

戴明珠,黄燕烽,彭逸,等. 斑马鱼发育毒性与致畸性相关实验研究进展[J]. 中国实验动物学报, 2020, 28(1): 137-142.

Dai MZ, Huang YF, Peng Y, et al. Advances in zebrafish experimental research on developmental toxicity and teratogenicity [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2020, 28(1): 137-142.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2020.01.020

# 斑马鱼发育毒性与致畸性相关实验研究进展

戴明珠<sup>1</sup>,黄燕烽<sup>1</sup>,彭逸<sup>1</sup>,张双阳<sup>1</sup>,张立将<sup>2</sup>,李春启<sup>1,2\*</sup>

(1. 杭州环特生物科技股份有限公司,杭州 310051;  
2. 浙江省人用物品安全性评价技术研究重点实验室早期评价基地,杭州 310053)

**【摘要】** 自1994年Science、Nature等杂志发表专题评述,至2009年野生型AB品系斑马鱼全基因组测序完成,斑马鱼已经成为一种公认的新型模式生物。斑马鱼模式生物在发育毒性与致畸性研究中引人注目的优势是胚胎发育的透明性,基于高通量的检测体系,以及短时-高效-低费筛选,用于中药毒理和重大疾病中中药活性成分筛选,以及小分子化合物的大规模新药筛选研究。随着“3R原则”的推行与实施,斑马鱼可能发展成为发育毒性与致畸性试验哺乳动物替代模型。概括介绍了国内外斑马鱼发育毒性与致畸性研究最新进展。

**【关键词】** 斑马鱼;胚胎;发育毒性与致畸性

**【中图分类号】** Q95-33    **【文献标识码】** A    **【文章编号】** 1005-4847(2020) 01-0137-06

## Advances in zebrafish experimental research on developmental toxicity and teratogenicity

DAI Mingzhu<sup>1</sup>, HUANG Yanfeng<sup>1</sup>, PENG Yi<sup>1</sup>, ZHANG Shuangyang<sup>1</sup>, ZHANG Lijiang<sup>2</sup>, LI Chunqi<sup>1,2\*</sup>

(1. Hunter Biotechnology, Inc., Hangzhou 310051, China.  
2. Early Test Base of Zhejiang Province Key Labortary of Human Supplier Safety Evaluation, Hangzhou 310053)  
Corresponding author: LI Chunqi. E-mail:jackli@zhunter.com

**【Abstract】** Since the publication of special reviews and commentaries on zebrafish (*Danio rerio*) in Science, Nature, and other journals in 1994, and completion of the whole genome sequencing of wild type (AB strain) zebrafish in 2009, the zebrafish has become a well-recognized new model organism. The remarkable advantages of zebrafish in the research and assessment of developmental toxicity and teratogenicity includes its transparency, high throughput, and rapid, high-efficiency, and low-cost screening. Zebrafish have been extensively used to screen the active components of traditional Chinese medicine for toxicological and pharmaceutical investigations, as well as for large-scale new drug screening of small molecule compounds. With the implementation of the "3R principle (Reduction, Replacement, Refinement)", the zebrafish has been proposed as an alternative animal model for developmental toxicity and teratogenicity tests. The recent progress of developmental toxicity and teratogenicity assessments in zebrafish is reviewed in this report.

**【Keywords】** zebrafish; embryo; developmental toxicity and teratogenicity

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

1996年,美国食品药品监督管理局(Food and Drug Administration, FDA)规定,药物在获批准许人类使用之前需进行生殖和发育毒性评估<sup>[1]</sup>。现行的发育毒性指导原则主要包括经济合作与发展组织(Organisation for Economic Co-operation and Development, OECD)条例TG414<sup>[2]</sup>、TG416<sup>[3]</sup>、

**【基金项目】** 国家“重大新药创制”科技重大专项(2017ZX09031059)。  
Funded by National Science and Technology Major Project “Major New Drug Creation” (2017ZX09031059).  
**【作者简介】** 戴明珠(1991—),女,硕士,主要从事中药药理及新产品开发。Email: 465250609@qq.com  
**【通信作者】** 李春启(1963—),男,博士,教授,主要从事药理学和毒理学研究。Email: jackli@zhunter.com

