

【综述】

人多能干细胞在药物发育毒性评价中的研究进展

陈然然, 宋殿荣*

天津中医药大学第二附属医院 妇科, 天津 300150

摘要: 发育毒性是毒理学研究中最具挑战性的领域之一, 传统的发育毒性评价方法均存在实验成本高、周期长、技术复杂等弊端。人多能干细胞(hPSC)包括人胚胎干细胞(hESC)和诱导多能干细胞(iPSC), 具有分化多能性和无限增殖的潜力。近年来hPSC在发育毒性评价方面的研究逐渐增多, 主要从hPSCs培养中代谢小分子的变化、hPSCs的定向分化、拟胚体的形态结构和转录组学变化、3D器官培养等方面综述了基于hPSC的药物发育毒性评价的最新研究进展, 进而为今后药物发育毒性的研究提供参考。

关键词: 人多能干细胞; 发育毒性; 人胚胎干细胞; 毒性评价

中图分类号: R965.3 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-6376(2022)01-0156-06

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2022.01.019

Research of human pluripotent stem cells in developmental toxicity

CHEN Ranran, SONG Dianrong

The Second Affiliated Hospital of Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300150, China

Abstract: Developmental toxicity is one of the most challenging fields in toxicology. The traditional developmental toxicity evaluation methods have the disadvantages of high cost, long cycle and complex technology. Human pluripotent stem cells (hPSCs), including human embryonic stem cells (hESCs) and induced pluripotent stem cells (iPSC), have the potential of pluripotent differentiation and unlimited proliferation. In recent years, there are more researches on hPSCs in developmental toxicity evaluation. This paper mainly reviews the latest research progress of hPSCs based developmental toxicity evaluation from the aspects of the changes of small metabolic molecules in hPSCs culture, the induced differentiation of hPSCs, the morphological structure and transcriptome changes of embryoid, and 3D organ culture, then provides reference methods for the study of drug developmental toxicity.

Key words: human pluripotent stem cells; developmental toxicity; human embryonic stem cells; toxicity evaluation

全球每年约有800万名先天缺陷的婴儿出生, 其中具有明确原因的只占30%^[1]。在美国, 10%~15%的先天畸形由不恰当的药物、感染或其他干扰正常胚胎发育的因素所致^[2]。美国食品药品监督管理局(FDA)根据药物对胚胎的致畸潜能将其分为5类(即A、B、C、D和X), 然而, 由于对致畸原的鉴定和评估仍然存在困难, 使目前高达80%已批准的处方药对妊娠的影响未知, 其中约40%被归为C类(未确定风险), 另外40%未进行分类^[3]。

传统的发育毒性评价方法主要包括大鼠全胚胎培养(whole embryo culture, WEC)、肢芽微团试验(embryo micromass cultures, MM)和小鼠胚胎干细胞试验(mouse embryonic stem cell test, mEST), 以上方法不仅实验成本高、周期长、技术复杂, 而且存在种属差异^[4]。因此, 建立和发展符合人类特征的体外模型无疑是发育毒性评价的新领域和新方向。近年, 以细胞为基础的分析方法不断地被开发和优化。人多能干细胞(hPSC)包括取自胚胎内

收稿日期: 2021-10-09

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(82074275)

第一作者: 陈然然(1990—), 女, 医师, 博士研究生, 研究方向为妊娠期用药安全性及妇科肿瘤。Tel: 13920315917

E-mail: chenranran657@126.com

*通信作者: 宋殿荣, 主任医师, 博士生导师, 研究方向为妇科疾病诊治。E-mail: songdr58@126.com

细胞团的胚胎干细胞(hESC)和通过体细胞诱导去分化而来的诱导多能干细胞(iPSC),hPSC具有自我更新和分化为任何组织器官的潜能,该特点使其在胚胎分化、器官再生和药物毒理研究方面受到极大的关注^[5]。采用hPSCs研究药物对人类胚胎的发育毒性,不仅可以有效避免种属差异,结合现代研究方法和计算机技术还可以使研究结果更精确、更可靠^[6]。笔者综述了基于hPSCs评价药物发育毒性最新的研究进展,并对其应用现状及局限性进行讨论,从而为未来药物发育毒性的研究提供参考方法与研究思路。

