

邸亚男,朱丽英,沈婕,等. 四种有机溶剂对斑马鱼眼睛发育的影响[J]. 中国比较医学杂志, 2020, 30(5): 75-80.
Di YN, Zhu LY, Shen J, et al. Effects of four carrier solvents on eye development in zebrafish embryos [J]. Chin J Comp Med, 2020, 30(5): 75-80.
doi: 10.3969/j.issn.1671-7856. 2020.05.012

四种有机溶剂对斑马鱼眼睛发育的影响

邸亚男^{1#}, 朱丽英^{2#}, 沈 婕², 钱 雯², 潘 卫^{2,3,4*}

(1. 北京大学第三医院北方院区检验科; 兵器工业北京北方医院检验科, 北京 100089;
2. 贵州医科大学检验医学院, 贵阳 550025; 3. 贵州医科大学附属医院贵州省产前诊断中心, 贵阳 550025;
4. 贵州医科大学环境污染与疾病监控教育部重点实验室, 贵阳 550025)

【摘要】 目的 评估乙醇、异丙醇、丙酮和二甲基亚砜四种有机溶剂对斑马鱼胚胎发育, 尤其是眼睛发育的影响, 为其作为溶剂在斑马鱼眼睛疾病模型研究中提供参考。**方法** 将发育至 12 hpf 斑马鱼胚胎暴露于 0.5% 乙醇、1% 异丙醇、1.5% 丙酮和 2.5% 二甲基亚砜至 72 hpf, 观察其存活率、致畸率及眼睛发育状况。**结果** 对照组和乙醇、异丙醇、丙酮、DMSO 暴露组存活率分别为 96% 和 93%、90%、90%、86%。对照组斑马鱼幼鱼形态正常, 而有机溶剂暴露组则出现了不同程度形态变化如心包水肿、出血、卵黄缺损和身体弯曲等。其中, 以 DMSO 致畸作用最严重, 乙醇的致畸作用最弱。方差分析显示, 斑马鱼幼鱼眼睛长度/身体长度比值在有机溶剂暴露组和对照组之间没有显著差异; 但是 DMSO 暴露组斑马鱼幼鱼眼睛面积/身体面积比值显著低于其他组。另外与对照组相比, 四种有机溶剂暴露组的视网膜分层均为正常, 乙醇、异丙醇、丙酮暴露组视锥细胞、视杆细胞和视网膜神经元细胞信号正常, 但 DMSO 暴露组各细胞信号均较弱。**结论** 因此, 在以斑马鱼为模型动物进行眼睛疾病的相关研究时, 我们应谨慎选择有机溶剂作为药物或其他化学受试品的溶解载体, 并且应该进行预实验来确定其最佳使用浓度。

【关键词】 有机溶剂; 使用浓度; 斑马鱼; 眼睛发育

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2020) 05-0075-06

Effects of four carrier solvents on eye development in zebrafish embryos

DI Yanan^{1#}, ZHU Liying^{2#}, SHEN Jie², QIAN Wen², PAN Wei^{2,3,4*}

(1. Clinical Laboratory in Beifang Section of Peking University Third Hospital; Clinical Laboratory in Beijing Northern Hospital of Weaponry Industry, Beijing 100089, China. 2. School of Clinical Laboratory Science in Guizhou Medical University, Guiyang 550025. 3. Guizhou Prenatal Diagnosis Center, Affiliated Hospital of Guizhou Medical University, Guiyang 550025.
4. Key Laboratory of Environmental Pollution and Disease Monitoring of Ministry of Education, Guizhou Medical University, Guiyang 550025)

【Abstract】 Objective To study the effects of four organic solvents, including methanol, isopropanol, acetone, and dimethyl sulfoxide (DMSO), on the development of zebrafish embryos, especially eye development, and provide clues for their use in zebrafish studies. **Methods** Zebrafish embryos (12 hours post-fertilization) were exposed to 0.5% ethanol, 1% isopropanol, 1.5% acetone, and 2.5% DMSO for 60 hours. The survival rate, eye size, gross morphological changes, and retinal histological features were observed. **Results** The survival rates of the control group and the groups exposed to ethanol, isopropanol, acetone, and DMSO were 96%, 93%, 90%, 90%, and 86%, respectively. The

