

非洲爪蟾在生态毒理学研究中的应用： 概述和实验动物质量控制

秦占芬 徐晓白

(中国科学院生态环境研究中心, 环境化学与生态毒理国家重点实验室, 北京 100085. * 联系人, E-mail: zhfqin@yahoo.com)

摘要 非洲爪蟾因为终生生活在水中易于饲养管理、常年可以排卵孵化、行体外受精和体外发育等特点, 而作为模型动物广泛用于生物学的研究, 并积累了大量相关的资料. 像其他两栖动物一样, 非洲爪蟾的胚胎和幼体直接暴露在水中, 对环境污染物比较敏感. 另外, 非洲爪蟾的性别分化和性器官发育对性激素和具性激素活性的内分泌干扰物十分敏感, 所以非洲爪蟾可用于内分泌干扰物的性激素干扰作用和生殖毒性的研究. 同时, 非洲爪蟾的变态发育对甲状腺激素和具甲状腺干扰活性的内分泌干扰物十分敏感, 所以非洲爪蟾也可用于环境物质甲状腺干扰作用的研究. 除此, 非洲爪蟾的生态毒理学研究可与目前生态学研究中的热点问题——两栖动物世界范围内的减少和畸形蛙的出现衔接. 基于以上几点, 目前已有越来越多的实验室将非洲爪蟾引入生态毒理学的研究. 实验动物质量关系着动物实验结果的科学性和可靠性, 这对毒理学研究尤为重要. 本文从水质、食物等环节对非洲爪蟾质量控制的问题做了初步讨论.

关键词 非洲爪蟾 生态毒理学 实验动物

据世界卫生组织统计人类 80% 的疾病与环境污染有关^[1,2]. 尤其近年来, 随着有关环境污染导致的动物内分泌失调、生殖功能障碍、性别逆转及生态环境恶化、生物多样性降低等报道的增加, 环境污染物的毒理作用成为人们不得不重视的问题^[3,4], 生态毒理学也逐渐成为一个颇受关注的学科. 所谓生态毒理学是指研究化学污染物对种群、群落和生态系统产生的生态学及毒理学影响及污染物在环境中的命运的学科^[5,6]. 生态毒理学研究常用的实验材料有藻类、蚤类、蚯蚓、鱼、禽、鼠等, 并相应有比较成熟的实验方法和公认的适用范围. 如藻类毒性试验一般多用于评价水体中有机污染物的毒性, 鱼类毒性试验则适合评价更广泛污染物的毒性, 鼠的研究则能提供更为丰富的毒理学数据. 近年来有越来越多的学者开始关注两栖动物所受的生态毒理学影响. 两栖动物非洲爪蟾是生物学研究的一种重要模型动物, 多年来被用于动物早期胚胎发育和细胞生物学各领域的研究. 近年来该模型动物正引起越来越多生态毒理学家的注意.

1 非洲爪蟾作为生物学研究的模型动物

非洲爪蟾(South African Clawed toad, *Xenopus laevis*) 在分类系统中属两栖动物纲, 无尾目, 爪蟾科,

爪蟾属, 光滑爪蟾种^[7]. 多年来非洲爪蟾一直是生物学研究的重要模型动物, 用于早期胚胎发育(早期命运决定、身体构建模式、器官发生等)和细胞生物学(染色体复制、染色质和核凝集、细胞周期、细胞骨骼、信号转导等)的研究. 虽然斑马鱼和大鼠也被用于发育生物学的研究, 但是非洲爪蟾一直是这一研究领域最重要的模型动物, 实际上关于动物早期发育的知识绝大部分来自非洲爪蟾实验. 随着分子生物学的发展, 非洲爪蟾在生物学研究中的地位变得更加突出, 1998 年美国国家健康研究院(NIH)将非洲爪蟾评为基因功能研究的非哺乳动物最佳模型系统之一. 为满足众多研究人员的需求, 一些国家相应建有大的非洲爪蟾培育中心, 像美国的 *Xenopus Express*, *Xenopus I*, *NASCO*, 法国的 *Elevage National De Xenopus* 都是世界知名的非洲爪蟾及相关材料的供应商.

