

基于人胚胎干细胞健康安全评价新载体的构建

俞光岩^{1△}, 曹 彤², 欧阳宏伟³, 彭双清⁴, 邓旭亮¹, 李盛林¹, 刘 鹤¹, 邹晓晖³, 傅 歆², 彭 晖¹, 王晓颖¹, 战 国¹

(1. 北京大学口腔医学院·口腔医院, 北京 100081; 2. 新加坡国立大学牙医学院, 新加坡 119083, 新加坡; 3. 浙江大学干细胞和组织工程中心, 杭州 310058; 4. 中国人民解放军疾病预防控制中心药理毒理研究中心, 北京 100071)

[关键词] 胚胎干细胞; 体外研究; 毒性试验; 细胞分化; 人类

[中图分类号] R329.24 [文献标志码] A [文章编号] 1671-167X(2013)01-0009-03

doi: 10.3969/j.issn.1671-167X.2013.01.003

常用的外源性化合物多达 6 至 7 万种, 均可通过各种途径进入体内损害机体, 危害人类健康。现用的国际标准中, 健康安全体外评价载体仍采用微生物、动物及人类永生化细胞、肿瘤细胞或原代培养细胞, 但微生物和动物不能完全反映人类的生物学特征, 肿瘤细胞不是正常健康的细胞, 而原代培养细胞非单一来源细胞, 无法进行标准化, 因此, 急需建立新的生物安全性评价的体外模型。

人胚胎干细胞 (human embryonic stem cell, hESC) 是健康和永生的单一胚胎细胞来源的人类样本, 既可真实反映人类生物学特征, 又可通过单一胚胎细胞无限增殖和定向分化达到样本高度标准化, 为体外安全性评价提供了新的希望。目前, 鼠源型胚胎干细胞 (embryonic stem cell, ESC) 健康安全评价模型已纳入欧洲健康安全评价体系^[1], 但尚未建立基于 hESC 的健康安全评价模型。

hESC 存在种族或地区的生物学特征差异, 基于欧美人种的细胞模型并不适用于华人, 而华人人口约占全人类的 25%, 所以迫切需要建立适合华人的健康安全评价新载体, 以通过该高效载体监测产品及生态的安全。

在科技部国际科技合作项目基金的支持下, 由北京大学口腔医学院牵头, 联合浙江大学干细胞和组织工程中心、解放军疾病预防控制中心药理毒理研究中心, 与新加坡国立大学牙医学院合作, 开展了基于 hESC 健康安全评价新载体构建的研究, 取得了系列成果, 现综述如下。

1 建立符合国际标准的华人 hESC 系

浙江大学成功建立了两株基于华人的 hESC 系, 分别命名为 ZJU-1 和 ZJU-2, 并进行了 35 代与 170 代的传代和增殖, 完成了 hESC 特异性标志物的鉴定。经 hESC 向间充质干细胞分化过程中的克隆形成能力检测证实, 在传代和增殖的过程中, 两株 hESC 系持续保持未分化的状态和全能分化潜能的特性。这种非动物细胞来源 (人来源) 滋养层接触的干细胞技术改变了目前国际上大多 ESC 在鼠来源的滋养层上培养的现状, 解决了动物源性所带来的很多不安全的动物材料污染问题, 而且用血清代用品替代胎牛血清也避免了由动物血清带来的诸多不安全因素。

2 建立符合国际标准的华人 hESC 数据库

在将 hESC 诱导分化为间充质干细胞的基础上, 本项目采用含 hESC 来源成骨细胞提取物的仿生骨诱导培养基, 直接高效诱导 hESC 成骨分化, 或将 hESC 诱导分化为成纤维细胞。采用阶段性分化的方法, 将分化后的 hESC 与活性丝素蛋白胶原复合支架体外培养, 再植入体内成功构建功能化的组织工程肌腱^[2-5]。采用 hESC 形成拟胚体并诱导分化为成纤维细胞的成熟技术, 证实拟胚体成纤维细胞已经失去 hESC 的特点, 开始具有成纤维细胞的特点。研究发现, 拟胚体分化而成的人成纤维细胞 (embryoid body fibroblasts-H9, EBf-H9) 与由 hESC 直接分化而成的成纤维细胞相比, 对干细胞具有更