[基金项目] 贵州省科技支撑计划资助项目(黔科合支撑[2017]2970); 贵州省域内一流学科建设项目: 黔教科研发 2017[85]号。

[作者简介] 邸亚男(1984—)女, 副主任技师, 博士, 研究方向: 人类眼睛疾病遗传学研究。E-mail: diyanan2003@163.com

朱丽英, 副教授, 博士, 研究方向: 肝癌的发病机制与临床研究。E-mail: 179128466@qq.com *共同第一作者

[通信作者] 潘卫(1966—)女, 教授, 博士, 博士生导师, 研究方向: 糖尿病慢性并发症发病机制研究、疾病蛋白质组学研究。
E-mail: 313831139@qq.com

morphology of the zebrafish was normal in the control group, whereas there were morphological changes, such as pericardial edema, hemorrhage, yolk defect, and body bending, in the solvent-treated groups. Specifically, DMSO induced the most severe changes, and ethanol the least. Variance analysis showed that there was no significant difference in the ratio of eye length to body length between the organic solvent-treated groups and the control group, but the ratio of the eye area to body area in the group treated with DMSO was significantly lower than that in other groups. In addition, compared with the control group, the retina stratification in the group treated with four organic solvents was normal. The signals of cone cells, rod cells, and retinal neurons in the ethanol, isopropanol, and acetone exposed groups were normal, but the signals of each cell were weak in the group treated with DMSO. **Conclusions** Therefore, we should carefully select the solvent carrier for zebrafish studies and perform preliminary experiments to determine the safest concentration.

【Keywords】 organic solvents; safest concentration; zebrafish; eye development

据统计,目前全球大约有超过 2.8 亿人存在视力损害和失明如白内障、青光眼、老年性黄斑变性和糖尿病视网膜病变等^[1],但其发病机制尚不清楚,而且目前尚无有效治疗药物。因此,理想的眼病动物模型对于了解其发病机制和开发新的治疗药物非常重要。斑马鱼是一种发现于印度和巴基斯坦水域的热带鱼,具有繁殖力强、体外发育快、透明胚胎等优点^[2-3],是一种应用颇为广泛的模式动物^[4-5]。研究表明,斑马鱼的药物反应和药物代谢与人类的具有很高的相似性^[6-7]。另外,斑马鱼作为药物筛选模型时,其给药方式简单,通常将待筛选样品溶于斑马鱼胚胎培养液中,通过扩散或吸收进入胚胎发挥作用^[3]。因此,其已被越来越多地用于筛选眼睛疾病治疗药物和评估药物相关的眼毒性当中。

然而,由于许多药物或化合物表现出较差的水溶性,往往需要有机溶剂来溶解以保证适当的生物利用率和暴露浓度,且一些研究指出有机溶剂本身也可能表现出一定的毒性效应^[8]。因此,评估有机溶剂对斑马鱼胚胎发育,尤其是眼睛发育的影响在斑马鱼眼睛疾病研究中具有一定价值。本研究以四种常用的有机溶剂包括乙醇、丙酮、异丙醇和二甲基亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO)处理斑马鱼胚胎,并观察它们对斑马鱼胚胎,尤其是眼睛发育的影响,为其作为溶剂在斑马鱼眼睛疾病模型研究中提供参考。

1 材料和方法

1.1 实验动物

实验所用斑马鱼为野生 AB 系性成熟成年(20 ~ 24 周龄)斑马鱼由贵州医科大学贵州省再生医学重点实验室所赠,体重约 350~400 mg。其养殖和繁殖标准参考 Westerfield^[9]和《实验用斑马鱼养殖地方标

准的初步探讨》^[10]所述方法进行。生长温度(28 ± 1)℃,照明 14 h/10 h 光/暗交替,雌雄分开喂养,定时饲以 Larval AP100(Zeigler 公司)。斑马鱼卵是从性成熟成年斑马鱼的养殖中获得的。傍晚将 3~4 对性成熟斑马鱼按雌雄 1:1 或 1:2 的比例放入交配缸中,用隔板隔开,次日早晨光照 10 min 后撤掉挡板,收集受精卵。受精卵清洗和消毒后,放入含有 0.2% (w/v) 亚甲基蓝的培养液中于 28℃ 控光培养。本研究所有动物实验均严格遵循 3R 原则。

