

坤灵丸对雌性大鼠生育力及胚胎-胎仔发育影响的研究

刘妍¹, 唐桂毅¹, 温和¹, 张建军¹, 张海娇¹, 任萌¹, 王根辈^{2,3}, 张宗鹏¹, 申秀萍^{1*}

1. 天津药物研究院新药评价有限公司, 天津 300301

2. 天津大学药物科学与技术学院, 天津 300072

3. 天士力控股集团有限公司研究院, 天津 300410

摘要: **目的** 评价坤灵丸对雌性大鼠的生育力及胚胎发育的影响。**方法** 在生育力及早期胚胎发育毒性研究中, 每组 25 只雌性 SD 大鼠从交配前 14 d 开始, 每天 ig 给予 1 次坤灵丸 (0.875、1.750、3.500 g 制剂/kg) 或去离子水至妊娠第 7 天, 评价雌鼠症状、体质量、摄食量、生殖能力和早期胚胎发育情况; 在胚胎-胎仔发育毒性研究中, 每组 25 只雌性 SD 大鼠从妊娠第 6~15 天每天 ig 给予坤灵丸 (0.875、1.750、3.500 g 制剂/kg) 或去离子水 1 次, 评价妊娠母鼠的症状、体质量、摄食量、生殖能力及胎仔的体质量、性别和外观、内脏、骨骼发育的畸形或变异。**结果** 在生育力及早期胚胎发育毒性研究和胚胎-胎仔发育毒性研究中, 坤灵丸给药剂量达到 3.500 g/kg 时未产生任何药物相关的母体毒性和胚胎毒性。**结论** 本试验条件下, 雌鼠生育力及胚胎发育毒性的安全剂量为 3.500 g/kg, 按照体质量计算, 该剂量相当于人用最大临床使用剂量的 43.2 倍。

关键词: 坤灵丸; 大鼠; 生殖毒性; 胚胎-胎仔发育毒性

中图分类号: R962.2 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-6376 (2018) 07- 1235 - 06

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2018.07.013

Effects of Kunling Pills on fertility and embryo-fetal development in femal rats

LIU Yan¹, TANG Guiyi¹, WEN He¹, ZHANG Jianjun¹, ZHANG Haijiao¹, REN Meng¹, WANG Genbei^{2,3}, ZHANG Zongpeng¹, SHEN Xiuping¹

1. Tianjin Institute of Pharmaceutical Research New Drug Evaluation Co., Ltd., Tianjin 300301, China

2. School of Pharmaceutical Science and Technology, Tianjin University, Tianjin 300072, China

3. Tasly Academy, Tasly Holding Group Co., Ltd., Tianjin 300410, China

Abstract: **Objective** To evaluate the effects of Kunling Pills on fertility and embryo-fetal development (EFD) in female rats. **Methods** In fertility and early embryonic development toxicity studies, 25 femal SD rats per group were ig administrated daily with deionized water or Kunling Pills (preparation 0.875, 1.750, and 3.500 g/kg) respectively two weeks before mating until gestational day (GD) 7. The clinical signs, body weight and body weight gain, food consumption, reproductive performance, and early embryonic development were evaluated. In EFD studies, 25 femal SD rats per group were ig administrated daily with deionized water or Kunling Pills (preparation 0.875, 1.750, and 3.500 g/kg) respectively from GD 6 to 15. Confirmed pregnant dams were evaluated for clinical signs, body weight and body weight gain, food consumption, and reproductive performance. The body weight, gender and external, visceral, and skeletal malformations/variations of fetuses were examined. **Results** There were no maternal toxicity and embryotoxicity at dose up to 3.500 g/kg/d in the rat fertility and early embryonic development studies and EFD studies. **Conclusion** Under the condition of the experiment, the no observable adverse effect level (NOAEL) for maternal fertility and embryo-fetal development was preparation 3.500 g/kg (43.2 times of the maximum recommended human daily dose based on weight).

