

DOI: 10.7524/AJE.1673-5897.20150709001

聂芳红, 蔡吉榛, 王小宁, 等. 近海沉积物 DPCBs 对斑马鱼胚胎 EROD 和 *cyp1a* mRNA 的影响[J]. 生态毒理学报, 2016, 11(2): 364-368

Nie F H, Cai J Z, Wang X N, et al. EROD activity and *cyp1a* mRNA expression in zebrafish embryo exposed to marine sediment DPCBs extract [J]. Asian Journal of Ecotoxicology, 2016, 11(2): 364-368 (in Chinese)

# 近海沉积物 DPCBs 对斑马鱼胚胎 EROD 和 *cyp1a* mRNA 的影响

聂芳红<sup>1</sup>, 蔡吉榛<sup>2</sup>, 王小宁<sup>2</sup>, 林红英<sup>2</sup>, Ravi Gooneratne<sup>3</sup>, Anthony Hay<sup>4</sup>, 马驿<sup>2</sup>, 巨向红<sup>2</sup>, 郑锦庆<sup>2</sup>, 陈进军<sup>2,\*</sup>

1. 广东海洋大学食品科技学院, 湛江 524088
2. 广东海洋大学农学院, 湛江 524088
3. 林肯大学农业与生命学院, 基督城 7647, 新西兰
4. 康奈尔大学农业与生命科学学院, 伊萨卡 14853, 美国

收稿日期: 2015-07-09 录用日期: 2015-08-31

**摘要:** 为探究湛江近海域海洋沉积物中类二噁英多氯联苯(dioxin-like polychlorinated biphenyls, DPCBs)的生物学毒性效应, 选取湛江近海域 2 个地点(近工业区 TS 和近生活区 JSW)采集沉积物样品, 制备近海域沉积物 DPCBs 提取物, 将斑马鱼胚胎暴露于不同浓度的 DPCBs 提取物, 测定斑马鱼胚胎 7-乙氧基异吩恶唑脱乙酰基酶(ethoxyresorufin-*O*-deethylase, EROD)活性和 *cyp1a* mRNA 相对表达量。结果发现, JSW 采样点 DPCBs 提取物染毒组 EROD 酶活性变化与 TS 采样点 DPCBs 提取物一致, 在各染毒浓度下, 斑马鱼仔鱼 EROD 酶活性为对照组的 1.1~1.8 倍。TS 和 JSW 采样点不同浓度 DPCBs 提取物暴露斑马鱼胚胎 96 h 后, 使斑马鱼仔鱼 *cyp1a* mRNA 相对表达量是对照组的 3.36~19.45 倍。说明一定浓度的近海沉积物 DPCBs 能诱导斑马鱼仔鱼 EROD 酶活性和 *cyp1a* mRNA 表达量升高, 且呈现浓度-效应关系。

**关键词:** 类二噁英多氯联苯; 斑马鱼胚胎; EROD 酶; *cyp1a* mRNA; 近海沉积物

文章编号: 1673-5897(2016)2-364-05 中图分类号: X171.5 文献标识码: A

## EROD Activity and *cyp1a* mRNA Expression in Zebrafish Embryo Exposed to Marine Sediment DPCBs Extract

Nie Fanghong<sup>1</sup>, Cai Jizhen<sup>2</sup>, Wang Xiaoning<sup>2</sup>, Lin Hongying<sup>2</sup>, Gooneratne Ravi<sup>3</sup>, Hay Anthony<sup>4</sup>, Ma Yi<sup>2</sup>, Ju Xianghong<sup>2</sup>, Zheng Jinqing<sup>2</sup>, Chen Jinjun<sup>2,\*</sup>

1. Food Sci-Tech College, Guangdong Ocean University, Zhanjiang 524088, China
2. Agricultural College, Guangdong Ocean University, Zhanjiang 524088, China
3. Faculty of Agriculture & Life Sciences, Lincoln University, Christchurch 7647, New Zealand
4. College of Agriculture and Life Sciences, Cornell University, Ithaca 14853, USA

