

基于雷公藤和雷公藤多苷片提取物肝毒性检测的微流控肝器官芯片技术研究

林嘉伟, 杨依霏, 夏冰, 李春, 卢晨娜, 张亚*, 刘婷*

中国中医科学院 中药研究所, 北京 100029

摘要: 目的 使用一种在微米尺度空间对流体进行操控, 以模拟体内微环境为主要特征, 以微流控肝器官芯片技术, 评价雷公藤提取物 (*Tripterygium wilfordii* extract, TWE) 和雷公藤多苷片提取物 (*Tripterygium Glycosides Tablet* extract, TGE) 的肝脏毒性, 比较微流控-精密肝切片、静态-精密肝切片、微流控-HepaRG 细胞培养体系的差异性。方法 将新鲜的大鼠肝脏进行精密切片处理后, 分别置于静态/微流控培养体系中进行培养, 微流控-HepaRG 细胞培养体系则是将 HepaRG 细胞接种到已预先接种人脐静脉内皮细胞 (human umbilical vein endothelial cells, HUVECs) 的培养小室中加药培养; TWE 终质量浓度为 0.30、0.60、1.20 mg/mL (以生药量计), TGE 终质量浓度为 31.25、62.50、125.00 $\mu\text{g/mL}$, 共孵育 24 h 后进行肝脏损伤标志物的测定及形态学观察。结果 在不额外添加药物的正常培养情况下, 微流控/静态精密肝切片培养上清中丙氨酸氨基转移酶 (alanine aminotransferase, ALT)、乳酸脱氢酶 (lactate dehydrogenase, LDH)、总胆汁酸 (total biliary acid, TBA) 的表达均明显高于微流控-HepaRG 细胞培养体系。与 TWE 和 TGE 共培养后, 微流控-精密肝切片培养体系中, 高剂量的 TWE 和 TGE 均可导致培养上清中 ALT、LDH 和谷氨酰转氨酶 (γ glutamyl transferase, GGT) 活性的显著升高, TWE 还可以显著升高总胆红素 (total bilirubin, TBil) 的含量, 并显示出一定的量-毒关系; 而在静态-精密肝切片培养体系中, 仅中剂量的 TGE 可导致 ALT 和 LDH 活性的显著升高, 且未见剂量相关性; 在微流控-HepaRG 细胞培养体系中, 仅 GGT 的含量显著升高。组织病理学检查结果显示, TWE 和 TGE 低、中、高剂量对共培养体系中的 HUVECs 形态均未见明显影响, 说明受试药不影响共培养体系的血管仿生结构; TWE 和 TGE 在微流控培养体系或静态培养体系下, 低、中、高剂量均会对精密肝切片造成不同程度的损伤, 肝细胞出现不同程度肿胀, 弥漫性肝细胞核溶解、消失, 肝细胞索结构松散, 但仅在微流控-精密肝切片培养体系下, 形态学的改变呈现出一定的剂量相关性; 在微流控-HepaRG 细胞培养体系中, 仅高剂量的 TWE 和 TGE 可导致细胞形态的明显改变。结论 在微流控-精密肝切片培养体系下, TWE 和 TGE 所造成的肝损伤特点一致, 具有明显的量-毒关系, 表明微流控肝器官芯片技术可以更灵敏、更准确地反映出受试物对肝脏的损伤情况, 且有可能成为临床前中药肝毒性评价的新的技术手段。

关键词: 微流控; 精密肝切片; 雷公藤; 雷公藤多苷片; 肝毒性

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2023)24-8105-12

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2023.24.015

Microfluidic liver-on-a-chip technology based on hepatotoxicity detection of *Tripterygium wilfordii* and *Tripterygium Glycosides Tablet* extract

LIN Jia-wei, YANG Yi-fei, XIA Bing, LI Chun, LU Chen-na, ZHANG Ya, LIU Ting

Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100029, China

Abstract: Objective To manipulate fluids in micron-scale space to simulate the *in vivo* micro-environment as the main feature by using a microfluidic liver-on-a-chip technology, so as to evaluate the hepatotoxicity of *Tripterygium wilfordii* extract (TWE) and *Tripterygium Glycosides Tablet* (雷公藤多苷片) extract (TGE), and compare the difference between the microfluidic precision-cut liver slices model and the microfluidic HepaRG cell model and the static precision-cut liver slices model. **Methods** Fresh rat livers were subjected to precision-cut liver slice and cultured in a static/microfluidic culture model, HepaRG cells were inoculated into a

收稿日期: 2023-07-06

基金项目: 北京市自然科学基金资助项目 (7232301); 中国中医科学院科技创新工程项目 (CI2021A04804); 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金资助 (ZZ14-YQ-025, ZXKT22018, ZXKT21009)

作者简介: 林嘉伟, 硕士研究生, 研究方向为中药毒理。Tel: (010)84252832 E-mail: Jwlin730@163.com

*通信作者: 张亚, 博士, 研究方向为药理学。Tel: (010)84252832 E-mail: zhangya190726@naver.com

刘婷, 硕士, 研究员, 从事毒理学研究。Tel: (010)84252832 E-mail: tliu@icmm.ac.cn

culture chamber pre-inoculated with human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) and then incubated with drugs. TWE final concentrations were 0.30, 0.60, 1.20 mg/mL (calculated by the amount of crude drug), and TGE final concentrations were 31.25, 62.50, 125.00 $\mu\text{g/mL}$, respectively. After 24 h, the determination of liver injury markers and morphological observation were done. **Results** Under normal culture conditions, the expression levels of alanine aminotransferase (ALT), lactate dehydrogenase (LDH), and total biliary acid (TBA) in the supernatant of precision-cut liver slice culture were significantly higher than single HepaRG cell culture model when using two culture vectors. After co-culture with TWE and TGE, in the microfluidic precision-cut liver slice model, high-dose TWE and TGE could significantly increase the activities of ALT, LDH and gamma glutamyl transferase (GGT) in the culture supernatant, while TWE could also significantly increase the content of total bilirubin (TBil), and showed a certain dose-toxicity relationship; Only medium-dose TGE could significantly increase the levels of ALT and LDH in the static precision-cut liver slice model, with no dose-dependent effect; In the microfluidic HepaRG cell model, only the GGT content increased significantly. Histopathological examination showed that low-, medium- and high-dose of TWE and TGE had no significant effect on the morphology of HUVECs in the co-culture model, indicating that the bionic structure of blood vessels in the co-culture model was not affected by the experimental drugs; The low-, medium- and high-dose of TWE and TGE made different degrees of damage to precision-cut liver slices in two microfluidics culture model and static culture model. The liver cells appear different degrees of swelling, diffuse dissolution and disappearance of liver nuclei, and loose structure of liver cells. However, only in microfluidic precision-cut liver slice model, morphological changes showed a certain dose correlation; In the HepaRG cell culture model, only high-dose of TWE and TGE made significant changes in cell morphology. **Conclusion** In the microfluidic precision-cut liver slice culture model, the liver injury characteristics caused by TWE and TGE are consistent, with a clear dose-toxicity relationship. The microfluidic liver-on-a-chip technology can more sensitively and accurately reflect the damage of the test substance to the liver, which can become a new technology for preclinical liver toxicity evaluation of traditional Chinese medicine.

Key words: microfluidics; precision-cut liver slice; *Tripterygium wilfordii* Hook. f.; Tripterygium Glycosides Tablet; hepatotoxicity

随着药品种类的不断增多,药源性肝损伤(drug-induced liver injury, DILI)发生率呈逐年增加趋势,针对 DILI 的发病机制、预测、预防和诊断的研究亟待加强。中草药是亚太地区(韩国、新加坡)引起 DILI 最为主要的药物,已逐渐成为 DILI 的主要病因^[1]。文献研究显示,中药药源性肝损伤(herb-induced liver injury, HILI)占临床全部药物损伤的 2.6%~4.8%,在全部 DILI 中的构成比约为 20%^[2];在韩国,有 27.5%的 DILI 患者是由于摄取“草药”导致的^[3]。在临床前和临床试验阶段,肝毒性问题也已成为药物研发失败及药物上市后召回的最主要原因之一。而中药由于成分及代谢产物复杂多样,作用机制多元化,药材、产地、炮制、加工、提取等诸多影响因素导致结果的不确定性,导致研究风险的进一步增加。由于中药具有成分复杂、多靶点、多效应等特点,在对其进行临床评价上,有一定的局限性。因此,构建敏感可靠的肝毒性评价模型,进行充分的临床前药物毒性研究,是减少 DILI 发生的最有效途径^[1]。

