

DOI: 10.7524/AJE.1673-5897.20231017003

张晓顺, 纪秋怡, 向阳, 等. 有机磷阻燃剂 TCPP 和铅联合暴露对斑马鱼发育的影响[J]. 生态毒理学报, 2024, 19(1): 232-242

Zhang X S, Ji Q Y, Xiang Y, et al. Effects of combined exposure to organophosphorus flame retardant TCPP and lead on zebrafish development [J]. Asian Journal of Ecotoxicology, 2024, 19(1): 232-242 (in Chinese)

# 有机磷阻燃剂 TCPP 和铅联合暴露对斑马鱼发育的影响

张晓顺, 纪秋怡, 向阳, 许永杰, 宋珊珊, 孟晓静\*

南方医科大学公共卫生学院职业卫生与职业医学系, 广东 510515

收稿日期: 2023-10-17 录用日期: 2023-12-11

**摘要:** 近年来, 电子废弃物不断增多, 电子废弃物处理厂周边环境污染问题严重, 有机磷阻燃剂磷酸三(2-氯丙基)酯(tris(2-chloroisopropyl) phosphate, TCPP)和铅(Pb)是电子废弃物处理厂 2 种主要的污染物, 对周围环境及人群健康造成影响。目前还没有关于 TCPP 和 Pb 联合暴露对水生生物及人类发育影响的相关研究。本研究选用斑马鱼模式生物作为研究对象, 探讨 Pb ( $190 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ )、TCPP( $200, 2\ 000, 6\ 000 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ )单独及联合暴露对斑马鱼胚胎发育的影响。结果表明, Pb 和低中高 3 个剂量 TCPP 单独和联合暴露对斑马鱼的存活率和孵化率无明显影响。同时, Pb 和低中 2 个剂量 TCPP 单独和联合暴露对斑马鱼脊柱弯曲率和自发运动行为无明显影响。而与 TCPP、Pb 单独暴露相比, 高剂量 TCPP 联合 Pb 暴露(Pb:  $190 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ +TCPP:  $6\ 000 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ )抑制斑马鱼的自发运动( $P<0.01$ ), 导致其体长下降( $P<0.01$ )、96 hpf(hours post-fertilization, hpf)和 120 hpf 心率下降( $P<0.001$ )。同时, 脊柱发育相关基因(*col8a1a*、*ngs*、*bmp2a*、*bmp2b*、*runx2b*)和神经发育相关基因(*mbp*、*elavl3*、*gfap*、*gap43*)表达下调( $P<0.05$ )。以上的实验结果表明, 高剂量 TCPP 联合 Pb 暴露扰乱脊柱和神经发育相关基因的表达, 影响斑马鱼脊柱和神经的早期发育。

**关键词:** 磷酸三(2-氯丙基)酯; 铅; 斑马鱼; 神经毒性; 急性毒性; 脊柱弯曲

文章编号: 1673-5897(2024)1-232-11 中图分类号: X171.5 文献标识码: A

## Effects of Combined Exposure to Organophosphorus Flame Retardant TCPP and Lead on Zebrafish Development

Zhang Xiaoshun, Ji Qiuyi, Xiang Yang, Xu Yongjie, Song Shanshan, Meng Xiaojing\*

Department of Occupational Health and Occupational Medicine, School of Public Health, Southern Medical University, Guangdong 510515, China

Received 17 October 2023 accepted 11 December 2023

**Abstract:** Electronic waste (E-waste) has been increasing in recent years, and the pollution around E-waste dismantling plants is a serious problem. The organophosphorus flame retardants tris(2-chloroisopropyl) phosphate (TCPP) and lead (Pb) are the two primary pollutants in E-waste dismantling plants, which adversely affect both human health and the surrounding environment. There are no studies on the effects of combined exposure to TCPP and Pb on aquatic organisms and human development. In this study, the zebrafish was selected to investigate the

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81973071); 广东省自然科学基金资助项目(2023A1515012500)

第一作者: 张晓顺(1998—), 男, 硕士研究生, 研究方向为环境毒理学, E-mail: 578561315@qq.com

\* 通信作者 (Corresponding author), E-mail: xiaojingmeng@smu.edu.cn

effects of Pb ( $190 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ), TCPP (200, 2 000, and 6 000  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) and their co-exposure on the development of zebrafish embryos. The results showed that exposure to Pb and low, medium, and high doses of TCPP alone and in combination had no significant effect on zebrafish survival and hatching rates. Meanwhile, individual and co-exposure to Pb and low and medium doses of TCPP had no significant effect on zebrafish spinal curvature rate and behavior. Compared with TCPP and Pb exposure alone, the high-dose combined exposure (Pb  $190 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  + TCPP  $6\ 000 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) inhibited spontaneous locomotion in zebrafish ( $P<0.01$ ), decreased the body length ( $P<0.01$ ) and the heart rate at 96 hpf and 120 hpf ( $P<0.001$ ). In addition, the high-dose combined exposure down-regulated the expression of spinal development-related genes (*col8a1a*, *ngs*, *bmp2a*, *bmp2b*, *runx2b*) and neurodevelopment-related genes (*mbp*, *elavl3*, *gfap*, *gap43*) ( $P<0.05$ ). These findings suggest that high-dose combined exposure to TCPP and Pb disrupts the expression of key genes involved in spinal and neural development, thereby adversely affecting these crucial developmental processes in zebrafish embryos.

**Keywords:** tris(2-chloroisopropyl) phosphate; Pb; zebrafish; neurotoxicity; acute toxicity; spinal curvature

近年来,随着科技不断进步,电子产品种类不断增多,在日常生活中电子产品使用的频率越来越高,且电子产品的更新迭代非常快,随之带来了废弃电子产品不断增多的问题<sup>[1]</sup>。由于电子产品的回收、拆解等处理和监督管理仍不规范,电子废弃物处理厂周边环境问题严重<sup>[2]</sup>。有研究显示,全球 70% 的电子废弃物最终被运送到我国广东省某小镇进行处理,而大概仅有 25% 的电子废弃物在正规的废弃物回收中心处理,导致多种有毒物质进入环境中,对土壤和河流等造成严重污染<sup>[3]</sup>。铅(Pb)和有机磷阻燃剂是电子废弃物中最主要的环境污染物之一。有研究发现,电子废弃物拆解车间中重金属类污染最为严重的是 Pb<sup>[4]</sup>,Pb 的污染指数在电子废弃物处理厂中高达 4.60<sup>[5]</sup>。另有研究对电子废弃物处理厂附近的几种野生昆虫体内的有机磷阻燃剂含量进行检测,发现磷酸三(2-氯丙基)酯(tris(2-chloroisopropyl) phosphate, TCPP)是其主要的污染物之一<sup>[6]</sup>。这表明 Pb 和 TCPP 在电子废弃物处理厂中存在共同暴露的情况。目前研究发现,Pb 和 TCPP 单独暴露均对发育造成影响,Pb 单独暴露会影响神经、心脏和脊柱等多器官多系统的发育,出现学习和记忆能力下降、脊柱发育异常等损害<sup>[7-9]</sup>;TCPP 单独暴露后斑马鱼畸形率升高、心率下降和抑制斑马鱼的自发运动,影响斑马鱼的早期发育<sup>[10]</sup>。而目前尚无关于 Pb 和 TCPP 联合暴露对早期发育影响的相关研究,因此探讨 Pb 和 TCPP 联合暴露对发育的影响十分必要,具有现实意义。

斑马鱼(*Danio rerio*)模型生物具有养殖成本低、发育周期短、胚胎透明、产卵量大和基因与人类基因同源性高达 87% 等优点,已被广泛应用于环境毒理

学等研究领域<sup>[11]</sup>。由于其发育周期短,在研究发育毒性时被广泛使用<sup>[12]</sup>。故本研究选用斑马鱼模式生物探讨 TCPP、Pb 单独/联合暴露对其发育的影响。

