

DOI: 10.7524/AJE.1673-5897.20230928002

马栋栋, 李思颖, 张金阁, 等. 麻醉剂依托咪酯诱导斑马鱼幼鱼神经发育毒性[J]. 生态毒理学报, 2024, 19(1): 40-53 Ma D D, Li S Y, Zhang J G, et al. Developmental neurotoxicity of anesthetic etomidate on zebrafish larvae [J]. Asian Journal of Ecotoxicology, 2024, 19

Ma D D, Li S Y, Zhang J G, et al. Developmental neurotoxicity of anesthetic etomidate on zebrafish larvae [J]. Asian Journal of Ecotoxicology, 2024, 19 (1): 40-53 (in Chinese)

麻醉剂依托咪酯诱导斑马鱼幼鱼神经发育毒性

马栋栋¹²,李思颖¹²,张金阁¹²,卢志杰¹²,龙小冰¹²,黄争¹²,黄楚舒³,刘昕^{3,#}, 史文俊^{12,*},应光国¹²³

1. 华南师范大学环境研究院广东省化学污染与环境安全重点实验室,华南师范大学环境理论化学教育部重点实验室,广州 510006

2. 华南师范大学环境学院,广州 510006

3. 广东省毒品实验技术中心(国家毒品实验室广东分中心),广东省精神活性物质监测与安全重点实验室,广州 510230
 收稿日期:2023-09-28
 录用日期:2023-11-23

摘要:依托咪酯(etomidate, ET)在临床上常被用作麻醉剂。ET 长期高剂量地使用会导致人类意识下降和认知障碍等负面效 应。但 ET 对鱼类的神经毒性机制尚不清楚。在本文中,2 hpf (hours post-fertilization)的斑马鱼胚胎暴露于不同浓度 ET (0.010、0.091、0.501、9.400、84.31和664.4 μg·L⁻¹)至 168 hpf。通过分析 ET 对斑马鱼胚胎生理发育、早期行为、细胞凋亡以及多 巴胺(dopamine, DA)和 γ 氨基丁酸(gamma aminobutyric acid, GABA)通路相关基因转录表达水平的影响,评估其对斑马鱼幼鱼 神经发育毒性。结果表明,664.4 μg·L⁻¹ ET 显著增大 48 hpf 和 60 hpf 斑马鱼胚胎孵化率。0.091 μg·L⁻¹和 0.501 μg·L⁻¹ ET 诱 导 168 hpf 幼鱼体长减少。0.010、0.091、0.501、9.400、84.31和664.4 μg·L⁻¹ ET 增大 48 hpf 胚胎畸形评分。0.501、9.400、84.31 和 664.4 μg·L⁻¹ ET 暴露显著增大 96 hpf 胚胎畸形评分。0.501、9.400和664.4 μg·L⁻¹ ET 显著增大 168 hpf 胚胎畸形评分。 0.010 μg·L⁻¹ ET 促进了大脑细胞凋亡,而664.4 μg·L⁻¹ ET 抑制了大脑细胞凋亡。行为分析显示,ET 所有浓度均抑制触碰行 为。0.091 μg·L⁻¹ ET 增强幼鱼游泳行为,而664.4 μg·L⁻¹ ET 减弱游泳行为。并且 ET 以浓度依赖的方式导致焦虑行为增加。 qPCR 分析结果表明,低浓度 ET 显著上调了 DA 和 GABA 通路相关基因的转录表达水平,而高浓度 ET 显著抑制了这些基因 的转录表达水平。这些结果表明,ET 对发育早期斑马鱼具有明显的神经发育毒性。 关键词: 依托咪酯:斑马鱼;神经发育毒性;运动行为

文章编号: 1673-5897(2024)1-040-14 中图分类号: X171.5 文献标识码: A

Developmental Neurotoxicity of Anesthetic Etomidate on Zebrafish Larvae

Ma Dongdong^{1,2}, Li Siying^{1,2}, Zhang Jinge^{1,2}, Lu Zhijie^{1,2}, Long Xiaobing^{1,2}, Huang Zheng^{1,2}, Huang Chushu³, Liu Xin^{3,#}, Shi Wenjun^{1,2,*}, Ying Guangguo^{1,2,3}

1. SCNU Environmental Research Institute, Guangdong Provincial Key Laboratory of Chemical Pollution and Environmental Safety & MOE Key Laboratory of Environmental Theoretical Chemistry, South China Normal University, Guangzhou 510006, China

2. School of Environment, South China Normal University, Guangzhou 510006, China

3. Anti-Drug Technology Center of Guangdong Province (National Anti-Drug Laboratory Guangdong Regional Center), Guangdong Provincial Key Laboratory of Psychoactive Substances Monitoring and Safety, Guangzhou 510230, China

Received 28 September 2023 accepted 23 November 2023

基金项目:国家自然科学基金资助项目(42277268);广东省精神活性物质监测与安全重点实验室研究基金项目(2020B22101007)

第一作者:马栋栋(1991—),男,博士研究生,研究方向为生态毒理学,E-mail: dongdong.ma@m.scnu.edu.cn

^{*} 通信作者(Corresponding author), E-mail: wenjun.shi@m.scnu.edu.cn

[#] 共同通信作者(Co-corresponding author), E-mail: 87541944@qq.com

Abstract: Etomidate (ET) is widely used as an anesthetic in clinical practice. The long-term use of ET can lead to negative effects, such as decreased consciousness and cognitive impairment. However, the developmental neurotoxicity of ET on fish remains unclear. To address this issue, zebrafish embryos were exposed to ET from 2 hpf (hours post-fertilization) to 168 hpf at 0.010, 0.091, 0.501, 9.400, 84.31 and 664.4 μ g · L⁻¹. The physiological development, behavior and cell apoptosis, and transcriptional expression of genes related to dopamine (DA) and γ -aminobutyric acid (GABA) pathway were detected to investigate the developmental neurotoxicity of ET. The results showed that 664.4 $\mu g \cdot L^{-1}$ ET decreased hatching rate at 48 hpf and 60 hpf. 0.091 $\mu g \cdot L^{-1}$ and 0.501 $\mu g \cdot$ L^{-1} ET decreased body length in larvae at 168 hpf. At 48 hpf, 0.010, 0.091, 0.501, 9.400, 84.31 and 664.4 μ g· L^{-1} ET increased malformation. 0.501, 9.400, 84.31 and 664.4 μ g·L⁻¹ ET increased malformation at 96 hpf. Additionally, 0.501, 9.400 and 664.4 μ g·L⁻¹ ET increased malformation at 168 hpf. The 0.010 μ g·L⁻¹ ET caused cell apoptosis in the brain, while 664.4 μ g · L⁻¹ ET inhibited apoptosis. In addition, behavior analysis indicated that ET inhibited touch behavior at all concentrations. The 0.091 $\mu g \cdot L^{-1}$ ET enhanced swimming behavior in zebrafish larvae, while 664.4 µg · L⁻¹ ET weakened swimming behavior. ET increased anxious behavior in a concentration-dependent manner. The qPCR data showed that ET up-regulated the transcriptions of genes related to DA and GABA pathway at low concentration, while ET down-regulated the transcriptions of these genes at high concentration. The above results indicate that ET has significant neurodevelopmental toxicity in early development of zebrafish. Keywords: etomidate; zebrafish; developmental neurotoxicity; behavior

