

生殖毒理学研究动物模型的建立方法及应用评价

黄冬妍^{1,2}, 吴建辉^{1,2}

(1. 上海市生物医药技术研究院, 国家卫生健康委生育调节药械重点实验室, 上海生殖健康药具工程技术研究中心, 上海 200237; 2. 上海市生物医药技术研究院药理毒理学研究室, 上海 200032)

[摘要] 生殖毒理学是指应用毒理学方法研究外来物质干扰卵子或精子生成的机制及其有害作用对后代影响的学科, 研究内容包括受试物对亲代生殖功能的损伤作用和对子代胚胎的毒性评价。人们每天会接触到各种药品、化学品和环境污染物质, 这些物质是否具有生殖毒性, 关乎子孙后代的健康, 这就需要通过生殖毒理学研究来进行评价。由于生殖毒性评价的特殊性和重要性, 国内外相关机构出台了相应的指导原则、国家标准或行业标准, 均涉及动物实验。在生殖系统疾病研究中, 目前开发出了很多研究重要生殖器官的动物模型, 如睾丸和卵巢研究用动物模型。每种模型均涉及动物的选择、方法的建立和评价指标的量化, 且各有其优势和局限性, 研究人员使用时要根据试验需求和模型特点来综合考量。本文针对生殖毒理学研究中常用的生殖与发育毒性评价动物模型, 包括生育力与早期胚胎发育毒性评价大鼠模型、胚胎-胎仔发育毒性评价大鼠模型、胚胎-胎仔发育毒性评价兔模型、胚胎-胎仔发育毒性评价小型猪模型、围产期毒性评价大鼠模型、胚胎发育毒性评价斑马鱼模型, 化学药物和放射疗法诱导、自身免疫性和卵巢切除等方式引起的卵巢毒性评价动物模型, 以及化学药物和环境因素引起的睾丸毒性评价动物模型, 对这些模型的建立方法、应用范围和特点进行总结, 以期对相关领域的研究应用提供参考。

[关键词] 生殖毒理学; 发育毒性; 围产期毒性; 睾丸毒性; 卵巢毒性; 动物模型

[中图分类号] R994; Q95-33 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1674-5817(2024)05-0550-10



Establishment Methods and Application Evaluation of Animal Models in Reproductive Toxicology Research

HUANG Dongyan^{1,2}, WU Jianhui^{1,2}

(1. Shanghai Institute for Biomedical and Pharmaceutical Technologies, NHC Key Lab of Reproduction Regulation, Shanghai Engineering Research Center of Reproductive Health Drugs and Devices, Shanghai 200237, China; 2. Department of Pharmacology and Toxicology, Shanghai Institute for Biomedical and Pharmaceutical Technologies, Shanghai 200032, China)

Correspondence to: WU Jianhui (ORCID: 0000-0001-7031-4425), E-mail: wujh_731@163.com

[ABSTRACT] Reproductive toxicology is a discipline that uses toxicological methods to study the mechanisms by which foreign substances interfere with the generation of eggs or sperm and their detrimental effects on offspring. Research includes evaluating the damaging effects of test substances on reproductive function of parents and the toxicity evaluation of offspring embryos. People are exposed to a wide range of drugs, chemicals and environmental pollutants on a daily basis, and determining whether these substances have reproductive toxicity is crucial for the health of future generations. Reproductive toxicology research is therefore critical. Given the specificity and importance of reproductive toxicity evaluation, corresponding institutions both domestically and internationally have issued guidelines, national standards, or industry standards, all of which involve animal experiments. In the study of reproductive system diseases, numerous animal models have been developed to investigate key reproductive organs, such as testicles and ovaries. Each model involves the selection of animals, the establishment of methods, and the quantification of evaluation indicators, and all have advantages and limitations. The choice of model should be based on experimental needs and the characteristics of the model. This paper summarizes commonly used animal models for reproductive and development toxicity

[第一作者] 黄冬妍(1989—), 女, 硕士, 助理研究员, 研究方向: 生殖药理毒理学研究。E-mail: hdy043@163.com

[通信作者] 吴建辉(1976—), 男, 博士, 研究员, 研究方向: 生殖药理毒理学研究。E-mail: wujh_731@163.com。ORCID: 0000-0001-7031-4425

evaluation in reproductive toxicology research, including rat models for fertility and early embryonic development toxicity, rat models for embryo-fetal development toxicity, rabbit models for embryo-fetal development toxicity evaluation, minipig models for embryo-fetal development toxicity, rat models for perinatal toxicity, zebrafish models for embryonic development toxicity, and models for evaluating ovarian toxicity induced by chemical drugs, radiotherapy, autoimmunity, and ovariectomy, as well as models for evaluating testicular toxicity caused by chemical drugs and environmental factors. The methods for establishing these models, their application scope, and characteristics are reviewed in order to provide references for relevant research applications.

[Key words] Reproductive toxicity; Development toxicity; Perinatal toxicity; Testicular toxicity; Ovarian toxicity; Animal models

毒理学是一种主要通过动物实验等方法, 研究外源性因素(包括化学、物理、生物因素)对生物系统的有害作用, 以预测其对人体的危害, 从而为确定安全限值并采取防治措施提供科学依据的学科。作为毒理学的一门分支学科, 生殖毒理学着重应用毒理学方法, 研究外来物质(如药物、农药、环境污染及工业化学物质)干扰卵子或精子生成的机制及所致有害作用对后代的影响^[1]。1960年代, 沙利度胺(商品名: 反应停)在上市前由于没有被充分评估其潜在的生殖毒性, 导致全球许多国家的孕妇使用后产下很多四肢短小、形同海豹的婴儿, 这就是震惊世界的“反应停事件”^[2]。经过此事件, 世界各国开始重视生殖毒理学研究, 并对药物的生殖毒性进行系统性评价。

在药物开发过程中, 通过哺乳动物生殖毒性试验可以评估受试物对动物生殖功能及其子代发育过程的影响, 预测药物可能产生对生殖器官和细胞、受孕、妊娠、分娩、哺乳等亲代生殖机能的不良影响, 以及对子代胚胎-胎儿发育、出生后发育的不良影响。生殖毒性研究在限定临床研究受试者范围、降低临床研究受试者和药品上市后使用人群的用药风险方面发挥着重要作用^[3]。近年来, 随着中国育龄夫妇不孕不育率的逐年提高, 对生殖毒性研究的需求变得越来越迫切。药物生殖毒性评价领域已经出台了相应的技术指导原则, 同时食品保健品的生殖毒性评价领域也颁布了相应的国家标准, 其评价方法成熟, 评价指标完善。此外, 有关食品、保健品、环境污染物的生殖毒性研究报告也越来越多^[4]。

动物模型作为研究人类疾病的一个重要工具, 在探索疾病的病理机制、开发治疗药物方面发挥着极其重要的作用。目前, 生殖毒性动物模型已广泛应用于药物、食品、保健品、环境污染物等的评价^[5-6]。本文对生殖毒理学研究中常用的动物模型建立方法、应

