



胚胎干细胞试验预测胚胎毒性替代方法进展

程树军^{1,2}, 秦瑶³, 喻欢⁴, 陈或^{1,3}

(1. 广东出入境检验检疫技术中心, 广州 510623; 2. 广东省动植物与食品进出口技术措施研究重点实验室, 广州 510623;
3. 广州市华代生物科技有限公司, 广州 510623; 4. 中山大学公共卫生学院, 广州 510080)

【摘要】 小鼠胚胎干细胞试验(EST)是通过 ECVAM 正式验证的胚胎和发育毒性的动物试验替代方法。在新技术的推动下, 多项优化的 EST 方法通过基因转染、利用人来源的干细胞、增加检测通量、组合检测终点、量化检测指标等方式, 提高了 EST 方法预测胚胎毒性的科学相关性和检测效率。在整合测试策略的原则之下, 经过大规模化学物质的前验证和标准化试验, 新的 EST 方法可单独或作为组合试验的一部分可以应用于先导药物的研发和化学品的胚胎毒性预测及机制研究。

【关键词】 胚胎干细胞试验; 胚胎和发育毒性; 替代方法; 预测

【中图分类号】 R-332 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2016) 01-0081-04

doi: 10.3969/j.issn.1671.7856.2016.001.016

Progress for alternatives methods predict the embryotoxicity by embryonic stem cell test

CHENG Shu-jun^{1,2}, QIN Yao³, YU Huan⁴, CHEN Yu^{1,3}

(1. Guangdong Inspection and Quarantine Technology Center, Guangzhou 510623, China;
2. Guangdong Key Laboratory of Import and Export Technical Measures of Animal,
Plant and Food, Guangzhou 510623, China; 3. Guangzhou Calt Biotech. Ltd, Guangzhou 510623, China;
4. School of Public Health, Sun Yat-sin University, Guangzhou 510080, China)

【Abstract】 Embryonic Stem cell Test (EST) is an alternative testing method for testing embryotoxicity and developmental toxicity which have been validated by the European Centre for Validation of Alternative Methods (ECVAM). Under the promote of new technology, EST method has been refined by many ways including gene transfection, utilizing human-derived stem cell, increase the assay throughput, integrating test endpoints and quantifying the test indexes, which enhanced scientific relevance and testing efficiency. Within the principle of integration testing strategy (ITS), conducting pre-validation tests and standardized experiments on a large scale of chemicals, the new EST method as a individual test or a part of integrated test system is promising to apply on the research of lead drugs and the embryotoxicity prediction and mechanism study of chemicals.

【Key words】 Embryonic stem cell test; Embryotoxicity and developmental toxicity; Alternative method; Predictive

胚胎干细胞是毒性预测的有用工具, 2003 年, 欧洲替代方法验证中心 (european centre for validation of alternative methods, ECVAM) 发布了通

过验证的胚胎干细胞试验方法 (embryonic stem cell test, EST), 成为胚胎和发育毒性动物试验的三个替代方法之一^[1]。经典的 EST 方法周期偏长、通量

【基金项目】 检验检疫标准修订计划 (2013B381r); 广东省科技计划项目 (2015A030402005)。

【作者简介】 程树军 (1971 -), 男, 研究员, 研究方向: 动物替代实验方法开发与标准化。E-mail: chengsj@126.com。

低,形态观察的检测终点量化程度低。10 多年来,传统的 EST 方法已取得了重要进展,例如诱导多能干细胞(induced pluripotent stem cells,iPS)技术的革命性突破,解决了测试系统来源困难的问题^[2];基于微孔培养技术与流式标志物分析的高通量测试提高了定量检测毒性终点的效率^[3-4];"组"学技术和信号转导技术的运用优化了检测终点的特异性^[5-6]。技术上的进步提高了 EST 方法的适用范围,为胚胎干细胞应用于毒性机制研究和预测研究提供了快速发展的机遇,同时也对这些优化方法的验证提出了挑战。

