

DOI: 10.7524/AJE.1673-5897.20221010001

卯明彩, 孟瑞媛, 李亚梦, 等. 环丙沙星对斑马鱼早期发育阶段的神经毒性研究[J]. 生态毒理学报, 2023, 18(4): 411-420

Mao M C, Meng R Y, Li Y M, et al. Neurotoxicity of ciprofloxacin on early life stages of *Danio rerio* [J]. Asian Journal of Ecotoxicology, 2023, 18(4): 411-420 (in Chinese)

## 环丙沙星对斑马鱼早期发育阶段的神经毒性研究

卯明彩, 孟瑞媛, 李亚梦, 赵小余, 钱永忠, 邱静

中国农业科学院农业质量标准与检测技术研究所, 农业农村部农产品质量安全重点实验室, 北京 100081

收稿日期: 2022-10-10 录用日期: 2022-12-16

**摘要:** 环丙沙星是恩诺沙星的主要代谢产物, 因其抗菌谱广、杀菌力强、起效快等优点而被广泛应用, 在土壤、水体等环境中被不同程度检出, 然而目前有关环丙沙星对鱼类早期生命发育阶段的神经毒性效应研究较少。采用模式动物斑马鱼(*Danio rerio*)作为研究对象, 在0.1、1 mg·L<sup>-1</sup>浓度水平上, 从胚胎自发运动、运动活性、乙酰胆碱酯酶活性及多巴胺、血清素通路和神经发育关键基因的表达等方面评估环丙沙星对斑马鱼早期发育阶段的神经毒性。结果表明, 0.1 mg·L<sup>-1</sup>浓度组抑制斑马鱼胚胎自发运动( $P<0.001$ ), 1 mg·L<sup>-1</sup>浓度组诱导乙酰胆碱酯酶活性( $P<0.05$ ); 1 mg·L<sup>-1</sup>浓度组斑马鱼运动行为活跃( $P<0.05$ )和光照刺激惊厥反应性增加( $P<0.01$ ); 同时, 胆碱能系统、多巴胺、血清素通路和神经发育系统的 *ache*、*shha*、*th2*、*htr1aa*、*htr5a* 表达上调( $P<0.05$ ), *gfap*、*dat*、*nestin* 基因表达下调( $P<0.05$ )。这些结果表明环丙沙星可能通过影响多巴胺、血清素和神经发育关键基因的表达产生神经毒性, 进而影响运动行为。

**关键词:** 环丙沙星; 斑马鱼; 神经毒性; 行为学; 乙酰胆碱酯酶

文章编号: 1673-5897(2023)4-411-10 中图分类号: X171.5 文献标识码: A

## Neurotoxicity of Ciprofloxacin on Early Life Stages of *Danio rerio*

Mao Mingcai, Meng Ruiyuan, Li Yameng, Zhao Xiaoyu, Qian Yongzhong, Qiu Jing

Institute of Agricultural Quality Standards and Testing Technology, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Key Laboratory for Quality and Safety of Agricultural Products of the Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Beijing 100081, China

Received 10 October 2022 accepted 16 December 2022

**Abstract:** Ciprofloxacin is the main metabolite of enrofloxacin, which is widely used because of its broad antibacterial spectrum, strong bactericidal force and rapid onset of action, and has been detected in soil, water and other environments to varying degrees. However, there are few studies on the neurotoxic effects of ciprofloxacin on early life stages of fish development. Therefore, in this study, the model animal zebrafish (*Danio rerio*) was used to assess the neurotoxicity of ciprofloxacin on zebrafish at early developmental stages in terms of embryonic spontaneous movements, motor activity, acetylcholinesterase activity and expression of dopamine and serotonin pathways and key neurodevelopmental genes at concentrations of 0.1 mg·L<sup>-1</sup> and 1 mg·L<sup>-1</sup>. Our results showed that the 0.1 mg·L<sup>-1</sup> concentration group inhibited the spontaneous movement of zebrafish embryos ( $P<0.001$ ), and the 1 mg·L<sup>-1</sup> concentration group induced acetylcholinesterase activity ( $P<0.05$ ). Zebrafish in 1 mg·L<sup>-1</sup> group showed active locomotor activity ( $P<0.05$ ) and increased startle response upon light stimulation ( $P<0.01$ ); at the same time, upregulation of *ache*, *shha*, *th2*, *htr1aa*, *htr5a* and downregulation of *gfap*, *dat*, *nestin* were observed ( $P<0.05$ ). These results suggest that ciprofloxacin may produce neurotoxicity by affecting dopamine, serotonin and neurodevelopmental key genes expression, thereby affecting locomotor behavior.

**基金项目:** 中国农业科学院科技创新工程项目(CAAS-ASTIP-IQSTAP); 国家乳业技术创新中心创建重点项目(2021-国家乳创中心-10)

**第一作者:** 卯明彩(1996—), 女, 硕士研究生, 研究方向为食品质量与安全, E-mail: 1976215569@qq.com

\* 通信作者( Corresponding author ), E-mail: qiuqing@caas.cn

lation of the expression levels of genes *ache*, *shha*, *th2*, *htr1aa* and *htr5a* ( $P<0.05$ ), and downregulation of the expression levels of genes *gfap*, *dat* and *nestin* ( $P<0.05$ ) were observed, which regulate the cholinergic, dopaminergic, serotonergic and neurodevelopmental systems. These results suggested that ciprofloxacin produced neurotoxicity by affecting the expression of dopamine, serotonin and key neurodevelopmental genes, thereby causing alterations in motor behavior.

**Keywords:** ciprofloxacin; zebrafish; neurotoxicity; behaviors; acetylcholinesterase

氟喹诺酮类(fluoroquinolones, FQs)抗生素是喹诺酮类药物在6位上加上一个氟原子后形成的第三代药物,具有更强的抗菌活性,因其广谱性和抑制大多数细菌的脱氧核糖核酸旋转酶和拓扑异构酶Ⅳ的能力使其适用于治疗多种养殖动物和鱼类的感染<sup>[1]</sup>。FQs类药物进入环境生态系统,主要源自医疗行业、水产养殖以及畜牧业的大量使用<sup>[2]</sup>。其在体内不能完全代谢,大部分会通过粪便,尿液等途径释放到水生系统中<sup>[3]</sup>。大量研究报道废水中FQs类抗生素残留水平较高<sup>[4]</sup>。研究表明已在多种水生环境中检测到 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 水平的抗生素,甚至在 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 浓度水平,在地表河水中检测到恩诺沙星的含量为 $0\sim 136\text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$ ,生产兽用抗生素的制药公司的废水中氟喹诺酮类药物的含量最高达大约 $200\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ <sup>[5-8]</sup>,此外,根据2020年全国农产品抽检报告可知,2020年水产品中恩诺沙星与环丙沙星检出范围之和为 $18.7\sim 13\ 800.0\ \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ,平均值为 $895.4015\ \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ <sup>[9]</sup>;2020年阿根廷市场上的水产品检出情况为恩诺沙星(太平洋鲑鱼 $17.37\ \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 、鲷鱼 $22.63\ \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 、鳟鱼 $3.91\ \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ),环丙沙星(太平洋鲑鱼 $13.2\ \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 、鳟鱼 $70.41\ \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ )<sup>[10]</sup>。