依托咪酯(etomidate, ET)是一种非巴比妥类麻 醉剂,因其起效快,给药方式简单和对血压无影响等 优点而被广泛用于全身麻醉[1-2]。根据《麻醉药品和 精神药品管理条例》有关规定,依托咪酯(在中国境 内批准上市的含依托咪酯的药品制剂除外)已被列 入第二类精神药品目录^[3]。在 2007—2009 年,美国 接受心脏手术的病例中,有 62% 的患者接受过 ET 的治疗^[4]。临床剂量 ET 静脉注射数分钟后,患者血 浆浓度接近230 μg·L^{-1[5-6]}。然而,在临床治疗过程 中,ET 的长期高剂量使用能抑制肾上腺皮质皮质激 素的合成^[7],抑制神经元活动,从而引发记忆丧失^[8], 导致多器官衰竭¹⁹。近年来,多个国家非法销售 ET 注射剂,高剂量服用 ET 后因意识下降而发生意外 死亡^[10]。因此,ET 长期高剂量的使用已成为严重的 社会问题[11],并可能通过污水排放进入水生环境中 而导致严重的生态问题。神经发育毒性被定义为一 种有毒物质在动物出生前后对神经系统结构或功 能的正常发育产生不利影响^[12-13]。行为异常是神 经毒性的敏感效应终点,通常与神经元损伤有 关[14-16]。异常行为已经广泛用于评估早期生命阶 段的神经发育毒性^[17]。比如,急性 ET (0.73、2.1、 3.6 和 7.3 mg·L⁻¹)暴露可诱导斑马鱼幼鱼自发游 泳行为呈剂量依赖性降低,降低幼鱼对触碰的反 应^[18]。Broening 等^[19]的研究也表明,4.9 mg·L⁻¹或 9.8 mg·L⁻¹的 ET 以浓度依赖的方式抑制了斑马鱼 幼鱼游泳行为。静脉注射剂量为1 mg·kg⁻¹的 ET 能显著抑制大鼠的翻正行为^[20-21]。2 mg·kg⁻¹ ET 抑 制大鼠的运动行为^[22]。另外,1.6 mg·kg⁻¹ ET 也能 导致小鼠的运动行为降低^[23]。这些结果表明,高浓 度 ET 抑制了啮齿动物运动行为,并具有明显的神 经发育毒性。

多巴胺(dopamine, DA)和 γ 氨基丁酸(gamma aminobutyric acid, GABA)是调节运动行为和焦虑行为的重要神经递质^[24-25]。斑马鱼游泳行为与 DA 水 平成正相关关系^[26],而与 GABA 水平成负相关关系^[27]。斑马鱼焦虑行为与多巴胺水平和 GABA 水 平成负相关关系^[28-29]。例如,20 mg·kg⁻¹ ET 主要是通过诱导突触中 GABA 积累,增强 GABA 受体活性,导致啮齿动物运动能力减弱^[8,30]。0.6 mg·kg⁻¹ ET 显著降低大鼠脑纹状体 DA 释放量^[31-32],并抑制小鼠运动行为^[23]。这表明,ET 可能是通过 DA 和 GABA 信号通路影响啮齿动物行为,并诱导神经毒性。然而,目前对 ET 的研究多集中在人类和啮齿动物,ET 对鱼类的研究还很少,因此,需要进一步实验探究 ET 对鱼类的神经发育毒性机制。

1959 年英国动物学家 W. M. S. Russell 和美国 微生物学家 R. L. Burch 提出替代、减少和优化的 "3R 原则",其中替代是开展动物实验时首要考虑 的原则^[33]。在传统哺乳动物的实验中,神经毒性是 其毒性研究的主要特征之一,其中神经形态学、神经 行为学和神经化学是主要的评价指标^[34]。斑马鱼与 哺乳动物在疾病研究过程中表现出良好的相关性, 斑马鱼实验具有替代哺乳动物实验的巨大潜 力^[35-36]。因此,本研究以斑马鱼为研究对象,通过分 析早期发育、细胞凋亡、运动行为和 GABA 以及 DA 信号通路中目标基因转录表达,探究 ET 对斑马鱼 神经发育毒性潜在机制。

1 材料与方法(Materials and methods)

1.1 主要仪器和实验试剂

1.1.1 主要仪器

Applied Biosystems[™] QuantStudio[™] 7 Flex 实时 定量 PCR 仪, NanoDrop 2000 超微量分光光度计均 购于赛默科技有限公司; Nikon SMZ745T 体视生物 显微镜, Nikon Eclipse 50i 正置荧光显微镜均购于尼 康科技有限公司; Zebra Cube 自动化斑马鱼行为分 析系统购于 ViewPoint 公司; XEVO TQ-S 超高效液 相色谱串联三重四级杆串联质谱仪(UHPLC-MS/ MS)购于 Waters 公司。

1.1.2 实验试剂

依托咪酯(ET,分子式 C₁₄H₁₆N₂O₂,分子量 244.29, CAS 号为 33125-97-2,纯度 ≥ 98.6%),美托咪酯 (MT,分子式 C₁₃H₁₄N₂O₂,分子量 230.26,CAS 号为 5377-20-8,纯度≥98.6%)均购自北京伊诺凯科技有 限公司;二甲基亚砜(dimethylsulfoxide, DMSO), HPLC 级,纯度>99.9%,购于 Sigma 公司。RNAiso Plus、HiScript[®] Ⅲ RT SuperMix for qPCR (+gDNA wiper)反转录试剂,ChamQ Universal SYBR qPCR Master Mix 荧光定量 PCR 试剂购买于南京诺唯赞 生物科技股份有限公司。根据 ISO 7346/3 标准配 制胚胎母液,浓度如下:294.0 mg·L⁻¹ CaCl₂·2H₂O、 123.3 mg·L⁻¹ MgSO₄·7H₂O、63.0 mg·L⁻¹ NaHCO₃ 和 5.5 mg·L⁻¹ KCl。配制完成后,将母液按体积比 1:5 稀释,曝气 24 h 后,调节 pH 值到(7.8±0.2),用 于胚胎暴露实验。

1.2 斑马鱼饲养及暴露实验

AB 品系野生型成年斑马鱼(*Danio rerio*)由华南师范大学广东省化学品控制和生物安全实验室提供。成年斑马鱼在流动式循环系统中驯化 2 个月后开始产卵。饲养期间,每天早晚各投喂一次丰年虾,每隔 3 d 换一次水。水的氧饱和度高于 80%, pH 保持在 7~8, 饲养光暗周期维持 14 h : 10 h, 温度(28±1)℃。产卵前一天晚上把 2 只雌鱼和 2 只雄鱼放

入斑马鱼孵化盒中过夜。第2天清晨光刺激进行 产卵。产卵完成后收集发育正常的胚胎用于暴露 实验。

根据 ET 临床血液浓度(230 μg·L⁻¹)^[5-6],斑马鱼 ET 麻醉浓度(2 mg·L⁻¹)^[37]和 ET 运动行为半抑制浓 度(93 μg·L⁻¹)^[19]。设置 ET 低浓度暴露组:0.01、 0.1、1 和 10 μg·L⁻¹,ET 高浓度暴露组:100 μg·L⁻¹ 和 1 000 μg·L⁻¹,以及溶剂对照组。每个处理组有 4 个平行,每个平行中含有浓度均为 0.001%(*V*: *V*) 的 DMSO。使用 2 L 烧杯进行暴露实验,每个烧杯 中有 400 颗胚胎和 2 L 暴露溶液。每天更换一次暴 露液,从 2 hpf (hours post-fertilization)开始连续暴露 至 168 hpf。暴露期间培养条件同上。

1.3 化学分析

为了测定暴露液中 ET 的实际浓度,斑马鱼胚 胎暴露至72 hpf 时收集每个平行中的水样进行化 学分析。由于暴露液每24h更换一次,因此,在更 换暴露液后(T₀)和隔天更换暴露液前(T₂₄)这2个时 间点从每个平行取 500 mL 水样,每个处理组有 4 个平行。按照本课题组已发表的方法^[38-39]对暴露液 中 ET 进行固相萃取浓缩。方法简述如下:500 mL 水样倒入棕色玻璃瓶后,每个水样中加入 25 mL 甲 醇(HPLC级, Merk);使用玻璃纤维滤膜(0.7 μm)过 滤水样中的杂质;每个水样中加入 50 µL 内标美托 咪酯(1 mg·L⁻¹);摇匀后,500 mL 水样缓慢通过固相 萃取柱(Oasis HLB,6 mL,500 mg);然后用 10 mL 乙 酸乙酯(HPLC级, Merk)洗脱固相萃取柱中的ET,使 氮气吹干乙酸乙酯,并用 0.5 mL 甲醇(HPLC 级, Merk) 定容, 最后使用 LC-MSMS (Waters, XEVO TQ-S,USA)分析 ET 实际浓度。