用范围和优缺点进行综述, 以期从事药物生殖毒性评价和生殖系统疾病药物研发的专业人员提供有益参考。

1 生殖与发育毒性评价动物模型

生殖与发育毒性试验是评价药物对哺乳动物生殖系统的影响而进行的一组试验, 包含对一个完整生命周期(即从第一代受孕至下一代受孕)的观察, 可以检测即时和潜在的不良影响。根据“人用药品注册技术要求国际协调会”(International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use, ICH)关于人用药物生殖毒性研究技术指导原则^[7], 一般评估下列阶段:(A)从交配前至受孕(成年雄性和雌性的生殖功能、配子的发育和成熟、交配行为、受精);(B)从受孕至着床(成年雌性的生殖功能、着床前发育、着床);(C)从着床至硬腭闭合(成年雌性的生殖功能、胚胎发育、主要器官形成);(D)从硬腭闭合至妊娠结束(成年雌性的生殖功能、胎仔发育和生长、器官发育和生长);(E)从子代出生至离乳(分娩和哺乳、新生幼仔对宫外生活的适应性、离乳前发育和生长);(F)从子代离乳至性成熟(离乳后发育和生长、适应独立生活、青春期开始和达到完全性功能、对第二代的影响)。

在药物开发过程中, 通常采用经典的三段试验方案来评价大多数药物的生殖毒性: I段, 即生育力与早期胚胎发育试验阶段(A和B); II段, 即胚胎-胎仔发育试验阶段(C和D); III段, 即围产期发育试验阶段(C~F)。考虑到实用性、可获得性和背景历史数据, 生殖与发育毒性评价试验一般在啮齿类动物中进行, 通常选用的是大鼠、小鼠; 在特殊情况下, 如对生物制品进行评价时, 选用犬和非人灵长类动物。仅胚胎-胎仔发育毒性评价试验会采用第二种非啮齿类哺

乳动物(兔)进行评估。当传统动物不适合致畸性试验研究时,要根据具体情况,选择另一种可替代的动物进行试验。目前,小型猪作为生殖毒理研究的模式动物,应用不断增多,在胚胎-胎仔发育毒性评价试验中,可作为替代动物^[7]。2003年,美国国立卫生研究院将斑马鱼列为大鼠与小鼠之后的第三类模式动物,其也被广泛应用于药物的发育和胚胎毒性的研究^[8]。

1.1 生育力与早期胚胎发育毒性评价大鼠模型

大鼠由于遗传背景明确、操作方便,通常被推荐用于建立生育力与早期胚胎发育毒性评价动物模型。建模方法:成年大鼠于交配前至少2周开始给予受试物,雄性大鼠给药持续整个交配期;雌性大鼠给药持续至胚胎着床期[即妊娠第6天(gestation day 6, GD6)],见阴栓和/或精子者为交配成功,并定义为妊娠第0天(GD0)],并于GD13~GD15处死雌性大鼠。试验期间,观察受试大鼠的外观(至少每天1次)、体重(至少每周2次)、摄食量(至少每周1次)、动情周期,并剖检所有亲代大鼠,保存大鼠的睾丸、附睾、卵巢、子宫,以及肉眼观察有异常的组织器官;对雄性大鼠进行精子计数和活力检查,对雌性大鼠统计黄体数、着床点数、活胎数和死胎数^[3,7]。

郑成成等^[9]选用SD大鼠进行了荆防颗粒浸膏的生育力与早期胚胎发育毒性试验,将雌、雄大鼠分别给药2周和4周后合笼交配,并在交配期间持续给药,交配成功的雌鼠继续给药至GD6。试验期间,每日观察动物的一般状态;雄鼠和未交配成功的雌鼠每周测定2次体重,妊娠雌鼠于GD0、GD3、GD6、GD9、GD12、GD15分别测定1次体重;雌、雄鼠交配前每周测定1次摄食量,妊娠雌鼠于GD0、GD6、GD12分别测定1次摄食量。给药结束后检查雄鼠的精子活动度、数量和形态,称量睾丸、附睾、前列腺和精囊的湿重,并计算脏器系数;妊娠雌鼠于GD15解剖检查妊娠情况和着床数(统计活胎、死胎、吸收胎数量),称量子宫连胎、子宫和卵巢的质量。另有研究者^[10]在评价柚皮苷对SD大鼠生育力与早期胚胎发育毒性的研究中,采用类似的建模方法和评价指标,只是在具体细节上稍有区别,如:妊娠雌鼠于GD0、GD2、GD4、GD6、GD8、GD10、GD12、GD14分别测定1次体重;于GD0、GD6、GD13分别测定1次摄食量。

1.2 胚胎-胎仔发育毒性评价动物模型

胚胎-胎仔发育毒性试验的目的是观察受试物对妊娠动物的胚胎及胎仔发育的不良影响,包括胎仔发育

和存活情况。通常用大鼠和家兔作为模型动物,在特殊情况下会选用小型猪。

1.2.1 胚胎-胎仔发育毒性评价大鼠模型

大鼠是胚胎-胎仔发育毒性试验最常用的啮齿类动物。建模方法:从GD6或GD7开始每天给予孕鼠受试物,持续至GD15~17,并于分娩前(GD20或21)处死,进行解剖后终点检查。试验期间,观察动物的外观(至少每天1次)、体重(至少每周2次)、摄食量(至少每周1次),并进行毒代动力学(toxicokinetics, TK)检测;剖宫后,保存肉眼观察的异常器官,进行黄体、活胎、死胎和吸收胎计数,计算着床数,测量胎仔体重和顶臀长,检查胎仔外观、软组织和骨骼,观察胎盘并称量^[3,7]。

Yue等^[11]选用SD大鼠进行了洛索洛芬(loxoprofen)的胚胎-胎仔发育毒性检测, GD6~15期间每天对孕鼠静脉注射洛索洛芬。试验期间,每天观察动物1~2次;于GD0、GD3、GD6、GD10、GD13、GD16和GD20分别测定1次孕鼠体重,于GD0、GD3、GD6、GD10、GD13、GD16和GD19分别测定1次摄食量;于GD20进行剖宫检查,称量子宫质量,统计黄体数、活胎数、死胎数和吸收胎数,观察胎仔性别和外观,测量顶臀长,检查胎仔内脏和骨骼。在伴随TK试验中,设毒代A组和B组, A组动物于GD6首次给药时进行采血,而B组动物于GD15采血,采血时间点为给药前以及给药后5 min、30 min、1 h、2 h、4 h、7 h和24 h。同生育力与早期胚胎发育毒性评价试验一样,不同的胚胎-胎仔发育毒性试验的具体方案也会略有不同。如Kuwata等^[12]设计DS-7309的大鼠胚胎-胎仔发育毒性试验时,给药期为GD7~17,于GD0测定1次未妊娠雌性大鼠体重,于GD0、GD3、GD7、GD9、GD11、GD13、GD15、GD17和GD20分别测定1次孕鼠体重和摄食量;分别于GD7和GD17采血,采血点为给药前以及给药后30 min、2 h、7 h和24 h,用于TK试验。

1.2.2 胚胎-胎仔发育毒性评价兔模型

兔是胚胎-胎仔发育毒性试验最常用的非啮齿类动物。建模方法:从GD6或GD7开始每天给予孕兔受试物,持续至GD18~19,并于分娩前(GD28或GD29)处死孕兔,进行解剖后终点检查。试验期间,观察动物的外观(至少每天1次)、体重(至少每周2次)、摄食量(至少每周1次),并进行TK检测;剖宫后,保存肉眼观察到的异常器官,进行黄体、活胎、死胎和吸收胎计数,计算着床数,测量胎仔体重和顶臀长,

