

人胚胎干细胞在药物毒性风险评估中的研究进展

杨仁君^{1,2}, 梁小星^{1,2}, 郭恒³, 王维娜³, 沈素³, 殷诺雅^{1,2}, Francesco Faiola^{1,2}, 张杨^{3*}

1. 中国科学院生态环境研究中心 环境化学与生态毒理学国家重点实验室, 北京 100085

2. 中国科学院大学 资源与环境学院, 北京 100049

3. 首都医科大学附属北京友谊医院 药学部, 北京 100050

摘要: 人胚胎干细胞(hESCs)是来源于胚胎发育早期内细胞团的一类未分化的多能干细胞,具有自我更新和多向分化的生物学特性,在发育生物学、再生医学以及细胞治疗领域等方面已开展了广泛的研究。与常规药物毒性评估所采用的癌细胞或原代细胞不同,干细胞不仅能满足基础毒性评估,由于其多向分化的特点,可经诱导产生各种正常人体器官或组织细胞,为药物临床前评估提供多方面数据。与动物实验模型相比,hESCs不仅避免了种属差异,还具备高通量、低成本的优势,在预测药物毒性效应方面具有广阔的前景。对目前hESCs在药物毒性风险评估中的研究进展进行总结,为体外药物毒性筛选试验提供新思路。

关键词: 人胚胎干细胞; 细胞基础毒性; 胚胎发育毒性; 器官毒性

中图分类号: R99

文献标志码: A

文章编号: 1674-5515(2019)11-3491-06

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2019.11.063

Research progress on human embryonic stem cells in drug-induced toxicity

YANG Ren-jun^{1,2}, LIANG Xiao-xing^{1,2}, GUO Heng³, WANG Wei-na³, SHEN Su³, YIN Nuo-ya^{1,2}, Francesco Faiola^{1,2}, ZHANG Yang³

1. State Key Laboratory of Environmental Chemistry and Ecotoxicology, Research Center for Eco-Environmental Sciences, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100085, China

2. College of Resources and Environment, University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China

3. Department of Pharmacy, Beijing Friendship Hospital, Capital Medical University, Beijing 100050, China

Abstract: Human embryonic stem cells (hESCs) are undifferentiated pluripotent stem cells derived from the inner cell mass in the early stages of embryonic development, have properties of self-renewal and multi-differentiation. Owing to their unique properties, they have been extensively used in developmental biology, regenerative medicine and cell therapies. Different from cancer cells or primary cells in regular drug risk assessments, stem cells can not only assess the basic toxicity, but also can be induced to various normal human organs or tissue cells due to their multi-directional differentiation characteristics, which can provide various data for pre-clinical drug assessments. Compared with animal models, hESCs-derived cell lines or organs are more powerful drug screening tools, having the advantages of high throughput and low cost, as well as overcoming the problem of species specificity. hESCs has a promising development prospect in the future. The research progress on hESCs in drug toxicity risk assessments is summarized in this paper, and provides a new idea for drug toxicity screening tests *in vitro*.

Key words: human embryonic stem cells (hESCs); cell cytotoxicity; embryonic development toxicity; organ toxicity

药物的研发和毒性风险评估是一个耗时长、难度大、费用高的过程,一直以来,缺乏经济、可靠、准确模拟人体生理状态的实验模型是药物研发过程中的障碍之一。传统的药物毒性风险评估通常是基

于实验动物模型来实现,而该方法往往存在实验周期长、成本高且潜在动物福利伦理等问题。事实上,除实验通量较低,动物实验由于存在物种间差异,在一些药物临床前评估出现了严重的偏差,无法准

收稿日期: 2019-09-01

基金项目: 国家自然科学基金青年科学基金资助项目(21707160); 国家自然科学基金面上资助项目(21577166、21876197)

