

## 基于类器官 3D 培养何首乌易感物质肝毒性评价

李婷婷<sup>1,3</sup>, 李瑞红<sup>2</sup>, 刘振兴<sup>1,3</sup>, 张乐<sup>3</sup>, 王杰<sup>2</sup>, 常乐<sup>2</sup>, 陈志强<sup>2</sup>, 施艳霞<sup>2</sup>,  
李朋彦<sup>3</sup>, 李春雨<sup>4</sup>, 刘建红<sup>5</sup>, 柏兆方<sup>3</sup>, 王伽伯<sup>3</sup>, 王韞芳<sup>2</sup>, 柳娟<sup>2\*</sup>, 肖小河<sup>3\*</sup>

(1. 承德医学院, 河北 承德 067000; 2. 北京输血医学研究所, 北京 100850; 3. 解放军 302 医院全军中医药研究所, 北京 100039; 4. 中国医学科学院药用植物研究所, 北京 100193; 5. 火箭军总医院礼士路门诊部, 北京 100820)

**摘要:** 采用液滴重叠法构建类器官 3D 培养模型, 评价何首乌易感物质顺式二苯乙烯苷 (*cis*-SG) 的肝损伤作用。结果表明, 相对于普通 2D 培养肝细胞模型, 所构建的类器官 3D 培养模型的 L02 细胞和 HepG2 细胞白蛋白表达分别提高 2.5 和 6.7 倍; 在第 21 天时, 尿素生成水平分别提高 8.3 和 15.5 倍, 且 HepG2 细胞构建的类器官模型显著优于 L02 细胞; 相对于 2D 培养肝细胞模型, HepG2 细胞构建的类器官模型的药物 I 相和 II 相代谢酶表达量显著上调, 如 CYP2C9、CYP3A4 和 CYP2D6 表达上调分别为 381.9、87.0 和 312.6 倍, 药物转运体相关基因也明显上调, 提示所建立的类器官 3D 培养模型的肝脏合成和代谢功能显著优于普通 2D 培养肝细胞模型。肝毒性评价结果表明, 相对于普通 2D 培养肝细胞模型, 类器官 3D 培养模型可以更灵敏地评价对乙酰氨基酚等肝毒性阳性药物的毒性差异, 且在类器官 3D 培养模型上重复给药评价的半数抑制浓度 (IC<sub>50</sub>) 值显著低于单次给药方式; 何首乌易感物质 *cis*-SG 在普通 2D 培养肝细胞模型未检测到 IC<sub>50</sub>, 在类器官 3D 培养模型上单次给药方式的 IC<sub>50</sub> 是肝毒性阳性药环孢霉素的 1.9 倍, 而其光学异构体反式二苯乙烯苷 (*trans*-SG) 的 IC<sub>50</sub> 比 *cis*-SG 高 4.1 倍, 与前期整体动物水平的毒性强弱基本一致; *cis*-SG 在类器官 3D 培养模型上多次给药方式的 IC<sub>50</sub> 进一步降低, 提示长期用药可能增大何首乌肝损伤风险。综上, 何首乌易感物质 *cis*-SG 对类器官的肝毒性大于 *trans*-SG; 类器官 3D 培养模型可长期培养且保留更多的肝脏合成和代谢功能, 适用于中药成分低浓度、长时间暴露产生肝毒性评价和机制研究。

**关键词:** 中药; 何首乌; 二苯乙烯苷; 肝毒性评价; 类器官模型

中图分类号: R965

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870 (2017) 07-1048-07

## Three dimensional organoids-based evaluation for hepatotoxicity of the susceptible compound in *Polygonum multiflorum* Thunb.

LI Ting-ting<sup>1,3</sup>, LI Rui-hong<sup>2</sup>, LIU Zhen-xing<sup>1,3</sup>, ZHANG Le<sup>3</sup>, WANG Jie<sup>2</sup>, CHANG Le<sup>2</sup>,  
CHEN Zhi-qiang<sup>2</sup>, SHI Yan-xia<sup>2</sup>, LI Peng-yan<sup>3</sup>, LI Chun-yu<sup>4</sup>, LIU Jian-hong<sup>5</sup>, BAI Zhao-fang<sup>3</sup>,  
WANG Jia-bo<sup>3</sup>, WANG Yun-fang<sup>2</sup>, LIU Juan<sup>2\*</sup>, XIAO Xiao-he<sup>3\*</sup>

(1. Chengde Medical College, Chengde 067000, China; 2. Beijing Institute of Transfusion Medicine, Beijing 100850, China; 3. China Military Institute of Chinese Medicine, 302 Military Hospital, Beijing 100039, China; 4. Institute of Medicinal Plant Development, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100193, China; 5. Outpatient Department of Rocket Army General Hospital, Beijing 100820, China)

**Abstract:** In this study, the three dimensional (3D) organoid culture system was established by liquid overlay method, and applied as an effective model to evaluate the hepatic injury of susceptible compounds in

收稿日期: 2017-04-11; 修回日期: 2017-05-22.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81503350); 北京市自然科学基金资助项目 (7152142); 北京市科技新星计划项目 (Z16111000490000); 中国博士后科学基金资助项目 (2016M590065).

