

tail moment means the product of the distance between the center of gravity of the head and the center of gravity of the tail and percent tail DNA), were used to evaluate the DNA damage of the *Eriocheir sinensis* sperms which were treated by $5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ CdCl}_2$. The result showed that the four parameters all increased remarkably and the sperm DNA was seriously damaged by CdCl_2 . After that the protective effects of 3 kinds of antioxidants on CdCl_2 -induced DNA damage were investigated. The contents of V_C were $400 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, $3 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ and $5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$; that of V_E were $50 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, $200 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ and $400 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$; and that of Zn were $400 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, $2 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ and $4 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, respectively. The result showed that all these three antioxidants can protect *Eriocheir sinensis* sperm DNA from oxidizing. The bigger the content of V_E and Zn, the stronger the protective effect was. When the content of V_C was $3 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, the protective effect was the best and the ratio of cell drag was comparatively low. But when the content of that was $5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, the ratio of cell drag increased and the DNA damage became more serious. So it was concluded that the content of V_C which could protect the sperm DNA from damaging was limited. Whereas the protective effect of V_E and Zn had no limit of the content. Furthermore, by contrast to V_C and Zn, V_E appeared better protective effects with concentration of $400 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$. Vitamin E and Zn possessed antagonism to CdCl_2 -induced DNA damage but vitamin C possessed dual nature. Vitamin E was a sort of perfect antioxidants in antagonism to CdCl_2 -induced DNA damage. In addition, CASP is a good software to analyse comet image externally better than other analysis methods such as routine method. This research can provide methods for the research of *Eriocheir sinensis* feed additive, species protection, and sperm quality assessment.

Key words: V_C ; V_E ; ZnSO_4 ; CdCl_2 ; comet assay; DNA damage; single cell gel electrophoresis

镉是一种常见的有毒重金属,随着工农业的迅猛发展,环境中金属镉的排放量越来越多,其进入水环境中会引起水生生物的急性或慢性中毒,造成畸变甚至死亡^[1]。为此,美国毒物管理委员会(ATSDR)已将其列为第6位危及人体健康的有毒物质,其毒理学研究也备受国内外学者的关注^[2]。研究发现,镉的毒性与细胞脂质过氧化反应(lipid peroxidation, LPO)密切相关^[3],镉离子(Cd^{2+})可诱发细胞内脂质过氧化物的生成^[4],可通过增强膜LPO和改变细胞内的抗氧化系统从而在不同的组织中诱导氧化损伤^[5],并能引起细胞DNA链的断裂^[6],而这种DNA的损伤可能与其诱导的氧化损伤密切相关^[7]。因此,抗氧化保护剂在一定程度上可缓解甚至解除该类金属的毒性^[8-9]。

精子是一类高度特化的细胞,其质量的优劣直接影响该类动物的繁殖成功率及子代的品质,而在众多的精子质量评价指标中,精子DNA的完整性则是其中的一个关键性指标。然而,随着外环境污染以及养殖水体自身污染的日益加重,水产动物配子的质量亦受到威胁,如何通过营养强化的方式,有效提高精子的抗氧化能力,从而保

证精子的质量,对维持养殖动物良好的遗传性状具有重要的意义。本文以氯化镉作为DNA损伤诱导剂,采用单细胞凝胶电泳技术作为DNA损伤的评价方法,探讨了维生素C、维生素E和硫酸锌对氯化镉所致中华绒螯蟹(河蟹)精子DNA损伤的保护作用,为河蟹雄性生殖营养强化、精子质量提高提供理论参考。

1 材料与方法

1.1 试剂及仪器

常温熔点琼脂糖(NMP)和低熔点琼脂糖(LMP)(Promega公司),二甲基亚砜、十二烷基肌氨酸钠和溴化乙锭(EB)(Sigma公司),TritonX-100为Merck分装,氯化镉(上海试剂二厂),单面磨砂载玻片(上海鼎国生物公司),PowerPac 300型电泳仪(BIO-RAD),DYCP-31D型水平电泳槽(北京六一),Olympus BX51荧光显微镜等。

