

急性铜胁迫对海陆蛙蝌蚪抗氧化效应及金属解毒能力的影响*

洪美玲 李春瑜 王力军** 田丹丹 刘薇薇

海南师范大学生命科学院 海口 571158

摘要 海陆蛙 (*Fejervarya cancrivora*) 是红树林半咸水生境中唯一的两栖动物, 为了解铜离子 (Cu^{2+}) 对该蝌蚪的毒性效应, 测定了 Cu^{2+} 对海陆蛙蝌蚪 (38-39期) 96 h 内半数致死浓度 LC_{50} ; 在此基础上, 模拟其野外生存环境, 分别设计3个铜暴露组 (CuSO_4 含量分别为 80、160、300 $\mu\text{g L}^{-1}$) 和对照组, 检测海陆蛙蝌蚪在 Cu^{2+} 暴露 24 h、48 h、72 h、96 h 后抗氧化能力、乙酰胆碱酯酶 (AChE) 活性及金属硫蛋白 (MT) 表达量的变化. 结果显示, 海陆蛙蝌蚪对 Cu^{2+} 24 h、48 h、72 h、96 h LC_{50} 分别为 5.69、3.37、1.34、0.95 mg L^{-1} . 在急性胁迫试验中, 各暴露组蝌蚪体内超氧化物歧化酶 (SOD)、AChE 活性以及 MT 表达均被抑制, 在同一暴露时间下, 处理组 SOD、AChE 活性和 MT 含量显著低于对照组; 而在 Cu^{2+} 胁迫下, 蝌蚪体内脂质过氧化反应加剧, 表现为丙二醛 (MDA) 含量显著增多, 且染毒浓度越大、暴露时间越长, MDA 含量越多. 除 AChE 外, 其他指标组染毒时间与浓度间具有显著的互作效应. 本研究表明海陆蛙可作为红树林生境质量评价的指示物种, 其中 SOD、AChE 活性及 MDA 含量可作为重金属 Cu^{2+} 毒性效应评估较敏感的评价指标. 图1 表2 参29

关键词 海陆蛙蝌蚪; 铜胁迫; 抗氧化能力; 乙酰胆碱酯酶; 金属硫蛋白; 红树林
CLC X174

Effect of acute copper stress on antioxidant and metal detoxification ability of the tadpole of crab eating frog (*Fejervarya cancrivora*)*

HONG Meiling, LI Chunyu, WANG Lijun**, TIAN Dandan & LIU Weiwei
College of Life Sciences, Hainan Normal University, Haikou 571158, China

Abstract The crab eating frog (*Fejervarya cancrivora*) is the only amphibian in the mangrove forest. To explore the feasibility of using its tadpole as an indicator of the habitat quality of mangrove forests, we studied the effect of acute copper exposure on the activities of superoxide dismutase (SOD) and acetylcholine esterase (AChE) and the content of malonaldehyde (MDA) and metallothionein (MT) in the tadpole (Stage 38-39). The LC_{50} of Cu^{2+} was 5.69 mg L^{-1} for 24 h exposure, 3.37 mg L^{-1} for 48 h, 1.34 mg L^{-1} for 72 h, and 0.95 mg L^{-1} for 96 h exposure. Based on the 96h LC_{50} , four treatments of Cu^{2+} (control, 80, 160, 300 $\mu\text{g L}^{-1}$ CuSO_4) were designed and sampled at 24 h, 48 h, 72 h and 96 h. The results showed that SOD and AChE activities and MT content in three treatment groups were lower than the control groups, and decreased significantly with the time and the increase of Cu^{2+} concentration. However, the trend was conversed in the content of MDA. Higher exposure concentration and longer exposure time led to higher MDA content, suggesting that the lipid peroxidation increased under copper stress. Also, there was an interaction effect of exposure time and Cu^{2+} content on all indicators except AChE. Therefore, the biomarkers of SOD and AChE activity and MDA content are sensitive to heavy metal induced oxidative stress, and *Fejervarya cancrivora* can be the indicator species for environment monitoring of mangrove forests.

Keywords tadpole of crab eating frog; copper stress; antioxidants ability; acetylcholine esterase; metallothionein; mangrove forest

由于全球变化和人类活动的影响, 素有“海岸卫士”之称的红树林面临的环境污染日益增加, 尤以重金属污染为甚^[1-2]. 有色金属采矿业的发展, 以及红树林周边鱼虾养殖业的兴起,

尤其是养殖塘普遍使用硫酸铜等铜类化合物进行病害防治和清塘灭藻, 使得水体和土壤沉积物中铜离子 (Cu^{2+}) 浓度不断升高. 研究表明, 红树林水体中 Cu^{2+} 含量大大超过了《中华人民共和国渔业水质标准》规定 ($\leq 0.01 \text{ mg L}^{-1}$)^[3-5], 水体 Cu^{2+} 污染严重.

