

DOI: 10.20103/j.stxb.202403100484

王济佳, 高妮, 边重千, 王子龙, 荀昭博, 吴朗. DBP 和 BPA 对斑马鱼早期发育、运动行为和神经系统的影响. 生态学报, 2025, 45(4): 1748-1762.
Wang J J, Gao N, Bian C Q, Wang Z L, Xun Z B, Wu L. Effects of DBP and BPA on early development, locomotor behavior and nervous system in zebrafish. Acta Ecologica Sinica, 2025, 45(4): 1748-1762.

DBP 和 BPA 对斑马鱼早期发育、运动行为和神经系统的影响

王济佳, 高妮, 边重千, 王子龙, 荀昭博, 吴朗*

西北农林科技大学动物科技学院, 咸阳 712000

摘要:近年来, 塑料污染日趋严重, 已成为全球关注的环境问题。塑料添加剂等污染物随着塑料的不当处理或老化大量进入环境中, 严重威胁动物和人类健康。为确定两种典型塑料添加剂邻苯二甲酸二丁酯 (Dibutyl phthalate, DBP) 和双酚 A (Bisphenol A, BPA) 对鱼类早期发育和行为的影响, 研究以斑马鱼 (*Danio rerio*) 为模式动物, 探讨 DBP 与 BPA 单独及联合暴露对斑马鱼胚胎发育、运动行为和神经系统的影响。结果显示: DBP 和 BPA 单独和联合暴露导致斑马鱼胚胎和仔鱼心率下降, 体长缩短, 孵化进程加快, 但对总孵化率和畸形率无明显影响。DBP 单独及和 BPA 联合暴露导致仔鱼运动能力增强、活跃度增加。DBP 单独暴露导致丙二醛含量增加, 诱导脑部细胞凋亡水平升高。DBP 和 BPA 联合暴露导致神经系统发育相关基因转录水平升高, 神经递质五羟色胺含量降低, 但多巴胺含量和乙酰胆碱酯酶活性并无明显变化。DBP 和 BPA 在联合干扰胚胎早期发育 (心率、孵化率) 和仔鱼运动能力 (运动速度、运动距离、暴躁状态频率、暴躁状态持续时间、活跃状态频率、活跃状态持续时间) 方面主要表现为拮抗效应, 在影响神经系统发育相关基因 (*gfap*, *tph1b*, *th*, *syn2a* 和 *nestin*) 的转录水平方面表现为一定的协同效应。本研究结果可为 DBP 和 BPA 在水环境中的风险评估提供数据支撑, 也可为邻苯二甲酸酯类和双酚类化合物对水生动物联合神经毒性效应机制研究奠定基础。

关键词: 邻苯二甲酸二丁酯 (BPA); 双酚 A (DBP); 联合暴露; 运动行为; 斑马鱼; 神经毒性

Effects of DBP and BPA on early development, locomotor behavior and nervous system in zebrafish

WANG Jijia, GAO Ni, BIAN Chongqian, WANG Zilong, XUN Zhaobo, WU Lang*

Northwest Agriculture and Forestry University, Xianyang 712000, China

Abstract: In recent years, plastic pollution has become increasingly serious, becoming global environmental concern. Plastics are widely used in daily life, and their addictive chemicals bisphenol A and phthalates continue to be produced and released into the environment in large quantities, due to improper disposal or degradation of plastics. Alarming high levels of bisphenol A and phthalates have been frequently detected in water and sediments and pose serious threats to the health of both animals and humans. Most current studies focus on their single effects on organisms, yet their combined effects on aquatic organisms are not clear. Given that these compounds often coexist in the natural environment, their combined effects deserve further investigation. Hence, the aim of this study was to evaluate the combined effects of plastic additives dibutyl phthalate (DBP) and bisphenol A (BPA) in aquatic organisms. To determine the effects of DBP and BPA on the early development and behavior in fish, in this study, using zebrafish (*Danio rerio*) as animal model, we investigated the single and combined effects of DBP and BPA on embryonic development, motor behavior and nervous system in zebrafish. Our

基金项目: 国家自然科学基金青年基金项目 (32001196)

收稿日期: 2024-03-10; 网络出版日期: 2024-11-06

* 通讯作者 Corresponding author. E-mail: wl9430@163.com

results revealed that both individual and combined exposure to DBP and BPA resulted in decreased heart rate, shortened body length and accelerated hatching process in zebrafish embryos and larvae, but has no significant effect on total hatching rate and malformation rate. This suggested that DBP and BPA could interfere with normal physiological development. We observed that both individual and combined exposure to DBP and BPA enhanced the locomotor ability and activity level in zebrafish larvae. Furthermore, combined exposure to DBP and BPA increased the frequency of spontaneous tail curling in zebrafish embryos. We also found that DBP alone exposure resulted in increased malondialdehyde (MDA) levels and induced increased levels of apoptosis in brain cells. Combined exposure of DBP and BPA elevated the concentration of the oxidative stress product malondialdehyde (MDA), upregulated the transcriptional levels of genes related to nervous system development, reduced the neurotransmitter serotonin levels (5-HT), increased the brain cells apoptosis rates and the relative mRNA expression levels of the apoptosis-related gene *bax*. These findings provided strong evidence of the potential neurotoxic effects of DBP and BPA, suggesting that they may disrupt normal brain development and function in fish. In addition, our results indicated that DBP and BPA had antagonistic effects on the combined interference of early embryonic development (heart rate, hatching rate) and larval motor capacity (motor speed, distance, frequency of manic state, duration of manic state, frequency of active state, and duration of active state). The transcriptional levels of genes related to nervous system development (*gfap*, *tph1b*, *th*, *syn2a* and *nestin*) showed a certain synergistic effect. Our findings suggested that the abnormal locomotor behavior in zebrafish induced by combined exposure to DBP and BPA may be linked to changes in the mRNA expression of genes related to nervous system development and neurotransmitter levels. Our research provided new insights into the toxic effects of single and combined exposure to DBP and BPA at environmentally relevant concentrations on fish embryonic development, behavior, and the nervous system. These findings will help evaluate the ecological risk of DBP and BPA more objectively and precisely, and also can provide basic data for further study on combined disruptive mechanism of DBP and BPA on nervous system development in aquatic animals.

Key Words: dibutyl phthalate (DBP); bisphenol A (BPA); combined exposure; motor behavior; zebrafish; neurodevelopment

近年来,塑料污染问题愈发严重,塑料制品在环境中老化,引起塑料添加剂的释放,导致大气、水环境以及土壤被污染。邻苯二甲酸二丁酯(DBP, Dibutyl phthalate)和双酚 A(BPA, Bisphenol A)都是常见的塑料添加剂,在日常生活中被广泛使用,它们在环境中难以降解,持久存在给人类和动物的健康带来严重威胁。

目前,在全世界大部分的河流湖泊中均可检测到 DBP,甚至在饮用水中也有 DBP 的检出^[1],其浓度一般受周围具体环境影响^[2-6]。在波兰,废水中 DBP 最高浓度为 366 $\mu\text{g/L}$,平均浓度为 33 $\mu\text{g/L}$ ^[7]。在我国,汾河流域 DBP 的平均检出浓度为 10.031 $\mu\text{g/L}$,最高检出浓度为 45.540 $\mu\text{g/L}$ ^[8];黄河下游支流水体中 DBP 检出浓度可达 26 $\mu\text{g/L}$ ^[9]。

BPA 及其类似物也广泛分布于全世界各地的水体中,如:中国^[10]、加拿大^[11]、土耳其^[12]等国的河流^[6]和海洋^[13]中,BPA 均被频繁检出。在发展中国家,地表水中的 BPA 浓度通常为 0.41—21 $\mu\text{g/L}$ ^[14-15]。在非洲,自然水体中的 BPA 检出水平最高可达 251 $\mu\text{g/L}$,在废水中甚至高达 384.8 $\mu\text{g/L}$ ^[16]。

邻苯二甲酸酯类具有神经毒性,可以影响神经系统相关基因的表达,引起动物运动缺陷和认知障碍^[17]。王鑫^[18]等研究发现,DEHP 暴露使雄性大鼠产生氧化应激,造成神经损伤,导致大鼠神经行为发生变化。DBP 暴露可使斑马鱼仔鱼雌激素受体表达异常,进而导致大脑萎缩和脑内神经元减少^[19],还可引起初级运动神经元发育中断和功能障碍^[20]。双酚类化合物同样可以损害动物神经系统,造成行为异常。如:BPAP 的早期暴露可损害仔鼠的探索行为和运动能力^[21];TCBPA 暴露可显著降低斑马鱼幼鱼游泳速度^[22];BPA 暴露可显著改变斑马鱼的探索行为^[23];BPG 暴露导致斑马鱼行为异常,社交行为显著改变^[24]。

越来越多的证据表明邻苯二甲酸酯类和双酚类化合物均可干扰动物神经系统功能和行为活动,但大多数

研究主要聚焦于它们各自单独的毒性效应,而有关其复合生态毒性效应研究相对较少,尤其是它们联合暴露水生生物导致的发育和神经毒性效应及相关机制尚不明确^[25]。然而,在自然水体环境中,这两类物质通常都以混合形态存在,单独评价这几种塑料添加剂的毒性作用可能无法真实全面地反映它们在水环境中的毒性效应。因此,探究它们复合污染对水生生物的联合毒性效应及其机制具有十分重要的实际意义。

鱼类终生生活在水中,水环境中广泛存在的 DBP 和 BPA 可通过鳃呼吸、皮肤渗透、食物链富集等方式进入鱼体,相互作用,共同干扰鱼类生长发育、运动行为等生命活动,进而威胁其生存和种群维持。本研究以斑马鱼(*Danio rerio*)为模式动物,探讨环境相关浓度的 DBP 与 BPA 单独及联合暴露对斑马鱼胚胎发育、运动行为和神经系统的影响。本研究结果将有助于对水环境中的 DBP 和 BPA 进行正确的生态风险评估,同时也能为邻苯二甲酸酯类和双酚类化合物联合干扰水生动物早期发育和行为机制研究提供基础资料。

