

DOI:10.7524/AJE.1673-5897.20191024001

高美琪, 林鹤, 于娜, 等. 环境中可致肝脏损伤化学成分体外筛选模型的建立[J]. 生态毒理学报, 2020, 15(3): 56-63

Gao M Q, Lin H, Yu N, et al. Establishment of an *in vitro* screening model for environmental chemicals that can induce liver damage [J]. Asian Journal of Ecotoxicology, 2020, 15(3): 56-63 (in Chinese)

## 环境中可致肝脏损伤化学成分体外筛选模型的建立

高美琪<sup>1,2</sup>, 林鹤<sup>1</sup>, 于娜<sup>1</sup>, 刘兆泉<sup>1</sup>, 任利翔<sup>1,\*</sup>

1. 沈阳化工研究院有限公司安全评价中心, 沈阳 110021

2. 沈阳药科大学生命科学与生物制药学院, 沈阳 110016

收稿日期: 2019-10-24 录用日期: 2020-02-28

**摘要:** 环境污染日益严重, 环境中的有害化学成分对人类的健康具有潜在的危害, 而肝脏作为代谢的主要器官, 无疑最易受到损伤。本研究旨在建立一种高效的、多参数的肝脏毒性体外筛选方法。采用了 5 种肝毒性阳性化合物和 3 种阴性化合物, 3 种试验方法对 2 种肝细胞进行了比较。采用四甲基偶氮唑盐微量酶反应比色法(MTT 法)考察了化合物对 2 种细胞体外的生长抑制作用, 采用高内涵检测法考察了化合物对肝损伤相关指标的影响, 采用实时定量聚合酶链式反应(PCR 法)比较了 2 种细胞的肝药酶含量。5 种明确能够导致肝损伤的阳性化学物质对 HepG2 和 L-02 细胞均有不同程度的体外生长抑制作用, 而 3 种明确不能诱导肝损伤的化合物对 2 种细胞均无明显生长抑制作用, 且 L-02 细胞对肝毒性阳性化合物相对敏感。高内涵检测结果表明, 不同毒性机制的阳性化合物作用于 2 种细胞时, 与肝损伤机制相关的参数呈现出不同程度的变化, 且 L-02 细胞预测肝损伤的精确度、灵敏度和特异度更高, 表明其预测肝损伤的能力更强。此外, L-02 细胞药物代谢酶的 mRNA 表达含量显著高于 HepG2 细胞, 表明其与体内肝脏代谢水平更加接近。综上所述, L-02 细胞结合高内涵检测为合适的肝脏毒性体外筛选模型。

**关键词:** 肝细胞; 肝脏毒性; 毒性筛选; 高内涵检测

文章编号: 1673-5897(2020)3-056-08 中图分类号: X171.5 文献标识码: A

## Establishment of an *in vitro* Screening Model for Environmental Chemicals that Can Induce Liver Damage

Gao Meiqi<sup>1,2</sup>, Lin He<sup>1</sup>, Yu Na<sup>1</sup>, Liu Zhaoquan<sup>1</sup>, Ren Lixiang<sup>1,\*</sup>

1. Shenyang Research Institute of Chemical Industry, Safety Evaluation Center, Shenyang 110021, China

2. Faculty of Life Sciences and Biological Pharmacy, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China

Received 24 October 2019 accepted 28 February 2020

**Abstract:** The environmental pollution pose a threat to human health when exposed to harmful chemicals. Liver, mainly for metabolism, is undoubtedly the most sensitive organ to those harmful chemicals. In the present study, we established an effective *in vitro* screening model with multiple parameters for evaluation of hepatotoxicity. Five hepatotoxic chemicals and a plurality of three non-hepatotoxic chemicals were selected as positive controls and negative controls, respectively. Meanwhile, three kinds of assay were also applied in two hepatocytes for comparison. The growth inhibitions in these cell types induced by these chemicals were examined using MTT assay. Close relevant indicators of liver injury were then checked using high-content detection method. Hepatic enzyme contents

第一作者: 高美琪(1994—), 女, 硕士, 研究方向为肿瘤药理学、替代毒理学, E-mail: 1014773401@qq.com

\* 通讯作者( Corresponding author ), E-mail: renlixiang@sinochem.com

were finally tested by real-time quantitative PCR. Five hepatotoxic chemicals showed significant inhibition on the growth of HepG2 and L-02 cells in different patterns. Furthermore, when those hepatotoxic chemicals were administered in these cells, the liver injury-related parameters exhibited distinct degrees of changes. Our finding indicates that L-02 cells showed obvious higher sensitivity and specificity than HepG2 cells in hepatotoxic evaluation. The mRNA levels of metabolizing enzymes were also remarkably higher in L-02 cells than in HepG2 cells, indicating that L-02 cell is suitable for *in vitro* model closely simulating liver metabolism levels *in vivo* for hepatotoxic screening.

