

应用斑马鱼模型评价纳米粒子毒性机制的研究进展

陈亨宇^{1,2}, 付爱玲¹, 赵宝全²

(1. 西南大学药学院, 重庆 400715; 2. 军事医学科学院毒物药物研究所军事毒理学研究室, 北京 100850)

摘要: 纳米科学是 21 世纪重点支柱领域之一。目前纳米粒子的生物安全性体外实验已取得了一些研究成果,但其体内安全性评价,由于受到限制而进展缓慢。而斑马鱼是纳米粒子体内生物安全性评价的最佳模式生物。本文就目前国内外开展的纳米粒子体内毒理学研究方法和成果以及以斑马鱼作为模式生物研究纳米粒子体内毒性机制的优势进行了综述。

关键词: 纳米粒子; 毒理学; 斑马鱼

中图分类号: R99 **文献标志码:** A **文章编号:** 1000-3002(2012)02-0251-04

DOI: 10.3867/j.issn.1000-3002.2012.02.023

纳米材料是指在三维空间中至少有一维处于纳米尺度范围(1~100nm)或由它们作为基本单元构成的材料,大约相当于 10 个氢原子紧密排列在一起的直线长度。随着纳米科学的发展,越来越容易接触到纳米材料,因而其生物安全性问题也越来越受到重视^[1]。纳米级别的物质,由于其具有极小的尺寸、巨大的比表面积、具有量子尺寸效应和宏观量子隧道效应和易于积聚等诸多特点,其可能产生的毒性作用以及生理学响应等都与相同化学成分的非纳米材料之间具有极大的不同。纳米材料的纳米结构特性对生物体是否产生影响目前还缺乏有力的证据^[2]。因此,纳米毒理学应该从纳米结构特性尤其是其物理和化学特性以及其对生物整体系统的作用之间的联系入手。近年来,很多研究成果都是在细胞培养的基础上进行体外实验得出的,都需要进行体内实验行进一步证明,否则可能会对后续研究产生误导。纳米材料对于生物是一种异物,可引起机体一系列反应如对异物的免疫应答等^[3]。然而,目前动物体内实验的手段很少,比较成熟的只有亚慢性吸入毒性实验、呼吸道滴注染毒实验和暴露实验等^[4],不能满足进行多方面动物体内实验的要求。因此,加快纳米粒子体内毒理学的研究,建立系统完善的纳米粒子体内毒理学研究方法,是纳米毒理学亟待解决的问题和挑战。最近出现的斑马鱼动物模型,在纳米毒理研究方面展示了许多。

1 纳米粒子毒性

纳米粒子毒性实验大多处于描述性实验阶段,只有肺毒性机制是目前研究得较为全面和系统的领域。不过肯定的是,纳米材料在生物体内毒性作用及其可能机制,与纳米材料的化学成分和其进入生物体内后产生毒性作用的部位都有着密切的关联^[5]。

吸入是纳米粒子进入体内最可能的途径之一^[6-7],因此对于纳米粒子肺毒性的研究引起了重点关注。目前通过采

用呼吸道滴注染毒或亚慢性吸入,已经建立了比较完善的纳米粒子肺毒性体内实验方法。Lam 等^[8]采用支气管滴注染毒对单壁碳纳米管的毒性进行了比较,小鼠血清中浓度达到 10 mg·L⁻¹时,部分小鼠死亡,且未死亡小鼠也出现了明显的肺部中毒现象,出现间隙性肉芽肿。此外,对其他纳米粒子如二氧化钛纳米粒子^[9]等的肺毒性研究也观察到了类似的现象,并通过对比实验证明,纳米材料的吸入毒性与其组成颗粒的粒径大小有着密切关系,纳米材料粒径越小,比表面积越大,其毒性越强。这可能是由于随着纳米颗粒比表面积增大,纳米颗粒的表面结合能和化学活性显著增强,与机体内源物质发生生化反应的速率也就越高^[10]。初步揭示了纳米粒子产生肺毒性的机制。

