Cu^{2+}对克氏原螯虾(*Procambarus clarkii*)肝胰腺的蛋白质氧化损伤效应

魏克强[1], 庞胜喜[2], 赵 辉[1], 宋 欣[3]

(1.山西大学生命科学学院, 太原 030006; 2.山西省土地整理中心, 太原 030024; 3.河北保定师范专科学校涿州分校, 河北 涿州 072750)

摘 要:克氏原螯虾(*Procambarus clarkii*)是一种潜在的水质环境污染的指示生物,为研究水体中不同浓度的重金属 Cu^{2+}对其肝胰腺组织的蛋白质氧化损伤作用,在测得 Cu^{2+}致克氏原螯虾 96 h LC_{50} 为 30 mg·L^{-1} 后,将螯虾分别暴露于 0、0.5、1.0、3.0、5.0、10.0 mg·L^{-1} 的 Cu^{2+}溶液中,并在暴露 24、48、72、96 h 后测定各处理组肝胰腺组织的活性氧自由基(ROS)、总抗氧化能力(T-AOC)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-PX)活性、蛋白质羰基(PCO)含量以及 DNA-蛋白质交联(DPC)系数。结果表明,在暴露 24 h 时,随着 Cu^{2+}浓度的升高,ROS、T-AOC 和 GSH-PX 水平的变化规律相似,均为先上升后下降,PCO 含量和 DPC 系数随暴露浓度的升高而增加;在暴露 48、72、96 h 后,ROS、T-AOC、PCO 水平和 DPC 系数均表现为先升后降的趋势,GSH-PX 活性在染毒 96 h 后, 随着浓度的升高而下降。PCO 含量的变化具有一定的剂量-效应关系。结果提示,肝胰腺的蛋白质氧化损伤可能是重金属 Cu^{2+}致克氏原螯虾毒性效应的主要机制之一。

关键词:铜离子(Cu^{2+});克氏原螯虾;肝胰腺;蛋白质氧化损伤

中图分类号:X503.225 **文献标志码**:A **文章编号**:1672-2043(2014)07-1310-06 doi:10.11654/jaes.2014.07.008

Oxidative Damages of Proteins in Hepatopancreas of *Procambarus clarkii* Exposed to Cu^{2+}

WEI Ke-qiang[1], PANG Sheng-xi[2], ZHAO Hui[1], SONG Xin[3]

(1.School of Life Science, Shanxi University, Taiyuan 030006, China; 2.Shanxi Center of Land Consolidation and Rehabilitation, Taiyuan 030024, China; 3.Zhuozhou Branch School of Baoding Teachers College, Zhuozhou 072750, China)

Abstract: Crayfish *Procambarus clarkii* is an ideal indicator of freshwater pollution. An experiment was designed to study the effects of Cu^{2+} on oxidative damages of proteins in hepatopancreas of *Procambarus clarkii*. The crayfishes were exposed to various concentrations of Cu^{2+}(0, 0.5, 1.0, 3.0, 5.0 and 10.0 mg·L^{-1}) for 96 h. Reactive oxygen species(ROS), total antioxidant capacity(T-AOC), glutathione peroxidase (GSH-PX), protein carbonyl(PCO) content, and DNA-protein crosslinking(DPC) in the hepatopancreas tissues were determined at 24, 48, 72 and 96 h, respectively. ROS contents, T-AOC activity and DPC rates increased at lower, but decreased at higher concentrations of Cu^{2+} after exposure for 48, 72 and 96 h. PCO contents increased with Cu^{2+} concentrations and showed a dose-effect relationship. With Cu^{2+} concentration increasing, GSH-PX activity had "rise and decline" pattern at 24 h, while all decreased at 96 h. These results suggest that Cu^{2+} oxidative damages of proteins in the hepatopancreas may be one mechanisms of copper toxicity to *Procambarus clarkii*.

