

Li L L, Liu T, Liu L Y, *et al.* Discussion on the animal welfare in zebrafish [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2026, 50(2): 022618. [李玲璐, 刘涛, 柳力月, 等. 斑马鱼实验动物福利讨论 [J]. 水生生物学报, 2026, 50(2): 022618.]

综述

斑马鱼实验动物福利讨论

李玲璐 刘涛 柳力月 潘鲁媛

(中国科学院水生生物研究所, 国家水生生物种质资源库, 国家斑马鱼资源中心, 武汉 430072)

摘要: 实验动物在生命科学领域起着重要的基础性支撑作用, 其巨大贡献往往与以承受痛苦和死亡为代价。斑马鱼作为重要的模式生物, 近年来成为应用最广泛的实验动物之一。如何在保护实验结果科学可靠的前提下保障斑马鱼福利, 是本领域科研人员面对的重要问题。文章系统讨论了斑马鱼研究中实验动物福利的关键点, 涵盖痛苦感知、水环境、饲育、实验操作、运输及安乐死等方面, 为提升实验室斑马鱼生存质量, 推动实验鱼标准化进程提供理论支撑与实践参考。

关键词: 实验动物; 生存质量; 动物福利; 斑马鱼

中图分类号: Q95-33 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3207(2026)02-022618-12

doi: 10.3724/1000-3207.2025.2025.0172 **CSTR:** 32229.14.SSSWXB.2025.0172



实验动物作为生命科学研究的重要组成部分, 在基础生物学、生物医学、药物研发、环境毒理学等诸多领域中扮演重要角色^[1, 2]。实验动物给科学研究带来巨大贡献的同时, 自身福利却在实验中受到损害。实验动物福利是指人类保障实验动物健康和快乐生存权利的理念^[3], 保证实验动物得到适宜的生活条件和正确地对待, 尽量减少其痛苦和不适。其中“3Rs”原则是最为广泛接受的理论, 即: 通过改进和规范实验设计与操作, 减少(Reduce)使用动物的数量; 优化(Refine)饲养与实验操作, 减少动物承受的痛苦和伤害; 使用其他手段替代(Replace)动物实验, 或以低等动物替代高等动物^[4]。

斑马鱼(*Danio rerio*)是原产于印度半岛的杂食性热带淡水鱼类。20世纪50年代以来被引入生物学实验室, 逐渐成为经典的模式动物。斑马鱼因其体型小、发育快、体外受精、体外发育、胚胎透明、与人类基因组同源性高等特点, 被广泛应用于生命科学、健康科学、环境科学、水产科学等研

究领域, 是国际上应用范围最广的实验鱼类^[5-7]。我国斑马鱼研究体量全球占比, 从21世纪初的1%增至2024年的40.5%, 已成为全球斑马鱼研究体量最大的国家(图1)。与之不匹配的是, 在斑马鱼质量控制的各个方面一直缺少详尽的标准规范; 而关乎斑马鱼实验动物福利的规范几乎空白。本文结合国内外涉及斑马鱼福利保护的相关规范内容, 从痛苦压力感知、水环境、饲育、实验操作、运输和安乐死等方面进行讨论, 旨在为科研人员提供兼顾实验可行性与动物福利的技术参考。

1 斑马鱼的痛苦和压力感知

感知痛苦和压力的能力是动物适应生存环境, 保护自身的重要能力。执行该功能的大脑区域、生理反应的发生机制、相应的神经递质和分子机制从人到哺乳动物到鱼是相对保守的^[8, 9]。正因如此, 近年来斑马鱼也逐渐成为研究疼痛、情绪和压力反应的重要模型^[10-12]。我们在考虑斑马鱼福利

收稿日期: 2025-04-24; 修订日期: 2025-08-14

基金项目: 国家重点研发计划“实验动物新品种、新品系开发与评价”(2022YFF0710500)资助 [Supported by the National Key Research and Development Program of China (2022YFF0710500)]

作者简介: 李玲璐, 女, 硕士研究生, 实验师; 研究方向为斑马鱼资源维护与保藏。E-mail: lilingle@ihb.ac.cn

通信作者: 潘鲁媛, 女, 博士, 高级工程师; 研究方向为斑马鱼资源构建与应用。E-mail: luyuanpan@ihb.ac.cn

的时候,应参考这些研究成果所提供的新认知^[13]。

研究发现, 5 dpf (Days post fertilization, 受精后天数)的斑马鱼仔鱼已具备较完整的伤害感受能力, 在受到有害刺激时, 会表现出典型的“扭动”或“甩尾”等逃避行为, 这些行为可量化评估疼痛程度^[14]。成鱼的情绪反应更为复杂, 包括急性应激(如短暂剧烈游动)、恐惧(如冻结行为)和长期压力反应(如社交回避)等^[15]。在感知压力的情况下, 斑马鱼激活下丘脑-垂体-肾间组织(Hypothalamic-Pituitary-Interrenal, HPI)应激轴, 其结构和功能都和哺乳动物的下丘脑-垂体-肾上腺(Hypothalamic-Pituitary- Adrenal, HPA)应激轴基本一致^[8, 16]。在生理层面, 斑马鱼会产生诸如前列腺素内过氧化物合酶2a (Ptgs2a)表达上调^[11]、皮质醇(主要应激激素)水平升高、体温短暂上升及心率加快等^[17]反应, 与哺乳动物的应激生理高度一致, 表明斑马鱼具备类似的情绪体验能力。斑马鱼感知疼痛、恐惧和压力等的神经网络与分子机理也和哺乳动物极为相似, 依赖于瞬时受体电位离子通道家族(Transient receptor potential cation channel, TRP), 如TRPV1、TRPA1的激活, 这些通道在外界伤害性刺激下触发

动作电位, 并传递至中枢神经系统^[11, 12, 15]。斑马鱼成鱼不仅可因外力伤害表现出痛苦和恐惧的行为模式, 甚至可在自身并未受到直接伤害的情况下, 通过视觉或化学信号识别同类的痛苦, 并表现出类共情行为。例如, 当观察或感知其他个体受到伤害时, 催产素(与共情和社会联结相关的神经肽)水平会上升, 并出现模拟应激行为。这种社会性情绪传递的表现, 说明斑马鱼可能具备一定程度的共情能力, 进一步强化了对其福利保护的合理性^[15]。

传统观点认为仔鱼神经系统尚未成熟, 但研究证实, 5 dpf的斑马鱼已具备基本的疼痛感知能力, 因此该阶段应作为福利评估的起点, 在实验设计中需要考虑仔鱼的应激敏感性, 避免不必要的伤害性操作, 既可提高存活率, 也可维护实验数据稳定性。除直接伤害外, 间接应激(如旁观同类的痛苦、不适宜的饲养环境)也可能影响实验结果。因此, 需优化实验条件以减少非必要的干扰。依据已知的研究成果, 本文建议针对5 dpf以上的斑马鱼(即从仔鱼期开始)进行实验动物福利讨论。相关科研工作应通过完善饲育环境、优化实验设计、改进操作步骤及推广相关标准规范等方法, 在保障研

