

构建肠-肝体外模型用于模拟对乙酰氨基酚口服后的吸收过程和肝脏毒性

牛茜怡^{1,2#}, 俞月^{2,3#}, 林钊^{2,4}, 赵曼曼², 梁宁^{1*}, 周晓冰^{2*}

1. 沈阳药科大学, 辽宁 沈阳 110000

2. 中国食品药品检定研究院安全评价研究所, 北京 100176

3. 中国医学科学院北京协和医学院, 北京 100730

4. 中国药科大学 多靶标天然药物全国重点实验室, 江苏 南京 211198

摘要: **目的** 建立并初步测试肠-肝体外模型, 模拟对乙酰氨基酚 (APAP) 口服后的吸收过程和肝脏毒性。 **方法** 使用人结肠癌细胞系 Caco-2 和 HT29-MTX-E12 在 Transwell 中构建肠道模型, 检测单位面积跨膜电阻 (TEER); 苏木精-伊红 (HE) 染色和阿尔辛蓝 (AB)-过碘酸希夫 (PAS) 染色观察肠道结构; 免疫荧光检测紧密连接相关蛋白 (Occludin) 和闭锁小带蛋白-1 (ZO-1)、转运体多药耐药蛋白 1 (MDR1) 和多药耐药相关蛋白 2 (MRP2)、黏蛋白 2 (MUC2), 验证模型的完整性和转运蛋白表达。将肠道模型与人肝癌细胞系 HepG2 共同培养建立肠-肝模型, 连续培养 9 d, 期间每天测定 TEER; 试剂盒法测定单肝模型 (单独培养 HepG2 细胞)、肠道模型和肠-肝模型总腺嘌呤核苷三磷酸 (ATP) 和乳酸脱氢酶 (LDH)、天冬氨酸氨基转移酶 (AST)、丙氨酸氨基转移酶 (ALT)、白蛋白 (ALB) 分泌水平。CCK-8 法检测 APAP 对 Caco-2 和 HepG2 细胞的毒性。在肠-肝模型中模拟口服 APAP 产生的肝脏毒性, 共培养的第 2 天将肠-肝模型分为 3 组: 对照组给予不含药培养基; 肠道吸收组从肠室给予 $12 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ APAP, 肝室给予空白培养基, 药物平衡后预期终浓度为 $3 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$; APAP 组分别从肠室和肝室给予 $3 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ APAP, 高效液相色谱法测定肝室药物浓度; 在给药 48 h 后测定 TEER 并使用 Cell Titer Glo 试剂盒测定细胞活力; 试剂盒法检测 AST、ALT 和 ALB 分泌水平; 对模型肝室进行活性氧 (ROS) 和线粒体膜电位 (MMP) 染色。 **结果** 建立的肠道模型在第 14 天时屏障结构完整, Occludin 和 ZO-1 呈现网状结构分布, 转运蛋白 MDR1 和 MRP2 分布于单侧; 第 21 天仍含有分泌黏蛋白的 HT29-MTX-E12 细胞。肠-肝静态模型中, 肠道细胞的数量稳定, 肝脏细胞的数量不断增长, 在共培养前 5 d 肝脏功能和细胞活力维持情况良好, 适用于毒性测试。CCK-8 结果显示, APAP 对 HepG2 细胞的毒性强于 Caco-2 细胞, 选取 $3 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 作为 APAP 测试的终浓度。APAP 作用 48 h 后, 肠道吸收组肠道细胞活力和 TEER 均无显著下降趋势, 药物在肝室的浓度呈缓慢上升, 在 48 h 时达到最大浓度 (2.90 ± 0.05) $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$; 与对照组比较, 肠道吸收组和 APAP 组细胞存活率均显著下降 ($P < 0.01$), APAP 引起肝脏毒性标志物 AST、ALT 和 ROS 信号的升高, 造成肝脏功能标志物 ALB 和 MMP 的降低; 与 APAP 组相比, 肠道吸收组细胞存活率略有升高, 标志物改变程度略低。 **结论** 构建的肠-肝体外模型能够实现药物肝毒性测试, 肠道模型的存在通过影响药物暴露降低 APAP 诱导的肝脏毒性。

关键词: 肠-肝模型; 对乙酰氨基酚; 肝毒性测试; 药物暴露; 人结肠癌细胞系 Caco-2

中图分类号: R965 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376(2026)01-0059-10

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2026.01.006

Establishment of gut-liver *in vitro* models to simulate absorption process and hepatotoxic effects of acetaminophen

NIU Qianyi^{1,2}, YU Yue^{2,3}, LIN Tian^{2,4}, ZHAO Manman², LIANG Ning¹, ZHOU Xiaobing²

1. Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110000, China

2. National Center for Safety Evaluation of Drugs, National Institutes for Food and Drug Control, Beijing 100176, China

3. Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100730, China

4. State Key Laboratory of Natural Medicines, China Pharmaceutical University, Nanjing 211198, China

收稿日期: 2025-09-11

基金项目: 国家“十四五”重点专项 (2022YFF0711100); 国家重点实验室项目 (2023SKLDRS0129); 北京市科技计划项目 (Z231100007223001)