1.2 实验材料

实验用蟹于2005年12月购于上海长风集贸市场,活体解剖取出输精管并刺破贮精囊壁挤出精荚,置无钙人工海水(Ca^{2+} -FASW,盐度20)中

复洗 3 次,0.25% 胰酶处理 5 min^[10],离心获游离精子以备。

1.3 实验处理

将上述新鲜精子用 Ca^{2+} -FASW 调节浓度至 $(0.3 \sim 0.6) \times 10^{10} \text{ cell} \cdot \text{L}^{-1}$ 的精子悬液,伊红染色法检测精子存活率,其存活率在 95% 以上。

取 90 μL 精子悬液与 10 μL 用 Ca^{2+} -FASW 配制的氯化镉相混合,使氯化镉终浓度达到 $5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$,该处理作为镉处理对照组;同时以 90 μL 精子悬液与 10 μL Ca^{2+} -FASW 混合作为空白对照组。

取精子悬液分别添加 V_C 、 V_E 和 $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 3 种抗氧化剂,每种抗氧化剂分设 4 个浓度梯度^[11]。其中 V_C 的终浓度分别为:400 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ (实验 1 组),1 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ (实验 2 组),3 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ (实验 3 组)和 5 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ (实验 4 组); V_E 的终浓度分别为:50 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ (实验 A 组),100 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ (实验 B 组),200 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ (实验 C 组)和 400 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ (实验 D 组); $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 的终浓度分别为:400 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ (实验 I 组),1 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ (实验 II 组),2 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ (实验 III 组)和 4 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ (实验 IV 组)。之后,取上述添加了抗氧化剂的精子悬液,再分别添加氯化镉,使氯化镉的终浓度达到 $5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$,而精子密度约为 $2.5 \times 10^6 \text{ cell} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

所有对照组和实验组均在 37 $^\circ\text{C}$ 水浴中孵化 1 h,3 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min,弃上清,沉淀用 Ca^{2+} -FASW 洗涤 3 次,加 90 μL Ca^{2+} -FASW 复溶后测定其 DNA 损伤程度。各实验组分别重复 3 次。

1.4 单细胞凝胶电泳

按 Singh 等^[12]方法略加改进。用 Ca^{2+} -FASW 配制 0.5% 常温熔点琼脂糖(NMP)溶液,加热融化后,冷却至 45 $^\circ\text{C}$,取 100 μL 滴于洁净的载玻片上,立即盖上盖玻片,使琼脂糖均匀地敷在载玻片上,迅速置入 4 $^\circ\text{C}$ 10 min,待琼脂糖冷却变硬,形成第 1 层胶;分别取 10 μL 各处理组精子悬液与 75 μL 0.5% 的低熔点琼脂糖(LMP)溶液在 37 $^\circ\text{C}$ 下充分混匀,制成精子-低熔点琼脂糖悬液,取下第 1 层胶的盖玻片,迅速将该悬液滴于第 1 层琼脂糖表面,加盖玻片,4 $^\circ\text{C}$ 10 min 使之硬化,形成第 2 层胶;随后,再次取下盖玻片,滴加 75 μL 0.5% LMA,加盖玻片,4 $^\circ\text{C}$ 10 min 冷却硬

化,形成第 3 层胶。

取下盖玻片,将含有 3 层胶的玻璃片立即浸入预冷的裂解液($2.5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ NaCl}$, $100 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ Na}_2\text{-EDTA}$, $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ Tris}$,调节 pH 至 10 后加入 1% 肌氨酸钠,使用前加 1% TritonX-100 和 10% DMSO)中,4 $^\circ\text{C}$ 静置 1 h,使细胞充分裂解并使 DNA 松散。取出玻片,吸去表面液体,将上述处理过的玻片并列放置在水平电泳槽的阳极,加入预冷的电泳液($1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ Na}_2\text{-EDTA}$, $300 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ NaOH}$, $\text{pH} > 13$),液面高出玻片 2.5 mm,静置 30 min,以使 DNA 充分解旋。之后,4 $^\circ\text{C}$ 、25 V、300 mA 电泳 20~30 min。

取出玻片并吸干水分,置于 $0.4 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、pH 7.5 的 Tris 溶液中洗 3 次,每次约 5 min。随后分别加入 25 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 EB 各 50 μL ,盖上盖玻片,染色 15~20 min。

