

DOI:10.7524/AJE.1673-5897.20191129002

杨仁君, 任悦, 沈素, 等. 人多能干细胞在环境污染物风险评估中的应用与展望[J]. 生态毒理学报, 2020, 15(3): 47-55

Yang R J, Ren Y, Shen S, et al. Application and prospect of human pluripotent stem cells in risk assessment of environmental pollutants [J]. Asian Journal of Ecotoxicology, 2020, 15(3): 47-55 (in Chinese)

人多能干细胞在环境污染物风险评估中的应用与展望

杨仁君^{1,2}, 任悦³, 沈素³, 殷诺雅^{1,2}, Francesco Faiola^{1,2}, 张杨^{3,*}

1. 中国科学院生态环境研究中心, 环境化学与生态毒理学国家重点实验室, 北京 100085

2. 中国科学院大学资源与环境学院, 北京 100049

3. 首都医科大学附属北京友谊医院药学部, 北京 100050

收稿日期: 2019-11-29 录用日期: 2020-03-20

摘要: 在环境污染问题日益严峻的今天, 人们亟需一套高效的毒理学评价体系来全面评估各类环境污染物的毒性效应和致毒机制, 并阐明化合物结构与毒性效应之间的关系, 进而指导安全化合物的合成。人多能干细胞(hPSCs)具有近乎无限的增殖能力和分化成所有成体细胞的潜能, 近年来在毒理学的应用中崭露头角, 显现出极大的应用潜力。由 hPSCs 分化而来的细胞可以代替原代细胞进行高通量的毒理学研究; hPSCs 分化模型便于在体外研究环境污染物暴露对人体胚胎发育过程的毒性; 基于 hPSCs 构建的类器官技术也使环境污染物的器官毒性研究成为可能。hPSCs 在环境污染物风险评估中有很高的应用价值。
关键词: 环境污染物; 人多能干细胞; 发育毒性; 器官毒性

文章编号: 1673-5897(2020)3-047-09 中图分类号: X171.5 文献标识码: A

Application and Prospect of Human Pluripotent Stem Cells in Risk Assessment of Environmental Pollutants

Yang Renjun^{1,2}, Ren Yue³, Shen Su³, Yin Nuoya^{1,2}, Francesco Faiola^{1,2}, Zhang Yang^{3,*}

1. State Key Laboratory of Environmental Chemistry and Ecotoxicology, Research Center for Eco-Environmental Sciences, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100085, China

2. College of Resources and Environment, University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China

3. Department of Pharmacy, Beijing Friendship Hospital, Capital Medical University, Beijing 100050, China

Received 29 November 2019 accepted 20 March 2020

Abstract: With environmental issues being increasingly serious, an efficient toxicology evaluation system is urgently needed to comprehensively evaluate the toxic effects of various environmental pollutants, reveal the toxic mechanism, discern the relationship between the structure and toxic effects of chemicals, and thus guide the synthesis of safe compounds. In recent years, the application of human pluripotent stem cells (hPSCs) in toxicity research has emerged showing great potential. hPSCs possess almost unlimited proliferation ability and the potential to differentiate into all the cell types of the adult. Cells differentiated from hPSCs can replace primary cells for toxicity research and the experiments can be carried out in a high-throughput manner. The differentiation model of hPSCs

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(21577166, 21876197); 国家自然科学基金青年科学基金资助项目(21707160)

第一作者: 杨仁君(1990—), 男, 博士, 研究方向为干细胞毒理学, E-mail: 313659164@qq.com

* 通讯作者 (Corresponding author), E-mail: david19872005@163.com

can be used to study the developmental toxicity of environmental pollutants to human embryos *in vitro*. In addition, technology breakthroughs of iPSC-based organoid construction make it possible to study the organ toxicity of environmental pollutants. Therefore, hPSCs possess great practical value in risk assessment of environmental pollutants. **Keywords:** environmental pollutants; human pluripotent stem cells; developmental toxicity; organ toxicity

随着世界经济的发展、科技的进步和人类物质需求的日益增长,许多新型化学品被合成、制造和应用。新型化学品在为人们的工作和生活提供便利的同时,也带来了日益严峻的安全问题。近年来,由未经毒理学评估的化学品引起的健康危害事件频繁发生,为解决这一问题,人们亟需开发出一套高通量且高灵敏的毒理学评价体系,在新型化合物应用之前及时进行风险评估。

毒理学的研究长期以来非常依赖动物模型。动物实验存在着通量低、成本高的缺点,而且由于物种间的差异,基于动物实验得到的结果并不都适用于人类。体外细胞实验的兴起,提供了解决上述问题的途径。首先,体外细胞培养条件简单可控,解决了毒理学实验使用动物模型难以高通量化的问题。其次,细胞培养成本较低,解决了动物模型成本高昂的问题。再次,体外细胞实验不仅可以进行实时监测,还具有多种多样的生物学检测终点,使得化合物的致毒机制研究更为灵活多样。此外,使用人体细胞为模型得到的实验结果,还能够更准确地反映环境污染物对人体健康的影响。综上所述,体外细胞实验可以弥补动物实验的不足,实现环境污染物毒性的高效筛查,有力地推进环境污染物致毒机制研究,有望在将来建立起一套完整的结构-毒性效应体系,并且用于指导安全化合物的合成。干细胞毒理学是目前体外毒理学的一个新兴分支,本文将重点介绍多能干细胞毒理学的研究成果,阐述它为传统毒理学评估提供的补充和帮助,以期对干细胞在环境污染物风险评估中的应用提供参考、拓宽思路。