\*通讯作者 Tel: 86-10-66933322, Fax: 86-10-66933325, E-mail: pharmacy302@126.com; liujuan@mail.com

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2017-0348

*Polygonum multiflorum* Thunb. Compared with the ordinary two dimensional (2D) culture of liver cells, the albumin expression of L02 cells and HepG2 cells were increased by 2.5 and 6.7 times in the 3D organoid culture system, respectively. After the cultivation of 21 days, urea generation levels of 3D culture were increased by 8.3 and 15.5 times. More importantly, HepG2 cells were more suitable to development of organoids than L02 cells. The gene expressions of phase I and II drug metabolism enzymes of HepG2 cells cultured as 3D organoids were significantly increased than that in 2D culture, such as the fold changes of CYP2C9 was up to 381.9, CYP3A4 to 87.0, CYP2D6 to 312.6. In addition, drug transporter relative genes were also up-regulated. The results demonstrated that the liver synthesis and metabolic function of the 3D model were better than that of the 2D cultured hepatocytes. The results of hepatotoxicity evaluation showed this developed model can be used to assess the hepatotoxicity of acetaminophen and other positive control drugs, which were considered with defined hepatotoxicity. On the 3D culture model, the  $IC_{50}$  value of repeated drug dose administration was significantly lower than that of single dose administration. However, the  $IC_{50}$  of 2,3,5,4'-tetrahydroxy-*cis*-stilbene-2-*O*- $\beta$ -glucoside (*cis*-SG), which is the susceptible compound in *Polygonum multiflorum* Thunb., could not be detected in 2D cultured model. With the treatment of a single dose administration in organ 3D culture model, the  $IC_{50}$  of *cis*-SG was 1.9 times than that of cyclosporine A, and the  $IC_{50}$  of 2,3,5,4'-tetrahydroxy-*trans*-stilbene-2-*O*- $\beta$ -glucoside (*trans*-SG) was 4.1 times than *cis*-SG. The hepatotoxicity results of *cis*-SG and *trans*-SG on the 3D cultures were similar to *in vivo* toxicity results obtained in previous work. On organ 3D culture model, the  $IC_{50}$  of *cis*-SG with repeat of administration decreased compared with that with single dose administration, suggesting that long-term medication may increase the risk of liver injury. In summary, the 3D organoid culture system can be used for a long period to preserve the capacity of liver synthesis and metabolism. The organoids were a model suitable for evaluation of mechanism of the drugs with low toxicity.

**Key words:** traditional Chinese medicine; *Polygonum multiflorum* Thunb.; 2,3,5,4-tetrahydroxyl diphenylethylene-2-*O*-glucoside; evaluate hepatotoxicity; organoids model

何首乌是蓼科植物何首乌 (*Polygonum multiflorum* Thunb.) 的干燥块根<sup>[1]</sup>。何首乌的炮制品具有补肝肾、乌须发、益精血和强筋骨等功效, 广泛用于补益类中药制剂和保健食品。目前研究认为何首乌的主要活性成分是反式二苯乙烯苷 (2,3,5,4'-tetrahydroxy-*trans*-stilbene-2-*O*- $\beta$ -glucoside, *trans*-SG), 在提高记忆力、清除自由基抗氧化、降低胆固醇、抗肿瘤及抑制动脉粥样硬化等方面均显现出良好效果<sup>[2]</sup>。然而, 近年来关于何首乌及其制剂肝损伤的报道逐渐增多<sup>[3]</sup>, 引起国内外高度关注。本课题组前期实验研究发现何首乌引起的肝损伤可能是一种特异质肝损伤, 并在整体动物水平证实了顺式二苯乙烯苷 (2,3,5,4'-tetrahydroxy *cis*-stilbene-2-*O*- $\beta$ -glucoside, *cis*-SG) 是其重要的易感物质<sup>[4]</sup>。

肝脏作为药物代谢的主要场所, 是药物性肝损伤最主要的靶器官之一<sup>[5]</sup>。目前药物肝毒性评价常用的肝细胞模型有 L02 细胞和 HepG2 细胞等。L02 细胞是来源于人正常肝细胞的细胞株, 具有成熟肝细胞的主要表型特征<sup>[6]</sup>; HepG2 细胞则是来源于人肝癌组织的细胞株, 是一种高度分化并显示许多正常肝细胞基因型特征的细胞<sup>[7]</sup>, 被广泛应用于肝癌治疗及肝毒性预测等方面的研究<sup>[8]</sup>。然而, 由于普通细胞培

