

利用诱导多能干细胞构建流产毒性药物的体外筛查模型

毋姗姗^{1,2}, 范文娟³, 李瑞玲², 王艳丽¹, 李培全¹, 李超杰¹, 邓锦波^{1*}

(1. 河南省生殖健康科学技术研究院, 国家卫健委出生缺陷预防重点实验室, 河南省人口缺陷干预技术研究重点实验室, 河南 郑州 450002; 2. 河南大学护理与健康学院, 河南 开封 475000; 3. 漯河医学高等专科学校, 河南 漯河 462002)

摘要: 妊娠期用药不可避免, 如何帮助孕妇合理用药以减少自发流产、早产和低体重儿的发生, 对于医务工作者至关重要。本研究建立了药物流产毒性的检测模型, 可筛除疑似流产的药物, 避免用药不当导致的孕妇流产。通过三维悬浮培养诱导多能干细胞 (induced pluripotent stem cells, iPSCs) 的方式, 诱导其形成拟胚体 (embryoid bodies, EBs) 和类皮质器官, 在体外模拟早期胚胎从内细胞团向三胚层体系的分化过程。根据流产药物米非司酮 (RU486) 暴露浓度的不同, 随机将 EBs 分为 3 组: 空白对照组 (control)、低浓度组 (L-RU486, 10 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) 和高浓度组 (H-RU486, 20 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)。借助末端脱氧核糖核酸转移酶介导的 dUTP 缺口末端标记测定法 [terminal dextrynucleotidyl transferase (TdT)-mediated dUTP nick end labeling, TUNEL] 和免疫荧光染色等技术观察第 5、8 和 11 天的不同组别 EBs 的大小、细胞凋亡和胚层分化的情况。研究结果表明: iPSCs 体外可聚集成三维结构的 EBs, 在特异性神经诱导因子作用下, EBs 外周分化出神经玫瑰花状结构, 形成大脑皮质类器官; 米非司酮暴露导致 EBs 发育迟缓, EBs 直径减少 ($P < 0.01$), 促进 EBs 内部细胞凋亡 ($P < 0.01$), 并影响 EBs 胚层发育, 抑制胚胎干细胞增殖和外胚层细胞分化 ($P < 0.01$), 促进中胚层细胞发育 ($P < 0.05$)。本研究提示, iPSCs 可作为药物流产毒性的筛选模型, 而 EBs 的大小、细胞凋亡率和胚层细胞分化率可作为药物筛选的评价指标。

关键词: 诱导多能干细胞; 生殖发育毒性; 模型建立; 药物筛选

中图分类号: R965.1 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2021)02-0503-08

Construction of a drug screening model for miscarriage from induced pluripotent stem cells *in vitro*

WU Shan-shan^{1,2}, FAN Wen-juan³, LI Rui-ling², WANG Yan-li¹, LI Pei-quan¹, LI Chao-jie¹, DENG Jin-bo^{1*}

(1. National Health Commission Key Laboratory of Birth Defects Prevention, Henan Key Laboratory of Population Defects Prevention, Henan Institute of Reproduction Health Science and Technology, Zhengzhou 450002, China; 2. School of Nursing and Health, Henan University, Kaifeng 475000, China; 3. Luohe Medical College, Luohe 462002, China)

Abstract: Drug use during pregnancy is unavoidable. Therefore, it is vitally important for medical workers to help pregnant women take drugs correctly to reduce the incidence of spontaneous abortion, premature birth, and low birth weight. In our study, drug screening model with induced pluripotent stem cells (iPSCs) was used to find some improper drugs which will result in woman's abortion. With 3D culture *in vitro*, iPSCs can form embryoid bodies (EBs) and cerebral organoids, which simulated *in vitro* development of early embryos, from inner cell mass to germ-layer differentiation. In the experiment, EBs were exposed to mifepristone (RU486), and three experimental groups were divided randomly. They were control group (without RU486), low-dose group (L-RU486, 10 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), and high-dose group (H-RU486, 20 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$). After mifepristone exposure, EBs were observed at days 5, 8, and 11,

收稿日期: 2020-09-21; 修回日期: 2020-11-10.

基金项目: 国家卫健委出生缺陷预防重点实验室开放课题 (ZD201903); 河南省科技厅科技攻关项目 (192102310134); 河南省医学科技攻关计划 (联合共建) 项目 (LHGJ20190827, LHGJ20190828).

*通讯作者 Tel: 13613788951, Fax: 86-371-65961650, E-mail: jinbo_deng2017@126.com

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2020-1508

including size of EB, cell apoptosis, and differentiation of germ layers, by using inverted optical microscope, TUNEL assay, and immunofluorescent staining. The results showed that through 3D culture, iPSCs could develop into embryoid bodies, neural rosettes, and finally cerebral organoids. After mifepristone exposure, EBs' sizes were decreased ($P < 0.01$); the levels of cell apoptosis in EBs were increased after mifepristone exposure ($P < 0.01$); the development of EBs' germ layer was affected. Mifepristone exposure could inhibit the proliferation of embryonic stem cells, reduce the differentiation of ectoderm ($P < 0.01$) and promote the development of mesoderm ($P < 0.05$). In conclusion, iPSCs can be used as a screening model for abortion drug, and EBs' diameter, cell apoptosis, and differentiation changes of the germ layers can serve as criteria of abortion drug screening.

Key words: induced pluripotent stem cell; reproductive and developmental toxicity; model establishment; drug screening

随着我国“全面两孩”政策的开放, 高龄和高危产妇增多, 妊娠期用药往往不可避免, 妊娠期药物的系统评价结果显示, 60%~90% 妊娠期妇女需要使用药物, 平均用药 2~4 种, 最长达 8 种^[1]。其中约 79% 孕妇服用过对胎儿影响不明的药物, 增加了自发流产、早产和低体重儿的发生^[2]。因此, 如何有效筛查生殖毒性药物, 对于妊娠期妇女安全用药必不可少。通常生殖毒性药物的测定方法包括临床病例回顾、实验动物模型和细胞模型的筛选, 但是这些方法都存在一些弊端, 如通过患者用药回访查找生殖毒性药物, 所需样本量较大, 回访时间较长, 存在回忆偏差, 且药物不良反应已经发生。而动物模型成本高昂, 需要考虑动物福利等问题。此外, 由于种属差异性, 动物实验的结果不能完全替代药物在人体的药理作用。细胞模型也可用于药物筛选^[3], 但其丧失了组织、细胞发育的微环境, 破坏了组织和器官的结构, 不利于对整体胚胎发育的毒理学分析。因此, 寻求一种简便、灵敏、准确、经济的妊娠期药物筛选模型在所难免。