TG421<sup>[4]</sup>、TG422<sup>[5]</sup>和人用药品注册技术要求国际协调会议(International Conference on Harmonization, ICH) 准则 S5(R3)<sup>[6]</sup>, 其中建议使用的实验动物可以选择常规种属(大鼠、兔、小鼠)、非常规种属(食蟹猴、小型猪)、有限使用种属(豚鼠、仓鼠、犬、雪貂)和其他替代实验动物<sup>[7]</sup>。为快速、准确推行和 实施减少(reduction)、替代(replacement)和优化(refinement)原则, 实现保护动物福利和减少哺乳动物等较高级实验动物的使用量, 斑马鱼(Zebrafish, *Danio rerio*)发育毒性实验替代哺乳动物模型已广泛应用于药物的发育毒性与致畸性研究<sup>[8-9]</sup>。本文介绍了国内外斑马鱼发育毒性与致畸性研究最新进展。

# 1 发育毒性试验替代方法

食品、药品和环境安全问题是当前全人类都必须面临的一个严峻的问题。如, 目前人们普遍认为, 膳食纤维可分为两种, 可溶性膳食纤维(低聚果糖、果胶、菊粉等)和不可溶性膳食纤维(维生素等)。前者易在肠道中被细菌降解, 产生短链脂肪酸等一系列益于人体的代谢产物, 后者则不容易被消化酶降解, 而起到促进肠道蠕动的作用。然而 2018 年 10 月 18 日,《细胞》(*Cell*) 杂志发表文章表明, 长期喂食水溶性纤维会导致小鼠发生癌症<sup>[10]</sup>。这里并不宣扬膳食纤维是有害的, 相反, 应该说经过高度处理的可溶性膳食纤维并不是那么安全, 有可能会引起肠道菌群的过度生长和失调, 可能会增加罹患肝癌的风险。

2009 年 9 月, 欧洲化学品管理局(European Chemicals Agency, ECHA) 新闻稿就已报道, 有超过 143 835 种已预先注册的化学品会污染食品和环境<sup>[11]</sup>, 但其中约 86% 的化学品和其他现有化学品的安全性检测数据即时缺失的<sup>[12]</sup>, 这些实际数字远远超过了人们的认知。又根据 OECD 指导方针, 评估一种化学品的发育毒性需要 5816 只动物, 费用为 1 883 200 英镑<sup>[13]</sup>。因此, 促使研究和发展发育毒性试验的替代方法是顺势而为的。早期的替代方法大概可分为整体胚胎培养试验、哺乳动物微驴试验、爪蛙试验和胚胎干细胞试验。前两个模型仍然使用完整的哺乳动物作为实验对象, 仍属于高费-低效系统, 而蛙类专长于神经纤维兴奋传递类实验, 胚胎干细胞本身一直是一个具有争议的领域。

因此, 斑马鱼发育毒性试验替代方法似乎是适

用的。斑马鱼胚胎在母体外发育, 从合子期到孵化期仅 72 h, 且发育的完整过程均是透明的, 利于实时观察和检测(斑马鱼、大鼠和人胚胎发育时期的比较见表 1)。斑马鱼幼鱼长 3 ~ 4 mm, 拥有 6-384 孔板的高通量检测体系, 可实现低费-高效筛选。斑马鱼与人类基因同源性达到 87%<sup>[14-16]</sup>, 用于药物的体内快速评价实验结果可比性强。故可以利用斑马鱼早期各个阶段的发育形态, 准确高效的确定药物暴露在胚胎中的毒性, 广泛应用于药物的发育毒性与致畸性研究。

表 1 斑马鱼、大鼠和人胚胎发育时期的比较

| Table 1 Comparison of embryonic development periods among zebrafish, rat and human |                          |                  |                   |
|------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------|------------------|-------------------|
| 发育时期<br>Development periods                                                        | 斑马鱼(小时)<br>Zebrafish (h) | 大鼠(天)<br>Rat (d) | 人(天)<br>Human (d) |
| 卵裂期<br>Cleavage stage                                                              | 0                        | 1 ~ 2            | 1 ~ 5             |
| 8-细胞期<br>8-cell stage                                                              | 0.75                     | -                | 4                 |
| 原肠期<br>Gastrula stage                                                              | 5.25 ~ 10                | 6 ~ 8            | 2 ~ 4             |
| 初始神经胚形成<br>Initial neuroembryogenesis                                              | 9                        | 8                | 22                |
| 脑室发生<br>Ventricularogenesis                                                        | 30                       | 10               | 5 ~ 9             |
| 心叶形成<br>Cardiac lobe formation                                                     | 22                       | 8                | 16                |
| 心脏搏动<br>Heart beat                                                                 | 30                       | 8                | 22                |
| 器官发生<br>Organogenesis                                                              | 24 ~ 48                  | 8 ~ 14           | 4 ~ 8             |
| 颅面发生<br>Craniofacial development                                                   | 24                       | 8                | 22                |

