

高内涵筛选技术联合多能性基因 *Oct4*、*Sox2* 和 *Nanog* 检测建立药物胚胎毒性快速筛查方法

鲁 娣, 宋殿荣*, 张 巍, 郭 洁, 王雅楠, 杜文欣

天津中医药大学第二附属医院 妇科, 天津 300150

摘要: **目的** 通过高内涵筛选技术评价测试药对 PA-1 细胞的增殖毒性, 并联合分化毒性的评价指标——多能性基因 (*Oct4*、*Sox2* 和 *Nanog*) 表达检测, 初步建立药物胚胎毒性快速筛查方法。 **方法** 选择维生素 C、青霉素 G、维生素 E 作为无胚胎毒性的阴性测试药, 甲氨蝶呤、5-氟尿嘧啶、环磷酰胺作为具有胚胎毒性的阳性测试药。以测试药临床治疗剂量下的最大血药浓度 (C_{max}) 为基础设置加药浓度, 阴性测试药设置浓度梯度为: $1/2C_{max}$ 、 C_{max} 、 $2C_{max}$ 、 $3C_{max}$ 、 $4C_{max}$; 阳性测试药设置浓度梯度为: $1/8C_{max}$ 、 $1/4C_{max}$ 、 $1/2C_{max}$ 、 C_{max} 、 $2C_{max}$ 。测试药物在维持培养液 (培养液加入 1×10^6 U·L⁻¹ 的白血病抑制因子) 中作用于 PA-1 细胞 24 h 后, 基于高内涵筛选技术, 应用 DAPI、Calcein-AM、PI 共染 PA-1 细胞, 通过共聚焦成像检测荧光强度, 计算细胞存活率; 测试药物在分化培养液 (不加入白血病抑制因子) 中作用于 PA-1 细胞 24 h 后, 实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 技术检测多能性基因 *Oct4*、*Sox2* 和 *Nanog* 的表达变化。 **结果** DAPI、Calcein-AM、PI 3 者共染可以很好地区分活细胞及死细胞; 阴性测试药维生素 C、维生素 E、青霉素 G 对 PA-1 细胞的增殖能力均无影响; 与对照组比较, 阳性测试药 5-氟尿嘧啶、甲氨蝶呤 $1/4C_{max}$ 及以上浓度引起 PA-1 细胞存活率显著下降 ($P < 0.05$); 环磷酰胺 $1/8C_{max}$ 及以上浓度引起 PA-1 细胞存活率显著下降 ($P < 0.05$)。阴性测试药维生素 C、维生素 E、青霉素 G 对 PA-1 细胞多能性基因 *Sox2*、*Oct4*、*Nanog* 的表达均无影响。与对照组比较, 阳性测试药 5-氟尿嘧啶 $1/8C_{max}$ 及以上浓度使 PA-1 细胞多能性基因 *Sox2*、*Oct4*、*Nanog* 的表达显著下降 ($P < 0.05$); 甲氨蝶呤 $1/8C_{max}$ 及以上浓度使 *Oct4*、*Nanog* 的表达显著增加 ($P < 0.05$), 但当浓度达到 $2C_{max}$ 时对 *Sox2* 的表达依然没有影响; 环磷酰胺 $1/8C_{max}$ 及以上浓度使 *Sox2*、*Oct4*、*Nanog* 的表达均显著增加 ($P < 0.05$)。 **结论** 高内涵筛选技术 (DAPI、Calcein-AM、PI 共染) 联合多能性基因的检测可初步建立药物胚胎毒性快速筛查方法。

关键词: 胚胎毒性; 高内涵; 多能性基因; 方法建立; 增殖毒性

中图分类号: R965.2 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376 (2022) 09-1786-09

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2022.09.012

Establishment of a rapid screening method for drug embryotoxicity by high content screening combined with detection of pluripotency genes *Oct4*, *Sox2* and *Nanog*

LU Di, SONG Dianrong, ZHANG Wei, GUO Jie, WANG Yanan, DU Wenxin

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

Abstract: Objective To evaluate the proliferative toxicity of test substance on PA-1 cells by high content screening technology, and to establish a rapid screening method for drug embryotoxicity by combining with pluripotency genes (*Oct4*, *Sox2* and *Nanog*) as evaluation indexes. **Methods** Vitamin C, penicillin G and vitamin E were selected as negative test drugs without embryotoxicity, and methotrexate, 5-fluorouracil and cyclophosphamide were selected as positive test drugs with embryotoxicity. The dosing concentration was set based on the maximum blood drug concentration (C_{max}) under the clinical therapeutic dose of the test drug, and the concentration gradient of the negative test drug was $1/2C_{max}$, C_{max} , $2C_{max}$, $3C_{max}$, $4C_{max}$. The concentration gradient of positive test drug was $1/8C_{max}$, $1/4C_{max}$, $1/2C_{max}$, C_{max} , $2C_{max}$. The test drug was incubated in the maintenance medium (the medium was added with

收稿日期: 2022-03-30

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81573740)

第一作者: 鲁 娣 (1989—), 女, 河北人, 博士, 住院医师, 从事妊娠期应用中药安全性研究。Tel: 18920389692 E-mail: 811438083@qq.com

