

# 神经发育毒性动物实验替代方法研究进展

张楠楠<sup>1,2</sup>, 梁锦锋<sup>3</sup>, 宋淑亮<sup>2</sup>, 吉爱国<sup>1,2</sup>

(1. 山东大学药学院生化与生物技术药物研究所, 山东 济南 250012; 2. 山东大学威海国际生物技术研发中心, 山东 威海 264209; 3. 浙江省药品不良反应监测中心, 浙江 杭州 310012)

**摘要:** 胚胎早期暴露于某些工业化学物中,即使是很小剂量,也可导致胚胎脑损伤,引起神经发育性疾病和亚临床脑功能不良。虽然化学物基于动物毒性实验的安全性评价是较可靠的,但这种方法耗时长、成本高,而且不符合目前减少实验动物使用的趋势,因此神经发育毒性(DNT)实验的替代模型逐步引起重视。为建立和完善快速、经济又可高通量筛选受试物的替代方法,本文分别介绍了体外细胞模型和非哺乳动物模型的优势、现阶段应用以及所面临的挑战。这些替代法虽不能完全取代包括哺乳动物在内的体内实验,但它们在区分化合物和识别 DNT 机制方面将发挥巨大的作用。

**关键词:** 发育障碍; 动物替代实验; 模型, 神经学; 细胞, 非哺乳动物

**中图分类号:** R991 **文献标志码:** A **文章编号:** 1000-3002(2012)01-0116-04

**DOI:** 10.3867/j.issn.1000-3002.2012.01.024

发育中的神经系统对于很多工业化学物和污染物具有较强的易感性,由于血脑屏障尚未发育完全,某些毒剂在发育脑中的积累量会高于成人,而且发育过程中化学物暴露能引起持久的神经功能障碍<sup>[1]</sup>。而神经功能损伤会给家庭和社会带来沉重的负担,因此,对化学物的神经发育毒性(developmental neurotoxicity, DNT)的潜在危害进行评价尤为重要。现行 DNT 实验的标准是由美国环境保护署颁布的 OPPTS 870.6300 及世界经济合作与发展组织颁布的 TG426 草案,但是这些实验均采用整体哺乳动物进行研究,费用高、时间长且动物需求量大,很难利用其对 500 多万种化合物进行 DNT 检测<sup>[2]</sup>。另外,以替代、减少和优化为核心的动物实验替代方法已被越来越多的科学家所认同,因此,建立动物替代实验来快速和可靠地鉴定化合物的 DNT 已经迫在眉睫。本文对 DNT 实验替代方法的建立原则及其研究进展进行了综述。

## 1 神经发育毒性实验替代方法的建立原则

理想 DNT 实验替代模型最重要的特征就是模型的科学有效性,这就意味着它能预测人类处在发育阶段的神经系统的神经毒性反应<sup>[3]</sup>。在遗传毒理学中,模型的预测能力是由检测终点与已知毒理学生物机制之间的关联性所决定的,同样,理想的 DNT 实验替代模型就是以与 DNT 相关的保守生物机制为基础的。理想的 DNT 实验替代模型的另一个特征是灵敏、专一并且适合高通量筛选<sup>[4]</sup>。在这些特征的基础之上,结合替代、减少和优化原则以及神经发育生物学的现状,目前有两类模型系统作为 DNT 实验的替代模型:体外细胞模型和非哺乳动物模型。下面主要讨论这两类模型系统在 DNT 实验中的应用以及它们实现替代、减少和优化原则的潜能。

**基金项目:** 国家自然科学基金资助项目(30873198)

**作者简介:** 张楠楠(1986-),女,硕士研究生,主要从事神经药理毒理研究;吉爱国(1956-),男,教授,博士,主要从事生化与生物技术制药领域的研究。

**通讯作者:** 吉爱国, E-mail: jiaiguo@sdu.edu.cn, Tel: (0631) 5688526

## 2 神经发育毒性实验的替代方法

### 2.1 体外细胞模型

神经毒性效应可以在总体形态或基础行为不变的情况下产生,若要发现未受损大脑中细微的结构改变(如细胞数目或位置的变化以及突触连接的变化),不仅耗时长,有时还需要依靠专业的技能和昂贵的仪器设备。另外,由于人们尚不了解可能受到毒性物质影响的脑区以及在神经系统发育过程中会出现毒性反应的具体阶段<sup>[5]</sup>,因此,利用上述技术进行大量化学物筛选不仅花费惊人,而且并不能保证可以检测到突触连接、神经递质功能或细胞信号转导的改变。

