

利用 HepaRG 细胞构建三明治培养模型评价药物致胆汁淤积风险

文海若^{1,2}, 吴 辉^{1,3}, 唐茵茹¹, 兰 洁¹, 汪 祺^{2,4*}

1. 中国食品药品检定研究院 安全评价研究所, 北京 100176

2. 药品监管科学全国重点实验室, 北京 102629

3. 中国药科大学, 江苏 南京 210009

4. 中国食品药品检定研究院 中药民族药检定所, 北京 100020

摘要:目的 构建基于 HepaRG 细胞的三明治培养模型, 为评价药物致胆汁淤积风险提供一种高通量且适宜短期研究的参考方法。方法 通过检测 5(6)-羧基-2,7-二氯荧光素 (CDF) 及紧密连接蛋白 1 (ZO-1) 荧光强度, 结合光学显微镜观察细胞形态, 确定模型在 96 孔培养板中最佳接种密度及建模时间; 以对乙酰氨基酚 (APAP) 为受试物, CCK-8 法确定给药浓度; 制备三明治培养模型, 给药后利用免疫荧光法检测胆汁淤积相关指标, 包括 CDF、脂质含量、多药耐药蛋白 3 (MRP3)、法尼醇 X 受体 (FXR) 及胆盐输出泵 (BSEP), 验证模型对评价胆汁淤积的适用性。结果 模型最佳接种密度为每孔 7×10^4 个, 培养 72 h 后即可给药。与相同时间的对照组相比, 在 APAP 质量浓度为 $300 \sim 1\ 200 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时, 细胞脂质含量没有显著性变化; 给药 1 d, APAP 质量浓度在 $300 \sim 600 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时, CDF 荧光强度均显著升高 ($P < 0.01$), 给药 3 d, CDF 荧光强度均显著下降 ($P < 0.05, 0.01$); 给药 1 d, APAP 质量浓度在 $1\ 200 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时, 给药 3、7 d APAP 质量浓度在 $600 \sim 1\ 200 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时, MRP3 表达量显著下降 ($P < 0.05, 0.01$); 给药 3、7 d, APAP 质量浓度在 $1\ 200 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时, FXR 表达量显著下降 ($P < 0.01$); 给药 7 d, APAP 质量浓度在 $300 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时, BSEP 表达量显著下降 ($P < 0.01$)。结论 成功建立短期三明治肝细胞培养模型并揭示了 APAP 导致胆汁淤积的多靶点机制, 验证了该模型评价胆汁淤积风险的可靠性。

关键词: HepaRG 细胞; 三明治肝细胞培养模型; 胆汁淤积; 免疫荧光; 对乙酰氨基酚

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376(2025)08-2091-08

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2025.08.003

Evaluation of drug-induced cholestasis risk using a HepaRG cell-based sandwich culture model

WEN Hairuo^{1,2}, WU Hui^{1,3}, TANG Yinru¹, LAN Jie¹, WANG Qi^{2,4}

1. Institute of Safety Evaluation, National Institutes for Food and Drug Control, Beijing 100176, China

2. State Key Laboratory of Drug Regulatory Science, Beijing 102629, China

3. China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China

4. Institute of Traditional Chinese Medicine and National Medicine Control, National Institute for Food and Drug Control, Beijing 100020, China

Abstract: Objective To develop a sandwich-cultured HepaRG (SCH) model as a high-throughput and short-term research tool for evaluating drug-induced cholestasis risk. **Methods** The optimal seeding density and modeling time in 96-well plates were determined by detecting the fluorescence intensity of 5(6)-carboxy-2,7-dichlorofluorescein (CDF) and tight junction protein 1 (ZO-1), and observing the cell morphology under an optical microscope. Acetaminophen (APAP) was used as the test substance, and the CCK8 method was used to determine the drug concentration. Sandwich culture models were prepared, and the bile stasis-related indicators, including CDF, lipid content, multidrug resistance protein 3 (MRP3), farnesoid X receptor (FXR), and bile salt export pump (BSEP), were detected by immunofluorescence after drug administration to verify the applicability of the model for evaluating bile stasis.

收稿日期: 2025-04-24

基金项目: 国家重点研发计划“应用纳米材料医疗器械的生物相容性与毒理学研究”资助项目 (2022YFC2409702); 药品监管科学全国重点实验室课题“药品杂质遗传毒性评价新技术和生物标志物研究”资助项目 (2023SKLDRS0128)

作者简介: 文海若, 博士, 研究员, 研究方向为药理毒理学。E-mail: wenhairuo@nifdc.org.cn

*通信作者: 汪 祺, 博士, 研究员, 研究方向为药理毒理学。E-mail: sansan8251@sina.com

Results The optimal seeding density was 7×10^4 cells per well, and the model was ready for drug treatment after 72 h of culture. Under APAP exposure (300—1 200 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$), compared to the lowest concentration, lipid content showed no significant change. After administration for one day, the fluorescence intensity of CDF significantly increased when the APAP mass concentration was 300—600 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ($P < 0.01$). After administration for three days, the fluorescence intensity of CDF significantly decreased ($P < 0.05, 0.01$). After administration for one day and when the APAP mass concentration was 1 200 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, and after administration for 3 and 7 days and when the APAP mass concentration was 600—1 200 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, the expression level of MRP3 significantly decreased ($P < 0.05, 0.01$). After administration for 3 and 7 days and when the APAP mass concentration was 1 200 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, the expression level of FXR significantly decreased ($P < 0.01$). After administration for 7 days and when the APAP mass concentration was 300 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, the expression level of BSEP significantly decreased ($P < 0.01$). **Conclusion** A short-term SCH evaluation model was successfully established, revealing the multi-target mechanism of APAP-induced cholestasis and confirming the model's reliability for cholestasis risk evaluation.