*通信作者: 宋殿荣 Tel/Fax: (022)60637082 E-mail: songdr58@126.com

1×10^6 U·L⁻¹ leukemia inhibitory factor) in PA-1 cells for 24 h. Based on the high content screening technology, PA-1 cells were co stained with DAPI, Calcein-AM and PI. The fluorescence intensity was detected by confocal imaging and the cell survival rate was calculated. After the test drug incubated with PA-1 cells in differentiation culture medium (without leukemia inhibitory factor) for 24 h, the expression changes of pluripotent genes *Oct4*, *Sox2* and *Nanog* were detected by real-time fluorescent quantitative PCR (qRT-PCR). **Results** The CO staining of DAPI, Calcein-AM and PI can distinguish living cells from dead cells. Vitamin C, vitamin E and penicillin G had no effect on the proliferation of PA-1 cells. Compared with control group, the positive test drugs 5-fluorouracil, methotrexate of $1/4C_{max}$ and above concentrations significantly decreased the survival rate of PA-1 cells ($P < 0.05$). Cyclophosphamide of $1/8C_{max}$ and above significantly decreased the survival rate of PA-1 cells ($P < 0.05$). The negative test drugs vitamin C, vitamin E and penicillin G had no effect on the expression of pluripotency genes *Sox2*, *Oct4* and *Nanog* in PA-1 cells. Compared with control group, the positive test drug 5-fluorouracil of $1/8C_{max}$ and above significantly decreased the expression of pluripotent genes *Sox2*, *Oct4* and *Nanog* in PA-1 cells ($P < 0.05$). Methotrexate of $1/8C_{max}$ and above significantly increased the expression of *Oct4* and *Nanog* ($P < 0.05$), but when the concentration reached $2C_{max}$, it still had no effect on the expression of *Sox2*. Cyclophosphamide of $1/8C_{max}$ and above significantly increased the expression of *Sox2*, *Oct4* and *Nanog* ($P < 0.05$). **Conclusion** High content screening technology (DAPI, Calcein-AM, PI co-staining) combined with detection of pluripotent genes can establish a rapid screening system for drug embryotoxicity.

Key words: embryotoxicity; high content; pluripotent gene; method establishment; proliferative toxicity

美国1项调查^[1]显示出生缺陷的发病率为2%~4%,其中10%的出生缺陷来自环境暴露,包括药物滥用、感染、药物治疗、放射治疗、化学暴露等。2014年1项关于妊娠期女性用药的调查^[2]表明,在9 459例女性中有高达81.2%的女性存在妊娠期间服用药物的情况。而孕妇作为特殊群体不能纳入药物临床试验研究,这导致很多上市药物是否具有胚胎毒性是不明确的,因此,药物胚胎毒性的评价一直是药学研究领域的热点,研究者们一直致力于优化药物胚胎毒性筛查体系,如增加筛查通量、提高筛查准确性、简化筛查方法等,以求能快速准确地评价药物的胚胎毒性。本研究拟基于人卵巢畸胎瘤(PA-1)细胞,通过高内涵筛选方法联合多能性基因检测,初步建立药物胚胎毒性快速筛查方法。

1 材料

1.1 实验细胞

PA-1细胞,购于国家实验细胞资源中心。

1.2 药物与主要试剂

甲氨蝶呤(批号100138)、环磷酰胺(批号100234)、5-氟尿嘧啶(批号100187)、维生素C(批号100425)、维生素E(批号100062)、青霉素G(批号130437),质量分数均>98%,购于中国食品药品检定研究院;钙黄绿素-乙酰氧基/碘化丙啶双染试剂盒(Calcein-AM/PI,货号C542),购于东仁化学科技有限公司;4,6-联脒-2-苯基吡啶(DAPI,货号DAPI),购于美国Sigma公司;RNA提取试剂盒,购于天根生化科技(北京)有限公司;反转录试剂

盒(RR037A)、PCR试剂盒(RR820A),均购于日本TaKaRa公司;白血病抑制因子(LIF)、胎牛血清(FBS)、MEM培养基均购自美国Sigma公司。

1.3 主要仪器

高内涵成像分析仪(GE InCell Analyzer 2000, GE公司);PCR仪(7900,ABI公司);倒置相差显微镜(TS100, Nikon公司);CO₂恒温培养箱(FORMA3111, Thermo Fisher公司)。

2 方法

2.1 PA-1细胞的培养

将PA-1细胞培养于维持培养液(89% MEM+10% FBS+1%双抗培养液,加入 1×10^6 U·L⁻¹的LIF)中,待细胞生长至80%~90%汇合时传代,备用。

2.2 高内涵筛选方法的建立

2.2.1 荧光探针的溶解 将3种荧光探针DAPI、PI、Calcein-AM分别用磷酸缓冲液(PBS)溶解至10.0、2.0、4.5 μmol·L⁻¹;Calcein-AM与PI染色工作液按一定比例混合制备含2.0 μmol·L⁻¹ PI、4.5 μmol·L⁻¹ Calcein-AM的Calcein-AM/PI染色工作液。

2.2.2 活细胞、凋亡细胞、活/凋亡细胞混合悬液的制备 取生长状态良好的PA-1细胞,制备单细胞悬液,分别用PBS及75%酒精重悬,静置20 min,制备活细胞悬液、凋亡细胞悬液。将活细胞及凋亡细胞分别用PBS重悬后按1:1比例混合制备活/凋亡细胞混合悬液。

2.2.3 荧光标记、共聚焦成像及高内涵成像分析 活细胞悬液中加入100 μL Calcein-AM染色工作

液,凋亡细胞悬液中加入100 μL PI染色工作液,活/凋亡细胞混合悬液加入100 μL Calcein-AM/PI染色工作液,37 $^{\circ}\text{C}$ 避光静置20 min,每组3孔。

将染色后的细胞离心去除染色液后,分别用200 μL DAPI溶液重悬,室温避光静置5 min。PBS清洗2次后,接种于96孔板,分别上机进行共聚焦成像及高内涵成像分析。

DAPI和Calcein-AM/PI成像条件如下:10倍物镜,每孔取6个视野;DAPI激发波长377 nm,发射波长447 nm;Calcein-AM激发波长490 nm,发射波长515 nm;PI激发波长543 nm,发射波长593 nm。

2.3 PA-1细胞多能性基因 *Sox2*、*Oct4*、*Nanog* 的表达检测

在维持培养液的基础上去除 $1 \times 10^6 \text{ U} \cdot \text{L}^{-1}$ 的LIF,配制成分化培养液(89% MEM+10% FBS+1% 双抗)。

待PA-1细胞生长至80%~90%汇合时,消化、离心、加入分化培养液混匀后,调整细胞浓度至 $1 \times 10^7 \cdot \text{mL}^{-1}$,接种于“U”型96孔板进行悬滴培养,37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 、饱和湿度条件下培养24 h后通过实时荧光定量PCR(qRT-PCR)技术检测多能性基因*Sox2*、*Oct4*、*Nanog*的表达情况,操作步骤参照试剂盒说明书进行。引物序列如下:*Nanog*上游引物:5'-CAATGGTGTGACGCAGGGAT-3',下游引物:5'-TGCACCAGGTCTGAGTGTTTC-3';*Oct4*上游引物:5'-AACCCACACTGCAGCAGATCA-3',下游引物:5'-TCTCGTTGTGCATAGTCGCT-3';*Sox2*上游引物:5'-GGATAAGTACACGCTGCCCG-3',下游引物:5'-ATGTGCGCGTAACTGTCCAT-3'; β -actin上游引物:5'-CGCACCCTGGCCATTGTCAT-3',下游引物:5'-TTCTCCTGGATGTCACGCAC-3'。

