

【药物非临床安全性评价方法学】

基于拟胚体面积的体外胚胎毒性模型的建立和验证

赵曼曼¹, 郑锦芬^{1,2}, 黄芝瑛², 耿兴超¹, 张曦¹, 刘晓萌¹, 王三龙^{1*}, 周晓冰^{1*}

1. 中国食品药品检定研究院国家药物安全评价监测中心 药物非临床安全评价研究北京市重点实验室, 北京 100176

2. 中山大学 药学院, 广东 广州 510006

摘要: 目的 利用小鼠胚胎干细胞, 以拟胚体面积为分化抑制终点, 构建体外胚胎毒性模型。方法 模型建立: 分别用训练集10个化合物青霉素G、异烟肼、5-氟尿嘧啶、羟基脲、阿司匹林、氟康唑、地塞米松、丙戊酸钠、洛伐他汀、苯海拉明处理小鼠胚胎干细胞ES-D3和小鼠胚胎成纤维细胞NIH/3T3 5 d, 用细胞活力检测试剂盒检测细胞活性, 得到相应的半数抑制浓度 ($IC_{50\ 3T3}$ 、 $IC_{50\ D3}$); 同时用10种化合物处理ES-D3细胞, 用悬浮-悬滴培养的途径制备拟胚体, 于第5天对拟胚体进行拍照, 用Image J软件测量拟胚体的横截面积, 并计算半数抑制细胞分化的浓度(ID_{50})。根据得到的 $IC_{50\ 3T3}$ 、 $IC_{50\ D3}$ 、 ID_{50} , 用Python软件采用线性判别分析(LDA)拟合得到线性二分类判别式。模型验证: 以上述同样的方法测定测试集3个化合物维生素C、布洛芬、顺铂的 $IC_{50\ 3T3}$ 、 $IC_{50\ D3}$ 、 ID_{50} , 将其代入得到的判别式, 并预测化合物的胚胎毒性。结果 通过训练集10个化合物拟合出线性预测判别式为: 判别值= $21.550\ 926\ 58 \times \lg IC_{50\ 3T3} - 7.600\ 241\ 83 \times \lg IC_{50\ D3} - 14.007\ 571\ 16 \times \lg ID_{50} + 6.675\ 517\ 2$, 判别值 <0 , 归为无胚胎毒性; 判别值 ≥ 0 , 归为胚胎毒性。将测试集化合物的 $IC_{50\ 3T3}$ 、 $IC_{50\ D3}$ 、 ID_{50} 代入判别式, 得到维生素C判别值 <0 , 为无胚胎毒性药物; 顺铂和布洛芬判别值 >0 , 为胚胎毒性药物, 均与文献中体内试验结果一致, 预测正确。结论 基于拟胚体面积成功建立体外胚胎毒性模型。

关键词: 小鼠胚胎干细胞; 拟胚体面积; 胚胎毒性; 线性判别分析

中图分类号: R965.3 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376 (2023) 05-0925-09

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2023.05.001

Establishment and validation of an *in vitro* embryotoxicity model based on embryoid body's areaZHAO Manman¹, ZHENG Jinfen^{1,2}, HUANG Zhiying², GENG Xingchao¹, ZHANG Xi¹, LIU Xiaomeng¹, WANG Sanlong¹, ZHOU Xiaobing¹

1. Beijing Key Laboratory, National Center for Safety Evaluation of Drugs, National Institutes for Food and Drug Control, Beijing 100176, China

2. School of Pharmaceutical Sciences, Sun Yat-Sen University, Guangzhou 510006, China

Abstract: **Objective** To establish an *in vitro* embryotoxicity model based on mouse embryonic stem cell-derived embryoid bodies. **Method** Model establishment: Mouse embryonic stem cells and NIH/3T3 cells were treated with penicillin G, isoniazid, 5-fluorouracil, hydroxyurea, aspirin, fluconazole, dexamethasone, sodium valproate, lovastatin, and diphenhydramine for 5 d, cell activity was detected with cell viability detection kit to obtain half inhibitory concentration ($IC_{50\ 3T3}$, $IC_{50\ D3}$). Embryoid bodies made by suspension-hanging method were photographed on day 5. The areas of embryoid bodies were measured by Image J and calculate the concentration of half inhibitory cell differentiation (ID_{50}). Then a linear discriminant analysis (LDA) was used to obtain the estimated linear discriminant function by Python based on the obtained $IC_{50\ 3T3}$, $IC_{50\ D3}$, ID_{50} . Model verification: The $IC_{50\ 3T3}$, $IC_{50\ D3}$, and ID_{50} of ascorbic acid C, ibuprofen and cisplatin were obtained by the same method as above. The function score were calculated by the prediction model. **Result** The estimated linear discriminant function is: discriminant value = $21.550\ 926\ 58 \times \lg IC_{50\ 3T3} - 7.600\ 241\ 83 \times$

收稿日期: 2023-03-27

基金项目: 中国食品药品检定研究院中青年发展研究基金(2020C1)

第一作者: 赵曼曼, 研究方向为药物非临床安全性评价。E-mail: zhaomanman@nifdc.org.cn

*共同通信作者: 王三龙 E-mail: wangsanlong@nifdc.org.cn

周晓冰 E-mail: zhxb@nifdc.org.cn

$\lg IC_{50\ D3} - 14.007\ 571\ 16 \times \lg ID_{50} + 6.675\ 517\ 2$, if the discriminant value < 0 , it is classified as nontoxic drug, otherwise, it is classified as toxic drug. The discriminant value of ascorbic acid $C < 0$, the discriminant value of ibuprofen and cisplatin > 0 . Ascorbic acid C was classified as nontoxic drug, ibuprofen and cisplatin were classified as toxic drug, which were consistent with the classification by *in vivo* research. **Conclusion** An *in vitro* embryotoxicity model was established based on embryoid body area.