Key words: Kunling Pills; rats; reproductive toxicity; embryo-fetal developmental toxicity

收稿日期: 2017-11-08

基金项目: 国家科技重大新药创制项目 (2015ZX09501004)

第一作者: 刘妍 (1973—), 女, 硕士, 副研究员, 主要从事新药临床前安全性评价研究。E-mail: liuy8@tjipr.com

*通信作者: 申秀萍 (1964—), 女, 研究员, 主要从事新药临床前安全性评价研究。E-mail: shenxp@tjipr.com

坤灵丸是《中华人民共和国卫生部药品标准中药成方制剂》第十册中的品种,由香附(制)、甘草、白薇、益母草、黄芪、鸡冠花、麦冬、五味子、地黄、红花、关木通、白术(炒)、赤石脂、茯苓、厚朴、肉苁蓉(制)、白芍(酒炒)、荆芥、牡丹皮、阿胶、当归、藁木、红参、鹿角胶、川贝母、没药(炒)、砂仁、延胡索、小茴香(盐制)、龟甲胶和川穹等31味中药组成的复方制剂,具有调经养血,逐瘀生新的作用。用于月经不调,行经腹痛,子宫寒冷,久不受孕,习惯性流产,赤白带下,崩漏不止等症的治疗^[1]。

作为已批准上市的中成药,坤灵丸临床治疗效果显著,为了对该药的安全性进行更全面的了解,本研究以大鼠为研究对象,分别进行了坤灵丸对雌性大鼠生育力和早期胚胎发育毒性试验研究,以及对大鼠胚胎-胎仔发育毒性试验研究,评价坤灵丸对生育力和出生前胚胎发育方面的影响,为临床应用提供参考。

1 材料

1.1 实验药物

坤灵丸,天士力(辽宁)制药有限责任公司提供,规格1.73 g生药/丸,批号20150804。

1.2 实验动物

雌性大鼠生育力和早期胚胎发育毒性试验:SPF级SD大鼠200只,雌雄各半,雄鼠10周龄,雌鼠8周龄,购于北京维通利华实验动物技术有限公司,实验动物生产许可证号SCXK(京)2012-0001。

大鼠胚胎-胎仔发育毒性试验:SPF级SD雄性大鼠75只,雌性大鼠130只,均为8周龄,购于北京维通利华实验动物技术有限公司。

动物饲养于天津药物研究院新药评价有限公司动物实验楼(屏障环境),温度范围20℃~26℃,湿度范围40%~70%,换气次数为≥15次全新风/小时,12h/12h明暗交替光照。

动物自由摄食和水,饲料为经⁶⁰Co辐照的SPF大小鼠生长繁殖饲料,由北京科澳协力饲料有限公司提供,批号15083113、15093133、15123113、16013113;饮用由1T/h型多重微孔滤膜过滤系统制备的无菌水(四级过滤紫外灭菌)。

1.3 实验试剂

戊巴比妥钠(德国默克公司,批号140418);氢氧化钾(天津市化学试剂供销公司,批号

20130909);茜素红(天津市化学试剂供销公司,批号20130918);丙三醇(天津市风船化学试剂科技有限公司,批号20141021、201512102、20150926);饱和苦味酸溶液(南京建成生物工程研究所,批号20151104);40%甲醛(天津市化学试剂供销公司,批号20160113);冰醋酸(天津市化学试剂供销公司,批号20140106);天津市风船化学试剂科技有限公司,批号201602222)。

1.4 主要仪器

BT224S电子天平(赛多利斯科学仪器(北京)有限公司);ML203/02电子天平(梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司);E3000-0.5电子天平(常熟市双杰测试仪器厂);SZX16体视显微镜(日本Olympus公司);JM体视显微镜(日本Olympus公司);游标卡尺(陕西航空硬质合金工具公司);游标卡尺[世达工具(上海)有限公司]。

