

· 综述 ·

三明治肝细胞培养模型及其在中药肝毒性评价中的应用[△]唐茵茹^{1,2}, 黄芝瑛¹, 汪祺^{2*}, 文海若^{2*}, 马双成²

1. 中山大学 药学院, 广东 广州 510006;

2. 中国食品药品检定研究院, 北京 100050

【摘要】 随着中药的广泛使用, 安全性逐渐成为影响其临床应用的关键因素之一。肝脏作为机体主要的代谢场所, 是药物毒性反应主要的靶器官之一, 而使用高效、简便且可靠的体外模型对中药肝毒性进行评价和预警是当前毒理学研究的热点。三明治肝细胞培养模型能表达肝细胞血窦侧与胆管侧的转运体, 形成功能性胆小管网络, 并具有代谢能力, 是研究药物肝胆转运和胆汁淤积的重要工具。对三明治肝细胞培养模型的特点、构建、影响因素及其在中药肝毒性评价中的应用进行综述, 为中药肝毒性的评价方法研究提供参考。

【关键词】 三明治肝细胞培养模型; 体外肝毒性; 中药肝毒性; 细胞色素P450酶; 胆汁淤积

【中图分类号】 R285 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1673-4890(2022)05-0926-07

doi: 10.13313/j.issn.1673-4890.20210514004

Sandwich-cultured Hepatocytes and Application in Hepatotoxicity Evaluation of Chinese Medicine

TANG Yin-ru^{1,2}, HUANG Zhi-ying¹, WANG Qi^{2*}, WEN Hai-ruo^{2*}, MA Shuang-cheng²

1. School of Pharmaceutical Sciences, Sun Yat-Sen University, Guangzhou 510006, China;

2. National Institutes for Food and Drug Control, Beijing 100050, China

【Abstract】 With the widespread application of Chinese medicine, the safety of Chinese medicine has become a key factor affecting its clinical application. As the major organ responsible for metabolism, liver is one of the main targets of drug-induced toxicity. Consequently, developing and utilizing an efficient, simple, and reliable *in vitro* model to screen and predict the hepatotoxicity of Chinese medicine has become a research hotspot in toxicological research. Sandwich-cultured hepatocyte (SCH) model can express drug transporters in both sinusoidal and canalicular poles to establish the bile canaliculi-like network with metabolic capability. It provides a unique tool to evaluate hepatobiliary drug transport and cholestasis. The present review was designed to summarize the features, establishment, and factors of SCH model, as well as its application in hepatotoxicity evaluation of Chinese medicine, which is expected to provide references for the research of evaluation methods of Chinese medicine hepatotoxicity.

【Keywords】 sandwich-cultured hepatocyte model; *in vitro* hepatotoxicity; hepatotoxicity of Chinese medicine; cytochrome P450; cholestasis

中药在我国的使用历史可以追溯到几千年前, 现今仍然被广泛用于临床治疗。国务院办公厅于2019年发布《关于促进中医药传承创新发展的意见》, 从国家层面扶持和促进中医药行业的传承与发展。可以预见中药的研究及应用规模将进一步扩大。

与此同时, 越来越多的中药被报道具有潜在的肝毒性, 引起社会广泛重视。其中, 药物引起的肝脏损伤是新药临床试验和上市后被撤回的主要原因之一, 因此在药物研发阶段检测和评估药物的肝毒性一直是制药行业和监管机构重点关注的问题^[1]。研究数据

[△] **【基金项目】** 国家自然科学基金项目(81503347, 81503068); 国家“重大新药创制”科技重大专项(2018ZX09201017)

^{*} **【通信作者】** 文海若, 研究员, 研究方向: 药理毒理; E-mail: wenhairuo@nifdc.org.cn

汪祺, 研究员, 研究方向: 中药质量及安全性评价; E-mail: sansan8251@sina.com

表明, 2012—2014年我国发生的药源性肝损伤事件中有26.81%是由中药引起^[2]。其毒性机制包括氧化应激、线粒体损伤和凋亡、胆汁淤积、脂肪变性、产生毒性代谢产物等。此外, 药物间相互作用也是导致肝脏损伤的重要原因。例如, 黄芩中的吡啶生物碱和二萜类成分就是典型的通过肝细胞色素P450 (CYP) 3A4代谢产生的肝毒素, 可通过上调CYP3A4活性加剧不良反应^[3]。此外, 麻黄、雷公藤、何首乌、川楝子、补骨脂、半夏等都是常见的具有肝毒性的中药^[4]。因此, 在中药的开发与研究过程中, 明确其不良反应及机制并探索安全剂量, 从而增强中药使用的安全性, 将有助于中医药事业的传承与发展, 有利于中医药获得国际的认可。