**Keywords:** hepatocytes; hepatotoxic; toxicity screening; high-content detection

环境中的各种化学物质可通过不同途径进入人体。肝脏作为主要的代谢器官无疑最易受到损害。如何快速、准确和多维度地进行化学物质肝脏毒性筛选,对于化学品环境风险防控具有重要意义。

化学物质可通过多种作用机制诱导肝损伤<sup>[1-2]</sup>,主要包括:破坏钙离子平衡和细胞膜损伤、胆汁淤积和胆管损伤、激活经肝药酶代谢、激活自身免疫、激活细胞凋亡和线粒体损伤等<sup>[3]</sup>。事实上,这些机制不是完全孤立存在的,细胞内钙离子稳态对细胞的生存极为重要,钙离子跨膜内流会聚集在线粒体,引起线粒体膜电位降低,进而产生大量氧自由基,最后导致线粒体和肝细胞的脂质过氧化损伤<sup>[4-5]</sup>。

高内涵筛选系统是指在保持细胞结构和功能完整性的前提下,同时检测被筛化合物对细胞形态、生长、分化、迁移、凋亡、代谢途径及信号转导各个环节的影响,在单一实验中获取大量与基因、蛋白及其他细胞成分相关的信息,确定其生物活性和潜在毒性的过程。高内涵筛选系统弥补了毒理学筛选系统在通量、毒性机制检测和潜在毒性揭示等方面的不足,为化学物质的毒理学研究提供了新的有效的技术。近年来,高内涵能够实时、动态监测体外肝细胞毒性的多个参数、毒理学相关机制,是评估候选化学物质肝细胞毒性和预测化学物质肝脏毒性的有效手段<sup>[6-7]</sup>。根据肝损伤的发生机制,高内涵检测的荧光探针主要包括:Hoechst 33342、DCFH-DA、Mito-TrackerDeep Red FM、mBBr 和 DIOC6(3)等,它们分别用来检测细胞核的损伤、细胞内活性氧的水平、线粒体膜电位的情况、谷胱甘肽含量和内质网的损伤程度等<sup>[8-9]</sup>。

人源肝癌细胞系 HepG2 具有正常肝细胞的很多功能和特点,保留了较完整的生物转化酶体系,敏感性高,与原代肝细胞及 HepRG 细胞相比更为稳定、成熟,被认为是体外肝细胞筛选的理想模型之

一。而 L-02 细胞是人正常肝细胞系,没有癌变细胞的特征,功能表达完整,可以传代培养,已经大量应用在体外肝毒性筛选过程中<sup>[10]</sup>。因此,本研究通过以 HepG2 细胞和 L-02 细胞为对象,建立 2 种肝损伤体外筛选模型,并比较 2 种细胞预测肝损伤的能力,选出更有优势的体外筛选模型。

环境中存在的化学物质导致的肝损伤是不容忽视的问题,且其筛选模型仍然是目前研究的热点。大多数筛选模型只以单一参数为判断标准,缺乏准确性。而目前还没有合适的体外筛选模型和筛选方法能够有效地筛选出具有肝损伤风险的化学物质,所以建立适宜的肝损伤筛选模型尤为重要。本研究选取 2 种肝细胞、5 种阳性药及 3 种阴性药,首先用四甲基偶氮唑盐微量酶反应比色法(MTT 法)考察不同药物对 2 种细胞体外的生长抑制作用,并且采用高内涵检测法考察 2 种细胞预测肝损伤的能力,并采用实时定量 PCR 法比较了 2 种细胞的药物代谢酶含量。理论上,可以通过比较 2 种细胞对阳性药的敏感性、预测肝损伤机制的准确性以及人体肝药酶水平的含量选出最适宜的细胞模型。希望通过这些研究,可以为环境中能够导致肝毒性化学成分的发现和筛选以及其肝损伤机制的确定奠定基础。

## 1 材料与方法 (Materials and methods)

### 1.1 细胞株

本实验所使用的细胞系为 HepG2 人源肝癌细胞系和 L-02 人源正常肝细胞系,均购自中国科学院上海生命科学研究院细胞资源中心。

### 1.2 主要仪器与试剂

盐酸胺碘酮(99.9%)、盐酸四环素(97.5%)、利福平(99.9%)和地塞米松(99.7%)购自中国食品药品检定研究院;双氯芬酸钠(99.0%)、他莫昔芬(99.0%)和 DIOC6(3)(98.0%)荧光探针购自 aladdin 公司;柠檬酸三钠(99.0%)购自西陇化工股份有限公司;抗坏血

酸(99.0%)、二甲基亚砷(99.7%)、噻唑蓝(98.0%)和 mBBr(99.0%) 荧光探针购自 Sigma 公司; Hoechst 33342、DCFH-DA 荧光探针和 SYBR Green qPCR Mix(2×) 购自碧云天生物技术有限公司; MitoTrackerDeep Red FM 荧光探针购自 Yeasen 公司。

