



斑马鱼在生态毒理学研究及环境监测中的应用

刘辉^{1,2}, 戴家银^{1*}

(1. 中国科学院动物生态与保护生物学重点实验室, 中国科学院动物研究所, 北京 100101;
2. 蚌埠医学院医学检验系, 安徽 蚌埠 233030)

【摘要】 斑马鱼作为一种新型的模式动物, 由于其易于饲养、体外受精、产卵量大、胚胎透明及体外发育等优点, 已经广泛应用于生物研究的多个领域。近年来, 斑马鱼及其胚胎也已经广泛应用于生态毒理学研究及环境监测领域; 并且随着转基因斑马鱼技术的建立, 斑马鱼及其胚胎将更好地应用于生态毒理学研究和环境监测。

【关键词】 斑马鱼; 生态毒理学; 环境监测; 转基因

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2015) 05-0529-06

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2015.05.017

Application of zebrafish (*Danio rerio*) in the fields of environmental ecotoxicology and environmental monitoring

LIU Hui^{1,2}, DAI Jia-yin^{1*}

(1. Key Laboratory of Animal Ecology and Conservation Biology, Institute of Zoology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China; 2. Department of Laboratory Medicine, Bengbu Medical College, Bengbu, Anhui 233030)

【Abstract】 Zebrafish, a new type of model animal, has been widely used in many fields of biological research because of its low cost, ability of external fertilization, high fecundity, allowance of embryo transplant, and ectogenesis. Recently, zebrafish and its embryos have been widely used in ecotoxicological studies and environmental monitoring. Furthermore, with the maturation of zebrafish transgenic techniques, a new era has come for environmental pollution monitoring.

【Key words】 Zebrafish (*Danio rerio*); Ecotoxicology; Environmental monitoring; Transgene

斑马鱼(英文名: zebrafish, 拉丁文名: *Danio rerio*) 也称为蓝条鱼、花条鱼、蓝斑马鱼、印度鱼或印度斑马鱼等, 属于硬骨鱼类, 辐鳍亚纲(Actinopterygii), 鲤形目(Cypriniformes), 鲤科(Cyprinidae), 鱼丹属(Danio)。斑马鱼为淡水鱼类, 原产于孟加拉、印度、巴基斯坦、缅甸和尼泊尔的溪流中, 因全身布满多条深蓝色纵纹与相间排列的银白色或金黄色纵纹, 形似斑马而得名斑马鱼。上世纪70年代, 美国科学家首次把斑马鱼引入实验室研究, 自1981年, 《Nature》杂志刊登美国遗传学家 George Streisinger 关于斑马鱼的论文后, 斑马鱼作为一种新型模式动物开始广泛应用于科学研究。斑马鱼在我国生物科

学方面的研究始于1998年, 孟安明院士在清华大学建立国内第一家以斑马鱼为模式动物的发育生物学实验室。发展至今, 斑马鱼成为大鼠、小鼠以外第三种广泛使用的模式动物应用于各领域的科学研究。

目前, 斑马鱼信息网络(Zebrafish Information Network, ZFIN: <http://www.zfin.org/>) 数据库已较为完备。在生物学上, 斑马鱼和人类基因有高达87%的同源性, 大多数人类基因都有斑马鱼的直系同源基因, 这意味利用斑马鱼做药物实验所得到的结果在多数情况下也适用于人体, 因此它被广泛应用于生命科学实验研究。它成为帮助人类攻克疑难杂症的得力助手, 被誉为“水中小白鼠”。除了帮助

[基金项目] 国家高技术研究发展计划(863计划; 2013AA065203) 资助。

[作者简介] 刘辉, 男, 博士, 研究方向: 生物化学, 分子生物学。

[通讯作者] 戴家银, 博士, 研究方向: 生态毒理学。Email: daijy@ioz.ac.cn

人类了解疾病病理以外,斑马鱼还是环境检测的“活试剂”,由于斑马鱼对外界环境变化极为敏感,转基因斑马鱼在遇到一些特定物质的时候体色会发生变化,利用这种特性,部分欧美国家开始在河流湖泊中放养斑马鱼,来实时检测水质状况。

