

张元慧,蒋建东,孔维佳. 非啮齿类动物在生殖毒性试验中的应用进展 [J]. 中国比较医学杂志, 2019, 29(11): 111-115.
Zhang YH, Jiang JD, Kong WJ. Research progress with non-rodent species in reproductive toxicity studies [J]. Chin J Comp Med, 2019, 29(11): 111-115.
doi: 10.3969/j.issn.1671-7856. 2019. 11. 017

非啮齿类动物在生殖毒性试验中的应用进展

张元慧¹, 蒋建东², 孔维佳^{1*}

(1. 中国医学科学院北京协和医学院医药生物技术研究所, 北京 100050; 2. 中国医学科学院北京协和医学院药物研究所, 北京 100050)

【摘要】 随着社会的发展,人类可接触的化学物质不断增多,导致生殖功能受损、生育能力下降等问题愈发严重,因此生殖毒性研究已经变得越来越重要。在进行临床前生殖毒性试验时,选择合适的动物模型非常关键,非啮齿类动物与啮齿类动物相比,生殖系统与人类更为接近,实验结果更具有参考价值。本文对非啮齿类动物的自身特点及其目前在生殖毒性研究中的应用情况进行总结,以期扩大试验中动物模型的选择范围,为受试物临床前安全性评价提供新的研究方法。

【关键词】 非啮齿类动物;生殖毒性试验;研究现状
【中图分类号】 R-33 【文献标识码】 A 【文章编号】 1671-7856(2019) 11-0111-05

Research progress with non-rodent species in reproductive toxicity studies

ZHANG Yuanhui¹, JIANG Jiandong², KONG Weijia^{1*}

(1. Institute of Medicinal Biotechnology, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Beijing 100050, China. 2. Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Beijing 100050)

【Abstract】 With the observed decline in human fertility, reproductive toxicity research has become increasingly important. It is crucial to select appropriate animal models for evaluating the toxicity of compounds of interest. Because of similarities in their reproductive system, non-rodent animals are valuable models for researching reproductive health and disorders. In this review, we summarized the characteristics of non-rodent animal models and their current applications in reproductive toxicity studies. The aim of this study was to expand the range of animal models available for selection and to provide new approaches for nonclinical reproductive toxicity studies.

【Keywords】 non-rodent; reproductive toxicity study; research status

随着医疗水平的提高,新生儿畸形现象正在逐渐减少,然而不孕不育症却愈发严重,据最新文献报道,全球范围内大概有 20% 的人患有不孕不育症^[1],这引起了人们对生殖毒性研究的重视。生殖毒性是指外源因素(如药品、食品添加剂、环境污染

物、辐射)对亲代生殖功能和子代生长发育所产生的有害作用^[2],该研究是安全性评价的重要内容。在进行生殖毒性试验时,实验动物的选择对于研究具有重要意义,一般会采用两类动物进行实验,即啮齿类动物和非啮齿类动物。非啮齿类动物通常

【作者简介】张元慧(1993—),女,在读博士生,研究方向:代谢性疾病分子药理学。E-mail: 369098717@qq.com
【通信作者】孔维佳(1972—),男,博士生导师,研究方向:分子医学与药物研究。E-mail: wjkong894@163.com

会选择家兔,在一些特殊条件下也会选择其他动物进行实验,如犬、小型猪或非人灵长类动物。生殖毒性研究主要根据受试物的药代动力学特点、药理学和毒理学信息进行判断,通常选择对受试物的体内代谢过程以及毒效学参数与人体相似的实验动物^[3]。目前,对于非啮齿类动物在生殖毒性研究中的应用资料较少。因此,本文根据不同实验动物的自身特点,对各种非啮齿类实验动物模型在生殖毒性研究中的现状进行总结,旨在为科研工作者选择合适的动物模型提供一些参考。

1 家兔

家兔作为生殖毒性研究的动物模型具有很多优点:不发情期,一年四季均可交配繁殖;妊娠期较短,一般为 30~33 d;繁殖能力强,每胎产仔数 7~12 只^[4]。家兔属于刺激性排卵动物,经过交配的刺激后可进行排卵。其胎盘是血窦内皮型,与人类的血窦绒毛型胎盘较为相似。生殖道与人类最接近,适用于评价避孕药和局部用的药物(如凝胶剂、阴道环等)^[5]。

