

铜、汞和铅对斑马鱼仔鱼肝脏发育的影响

韩建, 彭维兵, 韩利文, 何秋霞, 张云, 孙晨, 王荣春, 楚杰, 刘可春*

(山东省科学院生物研究所, 山东省生物检测技术工程实验室, 山东省生物传感器重点实验室, 山东省科学院药物筛选技术重点实验室, 山东 济南 250014)

摘要:以肝脏绿色荧光转基因斑马鱼 T3(*lfabp:EGFP*) 为模型, 研究水环境典型重金属污染物铜(CuCl_2)、汞(HgCl_2) 和铅($\text{Pb}(\text{Ac})_2$) 在较低浓度暴露下对仔鱼(72~144 hpf) 肝脏发育的影响。结果显示, 各暴露组存活率均在 95% 以上; CuCl_2 和 HgCl_2 在 1 $\mu\text{mol/L}$ 时均能够引起鳔发育或充气异常; 3 种化合物均能够显著减小肝脏荧光面积和光密度。相同暴露浓度下, CuCl_2 抑制肝脏发育的能力强于 $\text{Pb}(\text{Ac})_2$ 和 HgCl_2 , 但 HgCl_2 在 0.01 $\mu\text{mol/L}$ 时就能够显著抑制肝脏发育; CuCl_2 和 $\text{Pb}(\text{Ac})_2$ 抑制 *lfabp* 表达量的能力强于 HgCl_2 , 且 $\text{Pb}(\text{Ac})_2$ 在 0.01 $\mu\text{mol/L}$ 时就能够显著抑制 *lfabp* 表达。结果表明, 3 种重金属化合物均能够显著抑制肝脏发育; 转基因斑马鱼仔鱼可以作为检测环境污染物肝脏发育毒性的首选模型。

关键词:铜; 汞; 铅; 斑马鱼; 仔鱼; 肝脏发育

中图分类号: R965.1 文献标识码: A 文章编号: 1002-4026(2016)05-0054-06

Impact of Cu, Hg and Pb on liver growth of zebrafish larvae

HAN Jian, PENG Wei-bing, HAN Li-wen, HE Qiu-xia, ZHANG Yun,
SUN Chen, WANG Rong-chun, CHU Jie, LIU Ke-chun*

(Shandong Provincial Engineering Laboratory for Biological Testing Technology, Shandong Provincial Key laboratory of Biosensors, Key Laboratory for Drug Screening Technology of Shandong Academy of Sciences, Biology Institute, Shandong Academy of Sciences, Jinan 250014, China)

Abstract : We addressed the impact of three typical heavy metal pollutants (copper chloride, mercury chloride and lead acetate) on liver growth of zebrafish larvae (72~144 hpf) with a liver green fluorescence transgenic zebrafish T3 (*lfabp:EGFP*) as a model. Results show that the survival rates of all groups are all more than 95%. CuCl_2 and HgCl_2 of 1 $\mu\text{mol/L}$ can all cause abnormality of swimbladder growth or inflation. The three heavy metal compounds can all significantly reduce liver fluorescence area and integral optical density. CuCl_2 has more powerful inhibition capability for liver growth than $\text{Pb}(\text{Ac})_2$ and HgCl_2 under identical exposure concentration. However, HgCl_2 of 0.01 $\mu\text{mol/L}$ can inhibit liver growth. Inhibition capability of *lfabp* expression of CuCl_2 and $\text{Pb}(\text{Ac})_2$ is greater that of HgCl_2 . Moreover, $\text{Pb}(\text{Ac})_2$ of 0.01 $\mu\text{mol/L}$ can inhibit the expression of *lfabp*. Results show that the three heavy metal compounds can all significantly inhibit liver growth. Transgenic zebrafish larvae can serve as priority model for detection of environmental contaminants caused liver growth toxicity.

