实验研究
Experiment

溴敌隆对斑马鱼早期发育阶段的神经毒性作用

吴元钊[1]，张安慧[1]，徐帆[1]，郑中堉[1]，应剑波[2]，王斌杰[1]，王继业[1]，姚伟宣[1]

1. 浙江警察学院浙江省毒品防控技术研究重点实验室，浙江 杭州 310051
2. 杭州市公安局刑事科学技术研究所，浙江 杭州 310004

摘要：

[背景] 溴敌隆是国内外广泛使用的第二代抗凝血类杀鼠剂，在生命早期暴露会导致神经发育毒性，但对于神经发育的毒性机制作用尚不明确。

[目的] 探究溴敌隆暴露导致斑马鱼胚胎神经发育毒性及可能的作用机制。

[方法] 将斑马鱼胚胎随机分为 4 组，分别为对照组（二甲基亚砜）以及 0.39、0.78、1.18 mg·L^{-1} 溴敌隆暴露组。暴露时间为受精后 4~120 h。暴露至 24 h 记录每分钟内斑马鱼胚胎自主抽动次数，至 120 h 记录斑马鱼幼鱼 120 min 内的运动情况，检测幼鱼体内的乙酰胆碱酯酶（AChE）活性，通过荧光定量 PCR 方法检测神经发育相关基因（*elavl3*、*gap43*、*mbp*、*syn2a*）表达情况。

[结果] 与对照组相比，24 h 时 1.18 mg·L^{-1} 溴敌隆暴露组的斑马鱼胚胎自主抽动次数下降 40%（$P<0.05$）。120 h 时，当溴敌隆暴露浓度达到 0.78、1.18 mg·L^{-1} 时，运动总距离相较于对照组分别下降 60%、69%（$P<0.05$、$P<0.01$），运动总时间相较于对照组分别下降 34%、65%（$P<0.05$、$P<0.01$）。与对照组相比，1.18 mg·L^{-1} 暴露组 AChE 活性升高 36%（$P<0.05$）。荧光定量 PCR 测试结果表明：与对照组相比，神经发育关键基因 *elavl3*、*syn2a* 和 *mbp* 的基因表达在 1.18 mg·L^{-1} 暴露组分别下调 66%、69%、65%（$P<0.01$），*gap43* 基因表达在溴敌隆浓度为 0.78 mg·L^{-1} 时上调 56%（$P<0.01$），在浓度为 1.18 mg·L^{-1} 时，表达量下调 34%（$P<0.05$）。

[结论] 溴敌隆暴露抑制斑马鱼胚胎自主抽动、运动行为能力，斑马鱼神经发育相关基因表达下调，阻碍神经传导递质释放，从而对斑马鱼产生神经发育毒性作用。

关键词：抗凝血杀鼠剂；溴敌隆；斑马鱼；神经发育毒性

Neurodevelopmental toxicity of bromadiolone to early-staged zebrafish

WU Yuanzhao[1], ZHANG Anhui[1], XU Fan[1], ZHENG Zhongyu[1], YING Jianbo[2], WANG Binjie[1], WANG Jiye[1], YAO Weixuan[1]
(1. Key Laboratory of Drug Prevention and Control Technology of Zhejiang Province, Zhejiang Police College, Hangzhou, Zhejiang 310051, China; 2. Institute of Criminal Science and Technology, Public Security Bureau of Hangzhou, Hangzhou, Zhejiang 310004, China)

Abstract:

[Background] Bromadiolone is the second-generation anticoagulant rodenticide widely used all over the world. Exposure to bromadiolone in early life stage can lead to neurodevelopmental toxicity, but its toxic mechanism of neurodevelopment is not clear so far.

[Objective] To investigate the developmental neurotoxicity and mechanism of bromadiolone to zebrafish embryos.

[Methods] Zebrafish embryos were randomly divided into four groups: a solvent control group (dimethylsulphoxide) and three bromadiolone exposure groups (0.39, 0.78, and 1.18 mg·L^{-1}). The exposure period was from 4 h to 120 h post-fertilization. The number of spontaneous movement per minute was recorded at 24 h post-treatment. The locomotor ability of zebrafish larvae and the activity of acetylcholinesterase (AChE) were tested at 120 h post-treatment. The relative expression levels of neurodevelopment-related genes (*elavl3*, *gap43*, *mbp*, and *syn2a*) were measured by fluorescence quantitative PCR.