养为平面培养, 难以维持肝细胞立体结构形态和细胞间联系, 故导致肝细胞在培养过程中较少表达肝脏特有合成和代谢功能相关的蛋白质和代谢物, 与体内肝脏真实情况相差较大。如前期在整体动物水平发现, *trans*-SG 和 *cis*-SG 的肝毒性差异在普通二维 (two-dimension, 2D) 细胞培养模型无法评价。因此, 寻找能够准确、快速、灵敏反映药物肝毒性的新评价模型, 已成为当前中药肝毒性研究亟待解决的问题。

近年来一些研究显示, 三维 (three-dimension, 3D) 培养条件下获得的具有类器官 (organoids) 特点的细胞球在维持细胞形态与功能方面, 较常规 2D 培养具有显著优势<sup>[9]</sup>。类器官 3D 培养技术的发展为再生医学和药物安全性评价等方面的研究开辟了新的途径<sup>[10]</sup>。本研究将基于以上两种细胞, 采用液滴重叠法构建类器官 3D 培养体系, 通过评测细胞生长状态和肝脏功能等相关指标, 选择合适的细胞构建类器官评价模型, 进一步用于何首乌易感物质的肝毒性评价。

## 材料与方法

**药物、试剂与仪器** 对乙酰氨基酚 (acetaminophen, APAP)、阿司匹林 (aspirin, ASP)、丙戊酸 (valproic

acid, VPA)、环孢霉素 (cyclosporine, CSP) (Sigma 公司); *trans*-SG、*cis*-SG (成都普菲德生物技术有限公司); DMEM 培养基 (Gibco 公司); 胎牛血清 (Biological Industries 公司); DAPI (Santa 公司); 白蛋白 (albumin, ALB) 抗体 (Abcam 公司); 尿素测试盒 (BioAssay Systems 公司); 引物合成 (北京奥科鼎盛生物科技有限公司); RNA 提取试剂盒 (QIAGEN 公司); cDNA 反转录试剂盒、RT-PCR 试剂盒 (TOYOBO 公司); Alamar Blue (Invitrogen 公司); 96 孔板 (Costar 公司); CO<sub>2</sub> 培养箱 (Thermo Scientific 公司); Ensiht 微孔板检测仪 (PerkinElmer 公司)。

**细胞培养** HepG2 和 L02 细胞培养于含 10% 胎牛血清、100 u·mL<sup>-1</sup> 青霉素、100 μg·mL<sup>-1</sup> 链霉素的 DMEM 培养基中, 隔天换液, 于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 饱和湿度培养箱中培养, 待其汇合度达到 90% 左右传代。

**类器官 3D 模型构建** 将 HepG2 和 L02 细胞分别以 100、200、400、800 和 1 600 个/孔接种于低吸附的 96 孔 U 型底板中, 静置 10 min 左右, 于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 饱和湿度培养箱中培养, 使细胞形成 3D 结构。培养 28 天, 期间测量其直径大小并记录 3D 类器官的变化。

**RNA 提取及 RT-PCR 分析** 为了比较细胞在 2D 及 3D 不同培养条件下, 相关基因表达的差异性, 分别收集 2D 及 3D 培养 7、14、21 和 28 天的细胞提取 RNA。将细胞收集到 1.5 mL 离心管, PBS 洗 1 次, 加入裂解液, 待其在冰上充分裂解, 放于 -80 °C 备用。根据 RNeasy® Mini Kit 说明书提取 RNA。逆转录成 cDNA 的反应条件: 65 °C、5 min, 冰上静置 2 min; 加反转录试剂后 37 °C 15 min; 50 °C 5 min; 98 °C 7 min; 4 °C ∞。RT-PCR 所用引物序列见表 1, 反应程

序: 95 °C 3 min; (95 °C 10 s; 60 °C 35 s) 40 cycles; 65 °C 5 s; 95 °C ∞。以 GAPDH 为内参, 采用 Livak (2<sup>-ΔΔC<sub>t</sub></sup>) 法进行相对基因表达分析, 并以 2D 细胞基因表达结果为对照进行数据分析。