# 2 斑马鱼发育毒性国内外最新研究进展

2010 年, Brannen 等<sup>[14]</sup>利用斑马鱼胚胎评价 31 种已知对体内哺乳动物胚胎致畸/不致畸化合物的致畸性, 证实斑马鱼与哺乳动物体内发育毒性与致畸性评价的一致性为 87%。同一年, 由阿斯利康(AstraZeneca) 牵头的 4 个实验室间<sup>[15]</sup>利用斑马鱼对 20 种化合物的发育毒性进行盲法评估, 并详细规范了斑马鱼发育毒性与致畸性的实验方法、检测指标和结果判定(毒性/畸形分级以及评分标准), 最终, 4 个实验室的结果与哺乳动物数据的整体一致性范围在 60% ~ 70%。经过进一步的调整, 更多因素如 pH、绒毛膜的通透性、胚胎的摄取率等考虑在内。2014 年, 阿斯利康又在两个实验室内平行对 38

种化合物的发育毒性与致畸性进行了评估,此次两个实验室间的总一致性达到 62% ~ 82%<sup>[16]</sup>。近年来国外斑马鱼发育毒性研究报告汇总详见表 2。

2013 年,鲁疆等<sup>[17]</sup>、夏继刚等<sup>[18]</sup>先后成功利用斑马鱼胚胎评价氯化铬等重金属离子和全氟辛烷

磺酸等有机污染物对水生生态的毒理学效应。2016 年,许冰洁等<sup>[19]</sup>利用斑马鱼评价 5 种已知对人类胚胎致畸药物的毒性与安全性,证实斑马鱼胚胎模型可用于初步评价药物的发育毒性和安全性。

表 2 斑马鱼发育毒性研究报告汇总

| Table 2 Summary of developmental toxicity study reports in zebrafish |                             |                                   |                            |                                                                                                                     |                                                |                                                                                   |
|----------------------------------------------------------------------|-----------------------------|-----------------------------------|----------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------|
| 时间<br>Time                                                           | 实验室<br>Laboratory           | 斑马鱼品系<br>Zebrafish Lines          | 处理时间<br>Exposure<br>Period | 评价指标<br>Evaluation Index                                                                                            | 预测性/化合物数目<br>Predictability/<br>Test compounds | 备注<br>Notes                                                                       |
| 2011                                                                 | OECD                        | —                                 | 0 hpf-<br>4 dpf            | LC <sub>50</sub>                                                                                                    | —/7                                            | 实验平行在 7 个实验室<br>中进行<br>Experiments were<br>evaluated in 7 laboratories            |
| 2011                                                                 | OECD                        | —                                 | 0 hpf-<br>4 dpf            | LC <sub>50</sub>                                                                                                    | —/13                                           | 实验平行在 4 个实验室<br>中进行<br>Experiments were<br>evaluated in 4 laboratories            |
| 2011                                                                 | 阿斯利康等<br>AstraZeneca et al. | 野生型<br>Wild type                  | 6 hpf-<br>5 dpf            | 形态学分级、LC <sub>25</sub> 、<br>LOAEL、NOAEL<br>Morphological scoring,<br>LC <sub>25</sub> , LOAEL,<br>NOAEL             | 60% ~ 70%/20                                   | 实验平行在 4 个实验室<br>中进行<br>Experiments were<br>evaluated in 4 laboratories            |
| 2012                                                                 | 佛兰德技术研究所<br>FITR            | 野生型<br>Wild type                  | 2 hpf-<br>6 dpf            | TI( =LC <sub>50</sub> //EC <sub>50</sub> )                                                                          | 50% ~ 60%/27                                   | 实验重复 3 次<br>Experiments were<br>conducted for 3 times                             |
| 2012                                                                 | 赛诺菲等<br>Phylonix et al.     | —                                 | 6 hpf-<br>5 dpf            | TI( =LC <sub>50</sub> //EC <sub>50</sub> )                                                                          | 92%/12                                         | —                                                                                 |
| 2014                                                                 | 阿斯利康等<br>AstraZeneca et al. | 野生型<br>Wild type                  | 6 hpf-<br>5 dpf            | 形态学分级、LOAEL、<br>TI( =LC <sub>25</sub> /NOAEL)<br>Morphological scoring,<br>LOAEL, TI<br>( =LC <sub>25</sub> /NOAEL) | 62% ~ 82%/38                                   | 实验平行在 2 个实验室<br>中进行<br>Experiments were<br>evaluated blinded in<br>2 laboratories |
| 2014                                                                 | FDA                         | hb9;GFP 转基因<br>hb9;GFP transgenic | 24 hpf-<br>52 hpf          | 体长和体周长<br>Body length,<br>fiber length                                                                              | —/5                                            | —                                                                                 |

