

DOI: 10.7524/j.issn.0254-6108.2015.03.2014071001

侯丽萍, 舒琥, 李海鹏, 等. 雄烯二酮长期暴露对食蚊鱼肝脏生物转化酶系的影响[J]. 环境化学, 2015, 34(3): 442-447

HOU Liping, SHU Hu, LI Haipeng, et al. Long-term exposure effects of androstenedione on biotransformation enzymes activity in the liver of *Gambusia affinis* [J]. Environmental Chemistry, 2015, 34(3): 442-447

雄烯二酮长期暴露对食蚊鱼肝脏生物转化酶系的影响*

侯丽萍¹ 舒琥^{1**} 李海鹏¹ 刘珊¹ 赵建亮² 方展强³

(1. 广州大学生命科学学院, 广州, 510006; 2. 中国科学院广州地球化学研究所有机地球化学国家重点实验室, 广州, 510640;
3. 华南师范大学生命科学学院, 广东省高等学校生态与环境科学重点实验室, 广州, 510631)

摘要 为了研究雄烯二酮(4-androstene-3,17-dione, AED)长期暴露对食蚊鱼(*Gambusia affinis*)肝脏7-乙氧基-3-异酚恶唑脱乙酰酶(EROD)和谷胱甘肽硫转移酶(GST)的影响,分别利用不同浓度的AED(0.14、1.4、14、140 nmol·L⁻¹和420 nmol·L⁻¹)对食蚊鱼仔鱼进行180 d的水浴暴露,同时设丙酮和空白对照组,分别于第180天取样后测定肝脏的EROD和GST活性.结果表明,与对照组相比,AED对食蚊鱼雌性幼鱼的体重和体长均起到显著的抑制作用,对食蚊鱼雄性幼鱼的体重和体长的影响不明显,只有最高浓度起抑制作用.AED对食蚊鱼幼鱼EROD的抑制作用与暴露浓度呈显著的剂量关系.各浓度组AED对雌性食蚊鱼幼鱼和雄性食蚊鱼幼鱼GST活性的影响大致呈现出倒“U”曲线的趋势.

关键词 雄烯二酮, 食蚊鱼, 长期暴露, 生物转化酶.

Long-term exposure effects of androstenedione on biotransformation enzymes activity in the liver of *Gambusia affinis*

HOU Liping¹ SHU Hu^{1**} LI Haipeng¹ LIU Shan¹ ZHAO Jianliang² FANG Zhanqiang³

(1. School of life science, Guangzhou University, Guangzhou, 510006, China; 2. State Key Lab of Organic Geochemistry, Guangzhou Institute of Geochemistry, Chinese Academy of Sciences, Guangzhou, 510640, China;
3. Key Laboratory of Ecology and Environmental Science in Guangdong Higher Education, College of Life Science, South China Normal University, Guangzhou, 510631, China)

Abstract: Two main anti-oxidation enzymes, 7-ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD) and glutathione S-transferase (GST), play an important role in the transformation and metabolism of toxicants. In this study, the effect of androstenedione (AED) on EROD and GST in the liver of *Gambusia affinis* was investigated. Both male and female mosquitofish fry were exposed to 0.14, 1.4, 14, 140 nmol·L⁻¹ and 420 nmol·L⁻¹ AED for 180 d by using the hydrostatic bath method, and EROD and GST enzyme activities in fish liver were detected, respectively. The results showed that within a certain concentration range of AED, there was dose-effect relationship between EROD activity and AED concentration. The GST activity was induced significantly at lower doses (1.4, 14, 140 nmol·L⁻¹), but was inhibited at higher doses (420 nmol·L⁻¹).

Keywords: androstenedione, *Gambusia affinis*, long-term exposure, biotransformation enzymes.

内分泌干扰物 (Endocrine disrupting chemicals, EDCs) 在环境中的含量很低, 但能够干扰生物的生长发育及生殖^[1], 因此成为目前国内外研究的热点. 有关内分泌干扰物的研究工作, 主要集中在环境雌激

2014年7月10日收稿.

* 广东省教育厅科技计划“育苗工程”(2012LYM0100); 广州市市属高校科技计划(2012A040)资助.