体外细胞模型能够成为 DNT 实验替代方法,主要原因有:①利用体外细胞模型模拟神经发育过程中的关键事件,可以检测到细胞增殖、细胞结构以及神经递质合成或功能上的轻微变化。②从体外细胞模型的数据可研究相关的分子、细胞、局部区域以及易受损伤的发育阶段,因此,集中并且减少了动物研究。③许多 DNT 物质,不论其具体作用机制如何,都具有相同的毒性作用终点,如改变细胞分裂或存活、扰乱神经元或胶质细胞的分化以及中断神经连接。因此,在细胞模型中所检测到的毒性作用终点均在生物学上与 DNT 相关。④体外细胞模型有利于描述遗传毒性的作用机制以及评价物种间作用机制的保守性<sup>[6]</sup>。通过检测神经细胞基因表达,可以将分子数据及结构与功能上的观察结果整合到一起,这类整合的数据库对于利用分子终点进行的筛选实验是必要的。

目前,细胞模型可用于研究神经发育过程中的关键事件,包括增殖和凋亡<sup>[7]</sup>、胚胎干细胞分化<sup>[8]</sup>、神经细胞迁移<sup>[9]</sup>、轴突树突生长和突触发生<sup>[10]</sup>、神经胶质细胞分化和髓鞘形成<sup>[11]</sup>、神经递质合成与功能<sup>[12]</sup>以及血脑屏障生成<sup>[13]</sup>。常用模型有神经元型细胞系和胶质型细胞系<sup>[14]</sup>,还有从神经系统不同发育阶段分离的组织,包括纯化的原代神经元细胞和胶质细胞,神经元-胶质细胞共培养,器官型脑片培养<sup>[15]</sup>。其检测终点有细胞形态、生化标记、神经传递和分子事件,如基因表达和细胞内信号转导<sup>[16]</sup>。Radio 等<sup>[17]</sup>以轴突生长为检测指标,建立了 PC12 细胞的 DNT 高通量筛选系统,能快速量化化学物对轴突生长的化学效应,并且细胞活

力和轴突生长的浓度响应数据可以作为化学物 DNT 的检测终点。脑片等一些复杂的体外模型,已用于与功能相关的复杂行为研究,比如长时程增强和突触可塑性<sup>[18]</sup>。

在体外神经生物学研究中,分离的大鼠小脑颗粒细胞是应用最广泛的体外系统,90% 原代培养的小脑颗粒细胞是由小脑颗粒神经元组成,可以用于神经元的发育、功能和病理学研究。尽管没有神经电路,小脑颗粒细胞却具有多条功能通路对化学物进行应答<sup>[19]</sup>。总之,相对于细胞系,原代培养物对毒性物质有更高的敏感性<sup>[20]</sup>。原代培养的小脑颗粒细胞中还包含胶质细胞,其中,星形胶质细胞可特异性地表达胶质纤维酸性蛋白,它是星形胶质细胞骨架蛋白的特有成分,常作为星形胶质细胞毒性反应的特异性标志物,用于研究胶质细胞的毒性反应<sup>[16]</sup>。

迄今为止,大多数机制信息是通过在非干细胞正常增殖、永生或致瘤细胞的研究而获得的。多数情况下,这些结果外推到体内后不是很理想。干细胞技术为更好地理解毒性机制和预测人体内毒性提供了一种新的工具<sup>[21]</sup>。理想的 DNT 模型是人胚胎干细胞。人神经祖细胞、干细胞系和脐带血干细胞等模型,可用于研究前体细胞向神经元和胶质细胞的分化以及神经网络形成等神经发育过程中的重要事件,而且这些模型可以避免物种不同所致的推测不确定性<sup>[22]</sup>。Breier 等<sup>[23]</sup>用多种化合物作用于人神经祖细胞,通过 PI 排除法和 BrdU 掺入法检测细胞活力和增殖情况,建立了以人神经祖细胞为对象,采用高通量筛选方法评价化学物对细胞增殖和活力的影响的 DNT 检测体系。

