

赵爽, 段鑫越, 王娇, 等. 转基因斑马鱼在镉免疫毒性研究中的应用[J]. 农业环境科学学报, 2019, 38(12): 2723–2728.

ZHAO Shuang, DUAN Xin-yue, WANG Jiao, et al. Use of transgenic zebrafish in the study of cadmium immunotoxicity[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2019, 38(12): 2723–2728.

转基因斑马鱼在镉免疫毒性研究中的应用

赵爽¹, 段鑫越¹, 王娇¹, 冯一凡¹, 王予頔¹, 宫知远², 端正花^{1*}

(1. 天津理工大学环境科学与安全工程学院, 天津 300384; 2. 新加坡国立大学生命科学学院, 新加坡 117543)

摘要: 为开发转基因斑马鱼技术在环境污染物免疫毒性研究中的应用, 以转基因斑马鱼 *Tg(lysC:DsRed2)-Lyz fish* 为模型, 利用斑马鱼胚胎发育技术和定量实时 RT-PCR 技术, 探讨了 Cd 对斑马鱼仔鱼的免疫毒性及其作用机制。结果表明, $0.01 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ CdCl_2 即可显著抑制转基因斑马鱼胚胎的孵化 ($P=0.013$), 当暴露浓度增大到 $0.1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 斑马鱼胚胎 24 h 血流障碍和 52 h 孵化抑制这两个毒性效应都大幅增强, 且剂量-效应关系显著。 $0.1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ CdCl_2 使得溶菌酶 (*lysozyme C*, *lyz*) 标记的斑马鱼仔鱼体内中性粒细胞数量增多, 且趋向肝脏部位聚集。免疫毒性的作用机制与斑马鱼仔鱼体内金属硫蛋白相关基因 (*DMT*) 和炎症相关基因 (*serp*, *tnf*) 表达的诱导, 以及癌症抑制相关基因 (*ccgn1*, *chk2*, *p53*) 表达的抑制有相关性。研究表明, 转基因斑马鱼 *Tg(lysC:DsRed2)* 在重金属污染物免疫毒性评价中具有重要意义。

关键词: 镉; 转基因; 斑马鱼; 免疫毒性

中图分类号: X820.4 文献标志码: A 文章编号: 1672-2043(2019)12-2723-06 doi:10.11654/jaes.2019-0725

Use of transgenic zebrafish in the study of cadmium immunotoxicity

ZHAO Shuang¹, DUAN Xin-yue¹, WANG Jiao¹, FENG Yi-fan¹, WANG Yu-di¹, GONG Zhi-yuan², DUAN Zheng-hua^{1*}

(1. School of Environmental Science and Safety Engineering, Tianjin University of Technology, Tianjin 300384, China; 2. Department of Biological Sciences, National University of Singapore, Singapore 117543)

Abstract: To use transgenic zebrafish in research on the immunotoxicity of environmental pollutants, transgenic zebrafish *Tg(lysC:DsRed2)-Lyz fish* was modelled, and zebrafish embryo development technology and quantitative real-time RT-PCR (Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction) technology were carried out in this study. The immunotoxicity of cadmium and its toxic mechanism were discussed. The results showed that the incubation of transgenic zebrafish embryos could be significantly inhibited by $0.01 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ CdCl_2 ($P=0.013$). When the exposure concentration increased to $0.1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 24 h blood flow disorder and 52 h hatch inhibition were both greatly enhanced in the fish embryo, and these toxic effects were significantly dose dependent. The level of neutrophils that were labelled with lysozyme (*lysozyme C*, *lyz*) in zebrafish larvae was increased upon $0.01 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ CdCl_2 exposure, and the neutrophils tended to aggregate in the fish liver. The mechanism of immunotoxicity was related to the induction of the expression of the metallothionein related gene (*DMT*) and inflammation related genes (*serp*, *tnf*), and the inhibition of the expression of cancer related genes (*ccgn1*, *chk2*, *p53*). Therefore, the transgenic zebrafish *Tg(lysC:DsRed2)-Lyz fish* could play important roles in the evaluation of the immunotoxicity of heavy metal pollutants.

