

家兔用于药物生殖发育毒性评价的研究进展

郑锦芬^{1,2}, 黄芝瑛², 周晓冰¹, 赵曼曼^{1*}, 王三龙^{1*}

1. 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

2. 中山大学 药学院, 广东 广州 510006

摘要: 生殖发育毒性评价是药物安全性评价的重要组成部分。家兔属兔科兔形目, 是药物生殖发育毒性评价的非啮齿类哺乳动物模型之一, 但是其相关研究较啮齿动物少, 对不同种属动物模型进行药物生殖发育毒性评价有助于提高风险评估的准确性。从生育力与早期胚胎发育毒性试验、胚胎-胎仔发育毒性试验、围产期发育毒性试验和体外生殖发育毒性评价等方面综述了家兔在药物生殖发育毒性评价中的研究进展, 并探讨了家兔在药物生殖发育毒性评价研究中存在的问题及今后的发展方向, 以期今后研究提供参考。

关键词: 家兔; 生殖发育毒性; 药物评价; 体内评价; 体外评价

中图分类号: R965.3 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376 (2022) 06-1194-06

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2022.06.025

Research progress in evaluation of drug developmental and reproductive toxicity in rabbit

ZHENG Jinfen^{1,2}, HUANG Zhiying², ZHOU Xiaobing¹, ZHAO Manman¹, WANG Sanlong¹

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

2. School of Pharmaceutical Sciences, Sun Yat-Sen University, Guangzhou 510006, China

Abstract: Developmental and reproductive toxicity evaluation is an important part of drug safety evaluation. Rabbit, a member of the *Lagomorpha* order, are one of the non-rodent animal models for drug developmental and reproductive toxicity evaluation. However, there are fewer related studies than rodents, and the evaluation of drug developmental and reproductive toxicity in different species animal models can help improve the accuracy of risk assessment. This paper mainly review the the research progress of drug developmental and reproductive toxicity evaluation in rabbit, including fertility and early embryonic development toxicity study, embryo-fetal developmental toxicity study, pre-postnatal and postnatal development toxicity study and *in vitro* developmental and reproductive toxicity evaluation, and also discuss the problems and future development directions in the evaluation of drug reproductive and developmental toxicity in rabbit, hoping to provide references for the follow-up research.

Key words: rabbit; developmental and reproductive toxicity; drug evaluation; *in vivo* evaluation; *in vitro* evaluation

生殖发育毒性是指某种物质对动物和人类生殖及发育过程产生的负面作用, 包括对亲代生殖机能以及对子代胚胎或胎儿发育、出生后发育的不良影响^[1]。生殖发育毒性评价是新药临床前安全性评价的重要组成部分, 由于通常不将孕妇纳入临床试验, 因此生殖发育毒性评价是多数上市药物风险评估的基础。目前, 药物生殖发育毒性评价仍依赖于

动物模型, 然而不同物种之间具有反应差异性, 有研究表明约20%的化合物在不同种属之间的反应缺乏一致性^[2], 因此需要采用不同种属动物模型对药物的生殖发育毒性进行评价, 以提高风险评估的准确性。

家兔属兔科兔形目动物, 是药物生殖发育毒性评价中的非啮齿类哺乳动物模型之一。新西兰兔、

收稿日期: 2022-03-29

基金项目: 中国食品药品检定研究院中青年发展研究基金课题(2020C1)

第一作者: 郑锦芬, 硕士研究生, 研究方向为药物非临床安全性评价。E-mail: zhengjf27@mail2.sysu.edu.cn

*共同通信作者: 王三龙, 博士, 主任药师, 研究方向为药物非临床安全性评价。E-mail: wangsanlong@nifdc.org.cn

赵曼曼, 博士, 主管药师, 研究方向为生殖毒性评价。E-mail: zhaomanman@nifdc.org.cn

喜马拉雅兔、日本白兔、荷兰兔是试验中常用的品系。相较于其他动物模型,家兔用于药物生殖发育毒性评价具有以下优点:(1)体型小,产仔量大,妊娠期短,性情温顺,饲养便利,操作方便;(2)精子易获性,有利于男性生殖毒性药物的筛选;(3)属于诱发性排卵动物,无发情周期,可人工授精,生殖周期可预测;(4)卵母细胞易用,胚胎可操纵性强,可应用于生育力和早期胚胎发育的研究^[3]。