稳定的支持能力^[6]。

已知转化生长因子 β (transforming growth factor- β , TGF- β) 具有诱导干细胞软骨向分化的潜能, TGF- β /activin/nodal 信号传导通路在干细胞软骨向分化中发挥重要作用。本项目较为系统地研究了 hESC 分化过程中相关生长因子 TGF- β 的作用, 研究通过实时聚合酶链反应、II型胶原酶免疫吸附测定、硫酸化糖胺多糖定量测定以及免疫荧光染色等检测方法, 证实 TGF- β 对未分化的 hESC、经典拟胚体细胞 5 天传代细胞软骨向分化过程存在影响, TGF- β 1 可以在诱导条件下一定程度地保持 hESC 的未分化状态, 提示在进行软骨诱导分化时应慎用 TGF- β 1, 以免形成畸胎瘤^[7]。

临床上, 与口腔生物材料接触的是含有角化层的口腔黏膜上皮细胞, 为了更好地检测口腔材料的生物相容性, 项目组尝试用 hESC 分化为角质形成细胞。已有的关于角质形成细胞体外诱导分化的研究显示, 直接诱导法获得的角质形成细胞明显多于拟胚体形成法。本项目采用直接诱导法成功地将 hESC 诱导为角质形成细胞, 并对其生物学特性进行了初步鉴定。

通过研究, 本项目使 hESC 向间充质干细胞、角质形成细胞和软骨细胞的分化得以实现, 并初步建立了华人 hESC 数据库; 同时, 本项目还利用 hESC 分化而来的间充质干细胞在体内构建组织工程软骨^[8], 为靶器官毒理检测平台的建立奠定了基础。

3 构建 hESC 胚胎毒性评价模型

本项目构建了基于 hESC 的毒性检测模型, 研究发现, 以 hESC 系为模板能够较为准确地反映出氧化毒性、基因毒性、高温毒性、氟化钠毒性、纳米银毒性相关的细胞活性的改变, 证明了以 hESC 作为毒性检测模板的可行性, 为进一步研究 hESC 及其分化衍生物表型的改变, 探讨毒性机制奠定了基础。

研究结果还显示, hESC 较 hESC 诱导分化而成的成纤维细胞具有更灵敏的氧化毒性反应能力^[9], 较移植体细胞具有更灵敏的基因毒性和高温毒性反应能力, 可以延长 hESC 对热休克的暴露时间, 引起细胞凋亡^[10]。

氟化钠是最常用的防龋材料, 在基于 hESC 的氟化钠胚胎毒性的检测模型上发现, 以 hESC 系为模板能够较为准确地反映出已知的氟化钠细胞毒性相关的线粒体活性改变, 证明了以 hESC 作为氟化钠胚胎毒性实验模板的可行性。处于不同分化阶段的 hESC 及其分化衍生物对于氟化钠细胞毒性的耐受程度明显不同, 与氟化钠作用的时间影响细胞对氟化钠的耐

受程度, 但长时间与氟化钠接触并不改变干细胞万能性标志基因的表达。上述结果均为进一步研究氟化钠介导的胚胎毒性机制提供了方向^[11]。

银汞是最常用的口腔充填材料之一, 纳米银是今后重点开发应用的口腔材料。用不同浓度的 20 nm 和 100 nm 的纳米银颗粒对两种细胞进行刺激, 结果显示, 纳米银对两种细胞的毒性呈时间和浓度依赖性, 这与现有的纳米银毒性理论一致。同种粒径同种浓度的纳米银颗粒对 Ebf-H9 细胞 G2/M 期的阻滞早于 L-929, 提示 Ebf-H9 用于评价纳米银颗粒的细胞毒性更为敏感; 相同条件下 Ebf-H9 的氧化应激反应比 L-929 剧烈。这些结果提示, 与永生化的细胞系相比, Ebf-H9 用作纳米银颗粒的毒理学评价不仅可行, 而且更为敏感^[12-13]。

在细胞毒性方面, 氟化钠和甲醛都能明显抑制 Ebf-H9 和 L-929 细胞的增殖, 流式细胞仪的检测结果显示, Ebf-H9 和 L-929 被氟化钠和甲醛阻滞在不同的细胞周期^[11]。在遗传毒性方面, 微核实验、姐妹染色单体交换实验、彗星实验的结果证明, 与 L-929 细胞相比, Ebf-H9 细胞对于氟化钠的反应更敏感, 而 L-929 细胞对于甲醛的反应比 Ebf-H9 细胞更敏感^[11]。氢氧化钙和复合树脂是口腔疾病治疗中常用的材料, 在其对原代培养人牙髓细胞、Ebf-H9 和 L-929 细胞的毒性作用对比研究中发现, Ebf-H9 较 L-929 细胞更接近原代培养细胞^[14]。

