

[34] HAWTHORNE S.B., MILLER D.J. Directly coupled supercritical fluid extraction-gas chromatographic analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons and polychlorinated biphenyls from environ-

mental solids[J]. Journal of Chromatography A, 1987, 403(1): 63-76.

• 监测技术 •

doi:10.3969/j.issn.1674-6732.2011.01.005

斑马鱼在环境检测领域中的应用

刘在平, 张松林

(西北师范大学地理与环境科学学院, 甘肃 兰州 730070)

摘要:斑马鱼易饲养、易管理, 体外受精和体外发育, 可常年产卵、孵化, 因此早期被作为模型动物广泛用于生物学研究中。近年来, 随着环境问题日益突出, 迫切需要有效、全面的环境监测手段和方法。斑马鱼或其转基因品种就是非常好的环境监测首选生物。因其对许多环境污染物十分敏感, 可实时检测进入水环境的污染物。对斑马鱼在水体中重金属毒性、环境激素、综合毒性、生物诱导和有机污染物毒性检测等方面的应用进行了初步讨论, 以为相关研究和应用提供参考。

关键词:斑马鱼; 环境检测; 应用; 毒性检测; 环境激素; 生物诱导

中图分类号: X835

文献标识码: A

文章编号: 1674-6732(2011)-01-0017-04

Application of Zebrafish in the Field of Environmental Detection

LIU Zai-ping, ZHANG Song-lin

(College of Geography and Environment Science, Northwest Normal University, Lanzhou, Gansu 730070, China)

ABSTRACT: Zebrafish was raised and managed easily, fertilized and developed in vitro, and layed eggs and hatched throughout the year, such being used widely in biology study as animal model. In recent years, along with the water environment problem, it needed urgently effective and comprehensive environmental monitoring methods. Zebrafish or genetically modified Zebrafish were the best choice of water environment monitoring. They were more sensitive to environmental pollutants, and detected real-timely environmental pollutants in water. Therefore, the application of zebrafish in heavy metal toxicity, environmental hormone testing, water quality inspection, biological exutory testing, and organic pollutant toxicity was discussed preliminarily, so as to provide reference for relevant research and application.

KEY WORDS: Zebrafish (*Danio rerio*); environmental detection; application; toxicity test; environmental hormone; biological induction

0 引言

斑马鱼(*Danio rerio*), 又名斑马担尼鱼、蓝条鱼、花条鱼、印度鱼、印度斑马鱼、蓝斑马鱼和黑斑刺鲃鱼等, 属于辐鳍亚纲(*Actinopterygii*) 鲤科(*Cyprinidae*)短担尼鱼属(*Danio*)的一种硬骨鱼。原产于印度东部、巴基斯坦、缅甸以及孟加拉国的小溪、稻田及恒河中游地区, 是一种小型热带鱼。

斑马鱼在环境科学研究中之所以备受关注, 是因为它是世界公认的新兴模式动物。与其他模式脊椎动物相比, 有其独特优势: 成鱼体型小、易管理、养殖成本低; 体外受精、体外发育、早期发育快; 其对污染物的作用反应快, 可在短时间内调查水污染状况或用于特定污染物的检测等; 可用于建立毒

理学评价模型; 其基因组计划已基本完成, 已知基因较多, 广泛用于转基因技术、基因活性抑制技术等; 品系资源丰富, 研究中常用的斑马鱼野生型品系主要为 Tuebingen 品系、AB 品系和 WIK 品系等。另外, 保存有 3 000 多个突变品系和 100 多个转基因品系, 这些品系对利用斑马鱼开展各种科学研究均有很大的推动作用。