Key words: HepaRG cells; sandwich-cultured hepatocytes model; cholestasis; immunofluorescence; acetaminophen

药物性肝损伤 (DILI) 是新药临床试验和上市后被撤回的主要原因之一^[1]。药物引起肝损伤通常涉及药物或其代谢产物的直接毒性或免疫介导的损伤^[2], 在药物研发阶段检测和评估 DILI 是制药行业和监管机构关注重点。胆汁淤积是 DILI 的一种常见症状, 具体表现为外源物质作用下胆汁酸在肝中积累后产生的氧化应激、炎症、肝细胞凋亡和纤维化等肝毒性效应^[3]。鉴于人类和实验动物在药物代谢酶、药物转运体、多药耐药蛋白等基因的表达存在种属差异, 临床研究中 38%~51% 引起 DILI 的药物未能在非临床动物研究中检出相关风险^[4]。故建立高效筛选药物肝毒性成分和评价药物对肝细胞综合作用的体外模型尤为重要。

三明治肝细胞培养 (SCH) 模型是当前应用较为广泛的研究药物肝胆转运和胆汁淤积的体外模型^[5], 可较好地模拟体内肝细胞环境, 药物代谢能力较好。但传统方法使用原代肝细胞于 24 孔板中夹层培养构建 SCH, 成本高且通量低。本研究采用人源肝细胞 HepaRG, 该细胞系具有肝祖细胞特征和更高水平的胆汁酸转运蛋白, 是目前为止可替代原代肝细胞的最具有潜力和优势的细胞系^[6-7]。本研究构建基于 96 孔板的 SCH 培养模型, 并以对乙酰氨基酚 (APAP) 为阳性药, 检测胆汁酸转运蛋白的表达, 验证其用于药物潜在的致胆汁淤积风险评估的可行性。

1 材料

1.1 细胞

HepaRG 细胞 (10 代以内) 来自中国医学科学院细胞库, 液氮保存。

1.2 主要试剂

APAP 来自中国食品药品检定研究院 (批号 100018-201610, 质量分数 99.9%); Williams'

Medium E (WME) 培养基、5(6)-羧基-2, 7-二氯荧光素二乙酸酯 (CDCFDA) 染液购自美国 Sigma 公司; 青链霉素混合液、Hanks 溶液 (含钙镁、酚红)、I 型鼠尾胶原蛋白购自中国 Solarbio 公司; 胎牛血清 (FBS) 购自以色列 BI 公司; 0.25% 胰酶购自北京全式金生物技术股份有限公司; Matrigel 基质胶购自美国 Corning 公司; CCK-8 购自日本同仁化学公司; Anti-多药耐药蛋白 3 (MRP3) 抗体、Anti-法尼醇 X 受体 (FXR) 抗体购自英国 Abcam 公司; Anti-胆盐输出泵 (BSEP) 抗体购自美国 Enzo Life science 公司; 紧密连接蛋白 1 (ZO-1) 单克隆抗体购自美国 Invitrogen 公司; 抗荧光淬灭封片液 [含 4', 6-二脒基-2-苯基吡啶 (DAPI)] 购自中国碧云天公司。

1.3 主要仪器

HCB-900VS 超净工作台 (中国海尔集团); CKX31 倒置光学显微镜 (日本 Olympus 公司), EVOS XLCORE 细胞成像系统 (美国 Thermo Fisher Scientific 公司); ICO-150 培养箱 (德国 Memmert 公司); DF-101T 恒温水浴锅 (予华仪器设备有限公司); 5810R 高速冷冻离心机 (德国 Eppendorf 公司); Operetta CLS 高内涵分析仪 (美国 Perkin Elmer 公司); SpectraMax Plus384 酶标仪 (美国 Molecular Devices 公司)。

2 方法

2.1 细胞培养

HepaRG 细胞 (10 代以内) 使用 WME 完全培养基 (含 10% FBS、1% 青链霉素混合液) 于 37 °C、5% CO₂ 条件下培养传代。

2.2 模型建立

在 96 孔培养板中, 每孔预先包被 2 μL 1.5 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$

I型鼠尾胶原,在接种细胞前用含 5% FBS 的 WME 培养基平衡 2 h。HepaRG 细胞达对数生长期后,使用胰酶消化细胞,室温 $1\ 000\ \text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 5 min,弃上清后加入含 5% FBS 的 WME 培养基重悬,分别以每孔 3×10^4 、 4×10^4 、 5×10^4 、 6×10^4 、 7×10^4 、 8×10^4 个为接种密度,将细胞接种于预涂 I 型鼠尾胶原的 96 孔板中,每孔 $100\ \mu\text{L}$,在 $37\ ^\circ\text{C}$ 、5% CO_2 条件下培养 24 h。培养结束将培养基换成含 $0.25\ \text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ Matrigel 的无血清培养基,为给药第 0 天(D0),每隔 24 h 换液 1 次。利用高内涵成像系统在 D2~D8 分别经 CDCFDA 染液染色检测代谢物 5(6)-羧基-2,7 二氯荧光素(CDF)荧光强度,免疫荧光法检测 ZO-1 荧光强度,同时利用光学显微镜观察肝细胞形态,从而评价不同细胞接种密度对模型中胆小管分泌功能和相关蛋白表达量的影响,以及肝细胞的功能和活性的维持时间,确立模型建立的最佳接种密度。