收稿日期: 2016-07-14
基金项目: 山东省科学院青年基金 (2015QN012); 山东省自主创新及成果转化专项 (2014ZZCX02105); 山东省自然科学基金三院联合基金 (ZR2015YL013)
作者简介: 韩建 (1983—), 男, 博士, 助理研究员, 研究方向为毒理学和药物筛选。Email: hanjian251314@163.com。
* 通信作者, 刘可春 (1964—), 男, 博士, 研究员, 研究方向为药物筛选。Email: hliukch@sdas.org。

Key words : copper; mercury; lead; zebrafish; larvae; liver growth

重金属是水环境中的典型污染物,目前水体突发性重金属污染事故时有发生,主要的污染物有铜、汞、铅、镉、铬和镍等^[1-2]。水环境重金属污染严重威胁水生生物健康和生存,鱼类作为水环境中较大的脊椎动物类群,重金属污染物对其产生的危害引起越来越多的关注^[3-4]。鱼类胚胎、仔鱼期等早期发育阶段对重金属污染较为敏感,以此为动物模型开展了许多相关的毒理学研究,且主要集中于急性毒性评价方面,暴露浓度水平一般在数百微克每升或数十毫克每升级别,评价指标包括致死率、孵化率以及水肿、脊柱弯曲等^[5-10]。然而重金属污染物在水体中的含量相对较低,一般在 100 μg/L 以下^[11-13],其在低剂量下对亚个体水平(如器官、组织水平等)产生的毒性效应尚不清楚。肝脏是鱼体重要的代谢和解毒器官,为鱼类早期阶段发育提供能量并降低外源毒物的毒性效应,而重金属对鱼类早期阶段肝脏发育的影响尚不明确。因此,开展较低剂量重金属暴露对鱼类早期肝脏发育影响的研究具有重要意义。

斑马鱼(*Danio rerio*)是良好的实验动物模型,已被广泛应用于药物毒理学、生态毒理学、环境监测以及疾病研究等科研领域^[14-18]。与细胞及哺乳类实验动物相比,斑马鱼及其胚胎在肝脏毒性方面的应用更加符合国际上倡导的毒理实验 3R 原则(Replacement, Reduction and Refinement)^[19]。随着诸多转基因模型的建立,斑马鱼在相关研究领域的应用变得更加广泛。张云等^[20]以发育 72 hpf 的肝脏荧光转基因斑马鱼仔鱼 Tg(*lfabp* : *EGFP*)为模型,研究了对乙酰氨基酚对仔鱼肝脏的毒性。端正花等^[21]也以肝脏转基因斑马鱼 Tg(*lfabp10a* : *dsRed*; *elaA* : *EGFP*)为模型,研究了环境中苯并三唑及其衍生物与重金属镉对斑马鱼的单独与联合肝脏毒性效应。Zhang 等^[22]发现对乙酰氨基酚、利福平和阿司匹林等肝脏细胞损伤毒性物质的暴露与转基因斑马鱼品系 Tg(*lfabp10a* : *dsRed*; *elaA* : *EGFP*)肝脏荧光量表达的降低存在显著的剂量-效应关系。

本文选取典型重金属化合物氯化铜(CuCl_2)、氯化汞(HgCl_2)和醋酸铅 $\text{Pb}(\text{Ac})_2$ 作为研究对象,以肝脏荧光转基因斑马鱼为模型,研究了 3 种重金属化合物在低浓度暴露下对斑马鱼仔鱼肝脏发育的影响。

1 材料与方法

1.1 实验鱼及胚胎

本实验采用肝脏绿色荧光转基因斑马鱼 T3(*lfabp* : *EGFP*),具体养殖和繁殖操作参照文献[23]方法。成鱼在 28 ℃、照明/黑暗(14/10 h)条件下分开饲养,每天定时投喂颗粒饵料和活丰年虾。于实验开始前一天下午,取健康性成熟的 T3 斑马鱼,按雌雄 1 : 2 的比例放入交配缸内,雌雄用隔板分开,次日灯光开启后抽隔板,雌雄追尾交配产卵。收集受精卵并用亚甲基蓝溶液消毒,再用胚胎培养水清洗后培养,光照周期和培养温度同成年斑马鱼。每天换新鲜培养水,并及时将死卵和卵壳清除。养至 72 hpf,依据国家标准 GB/T 21807—2008 化学品 鱼类胚胎和卵黄囊仔鱼阶段的短期毒性试验^[24]对孵化、存活和畸形情况进行评价。在相关指标符合国标要求的条件下,挑选孵化出的健康个体进行后续暴露实验。