作者简介: 杨仁君,博士,研究方向为干细胞毒理学。E-mail: rjyang_st@rcees.ac.cn

*通信作者 张杨,硕士,主管药师,研究方向为临床药学。E-mail: david19872005@163.com

确地预测和评价药物在人体的毒性,如由沙利度胺引起的著名的“海豹肢”胎儿事件。研究表明沙利度胺在人体内代谢可产生两种旋光异构体 $R(+)$ 与 $S(-)$,其中, $R(+)$ 发挥镇静催眠作用;而 $S(-)$ 发挥免疫抑制作用,同时与致畸密切相关;然而,由于大鼠体内缺乏将沙利度胺转化为有害异构体 $S(-)$ 的酶,因此在临床前沙利度胺的大鼠试验中未出现畸形胚胎。由于沙利度胺在动物体内与人体内的代谢动力学有着很大的差异,导致动物模型无法准确地预测和评价人体内的毒性^[1]。在研发过程中,由于药物潜在的毒性风险而导致的高淘汰率是最大的瓶颈之一,研究表明超过40%的新化学实体在临床试验的过程中由于无效或不可预见的毒性风险而被淘汰^[2]。因此,建立一个能够模拟正常人体生理水平的毒理学模型进而多角度、多维度评估药物的毒性风险效应具有重要的意义。

通常地,干细胞是一类具有自我更新能力并能一定条件下分化形成一种以上类型细胞的多潜能细胞^[3]。胚胎干细胞(ESCs)是从胚胎发育早期内细胞团(ICM)分离得到的一种未分化细胞,在离体情况下可无限地增殖传代并维持其未分化状态,同时也可以分化成各种各样的祖细胞,在不同条件的作用下又可进一步分化成许多具有特定功能的细胞系^[4]。1981年,Evans和Kaufman分离并建立了小鼠胚胎干细胞体外培养体系,推动了胚胎干细胞的迅速发展^[5]。1998年Thomson等^[6]成功分离出人胚胎干细胞(hESCs)并在体外成功建立了稳定的细胞系,为人胚胎干细胞技术的发展奠定了良好的基础。hESCs具有向多种胚层细胞分化的特点,可自我更新及多向分化为各种类型的人体细胞,包括心肌细胞、神经细胞、肝细胞等,同时结合组织工程技术还可进一步培养成人体特定的器官或组织。Krug等^[7]利用hESCs诱导分化了可模拟神经系统发育的模型,该模型可在体外模拟细胞增殖、迁移、凋亡、分化、神经突生长、突触发生、髓鞘形成及神经递质合成等神经系统发育的整个生物学过程。同时,借助3D细胞培养技术,可定向诱导hESCs分化成心肌细胞、肝细胞、神经管组织等不同类型的细胞或组织,并重建体内细胞间、细胞基质间的相互作用,进而缩小细胞水平与体内水平的差异,更好模拟体内环境^[8-10]。hESCs不仅重现了胚胎细胞发育过程的全部生物信息,还能反映人类疾病的发生、发展过程,因此可用来预测药物对人体的靶

器官毒性及作用机制,在药物研发过程中具有非常广阔的应用前景^[11]。2008年欧盟替代药物研究中心发布了基于hESCs的毒理学模型,阐述了该模型在解决药物筛选过程中的安全性和假阳性问题上具有明显优势^[12]。近年来,将hESCs应用于药物研发及毒性风险评估已成为行业内的研究热点,也促进了该技术的发展,如欧洲委员会FP7综合工程分项提出的“基于胚胎干细胞新法替代测试策略”等。目前,相对于传统的动物实验模型,基于hESCs的毒理学模型能比较真实地反映药物在人体内的毒性发生发展过程,避免种属差异,减少研发费用,缩短研发周期,是更加安全、经济、高通量的药物筛选模型。因此,本文将从细胞基础毒性、胚胎发育毒性和器官毒性3个层次来介绍hESCs在药物毒性风险评估中的研究进展。

