

基于复合细胞模型的顺式和反式二苯乙烯苷特异质肝损伤评价

潘韵铮, 李庆菊, 张琦, 蒋宝平, 张良, 许立*

(南京中医药大学药学院, 江苏省中药药效与安全性评价重点实验室, 江苏南京 210023)

摘要: 本研究从免疫炎症角度建立一种体外评价特异质型药物性肝损伤 (idiosyncratic drug-induced liver injury, IDILI) 的复合细胞模型, 并应用此模型对顺式二苯乙烯苷 (2,3,5,4'-tetrahydroxy-*cis*-stilbene-2-*O*- β -glucoside, Cis-SG) 和反式二苯乙烯苷 (2,3,5,4'-tetrahydroxy-*trans*-stilbene-2-*O*- β -glucoside, Trans-SG) 的IDILI风险进行评价。CellTiter-Glo® 3D Cell Viability Assay 法测定 Cis-SG 和 Trans-SG 对三维 (three-dimension, 3D) 培养下 HepG2 细胞活力的影响; MTT 法测定 Cis-SG 和 Trans-SG 对 THP-1 巨噬细胞活力的影响, 确定低、中、高给药剂量。分别给予 THP-1 巨噬细胞 1、5 和 25 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 Cis-SG 和 Trans-SG 或其经 3D HepG2 细胞孵育的上清液, 酶联免疫吸附分析 (enzyme linked immunosorbent assay, ELISA) 法检测 THP-1 巨噬细胞上清液中白细胞介素 (interleukin, IL)-1 β 的水平; 免疫印迹 (Western blot) 法和逆转录聚合酶链反应 (reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR) 分别检测 THP-1 巨噬细胞中凋亡相关斑点样蛋白 (apoptosis-associated speck-like protein, ASC)、Nod 样受体蛋白 3 (Nod-like receptor protein 3, NLRP3) 炎症小体、天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶-1 (cysteiny aspartate specific proteinase-1, caspase-1) 和 IL-1 β 的表达。结果显示, 1、5 和 25 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 Cis-SG 和 Trans-SG 对 THP-1 巨噬细胞分泌 IL-1 β 的水平无明显影响, 而 1、5 和 25 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 Cis-SG 和 25 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 Trans-SG 经肝细胞孵育后的上清液能显著提高 THP-1 巨噬细胞分泌 IL-1 β 的水平, 并能明显提高 ASC、NLRP3、caspase-1 和 IL-1 β 蛋白和 mRNA 的表达。综上, 本研究建立的体外 IDILI 复合细胞评价模型在测试 Cis-SG 和 Trans-SG 上成功应用, 此模型有助于在体外初步评价和筛选具有 IDILI 风险的药物, 为药物的特异质肝毒性预测与解决提供方法。

关键词: 特异质型药物性肝损伤; 何首乌; 二苯乙烯苷; NLRP3 炎症小体; 评价模型

中图分类号: R966 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2021)03-0808-08

The compound cell model-based evaluation for idiosyncratic liver injury of Cis-SG and Trans-SG

PAN Yun-zheng, LI Qing-ju, ZHANG Qi, JIANG Bao-ping, ZHANG Liang, XU Li*

(Jiangsu Key Laboratory for Pharmacology and Safety Evaluation of Chinese Materia Medica, School of Pharmacy, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China)

Abstract: In this study, a composite cell model for evaluation of idiosyncratic drug-induced liver injury (IDILI) was established *in vitro* from the perspective of immune inflammation. And this model was used to evaluate the risk of IDILI for 2,3,5,4'-tetrahydroxy-*cis*-stilbene-2-*O*- β -glucoside (Cis-SG) and 2,3,5,4'-tetrahydroxy-*trans*-stilbene-2-*O*- β -glucoside (Trans-SG). To determine the low, medium, and high dosage of Cis-SG and Trans-SG, CellTiter-Glo® 3D Cell Viability Assay was used to detect the effects of Cis-SG and Trans-SG on cell viability of HepG2 cells in three dimensional (3D) culture, and MTT assay was used to detect the effects of Cis-SG and Trans-SG on cell viability of THP-1 derived macrophages. THP-1 derived macrophages were incubated by Cis-SG and Trans-SG directly or supernatants from HepG2 cells incubated with them. Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA)

收稿日期: 2020-11-17; 修回日期: 2020-12-30.

基金项目: 江苏省中药药效与安全性评价重点实验室资助项目 (JKLPSE201810); 江苏省高校中医学优势学科建设工程资助项目 (PAPD).

*通讯作者 Tel: 13851572203, E-mail: xuli64@163.com

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2020-1741

was used to detect the levels of interleukin- 1β (IL- 1β) in the supernatants of the THP-1 derived macrophages. Western blot and reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) were used to determine the expression of apoptosis-associated speck-like protein (ASC), Nod-like receptor protein 3 (NLRP3), cysteinyl aspartate specific proteinase-1 (caspase-1), and IL- 1β in THP-1 derived macrophages. The results showed that there was no effect on the secretion of IL- 1β in THP-1 derived macrophages incubated by Cis-SG and Trans-SG directly. However, the secretion of IL- 1β , the protein and mRNA expression of ASC, NLRP3, caspase-1, and IL- 1β significantly increased in THP-1 derived macrophages incubated by supernatants from HepG2 cells incubated with 1, 5, and 25 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Cis-SG or 25 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Trans-SG. In summary, the composite cell model for evaluation of IDILI established *in vitro* has been successfully applied in testing Cis-SG and Trans-SG. This composite cell model is helpful to evaluate and screen drugs with IDILI risk *in vitro* preliminarily, which provides methods for predicting and solving the idiosyncratic liver toxicity of drugs.