检查胎仔外观、软组织和骨骼,观察胎盘并称重^[3,7]。

Kuwata等^[12]选用兔进行了DS-7309的胚胎-胎仔发育毒性试验,于GD6~18给予DS-7309。试验期间,每天观察动物1~2次;于GD3、GD6、GD9、GD12、GD15、GD18、GD21、GD24和GD28分别测定1次体重,GD1~28每日测定摄食量;于GD28进行剖宫检查,统计活胎数和吸收胎数,计算着床数,称量子宫等。于GD6和GD18,分别在给药前以及给药后30 min、2 h、7 h和24 h采血,进行TK分析。

兔和大鼠胚胎-胎仔发育毒性试验的建立方法和评价指标较为一致,在进行胚胎-胎仔发育毒性伴随TK试验时,一般设置卫星组,参考受试物的药代动力学数据设计采血时间点,多为GD6~8。Rao等^[13]在进行PTX-2的大鼠和兔胚胎-胎仔发育毒性试验时,考虑到动物可能在妊娠和非妊娠状态下药代动力学不同,除了分别在GD7、GD17/19(大鼠/兔)进行首次和末次采血外,在GD13增加了一次中间采血,采血点为给药前以及给药后5 min、1 h、4 h、8 h和24 h。大多数药物的胚胎-胎仔发育毒性试验是在大鼠和(或)家兔上进行,这两个物种对发育毒性药物同样敏感,但在相同的全身暴露水平下,家兔对母体毒性药物略敏感。尽管如此,在大鼠和家兔的发育毒性低不良反应水平上,依然有68%的药物表现出2倍以上的差异^[14]。

1.2.3 胚胎-胎仔发育毒性评价小型猪模型

小型猪在生理学和解剖学等方面与人类有很多相似性,对很多人类致畸物质表现出敏感性,可作为胚胎-胎仔发育毒性评价的替代动物模型。建模方法:于GD11~35期间给予孕猪(6~8月龄)受试物,在GD28~35期间每天通过超声检查确定妊娠状态。试验期间,每日观察动物临床体征,并记录摄食量和体重的变化。于GD110~112进行剖宫产检查,包括黄体、着床、死胎和活胎计数,胎仔外观和内脏检查、性别确定等。为了缩短小型猪致畸试验的研究周期,有研究者于GD60(妊娠中期)和GD110分别对哥廷根小型猪进行剖宫产检查,发现中期剖宫产胎猪大小与终末处死家兔时胎兔的大小和体重相当;通过生殖器官内部检查可确定胎猪性别,骨骼和软骨双染法可检出骨骼改变,结果表明小型猪中期剖宫产技术可行,能缩减成本,节省时间^[15-16]。

1.3 围产期发育毒性评价大鼠模型

围产期发育毒性试验的目的是检测母体动物从胚胎着床至离乳时给药对妊娠或哺乳期雌性动物与子代

发育的不良影响,推荐使用大鼠作为动物模型。建模方法:从胚胎着床(GD6或GD7)开始给药至子代(F1)出生后第20天(postnatal day 20, PND20),即F1代离乳的时间点。孕鼠(F0)分娩后,饲养其子代(F1)至离乳,每窝至少保留雌、雄子代各1只;子代(F1)至少10周龄时,将同组内非同窝的雌、雄子代大鼠进行合笼交配,检测其生殖能力。试验期间,观察F0雌性大鼠的外观(至少每天1次)、测量体重(至少每周2次)和摄食量(至少每周1次,直至哺乳中期);PND21进行剖检,保存肉眼观察的异常器官,计数子宫着床点;观察F1子代大鼠离乳前后的存活、性别、体格发育情况,测量体重,检测性成熟程度和生育力,以及感觉功能和反射行为^[3,7]。

Song等^[17]在研究新型冠状病毒疫苗ZF2001的围产期发育毒性时,选用10~12周龄的SD大鼠,分别于交配前7 d、GD6、GD20和PND20肌内注射ZF2001,其间记录F0代雌性大鼠的一般状况、体重和摄食量,PND21进行剖宫产检查。在PND1~21期间,每日观察F1代大鼠的临床体征、存活情况,记录体重和生长发育指标;并于PND4将F1代均窝至8只/窝,雌雄各半;于PND19进行自主神经活动测试,PND20进行改良的Irwin's行为评价;在PND21处死每窝中的6只后进行大体检查;于PND77将每窝中剩余的2只大鼠(一雌一雄)用于生育力检测,记录雄鼠的交配天数,计算交配率和交配后雌鼠受孕率,并于GD15处死F1代雌性大鼠,剖宫产检查,记录黄体数、着床数、活胎数、死胎数和吸收胎数等。

1.4 胚胎发育毒性评价斑马鱼模型

斑马鱼作为一种水生脊椎动物,具有每次产卵数量多、胚胎透明、发育时间短等特点。斑马鱼在受精后72 h内完成胚胎发育,并在3个月内达到性成熟。斑马鱼与人类基因的同源性达70%,具有87%的全基因组相似性,且82%的人类疾病相关基因可以在斑马鱼中找到同源性。因此,斑马鱼可以作为评价药物潜在发育毒性的模式动物^[18]。建模方法:将雌、雄斑马鱼以一定比例隔离在产卵池中(使用玻璃隔板),于次日清晨交尾产卵,数分钟后(一般不超过30 min)收集胚胎。正常发育的胚胎在含待测受试物的培养皿中继续培养,在不同时间节点观察性腺、产卵率、受精率、受精卵死亡率、孵化率和胚胎死亡率等指标^[18]。

Yu等^[20]在评价全氟辛酸对斑马鱼早期胚胎发育的毒性研究中,将4月龄AB野生型斑马鱼置于产卵池中,受精2 h后选用正常的胚胎进行试验,在受精后

12 h、24 h和72 h分别用显微镜观察胚胎存活率，在受精后72 h测定胚胎孵化率、体长和畸形率，在受精后120 h测量斑马鱼幼体的运动情况。

综上，大鼠、兔、小型猪和斑马鱼是目前生殖与发育毒性评价试验汇总常用的模型动物，各自的优缺点^[7,21]汇总见表1。

表1 生殖与发育毒性试验常用模型动物的比较
Table 1 Comparisons of animal models for reproductive and developmental toxicity tests

模型动物 Modeling animals	优点 Advantages	缺点 Disadvantages
大鼠 Rats	生物学资料全面;妊娠期短,生育力强;自发畸形率低;价格低廉,易获得	对性激素敏感,不适用于多巴胺受体激动剂和非固醇类抗炎药物的研究;对外源性蛋白的应用受限;药理活性有限或无活性
兔 Rabbits	同大鼠;且生殖道与人类最相似	对某些抗生素和消化道紊乱有易感性,其临床症状难以解释
小型猪 Minipigs	性成熟时间较其他非啮齿类动物短;器官发生期短(妊娠第11~35天);与非人灵长类动物相比,多产,精子学资料与人类相似	胎盘缺乏转移大分子能力;妊娠期长(114 d);受试物用量大,成本高;尚无用于研究的商业试剂盒
斑马鱼 Zebrafish	生殖周期短;每次产卵数量多;胚胎透明易观察,胎仔发育迅速;实验成本低	生殖系统基础资料相对缺乏;体外受精,与人类繁殖方式差异大

