·重大新药创制专项巡礼·

雄性生殖毒性的体外试验方法研究进展

李英奇[1,2],李申宁[2],朱海美[1,2],许翰林[1,2],李嫚琪[2],杨紫轩[2],邱云良[2],常　艳[2]
(1 上海工程技术大学化学化工学院,上海 201620;2 中国医药工业研究总院国家上海新药安全评价中心,上海益诺思生物技术股份有限公司,上海 201203)

[摘要] 近年来,体外替代试验在雄性生殖毒理研究中愈来愈重要,而构建稳定可靠的体外模型是其有力保障。随着生物技术的发展,体外睾丸模型已从单层的细胞培养过渡到更能模拟体内微环境的新培养体系,如微流控培养、三维(three-dimensional, 3D)培养、类器官培养等。这些培养体系不仅能模拟体内血睾屏障(blood-testis-barrier, BTB)和睾丸微环境,还能通过睾丸组织或生殖细胞培养,延长培养体系持续的时间,更为重要的是啮齿类动物、非人灵长类甚至人类生殖细胞在这些培养体系中都已成功分化出精子,这些新的培养体系也成功应用于睾丸毒物评价。然而,这些新的培养体系仍存一些局限性,如精子分化数量少、效率低以及无法完全复制体内生精进程等。本文主要综述新的睾丸体外培养体系的优缺点以及未来发展方向。

[关键词] 睾丸;精子;微流控;三维培养;类器官
[中图分类号] R99　[文献标志码] A　[文章编号] 1003-3734(2021)22-2064-05

Advances in the methods of evaluating male reproductive toxicity *in vitro*

LI Ying-qi[1,2], LI Shen-ning[2], ZHU Hai-mei[1,2], XU Han-lin[1,2], LI Man-qi[2], YANG Zi-xuan[2], QIU Yun-liang[2], CHANG Yan[2]
(1 *College of Chemistry and Chemical Engineering, Shanghai University of Engineering Science, Shanghai* 201620, *China*; 2 *China State Institute of Pharmaceutical Industry National Shanghai Center for New Drug Safety Evaluation & Research, Shanghai InnoStar Bio-Tech Co., Ltd., Shanghai* 201203, *China*)

[**Abstract**] In recent years, *in vitro* substitution experiments have become more and more important in male reproductive toxicology research, and the construction of a stable and reliable *in vitro* model is a strong guarantee for the research. With the development of biotechnology, *in vitro* testicular models have also transitioned from a single-layer cell culture to a new culture system that can simulate *in vivo* microenvironment better, such as microfluidic technology, three-dimensional culture technology, and organoids, and so on. These culture systems not only can simulate the blood-testis-barrier (BTB) or *in vivo* testicular microenvironment, but also extend duration of the culture system through co-cultivating of testicular tissues or germ cells. More importantly, sperm has also been successfully differentiated from germ cells of rodents, non-human primate and even human beings. These new culture systems have been successfully applied to the evaluation of testicular toxicants. However, there are some limitations for them, such as small number of differentiated sperm, low efficiency and difficulty in completely simulate the process of spermatogenesis *in vivo*, etc. This review mainly summarizes the advantages and disadvantages of these new testis culture systems *in vitro* and their future development directions.

[**Key words**] testis; sperm; microfluidic; three-dimensional culture; organoid

[基金项目] 国家"重大新药创制"科技重大专项资助项目(2020ZX09201-013);上海市研发公共服务平台项目(18DZ2290100)
[作者简介] 李英奇,女,硕士研究生,主要从事生殖毒理学研究。E-mail:821959616@qq.com。
[通讯作者] 常艳,女,博士生导师,研究员,主要从事遗传和生殖毒理学研究。联系电话:(021)60211997,E-mail:ychang@ncdser.com。

