

人类辅助生殖实验室环境挥发性有机化合物国际专家共识与现状解

读

李红星^{1*}, 李文强¹, 薛石龙², 宋德潇², 孙亮², 席亚明¹

1 兰州大学第一临床医学院, 甘肃兰州 730000

2 兰州大学第一医院生殖医学中心, 甘肃兰州 730000

*通讯作者: 李红星, 邮箱: hxli_01@163.com

基金项目: 甘肃省青年科技基金(20JR10RA705); 甘肃省高等学校创新基金(2021B-008); 兰州大学第一医院院内基金(1dyyn2021-15); 兰州大学学生创新创业计划项目(20220060217)

【摘要】目的: 胚胎发育是一个非常复杂和精细调控的过程, 胚胎培养不仅需要良好的培养液体系, 而且依赖于体外受精实验室整个空气环境。2017 年开罗国际辅助生育技术专家会议就实验室空气质量的技术和操作等方面达成数十项共识, 涉及辅助生殖实验室选址、新建设施的设计标准、实验室调试、挥发性有机化合物持续管理等方面, 为现有实验室提供了标杆, 为新建实验室提供了指引。我们针对人类辅助生殖实验室环境挥发性有机化合物国际专家共识与我国现状, 对实验室污染物(挥发性有机化合物)是否影响以及如何影响卵母细胞受精和胚胎发育的文献进行检索, 总结实验室挥发性有机化合物类型、来源、可能造成的有害影响以及环境质量控制。不同类型挥发性有机化合物可能会影响细胞结构和细胞通讯, 改变特定基因表达, 并使其更容易受到遗传突变的影响。同时, 挥发性有机化合物对卵母细胞受精、囊胚发育、孵化和着床等方面的可能存在不良影响, 这些不良影响与临床结果呈负相关。

【关键词】 挥发性有机化合物; 质量控制; 胚胎发育

2017 年开罗国际辅助生育技术专家会议就实验室空气质量的技术和操作等方面达成数十项共识, 涉及辅助生殖实验室选址、新建设施的设计标准、实验室调试、挥发性有机化合物持续管理等方面, 为现有实验室提供了标杆, 为新建实验室提供了指引。体外受精实验室常规设置不同级别过滤装置, 且培养箱提供相对稳定培养环境, 但有时会受到意想不到的污染源的强烈影响^[1]。有文献指出, 环境挥发性有机化合物(volatile organic compounds, VOCs)的最高值出现在 IVF 培养箱内, 因为密闭性缘故 VOCs 难以及时扩散出去, 而实验室环境空气实时处于循环状态^[2]。在 IVF 实验室内, 最常见的两种污染物包括微粒物质和 VOCs。一般认为挥发性有机化合物具有相对明确的致畸性和生殖毒性^[3], 在标准大气压下, VOCs 的沸

点低于 250℃, 蒸汽压大于 0.1 mmHg, 由于分子间作用力的减弱, VOCs 因高挥发性而存在各个角落。

一、挥发性有机化合物来源

影响体外受精实验室内空气环境的主要因素包括: 通风类型(自然或强制)、通风率(每小时换气次数)和污染物性质^[4]。微粒和 VOCs 通过各种载体存在于实验室各个角落, 这些载体包括加热、通风和空调系统、相邻房间和走廊的扩散、排气材料、设备和麻醉气体等。此外微粒和 VOC 其他来源包括灰尘、玻璃碎片、酒精燃烧、一次性塑料器皿、标记笔、消毒剂、显微镜、监视屏幕和家具等。不同类型的饱和挥发物不断释放, 并通过空气和日光灯在常规使用材料表面发生氧化而累积, 即使实验室使用适当

的清洁消毒液达到洁净室标准亦难以完全排除^[5]。据报道, IVF 实验室内存在 18 到 300 种挥发性化合物^[1], 某些 VOCs (例如苯类物质) 可以在培养箱/CO₂ 气瓶内部产生, 并可能污染配子和胚胎。VOCs 难以从实验室的环境空气和培养箱内完全去除, 并且 VOCs 也可以与微粒相互作用进一步影响整个 IVF 治疗结局^[5]。

