fmol 量的加合物,而且测定的是 DNA 与 BaP 最终的致癌形式 BaPDE 之间形成的加合物。但这种方法在应用方面的限制是需要得到加合物的标准品。

4.1.2. 碱性解链实验 检测化学物与 DNA 作用的另一手段是碱性解链实验。原来这个方法主要用于细胞培养物中 DNA 损伤的检测,其原理是,在一定的 pH 和温度下, DNA 在分子内单股断裂处发生链分离,在一定时间内,残余的双链 DNA 量与断裂点的数目成反比。这是通过检查 DNA 分子的完整性来证明化学物对 DNA 的作用。八十年代末美国科学家将这一方法用于环境监测,他们用蓝鳃太阳鱼中 DNA 断裂来作为环境中遗传毒性物质的生物监测指标。该方法简单易行,而且能反映多种遗传毒性物质对 DNA 暂时的损伤的潜在可能。

4.1.3. DNA 甲基化测定 有时化学物并不一定与 DNA 形成加合物,而是以一定方式改变 DNA 所特有的甲基化遗传模式。该方法的基本原理是在真核细胞内, m^5 -dCyd 是唯一的甲基化脱氧核糖核苷酸,其含量是具有一定比例的,在脊椎动物中这个值是 0.7—2.8%。通过多种酶水解被分离出的 DNA,得到核苷酸混合物,经一定的方法将甲基化与未甲基化胞嘧啶分离,分别测出二者的含量,从甲基化比例,可以判断 DNA 是否受到影响。Shugart 从研究中得出结论, DNA 低甲基化也是反映遗传毒物毒性的一种生化指标。

4.1.4. ^{32}P 后标记检测 DNA 损伤 前述几种方法被成功的应用于检测某些化合物或物理因子对 DNA 的作用,其局限性是要选定特定的 DNA 加合物,对于确定大量未知结构和浓度的有致癌可能性的化学物与 DNA 的作用则受到一定限制,而 ^{32}P 后标记技术则弥补了这个不足。将分离出的 DNA 用一定的酶水解成正常的单核苷酸和形成了加合物的单核苷酸,并进一步将二者分离,再用 ^{32}P 标记的 ATP 将带有加合物的单核苷酸标记,然后用双向层析、放射性自显影、液闪计数等方法定量。此法最大的优点是检测能力强,应用范围广,可检测任何化学物与 DNA 的连接,尤其是可用于环境中生物样品的加合物测定以及判断化合物的毒性,包括纯品或混合物是否有潜在的致癌作用,同时具有极高的灵敏度,可检测到 10^9 个碱基中的一个 DNA 加合物^[36]。

4.2 加合物检测的意义及与其它遗传毒性指标的比较

Brook 在六十年代已发现小鼠皮肤中 DNA 与 BaP 的连接的量与致癌活性有很好的相关性,但深入全面的研究是近十年才开始的。大量的实验室研究结论主要从苯并芘的研究中获得。经用多种实验材料的研究证明,它与 DNA 的连接形式是苯并芘二环氧化物 BaPDE,并且这是最终的致癌形式,在小鼠皮肤培养实验中,当 BaP 用量为 $5\mu\text{g}$ 时,在 65h 内,加合物的量以线性速度增加;当 BaP 用量小于 $10\mu\text{g}$ 时,加合物的量是 BaP 剂量依赖性的。DNA 与 BaPDE 的连接与体内的芳烃羟化酶有关。Shugart 等人提出, DNA-BaPDE 加合物的量可作为一种 BaP 致癌作用的生物剂量的量度,还提出致癌物经细胞活化后与 DNA 连接的百分数可反映它的致癌能力,他用小鼠器官培养进行实验,当考虑代谢活化速度,即可利用的 BaP 的量时,每小时有 0.025% 的 BaP 与 DNA 连接。Shugart 不仅检测到了 BaP 对 DNA 引起低甲基化,还发现低甲基化与加合物形成的程度成比例,这表明 BaP 对 DNA 的几种形式的损伤是一致的。由于在对哺乳动物的研究中