环丙沙星具有抗菌谱广、杀菌力强、起效快、不易产生耐药性、价格低廉等特点<sup>[11]</sup>,而被广泛应用,其也是恩诺沙星的主要代谢产物,由于氟喹诺酮类药物本身的性状和不合理使用现象的存在,引起了一系列的不良反应,主要包括胃肠道反应、中枢神经系统毒性、光毒性、肝毒性和过敏反应等<sup>[12]</sup>,氟喹诺酮类药物引起的中枢神经毒性发生率仅次于胃肠道反应,中枢神经毒性主要表现为失眠、头痛、头昏,严重者会精神异常、昏厥等<sup>[13]</sup>,研究表明诺氟沙星是通过诱导神经系统内细胞凋亡的发生,扰乱神经元和神经胶质细胞系的分化平衡来引发神经毒性<sup>[14]</sup>,环丙沙星在高浓度组( $50\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ )表现出诱发抑郁和焦虑状态,是通过降低脑部血清素和 $\gamma$ -氨基丁酸( $\gamma$ -aminobutyric acid, GABA)的含量,并增强氧化应激及降低抗氧化防御系统来引起神经毒性的<sup>[15]</sup>,诺氟

沙星单独或与磺胺甲噁唑联合使用可抑制金鱼的乙酰胆碱酯酶活性<sup>[16]</sup>。当恩诺沙星暴露鲇鱼时体内乙酰胆碱酯酶的活性发生了变化<sup>[17]</sup>。以往研究表明环丙沙星引起的神经毒性强于依诺沙星、培氟沙星,但对其引发的神经毒性的机制尚未明确。目前研究认为,该毒性可能与 $\gamma$ -氨基丁酸A受体和N-甲基-D-天冬氨酸(N-methyl-D-aspartic acid, NMDA)受体活性相关<sup>[18]</sup>。通过对FQs暴露后的斑马鱼幼鱼的行为效应和组织病理学分析,发现FQs对神经具有显著的毒理学效应,但其神经毒性作用机制尚未完全明确,因此需要进一步的研究来阐明斑马鱼幼鱼与FQs相关的神经毒性作用机制<sup>[19]</sup>。

乙酰胆碱酯酶(acetylcholinesterase, AchE)被认为是检测神经毒性的生物标志物<sup>[20]</sup>,da Silva Santos等<sup>[21]</sup>的研究表明药物长期暴露后斑马鱼的AchE活性升高是斑马鱼产生神经毒性的原因之一,章子男等<sup>[22]</sup>报道了神经性毒剂塔崩染毒小鼠后使AchE活性上升。运动行为指标相较于死亡率和孵化率等指标对水生环境中的污染物更为敏感,而斑马鱼早期生命阶段的运动行为已被用来评估化学物质的发育神经毒性<sup>[23]</sup>。

斑马鱼(*Danio rerio*)因生理机制与哺乳动物具有高度保守性、基因与人类基因同源性高、产卵量大、繁殖能力强、胚胎透明、发育周期短、借助显微镜可观察到胚胎活体状态下的发育过程等<sup>[24]</sup>优点而被广泛用于毒理学、遗传学、免疫学和损伤修复<sup>[25]</sup>等研究领域。鉴于此,本研究选取环丙沙星为暴露用药,将斑马鱼胚胎暴露于不同浓度的环丙沙星,通过测定斑马鱼胚胎自发运动、运动行为、乙酰胆碱酯酶活性和神经递质、神经发育系统标志基因表达,从而探究环丙沙星对斑马鱼胚胎的神经毒性影响。

## 1 材料与方法 (Materials and methods)

### 1.1 试剂和仪器

环丙沙星(纯度 $>99\%$ ,天津阿尔塔科技有限公司);乙酰胆碱酯酶活性试剂盒(南京建成生物工程研究所);RNA提取、反转录和荧光定量PCR试剂盒

(北京京北日晟生物科技有限公司)。

斑马鱼养殖系统(Z-A-S5,上海海圣生物实验设备有限公司,中国)、体式光学显微镜(SZX2-ILLT,日本奥林巴斯);人工气候培养箱(RXM 智能型,宁波江南仪器厂,中国);酶标仪(Infinite M200 PRO,美国TECAN 公司),斑马鱼行为分析仪(DanioVison, Noldus 公司,荷兰);荧光定量 PCR 仪(CFX96TM Real Time PCR Detection System, BioRad, 美国)。

## 1.2 实验动物

本实验所用斑马鱼为 AB 系野生鱼,购自南京一树梨花生物科技有限公司。饲养条件如下:光照周期 14 h(光)/10 h(暗),水温( $28 \pm 0.5$ ) °C, pH=7.20 $\pm$ 0.3,电导率( $500 \pm 30$ ) S $\cdot$ m<sup>-1</sup>,每天投喂丰年虾活体(*Artemia nauplii*)2 次。实验前一晚,将健康斑马鱼按雌鱼和雄鱼 2:2(个体数目比)的比例放置于产卵缸内,次日清晨完成交配和产卵,挑选发育正常的斑马鱼胚胎用于药物暴露实验。

## 1.3 斑马鱼胚胎暴露实验

实验前配制系列浓度暴露溶液,实验共设 3 个环丙沙星浓度梯度:0(超纯水)、0.1、1 mg $\cdot$ L<sup>-1</sup>,收集斑马鱼胚胎,于显微镜下挑选发育正常,同一时期的胚胎置于 6 孔板中,加入相应体积的暴露液,于恒温培养箱中培养至 120 hpf (hours post fertilization, hpf),每个浓度设置 6 个平行,每个平行 30 枚胚胎,每 24 h 更换一次暴露液,暴露浓度依据农产品抽检结果和预实验结果选定。

分别在暴露 0 h 和 24 h 取 100  $\mu$ L 暴露液进行浓度测定,色谱条件:XBridge@C18 色谱柱(2.1 mm $\times$ 100 mm, 3.5  $\mu$ m),流动相为 0.1% 甲酸水(A)-0.1% 甲酸乙腈(B),流速为 0.4 mL $\cdot$ min<sup>-1</sup>;柱温为 40 °C;进样量为 1  $\mu$ L。质谱条件:电喷雾离子源;去簇电压(DP)为 73 V;正离子模式扫描;离子源电压为 4 500 V;雾化器温度为 500 °C;检测方式为多反应监测(multiple reaction monitoring mode, MRM),碰撞能为 23 V,保留时间为 2.02 min。

## 1.4 胚胎自发运动测定

从不同浓度暴露组中随机挑选 20 枚发育至 24 hpf 的斑马鱼胚胎,于显微镜下视频记录并计数斑马鱼胚胎的自发胎动情况,每次 30 s,重复观察 2 次,观测前,将胚胎置于显微镜下适应 2 min。