纳米粒子致肺毒性的机制,主要与氧化负荷、活性氧(reactive oxygen species, ROS)以及纳米粒子的沉积能力有关^[5]。

氧化负荷一直都是微粒造成肺损伤的主要原因之一。氧化负荷的产生与不稳定活性自由基的形成有直接联系。自由基可以造成一系列的连锁反应可能导致破坏性的氧化作用。当哺乳动物体内受到异物入侵时,其中性粒细胞、单核细胞和巨噬细胞都可能在防御的同时产生毒性氧自由基,并在通过细胞膜释放到周围组织中去的同时产生应激氧化反应,导致细胞膜脂质层断裂,引起细胞凋亡^[6]。ROS 的产生与纳米粒子的比表面积、粒子尺度和化学特性等粒子性质具有更为密切的联系。其产生机制主要是受到激发光或其他因素刺激影响。大部分纳米粒子如碳纳米管、量子点、富勒烯等都能产生 ROS,可能造成生物体组织及细胞损伤。MacNee 等^[11]报道,碳黑微粒及其他一些纳米粒子能够在其表面释放出活性氧自由基,并对细胞产生氧化应激,因而可能导致炎症的产生。纳米粒子在肺组织中的沉积能力与粒子的尺度具有密切联系。这主要是通过其沉降和扩散等作用在肺组织里沉积下来,从而对肺组织及细胞产生长期的毒性影响。此外,也有文献报道,树枝状 TiO₂ 粒子比纺锤状和球状 TiO₂ 粒子对巨噬细胞产生了更高的细胞毒性水平,因此认为纳米粒子的形状也能对纳米粒子的毒性产生影响^[12],这可能也是因为不同形状的粒子的沉积能力不同所造成的。

纳米粒子的化学组成如重金属离子等已经被证明具有毒性,也可能在生物体内通过与一些内源物质相互作用而释放出来,造成与该化学成分相似的毒性影响^[2]。

作者简介: 陈亨宇(1985-),硕士研究生,主要从事药理学研究; E-mail: pittsburgh1985@126.com, Tel: (010)66874609; 赵宝全(1967-),副研究员,博士,主要从事生化药理学研究。

通讯作者: 赵宝全, E-mail: baoquan9838@sina.com, Tel: (010)66874609

2 纳米粒子生物体内毒性实验研究常用方法

纳米粒子经肺染毒是目前研究最多的一个领域,其方法已有很多报道,其中,呼吸道滴注染毒法对纳米粒子肺毒性的研究因其操作简便,定量容易的特点^[13]而应用最多。Muller 等^[14]采用呼吸道滴注染毒方式,将单壁碳纳米管和碎纳米管分别注入 SD 大鼠肺中,发现两者均对大鼠肺部组织造成纤维化反应和炎症反应,并且 60 d 后仍大量留存于肺部组织中,且导致支气管腔形成富胶原质的肉芽肿大,并伴随周围组织出现肺炎。这是由于碳纳米管在空气中积聚成块并滞留于肺组织中导致的。Afaq 等^[15]采用同样的给药方式,研究对 TiO₂ 纳米粒子对大鼠肺部组织所造成毒性影响,发现在纳米粒子侵入大鼠肺部后,虽然引起巨噬细胞增多,谷胱甘肽过氧化酶和还原酶等抗氧化酶活性增加,但并未完全消除纳米粒子的毒性影响,大鼠肺部组织仍然出现炎症反应。还有吸入染毒法,包括常规吸入染毒法和咽部吸入染毒法。常规吸入染毒法通常是采用染毒中毒柜将动物鼻部暴露于柜内气体中染毒。咽部吸入染毒法则是将动物舌部固定,并将含纳米粒子的缓冲液置于其舌后部直至其完全自动挥发进入空气中散开。Johnston 等^[16]通过此方法使烟形态的聚四氟乙烯颗粒进入 SD 大鼠肺部组织,在粒子浓度达到 50 μg·m⁻³时,15 min 大鼠即会出现急性中毒症状。当聚四氟乙烯在氩气里刚被制备出来时,颗粒是独立存在的,暴露于这样的粒子中并不会出现中毒症状。在空气中制造出的气相聚四氟乙烯同样不具有毒性。只有当颗粒以气溶胶形式存在时,才会造成很高的肺毒性。Shvedova 等^[17]也通过咽部吸入法使单壁碳纳米管粒子进入小鼠肺部,并观察到 1~3 d 小鼠肺部出现炎症反应,并伴有肉芽肿,并具有剂量依赖性。此 2 种方法由于气溶胶制备困难^[18],难以确定纳米粒子进入体内(肺部及血液)的时间和剂量,长时间固定及给药可能产生物理损伤,动物安全问题等缺点,因此成果也很少。但由于相比呼吸道滴注染毒法,两者进入到肺部时的微粒形态有很大差别,水悬液遵循液体动力学而气溶胶遵循气体动力学,因而其到肺部组织的深度及部位都有可能不同,因此对于肺部的毒性作用可能会产生很大的差别,而在日常生活中,可能由呼吸系统接触到的纳米粒子通常是第二种形态,因此,需要更多的研究来证明此形态的纳米粒子对肺部产生毒性的作用机制和作用结果。

