

DOI: 10.7524/AJE.1673-5897.20170928001

贺凯宏, 尚楠, 陈建平, 等. 纳米氧化铝对斑马鱼幼鱼早期运动行为的影响[J]. 生态毒理学报, 2018, 13(3): 165-171

He K H, Shang N, Chen J P, et al. Effects of nano-alumina on motor behaviors of zebrafish larva [J]. Asian Journal of Ecotoxicology, 2018, 13(3): 165-171 (in Chinese)

纳米氧化铝对斑马鱼幼鱼早期运动行为的影响

贺凯宏, 尚楠, 陈建平, 张萍, 张玲, 牛侨, 张勤丽*

山西医科大学公共卫生学院劳动卫生教研室, 太原 030001

收稿日期: 2017-09-28 录用日期: 2017-12-25

摘要: 随着纳米技术的迅猛发展, 纳米材料的安全性研究具有十分重要的意义。为探讨纳米氧化铝对斑马鱼幼鱼早期运动行为的影响, 本研究将受精后 6 h(6 hpf)的斑马鱼胚胎随机分成空白对照组(E3 培养液)、纳米氧化铝组(12.5、25、50、100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)。采用 6 孔板染毒, 每组 160 颗卵, 共 8 个孔, 每孔 20 颗卵/10 mL 试液, 染毒液更新周期为 1 d。观察急性毒性和运动行为。结果显示, 各纳米氧化铝组无明显的急性毒性; 运动行为检测发现, 25、50、100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 纳米氧化铝组受精后 6 d 幼鱼(6 dpf)黑暗状态下的运动速度、运动距离、趋触性程度较空白对照组均显著下降($P<0.05$); 在 6 dpf 幼鱼对强光刺激的惊恐逃避反射试验中发现, 各组幼鱼在光照 1 min 内运动速度较光照前的黑暗期均明显下降($P<0.05$), 但 25 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 和 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 浓度组在光照时速度下降得更慢($P<0.05$); 关闭光源后, 各组幼鱼的运动速度都会上升, 但 25 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 和 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 浓度组在打开光源后速度上升得更慢($P<0.05$)。上述结果表明, 纳米氧化铝可以影响斑马鱼幼鱼早期的运动行为。

关键词: 纳米氧化铝; 斑马鱼; 运动行为

文章编号: 1673-5897(2018)3-165-07 中图分类号: X171.5 文献标识码: A

Effects of Nano-Alumina on Motor Behaviors of Zebrafish Larva

He Kaihong, Shang Nan, Chen Jianping, Zhang Ping, Zhang Ling, Niu Qiao, Zhang Qinli*

Department of Occupational Medicine, School of Public Health, Shanxi Medical University, Taiyuan 030001, China

Received 28 September 2017 accepted 25 December 2017

Abstract: With the rapid development of nanotechnology, the research on the safety of nanomaterial is of great significance. To explore the effects of alumina nanoparticles (AlNPs) on motor behaviors of zebrafish larva, fertilized zebrafish eggs were transferred into 6-well plates, 20 embryos per well, 160 embryos per group, which were exposed to various concentrations of AlNPs suspensions (0, 12.5, 25, 50, 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) until larva reach free swimming stage. AlNPs suspensions were renewed daily. The general toxicity on motor behavior were observed. The results showed that hatch rate and mortality rate in AlNPs treated groups had no significant difference compared with that in controls, while larval swimming parameters, including average velocity and total distance moved and thigmotaxis were significantly affected by AlNPs. Strong light stimulation experiments showed that the average velocity of all groups decreased during the light-on period of 1 min and increased after the light was turned off. However, the average velocity of larva in 25 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ and 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ group altered much slower ($P<0.05$). This study suggests that AlNPs can affect motor behaviors in zebrafish larva.

