

DOI: 10.7524/j.issn.0254-6108.2017080905

张晴, 张斌, 赵静, 等. 环境相关浓度铅暴露诱导斑马鱼仔鱼神经行为毒性[J]. 环境化学, 2018, 37(3): 445-452.

ZHANG Qing, ZHANG Bin, ZHAO Jing, et al. Neurobehavioral toxicity of zebrafish larvae caused by lead exposure at environmentally relevant concentrations [J]. Environmental Chemistry, 2018, 37(3): 445-452.

环境相关浓度铅暴露诱导斑马鱼仔鱼神经行为毒性*

张 晴¹ 张 斌² 赵 静^{1**} 白建峰¹ 尹大强²

(1. 上海第二工业大学电子废弃物研究中心, 上海电子废弃物资源化协同创新中心, 上海, 201209;

2. 同济大学环境科学与工程学院, 长江水环境教育部重点实验室, 上海, 200092)

摘 要 铅是公认的神经毒物, 它的神经毒性是全世界备受关注的重要公共健康问题, 特别是发育早期阶段铅暴露与神经行为变化之间的关联。斑马鱼被认为是研究发育早期阶段低浓度铅暴露诱导神经行为毒性的优良模式生物。因此, 本研究以斑马鱼胚胎/仔鱼为研究对象, 利用 Zebabox 建立的行为学效应测试方法, 包括运动行为、转动行为和社交行为, 系统评价发育早期阶段环境相关浓度(以电子废弃物拆解场地为例)铅暴露的神经行为毒性效应。发育正常的斑马鱼胚胎暴露在浓度为 0、5、10、20 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 铅暴露液中直至 6 dpf。铅暴露对斑马鱼胚胎/仔鱼具有发育毒性作用, 包括孵化率和存活率下降, 卵黄囊肿、心包囊肿和脊柱弯曲等畸形现象。在光照条件下, 铅暴露对斑马鱼仔鱼的运行行为和转向行为并未产生显著影响; 但是在黑暗条件下, 20 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 铅暴露后斑马鱼仔鱼运动距离和总转向次数均显著下降, 但是其行进路径角度和偏转偏好却无变化。与运动行为和转向行为不同, 在黑暗条件下, 铅暴露对斑马鱼仔鱼的社交行为并未产生显著影响; 但在光照条件下 20 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 铅暴露却显著改变了仔鱼的社交次数。本研究结果表明, 行为学指标不仅具备足够的灵敏度可用于指示电子废弃物拆解场地铅污染的潜在风险, 还能更好地服务于人类健康早期预警的需求。

关键词 环境相关浓度, 铅, 运动行为, 转向行为, 社交行为, 斑马鱼。

Neurobehavioral toxicity of zebrafish larvae caused by lead exposure at environmentally relevant concentrations

ZHANG Qing¹ ZHANG Bin² ZHAO Jing^{1**} BAI Jianfeng¹ YIN Daqiang²

(1. WEEE Research Centre of Shanghai Polytechnic University, Shanghai Collaborative Innovation Centre for WEEE Recycling,

Shanghai, 201209, China; 2. Key Laboratory of Yangtze River Water Environment, Ministry of Education,

College of Environmental Science & Engineering, Tongji University, Shanghai, 200092, China)

Abstract: Lead (Pb) is recognized as a neurological toxicant. Up to date, Pb neurotoxicity continues to be a major public health problem around the world, especially the link between early developmental Pb exposure and neurological alterations. Zebrafish is considered as a useful model for the identification of the association between early-life low-dose Pb exposure and neurological adverse outcomes. In this study zebrafish embryos/larvae were used as research object and the test methods of the behavioral effects including locomotor activity, rotation activity and social activity were established with Zebabox, which can systematically evaluate the neurobehavioral toxicity of early-life

2017 年 8 月 9 日收稿 (Received: August 9, 2017).

* 国家自然科学基金 (21507080, 21577104), 上海第二工业大学重点学科 (XXKZD1602) 和上海第二工业大学研究生项目基金 (EGD16YJ046) 资助。

Supported by the National Natural Science Foundation of China (21507080, 21577104), the Key Subject of Shanghai Polytechnic University (XXKZD1602) and the Graduate Program Fund of Shanghai Polytechnic University (EGD16YJ046).

** 通讯联系人, Tel: 021-50215021-8010, E-mail: zhaojing@sspu.edu.cn

Corresponding author, Tel: 021-50215021-8010, E-mail: zhaojing@sspu.edu.cn

low-dose Pb exposure (referred from e-waste disposal sites). The normal zebrafish embryos were selected and exposed to Pb at the concentrations of 0, 5, 10, 20 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ until 6 dpf. The developmental toxicity of zebrafish embryos/larvae was induced by Pb exposure, including the decline of hatching rates and survival rates, and the malformation of yolk-edema, pericardial edema and axial spinal curvature. Pb exposure had no significant impact on the locomotor activity and rotation activity of the zebrafish larvae during the light illumination period. However, in the dark conditions, the locomotor distance and the total rotation times of zebrafish larvae were decreased significantly after exposure to 20 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ Pb, and the path angle and orientation preference did not change. Different from the locomotor activity and rotation activity, in the dark conditions, Pb exposure had no significant impact on the social activity of zebrafish larvae. However, the social activity especially the contact times of zebrafish larvae were changed significantly with 20 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ Pb exposure. Our results suggest that the behavioral indicators are not only sensitive enough to evaluate the potential risk of Pb pollution at e-waste disposal sites, but can also be applied to establish novel early warning system for health risk assessment.