建立了系列检测 DNA 损伤的方法,为进一步开展 DNA 损伤的研究奠定了方法学基础,随后,在用这些方法研究水生生物的 DNA 损伤时也得到了类似的结果^[37,38]。许多研究发现,污染严重的水体的沉积物导致底栖鱼肝脏大量发生病变,显然这与鱼的生活习性密切相关,而与之相应的是底栖鱼中有更多的 DNA 加合物被检出。这表明 DNA 加合物形成与肿瘤形成有很好的相关性。Shugart 用蓝鳃太阳鱼和肥头软口鲶进行实验,在两种鱼中得到了类似的结果。他还同时用鱼与鼠进行 BaP 的 DNA 加合物的研究,结果发现不仅形成加合物的反应类似,而且所用的两种底栖鱼的反应比鼠更灵敏,这说明鱼的实验结果有可能外推到其它物种,而以鱼做材料比鼠更为经济和方便。所以,对鱼的 DNA 加合物的研究结果不仅为水环境提供重要参数,而且还可以为预测污染物对更高等生物以至人类可能产生的影响提供很有意义的信息。

Jones 等人进行了很有特色的研究。他们同时应用 ^{32}P 后标记技术、限制性点突变实验及微核实验等手段从加合物形成即 DNA 损伤的起始、点突变和染色体损伤等几个方面确定遗传毒性污染物的影响,通过几种方法的结合很全面地描述了这种影响的过程,从而对生物所受到的早期影响的判断更为准确^[39]。Maccubbin 用 ^{32}P 后标记技术检测了沉积物中含有大量化学污染物包括 PAH 的几个水体中的若干种鱼,发现鱼中 DNA 加合物比实验室培养的鱼的要高得多,结合组织病理学和对胆汁进行 HPLC/荧光分析,剖析了在环境中已存在的物质的性质以及对鱼的肿瘤诱导中所起的作用,这是将 DNA 损伤检测用于环境样品分析的一个很成功的例子。对水体中鱼类进行 DNA 损伤检测,实际上是反映了作用于 DNA 的多种化学物质的综合效应,也反映了化学物质在体内的代谢、组织中的分布、生物可利用性和解毒等状况,这样,不仅解释了鱼器官病变的原因,而且也可将这种作用作为一种指标来反映水生生物暴露于潜在遗传毒性混合物的情况^[40]。Shugart 还认为通过 DNA 损伤动力学的研究,可以反映机体对 DNA 损伤的修复能力。

值得注意的是,目前越来越多的研究发现,血红蛋白在一定程度上可以代替 DNA 用于检测加合物,虽然化学物与血红蛋白的加合并不具有致癌作用,但由于血红蛋白也具有亲核中心,可与亲电物质反应形成稳定加合物,因而,血红蛋白加合物可间接反映连接于 DNA 的加合物。动物实验中已发现有五十多种化学物质可与血红蛋白反应,致突变剂与癌诱导剂都可与血红蛋白连接。从实验方法来看,血红蛋白易得,且在生物个体中浓度变化不大,这是值得进一步探讨的。多年来的研究在这一领域有了很大进展,但还有很多问题需要进一步解决。如加合物的量与暴露的化学物的量的相关性,这需用多种材料和多种化学物来进行验证;DNA 损伤的速度和程度是否和暴露的化学物的量有关系,这也是人们希望回答的。此外,亟待了解的是加合物的量与靶组织瘤形成的相关性及其二者的剂量/效应关系。

5. 抗氧化剂防御系统与污染物的作用

在研究污染物的致毒机理中,人们发现许多外源性化学物是通过产生大量活性氧,从而对机体诱发多种损害的,而这些产生活性氧的污染物的暴露对体内抗氧化作用的酶有诱导作用,因而,生态毒理学家试图探索用抗氧化剂系统的成份来检测污染物的早期影