4 系统评价相关药物

本项目利用现有国际标准胚胎毒性评价体系 (大鼠全胚胎培养) 与胚胎干细胞实验 (embryonic stem cell test, EST), 对青霉素、氟脲嘧啶、T-2 毒素、丝裂霉素 C 等常用药物和代表化合物进行毒理学系统分析, 并以此作为参考试验, 与华人 hESC 体外优化筛选系统进行差异性和相关性比较, 确认 hESC 评价体系用于胚胎毒性评价时的重复性、敏感性、特异性和准确性。

大鼠全胚胎培养实验结果显示, 青霉素和丙烯酰胺为无胚胎毒性物质, 地塞米松和氯化锂为中等发育毒性化合物, 氯化镉、阿霉素、T-2 毒素和丁烯酸内酯为强发育毒性化合物^[15]。EST 的结果显示, 青霉素无胚胎毒性, 氟脲嘧啶和 T-2 毒素为强胚胎毒性。Ebf-H9 对于丝裂霉素的浓度变化反应比 L-929 细胞系更为敏感, 提示 Ebf-H9 在细胞毒性筛查的实验上是一个更佳的细胞模型^[16]。

进一步研究 T-2 毒素的作用机制, 结果显示, T-2 毒素损伤胚胎细胞内的酶性和非酶性抗氧化防御系

统,诱导细胞内氧化性物质活性氧(reactive oxygen species,ROS)和氧化产物丙二醛的过量产生,进而引起细胞内明显的氧化应激,从而导致ESC损伤,同时由ROS介导的通过线粒体途径的凋亡也会增加^[17]。

EST是一种体外检测方法,与体内方法相比,不必考虑对人体及动物体的毒副作用,而且可以区分生殖细胞和体细胞突变剂;与其他体外方法(全胚或解离的大块胚芽细胞原初培养进行的筛选测试)相比,不需要大量的怀孕动物。就细胞毒性而言,ESC对药物等化合物的敏感性高于成体组织。另外,ESC体外分化的潜能使EST可以用于研究胚胎发育的毒性,有利于阐明发育毒理学。

综上所述,通过此次国际合作研究,本项目形成了以hESC为基础,以细胞生物医学研究为主线,跨越物理、化学、力学和生物医学工程等学科的多学科交叉的创新科研平台。该平台致力于基于hESC的健康安全评价体系前沿领域的研究,在hESC分离培养、定向诱导分化、毒性检测模型构建、材料毒理学检测以及组织工程技术等方面建立了相关先进技术,为完善我国食品、药品、工业原料、食品添加剂、医用化学品、生物制剂及军用制剂的健康安全评价体系奠定了基础。

参考文献

- [1] Genschow E, Spielmann H, Scholz G, et al. The ECVAM international validation study on *in vitro* embryotoxicity tests; results of the definitive phase and evaluation of prediction models. European Centre for the Validation of Alternative Methods [J]. Altern Lab Anim, 2002, 30(2): 151-176.
- [2] Chen X, Song XH, Yin Z, et al. Stepwise differentiation of human embryonic stem cells promotes tendon regeneration by secreting fetal tendon matrix and differentiation factors [J]. Stem Cells, 2009, 27(6): 1276-1287.
- [3] Chen JL, Yin Z, Shen WL, et al. Efficacy of hESC-MSCs in knitted silk-collagen scaffold for tendon tissue engineering and their