生殖发育毒性评价包括体内和体外评价。根据国际人用药品注册技术协调会(the international council for harmonisation of technical requirements for pharmaceuticals for human use, ICH)发布的人用药物生殖与发育毒性检测指导原则[ICH S5 (R3)],对于大多数药物来说,应对生殖周期的所有阶段进行评估,进行传统3阶段的体内试验,即生育力与早期胚胎发育(fertility and early embryonic development, FEED)毒性试验、胚胎-胎仔发育(embryo-fetal development, EFD)毒性试验和围产期发育(pre-and postnatal development, PPND)毒性试验^[4]。同时对啮齿动物(通常用鼠)和非啮齿动物(通常用兔)进行药物生殖发育毒性评价可以有效地避免因物种特异性以及解剖学差异而造成的影响。目前,大鼠和小鼠的生殖发育以及毒理学方面的背景数据丰富,然而除EFD毒性试验外,家兔其他毒理研究背景数据较少。因此,本文将介绍家兔在药物体内和体外生殖发育毒性评价中的研究进展及其局限性与发展方向,以期为后续研究提供参考。

1 FEED 毒性试验

FEED毒性试验是在动物交配前至交配和着床期间给予受试药物,目的是评价受试药物对配子成熟、交配行为、生育力、胚胎着床前发育以及着床的影响。雌性生殖毒性的评估终点包括发情周期、交配、生育力、黄体数和着床点、胚胎存活率等;雄性生殖毒性可以通过交配、生育力、生殖器官质量(睾丸、附睾、附睾尾部等)、睾丸和附睾的组织病理学、精子分析(计数、浓度和形态)等来评估^[5]。此段试验通常选择啮齿类动物,家兔在FEED毒性试验中的应用较少。

Breslin等^[6]给新西兰雄兔和雌兔静脉注射他贝芦单抗以探究其对生育力的影响,发现他贝芦单抗对雄兔和雌兔的生殖功能(交配、生育力和受孕指数)或交配所需天数、生殖器官质量、黄体数、胚胎存活率、植入前后胚胎丢失等均无影响,且未观

察到对雄性精子活力的不良作用。此外,雄兔在评价雄性生殖毒性物质方面具有一定优势。Ewuola等^[7]探究伏马菌素B1对雄性生殖的影响,评估了雄兔的性欲、精子形态、密度和活力、生育力(受精率、产仔数、胚胎存活率)、睾丸组织形态学等,发现连续7 d饲喂雄兔含7.50 mg·kg⁻¹伏马菌素的饲料导致雄兔的青春期延缓、精子数量降低、胚胎死亡。

2 EFD 毒性试验

EFD毒性试验是检测母体动物在器官发生期给药,对雌性动物和胚胎、胎仔产生的不良影响。其中,确定胎儿异常(畸形或变异)的发生率是否与药物相关是关键目标之一。不同物种对致畸物的敏感性具有差异,物种敏感差异性可能与代谢、母体药物暴露量、母体毒性、胎盘转运等有关^[8]。有研究表明几乎1/10的药物对大鼠没有致畸作用,但对家兔有致畸作用,而第2个非啮齿动物物种的使用提高了实验动物数据向人类外推的准确性^[9]。ICH S5(R3)指出小分子药物的EFD毒性试验应使用啮齿动物和非啮齿动物进行评估,基于大量的历史背景数据、动物的可获得性和实用性,家兔为常规使用的非啮齿类种属。