** 通讯联系人, E-mail: 973796605@qq.com

素这方面,有关环境雄激素的研究尚处于起步阶段.近年来,不少国家和地区陆续在城市水环境中检出环境雄激素物质.环境雄激素损害水生生物正常的内分泌系统,并能引起某些水生生物雌雄比例发生改变.雌鱼出现雄性第二性征,出现卵精巢、抑制卵黄蛋白原的诱导,并导致了生殖能力的下降^[2-4].雄激素类物质在环境介质中不断的迁移,因此扩大了其污染的范围,对周围的生态和环境健康构成潜在的威胁.在地下水体和地表水体中最容易检出的环境雄激素物质之一是雄烯二酮.雄烯二酮在环境中普遍存在^[5],但目前尚缺乏有关雄烯二酮的毒理数据.

如何采用酶活性指标来监测环境雄激素受污染的程度仍处于起步阶段,还未有利用食蚊鱼活体 7-乙氧基-3-异酚恶唑脱乙酰酶(7-ethoxyresorufino-deethylase, EROD) 和谷胱甘肽硫转移酶(Glutathione-S-transferase, GST) 来对环境雄激素雄烯二酮毒性进行评估的相关报道. EROD 为第一阶段解毒酶,是混合功能氧化酶系统(MFO) 的主要组分之一,并属细胞色素氧化酶 p450 系中同工酶 CYP1A1 的一族,主要通过催化氧化反应增加底物的极性.正常水体环境中,鱼体内的 EROD 活性较低,但在某些特定的外来化学物质的诱导下,鱼体内的 EROD 活性出现异常.此外,环境内分泌干扰物也能影响此酶的活性,有研究报道,环境雌激素能抑制该酶的表达.因此,可将鱼体内 EROD 活性的变化作为水体环境中某些污染物的监测指标. GST 则广泛存在于动物肝脏微粒体之中,同时也是外源性物质在体内生物转化的关键酶类之一,属于第二阶段解毒酶^[6].

食蚊鱼(*Gambusia affinis*) 是原产于北美洲的著名入侵种,属鲈形目(Cyprinodontiformes) 胎鲈科(Poeciliidae). 食蚊鱼广泛分布在我国华南地区的淡水水体中,尤其是城市河涌中,很容易捕捞,并易于在实验室进行饲养,因此目前已作为模式生物被广泛用于化合物的各种毒性测试,是研究内分泌干扰作用和水体污染监测的理想指示生物^[7].

目前,尚未见有关利用雄烯二酮慢性暴露对食蚊鱼生物转化酶活力产生影响的文献报道.为进一步探讨雄烯二酮的环境毒理效应,并筛选生物标志物,本文研究了雄烯二酮长期暴露对食蚊鱼 EROD 和 GST 的影响.

1 材料和方法

1.1 实验动物与试剂

实验所用的食蚊鱼均购自广州市花地湾的花鸟鱼虫市场.挑选足够数量的临产的雌性食蚊鱼,单独在水族缸中进行饲养,并在同一星期内收集产出的食蚊鱼仔鱼,另用水族缸饲养 4 周,进行暴露实验.

实验条件:实验用水为充分曝气的自来水,实验期间每天换水 1/3,并清理排泄物,光周期为 12 h (光):12 h (暗).实验期间控制水温保持在 25 °C 左右,用充气机供氧,通过调节充气量以保证不同浓度废水中的溶解氧含量一致,溶解氧大于 4 mg·L⁻¹,pH 值在 6—8 之间.每日的早晨、中午、晚上各喂食 1 次,饵料为商业购买的红虫.实验期间用 Thermo 多道水质监测仪(Thermo Orion, 520M-01, Guangzhou, China) 监测水质,隔 3 d 换 1 次水,每次换总体积的 1/2.若水质出现异常波动,则立即换水.

雄烯二酮(AED, Sigma 公司),以丙酮(分析纯,国药集团化学试剂有限公司)为助溶剂,配制成 10 mg·mL⁻¹的 AED 母液,稀释到相应浓度,4 °C 避光保存,待用.对照组丙酮浓度为 10 μL·L⁻¹.