Key words: mouse embryonic stem cells; embryoid body's area; embryotoxicity; linear discriminant analysis

生殖发育毒性评价(DART)是药物非临床安全性评价的重要组成部分。根据目前的法规指南, DART 评价仍需进行动物体内试验, 不符合替代(replace)、减少(reduce)、优化(refine)原则^[1-2]。基于细胞、组织等的体外替代试验可减少试验动物的使用、降低毒理学试验的成本、提高结果外推至人类的准确性, 是21世纪生殖发育毒理领域发展的一个方向^[3]。目前已开发出多种体外胚胎毒性模型, 如已通过欧洲替代验证中心验证(ECVAM)的小鼠胚胎干细胞试验(EST)、微团试验(MM)、体外全胚胎培养试验(WEC)以及非哺乳动物的斑马鱼模型等^[4]。2020年实施的人用药品技术要求国际协调理事会(ICH)S5(R3)提出^[5], 经过恰当验证合格的替代方法在某些情况下可延迟或者替代体内试验, 用于胚胎毒性风险的评估, 因此体外胚胎毒性模型的开发和验证对新形势下做好药品监管具有重要意义。

EST是利用小鼠胚胎干细胞(mESC)无限分化和自我更新的特性而发展起来的体外胚胎毒性模型。评估终点包括:(1)对于干细胞的细胞毒性作用;(2)对3T3成纤维细胞的细胞毒性作用;(3)抑制ESC分化为搏动的心肌细胞^[6-7]。此模型应用2种永久细胞系, 无需使用怀孕动物的原代细胞或者组织。经过验证的EST的总体预测准确性达到78%, 对于强胚胎毒性化合物预测准确性为100%, 目前主要作为早期胚胎毒性筛选和致畸机制研究工具。然而经典的EST依赖于形态学检测, 需要经验丰富的研究人员确认此终点的准确性, 而且其试验周期长, 操作步骤复杂, 无法广泛应用^[8]。因此, 国内外研究人员对EST模型进行了改良^[9], 包括(1)采用人ESC或者多能诱导干细胞代替mESC;(2)应用PCR、流式细胞术等分子生物学方法检测成熟心肌细胞或者其他生物标志物的表达;(3)检测化合物对ESC分化成其他谱系细胞的抑制, 如神经细胞、成骨细胞;(4)加入代谢系统等。其中, 日本替代法验证中心(JaCVAM)将心脏和神经嵴衍生物表达转录本1基因(Hand-1)导入ESC, 并利用荧光素报告酶基因监测hand-1的表达, 以测定化合物对细胞的

分化抑制, 同时将作用时间缩短至6 d^[10]。然而此试验技术要求高, 且不同操作者之间存在误差。拟胚体是ESC在体外形成的具有胚层结构的三维聚集体^[11], 与人类早期胚胎发育过程中的卵圆柱时期结构十分相似, 是研究哺乳动物胚胎发育的体外模型系统^[12]。有相关研究表明, 心肌细胞搏动率与拟胚体面积存在高度相关性^[13]。根据拟胚体的横截面积可评估发育迟缓和胚胎死亡率。因此本研究基于拟胚体面积, 利用mESC初步建立1种体外胚胎毒性模型, 为化合物体外胚胎毒性风险评估提供参考。

1 材料

1.1 细胞

小鼠胚胎成纤维细胞NIH/3T3来自中国食品药品检定研究院; 昆明白MEF细胞和小鼠胚胎干细胞ES-D3购自上海中国科学院细胞库。

1.2 受试物及主要试剂

依据ECVAM及ICH S5(R3)推荐的参考化合物清单^[5, 14], 选择不同作用系统、不同作用机制的化合物。训练集和测试集化合物分为2类: 胚胎毒性药物和无胚胎毒性药物, 涵盖抗肿瘤、抗生素、抗真菌药、非甾体抗炎药、神经系统药物、调血脂药物、激素等类型药物, 具体的信息见表1。5-氟尿嘧啶、苯海拉明、维生素C、异烟肼、丙戊酸钠购于美国Sigma公司; 布洛芬、地塞米松、洛伐他汀、阿司匹林、顺铂、羟基脲购自中国食品药品检定研究院; 氟康唑、青霉素G购自北京伊塔生物科技有限公司。

丝裂霉素C购于美国Sigma公司; ES级胎牛血清(ES FBS)、胎牛血清(FBS)、高糖DMEM培养基、非必需氨基酸(NEAA)、Glutamax⁻¹、 β -巯基乙醇、胰酶均购于Thermo Fisher公司; 重组小鼠LIF蛋白(mLIF)购于Sigma公司; 青霉素-链霉素、PBS缓冲液、二甲基亚砜(DMSO)、无菌1%明胶购于索莱宝生物科技有限公司; CellTiter-Glo® 2.0细胞活力检测试剂盒购于Promega公司; 碱性磷酸酶(ALP)染色液购于北京伊塔生物科技有限公司。

1.3 主要仪器

移液枪(德国Eppendorf公司); 二氧化碳培养

表1 13种受试物的信息
Table 1 Information of 13 compounds

名称	CAS号	作用	相对分子质量	胚胎毒性及致畸效应	体内胚胎毒性分级	在本研究中的应用
青霉素G	69-57-8	抗细菌	356.37	对动物和人没有致畸作用	阴	模型建立
异烟肼	54-85-3	抗结核	137.14	对人、鼠或兔无致畸作用	阴	模型建立
阿司匹林	50-78-2	解热镇痛	180.16	对大鼠致畸作用(脑疝、足畸形、脊椎和肋骨严重缺损、吸收胎增加)	阳	模型建立
地塞米松	50-02-2	激素	392.46	动物致畸作用(腭裂)	阳	模型建立
丙戊酸钠	1069-66-5	抗惊厥	166.19	大鼠致畸(肾积水、神经管缺陷);家兔致畸(外观异常、内脏畸形、骨骼畸形)	阳	模型建立
洛伐他汀	75330-75-5	降胆固醇	404.54	小鼠、大鼠、兔和人类的致畸作用(骨骼缺陷、神经管缺陷、腹裂、全脑畸形、导水管狭窄)	阳	模型建立
5-氟尿嘧啶	51-21-8	抗肿瘤	130.08	大鼠致畸性(小/无眼、颅面缺损、脑积水、脑膨出);家兔致畸	阳	模型建立
羟基脲	127-07-1	抗肿瘤/酶抑制剂	76.05	有胚胎毒性且会导致胎儿畸形(颅骨部分骨化、无眼窝、脑积水、胸骨分叉、腰椎缺失)	阳	模型建立
氟康唑	86386-73-4	抗真菌	306.27	大鼠胚胎死亡、腭裂、短颌;家兔流产	阳	模型建立
苯海拉明	147-24-0	抗过敏	291.82	大鼠致畸(脑积水、脑发育不全、心脏缺陷、马蹄内翻足、腭裂)	阳	模型建立
维生素C	50-81-7	维生素	176.12		阴	模型验证
布洛芬	15687-27-1	解热镇痛	206.28	大鼠室间隔缺损	阳	模型验证
顺铂	15663-27-1	抗肿瘤	300.05	大鼠胎儿死亡率增加	阳	模型验证