因为方法学原因, 空气污染物 (如挥发性有机化合物) 的测量结果可能会有很大的差异, 所以一直以来难以确定污染物对胚胎造成损伤的具体质量标准 and 具体阈值水平。在“体外受精实验室环境和空气质量开罗共识”中, 专家们提出的基准如下: 0.5 μm-10 μm 微粒小于 352,000 个/m³, 总 VOCs 低于 500 μg/m³, 醛类低于 5 μg/m³, 每小时 15 次总换气 (包括每小时完全新鲜换气 3 次)^[4]。需要引起注意的是, 实验室总微粒数量和换气效率可能与部分病毒传播 (如新冠病毒等) 有一定相关性, 但这方面尚缺深入研究^[6]。当然在设定新鲜空气与再循环空气比时, 应考虑制造厂商关于 VOCs 过滤类型和过滤器的相关说明。

二、VOCs 对 IVF 治疗结局的影响

开罗共识提出常规 ART 实验室质控时, 建议评估空气中 VOCs 和其他污染物的浓度, 以杜绝其对胚胎发育和职员身体健康的危害。已有研究证明, 建造新实验室虽然使用了高标准环保材料和完整 HEPA 过滤系统, 但实验室初期产生的气体排放对早期小鼠胚胎有致命性影响, 超过 90% 的小鼠胚胎在阻滞于两个细胞阶段。增加 VOCs 过滤系统可以明显增加同时间段卵裂球数量进而提高囊胚形成率^[4, 7]。安装空气过滤系统后减少 VOC 的同时, 受精率、卵裂率、D5 囊胚形成率、种植率和妊娠率显着提高。新型空气过滤系统降低了甲醛、乙烯、乙炔、乙烷、丙烯、SO₂、NO_x、异丁烯、顺丁烯、环戊烷、苯、氯仿、四氯化碳、卤代烷-1211 和酒精的浓度。超过 1 ppm 的挥发性有机化合物可对动物胚胎产生直接毒性, 0.5 ppm 左右的挥发性有机化合物水平虽然不影响早期胚胎发育形容参数和妊娠率数据, 但早期流产

率明显升高, 所以挥发性有机化合物浓度应低于 0.2 ppm, 以获得理想的体外受精结局^[7]。

1、苯及其代谢物

苯 (C₆H₆) 是实验室中最常见的 VOC 空气污染物之一。常温下它是一种无色透明的液体, 挥发性高, 一般环境浓度在 1 至 50 ppb 之间, 空气中 0.4 ppb 以上的暴露会导致癌症的严重风险。迄今为止实验室空气苯浓度的阈值水平未见报道, 也没有证据表明苯与体外受精妊娠率之间是否存在相关性。Alviggi 等人检测卵泡内苯浓度, 以 0.54 ng/mL 为界将其分为卵泡内低浓度组 (A 组) 和卵泡内高浓度组 (B 组)。B 组的苯浓度与 FSH 基线水平呈显著正相关, 而与 E2 峰值水平和平均获卵数呈显著负相关, A 组的可利用胚胎数明显多于 B 组。卵泡内苯含量与卵泡对内源性和外源性促性腺激素的低敏感性有关, 推测可能导致了一种未知的耐药机制^[8]。

当暴露于苯及其代谢物 (苯二酚和苯酚等) 时, 小鼠胚胎细胞表现出明显的剂量依赖性遗传毒性, 如细胞增殖速率下降, 染色体畸变频率 (间隙和断裂) 增加, 并观察到染色体数目改变和基因突变。在剂量依赖性吸入苯后, 可观察到小鼠 MI 卵母细胞的减数分裂延迟和 MII 卵母细胞非整倍性率增加。毒理学实验通过苯在子宫内暴露的研究表明, 苯对胚胎或胎儿组织具有明显致癌作用。苯引起氧化还原信号通路的改变, 产生高水平活性氧 (ROS) 进而导致氧化应激, 导致基因表达水平的异常, 最后发生细胞生长停滞和细胞死亡, 另外子宫内苯暴露引起正常造血所必需的关键细胞信号通路的改变。但靶细胞的易感性 (类型、年龄、性别) 也有许多内在的差异, 雄性胎儿在接触苯类物质两小时后更容易产生活性氧^[9]。

