

# 分子生物标志物在污染环境早期诊断和生态风险评估中的应用\*

王晓蓉\* 罗 义 施华宏 张景飞

(南京大学环境学院, 污染控制与资源化研究国家重点实验室, 南京, 210093)

**摘 要** 介绍了抗氧化防御系统、应激蛋白 HSP70、活性氧 (ROS) 以及植络素 (PCs) 等作为分子水平上的生物标志物, 在水和土壤环境污染早期诊断和生态风险评估中的研究现状及最新进展, 以及污染物胁迫下活性氧的产生及对机体的氧化损伤机理, 并展望了分子生物标志物在污染环境早期诊断和生态风险评估中的发展方向。

**关键词** 生物标志物, 抗氧化防御系统, 应激蛋白, 活性氧, 植络素。

近年来, 细胞或分子水平上的生物标志物作为污染物暴露和毒性效应的早期预警指标受到广泛关注, 并已成为国内外生态毒理学研究的热点之一<sup>[1-4]</sup>, 由于其具有特异性、预警性和广泛性等特点, 在水和土壤环境生态风险评估中的应用日益广泛。国际毒理界对引起生物系统损伤的估算, 包括污染物暴露、敏感性等生物标志物的研究极为重视, 我国国家自然科学基金委员会已把生物标志物作为环境化学的鼓励研究领域。

本文综述了抗氧化防御系统、应激蛋白 HSP70、活性氧 (ROS) 以及植络素 (PCs) 等作为分子水平上的生物标记物, 在水和土壤环境污染早期诊断和生态风险评估中的研究现状, 以及污染物胁迫下活性氧的产生及路径和对机体的氧化损伤机理, 并展望了分子生物标志物在污染环境早期诊断和生态风险评估中的发展方向。

## 1 抗氧化防御系统用作生物标志物的研究

抗氧化防御系统包括酶和非酶系统两大类, 在参与活性氧的清除及机体的保护性防御反应中发挥巨大作用。超氧化物歧化酶 (SOD) 是最先与活性氧自由基作用的酶, 它可将超氧阴离子 ( $O_2^-$ ) 分解为  $H_2O_2$  和  $O_2$ , 过氧化氢酶 (CAT) 又可继续分解  $H_2O_2$ , 从而降低体内  $H_2O_2$  的浓度。除过氧化氢酶外, 谷胱甘肽过氧化物酶 (GPx) 也可利用  $H_2O_2$  将还原型谷胱甘肽 (GSH) 氧化生成氧化型谷胱甘肽 (GSSG)。谷胱甘肽硫转移酶 (GST) 作为第二阶段解毒酶, 可催化污染物与 GSH 结合, 生成极性的小分子物质, 从而减轻其毒性。生物体的抗氧化酶对污染物胁迫相当敏感, 其活性变化可为污染物胁迫下的机体氧化应激提供敏感信息, 因此, 抗氧化酶被用作指示环境污染的早期预警, 从而成为分子生态毒理学生物标志物研究的热点之一<sup>[5-11]</sup>。有机污染物如 20# 柴油和 2,4-二氯苯酚 (2,4-DCP) 在较低的浓度下便可引起机体的氧化应激和氧化损伤<sup>[12]</sup>, SOD, GST 和 GSH 等对两种污染物的响应都很敏感, 柴油和 2,4-二氯苯酚在国家现行渔业用水标准以下 ( $0.005\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ), 都能引起抗氧化酶活性的改变。研究发现<sup>[13]</sup>, Cu 在低于我国现行渔业水质标准时 ( $0.01\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ), 就能对 GST 产生显著诱导, 表明 GST 对 Cu 反映敏感, 有潜力成为指示 Cu 污染的生物标志物。然而, 用抗氧化酶的活性变化来指示环境污染, 不同的实验室和野外研究中得到的结果不尽相同, 甚至相反。如未发现污染物胁迫下 GST 活性发生显著变化<sup>[14, 15]</sup>, 相反, PCDDs, PAHs 或一些杀虫剂胁迫下, 红鲮鱼、鲈科鱼以及翻车鱼体内 GST 活性降低<sup>[3]</sup>。因此, GST 能否作为理想的生物标志物指示环境污染还值得进一步研究。将 SOD 作为生物标志物研究时也出现类似的问题, Van der Oost 总结了 20 多个实验室的研究结果<sup>[3]</sup>, 发现 SOD 在污染物胁迫下做出的响应不尽相同, 60% 多的实验室未发现 SOD 活性产生显著性变化, 20% 的实验室发现 SOD 产生诱导, 而大部分的野外研究表明 SOD 活性出现诱导。对 CAT 的研究, 超过 50% 的实验室未发现 CAT 活性发生显著变化, 大于 20% 的实验室研究表明, CAT 活性受到抑制, 而小于 20% 实验室研究表明, CAT 活性产生诱导。以上结果表明, 抗氧化酶用