基金项目: 国家自然科学基金(81673142)

作者简介: 贺凯宏(1991-), 男, 硕士研究生, 研究方向为纳米毒理学, E-mail: xinkaige@foxmail.com;

* 通讯作者(Corresponding author), E-mail: zhangql930611@126.com

Keywords: nano-alumina; zebrafish; motor behaviors

目前,纳米氧化铝主要用于制备催化剂载体、分散助剂、粉末涂料和研磨料等而被广泛应用于微电子、制陶业和生物医学等领域,有研究者计划将纳米氧化铝作为一种用于污水处理的促凝剂和清除有机质的重要成分^[1]。这些应用都可能使纳米氧化铝进入环境,特别是水生环境中,可能对水生生物产生潜在的危害^[2-3]。已有研究表明,纳米氧化铝对多种水生生物有潜在的毒性,如细菌^[4]、藻类^[5-6]、大型蚤^[7]等,但关于纳米氧化铝对斑马鱼胚胎及幼鱼的神经发育毒性尚未见报道。

神经发育对个体发育至关重要,处于发育中的神经系统较成熟的神经系统更加容易受到外源性毒物的作用^[8]。已有文献报道,其他纳米颗粒对斑马鱼胚胎及幼鱼存在神经发育毒性。Chen等^[9]研究发现,纳米二氧化钛暴露不影响斑马鱼胚胎和幼鱼的孵化率、死亡率和畸形率,但会影响斑马鱼幼鱼的运动行为;纳米氧化锌可影响斑马鱼幼鱼的孵化率和运动行为^[10]。本课题组研究亦证实,孕期暴露纳米氧化铝可影响仔鼠正常的神经发育^[11],提示纳米氧化铝可能会影响斑马鱼幼鱼的运动行为。但哺乳动物存在周期长、成本高等局限性,而斑马鱼具有哺乳类动物不具备的优点:繁殖周期短、产卵量大且体外受精、胚胎透明、饲养成本低等;除此之外,斑马鱼基因可以更加简单有效地用于基因重组或者培育转基因斑马鱼^[12]。斑马鱼幼鱼个体小而透明,幼鱼发育至出生后第5天(5 dpf, day post-fertilization)便可自由游动,可以同时为数百条幼鱼进行运动速度、运动轨迹以及光刺激等行为学分析,可以更加客观地评价幼鱼的运动行为^[13-14]。故本研究以斑马鱼幼鱼为研究对象,探讨纳米氧化铝对斑马鱼幼鱼早期运动行为的影响。

1 材料与方法 (Materials and methods)

1.1 材料

成年TU野生型斑马鱼购自中国科学院水生生物研究所国家斑马鱼资源中心(武汉,中国);50 nm粒径氧化铝(货号544833-50G)购自美国Sigma公司(分析纯);BCA(货号CW0014S)蛋白定量试剂盒(北京康为世纪公司);超氧化物歧化酶SOD(货号A003-1)、微量丙二醛MDA(货号A003-1)检测试剂盒(南京建成生物工程研究所);其余化学试剂均为国产分析纯试剂。

SB25-12DTDN超声波清洗机(宁波新芝生物科技股份有限公司);VCX150超声波细胞破碎仪(美国SONICS公司);spectra MAX M₂酶标仪(美国BIORAD公司);nano-ZS90纳米粒度仪(英国马尔文仪器有限公司);OLYMPUS BX51荧光显微镜(日本OLYMPUS公司);斑马鱼幼鱼行为轨迹跟踪系统(Noldus Information Technology);智诚ZXS-R-1090彩屏、编程生化培养箱。

实验用水均为充氧饱和的标准胚胎培养液(E3培养液)^[15]:5 mmol·L⁻¹ NaCl、0.17 mmol·L⁻¹ KCl、0.33 mmol·L⁻¹ CaCl₂和0.33 mmol·L⁻¹ MgSO₄,不含亚甲基蓝,并用NaHCO₃溶液调节pH值至7.2左右。用E3培养液逐级稀释成不同浓度的纳米氧化铝暴露液:12.5、25、50、100 μg·mL⁻¹,超声处理30 min。考虑到纳米材料易团聚沉淀^[16],暴露液均为当天暴露前新鲜配制。

1.2 方法

1.2.1 纳米颗粒的表征

用E3培养液配制不同浓度的纳米氧化铝悬液,超声处理30 min后,用nano-ZS90纳米粒度仪检测纳米颗粒的尺寸及电位。

1.2.2 斑马鱼饲养与繁殖

斑马鱼饲养于爱生牌1型5层双排养殖单元循环养殖系统,水温(28±1)℃,pH值7.2~7.8,电导率500~550 μS·cm⁻¹。光照自动控制,光照/黑暗周期为14 h:10 h,光照时间为8:30—22:30。斑马鱼每日规律喂食2次人工孵化的丰年虾(“七彩鱼”牌)幼体。繁殖方法参考文献[17]进行。