1.5 观察和分析

用 Olympus BX51 荧光显微镜在绿光 400 倍激发下观察,拍照获取彗星图像后,用 CASP 软件^[13]分析测量 DNA 迁移的各种参数^[14]:彗星拖尾长度(L tail)、彗星尾部 DNA 的相对含量(Tail DNA)、尾动量(TM,即 L tail \times Tail DNA)、Olive 尾动量(OTM,即 Tail DNA \times 迁移 DNA 中心密度),见图 1。

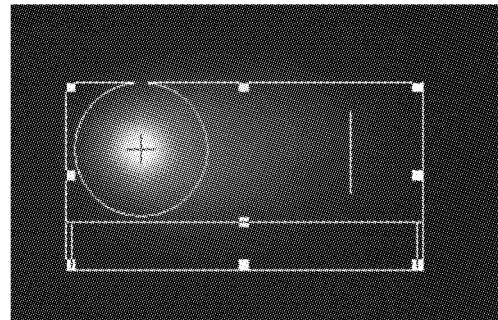


图 1 CASP 软件分析彗星图像的示意图

Fig. 1 Sketch map of comet image analyzed by CASP software

2 结果

2.1 镉对河蟹精子的损伤作用

从空白对照组的彗星图像(图 2-a)可以看出,在电场中河蟹精子核 DNA 几乎不泳动,染色后呈圆形的荧光团,无拖尾现象,表明其 DNA 未受损伤;而镉处理对照组经 $5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ CdCl}_2$

处理 1 h 后河蟹精子 DNA 出现较长的彗星状拖尾现象(图 2-b),经 CASP 软件分析,表征 DNA 伤害程度的 4 个参数(L tail, Tail DNA, TM,

OTM)值都大大超过空白处理组(表 1),表明 DNA 已经受到严重损伤。

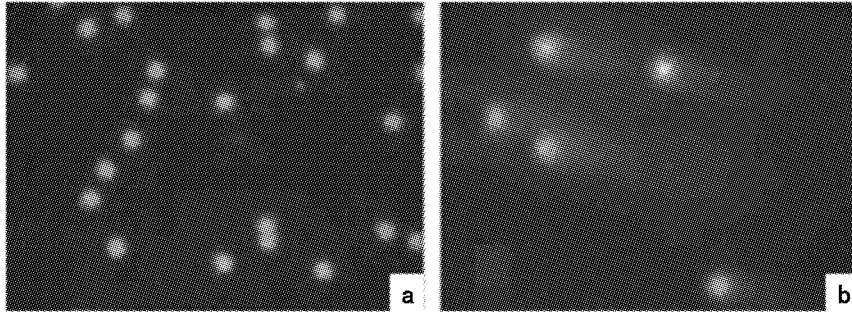


图 2 河蟹精子 DNA 损伤的彗星图像

Fig. 2 Comet image of *Eriocheir sinensis* sperm DNA

a. 空白对照; b. $5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ CdCl}_2$ 处理

a. control; b. $5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ CdCl}_2$

表 1 不同剂量 V_C 作用于河蟹精子 DNA 彗星实验影响

Tab. 1 Comet assay effects of different doses V_C on *Eriocheir sinensis* sperm DNA mean \pm SE

实验组 group	L tail	Tail DNA	TM	OTM
空白对照组 control	4.40 ± 0.86	0.68 ± 0.26	0.05 ± 0.26	0.23 ± 0.09
镉处理对照组 control of CdCl_2 -induced	133.2 ± 18.57	22.12 ± 2.82	33.84 ± 8.70	19.56 ± 3.94
实验 1 组 group 1	81.20 ± 10.13	14.27 ± 1.69	13.05 ± 3.31	10.47 ± 1.89
实验 2 组 group 2	78.00 ± 18.90	14.12 ± 3.22	13.41 ± 5.15	10.44 ± 3.58
实验 3 组 group 3	24.40 ± 6.82	5.18 ± 1.51	2.15 ± 0.80	3.02 ± 1.04
实验 4 组 group 4	99.00 ± 14.55	7.46 ± 1.70	19.29 ± 4.47	12.28 ± 1.80