2.3 模型应用

2.3.1 CCK-8 法确定给药浓度 取对数生长期的 HepaRG 细胞离心重悬后,在 96 孔培养板中以每孔 2×10^4 个的密度接种, $37\ ^\circ\text{C}$ 、5% CO_2 条件下培养 24 h 后给药。APAP 设置终质量浓度为 200、500、800、1 100、1 400、1 700、2 000 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的共 7 个组,同时设置对照组和 DMSO (0.32%, 溶媒对照) 组,空白组不接种细胞。给药后于 $37\ ^\circ\text{C}$ 、5% CO_2 条件下孵育 72 h,孵育结束每孔加入等体积 CCK-8 检测试剂, $37\ ^\circ\text{C}$ 孵育 1 h,采用酶标仪检测各孔在 450 nm 处的吸光度(A)值,并计算细胞存活率。

$$\text{细胞存活率} = (A_{\text{实验}} - A_{\text{空白}}) / (A_{\text{对照}} - A_{\text{空白}})$$

2.3.2 APAP 对 SCH 模型中胆汁淤积相关指标的影响 按照“2.2”项所示方法建立模型,含 $0.25\ \text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ Matrigel 无血清培养基培养 72 h 后轻轻吸去培养基,加入含 150、300、600、1 200 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ APAP 的 $0.25\ \text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ Matrigel 无血清培养基,孵育 24 h 后吸去含药培养基,加入 $100\ \mu\text{L}\ 20\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的 CDCFDA 染液染色 15 min 或加入 $100\ \mu\text{L}\ 2\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 Nile Red 染液染色 5 min,染色结束用 Hanks 溶液(含钙、镁、酚红)洗涤细胞 2 次,加入抗荧光淬灭剂,使用高内涵分析仪检测 CDF 荧光强度;DAPI 染色后,使用高内涵分析仪检测细胞脂质含量(Nile 荧光强度);同时利用免疫荧光法检测胆汁酸转运蛋白 MRP3、FXR 及 BSEP 的表达量。

2.4 数据处理

数据均采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,使用 GraphPad Prism 软件进行统计处理和作图,组间数据比较采用 ANOVA 单因素方差分析。

3 结果

3.1 细胞接种密度的选择

如图 1 所示,每孔 8×10^4 个的接种密度于 D2 即可形成广泛的胆小管网络,但维持时间不如每孔 7×10^4 个的接种密度。与相同时间的最低密度孔相比,接种密度为每孔 8×10^4 个时 CDF 和 ZO-1 荧光强度分别在 D1 显著升高 ($P<0.01$),但随后呈减弱趋势,提示每孔 8×10^4 个的接种密度可能导致细胞过度拥挤,抑制 CDF 外排,并产生应激反应,影响细胞正常极性建立,可能导致假阳性结果。而当接种密度为每孔 7×10^4 个时,与相同时间的最低密度孔相比,CDF 荧光强度在 D1 显著升高 ($P<0.05$),D7 显著下降 ($P<0.01$),ZO-1 荧光强度在 D3 显著升高 ($P<0.01$),提示细胞 CDF 外排增多,D3 开始建立极性并维持稳定,因此后续实验使用每孔 7×10^4 个的接种密度建模。

同时利用光学显微镜观察接种密度为每孔 7×10^4 个时不同培养时间肝细胞形态,如图 2 所示,未添加 Matrigel 基质胶前,细胞呈扁平的圆形,添加含 $0.25\ \text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ Matrigel 的无血清培养基并培养 24 h 后,细胞呈相对立体的多边形,且随培养时间延长逐渐出现胆管腔结构。ZO-1 的表达逐渐围绕在细胞顶侧膜,CDF 荧光逐渐由胞浆向胆管侧聚集,同样提示模型细胞极性建立,形成功能性胆小管网络,激活 MRP2 介导的胆汁排泄通路,该 SCH 模型可以用于后续给药检测。

3.2 药物作用浓度的选择

如图 3 所示,APAP 组细胞存活率与对照组相比均显著下降 ($P<0.01$),且呈浓度递减趋势,利用 Graphpad 计算半数抑制浓度 (IC_{50}) 为 $521.2\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。为避免因高浓度药物造成细胞毒性的假阳性结果,后续实验中给药质量浓度设置为 300、600、1 200 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。

3.3 不同浓度 APAP 对胆汁淤积相关指标的影响

3.3.1 CDF 荧光强度 如图 4 所示,给药 1 d,APAP 质量浓度在 300~600 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时,CDF 荧光强度与相同时间对照组相比均显著升高 ($P<0.01$),且呈浓度递增趋势。给药 3 d,CDF 荧光强度与相同时间

