

王蓉,王永,骆永伟,等. 雌性大鼠生育力与早期胚胎发育毒性阳性模型建立及比较 [J]. 中国比较医学杂志, 2020, 30(2): 21-26.

Wang R, Wang Y, Luo YW, et al. Establishment and comparison of a positive model for fertility and early embryonic developmental toxicity in female rats [J]. Chin J Comp Med, 2020, 30(2): 21-26.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2020.02.004

雌性大鼠生育力与早期胚胎发育毒性阳性模型建立及比较

王蓉,王永,骆永伟,许丽,周莉,孙祖越*

(上海市计划生育科学研究所药理毒理学研究室,中国生育调节药物毒理学检测中心,国家人口和计划生育委员会计划生育药具重点实验室,复旦大学生殖与发育研究院,上海 200032)

【摘要】 目的 比较 Sprague Dawley (SD) 雌性大鼠交配前给予不同剂量和次数的环磷酰胺 (Cyclophosphamide, CTX) 后生殖和发育指标的变化,建立生育力与早期胚胎发育毒性试验(I段)标准化阳性对照模型。方法 SD大鼠150只,雌雄各半,按体重随机分为溶媒对照组、CTX 20 mg/kg 和 CTX 100 mg/kg 组,每组50只,雌雄各半。雌性大鼠于交配前14 d 分别按5次和1次腹腔注射 (intraperitoneal, ip) 给予20 mg/kg 和100 mg/kg 的CTX,每日1次;溶媒对照组同途径给予等量生理盐水。用于交配的各組雄性大鼠不给药;每天观察SD大鼠一般状况,每周测定2次体重和1次摄食量。雌性大鼠于妊娠第14天(GD₁₄;查到精子或阴栓日为GD₀)处死进行终末检查并计算妊娠率、着床前丢失率、着床率、平均黄体数、平均着床数、着床后丢失率、平均活胎数、活胎率、子宫连胎重和吸收胎率等指标。结果 与溶媒对照组相比,CTX各组SD大鼠体重和摄食量均明显降低($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),妊娠率、着床前丢失率、着床率、平均黄体数和平均着床数均无统计学差异;CTX 20 mg/kg 组子宫连胎重明显降低($P < 0.01$);CTX 100 mg/kg 着床后丢失率明显增加($P < 0.01$),平均活胎数、活胎率、子宫连胎重明显偏低,吸收胎率明显偏高($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。结论 雌性SD大鼠于交配前14 d 按20 mg/kg 和100 mg/kg 分别以5次和1次腹腔注射给予CTX,均可以成功地建立SD雌性大鼠生育力与早期胚胎发育毒性阳性模型,且CTX按100 mg/kg 给药1次的给药方案为最佳选择。

【关键词】 生育力与早期胚胎发育毒性;阳性模型;环磷酰胺;生殖毒性;大鼠

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2020)02-0021-06

Establishment and comparison of a positive model for fertility and early embryonic developmental toxicity in female rats

WANG Rong, WANG Yong, LUO Yongwei, XU Li, ZHOU Li, SUN Zuyue*

(Shanghai Institute of Planned Parenthood Research & National Evaluation Centre for Toxicology of Fertility Regulating Drugs, Key Laboratory of Reproduction Regulation of NPFPC, Reproductive and Developmental Research Institute of Fudan University, Shanghai 200032, China)

【Abstract】 Objective To compare the changes in reproductive and developmental indexes after administration of different doses of cyclophosphamide before mating in Sprague Dawley (SD) female rats, and to establish a standardized

