

DOI: 10.7524/AJE.1673-5897.20180406002

孙立伟, 靳远祥, 傅正伟, 等. 基于斑马鱼的水生生态毒理学实验教学体系的构建[J]. 生态毒理学报, 2018, 13(2): 189-194

Sun L W, Jin Y X, Fu Z W, et al. Establishment of experimental teaching system based on the zebrafish in aquatic ecotoxicology [J]. Asian Journal of Ecotoxicology, 2018, 13(2): 189-194 (in Chinese)

## 基于斑马鱼的水生生态毒理学实验教学体系的构建

孙立伟<sup>1</sup>, 靳远祥<sup>2</sup>, 傅正伟<sup>2</sup>, 钱海丰<sup>1,\*</sup>

1. 浙江工业大学环境学院, 杭州 310014

2. 浙江工业大学生物工程学院, 杭州 310014

收稿日期: 2018-04-06 录用日期: 2018-05-02

**摘要:** 在我国现有的生态毒理学教学体系中, 相对于理论教学, 其实验教学体系的构建和实践相对滞后, 阻碍了相关领域的人才培养。斑马鱼是国际上广受瞩目的小型模式鱼, 本文在目前已成功开发并应用于科研的一系列斑马鱼毒性测试策略和方法的基础上, 初步构建较为完整的水生生态毒理学实验内容和案例。虽然仅基于斑马鱼这一实验物种, 但包括了致死效应、致畸效应、神经毒性、内分泌干扰效应、免疫毒性、遗传毒性等, 涵盖不同生物学层面的多个毒理学终点, 有助于充分训练学生的实验技能, 巩固所学的理论知识。此外, 在学生初步掌握上述实验手段的基础上, 设置综合性或者设计性实验, 可进一步培养学生的创造性思维和科研能力。本文对于现有的生态毒理学实验教学有一定的参考和借鉴意义。

**关键词:** 斑马鱼; 实验教学体系; 课程内容; 毒理学终点; 模式鱼

文章编号: 1673-5897(2018)2-189-06 中图分类号: X171.5 文献标识码: A

## Establishment of Experimental Teaching System Based on the Zebrafish in Aquatic Ecotoxicology

Sun Liwei<sup>1</sup>, Jin Yuanxiang<sup>2</sup>, Fu Zhengwei<sup>2</sup>, Qian Haifeng<sup>1,\*</sup>

1. College of Environment, Zhejiang University of Technology, Hangzhou 310014, China

2. College of Biotechnology and Bioengineering, Zhejiang University of Technology, Hangzhou 310014, China

Received 6 April 2018 accepted 2 May 2018

**Abstract:** Up to now, the establishment and practice of experimental teaching system in the ecotoxicology is lagging behind when compared with the theoretical teaching. Over the past two decades, zebrafish has been recognized as a primary small model fish for ecotoxicology. Therefore, based on the current toxicity testing strategy and method in zebrafish, the aim of this paper is to preliminarily establish an experimental teaching system in the aquatic ecotoxicology. The contents include a set of tests on the lethal effect, teratogenic effect, neurotoxicity, endocrine disrupting effect, immunotoxicity, and genotoxicity, which covers multiple endpoints in different biological levels. This system will be helpful to the students for the practice of experimental skill, and the consolidation of theoretical knowledge. Moreover, the comprehensive and designed experiments are recommended in order to develop the ability of creative thinking and scientific research. This paper can provide some references for the reform of current ex-

作者简介: 孙立伟(1980-), 男, 副教授, 硕士生导师, 研究方向为水生生态毒理学, E-mail: sunliwei@zjut.edu.cn

\* 通讯作者 (Corresponding author), E-mail: hfqian@zjut.edu.cn

perimental teaching system in ecotoxicology.