## 1.5 运动行为测定分析

经环丙沙星暴露后,每组随机取出 30 条发育至 120 hpf 的斑马鱼幼鱼进行运动行为分析测定。将

选取的幼鱼置于 96 孔板内,每孔 1 尾幼鱼和 300  $\mu$ L 暴露液。完成准备工作后,将 96 孔板置于斑马鱼行为分析仪中进行运动行为测试,测试幼鱼在持续光照(自由游泳行为)、光暗周期下(运动活性监测)和不同光照刺激时长(光照刺激惊恐反应)下的运动行为。自由游泳行为检测程序为 10 min 暗-20 min 亮,检测斑马鱼仔鱼在连续光照下的运动行为;运动活性监测测定程序为 10 min 暗-5 min 亮-5 min 暗-5 min 亮-5 min 暗,检测斑马鱼仔鱼在光暗周期刺激下的游泳行为;光照刺激惊恐反应检测程序为 10 min 暗-1 min 亮-5 min 暗-2 min 亮-5 min 暗-3 min 亮,检测斑马鱼仔鱼在不同强光刺激时长下的应激惊恐行为。

## 1.6 乙酰胆碱酯酶活性检测

按照上述暴露条件处理斑马鱼胚胎至 120 hpf,收集幼鱼并整体组织匀浆,检测其乙酰胆碱酯酶活性。每个处理组 3 个平行,每个平行 30 条幼鱼(剔除未正常发育个体)。使用乙酰胆碱酯酶检测试剂盒进行测定。测定过程为:准确称取幼鱼组织质量,按照质量(g):体积(mL)为 1:9 的比例,加入 9 倍体积的生理盐水,在 0 °C 下超声破碎 15 min,2 500 r $\cdot$ min<sup>-1</sup>离心 10 min,于冰上待用,取上清液 30  $\mu$ L 用于测定乙酰胆碱酯酶活性,依次添加底物缓冲液和显色应用液 500  $\mu$ L(以上步骤于冰上避光操作),混匀,37 °C 准确反应 6 min 后,依次添加抑制剂 30  $\mu$ L、透明剂 100  $\mu$ L(以上步骤于常温条件下操作),混匀,静止 15 min 后,使用酶标仪于 412 nm 测定各管吸光度值。为了消除样品制备时由于蛋白量的差异而造成的误差,使用 Bradford 蛋白浓度测定试剂盒检测样品蛋白量。

## 1.7 实时荧光定量 PCR

按照上述暴露条件处理斑马鱼胚胎至 120 hpf,收集幼鱼,每个处理组 3 个平行,每个平行 50 条幼鱼(剔除未正常发育个体),液氮速冻,置于-80 °C 冰箱保存,使用试剂盒进行总 RNA 提取,提取过程为:获得的幼鱼组织中,加入 500  $\mu$ L 的 Buffer RL1 于 20 °C 条件下破碎匀浆 15 min,将匀浆液转移至 DNA-Cleaning Column 中(DNA-Cleaning Column 放入收集管中),12 000 r $\cdot$ min<sup>-1</sup>离心 2 min,移除 DNA-Cleaning Column,保留收集管内上清液,加入 1.6 倍体积的 Buffer RL2,轻柔混匀,将混合液转移至 RNA-Only Column 中(纯化柱放入收集管中),12 000 r $\cdot$ min<sup>-1</sup>离心 1 min,弃收集管中的废液,重复一次,

向纯化柱中加入 500  $\mu\text{L}$  的 Buffer RW1, 12 000  $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$  离心 1 min, 弃收集管中的废液, 加入 700  $\mu\text{L}$  的 Buffer RW2, 12 000  $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$  离心 1 min, 弃收集管中的废液, 重复一次, 将纯化柱放入收集管中, 12 000  $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$  空管离心 2 min, 将纯化柱转移至新的收集管中, 加入已于 65  $^{\circ}\text{C}$  预热的 RNase-Free ddH<sub>2</sub>O, 室温放置 2 min, 12 000  $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$  离心 1 min, 收集 RNA 溶液, 注意以上全程常温操作, 勿低温离心。

cDNA 的合成依据 All-in-One First-Strand Synthesis MasterMix (with dsDNase) 试剂盒说明书进行, 荧光定量 PCR 按照 2 $\times$ SYBR Green qPCR Premix (Universal) 试剂盒进行操作, 使用实时荧光定量 PCR 仪对各个基因进行扩增, 以  $\beta$ -actin 为内参基因, Real-time PCR 扩增结束后, 用  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  相对定量法计算各组基因的相对表达量, 目的基因引物序列信息<sup>[26-27]</sup>如表 1 所示。

### 1.8 统计与分析

实验数据采用 Graphpad Prism 8 软件进行数据分析和绘图。组间差异分析通过单因素方差分析 (ANOVA) 并以 Dunnett's 检验进行多重比较, 设  $P < 0.05$  时有统计学差异, \*  $P < 0.05$ 、\*\*  $P < 0.01$ 。

## 2 结果 (Results)

### 2.1 环丙沙星暴露前后浓度测定

在暴露 0 h 和 24 h 时取 100  $\mu\text{L}$  暴露液进行浓度测定, 对其峰面积进行定量。定量结果为 0.1  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  (0 h: 4.21E+05, 24 h: 3.83E+05)、1  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  (0 h: 4.32E+05, 24 h: 4.05E+05), 这表明, 在 24 h 暴露期间药物浓度基本维持恒定。根据定量结果, 每 24 h 更换一次暴露液可维持暴露浓度恒定。

### 2.2 环丙沙星暴露对胚胎自发运动的影响

斑马鱼胚胎的自主摆尾运动主要是斑马鱼尾部的摆动, 与斑马鱼的次级神经元无关, 是受到初级神经元支配的运动, 不依赖斑马鱼的脑部神经元, 是可检测到的最早神经行为<sup>[28-29]</sup>, 可作为检测神经毒性的初始指标。各浓度暴露组的 24 hpf 自主运动次数如图 1 所示, 0.1  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  浓度组与对照组相比其胚胎自发运动次数 (1.80 次  $\cdot \text{min}^{-1}$ ) 显著降低 ( $P < 0.001$ ), 1  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  浓度暴露下的胚胎自发运动次数 (2.25 次  $\cdot \text{min}^{-1}$ ) 与对照组 (2.90 次  $\cdot \text{min}^{-1}$ ) 相比显著降低 ( $P < 0.05$ ), 因此其可显著抑制胚胎早期的自主运动次数, 这表明, 环丙沙星抑制斑马鱼胚胎的自主运动行为。