2 卵巢毒性评价动物模型

人类胎儿卵巢中生殖细胞的发育可形成有限的原始卵泡池，而卵泡池是女性成年后生育能力和生殖寿命的最终决定因素。在胎儿卵巢发育过程中，如果亲代暴露在毒性物质中，可能会引起子代生殖表型的变化，包括卵巢重量降低、原始卵泡数量减少、雌激素水平改变、生殖功能下降等，也可能增加成年后卵巢相关疾病的易感性^[22]。雌性子代的生殖表型变化（包括Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ段）已经在第一节中具体描述，本节主要讨论卵巢相关疾病模型。卵巢早衰又称为早发性卵巢功能不全，是指女性40岁之前出现原发性或继发性闭经，月经稀发或闭经至少4个月，随机2次检查（间隔>4周）的血清卵泡刺激素（follicle-stimulating hormone, FSH）≥25 IU/L，并伴有雌二醇（estradiol, E2）和抗米勒管激素（anti-müllerian hormone, AMH）水平降低的内分泌疾病。卵巢早衰的病因复杂且发病机制尚不明确，而理想可靠的动物模型是开展卵巢早衰病理机制和干预技术研究必不可少的物质基础。卵巢早衰模型常用动物为大鼠和小鼠，建立方法一般包括放化疗诱导、自身免疫、卵巢切除、特定基因敲除和超促排卵等^[23]。卵巢早衰患者在临床上表现为卵泡丢失、卵泡闭锁增多、包膜增厚、间质纤维化的组织病理学改变，以及低雌激素和高促性腺激素的内分泌表现^[24]。大鼠、小鼠的动情周期可以反映卵巢功能，是评价卵巢早衰大鼠、小鼠模型的重要指标。如果同时出现动情周期紊乱、低雌激素和高促卵泡激素水平、

卵巢组织中各级卵泡变少而闭锁卵泡增多、卵巢颗粒细胞凋亡率增高等现象，且以上各项指标与对照组比较具有显著性差异，即可判定为造模成功。

2.1 化学药物诱导的卵巢早衰模型

环磷酰胺、顺铂和雷公藤多苷等化学药物可以通过促进卵泡闭锁，加速卵泡耗竭，从而引发卵巢早衰。Shen等^[25]选用C57BL/6小鼠，每天腹腔注射50 mg/kg环磷酰胺，连续14 d，小鼠出现动情周期紊乱、血清FSH水平升高、E2和AMH水平显著降低、卵巢组织中各阶段生长卵泡数目减少、闭锁卵泡数增多等典型的卵巢早衰表型。董若曦等^[26]给予Wistar大鼠腹腔注射4 mg/kg的顺铂，间隔1周再次注射，结果大鼠出现动情周期紊乱、体重明显下降、AMH水平降低和卵巢组织中各级卵泡数量减少等卵巢早衰表型。另有文献报告，连续每天灌胃40 mg/kg和50 mg/kg雷公藤多甙14 d，均能引起Wistar大鼠（或SD大鼠）动情周期紊乱、血清E2水平显著降低、子宫内膜厚度和卵巢面积显著减少、闭锁卵泡数明显增多等卵巢早衰特征^[27]。目前，药物诱导卵巢早衰模型报道较多，多选择大鼠、小鼠或家兔，单次或者连续给药后均能建立较为理想的卵巢早衰模型（其建模方法汇总见表2），可用于相关药物的药理毒理学评价。

2.2 放射疗法诱导卵巢早衰模型

卵巢对射线十分敏感，其中原始卵泡受损最明显。电离辐射会导致细胞内活性氧（reactive oxygen species, ROS）水平升高，诱发炎症反应，从而使卵巢内代谢和能量调节发生改变，引起颗粒细胞与卵母

表2 药物诱导卵巢早衰动物模型的建立方法比较

Table 2 Comparisons of modeling methods for drug-induced premature ovarian failure animals

诱导药物 Inducing drugs	所用动物 Animals	给药方式 Administration	给药剂量和周期 Dose and time	评价指标 Evaluation indicators
环磷酰胺 Cyclophosphamide	家兔	腹腔注射	50 mg/kg 连续 2 d	血清 FSH、E2 和 AMH 水平, 卵巢组织病理学表现
	2~3 月龄大鼠	腹腔注射	20 mg/kg, 连续 20 d	动情周期, 血清 FSH、E2 和 AMH
	6~8 周龄 C57BL/6 小鼠	腹腔注射	50 mg/kg, 连续 14 d; 100 mg/kg, 连续 10 d	水平, 卵巢组织病理学表现
顺铂 Cisplatin	Wistar 大鼠	腹腔注射	4 mg/kg, 第一次注射后间隔一周再注射	动情周期, 血清 FSH、E2 和 AMH
	SD 大鼠	腹腔注射	6 mg/kg, 第一次注射后间隔一周再注射	水平, 卵巢组织病理学表现
	C57BL/6 小鼠	腹腔注射	50 mg/kg, 连续 7 d	
雷公藤多苷片 Tripterygium glycosides tablet	Wistar 大鼠	灌胃	50 mg/kg, 连续 14 d	动情周期, 血清 FSH、E2 和 AMH
	7~8 周龄 SD 鼠		400 μ g/kg, 连续 60 d	水平, 卵巢组织病理学表现
	8 周龄 SD 大鼠		50 mg/kg, 连续 14 d	
	12 周龄 SD 大鼠		40 mg/kg, 连续 70 d	

注: FSH, 卵泡刺激素; E2, 雌二醇; AMH, 抗苗勒氏管激素。
Note: FSH, follicle-stimulating hormone; E2, estradiol; AMH, anti- Müllerian hormone.

细胞损伤、老化及质量下降, 卵巢储备功能降低, 诱导卵巢早衰的发生^[27]。通过暴露在不同剂量的X射线或 γ 射线可建立卵巢早衰模型, 操作简单, 耗时短, 效果显著。Tan等^[28]利用X射线照射仪, 以4 Gy的辐射剂量对C57BL/6J小鼠进行单次全身照射, 每周连续6 d, 持续2周。照射期间, 小鼠出现动情周期紊乱, 表现为持续的动情后期和动情间期、短暂的动情期。解剖后发现卵巢重量、血清AMH水平和各级卵泡数的显著下降, 成功建立了小鼠卵巢早衰模型。孙萍等^[29]用0.5 Gy和0.7 Gy钴⁶⁰ γ 射线照射大鼠后发现, 随着射线剂量的增加, 卵巢组织中闭锁卵泡数量逐渐增多, 成熟卵泡和次级卵泡数逐渐减少, 颗粒细胞层变薄。因此, 大剂量的钴⁶⁰ γ 射线可以用来建立卵巢早衰大鼠模型。

2.3 自身免疫性卵巢早衰模型

研究显示, 10%~30%的卵巢早衰与自身免疫性疾病相关。因此, 通过切除新生动物胸腺或利用透明带3多肽(zona pellucida glycoprotein 3, ZP-3)作为抗原对雌性动物进行免疫, 可构建自身免疫性卵巢早衰模型。将新生动物的胸腺切除, 会导致自身免疫性CD4⁺T细胞缺少, 引起急性免疫性卵巢炎。用ZP-3免疫后, 同样可以引起卵巢明显的炎症改变。大量卵泡受到淋巴细胞的浸润、破坏后, 无法继续生长为成熟卵泡, 从而出现卵巢萎缩。涂晓娟等^[30]选用新生3 d的BALB/c小鼠, 无菌条件下打开胸腔, 取出两片白色胸腺后立即缝合, 小鼠会出现血清FSH和黄体生成素