1 干细胞毒理学发展简介 (Brief introduction to the development of stem cell toxicology)

多能干细胞(pluripotent stem cells, PSCs)是一类拥有自我更新能力、近乎无限的增殖能力和可分化为成体几乎所有类型细胞潜能的细胞。从囊胚期内细胞团中分离得到的胚胎干细胞(embryonic stem cells, ESCs)和通过重编程得到的诱导多能干细胞(induced pluripotent stem cells, iPSCs)均属于PSCs^[1]。1981年,Evans和Kaufman^[2]成功分离了小鼠胚胎干细胞(mouse embryonic stem cells, mESCs)并建立了

培养体系。1997年,研究者提出了胚胎干细胞测试准则(Embryonic Stem Cell Test, EST),建立了首个基于胚胎干细胞的发育毒性评估模型^[3-4]。1998年,Thomson等^[5]成功分离了人胚胎干细胞(human embryonic stem cells, hESCs),并建立了体外培养体系。1999年,欧洲替代方法研究中心 ECVAM (European Centre for the Validation of Alternative Methods)的研究证明,使用EST模型可以准确地评估环境污染物的胚胎发育毒性^[6]。2007年,Takahashi等^[7]成功将人成纤维细胞重编程为诱导多能干细胞,2008年,Park等^[8]利用重编程技术,成功建立疾病特异性的iPSCs细胞系,解决了特定人群的特定组织样品难以获取和扩增的问题,为精准医疗和人群特异性毒性评价的发展奠定了基础。2008年,首个与小鼠EST相对应的人胚胎干细胞测试准则建立^[9],在接下来的10年时间里,hESCs逐步成为毒理学和药理学研究的热点,而其中最激动人心的三类突破是:(1)利用胚胎干细胞近乎无限的增殖能力和分化成成体各种细胞类型的能力,大量生产特定类型的细胞,解决了心肌细胞等原代细胞无法大量增殖的问题,进而实现了体外毒性评估的高通量化^[10];(2)利用体外胚胎干细胞分化过程模拟体内人胚胎的发育过程,基于不同分化模型构建了不同毒理学检测体系,可以用来评估化合物对人胚胎发育各个过程的毒性作用,预防药物或环境污染导致的胎儿畸变事件发生;(3)使用胚胎干细胞分化而来的类器官模拟真实生理状态下的组织器官进行化合物毒性检测,能更加准确地反映化合物在人体中的作用,再结合新兴的单细胞测序等分析技术,可以从类器官和单细胞2个层面高效立体地解析化合物的效应和机制(图1)。

在环境污染物毒性研究的过程中,多能干细胞体外实验模型的应用,有利于准确、灵敏地评估环境污染物对不同细胞、组织、器官或发育过程的毒性效应。干细胞体外实验模型结合高通量分析方法,还可以获得大量多层次的相关联毒性数据,极大地推进致毒机制的解析以及化合物结构-毒性效应关系的建立。虽然,目前干细胞在环境污染物毒性评估方面的应用仍处于探索阶段,但其发展潜力已展露无遗^[4-5,11]。



图 1 干细胞毒理学发展简介

Fig. 1 Development of stem cell toxicology

2 人多能干细胞在基础毒性评估中的应用 (The application of hESCs in basic toxicity evaluation)

在现代毒理学研究中,体外细胞实验具有系统简单、条件可控、实验周期短以及易于高通量化等特点。相比于癌细胞,胚胎干细胞具有正常的核型,在基础毒性测试中能够更加客观地反映化合物与正常细胞之间的作用;相比于原代细胞,胚胎干细胞的增殖能力更强,通过诱导分化可以大量获得不同原代细胞的替代品,为实现实验的高通量化创造条件。胚胎干细胞在基础毒性检测中的应用可以追溯到1991年, Laschinski 等^[1]从囊胚中分离出整倍体 mESCs,随后使用 MTT 法同时检测了多种化合物对 mESCs 和成纤维细胞的细胞毒性,相关测试结果不仅与之前活体动物实验结果高度吻合,还显示 mESCs 比已分化细胞具有更高的敏感性。随着 hPSCs 培养体系的建立以及诱导分化技术的不断突破, hPSCs 以及其分化而来的细胞也被应用于基础毒性检测当中,并且毒性检测方法也逐渐走向高通量化。2016年, Pei 等^[12]建立了一套基于 hiPSCs 和 hiPSCs 分化而来的细胞(神经干细胞、神经元和星形胶质细胞)的高通量化毒性筛查系统,随后使用该系统研究了包括神经毒素、发育神经毒素和环境污染物的 80 种化合物在 $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时的毒性。MTT 细胞毒性检测实验结果表明,在被测试的 80 种化合物中,有 50 种化合物对上述 4 种细胞中的至少一种具有细胞毒性,其中缬霉素、四溴双酚 A、溴氰菊酯和磷酸三苯酯对 4 种细胞均具有显著的细胞毒性。可见,使用胚胎干细胞分化系统,便于建立基于各种不同类型细胞的高通量化毒性筛查平台,可以极大地推进化合物毒性敏感阶段和靶点细胞的确定。同时,环境污染物四溴双酚 A、溴氰菊酯和磷酸三苯酯相比于其他已知神经毒剂具有更广泛的毒性效应,说明了使用基于 hPSCs 和不同分化细胞的高通量毒性筛查平台进行环境污染物基础毒性筛查的必要性。