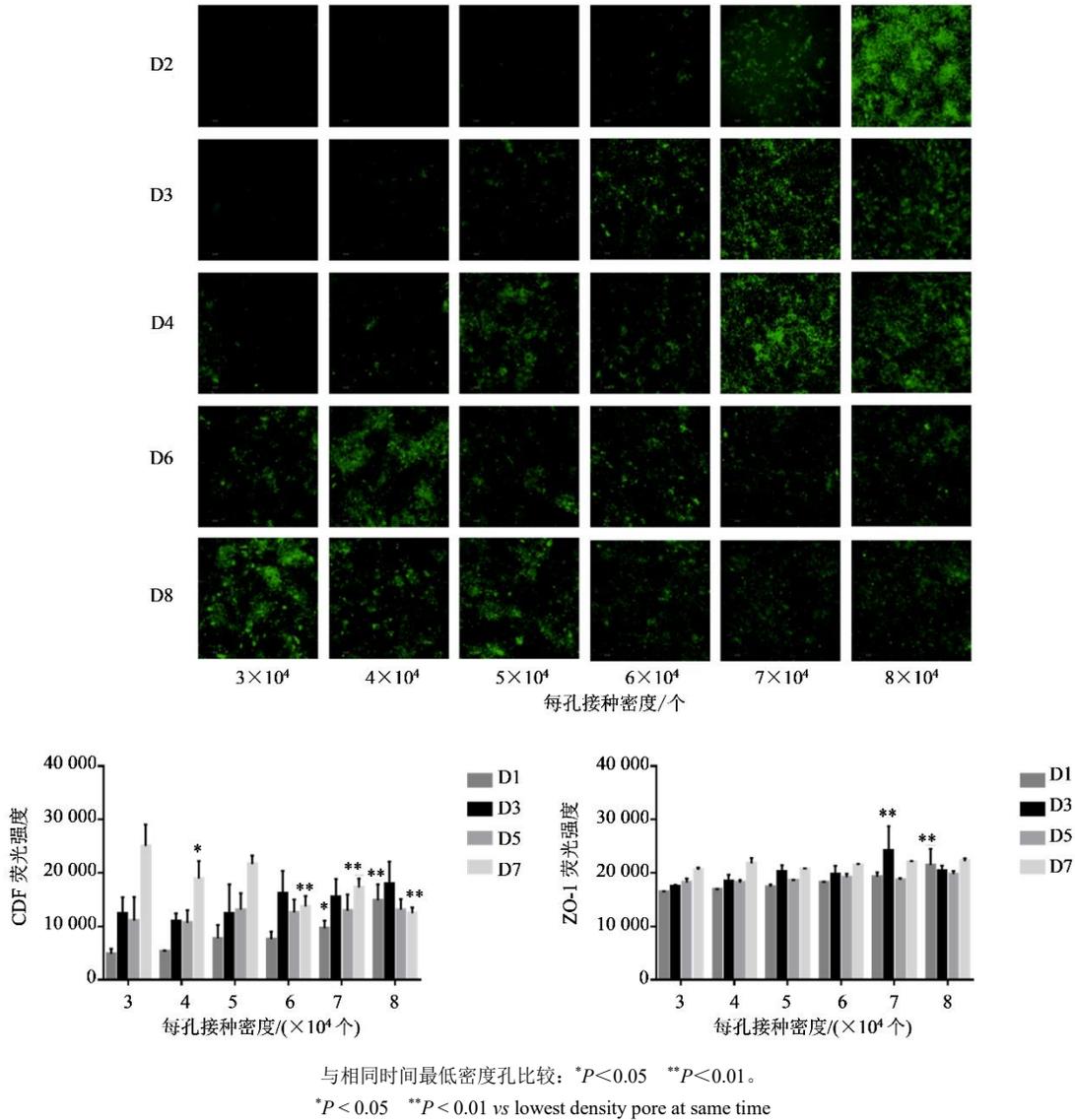


图 1 高内涵分析仪观察 CDCFDA 染色结果及 ZO-1 荧光强度 ($\times 10$, $\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Fig. 1 Observation of CDCFDA staining results using a high connotation analyzer and ZO-1 fluorescence intensity ($\times 10$, $\bar{x} \pm s$, $n=3$)

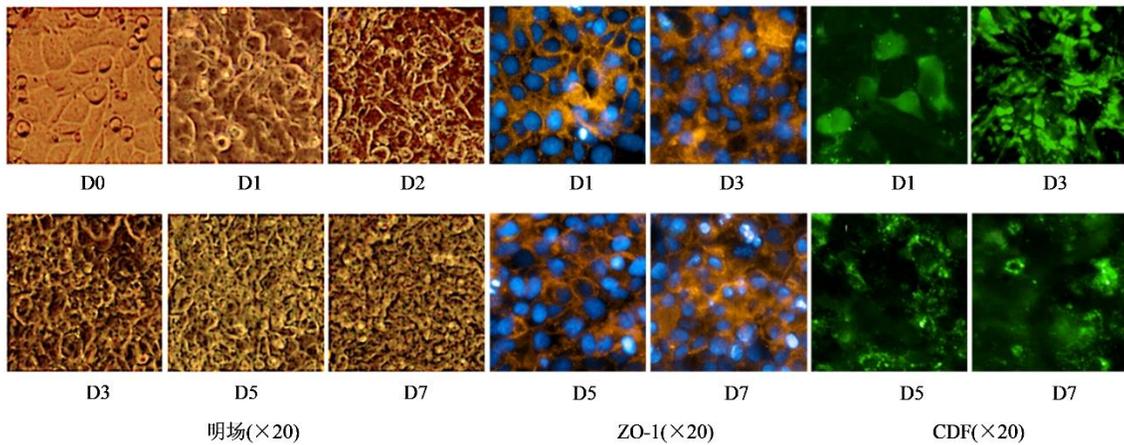
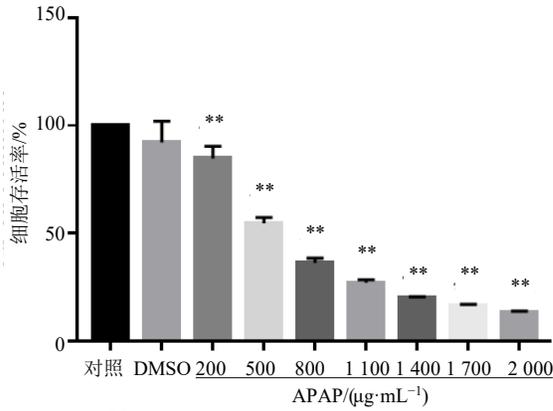


图 2 接种密度为每孔 7×10^4 个时肝细胞形态及荧光分布

Fig. 2 Morphology and fluorescence distribution of hepatocytes when inoculation density was 7×10^4 per well



与对照组比较: ** $P < 0.01$ 。
** $P < 0.01$ vs control group.

