

# 秋水仙碱对斑马鱼肝脏和鳃组织中 SOD 及 $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ 活性的影响\*

## Effects of Colchicine on the Activities of SOD and $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ in the Liver and Branchi of *Brachydanio rerio*

王稼农, 黄健, 黄仁彬, 蒋伟哲, 刘华钢

WANG Jia-nong, HUANG Jian, HUANG Ren-bin, JIANG Wei-zhe, LIU Hua-gang

(广西医科大学药学院, 广西南宁 530021)

(Pharmacy College, Guangxi Medical University, Nanning, Guangxi, 530021, China)

**摘要:**将斑马鱼 (*Brachydanio rerio*) 暴露于秋水仙碱5个浓度组 ( $0\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 $10.00\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 $14.12\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 $19.95\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 $28.18\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 $39.80\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ) 中进行96h急性毒性试验, 计算其半数致死浓度 ( $LC_{50}$ ), 再设置秋水仙碱3个浓度 ( $0.67\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 $1.70\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 $4.26\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ) 将斑马鱼进行21d慢性毒性实验, 每7天测定肝脏和鳃中的超氧化物歧化酶(SOD)及  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$  活性。结果表明, 秋水仙碱对斑马鱼的  $LC_{50}$  为  $16.90\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ , 随着秋水仙碱浓度增大和染毒时间延长, 斑马鱼鳃中 SOD 和  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$  活性均显著受到抑制, 肝脏中 SOD 活性增加,  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$  活性总体呈现抑制趋势。斑马鱼肝脏和鳃中的 SOD 及  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$  对秋水仙碱敏感, 可以作为观测指标用于评价秋水仙碱的毒性。

**关键词:** 斑马鱼 秋水仙碱 超氧化物歧化酶  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$

**中图分类号:** R965.3 **文献标识码:** A **文章编号:** 1005-9164(2010)02-0144-04

**Abstract:** *Brachydanio rerio* were exposed to five different concentrations of colchicine for 96h, and the median lethal concentration ( $LC_{50}$ ) was calculated for evaluating acute toxicity. In addition, *Brachydanio rerio* were exposed to three different concentrations of colchicine ( $0.67$ ,  $1.70$ ,  $4.26\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ) for 21 days in chronic toxicity test, and the activities of SOD and  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$  in the liver and branchi of *Brachydanio rerio* were measured at interval of 7 days. The result indicates that  $LC_{50}$  of colchicine was  $16.90\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  to *Brachydanio rerio*. With the increases of colchicine concentrations and exposure time, the activities of SOD and  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$  in the branchi of *Brachydanio rerio* were suppressed significantly, and the activity of SOD in liver was increased, but the activity of  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$  in liver presented the tendency of depression. The SOD and  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$  in liver and branchi tissue of *Brachydanio rerio* are sensitive to toxicant, and can be used as observation index for drug toxicity evaluation.

**Key words:** *Brachydanio rerio*, colchicine, SOD,  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$

传统的新药临床前安全性评价一般采用啮齿类动物进行体内试验。该方法虽然具有结果可靠、综合全面的优点, 但是耗时、耗资、耗力, 不适合高通量筛选, 急需建立经济可靠的早期毒性评价预测动物模型。

收稿日期: 2009-12-11

作者简介: 王稼农(1982-), 男, 硕士研究生, 主要从事药物毒理学研究。

\* 广西科学研究与技术开发计划项目(桂科合0815007-2-5)资助。

斑马鱼 (*Brachydanio rerio*) 是辐鳍亚纲鲤科短担尼鱼属的一种硬骨鱼, 原产于印度和孟加拉等国家, 因其体侧具有类似斑马一样的纵向暗蓝与银色相间的条纹而得名斑马鱼<sup>[1]</sup>。作为一种新型的模式生物, 斑马鱼被广泛地应用于胚胎发育学、环境毒理学、人类疾病模型研究及药物安全性评价等<sup>[2]</sup>。相对于鼠类等哺乳动物, 斑马鱼胚胎体外发育而且透明, 试验时容易观察药物对活体胚胎内部组织、器官变化, 药物用量少, 给药方式简单。药物溶于培养水体中, 斑马鱼通过皮肤、鳃、消化系统等来吸收。用斑马鱼进行试