生殖毒性评价是新药非临床研究中极为重要的一个环节,但目前仍以动物实验为主,全世界每年用于实验的动物数以千万计,庞大的动物消耗不仅不符合动物伦理,还耗费大量的人力和物力。随着动物保护的“3R”原则[减少(reduction)、替代(replacement)和优化(refinement)]在国际上被普遍接受,以及新的人用药品注册技术国际协调会议(ICH)S5 药物生殖毒性指导原则的颁布和实施,毒理学替代方法在生殖毒性研究中的呼声越来越高。其中,在雄性生育力毒性评价中,已采用离体的睾丸细胞或睾丸组织进行体外培养,建立了相应的评价模型,可以在一定程度上进行药物评价;然而,这些模型普遍存在自身的局限性,如无法模拟睾丸微环境、血睾屏障(blood-testis-barrier,BTB)及精子形成等[1]。为了克服这些缺陷,人们开始引入微流控培养、三维(three-dimensional, 3D)培养、类器官等先进技术,用于体外睾丸模型的构建,不断取得新的进展。本文主要综述这些新技术目前存在优缺点和发展方向,希望给广大科研工作者提供一些参考。

1 微流控培养技术

近年来,微流控芯片技术逐渐发展成熟,在生殖毒性研究中,它不仅可以满足高通量筛选要求,还可以适用于自动化操作,具有良好的应用前景。微流控技术因具有多种优势而备受青睐,如可以灵活设计微管道的形状和尺寸、更好地模拟生理环境、设计尺寸小、对样品的消耗量低、具有很高的集成性。

Komeya 等[2]在 2016 年利用微流控设备(microfluidic device,MFD)模拟小鼠的睾丸组织,在培养室中装入小鼠睾丸组织碎片后进行培养,可以维系 6 个月,并可以分化出精子和分泌睾酮,还证明产生的精子可以通过微授精产生健康的后代。MFD 克服了传统气液相间培养方法的缺陷,精子发生的总效率较高、持续时间较长,与体内精子发生较为相似。然而,这种微流控设备需要动力泵维持设备内培养基的流动,动力泵影响研究的样本数,且连接设备和泵的管可能会出现问题,设备内集成的微型泵需要专门制造且价格昂贵。2017 年,Komeya 等[3]对 MFD 进行了改进,发明了无泵(pumpless,PL)设备,其基本设计参数与 MFD 一致,但是上层聚二甲基硅氧烷(polydimethylsiloxane,PDMS)多了用于调节介质流速的阻力通路,下层 PDMS 多了中等出水孔。它成功地诱导了小鼠精原细胞形成精子,并维持了 3 个月,这是微流控无泵系统长期维持睾丸组织及其功能的首次报道。该设备不需要额外的动力泵,利用静水压力诱导培养基的流动,降低了运行成本和维护的难度,且较传统的气液相间的培养方法维持时间更长。上述 2 种方法是用微量移液管施加压力将睾丸组织通过狭窄的管道输送至组织培养室,它们均不适用于柔韧性较差的组织。

2018 年,Yamanaka 等[4]开发了单层设备(monolayer device,MLD),设计了一种新的组织装载方式,即在 PDMS 的上层和底部载玻片黏合之前,将组织引入设备,还适用于睾丸以外的组织。该设备设计简单,更易于制造。MLD 载玻片放置在组织培养室的底部,利用倒置显微镜观察组织更加清晰。运用此设备,体外精子发生过程首次被摄影记录下来,与体内精子形成过程相似。

2019 年,Day 等[5]提出了 2 种 3D 打印的微型共培养设备,由聚苯乙烯制造而成,该设备有以下显著优点:① 可以在培养结束时实现高分辨率成像。② 能集成到标准孔板培养程序中进行更高级的实验。③ 无需大幅度改变实验条件。④ 蒸发控制方法简单。⑤ 可以避免不熟悉微流控设备的人员造成污染或引起液体溢出。该设备有望应用于睾丸细胞的体外培养以及模拟体外生精过程。

综上所述,微流体培养技术已经取得了突破性进展,可模仿体内复杂的微环境,如物理刺激、机械刺激、化学梯度等,其中流动的培养基可以供应营养、及时清除细胞代谢的废物。且因其体积微小,使用的试剂、细胞较少,更适合培养原代细胞。微流控设备采用 PDMS 或聚苯乙烯材质,可通过注塑成型进行大规模生产,缩短时间并降低成本。