表 1 目的基因引物序列信息

Table 1 Gene primer sequence information

| 基因<br>Gene         | 引物序列(5' ~ 3')<br>Primer sequence (5' ~ 3')                  |
|--------------------|-------------------------------------------------------------|
| $\beta$ -actin     | F: CGAGCAGGAGATGGGAACC<br>R: CAACGGAACGCTCATTGC             |
| ache               | F: CCCTCCAGTGGGTACAAGAA<br>R: GGGCCTCATCAAAGGTAACA          |
| th1                | F: GGTCTCACGGCTGGTATCCT<br>R: TGCCTCGCAGAGCTTCACT           |
| dat                | F: TGGACTTCCGCGCCTGTATGATG<br>R: TCCGGGCGAGCAGCAGAACTTGTA   |
| nr4a2b             | F: GAAGACGGCGAAATCGATGC<br>R: CTGGCGTTCTGACAACTTCC          |
| bdnf               | F: ATAGTAACGAACAGGATGG<br>R: GCTCAGTCATGGGAGTCC             |
| th2                | F: ACATTACCGGTGAGGAGTTT<br>R: ATGCTGCCATACGTTTGTC           |
| htr1aa             | F: TTCTACATCCCCTCATCTCA<br>R: CCTCCAAGTTTACCCACCTCTC        |
| htr5a              | F: TGGATCAAAGAGGACCAACACC<br>R: CTGAAACGTCACCGTGGCAT        |
| htr1b              | F: GCTACGTCAACTACTCATCAA<br>R: TCCTATCGTCTGCAACATCTAAA      |
| htr2a              | F: TACGGTGGCTGGGAACATTTTAG<br>R: GGGACACAGTGATGCAGGGAAA     |
| syn2a              | F: CTCCAGCCCCACCAATAAGG<br>R: CATCCGTGTGCGAAAAGCAG          |
| mbp                | F: AATCAGCAGGTTCTTCGGAGGAGA<br>R: AAGAAATGCACGACAGGGTTGACG  |
| shha               | F: GCAAGATAACGCGCAATTCGGAGA<br>R: TGCATCTCTGTGTCATGAGCCTGT  |
| $\alpha$ 1-tubulin | F: AATCACCAATGCTTGCTTCGAGCC<br>R: TTCACGTCTTTGGGTACCACGTCA  |
| gfap               | F: GGATGCAGCCAATCGTAAT<br>R: TTCCAGGTCACAGGTCAG             |
| elavl3             | F: AGACAAGATCACAGGCCAGAGCTT<br>R: TGGTCTGCAGTTTGAGACCGTTGA  |
| gap43              | F: TGCTGCATCAGAAGAACTAA<br>R: CCTCCGGTTTGATTCCATC           |
| nestin             | F: ATGCTGGAGAAACATGCCATGCAG<br>R: AGGGTGTCTTACTTGGGCCTGAAGA |
| manf               | F: AGATGGAGAGTGTGAAGTCTGTGTG<br>R: CAATTGAGTCGCTGTCAAACTTG  |
| chrm7              | F: TCAGTATTTGCCACCACCA<br>R: CTTTGTCTTCGCCAGGTCTC           |

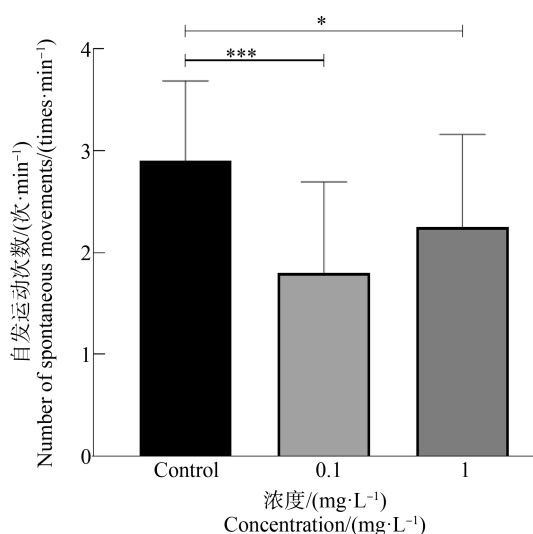


图1 环丙沙星暴露对斑马鱼胚胎自主运动的影响

注:与对照组相比,\*表示  $P<0.05$ ,\*\*\*表示  $P<0.001$ 。

Fig. 1 Effect of ciprofloxacin exposure on the autonomic movement of zebrafish embryos

Note: Compared with control, \*represents  $P<0.05$ ,

\*\*\* represents  $P<0.001$ .

### 2.3 环丙沙星暴露对幼鱼运动行为的影响

在设定的检测程序内,暴露至 120 hpf 的幼鱼在光暗周期、持续光照和不同光照刺激时长下的运动速度如图 2(a)~(c)所示,在运动活性(图 2(a))监测时间内,与对照组相比,各剂量组的运动速度随着暴露浓度的升高而降低,1 mg·L<sup>-1</sup> 浓度组(0.411 mm·s<sup>-1</sup>)与对照组(0.659 mm·s<sup>-1</sup>)相比显著降低( $P<0.05$ );自由游泳行为(图 2(b))检测结果显示,在持续光照刺

激下,各浓度组的运动速度与对照组相比,有降低的趋势,但未见显著性差异;在不同光照刺激时长(图 2(c))下,与对照组(0.729 mm·s<sup>-1</sup>)相比,0.1、1 mg·L<sup>-1</sup> 暴露组的运动速度(1.02 mm·s<sup>-1</sup>、1.06 mm·s<sup>-1</sup>)随着暴露浓度的升高而加快,且具有显著差异( $P<0.05$ ),这表明环丙沙星可能使仔鱼处于应激紧张状态,改变其运动行为。

### 2.4 环丙沙星暴露对幼鱼乙酰胆碱酯酶活性的影响

一般认为乙酰胆碱酯酶是水环境中暴露于神经性药物的生物标志物,乙酰胆碱酯酶通过催化水解乙酰胆碱来终止其对胆碱受体的兴奋作用,维持神经冲动。由图 3 可知,与对照组相比,不同浓度的环丙沙星能够诱导乙酰胆碱酯酶活性上升,且 1 mg·L<sup>-1</sup> (8.92 U·mg<sup>-1</sup>)与对照组(6.96 U·mg<sup>-1</sup>)之间有显著差异( $P<0.05$ ),乙酰胆碱酯酶活性的升高使乙酰胆碱的受体减少,抑制兴奋的传递从而破坏神经递质系统,这表明环丙沙星对斑马鱼幼鱼存在神经毒性作用,其作用可能是由于乙酰胆碱供应不足而导致的。

### 2.5 环丙沙星影响胆碱能系统相关基因表达

为了探究乙酰胆碱酯酶活性变化的原因,本研究对胆碱类的相关基因(*chra7* 和 *ache*)进行验证,结果如图 4 所示,烟碱型胆碱受体  $\alpha 7$ (*chra7*)与对照组相比,其表达量随着环丙沙星浓度的升高而下调,未见显著差异。乙酰胆碱酯酶(*ache*)基因表达量随着浓度升高而上调,1 mg·L<sup>-1</sup> 浓度组与对照组相比有显著差异( $P<0.05$ ),这与酶活测量结果一致,表明环丙沙星上调 *ache* 基因表达,诱导乙酰胆碱酯酶