Cu 虽是生命必需的微量元素, 然而高剂量 Cu^{2+} 可在动物组织细胞 (尤其是肝脏) 中蓄积, 其毒性已引起人们的普遍重视^[6]. 研究表明, 活性氧的大幅增加是重金属毒性效应的

收稿日期 Received: 2014-11-07 接受日期: 2015-01-07

*国家自然科学基金项目 (40901261) 资助 Supported by the National Natural Science Foundation of China (40901261)

**通讯作者 Corresponding author (E-mail: wanglijun_haikou@sina.com)

重要方面,也是造成机体细胞伤害的主要原因之一,而生物体内具有清除活性氧作用的抗氧化防御系统成分的改变可以作为机体遭受氧化胁迫的指示^[7-9],因而尝试以这些抗氧化防御系统成分的变化作为污染物胁迫的生物标志物的研究正成为生态毒理学领域中新的热点。

两栖动物具有皮肤高渗透性、水陆两栖等生物学特性,对环境污染极其敏感,其种群变化与气候、水体、温度、环境污染等环境因子关系密切,已被广泛应用于环境质量监测的指示生物。目前有关Cu²⁺对两栖动物(如中华大蟾蜍*Bufo gargarizans*、泽蛙*Rana limnocharis* Boie、黑斑蛙*Rana nigromaculata*)毒性的研究,国内外已有不少报道^[10-15]。海陆蛙作为唯一可生存于红树林半咸水环境中的两栖动物,目前却尚未见到有关重金属对其毒性效应影响的相关研究报道。

我们的前期研究表明,海陆蛙对Cu²⁺具有蓄积作用,尤其是肝脏中Cu²⁺蓄积量很高,因此本研究以海陆蛙蝌蚪为研究对象,模拟其野外生存环境,考察Cu²⁺对蝌蚪的半数致死浓度,以及蝌蚪在急性Cu²⁺胁迫下体内超氧化物歧化酶(SOD)、乙酰胆碱酯酶(AChE)活性以及丙二醛(MDA)和金属硫蛋白(MT)含量变化,以了解Cu²⁺对海陆蛙蝌蚪的急性毒性影响,为海陆蛙的保护管理提供科学依据,并探讨以海陆蛙作为红树林Cu²⁺污染评价指示物种的可行性。

1 材料与方法

1.1 半数致死浓度测定

实验用海陆蛙蝌蚪(25-26期)采自海南海口东寨港附近闲置虾塘,就近培养于虾塘附近人工池中(水温27-29℃,pH 7.2-7.8,盐度10),待蝌蚪发育至38-39期,选择体质健康蝌蚪(体长31.94 mm ± 2.67 mm,体重0.423 g ± 0.044 g)用于正式试验。蝌蚪发育期鉴定参照赵尔宓(1990)介绍的分期标准^[16]。

CuSO₄·5H₂O为分析纯,用曝气3 d的井水(盐度约18)掺和自来水调节盐度至10(接近于野外自然环境),溶解氧浓度>4.5 mg L⁻¹,配制成0.2 g L⁻¹母液,按实验所需浓度进一步稀释。根据预实验得出蝌蚪96 h不出现死亡的最高浓度和全部死亡的最低浓度,按等对数间距设置5个系列浓度(0.40、0.67、1.10、1.82、3.00 mg L⁻¹),每处理10尾蝌蚪,重复2次,另设1个空白对照。每天更换染毒溶液,统计死亡数,并及时清除死亡个体,持续96 h。

判断蝌蚪死亡的标准:用镊子轻夹蝌蚪尾部,如无反应,即认为死亡。

1.2 急性Cu²⁺胁迫下海陆蛙蝌蚪SOD、AChE酶活性及MDA、MT含量测定

根据半数致死浓度试验,分别设置1个空白对照组(自来水和井水的混合,盐度为10)及3个CuSO₄处理组(80、160、300 μg L⁻¹),实验容器为4 L塑料盆,内置相应溶液2 L,每盆放入30尾蝌蚪,每天更换全部溶液,实验期间不喂食。第24 h、48 h、72 h、96 h从每组取出6尾蝌蚪,置冰水混合物中处死后,于-80℃保存待用。每处理重复3次。

SOD、AChE、MDA及MT测定试剂盒均购自南京建城生

物研究所,测试步骤按试剂盒说明书进行。

1.3 数据处理

半数致死浓度LC₅₀的计算通过SPSS 16.0中Probit分析法^[17]。Cu²⁺对蝌蚪酶活性、MDA和MT含量的影响结果均以Mean ± SE表示,采用双因素方差分析(Univariate)和单因素方差分析(ANOVA)进行处理,对于同一采样时间点,不同处理组之间的多重比较采用Duncan法,差异显著临界值为0.05。