收稿日期: 2010-08-21

基金项目: 甘肃省自然科学基金项目(2007GS. 3614), 甘肃省教育厅基金项目(0801-08)。

作者简介: 刘在平(1977—), 男, 硕士在读, 从事环境化学研究工作。

1 斑马鱼在环境检测领域中的应用

近年来,国内外开始运用斑马鱼或转基因斑马鱼进行水体中重金属毒性、环境激素、综合毒性、生物诱导剂和有机污染物毒性检测等,成效显著,因而备受关注。

1.1 在重金属毒性检测中的应用

重金属对生物的胁迫效应已有报道。李淑琼等用斑马鱼获得了 Zn^{2+} 、 Cr^{6+} 、 Cd^{2+} 作用下的毒性效应情况:重金属单一毒性表明,在投加毒物后几小时内,斑马鱼的行为一般都会有特殊的变化,如行动变缓、呼吸变慢等。当接触 Cd^{2+} 时表现出异常的兴奋状态,接近死亡前行动会变快,四处乱窜。 Zn^{2+} 、 Cr^{6+} 、 Cd^{2+} 的 24 h 半致死质量浓度 (LC_{50}) 分别是 25.88, 46.20 和 1.04 mg/L。对斑马鱼的毒性排列为 $Cd^{2+} > Zn^{2+} > Cr^{6+}$, 其中 Cd^{2+} 为剧毒, Zn^{2+} 、 Cr^{6+} 为高毒;联合毒性研究发现, Zn^{2+} 、 Cr^{6+} 、 Cd^{2+} 为协同作用, Cr^{6+} 的影响较显著^[1]。刘大胜等也进行了相似研究:4种金属离子对斑马鱼的毒性大小依次为: $Cu^{2+} > Cd^{2+} > Zn^{2+} > Cr^{6+}$ ^[2]。修瑞琴等进行的联合毒性实验结果为: As^{3+} 与 Cd^{2+} , 以及 As^{3+} 与 Zn^{2+} 共存时的联合毒性均为拮抗作用,而 Cd^{2+} 与 Zn^{2+} 的联合毒性主要为毒性剧增的协同作用。但当 As^{3+} 、 Cd^{2+} 、 Zn^{2+} 3种毒物联合时其毒性则为拮抗作用^[3]。可见,多种毒物共同污染环境后,发生了复杂的联合毒性效应。这是在以后研究中需要注意的方面,尽量避免从单一毒物的含量去判断污染后的毒性危害。重金属 Pb、Zn 对斑马鱼也有毒性效应,对其 24 h 的 LC_{50} 分别为 5.38 和 3.99 mg/L^[4]。

此外,金属对斑马鱼胚胎的毒性影响也很明显。陈中智等用 Ca^{2+} 与 Pb^{2+} 测试了斑马鱼胚胎,结果表明: Pb 暴露的高浓度组与对照相比,胚胎的孵化率有明显的降低,这可能是 Pb 对其发育过程有影响。有些延迟孵化的个体在观察的时间内发育不完全,能够孵化的个体也多出现畸形、平衡能力及游泳能力降低等现象。当 Ca^{2+} 浓度从 0.25 mmol/L 增加到 2.00 mmol/L 时,导致了 72 h $EC_{50}\{Pb^{2+}\}$ (游离铅离子浓度) 和 72 h $EC_{50}[Pb]_T$ (溶解态铅总浓度) 的升高,表现为胚胎延迟孵化及孵化率降低^[5]。

1.2 在环境激素检测中的应用

环境雌激素会影响生物的生殖、发育以及内分泌、免疫和神经系统等,有的还有致癌作用^[6,7]。

其结构多样,且有新的环境激素不断出现,单从分子结构很难预测其干扰能力,因此需要新的检测技术。

有实验证实斑马鱼可成为检测环境激素的模型生物。斑马鱼暴露于浓度相对较低的环境激素后,在其性腺发育过程中就会出现干扰和反转现象。如将斑马鱼暴露在低于 1 ng/L 的 17α -乙炔雌二醇 (EE2) 水溶液中,就会出现性别比例变化^[8]。OLSSON 等和 KIME 等将成年雌性斑马鱼暴露在 17β -雌二醇 (E_2) 和 EE₂ 中,发现其胚胎发育受到抑制^[9,10]。另外,斑马鱼暴露在一些多氯联苯 (PCBs) 及其代谢物和邻苯二甲酸 (2-乙基己基酯) (DEHP) 等雌激素类化合物中,也发生了类似的现象^[11]。

还有研究表明,成年斑马鱼的邻苯二甲酸二丁酯 (DBP) 暴露会明显抑制 F₁ 代雄鱼的性腺发育,引起生精小管畸形,且精巢间质 (Leydig) 细胞广泛而明显的增生与精子数量减少同时存在的特征十分明确^[12]。黄菲等将性成熟的斑马鱼分别暴露于菲 (PHE) 中,当 ρ (PHE) > 0.05 μ g/L 时能够显著降低斑马鱼的产卵量和受精率。 ρ (PHE) > 50 μ g/L 时则会抑制受精卵的孵化^[13]。可见,一定量的环境激素对生物的危害是相当严重的,有必要控制其应用范围和使用量。