2.2 不同剂量 V_C 对河蟹精子 DNA 的保护作用

V_C 处理组的实验结果见表 1。随着 V_C 添加量的增加,表征 DNA 损伤的各个参数值均逐渐下降,其中以实验 3 组的保护效果最显著,各参数值均降至最低,其 OTM 值仅为 3.02,较镉处理对照组下降了 84.6%,其彗星图像见图 3-a;然而,随着 V_C 浓度的继续提高,实验 4 组的各参数值又出现大幅回升,其中 OTM 值上升至 12.28,较实

验 3 组增加了 306.6%,损伤程度明显增加。

2.3 不同剂量 V_E 对河蟹精子 DNA 的保护作用

V_E 处理组的实验结果见表 2。随着 V_E 添加量的增加,表征 DNA 损伤的各个参数值均呈现逐渐下降的趋势,其中 OTM 值从实验 A 组的 18.25 降低至实验 D 组的 1.86,与镉处理对照组相比,实验 A 组降幅为 6.7%,实验 D 组的降幅则达到了 90.5%。实验 D 组的彗星图像见图 3-b。

表 2 不同剂量 V_E 作用于河蟹精子 DNA 彗星实验影响

Tab. 2 Comet assay effects of different doses V_E on *Eriocheir sinensis* sperm DNA mean \pm SE

实验组 group	L tail	Tail DNA	TM	OTM
空白对照组 control	4.40 ± 0.86	0.68 ± 0.26	0.05 ± 0.26	0.23 ± 0.09
镉处理对照组 control of CdCl_2 -induced	133.2 ± 18.57	22.12 ± 2.82	33.84 ± 8.70	19.56 ± 3.94
实验 A 组 group A	131.0 ± 19.03	20.59 ± 2.31	32.27 ± 7.74	18.25 ± 2.96
实验 B 组 group B	124.80 ± 11.70	21.17 ± 2.25	28.36 ± 4.68	18.32 ± 3.28
实验 C 组 group C	68.00 ± 12.19	14.97 ± 1.98	12.16 ± 3.00	8.92 ± 2.07
实验 D 组 group D	13.00 ± 2.47	2.00 ± 1.52	1.05 ± 0.89	1.86 ± 0.33

2.4 不同剂量 Zn^{2+} 对河蟹精子 DNA 的保护作用
 锌处理组的实验结果见表 3。锌处理组的结果与 V_E 相似,随着锌添加量的增加,各参数值亦呈现明显下降趋势,其中 OTM 值从实验 I 组的

17.05,下降至实验 IV 组的 3.36,分别较镉处理对照组下降了 12.8% 和 82.8%,实验 IV 组的彗星图像见图 3-c。

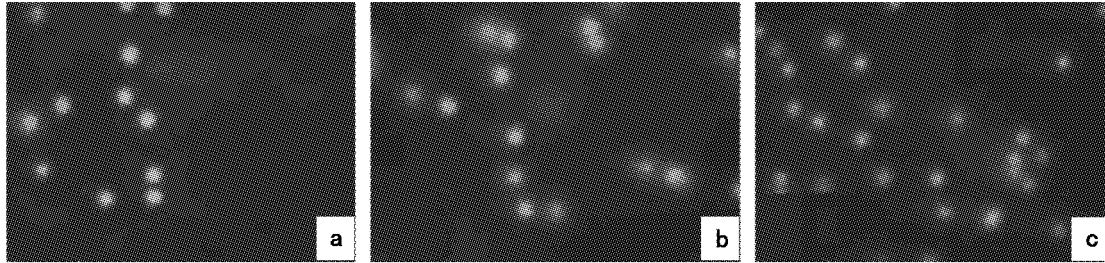


图 3 三种抗氧化剂对河蟹精子 DNA 影响的彗星图像

Fig. 3 Comet image of 3 antioxidants effect on sperm DNA

a. $3 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} V_C$; b. $400 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} V_E$; c. $4 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1} \text{Zn}$

表 3 不同剂量 Zn 作用于河蟹精子 DNA 彗星实验影响

Tab. 3 Comet assay effects of different doses Zn on *Eriocheir sinensis* sperm DNA mean \pm SE