箱(美国 Thermo Fisher 公司);PB-203 型电子天平(瑞士 METTLER 公司);细胞成像系统 EVOS XL (Life Technologies 公司);倒置显微镜(日本 Olympus 公司);多功能酶标仪(美国 PerkinElmer 公司);离心机(德国 Eppendorf 公司);摇床(美国 Thermo Fisher 公司)。

2 方法

2.1 细胞培养

MEF 饲养层细胞的制备:将 P0 代昆明白 MEF 细胞传至 P3 代,待细胞长至 80%,用 $10\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 丝裂霉素 C $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 处理 3 h 抑制细胞的分裂,消化后冻存备用或者直接接种于 1% 无菌明胶包被的新培养瓶中即制备成饲养层。MEF 细胞铺制 24 h 后可传入 mESC。

ES-D3 细胞的培养:从液氮中取出冻存的 ES-D3 细胞,复苏后接种于制备好的 MEF 饲养层,加入 ESC 完全培养基(高糖 DMEM、15% ES FBS、1% Glutamax⁻¹、1% NEAA、1% 青霉素-链霉素、 $0.137\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ β -巯基乙醇、 $1\text{ }000\text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$ mLIF)维持培养,每天更换培养基,待 ES-D3 细胞团集落达到 60%~70% 时传代。

小鼠成纤维细胞 NIH/3T3 的培养:将 NIH/

3T3 细胞置于含 10% FBS、1% 青霉素-链霉素的高糖 DMEM 培养基中,置于 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 饱和湿度细胞培养箱中培养,在细胞密度达到 80% 左右传代。

2.2 ALP 染色

将 ES-D3 细胞和 MEF 细胞共培养于六孔板,待细胞密度达到 60%,弃去培养基,并用 PBS 清洗。加入 ALP 固定液固定 3 min 或 4% 多聚甲醛固定 10~15 min,并用 PBS 清洗。滴加配制好的 ALP 孵育液(AS-BI 染色液-FBB 染色液=1:1),放入湿盒中,避光孵育 15~20 min, PBS 清洗干净,用显微镜拍照。

2.3 受试物对 ES-D3、NIH/3T3 细胞毒性的测定

第 0 天,于白色 96 孔板接种 NIH/3T3 细胞($1\times 10^4\cdot\text{mL}^{-1}$)和 ES-D3 细胞($3\times 10^4\cdot\text{mL}^{-1}$),每孔 $100\text{ }\mu\text{L}$; 2~3 h 待细胞贴壁后,加入 6~8 个浓度梯度含有受试物的培养基 $100\text{ }\mu\text{L}$ 。第 5 天,采用 CellTiter-Glo[®] 2.0 细胞活力检测试剂盒测试细胞活力。并以未接种细胞只加培养基孔的荧光值为空白对照校正,每个浓度设置 3 个复孔,实验重复 3 次。使用 Graphpad prism 8.0 软件绘制剂量-反应曲线,计算受试物的细胞活性的半数抑制浓度(IC_{50})。

2.4 受试物对ES-D3细胞分化抑制能力的测定

第0天,制备含系列浓度受试物的培养基,最后加入ES-D3细胞,将浓度调整到 $3.75 \times 10^4 \cdot \text{mL}^{-1}$ 。吸取含受试物的细胞悬液20 μL 置于培养皿盖(φ 100 mm)内侧,每培养皿盖约50~80滴,不同浓度受试物互不交叉。培养皿内添加PBS,小心翻转培养皿盖至正常位置,5% CO_2 、37 $^\circ\text{C}$ 条件下悬滴培养3 d。第3天,向悬滴培养的培养皿盖内侧加入含相应浓度的受试物培养基,倾斜盖子约45 $^\circ$ 使拟胚体到盖子底部,使用无菌移液器将拟胚体悬液小心转移至细菌培养皿中,5% CO_2 、37 $^\circ\text{C}$ 条件下摇床培养2 d。第5天,用显微镜对拟胚体的形态大小进行拍照。用Image J软件测量拟胚体的面积。实验重复3次,以对照组的面积为100%,使用Graphpad prism 8.0软件绘制剂量-反应曲线,计算细胞分化的 ID_{50} 。

2.5 模型构建和验证

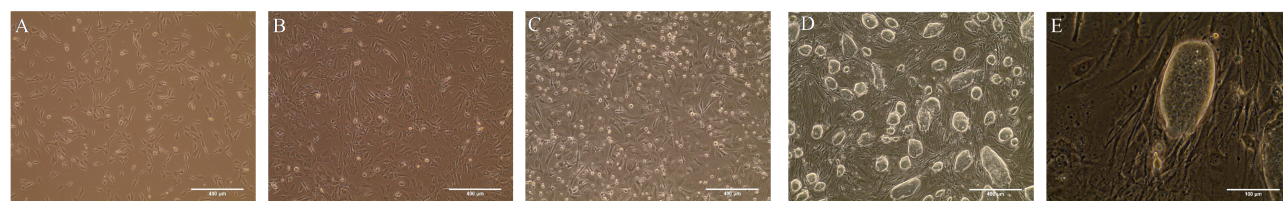
经“2.3”“2.4”部分实验可得到3个参数:(1)ES-D3细胞的 $\text{IC}_{50 \text{ D3}}$;(2)NIH/3T3细胞的 $\text{IC}_{50 \text{ 3T3}}$;(3)ES-

D3细胞的 ID_{50} ,将其转变为3个变量($\lg \text{IC}_{50 \text{ D3}}$ 、 $\lg \text{IC}_{50 \text{ 3T3}}$ 、 $\lg \text{ID}_{50}$)。使用线性分析判别(LDA)来预测胚胎毒性。LDA是一种经典的机器学习方法,其原理是实现最大的类间距离和最小的类内距离,可将不同类别的事物进行分类。运用含有10种受试物的训练集来构建预测模型,得到二分类判别分析公式,其中包括2个无胚胎毒性药物和8个胚胎毒性药物。测试集包含2个胚胎毒性药物和1个胚胎毒性药物,以此验证模型有效性。

3 结果

3.1 细胞形态

在常规培养基中的NIH/3T3细胞贴壁生长,细胞呈长梭形,大小较为均一(图1-A)。MEF细胞呈纤维样生长(图1-B、C)。ES-D3细胞呈克隆样生长,未分化的ES-D3克隆形似鸟巢或者岛屿状,形态均一,集落边缘光滑清晰,与滋养层细胞层界限清楚;集落内细胞排列紧密,细胞界限不清(图1-D、E)。ES-D3细胞增殖迅速,2~3 d可传代。