多功能酶标仪(Synergy HT, 美国 Bio-Tek 公司), 高内涵成像系统(CELLINSIGHT CX7, 美国 Thermo 公司), 实时定量 PCR 仪(C 1000TM Thermal Cycler, 美国 BIO-RAD 公司), 超微量核酸蛋白测定仪(NANO DROP 2000C, 美国 Thermo 公司)。

### 1.3 实验方法

#### 1.3.1 MTT 法检测不同肝毒性化学物质对 2 种细胞的生长抑制作用

将处于对数生长期的细胞以密度为 6 000 个·孔<sup>-1</sup>接种于 96 孔板中, 培养 24 h。次日, 每孔加入不同浓度的受试物溶液, 每个浓度设置 3 个复孔, 使其最大浓度均为 1 000 μmol·L<sup>-1</sup>(即盐酸胺碘酮 682 mg·L<sup>-1</sup>, 盐酸四环素 444 mg·L<sup>-1</sup>, 双氯芬酸钠 296 mg·L<sup>-1</sup>, 利福平 823 mg·L<sup>-1</sup>, 他莫昔芬 372 mg·L<sup>-1</sup>, 柠檬酸钠 294 mg·L<sup>-1</sup>, 抗坏血酸 176 mg·L<sup>-1</sup>, 地塞米松 392 mg·L<sup>-1</sup>), 并依次 3 倍向下稀释 4 个浓度。然后, 放入培养箱中继续培养 24 h。采用 MTT 法检测各孔吸光度, 并计算各浓度受试物对细胞生长的抑制作用, 用 SPSS 20.0 软件计算半数抑制浓度(IC<sub>50</sub>)。

#### 1.3.2 高内涵检测肝毒性机制相关参数的变化

以 3 种荧光探针的组合方式进行高内涵试验。分别为 Hoechst 33342(蓝色)/DCFH-DA(绿色)/MitoTrackerDeep Red FM(红色); Hoechst 33342(蓝色)/DIO6(3)(绿色); mBBR(绿色)3 种。

将处于对数生长期的细胞以 5 000 个·孔<sup>-1</sup>接种于 96 孔板中, 培养 24 h, 次日, 每孔加入不同浓度的受试物, 每个浓度设置 3 个复孔。肝毒性阳性化学物质(简称阳性物)盐酸胺碘酮、双氯芬酸钠、利福平、盐酸四环素和他莫昔芬作用的最大浓度均约为 IC<sub>50</sub> 值, 依次以 2 倍浓度梯度向下再稀释 4 个浓度。肝毒性阴性化学物质(简称阴性物)柠檬酸三钠、抗坏血酸和地塞米松的给药浓度与 MTT 法相同。然后, 继续放入培养箱中培养 24 h 用于检测。检测时, 弃去培养板内的液体, 用磷酸盐缓冲液(PBS)清洗一次, 弃去 PBS 后, 在 96 孔板中每孔加入 50 μL 不同荧光探针混合液, 37 °C 避光孵育 20 min。孵育结束后弃去 96 孔板内液体, 用 PBS 清洗一次后每

孔再加入 50 μL PBS, 将 96 孔板置于高内涵仪器中扫描检测, 得到每个孔不同参数的平均荧光强度值, 并根据各个参数阴性物与空白对照组平均荧光强度的比值计算出阴性阈。

其中, 对于呈剂量依赖性增加的指标, 忽略阴性阈的下限, 按式(1)计算阴性阈:

$$\text{阴性阈} = \text{荧光强度比值的平均值} + \text{荧光强度比值的标准差} \quad (1)$$

对于呈剂量依赖性减少的指标, 忽略阴性阈的上限, 按式(2)计算阴性阈:

$$\text{阴性阈} = \text{荧光强度比值的平均值} - \text{荧光强度比值的标准差} \quad (2)$$

各机制参数的精确度、灵敏度和准确度计算方法为:

$$\text{精确度} = (\text{TP} + \text{TN}) / (\text{TP} + \text{TN} + \text{FP} + \text{FN}) \quad (3)$$

$$\text{灵敏度} = \text{TP} / (\text{TP} + \text{FN}) \quad (4)$$

$$\text{特异度} = \text{TN} / (\text{TN} + \text{FP}) \quad (5)$$

式中: TP 表示与阳性物已知肝毒性机制相关的参数变化为阳性的个数; FP 表示与阳性物已知肝毒性机制相关的参数变化为阴性的个数; TN 表示与阴性物已知肝毒性机制相关的参数变化为阴性的个数; FN 表示与阴性物已知肝毒性机制相关的参数变化为阳性的个数。

#### 1.3.3 实时定量 PCR 法检测细胞肝毒性化学成分的代谢酶 mRNA 的相对表达含量

将处于对数生长期的细胞以 20 万个·孔<sup>-1</sup>接种于 6 孔板中, 24 h 后从 CO<sub>2</sub> 培养箱中取出, 胰酶消化后离心收集细胞于离心筒中, 用 1 mL PBS 重悬后转移至无酶的 1.5 mL EP 管中, 3 000 r·min<sup>-1</sup> 离心 10 min 后弃去上清。参照说明书操作步骤提取总 RNA, 核酸测定仪在波长 260 nm 和 280 nm 测定吸光度 A<sub>260</sub> 和 A<sub>280</sub>, 以上述总 RNA 为模板, 参照说明书操作步骤进行逆转录反应, 获得的 cDNA 于 -20 °C 保存。

