

· 专 论 ·

药物发育毒性体外替代方法研究进展及组合策略

郭 隽, 耿兴超, 汪巨峰*

中国食品药品检定研究院国家药物安全评价监测中心, 药物非临床安全评价研究北京市重点实验室, 北京 100176

摘要: 随着 3Rs 原则的实施, 药物非临床生殖发育毒性研究中的整体动物试验面临严重挑战, 体外替代研究逐步成为研究热点。生殖发育毒性周期长, 涵盖面广, 现有的任何一种体外方法无法全面模拟药物在体内作用的全过程, 无法全面反映其对于生殖发育周期中性成熟、受精、配子发生、合子发育、出生后发育及性功能等方面的影响。形成一套完整的生殖发育毒性体外替代法评价是解决体外替代法预测结果接近体内检测结果的关键, 在整合体外替代研究时, 应考虑体细胞与生殖细胞, 不同进化阶段的物种, 多个生殖毒性周期, 体内外代谢活化差异等因素。根据受试物特性、分布、用途、适用范围, 其他毒理学实验及毒代动力学资料, 技术水平, 管理部门的要求等特点进行实验设计, 通过一系列反应不同试验终点的组合实验 (Integrated testing strategy, ITS) 综合评定药物体外生殖发育毒性, 但目前尚无最合理的组合方案。对生殖发育毒性体外试验研究进展及应用策略需考虑要点进行综述, 以推动替代技术在药物非临床安全性评价中的应用。

关键词: 药物安全评价; 体外毒性; 体外替代技术; 生殖毒性; 发育毒性

中图分类号: R994.2 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376(2015)04-0345-05

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2015.04.001

Research progress and integrated testing strategies on alternative methods in drug developmental toxicity evaluation

GUO Jun¹, GENG Xing-chao, WANG Ju-feng

Beijing Key Laboratory, National Center for Safety Evaluation of Drugs, National Institutes for Food and Drug Control, Beijing 100176, China

Abstract: With the implementation of the 3Rs principle, the non-clinical reproductive and developmental toxicity studies of drugs in experimental animals are facing great challenges. Due to the long period of reproductive and developmental toxicity, any of the existing *in vitro* method cannot fully simulate the whole process of drug action *in vivo*. The existing methods cannot fully reflect the development cycle for reproductive neutral maturation, fertilization, zygote development, impact of development and other aspects of sexual function after birth. It is necessary to form a complete set of alternative method for reproductive and developmental toxicity *in vitro* evaluation to solve the above problems. To design an integrate research of *in vitro* alternative methods, the researchers should consider somatic and germ cells in different stages of the evolution of species, a number of reproductive toxicity periods, *in vivo* metabolic activation differences, and other factors. According to characteristics, distribution, use, scope, other toxicology experiments and toxic kinetic information, technology, management and other characteristics of the test substance, the experiment design requires a series of reactions with different combinations of experimental study endpoint (integrated testing strategy, ITS) of comprehensive assessment of reproductive and developmental toxicity *in vitro* drug. There is no combination of the most reasonable scheme available. In this paper, we will discuss the latest progress of *in vitro* studies and how to promote a battery of alternative technology of developmental and reproductive toxicity in the pharmaceutical non-clinical safety evaluation.

Key words: drug safety evaluation; *in vitro* toxicity; alternative methods; reproductive toxicity; developmental toxicity

收稿日期: 2015-05-11

基金项目: 中国食品药品检定研究院中青年发展研究基金 (2014C2)

作者简介: 郭 隽 (1979—), 女, 助理研究员, 博士, 主要从事药物安全性评价研究工作。Tel: (010) 67872233-8221 E-mail: guojun@nifdc.org.cn

*通信作者 汪巨峰, 研究员, 博士, 研究方向为药物安全性评价。Tel: (010)67876249 E-mail: wangjuifeng@nifdc.org.cn

网络出版时间: 2015-07-15 13:54:45 网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/12.1409.R.20150715.1354.003.html>