1 材料方法

1.1 实验试剂材料

DBP(纯度>98%)和 BPA(纯度>99%)均购自 Sigma-Aldrich 试剂公司(St. Louis, MO, USA),使用二甲基亚砜(DMSO, Sigma, USA)作为助溶剂。乙酰胆碱酯酶(acetylcholinesterase, AChE)、超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)和丙二醛(malondialdehyde, MDA)试剂盒购买于南京建成生物工程研究所。斑马鱼多巴胺(dopamine, DA)试剂盒和 5-羟色胺(5-hydroxytryptamine, 5-HT)酶联免疫吸附测定(ELISA)试剂盒购买于慧嘉生物科技有限公司。

1.2 实验动物

4 月龄斑马鱼亲鱼(AB 系野生型)购自国家斑马鱼资源中心,雌雄亲鱼分开饲养于斑马鱼循环饲养系统中,水温控制在(28±0.5)℃,光照周期为 14 h 光照/10 h 黑暗,每天早晚按时投喂红虫和商品颗粒饲料。

本研究所用的斑马鱼胚胎均由本实验室饲养的成年斑马鱼繁殖获得,具体方法如下:在产卵前一天下午,按照雌雄比 2:3 将斑马鱼亲鱼放入繁殖盒内,雌雄亲鱼用隔板隔开,当天晚上七点关闭灯光,次日上午八点抽出隔板。待交配产卵完成后移除亲鱼,收集受精卵于培养皿中,用曝气过的水洗去斑马鱼胚胎上黏附的粪便和杂质。挑选发育正常的胚胎进行后续暴露实验。

1.3 斑马鱼胚胎的暴露培养

参考污水中 DBP 和 BPA 的浓度,本实验设置 DBP 和 BPA 的暴露浓度均为 100 μg/L。将 BPA 固体粉末溶于 DMSO 中配制成母液,使用蒸馏水稀释配制成 100 μg/L BPA 暴露液(暴露液中 DMSO 的浓度为 0.001%),100 μg/L DBP 暴露液的配置方法同 BPA 暴露液相同。挑选正常发育受精后 4 小时(4 hour post fertilization, 4 hpf)的斑马鱼胚胎,随机分入溶剂对照组(0.001% DMSO)、DBP 单独暴露组(DBP 100 μg/L)、BPA 单独暴露组(BPA 100 μg/L)和 DBP+BPA 联合暴露组(DBP 和 BPA 各 100 μg/L),每组设置 2 个平行培养皿,每个培养皿中加入 200 mL 的暴露液和 250 颗胚胎,置于 28℃ 恒温培养箱中进行培养。斑马鱼胚胎从 4 hpf 开始暴露,持续至受精后 7 天(7 day post fertilization, 7 dpf)结束,每天更换一半暴露液,及时清除死卵并记录数据。每组暴露培养重复三次。在被处死之前,所有鱼均用 MS-222(Sigma, USA)麻醉。

1.4 斑马鱼常规发育指标检测

斑马鱼常规发育指标包括心率、孵化率、死亡率、畸形率和体长。

在斑马鱼发育至 72 hpf 进行心率的测定,将斑马鱼置于体式显微镜下,在周围环境保持安静的情况下,观察并记录斑马鱼在 1 min 内的心跳次数,每组取 15 尾斑马鱼进行测定,每组包括三个重复。

在斑马鱼发育至 96 hpf 进行体长、孵化率、死亡率、畸形率的测定,在周围环境安静的情况下,使用体式显微镜观察并记录斑马鱼的以上指标,每组取 15 尾斑马鱼进行测定,每组包括三个重复。

1.5 斑马鱼自发性卷尾频率观察

斑马鱼胚胎的自发性卷尾频率可以用来评估斑马鱼胚胎的自主运动活力,方法如下:在斑马鱼胚胎发育

至 24—32 hpf 期间,每隔两小时进行一次观察,每次观察前先将斑马鱼胚胎在光照下适应 5 min,再使用体式显微镜记录 1 min 内胚胎摆尾次数,每组取 15 尾斑马鱼进行测定,每组包括三个重复。

1.6 斑马鱼运动行为分析

在斑马鱼仔鱼暴露至终点(7 dpf)时,进行仔鱼的运动行为分析,方法如下:取 24 孔板作为观测板,从各组中随机选择外观正常的斑马鱼仔鱼逐条转移至观测板中,每孔 1 尾仔鱼,每个 24 孔板中放置 6 条仔鱼,并加入 1 mL 暴露液。一个 24 孔板作为一组,一组为四个重复。在斑马鱼适应 5 min 后进行持续 20 min 的观测录像。所得录像采用 EthoVision® XT 14.0 软件进行分析。

1.7 神经递质水平检测

在斑马鱼暴露至 7 dpf 时,从各组中分别随机选取 30 尾鱼,置于 1.5 mL 的 EP 管中,吸干残余的水分,液氮速冻,作为一个样本,每组重复取样 3 次(即每组各 3 个样本)。每个 EP 管加入 200 μ L PBS 溶液,用研磨棒在冰上充分研磨,研磨完成后,在 4 $^{\circ}$ C 条件下,3000 rpm 条件下离心 20 min,取上清液,按照斑马鱼酶联免疫分析试剂盒(慧嘉生物)说明书的步骤和要求来测定 DA 和 5-HT 含量。

1.8 RNA 提取及基因表达分析

在斑马鱼暴露至 7 dpf 时,从各组中分别随机选取 30 尾鱼,置于 1.5 mL 的 RNase-Free EP 管中,吸干残余的水分,液氮速冻,作为一个样本,-80 $^{\circ}$ C 冰箱冷藏,每个处理组取 6 个样本。参考前人研究^[26],使用 TRIzol 一步法提取样本总 RNA。测定总 RNA 的浓度和纯度,在确认符合要求后,通过反转录试剂盒(Invitrogen)将 RNA 合成为 cDNA 第一链。使用 SYBR Green 荧光定量 PCR 试剂盒(CoWin Biosciences(CWBIO))和实时荧光定量 PCR 仪(Bio-Rad,CFX96)检测相关基因表达水平。PCR 反应条件如下:95 $^{\circ}$ C 预变性 10 min,95 $^{\circ}$ C 变性 15 s,60 $^{\circ}$ C 退火 1 min,循环反应 40 次;循环完成后,将温度升至 95 $^{\circ}$ C,持续 10 s,然后升至 65 $^{\circ}$ C,持续 1 min;最后加热至 95 $^{\circ}$ C,以获得聚合酶链式反应产物的溶解曲线。以 β -actin 作为内参,使用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法进行目的基因表达水平的相对定量分析,目的基因与内参引物序列如表 1 所示。

表 1 引物序列
Table 1 Primer sequence

基因 Gene	引物序列(5'-3') Primer sequence	序列号 Sequence number
<i>β-actin</i>	Forward: AATTGCCGCACTGGTTGTG Reverse: ACCAACCATGACACCCTGATG	NM_181601.5
<i>bcl2</i>	Forward: AATGGAGGTTGGGATGCCTT Reverse: CCAAGCCGAGCACTTTTGT	NM_001030252.2
<i>bax</i>	Forward: CAGGGTGGATGGGACGGAAT Reverse: TCGGAATCACCAATGCTGTG	NM_131562.2
<i>syn2a</i>	Forward: GTTCTGATCCGGCAACATGC Reverse: CAGACATGCAAATGCCAGG	NM_001002597.2
<i>nestin</i>	Forward: TCAACATCTTCAGGCCCAAGT Reverse: CCACCTCCAGTCCAAGAGAC	XM_001919887.7
<i>gfap</i>	Forward: TTCAAGACGAGACTGCCCTG Reverse: GCCGCTTCATCCACATCTTGT	NM_131372.2
<i>tph1b</i>	Forward: GGACTCCTGCAAGCGATCTTA Reverse: GAATCCCGGATGATCTGCCT	NM_001001842.2
<i>th</i>	Forward: GCTCTCAGCAGCGGATTTTT Reverse: TCATGGACGCAATCCGGTTC	NM_131149.1

1.9 氧化应激和乙酰胆碱酯酶的酶活力检测

在斑马鱼暴露至 3 dpf 和 7 dpf 时,从每个处理组中随机选取 30 尾鱼,置于 1.5 mL 的 EP 管中,吸去多余的液体后,液氮速冻,作为一个样本,每个处理组取 3 个样本。每个 EP 管加入 200 μ L PBS 溶液,用研磨棒在冰上充分研磨,研磨完成后,4 $^{\circ}$ C 条件下 3000 rpm 条件下离心 10 min,取上清液,按照试剂盒说明书的方法和

步骤(南京建成生物)进行 SOD、MDA 和 AChE 的酶活力检测和样品蛋白浓度测定。

1.10 原位荧光 TUNEL 染色检测脑部细胞凋亡

每组选取 30 尾 96 hpf 仔鱼,使用 4% 多聚甲醛溶液固定,石蜡固定后制成切片,TUNEL 染色观察脑细胞凋亡情况。使用 Image J 软件分析光密度。

1.11 统计与分析

采用 SPSS 26.0 软件进行数据统计分析。实验数据确认符合正态分布及方差齐性后,通过单因素方差分析(one-way ANOVA)并以 Tukey 检验进行多重比较, $P < 0.05$ 表示差异显著。所有数值以均值 \pm 标准误($\bar{x} \pm$ SEM)表示,利用 Graph Pad 9.2.1 软件进行绘图。