非洲爪蟾之所以受到众多研究人员的青睐是因为: (1) 非洲爪蟾从受精卵到成蛙终生生活在水中, 一般静水系统就可满足其正常的生长发育. 静水系统中, 蝌蚪需要每天饲喂, 一般一周换两次水. 成蛙一周喂一到两次即可, 喂后换水. 目前国外几个大的培育中心都有配制的饲料出售. 此外, 一些天然的食物如动物肝脏、水蚤等也可用来喂非洲爪蟾. 养非洲

爪蟾所需的条件设备与养鱼的条件设备基本相同,只是养非洲爪蟾比养鱼更容易些。

(2) 不像其他的两栖动物一样一年只繁殖一次,非洲爪蟾常年都可以用人促绒毛膜性腺激素(HCG)诱导繁殖。雌性腹腔注射 500~1000 单位 HCG、雄性注射 300~500 单位 HCG 即可诱导抱对获得受精卵。在缺少雄性的情况下,雌性也可排卵,一次排卵量可达上万枚,且排卵 3 个月后可再次排卵。这一特点保证了研究材料绝对充足,这对显微操作和转基因研究来说尤其必要。

(3) 非洲爪蟾成熟的卵直径大约 1.3 mm,动物极呈黑色,植物极呈白色,肉眼容易观察,且易收集、转移和进行显微操作。自 20 世纪 50 年代 John Gurdon 将非洲爪蟾的卵引入生物学研究以来,这一实验材料已被用于细胞周期^[8]、细胞骨骼^[9,10]、减数分裂^[11,12]、蛋白功能表达与调节^[13]、DNA 合成和染色体复制^[14,15]、生物膜^[16]、受精^[17]等多领域的研究。著名生物学家 Brown 教授称非洲爪蟾的卵在现代生物学的发展中扮演了一个中心角色^[18]。

(4) 非洲爪蟾行体外受精,整个胚胎发育过程都在体外进行,易于控制和观察。Nieuwkoop 和 Faber 将非洲爪蟾从受精卵到尾完全吸收成蛙的发育过程分了 66 个阶段(stage),并对每一阶段的内外部特征进行了较为详细的描述^[7]。这一工作为非洲爪蟾相关的研究奠定了基础,目前几乎相关的所有研究都是在这一阶段划分系统的基础上进行的。非洲爪蟾胚胎早期发育的速度较快,从受精卵到有尾蝌蚪仅需 3 d,可以为实验研究节省时间。以上几点决定了非洲爪蟾是发育生物学研究的良好动物模型,可用于身体构建模式^[19]、形态发生^[20]、血细胞发育^[21]、前肾发生^[22]、肠的发育^[23]、胚胎诱导^[24]、细胞凋亡^[25]等领域的研究。

(5) 变态成蛙后的非洲爪蟾,某些器官可以部分或全部切除,所以切除术是非洲爪蟾研究中一种常用的方法,尤其多用于性器官/激素(卵巢和睾丸)和再生(腿牙和尾)的研究^[26-29]。非洲爪蟾在胚胎时期,带有既定功能的某些区域能够容易地剥离开来,并可在简单的培养基中体外培养。利用这一特点,非洲爪蟾的胚胎可用于绘制命运图等多方面的研究^[30]。另外,发育成熟的某些器官和器官提取的细胞也可在体外培养,为体外研究提供了可能^[31,32]。

(6) 非洲爪蟾胚胎能够表达外源 mRNA(包括人

和鼠的 mRNA)并表现相应产物的功能,所以用非洲爪蟾可以比较容易地克隆、鉴定基因^[33,34]。现在已知的与发育相关的基因中有许多是从非洲爪蟾首先获得的^[35,36]。最近有实验室建立了一种根据基因在胚胎中过度表达而诱导可观察表型来鉴定大量发育相关基因的方法^[18]。

2 非洲爪蟾作为毒理学研究的模型动物

随着环境问题的日益突出和人们对其的重视,非洲爪蟾逐渐引起了生态毒理学的兴趣,目前有越来越多的实验室将非洲爪蟾引入生态毒理学的研究。其中原因我们归纳为以下几点:

(1) 因为两栖动物行体外受精体外发育,胚胎和幼体直接暴露在环境中很容易受到有毒物质的损伤。所以现在两栖动物被公认是一类很好的反映环境污染的前哨动物。北美大量畸形蛙的出现和蛙体内激素水平的改变在一定程度上支持了这一认识^[37]。1997 年美国国家环境健康研究所组织了一个专门讨论畸形蛙所暗示的环境问题的会议^[38]。更早些的一个以“使用前哨动物评价环境中化学物质对人类健康潜在的影响”为主题的讨论也认为两栖动物是很好的评价环境健康的前哨动物^[39]。作为一个在实验室使用多年的两栖动物种,非洲爪蟾自然会首先被生态毒理学家们所注意。实际非洲爪蟾的胚胎作为评价环境污染物早期发育毒性的实验材料(Frog Embryo Teratogenesis Assay—*Xenopus*, FETAX)已被使用多年^[40]。

