

胚胎干细胞试验及其在毒理学发育毒性安全性评价中的应用

于 洲 徐海滨

(中国疾病预防控制中心营养与食品安全所,北京 100021)

摘要:为解决胚胎毒性体内筛选方法需要大量的动物及人力、耗时、耗力的问题,介绍了胚胎干细胞试验及其在毒理学发育毒性安全性评价中的应用。胚胎干细胞试验可同时检测不同受试物对细胞增殖和分化的影响,通过受试物对细胞及个体的发育毒性和致畸能力的判断,将受试物分成3类,即无胚胎毒性、弱胚胎毒性和强胚胎毒性,该试验方法大大提高了体外替代实验的预测符合率。干细胞试验方法有望成为研究受试物胚胎毒性的体外替代实验模型。

关键词:胚胎;干细胞;毒性试验;安全;评价研究

Embryonic Stem Cell Test and Its Application in Safety Evaluation of Development Toxicity

YU Zhou, XU Hai-bin

(National Institute for Nutrition and Food Safety, Chinese CDC, Beijing 100021, China)

Abstract: The screening tests for embryotoxicity in vivo are time-consuming and expensive when they are carried out on large number of laboratory animals. Because embryonic stem cell test (EST) may detect the influence of test compounds to the pluripotent and differentiation of stem cells, it is designed to discriminate test compounds of three classes of embryotoxicity: none, weakly and strongly embryotoxic. EST improves the correlation between the in vitro data and the in vivo data, and will be an alternative in vitro test for embryotoxicity in the future.

Key word: Embryo; Stem Cell; Toxicity Tests; Safety; Evaluation Studies

目前,判断受试物是否具有发育毒性/致畸性的实验方法主要是 一段实验,由于实验时间较长,费用较高,而且与目前减少实验动物使用的趋势不相吻合,因此发育毒性实验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,又能高通量筛检受试物是否具有胚胎发育毒性的方法成为此类研究的目标。胚胎干细胞(Embryonic stem cell, ES cell)来源于早期胚胎,它在体外既可维持不分化而无限增殖,又能参与胚胎发育,分化为各种类型细胞和组织而形成器官,因此被称为多(潜)能性细胞^[1]。自从1981年Martin、Evans等成功地分离培养出未分化小鼠ES细胞以来,研究者利用ES细胞体外特性开展了多方面研究,根据ES细胞的特性而发展起来的胚胎干细胞实验(Embryonic stem cell test, EST)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^[2]。

1 胚胎干细胞实验方法

1.1 胚胎干细胞试验 ES细胞具有体外分化潜能,通过检测ES细胞在分化为心肌细胞的过程中

受试物对细胞分化影响的结果,结合ES细胞(D3)与纤维母细胞(Ba1B/C3T3)细胞毒性实验的结果,判断受试物对胚胎发育的毒性^[3,4]。其中选择心肌细胞作为分化后的发育衡量指标的原因,一方面是因为其灵敏度较高,可以检测到发育过程中细微的分化;另一方面是心肌细胞的作用与窦房结、心房、心室的完整功能相似,能够反映整个组织的发育特点;最后一点是可以不用显微操作,就可以获得定量的心肌收缩数据^[5]。

1.2 干细胞实验的评价方法

1.2.1 干细胞实验评价指标的组成^[6] (1)抑制干细胞分化为具有收缩功能的心肌细胞的受试物浓度ID₅₀D3;(2)产生干细胞细胞毒性的浓度IC₅₀D3;(3)产生纤维细胞细胞毒性的浓度IC₅₀3T3。

1.2.2 干细胞分化能力的评价

1.2.2.1 ES细胞分化成心肌细胞的能力是检测干细胞分化能力的指标^[5] 将750个细胞接种在加入不同受试物浓度的培养基上,37、5%CO₂和95%湿度条件下培养3d,形成胚体(Embryonic bodies, EB),然后将EB移到含有相同浓度的受试物的细菌培养皿中,培养2d后,挑单个EB接种在相应浓度受试物的24孔组织培养板上,EB自发地向心肌细