Received 9 July 2015 accepted 31 August 2015

**Abstract:** To study the bio-toxicity of dioxin-like polychlorinated biphenyls (DPCBs) in marine sediment, the sediments from Zhanjiang industrial and living area (TS and JSW) were collected and extracted focusing on DPCBs,

基金项目: 广东省科技计划国际合作项目(2010B050600004, 2016A050502062)

作者简介: 聂芳红(1969-), 女, 硕士, 高级实验师, 研究方向为食品毒理学, E-mail: 15913577717@163.com;

\* 通讯作者 (Corresponding author), E-mail: jjchen777@aliyun.com

respectively. Then a range of zebrafish embryos were exposed to different concentrations of the sediment DPCBs extracts to examine the ethoxyresorufin-*O*-deethylase (EROD) activity and the expression of *cyp1a* mRNA. The results showed that the DPCBs extract from TS and JSW sediments had similarity to cause marked induction of EROD in the zebrafish embryos. The EROD activities in zebrafish embryos induced by different concentrations of the DPCBs extract were 1.1 to 1.8 times higher than that in the control embryos, respectively, and after the zebrafish embryos were exposed to different concentrations of the DPCBs for 96 h, the juvenile *cyp1a* mRNA relative expressions were significantly enhanced by 3.36 to 19.45 times of that in the control group, respectively. It is indicated that certain concentrations of the DPCBs extract increased EROD activity and *cyp1a* mRNA in zebrafish larvae, with a concentration-effect relationship.

**Keywords:** dioxin-like polychlorinated biphenyls; zebrafish embryo; EROD; *cyp1a* mRNA; marine sediment

类二噁英多氯联苯(dioxin-like polychlorinated biphenyls, DPCBs)来源广泛,具有强毒性、生物蓄积性、全球迁移性等特点,未来很长时间内将是动物和人类健康安全的巨大隐患。海洋沉积物是 DPCBs 的重要蓄积地,经过生物富集而大量存在于鱼类体内,污染蛋白类饲料原料,最终通过食物链污染进入动物及人体内<sup>[1-2]</sup>。斑马鱼(*Danio rerio*)是毒理学与药理学的优良模式实验动物<sup>[3-4]</sup>。本研究提取净化近海域沉积物中 DPCBs,利用斑马鱼胚胎活体 EROD 酶活性测定法和荧光定量 PCR 技术,探索 DPCBs 提取物对斑马鱼胚胎 EROD 酶活性和 *cyp1a* mRNA 相对表达量的影响,为利用斑马鱼胚胎 CYP1A 进行 DPCBs 污染的生物检测提供试验依据。

## 1 材料与方法 (Materials and methods)

### 1.1 仪器与试剂

气相色谱仪(GC-ECD, 6890N 型,配有电子捕获检测器,美国 Agilent 公司),真空冷冻干燥机(LGJ-10B 型,北京四环科学仪器厂有限公司),医用数控超声波清洗器(KQ3200DE 型,昆山超声仪器有限公司),玻璃层析柱(1997A 型,上海子期实验设备有限公司),氮吹仪(LBM-1J 型,北京莱伯曼公司);PCR 仪(德国 Eppendorf 公司),核酸蛋白检测仪(BioPhotometer plus 型,德国 Eppendorf 公司),ChemiDoc XRS 凝胶成像系统、荧光定量 PCR 仪(美国 Bio-Rad 公司)。

正己烷(色谱纯,美国 Burdick & Jackson 公司),丙酮(色谱纯,美国 J.T. Baker 公司),佛罗里土(60~100 目,美国 Sigma 公司),无水硫酸钠,PCB77、PCB81、PCB105、PCB114、PCB118、PCB123、PCB126、PCB156、PCB157、PCB167、PCB169、PCB170、PCB180、PCB189(美国 o2si 公司);总 RNA 提取试剂盒(TRIZOL Reagent)、一般 PCR 试剂盒(TaqTM)、DL 2000 DNA Marker、反转录试剂盒(PrimeScript RT reagent Kit With gD-