Keywords: cadmium; transgenic; zebrafish; immune toxicity

收稿日期: 2019-06-29 录用日期: 2019-09-02

作者简介: 赵爽 (1995—), 女, 辽宁沈阳人, 硕士研究生, 从事环境生物学研究。E-mail: 15710560223@163.com

*通信作者: 端正花 E-mail: duanzhenghua@mail.nankai.edu.cn

基金项目: 国家自然科学基金青年科学基金项目 (41807487); 大学生创新创业训练计划项目 (201810060003)

Project supported: The Young Scientists Fund of the National Natural Science Foundation of China (41807487); National College Students Entrepreneurship Innovation Training Program of China (201810060003)

随着工业及社会的快速发展,水体重金属污染已成为全球范围内最严重的环境问题之一^[1]。由于工业废水的违法排放,造成镉、砷、汞等多种重金属离子进入水体^[2]。重金属具有富集性并且难以自然降解,在水体中积累到一定限度就会对水体-水生植物-水生动物系统造成严重危害,并可能通过食物链直接或者间接影响到人类自身健康^[3-4]。水体中重金属污染物通常以很低浓度水平存在^[5-6]。近年来,大量基于鱼类、蚤类、藻类及处于不同营养级的微生物的毒性测试方法开始建立并迅速发展,为水体环境中低浓度污染物的毒性生物测试提供了可能^[7]。但是以上这些方法都存在实验周期长、操作复杂的缺点。斑马鱼(*Danio rerio*)是环境毒理学中常用的标准生物模型^[8],与人类基因组相比其基因的保守性约为87%。转基因斑马鱼技术检测方法在此基础上进一步发展,该检测技术快捷简单,可在活体上直接进行,因此能够观察到某一个体在环境污染物的干扰下整个连续生命周期的发展变化,从而可以为水环境污染检测提供更快速、直观的证据,弥补了传统水质毒性评价方法的不足^[9]。

免疫毒性是重金属毒性作用机制的一个重要方面。如重金属镉对动物机体具有广泛的损伤作用,尤其是免疫系统^[10]。在哺乳动物及鱼类血液的非特异性细胞免疫系统中,中性粒细胞都起着十分重要的作用,当发生炎症时,中性粒细胞会被诱导和迁移到感染部位^[11-12]。利用溶菌酶(*lysozyme C*, *lyz*)标记转基因斑马鱼 *Tg(lysC:DsRed2)-Lyz fish* 血液中的中性粒细胞,如果斑马鱼受外源化合物影响导致体内发生炎症反应,中性粒细胞则会迁移到该部位,表征为荧光量表达增强,进而可以便捷地找出炎症相关的靶器官。邹玉^[13]在研究中也发现不同浓度的内毒素(LPS)会诱导斑马鱼 *Tg(lfap:EGFP;lyz:DsRED₂)* 红色荧光标记的中性粒细胞和巨噬细胞向肝脏部位迁移聚集。本研究以转基因斑马鱼 *Tg(lysC:DsRed2)-Lyz fish* 为模型,以重金属镉为研究对象,拟建立速度快、特性强的重金属免疫毒性检测技术,进而为环境中重金属的免疫毒性健康风险和生态风险提供依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

本试验中氯化镉(CdCl_2)为分析纯,购于Sigma-Aldrich公司。称取一定量的粉末溶于重组水中,稀释到需要的浓度。根据水体环境中重金属的实际浓

度和预试验结果,本试验中 CdCl_2 的暴露浓度为0(空白对照)、0.01、0.1、1 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

实验室自培育成年野生斑马鱼和转基因斑马鱼 *Tg(lysC:DsRed2)-Lyz fish*,雌雄比1:2,每日喂食活卤虫芽苗(*Aremiamauplii*, World Aquafedds, USA)1次,于 $(26\pm 1)^\circ\text{C}$ 光照/黑暗(14 h/10 h)周期条件下培养1个月,开始采集鱼卵。饲养用水经生物过滤器过滤并充分曝气,pH值保持约8.0。

1.2 试验方法

1.2.1 毒性暴露

将转基因斑马鱼种鱼 *Tg(lysC:DsRed2)-Lyz fish* 与野生型斑马鱼种鱼进行杂交,得到斑马鱼鱼卵。在24孔细胞培养板中加入一定浓度的上述溶液,并于每孔中加入2 mL试液和1枚经过挑选发育良好的受精卵,进行零时(卵产出并受精1 h内,0 hpf)染毒。人工气候箱培养6 d后,观察致死和中毒反应,培养过程中每2 d更换一次溶液。胚胎发育期间的毒性观察指标有24 h血流障碍(显微镜下未观察到有血液流动作为血流障碍判断标准)、52 h死亡数(以无心跳作为死亡判断标准)和52 h孵化抑制(以未破胚胎绒毛膜作为孵化抑制的判断标准)。实验设置3个平行。