近年来, 由于干细胞重编程技术和体外三维培养策略的发展, 诱导多能干细胞 (induced pluripotent stem cells, iPSCs) 及其诱导产物逐渐成为筛选药物的新兴手段。iPSCs 是通过特定基因转染或小分子化合物诱导等方式, 使正常体细胞重编程为胚胎干细胞 (embryonic stem cells, ESCs) 样的多潜能细胞^[4]。相较 ESCs, iPSCs 取材方便, 成纤维细胞^[5]、外周血细胞^[6]、脂肪干细胞^[7]和尿上皮细胞^[8]都可用来制备 iPSCs。此外, 人源 iPSCs 规避了伦理学问题和物种差异性问题, 在药物筛选, 尤其是生殖毒性药物筛选方面有巨大临床应用潜力。近期 Lauschke 等^[9]利用人 iPSCs 筛查妊娠期药物, 但该实验仅测定 iPSCs 及其衍生的心肌细胞的药物毒理反应, 未对胚胎发育整体的药物作用进行研究。

本研究利用米非司酮 (mifepristone, RU486) 为实验药物, 以人类 iPSCs 培养的拟胚体 (embryoid bodies, EBs) 作为研究对象, 着眼于分析米非司酮对早期胚胎

发育、细胞凋亡数和不同胚层分化的影响, 制定出具体流产药物筛选模型的评估标准。希望未来可用于临床 I 期前药物筛选或成分不明药物的流产不良反应的检测, 为妊娠期妇女安全用药提供指导。

材料与方法

iPSCs 的准备 提前一天将 Matrigel 基底膜基质 (BD 公司, 354277) 从 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱取出并放置在铺满碎冰的泡沫盒中, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱过夜融化。次日, 预冷枪头备用。将 12 mL DMEM/F12 培养基 (Gibco 公司, C11330500BT) 转移至 15 mL 离心管内, 随后迅速加入 150 μL Matrigel 基质胶混匀 (使用冰冻后的枪头), 全过程冰上操作。混匀后滴加入 6 孔板中, 每孔 2 mL, 室温下放置 5~7 h, 待用。

本研究的 iPSCs (购自中国科学院, 编号 UE017C1) 是由尿上皮细胞重编程而来。首先将 2 只冻存的 iPSCs 从液氮中取出, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 水浴融化, 然后将细胞悬液转移至 15 mL 离心管内, 逐滴加入已预热过的 5 mL DMEM/F-12 培养基, $200\times g$ 离心 5 min, 弃去上清。再用 2 mL mTeSRTM1 完全培养基 (Stemcell 公司, 85850) 轻轻将细胞重悬, 制成混悬液。弃去之前包被 6 孔板所用的 Matrigel, 然后将细胞悬液接种至此 6 孔板中, 注意勿损伤底部的基质膜。随后放入 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 、95% 湿度的 CO_2 培养箱 (Phcbi 公司, MCO-170M UVL-PC) 中培养。

拟胚体的培养 通过三维悬浮培养的方式, iPSCs 在体外可以快速聚集成 EB, EB 类似于早期胚胎组织, 具有发育成三胚层的潜力。培养过程如下: 每日更换 iPSCs 培养基, 待 iPSCs 克隆团长到每孔 70%~80% 时 (培养 4~5 天), 用 $0.5\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ EDTA 消化液 (Life Technologies 公司, 15575020) 直接消化细胞, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 孵育 5~8 min 后, 弃去消化液即终止消化后。用含 γ -27632 诱导因子 (Stemcell 公司, 72302) 的拟胚体形成培养基 (StemdiffTM cerebral organoid basal medium-1, Stemcell

公司, 08572; Supplement A, Stemcell 公司, 08574) 轻轻吹打重悬 iPSCs, 制成混悬液, 用血小板计数器进行细胞计数, 调整细胞浓度为每毫升 $10^4 \sim 10^5$ 个左右。将处理后的 iPSCs 接种至超低黏附 U 型底 96 孔板中, 每孔 100 μL 。次日, 每孔再添加 75 μL 新鲜拟胚体培养基 (不含 y-27632 因子)。每日半量换液, 体外培养 3~4 天后形成大小均匀的细胞团, 即为 EBs。

拟胚体的继续分化 若对类皮质进行观察, 需要添加特异性的神经信号分子等诱导剂促使 EBs 向神经系统发育。EBs 培养 5 天后, 用灭菌的巴氏吸管将 EBs 吸入到低黏附 6 孔板内, 每孔加入 1.5 mL 神经上皮诱导培养基 (Stemdiff™ cerebral organoid basal medium-1, Stemcell 公司, 08572; Supplement B, Stemcell 公司, 08575), 诱导培养 48 h 后。更换 2 mL 神经上皮扩大培养基 (Stemdiff™ cerebral organoid basal medium-2, Stemcell 公司, 08573; Supplement C, Stemcell 公司, 08576; Supplement D, Stemcell 公司, 08577), 随后放入 $37\text{ }^\circ\text{C}$ 、5% CO_2 、平衡湿度的 CO_2 培养箱中, 培养 96 h 后。更换 2~4 mL 大脑皮质成熟培养基 (Stemdiff™ cerebral organoid basal medium-2, Stemcell 公司, 08573; Supplement E, Stemcell 公司, 08578), 每隔 3~4 天换液, 必要时培养至 50 天左右。

浓度选择及实验分组 目前临床指南推荐终止早期妊娠的药物是米非司酮和米索前列醇, 尤其是米非司酮对早期胚胎发育尤为敏感^[10]。本研究米非司酮 (Sigma 公司, M8046) 又名 RU486, 规格 100 mg, 以无水乙醇为溶剂溶解米非司酮。利用 SPSS 软件的回归模型计算米非司酮暴露 EBs 的半数致死浓度 (lethal dose, 50%, LD_{50}), 以倒置显微镜下 EBs 体积固缩、球体破裂和周围散在分布的死亡细胞增多为死亡观察指标。数据显示 LD_{50} 为 $31.70\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (95% CI: $18.98 \sim 44.35\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)。本研究根据 LD_{50} 和米非司酮浓度梯度预实验的结果, 最终确定本实验中米非司酮用量为低浓度 ($10\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) 和高浓度 ($20\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)。