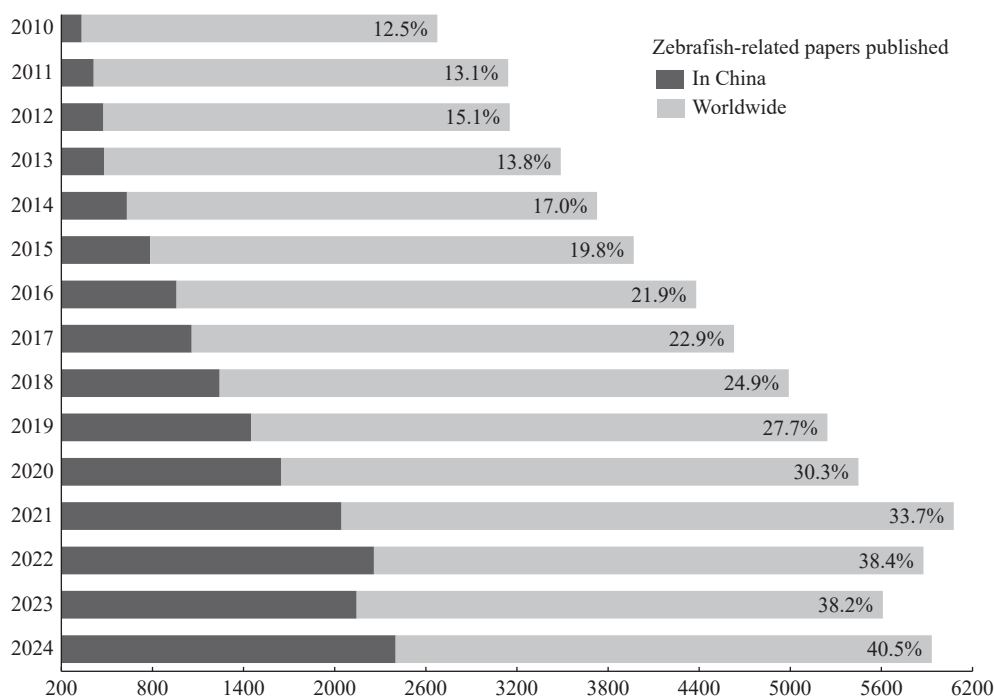


图1 中国斑马鱼研究体量全球占比发展趋势

Fig. 1 Trends in China's share of the global zebrafish research volume

本图显示在Web of Science™ Core Collection中以zebrafish为关键词搜索发表的研究论文数量后, 计算中国发表论文的全球占比; 图中浅灰色柱代表全球发表斑马鱼相关论文总量, 深灰色柱代表中国发表论文数量, 百分比数字为中国研究的全球占比

This figure shows the number of research papers found in the Web of Science™ Core Collection using the keyword “zebrafish”, followed by the global share of papers published in China; The light gray bars in the figure represent the total number of papers published worldwide related to zebrafish, while the dark gray bars represent the number of papers published in China; The percentages indicate the global share of Chinese research

究质量的同时提高斑马鱼的福利水平。

2 养殖环境

鱼类终身生活在水中, 水环境直接影响鱼类的健康和生存状况, 是最基本的福利条件。影响实验室斑马鱼福利的水环境指标主要包括水温、水质和光照等。

水温影响斑马鱼的发育、生长、摄食、新陈代谢、繁殖和行为能力^[18, 19]。野生斑马鱼的温度耐受范围为5.3—39.8℃^[20]。然而, 动物耐受的温度范围与其适宜的温度范围不同, 在非适宜温度下生活, 不仅会增加新陈代谢成本, 而且影响其发育、繁殖和存活率^[21]。对于实验室斑马鱼而言, 饲养温度和每日温度循环周期会影响仔鱼期和稚鱼期的存活率、生长、表观性状和性别决定^[22, 23]。斑马鱼养殖水温宜控制在25—28.5℃。

水质是影响斑马鱼健康和福利的最重要因素, 水质差或者不稳定会导致斑马鱼压力过大、繁殖能力降低或不繁殖, 甚至引发疾病和死亡^[24, 25]。常见的水质因素有pH、电导率、硬度、溶解氧、氨氮和氯的含量^[24, 26], 其中一些水质因素之间相互影响^[21]。

水体pH是实验室斑马鱼养殖环境中对健康影响最大的因素之一, 且会影响其他水质参数的变化, 应保持在稳定的范围内。斑马鱼野外自然群体生长的水环境pH在5.9—9.8^[13], 实验室养殖环境下pH过高可能会引起斑马鱼出现代谢紊乱、生长抑制和繁殖障碍等症状, 过低会易于感染疾病甚至死亡^[27]。斑马鱼养殖水的pH宜控制在7—8。电导率是水中溶解性离子或盐的浓度, 在一定温度下, 养殖水的电导率与盐度存在密切相关性, 且多数斑马鱼养殖设备通过监测电导率来代表水体盐度。斑马鱼野外生长环境的电导率在10—271 $\mu\text{S}/\text{cm}$ ^[28]。在实验室养殖环境下, 如果长时间暴露在过高或过低电导率的水环境中, 会对斑马鱼的能量代谢和繁殖能力产生负面影响^[24]。因此, 斑马鱼养殖水的电导率宜控制在500—800 $\mu\text{S}/\text{cm}$ 。水的总硬度指水中 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Fe^{2+} 等二价阳离子的总浓度, 硬度过高会引起能量代谢失衡从而导致健康问题, 太低会影响斑马鱼的繁殖^[24]。斑马鱼养殖水的硬度宜控制在75—200 mg/L CaCO_3 。水体中的溶解氧不足会造成生理代谢失衡、行为与发育异常甚至死亡, 而可溶性气体过饱和会引起气泡病^[29]。斑马鱼养殖水中溶解氧宜控制在6—8 mg/L 。水体中不同形态的氮, 在一定环境条件下可相互发生转化, 构成氮循环。氨氮含量过高会引起斑马鱼极度兴

奋、厌食、停止生长, 继而死亡, 有些病鱼会在体表形成溃烂^[29]。主要监测氨氮水平的指标: 非离子态氨、亚硝酸盐和硝酸盐的浓度; 含量分别宜控制在低于0.02、0.1和10 mg/L 。斑马鱼对游离氯基本不耐受^[29], 氯中毒会导致斑马鱼呼吸困难, 鳃肿胀变红和坏死^[30]。斑马鱼养殖水中的游离氯含量应为0。

适当的光照有利于斑马鱼的繁殖, 并且很大程度上减少斑马鱼的压力。稳定的光周期影响斑马鱼的生理和行为, 包括生长、发育和繁殖^[24, 31]。斑马鱼养殖环境的光周期宜设定为14h光照、10h黑暗, 或者12h光照、12h黑暗。水面光照强度太低会影响斑马鱼产卵, 太高不仅会在养殖环境中滋生藻类, 也会影响斑马鱼的行为, 增加焦虑程度^[32]。斑马鱼养殖环境水面光照强度宜控制在54—324 lx。

表1列出了国内外相关标准和指南中水环境因素的参考值。在实验室环境下, 斑马鱼通常养殖在集中式或独立式循环养殖系统中, 此类系统建成和稳定运行后, 仍需继续监控各项水质因素, 并定期手工检测, 避免因水质异常导致斑马鱼出现应激或健康问题。

3 环境丰富度

在环境因素中, 除健康的水环境外, 环境丰富度也会影响实验鱼的福利。丰富饲养环境是指通过丰富圈养动物所处的物理环境, 减少异常行为, 增强个体生理—行为适应性, 降低应激水平, 最终提升动物福利的手段^[13, 33, 34]。有研究表明, 丰富的环境可以刺激多个脑区, 促进神经形成(Neurogenesis)和神经保护(Neuroprotection), 降低慢性不可预见性应激(Unpredictable chronic stress, UCS)对斑马鱼造成的影响, 即焦虑性行为和皮质醇水平的升高^[35]。

斑马鱼是高度社会化动物, 偏好成群游动, 攻击性领地行为也是其常见的社会互动形式, 虽然严重的身体伤害较少发生, 但追逐或者“咬鱼”行为较为常见, 在此过程中可能导致鳞片脱落^[36]。在斑马鱼的天然栖息地中, 种类繁多且结构复杂的底质和植被, 帮助它们躲避天敌、降低被捕食压力、促进繁殖并提高卵的存活率^[37, 38]。相比之下, 实验室的养殖缸环境比较单一, 仅保障了基础生存需求, 从提供“积极福利”的角度考虑, 可通过一些修饰方法提升环境丰富度, 如在养殖缸中放入仿真水草或砾石, 作为斑马鱼藏身之处, 减少攻击行为; 或在鱼缸下方放置砾石图像, 作为非侵入性的改善形式, 也可对斑马鱼产生积极影响^[39, 40]。