[Results] Compared with the control group, the number of spontaneous movement per minute at 24 h decreased significantly in the 1.18 mg·L^{-1} bromadiolone exposure group ($P<0.05$). Compared with the control group, the total distance travelled of the zebrafish larvae in the 0.78 and 1.18 mg·L^{-1} bromadiolone exposure groups decreased by 60% and 69% respectively ($P<0.05$, $P<0.01$), and the total movement time decreased by 34% and 65% respectively ($P<0.05$, $P<0.01$). The AChE activity in the 1.18 mg·L^{-1} bromadiolone exposure group increased by 36%

CC BY NC ND

DOI 10.11836/JEOM21576

基金项目
国家重点研发计划项目（2018YFC0807201）；浙江省重点研发计划项目（2021C03135）；杭州农业与社会发展科研主动设计项目（20190101A08）；宁波市科技计划项目智慧禁毒大数据综合作战平台（2020Z010）

作者简介
吴元钊（1983—），博士，讲师；
E-mail：wuyuanzhao@zjjcxy.cn

通信作者
姚伟宣，E-mail：yaoweixuan@zjjcxy.cn

伦理审批 不需要
利益冲突 无申报
收稿日期 2021-12-06
录用日期 2022-06-05

文章编号 2095-9982(2022)10-1154-06
中图分类号 R114
文献标志码 A

▸引用
吴元钊，张安慧，徐帆，等. 溴敌隆对斑马鱼早期发育阶段的神经毒性作用[J]. 环境与职业医学，2022，39（10）：1154-1159.

▸本文链接
www.jeom.org/article/cn/10.11836/JEOM21576

Funding
This study was funded.

Correspondence to
YAO Weixuan, E-mail: yaoweixuan@zjjcxy.cn

Ethics approval Not required
Competing interests None declared
Received 2021-12-06
Accepted 2022-06-05

▸ To cite
WU Yuanzhao, ZHANG Anhui, XU Fan, et al. Neurodevelopmental toxicity of bromadiolone to early-staged zebrafish[J]. Journal of Environmental and Occupational Medicine, 2022, 39(10): 1154-1159.

▸ Link to this article
www.jeom.org/article/en/10.11836/JEOM21576

when compared with the control group ($P<0.05$). The fluorescence quantitative PCR results showed that compared with the control group, the expression levels of neurodevelopment-related genes *elavl3*, *syn2a*, and *mbp* were significantly down-regulated by 66%, 69%, and 65% in the 1.18 mg·L^{-1} bromadiolone exposure group respectively ($P<0.01$), the expression level of *gap43* was up-regulated by 56% in the 0.78 mg·L^{-1} bromadiolone exposure group ($P<0.01$) and down-regulated by 34% in the 1.18 mg·L^{-1} bromadiolone exposure group ($P<0.05$).

[Conclusion] Bromadiolone exposure could inhibit spontaneous movement and locomotive behavior, down-regulate the expression levels of neurodevelopment-related genes, hinder the release of neurotransmitters, and result in neurodevelopmental toxicity in the early-staged zebrafish.

Keywords: anticoagulant rodenticide; bromadiolone; zebrafish; neurodevelopmental toxicity

近年来，由于杀鼠剂的不规范投放，导致人、畜等中毒的案例屡见报道[1−2]。溴敌隆是典型的第二代香豆素衍生物类抗凝血杀鼠剂，因其具有广谱、高效以及适口性好等优点，被广泛应用于农村和城市灭鼠。但也正是其大量使用，溴敌隆残留对土壤、水体等生态环境造成了一定的污染。有研究表明，溴敌隆已经从土壤、鼠类尸体等介质进入小麦等农作物[3]，甚至家畜[4]等大型动物体内，对人类的生命健康构成了潜在的威胁。与其他抗凝血类灭鼠剂的毒性作用机理类似，溴敌隆为维生素 K 拮抗剂，主要通过干扰正常机体维生素 K 循环，导致维生素 K 依赖的凝血因子缺乏，最终引起机体凝血功能障碍，从而达到毒杀的效果[5]。截至目前，针对溴敌隆的研究大多集中于生物基质中的含量检测[6−7]、病例救治[8]以及鼠类的防治[9]等领域，关于溴敌隆对非靶向动物的神经毒性的研究鲜有人报道。此前有报道称溴敌隆中毒会引起患者出现头晕、步态不稳等症状[10−11]，对中枢神经系统造成一定的损害。可见，溴敌隆对神经系统具有一定的毒性作用，但具体机制不甚明了。因此，开展以溴敌隆为代表的抗凝血类杀鼠剂对神经系统的毒性作用机制的研究十分必要。

