

· 重大新药创制专项巡礼 ·

非人灵长类动物的发育神经毒性评价方法

秦晓菲¹,袁芳¹,潘晓靓¹,王庆利²,常艳¹

(1 中国医药工业研究总院国家上海新药安全评价研究中心,上海 201203;

2 国家食品药品监督管理局药品审评中心,北京 100038)

[摘要] 药物的非临床发育神经毒性 (Developmental neurotoxicity, DNT) 研究是药物非临床安全性评价的重要组成部分,通常与生殖发育毒性 (Developmental And Reproductive Toxicity, DART) 研究相结合。由于大分子生物技术药物多具有高度的种属特异性,在大鼠和兔体内不能或较少产生药理学应答,因此生物技术药物在评价 DART 时往往使用与人类更为接近的非人灵长类动物 (Non-human Primates, NHPs)。非人灵长类动物的生理特征与人类高度类似,行为高度进化,具有高级的解决问题的能力及复杂的社会关系,因此特别适用于生物技术药物的非临床 DNT 研究。本文综述了非人灵长类动物的发育神经毒性评价方法,为评价非人灵长类的神经行为学提供了概况,以期更好的研究药物的发育神经毒性。

[关键词] 发育神经毒性;非人灵长类;神经行为学;评价方法;测试

[中图分类号] R967 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1003-3734(2014)05-0513-06

Evaluation methods for developmental neurotoxicity of nonhuman primates

QIN Xiao-fei¹, YUAN Fang¹, PAN Xiao-liang¹, WANG Qing-li², CHANG Yan¹

(1 Shanghai Institute of Pharmaceutical Industry, National Shanghai Center for New Drug Safety Evaluation and Research, Shanghai 201203, China; 2 Center for Drug Evaluation, CFDA, Beijing 100038, China)

[Abstract] The study for nonclinical developmental neurotoxicity (DNT) of drugs is an important part of the nonclinical safety evaluation. It is often combined with the study of developmental and reproductive toxicity (DART). Most biopharmaceuticals are highly species-specific and can not interact with rats or rabbits, while non-human primates are more similar to humans. Thus, non-human primates are preferred in DART evaluation of biopharmaceuticals. The physiological characteristics of non-human primates are highly similar to humans, and the behavioral repertoire of non-human primates is highly evolved, for example, advanced problem-solving capabilities and complex social relationships. This similarity makes non-human primates valuable animal models for DNT studies. This review described tests designed to study developmental neurotoxicity of non-human primates, providing a rough framework of non-human primate neurobehavioral, in order to study developmental neurotoxicity of drugs better.

[Key words] developmental neurotoxicity; non-human primates; neurobehavioral; evaluation methods; tests

发育神经毒性 (developmental neurotoxicity, DNT) 是指个体在发育过程中由于暴露于神经毒性

物质而引起的神经系统结构和功能的异常改变,以及由此导致的机体感觉、运动及各种认知功能的改变,表现出的个体发育缺陷通常包括行为改变、智力低下、精神失常、孤僻症等。由于人类神经系统的发育成熟需要相当长的时间,神经元的增殖及迁移在出生后仍在继续,且在婴儿时期突触连接仍在形成时血脑屏障的发育很不完善,因此与成年人相比,未

[基金项目] 国家“重大新药创制”科技重大专项(2012ZX09302002)

[作者简介] 秦晓菲,女,硕士研究生,主要研究方向生殖毒理学。

联系电话:13917157542, E-mail: qinxiaofei_2007@126.com。

[通讯作者] 常艳,女,博士,主要从事新药安全评价与研究工作。

联系电话:(021)50800333-208, E-mail: ychang@ncdser.com。



成年人更易受到神经毒性物质的影响。神经系统发育过程中任何外来因素的干扰都可能导致永久性的损伤,由此而导致的疾病一旦形成很难治愈,将会给家庭和社会造成相当大的负担^[1-2]。因此药物的非临床 DNT 研究一直备受关注。

药物的非临床 DNT 研究是药物非临床安全性评价的重要组成部分,通常与生殖发育毒性(developmental and reproductive toxicity, DART)研究相结合,在 DART 试验中对仔代进行神经行为学测试^[3-4]。近年来,大分子生物技术药物的研发和应用不断增加,由于多数生物技术药物具有高度的种属特异性,在大鼠和兔体内不能或较少产生药理学应答,这类药物在 DART 评价时往往使用与人类更为接近的非人灵长类动物(non-human primates, NHPs)^[5]。