### 3 斑马鱼发育毒性与致畸性评价实验室间比对

国外学者利用斑马鱼进行化合物发育毒性与致畸性评价,其化合物一般可归为五类:A 妊娠初 3 个月用药,经临床对照未发现对胎儿有损害;B 动物实验未显示对胎仔有危害,但缺乏临床观察资料;C 动物实验显示对胎仔有危害,但未在妊娠早期临床试验中证实;D 对人类胎儿有危害,但利大于弊;X 妊娠妇女禁用药。实验一般规范选用受精后 6 h (hours post fertilization, 6 hpf) 野生型 AB 系斑马鱼于 24 孔板中,每孔处理 1 个胚胎,每孔药液体积为 1 mL,12 个 1 组,每个化合物均统一给予五个浓度

(0.1、1、10、100 和 1000 μmol/L 浓度,调节 pH 使控制在 6.4 ~ 8.4),在受精后第 5 天 (day post fertilization, 5 dpf) 观察斑马鱼的形态学结构/器官并进行评价。最终实验结果将与哺乳动物数据进行比较,计算斑马鱼与哺乳动物的一致性,由表 2 可知,实验结果的预测性最低为 50%,最高可达 92%。

许冰洁<sup>[22]</sup>等利用斑马鱼胚胎评价了环磷酰胺、乙酸地塞米松、乙酰水杨酸、盐酸四环素和阿扎胞苷 5 种已知对人类胚胎致畸药物的毒性和安全性。实验选用已知的胚胎致畸性阳性药沙利度胺和阴性药维生素 C 建立斑马鱼胚胎发育毒性模型,并设立格列本脲、头孢噻肟钠两种阴性药对实验方法进行验证。挑选 4 hpf AB 系斑马鱼于 6 孔板中,每孔

处理 30 个胚胎,每孔药液体积为 3 mL,每个化合物均统一给予 4 个浓度:1/10 MNLC、1/3 MNLC、MNLC(maximum non-lethal concentration,最大非致死浓度)和  $LC_{10}$ (10%死亡浓度),并分别以 0.5%二甲亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO)和人工海水为溶剂对照组和空白对照组,在 28.5℃ 条件下发育至 5 dpf,观察斑马鱼的形态学结构/器官和死亡数量并进行评价。结果表明,5 种药物 50% 死亡浓度(median lethal concentration,  $LC_{50}$ )由大到小为环磷酰胺 > 阿扎胞苷 > 盐酸四环素 > 乙酰水杨酸 > 乙酸地塞米松,半最大效应浓度(concentration for 50% of maximal effect,  $EC_{50}$ )由大到小为环磷酰胺 > 盐酸四环素 > 阿扎胞苷 > 乙酰水杨酸 > 乙酸地塞米松。乙酸地塞米松毒性最强,乙酰水杨酸次之,其次盐酸四环素、阿扎胞苷,环磷酰胺毒性较弱。格列本脲和头孢噻肟钠则均未出现明显的致畸作用。

此外,斑马鱼胚胎还被广泛运用于  $Cd^{2+}$ 、 $Cu^{2+}$ 、 $Hg^{2+}$  等重金属离子<sup>[23-24]</sup> 的发育毒性效应研究;农乳 602(苯乙基酚聚氧乙烯醚)、宁乳 33#(苯乙烯基苯酚甲醛树脂聚氧乙烯聚氧丙烯嵌段聚醚)、农乳 700 号(烷基酚聚氧乙烯醚甲醛缩合物)、OP-10(辛基酚聚氧乙烯醚)、NP-10(壬基酚聚氧乙烯醚),农乳 1602(三苯乙基酚聚氧乙烯聚氧丙烯醚)等多种市售表面活性剂<sup>[25]</sup> 的发育毒性效应研究;甲草胺、乙草胺、丙草胺、丁草胺、异丙甲草胺等多种酰胺类除草剂<sup>[26]</sup> 以及其他农药的毒理研究等。

