第 29卷第 11期
2009年 11月

环 境 科 学 学 报
Acta Scientiae Circumstantiae

Vol 29, No. 11
Nov., 2009

武阳,常青,杨旭. 2009. 不同浓度甲醛致大鼠肝细胞 DNA氧化损伤作用 [J]. 环境科学学报, 29(11): 2415 - 2419
Wu Y, Chang Q, Yang X. 2009. Oxidative DNA damage in rat liver cells induced by formaldehyde at different concentrations [J]. Acta Scientiae Circumstantiae, 29(11): 2415 - 2419

不同浓度甲醛致大鼠肝细胞 DNA氧化损伤作用

武阳,常青,杨旭*

华中师范大学生命科学学院环境实验室与湖北省遗传调控和整合生物学实验室,武汉 430079

收稿日期: 2009-04-01　　修回日期: 2009-05-08　　录用日期: 2009-09-07

摘要:为了探讨外源性化合物暴露致内脏细胞 DNA氧化损伤程度的定量检测方法,尝试以 8羟基脱氧鸟苷 (8-hydroxy-2′-deoxyguanosine, 8-OHdG)为分子生物标志物,以甲醛为模式外源性化合物,以丙二醛 (malondialdehyde, MDA)为参考指标,应用大鼠肝细胞悬液进行体外染毒实验研究. 同时,实验设置甲醛染毒的终浓度分别为 0、5、15、45μmol·L^{-1},在大鼠肝细胞悬液染毒 1h后,分别测量了肝细胞悬液中的 8-羟基脱氧鸟苷 (8-OHdG)和丙二醛 (MDA)含量. 研究结果显示,随着甲醛浓度升高,大鼠肝细胞中 8-OHdG和 MDA含量均呈升高趋势 ($F = 59.55$, $p < 0.01$; $F = 75.82$, $p < 0.01$),高浓度组 (45μmol·L^{-1}) 8-OHdG和 MDA含量与对照组的差异均具有显著性 ($p < 0.01$),中浓度组 (15μmol·L^{-1})的这种差别也具有显著性 ($p < 0.05$, $p < 0.01$),低浓度组 (5μmol·L^{-1})的这种差异没有显著性 ($p > 0.05$). 因此,8-OHdG不但可以用于血液和尿液样品的检测,而且采用本项研究摸索出的前处理方法可以很好地定量测定内脏细胞 DNA氧化损伤的程度.

关键词: 8羟基脱氧鸟苷; DNA氧化损伤; 大鼠肝细胞悬液; 甲醛

文章编号: 0253-2468(2009)11-2415-05　　**中图分类号**: X171.5　　**文献标识码**: A

Oxidative DNA damage in rat liver cells induced by formaldehyde at different concentrations

WU Yang, CHANG Qing, YANG Xu*

Laboratory of Environmental Sciences and Hubei Key Laboratory of Genetic Regulation and Integrative Biology, College of Life Sciences, Huazhong Normal University, Wuhan 430079

Received 1 April 2009;　　**received** in revised form 8 May 2009;　　**accepted** 7 September 2009

Abstract: We developed a quantitative detection method that can reflect the degree of visceral cell oxidative DNA damage induced by exogenous compound exposures using 8-OHdG as a molecular biomarker in vitro. In this study formaldehyde was used as a model toxic compound and malondialdehyde (MDA) was used as a reference indicator. Rat liver cells were exposed to different concentrations of formaldehyde (0, 5, 15, 45 μmol·L^{-1}) for 1 h, and then the contents of 8-OHdG and MDA were measured. Both 8-OHdG and MDA increased gradually with the increase of formaldehyde concentration ($F = 59.55$, $p < 0.01$; $F = 75.82$, $p < 0.01$). At high formaldehyde levels (45μmol·L^{-1}) the 8-OHdG and MDA contents were extremely significantly different when compared with the control group ($p < 0.01$), at intermediate formaldehyde levels (15μmol·L^{-1}) their differences were significant ($p < 0.01$, $p < 0.05$), and at the low level (5μmol·L^{-1}) there was no significant difference ($p > 0.05$). We conclude that 8-OHdG can be used not only for blood and urine sample testing, but also as a good biomarker oxidative DNA damage, in visceral cells.