参照说明书设定 PCR 程序, 每个样本设 3 个重复管。根据 2<sup>-ΔΔCt</sup> 法计算出每个目的基因的相对表达含量。本研究所用到的引物序列如表 1 所示。

#### 1.3.4 统计分析 with 数据处理

所有实验结果来源于至少 3 次独立重复试验, 并表示为 mean ± SD, 精确度、灵敏度和特异度实验结果采用 SPSS 22.0 统计学软件进行秩和检验, 其他实验结果采用 SPSS 22.0 统计学软件进行单因素方差分析(One-way ANOVA)。

## 2 结果 (Results)

### 2.1 不同肝毒性化学成分对2种细胞的生长抑制作用

通过 MTT 法评价了 8 种化合物对 2 种细胞的生长抑制作用(表 2)。结果表明,5 种阳性物对 2 种细胞均呈现出不同程度的体外生长抑制作用,且 L-02 细胞的  $IC_{50}$  值均不同程度地小于 HepG2 细胞。而阴性物并无抑制作用或者仅有轻度的抑制作用。

### 2.2 高内涵检测不同肝毒性的化学成分对2种细胞肝损伤机制相关参数的影响

各阳性物以  $IC_{50}$  近似值为最大给药浓度作用于 2 种细胞时,6 种与肝毒性机制相关的参数均出现不同程度的变化。高内涵检测结果显示,双氯芬酸钠、盐酸四环素和他莫昔芬作用于 HepG2 细胞时,均可引起活性氧的大量产生、线粒体膜电位的降低和谷胱甘肽含量的减少。同时,内质网出现一定程度的损伤,细胞核 DNA 含量增加,细胞核染色质

凝集、固缩,细胞可能发生凋亡。而盐酸胺碘酮作用于 HepG2 细胞时线粒体膜电位没有明显降低,利福平作用于 HepG2 细胞时谷胱甘肽含量没有明显变化。与此同时,双氯芬酸钠、利福平和他莫昔芬作用于 L-02 细胞时,也可引起活性氧的大量产生、线粒体膜电位的降低和谷胱甘肽的减少。同时,内质网出现一定程度的损伤,细胞核染色质凝集、固缩,细胞可能发生凋亡。而盐酸胺碘酮作用于 L-02 细胞时除线粒体膜电位没有明显降低外,细胞核也没有发生变化,盐酸四环素作用于 L-02 细胞时内质网没有出现明显损伤(图 1)。

此外,我们根据各机制参数的阴性阈,得到了阳性物每个机制参数的最小中毒浓度(minimum toxic concentration, MTC),即最初设置的 5 个浓度中超过阴性域的最小浓度(表 3 和表 4)。实验结果表明,各阳性物作用于 2 种细胞时,MTC 结果与高内涵图片反映出的结果基本一致。而阴性物作用于 2 种细胞时,各机制参数均无明显变化。

表 1 PCR 试验所用的引物序列  
Table 1 Primers used in real-time PCR

基因名称 Target gene	引物序列 Primer sequence		引物长度/bp Amplicon size/bp
	F	R	
CYP3A4	CTTCATCCAATGGACTGCATAAAT	TCCAAGTATAAACTCTACACAGACAA	52
CYP1A2	TGGAGACCTTCCGACACTCCT	CGTTGTGTCCCTTGTGTGTC	41
CYP2B6	TTCCTACTGCTCCGTCTATCAAA	GTGCAGAATCCCACAGCTCA	44
CYP2E1	TTGAAGCCTCTCGTTGACCC	CGTGGTGGGATACAGCCAA	39
GSTA1/2	TGCAACAATAAGTGCTTACCTAAGTG	TTAACTAAGTGGGTGAATAGGAGTTGTATT	57
UGT1A1	TGACGCCTCGTTGTACATCAG	CCTCCCTTGGAAATGGCAC	40
GAPDH	AGGTCCACCACTGACACGTT	GCCTCAAGATCATCAGCAAT	40

表 2 化合物对 2 种肝细胞的半数抑制浓度 ( $IC_{50}$ ) (均值±标准差,  $n=3$ )

Table 2 The 50% inhibiting concentration ( $IC_{50}$ ) of different chemicals in two cell lines (mean ± SD,  $n=3$ )

