

DOI:10.7524/AJE.1673-5897.20161126003

梁艺怀, 张京佶, 石利利, 等. 稀有鮡鲫作为化学品生态毒性测试鱼类模式生物的标准化实践[J]. 生态毒理学报, 2017, 12(2): 2-10

Liang Y H, Zhang J J, Shi L L, et al. Standardization of *Gobiocypris rarus* as fish model used in chemical ecotoxicity testing [J]. Asian Journal of Ecotoxicology, 2017, 12(2): 2-10 (in Chinese)

稀有鮡鲫作为化学品生态毒性测试鱼类模式生物的标准化实践

梁艺怀¹, 张京佶¹, 石利利², 刘济宁², 杨海荣³, 赵榆³, 杨鸿波⁴, 李俊⁴, 赵玉艳⁵, 殷浩文^{1,*}

1. 上海市检测中心生物与安全检测实验室, 上海 201203
2. 环境保护部南京环境科学研究所, 南京 210042
3. 沈阳化工研究院有限公司测试评价中心, 沈阳 110021
4. 贵州省分析测试研究院, 贵阳 550002
5. 苏州华测安评化学品技术服务有限公司, 苏州 215121

收稿日期: 2016-11-26 录用日期: 2017-03-20

摘要: 鱼类模式生物在化学品生态毒性测试中占有重要地位, 中国尚没有合适的标准化本土实验鱼种。国家环境保护部第7号令《新化学物质环境管理办法》对本土受试生物用于生态毒性测试提出了要求。稀有鮡鲫(*Gobiocypris rarus*)是一种我国特有的小型淡水鲤科鱼类, 具有成为标准试验鱼种的潜能。首个以稀有鮡鲫为标准供试生物的化学品鱼类急性毒性试验国家标准已经发布实施, 其他测试方法的标准化工作正在持续进行中。本文阐述了研发稀有鮡鲫为标准供试生物的依据, 对相关标准化研究工作进行了分析、归纳和总结, 并提出了未来工作的方向和需求。

关键词: 化学品; 稀有鮡鲫; 生态毒性; 模式生物; 标准化

文章编号: 1673-5897(2017)2-002-09 中图分类号: X171.5 文献标识码: A

Standardization of *Gobiocypris rarus* as Fish Model Used in Chemical Ecotoxicity Testing

Liang Yihuai¹, Zhang Jingji¹, Shi Lili², Liu Jining², Yang Hairong³, Zhao Yu³, Yang Hongbo⁴, Li Jun⁴, Zhao Yuyan⁵, Yin Haowen^{1,*}

1. Bioassay and Safety Assessment Laboratory, Shanghai Academy of Public Measurement, Shanghai 201203, China
2. Nanjing Institute of Environmental Sciences of the Ministry of Environmental Protection, Nanjing 210042, China
3. Testing Evaluation Center Shenyang Research Institute of Chemical Industry CO., LTD., Shenyang 110021, China
4. Guizhou Academy of Testing and Analysis, Guiyang 550002, China
5. Centre Testing International (Suzhou), Suzhou 215121, China

Received 26 November 2016 accepted 20 March 2017

Abstract: Fish models play an important role in chemical ecotoxicity testing, but no Chinese native fish species

基金项目: 上海市科委技术标准专项 (15DZ0504100)

作者简介: 梁艺怀(1981-), 男, 高级工程师, 研究方向为生态毒理学, E-mail: liangyh@apm.sh.cn;

* 通讯作者 (Corresponding author), E-mail: yinhw@apm.sh.cn

have been fully agreed on in this area. As the Provisions on Environmental Administration of New Chemical Substances (the Order No. 7, released by the Ministry of Environmental Protection of China) require, native test organisms would be preferred in ecotoxicity testing. Rare minnow (*Gobiocypris rarus*) is one species of small freshwater fish endemic to China, and probably is able to serve as a promising standardized test fish. While the first national standard for fish acute toxicity test adopting rare minnow has been developed and issued in China, other work on standardization of testing methods relevant to rare minnow is still ongoing. This article explained the foundation to develop rare minnow as standardized test fish, analyzed and summarized the related standardization issues, and also pointed out the trend and the demand of research in future.

Keywords: chemicals; *Gobiocypris rarus*; ecotoxicity; model organism; standardization

鱼类模式生物是生命科学基础研究的实验材料之一,是药物、食品、化学品等安全性评价和效果试验的活试剂^[1]。动物实验的目标是追求能准确反映实验过程的可靠数据。无论是科学研究、环境监测还是毒性检测,实验动物的质量是实验数据可重复性(repeatability)、再现性(reproducibility)和可比性(comparability)的基石。在化学品安全管理中,高质量的数据更是有效执法的依据。

某一种模式生物要成为实验动物,并得到广泛认可和應用必然要经过标准化研究。这也是实验动物区别于其他类动物的本质特征。鱼类模式生物中最为人所知的当属斑马鱼(zebrafish, *Danio rerio*),其在生态毒理学评价中应用广泛,已成为仅次于小鼠的第二优先脊椎模式生物^[2],得到国际标准化组织(International Organization for Standardization, ISO)、经济合作与发展组织(Organization for Economic Cooperation and Development, OECD),以及欧洲化学工业生态学与毒理学中心(European Chemical Industry Ecology and Toxicology Center, ECETOC)等权威组织认可。斑马鱼在遗传学控制、微生物学控制、环境控制、营养学控制等方面的相关标准化工作已经取得了诸多进展^[3]。在这方面,中国起步较晚,近 10 年来我国在环境科学研究领域有较多的本土物种参与到对环境质量、风险评估的应用研究中,包括稀有鮡鲫(*Gobiocypris rarus*)、鲤鱼(*Cyprinus carpio*)、草鱼(*Ctenopharyngodon idellus*)、鲢鱼(*Hypophthalmichthys molitrix*)、鳙鱼(*Aristichthys nobilis*)、麦穗鱼(*Pseudorasbora parva*)等本土获取的鱼种^[4-5],但是这些研究绝大部分是集中在生态学和生态毒理学层面,对本土实验鱼种的实验室内模式物种的标准化研发和应用尚在起步阶段。由于我国化学品管理法规的需求,我国本土鱼种稀有鮡鲫是目前标准化前景较好的鱼种,已经在化学品毒性测试领域中累积了较多