培养到第6 d,在荧光显微镜下筛选各暴露组具有荧光表达的斑马鱼幼鱼,并将其进行麻醉、固定成相同的姿势,利用荧光显微镜(ZEISS Axiovert 200M)观察幼鱼中荧光表达,并利用数码相机(ZEISS, Axiocam HRC)在相同放大倍数和曝光时间下拍照记录荧光表达量。每个暴露浓度和空白对照组记录10条转基因斑马鱼的荧光量。

1.2.2 相关基因表达分析

根据毒性暴露结果,将0.1 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ CdCl_2 溶液加入到10 cm玻璃表面皿中,每孔加入20 mL试液和50枚挑选过的发育良好的杂交斑马鱼鱼卵,在人工气候箱培养6 d后,每暴露组取1个表面皿中所有仔鱼样品作为1个样本,用液氮冷冻,于1.5 mL离心管中 -20°C 冷冻保存。试验设置空白对照组。总RNA利用Trizol(Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, US)方法提取,通过测定OD值和1%的琼脂糖凝胶电泳鉴定RNA的浓度和质量。根据课题组前期研究结果^[14],选择斑马鱼金属硫蛋白相关基因(*zMT*、*dMT*)、炎症相关基因(*serp*、*tnf*)和癌症相关基因(*ccgn1*、*chk2*、*p53*)作为研究对象,以 β -Actin基因为内参,采用Primer 5.0软件设计引物,具体功能与扩增引物序

列如表1所示。按照常规方法取3 μg 上述总RNA反转录成cDNA,利用LightCycle 480(Roche Applied Science)设备及配备的试剂盒(Roche Applied Science)进行实时定量RT-PCR分析。每个样品均设置4个平行, $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ 方法计算相对表达量,最终结果用暴露组基因表达量相对空白组基因表达量比例的形式表示。

表1 待测基因引物序列

Table 1 Primer sequences of target genes

基因功能 Gene function	基因名称 Gene name	引物序列 Primer sequence
内参基因 Reference gene	$\beta\text{-Actin}$	3'-ATGATGATGAAATTGCCGC-5' 5'-AGTTGGTGACAATACCGTGC-3'
金属硫蛋白 相关基因 Metallothionein related gene	zMT	3'-GCCAAGACTGGAAGTTCGCAAC-5' 5'-CGCAGCCAGAGGCACACT-3'
炎症相关基因 Inflammatory related genes	dMT	3'-ACTCCGCACTCGTCAAGTCT-5' 5'-CGTAGAAGGCCTCAGCAAAC-3'
炎症相关基因 Inflammatory related genes	$serp$	3'-AGGAGGAACACGAACACTCG-5' 5'-TGAAGACTGAGACTGGGAGACG-3'
癌症抑制相关 基因 Cancer suppressor- related genes	$chk2$	3'-TGATGATGACCGTATATCTCGC-5' 5'-TCATGTCTCTTAAAGCCGACC-3'
癌症抑制相关 基因 Cancer suppressor- related genes	$ccng1$	3'-AACTGGAAGGTCAAGGCTCC-5' 5'-AGAAGAGACAAAGCAAGCAGG-3'
癌症抑制相关 基因 Cancer suppressor- related genes	$chk2$	3'-TCATCTGTTTGGGTGGTATCC-5' 5'-TTTCCTTGTGCTTCTGGACG-3'
癌症抑制相关 基因 Cancer suppressor- related genes	$p53$	3'-ATTTAGGCTCAGGTTCCCG-5' 5'-GCCAAGTTATCTCCATCCG-3'

1.3 统计分析

胚胎发育各个毒性指标和基因表达量的最终结果以平均值 $\pm$ s.d.的形式表达,以SPSS 19.0(SPSS, Inc., Chicago, IL, USA)软件作图。对照组与各暴露组间的差异用student- t 进行检验, $P<0.05$ 表示组间有显著差异, $P<0.01$ 表示组间有极显著差异。

