

干细胞药物筛选模型研究进展

徐梦莎¹ 华允芬^{1,2*}

(¹浙江工业大学药学院, 杭州 310014; ²杭州精准医药研究中心, 杭州 310018)

摘要 药物筛选是针对特定的要求和目的通过建立合适的筛选模型对具有生理活性化合物进行优选的过程。建立高效的筛选模型能缩短研发周期, 降低研发成本。干细胞是一类具有自我更新和多向分化潜能的细胞。近年来, 以干细胞作为药物筛选模型的研究越来越受到重视。该文综述了近年来以胚胎干细胞、神经干细胞、间充质干细胞和诱导多能干细胞等作为药筛模型的研究进展, 为后续开展干细胞药物筛选研究提供参考。

关键词 干细胞; 药物筛选; 筛选模型

Advance in Stem Cell Drug Screening Model

Xu Mengsha¹, Hua Yunfen^{1,2*}

(¹College of Pharmaceutical Science, Zhejiang University of Technology, Hangzhou 310014, China;

²Hangzhou Precision Medicine Research Center, Hangzhou 310018, China)

Abstract Drug screening is the process of extracting physiological active component by establishing a suitable screening model for specific requirements and purposes. And it is well known that efficient screening models would shorten the developing period and cut down the costs. Stem cells are unspecialized cells which have the ability of self-renewing and multiple differentiation potential. In recent years, more and more attention has been paid to the stem cell research as a model for drug screening. This review summarized the application of embryonic stem cells, neural stem cells, mesenchymal stem cells, and induced pluripotent stem cells as drug screening models, in order to provide reference for future study in stem cell drug screening.

Keywords stem cell; drug screening; screening model

新药的研发和安全性评价是一个时间周期长且费用昂贵的过程。目前, 成功开发一种新药需花费12~17亿美元, 时间周期为8~12年^[1-2]。2006~2015年期间, 近1万个人类临床试验、监管申请和最终获批数据表明, 一款候选药物由I期试验到最终获得美国FDA(Food and Drug Administration)批准的可能性只有9.6%^[3]。如此高的淘汰率使得药物研发者高度重视药物筛选, 注重建立合适的药筛模型。

药物筛选是通过建立合适筛选模型对一系列化合物进行优选的过程, 是现代药物研发流程中检

验和获取具有特定生理活性化合物的一个重要步骤, 高效、可靠的筛选模型对药物筛选意义重大。药物筛选模型包括三个不同的水平: 整体动物水平筛选模型、组织器官水平筛选模型、分子和细胞水平筛选模型。整体动物筛选模型是采用动物为观察对象, 通常采用动物病理模型, 研究动物对于药物的反应, 从而评估药用价值。整体动物筛选虽然能从整体水平评估药物的治疗作用, 但存在高费用、低效率等缺点, 不适合高通量筛选的要求。组织器官水平筛选模型是指观察药物对特定组织或器官的作

收稿日期: 2016-08-01 接受日期: 2016-11-02

浙江省自然科学基金(批准号: LQ12C02003)资助的课题

*通讯作者。Tel: 0571-86689277, E-mail: huayfyxwd@hotmail.com

Received: August 1, 2016 Accepted: November 2, 2016

This work was supported by Zhejiang Provincial Natural Science Foundation (Grant No.LQ12C02003)

*Corresponding author. Tel: +86-571-86689277, E-mail: huayfyxwd@hotmail.com

网络出版时间: 2017-03-28 16:11:17 URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20170328.1611.008.html>

用,反映生理条件下的药物作用。与整体动物筛选模型相比,该模型降低药物用量和劳动强度,但仍存在规模小、效率低等不足之处。随着分子生物学和细胞生物学等学科的发展,大量分子和细胞水平药物筛选模型不断涌现^[4]。

基于分子水平的筛选模型通常是在靶标已知的情况下,检测化合物对特定靶标的影响,具有快速、微量的特点,筛选结果准确、稳定,但其检测模型只能做到对特定靶点的单指标检测,提供化合物对于靶点的信息有限,且不能准确、可靠地模拟人类真实生理反应。因此,单纯的分子水平筛选模型已经不能满足多指标、多靶点的筛选要求。细胞水平筛选是现代型药物筛选方法之一^[5],通过检测药物对细胞上靶标的作用以及对细胞增殖和细胞活力等影响,反映药物的生理活性,筛选出药物并研究其作用机制。在细胞水平研究药物对生命体的影响,非常接近体内的生理过程,能够比较准确地了解药物的生物学意义^[6-7]。