的实践经验,但要成为一种化学品测试普遍认可的模式生物还需深入开展与物种特征鉴定、饲养规范、毒性响应的稳定性、实验条件的适宜性、毒物敏感性等一系列标准化研究与验证工作。本文旨在阐述研发稀有鮡鲫为化学品测试的标准供试生物的依据;承前启后,对已开展的实验室内和实验室间的相关的质量与测试技术标准化工作进行分析、归纳和总结,提出未来工作的方向和需求。

1 以本土鱼种作为模式生物应用于化学品生态毒性测试的必要性 (The necessity of native fish species as model organism used in chemical ecotoxicity testing)

鱼类作为水生生态毒性试验体系中的顶级脊椎动物,在化学品生态毒性试验体系中有不可替代的作用。因此,发达国家早在化学品安全管理体系建立之初,就通过大量标准化研究推出符合管理要求、具有科学基础的代表性试验鱼种。国际标准化组织(ISO)在 20 世纪 80 年代即推荐斑马鱼(*Danio rerio*)、黑头软口鲮(*Pimephales promelas*)、蓝鳃鱼(*Lepomis macrochirus*)、虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)和青鳉(*Oryzias latipes*)等鱼种作为为毒性试验材料鱼。这些标准化工作为发达国家在化学品安全管理全球化的过程中争得了绝对的主导权,并将管理体系和标准化技术的优势延伸扩大到化学品生产、国际贸易等经济活动方面。

目前全球化学品测试体系基本上以经济合作与发展组织(OECD)发布的《化学品测试指南》系列技术指南文件(TGD)为框架。从测试方法到生物物种,欧美占了绝对的主导地位(表 1)。生态保护上的特异性是全球公认的,我们需要有符合我国环境保护特点的试验鱼种。2010 年 10 月 15 日国家环境保护部颁布实施《新化学物质环境管理办法》(第 7 号令)^[6],其中第十条规定新化学物质的“生态毒理学特

性测试报告,必须包括在中国境内用中国的供试生物按照相关标准的规定完成的测试数据”。这从行政管理上奠定了保护我国生态环境安全的基础,也为后续生态毒性测试技术标准化的突破预留了空间。

在世界贸易组织(WTO)框架下,工业产品安全性数据关联的技术标准已成为各国保护本国环境和经济的关键技术手段。作为化学品进出口和生产大

国,强调在与国际标准接轨的同时,也应该关注我国本土的特点,尤其在具有地域性特征的生态问题上。通过制定我国特有鱼种的标准系列,不仅能够提升我国化学品安全管理的水准,切实落实管理上要求的用中国特有的供试生物进行测试,还能推动我国标准化战略从遵从国际标准向兼容并蓄中国自主标准的方向转化。

表1 OECD 化学品测试指南中的鱼类测试方法及推荐鱼种

Table 1 Fish tests and recommended species in OECD guidelines for chemical testing

测试方法 Testing guidelines	推荐鱼种 Recommended species
203 鱼类急性毒性试验 ^[7] 203 Fish, Acute Toxicity Test ^[7]	斑马鱼 <i>Danio rerio</i> 黑头软口鲮 <i>Pimephales promelas</i> 蓝鳃鱼 <i>Lepomis macrochirus</i> 虹鳉 <i>Oncorhynchus mykiss</i> 青鳉 <i>Oryzias latipes</i> 鲤鱼 <i>Cyprinus carpio</i> 孔雀鱼 <i>Poecilia reticulata</i>
204 鱼类 14 天延长毒性试验(已废除) ^[8] 204 Fish Prolonged Toxicity 14 d Study (deleted) ^[8]	同 203 The same with 203
210 鱼类早期生活阶段毒性试验 ^[9] 210 Fish, Early-life Stage Toxicity Test ^[9]	虹鳉 <i>Oncorhynchus mykiss</i> 斑马鱼 <i>Danio rerio</i> 黑头软口鲮 <i>Pimephales promelas</i> 青鳉 <i>Oryzias latipes</i> 羊头鱼 <i>Cyprinodon variegatus</i>
212 鱼类胚胎-卵黄囊吸收阶段的短期毒性试验 ^[10] 212 Fish, Short-term Toxicity Test on Embryo and Sac-fry Stages ^[10]	虹鳉 <i>Oncorhynchus mykiss</i> 斑马鱼 <i>Danio rerio</i> 鲤鱼 <i>Cyprinus carpio</i> 黑头软口鲮 <i>Pimephales promelas</i> 青鳉 <i>Oryzias latipes</i>
215 鱼类幼体生长试验 ^[11] 215 Fish, Juvenile Growth Test ^[11]	虹鳉 <i>Oncorhynchus mykiss</i>
229 鱼类短期繁殖试验 ^[12] 229 Fish Short Term Reproduction Assay ^[12]	斑马鱼 <i>Danio rerio</i> 黑头软口鲮 <i>Pimephales promelas</i> 青鳉 <i>Oryzias latipes</i>
230 雌激素、雄激素活性与芳香化酶活性抑制鱼类 21 天短期筛选试验 ^[13] 230 21-day Fish Assay: A Short-Term Screening for Oestrogenic and Androgenic Activity, and Aromatase Inhibition ^[13]	斑马鱼 <i>Danio rerio</i> 黑头软口鲮 <i>Pimephales promelas</i> 青鳉 <i>Oryzias latipes</i>
234 鱼类性发育试验 ^[14] 234 Fish Sexual Development Test ^[14]	斑马鱼 <i>Danio rerio</i> 青鳉 <i>Oryzias latipes</i> 三刺鱼 <i>Gasterosteus aculeatus</i>
236 鱼类胚胎急性毒性试验 ^[15] 236 Fish Embryo Acute Toxicity (FET) Test ^[15]	斑马鱼 <i>Danio rerio</i>
240 青鳉扩展一代繁殖试验 ^[16] 240 Medaka Extended One Generation Reproduction Test (MEOGRT) ^[16]	青鳉 <i>Oryzias latipes</i>

