

• 论 著 •

应用胚胎干细胞实验模型评价氢醌的胚胎毒性*

李付贵,程伟民,季明芳,陈京[△]

(中山大学附属中山医院肿瘤研究所,广东中山 528403)

摘要:目的 建立胚胎干细胞实验(EST)模型,应用胚胎干细胞实验模型初步评价氢醌的胚胎毒性。方法 体外培养小鼠成纤维细胞 3T3 和小鼠胚胎干细胞 E14TG2a(ES-E14TG2a),四甲基偶氮唑盐(MTT)法检测阳性对照 5-氟尿嘧啶、阴性对照青霉素 G 和受试物氢醌对 3T3 细胞和 ES-E14TG2a 细胞的细胞毒性,计算 3 种化合物对 ES-E14TG2a 细胞和 3T3 细胞的半数生长抑制浓度(IC₅₀)值 IC₅₀ ES、IC₅₀ 3T3;采用悬滴-悬浮-贴壁法体外诱导胚胎干细胞向心肌细胞分化,根据浓度-反应曲线计算 3 种化合物对 ES-E14TG2a 细胞的半数分化抑制浓度(ID₅₀)值 ID₅₀ ES。利用胚胎毒性预测模型预测氢醌的胚胎毒性。结果 氢醌对 3T3 细胞和 E14TG2a 细胞的增殖均有抑制作用,其 IC₅₀ 3T3 和 IC₅₀ ES 分别为(5.97±0.48)、(2.57±0.10)μg/mL。氢醌对 ES-E14TG2a 细胞的分化也有抑制作用,其 ID₅₀ ES 为(3.77±0.31)μg/mL。根据 EST 预测模型计算得出氢醌具有强胚胎毒性。结论 氢醌具有强胚胎毒性。

关键词:胚胎干细胞; 氢醌; 胚胎毒性

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2015.13.003

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2015)13-1807-04

Embryonic stem cell test for the study of the embryotoxicity of hydroquinone*

Li Fugui, Cheng Weimin, Ji Mingfang, Chen Jing[△]

(Cancer Research Institution, Zhongshan Affiliated Hospital of Sun Yat-sen

University, Zhongshan, Guangdong 528403, China)

Abstract: **Objective** To establish a model of embryonic stem cell test(EST) and utilize this model to evaluate the embryotoxicity of hydroquinone. **Methods** Mouse 3T3 fibroblasts and mouse embryonic stem(ES) cells(ES-E14TG2a) were cultured in vitro, and methyl thiazolyl tetrazolium(MTT) test was performed to detect the cytotoxicity of 3T3 cells and ES-E14TG2a cells induced by the positive control(5-fluorouracil), negative control(penicillin G) and tested compound(hydroquinone). The concentrations of the test compounds that inhibited 50% viability of ES-E14TG2a cells(IC₅₀ ES) and 3T3 fibroblasts (IC₅₀ 3T3) were calculated. The hanging-suspension-adherent culture systems were used to induce embryonic stem cells into cardiomyocytes, and the concentrations of test compounds that caused 50% inhibition of differentiation of ES-E14TG2a cells into cardiomyocytes (ID₅₀ ES) was calculated. The embryotoxic potential of hydroquinone was classified by prediction model of the embryonic stem cell test. **Results** The proliferation of ES-E14TG2a and 3T3 cells were inhibited by hydroquinone, of which the IC₅₀ 3T3 and IC₅₀ ES values were (5.97±0.48) and (2.57±0.10)μg/mL respectively. The differentiation of ES-E14TG2a cells were also inhibited by hydroquinone, of which the ID₅₀ ES was (3.77±0.31)μg/mL. Hydroquinone was evaluated as a strong embryotoxicity chemical by prediction model of EST.

Conclusion Hydroquinone exhibits a strong embryotoxicity.