Keywords: environmentally relevant concentrations, lead, locomotor activity, rotation activity, social activity, zebrafish.

随着科技水平的快速发展和电子电器产业市场的迅速膨胀,每年有大量的电子废弃物(waste electrical and electronic equipment, WEEE or e-waste)产生并丢弃.目前中国的电子废弃物产生量已跃居世界首位.2015年,中国国内产生的电子废弃物约800万吨^[1];预计在2020年和2030年,中国将分别产生1550和2840万吨的WEEE^[2].电子废弃物成分复杂,具有资源性和环境污染性的双重属性.铅是电子废弃物拆解场地一类主要的重金属污染物.大量研究表明铅在电子废弃物拆解处理场地周边的环境介质和生物体中广泛存在,对环境和人体健康造成严重威胁^[3-5].浙江省台州市废弃的电子废弃物回收处理场地附近土壤中铅的浓度为6082.9 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$,风险评估结果表明铅残留对生态系统以及成人和儿童的健康具有极高风险^[4].Wu等的研究表明铅等重金属污染可以扩散,如从电子废弃物拆解场地土壤转移到池塘水体,通过灌溉再到稻田土壤,最终造成潜在的生态危害^[5].此外,电子废弃物拆解场地周边儿童的血铅浓度升高问题也引起研究者关注.典型电子废弃物拆解场地广州贵屿儿童的血铅浓度(4.40—32.67 $\mu\text{g}\cdot\text{dL}^{-1}$,均值15.3 $\mu\text{g}\cdot\text{dL}^{-1}$)显著高于周边陈店地区(4.09—23.10 $\mu\text{g}\cdot\text{dL}^{-1}$,均值9.94 $\mu\text{g}\cdot\text{dL}^{-1}$)^[6].研究认为儿童血铅浓度与电子废弃物拆解回收活动紧密相关,包括父亲是否从事电子废弃物相关工作、儿童在贵屿的居住时间和儿童每天在室外特别是公路附近的时间比例等^[7].

铅是公认的神经毒物,它的神经毒性是全世界备受关注的重要公共健康问题.近年来随着毒理学的发展,行为学指标被认为是研究环境污染诱导神经毒性表现效应的有效工具^[8-10].目前实验室和人类流行病学的研究均表明铅暴露能够导致实验动物和人体出现神经行为损伤.铅暴露诱导雄性啮齿类的运动行为和探索行为均显著降低,同时焦虑、空间记忆和学习能力损伤均显著增强^[11-12].此外,慢性职业暴露和居住环境暴露均能诱导成人和儿童出现行为损伤,包括精细运动变化和精神运动损伤^[13].但是鉴于发育中的大脑对神经毒物更为敏感,因此与成年人相比,儿童对铅暴露更为敏感(低至3—5 $\mu\text{g}\cdot\text{dL}^{-1}$);再加上儿童的暴露途径更加广泛,健康风险也更高(如认知障碍和智力损伤),造成的神经行为损伤能一直持续至成年期并可能诱导神经退行性疾病,如阿兹海默氏症和帕金森氏病^[14].

斑马鱼被认为是研究发育早期阶段低浓度铅暴露诱导神经行为毒性的优良模式生物^[15-16].因此,本研究以斑马鱼胚胎/仔鱼为研究对象,利用Zebbox建立的行为学效应测试方法,包括运动行为、转动行为和社交行为,系统评价发育早期阶段环境相关浓度(以电子废弃物拆解场地为例)铅暴露的神经行为毒性效应.研究结果表明行为学指标不仅具备足够的灵敏度可用于指示电子废弃物拆解场地铅污染的潜在风险,还能更好地服务于人类健康早期预警的需求.

1 材料与方法 (Materials and methods)

1.1 仪器与试剂

主要仪器:Zebbox 行为测试系统(ViewPoint Life Science, 法国),SZX-16型体视显微镜(Olympus,

日本),MGC-100P 型恒温光照培养箱(一恒,中国),其它仪器均为实验室常规仪器。

主要试剂:三水合醋酸铅 $\text{PbAC}_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (纯度 >99.5%) 购自国药集团(中国),其余试剂也均为国产分析纯。

1.2 斑马鱼胚胎暴露

成年野生型 Tuebingen 斑马鱼 (*Danio rerio*) 来自同济大学长江水环境教育部重点实验室,按照本课题组先前研究描述的方法进行养殖^[17]。饲养用水为循环系统水,氧饱和度 > 80%。鱼房恒温 28.5 °C,驯养光周期为 14 h : 10 h (昼:夜)。每天喂食丰年虾(购自天津丰年水产养殖有限公司)3 次。选取健康性成熟的斑马鱼,在饲养系统关灯之前按雌雄 1:2 的比例放入自制的鱼卵收集器内,第 2 天开灯 1 h 后收集斑马鱼胚胎,立即用灭菌水冲洗,在体视镜下挑选出发育正常且已到囊胚期的胚胎作为实验用卵。