\* 国家自然科学基金 (20237010, 20577021) 和国家重点基础研究 (2003CB415002) 资助项目。 \*\* 通讯联系人。

作环境污染的早期预警指标, 必须考虑其它环境因素如温度、溶解氧等的影响. 环境条件的微小差异都可能导致酶活性产生变化, 另外, 生物种属间的个体差异以及年龄、性别、不同生长发育阶段等也可能影响酶活性的检测结果. 总之, 将抗氧化酶如 SOD, CAT, GST 用作生物标志物指示环境污染的早期预警, 需考虑多种因素的综合影响, 在实验条件的操作上应严格控制, 尽量减少可能会产生的各种误差, 以确保实验结果的真实可靠.

除抗氧化酶外, 非酶参与的小分子抗氧化物质在机体保护防御过程中也发挥了不可替代的作用, 这类物质包括还原型谷胱甘肽 (GSH), 抗坏血酸 (维生素 C),  $\alpha$ -生育酚 (维生素 E) 等. GSH 是一种小分子三肽, 作为机体抵抗污染胁迫的第一道防线, 对机体起保护作用主要表现在两个方面, 其一, 在谷胱甘肽硫转移酶的催化作用下, 作为外源性污染物及其体内代谢产物所产生的亲电中间体的结合靶点, 降低污染物的生物毒性; 其二, 作为抗氧化剂保护机体因各种由生理及污染胁迫而造成的氧化应激及氧化损伤, 在清除活性氧如  $H_2O_2$  以及  $\cdot OH$  过程中发挥重要作用. 生物体遭受污染物胁迫时, GSH 含量降低<sup>[12]</sup>, 大量活性氧产生并积累, 使机体处于氧化应激态, 此时, 体内正常的氧化还原电位平衡机制被扰乱, 还原型谷胱甘肽向氧化型谷胱甘肽 (GSSG) 转化, GSSG 含量升高. 健康的生物体, GSH/GSSG 比值一般维持恒定且大于 10:1<sup>[16]</sup>. 生物体遭受污染胁迫时, 该比值降低. 因此, GSH/GSSG 比值通常可作为指示环境污染引起生物体氧化应激<sup>[3]</sup>的生物标志物.

## 2 活性氧 (ROS) 用作生物标志物的潜力

目前, 生物体因病理原因产生的内源性自由基 (endogenous sources of ROS) 所引起的健康问题已经在生物医学领域引起足够的重视, 并展开了相当广泛的研究<sup>[17-21]</sup>. 自由基造成的线粒体损伤以及由此而引发的一系列机体健康问题成为生物医学领域的研究前沿. 而随着环境污染的日趋加剧, 许多疾病的发生都不可避免地与环境中的污染物有着密切的联系. 目前, 国内外针对环境污染物特别是持久性有毒有机污染物和近年来备受关注的内分泌干扰物以及最新出现的溴化物胁迫下引起生物体自由基产生以及氧化损伤的研究几乎还是空白. 而已有的研究表明, 污染物胁迫下生物体活性氧的产生及其氧化损伤可能是污染物致毒的重要路径. 因此, 开展污染物胁迫下生物体自由基的产生 (exogenous sources of ROS) 及其分子毒性作用机制的研究, 对于生态系统的安全与健康意义重大.