目前公认的药物临床前安全性评价是以实验动物模型为主, 然而整体动物实验大多耗时长且费用较高。自1980年起, 为提高动物福利, 欧洲多国先后颁布动物保护法, 提倡实行“3R”原则, 即替代(replacement)、减少(reduction)和优化(refinement), 减少实验动物的使用^[5]。这也推进了许多体外毒理学预测模型的开发和应用。中药具有多成分、多靶点、多效用的特点, 不同成分间可能存在相互作用, 其引起肝脏损伤所涉及的靶点主要包括代谢酶、核受体、转运蛋白、活性氧(ROS)/核转录因子- κ B (NF- κ B)等介导的信号通路, 给中药肝毒性及安全性评价造成诸多困难^[6]。因此, 建立能高效筛选中药中肝毒性成分和评价中药对肝细胞综合作用的体外模型尤为重要。其中, 三明治肝细胞培养(sandwich-cultured hepatocytes, 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。该模型将肝细胞置于2层胶原中, 以三明治夹心的结构进行培养,

能达到模拟体内生长条件、重建肝细胞极性的目的。Dunn等^[6]研究表明, SCH模型中大鼠原代肝细胞的细胞形态和白蛋白分泌功能可维持42 d。本文将对SCH模型培养的特点、方法及近年来其在中药肝毒性评价中的应用进行综述, 并就其与其他体外肝毒性评价模型相比较的优势、不足及今后改良的方向进行探讨。

1 SCH模型的特点

肝细胞是有6~8个面的多角形细胞, 其中每个肝细胞表面均由胆管侧膜面、血窦面和肝细胞面3个功能面组成^[7]。研究表明, SCH模型能较长时间地保持肝细胞的形态和活力、重建肝细胞的极性、模拟肝脏的结构和功能。SCH模型可表达钠离子-牛磺胆酸共转运多肽(Na⁺-dependent taurocholic cotransporting polypeptide, NTCP)、有机阴离子转运蛋白(organic anion transporter, OAT)、有机阴离子转运多肽(organic anion transporting polypeptide, OATP)、P-糖蛋白(P-glycoprotein, P-gp)、多药耐药性蛋白1(multidrug resistance protein 1, MDR1)、多药耐药相关蛋白(multidrug resistance-associated protein, MRP)、胆盐输出泵(bile salt export pump, BSEP)、乳腺癌耐药蛋白(breast cancer resistance protein, BCRP)等转运体及CYP酶、磺基转移酶等药物代谢酶, 亦可持续分泌尿素、白蛋白、胆汁酸等肝特异性蛋白和有机物(图1)^[8-10]。大鼠原代肝细胞经三明治夹心培养后第4天即可形成广泛的胆小管网络和基底外侧结构域, 且至少能维持2~3周^[11]。因此, SCH模型常用于预测药物的肝胆转运与胆汁排泄、药物相互作用、胆汁淤积等研究中^[12]。