响。

在长期进化中, 需氧生物发展了防御过氧化损害的系统 (Antioxidant defense), 其组成包括: 水溶性组份如谷胱甘肽 (GSH), 维生素 C; 脂溶性成份, 如维生素 E, β -胡萝卜素; 酶如谷胱甘肽过氧化酶 (GPx), 超氧化物歧化酶 (SOD), 过氧化氢酶 (Ct) 等。在生理状态下, 由代谢产生的活性氧可为抗氧化防御系统所控制, 但当某些种类污染物如醌类, 芳香羟胺类, 金属螯合剂等在内进行生物转化时, 同时产生氧化还原循环 (Redox cycling), 这样, 不仅母体化合物产生的中间产物本身是自由基代谢物, 可与核酸, 蛋白共价连接, 产生毒害, 而且在循环中产生了大量活性氧, 如 $\text{OH}\cdot$; $\text{O}_2^{\cdot-}$, H_2O_2 , 这些活性氧又可使 DNA 断裂、脂质过氧化、酶蛋白失活等, 从而引起机体氧化应激 (Oxidative stress)。在这些活性氧产生及转化中, SOD, Ct, GPx, GSH 等起着非常重要的作用。图 1 简略表示了氧化还原循环与活性氧产生及酶的关系。

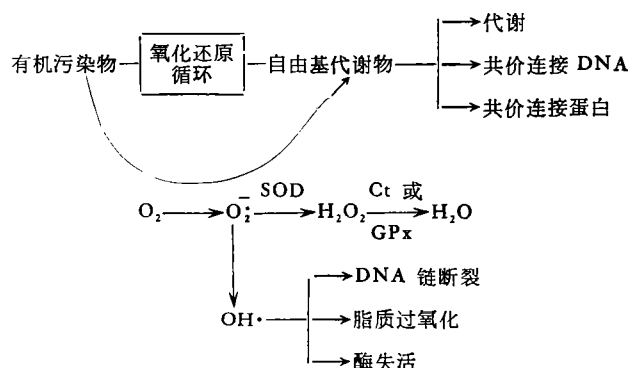


图 1 氧化还原循环、自由基产生、主要的酶及毒理学影响图示(仿 DiGiulio^[41])

Fig.1 Overview of redox cycling, production of free radical, antioxidant enzymes and toxicological consequences.

目前的研究发现, 暴露于可产生氧化还原循环的物质后, 机体抗氧化剂防御系统中的一些成分会改变。如 SOD, Ct, GPx 等可被诱导, 除了酶活性, GSH 以及活性氧的量也可反映氧化应激的存在, 脂质过氧化也能证明污染物氧化性损伤作用。Stein 提出, 鱼的总 GSH (包括氧化型和还原型) 是有希望的生物指标, 而且由于它在抗活性氧毒性中的作用, 其改变的程度可作为干扰了鱼的含氧自由基流的污染物暴露的标志。能在体内产生自由基的污染物的种类非常多, 远远超过了 MFO 的诱导剂, 目前虽然抗氧化剂防御系统的一些成份还没有象 MFO 那样成为广泛应用的指标, 但是, 正由于它们能反映多种污染物的作用, 而且其变化可定量检测, 已充分显示出了其作为分子生态毒理学指标的前景, 是一类有希望的敏感分子生态毒理学指标, 尤其可用于反映能产生含氧自由基污染物的早期影响, 因此, 对这一领域的研究将受到更多的重视^[42,44]。

6. 多指标综合研究

单项分子生态毒理学指标可以反映化学物质毒性的一个重要方面, 而要对水环境质量和化学品的安全性进行全面评价, 多项指标的综合研究对于全面评价污染物对生物的各种可能影响更为有价值, 目前已有一些这样的报道。