2 结果

2.1 海陆蛙蝌蚪对Cu²⁺毒性反应及半数致死浓度

通过4 d观察,对照组海陆蛙蝌蚪行为活动正常,处理组蝌蚪游泳行为和形态出现异常。高浓度组中,大部分蝌蚪在刚接触溶液后反应强烈,出现沿容器壁快速转圈游动、乱窜,适应一段时间后,蝌蚪体表出现粘液并伴随排便行为,反应迟钝,于容器底部静栖。受到刺激沿壁游动后沉入容器底部,身体失去平衡,出现侧卧、悬浮等行为,死亡个体尾部弯曲呈S形。随着染毒时间延长,低浓度组蝌蚪亦逐渐出现上述中毒症状,处理组死亡蝌蚪肠部发白,肿胀。

Cu²⁺对38-39期海陆蛙蝌蚪累计死亡数及半数致死浓度见表1。在暴露96 h后,对照组蝌蚪死亡率为0,低浓度组(Cu²⁺ 0.40 mg L⁻¹)蝌蚪累计死亡率为25%,高浓度组(Cu²⁺ 3.00 mg L⁻¹),死亡率达到85%。蝌蚪LC₅₀随着染毒时间逐渐降低,Cu²⁺暴露24 h、48 h、72 h、96 h后,LC₅₀分别为5.69、3.37、1.34、0.95 mg L⁻¹。

表1 Cu²⁺暴露下海陆蛙蝌蚪(38-39期)累计死亡数及半数致死浓度(N=20)

Table 1 Deaths and LC₅₀ value of Cu²⁺ toxicity to 38-39 period tadpoles of *Fejervarya cancrivora* (N=20)

暴露浓度 Concentration (ρ/mg L ⁻¹)	累计死亡蝌蚪数 Deaths (N)			
	24 h	48 h	72 h	96 h
0	0	0	0	0
0.40	0	2	5	5
0.67	1	3	8	8
1.10	3	4	9	12
1.82	3	5	9	12
3.00	6	11	15	17
LC ₅₀ (ρ/mg L ⁻¹)	5.69	3.37	1.34	0.95

2.2 急性Cu²⁺胁迫对海陆蛙蝌蚪SOD、AChE酶活性及MDA、MT含量的影响

经双因素方差分析,Cu²⁺染毒浓度和染毒时间对海陆蛙蝌蚪SOD、AChE活性及MDA、MT含量有显著的影响;除AChE指标组染毒时间与浓度间不存在交互效应(P=0.834),其他3个指标组中染毒时间与浓度间具有显著的交互效应。

除低浓度(80 μg L⁻¹)组海陆蛙蝌蚪SOD活性在48 h和72 h与对照组差异不显著外,其余各处理组SOD活性均显著低于对照组。随着暴露时间的延长,SOD酶活性变化无一定规律性,但在96 h时酶活性显著低于24 h(图1A)。从暴露浓度的主效应结果分析可看出,处理组SOD活性显著低于对照组,且各处理组之间两两差异显著,以160 μg L⁻¹处理组SOD

表2 急性Cu²⁺胁迫对海陆蛙蝌蚪SOD、AChE酶活性及MDA、MT含量影响的双因素方差分析结果Table 2 Two-way ANOVA results of SOD and AChE activity, MDA and MT contents in *Fejervary cancrivora* tadpoles under different ambient copper exposure

因素 Factor	Cu ²⁺ ($\rho/\mu\text{g L}^{-1}$)	SOD ($\mu\text{L}/(\text{mg prot})^{-1}$)	AChE ($\mu\text{L}/(\text{mg prot})^{-1}$)	MDA ($b/\text{nmol}(\text{mg prot})^{-1}$)	MT ($\rho/\text{ng mL}^{-1}$)
曝污时间 Exposure time ^e	24 h	129.25 ^a	12.33 ^{ab}	13.15 ^a	3.07 ^a
	48 h	108.01 ^b	12.70 ^a	14.36 ^a	2.47 ^b
	72 h	122.49 ^a	10.00 ^b	16.44 ^b	2.60 ^b
	96 h	95.04 ^c	11.55 ^{ab}	16.84 ^b	2.59 ^b
	P-value	< 0.001	0.042	< 0.001	< 0.001
曝污浓度 Exposure content ^e	0	149.67 ^a	18.58 ^a	10.14 ^a	3.96 ^a
	80	127.49 ^b	10.89 ^b	15.28 ^b	2.24 ^{bc}
	160	80.19 ^c	8.47 ^c	16.02 ^b	2.16 ^c
	300	97.44 ^d	8.64 ^c	19.34 ^c	2.37 ^b
	P-value	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001
曝污时间×曝污浓度 ^f Time × Content ^f	P-value	0.006	0.834	0.000	0.000

a, b, c, d为单因素方差分析 (One-way ANOVA) 结果, 且字母不同代表差异显著 ($P < 0.05$), $N = 6$. e表示主效应; f表示双因素分析的交互作用。
a,b,c,d are results of one-way ANOVA; data with different superscript lowercase letters are significantly different ($P < 0.05$), $N = 6$. e are the main effect means; f indicates the interactive effect of the two factors.