验不仅可以减少捕杀哺乳类实验动物还可以减少受试药物用量,同时可以在短期内进行大量化合物的筛选,缩短新药研发周期,降低研发成本,有助于在细胞和分子水平阐明新药毒性作用机理<sup>[3]</sup>。

秋水仙碱是从百合科植物秋水仙(*Colchicum autumnale* L.)的球茎中分离出来的一种生物碱,在临床上用于治疗急性痛风性关节炎和某些肿瘤。秋水仙碱毒性大,可以抑制细胞有丝分裂,破坏纺锤体,过量的秋水仙碱可导致消化道反应,肾脏、骨髓和肝脏的损害。本实验以秋水仙碱为受试药物,研究不同浓度的秋水仙碱对斑马鱼肝脏和鳃组织超氧化物歧化酶(SOD)及 $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-三磷酸腺苷酶}(\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase})$ 活性的影响,为今后以斑马鱼的酶类活性作为观测指标进行药物安全性评价提供依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

#### 1.1.1 实验动物

健康斑马鱼,体长 $(4.5 \pm 0.5)$  cm,体重 $0.5 \sim 0.9$  g,雌雄兼有,购于南宁市园湖花鸟市场。采用曝气自来水,在 $25\text{cm} \times 35\text{cm} \times 20\text{cm}$ 的玻璃缸驯养14d以上,水温维持 $(25 \pm 1)^\circ\text{C}$ ,每日光照 $12 \sim 14$  h,早晚定时定量投喂饲料2次(每次按每缸鱼总体重的 $1.5\%$ ),每次投喂15min后清除残余饲料,及时清除排泄物。选取驯养期间死亡率小于 $5\%$ 的斑马鱼作为实验用鱼<sup>[4]</sup>。

#### 1.1.2 药品与试剂

秋水仙碱:1g/瓶,美国 Sanland 公司出品,纯度 $>98\%$ 。考马斯亮蓝蛋白测定试剂盒、SOD测定试剂盒、 $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ 测定试剂盒均购于南京建成生物工程研究所。

#### 1.1.3 主要实验仪器

722S型可见分光光度计(上海精密科学仪器有限公司出品);IEC MicroCL 17R高速低温离心机(德国 Thermo Fisher scientific 公司出品);超低温冰箱(德国 Thermo Fornma 公司出品)。

## 1.2 实验方法

### 1.2.1 急性毒性实验

按照文献<sup>[4,5]</sup>中的方法进行急性毒性实验。在预实验基础上等对数浓度设置6个秋水仙碱浓度 $(\text{mg} \cdot \text{L}^{-1})$ : $0, 10.00, 14.12, 19.95, 28.18, 39.80$ ,每个浓度设3个重复。每缸10尾鱼,水量2L,水温维持 $(25 \pm 1)^\circ\text{C}$ 进行96h急性毒性实验,计算其半数致死浓度( $LC_{50}$ )。实验前1d及实验期间禁食,密切观察鱼的行为变化及中毒症状,及时剔除死亡个体,死亡