Key words: embryonic stem cell; hydroquinone; embryotoxicity

氢醌又称对苯二酚,是苯在生物体内的重要代谢产物之一,可造成肝、肾、造血系统和中枢神经系统的损伤并导致肿瘤的形成^[1-2]。氢醌也是黑色素合成限速酶酪氨酸酶(TYR)的抑制剂,能抑制 TYR 催化酪氨酸转化为黑色素,因此被广泛用作化妆品的增白剂^[3-4]。体外实验结果显示,氢醌具有明确的细胞毒性和遗传毒性,可引起肝、肾、骨髓和外周血淋巴细胞的 DNA 损伤和染色体断裂^[5],鉴于氢醌的毒性作用,欧盟与我国已禁止在化妆品中添加氢醌。但是由于氢醌价格低廉、易于获取,常被不法商贩添加于祛斑美白化妆品中。为评价其是否具有胚胎毒性,本课题拟应用已通过欧洲替代方法验证中心(ECVAM)验证的胚胎干细胞实验(EST)模型,对氢醌的胚胎毒性进行预测,为积累更多安全性资料,合理地开发和利用氢

醌提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料 小鼠胚胎干细胞 E14TG2a(ES-E14TG2a)、小鼠 3T3 细胞系均购自美国 ATCC 公司。8~10 周龄的昆明小鼠由中山大学实验动物中心提供。

1.2 仪器与试剂 H-DMEM 培养基(美国 Hyclone 公司);5-氟尿嘧啶(美国 Sigma 公司);青霉素 G(美国 Sigma 公司);氢醌(美国 Alfa 公司);细胞培养板、培养皿、培养瓶(美国 Corning 公司);小鼠白血病抑制因子(mLIF,美国 Chemicon 公司);胎牛血清(美国 Hyclone 公司);二氧化碳恒温培养箱(美国 Thermo 公司);酶标仪(瑞士 Tecan 公司);倒置显微镜(日本 Olympus 公司)。

* 基金项目:国家自然科学基金青年基金项目(81202604);中国博士后科学基金项目(2014M562244)。 作者简介:李付贵,男,检验技师,主要从事肿瘤学基础研究。 [△] 通讯作者, E-mail:chenjingmc@163.com。

1.3 方法

1.3.1 小鼠胚胎成纤维细胞(MEF)饲养层的制备 处死孕 12.5 d 的昆明小鼠,无菌条件下取出小鼠胚胎,从胚胎中分离 MEF,将细胞接种于 75 cm² 的培养瓶中培养、扩增至第 3 代,经 50 Gy γ 射线照射,冻存于液氮中。用前复苏至 6 孔板备用。

1.3.2 小鼠胚胎干细胞(ESC)的培养 从液氮中取出小鼠 ES-E14TG2a 复苏,接种于已铺好 MEF 饲养层的 6 孔板中,采用 ESC 常规培养基[H-DMEM 基础培养基、10%胎牛血清、1%双抗(50 U/mL 青霉素和 50 μ g/mL 链霉素)、2 mmol/L 谷氨酰胺、1%非必需氨基酸(NEAA)、0.1 mmol/L 巯基乙醇和 1 000 U/mL mLIF]进行培养。2~3 d 后,ESC 克隆达 60%~70%融合时传代。

1.3.3 建立 EST 模型

1.3.3.1 受试物细胞毒性实验 将 3T3 细胞和 ESC 按细胞密度 1×10^4 /mL 接种于 96 孔板,每孔 50 μ L;5% CO₂ 和 37 $^{\circ}$ C 孵育 2 h,细胞贴壁后,加入 150 μ L 含 7 个浓度梯度受试物的检测培养基。于第 3 天和第 5 天换液,每孔 200 μ L;第 10 天,相差显微镜下观察细胞形态,四甲基偶氮唑盐(MTT)法检测细胞活性。采用酶标仪检测 550~570 nm 处吸光度值,绘制浓度-反应曲线,计算出受试物对 ESC 和 3T3 细胞的半数生长抑制浓度(IC₅₀)值 IC₅₀ 3T3、IC₅₀ ES。每种受试物各重复实验 3 次,取 3 次实验 IC₅₀ 的平均值作为 IC₅₀ 的最终值。

