

综述

发育毒性体外筛选模型的研究现状和进展

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:利用发育毒性体外评价模型开展相关安全性评价,可避免人体或动物实验耗时、费力等缺点,适用于大规模体外高通量筛选。目前常用的体外评价模型中,胚胎干细胞实验、大鼠全胚胎培养以及体外胚胎肢芽培养实验因与体内实验结果一致性较强,已得到广泛的认可和推荐。但与一般毒理学体外试验发展相比,由于发育毒性受试物在体内消化代谢路线路径的差异,使得发育毒性试验的筛选实验的发展和完善受到阻碍,因此合理的利用新技术、新方法,提高筛选体系的合理性、系统性成为未来体外评价模型的方向。

关键词:发育生物学;毒性试验;实验室技术和方法;动物替代试验

Progress in Screening Tests of Developmental Toxicity in Vitro

YU Zhou, XU Hai-bin

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

Abstract: The safety assessment were carried out with developmental toxicity evaluation model applied to high throughput screening in large scale *in vitro*, which could avoid the shortcomings of human and animal experiments. In the current evaluation models, the embryonic stem cell test (EST), the whole embryo culture (WEC) and the micro mass culture (MM) were widely approved and recommended because they could have the high prediction values between *in vitro* and *vivo* tests. The development and advance of screening tests of developmental toxicity were hindered for the differences *in vivo* routes of chemical substances in comparison with general toxicity tests. So enhancing rationality and systematization of screening system using the application of the new technology and method would be the direction of evaluation model *in vitro*.

Key word: Developmental Biology; Toxicity tests; Laboratory Techniques and Procedures; Animal Festing Alternatives

传统的发育毒性体内实验方法耗时费力,且需要消耗大量的实验动物,因此建立设计科学、简便易行的体外发育毒性筛选实验模型成为研究的热点,通过早期对受试物进行高通量的筛选,可以大幅度提高化学物的研发效率。但同时也应当看到,由于受试物在体内消化代谢路线路径更复杂,发育毒性替代试验方法的建立和发展比其他毒性试验替代方法面临着更多的困难。目前发育毒性体外筛选模型实验与技术正在逐步完善和研究中。

1 发育毒性体外筛选方法现状

1.1 体外发育毒性的筛选替代方法 根据方法复杂性的增加可大致分为 3 种类型:细胞培养、器官培养和胚胎培养^[1]。(1)原代细胞的微团培养:根据化学物是否有抑制集落形成(与细胞分化、转移、迁徙、粘附、通讯等有关)检测有无致畸作用这一原理,先后建立了小鼠、大鼠肢芽细胞和中脑细胞微团等培

养方法,从目前的应用情况看,大鼠肢芽细胞和中脑细胞微团培养可用于潜在的致畸性研究,可作为发育毒性的选择项目之一^[1];(2)非哺乳动物胚胎体外培养:目前广泛应用于发育毒性模型、生态毒性监测以及化学毒物潜在致畸性检测,常用的亚哺乳脊椎动物有水螅、鱼、蛙、果蝇、蟋蟀、粘菌等^[2];(3)哺乳动物全胚胎培养:已建立了从受精卵到器官形成期不同阶段的体外哺乳动物全胚胎培养方法,其中小鼠的着床前阶段培养效果较好^[2]。

1.2 目前已建立的体外发育毒性替代方法的种类

已建立的体外发育毒性替代方法在实验设计的原理、依据和发育毒性筛选的应用方面有着一定的差异,但可以看出其采用的检测材料主要是原代和传代细胞,检测终点也多以抑制细胞分化为多^[3-5],表 1 列举了已建立的 15 种发育毒性体外筛选试验方法及其检测终点。

2 目前常用的体外筛选模型

近年来,经过广泛的应用和研究,欧洲替代方法研究中心(the European Center for the Validation of Alternative Methods, ECVAM)推荐了有效性较高的 3

基金项目:“十一五”国家科技支撑计划重大项目(2006BAK02A07)