- roles [J]. Biomaterials, 2010, 31(36): 9438-9451.
- [4] Shen W, Chen X, Chen J, et al. The effect of incorporation of exogenous stromal cell-derived factor-1 alpha within a knitted silk-collagen sponge scaffold on tendon regeneration [J]. Biomaterials, 2010, 31(28): 7239-7249.
- [5] Yin Z, Chen X, Chen JL, et al. Stem cells for tendon tissue engineering and regeneration [J]. Expert Opin Biol Ther, 2010, 10(5): 689-700.
- [6] Fu X, Sc B, Wei SH, et al. Autologous feeder cells from embryoid body outgrowth support the long-term growth of human embryonic stem cells more effectively than those from direct differentiation [J]. Tissue Eng Part C Methods, 2010, 16(4): 719-733.
- [7] Zheng Y, Lin S, Wei S, et al. Stage-dependent effect of TGF- β 1 on chondrogenic differentiation of human embryonic stem cells [J]. Stem Cells Dev, 2009, 18(6): 929-940.
- [8] Zhang SF, Jiang YZ, Zhang W, et al. Neonatal desensitization supports long-term survival and functional integration of human embryonic stem cell-derived mesenchymal stem cells in rat joint cartilage without immunosuppression [J/OL]. Stem Cells Dev, (2012-08-14) [2012-10-08] <http://online.liebertpub.com/doi/abs/10.1089/scd.2012.0116>.
- [9] Saji G, Boon CH, Kumar JV, et al. Comparison of the response of human embryonic stem cells and their differentiated progenies to oxidative stress [J]. Photomed Laser Surg, 2009, 27(4): 669-674.
- [10] Boon CH, Kumar JV, Lu K, et al. Prolonged exposure of human embryonic stem cells to heat shock induces necrotic cell death [J]. Biocell, 2007, 31(3): 405-410.
- [11] Wang XY, Li SL, Cao T, et al. Evaluating biotoxicity with fibroblasts derived from human embryonic stem cells [J]. Toxicol in Vitro, 2012, 26(6): 1056-1063.
- [12] Peng H, Zhang XH, Wei Y, et al. Cytotoxicity of silver nanoparticles in human embryonic stem cell-derived fibroblasts and an L-929 cell line [J/OL]. J Nanomater, 2012, <http://www.hindawi.com/journals/jnm/2012/160145/>.
- [13] 彭晖,俞光岩,李盛林,等.纳米银对人胚干细胞来源的成纤维细胞的细胞毒性评价研究[J].现代口腔医学杂志,2012,26(3): 171-174.
- [14] 战园,王晓颖,李盛林,等.两种牙科材料对人胚胎干细胞来源成纤维细胞的细胞毒性研究[J].北京大学学报:医学版,2012,44(1): 1-5.
- [15] Guo J, Zhang LS, Wang YM, et al. Study of teratogenicity of Fusarium mycotoxin butenolide using a whole rat embryo culture model [J]. Toxicol in Vitro, 2011, 25(8): 1727-1732.
- [16] Cao T, Lu K, Fu X, et al. Differentiated fibroblastic progenies of human embryonic stem cells for toxicology screening [J]. Clon Stem Cells, 2008, 10(1): 1-10.
- [17] Wu J, Jing L, Yuan H, et al. T-2 toxin induces apoptosis in ovarian granulosa cells of rats through reactive oxygen species-mediated mitochondrial pathway [J]. Toxicol Lett, 2011, 202(3): 168-177.

(2012-11-08 收稿)
(本文编辑:赵波)

Development of human embryonic stem cell model for toxicity evaluation

YU Guang-yan^{1△}, CAO Tong², OUYANG Hong-wei³, PENG Shuang-qing⁴, DENG Xu-liang¹, LI Sheng-lin¹, LIU He¹, ZHOU Xiao-hui³, FU Xin², PENG Hui¹, WANG Xiao-ying¹, ZHAN Yuan¹

(1. Peking University School and Hospital of Stomatology, Beijing 100081, China; 2. Faculty of Dentistry Research Laboratories, National University of Singapore, Singapore 119083, Singapore; 3. Centre for Stem Cell and Tissue Engineering, School of Medicine, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China; 4. Evaluation and Research Center for Toxicology, Institute of Disease Control and Prevention, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100071, China)

SUMMARY The current international standard for toxicity screening of biomedical devices and materials recommend the use of immortalized cell lines because of their homogeneous morphologies and infinite proliferation which provide good reproducibility for *in vitro* cytotoxicity screening. However, most of the widely used immortalized cell lines are derived from animals and may not be representative of normal human cell behavior *in vivo*, in particular in terms of the cytotoxic and genotoxic response. Therefore, It is vital to develop a model for toxicity evaluation. In our studies, two Chinese human embryonic stem cell (hESC) lines as toxicity model were established. hESC derived tissue/organ cell model for tissue/organ specific toxicity evaluation were developed. The efficiency and accuracy of using hESC model for cytotoxicity, embryotoxicity and genotoxicity evaluation were confirmed. The results indicated that hESCs might be good tools for toxicity testing and biosafety evaluation *in vitro*.

KEY WORDS Embryonic stem cells; *In vitro*; Toxicity tests; Cell differentiation; Humans