1.4 发育毒性

通过胚胎孵化率、心率、体长、成活率和畸形评估 ET 对斑马鱼的发育毒性。使用体视显微镜对斑 马鱼幼鱼进行分析观察(n=4,共48条幼鱼)。分别 在48、60、72和84 hpf统计斑马鱼孵化率^[40]。分别 在48、96和168 hpf统计斑马鱼畸形。畸形评分系 统如表1所示。在48 hpf,记录斑马鱼心率(次・ min⁻¹)。在168 hpf,利用体视显微镜统计斑马鱼体 长和死亡率。

1.5 行为效应

1.5.1 触碰反应

在48 hpf,统计斑马鱼胚胎触碰反应。前一天 晚上从每个平行随机吸出15 颗胚胎(n=4,共60 颗

胚胎),转入 24 孔板的单个孔中过夜适应新的环境。 保持室温(28±1) ℃光暗周期维持 14 h:10 h。第 2 天早上用 0.1 mg·L⁻¹链霉菌蛋白酶 E 溶液(pronase E,Sigma)溶解胚胎卵膜。用解剖针轻轻触碰幼鱼头 部 10 次,并在体视显微镜下观察记录每次触觉刺激 的运动反应。在 48 hpf 采用斑马鱼幼鱼触碰反应 评分系统进行评估^[41]。不同的反应程度对应不同的 评分,如表 2 所示。

1.5.2 游泳行为

前一天晚上,从每个平行烧杯中随机选取 12 条幼鱼 (*n*=4,共 48 条幼鱼)放入 24 孔板中,每个孔含有 2 mL 暴露液和一条鱼。保持室温(28±1)℃,光暗周 期维持 14 h:10 h条件下过夜适应新环境。为了 避免昼夜节律对斑马鱼幼鱼的游泳行为的影响, 行为测试在 9:00 am—2:00 pm 之间进行^[45]。用行 为分析系统对斑马鱼的行为记录 25 min,实验过 程包括 5 min 适应、10 min 光照刺激和 10 min 黑 暗刺激。斑马鱼游泳距离和游泳时间记录频率为 1 次·min⁻¹。

致死型畸形	评分	亚致死型畸形	评分	其他	评分
Lethal deformity	Score	Sublethal deformity	Score	Others	Score
凝结物 Congelation	3	眼睛发育 Eye development	2	颅面畸形 Craniofacial anomalies	1
积水 Hydrops	3	色素沉积 Pigmentation	2	心跳过缓 Bradycardia	1
无心跳 No heartbeat	3	血液无循环 No blood circulation	2	鱼鳔缺失 Swim bladder deletion	1
严重畸形 Severe deformity	3	脊柱弯曲 Spinal bent	2	尾尖上翘 Tail tip up	1

	表1	斑马鱼畸形特征	评分细则	
Table 1	The grading ru	les of zebrafish	malformation	characteristics

注:引自 Beekhuijzen 等^[42], Li 等^[43], Panzica-Kelly 等^[44]。

Note: Refer to Beekhuijzen et al., 2015^[42]; Li et al., 2018^[43]; Panzica-Kelly et al., 2010^[44].

表 2 触摸反应评分系统

Table 2 Touch response scoring system

评分	行为
Score	Behavior
5	对触碰反应迅速,游泳距离超过单孔直径 Fish quickly swim away from the source of the touch, move across the diameter of the well
4	幼鱼迅速离开碰触点,游泳路径为曲线 Fish react swiftly to tactile stimuli, which can lead to extended periods of swimming and disorientation
3	反应迟钝,游泳距离较短 Fish are slower to respond to touch and swim a shorter distance
2	幼鱼躯干轻微摆动,但不游泳 Fish flick the tail in response to touch, but do not swim
1	对触碰没有反应 Fish do not move

注:评分系统引自 Stanley 等^[41]。

Note: Scoring system refer to Stanley et al., 2009^[41].

1.5.3 趋触性行为

趋触性行为是评估鱼类焦虑行为常用的方法^[46]。在168 hpf,对斑马鱼幼鱼趋触性行为进行分析。前一天晚上,每个平行中随机选取12条幼鱼(*n*=4,共48条幼鱼)放入24孔板中,每个孔含有一条鱼和2 mL 暴露液。过夜适应新环境条件和测试流程同上。孔板的每一个孔分成面积相等的两部分:内圈和外圈。幼鱼单个孔中的游泳距离比例用外圈游泳距离/游泳总距离表示。幼鱼游泳时间比例用外圈游泳距离时间/游泳总游泳时间表示。

1.6 细胞凋亡分析

在 168 hpf,从每个平行随机选取 5 条幼鱼(*n*= 4,共 20 条幼鱼)。分别把每条鱼放入 24 孔板的单 孔中,每孔装有 2 mL 的吖啶橙溶液(acridine orange, Sigma)(5 µg·mL⁻¹)。室温(28±1) ℃,幼鱼在黑暗条 件下染色 60 min 后用胚胎培养液清洗幼鱼 5 次,以 去除残留吖啶橙溶液^[47]。每条幼鱼用 0.02% MS-222 麻醉,随后用 3% 甲基纤维素固定成侧面向上体 位。用正置荧光显微镜拍摄幼鱼头部荧光图像,

在168 hpf,对斑马鱼幼鱼游泳行为进行分析^[40]。

Image J 软件进行光密度测定。

1.7 基因转录水平分析

根据本课题组前期发表的方法^[38-39]进行样本收 集、RNA 提取、cDNA 合成和实时荧光定量 PCR 分 析。具体如下:在168 hpf,每个平行随机吸取 40 条 幼鱼(*n*=4,共 160 条幼鱼)到装有 1 mL RNA Later 离心管中。用 Trizol 法提取幼鱼中的 RNA。微量 分光光度计(NanoDrop 2000)测定 RNA 样品在 260 nm 和 280 nm 的吸光值,以及 RNA 浓度。*A*₂₆₀/*A*₂₈₀ 的比值范围在 1.8 ~ 2.03 之间。根据试剂盒说明书 的步骤,用 HiScript[®] Ⅲ RT Super Mix for qPCR (+gDNA wiper)反转录试剂合成 cDNA。在生工生 物工程(上海)股份有限公司官网合成引物并利用 Primer-BLAST (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/ primer-blast/)分析引物的特异性。

引物的详细信息如表 3 所示。荧光定量 PCR 分析在 Applied Biosystems[™] QuantStudio[™] 7 Flex 平台上进行。反应体系总体积为 20 μ L,包括 6.7 μ L DEPC 水、0.4 μ L 上游引物、0.4 μ L 下游引物、10 μ L ChamQ Universal SYBR qPCR Master Mix 和 2.5 μ L cDNA 模板。预变性后,在 95 ℃×15 s、60 ℃× 60 s 进行 40 个循环。斑马鱼内参基因 *RpL13* α 、 Actin-β和 EF1-α 表达非常稳定^[38-39],3 个基因转录 表达水平的平均值对本研究中目标基因进行归一 化。采用 2^{-ΔΔCT} 方法分析目标基因的相对表达量。 1.8 数据分析

本研究数据采用 SPSS 25 统计软件进行差异性 分析。Origin 2023 软件进行绘图。利用单因素方 差分析(One-way ANOVA)中的 LSD 多重比较分析 显著性差异。P<0.05 表明 ET 暴露组与对照组之间 存在显著性差异。本研究所有结果均以平均值±标 准差表示。