斑马鱼除具有生长发育周期短，实验成本低，脑部结构易于观察以及与人类基因相似度高等诸多优点外，斑马鱼胚胎和幼鱼对外源物质较为敏感，使得从发育学、运动行为学等角度评估化合物对斑马鱼的神经毒性成为可能，被广泛用于评估各种环境污染物的神经毒性等研究领域[12−13]。本研究通过检测斑马鱼胚胎的自主抽动、乙酰胆碱酯酶（acetylcholinesterase, AChE）活性、运动行为能力以及神经系统发育相关基因（*elavl3*、*gap43*、*mbp*、*syn2a*）的表达情况，以期从运动行为能力、神经传导递质、神经发育相关基因表达等角度探究溴敌隆对斑马鱼幼鱼的神经毒性及作用机制，为进一步评估溴敌隆对非靶向动物的毒性作用机制提供借鉴和参考。

1 材料与方法

1.1 实验动物

实验用斑马鱼为野生型 AB 品系，亲代购自中科院国家斑马鱼资源中心（中国湖北武汉）。培养条件为水温（28.5±0.3）℃，pH 为 7.0~7.5，光/暗周期设置为 14 h∶10 h，每日投喂 2 次活体丰年虾。在收集胚胎的前 1 天 17 时按雌雄比例 1∶2 或 1∶1 放进交配缸，用透明隔板将雌鱼与雄鱼隔开，放入恒温培养箱中。第 2 天上午 8 时光照 30 min 后移去隔板，记录产卵时间，收集并清洗受精胚胎，置于培养箱中，温度设置为（28±1）℃，于 4 h 后置于显微镜下挑除死亡胚胎，选取正常发育受精胚胎分组暴露于不同质量浓度（后称浓度）的溴敌隆溶液中。

1.2 主要试剂与仪器

溴敌隆（中国北京北方伟业计量技术研究院），二甲基亚砜（dimethyl sulfoxide, DMSO；中国国药集团化学试剂有限公司）。AChE 活性检测试剂盒购自南京建成生物工程研究所有限公司。实验前，用 DMSO 将溴敌隆配制成 5 000 mg·L^{-1} 的母液，逐级稀释到所需实验浓度，0 ℃ 避光保存。暴露溶液均为现配现用，确保各浓度组中 DMSO 最终体积分数小于 0.02%（经预实验，DMSO 体积分数为 0.02%时对照组的斑马鱼胚胎发育指标，如自主抽动次数、运动行为学指标以及体内 AChE 活性及相关基因表达与空白组相比差异无统计学意义）。

生化培养箱（LBI-400，中国上海龙跃），体式显微镜（Olympus-SZX7，日本奥林巴斯），斑马鱼行为分析仪（DanioVision，荷兰诺达思），全自动样品冷冻研磨仪（JXFSTPRP-CL，中国上海净信），冷冻离心机（LEGEND MICRO 21R，美国赛默飞世尔），酶标仪（FlexStation 3，美国赛默飞世尔），荧光定量 PCR 仪（CFX-96，美国 Bio-Rad）。

1.3 胚胎暴露实验

随机挑选受精 4 h 后发育正常、大小相近的斑马鱼胚胎进行染毒暴露实验。参考经济合作与发展组织

鱼类胚胎急性水生毒性实验进行暴露实验[14]，间隔 24 h 更换新配制的暴露溶液，以保证浓度恒定。前期通过毒理学实验，可计算得出 120 h 溴敌隆对斑马鱼胚胎的半数致死浓度（median lethal concentration, LC_{50}）为 1.56 mg·L^{-1}。参考顾杰等[15]以及何梦婷等[13]的研究，确定 0.25LC_{50}、0.5LC_{50}、0.75LC_{50} 作为实验暴露浓度，即以 DMSO（对照组）以及 0.39、0.78、1.18 mg·L^{-1} 的溴敌隆进行暴露。设置 3 组平行实验，采用 6 孔细胞培养板为实验容器，每孔放置 30 枚胚胎，暴露溶液每 24 h 更换一次，实验期间孔板需盖板盖，以保证各组浓度保持不变。暴露期间水温保持（28±1）℃，光/暗周期设置为 14 h∶10 h，及时挑出死亡胚胎以防对其他胚胎造成污染，并统计。

1.4 自主抽动分析

每个浓度组随机挑选 10 枚暴露至 24 h 的斑马鱼胚胎，通过显微镜视频记录 1 min 内胚胎的自主抽动情况，重复 3 次，使用 DanioScope 1.2 软件统计胚胎的自主抽动次数。

1.5 运动行为能力实验

每个浓度组随机挑选 12 尾溴敌隆暴露 120 h 后具有运动行为能力的斑马鱼幼鱼通过 DanioVision 高通量斑马鱼行为分析系统进行测试。参考 Nery 等[16]的实验方法，将随机挑选出的幼鱼放置在 24 孔细胞培养板中进行行为能力测试，每孔放置 1 尾斑马鱼幼鱼。光刺激条件设定为前 10 min 黑暗适应，之后每 10 min 进行一次明暗交替，记录总时长为 120 min 的运动行为数据，实验结束后用 Ethovision XT 14 软件统计和分析。