## 4 斑马鱼发育毒性与致畸性量化评价指标

2012 年,约翰威立国际出版公司(John Wiley & Sons)联合赛诺菲-安万特(Sanofi-Aventis)出版了书籍《斑马鱼:评估药物安全性和毒性的方法》(《Zebrafish: Methods for Assessing Drug Safety and Toxicity》),书中指出,与其他动物模型相比,斑马鱼胚胎的快速发育和透明性是其作为新型模式生物的重要优势,斑马鱼发育毒性试验是为了绘制毒-效效应曲线,并评估药物的致死性。得出  $LC_{50}$ 、 $EC_{50}$ 、TI(Teratogenic Index, =  $LC_{50}/EC_{50}$ ,致畸指数)和畸胎指数<sup>[27]</sup>。因此,书中详细描述了 5 dpf 时期斑马鱼发育毒性与致畸性形态学评价指标(表 3),并基于 TI 的截断值“1”来判定药物的发育毒性和致畸性:TI > 1,表明这种化合物是具有致畸性的,提示 50% 斑马鱼出现发育异常的浓度低于 50% 致死浓度;TI < 1,表明非致畸性的;TI = 1,提示发育毒

性与致畸性评估必须在精确的  $LC_{50}$  浓度下进行,以确定斑马鱼是否在这个浓度下表现出畸形。

近年来,有学者<sup>[18]</sup> 应用软件拟合出的  $EC_{50}$  值再回到实验中去进行验证,发现拟合  $EC_{50}$  值多低于实际半最大效应浓度,此外,仅用 TI 评价药物的致畸性不够全面。因此,可以见到有些学者会通过统计死亡率,得到无明显损害作用的最大染毒浓度(No Observed Adverse Effect Level, NOAEL)和产生畸形的最低浓度(Lowest Observed Adverse Effect Level, LOAEL),再通过软件拟合得到  $LC_{25}$ (25% 死亡浓度),最终计算 TI( $LC_{25}/NOAEL$ ) 值。

另外,在前期多以描述的方式进行形态学评估的基础上,有学者们对其进行改进,将形态学进行 0.5 ~ 5 评分进而对毒性/畸形进行分级<sup>[28]</sup>。一般观察指标为躯干、脊索、尾部、鳍、心脏、面部结构(眼睛、耳石、嗅觉区域)、神经管和下颌(以上指标均进行毒性/畸形分级以及评分),肝脏、卵黄囊、鳃和色素沉着(仅描述)。评分对于的毒性/畸形分级为:“5”正常形态学,“4(=NOAEL)”微变等效,“3(=LOAEL)”轻度异常,“2”中度畸形,“1”重度畸形,“0.5”结构缺失。

2014 年, FDA 发表一篇文章,其中仅仅以斑马鱼胚胎体长(Fiber length)和体周长(Body length)作为毒性的统计量化终点<sup>[29]</sup>。

## 5 展望

发育毒理学是指研究出生前暴露于环境有害因子导致的异常发育结局及有关的发病机制、发病原理、影响因素和有毒物质动力学等。人类成功妊娠结局的比率低,且有复发性倾向,发病原因复杂<sup>[30]</sup>。我国药物毒理学研究起步较晚,化药和中药毒理基础数据较少,如仅 2015 版《中国药典》指出的 83 种有毒中药中,至少 15 种完全不能检索到任何一项基础毒性数据信息,过半主要毒性成分和毒性靶器官不明确<sup>[31]</sup>。常规发育毒性实验常采用啮齿类动物(鼠、兔等)进行,先将成年的正处于发情期的雌雄鼠合笼,判断雌鼠妊娠,至妊娠中后期,方才收集样本进行检测<sup>[32-33]</sup>。如此实验操作复杂,过程不可控,药物用量大,费用高,无法批量或规模性缓解目前中药/化合物(发育)毒理学评价存在的问题,且哺乳动物试验无法对胚胎及其发育体系进行时-实监测。用胚胎发育透明的斑马鱼模式生物进行药物发育毒性与致畸性的高通量筛选和机制研