由于家兔较少用于一般毒性研究,相关毒理数据有限。在正式的EFD毒性试验之前,需进行最大耐受剂量的探索试验^[8]。与啮齿动物相比,除了自然交配法外,家兔可采用人工助配法进行交配。此外,可采用双重配种、早晚重复配种等方法增加交配次数,或采用人工授精方式以提高母兔受孕率。家兔交配确认当天记为妊娠第0天^[10]。一般设置4个剂量组,其中包括1个对照组和3个受试物组,每个剂量组动物不少于16只。雌兔从着床开始到硬腭闭合期间给药,试验期间对孕兔进行临床观察,记录体质量、摄食量。母体解剖后终点包括黄体数、着床点、早期晚期吸收胎、胎儿存活率、胎盘质量等。对于胎兔,需进行出生体质量记录、性别和外观检查,需对所有的胎兔进行软组织和骨骼检查。家兔胎仔比啮齿动物的胎仔更大,有利于肉眼观察。

家兔和灵长类动物对沙利度胺致畸作用较敏感。沙利度胺不会对大鼠子代造成肢体畸形,而家兔子代中明显出现了肢体畸形,其在形态上与在人类中引起的肢体畸形类似^[11]。这提示使用非啮齿动物种属进行发育毒性试验非常必要。Li等^[12]在钾竞争酸阻断剂沃诺拉赞对大鼠和家兔EFD毒性研究中发现,器官发生期iv 2、6、20 mg·kg⁻¹沃诺拉

赞对大鼠母体及胎儿无不良影响,然而在家兔高剂量组($12 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)中,观察到轻微母体毒性,胎儿生长迟缓,包括头臀长度缩短、胎儿体质量下降和胎儿骨化延迟,这提示家兔对沃诺拉赞的敏感性高于大鼠。

因此,采用第二物种进行药物生殖发育毒性评价将提高风险预测准确性。

3 PPND 毒性试验

PPND 毒性试验的目的是检测妊娠或者哺乳期雌性动物在胚胎着床至离乳期间给药,对母体及其子代发育产生的不良影响。通常选用啮齿类动物用于评价,在大鼠不适合的情况下,可选择其他替代性物种,如家兔、非人类灵长类动物等^[5]。

家兔是疫苗发育毒性试验的常用种属之一。家兔的胎盘以及抗体胎盘转运较啮齿动物更接近人类,表现出更高的母体胎儿产前抗体转移率^[13-14]。Stokes等^[15]将呼吸道合胞病毒疫苗肌肉注射到新西兰白兔体内,结果其对怀孕、分娩、哺乳母体和子代的发育均无不良影响。与人类相似,家兔含有丰富的血浆胆固醇酯转移蛋白(cholesteryl ester transfer protein, CETP),因此适合 CETP 抑制剂的非临床研究。礼来公司的 CETP 抑制剂 Evacetrapib 的产前产后毒性评估选用了新西兰白兔作为实验动物,在胚胎着床至离乳期间灌胃给药,结果表明药物对母体无不良影响,而 F1 代出生后存活率、交配指数、生育力和交配/受孕指数明显降低^[16]。

4 家兔在体外生殖发育毒性评价中的研究

近年来,随着动物福利 3R 原则[减少(reduction)、替代(replacement)和优化(refinement)]的实施,生殖发育毒性体外替代方法发展迅速。替代试验的种类有细胞培养、器官培养和胚胎培养。之前替代试验多用于药物生殖发育毒性筛选或机制研究,随着替代试验技术的发展及监管科学的进步,最新版本 ICH S5(R3)提出经过适当验证的体外替代试验可以推迟或替代(特定情况下)传统的体内试验^[4]。