作者简介:于 洲 男 助理研究员

通讯作者:徐海滨 男 研究员



表 1 15 种发育毒物体外试验名称及检测终点

名称	检测终点
小鼠卵巢肿瘤细胞贴附抑制试验	细胞间相互作用
V79 细胞代谢协调试验	细胞间通讯
人胚上腭间质细胞生长抑制试验	细胞增殖
动物病毒 (POX) 筛选试验	细胞生长
啮齿类动物全胚胎培养试验	胚胎生长
爪蟾胚胎致畸筛选试验	胚胎生长
果蝇胚胎细胞培养试验	细胞分化
神经胶质瘤细胞分化抑制试验	细胞分化
胚胎神经脊细胞分化抑制试验	细胞分化
胚胎癌细胞分化抑制试验	细胞分化
胚胎干细胞分化抑制试验	细胞分化
大鼠胚胎中脑及肢芽细胞培养试验	细胞分化
鸡胚神经视网膜细胞试验	生长、分化、相互作用
胚胎干细胞细胞毒性试验	A/D 比值
水螅试验	A/D 比值

注:A/D 比值:成体 (Adult) 和发育体 (Development) 的最低毒作用浓度/剂量比值。

个体外发育毒性筛选实验,即体外全胚胎培养试验 (whole embryo culture, WEC)、胚胎细胞微团培养试验 (micromass culture, MM) 和胚胎干细胞试验 (embryonic stem cell test, EST) 作为体外筛选的首选方法。除了作为体外筛选试验外,上述方法还可应用于发育毒性发生机制的研究,通过与整体动物试验相结合,提供有价值的毒性作用资料,并间接减少了所用动物的数量^[6]。

2.1 体外全胚胎培养 啮齿类动物全胚胎培养由 20 世纪 30 年代美国 Nicholas 和 Rudnick 等提出并实验,New 等通过不断的改进,于 20 世纪 70 年代将体外 WEC 培养方法成熟和完善。WEC 目前主要有间歇充气旋转瓶/管道培养法和连续充气旋转管培养法两种,从孕期第 9 至 10 天的大鼠子宫中取出胚胎,剥去 Reichert 膜,放入培养液中加入受试物,在含 O₂、CO₂、N₂ 环境中旋转培养,观察胚胎发育情况,记录胚胎存活,检测胚芽、卵黄囊直径、体节和体长等,以胚胎的心跳和血液循环是否存在作为胚胎存活的指标,以卵黄囊直径、颅臀长和头长、体节数和胚胎重作为胚胎生长发育的指标,最终根据 Brown 评分标准,对受试物可能影响器官形态分化的程度作出评价^[7]。

基于 WEC 模型的研究对象是正处于器官形成期的胚胎,而此期的胚胎对外源性的化学物质极为敏感,因此该方法一经推出便备受推崇,并被广泛地引入毒理/药理学、畸胎学和生理学等领域,为体外动态观察胚胎的正常生长发育和探索研究外源性化学物的致畸性、致突变性、胚胎毒性等提供了一种有效的和特殊的研究手段^[8]。

2.2 胚胎细胞微团培养 胚胎细胞微团培养是一项介于单细胞培养和器官培养之间的体外实验技

术,因其花费少、周期短、操作简单、准确性高等优点而广泛应用于筛检化学物质的致畸性。其原理主要是根据培养细胞集落数目减少程度,定性及定量评价化学物质的致畸作用。

胚胎细胞微团培养是从第 11 天的大鼠胚胎中取得代表中枢神经 (central nervous system, CNS) 的原代中脑细胞微团、肢芽区或其他区的细胞微团,在培养瓶中体外培养。同时分别加入不同浓度的受试物共同培养 5 d,用中性红染色判断细胞存活,用 Alcian 蓝染色判断肢芽软骨细胞分化数量,用苏木素染色判断 CNS 细胞分化数量,最终对上述结果进行分析和处理,求出影响细胞分化的终点的 IP50 肢芽细胞的 50% 增殖抑制浓度 (the concentration of cell survival or proliferation by 50% of the control, IP50),并将受试物组与对照组数据进行比较,评价受试物可能的发育毒性作用^[8]。