2 结果(Results)

2.1 暴露浓度

暴露实验每 24 h 更新暴露液,依托咪酯暴露至 72 hpf 进行暴露浓度测定。收集 T_0 和 T_{24} 时间点 暴露液上机检测。结果如表 4 所示,ET 的实际浓度 在 T_0 时刻与名义浓度接近,ET 在 T_{24} 的实际浓度 降低了 0.90% ~62.1%。在暴露 24 h 内,ET 的平均 浓度分别为 0.010、0.091、0.501、9.400、84.31 和 664.4 μ g·L⁻¹。ET 的实际浓度在 T_{24} 时刻比 T_0 时刻低,这 可能是由于 ET 吸附在暴露容器表面或斑马鱼体表 导致的,也可能是 ET 被烧杯内微生物降解引起的。

表 3	用于 qPCR 分析的基因引物列表	
-----	-------------------	--

基因	基因号	上游序列(5'~3')	下游序列(5'~3')	扩增长度/bp
Genes	Gene No.	Sense primer $(5' \sim 3')$	Antisense primer (5 ' ~ 3 ')	Product size/bp
β -actin ^a	AF057040.1	TCTGGCATCACACCTTCTACAAT	TGTTGGCTTTGGGATTCAGG	93
$RpL13\alpha^{a}$	NM_212784.1	CCCTTCCCGTGGATCATATC	TTTGCGTGTGGGTTTCAGAC	208
$EF1$ - α^{a}	BC064291.1	GAGGAAATCACCAAGGAAGTCA	AATCTTCCATCCCTTGAACCAG	147
th1 ^b	NM_131149.1	AGCGAGCAGATCGTGTTTGA	CCTCCAAGCCATCCTTTGGT	178
slc6a3 ^b	NM_131755.1	AGACATCTGGGAAGGTGGTG	ACCTGAGCATCATACAGGCG	151
drd3	NM_183067.1	CCAAGGCAGTGGCAAAGTTC	GGATCACCTGCTCCTTGCTT	140
drd2a	NM_183068.1	TGCTCTCTGTGTGATTGCGA	GCATGTGCGTTTGGTGTTGA	151
abat ^b	NM_201498.2	GACAATCACGCCTCACCAGA	CAGAATTTGCCCGTTGCTCC	116
gad2 ^b	NM_001017708.2	GCTGGAAACGGCAGTCAAAG	AGCTCTCGGCTGTAGACTCA	172
slc12a2	XM_021479152.1	CAGGCCACAGTGTCTGGTGA	GCGCACATGCCCACATAACA	112
slc12a5b	XM_009304148.3	TTGAGGAGGAGATGGACACTAGT	CACCCCAAGGATGTTTTGAAGAC	200
slc6a11b	NM_001007362.1	TCTTCGACTATTACTCTGCCAGC	ATATCCGATCATCTCCTCCAGGT	125
<i>p53</i> °	NM_001328587.1	GGGCAATCAGCGAGCAAA	ACTGACCTTCCTGAGTCTCCA	197
noxa ^c	NM_001045474.3	TAGGCTGTTTTGAGCCGTGT	ATTGGGAAGTGCAGTGGGTT	97
casp3a ^c	NM_131877.3	TCGGTTCTCGCTGTTGAAGG	AGTCTCCGTATCCGCATGTC	101

Table 3 Primers used for real-time qPCR analysis

注:^a引自 Shi 等^[38];^b引自 Tu 等^[48];^c引自 Cheng 等^[49]。

Note: a refer to Shi et al., 2018^[38]; b refer to Tu et al., 2020^[48]; c refer to Cheng et al., 2006^[49].

表 4	依	托咪酉	旨(ET)	在泰露	实验中名义	人浓度和实测浓度	吏
Table	4	The	nomina	al and	measured	concentrations	of
	eton	nidate	e (ET)	in the	exposure	experiment	

名义浓度/(µg·L ⁻¹) Nominal concentration /(µg·L ⁻¹)	实测浓度/(μg·L ⁻¹) Measured concentration /(μg·L ⁻¹)			
	T_0	T_{24}	Average	
SC	0	0	0	
0.01	0.013	0.006	0.010	
0.1	0.122	0.050	0.091	
1	0.623	0.379	0.501	
10	9.693	9.108	9.400	
100	88.42	80.21	84.31	
1 000	702.3	626.6	664.4	

注:SC 表示溶剂对照组; T₀ 和 T₂₄ 表示取样时间(0 h 和 24 h); 实测 浓度为平均值(n=4)。

Note: SC stands for solution control; T_0 and T_{24} represents exposure time (0 h and 24 h); measured concentrations are given as mean (n=4 replicates).

2.2 发育毒性

如图 1 所示,ET 对斑马鱼心率和死亡率均无显 著性影响。664.4 µg·L⁻¹ ET 暴露导致 48 hpf 和 60 hpf 胚胎孵化率显著增大(图 1(a))。0.091 µg·L⁻¹和 0.501 µg·L⁻¹ ET 导致斑马鱼幼鱼体长显著降低(图 1(c))。如图 2 所示, ET 暴露诱导斑马鱼心包水肿、 卵黄囊水肿、脊柱弯曲和尾部弯曲等畸形。在48 hpf, ET 处理组中所有浓度均显著增大胚胎畸形评 分(图 2(b))。在96 hpf,随着暴露浓度的升高,畸形 评分不断上升,0.501、9.400、84.31 和 664.4 μg·L⁻¹ ET 导致斑马鱼畸形率显著上升(图 2(c))。在168 hpf,0.091、0.501 和 664.4 μg·L⁻¹ ET 同样也导致斑 马鱼畸形评分显著上升(图 2(d))。

2.3 异常行为

2.3.1 自发运动、触碰运动和游泳行为

不同浓度 ET 暴露胚胎的触碰反应结果如图 3 所示。ET 所有处理组均显著降低 48 hpf 胚胎的触 碰反应敏感度(图 3(a))。触碰反应评分系统详见表 2。在 168 hpf,0.501 μ g·L⁻¹ ET 导致斑马鱼游泳速 度显著升高(图 3(b)),664.4 μ g·L⁻¹ ET 导致斑马鱼 游泳距离和游泳速度显著降低(图 3(b)和 3(c))。

2.3.2 焦虑行为

ET 暴露至 168 hpf, 对斑马鱼幼鱼趋触性进行 分析,结果如图 4 所示。在 168 hpf, 与对照组相比, 高浓度 ET(84.31 μ g·L⁻¹和 664.4 μ g·L⁻¹)处理组在 光照条件下显著增大了幼鱼在外部区域的游泳时间 比例(图 4(c))。



注:hpf 表示 hours post-fertilization;与对照组比较,*P<0.05。

Fig. 1 Effect of etomidate on hatching rate (a), heart rate (b), body length (c), mortality rate (d) in zebrafish larvae Note: hpf stands for hours post-fertilization; compared with the control, * P<0.05.



图 2 ET 暴露对斑马鱼幼鱼畸形的影响

注: 斑马鱼胚胎图片(a),48 hpf 畸形评分(b),96 hpf 畸形评分(c),168 hpf 畸形评分(d); 与对照组比较,* P<0.05。

Fig. 2 The etomidate induced malformation in zebrafish larvae

Note: Visual images of zebrafish embryos and larvae at 48 hpf, 96 hpf and 168 hpf (a), Malformation score in 48 hpf (b), 96 hpf (c) and 168 hpf (d) of zebrafish exposed to etomidate; compared with the control, * *P*<0.05.





Fig. 3 Effect of etomidate on touch responses (a), total swimming speed (b) and total swimming distance (c) in zebrafish larvae Note: Compared with the control, *P < 0.05.