1 验证的 EST 方法

德国动物试验替代方法评价中心(Centre for Documentation and Evaluation of Alternative Methods to Animal Experiments, ZEBET)于 1997 年建立了利用两种小鼠细胞系(成纤维细胞 3T3 和胚胎干细胞 D3)进行胚胎毒性测试的替代方法,2003 年,经过优化的 EST 方法通过了 ECVAM 的验证^[1]。2009 年,采用 E14Tg2A 小鼠胚胎干细胞系的 EST 方法发布成为 SN 标准^[7]。EST 方法采用了两种细胞,其中 mES(胚胎干细胞)代表胚胎组织,3T3 成纤维细胞代表成体组织。试验由三个程序组成,分别是检测受试物的 mES 细胞毒性、3T3 细胞毒性和检测抑制胚胎干细胞分化为心肌细胞的能力。ES 细胞分化抑制实验为 EST 方法的关键,实验时 mES 细胞先进行悬滴培养,3 d 后将形成的胚胎体(embryoid bodies,EB)转移至含有不同浓度化学物培养基的培养皿中悬浮培养。培养 2 d 后再将其接种在含相应化学物浓度的 24 孔组织培养板内进行贴壁培养。培养 5 d 后在相差显微镜下进行观察,计数含搏动心肌细胞的孔数,与对照组相比,得出不同浓度化学物抑制 ES 细胞向心肌细胞分化的百分比。根据浓度-反应曲线计算 ES 细胞分化抑制 50% 的化学物浓度(ID₅₀)。

实验得到 3 个毒理学反应终点的参数,分别是① ES 细胞半数分化抑制浓度(ID₅₀);② 3T3 细胞半数生长抑制浓度(IC₅₀ 3T3);③ ES 细胞半数生长抑制浓度(IC₅₀ ES)。ECVAM 验证的预测模型把试验结果转化为线性判别函数,通过公式分别计算判别值 I、II 和 III。 $I = 5.916 \lg(IC_{50} 3T3) + 3.500 \lg(IC_{50} ES) - 5.307 [(IC_{50} 3T3 - ID_{50}) / IC_{50} 3T3] - 15.27$, $II = 3.651 \lg(IC_{50} 3T3) + 2.394 \lg(IC_{50} ES) - 2.033 [(IC_{50} 3T3 - ID_{50}) / IC_{50} 3T3] - 6.85$,

$III = -0.125 \lg(IC_{50} 3T3) - 1.917 \lg(IC_{50} ES) + 1.500 [(IC_{50} 3T3 - ID_{50}) / IC_{50} 3T3] - 2.67$ 。最后根据判别值预测胚胎毒性并分类。无胚胎毒性: $I > II$ 且 $I > III$;弱胚胎毒性: $II > I$ 且 $II > III$;强胚胎毒性: $III > I$ 且 $III > II$ 。验证研究表明 EST 试验的总预测准确度可达 78%。

EST 方法是快速筛查环境污染物胚胎毒性的可靠方法,如用于环境雌激素、三唑类杀菌剂、酚、酞酸酯、农药等的评估。也可以用于工程纳米材料胚胎毒性的研究,如研究表明用金或硅烷包被的钴铁氧体纳米颗粒分类为非胚胎毒性,而其它纳米颗粒如金盐、钴铁氧盐等分类为弱胚胎毒性。EST 试验很少发现假阴性结果,但值得注意的是有些特异性抑制其它组织发育,如腭区、四肢或神经系统发育的致畸物,可能在标准 EST 中检测不出。

2 试验系统的优化

2.1 人 ES 源多能干细胞

有研究采用两种人的胚胎干细胞系 H9 和 LSJ-1,诱导分化 3 d 后形成单层多能干细胞,受试物作用后检测内胚层细胞转录因子 SOX17 核转录的减少情况。对已知体内效应的 71 种药物相关化合物的致畸作用研究表明,当阈值设为 5 μm 时,精确性为 94% (97% 敏感性和 92% 特异性)。进一步研究 15 种理化特性不同于小分子药物的环境毒物,发现与体内致畸作用高度一致^[3]。胚胎毒性预测的体外方法最好选择人来源的细胞,这也是“基于胚胎干细胞的新的替代试验”欧洲研究联盟(Embryonic Stem cell-based Novel Alternative Testing Strategies, ESNATS)达成的共识,在联盟合作框架下,已开发了多个基于人胚胎干细胞(hESC)的方法,覆盖发育过程的不同方面。如 NKK 系统模拟早期多胚层的分化,UKNI 系统模拟特定的神经内胚层的分化,UKN2 系统,也称为“神经嵴迁移抑制试验(migration of neural crest cell, MINC),用于评估对神经分化有影响的胚胎毒性。可见把胚胎发育不同阶段进行细分类,在 ES 细胞定向分化过程中给予毒性干预是建立特异性 EST 替代方法的有效途径。