生物体内活性氧在正常的生理条件下产生, 这些化学性质异常活泼的基团, 可氧化体内许多大分子, 包括不饱和脂肪酸, 蛋白质以及 DNA 等, 造成这些物质的损伤从而影响其发挥正常的生理功能. 正常的生理条件下, 活性氧的产生以及抗氧化防御系统之间存在动态平衡机制, 当活性氧的产生超出平衡机制, 此时机体产生氧化应激 (Oxidative stress)<sup>[22]</sup>.

已有资料表明, 生物体遭受污染物胁迫时, 体内产生的活性氧大大增加, 当超出机体抗氧化防御能力时, 会在机体内积累并导致细胞的解毒机制受到损伤, 从而造成生物的氧化损伤, 使机体处于氧化应激状态. 而污染物胁迫下, 无论抗氧化防御系统如何做出响应, 污染物或其它氧化剂都会通过诱导活性氧的生成进而对生物体造成不同程度 (个体、细胞、分子水平上) 的氧化损伤<sup>[5, 23-25]</sup>. 愈来愈多的证据表明<sup>[26-31]</sup>, 污染物胁迫下, 生物体活性氧的产生及其氧化损伤可能是污染物致毒的重要路径.

虽然抗氧化防御系统能对环境污染胁迫做出快速响应, 但是, 由于污染物的组成成分复杂, 而环境污染的实际情况往往是多种污染物共存下的复合体系, 抗氧化系统酶活性的变化只能间接反映生物体受污染胁迫的程度, 且其活性变化往往是个动态过程, 将其作为污染暴露的生物标志物时需考虑多种因素的影响. 因此, 以单一的某种酶的活性变化来反映机体在外来污染物胁迫下的氧化应激虽然具有特异性, 但往往不能直接反映生物体受污染胁迫的程度. 如果能够直接测定生物体内的活性氧, 弄清污染物与生物体活性氧和抗氧化防御系统之间的耦合关系, 对于预测水污染生物体早期伤害将更具意义.

由于生物体活性氧寿命极短, 并且在组织中存在的浓度极低, 因此检测极为困难. 目前, 除少数化合物如醌类、硝基苯类、二吡啶基除草剂以及百草枯等诱导生物体产生的活性氧自由基被直接证实外, 提供活性氧在水生生物体内产生的直接证据鲜见报道, 更多的则是停留在一种猜测的基础上, 还

未得到证实。而相关研究多以活性氧 (ROS) 毒性作用的终点如脂质过氧化和 DNA 损伤等作为指标间接反映污染物胁迫下生物体内活性氧的生成。

近年来, 电子顺磁共振 (EPR) 技术的广泛应用使得直接测定生物体内产生的活性氧自由基成为可能, 也为研究环境污染物对生物体的微观致毒机理提供了新的手段<sup>[32]</sup>。施华宏, 罗义, 孙媛媛等<sup>[33-35]</sup>运用自由基捕获/EPR 技术, 获得了四种非氧化还原污染物萘 (NAP)、2,4-二氯苯酚 (DCP)、2,4-二硝基苯酚 (DNP) 和镉以及菲等有机污染物胁迫诱导鲫鱼肝脏产生活性氧的直接证据。表明这些结构多样的非氧化还原污染物能够诱导鲫鱼活性氧的产生并导致氧化损伤, 氧化应激可能是这些非氧化还原特性污染物致毒的一种重要机制。同时发现, 污染物浓度与生成羟自由基的强度存在剂量-效应关系, 这种定量关系是使其能成为生物标志物的关键所在<sup>[34]</sup>, 对 2,4-二氯苯酚诱导鲫鱼产生活性氧的类型和机制的研究发现, 该物质诱导鲫鱼肝脏产生的自由基为羟自由基, 羟自由基的生成与 2,4-二氯苯酚存在较好的剂量-效应关系。超氧阴离子可能是羟自由基的前体, 经过 Fenton 反应生成羟自由基。

另外, 内分泌干扰物质因其扰乱激素平衡、影响人或动物的正常生殖功能, 成为生态毒理学研究的热点。内分泌干扰物在鱼体内浓度有逐年升高的趋势, 它可以改变鱼体内脂类的组成<sup>[36]</sup>。活性氧自由基可以引起脂类, 尤其是多不饱和脂肪酸发生过氧化反应, 导致氧化损伤。内分泌干扰物可能会通过诱导生物体产生活性氧的路径使其产生氧化应激<sup>[37]</sup>。因此, 对于能引起生物体自由基爆发的有机污染物的筛选及定量分析在生态毒理学研究中尤为重要。