1.2.3 急性毒性试验

收集受精后6 h(6 hpf, hour post-fertilization)的斑马鱼胚胎于6孔板中,以E3培养液为空白对照组,不同浓度的纳米氧化铝暴露液为染毒组,每组160颗,共8个孔,每孔20颗卵/10 mL试液,染毒液更新周期为1 d。水温保持在28.5℃左右,光照/黑暗周期控制在14 h:10 h。以卵凝结或心脏停跳为死亡终点,记录受精后144 h的死亡率;分别记录胚胎受精后48、54、60、72、96 h的孵化率。同时采集染毒时间达到24 h和48 h的斑马鱼胚胎及幼鱼图片。

1.2.4 黑暗状态下的运动行为及趋触性检测

在显微镜下随机选择各浓度组外观正常的受精后6 d(6 dpf, day post-fertilization)幼鱼,将其放入24

孔板中,24条/组。开启斑马鱼幼鱼行为轨迹跟踪系统,参考文献[18]设置观察区域和检测程序。采集3 min幼鱼运动视频。用EthoVision XT 10软件分析视频,导出运动速度、运动距离、在外区累计持续时间百分数等参数。

1.2.5 对强光刺激的惊恐逃避反射试验

随机选取同批次各浓度组6 dpf幼鱼放入24孔板中,24条/组。开启斑马鱼幼鱼行为轨迹跟踪系统,设置观察区域和检测程序。采集7 min幼鱼运动视频。其中前、后3 min无光照,中间1 min(即第4分钟)突然开启底座灯强光照1 min后迅速关闭。用EthoVision XT10软件分析视频,导出各个时间段幼鱼运动速度等参数。

1.2.6 统计学方法

应用SPSS22.0分析软件进行统计学分析,实验结果用 $\bar{x}\pm s$ 表示,正态性检验采用Shapiro-Wilk检验,方差齐性检验采用Levene方差齐性检验。方差分析采用单因素方差分析,多重比较采用最小显著

差法(LSD-t)检验。不满足正态或方差不齐采用秩检验(rank test)。

2 结果与分析 (Results and analysis)

2.1 纳米氧化铝的表征

本研究所用纳米氧化铝的表征参数数值见表1。

2.2 纳米氧化铝对斑马鱼胚胎的急性毒性

将受精后6 h(6 hpf)的斑马鱼胚胎暴露于不同浓度的纳米氧化铝悬液中,得出各浓度组胚胎/幼鱼144 hpf累积死亡率和各时间段胚胎孵化率。与空白对照组相比,孵化率、死亡率均无统计学差异($P>0.05$)。

由图1可知,与对照组相比,25、50、100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 纳米氧化铝组胚胎染毒24 h后着色加深,胚胎包膜表面遍布颗粒(见图1A);与对照组相比,25、50、100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 纳米氧化铝组染毒48 h后幼鱼头部着色均有加深,以100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 组最为明显,脑组织着色加深明显,轮廓已不清晰(见图1B)。