非人灵长类动物的生理特征与人类高度类似,行为高度进化,具有高级的解决问题的能力及复杂的社会关系,感觉敏感度与人类相同有时甚至高于人类,且妊娠期、婴儿期和青少年时期相对较长,因此非人灵长类动物特别适用于生物技术药物的非临床 DNT 研究^[6]。现对非人灵长类动物的发育神经毒性评价方法综述如下。

1 单终点评价测试

单终点评价测试通常包括学习能力测试、记忆力测试、程序控制行为测试、信息处理能力测试、成年动物的社会行为及母-婴互动行为测试、感觉功能测试以及视动协调能力和视觉空间定位能力测试。其中学习能力测试和记忆力测试是最常用的单终点评价测试项目。

1.1 学习能力测试(learning tests)

常用的非人灵长类动物学习能力测试方法有两种,其中 19 世纪 30 年代 Harlow^[7]发明的威斯康辛通用测验仪(wisconsin general testing apparatus, WGTA)是非人灵长类动物发育神经毒性评价最常用的方法。WGTA 是通过考察动物是否能正确摆放或选择正确的刺激物来评价其学习能力,测试成本较低。另一种测试方法是在计算机控制的环境中给予动物二维测试物,如幻灯片或彩色光等。通过控制相应的按钮或开关来记录动物的反应。这一方法实现了对刺激呈现顺序、试验顺序和反应记录等变量的精密电子控制,而且可同时评价受试动物的视觉、听觉等感官功能^[8]。

非人灵长类动物的学习能力测试通常包括辨别能力测试、逆转能力测试和概念能力测试。

1.1.1 辨别能力测试(discrimination learning tests)

辨别能力测试要求试验中至少具备 2 种不同的刺激物,规定其中一种为正确刺激物(correct stimuli)并与奖励相关,另一种为错误刺激物(incorrect stimuli)并与奖励无关。试验过程中,随机变换“正确刺激物”的摆放位置,直至动物能够一直准确的挑选出正确刺激物。

简单的辨别能力测试包括颜色辨别能力测试(color discrimination test)、形状辨别能力测试(shape discrimination test)和图案辨别能力测试(pattern discrimination test)。在此类测试中,两个刺激物仅有一种物理特征不同,如颜色(黑色 vs 白色)、形状(三角形 vs 正方形)或者图案(垂直条带 vs 水平条带)。这些简单的测试项目适用于评价 6 个月龄以下或者具有显著认知功能障碍的动物。

空间辨别能力测试(spatial discrimination test)难度相对较大。空间辨别能力测试通常使用两个完全相同的刺激物,任务的解决仅与刺激物的摆放位置有关,例如,当刺激物摆放在右边是“正确刺激”时,动物选择摆放在左边的刺激物时则拿不到食物奖励。反之亦然^[9]。

上述测试(颜色、形状、图案和空间辨别测试)都可以通过改变刺激物的一种或多种物理特征(physical dimension)来增加实验的难度。例如较复杂的辨别能力测试所用的刺激物可以是颜色、形状不同(如黑色的正方形 vs 白色的三角形)或颜色、图案和形状均不同(如黑色水平条带正方形 vs 白色垂直条带三角形)。动物需要学会分辨哪种为相关的物理特征,并学会忽视无关的物理特征。

因此,辨别能力测试可通过改变其复杂性来满足各年龄段动物的测试要求。

1.1.2 逆转或改变能力测试(reversal or alternation learning tests)

当成功通过辨别能力测试后,需要进行逆转能力测试来评价动物能否忽略已经掌握的方法并进行新的探索。例如,通过空间辨别能力测试后,动物已经熟知左边为正确的刺激物,此时就可以进行空间逆转能力测试(spatial reversal test)。将正确刺激物的位置由右边变换为左边,此时需要动物“抑制”对左边的物体产生应答,而接受“选择右边”这一改变^[10]。此外,也可进行颜色、形状和图案辨别能力测试的逆转能力测试,即将测试中正确与错误的刺激物对调^[11]。因此,掌握辨别能力是进行逆转能力测试的前提。