3 人多能干细胞在发育毒性评估中的应用 (The application of hESCs in developmental toxicity evaluation)

干细胞毒理学研究除了关注化合物对细胞活力、胞内活性氧自由基水平和胞膜完整性等基础毒性指标之外,更关注化合物在非致死浓度下对干细胞自我更新能力、分化潜能以及分化过程的影响。而且, hPSCs 分化模型也是目前直接研究化合物对

人早期胚胎发育作用的唯一有效模型。1997年, Spielmann 等^[4]在基于 mESCs 的胚胎发育毒性检测方法中引入了拟胚体(embryoid bodies, EBs)分化实验,在 EBs 分化过程中给药处理,随后根据分化末期跳动 EBs 的数量来评估化合物对分化实验效率的影响,该实验方法即为胚胎干细胞在发育毒性评估中的应用雏形。hPSCs 分化模型的建立为发育毒性研究提供了多种可选方向,使人们能够全面地解析某个或某类化合物对胚胎干细胞不同分化过程的影响,有利于揭示化合物胚胎发育毒性的靶向性及致毒机制。

3.1 人多能干细胞在环境污染物神经发育毒性评估中的应用(The application of hESCs in developmental neural toxicity evaluation)

目前,基于 hPSCs 的神经、肝脏、心脏、胰腺和皮肤发育毒性的研究均有报道,其中,神经系统最容易受到外界因素干扰,因而成了胚胎干细胞发育毒性研究的热点^[13-14]。神经系统是动物和人类进行思考、行为和生理活动的调控枢纽,发育过程极其复杂,需要有程序地进行神经元的发生、神经元的迁移、突起长出和突触连接形成等过程,耗时长达数年。已报道的相关神经发育毒性研究涉及神经丛形成^[15]、神经前体发育^[16]和多巴胺能神经元发育等各个过程^[17-18]。

2019年, Chen 等^[9]使用 hPSCs 神经分化系统,研究了溴代阻燃剂多溴联苯醚(PBDEs)同系物 BDE-47 和 BDE-99 对人早期神经发育不同阶段的影响。该研究将 hPSCs 神经分化过程分为 hESC 自我更新、EB 三胚层形成、EB 外胚层至神经丛形成、神经前体增殖和神经球扩张等 5 个阶段。分段式的研究结果显示,神经前体阶段的细胞对 PBDEs 引起的细胞毒性较为敏感,并且在亚致死浓度下, BDE-47 即可抑制神经前体细胞(NPCs)的增殖和神经元的生成。随后,转录组和甲基化组学分析显示, PBDEs 暴露影响细胞氧化应激、细胞周期、激素信号、类固醇代谢和神经发育等生理过程,并且导致 CpG 甲基化显著增加。该研究表明,运用 hPSCs 神经分化系统分段式的研究,有利于找出化合物作用的敏感时期,并且大量的组学数据也为全面揭示 PBDEs 的毒性效应奠定了基础。

目前,基于 hPSCs 的神经发育毒性研究,因为分化方法的不同而种类繁多。然而,大多数实验都只是独立地研究特定化合物对特定神经分化过程的

影响,如何形成一套完整的发育神经毒性评价体系以及如何整合已有研究成果,从而形成各种化合物的结构-神经毒性效应体系,是该研究方向面临的一大挑战。

3.2 人多能干细胞在环境污染物肝脏发育毒性评估中的应用(The application of hESCs in developmental hepatic toxicity evaluation)

肝脏是人体至为重要的解毒器官,在解毒的同时,往往会因为化合物的累积,给自身带来损伤。以往的大多数研究只关注化合物对肝脏或肝细胞的影响,而很少关注胚胎发育时期化合物暴露对肝脏发育的影响。然而,近年来基于小鼠模型的研究显示,胚胎发育时期内分泌干扰物的暴露会增加后天患非酒精性脂肪肝病的风险,表明胚胎发育时期化合物暴露造成的影响同样不可小觑^[20]。