**Keywords:** zebrafish; experimental teaching system; course content; toxic endpoint; model fish

目前,在我国开设有环境科学与工程专业的院校中,各级科教人员均越来越认识到生态毒理学在整个课程体系中的重要性。伴随着我国在生态毒理学领域的飞速发展,在过去的20年间,相关的教材陆续出版,比如周启星、孔繁翔、朱琳合著的《生态毒理学》(科学出版社,2004)<sup>[1]</sup>和孟紫强主编的《生态毒理学》(高教出版社,2009)<sup>[2]</sup>等,开启了我国生态毒理学教学的新纪元。然而,生态毒理学作为一门实践性很强的学科,经典理论需要实验来展示,前沿理念需要实验来验证。目前,虽有个别相关的实验教材出版,比如孔志明、杨柳燕、尹大强、程树培合著的《现代环境生物学实验技术与方法》(中国环境科学出版社,2005)<sup>[3]</sup>,付保荣主编的《环境污染生态毒理与创新型综合设计实验教程》(中国环境出版社,2016)<sup>[4]</sup>和宋志慧编著的《水生生态毒理学实验》(化学工业出版社,2008)<sup>[5]</sup>等,但相较于较为成熟和完备的理论教学,生态毒理学实验教学体系的构建和实践相对滞后,也难以反映相关领域的最新发展,阻碍了我国生态毒理学领域的人才培养。

水生生态毒理学一直是生态毒理学领域的重要组成部分。放眼国际上的最新研究成果,其中基于斑马鱼(*Danio rerio*)的研究占有相当的比重,贡献良多<sup>[6-7]</sup>。作为国际上广受欢迎的模式动物,斑马鱼除了易于养殖、性成熟周期短、产卵量大等特点之外,还具有诸多独特的优势,包括受精卵体外发育、胚胎透明;易于活体成像以及细胞追踪;易进行化合物的高通量筛选以及一系列新兴分子生物学技术手段的成功应用等<sup>[8-9]</sup>。同时,研究发现人类和斑马鱼之间,生理和遗传上均有高度同源性,其中基因的同源性高达70%,而人类疾病相关的基因中更有大约84%也存在于斑马鱼中<sup>[8]</sup>。此外,传统应用啮齿类动物的毒性测试受到越来越严苛的实验动物福利伦理规定的挑战,而应用培养细胞的体外测试方法由于缺少生物体的复杂性,从而限制了其实验数据的意义<sup>[8]</sup>。因此,以斑马鱼为实验动物的研究近年来越来越受到毒理学领域科研工作者的重视,不仅在探究污染物对水生生物的毒性效应及其作用机制中发挥了重要作用,相关的数据还有助于评价污染物对哺乳动物乃至人类的毒作用。本文试图在目前已成功开发并应用于科研的一系列斑马鱼毒性测试策

略和方法的基础上,初步构建较为完整的水生生态毒理学实验内容和案例,其对于现有的生态毒理学教学有一定的参考和借鉴意义。

## 1 实验用鱼斑马鱼的简介 (Introduction of zebrafish)

斑马鱼常见的野生品系约有10余个,目前国内外用于科研的主要有源于德国的Tübingen和源于美国的AB系。对于国内科研院所而言,可直接向国家斑马鱼资源中心(China Zebrafish Resource Center)订购,中心另提供多种转基因斑马鱼。若仅用于实验教学,则也可以用当地花鸟市场购买的斑马鱼替代,在实验前注意足够的驯化时间即可。

斑马鱼的养殖方法详见于 *The Zebrafish Book*<sup>[11]</sup>。实验用水可使用Westerfield<sup>[11]</sup>推荐的培养液,也可用曝气自来水替代。鉴于实际操作中的可行性,比如希望有数量足够多的实验动物、较短的实验时间和较小的实验空间,推荐使用斑马鱼胚胎或者幼鱼。由于斑马鱼目前还未发现明确的性别决定基因,因此,可忽略胚胎或者幼鱼的性别差异。斑马鱼是一种光周期调控交配行为的鱼类,因此,对于发育阶段要求严格的实验,则推荐人工调控光周期,并使用配鱼专用缸。在26~28℃的标准培养温度下,斑马鱼约在受精后72h(即72 hpf, hours post fertilization)孵化完全,孵化后即可自由游泳,约5~6 dpf (days post fertilization)开始进食。由于饲料对实验结果可能带来难以预料的影响,实际操作中可视幼鱼卵黄囊是否已被完全吸收,再决定是否喂食。