1.1.3 概念能力测试 (concept learning tests) 概念能力测试比前两项测试更为复杂,要求动物关注物体的抽象特征而非直观的颜色、图案等^[12]。非人灵长类动物的概念能力测试通常包括样本不匹配测试 (nonmatch-to-sample test)、样本匹配测试 (match-to-sample test) 和异物测试 (odddity test)。

进行样本不匹配测试时,需要在试验开始前给动物展示一个预先准备好的样本物体 (sample),动物看过样本立即拿走。然后给动物展示两个测试物体,其中一个测试物体与样本物体类似,另一个则完全不同。样本不匹配测试要求动物挑选出与样本物体不同的测试物体,动物成功完成后可得到一定的食物奖励。样本匹配测试与样本不匹配测试的方法大体相同,只是前者要求动物挑选出与样本物体相同的测试物体^[13]。

异物测试与样本不匹配测试非常类似,但是难度较后者稍大。在异物测试中,每次试验时同时给动物展示3个测试物体,其中有2个测试物体完全相同,因此不同的那个测试物体即被视为“异物”。动物成功挑选出“异物”后可得到一定的食物奖励。

异物测试与样本不匹配测试或样本匹配测试最显著的差别是试验顺序的不同。异物测试是同时给动物展示3个测试物体,而样本不匹配测试及样本匹配测试则是分2步进行,在动物进行选择之前先展示样本物体,待动物观察过后再进行选择。样本不匹配测试及样本匹配测试需要动物运用“先观察样本,后转换思维”(“view sample, then shift”)的策略来完成测试,而异物测试要求动物正确判断测试物体之间的联系。

1.2 记忆力测试 (memory tests)

动物在完成学习能力测试的基础上可进一步进行记忆能力测试,方法是在给予刺激物后,经过一定时间间隔再给予下一个刺激物,并记录动物的应答率。根据时间间隔的长短可分为短期记忆力测试和长期记忆力测试。对于非人灵长类动物,大多数记忆力测试都是通过延迟应答测试 (delayed response test) 演变而来的^[14]。

延迟应答测试开始于80年前,是第1个非人灵长类动物认知实验,该实验要求动物在拿走刺激物后仍能做出应答反应。延迟应答测试中需要设立两个或多个应答位置,实验人员将食物奖励放在其中一个应答位置并向动物展示。间隔一段时间后,让

动物在应答位置上自由放置物体。如果物体放置在有食物奖励的应答位置,则被视为正确应答,计算动物的正确应答率从而评价其记忆力。

学习能力测试增加一定的时间间隔后可用于评价动物的记忆力^[15]。例如,延迟空间改变测试 (delayed spatial alternation test) 与空间改变测试 (spatial alternation test) 类似,区别在于前者在连续的试验之间加入了时间间隔。动物需先记住食物奖励所在的位置,经过一段时间间隔后仍能记住食物奖励的位置才能顺利通过测试。时间间隔一般介于5~40 s。

除增加时间间隔外,还可增加记忆内容来评价动物的记忆力。样本不匹配列表长度测试 (non-match-to-sample list length tests) 或样本匹配列表长度测试 (match-to-sample list length tests) 都是样本不匹配测试和样本匹配测试的改良版。改良之后的不同之处在于先给动物展示的是一系列样本物体而非单个样本物体。此时动物必须准确记住所有样本物体的特征才能顺利通过测试。

1.3 程序控制行为测试 (schedule-controlled behavior tests)

程序控制行为测试在神经毒理学研究中很有价值^[16],因为该测试不仅可以分析神经毒物引起的短期行为学改变,还可以分析该行为学改变的连续性。典型的程序控制行为测试包括固定间隔测试和固定比率测试^[17]。

1.3.1 固定间隔测试 (fixed interval (FI) test) 固定间隔测试通过在特定的时间间隔 (a specific interval of time) 内评价动物应答的次数来评价受试动物的多种行为变化。特定时间间隔内的总反应率可以揭示动物的活动性,而反应速率的变化则可反映暂时的辨别能力 (temporal discrimination)。

1.3.2 固定比率测试 (fixed ratio (FR) test) 固定比率测试中,受试动物必须做出特定次数的应答才能获得食物奖励。该测试的特点是:试验开始阶段动物的反应速率为零,随后达到稳定的高反应速率。主要的评价参数包括平均暂停时间 (从实验开始至动物第一次应答的时间)、运行速率 (总时间减去暂停时间后平均每秒的应答数量) 和反应间隔 (两个反应之间所经历的时间)。