作者简介:于洲 男 硕士生

胞方向分化。到第 10 天时,检测不同浓度条件下 ES 细胞分化成具有收缩能力的心肌细胞的量,分别与对照组相比较,判断不同的受试物浓度与 ES 细胞分化能力的关系,同时作出浓度 - 效应曲线,并依据曲线求出抑制 ES 细胞 50% 分化能力的受试物的浓度 ID_{50} ^[7]。

1.2.2.2 目前常用的判别 ES 细胞分化的手段主要有 3 种 (1) 由于不同毒性受试物对细胞形态的影响不同,细胞形态是 EST 判断化合物毒性的标准,依靠显微镜观察细胞形态的变化,可以对受试物进行毒性结果分析。但是分化的、具有收缩功能的心肌细胞定量在镜下很难做到标准化,需要训练有素且有经验的技术人员才能做到相对准确的定量;(2) 提取发育过程中的细胞 RNA,进行 RT-PCR 分析,然后再进行 TaqMan PCR 实时分析,研究在受试物作用下,分化的心肌细胞中所含的特异的肌球蛋白重链基因(MHC 基因)的定量表达,从而判断受试物抑制 ES 细胞分化的情况,这样 EST 在受试物分类筛选中会有较高的灵敏度和准确性,同时会缩短培养时间;(3) 通过载体将绿色荧光蛋白基因转染 ES 细胞,受试物引起的 ES 细胞向心肌细胞分化的异常,可以启动荧光蛋白质基因表达,产生特异的绿色荧光蛋白质,发出波长在 509 nm 的绿色荧光,通过检测荧光的强度,判断分化的程度^[8,9]。

1.2.3 细胞毒性的评价 使用四甲偶氮蓝(MTT)实验法,在没有白细胞介素 1 条件的培养基中对受试物引起的 ES 细胞以及 3T3 成纤维细胞的细胞毒性进行评价。将 500 个/200 μ l 的 3T3 细胞和 ES 细胞接种在 96 孔的培养板上,每孔中加入不同浓度的受试物,同时设立阴性对照组。第 3、5 天更换培养基,第 10 天,用 MTT 法检测细胞活性,于 570/630 nm 处测量其吸光度,并绘成浓度 - 反应曲线,求出相对应的产生 50% 细胞毒性的受试物浓度,即: IC_{50} D3 和 IC_{50} 3T3^[10]。

1.3 实验结果分析

1.3.1 根据生物统计原理,结果采用下列公式进行计算^[11]。

$$5.9157 \lg(IC_{50}3T3) + 3.500 \lg(IC_{50}D3) - 5.307 (IC_{50}3T3 - ID_{50}D3)/IC_{50}3T3 - 15.72$$

$$3.651 \lg(IC_{50}3T3) + 2.394 \lg(IC_{50}D3) - 2.033 (IC_{50}3T3 - ID_{50}D3)/IC_{50}3T3 - 6.85$$

$$- 0.125 \lg(IC_{50}3T3) + 1.917 \lg(IC_{50}D3) + 1.500 (IC_{50}3T3 - ID_{50}D3)/IC_{50}3T3 - 2.67$$

1.3.2 结果评价^[11] 如果上述结果中, $>$ 且 $>$, 则受试物发育毒性为一级,即无胚胎毒性;如果上述结果中, $>$ 且 $>$, 则受试物发育毒性