其他的方式还有为鱼缸提供活水流, 模拟溪流

表1 国内外斑马鱼标准或指南中水环境指标推荐值

Tab. 1 Water indicators in the standards and guidelines of zebrafish husbandry

指标Index	RSPCA指南 ^[41] Guidance of RSPCA	CCAC指南 ^[42] Guidance of CCAC	UFAW手册 ^[43] Handbook of UFAW	实验鱼国标 ^[44] GB/T 39649—2020	CZRC建议 Recommended by CZRC
温度Temperature (°C)	28.5	26—29	24—29	24—30	25—28.5
pH	7—8	7—8	7—8	6.8—7.5	7—8
电导率Conductivity (μS/cm)	—	200—3000	500—800	300—1500	500—800
硬度Calcium hardness (mg/L CaCO ₃)	—	75—200	75—200	—	75—200
溶氧DO (mg/L)	6	6—8	7.8	≥5	6—8
非离子态氨NH ₃ -N (mg/L)	—	<0.05	0	≤0.02	<0.02
NO ₂ ⁻ (mg/L)	—	<0.1	0	≤0.2	<0.1
NO ₃ ⁻ (mg/L)	—	<50	<25	—	<10
游离氯Free chlorine (mg/L)	—	<0.01	0	—	0
光周期Photo period (h光/h暗)	14/10	14/10或12/12	14/10	14/10	14/10或12/12
光照强度Light intensity (lx)	54—324	54—324	54—354	54—324	54—324

注: RSPCA为“英国皇家防止虐待动物协会”的简称; CCAC为“加拿大动物护理委员会”的简称; UFAW为“英国慈善机构动物福利联合会”的简称; 实验鱼国标为“国家标准GB/T 39649—2020《实验动物 实验鱼质量控制》”的简称; CZRC为“国家斑马鱼资源中心”的简称

Note: RSPCA stands for Royal Society for the Prevention of Cruelty to Animals; CCAC stands for the Canadian Council on Animal Care; UFAW stands for the Universities Federation for Animal Welfare; National standard of laboratory stands for GB/T 39649—2020<Laboratory animal—Quality control of laboratory fish>; CZRC stands for China Zebrafish Resource Center

缓急交替的水动力环境, 促进斑马鱼的游动^[45]。给斑马鱼投喂活饵料, 也是丰富环境的一种手段, 可以刺激它们的捕食行为^[46, 47]。

4 饲养与繁育

环境因素外, 影响斑马鱼福利的首要人为因素即为饲养与繁育的管理。斑马鱼作为实验动物的一个显著优势在于四季产卵、产卵量大, 且亲本能重复多次交配产卵。这些优势使得斑马鱼能以较低成本为科学研究提供大量个体, 服务于各种高通量的筛选和检测工作^[48, 49]。然而, 利用斑马鱼的这一优势需要以正确的饲养和繁育作为基础, 饲养环境拥挤会影响斑马鱼的性别发育, 饲料单一或营养不足会严重影响斑马鱼繁殖能力, 不当传代方式会导致遗传多态性的丧失和种群退化, 这些因素不仅会损害斑马鱼福利, 且会影响实验数据的稳定性及准确性^[47, 50—52]。

饲养密度直接影响斑马鱼的福利水平。高密度饲养不仅会造成群体增重慢、饲料报酬低, 而且可能诱发慢性应激反应使得免疫力下降, 同时恶化水质; 而过低密度会导致压力水平和攻击行为增加^[53, 54]。饲养密度应保障斑马鱼的健康与舒适, 并根据年龄和体型及时进行调整^[55]。表2列出了不同发育阶段的推荐饲养密度。

充足且均衡的营养供给是斑马鱼卵子生成和精子质量的基础^[56, 57]。斑马鱼所需的营养元素主

表2 斑马鱼饲养密度的推荐范围

Tab. 2 Recommended range for zebrafish stocking density

胚胎阶段 Embryonic stage (0—4 dpf)	仔鱼阶段 Larva stage (5—15 dpf)	稚鱼阶段 Juvenile stage (16—45 dpf)	幼鱼阶段 Young fish stage (46—90 dpf)	成鱼阶段 Adult stage (>90 dpf)
≤100 枚/ 90 mm ² 平皿	≤50 尾/L	≤25 尾/L	≤8 尾/L	≤5 尾/L

要包括蛋白质、碳水化合物、多不饱和脂肪酸和维生素等^[58, 59]。蛋白质是斑马鱼饲料的核心营养成分之一, 直接影响斑马鱼生长、繁殖、免疫力及代谢效率。有研究表明, 含有35%—45%蛋白质的食物对斑马鱼来说较为合适^[59, 60]。蛋白质含量过高会导致水体中氨含量过度增加^[61]。食物中添加碳水化合物能提高斑马鱼对缺氧应激的抵抗力^[62], 饲料中碳水化合物含量低于5%时, 斑马鱼的生长速度可能会受到影响^[59, 63]。多不饱和脂肪酸是斑马鱼通过食物才能获取的重要营养, 不同类型的脂肪酸对斑马鱼的生长和产卵能力有重要影响^[64, 65]。此外, 维生素也是斑马鱼营养的重要成分, 维生素A参与视觉系统和鳍的发育, 维生素D在骨骼生长和维持体内激素水平方面发挥作用^[59], 而缺乏维生素E会导致斑马鱼骨骼肌退化^[66]。目前尚缺少针对斑马鱼的饲料营养标准, 未来相关机构需建立饲料的标准化体系, 明确营养需求, 从而提升斑马鱼饲育水平。

斑马鱼饲料的适口性直接影响其摄食行为、

营养吸收和生理状态。由于不同发育阶段斑马鱼的口大小不同,各阶段投喂的饲料应注意选择合适的直径^[47]。图2列举了斑马鱼在各个发育阶段所投喂的食物类型及适宜的饲/饵料粒的直径大小。饲料颗粒若直径过大,会造成鱼摄食困难,或强行吞咽刮伤消化道黏膜;粒径过小则常被鱼忽略,不仅影响摄食效率,而且会沉底败坏水质^[67]。相较于干饲料,活饵料的适口性更好,其浮游活动过程对斑马鱼更具吸引力,让斑马鱼产生捕获行为,投喂活饵料也可提高斑马鱼的繁殖效率^[46, 68]。每个饲养阶段需投喂足量的饲料,投喂不足影响斑马鱼存活率和健康,投喂过量易造成水质恶化,成鱼阶段的斑马鱼过于肥胖也会影响繁殖能力^[69]。一般投喂量以一缸鱼吃完的时间为判断依据,普遍认为投喂后5—15min吃完为宜^[69—71]。成鱼可每天投喂2—3次,对于仔鱼和稚鱼,可以适当增加投喂频率,但同时要增加换水频率保证水质^[69, 72]。

影响斑马鱼繁殖的因素还有体型、交配密度和频率等。交配行为中的支配模式往往与鱼的大小有关,体型较大的斑马鱼展现出更强的攻击性^[73],可能会给体型较小的鱼带来伤害。因此用于繁殖的个体,宜选用体型相近的雌雄鱼。建议将斑马鱼的交配密度控制在4尾/L以下,以避免因密度过高引发的应激反应。鉴于产卵会消耗雌鱼巨大的新陈代谢成本,建议雌鱼的繁殖频率不超过每周1次。另外,为保持遗传多态性,传代方式宜采用侧交,避免长期自交导致种质退化。

5 实验操作

实验操作经常是实验鱼受到直接伤害的环节,实验操作应遵循“3Rs”原则,在科学必要性与动物

福利间寻求平衡。对斑马鱼而言,这要求研究者从实验设计到操作细节均体现对生命的尊重。在日常实验流程中,斑马鱼常经历捞取、保定或样本采集等操作,不当操作可能引发斑马鱼急性疼痛、慢性应激或长期行为障碍,不仅损害动物福利,还会削弱实验数据的可重复性^[74, 75]。

实验人员必须能够熟练掌握操作步骤;在操作过程中应戴上无粉、无纹理的手套;只有必要时才对鱼进行操作;尽量减少保定次数,保定时应缩短鱼暴露在空气中的时间,并最大限度地减少伤害。当需要对斑马鱼反复操作时,应在两次操作期间留出恢复期,使得操作对象恢复正常的摄食行为。反复操作后应对操作对象进行监控,必要时可以使用镇静剂减轻其压力^[76]。