## 2 实验编排和内容设计 (Course contents and experiment design)

由于篇幅所限,本文仅给出实验方法的简要描述,而不涉及具体的实验条件、设备、步骤、统计分析方法以及结果报告等。相关内容可以参考国内外毒性测试标准,比如经济合作与发展组织(Organization for Economic Co-operation and Development, OECD)的化学品毒性测试标准等。具体操作时可因地制宜,根据实际情况作出调整。

### 2.1 致死效应的检测——幼鱼急性毒性实验

本实验适用于检测单一化合物的急性毒性,也可测定环境水体的污染程度<sup>[12]</sup>。毒理学终点为斑马

鱼的死亡。以刚孵化的斑马鱼幼鱼(72 hpf)为实验动物,暴露时间可选24~96 h,从而得到相应时间点的半致死浓度(lethal concentration 50%, LC<sub>50</sub>)。从本实验中,通过剂量(浓度)-效应曲线,学生可以理解有关经典毒理学的最基本概念,即“剂量决定毒性”。

**实验方法简介:**考虑到操作的安全性以及受试化合物的稳定性,实验毒物可选择铜离子。实验前一天将雌雄成鱼转移至配鱼专用盒中,用隔板将雌雄分开。在实验当天早晨抽去隔板,30 min后即可得到受精卵。胚胎在72 hpf完全孵化,即可用于后续实验。在正式实验前,授课教师可参考有关资料或者进行预实验,确定正式实验浓度范围。正式实验按等比间距设置5个污染物浓度,以得到较为完整的剂量效应曲线,并包括必要的对照组。暴露方式可选择静水或者半静水式,容器可选用烧杯或者6孔板。每个浓度至少设3个平行,每个平行10条实验鱼。一般而言,每升溶液中鱼的负荷最好不要超过1 g<sup>[3]</sup>,在此发育阶段的幼鱼,每条鱼100 μL水也能满足要求<sup>[8]</sup>。在暴露后每天定时检查幼鱼的情况,记录死鱼数目,并及时清除死鱼。条件具备的话,应该同时检测并记录暴露液的水温、pH、溶解氧、硬度等信息以及受试毒物的真实浓度。实验结束后计算各时间点的LC<sub>50</sub>以及95%置信区间,确定化合物毒性分级<sup>[3,12-13]</sup>。

## 2.2 致畸效应的检测——胚胎发育毒性实验

斑马鱼胚胎发育快速,绒毛膜透明,在倒置光学显微镜下即可观察。暴露的容器可选择96或者24孔板,从而适用于高通量筛选。在受精后的72 h内,胚胎历经卵裂期、囊胚期、原肠期、体节期直至孵化,可以观察到化合物在不同发育阶段对体节、血管、脑、心脏、耳石、眼点等各器官部位的毒性效应,尤其是诸如脊椎弯曲、心包水肿、眼点不发育等畸形,以及无心跳、卵凝结、无自主活动、不孵化等致死效应<sup>[14]</sup>。针对不同的毒理学终点,可以得到各自的无可见效应浓度(no observed effects concentration, NOEC)和最低可见效应浓度(lowest observed effects concentration, LOEC)。此外,可通过手工或者链霉菌蛋白酶解膜<sup>[8]</sup>,从而对比研究卵膜对化合物毒性的影响。

**实验方法简介:**实验毒物可选择和幼鱼急性毒性实验一致的化合物,有利于相互比较。收集鱼卵后,在倒置显微镜下甄别是否受精。将受精卵放置于多孔培养板,每孔一个胚胎,防止相互干扰。按等

比间距设置3~5个污染物浓度,每个浓度至少3个平行(应分布在不同孔板中),每个平行至少10枚胚胎。在暴露后定时观察胚胎的发育状况,并记录异常发育现象。暴露结束后,进行结果分析。