2 结果

2.1 DBP 和 BPA 单独及联合暴露对斑马鱼仔鱼胚胎发育和氧化应激的影响

2.1.1 对胚胎发育的影响

心率是评估斑马鱼早期发育状况的重要指标,如图 1 所示,DBP 和 BPA 单独和联合暴露均影响了斑马鱼胚胎的心率。在胚胎发育至 48 hpf 时,与对照组相比,BPA 单独暴露组、DBP 单独暴露组和 BPA+DBP 联合暴露组斑马鱼胚胎的心率显著下降,分别降低了 10.61%、17.98% 和 23.97% ($P < 0.05$)。在胚胎发育至 72 hpf 时,与对照组相比,BPA 单独暴露组、DBP 单独暴露组和 BPA+DBP 联合暴露组斑马鱼胚胎的心率分别下降了 17.62%、23.83% 和 23.86% ($P < 0.05$)。总体来看,心率随着时间的推移而有所增加,但在各个时间段内各暴露组的心率普遍低于对照组。

图 2 显示了 48 hpf 至 96 hpf 各组斑马鱼胚胎的孵化率。结果显示,BPA 和 DBP 暴露均刺激了斑马鱼胚胎的孵化,导致斑马鱼胚胎出膜时间提前,总孵化时间减少。在斑马鱼胚胎发育至 48 hpf 时,BPA 单独暴露组、DBP 单独暴露组和 BPA+DBP 联合暴露组的斑马鱼孵化率与对照组相比较显著升高 ($P < 0.05$),各暴露组的孵化率分别提高了 2.49 倍、4.96 倍和 4.27 倍。斑马

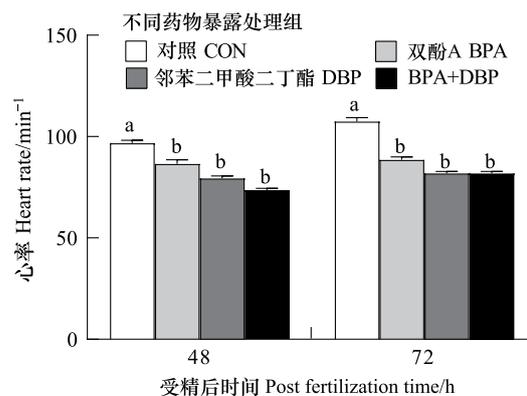


图 1 48 hpf 及 72 hpf 各组斑马鱼胚胎的心率

Fig.1 Heart rate of zebrafish embryos in each group at 48 hpf and 72 hpf

柱形图中字母不同表示不同组别之间具有显著差异性 ($P < 0.05$)

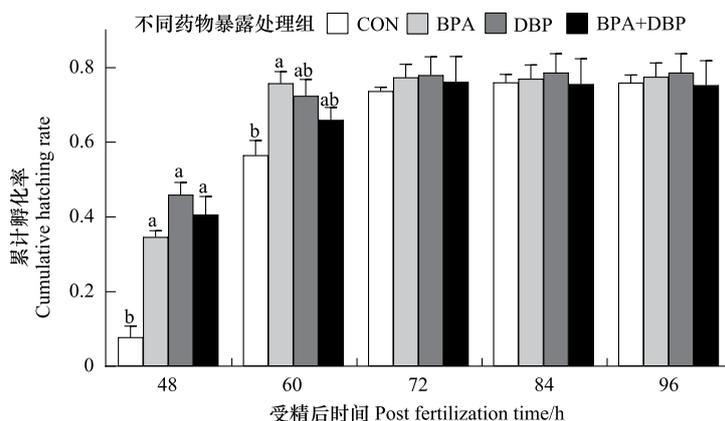


图 2 48 hpf—96 hpf 各组斑马鱼胚胎的累计孵化率

Fig.2 Cumulative hatching rate of zebrafish embryos in each group from 48 hpf to 96 hpf

柱形图中字母不同表示不同组别之间具有显著差异性 ($P < 0.05$)

鱼胚胎发育至 60 hpf 时,四组的孵化率均超过了 50%,其中 BPA 暴露组孵化率仍显著高于对照组($P<0.05$),孵化率为对照组的 1.33 倍。从 72 hpf 开始,各组总孵化率无明显差异。

如图 3 所示,实验中采集到的斑马鱼胚胎畸形类型主要包括心包膜出血、歪尾、脊柱畸形和卵黄囊肿大,各暴露组的畸形率与对照组相比略有升高,但无显著差异。如图 4 所示,BPA 和 DBP 单独和联合暴露导致 96 hpf 斑马鱼仔鱼体长缩短($P<0.05$),但对其死亡率无明显影响。

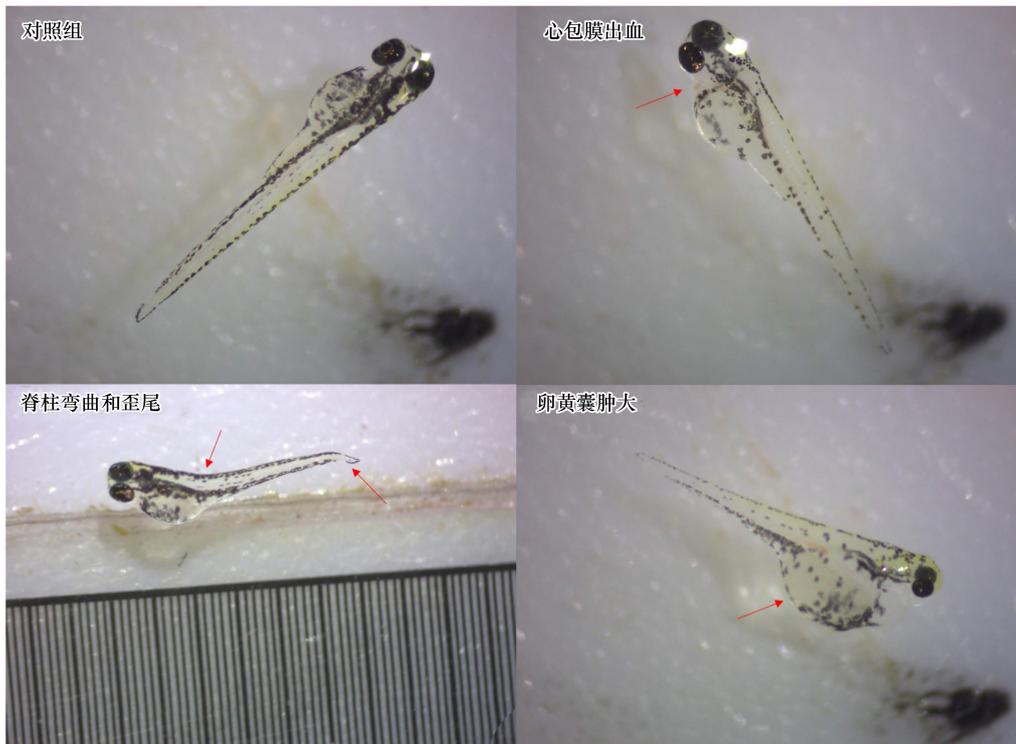
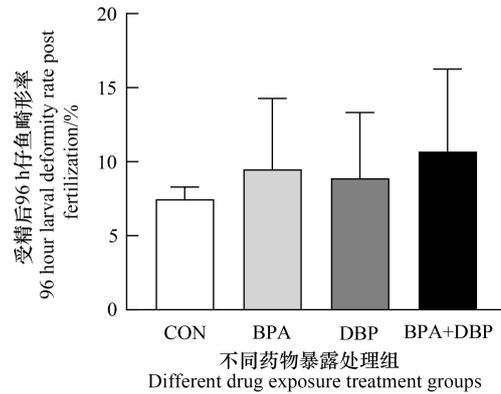


图 3 实验各组中的斑马鱼畸形类型及畸形率

Fig.3 Deformities and malformation rate of zebrafish in each experimental group

柱形图中字母不同表示不同组别之间具有显著差异性($P<0.05$)

各组斑马鱼自发性卷尾频率如图 5 所示,在斑马鱼胚胎发育至 24—32 hpf 时,斑马鱼的自发性卷尾次数随着时间的推移而减少。在 24、26、30、32 hpf 时,DBP 和 BPA 联合暴露胚胎自发卷尾频率均显著高于对照组($P<0.05$),DBP 和 BPA 单独暴露组胚胎自发卷尾频率相较于对照组略有升高,但差异不明显。

2.1.2 对氧化应激的影响

各组斑马鱼胚胎发育至 3 dpf 和 7 dpf 时的 SOD 酶活力和 MDA 含量如图 6 所示。三个暴露组 SOD 酶活

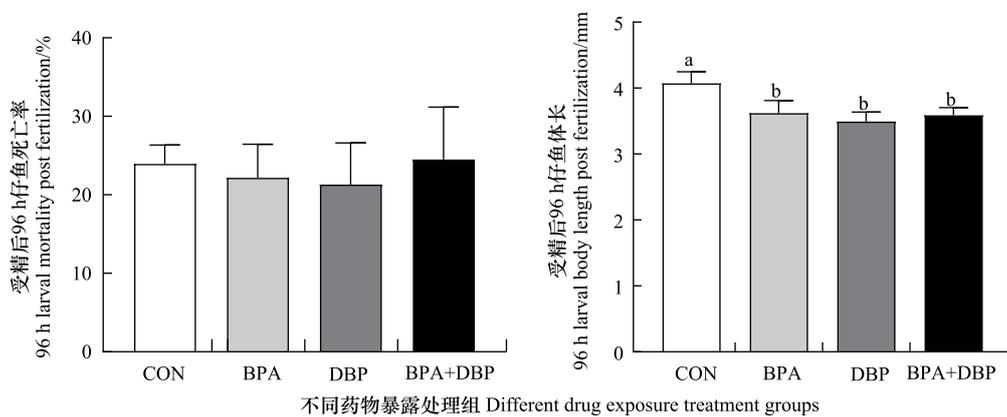


图 4 96 hpf 各组斑马鱼胚胎的死亡率和体长

Fig.4 Mortality and body length of zebrafish embryos in each group at 96 hpf

柱形图中字母不同表示不同组别之间具有显著差异性 ($P < 0.05$)