1.3.3.2 受试物对 ESC 的分化抑制实验 将受试物溶于 ESC 分化培养基[H-DMEM 培养基、20%胎牛血清、1%双抗(50 U/mL 青霉素和 50 μ g/mL 链霉素)、2 mmol/L 谷氨酰胺、1% NEAA 和 0.1 mmol/L 巯基乙醇],制备成 7 个浓度梯度的检测培养基,其浓度设置与细胞毒性相同。胰酶消化 ESC,采用含不同浓度受试物的检测培养基重悬 ESC,制备成单细胞悬液,调整细胞密度为 3.75×10^4 /mL。将单细胞悬液以每滴 20 μ L(约 750 个细胞)滴于 100 mm $\times$ 20 mm 组织培养皿内盖上,加 5~10 mL 磷酸盐缓冲液(PBS)于培养皿中,置于 5% CO₂ 饱和湿度培养箱,37 $^{\circ}$ C,悬滴培养 3 d。3 d 后,倒置显微镜观察,每个悬滴中一个拟胚体(EB)。倾斜培养盖约 45 $^{\circ}$ 将胚体冲到底部,转移至 60 mm 细菌培养皿,放入 5% CO₂ 饱和湿度培养箱,37 $^{\circ}$ C,悬浮培养 2 d。第 5 天,吸取 1 mL 含不同浓度受试物的检测培养基于明胶包被的 24 孔板内,将 EB 移至 24 孔板,每孔加入 1 个胚体,置于 5% CO₂ 饱和湿度培养箱,37 $^{\circ}$ C,培养 5 d。第 10 天,光镜下观察并计数每个培养板含心肌细胞搏动的孔数。溶剂对照组 24 孔板中含心肌细胞搏动的孔数设为 100%,各浓度组搏动孔数与溶剂对照组相比得出各浓度组的百分率,绘制浓度-反应曲线。根据浓度-反应曲线计算对照与受试化合物半数分化抑制浓度(ID₅₀)值。每种受试物各重复实验 3 次,取 3 次实验 ID₅₀ 的平均值作为 ID₅₀ 的最终值。

1.3.3.3 EST 的预测模型 EST 的预测模型(PM)是利用 EST 的 3 个反应终点(IC₅₀ 3T3、IC₅₀ ES、ID₅₀)对检测物质的胚胎毒性进行判断。通过比较 3 个线性判别函数的大小,对胚胎毒性进行分类。3 个线性判别函数如下:

$$\text{I} : 5.916 \lg(\text{IC}_{50} \text{ 3T3}) + 3.500 \lg(\text{IC}_{50} \text{ ES}) - 5.307[(\text{IC}_{50} \text{ 3T3} - \text{ID}_{50}) / \text{IC}_{50} \text{ 3T3}] - 15.27$$

$$\text{II} : 3.651 \lg(\text{IC}_{50} \text{ 3T3}) + 2.394 \lg(\text{IC}_{50} \text{ ES}) - 2.033[(\text{IC}_{50} \text{ 3T3} - \text{ID}_{50}) / \text{IC}_{50} \text{ 3T3}] - 6.85$$

$$\text{III} : -0.125 \lg(\text{IC}_{50} \text{ 3T3}) - 1.917 \lg(\text{IC}_{50} \text{ ES}) + 1.500[(\text{IC}_{50} \text{ 3T3} - \text{ID}_{50}) / \text{IC}_{50} \text{ 3T3}] - 2.67$$

受试物胚胎毒性分类标准:1类:无胚胎毒性,如 I > II 且 I > III;2类:弱胚胎毒性,如 II > I 且 II > III;3类:强胚胎毒性,如 III > I 且 III > II。

1.3.4 验证 EST 模型 选择已通过 ECVAM 验证的化合物 5-氟尿嘧啶(强胚胎毒性)作为阳性对照,青霉素 G(无胚胎毒性)作为阴性对照来验证 EST 模型的有效性,并且作为整个实验过程的质量控制指标。5-氟尿嘧啶从 1 mg/mL 开始,依次按 1:10 进行倍比稀释,共设 7 个检测浓度;青霉素 G 从 10 mg/mL 开始,依次按 1:10 进行倍比稀释,同样设 7 个检测浓度,分别进行细胞毒性和分化抑制实验,获得各个实验的检测终点,再按照 PM 评价其胚胎毒性。