Keywords: 8-OHdG; oxidative DNA damage; rat liver cell; formaldehyde

1 引言 (Introduction)

外源性化合物暴露所致机体内脏细胞氧化损伤的定量检测是环境毒理学要经常研究的一个问题. 国内实验室一般采用丙二醛 (malondialdehyde, MDA)含量和 DNA断裂 (单细胞凝胶电泳实验)作为生物标志物对其进行测量. MDA反映的是脂质的过氧化作用,不能准确反映外源性化合物对遗传物质 DNA的损伤;而 DNA断裂虽然可以反映 DNA的氧化损伤,但实验结果不稳定,数据的重现性效果差,同时还受到 DNA-DNA交联和 DNA蛋白质交联的影响. 为了探讨更好地反映外源性化合物暴露致

基金项目: 国家科技部卫生部科技支撑计划项目 (No. 2006BAI19B05, 2006BAJ02A10)
Supported by the China Key Technologies R&D Program (No. 2006BAI19B05, 2006BAJ02A10)
作者简介: 武阳 (1983—),男, E-mail: wysj2007@yahoo.com.cn; *通讯作者 (责任作者), E-mail: yangxu@mail.ccnu.edu.cn
Biography: WU Yang (1983—), male, E-mail: wysj2007@yahoo.com.cn; * **Corresponding author**, E-mail: yangxu@mail.ccnu.edu.cn

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

内脏器官细胞氧化损伤程度的定量检测方法,本实验室以 8-OHdG为分子生物标志物进行研究.

甲醛 (formaldehyde, FA)是一种无色、强嗅、氧化力强的刺激性气体,是人们日常生活中经常接触的室内污染物. 甲醛污染对人健康影响具有范围广、水平高、持续时间长、毒性大等特点 (Yang *et al*, 2004). 因此,居室低剂量甲醛长时间污染的潜在危害,已成为倍受公众关注的社会问题之一. 同时,甲醛可导致呼吸道和眼部刺激作用、致敏作用、免疫毒性和各组织器官氧化损伤 (WHO, 2002). 研究已证实,甲醛具有遗传毒性和致突变性,可作为氧化剂对 DNA 分子直接氧化,形成 8-OHdG,直接引起 DNA 点突变 (Conaway *et al*, 1996),进而导致碱基分子间的环化和交联,使染色体 DNA 不能进行正常复制与转录. 因此,本实验选取甲醛为模式外源性化合物.

以往对 8-OHdG的研究大多集中在血液和尿液样品方面 (Tokujiro *et al*, 2009; Chi *et al*, 2008),而对内脏样品的研究却甚少. 由于 8-OHdG的生成被认为是由于过量活性氧自由基 (ROS)与 DNA 分子反应所致 (Simon *et al*, 2008),而过量 ROS同时还可加速脂质过氧化过程并产生大量 MDA,而 MDA 是机体在清除自由基过程中发生脂质过氧化的最终产物,也是一种反映机体细胞氧化损伤程度的指标. 因此,本研究采用液态甲醛体外染毒方法,以大鼠肝细胞为实验材料,对 8-OHdG所致 DNA 氧化损伤及其剂量 效应关系进行研究,同时分析 MDA 含量的变化. 以期探讨更好的能反映内脏细胞氧化损伤的定量检测方法,并验证 8-OHdG作为氧化损伤分子生物标志物的效果.

2 材料和方法 (Materials and methods)

2.1 实验材料

实验动物:纯系 Wistar雄性大鼠购自湖北省预防医学院实验动物中心,体重为 150～170g

2.2 试剂与仪器

主要试剂: 10%甲醛 (*v*/*v*)溶液 (Sigma); 8-OHdG免疫酶联吸附反应检测试剂盒 (美国 RD);牛血清白蛋白 (Amresco); 0.004g·mL^{-1}苔盼蓝溶液,其他试剂均为国产分析纯.