**白蛋白表达的检测** 通过 RT-PCR 及免疫荧光染色的方法分别比较两种细胞的白蛋白在基因水平及蛋白水平的表达差异。*ALB* 基因引物参照表 1。免疫荧光染色步骤如下: 收集生长 7 天的细胞球于 4% 多聚甲醛固定 30 min, 10% BSA 封闭 1 h, 一抗 4 °C 孵育过夜, 荧光二抗室温避光孵育 1 h; DAPI 染色 10 min, PBS 洗 3 次。采用激光共聚焦显微镜进行拍照分析。

**尿素检测** 分别取 7、14、21 和 28 天类器官 3D 培养的 L02 和 HepG2 细胞模型及 2D 培养的细胞, 弃去培养基并用 PBS 洗 2 次, 加入含 10 mmol·L<sup>-1</sup> 氯化铵的无酚红无血清培养基, 24 h 后收上清, 采用 BioAssay Systems 试剂盒检测尿素生成的含量。具体检测操作步骤按说明书进行, 尿素生成量用细胞数与生成时间进行均一化处理分析。

**药物毒性实验** 取对数生长期的 HepG2 细胞接种, 2D 培养的细胞以 1×10<sup>4</sup> 个/孔接种于 96 孔中, 24 h 后进行细胞毒性测试。3D 培养的细胞以 400 个/孔接种于低吸附的 96 孔板培养 7 天后, 进行细胞毒性测试。二者在给药 24 h 后, 加入 Alamar blue 试剂检测细胞活性。对 3D 培养的 HepG2 细胞进行重复给药 3 次, 隔天给药且半换液, 第 7 天使用 Alamar Blue 试剂检测。具体检测分析步骤参照试剂使用说明。

**统计学方法** 采用 Office Excel 2010 软件进行数据统计, 数据以  $\bar{x} \pm s$  表示, 使用 SPSS 19.0 软件进行单因素方差分析,  $P < 0.05$  表示具有显著性差异。

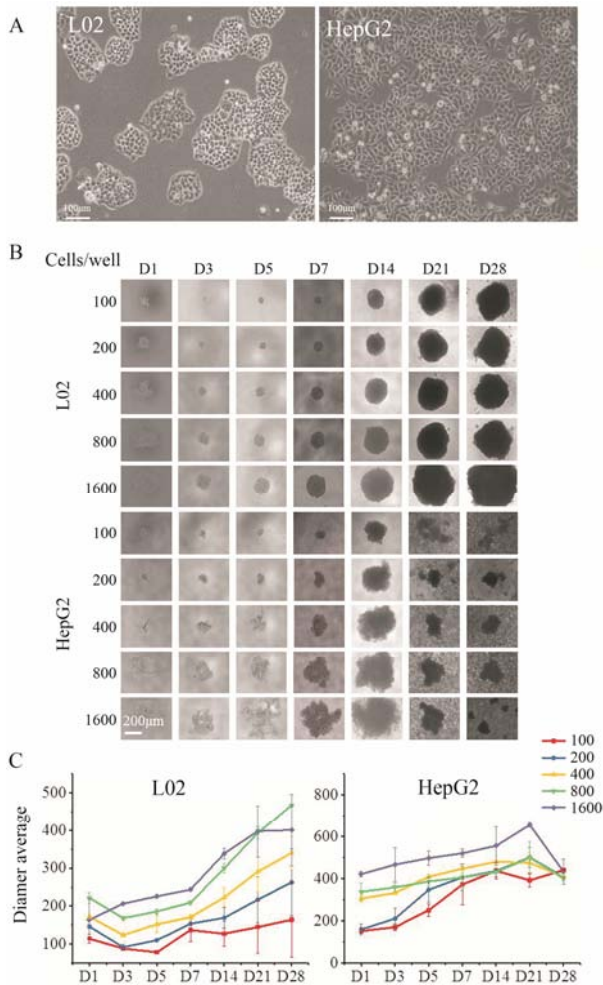
**Table 1** Primer sequences used for RT-PCR

Gene	Forward primer	Reverse primer
<i>GAPDH</i>	CATGAGAAGTATGACAACAGCCT	AGTCCTTCCACGATACCAAAGT
<i>ALB</i>	TTTATGCCCGGAAGTCTTTT	ACAGGCAGGCAGCTTTATCAG
<i>CYP1A2</i>	ATGGCATTGTCCAGTCTGTT	TGGCTCTGGTGGACTTTTCAG
<i>CYP2C9</i>	GCCACATGCCCTACACAGATG	TAATGTCACAGGTCACATGCATGG
<i>CYP2D6</i>	GTGTCCAACAGGAGATCGACG	CACCTCATGAATCACGGCAGT
<i>CYP2E1</i>	CTGACCACCCTCCGGAACTA	ATGTAGGCTATGACGTTGCA
<i>CYP3A4</i>	AAGTCGCCTCGAAGATACACA	AAGGAGAGAACACTGCTCGTG
<i>NAT2</i>	TTCCTGGTTGCTGGCCAAAG	AGTTCTCAAAGGGAACAGCC
<i>UGT1A1</i>	CCATCATGCCCAATATGGTT	CCACAATTCCATGTTCTCCA
<i>UGT1A3</i>	GCCAACAGGAAGCCACTATC	CAGCAATTGCCATAGCTTTC
<i>UGT2B7</i>	AACGTAATTGCATCAGCCCT	GGTCATTCTGGGTATCCAC
<i>MRP1</i>	CCGTGTTGGTCTCTGTGTTCTT	AGTCGGCGGCTAATTCTTAGC
<i>MRP2</i>	AGCGTCCTCTGACACTCG	GGCATCTTGGCTTTGACT
<i>MRP3</i>	GGAGGGCATCAGGCAGGGTGA	GACACAAAGGCCTTCTCGGCGT