以 2D 细胞或动物为标准进行临床前药物毒性预测和评价仍是目前的主流技术。基于中药有效物质浓度低、多靶点、网络式整体调控的特点,使用传统的体外研究方法(如细胞 2D 培养体系)无法完全满足现代生命科学体系下中药毒性机制研究的

需求,而体内实验又存在着种属的巨大差异和灵敏度较差的问题。故亟需找到一种更为灵敏、准确、快速、接近体内代谢过程,可实时动态监测细胞功能和结构变化,全面评估药物作用特点的新模型用于中药的肝毒性评价。基于微流控芯片技术研制的器官芯片(organ-on-chip, OOC),可在体外模拟多种活体细胞、组织器官微环境,反映人体组织器官的主要结构和功能特征,不仅满足了中药长期多次给药的研究需求,还可实现实时动态监测细胞内各项药物毒性相关指标,因此受到广泛关注。相较体外 2D 细胞或体内动物实验,3D 体外器官模型的使用,不仅会减少动物的使用,减少伦理问题的发生,同时还具有稳定性和可重复性的优点^[4]。美国食品药品监督管理局,首次允许新药申报资料中以器官芯片模型代替动物模型对药物进行药效学评价,并在此之后批准该治疗“慢性自身免疫性脱髓鞘行神经病”的新药上市^[5-6]。

1985 年 Smith 等^[7]首次使用 3D 体外肝脏模型构建了药物毒性实验,但受到不能及时供应大量营养物质、肝脏受损后 48 h 内激活纤维化进程等局限性,该模型仅维持了 72 h。随着科技的发展,在 2008 年 Vickerman 等^[8]把微流控芯片技术和细胞相结合,在体外成功的模拟了血管生成过程中的微环境。

2023 年 Vega 等^[9]证明将肝切片和微流控芯片技术相结合,使精密肝切片可以在体外存活 31 d。大大提高了 3D 体外肝脏模型存活的时间。本研究构建的肝器官芯片是通过震荡切片机从肝脏中分离出来的组织薄片,精密肝切片保留了肝脏的实质细胞、非实质细胞(星状细胞、枯否细胞等)、小胆管、肝小叶中央静脉、肝窦周狄氏腔(Disse 腔)等,所有细胞类型及完整结构,使得其失去代谢能力的速度比一般原代细胞体外培养要慢,更有利于体外培养和药物毒性检测。

雷公藤是卫矛科植物雷公藤 *Tripterygium wilfordii* Hook. f. 的干燥根,始载于《神农本草经》,具有祛风除湿、活血通络、消肿止痛、杀虫解毒的功效。现代研究发现,雷公藤具有抗肿瘤、抗炎、免疫抑制等作用,同时也可引起多器官的损害,其中肝毒性是雷公藤报道较多的毒性反应之一^[10-13]。雷公藤多苷片是从雷公藤有效部位中提取的中药制剂,是我国首先研究利用的抗炎免疫调节天然药物制剂,有“中草药激素”之称,被列为国家基础药物中的免疫抑制剂,被世界卫生组织认定为治疗关节炎的“中国首创植物新药”,良好的疗效使其在临床中应用广泛^[14-16]。雷公藤及其制剂均可引起 DILI,2012 年国家食品药品监督管理总局在第 46 期药品不良反应信息通报中,特别提出要关注雷公藤及其制剂的用药安全^[17]。雷公藤及其制剂引发的肝损伤在临床上表现相似,患者表现出食欲不振、乏力、恶心、呕吐、尿黄、皮肤和巩膜黄染等症状,并存在肝脏肿大、有压痛及血清丙氨酸氨基转移酶(alanine aminotransferase, ALT)、总胆红素(total bilirubin, TBil)升高等临床表征^[18]。

本研究通过使用可明确造成肝损伤的雷公藤醇提物(*Tripterygium wilfordii* extract, TWE)和其制剂雷公藤多苷片提取物(*Tripterygium Glycosides Tablet extract*, TGE)为工具药,基于微流控器官芯片系统,通过肝毒性敏感生物标志物检测和病理组织学观察,比较了 2 种培养载体(精密肝切片、HepaRG 细胞)在 3 种培养体系中(微流控-HepaRG 细胞、静态-精密肝切片、微流控-精密肝切片)的差异性,以期为中药肝毒性评价提供更为灵敏和可靠的新型技术模型。

1 材料

1.1 动物与细胞

SPF 级雌性 SD 大鼠,体质量 120 g~180 g, 6

周龄,购自北京维通利华实验动物技术有限公司,许可证号 SCXK(京)2021-0011。动物饲养于中国中医科学院中药研究所中药安全评价中心屏障环境动物实验室,实验设施许可证号 SYXK(京)2020-0042,温度 20~26 ℃,相对湿度 40%~70%,人工光照 12 h 明暗周期,动物自由饮水进食。本实验中,对动物实验的必要性、动物数量、实验过程中动物预期受到的伤害、动物福利等内容经中国中医科学院中药研究所实验动物福利伦理委员会审查批准,批件编号为 2022A012、2022A015。

人肝原代细胞系的终末分化肝细胞(HepaRG 细胞)、人脐静脉内皮细胞(human umbilical vein endothelial cells, HUVECs),均购自商城北纳创联生物科技有限公司。

1.2 药品与试剂

雷公藤(批号 2105001)购自安国市昌达中药饮片有限公司,经中国中医科学院中药研究所李春研究员鉴定为卫矛科植物雷公藤 *T. wilfordii* Hook. f. 的干燥根;雷公藤多苷片(批号 20230202)购自湖南千金协力药业有限公司;DMEM 培养基(批号 8122548)、胎牛血清(fetal bovine serum, FBS, 批号 16140089)、胰蛋白酶(含 EDTA,批号 25200072)、磷酸缓冲盐溶液(phosphate buffered saline, PBS, pH 7.4, 批号 8122302)购自美国 Gibco 公司;青霉素-链霉素双抗(批号 15070063)购自索莱宝生物科技有限公司;琼脂糖(批号 192235)购自上海百济神州生物科技有限公司;纤连蛋白(批号 MQC2521071)购自美国 R&D Systems 公司;ALT 试剂盒、乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH)试剂盒、谷氨酰转移酶(gamma glutamyl transferase, GGT)试剂盒、总胆汁酸(total biliary acid, TBA)试剂盒、TBil 试剂盒均购自北京安图生物工程股份有限公司,批号分别为 10713D11、01023C11、10202E11、110810C11、10128A11;CCK-8 试剂盒(批号 VE575)购自东仁化学科技(上海)有限公司;对照品雷公藤内酯甲、雷公藤甲素(质量分数>98%,批号分别为 RDD-L06002009017、RDD-L00402111018)均购自成都瑞芬思德丹生物科技有限公司。

1.3 仪器

Vibratome1000 Plus 型震荡切片机(美国 Vibratome 公司);BCM-1000A 型单人超净台(苏州安泰空气技术有限公司);HERA Cell CO₂ 培养

箱(德国 BINDER 公司); TBA-120FR 型全自动生化检测仪(日本佳能公司); SYNERQY III 型多功能酶标仪(美国伯腾仪器有限公司); Histo-Tek VP1 型全封闭组织脱水机(河南中宝医疗器械销售有限公司); Tissue-Tek TEC5 型石蜡包埋机(日本樱花公司); HistoCore BIOCUT 型轮转式切片机(德国 Leica 公司); Shandon Varistain Gemini 型全自动染色机(赛默飞世尔科技有限公司); Olympus BX51 型显微镜及图像分析系统(日本奥林巴斯公司); Mimicup 灌流系统(上海新微科技有限公司); Waters e2695 型高效液相色谱仪(包括在线脱气机、四元梯度洗脱泵、自动进样器、柱温箱、2695 型溶剂管理系统、2998 型二极管阵列检测器和 Empower 色谱工作站(美国 Waters 公司); XS105DU 型十万分之一电子天平(瑞士梅特勒-托利多公司)。

2 方法

2.1 TWE 的制备

精密称取雷公藤饮片粉末 100.00 g, 放置到烧杯, 加入 1000 mL 95%乙醇, 盖上保鲜膜, 放置过夜(约 16 h), 超声处理 45 min, 放冷至室温, 滤过, 滤渣用 500 mL 95%乙醇润洗 2 遍, 合并滤液, 用旋转蒸发器减压回收至无醇味, 放置在冰箱中冷藏, 用冷冻干燥机冻干成粉。得 TWE 粉末 5.01 g, 药物得率为 5.01%。经高效液相色谱检测分析, TWE (5.01 g) 中雷公藤内酯甲的质量为 268.79 mg, 质量分数为 5.365%。