主要仪器: 低温冷冻离心机 (Eppendorf-5415R);酶标仪 (bio-tek);三用电热恒温水箱 (北京市长源实验仪器厂).

2.3 实验方法

2.3.1 大鼠肝细胞悬液的制备及染毒方案 肝细胞悬液制备参照徐钱等 (Xu *et al*, 2007)的方法. 将大鼠脱颈致死后,迅速取出肝脏,在冰冷生理盐水中漂洗,以除去肝脏表面血迹,用眼科剪剪成糜状,洗净剪刀器皿,2层擦镜纸过滤,收集细胞滤液并在 1400r·min^{-1}下离心 5min,取上清液,并调整细胞密度至 10^7个·mL^{-1}左右. 将得到的细胞悬液均匀分装到 4个离心管中,并分别加不同浓度的甲醛溶液,使甲醛的最终浓度分别为 0、5、15、45μmol·L^{-1};然后将 4组离心管放入 37 ℃水浴中,染毒 1 h. 设计每个染毒组分别做 5个样品. 在此试验过程中要注意: ①漂洗过程要反复进行,尽量将表面血迹除净,必要时可用擦镜纸包裹肝脏轻微挤压以除去肝脏内部血细胞,以排除计数过程中血细胞的干扰; ②剪碎肝脏过程要在冰上进行,剪成糜状组织块体积大约在 1mm^{3}左右; ③离心速度不宜太大,时间不宜过长,以防止在过大离心力下导致肝细胞破裂; ④细胞计数量最好接近 10^7个·mL^{-1},以满足最佳实验要求; ⑤水浴染毒的温度、时间要尽量严格控制,以保证良好充分的染毒效果; ⑥保证各实验组甲醛浓度的精确性.

2.3.2 离体细胞存活率检测 用苔盼蓝排斥法检测离体细胞活力,细胞存活率数据为 93.200% ± 0.886% (n = 5).

2.3.3 检测指标的测定方法 8-OHdG含量的测定严格按照试剂盒操作说明进行. 以 8-OHdG含量为横坐标, 450nm 处 OD 值为纵坐标,做 1套 0～400mg·L^{-1}的标准曲线,每个浓度做 2个平行样,得到标准曲线如图 1所示. 根据标准曲线来确定样品中 8-OHdG的含量. MDA 含量采用硫代巴比妥酸法检测 (Bai, 1998),蛋白含量使用 Folin酚法测定 (Zhou *et al*, 2003).

2.4 统计学分析

实验测得数据用 SPSS13.0软件的单因素方差分析软件包进行各实验组间数据差异显著性检验,并用 LSD检验软件包进行组间两两比较.

3 结果 (Results)

3.1 不同浓度甲醛处理组肝细胞悬液中 8-OHdG含量的变化

不同浓度甲醛对肝细胞悬液染毒 1h后,经 ELISA测定后,所作标准曲线如图 1所示,回归方程

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

为 $Y = 0.00067X + 0.18510$, $R^2 = 0.996$.

