

DOI: 10.7524/AJE.1673-5897.20211206002

杨慧婷, 谷孝鸿, 陈辉辉, 等. 环境相关浓度的卡马西平对斑马鱼幼鱼抗氧化系统和神经递质系统的影响[J]. 生态毒理学报, 2022, 17(3): 268-276
Yang H T, Gu X H, Chen H H, et al. Effects of environment-related concentrations of carbamazepine on antioxidant system and neurotransmitter system of juvenile zebrafish [J]. Asian Journal of Ecotoxicology, 2022, 17(3): 268-276 (in Chinese)

环境相关浓度的卡马西平对斑马鱼幼鱼抗氧化系统和神经递质系统的影响

杨慧婷^{1,2}, 谷孝鸿^{1,*}, 陈辉辉^{1,#}, 曾庆飞¹, 毛志刚¹, 李红敏^{1,2}, 葛优^{1,2}, 查金苗^{2,3}

1. 中国科学院南京地理与湖泊研究所湖泊与环境国家重点实验室, 南京 210008

2. 中国科学院大学, 北京 100049

3. 中国科学院生态环境研究中心 环境水质学国家重点实验室, 北京 100085

收稿日期: 2021-12-06

录用日期: 2022-01-14

摘要: 卡马西平(carbamazepine, CBZ)是一种在临床上常用的抗癫痫药物,由于使用量巨大,且在污水处理厂中去除效率较低,在地表水中广泛被检出,其对非目标水生生物的影响已引起人们的广泛关注。然而目前缺乏有关环境相关浓度下的CBZ对鱼类的慢性毒性效应的研究。因此,以斑马鱼(*Danio rerio*)幼鱼为研究对象,以 $1\ \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 $10\ \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 2种环境相关浓度为暴露浓度,通过测定斑马鱼幼鱼的体长、体质量、脑组织和肝脏中的抗氧化酶(超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、过氧化氢酶(catalase, CAT))活性和氧化产物(丙二醛(malonic dialdehyde, MDA))浓度、脑组织中神经递质降解酶(乙酰胆碱酯酶(acyetylcholinesterase, AChE))活性、神经递质(γ -氨基丁酸(γ -aminobutyric acid, GABA)和谷氨酸(glutamate, Glu))浓度,以评估CBZ对斑马鱼幼鱼的生长发育、抗氧化系统以及神经递质系统的影响。结果表明, $1\ \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ CBZ暴露导致斑马鱼幼鱼脑组织中SOD活性、CAT活性和GABA浓度增加,肝脏中SOD活性降低、CAT活性增加和MDA浓度增加; $10\ \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ CBZ暴露导致斑马鱼幼鱼的体长增加,脑组织中SOD活性增加、AChE活性降低和GABA浓度增加,肝脏中CAT活性和MDA浓度增加。综上,环境相关浓度下CBZ的慢性暴露能够促进斑马鱼幼鱼的生长发育,诱导斑马鱼幼鱼产生氧化应激效应和神经毒性效应。

关键词: 卡马西平; 斑马鱼; 生长发育; 氧化应激; 神经毒性

文章编号: 1673-5897(2022)3-268-09

中图分类号: X171.5

文献标识码: A

Effects of Environment-related Concentrations of Carbamazepine on Antioxidant System and Neurotransmitter System of Juvenile Zebrafish

Yang Huiting^{1,2}, Gu Xiaohong^{1,*}, Chen Huihui^{1,#}, Zeng Qingfei¹, Mao Zhigang¹, Li Hongmin^{1,2}, Ge You^{1,2}, Zha Jinmiao^{2,3}

1. State Key Laboratory of Lake Science and Environment, Nanjing Institute of Geography and Limnology, Chinese Academy of Sciences, Nanjing 210008, China

2. University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China

3. State Key Laboratory of Environmental Aquatic Chemistry, Research Center for Eco-Environmental Sciences, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100085, China

Received 6 December 2021

accepted 14 January 2022

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(41907222); 中国科学院饮用水科学与技术重点实验室专项经费(20K05KLDWST)

第一作者: 杨慧婷(1996—), 女, 博士研究生, 研究方向为鱼类生态学, E-mail: 1933690477@qq.com

* 通讯作者(Corresponding author), E-mail: xhgu@niglas.ac.cn

共同通讯作者(Co-corresponding author), E-mail: hhchen@niglas.ac.cn

Abstract: Carbamazepine (CBZ) is an antiepileptic drug that is widely used in human clinical practice. Due to the high prescription rates and incomplete removal in sewage treatment plants, CBZ has been widely detected in surface water. The adverse effects of CBZ on non-target aquatic organisms have raised global concern. However, chronic effects of CBZ at environmental concentrations on fish are very limited. In this study, juvenile zebrafish (*Danio rerio*) were exposed to $1 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ and $10 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ CBZ for 28 d. Physiological parameters were evaluated including body length, weight, antioxidant enzymes (i.e. superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT)) activity, oxidative production (i.e. malonic dialdehyde (MDA) concentration), neurotransmitter-degrading enzyme (i.e. acetylcholinesterase (AChE)) activity, as well as neurotransmitters (i.e. γ -aminobutyric acid (GABA) and glutamate (Glu) concentration). Results showed that $10 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ CBZ increased the body length of juvenile zebrafish. The SOD activity in the brain was increased after exposure to $1 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ and $10 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ CBZ, while the CAT activity in the brain was increased in $1 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ group. In the liver of juvenile zebrafish, both $1 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ and $10 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ CBZ increased the CAT activity and MDA concentration. However, the SOD activity was decreased in the liver of juvenile zebrafish following exposure to $1 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ CBZ. Besides, $1 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ and $10 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ CBZ increased the GABA concentration in the brain, while $10 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ CBZ decreased the AChE activity in the brain. In summary, chronic exposure to CBZ at environmentally relevant concentrations could promote the growth and development of juvenile zebrafish, inducing oxidative stress and neurotoxic effects.