2.4 测试药对PA-1细胞增殖及分化能力的影响

2.4.1 测试药物的选择 维生素C、青霉素G、维生素E在美国食品药品监督管理局(FDA)妊娠期用药分级中均为A级药物,在本实验中作为无胚胎毒性的阴性对照药。甲氨蝶呤、5-氟尿嘧啶、环磷酰胺在FDA妊娠期用药分级中均为X级药物,在本实验中作为具有胚胎毒性的阳性对照药。

2.4.2 测试药溶解及浓度的设置 甲氨蝶呤、维生素E用二甲基亚砜(DMSO)作为溶剂,维生素C、青霉素G、5-氟尿嘧啶、环磷酰胺均用超纯水作为溶剂。查阅相关文献获得阴性及阳性测试药临床治疗剂量下的最大血药浓度(C_{max})^[3-8],并以 C_{max} 为基础设置加药浓度,阴性测试药设置浓度梯度为:1/2 C_{max} 、 C_{max} 、

2 C_{max} 、3 C_{max} 、4 C_{max} ;阳性测试药设置浓度梯度为:1/8 C_{max} 、1/4 C_{max} 、1/2 C_{max} 、 C_{max} 、2 C_{max} 。具体浓度如下:维生素C:45、90、180、270、360 $\mu\text{mol} \cdot \text{mL}^{-1}$;青霉素G:67.30、134.60、269.20、403.80、538.4 $\mu\text{mol} \cdot \text{mL}^{-1}$;维生素E:22.20、44.39、88.78、133.17、177.56 $\mu\text{mol} \cdot \text{mL}^{-1}$;5-氟尿嘧啶:0.53、1.06、2.13、4.25、8.50 $\mu\text{mol} \cdot \text{mL}^{-1}$;甲氨蝶呤:0.03、0.05、0.10、0.20、0.40 $\mu\text{mol} \cdot \text{mL}^{-1}$;环磷酰胺:68.97、137.94、275.89、551.77、1103.54 $\mu\text{mol} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

2.4.3 测试药对PA-1细胞增殖能力的影响 取生长状态良好的PA-1细胞,稀释至 $100 \cdot \mu\text{L}^{-1}$,每孔100 μL 接种于96孔板中培养24 h后,加入提前配制好的相应浓度的测试药物,并设置空白对照(不接种细胞)组和对照(给予相应溶剂)组,每组3复孔,置37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 、饱和湿度条件下培养24 h。24 h后分别加入Calcein-AM/PI染色工作液200 μL ,室温避光静置5 min,后用PBS重悬后加入200 μL DAPI溶液,室温避光静置5 min。上机检测荧光强度,获得细胞存活率。

细胞存活率=Calcein-AM荧光强度/(Calcein-AM+PI)荧光强度

2.4.4 测试药对PA-1细胞多能性基因 *Sox2*、*Oct4*、*Nanog* 表达的影响 取生长状态良好的PA-1细胞,调整细胞浓度至 $1 \times 10^7 \cdot \text{mL}^{-1}$,接种至“U”型96孔板进行悬滴培养,每孔200 μL ,分化培养液诱导分化,培养24 h后加入相应浓度的阴性及阳性测试药,37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 、饱和湿度条件下培养24 h。24 h后提取各孔细胞的RNA,并通过qRT-PCR技术检测多能性基因的表达。

2.5 统计学方法

计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,运用SPSS 13.0中文软件包进行统计分析,两组间比较采用独立样本 t 检验、多组间比较采用单因素方差分析。

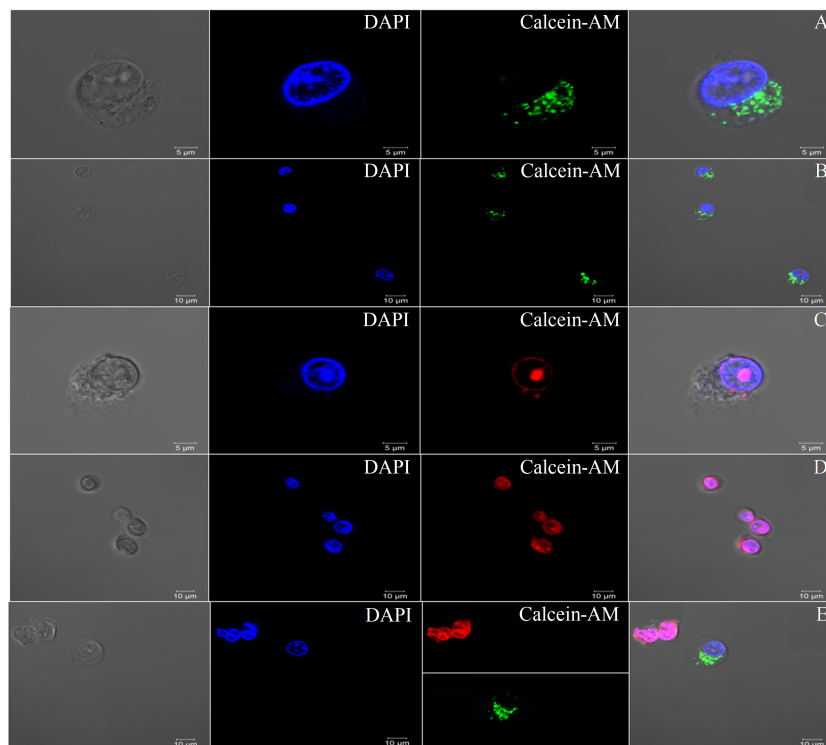
3 结果

3.1 DAPI和Calcein-AM/PI共聚焦成像

DAPI可与DNA双螺旋结构强力结合,用于标记细胞核,发出蓝色荧光;Calcein-AM标记活细胞,发出绿色荧光;PI标记凋亡细胞,发出红色荧光。实验结果提示,DAPI、Calcein-AM、PI共染可同时观察活细胞和凋亡细胞,见图1。