1.2 暴露处理

暴露容器为 25 cm×20 cm×20 cm 的方形玻璃缸.正式暴露实验前,使鱼群处于实验环境条件下,驯养适应 4 周.暴露浓度分别为丙酮溶剂对照组、空白对照组、0.14、1.4、14、140 nmol·L⁻¹和 420 nmol·L⁻¹雄烯二酮溶液共 6 组,每组实验鱼 30 尾,用 15 L 的水进行养殖,暴露周期持续 180 d.每天死亡率低于 0.1%时适合进行暴露实验.每个处理设 3 个平行组,采用半静态暴露装置,每日换水 50%.

1.3 酶源的制备

食蚊鱼在冰浴条件下进行解剖后,迅速取出鱼肝,用滤纸吸掉血渍的鱼肝置于组织匀浆器中进行匀浆.配制缓冲液 PBS1: 加入 11.184 g KCl 和 5.206 g HEPES (4-羟乙基哌嗪乙磺酸、N-(2-羟乙基)哌嗪-N'-2-乙烷磺酸)于 1 L 水中,调节 pH 值至 7.5.加入缓冲液于组织匀浆器中匀浆.取适量匀浆液于高速冷冻离心机中(Beckman 4 °C, 10000 r·min⁻¹)离心 20 min.取上清液,将之分为 3 份,每份 200 μL,在 4 °C

下保存.其中,1份用于酶源中蛋白质含量的测定,1份用于 EROD 的测定,1份用于 GST 活性的测定,

1.4 EROD 活性的测定

食蚊鱼的 EROD 活性采用改进的快速终止荧光光度法进行测定,并根据鲫鱼肝脏 EROD 活性的测定方法稍作修改^[8].总反应体系为 190 μL 磷酸缓冲液(浓度为 $0.1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$, pH 值为 7.8), 30 μL 的 7-乙氧基-3-异吩噻唑酮(ERF, 浓度为 $1.73 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), 50 μL 的酶源上清液.向测试管中加入 30 μL 的四钠盐(NADPH, 浓度为 $0.4 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$), 同时在 $20 \text{ }^\circ\text{C}$ 水浴中进行反应 10 min, 然后加入 2 mL 预冷甲醇来终止反应.此外,空白管则用重蒸水来代替酶源上清液.用荧光分光光度计来测定产物 7-羟基-3-异吩噻唑酮(RF)的荧光强度,测定的激发波长为 550 nm,发射波长为 585 nm.参照标准曲线后得到 RF 的含量,计算 EROD 活性.

1.5 GST 活性的测定

GST 活性的测定参照 Habig 等^[9]的方法.试剂盒购自南京建成生物工程研究所,酶促反应则为 1200 μL 的反应总体系.首先,向 1.5 mL 离心管中加入 150 μL 基质液,再加入 50 μL 的酶源上清液,对照则不加任何酶液.在 $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 的水浴中反应 10 min, 然后再加入 500 μL 的试剂, 500 μL 的无水乙醇,对照则另加入 50 μL 的酶源上清液,大力振荡,充分摇匀后,在 $4000 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 下进行常温离心 10 min, 最后取上清液进行显色反应.显色反应则在 1.5 mL 的 EPA 管中进行,反应的总体系一共为 1125 μL .显色反应液经过混匀后在室温条件下放置 15 min, 取 300 μL 显色后的反应液置于 96 孔板中,进行 412 nm 吸光值测试.

1.6 酶源中蛋白质含量的测定

测定酶源中蛋白质的含量采用 Bradford 的方法^[10],选取的蛋白质标准液为小牛血清蛋白(BSA).取适量离心之后的酶源上清液,加入考马斯亮蓝(Coomassie brilliant blue G250).测定之前先按 $V(\text{考马斯亮蓝}):V(\text{水}) = 1:4$ 的比例来稀释考马斯亮蓝,在 96 孔板中加 300 μL 稀释之后的考马斯亮蓝,再加入 10 μL 的酶源上清液,同时设 3 个孔并加入蛋白标准液,其它 3 个孔则为空白样.反应结束后,通过测定 595 nm 下吸光度来确定酶源中蛋白质的含量.

1.7 统计分析

实验所得的数据均采用 SPSS (ver.11.5) 来分析;并用单因素方差分析(ANOVA)来检验不同采样点食蚊鱼 EROD 和 GST 的活性,并用 Dunnett's test 对结果进行验后多重比较.如果 $P < 0.05$, 则认为有显著性统计意义.