Key words: idiosyncratic drug-induced liver injury; *Polygonum multiflorum* Thunb.; stilbene glucoside; NLRP3 inflammasome; evaluation model

特异质型药物性肝损伤 (idiosyncratic drug-induced liver injury, IDILI) 是一种仅发生在少数易感人群中的药物不良反应, 它可能与患者的性别、年龄、基因和基础疾病等存在某种关系, 具有发病率低、难以预测和无明显剂量依赖性等特点^[1]。虽然 IDILI 的发生机制尚不明确, 但目前研究已经从代谢和免疫角度提出了一些机制假说, 主要包括肝脏代谢功能障碍假说、炎症应激假说、半抗原假说、危险因子假说、免疫稳态失衡假说和基因多态性假说^[2]。越来越多的证据表明, IDILI 的发生是由免疫介导的, 而强烈的免疫反应仅靠 T 细胞受体 (T cell receptor, TCR) 介导的 MHC (major histocompatibility complex, MHC)-肽段抗原识别通路很难诱发, 其需要免疫系统进一步识别到危险因子介导的抗原提呈细胞 (antigen presenting cells, APCs) 活化信号通路^[3]。APCs 活化的常见机制是胞内炎症小体的激活。Nod 样受体蛋白 3 (nod-like receptor protein 3, NLRP3) 炎症小体作为固有免疫系统的重要组成部分, 是由胞内固有免疫受体 NLRP3、凋亡相关点样蛋白 (apoptosis-associated speck-like protein, ASC) 和天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶-1 (cysteinyl aspartate specific proteinase-1, caspase-1) 组成的多蛋白复合体^[4]。目前研究发现, 卡马西平^[5]和淫羊藿^[6]等引起的 IDILI 与 NLRP3 炎症小体的活化密切相关。

何首乌为蓼科植物何首乌 (*Polygonum multiflorum* Thunb.) 的干燥块根, 是我国临床上常用的传统补益类中药, 具有补肝肾益精血和乌须发强筋骨的功效^[7]。然而, 近年来关于何首乌及其制剂导致肝损伤的病例报道逐渐增多^[8], 引起了广泛重视。肖小河课题组^[9]研究发现何首乌在免疫应激大鼠上可以诱导 IDILI, 通过对何首乌不同提取部位的筛选与分析确定了与 IDILI 相关的成分是二苯乙烯苷类, 并在整体模型上进一步

研究证实顺式二苯乙烯苷 (2,3,5,4'-tetrahydroxy-*cis*-stilbene-2-*O*- β -glucoside, Cis-SG) 能通过抑制过氧化物酶体增殖物活化受体- γ (peroxisome proliferator-activated receptor γ , PPAR- γ) 诱导免疫应激介导的特异质肝损伤^[10]。反式二苯乙烯苷 (2,3,5,4'-tetrahydroxy-*trans*-stilbene-2-*O*- β -glucoside, Trans-SG) 不能直接诱导免疫应激介导的肝损伤, 但当机体处于过度免疫活化状态时, 会进一步促进免疫反应, 增强肝脏对 Cis-SG 的敏感性, 从而导致 IDILI^[11]。由于 IDILI 较难预测且发生机制错综复杂, 目前评价 IDILI 风险药物仅集中在体内模型, 体外评价模型报道较少。为此, 本研究从免疫炎症角度建立一种体外评价 IDILI 的复合细胞模型, 并应用此模型对 Cis-SG 和 Trans-SG (图 1) 的 IDILI 风险进行评价。

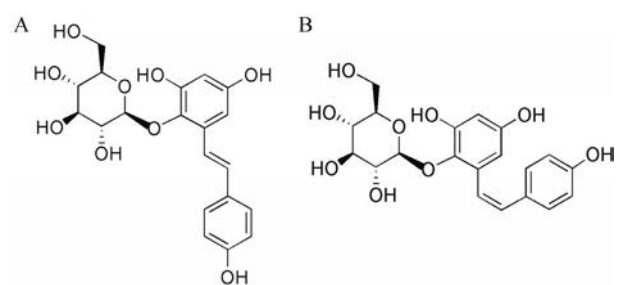


Figure 1 Chemical structures of 2,3,5,4'-tetrahydroxy-*trans*-stilbene-2-*O*- β -glucoside (Trans-SG, A) and 2,3,5,4'-tetrahydroxy-*cis*-stilbene-2-*O*- β -glucoside (Cis-SG, B). Molecular weight: 406.39

材料与方法

药物与试剂 Cis-SG 和 Trans-SG (成都普菲德生物技术有限公司, 纯度 $\geq 98\%$); 佛波酯 (phorbol 12-myristate 13-acetate, PMA, 美国 Sigma 公司, 纯度 $\geq 99\%$); caspase-1 抑制剂 Z-VAD-FMK (ZVAD) (大连美仑生物技术有限公司, 纯度 $\geq 98\%$); DMEM 高糖不完

全培养基和 RPMI1640 不完全培养基 (江苏凯基生物技术有限公司); 胎牛血清 (BI 公司); 0.25% 胰酶细胞消化液 (上海碧云天生物技术公司); CellTiter-Glo[®]3D 细胞活力检测试剂 (美国 Promega 公司); 白介素 1 β (interleukin 1 β , IL-1 β) 酶联免疫吸附分析 (enzyme linked immunosorbent assay, ELISA) 试剂盒 (杭州联科生物技术股份有限公司); 96 孔超低吸附培养板 (美国 Corning 公司); 普通 96 孔、24 孔和 6 孔细胞培养板 (NEST 公司); IL-1 β 抗体 (武汉三鹰生物技术有限公司); caspase-1 p20 抗体 (Abclonal 生物技术公司); ASC 抗体和 NLRP3 抗体 (Cell Signaling 生物技术公司); ASC、NLRP3、caspase-1 和 IL-1 β 引物合成于上海生工生物技术有限公司。

主要仪器 超净工作台 (苏州净化公司); CO₂ 培养箱 (美国 Thermo Scientific 公司); Synergy2 多功能酶标仪 (美国 Biotech 公司); EnSpire 荧光紫外分析器 (美国 PerkinElmer 公司); Allegra 64 R 型超速冷冻离心机 (美国 Beckman 公司); Nanodrop 检测仪 (美国 Thermo Scientific 公司); Bio-Rad 电泳仪及凝胶成像仪 (美国 Bio-Rad 公司); 7500 型实时定量荧光 PCR 仪 (美国 ABI 公司), 倒置显微镜 (德国 ZEISS 公司)。