1 在细胞基础毒性评估中的应用

利用体外细胞实验对药物的基础毒性进行初步评估是毒理研究中较为普遍的实验方法。与其他细胞相比,hESCs具有明显的生物学特点:首先hESCs具有自我复制及无限增殖的能力;其次hESCs具有稳定的遗传功能,在分化过程中能保持原有生理特性和结构特点;再次hESCs具有多能性,在适宜的诱导条件下,可分化为机体的任一细胞类型,形成多种组织器官^[13-15]。基于其生物学特点,hESCs可以在毒性测试中直观反映药物与胚胎细胞之间的作用,快速评估药物对细胞增殖和分化过程的影响,进而评估其靶向性。如抗肿瘤药物氟尿嘧啶在以hESCs为模型的基础毒性测试中显示出能够抑制多能性因子Oct4和Nanog的表达,同时还能影响hESCs分化过程中不同组织的标志信号表达,如氟尿嘧啶显著影响与神经元、骨骼肌、脂肪分化相关的HDAC9、与间充质干细胞向软骨细胞分化相关的DLK1、与炎症和心脏发育相关的NFE2L3等^[16],这为全面、系统评估该药物的毒性风险提供了重要的理论基础。目前使用hESCs评估基础细胞毒性,主要包括细胞存活率、增殖能力、多向分化、定向分化能力等方面;利用hESCs评估药物基础毒性的相关研究,将有助于评价药物的急性毒性风险,并有助于理解药物如何影响多能干细胞的谱系命运决定过程。

2 在胚胎发育毒性评估中的应用

由于hESCs能在细胞水平重现胚胎的发育过程,并且在拟胚体的分化过程中,早期胚胎发育的标志基

因、各组织的特异性基因也按一定顺序先后表达,能很好地重演体内胚胎发育的基因表达图式^[17]。因此,hESCs 分化过程涵盖了整个早期胚胎阶段到最终分化为特定功能细胞的全过程,研究药物对 hESCs 分化全过程的影响,可用来揭示哪些药物可能干扰胎儿发育和引起出生缺陷,能更直观地说明药物是否具有胚胎毒性与发育毒性,同时,也为药物胚胎发育毒性评估提供了一个很有价值的体外模型。hESCs 模型的建立无需大量的怀孕动物,且细胞来源丰富,对药物的敏感性也高于成体组织,研究药物的胚胎毒性更方便、快捷。基于此,20 世纪 90 年代末欧洲替代方法研究中心(ECVAM)推荐 ESCs 模型为体外胚胎发育毒性筛选试验的替代方法,可通过检测药物对 ESCs 生长分化的影响及已分化成纤维细胞活力的影响来预测药物的胚胎毒性或致畸性,该模型是目前唯一利用细胞系而无需怀孕动物的胚胎发育毒性体外替代模型^[18]。Meganathan 等^[19]将 hESCs 暴露于不同浓度的沙利度胺中,利用全基因组表达谱及蛋白质图谱技术发现,与神经发育相关的 p21 蛋白活化激酶 2、血小板活化因子乙酰水合酶 1b 催化亚单位 2 (PAFAH1B2) 和 PAFAH1B3 等蛋白表达上调;与胚胎、心脏和四肢发育相关的转录因子及生物学过程的基因组和蛋白质组表达水平均有差异,同时发现沙利度胺能阻止谷胱甘肽 S 转移酶的基因表达,从而在细胞内水平揭示了沙利度胺的胚胎发育毒性机制。

3 在器官毒性评估中的应用

hESCs 通过定向分化诱导,可形成多种不同的组织细胞,通过组织工程技术可进一步实现体外构建三维类器官结构,如脑、肝脏、心脏等^[20-22]。研究表明 hESCs 诱导获得的细胞在基因表达、细胞外基质分泌以及细胞的功能活动等方面与体内器官非常类似,利用 hESCs 诱导分化产生的体细胞,在特定时间阶段可构建出较为接近真实生理水平的组织器官^[23-24]。使用 hESCs 获得多种不同组织的类器官模型,更有助于全面、真实地评估药物在人体的毒性数据。