当前, 生态毒理学发展的一个重要趋势是加强分子水平上污染物对生物毒性作用机制的研究, 因此, 建立在分子水平上的对污染物胁迫能做出早期预警的生物标志物的筛选显得非常迫切。研究表明<sup>[38]</sup>, 活性氧对环境污染物的响应非常敏感, 且比抗氧化防御系统更快速、更直接, 有潜力成为指示环境污染的早期预警指标。研究污染物胁迫下活性氧的产生势必对揭示污染物生物毒性的微观作用机理提供重要启发和补充。将活性氧用做分子生物标志物应用在污染环境早期诊断和生态风险评价中, 今后应加强: (1) 具有诱导自由基爆发潜力的化学品污染物的筛选, 尤其加强持久性有机污染物、内分泌干扰物以及最新出现的溴化物诱导生物体产生活性氧的研究; (2) 环境污染物诱导生物体产生活性氧的剂量-效应关系, 以及由活性氧引起的氧化应激和生物大分子的氧化损伤及其机制的探讨; (3) 污染物胁迫下, 产生不同类型活性氧的检测方法的建立及其路径的研究。

### 3 应激蛋白 HSP70 的研究

应激蛋白又称为热休克蛋白, 是一切生物细胞 (包括原核细胞及真核细胞) 在受热、病原体、理化因素等应激原刺激后, 发生热休克反应时所产生的一类在生物进化中最保守并由热休克基因所编码的伴随细胞蛋白。应激蛋白是环境压力促使特定基因表达的产物, 包括 HSP (热休克蛋白) 家族及相关蛋白, 是细胞保护机制的重要部分。根据 HSPs 分子量的不同, 通常分为四个主要家族: HSP90 家族 (83—90 Kda), HSP70 (66—78 Kda) 家族, HSP60 家族, 小分子 HSP (15—30Kda) 家族。其中, HSP70 家族是序列最保守并且对污染物的应激反应最为显著的一类应激蛋白。近年来, 被广泛地应用于指示污染物胁迫的早期预警指标。研究表明, 亚硝酸, 重铬酸盐,  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ , 五氯酚和林丹等污染物胁迫下, 都能引起水生生物体内 HSP70 显著诱导<sup>[39-41]</sup>, 这些污染物在接近于环境真实值甚至更低浓度下就能对 HSP70 显著诱导, 显示其具有作为水环境生态安全早期预警指标的巨大潜力。HSP70 作为生物标志物的研究在国内相对较少, 尚属起步。胡炜等<sup>[42]</sup>发现  $\text{Cu}^{2+}$  浓度低达  $10\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ , 5d 对稀有构鲫 54kda 的应激蛋白显著诱导,  $100\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  的  $\text{Zn}^{2+}$  5d 后分别诱导出 94kda 67kda 40kda 的应激蛋白。沈骅等<sup>[43]</sup>以鲫鱼为实验动物,  $\text{Cu}$ , EDAT- $\text{Cu}$ ,  $\text{Zn}$ ,  $\text{Pb}$ ,  $\text{Cd}$  染料橙 (HC Orange 1) 及两种金属同时进行长期低浓度暴露, 在不同浓度下, 应激蛋白 HSP70 被不同程度地诱导, 并有明显的剂量-效应关系。研究发现, 在低于国家渔业水质标准的浓度下, HSP70 仍然有显著的诱导表达, 说明水体中污染物在低于现行渔业水质标准的浓度下, 长期暴露仍然会对鱼类产生一定的损伤。HSP70 比传统的生长、繁殖等生物指标更为敏感, 可考虑将 HSP70 作为反映污染物对生物体早期伤害的毒理学指标。