【基金项目】 重大新药创制科技重大专项“十三五”计划(2018ZX09201017-002);上海市科委研发平台专项(17DZ2293600)。

【作者简介】 王蓉(1990—),女,助理实验师,主要研究方向:新药临床前安全性评价和药物生殖药理毒理学研究。E-mail:luhequ@163.com

【通信作者】 孙祖越(1964—),男,研究员,主要研究方向:新药临床前安全性评价和药物生殖药理毒理学研究。E-mail:sunzy64@163.com

positive model for fertility and early embryo developmental toxicity test (Phase I). **Methods** One hundred and fifty SD rats (75 male, 75 female) were randomly divided into three groups ($n = 50$; 25 male, 25 female), solvent control, cyclophosphamide 100 mg/kg and cyclophosphamide 20 mg/kg. Female rats were injected intraperitoneally with 20 mg/kg or 100 mg/kg of cyclophosphamide once daily in the 14 days preceding the mating period. The solvent control group was given the same volume of normal saline via the same route. Drug was administered from 14 days before mating until the 7th day of gestation (GD₇, the day found the sperm or the pudendal embolism seemed as GD₀). No drug was administered to male rats in any group. General physical examination of the animals was performed daily, body weight was measured twice a week and food intake was measured once a week. Female rats were sacrificed at GD₁₄ and pregnancy outcomes including pregnancy rate, loss rate before implantation, rate of implantation, the numbers of corpora lutea, loss rate after implantation, live fetuses, rate of live fetuses, uterine plus fetal weight and rate of absorbed fetuses were recorded. **Results** Compared with the solvent control group, the body weight and food intake of the two cyclophosphamide groups were all significantly decreased ($P < 0.05$ and $P < 0.01$). There was no significant difference in pregnancy, pre-implantation loss and implantation rates, or the average number of corpora lutea and the mean implantation number. The weight of uterus plus fetuses in the cyclophosphamide 20 mg/kg group was significantly reduced ($P < 0.01$). The average number of live fetuses, the rate of live fetuses, and uterus plus fetuses weight were significantly reduced, and the rate of absorbed fetuses was significantly higher in both treatment groups compared with the control group ($P < 0.05$ and $P < 0.01$). **Conclusions** One hundred milligrams per kilogram and 20 mg/kg of cyclophosphamide administered intraperitoneally to female rats once and 5 times a day during the 14 days preceding mating, can successfully establish a standardized positive model for fertility and early embryo developmental toxicity in SD female rats, with 20 mg/kg cyclophosphamide representing the best option.

【Keywords】 cyclophosphamide; reproductive toxicity; fertility and early embryonic developmental toxicity; positive model; rat

2012 年,参考人用药品国际协调组织及美国食品药品监督管理局等指南^[1-4],原国家食品药品监督管理局药品审评中心颁布了我国的《药物生殖毒性研究技术指导原则》。依据该指导原则,Ⅰ段生殖毒性试验由交配前到交配期直至胚胎着床给药,而Ⅱ段生殖毒性试验自胚胎着床至硬腭闭合给药,主要目的在于评价受试物对生殖细胞、受孕和妊娠等亲代生殖机能是否产生不良影响,是新药非临床安全性评价中判定外源性因素生殖毒性的标准方法^[1-5]。

考虑到生殖毒性实验主要有以下几个特点:1、SD 大鼠交配、接受受试物时间以及分娩时间不同步;2、毒性表现的形式具有蓄积性、迁延性、滞后性和整体性;3、检测指标及其统计处理呈现多样性和复杂性;4、窝效应和窝大小不均一等。因此,数据采集、处理、解释和分析具有一定的复杂性和难点。而阳性对照的设立可以屏蔽干扰因素,平衡非实验因素对于实验结果的影响,以利于充分观察毒性效应。为了对每一次实验都能做到认真和谨慎,我们认为建立一个良好的阳性模型对大量实验数据的分析以及对实验结果的解释才会充分、真实和可信,是保证实验顺利进行的重要环节^[6-7]。

环磷酰胺对动物胎仔的致畸性已得到广泛接

受,常被设定为Ⅱ段生殖毒性实验的阳性对照受试物。同时,可作为Ⅱ段生殖毒性实验阳性对照的还有敌枯双、阿斯匹林、维生素 A 和反应停等,本研究室也对此进行了系统研究^[8],而鲜有人进行Ⅰ段生殖毒性实验阳性对照物敏感性高低的对比研究。现有的文献报道显示,CTX 的Ⅰ段生殖毒性研究集中于其对雄性大鼠精子及睾丸生精细胞等毒性^[9],少见对雌性动物毒性的报道。因此,本研究在 GLP 实验室条件下,比较雌性 SD 大鼠于交配前给予不同剂量和频次的 CTX 后生殖和发育指标的变化,发现生育力与早期胚胎发育毒性实验(Ⅰ段)标准化阳性对照模型的建立方案。