虽然体外细胞模型能够对化学物进行神经系统毒性作用筛选,优化和减少动物实验,但是,也存在局限性:① 大部分细胞系是从肿瘤中得到的永生细胞,不能代表天然神经细胞真实状态,原代细胞的很多性质会丢失或与体内情况不同。随着传代,基因组的不稳定性增加。缺少三维结构,不同细胞类型之间的相互作用变得非常有限。② 原代培养物中,细胞表型和功能会发生改变,细胞代谢和细胞间相互作用水平显著降低,这会导致细胞对化学物的回应发生改变。另外,初级神经培养物大部分由有丝分裂后的神经元组成,这些细胞不能增殖,模型的生存期受到限制,因此,培养物需要经常更换,不适合进行高通量筛选。③ 尚不能完全控制神经祖细胞的分化,对其很多培养特征缺乏了解<sup>[24]</sup>。④ 发育中的大脑,其基因表达类型、发育周期、神经保护分子的表达和代偿性机制会因部位的不同而不同,因此,体外细胞模型很难解释神经毒性物质对大脑不同部位的毒性作用<sup>[18]</sup>。⑤ 神经毒性物质对整个神经系统的作用大于对各个部分作用的总和。这样,将发育中的神经系统简化到细胞亚群或某一区域的脑片,就不能从总体上研究大脑不同区域、不同细胞类型和不同发育阶段间的相互作用和重要差别,而且不易观察到毒性物质对可以影响神经发育的神经外因子(如代谢、免疫调节和内分泌功能)的毒性作用<sup>[25]</sup>。

## 2.2 非哺乳动物模型

发育中的神经系统具有很多比较复杂的相互依赖过程,所以,体外细胞模型很难准确地预测化学物的体内效应,而那些简单生物体构成的非哺乳动物模型可以评价完整的生物效应,为 DNT 实验提供更可行和更快速的替代方法。线虫、果蝇和斑马鱼已广泛用于神经发育机制的研究,而且已经掌握它们关于神经发育的细胞和分子调节方面的相关理

论。研究证实,尽管这些模型的神经发育与哺乳动物有明显的差异,但是它们神经发育的基础进程与人具有相似性,而且所表达的基因与人神经发育疾病相关的基因存在较高的同源性,这说明这些模型系统可以用于检测化学物对人发育中的神经系统的潜在神经毒性<sup>[26]</sup>。

随着线虫、果蝇和斑马鱼基因组测序的完成,已经有能够监测和调控这些生物体中基因表达的技术,而且某些行为测试也已被开发出来,利用这些工具可以在生物化学、分子和细胞水平上对 DNT 引起的结构、功能和行为的改变进行研究,还可以直接检测化学物与生物化学、细胞或分子终点以及行为的原因-效应关系<sup>[27]</sup>。另外,这些信息可以构建用于预测物种间 DNT 潜在危害的基因组学和蛋白质组学数据库。以后的研究主要集中在发展适用于非哺乳动物模型的基因组学、蛋白质组学、结构、生物化学和行为学终点的高通量分析技术。

非哺乳动物模型的一个最重要的优势就是这些组织体积小,胚胎发育快,生活周期短,这大大减少了时间和空间上的消耗。在这些模型中,斑马鱼呈现出很多线虫或果蝇所没有的特征,如在基因组结构上脊椎动物和无脊椎动物之间有很显著的差异。这样,即使物种间基因具有功能同源性,但是基因调节的机制在脊椎动物和无脊椎动物之间会有明显的不同<sup>[28]</sup>。而且,无脊椎动物神经系统不能反映脊椎动物大脑的大小和组成,脊椎动物神经电路的复杂性排除了它们与无脊椎动物之间对大脑的形成和功能进行直接比较的可能性,但是,鱼类大脑的主要组成部分却与人脑具有高度的同源性<sup>[29]</sup>。斑马鱼还具有所有的经典感觉形态,包括视觉、嗅觉、味觉、触觉、平衡和听觉,并且它们的感覺传导通路与人完全相同。认知行为测试表明解剖学上担负认知行为的物质在鱼和其他脊椎动物之间是保守的,这样,与对哺乳动物海马损伤的观察相类似,鱼中的海马结构类似物损伤选择性地损害了其空间记忆<sup>[30]</sup>。