1 斑马鱼及其胚胎在生态毒理学领域的应用

1.1 斑马鱼及其胚胎在急性毒性实验中的应用

鱼类急性毒性试验通常用于评价环境污染物包括工业废水、农药、杀虫剂、除草剂、洗涤剂以及药物等物质的风险,很多国家也将鱼类急性毒性实验用作常规的废水检测模型。斑马鱼胚胎最早应用在生态毒理学领域是 Nagel 等^[1]2002 年使用斑马鱼胚胎替代鱼类 96 h 的急性毒性实验。由于其胚胎和成体的急性毒性结果一致性很好,胚胎在毒性实验中的应用更能节约试验时间及成本,德国废水收费法案中要求把鱼类急性毒性实验替换成斑马鱼胚胎毒性实验(fish embryo test, FET)^[2]。

在斑马鱼急性毒性实验中,通常要计算斑马鱼胚胎发育过程中三个阶段的半致死浓度(median lethal concentration, LC_{50}):胚胎早期的囊胚期(大约 3 hpf),幼鱼开口期(72 hpf)和幼鱼浮游期(120 hpf)^[3]。具体的生物检测按照经济合作与发展组织(Organization for Economic Cooperation and Development, OECD)颁布的鱼类早期毒性实验准则进行^[4]。

Kovacs 等^[5]利用斑马鱼和胚胎的急性及亚急性毒性实验开展了 4 种环境残留抗肿瘤药物的毒性评价,包括:5-氟尿嘧啶(5-fluorouracil, 5-FU)、顺氯氨铂(cisplatin, CisPt)、表鬼白毒素吡喃葡萄糖苷(etoposide, ET)和甲磺酸伊马替尼(imatinib mesylate, IM),并认为这四种环境剂量的抗肿瘤药物属于低毒性物质,对斑马鱼的毒性作用不大。同时急性试验发现这些药物都有抑制 DNA 复制的作用,仍需要进一步通过慢性毒性实验进行验证,所以斑马鱼及其胚胎的急性及亚急性毒性实验还能为化学品毒性的深入研究提供一些基本信息。

Liu 等^[6]利用斑马鱼胚胎开展了一种持久性有机污染物(persistent organic pollutants, POPs)—全氟壬酸(perfluorononanoic acid, PFNA)的急性毒性研究,发现 PFNA 对斑马鱼胚胎具有发育毒性,表现出发育迟缓并伴有各种畸形。8 hpf 和 24 hpf 半致死浓度(LC_{50})分别为 342 和 302 $\mu\text{mol/L}$ 。400 $\mu\text{mol/L}$ 暴露条件下所有胚胎在 8 hpf 全部死亡,胚

胎死亡率与畸形率均与 PFNA 的浓度呈正相关。

1.2 斑马鱼在慢性毒性实验中的应用

急性毒性实验的优点是能在较短时间内粗略判断某种物质的毒性作用,但是,更为真实和全面的反映某种化学物质在环境中的毒性,还需模拟真实环境,开展低浓度和长时间暴露的慢性毒性实验,因此,斑马鱼作为慢性毒性实验模型具有显著优势,以斑马鱼及其胚胎作为实验对象有利于节约空间,由于其繁殖量大及周期短等优点能有效的节约实验成本及时间,更重要的是化学品在流水暴露条件下更贴近于真实水体环境,在这些方面是大、小鼠等啮齿动物无法比拟的。因此,有毒物质低浓度、长时间暴露实验更加受到生态毒理学家的关注。OECD 还专门制定了关于鱼类 14d 延长毒性试验的标准实验方法和观察化学物质干扰鱼类内分泌系统的 21d 鱼类实验方法^[7,8]。

下面从斑马鱼在肝脏毒性、生殖发育及内分泌干扰毒性以及心血管毒性等方面的应用进行论述。

1.2.1 斑马鱼在肝脏毒性研究中的应用

肝脏是重要的代谢器官,也是重要的解毒器官。目前,在药物或者环境污染物毒性实验中,仍然以大鼠、小鼠体内实验和肝细胞体外实验检测药物或污染物的肝脏毒性为主。但这些方法还存在一些局限性,例如细胞实验不能准确反映药物或污染物在体内微环境下的毒性或作用;啮齿动物模型实验费时、费力、费资金。近十年来,国内外的研究发现斑马鱼可用于构建多种人类疾病模型并用于药物或污染物的肝脏毒性研究,而且斑马鱼及其胚胎在肝脏毒性方面的研究也更加符合国际上倡导的毒理实验 3R (Replacement, Reduction and Refinement) 原则^[9]。