Keywords: carbamazepine; zebrafish; growth and development; oxidative stress; neurotoxicity

近年来,随着药物在农业、水产养殖业和人类医疗中大量频繁地使用^[1-2],自然水体中药物污染物对非目标水生生物的生态风险引起社会各界的广泛关注。卡马西平(carbamazepine, CBZ)是临床上治疗癫痫、双向情感障碍和三叉神经痛的常用药物^[3],在我国的年消费量可达 $78 \text{ t}^{[4]}$ 。由于CBZ的大量使用,且在大多数污水处理厂中的去除率较低($< 10\%$)^[5-6],CBZ在地表水中广泛被检出。目前,CBZ在地表水和污水中的浓度水平为 $\text{ng}\cdot\text{L}^{-1} \sim \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ^[7-10],我国长江三角洲地区的苏州河中CBZ的浓度高达 $1.09 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ^[8],而在希腊圣托里尼岛的Kamari污水处理厂入水中CBZ的浓度高达 $6.82 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ^[9]。此外,CBZ在水环境中的半衰期较长($82 \pm 11 \text{ d}$)^[11-12],且能够持续不断地进入水体环境中,具有环境持久性。

迄今为止,已有多篇文献报道了CBZ能够对非目标水生生物产生不良影响。例如,在 $0.03 \sim 30 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ CBZ中暴露21 d后,同形蚤(*Daphnia similis*)的蜕皮受到显著抑制,生殖力显著降低^[13]。中华绒螯蟹(*Eriocheir sinensis*)在 $1 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 $10 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ CBZ中暴露40 d后,其蜕皮和生长受到显著抑制^[14]。河蚬(*Corbicula fluminea*)在 $0.5 \sim 50 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ CBZ中暴露30 d后,其鳃和消化腺内产生氧化应激效应,虹吸行为减弱^[6]。斑马鱼(*Danio rerio*)胚胎(受精后4 h)暴露在 $1 \sim 5 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ CBZ中92 h后,其生长发育

显著加速^[15]。斑马鱼成鱼在 $10 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ CBZ中暴露63 d后,其摄食行为显著减慢、受精卵的成活率显著降低,头部的乙酰胆碱酯酶(acetylcholinesterase, AChE)活性显著升高,肝脏和腮内产生氧化应激效应^[16]。此外,CBZ对鱼类具有类雌激素效应,能够干扰鱼类的内分泌系统^[11],然而目前有关环境相关浓度下的CBZ对鱼类的慢性毒性效应十分有限,尤其是发育阶段的鱼类。

本研究选择斑马鱼幼鱼为受试生物,研究环境相关浓度下CBZ的慢性暴露对鱼类抗氧化系统和神经递质系统的影响。将斑马鱼幼鱼(~ 2 月龄)暴露在2种环境相关浓度的CBZ($1 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 $10 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)中28 d,首先对斑马鱼幼鱼的体长和体质量进行测定,评估CBZ对斑马鱼幼鱼生长发育的影响,其次对斑马鱼幼鱼脑组织和肝脏中的超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)活性、过氧化氢酶(catalase, CAT)活性和丙二醛(malonic dialdehyde, MDA)浓度进行测定,评估CBZ对斑马鱼幼鱼抗氧化系统的影响,最后对斑马鱼幼鱼脑组织中的AChE活性、 γ -氨基丁酸(γ -aminobutyric acid, GABA)浓度和谷氨酸(glutamate, Glu)浓度进行测定,评估CBZ对斑马鱼幼鱼神经递质系统的影响。

1 材料与方法 (Materials and methods)

1.1 实验动物

斑马鱼幼鱼(野生AB型, ~ 2 月龄)购自费曦生

物(上海,中国),并驯养在实验室养殖系统内。养殖系统的光/暗周期设置为14 h:10 h,养殖用水的温度为 $(28\pm 1)^\circ\text{C}$,pH为 7.2 ± 0.1 ,电导率为 $(500\pm 50)\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$,每天定时投喂鱼饲料和刚孵化的丰年虾(*Artemia naupli*)各一次。暴露实验开始前1 d停止喂食。

1.2 实验材料及仪器

所用试剂:CBZ(CAS号:298-46-4,纯度>97%,梯希爱,日本)、二甲亚砜(dimethylsulfoxide, DMSO; CAS号:67-68-5,纯度>99%,Sigma,美国)、磷酸缓冲溶液(phosphate buffered saline, PBS; 碧云天,中国)、总蛋白测定试剂盒(南京建成,中国)、SOD测定试剂盒(南京建成,中国)、CAT测定试剂盒(南京建成,中国)、MDA测定试剂盒(南京建成,中国)、AChE测定试剂盒(酶免,中国)、GABA测定试剂盒(酶免,中国)和Glu测定试剂盒(酶免,中国)。

所用仪器:金属浴(SCILOGEX HC 110-PRO, SCILOGEX,美国)、匀浆仪(OSE-Y30, TIANGEN,中国)、漩涡混匀仪(SCILOGEX MX-S, SCILOGEX,美国)、离心机(Eppendorf 5804R, Eppendorf,德国)、恒温培养箱(JYC-412, HENGZWELL,中国)、酶标仪(BioTek Synergy HTX, BioTek,美国)和超高效液相色谱质谱联用仪(ACQUITY H-class UPLC, Xevo TQD, Waters,美国)。

1.3 实验方法

1.3.1 暴露液配制

将0.2 g CBZ溶解到0.01 L DMSO中制备 $20\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的CBZ母液,随后将CBZ母液进行梯度稀释配制成 $0.02\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 $0.2\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的CBZ储备液,最后将 $0.02\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 $0.2\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ CBZ储备液分别用养殖水稀释得到 $1\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 $10\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的CBZ暴露液。实验以0.005% DMSO(1:20 000, V/V)为溶剂对照组。

1.3.2 斑马鱼暴露

实验室驯化2周后,随机选取180条斑马鱼幼

鱼(体长为 $(2.93\pm 0.16)\text{ cm}$,体质量为 $(0.25\pm 0.14)\text{ g}$)进行暴露实验。暴露容器为3 L烧杯,分别设置对照组(0.005% DMSO)和2个处理组($1\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 $10\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ CBZ),每个组设置3个平行,每个平行随机放入20条斑马鱼幼鱼于3 L实验溶液中。采用半静态暴露方法,暴露周期为28 d,每天更换50%实验溶液,光照条件、温度和投喂方法等其他条件同驯化条件一致。暴露实验结束后,将幼鱼放置在冰水中进行麻醉,测量幼鱼的体长和体质量。在每个平行中随机选取4~5只幼鱼,分别解剖出脑组织和肝脏混合作为一个样品放置在1.5 mL离心管里,置于液氮快速冷冻后转移到 -80°C 冰箱保存备用。