铅暴露液的配置是将 $\text{PbAC}_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 以 10% Hank's 液^[18] ($0.137 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ NaCl}$, $5.4 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ KCl}$, $0.25 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ Na}_2\text{HPO}_4$, $0.44 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ KH}_2\text{PO}_4$, $1.3 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ CaCl}_2$, $1.0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ MgSO}_4$, $4.2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ NaHCO}_3$) 逐级稀释而成。在本研究中铅暴露浓度为环境相关浓度^[5], 设置为 0、5、10、20 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。每组 60 枚胚胎在直径 9 cm 的玻璃培养皿中进行暴露,暴露液每天更换一半。每组设置 3 个平行。

染毒后将培养皿置于培养箱中培养,培养箱的温度及光照条件与鱼房一致。每 24 h 在体视镜下观察胚胎孵化、死亡和畸形情况(如心包囊肿、体轴弯曲等)。暴露至 6 dpf,随机挑选发育正常的斑马鱼仔鱼进行行为学实验。

1.3 斑马鱼仔鱼行为学实验

本研究涉及的行为学效应包括运动行为、转动行为和社交行为。斑马鱼行为学效应终点均通过 Zebabox 行为测试系统进行检测,采用 Zebalab 软件记录和量化。测试时长为 30 min。测试前 10 min 为光照适应阶段,随后进入测试,分别为 10 min 黑暗、10 min 光照和 10 min 黑暗。行为学数据的记录间隔 60 s。

1.3.1 运动行为

斑马鱼仔鱼运动行为实验方法参照先前的研究^[17]。测试终点为仔鱼运动轨迹和运动总量。测试在 96 孔板中进行。暴露至 6 dpf,从各组随机挑选发育正常的 24 条仔鱼 ($n=24$),4 组共 96 条仔鱼,转移到 96 孔板中,每孔各放 1 条仔鱼和 250 μL 暴露液。

1.3.2 转动行为

斑马鱼仔鱼转动行为实验方法参照先前的研究^[19]。测试终点为仔鱼在游动时各设定路径角度范围内的次数和总转圈次数。测试在 24 孔板中进行。暴露至 6 dpf,从各组随机挑选发育正常的 6 条仔鱼 ($n=6$),4 组共 24 条仔鱼,转移到 24 孔板中,每孔各放 1 条仔鱼和 2 mL 暴露液。

1.3.3 社交行为

斑马鱼仔鱼社交行为实验方法参照先前的研究^[20]。测试终点为仔鱼两两接触的时间及接触次数。当两条鱼之间的距离小于 5 mm 时,则认为两条鱼出现社交行为。测试在 6 孔板中进行。暴露至 6 dpf,从各组随机挑选发育正常的 12 条仔鱼 ($n=6$) 共 4 组,转移到 6 孔板中,每孔各放 2 条仔鱼和 5 mL 暴露液。

1.4 数据统计分析

以每分钟的运动距离(cm)和每 10 min 的运动总距离(cm)2 项指标来表征斑马鱼仔鱼的运动行为;以斑马鱼仔鱼每 10 min 在不同角度范围内的转动次数(次)和总转动次数(次)来表征转动行为;以斑马鱼仔鱼每 10 min 的接触次数(次)和接触时间(s)来表征社交行为。实验结果以平均值(mean) \pm 标准误差(Standard Error of Mean, SEM)来表示。

数据的统计分析和作图采用 Microsoft Excel、Graphpad Prism 和 Origin 8.5 等软件,统计方法采用双因素方差分析(two-way ANOVA)检验不同处理组与对照组之间的差异。若 $P < 0.05$,则认为具有显著性差异。

2 结果与讨论 (Results and discussion)

2.1 胚胎发育毒性

铅暴露对斑马鱼胚胎/仔鱼的孵化率和存活率的影响如表 1 所示,72 hpf 暴露组胚胎孵化率为

64.58%—77.08%显著低于对照组的 90.83% ($P < 0.05$), 说明与对照组相比铅暴露组存在孵化延迟现象; 并且该现象一直延续至 96 hpf. 同样地, 96 hpf 铅暴露组斑马鱼仔鱼存活率为 75.42%—79.58% 显著低于对照组的 92.08% ($P < 0.05$). 此外, $20 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 铅暴露诱导斑马鱼仔鱼出现卵黄囊肿、心包囊肿和脊柱弯曲等畸形现象(图 1). 综上所述, 铅暴露对斑马鱼胚胎/仔鱼具有发育毒性作用. 这与先前的研究结果相类似^[21].