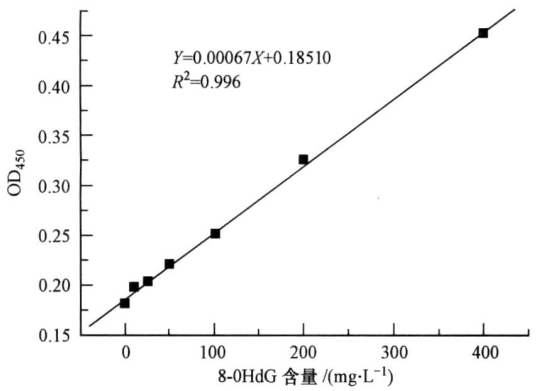

图 1　ELISA法测定 8-0HdG含量标准曲线

Fig 1　The standard curve of 8-OHdG concentration with ELISA assay

甲醛染毒 1h后悬液中 8-OHdG含量变化如图 2所示. 从图 2中可以看出,甲醛的浓度变化对悬液中 8-OHdG含量变化有显著性影响 ($F = 59.55$, $p < 0.01$),表明大鼠原代肝细胞悬液经甲醛作用后,其 8-OHdG含量呈明显上升趋势;与对照组含量相比,各浓度染毒组的含量均有升高趋势,但 5μmol·L^{-1}组的数值升高没有统计学意义 ($p > 0.05$),而 15μmol·L^{-1}组和 45μmol·L^{-1}组数值升高明显,具有统计学意义,差异显著 ($p < 0.01$).

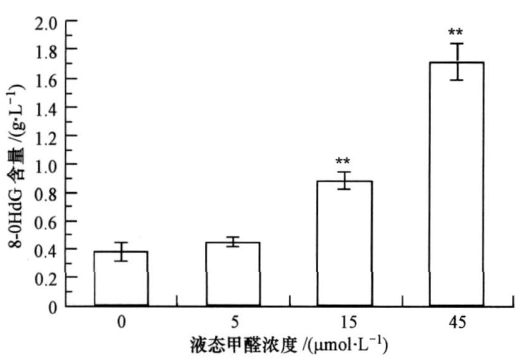

图 2　不同浓度甲醛染毒后大鼠肝细胞 8-OHdG含量的变化 ($n = 5$; $F = 59.55$, $p < 0.01$;经 LSD检验, * *:与对照组比较, $p < 0.01$)

Fig 2　The 8-OHdG contents in rat liver cells induced by different concentrations of formaldehyde ($n = 5$; $F = 59.55$, $p < 0.01$, by LSD test, * *: $p < 0.01$, compared with control group)

3.2　不同处理组肝细胞悬液中 MDA含量的变化

不同浓度甲醛对肝细胞悬液染毒 1h后,悬液中 MDA含量变化如图 3所示. 从图 3中可以看出,甲醛的浓度变化对悬液中 MDA含量变化有显著性影响 ($F = 75.82$, $p < 0.01$),表明大鼠原代肝细胞悬液经甲醛作用后,其 MDA含量同样呈上升趋势;与对照组相比, 15μmol·L^{-1}组含量升高有统计学意义,差异性显著 ($p < 0.05$); 45μmol·L^{-1}组含量升高更加明显,差异性显著 ($p < 0.01$);但 5μmol·L^{-1}组 MDA含量反而呈微弱下降趋势,与对照组的差异没有统计学意义 ($p > 0.05$).

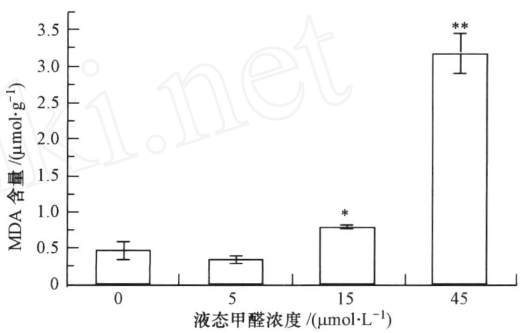

图 3　不同浓度甲醛染毒后大鼠肝细胞 MDA含量的变化 ($n = 5$; $F = 75.82$, $p < 0.01$;经 LSD检验, *、* *:与对照组比较, $p < 0.05$、$p < 0.01$)

Fig 3　The MDA contents in rat liver cells induced by different concentrations of formaldehyde ($n = 5$; $F = 75.82$, $P < 0.01$, by LSD test, *: $p < 0.05$, * *: $p < 0.01$, compared with control group)

4　讨论 (Discussion)