关于纳米粒子由其他途径,如胃肠道、血管注射和皮肤等进入生物体,特别是哺乳动物体内,造成其他内脏器官损伤的研究目前相对较少。

暴露是常用的研究纳米材料毒性的方法之一,对象为水生生物(包括水生动植物如水蚤、水稻等)及细菌。通常直接给药后在固定时间内观察取样,简便直接。Lin 等^[19]用透射电镜观察了植物的叶片细胞能够吸收 C70 粒子,进入细胞中的 C70 粒子会聚集成小团并留存在细胞壁和液泡中,并在透射电镜图像中呈暗层结构。而对于纳米粒子对陆生哺乳动物通过皮肤接触产生毒性还鲜有开展,仅较常用于致敏实验^[5],这可能与此途径染毒毒性并不明显有关。目前不能确定纳米粒子能否通过此途径进入哺乳动物体内^[20]。

胃肠道和血管注射给药更多用于纳米粒子作为药物载体,对于靶向性,穿透性,运载能力等研究较多,而对于毒理方面的成果较少。其方法与常规毒理方法基本一致。

各种碳纳米粒子,包括碳纳米管、石墨单原子层等,因其不含重金属成分等毒性物质,而成为目前生物传感器、药物运输及分子成像等多方面的研究重点。Yang 等^[21]在对聚乙二醇(PEG)修饰剂修饰的碘(¹²⁵I)标石墨氮原子层纳米材料的分布、药代动力学、毒性等研究表明,静脉注射给予小鼠后,主要短期存在于肝等的网状内皮组织中,且在血液和组织等均发现明显毒性,因此其在生物医学有广阔应用前景。Yamago 等^[22]将水溶性吡咯碳粒子 ig 给予大鼠,发现消化道吸收效率很低,大部分都随粪便排出体外。而采用静脉注射,吡咯碳粒子能迅速分布,甚至能穿越血脑屏障并长期留存。还发现,其可能造成急性毒性很低,但其难以被排出体外可能是其造成较严重的慢性毒性的原因。Kolosnjaj-Tabi 等^[23]将高浓度的单壁碳纳米管粒子 ig 给予小鼠,同样未发现死亡及生长和行为障碍。而 ip 给药,粒子能在体内结合成纤维状结构并在其聚集程度达到一定量后导致肉芽肿的形成,其在细胞中的留存时间也超过了 5 个月。这表明了粒子聚集程度对其毒性具有决定性影响。

系统研究纳米粒子由非呼吸道吸入进入生物体造成的毒性及机制,建立完善的实验方法,是进一步开展的方向。

3 一种纳米毒理学研究的新方法——斑马鱼模型

斑马鱼(zebrafish)是重要的模式脊椎动物。其成鱼个体小,适合高密度养殖,3 个月即可性成熟,卵生且排卵量大,一次可排卵数百粒,胚胎发育迅速,适应性较强,易于养殖,因此斑马鱼作为实验模式生物,可以获得大量样本,减少误差,同时能大幅度缩短实验周期。斑马鱼胚胎体外受精发育,其胚胎以及幼生期(约 20 日龄内)均完全或部分透明,很容易在活体状态下分析和观察器官和组织变化^[24]而不需要病理切片,且能通过渗透作用吸收小分子药物^[25]。此外,近年来斑马鱼基因组学发展迅速,已知的 30 000 余基因已被证实与人类相似度高达 87%^[26],在对其进行的大规模遗传筛选中得到的许多突变显现与人类疾病相似的表型,同时许多斑马鱼基因与哺乳动物同源,其中很多基因已经被克隆并被发现两者功能相似,这表明斑马鱼是一种优良的人类疾病模型。