1 基于hPSCs培养的发育毒性评价体系

hPSCs具有无限增殖和分化成几乎人体所有细胞类型的特性。在不同的发育阶段,其代谢特点和代谢产物各不相同。通过观察加入特定药物后培养基中代谢小分子的变化,了解细胞的增殖和分化情况,可以判断该药物对人类胚胎发育早期可能的影响。此外,通过特定方法将hPSCs诱导分化为某一胚层细胞或心肌细胞、神经细胞等成体组织细胞,观察药物作用后相应指标的变化,可有效判断药物对该细胞系或组织器官的影响,确定药物的胚胎毒性。

1.1 代谢小分子的检测

代谢和相关的表观遗传重塑在维持人hPSCs的干性和调节分化中起着至关重要的作用。代谢组学是研究细胞内全部小分子或代谢物的科学,是分析代谢变化的一种准确、灵敏、可重复的工具。该方法不仅应用于寻找多种疾病的生物标记分子,近年来也越来越多地引入到药物发育毒性的筛查中。

Bhute等^[7]研究发现hESC向中胚层和外胚层分化时有明显的代谢变化,并确定了调控hESC分化的代谢途径。例如,二十烷酸途径抑制多能性的维持,而脂肪酸和酰基肉碱等氧化代谢底物可以促进神经发生和心脏发生。2007年,Cezar等^[8]首先将代谢组学方法引入发育毒性试验中,证明丙戊酸作为一种神经发育毒性物质可以改变hESC的分泌组情况,影响色氨酸和谷氨酸代谢等过程。随后,他将hESC暴露于丙戊酸,通过使用非靶向代谢组学方法分析了分泌组变化,确定了8种与受试物致畸性相关的小分子代谢物(二甲基精氨酸、天冬氨酸、精氨酸、谷氨酸、 γ -氨基丁酸、苹果酸、琥珀酸、异亮氨酸),并由此建立了一个发育毒性筛查模型,该模型对药物和环境毒物筛查的准确性分别为88%(7/8)和73%(8/11)^[9]。Palmer等^[10]发现,与传

统采用的检测细胞存活率相比,暴露3 d后hESC培养基中鸟氨酸/半胱氨酸(O/C)比率降低12%可以更好地预测受试物的发育毒性。尽管这种方法的准确性只有77%,但在维甲酸类似物发育毒性的评估中,O/C比值变化有重要的作用。Paul等^[11]在hESC中加入已知发育毒性的药物,并于加药前后通过液相色谱-质谱联用(LC-MS)测量给药后小分子代谢物丰度的变化,结果发现药物的致畸性与精氨酸与不对称二甲基精氨酸含量之比变化大于10%之间存在相关性,研究者进一步采用随机森林算法将26种已知发育毒性的药物作为训练集,通过计算各原始因素对预测结果准确性的影响,选择最重要的18种因素做为模型判定的质量特征,建立了基于hESC代谢物小分子的胚胎发育毒性评价模型,经检测其准确性为92%。

在胚胎发育过程中特定系统的毒性方面,代谢组学也得到了深入的研究。Palmer等^[12]采用不同剂量的乙醇处理hESC来源的拟胚体、神经祖细胞和神经元,采用电喷雾离子源高分辨串联飞行时间质谱仪(ESI-Q-TOFMS)对培养基进行代谢物定量,以确定乙醇诱导神经发育毒性的代谢变化。结果显示乙醇处理对拟胚体、神经前体和神经元代谢产物丰度有显著影响,并确定了5'-甲硫腺苷、左旋甲状腺素、色氨酸代谢物、L-胞嘧啶和吡啶乙醛是发育早期酒精毒性的潜在生物标志物。

以上研究突出了代谢变化对致畸原的作用具有良好的敏感性,也说明检测hPSCs及分化产物代谢改变在药物毒理学筛选中有着巨大的潜力。

1.2 hPSC的定向分化

通过向培养基中加入某些成分或对细胞采用特殊的处理,将hPSC进行定向诱导分化,有助于研究药物对不同发育阶段或发育组织的致畸作用。

1项研究在hESC培养过程中,于0、24 h两个时间点向培养基中加入40 ng·mL⁻¹活化素(activin)A和0.2 ng·mL⁻¹的Wnt3a,使中胚层分化时间较自发分化缩短了1/3,随后将分化好的细胞作为模型对已知发育毒性的71种药物和15种环境毒物进行检测,通过测量转录因子SOX17在中胚层细胞中的表达来评价化合物的发育毒性,结果发现该模型的准确率分别为94%和87%^[13]。Xing等^[14]将hPSC接种于圆形基质凝胶岛(直径1 mm)上,并用诱导因子处理以促进中胚层分化,以该系统为模型,根据不同剂量受试物对细胞发育相关特征(如集体细胞迁移和空间中胚层谱系分化)的影响,可以将已知致畸