1.6 AChE 活性测量

每个暴露组随机取 100 尾暴露 120 h 后的斑马鱼幼鱼，用去离子水清洗 2~3 次，加入 300 μL 预冷的 0.1 mol·L^{-1} 磷酸盐缓冲溶液，置于 2.5 mL 离心管内 0℃匀浆 400 s，加入 700 μL 磷酸盐缓冲溶液进行清洗转移。0℃ 下 5 000 r·min^{-1}（离心半径 5 cm）离心 10 min，取上清液待测。用酶标仪在 412 nm 波长依序测量各孔的光密度，采用 Bradford 法测量 AChE 活性。

1.7 荧光定量 PCR 检测神经发育相关基因的相对表达量

溴敌隆暴露 120 h 后，每个暴露组取 50 尾斑马鱼幼鱼置于冰上匀浆，用 TRIzol 试剂抽提总 RNA，逆转录为 cDNA，引物序列见表 1。PCR 反应程序设定如下：cDNA 模板 2.0 μL，正、反向引物（10 μmol·L^{-1}）各 1.0 μL，荧光预混液 12.5 μL，双蒸水 8.5 μL。95 ℃ 预变性 3 min，95 ℃ 变性 10 s，55 ℃ 退火 10 s，72 ℃ 延伸 20 s（循环 40 次）。设定对照组幼鱼的 *syn2a*、*gap43*、*elavl3* 和 *mbp* 的 mRNA 相对表达量为 1.0±0.0，结果采用相对 *Ct* 法（$2^{-\Delta\Delta Ct}$）确定 mRNA 的相对表达量。

表 1 荧光定量 PCR 引物序列

Table 1 The sequences of fluorescent quantitative PCR primers

引物名称	正向（5′→3′）	反向（5′→3′）
syn2a	TGGTTATTGACGAGCCCCAG	TCGCCAAACTCAGCCTGTTC
gap43	ATAGACAAACCAGACGCTGC	TACATTGCACTGGTCCTCCG
elavl3	AATCAAGGTGTCTTACGCCAGG	ACCGAATGAAACCTACCCCG
mbp	GGAGCTTTGTGTCCTCTCCT	GCGTCTCTGTGGCGATCTAA

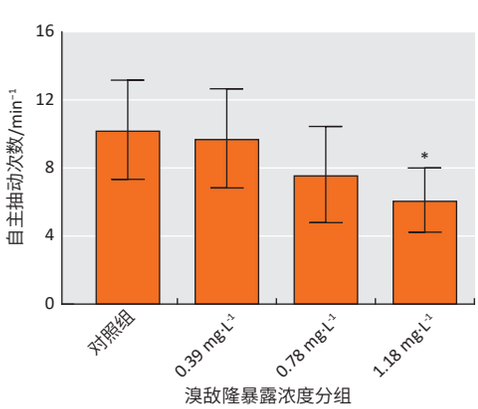
1.8 统计学分析

资料数据使用 SPSS 20 软件进行统计分析，以均数±标准差表示。在满足正态分布和方差齐性的前提条件下，各染毒组间比较用单因素方差分析，进一步使用最小显著性差异法进行两两比较，检验水准为 α=0.05。

2 结果

2.1 溴敌隆对斑马鱼胚胎自主抽动的影响

不同浓度的溴敌隆暴露 24 h 后斑马鱼胚胎的自主抽动测试结果如图 1 所示。结果显示，0.39、0.78 mg·L^{-1} 暴露组的斑马鱼胚胎自主抽动次数相较于对照组分别下降 5%和 25%（P > 0.05），当暴露浓度达到 1.18 mg·L^{-1} 时，自主抽动次数相较于对照组下降 40%，具有统计学意义（P < 0.05）。



[注] 与对照组相比，*：P<0.05。

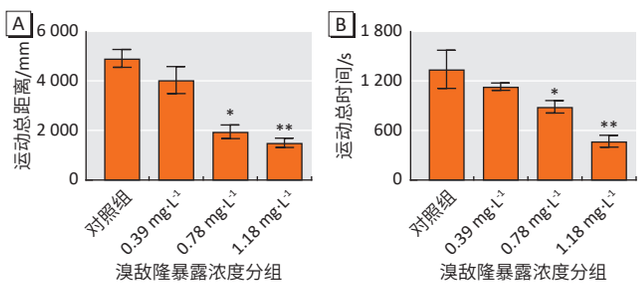
图 1 溴敌隆暴露对斑马鱼胚胎自主抽动的影响（$\bar{x} \pm s$，n=10）

Figure 1 Effects of exposure to bromadiolone on spontaneous movement of zebrafish embryos ($\bar{x} \pm s$, n=10)