活性最低 (表2)。

Cu²⁺暴露组AChE活性显著低于对照组。高浓度组 (300 $\mu\text{g L}^{-1}$) 在染毒72 h出现最低值, 在96 h酶活性稍微升高但仍显著低于对照组 (图1B)。主效应分析结果表明, 随Cu²⁺暴露浓度增大, AChE活性下降, 但160 $\mu\text{g L}^{-1}$ 和300 $\mu\text{g L}^{-1}$ 组之间差异不显著, 且均为对照组的1/2左右 (表2)。

MDA含量随暴露浓度的增加和暴露时间的延长而增加。高浓度组 (300 $\mu\text{g L}^{-1}$) 海陆蛙蝌蚪在染毒96 h时, MDA含量为10.41 $b/\text{nmol}(\text{mg prot})^{-1}$, 达到最大值, 约为对照组两倍左右 (图1C)。从主效应结果来看, 72 h和96 h暴露组的MDA含量

显著高于24 h和48 h; 而3个Cu²⁺处理组MDA含量显著高于对照组, 但低浓度组 (80 $\mu\text{g L}^{-1}$) 和中浓度组 (160 $\mu\text{g L}^{-1}$) 之间差异不显著 (表2)。

Cu²⁺暴露组中MT表达量在不同取样时间点均显著低于对照组, 但各暴露组之间大多差异不显著 (图1D)。在暴露24 h时, 对照组MT含量为4.56 ng mL^{-1} , 而3个处理组MT的含量均下降50%左右, 约为2.5 ng mL^{-1} 。其它各取样时间点, 3个处理组MT含量也约为对照组50-60%。从暴露时间的主效应结果来看, 随暴露时间的延长, MT含量有下降趋势, 暴露24 h海陆蛙蝌蚪MT含量显著高于其他3个取样时间点 (表2)。

