

纳米材料生殖发育毒性特点及体外替代模型的应用

赵曼曼, 侯田田, 耿兴超, 周晓冰* (中国食品药品检定研究院国家药物安全评价监测中心, 药物非临床安全评价研究北京市重点实验室, 北京100176)

摘要: 纳米材料是物质结构在三维空间中至少有一维处于纳米尺度的新型材料, 具有比表面效应、小尺寸效应、宏观量子隧道效应等独特的性质, 在生物医药领域应用广泛。随着纳米技术的飞速发展, 纳米材料的生殖发育毒性问题受到越来越多的关注。金属纳米材料可引起大鼠生殖器官结构改变、功能受损, 还可进入胎儿体内直接影响或通过干扰胎盘的生长发育间接影响胎儿发育。而纳米载体药物相比于普通药物, 生物分布特征的改变可能使其生殖器官及胚胎毒性减弱。随着动物福利3R原则的推行, 国内外已建立多种体外替代方法用于生殖发育毒性评价, 其中, 胚胎干细胞试验 (EST)、全胚胎培养技术 (WEC)、斑马鱼模型、线虫在纳米材料生殖发育毒性评估中有良好的适用性。

关键词: 纳米材料; 生殖发育毒性; 体外替代模型

中图分类号: R99 文献标识码: A 文章编号: 1002-7777(2020)10-1180-06

doi:10.16153/j.1002-7777.2020.10.009

The Characteristics of Reproductive and Developmental Toxicity of Nanomaterials and the Application of *In Vitro* Alternative Models

Zhao Manman, Hou Tiantian, Geng Xingchao, Zhou Xiaobing* (National Center for Safety Evaluation of Drugs, National Institutes for Food and Drug Control, Beijing 100176, China)

Abstract: Nanomaterials are new materials with at least one dimension of the material structure out of the three-dimensional space belonging to the nanoscale. They manifest unique properties such as surface effect, small size effect and macroscopic quantum tunneling effect, and they have been widely used in the biological fields. With the rapid development of nanotechnology, more and more attention has been paid to the reproductive and developmental toxicity of nanomaterials. Metal nanomaterials may cause structural changes and functional impairment of reproductive organs in rats, and they can also directly affect fetal development by entering the fetus or indirectly affecting placenta functions. The toxicity of reproductive organs or embryos of nanomedicines may reduce because of the altered biological distribution compared with ordinary medicines. A variety of alternative test systems for reproductive toxicity evaluation have been established with the implementation of the 3R principle of animal welfare, among which embryonic stem cell test (EST), whole embryo culture (WEC), zebrafish model and *Caenorhabditis elegans* showed good applicability in the evaluation of nanomaterials.

Keywords: nanomaterials; reproductive and developmental toxicity; *In Vitro* Alternative Models

基金项目: 国家“重大新药创制”科技重大专项 (编号 2018ZX09201017-001)

作者简介: 赵曼曼, 主管药师; 研究方向: 生殖毒性评价、药物生物转化研究; E-mail: zhaomanman@nifdc.org.cn

通信作者: 周晓冰, 研究员; 研究方向: 毒理学; E-mail: zhxb@nifdc.org.cn

纳米材料是指物质结构在三维空间中至少有一维处于纳米尺度(1~100 nm),或由纳米结构单元构成的材料,因其尺度上的特殊性,表现出比表面效应、小尺寸效应、宏观量子隧道效应等独特的性质。纳米材料作为一种新型材料,纳米氧化银、二氧化钛等金属纳米材料及纳米载体载物等在生物医药领域应用前景广阔。随着纳米材料广泛应用,人类暴露于纳米材料的途径多种多样,如接触、吸入、直接摄取等,对人类健康可能造成的影响不容忽视。纳米材料小粒径的特点使其通过血睾屏障、胎盘屏障等生物屏障的能力增加,可能对生殖器官或胚胎发育产生不利影响。在生殖发育毒性研究中,体外替代方法因可减少动物使用、更符合动物福利原则逐渐被监管部门推荐和研究机构采用,本文还讨论了体外替代方法在纳米材料生殖毒性评价中的适用性。