Keywords: Cu^{2+}; *Procambarus clarkii*; hepatopancreas; protein oxidative damage

近年来随着工农业的快速发展,我国水域环境的重金属污染程度日益严重。《2012 年中国环境状况公报》显示,重金属铜是最主要的水体污染物之一,铜超标在长江、黄河流域以及东海部分渔业水域相对较重。铜作为一种必需营养元素在水生甲壳动物体内承担着重要的生理功能,既作为辅助因子调节铜依赖酶的活性,又是合成血蓝蛋白所必需的[1]。但随着浓度的增加,铜将直接或间接产生毒性效应,前者是铜与生物大分子结合,破坏其结构与功能,后者是诱导机体产生大量的活性氧自由基(Reactive oxygen species, ROS)[2]。生物在长期的进化过程中已形成了复杂的酶类和非酶类抗氧化保护系统来消除活性氧,但当活性氧的产生超过机体的清除能力时,将导致生物大分子

收稿日期:2013-10-29

基金项目:教育部高等学校博士学科点专项科研基金(200801081012);山西省人才引进与开发专项基金(2008)

作者简介:魏克强(1970—),男,副教授,博士,主要从事环境毒理学研究。E-mail:kqwei@sxu.edu.cn

的氧化损伤[3]。

蛋白质是构成细胞含量最多的生物大分子(70%),与蛋白质反应的 ROS 占细胞所消耗 ROS 的 5%~75%,因而成为活性氧自由基和其他氧化剂作用的主要靶分子。蛋白质氧化损伤不仅是生物体应激的标志物,还代表了氧化应激下复杂的细胞反应,而且蛋白质氧化损伤比脂质过氧化更加灵敏[4]。因此,环境污染物对生物体的蛋白质氧化损伤研究日益受到关注。研究发现,镉对黑斑蛙(*Rana nigromaculata*)和瓯江彩鲤(*Cyprinus carpio var color*)肝、鳃和脑等组织的蛋白质产生不同程度的氧化损伤[5-7]。铜暴露导致斑马鱼(*Danio rerio*)组织的 SOD 活性、蛋白质羰基含量显著升高[8]。Sabatini 等[9]还发现,河口蟹(*Neohelice granulata*)组织蛋白的氧化损伤程度随铜离子浓度的升高而显著增加。克氏原螯虾(*Procambarus clarkii*)俗称小龙虾,属甲壳纲、十足目、喇蛄科、原螯虾属,是我国主要的淡水养殖品种之一。因其适应性广,对外界环境条件的要求低,即使在一些严重污染的水体中也能生存,常被用作一种潜在的水质环境污染监测的指示生物[10]。目前,有关铜对克氏原螯虾的毒性研究主要集中在生物累积、脂质过氧化和免疫抑制等方面[11-13],从蛋白质氧化损伤来解析水体铜污染的毒性机制还鲜见报道。研究表明,依赖于暴露的时间、剂量,铜主要蓄积在螯虾的肝胰腺组织[14]。谷胱甘肽(GSH)是生物体内最丰富的含有巯基的小分子肽类物质,在细胞防御铜的毒性中起重要作用[15]。蛋白质的羰基化被广泛用于评价机体组织的氧化程度,蛋白质羰基(PCO)含量是蛋白质氧化损伤的敏感指标[16]。机体内的生物大分子受到外来污染物的作用时,可以诱导大量的 DNA-蛋白质交联(DNA-protein crosslinks,DPC),从而对 DNA 的构象、功能、复制及转录产生影响,也会影响蛋白质的结构与功能[17]。基于此,本研究以淡水克氏原螯虾为研究对象,重金属 Cu^{2+}为胁迫因子,通过检测不同浓度和时间暴露下其肝胰腺组织中的 ROS 含量、抗氧化防御能力(T-AOC 和 GSH-PX 活力)以及蛋白质氧化损伤效应(PCO 含量和 DPC 系数),为重金属铜对虾类的毒性作用机制研究提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料和试剂

1.1.1 实验材料

克氏原螯虾(*Procambarus clarkii*),购于太原市五龙口水产批发市场,体重(20.1±0.5)g,体长(8.7±0.3)cm。实验前于 40 cm×30 cm×20 cm 的玻璃水族箱内驯养 1 周,暂养水为曝气 2 d 以上的自来水。每天不间断曝气,定时换水;每日投放饵料 1 次,实验前 1 d 停止喂食。驯养 1 周后,选择螯肢完整、健康活泼、规格基本一致的螯虾用于染毒实验。

1.1.2 实验试剂

Cu^{2+}溶液用硫酸铜配制($CuSO_4·5H_2O$,分析纯,天津登峰化学试剂厂),用蒸馏水将 $CuSO_4·5H_2O$ 配成 10 $g·L^{-1}$ 的母液备用。二氯荧光素二乙酸酯(DCFH-DA)、Hoechst 33258、蛋白酶 K 和盐酸胍购于 SIGMA 公司,硫酸链霉素购自 AMERSCO 公司,2,4-二硝基苯肼、乙酸乙酯、三氯乙酸、SDS 等均为国产分析纯。考马斯亮兰蛋白试剂盒、总抗氧化能力(T-AOC)和谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-PX)测定试剂盒购于南京建成生物工程研究所。

