

临床与基础
桥接研究Clinical and Basic
Bridging Research基于3D肝细胞球模型评价何首乌醇提物
毒性研究Toxicity evaluation of alcohol extract of *Polygonum multiflorum* based on 3D
hepatocyte ball model苏华龙^{1,2}, 姚香草^{1,2}, 陈佳敏^{1,2},
岑柏宏^{1,2}, 王 萍^{1,2}, 陈宗正³,
许重远^{1,2}(1. 南方医科大学 南方医院 临床药学中心, 广东
广州 510515; 2. 南方医科大学 药学院 国家药品监
督管理局药物代谢研究与评价重点实验室 & 广东
省新药筛选重点实验室, 广东 广州 510515; 3. 深圳
大学 第一附属医院, 广东 深圳 518035)SU Hua-long^{1,2}, YAO Xiang-cai^{1,2},
CHEN Jia-min^{1,2}, CEN Bo-hong^{1,2},
WANG Ping^{1,2}, CHEN Zong-zheng³,
XU Zhong-yuan^{1,2}(1. Clinical Pharmacy Center, Nanfang
Hospital, Southern Medical University,
Guangzhou 510515, Guangdong
Province, China; 2. National Medical
Products Administration Key Laboratory
for Research and Evaluation of Drug
Metabolism & Guangdong Provincial Key
Laboratory of New Drug Screening,
School of Pharmaceutical Sciences,
Southern Medical University, Guangzhou
510515, Guangdong Province, China; 3.
The First Affiliated Hospital of Shenzhen
University, Shenzhen 518035, Guangdong
Province, China)**基金项目:**广东省基础与应用基础研究基金企
业联合基金资助项目
(2022A1515220136); 广东省研究生
教育创新计划基金资助项目
(2022ANLK_023); 青年基金-南方
医科大学南方医院院长基金资助
(2022B043); 南方医院临床研究专项
基金资助项目(2019CR015)**作者简介:**苏华龙(1996-), 男, 硕士研究生, 主
要从事药理学研究**通信作者:**许重远, 教授, 硕士生导师

Tel: (020) 62787926

E-mail: nfcyljd@smu.edu.cn

摘要:目的 探究何首乌醇提物对3D肝细胞球的毒性。方法 设置不同的条件以及细胞比例, 测量细胞球直径、致密度、圆度, 探索最佳培养条件。3D肝细胞球分为对照组和低、中、高剂量实验组, 低、中、高剂量实验组给予0.25、1.00和2.50 mg·mL⁻¹何首乌醇提物, 对照组给予等量的培养基。用CellTiter-Glo试剂检测细胞球活性, 用荧光定量聚合酶链反应(RT-qPCR)检测肝功能相关基因表达水平, 用活死细胞双荧光染色试剂检测细胞球的毒性作用。结果 细胞球理想接种条件为每微孔500个细胞, 细胞比例为HepG2-Huvec-LX-2=8:1:1, 圆度为0.91±0.07, 坚实度为0.91±0.02, 长径比为1.12±0.14, 直径为(170.97±14.79) μm; 第3、7、10和14天细胞球白蛋白(ALB)mRNA相对表达水平分别为1.00±0.02、0.96±0.02、0.54±0.07和0.52±0.07, 细胞色素P450 1A2(CYP1A2)mRNA相对表达水平分别为1.00±0.10、2.15±0.16、2.45±0.33和1.30±0.03。对照组和低、中、高剂量实验组多药耐药蛋白2(MRP2)mRNA相对表达水平分别为1.00±0.31、1.38±0.24、1.48±0.06和1.90±0.08, 细胞球存活率分别为(98.19±0.49)%、(88.53±0.90)%、(71.60±2.91)%和(56.65±5.41)%。低、中、高剂量实验组上述指标与对照组比较, 在统计学上差异均有统计学意义(均P<0.05)。结论 建立的肝细胞球共培养模型中I/II相药物代谢酶、转运体、及肝细胞特异标志分子白蛋白均有不同程度的表达, 可用于中药何首乌的毒性评价, 为何首乌的临床应用提供了参考。

关键词:何首乌; 肝毒性模型; 共培养; 3D细胞球

DOI:10.13699/j.cnki.1001-6821.2024.09.007

中图分类号: R28 文献标志码: A

文章编号: 1001-6821(2024)09-1272-05

Abstract: Objective To explore the toxicity of *Polygonum multiflorum* alcohol extract on 3D hepatospheres. **Methods** Variations in culture conditions and cell ratios were implemented, followed by the assessment of cell sphere diameter, density, and roundness, aiming to explore the optimal culture conditions. The 3D hepatocyte spheres were divided into control group and experimental -L, -M, -H groups. The experimental -L, -M, -H groups were treated with 0.25, 1.00 and 2.50 mg·mL⁻¹ *Polygonum multiflorum* alcohol extract, and the control group was given the same amount of culture medium. The cell viability of the cell spheroids was tested by CellTiter-Glo reagent, the expression level of liver function related genes was detected by fluorescent quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR). The toxicity of cell spheres was detected by double fluorescent staining of living and dead cells.