作者简介: 牛茜怡, 硕士, 研究方向为药物安全性评价。E-mail: 2779092464@qq.com

#共同第一作者: 俞月, 博士, 研究方向为药物安全性评价。E-mail: y1935222y@qq.com

*通信作者: 梁宁, 女, 副教授, 研究方向为环境污染物分析。E-mail: liangning@syphu.edu.cn

周晓冰, 女, 研究员, 研究方向为药物安全性评价。E-mail: zhxb@nifdc.org.cn

Abstract: Objectives To establish a static gut-liver *in vitro* model to simulate the absorption process and hepatotoxic effects after administration of acetaminophen (APAP). **Methods** Human colon cancer cell lines Caco-2 and HT29-MTX-E12 were used to construct an intestinal model in Transwell, and the transepithelial electrical resistance (TEER) per unit area was measured. Hematoxylin-eosin (HE) staining and alcian blue (AB)-periodic acid-Schiff (PAS) staining were used to observe the intestinal structure. Immunofluorescence was used to detect tight junction proteins Occludin and zonula occludens-1 (ZO-1), transporters multidrug resistance protein 1 (MDR1) and multidrug resistance-associated protein 2 (MRP2), and mucin 2 (MUC2) to verify the integrity of the model and the expression of transport proteins. The intestinal model was co-cultured with human hepatoma cell line HepG2 to establish an intestinal-liver model, which was continuously cultured for 9 d. TEER was measured daily during the culture period. The levels of total adenosine triphosphate (ATP), lactate dehydrogenase (LDH), aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT), and albumin (ALB) secreted by the single liver model (cultured HepG2 cells alone), intestinal model, and intestinal-liver model were determined by kits. The cytotoxicity of APAP to Caco-2 and HepG2 cells was detected by CCK-8 assay. The liver toxicity caused by oral APAP was simulated in the intestinal-liver model. On the second day of co-culture, the intestinal-liver model was divided into three groups: the control group was given drug-free medium; the intestinal absorption group was given 12 mmol·L⁻¹ APAP from the intestinal chamber and blank medium from the liver chamber, with an expected final concentration of 3 mmol·L⁻¹ in the liver chamber after drug equilibration; the APAP group was given 3 mmol·L⁻¹ APAP from both the intestinal and liver chambers. The drug concentration in the liver chamber was determined by high-performance liquid chromatography. TEER was measured and cell viability was determined using the Cell Titer Glo kit 48 h after drug administration. AST, ALT, and ALB secretion levels were detected by kits. Reactive oxygen species (ROS) and mitochondrial membrane potential (MMP) staining were performed on the liver chamber of the model. **Results** The established intestinal model had an intact barrier structure on the 14th day, with Occludin and ZO-1 presenting a reticular distribution, and MDR1 and MRP2 distributed on one side. HT29-MTX-E12 cells secreting mucin were still present on the 21st day. In the static intestinal-liver model, the number of intestinal cells was stable, and the number of liver cells continued to increase. The liver function and cell viability were maintained well in the first 5 days of co-culture, making it suitable for toxicity testing. The CCK-8 results showed that APAP was more toxic to HepG2 cells than Caco-2 cells, and 3 mmol·L⁻¹ was selected as the final concentration for APAP testing. After 48 h of APAP treatment, there was no significant decrease in cell viability and TEER in the intestinal absorption group, and the drug concentration in the liver chamber increased slowly, reaching the maximum concentration of (2.90 ± 0.05) mmol·L⁻¹ at 48 h. Compared with the control group, the cell survival rates in the intestinal absorption group and the APAP group were significantly decreased ($P < 0.01$), and APAP caused an increase in liver toxicity markers AST, ALT, and ROS signals, and a decrease in liver function markers ALB and MMP. Compared with the APAP group, the cell survival rate in the intestinal absorption group was slightly increased, and the degree of marker changes was slightly lower. **Conclusion** The intestinal-liver *in vitro* model can be used for drug hepatotoxicity testing, and the presence of the intestinal model reduces the liver toxicity induced by APAP by affecting drug exposure.

Key words: gut-liver model; acetaminophen; hepatotoxic assessment; drug exposure; Human colon cancer cell line Caco-2

口服给药是一种简单无创的药物递送方式,也是目前最常用的给药方式^[1]。口服药物经过肠道吸收进入系统循环,在肝脏代谢后进入体循环,药物的吸收影响药物的体内暴露,而药物的体内暴露又影响药物的药效/毒性强度^[2]。肝脏处于循环系统的门户位置,是处理外源物质的主要场所,也是药物毒性的主要靶器官^[3]。药物性肝损伤作为药物研发失败和药品撤市的主要原因^[4-5],受到药物本身的作用和药物暴露的影响,研究者可以通过描述药物的全身暴露及其与毒性研究剂量、时间的关系从而研究暴露量、毒性和临床安全性之间的相关性^[6]。为了达到这一目的,本研究首先基于人结肠癌细胞系 Caco-2 和 HT29-MTX-E12 细胞系建立肠道模型,然后将肠道模型与

HepG2 细胞共培养,建立一种简单可重复的肝毒性测试肠-肝双器官体外模型,并在模型中检测了对乙酰氨基酚(APAP)的肝毒性影响及药物吸收情况。

1 材料

1.1 仪器

超净工作台(青岛海尔生物医疗股份有限公司); Countess™ 自动细胞计数仪(美国 Thermo Fisher Scientific 公司); 细胞二氧化碳培养箱(美国 Thermo Fisher Scientific 公司); Operetta CLS™ 高内涵成像分析系统(美国 PerkinElmer 公司); LC-2040C 3D HPLC(岛津公司)。

1.2 细胞

人结肠癌细胞系 Caco-2 和人肝癌细胞系

HepG2 由中国科学院干细胞库提供; 人结肠癌细胞系 HT29-MTX-E12 购买自上海瑾原生物科技有限公司。

1.3 主要试剂

胎牛血清 (Gibco 公司, 货号 10091148); Transwell 小室 (康宁公司, 面积 0.33 cm^2); DMEM (VivaCell 公司, 货号 C3113-0500); 三抗 (Solarbio 公司, 货号 P7630); APAP 对照品 (中国食品药品检定研究院, 相对分子质量 151.165, 批号 100018-202111); 腺嘌呤核苷三磷酸(ATP)试剂盒(Promega 公司); 乳酸脱氢酶 (LDH)、天冬氨酸氨基转移酶 (AST)、丙氨酸氨基转移酶 (ALT) 试剂盒 (南京建成生物工程研究所有限公司); 活性氧 (ROS) 检测试剂 (CellROX) 和线粒体膜电位 (MMP) 检测试剂 (TMRE) (上海碧云天生物技术有限公司); 白蛋白 (ALB) 试剂盒 (Abcam 公司)。使用抗体包括: Anti-闭合蛋白 (Occludin) (CST 公司, 货号 E6B4R, 1 : 400); Anti-闭锁小带蛋白-1 (ZO-1) (Santa Cruz 公司, 货号 sc-33725, 1 : 200); Anti-多药耐药蛋白 1 (MDR1) (CST 公司, 货号 E1Y7B, 1 : 800); Anti-多药耐药相关蛋白 2 (MRP2) (Abcam 公司, 货号 ab172630, 1 : 100); Anti-黏蛋白 2 (MUC2) (ThermoFisher 公司, 货号 MA5-32654, 1 : 500); 羊抗兔二抗 (Abcam 公司, 货号 ab150077, 1 : 1000); 羊抗大鼠二抗 (CST 公司, 货号 4417, 1 : 1000); 羊抗兔二抗 (Abcam 公司, 货号 ab150078, 1 : 1000); 羊抗小鼠二抗 (Abcam 公司, 货号 ab150113, 1 : 1000)。