鱼以身体完全不动,而且放入清水中5min仍不动为准。记录试验鱼存活数量,计算其死亡率。

### 1.2.2 慢性毒性实验

采用96h急性毒性实验的 $LC_{50}$ 值乘以安全系数0.1作为安全浓度<sup>[6]</sup>,以等对数浓度设置3个浓度组,分别为 $0.67\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}, 1.70\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ (安全浓度)、 $4.26\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 进行21d慢性毒性实验。每缸80尾鱼,水量10L,水温维持 $(25 \pm 1)^\circ\text{C}$ ,早晚定时定量投食2次,下午投食0.5h后更换药液以维持原设计药液浓度和溶氧量等。试验的第0d、7d、14d、21d各缸分别取鱼采集肝脏和鳃组织测定SOD及 $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ 活性。具体方法如下:将斑马鱼置冰盘上速冻,迅速取出肝脏和鳃,每4尾鱼的肝脏和鳃分别合并作为一个样本,用冰浴 $0.86\%$ 的鱼用生理盐水洗净,吸干后称重,立即放入匀浆器中,加入 $0.86\%$ 的鱼用生理盐水冰浴匀浆,制备 $1\%$ 组织匀浆,然后转移至离心管中, $4^\circ\text{C}$ 、 $10000\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离10min,取上清液置 $-80^\circ\text{C}$ 冰箱中储存,3d内完成蛋白含量、SOD、 $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ 活性测定。测定方法按试剂盒说明书操作。

### 1.2.3 数据处理

采用概率单位法分析秋水仙碱对斑马鱼的96h半数致死浓度( $LC_{50}$ )。实验数据以平均值及标准差 $(\bar{x} \pm s)$ 表示,用计算机 Spss13.0软件进行统计分析,同一时间点不同处理组间数据采用单因素方差分析 Dunnett 检验进行组间差异比较。

## 2 结果

### 2.1 秋水仙碱对斑马鱼的96h急性毒性

#### 2.1.1 形态学变化

置于较高浓度秋水仙碱溶液中的斑马鱼12h后即出现中毒症状,表现为游动缓慢,鱼体颜色加深;24h后高浓度组部分斑马鱼身体失去平衡、侧游;48h出现死亡,死亡鱼鳃及腹部有淤血。低浓度组出现中毒症状时间较晚,中毒症状较轻。

#### 2.1.2 秋水仙碱对斑马鱼的96h半数致死浓度

从表1可以看出,96h内,随着秋水仙碱浓度的升高,斑马鱼死亡率逐渐升高,二者呈线性关系。采用概率单位法得出浓度对数-死亡率概率单位的回归方程为 $Y = 3.5536X + 0.6366$  ( $r = 0.9989$ )。计算得出秋水仙碱对斑马鱼的96h $LC_{50}$ 为 $16.90\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ,95%置信区间为 $16.18 \sim 17.66$ 。

### 2.2 秋水仙碱对斑马鱼肝脏和鳃组织SOD活性的影响

表2结果表明,斑马鱼在经秋水仙碱溶液染毒7d时,与对照组相比, $1.70\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $4.26\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 组肝

组织中 SOD 活性显著升高 ( $P < 0.01$ ), 且呈现浓度效应关系。至 14d 和 21d 时, 各染毒组肝组织中 SOD 活性相比对照组亦显著升高 ( $P < 0.01$ )。然而与 7d 时相比, 1.70 mg·L<sup>-1</sup> 组和 4.26 mg·L<sup>-1</sup> 组肝组织中 SOD 活性持续下降。染毒 7d 后, 与对照组相比, 1.70 mg·L<sup>-1</sup> 组和 4.26 mg·L<sup>-1</sup> 组斑马鱼鳃组织中 SOD 活性均显著力升高 ( $P < 0.05$  和  $P < 0.01$ )。14d 时, 各染毒组鳃组织中 SOD 活性与对照组相比均无显著差异, 然而与 7d 时相比, 其活性呈现下降趋势。至 21d 时, 各染毒组鳃组织中 SOD 活性均显著低于对照组 ( $P < 0.01$ )。

表1 秋水仙碱对斑马鱼的急性毒性试验结果

Table 1 The results of acute toxicity test of colchicine to *Brachydanio rerio*

浓度组 Groups(mg·L <sup>-1</sup> )	对数浓度 Logarithmic concentration	死亡率 Mortality(%)	概率单位 Probit
0		0	
10.00	1.00	20	4.160
14.12	1.15	40	4.750
19.95	1.30	60	5.250
28.18	1.45	80	5.840
39.80	1.60	90	6.280

