



· 综述 ·

全胚胎培养技术及其应用研究进展

韩佳寅^{1,2}, 梁爱华^{2*}

(1. 首都医科大学 中医药学院, 北京 100069;
2. 中国中医科学院 中药研究所, 北京 100700)

[摘要] 体外全胚胎培养技术是以体外胚胎替代整体动物进行实验的技术,主要用于研究早期器官的生长发育和化学物质的胚胎毒性及造成胚胎毒性的机制等。本文就大鼠和小鼠的全胚胎培养技术及其应用进行综述,着重介绍了全胚胎培养技术的发展概况,应用全胚胎培养技术的注意事项及全胚胎培养技术在生长发育研究、环境污染物和重金属的胚胎毒性研究、药物安全性评价、中药的胚胎毒性及其机制研究领域的应用,并就该技术在中药生殖毒性研究中的应用前景进行了讨论。

[关键词] 全胚胎培养;胚胎发育;生殖毒性;安全性评价

体外全胚胎培养技术(whole embryo culture, WEC)是一种将动物的完整胚胎移植到体外进行培养的实验技术。Nicholas 于 1934 年采用血浆作为培养基,证明大鼠胚胎能够在母体外培养成活 24~36 h,从而创立了该实验方法。之后,科学家们对培养基以及培养方法等条件不断改善。20 世纪 80 年代, Brown 制定了用于评价胚胎的生长和分化情况的评分系统,作为评价胚胎发育程度的指标^[1]。目前, WEC 已经被广泛用于胚胎发育、化合物的胚胎毒性和致畸性研究以及药物的安全评价等^[2-3]。能够用于 WEC 的胚胎材料来源广泛,鱼类、两栖类、鸟类、哺乳类胚胎均可用于实验。采用上述动物胚胎进行的各种研究均已见文献报道,例如,朱小山、端正花等^[4-5]应用斑马鱼胚胎分别研究了富勒烯和双酚 A 的胚胎毒性; Li X Y 等^[6]应用蛙卵研究了 1-甲基-3-辛烷基咪唑啉酮溴化物对胚胎发育的影响; Alvarez I 等^[7]应用鸡胚胎研究了成纤维细胞生长因子(FGFs)的神经诱导作用; Hansen J M 等^[8]采用兔胚胎与大鼠胚胎对比研究了谷胱甘肽和半胱氨酸在反应停致畸中的作用等。目前,利用大鼠或小鼠器官形成期的胚胎通过旋转培养方法进行化合物的致畸研究最为常见。本文主要对大鼠和小鼠的全胚胎培养技术及其应用进行综述。

1 WEC 技术及其发展概况

1.1 培养方法 全胚胎培养技术经历了从静态培养向旋转培养发展的过程。20 世纪 30 年代, Nicholas 等^[9]建立了早期的体外静态胚胎培养技术。以大鼠肝素化血清与大鼠

14~15 d 的胚胎提取物混合作为培养基,可使得大鼠胚胎在体外生长。然而,胚胎生长的时间较短,一般在培养的 24 h 内生长,而 36 h 后胚胎生长速度即减慢。培养 48 h 内正常生长的胚胎不到一半,正常分化的胚胎只有 3/4。

New 等^[10]通过静态培养法,以血浆凝块作为培养基,并在培养过程中通入 4%~5% CO₂ 气体,有效地提高了体节阶段早期胚胎的生长发育率。通过该实验还发现,通入 60% 的 O₂ 气体对于胎龄较长的胚胎的生长发育率有提高作用。在此之后, New^[11]对其技术进行了改进,其设计的循环器装置采用循环的同源离心血清培养基进行胚胎培养,在培养过程中通入 95% O₂ 和 5% CO₂ 气体。结果证明,除在 30 体节胚胎无法建立血管与尿囊胎盘的连接外,胚胎生长发育和器官分化均与体内同龄胚胎无显著性差异。由于循环器装置较复杂, New 等^[12]随后又设计了一套更为简便的充气旋转瓶装置,采用旋转培养法,其培养效果与循环培养器装置的培养基本一致。目前所采用的 WEC 技术基本上是在 New 的实验基础上改进而来,即采用大鼠或小鼠受孕后 8~10 d 的胚胎,在合适的气体环境和适当的培养基条件下,进行旋转培养一定时间后,根据研究目的进行胚胎评价。