与其他模型相比,斑马鱼的另一个优势是其胚胎透明,简单的显微技术就能在较宽的发育阶段内分辨体内单个细胞,而且,采用能表达荧光报道基因的转基因斑马鱼模型可使分辨率提高,用以观察基因表达的动态变化和活体中发育胚胎详细的形态发生运动,进而可以研究在神经系统发育过程中暴露于神经毒性物质时的补偿机制<sup>[31]</sup>。在活体斑马鱼中可见的神经发育事件,包括神经诱导、神经元迁移、轴突向外生长和突触发生、后脑形态发生的分子调控以及视觉系统的发育<sup>[32]</sup>。而且利用这些过程在同一个生物体中的重现性还可以进行反复的观察,因此减少了研究中的动物使用量。Yang 等<sup>[33]</sup>将受精 24 ~ 72 h 的斑马鱼受精卵暴露于毒死蜱的代谢产物后,发现其代谢产物能显著抑制乙酰胆碱酯酶的活性,并且抑制感觉神经元、初级运动神经元和次级运动神经元的轴突生长,由此表明神经连接方式的改变是毒死蜱 DNT 的一种表现形式。Powers 等<sup>[34]</sup>将斑马鱼胚胎长期暴露于对形态发育不产生明显影响的银离子浓度中,通过对斑马鱼神经化学指标和行为效应的检测,证明银离子是一种能够引起永久神经行为效应的神经发育毒剂。

作为模型物种,斑马鱼为研究提供了很多方便,但是它也有一定的缺陷。它的小体积使得生化或遗传分析对胚胎或幼虫的需求量增大,同时也极大地限制了检测和评估装置的类型,给包埋和切片增加了难度。其次,斑马鱼发育进程迅速,仅几个小时就可以使其发育阶段或对毒性物质的敏感

性发生改变,这使得记录发育时段的观察费用得以增加。另外,斑马鱼胚胎起初被包在绒毛膜内,它可能会成为某些化学物进入胚胎的额外屏障。虽然胚胎的卵膜可以通过机械法或蛋白酶法去除,但这会影响胚胎的行为和完整性,同时也排除了检测化学物对孵化影响的可能<sup>[35]</sup>。在毒性研究中,斑马鱼最主要的缺陷是给药的不可控性。最简单的暴露方式是将胚胎置于含有毒性物质的溶液中,但实际到达胚胎的剂量是不确定的。已有研究表明,真正到达胚胎/幼虫的剂量极少会与周围水中的药物浓度相接近<sup>[36]</sup>。

总之,以非哺乳动物为基础的体内 DNT 实验替代模型所面临的主要挑战是要确定潜在的物种间毒性物质代谢动力学和毒性物质效应动力学的差异。目前已有关于外源物与人在代谢和细胞防御机制上相似程度的探讨,如果二者之间存在显著差别,那么,利用通过稳定表达人类基因(如代谢酶类)而使其人源化的技术,可能使这个难题得到部分解决<sup>[37]</sup>。