A-贴壁生长的NIH/3T3细胞;B-P2代MEF细胞;C-经丝裂霉素C处理后的P3代MEF细胞复苏24 h后;D、E-在饲养层上的ES-D3细胞
A-NIH/3T3 cells with adherent growth; B-P2 generation MEF cells; C-After 24 h of resuscitation of P3 generation MEF cells treated with mitomycin
C; D, E-ES-D3 cells on feeding layer

图1 培养细胞形态和特性

Fig. 1 Morphological features of cell

3.2 ALP染色

如图2所示,未分化的ES-D3细胞集落染上深紫色,而饲养层细胞未着色或者着色浅。

3.3 拟胚体试验模型的建立

3.3.1 药物对细胞的毒性作用 如图3所示,ES-

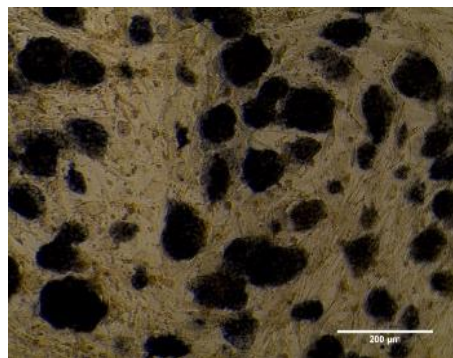
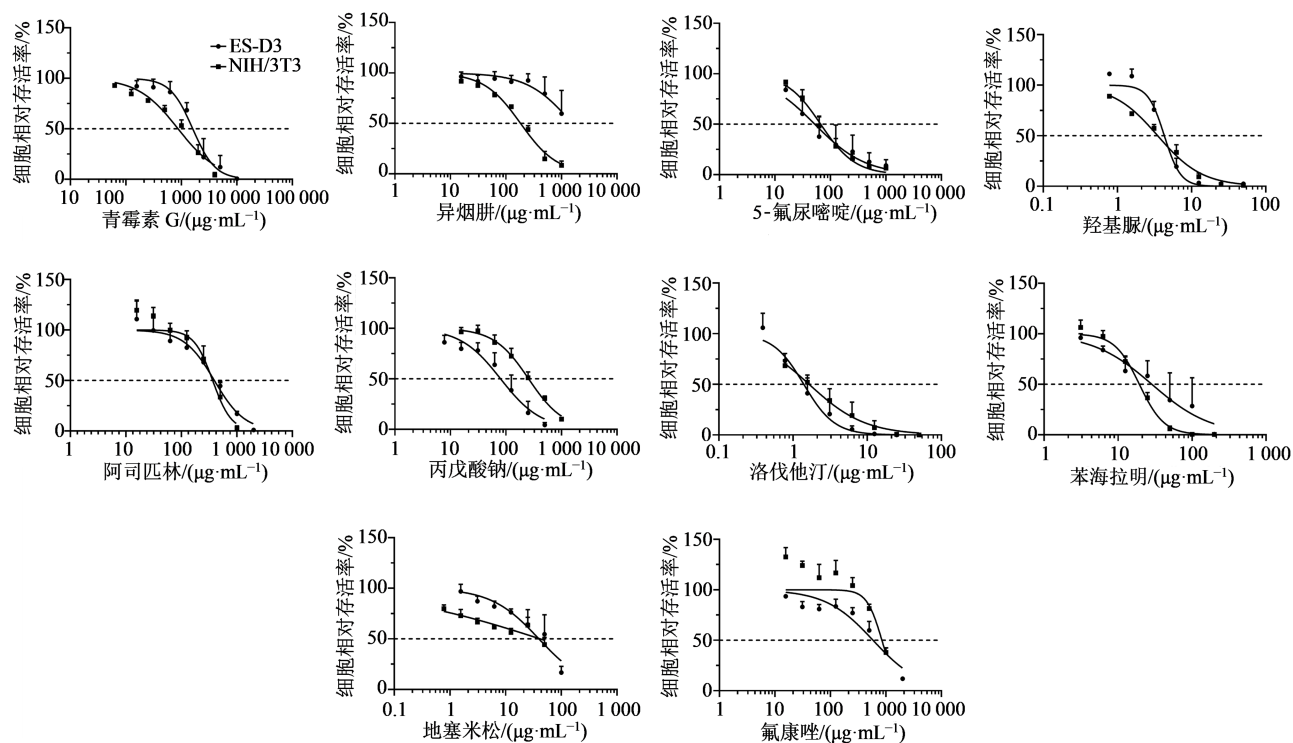


图2 ALP染色结果

Fig. 2 Result of ALP staining

D3细胞和NIH/3T3细胞的存活率均随着药物浓度的增加而降低。 IC_{50} 、 ID_{50} 值见表2,2种细胞对于无胚胎毒性药物青霉素G和异烟肼的反应敏感性有差异, $\text{IC}_{50 \text{ D3}}$ 在1 000 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 以上,而 $\text{IC}_{50 \text{ 3T3}} < 1 000 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$;5-氟尿嘧啶、羟基脲、洛伐他汀的 $\text{IC}_{50 \text{ D3}}$ 和 $\text{IC}_{50 \text{ 3T3}}$ 在4.295 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 以下,地塞米松、苯海拉明对2种细胞的 IC_{50} 则在19.37~41.84 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$,阿司匹林、氟康唑、丙戊酸钠在80.13~846.2 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

3.3.2 药物对拟胚体面积的影响 结果如图4、5所示,拟胚体横截面积随着药物浓度的增加而减少。与对照组相比,青霉素G和异烟肼质量浓度达到1 000 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时,拟胚体的横截面积仍无明显的变化;40 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 5-氟尿嘧啶组的拟胚体面积已降至对照组拟胚体的50%以下;经6 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 羟基脲处理的拟胚体,其横截面积为对照的50%以下;阿司匹林 ID_{50} 为466.8 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$;苯海拉明、地塞

图3 训练集药物对ES-D3和NIH/3T3细胞的毒性($\bar{x} \pm s, n \geq 3$)Fig. 3 Cytotoxicity of compounds of training set on ES-D3 and NIH/3T3 cell ($\bar{x} \pm s, n \geq 3$)表2 训练集化合物的 $IC_{50\ D3}$ 、 $IC_{50\ 3T3}$ 、 ID_{50} Table 2 $IC_{50\ D3}$, $IC_{50\ 3T3}$, ID_{50} of compounds of training set