1.2 主要试剂与仪器

试剂乙醇、丙酮、异丙醇和 DMSO(分析纯)购于西龙化工股份有限公司;麻醉剂 Tricaine 购于 Sigma 公司;小鼠抗 ZPR1 抗体、小鼠抗 ZPR3 抗体、小鼠抗 ZN12 抗体购于 ZRIC 斑马鱼资源中心;荧光标记山羊抗鼠 IgG 抗体购于 Invitrogen 公司;体视镜 stemi-200c(德国蔡司公司);激光共聚焦显微镜 TCS SP8 DIVE(德国徕卡公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 斑马鱼胚胎处理

研究显示,斑马鱼眼睛的发育始于受精后 12 h(hpf, hours post fertilization)由前脑外翻形成视囊,大约 72 hpf 时眼睛的形态结构发育几乎全部完成并具有视觉功能^[11]。同时,根据参考文献设定各个有机溶剂的浓度^[12]。因此,本研究收集 12 hpf 胚胎 120 枚分别置于含有机溶剂 0.5%乙醇、1.5%丙酮、1%异丙醇和 2.5% DMSO 的胚胎培养液中培养至 72 hpf,每种有机溶剂 30 枚胚胎。对照组 30 枚胚胎仅用胚胎培养液培养。每组实验重复 3 次。72 hpf 后,统计并观察胚胎的存活率和畸形率及眼睛的形态结构。

1.3.2 斑马鱼眼睛大小的观察

斑马鱼胚胎生长至 72 hpf 后,以 0.05% Tricaine 溶液麻醉并固定后,用体视镜 stemi-200c 所带成像系统拍照,并用 AxioVison 软件测量斑马鱼

眼睛和身体长度。体长为从头部顶端到躯干末端(不包括尾鳍);眼睛长度为眼睛长轴前部至后部。同时,测量斑马鱼眼睛和身体面积,测量时本研究首用 AxioVison 软件将斑马鱼眼睛和身体区域圈定之后利用工具栏的 Measure 功能进行面积计算得到面积数值。为了更加准确的评估斑马鱼眼睛大小的变化,本研究计算了眼睛长度和身体长度的比值(眼睛/身体长度比)及眼睛面积和身体面积的比值(眼睛/身体面积比)。由于 DMSO 组斑马鱼幼鱼的身体弯曲使其长度较难测量,所以仅仅测量了眼睛/身体面积比值。

1.3.3 斑马鱼眼睛免疫组织化学染色

斑马鱼胚胎生长至 72 hpf 后,以 0.05% Tricaine 溶液麻醉,4% PFA 固定,室温下依次用 15%蔗糖和 30%蔗糖脱水 2 h,然后依次置于 25%、50%、75%和 100%包埋剂 OCT 中各处理 2 h,包埋组织后用冷冻切片机切片(约 6 μm),置于防脱载玻片上,37℃切片干燥 15 min,1%牛血清白蛋白室温封闭 1 h,加一抗 ZPR1(1:500)或 ZPR3(1:500)或 ZN12(1:500)4℃孵育过夜;PBS 清洗 3 次后,加荧光标记山羊抗鼠 IgG 室温孵育 2 h;PBS 清洗 3 次。细胞核用 4',6-二脒基-2-苯基吲哚(4',6-diamidino-2-phenylindole, DAPI)染色。盖上盖玻片置于激光共聚焦显微镜下观察染色情况,并应用 Image J 软件计算各组平均荧光强度。其中,ZPR1 为视锥细胞标记抗体,ZPR3 为视杆细胞标记抗体,Zn12 为视网膜神经元细胞标记抗体。