基于细胞水平的药物筛选主要包括永生化细胞、原代细胞和干细胞。永生化细胞是指自发或受外界因素的影响而获得无限增殖能力的细胞^[8]。永生化细胞快速增殖的特点满足高通量药物筛选在细胞数量上的需求,却难以反映正常人的生理状况,而原代细胞存在细胞类型和数量有限等缺点^[9-11]。干细胞是一类具有自我更新和自我复制的多向分化潜能细胞,且来源丰富。20世纪70年代,国外学者开始研究不同镇静剂对于造血干细胞增殖作用的影响,结果显示,氯丙嗪和巴比妥类药物促进造血干细胞增殖^[12]。Gordon等^[13]比较了不同细胞毒性物质对于小鼠造血干细胞和人造造血干细胞的影响,发现环磷酰胺和5-氟尿嘧啶具有细胞毒性作用,并证实人造造血干细胞比鼠造血干细胞对于上述细胞毒性物质更为敏感。1991年, Laschinski等^[14]首次提出可采用胚胎干细胞进行体外毒性筛查。本世纪初,欧洲替代方法验证中心(european center for the validation of alternative method, ECVAM)正式批准采用胚胎干细胞进行体外药物和化合物毒性筛选的动物替代方法,是目前唯一一个国际公认的采用细胞系替代怀孕动物进行毒性筛查的试验方法^[15]。近几年来,诱导多能干细胞的出现为构建药物筛选模型带来新的契机。本文就近年来以干细胞作为药物筛选模型作一综述。

1 不同干细胞药物筛选模型

1.1 胚胎干细胞药物筛选模型

上世纪80年代, Evans等^[16]首次从发育中的小鼠胚囊分离出胚胎干细胞(embryonic stem cell, ESC)。此后,关于胚胎干细胞的研究不断涌现,作为一种全能干细胞,胚胎干细胞在药物筛选过程中具有重要作用。

Ding等^[17]建立了一个简便的高通量筛选方法,致力于中药提取物的筛选,以增强型绿色荧光蛋白为指标,研究7种不同的中药提取物(地黄、灵芝、松花粉、三七总皂苷、灵芝孢子粉、白术和川穹)在不同浓度时对于鼠胚胎干细胞(mouse embryonic stem cell, mESC)生长的作用效果。结果表明,在质量浓度为0.01%和0.10%时,三七总皂苷、灵芝孢子粉、白术和川穹提取物促进细胞增殖。对这4种中药提取物进行随机混合,形成的11种中药混合物再进一步筛选,结果显示,三七总皂苷和灵芝孢子粉的等量混合物在质量浓度为0.01%时,促进细胞增殖作用十分明显。此后,他们还研究了灵芝孢子粉、银杏和淫羊藿对细胞增殖的影响,发现质量浓度为0.01%~0.10%时,灵芝孢子粉提取物促进mESC增殖,银杏提取物对mESC增殖无作用,淫羊藿抑制mESC增殖^[18]。文献报道,灵芝孢子粉具有提高免疫力的作用,其药效作用机制与灵芝多糖活化淋巴细胞、促进淋巴细胞增殖有关^[19]。上述研究从胚胎干细胞角度给予了证实。

胚胎干细胞还可用于建立药物在胚胎发育过程中的毒性筛查模型。Hong等^[20]研究了5种不同化合物(羟基脲、5-氟尿嘧啶、阿糖胞苷、吡哆美辛和地塞米松)在鼠胚胎干细胞形成拟胚体时的毒理作用,并在显微镜下观察药物对于拟胚体大小的影响,发现上述药物均能使拟胚体缩小,其中羟基脲、5-氟尿嘧啶和阿糖胞苷是强胚胎毒性化合物,吡哆美辛和地塞米松是弱胚胎毒性化合物。后续机制研究揭示了拟胚体缩小可能是由于药物介导胚胎干细胞坏死。

近年来,胚胎干细胞在药物筛选方面应用广泛。以胚胎干细胞为筛选模型具有以下优点:(1)胚胎干细胞一旦建系,即可获得源源不断的细胞用于研究,成本耗费较低;(2)胚胎干细胞能分化成胚胎所有成分,包括外胚层、中胚层和内胚层以及这些胚体后续的分化,因此,该模型能评估多种与胚胎发育相关的事件,可进行药物在胚胎发育中的

