

论著

以 ITSFn 诱导法为基础的神经发育毒性评价模型的
建立及其有效性研究刘海波¹, 支媛¹, 冯永全¹, 戴抒豪², 于洲¹

(1. 国家食品安全风险评估中心, 北京 100021; 2. 徐州医学院公共卫生学院, 江苏 徐州 221004)

摘要:目的 建立体外以胰岛素-转铁蛋白-硒-纤维连接蛋白 (ITSFn) 培养法为基础的胚胎干细胞神经发育毒性评价模型, 并对其有效性进行验证, 完善神经发育毒性评价体系。方法 胚胎干细胞悬滴、悬浮培养后, 加入胰岛素、转铁蛋白、硒、纤维连接蛋白诱导神经细胞分化, 结合细胞毒性 MTT 法建立神经发育毒性体外评价模型, 并检测不同浓度青霉素 G、苯妥英钠和氟尿嘧啶作用条件下其对胚胎干细胞神经分化能力的影响, 判断受试物的神经发育毒性。结果 青霉素 G、苯妥英钠和氟尿嘧啶的 ID₅₀D3 nestin 分别为 0.017 μg/ml、49.40 μg/ml、1 139 μg/ml, ID₅₀D3EN-1 分别 0.031 μg/ml、25.63 μg/ml、1 762 μg/ml, 其发育毒性的判定均依次为无、弱和强。结论 以 ITSFn 诱导法为基础建立的体外神经发育毒性评价模型, 能够正确判定氟尿嘧啶、苯妥英钠和青霉素 G 的发育毒性, 可用于体外神经发育毒性的筛选和评价。

关键词: 胚胎干细胞; 神经发育毒性; 有效性; 评价模型

中图分类号: Q132.7; Q593.2 文献标识码: A 文章编号: 1004-8456(2013)01-0006-06

Study the developmental neurotoxicity evaluation model by ITSFn protocol and To verify its validity

Liu Haibo, Zhi Yuan, Feng Yongquan, Dai Shuhao, Yu Zhou

(China National Center For Food Safety Risk Assessment, Beijing 100021, China)

Abstract: Objective Establishment of in vitro to insulin and transferrin-se-fibronectin (ITSFn) training method based on embryonic stem cells neural developmental toxicity evaluation model, and its effectiveness is verified, the refinement of neural development toxicity evaluation system. **Methods** embryonic stem cells suspended drops, suspension culture, insulin, transferrin, adding selenium, fibronectin induces neuronal differentiation, in combination with cytotoxic MTT law to build the evaluation model of neurodevelopmental toxicity in vitro, and detection of different concentrations of penicillin G, phenytoin and 5-fluorouracil effect under the condition of embryonic stem cell neural differentiation, ability, judgment the neurodevelopmental toxicity. **Results** penicillin G, phenytoin and 5-fluorouracil ID₅₀D3 nestin were 0.017 μg/ml, 49.40 μg/ml, 1 139 μg/ml, ID₅₀D3EN-1 respectively 0.031 μg/ml, 25.63 μg/ml, 1 762 μg/ml, its developmental toxicity determination in turn were no, weak and strong. **Conclusions** Based on ITSFn neural development toxicity in vitro models to evaluate the correct judgement of 5-fluorouracil, phenytoin and penicillin G developmental toxicity, can be used for in vitro neural developmental toxicity screening and evaluation.

Key words: Embryonic stem cell; neurodevelopmental toxicity; validity; evaluation model

目前,发育毒性评价的体外可替代模型逐步为人们重视,建立和完善既短期、经济,而且又能大流量的筛检受试物的发育毒性方法成为此类研究的

目标^[1]。欧洲替代实验方法研究中心(the european center for the validation of alternative methods, ECVAM)依据胚胎干细胞(embryonic stem cell, ES)的特性建立了胚胎干细胞实验作为一种体外替代试验方法,可以从细胞毒性、分化抑制以及分子生物学水平反映发育毒性,因此越来越为人们所关注。

本实验室在胚胎干细胞实验模型建立方面积累了一定的经验^[2]。在前期建立的神经发育毒性评价模型中,已采用了经典的全反视黄酸(retinoic acid, RA)4-/4+法作为体外胚胎干细胞神经分化的模型^[1]。而与 RA 诱导法相比,胰岛素-转铁蛋

收稿日期:2012-09-06

基金项目:国家自然科学基金青年基金项目(81102134);农业部科技行业科技项目《农药风险评估综合配套技术研究》(200903054-06)