1 材料和方法

1.1 实验动物

SPF 级 SD 大鼠 150 只,雌雄各半,雌鼠体重 170~190 g,6~8 周龄;雄鼠体重 380~400 g,12~14 周龄(均为接收时体重),由上海西普尔-必凯实验动物有限公司提供 [SCXK(沪)2018-0006],合格证序号 0034062。动物饲养于上海市计划生育科学研究所(中国生育调节药物毒理检测中心) SPF 级动物房内 [SYXK(沪)2018-0017],室温 20℃~26℃,湿度 40%~70%,12 h/12 h 光照/黑暗,换气

每小时 12 次,全新风,自由饮水摄食。本试验所涉及的动物管理、使用和相关操作均经过中国生育调节药物毒理检测中心实验动物管理和使用委员会(IACUC)批准并严格遵循实验动物使用的 3R 原则给予人道主义关怀,批准号为(IACUC-20150315-01)。

1.2 主要试剂与仪器

CTX (批号 I15T010) 购自 Alfa AesarJohnson Matthey plc, 临用前用无菌生理盐水配制;大鼠黄体生成素、卵泡刺激素、雌二醇、孕酮和睾酮酶联免疫吸附试验(ELISA)试剂盒均购于上海沪峰生物科技有限公司。

BH-2 生物显微镜, Olympus 公司; PL1501-S 电子天平, 梅特勒-托利多公司; Zenith 200st 酶标仪, Anthos 公司。

1.3 实验方法

1.3.1 实验分组及处理

SD 大鼠根据体重随机分为 3 组,分别为溶媒对照组、CTX 20 mg/kg 和 CTX 100 mg/kg 组,每组 50 只,雌雄各半。

溶媒对照组雌性大鼠交配前连续腹腔注射给予生理盐水 14 d 至 GD₇ 停药; CTX 100 mg/kg 组雌性大鼠于交配前 14 d 一次性腹腔注射给予 100 mg/kg 的 CTX; CTX 20 mg/kg 组雌性大鼠于交配前 14 d 腹腔注射给予 20 mg/kg 的 CTX, 每日 1 次连续 5 d。给药体积均为 10 mL/kg。

1.3.2 体重和摄食量测定

每天观察 1~2 次 SD 大鼠外观体征、行为活动及死亡等情况,发现死亡或濒死动物,及时剖检。每周测定 2 次体重,每周测定 1 次摄食量(交配期除外)。

1.3.3 性周期和激素测检测

各组雌性大鼠按 1:1 比例与正常雄性大鼠合笼交配,连续交配 2 周,每天上午 8:00~9:30 进行阴道涂片检查,查到精子或阴栓时定为 GD₀,观察其性周期(动情间期、动情前期、动情期和动情后期^[10])及是否含有精子,计算 SD 大鼠交配成功的平均合笼时间和交配率;妊娠 SD 大鼠于 GD₁₄ 处死,2 周内仍未交配成功的雌性大鼠于交配结束后 24 h 处死,处死前采集外周血约 2 mL,分离血清,ELISA 法测定睾酮(testosterone, T)、雌二醇(estradiol, E₂)、卵泡刺激素(follicle-stimulating hormone, FSH)、黄体生成素(luteinizing hormone, LH)和孕酮

(progesterone, P)含量。

1.3.4 妊娠终末检查

孕鼠于 GD₁₄ 处死后记录黄体数、着床数、子宫连胎重、活胎数、死胎数、吸收胎数,检查卵巢、子宫以及胎盘、胎鼠外观,肉眼观察有异常时进行组织病理学检查。计算交配率、妊娠率、着床前丢失率(1-着床数/黄体数)、着床后丢失率(1-活胎数/黄体数)、平均着床率、活胎率、死胎率和吸收胎率。2 周内未交配成功雌鼠,除不检查胎鼠、胎盘外,其它解剖后处理方法同交配成功雌鼠。