## 1 材料与方法 (Materials and methods)

### 1.1 实验动物

本研究使用的 AB 型野生斑马鱼购自中国科学院武汉水生所斑马鱼资源中心,均饲养于斑马鱼循环养殖系统中。饲养条件如下:光照周期为 14 h 光照/10 h 黑暗(早上 8:30 开灯,晚上 10:30 关灯),水温控制在  $(28.5\pm 0.5)^\circ\text{C}$ ,电导率控制在  $450\sim 550 \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$  之间,pH 控制在 7.0 ~ 8.0 之间,成鱼每日投喂丰年虫 2 次。

为了保证受精卵的质量,选取 4 ~ 18 月龄斑马鱼进行交配产卵。交配前的一天晚上,将待交配的雄鱼和雌鱼转移到交配缸中,中间插上挡板将雄鱼和雌鱼分开,雌雄比例一般为 1 : 1 或 1 : 2,次日待鱼房亮灯后,抽出中间的挡板,待交配产卵过程完成后(受精卵的卵膜充盈),收集受精卵,用系统水清洗去除粪便和其他杂质,转移至含有亚甲基蓝的胚胎培养液中,挑选发育正常的斑马鱼胚胎用于毒物暴露实验。

### 1.2 试剂与仪器

磷酸三(2-氯丙基)酯(CAS No.13674-84-5,中国上海易恩化学技术有限公司);醋酸铅(CAS No. 467863,美国 Sigma 公司);DEPC 水(美国 Invitrogen 公司);二甲基亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO;中国上海麦克林生化科技股份有限公司);AG RNAex Pro RNA 提取试剂、Evo M-MLV 反转录试剂盒、SYBR<sup>®</sup> Green Pro Taq HS Premix 试剂盒(中国湖南艾科瑞生物工程有限公司)。

斑马鱼循环养殖系统(中国上海海圣生物技术有限公司);MJP 150 斑马鱼恒温培养箱(中国环凯生物技术有限公司);Viewpoint 斑马鱼行为学记录仪(法国 Viewpoint 公司);Nikon-SMZ18 体式荧光显微镜(日本 Nikon 公司);BIO-RAD 实时定量 PCR 仪(美国 BIO-RAD 公司);MIKRO 220R 4 °C 低温离心机(德国 Hettich 公司);NanoDrop 2000 微量分光光度计(美国 Thermo 公司);AL-104 万分之一电子分析天平(瑞士 Mettler-Toledo 公司)。

### 1.3 实验设计

查阅有关 Pb 和 TCP P 污染及其单独暴露毒性的相关研究发现,某流域中 Pb 的浓度为 $(186.3 \pm 6.1) \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ <sup>[13]</sup>,另外还有研究对某海域的重金属浓度进行检测发现,Pb 的平均含量为 $212.1 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ <sup>[14]</sup>,同时,查阅有关 Pb 对鱼类毒性研究发现,大多数的研究中 Pb 的染毒浓度都在 $100 \sim 10\,000 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ <sup>[15]</sup>,故本研究将 Pb 的染毒浓度设定为 $190 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。一项对污水处理厂入水的有机磷阻燃剂含量进行检测发现,TCP P 的浓度平均为 $(204.2 \pm 3.8) \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ <sup>[16]</sup>;同时,查阅有关于 TCP P 的研究发现,研究者使用的浓度在 $0.1 \sim 400 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ <sup>[17-19]</sup>,基于以上的背景,本研究将 TCP P 的染毒设定为 $200, 2\,000, 6\,000 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 低中高3个浓度,其中低浓度为环境浓度,高浓度与其他研究所使用的染毒浓度类似。本实验共分为8个组,具体分组如表1所示。其中 Control 组 DMSO 的浓度为0.1%,Pb 组使用去离子水作溶剂,TCP P 组使用 DMSO 作溶剂,DMSO 终浓度不超过0.1%。

### 1.4 斑马鱼胚胎染毒处理

将收集的斑马鱼胚胎转移到 90 mm 培养皿中,每个培养皿放 30 ~ 50 颗胚胎,每组设 3 个平行,小心吸干培养皿中的水分后,迅速加入 30 mL 含有亚甲基蓝的 E3 胚胎培养液(含有亚甲基蓝的 E3 胚胎培养液配制方法如下:加入浓度为 $0.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  NaCl, $0.17 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  KCl, $0.33 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  CaCl<sub>2</sub>, $0.33 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  MgSO<sub>4</sub> 后用去离子水定容至 1 L,再加入 0.5 mL 0.1% 亚甲基蓝存储液),后按照表 1 不同的染毒剂量加入适当体积的 Pb 工作液和 TCP P 工作液配制成暴露液。在受精后 12 h,挑出自然死亡胚胎,每隔 24 h 更换一次暴露液。

### 1.5 观察单独/联合暴露后对斑马鱼胚胎/幼鱼一般毒性的影响

使用体式荧光显微镜观察斑马鱼胚胎/幼鱼在 Pb、TCP P 单独/联合暴露后 24、48、72、96、120 hpf 的死亡和脊柱畸形情况以及在 72 hpf 观察斑马鱼胚胎的孵化情况,斑马鱼胚胎/幼鱼死亡的判断标准为卵凝结和心跳停止。

### 1.6 观察单独/联合暴露后对斑马鱼心率的影响

使用体式荧光显微镜记录斑马鱼在 Pb、TCP P 单独和联合暴露后 48、72、96、120 hpf 的 20 s 心跳,根据公式:心率=心跳次数(20 s)×3 计算心率。

### 1.7 观察单独/联合暴露后对斑马鱼胚胎/幼鱼体长的影响

使用体式荧光显微镜拍照记录 Pb、TCP P 单独/联合暴露 120 hpf 的斑马鱼,使用 Image J 软件测量

表 1 实验分组及 Pb 和磷酸三(2-氯丙基)酯(TCP P)的剂量

Table 1 Experimental groups and concentration of Pb and tris(2-chloroisopropyl) phosphate (TCP P)

组别 Group	剂 量 Concentration
Control	0.1% DMSO (体积比 Volume ratio)
Pb	$190 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$
TCP P 低剂量组 TCP P low-dose group	TCP P-L $200 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$
TCP P 中剂量组 TCP P medium-dose group	TCP P-M $2\,000 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$
TCP P 高剂量组 TCP P high-dose group	TCP P-H $6\,000 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$
Pb+TCP P 低剂量联合暴露组 Pb+low-dose TCP P combined exposure group	Pb+TCP P-L $\text{Pb } 190 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1} + \text{TCP P } 200 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$
Pb+TCP P 中剂量联合暴露组 Pb+medium-dose TCP P combined exposure group	Pb+TCP P-M $\text{Pb } 190 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1} + \text{TCP P } 2\,000 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$
Pb+TCP P 高剂量联合暴露组 Pb+high-dose TCP P combined exposure group	Pb+TCP P-H $\text{Pb } 190 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1} + \text{TCP P } 6\,000 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$

斑马鱼的体长。

### 1.8 斑马鱼幼鱼行为学分析

斑马鱼幼鱼行为学实验在 11:00—17:00 之间进行,首先将正常无畸形的 5 dpf(days post-fertilization, dpf)斑马鱼幼鱼转移到 96 孔板中,每孔放入一条斑马鱼,每组 24 个检测孔,将 96 孔板置于恒温培养箱中 30 min,随后将 96 孔板置于 Viewpoint Lab 行为学仪器中适应 10~20 min。行为学仪器参数设定:5 min 光照-5 min 黑暗交替共 30 min;监测的移动速度范围设为 2~20 mm·s<sup>-1</sup>。