2.2 TGE 的制备

20 片雷公藤多苷片称定质量, 为 1.415 2 g, 研细, 置于具塞三角瓶中, 加入 30 mL 无水乙醇, 超声提取(功率 400 W, 频率 40 kHz) 30 min, 放冷, 滤过, 滤液回收至干, 称定质量, 得 TGE 121.90 mg, 提取率为 8.60%。经高效液相色谱检测分析, TGE (121.90 mg) 中雷公藤内酯甲的质量为 0.487 8 mg, 质量分数为 0.400%; 雷公藤甲素的质量为 0.119 4 mg, 质量分数为 0.097 9%。

2.3 CCK-8 细胞毒性检测

HepaRG 细胞以含 10% FBS、1%双抗的 DMEM 培养液常规培养, 取对数生长期的细胞, 胰酶消化后进行细胞计数, 以 1×10^5 个/mL 接种于 96 孔板, 在 37 °C、5% CO₂ 的细胞培养箱中培养 24 h 后给药。TWE 和 TGE 用二甲基亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO)助溶, DMSO 终体积分数为 0.5%, 以含有

0.5% DMSO 的 DMEM 培养液为对照组, TWE 组的药物质量浓度梯度设为 0.20、0.39、0.78、1.56、3.12、6.25、12.50 mg/mL (以生药量计), TGE 组的药物质量浓度梯度设置为 7.81、15.62、31.25、62.50、125.00、250.00、500.00 μg/mL。药物孵育 24 h 后, 吸弃上清液, 每孔加入 CCK-8 溶液 110 μL, 37 °C 培养箱孵育 30 min 后, 450 nm 处测定吸光度(A)值, 计算药物对细胞的抑制率和半数抑制浓度(half inhibitory concentration, IC₅₀), 并选择对 HepaRG 细胞无明显抑制浓度、IC_{30~40}、>IC₅₀ 的剂量进行后续实验。

2.4 精密肝切片的制备

将 SD 大鼠脱颈椎处死, 在无菌条件下取出肝脏, 用预冷的 DMEM 培养基漂洗 3 次后, 置于预先以氧饱和并不断通入氧气(95% O₂、5% CO₂) 的 DMEM 培养基中。按照文献方法^[19]制备厚度 300 μm、直径 6 mm 的精密肝切片。

2.5 静态培养体系的构建

将上述制备的精密肝切片置于 96 孔板中, 设 0.5% DMSO 对照组, TWE (0.30、0.60、1.20 mg/mL, 以生药量计) 组和 TGE (31.25、62.50、125.00 μg/mL) 组, 分别与精密肝切片共培养, 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养 24 h 后, 用于检测。

2.6 微流控培养体系的构建

芯片为 5 层 4 通道结构。第 1 层为聚碳酸酯(polycarbonate, PC)材质的芯片培养小室, 第 2 层为细胞培养室底部聚对苯二甲酸乙二醇酯膜(polyethylene terephthalate, PET)的上面, 上述 2 层构成整个芯片的上层, 用于 HepaRG 细胞/大鼠精密肝切片的培养; 第 3 层为细胞培养室 PET 膜的底面, 用于 HUVECs 的培养, 第 4 层为 PC 材质的芯片流道板, 该流道板上层为芯片培养小室的基座, 下层包含豆荚状流道, 为培养液的流动层, 上述 3、4 层构成整个芯片的中层; 第 5 层为聚甲基丙烯酸甲酯(polymethylmethacrylate, PMMA)材质薄膜, 构成了整个芯片的下层。将芯片流道板与 PMMA 薄膜进行紧密封接, 上、中层之间不进行封接直接进行各个部件的组装后, 通过灌流管路系统连接微量蠕动泵及控制器, 从而构成 1 个芯片结构(图 1-A)。在无菌条件下将 PET 膜底面用 100 μL 的 10 μg/mL 纤连蛋白预处理 3 h, PBS 冲洗底面, 以 5×10^5 个/mL 的密度接种 HUVECs, 接种体积 100 μL/孔。12 h 后, 翻转扣入已预先封装有

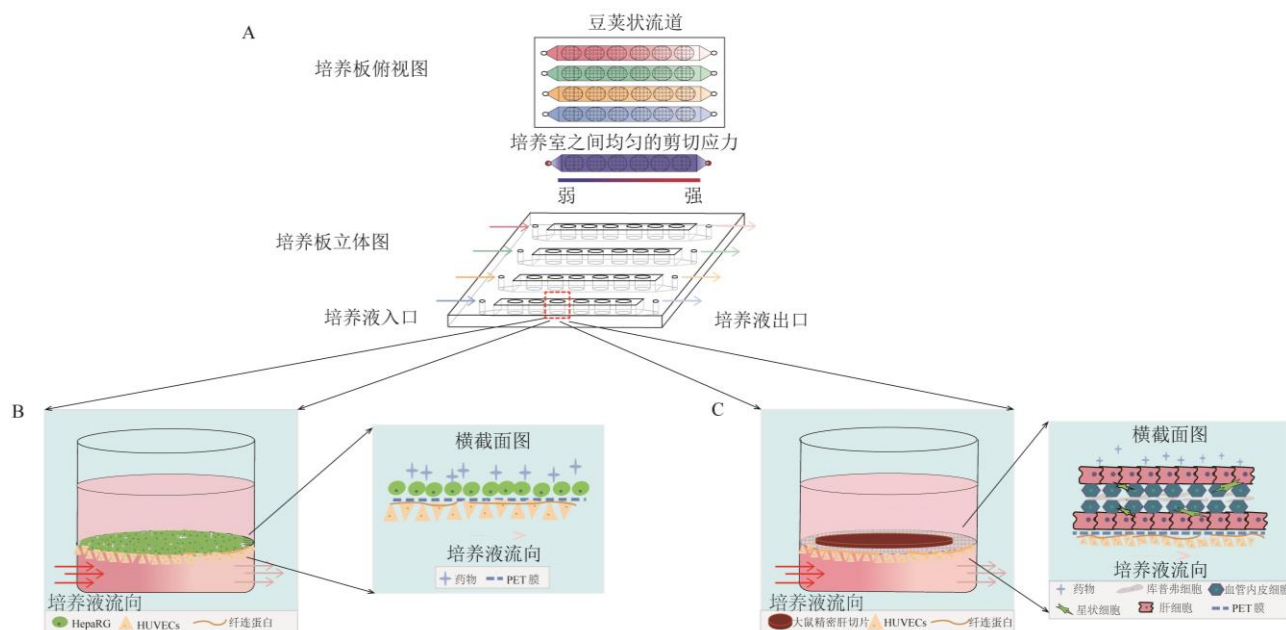


图 1 微流控肝芯片结构 (A)、微流控-HepaRG 细胞培养体系 (B) 和微流控-精密肝切片培养体系 (C) 培养方式示意图
Fig. 1 Structure of microfluidics liver chip (A), schematic diagram of microfluidic HepaRG cell model (B) and microfluidic precision-cut liver slice model (C)

PMMA 底膜的芯片流道板凹槽中, PET 膜上面以 5×10^5 个/mL 的密度, $100 \mu\text{L}$ /孔的接种体积, 接种 HepaRG 细胞作为微流控-HepaRG 细胞培养体系的培养物 (图 1-B) 或按“2.4”项下方法制备的精密肝切片 (图 1-C), 连接灌流管路系统, 打开微流体控制器调整微量蠕动泵体积流量为 $251 \mu\text{L}/\text{min}$ ^[20]。置于 37°C 、 $5\%\text{CO}_2$ 的培养箱培养 12 h 后, TWE 组和 TGE 组分别以含 0.30、0.60、1.20 mg/mL (以生药量计) 和 31.25、62.50、125.00 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 受试物的 DMEM 培养液 (含 0.5% DMSO) 为循环液进行灌流, 同时芯片培养小室内加入上述含药培养液 150 μL ; 对照组的循环液和皿内液均为含 0.5% DMSO 的 DMEM 培养液。 37°C 、 $5\%\text{CO}_2$ 培养箱中继续培养 24 h 后, 用于后续检测。

2.7 肝损伤标志物的检测

取培养上清, 使用全自动生化分析仪对肝细胞损伤相关的生物标志物 ALT、LDH, 胆管损伤的生物标志物 GGT, 肝胆排泄功能相关的生物标志物 TBil、TBA 进行检测。

2.8 精密肝切片组织病理学检查

将培养后的精密肝切片置于 4% 中性多聚甲醛中固定 7 d, 常规苏木素-伊红 (hematoxylin-eosin staining, HE) 染色后, 利用光学显微镜进行组织病理学检查。