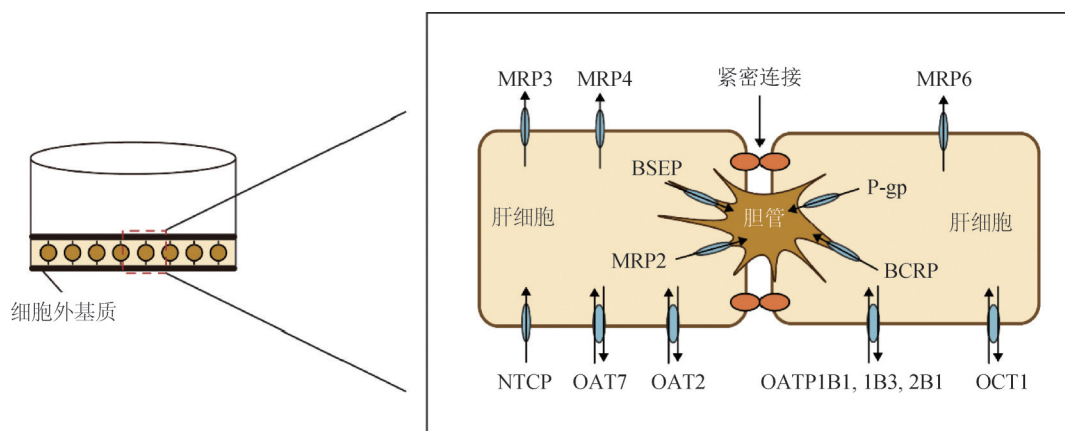


图1 SCH模型示意图

2 三明治肝细胞培养体系的制备

2.1 肝细胞的分离

原代肝细胞的分离方法主要分为非灌注法和灌注法。前者操作简便,但获取的肝细胞数量较少且成活率低;后者则需要特殊的灌注装置,所分离细胞的纯度和活性均明显优于非灌注法^[13]。其中Seglen两步灌注法是目前常用的原代肝细胞分离方法,首先用含阳离子螯合剂、不含钙离子和镁离子的D-Hank's溶液灌注肝组织,将肝组织中血液完全排出;接着用含钙离子和胶原酶的Hank's溶液继续灌注,以消化周围组织;最后撕去肝脏包膜并收集细胞悬液^[14]。

2.2 肝细胞的培养

分离得到的肝细胞可接种于预先包被肝细胞外基质(extracellular matrix, ECM)的培养板中,待其贴壁后吸除培养基,并用磷酸盐缓冲液(PBS)洗去未贴壁的细胞,再铺上第2层ECM,即可构成三明治培养体系。ECM除可以为肝细胞提供结构性支持外,还可调节细胞增殖、分化和迁移,影响MRP2、BSEP的表达和活性。常用的ECM为I型胶原和Matrigel I[™],前者由大鼠尾部肌腱中提取获得,后者是由小鼠肉瘤细胞分泌的含有黏连蛋白和IV胶原的复合蛋白混合物。与I型鼠尾胶原相比,使用Matrigel I[™]的肝细胞更容易聚集,形成更广泛的胆小管网络。此外,Matrigel I[™]的操作简便,更适合于高通量筛选^[12,15]。

肝细胞接种的密度对细胞的形态和细胞间接触至关重要。人和大鼠原代细胞最佳的接种密度分别为 1.8×10^5 、 1.5×10^5 个/cm²。细胞密度过低会影响细胞间接触,导致肝细胞扁平化和纤维化;密度过高则会干扰细胞黏附,同时抑制MRP2和MDR1a/1b的表达和活性^[12]。

三明治培养体系所使用的培养基中应包含氨基酸、激素、维生素、微量元素和辅因子。常用的培养基有DMEM、WME和氨基酸含量更高的MCM、L15。Chandra等^[16]的研究结果表明,使用WME培养基的肝细胞和胆小管网络的形态都更接近体内实际情况,牛磺胆酸的胆管外排指数也较其他培养基高。而MCM培养基则更有利于保持肝细胞的形态,稳定肝特异性酶的活性和减少自噬蛋白的降解,这

可能与其氨基酸含量更高有关^[16]。

在细胞接种后的24 h内,培养基中应添加5%~10%的胎牛血清,促进肝细胞贴壁并改善细胞的形态。但血清也会导致细胞分化和抑制胆小管重建,因此应合理控制添加血清的时间^[17]。此外,培养基中添加低剂量($0.1 \sim 1.0 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)的地塞米松可以促进肝细胞附着于ECM、增强细胞分泌白蛋白能力和改善胆小管网络;而高剂量($10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)的地塞米松则能诱导CYP3A和胞膜转运体的表达^[12]。据报道,添加胰岛素也能改善肝细胞的存活率和贴壁率、增强氨基酸转运和蛋白质的合成效率、促进糖原和脂肪的合成^[11]。

随着技术的发展,近年来有研究将微流控芯片技术和肝细胞整合。微流控芯片是由硅、玻璃、高分子聚合物等材料制作而成,具有过滤器、流体通道、反应室、检测室、传感器等元件,能在微米级别操控流体,配合自动分析仪器能完成提取、分析等过程^[18]。与其他培养方法相比,微流控芯片技术能模拟生理条件下的血液动力学过程,实现细胞的动态培养,同时还能调节营养物质或药物的浓度产生浓度梯度。微流控芯片培养的肝脏组织已被用于肝脏生理学、肝脏疾病模型、药物肝毒性反应、新药筛选等研究中^[19-20]。