捞取是斑马鱼实验中最常见的操作,会给斑马鱼造成直接压力;如Ramsay等^[77]研究表明,斑马鱼在捞取操作后皮质醇水平会升高,并持续1h。如果长期处于应激状态,会使斑马鱼出现食欲不振、生长缓慢、免疫机能和繁殖率下降等情况^[78, 79]。在捞取仔、稚和幼鱼时,应选用网孔密集的鱼卵捞网;在捞取成鱼时,应选用光滑软网进行捞取。捞取动作应尽量柔和,避免过度追逐斑马鱼,或用捞网边缘挤压鱼身。

斑马鱼的保定是指在操作过程中,通过物理或化学方法限制斑马鱼的活动,以确保操作的安全性和准确性。物理方法是使用保定装置,如表面光滑的软网或者特定保定槽。接触鱼身时应谨慎操作,因为与哺乳动物不同,斑马鱼没有由角蛋白组成的皮肤层,而是由黏液层包裹着鳞片组成的保护屏障,如果黏液层受损,鱼会容易受到病菌的感染^[80]。化学方法是通过一定浓度麻醉剂浸泡

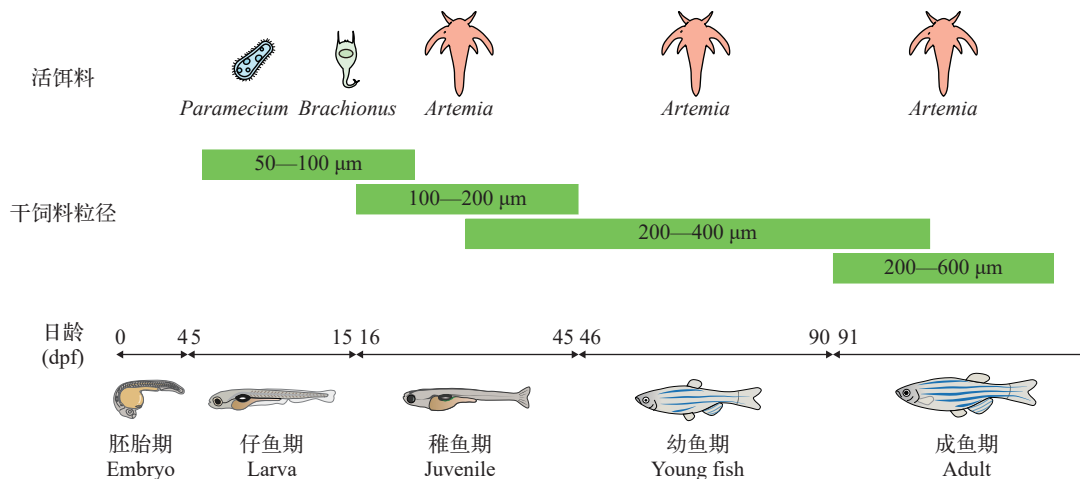


图2 在斑马鱼各个发育阶段投喂的食物类型及粒径大小

Fig. 2 Food types and particle sizes fed to zebrafish at each developmental stage

斑马鱼进入麻醉状态。常用的麻醉剂有三卡因(MS-222)、苯佐卡因(Benzocaine)、2-苯氧乙醇(2-Phenoxyethanol)、丁香油(Clove oil)等。它们的化学性质、作用机制、使用场景及安全性都各有不同。可以根据实验目的、发育阶段以及资源条件选择最合适的麻醉剂进行保定^[81, 82]。当观察到鱼身完全失去平衡、鳃动停止、对外界失去反应后即视为保定成功。相对于物理保定方法, 化学保定方法对斑马鱼的应激风险较小, 更大程度地减少了表皮或肌肉损伤, 更符合福利要求。

斑马鱼样本采集是指从斑马鱼个体通过规范化的实验操作获取特定生物样本的过程。这些生物样本包括组织、血液、细胞或遗传物质等。该过程需遵循适宜的操作规范, 保证操作的无创性或伤害最小化。样本采集后应配合适当的保存和标记以保证后续使用, 避免浪费。采样前应对斑马鱼进行麻醉或安乐死, 将取样过程造成的不适和痛苦最小化。在采样后, 应预防细菌感染, 监测操作对象的鳃动、游泳行为和健康状况。常见的组织样本包括鱼鳍(腹鳍、臀鳍或尾鳍)、刮取或拔取的鳞片、特定脏器、配子(精子或卵子)和血液等。对较小个体的斑马鱼进行采血通常是致命的, 在采血前应实施安乐死。斑马鱼血液样本采集操作的单次最大采血量应小于体重的2%^[83]。若需多次采血或出现严重应激, 应立即实施安乐死。以上实验操作的注意事项见表3。

6 运输

相比于常规实验操作, 运输环节常常成为实验鱼福利的盲点。随着国内外科研合作的深化, 斑马鱼的活体运输需求日益增加, 而运输过程中的环境

压力、生理应激和相关福利状况不仅关乎斑马鱼的存活与健康, 更直接影响科研数据的可靠性与可重复性^[84, 85]。例如, 运输中的温度波动、溶氧不足或过度拥挤可能导致斑马鱼免疫力下降、行为异常甚至死亡。此外, 国际运输还需遵循复杂的生物安全法规与福利准则, 这对运输方案的设计提出了更高要求^[86]。

斑马鱼的仔鱼处于初次摄食关键期, 稚鱼对水质波动更敏感, 在这两个阶段运输会严重影响其存活率。为减少可能的伤害或压力, 建议优先选择运输胚胎, 只在必要时运输幼鱼和成鱼, 尽量避免运输仔鱼和稚鱼。在理想情况下, 应在温和的季节进行运输, 炎热的夏季和严寒的冬季会增加死亡风险。气温过高或过低时, 运输要配备降温或保暖措施。冬季不建议在无特殊应对措施的情况下向黄河以北地区运输斑马鱼。

在运输过程中, 斑马鱼一直处于封闭水环境, 因此水体质量是保障其健康的重要因素。影响运输水质的关键因素: 包装密度、溶氧状况及氨氮含量。应根据斑马鱼的年龄采取不同的包装密度; 还应保证密封运输容器中保持不少于水体体积的空气体积, 在条件许可下宜以氧气替代空气。装运前应禁食1d, 以减少运输过程中斑马鱼排泄产生的有害氨氮。

运输的外部包装应为保温防震材料, 包装空隙中应装满填充物避免剧烈晃动。推荐的运输温度、密度、空气及时间如表4所示。

应事先了解运输过程, 保证包装条件可应对可能出现的运输延时。交运方应向接收方提供运输行程、运输条件、饲养历史、健康状况等信息, 以保证接收方在收到斑马鱼后采取适宜的处理。

表3 斑马鱼中常见的实验操作

Tab. 3 Common experimental operations in zebrafish

实验操作Experimental operation		注意事项Precaution
捞取		仔鱼、稚鱼和幼鱼: 鱼卵捞网捞取
		成鱼: 光滑软网捞取
保定		物理方法: 保定装置固定
		化学方法: 浸泡麻醉剂
组织样本采集	鱼鳍	满足实验需求最小量采集, 一般不超过0.25 cm
	鳞片	背鳍后方, 侧线上方区域刮取或拔取
	脏器	根据解剖学结构选择特定的解剖方法
	配子	轻柔挤压腹部收集精子或卵子
血液样本采集	心脏动脉取血	从腹侧刺入动脉球, 避免穿透心室
	鳃丝取血	少量撕开鳃丝进行收集
	尾静脉抽血	轻轻刺入尾静脉后进行收集
	断尾取血	在尾鳍末端快速剪切, 形成平滑切口后进行收集, 操作前需安乐死

在斑马鱼被接收后,应及时从运输容器转移至适宜的养殖环境内。为避免水环境骤变引发的应激反应,需进行水温过渡性调节,使其与养殖环境逐渐一致,并采用梯度换水法使其适应新水质。出于健康和防止疾病传播的考虑,接收的鱼不应直接进入接收方的循环系统中饲养,应采取隔离措施。