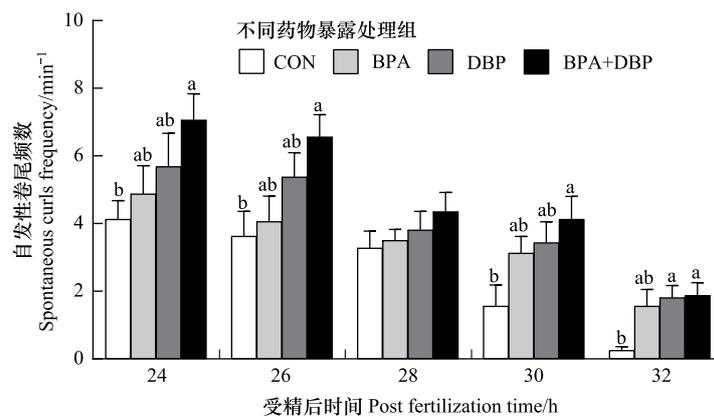


图 5 24—32 hpf 各组斑马鱼的自发性卷尾频数柱状图

Fig.5 Bar plots of spontaneous curls frequency in zebrafish from 24 hpf to 32 hpf

柱形图中字母不同表示不同组别之间具有显著差异性 ($P < 0.05$)

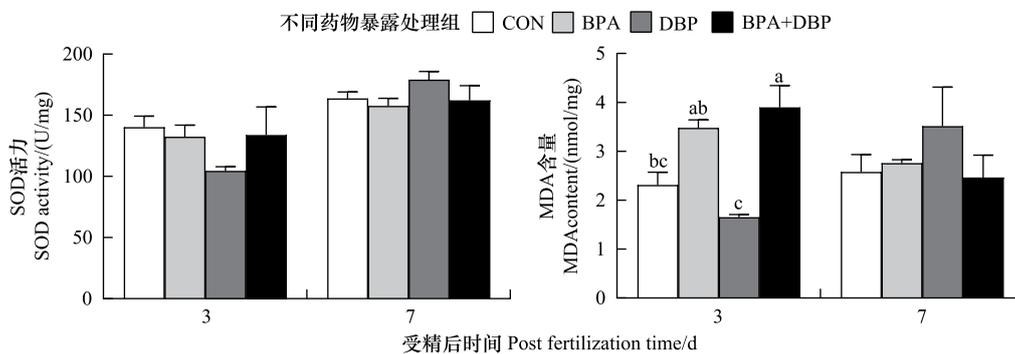


图 6 3 dpf 和 7 dpf 各组斑马鱼的 SOD 活性和 MDA 含量

Fig.6 SOD activities and MDA contents of zebrafish in 3 dpf and 7 dpf groups

SOD:超氧化物歧化酶 Superoxide dismutase; MDA:丙二醛 Malondialdehyde;柱形图中字母不同表示不同组别之间具有显著差异性 ($P < 0.05$)

力相较于对照组均无明显差异。斑马鱼胚胎发育至 3 dpf 时, BPA+DBP 联合暴露组的 MDA 含量与对照组相比显著上升 ($P < 0.05$), 是对照组的 1.69 倍, 其余组与对照组相比无显著差异。斑马鱼胚胎发育至 7 dpf 时, MDA 含量在各组之间均无明显差异。

2.2 DBP 和 BPA 单独及联合暴露对斑马鱼仔鱼运动行为的影响

利用 EthoVision® XT 14.0 软件对 7 dpf 的斑马鱼仔鱼运动行为进行分析,共检测了 14 个行为学指标,分别为平均运动速度、运动距离、运动累计时间、静止累计时间、最大加速度、最小加速度、轨迹平均半径、蜿蜒度、狂躁状态频率、狂躁状态持续时间、活跃状态频率、活跃状态持续时间、静止状态频率和静止状态持续时间。在这 14 个行为学指标中,四个实验组的运动速度、运动距离、狂躁状态频率、狂躁状态持续时间、活跃状态频率、活跃状态持续时间共计 6 个指标出现了显著差异($P<0.05$)。

如图 7 所示,DBP 单独暴露组和 BPA+DBP 联合暴露组斑马鱼的平均运动速度均显著提高($P<0.05$),分别为对照组的 3.52 倍和 2.96 倍;总游动距离相较于对照组也显著增加($P<0.05$)。如图 8 所示,DBP 单独暴露和 BPA+DBP 联合暴露均刺激提高了斑马鱼仔鱼的运动能力,具体表现为狂躁状态频率、活跃状态频率、活跃状态持续时间大幅增加($P<0.05$)。DBP 暴露还导致斑马鱼仔鱼的狂躁状态持续时间延长($P<0.05$)。BPA 暴露对斑马鱼各项运动行为指标均无明显影响。

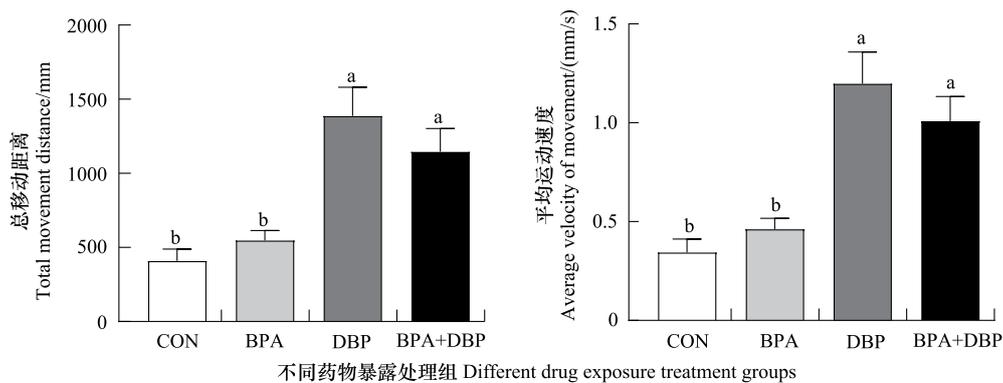


图 7 7 dpf 各组斑马鱼的平均运动速度和总运动距离

Fig.7 Average moving speed and total moving distance of zebrafish in each 7 dpf group

柱形图中字母不同表示不同组别之间具有显著差异性($P<0.05$)

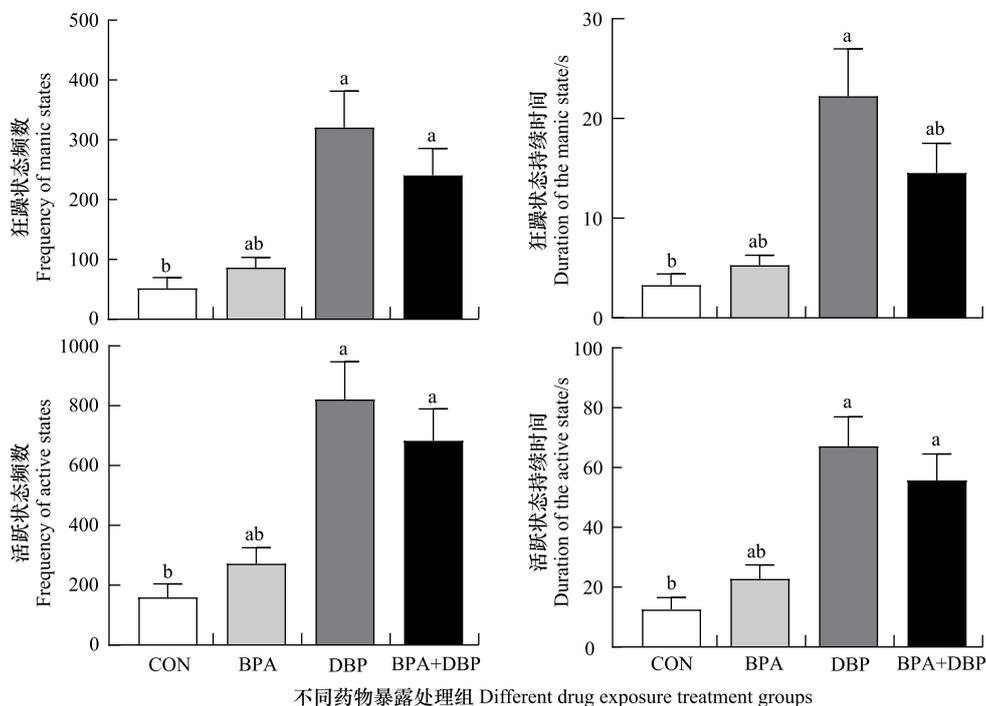


图 8 7 dpf 各组斑马鱼的活动状态以及状态持续时间

Fig.8 Activity state and duration of zebrafish in each 7 dpf group

柱形图中字母不同表示不同组别之间具有显著差异性($P<0.05$)

另外,从总体上来看,DBP 和 BPA 暴露对斑马鱼的运动轨迹也产生一定干扰。如图 9 所示,与对照组相比,DBP 和 BPA 单独和联合暴露组的运动轨迹较为杂乱。