2 方法

2.1 雌性大鼠生育力与早期胚胎发育毒性试验

100只雌性大鼠随机分为对照组(给予去离子水)及坤灵丸低、中、高剂量(0.875、1.750、3.500 g制剂/kg,分别相当于临床等效剂量的10.8、21.6和43.2倍)组,每组各25只,雌鼠从交配前14 d开始每天ig一次坤灵丸或去离子水至妊娠第7天,给药体积均为10 mL/kg。雌鼠给药14 d后与雄鼠按照1:1的比例开始合笼交配,交配成功雌鼠于妊娠第13~15天处死。试验期内每日观察动物的一般状态和存活情况,称量体质量和24 h摄食量,雌鼠安乐死后进行解剖检查,特别检查子宫、羊膜、羊水和胎盘情况,计数黄体数、植入数、吸收胎数和活胎数。

2.2 大鼠胚胎-胎仔发育毒性试验

雌雄大鼠按照1:1的比例进行合笼交配,将每日交配成功的雌鼠随机分入对照组(给予去离子水)及坤灵丸低、中、高剂量(0.875、1.750、3.500 g制剂/kg)组,当每组交配成功的雌鼠达到25只时交配结束。各组雌鼠于妊娠6~15 d每天ig一次坤灵丸或去离子水,给药体积为10 mL/kg。实验期间每日观察动物的一般状态和存活情况,并于妊娠的0、3、6~16和21 d称量体质量,妊娠的0~1、6~7、11~12、15~16和20~21 d称量24 h摄食量。妊娠21 d,孕鼠解剖进行大体检查、称量子宫质量、计数黄体数、植入数、吸收胎、死胎和活胎数。胎仔经称质量、性别鉴定、顶臀长和尾长测定及外观

检查后,各留取约50%胎仔制作标本进行骨骼和内脏的检查。

2.3 统计学分析

采用 SPSS 19.0 软件进行统计学分析,计量资料如方差齐,采用 One-way ANOVA 进行多组之间比较,如比较有差异,采用 Dunnett-t 检验进行给药组与对照组间的比较;如方差不齐,采用 Kruskal-Wallis 检验进行多组之间比较,如比较有差异,采用 Mann-Whitney 检验进行给药组与对照组间的比较。计数资料采用 χ^2 检验、Kruskal-Wallis 检验(两组以上比较)或 Mann-Whitney 检验(两组间比较)进行统计分析。

3 结果

3.1 雌性大鼠生育力与早期胚胎发育毒性试验

试验期内雌鼠一般状态良好,无死亡。坤灵丸3个剂量对雌鼠的体质量、体质量增长和摄食量均无明显影响。试验结束动物解剖检查未见与药物有关的肉眼可见病理改变。3个给药组雌鼠的交配率、受孕率、合笼天数、黄体数、植入数、活胎数、植入前丢失率、吸收胎发生率和有吸收胎窝数与对照组比较均无明显差异。结果见图1、2和表1。

3.2 大鼠胚胎-胎仔发育毒性试验

3.2.1 对孕鼠的影响 试验期内孕鼠一般状态良好,无流产、早产和与药物相关的异常死亡。坤灵丸对孕鼠的体质量、体质量增长和摄食量均无明显

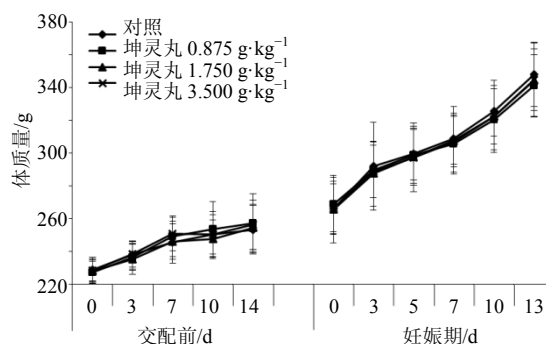


图1 坤灵丸对雌鼠交配前和妊娠期体质量的影响

Fig. 1 Effects of Kunling Pills on body weight in female rats during pre-mating and gestation