### 3 神经发育毒性实验替代方法存在的问题和展望

基于神经发育保守机制的 DNT 替代模型的重要特征是可对发育中的人神经系统的神经毒性反应进行预测,因此,无论基于细胞培养的体外模型还是基于非哺乳动物的体内模型,都有必要对其是否具有这一特征进行评价。理想 DNT 替代模型的另一个特点是应用于高通量分析,而且要具有敏感性、专属性和适用性等优点。另外,还要求快速、经济并且相对容易实施。但是,总体上,无论是体外还是体内替代模型,均存在如下问题:① 其所得数据均不能对预测的准确性、专属性和敏感性进行充分的评价。所以,目前要做的工作是建立一组可以检测 DNT 实验替代模型的参照化合物<sup>[38]</sup>,进而利用这些不同机制的 DNT 化合物对不同候选模型进行测试。② DNT 实验数据的收集、存储和分析。最理想的情况是每一个参与者在公共数据库中共享 DNT 实验替代模型发展和检测的相关信息。除了要鉴别收集有关资源来建立和维持这个数据库,还要运用计算毒理学与系统生物学,使结构和功能的数据与基因组学、蛋白质组学和代谢组学得以结合<sup>[37]</sup>。

从体外细胞模型和非哺乳动物模型的 DNT 实验替代法获得的数据,有利于对相关细胞、分子和局部靶点更深入的理解,由此可以提出化学物作用方式的相关假说,鉴别潜在的易损发育阶段,继而优化和减少哺乳动物体内实验,实现保障儿童健康的最终目标。目前,虽然 DNT 替代实验不能完全取代哺乳动物体内实验,但是,DNT 替代模型在区分化学物以及优化和减少哺乳动物体内实验中有重大价值。

#### 参考文献:

[1] Andersen HR, Nielsen JB, Grandjean P. Toxicologic evidence of developmental neurotoxicity of environmental chemicals[J]. *Toxicology*, 2000, **144**(1-3):121-127.

[2] Kuegler PB, Zimmer B, Waldmann T, Baudis B, Ilmjärvi S, Hescheler J, et al. Markers of murine embryonic and neural stem cells, neurons and astrocytes; reference points for developmental neurotoxicity testing[J]. *ALTEX*, 2010, **27**(1):17-42.

[3] Lilienblum W, Dekant W, Foth H, Gebel T, Hengstler JG, Kahl R, et al. Alternative methods to safety studies in experimental animals; role in the risk assessment of chemicals under the new Eu-

ropean Chemicals Legislation (REACH) [J]. *Arch Toxicol*, 2008, **82**(4):211-236.

[4] Bal-Price AK, Suñol C, Weiss DG, van Vliet E, Westerink RH, Costa LG. Application of *in vitro* neurotoxicity testing for regulatory purposes: Symposium III summary and research needs [J]. *Neurotoxicology*, 2008, **29**(3):520-531.

[5] Coecke S, Eskes C, Gartlon J, Kinsner A, Price A, van Vliet E, et al. The value of alternative testing for neurotoxicity in the context of regulatory needs [J]. *Environ Toxicol Pharmacol*, 2006, **21**(2):153-167.

[6] Högberg H. Alternative *in vitro* and non-mammalian models relevant to DNT evaluation [M] // Högberg H. *Developmental Neurotoxicity Testing Using In vitro Approaches*. Stockholm: Universitetservice AB, 2009:27-33.

[7] Moors M, Rockel TD, Abel J, Cline JE, Gassmann K, Schreiber T, et al. Human neurospheres as three-dimensional cellular systems for developmental neurotoxicity testing [J]. *Environ Health Perspect*, 2009, **117**(7):1131-1138.

[8] Tamm C, Duckworth J, Hermanson O, Ceccatelli S. High susceptibility of neural stem cells to methylmercury toxicity: effects on cell survival and neuronal differentiation [J]. *J Neurochem*, 2006, **97**(1):69-78.

[9] Ayala R, Shu T, Tsai LH. Trekking across the brain: the journey of neuronal migration [J]. *Cell*, 2007, **128**(1):29-43.

[10] Spitzer NC. Electrical activity in early neuronal development [J]. *Nature*, 2006, **444**(7120):707-712.

[11] Simons M, Trotter J. Wrapping it up: the cell biology of myelination [J]. *Curr Opin Neurobiol*, 2007, **17**(5):533-540.

[12] Collier TJ, Steece-Collier K, McGuire S, Sortwell CE. Cellular models to study dopaminergic injury responses [J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2003, **991**:140-151.