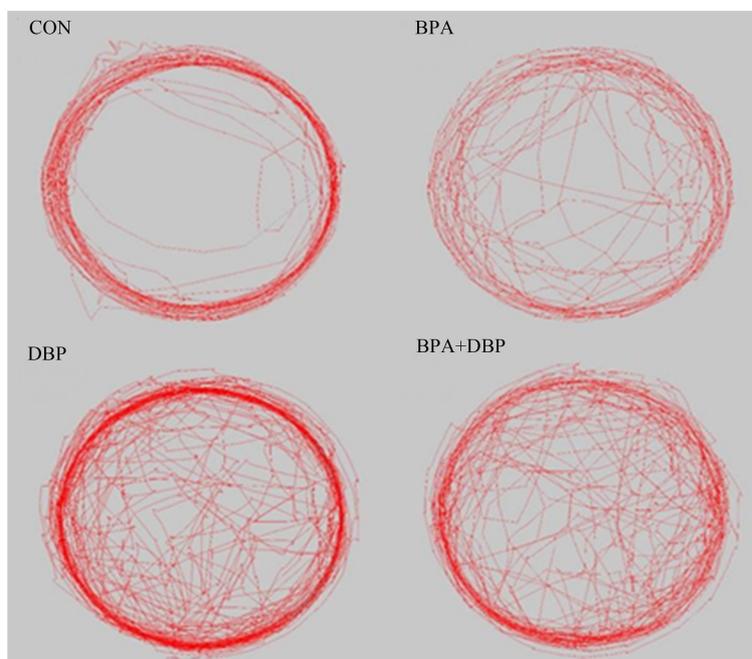


图 9 四组斑马鱼仔鱼的运动轨迹典型图

Fig.9 Typical plots of the trajectories of four groups of juvenile zebrafish

2.3 DBP 和 BPA 单独及联合暴露对斑马鱼神经系统的影响

2.3.1 DBP 和 BPA 单独及联合暴露对斑马鱼神经递质和神经发育相关基因表达的影响

5-HT 和 DA 是两种经典神经递质,在调节鱼类运动行为中发挥重要作用。如图 10 所示,与对照组相比较,BPA 组、DBP 组和 BPA+DBP 组的 5-HT 水平被显著抑制($P < 0.05$),分别降低了 11.08%、13.38% 和 16.22%;DA 水平在各暴露组呈现降低趋势,但相较于对照组无明显差异。乙酰胆碱酯酶可将乙酰胆碱水解为胆碱和乙酸,在胆碱能神经传递过程中具有关键作用,被广泛用作评估环境污染物神经毒性的重要指标。本实验中,斑马鱼经 BPA 和 DBP 单独和联合暴露后,AChE 活性均无明显改变。

在斑马鱼胚胎暴露至 7 dpf 时,对神经系统发育相关基因(*gfap*、*syn2a* 和 *nestin*)和神经递质合成相关基因(*tph1b* 和 *th*)进行相对表达量的检测,结果如图 10 所示。与对照组相比较,BPA 和 DBP 联合暴露显著上调了 *gfap*、*syn2a*、*tph1b*、*th* 和 *nestin* 的表达水平($P < 0.05$);而 DBP 和 BPA 单独暴露对上述基因相对表达量均无明显影响。

2.3.2 DBP 和 BPA 单独及联合暴露对斑马鱼仔鱼脑部细胞凋亡的影响

TUNEL 染色后,凋亡细胞呈现绿色荧光。如图 11 所示,DBP 单独暴露组斑马鱼脑部细胞凋亡率显著高于对照组($P < 0.05$),其它各组之间无显著差异。荧光定量 PCR 结果显示,凋亡相关基因 *bax* 的相对表达量在各暴露组中相较于对照组均显著上调($P < 0.05$),*bcl2* 的表达量无明显改变(图 11)。

3 讨论

DBP 和 BPA 作为塑料添加剂在环境中被广泛检出,它们两者均具有神经毒性。有研究发现,DBP 暴露可使小鼠出现空间学习和记忆障碍,诱发类似焦虑的行为,并且导致大脑中神经元数量减少和神经炎症^[27-28]。DBP 暴露可显著抑制斑马鱼的自发运动,促进其焦虑水平升高^[29];也可导致斑马鱼出现由血管神经支配的神经元模式的紊乱^[30]。低浓度的 DBP 还能够诱导斑马鱼大脑的氧化损伤和遗传毒性^[31]。BPA 暴

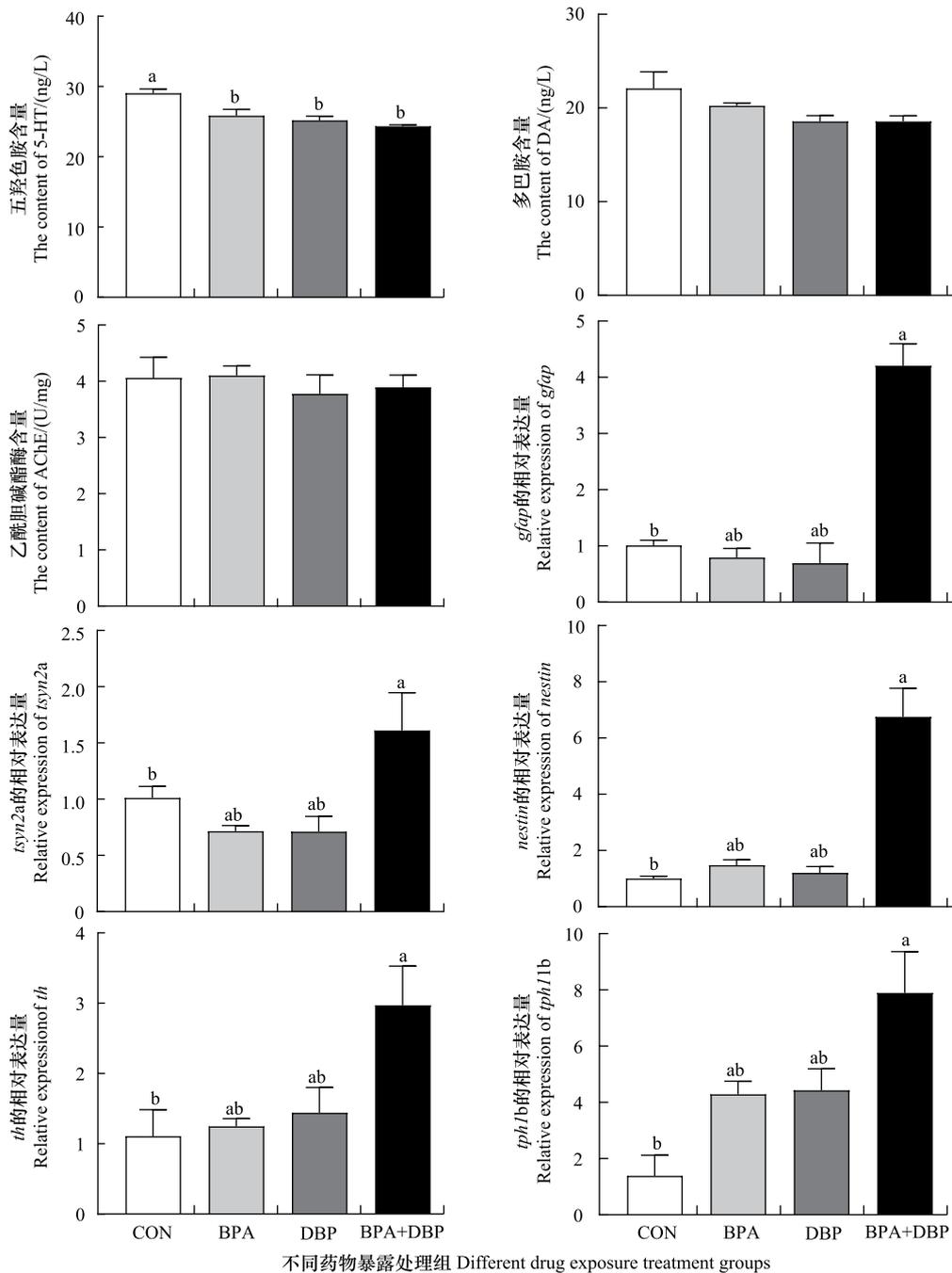


图 10 各组斑马鱼体内的神经递质活性及神经相关基因的相对表达量

Fig.10 Neurotransmitter activity and expression of neural-related genes in zebrafish of each group

5-HT: 5-羟色胺 5-hydroxytryptamine; DA: 多巴胺 Dopamine; AChE: 乙酰胆碱酯酶 Acetylcholinesterase; 柱形图中字母不同表示不同组别之间具有显著差异性 ($P < 0.05$)

露可导致斑马鱼幼鱼新生神经元细胞的数量下降, 脑部凋亡细胞明显增加, 对中枢神经系统发育产生影响^[32]; BPA 暴露可导致大鼠神经变性、认知障碍和突触可塑性的改变^[33]。上述研究证实了 DBP 和 BPA 二者单独的神经毒性效应, 但关于二者联合暴露对水生动物神经系统功能和行为等方面的影响的研究仍然不足。本研究探讨了环境相关浓度的 BPA 和 DBP 单独和联合暴露对斑马鱼胚胎早期发育、运动行为和神经系统的影响, 有助于水环境中 BPA 和 DBP 的生态风险评估。

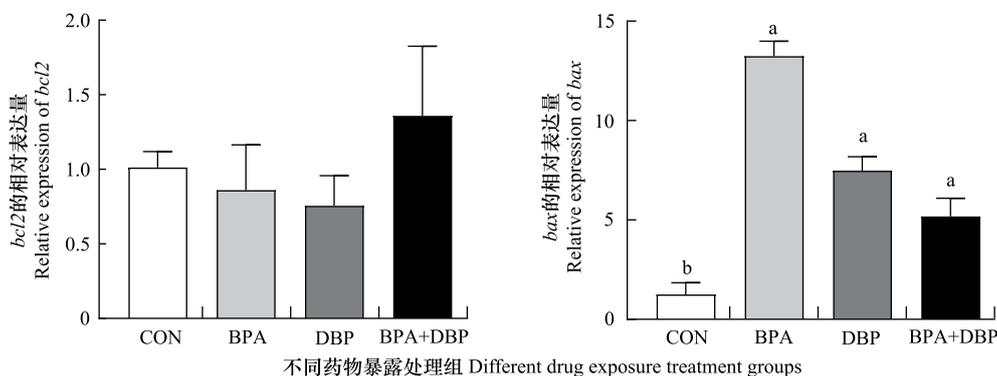


图 11 各组斑马鱼的凋亡相关基因的相对表达量

Fig.11 Relative expression levels of apoptosis-related genes of zebrafish in each group

柱形图中字母不同表示不同组别之间具有显著差异性 ($P < 0.05$)