细胞培养和药物配制 HepG2 和 THP-1 细胞均购自江苏凯基生物技术公司。HepG2 细胞生长在含有 10% 胎牛血清的 DMEM 完全培养基中, 于 37 °C、5% CO₂ 普通培养箱常规培养, 每隔 2 天传代一次; THP-1 细胞生长在含有 10% 胎牛血清的 RPMI1640 完全培养基中, 于 37 °C、5% CO₂ 普通培养箱常规培养, 每隔 2~3 天传代一次。药物配制过程在无菌条件下进行, 精密称取适量的 Cis-SG 和 Trans-SG, 用 PBS (phosphate buffer saline) 分别将其配成 5 mmol·L⁻¹ 储液, 分装后置于 -20 °C 冰箱保存, 实验前用完全培养基稀释到相应浓度。用细胞级 DMSO 分别将诱导剂 PMA 和抑制剂 ZVAD 配制成 0.2 和 1 mg·mL⁻¹ 的母液, 分装后置于 -20 °C 冰箱保存, 实验前用完全培养基稀释, PMA 和 ZVAD 的终浓度分别为 50 ng·mL⁻¹ 和 10 μ g·mL⁻¹。

MTT 法检测药物对 THP-1 巨噬细胞存活率的影响 将 THP-1 细胞接种于普通 96 孔板 (150 μ L, 2 \times 10⁴ 个/孔), 给予 50 ng·mL⁻¹ 的 PMA 诱导 72 h 使其分化为 THP-1 巨噬细胞, 用 PBS 清洗 2 次, 再给予每孔 150 μ L 完全培养基培养 24 h, 弃去培养基, 每孔加入不同浓度含 Cis-SG 或 Trans-SG 的完全培养基, 对照组加入等量完全培养基, 放入细胞培养箱孵育 24 h, 取出培养板每孔加入 20 μ L 的 MTT, 再于培养箱中孵育 4 h, 取出培养板吸弃培养基, 每孔加入 150 μ L 的 DMSO, 振荡摇匀 10 min, 使用酶标仪读取波长 570 nm 处的吸光度值

(A₅₇₀), 计算细胞存活率 = (各给药组 A₅₇₀ 值 - 空白孔 A₅₇₀ 值) / (对照组 A₅₇₀ 值 - 空白孔 A₅₇₀ 值) \times 100%。

CellTiter-Glo[®] 3D Cell Viability Assay 检测药物对 3D HepG2 细胞存活率的影响 将 HepG2 细胞悬液 (100 μ L, 500 个细胞/孔) 与等体积不同浓度的含药培养基接种于超低吸附 96 孔 U 型板中, 静置 10 min, 置于 37 °C、5% CO₂ 细胞培养箱中培养 7 天, 使细胞形成 3D 微球结构。7 天后将细胞培养板取出, 室温下静置 30 min, 每孔加入 100 μ L 的 CellTiter-Glo 试剂, 避光振荡 5 min 促使细胞完全裂解, 室温下静置 25 min 稳定发光信号, 取反应液于全白不透明的 96 孔板中, 使用荧光紫外分析器读取各孔化学发光值, 计算细胞存活率 = (给药组发光值 / 对照组发光值) \times 100%。

药物与肝细胞共孵育上清液的制备 将处于对数生长期的 HepG2 细胞以 500 个细胞/孔的密度接种于底面超低吸附的 96 孔 U 型板中, 静置 10 min, 每孔给予 100 μ L 不同浓度的含 Cis-SG 或 Trans-SG 的完全培养基, 使两种药物的终浓度为 1、5 和 25 μ mol·L⁻¹, 对照组给予等量的 DMEM 完全培养基, 置于 37 °C、5% CO₂ 恒湿培养箱中孵育 7 天。7 天后, 收集各组上清液, 4 °C、2 000 r·min⁻¹ 离心 10 min 去除细胞碎片后备用。

ELISA 法检测 THP-1 巨噬细胞上清液中 IL-1 β 水平 将处于对数生长期的 THP-1 细胞以每孔 4 \times 10⁵ 个细胞的密度接种于 24 孔板, 给予 50 ng·mL⁻¹ 的 PMA 诱导 72 h 使其贴壁分化为 THP-1 巨噬细胞, PBS 洗 1~2 次, 每孔加入 1 mL 完全培养基孵育 24 h 使巨噬细胞成熟, 弃去培养基, 设置对照组、给药组和抑制剂组, 给药组分别给予 1、5 和 25 μ mol·L⁻¹ 的 Cis-SG 和 Trans-SG 经肝细胞孵育的上清液或含药培养基, 抑制剂组给予 10 μ g·mL⁻¹ 的 ZVAD 预处理后再给予 25 μ mol·L⁻¹ 的 Cis-SG 和 Trans-SG 经肝细胞孵育的上清液, 将细胞培养板置于 37 °C、5% CO₂ 细胞培养箱中孵育 18 h, 使用 ELISA 试剂盒检测 THP-1 巨噬细胞上清液中 IL-1 β 的水平。

Western blot 法检测蛋白的表达 将处于对数生长期的 THP-1 细胞以每孔 1 \times 10⁶ 个细胞的密度接种于 6 孔板, 给予 50 ng·mL⁻¹ 的 PMA 诱导 72 h 使其贴壁分化为 THP-1 巨噬细胞, 用 PBS 洗 1~2 次, 每孔加入 2 mL 完全培养基孵育 24 h 使 THP-1 巨噬细胞成熟, 设置对照组、给药组和抑制剂组, 给药组分别给予 1、5 和 25 μ mol·L⁻¹ 的 Cis-SG 和 Trans-SG 经肝细胞孵育的上清液, 抑制剂组给予 10 μ g·mL⁻¹ 的 ZVAD 预处理后再给予 25 μ mol·L⁻¹ 的 Cis-SG 和 Trans-SG 经肝细胞孵育的上清液, 将细胞培养板置于 37 °C、5% CO₂ 细胞培养