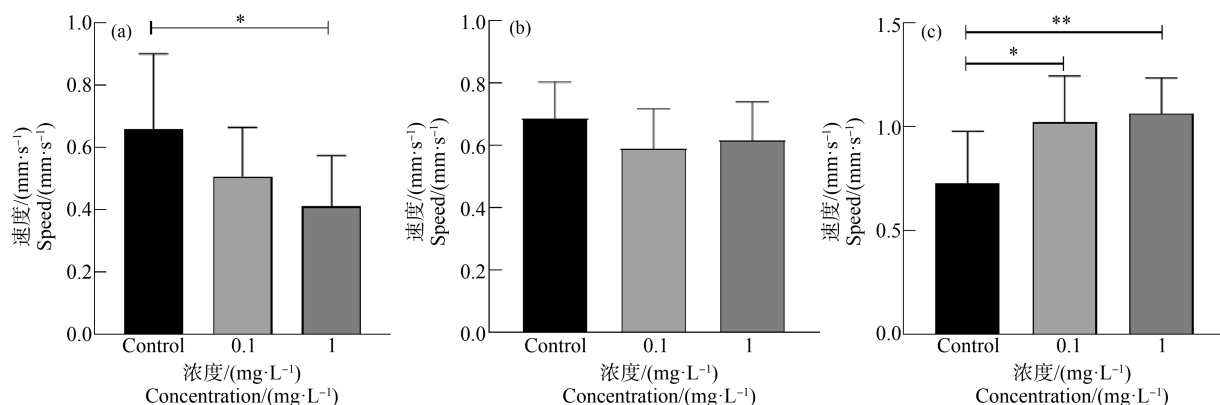


图2 环丙沙星暴露对幼鱼运动行为的影响

注:(a) 幼鱼在光暗周期下的运动速度,(b) 幼鱼在持续光照条件下的运动速度,(c) 幼鱼在不同光照刺激时长下运动速度;与对照组相比,\*表示  $P<0.05$ ,\*\*表示  $P<0.01$ 。

Fig. 2 The effect of ciprofloxacin exposure on the movement behavior of juvenile fish

Note: (a) The movement speed of zebrafish larvae under light dark cycle, (b) The movement speed of zebrafish larvae under continuous light conditions, (c) The movement speed of zebrafish larvae under different light stimulation duration; compared with control, \*represents  $P<0.05$ , \*\*represents  $P<0.01$ .

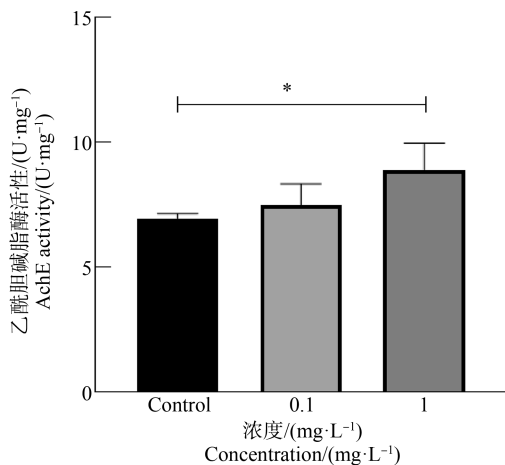


图3 环丙沙星暴露对幼鱼乙酰胆碱酯酶活性的影响

注:与对照组相比,\*表示  $P<0.05$ 。

Fig. 3 Effect of ciprofloxacin exposure on acetylcholinesterase activity of juvenile fish

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

活性,破坏胆碱能系统。

## 2.6 环丙沙星影响神经递质相关基因表达

为了探究环丙沙星暴露引起的运动活性和应激反应行为变化的原因,测定了多巴胺通路关键基因(*th1*、*dat*、*nr4a2b*和*bdnf*)和血清素通路关键基因(*th2*、*htr1aa*、*htr5a*、*htr1b*和*htr2a*)的表达。结果如图5(a)所示,在多巴胺通路所验证的基因只有*dat*出现显著差异( $P<0.01$ ),随着浓度的升高而下调;*th1*和*nr4a2b*基因表达量下调,*bdnf*基因表达上调,未见显著差异。如图5(b)所示,血清素通路的*th2*、*htr1aa*和*htr5a*基因表达量随着浓度升高而显著上

调( $P<0.05$ ),而*htr1b*和*htr2a*基因表达量亦上调,未见显著差异,这提示环丙沙星影响多巴胺和血清素通路关键基因的表达,影响仔鱼运动活性和光照刺激惊恐反应。

## 2.7 环丙沙星影响神经发育相关的基因表达

为了进一步探究环丙沙星对斑马鱼神经毒性的内在机制,测定了神经发育系统的关键基因表达,结果如图6所示,*syn2a*、*mbp*、 $\alpha 1$ -*tubulin*、*gfap*、*nestin*和*manf*基因表达量下调,*shha*、*elavl3*基因表达量上调,*gap43*基因表达量低浓度上调、高浓度下调,而*shha*、*gfap*和*nestin*基因表达量与对照组相比有显著差异( $P<0.05$ ),表明环丙沙星扰乱幼鱼的神经发育关键基因的表达,从而影响仔鱼运动行为,诱导神经毒性。

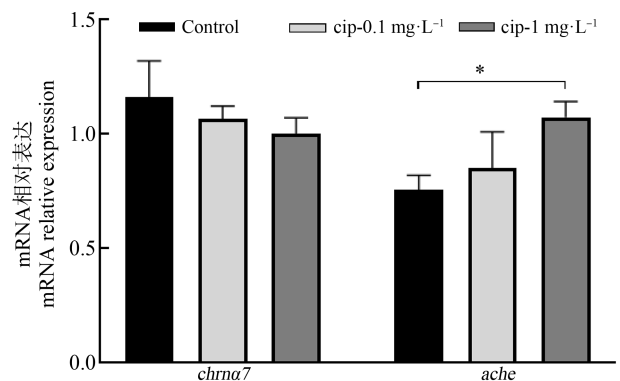


图4 环丙沙星暴露对幼鱼胆碱类受体相关基因表达的影响

注:与对照组相比,\*表示  $P<0.05$ 。

Fig. 4 Effect of ciprofloxacin exposure on the expression of choline receptor related genes in juvenile fish

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

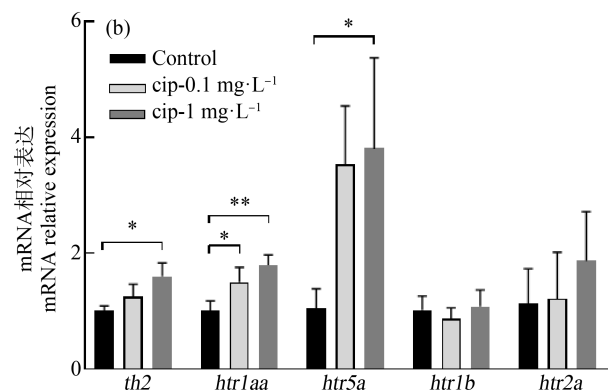
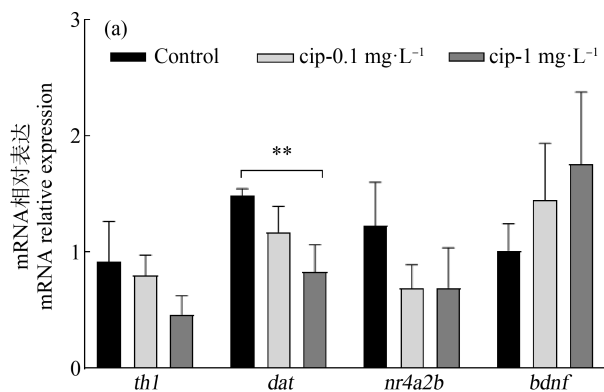


图5 环丙沙星暴露对幼鱼神经递质相关基因表达的影响

注:(a) 多巴胺通路相关基因的表达水平,(b) 血清素通路相关基因的表达水平;与对照组相比,\*表示  $P<0.05$ ,\*\*表示  $P<0.01$ 。

Fig. 5 Effect of ciprofloxacin exposure on expression of neurotransmitter related genes in juvenile fish

Note: (a) The expression level of dopamine pathway related genes, (b) The expression level of serotonin pathway related genes; compared with control, \* represents  $P<0.05$ , \*\* represents  $P<0.01$ .