McCarthy 在实验中使用强致癌物二乙基硝胺 (DEN) 处理青鳉后, 同时对 DNA 链断裂、加合物含量、EROD 和谷胱甘肽硫转移酶 (GST) 等几项指标进行测定, 发现 DNA 链断裂略为增加, 而没有检测到加合物; EROD 活力降低; GST 活力增加。他认为, 链断裂少和无加合物证明机体有足够的 DNA 修复机制, 可能 GST 活力增加对加合物的去除起了一定作用。这些结果从 DNA 改变及解毒系统的变化两个方面对遗传毒物的潜在影响作出了评价^[45]。Boon 等人同时研究了 PCB 对解毒系统 I 期和 II 期的酶的作用。发现致毒 10, 16d 后测定, 鳃的 P450 蛋白明显升高; GST 仅在 16d 才有升高, 而 10d 内无变化, 表明 GST 和 P450 诱导所需时间不一样, 他认为解毒系统的这两种酶在鱼中的调节是各自独立的^[46]。当底栖鱼类暴露于严重的芳烃污染水体沉积物时, EROD, ECOD, DNA 单链比例, SOD, 氧化型和还原型 GSH 的量及脂质过氧化等反映氧化压力的参数均升高, 几个方面的生化指标的反映非常一致, 这表明生物的这些早期异常生化变化可作为环境变坏的早期预报, 也表明三者之间有一定联系^[47]。残留测定在一定程度上可以反映污染物的影响, 但许多污染物的代谢产物毒性更大, 因此, 测定机体的早期生理生化反应更能反映作用本质, 而 Stein 等人将残留分析和多项分子生态毒理学指标测定结合, 将肝 PCBs 残留, 胆汁中荧光芳烃物质的量, AHH 和 EROD 活力, 总 GSH 量和 DNA 加合物这一系列指标及参数的变化结合, 这样对于污染物的毒性评价和潜在的严重影响的早期预报极为有价值。镉致毒后引起 GST 活性降低, 而 BaP 暴露使 MFO 活性升高, 当两种物质同时存在时就可能使 BaP 代谢积累, 这样对生物的危害更大。利用多项分子生态毒理学指标进行研究可以为生态毒理学提供更多的信息和更可靠的依据。

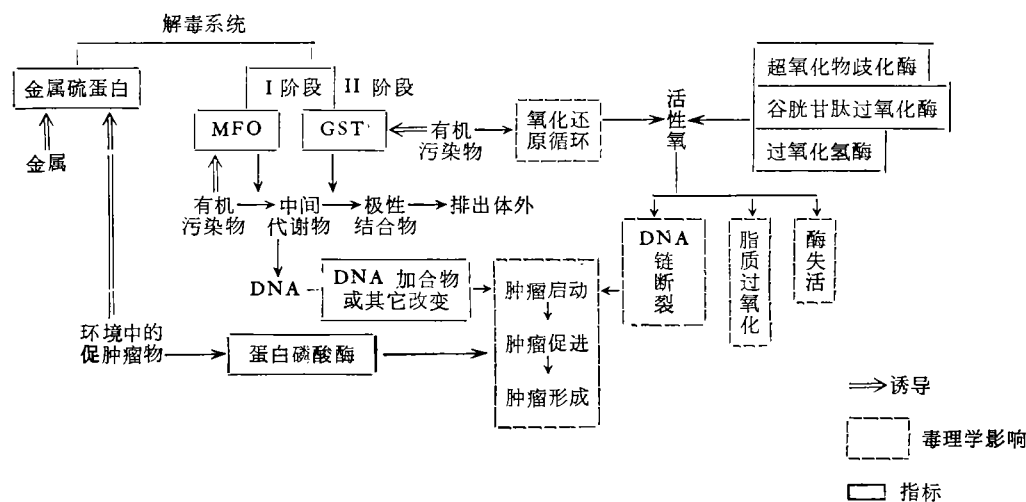


图 2 几种分子生态毒理学指标之间的联系

Fig. 2 Linkage of molecular ecotoxicological indicators.

由于分子生态毒理学指标是用生物体内重要的生物学过程来反映污染物的影响,因此,这些指标之间必然有着不可分割的联系。图 2 综合了本文所介绍的指标、污染物及毒理学影响之间的关系。这些结果综合了许多学者的研究,几类指标都代表着生物体内重要的生化反应,例如,与 DNA 形成加合物的物质大多经过了 MFO 的酶催化,即致癌物

的活化,这表明加合物与 MFO 酶诱导之间存在一定的联系;致癌物与促肿瘤物对肿瘤形成过程都起着重要的作用。虽然大量的研究是从不同国家、实验室和用不同实验材料获得,但所选指标的一致性,结果的相似性以及指标间高度的相关性,表明由污染物作用机理而得出的分子生态毒理学指标不仅揭示了毒物作用本质,而且在生物种内、种间具一定可比性,可以准确反映污染物对生物的早期作用。