### 1.9 实时荧光定量 PCR

根据上述的实验设计处理斑马鱼胚胎至 3 dpf 或 5 dpf,使用 1.5 mL 无酶 EP 管收集各剂量组斑马鱼幼鱼 50 条左右,去离子水清洗 2 遍,液氮速冻,置于-80 °C 保存。使用 TRIzol 法提取斑马鱼 RNA,首先向每个无酶 EP 管加入 1 mL TRIzol 试剂,并用 1 mL 注射器将组织彻底匀浆。后向每个 EP 管加入 200  $\mu$ L 氯仿,振荡混匀不分层,冰上静置 10 min,用 4 °C 低温离心机以 12 000  $g$  离心 15 min;将上清液转移至新的 1.5 mL 无酶 EP 管。加入与上清等体积的 4 °C 预冷异丙醇,颠倒混匀,冰上静置 30 min,后用 4 °C 低温离心机以 12 000  $g$  离心 15 min,弃上清,管底侧壁可见少量白色沉淀物。随后加入 200~400  $\mu$ L 无 RNase 的 75% 乙醇,转动 EP 管以清洗管壁,用 4 °C 低温离心机以 7 500  $g$  离心 10 min,弃上清。此步骤重复操作一次,待管中乙醇挥发后,加入 20  $\mu$ L DEPC 水溶解。用微量分光光度计 NanoDrop 2000 测量 RNA 浓度以及 OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> 的比值。

cDNA 的合成根据 Evo M-MLV 反转录试剂盒说明书进行。使用 qRT-PCR 对各个基因进行扩增,qRT-PCR 根据 SYBR<sup>®</sup> Green Pro Taq HS Premix 试剂盒说明书进行操作,以 *elfa* 作为内参基因,用 2<sup>- $\Delta\Delta C_t$</sup>  相对定量法计算各组基因的相对表达量,目的基因引物序列信息如表 2 所示。

### 1.10 统计与分析

使用 GraphPad Prism 8 和 SPSS 26.0 软件进行数据统计分析。所有数据以均数 $\pm$ 标准差(SD)表示。数据在满足正态分布和方差齐性要求下,通过单因素方差分析(ANOVA)并以 Bonferroni's 检验进行多重比较,所有统计检验均为双侧检验。 $P$  值小于 0.05 表示具有统计学差异。\*为与 Control 相比,\*代表  $P < 0.05$ 、\*\*代表  $P < 0.01$ 、\*\*\*代表  $P < 0.001$ ;#为与 Pb+TCPP-H 组相比,#代表  $P < 0.05$ 、##代表  $P < 0.01$ 、

###代表  $P < 0.001$ 。

## 2 结果 (Results)

### 2.1 TCPP 和 Pb 单独/联合暴露对斑马鱼发育的一般毒性

为了探讨 TCPP 和 Pb 单独/联合暴露对斑马鱼幼鱼/胚胎产生的一般毒性作用,我们将收集的斑马鱼受精卵在 2 hpf 单独/联合暴露于不同浓度的 TCPP 和 Pb 至 5 dpf,观察斑马鱼形态学的变化。结果发现,在设定的浓度下,斑马鱼无论是单独还是联合暴露于 Pb 和 TCPP,斑马鱼的存活率和 72 hpf 孵化率无明显变化(图 1(a)、1(b))。在脊柱发育方面,与对照组相比,Pb 和 TCPP 低中高 3 个剂量单独暴露后斑马鱼的脊柱弯曲率无明显变化;而与单独暴露相比,高剂量联合暴露组脊柱弯曲率明显升高( $P < 0.001$ ),脊柱弯曲率接近 20% (图 1(c)),脊柱弯曲形态如图 1(d)红色箭头所示。根据以上的结果可知,斑马鱼早期单独/联合暴露于 Pb 和 TCPP 不引起存活率和孵化率变化,但是高剂量联合暴露会导致斑马鱼脊柱弯曲率明显升高。

表 2 目的基因引物序列信息

基因 Gene	引物序列(5'~3') Primer sequence (5'~3')
<i>elfa</i>	F: TTGAGAAGAAAATCG GTGGTGCTG R: GGAACGGTGTGATTAGGGGAAATTC
<i>clav13</i>	F: GTCAGAAAAGACATGGAGCAGTTG R: GAACCGAATGAAACCTACCCC
<i>mbp</i>	F: AATCAGCAGGTTCTTCGGAGGAGA R: AAGAAATGCACGACAGGGTTGACG
<i>gfap</i>	F: GGATGCAGCCAATCGTAAT R: TTCCAGGTCACAGGTCAG
<i>gap43</i>	F: TGCTGCATCAGAAGAATAA R: CCTCCGGTTTGATTCCATC
<i>col8a1a</i>	F: AGGCCCAAATGGATCACCAG R: CATCAAGGGCAGGACCCATT
<i>ngs</i>	F: ATGGGTGGCAGTGTGAG R: ATGGTTGTGGTTGAGCG
<i>bmp2a</i>	F: CTCGCGAGTGGTTTCCTCAAT R: CGGATCTCTCGGAGCCTTTC
<i>bmp2b</i>	F: TACAGTGATTCGGGGAGACA R: CGGGTCATCGTTTTTCAGAGT
<i>runx2b</i>	F: AGGGCCAAACGCAGATTACA R: CTGAAGACGTCTGGGCACAT

2.2 TCPP 和 Pb 单独/联合暴露对斑马鱼心脏发育的影响

斑马鱼心脏在 5 hpf 开始发育,在 48 hpf 时,心脏发育基本完成,故一般选用发育至 48 hpf 斑马鱼进行毒物、药物的心脏毒性研究<sup>[20-21]</sup>。我们探讨了斑马鱼从 48 hpf 开始不同时间点(48、72、96、120 hpf)单独/联合暴露于 Pb 和 TCPP 对其心率的影响。

结果发现,与对照组相比,Pb 和高剂量 TCPP 单独暴露后斑马鱼的心率在 96 hpf 时下降( $P<0.01$ ),在 48、72 和 120 hpf 无明显变化;而与对照组相比,Pb 和高剂量 TCPP 联合暴露后,心率在 96 hpf 和 120 hpf 明显下降( $P<0.001$ )。且从 96 hpf 开始,与单独暴露于 Pb 和 TCPP 相比,高剂量联合暴露导致斑马鱼心率明显下降( $P<0.001$ ) (图 2)。

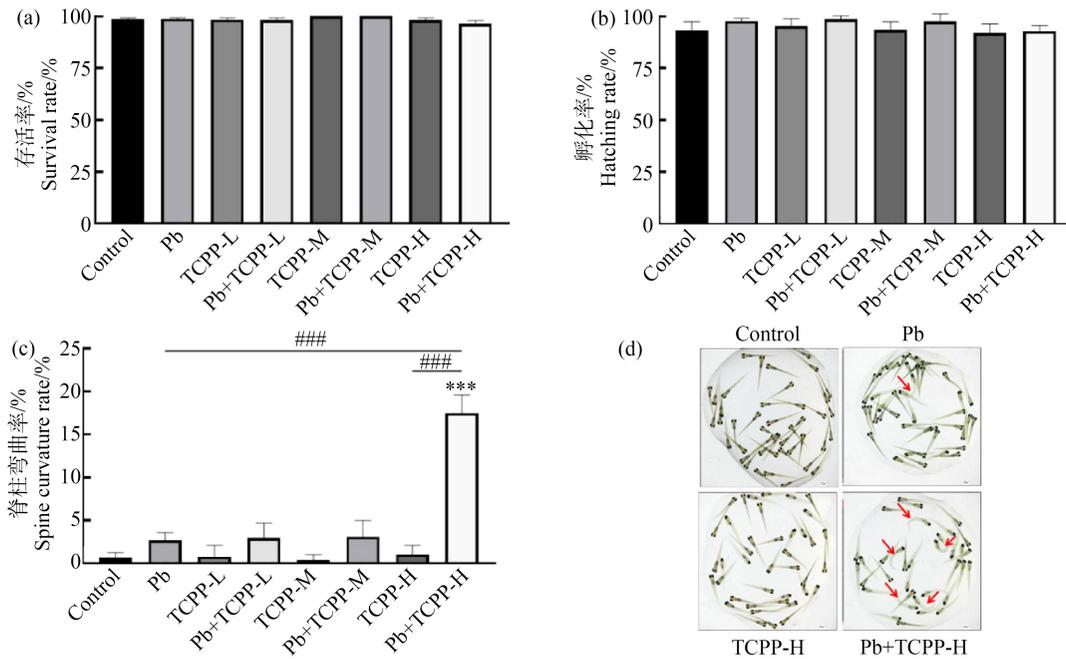


图 1 TCPP、Pb 单独/联合暴露对斑马鱼一般毒理学的影响

注:(a) 存活率;(b) 72 hpf 孵化率;(c) 脊柱弯曲率;(d) 脊柱弯曲情况示意图;与 Pb+TCPP-H 组相比,###为  $P<0.001$ ,与 Control 相比,\*\*\*为  $P<0.001$ 。