1.2 实验方法

1.2.1 染毒与采样

采用静态水质接触染毒法对克氏原螯虾进行 Cu^{2+}染毒,根据 LC_{50} 值和预实验,将 Cu^{2+}浓度设为 0.5、1.0、3.0、5.0、10.0 $mg·L^{-1}$ 5 个处理组和对照组,每个处理组 15 尾螯虾。分别于暴露 24、48、72、96 h 后从各处理组中随机取 3 尾螯虾,活体解剖取肝胰腺,用 0.9%预冷生理盐水清洗,再用滤纸吸干,称重,置于-80 ℃冰箱保存备用。

1.2.2 组织活性氧(ROS)含量测定

参照 Curtin 等[18]的方法,组织 ROS 含量利用荧光探针 DCFH-DA 进行检测。取 1%组织匀浆上清液 190 μL 和 10 μL 0.1 $mmol·L^{-1}$ DCFH-DA 溶液加入 96 孔酶标板中,使之充分混匀。置于酶标仪(Spectra Max M5)中,37 ℃保温 30 min。于激发波长 485 nm、发射波长 538 nm 测荧光强度(FI)值,单位以 $FI·mg^{-1}$ 蛋白表示。蛋白质含量用考马斯亮蓝蛋白试剂盒进行测定。

1.2.3 总抗氧化能力和谷胱甘肽过氧化物酶活力测定

按照试剂盒说明书进行 T-AOC 和 GSH-PX 活力测定。

1.2.4 蛋白质羰基含量(PCO)测定

组织 PCO 含量的测定根据 Levine 等[19]的方法并略有改动。取适量肝胰腺,加入一定量冷的生理盐水(W/V=1:9),组织匀浆器研磨,制成 10%的组织匀浆,匀浆液于 4 ℃,3000 $r·min^{-1}$ 离心 15 min。取上清液 900 μL,加 10%硫酸链霉素溶液,使之终浓度为 1%,室温放置 10 min 后,11 000 $r·min^{-1}$ 下离心 10 min,上清液用于组织蛋白质羰基含量的测定。蛋白质羰基含

量的测定采用 2,4-二硝基苯肼(DNPH)比色法,羰基含量用每毫克蛋白中含有多少纳摩尔的羰基来表示:蛋白羰基含量=(A/C)×稀释倍数。其中 A 为吸光值,C 为消光系数。

1.2.5 DNA-蛋白质交联系数(DPC)测定

肝胰腺组织细胞中 DPC 含量的测定参照 Merk 等[20]的方法并略有改进。取制备好的肝胰腺组织匀浆 500 μL,加入 20%的 SDS 溶液 500 μL,轻微振荡,65 ℃水浴 10 min,然后取出,加入 0.1 mL KCl,用枪头吹打 6 次,冰上放置 5 min,形成大量白色沉淀后,12 000 r·min^{-1} 离心 10 min,收集沉淀,并将上清转移至另一 5 mL 的离心管中,加入 1 mL 的清洗缓冲液重悬浮沉淀,65 ℃水浴 10 min, 冰上骤冷 5min,12 000 r·min^{-1} 离心 10 min, 如此清洗 3 次。最终的沉淀重悬浮于 0.5 mL 的清洗缓冲液,加入 0.5 mL 的蛋白酶 K,50 ℃消化 3 h,水浴中取出,冰上骤冷 5 min,12 000 r·min^{-1} 4 ℃离心 10 min,收集上清液取 0.4 mL,加入 0.4 mL 荧光染料(Hoechst 33258,400 ng·mL^{-1}),于激发波长 350 nm、发射波长 460 nm 测定交联 DNA 和自由 DNA 的荧光强度。DPC 系数=交联 DNA/(交联 DNA+自由 DNA)。

1.3 数据处理与分析

利用 SPSS 16.0 软件进行统计分析, 采用 One-way ANOVA 进行单因素方差分析和差异显著性检验。所得结果均表示为平均数±标准差,P<0.05 为差异显著(图中以 * 表示),P<0.01 为差异极显著(图中以 ** 表示)。