药物生殖发育毒性评价主要检测药物对性腺形态与功能、发情周期、交配行为、受孕、妊娠过程、分娩、授乳以及幼仔断乳后生长发育过程的影响。完整的药物非临床生殖毒性试验包括生育力与早期胚胎发育毒性试验、胚胎-胎仔发育毒性试验和围产期毒性试验,即传统三阶段实验,上述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重要作用^[1-3]。体内发育毒性和致畸性评价试验周期长、费用高、需要相当数量动物,不能完全满足对大量新化合物发育毒性进行高通量筛选的要求。随着3Rs(减少、替代和优化实验动物的使用)原则的实施,整体动物试验面临严重挑战,廉价可靠的体外替代方法以及风险评估模型成为趋势,近年来生殖发育毒性体外替代研究逐步成为研究热点。欧洲体外替代法研究中心(ECVAM)现已批准3种不同的胚胎毒性检测方法,即全胚胎培养法(whole embryo culture, WEC)、微团检测法(micromass culture, MM)、胚胎干细胞检测法(embryo stem cell test, EST)。化学物质根据胚胎毒性大小可分成无胚胎毒性、弱胚胎毒性、强胚胎毒性,以上3种方法都可对物质的胚胎毒性进行分类。经实验室间双盲法比对,体外全胚胎培养体系与体内毒性分类的一致性可达80%,胚胎干细胞检测法达78%,微团检测法达71%。对于强胚胎毒性物质,3种检测方法的预测能力均达100%^[4-6]。然而生殖发育毒性周期长,涵盖面广,任何一种体外方法无法全面模拟化合物在体内作用的全过程,一般仅反映一种或数种发育毒性的可能机制,如对生殖细胞作用、对体细胞作用、对细胞增殖分化的影响等作用机制的分析,缺乏发育过程的复杂性以及母体与生长机体(胚胎)间动态的相互变化。这些系统不能明确排除某一作用,也不能对其危险性/暴露情况进行推测,尚不能完全替代目前生殖毒性试验常用的整体动物。体外替代实验在筛选一系列结构类似化合物的生殖发育毒性中发挥重要的作用,目前的替代方法更多集中于致畸性,已被认可的3种发育毒性体外替代方法也只能覆盖生殖发育周期的一部分且评价重点都是胚胎毒性,对于生殖发育周期中性成熟、受精、配子发生、合子发育、出生后发育及性功能等方面的影响尚无法覆盖^[7-8]。

体外试验存在代谢能力和人体有差异、缺乏毒代动力学过程、种属外推、体细胞与生殖细胞敏感

度不同等问题。针对以上问题,遗传毒性和致癌性评价中通过一系列试验组合及体外活化体系的添加来判定化合物的毒性。对于上述组合,一般认为组合试验应用的越多,其预测结果更为可靠,但是随着使用方法的增加,可使试验成本增加,周期延长,人力投入增加。各试验结果之间,可能相互补充,但在多数情况下具有一致性。因此,不加选择的增加试验项目并不一定能提高预测可靠性^[9-10]。为解决生殖发育毒性体外替代研究方法尚存缺陷及发挥各替代方法优势,有人提出以现有体外生殖发育毒性替代方法为基础,根据受试物特性、分布、用途、适用范围,其他毒理学实验及毒代动力学资料,技术水平,管理部门的要求等特点进行实验设计,通过一系列反应不同试验终点的组合实验(integrated testing strategy, ITS)综合评定药物体外生殖发育毒性^[11],但目前尚无最合理的组合方案。本文对生殖发育毒性体外试验研究进展及应用策略需考虑要点进行综述。

1 生殖发育毒性替代研究整合要点

Sogor 等^[12]提出化学品评估体外生殖发育毒性体外实验组合建议:首先进行短期(5 d内)细胞实验以评估早期分化阶段毒性,之后进行超过6 d细胞实验,以评估晚期分化阶段毒性。若上述任一研究结果为阳性,则此化合物被判定为具有胚胎毒性化合物。若上述研究结果均为阴性,则进一步选择斑马鱼实验进行测试,结果呈阳性则判定为致畸物,如为阴性,则继续进行实验大鼠体外全胚胎培养实验。若为阳性则判定为致畸物。上述结果均为阴性,则该化合物不必进行体内测试或仅进行部分体内研究。若上述结果有一种为阳性,则化合物可判定为致畸物或胚胎毒性化合物。上述组合方式可发挥各评价方法优势,正确、高效、低成本的评价化学品体外生殖发育毒性,Piersma 等^[13]应用小鼠胚胎干细胞方法、斑马鱼胚胎毒性检测以及CYP17、CYP19活力测定等检测方法组合,对12种化合物进行测试,仅有1种得到假阴性结果。形成一套完整的生殖发育毒性体外替代法评价是解决体外替代法预测结果接近体内检测结果的关键,在整合体外替代研究时,应考虑体细胞与生殖细胞、不同进化阶段的物种、多个生殖毒性周期、体内外代谢活化差异等因素。