Fig. 1 Effects of TCPP, Pb individual/combined exposure on general toxicology of zebrafish

Note: (a) Survival rate, (b) 72 hpf hatching rate, (c) Spinal curvature rate, (d) Curvature of the spine; compared with Pb+TCPP-H group, ### represents  $P<0.001$ ; compared with Control, \*\*\* represents  $P<0.001$ .

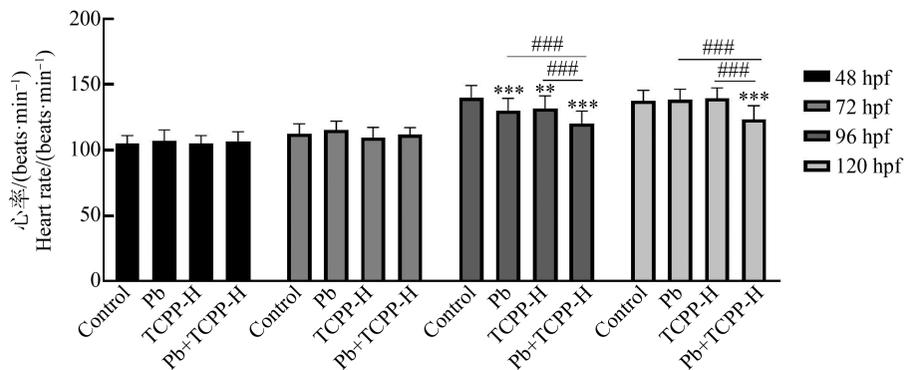


图 2 TCPP、Pb 单独/联合暴露对斑马鱼心率的影响

注:与 Pb+TCPP-H 组相比,###为  $P<0.001$ ;与 Control 相比,\*\*为  $P<0.01$ ,\*\*\*为  $P<0.001$ 。

Fig. 2 Effect of TCPP, Pb individual/combined exposure on zebrafish heart rate

Note: Compared with Pb+TCPP-H group, ### represents  $P<0.001$ ; compared with Control, \*\* represents  $P<0.01$ , \*\*\* represents  $P<0.001$ .

### 2.3 TCPP 和 Pb 单独/联合暴露对斑马鱼体长的影响

接下来,我们探讨 TCPP、Pb 单独和联合暴露对斑马鱼体长的影响。结果发现,与对照组相比,Pb 和高剂量 TCPP 单独暴露后斑马鱼的体长无明显变化,而与对照组相比,Pb 和高剂量 TCPP 联合暴露后,斑马鱼体长明显下降( $P<0.01$ );且与 Pb、高剂量 TCPP 单独暴露相比,高剂量联合暴露 5 dpf 斑马鱼的体长明显下降( $P<0.01$ ,图 3(a)、3(b))。

### 2.4 TCPP 和 Pb 单独/联合暴露对斑马鱼自发运动的影响

斑马鱼的自发运动在一定程度上能够反映出其神经系统的状况,本研究使用 Viewpoint 斑马鱼幼鱼运动行为学分析系统,对不同处理至 5 dpf 的斑马鱼的运动行为进行监测。从图 4(d)的运动轨迹可以看出,与单独暴露相比,低剂量和中剂量联合暴露组的运动轨迹及运动轨迹密度无明显变化,而高剂量联合暴露组斑马鱼的运动轨迹明显减少,运动轨迹的密度明显降低。对行为学分析系统检测的运动数据进行统计分析发现,与对照组相比,Pb 和 TCPP 低中高 3 个剂量单独暴露后斑马鱼的总运动距离和暗条件下的运动速度无明显变化,在光照条件下,Pb 和低剂量 TCPP 联合暴露组运动速度加快( $P<0.01$ );而对照组相比,Pb 和高剂量 TCPP 联合暴露后,斑马鱼总运动距离、明暗条件下每分钟运动距离和暗条件下运动速度明显下降( $P<0.01$ )。且与单独暴露相比,低剂量和中剂量联合暴露组中 30 min 总运动距离和明暗条件下每分钟的总运动距离、运

动速度无明显差异;而高剂量联合暴露后,斑马鱼 30 min 总运动距离、明暗条件下每分钟运动距离和暗条件下运动速度都进一步下降( $P<0.01$ ,图 4(a)~(c))。

### 2.5 TCPP、Pb 单独/联合暴露影响斑马鱼神经发育相关基因

接下来,我们检测了参与斑马鱼神经发育过程中关键基因(*mbp*、*elavl3*、*gfap*、*gap43*)在 3 dpf、5 dpf 的表达情况。结果发现,与对照组相比,Pb 单独暴露后 *mbp*、*elavl3* 基因在 5 dpf 表达下降( $P<0.001$ ),*mbp*、*gfap* 基因在 3 dpf 表达也下降( $P<0.001$ );同时,与对照组相比,高剂量 TCPP 单独暴露后 *mbp* 基因在 3 dpf 表达下降( $P<0.05$ ),*elavl3* 基因在 3 dpf 表达升高( $P<0.05$ )。同时,与对照组相比,Pb 和高剂量 TCPP 联合暴露组 *mbp*、*gap43* 在 3 dpf 和 5 dpf 都显著下降( $P<0.01$ ),*elavl3* 基因在 5 dpf 表达下降( $P<0.001$ ),*gfap* 基因在 3 dpf 表达下降( $P<0.001$ )。且与单独暴露相比,高剂量联合暴露后,*mbp* 基因在 3 dpf 和 5 dpf 表达进一步下降( $P<0.001$ ,图 5(a)),*gfap* 基因在 3 dpf 表达进一步下降( $P<0.01$ ,图 5(c)),*elavl3* 和 *gap43* 在 5 dpf 都进一步下降( $P<0.01$ ,图 5(b)、5(d))。以上的实验结果表明,Pb 和 TCPP 高剂量联合暴露后进一步下调参与斑马鱼神经发育关键基因的表达。

### 2.6 TCPP、Pb 单独/联合暴露影响斑马鱼脊柱发育相关基因

由于高剂量联合暴露使斑马鱼的脊柱弯曲率明显升高(图 1(c)),接下来我们探讨 Pb、TCPP 单独/联

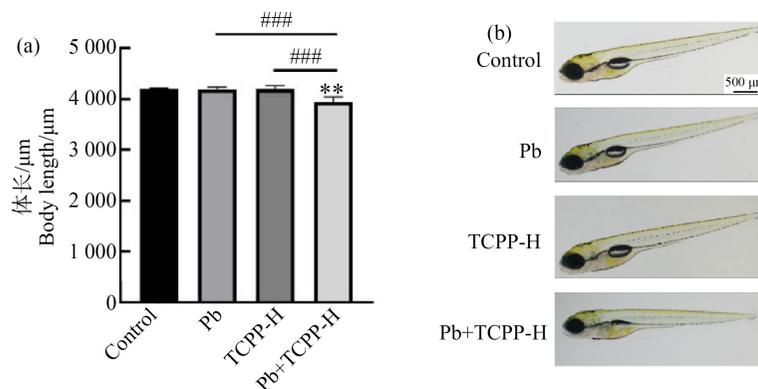


图 3 TCPP、Pb 单独/联合暴露 5 dpf 后斑马鱼的体长

注:(a) 斑马鱼 5 dpf 体长;(b) 测量斑马鱼体长示意图;与 Pb+TCPP-H 组相比,###为  $P<0.001$ ;与 Control 相比,\*\*为  $P<0.01$ 。