2 结果与分析

2.1 CdCl_2 暴露对转基因斑马鱼胚胎发育的影响

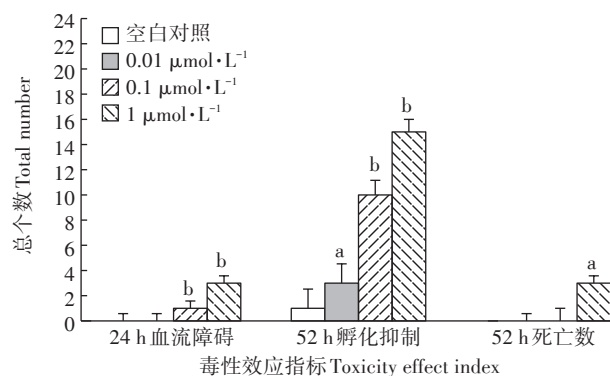
与空白实验组相比, CdCl_2 对转基因斑马鱼胚胎发育主要有24 h血流障碍、52 h死亡数和52 h孵化抑制3个毒性效应。如图1所示, $0.01 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ CdCl_2 即可显著抑制转基因斑马鱼胚胎的孵化($P=0.013$)。随着暴露浓度的增大,斑马鱼胚胎24 h血流障碍和52 h孵化抑制这两个毒性效应都显著增强,其中 CdCl_2 在52 h孵化抑制指标的 EC_{50} 为 $0.05 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ($R^2=0.991$)。当 CdCl_2 的浓度高达 $1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,斑马鱼胚胎的死亡率显著增大到12.5% ($P=0.025$)。

2.2 CdCl_2 暴露对转基因斑马鱼免疫毒性的影响

转基因斑马鱼 $Tg(lysC:DsRed2)\text{-}Lyz\ fish$ 利用溶

菌酶标记了斑马鱼血液中的中性粒细胞,不同浓度 CdCl_2 暴露下 $Lyz\ fish$ 仔鱼中的中性粒细胞荧光量表达及其分布如图2所示。

$0.01 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ CdCl_2 诱导下的斑马鱼仔鱼血管内荧光表达量高于空白对照组,表示斑马鱼仔鱼血管内的中性粒细胞数量增多。 $0.1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 $1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ CdCl_2 暴露下,不仅斑马鱼仔鱼血管内荧光表达量进



a表示与空白对照相比有显著差异, $P<0.05$; b表示与空白对照相比有极显著差异, $P<0.01$ 。下同

a indicates a significant difference compared with the blank control, $P<0.05$; b indicates a significant difference compared with the blank control, $P<0.01$. The same below

图1 不同浓度 CdCl_2 作用下转基因斑马鱼胚胎发育毒性
Figure 1 Development toxicity by different concentrations of CdCl_2 in transgenic zebrafish embryos

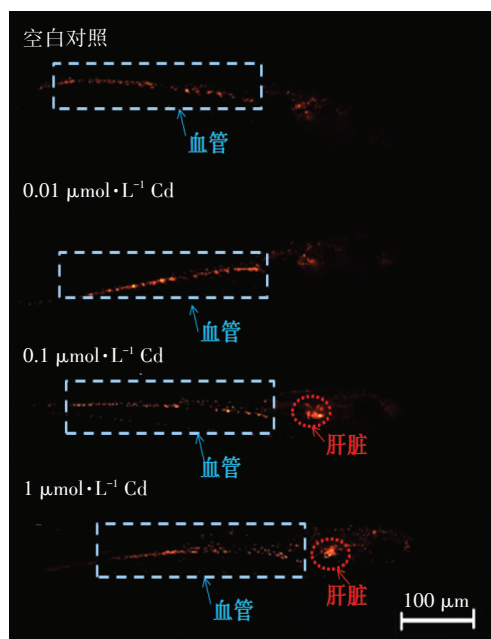


图2 不同浓度 CdCl_2 诱导下转基因斑马鱼体内荧光表达
Figure 2 The fluorescence expressions in transgenic zebrafish induced by CdCl_2

一步增强,而且还可以显著看到红色荧光在斑马鱼肝脏部位聚集。因此,CdCl₂能够诱导斑马鱼仔鱼发生炎症作用,血液和肝脏是其主要靶器官。

2.3 CdCl₂暴露对斑马鱼仔鱼标志基因表达的影响

为进一步探讨CdCl₂对斑马鱼仔鱼免疫毒性的机制,试验对比研究了0.1 μmol·L⁻¹ CdCl₂暴露下斑马鱼体内金属硫蛋白相关基因(*zMT*、*dMT*)、炎症相关基因(*serp*、*tnf*)和癌症抑制相关基因(*chk2*、*ccnc*、*ccng1*)这3组功能基因的表达,结果如图3所示。0.1 μmol·L⁻¹ CdCl₂显著诱导了金属硫蛋白相关基因*dMT*的表达,*dMT*基因表达量约为空白对照组的3倍($P=0.001$),而金属硫蛋白相关基因*zMT*的表达则与空白对照组无显著差异($P=0.253$)。炎症相关基因(*tnf*、*serp*)在转基因斑马鱼仔鱼体内也显著上调,分别为空白对照组的1.347倍($P=0.001$)和1.778倍($P=0.025$)。而癌症相关基因(*chk2*、*ccng1*和*p53*)的表达在0.1 μmol·L⁻¹ CdCl₂暴露下都显著受到抑制,表达量分别为空白对照组的0.092、0.816和0.596,其中*chk2*基因表达量受到的抑制更为显著($P=0.030$)。