稀有鮡鲫(*Gobiocypris rarus*)是我国特有的一种小型鲤科鱼类。因其性成熟时间短、繁殖季节长、产卵量较大,可常年人工繁殖,具有成为标准试验鱼种的潜能^[17]。因其生物学特征研究已较为系统,国内许多科研单位、测试机构使用稀有鮡鲫开展生命科学研究或生态毒性检测^[18-20]。正因为稀有鮡鲫存在的诸多优势和工作基础,它成为我国化学品鱼类测试方法标准化的首选受试鱼种。

2 稀有鮡鲫种群建立与质量标准化研究 (Rare minnow resource and quality standards)

数量充足、质量合格的稀有鮡鲫胚胎、幼鱼或成鱼的供应,是顺利进行各类毒性试验的前置条件。只有实现稀有鮡鲫的实验室规范化养殖,才能为相关国家标准的研制和实施提供保障。

中国科学院水生生物研究所王剑伟研究员通过国家科技支撑计划项目“实验动物新品种的种群建立与质量标准化研究”(2011BAI15B01),建立了稀有鮡鲫普通级和清洁级资源保存基地,制定了微生物、寄生虫、遗传、病理、饲料、环境等6个实验稀有鮡鲫质量标准和相关条件控制标准,以及饲养管理技术规范、生物学特性描述规范、数据测定技术规范,还完成了实验稀有鮡鲫分子遗传标记检测、4种细菌多重PCR检测、致病性嗜水气单胞菌等5种病原细菌检测、分枝杆菌检测、寄生虫检测等技术操作规程的编制^[21-23]。这些工作的完成,为稀有鮡鲫成为符合化学品环境管理要求的生态毒性测试受试生物奠定了基础。

3 稀有鮡鲫国家标准的研制以及在其他毒性测试方法适用性研究 (Development of national standards related to rare minnow and research on its applicability to other toxicity testing methods)

在经济合作与发展组织(OECD)化学品测试指南生物系统效应部分中,涉及鱼类的测试方法占了将近1/4。在我国现行有效的化学品测试方法国家标准中,无论是试验程序还是试验生物,几乎都是对OECD指南的等同转化,鲜有技术创新。而遵循国际规范,验证稀有鮡鲫的适用性并使之标准化,对完善我国的化学品生态毒性测试技术体系、落实环保部第7号令,具有重要意义。目前,已有一项稀有鮡鲫的化学品测试国家标准发布实施,另一项国家标准正在研制过程中。另外,为了应对国际上日趋严格的脊椎动物动物使用限制,以稀有鮡鲫胚胎为材料的替代

试验标准化基础研究已经启动;而管理部门对筛查新化学物质中潜在内分泌干扰物的技术需求,也使得稀有鮡鲫在该领域的适用性研究具有现实意义。

3.1 国家标准《化学品 稀有鮡鲫急性毒性试验》的研制

我国化学品管理法规要求,鱼类急性毒性试验是必须在中国境内完成的测试项目之一^[6]。通过试验可获得化学品对中国受试生物的急性毒性数据,并为后续毒性试验的设计和观察提供依据。同时,急性毒性试验由于时间短、易操作、试验条件便于控制等特点,成为我国化学品管理规定的生态毒性试验中最基础层面的数据要求。

首个以稀有鮡鲫为标准供试生物的国家标准《GB/T 29763-2013 化学品 稀有鮡鲫急性毒性试验》^[24]已经由上海市检测中心联合原环境保护部化学品登记中心、中国科学院水生生物研究所、中国检验检疫科学研究院、环境保护部南京环境科学研究所、沈阳化工研究院有限公司安全评价中心5家单位共同研制完成,并正式颁布实施。在此之前,有关稀有鮡鲫的研究大多是将稀有鮡鲫作为科学研究的材料,尚未见标准化方面的报道。生态毒理学应用研究较少,尤其在标准化基础研究方面。

为解决上述标准化过程中的短板,上海市检测中心生物与安全检测实验室在多年应用稀有鮡鲫进行毒性实验的基础上于2009年启动了为期2年的标准化专项研究,并延续一年补充数据基础和完成实验室间的比对验证,完成了稀有鮡鲫急性毒性试验结果的重复性和再现性论证,并进一步开展了与现行标准鱼种的可比性和敏感性研究。

(1) 稀有鮡鲫急性毒性试验结果的重复性和再现性研究

研究选择重铬酸钾和3,4-二氯苯胺为参比物。结果表明,同一实验室内部相同试验条件下,不同体长稀有鮡鲫对同一化学品的敏感性略有差异。同一实验室内6次重复试验比较显示,2种参比物对稀有鮡鲫96h半数致死浓度(96h-LC₅₀)值在质量控制范围之内,不同体长的稀有鮡鲫试验结果体现了较好的重复性。同时,6个实验室间的比对结果显示,稀有鮡鲫的急性毒性试验结果在不同实验室间具有良好的再现性^[25]。