表 1 铅暴露后斑马鱼胚胎/仔鱼的孵化率和存活率

Table 1 Hatching success rates and survival rates of zebrafish embryos/larvae after Pb exposure

铅浓度 Concentration/ ($\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)	孵化率 Hatching rates/%			存活率 Survival rates/%			
	48 hpf	72 hpf	96 hpf	24 hpf	48 hpf	72 hpf	96 hpf
0	67.08±1.10	90.83±0.42	92.08±1.50	94.58±1.50	92.50±1.44	92.08±1.50	92.08±1.50
5	50.00±5.77	76.25±3.61 *	78.33±3.56 *	88.33±2.32	82.92±4.64	80.42±4.64	78.75±3.82 *
10	44.58±6.14 *	77.08±3.00 *	78.75±3.82 *	84.17±3.63 *	82.50±4.33	81.67±3.97	79.58±3.00 *
20	52.50±5.77	64.58±1.82 *	73.75±1.91 *	89.17±1.10	82.08±2.20	78.75±2.89	75.42±2.73 *

注: * 与对照组相比 $P < 0.05$. Note: * $P < 0.05$ compared with control.

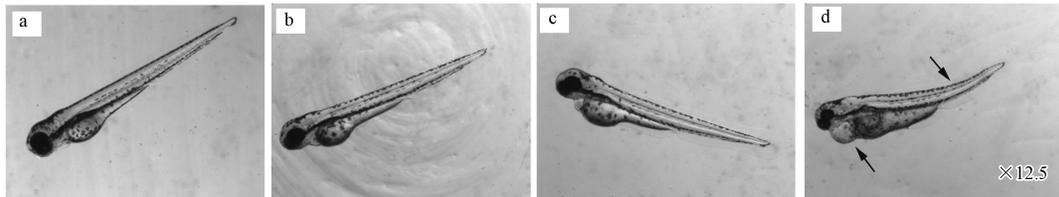


图 1 铅暴露后诱导 72 hpf 斑马鱼仔鱼出现卵黄囊肿、心包囊肿和脊柱弯曲等畸形现象

(a) control; (b) $5 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$; (c) $10 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$; (d) $20 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$

Fig.1 The malformation (e.g., yolk-edema, pericardial edema and axial spinal curvature) in 72 hpf larval zebrafish after Pb exposure

2.2 神经行为毒性

2.2.1 运动行为

铅暴露对斑马鱼仔鱼运动行为的影响如图 2 所示. 在光照条件下, 铅暴露均未显著改变仔鱼的运动行为. 在黑暗条件下, $5 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $10 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 铅暴露同样未改变仔鱼的运动行为; 而与对照组相比, $20 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 铅暴露却能诱导仔鱼出现显著的活动减退 (Hypoactivity) 现象 ($P < 0.05$), 特别是在 20—30 min 的黑暗周期. 与本文的研究结果相类似, 张小晶等发现黑暗条件下 $2.5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 铅暴露组斑马鱼仔鱼平均活力较对照组显著降低^[22]. 但是, Zhu 等的研究结果却表明 $20 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 铅暴露组斑马鱼仔鱼的运动速度在黑暗和光照条件下均显著下降^[23].

目前一些研究表明铅暴露能够诱导斑马鱼仔鱼神经行为变化, 可能的机制包括中枢神经系统基因表达的改变、运动神经元的损伤以及氧化损伤的增加等^[22-25]. 有趣的是, 本研究和其它一些研究发现铅暴露诱导的运动行为变化仅发生在黑暗条件或是光照条件下. 其它环境污染物也有类似的研究结果. BDE 47 暴露能够显著影响斑马鱼仔鱼在黑暗条件下的运动行为, 诱导其出现显著活动减退现象; 而在光照条件下则无任何影响^[17, 26]. DE-71 暴露能诱导斑马鱼仔鱼在黑暗状态下, 低浓度活动过度而高浓度活动减退; 在光照状态下, 活动减退与浓度呈正相关^[27]. 因此, 研究者认为感官系统特别是视觉系统损伤也是神经行为毒性的可能机制之一^[28-31]. 鉴于相似的研究结果, 推测重金属铅暴露诱导仔鱼运动行为的改变也可能与视觉系统的损伤相关联. 但是这需要进一步的研究来论证. 总的来说, 在光照条件下, 铅暴露对斑马鱼仔鱼的运行行为并未产生显著影响; 但是在黑暗条件下, 高浓度铅暴露诱导仔鱼出现显著的活动减退现象 ($P < 0.05$).

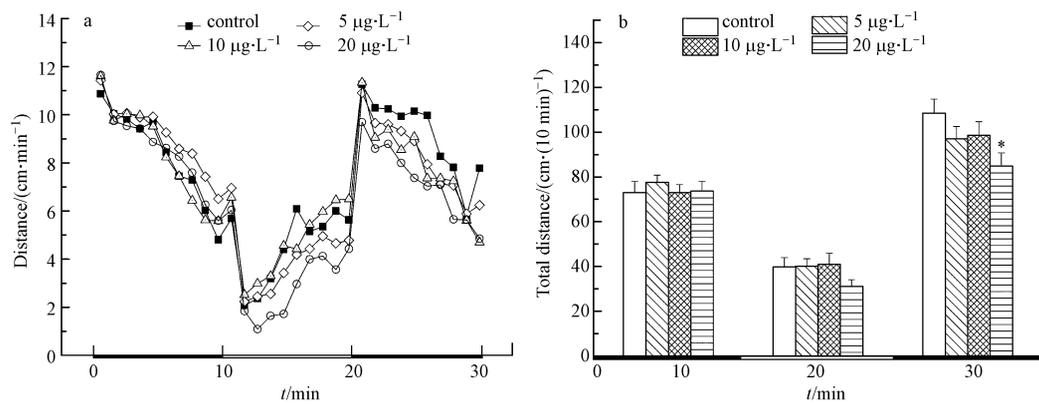


图2 铅暴露后 6 dpf 斑马鱼仔鱼的运动行为变化

(a) 每隔 1 min 记录的仔鱼的运动轨迹;(b) 每 10 min 光照和黑暗交替条件下仔鱼的总运动距离
底部黑色和白色杠分别表示黑暗和光照条件; * 与对照组相比 $P < 0.05$

