

基于胚胎干细胞实验模型评价黄芩苷的胚胎毒性

张 崑^{1,2}, 宋殿荣¹, 王雅楠¹, 朱 泽³

(1. 天津中医药大学第二附属医院妇科, 天津 300150; 2. 天津中医药大学, 天津 300193;
3. 天津医科大学微生物教研室, 天津 300070)

摘要: **目的** 应用胚胎干细胞实验模型体系评价黄芩苷的胚胎毒性。**方法** 分别将胚胎干细胞 D3 和胚胎成纤维细胞(BALB/c 3T3)与黄芩苷 20, 40, 60, 80 和 100 mg·L⁻¹共培养, MTT 法检测细胞活性, 分别计算黄芩苷对胚胎干细胞 D3 和 3T3 细胞增殖半数抑制浓度 IC₅₀(D3)和 IC₅₀(3T3)。利用悬滴-悬浮-贴壁方法, 体外培养胚胎干细胞向心肌细胞分化, 实时定量 PCR 方法检测心肌细胞特异表达肌球蛋白重链(β -MHC)基因的表达, 计算胚胎干细胞 D3 定向分化半数抑制浓度, 即 ID₅₀(D3)。利用胚胎毒性统计公式, 预测黄芩苷的胚胎毒性。**结果** 不同浓度黄芩苷作用 10 d 后, 胚胎干细胞 D3 和 3T3 细胞存活能力随着黄芩苷浓度增加缓慢下降, 黄芩苷对胚胎干细胞 D3 和 3T3 细胞增殖均有一定程度的抑制作用, 其 IC₅₀(D3)和 IC₅₀(3T3)分别为 135.9 和 63.3 mg·L⁻¹。体外胚胎干细胞经悬滴-悬浮-贴壁培养可分化为能够表达 β -MHC 基因的心肌样细胞, 黄芩苷 2, 5, 10, 20 和 40 mg·L⁻¹对胚胎干细胞定向分化为心肌细胞的抑制率分别为 29.5%, 46.8%, 59.6%, 61.7% 和 69.0%, 黄芩苷对胚胎干细胞分化有一定程度的抑制作用, 其体外心肌细胞定向分化的 ID₅₀(D3)为 7.25 mg·L⁻¹。根据胚胎毒性计算公式, 计算得黄芩苷具有弱胚胎毒性。**结论** 黄芩苷具有弱胚胎毒性。

关键词: 胚胎干细胞; 黄芩苷; 毒性作用

中图分类号: R99, R285.1 **文献标志码:** A

DOI: 10.3867/j.issn.1000-3002.2012.06.015

文章编号: 1000-3002(2012)06-0864-06

黄芩苷(baicalin, C₂₁H₁₈O₁₁)是从唇形科植物黄芩干燥根中提取的一种黄酮类化合物, 相对分子质量为 446.36, 极性小, 具有抑菌抗炎、抗病毒、抗肿瘤、心血管保护作用、神经保护作用、抗过敏反应和保护肝等药理作用^[1], 但是对其胚胎毒性的研究未见报道。宋殿荣等^[2]发现, 妊娠期应用双黄连冻干粉透过胎盘屏障造成胎儿宫内暴露的主要药物成分为黄芩苷, 因此, 研究黄芩苷的胚胎毒性对科学准确评价妊娠期应用双黄连冻干粉的安全性有重要意义。本研究应用胚胎干细胞(embryonic stem cells, ESC)实验模型, 同时采用 ES-D3 和 BALB/c-3T3 细胞系对黄芩苷的胚胎毒性进行初步预测, 其中 D3 代表胚胎组织, 用于评价受试物作用后干细胞分化成为心肌细胞的能力。3T3 代表成体组织, 用于比较分析受试物作用后体细胞的存活能力。以进一步评价双黄连冻干粉的胚胎毒性, 为临床合理用药提供实验依据。

基金项目: 国家中医药管理局中医药行业科研专项(200707011)

作者简介: 张 崑(1978 -), 女, 硕士研究生, 主治医师, 主要从事妊娠期用药安全性研究; 宋殿荣(1967 -), 女, 博士, 主任医师, 主要从事生殖健康研究。