(2) 稀有鮡鲫与斑马鱼试验结果的可比性

通过实验数据和文献分析2种方式获得稀有鮡鲫和斑马鱼(现行国际标准鱼种之一)对化学品敏感

性特征数据集(表2)。结果显示,受试化学品对稀有鮕鲫与斑马鱼的96 h-LC₅₀数值接近,基本处于同一数量级,提示2种试验鱼对受试化学品毒性响应的差异不大。因此,稀有鮕鲫作为一种中国本土的试验鱼种,具有敏感性与国际主流的标准鱼种斑马鱼相近的特点,适宜作为鱼类急性毒性试验的标准鱼种。

3.2 国家标准《化学品 稀有鮕鲫幼体生长试验》的研制

通过《化学品 稀有鮕鲫急性毒性试验》国家标准的发布和实施,稀有鮕鲫成为了化学品生态毒性测试领域的标准实验鱼种,然而,仅依据急性毒性数据来进行化学品的危害评估和风险评估是远远不够的。化学品在对试验生物长期重复暴露时可能产生与急性毒性试验不同的毒作用,而动物的生长衰老也可能影响毒作用的性质和程度。与急性毒性数据

相比,慢性毒性数据能够提供更多的效应终点,在进行某一化学品毒性的种间外推时慢性毒性数据具有较小的不确定性和评估因子,能够优化风险评估的结论。因此,必须持续推动我国标准试验鱼种用于化学品生态毒性测试的标准化战略,开展稀有鮕鲫在化学品慢性毒性试验方法的标准化研究。2014年9月国家标准化管理委员会批准了由上海市检测中心牵头,环境保护部固体废物与化学品管理技术中心、中科院水生生物研究所、中国检验检疫科学研究院、南京环境保护研究所、浙江省农业科学院农产品质量标准研究所共同参与的《化学品 稀有鮕鲫幼体生长试验》国家标准编制任务(项目编号20140324-T-469),该慢性毒性试验标准的研制,有助于我国特有试验鱼种测试标准的系列化,为稀有鮕鲫最终成为国际公认的标准试验鱼种创造条件。

表2 化合物对稀有鮕鲫和斑马鱼的急性毒性(96 h-LC₅₀)比较

Table 2 Comparison of acute toxicity (96 h-LC₅₀) between *Gobiocypris rarus* and *Danio rerio*

	鱼种 Fish species	96 h-LC ₅₀	试验鱼体长或日龄 Body length or days post-hatch	参考文献 References
重铬酸钾 Potassium dichromate	稀有鮕鲫 <i>Gobiocypris rarus</i>	182.30 mg·L ⁻¹	30.0±10.0 mm	[25]
	稀有鮕鲫 <i>Gobiocypris rarus</i>	160.11 mg·L ⁻¹	24 d	[26]
	稀有鮕鲫 <i>Gobiocypris rarus</i>	229.14 mg·L ⁻¹	20.0±3.0 mm	[27]
	斑马鱼 <i>Danio rerio</i>	128.15 mg·L ⁻¹	26.0±3.0 mm	[27]
	斑马鱼 <i>Danio rerio</i>	141.44 mg·L ⁻¹	20.0~23.0 mm	[28]
Zn ²⁺	稀有鮕鲫 <i>Gobiocypris rarus</i>	3.66 mg·L ⁻¹	24 d	[26]
	斑马鱼 <i>Danio rerio</i>	30.0 mg·L ⁻¹	24.6 mm	[29]
	斑马鱼 <i>Danio rerio</i>	44.48 mg·L ⁻¹	23.0±3.0 mm	[30]
	斑马鱼 <i>Danio rerio</i>	20.62 mg·L ⁻¹	30.0 mm	[31]
3,4-二氯苯胺 3,4-Dichloroaniline	稀有鮕鲫 <i>Gobiocypris rarus</i>	6.59 mg·L ⁻¹	30.0±10.0 mm	[25]
	斑马鱼 <i>Danio rerio</i>	6.08 mg·L ⁻¹	21.0±2.3 mm	[32]
Cu ²⁺	稀有鮕鲫 <i>Gobiocypris rarus</i>	105.2 μg·L ⁻¹	24 d	[26]
	斑马鱼 <i>Danio rerio</i>	174 μg·L ⁻¹	23.0±3.0 mm	[30]
五氯酚钠 Sodium pentachlorophenol	稀有鮕鲫 <i>Gobiocypris rarus</i>	113.2 μg·L ⁻¹	24 d	[26]
	稀有鮕鲫 <i>Gobiocypris rarus</i>	101.5 μg·L ⁻¹	20.0±3.0 mm	[27]
	稀有鮕鲫 <i>Gobiocypris rarus</i>	81 μg·L ⁻¹	9.5±2.0 mm	[33]
	斑马鱼 <i>Danio rerio</i>	107.7 μg·L ⁻¹	26.0±3.0 mm	[27]
二苯胂 Diphenyl cyanoarsine	稀有鮕鲫 <i>Gobiocypris rarus</i>	0.012 mg·L ⁻¹	20.0±10.0 mm	[34]
	斑马鱼 <i>Danio rerio</i>	0.014 mg·L ⁻¹	20.0±10.0 mm	[34]
二苯氯胂 Diphenyl chlorarsine	稀有鮕鲫 <i>Gobiocypris rarus</i>	0.014 mg·L ⁻¹	20.0±10.0 mm	[34]
	斑马鱼 <i>Danio rerio</i>	0.019 mg·L ⁻¹	20.0±10.0 mm	[34]
苯氯乙酮 Chloroacetophenone	稀有鮕鲫 <i>Gobiocypris rarus</i>	0.56 mg·L ⁻¹	20.0±10.0 mm	[34]
	斑马鱼 <i>Danio rerio</i>	0.56 mg·L ⁻¹	20.0±10.0 mm	[34]
甲苯 Toluene	稀有鮕鲫 <i>Gobiocypris rarus</i>	100.62 mg·L ⁻¹	9.5±2.0 mm	[33]
	斑马鱼 <i>Danio rerio</i>	77.5 mg·L ⁻¹	25 mm	[35]