1.2 胚胎期的选择 体外胚胎培养依据胚胎移出母体时所处的阶段主要分为 3 类: 卵圆柱期之前胚胎培养, 卵圆柱期到尿囊胎盘形成之前的胚胎培养, 尿囊胎盘形成之后的胚胎培养^[13]。

卵圆柱期之前胚胎培养主要指胚胎从胚泡生长到卵圆柱的过程,主要用来观察胚层的分化。此时培养的胚胎与体内生长的胚胎在显微结构上有很大相似性,但生长较体内缓慢,并且培养的成功率很低。卵圆柱期到尿囊胎盘形成之前的胚胎培养,特别是头褶期和体节阶段早期胚胎(小鼠 8.5 d, 大鼠 9.5 d) 培养 48 h 后,胚胎的存活率、生长发育、器官分化与体内都有很好的一致性,是 WEC 的主要阶段。由于本

[收稿日期] 2009-07-01

[基金项目] 国家自然科学基金项目(30873434); 国家科技部重大专项(2009ZX09301-005-08); 中国中医科学院自选课题(2007)

[通信作者] * 梁爱华, Tel: (010) 64288601, E-mail: liangaihua@ sina.com



阶段处于器官发生早期,胚胎细胞分化增殖活跃,器官形成迅速,对致畸物敏感,因此在筛选致畸原、评价药物安全性等方面发挥了重要作用^[14-15]。尿囊胎盘形成之后的胚胎培养存在较大困难,此时的体内胚胎与母体直接营养沟通,而体外培养基无法提供与母体相等效果的养分,使得体外培养胚胎的生长远远落后于体内胚胎的生长。

1.3 培养基和气体条件 培养基作为 WEC 成功与否的关键,长期以来一直是学者们关注的焦点。Nicholas 等^[9]早期采用鸡血浆、淀粉琼脂、营养琼脂、胎盘提取物、琼脂 + 不同浓度盐溶液、鸡血浆 + 大鼠胚胎提取物作为培养基进行胚胎培养,均未取得满意结果。New 等^[16]通过实验证明同种血清是大鼠胚胎体外培养的最佳培养基,且培养效果与提供血清的大鼠性别、是否怀孕、是否与提供胚胎的大鼠为同一只等因素无关。近年来,一些国内学者也对 WEC 的培养基进行了进一步探索。张天宝等^[17-18]通过实验发现,用人工合成培养基全部和部分替代大鼠血清进行全胚胎培养,结果发现 TC-199 培养基在添加 60% 大鼠血清后可替代大鼠血清作为培养基进行全胚胎培养。单用小牛血清及用小牛血清 + 10% 大鼠血清作为培养基,胚胎的生长发育都不能达到纯大鼠血清的水平。王秋枫等^[19]以 90% 人血清 + 10% 大鼠血清进行全胚胎培养,除胚胎 DNA 含量外,其他各项生长分化指标与大鼠血清培养的胚胎无明显差异,可以作为替代培养基用于胚胎早期生长发育的研究和评价。

目前用于 WEC 最常用的培养基为同源即刻离心血清(immediately centrifugal serum, ICS),即用于大鼠 WEC 的培养基为成年健康大鼠麻醉后经腹主动脉快速抽血、立即离心后而分离的血清。