2 3D 培养

鉴于传统的二维(two-dimensional,2D)培养系统无法模拟精子形成的过程,要想成功模拟体内睾丸的微环境,需构建 3D 睾丸结构[6]。迄今为止,已经出现各种形式的 3D 支架用于模仿睾丸细胞外基质(extra cellular matrix,ECM)引导生殖细胞分化。这些支架可以由天然或合成材料制成,最近还引入了新型的 3D 生物打印、静电纺丝等技术建立支架。

前人将睾丸细胞添加在 3D 基质中进行共培养,如胶原蛋白凝胶、基质胶、软琼脂等,在啮齿类动物的精子发生研究中取得了一定进展,但啮齿类动物和人类在精子发生方面存在差异。Huleihel 等[7-8]使用与人类更接近的恒河猴或猪进行实验,实现了睾丸生殖细胞向精子的增殖和分化,有效地

维持精原干细胞(spermatogonial stem cells, SSC)的活力并促进其增殖、分化到减数分裂后阶段。恒河猴和猪 3D 细胞模型的成功构建也促使研究人员进行人类生殖细胞的培养。2018 年,Gholami 等[9]将已经用于小鼠和恒河猴培养的软琼脂培养系统(soft agar culture system, SACS)进行改良,补充敲除血清替代物(knockout serum replacement, KSR)及褪黑素等用来培养人类生殖细胞,并增加生精小管的氧气接触,发现与 SSC 增殖分化相关的 Scp3,α6 的表达,但该培养系统需要进一步完善,也要评估氧气对于该模型的影响。2018 年,Abofoul 等[10]使用甲基纤维素培养系统(methylcellulose culture system, MCS)培养男性肿瘤患者的 SSC,成功分化出单倍体精子细胞,经免疫荧光鉴定存在单倍体生殖细胞的特异性标志物。

另一种 3D 培养系统是采用 ECM、生殖细胞、支持细胞和间质细胞进行共培养。Harris 等[11]的研究是利用原代小鼠睾丸细胞共培养,对邻苯二甲酸酯等化学物质反应敏感,但原代睾丸细胞分离过程复杂,会导致结果出现差异。在 Yin 等[12]的研究中,使用小鼠精原细胞、支持细胞和间质细胞建立了非原代睾丸细胞共培养模型,并在体外用 32 种化合物进行测试,结果表明,这种新型的体外共培养模型可用于筛选睾丸有毒物质。2017 年,国内张晓芳[13]将这种 3D 共培养模型进行了优化,将 KSR 作为血清替代物,通过对比选择优化了培养方法、条件与时间。将双酚 A 和邻苯二甲酸二丁酯作为阳性药物,证实了该模型作为雄性生殖毒性测试系统的适用性。2020 年 Yin 等[14]开发的 3D 小鼠睾丸细胞共培养模型,能够对生殖毒性物质进行分类。在这项研究中,使用了高含量分析(high content analysis, HCA)来进一步比较双酚 A 及其类似物的睾丸毒性,能够评估睾丸共培养模型中的多种毒性终点。

