

基于3D肝细胞模型评价盐酸胺碘酮重复给药肝毒性

林锐[#], 刘鑫磊[#], 孙百阳, 俞月, 耿兴超, 周晓冰^{*}, 李波^{*} (中国食品药品检定研究院国家药物安全评价监测中心, 药物非临床安全评价研究北京市重点实验室, 北京 100176)

摘要 **目的:** 建立3D肝细胞微球模型并用于评价盐酸胺碘酮及联用肝药酶诱导剂利福平或抑制剂酮康唑时的重复给药肝毒性。**方法:** 采用诱导分化的HepaRG和HHStcC细胞混合共培养构建3D肝细胞微球模型, 对HepaRG诱导分化后形成的胆管结构功能进行验证, 活细胞探针标记肝细胞微球中两种细胞并对其分布情况进行检测, 免疫荧光染色对肝细胞微球表达的特异性和功能性蛋白进行检验, 并对试验周期内模型的肝功能指标稳定性进行连续监测。模型验证后, 对每40个肝细胞微球进行连续4或5天的盐酸胺碘酮重复染毒, 并联合肝药酶诱导剂利福平或抑制剂胺碘酮进行重复染毒, 检测不同给药组的细胞毒性及肝功能指标。**结果:** 本研究构建的3D肝细胞模型可以模拟肝脏胆管结构的外排功能, HepaRG和HHStcC细胞在微球中以24:1的比例始终保持较均匀的分布, 肝脏特异性和功能性蛋白表达丰富, 并能在至少5天内维持肝功能指标稳定。在重复给予胺碘酮时, 模型从给药第三天起出现剂量和时间依赖性的细胞毒性作用, 且联合利福平(LDH和TBIL升高)或酮康唑(LDH、ALT、ALP和GLU升高)能产生剂量相关的肝毒性协同作用。**结论:** 本研究成功构建更适用于短期重复给药毒性评价的3D肝细胞微球模型, 对于体外药物肝毒性筛选和代谢研究具有明显优势, 能够进行药物肝毒性标志物的筛选研究。

关键词: 3D肝细胞模型; 肝毒性; 盐酸胺碘酮; 重复给药; 利福平; 酮康唑; 联合用药

中图分类号: R99 文献标识码: A 文章编号: 1002-7777(2022)12-1414-10

doi:10.16153/j.1002-7777.2022.12.011

Evaluation of the Hepatotoxicity Induced by Repeated Dosed Amiodarone Hydrochloride Based on 3D Liver Spheroid Model

Lin Ni[#], Liu Xinlei[#], Sun Baiyang, Yu Yue, Geng Xingchao, Zhou Xiaobing^{*}, Li Bo^{*} (Key Laboratory of Beijing for Nonclinical Safety Evaluation Research of Drugs, National Center for Safety Evaluation of Drugs, National Institutes for Food and Drug Control, Beijing 100176, China)

Abstract Objective: To establish a 3D liver spheroid model to assess the hepatotoxicity induced by repeated dosed amiodarone hydrochloride in combination with liver enzyme inducer rifampicin or inhibitor ketoconazole. **Methods:** The 3D liver spheroid model was established by mixed co-culture of differentiated HepaRG cells and HHStcC cells, and the function of DMSO-induced bile structure in HepaRG cells was validated. The live cell probes labeled two kinds of cells in hepatocyte spheroids and detected their distribution. The expression of liver-specific and functional proteins were determined by immunofluorescence staining, and the liver function

基金项目: 十三五重大新药创制专项课题“创新药物非临床安全性评价研究关键技术”(编号 2018ZX09201017-001)

作者简介: 林锐 Tel: (010) 67872233; E-mail: nilin@nifdc.org.cn

共同第一作者: 刘鑫磊 Tel: (010) 67872233; E-mail: 1365940480@qq.com

通信作者: 周晓冰 Tel: (010) 67872233; E-mail: zhxb@nifdc.org.cn

李波 Tel: (010) 67095790; E-mail: boli@nifdc.org.cn

parameters were continuously monitored throughout the period of experiment. Subsequent to the model verification, the repeated administration of amiodarone and its combination with rifampicin or ketoconazole on every 40 liver spheroids was conducted for consecutive 4 or 5 days, and the cytotoxicity and liver function were detected. **Results:** The 3D liver spheroid model simulated the efflux function of bile structure, HepaRG cells and HHStcC cells in spheroids were evenly distributed in spheroids at a ratio of 24 : 1, the expression of liver-specific and functional proteins were abundant, and the liver function remained stable in at least 5 days. When amiodarone was repeatedly dosed, the dose-independent and time-dependent cytotoxicity was observed from day 3 after initial dosage, and its combination with rifampicin (increase in LDH and TBIL) or ketoconazole (increase in LDH, ALT, ALP and GLU) could induce synergistic effect on dose-dependent hepatotoxicity. **Conclusion:** This study has successfully constructed a 3D hepatocyte spheroid model that is more suitable for toxicity evaluation of short-term repeated administration. Which has obvious superiority in the in vitro drug hepatotoxicity screening and metabolism studies and could be used to screen drug hepatotoxicity markers.