3.1 在心脏毒性评估中的应用

心脏毒性是药物研发和安全性评价的重要一环。药物心脏毒性的临床表现主要包括心律失常、心肌梗死、心肌炎、心肌病、心肌缺血性毒性和瓣膜毒性等^[25]。近年来,多种药物因出现了在动物试验中并未被发现的心脏毒性而被撤市,如西沙必

利、氟哌利多和罗非昔布等。目前,常用的药物心脏毒性体外评价模型均存在无法准确模拟人体生理反应的缺点,如原代心肌细胞、类心肌细胞系通常难以表现正常生理状态心肌细胞环境中的复杂通路相互作用。因此,在药物研发的早期使用能准确模拟人类心脏生理特征的模型去评估药物的心脏安全性,可减小药物研发的风险,提高药物安全性。近年来,随着干细胞研究的不断深入,hESCs 诱导分化的心肌细胞(hESC-CMs)成为药物心脏毒性体外评价研究的新热点。2001 年,Kehat 等^[26]首次将 hESCs 诱导分化为心肌细胞,hESC-CMs 的形态结构、基因表达及电生理特性与正常人心肌细胞极为相似,是一种非常理想的心脏毒性体外评价模型,从此开启了 hESC-CMs 在药物心脏毒性研究领域的新篇章。Jonsson 等^[27]通过膜片钳技术证实了 hESC-CMs 的电生理特性,该模型对药物所致心率失常的预测能力可以取代兔浦肯野纤维束模型。另有研究表明与犬的浦肯野纤维束相比,hESC-CMs 具有稳定性更高、实验周期更短和药物作用效果更直接等优势^[28]。将 hESC-CMs 与膜片钳、微电极阵列等实验技术相结合,可通过检测心肌细胞暴露药物后的收缩频率、动作电位时程、节律、兴奋性、复极化和传导性的变化等来评价药物的心脏毒性。2013 年,Himmel^[29]利用实时细胞分析技术检测了药物 E4031、多非利特、喷他脒和维拉帕米对 hESCs 分化的心肌细胞收缩性的作用,通过分析心肌细胞的收缩幅度、搏动频率和节律的变化评价了药物的心脏毒性。

心肌损伤标志物,如心肌肌钙蛋白 T (cTnT) 和心脏型脂肪酸结合蛋白 (HFABP)^[30],在基于 hESC-CMs 的毒理学研究中受到越来越多的关注。cTnT 是评价药物心脏毒性和心肌损害的关键生物标志物,当心肌损伤时,心肌细胞通透性增加、cTnT 从心肌纤维上降解等因素会引起血清 cTnT 增高,因此,cTnT 在血清的浓度水平可反映心肌损伤的情况,是心肌损伤的特异性标志^[31]。HFABP 是一种小相对分子质量的水溶性蛋白,能通过快速扩散的方式进入血液,心肌损伤后 90 min 即可检测到,释放量在 6 h 达到峰值,36 h 回归正常水平;由于在心肌梗死早期高浓度释放,HFABP 可作为评价药物心脏毒性更加敏感的生物标志物^[32]。因此,通过测定药物暴露后 hESC-CMs 的 cTnT 和 HFABP 的释放量来评价药物的心脏毒性是一种新颖的方法。研究表明,将多柔比星暴露于 hESC-CMs 24 h 后,使