然而,上述睾丸细胞或组织的培养系统仅呈现一个简单的厚层,需要构建三维组织支架才能更好地维持生殖细胞生理功能。2019 年,Baert 等[15]开发了一种新的培养系统,首次采用水凝胶进行 3D 打印来构建支架,也实现了小鼠体外生精。3D 打印支架重现性高、性能可调节,但该系统的实验动物转基因小鼠生产过程复杂,样本量低;培养系统中间质细胞的密度会随时间推移而降低。更为高级的支架是通过静电纺丝等技术制造的,静电纺丝技术可以模拟睾丸的纤维结构。2019 年,Vardiani 等[16]发明了一种电纺明胶(electrospun gelatin, EG)支架,将胚胎干细胞(embryonic stem cells, ESC)与睾丸支持细胞共培养。EG 支架是通过对明胶进行静电纺丝制作的,并与戊二醛蒸汽交联来降低水溶性和降解速率。实验结果证明,EG 支架对支持细胞和 ESC 没有细胞毒性,是共培养的优良底物。另一种是利用组织脱细胞制成的天然支架。2018 年,Vermeulen 等[17]利用猪未成熟睾丸组织(immature testicular tissue,ITT)脱细胞形成的支架培养人类 SSC,观察到 SSC 增殖率高于没有支架的培养系统。2019 年,Ganjibakhsh 等[18]利用人类脱细胞羊膜(decellularized amnion membrane,DAM)做支架,这是一种独特的天然三维支架,成本低、可长期储存、支持诱导性多能干细胞生成人类雄性生殖细胞。实验发现 DAM 支架可促进男性生殖细胞特异性标记、提高生殖细胞分化效率,在人类生殖细胞发育和临床研究上有良好的应用前景。2020 年,Majidi 等[19]将小鼠整个睾丸脱细胞制作为天然 3D 支架,用于培养 SSCs,结果表明 SSCs 可增殖并分化为精母细胞。

3D 培养相比 2D 培养更接近于体内环境,近年来也取得了很多进展,啮齿类动物和人类的生殖细胞都已经成功在 3D 培养系统中分化出精子。但产生的精子数少、分化效率低是不可忽视的问题,支架的制造使用有巨大的潜力,但存在营养、氧气和废物的扩散有限等共同缺点,需要进一步优化培养,才能更好地复制体内睾丸微环境,进行睾丸有毒物质筛选。

3 睾丸类器官

类器官是一个体外三维细胞簇,来源于原组织(正常或肿瘤组织)、干细胞或诱导的多能干细胞,能够自我更新、自我组织,并表现出与起源组织相似的生理功能[20]。近年来,睾丸类器官模型也被成功建立,可用于研究生殖细胞间的相互作用、组织发育和睾丸微环境。类器官对药物或毒物表现出与人体器官几乎类似的反应,因此,可以进行药物的高通量筛选,更准确地预测人用药物的功效和毒性。

2017 年,Baert 等[21]首次建立了人睾丸类器官,它是在人去细胞睾丸基质(decellularized testicular matrix, DTM)制造的天然睾丸支架中,添加体细胞和生殖细胞悬浮液,构建睾丸微环境,最终使睾丸细胞重新集聚形成的组织样结构。它可以维持形态约 4 周,能产生睾酮、抑制素 B 和白细胞介素 6,但未证明构建了睾丸生精小管结构。Pendergraft 等[22]采

用悬滴培养法,构建了另一种人睾丸类器官模型,它是将人睾丸组织提取的 ECM,SSC 及间质细胞和支持细胞进行共培养,可以维持 23 d。该模型还对 4 种临床药物进行检测,结果显示随剂量增加细胞活力降低,不仅可减少药物检测所需的时间,还可以减少假阳性或假阴性,表明此模型可以更好地用于药物筛选。2017 年,Alves-Lopes 等[23]开发了一种新的三层梯度系统(three-layer gradient system, 3-LGS),将大鼠睾丸细胞在 2 层基质胶之间悬浮培养,建立了睾丸类器官,可以维持 21 d,对视黄酸刺激也有反应,可以评估药物或毒物的毒性作用。2018 年,Strange 等[24]采用 SSC、支持细胞、间质细胞和肾小管管周细胞构建了一种人睾丸类器官,它虽缺乏 BTB,但可在长达 23 d 的培养期内保持 85% 以上的活力,且可连续产生睾丸激素和有限的生殖细胞分化。此类器官用寨卡病毒感染,睾丸细胞活力可显著下降,睾酮产生量也减少。

然而,上述人睾丸类器官尚未成功模拟体外精子形成。2018 年,国内的 Sun 等[25]建立了一个三维诱导(three-dimensional-induced, 3D-I)系统,它基于 ECM 的水凝胶,使人 SSC 在体外可有效分化为结构功能正常的精子,产生的精子还能够使小鼠卵母细胞受精,从而使杂种胚胎得以发育。该模型将人类 SSCs 向圆形精子细胞的分化效率提高了 10 倍以上。2019 年,Vermeulen 等[26]使用猪未成熟睾丸组织脱细胞做成支架,成功建立了猪睾丸类器官,这是首次在大型动物中成功形成生精小管组织。