1.3.5 应用 EST 模型评价氢醌的胚胎毒性 方法同前,将氢醌从 1 mg/mL 开始,依次按 1:10 进行倍比稀释,同样设 7 个检测浓度,分别进行细胞毒性和分化抑制实验,获得各个实验的检测终点,再按照 PM 评价其胚胎毒性。

1.4 统计学处理 采用 SPSS17.0 进行数据处理与统计分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组均数间比较采用 t 检验。以 $\alpha=0.05$ 为检验水准, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 小鼠 ESC 的培养 如图 1 所示,ES-E14TG2a 细胞呈克隆样生长,克隆呈典型的鸟巢样隆起,形态为圆形或椭圆形,边界清晰,形态均一,与滋养层细胞有明显界限。细胞增殖迅速,一般 2~3 d 即可传代。

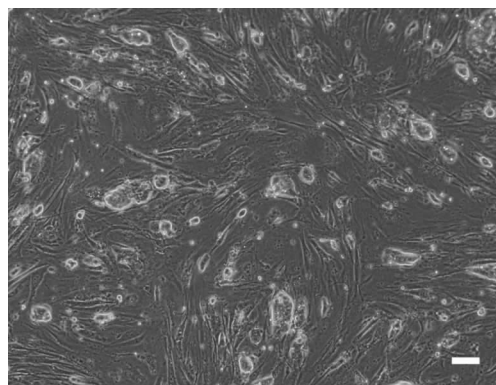


图 1 小鼠 ESC 形态(光学显微镜 $\times 100$)

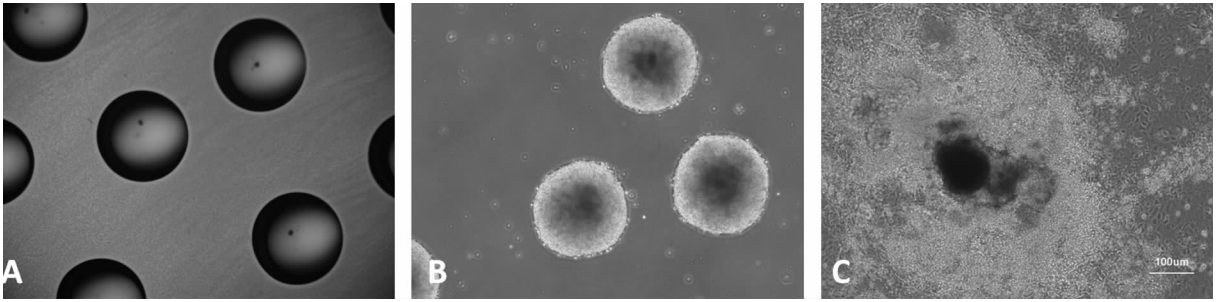
2.2 ESC 向心肌细胞分化 本实验采用悬滴-悬浮-贴壁法体外诱导 ESC 向心肌细胞分化。如图 2A 所示,悬滴 3 d 后,每个悬滴中生成一个 EB。将 EB 转移至细菌培养皿继续悬浮 2 d 后,EB 进一步增大,形成类似球形或椭圆形,细胞聚集紧密(见图 2B)。第 5 天,将 EB 接种于包被明胶的 24 孔板,逐日观察贴壁后生长状态,EB 外侧自发分化出多种细胞形态(见图 2C),贴壁 3 d 后即可见自发节律性收缩,随着培养时间延长,心肌细胞团逐渐增大,收缩细胞逐渐增多,有的可见多个收缩区域。

2.3 EST 模型建立与验证

2.3.1 5-氟尿嘧啶的胚胎毒性评价 如图 3A 所示,5-氟尿嘧啶对 3T3 细胞的增殖和 ES-E14TG2a 细胞的增殖及分化均有

较强的抑制作用,随着 5-氟尿嘧啶浓度增加,细胞存活率逐渐下降,并呈一定剂量依赖关系。经计算其 IC_{50} 3T3 为 $(0.264 \pm 0.047) \mu\text{g/mL}$, IC_{50} ES 为 $(0.062 \pm 0.004) \mu\text{g/mL}$, ID_{50} ES 为