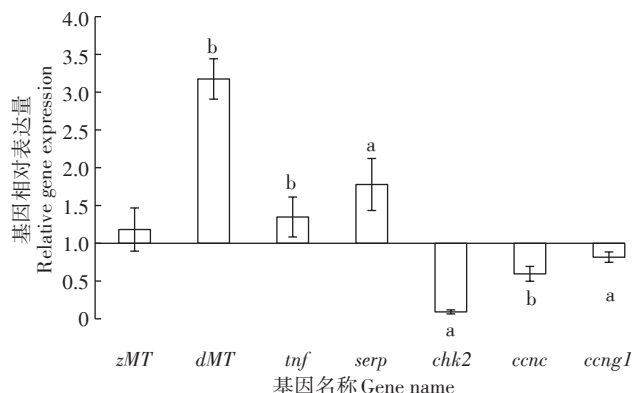


图3 0.1 μmol·L⁻¹ CdCl₂诱导下斑马鱼仔鱼相关基因表达

Figure 3 Expressions of related genes in transgenic zebrafish induced by 0.1 μmol·L⁻¹ CdCl₂

3 讨论

3.1 转基因斑马鱼在环境污染毒性检测中的应用

转基因斑马鱼是将外源基因通过显微注射等方式导入斑马鱼受精卵,注射的外源基因能够整合到斑马鱼受精卵的基因组中,从而建立具有稳定遗传特性的转基因品系。荧光标记不同组织(肝脏、心脏、肾脏等)、细胞(神经细胞、免疫细胞)的多种转基因斑马鱼品系的出现,促进了斑马鱼在遗传学、发育生物学、细胞生物学、医学水产育种学等研究领域的广泛应用^[15-16]。近年来转基因斑马鱼也在迅速发展,在环境

毒理学方面也体现出一定的价值^[17-18]。如Brion等^[19]构建了转基因斑马鱼品系*cyp19a1b-GFP*用于评估欧洲废水的内分泌干扰活性。孙冰等^[20]构建了*Tg(ere-vtg:egfp)*转基因斑马鱼,可直观地动态监测水体环境中内分泌干扰物的污染情况。纪喜文等^[21]利用芳香烃反应元件*AHRDtk*构建的新型转基因斑马鱼,可以直观判断水体环境中是否有该类化学物质存在。

本研究发现,0.01 μmol·L⁻¹ CdCl₂即可显著抑制转基因斑马鱼胚胎的孵化,0.1 μmol·L⁻¹ CdCl₂能够导致转基因斑马鱼胚胎发生血流障碍。这与作者前期在野生型斑马鱼胚胎发育中得到的结果一致^[14]。但是通过转基因斑马鱼*Tg(lysC:DsRed2)-Lyz fish*可以直观地看到在0.01 μmol·L⁻¹和0.1 μmol·L⁻¹ CdCl₂暴露下,斑马鱼仔鱼体内的中性粒细胞数量增多且趋向于肝脏,肝脏是CdCl₂作用的主要靶器官之一。这也得到了作者前期结果的验证,即在利用转基因斑马鱼*Tg(lfabp10a:dsRed;elaA:EGFP)*探讨CdCl₂的肝脏毒性时发现,0.1 μmol·L⁻¹ CdCl₂单独暴露使斑马鱼肝脏发生炎症作用,肝脏相对空白对照显著膨大,1 μmol·L⁻¹ CdCl₂则显著抑制斑马鱼肝脏发育^[9]。

环境污染作用于机体时,机体免疫系统功能常在早期就发生变化。因此,免疫转基因斑马鱼的发展对于提高环境污染检测的灵敏度和及时采取预防措施具有重要意义^[22]。目前我国免疫转基因斑马鱼的应用主要侧重在医学领域。如陈将飞等^[23]通过免疫转基因斑马鱼*MPO*研究发现免疫抑制剂雷帕霉素(RAP)暴露能够显著抑制斑马鱼体内免疫细胞(中性粒细胞)的荧光表达。王荣春等^[24]发现氯霉素对免疫转基因斑马鱼*Lyz*幼鱼的致畸和致死作用具有剂量、时间依赖性,并可以导致斑马鱼幼鱼的免疫细胞数量减少。免疫转基因斑马鱼在环境领域的应用还鲜有报道,本研究利用免疫转基因斑马鱼*Tg(lysC:DsRed2)-Lyz fish*模型探讨了Cd的免疫毒性效应,得到了显著的剂量-效应关系。