气体环境是决定 WEC 培养效果的另一重要因素。New 等^[10]发现,在气体系统中加入 5% CO₂ 能够起到中和碳酸氢盐,维持培养基 pH 的作用,有益于胚胎的生长发育。氧在哺乳动物胚胎器官发育期的代谢过程中起到重要作用,合适的氧浓度是 WEC 成功与否的关键。氧浓度过高会导致氧化,氧浓度过低则会造成代谢性应激。New 等^[20]在确定 CO₂ 气体含量后,又将 O₂ 限定到 20% ~ 95%,观察胚胎发育情况,发现随着胚胎生长发育的进行,耗氧量将会增加。

目前广泛应用的 WEC 气体系统是由 O₂、CO₂、N₂ 3 种气体组成。分别于培养开始时、第 16、26 小时往培养瓶内充入混合气体,其比例变化依次为 O₂-CO₂-N₂ (5:5:90, 20:5:75, 40:5:55)。

1.4 胚胎发育评价方法 胚胎的发育情况可以下述指标进行评价:①存活率:以可见心搏为存活指标^[21]。②胚胎组织器官形态分化:大鼠胚胎用 Brown 形态学计分法评价胚胎各器官的形态分化^[3],小鼠胚胎用 Van 形态学评分系统评价胚胎组织器官分化终点^[22]。③卵黄囊(visceral yolk sac, VYS)组织检查:可以将 VYS 迅速用 3.0% 戊二醛固定,制备扫描电镜标本进行超微结构观察;也可制备 HE 染色切片,观察

VYS 的组织形态学^[23]。

2 WEC 中应注意的问题

2.1 培养温度、时间和 pH 大部分胚胎在 15 ~ 25 °C 的 Hanks 液中停留 2 h 后发育较好。实验时应尽量缩短胚胎暴露于 Hanks 液中的时间,并保证实验温度在 15 ~ 37 °C^[24]。pH 对 WEC 影响较大,实验证明,培养基最适 pH 7.5 ~ 8.2,在研究弱酸或弱碱性化学物的致畸性时,培养基 pH 变动有可能增加培养胚胎对化学物质的敏感性,增强化学物对胚胎的损伤作用,使实验结果出现假阳性^[25]。

2.2 考虑母体代谢 实验表明以 WEC 替代体内有时候会出现体内外实验结果相差较大,而如果将药物在体内的代谢机制和代谢过程纳入考虑范围,就能提高 WEC 替代体内实验的准确性^[26-27]。一些实验采取加入代谢系统的方式,如胚胎与肝细胞联合培养,在培养系统中加入肝微粒体等方式,取得了较好的效果^[28]。

2.3 麻醉剂的替代应用 用于制备 ICS 的大鼠通常使用乙醚麻醉,但乙醚具有很强的刺激性,一直不被动物伦理协会所认可。应用异氟烷作为麻醉剂获得的 ICS 进行胚胎培养,其结果与乙醚作为麻醉剂时无明显区别,可作为乙醚良好的替代品^[29]。

2.4 有机溶剂的选择 当受试品为水难溶物时,需用有机溶剂替代水作为溶剂。实验证明甲酰胺,二甲基甲酰胺,牛血清蛋白(BSA),丙三醇都可以作为 WEC 受试品的溶剂。而二甲基亚砜和乙醇则由于具有较强的胚胎毒性不能作为 WEC 受试品的溶剂^[30]。