毒理学研究等^[21-22]; (3)采用胚胎干细胞筛选模型可避免利用全胚或解离的大块胚芽细胞原初培养进行筛选,不必培育大量怀孕动物^[23]。随着动物福利3R原则[减少(Reduction)、优化(Refinement)和替代(Replacement)]的推进和社会经济发展的需求,以胚胎干细胞代替整体动物试验获得越来越广泛的支持。

1.2 神经干细胞药物筛选模型

随着老龄化的加剧,神经退行性疾病发病率逐年增加。研究认为,神经退行性疾病帕金森病人中,神经干细胞可以代替死亡的神经元,从而起到延缓或者抑制疾病的进一步发展的作用^[24]。此外,神经干细胞在胚胎的神经系统发育到成人的神经系统中扮演着十分重要的角色。神经干细胞的自我更新能力对于一些正常功能例如学习、记忆和受伤后的反应有重要作用^[25]。因此,采用神经干细胞进行药物筛选具有重大意义。

Chang等^[24]将5-苯基-1,3,4-恶二唑-2-(1'-苯基)甲胺和5-苯基-1,3,4-恶二唑-2-(1'-对氟苯基)甲胺与磺酰氯或羧酸进行偶联反应,生成一系列小分子,建立了小型化合物库,并通过大鼠胎儿神经干细胞进行筛选。细胞免疫化学实验结果表明,该系列小分子有促进大鼠胎儿神经干细胞分化成星形胶质细胞的作用。RT-PCR结果显示,星形胶质细胞细胞标志物GFAP(glial fibrillary acidic protein)和S100 β 显著增加,而神经元标志物 β -III型微管蛋白(beta-III tubulin, TuJ1)并无变化。实验初步表明,1,3,4-恶二唑衍生物可控制大鼠胎儿神经干细胞向星形胶质细胞分化。Saxe等^[26]采用鼠神经干细胞对小分子化合物进行高通量筛选(图1),以神经元标志物TuJ1为免疫组化标志物,发现磷酸丝氨酸能抑制神经干细胞增殖,促进神经干细胞向神经元细胞分化。后期实验表明,磷酸丝氨酸通过介导代谢型谷氨酸受体4亚型,激活mTOR(mechanistic target of rapamycin)信号通路,从而促进神经干细胞分化。

目前,研究者关注较多的是神经毒物与神经系统之间的关系,某些神经毒物可能会致神经系统疾病,如一些杀虫剂能诱发帕金森病^[27]。Pei等^[28]筛选了80种药物和杀虫剂,其中包括已知和未知的神经毒性物质,采用MTT法测定化合物对神经干细胞细胞毒性。结果显示,缬氨霉素、四溴双酚A、溴氰菊酯和三苯基磷对神经干细胞具有毒性。Malik等^[29]以细胞毒性作为指标构建了神经干细胞筛选平台,

对2 000个已知药物、天然产物和生理活性物质进行筛选,发现地高辛、乌本苷和毛花苷C等一些强心苷类药物对神经系统有一定毒性。神经干细胞模型为神经毒性筛查提供了更为经济、直观的评价,有助于全面指导药物的活性筛选。

1.3 间充质干细胞药物筛选模型

间充质干细胞是干细胞家族的重要成员,来源于发育早期的中胚层和外胚层。该细胞在特定的诱导条件下,可分化为脂肪、骨、软骨、肌肉、肌腱、韧带、神经、肝、心肌、内皮等多种组织细胞。近年来的研究表明,间充质干细胞成骨分化的错误调节导致许多与之相关的疾病产生^[30-31],因此,以间充质干细胞为药筛模型具有重要意义。

早老症与核纤层蛋白A(lamin A, LMNA)密切相关。由于其编码基因中11号外显子发生碱基突变,激活剪接位点,从而产生一种截短型的核纤层蛋白A前体,又称为早老蛋白(progerin)。研究表明,早老症大多是由于法尼基化的核纤层蛋白A前体不能正常加工为核纤层蛋白A,以致核纤层蛋白A前体积聚在核膜,阻止细胞核的形成引起的^[32]。Blondel等^[33]针对法尼基过程中的法尼基焦磷酸合成酶和法尼基化转移酶,通过多能干细胞对21 608个小分子进行初筛,并筛选出11个化合物。患有儿童早衰症的病人其骨髓间充质干细胞存在着过早成骨分化的特点。他们研究了这11个化合物对碱性磷酸酶(成骨细胞分化的标志性酶)活力的影响,评估化合物对骨髓间充质干细胞成骨分化的抑制作用,发现单胺类化合物与已上市的法尼基转移酶抑制剂洛那法尼对于细胞的成骨分化抑制作用并无差异,显示单胺类化合物对儿童早衰症具有治疗价值。