4.1　甲醛的氧化损伤作用

甲醛是醛类化合物中最简单的小分子,它是一种亲电子剂,是广义上的自由基,也是一种强氧化剂. 甲醛本身及代谢过程中均可产生活性氧自由基 (ROS), ROS可直接与 DNA分子发生反应,导致 DNA链断裂,碱基修饰和 DNA蛋白交联等氧化性损伤 (WHO, 2002). 同时,甲醛具有抑制超氧化物歧化酶 (SOD)作用活性作用,使过量自由基不能及时清除,间接产生对组织和生物大分子的氧化损伤. 在正常情况下, 细胞中的有关酶类和小分子物质的抗氧化效应可拮抗自由基的损伤效应, 氧化损伤与抗氧化防御体系的防御作用处于一种动态平衡之中. 在自由基过度产生或机体的抗氧化防御体系功能受损的情况下, 过多的自由基导致机体的氧化应激, 自由基攻击靶分子, 可造成组织、器官及各种生物分子不同程度的损伤. 其中,最主要致突变性损伤是羟自由基能直接与 DNA分子反应,将 DNA上的鸟嘌呤氧化为 8-羟基脱氧鸟苷;而且 ROS可以与还原性谷胱甘肽 (GSH)结合形成硫代半缩醛

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

导致 GSH损竭,从而使机体抗氧化能力显著降低(Qiao *et al*, 2004),这样过量的 ROS可攻击生物膜中的多不饱和脂肪酸,引发脂质过氧化作用并形成脂质过氧化物. MDA是脂质过氧化最终分解产物,毒性较大,它不仅能改变细胞膜的流动性、交联、结构和功能,而且还能增加细胞膜脆性,最终导致细胞破坏而使机体遭到伤害(Jones *et al*, 2005). 因而,测试 MDA的量可以反映机体内脂质过氧化程度,间接反映细胞中遗传物质 DNA受损伤程度.

4.2 细胞 DNA氧化应激状态生物标志物的选择

图 2和图 3显示,各实验浓度组间 8-OHdG和 MDA含量在 0.01水平上差异显著,说明在本实验液态甲醛染毒条件下,8-OHdG和 MDA与甲醛之间剂量-效应关系良好,均可作为细胞氧化应激状态的生物标志物. 在较低浓度(5μmol·L^{-1})液态甲醛染毒条件下,并没有引起 8-OHdG和 MDA含量的显著升高,说明在该浓度条件下不致造成大鼠的氧化损伤;在中浓度(15μmol·L^{-1})条件下,8-OHdG含量显著上升($p < 0.01$),MDA含量显著上升($p < 0.05$);在高浓度(45μmol·L^{-1})条件下,8-OHdG和 MDA含量同时显著上升($p < 0.01$). 这说明在中浓度条件下,DNA对自由基伤害的敏感程度高于脂质,且 MDA反映的是脂质的过氧化作用,不能直接准确反映外源性化合物对遗传物质 DNA的损伤. 因而,实验中选择 8-OHdG作为细胞 DNA氧化应激状态生物标志物.

8-OHdG在机体内的含量直接反映遗传物质 DNA氧化损伤程度,它既是个体接触标志物,又是效应标志物(William *et al*, 2002). 8-OHdG还是一种内源性诱变剂,具有突变倾向(G:C - T:A颠换)(Thomas *et al*, 1997),可被机体特异性 DNA修复酶(OGG1)剪切清除并经肾脏随尿排泄(Parul *et al*, 2007),但它一旦逃避了机体自身修复,就极可能成为致突变、致畸、致癌的启动因子. 因而,它可能是活性氧引起突变和癌症的重要原因(Wu *et al*, 2004).

同时,8-OHdG在体内稳定存在,为代谢终产物,且只能通过 DNA氧化损伤途径形成,可通过分析其在细胞核 DNA及线粒体 DNA中的含量来反映体内 DNA氧化损伤. 体液中 8-OHdG水平不受饮食等因素影响,是目前国际上公认的一种新型评价 DNA氧化损伤和氧化应激状态敏感的生物标志物(Kasai *et al*, 1997). 因此,测定机体 8-OHdG含量对评估体内氧化损伤和修复程度,氧化应激与 DNA损伤相互关系,研究退行性疾病、衰老机制、癌发生机制、环境毒物、慢性炎症疾病与氧化应激的关系等均有重要的意义,也可以用来评价抗氧化剂治疗 DNA氧化损伤的效果(Irie *et al*, 2005).