用免疫细胞化学技术和表面等离子体共振的方法测得 HFABP 和 cTnT 的释放量均明显增加^[30],证实多柔比星存在较为明显的心脏毒性。

3.2 在肝毒性评估中的应用

肝脏是药物在人体内代谢的主要器官,同时也是药物毒性反应的重要靶器官。随着各种药物在临床的广泛应用以及联合用药的增多,药物性肝损伤(DILI)已成为临床治疗中常见的不良反应,也是药物频繁撤市的主要原因之一。在过去数年中,已有不少药物因 DILI 而被从市场上撤回,如溴芬酸、乙溴替丁、曲格列酮、曲伐沙星等^[33]。与此同时,中药引发的肝毒性问题也受到越来越多的关注,临床上报道的引起 DILI 的中药有雷公藤、何首乌、五倍子、黄药子、麻黄等^[34]。通常情况下,药物或其活性代谢物主要通过氧化应激、破坏细胞内稳态、抑制线粒体功能等机制对肝细胞产生直接损伤作用而引发 DILI;然而,药物引起的肝细胞功能障碍和死亡也可激活天然免疫细胞或适应性免疫细胞,进而诱导肝实质细胞的损伤,产生炎症和毒性介质,影响肝脏修复和再生能力,最终导致肝损伤^[35-36]。虽然部分 DILI 在以动物为模型的临床前研究中可以被观察到,但一些药物的肝毒性只有在上市后经过长时间的使用后才被发现,且没有明显的剂量相关性。因此,建立肝脏体外毒性评价模型对于药物肝毒性的评估具有重要的意义。然而,由于成熟的原代肝细胞获取困难,很难建立长期培养体系,而且体外培养的肝细胞增殖能力很快消失,肝细胞功能也迅速下降,严重限制了原代肝细胞在毒性研究中的应用^[37]。而 hESCs 诱导分化的肝细胞具有良好的自我增殖和复制能力,且能有效避免动物实验的种属差异,为在体外评估药物的肝毒性奠定了重要的基础。研究表明与体外培养的原代肝细胞相比,hESCs 诱导分化的肝细胞在新陈代谢能力、代谢酶表达以及等离子体转运蛋白水平等方面均相似^[38]。DILI 与药物经 CYP3A 酶家族代谢密切相关。研究显示 hESCs 诱导分化的肝细胞在体外培养 48 h 后,CYP3A 酶的活性与原代培养肝细胞的 CYP3A 酶活性相似。所不同的是,hESCs 诱导分化肝细胞的 CYP3A 酶活性可稳定至少 1 周,而原代培养肝细胞的 CYP3A 酶活性在 48 h 后开始降低^[39]。胺碘酮、苯溴马隆、海恩酮、酮康唑、奈法唑酮、己烯雌酚、嘌呤霉素、辛伐他汀和曲格列酮在 hESCs 诱导分化的肝细胞模型中表现出较强的毒性效应,特别是苯

溴马隆对 hESCs 分化获得的肝细胞毒性显著高于对原代肝细胞的毒性^[40]。由此可见,hESCs 诱导分化的肝细胞模型具备了在体外进行长期毒性评估的潜力。

3.3 在神经毒性评估中的应用

神经系统发育成熟具有高度的时间性和区域性特点,需要一个相当长的时期,在这一时期内,神经系统对具有神经毒性的药物高度敏感,任何外部因素对神经系统发育过程的干扰都可能造成永久性的损伤^[41]。因此,一个能真实模拟体内神经发育过程的实验模型是开展相关研究的重要基石。目前,hESCs 聚集形成拟胚体后,可在生长因子诱导、维 A 酸诱导、PA6 基质细胞诱导和直接分化法等条件下被诱导分化成神经前体细胞、神经元和胶质细胞等多种神经细胞^[20]。hESCs 用于体外评估药物的神经发育毒性已备受关注。Colleoni 等^[42]将 hESCs 暴露于不同剂量的维 A 酸后证实了该模型可用于测试药物的神经发育毒性,该研究将 Rosettes 形成作为形态学参数,同时结合分子参数作为检测指标来测试早期神经发育毒性;结果表明神经花结的形成形态与维 A 酸暴露的浓度有明显的相关性,且与之相关的诱导基因表达变化与体内的神经管发育也非常相似。Zimmer 等^[43]用 hESCs 分化出神经脊细胞,该模型能够成功模拟出人神经脊细胞的迁移过程,并且对神经发育毒性的检测显示出良好的敏感性和特异性。