Keywords: 3D hepatocyte model; hepatotoxicity; amiodarone hydrochloride; repeated administration; rifampicin; ketoconazole; drug combination

肝脏是人体重要的器官，参与多种生理功能和外源物的代谢，也是主要的药物毒性靶器官^[1]。临床的药源性肝损伤具有较高发病率和死亡率，也是药物撤市的主要原因之一^[2]。因此，药物临床前肝毒性评价对药物研发十分重要。用于药物肝毒性评价的动物模型存在种属差异和动物伦理方面的局限性，而体外2D (Two-dimension, 2D) 细胞模型则多为平面生长，与真实的人体细胞生长微环境有较大差距，且不能反映不同细胞之间相互作用以及药物在体内的代谢过程^[3]。研究表明，3D细胞培养环境更接近人体真实细胞生长微环境，有利于细胞的增殖、分化，重现细胞真实的生物学特性和功能^[4]；并能构建不同细胞之间、细胞与细胞外基质间相互作用；还能进行更长时间的培养，并能够较好地维持细胞功能，便于较长试验周期的研究。3D肝细胞模型作为一类新型的体外替代模型，在药物毒性评价中具有优势，3D肝细胞模型的应用研究是当前的热点，特别是对于重复给药毒性研究、与药物代谢酶相关的毒性研究和联合用药毒性研究有待进一步的探索和验证。

盐酸胺碘酮是临床上应用率超60%的广谱抗心律失常药物，但其临床使用也受到许多副作用的限制，例如急、慢性肝损伤，盐酸胺碘酮临床使用时的肝损伤常表现为轻至中度且具有延迟性^[5]。盐酸胺碘酮主要经肝药酶CYP3A4代谢，既是酶底物也是酶抑制剂，且盐酸胺碘酮及其代谢产物均具有肝毒性。因此，临床使用时药物相互作用产生的肝毒

性也是需要重点关注和研究的问题。

本研究利用诱导分化的人肝细胞HepaRG和人肝星状细胞HHStcC以固定比例混合共培养的方法建立了3D肝细胞模型，并对肝细胞微球在较长时间培养下维持细胞活性和肝功能稳定性进行了验证，评价了盐酸胺碘酮重复给药的肝细胞毒性以及胺碘酮联用CYP3A4诱导剂利福平或抑制剂酮康唑的肝毒性。本研究中构建的3D肝细胞微球模型能够长期培养，高表达肝药酶和转运体，适用于重复给药肝毒性检测，为肝毒性评价体外替代模型的开发提供了研究和数据基础。

1 材料与方法

1.1 试剂与仪器

William's Medium E培养基、胎牛血清、0.25% EDTA-胰酶，均购自美国Life Technologies公司；GlutaMAX™添加剂、青-链霉素双抗、人胰岛素、DMSO、DAPI，均购自美国Sigma-Aldrich公司；PBS购自美国Hyclone公司；SAKURA O.C.T.™冰冻切片包埋剂、4%多聚甲醛，均购自上海碧云天生物技术有限公司；家兔抗人Cytochrome P450 (CYP3A4)、Bile Salt Export Pump (BSEP)、Zonula Occludens-1 (ZO-1)、P-glycoprotein (P-gp)、Ki67一抗，小鼠抗人Cytokeratin8/18 (CK8/18)、Multi-drug Resistance Related Protein (MRP-2)和Vimentin (VIM)一抗，均购自美国Abcam公司；Alexa Fluor® 488羊抗小鼠IgG (H+L)、Alexa Fluor® 594羊抗兔IgG (H+L)，

均购自美国Jackson Immunoresearch Laboratories公司；生化试剂盒购自日本和光纯药工业株式会社；CellTracker™ Red CMTPX Dye、CellTracker™ Green CMFDA Dye、5 (and 6) -carboxy-2', 7' -dichlorofluorescein diacetate (CDFDA)，均购自美国Thermo Fisher公司。氢化可的松半琥珀酸酯、盐酸胺碘酮 (Amiodarone Hydrochloride, AMI)、利福平 (Rifampicin, RFP)、酮康唑 (Ketoconazole, KCZ)，均购自中国食品药品检定研究院。HepaRG细胞购自美国American Type Culture Collection (ATCC) 公司；HHStcC细胞、Stellate Cell培养基，均购自美国ScienCell Research Laboratories公司。384孔圆底低吸附培养板、24孔低吸附培养板，均购自美国Corning公司。

BCN-1360B细胞超净工作台、10-0221 CO₂ 培养箱、恒温水浴锅、Life Technologies EVOS® XL Core光学显微镜、OLYMPUS IX 71倒置型荧光显微镜、Thermo 88880022数字摇床、Hitachi 7180全自动生化分析仪、Perkin Elmer高内涵成像分析系统。

1.2 3D肝细胞微球模型的构建和验证

1.2.1 细胞培养及模型构建

将HepaRG细胞以 5×10^6 个·mL⁻¹的密度接种于T175大培养瓶中，培养于William E完全培养基中，每2~3天进行换液培养，直至细胞在培养瓶中汇合。然后将培养基换成加入2%DMSO的培养基，每2~3天进行换液，对细胞进行2周的诱导分化。同时，将HHStcC细胞培养于专用培养基 (Stellate Cell Media) 中。将2种细胞以0.25%胰酶分别消化，并调整浓度至每50 μL细胞中包含 0.1×10^4 个·mL⁻¹HHStcC细胞和 2.4×10^4 个·mL⁻¹诱导后的HepaRG细胞，然后将混合后的细胞悬液接于384孔超低吸附培养板中，将板子放置于细胞培养箱中，并在旋转摇床中摇动培养3天，形成均匀致密的3D细胞微球。

1.2.2 HepaRG细胞分化及功能验证

将诱导后的HepaRG细胞吸去培养基，用PBS轻柔洗涤1次，加入用William's E培养基稀释至 $2 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的CDFDA，细胞在培养箱中孵育10 min，用PBS轻柔洗涤3次，换成新鲜培养基，HepaRG细胞采用倒置荧光显微镜观察并拍照。