2 结果与讨论

2.1 雄烯二酮长期暴露对雌性和雄性食蚊鱼幼鱼生长发育的影响

图 1 显示了 AED 180 d 暴露下对雌性和雄性食蚊鱼幼鱼体重的影响.由图 1 可见, AED 暴露下对雌性食蚊鱼幼鱼体重产生了显著性的抑制作用($P < 0.05$), 高浓度组的差异最显著($P < 0.01$), AED 半年暴露下对雄性食蚊鱼体重的影响差异不显著, 只有在高浓度 $420 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 下对雄鱼的体重产生抑制作用($P < 0.05$).

图 2 显示了 AED 半年暴露下对雌性和雄性食蚊鱼幼鱼体长的影响.由图 2 可见, AED 暴露下对雌性食蚊鱼幼鱼的体长产生了显著性的抑制作用($P < 0.05$), 高浓度组的差异最显著($P < 0.01$), AED 半年暴露下对雄性食蚊鱼幼鱼体长的影响差异不显著, 只有在高浓度 $420 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 下对雄鱼幼鱼的体长产生抑制作用($P < 0.05$).

本研究结果中, AED 暴露组的雌性食蚊鱼幼鱼的生长受到了抑制, 而 AED 对雄性食蚊鱼幼鱼的生长影响不大, 只在高浓度组才发生显著改变.自然条件下, 性成熟的雄性食蚊鱼比雌性食蚊鱼短.野外和室内研究表明, 雄激素可抑制雌性食蚊鱼的生长, 使其体长变短.对邓村造纸废水的食蚊鱼调查发现, 造纸废水中的雌性食蚊鱼比对照点体长短, 而化学分析的结果也显示, 邓村造纸废水中存在 AED.结合本实验的研究结果, 推测引起邓村造纸废水中雌性食蚊鱼体长变短的因素之一很有可能是 AED.垂体调控生长激素的释放, 并由其它激素反馈调控其机能.因此, 有可能 AED 通过影响鱼体内激素的平衡机制,

诱导产生雄性化 抑制鱼的生长发育, 导致不健康鱼的形成.

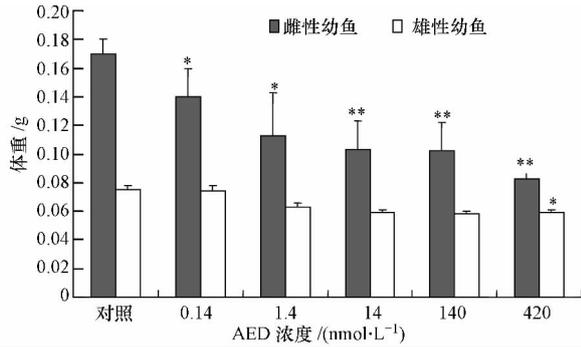


图1 AED 暴露 180 d 对食蚊鱼幼鱼体重的影响

Fig.1 Effect of AED on the weight of the fry mosquitofish

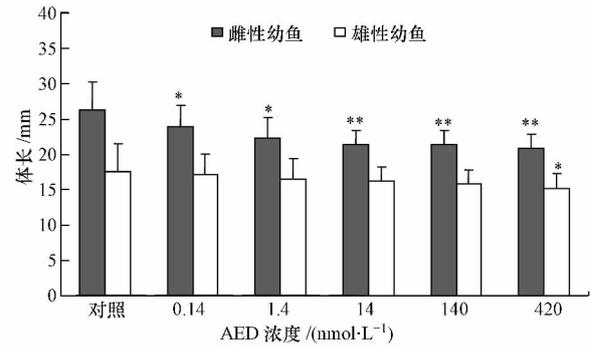


图2 AED 暴露 180 d 对食蚊鱼幼鱼体长的影响

Fig.2 Effect of AED on the length of the fry mosquitofish

2.2 雄烯二酮长期暴露对食蚊鱼 EROD 的影响

图 3 显示雌性、雄性食蚊鱼幼鱼经 AED 暴露 180 d 后 EROD 酶的反应情况. 由图 3 可见, 雌性幼鱼的 EROD 活性比雄性幼鱼的 EROD 值高. 不同浓度 AED 暴露对食蚊鱼 EROD 活性的影响各异, 总体表现为抑制作用. 与对照组相比, 雌性幼鱼 EROD 活性于 1.4、14、140 nmol·L⁻¹ 和 420 nmol·L⁻¹ 暴露组时显著受到抑制 ($P < 0.05$), AED 对最高浓度组 420 nmol·L⁻¹ 的雌性幼鱼 EROD 活性的抑制率为 59%. 雄性幼鱼 EROD 活性于 0.14、1.4、14、140 nmol·L⁻¹ 和 420 nmol·L⁻¹ 暴露组时显著受到抑制 ($P < 0.05$), 最高浓度组的抑制率为 94%.