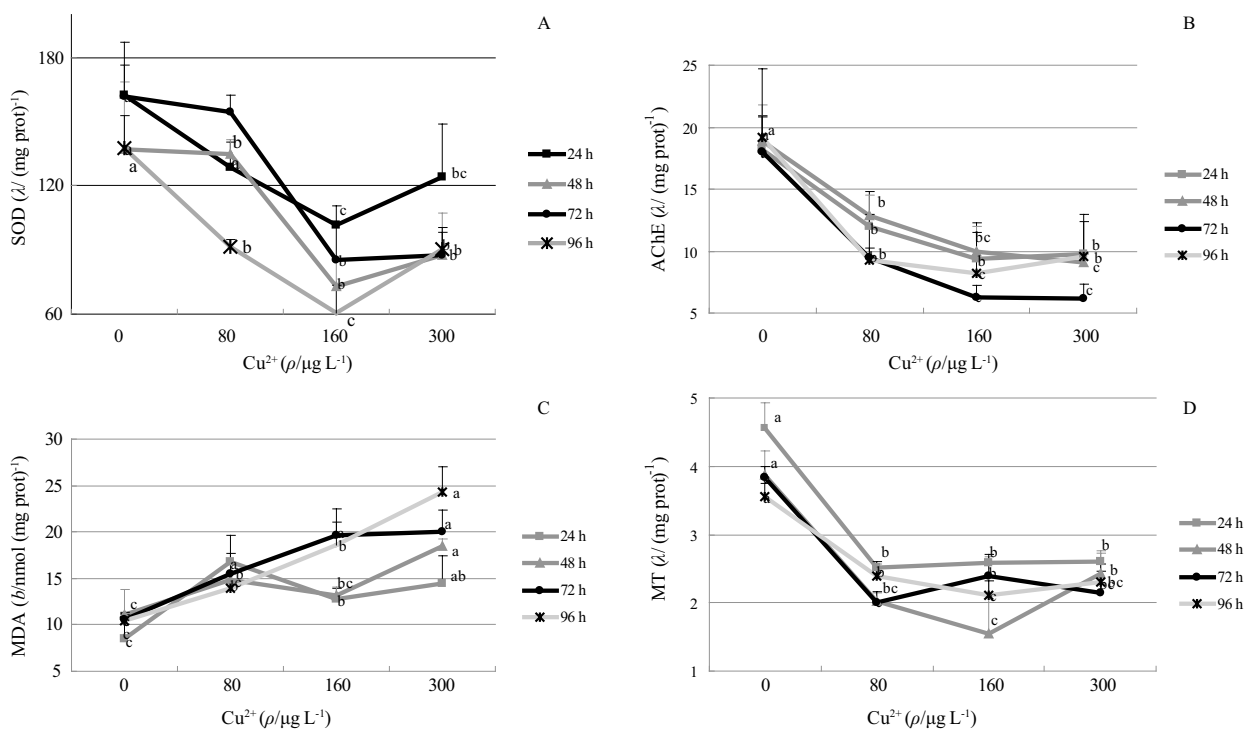


图1 急性Cu²⁺胁迫对海陆蛙蝌蚪SOD、AChE酶活性及MDA、MT含量的影响。A: SOD酶活性; B: AChE酶活性; C: MDA含量; D: MT含量。

Fig. 1 Effect of acute copper stress on SOD, AChE activity and MDA, MT content in *Fejervary cancrivora* tadpoles. A: SOD activity; B: AChE activity; C: MDA content; D: MT content.

3 讨论

本研究结果表明,在短时期高浓度 Cu^{2+} 暴露下可致海陆蛙蝌蚪死亡,在相同的染毒时间内,随着染毒浓度的升高其累计死亡数逐渐升高,而在同一染毒浓度下,随着处理时间的延长其累计死亡数亦逐渐增大.在本研究中, Cu^{2+} 对38-39期蝌蚪96 h LC_{50} 为 0.95 mg L^{-1} ,明显高于其它淡水蛙蟾类,如 Cu^{2+} 对黑眶蟾蜍(*Bufo melanostictus*)蝌蚪96 h LC_{50} 为 0.03 mg L^{-1} ^[18],泽蛙(*Rana limnocharis*)蝌蚪96 h LC_{50} 为 0.43 mg L^{-1} ^[12],中国林蛙蝌蚪(*Rana chensinensis*)对 Cu^{2+} 48 h LC_{50} 为 0.11 mg L^{-1} ^[14].这说明海陆蛙蝌蚪对 Cu^{2+} 耐受性较强.

已有研究表明,重金属毒性与氧化损伤密切相关,可引起机体脂质过氧化水平增高.贾秀英等(2008)研究结果表明 Cu^{2+} 可引起中华大蟾蜍蝌蚪脂质过氧化水平增高,产生氧化损伤^[15].在本研究中,海陆蛙蝌蚪在低浓度 Cu^{2+} ($80 \mu\text{g L}^{-1}$)组中SOD活性呈先升高再降低趋势,而高浓度组SOD活性随着染毒时间的延长而降低.这与吴众望等(2005)研究结果^[19]相一致,凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)在0.1、0.2、0.5、1.0 mg L^{-1} Cu^{2+} 作用下,12 h后0.5、1.0 mg L^{-1} Cu^{2+} 暴露对肝胰脏SOD活性有促进作用,0.1、0.2 mg L^{-1} 浓度组在24 h表现出最大激活,随暴露时间延长,酶活性下降,呈现出一个峰值的变化,至96 h全部表现为抑制.这说明随着体内自由基的产生和积累,导致了体内抗氧化酶SOD、CAT、GSH-Px等活性因代偿性应激反应而被显著诱导,因此,在低浓度 Cu^{2+} 暴露下,蝌蚪抗氧化酶SOD、CAT及GSH-Px酶活性均显著高于对照组,力图维持活性氧代谢平衡,保护膜结构,但这种维持作用是有一定限度的;随着 Cu^{2+} 暴露浓度的增加,抗氧化酶SOD、CAT及GSH-Px活性开始下降回落甚至被明显抑制,这使得机体清除自由基的能力下降,自由基大量蓄积,脂质过氧化产物明显增多,最终造成活性氧的积累和对细胞膜的损伤^[7].但在本研究中还有一个特殊现象,中浓度组($160 \mu\text{g L}^{-1}$) SOD活性却显著低于高浓度组($300 \mu\text{g L}^{-1}$),这可能是由于本研究中抗氧化酶只选取了SOD这一酶活指标,有研究表明机体内几种抗氧化系统酶活(如SOD、CAT、GPX、GR和GST)具有相互补偿作用^[20],但在中浓度组中其它几种抗氧化酶活性的高低还有待于进一步研究.尽管本研究的各个处理是在盐度为10且pH为7.2-7.8的条件下完成的,但由于该盐度和pH值是模拟海陆蛙蝌蚪的野外生存环境,应为其最佳生长环境,因此本研究不讨论盐度和pH值对各种酶活性的影响.