## 结果

### 1 3D 类器官培养的细胞结构与功能

将 L02 和 HepG2 细胞接种于 96 孔板并观察细胞状态, 细胞成对数生长。L02 与 HepG2 细胞以不同密度 (100、200、400、800 和 1600 个/孔) 接种于低吸附 96 孔板中的, 在培养 3 天后开始形成 3D 微球结构, 7 天结构更加紧密, 可持续培养 14 天以上。培养前 14 天, L02 与 HepG2 细胞均可以形成形貌较为规整的细胞球体, 继续培养之后, 由于细胞自身的来源不同, L02 细胞仍可维持细胞球的形态, HepG2 细胞则呈近球体状态, 相对于 L02 细胞的 3D 模型呈松散状态。微球大小与初始细胞数及培养天数有关, 稳定培养可达 28 天。3D 培养的 L02 和 HepG2 细胞形态及直径增长曲线, 见图 1。为保证后续研究的一致与稳定

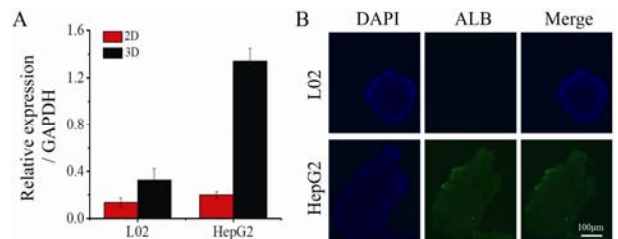


**Figure 1** Morphology of L02 and HepG2 cells in two dimensional (2D) culture (A) and in three dimensional (3D) culture (B); Diameter of 3D L02 and HepG2 spheroids. L02 and HepG2 cells were seeded at different densities (100, 200, 400, 800 and 1600 per well) (C). Spheroid formation was monitored at 1, 3, 5, 7, 14, 21 and 28 day by light microscopy.  $n=5$ ,  $\bar{x} \pm s$

性, 最终均选用两种细胞接种密度为 400 个/孔, 形成紧密结构的细胞球。

### 2 ALB 检测

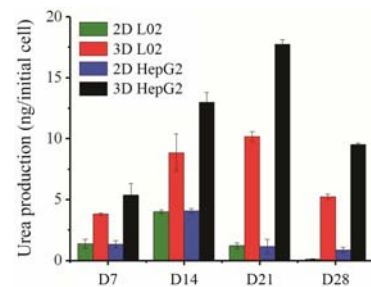
RT-PCR 结果显示, 在 3D 培养状态下, 无论 L02 细胞还是 HepG2 细胞, 其 ALB 的 mRNA 水平均高于 2D 培养的细胞, 分别提高 2.5 和 6.7 倍; 且 3D 培养的 HepG2 细胞较 3D 培养的 L02 细胞升高倍数更明显, 可达到约 4.5 倍。免疫荧光染色检测 ALB 表达水平, 结果显示, L02 几乎不表达, HepG2 细胞 ALB 表达显著高于 L02 细胞, 见图 2。



**Figure 2** RT-PCR analysis of albumin (ALB) expression in 2D and 3D of L02 and HepG2 (A); Immunofluorescence detection of ALB in 3D culture of L02 and HepG2 (B).  $n=5$ ,  $\bar{x} \pm s$