2 方法

2.1 Caco-2 和 HT29-MTX-E12 细胞肠道模型的建立

以 1.67×10^5 个 $\cdot\text{cm}^{-2}$ 接种 Caco-2 细胞或与 HT29-MTX-E12 细胞共培养 (Caco-2+HT29-MTX-E12, 比例 9 : 1) 至 Transwell 小室, 连续培养 21 d。使用完全培养基进行培养, 前 7 d 隔天换液, 之后每天换液。培养时需要向顶端侧 (AP) 加入 $100\text{ }\mu\text{L}$ 培养基, 基底侧 (BL) 加入 $600\text{ }\mu\text{L}$ 培养基。模型在 21 d 内监测电阻值, 将电阻仪中的电极于 75% 酒精中浸泡 10 min, 后使用磷酸盐缓冲溶液 (PBS) 冲洗, 将 Transwell 转移至新的 24 孔板中, 于顶端侧和基底侧加入适量 PBS, 将电极插入顶端侧和基底侧, 读取电阻仪读数。当培养期间模型单位面积跨膜电阻 (TEER) 高于 $300\text{ }\Omega\cdot\text{cm}^2$ 即认为模型构建成功, 可用于后续实验。电阻值计算方式为使用含

细胞的培养板测出的电阻减去不含细胞的空白电阻得到实际组织电阻 (Ω), 乘以有效表面积, 得到 TEER ($\Omega\cdot\text{cm}^2$)。

2.2 苏木精-伊红 (HE) 染色和阿尔辛蓝 (AB) -过碘酸希夫 (PAS) 染色观察肠道结构

肠道模型用 PBS 润洗 2 次, 小心将膜取下。膜用 4% 多聚甲醛固定 1 h, 按照程序进行脱水和石蜡包埋。第 14 天的模型切片进行 HE 染色观察切面的细胞连接情况, 第 21 天的模型切片进行 AB-PAS 染色观察黏蛋白的分泌情况。

2.3 免疫荧光检测肠道紧密连接、转运体及黏蛋白 MUC2

对模型生长至第 14 天的紧密连接蛋白 Occludin、ZO-1 及转运体 MDR1 和 MRP2, 模型生长至第 21 天的 MUC2 进行检测。小心取出膜结构, 使用 OCT 进行包埋, 切片, 厚度为 $8\text{ }\mu\text{m}$ 。PBS 清洗 3 次, 多聚甲醛固定 30 min, PBS 清洗 3 次, 山羊血清封闭 1 h, $4\text{ }^\circ\text{C}$ 一抗孵育过夜。第 2 天将玻片使用 PBS 清洗 3 次, 孵育二抗 30 min, PBS 清洗 3 次, 加入含 DAPI 的荧光抗淬灭封片液。荧光显微镜下观察各个视野。

2.4 肠-肝模型的建立

在肠道模型构建第 12 天, 向空白 24 孔板中加入 2×10^4 个 HepG2 细胞, 静置 2 d 后, 与 Transwell 中构建的肠道模型进行共培养, 作为肠-肝模型。余 3 孔不和 HepG2 细胞共培养作为肠道模型, 余 3 孔仅培养 HepG2 细胞作为单肝模型。培养基为含 2% FBS 的完全培养基, 每天换液, 连续培养 9 d, 期间每天测定 TEER。于肠-肝模型建立第 5、6、7、8 和 9 天 (肠道模型构建后 17、18、19、20、21 d), 试剂盒法分别测定单肝和肠-肝模型肝室、肠道和肠-肝模型肠室的总 ATP; 试剂盒法检测 17、18、19、20、21 d 肠道、单肝和肠-肝模型肝室上清液中 LDH 分泌水平; 试剂盒法检测 17、18、19、20、21 d 单肝和肠-肝模型肝室 AST 和 ALT 分泌水平; 试剂盒法检测 15、17、19、21 d 单肝和肠-肝模型肝室 ALB 分泌水平。

2.5 CCK-8 法检测 APAP 药物毒性

取对数生长期 Caco-2 和 HepG2 细胞, 分别以每孔 2×10^4 和 1×10^4 个接种于 96 孔板。静置 24 h, 分别给予 33.08、16.54、8.27、4.14、2.07、1.03、0.52、0.26 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ APAP, 对照组不加药, 培养 48 h 后, 弃去药液, 根据 CCK-8 说明书操作, 计算细胞抑制

率及半数抑制浓度 (IC_{50})。

2.6 肠-肝模型 APAP 肝脏毒性测试

按照“2.5”项下方法建立肠-肝模型,在共培养后的第 2 天将 18 个模型分为 3 组。对照组给予不含药培养基;肠道吸收组从肠室给予 $12\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ APAP $200\text{ }\mu\text{L}$,肝室给予空白培养基 $600\text{ }\mu\text{L}$,药物平衡后预期终浓度为 $3\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$;APAP ($3\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$) 组模拟口服给药终点时的药物浓度,分别从肠室和肝室给予 $3\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ APAP。每组选择 3 个样本于 1、2、4、8、24、32、48 h 收集肝室药液 $10\text{ }\mu\text{L}$,参考文献方法^[7]使用高效液相色谱仪测定肝室药物浓度;在给药 48 h 后测定 TEER 并使用 Cell Titer Glo 试剂盒测定细胞活力。每组另外 3 个样本在给药 48 h 收集上清,使用试剂盒检测 AST、ALT 和 ALB 水平,对模型肝室进行 CellROX 和 TMRE 染色,将 CellROX 试剂和 TMRE 试剂使用缓冲液稀释成 $1\times$ 工作溶液加入肝室中,孵育 30 min 后,使用高内涵成像分析仪检测荧光分布。

药物浓度检测方法^[7]:用 LC-2040C 3D HPLC (SHIMADZU) 测定 APAP 的浓度。每 $10\text{ }\mu\text{L}$ 的样品加入 $30\text{ }\mu\text{L}$ 甲醇沉淀蛋白, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $13\text{ }000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 15 min,使用甲醇稀释 20 倍后滤过即得供试品溶液。色谱柱为 InertSustain C_{18} ($150\text{ mm}\times 4.6\text{ mm}$, $5\text{ }\mu\text{m}$, SHIMADZU),检测条件如下:流动相为乙醇 (A)-蒸馏水 (B),体积流量 $0.8\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ 。梯度洗脱条件为 5% A ($0\sim 4\text{ min}$), 5% \rightarrow 100% A ($4\sim 10\text{ min}$), 100% A \rightarrow 5% A ($10\sim 15\text{ min}$)。进样量为 $10\text{ }\mu\text{L}$,采用二极管阵列 (PDA) 检测器 (波长为 280 nm) 进行检测,使用标准曲线计算 APAP 的浓度。