挑选外观大小均匀的 EBs 进行培养, 2 天后开始加药。以米非司酮用药浓度的不同, 将其分成 3 组: ① 低浓度组: 将 EBs 移入含有 $10\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 米非司酮的拟胚体培养基中培养; ② 高浓度组: EBs 移入含有 $20\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 米非司酮的拟胚体培养基培养; ③ 对照组: 将 EBs 移入不含有米非司酮的拟胚体培养基培养。为平衡无水乙醇作为溶剂对 EBs 的影响, 根据米非司酮加入量不同分别加入相应体积的无水乙醇。每天半量换液, 观察并定期收集 EBs 样本。

TUNEL 法检测细胞凋亡 末端脱氧核苷酸转移酶介导的 dUTP 缺口末端标记测定法 [terminal dexty-

nucleotidyl transferase (TdT)-mediated dUTP nick end labeling, TUNEL] 是检测细胞凋亡的常用而精准的方法。本实验利用 TUNEL 细胞凋亡检测试剂盒 (Solarbio 公司, T2190) 检测细胞凋亡。具体步骤如下: 分别收集第 5、8 和 11 天的 3 个组别的 EBs 样本, 用 4% 多聚甲醛-磷酸缓冲盐溶液 (phosphate buffer saline, PBS) 固定 30 min, 用 $0.01\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ PBS 缓冲液洗涤 3 次, 每次 5 min, 再换 30% 蔗糖溶液沉降 EBs, 24 h 后, 用冰冻切片机 (Leica 公司, CM1950) 切片, 厚度约 $12 \sim 15\text{ }\mu\text{m}$, 备用。然后用 PBS 冲洗切片 3 次, 每次 5 min。每样品滴加 20 μL 末端氧核苷酸转移酶反应液, 同时每组样品滴加 20 μL PBS 作为阴性对照, $37\text{ }^\circ\text{C}$ 孵育 1 h, 用 PBS 洗 3 次, 每次 5 min, 洗掉反应液。每样本加入 20 μL 链霉亲和素, 室温孵育 5 min, 用 PBS 冲洗, 最后用 65% 甘油-PBS 溶液封片, 荧光显微镜 (Olympus 公司, BX53) 下观察并采集图像。

DAPI 法检测凋亡小体 4',6-二脒基-2-苯基吲哚 (4',6-diamidino-2-phenylindole, DAPI) 可对细胞核进行非特异性染色, 用于显示细胞凋亡小体, 或衬染组织和器官。配制 65% 甘油-PBS 溶液-DAPI (1:1 000, Solarbio 公司, C0060) 的封片剂封片。

免疫荧光染色法检测 利用免疫荧光染色对 EBs 胚层和神经细胞发育进行观察, 本实验分别选用性别决定基因高迁移率组蛋白-2 (sex determining region Y-box 2, SOX2) 标记胚胎干细胞和神经干细胞、Nestin 标记外胚层细胞、CXCR4 标记中胚层细胞、FoxA2 标记内胚层细胞、NeuN 标记神经元和 GFAP 标记神经胶质细胞。具体过程如下: 将切片从 $-20\text{ }^\circ\text{C}$ 冰箱中取出, 室温下放置 $15 \sim 20\text{ min}$, 切片复温后, 用 $0.01\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ PBS 洗 3 次, 每次 5 min, 加入一抗, 放于 $4\text{ }^\circ\text{C}$ 冰箱孵育过夜。PBS 洗 3 次, 每次 5 min, 加入二抗, 室温下避光孵育 $1.5 \sim 3\text{ h}$, 用 PBS 洗 3 次, 每次 5 min。最后用 65% 甘油加 DAPI 封片。荧光显微镜 (Olympus 公司, BX61) 下观察并采集图片。所用一抗分别为: 鼠单克隆 Nestin 抗体 (1:1 200, Stemcell 公司, 60091)、鼠单克隆 NeuN 抗体 (1:100, Millipore 公司, MAB377)、鼠单克隆胶质纤维酸性蛋白 (glial fibrillary acidic protein, GFAP) 抗体 (1:200, Santa 公司, SC33673)、兔单克隆 C-X-C 趋化因子受体 4 型 (C-X-C chemokine receptor type 4, CXCR4) 抗体 (1:250, Abcam 公司, ab124824)、兔单克隆 FoxA2 抗体 (1:200, Abcam 公司, ab108422)、兔多克隆 SOX2 抗体 (1:200, Abcam 公司, ab97959) 和兔多克隆 cleaved caspase-3 抗体 (1:200, Abcam 公司, ab13847)。一抗稀释液以 1% 牛血清白蛋白 (bovine serum albumin, BSA)、0.3% Triton-X100 和 $0.01\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ PBS 配制。二抗分别

为 Alexa Fluoro 488 羊抗兔 IgG (1:400, Invitrogen 公司, A11034) 和 Alexa Fluoro 568 羊抗鼠 IgG (1:600, Invitrogen 公司, A11031)。二抗稀释液以 0.1% Triton-X100 和 0.01 mol·L⁻¹ PBS 配制。

指标测量与统计学分析 收集图片, 利用 Image J 1.48 软件对免疫荧光染色图片进行数据处理。以 EBs 直径、细胞凋亡率、SOX2 阳性细胞的密度、Nestin 和 CXCR4 阳性细胞有效分化率为测量指标。参数公式分别为: ① EBs 直径 (μm, 倒置显微镜下测量); ② 细胞凋亡率 (%) = TUNEL 阳性细胞数/细胞总数×100%; ③ SOX2 阳性细胞密度 (百个/平方毫米) = SOX2 阳性细胞数/观测面积; ④ 胚层细胞分化率 (%) = 阳性细胞数/细胞总数×100% (如外胚层源性 Nestin 和中胚层源性 CXCR4 阳性细胞)。使用 SPSS 21 软件对所得结果进行统计, 测量所得的数据利用单因素方差分析和卡方检验进行分析。结果采用均值 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, $P < 0.05$ 时为差异具有统计学意义。