1.3.3 暴露液浓度测定

暴露液测定方法参考本课题组之前的研究^[6,14]。暴露实验结束后,从每个组中取1.5 mL暴露液,暴露液通过 $0.22\mu\text{m}$ 针筒式过滤器过滤后置于2 mL棕色玻璃瓶中收集。收集后的暴露液用超高效液相色谱质谱联用仪检测。每个组测定的暴露液样品共3个($n=3$)。色谱条件:色谱柱 ACQUITY UPLC BEH C_{18} (2.1 mm $\times$ 100 mm, $1.7\mu\text{m}$, Waters,美国)温度为 40°C ,流动相A为0.1%甲酸水溶液,流动相B为乙腈,进样量为 $5\mu\text{L}$,流速为 $0.4\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ 。药品洗脱程序:0.5 min,5% B;0.5~6 min,5% B升至70% B;6.0~7.0 min,70% B升至95% B,7.1 min降至5% B。质谱条件:离子源为电喷雾电离源正离子模式,检测方式为多离子反应监测,离子源温度为 150°C ,毛细管电压为2.0 kV,脱溶剂温度为 450°C ,锥孔气流量为 $50\text{ L}\cdot\text{h}^{-1}$ 。采用外标法测定暴露液中的CBZ浓度,准确配制浓度为0.5、1、5、10、50、100和 $150\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的标准溶液,绘制标准曲线。方法检出限和定量限分别为 $0.01\text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 $0.02\text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$ 。每个组检测到的暴露液浓度如表1所示(本文全篇使用CBZ的名义浓度)。

表1 卡马西平(CBZ)暴露液实际浓度

Table 1 The carbamazepine (CBZ) concentration measured in the exposure solutions

条件 Conditions	对照组 Control	$1\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ CBZ	$10\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ CBZ
名义浓度/ $(\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1})$ Nominal concentration/ $(\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1})$	0	1	10
实际浓度/ $(\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1})$ Measured concentration/ $(\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1})$	ND	0.83 ± 0.03	8.2 ± 0.36

注:ND表示未检测出,数据以平均值 $\pm$ 标准误差表示。

Note: ND stands for not detected, and the data are expressed as mean $\pm$ SEM.

1.3.4 抗氧化系统及神经递质系统相关物质测定

准确称量幼鱼的脑组织或肝脏并放置在新的1.5 mL离心管中,按照质量(g):体积(mL)=1:9的比例,将1×PBS添加到不同的幼鱼样品(脑组织样品和肝脏样品)中,随后将样品放置在金属浴(-2℃~2℃)中进行匀浆,最后将匀浆后的样品进行离心(4℃,2 500 r·min⁻¹条件下离心10 min),取上清液备用(根据所测定的物质对上清液稀释不同的倍数)。每个组测定的脑组织和肝脏样品共3个($n=3$)。根据不同的试剂盒说明书测定幼鱼体内的总蛋白浓度、SOD活性、CAT活性、MDA浓度、AChE活性、GABA浓度和Glu浓度。

1.4 数据分析

使用GraphPad Prism 6.0软件进行实验数据的分析和制图。采用Kolmogorov-Smirnov和Levene分别检验实验数据的正态性和方差齐性。处理组和对照组之间的显著性检验采用单因素方差分析(One-way ANOVA)和Holm-Sidak多重比较检验。实验数据均以平均值±标准误差(mean±SEM)表示。处理组和对照组之间的显著性水平为 $P<0.05$ 。

2 结果(Results)

2.1 CBZ对斑马鱼生长发育的影响

在暴露28 d后,测定了斑马鱼幼鱼的体长和体质量(图1)。结果显示,与对照组相比,1 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ CBZ处理组中的幼鱼体长未出现显著性变化(图1(a)),10 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ CBZ处理组中的幼鱼体长显著增加($P=0.0257$) (图1(a)),1 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 和10 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ CBZ处理组中的幼鱼体质量未出现显著性变化(图1(b)),

表明10 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ CBZ的慢性暴露能够促进斑马鱼幼鱼的生长发育。

2.2 CBZ对斑马鱼抗氧化系统的影响

在暴露28 d后,测定了斑马鱼幼鱼脑组织和肝脏中的SOD活性、CAT活性和MDA浓度(图2)。结果显示,与对照组相比,1 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ CBZ暴露下,幼鱼脑内的SOD活性($P=0.0129$)和CAT活性($P=0.0301$)显著增加(图2(a)和(b)),肝脏中的SOD活性($P=0.0365$)显著降低,CAT活性($P=0.0026$)和MDA浓度($P=0.0009$)显著增加(图2(d)、(e)和(f))。与对照组相比,10 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ CBZ暴露下,幼鱼脑内的SOD活性($P=0.0187$)显著增加(图2(a)),肝脏中的CAT活性($P=0.0184$)和MDA浓度($P=0.0004$)显著增加(图2(c)和(f))。实验结果表明,1 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 和10 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ CBZ的慢性暴露能够干扰斑马鱼幼鱼脑组织和肝脏中的抗氧化系统,诱导幼鱼脑组织和肝脏产生氧化应激效应。

2.3 CBZ对斑马鱼神经递质系统的影响

在暴露28 d后,测定了斑马鱼幼鱼脑组织中的AChE活性、GABA浓度和Glu浓度(图3)。结果显示,与对照组相比,10 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ CBZ暴露能够显著抑制幼鱼脑组织中的AChE活性($P=0.033$) (图3(a)),1 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ($P=0.0001$)和10 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ($P=0.0001$)CBZ暴露能够显著提高幼鱼脑组织中的GABA浓度(图3(b)),而幼鱼脑组织中的Glu浓度在1 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 和10 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ CBZ暴露后未出现显著性变化(图3(c))。实验结果表明,1 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 和10 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ CBZ的慢性暴露能够干扰斑马鱼幼鱼脑组织中的神经递质系统,产生神经毒性。