通讯作者: 宋殿荣, E-mail: songdr58@126.com, Tel: (022)60335422

1 材料与方法

1.1 细胞和动物

胚胎干细胞 D3(ES-D3), 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。胚胎成纤维细胞(BALB/c 3T3), 由天津医科大学肿瘤医院研究所惠赠。BALB/c 小鼠, SPF 级, 由中国人民解放军军事医学科学院实验动物中心提供, 动物生产许可证号: SCXK-(军)2007-004。

1.2 试剂和仪器

黄芩苷购自中国药品生物制品检定所, 批号: 110715-200815。knock out-DMEM 培养基、knock out-血清替代品、1% 非必需氨基酸、 β -巯基乙醇、谷氨酰胺和胰蛋白酶购自 Gibco 公司。胎牛血清购自 Hyclone 公司。鼠白血病抑制因子 1000 kU·L⁻¹ 购自 Chemicon 公司。二甲亚砜、明胶、5-氟尿嘧啶、噻唑蓝和丝裂霉素购自 Sigma 公司。IX51 型倒置显微镜为日本 Nikon 公司产品、 Σ 960 酶联免疫检测仪和 Chromo4 四通道实时定量 PCR 仪为美国 Bio-Rad 公司产品。

1.3 饲养层细胞(mouse embryonic fibroblast, MEF)制备

BALB/c 小鼠, 孕期 12.5 ~ 14.5 d, 颈椎脱臼处死, 浸泡、洗刷, 消毒, 剖腹取出胚胎, 去除头、肝和四

肢,培养液冲洗,充分剪碎。加入 10 ml 0.25% 胰酶-0.04% EDTA,分阶段消化,吸取上层悬液并离心收集细胞,接种于 T75 培养瓶培养。倒置显微镜下观察胚胎成纤维细胞铺满培养瓶底,加入丝裂霉素 $10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 混匀,培养 4 h,消化,接种于明胶化的培养皿中备用。

1.4 小鼠胚胎干细胞 D3 培养

从液氮中取出 1 支 ES-D3 复苏,接种于已铺好胚胎成纤维细胞的 6 cm 培养皿中培养,每天更换细胞培养液(高糖 DMEM 培养基,15% 胎牛血清,谷氨酰胺 $2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$,1% 非必需氨基酸, β -巯基乙酸 $0.1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$,青霉素 $50 \text{ kU} \cdot \text{L}^{-1}$,链霉素 $50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$,鼠白血病抑制因子 $1000 \text{ kU} \cdot \text{L}^{-1}$)。ES 增殖 3 d,形成大小均一的克隆,细胞克隆铺占 60% ~ 70% 时传代。

1.5 MTT 法检测黄芩苷对胚胎干细胞 D3 和 3T3 细胞毒性

将 ES 细胞 $2.5 \times 10^6 \text{ L}^{-1}$ 的接种于 96 孔板上,每孔分别加入含黄芩苷 50, 75, 100, 125 和 $150 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 ES 细胞完全培养液。将 3T3 细胞 $2.5 \times 10^6 \text{ L}^{-1}$ 接种于 96 孔板上,每孔分别加入含黄芩苷 20, 40, 60, 80 和 $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 3T3 细胞培养液(高糖 DMEM 培养基,10% 胎牛血清,谷氨酰胺 $2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$,青霉素 $50 \text{ kU} \cdot \text{L}^{-1}$,链霉素 $50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)。设立空白对照组。第 3 天,第 5 天更换培养液。第 10 天相差显微镜下观察细胞形态。于波长 570 nm 处检测吸光度($A_{570 \text{ nm}}$),计算不同浓度黄芩苷对 ES 细胞和 3T3 细胞的生长抑制率(inhibitory rate, IR), $\text{IR} = [(A_{\text{对照}} - A_{\text{实验}}) / A_{\text{对照}}] \times 100\%$ [3]。分别以黄芩苷浓度为横坐标,抑制率为纵坐标,绘制浓度-反应曲线,应用 GraphPadPrism5 软件计算 50% 的 ES-D3 细胞和 3T3 细胞增殖受抑制的黄芩苷浓度,即半数抑制浓度(50% inhibitory concentration, IC_{50}),其中对 ES-D3 细胞活性半数抑制浓度以 IC_{50} (D3) 表示,对 3T3 细胞活性的半数抑制浓度以 IC_{50} (3T3) 表示。