(luteinizing hormone, LH)水平显著升高、淋巴细胞浸润、纤维组织增生、生长卵泡数明显减少、闭锁卵泡数目明显增多等表型, 与人类自身免疫性卵巢早衰的典型症状高度一致。Li等^[31]利用完全弗氏佐剂, 以ZP-3多肽(75 μ g/kg)为免疫原, 通过腹腔注射的方式, 对7~8周龄的BALB/c雌鼠进行第一次免疫, 14 d后再进行一次加强免疫, 并在42 d后处死小鼠, 发现小鼠出现典型的卵巢早衰表型, 包括动情周期紊乱、血清FSH水平上升、血清AMH和E2水平显著降低、各级卵泡数量明显减少、大量卵泡闭锁等。

2.4 卵巢切除型卵巢早衰模型

卵巢切除模型是研究雌激素缺乏和卵巢功能下降的经典模型, 可以模拟临床上卵巢手术损伤所致的卵巢早衰, 以及围绝经期妇女的临床症状和相关病理学改变。建模方法: 小鼠麻醉后, 完全暴露卵巢, 用手术缝合线结扎卵巢两侧血管, 切除双侧全部卵巢组织, 并以丝线将残端结扎, 逐层缝合关闭腹腔^[32]。周宇等^[33]通过手术方式切除小鼠的双侧卵巢后, 观察到小鼠的雌激素水平直线下降, 动情周期停滞, 血清FSH水平显著升高, 其他的生理病理改变也符合卵巢早衰的临床表现。卵巢切除法建模对小鼠的一般生理情况影响较小, 是研究卵巢早衰较为理想的动物模型。

2.5 基因敲除型卵巢早衰模型

染色体异常和基因突变都可以引起卵巢早衰的发生。目前, 基因敲除的卵巢早衰模型已较为成熟, 该模型有助于人们了解某特定基因对卵巢早衰的作用。

该模型一般选用小鼠，敲除特定基因后，小鼠血清FSH和LH水平明显增高，卵巢体积减小，原始卵泡数减少，闭锁卵泡数增多，符合卵巢早衰特征。目前已报告的卵巢早衰相关基因包括：磷酸酯酶与张力蛋白同源物基因（phosphatase and tensin homolog, *PTEN*）、生长分化因子9基因（growth differentiation factor 9, *GDF9*）、脆性X智力低下1基因（fragile X mental retardation 1, *FMR1*）、B淋巴细胞瘤-2基因（B-cell lymphoma-2, *Bcl-2*）等。其中，叉头框转录因子2基因（forkhead transcription factor gene 2, *FOXL2*）是目前研究最多的卵巢早衰相关基因^[34]，在卵泡细胞发育和成熟过程中发挥重要作用。Emori等^[35]发现敲除雌性小鼠的*FOXL2*基因后，小鼠颗粒细胞停止生长，随后卵母细胞死亡，大量卵泡闭锁，生育能力降低。随着基因编辑技术的广泛应用，尤其是常间回文重复序列丛集（clustered regularly interspaced short palindromic repeats, CRISPR）及其关联蛋白（CRISPR-associated proteins, Cas）技术，为新的基因突变型卵巢早衰动物模型的建立提供了良好的技术支持。

表3 常见的卵巢早衰动物模型比较

Table 3 Comparisons of common animal models of premature ovarian failure

建模方式 Modeling methods	优点 Advantages	缺点 Disadvantages
化学药物诱导 Chemical drugs induction	造模方法简单易行,周期短,成本低,模型稳定,应用最广	卵巢功能有自然恢复的可能性,不适合进行长期的探索性研究
放射疗法诱导 Radiotherapy induction	成功率高,可重复性强,周期短,能模拟临床放疗损伤导致的卵巢早衰	不易操作,对实验者的健康会产生潜在危害;在干预过程中对其他器官也会产生损伤,影响实验结果
自身免疫 Autoimmunity	模拟程度好,适用于免疫学相关的卵巢早衰生物医学研究	造模方法复杂,成功率低,周期长
卵巢切除 Ovariectomy	模拟程度好,对动物其他组织的损伤小	永久性的卵巢功能丢失,无法应用于卵巢早衰临床研究
基因敲除 Gene knockout	能明确某一特定基因对卵巢早衰的作用	成本高,对实验技术要求高,存在外源性基因表达不稳定可能
超促排卵 Superovulation	有效模拟自然衰老卵巢特征,适合卵巢衰老绝经领域研究	应用相对较少,缺少背景资料

3 睾丸毒性评价动物模型

睾丸在精子发生和分泌激素过程中发挥着至关重要的作用。睾丸组织中生精小管和间质的形态与功能发育会形成高度协调的微环境，保证了睾丸的正常发育和精子生成^[38]。药物和环境类激素污染物等许多外源性物质，会引起睾丸组织损害，导致精子发生障碍，最终引起男性不育。因此，在进行雄性生殖系统毒性评价时，睾丸毒性评价显得尤其重要。同卵巢毒性一样，睾

2.6 超促排卵型卵巢早衰模型

对于啮齿类动物，给予超排卵剂量的孕马血清促性腺激素（pregnant mare serum gonadotrophin, PMSG）和人绒毛膜促性腺激素（human chorionic gonadotropin, HCG）反复诱导超排卵，可导致卵泡闭锁增多，血清雄激素和E2水平均下降。建模方法^[36]：7~8周龄的C57BL/6雌性小鼠腹腔注射5 U的PMSG，48 h后腹腔注射5 U的HCG，19 h后腹腔注射25 U的前列腺素F2α（prostaglandin F2α, PGF2α），完成一个促排卵周期；12 h后进行下一个周期的注射，通过连续10次以上促排卵周期后，即可建立卵巢早衰小鼠模型。Nie等^[37]通过上述方法对C57BL/6小鼠进行5次、10次和15次的连续超排卵，结果发现超过10次超排卵后模型小鼠的卵巢指数降低、原始卵泡数减少、血清E2和AMH水平下降，而FSH水平上升、颗粒细胞凋亡显著增加，即出现卵巢早衰表型。

卵巢早衰动物模型的建立方法多样，各自的优缺点汇总见表3。科研人员可根据每种模型的特点和实验需求选择合适的建模方法。

丸介导的子代生殖表型的变化已经在第一节中详细描述，本节主要讨论受试物对睾丸的直接毒性作用。该类睾丸毒性动物模型的建立方法与药物重复给药毒性研究类似，即根据受试物特点，选择合适的动物和给药方式，给予一定周期的暴露，动物安乐死后，对相关指标进行检测。评价睾丸毒性的实验动物一般选择大鼠、小鼠。组织学检查被认为是评价睾丸损伤最敏感的指标。若睾丸萎缩，生精小管退化或坏死，同时精子质量和活力显著性下降，即可判定为造模成功^[1]。