(2) 两栖动物的性别分化和性器官发育由基因型决定^[41]。非洲爪蟾的性基因型为 ZW/ZZ, ZW 型决定动物发育成雌性, ZZ 型决定动物发育成雄性,自然情况下不出现两性表型^[42]。但在性别分化的早期,非洲爪蟾的性腺发育对雌激素十分敏感,一定剂量和时间的作用能将基因雄性逆转成表型雌性^[43]。如果作用的时间和剂量合适,雌激素可诱导出两性畸形。环境中某些有雌激素活性的内分泌干扰物也能影响非洲爪蟾的性腺发育甚至使性别完全逆转,目前一些实验研究已证明了这一点^[44-47]。除性腺发育外,第二性特征喉管的发育也能受到具性激素活性的内分泌干扰物的影响^[45]。另外,我们最新的研究结果表明输卵管也是内分泌干扰物作用的靶器官(未公开的数据)。因此,对性激素和有性激素活性的内分泌干扰物的敏感性,使非洲爪蟾可用于内分泌干扰物的性激素干扰作用和生殖毒性的研究。

(3) 非洲爪蟾的变态发育直接由甲状腺激素 (TH) 调控。在蝌蚪开始吃食后不久甲状腺便开始发育。随着蝌蚪的生长, 甲状腺不断发育并在一定的阶段开始分泌甲状腺激素, 在变态高潮期达到最高水平, 之后回落^[48,49]。伴随着甲状腺激素升高, 蝌蚪发生一系列的从形态到生理特征的变化, 如后腿出现, 前腿展开, 变态高潮时鳃和尾迅速吸收。整个过程甲状腺激素水平的变化起着关键作用, 而甲状腺激素水平的变化又受许多因素的调节。任何一个因素出现问题都可能影响变态发育。反过来, 非洲爪蟾的变态发育也就可以反映出甲状腺激素系统受到的干扰作用。因此, 变态发育对甲状腺激素和具甲状腺干扰活性的内分泌干扰物的敏感性, 使非洲爪蟾可用于环境物质甲状腺干扰作用的研究。美国内分泌干扰物质筛查和确证顾问委员会 (endocrine disruptor screening and testing advisory committee, EDSTAC) 曾建议用非洲爪蟾尾吸收试验来评价内分泌干扰物的甲状腺干扰作用¹⁾。目前有几个实验室在用非洲爪蟾评价环境物质的甲状腺干扰作用^[50,51]。

(4) 过去几十年中世界范围内的两栖动物经历了急剧的减少, 并有许多蛙出现畸形。寻找导致两栖动物减少和畸形的原因是近二三十年来生态学研究领域的一个热点^[52-55]。环境污染与栖息地减少、紫外线、真菌感染和疾病等一起被怀疑是几个可能的原因。非洲爪蟾的生态毒理学研究可与这个热点问题相衔接: 一方面非洲爪蟾的生态毒理学研究可以为两栖动物减少和野外大量畸形蛙的研究提供线索, 另一方面两栖动物的野外研究也可为实验室的生态毒理学研究指出方向并将后者推到生态学水平。

(5) 以往的非洲爪蟾的生物学研究积累了大量的关于生长发育繁殖的资料和成熟的研究方法, 可借鉴用于非洲爪蟾生态毒理学的研究, 这是生态毒理学研究中其他模型动物所不可比拟的优势。

目前国外已有不少实验室开始用非洲爪蟾开展生态毒理学的研究。Kloas 教授领导的研究室是最早用非洲爪蟾研究内分泌干扰物的单位之一, 他们在 1999 年首次报道了酚类物质对非洲爪蟾的内分泌干扰作用, 并明确提出: 非洲爪蟾可以作为研究内分泌

干扰作用的模型^[44,56]。除用非洲爪蟾开展内分泌干扰研究外, Kloas 教授还致力于两栖动物 (主要是非洲爪蟾) 发育机制的基础研究, 这种基础研究与基础研究相辅相成的研究格局为非洲爪蟾内分泌干扰研究的长足发展奠定了基础。Hayes 教授也是较早用非洲爪蟾开展内分泌干扰研究的知名学者。他的研究兴趣是激素和外源性激素对两栖动物发育的影响, 主要以非洲爪蟾为研究材料。2002 年他报道了环境水平下的阿特拉津可诱导非洲爪蟾的两性^[45], 晚些的野外蛙调查证实了这一实验室结果^[57]。此报道引发了相关学者及美国环保局的热烈争论, 但是由于各实验室间的研究结果存在很大差异, 所以到目前为止, 阿特拉津是否干扰非洲爪蟾的内分泌系统还没有定论^[51,58,59]。美国的 Fort 环境实验室是一个多年来致力于 FETAX 开发和利用的实验室, 曾用非洲爪蟾胚胎对多种环境污染物和环境样品的发育毒性做过评价^[60-62]。最近这个实验室又在探索用同一属的 *X. tropicalis* 代替非洲爪蟾进行 FETAX, 以避免非洲爪蟾的某些缺点^[63]。在未来的生态毒理学研究中非洲爪蟾会吸引越来越多科学家的注意。