3 WEC 技术在生长发育和毒理学中的应用

3.1 生长发育研究 Spezia 等^[31]应用 WEC 技术将 12 d 小鼠胚胎培养 30 h,通过生嵴裂的分化判断性别,取得了良好效果。Fujinaga M^[32]利用 WEC 过程包含身体许多不对称结构的发育过程的特点,应用其研究身体 L/R 轴线的发育机制。Inoue Y 等^[33]应用分子生物学技术结合 WEC 技术研究钙粘素在后脑区室化中的作用,得到 Cdh6 在后脑区室化中的作用可能受到 Hox 基因调节网控制的结论。Nagase M 等^[34]通过向 8 ~ 9.5 d WEC 系统中加入环王巴明或介芬胺,观察在血管形态形成期特异性抑制刺猬因子的效应,证实刺猬因子在小鼠卵黄囊时期血管发生中具有不可或缺的作用。Liu 等^[35]应用 WEC 技术培养受孕 13.5 ~ 14.5 d 胚胎,发现体外培养的胚胎在氧化应激状况和器官的发育情况上与体内无明显差异,此技术可用于研究胚胎在器官发生期后期的生长发育。赵如冰等^[36]采用 WEC 方法观察同型半胱氨酸(HCY)对大鼠胚胎生长发育的影响,结果证明 HCY 可能对胚胎有致畸作用,并且其致畸作用呈量效关系。李勇等^[37]应用鸡胚胎研究同型半胱氨酸(HCY)对胚胎神经管的致畸作用,通过实验发现 HCY 能诱发鸡胚神经管畸形,而叶酸对此致畸作用有明显的保护功能。

3.2 环境污染物和重金属的胚胎毒性研究 Hunter III ES



等^[38]应用 WEC 研究自来水中消毒剂 HAA 的发育毒性,发现高浓度的 HAA 和长时间暴露于 HAA 会导致胚胎畸形的发生。张全新等^[39]应用 WEC 技术,将胚胎暴露于经室内挥发性有机物染毒的大鼠血清中,胚胎发育迟缓并出现畸形,证明室内挥发性有机物具有致畸性和胚胎毒性。龙鼎新等^[40]应用 WEC 技术,针对在塑料和洗涤剂中广泛应用的壬基酚的致畸性进行研究,发现壬基酚具有一定的胚胎毒性并能诱发胚胎畸形。赵泽文等^[41]应用 WEC 研究环境雌激素 PCB 在人乳中含量最高的同系物 PCB₁₅₃,实验结果显示培养基中 PCB₁₅₃ 到达一定浓度后能抑制胚胎的生长发育和形态分化,具有致畸性和发育毒性。

贺庆芝等^[42]利用 WEC 模型探讨铅在胚胎发育中的毒性及对胚胎组织 GSH 和 MDA 含量的影响,证明铅能抑制胚胎生长发育和形态分化,诱发卵黄囊生长和血管分化不良以及神经管不闭合,胚胎发育异常率增高,更高剂量还会导致后脑水肿。且染毒后 GSH 含量降低,MDA 含量增高。赵树芬等^[43]利用 WEC 观察 3 种不同方式接触镉的大鼠胚胎,证明镉具有胚胎毒性,并且得到应用全胚胎培养方法筛选致畸原,经母体宫内染毒,取胚胎体外培养是较好的方法的结论。李勇等^[44]利用 WEC 研究硒、砷联合致畸作用,实验结果表明硒、砷联合毒性的主效应呈相互拮抗作用。Peter Beyrouy 等^[45]将体内胚胎毒性实验与体外 13.5 d 胚胎毒性实验相结合,证明低水平 MeHg 产生神经毒性的原因是其降低了发育胚胎的 MAO 活性。

3.3 药物的安全性评价 Uysal 等^[46]通过 WEC 技术研究用于抗妊娠期静脉血栓的抗凝剂肝素和低分子量肝素的毒性和致畸性,结果表明,此种血栓抗凝剂具有遗传毒性。Longo M 等^[47]应用体内和体外相结合的实验方法研究抗疟药 DHA 胚胎毒性产生的原因及其影响因素。Chan L Y 等^[48]应用 WEC 技术证明降糖药罗格列酮对体外培养胚胎的生长没有明显的影响。韩静等^[49]利用小鼠的 WEC 模型研究 atRA 的发育毒性,发现 atRA 具有明显的致畸作用,并且其发育毒性可能与 VYS 结构和功能的改变密切相关。Flick B 等^[50]研究氮甲基吡咯烷酮代谢产物的胚胎毒性。经过实验发现代谢产物中 NMP 和 5-HNMP 具有弱的胚胎毒性,而另外 2 种代谢产物 2-HMSI 和 MSI 则没有胚胎毒性。Renzo FD^[51]研究三唑酮类杀菌药致畸作用的分子生物学机制,确定胚胎在体外暴露于三唑酮会导致 TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β R1 表达减少,而 CRABPI 表达增加。