7. 结语

表 1 归纳了本文介绍的一些已成功地用于环境评价的分子生态毒理学指标及有应用前景的生化参数。

表 1 若干分子生态毒理学指标一览表
Tab. 1 Overview of molecular ecotoxicological indicators

指 标 Indicators	产生影响的主要污染物 Main effected pollutants	作用方式 Mechanism	毒性 Toxicity
胆碱酯酶	有机磷农药,氨基甲酸酯	酶抑制	神经传导受影响
ATP 酶	有机氯农药,多氯联苯,表面活性剂,金属,增塑剂等	酶抑制	细胞供能受影响
血清转氨酶,脱氢酶	肝毒类物质	器官损伤	肝损伤
多功能氧化酶,谷胱甘肽硫转移酶等	多环芳烃类,有机工业废水等	基因活化	解毒机制破坏
金属硫蛋白	重金属,某些有机物	基因活化	解毒机制破坏
DNA 及血红蛋白加合物, DNA 甲基化比例	多环芳烃类,有机工业废水等	DNA 修饰	致癌作用
蛋白磷酸酶	大田软海绵酸型促肿瘤剂	酶抑制	促肿瘤作用
抗氧化剂作用的酶	醌类,芳香硝基类,芳香羟胺,金属螯合剂等	酶诱导	氧化应激

综上所述,分子生态毒理学指标具有以下特点:(1)对有毒物质早期影响和低剂量暴露的作用具有准确的检测能力;(2)由于可对具有类似作用机制的一类物质的毒性作出判断和早期预报,故可用于污染总体效应的评价;(3)测定方法耗时短,可同时测定多个样品。从目前的研究结果看已展示了广阔的应用前景。

水环境污染控制及水质保护是资源和环境保护中的重大课题,因此,有关水分子生态毒理学研究必将引起人们越来越多的重视,预期今后的研究工作将主要从下列方面进行:(1)完善已有的各项指标的检测方法手段,使其更适用于大量样品和野外样品的监测;(2)开展对指标-化学物-毒性效应三者关系的同时研究,以反映指标与生物学功能的相关性;(3)在水生生物分子生物学领域研究逐步发展的基础上,继续探索新的分子生态毒理学指标;(4)用多项指标综合评价污染物对生物的早期作用和潜在影响,进行预测模型的研究,以达到保护水生态系统的最终目的。

参 考 文 献

[1] Jack de Bruijin, et al. Inhibition of acetylcholinesterase and acute toxicity of organophospho-