与国外的非洲爪蟾研究相比, 国内学术界对非洲爪蟾的认识还很少。目前仅有中国科学院遗传和发育生物学研究所、上海生命科学研究院、昆明动物研究所、生物物理研究所的几个实验室在用非洲爪蟾开展生物学的研究工作。至于非洲爪蟾的生态毒理学研究, 国内才刚刚起步。我们从 1999 年开始建立评价内分泌干扰作用的非洲爪蟾模型。经过几年探索, 已发展了一系列评价性腺发育干扰和变态发育干扰的终点指标, 发现了几种环境物质对非洲爪蟾的内分泌干扰作用^{[46,47]2-4)}。

3 实验动物的质量控制

实验动物质量是关系动物实验结果科学性和可靠性的一个至关重要的因素。作为生物学研究模型动物的非洲爪蟾虽被使用多年, 但是它还没能像其他模型动物那样做到真正的实验动物化。目前国际上没有有关非洲爪蟾作为实验动物的严格的饲养管理及使用的标准。我国更是没有有关非洲爪蟾的任

1) U.S. Environmental Protection Agency. Endocrine Disruptor Screening and Testing Advisory Committee (EDSTAC): Final Report. Washington, 1998

2) 秦占芬. 综合评价内分泌干扰作用的动物模型-非洲爪蟾模型的研究. 中国科学院生态环境研究中心博士学位论文, 2002

3) 周景明. 多氯联苯对非洲爪蟾的发育毒性. 中国科学院生态环境研究中心博士学位论文, 2004

4) 秦占芬. 非洲爪蟾用于环境毒理学研究的方法学探讨. 中国科学院生物物理研究所博士后出站工作报告, 2004

何规定. 因此非洲爪蟾用于生态毒理学研究存在着一个非常关键的问题, 即减少饲养环节中带入的污染.

3.1 水质

非洲爪蟾对水质的要求不高, 在硬度 150~250 mg/L(CaCO₃), 余氯低于 3 μg/L, pH 6.5~8.5, 溶解氧高于 5 mg/L的条件下, 蝌蚪和成蛙都能健康生存. 所以大多数的实验室用的都是活性炭处理的自来水, 如果自来水的硬度较高, 可设计加反渗透膜装置. 我们使用的水处理系统是一套炭砂处理柱, 经此柱处理的水可保证受精率在 70%~80%以上, 孵化率在 80%以上, 从蝌蚪到蛙的成活率在 80%以上, 基本能够满足实验要求. 单从生存的角度来考虑水质, 这好像是一个不用控制的问题. 但是毒理学研究除要求实验动物健康外还要求没有污染物的干扰. 因此, 日益加重的环境污染尤其是某些水源地可能的污染向水质控制提出了挑战.

3.2 食物

非洲爪蟾是杂食动物, Xenopus Express, Xenopus I, NASCO等国外供应商都有配制的商品饲料出售, NASCO的饲料被认为是质量最好(营养最全)的一种. 但是这些饲料同鼠的饲料一样大都存在从豆类获得的营养成分, 包括影响实验动物内分泌系统的植物雌激素, 这可能会影响内分泌干扰等生态毒理学研究的结果^[64~66]. 因此配制为生态毒理学研究的非洲爪蟾饵料时要特别注意不能掺入这些可能影响实验结果的成分. 除配制的饲料外, 动物肝脏、心脏和水蚤等小型水生生物也可分别作为蛙和蝌蚪的饵料. 因为国内还没有非洲爪蟾的商品饲料出售, 而国外的商品饵料的价格又普遍较高, 所以国内几个