图 3 APAP 作用 72 h 后细胞存活率 ($\bar{x} \pm s, n=3$)
Fig. 3 Cell survival rate after 72 h of APAP treatment ($\bar{x} \pm s, n=3$)

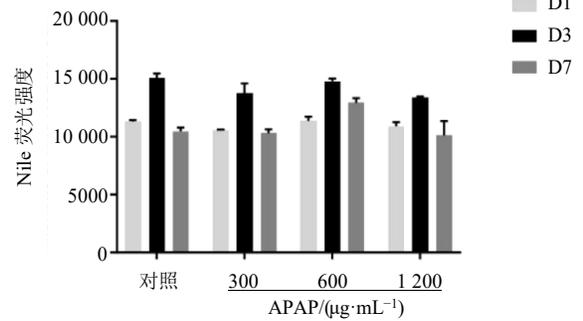
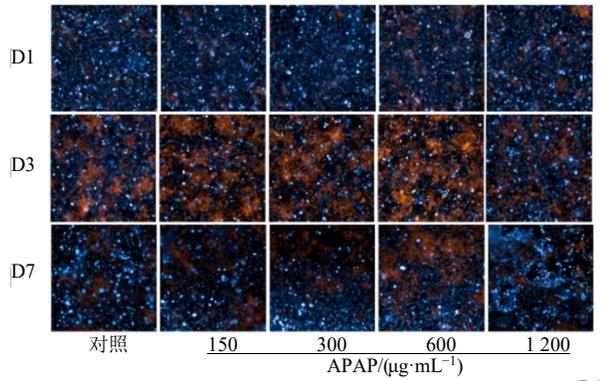
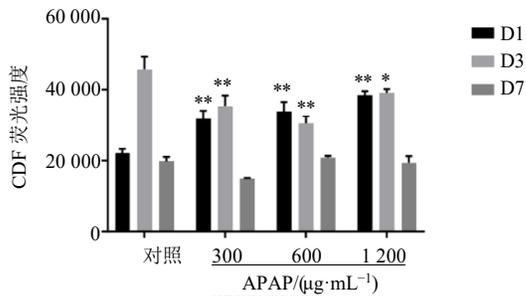
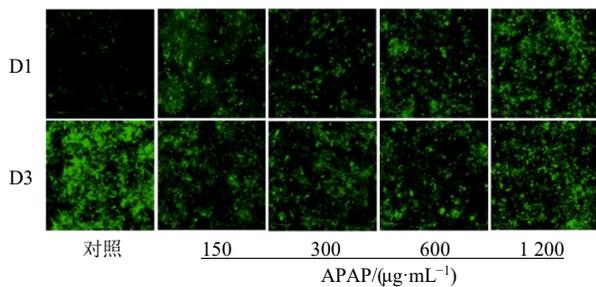


图 5 不同浓度 APAP 对细胞脂质含量的影响 ($\times 10, \bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 5 Effect of different concentrations of APAP on cell lipid content ($\times 10, \bar{x} \pm s, n=3$)

图 4 不同浓度 APAP 对 CDF 荧光强度的影响 ($\times 10, \bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 4 Effect of different concentrations of APAP on CDF fluorescence intensity ($\times 10, \bar{x} \pm s, n=3$)

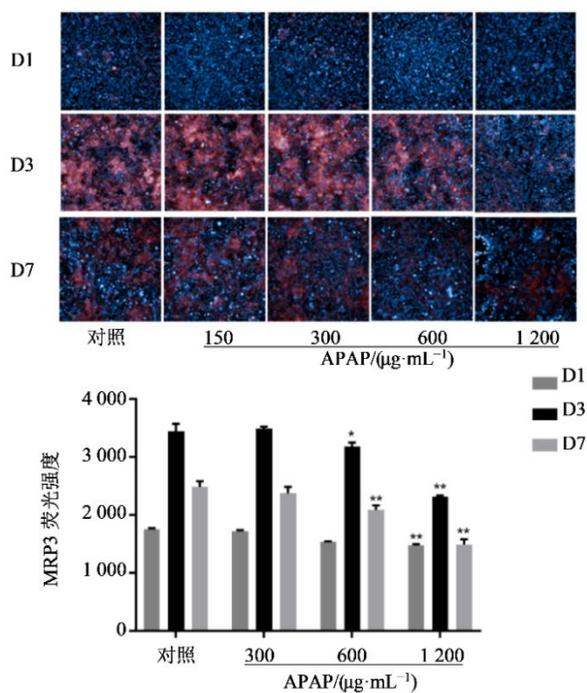
间对照组相比均显著下降 ($P < 0.05, 0.01$)。给药 7 d, CDF 荧光强度与相同时间对照组相比未见显著性差异。提示 APAP 给药后, 对 CDF 的影响过程呈现抑制-修复-恢复的特点。