1.3 在综合毒性检测中的应用

对水质进行全面检测以了解其污染状况和可能危害是解决水污染问题的前提。利用水污染的“活检测器”——斑马鱼检测水质变化,能够更加快速、真实和直观地反映水污染状况^[14]。

潘力军等检测了被农药污染的饮用水和地表水源水,发现斑马鱼对两种农药具有较高的灵敏性,最低可达微克级,而且速度快^[15]。随后他们又用斑马鱼对几家乡镇皮革厂经过简单沉淀池处理的综合废水和某小区生活污水进行了检测。结果表明,斑马鱼可灵敏、快速地检测工业废水和生活污水的毒性^[16]。还有学者观察了不同浓度的城市生活污水对斑马鱼的发育影响,发现在早期生命阶段,高浓度的生活污水对斑马鱼有致畸、致死效应。原因主要是污水中含有不少有机污染物、大量的细菌、病毒、部分寄生虫卵以及化学有害物^[17]。

转基因斑马鱼对水体污染物更敏感,一旦微量的有毒有害物质进入水源就会立刻产生反应。孙国根报道了一些研究者成功培育了一种可检测水

环境中雌激素污染的 F₁ 代转基因斑马鱼,它能直观、灵敏、特异和快速地显示水环境中雌激素类污染,即便极微量,其肝脏也会发出绿色荧光^[18]。CARVAN 等人运用转基因斑马鱼的一些效应元件来检测某些污染物。当这些效应元件遇到其敏感的污染物时,就会被激活而发出绿光或红光,以提示水中存在特定的有毒有害物质^[19]。

1.4 在生物诱导检测中的应用

采用斑马鱼诱导效应确定环境污染物的报道较少。何秋霞等用腺苷二磷酸(ADP)诱导斑马鱼血小板,发现 ADP 能使斑马仔鱼血小板在其眼睛、背部等多处聚集,一定条件时可导致其死亡^[20]。用 N-乙基-N-亚硝基脲(ENU)诱导斑马鱼,使其早期产生脊椎形态异常、体节减少、心脏血液系统异常、鳃弓及腭发育异常、脑和神经系统退化、鱼鳍发育不全和鱼鳔缺失等现象,其中以脊柱和体节异常为主^[21]。可见,斑马鱼也是生物诱导剂的敏感生物,可有效检测水环境中的生物诱导剂。

1.5 在有机污染物毒性检测中的应用

随着环保要求日益严格,生产、应用或排放有机污染化学物质时需要详细了解其毒性数据,而斑马鱼则是最佳检测动物模型之一。

王宇等测定了倍硫磷、氨磺磷、氯硫磷、杀螟松、碘硫磷、皮蝇硫磷、异氯磷、甲基对硫磷和乙基溴硫磷等 9 种硫代磷酸酯类化合物对斑马鱼的急性毒性 96h 的 LC₅₀ 值,分别为 0.95, 4.52, 1.95, 3.03, 0.85, 0.56, 3.44, 3.44 和 0.82 mg/L。其中倍硫磷、碘硫磷、皮蝇硫磷和乙基溴硫磷属于剧毒,其他 5 种属于高毒。影响这些有机物毒性的主要结构因素是 2 个 MEDV(分子电性距离矢量)描述子表达的 3 个子结构碎片,即—CH₃、—cCc 和 ≥N=。其中子结构—CH₃、—cCc 与硫代磷酸酯类化合物母体骨架密切相关,而 ≥N= 则反映取代基的变化^[22]。赵于丁等测定了 10 种农药对斑马鱼的毒性,并根据《化学农药环境安全评价试验准则》中农药对鱼类的毒性等级划分,评价了 10 种农药对鱼类的安全性。结果表明:有 2 种药剂的 96 h LC₅₀ < 0.1 mg/L,属于剧毒级;5 种药剂的 96 h LC₅₀ 为 0.1~1.0 mg/L,属于高毒级;1 种药剂的 96 h LC₅₀ 位于 1.0~10 mg/L,属于中毒级;2 种药剂的 96 h LC₅₀ > 10 mg/L,属于低毒级^[23]。无独有偶,赵春青等采用半静态法在室内测定了其他