3.2 Cd对斑马鱼造成免疫毒性的作用机制

化合物个体有害效应产生的机理可以由一种信号路径(Pathway)作用或几种信号路径共同作用分析得出。Cd的重要作用机理则是与含巯基、氨基、羧基的蛋白质分子结合形成镉结合蛋白,使许多酶系统的活性受到抑制和破坏^[25]。Cd对斑马鱼仔鱼造成损伤的途径可能有氧化性损伤、代谢紊乱、炎症、细胞凋亡等,进一步作用则可能发生癌变。在这些复杂的信号传递过程中,与其相关的基因表达可能发生变化。

反之,通过研究特定基因表达的变化,则可推断该化合物造成毒性的作用途径。例如在4-NP的氧化性压力下,斑马鱼肿瘤抑制相关基因 rb 和 $p53$ 的表达显著增强^[26]。

本研究通过金属硫蛋白(Metallothionein, MT)、炎症和癌症抑制相关基因这3类功能共7个基因的表达,探讨了 $0.1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ CdCl_2 诱导下斑马鱼仔鱼免疫毒性的可能机制。金属硫蛋白MT是重金属暴露下生物体内的防御者。如研究证实生物体中MT通过与Cd螯合从而降低Cd的毒性,并且MT能够在细胞不同周期抵御重金属造成的DNA损伤和细胞凋亡^[27]。Bonaventura等^[28]也研究发现Cd暴露刺激下骨髓细胞炎症与MT的过度表达有显著相关性。本研究也发现 $0.1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ CdCl_2 暴露显著诱导了转基因斑马鱼MT相关基因 dMT 的表达。

环境污染物致癌是一个相当复杂的过程,其机理可能涉及污染物通过直接和各种间接途径产生遗传性损伤,通过干扰细胞信号传导系统诱导原癌基因和蛋白的表达,以及抑制机体免疫防御功能等许多方面。免疫系统是生物异源物质毒性效应的主要靶系统之一。在癌症形成过程中,免疫炎症也发挥着重要的调节作用。例如,人体肺细胞(BEAS-2BR细胞)在Cd暴露下激活了 $tnf-\alpha$ 、 $nf-\kappa b$ 及 $cox-2$ 基因和蛋白的表达,从而产生炎性微环境,这与肺癌的发生有密切关系^[29]。大鼠小肠上皮(IEC-6)细胞在Cd的慢性暴露中,不仅降低了抑癌基因 $p53$ 的表达水平,而且还降低了UBE2D家族基因的表达^[30]。因此研究免疫系统的变化,不仅可以对癌症起到预警作用,还可以从机制上寻求癌症发生的可能途径。本研究发现 $0.1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ CdCl_2 暴露显著诱导了转基因斑马鱼炎症相关基因($serp$ 、 tnf)的表达,抑制了癌症抑制相关基因($ccgn1$ 、 $chk2$ 、 $p53$)的表达。因此,Cd对转基因斑马鱼免疫毒性的机制与上述基因表达的变化具有一定的相关性,并且 $0.1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ CdCl_2 暴露对斑马鱼仔鱼具有致癌风险。

4 结论

(1) $0.01 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ CdCl_2 对斑马鱼胚胎产生发育毒性,并且能够暴露显著诱导转基因斑马鱼的免疫毒性。

(2) Cd免疫毒性的机制与其诱导金属硫蛋白相关基因(dMT)、炎症相关基因($serp$ 、 tnf)的表达及抑制癌症相关基因($ccgn1$ 、 $chk2$ 、 $p53$)的表达有关。

参考文献:

- [1] Ma X, Armas S M, Soliman M, et al. *In situ* monitoring of Pb^{2+} leaching from the galvanic joint surface in a prepared chlorinated drinking water [J]. *Environmental Science & Technology*, 2018, 52(4):2126-2133.
- [2] Liu M, Du P, Yu C, et al. Increases of total mercury and methyl mercury releases from municipal sewage into environment in China and implications[J]. *Environmental Science & Technology*, 2018, 52(1):124-134.
- [3] Shou W, Kang F, Lu J. Nature and value of freely dissolved EPS ecosystem services: Insight into molecular coupling mechanisms for regulating metal toxicity[J]. *Environmental Science & Technology*, 2018, 52(2):457-466.
- [4] Egorova K S, Ananikov V P. Toxicity of metal compounds: Knowledge and myths[J]. *Organometallics*, 2017, 36(21):4071-4090.
- [5] 刘慧杰, 刘文君, 刘继平, 等. 南中国海表层海水重金属含量及其潜在生态风险分析[J]. 中国环境科学, 2017, 37(10):3891-3898.
LIU Hui-jie, LIU Wen-jun, LIU Ji-ping, et al. Heavy metals concentration and its potential ecological risk assessment of surface seawater in South China Sea[J]. *China Environmental Science*, 2017, 37(10):3891-3898.
- [6] Chen X, Wang Z, Zhu G, et al. The references level of cadmium intake for renal dysfunction in a Chinese population[J]. *Scientific Reports*, 2018, 8(1):9011.
- [7] Eck-Varanka B, Nora Kováts, Eszter Horváth, et al. Eco- and genotoxicity profiling of a rapeseed biodiesel using a battery of bioassays[J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2018, 151:170-177.
- [8] 穆希岩, 李成龙, 黄 瑛, 等. 两种邻苯二甲酸酯类污染物对斑马鱼胚胎发育的影响[J]. 中国环境科学, 2017, 37(9):3566-3575.
MU Xi-yan, LI Cheng-long, HUANG Ying, et al. Effects of two phthalate esters on zebrafish embryos[J]. *China Environmental Science*, 2017, 37(9):3566-3575.
- [9] 端正花, 陈晓欧, 刘灵丽, 等. 苯并三唑和镉对斑马鱼肝脏的联合毒性效应[J]. 中国环境科学, 2015, 35(6):1872-1876.
DUAN Zheng-hua, CHEN Xiao-ou, LIU Ling-li, et al. Joint toxicity of benzotriazole and cadmium to zebrafish liver[J]. *China Environmental Science*, 2015, 35(6):1872-1876.
- [10] 张人俊, 马 萍, 嵇辛勤, 等. 重金属镉的毒性研究进展[J]. 贵州畜牧兽医, 2016, 40(4):27-33.
ZHANG Ren-jun, MA Ping, JI Xin-qin, et al. The review of recent studies of the toxicity of heavy metal cadmium[J]. *Guizhou Journal of Animal Husbandry & Veterinary Medicine*, 2016, 40(4):27-33.
- [11] 肖 芳, 郑成云, 蒋卫东, 等. NETs在自身免疫性疾病发病机制中的作用研究进展[J]. 中国免疫学杂志, 2017, 33(5):781-783.
XIAO Fang, ZHENG Cheng-yun, JIANG Wei-dong, et al. Advances in the role of NETs in the pathogenesis of autoimmune diseases[J]. *Chinese Journal of Immunology*, 2017, 33(5):781-783.
- [12] Buchan K D, Prajsnar T K, Ogryzko N V, et al. A transgenic zebrafish line for *in vivo* visualisation of neutrophil myeloperoxidase[J]. *PLoS One*, 2019, 14(4):e0215592.
- [13] 邹 玉. 基于模式生物斑马鱼研究炎症状态下的异烟肼肝脏毒性