Zhang 等^[10]通过双向凝胶电泳及质谱分析方法,探讨了慢性 PFNA 暴露斑马鱼成鱼后,肝脏内蛋白谱表达的变化情况,鉴定了 57 个可能与 PFNA 肝脏毒性效应相关的差异表达蛋白,主要涉及物质代谢与能量代谢、蛋白质降解与修饰、氧化应激和细胞周期调控等。进一步研究部分差异表达蛋白的 mRNA 转录水平变化,发现蛋白翻译水平变化与 mRNA 转录水平变化并不完全一致,提示了 PFNA 暴露后,生物体可能存在着复杂的基因转录调控与翻译调控机制。Zhang 等^[11]采用 PFNA 流水式暴露斑马鱼 180 d 的研究方法,评估了 PFNA 在斑马鱼肝脏的累积水平和肝脏毒性效应。结果发现慢性 PFNA 暴露导致雌、雄斑马鱼肝脏内总胆固醇(Total cholesterol, TCHO)的含量升高;而甘油三酯(triglyceride, TG)的含量在雌、雄鱼之间存在明显的性别差异,即雄鱼升高而雌鱼下降的现象。这一发现与一些暴露

于全氟烷酸类化合物(perfluoroalkyl acids, PFAAs)的职业工人血清胆固醇结果类似,即 PFOS 和 PFOA 与胆固醇含量之间有正相关关系^[12]。这些结果暗示,斑马鱼可能是一个更合适研究 PFAAs 影响胆固醇的模式动物。同样在基因表达水平变化的检测也发现慢性 PFNA 暴露后,脂肪酸结合蛋白(fatty acid-binding proteins, FABPs)及其上游调控基因过氧化物酶体增殖物激活受体(peroxisome proliferator-activated receptor, PPARs)和 CCAAT 增强子结合蛋白(CCAAT-enhancer-binding proteins, C/EBPs)的转录水平与各自对照组相比,在雄鱼中显著升高,而在雌鱼中则显著下降。有研究指出,PFAAs 暴露所引起的基因表达的性别间差异可能来源于其对 PFAAs 的清除速率不同^[13]。这种雌雄个体清除速率的差异可能是由于肾脏中有机阴离子转运蛋白的差异表达,这些差异可能产生于性别分化期^[14]。

Liu 等^[15]在全氟十二碳羧酸(perfluorododecanoic acid, PFDoA)暴露斑马鱼成鱼实验中发现,PFDoA 可以引起斑马鱼明显的肝脏病理学损伤,导致超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、过氧化氢酶(catalase, CAT)和谷胱甘肽过氧化物酶(glutathione peroxidase, GPx)等发生显著变化,并最终导致肝脏脂质过氧化。在基因水平上,PFDoA 处理显著地改变肝脏中与线粒体脂肪酸代谢和抗氧化相关的基因的表达。能够显著性地抑制 *ppar α* , *cpt1*, *ucp-2* 和 *bcl-2* 的转录表达。说明 PFDoA 能够通过干扰肝脏线粒体中脂肪酸的代谢,进而干扰线粒体中能量产生途径,导致活性氧(reactive oxygen species, ROS)的过量产生并影响抗氧化系统,最终引起肝脏氧化损伤。

1.2.2 斑马鱼及其胚胎在生殖内分泌干扰毒性研究中的应用

近年来,斑马鱼也成为研究生殖内分泌干扰毒性的模式动物之一。目前在环境中已经发现有 900 多种内分泌干扰物(endocrine-disrupting chemicals, EDCs),其中有超过 200 多种被认为具有雌激素效应^[16],所以近来有关环境污染物对斑马鱼生殖内分泌干扰毒性的研究也引起了广泛地关注。Deng 等^[17]研究发现,三溴苯酚(tribromophenol, TBP)暴露斑马鱼 120 d 后,显著降低了斑马鱼产卵量;Carnevali 等^[18]也发现,连续暴露邻苯二甲酸酯(Di-(2-ethylhexyl)-phthalate, DEHP)3 周后,显著降低了斑马鱼的产卵量。

Wang 等^[19]开展了斑马鱼成鱼暴露一种有机磷酸酯阻燃剂-磷酸三(2,3-二氯丙基)酯(tris(1,3-dichloro-2-propyl) phosphate, TDCPP)实验,发现 TD-

CPP 可以从成鱼传递给 F_1 代,并显著增加 F_1 代幼鱼体内的 ROS 含量,降低存活率,降低血清中甲状腺素水平; F_0 代雌鱼和 F_1 胚胎或幼鱼的 T3 也显著下降。