斑马鱼在毒理学研究中应用广泛,特别是其可以对水体污染物做出相应的行为反应,对水质污染与毒性物质反应灵敏,因此被广泛用于水质监测,甚至目前有些国家已经制定了用斑马鱼检测水质毒性的标准,如我国的 GB/T 13267-91《水质物质对淡水鱼(斑马鱼)急性毒性测定方法》适用于水中单一化学物质以及工业废水的毒性测定^[27]。

斑马鱼进行毒性和毒理研究有了初步进展。常用的是 4 日龄毒性分析模型。即从受精卵发育开始 4 d 内,包括胚胎和孵化等发育阶段,在各不同阶段考察毒性成分对斑马鱼形态学、生理学和行为学等多方面所造成的影响,并对各方面的毒性终点进行选择 and 量化^[28]。采用从受精卵发育开始 4 d 内斑马鱼进行实验,除了其优点外,还因为不同物种的脊椎动物在早期发育阶段具有很强的相似性,且其在这一阶段对于外来化学物质的影响能够产生更灵敏的反应^[24]。

利用斑马鱼发育周期短,数量大和对毒性物质反应灵敏的特点,Zhu 等^[29]采用暴露法使斑马鱼胚胎染毒,考察了氧化锌、二氧化钛和氧化铝纳米粒子水悬液对斑马鱼的发育毒性影响,其纳米粒子在水悬液平均粒径为 180、230 和 930

nm, 并将其与普通材料做比较, 显示氧化锌纳米材料与其非纳米材料水悬液均延迟斑马鱼胚胎以及幼鱼发育, 降低其存活量和孵化率, 并造成了组织伤害。斑马鱼幼鱼暴露于氧化锌纳米材料与其非纳米材料水悬液中, 均产生严重的组织溃瘍。另 2 种则不明显。这可能与胚胎膜的保护作用有关。而与肺毒性不同的是, 斑马鱼胚胎及幼鱼暴露于氧化锌、二氧化钛和氧化铝纳米材料所产生的毒性反应与暴露于其对应的非纳米材料并无不同。这表明其毒性可能是由于释放到水中的金属离子引起的而与纳米结构无关。这是最早关于金属纳米粒子发育毒性的报道, 为后续的研究^[30]提供了重要的参考资料。

Ispas 等^[31]选用镍纳米粒子 30, 60 和 100 nm 与聚集成树枝状的 60 nm 镍纳米粒子作比较时发现, 树枝状纳米粒子具有明显的毒性, 而非聚集成树枝状纳米粒子则不具有明显毒性, 这证明粒子形状能够对纳米粒子的毒性产生重要影响。而非树枝状纳米粒子也检测到有部分崩解, 其轻微毒性可能也是由此而引起。对于形状不同造成的毒性差别, 可能主要是树枝状粒子更容易被吸附在肠道中而形成聚集所造成的。

Griffitt 等^[32]将斑马鱼置于可溶解铜和 80 nm 铜纳米粒子水悬液中, 发现会对斑马鱼的鳃部造成损伤, 并造成急性毒性。其 48 h 的 LC_{50} 为 $1.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。其中, 斑马鱼的鳃部是纳米铜粒子造成损害的首要器官, 主要损伤包括形态学影响以及基因表达的影响, 其机制目前尚不清楚。