1.2.3 活细胞荧光探针标记

将CellTracker™ Red CMTPX Dye和CellTracker™ Green CMFDA Dye两种活细胞染料溶解于DMSO配制成 $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 储备液，再用培养基将其稀释成浓度为 $20 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的工作液，将诱导后的HepaRG细胞和HHStcC细胞消化后轻轻加入绿色和红色的荧光染色液进行标记，细胞在培养箱中孵育15~45 min，吸出染色液，用PBS清洗1次，用新鲜培养基重悬/染色结束后，分别将两种细胞消化，并按照“1.2.1”节中不同细胞比例稀释混合，将混合后的细胞悬液接种于超低吸附培养板中，制备3D肝细胞微球，利用高内涵成像分析系统对3D肝细胞微球进行拍照观察。

1.2.4 免疫荧光染色

将包埋于Tissue-Teck肝细胞微球制作成冰冻切片标本，采用免疫荧光染色法检测人肝细胞特异性和功能性蛋白的表达。将冰冻切片于预冷的丙酮中固定10 min，PBS洗涤3次，每次5 min，10%山羊血清封闭20 min，孵育一抗，4℃过夜；第二天用PBS洗涤3次，避光孵育二抗山羊抗小鼠Alexa Fluor® 488 或山羊抗兔Alexa Fluor® 594，PBS洗涤3次， $5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ DAPI工作液对细胞核标记，PBS洗涤3次，封片。将制成的免疫荧光标本片置于荧光显微镜下观察，并进行拍照保存。本研究中检测的目的蛋白：CK8/18、VIM、ZO-1、CYP3A4、MRP-2、P-gp、BSEP和Ki67。

1.2.5 肝功能检测

每40个肝细胞微球移入超低吸附24孔培养板中的一个孔，连续5天换液并收集上清，将上清 $1000 \text{ rpm} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心10 min，除去细胞碎片。用Hitachi 7180全自动生化分析仪对AST、ALT、GGT、GLU、ALB、ALP、TBIL和UREA 8种肝功能指标进行每日检测。

1.3 盐酸胺碘酮、盐酸胺碘酮联用利福平/酮康唑重复给药

24孔板中每孔移入40个肝球，分别设置溶剂对照组 (1% DMSO)，盐酸胺碘酮低 ($25 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)、高 ($50 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 剂量组和盐酸胺碘酮低、高剂量联用利福平 ($25 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 组，每组3个复孔，每天给孔板中的细胞微球换液，同时各组分别加入600 μL药液，重复给药4天，每天收集上清，检测细胞毒性和肝功能指标 (方法同“1.2.5”节)。另一试验中，类似地，设

置溶剂对照组 (1% DMSO), 盐酸胺碘酮低 (25 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)、高 (50 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 剂量组和盐酸胺碘酮低、高剂量联用酮康唑 (10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 组, 重复给药5天, 检测每日细胞微球LDH释放量和肝功能指标 (方法同“1.2.5”节)。

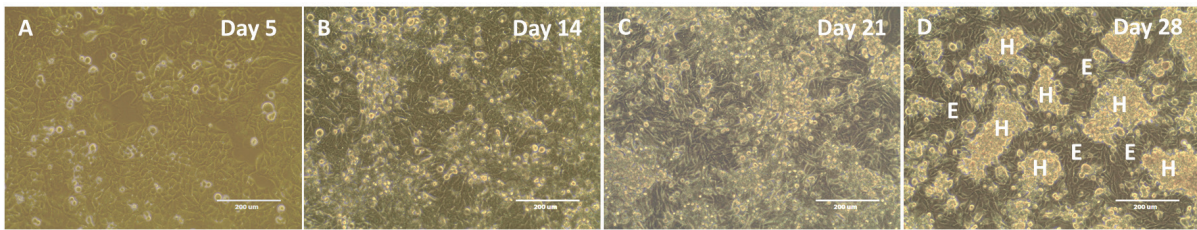
1.4 数据分析与统计

试验结果以平均值 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 的形式列出, 结果采用单因素方差分析对组间数据进行检验, $P < 0.05$ 时认为差异有统计学意义, 数据图与统计结果经GraphPad Prism 7软件处理生成。免疫荧光图像均使用Nikon Eclipse 80i数字荧光显微镜和Olympus IX 71倒置显微镜采集图片, 使用Image Pro Plus软件进行图片分析处理。

2 结果

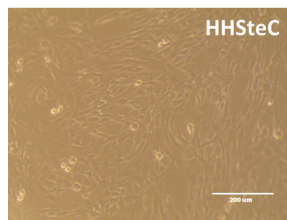
2.1 HepaRG细胞诱导分化的形态学观察

HepaRG细胞 (图1-A) 为贴壁细胞, 增殖期呈上皮样形态。汇合后细胞形态学产生变化 (图1-B), 用含2% DMSO的培养基诱导约2周后分化为肝细胞样细胞和上皮样细胞 (图1-C)。颗粒状的肝细胞样细胞 (图1-D-H) 形成了边界清晰的小梁结构, 类似于人原代肝细胞培养形成的明亮胆管样结构, 可明显分辨; 肝细胞样细胞周围还存在少量扁平的上皮样细胞 (图1-D-E)。人肝星形细胞HHStcC是肝内结缔组织细胞, 多呈梭形或不规则多边形, 培养3~5天后可见成纤维细胞样形态 (图2)。



显微镜下观察 HepaRG 细胞在培养瓶中生长第 5 天尚未完全汇合时 (A)、生长第 14 天已完全汇合时 (B)、生长第 21 天即诱导第 7 天时 (C) 和生长第 28 天即诱导第 14 天时 (D) 的形态学变化。其中, D 图中 H 表示肝细胞样细胞, E 表示上皮样细胞。标尺: 100 μm 。