[13] Yang J, Aschner M. Developmental aspects of blood-brain barrier (BBB) and rat brain endothelial (RBE4) cells as *in vitro* model for studies on chlorpyrifos transport [J]. *Neurotoxicology*, 2003, **24**(4-5):741-745.

[14] Tiffany-Castiglioni E, Ehrlich M, Dees L, Costa LG, Kodavanti PR, Lasley SM, et al. Bridging the gap between *in vitro* and *in vivo* models for neurotoxicology [J]. *Toxicol Sci*, 1999, **51**(2):178-183.

[15] Gähwiler BH, Thompson SM, McKinney RA, Debanne D, Robertson RT. Organotypic slice cultures of neural tissue [M] // Banker G, Goslin KE. *Culturing Nerve Cells*. 2nd ed. Cambridge: MIT Press, 1998:461-498.

[16] Hogberg HT, Kinsner-Ovaskainen A, Coecke S, Hartung T, Bal-Price AK. mRNA expression is a relevant tool to identify developmental neurotoxicants using an *in vitro* approach [J]. *Toxicol Sci*, 2010, **113**(1):95-115.

[17] Radio NM, Breier JM, Shafer TJ, Mundy WR. Assessment of chemical effects on neurite outgrowth in PC12 cells using high content screening [J]. *Toxicol Sci*, 2008, **105**(1):106-118.

[18] Lein P, Locke P, Goldberg A. Meeting report: alternatives for developmental neurotoxicity testing [J]. *Environ Health Perspect*, 2007, **115**(5):764-768.

[19] Contestabile A. Cerebellar granule cells as a model to study mechanisms of neuronal apoptosis or survival *in vivo* and *in vitro* [J]. *Cerebellum*, 2002, **1**(1):41-55.

[20] Costa LG. Neurotoxicity testing: a discussion of *in vitro* alternatives [J]. *Environ Health Perspect*, 1998, **106**(Suppl 2):505-510.