4.1 生殖系统细胞、组织体外培养

4.1.1 雄性精子细胞体外培养 与啮齿动物不同,家兔精子细胞可直接从活体动物体内重复采集后在体外进行培养,对雄性的药物生殖发育毒性评价具有很大的应用价值。Yousef等^[17]从雄兔体内提取精子后进行体外培养,探讨抗氧化剂对氯化铝致精子毒性的保护作用,结果发现维生素 C 或维生素 E 可降低氯化铝对精子细胞的毒性作用。有学者通

过人工阴道法收集家兔的精液后,与氯化铅共同体外培养,使用计算机精液分析辅助系统(CASA)评估精子的运动能力,并通过病理切片分析精子的形态,发现 22、37 °C 下氯化铅高浓度培养 30、60、120、180、240 min 后,精子形态和运动能力出现异常^[18]。Halo 等^[19]体外评估了纳米粒子 ZnO 对新西兰家兔精子的影响,观察到精子活力和活力参数呈剂量相关性降低。上述研究提示家兔精子体外培养的可能性及其在雄性生殖毒性药物筛选中的应用潜力。

4.1.2 雌性卵巢颗粒细胞体外培养 卵巢颗粒细胞是卵泡内主要的功能细胞,与卵母细胞的成熟和卵泡发育密切相关。已有研究建立了大鼠的卵巢颗粒细胞体外生殖毒性评价模型^[20],然而其在家兔的研究还未有报道。靳荣帅等^[21]将新西兰白兔注射促性腺激素后取卵巢,体外分离培养颗粒细胞,并对其分离培养条件进行了优化,发现兔卵巢颗粒细胞在含有 15% 血清的 DMEM/F-12 培养基中生长状况更好。另外 1 项研究从卵巢中分离出颗粒细胞,并通过免疫荧光评估细胞纯度,转染评估 miR-18b 对卵巢颗粒细胞功能的影响,发现 miR-18b 过表达促进细胞凋亡^[22]。然而家兔卵巢颗粒细胞在药物生殖发育毒性评价中的应用还有待研究。

4.1.3 雌性卵巢卵泡体外培养 卵巢卵泡体外培养主要包括卵巢器官体外培养、卵巢皮质薄片体外培养、腔前卵泡体外培养等^[23]。此法能同时评估 3 个主要功能,即卵泡发育、激素生成和卵子发生,因此在药物生殖发育毒性评价中有较好的应用前景。卵巢器官培养可对卵巢通过未损伤的脉管系统进行培养基灌流培养。Viana 等^[24]采用未成熟的家兔,手术前 48 h 注射促性腺激素促进卵泡达到大窦期,麻醉后取卵巢,将卵巢置于灌注室中,然后把药物加入到灌注培养基中通过脉管系统进行灌流,结束后检测排卵、卵泡发育和激素合成。结果发现血管紧张素诱导排卵的频率,增加类固醇的合成。由于分离卵泡技术问题,有研究用家兔卵巢碎片代替分离卵泡进行体外培养^[25-27],研究了绿茶、槲皮素、姜黄素对卵巢功能的影响,评估终点是类固醇激素孕酮(P40)、睾酮(T)、雌二醇(E₂)的释放以及细胞的凋亡。

4.2 生殖器官类器官培养

类器官(organoids)是指利用原组织、胚胎干细胞、成体干细胞或多能干细胞进行体外三维(3D)培养而形成的具有一定空间结构的组织类似物。生殖器官类器官(如睾丸类器官和卵巢类器官)可作

为二维(2D)细胞培养和动物模型之间的中间平台,模拟生殖细胞间的相互作用和睾丸或卵巢微环境,用于生殖发育毒性研究。目前只有少数报道了生殖器官类器官的构建,其中并不包括家兔^[28]。当前生殖器官类器官培养仍处于早期阶段,存在诸多不足,例如生殖细胞分化率低、维持功能性时间短等,故培养方法需要进一步改进。尽管类器官培养技术还不成熟,但是其能模拟真实器官的结构和功能,在毒性药物的筛选方面具有很好的应用前景,构建不同种属生殖器官类器官模型将有助于药物的安全性评价。