1 纳米材料在生物医药领域的应用

新型纳米材料的出现为疾病预防、诊断和治疗提供了新途径。基于石墨烯等纳米颗粒制备的微型智能化检测器械可能解决可穿戴医疗保健设备灵敏度不足等问题。相比于传统疾病诊断手段,借助纳米载体的高效率和高容量,可降低疾病诊断的时间和成本,如基于超顺磁性的金属纳米颗粒,只需3 h即可从患者血样中检测出90%的致命病原体,实现念珠菌感染等感染性疾病的快速诊断,大大降低感染性疾病检测的费用和时间。此外,生物纳米传感器技术用于过敏原的检测,检测速度快且患者依从性好^[1]。在肿瘤光动力治疗领域,新型纳米材料以优良的光学、催化活性及活性氧(ROS)产生能力等备受青睐^[2]。

将传统的小分子药物纳米化形成纳米药物制剂是现代药物研发的新方向。基于纳米载体如脂质体、PEG胶束、DNA自组装纳米颗粒等进行药物递送,可改进药物的制剂特性、改变药物的体内药动学行为、提高药物治疗指数等,提高药物的成药性^[3]。紫杉醇脂质体(力扑素)是国内首个批准上市的紫杉醇脂质体剂型,脂质体载体替代了传统的聚氧乙烯蓖麻油及无水乙醇混合溶媒,临床研究表明,紫杉醇脂质体对乳腺癌、卵巢癌、胃癌等疗效较好,由于制剂改变,过敏反应及剂量限制性相关的不良反应发生率较传统紫杉醇制剂降低,从而提高了肿瘤患者的耐受性^[4-7]。

2 纳米材料生殖发育毒性及机制

纳米材料因其粒径的特殊性,其体内吸收、分布、代谢、排泄过程不同于普通粒径材料,透过血睾、血胎等生物屏障的潜在特性使得其生殖发育毒性研究尤为重要。

2.1 对生殖器官的毒性

刘波等在纳米二氧化钛对雌性小鼠的生殖毒性研究中发现,连续28天灌胃染毒可引起小鼠动情周期紊乱及卵巢组织的氧化损伤^[8],纳米二氧化钛染毒后引起的血液生化参数改变、性激素失衡和细胞因子表达改变可能与雌性小鼠繁殖力降低有关^[9]。小鼠染毒纳米二氧化硅后可见类似的雌性生殖器官毒性。王文祥等应用纳米二氧化硅染毒雌性小鼠,可见卵巢重量和脏器系数下降、阴道口开放时间推迟、卵巢黄体构成比下降、闭锁卵泡构成比升高等雌性生殖器官毒性,进一步研究发现染毒小鼠卵巢组织中丙二醛(MDA)含量增加、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)活力、超氧化物歧化酶(SOD)活性下降,提示卵巢发育障碍可能与氧化损伤有关^[10]。碳纳米管作为一种新形的结晶碳,在工业及医药领域应用前景广阔。水溶性的多壁碳纳米管小鼠灌胃,透射电子显微镜和HE染色卵巢组织发现,碳纳米管可进入小鼠卵巢中,且随着暴露浓度的增加,卵泡的形态结构无明显变化,但卵泡数量显著减少^[11]。

呼吸道是环境中纳米材料的重要接触途径之一,研究表明,经鼻粘膜或气管染毒金属纳米材料(如纳米硫化镉、纳米氧化镍、纳米银等),可引起大鼠睾丸病理改变、精子数量及精子活动度受损等,这可能与金属纳米材料穿透血睾屏障、引起生殖系统关键酶和性激素水平改变等因素有关^[12-13]。

将普通药物与纳米载体结合制备的纳米药物制剂通常可改变药物体内动力学行为,改善其吸收、代谢等特性,从而降低不良反应提高患者耐受性。在生殖毒性方面,虽有少量研究显示纳米药物制剂相比普通制剂对生殖器官的影响更小^[14],但此方面的研究数据相对较少,有待更深入的研究。

2.2 胚胎毒性

药物或毒物可能直接作用于胎儿导致胎儿生长发育异常或通过干扰胎盘的功能而间接影响胎儿发育。胎盘是母体与胎儿进行物质交换的生理基础,在调节胎儿营养的同时可阻挡病原体或有害物