药物	$IC_{50\ 3T3}/(\mu g \cdot mL^{-1})$	$IC_{50\ D3}/(\mu g \cdot mL^{-1})$	$ID_{50}/(\mu g \cdot mL^{-1})$	$lg\ IC_{50\ 3T3}$	$lg\ IC_{50\ D3}$	$lg\ ID_{50}$	判别式值
5-氟尿嘧啶	0.067	0.052	0.033	-1.177	-1.283	-1.487	11.900
羟基脲	3.493	4.295	5.221	0.543	0.633	0.718	3.517
青霉素G	870.3	1 600	2 284	2.940	3.204	3.359	-1.371
异烟肼	183.3	>1 000	>1 000	2.263	3.000	3.000	-9.375
丙戊酸钠	256.1	80.13	201.5	2.408	1.904	2.304	11.830
洛伐他汀	1.651	1.399	0.854	0.218	0.146	-0.068	11.220
地塞米松	41.84	39.65	31.23	1.622	1.598	1.495	8.540
苯海拉明	19.37	28.57	13.17	19.37	28.570	13.170	7.666
阿司匹林	365.7	391.8	466.8	365.7	391.8	466.8	4.817
氟康唑	846.2	586.0	1 185	846.2	586	1 185	5.673

米松的 ID_{50} 分别为31.23、13.17 $\mu g \cdot mL^{-1}$;丙戊酸钠体内试验提示有神经管缺陷类的致畸风险,在浓度达到200 $\mu g \cdot mL^{-1}$ 时,其形成的拟胚体边缘不光滑,内部不紧实,200 $\mu g \cdot mL^{-1}$ 以上拟胚体开始破裂死亡。4 $\mu g \cdot mL^{-1}$ 及以上浓度洛伐他汀处理细胞,无拟胚体形成。与对照组相比,1 000 $\mu g \cdot mL^{-1}$ 以上的氟康唑组形成的拟胚体横截面积明显减少。

3.3.3 LDA 将得到的 $IC_{50\ D3}$ 、 $IC_{50\ 3T3}$ 、 ID_{50} 转化成 $lg\ IC_{50\ D3}$ 、 $lg\ IC_{50\ 3T3}$ 、 $lg\ ID_{50}$,数据见表2。使用Python软件拟合出以下判别式:

$$\text{判别值} = 21.550\ 926\ 58 \times lg\ IC_{50\ 3T3} - 7.600\ 241\ 83 \times$$

$$lg\ IC_{50\ D3} - 14.007\ 571\ 16 \times lg\ ID_{50} + 6.675\ 517\ 2$$

判别值 <0 ,归为无胚胎毒性;判别值 ≥ 0 ,归为胚胎毒性

3.4 拟胚体试验模型的验证

应用无胚胎毒性药物维生素C及胚胎毒性药物顺铂、布洛芬验证构建模型的有效性。如图6、表3所示,根据剂量-反应曲线,得出顺铂的 $IC_{50\ 3T3}$ 为0.223 $\mu g \cdot mL^{-1}$ 、 $IC_{50\ D3}$ 为0.097 $\mu g \cdot mL^{-1}$ 、 ID_{50} 为0.102 $\mu g \cdot mL^{-1}$,代入判别式,得判别值为14.210 >0 ,因此拟胚体试验分类预测顺铂为胚胎毒性药物。维生素C的 $IC_{50\ 3T3}$ 为3.367 $\mu g \cdot mL^{-1}$ 、 $IC_{50\ D3}$ 为31.62 $\mu g \cdot mL^{-1}$ 、 ID_{50} 为48.36 $\mu g \cdot mL^{-1}$,代入判别