2.4 细胞凋亡

在 168 hpf,ET 暴露导致斑马鱼幼鱼大脑细胞 凋亡水平显著变化,结果如图 5 所示。0.010 μg·L⁻¹ ET 显著增强了幼鱼大脑荧光强度,而 664.4 μg·L⁻¹ ET 显著降低了幼鱼大脑荧光强度(图 5(c))。此外, 0.501 μg·L⁻¹ ET 增大了凋亡相关基因 *noxa* 的转录 表达水平,664.4 μg·L⁻¹ ET 减少了凋亡相关基因肿 瘤蛋白基因(*p53*),凋亡相关半胱氨酸肽酶 a 基因 (*casp3a*)和黄细胞色素 b 大亚基基因(*noxa*)的转录表 达水平(图 5(e))。



注:实验在 24 孔板中进行,每个孔分为面积相等的内部区域和外部区域,实验过程包括 5 min 适应, 10 min 光照刺激和 10 min 黑暗刺激(a);ET 短期暴露对斑马鱼幼鱼外部区域游泳距离百分比的影响(b);ET 短期暴露 对斑马鱼幼鱼外部区域游泳时间百分比的影响(c);与对照组比较,* P<0.05。

Fig. 4 Effects of etomidate on thigmotaxis in zebrafish larvae

Note: The experimental procedure was performed in two steps including acclimatization and visual motor challenge in the 24-well plate format that each well was divided into outer zone and inter zone (a); the percentage of total distance moved in the outer zone in zebrafish larvae after etomidate exposure (b); the percentage of time spent in the outer zone in zebrafish larvae after etomidate exposure (c); compared with the control, * P < 0.05.

2.5 目标基因转录表达分析

如图 6(a)所示,聚类分析显示,低浓度 ET 增大 DA 和 GABA 信号通路相关基因转录表达水平,而 高浓度降低 DA 和 GABA 信号通路相关基因转录 表达水平。GABA 信号通路相关基因聚类到顶部, 而 DA 信号通路相关基因聚类到尾部。0.501 μg・ L⁻¹ ET 暴露显著增大了酪氨酸羟化酶基因 *th1*、多巴 胺受体基因 *drd3*、多巴胺受体基因 *drd2a*、氨基丁酸 转氨酶基因 *abat* 和 γ-氨基丁酸转运体基因 *slc6a1b* 的转录表达水平,而 664.4 μg·L⁻¹ ET 暴露显著降低 了 *th1*、*drd3*、谷氨酸脱羧酶基因 *gad2* 和 *abat* 的转录 表达水平(图 6(b)和 6(c))。

3 讨论(Discussion)

大脑细胞凋亡发生是神经毒性重要标志^[50-51]。 本研究中,低浓度 ET 促进斑马鱼幼鱼大脑细胞凋 亡,而高浓度 ET 抑制大脑细胞凋亡。同时,低浓度 ET 增加了凋亡相关基因 noxa 的转录表达水平,高 浓度 ET 减少了凋亡相关基因 p53、casp3a 和 noxa

的转录表达水平。大脑中 p53、casp3a 和 noxa 基因 异常转录已被证明是神经元凋亡的指示器[52-53]。其 中, casp3a和 noxa是 p53 主要的下游调控基因,并 在 p53 依赖的凋亡通路中发挥主要的调控作用^[54]。 显著下调 p53、casp3a 和 noxa 表明,高浓度 ET 通过 抑制 p53 凋亡通路降低斑马鱼大脑细胞的凋亡水 平。其他研究也表明,1.2 mg·kg⁻¹ ET 显著抑制大 鼠肾上腺细胞的凋亡发生^[55-56]。此外, Chen 等^[57]研 究发现,低浓度 ET 处理导致体外培养的大脑细胞 凋亡水平增加。亚麻醉剂量的异丙酚也能诱导显著 的神经细胞凋亡^[58]。这些结果表明,低浓度 ET 通 过促进大脑细胞凋亡诱导斑马鱼幼鱼神经毒性。然 而,高浓度 ET 抑制大脑细胞凋亡。凋亡细胞的减 少并不能改善麻醉剂导致的神经损伤^[59-60]。因此. 除了细胞凋亡以外,还有其他因素参与了高浓度 ET 诱导的神经发育毒性。

自发运动、触碰反应和游泳速度可帮助评估污 染物对早期斑马鱼游泳行为的影响,已经被广泛用 于神经发育毒性研究^[61-63]。自发运动反映了斑马鱼 胚胎中运动神经元周期性去极化引发的动作电位节 律性爆发,导致鱼体躯干重复收缩^[62,64]。触碰反应 是一种机械性感觉行为^[6]。游泳运动是由运动回路 中的同侧兴奋性中间神经元刺激引起的行为660。初 级运动神经元轴突生长缺陷会导致斑马鱼发育早期 出现自发运动、触碰反应和游泳活力的异常[67-68]。 本研究中,高浓度 ET 抑制了斑马鱼幼鱼触碰反应 和游泳行为。有研究表明,7.3 mg·L⁻¹ ET 降低斑马 鱼幼鱼对触碰的反应,并导致幼鱼自发游泳行为丧 失^[18]。Broening 等^[19]研究也发现 4.8 mg·L⁻¹ ET 抑 制了斑马鱼幼鱼的游泳行为。Ferreira 等^[37]研究发 现,2 mg·L⁻¹ ET 可导致成年斑马鱼麻醉。因此,高 浓度 ET 诱导的神经行为抑制作用可能与 ET 的麻 醉特性有关^[23]。有趣的是,低浓度 ET 增强了斑马 鱼幼鱼的运动行为。Newman 等^[69]研究也发现,亚 麻醉剂量 ET(0.3 mg·kg⁻¹)刺激小鼠更加活跃。我 们推测远低于麻醉剂量的 ET 可能尚不足引起斑马 鱼幼鱼麻醉作用,反而会导致其运动行为增加。总 之,低浓度和高浓度 ET 暴露会导致斑马鱼幼鱼的 行为异常,表现出神经毒性。

趋触性是鱼类在陌生环境中的一种空间定向策略,主要表现为主动靠近边缘区域^[70]。趋触性增强 被认为是焦虑症状的重要特征^[44]。本研究结果发现,ET 以浓度依赖的方式显著增加斑马鱼在外圈停 留时间。斑马鱼幼鱼游泳距离的减少也指示了焦虑 行为^[71]。因此,高浓度 ET 抑制斑马鱼游泳运动,并 且导致焦虑行为增加。而麻醉剂(异氟醚)也能导致 小鼠焦虑行为增加^[72]。

神经递质系统在介导异常行为和焦虑行为过程 中发挥重要作用^[40]。多巴胺是一种关键的神经递 质,活跃的 DA 系统与行为敏感和多动有关^[73]。紊 乱的多巴胺能可影响斑马鱼的运动行为,导致焦 虑^[28,74]。多篇研究结果显示,细胞内 DA 水平增加 会导致斑马鱼的运动活性增强,而细胞内 DA 水平 的减少可导致斑马鱼的运动活性减弱^[26,75]。多巴胺 神经元兴奋性降低与焦虑行为增加有关^[76]。因此, 本研究分析了 ET 对斑马鱼幼鱼多巴胺通路的影 响。在多巴胺通路中,基因 *th1* 编码的酪氨酸羟化 酶(tyrosine hydroxylase, TH)是 DA 合成过程中的限 制酶,并调节运动行为^[77]。Drd2 和 Drd3 是多巴胺 信号通路中重要的受体,Drd2 在多巴胺活跃区高度



图 5 ET 暴露对 168 hpf 斑马鱼大脑细胞凋亡水平的影响

注:斑马鱼大脑荧光图片(a), (b), (c);ET诱导斑马鱼大脑区域荧光强度变化(d); ET暴露对斑马鱼凋亡相关基因转录表达的影响(e);与对照组比较,*P<0.05。

Fig. 5 Apoptotic levels induced by etomidate in zebrafish larvae at 168 hpf

Note: Visual fluorescence images of zebrafish larvae (a), (b), (c); fluorescence intensity in the brain of the larvae at 168 hpf (d); transcriptional alterations of genes related to apoptosis in zebrafish larvae at 168 hpf (e); compared with the control, * P < 0.05.