1.2 诱导多能干细胞

人诱导多能干细胞(iPS)具有与人 ES 细胞相同的分化能力,在毒理学领域应用前景广泛,而且不涉及生物学伦理问题。例如反应停的毒性测试,已证明利用啮齿类动物的体内实验结果与人存在极大的差异性,同样 mEST 方法的预测分类为弱胚

胎毒性。因为反应停的作用机制在于抑制对四肢发育的调节起关键作用的泛素连接酶的活性,采用检测心肌分化为终点的传统 EST 方法显示其特异性不足。如果采用来源于人骨髓单核细胞的 iPS 检测反应停的胚胎毒性则结果为强胚胎毒性。类似的情况也出现在抗癫痫药丙戊酸钠的检测中,因此来源于人的 iPS 建立的试验系统比 mEST 方法预测性更好^[2]。

1.3 转染荧光素酶

EST 试验周期长达 10 d,如果把心肌分化的检测指标提前可以缩短实验时间。早期尝试将绿色荧光蛋白(green fluorescent protein, GFP)基因转入 ES 细胞,通过检测 GFP 荧光直观判断反应终点, GFP 的表达在第 7 天达到高峰^[4]。Suzuki 等^[8]用心脏和神经冠衍生物表达转录蛋白 1(Hand 1)或心肌病相关蛋白 1(Cmya 1)基因稳定转染的 ESC 细胞为测试系统,建立了 96 孔板检测荧光素酶报告基因的方法,称为“Hand 1-Cmya 1-ESTs”。Hand 1 和 Cmya 1 在心脏的早期发育过程中起到关键作用,可以代替心肌跳动作为毒性效应的终点,检测时间可缩短到 6 d。由于只转染 Hand 1 基因的细胞较转染两个基因的细胞荧光素酶的信号强,最新优化的方案称为“Hand 1-Luc ESTs”方法,进一步缩短检测时间至 5 d^[9]。

3 检测终点及组合

3.1 场电位

传统 EST 方法以显微镜观察跳动的心肌细胞为检测终点,通量低,以心肌场电位作为终点可以实现高通量。采用含有多电极阵列的培养室培养小鼠 D3 胚胎干细胞,检测胚胎毒性物质作用引起的分化细胞的场电位、心肌跳动和抗心肌钙蛋白的免疫组化,结果三者具有一致性^[6]。

3.2 神经胚胎干细胞试验

心肌分化主要与中胚层相关,因而经典 EST 方法不能检测可能对其它胚层发育产生影响的毒物。随着 EST 细胞向不同胚层细胞分化技术的日渐成熟,目前已开发出促进 ES 细胞向神经外胚层优势分化的培养基和方法,ES 细胞分化培养 13 d,可基于形态学分析(如树突生长评价)和转录组学分析(以致癌基因的生物学发生过程为主),筛查和预测神经发育胚胎毒性的化合物^[10]。这类方法称为神经胚胎干细胞试验(nEST)。如用于卡马西平、邻苯二甲酸单乙基己基酯、氟硅唑苯妥英、环唑醇、己唑醇、丙戊酸等药物的筛查。单个化合物体外检测中组合 EST 和 nEST 的终点,可明显提高检测的效率

和准确性。

3.3 非心肌细胞分化

以心肌细胞分化为终点的 EST 方法的总准确度可达 78%,如果同时检测化合物对 ES 细胞向心肌分化、成骨分化、软骨分化和神经分化的抑制作用可提高其预测准确性和特异性。成骨细胞来源于中胚层,对于骨基质产生及其矿化起到特殊的作用。将小鼠 D3 胚胎干细胞以单细胞悬液直接铺板,培养过程中添加抗坏血酸、地塞米松和 β -甘油磷酸盐。诱导培养 14 d,通过检测成骨细胞特异性的标志物,如茜红 S 染色、碱性磷酸酶活性分析和 Bglap、Runx2 基因表达作为检测终点。经 8 种胚胎毒性化合物和 4 种已知诱发骨骼损伤的化合物的验证研究表明,以成骨细胞分化为终点的方法与经典的 EST 方法相关性较好^[11]。