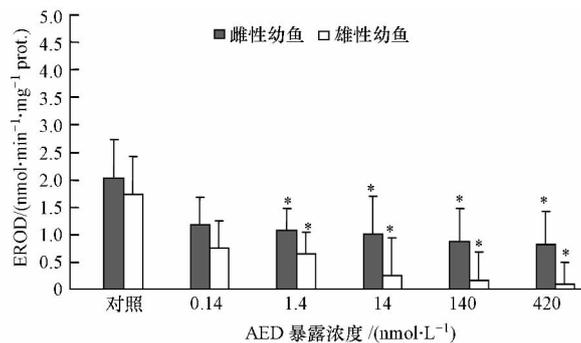


图3 AED 暴露 180 d 对食蚊鱼肝脏 EROD 活性的影响

Fig.3 Effect of AED on the hepatic EROD activity in mosquitofish following 180 day water bone exposure to AED

2.3 雄烯二酮长期暴露对食蚊鱼 GST 的影响

图 4 显示雌性、雄性食蚊鱼幼鱼经 AED 暴露 180 d 后 GST 酶的反应情况. 不同浓度的 AED 暴露浓度对食蚊鱼 GST 活性的影响各异, 其中, 各浓度组 AED 对成年雌性食蚊鱼的影响总体呈倒“U”曲线, 低浓度 1.4 nmol·L⁻¹ 和 14 nmol·L⁻¹ 暴露组对雌性幼鱼 GST 起诱导作用, 高浓度组 (140 nmol·L⁻¹、420 nmol·L⁻¹) 起显著的抑制作用. 各浓度组 AED 对雄性食蚊鱼幼鱼的影响也大致呈倒“U”曲线, 雄性幼鱼的 GST 在 0.14 nmol·L⁻¹ 和 1.4 nmol·L⁻¹ 时呈显著诱导作用, 14、140、420 nmol·L⁻¹ 呈抑制作用. 最高浓度组对雌性和雄性食蚊鱼幼鱼的 GST 均起抑制作用, 抑制率分别为 84.84% 和 20.24%.

CYP 酶系统是外源性化合物代谢过程中的重要 I 相酶, 有许多种不同的结构, 由于 CYP1A 和 CYP2B 能够影响 PCBs 的羟基化, 因此被广泛研究^[11-12]. 在生物体内化合物的代谢降解首先是由 CYP 酶 (主要是 CYP1A1/1A2 和 CYP2B1/2B2, CYP3A 也可能参与, 这一类酶的主要作用是将氧原子带入内源性或外源性化合物) 参与形成能够进一步代谢降解的中间产物——芳烃氧化物, 芳烃氧化物能够产生易溶于水的或易被结合而排出体外的化合物. 结果表明, AED 能抑制食蚊鱼 EROD 活性的表达, 抑制作用呈非单调的剂量关系. 外源激素对生物体 CYP 酶系统影响的机制相当复杂, 其中可能存在着不同的通路和反馈的机制. Klinger^[13] 研究了 27 种激素对大鼠肝脏 P450 系统的影响, 结果发现, 包括 AED 在

内的所有激素在极低浓度下(微摩尔级浓度)对 EROD 酶都起到强烈的抑制作用.有研究表明,雌激素 E2 可能通过影响雌激素受体基因表达的机制,对 CYP1A 基因起到抑制作用^[14].同时,E2、EE2 和其它雌激素也能抑制 MFO 的活性和降低 P450 的水平^[15-16].但也有研究表明,如 NP 这类化合物,在低浓度下诱导 EROD 的活性,高浓度下则起抑制作用,引起的效应与化合物的浓度密切相关^[16].外源的 AED 进入鱼体内,可以代谢为 E2,则可能引起由 E2 诱发的系列生理变化,包括对 MFO 的抑制作用.生物体内激素与 MFO 之间的关系非常错综复杂,其中的机理需要进一步研究阐明.