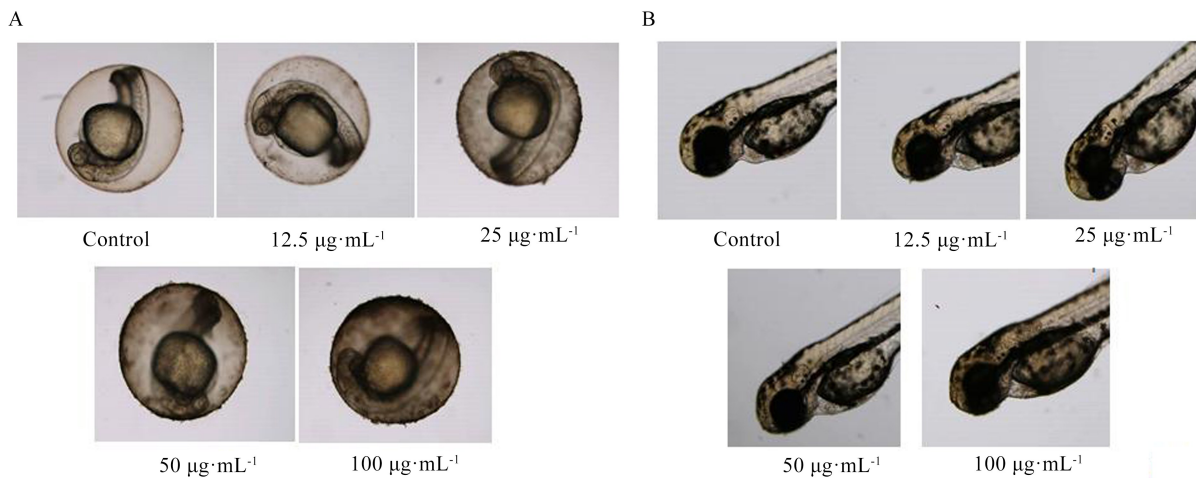


图1 纳米氧化铝染毒对斑马鱼胚胎(6 hpf)和幼鱼(6 dpf)的毒性影响

注:A图,染毒24 h的斑马鱼胚胎;B图,染毒48 h的斑马鱼幼鱼。

Fig. 1 Images of zebrafish embryo (6 hpf) and larvae (6 dpf) after exposure to nano-alumina

Note: A, the zebrafish embryos exposed for 24 h; B, the zebrafish larvae exposed for 48 h.

表1 纳米氧化铝的尺寸和电位($\bar{x}\pm s$)

Table 1 Size and potential of nano-alumina ($\bar{x}\pm s$)

| | 平均粒径/nm Average particle size/nm | Zeta 电位/mV Zeta potential/mV |
|-----------------------------------|-------------------------------------|---------------------------------|
| 50 nm 氧化铝 Nano-Alumina (50 nm) | 88.58±2.09 | 45.3±2.12 |

2.3 纳米氧化铝暴露对幼鱼黑暗状态下运动能力及趋触性程度的影响

图2为不同浓度纳米氧化铝暴露6d后幼鱼的运动行为及趋触性行为。与对照组相比,25、50、100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 纳米氧化铝组幼鱼的运动速度、运动距离均显著下降($P<0.05$),幼鱼运动行为能力受到抑制

(见图2A和图2B)。以外区累计持续时间百分数为指标考察幼鱼趋触性程度^[18],50、100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 纳米氧化铝组幼鱼趋触性程度较空白对照组均显著下降($P<0.01$),表明这2组幼鱼触壁行为减弱(见图2C)。图3为各组幼鱼的运动行为轨迹图和热区图。