2.9 细胞形态学观察

取铺有 HUVECs 或 HepaRG 细胞的 PET 膜, 将有细胞附着的一侧朝上, 浸入 4% 中性多聚甲醛中固定 30 min, 随后吸去固定液, 行常规 HE 染色, 利用光学显微镜进行细胞形态学观察

2.10 统计学分析

实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, SPSS 20.0 统计软件处理, 采用 One-way ANOVA 进行多组比较, 方差齐性用 LSD 检验, 方差不齐用 Tamhane 检验。

3 结果

3.1 CCK-8 细胞毒性检测的结果

如图 2 所示, 随着 TWE 和 TGE 的浓度升高, 对 HepaRG 细胞增殖的抑制作用加强, 呈剂量相关性。TWE 0.39 mg/mL 及以下质量浓度对 HepaRG 细胞生长无明显抑制作用, 0.78 mg/mL 及以上质量浓度则明显抑制 HepaRG 细胞的生长 ($P < 0.01$), IC_{50} 为 0.99 mg/mL; TGE 31.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 及以下质量浓度对 HepaRG 细胞生长无明显抑制作用, 62.50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 及以上质量浓度则明显抑制 HepaRG 细胞的生长 ($P < 0.001$), IC_{50} 为 109.57 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。根据以上实验结果, 后续实验中 TWE 的质量浓度设定为 0.30、0.60、1.20 mg/mL, TGE 的质量浓度设定为 31.25、62.50、125.00 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 均为对细胞无影响的抑制浓度、 $\text{IC}_{30 \sim 40}$ 、 $> \text{IC}_{50}$ 的浓度。

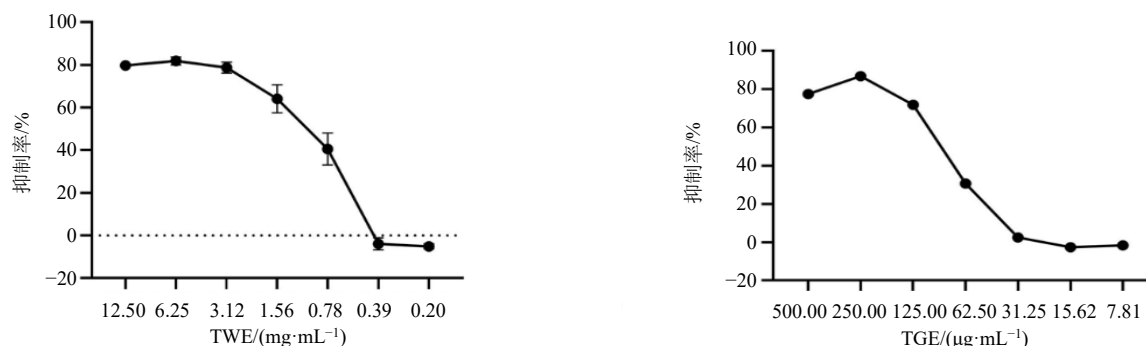


图 2 HepaRG 细胞毒性检测结果

Fig. 2 Results of HepaRG cell cytotoxicity

3.2 TWE 和 TGE 对 3 种培养体系中培养载体肝损伤标志物的影响

3.2.1 2 种培养载体在正常培养条件下的比较 确定在正常培养情况下（不含药），2 种培养载体之间肝损伤标志物的表达差异性。将 2 种精密肝切片培养体系的对照组与微流控-HepaRG 细胞培养体系的对照组进行比较（表 1、2），结果表明 2 种精密肝切片培养体系的 ALT、LDH 和 TBA 的表达均明显高于微流控-HepaRG 细胞培养体系（ $P<0.05$ 、 0.01 、 0.001 ）；微流控-精密肝切片培养体系 GGT 的表达有高于微流控-HepaRG 细胞的情况（ $P<0.05$ ），静态-精密肝切片培养体系 GGT 的表达有低于微流控-HepaRG 细胞培养体系的情况（ $P<0.05$ ）；2 种培养载体 TBil 的表达均未见显著性差异。

3.2.2 TWE 和 TGE 对 3 种培养体系肝损伤标志物的影响 根据雷公藤在临床造成肝损伤特点，从肝

损伤生物标志物角度，比较微流控-精密肝切片培养体系、静态-精密肝切片培养体系、微流控-HepaRG 细胞培养体系的差异性。

在 ALT 的分泌方面，与各自体系中对照组比较，微流控-精密肝切片培养体系中 TWE、TGE 的培养上清中 ALT 活性呈剂量相关性升高。其中，TWE 和 TGE 高剂量组的升高具有统计学意义（ $P<0.05$ ）。在静态-精密肝切片培养体系中，中剂量的 TGE 虽可导致 ALT 的显著升高（ $P<0.05$ ），但未见剂量相关性。微流控-HepaRG 细胞培养体系与对照组比较未见统计学意义。

在 LDH 的分泌方面，微流控-精密肝切片培养体系中，TWE 的中、高剂量组、TGE 的高剂量组培养上清中 LDH 的升高与各自的对照组比较有统计学意义（ $P<0.01$ ），且呈现出一定的剂量相关性；微流控-HepaRG 细胞培养体系中 TGE 高剂量组和

表 1 TWE 对不同培养体系肝损伤生物标志物的影响

Table 1 Effect of TWE on biomarkers of liver injury in different culture systems

培养体系	剂量/(mg·mL ⁻¹)	ALT/(U·L ⁻¹)	LDH/(U·L ⁻¹)	GGT/(U·L ⁻¹)	TBil/(μmol·L ⁻¹)	TBA/(μmol·L ⁻¹)
微流控-HepaRG 细胞	—	1.00±0.00	34.65±3.04	0.72±0.11	0.36±0.17	0.40±0.00
	0.30	1.00±0.00	45.63±19.74	0.76±0.05	0.20±0.28	0.43±0.12
	0.60	1.00±0.00	31.33±7.67	0.93±0.29	0.03±0.15	0.37±0.06
	1.20	1.33±0.58	82.17±51.80	2.09±0.18***	-0.13±0.48	0.43±0.15
微流控-精密肝切片	—	22.67±2.89 [#]	2 839.80±191.71 ^{###}	0.43±0.17	-0.07±0.09	10.90±2.83 ^{###}
	0.30	24.67±6.03	3 058.80±352.11	0.68±0.46	0.19±0.23	17.63±9.43
	0.60	43.67±23.76	3 679.40±54.73 ^{**}	0.81±0.56	0.17±0.24	15.57±2.48
	1.20	53.67±11.06 [*]	3 755.67±180.75 ^{**}	1.27±0.10 [*]	0.41±0.15 [*]	22.27±7.47
静态-精密肝切片	—	39.80±8.17 ^{###}	2 728.64±345.43 ^{###}	0.21±0.17 [#]	0.40±0.35	6.52±1.22 ^{##}
	0.30	45.80±11.12	2 790.72±545.30	0.43±0.42	0.47±0.15	7.02±1.84
	0.60	46.80±6.14	2 987.90±452.92	0.21±0.20	0.56±0.23	7.92±1.31
	1.20	40.00±8.00	2 695.30±469.60	0.31±0.25	0.43±0.18	6.20±0.79

与各自培养体系内的对照组比较：^{*} $P<0.05$ ^{**} $P<0.01$ ^{***} $P<0.001$ ；与 HepaRG 细胞培养体系对照组比较：[#] $P<0.05$ ^{##} $P<0.01$ ^{###} $P<0.001$ ，表 2 同

^{*} $P<0.05$ ^{**} $P<0.01$ ^{***} $P<0.001$ vs control group within their respective culture model；[#] $P<0.05$ ^{##} $P<0.01$ ^{###} $P<0.001$ vs control group in HepaRG cell culture model, same as table 2