目前常用的 MM 实验方法主要有 4 种。(1) 将受试物直接加入细胞培养液中,通过观察受试物对细胞分化、增殖抑制作用可测试母体代谢的影响,排除母体的干扰;(2) 将代谢活化系统和受试物同时加入细胞培养液中,观察受试物经过活化代谢后是否对细胞产生毒性作用;(3) 体内/体外结合法,将受试物染毒孕鼠,经过一段时间后再取出肢芽细胞进行培养,观察体内生物转化对受试物致畸作用的影响;(4) 将人或动物血清加入细胞培养基中,测试血清中是否存在致畸因子^[8]。

胚胎细胞微团培养的最大优点在于简化了环境条件,排除了整体动物实验中复杂的干扰因素。另外通过人为地改变培养条件,有利于应用不同的技术手段观察和研究细胞结构和生化功能的变化,便于从细胞水平揭示外源性化学物质的致畸作用机理。

2.3 小鼠胚胎干细胞试验 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,人们纷纷利用 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 EST 可以从细胞毒性、分化抑制以及分子生物学水平反映受试物的发育毒性作用,其作为一种新兴的体外替代试验方法越来越为人们所关注。

目前 EST 中采用的 ES 细胞是较成熟的小鼠细胞株 D3,它可分化成各种类型的细胞,包括:心肌细胞、内皮细胞、胰岛细胞、神经细胞等。同时 EST 选择心肌细胞作为分化发育后的衡量指标,一方面是因为心肌细胞灵敏度较高,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^[9]。

EST常用的判别ES细胞分化情况的手段主要有3种。(1)依靠显微镜观察细胞形态的变化,由于不同毒性受试物对细胞形态的影响不同,可以通过细胞形态变化的程度对受试物进行发育毒性分析,但这种方法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)提取分化发育过程中细胞的RNA,进行逆转录聚合酶链反应(reverse transcriptase polymerase chain reaction, RT-PCR)分析,研究受试物作用条件下,分化的心肌细胞中所含的特异肌球蛋白重链基因(myosin heavy chain; MHC基因)表达量的变化情况,从而判断受试物抑制ES细胞分化的程度;(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发育的异常,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,并发出波长509 nm的绿色荧光,通过检测荧光的强度可以间接判断出分化发育的情况^[10]。

EST用于发育毒性的体外筛选,具有比其方法更优越的一些特点。首先与其他体外方法相比,ES细胞的获得不用大量怀孕的动物,一旦建系就可以源源不断地获得细胞用于研究;其次就发育毒性而言,ES细胞对受试物的敏感性高于成体组织,并且在细胞分化程度检测中,对特异基因和报告子检测方法的应用和更新,使得研究受试物发育毒性作用变得更简便^[11]。

3 发育毒性体外筛选模型的进展

3.1 体外代谢模型的应用 在发育毒性安全性评价过程中,受试物体内吸收、分布、消化和排泄途径的明确,对于最终判断和评价受试物的毒性有着至关重要的作用。目前,体外筛选模型由于缺少体内的生物转化体系,受试物的毒性作用机制与体内存在着较大的差别,因此结合科学的体外模拟代谢消化模型,提高体外毒性筛选模型的有效性,成为体外发育毒性筛选模型面临的主要问题。

体外模拟代谢模型建立的基础,主要依靠人体内生物转化体系功能的阐明,以及人体内表相分布的相关数据。目前通过对上述数据的整合,初步建立了演算模型,模拟受试物在体内的吸收、分布、代谢的过程,比如模拟受试物在血液和组织中的溶解性,血液流进和流出组织的量,以及组织对受试物的代谢能力等^[14]。通过上述推断,可以进一步计算出受试物在体内不同器官分布的量,在血液中的实际浓度,以及对靶器官作用的浓度,最终将结果作为体外高通量筛选模型的依据。

受试物的毒性作用效应与受试物作用浓度和暴露时间有关^[12],体外代谢模型可以从量上解释环境中受试物的作用浓度与体内受试物对靶器官作用浓度的关系。一般来说,环境中受试物作用浓度与体内作用浓度差别较大,因为受试物通过吸收、分布和生物转化作用后,才会以相同或不同的形式作用于靶器官。另外许多毒性物质需要通过生物转化其毒性效应才能出现。当然,不同物种间生物转化和代谢分布的模式也有差别,不能简单地将结果从实验动物外推到人;另外,在相同物种间,由于遗传基因和生活方式的差别,个体生物转化能力也存在差异,从而造成对毒性物质的生物转化和代谢能力的不同^[13]。因此,以生理学为基础,结合解剖学和生物化学建立起来的体外代谢模型,可以在很大程度上解决上述的问题。