Results The ideal culture condition of cell sphere was 500 cells per micropore, and the cell ratio was HepG2 – Huvec – LX – 2 = 8:1:1. It displayed the values of 0.91 ± 0.07 for circularity, 0.91 ± 0.02 for firmness, 1.12 ± 0.14 for aspect ratio, and $(170.97 \pm 14.79) \mu\text{m}$ for diameter. On the 3rd, 7th, 10th and 14th days, the expression levels of albumin (ALB) mRNA were 1.00 ± 0.02 , 0.96 ± 0.02 , 0.54 ± 0.07 , 0.52 ± 0.07 , and the expression levels of cytochrome P450 1A2 (CYP1A2) mRNA were 1.00 ± 0.10 , 2.15 ± 0.16 , 2.45 ± 0.33 , 1.30 ± 0.03 , respectively. The expression levels of multidrug resistance protein 2 (MPR2) in the control group and the experimental – L, – M, – H groups were 1.00 ± 0.31 , 1.38 ± 0.24 , 1.48 ± 0.06 and 1.90 ± 0.08 , respectively; spheroid viability were $(98.19 \pm 0.49)\%$, $(88.53 \pm 0.90)\%$, $(71.60 \pm 2.91)\%$ and $(56.65 \pm 5.41)\%$. There were statistically significant differences in the above indexes between the experimental – L, – M, – H groups and the control group (all $P < 0.05$). **Conclusion** The established hepatocyte sphere co – culture model showed varying degrees of expression of phase I/II drug metabolism enzymes, transporters, and liver cell specific marker molecule albumin and can be used to evaluate the toxicity of multiflorum multiflorum, which provides further reference for the clinical application of multiflorum multiflorum.

Key words: *Polygonum multiflorum*; hepatotoxicity model; co – culture; 3D cell spheres

药物性肝损伤 (drug – induced liver injury, DILI) 是由药物或其代谢产物乃至辅料所引起的肝损伤,是临床上常见的药物不良反应之一^[1],其严重程度可从轻度肝转氨酶升高到肝衰竭或死亡,发病率为每10万人中14~19人^[2]。与传统2D细胞培养相比,3D共培养模型具有满足长期培养且保持增强代谢活性的优点^[3]。何首乌为蓼科植物何首乌 (*Polygonum multiflorum* Thunb.) 的干燥块根,被广泛应用于乌发及治疗脱发、补肝肾和降血脂等方面。近年来,有因服用何首乌及其相关制剂引起肝损伤的药物不良反应报告^[4]。本研究旨在构建由 HepG2、Huvec 和 LX – 2 组成的细胞球,建立更切实可行的临床前 DILI 检测模型,供有潜在肝毒性的何首乌毒性研究。

材料与方法

1 材料

细胞株 人肝癌 HepG2 细胞和人肝星状 LX – 2 细胞,均由南方医科大学南方医院放疗科惠赠;人肝癌 Huvec 细胞,由南方医科大学南方医院心内科惠赠。

药品与试剂 何首乌醇提物,湘雅医学院临床药物研究所惠赠,由药物研究所曾祥昌博士鉴定。制备方法:制何首乌饮片 17.5 kg,加8倍量的70%乙醇,浸泡30 min,常压煮沸1.5 h,200目筛过滤,得到滤液。药渣再加8倍量70%乙醇常压煮沸1.5 h,和前述滤液合并,60℃减压浓缩,60℃真空干燥,得到何首乌醇提物2.9 kg。高通量3D细胞球制备培养微阵

列试剂盒,深圳市犀锐生物科技有限公司生产;CellTiter – Glo Luminescent Cell Viability Assay, 美国 Promega 公司生产;微量细胞核酸提取试剂盒,常州百代生物;Evo M – MLV 反转录试剂预混液,湖南艾科瑞生物工程有限公司生产;ChamQ Universal SYBR qPCR Master Mix, 南京诺唯赞生物科技股份有限公司生产;活死细胞双荧光染色试剂盒,美国 US EVERBRIGHT 公司生产。