2.7 统计分析

数据以 $\bar{x}\pm s$ 的形式表现,多组间比较采用单因素方差分析,事后比较方法为 Bonferroni 法,分析软件为 SPSS 25.0。

3 结果

3.1 共培养肠道模型屏障完整性检测

TEER 可反映肠道屏障紧密连接的完整程度,因此测定了第 3、6、9、12、15、18、21 天的 TEER 值 (图 1)。模型在第 12 天前 TEER 值缓慢增长,并在第 12 天时超过 $300\text{ }\Omega\cdot\text{cm}^2$,说明在第 12 天时已经产生了较为完整的肠膜屏障结构。TEER 在第 12 至 21 天时电阻值保持在 $300\text{ }\Omega\cdot\text{cm}^2$ 以上,并基本保持稳定,满足药物转运实验要求,可用于后续实验。

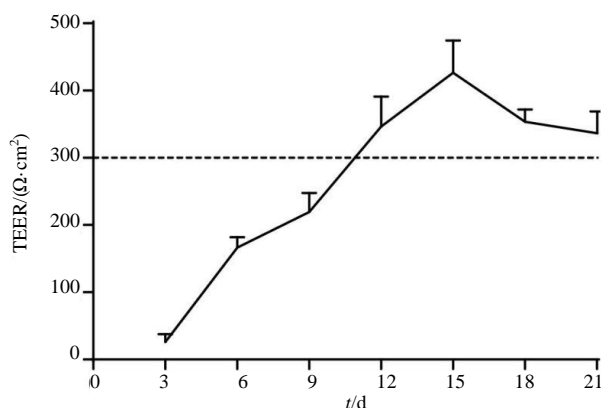
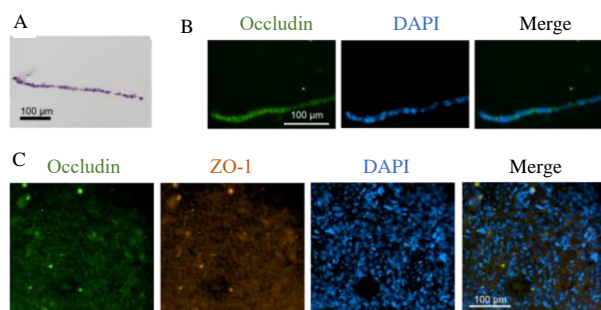


图 1 共培养肠道模型 TEER 变化 ($\bar{x}\pm s$, $n=6$)

Fig. 1 TEER changes in co-cultured intestinal model ($\bar{x}\pm s$, $n=6$)

3.2 共培养肠道模型紧密连接蛋白表达

在模型培养第 14 天,对肠道屏障结构及紧密连接蛋白表达进行检测。HE 染色结果显示 (图 2-A),共培养肠道模型屏障结构完整。对于紧密连接蛋白 Occludin,在第 14 天即可检测到蛋白分布于细胞核的四周,说明紧密连接形成 (图 2-B)。进一步检测其俯视面结构,紧密连接相关蛋白 Occludin 和 ZO-1 呈现网状结构分布 (图 2-C),上述结果说明肠道细胞在第 14 天即可形成紧密连接。结合 TEER 变化趋势,肠道模型在第 14 天时肠上皮屏障结构即完整,此时药物不通过细胞间间隙渗透,而是需要通过肠道细胞吸收进入对侧腔室。



A-HE 染色观察肠道模型纵向切面结构; B-第 14 天免疫荧光技术检测细胞紧密连接相关蛋白 Occludin 的形成; C-第 14 天免疫荧光检测俯视面紧密连接相关蛋白 Occludin 和 ZO-1。

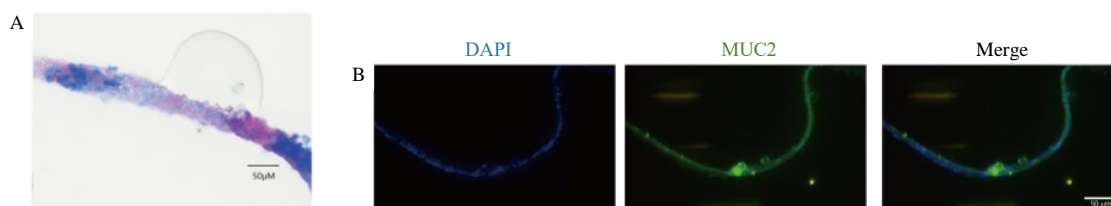
A-HE staining of longitudinal section of the intestinal model; B-Immunofluorescence of tight junction-related protein Occludin on day 14; C-Immunofluorescence of tight junction-associated proteins Occludin and ZO-1 from a top-down perspective on day 14.

图 2 肠屏障结构及紧密连接蛋白表达检测

Fig. 2 Structure of intestinal chamber and expression of tight junction

3.3 共培养肠道模型黏蛋白分布检测

在模型培养第 21 天, 采用 AB-PAS 染色观察黏蛋白分布 (图 3-A), 该肠道部分细胞内可以稳定表达黏蛋白, 而部分细胞不表达黏蛋白。同时检测黏蛋白 MUC2 的分布 (图 3-B), 可检测到较弱的 MUC2 信号, 上述结果说明模型在第 21 天仍含有分泌黏蛋白的 HT29-MTX-E12 细胞。



A-AB-PAS 染色观察黏蛋白分布 ($\times 20$); B-免疫荧光技术检测黏蛋白 MUC2 信号 ($\times 20$).
A-AB-PAS staining of mucin distribution ($\times 20$); B-Immunofluorescence of MUC2 mucin ($\times 20$).

图 3 共培养肠道模型黏蛋白分布

Fig. 3 Mucin distribution in co-cultured intestinal model

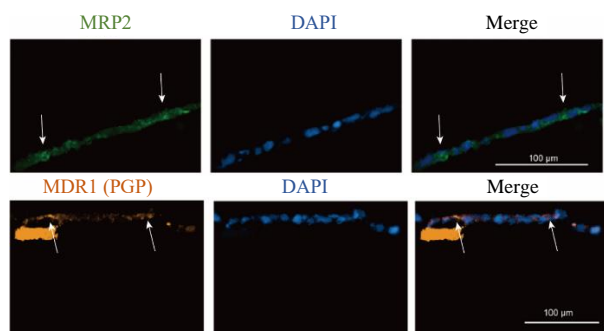


图 4 共培养肠道模型转运蛋白 MDR1 和 MRP2 表达检测

Fig. 4 Expression of transporter MDR1 and MRP2 in co-cultured intestinal model

3.5 肠-肝模型的构建

为测定本模型的稳定时间, 于 Tranwell 模型构建第 12 天, 将肠道模型与肝脏模型共培养 (图 5-A), 连续监测肠道功能变化。TEER 检测结果在 10 d 内可维持在 $300 \Omega \cdot \text{cm}^2$ 以上 (图 5-B), 肠道模型在 10 d 内可维持良好的屏障功能。