目前,Liang 等^[21]已建立一套基于 hPSCs 肝脏分化模型的毒性检测系统。使用甲状腺素 T3 和 T4 作为阳性化合物对该系统进行验证,结果表明,该系统可以很好地反映过量甲状腺素处理对肝脏细胞分化造成的影响,具体表现为分化末期细胞内脂肪的大量积累和糖原贮存能力偏低。同样,在上述研究中,研究者还研究了与甲状腺素结构类似的环境污染物 BDE-47 和 BDE-209 对肝脏分化的影响。实验结果表明,PBDEs 和甲状腺激素处理均能够促进 CYP 家族(*CYP1A1*、*CYP2C8*、*CYP2C9*、*CYP3A4* 和 *CYP3A7*)肝脏标志基因的表达,但对 *PPARA* 和 *HNF4A* 等基因的作用相反,可见 PBDEs 和甲状腺激素对肝脏发育的影响有类似之处,但又不完全相同,暗示 PBDEs 还影响肝脏分化过程中的其他关键靶点^[21]。该研究为揭示 PBDEs 的人体肝脏发育毒性提供了线索。上述研究系统是目前已报道的首个基于 hPSCs 的肝脏发育毒性评估系统,但该系统的应用目前仍不成熟,将来更多检测终点的加入有望使该系统不断完善,最终成为一套全面的肝脏发育毒性评估系统。

3.3 人多能干细胞在环境污染物心脏发育毒性评估中的应用(The application of hESCs in developmental cardiac toxicity evaluation)

心脏是人体的泵血器官,先天性心脏畸形是较为普遍的先天性畸形病症,全世界每年有约 1% 的新生儿患有该病^[22-23],然而先天性心脏病的病因往往难以明确。目前,已知孕期药物和环境污染物的暴露会增加新生儿罹患先天性心脏病的风险,因此,

近年已有研究建立了基于 hPSCs 的心脏发育毒性检测系统,并以二恶英类化合物 2,3,7,8-TCDD 为例,研究了环境污染物的心脏发育毒性^[24]。该研究同样采取了分段式的研究方法,研究了在胚胎干细胞、中胚层、心脏中胚层、心肌前体或心肌细胞阶段 TCDD 处理对心脏分化的影响。结果显示,在胚胎干细胞阶段或中胚层阶段 TCDD 的暴露会显著抑制心脏分化。后续转录组分析和染色质免疫沉淀测序分析(ChIP-seq)结果表明,TCDD 在 hPSCs 分化早期会作用于芳香烃受体(AhR),促使其与基因组 DNA 的反式作用元件结合,抑制中胚层相关基因的表达,进而抑制心脏分化。该研究结论与利用动物模型和小鼠细胞模型得到的研究结果一致^[24],证明了使用该系统研究化合物对人胚胎心脏发育过程的影响是可行的。

3.4 人多能干细胞在环境污染物胰腺发育毒性评估中的应用(The application of hESCs in developmental pancreatic toxicity evaluation)

胰腺是人体内具有外分泌和内分泌功能的重要器官,与消化和糖代谢密切相关。胰腺发育相关研究在哺乳动物中难以进行,因此,往往需要依赖斑马鱼等脊椎动物模型^[25]。hPSCs 胰腺分化方法的突破为人胰腺发育毒性的研究提供了一个新思路。目前,Liu 等^[26]已初步建立了基于 hPSCs 胰腺分化的胰腺发育毒性研究系统,并研究了持久性有机污染物全氟辛酸(PFOA)和全氟辛基磺酸(PFOS)的胰腺发育毒性。结果表明,低至 5 nmol·L⁻¹ 的 PFOA 和 PFOS 处理就会抑制胰腺分化,具体表现在抑制了胰腺分化过程中内胚层标志基因(*FOXA1*、*FOXA2*、*SOX7* 和 *SOX17*)和胰腺相关重要转录因子(*HNF1b*、*HNF4a*、*HNF6*、*PDX1* 和 *SOX9*)的表达。该结果与已有动物实验结果和流行病学调查结果相吻合^[27-31],暗示 PFOA 和 PFOS 干扰人胚胎发育早期阶段胰腺发育^[26]。上述研究表明,基于胚胎干细胞的胰腺分化模型可以方便、快捷并灵敏地反映极低剂量环境污染物诱发的胰腺发育毒性^[26],该胰腺发育毒性模型的发展和完善将极大地推进化合物胰腺发育毒性的研究。

3.5 人多能干细胞在环境污染物皮肤发育毒性评估中的应用(The application of hESCs in developmental skin toxicity evaluation)

表皮是皮肤对外的屏障,可以起到阻止外界病原入侵、抵御辐射和防止机体水分丢失等作用^[32]。

表皮中90%的细胞是角质形成细胞,正常状态下,角质形成细胞可以自我更新、增殖并修复受损的表皮,而病理状态下角质形成细胞是表皮性水疱、牛皮癣等皮肤炎症作用的靶点^[33]。目前,有关化合物的皮肤发育毒性的相关研究非常匮乏,Cheng等^[34]建立了基于hPSCs分化的皮肤发育毒性检测模型,并研究了空气污染物超细碳颗粒物对皮肤发育的影响。结果表明,超细碳颗粒物暴露使角质形成细胞前体相关基因 *KRT8*、*KRT18* 和 Δ *NP63* 表达水平上升,成熟相关基因 *KRT14*、*KRT5*、*KRT16* 和 *COL7A1* 表达水平下降,同时,使牛皮癣相关基因 *S100A7*、*S100A9* 和炎症相关因子表达水平显著上升。上述结果显示,超细碳颗粒物可以影响表皮发育过程,增加表皮炎症疾病的发病率^[34]。该研究显示了空气污染对婴幼儿皮肤发育的潜在影响,为揭示超细碳颗粒的毒性效应提供了帮助。同时,该研究也是人体皮肤发育毒性研究的初探,在将来,表观遗传组等各种组学技术与皮肤发育毒性研究的结合或许能够揭示环境污染与人体皮肤敏感性的关联。