2、甲苯

另一种实验室常见的有机挥发性化合物是甲苯, 它是一种有机溶剂 (芳烃), 广泛存在于各类化工产品, 如油漆, 胶水和汽油等。甲苯和其他有机溶剂对富含脂质的组织具有高亲和力, 且容易穿过胎盘, 直接暴露于胎儿。通过评估不同的测试季度与种植率的相关性时发现甲苯的存在与外界温度/

湿度过高有关,当甲苯处于较高水平时,受精率、优质胚胎率和种植率显著下降^[9]。体外实验证明甲苯对人胚胎干细胞具有明显细胞毒性作用,较高剂量的甲苯会降低卵子受精率并增加胚胎坏死率,导致胚胎致死率增加。动物模型中的其他研究表明,母体暴露于吸入的甲苯之后早期雌性胎儿产生形态异常和先天性缺陷,如胎盘重量减少,胎儿生长减缓,骨骼骨化减少,具有明显的神经发育负面影响^[10,11]。需要注意的是,实验室内真菌污染会产生 1-辛烯-3-醇及其对映体,具有与甲苯类似的胚胎毒性^[12]。小鼠骨髓干细胞暴露于 1-辛烯-3-醇后,细胞膜不饱和脂肪酸增加的同时胆固醇水平降低,进而导致膜流动性增加,提示可能与免疫系统的功能障碍有关^[13]。

3、多环芳烃类

烟草燃烧产生多环芳烃类(苯并蒽、二甲基苯并蒽、苯并芘、二苯并蒽等)对人类生殖健康的负面影响较为明确^[14]。多环芳烃能在分子水平上改变胚胎和胎儿的发育,减少胚胎和胎盘细胞系的分配,诱导 Bax 表达(bcl-2 组家族成员)显著增加,激活 caspase 3 基因,导致细胞凋亡,同时具有明确致突变性。同时,多环芳烃类 ICM/TE 细胞比率受到显著影响,ICM 细胞减少,在胚胎中观察到 OCT-4 表达的降低,这可能与 ICM 的细胞数减少有关。Brevik 等人证明在对多环芳烃的急性暴露之后会产生亲代基因突变,这可能会影响早期胚胎转录、胚胎基因组的激活,并可能导致跨代效应^[15]。

4、三氯乙烯

三氯乙烯(Trichloroethylene, TCE)是一种高挥发性吸入麻醉剂,主要用于短时手术,具有良好的镇痛作用。在大鼠怀孕期间吸入 TCE 可导致胎儿骨骼和软组织发育迟缓,同时,动物胚胎毒性模型表明, TCE 可导致心脏瓣膜和房间隔畸形,实验表明 TCE 可以破坏胚胎肌细胞中的钾离子和钙离子转运通量,产生钙稳态的基因错误表达,从而改变细胞膜的通透性,导致电解质失衡,可能是心脏畸形发生的机制之一^[16]。

5、柠檬烯

柠檬烯作为一种清洁和化妆品的添加

剂,广泛存在于体外受精实验室内。通常认为柠檬烯不具有强烈的致突变、致癌或肾毒性作用,被称为低毒性 VOCs,很少有研究对可能的有害影响进行评估。然而, Ha jagos 等人提出柠檬烯尽管不是剧毒或致癌物质,胚胎毒理实验证实其可能会诱导异常细胞分化,并活化钙离子通道,增加胞内钙离子浓度,可能增加子宫肌层的不规则收缩^[17]。

6、丙烯醛

丙烯醛是一种实验室空气中的常见的挥发性有机化合物,产生于脂质过氧化、液体燃料燃烧和烟草燃烧等。早期研究表明,丙烯醛暴露对卵裂率、卵裂球数目和囊胚形成率有负面影响。近来一项小鼠胚胎与 500 ppb 的丙烯醛短时孵育的研究表明,这种负面影响取决于培养基中的蛋白质浓度。培养液中含有 5 mg/mL 的人血清白蛋白时,卵裂球分裂时间和胚胎发育速率未见明显异常。低蛋白培养基培养的胚胎在四细胞期和桑椹胚期被抑制。无蛋白组的胚胎在单细胞阶段发生退化^[18]。