图 6 ET 暴露对 168 hpf 斑马鱼幼鱼多巴胺(dopamine, DA)和 γ 氨基丁酸(gamma aminobutyric acid, GABA) 信号通路相关基因转录表达水平的影响

注:聚类分析 DA 和 GABA 信号通路相关基因的 qPCR 数据(a);ET 暴露对斑马鱼幼鱼 DA 信号通路相关基因转录表达水平的影响(b); ET 暴露对斑马鱼幼鱼 GABA 信号通路相关基因转录表达水平的影响(c);与对照组比较,* P<0.05。

Fig. 6 Transcriptional alteration of genes related to dopamine (DA) and gamma aminobutyric

acid (GABA) signaling pathway in zebrafish larvae exposed to etomidate at 168 hpf

Note: Hierarchical clustering analysis of qPCR data from the DA and GABA pathway (a); transcriptional alteration of genes related to DA signaling pathway in zebrafish larvae exposed to etomidate at 168 hpf (b); transcriptional alteration of genes related to GABA signaling pathway in zebrafish larvae exposed to etomidate at 168 hpf (c); compared with the control, * *P*<0.05.

表达,而 Drd3 为神经递质释放提供负反馈机制,并 调节细胞外神经递质水平^[78-79]。本研究中,低浓度 ET 显著上调 th1、drd3 和 drd2 的转录表达水平。然 而,高浓度 ET 显著下调了 th1 和 drd3 的转录表达水 平。结果表明,低浓度 ET 加强了多巴胺信号传递, 而高浓度 ET 阻断了多巴胺合成代谢和信号传导。

GABA 是一种主要的抑制性神经递质^[22]。减少的 GABA 水平诱导大鼠运动行为的增加^[80]。在 GABA 能神经通路中, gad2 负责合成 GABA^[48], 而 abat 将突触间隙的 GABA 代谢成琥珀酸半醛^[81]。 此外, GABA 转运体 (slc6a1b; GABA transporter, GAT)负责从突触间隙中重新吸收 GABA 到突触前 膜^[82]。本研究中低浓度 ET 显著上调 abat 和 slc6a1b 的转录表达水平,高浓度 ET 显著下调 abat 和 gad2 的转录表达水平。这些结果表明,低浓度 ET 通过 增强 GABA 的再摄取而降低胞外 GABA 水平。高浓度 ET 显著抑制了 GABA 的合成和代谢,干扰了 GABA 信号传递。减少的 GABA 水平诱导运动行 为的增加^[78]。扰乱的 GABA 信号传递导致焦虑行 为的增加^[78]。这些结果表明,低浓度 ET 导致游泳 行为的增强与活跃的 DA 信号通路和被抑制 GABA 信号通路有关。高浓度 ET 导致游泳行为的抑制和 焦虑行为的增加与抑制的 DA 系统和扰乱的 GABA 信号传递有关。

此外本研究的结果显示,ET 对斑马鱼和哺乳动物的神经毒性特征类似。例如高浓度 ET 能显著抑制哺乳动物的运动行为和细胞凋亡^[20-23,55-56],低浓度 ET 处理导致脑细胞凋亡水平增加^[57]。本研究结果也表明,高浓度 ET 抑制斑马鱼触碰反应和游泳行为,低浓度 ET 增大斑马鱼大脑细胞凋亡水平。

这些结果显示依托咪酯对人类和哺乳动物具有巨大的健康风险。综上所述,ET 对生命早期发育阶段斑马鱼具有明显的神经毒性。ET 可能通过干扰大脑细胞凋亡,影响 DA 和 GABA 通路以及突触传递相关基因的转录表达水平诱导神经毒性,最终导致斑马鱼幼鱼行为异常(触碰反应,游泳活性和焦虑行为)。而鱼类的行为异常导致被捕食的风险、死亡风险和繁殖风险的增加^[83]。这些结果加强了我们对依托咪酯健康风险评估的认识,并加深了我们对依托咪酯诱导生物神经发育毒性潜在机制的理解。

通信作者简介:史文俊(1987—),男,博士,副研究员,主要研 究方向为生态毒理学。

共同通信作者简介:刘昕(1987—),女,博士,教授,主要研究 方向为新精神活性物质的检验鉴定和环境行为。

参考文献(References):

- Beckman E J, Buck M L, Manasco K B. Analgesia and Sedation in Hospitalized Children [M]// PedSAP Book 3: Sedation and Analgesia. Pkwy Lenexa, KS: American College of Clinical Pharmacy, 2017: 7-30
- [2] Collymore C. Anesthesia, Analgesia, and Euthanasia of the Laboratory Zebrafish [M]//The Zebrafish in Biomedical Research. Amsterdam: Elsevier, 2020: 403-413
- [3] 国家药品监督管理总局,中华人民共和国公安部,中华人民共和国国家卫生健康委员会.精神药品目录
 [R].北京:国家药品监督管理总局,中华人民共和国公安部,中华人民共和国国家卫生健康委员会,2023
- [4] Wagner C E, Bick J S, Johnson D, et al. Etomidate use and postoperative outcomes among cardiac surgery patients [J]. Anesthesiology, 2014, 120(3): 579-589
- [5] McIntosh M P, Rajewski R A. A simple and efficient high-performance liquid chromatographic assay for etomidate in plasma [J]. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2001, 24(4): 689-694
- [6] Su F, El-Komy M H, Hammer G B, et al. Population pharmacokinetics of etomidate in neonates and infants with congenital heart disease [J]. Biopharmaceutics & Drug Disposition, 2015, 36(2): 104-114
- [7] Dörr H G, Kuhnle U, Holthausen H, et al. Etomidate: A selective adrenocortical 11 beta-hydroxylase inhibitor [J]. Klinische Wochenschrift, 1984, 62(21): 1011-1013
- [8] Liu Y T, Liu W, Wang X Q, et al. Hippocampal astrocyte dysfunction contributes to etomidate-induced long-lasting synaptic inhibition [J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2019, 519(4): 803-811

- [9] Bruder E A, Ball I M, Ridi S, et al. Single induction dose of etomidate versus other induction agents for endotracheal intubation in critically ill patients [J]. The Cochrane Database of Systematic Reviews, 2015, 1(1): CD010225
- [10] Supreme Prosecutors' Office. A drug- crime white paper[R]. Seoul, Republic of Korea: Supreme Prosecutors' Office, 2017: 4
- [11] Jung Y K, You S Y, Kim S Y, et al. Simultaneous determination of etomidate and its major metabolite, etomidate acid, in urine using dilute and shoot liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. Molecules, 2019, 24 (24): 4459
- United States Environmental Protection Agency (US EPA). Health effects test guidelines OPPTS 870.6300 Developmental neurotoxicity study [R]. Washington DC: US EPA, 1998
- [13] Mileson B E, Ferenc S A. Methods to identify and characterize developmental neurotoxicity for human health risk assessment: Overview [J]. Environmental Health Perspectives, 2001, 109(Suppl.1): 77-78
- [14] Chen X P, Dong Q X, Chen Y H, et al. Effects of Dechlorane Plus exposure on axonal growth, musculature and motor behavior in embryo-larval zebrafish [J]. Environmental Pollution, 2017, 224: 7-15
- [15] Jin Y X, Zhu Z H, Wang Y Y, et al. The fungicide imazalil induces developmental abnormalities and alters locomotor activity during early developmental stages in zebrafish [J]. Chemosphere, 2016, 153: 455-461
- [16] Altenhofen S, Nabinger D D, Wiprich M T, et al. Tebuconazole alters morphological, behavioral and neurochemical parameters in larvae and adult zebrafish (*Danio rerio*)
 [J]. Chemosphere, 2017, 180: 483-490
- [17] 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
- [18] Du W J, Zhang R W, Li J, et al. The locus coeruleus modulates intravenous general anesthesia of zebrafish via a cooperative mechanism [J]. Cell Reports, 2018, 24(12): 3146-3155.e3
- [19] Broening H W, La Du J, Carr G J, et al. Determination of narcotic potency using a neurobehavioral assay with larval zebrafish [J]. NeuroToxicology, 2019, 74: 67-73
- [20] Pejo E, Santer P, Jeffrey S, et al. Analogues of etomidate: Modifications around etomidate's chiral carbon and the impact on *in vitro* and *in vivo* pharmacology [J]. Anesthesiology, 2014, 121(2): 290-301
- [21] McGrath M, Hofmann A, Raines D E. Behavioral and ste-

roidogenic pharmacology of phenyl ring substituted etomidate analogs in rats [J]. BMC Pharmacology & Toxicology, 2019, 20(1): 48