原(如沙利度胺)和非致畸原(如D-青霉胺)进行正确分类。

Marikawa 等^[15]将人胚胎干细胞聚集体(HESCA)诱导为轴旁中胚层和神经外胚层,利用该模型研究了15种胚胎发育调节基因在18种已知发育毒性的化合物作用后形态和转录水平的变化,结果显示,94%的致畸原暴露组的转录水平发生了显著变化,92%的非致畸暴露组的转录水平没有变化,表明将HESCA模型用于药物致畸性评价具有很高的预测价值。Sarma 等^[16]将hESC诱导分化为神经细胞,不同的组别分别于分化的第0、9、35天加入2,3,7,8-四氯二苯并二恶英(TCDD),采用RT-qPCR和免疫组化技术检测神经元标记物微管相关蛋白2(MAP2)和甲状腺素羟化酶(TH)的表达水平,发现虽然早期神经元细胞对TCDD有较强的抵抗力,但在拟胚体期(第9天暴露组)经短暂暴露后,神经元花环数目、mRNA表达水平及MAP2和TH阳性细胞数目均显著增加。相反,TCDD对hESC(第0天暴露组)和分化神经细胞(第35天暴露组)的暴露完全没有影响。

2 基于hPSCs源性拟胚体的发育毒性评价体系

拟胚体是由胚胎干细胞自发分化形成的包括3个胚层(外胚层、中胚层和内胚层)的三维(3D)聚集体,概括了早期胚胎发生过程中形态及分子变化特点。最常用的检测发育毒性的方法是将发育中的拟胚体暴露于受试物中14 d,然后用转录组学或免疫化学方法评估拟胚体的分化情况。

2.1 拟胚体的形态结构变化

许多常见的出生缺陷不仅表现为细胞增殖或分化受损,胚胎组织的形态亦发生明显变化,如神经管缺陷、心脏间隔缺陷、胃裂和唇腭裂等。因此,hPSCs试验中应加入形态变化相关的指标,以全面评估药物的致畸作用。Yuan 等^[17]在评价3种着色剂(诱惑红、亮蓝和柠檬黄)和3种防腐剂(丁基羟基茴香醚、偏亚硫酸氢盐和尼泊金甲酯)的发育毒性实验中,采用了拟胚体的体积和伸长变形指数作为评价指标,发现诱惑红和亮蓝在最低毒性浓度为600 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,尼泊金甲酯、丁基羟基茴香醚、偏亚硫酸钾在最低浓度分别为200、400、1 000 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时会对拟胚体的体积或伸长变形指数造成明显影响。

Flamier 等^[18]将每个时间点拟胚体的圆度系数作为药物致畸作用的评价终点,发现弱致畸剂咖啡因可以造成拟胚体形状的细微变化。Kang 等^[19]发

现拟胚体大小的变化可以反映受试物浓度和毒性强度的差异,在他的研究中弱发育毒性药物阿司匹林可以使拟胚体大小略为下降,中度发育毒性药物消炎痛和地塞米松则使拟胚体显著减小,除此之外,经发育毒性药物处理后的拟胚体大小不均匀、形态萎缩,表明拟胚体横截面积(拟胚体大小)可以作为一种敏感而直观的指标用于受试物发育毒性的评价。

2.2 转录组学改变

在胚胎发育的每一阶段,都有成千上万的基因表达发生变化,基于转录组学可以更全面地检测在特定时间段表达的mRNA数量和种类。因此,为了提高实验的准确性和可靠性,转录组学越来越多地被用于致畸实验和发育毒性的评价。