Liu 等^[20]开展斑马鱼慢性暴露 PFNA 的实验,结果发现暴露 PFNA 180 d 后,斑马鱼 F_0 代和 F_1 代成体鱼血浆中的 T3 水平显著升高,同时 F_0 代成体斑马鱼甲状腺滤泡的病理组织切片结构发生改变。肝脏中的甲状腺激素结合蛋白(transthyretin, TTR)基因的表达量显著上升,而 F_0 代斑马鱼肝脏内的磷酸尿苷葡萄糖苷(基)转移酶(UDP-glucuronosyl-transferases, UDPG)表达水平显著受到抑制。PFNA 的长期暴露表现出了明显的甲状腺干扰效应。

1.2.3 斑马鱼及其胚胎在心血管毒性研究中的应用

斑马鱼由于其其在体外发育,并且胚胎透明,可以在显微镜下实时观察心血管的生成,所以在心血管研究领域有着广泛的应用。Gerger 等^[21]用斑马鱼成鱼进行苯并芘(Benzo[*a*]pyrene)暴露实验,发现成鱼暴露后,耗氧量明显增加,心率明显下降,肝脏和心脏组织的 *cyp1a* 基因表达量也明显升高,苯并芘对斑马鱼的心血管系统有明显的毒性作用。Zhang 等^[22]在用菲(phenanthrene, Phe)暴露斑马鱼胚胎实验中也发现菲能够损伤斑马鱼的心血管系统,造成了心室水肿、心室内壁变大变薄、小肠纤维化等现象,而基质金属蛋白酶 9(matrix metalloproteinase-9, MMP-9)可以缓解菲的毒性效应,进一步研究发现,这一毒性效应与 TGF- β 通路激活有关。

Liu 等^[6]利用斑马鱼胚胎进行 PFNA 暴露实验,发现 PFNA 可导致斑马鱼胚胎发育迟缓,孵化率降低心室水肿和脊椎弯曲。另外,PFNA 暴露可显著增加幼鱼体内的 ROS 的含量。并发现这一现象可能与 *lfabp* 和 *ucp2* 基因的表达显著升高,*sod1* 和 *mt-nd1* 基因的表达水平显著下降有关。

2 斑马鱼及其胚胎在环境监测与评价中的应用

2.1 在水体无机物重金属离子监测中的应用

检测环境中重金属污染最常用的方法就是用斑马鱼及其胚胎进行毒理学实验^[23,24]。重金属通常可以抑制酶的活性^[24-26]或者影响基因的表达^[27-28]。所以可以通过检测斑马鱼成鱼或者胚胎的酶活性或者生物标志物基因的表达来间接地反映水体环境中的重金属污染。例如,Ling 等^[29]发现一些酶的活性,包括 SOD、CAT 和乙酰胆碱酯酶(acylcholinesterase, AChE)的酶活性受 Cd、Zn 或者甲

基对硫磷(methyl parathion)的暴露而变化。这三种酶可以作为环境中复合污染的生物标志物。Leite 等^[30]发现斑马鱼暴露 Cu^{2+} 后,可导致炎症反应,氧化压力,并伴随炎症反应相关基因 *il-1 β* , *tnf- α* , *cox-2* 和 *pge2* 基因表达的变化。Wang 等^[31]发现斑马鱼在 Cu^{2+} 暴露后,嗅觉系统中与神经发生相关的一些 miRNA 的表达量,如 *let-7*, *miR-7a*, *miR-128* 和 *miR-138* 发生了显著下调,这可能与 Cu^{2+} 介导的神经发生毒性相关。这些表观遗传的改变也可以作为检测重金属污染的新型生物标志物。

2.2 在有机污染物监测中的应用

环境中除了无机重金属污染之外,近年来,越来越多的研究发现环境中的有机污染物被频繁检出,并且这些有害有机污染物对环境及人类健康的影响已经引起流行病学家和生态毒理学家的广泛关注。常见的有机污染物如-多环芳烃(polycyclic aromatic hydrocarbons, PAHs)等,可以干扰斑马鱼的内分泌系统,影响胚胎发育、损伤 DNA 并且导致氧化压力^[32,33]。这一类化合物不仅具有发育毒性^[34],而且也会影响心血管系统发育及其相关基因的表达^[35]。