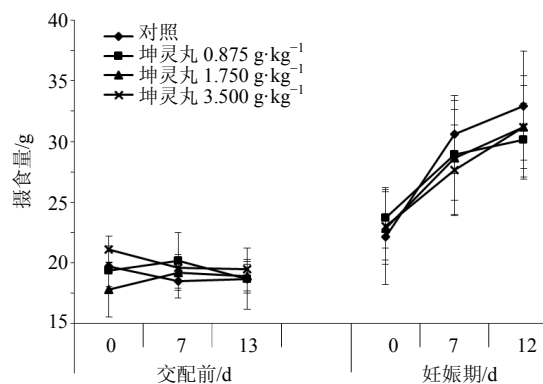


图2 坤灵丸对雌鼠交配前和妊娠期摄食量的影响

Fig. 2 Effects of Kunling Pills on Food consumption in female rats during pre-mating and gestation

表1 坤灵丸对雌鼠生殖能力和早期胚胎发育的影响

Table 1 Effects of Kunling Pills on maternal fertility and early embryonic development

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	合笼动物数	合笼天数	受孕动物数	受孕率/%	黄体数
对照	—	25	3.2±1.81	23	92.0	18.4±2.46
坤灵丸	0.875	25	3.0±1.87	23	92.0	18.5±3.19
	1.750	25	2.9±1.98	23	92.0	18.5±2.71
	3.500	25	2.8±2.72	24	96.0	18.5±3.54
组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	植入数	活胎数	植入前丢失率/%	吸收胎发生率/%	有吸收胎窝数 (%) ^a
对照	—	15.2±3.41	13.9±3.46	16.9±19.14	8.3±8.68	18 (78.3)
坤灵丸	0.875	15.5±3.92	14.7±3.97	16.2±18.78	6.2±7.78	14 (60.9)
	1.750	15.9±4.20	14.7±4.83	14.2±19.09	10.8±17.71	12 (52.2)
	3.500	15.3±4.37	14.5±4.27	17.2±20.17	5.8±6.85	13 (54.2)

^a: 括号内的值为窝发生率

^a: Values in parentheses represent means of incidences of litter

影响。试验结束动物解剖检查未见与受试药物有关的肉眼可见病理改变。给药组孕鼠的受孕率、子宫质量、平均黄体数、平均植入数、植入前(后)丢失率、活胎数、吸收胎和死胎发生率、发生吸收胎