Fig.2 6 dpf larval zebrafish locomotor activity change after exposure to Pb

(a) The time course by dose in 1 min intervals; (b) The total activity in each 10 min light/dark period;

Solid and open bars at the bottom indicate dark and light period, respectively; * $P < 0.05$ compared with control

2.2.2 转动行为

一般情况下,斑马鱼仔鱼游动时尾部的摆动频率比较低,行进路径角度变化的幅度也不大^[32-33];但当仔鱼遇到外源性刺激等异常情况时才会出现大幅度的转向行为^[34].鉴于此,斑马鱼行进角度在 -10° — 10° 之间被定义为直线运动/无转向, $\pm 10^{\circ}$ — $\pm 90^{\circ}$ 为一般型转向, $\pm 90^{\circ}$ — $\pm 180^{\circ}$ 为刺激型转向.

铅暴露对斑马鱼仔鱼行进角度的影响如图 3 所示.从整体上看,在测试周期内斑马鱼仔鱼行进角度的分布高度相似,均极少发生转角大于 $\pm 90^{\circ}$ 的变向;且每组仔鱼在行进过程中更倾向于向右偏转(+),而不是向左偏转(-),这与先前关于斑马鱼转向行为的研究结果相一致,即斑马鱼偏好顺时针转向与发育早期分子结构的顺时针转向相关^[35].本课题组先前关于环境污染物包括饮用水污染物和 BDE47 的行为学效应也出现了相同的研究结果^[19-20].可见与运动行为指标不同,环境污染物似乎并不能改变斑马鱼的行径路径角度和偏转偏好,这说明环境污染物可能并未能改变发育早期分子结构.

虽然铅暴露并未改变斑马鱼仔鱼的行进路径角度和偏转偏好,但是却显著改变了仔鱼的转向次数.从整体上看,在黑暗时期内仔鱼的转向次数明显多于光照时期.在光照条件下,铅暴露并未改变仔鱼的转向次数;但是在黑暗条件下, $10 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 $20 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 铅暴露诱导仔鱼出现显著的转向次数减少现象 ($P < 0.05$),特别是在 20—30 min 黑暗周期.

2.2.3 社交行为

铅暴露对斑马鱼仔鱼社交行为的影响如图 4 所示.从整体上看,在测试周期内斑马鱼仔鱼的接触时间和接触次数的变化规律相类似:在黑暗条件下,铅暴露均未改变仔鱼的社交行为;但是在光照条件下高浓度铅暴露可以显著改变仔鱼的社交行为,特别是社交次数 ($P < 0.05$).

就接触次数而言,在黑暗时期内仔鱼之间的接触次数明显多于光照时期.在光照时期, $20 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 铅暴露组仔鱼的接触次数显著高于对照组 ($P < 0.05$),且总的接触次数最多(图 4a).在黑暗周期内,不同暴露组和对照组的仔鱼接触时间比较稳定,并未发生明显变化;但在光照时期,与对照组相比 $10 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 $20 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 暴露组的仔鱼接触时间变长(图 4b).研究发现通常情况下一个孔内的两条仔鱼偏好远离对方^[36],但是污染物(如 BDE 47)暴露可能会干扰这种偏好,导致仔鱼之间的接触次数显著增多,本研究结果与先前 BDE 47 的效应相似^[20].

斑马鱼社交行为是一种天生的神经行为能力,是更高级的群聚反应的基础^[37].环境污染物暴露干扰斑马鱼正常的社交行为,从而可能会影响其种群的繁殖.在本研究与铅暴露诱导斑马鱼仔鱼的运动行为和转向行为变化仅发生在黑暗条件下不同,社交行为变化仅发生在光照条件下.这表明铅暴露诱导社交行为变化的机制可能存在不同.有研究表明如果斑马鱼仔鱼发育早期阶段体内视黄酸信号通路受到干扰,那么它的行为特别是社交行为就会受到影响并可能会持续至成年期^[38].鉴于目前对于社交行

为研究甚少,铅暴露诱导斑马鱼社交行为的改变是否也与视黄酸信号通路相关还需要进一步研究.