此外,毒理学家也常将 FI 和 FR 测试进行结合,这样不仅可以创造出更多复杂的测试方法,而且也可以在同一项测试中综合评价受试动物暴露于神经毒物后对 FI 和 FR 测试指标的不同敏感性。

1.4 信息处理能力测试 (information processing tests)

对于非人灵长类,反应时间测试 (reaction time test) 是最常用的信息处理能力测试,主要用来评价动物处理信息的速度和准确度。利用该测试可以区分动物的认知决策时间 (cognitive decision time) 和动作/响应时间 (movement/response time)。人类的研究表明动物在特定反应时间测试中的表现与智力和解决问题的能力有关,而且测试评分可能反映了中枢处理速度和神经完整性。此外,该测试通常用来探测人类工作环境中的神经毒性迹象^[18]。因此,当处理该测试的结果时,可以应用类比方法将动物实验数据外推到人,有助于降低评估风险。

1.5 成年动物的社会行为及母-婴互动行为测试 (adult social behavior and mother-infant interactions tests)

动物之间社会互动行为的评价有助于解释神经毒物是如何影响正常的行为模式。目前试验用的非人灵长类几乎都是单笼饲养,极少群居饲养,这一现状阻碍了成年动物社会行为的评价。鉴于此,新的政府指导方针要求为试验动物提供社交时间,以利用这些社交时间来研究动物的气质特征,如攻击性以及友好行为模式。

对于实验室中的非人灵长类,母-婴互动行为测试主要研究母体和婴儿在笼子里的互动行为。母体-婴儿的互动行为可分为以下3类:社会接触行为 (social contact behaviors),社会互动行为 (social interaction behaviors) 和非社会性的行为 (nonsocial behaviors)。测试时,观察者在预先确定的观察时间段内对每对母体-婴儿的互动行为进行评分和分类。

此外,化学物的暴露不仅可能改变母体正常照顾子代的积极性和能力,而且可能导致仔代行为学改变使得母体照料子代的难度增大。母体和婴儿间缺乏正常的社会关系可能会长期干扰仔代正常行为学的发展。因此,少数研究者也研究了化学物暴露对母体照料行为的影响。

1.6 感觉功能测试 (sensory function tests)

非人灵长类的感觉功能测试可以较好的评价神经毒物对中枢神经系统可能造成的损伤,而且也能比较准确的评价动物的视觉和听觉等感觉功能。

非人灵长类与人类的视力差不多,而且视觉是二者的主要感觉形态。非人灵长类的视觉功能测试通常在自动化仪器设备中进行,主要的评价参数是视觉

敏度 (visual acuity),即考察动物能否看到物体。

听觉功能测试是感觉功能测试的另一个重要内容。纯音听力测试 (tests of pure tone auditory detection) 是常用的听觉功能测试。用于非人灵长类测试的音频通常介于 125 和 31 500 Hz 之间,纯音听力测试可以利用信号检测模式来评价受试动物的听力阈值和震动灵敏度,此外也可以评价动物的躯体感觉阈值^[19]。

1.7 视觉-运动协调能力和视觉空间的定位能力测试 (visual-motor coordination and visuospatial orientation tests)

这类测试中具有代表性的是拾物试验 (pick-up test)^[20]。该测试可以快速而准确的定量评价动物的视动(眼-手)协调能力。该测试使用的刺激呈现板上有多多个不同深度的树脂玻璃孔 (plexiglas wells of varying depths),玻璃孔中有测试者事先放入的食物奖励。这一测试通过记录受试动物从玻璃孔中获取食物奖励所需要的时间以及动作的准确性来评价动物的视觉-运动协调能力和视觉空间定位能力。

2 多终点评价测试

多种点评价测试通常包括美国国家毒理学研究中心的行为学组合测试和非人灵长类动物出生后 12 个月内的行为学组合测试。

2.1 美国国家毒理学研究中心 (national center for toxicological research, NCTR) 行为学组合测试 (NCTR operant test battery)