刘丽莉等^[39]通过腹腔注射的方式给予昆明小鼠每天50 mg/kg的环磷酰胺,每周1次,连续4周,小鼠出现睾丸指数显著降低、睾丸曲细精管结构不完整、生精细胞脱落后呈现大面积的空泡、精子存活率降低而畸形率升高、血清睾酮水平降低等表型。Lin等^[40]以灌胃的方式每天给予SD大鼠40 mg/kg的雷公藤多苷,连续4周,可以降低精子活力,引起生精小管损伤,建立了具有生殖毒性的弱精子症大鼠模型。在雷公藤多苷建模后,大鼠表现出体重减轻和发育迟缓,与中医中由脾虚肾虚引起男性不育的症状一致。

除药物外,环境因素对睾丸的毒性作用也不容小觑,并且随着研究的深入,不断有新的环境污染物被发现可能导致睾丸损害。内分泌干扰物(endocrine disrupting chemicals, EDCs)是一种干扰体内天然激素合成、分泌、转运、结合、作用或消除的外源性物质,可损害生殖系统和内分泌系统^[4]。双酚A、邻苯二甲酸二(2-乙基己基)酯[di-(2-ethylhexyl) phthalate, DEHP]、重金属、丙烯酰胺是常见的具有睾丸毒性的EDCs,可以用于建立睾丸毒性模型。Iram等^[41]以灌胃的方式给予小鼠每天500 mg/kg的DEHP,连续4周,生精细胞和支持细胞高度扭曲,生精小管萎缩,睾丸重量、生精小管管腔平均横截面积、生精细胞数和间质细胞数均减少。Zheng等^[42]在Wistar大鼠饲喂饮水中分别加入梯度浓度的醋酸铅,根据小鼠的饮食习惯,在每晚9时更换新的醋酸铅饮水,并在第2天上午9时再次更换,连续56 d。结果显示,随着醋酸铅剂量的增加,死精子数量和畸形精子数量增加,精子总数和活力下降,睾丸细胞凋亡数量增加,血清睾酮浓度下降,提示醋酸铅致大鼠睾丸毒性模型建立成功。

4 总结

随着2017年中国加入ICH,以及2020年生殖与发育毒性相关指导原则[ICH.S5(R3)]的更新,进行生殖与发育毒性试验时通常选择研究背景资料丰富、与人的种属接近、容易获取且方便操作的动物开展试验,常规实验动物为大鼠、小鼠和家兔。考虑到动物对受试物致畸敏感性的差异,在开展胚胎-胎仔发育毒性试验时,通常选择两种动物,一种是啮齿类动物如大鼠,一种是非啮齿类动物如家兔,以充分暴露受试物的生殖毒性^[7]。小鼠由于易惊、胎仔小、群体畸形现象明显,通常不作为首选动物;大鼠通过催乳素维持早期妊娠,不适合用于评价多巴胺类兴奋剂或降低催乳素水平药物的生殖毒性试验;家兔对消化道功能

紊乱药物和抗生素敏感,其临床表现难以解释。在这些特殊情况下,可以考虑使用替代动物,如小型猪。目前在药物毒理学试验中已有几十种不同品种品系的小型猪得到应用,但国内有关小型猪生殖毒性试验的研究资料还相对有限,在应用上还存在局限性。非人灵长类动物应视为非常规的实验种属,常用于评价仅在灵长类中具有药理学活性的生物制品对胚胎-胎仔发育和出生后早期发育的影响。近年来,使用非人灵长类动物进行生物制品发育毒性测试的比例有所下降(2020—2022年占生物制品许可申请的22%,而2002—2015年为62%),现在更多的生物制品在啮齿类动物中进行测试(2020—2021年占生物制品许可申请的37%)^[14]。在进行动物试验时,还要充分考虑动物福利,遵守“3R”原则。斑马鱼的应用减少了哺乳动物的使用量,而且斑马鱼获取方便,实验周期短,实验成本低,已在部分早期发育毒性研究中替代大鼠和兔。

卵巢早衰动物模型的建立方法多样,每种方法均有独特性和局限性。目前,肿瘤和自身免疫性疾病在临床上发病率高,且社会关注度高,国内外研究化疗药物和自身免疫性疾病导致的卵巢早衰模型最多,其中环磷酰胺、顺铂和ZP-3最具代表性,是公认的卵巢早衰发病机制和治疗研究的常用动物模型。睾丸是许多物质产生生殖毒性的靶器官,而且毒性作用的分子机制多样。在实验研究中,主要依据其发病原因的不同而采用不同的病理方法来进行模型制备,其中化疗药物和内分泌干扰物造模应用较为广泛。

需要强调,研究人类生殖毒性并没有单一的理想动物模型,应根据受试物的特点、与人体的相互作用以及实验动物的特点进行综合考量,选择最适合的动物模型,在一定条件下也可以采用多个动物模型进行评价。尽管动物模型因其局限性不能完全模拟人类疾病,但不断发展优化的动物模型为生殖系统疾病发生机制和治疗靶点的探索提供了更多可能。同时,生殖毒理学动物模型作为评价生殖系统疾病的重要工具,在相关药物开发、诊断方法筛选方面起着不可替代的作用,对于维护生殖健康,提升国家人口安全具有重要意义。

[作者贡献 Author Contribution]

黄冬妍负责查找文献、撰写初稿及修改;
吴建辉负责论文审核和写作指导。

[利益声明 Declaration of Interest]

所有作者均声明不存在利益冲突。

[参考文献References]