全氟烷酸类化合物(perfluoroalkyl and polyfluoroalkyl substances, PFASs)是一种新型持久性有机污染物,在环境中广泛检出。最近研究显示 PFASs 能通过食物链富集放大,因此,对人类及野生动物的健康具有潜在的威胁。全氟辛酸(perfluorooctanoic acid, PFOA)和全氟辛磺酸(perfluorooctane sulfonate, PFOS)是最常见的两种全氟烷酸类化合物,它们都能够影响斑马鱼的胚胎发育^[36]。Du 等^[37]研究发现,PFOS 暴露斑马鱼成鱼后,影响雌激素受体和甲状腺受体活性,降低了睾酮水平,升高了雌二醇水平;同时研究还发现,PFOS 能够显著增加甲状腺发育相关基因 *hhx* 和 *pax8* 的表达,降低甾类生成相关酶的基因 *cyp17*, *cyp19a* 和 *cyp19b* 的表达,并呈现浓度(剂量)-效应关系,检测这些基因的表达变化为环境监测提供一个可行的方法。

此外,斑马鱼在水体中杀虫剂和抗生素等污染监测中也有着广泛的应用。Huang 等^[38]研究发现斑马鱼的游泳行为与水体中一种杀虫剂-溴氰菊酯(deltamethrin, DM)的浓度有相关性。水体中 DM 的浓度达到 1% 就能够影响斑马鱼的游泳行为。在暴露的最初 2h 内,斑马鱼的游泳速度和深度会受到明显的影响,这被认为是监测水质最重要的时期。此外,还发现斑马鱼极度活跃的时间和浮出水面的时间与 DM 暴露浓度均呈现指数相关关系,这两个参数可以作为区分水体 DM 污染级别的重要指标。

2.3 在水体环境类雌激素监测中的应用

近年来,研究发现一些物质如 PFNA、双酚 A(bisphenol A, BPA)等在体内实验中表现出雌激素效应^[39],这些物质在水体环境中可能是扮演一种雌激素的效应,被称为“环境雌激素(xenoestrogens)”^[40]。Urbatzka 等^[41]用含有 11 种环境雌激素的杜罗河(位于葡萄牙)河口的水暴露斑马鱼成鱼 21d 后,并用 17 α -乙炔雌二醇(17 α -ethinylestradiol, EE2)作为阳性对照,筛选出 *star*, *17 β -hsd1*, *cyp19a1* 候选基因可用于水体环境中类雌激素的监测。Notch 等^[42]以斑马鱼胚胎为模型进行环境雌激素的暴露研究,斑马鱼胚胎在 0 hpf 时即进行 EE2 的暴露,并在 12、24、48、72 和 96 hpf 取样研究,发现在 24 hpf 时,卵黄蛋白原(vitellogenin, VTG)的 mRNA 的表达水平就已经显著升高,这一基因的表达变化可以作为雌激素暴露的生物指示物。

2.4 转基因斑马鱼在环境监测与评价中的应用

尽管野生型斑马鱼及其胚胎已广泛地应用于环境污染物的毒性监测,但是这种方法仍然有不足之处,例如,检测灵敏度相对较低,以及实验过程及结果统计计算相对繁琐等。最近,随着遗传学技术的不断发展,转基因技术也日益成熟,转基因斑马鱼也越来越多地应用于药物筛选和环境毒物监测领域。近年来,随着斑马鱼胚胎显微注射技术的完善,转基因斑马鱼技术也迅速发展,目前,已有很多技术成功地应用于斑马鱼的转基因研究。如 GAL4/UAS 转录激活系统^[43]、Tol2 转座子系统^[44]和 Φ C31 整合酶系统^[45]等。

目前,应用于环境监测的转基因斑马鱼主要有以下五种类型:芳香烃反应元件(aromatic hydrocarbon response element, AHRE)、亲电反应元件(electrophile response element, EPRE)、金属离子反应元件(metal response element, MRE)、雌激素反应元件(estrogen response element, ERE)和维甲酸和类维生素 A X 反应元件(retinoic acid and retinoid x response elements, RAREs, RXREs)^[46]。Petersen 等^[47]构建了一种雌激素反应元件转基因斑马鱼 *tg(cyp19a1b-GFP)* 用于环境中类雌激素的监测,在研究中,分别用 5 种不同的环境雌激素暴露转基因斑马鱼胚胎 96 h,结果发现,所有潜在的和弱的类雌激素都能够检测到。Chen 等^[48]构建了一种转基因斑马鱼,在这种鱼的体内,利用 *vtg1* 的启动子调控报告基因 EGFP 的表达,直观地检测水环境中的雌激素污染。通过荧光显微镜直接观察转基因斑马鱼的绿色荧光,可以直接判断水样中是否有雌激素污染,为环境雌激素的监测提供了一种便捷的工具。