Fig. 3 Effect of TCPP, Pb individual/combined exposure on the body length of zebrafish

Note: (a) 5 dpf zebrafish body length, (b) Schematic diagram of measured zebrafish body length; compared with Pb+TCPP-H group,

### represents  $P<0.001$ ; compared with Control, \*\* represents  $P<0.01$ .

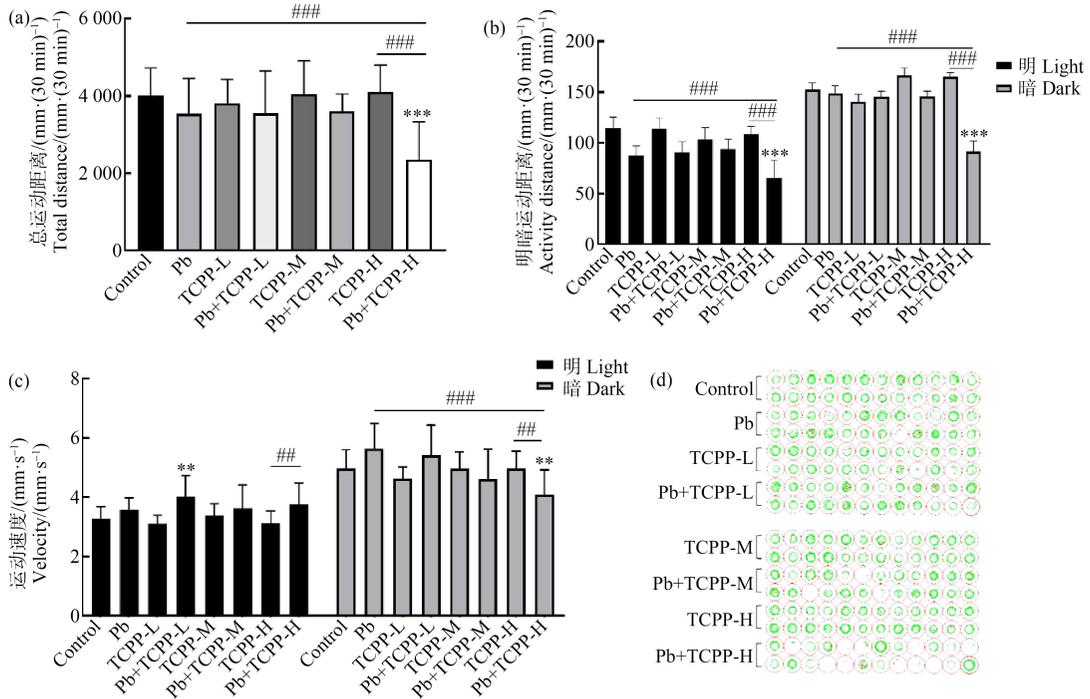


图 4 TCPP、Pb 单独/联合暴露对斑马鱼行为学的影响

注:(a) 斑马鱼 30 min 总运动距离;(b) 明暗条件下斑马鱼每分钟运动距离;(c) 明暗条件下斑马鱼运动速度;  
(d) 某时刻斑马鱼运动轨迹图;与 Pb+TCPP-H 组相比,##为  $P<0.01$ ,###为  $P<0.001$ ;与 Control 相比,\*\*为  $P<0.01$ ,\*\*\*为  $P<0.001$ 。

Fig. 4 Effect of TCPP, Pb individual/combined exposure on zebrafish spontaneous locomotion

Note: (a) 30 min total distance, (b) Distance per minute under light and dark conditions, (c) Speed under light and dark conditions, (d) Movement trajectory; compared with Pb+TCPP-H group, ## represents  $P<0.01$ , ### represents  $P<0.001$ ; compared with Control, \* represents  $P<0.05$ , \*\* represents  $P<0.01$ , \*\*\* represents  $P<0.001$ .

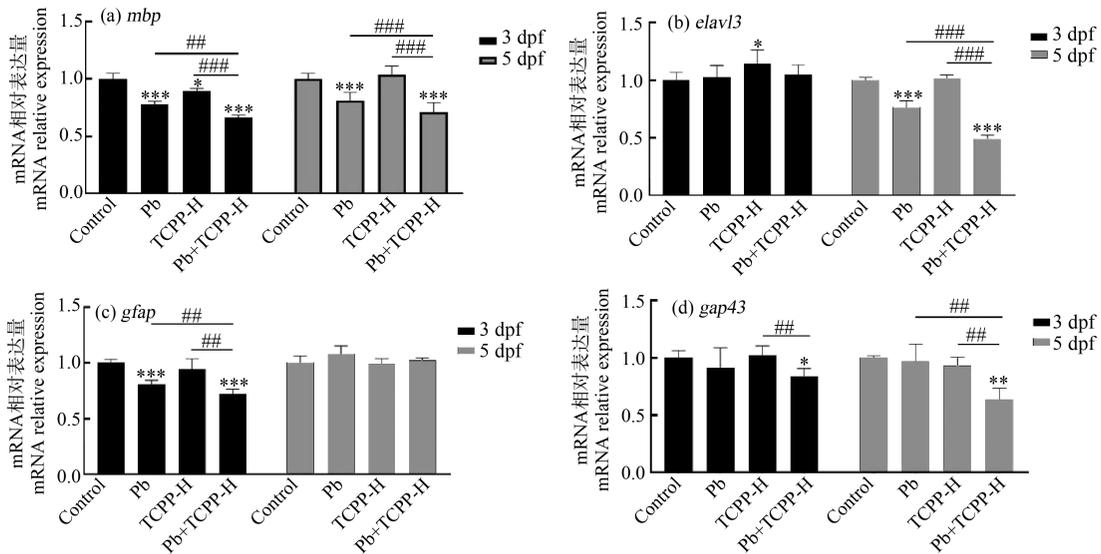


图 5 TCPP、Pb 单独/联合暴露对斑马鱼神经发育关键基因的影响

注:(a) *mbp* 基因在 3 dpf、5 dpf 表达水平;(b) *clav3* 基因在 3 dpf、5 dpf 表达水平;(c) *gfap* 基因在 3 dpf、5 dpf 表达水平;(d) *gap43* 基因在 3 dpf、5 dpf 表达水平;与 Pb+TCPP-H 组相比,##为  $P<0.01$ ,###为  $P<0.001$ ;与 Control 相比,\*为  $P<0.05$ ,\*\*为  $P<0.01$ ,\*\*\*为  $P<0.001$ 。

Fig. 5 Effects of TCPP, Pb individual/combined exposure on neurodevelopmental genes

Note: (a) The expression of *mbp* at 3 dpf, 5 dpf, (b) The expression of *clav3* at 3 dpf, 5 dpf, (c) The expression of *gfap* at 3 dpf, 5 dpf, (d) The expression of *gap43* at 3 dpf, 5 dpf; compared with Pb+TCPP-H group, ## represents  $P<0.01$ , ### represents  $P<0.001$ ; compared with Control, \* represents  $P<0.05$ , \*\* represents  $P<0.01$ , \*\*\* represents  $P<0.001$ .