在对新型左炔诺孕酮和炔雌醇复方避孕贴剂进行安全性评价时,研究人员选用了新西兰家兔进行实验,多次给予此避孕帖后家兔的体内并未发生药物蓄积^[6]。Susheela 等人^[7]在研究饮用水中超标氟化物对生殖功能的影响时,发现氟化处理可导致家兔精小管退化、抑制精子生成,这与氟化物对人体产生的影响一致。另有研究发现,在停药期间给予家兔维生素 D 和 E 可以修复氟化物引起的生殖功能损伤^[8],这为超标氟化物引起的不孕不育症提供了新的治疗手段。

家兔由于具有上述优点,在生殖毒性试验中应用最多,积累了丰富的基础数据。但家兔是食草动物,对能够引起消化道功能紊乱的化学物质以及抗生素类药物较敏感,临床表现难以解释,因此不适合评价此类物质。

2 犬

犬无需借助电刺激等痛苦的采精技术即可获得精子,因此常用于精子数量、成熟度和活力测定的分析研究^[9]。目前国际公认的标准实验用犬为比格犬,其具有体型小,性情温顺,便于实验操作的优点^[10]。同时,其生理生化指标稳定,实验结果的重复性好,遗传学资料丰富^[11]。另外,比格犬易于

驯化,能够采用注射等在其他实验动物不宜操作的给药方式^[12]。

羟胺基组蛋白去乙酰化酶抑制剂 HZ1006 是一种有临床应用前景的抗癌药物,研究者选择了比格犬作为该药物临床前毒性评价的动物模型,实验表明男性生殖道、消化道、呼吸道和血液系统可能是 HZ1006 的毒性靶点,提示该药物可能存在一定的生殖毒性^[13]。另有研究者发现犬对谷物中广泛存在的玉米赤霉烯酮的毒性作用敏感,幼龄雌犬接触低剂量玉米赤霉烯酮可引起子宫和卵巢功能异常,类固醇激素发生变化,生育能力下降^[14]。

但是,犬是季节性繁殖动物,只在春秋季节发情,产仔数量变动较大,每胎 2~10 只不等,并且存在近亲繁殖因素的影响,这些特点均限制了犬在生殖毒性试验中的应用。已有文献表明犬对抗高血压药物、拟交感神经药物和非甾体抗炎药物的反应与人体存在较大差异^[15],因此不适用于此类药物的安全性评价。

3 小型猪

小型猪在生理学和解剖学等方面与人类有很多相似性,具有胎仔数量多、性成熟时间短等优点。动情周期、子宫组织学和精子学资料与人类非常接近^[16]。有证据表明^[17],小型猪对很多人类致畸物质敏感,如乙醇、羟基脲、维甲酸、沙利度胺、氨基蝶呤等。相对于其他实验动物,小型猪对这些化合物的反应性可能更具有参考价值。

在进行维甲酸的致畸作用研究时,研究人员选用了哥廷根小型猪进行实验,证实了维甲酸的致畸作用非常明显^[18],该研究结果显示,随着给药剂量的增加,胎仔畸形发生率不断上升,畸形程度也越来越严重,且畸形表现与人类的视黄酸肝病(小颌、小耳、腭裂、心脏和胸腺的缺陷、中枢神经系统异常)极为相似。另外,Hayama 等^[19]发现在器官形成期给予孕猪乙嘧啶可导致上腭裂等结构性缺陷,也可引起后肢瘫痪等功能性缺陷。美国食品药品监督管理局在 2013 年批准上市的新药阿法替尼^[15](主要用于治疗晚期非小细胞肺癌和晚期乳腺癌),在其临床前安全性评价中,由于犬发生严重的胃肠道反应,研究人员选用了哥廷根小型猪进行安全性评价,表明小型猪在新药临床前研究中具有良好的应用前景^[20]。

目前,小型猪在生殖毒性评价方面的应用还存

在一些局限性。首先,小型猪的体型较大,导致实验人员的操作难度增加,操作过程中体能消耗较大。其次,目前尚无用于研究的商业试剂盒^[21],给实验带来一定困难。最后,小型猪的胎盘不能转移大分子物质,无法用于抗体、疫苗等生物制品的安全性评价。