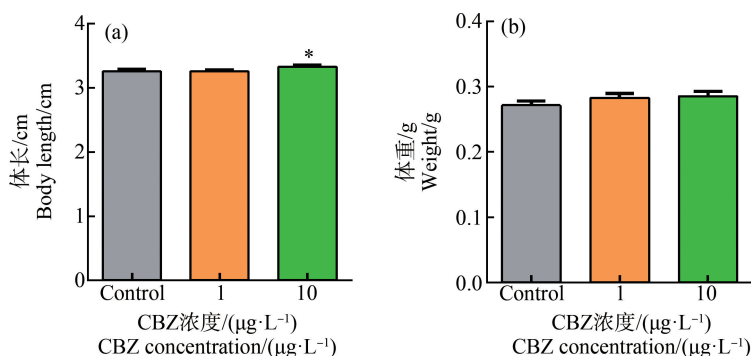


图1 CBZ暴露对斑马鱼幼鱼生长发育的影响

注:斑马鱼幼鱼暴露在对照组(Control)、1、10 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ CBZ中28 d,幼鱼的体长(a)和体质量(b)变化;

数据以平均值±标准误差表示,星号表示处理组与对照组之间有显著性差异(* $P<0.05$)。

Fig. 1 Effects of CBZ exposure on the growth and development of juvenile zebrafish

Note: The body length (a) and body mass (b) of juvenile zebrafish exposed to Control, 1, 10 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ CBZ for 28 d; the data are expressed as mean±SEM, and asterisk denote significant differences (* $P<0.05$) between treatments and controls.

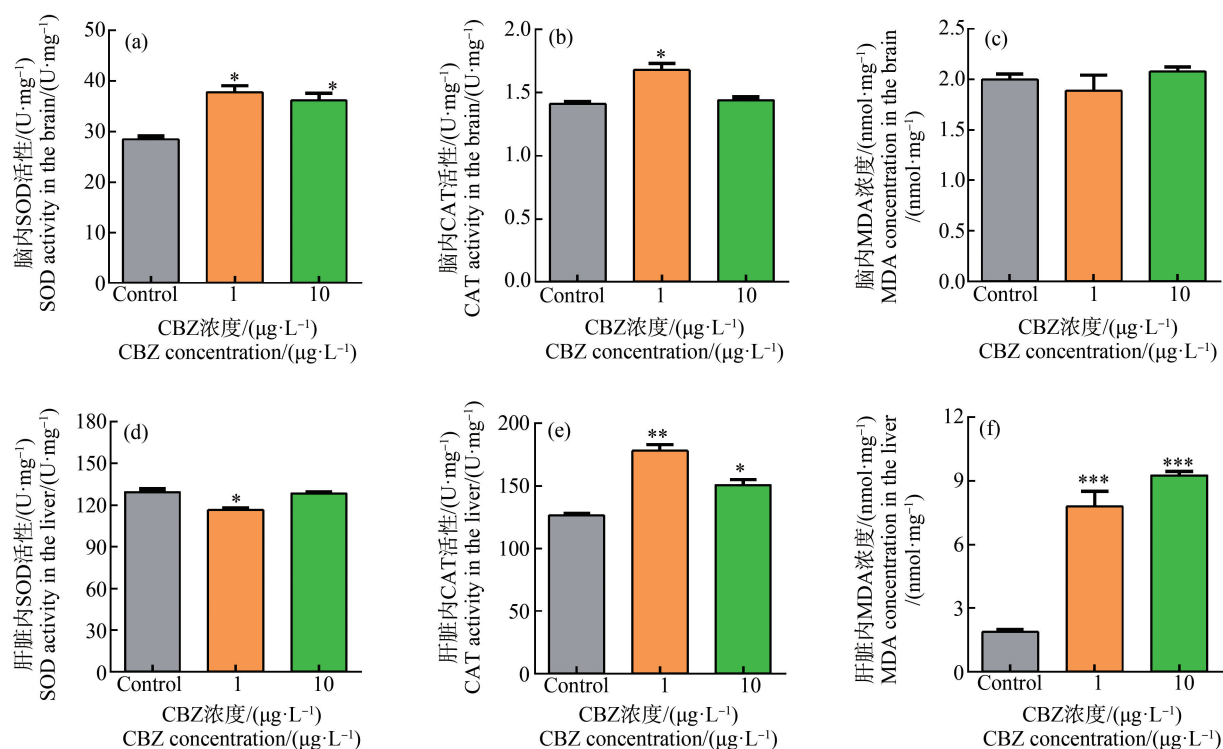


图 2 CBZ 暴露对斑马鱼幼鱼脑组织和肝脏中抗氧化系统的影响

注:斑马鱼幼鱼暴露在对照组(Control)、1、10 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ CBZ 中 28 d; SOD 表示超氧化物歧化酶, CAT 表示过氧化氢酶, MDA 表示丙二醛; 数据以平均值 $\pm$ 标准误差表示, 星号表示处理组与对照组之间有显著性差异(* $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$)。

Fig. 2 Effects of CBZ exposure on the antioxidaion system in the brain and liver of juvenile zebrafish

Note: Juvenile zebrafish exposed to Control, 1, 10 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ CBZ for 28 d; SOD stands for superoxide dismutase,

CAT stands for catalase, and MDA stands for malonic dialdehyde; the data are expressed as mean $\pm$ SEM,

and asterisk denote significant differences (* $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$) between treatments and controls.