4.3 体外胚胎培养

4.3.1 着床前胚胎培养 家兔排卵容易操控,卵内细胞团数量远远多于啮齿动物,着床前胚胎的不同阶段均可进行体外培养,是评价药物早期胚胎发育毒性的优势物种。家兔受精后单细胞胚胎大约24 h后分裂为2~4个细胞的胚胎,48 h后分裂到8~16个细胞的胚胎,72 h后为桑葚胚时期,72~84 h后为囊胚期^[29]。过去几十年,有多位研究人员对兔着床前胚胎培养方法进行探索优化,例如对培养基条件进行优化^[30];开发可用显微镜持续观察记录的密闭型培养装置^[31]。Mehaisen等^[32]回收2~4个细胞、8~16个细胞和桑葚胚阶段胚胎,通过体外培养,评估了褪黑素对于上述阶段胚胎发育的影响,结果表明适量的褪黑激素可提高家兔着床前胚胎的发育率和孵化率。Alshaheen等^[33]探讨了不同浓度的瘦素对桑葚胚时期兔胚胎作用48 h后的影响,记录了扩张囊胚和孵化囊胚的数量,发现20 ng·mL⁻¹瘦素组的胚胎膨胀率和孵化率显著高于其他浓度的。

4.3.2 体外全胚胎培养 体外全胚胎培养(whole embryo culture, WEC)技术是评价发育毒性的一种替代方法,该法在20世纪30年代由Nicholas和Rudnick等提出,并在20世纪70年代由New等不断改良^[34]。并且,WEC已经被欧洲替代方法验证中心(European Center for Validation of Alternative Methods, ECVAM)验证^[35]。啮齿类动物的WEC已广泛用于体外发育毒性筛选,然而关于兔WEC模型的研究数量有限。大鼠和家兔的绒毛膜尿囊胎盘和卵黄囊(visceral yolk sac, VYS)结构存在差异,因此对受试物具有不同的敏感性。Marshall等^[36]利用WEC方法,比较大鼠和家兔对不同途径吸收的营养抑制剂反应,发现了物种特异性,也证实了以上观点,同时提示补充非啮齿动物WEC毒性数据可能有助于提高药物体外毒性的预测能力。

兔体外全胚胎培养技术是在啮齿动物体外全胚胎培养技术上发展而来。简单来说,将妊娠第9~11 d的胚胎置于含受试药物、100%兔血清或者血清混合物的培养基中,并在37 °C培养箱内培养不超过48 h,期间根据胚胎生长发育阶段供给含O₂、CO₂、N₂等不同比例的混合气体,最后评估胚胎的生长发育情况^[37]。2007年,Carney等^[38]建立了兔WEC形态评分系统,使其更好与Brown建立的全胚胎培养的啮齿类评分系统相匹配。

Zhu等^[39]将毒理学与体外全胚胎培养相结合,研究了沙利度胺对兔胚胎的毒性作用及其在体外和体内的行为。结果表明,在体内外沙利度胺均可诱发胚胎脑发育不全、肢芽短小等胚胎畸形。此研究建立了1种新方法,补充了非啮齿类哺乳动物的背景数据,有助于提高数据的可靠性,在药物生殖发育毒性评价中应用前景广阔。

5 结语

从沙利度胺的生殖发育毒性研究开始,家兔在药物生殖发育毒性评价中一直发挥重要作用。目前,家兔在药物体内生殖发育毒性评价方面应用较多。美国食品药品监督管理局(FDA)2018—2019年审批的药物中,84%的小分子药物使用家兔进行EFD毒性试验^[40],积累了大量的历史背景数据,可为后续研究提供参考。