1.6 黄芩苷抑制胚胎干细胞定向分化为心肌细胞能力的检测

1.6.1 胚胎干细胞体外分化培养

① 悬滴培养: ES 细胞中加入含黄芩苷 2, 5, 10, 20 和 $40 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的分化培养液(高糖 DMEM 培养基,15% 胎牛血清,谷氨酰胺 $2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$,1% 非必需氨基酸, β -巯基乙酸 $0.1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$,青霉素 $50 \text{ kU} \cdot \text{L}^{-1}$,链霉素 $50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$),调整细胞密度至 $3.75 \times 10^4 \text{ L}^{-1}$ 。设立空白对照组和 5-氟尿嘧啶为

阳性对照组。分别将单细胞悬液置于 6 cm 细菌培养皿中,从中取单细胞悬液以每滴 20 μl ,培养皿每皿 80 滴置于 10 cm 细胞培养皿内盖上。翻转培养皿盖子至正常位置,盖在培养皿上,使之悬滴生长,培养皿内加入 5 ml PBS。置 37°C ,5% CO_2 和饱和湿度培养箱培养 3 d。② 悬浮培养:第 3 天于倒置显微镜下观察,每个悬滴内均含有 1 个拟胚体。吸弃 PBS,分别加入上述不同浓度黄芩苷分化培养液。将拟胚体冲入培养皿底,并移至 6 cm 细菌培养皿悬浮培养 2 d。③ 贴壁培养:第 5 天时肉眼观察每个培养皿中均可见数十个拟胚体。分别接种至事先用明胶包被的 24 孔板内,每孔中加入 2 ml 上述不同浓度黄芩苷分化培养液。 37°C ,5% CO_2 和饱和湿度培养箱培养 5 d。

1.6.2 实时定量 PCR 法检测分化心肌细胞特异基因(β -MHC) mRNA 的表达

Trizol 试剂一步法提取细胞总 RNA,检测总 RNA 浓度,鉴定其纯度及完整性,以 2 μg RNA 为模板逆转录合成 cDNA。心肌分化特异基因肌球蛋白重链(β -MHC)引物序列正向:5'-GCCCTCCTCATCTTCTCC-3' 和反向:5'-CAGGGTTGCTTGATGATTT-3';内参照 GAPDH 引物序列正向:5'-CCTTCCGTGTTCTACCC-3'和反向:5'-CAACCTGGTCCTCAGTGTAG-3'。PCR 扩增的反应体系为:SYBR Green Realtime PCR Master Mix 12.5 μl ,样品溶液 2.5 μl ,引物各 1.0 μl ,加双蒸水至总体积 25 μl 。反应条件:95 $^\circ\text{C}$ 预变性 60 s;95 $^\circ\text{C}$ 变性 15 s,60 $^\circ\text{C}$ 退火 15 s,72 $^\circ\text{C}$ 延伸 30 s,40 个循环,熔解曲线 72 $^\circ\text{C}$ to 95 $^\circ\text{C}$,每 0.4 $^\circ\text{C}$ 读数 1 次,持续 1 s。用 ABI 7500 Software v2.0 系统对扩增后的 PCR 产物进行荧光定量检测,生成定量标准曲线图,计算机分析 Ct 值。按照 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 法对数据进行分析处理。 β -MHC 表达量 = $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$,其中 $\Delta\Delta\text{Ct} = \Delta\text{Ct}_{\text{实验}} - \Delta\text{Ct}_{\text{对照}}$, $\Delta\text{Ct} = \text{Ct}_{\beta\text{-MHC}} - \text{Ct}_{\text{GAPDH}}$ 。利用心肌细胞特异基因 β -MHC 的表达量,计算黄芩苷对 ES 细胞分化的抑制率,抑制率(%) = $[(\beta\text{-MHC}_{\text{对照}} - \beta\text{-MHC}_{\text{实验}}) / \beta\text{-MHC}_{\text{对照}}] \times 100\%$ 。以黄芩苷浓度为横轴,抑制率为纵轴,绘制浓度-反应曲线。计算 50% 的 ES 细胞分化受抑制的黄芩苷浓度,即 ID_{50} (D3)。

1.7 黄芩苷胚胎毒性分析

根据 Scholz 等 [4] 的报道,评价胚胎毒性计算公式 I: $5.916 \lg[\text{IC}_{50}(3\text{T3})] + 3.500 \times \lg[\text{IC}_{50}(\text{D3})] - 5.307[\text{IC}_{50}(3\text{T3}) - \text{ID}_{50}(\text{D3})] / \text{IC}_{50}(3\text{T3}) - 15.72$ 。公式 II: $3.651 \lg[\text{IC}_{50}(3\text{T3})] + 2.394 \times \lg[\text{IC}_{50}(\text{D3})] - 2.033[(\text{IC}_{50}(3\text{T3}) - \text{ID}_{50}(\text{D3})) /$