作者简介:刘海波 男 主管技师 研究方向为食品生殖、发育毒理学研究 E-mail: yuzhou19780413@yahoo.com.cn

通信作者:于洲 男 副研究员 研究方向为食品生殖、发育毒理学研究 E-mail: yz1244@yahoo.cn

白-硒-纤维连接蛋白 (insulin-trans-ferrin-selenium-fibronectin, ITSFn) 法可以使 ES 细胞经过神经前体细胞阶段后再分化为成熟神经细胞,并最终可获得高比例的神经元,此法更接近于体内神经分化的过程,因而已成为研究神经发育毒性作用机制的一个较好的体外模型^[3],目前国内将其应用于发育毒性研究的报道较少。本研究将在本课题前期已进行的体外 ITSFn 神经分化模型探索的基础上,以巢蛋白基因 (nestin) 和 Engrailed 1 基因 (EN-1) 为神经分化标记基因,建立适用于体外筛选的神经发育毒性模型。

1 材料和方法

1.1 仪器与试剂

①细胞:ES (D3)、BALB/C (3T3) 细胞,购自中国科学院上海生命科学研究院生物化学与细胞生物学研究所。②仪器:Olympus IX71 倒置显微镜 (日本 Olympus 公司)、TOMY LC-120 低速离心机 (美国贺利氏公司)、Beckman 低温高速离心机 (美国 Beckman 公司)、Biometra Real-timePCR 仪 (美国 Bio-Rad 公司)。③主要试剂:knock out-DMEM 培养基、DMEM/F-12 培养基、胰蛋白酶 (trypsin/EDTA)、特级胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS)、谷氨酰胺 (L-glutamic acid)、 β -巯基乙醇 (β -mercaptoethanol, β -ME)、非必需氨基酸 (nonessential amino acid)、0.1 mol/L 磷酸盐缓冲液 (phosphate buffer)、羟乙基哌嗪乙磺酸 [4-(2-hydroxyethyl) piperazine-1-erhanesulfonic acid]、软琼脂 (soft agar)、白血病抑制因子 (leukemia inhibitory factor, LIF)、胰岛素 (insulin)、转铁蛋白 (transferrin)、硒酸钠 (sodium selenite) 和纤维连接蛋白 (fibronectin) 苯妥英钠 (diphenylhydantoin, DPH)、氟脲嘧啶 (5-fluorouracil, 5-FU) 和青霉素 G (penicillin G) 均购自 Sigma 公司;逆转录-聚合酶链反应 (reverse transcription polymerase chain reaction, RT-PCR) 试剂盒、Trizol 细胞裂解液购自 Invitrogen 公司, Taq DNA 聚合酶购自上海生物工程公司;其余试剂均为国产分析纯。

1.2 方法

1.2.1 ES 细胞体外培养^[4]

取出 $-180\text{ }^{\circ}\text{C}$ 液氮冷冻条件下保存的 ES (D3) 细胞进行细胞复苏,接种于备用的小鼠胚胎成纤维细胞 (mouse embryonic fibroblast, MEF) 饲养层上,加入含 15% 特级胎牛血清、0.1 mmol/L β -巯基乙醇、1 mmol/L 羟乙基哌嗪乙磺酸、2 mmol/L 谷氨酰胺、1% 非必需氨基酸及 1×10^6 U/L 白血病抑制因子的 knock out-DMEM 培养基进行维持培养。为保持其

理想的未分化状态,当胚胎干细胞团集落达到 60% ~ 70% 融合时,即需传代。

1.2.2 受试物细胞毒性的评价^[4]

将 500 个/200 μl 的 BALB/C (3T3) 和 ESCs (D3) 细胞分别接种在 96 孔的培养板上,每孔加入不同浓度的受试物,同时设立阴性对照组。第 3 天和第 5 天更换培养基,第 10 天用 MTT 法检测细胞活性,于 570/630 nm 处检测其吸光度 (A),制成浓度-反应曲线,求出 5-FU、DPH 和青霉素 G 对细胞活性的半数抑制浓度 (half-maximal inhibition concentration, IC_{50}),其中对 ESCs (D3) 细胞活性半数抑制浓度以 $\text{IC}_{50}\text{D3}$ 表示,对 BALB/C (3T3) 细胞活性半数抑制浓度以 $\text{IC}_{50}\text{3T3}$ 表示。