### 3 尿素检测

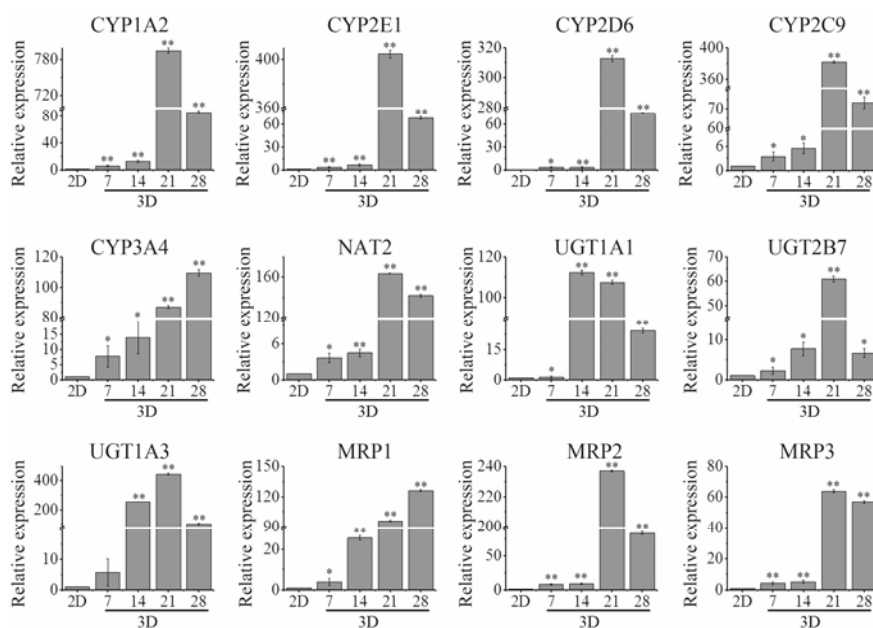
尿素检测结果显示, 两种细胞在 3D 培养条件下, 较 2D 培养尿素生成能力升高, 且在 3D 培养下, HepG2 细胞尿素生成能力显著高于 L02 细胞, 见图 3。在第 21 天时, 较 2D 培养尿素生成, 3D 培养的 L02 细胞球升高 8.3 倍, HepG2 细胞球升高 15.5 倍。基于以上结果, HepG2 在白蛋白表达及尿素生成能力均优于 L02, 因此 HepG2 是更加优选的细胞模型, 后续研究采用 HepG2 细胞。



**Figure 3** Urea production of the 2D and 3D L02 and HepG2 cultures.  $n=5$ ,  $\bar{x} \pm s$

### 4 2D 与 3D HepG2 细胞肝功能相关基因表达比较

RT-PCR 检测结果显示, HepG2 细胞在 3D 培养条件下, 肝功能相关基因表达在第 7 天开始较 2D 有不同程度上调, 且大多数药物代谢酶及药物转运体的基因表达在第 21 天表达最高, 见图 4。在第 21 天, 相



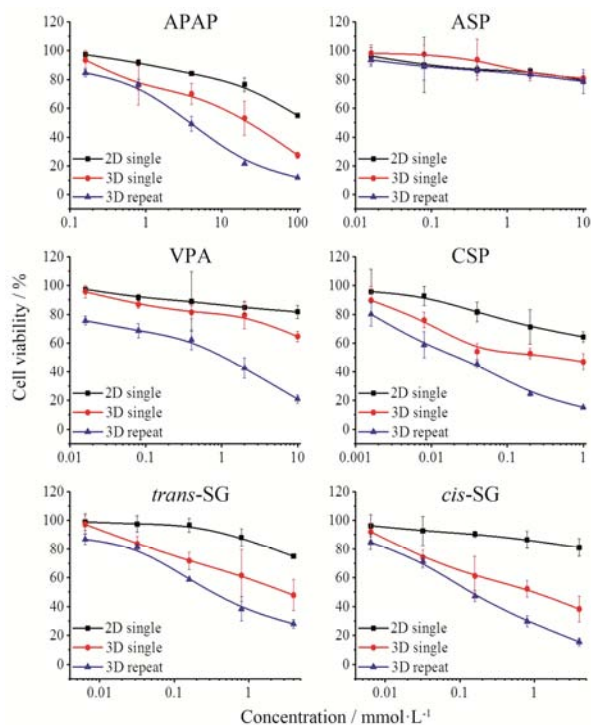
**Figure 4** RT-PCR analysis of drug metabolic enzymes and transporters in 2D and 3D culture.  $n=5$ ,  $\bar{x} \pm s$ . \* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$  vs 2D culture cells

比较 2D 培养的细胞, 3D 培养条件下, I 相药物代谢 CYP1A2 上调 794.6 倍, CYP3A4 上调 87.0 倍, CYP2E1 上调 404.4 倍, CYP2D6 上调 312.6 倍, CYP2C9 上调 381.9 倍, II 相药物代谢 UGT1A3 上调 445.7 倍, 药物转运体 MRP2 上调 236.8 倍。本研究观察到涵盖了 80% 临床药物代谢的 CYP450 酶 (3A4、2D6 和 2C9) 的功能活性增加。3D 培养的模型在肝功能相关基因表达方面显著优于 2D 培养的细胞。