$IC_{50}(3T3)] - 6.85$ 。公式Ⅲ: $-0.125 \lg[IC_{50}(3T3)] + 1.917 \times \lg[IC_{50}(D3)] + 1.500 \times [IC_{50}(3T3) - ID_{50}(D3)] / IC_{50}(3T3) - 2.67$ 。公式中均以 $mg \cdot L^{-1}$ 为单位, 其中 $IC_{50}(D3)$ 和 $IC_{50}(3T3)$ 分别为 ES D3 细胞和 3T3 细胞增殖半数浓度, $ID_{50}(D3)$ 为 ES 细胞体外定向分化为心肌细胞半数抑制浓度。

评价胚胎毒性判定标准为:若上述结果中,公式 I 值 > 公式 II 值且公式 I 值 > 公式 III 值,则受试物胚胎毒性为一级,即判定黄芩苷无胚胎毒性;若公式 II 值 > 公式 I 值且公式 II 值 > 公式 III 值,则判定黄芩苷胚胎毒性为二级,即弱胚胎毒性;若公式 III 值 > 公式 I 值且公式 III 值 > 公式 II 值,则判定黄芩苷胚胎毒性为三级,即强胚胎毒性。

利用胚胎毒性计算公式和判定标准,分析黄芩苷的胚胎毒性。

1.8 统计学分析

实验结果数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。所有统计分析均使用 SPSS 11.5 统计软件。两组间比较采用 *t* 检验。

2 结果

2.1 黄芩苷对细胞存活的影响

如图 1 浓度-反应曲线所示,黄芩苷不同浓度作用 10 d 后,胚胎干细胞 D3 和 BALB/c 3T3 细胞存活能力,随着黄芩苷浓度增加缓慢下降,并呈现一定的浓度依赖性,经计算 $IC_{50}(D3)$ 为 $135.9 \text{ mg} \cdot L^{-1}$, $IC_{50}(3T3)$ 为 $63.34 \text{ mg} \cdot L^{-1}$ 。表明黄芩苷对 ES 细胞和 3T3 细胞增殖均有一定程度的抑制作用,但是抑制程度较弱。

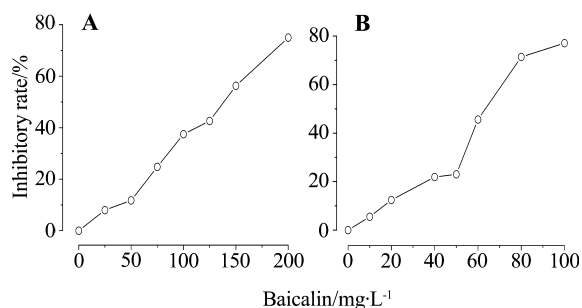


Fig. 1 Effect of baicalin on ES cells(A) and 3T3 cells(B) proliferation. The embryonic stem or Balb/c 3T3 cells were seeded in the 96 hole on the board. Each hole was respectively added with different concentration of Baicalin in ES cells complete culture solution. Medium replace on the third and fifth days, and MTT assay used for the detection of cell activity in the 570 nm wavelength on the tenth day ($A_{570 \text{ nm}}$). $\bar{x} \pm s$, $n = 5$. Inhibitory rate (%) = $[A_{570 \text{ nm}}(\text{blank control}) - A_{570 \text{ nm}}(\text{experimental})] / A_{570 \text{ nm}}(\text{blank control}) \times 100\%$

2.2 黄芩苷对 ES 细胞向心肌分化的影响

体外 ES 细胞经悬滴培养 3 d、悬浮培养 2 d 和贴壁培养 5 d 后可分化为能够表达 β -MHC 基因的心肌样细胞(图 2),第 3 天可见形成的拟胚体周边缘光滑,形态正圆、匀一(图 2A);第 5 天可见拟胚体开始分化,细胞分成叶状,体积逐渐增大(图 2B);第 10 天可见拟胚胎分化成心肌细胞(图 2C)。由实时定量 PCR 检测心肌 β -MHC 表达的扩增曲线和溶解曲线见(图 3)可见,随着黄芩苷作用浓度的增加,ES 细胞定向分化为心肌细胞的能力逐渐下降(表 1),可见黄芩苷对 ES 细胞分化有一定程度的抑制作用。根据浓度-反应曲线,计算 $ID_{50}(D3)$ 为 $7.25 \text{ mg} \cdot L^{-1}$ 。