1.2.3 受试物对 ES 细胞体外神经分化的影响

1.2.3.1 胚体的培养^[5]

将长满细胞培养瓶的 ES 细胞用 0.25% trypsin/EDTA 酶消化,用差速贴壁的方法除去 MEF,同时培养基中添加 1 000 IU/ml 的 mLIF。取生长旺盛的 ES 细胞消化成单细胞悬液或小细胞团,分别作如下处理以得到胚体:①悬滴培养:ES 细胞以 10^5 数量级密度悬滴培养于 10 cm 的细菌培养皿盖板上,每滴 30 μl 大小;②悬滴转悬浮培养:以 1% 软琼脂铺底于 6 cm 培养皿中,将悬滴培养 3 d 的胚体转入其中继续作悬浮培养 1 d。此阶段用的培养基不含 mLIF 和 β -ME, FBS 由常规培养时的 15% 增加到胚体培养阶段的 20%。

1.2.3.2 ITSFn 神经分化诱导培养^[5,6]

将 EBs 接种于 0.1% 明胶铺底的普通培养皿中加入不含 mLIF 的 ES 培养基,将 ES 培养基更换为无血清的 ITSFn 培养基扩增 nestin 阳性细胞。ITSFn 筛选培养基:DMEM/F-12 中加入 5 mg/L 胰岛素 (insulin), 50 $\mu\text{g/L}$ 转铁蛋白 (transferrin), 30 nmol/L 硒酸钠 (sodium selenite), 5 mg/L 纤维连接蛋白 (fibronectin)。隔日换液,连续培养 8 d。

1.2.3.3 受试物浓度的设计

根据相关文献的报道^[7]及 1.2.2 细胞活性的结果,取受试物用 knock out-DMEM 培养基 (无 LIF) 溶解,并制备成相应浓度的含受试物的培养基。5-FU 浓度为 0.000、0.005、0.010、0.015、0.020 $\mu\text{g/ml}$, DPH 浓度为 0、20、40、60 $\mu\text{g/ml}$,青霉素 G 浓度为 0、400、600、800、1 000 $\mu\text{g/ml}$ 。

1.2.3.4 ES 细胞神经分化标记基因表达的检测

取不同浓度受试物作用条件下,经神经分化诱导后的 ES 细胞,提取 EBs 团的总 RNA。提取后的 RNA 用紫外分光光度计,选择 A260/280 nm 检测,以确定 RNA 浓度与质量后合成 cDNA。采用 Real

Time-PCR 检测方法分别对其中神经样细胞特异表达基因 (nestin, EN-1) 的表达量进行检测,用甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH) 作内参照。各引物序列如下, nestin: 上游引物 5'-CTC GAG CAG GAA GTG GTA GG-3', 下游引物 5'-TTG GGACCAGGGAC TGTTAG-3'; EN-1: 上游引物 5'-TCAAGACTG ACTCACAGCAACCCC-3', 下游引物 5'-CTTTGT CCTGAACCGTG-GTGGTAG-3'; GAPDH: 上游引物 5'-ACTCACGG CAAATTCAACGG-3', 下游引物 5'-ACGTCAGATCCACGACGGAC-3', EN-1、nestin 和 GAPDH 基因扩增退火温度分别为 60 °C、55 °C 和 62 °C, 循环次数均为 34 次^[5,8]。

1.3 神经发育毒性分析^[9]

1.3.1 毒性分析

实验数据结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 将上述分化影响结果绘成剂量-反应曲线, 求出相对应的产生 50% ES 细胞神经分化抑制作用的受试物浓度, 即 ID₅₀D3 nestin 和 ID₅₀D3EN-1。

1.3.2 发育毒性结果的计算公式

公式中均以 $\mu\text{g/ml}$ 为单位。

$$I . 5.91571g (IC_{50} 3T3) + 3.5001g (IC_{50} D3) - 5.307 (IC_{50} 3T3-ID_{50} D3) / IC_{50} 3T3-15.72$$

$$II . 3.6511g (IC_{50} 3T3) + 2.3941g (IC_{50} D3) - 2.033 (IC_{50} 3T3-ID_{50} D3) / IC_{50} 3T3-6.85$$

$$III . -0.1251g (IC_{50} 3T3) + 1.9171g (IC_{50} D3) + 1.500 (IC_{50} 3T3-ID_{50} D3) / IC_{50} 3T3-2.67$$

1.3.3 受试物发育毒性的判定标准

上述结果中, I > II 且 I > III, 则受试物发育毒性为无神经发育毒性; 如 II > I 且 II > III, 则受试物发育毒性为弱神经发育毒性; 如 III > I 且 III > II, 则受试物发育毒性为强神经发育毒性。