单层细胞培养法具有操作简便、细胞稳定性高、数据重现性好等优势,是目前体外细胞实验最常使用的方法。然而,单层细胞培养所反映的生理生化特性与体内正常组织细胞仍存在一定的差别。只有构建出在体外能模拟人体体内生理学条件的实验模型,才能更准确地预测和评估药物在人体的毒副作用。Schwartz 等^[44]最先建立了“人脑模型”的类器官,通过采用标准化培养技术,诱导人胚胎干细胞分化为神经前体细胞、内皮细胞、间充质干细胞和小胶质、巨噬细胞前体,然后将上述细胞在人工水凝胶条件下相结合,以模拟发育中大脑内的细胞相互作用;在此培养条件下,神经前体自组装形成三维神经结构,该结构具有不同的神经元和胶质细胞群、相互连接的血管网络以及小胶质细胞。人脑类器官的成功建立为药物毒性评估中最为复杂的神经毒性研究开辟了崭新的思路。在此基础上,Zhu 等^[45]研究了乙醇对胎儿大脑发育的影响,以 hESCs 衍生的脑类器官为模型,研究者发现乙醇可导致妊娠期

谷氨酰胺能神经元过度分化,使得兴奋性和抑制性神经元失衡,这也是酒精综合症发病时出现神经功能障碍的根本原因;进一步研究还发现,GSX2、RSPO2和Hippo等通路在乙醇的毒性发生过程中均起到了重要作用,这为后续寻找乙醇的解毒方法提供了重要的思路。

4 结语

近年来,国内外科研人员逐渐认识到hESCs在药物毒性风险评估中广阔的应用前景。hESCs的无限增殖性、分化多能性和人源性,为药物的毒性风险评估提供了丰富的资源。与传统的动物实验模式相比,利用hESCs或其衍生的组织、器官评估药物的毒性具有多方面的优点,在免除使用实验动物的同时也避免了种属差异,更能反映人体的真实状况,具有更高的准确率和敏感性;此外,细胞实验周期短、用药量少,减少了药物评价中的人力物力,降低了药物研发过程中的成本。但同时,仍有一些瓶颈亟需克服,如在诱导hESCs分化成为不同组织细胞过程中,如何确保分化效率,如何更为精准地控制干细胞分化过程,仍然需要进一步深入研究。不难看出,随着hESCs技术的不断进步与完善,以hESCs来筛选和评估药物的毒性将是不可避免的趋势,在未来的发展具有广阔的前景。

参考文献

- [1] Botting J. The history of thalidomide [J]. *Drug News Perspect*, 2002, 15(9): 604-611.
- [2] The bitterest pill [J]. *Nature*, 2006, 444(7119): 532-533.
- [3] Wilson E S, Newell-Litwa K. Stem cell models of human synapse development and degeneration [J]. *Mol Biol Cell*, 2018, 29(24): 2913-2921.
- [4] Zhang B, Krawetz R, Rancourt D E. Would the real human embryonic stem cell please stand up? [J]. *Bioessays*, 2013, 35(7): 632-638.
- [5] Evans M J, Kaufman M H. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos [J]. *Nature*, 1981, 292(5819): 154-156.
- [6] Thomson J A, Itskovitz-Eldor J, Shapiro S S, et al. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts [J]. *Science*, 1998, 282(5391): 1145-1147.
- [7] Krug A K, Kolde R, Gaspar J A, et al. Human embryonic stem cell-derived test systems for developmental neurotoxicity: a transcriptomics approach [J]. *Arch Toxicol*, 2013, 87(1): 123-143.
- [8] Zhang D, Shadrin I Y, Lam J, et al. Tissue-engineered cardiac patch for advanced functional maturation of

human ESC-derived cardiomyocytes [J]. *Biomaterials*, 2013, 34(23): 5813-5820.