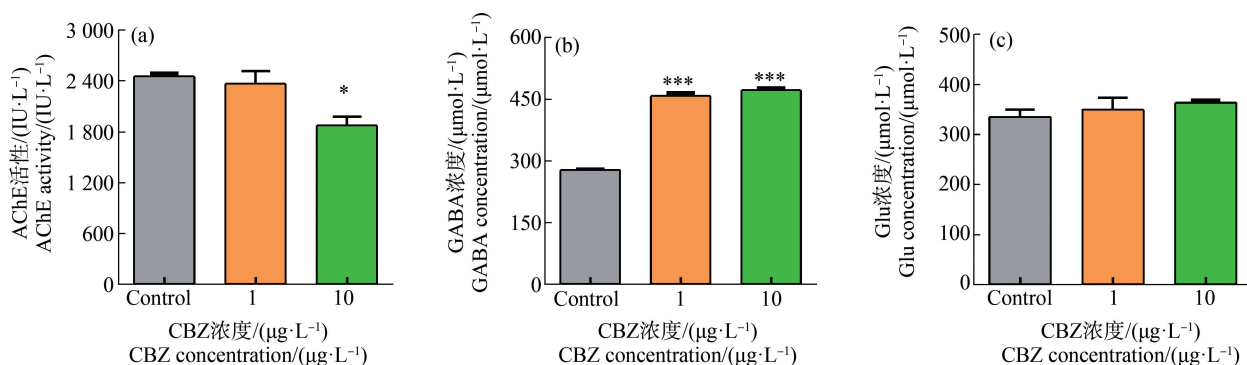


图 3 CBZ 暴露对斑马鱼幼鱼脑组织中神经递质系统的影响

注:斑马鱼幼鱼暴露在对照组(Control)、1、10 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ CBZ 中 28 d; AChE 表示乙酰胆碱酯酶, GABA 表示 γ -氨基丁酸, Glu 表示谷氨酸; 数据以平均值 $\pm$ 标准误差表示, 星号表示处理组与对照组之间有显著性差异(* $P<0.05$, *** $P<0.001$)。

Fig. 3 Effects of CBZ exposure on the neurotransmitter systems in the brain of juvenile zebrafish

Note: Juvenile zebrafish exposed to Control, 1, 10 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ CBZ for 28 d; AChE stands for acetylcholinesterase,

GABA stands for γ -aminobutyric acid, and Glu stands for glutamate; the data are expressed as mean $\pm$ SEM,

and asterisk denote significant differences (* $P<0.05$, *** $P<0.001$) between treatments and controls.

3 讨论 (Discussion)

Qiang 等^[15]报道了 1~5 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ CBZ 的急性暴

露(92 h)能够导致斑马鱼仔鱼的体长增加、卵黄囊面积减少和鱼鳔发育迅速,表明 CBZ 能够加速斑马鱼

仔鱼的生长发育。在本研究中, $10 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ CBZ 的慢性暴露能够导致斑马鱼幼鱼的体长显著增加,表明 CBZ 促进了幼鱼的生长发育。CBZ 是对鱼类能够产生类雌激素效应的药物^[11]。性激素能够促进生物体的食欲和生物体内蛋白质的合成,从而促进生物体的生长^[17-18]。因此, $10 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ CBZ 处理组中斑马鱼幼鱼体长的增加可能与 CBZ 的类雌激素效应有关。作为一种精神类药物, CBZ 能够提高细胞外的血清素(serotonin, 5-HT)浓度,增强 5-HT 能系统的神经传递^[19]。5-HT 在调节鱼类发育方面发挥着重要作用^[20-22]。例如, Barreiro-Iglesias 等^[20]报道了 5-HT 能够促进斑马鱼脊髓运动神经元的发育和再生。Bashammakh 等^[21]研究发现 5-HT 在斑马鱼的咽弓形态形成过程中发挥着重要作用。Airhart 等^[22]报道了 5-HT 水平的减少能够对斑马鱼早期发育阶段的体长和脊索形态等造成不良影响。因此, $10 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ CBZ 处理组中斑马鱼幼鱼体长的增加可能与其体内 5-HT 能系统神经传递的异常有关。由于物种生长发育的加速可能会对其产生不利的影响,因此今后还需要进一步的研究 CBZ 加速斑马鱼生长发育的具体机制。

在正常的生理条件下,生物体内活性氧(reactive oxygen species, ROS)的产生和清除处于一种动态平衡状态,而一旦这种平衡被打破(ROS 过量生成),就会导致氧化应激^[23-24]。生物体抗氧化系统中的抗氧化酶和抗氧化剂在清除 ROS 方面具有重要作用^[25],而抗氧化酶活性和抗氧化剂含量的改变能够诱导氧化损伤^[26]。其中, SOD 和 CAT 在生物体抗氧化系统防御氧化应激过程中发挥着重要作用,前者负责将细胞内氧自由基($\text{O}_2^{\cdot-}$)转化为过氧化氢(H_2O_2)和分子氧(O_2),后者随后将 H_2O_2 转化为水(H_2O)和 O_2 ^[23-24]。SOD 和 CAT 活性的增加表明这 2 种酶能够清除机体产生的过量 ROS,而 SOD 和 CAT 的活性降低表明机体的蛋白质结构受到了损伤^[24,27-28]。脂质过氧化是 ROS 在机体内引起的最常见的细胞损伤,被认为是氧化应激的主要生物指标之一^[23,25-26]。当生物体内的 ROS 含量超过抗氧化酶的清除能力时,过量的 ROS 就会刺激 MDA 的产生^[6,29]。MDA 是生物体内 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 与多不饱和脂肪酸发生过氧化反应后形成的脂质过氧化产物,其浓度水平可作为机体脂质过氧化的指标^[23,25-26]。

在本研究中,斑马鱼幼鱼脑内的 SOD 活性在 $1 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $10 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ CBZ 暴露下均显著增加, CAT