3 SCH模型在中药肝毒性评价中的应用

中药导致肝脏损伤的机制主要包括:1)影响CYP酶代谢;2)干扰内源性化合物(如胆红素、胆汁酸)的转运;3)抑制胆汁排泄诱发胆汁淤积;4)直接引起细胞器损伤^[12]。已有大量研究应用SCH针对上述毒性机制开展研究。

3.1 评价中药对CYP酶的影响

CYP酶为单加氧酶的一种,因其还原状态在450 nm下有最大吸收波长而得名。CYP酶以血红素铁卟啉为催化活性中心,参与多种外源物质的I相代谢反应,包括羟基化、脱卤、脱氨、环氧化等,是机体重要的代谢酶系^[21]。据统计,75%的药物进入机体后经由CYP酶系进行代谢,这其中95%的反应是由CYP3A4、CYP2C9、CYP2C19、CYP2D6和CYP1A2 5种酶介导^[22]。中药尤其是中药复方成分复杂,对CYP酶产生抑制或诱导效应都有可能延长药效成分或其他活性代谢物在体内的作用时间,增加药物源性肝损伤的风险。研究提示,黄独素B、黄

樟油、大黄酸等中药活性单体的肝毒性机制均与CYP酶功能和水平的变化有关^[23]。因此,研究代谢酶介导的药物-药物相互作用和肝毒性机制对于临床上中药的增效减毒具有重要的意义^[4,23]。SCH模型中正常表达的药物代谢酶和转运体使其成为重要的中药代谢研究体外模型。Kirby等^[24]研究利托那韦和奈非那韦对SCH模型和肝微粒体中CYP3A4的抑制作用,结果显示,在利托那韦和奈非那韦处理下,肝微粒体中CYP3A4的活性分别比SCH模型中的高13、4倍,因此,与肝微粒体相比,使用SCH模型能更准确地预测药物对CYP的抑制作用。

Shen等^[25]构建了SCH模型,以咪达唑仑为探针药物,研究雷公藤甲素(triptolide, TP)的肝毒性机制,结果显示,TP以质量浓度依赖性的方式抑制CYP3A的活性,CYP3A4抑制剂能加剧TP对肝细胞的毒性,CYP3A4诱导剂则能缓解TP的毒性,提示CYP3A4的活性可能与TP的肝毒性机制有关,在临床中TP应尽量避免与CYP3A4的抑制剂联用。Zhuang等^[26]利用SCH模型证实CYP3A活性的抑制会导致TP的肝毒性增强。Jackson等^[27]发现在SCH模型上,五味子提取物能抑制CYP3A4/5的活性并增加CYP3A4 mRNA水平,由此推测五味子提取物可能会与经由CYP3A4/5代谢的药物产生药物-药物相互作用。

3.2 评价中药导致的胆汁淤积

胆汁淤积是指肝内外各种原因导致的胆汁形成、分泌和排泄障碍,进而导致胆汁不能正常进入十二指肠而反流入血的病理状态^[28]。在正常生理状态下肝细胞通过自身合成或血窦侧转运蛋白NTCP和OATP摄取胆汁酸。胆汁酸在肝细胞内被葡萄糖醛酸化或硫酸化,随后通过BSEP和MRP2排泄至胆汁中。胆汁排泄后,胆汁酸能通过回肠转运体重新吸收至门静脉,并再次被肝细胞血窦侧转运体所摄取。因此,任何能干扰胆汁酸正常循环的外源性物质均有可能引起胆汁淤积并导致肝脏损伤^[29]。调查显示,在中药药源性肝损伤事件中,4.8%的患者出现胆汁淤积的临床症状,6.7%的患者表现为肝实质损伤合并胆汁淤积^[30]。因此,建立能预测中药诱导胆汁淤积型肝毒性的体外模型是研究人员重点关注的问题之一。