化合物 Compound	$IC_{50}/(\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1})$	
	HepG	L-02
盐酸胺碘酮 Amiodarone	51.53 ± 4.88	19.38 ± 3.05
双氯芬酸钠 Diclofenac sodium	164.49 ± 21.62	154.90 ± 9.41
利福平 Rifampicin	215.47 ± 14.64	158.52 ± 14.64
盐酸四环素 Tetracycline	147.18 ± 14.42	136.70 ± 3.74
他莫昔芬 Tamoxifen	43.18 ± 5.31	18.01 ± 3.25
柠檬酸钠 Sodium citrate	>1 000	>1 000
抗坏血酸 Ascorbic acid	>1 000	>1 000
地塞米松 Dexamethasone	>1 000	>1 000

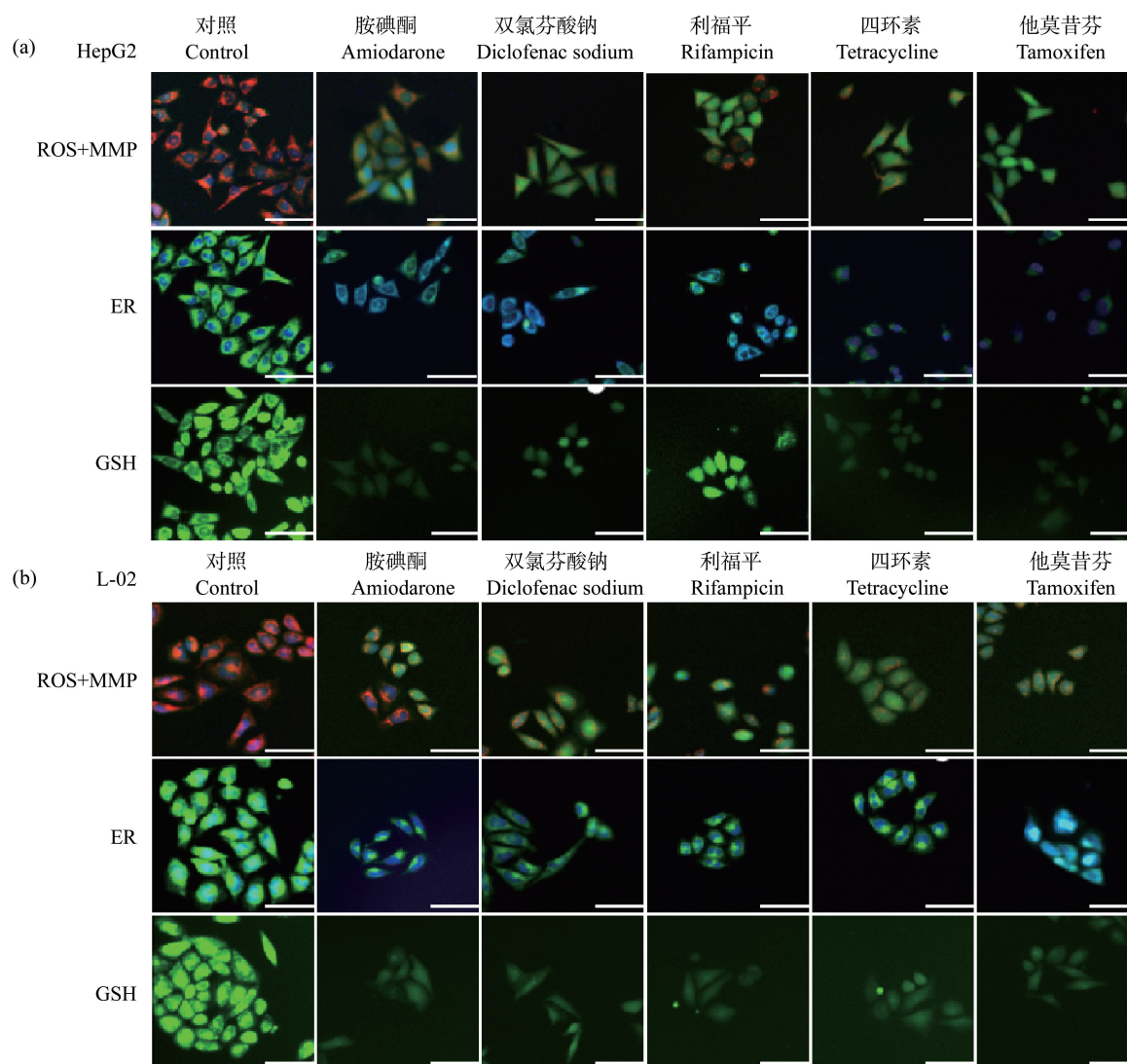


图1 化合物处理肝细胞系后的高内涵(HCS)分析图像

注:ROS表示活性氧,MMP表示线粒体膜电位,ER表示内质网损伤,GSH表示谷胱甘肽;nuclei-蓝/ROS-绿/MMP-红,nuclei-蓝/ER-绿,GSH-绿;对于HepG2细胞,胺碘酮 $50\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  ( $34\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ),双氯芬酸钠 $150\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  ( $44\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ),利福平 $200\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  ( $165\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ),四环素 $150\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  ( $67\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ),他莫昔芬 $50\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  ( $19\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ );对于L-02细胞,胺碘酮 $20\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  ( $14\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ),双氯芬酸钠 $150\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  ( $44\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ),利福平 $150\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  ( $123\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ),四环素 $150\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  ( $67\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ),他莫昔芬 $20\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  ( $7\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ );比例尺为 $50\ \mu\text{m}$ 。