1.4 统计学方法

实验数据用平均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用 SPSS 20.0 软件进行统计分析。体重、摄食量、黄体数、着床数、活胎数、死胎数和吸收胎数等资料用单因素方差分析进行检验,方差齐时选用 Dunnett 分析,方差不齐时选 Dunnett's T₃ 分析;交配率、受孕率、生育率、活胎率、死胎率和死亡率等资料用 χ^2 检验。以 $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 认为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 一般状况及体重

给药后第 5 天开始,环磷酰胺组部分雌性 SD 大鼠均出现眼角、鼻周分泌物增多现象,至给药后第 7 天,全部 SD 大鼠出现该异常,均持续 3 d 左右基本恢复,CTX 100 mg/kg 组 2 只大鼠伴嘴角溃烂现象,给药后第 10 天时其中 1 只死亡,另一只于给药后 3 周基本恢复。溶媒对照组雌性 SD 大鼠外观体征、行为活动均未见明显异常,未出现 SD 大鼠死亡。

溶媒对照组和 CTX 20 mg/kg 动物交配前体重均呈逐渐升高趋势,20 mg/kg 组呈升-降-升趋势,其中第 8 天和第 11 天时与溶媒对照组相比降低($P < 0.01$ 和 $P < 0.05$),详见表 1。

如表 2 所示,妊娠期间,溶媒对照组、CTX 20 mg/kg 和 100 mg/kg 组增重均呈 U 型变化趋势,提示环磷酰胺造成的体重降低可恢复;GD₀~GD₃ 至 GD₁₀~GD₁₄ 时,CTX 20 mg/kg 和 100 mg/kg 组与溶媒对照组相比无明显差异($P > 0.05$)。

2.2 摄食量

交配前第 1 周,CTX 20 mg/kg 和 100 mg/kg 组雌性 SD 大鼠摄食量均明显低于溶媒对照组($P < 0.01$);妊娠期第 2 周,CTX 20 mg/kg 组摄食量与溶媒对照组相比降低($P < 0.01$),详见表 3。

2.3 性周期

交配期间,溶媒对照组、CTX 20 mg/kg 和 100 mg/kg 组交配成功及未交配成功雌性 SD 大鼠均未见明显性周期异常。上述各组交配成功的平均合笼时间分别为 3.83、3.09 和 3.00 d,与溶媒对照组相比均未见明显统计学差异。

2.4 激素水平

如表 4 所示,与溶媒对照组相比,仅 CTX 20 mg/kg 组 T 显著降低($P < 0.01$),其它指标均无统计学差异,提示 20 mg/kg 的 CTX 给药方案可能会影响孕鼠卵泡内膜细胞和肾上腺皮质网状带细胞睾酮的产生。

2.5 妊娠结局

如表 5 所示,与溶媒对照组相比,仅 CTX 100 mg/kg 组着床后丢失率明显升高($P < 0.01$),与 CTX 处理组妊娠率、着床前丢失率、着床率、平均黄体数和平均着床数均无统计学差异,提示 CTX 100 mg/kg 的给药方案仅影响妊娠母鼠着床后参数,不会影响着床前相关参数。

CTX 20 mg/kg 组子宫连胎重和 CTX 100 mg/kg 组的平均活胎数、活胎率、吸收胎率与溶媒对照组相比有统计学差异($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),表明 CTX 两种给药方案均可导致母体黄体功能不足进而无法维持妊娠后子宫内膜的正常生理作用,引起着床后相关指标的异常。

表 1 环磷酰胺对交配前 SD 雌鼠体重的影响($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Effect of CTX on body weight of female rats before mating

组别 Groups	动物数 No.	D ₀	D ₄	D ₈	D ₁₁
对照组 Control group	25	194.9±9.4	206.0±10.5	215.7±11.0	220.9±11.9
CTX 100 mg/kg	25 ^a	195.1±10.1	199.5±9.6	191.1±15.5 ^{**}	208.8±16.3 [*]
CTX 20 mg/kg	25	195.1±10.3	202.1±8.6	209.5±8.6	216.2±11.2

注:与溶媒对照组相比,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$ 。^aCTX 100 mg/kg D₁₁时 $n = 24$ 。

Note. Compared with the control group,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$.^aCTX 100 mg/kg group with $n = 24$ (D₁₁).