4.3 用 ELISA法测定内脏器官的 8-OHdG含量

活性氧自由基所造成的 8-OHdG诱变广泛存在于全身各组织器官 DNA中,以往对其测定大多通过取患者尿样来间接测定身体内各患病器官的 8-OHdG产生状况,因而本研究希望通过建立内脏器官 8-OHdG含量检测体系来更直接地反映脏器细胞 DNA氧化损伤的程度. 由图 2可以看出,在较高浓度甲醛染毒下,离体大鼠肝细胞中 8-OHdG含量显著增加,说明动物脏器中的 8-OHdG含量变化可以通过直接检测脏器本身而反映出来. 由于尿液中 8-OHdG含量反映的是全身各组织器官的 8-OHdG切除后累计排出总量,并不能直接反映出具体某一脏器的含量状况;并且 8-OHdG还可能逃脱机体自身修复,直接造成 DNA点突变,在体内产生累积效应,而这部分含量通过尿液很难检测到,所以检测脏器中 8-OHdG含量对于直接反映病灶处病理和生理状态是有积极意义的.

1995年 Yin等(1995)报道了应用 ELISA法测定尿液中 8-OHdG含量,2003年 Chiou等(2003)应用 ELISA试剂盒测定了膀胱癌和前列腺癌患者尿液中的 8-OHdG含量,均收到了很好的效果. 与其他方法相比,ELISA试剂盒法主要应用单克隆抗体技术,不用对 DNA分解处理,同时具有试剂用量少、所需仪器简单、特异性强、测定时间短、样品预处理程序简单、灵敏性高和重现性好等特点. 经本研究多次实验证实,该法测定结果的稳定性较好,数据的重现性较高,可满足生物体内低水平 DNA氧化损伤定量测定要求.

5 结论(Conclusions)

1)实验检测结果表明,液态甲醛浓度的变化与 DNA及脂质氧化损伤的程度具有良好的剂量-效应关系.

2) 8-OHdG可作为检测机体 DNA氧化性损伤的特异性分子生物标志物,在相关动物和人体的生物检测研究中具有很高的应用价值.

3)应用 ELISA法不但可以定量检测尿液和血液样品中机体氧化损伤的分子生物标志物 8-OHdG,

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

而且本研究摸索出的前处理技术可对内脏器官细胞 DNA的氧化损伤进行定量检测.实验结果表明,ELISA法灵敏性、重现性好,能够较好地反映外源性化合物暴露与内脏细胞 DNA氧化损伤的剂量/效应关系.

责任作者简介:杨旭(1954—),男,华中师范大学生命科学学院教授,博士生导师,环境科学实验室主任.

参考文献(References):

白宝璋. 1998. 植物生理实验教程 [M]. 北京:中国农业出版社, 103—104

Bai B Z. 1998. Experimental Guide of Plant Physiology [M]. Beijing: China Agricultural Press, 103—104 (in Chinese)

Chiou C C, Chang P Y, Chan E C, *et al* 2003. Urinary 8-hydroxydeoxyguanosine and its analogs as DNA marker of oxidative stress: development of an ELISA and measurement in both bladder and prostate cancers [J]. Clinica Chimica Acta, 334: 87—94

Chi-Jung C, Chi-Jung H, Yeong-Shiau P, *et al* 2008. Urinary 8-hydroxydeoxyguanosine and urothelial carcinoma risk in low arsenic exposure area [J]. Toxicology and Applied Pharmacology, 226: 14—21

Conaway C C, Whysner J, Verna L K, *et al* 1996. Formaldehyde mechanistic data and risk assessment: Endogenous protection from DNA adduct formation [J]. Pharmacology, 71: 29—35