为二级,即弱胚胎毒性;如果上述结果中, $>$ 且 $>$, 则受试物发育毒性为三级,即强胚胎毒性。

1.4 胚胎干细胞试验的特点 胚胎干细胞试验,主要是测定受试物质对细胞及个体是否存在发育毒性以及致畸能力的强弱,并依据测试结果将受试物分成 3 类,即无胚胎毒性、弱胚胎毒性和强胚胎毒性^[12]。ES 细胞应用于受试物筛选比其它方法优越。因为首先 EST 是一种体外检测方法,与体内方法相比,不用考虑对人体及动物体的副作用,而且可以区分受试物的效应细胞为生殖细胞还是体细胞;与其它体外方法(体外全胚胎或胚胎肢芽培养进行的筛选测试)相比,ES 细胞的获得不用大量的怀孕动物,一旦建系,就可以获得源源不断的细胞用于研究^[13]。其次 ES 细胞体外分化的潜能,使 EST 可以研究受试物对胚胎发育的毒性,有利于阐明发育毒理学;就细胞毒性而言,ES 细胞对受试物的敏感性高于成体组织,并且细胞检测中已有的关于特异基因和报告子检测方法的应用,使得研究受试物胚胎毒性更简便^[14]。

2 胚胎干细胞在毒理学研究中的应用

2.1 体外胚胎毒性的筛检 胚胎干细胞实验主要的应用领域是环境污染物、研发药品以及农药等化学制剂对人体以及动物胚胎致畸性、细胞毒性等可能存在的损伤的研究,作为哺乳动物发育毒性的体外代替方法。目前已经建立了稳定的细胞系,不需要受孕动物,并且根据试验目的的需要,细胞体外分化为特定的组织细胞的诱导模型也逐步成熟,通过这些可以对受试物的胚胎毒性进行高通量的检测^[15]。ECVAM(the European Center for the Validation of Alternative Methods)曾在大约 360 种受试物中挑选出具有明确体内胚胎发育毒性实验数据的 30 种,使用 EST 进行胚胎发育毒性检测,结果显示,与体内结论的符合率达到 82%,其中强胚胎毒性的符合率更达到 100%^[16]。因此使用 EST 对可能的胚胎毒性受试物进行初筛,在每年有上千种新合成化学制剂出现的今天,可以达到良好的鉴定、评价、管理和防护的目的。

2.2 判断受试物的胚胎毒性 通常原代细胞的培养或者建立稳定的细胞系的方法可用于分析体外受试物的致突变性和胚胎发育毒性,但是这些细胞分析系统没有涵盖早期的胚胎阶段到最终分化成特定细胞的全过程,通过受试物对 ES 细胞的发育全过程影响的检测,可以对受试物是否具有胚胎毒性做出正确的判断,提高检测的准确度^[17]。同时 EST 对受试物的检测终点是由 2 个部分组成的,一为细胞

毒性,二为胚胎毒性,可分别通过前述的实验获得,这是因为实际检测时会发现,受试物产生的胚胎毒性和细胞毒性浓度是有差别的。有些受试物在低浓度时即可抑制干细胞分化,而其对成纤维细胞和干细胞细胞毒性的浓度却比之高出很多个数量级,因此将2个毒性浓度进行综合考虑和计算分析,而不单纯的以某一个浓度为判断依据,对于最终正确判定受试物产生毒性的特点及其胚胎毒性的强弱有实际意义^[18]。

2.3 受试物胚胎毒性靶器官的判定 由于有些受试物的胚胎毒性的产生,可能的靶器官特异性较强,一般的组织细胞不能充分和准确地反应,比如具有明确的神经发育毒性的维甲酸,其对心肌胚胎发育毒性的剂量与神经系统相差较大,而且其作用于组织细胞的发生阶段和作用方式上也存在差异。ES细胞具有多能性,可以在不同的诱导条件下向特定的组织器官细胞分化,而且分化过程包括了整个细胞发育的全过程,利用ES细胞这一特点,可以对受试物可能作用的靶器官细胞及其方式和阶段进行初步判别^[19]。