2.2 溴敌隆对斑马鱼幼鱼运动行为的影响

图 2 是溴敌隆暴露 120 h 后在 120 min 内的斑马鱼幼鱼运动行为能力测试结果。结果显示，与对照组

相比，0.39 mg·L^{-1} 暴露组的斑马鱼幼鱼的运动总距离（图 2A）下降 17%，运动总时间（图 2B）下降 15%（$P>0.05$），当溴敌隆暴露浓度达到 0.78、1.18 mg·L^{-1} 时，运动总距离相较于对照组分别下降 60%、69%，运动总时间相较于对照组分别下降 34%、65%，差异均具有统计学意义（$P<0.05$，$P<0.01$）。



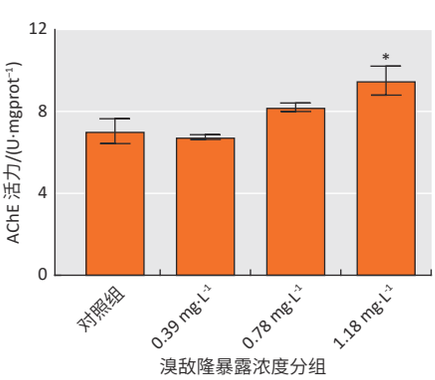
[注] A：运动总距离；B：运动总时间。与对照组相比，*：$P<0.05$；**：$P<0.01$。

图 2 溴敌隆暴露对斑马鱼幼鱼运动行为能力的影响（$\bar{x}\pm s$，n=12）

Figure 2 Effects of exposure to bromadiolone on locomotive behavior of zebrafish larvae ($\bar{x}\pm s$, n=12)

2.3 溴敌隆对斑马鱼幼鱼 AChE 活性的影响

溴敌隆暴露 120 h 后斑马鱼幼鱼体内的 AChE 活性的测试结果见图 3。结果显示，0.78 mg·L^{-1} 溴敌隆暴露组的 AChE 活性较对照组上升 17%（$P>0.05$），当溴敌隆浓度达到 1.18 mg·L^{-1} 时，AChE 活性升高 36%（$P<0.05$）。



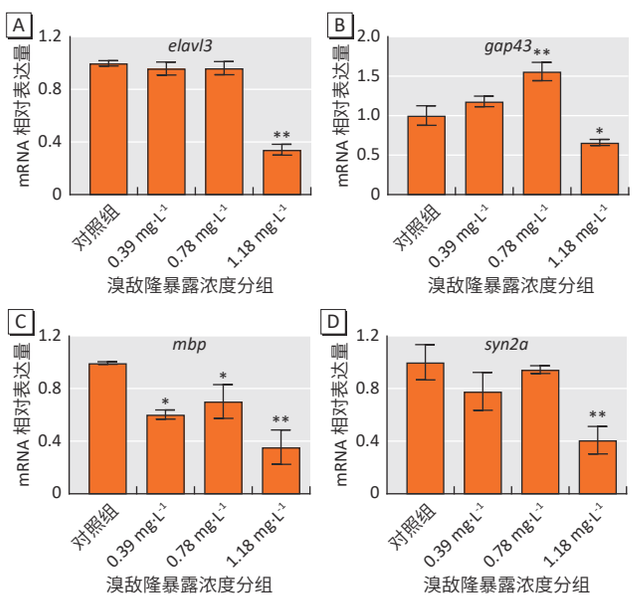
[注] 与对照组相比，*：$P<0.05$。

图 3 溴敌隆暴露对斑马鱼幼鱼体内 AChE 活性的影响（$\bar{x}\pm s$，n=3）

Figure 3 Effects of exposure to bromadiolone on AChE activity of zebrafish larvae ($\bar{x}\pm s$, n=3)

2.4 溴敌隆对斑马鱼幼鱼神经发育相关基因的影响

溴敌隆暴露 120 h 后，与对照组相比，0.39 mg·L^{-1} 和 0.78 mg·L^{-1} 暴露组的 *elavl3* 基因相对表达未出现明显下调（$P>0.05$），但 1.18 mg·L^{-1} 暴露组下调 66%（$P<0.01$）（图 4A）。0.39 mg·L^{-1} 暴露组 *gap43* 基因的相对表达量上调 18%，但无统计学意义（$P>0.05$），0.78 mg·L^{-1} 暴露组上调 56%（$P<0.01$），但当暴露浓度达到 1.18 mg·L^{-1} 时，相对表达量下调 34%（$P<0.05$）（图 4B）。各暴露组 *mbp* 基因的相对表达均受到抑制，0.39 mg·L^{-1}暴露组下调 40%（$P<0.05$），0.78 mg·L^{-1} 暴露组下调 30%（$P<0.05$），当浓度达到 1.18 mg·L^{-1} 时下调 65%（$P<0.01$）（图 4C）。0.39 mg·L^{-1} 暴露组 *syn2a* 基因的相对表达量下调 22%，0.78 mg·L^{-1} 暴露组下调 5%，但均无统计学意义（$P>0.05$），当浓度达到 1.18 mg·L^{-1} 时，其相对表达量下调 69%（$P<0.01$）（图 4D）。