实验组 group	L tail	Tail DNA	TM	OTM
空白对照组 control	4.40 \pm 0.86	0.68 \pm 0.26	0.05 \pm 0.26	0.23 \pm 0.09
镉处理对照组 control of CdCl ₂ -induced	133.2 \pm 18.57	22.12 \pm 2.82	33.84 \pm 8.70	19.56 \pm 3.94
实验 I 组 group I	129.60 \pm 19.90	20.73 \pm 3.04	31.33 \pm 13.38	17.05 \pm 6.62
实验 II 组 group II	124.70 \pm 17.91	18.11 \pm 3.72	27.52 \pm 9.80	15.11 \pm 7.13
实验 III 组 group III	88.40 \pm 12.98	14.79 \pm 2.65	16.10 \pm 4.42	11.78 \pm 2.84
实验 IV 组 group IV	15.10 \pm 1.55	5.03 \pm 0.72	4.13 \pm 0.09	3.36 \pm 0.27

3 讨论

3.1 V_C 对河蟹精子 DNA 的保护作用

维生素可以清除正常细胞活动或应激过程中产生的有害自由基。有报道显示, V_C 可以通过对生物体内的超氧化物、羟自由基、过氧化氢、过氧自由基和单线态氧的有效清除,来增强水生动物对环境污染物和刺激物的耐受力^[15]。 V_C 作为抗氧化剂在恢复由紫外线引起的各类细胞损伤中也有相关报道^[16-17]。然而,在某种条件下 V_C 还具有一定的促氧化剂作用^[18], Guo 等^[19] 研究发现, V_C 的抗氧化或促氧化作用的转换完全取决于 V_C 的浓度。本研究发现,在低剂量情况下,随着 V_C 剂量的增加,其抗氧化保护作用不断增强,当达到 $3 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的浓度时,其保护效果最佳,而超过此添加量时 ($5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$), V_C 的抗氧化保护效果显著下降,表现出一定的促氧化作用,这一结果与 Guo 等^[19] 的结果吻合,其原因可能与高浓度

V_C 促进邻苯二酚和氢醌的循环氧化还原作用,进而产生大量的活性氧中间物,致使 DNA 受到损伤有关^[20]。

3.2 V_E 对河蟹精子 DNA 的保护作用

V_E 和 V_C 一样,均是体内抗氧化系统的组成成分,可以淬灭多种脂自由基,降低由 H_2O_2 引起的 DNA 或染色体损伤^[21-22]。 V_E 除了具有阻止自由基形成的作用外,还可抑制由细胞内氧化应激诱发的核酸内切酶的激活,并通过提高损伤 DNA 的清除率而增强损伤 DNA 的修复能力^[23];能抑制金属铬离子诱导的中国仓鼠肺细胞 V79 DNA 链的断裂和染色体畸变^[24],而其机理可能与 V_E 减少金属离子铬与 DNA 加合物的形成有关;能对紫外线诱发的 DNA 损伤起很好的保护作用,并呈现剂量 - 保护效应关系^[16]。

在水产动物研究领域,有关 V_E 作为饲料添加剂的研究已有大量报道^[25-28]。研究证实,饲料中添加 V_E 可预防饵料和虾蟹类体组织中多种不

饱和脂肪酸的氧化,降低组织对氧的消耗,提高虾蟹类的存活率和生长率^[25]。然而, V_E 为脂溶性维生素,在离体培养的相关研究中,通常采用助溶剂^[29-30] (如 DMSO 和乙醇)或极微量添加的方式^[31-34] 以确保 V_E 在细胞培养液中一定的溶解度和浓度。本研究采用后一种添加方式研究 V_E 对镉离子所致河蟹精子 DNA 损伤的保护作用,结果发现,随着 V_E 添加量的增加,其保护作用增强,且两者间同样存在明显的剂量-保护效应关系,表明 V_E 具有较好的抗氧化活性,对河蟹精子 DNA 具有较好的保护作用。

3.3 Zn^{2+} 对河蟹精子 DNA 的保护作用

锌是超氧化物歧化酶的重要成分之一,可与某些抗氧化剂螯合,控制过氧化作用^[35], 缺锌可以导致细胞清除自由基的能力下降,脂质过氧化作用增强^[36]。有报道显示,锌对镉中毒表现出良好的保护效应^[37]。姜声扬等^[2] 在锌对小鼠睾丸细胞 DNA 损伤保护作用的研究中发现,锌对小鼠镉中毒所致睾丸组织损伤具有一定保护作用,但与保护和降低小鼠睾丸细胞 DNA 损伤无关。然而,本研究发现,随着 Zn^{2+} 浓度的增加,河蟹精子 DNA 损伤程度降低,其尾长、TM、OTM 等逐渐降低,呈现出明显的剂量效应关系。当 Zn^{2+} 的浓度达到 $4 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时,各参数均降到最低。因此,可以认为 Zn^{2+} 对河蟹精子 DNA 的损伤具有较好的保护效应。