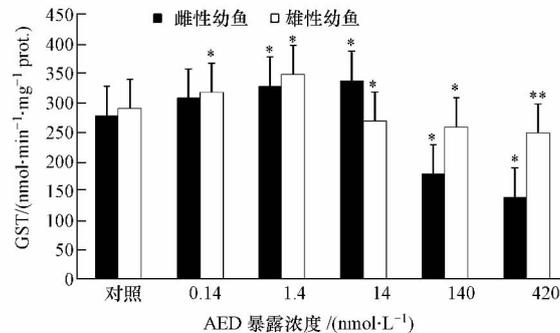


图4 AED 暴露 180 d 对食蚊鱼肝脏 GST 活性的影响

Fig.4 Effect of AED on the hepatic GST activity in mosquitofish following 180 day waterborne exposure to AED

谷胱甘肽-S-转移酶(GST)是一组多种生理功能的二聚体同功酶蛋白,对异生物质的生物转化和解毒都具有重要作用.GST 活性的测定作为肝功能指标常用于临床研究中,是环境污染一个有效的生物标志物^[18].本研究发现,低浓度的 AED 暴露之下,食蚊鱼肝脏的 GST 活性被诱导,但高浓度下 GST 活性则被抑制,总体为倒“U”型曲线.该研究结果与丁秀蓉等^[19]相似,其应用牙鲈肝脏组织中 GST 酶活性作为生物标志物,发现低浓度下牙鲈 GST 酶活性被诱导,但高浓度下 GST 酶活性被抑制,也呈现倒“U”型曲线趋势.随着污染物质暴露浓度的增加,污染物在食蚊鱼的肝脏内富集的量也随之增加,因此产生的自由基的量也随之增加,此时细胞内解毒系统被诱导,生物体通过体内 GSH 的含量来加强自身的抗氧化能力,进而消除氧自由基,减轻 AED 对机体的损害.然而,当 AED 暴露的浓度比较大时,以 GSH 为底物的酶则受到抑制,活力则下降,GST 活性在 AED 暴露浓度大的时候降低,从而减少了 GSH 的转化,导致体内 GSH 积累.AED 浓度很低的时候,正常的 GST 水平就可消除掉脂质过氧化带来的次级产物;但随着 AED 胁迫的加重,GSH 持续耗竭,GST 活性重新下降至原来水平.研究结果表明,食蚊鱼 GST 在对 AED 的解毒过程中具有重要作用.GST 活性下降的原因有可能是作为底物的 GSH 被大量消耗,同时解毒过程当中,产生的大量中间代谢物很可能改变了 GST 亚基的组成,从而降低了 GST 活性或者在体外测定时与 GST 底物(如 cDNB)发生竞争性抑制^[20].

3 结论

雌性、雄性食蚊鱼幼鱼经 AED 暴露 180 d 后,与对照组相比,AED 对食蚊鱼雌性幼鱼的体重和体长均起到显著的抑制作用,对食蚊鱼雄性幼鱼的体重和体长的影响不明显,只有最高浓度起抑制作用.浓度为 1.4、14、140 nmol·L⁻¹和 420 nmol·L⁻¹的 AED 处理组的 EROD 活性显著下降.AED 对食蚊鱼幼鱼 EROD 的抑制作用与暴露浓度呈显著的剂量关系,AED 可能通过影响雌激素受体基因表达的机制,对 CYP1A 基因起到抑制作用,从而抑制 EROD 的活性.不同浓度的 AED 暴露浓度对食蚊鱼 GST 活性的影响各异;各浓度组 AED 对雌性食蚊鱼幼鱼和雄性食蚊鱼幼鱼的影响大致呈倒“U”曲线,低浓度暴露组对雌性幼鱼 GST 起诱导作用,高浓度组起显著的抑制作用.