合暴露对脊柱发育相关基因的影响。结果显示,与对照组相比,高剂量 TCP 单独暴露后, *col8ala*、*ngs* 和 *bmp2b* 基因在 3 dpf 表达升高( $P<0.05$ );Pb 单独暴露后, *col8ala* 和 *runx2b* 基因在 5 dpf 表达下降( $P<0.05$ )。同时,与对照组相比,Pb 和高剂量 TCP 联合暴露后, *col8ala*、*ngs*、*bmp2a*、*bmp2b*、*runx2b* 基因在 5 dpf 表达明显下降( $P<0.01$ )。且与单独暴露相比,高剂量联合暴露导致脊柱发育相关基因 *col8ala*、*ngs* 在 5 dpf 时显著下调( $P<0.001$ ,图 6(a)~(b));同时,高剂量联合暴露后骨发育相关基因 *bmp2a* 的表

达量在 5 dpf 时显著下降( $P<0.01$ ,图 6(c)),*bmp2b* 和 *runx2b* 的表达量在 3 dpf、5 dpf 同时下降( $P<0.01$ ,图 6(d)~(e))。以上的实验结果表明,Pb 和 TCP 高剂量联合暴露进一步下调脊柱发育关键基因 *col8ala*、*ngs* 以及骨发育相关基因 *bmp2a*、*bmp2b*、*runx2b* 的表达。

### 3 讨论 (Discussion)

由于电子废弃物不断增多,电子废弃物回收处理不规范,导致电子废弃物处理厂周边环境污染严

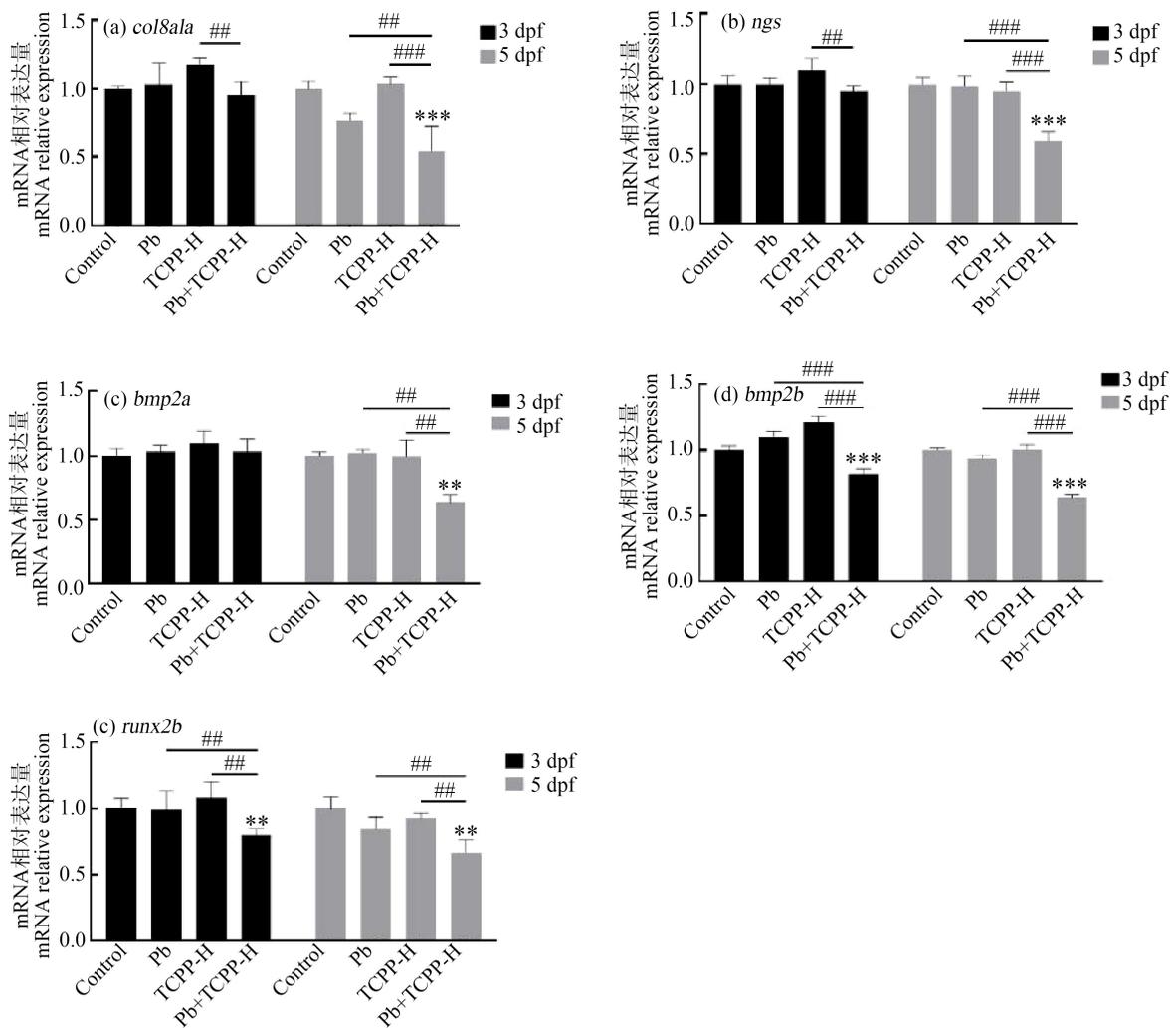


图 6 TCP、Pb 单独/联合暴露对斑马鱼脊柱、骨骼发育相关基因的影响

注:(a) *col8ala* 基因在 3 dpf、5 dpf 表达水平;(b) *ngs* 基因在 3 dpf、5 dpf 表达水平;(c) *bmp2a* 基因在 3 dpf、5 dpf 表达水平;(d) *bmp2b* 基因在 3 dpf、5 dpf 表达水平;(e) *runx2b* 基因在 3 dpf、5 dpf 表达水平;与 Pb+TCP-H 组相比,##为  $P<0.01$ ,###为  $P<0.001$ ;与 Control 相比,\*\*为  $P<0.01$ ,\*\*\*为  $P<0.001$ 。

Fig. 6 Effects of TCP, Pb individual/combined exposure on spine and bone development-related genes

Note: (a) The expression of *col8ala* at 3 dpf, 5 dpf, (b) The expression of *ngs* at 3 dpf, 5 dpf, (c) The expression of *bmp2a* at 3 dpf, 5 dpf, (d) The expression of *bmp2b* at 3 dpf, 5 dpf, (e) The expression of *runx2b* at 3 dpf, 5 dpf; compared with Pb+TCP-H group, ## represents  $P<0.01$ , ### represents  $P<0.001$ ; compared with control, \*\* represents  $P<0.01$ , \*\*\* represents  $P<0.001$ .

重。有机磷阻燃剂 TCPP 和重金属 Pb 都是电子废弃物处理厂中主要的污染物之一,故在环境中 TCPP 和 Pb 存在共同暴露的情况,而其联合暴露对发育的影响尚未见研究,本研究选用斑马鱼作为模式生物,对其进行一般毒性、行为学以及发育相关基因的检测,以探究 TCPP、Pb 单独/联合暴露对斑马鱼发育影响。

我们首先探讨了 TCPP 和 Pb 单独/联合暴露对斑马鱼发育的一般毒性,结果发现,Pb 和 TCPP 低中高 3 个剂量单独和联合暴露对斑马鱼的存活率和孵化率无明显影响。同时,Pb 和 TCPP 低中 2 个剂量单独和联合暴露对斑马鱼脊柱弯曲率无明显影响。而与 TCPP、Pb 单独暴露相比,TCPP 和 Pb 高剂量联合后导致斑马鱼 96 hpf 和 120 hpf 心率、体长明显下降,脊柱弯曲率明显升高。李萍萍等<sup>[22]</sup>发现,暴露于浓度为  $24 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  的醋酸铅斑马鱼脊柱弯曲率明显升高,而醋酸铅浓度为  $6 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  时,斑马鱼未见脊柱弯曲情况,本研究设定的 Pb 浓度经换算约为  $0.5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ,远低于  $6 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ,本研究的结果与其相似。