- [22] Diaz-Gil D, Mueller N, Moreno-Duarte I, et al. Etomidate and ketamine: Residual motor and adrenal dysfunction that persist beyond recovery from loss of righting reflex in rats [J]. Pharmaceuticals, 2014, 8(1): 21-37
- [23] Linsenbardt D N, Boehm S L. Ethanol-induced locomotor sensitization in DBA/2J mice is associated with alterations in GABA_A subunit gene expression and behavioral sensitivity to GABA_A acting drugs [J]. Pharmacology Biochemistry and Behavior, 2010, 95(3): 359-366
- [24] Nuss P. Anxiety disorders and GABA neurotransmission: A disturbance of modulation [J]. Neuropsychiatric Disease and Treatment, 2015, 11: 165-175
- [25] Klein M O, Battagello D S, Cardoso A R, et al. Dopamine: Functions, signaling, and association with neurological diseases [J]. Cellular and Molecular Neurobiology, 2019, 39(1): 31-59
- [26] Tran S, Facciol A, Nowicki M, et al. Acute alcohol exposure increases tyrosine hydroxylase protein expression and dopamine synthesis in zebrafish [J]. Behavioural Brain Research, 2017, 317: 237-241
- [27] Clayman C L, Connaughton V P. Neurochemical and behavioral consequences of ethanol and/or caffeine exposure: Effects in zebrafish and rodents [J]. Current Neuropharmacology, 2022, 20(3): 560-578
- [28] Tran S, Nowicki M, Muraleetharan A, et al. Differential effects of acute administration of SCH-23390, a D1 receptor antagonist, and of ethanol on swimming activity, anxiety-related responses, and neurochemistry of zebrafish [J]. Psychopharmacology, 2015, 232 (20): 3709-3718
- [29] Assad N, Luz W L, Santos-Silva M, et al. Acute restraint stress evokes anxiety-like behavior mediated by telencephalic inactivation and GabAergic dysfunction in zebrafish brains [J]. Scientific Reports, 2020, 10(1): 5551
- [30] Mantz J, Lecharny J B, Laudenbach V, et al. Anesthetics affect the uptake but not the depolarization-evoked release of GABA in rat striatal synaptosomes [J]. Anesthesiology, 1995, 82(2): 502-511
- [31] Koorn R, Brannan T S, Martinez-Tica J, et al. Effect of etomidate on *in vivo* ischemia-induced dopamine release in the corpus striatum of the rat: A study using cerebral microdialysis [J]. Anesthesia and Analgesia, 1994, 78(1): 73-79
- [32] Lesser J B, Koorn R, Vloka J D, et al. The interaction of temperature with thiopental and etomidate on extracellular

dopamine and glutamate levels in Wistar-Kyoto rats subjected to forebrain ischemia [J]. Acta Anaesthesiologica Scandinavica, 1999, 43(10): 989-998

- [33] Russell W M S, Burch R L. The Principles of Humane Experimental Technique [M]. Methuen, 1959
- [34] Organization for Economic Co-operation and Development (OECD). Test No. 424: Neurotoxicity study in rodents [R]. Paris: OECD, 1997
- [35] McGrath P, Li C Q. Zebrafish: A predictive model for assessing drug-induced toxicity [J]. Drug Discovery Today, 2008, 13(9-10): 394-401
- [36] Hill A J, Teraoka H, Heideman W, et al. Zebrafish as a model vertebrate for investigating chemical toxicity [J]. Toxicological Sciences, 2005, 86(1): 6-19
- [37] Ferreira J M, Jorge S, Félix L, et al. Behavioural aversion and cortisol level assessment when adult zebrafish are exposed to different anaesthetics [J]. Biology, 2022, 11(10): 1433
- [38] Shi W J, Jiang Y X, Huang G Y, et al. Dydrogesterone causes male bias and accelerates sperm maturation in zebrafish (*Danio rerio*) [J]. Environmental Science & Technology, 2018, 52(15): 8903-8911
- [39] Ma D D, Jiang Y X, Zhang J G, et al. Transgenerational effects of androstadienedione and androstenedione at environmentally relevant concentrations in zebrafish (*Danio rerio*) [J]. Journal of Hazardous Materials, 2022, 423 (Pt B): 127261
- [40] Zhang J G, Ma D D, Xiong Q, et al. Imidacloprid and thiamethoxam affect synaptic transmission in zebrafish [J]. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2021, 227: 112917
- [41] Stanley K A, Curtis L R, Simonich S L, et al. Endosulfan I and endosulfan sulfate disrupts zebrafish embryonic development [J]. Aquatic Toxicology, 2009, 95(4): 355-361
- [42] Beekhuijzen M, de Koning C, Flores-Guillén M E, et al. From cutting edge to guideline: A first step in harmonization of the zebrafish embryotoxicity test (ZET) by describing the most optimal test conditions and morphology scoring system [J]. Reproductive Toxicology, 2015, 56: 64-76
- [43] Li X S, Ding G H, Xiong Y J, et al. Toxicity of water-accommodated fractions (WAF), chemically enhanced WAF (CEWAF) of Oman crude oil and dispersant to early-life stages of zebrafish (*Danio rerio*) [J]. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, 2018, 101(3): 314-319
- [44] Panzica-Kelly J M, Zhang C X, Danberry T L, et al. Mor-

phological score assignment guidelines for the dechorionated zebrafish teratogenicity assay [J]. Birth Defects Research Part B, Developmental and Reproductive Toxicology, 2010, 89(5): 382-395

- [45] MacPhail R C, Brooks J, Hunter D L, et al. Locomotion in larval zebrafish: Influence of time of day, lighting and ethanol [J]. Neurotoxicology, 2009, 30(1): 52-58
- [46] dos Santos C P, de Oliveira M N, Silva P F, et al. Relationship between boldness and exploratory behavior in adult zebrafish [J]. Behavioural Processes, 2023, 209: 104885
- [47] Huang H H, Huang C J, Wang L J, et al. Toxicity, uptake kinetics and behavior assessment in zebrafish embryos following exposure to perfluorooctanesulphonicacid (PFOS) [J]. Aquatic Toxicology, 2010, 98(2): 139-147
- [48] Tu X, Li Y W, Chen Q L, et al. Tributyltin enhanced anxiety of adult male zebrafish through elevating cortisol level and disruption in serotonin, dopamine and gamma-aminobutyric acid neurotransmitter pathways [J]. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2020, 203: 111014
- [49] Cheng B, Jiang F, Su M L, et al. Effects of lincomycin hydrochloride on the neurotoxicity of zebrafish [J]. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2020, 201: 110725
- [50] Dey S, Mactutus C F, Booze R M, et al. Cocaine exposure in vitro induces apoptosis in fetal locus coeruleus neurons by altering the Bax/Bcl-2 ratio and through caspase-3 apoptotic signaling [J]. Neuroscience, 2007, 144(2): 509-521
- [51] Cunha-Oliveira T, Rego A C, Cardoso S M, et al. Mitochondrial dysfunction and caspase activation in rat cortical neurons treated with cocaine or amphetamine [J]. Brain Research, 2006, 1089(1): 44-54
- [52] Wong H K, Fricker M, Wyttenbach A, et al. Mutually exclusive subsets of BH3-only proteins are activated by the p53 and c-Jun N-terminal kinase/c-Jun signaling pathways during cortical neuron apoptosis induced by arsenite [J]. Molecular and Cellular Biology, 2005, 25(19): 8732-8747
- [53] Akhtar R S, Geng Y, Klocke B J, et al. BH3-only proapoptotic Bcl-2 family members Noxa and Puma mediate neural precursor cell death [J]. The Journal of Neuroscience, 2006, 26(27): 7257-7264
- [54] Michalak E M, Villunger A, Adams J M, et al. In several cell types tumour suppressor p53 induces apoptosis largely via Puma but Noxa can contribute [J]. Cell Death and Differentiation, 2008, 15(6): 1019-1029
- [55] Liu S, Zhang X P, Han N N, et al. Pretreatment with low dose etomidate prevents etomidate-induced rat adrenal insufficiency by regulating oxidative stress-related MAPKs