实验室都在用猪肝喂蛙. 猪肝价格便宜, 容易获得, 操作也简便. 成蛙一周喂两次猪肝, 喂完几个小时后换水. 但是目前猪饲料中普遍添加激素、抗生素等类物质, 猪肝富集的这些物质可能会影响生物学和毒理学研究(尤其是内分泌相关的研究)的结果. 所以在国内开发非洲爪蟾的商品饵料是必要的. 与配制饵料相比活饵料有不污染水质的优点, 所以国内有的实验室在用野外采集的水蚤喂蝌蚪. 我们也曾用这种水蚤喂过蝌蚪. 但是水蚤一般生活在富营养的污水中, 可能存在多种污染物的污染. 这样的食物作为实验动物的饵料显然是不合适的. 当了解到目前世界上有 85% 以上的水产养殖动物的育苗都以丰年虫幼虫为饵料时, 我们开始尝试用这种活饵料喂蝌蚪. 丰年虫幼虫有大量的卵黄, 含有丰富的蛋白质和脂肪. 一年的喂养试验显示, 食用丰年虫幼虫的蝌蚪能够正常地生长, 但睾丸的发育却被明显抑制, 这表明丰年虫幼虫中存在某些影响睾丸发育的污染物(图 1). 于是我们考查了丰年虫的产地, 发现目前市售的丰年虫多来自沿海盐田, 这些地方的染污一般比较严重, 我们第一次使用的丰年虫就来自渤海湾, 肯定存在某些污染物的污染. 现在我们又选择了一种俄罗斯内陆盐湖的产品, 经分析发现该产品中不存在常见的几种染污物. 喂养试验也表明该产品能够满足蝌蚪正常生长发育的需要. 所以这种丰年虫有希望成为培养非洲爪蟾蝌蚪的理想饵料.

除水和食物等可能会对非洲爪蟾造成背景污染的环节, 饲养空间、饲养密度、生活背景等因素也会对非洲爪蟾的生长发育有一定的影响, 最终可能影响到生态毒理学研究的结果. 实际目前对某些问题的研究, 不同实验室间已出现了相反的结果.

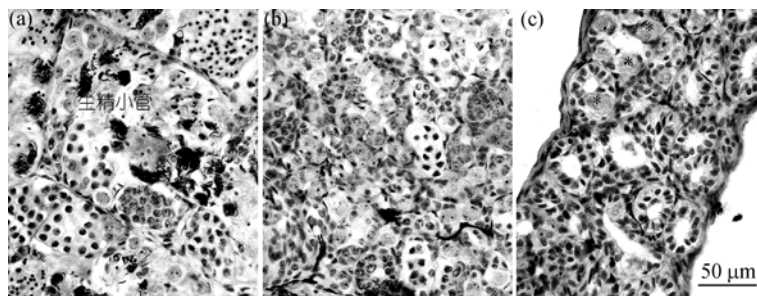


图 1 变态 6 个月时非洲爪蟾睾丸的组织学结构

(a) 正常睾丸的组织学结构, 由发育良好的生精小管组成, 包含晚期的生精细胞和精子; (b), (c) 食用污染的丰年虫幼虫导致的非洲爪蟾睾丸发育迟缓, 只有早期的生精细胞没有精子, 也没有形成明显的生精小管(b), 或仅有大量体细胞和少量的精原细胞(*), 无发育中的生精细胞(c)

果^[45,58,67,68]。这就提示非洲爪蟾像生态毒理学研究中其他的模型动物一样,其质量控制对实验结果的科学性非常重要。但是非洲爪蟾的质量控制并不是件容易的事,需要相关的科学家做出大量的努力。

4 展望

随着非洲爪蟾生物学研究的不断进展,所积累的有关生长发育的信息及新的研究思想和方法,将为非洲爪蟾生态毒理学的研究提供更大的空间;同时,由于毒理学研究的参与,非洲爪蟾的生物学研究会因为有了正常与异常的对照而多出一条揭示生物学问题的途径。

致谢 本工作为国家自然科学基金(批准号:20377044,20437020)、国家高技术研究发展计划(批准号:2003AA646010)和国家重点基础研究发展规划(批准号:2003CB415005)资助项目。