## 2.3 神经毒性的检测——幼鱼游泳行为实验

神经系统对于外源因素的影响极为敏感,尤其是尚处于发育中的神经系统。运动行为可视为评价神经系统正常与否的重要指标,与生物的机体健康及其在环境中的适应能力息息相关<sup>[15]</sup>。目前,已发展了基于斑马鱼等小型模式鱼运动行为的多种测试方法。而近年来,由于行为轨迹分析系统的开发,更使得斑马鱼游泳行为检测在毒理学测试,特别是高通量筛选中拥有广阔的应用前景<sup>[16]</sup>。开展本项实验需要有专门的行为轨迹分析设备,比如ZebraLab高通量行为分析仪(ViewPoint Life Sciences, France),也有研究人员自制行为记录分析系统<sup>[17]</sup>。可采用受精卵或者刚孵化的斑马鱼幼鱼进行暴露,并对幼鱼进行自由游泳或者明暗光刺激下的行为检测。实验毒物可选择乙醇,其为已知的神经毒物,在低浓度有神经兴奋效应,而高浓度则有神经抑制效应<sup>[18]</sup>。

**实验方法简介:**以刚孵化的斑马鱼幼鱼为例。按等比间距设置3~5个污染物浓度,每个浓度至少3个平行,每个平行至少10条幼鱼。在暴露3 d后,将斑马鱼转移至96孔板,每孔一尾,并更换暴露液为曝气自来水或者稀释水(假如暴露液不影响行为分析仪的图像采集,也可不必更换)。孔板置于行为分析仪中进行测试,记录自由游泳和在光周期下的游泳行为。一般而言,测定神经毒性时所设定的浓度应该不会导致致死效应或者其他发育畸形,因此分析结果时需剔除死亡和不能正常发育幼鱼的行为数据<sup>[19]</sup>。

必须注意:游泳行为的改变也可能是其他毒作用模式所导致,比如化合物影响肌肉组织发育,或者影响视力从而改变其对光刺激的反应等等。以此为例,也可以加深学生关于毒理学终点特异性的理解。

此外,对于神经毒性,检测乙酰胆碱酯酶(acetylcholinesterase, AChE)的活性也是经典方法<sup>[19]</sup>。毒物可选择有机磷农药等。对于幼鱼,可以选择整体匀浆;而对于成鱼,可单独分离脑组织,并进行后续的酶活测定。考虑到生态毒理学中有一大类以酶活为生物标志物的经典研究方法,该实验有助于学生掌握其原理和实验步骤,对于未配备小型模式鱼行为检测系统的实验室而言,是一个很好的选择。

## 2.4 内分泌干扰效应的检测——幼鱼卵黄蛋白原的诱导实验

在现有的内分泌干扰物清单中,以雌激素受体激动剂最为典型。卵黄蛋白原(vitellogenin, VTG),作为雌激素受体激动剂暴露最为经典的生物标志物,其在幼鱼或者雄鱼中的表达可有效指示环境中相关化合物的存在,并已发展了一套成熟的检测方法<sup>[20-21]</sup>。在本实验中,可选择幼鱼为实验对象。化合物可选择人工合成的雌激素,比如己烯雌酚(diethylstilbestrol, DES),其为口服避孕药的主要成分,或者双酚 A(bisphenol A, BPA),其曾广泛使用于食品包装和容器内壁涂装中<sup>[4]</sup>。在实践中,可以通过反转录荧光定量 PCR (quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction, qRT-PCR)检测斑马鱼幼鱼在暴露后体内 *vtg* 基因 mRNA 的诱导水平,或者通过蛋白质免疫印迹法(Western blot)检测相应的 Vtg 蛋白,也可使用商业化的试剂盒,比如 Cayman Chemical 公司的酶联免疫吸附测定(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)试剂盒等。该实验可以向学生直观地阐述有关生物标志物的相关概念,以及目前各种分子生物学检测手段在生态毒理学中的广泛应用。

实验方法简介:以 qRT-PCR 检测 *vtg* 基因的 mRNA 水平为例。化合物按等比间距设置 3~5 个浓度,每个浓度至少 3 个平行。考虑到能否提取足够的 mRNA 进行后续实验,每个平行幼鱼(3 dpf)数量至少为 20 条。暴露 3 d 后,幼鱼整体匀浆,提取总 RNA,进行 cDNA 第一链合成,并进行 qRT-PCR 分析。以肌动蛋白  $\beta$ -actin 为管家基因,测定 *vtg* 相对转录水平<sup>[21]</sup>。可能的话,同时测定雌激素受体(estrogen receptor, *er*)的转录水平,并从 *er* 和 *vtg* 的相关性上使学生对于此类内分泌干扰物的作用机理有更深入理解。