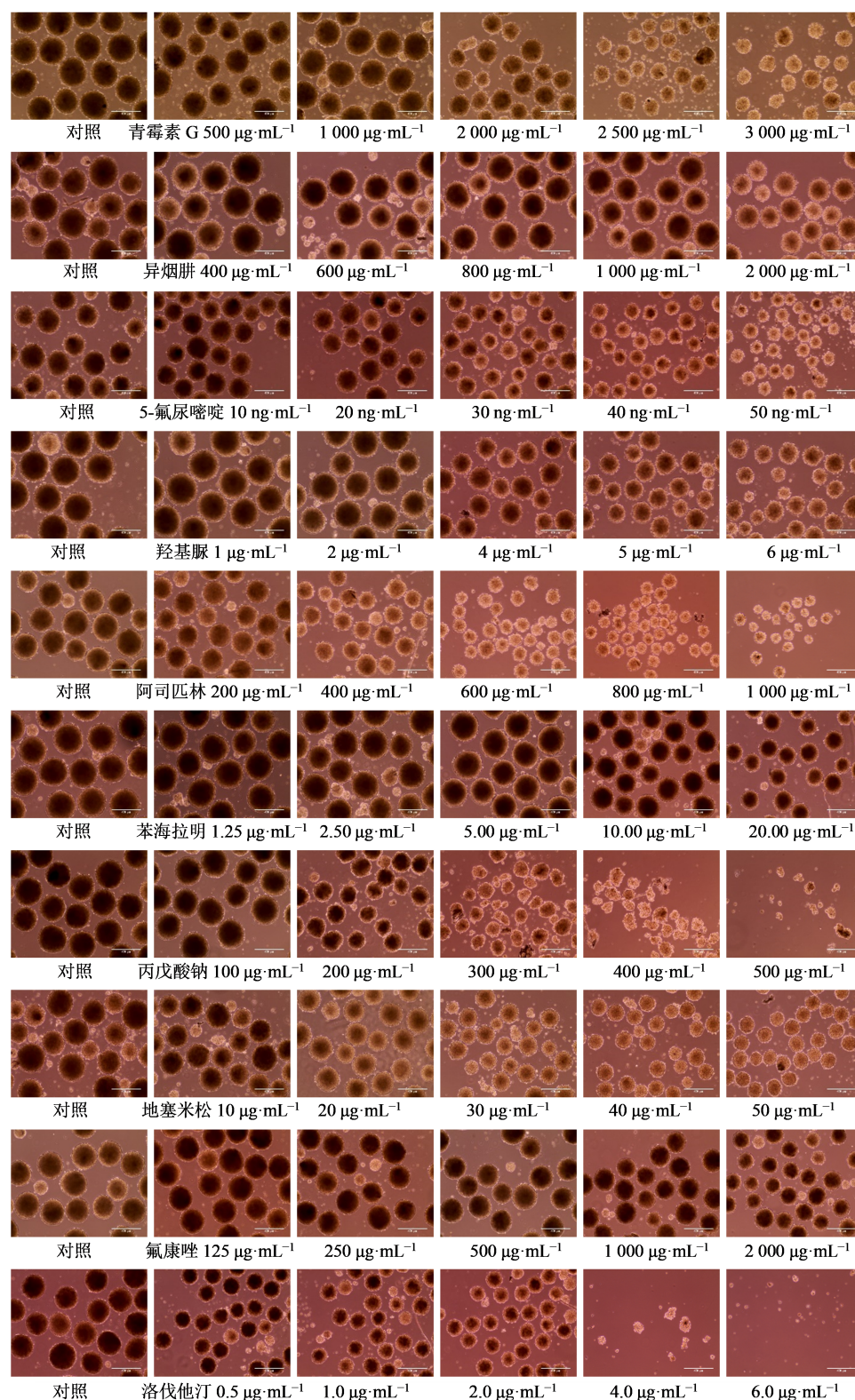


图4 训练集药物对ES-D3细胞形成的拟胚体大小和形态的影响

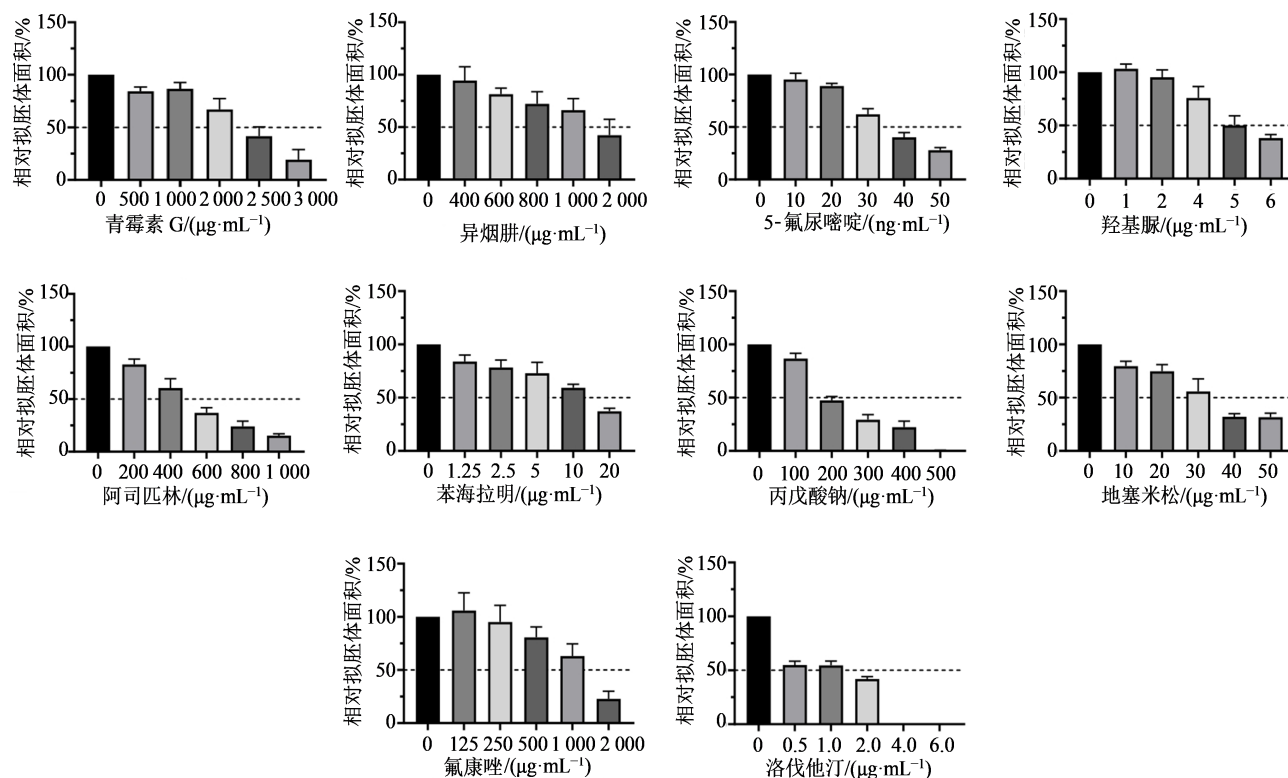
Fig. 4 Effect of training set drugs on the size and morphology of embryoid bodies formed by ES-D3 cell

式,得出判别值为 $-16.958 < 0$,因此预测维生素C为无胚胎毒性药物。布洛芬的 IC_{50T3} 为 $223.9 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、 IC_{50D3} 为 $48.57 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、 ID_{50} 为 $123.0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$,代入判别式,得出判别值为 $15.230 > 0$,因此预测布洛芬