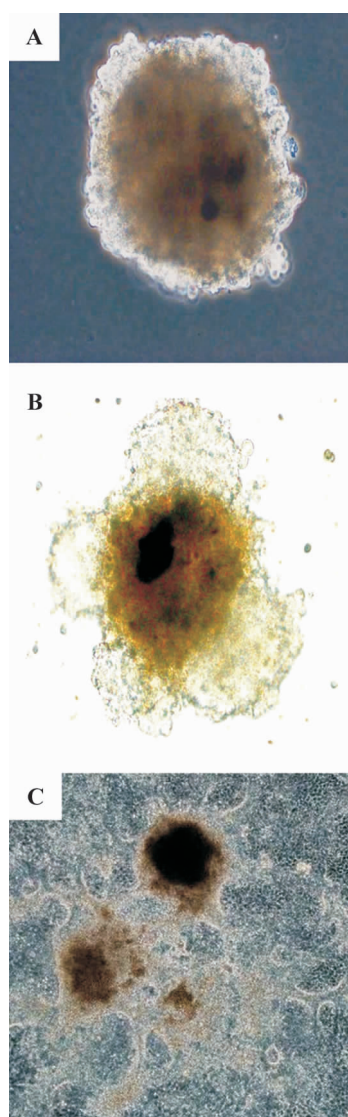


Fig. 2 Effect of baicalin on ES cells differentiation toward cardiomyocytes. (A, B: $\times 200$, C: $\times 100$). Baicalin was added into cultured embryonic stem cells, after hanging drop cultured for 3 d, to form embryoid bodies, the embryoid bodies were placed in Petri dishes, cultured 2 d, and then inoculated to gelatin coated 24 hole plate, adherent cultured 5 d. A: on the 3rd day; B: on the 5th day; C: on the 10th day.

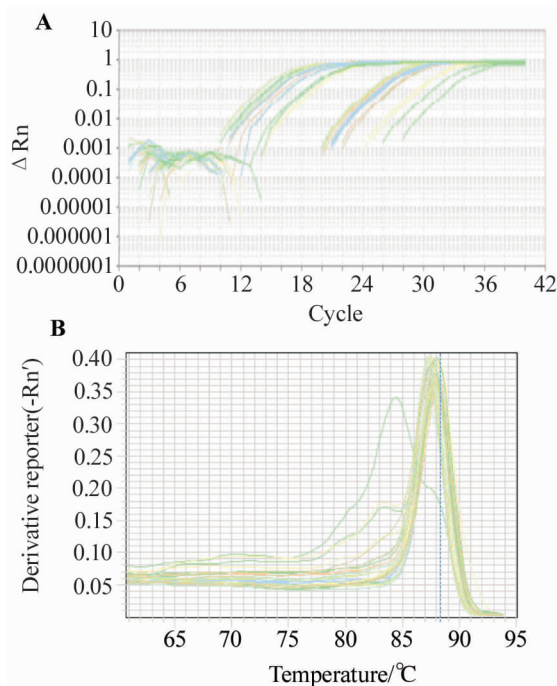


Fig. 3 Effect of baicalin on embryonic stem cell differentiation into cardiomyocyte cells with myosin heavy chain expression. Embryonic stem cells were cultured with different concentrations of baicalin by hanging drop-suspension-adherent for 10 d, and then the real-time quantitative PCR assay was used to detect expression of heart muscle myosin heavy chain (β -MHC) gene and housekeeping genes glyceraldehyde dehydrogenase (GAPDH). A: melting curve of β -MHC gene; B: amplification curve of β -MHC gene.