3.2 DAPI和Calcein-AM/PI高内涵成像

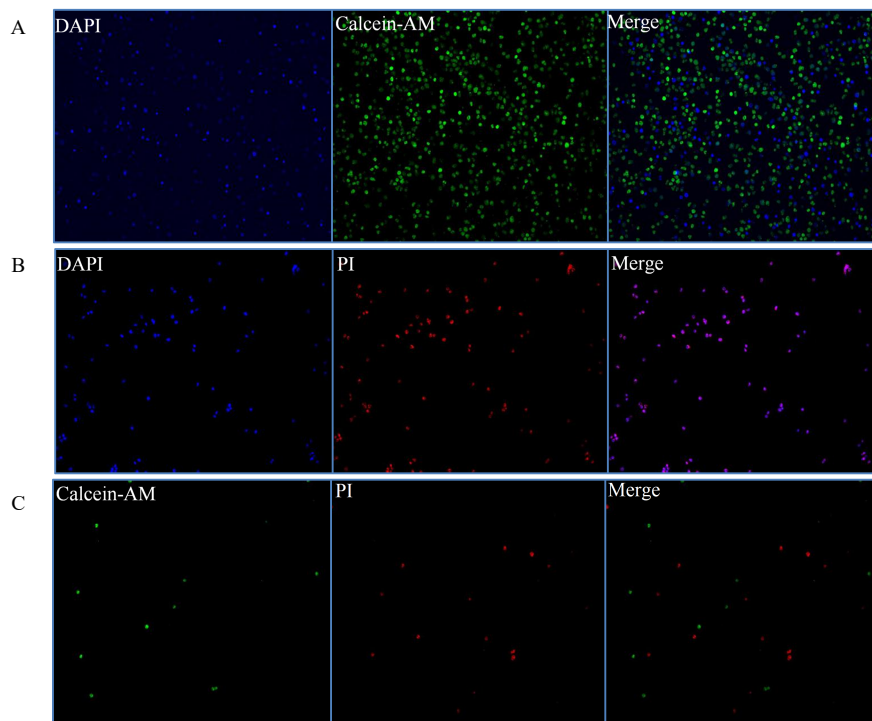
通过高内涵分析仪获得的图像(图2)可以看出,DAPI标记所有细胞核,呈蓝色;Calcein-AM标记活细胞,呈绿色;PI标记凋亡细胞,呈红色。提示高内涵分析仪可同时检测DAPI、Calcein-AM和PI进



A、B-DAPI 和 Calcein-AM 共染标记活细胞；C、D-DAPI 和 PI 共染标记凋亡细胞；E-DAPI 和 Calcein-AM/PI 共染同时标记活细胞及凋亡细胞；DAPI 标记细胞核呈蓝色；Calcein-AM 标记活细胞呈绿色；PI 标记凋亡细胞呈红色
A, B-DAPI and Calcein-AM labeled viable cells; C, D-DAPI and PI labeled apoptotic cells; E-DAPI and Calcein-AM/PI-labeling both viable and apoptotic cells; DAPI labeled nuclei in blue; Calcein-AM labeled viable cells in green; PI labeled apoptotic cells in red

图1 DAPI 和 Calcein-AM/PI 共聚焦显微镜图像

Fig. 1 DAPI and Calcein-AM / PI confocal microscopy images



A-DAPI 和 Calcein-AM 共染标记活细胞；B-DAPI 和 PI 共染标记凋亡细胞；C-DAPI 和 Calcein-AM/PI 共染同时标记活细胞及凋亡细胞；DAPI 标记细胞核呈蓝色；Calcein-AM 标记活细胞呈绿色；PI 标记凋亡细胞呈红色
A-DAPI and Calcein-AM labeled viable cells; B-DAPI and PI labeled apoptotic cells; C-DAPI and Calcein-AM/PI-labeling both viable and apoptotic cells; DAPI labeled nuclei in blue; Calcein-AM labeled viable cells in green; PI labeled apoptotic cells in red

图2 DAPI 和 Calcein-AM/PI 高内涵成像

Fig. 2 DAPI and Calcein-AM/PI high-connotation imaging

行成像分析,通过不同的染色情况区分活细胞及凋亡细胞,并可通过荧光强度获得细胞的存活率。

3.3 PA-1 细胞多能性基因 *Sox2*、*Oct4*、*Nanog* 的表达

PA-1 细胞在分化培养液诱导分化 24 h 后,多能性基因 *Sox2*、*Nanog*、*Oct4* 的表达明显下降(图 3),因此可将诱导分化 24 h 作为后续实验中测试药物干预 PA-1 细胞的时间节点。

3.4 测试药对 PA-1 细胞增殖能力的影响

阴性测试药维生素 C、维生素 E、青霉素 G 在 $1/2C_{\max}$ 、

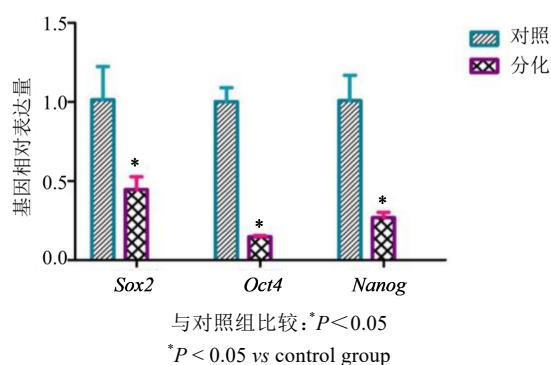


图 3 PA-1 细胞诱导分化 24 h 多能性基因表达情况
Fig. 3 Gene expression of pluripotency after induced differentiation in PA-1 cells

$C_{\max}$ 、 $2C_{\max}$ 、 $3C_{\max}$ 、 $4C_{\max}$ 浓度下对 PA-1 细胞的增殖能力均无影响。见表 1。

与对照组比较,阳性测试药 5-氟尿嘧啶、甲氨蝶呤 $1/4C_{\max}$ 及以上浓度引起 PA-1 细胞存活率显著下降($P < 0.05$);环磷酰胺 $1/8C_{\max}$ 及以上浓度引起 PA-1 细胞存活率显著下降($P < 0.05$)。见表 2。