综上所述,3 种抗氧化剂对河蟹精子 DNA 均具有较好的保护效果,但不同的保护剂其保护效果不尽相同,其中 V_C 的添加存在剂量限制,过量添加反而会影响到其保护效果。此外,与空白对照组相比,添加抗氧化剂的实验组仍然存在不同程度的损伤,故仍有必要深入研究多种抗氧化剂组合对精子 DNA 的保护作用,以突破单一抗氧化剂的局限性,达到最佳的保护效果。

参考文献:

- [1] Coogan T P, Bare R M, Waalkes M P. Cadmium-induced DNA strand damage in cultured liver cells: reduction in toxicol [J]. *Appl Pharmacol*, 1992, 113: 227-233.
- [2] 姜声扬,庄 勋,朱晓蓉. 镉对小鼠睾丸细胞 DNA 损伤及锌保护作用研究 [J]. *中国公共卫生*, 2003, 19(12): 1450-1452.
- [3] Stohs S, Bagchi D. Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions [J]. *Free Radical Biol Med*, 1995, 18: 321-336.
- [4] Yang C F, Shen H M, Shen Y, et al. Cadmium-induced oxidative cellular damage in human fetal lung fibroblasts (MRC-5 cells) [J]. *Environmental Health Perspectives*, 1997, (105): 712-716.
- [5] 洪 峰,金 泰. 镉与氧化损伤研究进展 [J]. *国外医学医学地理分册*, 2002, 23(3): 97-103.
- [6] 余日安. 镉与 DNA 损伤、癌基因表达、细胞凋亡 [J]. *国外医学卫生学分册*, 2000, 27(6): 359-363.
- [7] 邓红玉. 水产动物的维生素 C 的营养 [J]. *粮食与饲料工业*, 1998, 6: 26-28.
- [8] Jeffrey M P, John R D, Lynn M W, et al. Influence of antioxidants on cadmium toxicity of mouse preimplantation embryos *in vitro* [J]. *Toxicology*, 1995, 99: 11-18.
- [9] Zahir A S, Thanhtam T V, Khalequz Z. Oxidative stress as a mechanism of chronic cadmium-induced hepatotoxicity and renal toxicity and protection by antioxidants [J]. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 1999, 154: 256-263.
- [10] 马 强,王 群,李 恺,等. 胰蛋白酶消化法和机械匀浆法获得河蟹 (*Eriocheir sinensis*) 游离精子的比较研究 [J]. *华东师范大学学报(自然科学版)*, 2006, 2: 82-87.
- [11] 李 晶,刘 扬,孙 炜,等. 抗氧化剂对紫外线诱发 DNA 损伤的保护作用 [J]. *中国公共卫生*, 2004, 20(2): 177-179.
- [12] Singh N P, McCoy M T, Tice R R, et al. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cell [J]. *Exp Cell Res*, 1988, 175(2): 184-191.
- [13] Konca K, Lankoff A, Banasik A, et al. A cross platform public domain PC image analysis program for the comet assay [J]. *Mutat Res*, 2003, 534: 15-20.
- [14] Lin A J, Zhang X H, Zhu Y G. The comet assay detects Cd-induced DNA damages in wheat leaves [J]. *Acta Scientiae Circumstantiae*, 2005, 25(3): 329-333.
- [15] 方允中,李文杰. 自由基与酶基础理论及其在生物学和医学上的应用 [M]. 北京: 科学出版社, 1989: 129-146.
- [16] 周殿凤,柯惟中,籍 康,等. 维生素 C 对紫外线诱发 DNA 损伤的保护作用 [J]. *光学学报*, 2005, 25(5): 643-646.
- [17] 于 芳. 维生素 E、维生素 C 与基因的稳定性 [J].