7、微粒

生物医学材料相关的纳米级超细颗粒容易飘散到空气中,其影响人类胚胎发育早期的文献很少,动物模型身上发现了许多有害影响。研究发现,较小的聚苯乙烯(C8H8)纳米超细颗粒可被滋养层细胞内化(通过内吞作用或胞饮作用),虽然早期发育速度无明显差异,但囊胚孵化率明显降低暴露于硒化镉超微颗粒的囊胚在体内外均可产生细胞凋亡,抑制细胞增殖,增加早期囊胚死亡,有意思的是添加硫化锌(ZnS)涂层可显著降低细胞毒性^[19]。最近的一项研究报道壳聚糖超微颗粒可以内化到囊胚细胞胞质中,启动细胞间氧化应激反应,导致线粒体肿胀,纺锤体、溶酶体等细胞器呈现早期退化迹象,内质网应激相关基因表达水平升高,进而影响表观遗传重编程^[20]。

研究发现,直径小于 2.5 微米的微粒(PM2.5)对受精率、合子评分、胚胎发育速率、内细胞团和滋养外胚层评级、孵化率、种植率等均有显著负作用^[21]。PM2.5 和 PM10 混合物在急性或慢性暴露后降低卵泡生长速度、优质胚胎率、种植率并最终降低活产

率^[22]。闭锁小带蛋白1 (Zonula Occludens, ZO-1) 是一种调节细胞间形成紧密连接的蛋白分子, 该蛋白首次表达于桑椹胚阶段, 有助于囊胚形成和 TE/ICM 的分化。微粒可能影响该蛋白的表达, 导致形成囊胚形成率显著降低^[23]。

三、结合人类辅助生殖实验室环境国际专家共识和我国现状, 实现 VOCs 污染物控制

对实验室和培养箱内污染物产生机制的理解有助于改进设计和制定预防策略^[5]。针对实验室墙壁和天花板表面进行密封的标准涂料填充可能是 VOCs 的一大来源。我国大部分医院建筑空间紧张, 在辅助生殖实验室附近的房间或走廊上刷漆装修, 可能会导致 VOCs 进入实验室。因此, 有必要提醒所有建筑人员, 包括设施管理人员、承包商和一线施工人员等, 注意 VOCs 对胚胎的影响, 在相关建筑物内使用含 VOCs 的建筑材料前须与实验室负责人相互协商。如果需要在实验室内或在相关建筑物的其他地方进行喷漆操作, 必须选择在实验室未进行胚胎培养的时候进行。此外, 房间翻新后, 在一定时间内(2周~3周时间)提高室温至 28℃、打开所有灯光, 可以大范围促使 VOCs 尽量释放彻底。委托具有资质的第三方机构通过具体的 VOCs 测试做验证, 并与基线进行比较。需要注意的是人类精子存活测试不足以实现此目的。

实验室污染的预防策略包括: 人员通道和材料通道互相分离并定时清洁; 手术室和体外受精实验室之间的设置合适面积窗户, 以尽量减少空气混合; 设置一个带安全通风的独立实验室, 以方便使用有毒试剂; 设置用于清洁和消毒材料的独立区域^[24]。直径小于 0.5 微米的灰尘颗粒通常携带细菌和/或真菌, 可通过层流正压和洁净台空气过滤系统实现空气管理。实验室配备不同级别的过滤系统, 如高效微粒空气过滤系统 (HEPA, 可去除大于 0.3 μm 的颗粒)、活性炭过滤器、高锰酸钾过滤器、培养箱气体过滤装置和光催化装置等。活性炭通过不同大小的孔道和分子引力场吸收更高分子量的碳氢化合物, 高锰酸钾可以氧化降解低分子量有机

物、醇类、酮类和醛类, 光催化氧化技术也用于过滤挥发性有机化合物^[25]。

控制体外受精污染物, 需进一步明确测量各种理化参数, 例如: 化合物浓度和成分、溶解度和饱和蒸气压 (特别是挥发性有机化合物)、颗粒大小、形状、表面电荷和团聚程度等^[19]。VOC 化合物的溶解度影响它们能否穿透矿物油层并进入培养基。分子的穿透力可以通过从空气到油和油到水的分配系数来估算, 以确定其是否溶于油和水。例如丙烯醛和甲醇分配系数分别为是 -0.01 和 -0.74, 均为负值, 表明有可能被培养基吸收^[26]。