3.5 测试药对 PA-1 细胞分化能力的影响

阴性测试药维生素 C、维生素 E、青霉素 G 在 $1/2C_{\max}$ 、 $C_{\max}$ 、 $2C_{\max}$ 、 $3C_{\max}$ 、 $4C_{\max}$ 浓度下对 PA-1 细胞多能性基因 *Sox2*、*Oct4*、*Nanog* 的表达均无影响。结果见表 3。

与对照组比较,阳性测试药 5-氟尿嘧啶 $1/8C_{\max}$ 及以上浓度使 PA-1 细胞多能性基因 *Sox2*、*Oct4*、*Nanog* 的表达显著下降($P < 0.05$);甲氨蝶呤 $1/8C_{\max}$ 及以上浓度使 *Oct4*、*Nanog* 的表达显著增加($P < 0.05$),但当浓度达到 $2C_{\max}$ 时对 *Sox2* 的表达依然没有影响;环磷酰胺 $1/8C_{\max}$ 及以上浓度使 *Sox2*、*Oct4*、*Nanog* 的表达均显著增加($P < 0.05$)。结果见表 4。

4 讨论

胚胎毒性是指妊娠期外来化合物对胚胎或胎儿造成的不良影响,如胚胎死亡、畸形、功能不全等。哺乳动物早期发育过程伴随着细胞的增殖、迁移以及细胞命运的层级特化。在细胞命运层级特

表 1 阴性测试药对 PA-1 细胞增殖能力的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 1 Effect of negative test drugs on proliferative capacity of PA-1 cells ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	剂量/ ($\mu\text{mol} \cdot \text{mL}^{-1}$)	存活率/%	组别	剂量/ ($\mu\text{mol} \cdot \text{mL}^{-1}$)	存活率/%	组别	剂量/ ($\mu\text{mol} \cdot \text{mL}^{-1}$)	存活率/%
对照	—	96.87 $\pm$ 2.31	对照	—	97.01 $\pm$ 2.43	对照	—	97.24 $\pm$ 2.66
维生素 C	45	96.82 $\pm$ 2.61	青霉素 G	67.30	96.73 $\pm$ 2.26	维生素 E	22.20	96.72 $\pm$ 1.93
	90	96.78 $\pm$ 2.58		134.60	97.06 $\pm$ 2.09		44.39	97.78 $\pm$ 2.73
	180	96.74 $\pm$ 2.59		269.20	97.07 $\pm$ 2.18		88.78	96.59 $\pm$ 2.10
	270	96.56 $\pm$ 2.60		403.80	96.84 $\pm$ 2.38		133.17	96.90 $\pm$ 2.41
	360	95.84 $\pm$ 1.77		538.40	97.30 $\pm$ 2.60		177.56	96.83 $\pm$ 1.74

表 2 阳性测试药对 PA-1 细胞增殖能力的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 2 Effects of positive test drugs on proliferative capacity of PA-1 cells ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	剂量/ ($\mu\text{mol} \cdot \text{mL}^{-1}$)	存活率/%	组别	剂量/ ($\mu\text{mol} \cdot \text{mL}^{-1}$)	存活率/%	组别	剂量/ ($\mu\text{mol} \cdot \text{mL}^{-1}$)	存活率/%
对照	—	97.66 $\pm$ 2.35	对照	—	97.99 $\pm$ 0.64	对照	—	97.54 $\pm$ 2.66
5-氟尿嘧啶	0.53	89.29 $\pm$ 2.56	甲氨蝶呤	0.03	93.99 $\pm$ 4.81	环磷酰胺	68.97	69.21 $\pm$ 3.91*
	1.06	63.53 $\pm$ 4.26*		0.05	67.41 $\pm$ 2.47*		137.94	52.09 $\pm$ 2.48*
	2.13	55.94 $\pm$ 2.48*		0.10	59.86 $\pm$ 1.44*		275.89	46.71 $\pm$ 4.39*
	4.25	46.34 $\pm$ 2.55*		0.20	52.53 $\pm$ 2.91*		551.77	35.99 $\pm$ 3.57*
	8.50	25.77 $\pm$ 1.59*		0.40	34.87 $\pm$ 1.96*		1 103.54	27.72 $\pm$ 1.16*

与对照组比较: * $P < 0.05$

* $P < 0.05$ vs control group

表3 阴性测试药对多能性基因表达的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)Table 3 Effects of negative test drugs on expression of pluripotency genes ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	剂量/ ($\mu\text{mol} \cdot \text{mL}^{-1}$)	Sox2/ $\beta\text{-actin}$	Oct4/ $\beta\text{-actin}$	Nanog/ $\beta\text{-actin}$
对照	—	1.01±0.20	1.01±0.18	1.01±0.16
维生素C	45	1.01±0.07	1.01±0.05	0.97±0.07
	90	1.02±0.15	1.02±0.06	1.05±0.27
	180	1.09±0.14	1.07±0.08	0.98±0.29
	270	1.04±0.06	1.03±0.04	1.00±0.32
	360	1.04±0.12	1.00±0.22	1.01±0.17
组别	剂量/ ($\mu\text{mol} \cdot \text{mL}^{-1}$)	Sox2/ $\beta\text{-actin}$	Oct4/ $\beta\text{-actin}$	Nanog/ $\beta\text{-actin}$
对照	—	1.01±0.20	1.01±0.18	1.01±0.16
青霉素G	67.30	1.04±0.23	1.01±0.13	1.01±0.24
	134.60	1.06±0.14	1.03±0.16	1.01±0.08
	269.20	1.01±0.24	1.01±0.16	1.01±0.22
	403.80	1.03±0.21	1.03±0.15	1.00±0.15
	538.40	1.02±0.14	1.01±0.15	1.00±0.10
组别	剂量/ ($\mu\text{mol} \cdot \text{mL}^{-1}$)	Sox2/ $\beta\text{-actin}$	Oct4/ $\beta\text{-actin}$	Nanog/ $\beta\text{-actin}$
对照	—	1.01±0.20	1.01±0.18	1.01±0.16
维生素E	22.20	1.01±0.14	1.01±0.24	1.02±0.18
	44.39	1.01±0.09	1.01±0.09	1.02±0.08
	88.78	0.99±0.18	1.02±0.16	1.02±0.09
	133.17	1.03±0.03	1.01±0.20	1.04±0.07
	177.56	1.03±0.11	1.03±0.24	1.01±0.22