本研究结果亦表明,在 Cu^{2+} 暴露24 h后,海陆蛙蝌蚪体内MDA含量随着染毒浓度的升高而增加,并且随着染毒时间的延长而增加.贾秀英等(2011)在研究 Cd^{2+} 暴露对黑斑蛙精巢氧化损伤中发现,在高浓度 Cd^{2+} 暴露下,黑斑蛙精巢中MDA含量随着暴露浓度的升高而逐渐增加,呈明显的剂量-效应关系^[21];贾秀英等(2004)在研究 Cu^{2+} 暴露对中华大蟾蜍蝌蚪氧化损伤中亦发现了类似结果^[22].相关研究已表明MDA是目前反映机体氧化损伤最具代表性的指标之一,其在机体中的含量水平反映了脂质过氧化程度,即机体细胞受自由基攻击的严重程度^[23].

乙酰胆碱酯酶(AChE)作为生物神经传导中一种关键

性酶,是一个经典的毒理指标,常被用于评价水机中污染物尤其是有机磷农药的毒性^[24].顾颖等(2004)通过体外毒性试验表明乙酰甲胺磷、巴丹等6种农药对AChE活性均有明显抑制作用^[25].王晶等(2007)研究发现沙蚕(*Perinereis aibuhitesis*)在 Cu^{2+} 胁迫下体内AChE活性受到一定程度的抑制^[26].贾秀英和董爱华(2003)研究也发现 Cd^{2+} 抑制鲫鱼(*Carassius auratus*)脑组织AChE活性,且染毒时间、浓度与酶活性呈效应-剂量关系^[23].在本研究中, Cu^{2+} 染毒初期(24h)AChE活性显著降低,这说明 Cu^{2+} 抑制了AChE活性,并随着染毒浓度和染毒时间的延长其活性逐渐降低.

此外,重金属还能诱导动物肝脏和肾脏内金属硫蛋白(MT)合成,且重金属离子浓度与生物体内MT的合成存在一定的时间、剂量-效应关系.目前,机体MT含量已被作为水环境监测重金属暴露的一个分子生态毒理学指标^[23, 26-27].Vogiatzis等(1998)将雌性湖蛙(*Rana ridibunda*)暴露于 200 mg L^{-1} CdCl_2 中,处理第4天、10天、30天后肝脏中MT含量与 Cd^{2+} 呈正相关性^[28];吴众望等(2005)在研究中发现,在重金属 Cu^{2+} 、 Cd^{2+} 、 Zn^{2+} 暴露下,凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)肝胰脏中MT含量在一定的暴露浓度及时间范围内,其表达量随重金属浓度增加及暴露时间延长而升高^[19].但在本研究中,海陆蛙蝌蚪MT含量随着染毒时间和染毒浓度的延长却逐渐降低,这与上述研究结果相反.柯翎等(2004)在研究 Cd^{2+} 对菲律宾花蛤(*Ruditapes philippin*)外套膜MT含量的影响时也发现,随 Cd^{2+} 染毒浓度升高MT含量降低,并分析可能是MT作为应激蛋白,其诱导表达是有一定限度的,当重金属浓度过高,暴露时间持续延长,MT呈下降趋势^[29].而本研究采用24 h为最小检测时间或者最低浓度超过了MT结合能力,过量的重金属导致海陆蛙蝌蚪机体受到损害从而抑制了MT的表达,其原因有待进一步分析.

由此可知,SOD、AChE活性及MDA含量的变化反映了急性 Cd^{2+} 胁迫对海陆蛙蝌蚪损伤的浓度-剂量效应,可将它们作为重金属对海陆蛙污染胁迫的生物标志.

致谢 海南省林业局苏文拔工程师,海南东寨港红树林国家级自然保护区林卫海、林志军,海南师范大学生命科学学院罗樊强、洪云彩、何艳冰、谢爽、孟宇、李星雅、羊健鼎、黄国超等人在样品采集及数据测量过程中给予了大力支持和帮助,一并致以衷心感谢!

参考文献 [References]

- Machado W, Moscatelli M, Rezende LG, Lacerda LD. Mercury, zinc and copper accumulation in mangrove sediments surrounding a large landfill in southeast Brazil [J]. *Environ Pollut*, 2002, 120: 455-461
- 林鹏. 中国红树林生态系[M]. 北京: 科学出版社, 1997. 259-260 [Lin P. Mangrove ecosystem in China [M]. Beijing: Science Press, 1997: 259-260
- 张洪, 岳兴建, 王英. 镉对中华蟾蜍蝌蚪毒性的研究[J]. 内江师范学院学报, 2006, 21 (6): 58-60 [Zhang H, Yue XJ, Wang Y. Acute toxicity of cadmium on toad tadpole (*Bufo bufo*) [J]. *J Neijian Teach Coll*, 2006, 21 (6): 58-60]