心率、体长、畸形率、孵化率等常规指标可以比较直观地反映鱼类胚胎的发育状况。本实验中, BPA 和 DBP 的单独和联合暴露均显著降低了斑马鱼胚胎的心率, 表明 BPA 和 DBP 暴露可以影响斑马鱼心脏早期发育, 这与潘睿^[34]和穆希岩等人^[35]的研究结果一致。王伟等人发现, 浓度为 5.7 mg/L 的 BPA 可以使斑马鱼胚胎的孵化率下降^[36]。陈朋宇等的研究证明, 低浓度 (1.5—2.5 mg/L) 的 DBP 对于斑马鱼胚胎的孵化具有一定的促进作用, 但在高浓度 (3.5—4 mg/L) 情况下则会延缓孵化, 导致斑马鱼胚胎的孵化率下降^[37]。本研究中, DBP 和 BPA 暴露并未延迟斑马鱼孵化, 相反, DBP 和 BPA 单独及联合暴露均促进了斑马鱼的孵化, 导致了斑马鱼胚胎的总孵化时间缩短, 但对总孵化率并无明显影响。上述结果表明, 较低浓度 (100 $\mu\text{g/L}$) 的 BPA 和 DBP 对斑马鱼的孵化并无抑制作用, 反而可以刺激斑马鱼胚胎提前出膜。DBP 和 BPA 作为两种典型的环境内分泌干扰物, 已被证明可以导致斑马鱼胚胎中存在的几乎所有脂质家族 (磷脂酰胆碱、溶血磷脂酰胆碱、二酰基甘油) 的增加, 其含量增加可以促进斑马鱼胚胎卵黄囊吸收^[38—39], 本研究中斑马鱼胚胎孵化进程加快可能正是由这种作用导致的。另外, BPA 暴露会影响鱼类心肌收缩代谢通路及体内甲状腺相关激素水平^[40], 邻苯二甲酸酯类暴露同样会产生甲状腺内分泌毒性^[41], 这可能是导致本研究中斑马鱼胚胎心率改变的原因。这也证明了环境相关浓度的 DBP 和 BPA 单独和联合暴露对斑马鱼胚胎发育均具有一定的毒性效应。

机体通过酶系统与非酶系统产生氧自由基, 大量聚集的氧自由基可对脑部血管产生损伤, 进而损害神经组织。SOD 可促进氧自由基的消除, 在机体的抗氧化过程中发挥重要作用。在体内, 氧自由基可发生脂质过氧化作用, 并形成脂质过氧化物, 这些过氧化物可攻击细胞, 造成组织损伤。MDA 是脂质过氧化作用的一种产物, MDA 的含量通常可以反映出机体受自由基攻击的严重程度, 常常与 SOD 的测定相互配合。本研究中, 斑马鱼胚胎发育至 3 dpf 时, BPA+DBP 联合暴露组的 MDA 含量与对照组相比显著上升, 而到 7 dpf 时, 各暴露组的斑马鱼胚胎体内的 SOD 活性与 MDA 含量与对照组相比均无显著性差异。这可能是由于在胚胎发育的早期阶段, 机体受到的联合暴露影响较大, 并且其对氧化和抗氧化平衡的调节能力较弱。然而, 随着胚胎的发育, 这种调节能力逐渐增强。此外, 由于两种化合物的暴露浓度较低, 随着暴露时间的增加, 机体可能对化合物产生了一定的耐受性, 因此, 7 dpf 暴露组斑马鱼仔鱼体内的 SOD 和 MDA 水平恢复正常。李专等研究发现, 毫克级别的 BPA 暴露斑马鱼胚胎 24 h 后其 SOD 活性和 MDA 含量均发生明显变化^[42]。后续研究中可以通过增加暴露剂量、改变暴露时间等方式进一步探讨。

鱼类行为活动变化是评估水体污染物对鱼类影响的最为直观和敏感的指标。本实验中, 100 $\mu\text{g/L}$ 的 BPA 和 DBP 单独和联合暴露组斑马鱼胚胎的自发性卷尾频数以及仔鱼的运动速度和运动距离均显著增加, 活跃度也显著升高, 运动轨迹更为杂乱。韩晓雯等人的研究表明, 当 BPA 的暴露浓度较高时 (2500 $\mu\text{g/L}$), 这种对运动行为的促进效应则转变为抑制效应, 具体表现为运动速度下降和运动距离减少^[32]。另有研究发

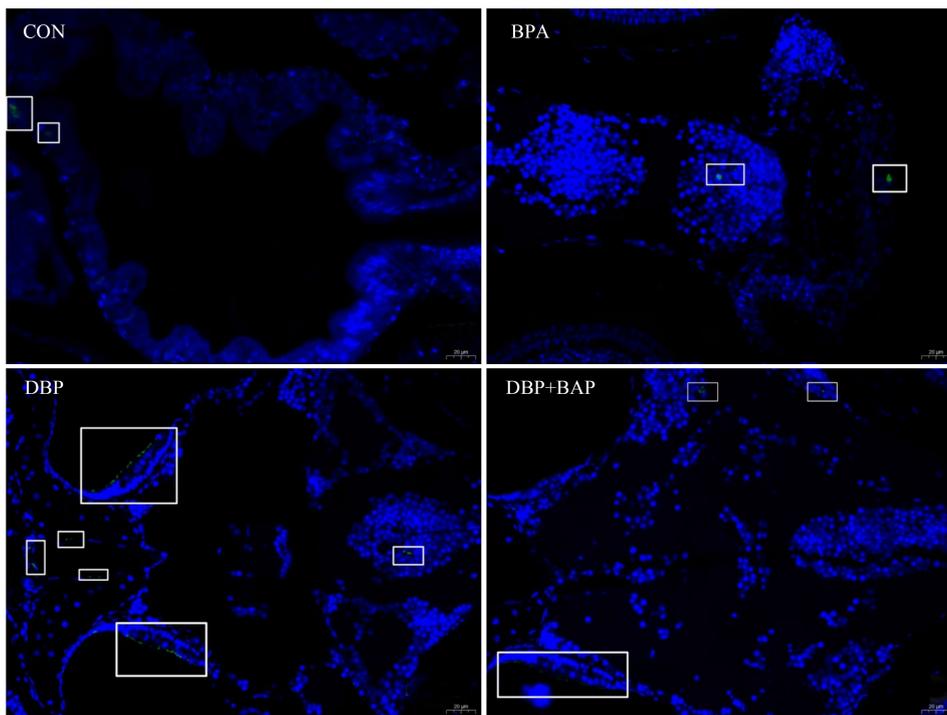
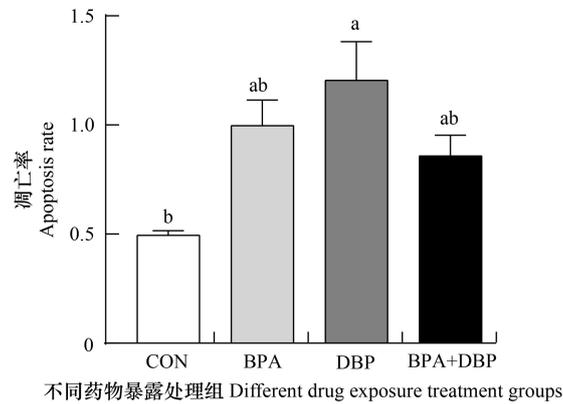


图 12 各组斑马鱼脑部凋亡率

Fig.12 Brain apoptosis rate of zebrafish in each group

柱形图中字母不同表示不同组别之间具有显著差异性 ($P < 0.05$)

现, DBP 暴露浓度为 $50 \mu\text{g/L}$ 时, 斑马鱼胚胎的运动速度、运动距离等行为指标出现大幅上升; 而当暴露浓度为 $250 \mu\text{g/L}$ 时, 部分斑马鱼胚胎的运动能力受到抑制^[29]。上述研究结果表明 BPA 和 DBP 对斑马鱼运动行为的影响与它们的暴露浓度密切相关, 通常呈现低浓度促进、高浓度抑制的效应。本实验中环境相关浓度的 BPA 和 DBP 单独及联合暴露对斑马鱼的运动行为均产生了干扰, 刺激增强了斑马鱼胚胎及仔鱼的运动活力, 这种现象可能是由于中枢神经系统的功能被扰乱, 从而导致行为异常。

鱼类行为受到神经功能调节和神经传递的高度影响, 神经传递过程涉及许多分子成分, 其中, 多巴胺能和血清素能神经递质参与鱼类发育、行为和生理过程的调节, 包括焦虑和情感状态^[43]。本研究中, BPA 和 DBP 暴露导致斑马鱼体内 5-HT 和 DA 水平降低, 表现出运动行为异常。前人研究发现, 花斑拟腹丽鱼经 DBP 暴露后 DA 含量显著降低, 鱼脑的神经递质系统被破坏^[44]。口服 DBP 的大鼠的大脑组织发生氧化应激^[45], 这种氧化应激与多巴胺水平的降低以及参与多巴胺传递的主要神经递质的改变有关^[46]。急性暴露于 BPA 导致斑马鱼仔鱼中的 DA 含量显著下降^[47]。BPA 暴露可抑制多巴胺神经元分化, 导致多巴胺神经元数量减少,

多巴胺表达量下降^[48]。BPA 暴露对尼罗罗非鱼也具有明显的神经毒性效应^[49]。上述研究结果均表明,BPA 和 DBP 暴露确实可对多巴胺神经造成损害,改变相关神经递质表达水平,从而导致运动行为异常。本研究中,我们还检测了影响体内 5-HT 和 DA 合成的色氨酸羟化酶 *tph1b* 和酪氨酸羟化酶 *th* 的相对表达量,结果显示,BPA 和 DBP 联合暴露显著上调了 *tph1b* 和 *th* 的表达水平,这种基因的表达水平和神经递质水平呈现不一致(基因表达量高,而对应神经递质水平低),原因可能与神经递质的反馈调节有关,具体机制还有待后续进一步探索。