结果

1 正常拟胚体和类皮质的发育

倒置显微镜下, iPSCs 散在分布, 30 min 内在无血清培养基中发生快速聚集 (图 1A), 培养第 4 天, iPSCs 聚集成三维球体即 EBs, 高倍镜下观察到 EBs 边界清晰, 呈半透明环状, 中心部较黑 (图 1B)。随后将 EBs 包埋于 Matrigel 基质胶中进行神经诱导培养, 第 20 天, EBs 外围形成数个玫瑰花环状结构 (neural rosettes, NR) 的芽突, 类似神经管的发育。此时, 原始皮质类器官的形态初步可见 (图 1C)。第 32 天, 类器官表面的 NR 结构有一部分会融合或退化, 约 4~5 个发育成大脑类皮质 (图 1D)。第 41 天时, 类器官表面出现连续的放射状结构 (图 1E)。第 52 天时, 类器官中放射状的结构增厚, 且具有层次化分布的特征 (图 1F)。作者团队基于拟胚体的三胚层细胞分化、类皮质器官中神经干细胞发生、神经元和胶质细胞分化以及神经纤维再生等方面的研究, 成功证明了此方法培养的拟胚体和类器官类似于早期胚胎和大脑皮质^[11,12]。

2 米非司酮暴露与拟胚体大小改变

对 EBs 的生长动力学参数进行观察, 包括 EBs 直径、面积和体积, 旨在探讨该化学物质对胚胎的毒性作用^[13]。随着体外培养时间的增加, EBs 体积逐渐增大, EBs 内部出现囊性结构。体外培养第 5 天, 对照组、低浓度和高浓度组间 EBs 直径变化不显著 (图 2A~C)。培养第 8 天, 三组间 EBs 直径差异显著, 对照组 EBs 直径约为 (636.73 ± 19.48) μm, 低浓度组 EBs 直径约为 (564.74 ± 15.95) μm, 高浓度组 EBs 直径约为 (522.65 ±

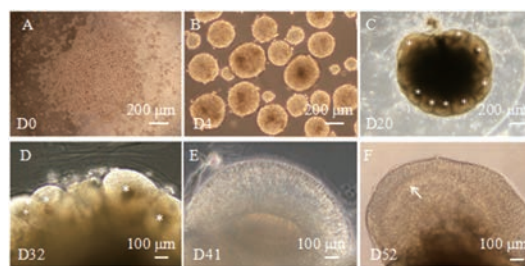


Figure 1 Development of embryoid bodies (EBs) and cerebral organoids (under inverted microscope). A: The dissociated induced pluripotent stem cells (iPSCs) rapidly started to gather into iPSC clones; B: At day 4 (D4), iPSCs accumulated continuously into three dimensional EBs, and EBs showed a smooth surface and translucent ring with dark center at high magnification; C: After neural induction, several rosettes (*) appeared in the periphery of EBs, and the primary organoids was visible at day 20 (D20); D, E: Some rosettes on the surface of cultivation would degenerate, and only a few developed into normal cerebral organoids with radial structures (↑); F: At day 52 (D52), cerebral organoids had typically cerebral lamination (↑). Scale bar, 200 μm (A-C) and 100 μm (D-F)

6.03) μm (图 2D~F)。其中, 高浓度组 EBs 直径比对照组缩小约 17.92% ($P < 0.01$, 图 2M)。第 11 天, 对照组 EBs 直径约为 (670.68 ± 11.73) μm, 低浓度组 EBs 直径约为 (591.19 ± 6.05) μm, 高浓度组 EBs 直径约为 (538.92 ± 18.55) μm (图 2G~L)。其中, 高浓度组 EBs 直径比对照组缩小约 19.64% ($P < 0.01$, 图 2M)。综上, 米非司酮的用药浓度与 EBs 直径大小具有相关性, 随着用药浓度增加, EBs 直径减小。当 EBs 直径缩小 18% 以上时, 可作为流产药物筛选的一个重要指标。

3 米非司酮暴露与拟胚体细胞凋亡

细胞凋亡是细胞主动激活的程序性死亡过程, 凋亡早期出现细胞核固缩, 染色加深, 或核呈新月形聚集于核膜一侧, 凋亡细胞晚期形成凋亡小体, 即细胞膜包裹胞质、核碎片及细胞器的泡状小体。DAPI 染色结果显示, 培养 5 天后, 米非司酮暴露组凋亡小体逐渐增多 ($P < 0.05$, 图 3A~C)。此外, TUNEL 法也可以检测细胞凋亡, 其原理是通过标记 DNA 断裂的 3'-OH 末端来检测凋亡细胞。作者发现米非司酮用药组中 TUNEL 阳性细胞细胞核呈片状分布, 细胞排列紊乱。体外培养第 5 天, 对照组、低浓度和高浓度组间细胞凋亡数存在统计学差异 ($P < 0.01$, 图 3D~F, M), 且与 DAPI 染色结果相比, TUNEL 阳性细胞凋亡数偏高, 敏感度更高。培养第 8 天, 三组间 EBs 内部细胞凋亡率差异显著。对照组细胞凋亡率约为 (26.66 ± 5.01) %, 低浓度组细胞凋亡率约为 (48.62 ± 8.90) %, 高浓度组细胞凋亡率约为 (63.36 ± 7.40) % (图 3G~I)。其中高浓度组比对