目前,标准研制团队以重铬酸钾和 3,4-二氯苯胺为参比物质,开展稀有鮎鲫幼体生长试验结果的重复性研究,这项参比物研究汇集了国内 5 家同类实验室,共同开展比对试验,以期对试验结果的再现性进行评价。这些工作成果将成为《化学品 稀有鮎鲫幼体生长试验》国家标准的重要依据,为 2017 年底前完成标准草案的编制和送审奠定基础。

3.3 利用稀有鮎鲫进行鱼类相关替代试验的适用性研究

欧美国家的动物福利法规对采用脊椎动物作为实验材料提出了越来越严格的限制。比如,欧洲动物福利法要求科学研究遵从 3R(replacement, reduction and refinement)原则,尽可能地减少脊椎动物的使用,开发和验证出可替代整体生物的试验方法(如,细胞、组织、胚胎)^[36-37]。其中,首选用于替代鱼体暴露的方法为胚胎暴露。目前,OECD 已颁布多个有关鱼类胚胎毒性试验的方法,如鱼类胚胎急性毒性试验(OECD TG 236)^[15]、鱼类早期生活阶段毒性试验(OECD TG 210)^[9]、鱼类胚胎-卵黄囊吸收阶段短期毒性试验(OECD TG 212)^[10]。随着国际上化学品毒性测试技术的升级换代,我国刚刚完成传统意义上的化学品安全测试体系框架建设,在体外活体替代试验的测试技术、验证和标准化等关键环节上还存在空白,相关工作大多还停留在毒性效应研究阶段^[18,38-43]。因此,需要紧跟国际大趋势,在稀有鮎鲫急性、慢性毒性试验标准的研制基础上,开展该鱼种的替代潜力研究,进行胚胎毒性试验关键技术攻关,为鱼类替代试验的标准化积累数据,实现相关替代试验技术的革新。

3.4 利用稀有鮎鲫筛查内分泌干扰物质的适用性研究

环境中的许多化学物质可能与人体和野生生物的内分泌系统产生相互作用,从而导致某些不良影响,比如损害动物体和人体的生殖系统、神经系统、免疫系统。就管理部门而言,对内分泌干扰物质的进行有效监管的前提是正确识别,而传统的测试方法已难以满足这方面的需求。1998 年 OECD 便启动了优先工作计划,开发了一组鱼类测试方法(229 鱼类短期繁殖试验^[12]、230 雌激素、雄激素活性与芳香化酶活性抑制鱼类 21 天短期筛选试验^[13]、234 鱼类性发育试验^[14]以及 240 青鳉扩展一代繁殖试验^[16]),用于筛选并测定对鱼类内分泌系统具有干扰效应的活性物质。上述方法推荐的试验用鱼包括黑

头软口鲮(*Pimephales promelas*)、日本青鳉(*Oryzias latipes*)、斑马鱼(*Danio rerio*),主要采用卵黄蛋白原(VTG)和第二性征作为观测指标,或伴有繁殖力的检测,甚至性腺组织病理学分析。由于内分泌干扰物质对环境对人类健康的潜在危害和风险,此类物质的筛查和评价终会成为我国化学品安全管理的一个重点。近 10 年来,国内学者利用稀有鮎鲫作为受试生物,开展了各类环境污染物的内分泌干扰效应研究^[44-54]。然而,对于 OECD 鱼类内分泌干扰物筛查试验,有关稀有鮎鲫的适用性验证工作才刚刚起步,需要国内的科研和测试机构共同努力,为相关方法建立国家标准积累关键数据和技术,也为未来国家职能部门的管理需求进行技术储备。

4 展望(Outlook)

总之,稀有鮎鲫作为特有的本土鱼种,在我国多年来的化学品管理和环境保护中具有重要的意义和实践,已经具备了化学品测试标准化的基础。相关的实验室和研究机构应该在遵从与国际一致的标准化原则的前提下,科学地验证和评价稀有鮎鲫对化学品鱼类测试方法的适用性,不断扩大稀有鮎鲫作为化学品测试模式生物的使用范围,在化学品测试实践中累积物种稳定性和敏感性数据,完善物种鉴定要求和饲养条件。这些都是未来稀有鮎鲫标准化工作的需求和研究方向。

通讯作者简介:殷浩文(1959-),男,教授级高级工程师,主要从事化学品风险评价和生态毒理学研究,发表学术论文 50 余篇,专著及合著 6 部。

参考文献(References):

- [1] 吴淑勤,黄志斌等,水生实验动物——剑尾鱼[M].北京:中国农业出版社,2005:1-5
Wu S Q, Huang Z B, et al. Aquatic Laboratory Animal: Swordtail Fish (*Xiphophorus helleri*) [M]. Beijing: China Agriculture Press, 2005: 1-5 (in Chinese)
- [2] Lammer E, Carr G J, Wendler K, et al. Is the fish embryo toxicity test (FET) with the zebrafish (*Danio rerio*) a potential alternative for the fish acute toxicity test? [J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology, 2009, 149(2): 196-209
- [3] 何嘉玲,刘静,王天奇,等.斑马鱼的质量标准化[J].中国实验动物学报,2014,22(6):99-102
He J L, Liu J, Wang T Q, et al. Research of zebrafish quality standardization [J]. Acta Laboratorium Animalis