Marikawa 等^[15]研究发现在hESC分化为拟胚体的第3天,许多参与胚轴形成和形态发生的基因(如ALDH1A2、FGF8、HOXB9、MEOX1和WNT5A)表达上调,这与细胞聚集体发生明显的形态改变的时间一致。部分基因在不同的化合物作用下呈现为单向变化,如ALDH1A2(降低)、EYA1(降低)、FOXC2(降低)、HOXB7(升高)、HOXB9(升高)、PAX3(降低)和UNCX(降低),另外一些基因在不同浓度的药物作用下表现为双向改变,如FGF8、MEOX1、MESP2、NEUROG2、OLIG3、PAX6、TCF15和WNT5A,其中OLIG3在2~4 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 氟尿嘧啶的作用下表达降低,而在1~16 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 沙利度胺的作用下表达上调。毋姗姗等^[20]采用特异性神经诱导因子将iPSCs形成的拟胚体诱导分化出神经玫瑰花状结构,形成大脑皮质类器官。而米非司酮可导致拟胚体发育迟缓,体积减小,并影响拟胚体向三胚层的正常发育,提示米非司酮具有明显的胚胎毒性,iPSCs作为药物发育毒性的判定模型有较高的应用价值。路璐等^[21]在hESC分化为拟胚体的培养基中加入不同浓度的反式维甲酸,待其自然分化20 d后,检测细胞中Nkx2.5、 α -MHC、ACTC1和TNNT2基因的表达,发现0.3 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 及其以上浓度反式维甲酸显著抑制hESC向心肌细胞分化。反式维甲酸对hESC α -MHC、TNNT2和ACTC1的半数抑制分化浓度(ID₅₀)分别为0.16、0.07、0.05 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$,提示ACTC1和TNNT2可能更适合作为hESC分化抑制的评价的指标。

UKK和UKN1为两种常用的基于转录组学方法检测受试物发育毒性的体外模型,UKK主要用于胚胎早期整体发育毒性的检测,即将一定浓度的药

物加入到hESC分化为拟胚体的培养基中,在分化的第14天提取拟胚体的总RNA,采用微阵列的方法检测用药组与对照基因的差异性表达(基因表达量增加或降低2倍以上,且差异存在统计学意义为变化显著),初步评价药物的发育毒性。UKN1主要用于胚胎神经毒性的检测。通过将甲基汞应用于UKK进行验证发现,当甲基汞的浓度为 $1\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时会引起276个基因差异性表达,当甲基汞浓度为 $0.25\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时会引起31个基因差异性表达^[22]。

3 基于微观技术的发育毒性评价体系

胚胎在发生过程中经历了剧烈的形态学和分子学变化,伴随着形态梯度、细胞-细胞和细胞-基质相互作用以及生物力学等多种生物因素的精密调控,干细胞增殖、分化和细胞迁移等时空模式得以高效有序地进行。尽管体外hESC培养和拟胚体分化在一定程度上具备了胚胎发育过程中的某些特性,但还无法完全模拟胚胎发育的过程。为了建立一个真正有生理意义的体外模型,重塑包括生物化学分子和生物机械作用在内的最接近在体状态的细胞微环境是必要的。微图形、微孔和微流控系统等技术可以在细胞、多细胞甚至亚细胞水平上对细胞进行精确控制。结合微观技术的高通量特性,使实现高效的致畸原筛选和全面的致畸毒性评估成为可能^[23]。

微细加工技术是模拟、控制和复制复杂、动态的体外干细胞微环境或干细胞龛的高效方法,可进一步提高人们对细胞分化和胚胎发生的认识。许多方法已经被用来产生干细胞培养模式,包括微接触印刷、微孔板和直接细胞打印。这些不同的方法可能在干细胞功能方面产生相似但不同的结果。微接触印刷通常涉及使用软光刻技术在微米尺度($1\sim 500\text{ }\mu\text{m}$)上制造聚二甲基硅氧烷(PDMS)、聚乙二醇(PEG)或聚丙交酯-乙交酯(PLGA)基底结构的印记,分辨率约为 $1\text{ }\mu\text{m}$ 。印记的弹性性质允许蛋白质印刷和成型,从而模拟细胞微环境的重要特点(即细胞-细胞和细胞-基质间相互作用、细胞群落大小和群落之间的距离)。微孔板使细胞-基质的黏附性最小化。当细胞被限制在1个狭窄的空间内时,它们相互黏附并形成1个细胞团,因此,微孔技术是控制拟胚体大小、调节干细胞更新和分化的有效途径。最后,越来越流行的直接细胞打印技术则是将细胞放置在二维(2D)表面上或以预定的模式放置到3D水凝胶中,自下而上逐层“打印”,层层叠加形成3D多细胞/凝胶体系。该方法允许研究多细