## 2.5 免疫毒性的检测——幼鱼中性粒细胞迁移实验

环境中的污染物暴露可引起免疫系统结构或功能的损害<sup>[22]</sup>。由于免疫系统的复杂性,有关免疫毒性的检测有很多方法。对于鱼类而言,先天免疫系统的作用至关重要。因此,本实验针对先天免疫系统的中性粒细胞,通过测定其迁移能力来评价化合物对于斑马鱼免疫系统的影响。实验选用转基因斑马鱼 Tg(*mpx:EGFP*),其中性粒细胞由荧光蛋白特异性标记,在荧光显微镜下可清楚观察到幼鱼体内中性粒细胞的行为<sup>[23]</sup>。实验中通过幼鱼尾鳍断尾,或

者手术造成其他机械损伤,使得中性粒细胞大量迁移到伤口处,而部分化合物的毒性作用可能改变伤口周围的中性粒细胞数量,从而体现其对免疫系统的损害。在实验中可选用糖皮质激素类化合物,其为临床上通用的消炎剂和免疫抑制剂<sup>[24]</sup>,效应显著。同时,选择此类化合物也可向学生强化药品和个人护理品(pharmaceutical and personal care products, PPCPs)对生态环境的潜在危害这一概念。

实验方法简介:以地塞米松的免疫抑制效应为例。转基因斑马鱼幼鱼(3 dpf)在体视显微镜下切断尾鳍后<sup>[25]</sup>,进行化合物暴露。化合物按等比间距设置 3~5 个浓度,每个浓度至少 3 个平行,每个平行 10 条幼鱼。在暴露后的 12、24、48、72 h 定时统计迁移到伤口周围一定面积内的中性粒细胞数量,从而阐明糖皮质激素类化合物对鱼类免疫系统的抑制作用。

如果购买转基因斑马鱼有困难的话,则可利用苏丹黑(Sudan black)染色检测中性粒细胞在伤口处的招募和迁移<sup>[26]</sup>。此外,也可通过 qRT-PCR 检测免疫系统相关基因的转录水平变化。以细胞因子为例,可检测促炎因子 IL-6、TNF,抗炎因子 IL-10,调控因子 NF $\kappa$ B,以及趋化因子 CC-chem 等等<sup>[27]</sup>。

## 2.6 遗传毒性检测——成鱼红细胞微核实验

微核实验可指示染色体损伤,已成为检测环境污染物致突变效应的有效手段。诸如蚕豆根尖、紫露草、哺乳动物骨髓等,均是常规使用的生物材料<sup>[13]</sup>。不同于哺乳类,鱼类的成熟红细胞依然存在细胞核,因此可进行微核实验,从而用于检测水体中可能的致突变物质。考虑到血量,宜选用成鱼进行实验。实验毒物可选用重铬酸钾(或者丝裂霉素 C)。

实验方法简介:化合物按等比间距设置 3~5 个浓度,每个浓度至少 3 个平行,每个平行 10 尾成鱼。在暴露 7 d 后,按常规方法尾部采血、涂片、染色(可采用吉姆萨 Giemsa 或吖啶橙染色),镜检后记录微核率即可。

此外,也可采用单细胞凝胶电泳技术(single cell gel electrophoresis, SCGE),又名彗星实验,其可在单细胞水平上检测 DNA 损伤与修复<sup>[13]</sup>。以斑马鱼活体暴露为例,其实验流程为:斑马鱼暴露后,按常规方法尾部采血,细胞悬液与琼脂糖混合后铺胶,裂解后置于水平电泳槽中进行 DNA 解旋,之后电泳。电泳时 DNA 断片向阳极迁移,形成特征性彗星尾

部,可在染色(如用溴化乙锭)后观察。彗尾中 DNA 含量越多,表明 DNA 受损越严重。此外,也可采血制备单细胞悬液后再进行体外暴露。详细的实验步骤可参考孔志明主编的《环境毒理学》(第五版)<sup>[13]</sup>。