Mazaki等^[34]利用间充质干细胞对768个药理活性化合物进行高通量筛选,其中包括抗骨质疏松药依普黄酮。筛选结果表明,山奈酚能诱导碱性磷酸酶表达且无细胞毒性。体内试验显示,山奈酚与依普黄酮的成骨活性差异较小。进一步的研究表明,山奈酚促进间充质干细胞向成骨细胞分化,上调骨保护素,对骨质疏松患者而言,具有明显的治疗价值。

目前,研究人员多采用来源丰富的骨髓间充质干细胞作为药筛模型,以碱性磷酸酶的活性为指标,初步判断药物有无促进骨髓间充质干细胞分化作用,筛选出药物并用于相关疾病的治疗,例如骨质疏松等。骨髓间充质干细胞来源广泛,易于培养、分离、

扩增和纯化, 是重要的药物筛选模型之一。

1.4 诱导多能干细胞药物筛选模型

诱导多能干细胞(induced pluripotent stem cells, iPSCs)是体细胞在一系列异位转录因子作用下, 调节培养环境诱导而成的一类干细胞, 具有自我更新和分化成内胚层、中胚层和外胚层的能力^[35]。2012年, 英国发育生物学家约翰·戈登因和日本京都大学iPS细胞研究所所长山中伸弥因在细胞核重新编程研究领域的杰出贡献而荣获诺贝尔生理学或医学奖。近年来, 多种细胞组织成功诱导为iPSCs, 如成纤维细胞^[36]、神经干细胞^[37]、颗粒细胞^[38]等。诱导患者自身体细胞形成的iPSCs, 称为疾病特异性诱导多能干细胞, 具有潜在的疾病源特质, 非常适合作为药物筛选模型^[39]。

脊髓性肌肉萎缩症(spinal muscular atrophy, SMA)是一种常染色体隐性遗传疾病, 由运动神经元存活基因1(survival motor neuron gene 1, *SMN1*)突变造成SMN蛋白质水平下降, 以致 α 运动神经元选择性退化。Ebert等^[40]将*SMN1*型病人的纤维母细胞重新编

程为诱导多能干细胞, 研究了2-丙基戊酸和妥布霉素对于SMN蛋白质水平的影响, 发现上述药物能上调SMN蛋白质水平。上述模型为今后该病的药物筛选研究提供了新的方向。

脆性X染色体综合征是仅次于唐氏综合征的一大类与智力发育低下有关的人类遗传病, 该病大多是由于脆性X智力低下基因1(fragile X mental retardation 1, *FMR1*)表观基因沉默, 造成脆性X智力低下蛋白质不表达或低表达。Kaufmann等^[41]建立了以疾病特异性诱导多能干细胞为基础的高通量筛选平台, 筛选出组蛋白去乙酰化酶抑制剂可诱导脆性X智力低下蛋白质表达, 实验结果为进一步研究潜在靶点和作用机制提供了基础。

以诱导多能干细胞为来源的药物筛选模型, 免受人胚胎提取干细胞的伦理道德制约, 相较于动物细胞筛选方法, 避免了物种差异性, 且iPSCs来源丰富, 克服了取材上的困难^[42]。此外, 在筛选模型中获得的相关信息能提供给复杂的人类疾病新的治疗选择^[43], 助推个性化医药发展(图2), 具有广阔的发展

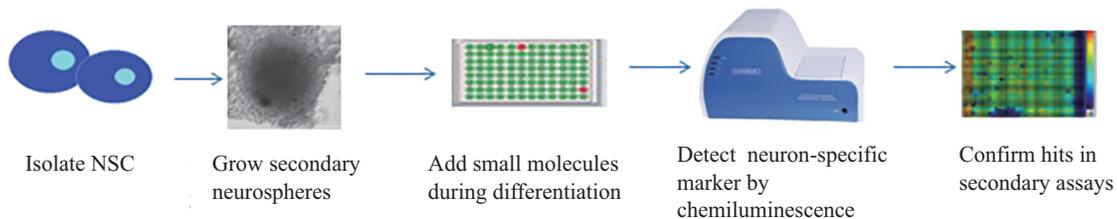


图1 小分子筛选流程图(根据参考文献[26]修改)