SCH模型因能表达胆汁酸循环相关的酶及转运蛋白而成为极有潜力的研究药物性胆汁淤积的体外

模型。体系中能形成具有正常形态和功能的胆小管结构,在含 $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ 的缓冲液中,胆小管结构能维持正常功能;而在不含 $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ 的缓冲液中,细胞的紧密连接无法维持,胆小管结构被破坏,管腔中的物质将会扩散至培养液中。因此含 $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ 缓冲液下的细胞和管腔内底物总量与不含 $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ 缓冲液下细胞内底物总量之差即为排泄进入胆小管的底物量^[31]。研究中常使用氘标记的牛磺胆酸($\text{d}_5\text{-TCA}$)、氘标记的甘氨酸鹅脱氧胆酸($\text{d}_4\text{-GCDCA}$)和羧基二氯荧光素(CDCFDA)作为探针底物,评价药物对转运体的影响。 $\text{d}_5\text{-TCA}$ 和 $\text{d}_4\text{-GCDCA}$ 是胆管侧外排型转运体BSEP、血窦侧摄取转运体NTCP及血窦侧转运体MRP3和MRP4的底物,利用液相色谱-质谱法(LC-MS)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。CDCFDA进入细胞后被酯酶代谢得到的5(6)-羧基-2,7二氯荧光素(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^[32]。

康丽^[31]在SCH模型中分别使用 $\text{d}_5\text{-TCA}$ 、 $\text{d}_4\text{-GCDCA}$ 和CDCFDA作探针,利用实时荧光定量聚合酶链式反应和免疫印迹法(Western blot)评价何首乌中大黄素、大黄酚和大黄素甲醚对胆汁酸转运体功能和表达的影响,进一步明确何首乌致肝脏毒性的机制。Wu等^[33]发现在SCH模型中知母皂苷A3能抑制 $\text{d}_5\text{-TCA}$ 的摄取和胆汁排泄,同时从mRNA和蛋白水平上抑制胆汁酸相关转运体的表达,即知母皂苷A3的肝毒性机制可能与胆汁淤积有关。胆汁淤积是治疗肺结核的一线药物利福平常见的不良反应之一,刘蕾等^[34]利用SCH模型研究利福平及联用丹参酮II_A对BSEP底物普伐他汀的胆管外排的影响,其结果表明利福平引起胆汁淤积的机制与BSEP抑制有关,且联用丹参酮II_A能减弱BSEP的抑制作用,缓解胆汁淤积,为临床上预防利福平引起胆汁淤积提供依据。

除了胆汁酸以外,胆红素是另一种依赖胆汁排泄的内源性物质。唐志芳等^[35]利用SCH模型研究何首乌炮制前后对胆红素外排的影响,结果提示何首乌与制何首乌能抑制MRP2的功能,导致胆红素的胆汁排泄减少,进而引发胆汁淤积。

3.3 评价中药的其他肝毒性机制

通过检测SCH模型中有和无 $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ 缓冲液条件下药物在细胞内的累积量,计算胆汁外排指数和清除率,可推断药物的动力学过程和毒性反应机制。Zhuang等^[26]利用SCH模型发现在P-gp抑制剂ritonavir和tariquidar的作用下,TP的胆汁清除率分别下降73.7%和84.2%;而在P-gp诱导剂作用下,TP的胆汁清除率可增加2倍,表明P-gp介导了TP的胆汁外排过程。梁瑞峰等^[36]也利用该模型研究了有和无P-gp、MRP2抑制剂对黄连中3个活性成分小檗碱、巴马汀和药根碱的胆汁外排指数的影响,从而确定是P-gp而不是MRP2介导这3个活性成分的胆汁排泄。

4 SCH与其他肝细胞体外培养模型的对比

SCH与其他肝细胞体外培养模型相比主要有两大优势,即可较好地模拟体内肝细胞环境及较长时间维持肝细胞状态,药物代谢能力较好。但培养过程中需要每天更换培养基,且不适合用于96孔板培养。

尽管传统的2D培养操作简便且成本相对较低,但是无法有效地模拟实际体内环境。在生理条件下,肝细胞呈三维立体的方式生长,能与其他细胞和细胞外基质相互作用,这有利于维持良好的细胞形态,调节相关基因的表达,并形成正常的增生和分化功能。因此,3D培养能更好地模拟肝细胞在生理状态下的形态和活性,对于提高预测药物代谢和毒性反