和死胎窝数与对照组比较未见明显差异。结果见图3、4和表2。

3.2.2 对胎仔的影响 胎仔体质量、顶臀长、尾长、性别比例无明显异常。坤灵丸低剂量组2号孕鼠的

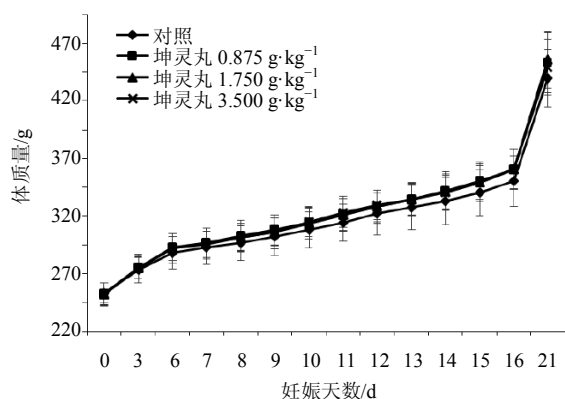


图3 坤灵丸对孕鼠体质量的影响

Fig. 3 Effects of Kunling pills on body weight in pregnant rats

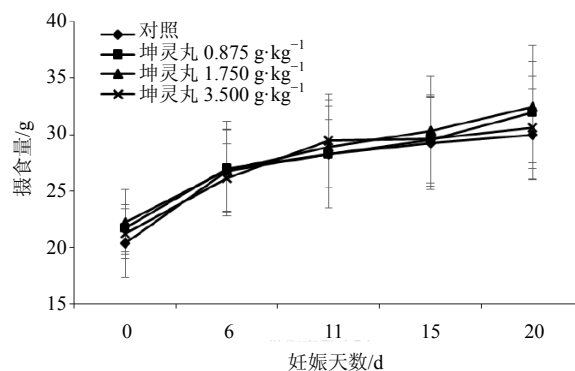


图4 坤灵丸对孕鼠摄食量的影响

Fig. 4 Effects of Kunling Pills on food consumption in pregnant rats

表2 坤灵丸对孕鼠生育能力的影响

Table 2 Effects of Kunling Pills on fertility of pregnant rats

组别	剂量/ (g·kg ⁻¹)	合笼动物数	受孕动物数	检查动物数	子宫质量/g	黄体数	植入数
对照	—	25	25	25	103.179±12.916	17.5±3.15	15.3±1.70
坤灵丸	0.875	25	24	24	109.946±13.982	17.8±3.11	15.3±1.97
	1.750	25	24	23 ^a	112.576±11.619	17.0±2.16	15.4±1.78
	3.500	25	25	25	109.781±8.279	17.9±3.80	15.6±1.22
组别	剂量/ (g·kg ⁻¹)	检查动物数	植入前丢失率/%	植入后丢失率/%	活胎数	吸收胎(%) ^b	死胎(%) ^b
对照	—	25	10.9±10.83	9.2±10.36	13.9±2.00	35(8.9)/16(64.0)	1(0.2)/1(4.0)
坤灵丸	0.875	24	12.0±13.29	3.9±6.81	14.8±2.03	14(3.7)/8(33.3)	1(0.3)/1(4.2)
	1.750	23 ^a	8.6±9.72	3.4±3.40	14.9±1.84	12(3.4)/12(52.2)	0(0.0)/0(0.0)
	3.500	25	10.3±13.41	5.3±5.32	14.8±1.33	21(5.3)/15(60.0)	0(0.0)/0(0.0)

^a: 25号动物在给药第2天因ig给药失误死亡; ^b: 数据表示形式为“胎仔数(发生率)/窝数(发生率)”, 括号内为发生率(%).

^a: Animal No.25 died in treatment day 2 for improper gavage. ^b: Form of data representation is “numbers (incidences) of fetuses/ numbers (incidences) of litters”, values in parentheses represent incidences (%).

1只胎仔(1/12)为卷尾, 由于该窝仅1只胎仔发生这种外观异常, 且同组和其他给药组并无此类变异, 因此认为应属于动物自身的偶发事件, 与药物无关。

对照组和坤灵丸高剂量组胎仔均出现部分内脏和骨骼发育异常, 除高剂量组胎仔胸骨节骨化不全胎仔发生率明显少于对照组($P<0.05$)外, 其他内脏和骨骼发育异常两组间未见明显差别。结果见表3~5。

表3 坤灵丸对胎仔生长发育的影响

Table 3 Effects of Kunling Pills on growth and development of fetal rats

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	胎仔数	窝数	体质量/g		雄/雌比例
				雄性	雌性	
对照	—	348	25	5.625±0.507	5.377±0.413	178/170
坤灵丸	0.875	354	24	5.658±0.426	5.389±0.356	185/169
	1.750	342	23	5.802±0.365	5.551±0.325	177/165
	3.500	369	25	5.652±0.293	5.414±0.298	193/176

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	胎仔数	窝数	顶臀长/mm		尾长/cm	
				雄性	雌性	雄性	雌性
对照	—	180	25	40.946±1.644	39.879±1.868	1.531±0.050	1.558±0.057
坤灵丸	0.875	183	24	40.962±1.600	40.229±1.505	1.524±0.058	1.534±0.056
	1.750	177	23	41.551±1.050	40.724±1.328	1.531±0.041	1.543±0.047
	3.500	189	25	41.315±1.197	40.413±1.256	1.541±0.036	1.542±0.036

表4 坤灵丸对胎仔内脏发育的影响

Table 4 Effects of Kunling Pills on visceral development of fetal rats

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	胎仔数	窝数	鼻中隔细	肾盂扩张	肾乳头小	肾乳头缺失
对照	—	180	25	1(0.6)/1(4.0)	10(5.6)/6(24.0)	9(5.0)/6(24.0)	1(0.6)/1(4.0)
坤灵丸	3.500	189	25	1(0.5)/1(4.0)	5(2.6)/3(12.0)	4(2.1)/2(8.0)	1(0.5)/1(4.0)

数据表示形式为“胎仔数(发生率)/窝数(发生率)”,括号内为发生率(%)。

Form of data representation is “numbers (incidences) of fetuses/ numbers (incidences) of litters”, values in parentheses represent incidences (%).