- Scientia Sinica, 2014, 22(6): 99-102 (in Chinese)
- [4] 王晓南, 郑欣, 闫振广, 等. 水质基准鱼类受试生物筛选[J]. 环境科学研究, 2014, 27(4): 341-348
Wang X N, Zheng X, Yan Z G, et al. Screening of native fishes for deriving aquatic life criteria [J]. Research of Environmental Sciences, 2014, 27(4):341-348 (in Chinese)
- [5] 王晓南, 刘征涛, 闫振广, 等. 麦穗鱼物种敏感性评价[J]. 环境科学, 2013, 34(6): 2329-2334
Wang X N, Liu Z T, Yan Z G, et al. Species sensitivity evaluation of *Pseudorasbora parva* [J]. Environmental Science, 2013, 34(6): 2329-2334 (in Chinese)
- [6] 环境保护部. 环境保护部令 第7号. 新化学物质环境管理办法[Z]. 北京: 环境保护部, 2010
MEP. The Order No. 7, The Ministry of Environmental Protection of the PRC. The Provisions on Environmental Administration of New Chemical Substances [Z]. Beijing: MEP, 2010 (in Chinese)
- [7] OECD. Guidelines for Testing of Chemicals, 203: Fish, Acute Toxicity Test [S]. Paris: OECD, 1992
- [8] OECD. Guidelines for Testing of Chemicals, 204: Fish, Prolonged Toxicity Test: 14-Day Study [S]. Paris: OECD, 1984
- [9] OECD. Guidelines for Testing of Chemicals, 210: Fish, Early-Life Stage Toxicity Test [S]. Paris: OECD, 1992
- [10] OECD. Guidelines for Testing of Chemicals, 212: Fish, Short-term Toxicity Test on Embryo and Sac-Fry Stages [S]. Paris: OECD, 1998
- [11] OECD. Guidelines for Testing of Chemicals, 215: Fish, Juvenile Growth Test [S]. Paris: OECD, 2000
- [12] OECD. Guidelines for Testing of Chemicals, 229: Fish Short Term Reproduction Assay [S]. Paris: OECD, 2012
- [13] OECD. Guidelines for Testing of Chemicals, 230: 21-day Fish Assay: A Short-Term Screening for Oestrogenic and Androgenic Activity, and Aromatase Inhibition [S]. Paris: OECD, 2009
- [14] OECD. Guidelines for Testing of Chemicals, 234: Fish Sexual Development Test [S]. Paris: OECD, 2011
- [15] OECD. Guidelines for Testing of Chemicals, 236: Fish Embryo Acute Toxicity (FET) Test [S]. Paris: OECD, 2013
- [16] OECD. Guidelines for Testing of Chemicals, 240: Medaka Extended One Generation Reproduction Test (MEOGRT) [S]. Paris: OECD, 2015
- [17] 曹文宣, 王剑伟. 稀有鮡鲫——一种新的鱼类实验动物[J]. 实验动物科学与管理, 2003, 20(z1): 96-99
Cao W X, Wang J W. Rare minnow: A new laboratory animal in China [J]. Laboratory Animal Science and Management, 2003, 20(z1): 96-99 (in Chinese)
- [18] 杨亚洲, 蔡磊明, 孟智启, 等. 毒死蜱对稀有鮡鲫不同生命阶段的毒性效应[J]. 农药学学报, 2014, 16(1): 78-83
Yang Y Z, Cai L M, Meng Z Q, et al. Toxicity effects of chlorpyrifos to different life stages of Chinese rare minnow (*Gobiocypris rarus*) [J]. Chinese Journal of Pesticide Science, 2014, 16(1): 78-83 (in Chinese)
- [19] 吴本丽, 曹岩, 罗思, 等. 封闭群稀有鮡鲫对几种常见化学品的敏感性[J]. 中国环境科学, 2014, 34(4): 1059-1066
Wu B L, Cao Y, Luo S, et al. Sensitivity of rare minnow (*Gobiocypris rarus*, IHB) to several common chemicals [J]. China Environmental Science, 2014, 34(4):1059-1066 (in Chinese)
- [20] 陈曦, 洪响生, 吴慧敏, 等. 稀有鮡鲫神经发育相关基因的克隆、同源性分析及组织分布[J]. 生态毒理学报, 2016, 11(1): 173-181
Chen X, Hong X L, Wu H M, et al. Cloning, homology analysis, and distribution of neural development related genes of Chinese rare minnow (*Gobiocypris rarus*) [J]. Asian Journal of Ecotoxicology, 2016, 11(1): 173-181 (in Chinese)
- [21] Zhang D F, Zhang Q Q, Li A H. Development of a multiplex PCR assay for rapid and simultaneous detection of four genera of fish pathogenic bacteria [J]. Letters in Applied Microbiology, 2014, 59(5): 471-478
- [22] Wu B L, Luo S, Wang J W. Effects of temperature and feeding frequency on ingestion and growth for rare minnow [J]. Physiology & Behavior, 2015, 140: 197-202
- [23] Wu B L, Xiong X Q, Xie S Q, et al. Dietary lipid and gross energy affect protein utilization in the rare minnow *Gobiocypris rarus* [J]. Chinese Journal of Oceanology & Limnology, 2016(4): 1-9
- [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 29763—2013 化学品 稀有鮡鲫急性毒性试验[S]. 北京: 中国标准出版社, 2014
General Administration of Quality Supervision, Inspection and Quarantine of the PRC, and Standardization Administration of the PRC. GB/T 29763-2013 Chemicals—Rare Minnow (*Gobiocypris rarus*) acute toxicity test [S]. Beijing: Standards Press of China, 2014 (in Chinese)
- [25] 张京佶, 殷浩文, 赵华清. 稀有鮡鲫对重铬酸钾和3,4-二氯苯胺急性毒性研究[J]. 中国实验动物学报, 2014, 22(2):57-61
Zhang J J, Yin H W, Zhao H Q. Acute toxicity of potassium bichromate and 3,4-dichloroaniline in Chinese rare minnow (*Gobiocypris rarus*) [J]. Acta Laboratorium Animalia Scientia Sinica, 2014, 22(2): 57-61 (in Chinese)