4 非人灵长类动物

非人灵长类动物与人类的生殖系统具有很多相似性,首先两者均是单胎妊娠,内分泌系统对生殖功能的调控都是通过下丘脑-垂体-卵巢轴进行^[22],均在更年期阶段丧失生育能力。女性的生理周期一般是 30 d 左右,而雌猴一般是 28 d^[23]。雌猴生殖道的生理结构,包括输卵管、子宫和阴道均与人类具有可比性。胎盘的生理结构和转移机制等方面也与人类相似^[24-25]。

非人灵长类动物在比较胎儿和新生儿发育能力方面具有极大优势,特别是脑部发育。与大脑发育不成熟的啮齿类动物不同,新生恒河猴在出生时脑白质明显增多,这使得恒河猴成为评估不良妊娠(如胎盘功能不全、胎儿生长受限和子痫前期)导致新生儿认知和行为异常的良好模型^[26-27]。

Frias 等人^[28]通过研究发现,雌性恒河猴长期接触尼古丁(接近怀孕女性吸烟者的水平)后,胎盘血流量在短期内降低,绒毛组织学异常。然而,联合服用抗坏血酸药物(如维生素 C)减轻了这些变化。这些研究表明产前接触尼古丁对胎盘结构和功能产生有害作用,并为补充维生素 C 可以减弱孕期吸烟的一些不良影响这一发现提供了新的证据。

虽然非人灵长类动物生殖系统的结构和功能与人类最为相近,在生殖毒性研究中具有极大的应用价值,但其价格昂贵,资源稀缺,对于实验方案设计和执行均有一定挑战。另外,非人灵长类动物面对极大的动物福利压力和伦理挑战,进一步限制了其在此类研究中的应用。

5 斑马鱼

斑马鱼的基因组与人类的基因相似度高达 87%^[29],这使其成为人类疾病研究的良好动物模型。在生殖毒性试验中,斑马鱼具有其他动物无法比拟的优点:生殖周期短,每次产卵数量多,胎仔发育迅速。个体小,对环境适应力强,可以减少实验周期和成本。在早期发育阶段通体透明,便于开展

胚胎、胎仔的发育研究^[30-31]。另外,斑马鱼和人类的生殖调控系统具有高度相似性,这使得研究人员能够通过研究斑马鱼的重要神经元,以及生殖激素及其作用效果来全面地研究和理解人类生殖系统^[32-33]。

随着研究的不断深入,斑马鱼逐渐成为科学家们评估人类生殖系统潜在危险化合物的良好动物模型,特别是评估环境污染物。以哺乳动物为主的评估生殖毒性的分析方法耗时、复杂且昂贵,需要进行大规模的实验分析^[34]。同时,哺乳动物往往需要较高剂量,但环境中化学物质的浓度水平往往较低^[35],从而导致现实环境的毒性水平无法预测。而微量的化合物在较短的时间内就可以进入斑马鱼体内,因此斑马鱼可以作为环境污染物研究的最佳实验动物模型。此外,斑马鱼易受基因操纵,为研究基因对繁殖的影响提供了一个新的选择^[36]。

Webster 等人^[37]将斑马鱼暴露于除草剂草甘膦后,发现斑马鱼 *cyp19a1* 基因的表达上调、芳香化酶的活性以及卵巢中主要雌激素受体 *esr1* 的表达均显著增加,从而揭示草甘膦对斑马鱼生殖器官的类固醇合成具有破坏作用。Lopes 等人^[38]在暴露于草甘膦的成年雄性斑马鱼中也观察到抗氧化基因的上调和精子运动性降低的现象,这表明草甘膦在诱导睾丸氧化应激方面具有一定作用。这与许多人类细胞体外研究结果一致^[39],均揭示了草甘膦通过破坏激素合成、抑制芳香化酶活性而使精子和卵子质量下降,最终导致胚胎早期发育阶段死亡率上升。

迄今为止,斑马鱼作为生殖领域的研究模型只有十几年^[40],与其他传统的高等脊椎动物相比,其生殖系统的基础资料明显缺乏,特别是对雄性生殖系统的了解还很有限。另外,斑马鱼是卵生动物,交配方式是体外受精,这与人类的繁殖方式存在巨大差异。