NCTR 行为学组合测试由 NCTR 设计,用于评价非人灵长类和儿童神经行为学^[21]。该测试结合了自动化技术、标准学习能力测试和程序控制行为测试等,因此能够更准确地评价神经毒物对动物或人类的影响。研究表明,在该行为学组合测试中,恒河猴的表现与儿童没有区别。这套测试项目包含以下几部分:增量重复采集测试 (incremental repeated acquisition, IRA)、条件位置反应测试 (conditioned position responding, CPR)、逐行比率测试 (progressive ratio, PR)、延迟样本匹配测试 (delayed matching-to-sample, DMTS) 和时间响应区别测试 (temporal response differentiation, TRD)。以上测试评价的侧重点各有不同:IRA 测试用来研究动物的整体学习能力;CPR 测试主要关注动物对颜色和位置的辨别学习能力;PR 测试用于衡量动物的积极性;DMTS 测试用来评价动物的短期记忆力和注意力;而 TRD 测试则主要反映受试动物的时间知觉^[22]。



2.2 非人灵长类动物出生后 12 个月内的行为学组合测试 (behavioral tests battery of NHPs from birth to 12 months of age)

由于非人灵长类出生前后的变量会对其行为发育产生重要的影响,因此 12 月龄以内的婴儿的行为发育一直备受人们的关注^[23]。非人灵长类与人类相似,两者在婴儿时期都不能说话(缺乏语言),运动技能发育不完善,且都需要经历一段较长的婴儿时期^[24],因此评价 12 月龄内的婴儿的行为测试大部分改编自人类婴儿的评价方法。

根据非人灵长类的年龄顺序,简要介绍以下行为学测试方法。

2.2.1 新生儿评估测试 (simian newborn assessment) 新生儿评估测试由 Apgar 设计的人类婴儿测试方法改编而来,主要用来评价新生儿在分娩时的身体完整性^[25]。该测试利用 0-2 的数值评分,分别评价婴儿出生后 5 和 10 min 的呼吸率、视觉、肌张力、心率和觉醒 (arousal)。

2.2.2 新生儿行为评估量表 (the simian neonatal behavioral assessment scale) 新生儿行为评估量表由人类巴氏新生儿行为评估量表改编而来,主要用于评价出生后 d1 的新生儿行为学^[26]。该评估量表通过对受试动物的各类反射,如吮吸反射,眨眼反射、翻正反射以及扣力和抓握力等进行评分来评价新生儿的行为变化。此外,同人类的测试过程一样,试验过程中还需记录动物的应激性和可安慰性等状态变量,并把这些变量作为整体应答质量。

2.2.3 运动功能发育评价测试 (tests of motor milestones) 运动功能发育评价测试主要用于评价非人灵长类出生后前 6 个月内的运动功能和社交功能的发展。测试中,测试者将不同性别的动物放在配有斜坡、椅子和架子的游戏室后观察并记录动物的行为变化。测试者除了要记录动物第 1 次出现某种特定行为 (specific behavioral milestones) 的日期和运动方面的进展,此外,还需记录动物在社交方面的进展,如各种面部表情和声音信号等。

3 结语

本文涉及的测试方法为评价非人灵长类的神经行为学提供了一个大概框架,这将有助于毒理学家研究受试物的发育神经毒性。具体测试方法的选择应该根据受试物的理化性质、暴露时间、暴露剂量、暴露途径以及受试动物的具体年龄来选择。非人灵长类与人类具有相近的进化历史,是一类非常难得

的动物的资源,因此,在设计非人灵长类的动物试验时应该更加谨慎。通过观察这非人灵长类的行为学,将会指导我们更好的评价神经毒物暴露所导致的重要的、频繁的、精细的神经行为学改变。

药物的非临床 DNT 是一个不断发展完善的研究领域,非人灵长类的发育神经毒理学评价方法也将不断完善,并促进药物非临床 DNT 研究领域的发展。这也将更好地指导药物的研发。

[参 考 文 献]