表2 不同浓度秋水仙碱对斑马鱼肝脏和鳃组织中 SOD 活性的影响

Table 2 Effect of different concentrations of colchicine on the SOD activity in liver and branchi tissue of *Brachyclanio rerio*

组别 Groups	n	SOD 活性 SOD activity (U/mg prot)				
		0d	7d	14d	21d	
肝	0 mg·L <sup>-1</sup>	10	86.54±10.20	88.71±19.62	90.12±14.16	86.56±11.69
Liver	0.67mg·L <sup>-1</sup>	10	90.02±11.36	101.80±8.14	203.52±26.75 <sup>b</sup>	152.29±15.63 <sup>b</sup>
	1.70 mg·L <sup>-1</sup>	10	87.38±9.56	172.86±20.28 <sup>b</sup>	164.40±15.08 <sup>b</sup>	140.36±15.89 <sup>b</sup>
	4.26 mg·L <sup>-1</sup>	10	91.91±12.37	228.80±26.78 <sup>b</sup>	180.39±27.91 <sup>b</sup>	130.21±18.02 <sup>b</sup>
	鳃	0 mg·L <sup>-1</sup>	10	80.48±9.27	77.05±13.48	79.88±14.59
Branchi	0.67mg·L <sup>-1</sup>	10	76.54±12.69	84.19±11.55	71.09±10.09	54.30±5.36 <sup>b</sup>
	1.70mg·L <sup>-1</sup>	10	81.63±10.05	99.20±15.38 <sup>a</sup>	67.88±8.21	44.29±6.14 <sup>b</sup>
	4.26 mg·L <sup>-1</sup>	10	79.88±11.49	127.28±13.65 <sup>b</sup>	79.02±13.33	34.81±4.45 <sup>b</sup>

注: 与 0 mg·L<sup>-1</sup> 组相比, <sup>a</sup> $P < 0.05$ ; <sup>b</sup> $P < 0.01$ 。Note: Compared with the group of 0mg·L<sup>-1</sup>, <sup>a</sup> $P < 0.05$ ; <sup>b</sup> $P < 0.01$ 。

表3 不同浓度秋水仙碱对斑马鱼肝脏和鳃组织中 Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase 活性的影响

Table 3 Effect of different concentrations of colchicine on the Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase activity in liver and branchi tissue of *Brachyclanio rerio*

组别 Groups	n	Na <sup>+</sup> -K <sup>+</sup> -ATPase 活性 Na <sup>+</sup> -K <sup>+</sup> -ATPase activity(μmolPi/mg prot/h)				
		0d	7d	14d	21d	
肝	0 mg·L <sup>-1</sup>	10	2.04±0.41	2.15±0.38	2.24±0.40	2.11±0.33
Liver	0.67mg·L <sup>-1</sup>	10	2.12±0.62	2.07±0.70	2.68±0.24 <sup>b</sup>	2.83±0.16 <sup>b</sup>
	1.70 mg·L <sup>-1</sup>	10	2.21±0.54	2.66±0.91	2.44±0.49	1.85±0.13 <sup>a</sup>
	4.26 mg·L <sup>-1</sup>	10	2.18±0.49	3.01±0.40 <sup>b</sup>	2.01±0.28 <sup>a</sup>	1.46±0.21 <sup>b</sup>
	鳃	0 mg·L <sup>-1</sup>	10	1.17±0.14	1.19±0.21	1.22±0.19
Branchi	0.67mg·L <sup>-1</sup>	10	1.24±0.12	1.61±0.67	1.51±0.44 <sup>a</sup>	1.42±0.33 <sup>b</sup>
	1.70mg·L <sup>-1</sup>	10	1.31±0.21	1.83±0.47 <sup>b</sup>	1.61±0.23 <sup>b</sup>	1.12±0.21
	4.26 mg·L <sup>-1</sup>	10	1.19±0.13	2.40±0.33 <sup>b</sup>	1.70±0.28 <sup>b</sup>	0.91±0.11 <sup>a</sup>