1.4 统计学方法

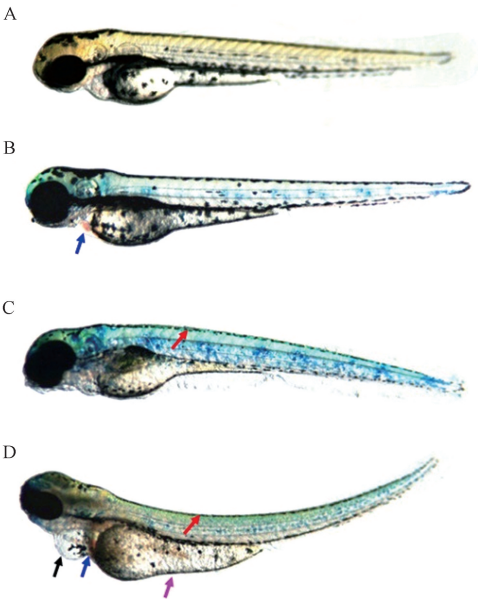
应用 SPSS 14.1 统计软件处理数据,多组间的比较采用方差分析,两组间定量资料的比较采用 *t* 检验。*P*<0.05 差异具有统计意义。

2 结果

2.1 四种有机溶剂中斑马鱼胚胎的畸形率和死亡率

斑马鱼胚胎生长至 72 hpf 后,结果显示,对照组

和四种有机溶剂乙醇、丙酮、异丙醇、DMSO 暴露组的存活率分别为 96%和 93%、90%、90%、86%。其中,以 DMSO 暴露组斑马鱼幼鱼的存活率最低,但差异不具有统计学意义(见表 1)。对照组斑马鱼幼鱼形态正常,而有机溶剂暴露组则出现了不同程度形态变化如心包水肿、出血、卵黄缺损和身体弯曲等(见表 1、图 1)。其中,以 DMSO 致畸作用最严重,导致的心包水肿、出血、卵黄缺损和身体弯曲的发生率分别为 16%、10%、20%和 3%;乙醇的致畸作用最弱,仅 6%表现为身体弯曲。



注:A:对照斑马鱼幼鱼(72 hpf);B、C 和 D:溶剂中暴露组斑马鱼幼鱼(72hpf)异常表现,包括心包水肿(黑色箭头)、出血(蓝色箭头)、体曲(红色箭头)和卵黄缺损(紫色)。

图 1 有机溶剂对斑马鱼胚胎的致畸作用

Note. A, The control zebrafish larvae (72 hours post-fertilization) had well-developed body and head regions. B, C, and D, Abnormalities in embryos exposed to different solvents. Abnormalities included pericardial edema (black arrows), hemorrhage (blue arrows), body curvature (red arrows), and yolk defects (purple).

Figure 1 Teratogenic effects of solvents on zebrafish embryos

表 1 不同有机溶剂暴露组斑马鱼胚胎的存活率和致畸率

Table 1 Survival and teratogenicity rate in zebrafish embryos treated with different solvents

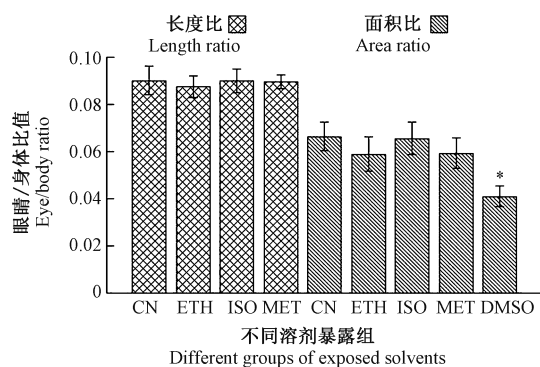
观察指标 Observed indexes	对照 Control	乙醇 Ethanol	丙酮 Methanol	异丙醇 Isopropanol	二甲基亚砜 DMSO
存活率 Survival rate	96%	93%	90%	90%	86%
心包水肿 Pericardial edema	0	0	0	0	16%
出血 Hemorrhage	0	0	3%	13%	10%
身体弯曲 Body curvature	0	6%	16%	10%	20%
卵黄缺损 Yolk defect	0	0	0	0	3%