1.1 涵盖生殖细胞与体细胞

体细胞指不承担生殖功能的细胞,生殖细胞则

是承担生殖功能、能进行减数分裂的细胞。体细胞与生殖细胞敏感度不同,且相互作用。在生殖发育毒性体外替代研究中,需综合考虑对体细胞及生殖细胞的影响,以综合评定其生殖发育毒性。在胚胎干细胞试验中以3T3细胞系反映化合物对体细胞毒性,以胚胎干细胞反映化合物对胚胎分化抑制的影响,现已证实部分化合物在低浓度即可抑制干细胞分化,而其对3T3细胞和干细胞的细胞毒性浓度却比之高出很多数量级,因此将两个毒性浓度进行综合考虑计算分析,综合判定其发育毒性。WEC中也引入3T3细胞,综合3T3细胞毒性试验结果,胚胎生存死亡以及胚胎发育指标,判定化合物发育毒性。睾丸支持细胞、睾丸间质细胞属体细胞,为生精细胞提供营养支持,在精子发生内分泌、旁分泌调控中扮演重要角色。评价化合物对支持细胞、间质细胞的毒性作用可判定化合物对精子发生过程的影响,即对雄性生育力的间接影响。在进行生殖发育毒性体外替代研究时,应以体细胞为模型判定化合物的细胞毒性及对生殖细胞的间接毒性,以生殖细胞、胚胎来源细胞为模型判定生殖发育毒性,综合确定化合物毒性作用及其靶点^[5,7]。

1.2 覆盖生殖周期

生育力主要指对雌雄动物由交配前到交配期直至胚胎着床给药,以评价受试物对动物生殖的毒性或干扰作用。评价内容包括配子成熟度、交配行为、生育力、胚胎着床前阶段和着床等。精子发生、卵子发生均为动态变化过程,且受下丘脑-垂体-性腺轴影响,配子形成过程较为复杂,体外培养的原生殖细胞系是否保留有原生殖细胞的特征尚不明确,生殖细胞培养体系及其相关的毒理学检测终点的研究处于发展中,尚未能有一种方法可以完全取代体内生育力评价实验,需要考虑雌性雄性生殖周期特点进行综合分析。精液分析可以显示化学物质对雄性生殖系统及其生育能力的影响,全自动精子分析仪等自动化仪器可监测精子活动力、运动、形态、头部形态、染色体结构和精液其他组分的变化。睾丸间质细胞和支持细胞共培养体系可以模拟睾丸内细胞间的相互作用。卵母细胞和精原细胞经原代培养模型,以细胞毒性、凋亡和基因的选择表达作为毒理学终点,其结果比体内系统更敏感。内分泌干扰物对生殖系统的研究被广为关注,ECVAM已有多重雌雄结合检测法及激素转录活化检测方法,其中有代表性的为体外雌激素受体转录激活试验

(estrogen receptor transcription activation test in vitro, ERTA),被广泛的应用于评估特定核受体(如雌激素受体)调控的特定基因表达,可用于受ER调控的雌激素转录激活的检测^[12,14]。CALUX系列测试中的采用人T47D细胞系、大鼠肝细胞H4IIE、人U2OS细胞系,观察化合物对细胞内 α -孕激素受体(α -progesterone receptor, α -PR)、糖皮质激素受体(glucocorticoid receptor, GR)、雄激素受体(androgen receptor, AR)等多个内分泌相关受体的影响,反映化合物对内分泌干扰作用的影响,评估化合物对生殖毒性的影响^[15-16]。然而上述方法干扰因素较多,容易出现假阳性或假阴性结果,尚未能标准化,仍需要改进及验证方可广泛应用。