$(0.050 \pm 0.004) \mu\text{g/mL}$ 。根据 EST 模型的 3 个线性判别函数,得到 $III > I$ 且 $III > II$,由模型预测可得 5-氟尿嘧啶为强胚胎毒性化合物。



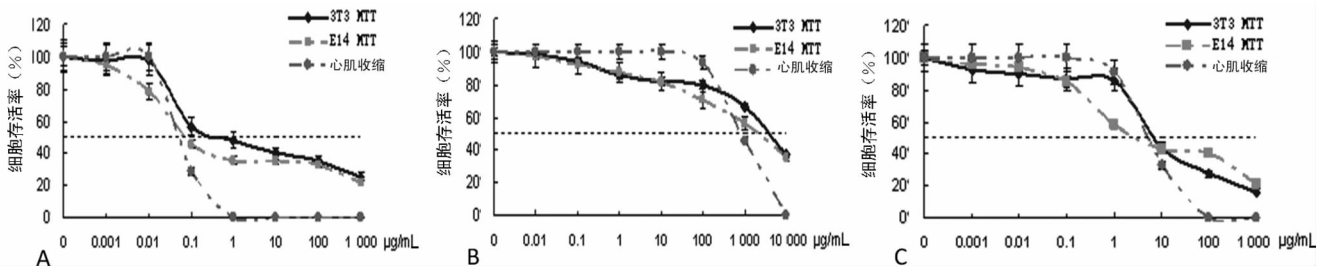
A:悬滴培养(倒置显微镜 $\times 7$);B:悬浮培养(倒置显微镜 $\times 100$);C:贴壁培养(光学显微镜 $\times 100$)。

图 2 小鼠 ESC 向心肌细胞分化培养

2.3.2 青霉素 G 的胚胎毒性评价 如图 3B 所示,根据 EST 模型得出青霉素 G 的 IC_{50} 3T3 为 $(4\ 043.0 \pm 108.3) \mu\text{g/mL}$, IC_{50} ES 为 $(2\ 076.0 \pm 140.6) \mu\text{g/mL}$, ID_{50} ES 为 $(681.1 \pm 29.0) \mu\text{g/mL}$,再将 3 个反应终点代入 PM 的线性判别函数,得出 $I > II$ 且 $I > III$,根据 EST 的分类标准,青霉素 G 为无胚胎毒性化合物。对 5-氟尿嘧啶、青霉素 G 两种化合物的预测结果都与 ECVAM 的预测结果一致,证明本实验建立的 EST 模型可以准确预测受试物的胚胎毒性,因此可以用其来评价氢醌的胚胎毒性。

2.4 氢醌的胚胎毒性评价 应用 EST 模型评价氢醌的胚胎

毒性,结果如图 3C 所示,随着氢醌浓度增加,3T3 细胞及 ESC 增殖能力逐渐下降,说明氢醌对 ESC 和 3T3 细胞增殖均有一定程度的抑制作用。随着氢醌浓度增加,ES 细胞定向分化为心肌细胞的能力也逐渐下降,可见氢醌对 ES 细胞分化也有一定程度的抑制作用。根据浓度-反应曲线计算氢醌的 IC_{50} 3T3 为 $(5.97 \pm 0.48) \mu\text{g/mL}$, IC_{50} ES 为 $(2.57 \pm 0.10) \mu\text{g/mL}$, ID_{50} ES 为 $(3.77 \pm 0.31) \mu\text{g/mL}$,将 IC_{50} 3T3、 IC_{50} ES、 ID_{50} ES 值代入线性判别函数,得出 $III > I$ 且 $III > II$,按照 EST 模型的标准,氢醌为强胚胎毒性化合物。



A:5-氟尿嘧啶;B:青霉素 G;C:氢醌。

图 3 不同化合物浓度-反应曲线

3 讨 论

本课题采用经 ECVAM 推荐的 EST 模型进行胚胎发育毒性的评价。EST 利用两种小鼠细胞系(3T3 细胞系和 ESC 细胞系)进行细胞毒性实验及 ESC 的分化抑制实验。细胞毒性实验采取 MTT 法得到反应终点(IC_{50} 3T3、 IC_{50} ES),ESC 分化抑制实验通过 ESC 悬滴-悬浮-贴壁法获得反应终点(ID_{50})。PM 建立了含有 3 个反应终点的 3 个线性判别函数,通过比较 3 个公式值的大小,将化合物的胚胎毒性分为无胚胎毒性、弱胚胎毒性和强胚胎毒性。ECVAM 采用 EST 对 30 种有明确体内胚胎发育毒性的化合物进行胚胎发育毒性检测,结果显示与体内结论的符合率达到 82%,其中强胚胎毒性的符合率更达到 100%^[6-8]。