### 5 2D 与 3D HepG2 细胞毒性研究

通过比较 2D 与 3D HepG2 细胞单剂量给药测试细胞毒性的结果, 可发现在 3D 培养条件下的细胞对药物毒性反应较为敏感, 同时 3D 培养可以实现重复给药, 反映出更强的细胞毒性。采用已知有肝毒性的 APAP 为阳性对照, 在 2D 和 3D 培养的 HepG2 细胞加入 APAP, 单剂量给药结果显示, 3D 培养的类型器官较 2D 培养的细胞对药物毒性更为敏感; 重复给药后 3D 细胞对药物毒性的敏感性明显增强。通过半数抑制浓度 ( $IC_{50}$ ) 值比较可以看出, 在 3D 培养条件下, APAP 重复给药的  $IC_{50}$  显著小于单剂量给药, 2D 培养的 HepG2 无法测出  $IC_{50}$ 。采用 ASP 为阴性对照, 在 2D 和 3D 培养的条件下, 单剂量及重复给药均没有明显的细胞毒性。进一步检测 VPA 及 CSP 的肝毒性, 结果显示, 3D 培养的 HepG2 细胞重复给药时, 细胞对药物毒性的敏感性明显增强, 说明 3D 培养的类型器官模型及重复给药能更好地预测药物产生的肝毒性。因此, 可使用该模型探索 *trans*-SG 和 *cis*-SG 的肝毒性。

细胞毒性结果显示, 3D 重复给药与 2D、3D 单剂量给药相比较, 3D 重复给药细胞对药物毒性更为敏感, 见图 5。*cis*-SG 在普通 2D 培养肝细胞模型未检测到  $IC_{50}$ , 在类器官 3D 培养模型上单次给药方式的  $IC_{50}$



**Figure 5** Comparison of cytotoxicity of 2D and 3D HepG2 cells in single and repeated dose administration. APAP, Acetaminophen; ASP, Aspirin; VPA, Valproic acid; CSP, Cyclosporine; *trans*-SG, 2,3,5,4'-Tetrahydroxy *trans*-stilbene-2-*O*- $\beta$ -glucoside; *cis*-SG, 2,3,5,4'-Tetrahydroxy *cis*-stilbene-2-*O*- $\beta$ -glucoside

是肝毒性阳性药 CSP 的 1.9 倍, 而 *trans*-SG 的 IC<sub>50</sub> 比 *cis*-SG 高 4.1 倍, 与前期整体动物水平的毒性强弱基本一致<sup>[4]</sup>; *cis*-SG 在类器官 3D 培养模型上多次给药方式的 IC<sub>50</sub> 进一步降低, 提示长期用药可能增大何首乌肝损伤风险, 见表 2。

**Table 2** IC<sub>50</sub> (mmol·L<sup>-1</sup>) value of drugs in 2D and 3D culture model

Drug	2D single	3D single	3D repeat
APAP	>100	21.08	3.65
ASP	>10	>10	>10
VPA	>10	>10	1.05
CSP	>1	0.46	0.02
<i>trans</i> -SG	>4	3.69	0.39
<i>cis</i> -SG	>4	0.89	0.14

## 讨论

传统 2D 培养的细胞呈平面生长, 虽操作简单、费用低, 但是其自身细胞与细胞之间联系缺失, 使细胞极化现象消失, 药物代谢酶和转运体低表达, 导致与正常生理环境存在较大差异<sup>[11]</sup>, 且 2D 细胞增殖较快, 在一定程度上掩盖了药物毒性所造成的损伤<sup>[12]</sup>, 从而限制了其在药物安全评价的应用, 难以用于特异质肝损伤的评价。3D 培养的细胞球 (类器官) 可模拟体内生长模式, 更接近人体的组织微结构, 模拟肝脏的功能<sup>[13]</sup>, 在评价药物毒性时可重复给药激活多种生物活性, 克服 2D 细胞模型掩盖药物毒性的缺陷<sup>[12]</sup>, 从而在药物特异质毒性评价方面更具优势。而且, 类器官 3D 培养模型具有构建周期短、成本低、易于操作和作用机制较易探明等特点<sup>[14]</sup>。在细胞选择方面, L02 来源于正常人肝细胞系, HepG2 来源于肿瘤细胞系, 可能是导致在 3D 模型建立时 L02 细胞仍可维持细胞球的形态, HepG2 细胞则呈近球体状态, 相对于 L02 细胞的 3D 模型呈松散状态的原因。但通过 L02 和 HepG2 两种细胞白蛋白检测及尿素代谢方面的比较, HepG2 优于 L02 细胞, 因此选用 HepG2 细胞作为药物肝毒性筛选的模型。