应的准确性具有重要的意义^[37]。肝细胞的3D培养模型主要分为有支架和无支架2种。支架能为细胞间的连接和肝细胞聚集体的形成提供良好的支撑作用,常用的支架材料包括壳聚糖、海藻酸盐、胶原蛋白等。而无支架的方法则是通过使用无黏附性的培养皿、生物反应器或悬滴培养等方法,使肝细胞自发形成球状聚集体^[18,38]。

此外,早期常用的肝细胞体外培养模型为2D平面培养模型,模型中肝细胞为扁平状,且具备大部分肝脏特异性的功能,如糖原合成、蛋白质的合成和分泌、尿素生成、胆汁酸的合成和吸收、代谢外源性物质等^[18]。但是由于2D培养的肝细胞缺少细胞间接触和细胞与细胞基质的接触,随着培养时间延长,其形态和极性都与体内肝细胞有较大差异,对药物的代谢能力也会急剧下降,因此不适用于长期给药研究。与2D培养相比,SCH模型的肝脏特异性功能明显提高,能重建肝细胞极性,形成广泛的类胆小管结构,是研究药物肝胆转运和胆汁淤积最有力的模型。但是在长期培养的过程中,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。不同肝细胞体外培养模型及比较见图2和表1。

5 结语与展望

中药毒性作用靶点不明确是限制其发展的重要因素之一。与其他肝毒性体外评价模型相比,SCH模型能模拟在药物转运体和药物代谢酶共同作用下的生物学效应,在研究药物肝胆转运和药源性肝损

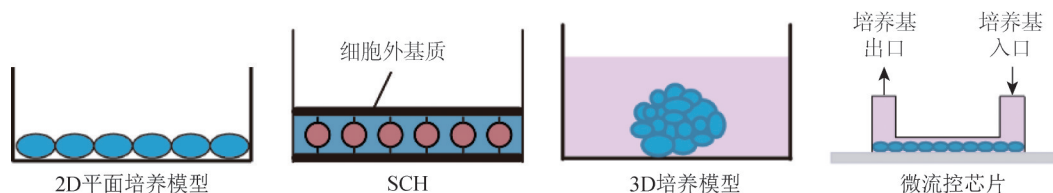


图2 不同类型肝细胞体外培养模型

表1 常用肝毒性体外评价模型对比

体外模型	优点	缺点	参考文献
2D平面培养模型	能保留肝细胞关键的特异性功能;操作简便,易于标准化	细胞的形态、极性等与生理状态下的差异较大,且丧失部分肝功能	[18]
SCH	重建肝细胞极性并能形成胆小管网络;保留药物代谢酶和转运体的功能;具有细胞-细胞外基质的相互作用	肝脏特异性功能只能维持10 d左右;需要每天更换培养基;不适合用96孔板培养	[9,29]
3D培养模型	重建细胞极性;保留药物代谢酶和转运体的功能;具有细胞-细胞和细胞-细胞外基质相互作用;适合多种细胞共培养	通常需要特殊的材料;多种细胞共培养时难以控制细胞的排布;细胞增殖速度慢;核心容易缺氧坏死	[39]
微流控芯片	能模拟体内血液动力学过程	需要特殊装置,实验成本较高;培养装置及方法有待进一步提高	[40]

伤机制方面具有突出的优势。但是随着培养时间延长,肝细胞仍然不可避免地去分化,丧失部分肝脏特异性生物活性。因此研究人员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^[41]。应用SCH模型进行毒性研究时也应考虑细胞来源的问题。原代肝细胞保留了多种肝脏特异性功能,是体外研究药物肝毒性的金标准。但其来源独特、应用成本较高且无法批量生产,因此应用受到限制。而在使用癌细胞系、多能干细胞来源的肝细胞等细胞系时,应充分考虑实验的需要和细胞系的特点,选择合适的细胞,如HepG2细胞中CYP450酶活性普遍不高,不适用于与CYP酶相关的毒性研究中;人诱导多能干细胞来源肝细胞BESPL低水平表达,不适用于胆汁淤积的研究^[42]。通过不断改良和优化SCH模型构建方法,模型用于预测药物肝毒性的风险和研究毒性机制的价值将会大大提高,有望成为体外评价药物肝毒性的有力工具。