7 安乐死

实验动物的生命终点是安乐死环节,常成为实验动物福利伦理争议的焦点。对斑马鱼而言,行为学与生理学研究证实不当的安乐死方法可能诱发剧烈的应激反应,进而影响后续的实验数据^[76, 87]。

在野生环境中,斑马鱼栖息于溪流和稻田浅水区域,其平均寿命往往在1年左右^[42, 88]。实验室环境下的斑马鱼,有报道的最长寿命可达66个月^[89]。由于18个月以上的斑马鱼开始老化,产卵减少,免疫力降低,容易感染细菌或者生长肿瘤^[90, 91],可施以安乐死处理。除鱼龄之外,“仁慈终点”的判定还可考虑特定实验操作、养殖需要和健康情况。在致死性实验,如解剖、完整脏器取样之前,应实施安乐死;实验结束不再需要的鱼和严重患病的鱼也应做安乐死处理^[92, 93]。

在斑马鱼安乐死方法的选择中,需综合考量其发育阶段、个体大小及生理学特征,确保所选方法既符合仁慈终点的要求——即尽量减少痛苦与

不适,同时满足方法的可操作性、有效性和安全性^[94—96]。常见的斑马鱼安乐死方法有两种。第一种是高浓度麻醉法:使用3—5倍于正常浓度的麻醉剂,将斑马鱼浸入其中,观察鳃动完全停止后继续浸泡30min以上,保证鱼已死亡;第二种是直接冰浴法(冷休克法):将斑马鱼浸入冰水混合物(全过程中冰体积占比>50%)中至少40min,以确保死亡。对于胚胎和仔鱼,高浓度麻醉法效果不佳,应选择冰浴法,可在充分冰浴后再浸泡于次氯酸钠溶液(500 mg/L)中确保死亡^[87, 97]。对于稚鱼和幼鱼,需要在冰水中浸泡更长时间才能保证死亡。在保证斑马鱼已死亡后,可进行后续实验或进行无害化处理。

8 国内外相关规范现状

在斑马鱼研究发展较早的欧美国家,随着使用数量的急剧增加,对其福利保护的相关标准与规范也应运而生。自2010年以来,多个国家相继颁布并实施了一系列针对斑马鱼实验动物福利的规范化文件,内容涵盖饲养环境指标、实验操作管理及仁慈终点判定等,表5对影响较大,应用较为广泛的规范或指南文件进行了总结。

9 结论

斑马鱼作为一种应用广泛的模式动物,相对简单的实验操作和低廉的饲育成本是其优势之一,但

表 4 斑马鱼的运输管理指标推荐范围

Tab. 4 Recommended indicators for zebrafish transportation

发育阶段 Developmental stage	温度 Temperature (°C)	密度 Density	空气 Air content	运输时间 Transportation duration
胚胎	20—30	1枚/mL	约50%	5 dpf前到达目的地
幼鱼		≤50尾/L	2/3纯氧	3d内到达目的地
成鱼		≤10尾/L		

表 5 国内外颁布的与斑马鱼福利相关的规范及指南

Tab. 5 Guidelines related to the welfare of zebrafish

发布机构 Agency	发布时间 Release date	规范标题 Title	备注 Note
英国皇家防止虐待动物协会Royal Society for the Prevention of Cruelty to Animals (RSPCA)	2010年	Guidance on the housing and care of Zebrafish <i>Danio rerio</i> ^[37]	包括斑马鱼的养殖、繁育、运输、实验操作和安乐死等内容
欧盟理事会THE COUNCIL OF THE EUROPEAN UNION	2010年	European Directive 2010/63/EU (Annex IV) ^[98]	包括斑马鱼的饲养、护理和使用等内容
美国国家卫生院USA-National Institutes of Health	2011年	Guide for the Care and Use of Laboratory Animals ^[85]	包括斑马鱼的机构管理、饲养环境、运输、安乐死等内容
加拿大动物护理委员会The Canadian Council on Animal Care (CCAC)	2020年	CCAC guidelines: Zebrafish and other small, warm-water laboratory fish ^[34]	包括斑马鱼的水环境、设施、运输、繁育、健康管理、实验操作、保定、麻醉、安乐死和生物安全等内容
英国慈善机构动物福利联合会The Universities Federation for Animal Welfare (UFAW)	2024年	The UFAW Handbook on the Care and Management of Laboratory and Other Research Animals ^[35]	包括斑马鱼的饲养、运输、操作等内容
国家市场监督管理总局, 国家标准化管理委员会	2020年	国家标准GB/T 39649—2020《实验动物 实验鱼质量控制》 ^[36]	包括实验鱼的种质鉴定、遗传管理、微生物和寄生虫监测、饲料和环境设施等内容

在斑马鱼的饲养繁育、实验操作、管理流程等方面实现福利保障并不简单。近年来,我国通过优化政策框架和构建伦理审查体系,系统性地推进实验动物福利工作的规范化进程^[3, 99],但这些标准中,尚缺乏针对实验鱼类福利的指导方针。本综述系统分析了实验动物斑马鱼多方面的福利需求,包含痛苦感知、水环境、饲养、繁育、实验操作、运输及安乐死等方面,为提升实验室斑马鱼生存质量,推动实验鱼类标准化进程提供理论支撑与实践参考。

本文从以下几个方面对斑马鱼的福利因素进行讨论:(1)斑马鱼感知痛苦与压力的能力与哺乳动物具有较高可比性,同时鉴于5 dpf的斑马鱼开始具备基本的疼痛感知能力,建议该阶段作为斑马鱼福利伦理审查的起始阶段;(2)养殖水环境作为斑马鱼的基础福利要素,在确保各项参数符合标准参数范围后,仍需定期监测水质,避免因水质异常诱发健康风险;(3)在饲养与繁育管理方面,应注意饲养密度、饲料的营养配比和繁殖方式,从而提升健康水平;(4)在实验操作方面,应事先对实验对象进行必要的保定或安乐死处理,规范实验操作步骤,以避免或减少斑马鱼的急性疼痛、慢性应激或长期行为障碍;(5)运输管理应着重考虑运输过程中的温度、密度、空气和时间等因素,配合接收后的适应措施和隔离方法,有效减少斑马鱼运输环节的应激损伤,同时防止疾病的传播;(6)安乐死是实验动物福利体系的核心环节,在选择斑马鱼安乐死方法时,需综合考量其发育阶段、个体大小及生理学特征,选择高浓度麻醉或直接冰浴法,在确保死亡的同时尽量减少痛苦。

21世纪以来,多个国家相继颁布了关于实验鱼(含斑马鱼)的相关指南和手册。我国也在积极推动实验动物福利工作,已颁布《实验动物 福利伦理审查指南》(GB/T 35892—2018)和《实验动物 福利通则》(GB/T 42011—2022)等国家标准,但是在条款适用性方面主要针对陆生动物尤其是哺乳动物,未涉及实验鱼的福利内容^[3, 99]。2020年发布的《实验动物 实验鱼质量控制》(GB/T 39649—2020)国家标准已对斑马鱼养殖水环境参数做出规定,但并未包括实验动物福利和生物安全的相关条款^[36]。国家斑马鱼资源中心在日常工作中收到大量技术咨询,涉及的问题包括饲养、繁育、养殖设备故障、实验操作、鱼病和鱼房大规模死鱼等。这些咨询中反映出的问题,普遍与斑马鱼福利相关。从中可以发现,很多使用斑马鱼作为实验动物的研究者尚缺乏对斑马鱼健康与生存质量的基础认知,又

无相关的规范文件可参考;这些实验室中常常出现错误的饲育管理、运输流程和实验操作;不仅给斑马鱼带来巨大的伤害,也严重影响科研工作的进展和实验数据的可靠性。由此可见,推广斑马鱼福利相关的认知和标准规范是领域内亟待解决的问题。为提高斑马鱼的实验动物质量和管理水平,促进产业化发展,国家斑马鱼资源中心建议尽快制定并颁布斑马鱼实验动物福利的相关标准规范;同时积极推动将实验鱼类福利相关内容纳入国家实验动物伦理标准体系。

(作者声明本文符合出版伦理要求)

参考文献:

- [1] Luo X Q, Li L X, Li S S, *et al.* Current situation and countermeasures of laboratory animal welfare in medical research in China [J]. *Laboratory Animal and Comparative Medicine*, 2018, **38**(5): 403-406. [罗小泉, 李龙雪, 李姗姗, 等. 我国医学科研实验动物福利现状及对策 [J]. 实验动物与比较医学, 2018, **38**(5): 403-406.]
- [2] Yang G B. Ethical reflection on laboratory animals in biomedical research [J]. *Chinese Medical Ethics*, 2010, **23**(3): 10-13. [杨国斌. 生物医学研究中实验动物伦理学问题的思考 [J]. 中国医学伦理学, 2010, **23**(3): 10-13.]
- [3] National Research Institute Family Planning, National Institutes for Food and Drug Control, Beijing Cancer Hospital, *et al.* Laboratory animal-Guideline for ethical review of animal welfare (GB/T 35892-2018) [S]. General Administration of Quality Supervision, Inspection and Quarantine of the People's Republic of China, Standardization Administration of the People's Republic of China, 2018. 24. [国家卫生计生委科学技术研究所, 中国食品药品检定研究院, 北京大学肿瘤医院, 等. 实验动物 福利伦理审查指南 [S]. 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, 2018: 24.]
- [4] Kirk R G W. Recovering the principles of humane experimental technique: the 3Rs and the human essence of animal Research [J]. *Science Technology & Human Values*, 2018, **43**(4): 622-648.
- [5] Commission E. 2019 Report on the Statistics on the use of Animals for Scientific Purposes in the Member States of the European Union in 2015-2017 [Z]. Commission E. Brussels; European Commission. 2020.
- [6] Cartner S E J, Farmer S, Guillemin K, *et al.* The Zebrafish in Biomedical Research: Biology, Husbandry, Diseases, and Research Applications [M]. 1st ed ed. San Diego CA: Academic Press: American College of Laboratory Animal Medicine Series, 2019.
- [7] Andersen-Civil A I S, Sawale R A, Vanwalleghe G C. Zebrafish (*Danio rerio*) as a translational model for neuro-immune interactions in the enteric nervous system in autism spectrum disorders [J]. *Brain, Behavior, and*

- Immunity*, 2023(112): 254-266.
- [8] de Abreu M S, Demin K A, Giacomini A, *et al.* Understanding how stress responses and stress-related behaviors have evolved in zebrafish and mammals [J]. *Neurobiology of Stress*, 2021(15): 100405.
- [9] Malafoglia V, Bryant B, Raffaelli W, *et al.* The zebrafish as a model for nociception studies [J]. *Journal of cellular physiology*, 2013, **228**(10): 1956-1966.
- [10] Mills E G, Izzi-Engbeaya C, Abbara A, *et al.* Functions of galanin, spexin and kisspeptin in metabolism, mood and behaviour [J]. *Nature Reviews Endocrinology*, 2021, **17**(2): 97-113.
- [11] Ohnesorge N, Heintz C, Lewejohann L. Current methods to investigate nociception and pain in zebrafish [J]. *Frontiers in Neuroscience*, 2021(15): 632634.
- [12] Gazzano V, Ogi A, Cecchi F, *et al.* Cognitive bias in adult zebrafish (*Danio rerio*): a systematic review [J]. *Veterinary sciences*, 2025, **12**(1): 71.
- [13] Lee C J, Paull G C, Tyler C R. Improving zebrafish laboratory welfare and scientific research through understanding their natural history [J]. *Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society*, 2022, **97**(3): 1038-1056.
- [14] Steenbergen P J, Bardine N. Antinociceptive effects of buprenorphine in zebrafish larvae: An alternative for rodent models to study pain and nociception [J]? *Applied Animal Behaviour Science*, 2014(152): 92-99.
- [15] Akinrinade I, Kareklas K, Teles M C, *et al.* Evolutionarily conserved role of oxytocin in social fear contagion in zebrafish [J]. *Science*, 2023, **379**(6638): 1232-1237.
- [16] Alsop D, Vijayan M. The zebrafish stress axis: molecular fallout from the teleost-specific genome duplication event [J]. *General and Comparative Endocrinology*, 2009, **161**(1): 62-66.
- [17] Li X H, Fu C, Tan X T, *et al.* Responses of zebrafish to chronic environmental stressors: anxiety-like behavior and its persistence [J]. *Frontiers in Marine Science*, 2025, **12**(1551595).
- [18] Kimmel C B, Ballard W W, Kimmel S R, *et al.* Stages of embryonic development of the zebrafish [J]. *Developmental Dynamics*, 1995(203): 253-310.
- [19] de Souza A M, da Silva Junior F C, Dantas É D, *et al.* Temperature effects on development and lifelong behavior in zebrafish [J]. *Science of the Total Environment*, 2025(973): 179172.
- [20] Cortemeglia C, Beiting T L. Projected US distributions of transgenic and wildtype zebra danios, *Danio rerio*, based on temperature tolerance data [J]. *Journal of Thermal Biology*, 2006, **31**(5): 422-428.
- [21] McArthur K L, Chow D M, Fetcho J R. The Zebrafish in Biomedical Research: Biology, Husbandry, Diseases, and Research Applications [M]. 2019.
- [22] Schaefer J, Ryan A. Developmental plasticity in the thermal tolerance of zebrafish *Danio rerio* [J]. *Journal of Fish Biology*, 2006, **69**(3): 722-734.
- [23] Sfakianakis D, Leris I, Laggis A. The effect of rearing temperature on body shape and meristic count in zebrafish (*Danio rerio*) juveniles [J]. *Environmental Biology of Fishes*, 2011(92): 197-205.
- [24] Hammer H S. Chapter 29 - Water Quality For Zebrafish Culture [M]. Cartner S C, Eisen J S, Farmer S C, *et al.* The Zebrafish in Biomedical Research. Academic Press. 2020: 321-335.
- [25] Sanders E, Farmer S C. Aquatic models: water quality and stability and other environmental factors [J]. *Ilar Journal*, 2020, **60**(2): 141-149.
- [26] Wedemeyer G A. Physiology of Fish in Intensive Culture Systems [M]. 1 ed.: Springer New York, NY, 1999.
- [27] Liu L Y, Pan L Y, Sun Y H. Pathogen isolation and identification of the zebrafish “hole in the head” disease and diagnosis of common diseases [J]. *Progress in Biochemistry and Biophysics*, 2022, **49**(5): 917-927. [柳月, 潘鲁, 孙永华. 斑马鱼“裂头病”病原的分离与鉴定及常见疾病诊断 [J]. 生物化学与生物物理进展, 2022, **49**(5): 917-927.]
- [28] Tsang B, Gerlai R. Nature versus laboratory: how to optimize housing conditions for zebrafish neuroscience research [J]. *Trends in Neurosciences*, 2024, **47**(12): 985-993.
- [29] Murray K N, Lains D, Spagnoli S T. Chapter 39 - Water Quality and Idiopathic Diseases of Laboratory Zebrafish [M]// Cartner S C, Eisen J S, Farmer S C, *et al.* (EDS.), The Zebrafish in Biomedical Research. Academic Press. 2020: 463-477.
- [30] Kent M L, Sanders J L, Spagnoli S, *et al.* Review of diseases and health management in zebrafish *Danio rerio* (Hamilton 1822) in research facilities [J]. *Journal of fish diseases*, 2020, **43**(6): 637-650.
- [31] Villamizar N, Vera L M, Foulkes N S, *et al.* Effect of lighting conditions on zebrafish growth and development [J]. *Zebrafish*, 2014, **11**(2): 173-181.
- [32] Silva P F, Garcia de Leaniz C, Freire F A M, *et al.* Different housing conditions for zebrafish: What are the effects [J]? *Behavioural Processes*, 2023(209): 104886.
- [33] Gallas-Lopes M, Benvenuti R, Donzelli N I Z, *et al.* A systematic review of the impact of environmental enrichment in zebrafish [J]. *Lab Animal*, 2023, **52**(12): 332-343.
- [34] Tsang B, Gerlai R T. Common aquarium plants as an enrichment strategy in zebrafish facilities [J]. *Zebrafish*, 2022, **19**(6): 218-223.
- [35] Marcon M, Mocelin R, Benvenuti R, *et al.* Environmental enrichment modulates the response to chronic stress in zebrafish [J]. *Journal of Experimental Biology*, 2018, **221**(Pt 4).
- [36] Ruhl N, McRobert S P, Currie W J. Shoaling preferences and the effects of sex ratio on spawning and aggression in