Tab.1 Effect of baicalin on embryonic cell differentiated into myocardial cells influence

Baicalin/ $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	β -MHC relative expression ($2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$)	Inhibitory rate/ %
2	0.7046 ± 0.06	29.5
5	0.5321 ± 0.08	46.8
10	0.4033 ± 0.09	59.6
20	0.3826 ± 0.09	61.7
40	0.3099 ± 0.08	69.0

The real-time quantitative PCR data were analyzed according to $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ method. β -MHC relative quantitative values was $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$. The β -MHC relative quantitative values were setted to be 1 when baicalin concentration was $0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$. Cardiomyocytes differentiation inhibitory rate was calculated according to the inhibitory rate = [β -MHC (blank control) - β -MHC (experimental group)]/ β -MHC (blank control) $\times 100\%$, $\bar{x} \pm s$, $n = 3$.

2.3 黄芩苷胚胎毒性预测

分别将 IC_{50} (D3), IC_{50} (3T3) 和 ID_{50} (D3) 结果, 按照胚胎毒性评价公式计算, 公式I结果为 -2.295, 公式II结果为 3.035, 公式III结果为 2.522, 公式II > 公式I, 而且公式II > 公式III。根据胚胎毒性判定标准, 预测黄芩苷具有弱胚胎毒性。

3 讨论

胚胎毒性研究方法包括体内生殖发育毒性实验和体外替代实验。体内生殖发育毒性实验即三阶段实验: ① 生育力与早期胚胎发育毒性实验; ② 胚胎-胎仔发育毒性实验 (致畸敏感期生殖毒性实验); ③ 围生期毒性实验。这一实验需要使用大量实验动物、费用较高、实验周期长、难以迅速对大量物质进行毒性评价。因此, 发育毒性实验的体外可替代模型日益受到关注。体外替代实验主要有体外全胚胎培养实验、胚胎细胞微团培养实验和胚胎干细胞实验 (embryonic stem cell test, EST)^[5]。其中 EST 是目前唯一一个利用细胞系、而非怀孕动物的体外替代实验。胚胎干细胞来源于早期胚胎, 它在体外既可维持不分化而无限增殖, 又能参与胚胎发育, 它可以在不同的诱导条件下向特定的组织器官分化。根据 ESC 的特性发展起来的 EST 可以从细胞毒性、分化抑制以及分子生物学水平反映发育毒性, 具有简便、经济、实验周期短、实验条件可控、剂量-反应关系易测、排除母体干扰等优点, 于 2006 年被欧洲替代方法认证中心接受, 成为体外药物和化合物胚胎毒性筛选的标准实验方法。Scholz 等^[6] 研究 EST 能对大多数化学物质的胚胎毒性进行正确分类预测, 且与体内实验结果有较好的一致性, 其准确性可达 78%。在本研究中, 同时应用了 ES-D3 和 BALB/c-3T3 两种细胞系来检测黄芩苷的毒性。其中 D3 代表胚胎组织, 用于评价受试物作用后干细胞分化成为心肌细胞的能力。选择心肌细胞作为分化发育后的衡量指标, 一方面是先天性心脏缺陷往往伴有其他组织器官的发育缺陷, 因而心肌细胞损害可以作为胚胎损伤的早期预警指示, 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^[7-8]。3T3 代表成体组织, 用于比较分析受试物作用后体细胞的存活能力。尽管 ES 细胞在体外的分化途径和机制与体内胚胎细胞的分化途径和机制不完全相同, 但在分子水平上有许多相似之处, 而且不同哺乳动物种属着床前胚胎发育形态学及某些生化参数极其相似, 这些均为 EST 预测药物胚胎毒性提供了理论基础。

中药具有作用整体性、组成成分多样性和可变性、作用靶点和机制复杂性、以及成分间相互作用难以预测性的特点^[9], 应用中药后只有被吸收入血或是在体内代谢最终存在于血液中含量较高的成分, 才是发挥药效或毒性作用的成分。妊娠期应用中药, 母体内药物成分只有透过胎盘屏障, 进入胎儿体内才可能对胎儿的生长发育造成影响。胎盘作为母

体与胎儿之间的重要器官,具有物质交换、代谢、防御以及合成功能。胎盘内存在母体和胎儿两个血液循环系统,母体动脉血从子宫螺旋动脉流入绒毛间隙,胎儿的静脉血经脐动脉流入绒毛毛细血管,与绒毛间隙内的母体血进行物质交换后,成为动脉血,经脐静脉回流到胎儿,两者的血液在各自封闭管道内循环,互不相混,形成胎盘屏障,具有保护胎儿的作用。药物能否通过胎盘屏障除了胎盘因素外,药物因素也十分重要,与药物的相对分子质量、极性、脂溶性和血浆蛋白结合率有关。分子质量小于 500、极性小、脂溶性高、血浆蛋白结合率低的药物较容易透过胎盘屏障。本研究应用 EST 预测了黄芩苷的胚胎毒性,结果显示其具有弱胚胎毒性,为进一步评价妊娠期应用双黄连冻干粉的安全性提供了毒理学研究资料,为临床合理用药提供参考,但是体外实验的发展并不能排斥体内实验本身的重要性,两者的相关性还有待进一步研究探索。