表 2 环磷酰胺对 SD 孕鼠体重的影响($\bar{x} \pm s$, g/d)

Table 2 Effects of CTX on weight gain of pregnant rats

组别 Groups	动物数 No.	GD ₀ ~GD ₃	GD ₃ ~GD ₇	GD ₇ ~GD ₁₀	GD ₁₀ ~GD ₁₄
对照组 Control group	23	5.0±1.6	4.2±1.1	5.0±1.3	5.5±1.7
CTX 100 mg/kg	22	5.7±1.5	4.1±1.3	4.9±1.5	5.3±1.1
CTX 20 mg/kg	20	5.2±1.4	4.0±0.9	4.7±1.4	5.6±1.3

表 3 环磷酰胺对 SD 雌鼠摄食量的影响($\bar{x} \pm s$)

Table 3 Effects of cyclophosphamide on food intake of female rats

组别 Groups	交配前 Before mating			妊娠期 Gestation period		
	笼数 No.	第一周 First week	第二周 Second week	动物数 No.	第一周 First week	第二周 Second week
对照组 Control group	5	15.6±0.3	17.4±0.5	23	21.7±1.3	25.8±1.8
CTX 100 mg/kg	5	10.8±0.7 ^{**}	17.4±0.7	22	21.8±1.4	24.5±1.9
CTX 20 mg/kg	5	13.9±0.5 ^{**}	18.4±0.4	20	21.3±2.4	23.5±2.2 ^{**}

注:与溶媒对照组相比,** $P < 0.01$ 。

Note. Compared with the control group,** $P < 0.01$.

表 4 环磷酰胺对 SD 孕鼠激素的影响($\bar{x} \pm s$)

Table 4 Effects of CTX on the hormones of pregnant rats

组别 Groups	动物数 No.	睾酮(nmol/L) T	雌二醇(ng/L) E ₂	卵泡刺激素(IU/L) FSH	黄体生成素(pg/mL) LH	孕酮(μg/L) P
对照组 Control group	23	74.1±7.6	44.0±13.1	11.6±1.5	992.6±78.1	18.1±4.1
CTX 100 mg/kg	22	72.0±7.9	46.6±13.8	11.3±1.6	984.8±72.9	18.2±5.4
CTX 20 mg/kg	20	66.1±7.7 ^{**}	49.2±14.9	11.6±1.2	1001.0±81.6	21.1±6.1

注:与溶媒对照组相比,** $P < 0.01$ 。

Note. Compared with the control group,** $P < 0.01$.

表 5 环磷酰胺对 SD 雌鼠妊娠结局的影响($\bar{x} \pm s$)
Table 5 Effects of CTX on the pregnancy outcome of female rats