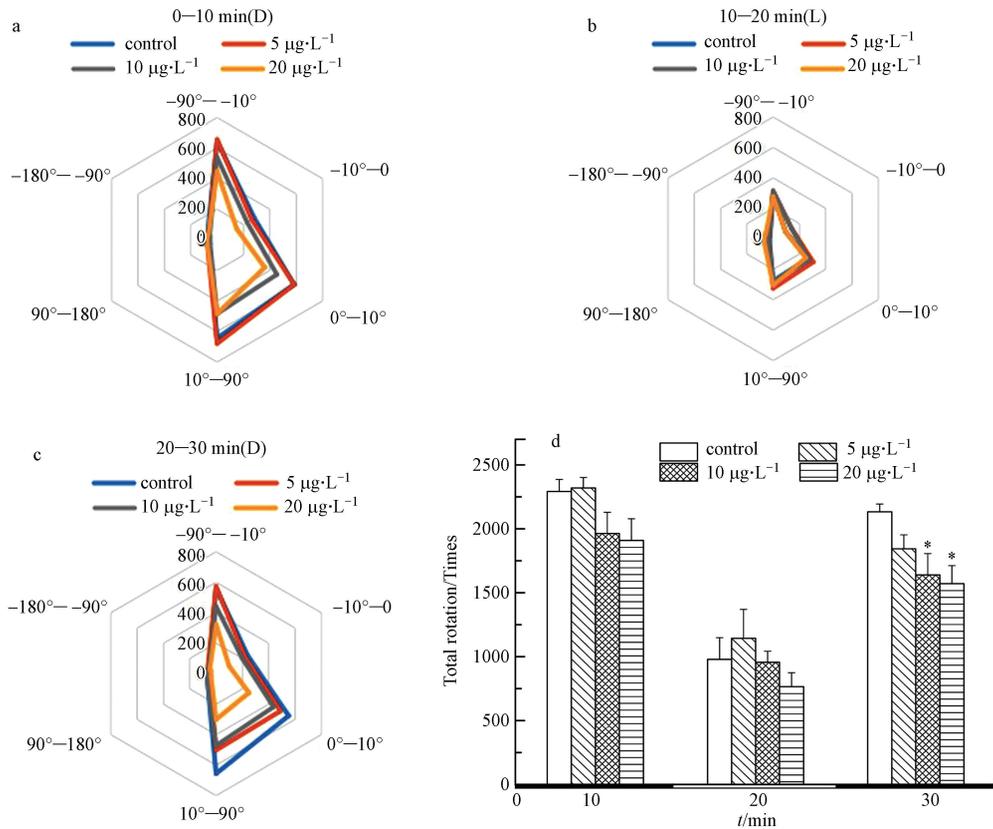


图3 铅暴露后 6 dpf 斑马鱼仔鱼转动行为变化

(a 和 c) 黑暗条件下仔鱼在各设定路径角度范围内的次数; (b) 光照条件下仔鱼在各设定路径角度范围内的次数; (d) 每 10 min 光照和黑暗交替条件下仔鱼的总转向次数; 底部黑色和白色杠分别表示黑暗和光照条件; * 与对照组相比 $P < 0.05$

Fig.3 6 dpf larval zebrafish rotation activity change after exposure to Pb

(a and c) The turning numbers of each path angle class in the dark period; (b) The turning numbers of each path angle class in the light period; (d) The total rotation times in each 10 min light/dark period; Solid and open bars at the bottom indicate dark and light period, respectively; * $P < 0.05$ compared with control

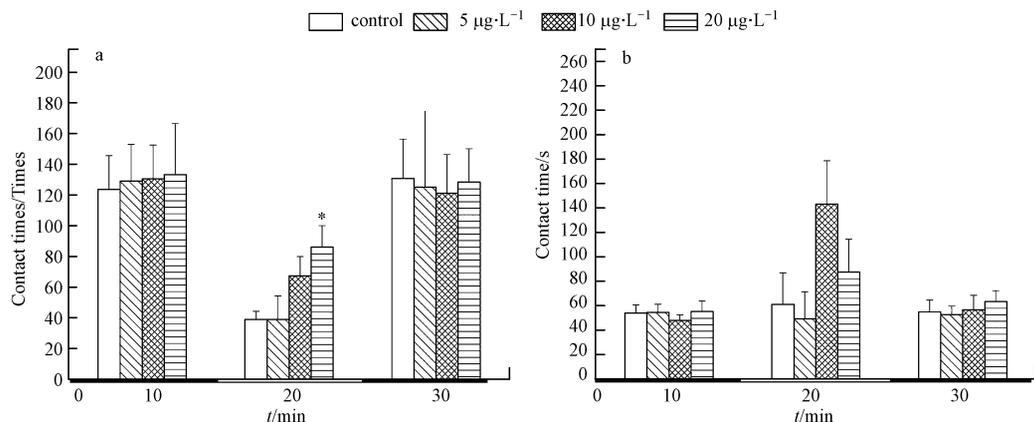


图4 铅暴露后 6 dpf 斑马鱼仔鱼社交行为变化

(a) 每 10 min 光照和黑暗交替条件下接触次数; (b) 每 10 min 光照和黑暗交替条件下接触时间; 底部黑色和白色杠分别表示黑暗和光照条件; * 与对照组相比 $P < 0.05$

Fig.4 6 dpf larval zebrafish social activity change after exposure to Pb

(a) The contact times in each 10 min light/dark period; (b) The contact time in each 10 min light/dark period; Solid and open bars at the bottom indicate dark and light period, respectively; * $P < 0.05$ compared with control