斑马鱼胚胎完全透明, 可实时监控, Bar-Ilan^[33]等对胶态金纳米粒子和银纳米粒子 3, 10, 50 和 100 nm 对斑马鱼胚胎所造成的毒性影响进行了评价, 两者均对斑马鱼胚胎造成了很高的死亡率且同种粒子由于粒径不同而造成的毒性差异不明显, 其中银纳米粒子 120 h 后致死率几乎达到 100%, 而使用与金纳米粒子最小亚致死量相同剂量的银纳米粒子处理斑马鱼胚胎, 只会造成各种形态学畸形。此外, 两者在斑马鱼体内具有明显不同的毒性分布, 这揭示了纳米粒子毒性机制的多样性和复杂性以及纳米粒子化学的重要影响。

King-Heiden 等^[34]利用斑马鱼模型廉价快速、易于分辨毒性特征的特点, 选用以 CdSe 为核, 外包 ZnS 外壳并特殊处理的量子点制成水悬液, 然后将斑马鱼胚胎置于其中, 发现量子点的水悬液稳定性及毒性影响很大程度上均受到其外壳的影响, 而其毒性特征并未强烈表现出与 Cd 毒性相同, 表明量子点在生物体内难以被降解分离, 其毒性可能是其纳米材料的特性或者外壳的化学成分引起的而非金属离子的释放所造成的。其纳米材料的特性所引起的毒性反应主要还是在生物体内产生 ROS 从而产生氧化压力, 造成细胞损伤。将斑马鱼同时暴露于纳米粒子与还原性谷胱甘肽混合溶液中时, 产生了不同的毒性反应, 证明了氧化应激对于纳米材料毒性的影响, 但是结果并不稳定。Usenko 等^[24]也认为氧化应激是吡咯碳纳米粒子造成细胞损伤的主要机制。

总之, 目前纳米粒子对斑马鱼产生毒性的机制研究表明, 纳米粒子崩解或释放出的毒性化学物质以及 ROS 产生的氧化应激是最可能的导致毒性的原因。

除暴露法之外, 目前尚未发现其他方法考察纳米粒子对斑马鱼的毒性的文献, 也未发现纳米粒子对斑马鱼发育毒性之外的其他毒性的文献, 这都还有待于进一步研究, 如可利用其生长期短, 排卵量大等特点研究其生殖毒性。

4 展望

纳米粒子材料作为一类全新概念的新型材料, 具有许多独有特性, 已广泛应用于许多领域。然而, 纳米粒子生物安全性的研究仍然停留在细胞实验以及描述性实验的阶段, 对于其体内生物毒性以及其机制的研究仍然甚少。在未来研究中, 应该建立一套能全面、合理和系统的评价纳米粒子材料尺寸、形状、表面化学及其生物体内分布的相关性以及其致毒性机制的体内实验方法, 以便能全面分析纳米结构独特的物理性质对生物体所产生的影响, 从而进一步研究减少其对生物体所可能造成的伤害。而斑马鱼作为一种优秀的模型动物, 能够迅速敏捷地检测纳米粒子对生物体产生的毒理作用, 在纳米毒理学研究领域必然会得到广泛应用。

参考文献:

- [1] Dhawan A, Sharma V. Toxicity assessment of nanomaterials: methods and challenges[J]. *Anal Bioanal Chem*, 2010, **398**(2):589-605.
- [2] Colvin VL. The potential environmental impact of engineered nanomaterials[J]. *Nat Biotechnol*, 2003, **21**(10):1166-1170.
- [3] Fischer HC, Chan WC. Nanotoxicity: the growing need for *in vivo* study[J]. *Curr Opin Biotechnol*, 2007, **18**(6):565-571.
- [4] Yang WJ, Shen CC, Zhang ZZ. Several approaches for toxicity assessment of nanomaterials[J]. *China Biotechnol* (中国生物工程杂志), 2009, **29**(2):119-124.
- [5] Zhang YG. *Nanotoxicology for safe use of nanomaterials* (纳米毒理学)[M]. Beijing: Peking Union Medical College Press, 2010.
- [6] Chen HQ, Wang B, Wang KQ. Study on toxic effect of nanomaterials on organisms[J]. *China Safety Sci J* (中国安全科学学报), 2010, **20**(1):106-111.
- [7] Maynard AD. Nanotechnology: assessing the risk[J]. *Nanotoday*, 2006, **1**(2):22-33.
- [8] Lam CW, James JT, McCluskey R, Hunter RL. Pulmonary toxicity of single-wall carbon nanotubes in mice 7 and 90 days after intratracheal instillation[J]. *Toxicol Sci*, 2004, **77**(1):126-134.
- [9] Oberdörster G, Ferin J, Lehnert BE. Correlation between particle size, *in vivo* particle persistence, and lung injury[J]. *Environ Health Perspect*, 1994, **102**(Suppl 5):173-179.
- [10] Oberdörster G, Finkelstein JN, Johnston C, Gelein R, Cox C, Baggs R, et al. Acute pulmonary effects of ultrafine particles in rats and mice[J]. *Res Rep Health Eff Inst*, 2000, (96):5-74, 75-86.
- [11] MacNee W, Donaldson K. Mechanism of lung injury caused by PM10 and ultrafine particles with special reference to COPD[J]. *Eur Respir J Suppl*, 2003, **40**:47s-51s.
- [12] Yamamoto A, Honma R, Sumita M, Hanawa T. Cytotoxicity evaluation of ceramic particles of different sizes and shapes[J]. *J Biomed Mater Res A*, 2004, **68**(2):244-256.
- [13] Zhang HS, Yang DF, Xi ZG, Yang H, Lin BC, Zhang W, et al. Evaluation of different dispersal liquid for nanoparticles[J]. *Chin J Public Health* (中国公共卫生), 2008, **24**(2):189-191.
- [14] Muller J, Huaux F, Moreau N, Misson P, Heilier JF, Delos M, et al. Respiratory toxicity of multi-wall carbon nanotubes[J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2005, **207**(3):221-231.
- [15] Afaq F, Abidi P, Matin R, Rahman Q. Cytotoxicity, pro-oxidant effects and antioxidant depletion in rat lung alveolar macrophages exposed to ultrafine titanium dioxide[J]. *J Appl Toxicol*, 1998, **18**(5):307-312.