2.2 四种有机溶剂对斑马鱼眼睛大小的影响

结果发现,对照组斑马鱼幼鱼($n=30$)眼睛长度/身体长度比值为(0.090 ± 0.006),眼睛面积/身体面积比值为(0.066 ± 0.006);乙醇处理组斑马鱼幼鱼($n=30$)眼睛长度/身体长度比值为(0.087 ± 0.045),眼睛面积/身体面积比值为(0.058 ± 0.007);异丙醇处理组斑马鱼幼鱼($n=30$)眼睛长度/身体长度比值为(0.091 ± 0.006),眼睛面积/身体面积比值为(0.065 ± 0.006);丙酮处理组斑马鱼幼鱼($n=30$)眼睛长度/身体长度比值为(0.090 ± 0.003),眼睛面积/身体面积比值为(0.056 ± 0.008);DMSO 处理组斑马鱼幼鱼($n=30$)眼睛面积/身体面积比值为(0.041 ± 0.004)。方差分析显示,斑马鱼幼鱼眼睛长度/身体长度比值在有机溶剂暴露组和对照组之间没有显著差异;但是 DMSO 暴露组斑马鱼幼鱼眼睛面积/身体面积比值显著低于其他组($P<0.05$,见图 2)。

2.3 四种有机溶剂对斑马鱼眼睛视网膜的影响

为了观察有机溶剂对斑马鱼视网膜发育的影响,组织免疫荧光染色显示,与对照组相比,四种有机溶剂暴露组的视网膜分层均为正常(见图 3),但 DMSO 暴露组视锥细胞排列紊乱(见 E3)。两组间 t 检验显示,乙醇、异丙醇、丙酮和 DMSO 暴露组视杆细胞(Zpr3)和视网膜神经元细胞(Zn12)



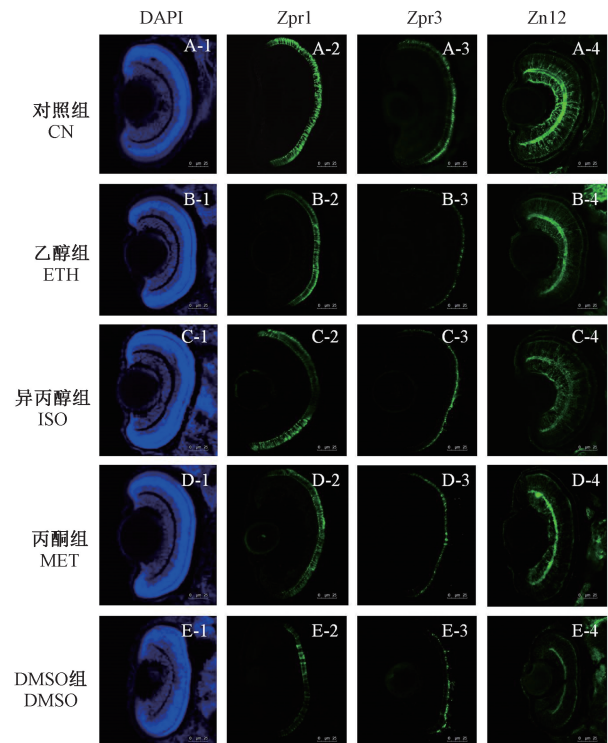
注:CN:正常对照组;ETH:乙醇暴露组;ISO:异丙醇暴露组;MET:丙酮暴露组;DMSO:二甲基亚砜; * $P<0.05$ 。

图 2 不同有机溶剂暴露组斑马鱼幼鱼(72 hpf)眼/体长度比值和眼/体面积比值

Note. CN, contrl group. ETH, ethanol exposed group. ISO, isopropanol exposed group. MET, methanol exposed group. DMSO, dimethyl sulfoxide exposed group, * $P<0.05$.