3.2 毒性基因组学的应用 受试物引起人或动物的毒性反应,最终是在细胞水平上发挥作用,造成细胞死亡或分化发育异常。基因组学技术的发展,尤其是DNA微阵列芯片分析技术(DNA gene microarray),为观察受试物对细胞整个基因组表达变化提供了可能^[15]。在研究体内与体外发育毒性实验模型的过程中,毒性基因组学做为一种有效评价手段,目前已广泛应用于毒性作用机制、毒性靶基因的鉴别以及早期毒性作用特异性生物标记物的确定等研究中。比如采用维甲酸作为具有明确致畸作用的受试物,采用DNA矩阵研究可确定致畸作用过程中可能的致畸敏感基因,并可将其作为可能的体外致畸模型中的报告基因^[15]。

毒性基因微阵列(tox-gene microarray)的构建,是以毒性基因组序列信息为基础,微阵列可用于定量分析毒性基因的转录活性及序列。毒性基因微阵列主要分为两种:诱导型微阵列和演绎型微阵列。主要用于化学物质暴露前后机体组织mRNA含量变化的检测^[16]。目前普遍认为微阵列技术在研究毒性作用机制、化学物质毒性预测、剂量-反应关系、实验数据外推、混合化合物毒性鉴定等方面有较大应用前景。

3.3 斑马鱼实验模型的应用 近年来,斑马鱼实验模型因其自身具有的优点,在发育毒性筛选及安全性评价,如生殖毒性、发育毒性、急性毒性、神经毒性、致癌毒性、神经行为毒性、心血管毒性、内分泌毒性等领域中得到了广泛的应用^[17]。

斑马鱼实验模型做为体外发育毒性筛选模型,其自身具有非常独特的优点:(1)斑马鱼的体积较小,成体鱼体长平均仅1~1.5英寸,可以避免实验场地的空间的限制,并大幅度节省实验费用;(2)斑

马鱼的繁殖速度非常快,可以大量获得,平均一对成年鱼,一个早晨可以产下 200~300 枚鱼卵;(3)斑马鱼卵具有透明的特点,便于在实验中观察胚胎的生长发育情况;(4)斑马鱼遗传背景非常清晰;(5)斑马鱼成熟时间快,平均 3~6 个月就可发育成熟;(6)斑马鱼便于进行转基因操作,可实现报告基因转入和表达^[18]。另外不同于啮齿类动物,斑马鱼的整个发育过程很容易被观察,因为斑马鱼的卵从排出到组织形成过程,一直保持高度的透明性,便于观察和测量脑、心脏等组织在暴露于受试物条件下,发育过程中的形态变化情况。同时斑马鱼实验中发育毒性的观察可从母代连续观察到子代,而不同于其他模型中只能利用收集的胚胎^[19]。

4 体外筛选模型的前景

目前新研发的化学制品或药物的数量大大超过注册和授权的速度,但迄今仅少数物质的发育毒性经过安全性评价,人群面临的潜在危险性大大增强。所以体外发育毒性筛选模型,如全胚胎培养技术等已逐渐被相关评价机构接受并纳入了安全性评估规程;同时体外药物代谢动力学、毒性基因组学等新技术的研究和应用,有助于进一步提高体外胚胎毒性评价的精确度和可预测性^[20]。

当然,在正视体外发育毒性筛选模型和相关技术、方法取得进展,节省了大量人力、物力的同时,也应当清楚地认识到,因为发育毒性涉及亲代两性,从配子到下一代出生的多个发育阶段,无法只用一、二种方法就可以回答复杂的毒性问题。另外,目前体外发育毒性筛选试验采用的都是相对单一的测试终点,不能全面反映发育毒性受试物的毒作用机制,因此目前国内外学者都建议将不同终点的体外筛选试验进行组合,以便提高体外发育毒性筛选和评价的价值^[21]。