本研究还检测了影响神经系统正常功能的另外 3 个关键基因(*gfap*、*syn2a* 和 *nestin*)的相对表达水平。GFAP 是一种在中枢神经系统的星形胶质细胞中表达的中间丝蛋白,被认为是神经毒性的标志物^[50],在包括艾滋病在内的各种神经退行性疾病中都有观察到 GFAP 的异常表达^[51]。另外,GFAP 聚合的中断可干扰谷氨酸的运输和新陈代谢,诱导谷氨酸介导的神经兴奋性毒性效应^[52]。*Nestin* 是一种在中枢神经系统发育过程中在神经上皮中表达的细胞骨架蛋白,主要分布在神经前体细胞中^[53],参与神经干细胞的迁移和收缩^[54]。*syn2a* 参与神经递质谷氨酸(Glu)的释放,并参与维持谷氨酸突触小泡储备池的稳定性^[55],有研究证实 BPA 单独暴露可使 *syn2a* 基因的表达水平下降^[17]。本研究中,*gfap*、*syn2a* 和 *nestin* 基因的表达水平仅在 BPA 和 DBP 联合暴露组斑马鱼中被显著上调,由此可以推测,DBP 和 BPA 联合暴露主要通过影响谷氨酸介导的兴奋传导过程,损伤神经系统的正常功能,刺激斑马鱼仔鱼的运动行为。

Bax 和 *bcl2* 是参与细胞凋亡过程的重要基因。*Bcl2* 基因是一种癌基因,能增强细胞对大多数 DNA 损伤因子的抵抗性,抑制细胞凋亡^[56]。*Bax* 广泛表达在人体各种细胞中,可促进细胞凋亡,是人体最主要的凋亡基因^[57]。本研究中 DBP 和 BPA 单独和联合暴露组斑马鱼 *bax* 基因的相对表达量均显著上调($P < 0.05$),*bcl2* 的表达量均无显著性差异。同时,各组凋亡率与对照组相比均有所升高,这说明 BPA 和 DBP 暴露可能导致脑部细胞凋亡增加,引起神经系统损伤。据此我们推测,本实验中斑马鱼仔鱼的运动行为障碍可能由以下因素引起:脑部细胞凋亡的增加和多巴胺能神经元的损伤。这种神经元损伤可能导致了体内 5-HT 和 DA 合成相关基因——色氨酸羟化酶(*tph1b*)和酪氨酸羟化酶(*th*)的异常表达。这些基因的异常表达可能导致了神经递质 DA 和 5-HT 含量的异常,最终影响了斑马鱼仔鱼的运动行为。

DBP 和 BPA 通常复合存在于天然水体中,单独评价它们的毒性作用可能无法真实全面地反映它们在水环境中的毒性效应,因此,对它们进行联合毒性作用研究更具实际意义。本研究结果显示,DBP 和 BPA 单独和联合暴露均可导致斑马鱼胚胎发育和运动行为异常,但联合暴露组的毒性效应小于 DBP 和 BPA 单独暴露组的毒性效应之和,这表明 DBP 和 BPA 在联合影响斑马鱼胚胎早期发育和运动行为方面可能具有一定的拮抗作用。荧光定量 PCR 结果显示,DBP 和 BPA 联合暴露导致斑马鱼神经系统发育相关基因转录水平升高,且联合暴露组的效应高于 DBP 和 BPA 单独暴露组的效应之和,这提示 DBP 和 BPA 在联合干扰斑马鱼神经发育方面可能具有一定的协同作用,DBP 和 BPA 的联合神经毒性效应相较于它们各自单独的神经毒性效应可能更强,因此,在对这两类化合物进行风险评估时需慎重考虑。

4 结论

本研究确定了环境相关浓度的 DBP 和 BPA 单独和联合暴露对鱼类胚胎发育、行为和神经系统的毒性效应,有助于这两类污染物在水环境中的全面风险评估。研究结果表明,DBP 和 BPA 联合暴露引起的斑马鱼运动行为异常可能与神经发育相关基因表达和神经递质水平改变以及脑部细胞凋亡等有关,但具体毒性效应机制尚不完全清楚。因此,未来还需进一步探究 DBP 和 BPA 的毒性作用机制和神经毒性分子靶点。

参考文献(References):

- [1] Wang X F, Lou X M, Zhang N H, Ding G Q, Chen Z J, Xu P W, Wu L Z, Cai J M, Han J L, Qiu X T. Phthalate esters in main source water and drinking water of Zhejiang Province (China): Distribution and health risks. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 2015, 34(10): 2205-2212.

- [2] Schmidt N, Fauvelle V, Ody A, Castro-Jiménez J, Jouanno J, Changeux T, Thibaut T, Sempéré R. The Amazon River: a major source of organic plastic additives to the tropical North Atlantic? *Environmental Science & Technology*, 2019, 53(13): 7513-7521.
- [3] Sun C Z, Chen L Y, Zhao S S, Guo W, Luo Y D, Wang L, Tang L, Li F M, Zhang J. Seasonal distribution and ecological risk of phthalate esters in surface water and marine organisms of the Bohai Sea. *Marine Pollution Bulletin*, 2021, 169: 112449.
- [4] Teil M J, Blanchard M, Dargnat C, Larcher-Tiphagne K, Chevreuil M. Occurrence of phthalate diesters in rivers of the Paris district (France). *Hydrological Processes*, 2007, 21(18): 2515-2525.
- [5] Wen Z D, Huang X L, Gao D W, Liu G, Fang C, Shang Y X, Du J, Zhao Y, Lv L L, Song K S. Phthalate esters in surface water of Songhua River watershed associated with land use types, Northeast China. *Environmental Science and Pollution Research International*, 2018, 25(8): 7688-7698.
- [6] Shehab Z N, Jamil N R, Aris A Z. Occurrence, environmental implications and risk assessment of Bisphenol A in association with colloidal particles in an urban tropical river in Malaysia. *Scientific Reports*, 2020, 10(1): 20360.
- [7] Kotowska U, Kapelewska J, Sawczuk R. Occurrence, removal, and environmental risk of phthalates in wastewaters, landfill leachates, and groundwater in Poland. *Environmental Pollution*, 2020, 267: 115643.
- [8] 韩文辉, 赵颖, 党晋华, 熊莲. 汾河流域邻苯二甲酸酯的分布特征及生态风险评价. *环境化学*, 2017, 36(6): 1377-1387.
- [9] 沙玉娟, 夏星辉, 肖翔群. 黄河中下游水体中邻苯二甲酸酯的分布特征. *中国环境科学*, 2006, 26(1): 120-124.
- [10] Wang Q X, Zhang Y, Feng Q Y, Hu G J, Gao Z Q, Meng Q J, Zhu X Q. Occurrence, distribution, and risk assessment of bisphenol analogues in Luoma Lake and its inflow rivers in Jiangsu Province, China. *Environmental Science and Pollution Research International*, 2022, 29(1): 1430-1445.
- [11] Lalonde B, Garron C. Spatial and temporal distribution of BPA in the Canadian freshwater environment. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 2020, 78(4): 568-578.
- [12] Ozhan K, Kocaman E. Temporal and spatial distributions of bisphenol A in marine and freshwaters in Turkey. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 2019, 76(2): 246-254.
- [13] Biswal A, Srivastava P P, Shamna N, Kumar M. Plastic originated bisphenol A; a potential endocrine disruptor for fish reproduction. *International Journal of Chemical Studies*, 2020, 8(1): 2085-2089.
- [14] Berger A, Ziv-Gal A, Cudiamat J, Wang W, Zhou C Q, Flaws J A. The effects of *in utero* bisphenol A exposure on the ovaries in multiple generations of mice. *Reproductive Toxicology*, 2016, 60: 39-52.
- [15] Idowu G A, David T L, Idowu A M. Polycarbonate plastic monomer (bisphenol-A) as emerging contaminant in *Nigeria*: Levels in selected rivers, sediments, well waters and dumpsites. *Marine Pollution Bulletin*, 2022, 176: 113444.
- [16] Rotimi O A, Olawole T D, De Campos O C, Adelani I B, Rotimi S O. Bisphenol A in Africa: a review of environmental and biological levels. *Science of the Total Environment*, 2021, 764: 142854.
- [17] Zhao Y, Chang Y H, Ren H R, Lou M, Jiang F W, Wang J X, Chen M S, Liu S, Shi Y S, Zhu H M, Li J L. Phthalates induce neurotoxicity by disrupting the Mfn2-PERK axis-mediated endoplasmic reticulum-mitochondria interaction. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2024, 72(13): 7411-7422.
- [18] 王鑫, 刘贺荣, 陈晓珍, 杨怡, 雷瑞琛, 朱粤, 李丽萍. 邻苯二甲酸二(2-乙基己基)酯通过氧化损伤介导 PI3K/Akt 信号通路对大鼠的神经毒性作用. *宁夏医科大学学报*, 2023, 45(8): 764-773.
- [19] Xu S S, Zhang H, Pao P C, Lee A, Wang J, Suen Chan Y, Manno F A M III, Shun W C, Han Cheng S, Chen X P. Exposure to phthalates impaired neurodevelopment through estrogenic effects and induced DNA damage in neurons. *Aquatic Toxicology*, 2020, 222: 105469.
- [20] Paquette E, Rodrigues A, Fumo M, Giacalone J P, Roy N M. Di-butyl phthalate disrupts muscle, motor and sensory neuron development in embryonic zebrafish. *Neurotoxicology and Teratology*, 2023, 97: 107179.
- [21] Wu X R, Li S Q, Zhang M J, Bai S J, Ni Y Y, Xu Q Q, Fan Y, Lu C C, Xu Z P, Ji C B, Du G Z, Qin Y F. Early-life bisphenol AP exposure impacted neurobehaviors in adulthood through microglial activation in mice. *Chemosphere*, 2023, 317: 137935.
- [22] 申泽宇, 李红艳, 韩雅静, 陈晓雯, 唐斌, 党垚, 向明灯, 胡国成, 李廷真, 于云江. 四氯双酚 A 对斑马鱼幼鱼运动行为的影响及神经毒性机制研究. *生态毒理学报*, 2023, 18(3): 357-365.
- [23] Sahoo P K, Pradhan L K, Aparna S, Agarwal K, Banerjee A, Das S K. Quercetin abrogates bisphenol A induced altered neurobehavioral response and oxidative stress in zebrafish by modulating brain antioxidant defence system. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 2020, 80: 103483.
- [24] 刘再腾, 罗麟洁, 王天彩, 汪星宇, 邱静, 穆希岩, 姜敬哲. 双酚 C 对斑马鱼肠-脑功能和行为的影响及机制研究. *中国环境科学*, 1-11. doi:10.19674/j.cnki.issn1000-6923.20240011.024.
- [25] Dueñas-Moreno J, Mora A, Kumar M, Meng X Z, Mahlknecht J. Worldwide risk assessment of phthalates and bisphenol A in humans: The need for updating guidelines. *Environment International*, 2023, 181: 108294.
- [26] Zhao X S, Wang S T, Li D M, You H, Ren X. Effects of perchlorate on BDE-47-induced alteration thyroid hormone and gene expression of in the hypothalamus-pituitary-thyroid axis in zebrafish larvae. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 2013, 36(3): 1176-1185.
- [27] Lee W, Cho J H, Lee Y, Lee S, Kim D H, Ha S, Kondo Y, Ishigami A, Chung H Y, Lee J. Dibutyl phthalate impairs neural progenitor cell proliferation and hippocampal neurogenesis. *Food and Chemical Toxicology*, 2019, 129: 239-248.
- [28] Zhou T T, He S L, Ye X, Wei Z L, Wan J, Zhang H M, Ding S M. Exposure to dibutyl phthalate adsorbed to multi-walled carbon nanotubes causes neurotoxicity in mice by inducing the release of BDNF. *Science of the Total Environment*, 2022, 852: 158319.
- [29] Qian L, Liu J, Lin Z P, Chen X F, Yuan L L, Shen G M, Yang W B, Wang D H, Huang Y, Pang S, Mu X Y, Wang C J, Li Y R. Evaluation