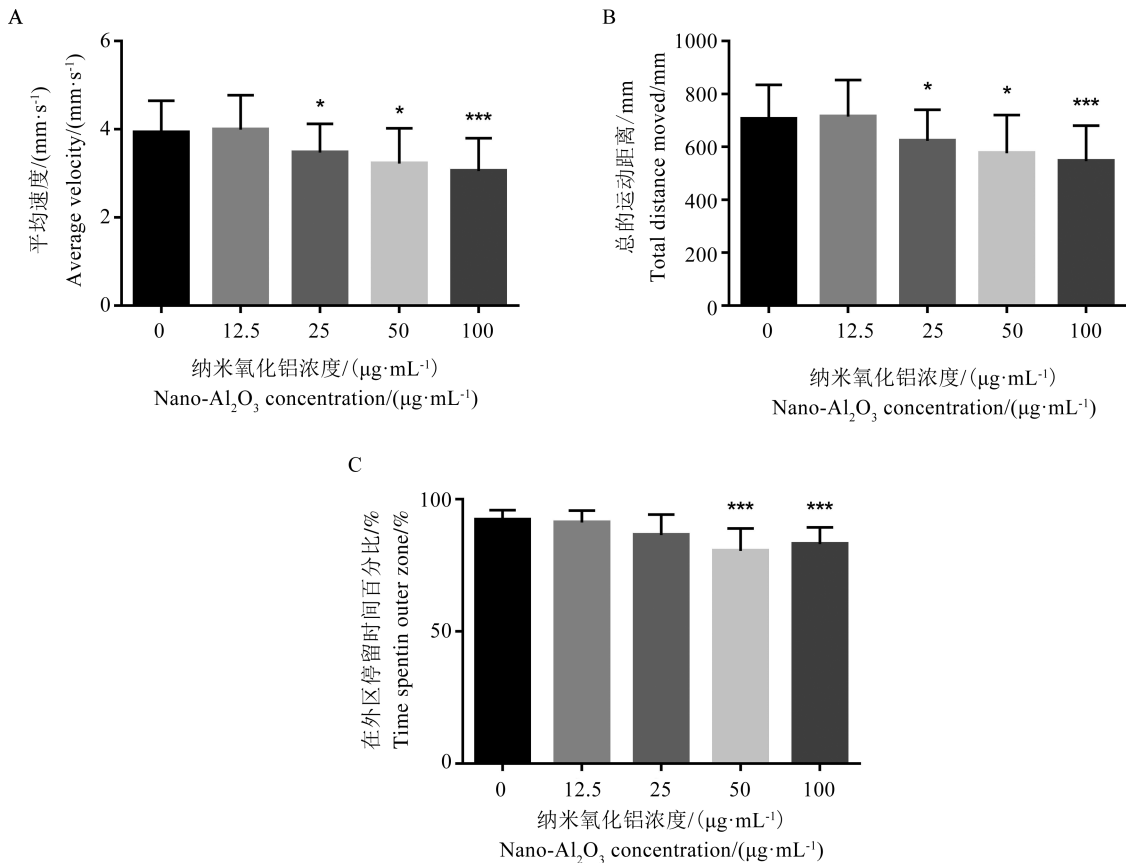


图2 不同浓度纳米氧化铝暴露6d后幼鱼的运动行为及趋触性行为

注:与对照组比较,* $P<0.05$,*** $P<0.01$ 。

Fig. 2 The motor behavior and thigmotaxis of zebrafish larvae after 6 days of exposure to different concentrations of nano-alumina

Note: Compared with control, * $P<0.05$, *** $P<0.01$.

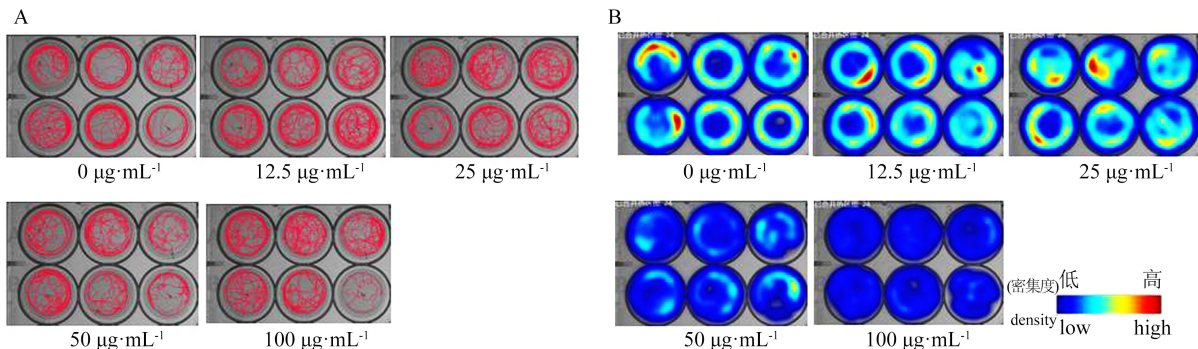


图3 不同浓度纳米氧化铝暴露6d后幼鱼运动行为轨迹图(A)和热区图(B)

Fig. 3 The trajectory (A) and heat map (B) of motor behavior of zebrafish larvae after 6 days of exposure to different concentrations of nano-alumina