3.4 基因表达谱

把分子生物学技术应用于 EST 检测,可提高效率和预测能力。最开始尝试把某个分子作为检测终点,后来尝试把多基因和通路调节作为鉴别发育毒性的方法。例如,基因组学技术发现,未经化合物暴露的 ESC 分化培养物中 38 个基因上调,而经发育毒物暴露 24 h 发现特定基因表达的下调。采用连续的基因分析技术,实时检测 ESC 的分化基因,鉴别出 26 个与发育毒性相关的分化基因,称为 EST 生物标志物。用基因指纹方法预测单一剂量发育毒性,与体内一致性达 67%^[12]。在检测时间方面,如果以经过筛选出的 16 个分化基因标志物的表达为检测指标代替形态学观察,可缩短检测时间为 5 d^[5]。这些基因涉及外胚层形成(*Nrcam*, *Nes*, *Shh* 和 *Pnpla6*)、内胚层形成(*Flk1* 和 *Afp*)、中胚层形成(*Mesp1*, *Vegfa*, *Myo1e* 和 *Hdac7*)和一般的细胞发生(*Cdk1*, *Myc*, *Jun*, *Mixl*, *Cer* 和 *Wnt3*)。采用的指标为使目的基因表达下降 50% 的化合物浓度。

3.5 信号通路

2009 年, Uibel 等人开发了 ReProGlo 方法,利用基于干细胞建立的体外系统预测药物和化学品的胚胎毒性。通过荧光素酶报告基因检测药物引起的 Wnt/ β -catenin 信号通路改变,后者是生物早期胚胎发育过程中极为保守的转导通路。经改良后的方法可以高通量的同时检测细胞活性和荧光素酶报告基因活性,试验过程仅需 3 d。该方法在欧盟 ChemScreen 计划项目内经过了扩大范围的测试研究^[13],经检测的化学物质从 17 种扩大到了 80 种,并结合了化合物的结构分析,其预测模型为:① 阳性:化学物对 Wnt 信号有特异性影响,无细胞毒性或只在

更高级浓度才有细胞毒性;② 阴性:不管化合物有无细胞毒性,都对 Wnt 信号通路无影响;③ 非特异性阳性:化学物对 Wnt 信号有特异性影响,同时也具有细胞毒性。优化后的 ReProGlo 方法预测胚胎毒性的假阳性率比较低,适用于药物开发早期的先导物设计和化合物胚胎毒性大规模筛查,对于其相对较高的假阴性率,不适合单独用于监管目的。

3.6 蛋白组学方法

蛋白组学方法可用于监测 D3 细胞向心肌细胞的分化,记录心肌分化过程中心肌蛋白的表达,其中最主要的是肌球蛋白重链和肌动蛋白。采用类似技术发现已知的早期神经发育标志 $\beta 3$ 微管蛋白($\beta 3$ Tubulin Tuj-1)的表达可作为 EST 方法的检测终点,适用于甲基汞类物质的测试。D3 细胞分化过程中暴露于胚胎毒物,经全蛋白组学分析发现其中 57 种蛋白上调和 42 种蛋白下调,大多数上调蛋白与心肌细胞的功能相关,而下调蛋白主要为多能性标志蛋白、伴侣蛋白和核糖体蛋白。表明在转录组水平,相关基因的表达与蛋白质水平呈正相关,这也说明蛋白质组可作为 EST 的检测终点^[14]。

4 检测方法的量化和高通量

ECVAM 验证的 EST 试验过程长,操作较为复杂,通常采用 24 孔板观察反应终点,由于每种化合物需要设置几种不同的浓度,工作量非常大。而且用跳动的胚胎体为定量检测参数,精确度不高。如果采用低粘附性 96 孔版代替传统悬滴实验进行 ES 细胞向心肌细胞分化抑制实验,并采用自动测试心肌细胞跳动的仪器简化步骤,可建立高通量的 EST 实验方法以提高检测效率。再如用流式细胞检测心肌细胞分化早期的特异蛋白质(肌球蛋白重链和肌动蛋白),代替分化后期出现的心肌纤维跳动,可缩短检测时间到 7 d。如果以血管生成紊乱作为 EST 的终点,采用基因技术可建立检测心肌细胞血小板内皮细胞粘附分子(Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule 1, PECAM-1)和血管内皮钙粘素基因(VE-Cadherin)表达变化的方法,这两个基因与心肌跳动呈线性相关。另外两个心肌的标志物,如 NK2 同源框和肌球蛋白重链基因表达分析也可作为 D3 细胞向心肌细胞分化的检测终点。此外,采用转染 Hand1 和 Cmyl 基因的 D3 细胞进行 EST 检测,可实现检测的高通量,但其缺点是只能检测心肌方向的分化^[8-9]。这些高通量方法中,基于流式技术的 EST 方法正处于验证过程中^[11]。修订后的 SN 标准也补充了这一相对成熟的技术。