1.2 试剂及仪器

考虑到暴露液浓度稳定性和均一性,本实验重金属均选用其易溶性盐或其盐的水合物。 HgCl_2 (纯度 99.9%)购自西亚化学工业有限公司; $\text{Pb}(\text{Ac})_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (纯度 99.998%)和 $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (纯度 99.99%)均购自 Aladdin 公司。其他均为国产分析纯试剂。

斑马鱼胚胎培养用水成分为 0.17 mmol/L KCl,0.4 mmol/L CaCl_2 ,5 mmol/L NaCl,0.16 mmol/L MgSO_4 。仔鱼拍照前先用 0.15 mg/L MS-222(间氨基苯甲酸乙酯甲磺酸盐)麻醉,于 4%甲基纤维素中固定拍照。

显微观察和拍照使用奥林巴斯(Olympus)SZX-16 荧光体视显微镜和 FSX-100 多功能显微成像工作站。斑马鱼成鱼饲养系统为北京爱生科技有限公司设备,胚胎和仔鱼在控温型光照培养箱中培养。

1.3 暴露及评价方法

考虑到简化流程和操作等要求,本研究采用已经成熟化的暴露评价方案^[20]。在斑马鱼发育至 72 hpf,挑选发育正常的斑马鱼仔鱼,移入 6 孔板中,每孔 15 尾仔鱼。根据预实验,设定 3 种重金属化合物暴露浓度均为 0、0.01、0.1 和 1 μmol/L,暴露液均用胚胎养殖水配制,每孔加 5 mL 暴露液,每个浓度组设 3 个平行孔。随后于光照培养箱中恒温(28 ℃)培养,每 24 h 换液一次。暴露至 144 hpf 时,观察记录各实验组仔鱼的形态和肝脏损伤情况。于 FSX-100 显微镜下对肝脏侧面进行拍照,采用 FSX-BSW 软件对照片进行处理,并用 Image-Pro plus 5.1 软件测定肝脏荧光面积(Area)和荧光光密度(integral optical density,IOD)。

1.4 统计分析

采用 SPSS 16.0 软件对数据进行统计学分析。采用单因素方差分析法(One way-ANOVA)对不同处理组数据进行组间差异显著性分析; $P < 0.05$ (*),表示差异显著; $P < 0.01$ (**),表示差异极显著。采用 GraphPad Prism 6.0 软件作图,数据表示为 $\bar{x} \pm s$ 。

2 结果与分析

2.1 实验仔鱼 72 hpf 基本指标

发育至 72 hpf,仔鱼存活率为 90.1%,孵化率为 88.8%,未见明显畸形个体。以上数据均符合相关国家标准(GB/T 21807—2008)对斑马鱼胚胎和卵黄囊仔鱼阶段存活率、孵化率的要求。

2.2 重金属暴露对仔鱼存活和形态的影响

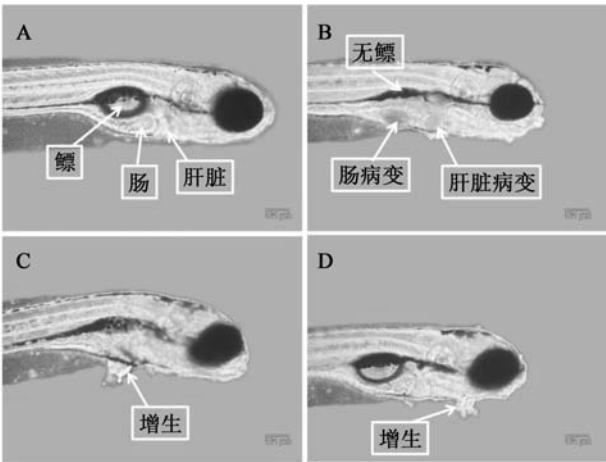
经过 72~144 hpf 暴露,不同处理组仔鱼的存活率和畸形率结果见表 1。对照组存活率为 100%。染毒组存活率均在 95%以上,与对照组相比无显著性差异。对照组个体无畸形现象出现;CuCl₂和 HgCl₂最高浓度组畸形率分别为 71.1%和 20.0%,表现为无鳔或鳔不充气状态,与对照组相比差异极显著。其余组亦有部分个体无鳔或鳔不充气,但无统计学差异。