2019 年,Sakib 等[27]采用微孔系统将猪的生殖细胞、支持细胞、睾丸间质细胞等用离心强制聚集法形成类器官,它的操作方式简单且可重现,更为重要的是不再需要添加 ECM。用邻苯二甲酸单乙基己基酯(monoethylhexyl phthalate, MEHP)处理时,它的生殖细胞自噬水平呈剂量依赖性增加,表明该类器官可用于药物毒性评价。

鉴于肝脏代谢以及肝脏-睾丸轴的相互作用对于药物的代谢转化非常重要,2020 年,Baert 等[28]开发了首例人肝脏和睾丸的多器官芯片共培养系统,检测环磷酰胺,发现它经过肝脏代谢后表现出生殖毒性,而在单独睾丸类器官系统则未表现出相似的作用,表明该系统重现了药物诱导的肝-睾丸系统相互作用。此模型也存在一定的局限性,如因培养复杂而复制性较差。

在药物开发过程中,时常发现一些已上市的药物因出现严重毒性而被撤市,其原因部分是因为在前期临床或非临床研究中采用的模型未能全面评估药物的毒性所致。2020 年,Skardal 等[29]开发了多种类器官集成模型,内置于微流控设备中,其中包含肝、心脏、肺、血管、睾丸和脑类器官,在体外至少可存活 28 d。其中睾丸类器官包括人精原细胞、支持细胞、间质细胞和肾小管周肌细胞。利用该模型测试被撤回的药物,发现了之前未发现的毒性作用,这是基于这种集成模型能更好地模拟不同器官或组织之间的相互作用,更贴近药物在人体内的代谢方式和反应特点。2020 年,Rajan 等[30]也开发了多组织(包括肝脏、心脏、肺、内皮、脑和睾丸)类器官平台,这些微型结构内置于低成本、基于胶膜的微流控设备中,用于检测药物代谢和相互作用,相比单个类器官有更复杂的集成响应。

睾丸类器官为药物筛选提供了良好途径,目前其模型建立方面虽取得了一些进展,也实现了体外精子形成,但还不足以完全复制体内睾丸结构和生精过程,培养方法仍需进一步改进。

4 结语

为了减少动物在生殖毒性研究中的消耗,建立稳定可靠的体外模型具有极为重要的意义[31-33]。在雄性生殖毒性研究方面,睾丸体外培养模型在一定范围内可以替代动物进行药物筛选和毒性评价。随着生物技术水平的不断提高,睾丸体外培养逐渐从 2D 培养系统过渡到更能模拟体内微环境的培养系统,如微流体培养、3D 培养和类器官培养等,这些先进技术不仅可以模仿睾丸正常的生理功能,还能模拟异常的刺激和反应,具有很好的应用前景,也是体外生殖毒性研究的主要发展方向。近年来,研究者不断优化睾丸细胞的培养条件,研究培养基的最佳配比,使得体外精子发生效率增高、培养时间延长;同时将啮齿类动物睾丸细胞体外培养的经验成功转移到大动物甚至人类体外睾丸细胞培养系统的构建,已经使人 SSC 在体外成功分化为结构功能正常的精子。然而,无论是动物还是人类模型还存在一些局限性,如产生的精子数量少、分化效率低、单一睾丸器官的培养难以反映全身各器官相互作用下的毒性作用等。因此,建立稳定、可复制且与体内关联性更强的体外生殖毒性评价模型还有很长的路要走,需要广大科研工作者共同努力,加强合作,进一步优化现有模型和寻找新的建模方式。

[参 考 文 献]

[1] NAKAMURA N, SLOPER DT, DEL VALLE PL. Evaluation of an *in vitro* mouse testis organ culture system for assessing male reproductive toxicity[J]. *Birth Defects Res*, 2019,111(2): 70 – 77.