表5 坤灵丸对胎仔骨骼发育的影响

Table 5 Effects of Kunling Pills on skeletal development of fetal rats

组别	剂量/ (g·kg ⁻¹)	胎仔数	窝数	骨化不全					
				颅骨		颈椎弓		胸椎体	
				胎仔数(%)	窝数(%)	胎仔数(%)	窝数(%)	胎仔数(%)	窝数(%)
对照	—	168	25	141(80.6)	25(100.0)	2(1.2)	1(4.0)	54(30.9)	22(88.0)
坤灵丸	3.500	180	25	129(64.5)	25(100.0)	5(2.8)	4(16.0)	57(28.5)	21(84.0)

组别	剂量/ (g·kg ⁻¹)	胎仔数	窝数	骨化不全					
				腰椎		胸骨节		耻骨	
				胎仔数(%)	窝数(%)	胎仔数(%)	窝数(%)	胎仔数(%)	窝数(%)
对照	—	168	25	10(5.7)	4(16.0)	109(62.3)	25(100.0)	1(0.6)	1(4.0)
坤灵丸	3.500	180	25	13(6.5)	9(36.0)	90(45.0)*	25(100.0)	0(0.0)	0(0.0)

组别	剂量/ (g·kg ⁻¹)	胎仔数	窝数	未骨化					
				舌骨		胸骨节		肋骨	
				胎仔数(%)	窝数(%)	胎仔数(%)	窝数(%)	胎仔数(%)	窝数(%)
对照	—	168	25	2(1.2)	1(4.0)	1(0.6)	1(4.0)	0(0.0)	0(0.0)
坤灵丸	3.500	180	25	5(2.8)	4(16.0)	0(0.0)	0(0.0)	1(0.6)	1(4.0)

组别	剂量/ (g·kg ⁻¹)	胎仔数	窝数	缺失					
				腰椎		胸骨节		肋骨	
				胎仔数(%)	窝数(%)	胎仔数(%)	窝数(%)	胎仔数(%)	窝数(%)
对照	—	168	25	2(1.2)	2(8.0)	1(0.6)	1(4.0)	0(0.0)	0(0.0)
坤灵丸	3.500	180	25	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	3(1.7)	2(8.0)

组别	剂量/ (g·kg ⁻¹)	胎仔数	窝数	融合				胸骨节配列异常	
				颈椎弓		枕外骨与颈椎弓			
				胎仔数(%)	窝数(%)	胎仔数(%)	窝数(%)	胎仔数(%)	窝数(%)
对照	—	168	25	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)
坤灵丸	3.500	180	25	1(0.6)	1(4.0)	1(0.6)	1(4.0)	1(0.6)	1(4.0)

组别	剂量/ (g·kg ⁻¹)	胎仔数	窝数	腰椎弓骨化亢进		腰椎弓多余骨化点		肋骨短小	
				胎仔数(%)	窝数(%)	胎仔数(%)	窝数(%)	胎仔数(%)	窝数(%)
				胎仔数(%)	窝数(%)	胎仔数(%)	窝数(%)	胎仔数(%)	窝数(%)
对照	—	168	25	5(3.0)	4(16.0)	1(0.6)	1(4.0)	9(5.4)	5(20.0)
坤灵丸	3.500	180	25	9(5.0)	6(24.0)	0(0.0)	0(0.0)	5(2.8)	2(8.0)

组别	剂量/ (g·kg ⁻¹)	胎仔数	窝数	短小多余肋					
				第7颈椎		第1腰椎		尾椎数	
				胎仔数(%)	窝数(%)	胎仔数(%)	窝数(%)		
对照	—	168	25	1(0.6)	1(4.0)	7(4.2)	6(24.0)	6.4±1.18	
坤灵丸	3.500	180	25	1(0.6)	1(4.0)	9(5.0)	7(28.0)	6.0±0.73	