3 前景展望

斑马鱼是一个相对“年轻”的模式生物,但是在最近 30 年,它在脊椎动物发育生物学以及人类疾病研究方面发挥了重要的作用。作为一种模式动物,应用于生态毒理学研究及环境监测领域,具有节约费用,易于饲养,节约空间等诸多优点。尤其是在转基因斑马鱼品系建立后,用于环境监测的优越性日益体现出来,转基因斑马鱼用于环境监测比野生型斑马鱼更加快速、更加灵敏、更加方便,能够反映不同污染类型。在不久的将来,转基因斑马鱼将会成为环境和水质监测的“哨兵”生物。

近年来,组学(-omics)不断兴起,尤其转录组测序及蛋白质组学技术在生态毒理学领域应用也得到了迅速发展,这将更加有利于以斑马鱼为研究模型研究环境污染物对人类健康危害和生物标志物的筛选。随着科学技术手段的不断改进,将来会有更多的转基因(反应元件)斑马鱼品系的建立,为活体监测多种微量环境污染物监测提供可能。各种带有不同反应元件的转基因斑马鱼卵可以像基因芯片一样排列在微孔板中,可以准确地检测出水环境中各种污染物的种类,并可以根据荧光强度来推算污染物的浓度。另外,转基因斑马鱼的 GFP 元件可以替换成其他新型的元件,在污染物存在的情况下可以直接发光,而不需要在荧光显微镜下观察,这样也会大大增加转基因斑马鱼在野外直接检测水体环境污染物的便捷性,使得转基因斑马鱼在环境监测中更好地发挥作用。

参 考 文 献

- [1] Nagel R, DarT. The embryo test with the Zebrafish *Danio rerio*—a general model in ecotoxicology and toxicology [J]. *Altex* 2002, 19(Suppl 1):38–48.
- [2] OECD, Fish embryo toxicity (FET) test. Draft OECD guideline for the testing of chemicals. <http://www.oecd.org/dataoecd/39/59/36817070.pdf>. 2006.
- [3] Kimmel CB, Ballard WW, Kimmel SR, et al. Stages of embryonic development of the zebrafish [J]. *Dev Dynamics* 1995, 203(3): 253–310.
- [4] Ema M, Fukui Y, Aoyama H, et al. Comments from the Developmental Neurotoxicology Committee of the Japanese Teratology Society on the OECD Guideline for the Testing of Chemicals, Proposal for a New Guideline 426, Developmental Neurotoxicity Study, Draft Document (October 2006 version), and on the Draft Document of the Retrospective Performance Assessment of the Draft Test Guideline 426 on Developmental Neurotoxicity [J]. *Congenital Anomalies*, 2007, 47(2): 74–76.
- [5] Kovacs R, Bakos K, Urbanyi B, et al. Acute and sub-chronic toxicity of four cytostatic drugs in zebrafish [J]. *Environ Sci Pollut Res Int*, First online; 24 July 2015.
- [6] Liu H, Sheng N, Zhang W, et al. Toxic effects of perfluorononanoic acid on the development of Zebrafish (*Danio rerio*) embryos [J]. *J Environ Sci (China)* 2015, 32: 26–34.
- [7] OECD, Guideline for the testing of chemicals 204; Fish, Prolonged Toxicity Test: 14-day Study [M]. Paris: Paris France OECD 1984.
- [8] OECD, Guideline for the testing of chemicals 230; 21-day Fish Assay: A Short-Term Screening for Oestrogenic and Androgenic Activity, and Aromatase Inhibition [M]. Paris: Paris France OECD; 2009.
- [9] Flecknell P. Replacement, reduction and refinement [J]. *Altex* 2002, 19(2): 73–78.
- [10] Zhang W, Liu Y, Zhang H, et al. Proteomic analysis of male zebrafish livers chronically exposed to perfluorononanoic acid [J]. *Environ Int* 2012, 42: 20–30.
- [11] Zhang W, Zhang Y, Zhang H, et al. Sex differences in transcriptional expression of FABPs in zebrafish liver after chronic perfluorononanoic acid exposure [J]. *Environ Sci Technol*, 2012, 46(9): 5175–5182.
- [12] Nelson JW, Hatch EE, Webster TF. Exposure to polyfluoroalkyl chemicals and cholesterol, body weight, and insulin resistance in the general U. S. population [J]. *Environ Health Perspect*, 2010, 118(2): 197–202.
- [13] Ohmori K, Kudo N, Katayama K, et al. Comparison of the toxicokinetics between perfluorocarboxylic acids with different carbon chain length [J]. *Toxicology* 2003, 184(2–3): 135–140.
- [14] Buist SC, Cherrington NJ, Choudhuri S, et al. Gender-specific and developmental influences on the expression of rat organic anion transporters [J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2002, 301(1): 145–151.
- [15] Liu Y, Wang J, Wei Y, et al. Induction of time-dependent oxidative stress and related transcriptional effects of perfluorododecanoic acid in zebrafish liver [J]. *Aquatic Toxicol (Amsterdam, Netherlands)* 2008, 89(4): 242–250.
- [16] Soffker M, Tyler CR. Endocrine disrupting chemicals and sexual behaviors in fish—a critical review on effects and possible consequences [J]. *Crit Rev Toxicol* 2012, 42(8): 653–668.
- [17] Deng J, Liu C, Yu L, et al. Chronic exposure to environmental levels of tribromophenol impairs zebrafish reproduction [J]. *Toxicol Applied Pharmacol*, 2010, 243(1): 87–95.
- [18] Carnevali O, Tosti L, Speciale C, et al. DEHP impairs zebrafish reproduction by affecting critical factors in oogenesis [J]. *PLoS ONE* 2010, 5(4): e10201.
- [19] Wang Q, Lai NL, Wang X, et al. Bioconcentration and transfer of the organophorous flame retardant 1,3-dichloro-2-propyl phosphate causes thyroid endocrine disruption and developmental neurotoxicity in zebrafish larvae [J]. *Environ Sci Technol*, 2015, 49(8): 5123–5132.
- [20] Liu Y, Wang J, Fang X, et al. The thyroid-disrupting effects of long-term perfluorononanoate exposure on zebrafish (*Danio rerio*) [J]. *Ecotoxicology (London, England)* 2011, 20(1): 47–55.
- [21] Gerger CJ, Weber LP. Comparison of the acute effects of benzo(a)pyrene on adult zebrafish (*Danio rerio*) cardiorespiratory function following intraperitoneal injection versus aqueous exposure