表 1 CuCl₂、HgCl₂、Pb(Ac)₂和对照组仔鱼在 144 hpf 时的存活率和畸形率

Table1 Survival and malformation rates of CuCl ₂ , HgCl ₂ , Pb(Ac) ₂ and control groups at 144 hpf			
组别	浓度/(μmol/L)	存活率/%	畸形率/%
对照组	-	100.0±0.0	0.0±0.0
	0.01	95.6±7.7	0.0±0.0
	0.1	97.8±3.9	2.2±3.9
CuCl ₂	1	95.6±7.7	71.1±3.8 * *
	0.01	100.0±0.0	0.0±0.0
	0.1	100.0±0.0	2.2±3.9
HgCl ₂	1	97.8±3.9	20.0±6.7 * *
	0.01	97.8±3.9	2.2±3.9
	0.1	100.0±0.0	2.2±3.9
Pb(Ac) ₂	1	97.8±3.9	2.2±3.9

注:** 表示 $P < 0.01$ 。

为了更为直观地展现染毒组畸形个体的形态,我们对各组异常个体进行了相差显微拍照记录。如图 1 所示,对照组个体形态正常,仔鱼发育良好(A),白色箭头所指部位从左到右依次为鳔、肠和肝脏;而 CuCl₂-1 μmol/L组部分个体无鳔(B和C),肝脏和肠道出现病变(B,白色箭头指示部位),体表出现类似增生(C和D,白色箭头指示部位)。



A 对照组个体;B、C、D 均为 CuCl_2 -1 $\mu\text{mol/L}$ 组,其中 B 为无卵且肝脏异常个体, C 为无卵、增生个体,D 为有卵、增生个体

图 1 对照组和 CuCl_2 -1 $\mu\text{mol/L}$ 组仔鱼 144 hpf 时的形态

Fig.1 Morphology of larvae at 144 hpf in control and CuCl_2 -1 $\mu\text{mol/L}$ groups

2.3 重金属暴露对肝脏发育的影响

通过荧光显微观察,检测重金属暴露对肝脏发育和 *lfabp* 表达情况。与对照组相比,重金属暴露导致肝脏显著减小。如图 2 所示,图中列出了对照组和各重金属最高浓度组个体的明视场-荧光叠加图片,白色箭头所指部位为肝脏,从图中可以看出暴露组肝脏荧光面积和亮度明显减小。

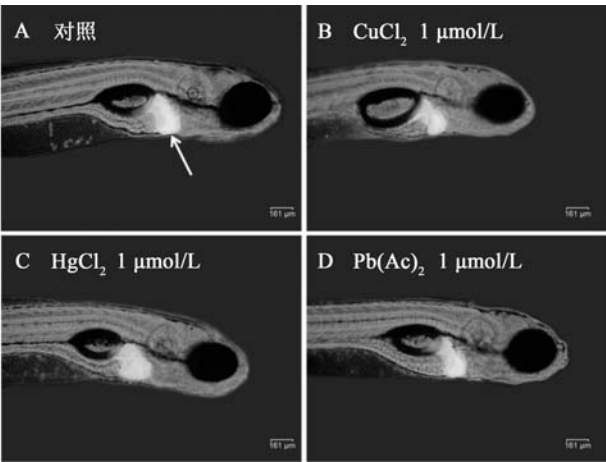


图 2 CuCl_2 、 HgCl_2 、 $\text{Pb}(\text{Ac})_2$ 最高浓度组和对照组的肝脏荧光图片

Fig.2 Liver fluorescence images of the highest dose groups of CuCl_2 , HgCl_2 , $\text{Pb}(\text{Ac})_2$ and control groups