箱中孵育 18 h。之后提取各组细胞裂解物总蛋白,用 Thermo Scientific Nanodrop 检测仪测定蛋白浓度,用 PBS 将各组蛋白稀释到同一水平并加入 1/4 体积的上样缓冲液。每孔加入 6 μL 蛋白样本进行 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳,将凝胶中充分分离的蛋白转移至活化后的 PVDF (polyvinylidene fluoride) 膜上,室温下用 5% 脱脂奶粉封闭 1 h 并用 TBST (tris-buffered saline tween-20) 溶液洗 3 次,每次 10 min,之后分别加入 ASC、NLRP3、caspase-1 p20、IL-1 β 和 β -actin 的一抗溶液于 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜,次日用 TBST 溶液洗涤后加入带有辣根过氧化物酶标记的二抗于摇床上孵育 2 h, TBST 溶液洗膜 3 次,加入化学发光试剂并用 Bio-Rad 凝胶成像仪显影。以 β -actin 为内参,使用 Image Lab 软件对蛋白条带进行半定量分析。

实时荧光定量 PCR 检测基因的表达 实验分组及处理方法同上,采用 Trizol 法提取 THP-1 巨噬细胞总 RNA,用 Thermo Scientific Nanodrop 检测仪测定 RNA 纯度和含量并用 DEPC (diethyl pyrocarbonate) 水将其稀释到同一浓度水平,按照逆转录试剂盒使用说明将 RNA 逆转录为 cDNA。取各组 cDNA 上机进行实时荧光定量 PCR 检测,反应程序为预处理 95 $^{\circ}\text{C}$ 10 min; 95 $^{\circ}\text{C}$ 15 s \rightarrow 60 $^{\circ}\text{C}$ 1 min 进行 40 个循环数。以 GAPDH (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) 为内参,采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法测定 ASC、NLRP3、caspase-1 和 IL-1 β 相对基因表达情况。具体引物序列见表 1。

统计学分析 采用 GraphPad Prism 7.0 软件对数据进行统计学分析,所有结果均用 $\bar{x} \pm s$ 表示,对两组数据之间比较采用 *t* 检验,对多组数据采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 被认为差异具有统计学意义。

Table 1 Primer sequences for real-time polymerase. ASC: Apoptosis-associated speck-like protein; NLRP3: Nod-like receptor protein 3; Caspase-1: Cysteiny aspartate specific proteinase-1; IL-1 β : Interleukin-1 β ; GAPDH: Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase

Gene	Forward sequence (5'-3')	Reverse sequence (5'-3')
ASC	CTCAAGAAGTTCAAGCTGAAGC	TAGGTCTCCAGGTAGAAGCTG
NLRP3	TGTCGGGAGGTGAGCCTTGTTG	GATCTTGTGGATGGGTGGGTTTGG
Caspase-1	CACACCGCCCAGAGCACAAG	TCCCACAAATGCCTTCCCGAATAC
IL-1 β	GCCAGTGAAATGATGGCTTATT	AGGAGCACTTCATCTGTTTAGG
GAPDH	GGCAAATCAACGGCACAGT	AGATGGTGATGGGCTTCCC

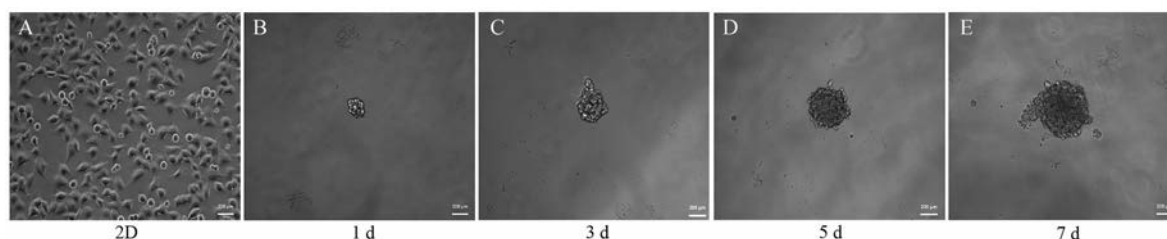


Figure 2 Morphology of HepG2 cells in two dimensional (2D) culture and morphology of HepG2 cells in three dimensional (3D) culture for different days. A: 2D; B: Day 1 (1d); C: 3d; D: 5d; E: 7d. Scale bar: 200 μm . Magnification: 200 \times

结果

1 普通二维培养和三维类器官培养的 HepG2 细胞形态观察

采用液滴重叠法构建类器官 3D 培养的 HepG2 细胞^[12],将 HepG2 细胞以每孔 500 个细胞的密度接种于超低吸附的 96 板中。结果显示 (图 2),培养 1 天后,细胞开始聚团生长 (图 2B);培养 3 天后,细胞开始形成 3D 微球结构 (图 2C);培养 5 天后,微球直径变大 (图 2D);培养 7 天后,形成致密的 3D 微球结构 (图 2E)。普通 2D 培养的 HepG2 细胞呈多边不规则形 (图 2A)。

2 Cis-SG 和 Trans-SG 对 THP-1 巨噬细胞和 3D HepG2 细胞活力的影响

MTT 法测定 250、500、1 000、2 000 和 4 000 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 Cis-SG 和 Trans-SG 对 THP-1 巨噬细胞活力的影响。Cis-SG 在 0~1 000 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 剂量范围内对于 THP-1 巨噬细胞活力无明显影响,Trans-SG 在 0~500 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 剂量范围内对于 THP-1 巨噬细胞活力无明显影响 (图 3A、B);CellTiter-Glo[®] 3D 细胞活力试剂测定 1、2、5、10、25、50、100 和 200 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 Cis-SG 和 Trans-SG 对 3D 培养的 HepG2 细胞活力的影响。Cis-SG 和 Trans-SG 在 0~50 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 范围内对于 3D 培养的 HepG2 细胞活力无明显影响 (图 3C、D)。综合细胞存活率的测定和显微镜下对于细胞形态的观察,本实验选择 1、5、25 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 作为 Cis-SG 和 Trans-SG 的低、中、高给药剂量。

3 Cis-SG 和 Trans-SG 及其经肝细胞孵育的上清液对 THP-1 巨噬细胞分泌 IL-1 β 的影响

ELISA 实验结果表明,与对照组相比,低、中、高剂量的 Cis-SG 和 Trans-SG 对 THP-1 巨噬细胞分泌的 IL-1 β 水平均无明显影响 (图 4A、B)。低、中、高剂量的 Cis-SG