究,其快速-高效-经济体系克服了传统哺乳动物实验的劣势,筛选结果预测性好、可比度高,应用前景广泛。

表 3 发育毒性与致畸性评价指标

| Table 3 Evaluation indicators of developmental toxicity and teratogenicity |                                                                                              |  |
|----------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------|--|
| 指标<br>Indicator                                                            | 参数<br>Parameter                                                                              |  |
| 心脏<br>Heart                                                                | 房/室缺失,血流异常,心律不齐<br>Atria or ventricles loss, abnormal blood flow, arrhythmia                 |  |
| 体循环<br>Circulation                                                         | 缺失,减慢,瘀血<br>Lack of systemic circulation, slowing down, thrombus                             |  |
| 水肿<br>Edema                                                                | 心包积液水肿,身体积液水肿,脑积液水肿<br>Pericardial hydrops, body hydrops, cerebral hydrops                   |  |
| 出血<br>Hemorrhage                                                           | 脑部、肝脏、肠道出血<br>Brain, liver or bowel bleeding                                                 |  |
| 脑<br>Head                                                                  | 畸形或变性<br>Malformation, degeneration                                                          |  |
| 眼<br>Eye                                                                   | 变小或畸形,色素沉着异常<br>Abnormal size, malformation, hyperpigmentation                               |  |
| 下颌<br>Mandible                                                             | 变短或畸形<br>Shorter or malformation                                                             |  |
| 胸鳍<br>Pectoral fins                                                        | 变小或缺失<br>Smaller or absent                                                                   |  |
| 肝<br>Liver                                                                 | 缺失,变小,变大,变性(黑褐色不透明组织)<br>Absent or abnormal size, degeneration (dark brown, opaque tissue)   |  |
| 肠道<br>Intestinal tract                                                     | 缺失,无肠腔褶皱,无延伸,变性<br>Absent, no or oversized lumen, does not extend to anal pore, degeneration |  |
| 肌肉<br>Trunk muscle                                                         | 肌肉纹理紊乱<br>Muscle texture disordered or irregular                                             |  |
| 尾<br>Tail                                                                  | 变短,弯曲,尾鳍皱缩<br>Shorter, curved, fins shrivel                                                  |  |
| 体色素积淀<br>Body pigmentation                                                 | 黑色素或黄色素异常<br>Significantly higher or lower amount of melanin or yellow pigment               |  |
| 运动能力<br>Swimming performance                                               | 无针触反应<br>No needle contact reaction                                                          |  |

参 考 文 献 (References)

[ 1 ] Marathe MR, Thomas GP. Current status of animal testing in reproductive toxicology [J]. Indian J Pharmacol, 1990, 22(4): 192-201.

[ 2 ] OECD. OECD guidelines for the testing of chemicals. No. 414: prenatal developmental toxicity study. Paris, France: Organisation for Economic Co-operation and Development [ EB/OL ]. 2018. <https://www.oecd-ilibrary.org/docserver/9789264070820-en.pdf?expires=1578213159&id=id&accname=guest&checksum=0C53D3BC424E2DBE5661DBCD1C3DAA86>

[ 3 ] OECD. OECD guidelines for the testing of chemicals. No. 416:

two-generation reproduction toxicity study. Paris, France: Organisation for Economic Co-operation and Development [ EB/OL ]. 2018. <https://www.oecd-ilibrary.org/docserver/9789264304741-33-en.pdf?expires=1578213285&id=id&accname=guest&checksum=31DDE7CA84D19D82576363D72A3D7F83>

[ 4 ] OECD. OECD guidelines for the testing of chemicals. No. 421: reproduction /developmental toxicity screening test. Paris, France: Organisation for Economic Co-operation and Development [ EB/OL ]. 2016. <https://www.oecd-ilibrary.org/docserver/9789264264380-en.pdf?expires=1578213512&id=id&accname=guest&checksum=72CAF1E2A3ABA2A32763C5D45907EA35>

[ 5 ] OECD. OECD guidelines for the testing of chemicals. No. 422: combined repeated dose toxicity study with the reproduction/developmental toxicity screening test. Paris, France: Organisation for Economic Co-operation and Development [ EB/OL ]. 2016. <https://www.oecd-ilibrary.org/docserver/9789264264403-en.pdf?expires=1578214039&id=id&accname=guest&checksum=B306DAF15756C5A391ADA39910751B0E>

[ 6 ] ICH. International Conference on Harmonisation S5(R3) (step 2): Detection of toxicity to reproduction for human pharmaceuticals [ EB/OL ]. 2017. <https://www.ich.org/news/ich-s5r3-revised-guideline-reaches-step-2b-ich-process>.