### 2.7 综合性或者设计性实验——未知化合物或者环境水体的毒性检测

上述实验均针对某一特定毒作用模式,而在实际工作中,需要检测毒性和作用模式未知的化合物,或者需要对环境水体(比如,城市污水或者工业废水)的生物毒性做出综合评价<sup>[4]</sup>。因此,授课教师可就以上实验目标,设置综合性或者设计性实验,让学生运用所掌握的基础知识和实验技能,利用上述基于斑马鱼的水生生态毒性实验方法,并结合其他研究手段,发挥主观能动性,自主设计实验方案,拟定实验步骤,并对结果进行科学有效的整理和分析。在此过程中,不但可以巩固学生对于所学的实验原理和方法的掌握程度,更可以培养学生的创造性思维和独立进行科研的能力。

### 3 结论和展望(Conclusion and expectation)

斑马鱼作为实验动物,符合目前所推崇的 3R 原则(Reduction 减少、Replace 替代、Refinement 优化)<sup>[28]</sup>。相关的毒性数据不但能够为水生生态系统的生态安全性评价提供有效的参考,而且可合理外推至哺乳类乃至人类,具有重要的科学意义。上述一系列实验虽都基于斑马鱼这一种实验动物,但涵盖了不同生物学层面的多个毒理学终点,可以充分训练学生的实验技能,使其进一步巩固所学的理论知识。在实验内容的编排上由易而难,兼顾基础和前沿,授课教师可酌情增删,以满足本科乃至研究生教学的要求。同时,所设置的综合性或者设计性实验,更能全面提高学生的综合科研素质,有利于高级应用型人才的培养。

当然,水生生态毒理学内涵丰富,研究手段多样。在实际教学中,授课教师可以结合初级生产者(如铜绿微囊藻(原核生物)和小球藻(真核生物))、维管植物(如浮萍)、无脊椎动物(如大型蚤)、两栖类动物(如爪蟾)等不同模式生物或者其他本地特有物种,针对不同胁迫设定毒理学终点,建立实验方法,丰富实验教学体系,从而推进我国生态毒理学教学的进一步发展。

通讯作者简介:钱海丰(1973-),男,博士,教授,博士生导师,主要研究方向为生态毒理学,主持国家自然科学基金(5项),

浙江省杰出青年基金等项目。已发表 SCI 论文 70 余篇,被 SCI 源期刊引用 1300 余次。

### 参考文献(References):

- [1] 周启星,孔繁翔,朱琳.生态毒理学[M].北京:科学出版社,2004
- [2] 孟紫强.生态毒理学[M].北京:高教出版社,2009
- [3] 孔志明,杨柳燕,尹大强,等.现代环境生物学实验技术和方法[M].北京:中国环境科学出版社,2005
- [4] 付保荣.环境污染生态毒理与创新型综合设计实验教程[M].北京:中国环境出版社,2016
- [5] 宋志慧.水生生态毒理学实验[M].北京:化学工业出版社,2008
- [6] Rennekamp A J, Peterson R T. 15 years of zebrafish chemical screening [J]. *Current Opinion in Chemical Biology*, 2015, 24(1): 58-70
- [7] Garcia G R, Noyes P D, Tanguay R L. Advancements in zebrafish applications for 21st Century toxicology [J]. *Pharmacology & Therapeutics*, 2016, 161: 11-21
- [8] Truong L, Reif D M, St Mary L, et al. Multidimensional *in vivo* hazard assessment using zebrafish [J]. *Toxicological Sciences*, 2014, 137(1): 212-233
- [9] 王佳佳,徐超,屠云杰,等.斑马鱼及其胚胎在毒理学中的实验研究与应用进展[J].*生态毒理学报*, 2007, 2(2): 123-135  
Wang J J, Xu C, Tu Y J, et al. Experimental research and application of zebrafish and embryos in toxicology [J]. *Asian Journal of Ecotoxicology*, 2007, 2(2): 123-135 (in Chinese)
- [10] Howe K, Clark M D, Torroja C F, et al. The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome [J]. *Nature*, 2013, 496(7446): 498-503
- [11] Westerfield M. *The Zebrafish Book: A Guide for the Laboratory Use of Zebrafish (Danio rerio)* [M]. Eugene: University of Oregon Press, 2000
- [12] 国家环境保护局. GB/T 13267—91 水质物质对淡水鱼(斑马鱼)急性毒性测定方法[S].北京:中国标准出版社,1991
- [13] 孔志明.环境毒理学[M].南京:南京大学出版社,2012
- [14] 朱琳,史淑洁.斑马鱼胚胎发育技术在毒性评价中的应用[J].*应用生态学报*, 2002, 13(2): 252-254  
Zhu L, Shi S J. Utilization of embryo development technique of *Brachydanio rerio* to evaluating toxicity on various chemicals [J]. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2002, 13(2): 252-254 (in Chinese)
- [15] Ahmad F, Noldus L P, Tegelenbosch R A, et al. Zebrafish embryos and larvae in behavioural assays [J]. *Behaviour*, 2012, 149(10-12): 1241-1281