3 目前 EST 仍存在的不足及展望

3.1 由于技术和条件的限制,ES细胞在体外培养的条件从理论上讲还不可能与体内胚胎中的多能细胞的生长条件完全相一致,因此ES细胞的体外分化通路和机制也难以完全相同于体内胚胎细胞的发育^[20]。所以在受试物的作用下,对于干细胞发育的干扰因素及机制的判断与体内结果将出现差异,影响到体外结论向体内的推断,降低了实验结果的可靠性。

3.2 目前,ES细胞体外分化为特定类型细胞大多采用诱导剂诱导的方法,特定类型的细胞的获得对判断受试物可能作用的效应细胞以及提高检测的准确性有重要作用。但是诱导剂本身可能具有毒性作用,同时诱导剂和诱导方法的使用也因人而异,这对于正确判定受试物可能作用的靶器官,以及对敏感组织细胞产生细胞毒性和抑制分化能力的检测产生偏差,因此如何达到分化细胞特异性与检测结果准确性的平衡,仍需要进一步研究^[21]。

3.3 在EST实验中,所得到特定的分化组织细胞,其纯化程度只是一个相对值,其中含有很多其它形式和特性的细胞。当受试物作用于ES细胞分化过程时,其它形式的细胞同样受到受试物的作用,可能产生相应的向其它特定组织细胞分化的效应,而这些效应对ES细胞向预期的特定组织细胞分化产生不确定的影响,进而对最终判定受试物引起的胚胎

毒性效应的程度和水平产生干扰^[21]。

参考文献

- [1] Thomson J A, Itskovitz Eldor J, Shapiro S S. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts[J]. Science, 1998,282:1145-1147.
- [2] Brown N A, Spielmann H, Bechter R. Screening chemicals for reproductive toxicity: the current alternatives [J]. The report and recommendations of an ECVAM EST work shop (ECVAM work shop 12), ATLA, 1995, 23 868-874.
- [3] Eisenbrand G, Baker V. Methods of in vitro toxicology[J]. Food Chem Toxicol, 2002, 40 193-201.
- [4] Bremer S, Pellizzer C, Coecke S. Detection of the embryotoxic potential of cyclophosphamide by using a combined system of metabolic competent cells and embryonic stem cells[J]. Altern Lab Anim, 2002,30(1) 77-86.
- [5] Laschinski G, Vogel R, Spielmann H. Cytotoxicity test using blastocyst-derived euploid embryonic stem cells: A new approach to in vitro teratogenesis screening [J]. Report Toxicol, 1991, 5 57-66.
- [6] ECVAM News and Views. Statement on the Scientific Validity of the Embryonic Stem Cell Test (EST) - an in vitro test for embryotoxicity[J]. ALTA,2002,30:265-273.
- [7] Department of Reproductive Toxicology, Laboratory for Toxicology, Pathology and Genetics. Validation of alternative methods for developmental toxicity testing [J]. Toxicology Letters,2004,149:147-153.
- [8] M Paparella, E Kolosov, B K Fleischmann. The use of quantitative image analysis in the assessment of in vitro embryotoxicity endpoints based on a novel embryonic stem cell clone with endoderm-related GFP expression [J]. Toxicology in vitro,2002,16:589-597.
- [9] Wilmut I. Pluripotent stem cells: biology and applications [J]. Trends Method, 2001, 7(6) 240-254.
- [10] Spielmann H, Pohl I, Doring B. The embryonic stem cell test (EST)-an in vitro embryonic stem cell test using two permanent mouse cell lines: 3T3 fibroblasts and embryonic stem cells[J]. Toxicol in Vitro, 1997,10 119-127
- [11] Alexandra Rolletschek, Przemyslaw Blyszczuk, Anna M Embryonic stem cell-derived cardiac, neuronal and pancreatic cell as model systems to study toxicological effects [J]. Toxicology Letters,2004,149:361-369.
- [12] M Klemm, E Genschow, I Pohl. Permanent embryonic germ cells of BALB/c J mice - an in vitro alternative for in vivo germ cell mutagenicity tests [J]. Toxicol In Vitro, 2001,15,447-453.
- [13] Scholz G, Genschow E, Pohl I. Prevalidation of the embryonic stem cell test - a new in vitro embryo toxicity test [J]. Toxicol in Vitro, 1999, 13 675-681.
- [14] Genschow E, Scholz G, Brown N. Development for prediction models for three in vitro embryo toxicity test[J].