Fig.1 Scheme of small molecule screening (modified from reference [26])

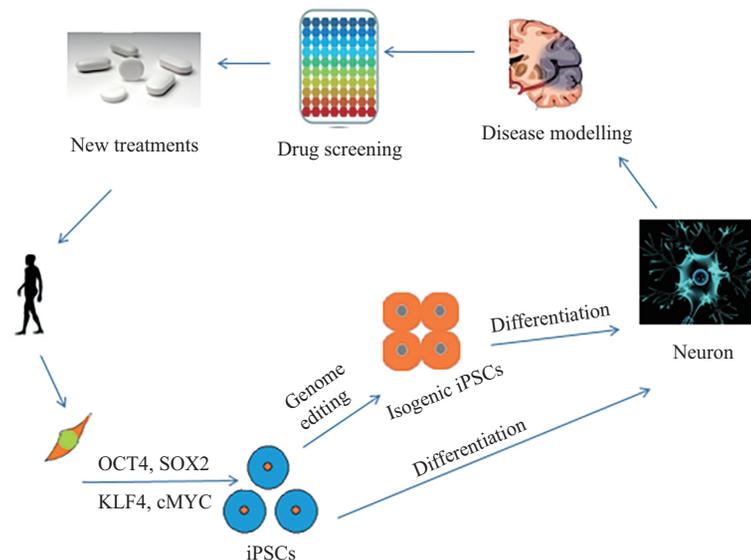


图2 以人iPSCs来源的疾病模型和药物研发图(根据参考文献[44]修改)

Fig.2 Diagram of disease modeling and drug development with human iPSCs (modified from reference [44])

前景。

1.5 其他干细胞药物筛选模型

研究人员通过3D培养诱导肿瘤干细胞对6 000个化合物进行筛选,以盐霉素为阳性对照,检测化合物对碱性磷酸酶抑制作用,初步筛选出86个化合物,后期筛选出青蒿琥酯能选择性抑制肿瘤干细胞^[45]。进一步研究发现,青蒿琥酯可能通过血红素的激活从而诱导线粒体功能异常,进而选择性抑制肿瘤干细胞“干性”,显示青蒿琥酯具备靶向治疗癌症的潜力^[45]。肿瘤干细胞具有高度增殖和分化能力,即为“干性”,又具备致肿瘤性,因此备受关注。在体外建立肿瘤干细胞药物筛选模型并与高通量技术结合,可以快速筛选潜在的抗肿瘤药物,对癌症治疗的发展具有重要意义。

近年来,单倍体胚胎干细胞得到了广泛关注^[46-48]。单倍体胚胎干细胞在传代后维持单倍体及其稳定性,并能分化成三个胚叶层,当嵌入胚囊时,能形成种系嵌合体。上述特征预示着单倍体胚胎干细胞是未来小分子筛选的重要平台^[49]。

2 总结与展望

干细胞具有无限的自我更新能力,并且能分化成各种细胞类型。采用干细胞作为药物筛选模型,主要有以下几个方面优点。(1)与动物模型相比,干细胞筛选人工劳动少,时间强度小,研究周期短。同时,采用人干细胞筛选模型能够避免种属差异性,提供更为严苛的临床前药理数据。(2)与分子模型相比,干细胞可结合高通量筛选技术提供多通道、多靶点、多指标检测,形成更大的筛选规模。(3)与永生细胞相比,干细胞更贴近人体生理环境。(4)干细胞建系后,细胞数量充足^[50-52]。

干细胞药物筛选模型虽然具有诸多优势,但也存在一些亟待解决的问题。例如,在筛选前应排除化合物的一般毒性,确认化合物的结构和纯度。筛选中避免除候选化合物之外的其他物质导致细胞在形态、结构发生变化和其他可能导致产生假阳性的筛选结果。另外,还需考虑筛选结果的可重复性问题^[5]。对于iPSCs药筛模型,如何提高iPSCs重编程效率从而形成统一的高质量iPSCs。以啮齿类动物干细胞为筛选模型,与人源的干细胞筛选模型之间是否存在有差异。相信随着生命科学的整体发展以及干细胞研究的快速推进,上述问题会一一得到解决,而干细胞作为筛选模型应用于高通量药物筛选的前景会更加广阔。

参考文献 (References)