氢醌除了可以用作化妆品的增白剂,还可以用于照相机的黑白显影剂、食物的抗氧化剂和稳定剂,也存在于香烟烟雾中,人们可以通过环境、职业暴露,以及食物和吸烟等多种途径接

触氢醌^[9]。我国是氢醌的主要生产和使用国,氢醌对职业接触者的健康影响不容忽视。在本实验中,选取经 ECVAM 验证的已知强胚胎毒性化合物 5-氟尿嘧啶和无胚胎毒性化合物青霉素 G 作为对照^[7,10],来验证本实验建立的 EST 结果的有效性。经验证 5-氟尿嘧啶和青霉素 G 的发育毒性与 ECVAM 的结论具有一致性,证明本实验室建立的 EST 模型可以准确评价化合物的发育毒性。最后应用此模型得到氢醌的 3 个检测终点,代入线性判别函数,得出 $III > I$ 且 $III > II$,推断其为强胚胎毒性化合物,为进一步评价氢醌的安全性提供了研究数据,具有良好的社会效益。

参考文献

- [1] McGregor D. Hydroquinone: an evaluation of the human risks from its carcinogenic and mutagenic properties[J]. Crit Rev Toxicol, 2007, 37(10): 887-914.

(下转第 1812 页)

感染。

铜绿假单胞菌广泛分布于周围环境和人体皮肤、呼吸道、消化道等部位,是引起医院感染的重要条件致病菌。铜绿假单胞菌对阿米卡星敏感性较好,对亚胺培南和美罗培南的耐药率分别为 34.9%和 42.0%,高于卫生部全国细菌耐药监测网(Mohnarin)2011 年西南地区耐药监测数据(24.1%和 22.8%)^[7]。鲍曼不动杆菌检出率仅次于铜绿假单胞菌,可引起下呼吸道感染、泌尿系统感染、呼吸机相关性肺炎等。鲍曼不动杆菌对亚胺培南和美罗培南的耐药率分别为 52.1%和 48.8%,低于 Mohnarin2011 年西南地区耐药监测数据(52.2%和 65.6%)^[7]。铜绿假单胞菌和鲍曼不动杆菌对大多数抗菌药物都呈现很强的耐药性(耐药率大于 50%),可选用的药物越来越少。有文献报道,在重症监护室(ICU)检测到有持久性克隆的鲍曼不动杆菌流行株存在,同时也在 ICU 医护人员的手上检测到相同耐药谱的相同菌株^[8],提示带菌环境和医护人员可能是造成鲍曼不动杆菌在患者间、病房或者医院小范围流行的原因。所以预防鲍曼不动杆菌流行已越来越紧迫,医务部门、院感办、微生物室和临床医生应加强合作,定期检查手和物品表面细菌,制订抗菌药物管理制度,临床医生和微生物室及时沟通,重视细菌培养和药敏试验,如发现多重耐药患者,采取消毒隔离措施,防止鲍曼不动杆菌传播流行^[9]。

在革兰阳性菌中,凝固酶阴性的葡萄球菌在血液标本中的检出率最高(32.3%),说明由于静脉导管等医用植入装置的使用,增加了凝固酶阴性葡萄球菌血行感染的概率。MRSA 和 MRCNS 检出率分别为 42.3%和 65.6%,低于 2012 年中国 CHINET 细菌耐药监测数据(47.9%和 77.1%)^[3]。其对常用抗菌药物的耐药率明显高于 MSSA 和 MSCNS。MRSA 对非 β -内酰胺类抗菌药物的耐药率高于 MRCNS。目前未发现耐利奈唑胺、万古霉素的菌株。