3.4 中药的胚胎毒性及其机制研究 WEC 在中药的胚胎毒性研究中也得到了广泛应用。Liu 等^[52]应用 WEC 技术研究人参皂苷 Rg₁ 对大小鼠体外胚胎生长发育的影响,得到人参皂苷 Rg₁ 对于器官形成期的大小鼠胚胎具有胚胎毒性,并且大鼠胚胎比小鼠胚胎对 Rg₁ 更敏感的结论。肖凯等^[53]应用大鼠体外胚胎培养模型研究生草乌对胚胎发育的影响,结果表明,较高剂量生草乌对体外培养的大鼠胚胎有一定毒性

作用。Chan L Y 等^[54]应用 WEC 技术研究人参皂苷的胚胎毒性,通过实验证实,与 人参皂苷 Rb₁ 分离后的人参皂苷 Re 仍具有胚胎毒性,而人参皂苷 Rc 则无明显毒性反应。

4 结语

妊娠期间的用药安全性一直受到人们的广泛关注,特别是“反应停”事件后,药物的生殖毒性评价更成为了药物安全性评价不可缺少的重要部分。妊娠禁忌是中药药性理论的重要方面。中医临床历来重视妊娠期用药安全,古代文献中有不少关于中药妊娠禁忌方面的记载,并将一些可能影响妊娠期安全性的中药列为妊娠禁忌药。然而,由于历史条件的局限性以及现代对中药依然缺乏系统的生殖毒性研究,人们对中药妊娠禁忌的认识仍然停留在临床经验水平。迄今,对有关中药的生殖毒性缺乏系统的研究,其生殖毒性特点及其机制均未阐明。随着中药的大量应用,发现有些古代文献记载与现代研究结果有较大的出入。例如,青蒿在历代本草文献中从未被列为妊娠禁忌药,但是从青蒿中提取得到的青蒿素及其衍生物却在很低的剂量下能引起妊娠小鼠、大鼠、家兔等多品系动物出现高比例甚至全部吸收胎,还可引起地鼠和豚鼠的流产。因此,为了保证妊娠期安全用药,有必要对常用中药进行生殖毒性筛选和研究。

目前,有关药物的生殖毒性研究多采用活体动物进行。然而,由于整体动物生殖毒性试验耗时、费力,需要耗费大量的动物以及大量的受试药物,因此不适用于大样本、小量受试物的胚胎毒性筛选。而啮齿类动物全胚胎体外培养技术可以利用少量的动物提供足量的胚胎,从而可以节约大量的动物。同时可实现胚胎在母体环境外的生长发育与组织器官形态分化达到与体内同龄胚胎的高度相似,并可以克服体内生殖毒性周期长、用药量大的缺点。全胚胎培养还排除了母体等因素对胚胎发育的影响,并可人为控制实验条件,敏感地检测药物对胚胎发育不同阶段的毒性,动态观察和研究药物的胚胎毒性作用及机制,因此,笔者认为,该项技术在中药的胚胎毒性筛选中有重要的应用价值。

[参考文献]

- [1] Brown N A, Fabro S. Quantitation of rat embryonic development *in vitro*; A scoring system [J]. *Teratology*, 1981, 24: 65.
- [2] Flick B, Klug S. Whole embryo culture: An important tool in developmental toxicology today [J]. *Curr Pharm Desi*, 2006, 12: 1467.
- [3] 赵树芬,保毓书,张兰芬,等. 应用啮齿类动物全胚胎培养方法筛查致畸原的研究 [J]. *卫生毒理学杂志*, 1993, 1: 1.
- [4] 朱小山,朱琳,郎宇鹏,等. 富勒烯及其衍生物对斑马鱼胚胎发育毒性的比较 [J]. *中国环境科学*, 2008, 28(2): 173.
- [5] 端正花,张斌田,朱琳. 双酚 A 对斑马鱼胚胎发育阶段的毒性及生物蓄积 [J]. *中国环境科学*, 2008, 28(3): 260.
- [6] Li X Y, Zhou J, Yu M, et al. Toxic effects of 1-methyl-3-octylimidazolium bromide on the early embryonic development of the frog *Rana nigromaculata* [J]. *Ecotoxic Environm Saf*, 2009, 72:



- 552.
- [7] Alvarez I S, Araujo M, Nieto M A. Neural induction in whole chick embryo cultures by FGF[J]. *Developm Biol*, 1998, 199: 42.
- [8] Hansen J M, Carney E W, Harris C. Differential alteration by thalidomide of the glutathione content of rat vs. rabbit conceptuses *in vitro*[J]. *Reprod Toxicol*, 1999, 13: 547.
- [9] Nicholas J S, Rudnick D. The development of rat embryos in tissue culture[J]. *Zoology*, 1934, 20: 656.
- [10] New D A T, Stein K F. Cultivation of post-implantation mouse and rat embryos on plasma clots[J]. *J Embryol Exp Morph*, 1964, 12 (1): 101.
- [11] New D A T. Development of explanted rat embryos in circulating medium[J]. *J Embryol Exp Morph*, 1967, 17(3): 513.
- [12] New D A T, Coppola P T, Terry S. Culture of explanted rat embryos in rotating tubes[J]. *Reprod Fert*, 1973, 35: 135.
- [13] New D A T. The culture of postimplantation embryos[J]. *Hum Reprod*, 1991, 6(1): 58.
- [14] 王剑, 宋瑞琨. 大鼠全胚胎培养实验方法的研究[J]. *卫生毒理学杂志*, 1993, S1: 202.
- [15] 张天宝, 孙棉龄, 杨在昌. 小鼠着床后全胚胎培养方法的建立和应用[J]. *癌变·畸变·突变*, 1995, 7(1): 23.
- [16] New D A T. Development of rat embryos cultured in blood sera [J]. *Reprod Fert*, 1966, 12: 509.
- [17] 张天宝, 孙棉龄. 大鼠着床后全胚胎培养中培养基的研究: I 人工合成培养基[J]. *卫生毒理学杂志*, 1995, 9(1): 39.
- [18] 张天宝, 孙棉龄. 大鼠着床后全胚胎培养中培养基的研究: II 小牛血清和 IGF-II [J]. *卫生毒理学杂志*, 1995, 9(2): 126.
- [19] 王秋枫, 赵树芬, 张秀池. 以人血清为培养基的大鼠全胚胎培养方法研究[J]. *内蒙古医学杂志*, 2000, 32(2): 81.
- [20] New D A T, Coppola P T. Effects of different oxygen concentrations on the development of rat embryos in culture[J]. *Reprod Fert*, 1970, 21: 109.
- [21] 张帆, 保毓书, 赵树芬. 应用全胚胎培养方法检测铅的胚胎毒性[J]. *中华劳动卫生职业病杂志*, 1992, 10(5): 273.
- [22] 王爱平, 王治乔. 小鼠全胚胎培养的形态学记方法介绍[J]. *卫生毒理学杂志* 1993, 7(1): 44.
- [23] 裴新荣, 李勇, 龙鼎新, 等. 双酚 A 对小鼠早期胚胎发育毒性的体外实验研究[J]. *中国生育健康杂志*, 2003, 4(1): 34.
- [24] 袁立懋, 孙棉龄, 吴德生. 全胚胎培养移植条件对胚胎发育影响的研究[J]. *卫生毒理学杂志*, 1998, 12(4): 239.
- [25] 龙鼎新, 李小玲, 贺性鹏, 等. 植入后全胚胎培养的培养基 pH 值改变对大鼠胚胎生长发育的影响[J]. *南华大学学报: 医学版*, 2003, 31(3): 262.
- [26] Janer G, Verhoef A, Gilsing H D, et al. Use of the rat postimplantation embryo culture to assess the embryotoxic potency within a chemical category and to identify toxic metabolites[J]. *Toxicol In Vitro*, 2008, 22: 1797.
- [27] Saillenfait A M, Sabat J P, Gallissot F. Comparative embryotoxicities of butyl benzyl phthalate, mono-*n*-butyl phthalate and mono-benzyl phthalate in mice and rats; *in vivo* and *in vitro* observations [J]. *Reprod Toxicol*, 2003, 17: 575.