3 结论 (Conclusion)

(1) 铅暴露对斑马鱼胚胎/仔鱼具有发育毒性作用,包括孵化率和存活率下降,脊柱弯曲、心包囊肿等畸形现象。

(2) 在光照条件下,铅暴露对斑马鱼仔鱼的运行行为并未产生显著影响;但是在黑暗条件下,20 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 铅暴露诱导仔鱼出现显著的活动减退现象。

(3) 在光照条件下,铅暴露并未改变斑马鱼仔鱼的转向行为;在黑暗条件下,虽然铅暴露同样未改变斑马鱼仔鱼行进路径角度和偏转偏好,但是却显著改变了 10 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 20 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 铅暴露组仔鱼的总转向次数。

(4) 在黑暗条件下,铅暴露对斑马鱼仔鱼的社交行为并未产生显著影响;但在光照条件下 20 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 铅暴露却显著改变了仔鱼的社交行为特别是社交次数。

参考文献 (References)

- [1] DUAN H B, HU J K, TAN Q J, et al. Systematic characterization of generation and management of e-waste in China [J]. Environmental Science and Pollution Research, 2016, 23(2): 1929-1943.
- [2] ZENG X L, GONG R Y, CHEN W Q, et al. Uncovering the recycling potential of “New” WEEE in China [J]. Environmental Science and Technology, 2016, 50(3): 1347-1358.
- [3] QIU Y W, LIN D, LIU J Q, et al. Bioaccumulation of trace metals in farmed fish from South China and potential risk assessment [J]. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2011, 74(3): 284-293.
- [4] ZHANG Q, YE J J, CHEN J Y, et al. Risk assessment of polychlorinated biphenyls and heavy metals in soils of an abandoned e-waste site in China [J]. Environmental Pollution, 2014, 185: 258-265.
- [5] WU Q H, LEUNG J Y, GENG X H, et al. Heavy metal contamination of soil and water in the vicinity of an abandoned e-waste recycling site: Implications for dissemination of heavy metals [J]. Science of the Total Environment, 2015, 506: 217-225.
- [6] HUO X, PENG L, XU X J, et al. Elevated blood lead levels of children in Guiyu, an electronic waste recycling town in China [J]. Environmental Health Perspectives, 2007, 115(7): 1113-1117.
- [7] ZHENG L K, WU K S, LI Y, et al. Blood lead and cadmium levels and relevant factors among children from an e-waste recycling town in China [J]. Environmental Research, 2008, 108: 15-20.
- [8] 赵静, 朱祥伟, 徐挺, 等. BDE17 及 OH-BDE17 暴露对斑马鱼幼鱼的运动行为效应[J]. 环境化学, 2015, 34(7): 1239-1245.
ZHAO J, ZHU X W, XU T, et al. Locomotor behavior effect in zebrafish larvae after exposure to BDE17 and OH-BDE17 [J]. Environmental Chemistry, 2015, 34(7): 1239-1245 (in Chinese).
- [9] VALERIA D G S, ADILSON P S, JHONNES M S T, et al. Metabolic and behavior changes in surubim acutely exposed to a glyphosate-based herbicide [J]. Archives of Environmental Contamination and Toxicology, 2014, 67(4): 659-667.
- [10] IRONS T D, MACPHAIL R C, HUNTER D L, et al. Acute neuroactive drug exposures alter locomotor activity in larval zebrafish [J]. Neurotoxicology and Teratology, 2010, 32(1): 84-90.
- [11] ABDULMAJEED W I, SULIEMAN H B, ZUBAYR M O, et al. Honey prevents neurobehavioural deficit and oxidative stress induced by lead acetate exposure in male wistar rats: A preliminary study [J]. Metabolic Brain Disease, 2016, 31(1): 37-44.
- [12] AKTAR S, JAHAN M, ALAM S, et al. Individual and combined effects of arsenic and lead on behavioral and biochemical changes in mice [J]. Biological Trace Element Research, 2017, 177(2): 288-296.
- [13] MANSOURI M T, CAULI O. Motor alterations induced by chronic lead exposure [J]. Environmental Toxicology and Pharmacology, 2009, 27: 307-313.
- [14] BELLINGER D C. Very low lead exposures and children’s neurodevelopment [J]. Current Opinion in Pediatrics, 2008, 20(2): 172-177.
- [15] RICE C, GHORAI J K, ZALEWSKI K, et al. Developmental lead exposure causes startle response deficits in zebrafish [J]. Aquatic Toxicology, 2011, 105(3-4): 600-608.
- [16] CHEN J, CHEN Y, LIU W, et al. Developmental lead acetate exposure induces embryonic toxicity and memory deficit in adult zebrafish [J]. Neurotoxicology and Teratology, 2012, 34(6): 581-586.
- [17] ZHAO J, XU T, YIN D Q. Locomotor activity changes on zebrafish larvae with different 2,20,4,40-tetrabromodiphenyl ether (PBDE-47) embryonic exposure modes [J]. Chemosphere, 2014, 94: 53-61.
- [18] WESTERFIELD M. A guide for the laboratory use of zebrafish (*Danio rerio*) [M]. Eugene, OR: University of Oregon Press, 2000.
- [19] 潘睿捷, 黄文平, 张斌, 等. 斑马鱼幼鱼运动行为测试评价饮用水安全 [J]. 生态毒理学报, 2016, 11(4): 18-25.
PAN R J, HUANG W P, ZHANG B, et al. Toxicity assessment of drinking water using zebrafish swimming behavior tests [J]. Asian