- [J]. *Aquatic Toxicol* (Amsterdam, Netherlands) 2015, 165: 19–30.
- [22] Zhang Y, Huang L, Wang C, et al. Phenanthrene exposure produces cardiac defects during embryo development of zebrafish (*Danio rerio*) through activation of MMP-9 [J]. *Chemosphere* 2013, 93(6): 1168–1175.
- [23] Dave G. The influence of pH on the toxicity of aluminum, cadmium, and iron to eggs and larvae of the zebrafish, *Brachydanio rerio* [J]. *Ecotoxicol Environ Saf*, 1985, 10(2): 253–267.
- [24] Roales RR, Perlmutter A. Toxicity of zinc and cygon, applied singly and jointly, to zebrafish embryos [J]. *Bull Environ Cont Toxicol* 1974, 12(4): 475–480.
- [25] Devi GP, Ahmed KB, Varsha MK, et al. Sulfidation of silver nanoparticle reduces its toxicity in zebrafish [J]. *Aquatic Toxicol* (Amsterdam, Netherlands) 2015, 158: 149–156.
- [26] Chen M, Chen S, Du M, et al. Toxic effect of palladium on embryonic development of zebrafish [J]. *Aquatic Toxicol* (Amsterdam, Netherlands) 2015, 159: 208–216.
- [27] Miao W, Zhu B, Xiao X, et al. Effects of titanium dioxide nanoparticles on lead bioconcentration and toxicity on thyroid endocrine system and neuronal development in zebrafish larvae [J]. *Aquatic Toxicol* (Amsterdam, Netherlands) 2015, 161: 117–126.
- [28] Komjarova I, Bury NR. Evidence of common cadmium and copper uptake routes in zebrafish *Danio rerio* [J]. *Environ Sci Technol* 2014, 48(21): 12946–12951.
- [29] Ling X, Zhang Y, Lu Y, et al. Superoxide dismutase, catalase and acetylcholinesterase: biomarkers for the joint effects of cadmium, zinc and methyl parathion contamination in water [J]. *Environ Technol* 2011, 32(13–14): 1463–1470.
- [30] Leite CE, Maboni Lde O, Cruz FF, et al. Involvement of purinergic system in inflammation and toxicity induced by copper in zebrafish larvae [J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2013, 272(3): 681–689.
- [31] Wang L, Bammler TK, Beyer RP, et al. Copper-induced deregulation of microRNA expression in the zebrafish olfactory system [J]. *Environ Sci Technol* 2013, 47(13): 7466–7474.
- [32] Ma Y, Han J, Guo Y, et al. Disruption of endocrine function in *in vitro* H295R cell-based and *in vivo* assay in zebrafish by 2,4-dichlorophenol [J]. *Aquatic Toxicol* (Amsterdam, Netherlands) 2012, 106–107, 173–181.
- [33] Shao B, Zhu L, Dong M, et al. DNA damage and oxidative stress induced by endosulfan exposure in zebrafish (*Danio rerio*) [J]. *Ecotoxicology* (London, England) 2012, 21(5): 1533–1540.
- [34] Hawliczek A, Nota B, Cenijn P, et al. Developmental toxicity and endocrine disrupting potency of 4-azapyrene, benzo[b]fluorene and retene in the zebrafish *Danio rerio* [J]. *Reprod Toxicol* (Elmsford, N. Y.) 2012, 33(2): 213–223.