1.3 包含胚胎毒性与致畸性

在进行化合物体外发育毒性评价时,除考虑体细胞与胚胎细胞差异外,应区分胚胎毒性(embryotoxicity)及致畸性(teratogenicity),胚胎毒性指化合物致胚胎/胎儿发育迟缓、致死作用及功能不全;致畸性指化合物致子代骨骼或软组织畸形或变异。现有的3种已被认可的体外发育毒性替代方法,EST侧重于特定细胞分化过程,MM侧重于肢芽细胞向软骨细胞分化的能力,WEC侧重于评价段内胚体向胎体转化这一过程。上述3个实验更适用于区分具有强致畸性、无致畸性、弱致畸性化合物。关于胚胎毒性体外替代法主要包括EST、神经干细胞实验(neural embryonic stem cell test, nEST)、小鼠胚胎干细胞黏附分化细胞毒性实验(the mouse embryonic stem cell adherent cell differentiation and cytotoxicity assay, ACDC)、大鼠小脑颗粒细胞实验(rat cerebellar granule cell)。可反映致畸性的体外发育毒性替代方法主要包括MM、WEC、斑马鱼实验(acute fish embryotoxicity test, FET)。在选取发育毒性体外替代方法时,应区分胚胎毒性与致畸性的概念,分别从两类方法中选出可评估胚胎毒性、致畸性的方法,综合判定化合物的发育毒性^[12]。

1.4 克服代谢问题干扰

在未知化合物体内代谢特点的情况下,开展生殖发育体外替代研究需考虑其体内代谢特点。体外活化体系一直被认为是体外替代方法的难点。肝细胞共培养可以较好的对化合物进行体外转化,但其过程复杂,对技术要求高,不宜广泛推广。S9内成分复杂不易控制其剂量,对体外胚胎/细胞可产生毒性作用,因此限制了其应用。肝微粒体具有蛋白质

合成、蛋白质糖基化和脂类合成等内质网的基本功能，微粒体含有细胞色素 P450 (CYP) 酵素，与氧化代谢有关。ECVAM 关于生殖发育毒性体外替代法的 ReProTect 专项研究中，验证了肝微粒体对 20 种化合物的体外转化作用，推荐肝微粒体与 WEC 相结合研究化合物的发育毒性^[11, 17]。其中 CYP17、CPY19 活性被认为是雌性、雄性激素及其受体密切相关代谢体系，通过检测上述两种酶活性，在体外成功预测了氟硅唑 (Flusilazole, FLU)、二氯甲烷 (Dichloromethane)、氯化甲基汞 (MMC) 体外生殖毒性，与体内研究结果一致^[18]。在血睾屏障、胎血屏障的作用下，化合物对生殖发育系统的影响会表现出与其他器官不同的毒性作用，然而体内代谢实验周期长，花费高，提高了检测成本。建立体外代谢替代模型模拟药物体内代谢模式，可以在降低检测成本、提高检测效率前提下，快速准确筛选药物体外生殖发育毒性。胎盘转运被认为是化合物对胚胎/胎儿影响的重要环节，有研究利用胎盘细胞培养模型观察药物滥用对胎盘正常功能的影响。建立体外血睾屏障模型可以判定能够穿越屏障并影响生殖细胞成熟的化学物质种类，减少体内研究涉及的受检物质数量。Legendre 等^[19]从 18 日龄大鼠睾丸分离获得管周细胞、睾丸支持细胞、精原细胞，构建体外人工血睾屏障体系 (blood-testis barrier, eBTB) 为血睾屏障体外研究提供了新的思路。该模型可用于观察化合物透过血睾屏障过程及对生精过程的影响。斑马鱼胚胎对化合物暴露方式、代谢活化能力与哺乳动物差别较大，其亲代及子代均不具备代谢活化体系，不适用于测试大分子化合物 (相对分子质量大于 3 000)，最好采用化合物代谢物进行测试^[12]。

1.5 包含不同种属

现有的生殖发育毒性替代方法主要针对啮齿类动物，如大鼠、小鼠，然而啮齿类与人类间种属差异较大。继人和小鼠之后，斑马鱼模型 (zebrafish embryotoxicity test, ZET) 已被列为第三大模式生物，与人类基因具有高达 87% 的同源性，其信号传导通路、生理结构与功能等均与哺乳动物高度相似。斑马鱼在心血管有严重畸形的情况下还可以存活并继续发育较长时间，且实验成本低、试验周期短、对致畸物反应较为敏感，是评价药物发育毒性的有效模型之一。利用斑马鱼对药物发育毒性进行评价时，在加药处理斑马鱼胚胎后，结合活体染料、抗体、荧光示踪等方法，研究者可以直接观察原肠期