3.3.2 细胞脂质含量 如图 5 所示, 给药 1、3 和 7 d, APAP 质量浓度在 $300 \sim 1200 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时, 细胞脂质含量与相同时间对照组相比均未见显著性差异。提示 APAP 给药后, 对细胞脂质含量没有影响。

3.3.3 MRP3 表达量 如图 6 所示, 给药 1 d, APAP 质量浓度在 $1200 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时, MRP3 表达量与相同时间对照组相比显著下降 ($P < 0.01$)。给药 3、7 d, APAP 质量浓度在 $600 \sim 1200 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时, MRP3 表达量与相同时间的对照组相比均显著下降 ($P < 0.05, 0.01$), 且呈浓度递减趋势。提示 APAP 给药后, 对 MRP3 表达呈现持续性抑制的特点。

3.3.4 FXR 表达量 如图 7 所示, 给药 1 d, APAP 质量浓度在 $300 \sim 1200 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时, FXR 表达量与相同时间的对照组相比未见显著性差异。给药 3、7 d, APAP 质量浓度在 $1200 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时, FXR 表达量与相同时间的对照组相比均显著下降 ($P < 0.01$)。提示 APAP 给药后, 对 FXR 表达呈现延迟性抑制的特点。

3.3.5 BSEP 表达量 如图 8 所示, 给药 1、3 d, APAP 质量浓度在 $300 \sim 1200 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时, BSEP 表达量与相同时间的对照组相比未见显著性差异。给药 7 d, APAP 质量浓度在 $300 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时, BSEP 表达量与相同时间的对照组相比显著下降 ($P < 0.01$)。提示 APAP 给药后, 对 BSEP 表达呈现延迟性、低剂量抑制的特点。

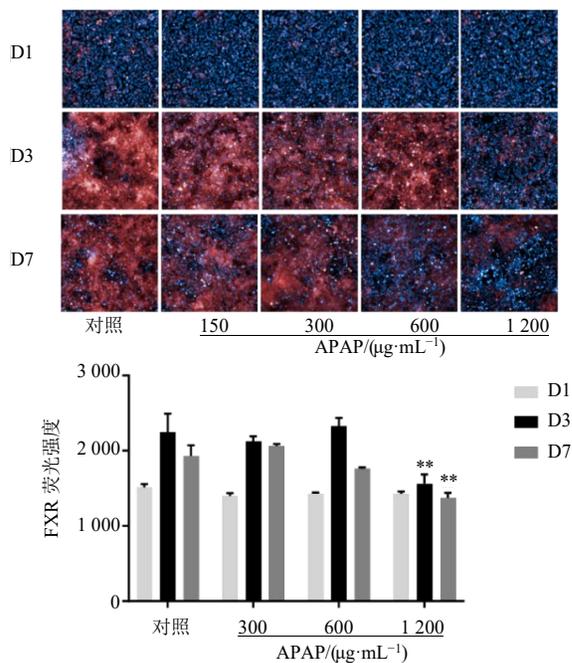


与相同时间对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ 。

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs control group at same time.

图 6 不同浓度 APAP 对 MRP3 表达量的影响 ($\times 10$, $\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Fig. 6 Effect of different concentrations of APAP on expression level of MRP3 ($\times 10$, $\bar{x} \pm s$, $n=3$)

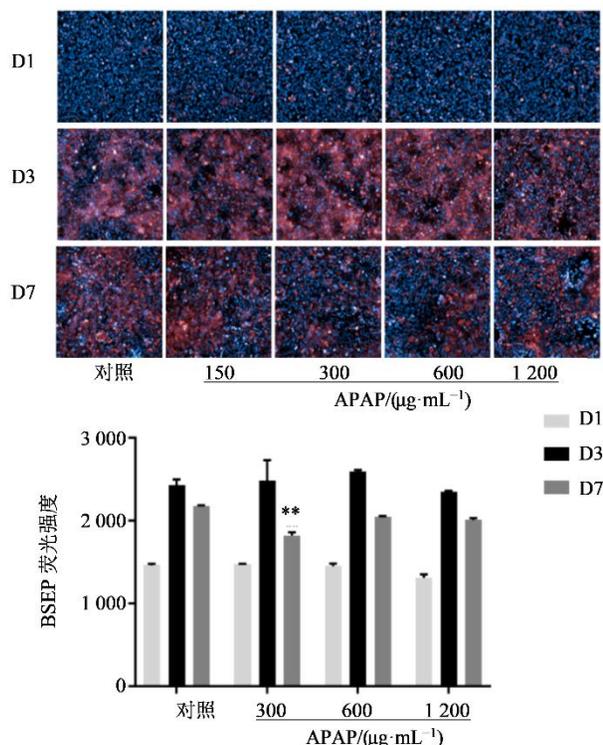


与相同时间对照组比较: ** $P < 0.01$ 。

** $P < 0.01$ vs control group at same time.

图 7 不同浓度 APAP 对 FXR 表达量的影响 ($\times 10$, $\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Fig. 7 Effect of different concentrations of APAP on expression level of FXR ($\times 10$, $\bar{x} \pm s$, $n=3$)



与相同时间对照组比较: ** $P < 0.01$ 。

** $P < 0.01$ vs control group at same time.

图 8 不同浓度 APAP 对 BSEP 表达量的影响 ($\times 10$, $\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Fig. 8 Effect of different concentrations of APAP on expression level of BSEP ($\times 10$, $\bar{x} \pm s$, $n=3$)