2016 年 ESHRE 指南提出质量控制应包括体外培养使用的培养基、耗材和气体。用于胚胎培养和胚胎研究应用的矿物油既可能是毒素的来源之一, 部分批次产品的质量有很大的差异。矿物油是直链烃、环烃和芳香烃的混合物, 大部分是饱和的, 但也含有低水平的不饱和烃, 其中包括活性更强的多环芳烃, 也可以存在过氧化物、醛、烯醛等化合物^[27,28]。矿物油还可能受到氧暴露 (过氧化和自由基形成) 和储存条件 (不同温度) 的影响。实时观察培养系统应用于培养液和矿物油的质量控制有较大优势, 观察和评估单个培养胚胎的细胞数和囊胚形成时间 144 小时 (而不是常规的 96 小时评估), 因为扩张期小鼠胚胎 (EMEA) 的敏感性更高^[29]。

体外受精实验室空气质量对人类受精率、优质胚胎率、种植率、活产率以及新生儿的长期健康发育都至关重要^[30]。环境监测是所有实验室的重要质控程序。体外受精实验室和培养箱内以及在配子和胚胎常规操作过程中存在暴露于不同污染物化合物的风险, 实验室必须不同级别空气过滤系统, 所有气体经过滤后方可导入培养箱内。尽管很多污染物与人类胚胎相互作用存在高度不确定性, 但实验室需要制定符合自己的预防策略和紧急备案^[31]。

参考文献

[1] Agarwal N, Chattopadhyay R, Ghosh S, et al. Volatile organic compounds and good laboratory practices in the in

- vitro fertilization laboratory: the important parameters for successful outcome in extended culture[J]. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 2017, 34(8): 999-1006.
- [2] Pollet-Villard X, Levy R. Impact of air quality on practices and results in the IVF laboratory[J]. *Gynecologie, Obstetrique, Fertilité, Senologie*, 2018, 46(10): 713-728.
- [3] Conforti A, Mascia M, Cioffi G, et al. Air pollution and female fertility: a systematic review of literature [J]. *Reproductive Biology and Endocrinology : RB&E*, 2018, 16(1): 117.
- [4] Mortimer D, Cohen J, Mortimer ST, et al. Cairo consensus on the IVF laboratory environment and air quality: report of an expert meeting [J]. *Reproductive Biomedicine Online*, 2018, 36(6): 658-674.
- [5] Wale PL, Gardner DK. The effects of chemical and physical factors on mammalian embryo culture and their importance for the practice of assisted human reproduction [J]. *Human Reproduction Update*, 2016, 22(1): 2-22.
- [6] Maggiulli R, Giancani A, Fabozzi G, et al. Assessment and management of the risk of SARS-CoV-2 infection in an IVF laboratory [J]. *Reproductive Biomedicine Online*, 2020, 41(3): 385-394.
- [7] Quraishi SM, Lin PC, Richter KS, et al. Ambient air pollution exposure and fecundability in women undergoing in vitro fertilization [J]. *Environmental Epidemiology (Philadelphia, Pa.)*, 2019, 3(1): e036.
- [8] Alviggi C, Guadagni R, Conforti A, et al. Association between intrafollicular concentration of benzene and outcome of controlled ovarian stimulation in IVF/ICSI cycles: a pilot study [J]. *Journal of Ovarian Research*, 2014, 7: 67.
- [9] Morbeck DE. Air quality in the assisted reproduction laboratory: a mini-review [J]. *Journal of Assisted Reproduction Genetics*, 2015, 32(7): 1019-1024.
- [10] Callan SP, Hannigan JH, Bowen SE. Prenatal toluene exposure impairs performance in the Morris Water Maze in adolescent rats [J]. *Neuroscience*, 2017, 342: 180-187.
- [11] Callan SP, Kott JM, Cleary JP, et al. Changes in developmental body weight as a function of toluene exposure: a meta-analysis of animal studies [J]. *Human Experimental Toxicology*, 2016, 35(4): 341-352.
- [12] Hokeness K, Kratch J, Nadolny C, et al. The effects of fungal volatile organic compounds on bone marrow stromal cells [J]. *Canadian Journal of Microbiology*, 2014, 60(1): 1-4.
- [13] Inamdar AA, Moore JC, Cohen RI, et al. A model to evaluate the cytotoxicity of the fungal volatile organic compound 1-octen-3-ol in human embryonic stem cells [J]. *Mycopathologia*, 2012, 173(1): 13-20.
- [14] Li P, Hua R, Li K, et al. Polycyclic aromatic hydrocarbons exposure and early miscarriage in women undergoing in vitro fertilization-embryo transfer [J]. *Human Fertility (Cambridge, England)*, 2020, 23(1): 17-22.
- [15] Brevik A, Lindeman B, Rusnakova V, et al. Paternal benzo[a]pyrene exposure affects gene expression in the early developing mouse embryo [J]. *Toxicological Sciences : an Official Journal of the Society of Toxicology*, 2012, 129(1): 157-165.
- [16] Caldwell PT, Manziello A, Howard J, et al. Gene expression profiling in the