Figure 2 Eye to body length and area ratio in embryos treated with different solvents

平均荧光强度较正常组显著减低($P<0.05$),而暴露组视锥细胞(Zpr1)平均荧光强度较正常组减低,但仅有乙醇和 DMSO 暴露组差异具有统计学意义($P<0.05$)(见图 4)。



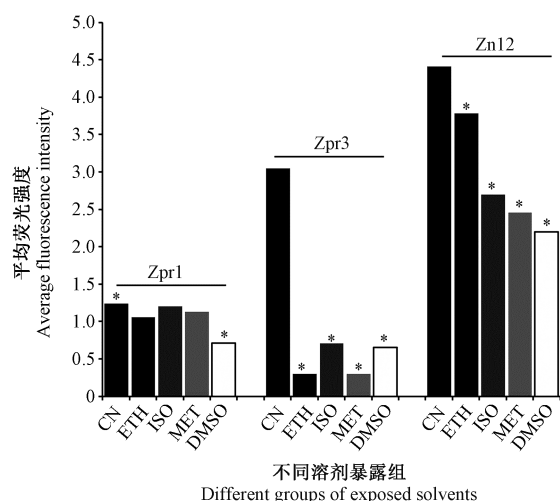
注:DAPI 细胞核染色显示,对照组(A-1)和有机溶剂暴露组(B-1、C-1、D-1 和 E-1)视网膜均分离成 3 个核层,包括内核层、外核层和神经细胞层。Zpr1(视锥细胞)、Zpr3(视杆细胞)、Zn12(视网膜神经元细胞)免疫组化染色显示,视锥细胞、视杆细胞和神经元细胞在 DMSO 暴露组明显异常(E-2、E-3 和 E-4),其他有机溶剂暴露组和对照组则未有明显改变。

图 3 不同有机溶剂暴露组斑马鱼幼鱼(72 hpf)

视网膜细胞免疫荧光染色

Note. DAPI staining for nuclei showed the lamination of the retina. As in the control group (A-1), the retinas in the solvent-treated groups (B-1, C-1, D-1, and E-1) were segregated into three nuclear layers, including ONL, INL, and GCL. Zpr1 (cone cell), Zpr3 (rod cell), and Zn12 (retinal neurons) immunostaining showed the cone photoreceptors (A-2, B-2, C-3, D-3, and E-3), rod photoreceptors (A-4, B-4, C-4, D-4, and E-4), and neurons (A-5, B-5, C-5, D-5, and E-5). The results showed there were no differences in cone photoreceptors, rod receptors, or neurons between the solvent-treated groups and control group, except thinner laminations of the retina were observed after treatment with 2.5% DMSO.

Figure 3 Immunostaining of retinal cells in embryos treated with different solvents



注: CN: 正常对照组; ETH: 乙醇暴露组; ISO: 异丙醇暴露组; MET: 丙酮暴露组; DMSO: 二甲亚砜。Zpr1: 视锥细胞; Zpr3: 视杆细胞; Zn12: 视网膜神经元细胞; * $P < 0.05$ 。

图 4 各组视锥细胞、视杆细胞和神经细胞免疫荧光染色荧光强度

Note. CN, Control group. ETH, ethanol exposed group. ISO, isopropanol exposed group. MET, methanol exposed group. DMSO, dimethyl sulfoxide exposed group. Zpr1, cone cell. Zpr3, rod cell. Zn12, retinal neurons, * $P < 0.05$.

Figure 4 Fluorescence intensity of immunofluorescence staining of cones, rod cells and neurons in each group

3 讨论

由于眼睛发育与人类的相似性及在药物筛选方面的优势,斑马鱼越来越多地被用于人类眼病发病机制研究及治疗药物的筛选和研发。但是通常情况下,很多药物不能溶解于水中,需要载体如有机溶剂乙醇、丙酮等运输至动物体内。本研究观察了四种有机溶剂乙醇、甲醇、异丙醇和 DMSO 对斑马鱼胚胎发育尤其是眼睛发育的影响。结果发现,斑马鱼胚胎在该四种有机溶剂中暴露至 72 hpf 的存活率均高于 50%,这与之前的研究结果相似^[13]。本研究还发现,不同有机溶剂对斑马鱼幼鱼的形态存在不同程度的影响,乙醇影响最小,仅表现为身体弯曲,DMSO 影响最大,可导致幼鱼出现心包水肿、出血、卵黄缺损和身体弯曲等异常。但是,本研究中观察到的致畸效应比之前的研究更严重^[12],可能是由于本研究有机溶剂暴露时间较长所致。另外,由于本研究未肉眼观察到有机溶剂暴露组和对照组幼鱼间眼睛形态的差异,所以测量了其眼睛的大小及眼睛长度/身体长度比值和眼睛面