- [1] 周植星, 陈美灵, 张晓东, 等. 男性生殖系统用药生殖毒性评价的监管要求和关注要点[J]. 中国临床药理学杂志, 2023, 39(21): 3183-3192. DOI: 10.13699/j.cnki.1001-6821.2023.21.030.
- ZHOU Z X, CHEN M L, ZHANG X D, et al. The regulatory requirements and points to consider for the developmental and reproductive toxicity assessment for male reproductive system medicines[J]. Chin J Clin Pharmacol, 2023, 39(21):3183-3192. DOI: 10.13699/j.cnki.1001-6821.2023.21.030.
- [2] KIM J H, SCIALLI A R. Thalidomide: the tragedy of birth defects and the effective treatment of disease[J]. Toxicol Sci, 2011, 122(1):1-6. DOI: 10.1093/toxsci/kfr088.
- [3] 国家药品监督管理局药品审评中心. 药物生殖毒性研究技术指导原则[EB/OL]. (2006-12-19)[2024-02-01]. <https://www.cde.org.cn/zdyz/domesticinfopage?zdyzldCODE=8eab7a099135eb60cebb678adfec6587>.
- National Medical Products Administration Drug Evaluation Center. The Technical guidelines for research on reproductive toxicity of drugs[EB/OL]. (2006-12-19) [2024-02-01]. <https://www.cde.org.cn/zdyz/domesticinfopage?zdyzldCODE=8eab7a099135eb60cebb678adfec6587>.
- [4] 周萍, 吴建辉. 常见内分泌干扰物对人类生殖功能损伤及其药物干预的研究进展[J]. 中华生殖与避孕杂志, 2022, 42(9):956-961. DOI: 10.3760/cma.j.cn101441-20210307-00106.
- ZHOU P, WU J H. Research progress on the damage of human reproductive function caused by common endocrine disruptors and its drug intervention[J]. Chin J Reprod Contracept, 2022, 42(9):956-961. DOI: 10.3760/cma.j.cn101441-20210307-00106.
- [5] WANG K Y, HUANG D Y, ZHOU P, et al. Bisphenol A exposure triggers the malignant transformation of prostatic hyperplasia in beagle dogs via cfa-miR-204/KRAS axis[J]. Ecotoxicol Environ Saf, 2022, 235: 113430. DOI: 10.1016/j.ecoenv.2022.113430.
- [6] ZHOU P, WU S S, HUANG D Y, et al. Oral exposure to DEHP may stimulate prostatic hyperplasia associated with upregulation of COX-2 and L-PGDS expressions in male adult rats[J]. Reprod Toxicol, 2022, 112: 160-170. DOI: 10.1016/j.reprotox.2022.07.008.
- [7] Food and Drug Administration. S5(R3): Detection of reproductive and developmental toxicity for human pharmaceuticals[EB/OL]. (2020-02-18) [2024-02-01]. <https://www.fda.gov/media/148475/download>.
- [8] 刘昱甫. 拟胚胎和斑马鱼模型评价五种食药两用物质发育毒性[D]. 南昌: 江西中医药大学, 2023. DOI: 10.27180/d.cnki.gjxzc.2023.000568.
- LIU Y F. Embryoid bodies and zebrafish model to evaluate developmental toxicity of five kinds of drug dual-use materials[D]. Nanchang: Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, 2023. DOI: 10.27180/d.cnki.gjxzc.2023.000568.
- [9] 郑成成, 王恩力, 徐百卉, 等. 荆防颗粒浸膏对大鼠生育力与早期胚胎发育毒性研究[J]. 中国药物警戒, 2022, 19(5):505-509. DOI: 10.19803/j.1672-8629.2022.05.07.
- ZHENG C C, WANG E L, XU B H, et al. Toxicity of the reproductive and early embryonic development of Jingfang granule extract in rats[J]. Chin J Pharmacovigil, 2022, 19(5): 505-509. DOI: 10.19803/j.1672-8629.2022.05.07.
- [10] WANG Y G, WU H, CHEN P, et al. Fertility and early embryonic development toxicity assessment of naringin in Sprague-Dawley rats[J]. Regul Toxicol Pharmacol, 2021, 123: 104938. DOI: 10.1016/j.yrtph.2021.104938.
- [11] YUE P, ZHAO X X, LU F, et al. Embryo-fetal developmental toxicity and toxicokinetics of loxoprofen tromethamine intravenously administered to pregnant rats[J]. Birth Defects Res, 2023, 115(2):240-250. DOI: 10.1002/bdr2.2116.
- [12] KUWATA C, MATSUOKA T, OHSHIMA Y, et al. Effects of glucokinase activator, DS-7309, on embryo-fetal developmental toxicity in rats and rabbits[J]. Regul Toxicol Pharmacol, 2022, 129:105119. DOI: 10.1016/j.yrtph.2022.105119.
- [13] RAO G K, SANTAGOSTINO S F, WONG L, et al. Repeat-dose and embryo-fetal developmental toxicity of zinpentraxin Alfa [J]. Reprod Toxicol, 2024, 123: 108526. DOI: 10.1016/j.reprotox.2023.108526.
- [14] BARROW P. Review of embryo-fetal developmental toxicity studies performed for pharmaceuticals approved by FDA in 2020 and 2021[J]. Reprod Toxicol, 2022, 112: 100-108. DOI: 10.1016/j.reprotox.2022.06.012.
- [15] LUNNEY J K, VAN GOOR A, WALKER K E, et al. Importance of the pig as a human biomedical model[J]. Sci Transl Med, 2021, 13(621): eabd5758. DOI: 10.1126/scitranslmed.abd5758.
- [16] 廖生钱. 小型猪在生殖毒性实验中的研究进展[J]. 畜牧兽医科技信息, 2020(9): 28-29. DOI: 10.3969/J. ISSN. 1671-6027.2020.09.015.
- LIAO S Q. Research progress of miniature pigs in reproductive toxicity experiment[J]. Chin J Anim Husb Vet Med, 2020(9): 28-29. DOI: 10.3969/J. ISSN. 1671-6027.2020.09.015.
- [17] SONG Y S, SHAO J J, SHE G B, et al. Developmental and reproductive toxicity of a recombinant protein subunit COVID-19 vaccine (ZF2001) in rats[J]. NPJ Vaccines, 2023, 8(1): 74. DOI: 10.1038/s41541-023-00673-3.
- [18] HOWE K, CLARK M D, TORROJA C F, et al. The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome[J]. Nature, 2013, 496(7446): 498-503. DOI: 10.1038/nature12111.
- [19] 马雪莹. 基于斑马鱼模型研究吡啶磺胺的发育毒性与致毒机制[D]. 厦门: 华侨大学, 2022. DOI:10.27155/d.cnki.ghqiu.2022.000728.
- MA X Y. Study on developmental toxicity and toxicity mechanism of indazolsulfamide based on zebrafish model[D]. Xiamen: Huaqiao University, 2022. DOI:10.27155/d.cnki.ghqiu.2022.000728.
- [20] YU J, CHENG W Q, JIA M, et al. Toxicity of perfluorooctanoic acid on zebrafish early embryonic development determined by single-cell RNA sequencing[J]. J Hazard Mater, 2022, 427: 127888. DOI: 10.1016/j.jhazmat.2021.127888.
- [21] 张元慧, 蒋建东, 孔维佳. 非啮齿类动物在生殖毒性试验中的应用进展[J]. 中国比较医学杂志, 2019, 29(11):111-115. DOI: 10.3969/j.issn.1671-7856.2019.11.017.
- ZHANG Y H, JIANG J D, KONG W J. Research progress with non-rodent species in reproductive toxicity studies[J]. Chin J Comp Med, 2019, 29(11):111-115. DOI: 10.3969/j.issn.1671-7856.2019.11.017.
- [22] 杨威, 杨明俊, 王玉柱, 等. 大气污染细颗粒物对女(雌)性生殖健康影响的研究进展[J]. 中华生殖与避孕杂志, 2019(7):602-607. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2096-2916.2019.07.016.
- YANG W, YANG M J, WANG Y Z, et al. Impact of atmospheric