[注] A：*elavl3* 基因相对表达量；B：*gap43* 基因相对表达量；C：*mbp* 基因相对表达量；D：*syn2a* 基因相对表达量。与对照组相比，*：$P<0.05$；**：$P<0.01$。

图 4 溴敌隆暴露对斑马鱼幼鱼神经发育相关基因表达的影响（$\bar{x}\pm s$，n=3）

Figure 4 Effects of exposure to bromadiolone on the expressions of neurodevelopment-related genes of zebrafish larvae ($\bar{x}\pm s$, n=3)

3 讨论

溴敌隆作为目前应用最为广泛的第二代抗凝血高效杀鼠剂之一，其对鼠类的毒杀作用机理已经被学者们研究得较为详细[17]，但对非靶向动物的毒性作用，尤其是对水生动物的神经毒性作用以及相关机制的研究鲜有人报道。Wang 等[13]通过核磁共振成像手段发现溴敌隆中毒患者的脑部形态改变，推测可能是由于维生素 K1 的缺失影响脑神经细胞的相关蛋白的合成，从而引起中枢神经紊乱，但并未深入研究毒性机制。本研究考察了在不同浓度溴敌隆暴露下对斑马鱼胚胎自主抽动、斑马鱼幼鱼运动行为能力的影响，以及幼鱼体内的 AChE 活性以及神经发育相关基因的变化情况，尝试从分子生物学层面对溴敌隆引起的神经

毒性作用机制进行探究。

斑马鱼的运动行为能力与神经系统发育密切相关，运动行为特征能够体现斑马鱼的神经发育情况，斑马鱼胚胎早期的自主抽动和幼鱼的运动行为能力常被用作评估药物神经毒性的重要指标[18–19]。自主抽动是斑马鱼胚胎发育至 24 h 时，尾部出现的有规律抽动，不受大脑神经元的控制，是能够观察到斑马鱼胚胎的最初始神经活动。本次实验研究显示，经溴敌隆染毒后，斑马鱼胚胎的自主抽动在高浓度（1.18 mg·L^{-1}）暴露组受到抑制，表明溴敌隆可能通过影响斑马鱼胚胎的脊柱神经元细胞而改变其自主抽动，对斑马鱼胚胎早期发育具有一定的神经毒性作用。不仅如此，本研究通过运动行为学实验发现，当溴敌隆暴露浓度达到 0.78 mg·L^{-1} 和 1.18 mg·L^{-1} 时，斑马鱼的运动总距离和运动总时间受到抑制，表明溴敌隆对斑马鱼幼鱼的运动神经发育具有一定的抑制作用。AChE 是与神经传导有关的酶，对斑马鱼胚胎的神经发育至关重要，是常被用于评估神经毒性的生理学指标之一[20]，AChE 活性增强，则抑制兴奋的传导；相反，减弱时，表现为过度兴奋。本实验研究发现，幼鱼体内 AChE 活性在高浓度暴露组（1.18 mg·L^{-1}）被诱导，说明 AChE 活性的增强可能导致斑马鱼幼鱼肌肉的收缩和行为反应变得迟钝[21]，以致斑马鱼幼鱼的运动行为能力下降。

为进一步探究溴敌隆对斑马鱼胚胎神经毒性的机制，本研究对神经发育相关基因（*elavl3*、*gap43*、*mbp*、*syn2a*）的表达情况进行了测试。参与编码特异性神经元 RNA 结合蛋白 HuC 的 *elavl3* 基因在神经元分化和维持中起到重要作用，是斑马鱼早期神经元发育的标志基因之一[22]。*mbp* 基因被认为是神经发育的重要标志物之一，它主要负责调控中枢神经系统轴突中的髓鞘发育水平[23]。神经元特异性突触小泡相关基因 *syn2a* 在斑马鱼胚胎早期中枢神经系统发育阶段神经递质释放中起着重要作用[24]。此前，王伟等[25]研究表明，将斑马鱼胚胎暴露于 25 μmol·L^{-1} 的双酚 A 后，*elavl3*、*mbp* 以及 *syn2a* 基因表达下调，致使斑马鱼胚胎出现神经发育毒性。本研究中，经溴敌隆暴露处理后，*elavl3*、*mbp* 和 *syn2a* 基因表达均出现不同程度的下调，表明溴敌隆染毒可能导致了斑马鱼胚胎神经系统的正常分化和发育，从而产生了神经毒性作用。*gap43* 是一种神经组织特异性细胞质蛋白，常用作神经损伤后再生时重新诱导轴突生长的标志[26]。本研究发现，随着溴敌隆浓度的增大，*gap43* 基因的表达量呈现先上升后下降的趋势，这可能是低浓度溴敌隆暴露引起斑马鱼胚胎的神经元损伤，诱导 *gap43* 基因的表达，但高浓度的溴敌隆致使神经损伤再生机制失效，从而导致 *gap43* 基因下调。因此，*gap43* 基因的表达异常表明溴敌隆暴露对斑马鱼胚胎的神经发育产生了毒性效应。