质透过胎盘进入胎儿体内, 又称胎盘屏障。有研究显示, 纳米二氧化钛通过干扰胎盘血管形成及细胞增殖与凋亡过程影响胎盘的生长和发育^[15]。胎盘功能受损不仅可影响胎儿正常的营养供应, 还可因屏障作用减弱使胎儿暴露于外源物的风险增加。

Yamashita 等^[16]将纳米二氧化硅及纳米二氧化钛颗粒注射于妊娠16和17天的小鼠体内, 胎盘及胎儿的肝脏、脑内均发现纳米颗粒存在。与对照组相比, 纳米颗粒处理的小鼠子宫重量减轻、胎鼠重量减轻、胚胎吸收率增加。胎盘病理检测可见其母体侧结构改变, 同时, 血浆中与胎盘功能相关的可溶性血管内皮生长因子受体浓度显著降低, 提示胎盘功能异常。然而, 更大粒径的二氧化硅颗粒(300和1000 nm)不会引起这些不良作用。丁勇^[17]对ICR孕鼠滴鼻给予纳米氧化铝后, 仔鼠正常的体格发育受影响, 其学习记忆能力及对环境的适应能力下降, 且这种毒性作用随着纳米氧化铝粒径的减小而增大, 提示纳米颗粒可透过胎盘屏障及胎仔血脑屏障, 对胎仔造成神经毒性。进一步研究显示, 这种毒性作用可能与纳米氧化铝引起仔鼠脑组织氧化/抗氧化失衡以及脑胆碱能神经递质的改变有关。此外, 体外研究显示纳米粒子胚胎毒性与纳米颗粒的粒径、暴露时间及剂量相关^[18]。

对纳米递送系统而言, 纳米载体改变了药物的体内动力学行为, 可能降低特定的组织器官毒性。Scialli A.R.^[19-20]比较了紫杉醇(溶媒为蓖麻油)与紫杉醇脂质体对鸡胚的毒性, 1.5 μg /胚的紫杉醇可导致60%的胚胎产生畸形或死亡, 而20倍剂量的紫杉醇脂质体才可导致与紫杉醇相同的胚胎毒性。随后, 在大鼠静脉注射紫杉醇与紫杉醇脂质体胚胎发育毒性的研究中发现, 脂质体包被可降低紫杉醇对母鼠及胎仔的毒性。有研究表明, 紫杉醇脂质体通过改变紫杉醇的生物分布特征使得正常组织暴露降低而毒性减弱, 但胚胎毒性相关机制报道较少^[21]。

3 替代模型在纳米材料生殖发育毒性评价中的应用

传统的生殖毒性评价方法为三段式生殖毒性试验, 试验过程较繁琐且须使用大量实验动物。随着动物福利3R原则的推行及生殖毒理学、胚胎学等学科的飞速发展, 已建立多种生殖发育毒性评价的体外替代方法, 体外替代方法相比动物试

验具有操作简便、试验周期短、经济且可排除母体干扰等优点, 广泛应用于胚胎毒性筛选及致畸机制研究。截至目前, 已通过欧洲替代方法验证中心(European Centre for the Validation of Alternative Method, ECVAM)验证完成的胚胎毒性评价方法有胚胎干细胞试验(Embryonic Stem Cell Test, EST)、微团检测法(Micromass, MM)及全胚胎培养技术(Whole Embryo Culture, WEC), 三种方法均具有良好的预测能力和重现性。

3.1 胚胎干细胞试验(EST)

胚胎干细胞是从着床前的囊胚内细胞团中分离得到原始生殖细胞, 其具有可增殖性、全能性及可操作性, 通过检测受试物对胚胎干细胞分化过程的影响评估其发育毒性。由于心肌细胞灵敏度高且心肌细胞作用与窦房结、心室心房的完整功能相似, 可反映整个组织的发育特点, 故一般选择心肌细胞作为分化发育后的衡量指标。EST的评价指标主要包括干细胞分化成搏动心肌细胞的半数分化抑制率、干细胞的半数生长抑制率及NIH-3T3成纤维细胞半数生长抑制率^[22]。近年来, 为克服传统EST技术局限性, 通过特定基因标记、联合组学技术改进形态学终点评估、应用人胚胎干细胞等对EST进行优化, 提高预测准确性^[23-25]。胚胎干细胞作为一种细胞系, 试验体系简单, 可进行纳米材料胚胎毒性相关机制研究。在胚胎干细胞基础上, 经体外培养形成胚状体类似物, 可用于分析不同粒径纳米材料在胚状体的富集和分布规律, 有助于阐明纳米颗粒的尺寸效应对胚胎干细胞分化、发育的影响^[26]。