10 种不同类型农药对斑马鱼的毒性。根据 96 h 的 LC₅₀ 值,25%氟虫腈悬浮剂和 8%精喹禾灵微乳剂对斑马鱼高毒;10%吡唑草胺乳油、5%己唑醇悬浮剂、40%乙草胺可湿性粉剂、30%三环异稻可湿性粉剂和 65%噁嗪酮可湿性粉剂对斑马鱼的毒性中等;25%甲霜·霜霉威可湿性粉剂、300 g/L 双酰草胺乳油和 35%吡·异可湿性粉剂对斑马鱼低毒。由此可见,斑马鱼作为模式生物,可有效地应用于环境污染物的毒性检测^[24]。

此外,也可从分子水平指标测定污染物对生物的影响。如 2,3,7,8-四氯代二苯并二噁英(TCDD)和 3,3',4,4'-四氯联苯(PCB77)均会使斑马鱼肝脏超氧化物歧化酶(SOD)和谷胱甘肽-S-转移酶(GST)活性下降,且均对斑马鱼脂质有过氧化作用^[25]。

2 展望

药物研制使用的高生产量斑马鱼正在开发当中,斑马鱼胚胎和鱼苗在第一周期间的生存能力决定了此开发对发现理想药物有意义。大多数亲水及亲脂性物质很容易被培养基卵或鱼苗吸收,有效地促进了此测试新的发展。该领域的斑马鱼毒理病理促进了哺乳动物的毒理病理学的发展。需要为自发的和毒物诱导的瘤样病变和由非肿瘤引起的病变建立一个全面的数据库,把它们共同点和突变系机理记录下来。对自然老化病变的各种斑马鱼,需要通过广泛深入的调查研究获取数据。利用代谢和药物动力学来研究毒物在各个共通系和突变系是至关重要的,它能支持复杂的病理毒理学研究。这方面的资料很少,可对 DNA 修复酶的各机理展开研究。在未来年份中一旦全部破译了斑马鱼的基因组序列,将会加快鉴定学研究和 DNA 修复酶研究的进程。一些科学家在解剖学、组织学、病理学和鱼类(包括斑马鱼)中开展充分的研究,以增加为人类疾病而研究的病理学专业知识^[26]。

斑马鱼基因与人类基因的相似度很高,意味着斑马鱼毒性实验结果多数情况下也适用于人体环境,因此斑马鱼环境检测受到环境科学研究和环境保护工作者的重视。此外,斑马鱼胚胎透明,在 28.5℃时 24 h 内就可发育成形,易观察水环境污染物对其发育过程的影响,且雌性斑马鱼一次可产卵数百、上千枚,使环境科学工作者可在同一代鱼身上进行不同的实验研究和监测工作,解决环境生

物检测时标准受试生物材料获取难、成本昂贵、检测周期长的问题。

综上所述,斑马鱼的独特性质决定了其在环境科学方面的广泛应用前景,尤其是生物技术的发展,推动了生物“环保哨兵”的创建。利用斑马鱼及其转基因品种对环境污染物进行直观、快速的预警检测预示其环境科学应用高潮即将到来。另外,斑马鱼在污染生态毒理学上的研究,是环境科学的学科生长点,属于环境化学学科的新分支学科之一。环境污染的修复,有赖于污染生态毒理学的研究,对区域或国家层面上的生态安全具有重要意义。相信随着研究工作的不断深入,其在环境科学等领域中将会发挥更大的作用。

[参考文献]