图 1 HepaRG 细胞诱导分化过程



标尺: 100 μm 。

图 2 HHStcC 细胞形态

2.2 诱导HepaRG细胞分化后的胆管结构胆汁排泄功能验证

HepaRG细胞诱导分化后的肝细胞样细胞能形成具有胆管功能的结构, 多药耐药相关蛋白2 (MRP-2) 表达于肝细胞的胆管侧, 是负责胆汁排泄的主要转运子。化合物CDFDA能够在肝酯酶的作用下代谢为一种荧光产物 5 (and

6) -carboxy-2',7'-dichlorofluorescein (CDF), 再通过胆汁排泄到细胞间隙中。因此, 可利用荧光探针CDFDA来测试胆管结构的胆汁排泄功能, 即MRP-2的转运功能。如图3所示, 在分化的HepaRG细胞形成的胆管样结构中检测到了CDF绿色荧光, 证明本研究建立的3D肝细胞模型可以模拟肝脏胆管结构相应的生理功能。

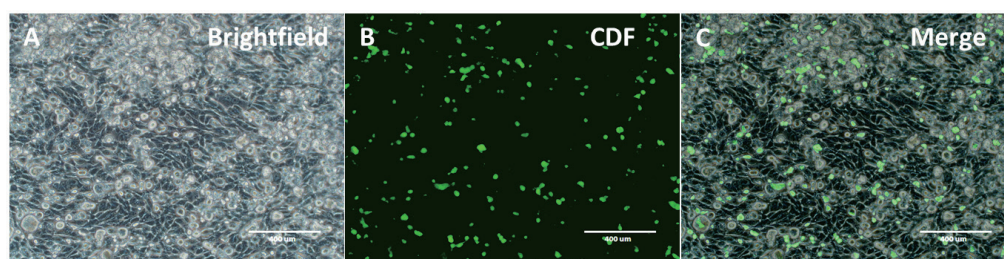


图3 CDFDA 经诱导分化的 HepaRG 细胞将代谢产物 CDF 释放至细胞间隙。标尺: 100 μm 。

图3 CDFDA 经诱导分化的 HepaRG 细胞将代谢产物 CDF 释放至细胞间隙

2.3 3D肝细胞微球的形成及细胞在微球中的生长和分布情况

诱导分化后的 HepaRG 细胞与 HHStc 细胞以 24 : 1 的比例混合, 细胞接种于超低吸附圆底培养板中 2 小时后较为松散地聚集生长 (图 4-A), 培养 3 天后可形成结构致密、三维生长的立体细胞微

球结构 (图 4-E)。利用活细胞荧光探针分别将 HepaRG 细胞和 HHStc 细胞标记为红色和绿色, 在高内涵成像系统中可观察到, 两种细胞在聚集生长的过程中的实际比例, 并始终保持较均匀的分布 (图 4-B~D、图 4-F~H)。