- Grainger DW. Cell-based drug testing; this world is not flat. *Adv Drug Deliv Rev* 2014; 69-70: vii-xi.
- Jenkins M, Bilsland J, Allsopp TE, Ho SV, Farid S. Patient-specific hiPSC bioprocessing for drug screening: Bioprocess economics and optimisation. *Bioch Eng J* 2015; 108: 84-97.
- Hay M, Thomas DW, Craighead JL, Economides C, Rosenthal J. Clinical development success rates for investigational drugs. *Nat Biotechnol* 2014; 32(1): 40-51.
- 胡娟娟, 杜冠华. 药物筛选模型研究进展. 基础医学与临床(Hu Juanjuan, Du Guanhua. *Basic Medical Sciences and Clinics*) 2001; 21(4): 302-5.
- 王月华, 杜冠华. 现代表型药物筛选——药物发现的有效途径. 中国新药杂志(Wang Yuehua, Du Guanhua. *Modern phenotypic drug screening, a feasible strategy for drug discovery. Chinese Journal of New Drugs*) 2016; 25(4): 395-404.
- 王淑颜, 汪溪洁, 韩玲, 马璟. 人胚胎干细胞和诱导型人多能干细胞分化的心肌细胞在药物心脏毒性筛选中的应用. 中国细胞生物学学报(Wang Shuyan, Wang Xijie, Han Ling, Ma Jing. *The application of human embryonic stem cells and human induced pluripotent stem cells derived cardiomyocytes on cardiotoxicity screening. Chinese Journal of Cell Biology*) 2014; 36(1): 143-8.
- 李韶菁, 杜冠华. 细胞水平的高通量药物筛选技术研究进展. 中国药学杂志(Li Shaojing, Du Guanhua. *Chinese Pharmaceutical Journal*) 2008; 43(2): 84-7.
- Mcgovern JV, Ebert AD. Exploiting pluripotent stem cell technology for drug discovery, screening, safety, and toxicology assessments. *Adv Drug Deliv Rev* 2014; 69-70: 170S-8S.
- 庄金秋, 梅建国, 王文秀, 沈志强. 细胞永生技术及其应用研究进展. 生命科学研究(Zhuang Jinqiu, Mei Jianguo, Wang Wenxiu, Shen Zhiqiang. *Progress in research and application of cell immortalization technology. Life Science Research*) 2011; 15(4): 363-8.
- Zhang W, Thorne N, Mckew JC. Phenotypic screens as a renewed approach for drug discovery. *Drug Discov Today* 2013; 18(21): 1067-73.
- Xu XH, Zhong Z. Disease modeling and drug screening for neurological diseases using human induced pluripotent stem cells. *Acta Pharmacol Sin* 2013; 34(6): 755-64.
- Dresch C, Poirier O, Mine J, Bismuth C. Effect of different sedative drugs on the proliferation of bone marrow cells. *Eur J Toxicol Environ Hyg* 1975; 8(4): 252-7.
- Gordon MY, Blackett N. The sensitivities of human and murine hematopoietic cells exposed to cytotoxic drugs in an *in vivo* culture system. *Cancer Res* 1976; 36(8): 2822-6.
- Laschinski G, Vogel R, Spielmann H. Cytotoxicity test using blastocyst-derived euploid embryonal stem cells: A new approach to *in vitro* teratogenesis screening. *Reprod Toxicol* 1991; 5(1): 57-64.
- 赵增明, 方海琴, 何俊, 武瑞琴, 彭双清. 胚胎干细胞毒性评价模型的建立及其在药物安全性评价中的应用. 中国药理学与毒理学杂志(Zhao Zengming, Fang Haiqin, He Jun, Wu Xuerui, Peng Shuangqing. *Chin J Pharmacol Toxicol*) 2013; 27(3): 487-8.
- Evans MJ, Kaufman MH. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature* 1981; 292(5819): 154-6.
- Li D, Isherwood S, Motz A, Zang R, Yang ST, Wang JF, et al. Cell-based screening of traditional chinese medicines for proliferation enhancers of mouse embryonic stem cells. *Biotechnol Prog* 2013; 29(3): 738-44.
- Li D, Zang R, Yang ST, Wang JF, Wang XN. Cell-based high-throughput proliferation and cytotoxicity assays for screening