NA Eraser)、SYBR Premix Ex TaqTM II(Perfect Real Time)均为 Takara 公司产品。

### 1.2 近海沉积物 DPCBs 提取物的制备

以 Khim 等<sup>[5]</sup>和 Koh 等<sup>[6]</sup>所述方法为依据,将采集于湛江调顺岛(TS)和金沙湾(JSW)的近海域沉积物样品冷冻干燥,研碎,过 80 目筛。称取 30 g 于 500 mL 三角烧瓶中,加入 300 mL 正己烷和丙酮 1 : 1 (V : V),另加 1 g 铜粉脱硫,超声波提取 30 min,静置后分离有机溶剂层,重复上述步骤一次,合并 2 次提取液。转移至旋转蒸发仪 50 °C 浓缩至 5 mL 左右,加入 10 mL 正己烷继续浓缩至 2 mL,待净化。净化方法为:用正己烷润湿层析柱,在柱内加入 10 g 已活化的佛罗里硅土,再加 10 mm 厚的无水硫酸钠,排出过量正己烷至刚淹没无水硫酸钠层,关闭活塞。将样品提取液移入柱内,用 100 mL 正己烷进行淋洗,将洗脱液在旋转蒸发仪下浓缩至 10 mL 左右,转移至浓缩管,用氮气浓缩至 2 mL,1 mL 用于气相色谱法仪器分析,另外 1 mL 用于后续斑马鱼胚胎试验。

### 1.3 试验动物

斑马鱼(*Danio rerio*),购自湛江花鸟鱼市场,由广东海洋大学水产学院进行品种鉴定。在水族箱适应性饲养 1 个月后用于繁殖试验,养殖用水为自然曝气 3 d 的自来水,水温控制在 26~28 °C。挑选体长为 3.5 cm 左右的斑马鱼(雌 : 雄 = 1 : 2)置于繁殖用水族箱中,每天饲喂 2 次,光照与黑暗周期控制在 14 h/10 h,试验当天早上以光照刺激斑马鱼配对并产卵,0.5 h 内用胚胎收集器收集斑马鱼胚胎。

### 1.4 斑马鱼胚胎染毒

近海沉积物 DPCBs 提取物的最终染毒浓度依据斑马鱼胚胎急性毒性试验 96 h 的 LC<sub>50</sub> 配制,分别以 DPCBs 提取物对斑马鱼胚胎的 LC<sub>50</sub> 为最高浓度,二倍递减进行稀释,配制 5 个浓度(TS 采样点

DIPCBs 提取物的染毒浓度为 60、30、15、7.5、3.75  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ; JSW 采样点 DIPCBs 提取物的染毒浓度为 70、35、17.5、8.75、4.375  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ , 设空白对照组和 0.1% DMSO 对照组。斑马鱼胚胎染毒试验按照 OECD(2012)方法进行<sup>[7]</sup>, 试验期为 96 h, 每天定时更换一半染毒溶液。

### 1.5 斑马鱼胚胎 EROD 酶活性测定

采用胚胎活体 EROD 酶测定法测 EROD 酶活性, 综合 Liu 和 Marit 的方法<sup>[2,8]</sup>改良后进行。最终的分析结果为 5 条仔鱼荧光强度的平均值。

### 1.6 斑马鱼胚胎 *cyp1a* mRNA 相对表达量的测定

将 20 个染毒 96 h 后的斑马鱼仔鱼收集于离心管后, 马上放入  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  保存至提取 RNA。用 Trizol 总 RNA 提取试剂盒提取斑马鱼仔鱼总 RNA。用 TaKaRa 公司的反转录试剂盒 PrimeScript RT reagent Kit With gDNA Eraser (Perfect Real Time) 进行总 RNA 反转录, 反转录产物于  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  下保存。*cyp1a* 基因和内参基因  $\beta$ -actin 序列从 Genebank 获得, 其序列号分别为 AF210727 和 AF057040, 利用软件 Prime 5.0 设计引物。*cyp1a* 基因上游引物为: AG-GACAACATCAGAGACATCACCG, 下游引物为: CACTAGATAGACAACCGCCAGG, 产物片段大小 179 bp;  $\beta$ -actin 上游引物为: GATGCGGAACTG-GCAAAGG, 下游引物为: GAGGAGGGCAAAGTG-GTAAACG, 产物片段大小为 116 bp。荧光定量 PCR 反应按设定条件进行,  $0.5\text{ }^{\circ}\text{C}$  增值进行熔解曲线分析, 以检验产物的特异性。最终利用  $\text{Fold} = 2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$  计算基因的相对表达量<sup>[9]</sup>。