活性仅在 $1 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ CBZ 暴露下显著增加,但是 2 种浓度的 CBZ 暴露均未引起斑马鱼幼鱼脑组织中 MDA 水平出现显著性变化,表明 2 种 CBZ 浓度暴露下的斑马鱼幼鱼脑组织受到了轻微的氧化损伤,而幼鱼脑组织中的抗氧化系统能够通过提高抗氧化酶的活性减弱氧化损伤。另外,斑马鱼幼鱼肝脏中的 SOD 活性仅在 $1 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ CBZ 暴露下显著降低,幼鱼肝脏中 CAT 活性和 MDA 含量在 $1 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $10 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ CBZ 暴露下均显著增加,表明 2 种 CBZ 浓度暴露下的斑马鱼幼鱼肝脏均受到了严重的氧化损伤。肝脏是生物体排毒的主要器官,具有高度的代谢活性^[30-31],可能比其他组织暴露在更高水平的药品中,因此斑马鱼的肝脏受到的氧化损伤相比于脑组织更加严重。根据已有报道,生物体内抗氧化防御系统的激活与化合物诱导的神经毒性的降低有关^[32-33]。因此,本研究中 $1 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $10 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ CBZ 处理组对斑马鱼脑组织和肝脏引起的氧化损伤可能与 2 种浓度的 CBZ 诱导的神经毒性效应有关,这需要进行进一步的研究。由于斑马鱼幼鱼的肝脏受到了严重的氧化应激,引起 ROS 在肝脏中积累,可能对蛋白质、核酸和脂质等生物大分子造成损伤,从而影响斑马鱼幼鱼肝脏的正常生理功能^[25,34]。此外,已有相关文献也报道了环境相关浓度的 CBZ 对斑马鱼的氧化应激效应^[16,32]。例如, da Silva Santos 等^[16]发现 $10 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ CBZ 的慢性暴露(63 d)能够引起斑马鱼成鱼腮、肠道和肝脏中的抗氧化酶(CAT 和谷胱甘肽 S-转移酶)活性显著改变^[16]。不仅如此, CBZ 也能够引起其他的水生生物产生氧化应激效应^[6,35]。例如, Chen 等^[6]报道了 $0.5 \sim 50 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ CBZ 的慢性暴露(30 d)能够引起河蚬(*Corbicula fluminea*)腮和消化腺中的抗氧化酶(SOD、CAT 和谷胱甘肽还原酶)活性和氧化产物(MDA)浓度改变。此外,本研究中 $10 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ CBZ 的慢性暴露(28 d)能够显著诱导斑马鱼幼鱼肝脏内的 CAT 活性,但 da Silva Santos 等^[16]发现 $10 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ CBZ 的慢性暴露(63 d)能够显著抑制斑马鱼成鱼肝脏内的 CAT 活性,笔者推测这可能与较长时间的 CBZ 暴露导致斑马鱼肝脏内氧化损伤(ROS 产生过量所致)的加重有关, CAT 受到损伤(活性降低)无法发挥正常的作用。综上所述,本研究结果表明, $1 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $10 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ CBZ 的慢性暴露均导致斑马鱼幼鱼的脑组织和肝脏产生了氧化应激,但是斑马鱼幼鱼的肝脏产生的氧化应激效应相比于脑组织更为严重,可能会对斑马鱼幼鱼

产生一些不利的影响。

AChE 能够降解突触间隙中的神经递质乙酰胆碱,在生物体内神经信号传递过程中发挥着重要作用,被广泛用作神经毒性检测的生化标记物^[36-37]。在本研究中 $10\ \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ CBZ 的慢性暴露能够显著抑制斑马鱼幼鱼脑内的 AChE 活性,表明 $10\ \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ CBZ 能够干扰幼鱼脑内的胆碱能系统,产生神经毒性效应。另外,已有相关文献也报道了环境相关浓度的 CBZ 暴露(急性暴露)对水生生物体内 AChE 活性的抑制作用^[38-39]。例如 Juhel 等^[39]发现 $0.096\ \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ CBZ 的急性暴露(7 d)能够显著抑制贻贝(*Perna viridis*)无细胞血淋巴中的 AChE 活性。然而,da Silva Santos 等^[16]报道了 $10\ \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ CBZ 的慢性暴露(63 d)能够引起斑马鱼成鱼头部的 AChE 活性增加。笔者推测 da Silva Santos 等的结果与本文研究结果不一致的原因可能与不同时长 CBZ 暴露下对斑马鱼体内胆碱能系统的毒性效应有关,即不同时长的 CBZ 暴露在斑马鱼体内的毒性作用可能存在差异。例如,Rhee 等^[40]将朝鲜臂尾轮虫(*Brachionus koreanus*)暴露在 $100\ \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 $1\ 000\ \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ CBZ 中 12 h 和 24 h,发现 2 种浓度的 CBZ 仅在暴露 24 h 后对轮虫体内的 AChE 活性具有抑制效应。在本研究中, $10\ \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ CBZ 引起斑马鱼幼鱼脑内 AChE 活性降低,可能导致乙酰胆碱在脑内的积累和胆碱能受体的过度刺激^[41]。由于乙酰胆碱在调节生物体的运动、学习和记忆等方面发挥着重要作用^[41-43],因此 $10\ \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ CBZ 可能对幼鱼产生不利的影响。

Glu 和 GABA 分别是脊椎动物中枢神经系统的兴奋性神经递质和抑制性神经递质,前者能够介导生物体内兴奋性突触传递,后者能够介导生物体内抑制性突触传递^[44-46]。兴奋性(Glu)和抑制性(GABA)神经递质的平衡对生物体运动的调节和生物体内外周信号的整合具有重要作用^[45, 47]。目前,CBZ 的作用机制仍不清楚,可能与电子门控钠离子通道相互作用,增强 GABA 的抑制作用,从而引起神经细胞的兴奋性降低^[48-49]。在本研究中, $1\ \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 $10\ \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ CBZ 均引起斑马鱼幼鱼脑内的 GABA 浓度显著增加,但脑内的 Glu 浓度未出现显著性变化,能够导致幼鱼脑内兴奋性和抑制性神经传递的不平衡,这可能与 CBZ 的作用机制有关。本研究结果表明,环境相关浓度下 CBZ 的慢性暴露能够干扰幼鱼脑内的 GABA 能系统,产生神经毒性。类似地,Chen 等^[50]发现 $0.5\sim 50\ \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ CBZ 的慢性暴露(30

d)能够干扰河蚬(*Corbicula fluminea*)体内(外套膜组织、腮、性腺和消化腺)的 GABA 能系统。由于 GABA 在调节脊椎动物的生殖^[51-52]和运动^[45-46]方面发挥着重要作用,因此 $1\ \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 $10\ \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ CBZ 可能会对斑马鱼幼鱼产生不利的影响。

综上所述,环境相关浓度($1\ \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 $10\ \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)CBZ 的慢性暴露能够促进斑马鱼幼鱼的生长发育,诱导幼鱼的脑组织和肝脏产生氧化应激效应,且肝脏产生的氧化应激效应相比于脑组织更为显著,同时 CBZ 暴露能够干扰幼鱼脑组织的胆碱能系统和 GABA 能系统,产生神经毒性效应。