- 作用[D]. 河南:河南大学, 2017.
- ZOU Yu. The mechanism of moderate inflammation induced by LPS enhances the liver injury caused by isoniazide in zebrafish[D]. Henan: Henan University, 2017.
- [14] Duan Z, Xing Y, Feng Z, et al. Hepatotoxicity of benzotriazole and its effect on the cadmium induced toxicity in zebrafish, *Danio rerio*[J]. *Environmental Pollution*, 2017, 224:706–713.
- [15] Lulla A, Barnhill L, Bitan G, et al. Neurotoxicity of the parkinson disease-associated pesticide ziram is synuclein-dependent in zebrafish embryos[J]. *Environmental Health Perspectives*, 2016, 124(11):1766–1775.
- [16] Yan C, Yang Q, Gong Z. Activation of hepatic stellate cells during liver carcinogenesis requires fibrinogen / integrin $\alpha v \beta 5$ in zebrafish[J]. *Neoplasia*, 2018, 20(5):533–542.
- [17] 张 力, 刘 超, 周 昕, 等. 四环素诱导肝脏特异表达绿色荧光蛋白转基因斑马鱼模型建立[J]. 中国实验动物学报, 2015, 23(1):81–85.
- ZHANG Li, LIU Chao, ZHOU Xin, et al. Establishment of a transgenic zebrafish model with tetracycline-induced GFP expression in the liver[J]. *Acta Laboratorium Animalis Scientia Sinica*, 2015, 23(1):81–85.
- [18] 李珊珊, 孔德明, 秦 帅, 等. 可示踪转基因斑马鱼胰岛 β 细胞破坏和再生模型分析[J]. 基因组学与应用生物学, 2016, 35(10):2647–2652.
- LI Shan-shan, KONG De-ming, QIN Shuai, et al. Analysis of damage and regeneration model of traceable transgenic zebrafish pancreatic β cell[J]. *Genomics and Applied Biology*, 2016, 35(10):2647–2652.
- [19] Brion F, De Gussem V, Buchinger S, et al. Monitoring estrogenic activities of waste and surface waters using a novel *in vivo* zebrafish embryonic (EASZY) assay: Comparison with *in vitro* cell-based assays and determination of effect-based trigger values[J]. *Environmental International*, 2019, 130:104896.
- [20] 孙 冰, 许慧慧, 夏敏杰, 等. 荧光转基因斑马鱼 *Tg(ere-vtg:egfp)* 质粒的构建及验证[J]. 环境与职业医学, 2017, 34(6):511–516.
- SUN Bing, XU Hui-hui, XIA Min-jie, et al. Generation and verification of *Tg(ere-vtg:egfp)* plasmid in fluorescent transgenic zebrafish[J]. *Journal of Environmental & Occupational Medicine*, 2017, 34(6):511–516.
- [21] 纪喜文, 田 雪, 徐殿胜. 一种新型转基因斑马鱼毒物检测系统的建立[J]. 化学与生物工程, 2010, 27(9):69–72.
- JI Xi-wen, TIAN Xue, XU Dian-sheng. A new type of transgenic zebrafish toxicological detection system[J]. *Chemistry & Bioengineering*, 2010, 27(9):69–72.
- [22] Xu H, Zhang X, Li H, et al. Immune response induced by major environmental pollutants through altering neutrophils in zebrafish larvae[J]. *Aquatic Toxicology*, 2018, 201:99–108.
- [23] 陈将飞, 马 雪, 盖增鑫, 等. 雷帕霉素(RAP)对斑马鱼胚胎的发育、运动行为和免疫毒性的影响[J]. 环境化学, 2014, 33(4):556–561.
- CHEN Jiang-fei, MA Xue, GAI Zeng-xin, et al. Acute rapamycin (RAP) exposure induce developmental, neurobehavioral and immune toxicities in embryonic zebrafish[J]. *Environmental Chemistry*, 2014, 33(4):556–561.
- [24] 王荣春, 何秋霞, 韩 建, 等. 氯霉素对斑马鱼幼鱼发育及免疫毒性的研究[J]. 山东科学, 2017, 30(6):35–40.
- WANG Rong-chun, HE Qiu-xia, HAN Jian, et al. Research on the effects of chloramphenicol on developmental and immune toxicity of juvenile zebrafish[J]. *Shandong Science*, 2017, 30(6):35–40.
- [25] Wang B, Du Y L. Cadmium and its neurotoxic effects[J]. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2013(4/5):898034.
- [26] Lam S H, Ung C Y, Hlaing M M, et al. Molecular insights into 4-nitrophenol-induced hepatotoxicity in zebrafish: Transcriptomic, histological and targeted gene expression analyses[J]. *Biochimica Et Biophysica Acta-General Subjects*, 2013, 1830(10):4778–4789.
- [27] Duan Y, Duan J, Feng Y, et al. Hepatoprotective activity of vitamin E and metallothionein in cadmium-induced liver injury in *Ctenopharyngodon idellus*[J]. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2018(4):1–12.
- [28] Bonaventura P, Courbon G, Lamboux A, et al. Protective effect of low dose intra-articular cadmium on inflammation and joint destruction in arthritis[J]. *Scientific Reports*, 2017, 7(1):2415.
- [29] Caterina L. Cadmium exposure and prostate cancer: Insights, mechanisms and perspectives[J]. *Frontiers in Bioscience-Landmark*, 2018, 23(9):1687–1700.
- [30] Lee J Y, Tokumoto M, Hattori Y, et al. Different regulation of *p53* expression by cadmium exposure in kidney, liver, intestine, vasculature, and brain astrocytes[J]. *Toxicological Research*, 2016, 32(1):73–80.