### 1.7 数据统计分析

数据用 SPSS 19.0 软件进行单因素方差分析, 进行对照组与染毒组之间的差异比较。数据用“ $\bar{x}\pm\text{SEM}$ ”表示。

## 2 结果 (Results)

### 2.1 斑马鱼胚胎 EROD 酶活性

荧光生物显微镜可观察到各 DIPCBs 提取物染毒组斑马鱼仔鱼的肠道、眼睛、卵黄囊积累了荧光产物(resorufin), 其荧光强度均强于对照组, 而 0.1% DMSO 对照组仔鱼荧光强度很低(图 1F1)。TS 采样点 DIPCBs 提取物最高浓度组( $60\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ )仔鱼可观察到心包水肿, 在荧光显微镜下可观察到肠道和卵黄囊明显的荧光产物积累(图 1A1)。

利用光密度分析软件对肠道和卵黄囊荧光产物进行荧光强度分析, 与对照组比较, 可得不同染

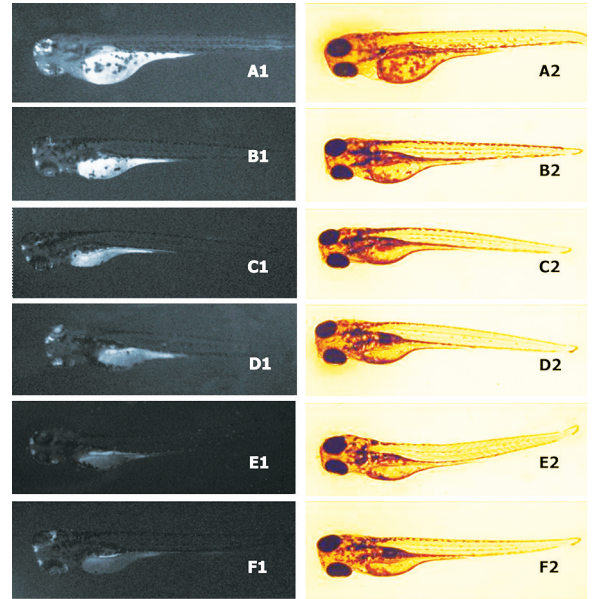


图 1 TS 采样点 DIPCBs 提取物染毒斑马鱼胚胎 96 h 后的荧光图和普通显微镜图 (100 $\times$ )

注: A1~F1 为荧光图, A2~F2 为普通显微镜图; A、B、C、D、E 分别为  $60\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、 $30\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、 $15\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、 $7.5\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、 $3.75\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  DIPCBs 提取物组, F 为 0.1% DMSO 对照组。

Fig. 1 Fluorescent and digital images of zebrafish larvae exposed to different concentrations of TS sediment DIPCBs extracts for 96 h (100 $\times$ )  
Note: A1-F1 indicate fluorescent microscopic images of the zebrafish larvae; A2-B2 indicate light microscopic images of the zebrafish larvae. A, B, C, D, E were zebrafish larvae treated with  $60\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ,  $30\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ,  $15\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ,  $7.5\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ,  $3.75\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  of DIPCBs extract, F were zebrafish larvae in the control.

毒浓度的仔鱼 EROD 活性相对大小(图 2)。7.5  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  染毒组的斑马鱼 EROD 活性为对照组的 1.1 倍 ( $P<0.05$ ), 15  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、30  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、60  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  染毒组 EROD 活性分别为对照组的 1.2、1.8 和 1.5 倍 ( $P<0.01$ )。JSW 采样点 DIPCBs 提取物染毒组 EROD 酶活性变化与 TS 采样点 DIPCBs 提取物类似, 染毒浓度达  $17.5\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  时, 斑马鱼仔鱼 EROD 酶活性为对照组的 1.26 倍 ( $P<0.05$ ), 35  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  和 70  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  的 DIPCBs 提取物染毒组 EROD 活性分别为对照组的 1.38 和 1.42 倍 ( $P<0.01$ )。