#### 4 植络素 (PCs) 作为生物标志物的研究

植物络合素 (phytochelatin<sub>s</sub> PC<sub>n</sub>) 广泛分布于植物界, 是重金属胁迫诱导下细胞质中响应的一类低分子量巯基多肽, 其合成随金属浓度增加而增加, 一旦金属离子与形成的 PCs 整合, PCs 的合成就会终止. 目前国际上对重金属胁迫下 PCs 的响应及其发挥的生理功能仍存在较大质疑, 尚无明确定论, 国内对此尚未展开系统研究. PCs 作为金属胁迫下细胞内一项反应敏感的生化指标受到极大关注<sup>[44-45]</sup>. 目前多侧重于单一重金属胁迫下 PCs 的研究, 而重金属复合污染下对 PCs 的研究则相对较少. Sun 等<sup>[46]</sup>建立了 mBB r-HPLC 柱前衍生荧光检测分析法测定 PCs 的新方法并系统研究了 Cd、Pb、Zn 单一和复合 (Cd/Pb 和 Cd/Zn) 污染下小麦体内 PCs 的响应机制, 及 M-PCs 复合物的分离、鉴定及其动力学形成过程, Cd 胁迫下不同环境因子对 PCs 合成的影响, 以及 Cd 超积累植物东南景天对 Cd/Zn/Pb 胁迫是否存在 PCs 的响应等. mBB r-HPLC 柱前衍生荧光检测分析法具有稳定、快速、衍生产物不易光衰等优点, 是一种科学而可行的测定 PCs 方法. 结果表明, 重金属胁迫下小麦体内 PCs 的合成是一快速的响应过程, 且随胁迫浓度的增加而显著增加, 与根系内金属的积累量呈极显著的正相关. PCs 的响应表现出明显的组织特异性, 表现为小麦根系 > 茎 > 叶片, 且其诱导量与重金属的种类、浓度、暴露时间相关. PCs 的合成与 Cd、Cd-Zn、Cd-Pb 复合暴露的生物毒性保持良好的线性关系, 两者不仅可作为 Cd, 还可作为 Cd-Zn 或 Cd-Pb 复合污染的早期预警指标. 发现在 Cd/Zn/Pb 胁迫下超积累植物东南景天体内不能合成 PCs, 证实其对 Cd/Zn/Pb 的积累和忍耐与 PCs 的诱导无关. PCs 可以考虑作为植物对重金属污染胁迫的分子生物标志物.

#### 5 生物标志物研究展望

当前, 生态风险评估研究正朝着多重性和实际性的方向发展. 在现阶段的研究中, 国内工作多集中在单一化合物和单一暴露途径的风险问题, 这显然与实际的生态系统状况不同. 作为受体的生物种或生态系统, 往往暴露于来自多重途径的多种化合物的综合影响. 目前的研究多注重室内暴露和效应的关系, 在宏观上尚未很好地同野外实际相结合, 微观上未能深入研究污染物的致毒机理, 因此, 考虑作为生态安全的早期诊断, 应加强 (1) 复合污染研究; (2) 生态系统中各指标的变化和相互关系研究; (3) 生物标志物在野外真实环境的早期诊断和生态风险评估的应用研究; (4) 污染物的微观致毒机理研究.

#### 参 考 文 献

- [1] Kille P, Sturzenbaum SR, Galko M, Molecular Diagnosis of Pollution Impact in Earthworms Toward Integrated Biomonitoring *Pedobiologia*, 1999, **43** (6): 602-607
- [2] Behnisch P A, Hosoe K, Sakai S, Combinatorial Bio/Chemical Analysis of Dioxin and Dioxin-like Compounds in Waste Recycling Feed/Food Humans/Wildlife and the Environment *Environ. Int.*, 2001, **27** (6): 441-442
- [3] Van der Oost R, Beyer J, Vermeulen N P E, Fish Bioaccumulation and Biomarkers in Environmental Risk Assessment: a Review. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 2003, **13**: 57-149
- [4] Aas E, Baussant T, Balk L et al., PAH Metabolites in Bile, Cytochrome P4501A and DNA Adducts as Environmental Risk Parameters for Chronic Oil Exposure: a Laboratory Experiment with Atlantic Cod. *Aquatic Toxicol.*, 2000, **51**: 241-258
- [5] Cossu C, Doyotte A, Babut M et al., Antioxidant Biomarkers in Freshwater Bivalves *Unionidus* in Response to Different Contaminant Profiles of Aquatic Sediments. *Ecotox. Environ. Safe*, 2000, **45**: 106-121
- [6] Niyogi S, Biswas S, Sarkar S et al., Antioxidant Enzymes in Brackishwater Oyster *Saccostrea Cucullata* as Potential Biomarkers of Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Pollution in Hooghly Estuary (India): Seasonality and Its Consequences *Sci. Total Environ.*, 2001, **281**: 237-246
- [7] Almeida JA, Diniz Y S, Marquesa SFG et al., The Use of the Oxidative Stress Responses as Biomarkers in Nile Tilapia (*Oreochromis Niloticus*) Exposed to *In Vivo* Cadmium Contamination. *Environ. Int.*, 2002, **27**: 673-679
- [8] Cheung C C C, Zheng G J, Lan P K S et al., Relationships Between Tissue Concentrations of Chlorinated Hydrocarbons (Polychlorinated Biphenyls and Chlorinated Pesticides) and Antioxidative Responses of Marine Mussels *Perna viridis*. *Mar. Pollut. Bull.*, 2002, **45**: 181-191
- [9] Cheung C C C, Siu W H L, Richardson B J et al., Antioxidant Responses to Benzo[a]pyrene and Aroclor 1254 Exposure in the Green-