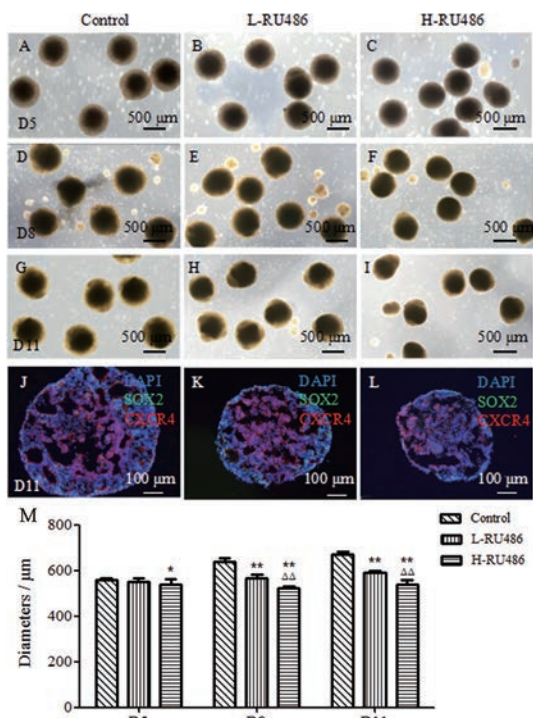


Figure 2 The changes of EBs' diameters after exposure to mifepristone. A-C: Under inverted microscope, at D5, no significant difference of EBs' size was found among these groups; D-I: At days 8 and 11 (D8 and D11), EBs' diameters of the experimental groups were smaller than control group; J-L: Immunofluorescent double labeling with SOX2 (green) and C-X-C chemokine receptor type 4 (CXCR4, red) were used to observe EBs, EBs' diameters were remarkably reduced after mifepristone treatment at day 11 (D11). Inside of EBs, net like structure can be found. Scale bar, 500 μm (A-I) and 100 μm (J-L); M: The histogram and statistical analyses of EBs' diameter at days 5, 8, and 11 (D5, 8, and 11). $n = 5$, $\bar{x} \pm s$. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs control group; $\Delta\Delta P < 0.01$ vs L-RU486 group

照组细胞凋亡率增加 43.60% ($P < 0.01$, 图 3M)。第 11 天时, 对照组 EBs 细胞凋亡率约为 $(38.56 \pm 4.70)\%$, 低浓度组 EBs 细胞凋亡率约为 $(57.62 \pm 0.80)\%$, 高浓度组 EBs 细胞凋亡率约为 $(82.15 \pm 7.73)\%$ (图 3J~L)。其中, 高浓度组比对照组细胞凋亡率增加 53.07% ($P < 0.01$, 图 3M)。总之, 米非司酮暴露可以导致细胞凋亡, 其凋亡率增加 44% 以上, 也是流产药物的筛选重要指标。

4 米非司酮暴露与胚层形成

EBs 是多种类型细胞聚合的三维球体结构, 根据不同细胞间作用力的强弱, 自发地分化出三胚层结构^[14]。选用 Nestin 标记外胚层中神经干细胞, 利用膜蛋白 CXCR4 标记中胚层细胞, 中胚层是心脏和血管等组织的发育原基。FoxA2 可以标记内胚层细胞, 内胚

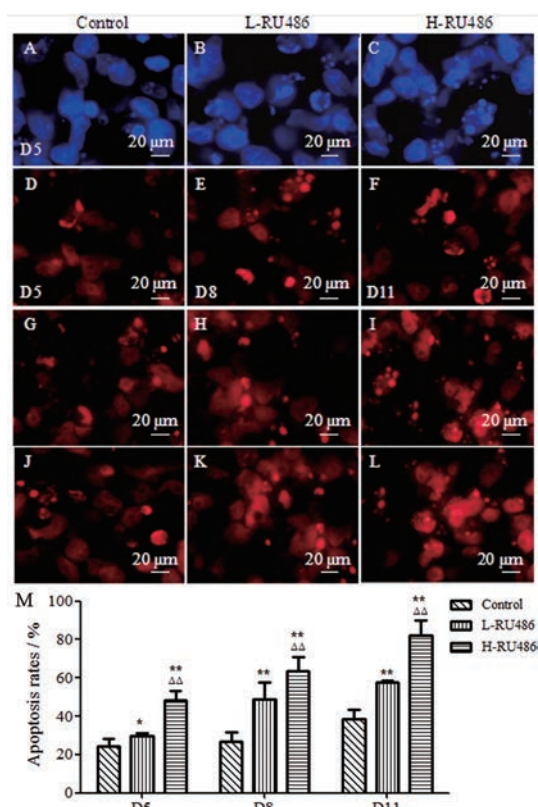


Figure 3 Cell apoptosis in EBs after exposure to mifepristone. A-C: With DAPI staining, many apoptotic bodies were found after mifepristone exposure, such as cell contraction, chromatin aggregation, and broken chromosomes. The number of apoptosis cells increased with mifepristone concentration increasing; D-L: The results of TUNEL staining were consistent with DAPI staining. The number of TUNEL positive cells significantly increased in experimental groups. Scale bar, 20 μm (A-L); M: The histogram and statistical analyses of EBs' cell apoptosis on the exposure of mifepristone at days 5, 8, and 11 (D5, 8, and 11); $n = 5$, $\bar{x} \pm s$. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs control group; $\Delta\Delta P < 0.01$ vs L-RU486 group

层是肝、胰等消化腺以及消化管和呼吸道上皮的生发原基。此外, 利用 SOX2 标记胚胎干细胞、NeuN 标记成熟神经元、GFAP 标记星形神经胶质细胞。

结果显示, 米非司酮可以抑制胚胎干细胞增殖, 抑制外胚层分化, 促进中胚层发育。① SOX2 阳性胚胎干细胞分化: SOX2 阳性细胞密度随着米非司酮用药浓度增加而减少。体外培养第 11 天, EBs 外围分布着大量未分化的 SOX2 阳性细胞。对照组 SOX2 阳性细胞密度约 (14.35 ± 0.69) 百个/ mm^2 , 低浓度组 SOX2 阳性细胞密度约 (8.99 ± 0.51) 百个/ mm^2 , 高浓度组 SOX2 阳性细胞密度约 (4.63 ± 0.62) 百个/ mm^2 。其中, 高浓度组 SOX2 阳性细胞密度比对照组减少约 67.72% ($P < 0.01$), 说明米非司酮可以抑制干细胞增殖; ② Nestin 阳性外胚层细胞分化: 荧光染色结果显示, EBs