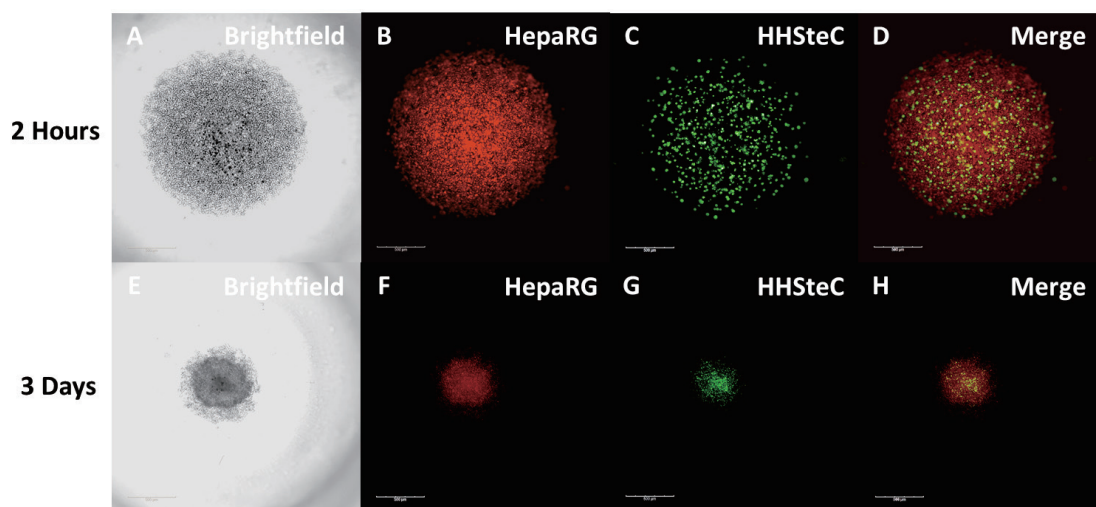


图4 高内涵成像系统下观察活细胞荧光探针标记的 HepaRG (红) 和 HHStc (绿) 细胞在 3D 肝细胞微球中分布

图4 高内涵成像系统下观察活细胞荧光探针标记的 HepaRG (红) 和 HHStc (绿) 细胞在 3D 肝细胞微球中分布

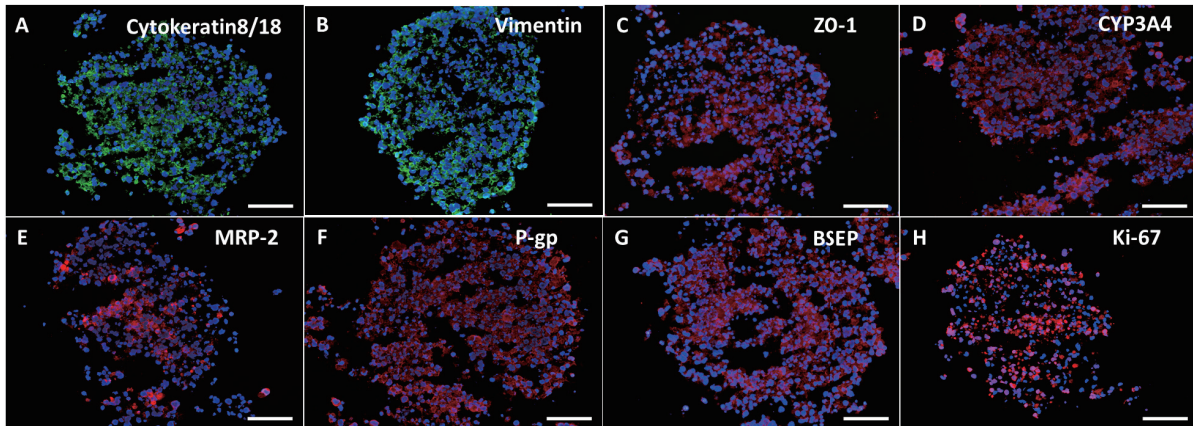
2.4 3D肝细胞微球特异性和功能性蛋白表达情况

对 3D 肝细胞进行免疫荧光染色, 考察肝特异性和功能性蛋白的表达情况。正常人肝脏中, 肝细胞和胆管上皮细胞的中间丝蛋白均表达 CK8/18,

是细胞骨架的重要结构之一^[6], CK8/18 表达丰富提示肝细胞分化成熟 (图 5-A)。图 5-B 中 Vimentin 的表达情况证明 HHStc 均匀分布于肝细胞微球中。肝细胞微球中 ZO-1 的表达证实肝细胞间形成紧密

连接(图5-C)。人肝脏中表达的细胞色素P450(CytochromeP450, CYP450)参与多种外源性和内源性物质的代谢,其中经过CYP3A4代谢的底物种类最多,3D细胞微球中CYP3A4的高表达提示证实了肝细胞分化成熟并具有药物代谢潜能(图5-D)。MRP-2、P-gp和BSEP(图5-E~G)的表达表明肝细胞极化并形成了具有胆管功能的结构^[7]。

Ki67的表达分布表明增殖中的细胞均匀分布于肝细胞微球中(图5-H)。本研究构建的3D肝细胞微球模型中表达成熟肝细胞的特异性标志物和胆管功能的蛋白,高表达人体肝脏重要的代谢酶和转运体,且细胞维持着一定的增殖活力和分化能力,证明此模型具有维持生理性稳态和用于药物毒性评价的潜在优势。



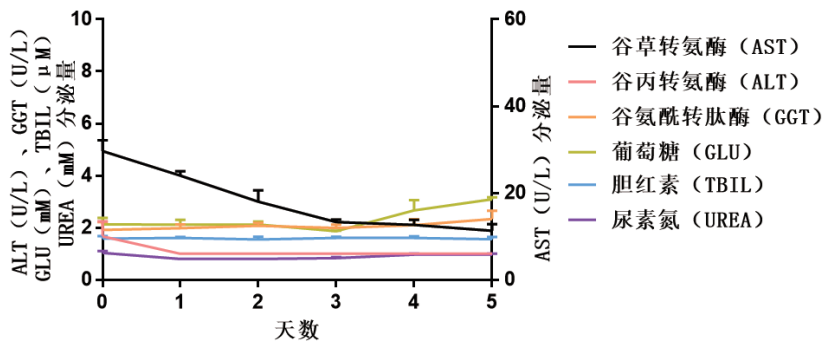
A. CK8/18 (绿色); B. VIM (绿色); C. ZO-1 (红色); D. CYP3A4 (红色); E. MRP-2 (红色); F. P-gp (红色); G. BSEP (红色); H. Ki-67 (红色); 标尺: 100 μm。

图5 肝细胞微球冰冻切片的免疫荧光染色表征肝脏特异性和功能性蛋白的表达

2.5 3D肝细胞微球能在至少5天内维持肝功能稳定性

为了检测3D肝细胞微球维持培养的过程中维持细胞活性和肝功能的稳定性,在连续培养的5天内对肝功能指标进行检测。如图6结果所示,在5天

维持培养的过程中,各种酶分泌水平始终维持在较为稳定的状态,细胞微球中细胞可维持较好活性和稳定的肝功能,细胞增殖、分化和凋亡之间维持平衡,证明肝细胞微球可以在至少5天内维持生理性稳态。



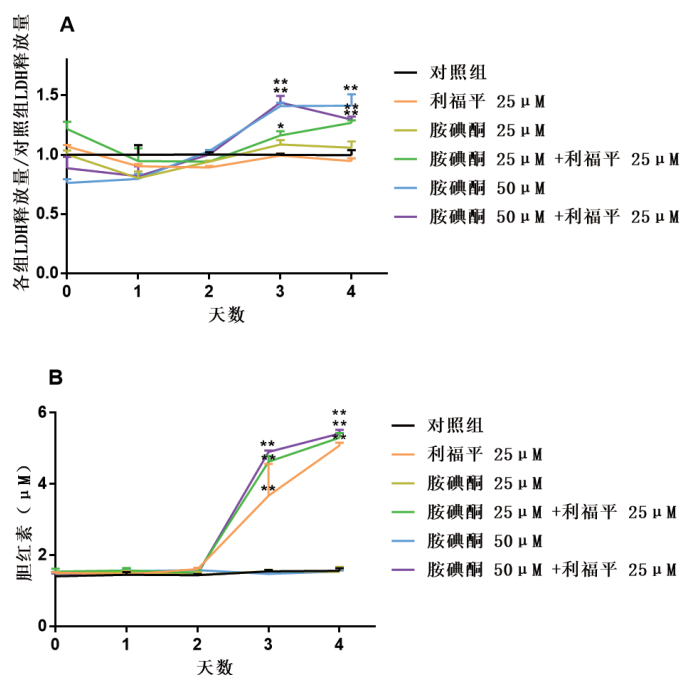
连续5天内每天各生化指标用平均值表示 (n=3)。

图6 肝细胞微球模型连续5天内肝功能指标维持稳定

2.6 肝细胞微球模型评价盐酸胺碘酮联用肝药酶诱导剂利福平的重复给药肝毒性

如图7-A结果所示,溶剂对照组、利福平组和胺碘酮低剂量组在重复给药4天内LDH释放量未见显著差异;从给药第三天开始,胺碘酮高剂量组的LDH释放量与对照组相比显著升高($P < 0.01$),联用利福平对胺碘酮低、高剂量组的LDH的释放均产生明显协同作用(与对照组相比, $P < 0.05$ 和