2 结果

2.1 5-FU 对 ES 细胞神经分化的影响

由图 1、2 可见, 随着胚胎干细胞培养基中 5-FU 浓度的增加, 分化形成的神经细胞特异基因 nestin 和 EN-1 表达量明显降低, 胚胎干细胞向神经细胞分化的能力下降, 分化过程受到明显抑制。根据剂量-反应曲线, 求出相对应的产生 50% 干细胞神经分化抑制作用的 5-FU 浓度, 即 ID₅₀ D3 nestin、ID₅₀ D3EN-1 分别为 0.023 $\mu\text{g/ml}$ 和 0.031 $\mu\text{g/ml}$ 。

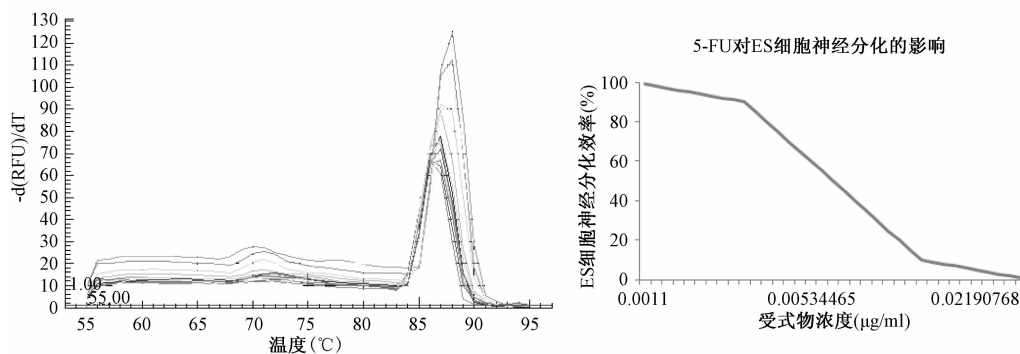


图 1 5-FU 对胚胎干细胞神经分化特异基因 nestin 表达的影响 (n = 3)

Figure 1 Effect of 5-FU on the embryonic stem cells differentiation into neuron cells with nestin expression (n = 3)

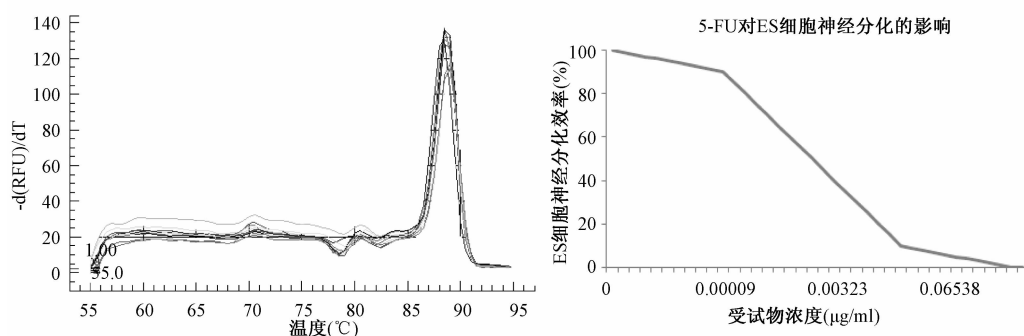


图 2 5-FU 对胚胎干细胞神经分化特异基因 EN-1 表达的影响 (n = 3)

Figure 2 Effect of 5-FU on the embryonic stem cells differentiation into neuron cells with EN-1 expression (n = 3)

2.2 青霉素 G 对 ES 细胞神经分化的影响

由图 3、4 可见, 随着青霉素 G 的浓度的增加, ES 细胞神经分化特异基因 nestin 和 EN-1 的表达量

下降, 但下降程度并不显著, 即便当青霉素 G 已经达到较高的作用浓度 (1 000 $\mu\text{g/ml}$) 时, ES 细胞向神经的分化与无干扰条件下的干细胞分化能力相