- [16] Noyes P D, Haggard D E, Gonnerman G D, et al. Advanced morphological-behavioral test platform reveals neurodevelopmental defects in embryonic zebrafish exposed to comprehensive suite of halogenated and organophosphate flame retardants [J]. *Toxicological Sciences*, 2015, 145(1): 177-195
- [17] Audira G, Sampurna B, Juniardi S, et al. A simple setup to perform 3D locomotion tracking in zebrafish by using a single camera [J]. *Inventions*, 2018, 3(1): 11
- [18] MacPhail R C, Brooks J, Hunter D L, et al. Locomotion in larval zebrafish: Influence of time of day, lighting and ethanol [J]. *Neurotoxicology*, 2009, 30(1): 52-58
- [19] 彭涛, 王思思, 任琳, 等. 磷酸三苯酯对斑马鱼早期生命阶段的神经毒性研究[J]. *生态毒理学报*, 2016, 11(1): 254-260
- Peng T, Wang S S, Ren L, et al. Neurotoxicity of triphenyl phosphate on the early life stages of zebrafish [J]. *Asian Journal of Ecotoxicology*, 2016, 11(1): 254-260 (in Chinese)
- [20] Van der Ven L T M, Holbech H, Fenske M, et al. Vitellogenin expression in zebrafish *Danio rerio*: Evaluation by histochemistry, immunohistochemistry, and *in situ* mRNA hybridisation [J]. *Aquatic Toxicology*, 2003, 65(1): 1-11
- [21] Sun L W, Wen L L, Shao X L, et al. Screening of chemicals with anti-estrogenic activity using *in vitro* and *in vivo* vitellogenin induction responses in zebrafish (*Danio rerio*) [J]. *Chemosphere*, 2010, 78(7): 793-799
- [22] 李玄, 尹大强, 于振洋, 等. 环境污染物免疫毒性及其研究技术[J]. *生态毒理学报*, 2013, 8(6): 857-863
- Li X, Yin D Q, Yu Z Y, et al. Progress in the technology and research of the immunotoxicity of environmental pollutants [J]. *Asian Journal of Ecotoxicology*, 2013, 8(6): 857-863 (in Chinese)
- [23] Renshaw S A, Loynes C A, Trushell D M I, et al. A transgenic zebrafish model of neutrophilic inflammation [J]. *Blood*, 2006, 108(13): 3976-3978
- [24] Sengupta S, Bisson W H, Mathew L K, et al. Alternate glucocorticoid receptor ligand binding structures influence outcomes in an *in vivo* tissue regeneration model [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology C-Toxicology & Pharmacology*, 2012, 156(2): 121-129
- [25] Mathew L K, Simonich M T, Tanguay R L. AHR-dependent misregulation of Wnt signaling disrupts tissue regeneration [J]. *Biochemical Pharmacology*, 2009, 77(4): 498-507
- [26] Keightley M C, Wang C H, Pazhakh V, et al. Delineating the roles of neutrophils and macrophages in zebrafish regeneration models [J]. *International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 2014, 56(2): 92-106
- [27] Rehberger K, Werner I, Hitzfeld B, et al. 20 Years of fish immunotoxicology—What we know and where we are [J]. *Critical Reviews in Toxicology*, 2017, 47(6): 509-535
- [28] National Research Council of the National Academies. *Toxicity Testing in the 21st Century: A Vision and a Strategy* [M]. Washington, DC: The National Academies Press, 2007