然后检测了肠室和肝室细胞的生长情况, 肠道模型和肠室 (图 5-C) 的细胞 ATP 总量未呈现显著变化, 但在单肝和肝室 (图 5-D) 中呈增长趋势, 各检测时间点间比较无统计学差异, 说明模型在培养期间肠道细胞的数量稳定, 肝脏细胞的数量不断增长。然后检测了肝室内细胞损伤及肝脏功能标志物的变化趋势, 结果显示在肠-肝和单肝模型中 LDH、AST、ALT 水平随着培养时间延长呈上升趋势, 各检测时间点间无统计学差异 (图 5-E、F、G),

3.4 共培养肠道模型转运蛋白表达检测

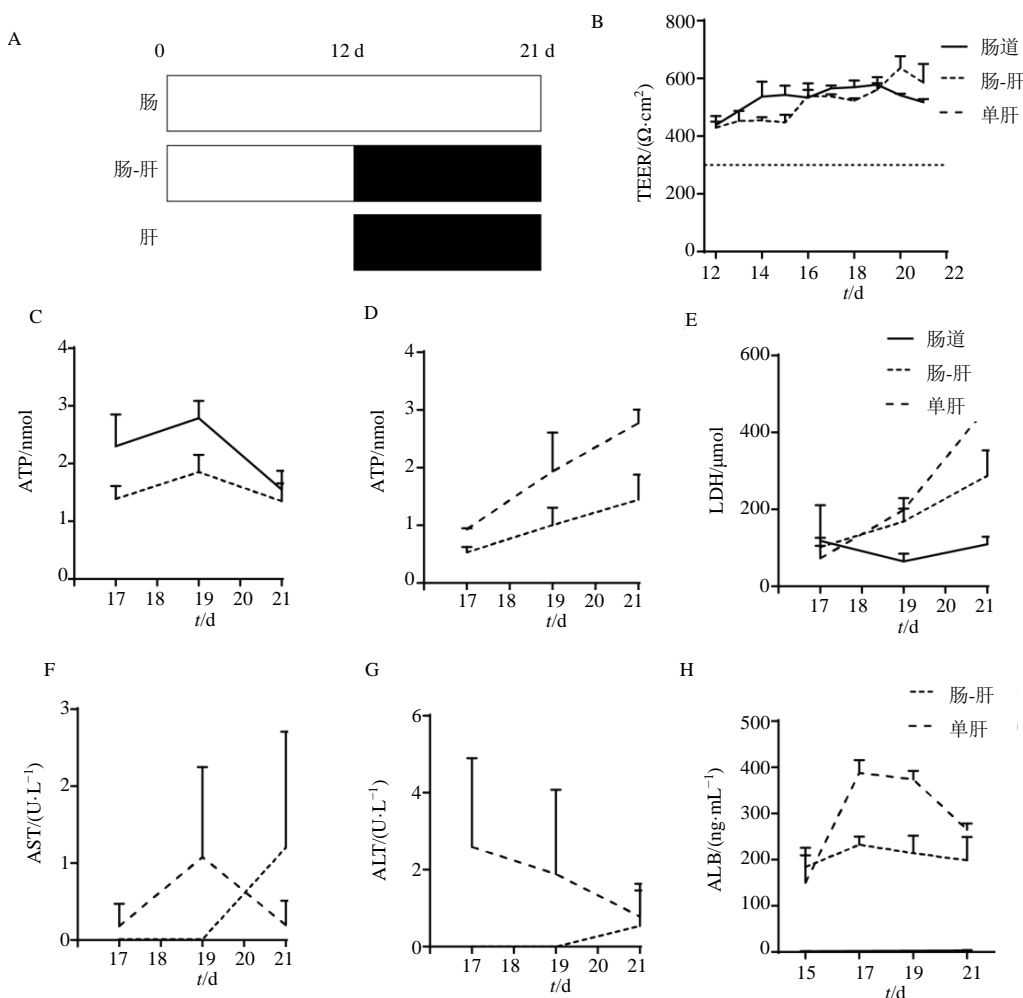
采用免疫荧光技术检测肠道模型转运蛋白 MDR1 和 MRP2 的表达。MDP1 和 MRP2 分布于细胞膜顶端, 第 14 天可在单侧检出 MDR1 和 MRP2 信号 (图 4), 与预期一致, 说明该共培养模型能够稳定表达 MDR1 和 MRP2 蛋白, 可用于药物的转运研究。

该结果的变化趋势提示随着培养时间的延长可能会出现轻微的肝脏损伤。最后检测了肝室 ALB 的变化 (图 5-H), 在第 15 天时单肝与肠-肝模型 ALB 水平无显著差异, 在 15~21 d 共培养模型 ALB 没有明显变化, 而单肝模型中 ALB 水平则先上升后降低。结合肝室 ATP 和 LDH 水平变化趋势, 单肝模型 ALB 水平在第 17 和 19 天高于肠-肝模型的原因可能是单肝模型肝细胞数量多于肠-肝模型, 第 21 天, 单肝模型 ALB 水平下降可能是因为出现了轻微的细胞损伤。综合考虑肠道屏障完整性、肝细胞活力及功能变化, 研究认为共培养模型在 17 d 内使用时, 肠道屏障完整性良好, 肝脏细胞具有良好的活力和代谢功能。

3.6 肠-肝模型 APAP 毒性测试结果

首先测试 APAP 对 Caco-2 和 HepG2 的细胞毒性, 结果如图 6 所示, 孵育 48 h 后, APAP 对 HepG2 细胞表现出较大毒性, 其 IC_{50} 值为 $18.52 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, 而 Caco-2 细胞只在药物最高浓度时表现出较大抑制率, 说明 APAP 对肝脏细胞 HepG2 的毒性强于 Caco-2, 选取 $3 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 作为 APAP 测试的终浓度进行后续测试, 此时 APAP 的肠道毒性低, 肝脏毒性高。

本研究通过从肠室给予药物 APAP, 模拟药物口服吸收后进入血液, 并对肝脏细胞产生毒性的过程。首先检测了肠道模型的损伤情况, 结果显示 APAP 作用 48 h 后, 肠道细胞活力 (图 7-A) 和 TEER



A-肠-肝模型的构建流程; B-肠-肝模型 TEER 值变化; C-肠-肝模型肠室、肠道细胞 ATP 总量; D-肠-肝模型肝室、单肝细胞 ATP 总量; E~H-肠-肝模型肝室、肠道、单肝 LDH 和肝室、单肝 AST、ALT (部分数据低于检测限, 显示为 0) 和 ALB 分泌总量。
A-Construction process of the gut-liver model; B-Changes in TEER values of gut-liver model; C-Total ATP in intestinal compartment and intestinal cells; D-Total ATP in liver compartment and single liver cells; E-H-Total secretion of LDH in hepatic chamber, intestinal tract and single liver, and AST, ALT (Some data were below the detection limit and were displayed as 0) and ALB in hepatic chamber, single liver.