组别/指标 Groups/Items	溶媒对照组 Control group	环磷酰胺 100 mg/kg 组 CTX 100 mg/kg	环磷酰胺 20 mg/kg 组 CTX 20 mg/kg
交配成功率 Mating success (%)	92.00 (23/25)	91.67 (22/24)	84.00 (21/25)
动物数 No. of pregnant animals (n)	23	22	20
妊娠率 Pregnancy rate (%)	100 (23/23)	100 (22/22)	95.24 (20/21)
黄体 Corpora lutea			
总黄体数 Total corpora lutea (n)	333	300	267
平均黄体数 Mean No. of corpora lutea (n)	14.5 \pm 1.3	13.6 \pm 1.4	13.4 \pm 2.1
着床前丢失率 Loss rate before implantation (%)	7.21 (24/333)	8.33 (25/300)	6.74 (18/267)
着床 implantations			
总着床数 Total No. of implantations (n)	309	275	249
平均着床数 Mean No. of implantations (n)	13.4 \pm 1.3	12.5 \pm 1.4	12.5 \pm 1.8
着床率 Rate of implantation (%)	92.79 (309/333)	91.67 (275/300)	93.26 (249/267)
着床后丢失率 Loss rate after implantation (%)	3.56 (11/309)	8.73** (24/275)	5.62 (14/249)
活胎 Live fetuses			
活胎数 No. of live fetuses (n)	298	251	235
平均活胎数 Mean No. of live fetuses (n)	13.0 \pm 1.4	11.4 \pm 1.8*	11.8 \pm 2.2
活胎率 Rate of live fetuses (%)	96.44 (298/309)	91.27** (251/275)	94.38 (235/249)
吸收胎数 No. of absorbed fetuses (n)	10	23	13
吸收胎率 Rate of absorbed fetuses (%)	3.24 (10/309)	8.36** (23/275)	5.22 (13/249)
死胎数 No. of dead fetuses (n)	1	1	1
死胎率 Rate of dead fetuses (%)	0.32 (1/309)	0.36 (1/275)	0.40 (1/249)
子宫连胎重 Uterus plus fetuses weight (g)	12.2 \pm 1.2	10.4 \pm 1.8**	10.7 \pm 2.1**
外观畸形数 No. of appearance malformation (n)	0	0	0
外观畸形率 Rate of appearance malformation (%)	0	0	0

注:与溶媒对照组相比,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$ 。

Note. Compared with the control group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

3 讨论

CTX 作为一种常见的烷化剂类免疫抑制剂,可以引发 SD 大鼠体重下降、摄食减低、骨髓抑制、感染甚至死亡等诸多全身毒性症状,但除死亡外其他症状停药一定时间后均具有可恢复性^[11]。本研究表明,雌性大鼠以 2 种不同的给药方案(CTX 100 mg/kg,腹腔注射给药 1 次和 20 mg/kg,腹腔注射给药 5 次)给予 CTX 后,体重和摄食降低;并出现明显的眼角、鼻周分泌物增多,偶见皮肤溃烂和死亡,考虑与 CTX 所致的全身毒性及其恢复性相关。

CTX 20 mg/kg 组睾酮显著低于溶媒对照组,孕酮高于溶媒对照组。据 Jarrell 等报道^[12],CTX 对卵巢具有潜在的毒性作用,对大鼠的急性影响表现为血清雌二醇和孕酮水平降低。结合本研究中 SD 大鼠激素的变化,认为该给药方案可轻度影响雌性大鼠卵巢分泌功能,与文献报道具有较好一致性。

CTX 20 mg/kg 和 100 mg/kg 组总黄体数、平均黄体数、总着床数和平均着床数虽与溶媒对照组相比无统计学差异,但均呈减少趋势。据朱长林等报道^[13],CTX 可使早期胚胎细胞数减少并可影响早期

胚胎发育的毒性阈值,但若达到一定阈值,则导致桑椹胚无法生存,呈蜕变状。因此,本研究采用的两种给药方案均可抑制雌性大鼠卵巢排卵数目,进而减少其着床数,与文献报道具有一致性。另外,两种给药方案均可导致吸收胎率和着床后丢失率明显升高,活胎率和子宫连胎重明显降低,表明 CTX 两种给药方案均可严重影响早期胚胎发育,延缓其生长速度或直接导致其死亡。

综上,在 GLP 实验室条件下,SPF 级雌性大鼠于交配前 14 d 按 20 mg/kg 和 100 mg/kg 分别腹腔注射给予 CTX 5 d 和 1 d,每天 1 次,均可以成功地建立 SD 雌性大鼠生育力与早期胚胎发育毒性阳性模型。比较两种给药方案引发的雌性大鼠妊娠结局发现其中 100 mg/kg 腹腔注射给予 1 次的给药方案可以导致更多的阳性指标变化(着床后丢失率明显升高,活胎率和子宫连胎重明显降低)和更明显的阳性特征,可以作为雌性大鼠生育力与早期胚胎发育毒性阳性模型的标准化构建方案。