组别	剂量/ (g·kg ⁻¹)	胎仔数	窝数	掌骨数		近端指骨数		远端指骨数	
				左侧	右侧	左侧	右侧	左侧	右侧
				胎仔数(%)	窝数(%)	胎仔数(%)	窝数(%)	胎仔数(%)	窝数(%)
对照	—	168	25	4.0±0.00	4.0±0.00	2.8±0.81	3.0±0.76	5.0±0.08	5.0±0.04
坤灵丸	3.500	180	25	4.0±0.00	4.0±0.00	2.4±0.87	2.7±0.80	5.0±0.04	5.0±0.04

组别	剂量/ (g·kg ⁻¹)	胎仔数	窝数	跖骨数		近端趾骨数		远端趾骨数	
				左侧	右侧	左侧	右侧	左侧	右侧
				胎仔数(%)	窝数(%)	胎仔数(%)	窝数(%)	胎仔数(%)	窝数(%)
对照	—	168	25	4.9±0.22	4.9±0.22	0.9±1.01	0.8±0.99	5.0±0.03	5.0±0.03
坤灵丸	3.500	180	25	4.9±0.13	4.9±0.16	0.7±0.95	0.6±0.88	5.0±0.03	5.0±0.00

与对照组比较: *P<0.05; 括号内为发生率

*P<0.05 vs control group; values in parentheses represent incidences

4 讨论

本研究按照国家食品药品监督管理总局 (CFDA) 和 ICH (International Council for Harmonisation) 发布的指导原则, 对妇科用药坤灵丸进行了雌鼠生殖功能和胚胎-胎仔发育方面的研究。在大鼠生育力和早期胚胎发育毒性实验中, 雌鼠从交配前到交配期直至胚胎着床给药, 评价药物可能对生殖细胞、受孕、妊娠等亲代生殖能力的影响, 以及胚胎着床及胚胎着床前阶段发育的影响。实验结果显示, 坤灵丸对雌鼠的交配前和妊娠期体质量增长和摄食量均无明显影响, 对雌鼠的生育能力及胚胎的植入和早期发育也无明显影响。在胚胎-胎仔发育毒性实验中, 妊娠雌鼠从胚胎着床至硬腭闭合给药, 评价药物可能对妊娠母体及胚胎器官形成的影响。实验结果显示, 坤灵丸对母体的体质量增长和摄食量均无明显影响, 对胚胎的生长发育也无明显影响。

以上结果表明, 在本实验条件下, 坤灵丸在 3.500 g/kg 剂量下对雌鼠生育能力及胚胎-胎仔的发育是安全的, 该剂量相当于临床人用剂量的 43.2 倍。为了更全面的评价坤灵丸对生殖发育的影响, 下一步可以进行家兔胚胎-胎仔发育毒性研究和大鼠围

产期毒性试验研究, 以便通过动物试验全面反映坤灵丸对哺乳动物生殖功能和发育过程的影响, 为临床安全用药提供参考。

参考文献

- [1] 坤灵丸说明书. 2015 年版. 天津天士力(辽宁)制药有限公司.
- [2] 《药物生殖毒性研究技术指导原则》课题调研组. 药物生殖毒性研究技术指导原则 [EB/OL]. (2006-12-09) [2017-06-29]. <http://www.sfda.gov.cn/WS01/CL1616/83445.html>.
- [3] ICH expert working group. ICH harmonised tripartite guideline S5(R2): Detection of toxicity to reproduction for medicinal products & toxicity to male fertility. [EB/OL]. (2005-09)[2017-06-29]. http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Safety/S5/Step4/S5_R2_Guideline.pdf
- [4] Susan L, Makris, Howard M, et al. Terminology of developmental abnormalities in common laboratory mammals (Version 2) [J]. Congenit Anom, 2013, doi: 10.1111/j.1741-4520.2009.00239.x.
- [5] Kobayashi K, Miyagawa M, Wang R S, et al. Effects of in utero and lactational exposure to di (2-ethylhexyl) phthalate on somatic and physical development in rat offspring [J]. Industrial Health, 2006, 44: 652-660.