积/身体面积比值。结果发现,DMSO 暴露组的眼/体面积比值显著降低。综上所述,本研究发现有机溶剂 DMSO 对斑马鱼存活及生长发育的影响很大,提示本研究在进行以斑马鱼为动物模型的相关研究中,最好不要选用 DMSO 作为药物或其他受试化合物的溶剂。

斑马鱼视网膜由三层组成,包括内核层、外核层和神经节细胞层,其中感光细胞主要位于外核层,而神经节细胞位于靠近晶状体的内核层^[13]。本研究显示,有机溶剂暴露的斑马鱼视网膜分为内核层、外核层和神经节细胞层,无明显的分层缺陷。但是,DMSO 暴露组视网膜结构较其他组薄。同时,除 DMSO 外,其余三种有机溶剂对视网膜视锥细胞、杆状细胞和神经元细胞发育的影响较小。

据文献报道,胚胎乙醇暴露会影响视觉功能的发展,因此斑马鱼是胎儿酒精综合征研究非常有价值的动物模型^[14]。然而,本研究未发现乙醇暴露的斑马鱼胚胎眼睛发育有明显的形态学变化和视网膜发育缺陷。这可能是由于本研究中所使用的乙醇浓度低所致。另外的研究表明,乙醇在低浓度下会影响感光细胞功能,而不引起视网膜形态的异常^[15]。遗憾的是,由于经费有限,本研究中既未设置不同乙醇浓度暴露组,也未评估斑马鱼的视觉功能,所以本研究不知道 0.5%乙醇暴露或更低的浓度是否会影响视觉功能。因此,在乙醇作为有机溶剂载体时,需要测试不同浓度乙醇对视觉功能的影响。

综上所述,本研究中所检测的有机溶剂乙醇、丙酮和异丙醇可分别在 0.5%、1.5%和 1%水平下作为斑马鱼胚胎的载体溶剂而不会对其造成明显影响。然而,不同的实验环境,鱼的种类和胚胎不同的发育时期等因素都可能对有机溶剂的安全性产生影响^[16]。因此,本研究应谨慎选择有机溶剂作为药物或其他化学受试品的溶解载体,并且应该进行预实验来确定其最佳使用浓度。

参考文献:

- [1] Pascolini, D. and S. P. Mariotti. Global estimates of visual impairment: 2010 [J]. Br J Ophthalmol, 2012. 96(5): 614-618.
- [2] 王思锋,刘可春,韩利文,等. 溶剂乙醇对斑马鱼胚胎发育的影响 [J]. 山东科学, 2007, 20(3): 10-14.
- [3] 王思锋,王希敏,侯海荣,等. 有机助溶剂对血管生成斑

- 鱼模型的使用性研究 [J]. 实验动物与比较医学, 2003, 28(4): 238-242.
- [4] Chhetri J, Jacobson G, Gueven N. Zebrafish-on the move towards ophthalmological research [J]. Eye (Lond), 2014, 28(4): 367-380.
- [5] 李志操, 黄波, 向文碧, 等. 红系祖细胞在造血缺陷斑马鱼体内的移植 [J]. 中国比较医学杂志, 2019, 29(5): 84-89.
- [6] Hung, MW, Zhang ZJ, Li S, et al. From omics to drug metabolism and high content screen of natural product in zebrafish: a new model for discovery of neuroactive compound [J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2012, 2012: 605303.
- [7] 汪玲, 陈朝红. 斑马鱼: 人类肾脏疾病治疗药物筛选的新工具 [J]. 中国比较医学杂志, 2018, 28(12): 113-118.
- [8] Buschmann J. The OECD guidelines for the testing of chemicals and pesticides [J]. Methods Mol Biol, 2013, 947: 37-56.
- [9] Westerfield M. The zebrafish book: a guide for the laboratory use of zebrafish (Danio rerio) [M]. MWesterfield, 2007.
- [10] 施张奎. 实验用斑马鱼养殖地方标准的初步探讨 [J]. 中国比较医学杂志, 2014, 24(8): 75-78.
- [11] Bibliowicz J, Tittle RK, Gross JM. Toward a better understanding of human eye disease insights from the zebrafish, Danio rerio [J]. Prog Mol Biol Transl Sci, 2011, 100: 287-330.
- [12] Maes J, Verlooy L, Buenafe OE, et al. Evaluation of 14 organic solvents and carriers for screening applications in zebrafish embryos and larvae [J]. PLoS One, 2012, 7(10): e43850.
- [13] Chromcova L, Stepanova S, Plhalova L, et al. Effect of four selected carrier solvents on embryonal stages of Danio rerio [J]. Neuro Endocrinol Lett, 2012, 33(3): 60-65.
- [14] Bilotta J, Saszik S, Givin CM, et al. Effects of embryonic exposure to ethanol on zebrafish visual function [J]. Neurotoxicol Teratol, 2002, 24(6): 759-766.
- [15] Matsui JI, Egana AL, Sponholtz TR, et al. Effects of ethanol on photoreceptors and visual function in developing zebrafish [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2006, 47(10): 4589-4597.
- [16] Mahabir, S, Chatterjee D, and Gerlai R. Strain dependent neurochemical changes induced by embryonic alcohol exposure in zebrafish [J]. Neurotoxicol Teratol, 2014, 41: 1-7.