Fig. 1 The high content screening (HCS) images were obtained from the same well of cell line treated with five chemicals by using different filters to detect

Note: ROS stands for reactive oxygen species; MMP stands for mitochondrial membrane potential; ER stands for endoplasmic reticulum; GSH stands for glutathione; nuclei-blue/ROS-green/MMP-red, nuclei-blue/ER-green, GSH-green; HepG2 cells treated with amiodarone  $50\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  ( $34\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ), diclofenac sodium  $150\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  ( $44\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ), rifampicin  $200\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  ( $165\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ), tetracycline  $150\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  ( $67\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ), tomozifen  $50\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  ( $19\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ); L-02 cells treated with amiodarone  $20\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  ( $14\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ), diclofenac sodium  $150\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  ( $44\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ), rifampicin  $150\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  ( $123\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ), tetracycline  $150\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  ( $67\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ), tomozifen  $20\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  ( $7\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ); Scale bar =  $50\ \mu\text{m}$ .

### 2.3 不同肝细胞模型预测肝毒性化学成分性肝损伤能力的比较

实验结果表明,2种细胞预测肝毒性化学成分性肝损伤的精确度、灵敏度和特异度均存在显著性

差异,且L-02细胞预测肝毒性化学成分性肝损伤的精确度、灵敏度和特异度均显著高于HepG2细胞(表5)。这表明L-02细胞预测肝毒性化学成分性肝损伤的能力更强。

表3 高内涵检测中受试化合物对 HepG2 细胞的最小毒性浓度 (MTC)

Table 3 Minimum toxic concentration (MTC) of tested chemicals in HepG2 cells in HCS test

化合物 Compound	MTC/( $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ )					
	存活率 Survival rate	活性氧 Reactive oxygen species	线粒体膜电位 Mitochondrial membrane potential	内质网损伤 Endoplasmic reticulum	谷胱甘肽 Glutathione	DNA
盐酸胺碘酮 Amiodarone	25	25	-	50	12.5	25
双氯芬酸钠 Diclofenac sodium	18.75	18.75	37.5	75	37.5	75
利福平 Rifampicin	50	200	100	200	-	100
盐酸四环素 Tetracycline	37.5	150	75	37.5	75	75
他莫昔芬 Tamoxifen	25	25	50	25	12.5	25
柠檬酸钠 Sodium citrate	-	-	-	-	-	-
抗坏血酸 Ascorbic acid	-	-	-	-	-	-
地塞米松 Dexamethasone	-	-	-	-	-	-

表4 高内涵检测中受试化合物对 L-02 细胞的 MIC

Table 4 MIC of tested chemicals in L-02 cells in HCS test

化合物 Compound	MTC/( $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ )					
	存活率 Survival rate	活性氧 Reactive oxygen species	线粒体膜电位 Mitochondrial membrane potential	内质网损伤 Endoplasmic reticulum	谷胱甘肽 Glutathione	DNA
盐酸胺碘酮 Amiodarone	5	5	-	5	20	-
双氯芬酸钠 Diclofenac sodium	37.5	37.5	18.75	37.5	18.75	37.5
利福平 Rifampicin	37.5	75	150	18.75	75	37.5
盐酸四环素 Tetracycline	37.5	37.5	37.5	-	37.5	37.5
他莫昔芬 Tamoxifen	5	5	10	2.5	5	20
柠檬酸钠 Sodium citrate	-	-	-	-	-	-
抗坏血酸 Ascorbic acid	-	-	-	-	-	-
地塞米松 Dexamethasone	-	-	-	-	-	-

表5 2种肝细胞系在高内涵检测中的预测能力

Table 5 Predictive ability of two liver cell lines detected with HCS

参数 Parameter	HepG2			L-02		
	精确度/%	敏感度/%	特异度/%	精确度/%	敏感度/%	特异度/%
	Accuracy/%	Sensitivity/%	Specificity/%	Accuracy/%	Sensitivity/%	Specificity/%
存活率 Survival rate	100	100	100	100	100	100
活性氧 Reactive oxygen species	100	100	100	100	100	100
线粒体膜电位 Mitochondrial membrane potential	85.7	80.0	100	85.7	80.0	100
内质网损伤 Endoplasmic reticulum	57.1	100	40.0	71.4	100	50.0
谷胱甘肽 Glutathione	85.7	80.0	100	100	100	100
DNA	42.9	100	33.3	57.1	100	50.0
显著性 Significance	-	-	-	*	*	*

注:\*  $P<0.05$ ,与 HepG2 相比。Note:\*  $P<0.05$ , compared with HepG2 cell.