图 5 肠-肝模型的构建 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Fig. 5 Construction of gut-liver model ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

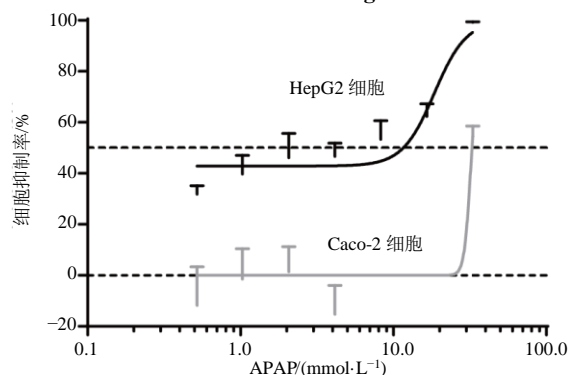
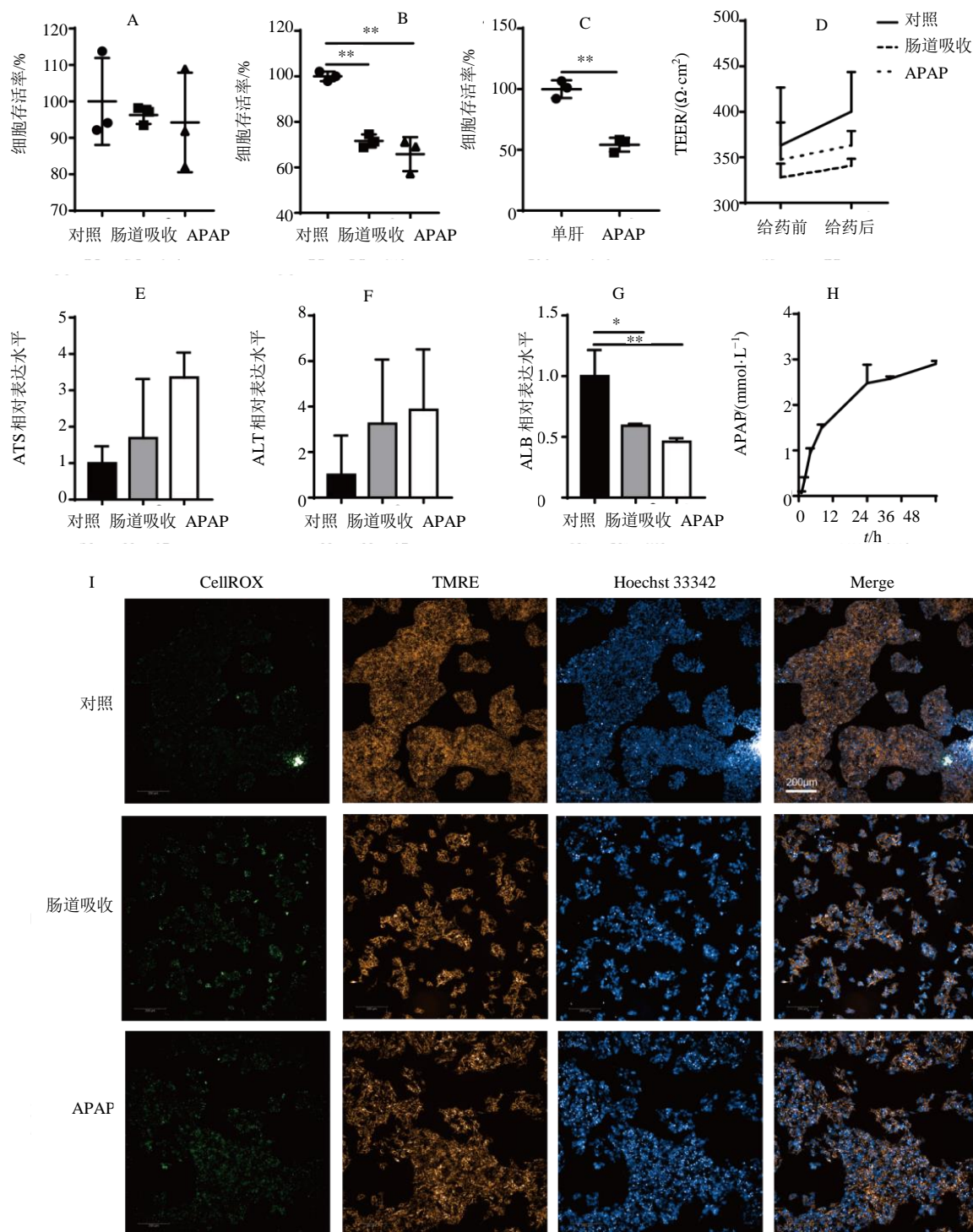


图 6 CCK-8 法检测 APAP 对 Caco-2 和 HepG2 细胞的生长抑制率 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Fig. 6 Growth inhibition of Caco-2 and HepG2 cells by APAP, measured by CCK-8 assay ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

(图 7-D)均无显著下降趋势,说明给药条件下 APAP 对肠道模型的损伤小。然后检测了肝室药物浓度的变化(图 7-H),药物在肝室的浓度呈缓慢上升,在 48 h 时达到最大浓度 (2.90 ± 0.05) $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

最后检测了肝脏细胞的毒性损伤,肠-肝模型中肝脏细胞的存活率如图 7-B 所示,与对照组比较,肠道吸收组和 APAP 组细胞存活率均显著下降 ($P < 0.01$),说明模型模拟了口服过量药物后导致的药物性肝损伤反应;单肝模型下给予 APAP $3 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 细胞存活率为 (54.22 ± 4.63)%, (图-7-C),与 APAP 组相比,肠道吸收模型肝细胞存活率 ($65.84 \pm 6.09\%$)略有升高。接着检测了肝脏毒性标志物 AST (图 7-E)、ALT (图 7-F),肝脏功



肠-肝模型中肠室 (A) 和肝室 (B) 细胞存活率变化; C-单肝模型中细胞存活率变化; D-TEER 值变化; 肝室 AST (E)、ALT (F) 和 ALB (G) 变化水平; H-从肠道给药后肝室药物浓度变化; I-肝室 CellROX 和 TMRE 的荧光染色结果; * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ 。