2 结果与分析

2.1 不同浓度 Cu^{2+}暴露对肝胰腺组织 ROS 含量的影响

不同浓度 Cu^{2+}胁迫下螯虾肝胰腺中 ROS 含量随时间的变化如图 1 所示。暴露 24、48、96 h 后,当Cu^{2+}浓度在 3.0 mg·L^{-1} 以内时,肝胰腺中 ROS 含量随着 Cu^{2+}浓度升高而上升; 当 Cu^{2+}浓度大于 3.0 mg·L^{-1} 时, 肝胰腺中 ROS 含量随着 Cu^{2+}浓度升高而下降。暴露 72 h 后, 当 Cu^{2+}浓度为 5.0 mg·L^{-1} 时,ROS 含量升至最高,与对照组的差异极显著(P<0.01)。

2.2 不同浓度 Cu^{2+}暴露对肝胰腺总抗氧化能力(T-AOC)的影响

不同浓度 Cu^{2+}胁迫下螯虾肝胰腺 T-AOC 活力随时间的变化如图 2 所示。暴露 24 h 和 96 h 后,当 Cu^{2+}浓度在 3.0 mg·L^{-1} 以内时, 肝胰腺 T-AOC 活力随着 Cu^{2+}浓度的升高而上升; 当 Cu^{2+}浓度大于 3.0 mg·L^{-1} 时, 肝胰腺 T-AOC 活力逐渐下降; 暴露 48 h 后,当 Cu^{2+}浓度为 0.5 mg·L^{-1} 时,T-AOC 活力升至最高,与对照组的差异极显著(P<0.01),之后随着 Cu^{2+}浓度的升高逐渐下降;暴露 72 h 后,当 Cu^{2+}浓度在 1.0 mg·L^{-1} 以内时, 肝胰腺 T-AOC 活力随着 Cu^{2+}浓度的升高而上升, 当 Cu^{2+}浓度为 1.0 mg·L^{-1} 时,T-AOC 活力与对照组的差异显著(P<0.05)。

2.3 不同浓度 Cu^{2+}暴露对肝胰腺谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-PX)活力的影响

不同浓度 Cu^{2+}胁迫下螯虾肝胰腺中 GSH-PX 活力随时间的变化如图 3 所示。暴露 24、48 h 后,当 Cu^{2+}浓度在 5.0 mg·L^{-1} 以内时,随着 Cu^{2+}浓度的升高,GSH-PX 活力逐渐上升;当 Cu^{2+}浓度达到 10.0 mg·L^{-1} 时,GSH-PX 活力降低。在 5.0 mg·L^{-1} Cu^{2+}暴露 48 h 时,GSH-PX 活力达到最大值, 与对照组相比差异显著(P<0.05);72、96 h 时,其活力随着 Cu^{2+}浓度的升高而降低,与对照组相比无显著差异(P>0.05)。

2.4 不同浓度 Cu^{2+}暴露对肝胰腺蛋白质羰基含量(PCO)的影响

不同浓度 Cu^{2+}胁迫下克氏原螯虾肝胰腺组织蛋白质羰基含量随时间的变化如图 4 所示。暴露 24 h

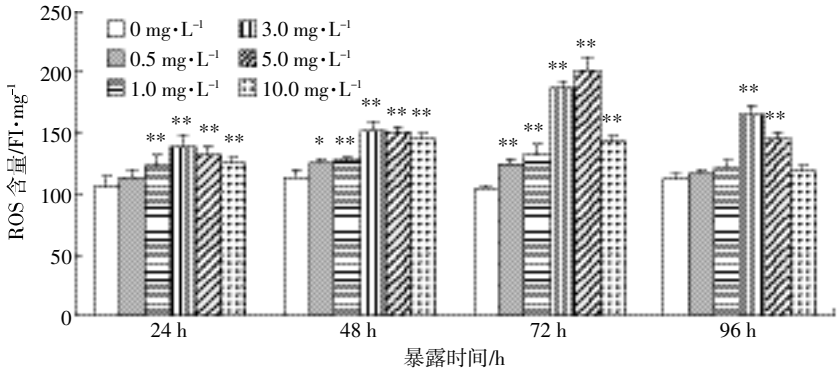

图 1 Cu^{2+}暴露对克氏原螯虾肝胰腺组织 ROS 含量的影响

Figure 1 Effects of Cu^{2+} on ROS contents in hepatopancreas of *Procambarus clarkii*