- [21] Bal-Price AK, Hogberg HT, Buzanska L, Lenas P, van Vliet E, Hartung T. *In vitro* developmental neurotoxicity (DNT) testing: relevant models and endpoints[J]. *Neurotoxicology*, 2010, **31**(5):545-554.
- [22] Betts KS. Growing knowledge: using stem cells to study developmental neurotoxicity[J]. *Environ Health Perspect*, 2010, **118**(10):A432-A437.
- [23] Breier JM, Radio NM, Mundy WR, Shafer TJ. Development of a high-throughput screening assay for chemical effects on proliferation and viability of immortalized human neural progenitor cells[J]. *Toxicol Sci*, 2008, **105**(1):119-133.
- [24] Breier JM, Gassmann K, Kayser R, Stegeman H, De Groot D, Fritsche E, et al. Neural progenitor cells as models for high-throughput screens of developmental neurotoxicity: state of the science[J]. *Neurotoxicol Teratol*, 2010, **32**(1):4-15.
- [25] Bal-Price AK, Hogberg HT, Buzanska L, Coecke S. Relevance of *in vitro* neurotoxicity testing for regulatory requirements: challenges to be considered[J]. *Neurotoxicol Teratol*, 2010, **32**(1):36-41.
- [26] Peterson RT, Nass R, Boyd WA, Freedman JH, Dong K, Narahashi T. Use of non-mammalian alternative models for neurotoxicological study[J]. *Neurotoxicology*, 2008, **29**(3):546-555.
- [27] Williams FE, White D, Messer WS. A simple spatial alternation task for assessing memory function in zebrafish[J]. *Behav Processes*, 2002, **58**(3):125-132.
- [28] Fan CY, Cowden J, Simmons SO, Padilla S, Ramabhadran R. Gene expression changes in developing zebrafish as potential markers for rapid developmental neurotoxicity screening[J]. *Neurotoxicol Teratol*, 2010, **32**(1):91-98.
- [29] Ton C, Lin Y, Willett C. Zebrafish as a model for developmental neurotoxicity testing[J]. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol*, 2006, **76**(7):553-567.
- [30] Rodríguez F, López JC, Vargas JP, Broglio C, Gómez Y, Salas C. Spatial memory and hippocampal pallium through vertebrate evolution: insights from reptiles and teleost fish[J]. *Brain Res Bull*, 2002, **57**(3-4):499-503.
- [31] Selderslaghs IW, Hooyberghs J, De Coen W, Witters HE. Locomotor activity in zebrafish embryos: a new method to assess developmental neurotoxicity[J]. *Neurotoxicol Teratol*, 2010, **32**(4):460-471.
- [32] Lein P, Silbergeld E, Locke P, Goldberg AM. *In vitro* and other alternative approaches to developmental neurotoxicity testing (DNT)[J]. *Environ Toxicol Pharmacol*, 2005, **19**(3):735-744.
- [33] Yang D, Lauridsen H, Buels K, Chi LH, La Du J, Bruun DA, et al. Chlorpyrifos-oxon disrupts zebrafish axonal growth and motor behavior[J]. *Toxicol Sci*, 2011, **121**(1):146-159.
- [34] Powers CM, Levin ED, Seidler FJ, Slotkin TA. Silver exposure in developing zebrafish produces persistent synaptic and behavioral changes[J]. *Neurotoxicol Teratol*, 2011, **33**(2):329-332.
- [35] Padilla S, MacPhail R. Using zebrafish to assess developmental neurotoxicity[M] // Gupta RC. *Reproductive and Developmental Toxicology*. Waltham: Academic Press, 2011:179-191.
- [36] Huang H, Huang C, Wang L, Ye X, Bai C, Simonich MT, et al. Toxicity, uptake kinetics and behavior assessment in zebrafish embryos following exposure to perfluorooctanesulphonic acid (PFOS)[J]. *Aquat Toxicol*, 2010, **98**(2):139-147.
- [37] Coecke S, Goldberg AM, Allen S, Buzanska L, Calamandrei G, Crofton K, et al. Workgroup report: incorporating *in vitro* alternative methods for developmental neurotoxicity into international hazard and risk assessment strategies[J]. *Environ Health Perspect*, 2007, **115**(6):924-931.
- [38] Radio NM, Mundy WR. Developmental neurotoxicity testing *in vitro*: models for assessing chemical effects on neurite outgrowth[J]. *Neurotoxicology*, 2008, **29**(3):361-376.

## Progress in alternatives for developmental neurotoxicity testing on animals

ZHANG Nan-nan<sup>1,2</sup>, LIANG Jin-feng<sup>3</sup>, SONG Shu-liang<sup>2</sup>, JI Ai-guo<sup>1,2</sup>

(1. Institute of Biochemical and Biotechnological Drugs, School of Pharmaceutical Sciences, Shandong University, Jinan 250012, China; 2. Shandong University-Weihai International Biotechnology R&D Center, Weihai 264209, China; 3. Zhejiang Center for ADR Monitoring, Hangzhou 310012, China)

**Abstract:** Industrial chemical exposure during early embryonic development can cause fetal brain damage, such as neurodevelopmental disorders and sub-clinical brain dysfunction. Although the safety evaluation of chemicals based on animal toxicity tests is relatively reliable, many of these tests are expensive in terms of scientific resources and time and do not fit in with the current trend of reduced use of laboratory animals. As a result, alternatives for developmental neurotoxicity (DNT) testing attract more attention. The paper reviews establishment and improvement of alternatives, including sensitivity, low consumption and adaptability to high throughput screening, advantages, and current applications of cell-based models and non-mammalian models and finally the challenges existing. The alternatives will not completely replace a paradigm that involves *in vivo* testing in mammals, but they will be of great value in prioritizing chemicals and in identifying mechanisms of DNT.

**Key words:** developmental disabilities; animal testing alternatives; models, neurological; cell, non-mammalian models

**Foundation item:** The project supported by National Natural Science Foundation of China(30873198)

**Corresponding author:** JI Ai-Guo, E-mail: jiaiguo@sdu.edu.cn, Tel: (0631)5688526

(收稿日期: 2011-06-24 接受日期: 2011-12-02)

(本文编辑: 付良青)