但是,家兔在药物体内生殖发育毒性评价的应用仍然存在一定局限性。(1)家兔应用于FEED及PPND毒性试验的背景数据有限;另外,家兔胎仔存活率低于啮齿动物,其在PPND毒性试验中应用更具挑战性。其次,家兔毒代动力学以及毒理学背景数据相对缺乏。(2)家兔胃肠道比较敏感,较少用于抗生素类药物的评价,通常在低剂量下进行评估,然而在多数情况下,家兔的试验最大剂量与临床使用剂量相似,尚未明确是否在可达到高剂量的情况下使用家兔进行抗生素药物的EFD毒性试验。

近年来,各项生殖发育毒性评价体外替代方法在不断发展,已验证的替代方法主要应用于胚胎毒性评价,如WEC技术。家兔的WEC技术取得了一定的进展,但是仍需不断优化和改进WEC技术,可联合组学等现代先进技术拓展评价终点。而且其在生物大分子药物的应用尚未涉及。家兔生殖器官类器官培养相关研究尚未被报道,未来需要进一步探索。

基于3R原则,体外替代方法的开发、验证和优化无疑是药物生殖发育毒性评价的一个发展方向。

为了提高试验的可预测性,第2物种体外生殖发育毒性替代方法也在不断开发。然而,由于哺乳动物生殖周期的复杂性,不同时期对于药物的敏感性不同,单独的体外替代试验无法模拟整个生殖周期,全面评价药物的生殖发育毒性。体外试验的假阴性和假阳性结果限制了体外替代方法的进一步研究。近年来,有害结局通路(adverse outcome pathway, AOP)是体外替代试验关注的一个问题。在AOP指导下,目前已成功建立了测试皮肤致敏的替代方法。因此基于AOP原理,应用整合测试和评估方法评价药物生殖发育毒性将会是一个新的趋势。未来将利用各种先进技术并加以整合,如干细胞技术、高通量试验,开发出更多的体外替代模型。家兔的体外替代模型也将逐步应用于药物生殖发育毒性评价中。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Brown E S, Jacobs A, Fitzpatrick S. Reproductive and developmental toxicity testing: from *in vivo* to *in vitro* [J]. *Altern Animal Exp*, 2012, 29(3): 333-339.
- [2] Teixidó E, Krupp E, Amberg A, et al. Species-specific developmental toxicity in rats and rabbits: Generation of a reference compound list for development of alternative testing approaches [J]. *Reprod Toxicol*, 2018, 76: 93.
- [3] Foote R H, Carney E W. The rabbit as a model for reproductive and developmental [J]. *Reprod Toxicol*, 2000, 14(6): 477-493.
- [4] ICH. Guideline S5(R3): Detection of reproductive and developmental toxicity for human pharmaceuticals [EB/OL]. (2020-02-18)[2022-02-01]. https://database.ich.org/sites/default/files/S5-R3_Step4_Guideline_2020_0218.pdf.
- [5] Faqi A S, Hoberman A, Lewis E, et al. Developmental and reproductive toxicology// Faqi A S. *A Comprehensive Guide to Toxicology in Nonclinical Drug Development* [M]. San Diego: Academic, 2017.
- [6] Breslin W J, Hilbish K G, Martin J A, et al. Developmental toxicity and fertility assessment in rabbits with Tabalumab: A human IgG4 monoclonal antibody [J]. *Birth Def Res Part B: Develop Reprod Toxicol*, 2015, 104(3): 117-128.
- [7] Ewuola E O, Egbunike G N. Effects of dietary fumonisin B1 on the onset of puberty, semen quality, fertility rates and testicular morphology in male rabbits [J]. *Reproduction*, 2010, 139(2): 439-445.
- [8] Allais L, Reynaud L. Teratology studies in the rabbit [J]. *Method Mol Biol*, 2013, 947: 139-156.