- small laboratory populations of zebrafish (*Danio rerio*) [J]. *Lab Animal*, 2009, **38**(8): 264-269.
- [37] Spence R, Gerlach G, Lawrence C, *et al.* The behaviour and ecology of the zebrafish, *Danio rerio* [J]. *Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society*, 2008, **83**(1): 13-34.
- [38] Spence R, Fatema M K, Reichard M, *et al.* The distribution and habitat preferences of the zebrafish in Bangladesh [J]. *Journal of Fish Biology*, 2006(69): 1435-1448.
- [39] Stevens C H, Reed B T, Hawkins P. Enrichment for laboratory zebrafish-a review of the evidence and the challenges [J]. *Animals*, 2021, **11**(3): 698.
- [40] Schroeder P, Jones S, Young I S, *et al.* What do zebrafish want? Impact of social grouping, dominance and gender on preference for enrichment [J]. *Laboratory animals*, 2014, **48**(4): 328-337.
- [41] Reed B, Jennings M. Guidance on the Housing and Care of Zebrafish *Danio rerio* [M]. 2011.
- [42] The Canadian Council on Animal Care Board. CCAC Guidelines: Zebrafish and Other Small, Warm-water Laboratory Fish [S]. 2020.
- [43] Wilson C. Zebrafish [M]. The UFAW Handbook on the Care and Management of Laboratory and Other Research Animals. 2024: 933-955.
- [44] Guangdong Laboratory Animals Monitoring Institute, Institute of hydrobiology Chinese academy of sciences, PearlRiver Fisheries Research Institute, *et al.* Laboratory animal-Quality control of laboratory fish (GB/T 39649-2020) [S]. General Administration of Quality Supervision, State Administration for Market Regulation, Standardization Administration of the People's Republic of China, 2020: 28. [广东省实验动物监测所, 中国科学院水生生物研究所, 中国水产科学研究院珠江水产研究所, 等. 实验动物 实验鱼质量控制 [S]. 国家市场监督管理总局; 国家标准化管理委员会, 2020: 28.]
- [45] DePasquale C, Fettrow S, Sturgill J, *et al.* The impact of flow and physical enrichment on preferences in zebrafish [J]. *Applied Animal Behaviour Science*, 2019(215): 77-81.
- [46] Aleström P, D'Angelo L, Midtlyng P J, *et al.* Zebrafish: housing and husbandry recommendations [J]. *Laboratory Animals*, 2020, **54**(3): 213-224.
- [47] Licitra R, Fronte B, Verri T, *et al.* Zebrafish feed intake: a systematic review for standardizing feeding management in laboratory conditions [J]. *Biology*, 2024, **13**(4).
- [48] Lam P Y, Peterson R T. Developing zebrafish disease models for in vivo small molecule screens [J]. *Current Opinion in Chemical Biology*, 2019(50): 37-44.
- [49] Changzhou Environmental Monitoring Center, Chinese Research Academy of Environmental Sciences. Water quality-Determination of the acute toxicity-Zebrafish (*Danio rerio*) eggs method (HJ 1069-2019) [S]. Ministry of Ecology and Environment, 2019: 19. [江苏省常州环境
- 境监测中心, 中国环境科学研究院环境基准与风险评估国家重点实验室. 水质 急性毒性的测定 斑马鱼卵法 [S]. 生态环境部, 2019: 19.]
- [50] Tsang B, Zahid H, Ansari R, *et al.* Breeding zebrafish: a review of different methods and a discussion on standardization [J]. *Zebrafish*, 2017, **14**(6): 561-573.
- [51] Tsang B, Ansari R, Gerlai R T. Chapter 2-Maintenance and Breeding of Zebrafish, with Some Ethological and Ecological Considerations in Mind [M]. GERLAI R T. Behavioral and Neural Genetics of Zebrafish. Academic Press. 2020: 17-32.
- [52] Hillman C, Cooper A H, Ram P, *et al.* The effect of laboratory diet and feeding on growth parameters in juvenile zebrafish [J]. *Lab Animal*, 2024, **53**(11): 327-335.
- [53] Andersson M, Kettunen P. Effects of holding density on the welfare of zebrafish: A systematic review [J]. *Zebrafish*, 2021, **18**(5): 297-306.
- [54] Andersson M, Roques J A C, Aliti G M, *et al.* Low holding densities increase stress response and aggression in zebrafish [J]. *Biology*, 2022, **11**(5): 725.
- [55] Sen Sarma O, Frymus N, Axling F, *et al.* Optimizing zebrafish rearing-Effects of fish density and environmental enrichment [J]. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 2023(17): 1204021.
- [56] Longkumer S, Jamir A, Pankaj P P. Maintenance and Breeding of Zebrafish under Laboratory Conditions for Animal Research [M//Kumar A (Eds.), Agricultural Science Digest. 2024: 551-555.
- [57] Kohale K. The Housing and Husbandry of Zebrafish (*Danio rerio*) in a Laboratory Environment [M//Nagarajan P, Gudde R, Srinivasan R (Eds.), Essentials of Laboratory Animal Science: Principles and Practices. Singapore; Springer Singapore. 2021: 277-311.
- [58] Ulloa P E, Iturra P, Neira R, *et al.* Zebrafish as a model organism for nutrition and growth: towards comparative studies of nutritional genomics applied to aquacultured fishes [J]. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 2011, **21**(4): 649-666.
- [59] Fowler L A, Williams M B, D'Abramo L R, *et al.* Chapter 33-Zebrafish Nutrition-Moving Forward [M//Cartner S C, Eisen J S, Farmer S C, *et al.* (Eds.), The Zebrafish in Biomedical Research. Academic Press. 2020: 379-401.
- [60] Watts S A, D'Abramo L R. Standardized reference diets for zebrafish: addressing nutritional control in experimental methodology [J]. *The Annual Review of Nutrition*, 2021(41): 511-527.
- [61] Fernandes H, Peres H, Carvalho A P. Dietary protein requirement during juvenile growth of zebrafish (*Danio rerio*) [J]. *Zebrafish*, 2016, **13**(6): 548-555.
- [62] Ma Q, Hu C-T, Yue J, *et al.* High-carbohydrate diet promotes the adaptation to acute hypoxia in zebrafish [J]. *Fish Physiology and Biochemistry*, 2020, **46**(2): 665-679.
- [63] Xi L, Lu Q, Liu Y, *et al.* Study on carbohydrate