通讯作者简介:谷孝鸿(1966—),男,博士,研究员,主要研究方向为鱼类生态学。

共同通讯作者简介:陈辉辉(1985—),男,博士,副研究员,主要研究方向为新型污染物的生态效应。

参考文献(References):

- [1] Almeida Â, Calisto V, Domingues M R M, et al. Comparison of the toxicological impacts of carbamazepine and a mixture of its photodegradation products in *Scrobicularia plana* [J]. Journal of Hazardous Materials, 2017, 323: 220-232
- [2] Heberer T. Occurrence, fate, and removal of pharmaceutical residues in the aquatic environment: A review of recent research data [J]. Toxicology Letters, 2002, 131(1-2): 5-17
- [3] Yan S H, Wang M, Liang X F, et al. Environmentally relevant concentrations of carbamazepine induce liver histopathological changes and a gender-specific response in hepatic proteome of Chinese rare minnows (*Gobiocypris rarus*) [J]. Environmental Pollution, 2018, 243: 480-491
- [4] Li Y, Zhang L Y, Liu X S, et al. Ranking and prioritizing pharmaceuticals in the aquatic environment of China [J]. Science of the Total Environment, 2019, 658: 333-342
- [5] Zhang Y J, Geißen S U, Gal C. Carbamazepine and diclofenac: Removal in wastewater treatment plants and occurrence in water bodies [J]. Chemosphere, 2008, 73(8): 1151-1161
- [6] Chen H H, Zha J M, Liang X F, et al. Effects of the human antiepileptic drug carbamazepine on the behavior, biomarkers, and heat shock proteins in the Asian clam *Corbicula fluminea* [J]. Aquatic Toxicology, 2014, 155: 1-8
- [7] Arnnok P, Singh R R, Burakham R, et al. Selective uptake and bioaccumulation of antidepressants in fish from effluent-impacted Niagara River [J]. Environmental Science & Technology, 2017, 51(18): 10652-10662

- [8] Zhou X F, Dai C M, Zhang Y L, et al. A preliminary study on the occurrence and behavior of carbamazepine (CBZ) in aquatic environment of Yangtze River Delta, China [J]. Environmental Monitoring and Assessment, 2011, 173(1): 45-53
- [9] Borova V L, Maragou N C, Gago-Ferrero P, et al. Highly sensitive determination of 68 psychoactive pharmaceuticals, illicit drugs, and related human metabolites in wastewater by liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2014, 406(17): 4273-4285
- [10] Nakada N, Hanamoto S, Jürgens M D, et al. Assessing the population equivalent and performance of wastewater treatment through the ratios of pharmaceuticals and personal care products present in a river basin: Application to the River Thames basin, UK [J]. Science of the Total Environment, 2017, 575: 1100-1108
- [11] Yan S H, Wang M, Zha J M, et al. Environmentally relevant concentrations of carbamazepine caused endocrine-disrupting effects on nontarget organisms, Chinese rare minnows (*Gobiocypris rarus*) [J]. Environmental Science & Technology, 2018, 52(2): 886-894
- [12] Barra Caracciolo A, Topp E, Grenni P. Pharmaceuticals in the environment: Biodegradation and effects on natural microbial communities. A review [J]. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2015, 106: 25-36
- [13] Chen H H, Gu X H, Zeng Q F, et al. Acute and chronic toxicity of carbamazepine on the release of chitinase, molting, and reproduction in *Daphnia similis* [J]. International Journal of Environmental Research and Public Health, 2019, 16(2): 209
- [14] Chen H H, Gu X H, Zeng Q F, et al. Carbamazepine disrupts molting hormone signaling and inhibits molting and growth of *Eriocheir sinensis* at environmentally relevant concentrations [J]. Aquatic Toxicology, 2019, 208: 138-145
- [15] Qiang L Y, Cheng J P, Yi J, et al. Environmental concentration of carbamazepine accelerates fish embryonic development and disturbs larvae behavior [J]. Ecotoxicology, 2016, 25(7): 1426-1437
- [16] 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
- [17] Chen J F, Wang X T, Ge X Q, et al. Chronic perfluorooctanesulphonic acid (PFOS) exposure produces estrogenic effects in zebrafish [J]. Environmental Pollution, 2016, 218: 702-708
- [18] Michopoulos V, Wilson M E. Body weight decreases induced by estradiol in female rhesus monkeys are dependent upon social status [J]. Physiology & Behavior, 2011, 102(3-4): 382-388
- [19] Ambrósio A F, Soares-Da-Silva P, Carvalho C M, et al. Mechanisms of action of carbamazepine and its derivatives, oxcarbazepine, BIA 2-093, and BIA 2-024 [J]. Neurochemical Research, 2002, 27(1-2): 121-130
- [20] Barreiro-Iglesias A, Mysiak K S, Scott A L, et al. Serotonin promotes development and regeneration of spinal motor neurons in zebrafish [J]. Cell Reports, 2015, 13(5): 924-932
- [21] Bashammakh S, Würtele M, Kotnik K, et al. Serotonin is required for pharyngeal arch morphogenesis in zebrafish [J]. ScienceOpen Research, 2014: 1
- [22] Airhart M J, Lee D H, Wilson T D, et al. Adverse effects of serotonin depletion in developing zebrafish [J]. Neurotoxicology and Teratology, 2012, 34(1): 152-160
- [23] Maharajan K, Muthulakshmi S, Nataraj B, et al. Toxicity assessment of pyriproxyfen in vertebrate model zebrafish embryos (*Danio rerio*): A multi biomarker study [J]. Aquatic Toxicology, 2018, 196: 132-145
- [24] Wang C X, Harwood J D, Zhang Q M. Oxidative stress and DNA damage in common carp (*Cyprinus carpio*) exposed to the herbicide mesotrione [J]. Chemosphere, 2018, 193: 1080-1086
- [25] Li Y H, Wei L, Cao J R, et al. Oxidative stress, DNA damage and antioxidant enzyme activities in the Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) when exposed to hypoxia and reoxygenation [J]. Chemosphere, 2016, 144: 234-240
- [26] Wang G H, Xiong D M, Wu M N, et al. Induction of time- and dose-dependent oxidative stress of triazophos to brain and liver in zebrafish (*Danio rerio*) [J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology, 2020, 228: 108640
- [27] Zhang Q M, Zhang G L, Yin P J, et al. Toxicological effects of soil contaminated with spirotetramat to the earthworm *Eisenia fetida* [J]. Chemosphere, 2015, 139: 138-145
- [28] Ojha A, Yaduvanshi S K, Srivastava N. Effect of combined exposure of commonly used organophosphate pesticides on lipid peroxidation and antioxidant enzymes in rat tissues [J]. Pesticide Biochemistry and Physiology, 2011, 99(2): 148-156
- [29] Lushchak V I. Environmentally induced oxidative stress in aquatic animals [J]. Aquatic Toxicology, 2011, 101(1): 13-30
- [30] Zhang D L, Liu S Y, Zhang J, et al. Antioxidative respon-