## 2.4 2种肝细胞的药物代谢酶 mRNA 表达含量比较

实验结果显示,与 HepG2 细胞相比,L-02 细胞各个肝毒性化学成分代谢酶的 mRNA 表达水平均显著增加。其中,L-02 细胞 II 相肝毒性化学成分代谢酶 UGT1A1 和 GSTA1/2 的 mRNA 表达含量增加最为显著,分别约为 HepG2 细胞的 12 倍和 9 倍。这表明,L-02 细胞相对于 HepG2 细胞高表达肝毒性化学成分代谢相关的酶类,可能与体内肝脏代谢水平更加接近(图 2)。

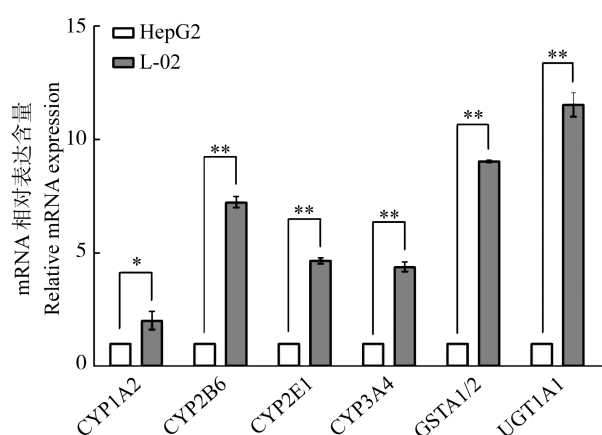


图 2 L-02 与 HepG2 细胞中代谢酶 mRNA 的相对表达量 (均值±标准差, n=3)

注: \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$  表示与 HepG2 相比差异显著。

Fig. 2 The relative mRNA expression of metabolizing enzyme in L-02 cells and HepG2 cells (mean ± SD, n=3)

Note: \*, \*\* indicate significance at  $P < 0.05$  and  $P < 0.01$  compared with HepG2 cells.

## 3 讨论 (Discussion)

Livertox Database 数据库详细介绍了能够导致肝毒性药物的药理活性,其在使用时与肝损伤发生的因果关系、导致肝损伤发生的频率和肝损伤的机制及类型等。而本研究所选的阳性药(盐酸胺碘酮、双氯芬酸钠、利福平、盐酸四环素和他莫昔芬)均为 Livertox Database 里药物列表中明确会导致药物性肝损伤的药物,阴性药(柠檬酸三钠、抗坏血酸和地塞米松)均为临床上没有与肝损伤相关的任何报道的药物,上述 8 种药物分别作为工具化合物用于评价筛选体系<sup>[11-12]</sup>。实验结果显示,当阴性物作用于 2 种细胞时,2 种细胞均呈现出较低程度的生长抑制。而当阳性物作用于 2 种细胞时,2 种细胞均受到不同程度较强的生长抑制作用。L-02 细胞对阳

性物的敏感程度均大于 HepG2 细胞,且盐酸胺碘酮和他莫昔芬这 2 种阳性物作用时更加明显,L-02 细胞的敏感性约为 HepG2 细胞的 2 倍以上。本研究的 MTT 实验中,3 种阴性药的实验结果与已有文献报道的结果一致, $IC_{50}$  均  $> 1\ 000\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ,而 5 种阳性药作用于 2 种细胞时的  $IC_{50}$  值与已有文献报道虽不完全一致,但均相差不大且在同一数量级,此外本研究中的 MTT 法实验均设有 3 个复孔,标准差较小,因此,本研究的 MTT 法实验结果是准确的<sup>[10]</sup>。根据 MTT 法实验结果,可以初步判断 L-02 细胞可能比 HepG2 细胞对能够导致肝毒性化学成分性肝损伤的化学成分更敏感。

为了进一步比较 2 种细胞的预测能力,采用了高内涵检测的方法。大量研究表明,在高内涵实验中,当参数变化超过阴性域时的给药浓度小于该肝毒性化合物最大血药浓度( $C_{\text{max}}$ )的 100 倍时,可以认为其具有肝毒性<sup>[13]</sup>。根据 MTT 法实验结果,测得的各个阳性物的  $IC_{50}$  值均在其  $C_{\text{max}}$  的 100 倍以内,因此,在此浓度范围内能够正确筛出阳性物的机制参数变化情况。实验结果显示,当阴性物作用于 2 种细胞时,各参数的变化情况均小于空白组的 20%,根据阴性物的实验结果,计算出了各个机制相关参数的阴性域,即在阴性域范围内变化为阴性,而在阴性域范围外变化为阳性。根据实验结果可知,当 5 种阳性物作用于 2 种细胞时,除个别参数外,各机制参数变化时,整体来看 L-02 细胞的最小中毒浓度较小,说明 L-02 细胞对肝毒性机制的变化更加敏感<sup>[14]</sup>。为了能更准确和更直观地比较 2 种细胞模型对肝毒性化学成分性肝损伤的预测能力,根据高内涵的实验结果计算并比较了 2 种细胞预测肝毒性化学成分性肝损伤的精确度、灵敏度和特异度。实验结果表明,L-02 细胞的精确度、敏感度和特异度均显著高于 HepG2 细胞,这表明 L-02 细胞预测肝毒性化学成分性肝损伤的能力更强。高内涵试验可以多端点且准确地检测出肝损伤的机制。在今后的研究中,笔者会通过阳性药和阴性药的高内涵实验结果制定肝损伤的评分和判定标准,以用来大规模筛选出环境中能够导致肝损伤的化学物质。