斑马鱼发育周期短,在 5 dpf 时,斑马鱼就能自主运动,斑马鱼的自发运动在一定程度上能反映其神经系统的发育情况<sup>[23]</sup>。故本研究在 5 dpf 时检测斑马鱼的自发运动行为,结果发现,Pb 和 TCPP 低中 2 个剂量单独和联合暴露对斑马鱼自发运动行为无明显影响。而与 TCPP、Pb 单独暴露相比,高剂量联合暴露后斑马鱼 30 min 总运动距离、明暗不同条件下斑马鱼的每分钟平均运动距离和暗条件下斑马鱼的运动速度明显下降,提示高剂量联合暴露对斑马鱼神经发育有一定损伤。Xia 等<sup>[10]</sup>发现斑马鱼暴露于浓度为  $15 \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  的 TCPP 时,斑马鱼的运动速度明显下降,而  $5 \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  无明显影响。Liu 等<sup>[24]</sup>发现斑马鱼暴露于  $1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  的 Pb 时,对斑马鱼的自发运动无明显影响。上述说明本研究 TCPP、Pb 单独暴露对斑马鱼自发运动的影响与之前的研究相似。行为学相关指标属于综合性的评价指标,神经、骨骼和肌肉等多器官多系统损伤均可引起斑马鱼行为的改变,因此,需进一步深入探讨 Pb 和 TCPP 高剂量联合暴露是否导致神经系统损伤。

为了明确高剂量联合暴露的神经毒性,我们检测了在斑马鱼神经发育过程中起着关键作用的基因的表达情况。*mbp* 基因是斑马鱼中枢神经系统发育过程中轴突髓鞘形成所必需的,由少突胶质细胞作

为髓鞘的组成部分表达<sup>[25-26]</sup>。参与编码特异性神经元 RNA 结合蛋白 HuC 的 *clav3* 基因在神经元分化和维持中起到重要作用,在神经板的神经元前体中表达,是斑马鱼早期神经元发育的标志基因之一<sup>[27]</sup>。神经胶质纤维酸性蛋白是一种中间丝蛋白,其编码基因 *gfap* 在中枢神经系统的星形胶质细胞和放射状胶质细胞中高表达,是大脑中星形胶质细胞的标志物<sup>[28]</sup>。*gap43* 基因在斑马鱼神经元的发育和轴突再生过程中高表达<sup>[29]</sup>。Li 等<sup>[30]</sup>发现,暴露于磷酸三(1-氯-2-丙基)酯(tris (1-chloro-2-propyl) phosphate, TCIPP)和磷酸三(2-氯乙基)酯(tris (2-chloroethyl) phosphate, TCEP)可导致 *mbp* 和 *gfap* 基因表达下降,*gap43* 基因表达升高。Shi 等<sup>[31]</sup>也发现,暴露于磷酸三苯酯可导致神经发育相关基因 *mbp*、*clav3* 表达下降。另外,Hu 等<sup>[32]</sup>发现,暴露于沸石咪唑酯骨架材料-8(zeolite imidazolate framework-8, ZIF-8) NPs 会导致斑马鱼 *gap43* 基因表达下降。上述表明,当斑马鱼的神经发育受到毒物等影响后,会扰乱神经发育相关基因的表达,导致其表达下调/升高。本研究发现,与 TCPP、Pb 单独暴露相比,高剂量联合暴露 *mbp* 基因在 3 dpf 和 5 dpf 表达都下降,*gfap* 基因在 3 dpf 表达下降,*clav3* 和 *gap43* 在 5 dpf 都下降。以上的实验结果表明,与单独暴露相比,高剂量联合暴露可能通过下调参与斑马鱼神经发育关键基因的表达,抑制斑马鱼的自发运动,对斑马鱼产生神经毒性。

TCPP 和 Pb 联合暴露对斑马鱼的一般毒性的结果表明,高剂量联合暴露会导致斑马鱼脊柱弯曲率明显升高,故我们检测了联合暴露对斑马鱼脊柱发育相关基因(*col8a1a*、*ngs*、*bmp2a*、*bmp2b*、*runx2b*)表达的影响。有研究发现,*col8a1a*、*ngs* 在脊索发育中发挥着重要作用,*col8a1a* 基因功能缺失会导致斑马鱼先天脊柱畸形<sup>[33]</sup>;暴露于邻苯二甲酸酯导致斑马鱼脊柱畸形和 *col8a1a*、*ngs* 基因表达下降<sup>[34]</sup>。上述表明在斑马鱼脊柱发育受损时,参与斑马鱼脊柱发育相关基因的表达下调。骨形态发生蛋白(bone morphogenetic protein, BMP)是多功能生长因子,其参与斑马鱼骨骼的发育,*bmp2a* 和 *bmp2b* 可诱导间充质细胞分化成成骨细胞,而 *runx2b* 是 BMP 的下游,在成骨细胞的分化中起着重要作用<sup>[35-36]</sup>。Yan 等<sup>[37]</sup>发现,暴露于 Pb 导致 *bmp2*、*runx2* 基因表达下调。本研究的结果与之前的研究类似,与单独暴露相比,高剂量联合暴露后 *col8a1a*、*ngs*、*bmp2a*、

*bmp2b*、*runx2b* 基因表达显著下调,说明 TCPP 和 Pb 高剂量联合暴露可能通过扰乱上述基因的表达加重脊柱弯曲情况。

综上所述,与对照组相比,Pb 和低中高 3 个剂量 TCPP 单独暴露后,对斑马鱼的存活率、孵化率、体长、脊柱弯曲率、心率(48、72 和 120 hpf)、总运动距离和明暗条件下运动速度无明显影响,而与对照组相比,Pb 和高剂量 TCPP 联合暴露后,体长明显下降,脊柱弯曲率明显升高,96 hpf 和 120 hpf 心率明显下降;总运动距离和明暗条件下每分钟运动距离明显下降。而且 Pb 和 TCPP 高剂量联合暴露与单独暴露相比,Pb 和 TCPP 高剂量联合暴露进一步抑制斑马鱼自发运动,导致斑马鱼体长下降,脊柱弯曲率升高;qPCR 的结果显示,Pb 和 TCPP 高剂量联合暴露与单独暴露相比,神经发育相关基因 *mbp*、*elavl3*、*gfap*、*gap43* 表达进一步下调,同时,脊柱发育相关基因 *col8a1a*、*ngs*、*bmp2a*、*bmp2b*、*runx2b* 表达也进一步下调,Pb 和 TCPP 高剂量联合暴露进一步损害斑马鱼的正常发育。与神经发育和脊柱发育相关基因表达的进一步下调可能与 TCPP 和 Pb 高剂量联合暴露引起的神经毒性和脊柱弯曲有关;但脊柱损伤和神经毒性的潜在机制复杂,还需更进一步的研究以解析 TCPP 和 Pb 联合暴露对斑马鱼胚胎发育毒性的机制。