- 国外医学卫生学分册,2002,2(3):141-145.
- [18] Lutsenko E A, Carcamo J M, Golde D W. Vitamin C prevents DNA mutation induced by oxidative stress [J]. *J Biol Chem*, 2002, 277(19):16895-16899.
- [19] Guo B, Yuan Y, Wu Y, *et al.* Assay and analysis for anti-and pro-oxidative effects of ascorbic acid on DNA with the bulk acoustic wave impedance technique [J]. *Anal Biochem*, 2002, 305(2):139-148.
- [20] Yang Q, Hergenbahn M, Weninger A, *et al.* Cigarette smoke induces direct DNA damage in the human B-lymphoid cell line Raji [J]. *Carcinogenesis*, 1999, 20(9):1769-1775.
- [21] 张艳淑,王广增,姚林,等.3种抗氧化剂对染尘大鼠DNA链断裂的影响[J]. *卫生毒理学杂志*, 2001, 15(2):84-85.
- [22] Factor V M, Laskowska D, Jensen M R, *et al.* Vitamin E reduces chromosomal damage and inhibits hepatic tumor formation in a transgenic mouse model [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 97(5):2196-2201.
- [23] 张明,陈学存,马爱国.维生素E对DNA稳定的影响[J]. *中华临床营养杂志*, 2003, 11(4):291-294.
- [24] Sugiyama M, Lin X H, Costa M. Protective effect of vitamin E against chromosomal aberrations and mutation induced by sodium chromate in Chinese hamster V79 cells [J]. *Mutat Res*, 1991, 260(1):19-23.
- [25] 刘晓玲,周忠良,陈立侨,等.维生素C、E对镉致毒后中华绒螯蟹抗氧化系统酶活性的影响[J]. *海洋科学*, 2006, 30(1):39-43.
- [26] 罗文,王群,赵云龙,等.维生素E对红螯螯虾繁殖性能的影响[J]. *海洋与湖沼*, 2005, 36(4):335-342.
- [27] 周歧存,麦康森,谭北平,等.维生素E对皱纹盘鲍幼鲍生长、存活及体成分的影响[J]. *海洋与湖沼*, 2001, 32(2):125-131.
- [28] 金明昌,汪开毓.水产动物的维生素E营养研究进展[J]. *淡水渔业*, 2006, 36(4):59-61.
- [29] Viviane A N, Andrezza J G, Ilana C S, *et al.* Vitamin E prevents cell death induced by mild oxidative stress in chicken skeletal muscle cells [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C* 2005;141:225-240.
- [30] Palf M W M, Gerard M J. Beijersbergen van Henegouwen. Topical antioxidant vitamin C and E prevent UVB-radiation-induced peroxidation of eicosapentaenoic acid in pig skin [J]. *Radiation Research* 2002;157:402-409.
- [31] Zhang J, Slevin M, Duraisamy Y, *et al.* Comparison of protective effects of aspirin, D-penicillamine and vitamin E against high glucose-mediated toxicity in cultured endothelial cells [J]. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2006, 1762:551-557.
- [32] Gehin A, Guillaume Y C, Millet J, *et al.* Vitamins C and E reverse effect of herbicide-induced toxicity on human epidermal cells HaCaT: a biochemometric approach [J]. *International Journal of Pharmaceutics*, 2005, 288:219-226.
- [33] 唐学玺,李永祺.抗氧化剂对扁藻久效磷毒害的抑制效应[J]. *环境科学*, 2000, 21(1):87-89.
- [34] 杨家新.维生素E对萼花臂尾轮虫繁殖的影响[J]. *生态学报*, 2004, 24(8):1664-1671.
- [35] 李连姬,韩春姬,催山田,等.锌硒对铅致小鼠学习记忆功能障碍及脑脂质过氧化的保护作用[J]. *微量元素与健康研究*, 1998, 15(3):8-9.
- [36] Jacinda B S, Joseph S B. Hydrogen peroxide damages the zinc-binding site of zinc-deficient Cu, Zn superoxide dismutase [J]. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 2001, 392(1):8-13.
- [37] Peraza M A, Ayala-Fierro F, Barber D S, *et al.* Effects of micronutrients on metal toxicity [J]. *Environmental Health Perspectives*, 1998, 106 (Suppl)1:203-216.