- Journal of Ecotoxicology, 2016, 11(4): 18-25(in Chinese).
- [20] ZHANG B, CHEN X L, PAN R J, et al. Effects of three different embryonic exposure modes of 2,2',4,4'-tetrabromodiphenyl ether on the path angle and social activity of zebra fish larvae [J]. Chemosphere, 2017, 169: 542-549.
- [21] ZHU B R, WANG Q W, WANG X F, et al. Impact of co-exposure with lead and decabromodiphenyl ether(BDE-209) on thyroid function in zebrafish larvae [J]. Aquatic Toxicology, 2014, 157: 186-195.
- [22] 张小晶. 胚胎期铅暴露对斑马鱼 NMDA 受体表达及行为的影响[D]. 温州: 温州医学院, 2012.
- ZHANG X J. Effects on expression of NMDA receptor and behavior in zebrafish exposed to lead during embryonic period [D]. Wenzhou: Wenzhou Medical College, 2012(in Chinese).
- [23] ZHU B R, WANG Q W, SHI X J, et al. Effect of combined exposure to lead and decabromodiphenyl ether on neurodevelopment of zebrafish larvae [J]. Chemosphere, 2016, 144: 1646-1654.
- [24] WIRBISKY S E, WEBER G J, LEE J W, et al. Novel dose-dependent alterations in excitatory GABA during embryonic development associated with lead (Pb) neurotoxicity [J]. Toxicology Letters, 2014, 229(1): 1-8.
- [25] TU H W, FAN C J, CHEN X H, et al. Effects on cadmium, manganese, and lead on locomotor activity and neurexin 2A expression in zebrafish [J]. Environmental Toxicology and Chemistry, 2017, 38(8): 2147-2154.
- [26] CHEN X J, HUANG C J, WANG X C, et al. BDE-47 disrupts axonal growth and motor behavior in developing zebrafish [J]. Aquatic Toxicology, 2012, 120-121: 35-44.
- [27] 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.
- [28] CHEN L G, HUANG Y B, HUANG C J, et al. Acute exposure to DE-71 causes alterations in visual behavior in zebrafish larvae [J]. Environmental Toxicology and Chemistry, 2013, 32(6): 1370-1375.
- [29] XU T, ZHAO J, Yin D Q, et al. High-throughput RNA sequencing reveals the effects of 2,2',4,4'-tetrabromodiphenyl ether on retina and bone development of zebrafish larvae [J]. BMC Genomics, 2015, 16(1): 1-12.
- [30] ZHAO J, XU T, YIN D Q, et al. The regulatory roles of microRNA in effects of 2,2',4,4'-tetrabromodiphenyl ether (BDE47) on the transcriptome of zebrafish larvae [J]. Plos One, 2017, 12(1): e0169599.
- [31] XU T, LIU Y, PAN R J, et al. Vision, color vision, and visually guided behavior: The novel toxicological targets of 2,2',4,4'-tetrabromodiphenyl ether (BDE-47) [J]. Environmental Science & Technology Letters, 2017, 4(4): 132-136.
- [32] VAN LEEUWEN J L, VOESENEK C J, MULLER U K. How body torque and Strouhal number change with swimming speed and developmental stage in larval zebrafish [J]. Journal of the Royal Society Interface, 2015, 12(110): 1-11.
- [33] MULLER U K, VAN LEEUWEN J L. Swimming of larval zebrafish ontogeny of body waves and implications for locomotory development [J]. Journal of Experimental Biology, 2004, 207(5): 853-868.
- [34] BUDICK S A, O'MALLEY D M. Locomotor repertoire of the larval zebrafish swimming, turning and prey capture [J]. Journal of Experimental Biology, 2000, 203(17): 2565-2579.
- [35] CRETON R. Automated analysis of behavior in zebrafish larvae [J]. Behavioural Brain Research, 2009, 203: 127-136.
- [36] COLWILL R M, CRETON R. Imaging escape and avoidance behavior in zebrafish larvae [J]. Reviews in the Neurosciences, 2011, 22: 63-73.
- [37] 邹苏琪, 殷梧, 杨昱鹏. 斑马鱼行为学实验在神经科学中的应用[J]. 生物化学与生物物理进展, 2009, 36(1): 5-12.
- ZOU S Q, YIN W, YANG Y P, et al. The ethology application of zebrafish in neuroscience [J]. Progress in Biochemistry and Biophysics, 2009, 36(1): 5-12(in Chinese).
- [38] BAILEY J M, OLIVERI A N, KARBHARI N, et al. Persistent behavioral effects following early life exposure to retinoic acid or valproic acid in zebrafish [J]. Neurotoxicology, 2016, 52: 23-33.