- traditional Chinese herbal medicines. *Process Biochemistry* 2013; 48(3): 517-24.
- 19 Guo L, Xie J, Ruan Y, Zhou L, Zhu H, Yun X, *et al.* Characterization and immunostimulatory activity of a polysaccharide from the spores of *Ganoderma lucidum*. *Int Immunopharmacol* 2009; 9(10): 1175-82.
- 20 Hong EJ, Choi Y, Yang H, Kang HY, Ahn CH, Jeung EB. Establishment of a rapid drug screening system based on embryonic stem cells. *Environ Toxicol Pharmacol* 2015; 39(1): 327-38.
- 21 赵 卿, 徐金森. 胚胎干细胞用于药物及其他化合物筛选的研究进展. *生物医学工程学杂志*(Zhao Qing, Xu Jinseng. Embryonic stem cell Test in screening of medicine and other chemicals. *Journal of Biomedical Engineering*) 2005; 22(1): 181-4.
- 22 张 丽, 张利军, 郭家彬, 彭双清. ECVAM验证的生殖发育毒性测试替代方法及其改进. *毒理学杂志*(Zhang Li, Zhang Lijun, Guo Jiabin, Peng Shuangqin. *Journal of Toxicology*) 2015; 29(6): 458-61.
- 23 Genschow E, Scholz G, Brown N, Piersma A, Brady M, Clemann N, *et al.* Development of prediction models for three *in vitro* embryotoxicity tests. *In Vitro Mol Toxicol* 2000; 13(1): 51-65.
- 24 Chang DJ, Jeong MY, Song J, Jin CY, Suh YG, Kim HJ, *et al.* Discovery of small molecules that enhance astrocyte differentiation in rat fetal neural stem cells. *Bioorg Med Chem Lett* 2011; 21(23): 7050-3.
- 25 Llorens J, Li AA, Ceccatelli S, Sunol C. Strategies and tools for preventing neurotoxicity: To test, to predict and how to do it. *Neurotoxicology* 2012; 33(4): 796-804.
- 26 Saxe JP, Wu H, Kelly TK, Phelps ME, Sun YE, Kornblum HI, *et al.* A phenotypic small-molecule screen identifies an orphan ligand-receptor pair that regulates neural stem cell differentiation. *Chem Biol* 2007; 14(9): 1019-30.
- 27 屈 哲, 吕建军, 林 志, 霍桂桃, 杨艳伟, 张 颀, 等. 神经毒性体外评价系统研究进展. *中国新药杂志*(Qu Zhe, Lü Jianjun, Lin Zhi, Huo Guitao, Yang Yanwei, Zhang Di, *et al.* Research progress of *in vitro* systems for neurotoxicity evaluation. *Chinese Journal of New Drugs*) 2015; 24(15): 1702-6.
- 28 Pei Y, Peng J, Behl M, Sipes NS, Shockley KR, Rao MS, *et al.* Comparative neurotoxicity screening in human ipsc-derived neural stem cells, neurons and astrocytes. *Brain Res* 2015; 1638: 57-73.
- 29 Malik N, Efthymiou AG, Mather K, Chester N, Wang X, Nath A, *et al.* Compounds with species and cell type specific toxicity identified in a 2000 compound drug screen of neural stem cells and rat mixed cortical neurons. *Neurotoxicology* 2014; 45: 192-200.
- 30 Houdek MT, Wyles CC, Packard BD, Terzic A, Behfar A, Sierra RJ. Decreased osteogenic activity of mesenchymal stem cells in patients with corticosteroid-induced osteonecrosis of the femoral head. *J Arthroplasty* 2015; 31(4): 893-8.
- 31 Wu X, Ding S, Ding Q, Gray NS, Schultz PG. A small molecule with osteogenesis-inducing activity in multipotent mesenchymal progenitor cells. *J Am Chem Soc* 2002; 124(49): 14520-1.
- 32 袁 源, 陈维春, 刘新光, 周中军. 核层蛋白A前体的法尼基化与衰老. *生命的化学*(Yuan Yuan, Chen Weichun, Liu XinGuang, Zhou Zhongjun. Relationship between farnesylation of prelamin A and aging. *Chemistry of Life*) 2011; 31(4): 592-7.
- 33 Blondel S, Egesipe AL, Picardi P, Jaskowiak AL, Notarnicola M, Ragot J, *et al.* Drug screening on hutchinson gilford progeria pluripotent stem cells reveals aminopyrimidines as new modulators of farnesylation. *Cell Death Dis* 2016; 7(2): e2105.