- of the spinal effects of phthalates in a zebrafish embryo assay. *Chemosphere*, 2020, 249: 126144.
- [30] Jergensen T, Cusmano D, Roy N M. Di-butyl phthalate (DBP) induces craniofacial defects during embryonic development in zebrafish. *Ecotoxicology*: London, England, 2019, 28(8): 995-1002.
- [31] Jiang N, Song P P, Li X X, Zhu L S, Wang J H, Yin X Q, Wang J. Dibutyl phthalate induced oxidative stress and genotoxicity on adult zebrafish (*Danio rerio*) brain. *Journal of Hazardous Materials*, 2022, 424(Pt D): 127749.
- [32] 韩晓雯, 徐婕妤, 王伟伟, 钱秋慧, 王慧利. 三氯生和双酚 A 对斑马鱼神经毒性的比较研究. *中国环境科学*, 2024, 44(2): 1111-1121.
- [33] Flores A, Moyano P, Sola E, García J M, García J, Frejo M T, Guerra-Menéndez L, Labajo E, Lobo I, Abascal L, Pino J D. Bisphenol-a neurotoxic effects on basal forebrain cholinergic neurons *in vitro* and *in vivo*. *Biology*, 2023, 12(6): 782.
- [34] 潘睿, 胡晶莹, 户宜, 姚谦, 李卫华, 田英, 高宇. 胚胎期双酚 A 暴露对斑马鱼发育及神经行为的影响. *上海交通大学学报: 医学版*, 2019, 39(5): 458-462.
- [35] 穆希岩, 李成龙, 黄瑛, 沈公铭, 李绪兴, 雷云雷, 黄岚, 逢森, 李应仁, 李学锋, 王成菊. 两种邻苯二甲酸酯类污染物对斑马鱼胚胎发育的影响. *中国环境科学*, 2017, 37(9): 3566-3575.
- [36] 王伟, 何梦婷, 许洁, 张洁. 芳香烃受体介导双酚 A 致斑马鱼胚胎发育毒性. *环境与职业医学*, 2021, 38(4): 342-349.
- [37] 陈朋宇, 刘磊, 李松, 许楠, 徐一峰, 范重阳. EE2 与 DBP 对斑马鱼胚胎发育的联合毒性研究. *农业环境科学学报*, 2013, 32(6): 1099-1105.
- [38] Ortiz-Villanueva E, Jaumot J, Martínez R, Navarro-Martín L, Piña B, Tauler R. Assessment of endocrine disruptors effects on zebrafish (*Danio rerio*) embryos by untargeted LC-HRMS metabolomic analysis. *Science of the Total Environment*, 2018, 635: 156-166.
- [39] Huff M, da Silveira W A, Carnevali O, Renaud L, Hardiman G. Systems analysis of the liver transcriptome in adult male zebrafish exposed to the plasticizer (2-ethylhexyl) phthalate (DEHP). *Scientific Reports*, 2018, 8(1): 2118.
- [40] Li X Y, He X X, Lin X N, Li W H, Gao J H, Zhang N, Guo Y S, Wang Z D, Zhao N, Zhang B, Dong Z D. Effects of bisphenols on lipid metabolism and neuro - cardiovascular toxicity in marine medaka larvae. *Aquatic Toxicology*, 2023, 259: 106551.
- [41] Zhai W H, Huang Z G, Chen L, Feng C, Li B, Li T S. Thyroid endocrine disruption in zebrafish larvae after exposure to mono-(2-ethylhexyl) phthalate (MEHP). *PLoS One*, 2014, 9(3): e92465.
- [42] 李专, 陈力可, 汪雪格, 李广柱, 边德军. 双酚类化合物对人胚肾细胞 HEK293 的毒性和氧化应激的研究. *科学技术与工程*, 2023, 23(2): 863-869.
- [43] Wang Y, Wu J, Wang D G, Wan M Q, Li X, Zhang L, Yang D, Liu F S, Liu J J, Li K H, Zhang S H, Lu H Q. BPA induces hepatotoxicity in zebrafish through oxidative stress and apoptosis pathways. *Fish Physiology and Biochemistry*, 2024, 50(2): 403-412.
- [44] Nahla E, Arya P, Maneesha P, Chitra K C. Exposure to the plasticizer dibutyl phthalate causes oxidative stress and neurotoxicity in brain tissue. *Environmental Science and Pollution Research International*, 2024, 31(14): 21399-21414.
- [45] Kassab R B, Lokman M S, Essawy E A. Neurochemical alterations following the exposure to di-n-butyl phthalate in rats. *Metabolic Brain Disease*, 2019, 34(1): 235-244.
- [46] Huang M L, Yen P L, Chang C H, Liao V H C. Chronic di(2-ethylhexyl) phthalate exposure leads to dopaminergic neuron degeneration through mitochondrial dysfunction in *C. elegans*. *Environmental Pollution*, 2022, 307: 119574.
- [47] Kim S S, Hwang K S, Yang J Y, Chae J S, Kim G R, Kan H, Jung M H, Lee H Y, Song J S, Ahn S, Shin D S, Lee K R, Kim S K, Bae M A. Neurochemical and behavioral analysis by acute exposure to bisphenol A in zebrafish larvae model. *Chemosphere*, 2020, 239: 124751.
- [48] Huang B X, Ning S, Zhang Q J, Chen A Q, Jiang C Y, Cui Y G, Hu J, Li H, Fan G P, Qin L J, Liu J Y. Bisphenol A represses dopaminergic neuron differentiation from human embryonic stem cells through downregulating the expression of insulin-like growth factor 1. *Molecular Neurobiology*, 2017, 54(5): 3798-3812.
- [49] Vega-López A, Lara-Vega I, Atonal-Brioso G, Nájera-Martínez M. Neurotoxicant effects of bisphenol A, nonylphenol, and tert-butyl phenol in the Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquatic Toxicology*: Amsterdam, Netherlands, 2024, 268: 106868.
- [50] El-Fawal H A N, O'Callaghan J P. Autoantibodies to neurotypic and gliotypic proteins as biomarkers of neurotoxicity: Assessment of trimethyltin (TMT). *NeuroToxicology*, 2008, 29(1): 109-115.
- [51] Li D Y, Liu X Y, Liu T M, Liu H T, Tong L, Jia S W, Wang Y F. Neurochemical regulation of the expression and function of glial fibrillary acidic protein in astrocytes. *Glia*, 2020, 68(5): 878-897.
- [52] Lin N H, Yang A W, Chang C H, Perng M D. Elevated GFAP isoform expression promotes protein aggregation and compromises astrocyte function. *The FASEB Journal*, 2021, 35(5): e21614.
- [53] Miloudi S, Valensi M, El Sanharawi M, Abitbol M M, Behar-Cohen F, Versaux-Botteri C. Nestin contributes to laser choroidal and retinal neovascularization. *Molecular Vision*, 2022, 28: 280-299.
- [54] Yan S X, Li P L, Wang Y, Yu W H, Qin A P, Liu M Y, Xiang A P, Zhang W, Li W Q. Nestin regulates neural stem cell migration via controlling the cell contractility. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 2016, 78: 349-360.
- [55] Gitler D, Cheng Q, Greengard P, Augustine G J. Synapsin IIa controls the reserve pool of glutamatergic synaptic vesicles. *The Journal of Neuroscience*, 2008, 28(43): 10835-10843.
- [56] Ashkenazi A, Fairbrother W J, Levenson J D, Souers A J. From basic apoptosis discoveries to advanced selective BCL-2 family inhibitors. *Nature Reviews Drug Discovery*, 2017, 16(4): 273-284.
- [57] 王学敏, 安聪, 黄宗轩, 潘茂华, 潘宇政. 血府逐瘀汤对重型颅脑损伤大鼠脑细胞凋亡及相关蛋白 Bcl-2、Bax 的影响. *广西医科大学学报*, 2018, 35(2): 166-169.