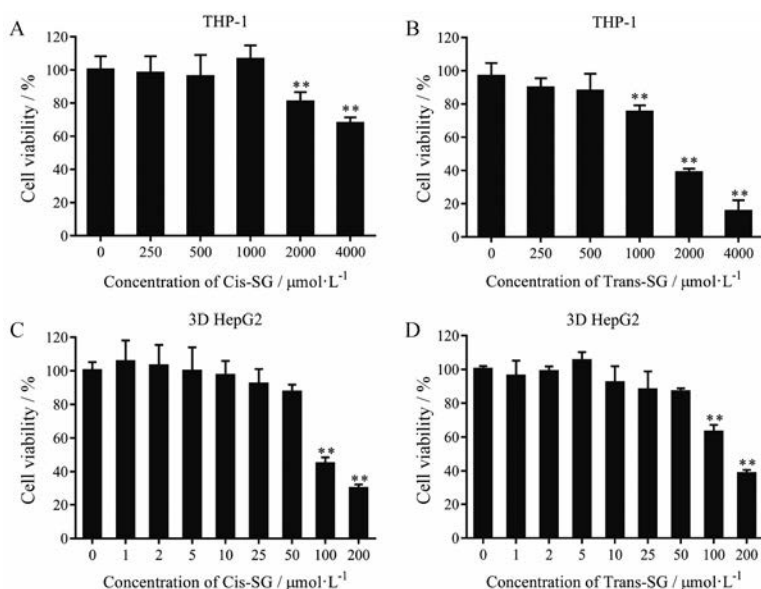


Figure 3 Cytotoxicity determination of Cis-SG and Trans-SG. A and B: Effect of Cis-SG (A) and Trans-SG (B) on cell viability in THP-1-derived macrophages. $n = 6, \bar{x} \pm s$; C and D: Effect of Cis-SG (C) and Trans-SG (D) on cell viability in 3D HepG2. $n = 3, \bar{x} \pm s$. ** $P < 0.01$ vs control group

经肝细胞孵育的上清液均使 THP-1 巨噬细胞分泌的 IL-1 β 水平显著升高; 给予低、中、高剂量的 Trans-SG 经肝细胞孵育的上清液后, 仅高剂量组 THP-1 巨噬细胞分泌的 IL-1 β 水平显著升高, 低、中剂量组巨噬细胞分泌的 IL-1 β 水平与对照组相比无明显差异 (图 4C、D)。为了排除肝细胞上清液带来的干扰, 进一步验证 IL-1 β 是由 THP-1 巨噬细胞分泌的, 在给予高剂量的 Cis-SG

和 Trans-SG 经肝细胞孵育的上清液之前用 caspase-1 抑制剂 ZVAD 预处理 THP-1 巨噬细胞, 结果其分泌的 IL-1 β 水平与高剂量组相比显著下降。

4 Cis-SG 和 Trans-SG 经肝细胞孵育的上清液对 THP-1 巨噬细胞 ASC、NLRP3、caspase-1 p20 和 IL-1 β 蛋白表达的影响

Western blot 实验结果表明, 与对照组相比, 给予

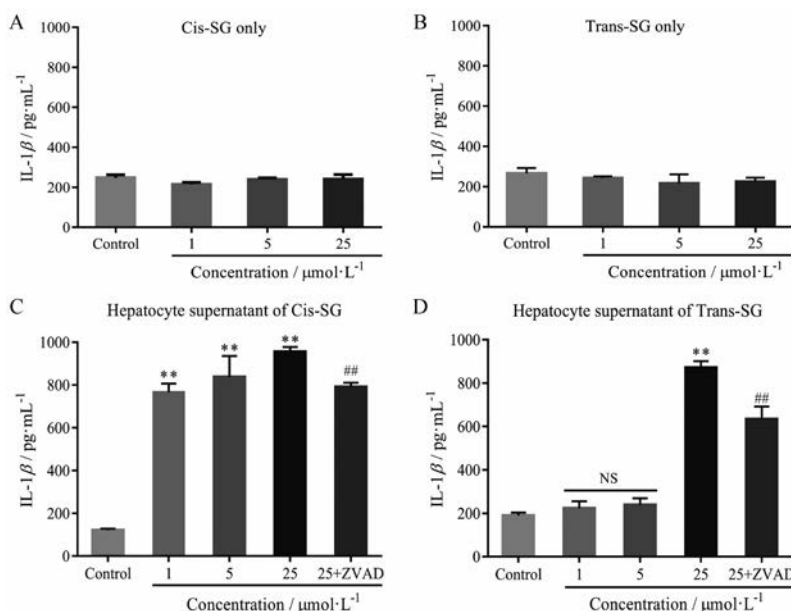


Figure 4 The secretion of IL-1 β was measured in the supernatant of THP-1-derived macrophages by ELISA. A and B: Levels of IL-1 β secreted by THP-1-derived macrophages incubated with Cis-SG (A) or Trans-SG (B) for 18 h; C and D: Levels of IL-1 β secreted by THP-1-derived macrophages incubated with the hepatocyte supernatant of Cis-SG (C) or Trans-SG (D) for 18 h. $n = 3, \bar{x} \pm s$. ** $P < 0.01$ vs control group; ## $P < 0.01$ vs 25 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ group; NS: Nonsignificant

低、中、高剂量的 Cis-SG 经肝细胞孵育的上清液后, THP-1 巨噬细胞中 ASC、NLRP3、caspase-1 p20 和 IL-1 β 蛋白表达水平均显著升高。给予低剂量和中剂量的 Trans-SG 经肝细胞孵育的上清液后, THP-1 巨噬细胞中 ASC、NLRP3、caspase-1 p20 和 IL-1 β 蛋白表达水平无明显变化, 仅高剂量的 Trans-SG 经肝细胞孵育的上清液具有显著促进 THP-1 巨噬细胞 NLRP3 炎症小体激活的作用。在给予高剂量的 Cis-SG 和 Trans-SG 经肝细胞孵育的上清液前用 caspase-1 抑制剂 ZVAD 预处理 THP-1 巨噬细胞, 其 ASC、NLRP3、caspase-1 p20 和 IL-1 β 蛋白表达水平均不同程度的降低 (图 5)。