$P < 0.01$),至给药第四天胺碘酮高剂量联用利福平组的LDH释放量则有所降低。其余肝毒性生化指标中,仅TBIL可见给药相关明显变化(图7-B),从给药第三天起,利福平组,利福平联用胺碘酮低、高剂量组的TBIL与对照组相比显著升高($P < 0.01$),且胺碘酮和利福平联用对TBIL升高产生一定程度协同作用。其他肝功能指标未见给药相关的显著性改变。



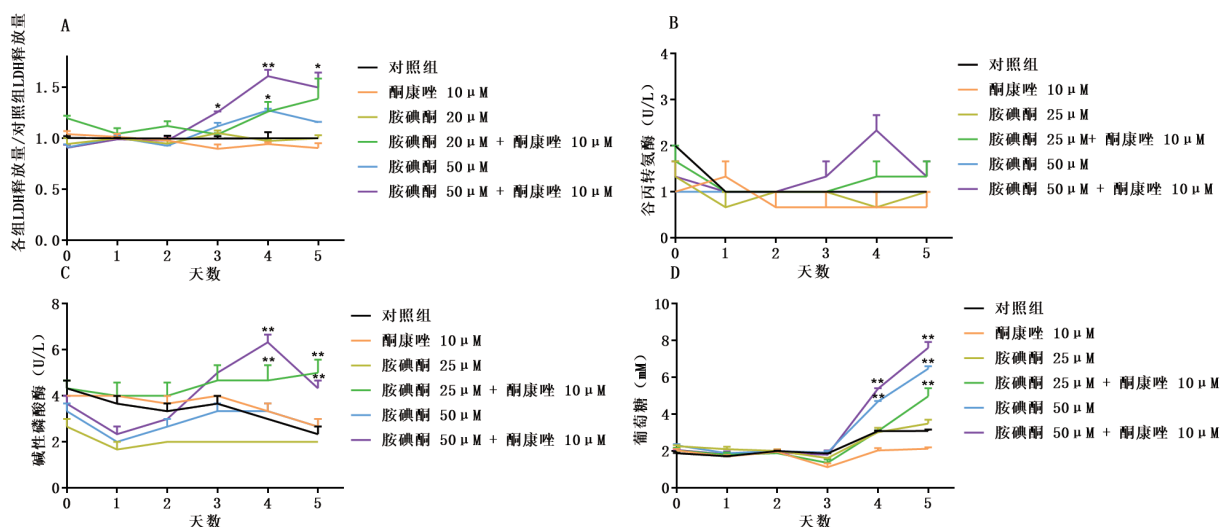
A. 各组 LDH 释放量 / 对照组 LDH 释放量; B. 胆红素分泌量 ($n=3$, 与对照组相比, $*P < 0.05$; $**P < 0.01$)。

图7 连续4天给予3D肝细胞微球不同剂量的胺碘酮及联用利福平

2.7 肝细胞微球模型评价盐酸胺碘酮联用肝药酶抑制剂酮康唑的重复给药肝毒性

如图8-A结果所示,溶剂对照组、酮康唑组和胺碘酮低剂量组在重复给药5天内LDH释放量未见显著差异;从给药第三天开始,胺碘酮高剂量组的LDH释放量升高,第四天达最高点(与对照组相比, $P < 0.05$),直至给药第五天LDH释放量又降低;从给药第三天开始,联用酮康唑对胺碘酮高剂量组的LDH的释放产生明显协同作用(与对照组相比, $P < 0.05$),第四天LDH达最高点($P < 0.01$),直至第五天LDH释放量又下降,而胺碘酮低剂量组联用酮康唑从第四天开始LDH释放量显著升高($P < 0.05$)持续至第五天。肝毒性生化指标中,胺碘酮重复给药5天中ALT水平(图

8-B)未见变化,而联用酮康唑使胺碘酮低、高剂量组ALT水平分别从第二、第三天呈剂量依赖性升高;此外,联用酮康唑还使胺碘酮低、高剂量组ALP水平(图8-C)从第三天呈剂量依赖性地显著升高($P < 0.01$);细胞未出现明显损伤时,每日更换培养基中GLU补充量与细胞对GLU摄取量在一定范围内维持平衡,细胞明显损伤或死亡时GLU消耗量减少。图8-D结果可见高剂量组胺碘酮重复给药第四天出现细胞GLU消耗量显著下降($P < 0.01$),提示出现明显细胞毒性;同时,联用酮康唑使低、高剂量组胺碘酮GLU消耗量呈剂量依赖性显著下降($P < 0.01$),即对胺碘酮的肝细胞毒性产生协同作用。其他肝功能指标未见给药相关的显著性改变。