胞相互作用和细胞-蛋白质相互作用,这可以更好地模拟胚胎发育的复杂性。与其他2种方法相比,直接细胞打印效率较低,因此在胚胎发生研究和药物筛选方面没有得到广泛应用^[24-26]。

目前微观技术开始致力于重现特定胚胎发育阶段,如原条的形成和胚层的分化等,以进一步探索致畸原对hPSCs的影响。Warmflash等^[27]将hESC培养在一种含有骨形态蛋白-4(BMP4)的圆形(直径 $1\text{ }000\text{ }\mu\text{m}$)基质上,细胞可以自发形成不同胚层和类似滋养层的细胞层。Morgani等^[28]采用相同的圆形微图案产生了区域化的细胞特性,该研究将ESC培养于圆形岛(直径 $1\text{ }000\text{ }\mu\text{m}$)上,通过补充各种信号因子(例如,纤维细胞生长因子、激活素A、BMP4和Wnt3a)来诱导不同的细胞分化和发育(例如上胚层、下胚层、原条、内皮层,胚胎外中胚层和胚内中胚层),进而促进了原肠胚的形成。以上2个平台在微尺度上同时模拟了数个发育阶段和不同区域,都有潜力通过一个强大的定量系统来研究致畸原对hPSCs的影响。

4 基于3D器官培养技术的发育毒性评价体系

2D和各种微观技术的应用使人们初步建立了评估化合物毒性的分析方法,然而,这些系统往往不能准确反映体内的情况。近来,3D细胞培养模型在毒理学、疾病建模和药物发现中的使用日益增多,多项研究发现,3D体外模型比单细胞培养更接近在体器官发育过程和分子变化机制。

Schwartz等^[29]将PEG水凝胶平台与定时添加细胞(即定时添加不同类型神经发育相关的细胞)相结合,最初该系统由PEG水凝胶和神经前体细胞组成,培养至第9天时加入血管细胞,第13天时加入小胶质细胞和巨噬细胞前体,以此模拟神经组织中血管和小胶质细胞的发育,在为时47 d的培养过程中,该系统自发进行形态发育和结构变化,最终形成与体内神经发育相似的3D结构。之后研究者用34种有神经发育毒性和26种无神经发育毒性的药物对构建的240个神经3D结构进行测试,结合RNA测序数据,建立了完整的神经发育毒性评价模型^[30]。在体外心脏模型方面,Hudson等^[31]利用光刻和聚二甲基硅氧烷(PDMS)技术将从hPSCs中提取的心肌细胞置于两个弹性柱之间,缩短成长度约为 1 mm 的类心脏器官,通过评估心肌细胞收缩力和特定分子免疫染色(例如MLC2v、Ki-67和 α -肌动蛋白标记)可以用于心脏毒性的高通量筛选。利用该模型,研究者发现棕榈酸盐可以促进代谢、基因转录

和细胞周期成熟,进而促进类心脏器官的成熟。此外,肾发育异常在出生缺陷中也广泛存在,Morizane等^[32]提出了将hPSCs定向分化为肾单位祖细胞(NPCs)的高效便捷的方案,首先将hPSCs培养于2D培养基上,第9天时转为3D培养,使其产生具有肾单位样结构组织,培养至21 d时在该组织中已很难检测到NPC标记物,表明细胞已完全分化,类肾组织发育成熟,该培养过程很好地模拟了后肾在体内的发育过程。随后,研究者通过加入Notch信号抑制剂(DAPT)($10\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)和常见肾毒性药物庆大霉素($5\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$)检验类肾脏模型对毒性受试物的反应,发现以上毒物均可以导致近端小管的损伤。最近,Manuela等^[33]通过将小鼠和人PSCs分化为视网膜细胞,有效模拟了视网膜的体外发生,该模型在评价与眼部缺陷有关的致畸原方面有重要的潜力。

近年采用体外器官培养来评价发育毒性逐渐兴起,我们相信在未来的发展中将会有更多高性能的体外器官被建立,对模型进行标准化,确保评价结果的准确性和可靠性是实现高通量筛选药物发育毒性必不可少的步骤。