- [1] RICE D, BARONE S Jr. Critical periods of vulnerability for the developing nervous system: evidence from humans and animal models [J]. *Environ Health Perspect*, 2000, 108 (Suppl 3): S511-S533.
- [2] WINNEKE G. Developmental aspects of environmental neurotoxicology: lessons from lead and polychlorinated biphenyls [J]. *J Neurol Sci*, 2011, 308(1-2): 9-15.
- [3] LADICS GS, CHAPIN RE, HASTINGS KL, et al. Developmental toxicology evaluations-issues with including neurotoxicology and immunotoxicology assessments in reproductive toxicology studies [J]. *Toxicol Sci*, 2005, 88(1): 24-29.
- [4] CHELLMAN GJ, BUSSIERE JL, MAKORI N, et al. Developmental and reproductive toxicology studies in non-human primates [J]. *Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol*, 2009, 86(6): 446-462.
- [5] 秦晓菲,袁芳,潘晓靓,等.生物技术药物的临床前发育免疫毒性研究[J].中国新药杂志,2013,22(12):1410-1414.
- [6] BURBACHER TM, GRANT KS. Methods for studying nonhuman primates in neurobehavioral toxicology and teratology [J]. *Neurotoxicol Teratol*, 2000, 22(4): 475-486.
- [7] HARLOW HF, BROMMER JA. A test-apparatus for monkeys [J]. *Psychol Record*, 1938, 2: 434-438.
- [8] REED MN, NEWLAND MC. Gestational methylmercury selectively increases the sensitivity of operant behavior to cocaine [J]. *Behav Neurosci*, 2009, 123(2): 408-417.
- [9] RICE DC. Lead-induced behavioral impairment on a spatial discrimination reversal task in monkeys exposed during different periods of development [J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 1990, 106(2): 327-333.
- [10] LUBACH GR, COE CL. Selective impairment of cognitive performance in the young monkey following recovery from iron deficiency [J]. *J Dev Behav Pediatr*, 2008, 29(1): 11-17.
- [11] CAPPON GD, BOEMAN GJ, HURTT ME, et al. Object discrimination reversal as a method to assess cognitive impairment in nonhuman primate enhanced pre- and postnatal developmental (ePPND) studies: statistical power analysis [J]. *Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol*, 2012, 95(5): 354-362.
- [12] TREICHLER FR. Successive reversal of concurrent discriminations by macaques (*Macaca mulatta*): proactive interference effects [J]. *Anim Cogn*, 2005, 8(2): 75-83.
- [13] WEINSTEIN B. Matching-from-sample by rhesus monkeys and by children [J]. *J Comp Psychol*, 1941, 31(1): 195-213.
- [14] GOLUB MS, HOGREFE CE, GERMANN SL. Iron deprivation during fetal development changes the behavior of juvenile rhesus monkeys [J]. *J Nutr*, 2000, 137(4): 979-984.

(下转第 532 页)

作用并对其进行优化,在最优条件下,即在丙酸钠、L-异亮氨酸、L-甲硫氨酸浓度分别为 $0.95 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $15.18 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $29.32 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,埃博霉素 B 产量可达到 $49.37 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$,比优化前提高了 38.29%。同时回归方程所得到的最大预测值与验证值接近,说明回归方程能较真实地反映各重要因素的影响,建立的模型与实际情况比较吻合,说明本研究设计有效可行。

迄今与埃博霉素生物合成途径报道的相关内容较少,相关报道有韩莉莉等^[10]在发酵培养基中添加丙酸钠,研究了不同浓度的丙酸钠对埃博霉素产量的影响,丙酸钠的最佳添加浓度为 $6.25 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。李越中等^[3]研究了不同氨基酸和碳代谢物的添加对埃博霉素产量的影响,结果表明氨基酸混合物能够提高埃博霉素的产量。埃博霉素的具体的生物合成代谢途径尚不清楚,基于已知的代谢途径,找出对微生物合成埃博霉素 B 具有重要影响的前体物质及其他物质并确定其最佳浓度对埃博霉素 B 的高产、稳产具有重要意义。

[参 考 文 献]

[1] MENG FX, LI YX, GUO WL, et al. Optimization of fermentation medium for epothilones production with sequential statistical approach[J]. *Chem Res Chinese Universities* 2010 26(1):86-91.
 [2] REGENTIN R, FRYKMAN S, LAU J, et al. Nutrient regulation of epothilone biosynthesis in heterologous and native production strains[J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2003 61(5-6):451-455.