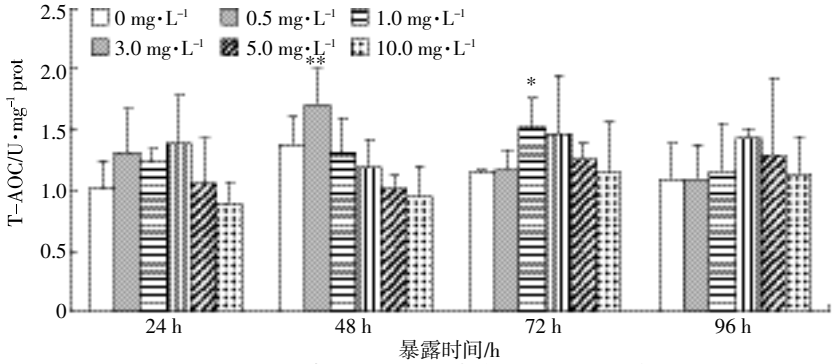

图 2 Cu^{2+}暴露对克氏原螯虾肝胰腺 T-AOC 能力的影响

Figure 2 Effects of Cu^{2+} on T-AOC activity in hepatopancreas of *Procambarus clarkii*

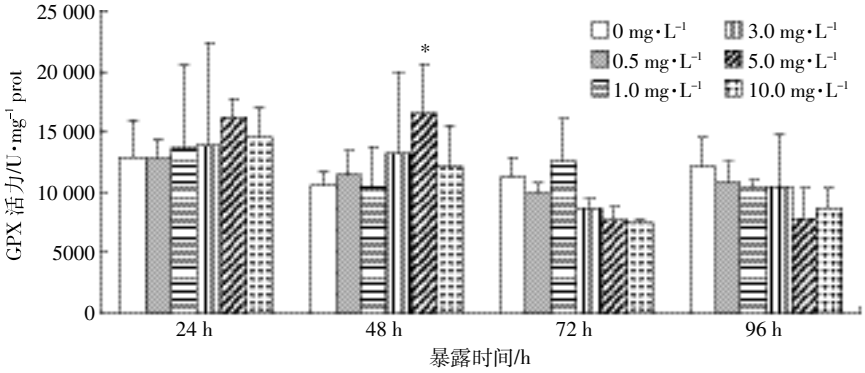

图 3 Cu^{2+}暴露对克氏原螯虾肝胰腺 GSH-PX 活力的影响

Figure 3 Effects of Cu^{2+} on GSH-PX activity in hepatopancreas of *Procambarus clarkii*

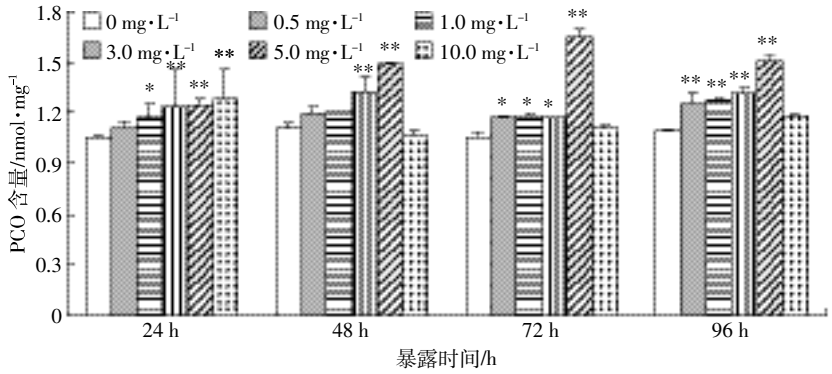

图 4 Cu^{2+}暴露对克氏原螯虾肝胰腺组织 PCO 含量的影响

Figure 4 Effects of Cu^{2+} on PCO contents in hepatopancreas of *Procambarus clarkii*

后，与空白对照组相比,PCO 含量随 Cu^{2+}含量的升高而上升,0.5 mg·L^{-1} 处理组 PCO 含量无显著变化,1.0 mg·L^{-1} 处理组 PCO 含量呈现显著升高(P<0.05),其余处理组为极显著升高(P<0.01);48~96 h 期间,肝胰腺 PCO 的含量随着 Cu^{2+}浓度的升高而上升,并在 5.0 mg·L^{-1} 达到最高值,10.0 mg·L^{-1} 处理组和对照组无显著差异(P>0.05)。

2.5 不同浓度 Cu^{2+}暴露对肝胰腺 DNA-蛋白质交联系数(DPC)的影响

不同浓度 Cu^{2+}胁迫下克氏原螯虾肝胰腺组织的 DPC 系数随时间的变化如图 5 所示。暴露 24 h 后,各处理组 DPC 系数与对照组相比无显著性差异;0.5 mg·L^{-1} 和 5.0 mg·L^{-1} Cu^{2+}分别暴露 72 h 和 48 h 时,DPC 系数与对照组相比均显著升高(P<0.05)。暴露 96 h 时 DPC 系数逐渐趋于稳定，高于对照组但与对照组相比无显著差异(P>0.05)。