仪器 IX73 光学倒置显微镜,日本 Olympus 公司产品;多功能酶标仪 Spectramax i3,美国 Molecular Devices 公司产品;ND1000 微量分光光度计,美国 Thermo 公司产品;LightCycler480 实时荧光定量 PCR 仪,瑞士 Roche 公司产品。

2 实验方法

2.1 细胞培养^[5]

人肝癌 HepG2 细胞和人 LX – 2 细胞, Huvec 细胞培养于5% CO₂、37℃恒温细胞培养箱中,培养基为含有10%的胎牛血清的 DMEM 高糖培养基。

2.2 共培养细胞球的建立及培养条件优化^[6]

在微阵列中培养,分为 A、B 和 C 组, A 组细胞比例为 HepG2 – Huvec – LX – 2 = 8:1:1, B 组细胞比例为 HepG2 – Huvec – LX – 2 = 7:2:1, C 组细胞比例为 HepG2 – Huvec – LX – 2 = 6:3:1, 每微孔 500 个细胞。每个微阵列加入含有 5% 的胎牛血清的高糖培养基,于 5% CO₂、37℃恒温细胞培养箱中培养,每隔 24 h 更换 1 次培养基。培养 3 d 后,将微阵列中形成的细胞球转移至 24 孔板中,用显微镜观察拍照, Image J 软件分析细胞球的直径、圆度和致密度。

2.3 细胞球的长期培养

细胞球形成后,于5% CO₂、37℃恒温细胞培养箱中培养,每隔24 h换液,培养基为含有5%胎牛血清的高糖培养基,并在显微镜下观察生长情况,一直培养至14 d。

2.4 细胞分组与给药方法^[7]

用24孔板培养细胞球48 h,分为空白对照组和低、中、高剂量实验组,低、中、高剂量实验组分别给予0.25、1.00和2.50 mg·mL⁻¹何首乌醇提物,每孔1 mL,对照组给予等量的培养基,24 h后弃去药物培养基,再次按上述给药方法继续给药24 h。

2.5 实时定量逆转录聚合酶链反应(real-time quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction, RT-qPCR)检测细胞球相关肝功能基因表达水平^[8]

给药分组同“2.4”,用微量核酸提取试剂盒提取细胞球总RNA,反转录为cDNA后进行qPCR反应,检测细胞球形成后第1、3、5和10天以及各组给药后白蛋白(albumin, ALB)、I相药物代谢酶细胞色素P450酶1A2(cytochrome P450 1A2, CYP1A2)、细胞色素P450酶2C9(cytochrome P450 2C9, CYP2C9)、细胞色素P450酶2E1(cytochrome P450 2E1, CYP2E1)、细胞色素P450酶3A4(cytochrome P450 3A4, CYP3A4)、II相药物代谢酶二磷酸尿苷葡萄糖醛酸基转移酶(UDP-glucuronosyltransferase, UGT1A1)、转运体多药耐药蛋白2(multidrug resistance protein 2, MRP2)、胆酸盐外排泵(bile salt export pump, BSEP)mRNA的表达水平,以甘油醛-3-磷酸脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)为内参基因,每组设置3个复孔。用2^{-ΔΔCt}法计算mRNA相对表达水平。

2.6 CellTiter-Glo试剂法检测长期培养细胞球活性^[9]

在形成细胞球的第3、7、10和14天,取含有4~5个细胞球的培养基100 μL于96孔板中,每组设置4个复孔,按照试剂盒方法加入CellTiter-Glo试剂,

避光,震荡混匀,于室温下放置10 min后,用多功能酶标仪检测化学发光值。细胞球存活率=(实验孔发光值/对照孔发光值)×100%。

2.7 活死染色检测何首乌醇提物对细胞球的毒性^[9]

用24孔板培养细胞球48 h,按照“2.4”方法处理细胞,按照试剂盒方法加入Calcein AM和PI,对活细胞和死细胞分别染色,用荧光显微镜观察并拍照,使用Image J软件进行半定量分析。

3 统计学处理

用Graph Pad Prism 8软件进行数据分析,数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较用单因素方差分析。

结 果

1 细胞球中HepG2细胞、Huvec细胞和LX-2细胞的最佳接种比例的确定

各组圆度、坚实度,长径比和直径之间比较,在统计学上差异均无统计学意义(均 $P > 0.05$),见表1。由于本研究旨在体外建立肝毒性评价体系,模拟体内细胞比例,应包含更多的肝实质细胞,最终确立C组(HepG2-Lx-2-Huvec=8:1:1)为接种比例。