比较,分化能力依然保持较高水平。根据剂量-反应曲线,求出相对应的产生 50% 干细胞神经分化抑制

作用的青霉素 G 浓度,即 ID₅₀ D3 nestin、ID₅₀ D3 EN-1 分别为 2 053 μg/ml 和 1 762 μg/ml。

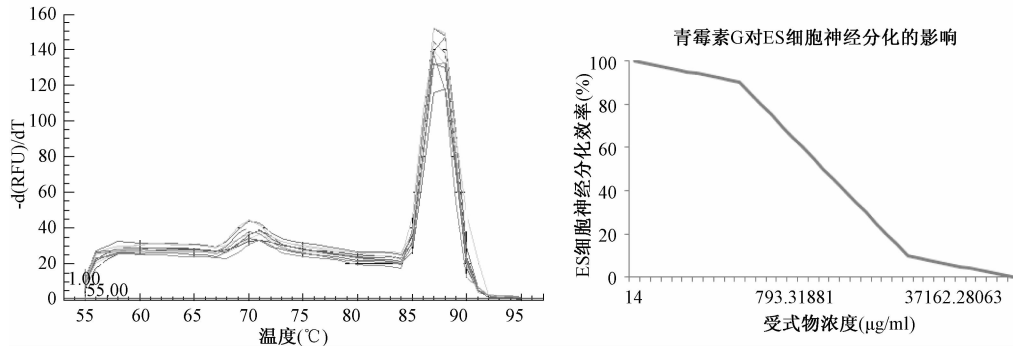


图 3 青霉素 G 对胚胎干细胞神经分化特异基因 nestin 表达的影响 (n = 3)

Figure 3 Effect of penicillin G on the embryonic stem cells differentiation into neuron cells with nestin expression (n = 3)

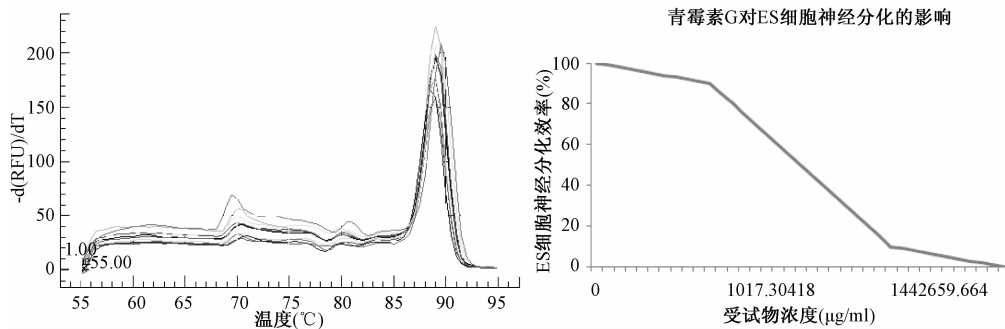


图 4 青霉素 G 对胚胎干细胞神经分化特异基因 EN-1 表达的影响 (n = 3)

Figure 4 Effect of penicillin G on the embryonic stem cells differentiation into neuron cells with EN-1 expression (n = 3)

2.3 DPH 对 ES 细胞神经分化的影响

由图 5、6 可见,随着 DPH 作用浓度的增加,ES 细胞向神经分化的程度受到一定程度的抑制,神经分化的特异性表达基因 nestin 和 EN-1 的表达量下降,但这种分化抑制作用一直维持在较低的水平,

神经分化过程受到的抑制程度较轻。根据剂量-反应曲线,求出相对应的产生 50% 干细胞神经分化抑制作用的 DPH 浓度,即 ID₅₀ D3 nestin、ID₅₀ D3 EN-1 分别为 16.36 μg/ml 和 25.63 μg/ml。

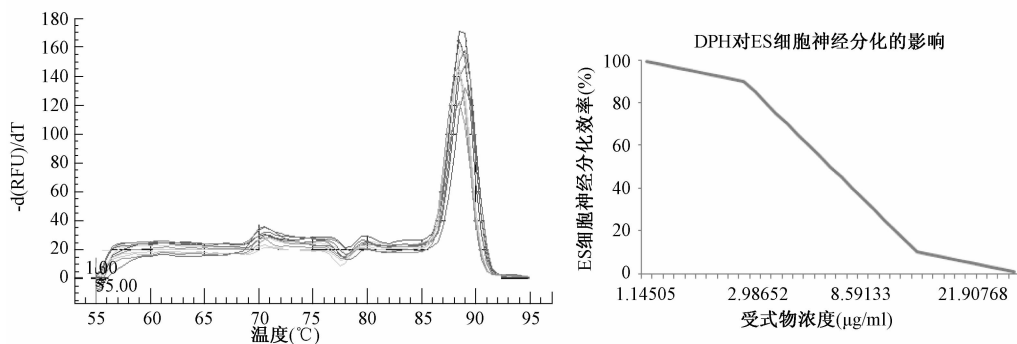


图 5 DPH 对胚胎干细胞神经分化特异基因 nestin 表达的影响 (n = 3)