5 Cis-SG 和 Trans-SG 经肝细胞孵育的上清液对 THP-1 巨噬细胞 ASC、NLRP3、caspase-1 和 IL-1 β mRNA 表达的影响

RT-PCR 实验结果表明, 与对照组相比, 给予低、中、高剂量的 Cis-SG 经肝细胞孵育的上清液后, THP-1 巨噬细胞中 ASC、NLRP3、caspase-1 和 IL-1 β mRNA 的表达水平均显著提高。给予 Trans-SG 经肝细胞孵育的上清液后, 仅高剂量组的 THP-1 巨噬细胞中 ASC、NLRP3、caspase-1 和 IL-1 β mRNA 表达水平显著提高, 低、中剂量组无明显变化。给予 caspase-1 抑制剂 ZVAD 预处理后, THP-1 巨噬细胞中 ASC、NLRP3、caspase-1 和 IL-1 β mRNA 表达水平均不同程度的降低 (图 6)。这与 Western blot 实验结果相互印证。

讨论

IDILI 是一种罕见且潜在的严重药物不良反应。近年来, 不少已经获得批准的药物因 IDILI 从市场上撤回或受到“黑框”警告, 这不仅提高了制药企业研发新药的成本, 还增加了临床用药的风险^[13]。目前研究人员基于 IDILI 发生机制的假说尝试建立了一些动物评价模型, 主要包括炎症应激模型和免疫耐受抑制模型, 它们在评价 IDILI 风险药物上取得了一定进展^[14,15]。然而由于缺乏对 IDILI 发生机制的全面了解, 使用动物评价模型仍然具有一定挑战性^[16]。因此, 深入了解 IDILI 的发生机制, 建立高效、准确的 IDILI 体外评价模型显得尤为重要。

在 IDILI 发生机制中占主导地位的是半抗原和危险因子假说, 前者认为一般药物单独作用不会诱导强烈的免疫反应, 需要与细胞内源性蛋白结合形成半抗原; 后者认为由 APCs 提供的共刺激分子介导的第二信号是免疫反应的必要条件^[17]。因此, 药物的活性代谢产物可能与内源性蛋白结合导致细胞损伤, 进而产生激活炎症小体的危险信号^[18]。经典的 NLRP3 炎症小体激活过程是由启动和活化两个阶段共同完成的^[19]。在启动阶段, 损伤相关分子模式 (damage-associated molecular patterns, DAMPs) 或病原相关分子模式 (pathogen-associated molecular patterns, PAMPs) 作为危险因子通过 Toll 样受体 (toll like receptor, TLR) 激活核转录因子- κ B (nuclear factor- κ B, NF- κ B), 进而介

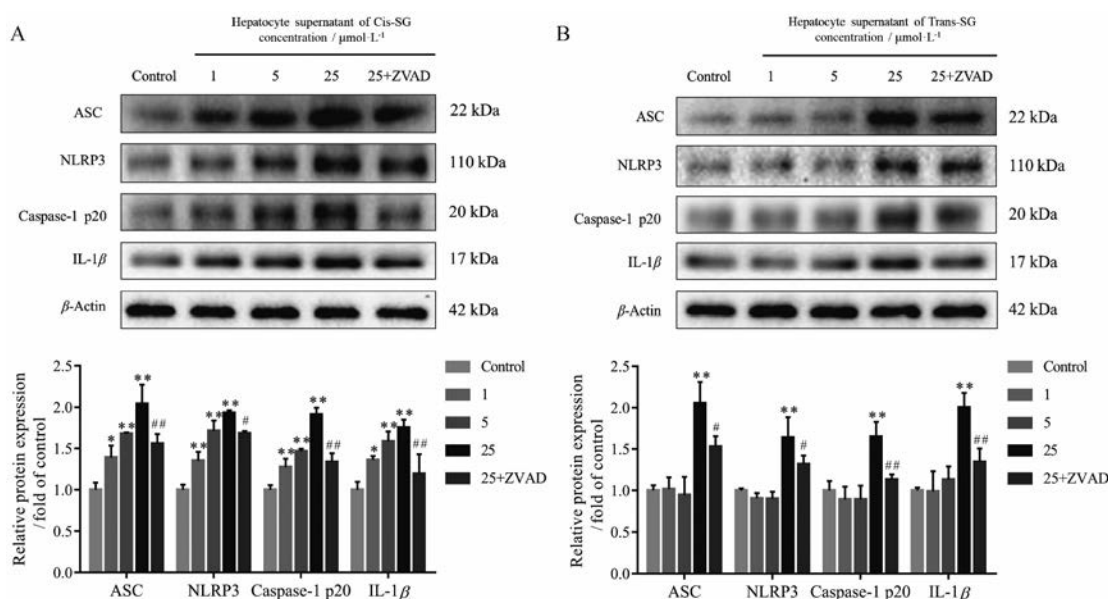


Figure 5 Effect of hepatocyte supernatant of Cis-SG or Trans-SG on NLRP3 inflammasome activation-related proteins in THP-1-derived macrophages. A: Protein expression of ASC, NLRP3, caspase-1 p20, and IL-1 β was determined by Western blot at different doses of hepatocyte supernatant of Cis-SG; B: Protein expression of ASC, NLRP3, caspase-1 p20, and IL-1 β was determined by Western blot at different doses of hepatocyte supernatant of Trans-SG. The relative protein levels were calculated by densitometry analysis and normalized to those of β -actin. $n = 3$, $\bar{x} \pm s$. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs control group; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ vs 25 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ group