3 讨论

环境重金属污染及其导致的氧化应激潜在威胁着生物体的健康状况[2]。在正常情况下,机体自由基的

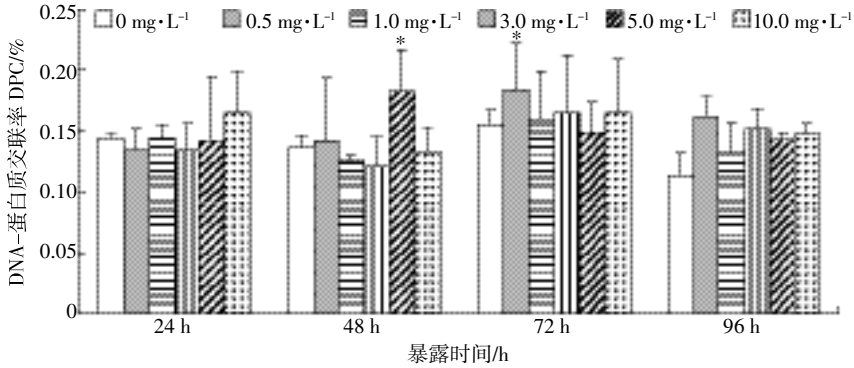

图 5 Cu^{2+}暴露对克氏原螯虾肝胰腺组织 DPC 系数的影响

Figure 5 Effects of Cu^{2+} on DPC rates in hepatopancreas of *Procambarus clarkii*

产生和清除处于动态平衡，当 ROS 的产生超过机体的抗氧化防御能力时，这些活性氧将造成生物大分子（如蛋白质）的过氧化，从而诱发多种损害[21]。肝胰腺是水生甲壳动物 Cu^{2+}蓄积的主要组织，随着 Cu^{2+}浓度的升高，通过 Haber-weiss 反应或 Fenton 反应，Cu^{2+}能诱导机体产生过量的 ROS[2]。抗氧化酶是机体防御活性氧自由基损伤的第一道防线，总抗氧化能力（T-AOC）是近年来发现的用于衡量机体抗氧化系统功能状况的综合性指标，代表和反映了机体抗氧化酶系统和非酶促系统对外来刺激的代偿能力以及机体自由基代谢的状态[22]。谷胱甘肽过氧化物酶（GSH-PX）是生物机体内解毒代谢的重要抗氧化酶，可催化 H_2O_2 转变为 H_2O 或使脂质过氧化物还原为正常状态，以防止细胞膜和其他生物组织受到破坏[15]。研究表明，ROS 对蛋白质的损伤作用主要是氨基酸残基氧化修饰、肽键断裂、聚合和交联、结构和构象的改变等，蛋白质羰基化是一个不可逆过程。一方面，ROS 通过氧化氨基酸残基侧链，使其形成酮或醛类衍生物；另一方面，ROS 与糖类、脂质大分子反应产生活性羟基类似物，然后作用于蛋白质，形成羟基蛋白，而羟基蛋白的形成将使蛋白质功能永久性丧失[5]。DPC 是 DNA与蛋白分子之间形成的一种稳定的共价结合物，DPC 在正常细胞中有一定的本底水平，但超量的 DPC 体现出一种病理状态[23]。

本研究显示，Cu^{2+}暴露能够导致克氏原螯虾肝胰腺组织 ROS 含量升高，与对照组相比差异极显著（$P<0.01$）。低浓度的 Cu^{2+}暴露后，肝胰腺组织的 T-AOC 和 GSH-PX 活力逐渐升高，说明其活性被激活；但随着浓度的增大和暴露时间的延长，Cu^{2+}的累积毒性增加，机体通过 SOD、CAT 和 GSH-PX 等抗氧化酶来维持氧化和抗氧化的平衡，但当机体的抗氧化防御体系无法清除过量的 ROS 时，自由基含量将维持在一个较高的水平，GSH-PX 活性和 T-AOC 能力开始下降甚至被抑制。在整个染毒过程中，T-AOC 和 GSH-PX 均呈现低浓度促进高浓度抑制的效应，结果使羟自由基和氧自由基的清除不力，导致 PCO 升高[4]。相对于 PCO 含量的变化，DPC 系数的变化规律不显著，而蛋白质羰基化水平的不断上升，不但反映了组织处于氧化应激状态，也标志着蛋白质的功能发生了紊乱[24]。谭树华等[25]研究了镉对克氏原螯虾肝胰腺抗氧化系统的影响，也表明了类似的规律，即低浓度镉刺激下 GSH-PX 活力增加，高浓度、长时间的暴露则对机体造成抗氧化防御系统的损伤。Hansen 等研究表明，当褐鲑鱼（*Salmo trutta*）受到 Cu^{2+}胁迫时，SOD、CAT 和 GSH-PX 活性升高，金属硫蛋白含量上升[26]，与我们的前期研究结果一致[27]。至于 Cu^{2+}诱导克氏原螯虾肝胰腺组织形成 DPC 和 PCO 将会对机体的生理功能产生哪些影响，还有待于进一步深入研究。