Figure 5 Effect of DPH on the embryonic stem cells differentiation into neuron cells with nestin expression (n = 3)

2.4 细胞毒性的评价结果

由表 1 ~ 3 可见,随着 5-FU 浓度的增加,ES (D3) 细胞和 BALB/C (3T3) 细胞活性下降,受试物很小的浓度变化,即可引起细胞活性显著的差异,当 5-FU 浓度达到 0.100 μg/ml 时,已经无法检测出 D3 和 3T3 细胞的活性,根据剂量-反应曲线,5-FU

对细胞活性的半数抑制浓度 IC₅₀ D3 和 IC₅₀ 3T3 分别为 0.071 μg/ml 和 0.052 μg/ml。DPH 具有一定的细胞毒性作用,细胞活性随着 DPH 作用浓度的增加而降低,呈明显的剂量反应关系,两种细胞对 DPH 的细胞毒性的敏感性差别不大,DPH 的 IC₅₀ D3 和 IC₅₀ 3T3 为 59.7 μg/ml 和 67.8 μg/ml。而青霉素 G

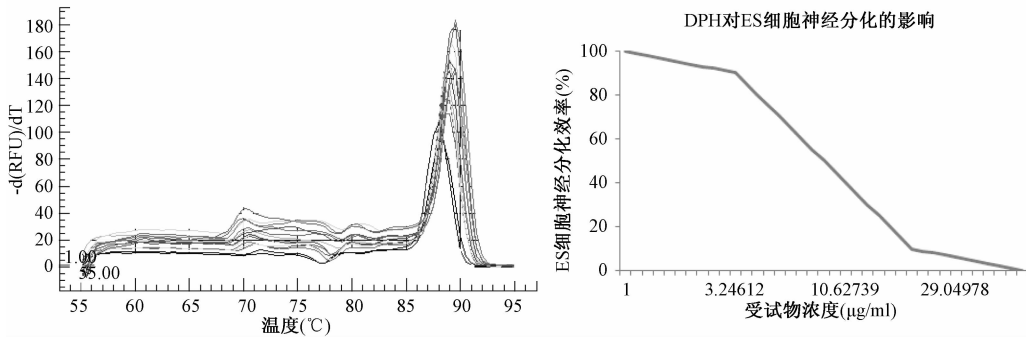


图 6 DPH 对胚胎干细胞神经分化特异基因 EN-1 表达的影响 (n = 3)

Figure 6 Effect of DPH on the embryonic stem cells differentiation into neuron cells with EN-1 expression (n = 3)

表 1 5-FU 的细胞毒性作用 ($\bar{x} \pm SD, n = 3$)

Table 1 The cytotoxicity result of 5-FU

受试物剂量 (μg/ml)	3T3 细胞活性检测结果(A)	D3 细胞活性检测结果(A)
0	0.046 ± 0.008	0.056 ± 0.009
0.010	0.035 ± 0.004	0.041 ± 0.006
0.020	0.034 ± 0.006	0.040 ± 0.007
0.030	0.031 ± 0.003	0.038 ± 0.003
0.040	0.026 ± 0.008	0.035 ± 0.008
0.050	0.027 ± 0.004	0.036 ± 0.004
0.060	0.022 ± 0.010	0.031 ± 0.006
0.070	0.012 ± 0.002	0.028 ± 0.004
0.080	0.015 ± 0.005	0.024 ± 0.009
0.090	0.011 ± 0.004	0.021 ± 0.005
0.100	-	0.022 ± 0.003
0.120	-	0.018 ± 0.003

表 2 DPH 的细胞毒性作用 ($\bar{x} \pm SD, n = 3$)