[收稿日期] 2019-12-08

(上接第 74 页)

- [11] Hall KE, Sharp CR, Adams CR, et al. A novel trauma model: naturally occurring canine trauma [J]. Shock, 2014, 41(1): 25-32.
- [12] Lomas-Niera JL, Perl M, Chung CS, et al. Shock and hemorrhage: an overview of animal models [J]. Shock, 2005, 24 Suppl 1: 33-39.
- [13] Lu Q, Xu DZ, Sharpe S, et al. The anatomic sites of disruption of the mucus layer directly correlate with areas of trauma/hemorrhagic shock-induced gut injury [J]. J Trauma, 2011, 70(3): 630-635.
- [14] Leung LY, Deng-Bryant Y, Shear D, et al. Experimental models combining TBI, hemorrhagic shock, and hypoxemia [J]. Methods Mol Biol, 2016, 1462: 445-458.
- [15] Valparaiso A P, Vicente DA, Bograd BA, et al. Modeling acute traumatic injury [J]. J Surg Res, 2015, 194(1): 220-232.
- [16] Morgan CE, Prakash VS, Vercammen JM, et al. Development and validation of 4 different rat models of uncontrolled hemorrhage [J]. JAMA surgery, 2015, 150(4): 316-324.
- [17] 刘江伟, 钱建辉, 李瑞, 等. 沙漠干热环境下创伤失血性休克大鼠模型的建立 [J]. 中国比较医学杂志, 2015, 25(2): 30-33, 86.
- [18] Fulop A, Turocz Z, Garbaisz D, et al. Experimental models of hemorrhagic shock: a review [J]. Eur Surg Res, 2013, 50(2): 57-70.
- [19] Hwabejire JO, Imam AM, Jin G, et al. Differential effects of fresh frozen plasma and normal saline on secondary brain damage in a large animal model of polytrauma, hemorrhage and traumatic brain injury [J]. J Trauma Acute Care Surg, 2013, 75(6): 968-974.
- [20] Martini WZ, Chung KK, Dubick MA. Differential changes in hepatic synthesis of albumin and fibrinogen after severe hemorrhagic shock in pigs [J]. Shock, 2014, 41(1): 67-71.
- [21] Brotfain E, Leibowitz A, Dar DE, et al. Severe traumatic brain injury and controlled hemorrhage in rats: quest for the optimal mean arterial blood pressure after whole fresh donor blood resuscitation [J]. Shock (Augusta, Ga), 2012, 38(6): 630-634.
- [22] 孙安会, 谷捷, 吴涛, 等. 四种常用实验麻醉药物对大鼠心血管系统的影响 [J]. 中国实验动物学报, 2016, 24(2): 120-126.
- [23] Tobin JM, Grabinsky A, Mccunn M, et al. A checklist for trauma and emergency anesthesia [J]. Anesth Analg, 2013, 117(5): 1178-1184.

[收稿日期] 2019-12-29