[2] KOMEYA M, KIMURA H, NAKAMURA H, *et al*. Long-term ex vivo maintenance of testis tissues producing fertile sperm in a microfluidic device[J]. *Sci Rep*, 2016,6(1):21472.

[3] KOMEYA M, HAYASHI K, NAKAMURA H, *et al*. Pumpless microfluidic system driven by hydrostatic pressure induces and maintains mouse spermatogenesis *in vitro*[J]. *Sci Rep*, 2017,7(1):15459.

[4] YAMANAKA H, KOMEYA M, NAKAMURA H, *et al*. A monolayer microfluidic device supporting mouse spermatogenesis with improved visibility[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2018, 500(4): 885 – 891.

[5] DAY JH, NICHOLSON TM, SU X, *et al*. Injection molded open microfluidic well plate inserts for user-friendly coculture and microscopy[J]. *Lab Chip*, 2020,20(1): 107 – 119.

[6] REDA A, HOU M, WINTON TR, *et al*. *In vitro* differentiation of rat spermatogonia into round spermatids in tissue culture[J]. *Mol Hum Reprod*, 2016,22(9): 601 – 612.

[7] HULEIHEL M, NOURASHRAFEDDIN S, PLANT TM. Application of three-dimensional culture systems to study mammalian spermatogenesis, with an emphasis on the rhesus monkey (Macaca mulatta)[J]. *Asian J Androl*, 2015,17(6): 972 – 980.

[8] ZHAO H, NIE J, ZHU X, *et al*. *In vitro* differentiation of spermatogonial stem cells using testicular cells from Guangxi Bama mini-pig[J]. *J Vet Sci*, 2018,19(5): 592 – 599.

[9] GHOLAMI K, POURMAND G, KORUJI M, *et al*. Efficiency of colony formation and differentiation of human spermatogenic cells in two different culture systems[J]. *Reprod Biol*, 2018,18(4): 397 – 403.

[10] ABOFOUL-AZAB M, ABUMADIGHEM A, LUNENFELD E, *et al*. Development of postmeiotic cells *in vitro* from spermatogonial cells of prepubertal cancer patients[J]. *Stem Cells Dev*, 2018, 27(15): 1007 – 1020.

[11] HARRIS S, HERMSEN SAB, YU X, *et al*. Comparison of toxicogenomic responses to phthalate ester exposure in an organotypic testis co-culture model and responses observed *in vivo*[J]. *Reprod Toxicol*, 2015,58: 149 – 159.

[12] YIN L, WEI H, LIANG S, *et al*. From the cover: an animal-free *in vitro* three-dimensional testicular cell coculture model for evaluating male reproductive toxicants[J]. *Toxicol Sci*, 2017, 159(2): 307 – 326.

[13] 张晓芳. 基于大鼠睾丸细胞三维共培养模型的雄性生殖毒性测试系统建立[D]. 上海:第二军医大学,2017.

[14] YIN L, SIRACUSA JS, MEASEL E, *et al*. High-content image-based single-cell phenotypic analysis for the testicular toxicity prediction induced by bisphenol a and its analogs bisphenol s, bisphenol af, and tetrabromobisphenol a in a three-dimensional testicular cell co-culture model[J]. *Toxicol Sci*, 2020,173(2): 313 – 335.

[15] BAERT Y, DVORAKOVA-HORTOVA K, MARGARYAN H, *et al*. Mouse *in vitro* spermatogenesis on alginate-based 3D bioprinted scaffolds[J]. *Biofabrication*, 2019,11(3): 035011.

[16] VARDIANI M, GHOLIPOURMALEKABADI M, GHAFFARI NOVIN M, *et al*. Three-dimensional electrospun gelatin scaffold coseeded with embryonic stem cells and sertoli cells: a promising substrate for *in vitro* coculture system[J]. *J Cell Biochem*, 2019, 120(8): 12508 – 12518.