的血液循环、心跳、脑区形成、体轴形成和细胞运动等胚胎发育事件。应用 31 种化合物对斑马鱼发育毒性实验验证，共验证出 18 种为致畸物，13 种为非致畸物，结果表明 87% 结果与体内研究一致，13% 为假阳性或假阴性。在大量验证基础上，OECD 于 2013 年发布斑马鱼胚胎毒性测试指导原则^[19-20]。

1.6 高通量手段的实施

通过基因组学、蛋白质组学的系列研究，现已发现大量与生殖发育毒性密切相关的生物标志物，将这些生物标志物应用于现有模型中，可更有效的应用现有模型对化合物生殖发育毒性进行预测。Wnt/ β -catenin 信号通路与早期胚胎分化密切相关，ReProGlo 测试指以转染了 Wnt 报告基因的鼠源胚胎干细胞为模型，采用高通量加样体系，通过观察化合物对 Wnt/ β -catenin 信号通路作用，预测化合物对胚胎早期分化的影响^[21]。计算机芯片方法和生理药动学模型 (PBPK) 的联合使用，有望改善风险评估中体外生殖毒性试验的预测能力。大部分测试处于研发水平，一些先进的测试方法处在预验证阶段。生殖和发育毒性重点是对哺乳动物生殖周期中敏感的检测点、关键事件及各阶段的研究，已验证体外方法的检测系列，也不能涵盖所有的生育和发育毒性过程。斑马鱼基因组的多种遗传标记与基因芯片已经商品化。因此，考虑发展体外方法、定量构效关系 (QSARs) 及其他替代方法和工具在内的联合检测体系。例如，利用血睾屏障和血胎盘屏障研究的 QSARs 方法对体外试验加以补充。然而芯片技术多基于现有数据且数据量较小，而生殖发育周期较长且机制复杂，因而需建立体内体外生殖发育毒性研究数据库，如毒性相关数据库 (ToxRefDB)，汇总标准化属性、一致性结构及质量控制体系^[22-24]。

2 展望

药物生殖发育毒性评价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为不可或缺的重要环节。体内发育毒性和致畸性评价试验已不能完全满足对低成本、周期短、高通量筛选的要求。建立体外替代方法以及风险评估模型是解决上述问题的关键，然而任何一种体外方法无法全面模拟化合物在体内对生殖发育系统影响的全过程，尚不能完全替代目前生殖毒性试验常用的整体动物。体外试验存在代谢能力和人体有差异、缺乏毒代动力学过程、种属外推、体

细胞与生殖细胞敏感度不同等问题。针对以上问题,根据受试物特性、分布、用途、适用范围,其他毒理学实验及毒代动力学资料,技术水平,管理部门的要求等特点进行实验设计,考虑体细胞与生殖细胞,不同进化阶段的物种,多个生殖毒性周期等,体内外代谢活化差异等因素,有目标的选取一系列反应不同试验终点的组合实验综合评定药物体外生殖发育毒性。在现有方法的基础上,积极展开新领域的研究,将传感器技术、自动高通量筛选技术、高内涵筛选技术等新方法引入生殖发育毒性体外替代方法中,探索敏感的分子靶点及药物相互作用的生物途径。构建及完善体外代谢模型,解决体内外代谢活化差异的干扰,建立可模拟体内胎血屏障、血睾屏障的三维模型,提高体外预测准确性。综上,生殖发育体外替代评价时,需要考虑评估模型的准确性及特异性,化合物作用方式及暴露积累,生殖发育周期,种属外推等因素,将现有评价模型有效整合,适时引入更加高效可靠的新方法,积极开展验证工作,以促成体外实验替代体内研究的发展进程。