表 2 TGE 对不同培养体系肝损伤生物标志物的影响

Table 2 Effect of TGE on biomarkers of liver injury in different culture systems

培养体系	剂量/($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	ALT/($\text{U}\cdot\text{L}^{-1}$)	LDH/($\text{U}\cdot\text{L}^{-1}$)	GGT/($\text{U}\cdot\text{L}^{-1}$)	TBil/($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)	TBA/($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)
微流控-HepaRG 细胞	—	1.33 ± 0.58	40.07 ± 7.12	0.38 ± 0.25	0.17 ± 0.14	0.50 ± 0.10
	31.25	0.33 ± 0.58	45.17 ± 12.11	0.62 ± 0.08	0.02 ± 0.09	0.37 ± 0.25
	62.50	1.00 ± 0.00	47.27 ± 5.40	$0.85\pm 0.18^{**}$	0.06 ± 0.09	0.43 ± 0.06
	125.00	1.00 ± 0.00	$111.83\pm 9.24^{***}$	$1.79\pm 0.13^{***}$	0.05 ± 0.41	0.43 ± 0.06
微流控-精密肝切片	—	$55.00\pm 11.53^{\#}$	$3\ 641.65\pm 418.25^{###}$	$1.38\pm 0.32^{\#}$	-0.05 ± 0.26	$6.95\pm 0.07^{###}$
	31.25	57.00 ± 9.54	$4\ 103.77\pm 195.17$	1.22 ± 0.50	0.02 ± 0.36	7.57 ± 0.74
	62.50	68.67 ± 18.82	$4\ 272.05\pm 42.50$	1.50 ± 0.72	-0.04 ± 0.03	7.27 ± 2.10
	125.00	$88.00\pm 19.52^{*}$	$4\ 330.43\pm 442.14^{*}$	$3.20\pm 0.23^{**}$	0.22 ± 0.38	10.15 ± 3.61
静态-精密肝切片	—	$25.33\pm 5.51^{\#}$	$1\ 433.50\pm 82.02^{###}$	0.44 ± 0.31	-0.03 ± 0.15	$2.87\pm 0.29^{\#}$
	31.25	29.33 ± 5.51	$1\ 702.13\pm 90.88$	0.57 ± 0.09	0.10 ± 0.85	3.67 ± 0.47
	62.50	$36.33\pm 7.23^{*}$	$2\ 040.10\pm 21.91^{*}$	0.71 ± 0.25	0.23 ± 0.34	3.57 ± 1.45
	125.00	19.33 ± 3.79	$1\ 184.23\pm 21.32$	0.05 ± 0.07	-0.07 ± 0.16	2.57 ± 0.72

静态-精密肝切片中 TGE 中剂量组培养上清的 LDH 有显著升高 ($P<0.05$), 但仅在微流控-精密肝切片培养体系中, TWE 和 TGE 导致的 LDH 的升高表现出一致性且具有一定的量-毒关系, 显示出微流控-精密肝切片培养体系具有良好的敏感性和准确性。

在 GGT 的分泌方面, 微流控-精密肝切片培养体系和微流控-HepaRG 细胞培养体系表现一致, 均呈现剂量相关性。其中, 微流控-精密肝切片培养体系中 TWE 和 TGE 的高剂量组, 微流控-HepaRG 细胞培养体系中 TWE 的高剂量组和 TGE 中、高剂量组的 GGT 活性与对照组比较均有显著升高 ($P<0.05$ 、 0.01 、 0.001)。而静态-精密肝切片培养体系各组与对照组比较未见统计学差异。

在 TBil 和 TBA 的分泌方面, 与对照组比较, 微流控-精密肝切片培养体系中, TWE 和 TGE 3 个剂量组 TBil 和 TBA 均有一定程度的升高。其中 TWE 高剂量组的 TBil 表达量显著升高 ($P<0.05$), TWE 和 TGE 的低、中、高剂量组与各自对照组比 TBA 的分泌虽有升高, 但没有显著差异。静态-精密肝切片培养体系和微流控-HepaRG 细胞培养体系中 TBA 和 TBil 未见升高趋势。

3.3 TWE 和 TGE 对 3 种培养体系中培养载体形态学的影响

3.3.1 TWE 和 TGE 对 HepaRG 细胞形态学的影响
如图 3 所示, 在微流控-HepaRG 细胞培养体系中, 对照组及 TWE 低、中剂量组和 TGE 低、中剂量组

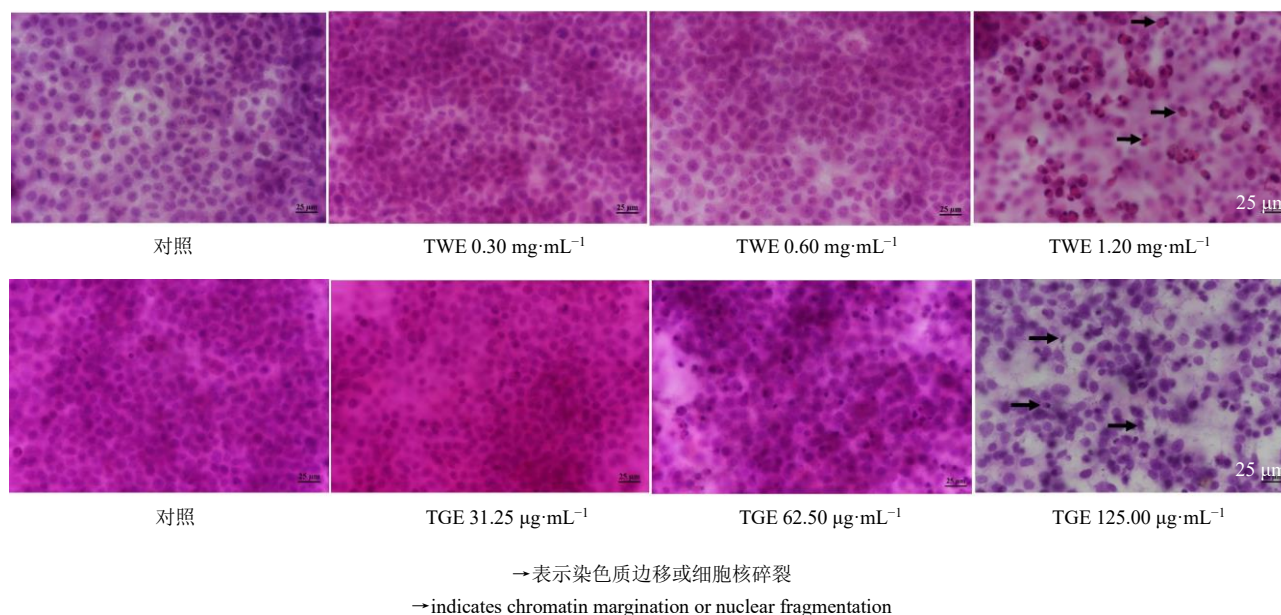


图 3 TWE 及 TGE 对 HepaRG 细胞形态的影响 (HE, $\times 400$)

Fig. 3 Effect of TWE and TGE on morphology of HepaRG cells (HE, $\times 400$)

的 HepaRG 细胞形态均未见显著异常, TWE 高剂量组及 TGE 高剂量组 HepaRG 细胞排列稀疏, 数量减少, 部分细胞形态不规则, 可见染色质边移或细胞核碎裂现象。

3.3.2 TWE 和 TGE 对大鼠精密肝切片组织形态学的影响 如图 4 所示, 微流控-精密肝切片培养体系中, 对照组肝组织结构未见显著异常, TWE 低剂量组肝组织局灶性肝细胞轻微肿胀, 中、高剂量组可

见局灶性至片状肝细胞肿胀, 核质分界不清晰, 部分细胞核消失。在静态-精密肝切片培养体系中, 对照组肝组织结构未见显著异常, TWE 低、中、高剂量组均出现局灶性肝细胞肿胀, 局灶性细胞核溶解、消失。

如图 5 所示, 微流控-精密肝切片培养体系中, 对照组肝组织结构未见显著异常, TGE 低剂量组肝窦轻微扩张, 中剂量组肝窦轻微扩张, 个别肝细胞

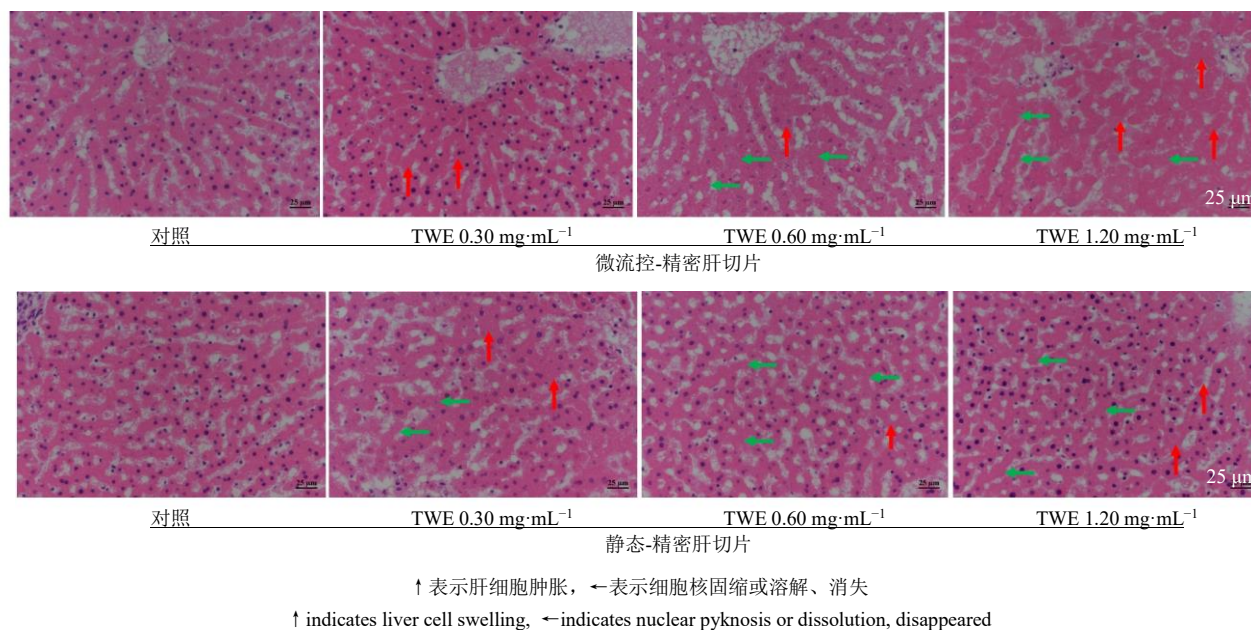


图 4 TWE 对大鼠精密肝切片的影响 (HE, ×400)