化过程中,细胞通过多重调控机制协调多能性相关基因的维持及关闭和特定谱系关键基因的时空特异性表达,保证胚胎的正常生长发育。任何影响胚胎细胞增殖和(或)分化的因素均会造成胚胎的发育异常。妊娠期间使用的任何药物都可能对胎儿产生有害影响,缺乏评估妊娠期间药物治疗安全性所需的信息是一个严重的公共卫生问题,有调查显示大约2/3的孕妇在怀孕期间至少服用1种药物,超过60%的孕妇服用过处方药^[9-10],但是由于缺乏药物致畸风险的性质、程度等信息,医生向孕妇提供药物治疗的风险或安全性咨询时常常缺乏可靠的依据。

药物对胚胎干细胞增殖能力的影响是药物胚胎毒性评价中的重要部分。高内涵筛选技术最早在1977年被提出^[11],在考察测试药物对细胞增殖的影响时是基于单个细胞水平的,因此可以排除实验过程中各组细胞接种数量不一,分布不均等对实验结果的影响,也可以很好地排除细胞样品中杂质的

表4 阳性测试药对多能性基因表达的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)Table 4 Effects of positive test on pluripotency genes expression ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	剂量/ ($\mu\text{mol} \cdot \text{mL}^{-1}$)	Sox2/ $\beta\text{-actin}$	Oct4/ $\beta\text{-actin}$	Nanog/ $\beta\text{-actin}$
对照	—	1.01±0.20	1.01±0.18	1.01±0.16
5-氟尿嘧啶	0.53	0.83±0.09*	0.88±0.17*	0.84±0.08*
	1.06	0.81±0.26*	0.73±0.07*	0.61±0.10*
	2.13	0.65±0.08*	0.63±0.06*	0.61±0.04*
	4.25	0.46±0.09*	0.57±0.04*	0.51±0.07*
	8.50	0.25±0.04*	0.25±0.03*	0.32±0.06*
组别	剂量/ ($\mu\text{mol} \cdot \text{mL}^{-1}$)	Sox2/ $\beta\text{-actin}$	Oct4/ $\beta\text{-actin}$	Nanog/ $\beta\text{-actin}$
对照	—	1.01±0.20	1.01±0.18	1.01±0.16
甲氨蝶呤	0.03	1.01±0.27	1.59±0.47*	1.64±0.32*
	0.05	1.02±0.16	1.89±0.21*	1.72±0.50*
	0.10	1.09±0.15	3.08±0.79*	3.46±0.67*
	0.20	1.04±0.25	5.77±0.57*	5.01±1.43*
	0.40	1.04±0.07	8.02±1.30*	7.57±0.93*
组别	剂量/ ($\mu\text{mol} \cdot \text{mL}^{-1}$)	Sox2/ $\beta\text{-actin}$	Oct4/ $\beta\text{-actin}$	Nanog/ $\beta\text{-actin}$
对照	—	1.01±0.20	1.01±0.18	1.01±0.16
环磷酰胺	68.97	2.10±0.44*	2.09±0.47*	2.10±0.17*
	137.94	2.93±0.39*	2.88±0.33*	2.95±0.24*
	275.89	5.46±0.83*	5.79±0.17*	6.84±0.98*
	551.77	8.84±1.19*	7.33±1.43*	11.29±3.59*
	1103.54	12.93±2.40*	9.67±0.88*	13.48±3.08*

与对照组比较: * $P < 0.05$ * $P < 0.05$ vs control group

干扰,具有较高的敏感性和准确性,因此,该技术目前被广泛应用于细胞毒性的研究。

本研究首先选用DAPI对所有细胞核进行染色,以达到对孔板中所有细胞进行定位的目的,然后用Calcein-AM对活细胞的细胞质进行染色,PI对死细胞的细胞核进行染色,DAPI、Calcein-AM、PI共染PA-1区分活细胞、死细胞,降低数据分析的难度,提高实验准确性及敏感性。该研究实验结果表明DAPI、Calcein-AM、PI共染PA-1细胞可以很好地区分活细胞及死细胞。

本研究选择了3种阴性测试药(维生素C、维生素E、青霉素G)及3种阳性测试药(5-氟尿嘧啶、甲氨蝶呤、环磷酰胺)考察高内涵筛选技术评价测试物对PA-1细胞增殖毒性的准确性。

青霉素G、维生素C、维生素E在小鼠、大鼠和兔体内进行的生殖实验研究结果显示,3者均不影

响胚胎发育。从女性在妊娠期间应用青霉素G、维生素C、维生素E所积累的经验来看,未显示出对胚胎有任何有害的影响,因此3者在FDA妊娠期用药分级中均为A级药物,在本实验中作为阴性对照药。

甲氨蝶呤为叶酸类的同系物,具有抑制细胞二氢叶酸还原酶而减少细胞内叶酸含量的作用,临床主要用于治疗自身免疫性疾病和各种肿瘤。临床资料显示:早期妊娠(12周内)使用甲氨蝶呤对胎儿具有致畸作用,主要表现为头颅畸形,其次是骨骼、四肢、及中枢神经系统的畸形,并且甲氨蝶呤的致畸作用具有剂量相关性,使用大于 $10\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 的剂量会大大增加致畸风险^[12-13]。

环磷酰胺在肝脏内通过细胞色素P450微粒体系统转化为具有细胞毒性作用的环磷酰胺氮芥和丙烯醛,这2种代谢产物可和DNA结合而抑制DNA的合成,主要用于肿瘤的治疗。1964年首次报道环磷酰胺对人有致畸效应,随后的一系列动物试验也证实了环磷酰胺的致畸作用^[14],主要表现为颌面部畸形、趾(指)缺乏、冠状动脉缺乏等。谢明仁等^[15]对环磷酰胺对鼠胚胎脑及骨骼发育的毒性作用进行了综合性的研究,孕鼠于妊娠8d给予不同剂量环磷酰胺(5 、 10 、 15 、 $20\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$),每天1次,连续给药3d;环磷酰胺 $5\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 组胎仔体表、四肢形态、骨骼和脑形态未见明显变化; $10\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 组胎仔中脑导水管和左右脑室增宽,大脑半球、腰椎骨、肋骨、肢掌骨发育不全; $15\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 组胎仔侧脑室扩大、大脑皮层、颞叶、双侧被盖区及结合臂发育不全,枕骨缺如、脑膨出、椎骨裂开、肋骨骨化不全、四肢远端骨未骨化; $20\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 组未见成形胚胎,从而得出结论环磷酰胺对大鼠胚胎脑及骨骼发育有明显的毒性作用。