参考文献:

- [1] Wang LW, Yang J. Clinical application of Shuanghuanglian in pregnancy complication [J]. *J Chengde Med Coll*(承德医学院学报), 2007, **24**(2):157-158.
- [2] Song DR, Guo J, Wang YF, Pan GX, Li PL, Zhang W, et al. Ingredients of Shuanghuanglian injection powder permeation through placental barrier of rat in pregnancy [J]. *China J Chin Mater Med*(中国中药杂志), 2010, **35**(12):1626-1629.
- [3] Kuang NZ, Fu YY, Huang BH, Zhou ZX, Zeng XP. An experimental study on inhibitory effect of baicalin on human hepatic carcinoma cell line SMMC7721 *in vitro*. *Lishizhen Med Mater Med Res*(时珍国医国药), 2008, **19**(6):1422-1424.
- [4] Scholz G, Genschow E, Pohl I, Bremer S, Paparella M, Raabe H, et al. Prevalidation of the embryonic stem cell test (EST) – a new *in vitro* embryotoxicity test[J]. *Toxicol In Vitro*, 1999, **13**(4-5):675-681.
- [5] Ahuja YR, Vijayalakshmi V, Polasa K. Stem cell test: a practical tool in toxicogenomics [J]. *Toxicology*, 2007, **231**(1):1-10.
- [6] Scholz G, Pohl I, Genschow E, Klemm M, Spielmann H. Embryotoxicity screening using embryonic stem cells *in vitro*: correlation to *in vivo* teratogenicity[J]. *Cells Tissues Organs*, 1999, **165**(3-4):203-211.
- [7] Rolletschek A, Blyszczuk P, Wobus AM. Embryonic stem cell-derived cardiac, neuronal and pancreatic cells as model systems to study toxicological effects[J]. *Toxicol Lett*, 2004, **149**(1-3):361-369.
- [8] Bremer S, Worth AP, Paparella M, Bigot K, Kolossov E, Fleischmann BK, et al. Establishment of an *in vitro* reporter gene assay for developmental cardiac toxicity[J]. *Toxicol In Vitro*, 2001, **15**(3):215-223.
- [9] Qi LW, Zhou JL, Hao HP, Li HJ, Wen XD, Chen J, et al. Biological-chemical profiling of *in vitro* and *in vivo* bioactive compounds from traditional Chinese medicines with holistic views[J]. *J China Pharm Univ*(中国药科大学学报), 2010, **41**(3):195-202.

Evaluation of embryotoxicity of baicalin based on embryonic stem cell test system

ZHANG Wei^{1,2}, SONG Dian-rong¹, WANG Ya-nan¹, ZHU Ze³

(1. Department of Obstetrics and Gynecology, the Second Affiliated Hospital, Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300150, China; 2. Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300193; 3. Tianjin Medical University, Tianjin 300070)

Abstract: OBJECTIVE To assess embryotoxicity of baicalin using embryonic stem (ES) cell test *in vitro*. **METHODS** ES D3 cells and BALB/c 3T3 cells were cultured respectively with baicalin 20, 40, 60, 80 and 100 mg · L⁻¹. Cell morphology was observed with a phase contrast microscope and absorbance of the resulting colored solution at 570 nm was measured by microplate reader. According to the concentration-effect curve, 50% inhibition of cell growth (IC₅₀) and viability were obtained in ES cell line D3 [IC₅₀(D3)] and in 3T3 cells [IC₅₀(3T3)]. ES cells were cultured in baicalin with using hanging drop-suspension-attachment method, then cardiac myoblasts specific genes myosin heavy chain (β-MHC) in differentiation of embryonic stem cell were detected by real time Q-PCR, the growth inhibitory rate was calculated with quantitative analysis, according to the concentration-effect curve, 50% inhibition of ES cells differentiation into cardiac myoblasts [ID₅₀(D3)] obtained. Baicalin embryotoxicity potential was predicted using statistics formula.