Fig. 4 Effect of TWE on precision-cut liver slice of rats (HE, × 400)

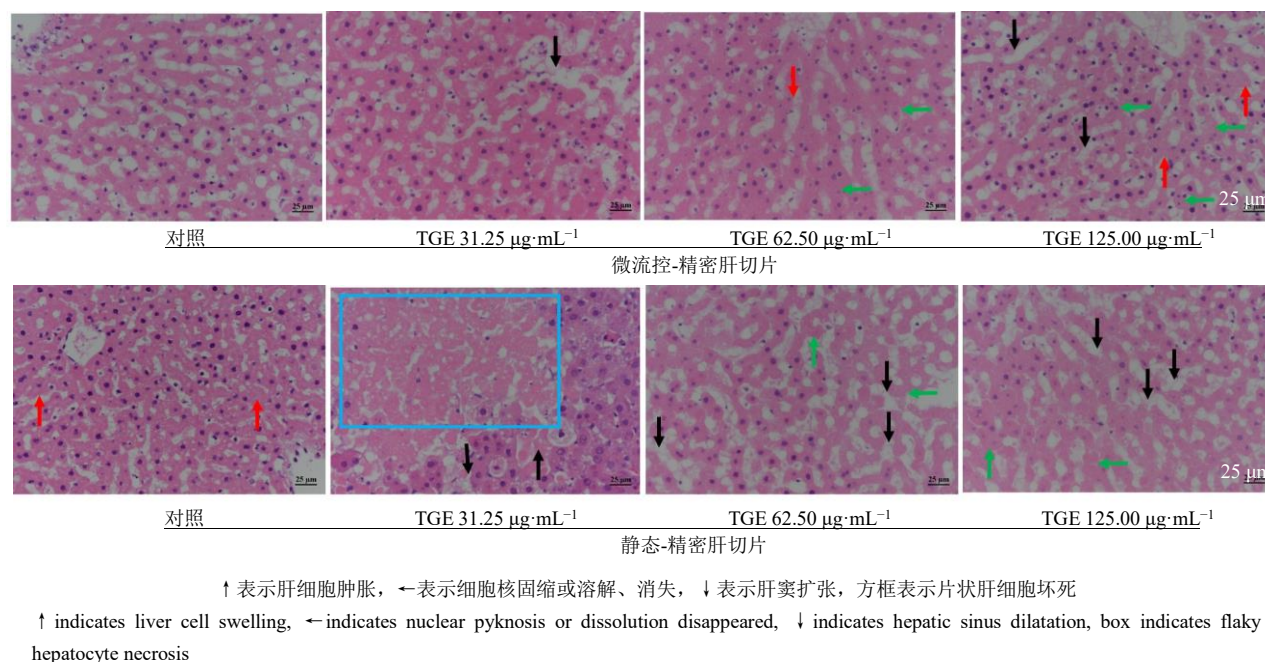


图 5 TGE 对大鼠精密肝切片的影响 (HE, ×400)

Fig. 5 Effect of TGE on precision-cut liver slice of rats (HE, × 400)

核固缩,高剂量组可见局灶性肝细胞肿胀、肝窦扩张,局灶性肝细胞核溶解。在静态-精密肝切片培养体系中,对照组肝细胞局灶性肿胀、变性,低剂量组出现片状肝细胞坏死、肝细胞索紊乱、部分肝细胞肿大,TGE 中、高剂量组均出现片状肝细胞核溶解消失、肝细胞坏死、肝索紊乱、肝窦轻度至中度扩张。综上,微流控-精密肝切片培养体系中,肝损伤程度与剂量呈现一定的相关性,而在静态-精密肝切片培养体系中未见明显的量-毒关系。静态-精密

肝切片培养体系中 TWE 和 TGE 对照组的肝组织形态较微流控-精密肝切片培养体系 TWE 和 TGE 的对照组有轻微损伤。

3.4 TWE 和 TGE 对微流控培养体系中 HUVECs 的形态学观察

如图 6 所示,TWE 和 TGE 对微流控培养体系中 HUVECs 形态未见明显影响,细胞生长呈梭形,排列紧密,细胞边缘整齐,分界清楚,核质比正常,说明整个仿生培养体系状态良好。

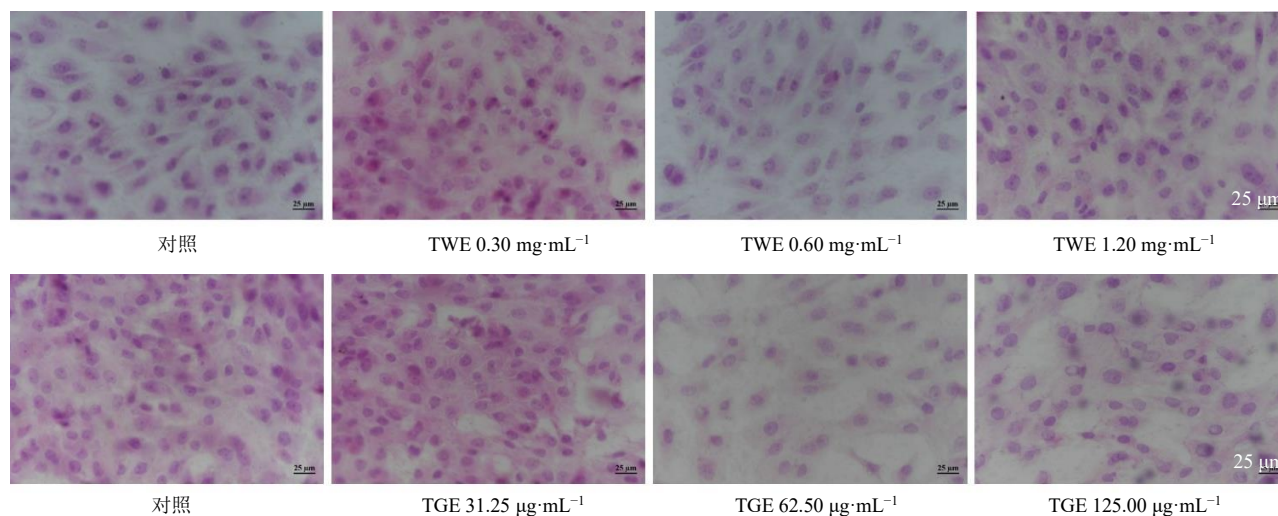


图 6 TWE 及 TGE 对 HUVECs 的影响 (HE, ×400)

Fig. 6 Effect of TWE and TGE on HUVECs (HE, × 400)

4 讨论

中药药物毒性检测目前基本仍以传统 2D 体外细胞模型和动物整体模型为主,新技术、新方法在中药毒性评价上的应用有很大的提升空间。传统体外细胞模型生理结构和细胞行为与原代细胞差异较大,且单一细胞不能完全模仿肝细胞在体内的天然功能^[21]。动物整体模型可以很好地模拟药物在体内的代谢过程,研究表明,在使用动物进行药物肝毒性评价时,其准确率可达 71%^[22]。虽然精确度已经很高,但其存在实验周期长、个体差异性大以及灵敏度不够等问题,可能耗时耗力的一项研究结果最终仍会与临床实际结果产生偏差。所以在临床使用时,仍会出现 DILI 的情况,而且中药成分的复杂性可能会使这种不确定性进一步增加。因此,中药毒性评价迫切需要更为灵敏、准确、高效、快速的检测模型用于中药毒性评价。