培养第 11 天时, 大量 Nestin 阳性细胞呈双极形态突起, 贯穿于 NR 管腔。对照组 Nestin 阳性细胞有效分化率约为 $(45.80 \pm 4.15)\%$, 低浓度组 Nestin 阳性细胞有效分化率约为 $(29.00 \pm 1.09)\%$, 高浓度组 Nestin 阳性细胞有效分化率约为 $(16.75 \pm 4.23)\%$ (图 4A~C)。其中, 高浓度组比对照组减少约 63.44% ($P < 0.01$)。此外, 在 NR 管腔内部发现了 caspase-3 阳性细胞, 且随着浓度增加而染色加深 (图 4D~F), 提示米非司酮可以抑制神经系统发育, 导致神经管内部细胞凋亡; ③ CXCR4 阳性中胚层细胞分化: 培养至第 11 天, CXCR4 阳性细胞多集中在 EBs 的中心区域。随着用药浓度的增加, CXCR4 阳性细胞相互缠绕成结。对照组 CXCR4 阳性细胞有效分化率约为 $(31.49 \pm 5.81)\%$, 低浓度组 CXCR4 阳性细胞有效分化率约为 $(41.81 \pm 5.40)\%$, 高浓度组 CXCR4 阳性细胞有效分化率约为 $(43.74 \pm 3.10)\%$ (图 4G~I)。其中, 高浓度比对照组增加约 28.01% ($P < 0.05$), 提示米非司酮可能促进心血管系统发育。而 EBs 内胚层 FoxA2 阳性细胞的表达较少, 且与米非司酮用药无明显影响 (图 4J~L)。此外, 对神经细胞和神经胶质细胞的观察结果显示, 在外胚层中未发现 NeuN 阳性的成熟神经元细胞和 GFAP 阳性的神经胶质细胞。

综上, 米非司酮暴露影响胚层发育, 抑制胚胎干细胞增殖和外胚层细胞分化, 促进中胚层细胞增多。SOX2 阳性细胞密度减少高达 68% ($P < 0.01$, 图 4M), Nestin 阳性细胞有效分化率减少达 63% ($P < 0.01$, 图 4N), CXCR4 阳性细胞有效分化率增加 28% ($P < 0.05$, 图 4O), 可作为流产药物筛选的辅助指标。

讨论

iPSCs 可以作为流产药物的筛查模型。生殖毒性实验是指受试物在哺乳动物胚胎发育过程中对其生殖功能或发育成个体潜能的不利影响。研究表明: 美国医生案头参考 (PDR) 药物仅 40% 有生殖毒性方面的说明, 且其中 60% 为妊娠危害性不明的药物^[15]。因此, 医药工作者非常有必要去筛选和判断药物是否具有生殖毒性, 以保证妊娠期妇女安全用药。iPSCs 来源于人类体细胞, 可以模拟人体毒性试验, 且 iPSCs 不需要损伤胚胎组织, 避免了伦理学问题, 在药物生殖毒性试验中具有突出的优势^[16]。Palmer 等^[17]利用人 iPSCs 研究类维生素 A 的发育毒性, Chaudhari 等^[18]通过人 iPSC 衍生的心肌细胞筛选化妆品中具有心脏毒性的化合物等, 说明 iPSCs 可以预测药物的生殖毒性, 但是 iPSCs

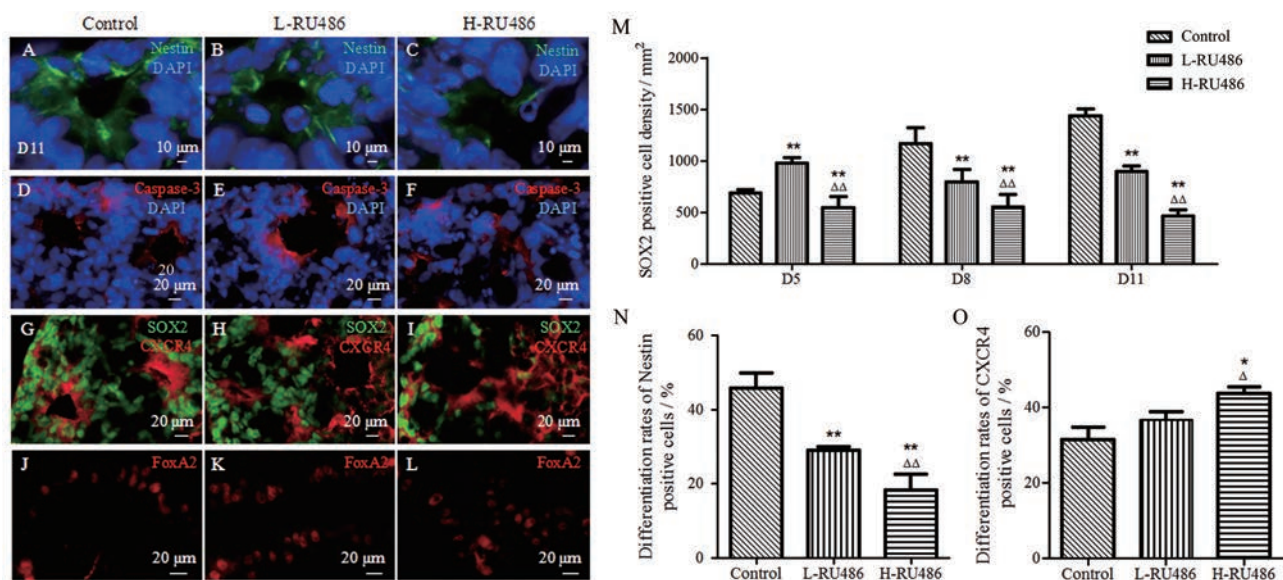


Figure 4 Differentiation of germ layers after mifepristone exposure at D11. A–C: immunofluorescent labeling with Nestin (green) and DAPI staining (blue) were performed. Nestin positive cells (green) were radially distributed around neural rosettes. The number of Nestin positive cells remarkably decreased in experimental groups; D–F: Caspase-3 immunofluorescent labeling (red) and DAPI staining (blue) were carried out. Caspase-3 positive cells (red) were located in the inside of NR; G–I: SOX2 (green) and CXCR4 (red) immunofluorescence double labeling were operated. SOX2 positive cells (green) were mostly distributed in the periphery of EBs, and the number of SOX2 positive cells gradually decreased in the treatment group ($P < 0.01$). While CXCR4 positive cells (red) increased after mifepristone exposure; J–L: There were some FoxA2 positive cells (red) in EBs, but they had no obvious difference on the exposure of mifepristone. Scale bar, 10 μm (A–C) and 20 μm (D–L); M: The histogram and statistical analyses of differentiation of embryonic stem cells (SOX2 positive cell density); N: The histogram and statistical analyses of differentiation of ectoderm; O: The histogram and statistical analyses of mesoderm's differentiation; $n = 5$, $\bar{x} \pm s$. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs control group; $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$ vs L-RU486 group