3.2 微团培养试验(MM)

微团培养试验是介于单细胞培养和器官培养之间的体外试验系统, 试验操作简单、周期短、准确性高、费用低, 试验中最常用的是大鼠发育肢芽或中脑, 通过检测受试物对肢芽或中脑微团分化过程的影响, 评估其致畸作用。目前常用的MM实验方法主要有4种: (1)直接加入法, 即直接将受试物加入细胞培养液中考察受试物本身对细胞增殖分化影响; (2)代谢活化法, 将受试物与肝微粒体或S9等代谢活化系统同时加入细胞培养液中, 考察受试物经代谢活化后对细胞增殖分化影响; (3)染毒血清法, 将动物染毒后的血清加入细胞培养液中, 考察血清中受试物和/或代谢产物对细胞增殖分化影响; (4)孕鼠染毒法, 取染毒后胚胎肢芽

进行培养,评估受试物经动物体内代谢转化后对胚芽发育的潜在影响^[27]。微团培养试验仅能综合评价对器官的毒性效应,不适合具有特定毒性靶器官的药物或材料毒性筛选,在纳米材料胚胎毒性研究中应用较少。

3.3 全胚胎培养技术(WEC)

体外全胚胎培养是将动物完整胚胎移植到体外进行培养的技术,可以在较短时间内(48 h内)评估胚胎整体发育过程^[28-29]。用于全胚胎培养的胚胎来源广泛,如鱼类、鸟类、哺乳类等均可用于试验,其中比较常用的为哺乳动物大鼠、小鼠和兔全胚胎培养。体外培养结束后,通过已建立的评分系统(Brown-Fabro啮齿类评分系统及Carney兔胚胎评分系统)对胚胎发育阶段进行评分,检测蛋白质水解、细胞死亡标志物如caspase3、DNA等,评估受试物对胚胎发育的综合影响。随着成像技术的发展,CT及核磁成像技术被用于WEC中胚胎的形态计量及发育特异标识。此外,代谢活化系统的加入在一定程度上弥补了母体影响的缺失,增强了体内外预测的相关性^[30]。该模型是一个完整的生物体系统,类似于体内胚胎发育过程,可以对暴露更好地产生反应,且能与体内动物实验数据关联,在生长发育基础研究、环境污染物及重金属胚胎毒性评价、药物的安全性评价中均有重要应用价值。

小鼠/大鼠体内研究表明纳米氧化物如纳米二氧化钛、纳米二氧化硅和纳米氧化锌等可致活胎率降低、胎仔发育不良、子代器官毒性等胚胎毒性^[31-32],应用体外全胚胎培养法评估上述纳米材料对小鼠胚胎生长发育的影响发现,三种材料对ICR小鼠体外培养胚胎均有明显毒性,特点为胚胎生长发育及组织器官形态分化异常、存在明显的剂量-效应关系和时间-效应关系、对组织器官的影响广泛而未见明显特异的靶器官、对卵黄囊发育也有一定毒性作用^[18]。提示体外全胚胎培养方法适用于纳米材料胚胎发育毒性筛选及评估。

3.4 斑马鱼模型

斑马鱼是一种产于印度、孟加拉和其他水域的鲤科小型热带鱼,具有价格低、繁殖力强、体积小、与人基因组相似度高等优点,是理想的模式生物,在评估药物的发育毒性与致畸性、心血管毒性、肝毒性、肾毒性和行为毒性等多个领域都有着广泛的应用^[33-34]。斑马鱼可成功用于纳米材料神经