注: 与 0 mg·L<sup>-1</sup> 组相比, <sup>a</sup> $P < 0.05$ ; <sup>b</sup> $P < 0.01$ 。Note: Compared with the group of 0mg·L<sup>-1</sup>, <sup>a</sup> $P < 0.05$ ; <sup>b</sup> $P < 0.01$ 。

## 2.3 秋水仙碱对斑马鱼肝脏和鳃组织 Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase 活性的影响

表3结果表明, 在试验时间内, 与对照组相比, 随着斑马鱼染毒时间延长, 0.67 mg·L<sup>-1</sup> 组斑马鱼肝组织中 Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase 活性升高; 1.70 mg·L<sup>-1</sup> 组和 4.26 mg·L<sup>-1</sup> 组 Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase 活性先升高后下降的趋势, 至 21d 时, 两组斑马鱼肝组织 Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase 活性均显著低于对照组 ( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ ); 在试验时间内与对照组相比, 0.67mg·L<sup>-1</sup> 组斑马鱼鳃组织 Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase 活性随染毒时间延长表现为升高趋势; 染毒 7d 和 14d 时, 1.70 和 4.26 mg·L<sup>-1</sup> 组鳃组织 Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase 活性均显著升高 ( $P < 0.01$ ); 至 21d 时, 4.26mg·L<sup>-1</sup> 组鳃组织 Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase 活性低于对照组 ( $P < 0.05$ )。两组斑马鱼鳃组织 Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase 活性总体表现为先升高后下降的趋势。

## 3 讨论

### 3.1 斑马鱼行为

急性毒性试验期间, 斑马鱼出现游动缓慢、鱼体

颜色变深、结群静于缸底、碰撞缸壁、失去平衡、侧游等中毒症状,在各浓度组均有不同程度的表现,这可以作为判断斑马鱼中毒的特征。中毒斑马鱼内脏颜色加深,肝脏明显淤血肿胀、胆汁淤积,部分斑马鱼肝脏呈现溶解状态,脏器界限不清。慢性毒性试验期间,随时间延长各组斑马鱼游动减少,摄食量减少,在 $1.70\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 组和 $4.26\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 组尤为明显。这与秋水仙碱临床使用出现的食欲减退不良反应是基本一致的。

### 3.2 SOD 活性

SOD 是鱼类体内普遍存在的一种抗氧化酶,可使自由基的产生和清除处于动态平衡,使机体维持较低而有效的自由基浓度,保护机体免受自由基损害<sup>[7,8]</sup>。试验中,斑马鱼肝脏和鳃中 SOD 活性在暴露于秋水仙碱后表现不一致。短期内(7d),斑马鱼受药物影响而产生大量活性氧,相应上调 SOD 活性,存在较明显的浓度效应关系,并且肝组织中 SOD 活性远高于鳃组织。这可能与肝和鳃的生理功能不同有关。秋水仙碱在肝脏内代谢产生大量活性氧,相应地肝组织中 SOD 活性较高,而鳃作为呼吸器官几乎没有解毒功能,故而 SOD 活性较肝脏低。随着斑马鱼染毒时间延长(21d),鳃组织中 SOD 活性受到显著抑制。这可能是由于鳃组织中较多的活性氧超过了 SOD 清除的能力范围,使酶蛋白受损,细胞不能进行正常的生理活动,导致 SOD 活性下降。而各染毒组斑马鱼肝组织中 SOD 活性虽较之前(7~14d)有所降低,但是仍处于高于对照组的水平。