对各个处理组的部分个体进行荧光拍照,测量了肝脏侧面荧光面积 (Area) 和荧光光密度 (IOD)。如图 3 所示,与对照组相比, CuCl_2 (0.1 和 1 $\mu\text{mol/L}$) 和 $\text{Pb}(\text{Ac})_2$ (0.1 和 1 $\mu\text{mol/L}$) 暴露组肝脏荧光面积均显著减小,且呈现一定的剂量-效应关系。如图 4 所示,与对照组相比, CuCl_2 (1 $\mu\text{mol/L}$) 和 $\text{Pb}(\text{Ac})_2$ (0.01、0.1 和 1 $\mu\text{mol/L}$) 暴露组肝脏荧光光密度均显著减小,且呈现一定的剂量-效应关系。 HgCl_2 各暴露组肝脏荧光光密度也呈现减小趋势,但无统计学差异。肝脏荧光面积结果表明,上述 3 种重金属化合物暴露显著影响了肝脏发育,导致肝脏显著小于对照组。肝脏荧光光密度结果表明,上述 3 种重金属化合物暴露显著影响了肝脏 *lfabp* 的正常表达,从而影响了肝脏的生理学功能。相同暴露浓度下, CuCl_2 对肝脏发育大小的负面影响比 $\text{Pb}(\text{Ac})_2$ 和 HgCl_2 强,但 HgCl_2 在 0.01 $\mu\text{mol/L}$ 时就能够显著抑制肝脏发育; CuCl_2 和 $\text{Pb}(\text{Ac})_2$ 抑制 *lfabp* 表达量的能力比 HgCl_2 强,且 $\text{Pb}(\text{Ac})_2$ 在 0.01 $\mu\text{mol/L}$ 时就能够显著抑制 *lfabp* 表达。