- [9] Theunissen P T, Beken S, Beyer B, et al. Comparing rat and rabbit embryo-fetal developmental toxicity data for 379 pharmaceuticals: on systemic dose and developmental effects [J]. *Crit Rev Toxicol*, 2017, 47(5): 402-414.
- [10] 孙祖越,周莉,闫晗,等. 如何成功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.
Sun Z Y, Zhou L, Yan H, et al. How to successfully carry out nonclinical reproductive toxicity study on new drugs [J]. *Chin J New Drugs*, 2011, 20(22): 2195-2204.
- [11] Posobiec L M, Cox E M, Solomon H M, et al. A probability analysis of historical pregnancy and fetal data from Dutch belted and New Zealand white rabbit strains from embryo-fetal development studies [J]. *Birth Def Res Part B: Develop Reprod Toxicol*, 2016, 107(2): 76-84.
- [12] Li T, Qiao H, Yue P, et al. Embryo-fetal toxicity assessment of vonoprazan in rats and rabbits [J]. *J Appl Toxicol*, 2018, 38(7): 987-995.
- [13] Barrow P C, Allais L. Developmental toxicity testing of vaccines [J]. *Method Mol Biol*, 2013, 947: 81-89.
- [14] PentSUK N, Van Der Laan J W. An interspecies comparison of placental antibody transfer: New insights into developmental toxicity testing of monoclonal antibodies [J]. *Birth Def Res Part B: Develop Reprod Toxicol*, 2009, 86(4): 328-344.
- [15] Stokes A H, Franklin K, Fisher D E, et al. Repeated dose toxicity study and developmental and reproductive toxicology studies of a respiratory syncytial virus candidate vaccine in rabbits and rats [J]. *Int J Toxicol*, 2021, 40(2): 125-142.
- [16] Breslin W J, Hilbish K G, Cannady E A, et al. Prenatal and postnatal assessment in rabbits with Evacetrapib: A cholesteryl ester transfer protein inhibitor [J]. *Birth Def Res*, 2017, 109(7): 486-496.
- [17] Yousef M I, Kamel K I, El-Guendi M I, et al. An *in vitro* study on reproductive toxicity of aluminium chloride on rabbit sperm: the protective role of some antioxidants [J]. *Toxicology*, 2007, 239(3): 213-223.
- [18] Krockova J, Roychoudhury S, Slanina T, et al. Lead induced alterations in rabbit spermatozoa motility and morphology *in vitro* [J]. *Czech J An Sci*, 2016, 61(9): 391-406.
- [19] Halo M, Jr., Bulka K, Antos P A, et al. The effect of ZnO nanoparticles on rabbit spermatozoa motility and viability parameters *in vitro* [J]. *Saudi J Biol Sci*, 2021, 28(12): 7450-7454.
- [20] 邬静. 大鼠卵巢颗粒细胞体外生殖毒性评价替代模型