- Lipped Mussel *Perna Viridis Environ. Pollut.*, 2004 **128**: 393—403
- [ 10 ] Pascual P, Pedrajas J R, Toribio F et al, Effect of Food Deprivation on Oxidative Stress Biomarkers in Fish (*Sparus aurata*) *Chem-Biol. Interact.*, 2003 **145**: 191—199
- [ 11 ] Onuc E O, Sevçiler Y, Uner N, Tissue Specific Oxidative Stress Responses in Fish Exposed to 2,4-D and Azinphosmethyl *Comp. Biochem. Phys. C*, 2004 **137**: 43—51
- [ 12 ] Zhang J F, Shen H, Wang X R et al, Effects of Chronic Exposure of 2,4-Dichlorophenol on the Antioxidant System in Liver of Fresh Water Fish *Carassius Auratus Atmosphere*, 2004 **55**: 167—174
- [ 13 ] 刘慧, 王晓蓉, 王为木等, 低浓度锌及其 EDTA 配合物长期暴露对鲫鱼肝脏锌富集及抗氧化系影响, *环境科学*, 2005 **26** (1): 173—176
- [ 14 ] Sole M, Porte C, Barcelo D, Vitellogenin Induction and Other Biochemical Responses in Carp *Cyprinus Carpio*, After Experimental Injection with 17  $\alpha$ -Ethinylestradiol *Arch. Environ. Toxicol.*, 2000, **38**: 494—500
- [ 15 ] Bello S M, Franks D G, Stegeman J J et al, Acquired Resistance to Ah Receptor Agonists in a Population of Atlantic Killifish (*Fundulus heteroclitus*) Inhabiting a Marine Superfund Site in Vivo and in Vitro Studies on the Inducibility of Xenobiotic Metabolizing Enzymes *Toxicol. Sci.*, 2001, **60**: 77—91
- [ 16 ] Stegeman J J, Brouwer M, Richard T D G et al, Molecular Responses to Environmental Contamination: Enzyme and Protein Systems as Indicators of Chemical Exposure and Effect. In: Huggett R J, Kinerly R A, Mehrle P M, Jr, Benigan H L (Eds.), *Biomarkers: Biochemical, Physiological and Histological Markers of Anthropogenic Stress*. Lewis Publishers, Chelsea MI USA (1992), pp. 235—335
- [ 17 ] Burdon R H, Superoxide and Hydrogen Peroxide in Relation to Mammalian Cell Proliferation. *Free Radic. Biol. Med.*, 1995 **18**: 775—779
- [ 18 ] Lenaz G, Role of Mitochondria in Oxidative Stress and Ageing *Biochem. Biophys. Acta Bioenergetics.*, 1998, **1366**: 53—67
- [ 19 ] Rahman L, Madhew, Lung Glutathione and Oxidative Stress Implications in Cigarette Smoke Induced Airways Disease *Free Radic Biol. Med.*, 2000 **28**: 1405—1420
- [ 20 ] St Pierre J, Buckingham J A, Roebuck S J et al, Topology of Superoxide Production from Different Sites in the Mitochondrial Electron Transport Chain *J. Biol. Chem.*, 2002, **277** (22): 44784—44790
- [ 21 ] Takeda K, Fujii K, Anzai K et al, In vivo Monitoring of Hydroxyl Radical Generation Caused by X-Ray Irradiation of Rats Using the Spin Trapping/EPR Technique *Free Radic. Biol. Med.*, 2004 **36** (9): 1134—1143
- [ 22 ] Halliwell B, Gutteridge J M C, *Free Radicals in Biology and Medicine* 3rd ed. Oxford University Press, Oxford, UK, 1999
- [ 23 ] Abele D, Burlando B, Vairo A et al, Exposure to Elevated Temperatures and Hydrogen Peroxide Elicits Oxidative Stress and Antioxidant Response in the Antarctic Intertidal Limpet *Nacella Concinna* *Comp. Biochem. Phys. C*, 1998 **117**: 123—129