5 组合策略的应用

EST 试验、全胚胎培养试验和斑马鱼模式动物试验是目前体外预测发育毒性的主要方法,这些方法都有其适用范围和局限性。Sogorb 等建立了分层的发育毒性测试策略,可以利用这些体外方法评价发育毒性,并根据测试需要逐渐增加模型的复杂性、技术复杂性和费用。第一步为短期的细胞水平测试,以测定胚胎早期分化阶段的作用;第二步为较长时间的细胞水平的胚胎毒性测试,以研究对胚胎后期发育产生作用的毒物;如果前两步的试验结果均为阳性,则可以考虑受试物为胚胎毒物,如果为阴性,则需要进行第三步的试验,即考虑使用胚胎体的测试,如全胚胎试验和斑马鱼模型,根据整个胚胎的分子和形态学的改变进行危害识别,而不只是以细胞的分化为指标^[15]。短期的细胞水平的胚胎毒性预测主要为试验周期小于 5 d 的改良 EST 试验,如基于区分 EST 功能的基因组学方法^[5],EST 早期化学物暴露中基因的下调和活性测试,ES D3 细胞的转录组学测试^[12],神经性 EST 的转录组学方法等^[14]。长期的细胞水平胚胎毒性试验以试验周期超过 6 的 EST 方法为主,如经典的 EST 试验、血管生成分化作用和基因鉴别试验^[5]、化学发光 EST 试验^[8]、EST 结合蛋白组学的方法、人胚胎干细胞的试验^[2]等。但这样的组合模式,应建立在每个方法标准化的基础上,而且需要大规模的数据解读,目前尚处于开发阶段,也缺少必要的决策判定步骤。

Panzica-Kelly 等开发了仅用 D3 细胞和两个终点评估化合物胚胎毒性的决策树模型,分别是细胞活性改变 50% ($< 22 \mu\text{m}$, $22 \mu\text{m} \sim 200 \mu\text{m}$ 或 $> 200 \mu\text{m}$ 3 个浓度),且在此浓度下能引起一组 12 个发育调控的目的基因至少 8 个基因下调 10% 以上,该决策树能正确预测 65 个化学物中 45 个化合物为致畸物,其优点是缩短检测时间为 4 d,且只需一种细胞的测试,缺点是只能提供有或无胚胎毒性的分类,而不是传统 EST 方法的三分类。

组合测试策略的目的是使用较少的方法,实现对人发育/胚胎毒性最大程度的预测。目前的组合策略研究,不但组合了不同种属来源的细胞水平测试(如 Mes, hESC 和 iPS),组合了不同水平的测试(形态学观察、基因组和蛋白组水平),还组合了不同适用范围化合物的测试(神经发育、心肌发育和骨骼发育等)。对组合中的单个方法的预测能力、适用范围还缺少明确的验证,不同方法间的分层次序、互补性、权重分析、决策程序也缺少足够的技术支持。目前的整合策

略研究更多的是一种探索,但其代表了利用 ES 细胞替代发育毒性动物实验的研究方向。

6 讨论

替代实验方法通常由试验系统、检测终点、检测方法和预测模型 4 个基本要素组成,多数对于 EST 方法的改进都集中于这几个要素。首先对于试验系统,采用更复杂的或更接近人类胚胎发育过程的系统,能够更好地反应人体发育的生物学过程的复杂性,从而提高检测方法的预测性,如使用人来源的干细胞(如 hESC、iPS 或转染人基因的测试系统)代替小鼠 ES 细胞的研究。其次,对于检测终点的选择仍以心肌分化为主,因为抑制心肌分化可以覆盖约 80% 的胚胎毒性;因而大多数研究集中于心肌终点的前移,不管是分子水平、基因水平还是蛋白水平,但值得注意的是一旦检测点前移,虽然有可能检测周期有所缩短,但也可能会带来准确性的下降,因为即使是心肌的分化也是多基因复杂调控的结果,对于检测指标的组合需要大量的化合物测试才能达到传统 EST 的预测水平。心肌以外的终点在胚胎发育过程中的权重还未完全了解,因而对于神经分化和骨分化终点的检测仍是心肌分化终点的有益补充。第三,检测方法的改进紧跟材料学、仪器和生物学技术的发展,例如借助培养板材料的发展可开发检测场电位的方法、用低粘度 96 孔板培养可建立中通量的 EST 方法,应用高内涵成像技术可定量神经细胞分化的形态学、使用荧光素酶技术可将检测终点进一步量化和自动化。其优点是及时运用现阶段技术的发展成果,缺点是标准化程度有待提高。第四,对于预测模型的改进并没有太多的进展,多数仍沿用 EST 方法的线性判别函数。需要关注的是如何把基于基因和蛋白水平的检测终点(例如目的基因表达下降、荧光信号通路等)建立预测模型,并验证预测模型的可靠性和科学性。最后,需要把这些测试方法与其它体外技术(如 QSAR 模型、专家系统)和其它方法(如全胚胎试验、斑马鱼试验)进行组合,尝试建立整合策略和决策模型,以期实现更好地预测胚胎和发育毒性。