[ 7 ] OECD. OECD guidelines for the zebrafish embryo toxicity test. No. 171: series on testing and assessment. Paris, France: Organisation for Economic Co-operation and Development [ EB/OL ]. 2012. <https://www.oecd-ilibrary.org/docserver/9789264221437-en.pdf?expires=1578213809&id=id&accname=guest&checksum=599AD2A6C6C66B9E7AA5A071324FA40E>

[ 8 ] 韩利文, 袁延强, 何秋霞, 等. 斑马鱼模型在中药活性筛选中的适用性研究 [J]. 中草药, 2011, 42(10): 2037-2041. Han LW, Yuan YQ, He QX, et al. Adaptability of zebrafish model in activity screening of Chinese materia medica [J]. Chin Tradit Herbal Drugs, 2011, 42(10): 2037-2041.

[ 9 ] 陈磊, 刘怡, 梁生旺. 模式生物斑马鱼在中药研究中的应用 [J]. 药学学报, 2012, 7(4): 434-439. Chen L, Liu Y, Liang SW. Application of zebrafish model organism in the research of Chinese materia medica [J]. Acta Pharm Sin, 2012, 7(4): 434-439.

[ 10 ] Singh V, Yeoh BS, Chassaing B, et al. Dysregulated microbial fermentation of soluble fiber induces cholestatic liver cancer [J]. Cell, 2018, 175(3): 679-694.

[ 11 ] Rovida C, Hartung T. Re-evaluation of animal numbers and costs for in vivo tests to accomplish reach legislation requirements for chemicals-a report by the transatlantic think tank for toxicology t<sup>4</sup> [J]. Altex, 2009, 26(3): 187-208.

[ 12 ] Selderslaghs IWT, Blust R, Witters HE. Feasibility study of the zebrafish assay as an alternative method to screen for developmental toxicity and embryotoxicity using a training set of 27 compounds [J]. Reprod Toxicol, 2012, 33(2): 142-154.