Cell viability changes in gut chamber (A) and liver chamber (B); C-Cell viability changes in single liver model; D-TEER change; Changed levels of AST (E), ALT (F) and ALB (G) in liver chamber; H-Changes in drug concentration in the liver chamber after intestinal administration; I-Fluorescence staining for ROS with CellROX and for MMP with TMRE in the liver chamber; * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ 。

图 7 肠-肝模型模拟 APAP 口服吸收给药的毒性测试结果 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Fig. 7 Toxicological assessment of APAP following oral absorption in gut-liver model ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

能标志物 ALB (图 7-G)、ROS (图 7-I) 和 MMP (图 7-I) 的变化, 观察到 APAP 引起肝脏毒性标志物和 ROS 信号的升高, 造成肝脏功能标志物和 MMP 的降低, 肠道吸收组的标志物改变程度略低于 APAP 组, 结合肝室药物浓度变化, 这可能是肠道吸收组的药物暴露略低于 APAP 组导致。

4 讨论

本研究在基于 Transwell 建立的静态肠-肝共培养模型中, 模拟了 APAP 过量口服后诱导的肝脏毒性过程。本模型实现了药物暴露浓度变化的监测, 也模拟了 APAP 诱导的药物性肝损伤, 这有助于描述药物毒性与药物暴露之间的关系。

药物性肝损伤由药物、药物代谢产物、膳食补充剂和来自环境的化学物质引起, 表现为从轻度生化异常到急性肝衰竭等一系列肝病。作为药物撤出市场、发布警告和修改使用说明的最常见原因^[8], 它也是导致患者肝损伤发病率、死亡率和医疗系统的成本升高的重要原因^[9], 因此无论是从监管角度还是从公共卫生领域的视角, 药物性肝损伤的准确预测和深入研究均具有重要意义。由于人与动物之间药物代谢、药动学和毒性靶点的存在种间差异^[9], 为了减少这一差异实现更准确的药物性肝损伤预测, 本研究使用人源细胞系进行模型构建和测试。HepG2 是在科学研究中应用最广泛的肝癌细胞系, 这种肿瘤细胞保留了正常肝脏细胞的形态特征及大部分正常肝细胞的代谢功能^[10], 被广泛用于药物的体外毒性研究, 因此, 本研究选择该细胞系用于肝毒性检测。为了进一步模拟药物口服吸收的过程, 研究将肠道模型与肝脏模型共培养建立肠-肝双器官模型。与传统的单肝模型相比, 肠-肝模型能够实现器官-器官间交互, 模拟口服药物经肠吸收后经过肝脏进行代谢、产生药效或毒性反应的过程^[11]。

本研究应用人结肠癌细胞系 Caco-2 和 HT29-MTX-E12 构建肠道模型, 检测了肠道模型的屏障和转运功能。TEER 是细胞屏障完整性的一种直观、便捷的检测指标, 本研究选择 TEER 评估模型紧密连接的完整性^[12]。结果显示模型在第 12 天时, 电阻值已经达到 $300 \Omega \cdot \text{cm}^2$, 电阻大小能至少维持到第 21 天。通过 HE 染色、AB-PAS 染色和免疫荧光染色对膜屏障结构进行观察, HE 和 AB-PAS 染色结果显示, 模型形成能够分泌黏蛋白的完整屏障, 紧密连接蛋白 Occludin 和 ZO-1 结果显示, 细胞形

成铺路石样结构。上述结果说明第 14 天时肠道模型屏障结构完整, 屏障功能良好。除了药物自身的特性外, 药物的肠道吸收也受到底物特异性和转运蛋白表达等多种因素影响^[2]。为检测模型的转运功能, 研究对转运蛋白 MDR1 和 MRP2 进行了检测, 观察到这 2 种转运蛋白分布于膜结构的一侧, 说明模型在第 14 天时表现出肠道极性。

接着将肠道模型与肝脏细胞共培养构建肠-肝模型。在肠道培养第 12 天时将肠道模型与肝脏模型组合, TEER 在模型培养第 21 天前能维持在 $300 \Omega \cdot \text{cm}^2$ 以上, 此时肠道屏障功能良好。接着使用 APAP 作为肝毒性测试化合物, 模拟口服 APAP 后产生肝脏毒性的结果。APAP 在低剂量时无害, 但在过量服用后会导致急性、严重肝细胞损伤^[13]。APAP 浓度的筛选满足如下要求: 1) 作用浓度下, 化合物不能严重损伤肠道屏障功能; 2) 测试浓度下, 药物对肝脏的毒性作用要高于肠道。因此根据细胞毒性测试结果, 选择 $3 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 作为测试的终浓度。从肠室给药, 48 h 后, 无论是在单肠模型中还是在肠-肝模型中, APAP 对肠道屏障功能和细胞存活率均无显著影响。但肝脏标志物和荧光探针检测结果显示, APAP 给药后表现出明显的肝脏毒性, 但是当引入肠道模型后, 肝脏细胞存活率略有升高 ($P=0.10$)。肠道吸收组药物的暴露浓度低于 $3 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 组, 药物毒性与药物暴露相关, 引入肠道模型后, 药物暴露下降, 进而导致肝脏毒性下降, 这一现象说明在肠-肝双器官模型中模拟 APAP 口服吸收的过程轻微降低了 APAP 的肝脏毒性, 但这种现象是由于药物暴露的降低导致。

最后, 研究检测了 APAP 对肝脏细胞的损伤。首先, 研究通过检测细胞存活率和肝脏标志物水平表征药物性肝损伤的程度。在临床中, APAP 过量服用后会导致血清 AST 和 ALT 水平显著升高^[14-15]; 文献表明 APAP 给药后会导致细胞内 ATP 水平^[16]及 ALB 分泌水平^[17]下降, 本研究测定 ATP 水平计算细胞存活率, 并采用肝脏功能标志物 ALB 评价药物肝毒性作用的大小^[18-19], 研究观察到了与文献相似变化趋势。线粒体功能损伤和 ROS 的生成是 APAP 诱导的药物性肝损伤过程中的早期毒性事件^[20-21], 研究也在共培养模型中观察到了 APAP 引起的 ROS 信号增强和 MMP 的降低, 说明研究在体外模拟了 APAP 诱导的肝损伤这一过程。

本研究构建了 2D 肠-肝共培养的体外静态模

型, 培养期间肠道屏障功能维持良好, 肝脏功能和细胞活力在共培养前 5 d 维持情况良好, 适用于毒性测试。肠-肝体外模型能够模拟口服药物吸收, 以实现药物肝毒性测试, 为药物肝毒性评价提供了可靠的体外平台。以 APAP 作为测试化合物, 单次给药后, APAP 对肠道细胞存活率无显著影响, 但对肝脏细胞造成了损伤, 表现为给药后肝脏细胞活力下降, 产生大量 ROS 信号, MMP 下降。药物含量检测显示肠道屏障降低了 APAP 口服后的药物暴露, 与 APAP 组相比, 肝脏毒性损伤降低。