- [9] Muguruma K, Nishiyama A, Kawakami H, et al. Self-organization of polarized cerebellar tissue in 3D culture of human pluripotent stem cells [J]. *Cell Rep*, 2015, 10(4): 537-550.
- [10] Koehler K R, Mikosz A M, Molosh A I, et al. Generation of inner ear sensory epithelia from pluripotent stem cells in 3D culture [J]. *Nature*, 2013, 500(7461): 217-221.
- [11] Agrawal M, Alexander A, Khan J, et al. Recent biomedical applications on stem cell therapy: a brief overview [J]. *Curr Stem Cell Res Ther*, 2019, 14(2): 127-136.
- [12] Adler S, Pellizzer C, Hareng L, et al. First steps in establishing a developmental toxicity test method based on human embryonic stem cells [J]. *Toxicol In Vitro*, 2008, 22(1): 200-211.
- [13] Shroff G, Dhanda Titus J, Shroff R. A review of the emerging potential therapy for neurological disorders: human embryonic stem cell therapy [J]. *Am J Stem Cells*, 2017, 6(1): 1-12.
- [14] Gearhart J. New potential for human embryonic stem cells [J]. *Science*, 1998, 282(5391): 1061-1062.
- [15] VanOudenhove J J, Grandy R A, Ghule P N, et al. Unique regulatory mechanisms for the human embryonic stem cell cycle [J]. *J Cell Physiol*, 2017, 232(6): 1254-1257.
- [16] Jung E M, Choi Y U, Kang H S, et al. Evaluation of developmental toxicity using undifferentiated human embryonic stem cells [J]. *J Appl Toxicol*, 2015, 35(2): 205-218.
- [17] Spielmann H. The way forward in reproductive/developmental toxicity testing [J]. *Altern Lab Anim*, 2009, 37(6): 641-656.
- [18] Adler S, Basketter D, Creton S, et al. Alternative (nonanimal) methods for cosmetics testing: current status and future prospects-2010 [J]. *Arch Toxicol*, 2011, 85(5): 367-485.
- [19] Meganathan K, Jagtap S, Wagh V, et al. Identification of thalidomide-specific transcriptomics and proteomics signatures during differentiation of human embryonic stem cells [J]. *PLoS One*, 2012, 7(8): e44228.
- [20] Sandström J, Eggermann E, Charvet I, et al. Development and characterization of a human embryonic stem cell-derived 3D neural tissue model for neurotoxicity testing [J]. *Toxicol In Vitro*, 2017, 38: 124-135.
- [21] Kim J H, Jang Y J, An S Y, et al. Enhanced metabolizing activity of human ES cell-derived hepatocytes using a 3D culture system with repeated exposures to xenobiotics [J]. *Toxicol Sci*, 2015, 147(1): 190-206.
- [22] Lee M O, Jung K B, Jo S J, et al. Modelling cardiac fibrosis using three-dimensional cardiac microtissues