and apoptosis [J]. Environmental Toxicology and Pharmacology, 2015, 39(3): 1212-1220

- [56] Félix N M, Goy-Thollot I, Walton R S, et al. Etomidate decreases adrenal gland apoptosis and necrosis associated with hemorrhagic shock in a rat model (*Rattus norvegicus*) [J]. Cogent Biology, 2017, 3(1): 1393864
- [57] Chen H T, Zhou J, Fan Y L, et al. Anesthetic agent etiomidate induces apoptosis in N2a brain tumor cell line [J]. Molecular Medicine Reports, 2018, 18(3): 3137-3142
- [58] Cattano D, Young C, Straiko M M, et al. Subanesthetic doses of propofol induce neuroapoptosis in the infant mouse brain [J]. Anesthesia and Analgesia, 2008, 106(6): 1712-1714
- [59] Fredriksson A, Pontén E, Gordh T, et al. Neonatal exposure to a combination of N-methyl-D-aspartate and gamma-aminobutyric acid type A receptor anesthetic agents potentiates apoptotic neurodegeneration and persistent behavioral deficits [J]. Anesthesiology, 2007, 107(3): 427-436
- [60] Boscolo A, Starr J A, Sanchez V, et al. The abolishment of anesthesia-induced cognitive impairment by timely protection of mitochondria in the developing rat brain: The importance of free oxygen radicals and mitochondrial integrity [J]. Neurobiology of Disease, 2012, 45(3): 1031-1041
- [61] Dubovický M, Kovaćovský P, Ujházy E, et al. Evaluation of developmental neurotoxicity: Some important issues focused on neurobehavioral development [J]. Interdisciplinary Toxicology, 2008, 1(3-4): 206-210
- [62] Selderslaghs I W, Hooyberghs J, De Coen W, et al. Locomotor activity in zebrafish embryos: A new method to assess developmental neurotoxicity [J]. Neurotoxicology and Teratology, 2010, 32(4): 460-471
- [63] Organization for Economic Co-operation and Development (OECD). OECD guideline for testing of chemicals.
 No. 426: Developmental neurotoxicity study [R]. Paris: OECD, 2008
- [64] Saint-Amant L. Development of motor networks in zebrafish embryos [J]. Zebrafish, 2006, 3(2): 173-190
- [65] Granato M, van Eeden F J, Schach U, et al. Genes controlling and mediating locomotion behavior of the zebrafish embryo and larva [J]. Development, 1996, 123: 399-413
- [66] Ljunggren E E, Haupt S, Ausborn J, et al. Optogenetic activation of excitatory premotor interneurons is sufficient to generate coordinated locomotor activity in larval zebrafish [J]. The Journal of Neuroscience, 2014, 34 (1): 134-139

- [67] Ma X, Li H Z, Xiong J J, et al. Developmental toxicity of a neonicotinoid insecticide, acetamiprid to zebrafish embryos [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2019, 67(9): 2429-2436
- [68] Xia S Y, Zhu X H, Yan Y P, et al. Developmental neurotoxicity of antimony (Sb) in the early life stages of zebrafish [J]. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2021, 218: 112308
- [69] Newman R, O' Meara G, Fradley R, et al. Beta 2 subunitcontaining GABA-a receptors are not necessary for etomidate-induced anaesthesia [J]. Acta Neurobiologiae Experimentalis, 2003, 63(5): 1
- [70] Sharma S, Coombs S, Patton P, et al. The function of wall-following behaviors in the Mexican blind cavefish and a sighted relative, the Mexican tetra (Astyanax) [J]. Journal of Comparative Physiology A, Neuroethology, Sensory, Neural, and Behavioral Physiology, 2009, 195 (3): 225-240
- [71] Pinheiro-da-Silva J, Agues-Barbosa T, Luchiari A C. Embryonic exposure to ethanol increases anxiety-like behavior in fry zebrafish [J]. Alcohol and Alcoholism, 2020, 55 (6): 581-590
- [72] Hankenson F C, Braden-Weiss G C, Blendy J A. Behavioral and activity assessment of laboratory mice (*Mus musculus*) after tail biopsy under isoflurane anesthesia [J]. Journal of the American Association for Laboratory Animal Science, 2011, 50(5): 686-694
- [73] Salahpour A, Ramsey A J, Medvedev I O, et al. Increased amphetamine-induced hyperactivity and reward in mice overexpressing the dopamine transporter [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2008, 105(11): 4405-4410
- [74] Kacprzak V, Patel N A, Riley E, et al. Dopaminergic control of anxiety in young and aged zebrafish [J]. Pharmacology Biochemistry and Behavior, 2017, 157: 1-8
- [75] Stednitz S J, Freshner B, Shelton S, et al. Selective toxici-

ty of L-DOPA to dopamine transporter-expressing neurons and locomotor behavior in zebrafish larvae [J]. Neurotoxicology and Teratology, 2015, 52(Pt A): 51-56

- [76] Peng B B, Xu Q K, Liu J, et al. Corticosterone attenuates reward-seeking behavior and increases anxiety via D2 receptor signaling in ventral tegmental area dopamine neurons [J]. The Journal of Neuroscience, 2021, 41(7): 1566-1581
- [77] Bedrossiantz J, Bellot M, Dominguez-García P, et al. A zebrafish model of neurotoxicity by binge-like methamphetamine exposure [J]. Frontiers in Pharmacology, 2021, 12: 770319
- [78] Beaulieu J M, Gainetdinov R R. The physiology, signaling, and pharmacology of dopamine receptors [J]. Pharmacological Reviews, 2011, 63(1): 182-217
- [79] Dongjie S, Rajendran R S, Xia Q, et al. Neuroprotective effects of Tongtian oral liquid, a Traditional Chinese Medicine in the Parkinson's disease-induced zebrafish model [J]. Biomedecine & Pharmacotherapie, 2022, 148: 112706
- [80] Asinof S K, Paine T A. Inhibition of GABA synthesis in the prefrontal cortex increases locomotor activity but does not affect attention in the 5-choice serial reaction time task [J]. Neuropharmacology, 2013, 65: 39-47
- [81] Schousboe A, Bak L K, Waagepetersen H S. Astrocytic control of biosynthesis and turnover of the neurotransmitters glutamate and GABA [J]. Frontiers in Endocrinology, 2013, 4: 102
- [82] Zaręba P, Gryzło B, Mazur G, et al. Development, recent achievements and current directions of research into GA-BA uptake inhibitors [J]. Current Medicinal Chemistry, 2021, 28(4): 750-776
- [83] Saaristo M, Brodin T, Balshine S, et al. Direct and indirect effects of chemical contaminants on the behaviour, ecology and evolution of wildlife [J]. Proceedings Biological Sciences, 2018, 285(1885): 20181297