发育毒性、心脏毒性、生殖器官毒性评估。同时,作为一种水生生物,斑马鱼毒性评估还可提示纳米材料对生态环境的潜在风险^[35-38]。和哺乳动物胚胎研究相比,斑马鱼发育与致畸研究可以提供更高的通量,减少人力及资源的浪费。Saji George等^[39]建立了基于高通量筛选与斑马鱼胚胎毒性试验相结合金属氧化物纳米颗粒风险评估方法。应用自动荧光显微镜跟踪活性氧产生、细胞内钙通量、线粒体去极化和膜通透性等细胞损伤反应,通过多参数、自动化筛选结合亚致死和致死性细胞损伤反应对纳米颗粒进行高通量分析,结果显示,量子点、纳米氧化锌细胞致死效应显著,纳米二氧化硅、纳米银、纳米铂及三氧化二铝引起亚致死性细胞损伤反应,量子点、纳米氧化锌可诱导斑马鱼胚胎形态异常或干扰胚胎孵化,后者还可抑制胚胎心率。这提示高通量分析与斑马鱼胚胎毒性检测相结合为纳米材料毒性评价提供了一种快速、完整的筛选方法。

3.5 线虫

秀丽线虫生长发育特点清楚且对环境毒物暴露高度敏感,作为一种模式生物逐渐被应用于纳米材料暴露毒性评价及毒理学研究^[40]。孔璐^[41]比较了纳米与微米尺度二氧化硅对秀丽线虫生殖及发育的影响,发现纳米二氧化硅可导致线虫产卵数目减少、世代时间延长的生殖毒性及线虫体长降低的发育毒性,且毒性作用与纳米尺寸及暴露剂量相关。纳米氧化铝、纳米氧化钛暴露后亦可致线虫后代数目以及卵巢中卵数目减少。纳米材料暴露诱发的线虫生殖缺陷可能与生殖相关信号通路基因表达抑制、氧化应激等有关^[42]。

3.6 其他替代方法

除上述模型外,生殖毒性体外研究方法不断建立,如大鼠卵巢颗粒细胞模型、大鼠腔前卵泡三维培养模型、大鼠睾丸支持细胞模型、大鼠睾丸三维共培养模型^[43-44]等,新模型的建立不仅可用于评估化合物对生殖细胞功能影响,还可提供更多毒性作用机制信息。截至目前,其在纳米材料毒性评估中应用较少。

4 小结

新型纳米材料在疾病预防、诊断和治疗领域应用前景广阔。相比于普通粒径材料,纳米级粒径材料可能更易透过血睾、血胎等生理屏障而对生殖器官及胎儿造成不良影响,而对纳米药物制剂而

言, 纳米递送系统的应用改变了其体内生物分布可能使得特定组织器官毒性降低。EST、WEC、斑马鱼模型及线虫等为纳米材料生殖及发育毒性筛选和评价提供了快速、准确、适宜的体外替代研究手段。

参考文献:

- [1] 毛宗万. 纳米技术在生物医药中的应用及展望[J]. 药学进展, 2019, 43(5): 321-323.
- [2] 张继双, 周林. 纳米材料在光动力疗法肿瘤治疗中的应用进展[J]. 药学进展, 2019, 43(5): 349-354.
- [3] 金丽霞. 纳米药物载体的研究及临床应用[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2010, 14(8): 1429-1432.
- [4] 耿丽, 陈小兵. 紫杉醇脂质体与紫杉醇新辅助化疗对乳腺癌的影响及机制[J]. 山东医药, 2011, 51(33): 37-38.
- [5] 叶泳珊, 陈济煜, 林燕玲, 等. 紫杉醇脂质体、紫杉醇分别联合卡铂在卵巢癌中的疗效与安全性的初步评估[J]. 中国医学创新, 2020, 17(6): 129-133.
- [6] Zhang JA, Anyarambhatla G, Ma L, et al. Development and Characterization of a Novel Cremophor[®] EL Free Liposome-based Paclitaxel (LEP-ETU) Formulation[J]. Eur J Pharm Biopharm, 2005, 59(1): 177-187.
- [7] 许晓东, 徐志英, 谢君, 等. 紫杉醇脂质体治疗进展期胃癌的疗效及安全性研究[J]. 中国现代医学杂志, 2020, 30(5): 107-110.
- [8] 刘波, 王海霞, 宋关玲, 等. 纳米TiO₂对雌性小鼠的生殖毒性[J]. 现代预防医学, 2019, 46(17): 3182-3187.
- [9] 邵政, 杨林, 黄楚楚, 等. 纳米二氧化钛对小鼠生殖毒性的研究进展[J]. 中国药理学与毒理学杂志, 2015, 29(3): 503-506.
- [10] 王文祥, 官艳红, 张健平, 等. 断乳至性成熟期暴露纳米二氧化硅对小鼠卵巢发育的影响[J]. 环境与健康杂志, 2015, 32(1): 22-25.
- [11] 郟明丽, 李志慧, 张伟伟, 等. 羧基化多壁碳纳米管对雌性小鼠卵泡发育的影响[J]. 生态毒理学报, 2018, 13(6): 369-374.
- [12] 中国化学会环境化学专业委员会. 全国环境纳米技术及生物效应学研讨会: 经滴鼻给药纳米银穿透大鼠血脑屏障[EB/OL]. (2016-04-08) [2020-3-28]. <http://cpfd.cnki.com.cn/Article/CPFDTOTAL-XMDZ201604001159.htm>.
- [13] 席海灵, 高艳荣, 王素华, 等. 三种典型纳米颗粒物对雄性大鼠的生殖毒性[J]. 环境与健康杂志, 2018, 35(1): 39-43.
- [14] 中国毒理学会. 首届中国药物毒物学年会(2011年)暨国际药物非临床安全性评价研究论坛: 纳米多西紫杉醇对小鼠DNA损伤、遗传和生殖毒性研究[EB/OL]. (2011-08-23) [2020-3-28]. <http://epfd.cnki.com.cn/Article/CPFDTOTAL-ZGDV201108001149.htm>.
- [15] 张璐. 妊娠期纳米二氧化钛暴露对小鼠胎盘生长与发育的影响[D]. 南昌: 南昌大学, 2017.
- [16] Yamashita K, Yoshioka Y, Higashisaka Y, et al. Silica and Titanium Dioxide Nanoparticles Cause Pregnancy Complications in Mice[J]. Nat Nanotechnol, 2011, 6(5): 321-328.
- [17] 丁勇. 纳米氧化铝致小鼠神经发育毒性及其机制初探[D]. 太原: 山西医科大学, 2015.
- [18] 丁树娟. 三种纳米与常规尺度材料对体外小鼠胚胎生长发育影响的比较研究[D]. 上海: 第二军医大学, 2011.
- [19] Scialli A R, DeSesso J M, Rahman A, et al. Embryotoxicity of Free and Liposome-Encapsulated Taxol in the Chick[J]. Pharmacology, 1995, 51(3): 145-151.
- [20] Scialli AR, Waterhouse TB, Desesso JM, et al. Protective Effect of Liposome Encapsulation on Paclitaxel Developmental Toxicity in the Rat[J]. Teratology, 1997, 56(5): 305-310.
- [21] Fetterly GJ, Straubinger RM. Pharmacokinetics of Paclitaxel-containing Liposomes in Rats[J]. AAPS PharmSci, 2003, 5(4): E32.
- [22] Faqi AS. Comprehensive Guide to Toxicology in Preclinical Drug Development[M]. USA: Academic Press Inc, 2013.
- [23] West PR, Weir AM, Smith AM, et al. Predicting Human Developmental Toxicity of Pharmaceuticals Using Human Embryonic Stem Cells and Metabolomics[J]. Toxicol Appl Pharmacol, 2010, 247(1): 18-27.
- [24] Kobayashi K, Suzuki N, Higashi K, et al. Editor's Highlight: Development of Novel Neural Embryonic Stem Cell Tests for High-Throughput Screening of Embryotoxic Chemicals[J]. Toxicol Sci, 2017, 159(1): 238-250.
- [25] Romero AC, Del Rio E, Vilanova E, et al. RNA Transcripts for the Quantification of Differentiation Allow Marked Improvements in the Performance of Embryonic Stem Cell