- rous compounds to fish: a preliminary structure-activity analysis. *Aquatic Toxicology*, 1993, **24**: 257—274.
- [2] Day K E, et al. Use of acetylcholinesterase activity to detect sublethal toxicity in stream invertebrates exposed to low concentrations of organophosphate insecticides. *Aquatic Toxicology*, 1990, **18**: 101—114.
- [3] Reddy D C, et al. Tissue ATPase activity and recovery in the freshwater crab *Ozitelphusa senex* exposed to a sublethal concentration of endosulfan for varying periods of time. *Comp. Biochem. Physiol.* 1991, **99C**:431—435.
- [4] Yadwad V B, et al. Inhibition of gill Na⁺K⁺-ATPase activity in dragonfly larva, *Pantala flavescens*, by endosulfan. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 1990, **44**:585—589.
- [5] 徐立红、张甬元、王德铭. 用草鱼组织 ATPase 作为生态毒理学指标的研究. *水生生物学报*, 1987, **11**: 194—201.
- [6] McCloskey J T, et al. Effects of anthracene and solar ultraviolet radiation exposure on gill ATPase and selected hematologic measurement in the bluegill sunfish (*Lepomis macrochirus*). *Aquatic Toxicology*, 1993, **24**:207—218.
- [7] Kulkarni B G. ATPase activity in the gill and hepatopancreas of the intertidal clam *Meretrix casta* var. *ovum* (Hanley) exposed to naphthalenes. *J. Environ. Biol.*, 1990, **11**:275—278.
- [8] Piovavrova N B, et al. Effect of cadmium on ciliary and ATPase activity in the gills of freshwater mussel *Anodonta cygnea*. *Comp. Biochem. Physiol.*, 1992, **103C**:27—30.
- [9] Gaete V, et al. Inhibition effects of *Microcystis aeruginosa* toxin on ion pumps of the gill of freshwater fish. *Toxicon*, 1994, **32**: 121—127.
- [10] Asztals B, et al. The effects of pesticides on some biochemical parameters of carp (*Cyprinus carpio* L.). *Arch Environ. Contamin. Toxicol.*, 1990, **19**:275—282.
- [11] Boge G, et al. The effects of hexavalent chromium on the activity of alkaline phosphatase in the intestine of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquatic Toxicology*, 1992, **23**: 247—260.
- [12] Ozretic B, et al. Plasma sorbitol dehydrogenase, glutamate dehydrogenase, and alkaline phosphatase as potential indicators of liver intoxication in grey mullet (*Mugil auratus* Risso). *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 1993, **50**:586—592.
- [13] Folmar L C. Effects of chemical contaminants on blood chemistry of teleost fish a bibliography and synopsis of selected effects. *Environ. Toxicol. Chem.*, 1993 **12**: 337—375.
- [14] 徐立红、张甬元. 微囊藻毒素分子致毒机理研究进展. *水生生物学报*, 1993, **17**(4), 279—288.
- [15] Sikka H C, et al. Comparative metabolism of benzo[a]pyrene by liver microsomes from brown buff bullhead and carp. *Aquatic Toxicol.* 1990 **16**:101—112.
- [16] Parker L M, et al. Metabolism of endogenous and xenobiotic aldehydes by rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) liver fractions. *Aquatic Toxicol.*, 1990, **18**: 1—12.
- [17] Nebert D W, et al. The P450 superfamily: update on new sequence, gene mapping, and recommended nomenclature. *DNA Cell Biol.*, 1991, **10**:1—14.
- [18] Anderson T, et al. Regulation of the cytochrome P450 enzyme system in fish *Aquatic Toxicology*, 1992, **24**:1—20.
- [19] Hahn M E, et al. The Ah receptor in marine animals: phylogenetic distribution and relationship to cytochrome P450A1 inducibility. *Mar. Environ. Res.*, 1992, **34**:87—92.
- [20] Hahn, M E, et al. Cytochrome P450 1A1 induction and inhibition in an Ah receptor-containing fish hepatoma cell line (PLHC-1). *Aquatic Toxicol.*, 1993, **26**: 185—208.
- [21] Norrgren L, et al., Liver morphology and cytochrome P450 activity in fry of rainbow trout after microinjection of lipid-soluble xenobiotics in the yolk-sac embryos. *Aquatic Toxicology*, 1993, **26**:307—316.
- [22] Jensen E G, et al. Response of xenobiotic metabolism enzymes in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) to endosulfan, detected by enzyme activities and immunochemical methods. *Aquatic Toxicology*, 1991, **21**:81—92.
- [23] Haasch M L., et al. Effects of acrylamide monomer hepatic CYP1A1 monooxygenase induction in rainbow trout. *Comp. Biochem. Physiol.*, 1992, **102C**:281—286.
- [24] Haasch M L, et al. Caged and wild fish: induction of hepatic cytochrome P450(CYP1A1) as an environmental biomonitor. *Environ. Toxicol. Chem.* 1993, **12**:885—895.
- [25] Martine E, et al. Induction of cytochrome P450A1 in fish treated with 2,3,7,8-tetrachloro dibenzo-a-dioxin or chemically contaminated sediment. *Environment. Toxicol. Chem.*, 1993, **12**:989—