### 2.2 DIPCBs 提取物对斑马鱼仔鱼 *cyp1a* mRNA 相对表达量的影响

不同浓度的 DIPCBs 提取物暴露斑马鱼胚胎 96 h 后, 使斑马鱼仔鱼 *cyp1a* mRNA 表达发生变化(图 3)。TS 采样点  $3.75\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、 $7.5\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  浓度组的斑马鱼仔鱼 *cyp1a* mRNA 相对表达量是对照组的 3.36、3.37 倍 ( $P<0.05$ ), 15  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、30  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、

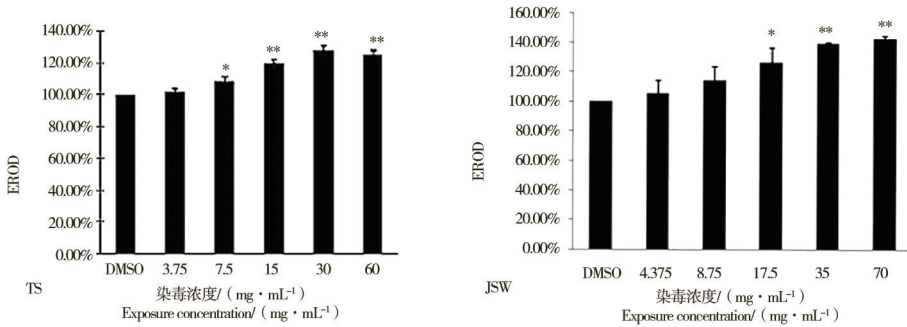


图 2 TS 和 JSW 采样点的 DPCBs 提取物染毒斑马鱼胚胎 96 h 后活体 EROD 酶相对活性变化

注: n=5; \*与对照组比,  $P<0.05$ , \*\*与对照组比较,  $P<0.01$ 。

Fig. 2 *In vivo* EROD activity in zebrafish larvae exposed to DPCBs extracts from TS and JSW for 96 h

Note: Mean±SEM, n=5. \* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$ , compared with control.

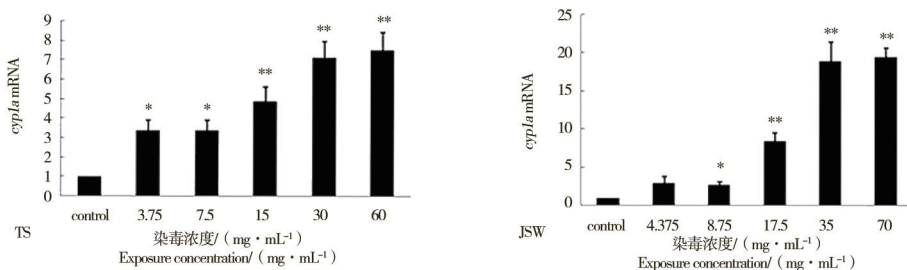


图 3 TS 和 JSW 采样点 DPCBs 提取物染毒 96 h 对供试斑马鱼胚胎 *cyp1a* 基因 mRNA 相对表达量的影响

注: n=3; 与对照组相比, \* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$ 。

Fig. 3 Fold-change in *cyp1a* mRNA expression in zebrafish embryos exposed to different concentrations of TS and JSW sediment DPCBs extracts for 96 h

Note: Mean±SEM (n=3). \* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$ , compared with control.

60 mg·mL<sup>-1</sup>浓度组的斑马鱼仔鱼 *cyp1a* mRNA 相对表达量为对照组 4.87、7.11 和 7.59 倍( $P<0.01$ ); JSW 采样点 4.375 mg·mL<sup>-1</sup> 的 DPCBs 提取物对仔鱼 *cyp1a* mRNA 的表达量与对照组相比差异不显著( $P>0.05$ ), 8.75 mg·mL<sup>-1</sup> 浓度组的斑马鱼仔鱼 *cyp1a* mRNA 相对表达量与对照相比差异具有统计学意义( $P<0.05$ ), 17.5 mg·mL<sup>-1</sup>、35 mg·mL<sup>-1</sup> 和 70 mg·mL<sup>-1</sup> 的 JSW 采样点 DPCBs 提取物浓度组的斑马鱼仔鱼 *cyp1a* mRNA 相对表达量为对照组的 8.39、18.82 和 19.45 倍( $P<0.01$ )。DPCBs 提取物与斑马鱼仔鱼 *cyp1a* mRNA 表达量呈现浓度-效应关系。