目前,在生命科学领域,与干细胞相关的诱导分化方法层出不穷,基于诱导分化而形成的细胞的自动化、高通量毒性研究方法也逐渐增多。然而,如何利用多能干细胞的优点来评估环境污染物对人胚胎早期发育过程的影响依旧是一个亟待探索的领域。由于人体发育过程本身的复杂性,每个发育阶段都存在着多种细胞类型和复杂的生命活动,如何通过众多的诱导分化手段在体外模拟人胚胎分化到某个特定阶段的过程,又如何将同种化合物在独立研究中取得的毒性数据进行整合分析,最终准确预测化合物的靶点和致毒机制,是该领域面临的一大挑战。

4 人多能干细胞在器官毒性评估中的应用 (The application of hESCs in organ toxicity evaluation)

随着胚胎干细胞不同诱导分化方法的发展,研究人员开始尝试使用分化而来的细胞构建高仿真3D组织。在过去几年里,出现了2种不同的技术来模拟体内器官的真实情况:(1)依赖干细胞生物学的自组织类器官技术;(2)依赖生物工程手段的器官芯片技术。3D类器官是与对应的器官具有类似的空间组织和功能的三维细胞培养物。类器官技术首先通过不同的方法诱导胚胎干细胞定向分化,获得处于特定发育阶段的干细胞或祖细胞,随后将这些细胞按照某种特定方式混合,使其自组装并且发育形成类器官。一般通过单层分化得到的细胞都处于未

成熟的状态,然而,一系列研究表明,使用分化到某一特定阶段的细胞自组装构建出的类器官内的细胞往往更为成熟,因此,3D类器官的基因表达、细胞外基质分泌以及细胞功能活动更为接近体内器官^[35-37],并且更适合进行化合物的器官毒性研究。目前,可以构建的类器官包括大脑^[38]、心脏^[39]、肝脏^[40-41]、胰腺^[42]、肺^[43]、肾^[44]、输卵管^[45]、视网膜^[46]、角膜^[47]、唾液腺^[48]、子宫内膜^[49]和血管^[50]等。部分人源类器官已经被应用于再生医学或化合物毒性评估当中。

在脑类器官方面,Schwartz等^[51]将hPSCs分化而来的神经前体细胞、内皮细胞、间充质干细胞和小胶质/巨噬细胞前体细胞共同培养,使这些前体细胞自组装成具有三维神经结构和血管网络的脑类器官。随后使用上述脑类器官检测了包括环境污染物二恶英在内的34种神经毒剂和26种无毒化合物对基因表达谱的影响,并且应用机器学习的方法,根据有毒和无毒情况下脑类器官基因表达谱的变化,建立了基于计算机识别毒性特异基因表达谱的化合物神经毒性评估模型。该研究不仅提供了一个可行的脑类器官构建方法,还证明了通过计算机识别毒性特异基因表达谱的方法评估化合物毒性的可行性。相较于细胞活力,化合物在低浓度下往往首先影响基因的转录,因此,基于转录组分析的毒性筛查方法更加灵敏。随着机器学习技术的进步和转录组测序成本的下降,计算机识别毒性特异基因表达谱的方法或能得以推广,从而建立起一些高灵敏、高通量的毒性筛查系统。在心脏类器官方面,Mills等^[52]已经建立了高通量心脏类器官毒性评估系统,使用该系统研究了105种潜在的促再生小分子,并且成功地从中筛选出2种不会影响心脏功能的促再生分子,初步揭示了其促再生机理。在肝脏类器官方面,李朋彦等^[53]使用3D肝脏类器官模型,研究了该模型对阳性对照物胺碘酮、环孢霉素和阴性对照药物阿司匹林的不同反应,初步证实了该系统在检测肝脏毒性时的准确性。在肾脏毒性方面,Czerniecki等^[54]更是建立了一套全自动化、高通量的肾脏类器官形成及肾毒性评估系统,使用该系统有望高效地进行化合物肾毒性的研究。

虽然基于现有技术构建的3D类器官还不能完美地模拟体内成熟器官,但使用类器官代替人体脏器官进行研究是毒理学研究发展的趋势之一。在不远的将来,类器官构建技术的突破以及基于类器

官的毒理学研究系统的高通量化,有望带来人体器官毒性研究的飞跃。此外,目前人源类器官的应用大多集中在药物的开发上,而实际上环境污染物对人体健康的效应同样值得关注,因此,人源类器官模型在环境污染物器官毒性评估方面的应用亟待开发。