相较于传统的单一肝细胞模型, 本模型具备显著优势, 能够连续再现药物在体内早期经历的“肠道吸收-肝脏代谢”完整路径。这不仅有助于评估药物的口服生物利用度, 还可检测经肝脏代谢后生成的活性或毒性代谢产物, 从而为早期药动学特性研究提供关键数据支持。基于当前研究成果, 后续研究可从以下方向进一步拓展: (1) 提升模型复杂性^[22], 通过引入更多细胞类型, 如在肠道侧共培养微生物群或黏液相关细胞, 在肝脏侧引入肝星状细胞或库普弗细胞, 以更真实地模拟肠道微环境、炎症反应及肝纤维化等复杂病理状态; (2) 整合动态培养系统^[23], 将现有静态模型升级为基于微流控技术的动态灌注体系, 模拟体内血液流动与胆汁排泄过程, 实现更生理相关的营养供给与废物清除, 并支持长期给药下的毒性及代谢物累积研究。综上所述, 本研究构建的 2D 肠-肝共培养静态模型是向更复杂、更仿生体外模型迈进的重要基础, 在药物吸收、代谢与毒性评估方面展现出广泛潜力, 为未来创新药物研发与安全性评价奠定了坚实基础。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Azman M, Sabri A H, Anjani Q K, et al. Intestinal absorption study: Challenges and absorption enhancement strategies in improving oral drug delivery [J]. *Pharmaceuticals (Basel)*, 2022, 15(8): 975.
- [2] Murakami T. Absorption sites of orally administered drugs in the small intestine [J]. *Expert Opin Drug Discov*, 2017, 12(12): 1219-1232.
- [3] Lorente S, Hautefeuille M, Sanchez-Cedillo A. The liver, a functionalized vascular structure [J]. *Sci Rep*, 2020, 10(1): 16194.
- [4] Dowden H, Munro J. Trends in clinical success rates and therapeutic focus [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2019, 18(7): 495-496.
- [5] Onakpoya I J, Heneghan C J, Aronson J K. Post-marketing withdrawal of 462 medicinal products because of adverse drug reactions: A systematic review of the world literature [J]. *BMC Med*, 2016, 14: 10.
- [6] ICH. S3A: Note for Guidance on Toxicokinetics: The Assessment of Systemic Exposure in Toxicity Studies [EB/OL]. (1994-10-27) [2024-08-24]. <https://www.cde.org.cn/ichWeb/guideIch/downloadAtt/1/bdade466106af842be0c559bc98e426e>.
- [7] Yu Y, Sun B Y, Ye X, et al. Hepatotoxic assessment in a microphysiological system: Simulation of the drug absorption and toxic process after an overdosed acetaminophen on intestinal-liver-on-chip [J]. *Food Chem Toxicol*, 2024, 193: 115016.
- [8] Allison R, Guraka A, Shawa I T, et al. Drug induced liver injury - a 2023 update [J]. *J Toxicol Environ Health B Crit Rev*, 2023, 26(8): 442-467.
- [9] Teresa Donato M, Gallego-Ferrer G, Tolosa L. *In vitro* models for studying chronic drug-induced liver injury [J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(19): 11428.
- [10] Arzumanyan V A, Kiseleva O I, Poverennaya E V. The curious case of the HepG2 cell line: 40 years of expertise [J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(23): 13135.
- [11] Lee D W, Ha S K, Choi I, et al. 3D gut-liver chip with a PK model for prediction of first-pass metabolism [J]. *Biomed Microdevices*, 2017, 19(4): 100.
- [12] Mukherjee T, Squillante E, Gillespie M, et al. Transepithelial electrical resistance is not a reliable measurement of the Caco-2 monolayer integrity in Transwell [J]. *Drug Deliv*, 2004, 11(1): 11-18.
- [13] Bunchornatavakul C, Rajender Reddy K. Acetaminophen (APAP or *N*-acetyl-*p*-aminophenol) and acute liver failure [J]. *Clin Liver Dis*, 2018, 22(2): 325-346.
- [14] Acheampong P, Thomas S H L. Determinants of hepatotoxicity after repeated supratherapeutic paracetamol ingestion: Systematic review of reported cases [J]. *Br J Clin Pharmacol*, 2016, 82(4): 923-931.
- [15] Watkins P B, Kaplowitz N, Slattery J T, et al. Aminotransferase elevations in healthy adults receiving 4 grams of acetaminophen daily: A randomized controlled trial [J]. *JAMA*, 2006, 296(1): 87-93.
- [16] Bashir S, Morgan W A. Inhibition of mitochondrial function: An alternative explanation for the antipyretic and hypothermic actions of acetaminophen [J]. *Life Sci*, 2023, 312: 121194.

- [17] Wu J Z, Zhou F, Fan G F, et al. Ferulic acid ameliorates acetaminophen-induced acute liver injury by promoting AMPK-mediated protective autophagy [J]. *IUBMB Life*, 2022, 74(9): 880-895.
- [18] Li F, Cao L, Parikh S, et al. Three-dimensional spheroids with primary human liver cells and differential roles of kupffer cells in drug-induced liver injury [J]. *J Pharm Sci*, 2020, 109(6): 1912-1923.
- [19] Nautiyal M, Qasem R J, Fallon J K, et al. Characterization of primary mouse hepatocyte spheroids as a model system to support investigations of drug-induced liver injury [J]. *Toxicol In Vitro*, 2021, 70: 105010.
- [20] Shan S L, Shen Z Y, Song F Y. Autophagy and acetaminophen-induced hepatotoxicity [J]. *Arch Toxicol*, 2018, 92(7): 2153-2161.
- [21] Ye H, Nelson L J, Gómez Del Moral M, et al. Dissecting the molecular pathophysiology of drug-induced liver injury [J]. *World J Gastroenterol*, 2018, 24(13): 1373-1385.
- [22] Sun B Y, Liang Z H, Wang Y P, et al. A 3D spheroid model of quadruple cell co-culture with improved liver functions for hepatotoxicity prediction [J]. *Toxicology*, 2024, 505: 153829.
- [23] Choe A, Ha S K, Choi I, et al. Microfluidic Gut-liver chip for reproducing the first pass metabolism [J]. *Biomed Microdevices*, 2017, 19(1): 4.

[责任编辑 兰新新]