- fine particles on female reproductive health[J]. Chin J Reprod Contracept, 2019(7): 602-607. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2096-2916.2019.07.016.
- [23] GHahremani-Nasab M, GHANBARI E, JAHANBANI Y, et al. Premature ovarian failure and tissue engineering[J]. J Cell Physiol, 2020, 235(5):4217-4226. DOI: 10.1002/jcp.29376.
- [24] 李虹璇, 李思慧, 冯嘉欣, 等. 卵巢早衰动物模型构建方法及比较研究进展[J]. 实验动物与比较医学, 2021, 41(6):505-514. DOI: 10.12300/j.issn.1674-5817.2021.056.
- LI H X, LI S H, FENG J X, et al. Construction methods and comparative research progress of premature ovarian failure animal models[J]. Lab Anim Comp Med, 2021, 41(6):505-514. DOI: 10.12300/j.issn.1674-5817.2021.056.
- [25] SHEN J, CAO D, SUN J L. Ability of human umbilical cord mesenchymal stem cells to repair chemotherapy-induced premature ovarian failure[J]. World J Stem Cells, 2020, 12(4): 277-287. DOI: 10.4252/wjsc.v12.i4.277.
- [26] 董若曦, 朱小丹, 樊伯珍, 等. 不同剂量顺铂腹腔注射建立大鼠化疗损伤性卵巢早衰模型[J]. 实验动物与比较医学, 2020, 40(2): 104-109. DOI: 10.3969/j.issn.1674-5817.2020.02.003.
- DONG R X, ZHU X D, FAN B Z, et al. Intraperitoneal injection in different dosages of cisplatin to establish a rat model of premature ovarian failure induced by chemotherapy[J]. Lab Anim Comp Med, 2020, 40(2):104-109. DOI: 10.3969/j.issn.1674-5817.2020.02.003.
- [27] HUANG Y Q, HU C, YE H F, et al. Inflamm-aging: a new mechanism affecting premature ovarian insufficiency[J]. J Immunol Res, 2019, 2019:8069898. DOI: 10.1155/2019/8069898.
- [28] TAN R R, HE Y H, ZHANG S Y, et al. Effect of transcutaneous electrical acupoint stimulation on protecting against radiotherapy-induced ovarian damage in mice[J]. J Ovarian Res, 2019, 12(1):65. DOI: 10.1186/s13048-019-0541-1.
- [29] 孙萍, 包秀芳. 不同剂量钴⁶⁰射线致大鼠卵巢早衰的实验研究[J]. 世界最新医学信息文摘, 2017, 17(47):1. DOI: CNKI: SUN: WMIA.0.2017-47-038.
- SUN P, BAO X F. Experimental study on premature ovarian failure induced by different doses of cobalt⁶⁰ gamma rays in rats [J]. World Latest Medical Information, 2017, 17(47):1. DOI: CNKI: SUN: WMIA.0.2017-47-038.
- [30] 涂晓娟. 免疫性卵巢早衰中Treg调控B细胞功能的初步研究[D]. 重庆: 中国人民解放军陆军军医大学, 2020. DOI: 10.27001/d.cnki.gtjyu.2019.000218.
- TU X J. Autoimmune ovarian premature aging Treg regulation B cell function in the preliminary study[D]. Chongqing: The Chinese people's liberation army (PLA) army medical university, 2020. DOI: 10.27001/, nkidc. Gtjyu. 2019. 000218.
- [31] LI X R, XIE J X, WANG Q R, et al. MiR-21 and pellino-1 expression profiling in autoimmune premature ovarian insufficiency[J]. J Immunol Res, 2020, 2020: 3582648. DOI: 10.1155/2020/3582648.
- [32] 潘先均, 张琪娟, 孙荣华, 等. 小鼠卵巢切除术中戊巴比妥麻醉使用及围手术期改良[J]. 医学信息, 2014, 27(1):45-46. DOI: 10.3969/j.issn.1006-1959.2014.01.058.
- PAN X J, ZHANG Q J, SUN R H, et al. The use of pentobarbital sodium and improvement of ovariectomy during the perioperative period[J]. J Med Inf, 2014, 27(1): 45-46. DOI: 10.3969/j.issn.1006-1959.2014.01.058.
- [33] 周宇, 贾玉玲, 严大为, 等. 两种小鼠卵巢早衰模型的比较[J]. 上海医学, 2018, 41(8): 489-494. DOI: CNKI: SUN: SHYX. 0.2018-08-012.
- ZHOU Y, JIA Y L, YAN D W, et al. Comparison of two kinds of premature ovarian failure model in mice[J]. Shanghai Med J, 2018, 41(8):489-494. DOI: CNKI: SUN: SHYX. 0.2018-08-012.
- [34] VENTURELLA R, DE VIVO V, CARLEA A, et al. The genetics of non-syndromic primary ovarian insufficiency: a systematic review[J]. Int J Fertil Steril, 2019, 13(3):161-168. DOI: 10.22074/ijfs.2019.5599.
- [35] EMORI C, ITO H, FUJII W, et al. Oocytes suppress FOXL2 expression in cumulus cells in mice[J]. Biol Reprod, 2020, 103(1):85-93. DOI: 10.1093/biolre/ioaa054.
- [36] 靳琦, 尹平, 郑慧敏. 早发性卵巢功能不全动物模型研究概述[J]. 中华中医药杂志, 2022, 37(1):305-308.
- JIN Q, YIN P, ZHENG H M. Summary of animal models of premature ovarian insufficiency[J]. Chin J Trad Chin Med Pharm, 2022, 37(1):305-308.
- [37] NIE X W, DAI Y J, ZHENG Y, et al. Establishment of a mouse model of premature ovarian failure using consecutive superovulation[J]. Cell Physiol Biochem, 2018, 51(5):2341-2358. DOI: 10.1159/000495895.
- [38] 张博航, 祁晓萱, 袁艳. 睾丸类器官在体外精子发生中的研究进展[J]. 合成生物学, 2024, 5(4):770-781. DOI: 10.12211/2096-8280.2023-095.
- ZHANG B H, QI X X, YUAN Y. Advancements in testicular organoids for *in vitro* spermatogenesis[J]. Synthetic Biol J, 2024, 5(4):770-781. DOI: 10.12211/2096-8280.2023-095.
- [39] 刘丽莉, 刘昌平, 孙桃桃, 等. 锁阳水提液对环磷酰胺所致小鼠睾丸损伤的影响[J]. 淮北师范大学学报(自然科学版), 2024, 45(1): 56-61. DOI: 10.3969/j.issn.2096-8248.2024.01.010.
- LIU L L, LIU C P, SUN T T, et al. Effect of *Cynomorium songaricum* water extract on testicular injury induced by cyclophosphamide in mice[J]. J Huaibei Norm Univ Nat Sci, 2024, 45(1):56-61. DOI: 10.3969/j.issn.2096-8248.2024.01.010.
- [40] LIN X Y, LI Q R, LI H Y, et al. Jujing Zhuyu decoction inhibits apoptosis in rats with asthenozoospermia by regulating the mitochondrial apoptosis pathway[J]. Andrologia, 2022, 54(11): e14632. DOI: 10.1111/and.14632.
- [41] IRAM F, BATTOOL S, SHAMEEM S, et al. Effect of aqueous garlic (*Allium sativum*) extract against di- (2-ethylhexyl) phthalate induced reproductive toxicity in male mice[J]. Andrologia, 2022, 54(8): e14480. DOI: 10.1111/and.14480.
- [42] ZHENG X Y, GUO C M, LV Z J, et al. From animal to cell model: pyroptosis targeted-fibrosis is a novel mechanism of lead-induced testicular toxicity[J]. Food Chem Toxicol, 2023, 178:113886. DOI: 10.1016/j.fct.2023.113886.
- (收稿日期: 2024-02-23 修回日期: 2024-07-28)
(本文编辑: 张俊彦, 富群华, 丁宇菁, 姜怡欣)

【引用本文】

黄冬妍, 吴建辉. 生殖毒理学研究动物模型的建立方法及应用评价[J]. 实验动物与比较医学, 2024, 44(5): 550-559. DOI: 10.12300/j.issn.1674-5817.2024.028.

HUANG D Y, WU J H. Establishment methods and application evaluation of animal models in reproductive toxicology research [J]. Lab Anim Comp Med, 2024, 44(5): 550-559. DOI: 10.12300/j.issn.1674-5817.2024.028.