参 考 文 献

- Pesch B, Bruning T, Frentzel-Beyme R, et al. Challenges to environmental toxicology and epidemiology: where do we stand and which way do we go? *Toxicol Lett*, 2004, 151(1): 255—266 [\[DOI\]](#)
- Neubert D. Reproductive toxicology: the science today. *Teratog Carcinog Mutagen*, 2002, 22(3): 159—174 [\[DOI\]](#)
- Colborn T. Endocrine disruption overview: are males at risk? *Adv Exp Med Biol*, 2004, 545: 189—201
- Hoyer P B. Reproductive toxicology: current and future directions. *Biochem Pharmacol*, 2001, 62(12): 1557—1564 [\[DOI\]](#)
- Chapman P M. Integrating toxicology and ecology: putting the "eco" into ecotoxicology. *Mar Pollut Bull*, 2002, 44(1): 7—15 [\[DOI\]](#)
- Boudou A, Ribeyre F. Aquatic ecotoxicology: from the ecosystem to the cellular and molecular levels. *Environ Health Perspect*, 1997, 105(Suppl 1): 21—35
- Nieuwkoop P D, Faber J. Normal Table of *Xenopus laevis* (Daudin). Amsterdam: North-Holland, 1956
- Philpott A, Yew P R. The *Xenopus* cell cycle: an overview. *Methods Mol Biol*, 2005, 296: 95—112
- Bement W M, Sokac A M, Mandato C A. Four-dimensional imaging of cytoskeletal dynamics in *Xenopus* oocytes and eggs. *Differentiation*, 2003, 71(9-10): 518—527 [\[DOI\]](#)
- Mandato C A, Bement W M. Actomyosin transports microtubules and microtubules control actomyosin recruitment during *Xenopus* oocyte wound healing. *Curr Biol*, 2003, 13(13): 1096—1105 [\[DOI\]](#)
- Jessus C, Ozon R. How does *Xenopus* oocyte acquire its competence to undergo meiotic maturation? *Biol Cell*, 2004, 96(3): 187—192 [\[DOI\]](#)
- Martinez S E, Yuan L, Lacza C, et al. XGef mediates early CPEB phosphorylation during *Xenopus* oocyte meiotic maturation. *Mol Biol Cell*, 2005, 16(3): 1152—1164 [\[DOI\]](#)
- Sigel E, Minier F. The *Xenopus* oocyte: system for the study of functional expression and modulation of proteins. *Mol Nutr Food Res*, 2005, 49(3): 228—234 [\[DOI\]](#)
- Yang H, Zhou J, Ochs RL, et al. Down-regulation of RNA helicase II/Gu results in the depletion of 18 and 28 S rRNAs in *Xenopus* oocyte. *J Biol Chem*, 2003, 278(40): 38847—38859 [\[DOI\]](#)
- Yagi Y, Ogawara D, Iwai S, et al. DNA polymerases eta and kappa are responsible for error-free translesion DNA synthesis activity over a cis-syn thymine dimer in *Xenopus laevis* oocyte extracts. *DNA Repair (Amst)*, 2005, 4(11): 1252—1269 [\[DOI\]](#)
- Anantharam A, Lewis A, Panaghie G, et al. RNA interference reveals that endogenous *Xenopus* MinK-related peptides govern mammalian K⁺ channel function in oocyte expression studies. *J Biol Chem*, 2003, 278(14): 11739—11745 [\[DOI\]](#)
- Rauh N R, Schmidt A, Bormann J, et al. Calcium triggers exit from meiosis by targeting the APC/C inhibitor XErp1 for degradation. *Nature*, 2005, 437(7061): 1048—1052 [\[DOI\]](#)
- Brown D D. A tribute to the *Xenopus laevis* oocyte and egg. *J Biol Chem*, 2004, 279(44): 45291—45299 [\[DOI\]](#)
- Weaver C, Kimelman D. Move it or lose it: axis specification in *Xenopus*. *Development*, 2004, 131(15): 3491—3499 [\[DOI\]](#)
- Shook D R, Majer C, Keller R. Pattern and morphogenesis of presumptive superficial mesoderm in two closely related species, *Xenopus laevis* and *Xenopus tropicalis*. *Dev Biol*, 2004, 270(11): 163—185 [\[DOI\]](#)
- Lane M C, Sheets M D. Fate mapping hematopoietic lineages in the *Xenopus* embryo. *Methods Mol Med*, 2005, 105: 137—148
- Jones E A. *Xenopus*: a prince among models for pronephric kidney development. *J Am Soc Nephrol*, 2005, 16(2): 313—321 [\[DOI\]](#)
- Ikuzawa M, Shimizu K, Yasumasu S, et al. Thyroid hormone-induced expression of a bZip-containing transcription factor activates epithelial cell proliferation during *Xenopus* larval-to-adult intestinal remodeling. *Dev Genes Evol*, 2006, 216(3): 109—118 [\[DOI\]](#)
- De Robertis E M, Kuroda H. Dorsal-ventral patterning and neural induction in *Xenopus* embryos. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2004, 20: 285—308 [\[DOI\]](#)
- Johnston J, Chan R, Calderon-Segura M, et al. The roles of Bcl-xL in modulating apoptosis during development of *Xenopus laevis*. *BMC Dev Biol*, 2005, 5: 20 [\[DOI\]](#)
- Marin M L, Tobias M L, Kelley D B. Hormone-sensitive stages in the sexual differentiation of laryngeal muscle fiber number in *Xenopus laevis*. *Development*, 1990, 110(3): 703—711
- Hu Z, Lelievre V, Tam J, et al. Molecular cloning of growth hormone-releasing hormone/pituitary adenyl cyclase-activating polypeptide in the frog *Xenopus laevis*: brain distribution and regulation after castration. *Endocrinology*, 2000, 141(9): 3366—3376 [\[DOI\]](#)
- Slack J M, Beck C W, Gargioli C, et al. Cellular and molecular mechanisms of regeneration in *Xenopus*. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 2004, 359(1445): 745—751 [\[DOI\]](#)
- Gargioli C, Slack J M. Cell lineage tracing during *Xenopus* tail regeneration. *Development*, 2004, 131(11): 2669—2679 [\[DOI\]](#)
- Aamar E, Frank D. *Xenopus* Meis3 protein forms a hind-brain-inducing center by activating FGF/MAP kinase and PCP pathways. *Development*, 2004, 131(1): 153—163 [\[DOI\]](#)
- Miyata S, Kubo T. In vitro effects of estradiol and aromatase inhibitor treatment on sex differentiation in *Xenopus laevis* gonads. *Gen Comp Endocrinol*, 2000, 119(1): 105—110 [\[DOI\]](#)
- Mitsui N, Tooi O, Kawahara A. Sandwich ELISAs for quantification of *Xenopus laevis* vitellogenin and albumin and their application to measurement of estradiol-17 beta effects on whole animals and primary-cultured hepatocytes. *Comp Biochem Physiol C*