RESULTS ES D3 cells and BALB/c 3T3 cells viability decreased slowly with the increase in baicalin concentration after they were cultured in different concentration of baicalin for ten days, which showed that baicalin had a certain degree of inhibition on ES D3 cell and BALB/c 3T3 cell proliferation. The half-maximal proliferation-inhibition concentration (IC_{50}) of baicalin on ES cell line D3 [$IC_{50}(D3)$] and 3T3 cells [$IC_{50}(3T3)$] was $135.9 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ and $63.34 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$. ES cells *in vitro* by hanging drop-suspension-adherent culture could differentiate to expression of β -MHC gene in myocardial cells. With baicalin 2, 5, 10, 20 and 40 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$, the ability of ES cells differentiate into myocardial cells gradually decreased, the inhibitory rate was 29.5%, 46.8%, 59.6%, 61.7% and 69.0%, respectively, and this indicated that baicalin had a certain degree of inhibitory effect on ES cells differentiation. The half-maximal differentiation-inhibition concentration (ID_{50}) of baicalin on D3 differentiating into MHC [$ID_{50}(D3)$] was $7.25 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$. According to the calculation formula of predicting embryo toxicity, baicalin had weak embryotoxicity. **CONCLUSION** Baicalin has weak embryotoxicity.

Key words: embryonic stem cell; baicalin; toxic actions

Foundation item: The project supported by State Administration of Traditional Chinese Medicine TCM Industry Scientific Research Special project (200707011)

Corresponding author: SONG Dian-rong, E-mail: songdr58@126.com

(收稿日期: 2011-10-27 接受日期: 2012-03-12)

(本文编辑: 付良青)

向 2012 年为本刊审稿的编委和专家表示衷心的感谢!

(以汉语拼音为序)

敖英	关永源	李国君	罗焕敏	唐萌	王宇光	杨纪峰	张有志
白贵荣	郭莲军	李桦	马越鸣	唐修文	王玉霞	杨静	张云
曹济民	郭宁	李锦	毛天球	唐亚雄	王字玲	杨静玉	招明高
曹亦菲	郭秀丽	李静	倪连松	唐泽耀	魏尔清	杨军	赵广
曹志然	郭振泉	李林	彭军	滕脉坤	魏晓丽	叶春玲	赵艳玲
柴振海	韩淑燕	李杨	彭仁琇	屠曾宏	吴纯启	叶菲	郑建全
陈汇	郝卫东	李元建	彭瑞云	汪渊	吴道澄	叶红	钟大放
陈建国	何俏军	李云峰	彭双清	王爱平	伍一军	殷明	钟赣生
陈龙	何晓阳	连晓媛	蒲小平	王芳	袭著革	尹大强	钟辉
陈枢青	侯琦	梁建辉	乔善义	王宏林	肖军花	游雪甫	仲来福
陈霆	胡长平	梁中琴	秦晓群	王洪新	肖小河	于晓姝	周刚桥
程桂芳	胡国渊	林晨	让蔚清	王华	肖智勇	余应年	周慧君
程宁	胡建安	林忠宁	任进	王嘉陵	谢克勤	俞炜源	周家国
程肖蕊	胡良平	刘广贤	任雷鸣	王建春	熊冬生	张宝旭	周建平
单俊杰	黄君健	刘红军	阮迪云	王莉莉	熊燕	张博	周平坤
丁日高	黄显	刘惠芬	邵荣光	王立辉	徐海滨	张丹参	周园
丁文军	贾光	刘俊田	申竹芳	王立生	徐江平	张天宝	周宗灿
董德利	姜岳明	刘晓东	时京珍	王林	徐明	张伟丽	朱邦豪
杜力军	蒋利和	刘新光	宋伦	王全军	徐群渊	张晓东	朱东亚
范文红	金肆	刘兆华	孙建宁	王蓉	徐新云	张晓玲	朱心强
冯林音	金泰虞	龙超良	孙晓波	王守林	许建华	张雄	祝庆余
冯义柏	金英	娄建石	孙祖越	王迎伟	许云禄	张岫美	庄志雄
高月	乐江	楼丽广	汤慧芳	王永利	薛智谋	张英鹤	邹伟
宫泽辉	黎燕	楼宜嘉	唐朝克	王永祥	颜慧		