2 长期培养细胞球相关肝功能基因表达

RT-qPCR实验结果显示,与培养3 d的细胞球比较,CYP1A2和CYP2C9 mRNA在第7和10天表达均升高(均 $P < 0.01$),CYP2E1 mRNA相对表达水平在第14 d表达显著增高($P < 0.01$),ALB mRNA相对表达水平在第10和14天均显著降低(均 $P < 0.001$)。CYP3A4、UGT1A1及MRP2 mRNA表达水平在14 d内表达无明显变化($P > 0.05$);BSEP mRNA在第14天相对表达水平显著升高($P < 0.05$),见表2。

3 长期培养细胞球活性的变化

培养3、7、10和14 d细胞球存活率分别为100%、90.08%、61.19%和25.55%,培养3 d和培养7 d细胞存活率比较,在统计学意义上差异无统计学意义($P > 0.05$),培养3 d细胞球存活率和培养10和14 d

表1 不同细胞比例的细胞球圆度、坚实度、长径比和直径的比较($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Comparison of roundness, firmness, length-diameter ratio and diameter of cell spheres with different cell proportions($\bar{x} \pm s$)

Group	<i>n</i>	Circularity	Solidity	Ratio	Diameter(μm)
A	36	0.91 ± 0.07	0.91 ± 0.02	1.12 ± 0.14	170.97 ± 14.79
B	33	0.93 ± 0.04	0.92 ± 0.02	1.08 ± 0.05	167.55 ± 19.07
C	38	0.93 ± 0.04	0.90 ± 0.03	1.07 ± 0.05	157.79 ± 16.45

Group A: HepG2-Lx-2-Huvec=8:1:1; Group B: HepG2-Lx-2-Huvec=7:2:1; Group C: HepG2-Lx-2-Huvec=6:3:1.

比较,在统计学上差异均有统计学意义(均 $P<0.01$),见图1,可知细胞球在培养7 d内存活率保持稳定。

4 何首乌醇提物作用于细胞球后相关肝功能基因表达水平

低、中、高剂量实验组分别给予0.25、1.00和2.50 mg·mL⁻¹何首乌醇提物处理,空白对照给予等量的培养基处理。

RT-qPCR结果显示,与对照组比较,ALB mRNA表达水平在低剂量实验组显著升高,在高剂量实验组显著下降,在统计学上差异均有统计学意义(均 $P<0.01$);与对照组比较,CYP1A2 mRNA表达水平在中剂量实验组显著下降,高剂

量实验组显著升高,在统计学上差异均有统计学意义($P<0.05$, $P<0.01$);与对照组比较,CYP2C9 mRNA在高剂量实验组表达显著升高($P<0.01$);与对照组比较,MRP2 mRNA表达水平在中、高剂量实验组中均显著升高($P<0.05$, $P<0.01$),见表3。

5 何首乌醇提物在细胞球模型中的毒性评价

对照组和低、中、高剂量实验组细胞球活性分别为(98.19±0.49)%、(88.53±0.90)%、(71.60±2.91)%和(56.65±5.41)%,对照组和低剂量实验组比较,在统计学上差异有统计学意义($P<0.01$),对照组和中、高剂量实验组比较,在统计学上差异有统计学意义($P<0.01$)。

表2 长期培养过程中白蛋白(ALB)、I相酶、II相酶以及转运蛋白 mRNA 表达水平($\bar{x}\pm s$)

Table 2 The mRNA expression levels of albumin(ALB), phase I enzyme, phase II enzyme, and transport protein during long-term cultivation($\bar{x}\pm s$)

Group	ALB	CYP1A2	CYP2C9	CYP2E1	CYP3A4	MRP2	BESP	UTG1A1
3 days	1.00±0.02	1.00±0.10	1.00±0.05	1.00±0.11	1.00±0.69	1.00±0.23	1.00±0.44	1.00±0.11
7 days	0.96±0.02	2.15±0.16**	1.60±0.28**	1.82±0.56	0.71±0.44	1.30±0.38	0.84±0.11	1.30±0.26
10 days	0.54±0.07**	2.45±0.33**	1.85±0.12**	1.19±0.37	0.54±0.05	1.51±0.29	2.86±1.08	1.08±0.14
14 days	0.52±0.07**	1.30±0.03	1.29±0.10	2.46±0.27**	0.22±0.11	1.11±0.23	5.18±2.34*	1.31±0.10

CYP1A2: Cytochrome P450 1A2; CYP2C9: Cytochrome P450 2C9; CYP2E1: Cytochrome P450 2E1; CYP3A4: Cytochrome P450 3A4; MRP2: Multidrug resistance protein 2; BESP: Bile salt export pump; UTG1A1: UDP-glucuronosyltransferase; Compared with 3 days, * $P<0.05$, ** $P<0.01$.