与 2D 培养细胞相比, 类器官 3D 培养模型表达的药物代谢酶、转运体及白蛋白显著升高, 与文献<sup>[8, 15, 16]</sup>报道的 3D 细胞模型特性一致。此外, 3D 细胞培养可进行长期培养, 适用于重复给药的研究。通过 IC<sub>50</sub> 值的比较, 结果显示 3D 类器官在重复给药后对肝损伤药物毒性更为敏感, 说明类器官 3D 培养模型符合中药肝损伤的特点, 与中药肝毒性的慢性损伤的生理发生过程类似。3D 培养的类器官可用于模拟长期低

剂量药物对人体肝细胞损害的影响, 比 2D 细胞模型更符合中药临床使用情况。

前期研究发现, *cis*-SG 是何首乌肝损伤的重要易感物质, 在对 *cis*-SG 及 *trans*-SG 在 3D 类器官代谢毒性进行检测后, 3 次给药结果显示, *cis*-SG 毒性显著高于 *trans*-SG, 与前期整体动物结果一致。在进一步的工作中, 利用该模型对 *cis*-SG 可能引起肝损伤的机制进行探讨, 从药物代谢方面深入研究 *cis*-SG 代谢过程对肝细胞引起损伤的机制, 从而找出何首乌引起肝损伤的相关原因, 为中药的肝毒性预测与解决提供思路。

## References

- [1] China Pharmacopoeia Committee. Chinese Pharmacopoeia (中国药典) [M]. Beijing: China Medical Science Press, 2010: 164.
- [2] Yang HL, Ge ZZ, Sun ZX. Advances in pharmacological studies of *Polygonum multiflorum* Thumb [J]. J Chin Med Mater (中药材), 2013, 36: 1713-1717.
- [3] Sun Z, Zhang L. Liver damage related to *Polygonum multiflorum* and its preparations: domestic literature review and analysis [J]. Adv Drug React J (药物不良反应杂志), 2010, 12: 26-30.
- [4] Li CY, Niu M, Bai ZF, et al. Screening for main components associated with the idiosyncratic hepatotoxicity of a tonic herb *Polygonum multiflorum* [J]. Front Med, 2017. DOI: 10.1007/s11684-017-0508-9.
- [5] Huang YY, Sun R. Research development on the application of systems biology in the discovery and assessment of hepatotoxicity TCM [J]. Chin J Pharmacovig (中国药物警戒), 2013, 10: 219-222.
- [6] Hu X, Yang T, Li C, et al. Human fetal hepatocyte line, L-02, exhibits good liver function *in vitro* and in an acute liver failure model [J]. Transplant Proc, 2013, 10: 695-700.
- [7] Gerets HH, Hanon E, Cornet M, et al. Selection of cytotoxicity markers for the screening of new chemical entities in a pharmaceutical context: a preliminary study using a multiplexing approach [J]. Toxicol In Vitro, 2009, 23: 319-332.
- [8] Luckert C, Schulz C, Lehmann N, et al. Comparative analysis of 3D culture methods on human HepG2 cells [J]. Arch Toxicol, 2017, 91: 393-406.
- [9] Lauschke VM, Hendriks DF, Bell CC, et al. Novel 3D culture systems for studies of human liver function and assessments of the hepatotoxicity of drugs and drug candidates [J]. Chem Res Toxicol, 2016, 29: 1936-1955.

- [10] Clevers H. Modeling development and disease with organoids [J]. *Cell*, 2016, 165: 1586–1597.
- [11] Tseng H, Balaoing LR, Grigoryan B, et al. A three-dimensional co-culture model of the aortic valve using magnetic levitation [J]. *Acta Biomater*, 2014, 10: 173–182.
- [12] Ramaiahgari SC, Den Braver MW, Herpers 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: 1083–1095.
- [13] Lau TT, Lee LQ, Leong W, et al. Formation of model hepatocellular aggregates in a hydrogel scaffold using degradable genipin crosslinked gelatin microspheres as cell carriers [J]. *Biomed Mater*, 2012, 7: 065003.
- [14] Qin YY, Liu Y, Liu CB, et al. Research progress of organ culture [J]. *Guangdong Med J (广东医学)*, 2016, 37: 2827–2828.
- [15] Guinness P, Mueller D, Shevchenko V, et al. 3D organotypic cultures of human HepaRG cells: a tool for *in vitro* toxicity studies [J]. *Toxicol Sci*, 2013, 133: 67–78.
- [16] Van Zijl F, Mikulits W. Hepatospheres: three dimensional cell cultures resemble physiological conditions of the liver [J]. *World J Hepatol*, 2010, 2: 1–7.