- 4 Wang CY, Wang XL. Spatial distribution of dissolved Pb, Hg, Cd, Cu and As in the Bohai sea [J]. *J Environ Sci*, 2007, **19** (9): 1061-1066
- 5 张少峰, 林明裕, 魏春雷, 刘保良, 张志娟. 广西钦州湾沉积物重金属污染现状及潜在生态风险评价[J]. 海洋通报, 2010, **29** (4): 450-454 [Zhang SF, Lin MY, Wei CL, Liu BL, Zhang ZJ. Pollution assessment and potential ecological risk evolution for heavy metals in the sediments of Qinzhou Bay [J]. *Mar Sci Bull*, 2010, **29** (4): 450-454]
- 6 Yang ZL. Research into the development and use of China's amphibian resources [J]. *Ecol Econ*, 2000, **11**: 46-48
- 7 Chen M, Xie JM, Gao XY. Effects of lead on lipid peroxidation in organs of mice [J]. *China Public Health*, 2000, **16** (12): 1107-1108
- 8 Winston GW, DiGiulio RT. Prooxidant and antioxidant mechanism in aquatic organism [J]. *Aquat Toxicol*, 1991, **24**: 143-152
- 9 Almeida JA, Diniz YS, Marques SF, Faine LA, Ribas BO, Burneiko RC, Novelli EL. The use of the oxidative stress response as biomarkers in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) exposed to in vivo cadmium contamination [J]. *Environ Int*, 2002, **27** (8): 673-679
- 10 Flament S, Kuntz S, Chesnel A, Grillier-Vuissoz I, Tankozic C, Penrad-Mobayed M, Auque G, Shirali P, Schroeder H, Chardard D. Effect of cadmium on gonadogenesis and metamorphosis in *Pleurodeles waltl* (urodele amphibian) [J]. *Aquat Toxicol*, 2003, **64**: 143-153
- 11 姚丹, 万琳燕, 耿宝荣, 黄浩, 张秋生. Cu²⁺对日本林蛙蝌蚪的急性毒性研究[J]. 福建师范大学学报, 2004, **20** (4): 117-120 [Yao D, Wan LY, Geng BR, Huang H, Zhang QS. Acute toxicity of Cu²⁺ to *Rana japonica* tadpole growth and development [J]. *J Fujian Norm Univ (Nat Sci)*, 2004, **20** (4): 117-120]
- 12 贾秀英, 董爱华, 杨亚琴. 铜、锌和三唑磷对泽蛙蝌蚪的毒性研究[J]. 环境科学研究, 2005, **20** (5): 370-371 [Jia XY, Dong AH, Yang YQ. Acute and joint toxicities of copper, zinc and triazophos to *Rana limnocharis* Boie Tadpole [J]. *Res Environ Sci*, 2005, **20** (5): 370-371]
- 13 卢祥云, 张燕萍, 吴海东, 赵湘. 汞离子和铜离子对中华大蟾蜍蝌蚪联合毒性研究[J]. 四川动物, 2006, **25** (2): 379-382 [Lu XY, Zhang YP, Wu HD, Zhao X. Study on joint toxicity of mercury ion and copper ion to *Bufo gargarizans* tadpole [J]. *Sichuan J Zool*, 2006, **25** (2): 379-382]
- 14 石戈, 王健鑫, 王日昕. Cu²⁺对中国林蛙蝌蚪生长发育的毒性效应[J]. 吉林师范大学学报(自然科学版), 2007 (3): 71-73 [Shi G, Wang JX, Wang RX. Toxic effect of Cu²⁺ on *Rana chensinensis* tadpole growth and development to [J]. *J Jilin Norm Univ (Nat Sci Ed)*, 2007 (3): 71-73]
- 15 贾秀英, 施蔡雷. 水体二价铜离子致蟾蜍蝌蚪DNA损伤和氧化损伤[J]. 环境科学学报, 2008, **28** (10): 2095-2099 [Jia XY, Shi CL. Exposure of *Bufo gargarizans* tadpoles to water-borne copper (II) leading to DNA damage and oxidative damage [J]. *Acta Sci Circ*, 2008, **28** (10): 2095-2099]
- 16 赵尔宓. 介绍一种蛙类胚胎及蝌蚪发育的分期[J]. 生物学通报, 1990 (1): 13-15 [Zhao EM. A Method to staging a frog's embryonic and tadpole development [J]. *Bull Biol*, 1990 (1): 13-15]
- 17 贾春生. 利用SPSS软件计算杀虫剂的LC₅₀[J]. 昆虫知识, 2006, **43** (3): 414-417 [Jia CS. Calculating the LC₅₀ of insecticides with software SPSS [J]. *Chin Bull Entom*, 2006, **43** (3): 414-417]