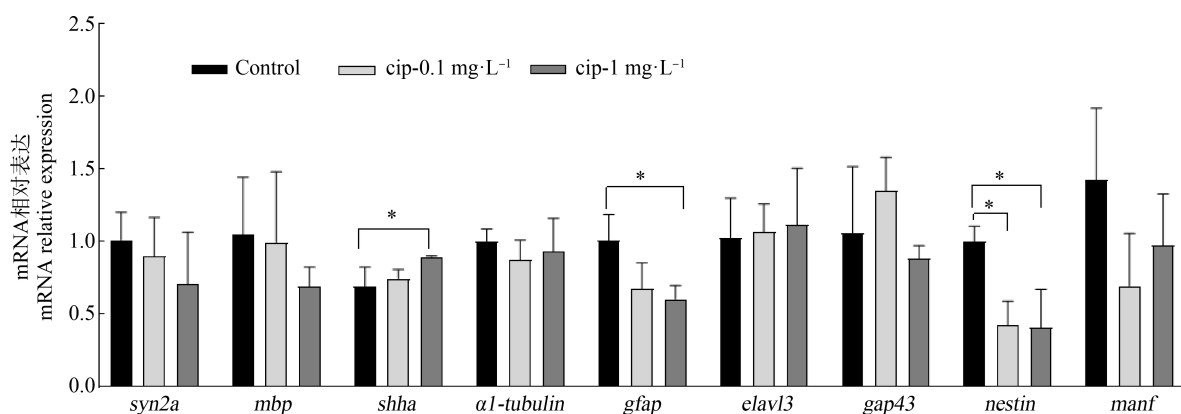


图6 环丙沙星暴露对幼鱼神经发育基因表达的影响

注:与对照组相比,\*表示  $P < 0.05$ 。

Fig. 6 Effect of ciprofloxacin exposure on the expression of neurodevelopmental genes in juvenile fish

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

### 3 讨论 (Discussion)

#### 3.1 环丙沙星对运动行为的影响

斑马鱼胚胎的自发运动反映斑马鱼的神经元活力,20~28 hpf的自发运动表型为尾部交替摆动,其运动频率较为稳定<sup>[30]</sup>。本研究结果表明,环丙沙星抑制斑马鱼胚胎的自发运动次数,具有浓度依赖性,这种自发运动行为常作为生命早期阶段神经发育毒性的评价指标<sup>[31]</sup>。刘倩等<sup>[32]</sup>的研究表明双酚S(BPS)显著抑制斑马鱼仔鱼的平均速度,对其运动行为能力产生影响,说明BPS对斑马鱼仔鱼具有早期神经毒性作用;胡占英和张靖溥<sup>[33]</sup>研究结果显示长春新碱暴露斑马鱼胚胎后出现运动速度降低,不活跃运动持续时间增加等神经抑制行为;尚艳楠等<sup>[34]</sup>用细辛脑溶液暴露斑马鱼胚胎后导致其运动行为活跃度减低,表明细辛脑对斑马鱼胚胎有神经发育毒性作用。而本研究结果显示,环丙沙星暴露后,光暗周期下的运动速度降低、不同光照刺激时长条件下运动速度上升,惊恐反应性增加,使仔鱼处于应激紧张状态,改变其运动行为。

#### 3.2 环丙沙星对神经递质相关基因的影响

乙酰胆碱酯酶是水环境中暴露于神经性药物的生物标志物,乙酰胆碱酯酶通过催化水解乙酰胆碱来终止其对胆碱受体的兴奋作用,维持神经冲动<sup>[35]</sup>。本研究结果表明,环丙沙星暴露后斑马鱼幼鱼的乙酰胆碱酯酶活性升高,表明乙酰胆碱受体减少,抑制神经兴奋冲动的传递。本研究也验证了胆碱能系统相关基因的表达,乙酰胆碱酯酶活性基因表达上调,与酶活结果一致,另烟碱类胆碱受体(乙酰胆碱)表达量下调,这表明环丙沙星暴露抑制胆碱类受体

的表达,抑制兴奋传递,进而破坏胆碱能系统,对斑马鱼仔鱼产生神经性影响。

有文章报道神经递质的合成分泌、神经元发育和眼部发育等因素能够影响斑马鱼幼鱼的运动行为<sup>[36-37]</sup>。多巴胺调节斑马鱼的运动活性,血清素调节斑马鱼焦虑行为<sup>[38]</sup>,因此,本研究选择中枢神经发育系统、多巴胺和血清素通路的关键基因进行验证,探究环丙沙星暴露对斑马鱼幼鱼运动行为的内在分子机制变化。

在多巴胺信号通路中,酪氨酸羟化酶(TH)是合成多巴胺的限速酶<sup>[39]</sup>,而多巴胺转运蛋白(DAT)可转运多巴胺至胞浆分解,是调节多巴胺的神经递质,*nr4a2b*负责多巴胺祖细胞的成熟、分化和存活,而*bdnf*基因在神经发育中发挥着重要作用<sup>[40]</sup>。杨丽华等<sup>[41]</sup>用双酚A暴露斑马鱼后干扰了*nr4a2b*和*th1*的表达,促进神经递质的分化。在本研究中,*dat*基因显著下调,*th2*、*htr1aa*、*htr5a*和*htr2a*基因表达显著上调,这与Jia等<sup>[27]</sup>的研究结果一致,这提示环丙沙星暴露扰乱斑马鱼幼鱼的多巴胺神经递质系统,进而引发运动活性和自由游泳行为的改变;上调血清素受体表达,促进兴奋传递,进而影响斑马鱼幼鱼的光照应激惊恐反应行为。

#### 3.3 环丙沙星对神经发育相关基因的影响

验证中枢神经系统(CNS)相关基因的表达,其中*α1-tubulin*、*gfap*和*nestin*对神经系统形成有重要作用,*syn2a*参与突触形成,*mbp*参与髓鞘形成,*shha*在神经系统中充当信号分子,*elavl3*负责一种RNA结合蛋白的表达,*gap43*负责神经细胞修复,而*manf*是一种重要的神经营养因子<sup>[42-43]</sup>,杨玉莹等<sup>[44]</sup>的研

究表明全反式维甲酸通过抑制 *mbp* 与 *syn2a* 的表达干扰斑马鱼仔鱼的神经发育及行为活力。而本研究中 *mbp* 与 *syn2a* 的基因表达下调,朱晓宇等<sup>[45]</sup>的研究结果表明仲丁威暴露斑马鱼胚胎后 *α1-tublin*、*shha*、*elavl3*、*gap43*、*syn2a*、*gfap*、*mbp* 和 *manf* 等基因的表达显著下调。本研究结果显示, *shha* 基因表达量与对照组相比显著上升; *gfap* 和 *nestin* 与对照组相比表达量显著下调,这表明环丙沙星暴露可能通过扰乱中枢神经系统的发育,进而对斑马鱼胚胎产生神经发育毒性。