- ses in zebrafish liver exposed to sublethal doses *Aphanizomenon flos-aquae* DC-1 aphanotoxins [J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2015, 113: 425-432
- [31] Shin S M, Yang J H, Ki S H. Role of the Nrf2-ARE pathway in liver diseases [J]. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2013, 2013: 763257
- [32] Jia D T, Li X W, Du S, et al. Single and combined effects of carbamazepine and copper on nervous and antioxidant systems of zebrafish (*Danio rerio*) [J]. *Environmental Toxicology*, 2020, 35(10): 1091-1099
- [33] Oyagbemi A A, Omobowale T O, Saba A B, et al. Gallic acid ameliorates cyclophosphamide-induced neurotoxicity in Wistar rats through free radical scavenging activity and improvement in antioxidant defense system [J]. *Journal of Dietary Supplements*, 2016, 13(4): 402-419
- [34] Sabatini S E, Juárez A B, Eppis M R, et al. Oxidative stress and antioxidant defenses in two green microalgae exposed to copper [J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2009, 72(4): 1200-1206
- [35] Martin-Diaz L, Franzellitti S, Buratti S, et al. Effects of environmental concentrations of the antiepileptic drug carbamazepine on biomarkers and cAMP-mediated cell signaling in the mussel *Mytilus galloprovincialis* [J]. *Aquatic Toxicology*, 2009, 94(3): 177-185
- [36] 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
- [37] de Farias N O, Oliveira R, Sousa-Moura D, et al. Exposure to low concentration of fluoxetine affects development, behaviour and acetylcholinesterase activity of zebrafish embryos [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 2019, 215: 1-8
- [38] Shi C H, He Y D, Liu J X, et al. Ecotoxicological effect of single and combined exposure of carbamazepine and cadmium on female *Danio rerio*: A multibiomarker study [J]. *Applied Sciences*, 2019, 9(7): 1362
- [39] Juhel G, Bayen S, Goh C, et al. Use of a suite of biomarkers to assess the effects of carbamazepine, bisphenol A, atrazine, and their mixtures on green mussels, *Perna viridis* [J]. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 2017, 36(2): 429-441
- [40] Rhee J S, Kim B M, Jeong C B, et al. Effect of pharmaceuticals exposure on acetylcholinesterase (AChE) activity and on the expression of AChE gene in the monogonont rotifer, *Brachionus koreanus* [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Toxicology & Pharmacology*: CBP, 2013, 158(4): 216-224
- [41] Pereira V M, Bortolotto J W, Kist L W, et al. Endosulfan exposure inhibits brain AChE activity and impairs swimming performance in adult zebrafish (*Danio rerio*) [J]. *Neurotoxicology*, 2012, 33(3): 469-475
- [42] Altenhofen S, Nabinger D D, Wiprich M T, et al. Tebucanazole alters morphological, behavioral and neurochemical parameters in larvae and adult zebrafish (*Danio rerio*) [J]. *Chemosphere*, 2017, 180: 483-490
- [43] Hasselmo M E. The role of acetylcholine in learning and memory [J]. *Current Opinion in Neurobiology*, 2006, 16(6): 710-715
- [44] Yang J L, Sykora P, Wilson D M III, et al. The excitatory neurotransmitter glutamate stimulates DNA repair to increase neuronal resiliency [J]. *Mechanisms of Ageing and Development*, 2011, 132(8-9): 405-411
- [45] Yan W, Li L, Li G Y, et al. Microcystin-LR induces changes in the GABA neurotransmitter system of zebrafish [J]. *Aquatic Toxicology*, 2017, 188: 170-176
- [46] Saint-Amant L, Drapeau P. Motoneuron activity patterns related to the earliest behavior of the zebrafish embryo [J]. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 2000, 20(11): 3964-3972
- [47] Prange O, Wong T P, Gerrow K, et al. A balance between excitatory and inhibitory synapses is controlled by PSD-95 and neuroligin [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2004, 101(38): 13915-13920
- [48] Bai Z H, Jia K, Chen G L, et al. Carbamazepine induces hepatotoxicity in zebrafish by inhibition of the Wnt/ β -catenin signaling pathway [J]. *Environmental Pollution*, 2021, 276: 116688
- [49] Thorn C F, Leckband S G, Kelsoe J, et al. PharmGKB summary: Carbamazepine pathway [J]. *Pharmacogenetics and Genomics*, 2011, 21(12): 906-910
- [50] Chen H H, Gu X H, Zeng Q F, et al. Characterization of the GABAergic system in Asian clam *Corbicula fluminea*: Phylogenetic analysis, tissue distribution, and response to the aquatic contaminant carbamazepine [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Toxicology & Pharmacology*: CBP, 2021, 239: 108896
- [51] Yu M, Feng Y L, Zhang X N, et al. Semicarbazide disturbs the reproductive system of male zebrafish (*Danio rerio*) through the GABAergic system [J]. *Reproductive Toxicology*, 2017, 73: 149-157
- [52] Zohar Y, Muñoz-Cueto J A, Elizur A, et al. Neuroendocrinology of reproduction in teleost fish [J]. *General and Comparative Endocrinology*, 2010, 165(3): 438-455 ◆