[17] VERMEULEN M, DEL VF, DE MICHELE F, *et al*. Development of a cytocompatible scaffold from pig immature testicular tissue allowing human sertoli cell attachment, proliferation and functionality[J]. *Int J Mol Sci*, 2018,19(1):227.

[18] GANJIBAKHSH M, MEHRAEIN F, KORUJI M, *et al*. Three-dimensional decellularized amnion membrane scaffold promotes the efficiency of male germ cells generation from human induced pluripotent stem cells[J]. *Exp Cell Res*,2019,384(1): 111544.

[19] MAJIDI GN, MOVAHEDIN M, MAZAHERI Z. Three-dimensional culture of mouse spermatogonial stem cells using a decellularised testicular scaffold[J]. *Cell J*, 2020,21(4): 410 – 418.

[20] FATEHULLAH A, TAN SH, BARKER N. Organoids as an *in vitro* model of human development and disease[J]. *Nat Cell Biol*, 2016,18(3): 246 – 254.

[21] BAERT Y, DE KOCK J, ALVES-LOPES JP, *et al*. Primary human testicular cells self-organize into organoids with testicular properties[J]. *Stem Cell Rep*, 2017,8(1): 30 – 38.

[22] PENDERGRAFT SS, SADRI-ARDEKANI H, ATALA A, *et al*. Three-dimensional testicular organoid: a novel tool for the study of human spermatogenesis and gonadotoxicity *in vitro*[J]. *Biol Reprod*, 2017,96(3): 720 – 732.

[23] ALVES-LOPES JP, SÖDER O, STUKENBORG J. Testicular organoid generation by a novel *in vitro* three-layer gradient system[J]. *Biomaterials*, 2017,130: 76 – 89.

[24] STRANGE DP, ZARANDI NP, TRIVEDI G, *et al*. Human testicular organoid system as a novel tool to study Zika virus pathogenesis[J]. *Emerg Microbes Infect*, 2019,7(1): 1 – 7.

[25] SUN M, YUAN Q, NIU M, *et al*. Efficient generation of functional haploid spermatids from human germline stem cells by three-dimensional-induced system[J]. *Cell Death Differ*, 2018, 25(4): 749 – 766.

[26] VERMEULEN M, DEL VENTO F, KANBAR M, *et al*. Generation of organized porcine testicular organoids in solubilized hydrogels from decellularized extracellular matrix[J]. *Int J Mol Sci*, 2019,20(21): 5476.

[27] SAKIB S, UCHIDA A, VALENZUELA-LEON P, *et al*. Formation of organotypic testicular organoids in microwell culture[J]. *Biol Reprod*, 2019,100(6): 1648 – 1660.

[28] BAERT Y, RUETSCHLE I, COOLS W, *et al*. A multi-organ-chip co-culture of liver and testis equivalents: a first step toward a systemic male reprotoxicity model[J]. *Hum Reprod*, 2020,35(5): 1029 – 1044.

[29] SKARDAL A, ALEMAN J, FORSYTHE S, *et al*. Drug compound screening in single and integrated multi-organoid body-on-a-chip systems[J]. *Biofabrication*, 2020,12(2): 025017.

[30] RAJAN SAP, ALEMAN J, WAN M, *et al*. Probing prodrug metabolism and reciprocal toxicity with an integrated and humanized multi-tissue organ-on-a-chip platform[J]. *Acta Biomater*, 2020, 106: 124 – 135.

[31] 朱晨霞, 宋翼升, 张立将. 体外全胚胎培养技术及其在药物生殖发育毒性评价中的应用[J]. 中国现代应用药学, 2021, 38(17): 2162 – 2169.

[32] 王敬亭, 周长慧, 常艳. 三维细胞培养技术在毒理学研究中的应用[J]. 中国新药杂志, 2020, 29(6): 624 – 628.

[33] 周昕, 林颖, 唐欲博, 等. 条件性重编程技术分离培养人原代乳腺癌干细胞[J]. 今日药学, 2021, 31(2): 100 – 104, 109.

编辑:蒋欣欣/接受日期:2021 – 08 – 26