- 18 Otham MS, Nadzifah Y, Umirah NS. Toxicity of metals to tadpoles of the common Sunda toad, *Duttaphrynus melanostictus* [J]. *Toxicol Environ Chem*, 2012, **94** (1-2): 364-376
- 19 吴众望, 潘鲁青, 张红霞. 重金属离子对凡纳滨对虾肝胰腺、鳃丝和血液SOD活力的影响[J]. 应用生态学报, 2005, **16** (1): 1962-1966 [Wu ZW, Pan LQ, Zhang HX. Effects of heavy metal ions on SOD activity of *Litopenaeus vannamei* hepatopancreas, gill and blood [J]. *Chin J Appl Ecol*, 2005, **16** (1): 1962-1966]
- 20 苏诗娟. 不同酸碱度和盐度对对灯氧自由基的产生和抗氧化系统的影响[D]. 华南师范大学, 2007: 60-64 [Su SJ. pH and salinity stresses on production of reactive oxygen species and antioxidant defense system of shrimp [D]. South China Normal University, 2007: 60-64]
- 21 贾秀英, 施蔡雷, 张杭君. 镉暴露致黑斑蛙精巢氧化损伤与DNA损伤[J]. 环境科学学报, 2011, **1** (7): 1537-1541 [Jia XY, Shi CL, Zhang HJ. DNA damage and oxidative damage in tests of *Rana nigromaculata* exposed to cadmium [J]. *Acta Sci Circ*, 2011, **1** (7): 1537-1541]
- 22 贾秀英, 董爱华, 马小梅. 镉致蟾蜍肝、肾脂质过氧化损伤[J]. 应用与环境生物学报, 2004, **10** (1): 92-94 [Jia X, Dong AH, Ma XM. Effect of Cd²⁺ on lipid peroxidation in liver and kidney of *Bufo gargarizans* [J]. *Chin J Appl Environ Biol*, 2004, **10** (1): 92-94]
- 23 贾秀英, 董爱华. Cd、Cr及其复合污染对鲫鱼脑组织乙酰胆碱酯酶活性的影响[J]. 农业环境科学学报, 2003, **22** (3): 337-339 [Jia XY, Dong AH. Single and combined of Cd, Cr pollution on acetylcholinesterase activity in brain of *Crassius auratus* [J]. *J Agro-environ Sci*, 2003, **22** (3): 337-339]
- 24 穆大刚, 孟范平, 朱小山, 何东海, 杨正先. 海鱼AChE监测海水有机磷农药的可行性研究[J]. 海洋湖沼通报, 2004 (1): 68-73 [Mu DG, Meng FP, Zhu XS, He DH, Yang ZX. A study on the feasibility of monitoring organophosphorus pesticides in seawater using AChE in Marine Fish: *Lateolabrax japonicas* (cuvier) [J]. *Trans Ocean Limn*, 2004 (1): 68-73]
- 25 顾颖, 王雨轩, 王斌, 朱增银, 尹大强. 六种农药对乙酰胆碱酯酶活性的体外毒性效应[J]. 农村生态环境, 2004, **21** (2): 70-74 [Gu Y, Wang YX, Wang B, Zhu ZY, Yin DQ. In vitro test for toxicity of six pesticides on acetylcholinesterase activity. *Rur Eco-environ*, 2004, **21** (2): 70-74]
- 26 王晶, 周启星, 张倩茹. 沙蚕暴露于石油烃、Cu²⁺、Cd²⁺毒性效应及乙酰胆碱酯酶活性的响应[J]. 环境科学, 2007, **28** (8): 1797-1801 [Wang J, Zhou QX, Zhang QR, Zhang Y. Toxic effects of petroleum hydrocarbons, copper and cadmium on polychaete [J]. *Environ Sci*, 2007, **28** (8): 1797-1801]
- 27 Stebbing ARD. Hormesis-the stimulation of growth by low levels of inhibitors [J]. *Sci Total Environ*, 1982, **22** (3): 213-234
- 28 Vogiatzis AK, Loumbourdis NS. Cadmium accumulation in liver and kidneys and hepatic metallothionein and glutathione levels in *Rana ridibunda*, after exposure to CdCl₂ [J]. *Arch Environ Cont Toxicol*, 1998, **34** (1): 64-68
- 29 柯翎, 骆庭伟, 林志超. 利用菲律宾花蛤的金属硫蛋白作为镉污染的检测指标[J]. 漳州师范学院学报, 2004, **17** (1): 60-64 [Ke L, Luo TW, Lin ZC. Monitoring the cadmium in the ocean by using MT as the biomarker [J]. *J Zhangzhou Teach Coll*, 2004, **17** (1): 60-64]