4 讨论

本研究利用 HepaRG 细胞短期内成功构建 SCH 模型。与原代人肝细胞、肝癌细胞系、HepG2 细胞系及类器官相比, HepaRG 细胞系表现出分化肝细胞的诸多特征, 包括 I 相和 II 相代谢酶 CYP3A4、CYP2E1 等、药物转运体及核受体的功能性表达。此外, HepaRG 细胞对胆汁酸毒性敏感, 其细胞死亡机制与新鲜分离的原代人肝细胞相似。这些特性使 HepaRG 细胞系成为研究药物诱导胆汁淤积效应的理想模型, 适合高通量和快速筛选^[8-9]。而 HepG2 细胞系缺乏完整的胆小管形成能力, 原代人肝细胞虽具备该功能但难以长期维持, 其形成的类器官培养可能因干细胞来源、分化方案不同导致功能异质性较大, 更适宜长期培养或研究特异性损伤。Bachour-EI 等^[10]首次比较并发现 HepaRG 细胞和常规培养人原代肝细胞 (CCHH) 中主要膜转运蛋白的定位和功能活性相似, 且胆管收缩/舒张活性更高。Yokoyama 等^[11]通过测定药物代谢酶 CYP1A2、

CYP2B6、CYP2C9、CYP2C19 等的活性,发现分化后的 HepaRG 细胞酶活性与人肝细胞相当,且远高于 HepG2 细胞。对暴露于黄曲霉毒素 B1 (AFB1) 和环磷酰胺 (CPA) 的 HepG2 和 HepaRG 细胞进行毒性基因组学分析发现,许多 p53 相关基因在 HepaRG 细胞中表达上调,高于 HepG2 细胞。

为评价药物对转运体的影响,在研究中常使用氘标记的牛磺胆汁酸 (d5-TCA)、氘标记的甘氨酸鹅脱氧胆酸 (d4-GCDCA) 和 CDCFDA 作为探针底物。d5-TCA 和 d4-GCDCA 是胆管侧外排型转运体 BSEP、血窦侧摄取转运体牛磺胆酸钠共转运蛋白 (NTCP) 及血窦侧转运体 MRP3 和 MRP4 的底物,利用液相色谱-质谱 (LC-MS) 法测定细胞内这 2 种底物的浓度即可计算胆汁外排指数,间接反映药物对上述几种转运体的影响^[12]。CDCFDA 进入细胞后被酯酶代谢得到的 CDF 是胆管侧外排型转运体 MRP2 和血窦侧外排转运体 MRP3 的底物,且 CDF 是一种荧光物质,可使用酶标仪检测荧光吸收值测定其含量^[13]。Penman 等^[14]研究发现在 HepaRG 细胞中,CMFDA 荧光染料可以通过 MRP2 和 P-糖蛋白 (P-gp) 转运体向胆小管主动外排,而 HepG2 细胞缺乏功能性胆管转运体表达,对胆汁淤积研究的适用性有限。近期有研究通过分析肝细胞转运蛋白在 DILI 中的作用,指出除原代肝细胞外, HepaRG 细胞是试验的另一种选择^[15]。本研究在 APAP 给药后检测了胆汁淤积相关指标,包括 MRP2 底物 CDF、细胞脂质含量、FXR、MRP3 及 BSEP,除细胞脂质含量没有显著性变化外,与相同给药天数的最低浓度相比, CDF 在给药 1 d 时显著升高,其余指标均有一定显著性下降趋势。综合所有指标分析, APAP 在 SCH 模型中导致肝毒性的机制不依赖于脂肪变性,而是可能通过诱导胆汁淤积,呈现“直接转运蛋白抑制-FXR 信号干扰-胆汁酸稳态崩溃”的级联反应过程,早期抑制 MRP2 和 MRP3 功能,导致胆汁酸排泄受阻;中期抑制 MRP3 功能和 FXR 信号通路,进一步加剧胆汁酸稳态失衡,导致代谢紊乱;晚期通过氧化应激长期抑制 FXR,导致 BSEP 表达下降,加剧胆汁排泄障碍,MRP3 耗竭导致细胞失去代偿性排毒能力,胆汁酸和毒性代谢物蓄积,从而引发肝毒性。综上所述,本研究揭示了 APAP 对肝细胞胆汁酸代谢和转运功能的阶段性、多靶点毒性作用。这与文献报道一致, Qiu 等^[16]研究了 HepaRG 细胞 BSEP 基因敲除后的肝脏转运蛋白表

达,发现 BSEP 的功能障碍使细胞易发生胆汁酸的改变,是药物性胆汁淤积损伤的易感因素。多项研究表明 APAP 具有明确胆汁淤积毒性机制^[17-18], APAP 过量是导致临床 DILI 和胆汁淤积的常见原因,美国食品药品监督管理局 (FDA) 等机构已将其列为药物肝毒性研究的标准阳性对照物。