目前,有文献报道 CTX 作为烷化剂诱导卵巢功能发生异常^[14],少数实验室甚至对其进行了比较全面的雌性生殖功能评价研究^[15],虽然彼此间所用的

动物品系、给药途径、给药阶段、给药剂量甚至实验室条件有所不同,得到的阳性指标也不尽相同,但这些阳性结果和本研究得到的相关结果均表明了 CTX 对 I 段生殖毒性生殖和发育指标影响的可能。鉴于本研究中仍有一些诸如性周期、激素等指标没有得到很明显的阳性结果,因此 CTX 的给药途径、给药阶段和给药剂量等仍有进一步优化的可能,各实验室间特别是 GLP 实验室间的比对研究也显得尤为迫切,CTX 成为公认的标准化阳性对照受试物,仍然需要进一步的探索研究。

参考文献:

- [1] ICH Steering Committee. Harmonised Tripartite Guideline S5 (R2). Detection of toxicity to reproduction for medicinal products [EB/OL]. 2000 [2018-12-29]. https://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Safety/S5/Step4/S5R2_Guideline.pdf.
- [2] ICH Steering Committee. Harmonised Tripartite Guideline S5 (R3) Revision of S5 Guideline on Detection of Toxicity to Reproduction for Human Pharmaceuticals [EB/OL]. 2017 [2018-12-29]. https://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Safety/S5/S5-R3EWG_Step2_Guideline_2017_0705.pdf.
- [3] ICH Steering Committee. Harmonised Tripartite Guideline M3 (R2): Non-clinical safety studies for the conduct of human clinical trials for pharmaceuticals [EB/OL]. 2009 [2018-12-29]. https://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Multidisciplinary/M3_R2/Step4/M3_R2_Guideline.pdf.
- [4] FDA. Guidance for Industry Reproductive and Developmental Toxicities-Integrating Study Results to Assess Concerns [EB/OL]. 2011 [2018-12-29]. <https://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/UCM079240.pdf>.
- [5] Central of Drug Assessment of National Food and Drug Administration. Technical principle of drug reproductive toxicity research [EB/OL]. 2012 [2018-12-29]. <http://www.cde.org.cn/zdyz.do?method=initValue&frameStr=0#top>.
- [6] 孙祖越,周莉,闫晗,等. 如何成功地开展药物非临床生殖毒性试验 [J]. 中国新药杂志, 2011, 20(22): 2195-2204.
- [7] 孙祖越,周莉,闫晗,等. 药物非临床生殖发育毒性试验中逐案原则的建议 [J]. 中国新药杂志, 2012, 21(8): 836-843.
- [8] 胡文娟,周莉,孙祖越. 致畸实验阳性对照的选择 [J]. 毒理学杂志, 2010, 24(2): 162-165.
- [9] Ghobadi E, Moloudizargari M, Asghari MH, et al. The mechanisms of cyclophosphamide-induced testicular toxicity and the protective agents [J]. Expert Opin Drug Metab Toxicol, 2017, 13(5): 525-536.
- [10] 孙祖越,周莉. 药物生殖与发育毒理学 [M]. 上海: 上海科技出版社; 2015.
- [11] 宋雁,贾旭东,崔文明,等. 不同途径和剂量环磷酰胺建立小鼠免疫抑制模型的对比研究 [J]. 中国食品卫生杂志, 2013, 25(3): 218-225.
- [12] Jarrell JF, Bodo L, YoungLai EV, et al. The short-term reproductive toxicity of cyclophosphamide in the female rat [J]. Reprod Toxicol, 1991, 5(6): 481-485.
- [13] 朱卡林,洪纓,楼宜嘉. 环磷酰胺对大鼠早期胚胎发育里程的影响 [J]. 中国现代应用药学杂志, 1999, 16(5): 1-3.
- [14] 丁岩,邵佳亮,李珺玮,等. 环磷酰胺致大鼠卵巢功能不全建立卵巢移植供体模型的研究 [J]. 上海医学, 2018, 41(8): 483-488.
- [15] 孙昌华,卜文,祝清芬. 环磷酰胺对 SD 大鼠生育力与早期胚胎发育毒性阳性模型的建立 [J]. 实验动物科学, 2015, 32(6): 8-12.

[收稿日期] 2019-09-17