为胚胎毒性药物。3种测试药物均预测正确。

4 讨论

胚胎毒性是指怀孕期间暴露于化合物可能造成的不良影响,包括胚胎发育迟缓、致畸和死亡。

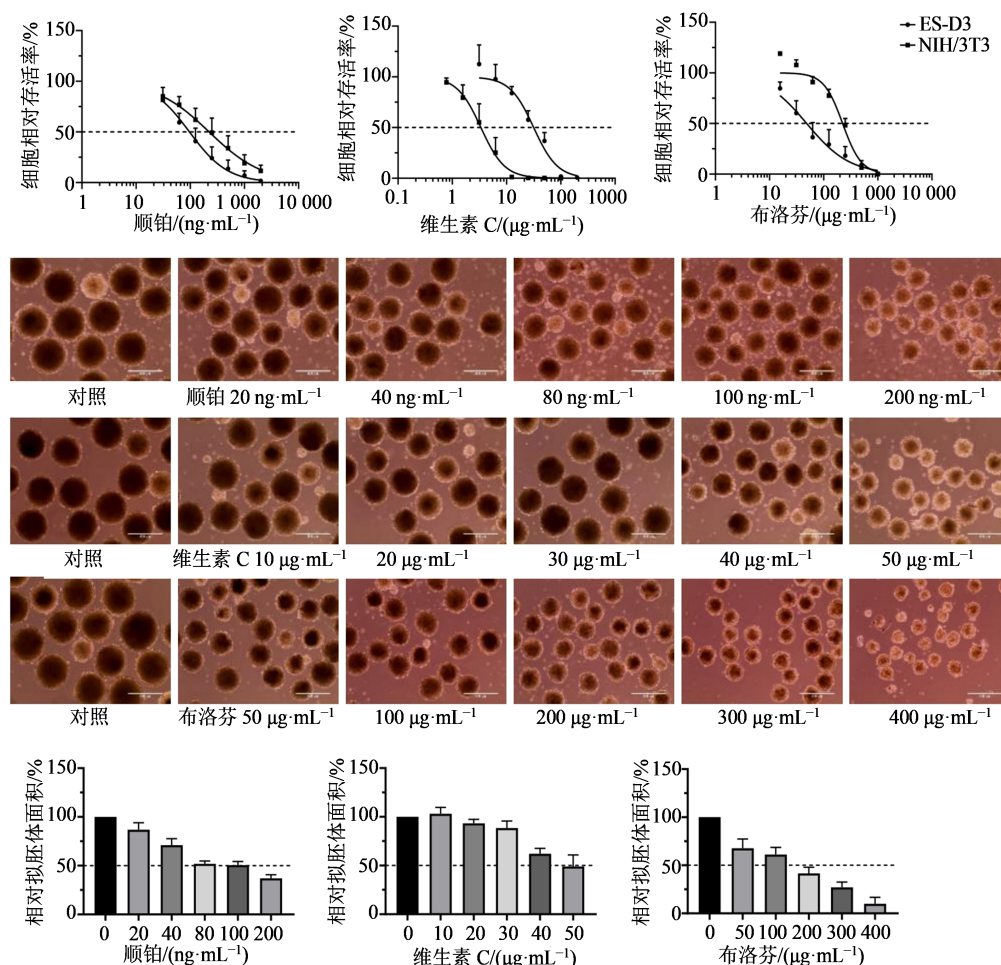
图5 训练集药物对ES-D3细胞形成的拟胚体面积的影响($\bar{x} \pm s, n \geq 3$)Fig. 5 Effect of training set drugs on area of embryoid bodies formed by ES-D3 cell ($\bar{x} \pm s, n \geq 3$)

评估化合物的胚胎毒性具有重要的科学和社会政治意义,因为它们可能导致出生缺陷或胚胎丢失^[15]。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。

mESC体外发育毒性试验利用ESC具有体外分化成各胚层及后续分化的特点^[16],用于评估多种与胚胎发育相关的事件,具有较高的特异性及准确性^[17]。经典的EST方法需要周期10 d的试验时间,且操作比较复杂,不同操作者之间存在误差。对于分化抑制终点的检测是显微镜下观察搏动的心肌细胞,要求实验人员有较丰富的经验,可操作性难度高。拟胚体是ESC自发形成的聚集体,是许多分化系统的基础。Kang等^[13]发现毒性化合物处理组的拟胚体面积较小,形态不均匀,而且其面积减少程度取决于化合物的毒性程度。通过评估拟胚体面积的大小变化可在一定程度上评估化合物的毒性,有可能作为胚胎毒性评估的终点。本研究证明以拟胚体面积为分化抑制终点能够明显缩短试验时间,简化流程,减少毒性试验的人力和物力。

本研究应用ES-D3细胞和小鼠胚胎成纤维细胞NIH/3T3 2种细胞系,其中ES-D3代表干细胞,NIH/3T3代表体细胞。 ID_{50} 、 $IC_{50\ D3}$ 及 $IC_{50\ 3T3}$ 3个变

量与胚胎毒性潜力密切相关^[6],因此本研究采用此3个变量作为分类判别的依据。本研究采用的阳性化合物的背景数据丰富^[5]。抗肿瘤化合物羟基脲、5-氟尿嘧啶与顺铂具有较低的 IC_{50} 和 ID_{50} 值,与体内试验结果相一致。其中,5-氟尿嘧啶为EST试验推荐的阳性化合物,体内试验显示其对大鼠具有致畸效应,造成大鼠胎仔颅脑缺损、脑膨出等不良后果。羟基脲通过抑制核糖核苷酸还原酶进而阻碍DNA合成,引起DNA损伤^[18],而羟基脲的胚胎毒性与胎仔致畸性与此相关^[19]。顺铂通过干扰DNA合成发挥抗癌作用,体内试验可发现大鼠胎仔死亡率上升,本研究中其 ID_{50} 为 $0.102 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。阿司匹林与布洛芬为解热镇痛抗炎药物,为ICH S5(R3)推荐的阳性对照化合物。200 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 的阿司匹林可导致大鼠腹疝、足畸形、吸收胎增加等,而布洛芬使得大鼠的室间隔缺损,本研究中阿司匹林 ID_{50} 为 $466.8 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$,布洛芬的 ID_{50} 为 $123.0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。氟康唑为三唑类抗真菌药物,有证据表明早期妊娠使用大剂量氟康唑(400~800 $\text{mg}\cdot\text{d}^{-1}$)后,婴儿可出现颅、面、骨骼和心脏异常等出生缺陷^[20-21]。丙戊酸钠是一种广谱抗癫痫药物,其对家兔和大鼠均有致畸性,造成大鼠神经管缺陷,使家兔内脏和骨骼畸形。洛伐他汀为他汀类降血脂药物,FDA推荐大部



A-测试集药物对ES-D3、NIH/3T3细胞的毒性;B-测试集药物对拟胚体面积变化;C-B图所对应的统计图

A-toxicity of test set drugs on ES-D3 and NIH/3T3 cells; B-effect of test set drugs on area of embryoid bodies; C-statistical chart corresponding to figure B

图6 测试集药物对ES-D3、NIH/3T3细胞的毒性和对ES-D3细胞的分化抑制作用

Fig. 6 Cytotoxicity on ES-D3 and NIH/3T3 cell and differentiation inhibition on ES-D3 cell of compounds of testing set

表3 测试集药物 $IC_{50\ D3}$ 、 $IC_{50\ 3T3}$ 、 ID_{50} 及判别值

Table 3 $IC_{50\ D3}$ 、 $IC_{50\ 3T3}$ 、 ID_{50} and function value of compounds of testing set

药物	$IC_{50\ 3T3}/(\mu g \cdot mL^{-1})$	$IC_{50\ D3}/(\mu g \cdot mL^{-1})$	$ID_{50}/(\mu g \cdot mL^{-1})$	$lg\ IC_{50\ 3T3}$	$lg\ IC_{50\ D3}$	$lg\ ID_{50}$	判别值	拟胚体试验分类	体内胚胎毒性分级
顺铂	0.223	0.097	0.102	-0.651	-1.014	-0.990	14.210	阳	阳
维生素C	3.367	31.62	48.36	0.527	1.500	1.684	-16.958	阴	阴
布洛芬	223.9	48.57	123.0	2.350	1.686	2.090	15.230	阳	阳