Table 2 The cytotoxicity result of DPH

受试物剂量 (μg/ml)	3T3 细胞活性检测结果(A)	D3 细胞活性检测结果(A)
0	0.038 ± 0.003	0.029 ± 0.007
20	0.028 ± 0.005	0.023 ± 0.005
40	0.022 ± 0.004	0.020 ± 0.005
60	0.023 ± 0.004	0.019 ± 0.001
80	0.018 ± 0.007	0.016 ± 0.003
100	0.015 ± 0.003	0.014 ± 0.003
120	0.013 ± 0.001	0.010 ± 0.002
140	0.011 ± 0.001	0.009 ± 0.003
160	0.007 ± 0.002	0.006 ± 0.001

表 3 青霉素 G 的细胞毒性作用 ($\bar{x} \pm SD, n = 3$)

Table 3 The cytotoxicity result of penicillin G

受试物剂量 (μg/ml)	3T3 细胞活性检测结果(A)	D3 细胞活性检测结果(A)
0	0.055 ± 0.007	0.066 ± 0.008
200	0.048 ± 0.010	0.051 ± 0.012
400	0.045 ± 0.006	0.048 ± 0.005
600	0.042 ± 0.008	0.045 ± 0.006
800	0.034 ± 0.009	0.040 ± 0.003
1 000	0.029 ± 0.003	0.037 ± 0.008
1 200	0.025 ± 0.004	0.033 ± 0.004
1 400	0.020 ± 0.006	0.028 ± 0.005
1 600	0.019 ± 0.005	0.025 ± 0.002

的细胞毒性作用较弱,青霉素 G 作用浓度即便达到较高水平时,细胞的活性仍能够检出,青霉素 G 的 IC₅₀D3 和 IC₅₀3T3 为 1 173 μg/ml 和 1 113 μg/ml。

2.5 受试物发育毒性评价

依据 ES 细胞神经分化实验模型对不同受试物体外分化抑制能力的评价结果 (ID₅₀D3nestin 和 ID₅₀D3 EN-1) 和体外细胞毒性的评价结果 (IC₅₀D3 和 IC₅₀3T3), 经前述发育毒性结果计算公式计算及发育毒性标准判定,青霉素 G、DPH 和 5-FU 的神经发育毒性均依次为无、弱、强。

3 讨论

从 ES 细胞(无论是鼠源还是人源的)向神经细胞自发分化是十分有限的,因此为了提高神经细胞的分化效率,人们已建立了一些特殊的诱导分化途径:如 RA 诱导法、谱系选择法等^[10]。高浓度的 RA 能有效的诱导 ES 细胞向神经细胞分化,并在分化的细胞中能检测到神经细胞的特异性蛋白、基因、离子通道和一些受体的表达^[10]。然而也应当看到,RA 虽然是 ES 细胞向神经细胞分化的有效诱导剂,但其诱导后获得的神经细胞中无法排除杂细胞的存在,与 RA 诱导法不同,以 ITSFn 培养法建立的体外神经分化培养体系,可以使 ES 细胞神经分化过程经历:胚胎干细胞-胚胎体-神经前体细胞-神经元/神经胶质细胞几个阶段,并最终可获得高比例的多巴胺能神经元^[3,11]。此法较 RA 诱导法更接近于体内神经分化的过程,已成为研究神经发育毒性作用机制的一个较好的体外模型^[11]。本研究在前期 ITSFn 法诱导 ES 细胞神经分化方法研究的基础上,探索建立更有效的神经发育毒性评价模型。

评价体系的判定受试物发育毒性的准确性,是开展胚胎干细胞实验方法进行体外评价受试物发育毒性评价的基础。因此,依然采用 ECVAM 提出的对 3 种具有明确无、弱和强发育毒性受试物的正确评价能力,来验证所建立的实验体系的有效性。

目前较常使用的受试物为青霉素 G(无发育毒性)、DPH(弱发育毒性)和 5-FU(强发育毒性)^[12]。本研究利用 ITSF_n 法神经发育毒性评价模型,分别以 nestin 和 EN-1 作为分化标记基因检测受试物对 ES 细胞神经分化的影响,并结合细胞毒性评价结果显示,对受试物神经发育毒性进行筛选。评价结果显示青霉素 G、DPH 和 5-FU 的神经发育毒性依次为无、弱、强,该结果与受试物发育毒性特点一致,评价模型的有效性得到初步验证。该评价模型可用于体外发育毒性的筛选,其较为完整的神经分化过程,提高了对神经发育毒性评价的敏感性。