参考文献

- [1] 《药物生殖毒性研究技术指导原则》课题组. 药物生殖毒性研究技术指导原则 [S/OL]. (2006-12-09) [2014-06-02]. http://wenku.baidu.com/link?url=3G5JnKf8WTAiMF16XhC7puqx4mpPT7f2N6ujr7v2HLmNYimRqISUX-1sLX7j4_9qG9sfDSK8-JWaM-wUwZE67UgVYJptIN5JvtC9XyFTwH_
- [2] 孙祖越. 新药临床前生殖药理毒理学规范性评价体系的建立和应用 [J]. 中国科技成果, 2010, (15): 66-67.
- [3] Barrow P C. Reproductive toxicity testing for pharmaceuticals under ICH [J]. *Reprod Toxicol*, 2009, 28(2): 172-179.
- [4] Costanza R, Hartung T. Reevaluation of animal numbers and costs for in vivotests to accomplish REACH legislation requirements for chemicals - a report by the transatlantic think tank for toxicology [J]. *Altex*, 2009, (26): 187-208.
- [5] 彭双清, 郝卫东, 伍一军. 毒理学替代法 [M]. 北京: 军事医学科学出版社, 2009.
- [6] 翁顺太, 郑立锋, 郑忠东, 等. 实验动物福利的基本内容 [J]. 海峡预防医学杂志, 2009, 15(6): 98-99.
- [7] Scialli A R, Guikema A J. Reach and reproductive and developmental toxicology: still questions [J]. *Sys Biol Reprod Med*, 2012, (58): 63-69.
- [8] Schulz F, Batke M, Mangelsdorf I, et al. Sensitivity of different generations and developmental stages in studies on reproductive toxicity [J]. *Toxicol Lett*, 2014, (224): 245-255.
- [9] 国家食品药品监督管理局. 药物遗传毒性研究技术指导原则 [S]. 2007.
- [10] Hornberg J J, Laursen M, Brenden N, et al. Exploratory toxicology as an integrated part of drug discovery. Part II: Screening strategies [J]. *Drug Discov Today*, 2014, 19(8): 1137-1144.
- [11] Hareng L, Pellizzer C, Bremer S, et al. The integrated project ReProTect: a novel approach in reproductive toxicity hazard assessment [J]. *Reprod Toxicol*, 2005, 20(3): 441-452.
- [12] Sogor M A, Pamies D, Lapuente J, et al. An integrated approach for detecting embryotoxicity and developmental toxicity of environmental contaminants using in vitro alternative methods [J]. *Toxicol Lett*, 2014(230): 356-367.
- [13] Piersma A H, Schulpen S H W, Uibel F, et al. Evaluation of an alternative in vitro test battery for detecting reproductive toxicants [J]. *Reprod Toxicol*, 2013(38): 53-64.
- [14] Schenk B, Weimer M, Bremer S, et al. The ReProTect Feasibility Study, a novel comprehensive in vitro approach to detect reproductive toxicants [J]. *Reprod Toxicol*, 2010, (30): 200-218.
- [15] Burg B, Winter R, Man H, et al. Optimization and prevalidation of the in vitro AR calux method to test androgenic and antiandrogenic activity of compounds [J]. *Reprod Toxicol*, 2010(30): 18-24.
- [16] Sonneveld E, Jansen H J, Riteco J A C, et al. Development of androgen- and estrogen-responsive bioassays, members of a panel of human cell line-based highly selective steroid responsive bioassays [J]. *Toxicol Sci*, 2005, (83): 136-148.
- [17] Luijten M, Verhoef A, Westerman A, et al. Application of a metabolizing system as an adjunct to the rat whole embryo culture [J]. *Toxicol In Vitro*, 2008, 22(5): 1332-1336.
- [18] Maarke J R, Piersma A H, Berg M, et al. The relevance of chemical interactions with CYP17 enzyme activity: Assessment using a novel in vitro assay [J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2013, (268): 309-317.
- [19] Legendre A, Froment P, Desmots S, et al. An engineered 3D blood-testis barrier model for the assessment of reproductive toxicity potential [J]. *Biomaterials*, 2010, (31): 4492-4505.
- [20] Ingrid W T, Rompay A R, Coen W D, et al. Development of a screening assay to identify teratogenic and embryotoxic chemicals using the zebrafish embryo [J]. *Reprod Toxicol*, 2009, (28): 308-320.
- [21] Osman A M, Dartel D A M, Zwart E, et al. Proteome profiling of mouse embryonic stem cells to define markers for cell differentiation and embryotoxicity [J]. *Reprod Toxicol*, 2010, (30): 322-332.
- [22] Dix D J, Houck K A, Martin M T, et al. The ToxCast program for prioritizing toxicity testing of environmental chemicals [J]. *Toxicol Sci*, 2007, 95(1): 5-12.
- [23] Schenk B, Weimer M, Bremer S, et al. The ReProTect Feasibility Study, a novel comprehensive in vitro approach to detect reproductive toxicants [J]. *Reprod Toxicol*, 2010, (30): 200-218.
- [24] Schulz F, Batke M, Mangelsdorf I, et al. Sensitivity of different generations and developmental stages in studies on reproductive toxicity [J]. *Toxicol Lett*, 2014, (226): 245-255.