Irie M, Kasai H. 2005. Depression and possible cancer risk due to oxidative DNA damage [J]. Journal of Psychiatric Research, 39: 553—560

Jones H B, Garside D A, Liu R, *et al* 2005. The influence of phthalate esters on Leydig cell structure and function in vitro and in vivo [J]. Experimental and Molecular Pathology, 58: 178—193

Kasai H. 1997. Analysis of a form of oxidative DNA damage, 8-hydroxy-2′-deoxyguanosine as a marker of cellular oxidative stress during carcinogenesis [J]. Mut Res, 387: 147—163

Parul R P, Ruth J B, Nalini M, *et al* 2007. Evidence of oligonucleotides containing 8-hydroxy-2′-deoxyguanosine in human urine [J]. Free Radical Biology & Medicine, 42: 552—558

乔琰,何胡军,牛丹丹,等. 2004. 甲醛吸入对小鼠不同组织器官谷脱苷肽水平的影响 [J]. 公共卫生与预防医学, 5: 12—14

Qiao Y, He H Y, Niu D D, *et al* 2004. Effect of formaldehyde inhalation on glutathione level in various organs of mice [J]. Journal of Public Health and Preventive Medicine, 5: 12—14 (in Chinese)

Simon G N, Althaf L, Michele K E. 2008. Deficient repair of 8-hydroxyguanine in the BxPC-3 pancreatic cancer cell line [J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 376: 336—340

Tokujiro Y, Fumihiro S, Hiromitsu B, *et al* 2009. Significance of the urinary 8-OHdG level as an oxidative stress marker in lung cancer patients [J]. Lung Cancer, 63 (1): 111—114

Thomas D, Scot A D, Barbey R. *et al* 1997. Inactivation of OGG1 increases the incidence of GC→TA transversions in Saccharomyces cerevisiae: Evidence for endogenous oxidative damage to DNA in eukaryotic cells [J]. Mol Gen Genet, 254: 171—178

WHO. 2002. Concise International Chemical Assessment Document 40: Formaldehyde [R]. Geneva: World Health Organization. 12—16

William W A, Boris O, Carsten H. 2002. Assessing DNA damage and health risk using biomarkers [J]. Mut Res, 509: 153—163

Wu L L, Chiou C C, Chang P Y, *et al* 2004. Urinary 8-OHdG: A marker of oxidative stress to DNA and a risk factor for cancer, atherosclerosis and diabetics [J]. Clinica Chimica Acta, 339 (6): 1—9

徐钱,杨旭,杨光涛,等. 2007. 不同浓度甲醛致小鼠肾细胞 NDA损伤效应研究 [J]. 环境科学学报, 27 (2): 276—281

Xu Q, Yang X, Yang G T, *et al* 2007. Study on DNA damage of the kidney cells of mice induced by formaldehyde at different doses [J]. Acta Scientiae Circumstantiae, 27 (2): 276—281 (in Chinese)

杨丹凤,袭著革,张华山,等. 2004. 甲醛吸入染毒致大鼠多组织器官氧化损伤效应研究 [J]. 环境科学学报, 24 (1): 174—176

Yang D F, Xi Z G, Zhang H S, *et al* 2004. Oxidation damage of formaldehyde inhalation on rat multiple organs [J]. Acta Scientiae Circumstantiae, 24 (1): 174—176 (in Chinese)

Yin B, Whyatt R B, Perera F P, *et al* 1995. Determination of 8-hydroxydeoxyguanosine by an immunoaffinity chromatography-monoclonal antibody-based ELISA [J]. Free Radic Bio Med, 18: 1023—1032

周先碗,胡晓倩. 2003. 生物化学仪器分析与实验技术 [M]. 北京:化学工业出版社, 22—24

Zhou X W, Hu X Q. 2003. Biochemistry Experimental Techniques and Instrumental Analysis [M]. Beijing: Chemical Industry Press, 22—24 (in Chinese)

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net