器官芯片是通过微流控等生物工程学方法精确模拟体内环境培养细胞的技术^[55-56]。该领域最早的研究报道于2010年,Huh等^[57]使用经典的软光刻技术和微流控技术创建了一个肺芯片,用来模拟人类肺泡毛细血管界面,使人们能够模拟肺部炎症和感染。近年来,器官芯片领域飞速发展,大量研究报道了各种器官芯片的构建。胚胎干细胞相关技术的成熟为使用器官芯片进行疾病特异性药物的开发或人群特异性污染物毒性的评估提供了便利。同时,类器官技术与器官芯片技术的结合,也将使化合物的器官发育毒性的研究更上一层楼^[58]。在研究环境污染物的毒性效应方面,器官芯片和类器官芯片有着极大的应用空间。

5 总结与展望 (Summary and prospects)

近年来,干细胞生物学的发展为环境污染物毒性的体外研究提供了许多有利条件和新的途径。通过扩增胚胎干细胞并且诱导其分化,可以大量获得特定类型的细胞,从而解决某些原代细胞难以大量增殖的问题,为环境污染物毒性评估的高通量化奠定了基础。使用胚胎干细胞分化来模拟人体胚胎发育的过程,可以在体外研究环境污染物的人体胚胎发育毒性,从而获得相比于动物实验更加接近人体发育过程的毒性数据。使用胚胎干细胞分化而来的细胞构建类器官,可以建立起更加接近人体内真实情况的器官毒性评价体系,实现人体器官毒性的体外评估。同时,多种毒性评估方法的应用,又将有助于全方位地评估环境污染物对人体各种细胞、组织、器官和发育过程的影响,进而全面揭示其致毒机制。目前,多数基于干细胞模型的环境污染物毒性研究都是独立进行的,使用的模型和研究对象也各不相同,如何将相关研究结果进行整合分析,并总结出某类化合物的毒性靶点和毒性规律是现阶段需要解决的一大难题。未来,把基于干细胞的各种细胞毒性、发育毒性和器官毒性研究方法进行整合,建立一套完整的干细胞毒理学评价体系并实现高通量化,将是一项极其庞大而又意义深远的工程。毋庸置疑,干细胞毒理学的发展能够有力地推进环境污染物的

毒性评估。基于现有的研究结果,人们有望在将来建立一套化合物结构-毒性效应关系体系,用以指导安全化合物的合成。

通讯作者简介:张杨(1987—),男,药剂学硕士,主管药师,主要研究方向为临床药学。

参考文献 (References):

- [1] Zhao X Y, Li W, Lv Z, et al. iPS cells produce viable mice through tetraploid complementation [J]. *Nature*, 2009, 461(7260): 86-90
- [2] Evans M J, Kaufman M H. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos [J]. *Nature*, 1981, 292(5819): 154-156
- [3] Laschinski G, Vogel R, Spielmann H. Cytotoxicity test using blastocyst-derived euploid embryonal stem cells: A new approach to *in vitro* teratogenesis screening [J]. *Reproductive Toxicology*, 1991, 5(1): 57-64
- [4] Spielmann H, Pohl I, Doring B, et al. The embryonic stem cell test (EST), an *in vitro* embryotoxicity test using two permanent mouse cell lines: 3T3 fibroblasts and embryonic stem cells [J]. *Toxicology in Vitro*, 1997, 10: 119-127
- [5] Thomson J A, Itskovitz-Eldor J, Shapiro S S, et al. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts [J]. *Science*, 1998, 282(5391): 1145-1147
- [6] Scholz G, Pohl I, Genschow E, et al. Embryotoxicity screening using embryonic stem cells *in vitro*: Correlation to *in vivo* teratogenicity [J]. *Cells Tissues Organs*, 1999, 165(3-4): 203-211
- [7] Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, et al. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors [J]. *Cell*, 2007, 131(5): 861-872
- [8] Park I H, Arora N, Huo H, et al. Disease-specific induced pluripotent stem cells [J]. *Cell*, 2008, 134(5): 877-886
- [9] Adler S, Pellizzer C, Hareng L, et al. First steps in establishing a developmental toxicity test method based on human embryonic stem cells [J]. *Toxicology in Vitro*, 2008, 22(1): 200-211
- [10] Guo L, Abrams R M, Babiarz J E, et al. Estimating the risk of drug-induced proarrhythmia using human induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes [J]. *Toxicological Sciences*, 2011, 123(1): 281-289
- [11] Rowe R G, Daley G Q. Induced pluripotent stem cells in disease modelling and drug discovery [J]. *Nature Reviews Genetics*, 2019, 20(7): 377-388
- [12] Pei Y, Peng J, Behl M, et al. Comparative neurotoxicity screening in human iPSC-derived neural stem cells, neu-