A. 各组 LDH 释放量 / 对照组 LDH 释放量; B. 谷丙转氨酶分泌量; C. 碱性磷酸酶分泌量; D. 葡萄糖分泌量 (n=3, 与对照组相比, *P < 0.05; **P < 0.01)。

图8 连续5天给予3D肝细胞微球不同剂量的胺碘酮及联用酮康唑

3 讨论

迄今, 国内外已有一定数量关于3D肝细胞微球模型构建及验证的文献报道, 各实验室验证模型是否构建成功的指标主要分为以下几个关键部分: (1) 体外模型短期内 (7~28天) 持续培养是否能够维持细胞活性、代谢及肝功能: 通过检测 LDH、GLU、乳酸、ALT、AST、TBIL、ALB 等指标, 验证模型是否能在培养期间内快速达到代谢内稳态, 保持肝细胞功能相对稳定, 以佐证重复给药时相关指标的变化为给药相关, 表明3D模型更适合重复给药毒性的评价或早期肝毒性标志物的筛选研究。(2) 肝脏特异性药物代谢酶和转运体的表达 (组织形态学、mRNA水平或蛋白水平): 人肝CYP450酶参与了约80%上市药物的代谢过程, 构建体外的肝代谢系统对于研究药物代谢及毒性十分重要。研究表明, 在体外人肝细胞模型中, 人原代肝细胞和HepaRG细胞都能够表达多种肝药酶 (如CYP3A4、2C9等) 和转运体 (如MRP-2、P-gp等), 且表达量高于HepG2、L0-2等永生化细胞系^[8], 更适用于肝毒性药物筛选、药物代谢研究及肝毒性标志物的筛选。(3) 胆管样结构的形成或胆汁排泄功能的检测: 肝脏对药物代谢的第二大重要功能是将药物从胆汁排泄, 因此模拟肝脏的胆汁排泄功能对于肝毒性研究十分重要, 可通过某些可被胆管上表达的胆汁排泄相关转运体的底物 (如

本研究所采用的CDFDA) 或胆汁酸类似物^[9]来验证体外胆汁排泄功能的构建, 也可通过检测胆汁排泄相关转运体 [如胆盐输出泵 (BSEP)] 的 mRNA 或蛋白水平的表达来验证体外胆管样结构构建成功^[10]。(4) 其他肝非实质细胞功能: 如肝窦内皮细胞、kuppfer细胞或巨噬细胞的吞噬或清除功能, 在炎症反应时会被激活; 肝星状细胞在肝纤维化过程中增多。构建3D肝细胞微球时加入肝非实质细胞, 不同细胞间相互接触有利于各种肝细胞结构的极化、肝脏微环境的重构和肝功能特征的表达, 有利于肝毒性的研究和肝脏毒性标志物的筛选。可通过检测肝非实质细胞的特异性蛋白表达来表征模型构建是否成功^[11]。

本研究采用诱导分化的人源HepaRG细胞和HHStc细胞在3D培养条件下混合培养, 3D培养环境增强了细胞之间的联系, 更接近人体内细胞生长真实的微环境, 并且能更长时间维持肝细胞活性和肝功能, 满足药物代谢和毒性筛选的需求。HepaRG细胞具有干性潜能, 可诱导分化为不同形态和功能的肝细胞^[12], 本研究中利用氢化可的松琥珀酸酯、人胰岛素和DMSO诱导HepaRG细胞可获得具有胆管结构功能的肝细胞样细胞和上皮样细胞。诱导分化的HepaRG细胞和HHStc细胞在3D培养条件下混合培养, 高表达肝药酶、转运体和肝细胞特异性蛋白, 远高于普通2D培养的单一肝细胞

模型^[13],对肝毒性筛选更敏感和特异,对于提高药物肝毒性评价的可靠性和准确性具有一定的优势。证明模型的细胞功能相对稳定平衡。肝细胞微球的直径大小约700~800 μm ,试验周期内球体中心没有出现坏死核,对肝细胞微球模型的细胞毒性和肝功能指标连续5天进行监测,结果表明细胞微球在试验周期内能够维持一定的细胞活力和肝功能以及生理稳态平衡。

临床抗心律失常药物盐酸胺碘酮可能诱发急、慢性肝损伤,主要经过CYP3A4代谢,也是酶的抑制剂,从而导致药物-药物间相互作用,影响联合用药的疗效,增加了毒性风险^[14]。此外,其主要代谢产物去乙基胺碘酮(N-desethylamiodarone Hydrochloride, DEA)也具有肝毒性,且毒性高于AMI^[15]。本研究结果显示,连续给药第三天才出现明显肝细胞毒性,且剂量明显低于其他报道中AMI在体外模型的毒性剂量(3D悬滴培养模型 IC_{50} 为 $100\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$;2D培养模型 IC_{50} 为 $50\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)^[16],原因可能是构建的细胞微球模拟体内生长结构,不同于2D模型中药物对细胞的直接作用;且每组40个肝细胞微球的细胞总数约为106,相当于人体肝脏细胞数量的十万分之一^[10],根据当量计算得出,本研究采用的AMI低剂量 $25\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 相当于人体剂量 $300\ \text{mg}\cdot\text{day}^{-1}$,为临床使用的AMI维持剂量^[17],本模型得到的毒性剂量与临床报道相近。在一项构建小鼠AMI诱发的肝毒性模型的研究中,由于人体内负责AMI代谢的肝药酶主要为CYP3A4,而因种属差异性导致小鼠体内表达的最接近人CYP3A的同源性肝药酶为Cyp3a11,因此研究人员在选择Cyp3a11诱导剂或非选择性Cyp3a抑制剂后,才出现小鼠血清ALT显著升高,提示产生明显肝毒性^[18]。在本研究中,肝细胞微球模型单独给予CYP3A4诱导剂利福平或抑制剂酮康唑对肝毒性指标没有显著变化的情况下,与胺碘酮联用后呈现显著协同毒性作用,且具有明显剂量依赖性,说明给予的利福平或酮康唑剂量为肝药酶诱导或抑制剂量而非各自的肝毒性剂量,由于3D肝细胞微球模型高表达人肝药酶和转运体,如CYP3A4和MRP-2,克服了动物试验的种属差异,可部分重现药物的肝代谢转化过程,并能展现更为精细的剂量-毒性差异,因此对于毒性评价更具有优势。