通信作者简介:孟晓静(1973—),女,博士,教授,主要研究方向为环境毒物的神经毒性作用及机制。

#### 参考文献 (References):

- [1] Heacock M, Kelly C B, Suk W A. E-waste: The growing global problem and next steps [J]. *Reviews on Environmental Health*, 2016, 31(1): 131-135
- [2] Li K Q, Liu S S, Yang Q Y, et al. Genotoxic effects and serum abnormalities in residents of regions proximal to e-waste disposal facilities in Jinghai, China [J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2014, 105: 51-58
- [3] Andeobu L, Wibowo S, Grandhi S. An assessment of e-waste generation and environmental management of selected countries in Africa, Europe and North America: A systematic review [J]. *The Science of the Total Environment*, 2021, 792: 148078
- [4] 万千. 电子废弃物拆解车间重金属和有机磷阻燃剂的分布特征及风险评价[D]. 上海: 上海第二工业大学, 2021: 12  
Wan Q. Pollution characteristics and risk assessment of heavy metals and organophosphate flame retardants in indoor dust from e-waste dismantling workshops [D]. Shanghai: Shanghai Polytechnic University, 2021: 12 (in Chinese)
- [5] Wang R, Zhang Q, Zhan L, et al. Urgency of technology and equipment upgrades in e-waste dismantling base: Pollution identification and emission reduction [J]. *Environmental Pollution*, 2022, 308: 119704
- [6] Poma G, Liu Y, Cuykx M, et al. Occurrence of organophosphorus flame retardants and plasticizers in wild insects from a former e-waste recycling site in the Guangdong Province, South China [J]. *The Science of the Total Environment*, 2019, 650(Pt 1): 709-712
- [7] Dórea J G. Environmental exposure to low-level lead (Pb) co-occurring with other neurotoxicants in early life and neurodevelopment of children [J]. *Environmental Research*, 2019, 177: 108641
- [8] Li X T, Chen C, He M Y, et al. Lead exposure causes spinal curvature during embryonic development in zebrafish [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2022, 23(17): 9571
- [9] Gundacker C, Forsthuber M, Szigeti T, et al. Lead (Pb) and neurodevelopment: A review on exposure and biomarkers of effect (BDNF, HDL) and susceptibility [J]. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 2021, 238: 113855
- [10] Xia M, Wang X D, Xu J Q, et al. Tris (1-chloro-2-propyl) phosphate exposure to zebrafish causes neurodevelopmental toxicity and abnormal locomotor behavior [J]. *The Science of the Total Environment*, 2021, 758: 143694
- [11] Lin F J, Li H, Wu D T, et al. Recent development in zebrafish model for bioactivity and safety evaluation of natural products [J]. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2022, 62(31): 8646-8674
- [12] He J H, Gao J M, Huang C J, et al. Zebrafish models for assessing developmental and reproductive toxicity [J]. *Neurotoxicology and Teratology*, 2014, 42: 35-42
- [13] Khan M I, Khisroon M, Khan A, et al. Bioaccumulation of heavy metals in water, sediments, and tissues and their histopathological effects on *Anodonta cygnea* (Linea, 1876) in Kabul River, Khyber Pakhtunkhwa, Pakistan [J]. *BioMed Research International*, 2018, 2018: 1910274
- [14] Annabi-Trabelsi N, Guerrazi W, Karam Q, et al. Concentrations of trace metals in phytoplankton and zooplankton in the Gulf of Gabès, Tunisia [J]. *Marine Pollution Bulletin*, 2021, 168: 112392
- [15] Sfakianakis D G, Renieri E, Kentouri M, et al. Effect of heavy metals on fish larvae deformities: A review [J]. *En-*

- vironmental Research, 2015, 137: 246-255
- [16] Pang L, Yang P J, Zhao J H, et al. Comparison of wastewater treatment processes on the removal efficiency of organophosphate esters [J]. Water Science and Technology: A Journal of the International Association on Water Pollution Research, 2016, 74(7): 1602-1609
- [17] Meng Y, Xu X J, Niu D, et al. Organophosphate flame retardants induce oxidative stress and Chop/Caspase 3-related apoptosis via Sod1/p53/Map3k6/Fkbp5 in NCI-1975 cells [J]. The Science of the Total Environment, 2022, 819: 153160
- [18] Saquib Q, Siddiqui M, Al-Khedhairi A. Organophosphorus flame-retardant tris (1-chloro-2-propyl) phosphate is genotoxic and apoptotic inducer in human umbilical vein endothelial cells [J]. Journal of Applied Toxicology, 2021, 41(5): 861-873
- [19] Liu X S, Ji K, Choi K. Endocrine disruption potentials of organophosphate flame retardants and related mechanisms in H295R and MVLN cell lines and in zebrafish [J]. Aquatic Toxicology, 2012, 114-115: 173-181
- [20] Zakaria Z Z, Benslimane F M, Nasrallah G K, et al. Using zebrafish for investigating the molecular mechanisms of drug-induced cardiotoxicity [J]. BioMed Research International, 2018, 2018: 1642684
- [21] Singleman C, Holtzman N G. Analysis of postembryonic heart development and maturation in the zebrafish, *Danio rerio* [J]. Developmental Dynamics: An Official Publication of the American Association of Anatomists, 2012, 241(12): 1993-2004
- [22] 李萍萍, 闫晓涛, 张金花, 等. 铅暴露对斑马鱼胚胎心脏和脊柱发育的影响[J]. 环境与职业医学, 2023, 40(2): 196-201, 215
- Li P P, Yan X T, Zhang J H, et al. Effects of lead exposure on development of heart and spine in zebrafish embryos [J]. Journal of Environmental and Occupational Medicine, 2023, 40(2): 196-201, 215 (in Chinese)
- [23] Alzualde A, Behl M, Sipes N S, et al. Toxicity profiling of flame retardants in zebrafish embryos using a battery of assays for developmental toxicity, neurotoxicity, cardiotoxicity and hepatotoxicity toward human relevance [J]. Neurotoxicology and Teratology, 2018, 70: 40-50
- [24] Liu J X, Xu Y J, Liao G Z, et al. The role of ambral in Pb-induced developmental neurotoxicity in zebrafish [J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2022, 594: 139-145
- [25] Brösamle C, Halpern M E. Characterization of myelination in the developing zebrafish [J]. Glia, 2002, 39(1): 47-57
- [26] Yoshida M, Macklin W B. Oligodendrocyte development and myelination in GFP-transgenic zebrafish [J]. Journal of Neuroscience Research, 2005, 81(1): 1-8
- [27] Xu H, Shao X L, Zhang Z, et al. Effects of di-n-butyl phthalate and diethyl phthalate on acetylcholinesterase activity and neurotoxicity related gene expression in embryonic zebrafish [J]. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, 2013, 91(6): 635-639
- [28] Nielsen A L, Jørgensen A L. Structural and functional characterization of the zebrafish gene for glial fibrillary acidic protein, GFAP [J]. Gene, 2003, 310: 123-132
- [29] Fan C Y, Cowden J, Simmons S O, et al. Gene expression changes in developing zebrafish as potential markers for rapid developmental neurotoxicity screening [J]. Neurotoxicology and Teratology, 2010, 32(1): 91-98
- [30] Li R W, Wang H Q, Mi C, et al. The adverse effect of TCIPP and TCEP on neurodevelopment of zebrafish embryos/larvae [J]. Chemosphere, 2019, 220: 811-817
- [31] Shi Q P, Wang M, Shi F Q, et al. Developmental neurotoxicity of triphenyl phosphate in zebrafish larvae [J]. Aquatic Toxicology, 2018, 203: 80-87
- [32] Hu H M, Su M L, Ba H X, et al. ZIF-8 nanoparticles induce neurobehavioral disorders through the regulation of ROS-mediated oxidative stress in zebrafish embryos [J]. Chemosphere, 2022, 305: 135453
- [33] Gray R S, Wilm T P, Smith J, et al. Loss of col8a1a function during zebrafish embryogenesis results in congenital vertebral malformations [J]. Developmental Biology, 2014, 386(1): 72-85
- [34] Qian L, Liu J, Lin Z P, et al. Evaluation of the spinal effects of phthalates in a zebrafish embryo assay [J]. Chemosphere, 2020, 249: 126144
- [35] Salazar V S, Gamer L W, Rosen V. BMP signalling in skeletal development, disease and repair [J]. Nature Reviews Endocrinology, 2016, 12: 203-221
- [36] Kim J M, Yang Y S, Park K H, et al. A RUNX2 stabilization pathway mediates physiologic and pathologic bone formation [J]. Nature Communications, 2020, 11: 2289
- [37] Yan R, Ding J, Yang Q L, et al. Lead acetate induces cartilage defects and bone loss in zebrafish embryos by disrupting the GH/IGF-1 axis [J]. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2023, 253: 114666 ◆