### 3 讨论 (Discussion)

#### 3.1 DPCBs 提取物使斑马鱼仔鱼 EROD 酶活性增加

哺乳动物的 EROD 酶是由 CYP1A1 介导的, 是二噁英类污染物的生物标志物<sup>[10]</sup>。Tsang 等<sup>[11-12]</sup> 利用 EROD 法检测了水体、沉积物、鱼肉和鸡蛋的二噁英类化合物污染水平。斑马鱼胚胎 EROD 酶活

性的检测方法有 2 种。一种是基于荧光分光光度计或多功能酶标仪的检测方法; 另外一种方法称为胚胎活 EROD 酶检测法, 利用荧光显微镜或激光共聚焦显微镜测定 resorufin 的荧光强度, 反映 EROD 酶活性大小<sup>[12]</sup>。Liu 等<sup>[2]</sup> 和 Tsang 等<sup>[12]</sup> 利用斑马鱼胚胎活体 EROD 酶检测法研究发现, 一定剂量的 DPCBs、TCDD 或 PAHs 能诱导斑马鱼胚胎 EROD 酶活性升高。本研究结果表明, DPCBs 提取物能诱导胚胎 EROD 酶活性升高, 通过荧光显微镜可观测到 resorufin 主要分布于斑马鱼胚胎的肠道、眼睛、卵黄囊和血管, 这与 Otte 利用激光共聚焦显微镜观测到的结果基本一致<sup>[13]</sup>。

Khim 等<sup>[5]</sup> 和 Koh 等<sup>[6]</sup> 用正己烷和丙酮 1:1 (V/V) 进行浸提, 再用佛罗里硅土柱层析法净化, 将沉积物中的 PCBs 与 PAHs、OCPs 和 PCDD/Fs 分离, 有效提高了仪器和生物学分析的特异性。本研究将沉积物用正己烷和丙酮 1:1 (V/V) 结合超声波进行提取和佛罗里土柱层析净化得到 DPCBs 提取物, 染毒斑马鱼

胚胎 96 h 后发现一定浓度的 DPCBs 提取物能使胚胎 EROD 酶活性增加,呈现明显的浓度-效应关系,这与 PCB126 对斑马鱼胚胎 EROD 酶活性的影响相类似<sup>[2]</sup>。由此说明,斑马鱼仔鱼 EROD 活性对 DPCBs 敏感,能有效指示沉积物 DPCBs 污染,胚胎活体 EROD 酶测定方法简单方便,具有一定的应用前景。

### 3.2 DPCBs 提取物上调斑马鱼仔鱼 *cyp1a* mRNA 表达量

生物体 *cyp1a* mRNA 的基底表达量很低,一定浓度的 DPCBs 可通过 AhR 途径使 *cyp1a* mRNA 表达量呈浓度依赖升高。因此 *cyp1a* 基因的表达量常用于指示 DPCBs 等二噁英类化合物污染的生物标志物<sup>[14-15]</sup>。本研究将斑马鱼胚胎暴露于 DPCBs 提取物中 96 h,发现 TS 采样点不同浓度的 DPCBs 提取物均能显著诱导 *cyp1a* mRNA 表达量升高( $P < 0.05$ ),JSW 采样点除最低浓度( $4.375 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ )外,其他浓度的 DPCBs 提取物均能显著诱导 *cyp1a* mRNA 表达量升高( $P < 0.05$ ),*cyp1a* mRNA 表达量的变化与 EROD 酶活性的变化一致,呈现浓度-效应关系。可见通过测定斑马鱼胚胎 *cyp1a* mRNA 表达量能反映沉积物 DPCBs 的污染水平<sup>[16]</sup>。