在流产药物筛选方面的研究相对较少。本实验利用 iPSCs 衍生的 EBs 作为药物流产毒性的筛查模型。首先, EBs 在结构和功能上与胚胎早期发育阶段的胚泡相似^[19], 适合筛选流产药物。其次, 此模型的实验操作简单, 观察指标易获得, 例如测量直径大小和细胞凋亡等, 在一般药物毒性实验室都可以进行操作。此外, 观察周期短, 一般 10 天左右就可完成药物检测。因此, 该药物筛查模型有较好的临床应用前景, 但仅限于 3 个月内早期妊娠的用药检测, 对于中晚期妊娠药物的检测, 需要对类皮质进行培养观察。

米非司酮是一种炔诺酮类衍生物, 具有拮抗孕激素、糖皮质激素和较弱的抗雄激素作用^[20], 是目前临床上使用最广泛的流产药物。本研究根据米非司酮对 EBs 的直径大小、细胞凋亡和胚层发育这三方面的影响, 来制定药物流产不良反应的筛选标准。具体标准如下: ① EBs 大小改变, 其直径缩小 18% 以上, 可以作为药物筛选的关键指标。EBs 生长动力学可以预测化学物质的胚胎毒性^[21], 通过 EBs 的直径大小变化来评估化学物质的生殖毒性。本研究发现米非司酮会导致 EBs 直径减少, 与 Ghosh 等^[22-24] 研究结果类似, 米非司酮用药后, 小鼠胚胎出现较大的卵裂球间隙, 细胞质内积聚着脂褐素、自噬体和多囊泡体等病理性改变^[23,24]。而米非司酮处理人 ESCs 源性 EBs 后, 其体积减少且未形成正常结构^[25], 提示米非司酮影响 EBs 的发育; ② 细胞凋亡变化, EBs 内部细胞凋亡率增加大于 44%, 可以作为药物筛选的重要指标。细胞凋亡在胚胎发育和清除多余细胞方面起关键作用。本研究发现米非司酮暴露导致细胞凋亡增加, EBs 表面上皮细胞间和 EBs 内部出现空腔。Zhang 等^[25] 研究发现米非司酮可调控 Bax、Bcl-2 及 caspase-3 等凋亡相关蛋白表达, 促进肿瘤细胞凋亡, 提示米非司酮促进 EBs 内部细胞凋亡, 且 EBs 内部空腔化的过程可能与米非司酮激活线粒体凋亡通路有关^[26]; ③ 胚层分化情况, 米非司酮抑制胚胎干细胞增殖 (抑制率高达 68%), 抑制外胚层分化 (抑制率达 63%) 和促进中胚层发育 (增加率约 28%), 它们可以作为药物筛选的参考指标。研究发现双酚 A 会导致 EBs 中多能性基因 SOX2 表达增加^[27], 细胞增殖增多。而 SOX2 表达降低会上调分化调节因子 Cdx2, 促进细胞分化^[28], 提示米非司酮可能通过影响多能因子的表达而干扰 EBs 的分化。此外, Kim 等^[29] 发现 EBs 表面存在孕激素受体, 外源性激素的改变会影响胚层的发育。在三胚层发育过程中, 米非司酮可能通过竞争性结合孕激素受体, 干预 EBs 外胚层中巢蛋白 Nestin 的表达, 引起神经玫瑰花状结节细胞大量凋亡, 阻碍神经系统的发育, 这与 Gould 等^[30] 研究

结果一致。此外, 米非司酮可能通过上调心肌组织 SDF-1 (干细胞归巢因子) 表达, 导致 CXCR4 阳性干细胞迁移至损伤部位^[31], 从而促进中胚层中心肌细胞增殖。也有研究发现孕激素可以影响心肌细胞内钙信号传导, 有助于心脏复极化过程, 抑制心肌细胞分化^[32], 米非司酮也可能通过拮抗孕激素对中胚层发育产生影响。而 FoxA2 阳性的内胚层细胞表达量较少, 且与米非司酮用药关系不大, 故本研究以 EBs 胚胎干细胞 SOX2 阳性细胞密度、外胚层中 Nestin 有效分化率和中胚层中 CXCR4 有效分化率为药物流产毒性的参考指标。

综上所述, 本实验以 iPSCs 三维培养的 EBs 为模型, 研究流产药物米非司酮对 EBs 发育的影响。结果表明, 米非司酮可导致 EBs 直径变小、细胞凋亡率增加、抑制胚胎干细胞增殖、抑制外胚层细胞分化和促进部分中胚层细胞发育, 故以此标准建立药物流产毒性评价的指标, 利用已知推断未知药物的流产不良反应, 将为后续药物筛选提供参考。未来可利用此模型进行新药临床 I 期前的细胞实验, 初步评价新药对孕妇的致流产效应, 补充或者代替动物模型的药物测试数据。但是, 目前此模型还需要药物筛查验证。

作者贡献: 邓锦波负责课题设计、技术指导、文稿修改并提供资金支持; 毋姗姗完成绝大部分实验, 撰写了初稿并参与了论文修改; 范文娟、李瑞玲、王艳丽、李培全和李超杰提供实验技术指导。所有作者均对本文内容负责, 并认可作者排序。

利益冲突: 所有作者均声明不存在利益冲突。

References

- [1] Lacroix I, Damase-Michel C, Lapeyre-Mestre M, et al. Prescription of drugs during pregnancy in France [J]. *Lancet*, 2000, 356: 1735-1736.
- [2] Li DK, Liu L, Odouli R. Exposure to nonsteroidal antiinflammatory drugs during pregnancy and risk of miscarriage: population based cohort study [J]. *BMJ*, 2003, 327: 368.
- [3] Genschow E, Spielmann H, Scholz G, et al. Validation of the embryonic stem cell test in the international ECVAM validation study on three *in vitro* embryotoxicity tests [J]. *Altern Lab Anim*, 2004, 32: 209-244.
- [4] Takeda Y, Harada Y, Yoshikawa T, et al. Chemical compound-based direct reprogramming for future clinical applications [J]. *Biosci Rep*, 2018, 38: BSR20171650.
- [5] Wada N, Wang B, Lin NH, et al. Induced pluripotent stem cell lines derived from human gingival fibroblasts and periodontal ligament fibroblasts [J]. *J Periodontal Res*, 2011, 46: 438-447.
- [6] Simara P, Tesarova L, Rehakova D, et al. Reprogramming of