参考文献

- [1] 张翔,荆博宇,袁小英,等.内分泌干扰物对鲤鱼器官细胞膜脂肪酸组分的影响[J].环境化学,2014,33(5):748-752
- [2] Soto A M, Calabro J M, Prechtl N V, et al. Androgenic and estrogenic activity in water bodies receiving cattle feedlot effluent in eastern

- nebraska, USA [J]. *Environmental Health Perspectives* 2004, 112: 346-352
- [3] Orlando E F, Kolok A S, Binzeik G A, et al. Endocrine-disrupting effects of cattle feedlot effluent on an aquatic sentinel species, the fathead minnow [J]. *Environmental Health Perspectives* 2004, 112(3): 353-358
- [4] Orn S, Svenson A, Viktor T, et al. Male-biased sex ratios and vitellogenin induction in Zebrafish exposed to effluent Water from a Swedish pulp mill [J]. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 2006, 51: 445-451
- [5] Zheng W, Yates S R, Bradford S A, et al. Analysis of steroid hormones in a typical dairy waste disposal system [J]. *Environmental Science and Technology* 2008, 42(2): 530-537
- [6] 王咏, 王春霞, 徐镜波, 等. 多环芳烃化合物对鲤鱼肝微粒体 EROD 的体外诱导 [J]. *环境科学学报*, 2000, 20(增刊): 176-180
- [7] Cody R P and Bortone S A. Masculinization of mosquitofish as an indicator of exposure to kraft mill effluent [J]. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 1997, 58(3): 429-432
- [8] 吴鹰, 孟艳玲, 周忠良. 环境内分泌干扰物对河川沙塘鳢的雌激素效应检测 [J]. *环境检测管理与技术*, 2006, 8(6): 13-15
- [9] Habig W H, Pabst M J, Jakoby W B. Glutathione transferases: The first enzymatic step in mercapturic acid formation [J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 1974, 249: 7130-7135
- [10] Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding [J]. *Anal Biochemistry*, 1976, 72(1/2): 248-249
- [11] Brown J J F, Lawton R W, Morgan C B, et al. PCB metabolism, persistence, and health effects after occupational exposure: Implication for risk assessment [J]. *Chemosphere*, 1994, 29: 2287-2294
- [12] Brown J J F. Metabolic alterations of PCB residues in aquatic fauna: distributions of cytochrome P450A- and P450B-like activities [J]. *Marine Environmental Research*, 1994b, 34: 261-266
- [13] Klinger W, Lupp A, Karge E, et al. Estradiol, testosterone, dehydroepiandrosterone and androstenedione: novel derivatives and enantiomers. Interactions with rat liver microsomal cytochrome P450 and antioxidant/radical scavenger activities *in vitro* [J]. *Toxicology Letters*, 2002, 128: 129-144
- [14] Arukwe A, Forlin L, Goksoyr A, et al. Xenobiotic and steroid biotransformation enzymes in Atlantic salmon (*Salmo salar*) liver treated with an estrogenic compound, 4-nonylphenol [J]. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 1997, 16(12): 2576-2583
- [15] Forlin L, Andersson T, Koivusaari U, et al. Influence of biological and environmental factors on hepatic steroid and xenobiotic metabolism in fish: interaction with PCB and naphthoflavone [J]. *Marine Environmental Research*, 1984, 14: 47-58
- [16] Elskus A A, Stegeman J J, Susani L C, et al. Polychlorinated biphenyls concentration and cytochrome P-450E expression in winter flounder from contaminated environments [J]. *Marine Environmental Research*, 1989, 28: 25-30
- [17] Teles M, Gravata C, Pacheco M, et al. Juvenile sea bass biotransformation, genotoxic and endocrine responses to β -naphthoflavone, 4-nonylphenol and 17 β -estradiol individual and combined exposures [J]. *Chemosphere*, 2004, 57: 147-158
- [18] Pérez L M, Nóvoa Valinas M C, Melgar Riol M J, et al. Induction of cytosolic Glutathione S-transferases from Atlantic eel (*Anguilla anguilla*) after intraperitoneal treatment with polychlorinated biphenyls [J]. *Science Total Environment*, 2002, 297: 141-151
- [19] 丁秀蓉, 李正炎, 王波, 等. 壬基酚对牙鲆肝脏 EROD 和 GST 酶活性的影响 [J]. *中国海洋大学学报*, 2007, 37: 101-104
- [20] Egaas E, Sandvik M, Fjeld E, et al. Some effects of the fungicide propiconazole on cytochrome P450 and glutathione transferase in brown trout (*Salmo trutta*) [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 1999, 122C: 337-344