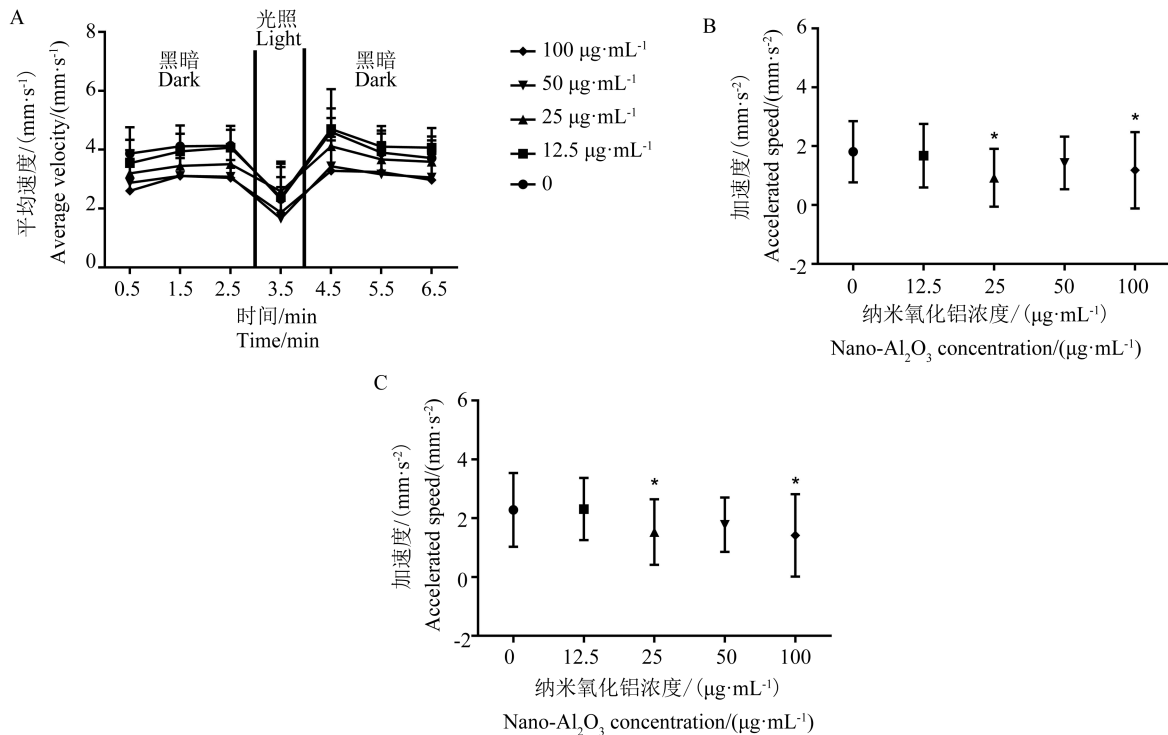


图4 纳米氧化铝暴露对幼鱼(6 dpf)惊恐逃避反射能力的影响

注:A图,不同浓度纳米氧化铝组幼鱼速度随时间变化图;B图,光照1 min时各组幼鱼运动速度的变化($\text{mm}\cdot\text{s}^{-2}$);

C图,光照1 min后各组幼鱼运动速度的变化($\text{mm}\cdot\text{s}^{-2}$)。与对照组比较,* $P < 0.05$ 。

Fig. 4 The effect of nano-alumina on panic and avoidance reflection of 6 dpf zebrafish larvae

Note: A, the velocity of larvae in different concentrations of nano-alumina changed with time;

B, the accelerated speed during the illumination time of 1 min;

C, the accelerated speed of 1 min after the illumination time. Compared with control, * $P < 0.05$.

2.4 纳米氧化铝暴露对幼鱼(6 dpf)惊恐逃避反射能力的影响

图4显示,各组幼鱼在光照1 min内运动速度较光照前的黑暗期均明显下降($P < 0.05$)(见图4A)。但 $25 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 和 $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 浓度组在光照时速度下降得更慢($P < 0.05$)(见图4B);关闭光源后,各组幼鱼的运动速度都会上升,但 $25 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 和 $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 浓度组在关闭光源后速度上升得更慢($P < 0.05$)(见图4C)。这提示幼鱼应激水平下降。

3 讨论(Discussion)

3.1 利用斑马鱼幼鱼建立早期运动行为检测模型

纳米氧化铝可以导致大鼠^[9]、小鼠^[11]等哺乳动物神经行为受损,运动能力下降。但哺乳动物存在周期长、成本高等局限性。而斑马鱼因其独特的优势而成为一种评价纳米毒性的良好动物模型,斑马鱼的行为作为一项敏感指标也已成为评价纳米毒性

水平最重要的参数,而运动行为又是斑马鱼行为学中与毒性测试最密切相关和高度研究的内容^[20]。Chen等^[9]2011年采用斑马鱼幼鱼行为轨迹跟踪系统检测了纳米二氧化钛对5 dpf斑马鱼幼鱼运动行为的影响,结果发现幼鱼运动行为受损,且运动行为比其他参数(如孵化率、死亡率等)更敏感。Chen等^[10]2014年的研究还发现高浓度纳米氧化锌($5\sim 10 \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)亦会影响斑马鱼幼鱼的运动行为。未见纳米氧化铝对斑马鱼幼鱼运动行为影响的报道。本研究初步建立了24孔板对斑马鱼幼鱼早期运动行为研究的评价方法,引入了趋触性行为。从幼鱼早期自发运动速度、运动距离、趋触性程度,黑暗条件下自发运动轨迹和热区图,以及对强光刺激的惊恐逃避反射等,客观评价了纳米氧化铝对斑马鱼幼鱼早期运动行为的影响。