6 小结

综上所述,在评价避孕药、凝胶剂和阴道环等局部给药的药物时可以优先考虑家兔作为研究对象。评价孕激素类和生育调节药物时,非人灵长类动物是最好的选择。斑马鱼适用于评价环境污染物和作用于中枢神经系统的药物。犬不适合评价抗高血压药、拟交感神经药和非甾体抗炎药。小型猪不适合评价抗体、疫苗等大分子药物。所有动物模型都有其优点和局限性,家兔胎仔数量多、便于

操作,但是食草性动物,消化道与人类存在差异。犬生理指标稳定、结果的重复性好,但犬是季节性繁殖,给实验设计带来较大困难。小型猪对某些致畸物质的反应与人类存在相似性,但其胎盘无法转移大分子物质。非人灵长类动物是单子宫、有月经周期,但价格昂贵、资源稀缺、动物福利压力大。斑马鱼与人类基因高度一致,在发育前期通体透明、便于观察,但斑马鱼是卵生动物,繁殖方式与人类存在一定差异。因此,在研究人类生殖毒性时,并没有单一的理想动物模型,应根据受试物的理化性质、与人体的相互作用以及实验动物的特点进行综合考量,选择最适合的动物模型,在一定条件下也可采用多个动物模型进行评价。

参考文献:

- [1] Turchi P. Prevalence, definition, and classification of infertility [M]// Cavallini G, Beretta G. Clinical management of male infertility. Springer International Publishing, 2015: 5-12.
- [2] 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.
- [3] 张伟. 在路上——我国创新药物注册管理体制现状与展望 [J]. 中国食品药品监管, 2012(2): 8-14.
- [4] Esteves P, Abrantes J, Baldauf HM, et al. The wide utility of rabbits as models of human diseases [J]. Exp Mol Med, 2018, 66(50): 1-10.
- [5] Fischer B, Chavatte-Palmer P, Viebahn C, et al. Rabbit as a reproductive model for human health [J]. Reproduction, 2012, 144(1): 1-10.
- [6] 李钊,郭湘洁,谢淑武,等. 应用液质联用法同时测定新西兰家兔血浆中左炔诺孕酮和炔雌醇浓度及其药理学 [J]. 中国药理学与毒理学杂志, 2017, 31(8): 823-831.
- [7] Susheela AK, Kumar A. Ultrastructural studies on the leydig cells of rabbits exposed to chronic fluoride toxicity [J]. Environ Sci, 1997, 5: 79-94.
- [8] Kumar N, Sood S, Arora B, et al. To study the effect of vitamin D and E on sodium-fluoride-induced toxicity in reproductive functions of male rabbits [J]. Toxicol Int, 2012, 19(2): 182-187.
- [9] 国家食品药品监督管理局. 药物生殖毒性研究技术指导原则 [M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2006-2007: 143-168.
- [10] Kutter A, Kantyka M, Meira C, et al. Effect of 50 mg/kg intravenous tranexamic acid on coagulation assessed by rotational thromboelastometry (ROTEM) in healthy Beagle dogs [J]. Schweiz Arch Tierheilkd, 2019, 161(6): 369-376.
- [11] 赵永斌,胡卫列. 比格犬实验动物应用进展 [A]. 中国中西医结合学会泌尿外科专业委员会第十四次全国学术会议暨 2016 年广东省中西医结合学会泌尿外科专业委员会学术年会论文集 [C]. 2016: 422-425.
- [12] Faehnrich B, Pastor A, Heide C, et al. Effects of isoquinoline alkaloids from *Macleaya cordata* on physiological, immunological and inflammatory parameters in healthy beagles; Alkaloids in dog nutrition [J]. J Anim Physiol Anim Nutr (Berl), 2019, 103(2): 661-667.
- [13] Zhang X, Zhang X, Yuan B, et al. Subchronic toxicities of HZ1006, a hydroxamate-based histone deacetylase inhibitor, in Beagle dogs and sprague-dawley rats [J]. Int J Environ Res Public Health, 2016, 13(12): 1190-1212.
- [14] Magdalena G, Ukasz Z, Maciej G. The effect of low monotonic doses of zearalenone on selected reproductive tissues in pre-pubertal female dogs [J]. Molecules, 2015, 20(11): 20669-20687.
- [15] 丁言伟,周大鹏,史激空,等. 小型猪在新药安全性评价中的应用展望 [J]. 中国新药杂志, 2016, 25(5): 543-547.
- [16] van der Laan JW, Brightwell J, McNulty P, et al. Regulatory acceptability of the minipig in the development of pharmaceuticals, chemicals and other products [J]. J Pharmacol Toxicol Methods, 2010, 62(3): 184-195.
- [17] 陈华. 小型猪在毒理学研究中的应用 [J]. 中国比较医学杂志, 2003, 13(3): 175-178.
- [18] 陈华. 小型猪医学研究模型的建立与应用 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2015: 281-282.
- [19] Hayama T, Kokue E. Use of the Goettingen miniature pig for studying pyrimethamine teratogenesis [J]. Crit Rev Toxicol, 1985, 14(4): 403.
- [20] 张元慧,高虹. 小型猪在生殖毒性实验中的研究进展 [J]. 中国医药导报, 2017, 14(18): 49-52.
- [21] Vamathevan JJ, Hall MD, Hasan S, et al. Minipig and beagle animal model genomes aid species selection in pharmaceutical discovery and development [J]. Toxicol Appl Pharmacol, 2013, 270(2): 149-157.
- [22] Plant TM. A comparison of the neuroendocrine mechanisms underlying the initiation of the preovulatory LH surge in the human, Old World monkey and rodent [J]. Front Neuroendocrinol, 2012, 33(2): 160-168.
- [23] Chaffin CL, Vandevort CA. Follicle growth, ovulation, and luteal formation in primates and rodents: A comparative perspective [J]. Exp Biol Med, 2013, 238(5): 539-548.
- [24] Acosta EP, Grigsby PL, Larson KB, et al. Transplacental transfer of azithromycin and its use for eradicating intra-amniotic ureaplasma infection in a primate model [J]. J Infect Dis, 2014, 209(6): 898-904.
- [25] Hong S, Winkler T, Wu C, et al. Path to the clinic: assessment of iPSC-based cell therapies *in vivo* in a nonhuman primate model [J]. Cell Rep, 2014, 7(4): 1298-1309.
- [26] Schneider ML, Champoux M, Moore CF. Neurobehavioral assessments of non-human primate neonates [M]// Sackett GP, Ruppenthal GC, Elias K. Nursery rearing of non-human primates in the 21st century. Springer, 2006: 215-247.
- [27] Curtis B, Liberato N, Rulien M, et al. Examination of the safety of pediatric vaccine schedules in a non-human primate model: assessments of neurodevelopment, learning, and social behavior