### 3.3 $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ 活性

$\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$  在物质(葡萄糖、氨基酸等)吸收、运输、能量转换以及信息传递方面有重要作用,机体处于应激时、供能活动和离子平衡等遭到破坏,此酶的活性会发生一系列改变<sup>[9]</sup>。在试验时间内,斑马鱼肝和鳃组织中  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$  活性除较低浓度的 $0.67\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 组表现为升高外,另外两个浓度组肝脏和鳃的  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$  活性均表现为先升高后抑制,随着药物浓度增加,其受抑制的程度也随之加大。秋水仙碱可以与细胞中微管蛋白结合,阻止其聚合,而且可以使微管解聚,破坏细胞膜上的离子平衡,使得生物膜功能遭到破坏,导致机体抗自由基的防御能力减弱,影响了  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$  活性中心的某些集团的解离,酶活性中心的亲核催化作用也受到影响,从而使  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$  活性下降。试验短期内(7d),各浓度组斑马鱼肝脏和鳃中的  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$  活性有不同程度的升高,可能是由于斑马鱼中毒后通过一系列代谢变化,动员机体的代偿适应功能来抵抗和适应毒性反应,而加大补偿性渗透调节影

响所致<sup>[10]</sup>。对  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$  的影响在鳃中尤为明显,这可能与鳃直接与药物接触,导致鳃上皮细胞膜结构和功能受到损伤,使  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$  活性中心构型发生变化,影响鳃丝的渗透调节和呼吸等生理功能有关。

本试验初步探讨不同浓度秋水仙碱在水环境染毒条件下对斑马鱼的行为学及肝脏和鳃组织中 SOD 及  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$  活性的影响,摸索并实践了以斑马鱼为实验动物及其重要酶活性为观测指标用于药物安全性评价时的实验方法,为建立药物安全性评价的斑马鱼生物体系平台积累了初步数据。广西拥有丰富的中草药资源,建成用于药物安全性评价的斑马鱼生物体系平台对开发广西中草药资源,减少药物安全性评价研究费用,加快新药研发速度有推动作用。

#### 参考文献:

- [1] Westerfield M. The zebrafish book. A guide for the laboratory use of zebrafish (*Danio rerio*) [M]. 4th Edition. Eugene: Univ of Oregon Press, 2007: 732-734.
- [2] Kahn P. Zebrafish hit the big time [J]. Science, 1994, 264: 904-905.
- [3] Shin J T, Fishman M C. From zebrafish to human: modular medical models [J]. Annu Rev Genomics Hum Genet, 2002, 3(24): 311-340.
- [4] ISO. ISO7346-2 Water quality-Determination of the acute lethal toxicity of substances to a fresh water fish [*Brachydanio rerio* namilton-Buchanan (Teleostei, Cyprinidae)]-Static method[S]. 1996.
- [5] OECD. OECD Guideline for testing of chemicals: fish, short-term toxicity test on embryo and sac-fry stages [S]. Paris: Organization for Economic Cooperation, 1998, Guideline, 212: 1-18.
- [6] Zhou Y X, Wang S D, Xia Y C. Hydrobiont and environment protection [M]. Beijing: Science Press, 1983: 123-133.
- [7] Lin C T, Tseng W C, Hsiao N W, et al. Characterization, molecular modelling and developmental expression of zebrafish manganese superoxide dismutase [J]. Fish Shellfish Immunol, 2009, 27(2): 318-324.
- [8] Wang L P, Zheng B H, Meng W. Molecular biomarkers in aquatic organisms in relation to the oxidative stress imposed by environmental pollutants [J]. Acta Ecologica Sinica, 2007, 27(1): 380-388.
- [9] Chert J C, Nan F H. Effect of ambient ammonia on ammonia-N excretion and ATPase activity of *Penaeus chinensis* [J]. Aquat Toxicol, 2005, 23(1): 1-10.
- [10] Paxton R, Umminger B L. Altered activities of branchial and renal Na/K and Mg-ATPases in cold-acclimated goldfish (*Carassius auratus*) [J]. Comp Biochem Physiol, 2003, 74B (3): 503-506.

(责任编辑:尹 闯 邓大玉)