4 结论

本研究结果表明，重金属 Cu^{2+}能够诱导克氏原螯虾肝胰腺组织 ROS 水平升高、蛋白质羰基含量和 DNA-蛋白质交联系数增加，对螯虾肝胰腺的组织蛋白具有氧化损伤作用，进而可能会破坏肝胰腺分泌消化液、吸收储存营养物质、重金属解毒等重要生理机能。这可能是水体重金属铜暴露导致虾类的毒性效应、影响机体健康的重要机制。

参考文献：

[1] Li X B, Hou X L, Mao Q, et al. Toxic effects of copper on antioxidative and metabolic enzymes of the marine gastropod, *Onchidium struma*[J]. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 2009, 56(4): 776-784.

[2] Gaetke L M, Chow C K. Copper toxicity, oxidative stress, and antioxidant nutrients[J]. *Toxicology*, 2003, 189(1-2): 147-163.

[3] Krumova E Z, Pashova S B, Dolashka-Angelova P A, et al. Biomarkers of oxidative stress in the fungal strain *Humico lalutea* under copper exposure[J]. *Process Biochemistry*, 2009, 44(3):288-295.

[4] 解静芳, 王学峰, 孟紫强, 等. SO_2 致小鼠肝蛋白质氧化损伤和 DNA-蛋白质交联作用[J]. 中国环境科学, 2007, 27(2):400-403.
XIE Jing-fang, WANG Xue-feng, MENG Zi-qiang, et al. Protein oxidative damage and DNA-protein crosslinks in mice liver induced by SO_2[J]. *China Environmental Science*, 2007, 27(2):400-403.

[5] 曹 慧, 施蔡雷, 贾秀英. 镉暴露对黑斑蛙精巢 ROS 的诱导及其蛋白质氧化损伤作用机理[J]. 生态学报, 2012, 32(13):4199-4206.
CAO Hui, SHI Cai-lei, JIA Xiu-ying. Toxicity mechanism of cadmium-induced reactive oxygen species and protein oxidation in testes of the frog *Rana nigromaculata*[J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2012, 32(13):4199-4206.

[6] 贾秀英, 施蔡雷. 镉致黑斑蛙肝脏中 ROS 生成及其蛋白质氧化损伤作用[J]. 环境科学学报, 2010, 30(1):186-191.
JIA Xiu-ying, SHI Cai-lei. Reactive oxygen species generation and protein oxidative damage in the liver of *Rana nigromaculata* exposed to cadmium[J]. *Acta Scientiae Circumstantiae*, 2010, 30(1):186-191.

[7] 刘晓旭, 曹 慧, 贾秀英. 镉对瓯江彩鲤脏器组织蛋白质的氧化损伤作用[J]. 生态毒理学报, 2011, 6(6):595-599.
LIU Xiao-xu, CAO hui, JIA Xiu-ying. Oxidative damage of cadmium to protein in the viscera tissues of *Cyprinus carpio var color*[J]. *Asian Journal of Ecotoxicology*, 2011, 6(6):595-599.

[8] Craig P M, Wood C M, McClelland G B. Oxidative stress response and gene expression with acute copper exposure in zebrafish(*Danio rerio*)[J]. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 2007, 293(5):1882-1892.

[9] Sabatini S E, Chaufan G, Juárez A B, et al. Dietary copper effects in the estuarine crab, *Neohelice*(*Chasmagnathus*)*granulata*, maintained at two different salinities[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C:Toxicology & Pharmacology*, 2009, 150(4):521-527.

[10] Vioque-Fernández A, De Almeida E A, Ballesteros J, et al. Doñana National Park survey using crayfish(*Procambarus clarkii*) as bioindicator: Esterase inhibition and pollutant levels[J]. *Toxicology Letters*, 2007, 168(3):260-268.