综上所述,环丙沙星暴露会抑制斑马鱼胚胎 24 hpf 自发运动,诱导乙酰胆碱酯酶活性,运动行为活跃和光照应激惊恐反应改变。同时,基因表达结果显示,多巴胺通路、中枢神经发育系统的 *dat*、*gfap* 和 *nestin* 基因下调,血清素通路、胆碱能系统和中枢神经发育系统的 *th2*、*htr1aa*、*htr5a*、*ache* 和 *shha* 基因上调可能与环丙沙星暴露后引起的神经毒性相关,但神经毒性背后的机制往往是高度复杂的,今后还需要进一步研究以深度解析环丙沙星对斑马鱼胚胎的神经毒性机制。

通信作者简介:邱静(1979—),男,研究员,博士生导师,研究方向为农产品质量安全风险评估。

#### 参考文献 (References):

- [1] Bird A. Molecular biology. Methylation talk between histones and DNA [J]. *Science*, 2001, 294(5549): 2113-2115
- [2] Bondarczuk K, Markowicz A, Piotrowska-Seget Z. The urgent need for risk assessment on the antibiotic resistance spread via sewage sludge land application [J]. *Environment International*, 2016, 87: 49-55
- [3] Chai T T, Cui F, Yin Z Q, et al. Chiral PCB 91 and 149 toxicity testing in embryo and larvae (*Danio rerio*): Application of targeted metabolomics via UPLC-MS/MS [J]. *Scientific Reports*, 2016, 6: 33481
- [4] Costa V, Angelini C, De Feis I, et al. Uncovering the complexity of transcriptomes with RNA-seq [J]. *Journal of Biomedicine & Biotechnology*, 2010, 2010: 853916
- [5] Silveira A T, Maranhão L A, Torres N H, et al. Assessment of <sup>14</sup>C-sulfadiazine on *Danio rerio* (zebrafish) [J]. *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry*, 2018, 318(2): 1001-1008
- [6] Datson N A, van der Perk J, de Kloet E R, et al. Identification of corticosteroid-responsive genes in rat hippocampus using serial analysis of gene expression [J]. *The European Journal of Neuroscience*, 2001, 14(4): 675-689
- [7] Ding L H, Zang L X, Zhang Y N, et al. Joint toxicity of fluoroquinolone and tetracycline antibiotics to zebrafish (*Danio rerio*) based on biochemical biomarkers and histopathological observation [J]. *The Journal of Toxicological Sciences*, 2017, 42(3): 267-280
- [8] Ellerbrock R E, Canisso I F, Podico G, et al. Diffusion of fluoroquinolones into equine fetal fluids did not induce fetal lesions after enrofloxacin treatment in early gestation [J]. *Veterinary Journal*, 2019, 253: 105376
- [9] Etminan M, Westerberg B D, Kozak F K, et al. Risk of sensorineural hearing loss with macrolide antibiotics: A nested case-control study [J]. *The Laryngoscope*, 2017, 127: 229-232
- [10] Gao D X, Lin J, Ou K L, et al. Embryonic exposure to benzo(a)pyrene inhibits reproductive capability in adult female zebrafish and correlation with DNA methylation [J]. *Environmental Pollution*, 2018, 240: 403-411
- [11] 肖超强. 利用斑马鱼探讨氟喹诺酮结构与毒性的关系研究[D]. 北京: 北京协和医学院, 2018: 7-8  
Xiao C Q. Study on structure-toxicity relationship of fluoroquinolones revealed by zebrafish [D]. Beijing: Peking Union Medical College, 2018: 7-8 (in Chinese)
- [12] 刘畅, 杨琳燕, 张伟, 等. 磁性微球免疫层析试纸快速检测牛奶中恩诺沙星和环丙沙星[J]. *中国兽医杂志*, 2022, 58(7): 38-43  
Liu C, Yang L Y, Zhang W, et al. Rapid detection of enrofloxacin and ciprofloxacin in milk by magnetic microsphere immunochromatographic test strip [J]. *Chinese Journal of Veterinary Medicine*, 2022, 58(7): 38-43 (in Chinese)
- [13] 牛日华, 张天闻, 邹红梅, 等. 恩诺沙星及其代谢物环丙沙星在大黄鱼体内的代谢动力学[J]. *中国渔业质量与标准*, 2018, 8(1): 24-33  
Niu Y H, Zhang T W, Zou H M, et al. Pharmacokinetics of enrofloxacin and its metabolite ciprofloxacin in *Larimichthys crocea* [J]. *Chinese Fishery Quality and Standards*, 2018, 8(1): 24-33 (in Chinese)
- [14] 沈荣. 三种氟喹诺酮药物的生物毒性研究[D]. 重庆: 重庆大学, 2019: 18-22  
Shen R. Study on the biological toxicity of three fluoroquinolones [D]. Chongqing: Chongqing University, 2019: 18-22 (in Chinese)
- [15] 俞春红, 潘任桃, 孙志良, 等. 氟喹诺酮类药物致神经系统和软骨毒性的机制研究进展[J]. *中国抗生素杂志*, 2013, 38(11): 810-814  
Yu C H, Pan R T, Sun Z L, et al. Recent advances in the study of mechanisms of neurotoxicity and chondrotoxicity caused by fluoroquinolones [J]. *Chinese Journal of Anti-*