综上所述，溴敌隆暴露可导致斑马鱼胚胎神经发育相关基因表达下调，阻碍神经传导递质的释放，抑制斑马鱼幼鱼的运动行为能力，最终导致斑马鱼神经发育毒性。尽管本研究对溴敌隆暴露引起的神经发育毒性的机制进行了初步探究，但仍然存在不足，如对斑马鱼神经发育相关基因和神经传导机理的研究不够充分和细致，对神经毒性的机理解释仍存在不确定因素，还需进一步研究。

参考文献

[1] BERNY P, VELARDO J, PULCE C, et al. Prevalence of anticoagulant rodenticide poisoning in humans and animals in France and substances involved[J]. Clin Toxicol (Phila), 2010, 48(9): 935-941.

[2] BERTERO A, CHIARI M, VITALE N, et al. Types of pesticides involved in domestic and wild animal poisoning in Italy[J]. Sci Total Environ, 2020, 707: 136129.

[3] HROMADA R, MIŇO I, KORYTÁ R, et al. Potential health risk to humans related to accumulation of brodifacoum and bromadiolone in the wheat grown on rodenticide contaminated soil[J]. Folia Vet, 2019, 63(3): 18-26.

[4] KUPPER J, GROBOSCH T, KISTLER R, et al. Bromadiolone poisoning in foxes [J]. Schweiz Arch Tierheilkd, 2006, 148(8): 405-408.

[5] 赵丹玭, 杨泽国, 尉志文, 等. 溴敌隆及其代谢物-苄叉丙酮在犬体内的死后分布[J]. 中国法医学杂志, 2017, 32(3): 294-297.
ZHAO D P, YANG Z G, WEI Z W, et al. The postmortem distribution of bromadiolone and its metabolite-benzylideneacetone in poisoned dogs[J]. Chin J Forensic Med, 2017, 32(3): 294-297.

[6] NOSAL D G, FEINSTEIN D L, VAN BREEMEN R B. Chiral liquid chromatography-tandem mass spectrometry analysis of superwarfarin rodenticide stereoisomers-bromadiolone, difenacoum and brodifacoum-in human plasma[J]. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2021, 1165: 122529.

[7] ALOMAR H, CHABERT A, COEURDASSIER M, et al. Accumulation of anticoagulant rodenticides (chlorophacinone, bromadiolone and brodifacoum) in a non-target invertebrate, the slug, *Deroceras reticulatum*[J]. Sci Total Environ, 2018, 610-611: 576-582.

[8] LU A, YUAN F, YAO Y, et al. Reversible leukoencephalopathy caused by 2 rodenticides bromadiolone and fluoroacetamide: a case report and literature review[J]. Medicine (Baltimore), 2021, 100(9): e25053.

[9] BUCKLE A P, JONES C R, RYMER D J, et al. The Hampshire-Berkshire focus of L120Q anticoagulant resistance in the Norway rat (*Rattus norvegicus*) and field trials of bromadiolone, difenacoum and brodifacoum[J]. Crop Prot, 2020, 137: 105301.

[10] ZUO W, ZHANG X, CHANG J B, et al. Bromadiolone poisoning leading to subarachnoid haemorrhage: A case report and review of the literature[J]. Journal of clinical pharmacy and therapeutics, 2019, 44(6): 958-962.