- [28] Luijten M, Verhoef A, Westerman A. Application of a metabolizing system as an adjunct to the rat whole embryo culture[J]. *Toxicol In Vitro*, 2008, 22: 1332.
- [29] Brown-Woodman P D C, Ritchie H E, Korabelnikoff A, et al. Replacement of ether with alternate volatile anesthetics for collection of rat serum used in embryo culture[J]. *Toxicol In Vitro*, 2004, 18: 719.
- [30] Augustine-Rauch K A, Zhang Q, Kleinman M, et al. A study of vehicles for dosing rodent whole embryo culture with non aqueous soluble compounds[J]. *Reprod Toxicol*, 2004, 18: 391.
- [31] Spezia F, Julien P, Thienaubert H, et al. A Whole-embryo culture system proposed to study mouse sexual determination [J]. *Toxicol In Vitro*, 1995, 9(5): 663.
- [32] Fujinaga M. Rat whole embryo culture system as a tool to investigate developmental mechanisms of left/right body axis[J]. *Toxicol In Vitro*, 1995, 9(5): 593.
- [33] Inoue Y U, Asami J, Inoue T. Genetic labeling of mouse rhombomeres by cadherin-6: EGFP-BAC transgenesis underscores the role of cadherins in hindbrain compartmentalization [J]. *Neurosci Res*, 2009, 63: 2.
- [34] Nagase M, Nagase T, Koshima I, et al. Critical time window of hedgehog-dependent angiogenesis in murine yolk sac [J]. *Microvasc Res*, 2006, 71: 85.
- [35] Liu J N, Chan H M, Kubow S. Oxidative stress status and development of late organogenesis stage rat whole embryos cultured from gestational days 13.5 to 14.5 [J]. *Toxicol In Vitro*, 2007, 21: 53.
- [36] 赵如冰, 李勇, 陈星. 同型半胱氨酸对体外培养大鼠胚胎生长发育的影响[J]. *卫生研究*, 2001, 30(1): 34.
- [37] 李勇, 李竹, 陈星, 等. 同型半胱氨酸诱发鸡胚神经管畸形及叶酸的保护作用[J]. *卫生研究*, 1998, 27(6): 372.
- [38] Hunter III E S, Blanton M R, Rogers E H, et al. Short-term exposures to dihaloacetic acids produce dysmorphogenesis in mouse conceptuses *in vitro*[J]. *Reprod Toxicol*, 2006, 22: 443.
- [39] 张全新, 朱伟, 周颖, 等. 室内主要挥发性有机物对离体培养胚胎发育的影响[J]. *中国职业医学*, 2007, 34(1): 24.
- [40] 龙鼎新, 李勇, 裴新荣. 壬基酚对体外培养大鼠胚胎发育的毒性研究[J]. *中国公共卫生*, 2004, 20(1): 13.
- [41] 赵泽文, 常青, 梁志清, 等. 应用小鼠体外全胚胎培养方法研究多氯联苯同系物 PCB₁₅₃ 对胚胎发育的影响 [J]. *重庆医学*, 2004, 33(5): 662.
- [42] 贺庆芝, 曾怀才, 廖端芳, 等. 铅的体外胚胎毒性[J]. *南华大学学报: 医学版*, 2005, 33(1): 26.
- [43] 赵树芬, 保毓书, 张秀池, 等. 不同途径接触镉的大鼠全胚胎培养[J]. *中华劳动卫生职业病杂志*, 1993, 11(5): 269.
- [44] 李勇, 孙棉龄, 吴德生. 硒-砷联合致畸作用的体外全胚胎培养实验研究[J]. *上海环境科学*, 1997, 16(2): 32.
- [45] Beyrouty P, Stamler C J, Liu J N, et al. Effects of prenatal methylmercury exposure on brain monoamine oxidase activity and neu-