- Toxicol Pharmacol, 2003, 135C(3): 305—313 [\[DOI\]](#)
- 33 Okuda T, Haga T. Functional characterization of the human high-affinity choline transporter. FEBS Lett, 2000, 484(2): 92—97 [\[DOI\]](#)
- 34 Gu S, Adan-Rice D, Leach R J, et al. A novel human amino acid transporter, hNAT3: cDNA cloning, chromosomal mapping, genomic structure, expression, and functional characterization. Genomics, 2001, 74(3): 262—272 [\[DOI\]](#)
- 35 Grammer T C, Liu K J, Mariani F V, et al. Use of large-scale expression cloning screens in the *Xenopus laevis* tadpole to identify gene function. Dev Biol, 2000, 228(2): 197—210 [\[DOI\]](#)
- 36 Voigt J, Chen J A, Gilchrist M, et al. Expression cloning screening of a unique and full-length set of cDNA clones is an efficient method for identifying genes involved in *Xenopus* neurogenesis. Mech Dev, 2005, 122(3): 289—306 [\[DOI\]](#)
- 37 Sower S A, Reed K L, Babbitt K J. Limb malformations and abnormal sex hormone concentrations in frogs. Environ Health Perspect, 2000, 108(11): 1085—1090
- 38 Burkhart J G, Ankley G, Bell H, et al. Strategies for assessing the implications of malformed frogs for environmental health. Environ Health Perspect, 2000, 108(11): 83—90
- 39 van der Schalie W H, Gardner Jr H S, Bantle J A, et al. Animals as sentinels of human health hazards of environmental chemicals. Environ Health Perspect, 1999, 107(4): 309—315
- 40 ASTM (American Society for Testing and Materials). Standard Guide for Conducting the Frog Embryo Teratogenesis Assay—*Xenopus* (FETAX). ASTM E1439—98. In: Annual Book of ASTM Standards, Philadelphia, 1998
- 41 Hayes T B. Sex determination and primary sex differentiation in amphibians: genetic developmental mechanisms. J Exp Zool, 1998, 281(5): 373—399 [\[DOI\]](#)
- 42 Gallien L. Intersexuality. In: Loft B, ed. Physiology of the Amphibia (Volume). New York and London: Academic Press, 1974. 523—527
- 43 Villalpando I, Merchant-Larios H. Determination of the sensitive stage for gonadal sex-reversal in *Xenopus laevis* tadpoles. Int Dev Biol, 1990, 34: 281—285
- 44 Kloas W, Lutz I, Einspanier R. Amphibians as a model to study endocrine disruptors: . Estrogenic activity of environmental chemicals in vitro and in vivo. Sci Total Environ, 1999, 225(1~2): 59—68 [\[DOI\]](#)
- 45 Hayes T B, Collins A, Lee M, et al. Hermaphroditic, demasculinized frogs after exposure to the herbicide atrazine at low ecologically relevant doses. Proc Natl Acad Sci, 2002, 99(8): 5476—5480 [\[DOI\]](#)
- 46 Qin Z F, Zhou J M, Chu S G, et al. Effects of Chinese domestic polychlorinated biphenyls (PCBs) on gonadal differentiation in *Xenopus Laevis*. Environ Health Perspect, 2003, 111(4): 553—556
- 47 Qin Z F, Zhou J M, Cong L, et al. Potential ecotoxic effects of polychlorinated biphenyls on *Xenopus Laevis*. Environ Toxicol Chem, 2005, 24(10): 2573—2578 [\[DOI\]](#)
- 48 Etkin W. How a tadpole becomes a frog. Sci Am, 1966, 214(5): 76—88
- 49 Galton V A. Role of thyroid hormones in amphibians metamorphosis. TEM, 1992, 3: 96
- 50 Freeman J L, Beccue N, Rayburn A L. Differential metamorphosis alters the endocrine response in anuran larvae exposed to T3 and atrazine. Aquat Toxicol, 2005, 75(3): 263—276
- 51 Zhang F, Degitz S J, Holcombe G W, et al. Evaluation of gene expression endpoints in the context of a *Xenopus laevis* metamorphosis-based bioassay to detect thyroid hormone disruptors. Aquat Toxicol, 2006, 76(1): 24—36 [\[DOI\]](#)