雷公藤及其制剂引发肝毒性在临床上多有报道,且在动物实验中亦经多位学者证实,课题组前期研究发现连续给予大鼠 189.00、472.50 mg/kg 的

雷公藤多苷 3 周,可引起不同程度的肝损伤,其中雷公藤多苷 472.50 mg/kg 组肝损伤更为严重,给药 3 周较给药 1 周时肝毒性更显著,具有一定的剂量-时间-效应关系^[23-24]。雷公藤在临床上引发的肝损伤,患者多以发热乏力、口干口苦、食欲减退、黄疸等症状为主,并伴有 ALT、天冬氨酸氨基转移酶 (aspartate aminotransferase, AST)、碱性磷酸酶 (alkaline phosphatase, ALP)、GGT、TBil、TBA 等肝功能损伤生物标志物表达量的增高^[25-26]。在罗琼等^[27]对 635 例由雷公藤引起的肝损伤患者进行调查研究发现,67.05% 的肝损伤患者被诊断为胆汁淤积型肝损伤。基于雷公藤在临床引发的肝损伤特点,在本研究中,选择对肝细胞损伤相关的生物标志物 ALT、LDH,胆管损伤的生物标志物 GGT,肝胆排泄功能相关的生物标志物 TBil、TBA 进行检测,以比较 TWE 和 TGE 诱导的肝损伤在 3 种不同培养体系下的表现。

ALT 主要存在于肝细胞中,ALT 由于具有高敏感度的特点,相较 AST 更适合作为 DILI 的参考指

标; LDH 则广泛存在于多种组织和器官中, 是灵敏的非特异性肝损伤指标^[28-29]。在肝细胞受到损伤后, 2 种酶都会被排出到细胞外, 使得在血液/组织液中的含量增加。3 种培养体系中, TWE 和 TGE 与精密肝切片共孵育后, 微流控-精密肝切片培养体系的肝损伤标记物 ALT 和 LDH, 明显高于微流控-HepaRG 细胞培养体系中的表达量, 且在微流控-精密肝切片培养体系中可观察到呈剂量相关性升高, 在其他 2 种培养体系中均未见, 说明其更灵敏和准确。GGT 主要存在于胆管上皮细胞(也称为胆细胞)中, 当胆管上皮细胞受损时, 血液/组织液中的 GGT 含量会升高, 而 HepaRG 细胞自身对 GGT 亦具有高表达、高分泌的特性^[30]。研究显示, GGT 的增加与 ALT 的增加呈正相关^[26]。本实验证实, 基于微流控的 2 种培养载体, HepaRG 细胞和精密肝切片在细胞受损后, GGT 的表达量均能表现出剂量相关性升高, 但只在精密肝切片培养体系中表现出与 ALT 指标的一致性; 静态-精密肝切片培养体系相较微流控体系, GGT 表达量较低且未见量-毒关系。说明 GGT 是检测受试物造成的胆管损伤中较为灵敏的指标, 在实验中也对胆管损伤的另一生物标志物 ALP 进行了检测, 但该生物酶在 3 种培养体系中的含量均较低, 有学者研究认为, 在大鼠的胆汁淤积相关的胆管损伤的判定中, GGT 是比 ALP 更具有特异性的指标^[31-32]。

肝脏是 TBil 的主要代谢场所, 检测 TBil 水平有助于对肝脏整体功能的评估^[33]。TBil 是直接胆红素和间接胆红素的总和, 衰老的红细胞在吞噬细胞的作用下, 分解血红蛋白产生间接胆红素, 并在肝脏通过葡萄糖醛酸化代谢产生直接胆红素。除了精密肝切片中肝血窦内保留了一定数量的血细胞之外, 由培养基模拟的血流无法为培养物提供 TBil 合成原料, 这可能是 3 种培养体系中 TBil 的含量均较低的原因, 这也是体外实验的局限所在, 但 3 种体外培养体系中, 仅在微流控-精密肝切片培养体系中发现 TBil 随着 TWE 和 TGE 浓度的升高而显示出一定的增加趋势, 而其余 2 种培养体系中未见。

胆汁酸是一类胆固醇的代谢物, 肝脏是合成胆汁酸的主要场所。任何能引起肝细胞和胆管细胞损害的因素均可导致胆汁酸的积累。HepaRG 细胞不具有胆汁酸合成能力, 在培养体系中含量极低, 几乎不能检出。2 种精密肝切片培养体系中, TBA 的含量明显较微流控-HepaRG 细胞培养体系的含量高

出数倍之多。与微流控-HepaRG 细胞培养体系对照组的 TBA 相比, 微流控-精密肝切片培养体系对照组和静态-精密肝切片培养体系对照组的 TBA 均有显著性差异。说明胆汁酸合成能力能在 2 种精密肝切片培养体系中均有良好体现, 其中在微流控-精密肝切片培养体系的 TWE 和 TGE 高剂量组相较微流控-精密肝切片 TWE 和 TGE 的对照组, 分别升高 104.30% 和 46.00%, 但可能较大的数据离散度导致统计学差异的不显著性。

肝窦内皮细胞在调节肝窦血流与周围肝组织物质交换中具有重要作用^[34]。在本研究中用到的微流控-精密肝切片、静态精密肝切片、微流控-HepaRG 细胞体系中, HUVECs 被铺于培养小室的一侧仿生肝窦内皮屏障。在本研究体系中, 仿生肝窦内皮屏障的完整性是后续科学、准确地利用微流控肝器官芯片培养体系进行药物毒性评价的保障。本实验中经 TWE 和 TGE 的低、中、高剂量灌注培养 24 h 后, 通过 HUVECs 细胞形态学观察可知, 附着在 PET 膜上的 HUVECs 细胞层均保持了较好的细胞形态, 细胞排列紧密, 细胞轮廓清晰, 胞质丰满, 质、核分界清晰, 证明仿生培养体系中肝窦内皮屏障完好, 可用于微流控肝器官芯片培养体系对 TWE 和 TGE 的肝毒性评价。在此仿生培养条件下, 微流控-精密肝切片培养体系的对照组肝组织结构未见显著异常, 中央静脉、肝窦、肝索结构清晰, 未见明显变性、坏死及炎症细胞浸润, 随着受试物浓度的增加, 呈现出损伤程度的逐渐加重, 表现出良好的量-毒关系, 而该剂量相关性关系在静态-精密肝切片培养体系中未见, 且静态-精密肝切片培养体系的对照组肝组织部分局灶性肿胀、变性。

自 1980 年克鲁姆迪克首次利用震荡切片机制备组织薄片以来, 精密器官切片由于其保留与体内相近的细胞种类、细胞 3D 组织结构、细胞与细胞之间相互作用机制而被认为具有替代传统肝细胞 2D 培养模型的潜力的新模型之一, 日渐广泛的应用于生物医学研究当中^[35]。上述相关生物标志物检测结果证实, 3 种培养载体相比较, 单一肝细胞存在表达量较低, 肝脏的部分功能无法复制等问题, 精密肝切片由于保留了肝脏所有类型的细胞, 且具有完整的组织结构, 可能更适合从肝脏的生理功能到组织结构损伤的全方位评估。但精密肝切片培养技术的主要缺点之一是新鲜的肝切片存活时间相对较短, 一般在 6 h 左右, 本研究发现静态培养的肝切

片随着时间的延长,肝细胞质内糖原含量减少,细胞处于明显的缺氧状态,作用缓慢的中药较难以在该培养体系中表现出毒性;并且相对于 2D 细胞培养,组织切片存在一定厚度,营养液不易均匀到达细胞内,非药物成分的物质如黏液质、植物蛋白等的堆积也很难真实的反映出药物成分本身的毒性。这种伴随着废物不断堆积、代谢产物不断产生和营养物质不断消耗的培养体系,势必影响肝切片的生物学功能和存活状态。微流体控制技术利用微型泵操控微流体,以多孔膜结构仿生具有高渗透性的血管内皮间隙,同时从物理空间上将肝组织、外部血窦样区域分离并保留物质交换的能力,为培养物提供与体内相近的微环境,包括不断更新的新鲜培养液,带走积累的代谢产物,通过调节流速提供类似于体内血流微环境的剪切力等,很好地解决了上述组织切片培养中的问题,维持了精密肝切片在体外的活性和灵敏度。

综合 3 种培养体系中 TWE 和 TGE 的相关肝损伤生物标志物的检测和组织形态学观察结果认为,雷公藤及其制剂所造成的胆汁淤积型肝损伤在微流控-精密肝切片培养体系中有较好的呈现,表现为肝细胞损伤标志物 ALT 和 LDH、胆管损伤生物标志物 GGT 的剂量相关性升高,与胆汁酸合成、排泄相关的生物标志物 TBA 的高表达,组织形态学观察到的具有明确量-毒关系的肝损伤,以及 TWE 和 TGE 所造成的肝损伤特点的一致性,相较微流控-HepaRG 细胞培养体系和静态-精密肝切片培养体系具有更高的敏感度和可信度。

本研究所用的肝器官芯片,以 HUVECs 和具有黏附蛋白的 PET 膜共同形成肝血窦模型,仿生血管与细胞间隙,利用微流体生物芯片灌注技术,对大鼠精密肝切片进行动态培养,能准确还原药物对肝脏的损伤特点,从而建立更加接近人体形态学的肝模型并能够在较长时间内保持肝脏的特异性功能。但由于伦理等约束,无法直接以正常人的肝脏作为研究材料,但相信在不久的将来,通过微流控精密切片技术与特定器官人源化的动物相结合(如人源化小鼠),将克服种属差异,制备与人体器官相近的检测体系,相信将成为适合药物研究的快速、灵敏、准确的新工具、新方法^[36-37]。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

[1] 国家药品监督管理局. 中药药源性肝损伤临床评价技

术指导原则 [J]. 临床肝胆病杂志, 2018, 34(7): 1403-1409.