5-氟尿嘧啶属于嘧啶类的抗肿瘤药物,主要是通过干扰DNA和RNA的合成而发挥抗肿瘤作用。氟尿嘧啶对胎儿的致畸作用已在包括大鼠、小鼠、家兔等多种动物模型上得到证实。畸形主要表现为肢体发育异常、腭裂、小眼等^[16-18]。

因此甲氨蝶呤、环磷酰胺、5-氟尿嘧啶在FDA妊娠期用药分级中均为X级药物,在本实验中作为阳性对照药。

实验结果提示,DAPI、Calcein-AM、PI共染PA-1细胞进行高内涵筛选可以快速准确地评价测试药物对PA-1细胞的增殖毒性。

传统胚胎干细胞试验(EST)将胚胎干细

胞(ESC)分化为具有收缩能力的心肌细胞的数量作为评价测试物对ESC分化毒性的指标,不能全面地评估测试物对胚胎正常分化的影响,假阴性率高,且体外培养ESC向心肌细胞分化,技术要求高、耗时长,该方法不适用于高通量筛选中药的胚胎毒性,因此,需要寻找新的分化毒性评价指标。

研究已证实,干细胞多能性的维持是基于一个层次分明、相互连接的多能性基因调控网络(PGRN),PGRN的核心由3个转录因子组成,即*Oct4*、*Sox2*和*Nanog*。*Oct4*主要作为许多基因的转录因子特异性的表达于全能细胞中,*Oct4*缺失使内胚层扩张而中胚层发育受阻,导致无法形成正常的三胚层结构^[19-21]。*Sox2*对于内细胞团的形成同样重要,敲除*Sox2*,无法形成上胚层及外胚层,导致胚胎死亡^[22-24]。*Nanog*可以维持上胚层的发育,*Nanog*缺失将会导致内细胞团中仅存在下胚层,不能形成上胚层^[25-27]。*Oct4*、*Sox2*和*Nanog*3者通常相互作用,共同调控多能基因的表达,如*Sox2*常作为*Oct4*的转录伙伴,与*Oct4*形成转录复合物;*Nanog*需要在*Oct4*存在的前提下才能表达;*Nanog*缺失的胚胎中*Sox2*的表达明显降低。*Oct4*、*Sox2*和*Nanog*与其他多能性基因组成一个强大而复杂的转录调节网络,使得胚胎发育中的多能性细胞能够维持稳定的多能性状态。

胚胎细胞只有在多能性基因的调控下有序地增殖分化才能保证胚胎的正常发育,若这些基因的表达受到影响,其下游的组织器官分化必然受到影响。因此,本研究选择多能性基因*Oct4*、*Sox2*和*Nanog*作为评价测试物对胚胎分化毒性的评价指标,相当于选择了胚胎发育过程中的“总开关”“总阀门”,可以提高筛查准确性。本研究结果显示多能性基因*Sox2*、*Oct4*、*Nanog*在PA-1细胞诱导分化24h后表达量即明显下降,因此选择药物干预24h作为检测时间点,极大地缩短了筛查的时间。

阴性测试药(维生素C、维生素E、青霉素G)及阳性测试药(5-氟尿嘧啶、甲氨蝶呤、环磷酰胺)的验证实验结果提示无胚胎毒性药物对多能性基因*Sox2*、*Oct4*、*Nanog*的表达无影响。而具有胚胎毒性的药物则会使多能性基因*Sox2*、*Oct4*、*Nanog*的表达产生增加或者降低。*Sox2*、*Oct4*、*Nanog*作为维持干细胞多能性的PGRN中的3个核心转录因子,任何干扰其正常表达(表达增加或降低均为异常表达)的因素均会造成胚胎发育过程中下游靶器官的分化发育异常,进而导致胚胎发育异常。因此,该研