参考文献

- [1] SENIOR J R. Evolution of the Food and Drug Administration approach to liver safety assessment for new drugs: Current status and challenges[J]. Drug Saf, 2014, 37 (Suppl 1): S9-S17.
- [2] SHEN T, LIU Y X, SHANG J, et al. Incidence and etiology of drug-induced liver injury in mainland China [J]. Gastroenterology, 2019, 156(8): 2230-2241.
- [3] STEDMAN C. Herbal hepatotoxicity[J]. Semin Liver Dis, 2002, 22(2): 195-206.
- [4] PAN X Q, ZHOU J, CHEN Y, et al. Classification, hepatotoxic mechanisms, and targets of the risk ingredients in traditional Chinese medicine-induced liver injury [J]. Toxicol Lett, 2020, 323: 48-56.
- [5] 宋冰, 辜吉秀, 汪永锋, 等. 实验动物替代技术研究[J]. 中国实验动物学报, 2020, 28(5): 680-687.
- [6] DUNN J C, YARMUSH M L, KOEBE H G, et al. Hepatocyte function and extracellular matrix geometry: Long-term culture in a sandwich configuration[J]. FASEB J, 1989, 3(2): 174-177.
- [7] 宁晨青, 孟强, 刘克辛. 肝脏转运体和代谢酶在化学性肝损伤中的作用[J]. 药物评价研究, 2017, 40(9): 1203-1209.
- [8] SAKAI Y, OKUMURA H, IWAIO T, et al. Development of an *in vitro* cholestatic drug-induced liver injury evaluation system using HepG2-hNTCP-C4 cells in sandwich configuration[J]. Toxicol In Vitro, 2019, 61: 104619.
- [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] YANG K, GUO C, WOODHEAD J L, et al. Sandwich-cultured hepatocytes as a tool to study drug disposition and drug-induced liver injury[J]. J Pharm Sci, 2016, 105 (2): 443-459.
- [11] SWIFT B, PFEIFER N D, BROUWER K L R. Sandwich-cultured hepatocytes: An *in vitro* model to evaluate hepatobiliary transporter-based drug interactions and hepatotoxicity [J]. Drug Metab Rev, 2010, 42 (3): 446-471.
- [12] 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.
- [13] 彭齐荣, 袁爱力, 赖卓胜, 等. 大鼠肝细胞的大量分离方法[J]. 现代消化及介入诊疗杂志, 1999, 4(1): 27-29.
- [14] 李耀庭, 吕建军, 周舒雅, 等. 原代肝细胞分离培养及其作为致癌物预测体外模型应用的进展[J]. 药物分析杂志, 2015, 35(7): 1134-1139.
- [15] TURNCLIFF R Z, TIAN X B, BROUWER K L R. Effect of culture conditions on the expression and function of BSEP, MRP2, and MDR1a/b in sandwich-cultured rat hepatocytes[J]. Biochem Pharmacol, 2006, 71(10): 1520-1529.
- [16] CHANDRA P, LECLUYSE E L, BROUWER K L. Optimization of culture conditions for determining hepatobiliary disposition of taurocholate in sandwich-cultured rat hepatocytes[J]. In Vitro Cell Dev Biol Anim, 2001, 37(6): 380-385.
- [17] TUSCHL G, HRACH J, WALTER Y, et al. Serum-free collagen sandwich cultures of adult rat hepatocytes maintain liver-like properties long term: A valuable model for *in vitro* toxicity and drug-drug interaction studies[J]. Chem Biol Interact, 2009, 181(1): 124-137.
- [18] 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.
- [19] LEE J H, HO K L, FAN S K. Liver microsystems *in vitro* for drug response[J]. J Biomed Sci, 2019, 26(1): 88.
- [20] MORADI E, JALILI-FIROOZINEZHAD S, SOLATI-