- 34 Mazaki T, Kitajima T, Shiozaki Y, Sato M, Mino M, Yoshida A, *et al.* *In vitro* and *in vivo* enhanced osteogenesis by kaempferol found by a high-throughput assay using human mesenchymal stromal cells. *J Functional Foods* 2014; 6(1): 241-7.
- 35 Spinelli V, Guillot PV, Coppi PD. Induced pluripotent stem (iPS) cells from human fetal stem cells. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 2015; 31: 112-20.
- 36 Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 2006; 126(4): 663-76.
- 37 Kim JB, Zaehres H, Wu G, Gentile L, Ko K, Sebastiano V, *et al.* Pluripotent stem cells induced from adult neural stem cells by reprogramming with two factors. *Nature* 2008; 454(7204): 646-50.
- 38 Jian M, Lin L. Generation of iPS cells from granulosa cells. *Methods Mol Biol* 2014; 1357: 451-64.
- 39 蒋 宁, 周文霞, 张永祥. 疾病特异性诱导多能干细胞: 神经退行性疾病研究和临床治疗的有力工具. *国际药学研究杂志*(Jiang Ning, Zhou Wenxia, Zhang Yongxiang. Induced pluripotent stem cells: Powerful tools for the study of neurodegenerative diseases and clinical therapy. *International Journal of Pharmaceutical Research*) 2016; 43(2): 183-90.
- 40 Ebert AD, Yu J, Rose FF Jr, Mattis VB, Lorson CL, Thomson JA, Svendsen CN. Induced pluripotent stem cells from a spinal muscular atrophy patient. *Nature* 2009; 457(457): 277-80.
- 41 Kaufmann M, Schuffenhauer A, Fruh I, Klein J, Thiemeyer A, Rigo P, *et al.* High-throughput screening using ipsc-derived neuronal progenitors to identify compounds counteracting epigenetic gene silencing in fragile x syndrome. *J Biomol Screen* 2015; 20(9): 1101-11.
- 42 张 瑄. 携线粒体DNA A1555G突变的聋病患者特异性iPS细胞系的建立与鉴定(硕士论文). 浙江大学(Zhang Xuan. Generation and characterization of deafness patient-specific induced pluripotent stem cells with mitochondrial DNA A1555G mutation, Zhejiang University), 2014.
- 43 Kim C. iPSC technology-powerful hand for disease modeling and therapeutic screen. *BMB Rep* 2014; 48(5): 256-65.
- 44 Zhang WX, Christian KM, Song HJ, Ming GL. Modeling psychiatric disorders with patient-derived ipscs. *Curr Opin Neurobiol* 2016; 36: 118-27.
- 45 Subedi A, Futamura Y, Nishi M, Ryo A, Watanabe N, Osada H. High-throughput screening identifies artesunate as selective inhibitor of cancer stemness: Involvement of mitochondrial metabolism. *Biochem Biophys Res Commun* 2016; 477(4): 737-42.
- 46 帅 领. 小鼠孤雄胚胎干细胞的建立和应用(博士论文). 东北农业大学(Shuai Ling. Derivation and application of mouse androgenetic embryonic stem cells. Northeast Agricultural University), 2013.
- 47 Leeb M, Wutz A. Derivation of haploid embryonic stem cells from mouse embryos. *Nature* 2011; 479(7371): 131-4.
- 48 Elling U, Taubenschmid J, Wirnsberger G, O'Malley R, Demers SP, Vanhaelen Q, *et al.* Forward and reverse genetics through derivation of haploid mouse embryonic stem cells. *Cell Stem Cell* 2011; 9(6): 563-74.
- 49 Wu B, Li W, Wang L, Liu ZH, Zhao XY. Stem cells and small molecule screening: Haploid embryonic stem cells as a new tool. *Acta Pharmacol Sin* 2013; 34(6): 725-31.
- 50 Eglen RM, Gilchrist A, Reisine T. An overview of drug screening using primary and embryonic stem cells. *Comb Chem High Throughput Screen* 2008; 11(11): 566-72.
- 51 Chen Y, Sakamuru S, Huang R, Reese D, Xia M. Identification of compounds that modulate retinol signaling using a cell-based qHTS assay. *Toxicol In Vitro* 2016; 32: 287-96.
- 52 Zang R, Li D, Tang I, Wang JF, Yang ST. Cell-based assays in high-throughput screening for drug discovery. *Int J Biotechnol Wellness Ind* 2012; 1(1): 31-51.