3.2 纳米氧化铝导致斑马鱼幼鱼早期运动能力下降
高浓度纳米氧化铝($25, 50, 100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)暴露会

导致斑马鱼幼鱼自发运动受损,可能与纳米颗粒引起鱼鳍氧化损伤有关。趋触性可反映幼鱼的紧张程度^[8],50、100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 纳米氧化铝组幼鱼趋触性下降,幼鱼紧张程度降低,怀疑纳米氧化铝透过血脑屏障进入了幼鱼脑组织。在6 dpf 幼鱼对强光刺激的惊恐逃避反射试验中发现,25 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 和100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 浓度组对强光刺激的惊恐反射能力和强光刺激后的黑暗逃避反射能力均下降,而幼鱼的应激反射受中枢神经系统支配,提示纳米氧化铝可能具有中枢神经系统毒性,这与纳米氧化铝具有神经毒性^[11]的结论一致。考虑到纳米材料易团聚沉淀^[16],团聚沉淀会使纳米颗粒在行为方式上与分散的颗粒表现不同,影响纳米颗粒在水环境中的迁移作用,进而影响纳米颗粒的生态毒理学效应。但尚未查到纳米颗粒团聚会影响斑马鱼幼鱼运动行为的报道,所以纳米氧化铝团聚对斑马鱼幼鱼运动行为的影响尚不清楚。但目前有研究表明,纳米材料团聚可引起细胞炎症和氧化应激反应^[21]。

3.3 纳米氧化铝对多种水生生物有潜在毒性

Zaleska-Radziwiłła 和 Dosekocz^[4]2016年通过随机扩增多态性DNA(RAPD)-PCR法来分析纳米氧化铝对恶臭假单胞菌的遗传毒性,发现纳米氧化铝可以影响DNA的稳定性。研究发现,纳米氧化铝抑制西班牙栅藻和小球藻生长的72 h半数有效浓度(72 h-EC₅₀)分别是39.35 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 和45.4 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ^[6];纳米氧化铝抑制大型蚤游动的48 h-EC₅₀为114.357 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 而48 h半数致死浓度(48 h-LC₅₀)为162.392 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ^[7]。Zhu等^[22]2008年将斑马鱼胚胎暴露于纳米氧化铝悬浊液中,发现纳米氧化铝对斑马鱼胚胎96 h孵化率、死亡率和畸形率均没有影响。未见纳米氧化铝对斑马鱼幼鱼神经行为的报道。

综上所述,纳米氧化铝可以影响斑马鱼幼鱼早期的运动行为,但纳米氧化铝对幼鱼鱼鳍的影响及幼鱼脑组织中的铝含量仍待进一步研究。

通讯作者简介:张勤丽(1968—),女,职业卫生与职业医学博士,教授,主要研究方向为纳米铝的神经毒性,主持国家自然科学基金5项,获省部级科研奖励6项,发表学术论文90余篇。

参考文献(References):

[1] Xu H, Xiao F, Wang D S, et al. Survey of treatment process in water treatment plant and the characteristics of flocs formed by two new coagulants [J]. Colloids and

Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects, 2014, 456: 211-221

- [2] Karwowska E, Mrozowicz M, Zawada A, et al. Impact of Al₂O₃ nanopowders characterised by various physicochemical properties on growth of green alga *Scenedesmus quadricauda* [J]. Advances in Applied Ceramics: Structural, Functional and Bioceramics, 2012, 111(3): 142-148
- [3] Yuan G D. Environmental nanomaterials: Occurrence, syntheses, characterization, health effect, and potential applications [J]. Journal of Environmental Science and Health, 2004, 39(10): 2545-2548
- [4] Załeska-Radziwiłła M, Dosekocz N. DNA changes in *Pseudomonas putida* induced by aluminum oxide nanoparticles using RAPD analysis [J]. Desalination and Water Treat, 2016, 57(3): 1573-1581
- [5] Ma S, Zhou K, Yang K, et al. Heteroagglomeration of oxide nanoparticles with algal cells: Effects of particle type, ionic strength and pH [J]. Environmental Science and Technology, 2014, 49(2): 932-939
- [6] Mukherjee A, Chandrasekaran N, Pakrashi S, et al. Studies on toxicity of aluminum oxide (Al₂O₃) nanoparticles to microalgae species: *Scenedesmus* sp. and *Chlorella* sp. [J]. Journal of Nanoparticle Research, 2011, 13(8): 3287-3299
- [7] Zhu X S, Zhu L, Chen Y, et al. Acute toxicities of six manufactured nanomaterial suspensions to *Daphnia magna* [J]. Journal of Nanoparticle Research, 2009, 11(1): 67-75
- [8] Nishimura Y, Murakami S, Ashikawa Y, et al. Zebrafish as a systems toxicology model for developmental neurotoxicity testing [J]. Congenital Anomalies, 2015, 55(1): 1-16
- [9] Chen T H, Lin C Y, Tseng M C. Behavioral effects of titanium dioxide nanoparticles on larval zebrafish (*Danio rerio*) [J]. Marine Pollution Bulletin, 2011, 63(5-12): 303-308
- [10] Chen T H, Lin C C, Meng P J. Zinc oxide nanoparticles alter hatching and larval locomotor activity in zebrafish (*Danio rerio*) [J]. Journal of Hazardous Materials, 2014, 277: 134-140
- [11] 丁勇,贾利娜,杨斌,等. 孕期暴露纳米氧化铝对子代小鼠神经发育的影响[J]. 中华劳动卫生职业病杂志, 2013, 31(10): 744-748
- Ding Y, Jia L N, Yang B, et al. The research of the developmental neurotoxicity and its mechanism induced by nano-alumina [J]. Chinese Journal of Industrial Hygiene and Occupational Diseases, 2013, 31(10): 744-748 (in Chinese)
- [12] Kang X, Wei D, Xiao J, et al. Development and applica-

- tion of biological technologies in fish genetic breeding [J]. Science China Life Sciences, 2015, 58(2): 187-201
- [13] Elsalini O A, Rohr K B. Phenylthiourea disrupts thyroid function in developing zebrafish [J]. Development, Genes and Evolution, 2003, 212(12): 593-598
- [14] Richendrer H, Créton R. Automated high-throughput behavioral analyses in zebrafish larvae [J]. Journal of Visualized Experiments Jove, 2013, 4(77): e50622
- [15] Nüsslein-Volhard C, Granato M, Brand M. Keeping and Raising Zebrafish [M]// Nüsslein-Volhard C, Dahm R. Zebrafish: A Practical Approach. Oxford: Oxford University Press, 2002: 50
- [16] Vincenzini P. Ceramic Powders [M]. Amsterdam: Elsevier Scientific Publishing Company, 1983: 623
- [17] 贾俊彩, 王锋, 余济美. 斑马鱼在纳米金属及金属氧化物毒性研究中的应用[J]. 环境化学, 2011, 30(1): 153-157
- Jia J C, Wang F, Yu J M. Toxicity study of metal and metal oxide nanoparticles by using zebrafish [J]. Environmental Chemistry, 2011, 30(1): 153-157 (in Chinese)
- [18] Schnörr S J, Steenbergen P J, Richardson M K, et al. Measuring thigmotaxis in larval zebrafish [J]. Behavioural Brain Research, 2012, 228(2): 367-374
- [19] Mirshafa A, Nazari M, Jahani D, et al. Size-dependent neurotoxicity of aluminum oxide particles: A comparison between nano- and micrometer size on the basis of mitochondrial oxidative damage [J]. Biological Trace Element Research, 2017(10): 1-9
- [20] Chakraborty C, Sharma A R, Sharma G, et al. Zebrafish: A complete animal model to enumerate the nanoparticle toxicity [J]. Journal of Nanobiotechnology, 2016, 14: 65
- [21] Warheit D B. Nanoparticles: Health impacts? [J]. Materials Today, 2004, 7(2): 32-35
- [22] Zhu X, Zhu L, Duan Z, et al. Comparative toxicity of several metal oxide nanoparticle aqueous suspensions to zebrafish (*Danio rerio*) early developmental stage [J]. Journal of Environmental Science and Health Part A-Toxic/Hazardous Substances & Environmental Engineering, 2008, 43(3): 278-284 ◆