**通讯作者简介:**陈进军(1967-),男,动物毒理学博士,三级教授,主要研究方向为动物毒理学和环境健康,发表学术论文 80 余篇。

### 参考文献 (References):

- [1] Jartun M, Ottesen R T, Steinnes E, et al. Painted surfaces important sources of polychlorinated biphenyls (PCBs) contamination to the urban and marine environment [J]. *Environment Pollution*, 2009, 157(1): 295-302
- [2] Liu H, Nie F H, Lin H Y, et al. Developmental toxicity, EROD, and CYP1A mRNA expression in zebrafish embryos exposed to dioxin-like PCB126 [J]. *Environmental Toxicology*, 2014, 31(2): 201-210
- [3] Henner H, Steffen K, Natalie K, et al. A new sediment contact assay to assess particle-bound pollutants using zebrafish (*Danio rerio*) embryos [J]. *Journal of Soils and Sediments*, 2003, 3(3): 197-207
- [4] Hallare A V, Kosmehl T, Schulze T, et al. Assessing contamination levels of Laguna Lake sediments (Philippines) using a contact assay with zebrafish (*Danio rerio*) embryos [J]. *Science of the Total Environment*, 2005, 347(1-3): 254-271
- [5] Khim J S, Kannan K, Villeneuve D L, et al. Characterization and distribution of trace organic contaminants in sediment from Masan Bay, Korea: Instrumental analysis [J]. *Environmental Science and Technology*, 1999, 32(23): 4199-4205
- [6] Koh C H, Khim J S, Kannan K, et al. Polychlorinated dibenzo-*p*-dioxins (PCDDs), dibenzofurans (PCDFs), biphenyls (PCBs), and polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and 2, 3, 7, 8-TCDD equivalents (TEQs) in sediment from the Hyeongsan River, Korea [J]. *Environmental Pollution*, 2004, 132(3): 489-501
- [7] OECD. Guideline for the testing of chemicals: Draft proposal for a new guideline fish embryo toxicity (FET) test [S]. Paris, France: OECD, 2012
- [8] Jordsn S M, Weber L P. Persistent effects on adult swim performance and energetic in zebrafish developmentally exposed to 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin [J]. *Aquatic Toxicology*, 2012, 106-107(1): 131-139
- [9] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  method [J]. *Methods*, 2001, 25(4): 402-408
- [10] 黎雯, 徐盈, 吴文忠, 等. 鱼肝 EROD 酶活力诱导作为二噁英的水生态毒理学指标[J]. *水生生物学报*, 2000, 24(3): 201-207
- [11] Li W, Xu Y, Wu W Z, et al. Induction of EROD activity in fish liver as a bio-indicator dioxin-like compounds in aquatic system [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2000, 24(3): 201-207 (in Chinese)
- [12] Otte J C, Andersson C, Abrhamson A, et al. A bioassay approach to determine the dioxin-like activity in sediment extracts from the Danube River ethoxyresorufin-*O*-deethylase induction in gill filaments and liver of three-spined sticklebacks [J]. *Environment International*, 2008, 34(8): 1176-1184
- [13] Tsang H L, Wu S C, Wong C C, et al. Risk assessment of PCDD/Fs levels in human tissues related to major food items based on chemical analyses and micro-EROD assay [J]. *Environment International*, 2009, 35(7): 1040-1047
- [14] Jens C O, Annette D S, Hollert H, et al. Spatio-temporal development of CYP1 activity in early life-stages of zebrafish (*Danio rerio*) [J]. *Aquatic Toxicology*, 2010, 100(1): 38-50
- [15] Jönsson M E, Kubota A, Timme-Laragy A R, et al. AhR2-dependence of PCB126 effects on the swim bladder in relation to expression of CYP1 and cox-2 genes in developing zebrafish [J]. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 2012, 265(2): 166-174
- [16] An L H, Hu J Y, Yang M, et al. CYP1A mRNA expression in redeye mullets (*Liza haematocheila*) from Bohai Bay, China [J]. *Marine Pollution Bulletin*, 2011, 62(4): 718-725
- [17] Liu H, Nie F H, Lin H Y, et al. Developmental toxicity, oxidative stress, and related gene expression induced by dioxin-like PCB 126 in zebrafish (*Danio rerio*) [J]. *Environmental Toxicology*, 2014, 31(3): 295-303