肠球菌是人体内源性正常菌群,屎肠球菌对大部分抗菌药物耐药性较高,除利奈唑胺和替考拉宁外,屎肠球菌对其他抗菌药物的耐药率均高于粪肠球菌。粪肠球菌和屎肠球菌对万古霉素的耐药率分别为 0.0%和 0.7%,对利奈唑胺的耐药率分别为 0.4%和 0.0%,未发现对替考拉宁不敏感的菌株。检出 1 株耐万古霉素的屎肠球菌。

综上所述,细菌耐药性在不同年代、不同级别医院、不同地

区的差异很大,确切地掌握病原菌的变迁及耐药情况,对指导临床医生合理选用抗菌药物,以及耐药菌的防治等方面有着重要作用。

参考文献

[1] Lieber M. The problem of antibiotic resistant bacteria. The important role of environmentally responsive mutagenesis, its relevance to a new paradigm that may allow a solution[J]. Theor Biol Forum, 2011, 104(1): 91-102.

[2] Ison CA. Antimicrobial resistance in sexually transmitted infections in the developed world: implications for rational treatment [J]. Curr Opin Infect Dis, 2012, 25(1): 73-78.

[3] 汪复, 朱德妹, 胡付品, 等. 2012 年中国 CHINET 细菌耐药性监测 [J]. 中国感染与化疗杂志, 2013, 13(5): 321-330.

[4] 王辉, 吴伟元, 陈民钧, 等. 肠杆菌科细菌中超广谱 β -内酰胺酶 (ELISA) 的研究 [J]. 中华微生物学和免疫学杂志, 2001, 21(6): 676-679.

[5] 余丹阳, 刘又宁. AmpC 酶和超广谱 β -内酰胺酶在阴沟肠杆菌中的表达及其对耐药性的影响 [J]. 中华医学杂志, 2002, 82(19): 1351-1358.

[6] 张健, 赵明东, 肖影. 医院感染菌分布及耐药性分析 [J]. 西部医学, 2011, 23(3): 555-558.

[7] 陈晓, 张伟丽, 杨青, 等. Mohnarin 2011 年报告: 西南地区细菌耐药监测 [J]. 中华医院感染学杂志, 2012, 22(22): 4983-4988.

[8] Kong BH, Hanifah YA, Yusof MY, et al. Antimicrobial susceptibility profiling and genomic diversity of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates from a teaching hospital in Malaysia [J]. Jpn J Infect Dis, 2011, 64(4): 337-340.

[9] 凌月明, 蔡媛媛, 王建福, 等. 鲍曼不动杆菌临床分布、易感因素及耐药情况分析 [J]. 检验医学与临床, 2014, 11(2): 212-214.

(收稿日期: 2015-04-22)



(上接第 1809 页)

[2] Yagiz K, Snyder PW, Morre DJ, et al. Cell size increased in tissues from transgenic mice overexpressing a cell surface growth-related and cancer-specific hydroquinone oxidase, tNOX, with protein disulfide-thiol interchange activity [J]. J Cell Biochem, 2008, 105(6): 1437-1442.

[3] 崔霞, 邹明强, 胡秀丽, 等. 皮肤美白剂中氢醌潜在毒性研究进展 [J]. 中国公共卫生, 2008, 24(7): 873-874.

[4] Nordlund JJ, Grimes PE, Ortonne JP. The safety of hydroquinone [J]. J Eur Acad Dermatol Venereol, 2006, 20(7): 781-787.

[5] 王强, 黄文琪, 时锡金, 等. 低浓度氢醌的细胞毒性及 DNA 损伤作用 [J]. 工业卫生与职业病, 2009, 35(3): 151-154.

[6] Genschow E, Scholz G, Brown N, et al. Development of prediction models for three in vitro embryotoxicity tests which are evaluated in an ECVAM validation study [J]. In Vitro Mol Toxicol, 2000, 13(1): 51-66.

[7] 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.

[8] 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(3): 209-244.

[9] 刘林华, 陈玉婷, 唐焕文, 等. 氢醌对 TK6 细胞周期的影响及其相关的调控机制探讨 [J]. 环境与职业医学, 2014, 31(2): 134-137.

[10] 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.

(收稿日期: 2015-04-28)