- [16] Johnston CJ, Finkelstein JN, Mercer P, Corson N, Gelein R, Oberdörster G. Pulmonary effects induced by ultrafine PTFE particles[J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2000, **168**(3):208-215.
- [17] Shvedova AA, Castranova V, Kisin ER, Schwegler-Berry D, Murray AR, Gandelsman VZ, et al. Exposure to carbon nanotube material: assessment of nanotube cytotoxicity using human keratinocyte cells[J]. *J Toxicol Environ Health A*, 2003, **66**(20):1909-1926.
- [18] Wong BA. Inhalation exposure systems; design, methods and operation[J]. *Toxicol Pathol*, 2007, **35**(1):3-14.
- [19] Lin S, Reppert J, Hu Q, Hudson JS, Reid ML, Ratnikova TA, et al. Uptake, translocation, and transmission of carbon nanomaterials in rice plants[J]. *Small*, 2009, **5**(10):1128-1132.
- [20] Schulz J, Hohenberg H, Pflücker F, Gärtner E, Will T, Pfeiffer S, et al. Distribution of sunscreens on skin[J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2002, **54**(Suppl 1):S157-S163.
- [21] Yang K, Wan J, Zhang S, Zhang Y, Lee ST, Liu Z. *In vivo* pharmacokinetics, long-term biodistribution, and toxicology of PEGylated graphene in mice[J]. *ACS Nano*, 2011, **5**(1):516-522.
- [22] Yamago S, Tokuyama H, Nakamura E, Kikuchi K, Kananishi S, Sueki K, et al. *In vivo* biological behavior of a water-miscible fullerene; ¹⁴C labeling, absorption, distribution, excretion and acute toxicity[J]. *Chem Biol*, 1995, **2**(6):385-389.
- [23] Kolosnjaj-Tabi J, Hartman KB, Boudjemaa S, Ananta JS, Morgant G, Szwarc H, et al. *In vivo* behavior of large doses of ultra-short and full-length single-walled carbon nanotubes after oral and intraperitoneal administration to Swiss mice [J]. *ACS Nano*, 2010, **4**(3):1481-1492.
- [24] Usenko CY, Harper SL, Tanguay RL. *In vivo* evaluation of carbon fullerene toxicity using embryonic zebrafish[J]. *Carbon NY*, 2007, **45**(9):1891-1898.
- [25] Beliaeva NF, Kashirtseva VN, Medvedeva NV, Khudoklinova Iu-Iu, Ipatova OM, Archakov AI. Zebrafish as a model organism for biomedical studies[J]. *Biomed Khim*, 2010, **56**(1):120-131.
- [26] Wu SJ, Wu CY, Shan C, Wang AR, Wang ZH. Bioinformatic analysis of angiotensin converting enzyme in Damio reio[J]. *Fujian J Agricultural Sci*(福建农业学报), 2009, **43**(3):205-211.
- [27] Liang AH. Zebrafish — Useful model for pharmacodynamics and toxicity screening of traditional Chinese medicine[J]. *China J Chin Mater Med*(中国中药杂志), 2009, **34**(22):2839-2842.
- [28] Fraysse B, Mons R, Garric J. Development of a zebrafish 4-day embryo-larval bioassay to assess toxicity of chemicals[J]. *Ecotoxicol Environ Saf*, 2006, **63**(2):253-267.
- [29] Zhu X, Zhu L, Duan Z, Qi R, Li Y, Lang Y. Comparative toxicity of several metal oxide nanoparticle aqueous suspensions to Zebrafish (*Danio rerio*) early developmental stage[J]. *J Environ Sci Health A Tox Hazard Subst Environ Eng*, 2008, **43**(3):278-284.
- [30] Zhu X, Wang J, Zhang X, Chang Y, Chen Y. The impact of ZnO nanoparticle aggregates on the embryonic development of zebrafish (*Danio rerio*)[J]. *Nanotechnology*, 2009, **20**(19):195103.
- [31] Ispas C, Andreescu D, Patel A, Goia DV, Andreescu S, Wallace KN. Toxicity and developmental defects of different sizes and shape nickel nanoparticles in zebrafish[J]. *Environ Sci Technol*, 2009, **43**(16):6349-6356.
- [32] Griffitt RJ, Weil R, Hyndman KA, Denslow ND, Powers K, Taylor D, et al. Exposure to copper nanoparticles causes gill injury and acute lethality in zebrafish (*Danio rerio*)[J]. *Environ Sci Technol*, 2007, **41**(23):8178-8186.
- [33] Bar-Ilan O, Albrecht RM, Fako VE, Furgeson DY. Toxicity assessments of multisized gold and silver nanoparticles in zebrafish embryos[J]. *Small*, 2009, **5**(16):1897-1910.
- [34] King-Heiden TC, Wicinski PN, Mangham AN, Metz KM, Nesbit D, Pedersen JA, et al. Quantum dot nanotoxicity assessment using the zebrafish embryo[J]. *Environ Sci Technol*, 2009, **43**(5):1605-1611.

Progress in application of zebrafish model in evaluation of nanotoxic mechanism

CHEN Heng-yu^{1,2}, FU Ai-ling², ZHAO Bao-quan¹

(1. College of Pharmaceutical Science, Southwest University, Chongqing 400715, China; 2. Department of Military Toxicology, Institute of Pharmacology and Toxicology, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100850, China)

Abstract: Science in nanometer scale, one of the most important research fields in 21 century. In present, achievements that have been made in nanotoxicity are basically based on *in vitro* systems. However, *in vivo* study developed tardily. Zebrafish, a kind of mode organism, which has more advantages than others in toxicity assessment, will be used more and more wildly in this field. This review summarized some investigative methods, results of *in vivo* nanostructures toxicology and the advantages of the mode organism — zebrafish to provide some help for its development and the methods being systematism.

Key words: nanoparticles; toxicology; zebrafish

Corresponding author: ZHAO Bao-quan, E-mail: baoquan9838@sina.com, Tel: (010)66874609

(收稿日期: 2011-05-30 接受日期: 2011-12-26)
(本文编辑: 付良青)