- derived from human embryonic stem cells [J]. *J Biol Eng*, 2019, 13: 15.
- [23] Haycock J W. 3D cell culture: a review of current approaches and techniques [J]. *Methods Mol Biol*, 2011, 695: 1-15.
- [24] Lancaster M A, Knoblich J A. Organogenesis in a dish: modeling development and disease using organoid technologies [J]. *Science*, 2014, 345(6194): 1247125.
- [25] Stummann T C, Beilmann M, Duker G, *et al*. Report and recommendations of the workshop of the European centre for the validation of alternative methods for drug-induced cardiotoxicity [J]. *Cardiovasc Toxicol*, 2009, 9(3): 107-125.
- [26] Kehat I, Kenyagin-Karsenti D, Snir M, *et al*. Human embryonic stem cells can differentiate into myocytes with structural and functional properties of cardiomyocytes [J]. *J Clin Invest*, 2001, 108(3): 407-414.
- [27] Jonsson M K, Duker G, Tropp C, *et al*. Quantified proarrhythmic potential of selected human embryonic stem cell-derived cardiomyocytes [J]. *Stem Cell Res*, 2010, 4(3): 189-200.
- [28] Peng S, Lacerda A E, Kirsch G E, *et al*. The action potential and comparative pharmacology of stem cell-derived human cardiomyocytes [J]. *J Pharmacol Toxicol Methods*, 2010, 61(3): 277-286.
- [29] Himmel H M. Drug-induced functional cardiotoxicity screening in stem cell-derived human and mouse cardiomyocytes: effects of reference compounds [J]. *J Pharmacol Toxicol Methods*, 2013, 68(1): 97-111.
- [30] Andersson H, Steel D, Asp J, *et al*. Assaying cardiac biomarkers for toxicity testing using biosensing and cardiomyocytes derived from human embryonic stem cells [J]. *J Biotechnol*, 2010, 150(1): 175-181.
- [31] 李 华, 马 璟, 陈长勋. 心肌损伤生物标志物在毒理学实验中的应用进展 [J]. *中国新药杂志*, 2011, 20(15): 1392-1395.
- [32] O'Donoghue M, de Lemos J A, Morrow D A, *et al*. Prognostic utility of heart-type fatty acid binding protein in patients with acute coronary syndromes [J]. *Circulation*, 2006, 114(6): 550-557.
- [33] Hoofnagle J H, Björnsson E S. Drug-induced liver injury-types and phenotypes [J]. *N Engl J Med*, 2019, 381(3): 264-273.
- [34] Calitz C, du Plessis L, Gouws C, *et al*. Herbal hepatotoxicity: current status, examples, and challenges [J]. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*, 2015, 11(10): 1551-1565.
- [35] Garc á-Cort és M, Ortega-Alonso A, Lucena M I, *et al*. Drug-induced liver injury: a safety review [J]. *Expert Opin Drug Saf*, 2018, 17(8): 795-804.
- [36] Navarro V J, Senior J R. Drug-related hepatotoxicity [J]. *New Engl J Med*, 2006, 354(7): 731-739.
- [37] Wang J, Sun M, Liu W, *et al*. Stem cell-based therapies for liver diseases: an overview and update [J]. *Tissue Eng Regen Med*, 2019, 16(2): 107-118.
- [38] Yoshie S, Ito J, Shirasawa S, *et al*. Establishment of novel detection system for embryonic stem cell derived hepatocyte-like cells based on nongenetic manipulation with indocyanine green [J]. *Tissue Eng Part C Methods*, 2012, 18(1): 12-20.
- [39] Ulvestad M, Nordell P, Asplund A, *et al*. Drug metabolizing enzyme and transporter protein profiles of hepatocytes derived from human embryonic and induced pluripotent stem cells [J]. *Biochem Pharmacol*, 2013, 86(5): 691-702.
- [40] Szkolnicka D, Farnworth S L, Lucendo-Villarin B, *et al*. Accurate prediction of drug-induced liver injury using stem cell-derived populations [J]. *Stem Cells Transl Med*, 2014, 3(2): 141-148.
- [41] Feutz A C, De Geyter C. Accuracy, discriminative properties and reliability of a human ESC-based in vitro toxicity assay to distinguish teratogens responsible for neural tube defects [J]. *Arch Toxicol*, 2019, doi: 10.1007/s00204-019-02512-8.
- [42] Colleoni S, Galli C, Gaspar J A, *et al*. Development of aneural teratogenicity test based on human embryonic stem cells: response to retinoic acid exposure [J]. *Toxicol Sci*, 2011, 124(2): 370-377.
- [43] Zimmer B, Lee G, Balmer N V, *et al*. Evaluation of developmental toxicants and signaling pathways in a functional test based on the migration of human neural crest cells [J]. *Environ Health Perspect*, 2012, 120(8): 1116-1122.
- [44] Schwartz M P, Hou Z, Propson N E, *et al*. Human pluripotent stem cell-derived neural constructs for predicting neural toxicity [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2015, 112 (40): 12516-12521.
- [45] Zhu Y, Wang L, Yin F, *et al*. Probing impaired neurogenesis in human brain organoids exposed to alcohol [J]. *Integr Biol (Camb)*, 2017, 9(12): 968-978.