肝药酶的含量也是比较 2 种细胞与生理水平接近程度的有效方法,采用实时定量 PCR 的方法评价了 2 种细胞的肝毒性化学成分代谢酶在 mRNA 水平的含量。实验结果表明,L-02 细胞肝毒性化学成分代谢酶的 mRNA 表达水平均不同程度地显著高

于 HepG2 细胞。

以上实验结果表明,2 种细胞均能正确区分出能够导致肝损伤的化学物质,且 L-02 细胞对能够导致肝损伤化学物质的敏感性优于 HepG2 细胞。与 HepG2 细胞相比,L-02 细胞预测药物性肝损伤的准确度、敏感度和特异度更高,且 L-02 细胞的肝药酶含量高于 HepG2 细胞。高内涵实验与 MTT 法实验结果均表明 L-02 细胞更适合作为肝损伤筛选模型,因其能够实现多端点、快速和高通量筛选,所以可以使用单一的高内涵实验作为肝损伤的筛选方法。因此,L-02 细胞结合高内涵可作为预测药物性肝损伤的最佳模型。

**通讯作者简介:**任利翔(1980—),男,博士,高级工程师,硕士生导师,主要研究方向为安全性评价及替代毒理学相关方法。

#### 参考文献 (References):

- [1] Visentin M, Lenggenhager D, Gai Z, et al. Drug-induced bile duct injury [J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*, 2018, 1864: 1498-1506
- [2] Woodhead J L, Brock W J, Roth S E, et al. Application of a mechanistic model to evaluate putative mechanisms of tolaptan drug-induced liver injury and identify patient susceptibility factors [J]. *Toxicological Sciences*, 2017, 155(1): 61-74
- [3] Hamilton L A, Collins Y A, Collins R E. Drug-induced liver injury [J]. *Advanced Critical Care Nursing*, 2016, 27(4): 430-440
- [4] Zhang J, Doshi U, Suzuki A, et al. Evaluation of multiple mechanism-based toxicity endpoints in primary cultured human hepatocytes for the identification of drugs with clinical hepatotoxicity: Results from 152 marketed drugs with known liver injury profiles [J]. *Chemico-Biological Interactions*, 2016, 255: 3-11
- [5] Ye H, Nelson L J, Gómez D M M, et al. Dissecting the molecular pathophysiology of drug-induced liver injury [J]. *World Journal of Gastroenterology*, 2018, 24: 1373-1385
- [6] Donato M T, Gómez-Lechón M J, Tolosa L. Using high-content screening technology for studying drug-induced hepatotoxicity in preclinical studies [J]. *Expert Opinion on Drug Discovery*, 2017, 12(2): 201-211
- [7] Mandavilli B S, Aggeler R J, Chambers K M. Tools to measure cell health and cytotoxicity using high content imaging and analysis [J]. *Methods in Molecular Biology*, 2018, 1683: 33-46
- [8] Tolosa L, Gómez-L M J, Donato M T. High-content screening technology for studying drug-induced hepatotoxicity in cell models [J]. *Archives of Toxicology*, 2015, 89(7): 1007-1022
- [9] Zhang J, Wang S, Xu L, et al. Multiple perspectives of qingkailing injection-fraction-single compound in revealing the hepatotoxicity of baicalin and hyodeoxycholic acid [J]. *Journal of Ethnopharmacology*, 2017, 215: 147-155
- [10] Wu Y, Geng X C, Wang J F, et al. The HepaRG cell line, a superior *in vitro* model to L-02, HepG2 and hiHeps cell lines for assessing drug-induced liver injury [J]. *Cell Biology and Toxicology*, 2016, 32(1): 37-59
- [11] Thakkar S, Tong W, Chen M, et al. The Liver Toxicity Knowledge Base (LKTb) and drug-induced liver injury (DILI) classification for assessment of human liver injury [J]. *Expert Review of Gastroenterology & Hepatology*, 2017, 12(1): 31-38
- [12] Yu K, Zhang J, Chen M, et al. Mining hidden knowledge for drug safety assessment: Topic modeling of LiverTox as a case study [J]. *BMC Bioinformatics*, 2014, 15(Suppl 17): S6
- [13] Li X, Li X Y, Huang N, et al. A comprehensive review and perspectives on pharmacology and toxicology of saikosaponins [J]. *Phytomedicine*, 2018, 50: 73-87
- [14] Moo L B, Cheul L W, Young J J, et al. Clinical features of drug-induced liver injury according to etiology [J]. *Journal of Korean Medical Science*, 2015, 30(12): 1815-1820