当然,以 ES 细胞分化体系为基础建立的体外发育毒性评价体系还存在不少问题:首先,对体内外调控 ES 细胞向特定细胞类型分化的因子还缺乏深入认识,因此要得到向神经方向分化且具有一定功能的细胞还很困难,而且培养的 ES 细胞通常不会全部被诱导分化,即使是分化了的细胞,种类也不单一,往往是多种分化细胞与部分未分化细胞混杂在一起,为发育毒性的准确评价带来一定困难;其次,目前诱导神经分化产生的细胞增殖缓慢,数量有限,获得大量分化细胞还有一定难度,这些都为评价模型的进一步研究与应用设置了障碍^[13-14]。因此,在后续的研究中仍需要积极探索更有效的诱导条件和方法,进一步完善体外神经发育毒性评价的手段。

参考文献

- [1] Martinez-Ceballos E, Gudas LJ. Hoxa1 is required for the retinoic acid-induced differentiation of embryonic stem cells into neurons[J]. J Neurosci Res, 2008, 6(13):2809-2819.
- [2] 于洲,徐海滨. 体外诱导胚胎干细胞分化为神经细胞特性的实验研究[J]. 卫生研究, 2010, 39(5):545-549.
- [3] Baizabal JM, Covarrubias L. The embryonic midbrain directs neuronal specification of embryonic stem cells at early stages of differentiation[J]. Dev Biol, 2009, 325(1):49-59.
- [4] Bremer S, Hartung T. The use of embryonic stem cells for regulatory developmental toxicity testing in vitro—the current status of test development [J]. Curr Pharm Des, 2004, 10(22):2733-2747.
- [5] Germain N, Banda E, Gabel L. Embryonic stem cell neurogenesis and neural Specification[J]. J Cell Biochem, 2010, 111(3):535-542.
- [6] Sanchez-Pernaute R. Dopamine neurons from embryonic stem cells[J]. Neurologia, 2004, 19(2):73-76.
- [7] Baek DH, Kim TG, Lim HK, et al. Embryotoxicity assessment of developmental neurotoxicants using a neuronal endpoint in the embryonic stem cell test [J]. J Appl Toxicol, 2012, 32(8):617-626.
- [8] Baek DH, Park SH, Park JH, et al. Embryotoxicity of lead (II) acetate and aroclor 1254 using a new end point of the embryonic stem cell test [J]. Int J Toxicol, 2011, 30(5):498-509.
- [9] Bremer S, Hartung T. The use of embryonic stem cells for regulatory developmental toxicity testing in vitro—the current status of test development [J]. Curr Pharm Des, 2004, 10(22):2733-2747.
- [10] Zhang JQ, Yu XB, Ma BF, et al. Neural differentiation of embryonic stem cells induced by conditioned medium from neural stem cell [J]. Neuroreport. 2006, 17(10):981-986.
- [11] Kuegler PB, Zimmer B, Waldmann T, et al. Markers of murine embryonic and neural stem cells, neurons and astrocytes: reference points for developmental neurotoxicity testing [J]. ALTEX, 2010, 27(1):17-42.
- [12] Piersma AH. Validation of alternative methods for developmental toxicity testing [J]. Toxicol Lett, 2004, 149(1-3):147-153.
- [13] Steindler DA. Stem cells, regenerative medicine, and animal models of disease [J]. ILAR J, 2007, 48(4):323-338.
- [14] Baek DH, An SY, Park JH, et al. Transferability of a modified embryonic stem cell test using a new endpoint for developmental neurotoxicity [J]. Toxicol Mech Methods, 2012, 22(2):118-130.

公告栏

关于发布食品安全国家标准《食品中农药最大残留限量》 (GB 2763—2012)的公告

2012 年 第 22 号

根据《食品安全法》规定,经食品安全国家标准审评委员会审查通过,现发布食品安全国家标准《食品中农药最大残留限量》(GB2763—2012),自 2013 年 3 月 1 日起实施。

下列标准自 2013 年 3 月 1 日起废止:《食品中农药最大残留限量》(GB 2763—2005);《食品中农药最大残留限量》(GB 2763—2005)第 1 号修改单;《粮食卫生标准》(GB 2715—2005)中的 4.3.3 农药最大残留限量;《食品中百菌清等 12 种农药最大残留限量》(GB 25193—2010);《食品中百草枯等 54 种农药最大残留限量》(GB 26130—2010);《食品中阿维菌素等 85 种农药最大残留限量》(GB 28260—2011)。

特此公告。

附件:《食品中农药最大残留限量》. doc(略)

卫生部 农业部
二〇一二年十一月十六日