- adult peripheral blood cells into human induced pluripotent stem cells as a safe and accessible source of endothelial cells [J]. *Stem Cells Dev*, 2018, 27: 10-22.
- [7] Qu X, Liu T, Song K, et al. Induced pluripotent stem cells generated from human adipose-derived stem cells using a non-viral polycistronic plasmid in feeder-free conditions [J]. *PLoS One*, 2012, 7: e48161.
- [8] Shi L, Cui Y, Zhou X, et al. Comparative analysis of gene expression profiles of urinary induced pluripotent stem cells and human embryonic stem cells [C]//Proceedings of the 2017 7th Pan-Rim Bohai Sea Society of Biochemistry and Molecular Biology Academic Exchange Conference (2017年第七届泛环渤海生物化学与分子生物学会学术交流会论文集). Shandong: Shandong Association of Biochemistry and Molecular Biology, 2017: 114.
- [9] Lauschke K, Rosenmai AK, Meiser I, et al. A novel human pluripotent stem cell-based assay to predict developmental toxicity [J]. *Arch Toxicol*, 2020, 94: 3831-3846.
- [10] Im A, Appleman LJ. Mifepristone: pharmacology and clinical impact in reproductive medicine, endocrinology and oncology [J]. *Expert Opin Pharmacother*, 2010, 11: 481-488.
- [11] Fan W, Wang Q, Deng J, et al. Mouse induced pluripotent stem cell-derived cortical organoids and its biological characteristics [J]. *Acta Anat Sin (解剖学报)*, 2017, 48: 387-396.
- [12] Fan W, Sun Y, Deng J, et al. Mouse induced pluripotent stem cells-derived Alzheimer's disease cerebral organoid culture and neural differentiation disorders [J]. *Neurosci Lett*, 2019, 711: 134433.
- [13] Lee JH, Park SY, Ahn C, et al. Second-phase validation study of an alternative developmental toxicity test using mouse embryonic stem cell-derived embryoid bodies [J]. *J Physiol Pharmacol*, 2020, 71: 223-233.
- [14] Vasioukhin V, Bauer C, Yin M, et al. Directed actin polymerization is the driving force for epithelial cell-cell adhesion [J]. *Cell*, 2000, 100: 209-219.
- [15] Sannersedt R, Lundborg P, Dnielsson BR, et al. Drugs during pregnancy: an issue of risk classification and information to prescribers [J]. *Drug Saf*, 1996, 14: 69-77.
- [16] Aikawa N. A novel screening test to predict the developmental toxicity of drugs using human induced pluripotent stem cells [J]. *J Toxicol Sci*, 2020, 45: 187-199.
- [17] Palmer JA, Smith AM, Egnash LA, et al. A human induced pluripotent stem cell-based *in vitro* assay predicts developmental toxicity through a retinoic acid receptor-mediated pathway for a series of related retinoid analogues [J]. *Reprod Toxicol*, 2017, 73: 350-361.
- [18] Chaudhari U, Nemade H, Sureshkumar P, et al. Functional cardiotoxicity assessment of cosmetic compounds using human-induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes [J]. *Arch Toxicol*, 2018, 92: 371-381.
- [19] Brickman JM, Serup P. Properties of embryoid bodies [J]. *Wiley Interdiscip Rev Dev Biol*, 2017, 6: e259.
- [20] Schaff EA. Mifepristone: ten years later [J]. *Contraception*, 2010, 81: 1-7.
- [21] Kang HY, Choi YK, Jo NR, et al. Advanced developmental toxicity test method based on embryoid body's area [J]. *Reprod Toxicol*, 2017, 72: 74-85.
- [22] Ghosh D, Sengupta J. Antinidatory effect of a single, early postovulatory administration of mifepristone (RU 486) in the rhesus monkey [J]. *Hum Reprod*, 1993, 8: 552-558.
- [23] Juneja SC, Dodson MG. Effect of RU486 on different stages of mouse preimplantation embryos *in vitro* [J]. *Can J Physiol Pharmacol*, 1990, 68: 1457-1460.
- [24] Gallego MJ, Porayette P, Kaltcheva MM, et al. Opioid and progesterone signaling is obligatory for early human embryogenesis [J]. *Stem Cells Dev*, 2009, 18: 737-740.
- [25] Zhang Y, Yi M. Mifepristone induces apoptosis and necrosis of human endometrial cells [J]. *Curr Adv Obstet Gynecol (现代妇产科进展)*, 2016, 25: 931-933.
- [26] Sun Y, Hou N, Lv Y, et al. Programmed cell death of embryoid body during the differentiation of mouse embryonic stem cells [J]. *Chin J Biochem Mol Biol (中国生物化学与分子生物学报)*, 2004, 20: 838.
- [27] Chen X, Xu B, Han X, et al. Effect of bisphenol A on pluripotency of mouse embryonic stem cells and differentiation capacity in mouse embryoid bodies [J]. *Toxicol In Vitro*, 2013, 27: 2249-2255.
- [28] Bhattacharya S, Serror L, Nir E, et al. SOX2 regulates P63 and stem/progenitor cell state in the corneal epithelium [J]. *Stem Cells*, 2019, 37: 417-429.
- [29] Kim YY, Kim H, Suh CS, et al. Effects of natural progesterone and synthetic progestin on germ layer gene expression in a human embryoid body model [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21: 769.
- [30] Gould E, Tanapat P, Rydel T, et al. Regulation of hippocampal neurogenesis in adulthood [J]. *Biol Psychiatry*, 2000, 48: 715-720.
- [31] Ryser MF, Ugarte F, Lehmann R, et al. S1P₁ overexpression stimulates S1P-dependent chemotaxis of human CD34⁺ hematopoietic progenitor cells but strongly inhibits SDF-1/CXCR4-dependent migration and *in vivo* homing [J]. *Mol Immunol*, 2008, 46: 166-171.
- [32] Lee JH, Yoo YM, Jung EM, et al. Inhibitory effect of octylphenol and bisphenol A on calcium signaling in cardiomyocyte differentiation of mouse embryonic stem cells [J]. *J Physiol Pharmacol*, 2019, 70: 435-442.