- biotics, 2013, 38(11): 810-814 (in Chinese)
- [16] Lai K P, Gong Z Y, Tse W K F. Zebrafish as the toxicant screening model: Transgenic and omics approaches [J]. *Aquatic Toxicology*, 2021, 234: 105813
- [17] Laing L V, Viana J, Dempster E L, et al. Bisphenol A causes reproductive toxicity, decreases dnmt1 transcription, and reduces global DNA methylation in breeding zebrafish (*Danio rerio*) [J]. *Epigenetics*, 2016, 11(7): 526-538
- [18] 贺静. 诺氟沙星对斑马鱼胚胎的神经毒性及机制研究[D]. 武汉: 武汉大学, 2017: 10-12
- He S J. Neurotoxicity of norfloxacin in zebrafish embryos (*Danio rerio*) [D]. Wuhan: Wuhan University, 2017: 10-12 (in Chinese)
- [19] Laville N, Ait-Aïssa S, Gomez E, et al. Effects of human pharmaceuticals on cytotoxicity, EROD activity and ROS production in fish hepatocytes [J]. *Toxicology*, 2004, 196(1-2): 41-55
- [20] Xie Z X, Lu G H, Li S, et al. Behavioral and biochemical responses in freshwater fish *Carassius auratus* exposed to sertraline [J]. *Chemosphere*, 2015, 135: 146-155
- [21] da Silva Santos N, Oliveira R, Lisboa C A, et al. Chronic effects of carbamazepine on zebrafish: Behavioral, reproductive and biochemical endpoints [J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2018, 164: 297-304
- [22] 章子男, 马嘉嘉, 黄静宜, 等. 神经性毒剂塔崩对小鼠胆碱能系统中毒效应研究[J]. *军事医学*, 2022, 46(7): 481-486
- Zhang Z N, Ma J J, Huang J Y, et al. Toxic effect of tabun on the cholinergic system in mice [J]. *Military Medical Sciences*, 2022, 46(7): 481-486 (in Chinese)
- [23] Li D, Sun W J, Lei H J, et al. Cyclophosphamide alters the behaviors of adult zebrafish via neurotransmitters and gut microbiota [J]. *Aquatic Toxicology*, 2022, 250: 106246
- [24] Liang X F, Zhao Y Q, Liu W, et al. Butylated hydroxytoluene induces hyperactivity and alters dopamine-related gene expression in larval zebrafish (*Danio rerio*) [J]. *Environmental Pollution*, 2020, 257: 113624
- [25] Ding L H, Zang L X, Zhang Y N, et al. Joint toxicity of fluoroquinolone and tetracycline antibiotics to zebrafish (*Danio rerio*) based on biochemical biomarkers and histopathological observation [J]. *The Journal of Toxicological Sciences*, 2017, 42(3): 267-280
- [26] 刘旺, 梁雪芳, 李霞, 等. 2,4-二叔丁基苯酚对斑马鱼早期发育阶段的神经毒性[J]. *环境科学学报*, 2021, 41(7): 2913-2921
- Liu W, Liang X F, Li X, et al. Neurotoxicity of 2,4-di-tert-butylphenol on the early-staged zebrafish [J]. *Acta Scientiae Circumstantiae*, 2021, 41(7): 2913-2921 (in Chinese)
- [27] Jia M, Teng M M, Tian S, et al. Developmental toxicity and neurotoxicity of penconazole enantiomers exposure on zebrafish (*Danio rerio*) [J]. *Environmental Pollution*, 2020, 267(C): 115450
- [28] Saint-Amant L, Drapeau P. Time course of the development of motor behaviors in the zebrafish embryo [J]. *Journal of Neurobiology*, 1998, 37(4): 622-632
- [29] 刘敬, 廉博雯, 黄晓婷, 等. 毛兰素对斑马鱼神经行为的改变研究[J]. *中国现代应用药理学*, 2021, 38(14): 1671-1677
- Liu J, Lian B W, Huang X T, et al. Effect of erianin on neuro-behavioral alterations of zebrafish [J]. *Chinese Journal of Modern Applied Pharmacy*, 2021, 38(14): 1671-1677 (in Chinese)
- [30] Velki M, Di Paolo C, Nelles J, et al. Diuron and diazinon alter the behavior of zebrafish embryos and larvae in the absence of acute toxicity [J]. *Chemosphere*, 2017, 180: 65-76
- [31] Weichert F G, Floeter C, Meza Artmann A S, et al. Assessing the ecotoxicity of potentially neurotoxic substances - Evaluation of a behavioural parameter in the embryogenesis of *Danio rerio* [J]. *Chemosphere*, 2017, 186: 43-50
- [32] 刘倩, 顾杰, 顾爱华. 环境污染物的神经发育毒性研究——以斑马鱼为例[C]// 中国毒理学会. 中国毒理学会第九次全国毒理学大会论文集. 太原: 中国毒理学会, 2019: 206-207
- [33] 胡占英, 张靖溥. 长春新碱对斑马鱼神经发育和行为的影 响[J]. *毒理学杂志*, 2014, 28(2): 98-103
- Hu Z Y, Zhang J P. Effects of vincristine on zebrafish neurodevelopment and behavior [J]. *Journal of Toxicology*, 2014, 28(2): 98-103 (in Chinese)
- [34] 尚艳楠, 蒲韵竹, 李小满, 等. 细辛脑对斑马鱼胚胎发育及运动行为的影响[J]. *国际药理学研究杂志*, 2015, 42(2): 176-182
- Shang Y N, Pu Y Z, Li X M, et al. Influence of asarone on zebrafish embryonic development and behavior [J]. *Journal of International Pharmaceutical Research*, 2015, 42(2): 176-182 (in Chinese)
- [35] Chen L G, Huang C J, Hu C Y, et al. Acute exposure to DE-71: Effects on locomotor behavior and developmental neurotoxicity in zebrafish larvae [J]. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 2012, 31(10): 2338-2344
- [36] 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)
- [37] Liang X F, Zhao Y Q, Liu W, et al. Butylated hydroxytoluene induces hyperactivity and alters dopamine-related gene expression in larval zebrafish (*Danio rerio*) [J]. Environmental Pollution, 2020, 257: 113624
- [38] Lu Z, Smyth S A, de Silva A O. Distribution and fate of synthetic phenolic antioxidants in various wastewater treatment processes in Canada [J]. Chemosphere, 2019, 219: 826-835
- [39] Parker M O, Annan L V, Kanellopoulos A H, et al. The utility of zebrafish to study the mechanisms by which ethanol affects social behavior and anxiety during early brain development [J]. Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry, 2014, 55: 94-100
- [40] Steenbergen P J, Richardson M K, Champagne D L. Patterns of avoidance behaviours in the light/dark preference test in young juvenile zebrafish: A pharmacological study [J]. Behavioural Brain Research, 2011, 222(1): 15-25
- [41] 杨丽华, 史奇朋, 周炳升. 双酚 A 对斑马鱼幼鱼神经递质和神经行为的影响[J]. 生态毒理学报, 2017, 12(3): 162-169
- Yang L H, Shi Q P, Zhou B S. The effects of BPA on neurobehavior and neurotransmitters of larval zebrafish (*Danio rerio*) [J]. Asian Journal of Ecotoxicology, 2017, 12(3): 162-169 (in Chinese)
- [42] 朱小乔, 唐天乐, 彭翔, 等. 双酚 AF 暴露降低斑马鱼学习记忆能力并影响神经系统相关基因表达[J]. 生态毒理学报, 2017, 12(1): 119-126
- Zhu X Q, Tang T L, Peng X, et al. Bisphenol AF exposure reduces learning and memory ability and influences expression of nervous system genes in zebrafish [J]. Asian Journal of Ecotoxicology, 2017, 12(1): 119-126 (in Chinese)
- [43] Anichtchik O V, Kaslin J, Peitsaro N, et al. Neurochemical and behavioural changes in zebrafish *Danio rerio* after systemic administration of 6-hydroxydopamine and 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine [J]. Journal of Neurochemistry, 2004, 88(2): 443-453
- [44] 杨玉莹, 李平灯, 金英伟, 等. 全反式维甲酸暴露对斑马鱼的神经毒性效应[J]. 武汉工程大学学报, 2021, 43(4): 376-380
- Yang Y Y, Li P D, Jin Y W, et al. Effect of all-trans-retinoic acid exposure on neurotoxicity of zebrafish [J]. Journal of Wuhan Institute of Technology, 2021, 43(4): 376-380 (in Chinese)
- [45] 朱晓宇, 夏波, 戴明珠, 等. 仲丁基诱发的斑马鱼神经毒性及机制研究[C]// 中国毒理学会. 2021(第五届)毒性测试替代方法与转化毒理学(国际)学术研讨会会议论文集. 沈阳: 中国毒理学会, 2021: 189 ◆