- 52 Wake D B. Declining amphibian populations. Science, 1991, 253(5022): 860
- 53 Blaustein A R, Wake D B. The puzzle of declining amphibian populations. Sci Am, 1995, 272: 52—57
- 54 Loeffler I K, Srocum D L, Fallon J F, et al. Leaping lopsided: a review of the current hypotheses regarding etiologies of limb malformations in frogs. Anat Rec, 2001, 265(5): 228—245 [\[DOI\]](#)
- 55 Srocum D L. Frog limb deformities: an “Eco-devo” riddle wrapped in multiple hypotheses surrounded by insufficient data. Teratology, 2000, 62(3): 147—150 [\[DOI\]](#)
- 56 Lutz I, Kloas W. Amphibians as a model to study endocrine disruptors: . Environmental pollution and estrogen receptor binding. Sci Total Environ, 1999, 225(1~2): 49—57 [\[DOI\]](#)
- 57 Hayes T B, Haston K, Tsui M, et al. Atrazine-induced hermaphroditism at 0.1ppb in American Leopard frogs (*Rana pipens*): laboratory and field evidence. Environ Health Perspect, 2003, 111(4): 568—575
- 58 Hecker M, Kim W J, Park J W, et al. Plasma concentrations of estradiol and testosterone, gonadal aromatase activity and ultrastructure of the testis in *Xenopus laevis* exposed to estradiol or atrazine. Aquat Toxicol, 2005, 72(4): 383—396 [\[DOI\]](#)
- 59 Jooste A M, Du Preez L H, Carr J A, et al. Gonadal development of larval male *Xenopus laevis* exposed to atrazine in outdoor microcosms. Environ Sci Technol, 2005, 39(14): 5255—5261 [\[DOI\]](#)
- 60 Fort D J, Stover E L, Propst T L, et al. Evaluation of the developmental toxicity of caffeine and caffeine metabolites using the frog embryo teratogenesis assay—*Xenopus* (FETAX). Food Chem Toxicol, 1998, 36(7): 591—600 [\[DOI\]](#)
- 61 Fort D J, Rogers R L, Paul R R, et al. Effects of pond water, sediment and sediment extract samples from New Hampshire, USA on early *Xenopus* development and metamorphosis: comparison to native species. J Appl Toxicol, 2001, 21(3): 199—209 [\[DOI\]](#)
- 62 Fort D J, McLaughlin D W, Rogers R L, et al. Evaluation of the developmental toxicities of ethanol, acetaldehyde, and thioacetamide using FETAX. Drug Chem Toxicol, 2003, 26(1): 23—34 [\[DOI\]](#)
- 63 Fort D J, Rogers R L, Thomas J H, et al. Comparative sensitivity of *Xenopus tropicalis* and *Xenopus laevis* as test species for the FETAX model. J Appl Toxicol, 2004, 24(6): 443—457 [\[DOI\]](#)
- 64 Odum J, Tinwell H, Jones K, et al. Effect of rodent diets on the sexual development of the rat. Toxicol Sci, 2001, 61(1): 115—127 [\[DOI\]](#)
- 65 Stroheker T, Cabaton N, Berges R, et al. Influence of dietary soy isoflavones on the accessory sex organs of the Wistar rat. Food Chem Toxicol, 2003, 41(8): 1175—1183 [\[DOI\]](#)
- 66 Thigpen J E, Setchell K D, Saunders H E, et al. Selecting the appropriate rodent diet for endocrine disruptor research and testing studies. ILAR J, 2004, 45(4): 401—416
- 67 Pickford D B, Hetheridge M J, Caunter J E, et al. Assessing chronic toxicity of bisphenol A to larvae of the African clawed frog (*Xenopus laevis*) in a flow-through exposure system. Chemosphere, 2003, 53(3): 223—235 [\[DOI\]](#)
- 68 Levy G, Lutz I, Kruger A, et al. Bisphenol A induces feminization in *Xenopus laevis* tadpoles. Environ Res, 2004, 94(1): 102—111 [\[DOI\]](#)

(2005-12-01 收稿, 2006-03-07 接受)