- robehaviour of rats[J]. *Neurotoxicol Teratol*,2006,28:251.
- [46] Uysal I I, Karabulut A K, Ozdemir K, et al. Investigation of direct toxic and teratogenic effects of anticoagulants on rat embryonic development using in vitro culture method and genotoxicity assay[J]. *Anat Histol Embryol*,2006,35:84.
- [47] Longo M, Zanoncelli S, Torre P D, et al. *In vivo* and *in vitro* investigations of the effects of the antimalarial drug dihydroartemisinin (DHA) on rat embryos[J]. *Reprod Toxicol*,2006,22:797.
- [48] Chan L Y, M Med Sc. Effect of rosiglitazone on embryonic growth and morphology: A study using a whole rat embryo culture model[J]. *Fertil Steril*,2006,86(2):490.
- [49] 韩静,张大超,肖颖,等. 全反式视黄酸对小鼠胚胎发育毒性的体外实验研究[J]. *中国生育健康杂志*,2005,16(4):217.
- [50] Flick B, Talsness C E, Jackh R, et al. Embryotoxic potential of N-Methyl-Pyrrolidone (NMP) and three of its metabolites using the rat whole embryo culture system[J]. *Toxicol Appl Pharmacol*,2009,237:154.
- [51] Renzo F D, Corsini E, Broccia M L. Molecular mechanism of teratogenic effects induced by the fungicide triadimefon:Study of the expression of TGF- β mRNA and TGF- β and CRABPI proteins during rat in vitro development[J]. *Toxicol Appl Pharmacol*,2009,234:107.
- [52] Liu P, Yin H J, Xu Y J, et al. Effects of ginsenoside Rg₁ on postimplantation rat and mouse embryos cultured *in vitro* [J]. *Toxicol In Vitro*,2006,20:234.
- [53] 肖凯,严光焰,王莉,等. 应用大鼠体外胚胎培养模型研究生草乌对胚胎发育的影响[J]. *四川大学学报:医学版*,2008,39(3):441.
- [54] Chan L Y, Chiu P Y, Lau T K. Embryotoxicity study of ginsenoside Rc and Re *in vitro* rat whole embryo culture[J]. *Reprod Toxicol*,2004,19:131.

Research progress of whole embryo culture tool and its application

HAN Jiayin^{1,2}, LIANG Aihua^{2*}

(1. *Capital Medical University School of Traditional Chinese Medicine, Beijing 100069, China;*

2. *Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China)*

[Abstract] Whole embryo culture (WEC) is an experimental tool, which is made use of embryos in vitro to replace whole animals to investigate the growth and development of early organs, the embryo toxicity of chemical materials and the mechanism of the occurrence of embryo toxicity. Compared with experiment with whole animals, WEC could reduce the number of experimental animals, shorten experimental time, decrease experimental expenses, eliminate disturbing factors and control dosage more exactly. So it is generally received that WEC tool is a good experimental method to match the principles of replacement, reduction, refinement and responsibility. This article is a review of the WEC tool of rat and mouse, including the development of this tool, announcements, and the application in the development of organs, the embryo toxicity of environmental pollution and heavy metal, safety evaluation of medicine and the embryo toxicity of traditional Chinese medicine and its mechanism. There is also a discussion of the application of this tool in the investigation of the embryo toxicity of traditional Chinese medicine.

[Key words] whole embryo culture (WEC); embryonic development; reproductive toxicity; safety evaluation

doi: 10.4268/cjcm20100501

[责任编辑 张宁宁]