- metabolism in adult zebrafish (*Danio rerio*) [J]. *Aquaculture Nutrition*, 2023(2023): 1397508.
- [64] Fowler L A, Dennis-Cornelius L N, Dawson J A, *et al.* Both dietary ratio of n-6 to n-3 fatty acids and total dietary lipid are positively associated with adiposity and reproductive health in zebrafish [J]. *Current developments in nutrition*, 2020, **4**(4): nzaa034.
- [65] Nowosad J, Kucharczyk D, Targońska K. Enrichment of zebrafish *Danio rerio* (Hamilton, 1822) diet with polyunsaturated fatty acids improves fecundity and larvae quality [J]. *Zebrafish*, 2017, **14**(4): 364-370.
- [66] Lebold K M, Löhr C V, Barton C L, *et al.* Chronic vitamin E deficiency promotes vitamin C deficiency in zebrafish leading to degenerative myopathy and impaired swimming behavior [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 2013, **157**(4): 382-389.
- [67] Önal U, Langdon C. Diet size preference of zebrafish (*Danio rerio*) larvae fed on cross-linked protein-walled capsules [J]. *Zebrafish*, 2016, **13**(6): 556-562.
- [68] Farias M, Certal A. Different feeds and feeding regimens have an impact on zebrafish larval rearing and breeding performance [J]. *International Journal Marine Biology and Research*, 2016(1): 1-8.
- [69] Vargesson N. Zebrafish in 'Manual of Animal Technology' [M]. Blackwell Publishing, 2007.
- [70] Brand M, Granato M, Nüsslein V C. Keeping and Raising Zebrafish [M]. Zebrafish: A Practical Approach. Oxford University Press. 2002.
- [71] Westerfield M. The Zebrafish Book: A Guide for the Laboratory Use of Zebrafish (*Danio rerio*) [M]. M. Westerfield, 2007.
- [72] Lawrence C. The husbandry of zebrafish (*Danio rerio*): A review [J]. *Aquaculture*, 2007, **269**(1): 1-20.
- [73] Paull G C, Filby A L, Giddins H G, *et al.* Dominance hierarchies in zebrafish (*Danio rerio*) and their relationship with reproductive success [J]. *Zebrafish*, 2010, **7**(1): 109-117.
- [74] Philippe C, Vergauwen L, Huyghe K, *et al.* Chronic handling stress in zebrafish *Danio rerio* husbandry [J]. *Journal of Fish Biology*, 2023, **103**(2): 367-377.
- [75] Kreiberg H. Chapter 29-Stress and Anesthesia [M]. Ostrander G K. The Laboratory Fish. London; Academic Press. 2000: 503-511.
- [76] Köhler A, Valentim A M. Chapter 6 - Analgesia, Anesthesia, and Euthanasia in Zebrafish [M]// D'angelo L, De Girolamo P (Eds.), Laboratory Fish in Biomedical Research. Academic Press. 2022: 119-137.
- [77] Ramsay J M, Feist G W, Varga Z M, *et al.* Whole-body cortisol response of zebrafish to acute net handling stress [J]. *Aquaculture*, 2009, **297**(1): 157-162.
- [78] Abdollahpour H, Falahatkar B, Jafari N, *et al.* Effect of stress severity on zebrafish (*Danio rerio*) growth, gonadal development and reproductive performance: Do females and males respond differently [J]? *Aquaculture*, 2020(522): 735099.
- [79] Nardocci G, Navarro C, Cortés P P, *et al.* Neuroendocrine mechanisms for immune system regulation during stress in fish [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2014, **40**(2): 531-538.
- [80] Cline A, Feldman S R. Zebrafish for modeling skin disorders [J]. *Dermatology Online Journal*, 2016, **22**(8): 130130.
- [81] Collymore C. Chapter 34-Anesthesia, Analgesia, and Euthanasia of the Laboratory Zebrafish [M]// Cartner S C, Eisen J S, Farmer S C, *et al.* (Eds.), The Zebrafish in Biomedical Research. Academic Press. 2020: 403-413.
- [82] Readman G D, Owen S F, Knowles T G, *et al.* Species specific anaesthetics for fish anaesthesia and euthanasia [J]. *Scientific Reports*, 2017, **7**(1): 7102.
- [83] Zang L, Shimada Y, Nishimura Y, *et al.* Repeated blood collection for blood tests in adult zebrafish [J]. *Jove-Journal of Visualized Experiments*, 2015(102): e53272.
- [84] Barton C L, Baumann D P, Cox J D. Chapter 37 - Export and Transportation of Zebrafish [M]// Cartner S C, Eisen J S, Farmer S C, *et al.* (Eds.), The Zebrafish in Biomedical Research. Academic Press. 2020: 443-450.
- [85] National Research Council Committee for the Update of the Guide for the C, Use of Laboratory A. The National Academies Collection: Reports funded by National Institutes of Health [M]. Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. Washington (DC); National Academies Press (US), National Academy of Sciences. 2011.
- [86] Chou S T, Clemons D, Dudoignon N, *et al.* Transportation of Laboratory Animals [M]. The UFAW Handbook on the Care and Management of Laboratory and Other Research Animals. 2024: 171-190.
- [87] Association A V M. AVMA Guidelines for the Euthanasia of Animals [M] 2020 edn ed.: Schaumburg IL: AVMA, 2020.
- [88] Engeszer R E, Patterson L B, Rao A A, *et al.* Zebrafish in the wild: a review of natural history and new notes from the field [J]. *Zebrafish*, 2007, **4**(1): 21-40.
- [89] Gerhard G S, Kauffman E J, Wang X, *et al.* Life spans and senescent phenotypes in two strains of zebrafish (*Danio rerio*) [J]. *Experimental Gerontology*, 2002, **37**(8-9): 1055-1068.
- [90] Van houcke J, De Groef L, Dekeyster E, *et al.* The zebrafish as a gerontology model in nervous system aging, disease, and repair [J]. *Ageing Research Reviews*, 2015(24): 358-368.
- [91] Ramsay J M, Watral V, Schreck C B, *et al.* Husbandry stress exacerbates mycobacterial infections in adult zebrafish, *Danio rerio* (Hamilton) [J]. *Journal of Fish Diseases*, 2009, **32**(11): 931-941.
- [92] Buenhombre J, Daza-Cardona E A, Sousa P, *et al.* Diffe-

- rent influences of anxiety models, environmental enrichment, standard conditions and intraspecies variation (sex, personality and strain) on stress and quality of life in adult and juvenile zebrafish: A systematic review [J]. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 2021(**131**): 765-791.
- [93] Kim S W, Jung W J, Han S H, *et al.* Current status of the zebrafish euthanasia and humane endpoint in the republic of Korea and guideline suggestion from nationwide expert elicitation: a model for other countries [J]. *Zebrafish*, 2024, **21**(1): 53-66.
- [94] Strykowski J L, Schech J M. Effectiveness of recommended euthanasia methods in larval zebrafish (*Danio rerio*) [J]. *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science*, 2015, **54**(1): 81-84.
- [95] Collymore C, Banks E K, Turner P V. Lidocaine hydrochloride compared with MS222 for the euthanasia of zebrafish (*Danio rerio*) [J]. *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science*, 2016, **55**(6): 816-820.
- [96] Köhler A, Collymore C, Finger-Baier K, *et al.* Report of workshop on euthanasia for zebrafish-a matter of welfare and science [J]. *Zebrafish*, 2017, **14**(6): 547-551.
- [97] Matthews M, Varga Z M. Anesthesia and euthanasia in zebrafish [J]. *Ilar Journal*, 2012, **53**(2): 192-204.
- [98] Council E P a. Directive 2010/63/EU of the European Parliament and of the Council of 22 September 2010 on the Protection of Animals Used for Scientific Purposes [Z]. Official Journal of the European Union. 2010.
- [99] Institute of Laboratory Animals Science, CAMS & PUMC, National Research Institute for Family Planning, Peking University. *et al.* Laboratory animals-General code of animal welfare (GB/T 42011-2022) [S]. General Administration of Quality Supervision, State Administration for Market Regulation, Standardization Administration of the People's Republic of China, 2019: 19. [中国科学院医学实验动物研究所, 国家卫生健康委科学技术研究所, 北京大学, 等. 实验动物 福利通则 [S]. 国家市场监督管理总局; 国家标准化管理委员会. 2022: 20.]

DISCUSSION ON THE ANIMAL WELFARE IN ZEBRAFISH

LI Ling-Lu, LIU Tao, LIU Li-Yue and PAN Lu-Yuan

(China Zebrafish Resource Center, National Aquatic Biological Resource Center, Institute of Hydrobiology, Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430072, China)

Abstract: Laboratory animals play an important and fundamental role in life sciences, and their great contribution comes at the cost of various physical and mental injuries, pains, and even deaths. As a key model organism, zebrafish has become one of the most widely used laboratory animals in recent years. An important issue for researchers is how to protect zebrafish welfare while ensuring the reliability of experimental results. Here, we systematically review key welfare concerns in zebrafish research, including pain and pressure perception, water environment, feeding and breeding, experimental operation, transportation, and euthanasia. This review provides theoretical support and practical guidance for improving the life quality of zebrafish and promoting the standardization of laboratory fish.

Key words: Laboratory animals; Life quality; Animal welfare; Zebrafish