- 的建立与应用 [D]. 长沙: 湖南农业大学, 2011.
- Wu J. Alternative and evaluation model of reproductive toxicity with rat ovarian granulosa cells and its application [D]. Changsha: Hunan Agricultural University, 2011.
- [21] 靳荣帅, 陈实, 周娟, 等. 兔卵巢颗粒细胞分离培养条件的优化 [J]. 中国畜牧杂志, 2021, 57(12): 140-143, 149.
- Jin R S, Chen S, Zhou J, et al. Optimization of isolation and culture conditions for rabbit ovarian granulosa cells [J]. Chin J An Sc, 2021, 57(12): 140-143, 149.
- [22] Li Z, Jiang J, Yi X, et al. miR-18b regulates the function of rabbit ovary granulosa cells [J]. Reprod Fert Develop, 2021, 33(5): 363.
- [23] 万旭英, 张天宝. 卵巢卵泡体外培养系统及其在生殖毒理学中的研究进展 [J]. 毒理学杂志, 2009, 23(6): 494-498.
- Wan X Y, Zhang T B. Ovarian follicle culture system in vitro and its research progress in reproductive toxicology [J]. J Toxicol, 2009, 23(6): 494-498.
- [24] Viana G E, Pereira V M, Honorato-Sampaio K, et al. Angiotensin-(1-7) induces ovulation and steroidogenesis in perfused rabbit ovaries [J]. Exp Physiol, 2011, 96(9): 957-965.
- [25] Balazi A, Sirotkin A V, Foldesiova M, et al. Green tea can suppress rabbit ovarian functions *in vitro* and *in vivo* [J]. Theriogenology, 2019, 127: 72-79.
- [26] Sirotkin A V, Štochmařová A, Grossmann R, et al. Quercetin directly promotes rabbit ovarian steroidogenesis [J]. World Rabbit Sci, 2019, 27(3): 163.
- [27] Sirotkin A V, Kadasi A, Stochmalova A, et al. Effect of turmeric on the viability, ovarian folliculogenesis, fecundity, ovarian hormones and response to luteinizing hormone of rabbits [J]. Animal, 2018, 12(6): 1242-1249.
- [28] Sakib S, Voigt A, Goldsmith T, et al. Three-dimensional testicular organoids as novel *in vitro* models of testicular biology and toxicology [J]. Environ Epigenet, 2019, 5(3): 1-8.
- [29] García M, Embryo manipulation techniques in the rabbit //Carreira R P, Authors M. *New Insights into Theriogenology* [M]. London: Intech Open, 2018.
- [30] Wang H, Cao W, Hu H, et al. Effects of changing culture medium on preimplantation embryo development in rabbit [J]. Zygote, 2021, doi: 10.1017/S0967199421000721.
- [31] Sultana F, Hatori M, Shimosawa N, et al. Continuous observation of rabbit preimplantation embryos *in vitro* by using a culture device connected to a microscope [J]. J Am Assoc Lab Anim, 2009, 48(1): 52-56.
- [32] Mehaisen G M K, Saeed A M. *In vitro* development rate of preimplantation rabbit embryos cultured with different levels of melatonin [J]. Zygote, 2015, 23(1): 111-115.
- [33] Alshaheen T A, Awaad M H H, Mehaisen G M K. Leptin improves the *in vitro* development of preimplantation rabbit embryos under oxidative stress of cryopreservation [J]. Plos One, 2021, 16(2): e0246307.
- [34] 王雅楠, 宋殿荣. 胚胎毒性体外试验的研究进展 [J]. 国际生殖健康: 计划生育杂志, 2010, 29(4): 277-280.
- Wang Y N, Song D R. Review of *in vitro* embryotoxicity screening methods [J]. J Int Reprod Health: Fam Plan, 2010, 29(4): 277-280.
- [35] 韩佳寅, 梁爱华. 全胚胎培养技术及其应用研究进展 [J]. 中国中药杂志, 2010, 35(05): 549-553.
- Han J Y, Liang A H. Research progress of whole embryo culture tool and its application [J]. China J Chin Mater Med, 2010, 35(05): 549-553.
- [36] Marshall V A, Johnson K J, Moore N P, et al. Comparative response of rat and rabbit conceptuses *in vitro* to inhibitors of histiotrophic nutrition [J]. Birth Def Res Part B: Develop Reprod Toxicol, 2015, 104(1): 1-10.
- [37] Marshall V A, Carney E W. Rabbit whole embryo culture [J]. Method Mol Biol, 2012, 889: 239-252.
- [38] Carney E W, Tornesi B, Keller C, et al. Refinement of a morphological scoring system for postimplantation rabbit conceptuses [J]. Birth Def Res B: Dev Reprod Toxicol, 2007, 80(3): 213-222.
- [39] Zhu Q, Jia Y, Guo J, et al. Establishment of an *in vitro* method of rabbit embryo toxicity with toxicokinetics study [J]. J Appl Toxicol, 2021, 42(3): 380-391.
- [40] Barrow P, Clemann N. Review of embryo-fetal developmental toxicity studies performed for pharmaceuticals approved by FDA in 2018 and 2019 [J]. Reprod Toxicol, 2021, 99: 144-151.

[责任编辑 李红珠]