[3] 李越中, GERTH K, REICHENBACH H. 纤维堆囊菌 *Socce 90* 菌株发酵合成新型抗癌物质 epothilone 的营养控制[J]. *中国抗生素杂志*, 1998 23(6):420-424.
 [4] 朱义彬, 朱德育, 翟明礼, 等. 吉他霉素发酵工艺的代谢调控研究[J]. *河南科学* 2011 29(9):1049-1051.
 [5] 杨世红, 李能威, 郭伟群, 等. 前体对多拉菌素生物合成的影响[J]. *中国抗生素杂志*, 2011, 36(11):829-832.
 [6] 胡景, 储炬, 谏颖, 等. 前体氨基酸对 avermectin 生物合成的影响[J]. *中国抗生素杂志*, 2004, 29(7):388-390.
 [7] 朱勇文, 侯水生, 杨琳. 生物素对营养代谢调控的研究进展[J]. *饲料工业*, 2011, 32(9):12-14.
 [8] JONG HS, PARK SW, et al. Selective production of epothilone B by heterologous expression of propionyl-CoA synthetase in *Sorangium cellulosum*[J]. *J Microbiol Biotechnol*, 2008, 18(1):135-137.
 [9] 龚国利, 陈松, 李慧, 等. 基因重组技术选育埃博霉素 B 高产菌株[J]. *中国抗生素杂志*, 2013 38(2):106-110.
 [10] 韩莉莉, 卢育新, 王赫, 等. 培养基组成对纤维堆壤菌产 epothilone 的影响[J]. *微生物学杂志* 2008 28(6):103-106.
 [11] 阎家麒. 埃博霉素新药研发与技术创新初探[J]. *中国新药杂志* 2012 21(19):2241-2249.
 [12] XU LJ, LIU YS, ZHOU LG, et al. Optimization of a liquid medium for beauvericin production in *fusarium redolens* Dzf2 mycelial culture[J]. *Biotechnol Bioprocess Engineering*, 2010, 15(3):460-466.
 [13] 张文军, 赵春燕, 范翠敏, 等. 高效抗肿瘤抗生素新产生菌 *Micromonospora C3509* 发酵优化研究[J]. *中国新药杂志*, 2009 18(13):1245-1249.
 [14] 陈杰, 魏鸿刚, 罗远婵, 等. 海洋芽胞杆菌 B-9987 产新型抗菌环脂肽 Marinhyisin A 的培养基优化[J]. *中国生物工程杂志*, 2013, 33(1):84-89.

编辑:韩培/接受日期:2013-10-30



(上接第 517 页)

[15] RICE DC, GILLBERT SG. Lack of sensitive period for lead-induced behavioral impairment on a spatial delayed alternation task in monkeys[J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 1990 103(2):364-373.
 [16] RICE DC. Schedule-controlled behavior in infant and juvenile monkeys exposed to lead from birth[J]. *Neurotoxicology*, 1988 9(1):75-87.
 [17] RICE DC. Lead exposure during different developmental periods produces different effects on FI performance in monkeys tested as juveniles and adults[J]. *Neurotoxicology*, 1992, 13(4):757-770.
 [18] ECHEVERRIA D, WOODS JS, HEYER NJ, et al. Chronic low-level mercury exposure, BDNF polymorphism, and association with cognitive and motor function[J]. *Neurotoxicol Teratol*, 2005, 27(6):9781-9796.
 [19] KIORPES L, MOVSHON JA. Development of sensitivity to visual motion in macaque monkeys[J]. *Vis Neurosci*, 2004, 21(6):851-859.
 [20] RICE DC. Evidence for delayed neurotoxicity produced by methylmercury[J]. *Neurotoxicology*, 1996, 17(3-4):583-596.

[21] PAULE MG. Use of the NCTR operant test battery in nonhuman primates[J]. *Neurotoxicol Teratol*, 1990 12(5):413-418.
 [22] PAULE MG, GREEN L, MYERSON J, et al. Behavioral toxicology of cognition: extrapolation from experimental animal models to humans: behavioral toxicology symposium overview[J]. *Neurotoxicol Teratol*, 2012 34(2):263-273.
 [23] GOLUB MS, HOGREFE CE, GERMANN SL, et al. Behavioral consequences of developmental iron deficiency in infant rhesus monkeys[J]. *Neurotoxicol Teratol* 2006 28(1):3-17.
 [24] HE N, BAI J, CHAMPOUX M, et al. Neurobehavioral deficits in neonatal rhesus monkeys exposed to cocaine in utero[J]. *Neurotoxicol Teratol* 2004, 26(1):13-21.
 [25] APGAR V. A proposal for a new method of evaluation of the newborn infant[J]. *Curr Res Anesthesia Analgesia*, 1953 32(4):260-268.
 [26] ALS H, TRONICK E, LESTER BM, et al. The Brazelton neonatal behavioral assessment scale (NBAS)[J]. *J Abnorm Child Psychol*, 1977 5(3):215-231.

编辑:韩培/接受日期:2013-09-20