[11] WANG M, YANG Y, HOU Y, et al. Effects of bromadiolone poisoning on the central nervous system[J]. Neuropsychiatr Dis Treat, 2017, 13: 2297-2300.
[12] LI R A, TALIKKA M, GUBIAN S, et al. Systems toxicology approach for assessing developmental neurotoxicity in larval zebrafish[J]. Front Genet, 2021, 12: 652632.
[13] 何梦婷, 王伟, 许洁, 等. 氧化应激参与溴乙酰胺致斑马鱼胚胎神经发育毒性[J]. 环境与职业医学, 2021, 38(6): 586-592.
HE M T, WANG W, XU J, et al. Role of oxidative stress in neurodevelopmental toxicity of bromoacetamide in zebrafish embryos[J]. J Environ Occup Med, 2021, 38(6): 586-592.
[14] BUSCHMANN J. The OECD guidelines for the testing of chemicals and pesticides[J]. Methods Mol Biol, 2013, 947: 37-56.
[15] 顾杰, 王宏烨, 廖振东, 等. 双酚AP和双酚AF对斑马鱼的早期神经发育毒性作用研究[J]. 环境与职业医学, 2019, 36(1): 11-16.
GU J, WANG H Y, LIAO Z D, et al. Neurodevelopmental toxicities of bisphenol AP and bisphenol AF in early life of zebrafish[J]. J Environ Occup Med, 2019, 36(1): 11-16.
[16] NERY L R, ELTZ N S, HACKMAN C, et al. Brain intraventricular injection of amyloid-β in zebrafish embryo impairs cognition and increases tau phosphorylation, effects reversed by lithium[J]. PLoS One, 2014, 9(9): e105862.
[17] LIAO X, ZHANG M, ZHAO A, et al. Retrospective study of twenty-four patients with prolonged coagulopathy due to long-acting anti-vitamin K rodenticide poisoning[J]. Am J Med Sci, 2014, 347(4): 299-304.
[18] 赵晨曦, 王杨, 钱秋慧, 等. 三氯卡班环境暴露对斑马鱼神经行为的影响[J]. 中国环境科学, 2022, 42(1): 456-464.
ZHAO C X, WANG Y, QIAN Q H, et al. Effects of environmental exposure to triclocarban on the neurobehavior of zebrafish (*Danio rerio*)[J]. China Environ Sci, 2022, 42(1): 456-464.
[19] BASNET R M, ZIZIOLI D, TAWEEDET S, et al. Zebrafish larvae as a behavioral model in neuropharmacology[J]. Biomedicines, 2019, 7(1): 23.
[20] PULLAGURI N, GROVER P, ABHISHEK S, et al. Triclosan affects motor function in zebrafish larva by inhibiting *ache* and *syn2a* genes[J]. Chemosphere, 2021, 266: 128930.
[21] CHEN L, YU K, HUANG C, et al. Prenatal transfer of polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) results in developmental neurotoxicity in zebrafish larvae[J]. Environ Sci Technol, 2012, 46(17): 9727-9734.
[22] XU H, SHAO X, 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]. Bull Environ Contam Toxicol, 2013, 91(6): 635-639.
[23] MÜLLER C, BAUER N M, SCHÄFER I, et al. Making myelin basic protein-from mRNA transport to localized translation[J]. Front Cell Neurosci, 2013, 7: 169.
[24] 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]. Neurotoxicol Teratol, 2010, 32(1): 91-98.
[25] 王伟, 何梦婷, 许洁, 等. 芳香烃受体介导双酚A致斑马鱼胚胎发育毒性[J]. 环境与职业医学, 2021, 38(4): 342-349.
WANG W, HE M T, XU J, et al. Aryl hydrocarbon receptor-mediated developmental toxicity in zebrafish embryos induced by bisphenol A[J]. J Environ Occup Med, 2021, 38(4): 342-349.
[26] CHENG R, JIA Y, DAI L, et al. Tris (1, 3-dichloro-2-propyl) phosphate disrupts axonal growth, cholinergic system and motor behavior in early life zebrafish[J]. Aquat Toxicol, 2017, 192: 7-15.

(**英文编辑**：汪源; **责任编辑**：汪源)

·**告知栏**·

《环境与职业医学》审稿政策和同行评议过程

审稿政策

①提交给《环境与职业医学》的稿件首先由科学编辑评估，并根据以下标准确定是否适合同行评审：主题是否在《环境与职业医学》涵盖范围内；研究的原创性；研究结果在该领域取得实质性突破的程度；稿件文字重复率低于 10%；

②符合《环境与职业医学》标准的论文将分配给 2～3 位专业同行审理；

③通过同行评审并修改的稿件将由常务编委会委员终审，责任编辑根据终审意见决定稿件处理方式。经修改完善后的稿件进入待发稿编辑处理阶段，排版后按序刊出。

同行评议过程

通过科学编辑评估的稿件将进入同行评议过程。由稿件责任编辑选择审稿人，审稿人有可能从编委会委员中选出，也可能来自相关领域专家，或来自投稿者推荐。所有论文均以“单盲”方式经过严格的同行评审。根据审稿人对稿件的意见及编辑评估，予以修改、复审或退稿。同行评议通过并经过修改后的稿件将由常务编委会终审，责任编辑根据终审意见决定稿件处理方式（修后录用、退稿）。

《环境与职业医学》编辑部

2022 年 10 月 25 日