- [ 24 ] Ringwood A H, Connors D E, Keppeler C J et al, Biomarker Studies with Juvenile Oysters (*Crassostrea Virginica*) Deployed in Situ. *Biomarkers*, 1999 **4**: 400—414
- [ 25 ] Roméo M, Bennani N, Gnassir-Barelli M et al, Cadmium and Copper Display Different Responses Towards Oxidative Stress in the Kidney of the Sea Bass *Dicentrarchus Labrax* *Aquat. Toxicol.*, 2000, **48**: 185—194
- [ 26 ] Di Giulio R T, Benson W H, Sanders B M et al, Biochemical Mechanisms: Metabolism, Adaptation, and Toxicity. In: *Fundamentals of Aquatic Toxicity: Effects, Environmental Fate, and Risk Assessment* ed. Rand G, Taylor and Francis, London, 1995
- [ 27 ] Livingstone D R, Organic Xenobiotic Metabolism in Marine Invertebrates. In: *Advances in Comparative and Environmental Physiology*, 1991, Vol 7, ed. Gilles R, pp. 45—185. Springer, Berlin
- [ 28 ] Livingstone D R, Garcia Martinez P, Michel X et al, Oxidative Generation as a Pollution Mediated Mechanism of Toxicity in the Common Mussel *Mytilus Edulis* L., and Other Mollusks. *Functional Ecology*, 1990 **4**: 415—424
- [ 29 ] Livingstone D R, Förlin L, George S, Molecular Biomarkers and Toxic Consequences of Impact by Organic Pollution in Aquatic Organisms. In: *Water Quality and Stress Indicators in Marine and Freshwater Systems: Linking Levels of Organization* ed. Sutcliffe D W, 1994, pp. 154—171. Freshwater Biological Association, Ambleside, UK
- [ 30 ] Di Giulio R T, Benson W H, Sanders B M et al, Biochemical Mechanisms: Metabolism, Adaptation, and Toxicity. In: *Fundamentals of Aquatic Toxicity: Effects, Environmental Fate, and Risk Assessment* ed. Rand G, Taylor and Francis, 1995, London
- [ 31 ] Livingstone D, Contaminant Stimulated Reactive Oxygen Species Production and Oxidative Damage in Aquatic Organisms *Mar. Pollut Bull.*, 2001, **42**: 656—666
- [ 32 ] Selote D S, Bharti S, Khanna Chopra R, Drought Acclimation Reduces O<sub>2</sub><sup>-</sup> Accumulation and Lipid Peroxidation in Wheat Seedlings *Biochem. Biophys. Res. Co.*, 2004 **314**: 724—729
- [ 33 ] Shi H H, Wang X R, Luo Y et al, Electron Paramagnetic Resonance Evidence of Hydroxyl Radical Generation and Oxidative Damage Induced by Tetrabromobisphenol A in *Carassius Auratus* *Aquat. Toxicol.*, 2005, **74**: 365—371
- [ 34 ] Luo Y, Wang X R, Shi H H et al, EPR Investigation of in Vivo Free Radical Formation and Oxidative Stress Induced by 2,4-Dichlorophenol in the Freshwater Fish *Carassius Auratus* *Environ. Toxicol. Chem.*, 2005, **24** (9): 2145—2153
- [ 35 ] Sun Y Y, Yu H X, Zhang J F et al, Bioaccumulation, Depuration and Oxidative Stress in Fish *Carassius auratus* Under Phenanthrene Exposure *Chemosphere*, 2005 (in press)