- Test (EST)[J]. *Toxicol Lett*, 2015, 238 (3): 60-69.
- [26] 杨小龙, 郭宏博, 金叔宾, 等. 不同尺寸金纳米颗粒在小鼠胚胎干细胞胚状体中富集和分布的研究[J]. *电子显微学报*, 2015, 34 (3): 250-256.
- [27] 薛纯纯, 李晓锋, 王利波, 等. 补肾活血方含药血清对小鼠胚芽细胞增殖和分化的影响[J]. *上海中医药杂志*, 2018, 52 (5): 79-82.
- [28] 张丽, 张利军, 郭家彬, 等. ECVAM 验证的生殖发育毒性测试替代方法及其改进[J]. *毒理学杂志*, 2015, 29 (6): 458-461.
- [29] 韩佳寅, 梁爱华. 全胚胎培养技术及其应用研究进展[J]. *中国中药杂志*, 2010, 35 (5): 549-553.
- [30] Chapin R, Augustine-Rauch K, Beyer B, et al. State of the Art in Developmental Toxicity Screening Methods and Away Forward: A Meeting Report Addressing Embryonic Stem Cells, Whole Embryo Culture and Zebrafish[J]. *Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol*, 2008, 83 (4): 446-456.
- [31] 赵翠霞, 金一和, 张颖花, 等. 纳米级与微米级二氧化硅粉尘对小鼠胚胎毒性的比较研究[J]. *卫生研究*, 2007, 36 (4): 414-416.
- [32] 张华山, 杨丹凤, 杨辉, 等. 气管滴注纳米材料对妊娠大鼠胚胎毒性影响的初步研究[J]. *南开大学学报 (自然科学版)*, 2008, 41 (3): 10-13.
- [33] 刘艺, 王瑞昕, 游龙泰, 等. 芦荟大黄素诱导斑马鱼肝毒性及作用机制研究[J]. *环球中医药*, 2020, 13 (1): 18-22.
- [34] 陈汝家, 朱俊靖, 周盛梅, 等. 斑马鱼模型在药物毒性与安全性评价中的应用[J]. *毒理杂志*, 2012, 26 (3): 224-228.
- [35] 李旭玲. SiO₂纳米颗粒对斑马鱼行为及其卵巢毒性效应的研究[D]. 深圳: 深圳大学, 2016.
- [36] 刘发生, 韩建, 李莎, 等. 纳米TiO₂联合Cu²⁺对斑马鱼胚胎发育毒性的影响[J]. *山东大学学报 (医学版)*, 2018, 56 (7): 33-38.
- [37] 王雅. 纳米银暴露对发育早期斑马鱼的神经毒性效应研究[D]. 太原: 山西大学, 2019.
- [38] 马爽. 纳米二氧化硅对斑马鱼胚胎发育的影响研究[D]. 哈尔滨: 哈尔滨工业大学, 2015.
- [39] George S, Xia T, Rallo R, et al. Use of A High-throughput Screening Approach Coupled With in Vivo Zebrafish Embryo Screening to Develop Hazard Ranking for Engineered Nanomaterials[J]. *ACS Nano*, 2011, 5 (3): 1805-1817.
- [40] 胡莉娟, 沈沁浩, 陈章悦, 等. 磁性纳米颗粒对不同模式生物的毒性研究[J]. *生态毒理学报*, 2019, 14 (5): 97-107.
- [41] 孔璐, 张婷, 王大勇, 等. 纳米二氧化硅对秀丽线虫的毒性作用研究[J]. *生态毒理学报*, 2011, 6 (6): 655-660.
- [42] Roh J, Sim SJ, Yi J, et al. Ecotoxicity of Silver Nanoparticles on the Soil Nematode *Caenorhabditis Elegans* Using Functional Ecotoxicogenomics[J]. *Environ Sci Technol*, 2009, 43: 3933-3940.
- [43] 夏仪. 大鼠腔前卵泡体外三维培养系统的建立及其在雌性生殖毒性研究中的应用[D]. 上海: 第二军医大学, 2012.
- [44] 张晓芳. 基于大鼠睾丸细胞三维共培养模型的雄性生殖毒性测试系统建立[D]. 上海: 第二军医大学, 2017.

(收稿日期 2020年3月31日 编辑 邹宇玲)