5 结语

我国hESC胚胎发育毒性研究仍处于起步阶段,评价时间点、评价指标及评价方法各不相同,尚需大量研究探索。胚胎发育是一个高度复杂的过程,没有一种体外试验可以完全重现,也没有一种检测方法能够100%准确地检测出发育毒性物质。近年来,人类体外模型的研究取得了一些进展,这些模型可以在不同阶段描述胚胎的发育过程。hESC培养、拟胚体培养和微观技术等发育毒性评价方法逐渐发展并完善,利用这些方法人们初步建立了体外药物发育毒性评价体系。然而,这些模型通常只能模拟早期胚胎的发生,一些严重的器官、系统畸形往往发生在原肠胚之后的器官分化时期,因此近期的研究重点又转移到了器官培养上来。虽然目前器官培养在发育毒性筛选方面的应用上还十分有限,但模拟神经系统、肾脏、心脏和视网膜发育过程的进展表明,实现该技术广泛应用并不遥远。此外,人类胚胎培养技术的进步和人工胚胎的出现,为建立更加准确的胚胎发育模型提供了新方向,但其中涉及的伦理问题不容忽视。

因此,深入了解人类胚胎早期发育机制,寻找合适的发育毒性模型,进一步完善药物发育毒性判定方法,成为当下最大的难点,也是提高妊娠期使

用药物安全性,降低胎儿畸形和新生儿死亡率的重点。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Luz A L, Tokar E J. Pluripotent stem cells in developmental toxicity testing: A review of methodological advances [J]. *Toxicol Sci*, 2018, 165(1): 31-39.
- [2] Benjamin S H, Katherine C B, Hanna R K, et al. Risk factors for birth defects [J]. *Obstetr Gynecol Surv*, 2017, 72(2): 123-135.
- [3] Worley K E, Rico-Varela J, Ho D, et al. Teratogen screening with human pluripotent stem cells [J]. *Integr Biol*, 2018, 10(9): 491-501.
- [4] Elke G, Horst S, Gabriele S, et al. The ECVAM international validation study on *in vitro* embryotoxicity tests: Results of the definitive phase and evaluation of prediction models [J]. *Altern Lab Anim*, 2002, 30(2): 151-176.
- [5] Shinya Y. Pluripotent stem cell-based cell therapy-promise and challenges [J]. *Cell Stem Cell*, 2020, 27(4): 523-531.
- [6] Konala V B R, Nandakumar S, Surendran H, et al. Neuronal and cardiac toxicity of pharmacological compounds identified through transcriptomic analysis of human pluripotent stem cell-derived embryoid bodies [J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2021, 9: 115792.
- [7] Bhute V J, Bao X, Palecek S P. Advances in applications of metabolomics in pluripotent stem cell research [J]. *Curr Opin Chem Eng*, 2017, 15: 36-43.
- [8] Cezar G G, Quam J A, Smith A M, et al. Identification of small molecules from human embryonic stem cells using metabolomics [J]. *Stem Cell Develop*, 2007, 16(6): 869-882.
- [9] Jessica A P, Alan M S, Laura A E, et al. Establishment and assessment of a new human embryonic stem cell-based biomarker assay for developmental toxicity screening [J]. *Birth Def Res Part B, Develop Reprod Toxicol*, 2013, 98(4): 343-363.
- [10] Palmer J A, Smith A M, Egnash L A, et al. A human induced pluripotent stem cell-based *in vitro* assay predicts developmental toxicity through a retinoic acid receptor-mediated pathway for a series of related retinoid analogues [J]. *Reprod Toxicol*, 2017, 73: 350-361.
- [11] Paul R W, April M W, Alan M S, et al. Predicting human developmental toxicity of pharmaceuticals using human embryonic stem cells and metabolomics [J]. *Toxicol Appl*