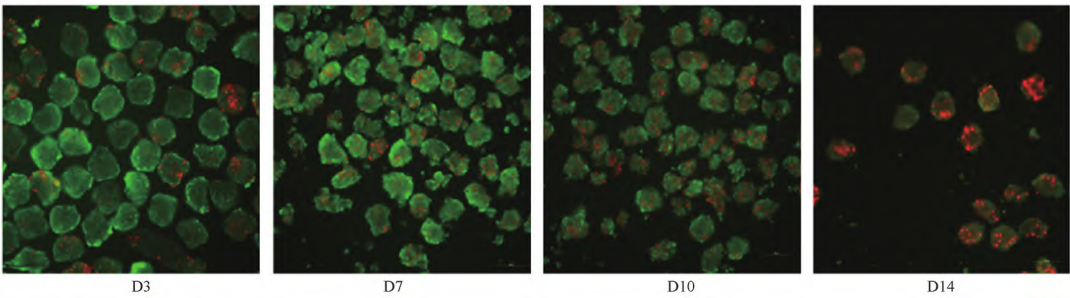


图1 细胞球在长期培养过程中的活性水平(×100)

Figure 1 Viability level of cell spheres during long-term cultivation(×100)

表3 何首乌醇提物给药后各浓度组细胞球的白蛋白(ALB)、I相酶、II相酶以及转运蛋白 mRNA 表达水平($\bar{x}\pm s$, $n=9$)

Table 3 Albumin (ALB), phase I enzyme, phase II enzyme and transporter mRNA expression levels of cell spheres in each concentration group after administration of *Polygonum multiflorum* ethanol extract ($\bar{x}\pm s$, $n=9$)

Group	ALB	CYP1A2	CYP2C9	CYP2E1	CYP3A4	MRP2	BESP	UTG1A1
Control	1.00±0.05	1.00±0.15	1.00±0.23	1.00±0.23	1.00±0.30	1.00±0.31	1.00±0.18	1.00±0.23
Experimental-L	1.38±0.08**	0.80±0.17	0.55±0.23*	0.99±0.03	1.34±0.40	1.38±0.24	2.74±0	0.97±0.09
Experimental-M	0.97±0.04	0.58±0.13*	0.68±0.03	0.64±0.10	0.43±0.13	1.48±0.06*	0.53±0	1.74±0.40**
Experimental-H	0.12±0.01**	1.83±0.19**	2.08±0.50**	0.75±0.15	1.28±0.74	1.90±0.08**	23.95±7.32**	0.47±0.19

Control group: Equal amount of medium; Experimental-L, -M, -H groups: 0.25, 1.00 and 2.50 mg·mL⁻¹ alcoholic extracts of *Polygonum multiflorum*; Compared with control group, * $P<0.05$, ** $P<0.01$.

讨 论

DILI 在我国发病率为 23.8/10 万人,其中中药或草药和膳食补充剂(26.81%)以及抗结核药(21.99%)是导致 DILI 发生的主要药物^[10]。几十年来,肝细胞或肝癌细胞系的 2D 培养已被广泛用于药物肝毒性的体外预测^[11],但是单层细胞培养模型存在去分化现象严重,肝药酶代谢能力变弱或消失,功能蛋白表达不完全等缺点^[12]。在临床前药物筛选中,体内模型是最常用的临床前评价模型,常用小鼠或者大鼠作为动物模型,能有效地反映实际的肝环境^[13]。但是动物和人体在药物代谢、机体结构等方面存在巨大的物种差异,特别是近交系、封闭群大小鼠难以模拟人类肝损伤的异质性^[14]。