- [26] 周永欣, 成水平, 胡炜, 等. 稀有鮡鲫——一种新的鱼类毒性试验材料[J]. 动物学研究, 1995, 16(1): 59-63
Zhou Y X, Cheng S P, Hu W, et al. A new toxicity test organism-*Gobiocypris rarus* [J]. Zoological Research, 1995, 16(1): 59-63 (in Chinese)
- [27] 姜福全. 稀有鮡鲫急性、亚慢性毒性试验方法及其在东湖底泥毒性研究中的应用[D]. 北京: 中国科学院研究生院, 2006
Jiang F Q. Methods of acute and subchronic toxicity test using *Gobiocypris rarus* and their application in toxicity study of sediment in Donghu Lake [D]. Beijing: Graduate School of Chinese Academy of Sciences, 2006 (in Chinese)
- [28] 陈家长, 胡庚东, 瞿建宏. 铅和铬对鱼类联合毒性的研究[J]. 浙江水产学院学报, 1998, 17(3): 169-173
Chen J C, Hu G D, Qu J H. Study on joint toxicity of lead and chromium [J]. Journal of Zhejiang College of Fisheries, 1998, 17(3): 169-173 (in Chinese)
- [29] 修瑞琴, 许永香, 高世荣, 等. 砷与镉、锌离子对斑马鱼的联合毒性实验[J]. 中国环境科学, 1998, 18(4): 349-352
Xiu R Q, Xu Y X, Gao S R, et al. Joint toxicity test of arsenic with cadmium and zinc ions to zebrafish, *Brachydanio rerio* [J]. China Environmental Science, 1998, 18(4): 349-352 (in Chinese)
- [30] 汪红军, 李嗣新, 周连凤, 等. 5种重金属暴露对斑马鱼呼吸运动的影响[J]. 农业环境科学学报, 2010, 29(9): 1675-1680
Wang H J, Li S X, Zhou L F, et al. The effect of exposure to five kinds of heavy metals on respiratory movement of zebra fish (*Brachydanio rerio*) [J]. Journal of Agro-Environment Science, 2010, 29(9): 1675-1680 (in Chinese)
- [31] 刘信勇, 朱琳. 多壁碳纳米管存在环境下 Pb、Zn 对斑马鱼毒性的变化[J]. 生态毒理学报, 2009, 4(6): 829-833
Liu X Y, Zhu L. The change of the toxicity of Pb and Zn on zebrafish in the case of the existence of multi-walled carbon nanotubes [J]. Asian Journal of Ecotoxicology, 2009, 4(6): 829-833 (in Chinese)
- [32] 李伟民, 尹大强, 李时银, 等. 氯代苯胺对斑马鱼的急性毒性及 3D-QSAR 分析[J]. 环境科学研究, 2002, 15(2): 6-7
Li W M, Yin D Q, Li S Y, et al. Acute toxicity of chloroanilines to zebra fish and 3D-QSAR analysis [J]. Research of Environmental Sciences, 2002, 15(2): 6-7 (in Chinese)
- [33] 卢玲, 沈英娃. 酚类、烷基苯类、硝基苯类化合物和环境水样对剑尾鱼和鮡鲫的急性毒性[J]. 环境科学研究, 2002, 15(4): 57-59
Lu L, Shen Y W. Acute toxicity of phenol, alkyl benzene, nitrobenzene and water sample to sword fish (*Xiphophorus helleri*) and rare minnow (*Gobiocypris rarus*) [J]. Research of Environmental Sciences, 2002, 15(4): 57-59 (in Chinese)
- [34] 杨霓云, 王鲁昕, 王宏, 等. 3种刺激性化学试剂对鱼类的急性毒性[J]. 环境科学研究, 2005, 18(1): 21-27
Yang N Y, Wang L T, Wang H, et al. Acute toxicity of three kinds of stimulating chemical warfare agents to fish [J]. Research of Environmental Sciences, 2005, 18(1): 21-27 (in Chinese)
- [35] 范亚维, 周启星. 水体甲苯、乙苯和二甲苯对斑马鱼的毒性效应[J]. 生态毒理学报, 2009, 4(1): 136-141
Fan Y W, Zhou Q X. Toxic effects of toluene, ethylbenzene and xylene in waters on zebrafish *Brachydanio rerio* [J]. Asian Journal of Ecotoxicology, 2009, 4(1): 136-141 (in Chinese)
- [36] Russell W M S, Burch R L. Principles of Humane Experimental Technique [M]. London: Methuen & Co Ltd., Universities Federation for Animal Welfare (UFAW), 1992
- [37] Rusche B. The 3Rs and animal welfare—Conflict or the way forward? [J]. ALTEX, 2003, 20(Suppl 1): 63-76
- [38] Zhu B, Wu Z F, Li J, et al. Single and joint action toxicity of heavy metals on early developmental stages of Chinese rare minnow (*Gobiocypris rarus*) [J]. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2011, 74(8): 2193-2202
- [39] 鲁增辉. 氨氮对稀有鮡鲫胚胎及卵黄囊期仔鱼的毒性效应研究[D]. 重庆: 西南大学, 2012
- [40] Zhu B, Liu T Q, Wang G X. Developmental toxicity of 3, 4-dichloroaniline on rare minnow (*Gobiocypris rarus*) embryos and larvae [J]. Chemosphere, 2013, 90: 1132-1139
- [41] Zhu B, Gong Y X, Liu L, et al. Toxic effects of triazophos on rare minnow (*Gobiocypris rarus*) embryos and larvae [J]. Chemosphere, 2014, 108: 46-54
- [42] Zhu B, Liu G L, Ling F, et al. Development toxicity of functionalized single-walled carbon nanotubes on rare minnow embryos and larvae [J]. Nanotoxicology, 2015, 9(5): 579-590
- [43] 蒋金花, 吴声敢, 陈江滨, 等. 三唑酮对斑马鱼和稀有鮡鲫不同生长阶段的急性毒性比较[J]. 生态毒理学报, 2015, 10(5): 150-156
Jiang J H, Wu S G, Chen J B, et al. Acute toxicity effects of triadimefon on different life stages of zebrafish (*Danio rerio*) and Chinese rare minnow (*Gobiocypris rarus*) [J]. Asian Journal of Ecotoxicology, 2015, 10(5): 150-156 (in Chinese)
- [44] Zhong X, Xu Y, Liang Y, et al. The Chinese rare minnow (*Gobiocypris rarus*) as an *in vivo* model for endocrine disruption in freshwater teleosts: A full life-cycle test with di-