- HASHJIN M. Microfluidic organ-on-a-chip models of human liver tissue[J]. *Acta Biomater*, 2020, 116: 67-83.
- [21] MANIKANDAN P, NAGINI S. Cytochrome P450 structure, function and clinical significance: A review[J]. *Curr Drug Targets*, 2018, 19(1): 38-54.
- [22] GUENGERICH F P. Cytochrome p450 and chemical toxicology[J]. *Chem Res Toxicol*, 2008, 21(1): 70-83.
- [23] BREWER C, CHEN T S. Hepatotoxicity of herbal supplements mediated by modulation of cytochrome P450 [J]. *Int J Mol Sci*, 2017, 18(11): 2353.
- [24] KIRBY B J, COLLIER A C, KHARASCH E D, et al. Complex drug interactions of HIV protease inhibitors 1: Inactivation, induction, and inhibition of cytochrome P450 3A by ritonavir or nelfinavir [J]. *Drug Metab Dispos*, 2011, 39(6): 1070-1078.
- [25] SHEN G L, ZHUANG X M, XIAO W B, et al. Role of CYP3A in regulating hepatic clearance and hepatotoxicity of triptolide in rat liver microsomes and sandwich-cultured hepatocytes[J]. *Food Chem Toxicol*, 2014, 71: 90-96.
- [26] ZHUANG X M, SHEN G L, XIAO W B, et al. Assessment of the roles of P-glycoprotein and cytochrome P450 in triptolide-induced liver toxicity in sandwich-cultured rat hepatocyte model[J]. *Drug Metab Dispos*, 2013, 41(12): 2158-2165.
- [27] JACKSON J P, FREEMAN K M, FRILEY W W, et al. Prediction of clinically relevant herb-drug clearance interactions using sandwich-cultured human hepatocytes: *Schisandra* spp. case study [J]. *Drug Metab Dispos*, 2017, 45(9): 1019-1026.
- [28] 何胜夫, 汪余勤. 胆汁酸在胆汁淤积性肝损伤发病中的作用研究进展[J]. *实用肝脏病杂志*, 2020, 23(6): 919-922.
- [29] PETROV P D, FERNÁNDEZ-MURGA M L, LÓPEZ-RIERA M, et al. Predicting drug-induced cholestasis: Preclinical models[J]. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*, 2018, 14(7): 721-738.
- [30] JING J, TESCHKE R. Traditional Chinese medicine and herb-induced liver injury: Comparison with drug-induced liver injury[J]. *J Clin Transl Hepatol*, 2018, 6(1): 57-68.
- [31] 康丽. 基于胆汁酸转运体和代谢酶何首乌致肝损伤机制研究[D]. 武汉: 华中科技大学, 2017.
- [32] 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.
- [33] WU Z T, QI X M, SHENG J J, et al. Timosaponin A3 induces hepatotoxicity in rats through inducing oxidative stress and down-regulating bile acid transporters[J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2014, 35(9): 1188-1198.
- [34] 刘蕾, 杨玉洁, 王凌, 等. 在“三明治”培养大鼠原代肝细胞中研究利福平及联用丹参酮Ⅱ_A对普伐他汀经BSEP转运的影响[J]. *中国药理学通报*, 2019, 35(7): 978-985.
- [35] 唐志芳, 马国, 梅全喜. 何首乌炮制前后对胆红素肝细胞摄取及胆汁排泄的影响[J]. *时珍国医国药*, 2018, 29(3): 595-598.
- [36] 梁瑞峰, 宋献美, 葛文静, 等. 小檗碱、巴马汀和药根碱在“三明治”培养大鼠原代肝细胞中的胆汁外排特征[J]. *中国药理学通报*, 2018, 34(2): 250-256.
- [37] MITTAL R, WOO F W, CASTRO C S, et al. Organ-on-chip models: Implications in drug discovery and clinical applications[J]. *J Cell Physiol*, 2019, 234(6): 8352-8380.
- [38] 李曼, 董延生, 李泽君, 等. 体外肝毒性评价细胞模型的研究进展[J]. *中国新药杂志*, 2015, 24(17): 1954-1958.
- [39] SOLDATOW V Y, LECLUYSE E L, GRIFFITH L G, et al. *In vitro* models for liver toxicity testing[J]. *Toxicol Res (Camb)*, 2013, 2(1): 23-39.
- [40] TETSUKA K, OHBUCHI M, TABATA K. Recent progress in hepatocyte culture models and their application to the assessment of drug metabolism, transport, and toxicity in drug discovery: The value of tissue engineering for the successful development of a microphysiological system[J]. *J Pharm Sci*, 2017, 106(9): 2302-2311.
- [41] 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.
- [42] 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 Pharmacok*, 2019, 34(4): 264-271.

(收稿日期: 2021-05-14 编辑: 田苗)