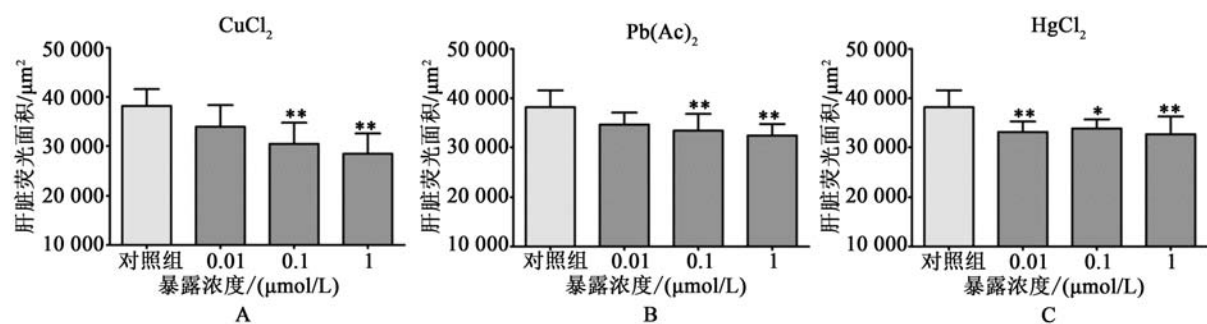


图 3 CuCl₂、HgCl₂、Pb(Ac)₂组和对照组肝脏荧光面积

Fig.3 Liver fluorescence areas of CuCl₂, HgCl₂, Pb(Ac)₂ and control groups

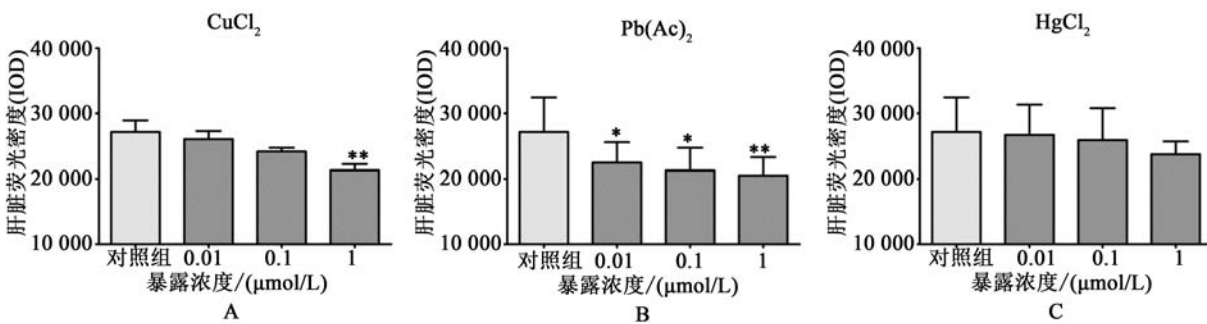


图 4 CuCl₂、HgCl₂、Pb(Ac)₂组和对照组肝脏荧光光密度 (IOD)

Fig.4 Liver fluorescence IOD of CuCl₂, HgCl₂, Pb(Ac)₂ and control groups

3 讨论

本研究丰富了转基因斑马鱼在快速评价肝脏发育毒性方面的应用,能够为评估不同重金属化合物对水生脊椎动物早期发育阶段的肝脏毒性提供参考,为综合评价水环境重金属污染物的毒性效应和环境健康风险提供了科学依据。本文以肝脏绿色转基因荧光斑马鱼 T3 (*lfabp:EGFP*) 为模型,研究了 3 种重金属化合物 (CuCl₂、HgCl₂ 和 Pb(Ac)₂) 在不显著引起死亡率上升的浓度下对仔鱼肝脏发育的影响。发育至 72 hpf 的仔鱼存活率和孵化率均满足相关标准要求,为实验结果的可靠性提供了保障。经过 72~144 hpf 暴露期后,各组存活率均在 95% 以上,与对照组相比无显著性差异。1 μmol/L 的 CuCl₂ 和 HgCl₂ 暴露能够分别引起 71.1% 和 20.0% 的个体无鳔或鳔不充气,这与之前文献报道的 2.56 μg/L CuSO₄ 暴露引起 65.6% 个体鳔缺失的结果类似^[25]。

与以往单纯测量荧光强度不同^[20-21],本研究分别对肝脏侧面荧光面积和荧光密度进行了测量。荧光面积大小代表肝脏发育大小,荧光密度强弱代表 *lfabp* 表达量的高低,间接反映了肝脏功能发育是否完善。Cu、Hg 和 Pb 都能够显著减小肝脏荧光面积,说明 3 种重金属化合物均能够显著抑制肝脏的发育。斑马鱼肝型脂肪酸结合蛋白相关基因 *lfabp* 是脂肪酸结合蛋白家族 (L-FABP) 的重要成员之一,L-FABP 不但可转运脂肪酸,为细胞生长提供能源及原材料,还可以结合和转运各种配体、参与细胞内的信号转导、影响有丝分裂,同时还具有抗氧化的功能^[21]。Cu 和 Pb 能够显著抑制 *lfabp* 的表达。虽然 Hg 的抑制作用无统计学差异,但抑制趋势呈现一定的剂量效应关系。通过分析可以得出,3 种重金属化合物都具有抑制仔鱼肝脏正常生理功能的作用,肝脏细胞受到不同程度的损伤,不同金属的毒性特点不一样,且 Pb 的抑制作用强于 Cu 和 Hg。

在 72 hpf 时仔鱼肝脏基本形成,此后肝脏会继续长大^[26]。为了便于实验操作,并结合之前本方案的成功应用经验^[20],本研究选择的暴露期为 72~144 hpf。这个时期内肝脏将行使代谢功能,消化吸收卵黄囊的营养物质,肝体继续长大,有利于特定考察重金属对肝脏发育和功能的影响。考虑到持续暴露对肝脏分化发

育的影响,以及选择更加敏感的暴露窗口期,今后的实验将会对 1 hpf 内的胚胎进行暴露,直到 72 hpf 或 144 hpf,与本文获得的实验结果进行比较,筛选出更加高效的暴露方案。