[11] 李 忠, 梁宏伟, 呼光富, 等. 克氏原螯虾(*Procambarus clarkii*)应急二价铜离子时超氧化物歧化酶和过氧化氢酶的变化[J]. 武汉大学学报(自然科学版), 2010, 56(1):115-119.
LI Zhong, LIANG Hong-wei, HU Guang-fu, et al. Activity change of superoxide dismutase and catalase of crayfish(*Procambarus clarkii*) under copper ion stress[J]. *Journal of Wuhan University*(*Natural Science Edition*), 2010, 56(1):115-119.

[12] Bini G, Chelazzi G. Acclimatable cardiac and ventilatory responses to copper in the freshwater crayfish *Procambarus clarkii*[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C:Toxicology & Pharmacology*, 2006, 144(3):235-241.

[13] Soedarini B, Klaver L, Roessink I, et al. Copper kinetics and internal distribution in the marbled crayfish(*Procambarus* sp.)[J]. *Chemosphere*, 2012, 87(4):333-338.

[14] Kouba A, Buric M, Kozák P. Bioaccumulation and effects of heavy metals in crayfish: A review[J]. *Water Air and Soil Pollution*, 2010, 211(1-4):5-16.

[15] Mosleh Y Y, Paris-Palacios S, Biagianti-Risbourg S. Metallothioneins induction and antioxidative response in aquatic worms *Tubifex tubifex* (Oligochaeta, Tubificidae) exposed to copper[J]. *Chemosphere*, 2006, 64(1):121-128.

[16] Stadtman E R, Levine R L. Free radical-mediated oxidation of free amino acids and amino residues in proteins[J]. *Amino Acids*, 2003, 25(3-4):207-218.

[17] Kuykendall J R, Trela B A, Bogdanffy M S.DNA-protein crosslink formation in rat nasal epithelial cells by hexamethylphosphoramide and its correlation with formaldehyde production[J]. *Mutation Research/Genetic Toxicology*, 1995, 343(4):209-218.

[18] Curtin J F, Donovan M, Cotter T G. Regulation and measurement of oxidative stress in apoptosis[J]. *Journal of Immunological Methods*, 2002, 265(1-2):49-72.

[19] Levine R L, Garland D, Oliver C N, et al. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins[J]. *Methods in Enzymology*, 1990, 186:464-478.

[20] Merk O, Reiser K, Speit G. Analysis of chromate-induced DNA-protein crosslinks with the comet assay[J]. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 2000, 471(1-2):71-80.

[21] Knott H M, Baoutina A, Davies M J, et al. Comparative time-courses of copper-ion-mediated protein and lipid oxidation in low-density lipoprotein[J]. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 2002, 400(2):223-232.

[22] 谭树华, 何典翼, 严 芳, 等. 亚硝酸钠对鲫鱼肝脏丙二醛含量和总抗氧化能力的影响[J]. 农业环境科学学报, 2005, 24(增刊 1):21-24.
TAN Shu-hua, HE Dian-yi, YAN-fang, et al. Effects of $NaNO_2$ on MDA content and total antioxidative capacity in the liver of *Carassius auratus*[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2005, 24 (Suppl1):21-24.

[23] Izzotti A, Cartiglia C, Taningher M. Age-related increases of 8-hydroxy-2X-deoxyguanosine and DNA-protein crosslinks in mouse organs[J]. *Mutation Research*, 1999, 446:215-223.

[24] Dalle-Donne I, Rossi D, Giustarini D. Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress[J]. *Clinica Chimica Acta*, 2003, 329(1-2):23-38.

[25] 谭树华, 袁志栋, 刘雨芳, 等. 镉对克氏原螯虾肝胰腺抗氧化系统的影响[J]. 应用生态学报, 2012, 23(9):2595-2601.
TAN Shu-hua, YUAN Zhi-dong, LIU Yu-fang, et al. Effects of Cd^{2+} on antioxidant system in hepatopancreas of *Procambarus clarkii*[J]. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2012, 23(9):2595-2601.

[26] Hansen B H, Romma S, Garmo Ø A, et al. Antioxidative stress proteins and their gene expression in brown trout(*Salmo trutta*) from three rivers with different heavy metal levels[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C:Toxicology & Pharmacology*, 2006, 143(3):263-274.

[27] 赵 婷. 克氏原螯虾(*Procambarus clarkii*)对铜胁迫的免疫响应研究[D]. 太原:山西大学, 2011.
ZHAO Ting. Effects of copper stress on the immune response of red swamp crayfish *Procambarus clarkii*[D]. Taiyuan: Shanxi University, 2011.