究结果证明多能性基因表达的变化可以作为评价药物分化毒性的观察指标,敏感性更高,且操作简单、技术要求低、检测周期短。

不断优化分化毒性评价的指标并与增殖毒性的评价相结合将是药物胚胎毒性研究领域取得重要进展的关键突破口。本研究中应用高内涵筛选技术评价测试物对PA-1细胞的增殖毒性,将多能性基因 *Sox2*、*Oct4*、*Nanog* 作为评价测试物对PA-1细胞分化毒性的评价指标,2者结合可同时考察测试物对PA-1细胞的增殖毒性及分化毒性,全面评价测试药物的胚胎毒性,将在一定程度上提高药物胚胎毒性筛查的效率及准确性。但是该研究中仍存在一定的局限性:①所选测试药物数量较少;②所选择的3个多能性基因 *Sox2*、*Oct4*、*Nanog* 对于测试药物的敏感性并不一致,如甲氨蝶呤在 $1/8C_{\max}$ 剂量下PA-1细胞多能性基因 *Oct4*、*Nanog* 的表达即明显增加,但在 $2C_{\max}$ 剂量下对 *Sox2* 的表达无影响,因此,需要进一步筛选敏感基因,增加测试药物数量,以优化筛查体系的敏感性及准确性。综上,本研究初步建立了药物胚胎毒性快速筛查方法,为药物胚胎毒性的筛查提供了新思路,但仍有待进一步优化和完善。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Harris B S, Bishop K C, Kemeny H R, et al. Risk factors for birth defects [J]. *Obstet Gynecol Surv*, 2017, 72(2): 123-135.
- [2] Lupattelli A, Spigset O, Twigg M J, et al. Medication use in pregnancy: A cross-sectional, multinational web-based study [J]. *BMJ Open*, 2014, 4(2): e004365.
- [3] Padayatty S J, Sun H, Wang Y H, et al. Vitamin C pharmacokinetics: Implications for oral and intravenous use [J]. *Ann Intern Med*, 2004, 140(7): 533-537.
- [4] Truven Health Analytics. Penicillin G Potassium (Injection) [EB/OL]. (2008-05-06) [2022-02-20] https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2008/050638s0121bl.pdf.
- [5] George S, Dreicer R, Au J J, et al. Phase I/II trial of 5-fluorouracil and a noncytotoxic dose level of suramin in patients with metastatic renal cell carcinoma [J]. *Clin Genitourin Cancer*, 2008, 6(2): 79-85.
- [6] Shoda H, Inokuma S, Yajima N, et al. Higher maximal serum concentration of methotrexate predicts the incidence of adverse reactions in Japanese rheumatoid arthritis patients [J]. *Mod Rheumatol*, 2007, 17(4): 311-316.
- [7] 刘 慧, 王本杰, 郭瑞臣. RP-HPLC 荧光法测定维生素E血浓度及药动学研究 [A]//山东省药学会第一届学术年会论文集(上) [C]. 济南: 山东省药学会, 2005: 78-84.
- [8] Liu H, Wang B J, Guo R C. Determination of serum Vitamin E concentration and pharmacokinetics by RP-HPLC [A]// *Proceedings of the First Academic Annual Conference of Shandong Pharmaceutical Association (I)* [C]. Jinan: Shandong Pharmaceutical Society, 2005: 78-84.
- [8] 陈 力, 熊筱娟, 高守红, 等. UHPLC-MS/MS 法测定大鼠血浆中环磷酰胺及其代谢物的浓度 [J]. *第二军医大学学报*, 2016, 37(9): 1063-1069.
- [9] Chen L, Xiong X J, Gao S H, et al. UHPLC-MS/MS in simultaneous determination of cyclophosphamide and its metabolites in rat plasma [J]. *Acad J Second Mil Med Univ*, 2016, 37(9): 1063-1069.
- [9] Mitchell A A, Gilboa S M, Werler M M, et al. Medication use during pregnancy, with particular focus on prescription drugs: 1976-2008 [J]. *Am J Obstet Gynecol*, 2011, 205(1): 51.e1-51.e8.
- [10] Gagne J J, Maio V, Berghella V, et al. Prescription drug use during pregnancy: A population-based study in Regione Emilia-Romagna, Italy [J]. *Eur J Clin Pharmacol*, 2008, 64(11): 1125-1132.
- [11] Lin S A, Schorpp K, Rothenaigner I, et al. Image-based high-content screening in drug discovery [J]. *Drug Discov Today*, 2020, 25(8): 1348-1361.
- [12] Perez C, Sutow W W, Wang Y M, et al. Evaluation of overall toxicity of high-dosage methotrexate regimens [J]. *Med Pediatr Oncol*, 1979, 6(3): 219-228.
- [13] Jordan R L, Wilson J G, Schumacher H J. Embryotoxicity of the folate antagonist methotrexate in rats and rabbits [J]. *Teratology*, 1977, 15(1): 73-79.
- [14] 英 永, 胡建廷, 王韶艳, 等. 动物体内致畸试验中常见阳性对照剂 [J]. *动物医学进展*, 2012, 33(2): 98-101.
- [15] Ying Y, Hu J T, Wang S Y, et al. Common positive control agents in teratogenicity tests in animals [J]. *Prog Vet Med*, 2012, 33(2): 98-101.
- [15] 谢明仁. 环磷酰胺对大鼠胚胎发育毒性作用的实验研究 [D]. 兰州: 西北师范大学, 2008.
- [16] Xie M R. Toxicity of cyclophosphamide on embryonic developmental of rats [D]. Lanzhou: Northwest Normal University, 2008.
- [16] Shah R M, MacKay R A. Teratological evaluation of 5-fluorouracil and 5-bromo-2-deoxyuridine on hamster fetuses [J]. *J Embryol Exp Morphol*, 1978, 43: 47-54.
- [17] Conti G, Aita M. On the effects of 5-fluorouracil injected into the chick embryo [J]. *Experientia*, 1965, 21(8): 479.

- [18] Hara H. Abnormalities of the *Triturus* embryo caused by 5-fluorouracil [J]. *Naturwissenschaften*, 1970, 57(3): 134-135.
- [19] Zhang Q, Han Z Z, Zhu Y B, et al. The role and specific mechanism of OCT4 in cancer stem cells: A review [J]. *Int J Stem Cells*, 2020, 13(3): 312-325.
- [20] Wang J W, Huang J J, Shi G. Retrotransposons in pluripotent stem cells [J]. *Cell Regen*, 2020, 9(1): 4.
- [21] Mulas C, Chia G, Jones K A, et al. Oct4 regulates the embryonic axis and coordinates exit from pluripotency and germ layer specification in the mouse embryo [J]. *Development*, 2018, 145(12): dev159103.
- [22] Novak D, Hüser L, Elton J J, et al. SOX2 in development and cancer biology [J]. *Semin Cancer Biol*, 2020, 67(Pt 1): 74-82.
- [23] Zhang S Z, Xiong X F, Sun Y. Functional characterization of SOX2 as an anticancer target [J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2020, 5(1): 135.
- [24] Schaefer T, Lengerke C. SOX2 protein biochemistry in stemness, reprogramming, and cancer: The PI3K/AKT/SOX2 axis and beyond [J]. *Oncogene*, 2020, 39(2): 278-292.
- [25] Alemohammad H, Asadzadeh Z, Motafakker Azad R, et al. Signaling pathways and microRNAs, the orchestrators of NANOG activity during cancer induction [J]. *Life Sci*, 2020, 260: 118337.
- [26] Najafzadeh B, Asadzadeh Z, Motafakker Azad R, et al. The oncogenic potential of NANOG: An important cancer induction mediator [J]. *J Cell Physiol*, 2021, 236(4): 2443-2458.
- [27] Ortega M S, Kelleher A M, O'Neil E, et al. NANOG is required to form the epiblast and maintain pluripotency in the bovine embryo [J]. *Mol Reprod Dev*, 2020, 87(1): 152-160.

【责任编辑 兰新新】