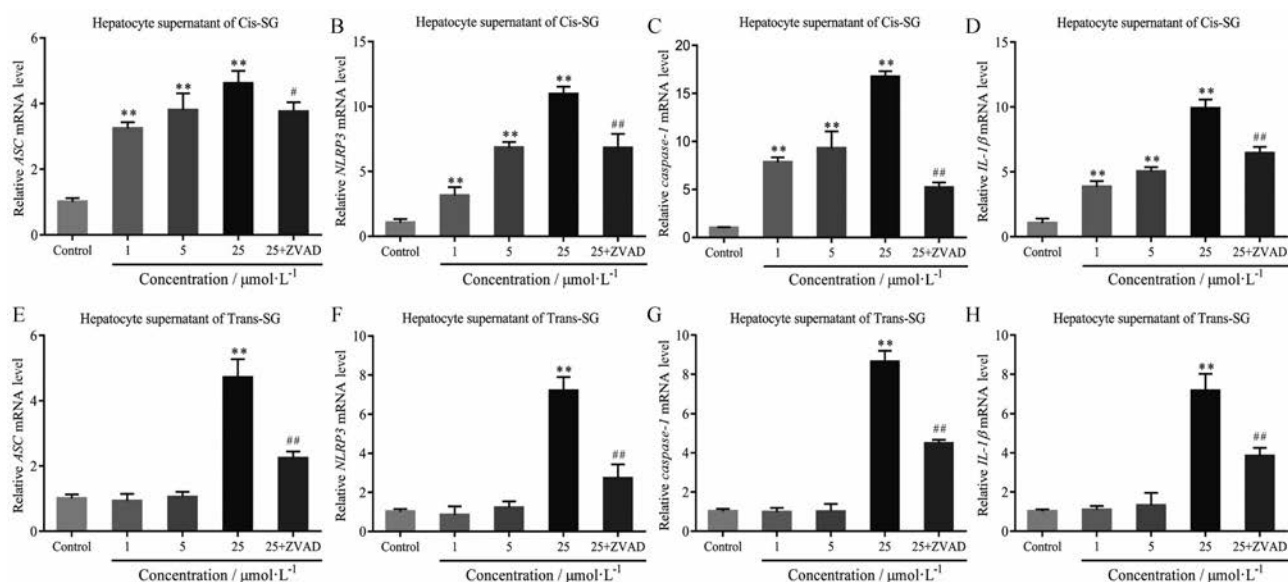


Figure 6 Effect of hepatocyte supernatant of Cis-SG or Trans-SG on NLRP3 inflammasome activation-related mRNA in THP-1-derived macrophages. A-D: The relative mRNA levels of *ASC*, *NLRP3*, *caspase-1*, and *IL-1β* were determined by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) at different doses of hepatocyte supernatant of Cis-SG; E-H: The relative mRNA levels of *ASC*, *NLRP3*, *caspase-1*, and *IL-1β* were determined by RT-PCR at different doses of hepatocyte supernatant of Trans-SG. $n = 3$, $\bar{x} \pm s$. ** $P < 0.01$ vs control group; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ vs 25 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ group

导 pro-IL-1 β 和 pro-IL-18 的产生^[20,21]; 活化阶段通常由 ATP、成孔毒素或颗粒物等引起, 介导 NLRP3/ASC/pro-caspase-1 蛋白复合体的组装, 促使 pro-caspase-1 自剪切成活化的 caspase-1, 进而剪切 pro-IL-1 β 和 pro-IL-18 并分泌成熟的 IL-1 β 和 IL-18 到细胞外^[22-24]。

目前研究表明, NLRP3 炎症小体的过度激活可能是导致某些患者肝脏疾病的免疫应答的重要机制^[25,26], 一些具有 IDILI 风险的药物可以诱导肝细胞释放 DAMPs, 从而激活 THP-1 巨噬细胞 NLRP3 炎症小体^[27,28]。因此, 本研究试图从免疫炎症角度去建立一种体外评价 IDILI 药物的复合细胞模型, 即用药物与类器官 3D 培养的 HepG2 细胞共孵育后的上清液来刺激 THP-1 巨噬细胞, 通过 THP-1 巨噬细胞 NLRP3 炎症小体的激活情况来评价药物潜在的 IDILI 风险。本课题组在预实验中使用能够诱导 IDILI 的阳性药物奈韦拉平对此复合模型进行了测试, 初步验证了其可靠性。在此, 作者应用这一复合细胞模型对何首乌中两种互为光学异构体的单体成分 Cis-SG 和 Trans-SG 的 IDILI 风险进行了评价。由于关于何首乌诱发的特异质肝损伤均是在正常剂量下发现的^[29], 因此选择了 Cis-SG 和 Trans-SG 对细胞存活率无影响的剂量进行实验。结果发现, Cis-SG 和 Trans-SG 直接作用于 THP-1 巨噬细胞均不能激活 NLRP3 炎症小体, 而经过 3D 培养的 HepG2 细胞孵育后, 1、5、25 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 Cis-SG 和 25 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 Trans-SG 均具有一定的激活 THP-1 巨噬细胞

NLRP3 炎症小体的作用。并且在低、中剂量下, 能够诱导 IDILI 的 Cis-SG 经肝细胞孵育后即可产生较强的促炎作用, 而不能诱导 IDILI 的 Trans-SG 经肝细胞孵育后则无明显促炎作用。结果表明 Cis-SG 和 Trans-SG 经过肝细胞孵育后可能形成了活性代谢产物, 这种活性代谢产物可能与内源性蛋白结合或直接引起肝细胞释放 DAMPs, 而 DAMPs 可以刺激 THP-1 巨噬细胞引起 NLRP3 炎症小体的激活, 进而导致促炎因子 IL-1 β 的释放。另外, 这也提示 NLRP3 炎症小体的活化可能是 Cis-SG 诱导 IDILI 的一种机制。但本实验对 Cis-SG 和 Trans-SG 经肝细胞孵育的上清液未做进一步研究, 后续将从代谢组学角度探究 Cis-SG 和 Trans-SG 在肝细胞代谢中的差异, 寻找可能导致促炎作用的代谢途径及相关代谢酶。

综上, 本研究建立的体外 IDILI 复合细胞评价模型在测试 Cis-SG 和 Trans-SG 上成功应用, 利用 3D 培养的 HepG2 细胞与 THP-1 巨噬细胞相结合是测试药物激活炎症小体能力的便捷方法, 这可能有助于筛选具有 IDILI 风险的药物, 为药物的特异质肝毒性预测与解决提供方法。