- rons and astrocytes [J]. *Brain Research*, 2016, 1638(Pt A): 57-73
- [13] Rice D, Barone S Jr. Critical periods of vulnerability for the developing nervous system: Evidence from humans and animal models [J]. *Environmental Health Perspectives*, 2000, 108(Suppl 3): 511-533
- [14] Kadereit S, Zimmer B, van Thriel C, et al. Compound selection for *in vitro* modeling of developmental neurotoxicity [J]. *Frontiers in Bioscience (Landmark Ed.)*, 2012, 17: 2442-2460
- [15] Colleoni S, Galli C, Gaspar J A, et al. Development of a neural teratogenicity test based on human embryonic stem cells: Response to retinoic acid exposure [J]. *Toxicological Sciences*, 2011, 124(2): 370-377
- [16] Hoelting L, Scheinhardt B, Bondarenko O, et al. A 3-dimensional human embryonic stem cell (hESC)-derived model to detect developmental neurotoxicity of nanoparticles [J]. *Archives of Toxicology*, 2013, 87(4): 721-733
- [17] Huang B, Ning S, Zhang Q, et al. Bisphenol A represses dopaminergic neuron differentiation from human embryonic stem cells through downregulating the expression of insulin-like growth factor 1 [J]. *Molecular Neurobiology*, 2017, 54(5): 3798-3812
- [18] Krug A K, Kolde R, Gaspar J A, et al. Human embryonic stem cell-derived test systems for developmental neurotoxicity: A transcriptomics approach [J]. *Archives of Toxicology*, 2013, 87(1): 123-143
- [19] Chen H, Seifkar H, Larocque N, et al. Using a multi-stage hESC model to characterize BDE-47 toxicity during neurogenesis [J]. *Toxicological Sciences*, 2019, 171(1): 221-234
- [20] Trevino L S, Katz T A. Endocrine disruptors and developmental origins of nonalcoholic fatty liver disease [J]. *Endocrinology*, 2018, 159(1): 20-31
- [21] Liang S, Liang S, Yin N, et al. Establishment of a human embryonic stem cell-based liver differentiation model for hepatotoxicity evaluations [J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2019, 174: 353-362
- [22] van der Linde D, Konings E E, Slager M A, et al. Birth prevalence of congenital heart disease worldwide: A systematic review and meta-analysis [J]. *Journal of the American College of Cardiology* 2011, 58(21): 2241-2247
- [23] Hoffman J I E, Kaplan S. The incidence of congenital heart disease [J]. *Journal of the American College of Cardiology*, 2002, 39(12): 1890-1900
- [24] Fu H, Wang L, Wang J, et al. Dioxin and AHR impairs mesoderm gene expression and cardiac differentiation in human embryonic stem cells [J]. *Science of the Total Environment*, 2019, 651(Pt 1): 1038-1046
- [25] Sant K E, Jacobs H M, Borofski K A, et al. Embryonic exposures to perfluorooctanesulfonic acid (PFOS) disrupt pancreatic organogenesis in the zebrafish, *Danio rerio* [J]. *Environmental Pollution*, 2017, 220(Pt B): 807-817
- [26] Liu S, Yin N, Faiola F. PFOA and PFOS disrupt the generation of human pancreatic progenitor cells [J]. *Environmental Science & Technology Letters*, 2018, 5(5): 237-242
- [27] Lind L, Zethelius B, Salihovic S, et al. Circulating levels of perfluoroalkyl substances and prevalent diabetes in the elderly [J]. *Diabetologia*, 2014, 57(3): 473-479
- [28] Karnes C, Winquist A, Steenland K. Incidence of type II diabetes in a cohort with substantial exposure to perfluorooctanoic acid [J]. *Environmental Research*, 2014, 128: 78-83
- [29] Domazet S L, Grontved A, Timmermann A G, et al. Longitudinal associations of exposure to perfluoroalkylated substances in childhood and adolescence and indicators of adiposity and glucose metabolism 6 and 12 years later: The European Youth Heart Study [J]. *Diabetes Care*, 2016, 39(10): 1745-1751
- [30] Conway B, Innes K E, Long D. Perfluoroalkyl substances and beta cell deficient diabetes [J]. *Journal of Diabetes and Its Complications*, 2016, 30(6): 993-998
- [31] Cardenas A, Gold D R, Hauser R, et al. Plasma concentrations of per- and polyfluoroalkyl substances at baseline and associations with glycemic indicators and diabetes incidence among high-risk adults in the diabetes prevention program trial [J]. *Environmental Health Perspectives*, 2017, 125(10): 107001
- [32] Gurtner G C, Werner S, Barrandon Y, et al. Wound repair and regeneration [J]. *Nature*, 2008, 453(7193): 314-321
- [33] Culton D A, Qian Y, Li N, et al. Advances in pemphigus and its endemic pemphigus foliaceus (Fogo Selvagem) phenotype: A paradigm of human autoimmunity [J]. *Journal of Autoimmunity*, 2008, 31(4): 311-324
- [34] Cheng Z, Liang X, Liang S, et al. A human embryonic stem cell-based *in vitro* model revealed that ultrafine carbon particles may cause skin inflammation and psoriasis [J]. *Journal of Environmental Sciences*, 2020, 87: 194-204
- [35] Haycock J W. 3D cell culture: A review of current approaches and techniques [J]. *Methods in Molecular Biology*, 2011, 695: 1-15
- [36] Lancaster M A, Knoblich J A. Organogenesis in a dish: Modeling development and disease using organoid technologies [J]. *Science*, 2014, 345(6194): 1247125
- [37] Takebe T, Sekine K, Enomura M, et al. Vascularized and