- [1] 李淑琼,周勤. 重金属对预警生物斑马鱼的急性毒性研究[J]. 科技通报,2010,26(3):454-457.
- [2] 刘大胜,孔强,王大榜,等. 金属离子鱼类急性毒性研究及对环境标准修订的启示意义[J]. 环境科学与管理,2010,35(4):38-42.
- [3] 修瑞琴,许永香,高世荣,等. 砷与镉、锌离子对斑马鱼的联合毒性实验[J]. 中国环境科学,1998,18(4):349-352.
- [4] 刘信勇,朱琳. 多壁碳纳米管存在环境下 Pb、Zn 对斑马鱼毒性的变化[J]. 生态毒理学报,2009,4(6):829-833.
- [5] 陈中智,朱琳,姚琨,等. Ca^{2+} 与 Pb^{2+} 相互作用对斑马鱼胚胎毒性效应的影响[J]. 环境科学,2009,30(4):1205-1209.
- [6] 杜克久,徐晓白. 环境雌激素研究进展[J]. 科学通报,2000,45(21):2241-2251.
- [7] MATTHEW E, YAN T, BRING M, et al. Effect of environmental estrogens on tumor necrosis factor-mediated apoptosis in MCF-7 cell[J]. Carcinogenesis, 1999, 20(11):2057-2061.
- [8] LYE C M, FRID C L J, GILL M E, et al. Abnormalities in the reproductive health of flounder *Platichthys flesus* exposed to effluent from a sewage treatment works[J]. Marine Pollution Bulletin, 1997, 34(1): 34-41.
- [9] OLSSON P E, WESTERLUND L, TEH S J, et al. Effects of maternal exposure to estrogen and PCB on different life stages of zebrafish (*Danio rerio*) [J]. Ambio, 1999, 28(1): 100-106.
- [10] KIME D E, NASH J P. Gamete viability as an indicator of reproductive endocrine disruption in fish [J]. Science of the Total Environment, 1999, 233(1-3):123-129.
- [11] HOLM G, HALLDEN T, NORRGREN L. Reproductive effects of di-2-ethylhexyl phthalate (DEHP) on zebrafish, *Brachydanio rerio* [J]. Marine Environmental Research, 1995, 39(1-4):357-358.
- [12] 胡晓晴,李卫华,田芳,等. 邻苯二甲酸二丁酯对 F1 代雄性斑马鱼性腺发育影响的研究[J]. 卫生研究,2010,39(2):231-234.
- [13] 黄菲,胡莹莹,焦艳,等. 非 (PHE) 短期暴露对斑马鱼 (*Brachydanio rerio*) 繁殖行为及产卵、受精、孵化和仔鱼死亡率的影响[J]. 北京师范大学学报:自然科学版,2010,46(1):63-68.
- [14] 李伟. 斑马鱼急性毒性试验在工业污染源监测中的应用[J]. 辽宁城乡环境科技,2001,21(2):36-37.
- [15] 潘力军,高世荣,宋瑞金,等. 应用斑马鱼对农药污染的饮用水和地表水源水毒性快速检测[J]. 中国卫生检验杂志,2007,17(1):4-5,25.
- [16] 潘力军,高世荣,孙凤英,等. 应用大型水蚤和斑马鱼对几种工业废水和生活污水的毒性监测[J]. 环境科学与管理,2007,32(2):180-183.
- [17] 张青碧,甘仲森,韩知峡,等. 城市生活污水对水生动物斑马鱼的发育毒性研究[J]. 现代预防医学,2008,35(23):4568-4573.
- [18] 孙国根. 用转基因斑马鱼监测环境污染 该成果可作为水环境雌激素水平“生物标”[N]. 健康报,2007-01-12.
- [19] CARVAN M J 3rd, DALTON T P, STUART G W, et al. Transgenic zebrafish as sentinels for aquatic pollution [J]. Annals of the New York Academy of Sciences, 2000, 919: 133-147.
- [20] 何秋霞,侯海荣,王希敏,等. 腺苷二磷酸诱导斑马鱼血小板聚集的初步研究[J]. 山东科学,2009,22(3):16-19.
- [21] 金鹏,田甜,孙智慧,等. 用 ENU 诱导斑马鱼突变的初步研究[J]. 科学通报,2004,49(20):2078-2082.
- [22] 王宇,刘树深,高树梅,等. 硫代磷酸酯类化合物对斑马鱼的急性毒性及 QSAR 分析[J]. 生态毒理学报,2006,1(2):139-143.
- [23] 赵于丁,徐敦明,刘贤进,等. 10 种农药对斑马鱼的毒性与安全评价[J]. 安徽农业科学,2007,35(22):6801-6802.
- [24] 赵春青,钱坤,李学锋,等. 不同类型农药对斑马鱼的急性毒性与安全评价[J]. 安徽农业科学,2008,36(34):15027-15028.
- [25] 聂芳红,孔庆波,刘连平,等. 两种二噁英类化合物对斑马鱼肝脏 MDA、SOD 和 GST 的影响[J]. 食品与生物技术学报,2009,28(2):210-213.
- [26] SPITSBERGEN J M, MICHAEL L K. The State of the Art of the Zebrafish Model for Toxicology and Toxicologic Pathology Research—Advantages and Current Limitations[J]. Toxicologic Pathology, 2003, 31(Suppl.): 62-87.