本研究旨在通过构建 3D 细胞共培养模型用于何首乌醇提物毒性评价。研究结果表明,在用肝癌细胞系 HepG2 与其他非实质细胞 Huvec、LX-2 共培养组成 3D 细胞球培养条件下,细胞球高表达对参与药物代谢的主要酶类(CYP450)、转运蛋白(MRP2)及其他肝特异性功能蛋白(ALB)。与文献^[15]报道的 3D 肝细胞模型的特性相类似,在长时间培养中能保持活力和功能,因此该细胞球模型适用于肝毒性测试的研究。在不同实验组何首乌醇提物给药时,主要酶类(CYP450)、转运蛋白(MRP2)及其他肝特异性功能(ALB)仍然有着高表达,但表达水平各异,可能是细胞球中酶参与了何首乌的代谢导致酶表达不同。有研究表明,何首乌 70% 醇提物的 H₂O 洗脱物,25% 乙醇洗脱物,40% 乙醇洗脱组分在 10~100 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 浓度作用 HepG2 细胞 48 h 未表现显著毒性,而何首乌 70% 醇提物的 95% 乙醇洗脱物(10、25、50、100 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)对 HepG2 细胞表现显著细胞毒性作用^[16]。本研究成功建立了体外肝细胞共培养模型,并用于何首乌 70% 醇提物的体外毒性评价。本研究发现,使用何首乌 70% 醇提物 0.25~2.5 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的浓度作用细胞球 48 h,各剂量实验组均有抑制细胞球增殖的趋势。

本研究利用 HepG2 细胞、LX-2 细胞和 Huvec 细胞构建了体外 3D 肝细胞球共培养模型,评价了何首乌 70% 醇提物肝毒性作用,结合既往研究成果,本研究结果进一步表明何首乌中极性高的物质是其毒性

物质基础,为后续研究何首乌毒性提供了必要的实验支持。

参考文献:

- [1] 沈琴,王晓萍,强磊. 药物引起的肝损伤发病机制研究进展[J]. 药学研究, 2022, 41(9): 595—599.
- [2] HOOFNAGLE J H, BJÖRNSSON E S. Drug-induced liver injury—types and phenotypes[J]. *N Engl J Med*, 2019, 381(3): 264—273.
- [3] SEGOVIA-ZAFRA A, DI ZEO-SÁNCHEZ D E, LÓPEZ-GÓMEZ C, et al. Preclinical models of idiosyncratic drug-induced liver injury (iDILI): Moving towards prediction[J]. *Acta Pharm Sin B*, 2021, 11(12): 3685—3726.
- [4] 王海珍,李秀惠. 33 例何首乌及其相关制剂致药物性肝损伤临床分析[J]. 中西医结合肝病杂志, 2018, 28(1): 25—27.
- [5] ZHANG B, LI Y, WANG G, et al. Fabrication of agarose concave petridish for 3D-culture microarray method for spheroids formation of hepatic cells[J]. *J Mater Sci Mater Med*, 2018, 29(5): 49.
- [6] PINGTOR P, SASIDHARAN K, EKSTRAND M, et al. Human multilineage 3D spheroids as a model of liver steatosis and fibrosis[J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(7): 1629.
- [7] 颜玉静,淡墨,汪祺,等. 基于 2D 和 3D 肝细胞模型的首乌体外肝毒性评价[J]. 中国药物警戒, 2019, 16(7): 385—392.
- [8] 李晓旭. 2D/3D HepaRG 细胞模型的建立及在体外肝毒性研究中的应用[D]. 山东 聊城:聊城大学,2020.
- [9] COLL M, PEREA L, BOON R, et al. Generation of hepatic stellate cells from human pluripotent stem cells enables *in vitro* modeling of liver fibrosis[J]. *Cell Stem Cell*, 2018, 23(1): 101—113.
- [10] SHEN T, LIU Y, SHANG J, et al. Incidence and etiology of drug-induced liver injury in mainland China[J]. *Gastroenterology*, 2019, 156(8): 2230—2241.
- [11] 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.
- [12] 吴宇,耿兴超,汪巨峰,等. 体外模型在药物性肝损伤的应用进展[J]. 中国新药杂志, 2015, 24(22): 2548—2554.
- [13] 方春秋,张文军,张景洲,等. 常见肝损伤动物模型构建和应用的研究状况[J]. 中国临床药理学杂志, 2022, 38(3): 276—280.
- [14] 赵善民,汪芸,刘畅,等. 常用药物性肝损伤动物模型的制备方法[J]. 中国实验动物学报, 2023, 31(7): 935—945.
- [15] RAMAIAHGARI S C, DEN BRAVER M W, 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(5): 1083—1095.
- [16] 陈子涵,杨建波,陈智伟,等. 何首乌醇提物及单体体外肝细胞毒性研究[J]. 中国药物警戒, 2022, 19(7): 728—732.

(收稿日期 2024-01-16; 本文编辑 吴焕贤)