- [35] Huang L, Wang C, Zhang Y, et al. Benzo[a]pyrene exposure influences the cardiac development and the expression of cardiovascular relative genes in zebrafish (*Danio rerio*) embryos [J]. *Chemosphere* 2012, 87(4): 369–375.
- [36] Zheng XM, Liu HL, Shi W, et al. Effects of perfluorinated compounds on development of zebrafish embryos [J]. *Environ Sci Pollution Res Int*, 2011, 19(7): 2498–2505.
- [37] Du G, Hu J, Huang H, et al. Perfluorooctane sulfonate (PFOS) affects hormone receptor activity, steroidogenesis, and expression of endocrine-related genes *in vitro* and *in vivo* [J]. *Environ Toxicol Chem / SETAC* 2013, 32(2): 353–360.
- [38] Huang Y, Zhang J, Han X, et al. The use of zebrafish (*Danio rerio*) behavioral responses in identifying sublethal exposures to deltamethrin [J]. *Int J Environ Res Pub Health*, 2014, 11(4): 3650–3660.
- [39] Gao Y, Li X, Guo LH. Assessment of estrogenic activity of perfluoroalkyl acids based on ligand-induced conformation state of human estrogen receptor [J]. *Environ Sci Technol* 2013, 47(1): 634–641.
- [40] Benninghoff AD, Bisson WH, Koch DC, et al. Estrogen-like activity of perfluoroalkyl acids *in vivo* and interaction with human and rainbow trout estrogen receptors *in vitro* [J]. *Toxicol Sci*, 2011, 120(1): 42–58.
- [41] Urbatzka R, Rocha E, Reis B, et al. Effects of ethinylestradiol and of an environmentally relevant mixture of xenoestrogens on steroidogenic gene expression and specific transcription factors in zebrafish [J]. *Environ Pollut (Barking, Essex: 1987)* 2012, 164: 28–35.
- [42] Notch EG, Mayer GD. Impact of environmental estrogens on nucleotide excision repair gene expression in embryonic zebrafish [J]. *Comp Biochem Physiol Toxicol Pharmacol*; 2013, 157(4): 361–365.
- [43] Akitake CM, Macurak M, Halpern ME, et al. Transgenerational analysis of transcriptional silencing in zebrafish [J]. *Dev Biol*, 2011, 352(2): 191–201.
- [44] Fisher S, Grice EA, Vinton RM, et al. Evaluating the biological relevance of putative enhancers using Tol2 transposon-mediated transgenesis in zebrafish [J]. *Nat Protocols* 2006, 1(3): 1297–1305.
- [45] Lister JA. Use of phage phiC31 integrase as a tool for zebrafish genome manipulation [J]. *Methods Cell Biol*, 2011, 104: 195–208.
- [46] Carvan MJ, 3rd, Dalton TP, Stuart GW, et al. Transgenic zebrafish as sentinels for aquatic pollution [J]. *Ann New York Acad Sci*, 2000, 919: 133–147.
- [47] Petersen K, Fetter E, Kah O, et al. Transgenic (cyp19a1b-GFP) zebrafish embryos as a tool for assessing combined effects of oestrogenic chemicals [J]. *Aquatic Toxicol* (Amsterdam, Netherlands) 2013, 138–139: 88–97.
- [48] Chen H, Hu J, Yang J, et al. Generation of a fluorescent transgenic zebrafish for detection of environmental estrogens [J]. *Aquatic Toxicol* (Amsterdam, Netherlands) 2010, 96(1): 53–61.

[收稿日期] 2015-08-20