[ 13 ] Fleischer M. Testing costs and testing capacity according to the

- REACH requirements-results of a survey of independent and corporate GLP laboratories in the EU and Switzerland [J]. J Bus Chem, 2007, 4(3): 96-114.
- [14] Howe K, Clark MD, Torroja CF, et al. The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome [J]. Nature, 2013, 496(7446): 498-503.
- [15] Kettleborough RN, Busch-Nentwich EM, Harvey SA, et al. A systematic genome-wide analysis of zebrafish protein-coding gene function [J]. Nature, 2013, 496(7446): 494-497.
- [16] 黄春念, 张晶晶. 模式动物斑马鱼在中枢神经系统疾病研究中的应用[J]. 中国实验动物学报, 2018, 26(3): 392-397.
- Huang CN, Zhang JJ. Research progress on the application of zebrafish in central nervous system diseases [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2018, 26(3): 392-397.
- [17] Brannen KC, Panzicakelly JM, Danberry TL, et al. Development of a zebrafish embryo teratogenicity assay and quantitative prediction model[J]. Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol, 2010, 89(1): 66-77.
- [18] Gustafson AL, Stedman DB, Ball J, et al. Inter-laboratory assessment of a harmonized zebrafish developmental toxicology assay-progress report on phase I [J]. Reprod Toxicol, 2012, 33(2): 155-164.
- [19] Ball JS, Stedman DB, Hillegass JM, et al. Fishing for teratogens: a consortium effort for a harmonized zebrafish developmental toxicology assay [J]. Toxicol Sci, 2014, 139(1): 210-219.
- [20] 鲁疆, 王占洋, 袁玉琴, 等. 氯化镉对斑马鱼胚胎的发育毒性[J]. 生态毒理学报, 2013, 3(8): 381-388.
- Lu J, Wang ZY, Yuan YQ, et al. Developmental toxicity of cadmium chloride to zebrafish embryo [J]. Asia Ecotoxi, 2013, 3(8): 381-388.
- [21] 夏继刚, 牛翠娟, 孙麓垠. PFOS 对斑马鱼胚胎及仔鱼的生态毒理效应[J]. 生态学报, 2013, 33(23): 7408-7416.
- Xia JG, Niu CJ, Sun LY. Ecotoxicological effects of exposure to PFOS on embryo and larva of zebrafish *Danio rerio* [J]. Acta Ecologica Sin, 2013, 33(23): 7408-7416.
- [22] 许冰洁, 张立将, 李春启, 等. 斑马鱼胚胎评价 5 种药物的发育毒性与模型验证[J]. 中国药理学通报, 2016, 32(1): 74-79.
- Xu BJ, Zhang LJ, Li CQ, et al. Model validation and evaluation of developmental toxicity of five drugs using zebrafish embryos [J]. Chin Pharmacol Bull, 2016, 32(1): 74-79.
- [23] 陈玉翠, 陈锦云. 重金属  $\text{Cu}^{2+}$ 、 $\text{Cd}^{2+}$ 、 $\text{Hg}^{2+}$  对斑马鱼胚胎发育的毒性效应[J]. 南方水产科学, 2016, 12(3): 35-42.
- Chen YC, Chen JY. Toxic effect of heavy metal ions of  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$  and  $\text{Hg}^{2+}$  on embryo development of zebrafish (*Danio rerio*) [J]. South Chin Fish Sci, 2016, 12(3): 35-42.
- [24] 梁秋燕, 谢勇平, 方展强.  $\text{Zn}^{2+}$  和  $\text{Cd}^{2+}$  对斑马鱼早期胚胎发育阶段的单一与联合毒性 [J]. 中国水产科学, 2012, 19(2): 283-293.
- Liang QY, Xie YP, Fang ZQ. Individual and joint toxicity of  $\text{Zn}^{2+}$  and  $\text{Cd}^{2+}$  during the early embryonic development of zebrafish (*Danio rerio*) [J]. J Fish Sci Chin, 2012, 19(2): 283-293.
- [25] 刘迎, 胡燕, 姜蕾, 等. 6 种表面活性剂对斑马鱼胚胎发育的毒性效应 [J]. 生态毒理学报, 2014, 9(6): 1091-1096.
- Liu Y, Hu Y, Jiang L, et al. The Toxicity effects of six pesticide surfactants on embryo development of zebrafish [J]. Asia J Ecotoxi, 2014, 9(6): 1091-1096.
- [26] 刘迎, 胡燕, 姜蕾, 等. 5 种酰胺类除草剂对斑马鱼胚胎发育的毒性效应 [J]. 农药, 2014, 53(11): 806-808.
- Liu Y, Hu Y, Jiang L, et al. The toxicity effects of five amide herbicides on embryo development of zebrafish [J]. Agrochem, 2014, 53(11): 806-808.
- [27] Haldi M, Harden M, D'Amico L, et al. Developmental toxicity assessment in zebrafish // Zebrafish: Methods for assessing drug safety and toxicity[M]. John Wiley & Sons, Inc.; 2012.
- [28] Panzica-Kelly JM, Zhang CX, Danberry TL, et al. Morphological score assignment guidelines for the dechorionated zebrafish teratogenicity assay [J]. Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol, 2010, 89(5): 382-395.
- [29] Lantz-McPeak S, Guo X, Cuevas E, et al. Developmental toxicity assay using high content screening of zebrafish embryos [J]. J Appl Toxicol, 2015, 35(3): 261-272.
- [30] Reis MF, Aniceto P, Aguiar P, et al. Quantification of urinary chorionic gonadotropin in spontaneous abortion of pre-clinically recognized pregnancy: Method development and analytical validation[J]. Int J Hyg Environ Health, 2007, 210(3-4): 419-427.
- [31] 夏青, 张晓昕, 徐柯心, 等. 《中华人民共和国药典》2015 版收录的有毒中药毒性研究概况 [J]. 环球中医药, 2017, 10(3): 377-384.
- Xia Q, Zhang XX, Xu KX, et al. Review on toxicity of toxic traditional Chinese medicine recorded in Chinese pharmacopoeia (2015 version) [J]. Global Tradit Chin Med, 2017, 10(3): 377-384.
- [32] 郜洁, 罗颂平. 寿胎丸不同提取部位对肾虚流产模型孕鼠补肾安胎的药效学筛选 [J]. 中药材, 2011, 34(8): 1251-1255.
- Gao J, Luo SP. Kidney-tonifying and abortion preventing effects of shou tai wan by different extraction methods on rats [J]. Chin Med Mater, 2011, 34(8): 1251-1255.
- [33] 欧莉, 韩猛, 张艺耀, 等. 茜草治疗功能性子宫出血的止血机制研究 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2015, 21(21): 152-155.
- Ou L, Han M, Zhang YY, et al. Study on hemostatic mechanism of rubiae radix et rhizoma in treating dysfunctional metrorrhagia [J]. Chin J Exp Tradit Med Form, 2015, 21(21): 152-155.