本研究成功建立的基于 96 孔板的 SCH 模型,胆小管分泌功能可维持 7 d,建模 72 h 后即可用于评价药物肝胆转运和胆汁淤积,具有微量、高效、快速的特点,为高通量筛选药物提供可能。但是在培养过程中, SCH 模型仍不可避免地丧失肝细胞原有的形态和功能,相关的药物代谢酶活性也逐渐下降。因此后续可通过调整培养基组成和更换 ECM 种类等方法获得最佳的培养条件。据报道,将肝细胞和其他非实质肝细胞 (如星状细胞、窦状内皮细胞和库普弗细胞) 以三明治夹心的结构进行共培养,能更好地模拟肝脏正常的结构和生物活性,活性可至少维持 4 周^[9]。后续应不断改良和优化 SCH 模型构建方法,提高模型用于药物肝毒性风险预测和毒性机制研究价值。课题组后续将进一步从临床生化、信号通路、代谢产物等角度,进一步验证模型在更长期药物暴露条件下 (如 2 周以上) 应用于多种诱导胆汁淤积药物评价的可靠性及灵敏性,从而充分评估其药物肝毒性预测能力。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Björnsson E S, Bergmann O M, Björnsson H K, et al. Incidence, presentation, and outcomes in patients with drug-induced liver injury in the general population of Iceland [J]. *Gastroenterology*, 2013, 144(7): 1419-1425.e3.
- [2] Björnsson E S. Drug-induced liver injury: An overview over the most critical compounds [J]. *Arch Toxicol*, 2015, 89(3): 327-334.
- [3] Petrov P D, Leonor Fernández-Murga M, López-Riera M, et al. Predicting drug-induced cholestasis: Preclinical models [J]. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*, 2018, 14(7): 721-738.
- [4] 李瑞红, 柳娟, 孙旭尔, 等. 药物肝毒性评价体外细胞模型的相关研究进展 [J]. *生命科学仪器*, 2020, 18(4): 41-52.
Li R H, Liu J, Sun X E, et al. Research progress on *in vitro* cell models for drug-induced hepatotoxicity evaluation [J]. *Life Sci Instrum*, 2020, 18(4): 41-52.

- [5] De Bruyn T, Chatterjee S, Fattah S, et al. Sandwich-cultured hepatocytes: Utility for *in vitro* exploration of hepatobiliary drug disposition and drug-induced hepatotoxicity [J]. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*, 2013, 9(5): 589-616.
- [6] Cerec V, Glaise D, Garnier D, et al. Transdifferentiation of hepatocyte-like cells from the human hepatoma HepaRG cell line through bipotent progenitor [J]. *Hepatology*, 2007, 45(4): 957-967.
- [7] Lübberstedt M, Müller-Vieira U, Mayer M, et al. HepaRG human hepatic cell line utility as a surrogate for primary human hepatocytes in drug metabolism assessment *in vitro* [J]. *J Pharmacol Toxicol Meth*, 2011, 63(1): 59-68.
- [8] Zeilinger K, Freyer N, Damm G, et al. Cell sources for *in vitro* human liver cell culture models [J]. *Exp Biol Med (Maywood)*, 2016, 241(15): 1684-1698.
- [9] Gijbels E, Vilas-Boas V, Deferm N, et al. Mechanisms and *in vitro* models of drug-induced cholestasis [J]. *Arch Toxicol*, 2019, 93(5): 1169-1186.
- [10] Bachour-El Azzi P, Sharanek A, Burban A, et al. Comparative localization and functional activity of the main hepatobiliary transporters in HepaRG cells and primary human hepatocytes [J]. *Toxicol Sci*, 2015, 145(1): 157-168.
- [11] Yokoyama Y, Sasaki Y, Terasaki N, et al. Comparison of drug metabolism and its related hepatotoxic effects in HepaRG, cryopreserved human hepatocytes, and HepG2 cell cultures [J]. *Biol Pharm Bull*, 2018, 41(5): 722-732.
- [12] 陈涛. 基于 LC-MS/MS 绝对定量人肝细胞中药物转运体及其应用 [D]. 广州: 广东药科大学, 2016.
Chen T. Absolute quantification of drug transporters in human liver cells based on LC-MS/MS and their applications [D]. Guangzhou: Guangdong Pharmaceutical University, 2016.
- [13] 唐茵茹, 黄芝瑛, 汪祺, 等. 三明治肝细胞培养模型及其在中药肝毒性评价中的应用 [J]. *中国现代中药*, 2022, 24(5): 926-932.
Tang Y R, Huang Z Y, Wang Q, et al. Sandwich-cultured hepatocytes and application in hepatotoxicity evaluation of Chinese medicine [J]. *Mod Chin Med*, 2022, 24(5): 926-932.
- [14] Penman S L, Sharma P, Aerts H, et al. Differential toxic effects of bile acid mixtures in isolated mitochondria and physiologically relevant HepaRG cells [J]. *Toxicol In Vitro*, 2019, 61: 104595.
- [15] Tátrai P, Erdő F, Krajcsi P. Role of hepatocyte transporters in drug-induced liver injury (DILI): *In vitro* testing [J]. *Pharmaceutics*, 2023, 15(1): 29.
- [16] Qiu X, Zhang Y, Liu T, et al. Disruption of BSEP function in HepaRG cells alters bile acid disposition and is a susceptible factor to drug-induced cholestatic injury [J]. *Mol Pharm*, 2016, 13(4): 1206-1216.
- [17] 靳永文. 基于转运体和胆酸盐的异烟肼和对乙酰氨基酚肝损伤机制初探 [D]. 兰州: 兰州大学, 2016.
Jin Y W. Preliminary exploration of the liver injury mechanism of isoniazid and acetaminophen based on transporters and bile salts [D]. Lanzhou: Lanzhou University, 2016.
- [18] McGill M R, Jaeschke H. Metabolism and disposition of acetaminophen: Recent advances in relation to hepatotoxicity and diagnosis [J]. *Pharm Res*, 2013, 30(9): 2174-2187.
- [19] Sakai Y, Iwao T, Susukida T, et al. *In vitro* bile acid-dependent hepatocyte toxicity assay system using human induced pluripotent stem cell-derived hepatocytes: Current status and disadvantages to overcome [J]. *Drug Metab Pharmacokinet*, 2019, 34(4): 264-271.