作者贡献: 潘韵铮负责整个实验的设计、操作及论文的撰写; 李庆菊、张琦和蒋宝平参与了数据分析及文献检索; 张良和许立负责论文的指导和审阅。

利益冲突: 所有作者均声明不存在任何利益冲突。

References

- [1] Fontana RJ. Pathogenesis of idiosyncratic drug-induced liver injury and clinical perspectives [J]. *Gastroenterology*, 2014, 146: 914-928.
- [2] Cho T, Uetrecht J. How reactive metabolites induce an immune response that sometimes leads to an idiosyncratic drug reaction [J]. *Chem Res Toxicol*, 2016, 30: 295-314.
- [3] Matzinger P. Tolerance, danger, and the extended family [J]. *Immunology*, 1994, 12: 991-1045.
- [4] Gros Lambert M, Py BF. Spotlight on the NLRP3 inflammasome pathway [J]. *J Inflamm Res*, 2018, 11: 359-374.
- [5] Wang Z, Xu G, Zhan X, et al. Carbamazepine promotes specific stimuli-induced NLRP3 inflammasome activation and causes idiosyncratic liver injury in mice [J]. *Arch Toxicol*, 2019, 93: 3585-3599.
- [6] Wang Z, Xu G, Wang H, et al. Icariside II, a main compound in *Epimedium Folium*, induces idiosyncratic hepatotoxicity by enhancing NLRP3 inflammasome activation [J]. *Acta Pharm Sin B*, 2020, 10: 1619-1633.
- [7] China Pharmacopoeia Committee. Chinese Pharmacopoeia (中国药典) [M]. Beijing: China Medical Science Press, 2010: 164.
- [8] Ma NH, Chen Y, Xu CSH, et al. Research progress of liver injury induced by *Polygonum Multiflori Radix* [J]. *China J Chin Mater Med (中国中药杂志)*, 2020, 45: 3594-3602.
- [9] Li C, Niu M, Bai Z, et al. Screening for main components associated with the idiosyncratic hepatotoxicity of a tonic herb, *Polygonum multiflorum* [J]. *Front Med*, 2017, 11: 253-265.
- [10] Meng YK, Li CY, Li RY, et al. *Cis*-Stilbene glucoside in *Polygonum multiflorum* induces immunological idiosyncratic hepatotoxicity in LPS-treated rats by suppressing PPAR-gamma [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2017, 38: 1340-1352.
- [11] He L, Yin P, Meng Y, et al. Immunological synergistic mechanisms of *trans*-/*cis*-stilbene glycosides in Heshouwu-related idiosyncratic liver injury [J]. *Sci Bull*, 2017, 62: 748-751.
- [12] Li TT, Li RH, Liu ZX, et al. Three dimensional organoids-based evaluation for hepatotoxicity of the susceptible compound in *Polygonum multiflorum* Thunb [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2017, 52: 1048-1054.
- [13] Yamashita YI, Imai K, Mima K, et al. Idiosyncratic drug-induced liver injury: a short review [J]. *Hepatol Commun*, 2017, 1: 494-500.
- [14] Su Y, Zhang Y, Chen M, et al. Lipopolysaccharide exposure augments isoniazide-induced liver injury [J]. *J Appl Toxicol*, 2014, 34: 1436-1442.
- [15] Metushi IG, Hayes MA, Uetrecht J. Treatment of PD-1(-/-) mice with amodiaquine and anti-CTLA4 leads to liver injury similar to idiosyncratic liver injury in patients [J]. *Hepatology*, 2015, 61: 1332-1342.
- [16] Yokoi T, Oda S. Models of idiosyncratic drug-induced liver injury [J]. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 2021, 61: 20. 1-20. 22.
- [17] Uetrecht J. Mechanisms of idiosyncratic drug-induced liver injury [J]. *Adv Pharmacol*, 2019, 85: 133-163.
- [18] Bettigole SE, Glimcher LH. Endoplasmic reticulum stress in immunity [J]. *Annu Rev Immunol*, 2015, 33: 107-138.
- [19] He Y, Hara H, Nunez G. Mechanism and regulation of NLRP3 inflammasome activation [J]. *Trends Biochem Sci*, 2016, 41: 1012-1021.
- [20] Su Q, Li L, Sun Y, et al. Effects of the TLR4/Myd88/NF-kappaB signaling pathway on NLRP3 inflammasome in coronary microembolization-induced myocardial injury [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2018, 47: 1497-1508.
- [21] Qiao Y, Wang P, Qi J, et al. TLR-induced NF-kappaB activation regulates NLRP3 expression in murine macrophages [J]. *FEBS Lett*, 2012, 586: 1022-1026.
- [22] Wang W, Hu D, Feng Y, et al. Paxillin mediates ATP-induced activation of P2X7 receptor and NLRP3 inflammasome [J]. *BMC Biol*, 2020, 18: 182-188.
- [23] Keyel PA, Roth R, Yokoyama WM, et al. Reduction of streptolysin O (SLO) pore-forming activity enhances inflammasome activation [J]. *Toxins (Basel)*, 2013, 5: 1105-1118.
- [24] Dostert C, Guarda G, Romero JF, et al. Malarial hemozoin is a Nalp3 inflammasome activating danger signal [J]. *PLoS One*, 2009, 4: e6510.
- [25] Wree A, Eguchi A, McGeough MD, et al. NLRP3 inflammasome activation results in hepatocyte pyroptosis, liver inflammation, and fibrosis in mice [J]. *Hepatology*, 2014, 59: 898-910.
- [26] Mridha AR, Wree A, Robertson AAB, et al. NLRP3 inflammasome blockade reduces liver inflammation and fibrosis in experimental NASH in mice [J]. *J Hepatol*, 2017, 66: 1037-1046.
- [27] Kato R, Uetrecht J. Supernatant from hepatocyte cultures with drugs that cause idiosyncratic liver injury activates macrophage inflammasomes [J]. *Chem Res Toxicol*, 2017, 30: 1327-1332.
- [28] Mak A, Kato R, Weston K, et al. Editor's highlight: an impaired immune tolerance animal model distinguishes the potential of troglitazone/pioglitazone and tolcapone/entacapone to cause IDILI [J]. *Toxicol Sci*, 2018, 161: 412-420.
- [29] Tu C, Ge FL, Guo YM, et al. Analysis of clinical characteristics and medication rationality of *Polygonum multiflorum* Thunb. and its preparation-related liver injury [J]. *Chin J Pharmacovig (中国药物警戒)*, 2013, 10: 219-222.