- 999.
- [26] Martine E J, et al. Concurrence of P4501A1 induction and toxic effects after administration of low dose of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin(TCDD) in the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquatic Toxicology*, 1992, **24**: 123—142.
- [27] Vigano L, et al. Xenobiotic metabolizing enzymes in rainbow trout exposed to river water. *Comp. Biochem. Physiol.*, 1991, **100C**: 169—172.
- [28] Li J C, et al. Glucose and sulfate conjugation of phenol, β -naphthol and 3-hydroxybenzo [a] pyrene by the American lobster (*Homarus americanus*). *Aquatic Toxicol.*, 1993, **26**: L57—72.
- [29] Van Veld PA, et al. Glutathione transferase in intestine, liver and hepatic lesions of mummichog. *Fish Physiol. Biochem.*, 1991, **9**:369—376.
- [30] Leaver M J, et al. molecular studies of the phase II conjugative enzymes of marine pleuronectid flatfish. *Aquatic Toxicology*, 1992, **22**:265—278.
- [31] Hogstrand C, et al. Binding and detoxification of heavy metals in lower vertebrates with reference to metallothionein. *Comp. Biochem. Physiol.* 1991, **100C**: 137—141.
- [32] Roesijadi G. Metallothioneins in metal regulation and toxicity in aquatic animals. *Aquatic Toxicology*, 1992, **22**: 81—114.
- [33] Hogstrand C, et al. A radioimmunoassay for perch metallothionein. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 1990, **103**:56—65.
- [34] Bebianno M J, et al. Cadmium induction of metallothionein synthesis in *Mytilus galloprovincialis*. *Comp. Biochem. Physiol.*, 1992, **103C**: 79—85.
- [35] Bonwick G A, et al. Hepatic metallothionein levels in roach (*Rutilus rutilus* L.) continuously exposed to water-borne cadmium. *Comp. Biochem. Physiol.*, 1991, **99C**: 119—125.
- [36] Maccubbin A E, et al. ³²P postlabeling detection of DNA adducts in fish from chemically contaminated waterways, *The Sci. of the total Environ.*, 1990, **94**:89—1041.
- [37] McElroy A E, et al. Relative bioavailability and DNA adduct formation of benzo [a] pyrene and metabolism in the diet of the winter flounder. *Comp. Biochem. Physiol.* 1991, **100C**:29—32.
- [38] Bihari N, et al. DNA damage determination by the alkaline elution technique in the haemolymph of mussel *Mytilus galloprovincialis* treated with benzo [a] pyrene and 4-nitroquinoline-N-oxide. *Aquatic Toxicology*, 1990, **18**: 13—22.
- [39] Jones N J, et al. The detection of DNA adducts DNA base changes and chromosome damage for the assessment of exposure to genotoxic pollutants. *Aquatic Toxicology*, 1992, **22**: 323—344.
- [40] Stein J E, et al. Overview of studies on liver carcinogenesis in English sole from Puget sound; evidence for a xenobiotic chemical etiology II: biochemical studies. *The Sci of the Total Environ.*, 1990, **94**:51—69.
- [41] DiGiulio R T, et al. Biochemical responses in aquatic animals: a review of determination of oxidative stress. *Environmental Toxicology Chemistry*, 1989, **8**: 1103—1123.
- [42] Stein J E, et al. Bioindicators of contaminant exposure and sublethal effects: studies with benthic fish in Puget sound, Washington. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 1992, **11**: 701—714.
- [43] Babo S, et al. In vitro effects of Thiram on liver antioxidant enzyme activities of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquatic Toxicology*, 1992, **22**:61—68.
- [44] Thomas P, et al. Effects of cadmium and Aroclor 1254 on lipid peroxidation, glutathione peroxidase activity, and selected antioxidants in Atlantic croaker tissues. *Aquatic Toxicology*, 1993, **27**: 159—178.
- [45] McCarthy J F, et al. DNA alteration and enzyme activities in Japanese medaka (*Oryzias latipes*) exposed to diethylnitrosamine. *Neurosci Biobehav Rev*, 1991, **15**:99—102.
- [46] Boon J P, et al. Changes in levels of hepatic biotransformation enzymes and haemoglobin levels in female plaice (*Pleuronectes platessa*) after oral administration of a technical polychlorinated biphenyl mixture (Clophen A40). *The Sci. of the Tot. Environ* 1992, **114**: 113—133.
- [47] DiGiulio R T, et al. Effects of black 'rock' harbor sediments on indices of biotransformation, oxidative stress, and DNA integrity in channel catfish. *Aquatic Toxicology*, 1993, **26**:1—22