此外,其他肝毒性生物标志物,如TBIL、ALT、ALP和GLU,也在重复给药第三天出现了给药相关显著变化,且呈现出时间依赖性和剂量正相关性,与细胞毒性指标LDH具有较好的一致性,提示这些肝功能指标可作为潜在肝毒性标志物,在3D细胞模型的毒性评价中具有应用价值。对于药物毒性早期筛选,体外肝毒性模型结果的灵敏度、特异度和准确度的提高离不开肝毒性标志物的研究与应用,在已有研究报道中,AST、LDH、MDH和miR-122等都可作为体外模型评价药物肝损伤的潜在生物标志物^[19-20],更多灵敏和特异性的肝毒性标志物的筛选仍需进一步的研究和验证。

参考文献:

- [1] Tabernilla A, Dos SRB, Pieters A, et al. In Vitro Liver Toxicity Testing of Chemicals: A Pragmatic Approach[J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(9): 5038.
- [2] Gunawan B, Kaplowitz N. Clinical Perspectives on Xenobiotic-induced Hepatotoxicity[J]. *Drug Metab Rev*, 2004, 36(2): 301-312.
- [3] Soldatow VY, Lecluyse EL, Griffith LG, et al. In Vitro Models for Liver Toxicity Testing[J]. *Toxicol Res (Camb)*, 2013, 2(1): 23-39.
- [4] Khetani SR, Berger DR, Ballinger KR, et al. Microengineered Liver Tissues for Drug Testing[J]. *J Lab Autom*, 2015, 20(3): 216-250.
- [5] Chen CC, Wu CC. Acute Hepatotoxicity of Intravenous Amiodarone: Case Report and Review of the Literature[J]. *Am J Ther*, 2016, 23(1): e260-e263.
- [6] 苏勤,付勇,张伟,等.细胞角蛋白7和19在肝细胞癌细胞系中的异常表达及其机制[J].*细胞与分子免疫学杂志*, 2001(1): 58-59.
- [7] Scoazec JY, Bringuier AF, Medina JF, et al. The Plasma Membrane Polarity of Human Biliary Epithelial Cells: In Situ Immunohistochemical Analysis and Functional Implications[J]. *J Hepatol*, 1997, 26(3): 543-553.
- [8] Shin DS, Seo H, Yang JY, et al. Quantitative Evaluation of Cytochrome P450 3A4 Inhibition and Hepatotoxicity in HepaRG 3-D Spheroids[J]. *Int J Toxicol*, 2018, 37(5): 393-403.
- [9] Ramaiahgari SC, den Braver MW, Hershers B, et al. A 3D In Vitro Model of Differentiated HepG2 Cell Spheroids with

- Improved Liver-like Properties for Repeated Dose High-Throughput Toxicity Studies[J]. *Arch Toxicol*, 2014, 88 (5): 1083-1095.
- [10] Lin N, Zhou X, Geng X, et al. Repeated Dose Multi-Drug Testing Using a Microfluidic Chip-based Coculture of Human Liver and Kidney Proximal Tubules Equivalents[J]. *Sci Rep*, 2020, 10 (1): 8879.
- [11] Rennert K, Steinborn S, Groger M, et al. A Microfluidically Perfused Three-Dimensional Human Liver Model[J]. *Biomaterials*, 2015, 71: 119-131.
- [12] Guillouzo A, Corlu A, Aninat C, et al. The Human Hepatoma HepaRG Cells: A Highly Differentiated Model for Studies of Liver Metabolism and Toxicity of Xenobiotics[J]. *Chem Biol Interact*, 2007, 168 (1): 66-73.
- [13] Shin DS, Seo H, Yang JY, et al. Quantitative Evaluation of Cytochrome P450 3A4 Inhibition and Hepatotoxicity in HepaRG 3-D Spheroids[J]. *Int J Toxicol*, 2018, 37 (5): 393-403.
- [14] 孙云川, 王家伟, 杨毅, 等. 盐酸胺碘酮注射液短期致4例急性肝损害的临床分析[J]. *临床药物治疗杂志*, 2012, 10 (4): 60-62.
- [15] Takai S, Oda S, Tsuneyama K, et al. Establishment of a Mouse Model for Amiodarone-Induced Liver Injury and Analyses of Its Hepatotoxic Mechanism[J]. *J Appl Toxicol*, 2016, 36 (1): 35-47.
- [16] 卢贤欢, 赵华琛, 王雪, 等. 体外肝脏3D模型在药物肝毒性评价中的优势[J]. *药学学报*, 2017, 52 (12): 1859-1864.
- [17] Sloskey GE. Amiodarone: A Unique Antiarrhythmic Agent[J]. *Clin Pharm*, 1983, 2 (4): 330-340.
- [18] Takai S, Oda S, Tsuneyama K, et al. Establishment of a Mouse Model for Amiodarone-induced Liver Injury and Analyses of Its Hepatotoxic Mechanism[J]. *J Appl Toxicol*, 2016, 36 (1): 35-47.
- [19] Wu Y, Geng XC, Wang JF, et al. The HepaRG Cell Line, a Superior In Vitro Model to L-02, HepG2 and HiHeps Cell Lines for Assessing Drug-Induced Liver Injury[J]. *Cell Biol Toxicol*, 2016, 32 (1): 37-59.
- [20] McGill MR, Jaeschke H. Biomarkers of Drug-Induced Liver Injury[J]. *Adv Pharmacol*, 2019, 85: 221-239.

(收稿日期 2022年4月8日 编辑 王雅雯)