- functional human liver from an iPSC-derived organ bud transplant [J]. *Nature*, 2013, 499(7459): 481-484
- [38] Pasca S P. The rise of three-dimensional human brain cultures [J]. *Nature*, 2018, 553(7689): 437-445
- [39] Richards D J, Coyle R C, Tan Y, et al. Inspiration from heart development: Biomimetic development of functional human cardiac organoids [J]. *Biomaterials*, 2017, 142: 112-123
- [40] Huch M, Gehart H, van Boxtel R, et al. Long-term culture of genome-stable bipotent stem cells from adult human liver [J]. *Cell*, 2015, 160(1-2): 299-312
- [41] Leite S B, Roosens T, El Taghdouini A, et al. Novel human hepatic organoid model enables testing of drug-induced liver fibrosis *in vitro* [J]. *Biomaterials*, 2016, 78: 1-10
- [42] Boj S F, Hwang C I, Baker L A, et al. Organoid models of human and mouse ductal pancreatic cancer [J]. *Cell*, 2015, 160(1-2): 324-338
- [43] Barkauskas C E, Chung M I, Fioret B, et al. Lung organoids: Current uses and future promise [J]. *Development*, 2017, 144(6): 986-997
- [44] Taguchi A, Nishinakamura R. Higher-order kidney organogenesis from pluripotent stem cells [J]. *Cell Stem Cell*, 2017, 21(6): 730-746.e6
- [45] Kessler M, Hoffmann K, Brinkmann V, et al. The Notch and Wnt pathways regulate stemness and differentiation in human fallopian tube organoids [J]. *Nature Communications*, 2015, 6: 8989
- [46] Zhong X, Gutierrez C, Xue T, et al. Generation of three-dimensional retinal tissue with functional photoreceptors from human iPSCs [J]. *Nature Communications*, 2014, 5: 4047
- [47] Foster J W, Wahlin K, Adams S M, et al. Cornea organoids from human induced pluripotent stem cells [J]. *Scientific Reports*, 2017, 7: 41286
- [48] Maimets M, Rocchi C, Bron R, et al. Long-term *in vitro* expansion of salivary gland stem cells driven by Wnt signals [J]. *Stem Cell Reports*, 2016, 6(1): 150-162
- [49] Turco M Y, Gardner L, Hughes J, et al. Long-term, hormone-responsive organoid cultures of human endometrium in a chemically defined medium [J]. *Nature Cell Biology*, 2017, 19(5): 568-577
- [50] Titmarsh D M, Nurcombe V, Cheung C, et al. Vascular cells and tissue constructs derived from human pluripotent stem cells for toxicological screening [J]. *Stem Cells and Development*, 2019, 28(20): 1347-1364
- [51] Schwartz M P, Hou Z, Propson N E, et al. Human pluripotent stem cell-derived neural constructs for predicting neural toxicity [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2015, 112(40): 12516-12521
- [52] Mills R J, Parker B L, Quaiife-Ryan G A, et al. Drug-screening in human PSC-cardiac organoids identifies proliferative compounds acting via the mevalonate pathway [J]. *Cell Stem Cell*, 2019, 24(6): 895-907.e6
- [53] 李朋彦, 李春雨, 陆小华, 等. 基于类器官3D培养和高内涵成像的药物肝毒性评价模型研究[J]. *药理学学报*, 2017, 52(7): 1055-1062
- Li P Y, Li C Y, Lu X H, et al. The three dimensional organoids-based high content imaging model for hepatotoxicity assessment [J]. *Acta Pharmaceutica Sinica*, 2017, 52(7): 1055-1062 (in Chinese)
- [54] Czerniecki S M, Cruz N M, Harder J L, et al. High-throughput screening enhances kidney organoid differentiation from human pluripotent stem cells and enables automated multidimensional phenotyping [J]. *Cell Stem Cell*, 2018, 22(6): 929-940.e4
- [55] Li X J, Valadez A V, Zuo P, et al. Microfluidic 3D cell culture: Potential application for tissue-based bioassays [J]. *Bioanalysis*, 2012, 4(12): 1509-1525
- [56] van Duinen V, Trietsch S J, Joore J, et al. Microfluidic 3D cell culture: From tools to tissue models [J]. *Current Opinion in Biotechnology*, 2015, 35: 118-126
- [57] Huh D, Matthews B D, Mammoto A, et al. Reconstituting organ-level lung functions on a chip [J]. *Science*, 2010, 328(5986): 1662-1668
- [58] Park S E, Georgescu A, Huh D. Organoids-on-a-chip [J]. *Science*, 2019, 364(6444): 960-965 ◆