分妊娠期患者停用他汀类药物^[22],因为这类药物可引起胆固醇生物合成中止,造成严重出生缺陷,而胆固醇生物合成对细胞膜形态发生很重要,已报道的出生缺陷包括肢体畸形、先天性心脏病和中枢神经系统异常^[23-24]。

本研究应用mESC,测定训练集10种化合物青霉素G、异烟肼、5-氟尿嘧啶、羟基脲、阿司匹林、氟康唑、地塞米松、丙戊酸钠、洛伐他汀、苯海拉明对ES-D3和NIH/3T3细胞的毒性作用,以拟胚体面积的变化来表示化合物对ES-D3细胞的分化抑制,并将得到的3个参数运用LDA

拟合得到胚胎毒性预测判别式。用3种化合物维生素C、顺铂、布洛芬验证模型有效性,3种化合物的胚胎毒性预测结果与体内试验一致,预测正确。然而本研究仍存在一定局限性,训练集和测试集的化合物有限,后续将增加化合物的种类和数量,进一步优化和验证此预测模型。

本研究基于拟胚体面积构建了1个体外胚胎发育毒性模型。此模型缩短了经典EST试验的时间,简化了实验操作流程,具有较好的应用前景。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Manon B. The era of 3Rs implementation in developmental and reproductive toxicity (DART) testing: Current overview and future perspectives [J]. *Reprod Toxicol*, 2017, 72: 86-96.
- [2] Sogorb M A, Pamies D, de Lapuente J, et al. An integrated approach for detecting embryotoxicity and developmental toxicity of environmental contaminants using *in vitro* alternative methods [J]. *Toxicol Lett*, 2014, 230(2): 356-367.
- [3] Brannen K C, Chapin R E, Jacobs A C, et al. Alternative models of developmental and reproductive toxicity in pharmaceutical risk assessment and the 3Rs [J]. *ILAR J*, 2016, 57(2): 144-156.
- [4] Knudsen T B, Kavlock R J, Daston G P, et al. Developmental toxicity testing for safety assessment: New approaches and technologies [J]. *Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol*, 2011, 92(5): 413-420.
- [5] ICH. Detection of toxicity to reproduction for human pharmaceuticals [EB/OL]. (2020-02-18) [2023-02-20] https://database.ich.org/sites/default/files/S5-R3_Step4_Guideline_2020_0218.pdf.2020.
- [6] Seiler A E M, Spielmann H. The validated embryonic stem cell test to predict embryotoxicity *in vitro* [J]. *Nat Protoc*, 2011, 6(7): 961-978.
- [7] Kuske B, Pulyanina P Y, zur Nieden N I. Embryonic stem cell test: Stem cell use in predicting developmental cardiotoxicity and osteotoxicity [J]. *Methods Mol Biol*, 2012, 889: 147-179.
- [8] Buesen R, Genschow E, Slawik B, et al. Embryonic stem cell test remastered: Comparison between the validated EST and the new molecular FACS-EST for assessing developmental toxicity *in vitro* [J]. *Toxicol Sci*, 2009, 108(2): 389-400.
- [9] Theunissen P T, Piersma A H. Innovative approaches in the embryonic stem cell test (EST) [J]. *Front Biosci (Landmark Ed)*, 2012, 17(5): 1965-1975.
- [10] Le Coz F, Suzuki N, Nagahori H, et al. Hand1-Luc embryonic stem cell test (Hand1-Luc EST): A novel rapid and highly reproducible *in vitro* test for embryotoxicity by measuring cytotoxicity and differentiation toxicity using engineered mouse ES cells [J]. *J Toxicol Sci*, 2015, 40(2): 251-261.
- [11] Fuchs C, Scheinast M, Pasteiner W, et al. Self-organization phenomena in embryonic stem cell-derived embryoid bodies: Axis formation and breaking of symmetry during cardiomyogenesis [J]. *Cells Tissues Organs*, 2012, 195(5): 377-391.
- [12] Kilberg M S, Terada N, Shan J. Influence of amino acid metabolism on embryonic stem cell function and differentiation [J]. *Adv Nutr*, 2016, 7(4): 780S-789S.
- [13] Kang H Y, Choi Y K, Jo N R, et al. Advanced developmental toxicity test method based on embryoid body's area [J]. *Reprod Toxicol*, 2017, 72: 74-85.
- [14] Rohwedel J, Guan K, Hegert C, et al. Embryonic stem cells as an *in vitro* model for mutagenicity, cytotoxicity and embryotoxicity studies: Present state and future prospects [J]. *Toxicol In Vitro*, 2001, 15(6): 741-753.
- [15] DeSesso J. Embryotoxicity: Anatomical, physiological, and functional [A]// *Comprehensive Toxicology* [M]. Oxford: Academic Press, 2010.
- [16] Brickman J M, Serup P. Properties of embryoid bodies [J]. *Wiley Interdiscip Rev Dev Biol*, 2017, 6(2): e259.
- [17] 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.
- [18] Yarbrow J W. Mechanism of action of hydroxyurea [J]. *Semin Oncol*, 1992, 19(3 Suppl 9): 1-10.
- [19] Desesso J M, Jordan R L. Drug-induced limb dysplasias in fetal rabbits [J]. *Teratology*, 1977, 15(2): 199-211.
- [20] FDA. Communication: Use of long-term, high-dose Diflucan (fluconazole) during pregnancy may be associated with birth defects in infants [EB/OL]. (2011-08-03) [2023-02-20]. <http://www.fda.gov/Drugs/DrugSafety/ucm266030.html>.2011.
- [21] Lopez-Rangel E, van Allen M I. Prenatal exposure to fluconazole: An identifiable dysmorphic phenotype [J]. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol*, 2005, 73(11): 919-923.
- [22] FDA. FDA requests removal of strongest warning against using cholesterol-lowering statins during pregnancy; still advises most pregnant patients should stop taking statins [EB/OL]. (2021-07-20) [2023-02-20]. <https://www.fda.gov/drugs/drug-safety-and-availability/fda-requests-removal-strongest-warning-against-using-cholesterol-lowering-statins-during-pregnancy>.2021.
- [23] Taguchi N, Rubin E T, Hosokawa A, et al. Prenatal exposure to HMG-CoA reductase inhibitors: Effects on fetal and neonatal outcomes [J]. *Reprod Toxicol*, 2008, 26(2): 175-177.
- [24] Petersen E E, Mitchell A A, Carey J C, et al. Maternal exposure to statins and risk for birth defects: A case-series approach [J]. *Am J Med Genet A*, 2008, 146A(20): 2701-2705.