参考文献

- [1] DASTON G P. The theoretical and empirical case for *in vitro* developmental toxicity screens, and potential applications [J]. *Teratology*, 1996, 53(6):339-344.
- [2] LIN GH Y. Prediction of teratogenic potential and a proposed scheme for teratogenicity screening of industrial and developmental materials [J]. *In Vitro Toxicol*, 1987, 1(3):203-217.
- [3] EISENBRAND G, BAKER V. Methods of *in vitro* toxicology [J]. *Food Chem Toxicol*, 2002, 40(2-3):193-201.
- [4] STIGSON M, KULTIMA K, JERGIL M, et al. Molecular targets and early response biomarkers for the prediction of developmental toxicity in *in vitro* [J]. *Altern Lab Anim*, 2007, 35(3):335-342.
- [5] LEWIN D A, WEINER M P. Molecular biomarkers in drug development [J]. *Drug Discov Today*, 2004, 9(22):976-983.
- [6] FLICK B, KLUG S. Whole embryo culture: an important tool in developmental toxicology today [J]. *Curr Pharm Des*, 2006, 12(12):1467-1488.
- [7] BROWN N A, SPIELMANN H, Bechter R. Screening chemicals for reproductive toxicity: the current alternatives [J]. *ATLA*, 1995, 23(2):868-874.
- [8] PIERSMA A H. Validation of alternative methods for developmental toxicity testing [J]. *Toxicology Letters*, 2004, 149(1-3):147-153.
- [9] ALEXANDRA ROLLETSCHEK, PRZEMYSŁAW BLYSZCZUK, ANNA M. Embryonic stem cell-derived cardiac, neuronal and pancreatic cell as model systems to study toxicological effects [J]. *Toxicology Letters*, 2004, 149(1-3):361-369.
- [10] SCHWENBERG S, BOHLEN H, KLEINSASSER N. *In vitro* embryotoxicity assessment with dental restorative materials [J]. *Journal of Dentistry*, 2005, 33(1):49-55.
- [11] AHUJA Y R, VIJAYALAKSHMI V, POLASA K. Stem cell test: a practical tool in toxicogenomics [J]. *Toxicology*, 2007, 231(1):1-10.
- [12] 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.
- [13] EKINS S. Systems-ADME/Tox: resources and network approaches [J]. *Pharmacol Toxicol Methods*, 2006, 53(1):38-66.
- [14] EKINS S, NIKOLSKY Y, NIKOLSKAYA T. Techniques: application of systems biology to absorption, distribution, metabolism, excretion and toxicity [J]. *Trends Pharmacol Sci*, 2005, 26(4):202-209.
- [15] STIERUM R, HEIJNE W, KIENHUIS A, et al. Toxicogenomics concepts and applications to study hepatic effects of food additives and chemicals [J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2005, 207(2 Suppl):179-188.
- [16] BOVERHOF D R, ZACHAREWSKI T R. Toxicogenomics in risk assessment: applications and needs [J]. *Toxicol Sci*, 2006, 89(2):352-360.
- [17] ADRIAN J HILL, HIROKI TERAOKA, WARREN HEIDEMAN, et al. Zebrafish as a model vertebrate for investigating chemical toxicity [J]. *Toxicological Sciences*, 2005, 86(1):6-19.
- [18] TON C, LIN Y, WILLETT C. Zebrafish as a model for developmental neurotoxicity testing [J]. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol*, 2006, 76(7):553-567.
- [19] KÜSTER E. Cholin and carboxylesterase activities in developing zebrafish embryos (*Danio rerio*) and their potential use for insecticide hazard assessment [J]. *Aquat Toxicol*, 2005, 75(1):76-85.
- [20] BERNAUER U, OBEREMM A, MADLE S, et al. The use of *in vitro* data in risk assessment [J]. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*, 2005, 96(3):176-181.
- [21] HUUSKONEN H. New models and molecular markers in evaluation of developmental toxicity [J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2005, 207(2 Suppl):495-500.

[收稿日期:2008-11-20]