转基因斑马鱼模型在快速评价化学品毒性方面具有显著优势。通过建立多种器官、靶点特异的荧光转基因品系,优化毒性筛选方案,并结合分子毒理致毒机制研究,将为实现快速、高效的污染物毒理学评价和环境健康风险评估提供有力保障。此外,实际水环境中的污染物种类繁多,且多种同时存在于同一水体中,构成复合污染。目前基于鱼类胚胎/仔鱼模型的复合暴露毒性评价指标也仍然停留在死亡率、孵化率和畸形率等一般急性毒性指标上^[21,27-28]。通过优化复合暴露方法和检测指标,提高在复合暴露毒性评价中应用相关转基因斑马鱼品系的可行性,从而加快对多种污染物复合暴露的风险评价,将成为下一阶段的重点研究方向。

参考文献:

[1] 孙维锋,肖迪. 水体重金属污染现状及治理技术[J]. 能源与节能, 2012(2):49-50.

[2] 戚平平,刘亮,苏乃洲,等.我国水体突发性污染不完全统计分析[J]. 济南大学学报(自然科学版), 2014,28(5):335-341.

[3] 赵顺顺,孟范平,王震宇,等. 监测水体重金属污染的分子生物标志物研究进展[J]. 生态环境学报, 2010, 19(2):453-458.

[4] 徐永江,柳学周,马爱军. 重金属对鱼类毒性效应及其分子机理的研究概况[J]. 海洋科学, 2004,28(10):67-70.

[5] 孔祥迪,陈超,李炎璐,等. Cu²⁺、Zn²⁺、Pb²⁺对七带石斑鱼(*Epinephelus septemfasciatus*)胚胎和初孵仔鱼的毒性效应[J]. 渔业科学进展, 2014,35(5):115-121.

[6] 王洪盼,赵艳民,秦延文,等. Cu 和 Cd 对日本青鳉(*Oryzias latipes*)早期发育阶段的急性毒性效应研究[J]. 生态毒理学报, 2014, 9(4):793-802.

[7] 穆景利,王莹,王新红,等. Cd²⁺、Hg²⁺、Cr⁶⁺和 Pb²⁺对黑点青鳉(*Oryzias melastigma*)早期生活阶段的毒性效应研究[J]. 生态毒理学报, 2011, 6(4):352-360.

[8] 鲁疆,王占洋,袁玉婷,等. 氯化镉对斑马鱼胚胎的发育毒性[J]. 生态毒理学报, 2013, 8(3):381-388.

[9] 胡蓉,谢玉华,唐正义. 汞镉离子对鲫鱼胚胎发育和仔鱼的毒性效应[J]. 安徽农业科学, 2010, 38(34):19446-19448.

[10] SFAKIANAKIS D G, RENIERI E, KENTOURI M, et al. Effect of heavy metals on fish larvae deformities: A review[J]. Environmental Research, 2015, 137:246-255.

[11] 谢文平,陈昆慈,朱新平,等. 珠江三角洲河网区水体及鱼体内重金属含量分析与评价[J]. 农业环境科学学报, 2010, 29(10):1917-1923.

[12] 谢文平,朱新平,郑光明,等. 广东罗非鱼养殖区水体和鱼体中重金属、HCHs、DDTs 含量及风险评价[J]. 环境科学, 2014,35(12):4663-4670.

[13] 简敏菲,李玲玉,余厚平,等. 鄱阳湖湿地水体与底泥重金属污染及其对沉水植物群落的影响[J]. 生态环境学报, 2015, 24(1):96-105.

[14] 王佳佳,徐超,屠云杰,等. 斑马鱼及其胚胎在毒理学中的实验研究与应用进展[J]. 生态毒理学报, 2007, 2(2):123-135.

[15] CRISTINA S, ZON L I. Hooked! Modeling human disease in zebrafish[J]. Journal of Clinical Investigation, 2012, 122(7):2337-2343.

[16] DAI Y J, JIA Y F, CHEN N, et al. Zebrafish as a model system to study toxicology[J]. Environmental Toxicology & Chemistry, 2014, 33(1):11-17.

[17] 刘辉,戴家银. 斑马鱼在生态毒理学研究及环境监测中的应用[J]. 中国实验动物学报, 2015, 23(5):529-534.