- ethylstilbestrol [J]. *Aquatic Toxicology*, 2005, 71(1): 85-95
- [45] 钟雪萍, 徐盈, 梁勇, 等. 稀有鮡鲫生命早期的己烯雌酚暴露对生长发育与繁殖的影响[J]. *水生生物学报*, 2005, 29(6): 667-672
- Zhong X P, Xu Y, Liang Y, et al. Effects of diethylstilbestrol exposure in early life stage on development and reproduction in rare minnow, *Gobiocypris rarus* [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2005, 29(6): 667-672 (in Chinese)
- [46] 廖涛, 徐盈, 钟雪萍, 等. EE2对稀有鮡鲫和斑马鱼幼鱼体内卵黄蛋白原诱导的比较[J]. *水生生物学报*, 2005, 29(5): 513-517
- Liao T, Xu Y, Zhong X P, et al. Comparative vitellogenic responses in zebrafish (*Brachydanio rerio*) and rare minnow (*Gobiocypris rarus*) exposed to 17 α -ethinylestradiol [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2005, 29(5): 513-517 (in Chinese)
- [47] 刘阿朋. 17 α -甲基睾酮和三丁基锡氧化物暴露对稀有鮡鲫的影响[D]. 武汉: 华中农业大学, 2006
- Liu A P. Influences of rare minnow (*Gobiocypris rarus*) to exposure of 17 α -methyltestosterone and bis (tributyltin) oxide [D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2006 (in Chinese)
- [48] Zha J, Wang Z, Wang N, et al. Histological alternation and vitellogenin induction in adult rare minnow (*Gobiocypris rarus*) after exposure to ethinylestradiol and nonylphenol [J]. *Chemosphere*, 2007, 66(3): 488-495
- [49] Zha J, Sun L, Zhou Y, et al. Assessment of 17 α -ethinylestradiol effects and underlying mechanisms in a continuous, multigeneration exposure of the Chinese rare minnow (*Gobiocypris rarus*) [J]. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 2008, 226(3): 298-308
- [50] Li W, Zha J, Spear P A, et al. Changes of thyroid hormone levels and related gene expression in Chinese rare minnow (*Gobiocypris rarus*) during 3-amino-1,2,4-triazole exposure and recovery [J]. *Aquatic Toxicology*, 2009, 92(1): 50-57
- [51] 熊力, 马永鹏, 张晓峥, 等. 五氯酚对稀有鮡鲫卵黄蛋白原及 p53 的诱导效应[J]. *环境科学*, 2012, 33(6): 1858-1864
- Xiong L, Ma Y P, Zhang X Z, et al. Induction effects of pentachlorophenol on vitellogenin and p53 in Chinese rare minnow (*Gobiocypris rarus*) [J]. *Chinese Journal of Environmental Science*, 2012, 33(6): 1858-1864 (in Chinese)
- [52] 王小芳. 邻苯二甲酸二乙基己酯(DEHP)对稀有鮡鲫的内分泌干扰效应研究[D]. 北京: 中国科学院大学, 2013
- Wang X F. Endocrine disruption by di-(2-ethylhexyl)-phthalate in Chinese rare minnow (*Gobiocypris rarus*) [D]. Beijing: University of Chinese Academy of Sciences, 2013 (in Chinese)
- [53] 杨亚洲. 三种农药对稀有鮡鲫内分泌干扰效应初步研究[D]. 杭州: 浙江师范大学, 2014
- Yang Y Z. Preliminary study of endocrine disrupting effects of three pesticides on rare minnow [D]. Hangzhou: Zhejiang Normal University, 2014 (in Chinese)
- [54] 郭勇勇, 周炳升. 苯并芘对稀有鮡鲫的内分泌干扰效应研究[J]. *环境科学学报*, 2015, 35(9): 3006-3012
- Guo Y Y, Zhou B S. Endocrine disruption effects of benzo (a) pyrene on Chinese rare minnow (*Gobiocypris rarus*) [J]. *Acta Scientiae Circumstantiae*, 2015, 35(9): 3006-3012 (in Chinese) ◆