- fetal cardiac tissue after folate and low-dose trichloroethylene exposure [J]. *Birth Defects Research. Part A, Clinical and Molecular Teratology*, 2010, 88(2): 111-127.
- [17] Hajagos-Tóth J, Hódi A, Seres AB, et al. Effects of d- and l-limonene on the pregnant rat myometrium in vitro [J]. *Croatian Medical Journal*, 2015, 56(5): 431-438.
- [18] Martinez CA, Nohalez A, Parrilla I, et al. The overlaying oil type influences in vitro embryo production: differences in composition and compound transfer into incubation medium between oils [J]. *Scientific Reports*, 2017, 7(1): 10505
- [19] Celá P, Vesela B, Matalova E, et al. Embryonic toxicity of nanoparticles [J]. *Cells, Tissues, Organs*, 2014, 199(1): 1-23.
- [20] Simopoulou M, Sfakianoudis K, Rapani A, et al. Considerations Regarding Embryo Culture Conditions: From Media to Epigenetics [J]. *In Vivo (Athens, Greece)*, 2018, 32(3): 451-460.
- [21] Huang CH, Yeh JM, Chan WH. Hazardous impacts of silver nanoparticles on mouse oocyte maturation and fertilization and fetal development through induction of apoptotic processes [J]. *Environmental Toxicology*, 2018, 33(10): 1039-1049.
- [22] Carre J, Gatimel N, Moreau J, et al. Influence of air quality on the results of in vitro fertilization attempts: a retrospective study [J]. *European Journal of Obstetrics, Gynecology, and Reproductive Biology*, 2017, 210: 116-122
- [23] Wang H, Ding T, Brown N, et al. Zonula occludens-1 (ZO-1) is involved in morula to blastocyst transformation in the mouse [J]. *Developmental Biology*, 2008, 318(1): 112-125.
- [24] Forman M, Sparks AE, Degelos S, et al. Statistically significant improvements in clinical outcomes using engineered molecular media and genomically modeled ultraviolet light for comprehensive control of ambient air (AA) quality [J]. *Fertil Steril*, 2014, 102(3): e91.
- [25] Munch EM, Sparks AE, Duran HE, et al. Lack of carbon air filtration impacts early embryo development [J]. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 2015, 32(7): 1009-1017.
- [26] Yin HB, Chen CH, Darre MJ, et al. Phytochemicals reduce aflatoxin-induced toxicity in chicken embryos [J]. *Poultry Science*, 2017, 96(10): 3725-3732.
- [27] Khan Z, Wolff HS, Fredrickson JR, et al. Mouse strain and quality control testing: improved sensitivity of the mouse embryo assay with embryos from outbred mice [J]. *Fertility and Sterility*, 2013, 99(3): 847-854.
- [28] Martinez CA, Martinez EA, Gil MA. Importance of oil overlay for production of porcine embryos in vitro [J]. *Reproduction in Domestic Animals = Zuchthygiene*, 2018, 53(2): 281-286.
- [29] Ainsworth AJ, Fredrickson JR, Morbeck DK. Improved detection of mineral oil toxicity using an extended mouse embryo assay [J]. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 2017, 34(3): 391-397.
- [30] Puttabyatappa M, Banker M, Zeng L, et al. Maternal Exposure to Environmental Disruptors and Sexually Dimorphic Changes in Maternal and Neonatal Oxidative Stress [J]. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 2020, 105(2): 492-505.
- [31] Gardner DK, Kelley RL. Impact of the IVF laboratory environment on human

preimplantation embryo phenotype [J]. Health and Disease, 2017, 8(4): 418-435.
Journal of Developmental Origins of