- [J]. Environ Health Perspect, 2015, 123(6): 579–589.
- [28] Lo JO, Schabel MC, Roberts VHJ, et al. Vitamin C supplementation ameliorates the adverse effects of nicotine on placental hemodynamics and histology in nonhuman primates [J]. Am J Obstet Gynecol, 2015, 212(3): 370.e1–370.e8.
- [29] 祁美娟, 石美智, 韩永龙. 斑马鱼在药学领域的应用研究 [J]. 中国药理学通报, 2018, 34(7): 903–906.
- [30] He JH, Gao JM, Huang CJ, et al. Zebrafish models for assessing developmental and reproductive toxicity [J]. Neurotoxicol Teratol, 2014, 42: 35–42.
- [31] Akhter A, Kumagai R, Roy SR, et al. Generation of transparent zebrafish with fluorescent ovaries: a living visible model for reproductive biology [J]. Zebrafish, 2016, 13: 155–160.
- [32] Ying HJ, Yatinesh K, Farooq SM, et al. Zebrafish: a versatile animal model for fertility research [J]. Biomed Res Int, 2016, 2016: 1–20.
- [33] Shkil F, Siomava N, Voronezhskaya E, et al. Effects of hyperthyroidism in the development of the appendicular skeleton and muscles of zebrafish, with notes on evolutionary developmental pathology (Evo-Devo-Path) [J]. Sci Rep, 2019, 9(1): 1–13.
- [34] Arora T, Mehta AK, Joshi V, et al. Substitute of animals in drug research: an approach towards fulfillment of 4R's [J]. Indian J Pharm Sci, 2011, 73(1): 1–6.
- [35] Prins GS, Patisaul HB, Belcher SM, et al. CLARITY-BPA academic laboratory studies identify consistent low-dose bisphenol A effects on multiple organ systems [J]. Basic Clin Pharmacol Toxicol, 2019, 125(Suppl 3): 14–31.
- [36] Fuentes R, Letelier J, Tajer B, et al. Fishing forward and reverse: Advances in zebrafish phenomics [J]. Mech Dev, 2018, 154: 296–308.
- [37] Webster TMU, Laing LV, Florance H, et al. Effects of glyphosate and its formulation, roundup, on reproduction in zebrafish (Danio rerio) [J]. Environ Sci Technol, 2014, 48(2): 1271–1279.
- [38] Lopes FM, Varela Junior AS, Corcini CD, et al. Effect of glyphosate on the sperm quality of zebrafish danio rerio [J]. Aquat Toxicol, 2014, 155: 322–326.
- [39] Benachour N, Sipahutar H, Moslemi S, et al. Time- and dose-dependent effects of roundup on human embryonic and placental cells [J]. Arch Environ Contam Toxicol, 2007, 53(1): 126–133.
- [40] Bradford YM, Toro S, Ramachandran S, et al. Zebrafish models of human disease: Gaining insight into human disease at ZFIN [J]. ILAR J, 2017, 58(1): 4–16.