参考文献:

- [1] Seiler AEM, Spielmann H. The validated embryonic stem cell test predict embryotoxicity in vitro[J]. *Nature Protocols*. 2011, 6(7):961-978.
- [2] Aikawa N, Kunisato A, Nagao K, *et al.* Detection of thalidomide embryotoxicity by in vitro embryotoxicity testing based on human iPS cells[J]. *J Pharmacol Sci*, 2014, 124:201-207.
- [3] Kameoka S, Babiarz J, Kolaja K, Chiao E. A High-Throughput Screen for Teratogens Using Human Pluripotent Stem Cells[J]. *Toxicological Sciences*, 2014, 137(1): 76-90.
- [4] 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, 108:389-400.
- [5] Romero AC, Del Rio E, Vilanova E, Sogorb MA. RNA transcripts for the quantification of differentiation allow marked improvements in the performance of embryonic stem cell test (EST)[J]. *Toxicol Lett*, 2015, 238(3):60-69.
- [6] Koseki N, Deguchi J, Yamada T, *et al.* Usefulness of field potential as a marker of embryonic stem cell-derived cardiomyocytes, and endpoint analysis of embryonic stem cell test [J]. *J Toxicol Sci*, 2010, 35(6):899-909.
- [7] SN/T 2330. 化妆品胚胎和发育毒性的小鼠胚胎干细胞试验[S]. 2009.
- [8] Suzuki N, Yamashita N, Koseki N, *et al.* Assessment of technical protocols for novel embryonic stem cell tests with molecular markers (Hand1-and Cmyc1-ESTs): a preliminary cross-laboratory performance analysis[J]. *J Toxicol Sci*, 2012, 37(4):845-851.
- [9] Coz FL, 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.
- [10] Theunissen PT, Pennings JL, van Dartel DA, *et al.* Complementary detection of embryotoxic properties of substances in the neural and cardiac embryonic stem cell tests[J]. *Toxicol Sci*, 2013, 132: 118-130.
- [11] Chen X, Hansen DK, Merry G, *et al.* Developing osteoblasts as an endpoint for the mouse embryonic stem cell test [J]. *Reproductive Toxicology*, 2015(53):131-140.
- [12] van Dartel DA, Pennings JL, de la Fonteyne LJ, *et al.* Evaluation of developmental toxicant identification using gene expression profiling in embryonic stem cell differentiation cultures [J]. *Toxicological Sciences*, 2011, 119(1):126-134.
- [13] Uibel F, Schwarz M. Prediction of embryotoxic potential using the ReProGlo stem cell-based Wnt reporter assay[J]. *Reproductive Toxicology*, 2015(55):30-49.
- [14] Osman AM, van Dartel DA, Zwart E, *et al.* Proteome profiling of mouse embryonic stem cells to define markers for cell differentiation and embryotoxicity[J]. *Reprod Toxicol*, 2010, 30: 322-332.
- [15] Sogorb MA, Pamies D, Lapuente J, *et al.* An integrated approach for detecting embryotoxicity and developmental toxicity of environmental contaminants using in vitro alternative methods [J]. *Toxicology Letters*, 2014(230):356-367.
- [16] Panzica-Kelly JM, Brannen KC, Ma Y, *et al.* Establishment of amolecular embryonic stem cell developmental toxicity assay[J]. *Toxicol Sci*, 2013, 131: 447-457.

[修回日期]2015-12-25