学生营养餐实施 HACCP 研究概况

宋 钰

(协和医科大学公共卫生学院,北京 100021)

摘要:为促进学生营养餐的健康发展,为我国学生营养餐生产者和管理部门提供借鉴,综述了日本、美国和中国学生营养餐存在的主要卫生问题,日本、美国、欧盟和我国学生营养餐实施 HACCP 的研究和管理情况,针对我国学生营养餐 HACCP 的具体实施情况提出了研究建议。

关键词:膳食;学生;营养;危害分析与关键控制点

Review of Studies on HACCP Implemented in School Nutritious Meal

SONG Yu

(School of Public Health, Peking Union Medical College, Beijing 100021, China)

Abstract: To promote the development of the school nutritious meal and give reference for school nutritious meal manufactories and administration authorities in China, the article reviewed main hygiene problems of school nutritious meal in the United States, Japan and China. Various aspects of school nutritious meal in the United States, Japan, China and EU including current research progresses and management of HACCP system, as well as some recommendations and suggestions for school nutritious meal in China are presented.

Key word: Diet; Students; Nutrition; Hazard Analysis and Critical Control Point

学生营养餐能够改善学生的营养状况,对提高学生的身体素质、学习能力和交际能力具有明显的促进作用。目前世界上有近 50 个国家实行学校供餐计划。由于学生营养餐引发的食物中毒事件时有发生,专家建议采用 HACCP 体系改善学生营养餐的食品安全问题^[1]。现就 HACCP 在学生营养餐食品

安全方面的研究与应用进行综述。

1 学生营养餐存在的卫生问题

由学生营养餐引发的食品安全问题乃至食物中毒在世界各国时有发生。如:尽管日本的学校食堂和配餐中心具备较完善的学生营养餐生产设备、设

In Vitro Toxicol, 2000, 1: 51-62.

[15] Schwengberg S, Bohlen H, Kleinsasser K. In vitro embryotoxicity assessment with dental restorative materials[J]. Journal of Dentistry, 2005, 33: 49-55.

[16] Gabriele Scholz, Ingeborg Pohl, Elke Genschow. Embryotoxicity screening using embryonic stem cell in vitro: correlation to in vivo teratogenicity [J]. Cells Tissues Organs, 1999, 165: 203-211.

[17] Sukoyan M A, Kerkis A Y, Mello M R B. Establishment of new murine embryonic stem cell lines for the generation of mouse models of human genetic diseases[J]. Brazilian journal of medicinal and biological research, 2002, 35: 535-542.

[18] Mbsman T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays

[J]. Immunol Methods, 1983, 65: 55-62.

[19] Julio C Davila, Gabriela G Cezar, Mark Thiede. Use and Application of Stem Cells in Toxicology[J]. Toxicological Sciences, 2004, 79: 214-223.

[20] ZEBRT. Improvement of an in vitro stem cell assay for development toxicity: the use of molecular endpoints in the embryonic stem cell test [J]. Reproductive Toxicology, 2004, 18: 231-240.

[21] Rohwedel J, Guan K, Heger C. Embryonic stem cells as an in vitro model for mutagenicity, cytotoxicity and embryotoxicity studies: present state and future [J]. Toxicology in Vitro, 2001, 15: 741-753.

[收稿日期:2006-02-10]

中图分类号:R15;R99;Q132.8 文献标识码:E 文章编号:1004-8456(2006)03-0247-04

作者简介:宋钰 女 硕士生