- [ 36 ] Mercure F, Holloway A C, Tocher D R et al, Influence of Plasma Lipid Changes in Response to 17-Estradiol Stimulation on Plasma Growth Hormone, Somatostatin, and Thyroid Hormone Levels in Immature Rainbow Trout *J. Fish. Biol.*, 2001, **59**: 605—615
- [ 37 ] Liehr J G, Roy D, Free Radical Generation by Redox Cycling of Estrogens *Free Radic. Bio. Med.*, 1990, **8**: 415—423
- [ 38 ] Luo Y, Su Y, Lin R Z et al,  $\alpha$ -Chlorophenol Induced ROS Generation in Fish Carassius Auratus Based on the EPR Method. *Chemosphere* 2006 ( in press)
- [ 39 ] Bierkens J, Maes J, Vander P F, Induction of Heat Shock Protein 70 in Raphidocelis Subcapitata as a Monitoring Tool for Environmental Pollution. In: *In Vitro* 96—9th international Workshop on *in Vitro* toxicology, Papendael, 1996, p. 5
- [ 40 ] Bierkens J, Maes J, Vander P F, Dose-Dependent Induction of Heat Shock Protein 70 Synthesis in Raphidocelis Subcapitata Following Exposure to Different Classes of Environmental Pollutants. *Environ. Pollution*, 1998, **101**: 91—97
- [ 41 ] Kammerga J E, Arts M S J, Oude Breuil W J M, HSP60 as a Potential Biomarker of Toxic Stress in the Nematoe Plectus Accuminatus *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 1998, **34**: 253—258
- [ 42 ] 胡伟, 汪亚平, 周永欣,  $\text{Cu}^{2+}$ 、 $\text{Zn}^{2+}$  诱导稀有构鲫应激蛋白的研究. *水生生物学报*, 2001, **25** (1): 50—53
- [ 43 ] 沈骅, 张景飞, 王晓蓉等,  $\text{Cu}^{2+}$ 、 $\text{Cu}$ -EDTA 对鲫鱼脑组织应激蛋白 HSP70 诱导的影响. *环境科学*, 2004, **25** (3): 94—97
- [ 44 ] Gavel J E, Ahner B A, Friedland A J et al, Role for Heavy Metal in Forests Decline Indicated by Phytochelatin Measurements *Nature* 1996, **381**: 64—65
- [ 45 ] Hu S, Wu M, Cadmium Sequestration in the Marine Macroalga *Kappaphycus Alvarezii* *Mol. Mar. Biol. Biotech.*, 1998, **7**: 97—104
- [ 46 ] Sun Q et al, Effects of Exogenous Organic Chelates on Phytochelatin Production and Its Relationship with Cd Toxicity in Wheat (*Triticum aestivum* L.) Under Cd Stress. *Chemosphere*, 2005, **60** (1): 22—31

## APPLICATION OF MOLECULAR BIOMARKERS IN EARLY DIAGNOSIS AND ECOLOGICAL RISK ASSESSMENT FOR WATER AND SOIL

WANG Xiao-rong   LUO Yi   SHI Hua-hong   ZHANG Jing-fei

(State Key Laboratory of Pollution Control and Resource Reuse, School of the Environment, Nanjing University, Nanjing 210008, China)

### ABSTRACT

Molecular biomarkers due to their sensitivities in early warning to indicate biological damages following the long-term exposure with low concentrations of the pollutants have been widely used in ecological risk assessment of water and soil compartments and are becoming one of the hotspots in ecotoxicological studies. In this paper, the overview studies and the most advancing developments in antioxidant defense, HSP70, reactive oxygen species (ROS), phytochelatin (PCs) which are used as the molecular biomarkers in early diagnosis and ecological risk assessment in water and soil are reviewed, as well as the mechanisms of ROS generation and its mediated oxidative damage. Finally, perspectives of trends in molecular biomarkers in early diagnosis and ecological risk assessment are discussed.

**Keywords** biomarker, antioxidant defense, HSP70, ROS, phytochelatin