[2] 彭朋, 元唯安. 中药药源性肝毒性的研究进展 [J]. 药物评价研究, 2021, 44(8): 1783-1792.

[3] Suk K T, Kim D J, Kim C H, *et al.* A prospective nationwide study of drug-induced liver injury in Korea [J]. *Am J Gastroenterol*, 2012, 107(9): 1380-1387.

[4] Jensen C, Teng Y. Is it time to start transitioning from 2D to 3D cell culture? [J]. *Front Mol Biosci*, 2020, 7: 33.

[5] Reardon S. Miniature liver on a chip could boost US food safety [EB/OL]. (2017-04-12) [2023-07-06]. <https://www.nature.com/articles/nature.2017.21818>.

[6] Rumsey J W, Lorange C, Jackson M, *et al.* Classical complement pathway inhibition in a “human-on-a-chip” model of autoimmune demyelinating neuropathies [J]. *Adv Ther*, 2022, 5(6): 2200030.

[7] Smith P F, Gandolfi A J, Krumdieck C L, *et al.* Dynamic organ culture of precision liver slices for *in vitro* toxicology [J]. *Life Sci*, 1985, 36(14): 1367-1375.

[8] Vickerman V, Blundo J, Chung S, *et al.* Design, fabrication and implementation of a novel multi-parameter control microfluidic platform for three-dimensional cell culture and real-time imaging [J]. *Lab Chip*, 2008, 8(9): 1468-1477.

[9] Vega J M H, Hong H J, Loutharback K, *et al.* A microfluidic device for long-term maintenance of organotypic liver cultures [J]. *Adv Mater Technol*, 2023, 8(2): 2201121.

[10] Ling Y, Xu H, Ren N N, *et al.* Prediction and verification of the major ingredients and molecular targets of *Tripterygium Radix* against rheumatoid arthritis [J]. *Front Pharmacol*, 2021, 12: 639382.

[11] Luo D, Zuo Z Y, Zhao H Y, *et al.* Immunoregulatory effects of *Tripterygium wilfordii* Hook. f. and its extracts in clinical practice [J]. *Front Med*, 2019, 13(5): 556-563.

[12] Bao J, Dai S M. A Chinese herb *Tripterygium wilfordii* Hook. f. in the treatment of rheumatoid arthritis: Mechanism, efficacy, and safety [J]. *Rheumatol Int*, 2011, 31(9): 1123-1129.

[13] 陈文娟, 吴晶金. 雷公藤毒性及中药配伍减毒研究进展 [J]. 中成药, 2023, 45(2): 499-503.

[14] 张国玉, 燕树勋. 基于网络药理学探讨雷公藤多苷治疗桥本病的潜在作用机制 [J]. 中成药, 2023, 45(4): 1358-1363.

[15] Li Y J, Li S, Xue X Y, *et al.* Integrating systematic pharmacology-based strategy and experimental validation to explore mechanism of *Tripterygium glycoside* on cholangiocyte-related liver injury [J]. *Chin Herb Med*,

- 2022, 14(4): 563-575.
- [16] 蔡思铭, 岑红霞, 廖赵妹, 等. 雷公藤多苷片联合泼尼松治疗儿童自身免疫性肝炎的临床研究 [J]. 药物评价研究, 2021, 44(2): 398-402.
- [17] 国家食品药品监督管理局提醒关注雷公藤制剂的用药安全 [J]. 中国药物评价, 2012, 29(1): 3.
- [18] 肖治均, 刘传鑫, 杨欣欣, 等. 雷公藤研究进展及其质量标志物的预测分析 [J]. 中草药, 2019, 50(19): 4752-4768.
- [19] 回连强, 高双荣, 刘婷, 等. 基于精密肝切片技术的野百合碱体外肝毒性初步研究 [J]. 中国中药杂志, 2011, 36(5): 628-632.
- [20] 刘婷, 杨依霏, 夏冰, 等. 一种用于中药肝毒性评价的基于微流控体系的精密肝切片培养模型: 中国, CN114854585A [P]. 2022-09-30.
- [21] McGill M R, Yan H M, Ramachandran A, *et al.* HepaRG cells: A human model to study mechanisms of acetaminophen hepatotoxicity [J]. *Hepatology*, 2011, 53(3): 974-982.
- [22] 马红红, 魏桂林, 潘秋莎, 等. 中药人源性毒性评判的科学基础、策略与技术关键点 [J]. 世界中医药, 2020, 15(23): 3568-3573.
- [23] 田雅格, 苏晓慧, 刘立玲, 等. 近 20 年来雷公藤肝毒性研究概述 [J]. 中国中药杂志, 2019, 44(16): 3399-3405.
- [24] 付小桐, 刘婷, 曹春雨, 等. 基于 P450 酶的雷公藤多苷致大鼠肝损伤及其与复方甘草酸苷配伍减毒研究 [J]. 中国药物警戒, 2023, 20(1): 85-91.
- [25] 柳小远, 盛梅笑. 治疗慢性肾脏病常用中草药相关肝损伤研究进展 [J]. 中华中医药杂志, 2019, 34(9): 4210-4213.
- [26] 林伟华, 陈华英. ALT、AST、GGT、CHE 在肝病中的诊断价值 [J]. 现代临床医学生物工程学杂志, 2005(3): 232-233.
- [27] 罗琼, 李盟, 李光耀, 等. 635 例类风湿性关节炎患者应用雷公藤制剂所致肝损伤的中医证候及联合用药特点 [J]. 中国药物警戒, 2023, 20(5): 500-504.
- [28] Yu Y C, Mao Y M, Chen C W, *et al.* CSH guidelines for the diagnosis and treatment of drug-induced liver injury [J]. *Hepatol Int*, 2017, 11(3): 221-241.
- [29] 宋国培. 正确判定肝功能检查的临床意义 [J]. 中国实验诊断学, 1997, 1(2): 11-14.
- [30] Bellanti F, di Bello G, Tamborra R, *et al.* Impact of senescence on the transdifferentiation process of human hepatic progenitor-like cells [J]. *World J Stem Cells*, 2021, 13(10): 1595-1609.
- [31] 王新芳, 胡晨旻, 赵真, 等. 茵陈五苓散对胆汁淤积幼龄大鼠肝功能保护作用 [J]. 中国公共卫生, 2021, 37(10): 1521-1526.
- [32] 耿兴超, 沈连忠, 李波, 等. 肝毒性生物标志物研究进展 [J]. 中国药理学杂志, 2011, 46(10): 721-725.
- [33] 于乐成, 茅益民, 陈成伟. 药物性肝损伤诊治指南 [J]. 临床肝胆病杂志, 2015, 31(11): 1752-1769.
- [34] Wan Y, Li X D, Slevin E, *et al.* Endothelial dysfunction in pathological processes of chronic liver disease during aging [J]. *FASEB J*, 2022, 36(1): e22125.
- [35] Krumdieck C L, dos Santos J E, Ho K J. A new instrument for the rapid preparation of tissue slices [J]. *Anal Biochem*, 1980, 104(1): 118-123.
- [36] Walsh N C, Kenney L L, Jangalwe S, *et al.* Humanized mouse models of clinical disease [J]. *Annu Rev Pathol*, 2017, 12: 187-215.
- [37] Shultz L D, Ishikawa F, Greiner D L. Humanized mice in translational biomedical research [J]. *Nat Rev Immunol*, 2007, 7(2): 118-130.

[责任编辑 李亚楠]