[收稿日期]2019-05-05

(上接第 70 页)

- [18] 陈善广. 动物学习记忆计算机测控系统研制及实验测评方法 [A]. 中国科学技术协会. 生命科学与生物技术: 中国科协第三届青年学术年会论文集 [C]. 中国科学技术协会: 中国科学技术协会学会学术部, 1998: 3.
- [19] Barnhart CD, Yang D, Lein PJ. Using the Morris water maze to assess spatial learning and memory in weanling mice [J]. PLoS One, 2015, 10(4): e0124521.
- [20] Prut L, Belzung C. The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review [J]. Eur J Pharmacol, 2003, 463(1–3): 3–33.
- [21] Saygin M, Ozguner MF, Onder O, et al. The impact of sleep deprivation on hippocampal-mediated learning and memory in rats [J]. Bratisl Lek Listy, 2017, 118(7): 408–416.
- [22] Zielinski MR, Davis JM, Fadel JR, et al. Influence of chronic moderate sleep restriction and exercise training on anxiety, spatial memory, and associated neurobiological measures in mice [J]. Behav Brain Res, 2013, 1(250): 74–80.
- [23] 芮霞. 睡眠剥夺小鼠模型的建立及宁心安神法的干预作用 [D]. 武汉: 湖北中医药大学, 2015.
- [24] 冯忠胜, 汤永红. 睡眠剥夺致相关功能障碍的研究进展 [J]. 世界睡眠医学杂志, 2018, 5(7): 866–870.
- [25] Wassom DJ, Lyons KE, Pahwa R, et al. Qigong exercise may improve sleep quality and gait performance in Parkinson's disease: a pilot study [J]. Int J Neurosci, 2015, 125(8): 578–584.
- [26] Moon HI, Yoon SY, Jeong YJ, et al. Sleep disturbances negatively affect balance and gait function in post-stroke patients [J]. Neuro Rehabilitation, 2018, 43(2): 211–218.
- [27] O'Dowd S, Galna B, Morris R, et al. Poor sleep quality and progression of gait impairment in an incident Parkinson's disease cohort [J]. J Parkinsons Dis, 2017, 7(3): 465–470.
- [28] 王茹, 刘楠, 王少朋, 等. 脑小血管病患者步态障碍、平衡障碍和跌倒研究进展 [J]. 中国现代神经疾病杂志, 2019, 19(4): 281–285.
- [29] 戴红. 康复医学 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 1998.
- [30] 李孟秋. 黄秋葵种子抗抑郁活性及机制研究 [D]. 天津: 天津科技大学, 2016.
- [31] 张亚宁, 张军武, 张胜威, 等. 基于步态分析系统的 DL-4-氯苯基丙氨酸致大鼠失眠模型的研究 [J]. 现代中医药, 2014, 34(2): 80–83.

[收稿日期]2019-05-20