[18] 何秋霞,董贞兰,楚杰,等. 芦荟大黄素对斑马鱼胚胎发育及运动行为学的毒性研究[J]. 山东科学, 2015, 28(3):23-28.

[19] FLECKNELL P. Replacement, reduction and refinement [J]. Altex, 2002,19(2):73-78.

[20] 张云,彭维兵,王希敏,等. 采用斑马鱼模型评价对乙酰氨基酚的肝脏毒性[J]. 药物评价研究, 2013, 36(5):351-354.

[21] 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.

[3] 刘立群,赵振南.频谱分析技术在超声检测中的应用[J].一重技术,2013(5):57-61.

[4] 蒋志峰,吴作伦,吴瑞明,等.材料缺陷超声检测中谱分析技术的研究[J].兵器材料科学与工程,2009,32(4):117-120.

[5] FELICE M V, VELICHKO A, WILCOX P D, et al. Obtaining geometries of real cracks and using an efficient finite element method to simulate their ultrasonic array response[J].Insight: Non-Destructive Testing and Condition Monitoring, 2014, 56(9): 492-498.

[6] 赵军辉,魏勤,袁媛,等. Lamb 波检测板中裂纹的有限元模拟[J].压电与声光,2013,35(3):320-324.

[7] XUE T, LORD W, UDPA S. Numerical analysis of the radiated fields of ultrasonic transducers [J]. Journal of Nondestructive Evaluation, 1995,14(3): 137-146.

[8] DATTA D, KISHORE N N. Features of ultrasonic wave propagation to identify defects in composite materials modelled by finite element method [J]. NDT & E International,1996,29(4): 213-223.

[9] KISHORE N N, SRIDHAR I, IYENGR N G R. Finite element modeling of the scattering ultrasonic waves by isolated flaws[J]. NDT & E International,2000, 33(5):297-305.

[10] BLANLOEUIL P, MEZIANE A, BACON C. 2D finite element modeling of the non-collinear mixing method for detection and characterization of closed cracks [J]. NDT & E International,2015, 76: 43-51.

[11] 孙朝明.超声横波检测的有限元模拟计算与分析[J].压电与声光,2014,36(6):1018-1021.

[12] 李树榜,李书光,刘学锋.裂纹超声散射的有限元模拟[J].无损检测,2007,29(1):27-31.

[13] LIU T, LIU K, ZHANG J. Triangular grid method for stress-wave propagation in 2-D orthotropic materials[J]. Archive of Applied Mechanics, 2005, 74(7):477-488.

[14] 韩秀甫,滕永平,吴迪,等.超声换能器暂态声场的理论分析与计算[J].安庆师范学院学报(自然科学版),2004,10(3):25-28.

(上接第 59 页)

[22] ZHANG X Y, LI C X, GONG Z Y. Development of a convenient *in vivo* hepatotoxin assay using a transgenic zebrafish line with liver-specific DsRed expression[J]. Plos One, 2014, 9(3):e91874.

[23] WESTERFIELD M. The Zebrafish Book [M]. Eugene: University of Oregon Press, 1995.

[24] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局,中国国家标准化管理委员会. GB/T 21807—2008 化学品 鱼类胚胎和卵黄囊仔鱼阶段的短期毒性试验[S].北京:中国标准出版社.

[25] 章强,辛琦,强丽媛,等.铜及其与四环素的联合暴露对斑马鱼胚胎的毒性效应[J].生态毒理学报,2015,10(5):35-46.

[26] CHU J, SADLER K C. New school in liver development: lessons from zebrafish.[J]. Hepatology, 2009, 50(5):1656-1663.

[27] 张亚辉,刘征涛,王一喆,等. Cu²⁺ 和 Cd²⁺ 对斑马鱼胚胎早期发育的联合毒性[J]. 环境科学研究, 2010, 23(11):1415-1420.

[28] 章晓凤,张微,周聪. 氟虫腈和铜对斑马鱼早期发育的联合毒性效应[J]. 浙江工业大学学报, 2012, 40(6):612-615.