- Pharmacol, 2010, 247(1): 18-27.
- [12] Palmer J A, Poenitzsch A M, Smith S M, et al. Metabolic biomarkers of prenatal alcohol exposure in human embryonic stem cell-derived neural lineages [J]. Alcohol Clin Exp Res, 2012, 36(8): 1314-1324.
- [13] Rico-Varela J, Ho D, Wan L Q. *In vitro* microscale models for embryogenesis [J]. Adv Biosyst, 2018, 2(6): 1-12.
- [14] Xing J W, Toh Y C, Xu S Y, et al. A method for human teratogen detection by geometrically confined cell differentiation and migration [J]. Sci Rep, 2015, 5 (10038): 1-13.
- [15] Marikawa Y, Hong-Ru C, Mark M, et al. Exposure-based assessment of chemical teratogenicity using morphogenetic aggregates of human embryonic stem cells [J]. Reprod Toxicol, 2020, 91: 74-91.
- [16] Sarma S N, Nagano R, Ohsako S. Tyroxine hydroxylase-positive neuronal cell population is increased by temporal dioxin exposure at early stage of differentiation from human embryonic stem cells [J]. Int J Mol Sci, 2019, 20 (11): 1-19.
- [17] Yuan C J, Marikawa Y. Developmental toxicity assessment of common excipients using a stem cell-based *in vitro* morphogenesis model [J]. Food Chem Toxicol, 2017, 109: 376-385.
- [18] Flamier A, Singh S, Rasmussen T P. A standardized human embryoid body platform for the detection and analysis of teratogens [J]. PLoS One, 2017, 12(2): e171101.
- [19] Kang H Y, Choi Y K, Na R J, et al. Advanced developmental toxicity test method based on embryoid body's area [J]. Reprod Toxicol, 2017, 72: 74-85.
- [20] 毋姗姗, 范文娟, 李瑞玲, 等. 利用诱导多能干细胞构建流产毒性药物的体外筛查模型 [J]. 药学报, 2021, 56 (2): 503-510.
- Wu S S, Fan W J, Li R L, et al. Construction of a drug screening model for miscarriage from induced pluripotent stem cells *in vitro* [J]. Acta Pharm Sin, 2021, 56(2): 503-510.
- [21] 路璐, 李盛林, 俞光岩, 等. 利用人胚胎干细胞评价反式维甲酸的胚胎发育毒性 [J]. 科学技术与工程, 2014, 14(24): 23-27.
- Lu L, Li S L, Yu G Y, et al. Evaluating developmental toxicity of retinoic acid via human embryonic stem cells [J]. Sci Technol Engin, 2014, 24(14): 23-27.
- [22] Vaibhav S, Stefanie K, Perumal S S, et al. Human pluripotent stem cell based developmental toxicity assays for chemical safety screening and systems biology data generation [J]. J Visua Exp, 2015, 6(100): 1-14.
- [23] Xing J, Cao Y, Yu Y, et al. *In vitro* micropatterned human pluripotent stem cell test (microP-hPST) for morphometric-based teratogen screening [J]. Sci Rep, 2017, 7(1): 8491.
- [24] Kristian K, Kam W L, Flemming B, et al. Guidance of stem cell fate on 2D patterned surfaces [J]. Biomaterials, 2012, 33(28): 6626-6633.
- [25] Manuel T. Micropatterning as a tool to decipher cell morphogenesis and functions [J]. J Cell Sci, 2010, 123: 4201-4213.
- [26] Ramila J, Pradip S T, James C B, et al. Microprinted stem cell niches reveal compounding effect of colony size on stromal cells-mediated neural differentiation [J]. Adv Healthcare Mater, 2018, 7(5): 1-21.
- [27] Warmflash A, Sorre B, Etoc F, et al. A method to recapitulate early embryonic spatial patterning in human embryonic stem cells [J]. Nat Method, 2014, 11(8): 847-854.
- [28] Morgani S M, Metzger J J, Jennifer N, et al. Micropattern differentiation of mouse pluripotent stem cells recapitulates embryo regionalized cell fate patterning [J]. Elife, 2018, 7: 1-35.
- [29] 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.
- [30] Christopher B, Matthew T S, Nicholas E P, et al. Uniform neural tissue models produced on synthetic hydrogels using standard culture techniques [J]. Exp Biol Med, 2017, 242(17): 1679-1689.
- [31] Hudson J, Mills R, D Titmarsh, et al. Functional screening in human cardiac organoids reveals a metabolic mechanism for cardiomyocyte cell cycle arrest [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2017, 114(40): E8372-E8381.
- [32] Morizane R, Albert Q L, Benjamin S F, et al. Nephron organoids derived from human pluripotent stem cells model kidney development and injury [J]. Nat Biotechnol, 2015, 33(11): 1193-1200.
- [33] Manuela V, Marlen Z, Maria R, et al. Retinal organoids from pluripotent stem cells efficiently recapitulate retinogenesis [J]. Stem Cell Report, 2016, 6(4): 525-538.

[责任编辑 李红珠]