

肝脏体外模型及其在毒理学方面的应用

蔡 燕, 宫丽崑, 任 进*

(中国科学院上海生命科学院 上海药物研究所新药研究国家重点实验室, 上海 201203)

摘要: 肝脏体外模型发展很快并日趋成熟。目前, 常用的肝脏体外模型包括原代肝细胞模型、离体肝脏模型、肝脏切片模型、肝细胞系模型、亚细胞模型及基因工程细胞模型等, 其中原代肝细胞模型最为常用。上述模型除了可以应用于药物肝脏毒性机制的研究之外, 还可以用于药物毒性的高通量筛选。在今后的研究中, 如何改善肝脏体外模型的培养条件及完善药物肝脏毒性研究体系是急需解决的课题。

关键词: 实验模型; 肝脏; 体外; 毒性实验; 药物筛选

中图分类号: R99

文献标识码: A

文章编号: 1000-3002(2004)05-0390-06

药物毒性研究是药物研究的重要组成部分, 然而, 由于一些伦理方面的原因, 研究者不但很难直接用人作为研究对象, 而且也必须尽量减少实验动物的使用。所以, 越来越多的体外模型开始应用于药物的毒性研究。药物作用的靶器官很多, 目前已经开展体外模型研究的有肝脏、中枢神经系统、肾脏、心脏、造血系统和肺。而在众多的药物靶器官中, 肝脏无疑是最为重要的一个。肝脏是药物代谢的重要器官, 通过肝脏代谢后, 多数药物对人体的毒性被消除。但是, 也有一些无毒或低毒的物质通过生物转化后会变成有毒或毒性更高的物质。作为这个生物转化过程的发生器官, 肝脏就必然成为研究药物毒性的重要靶器官。本文从肝脏体外模型在毒理学研究中的现状、应用和前景, 以及在药物毒性高通量等方面作一些探讨。

1 成熟肝脏体外模型介绍

目前, 较为成熟的肝脏体外模型主要有: 原代肝脏细胞模型、离体肝脏模型、肝脏切片模型、肝细胞系模型、亚细胞模型及基因工程细胞模型^[1-4]。

1.1 原代肝细胞模型

这种模型最为常用, 它含有分离后的肝实质细胞, 用来研究药物或毒素对细胞的作用^[1,4], 是一个比较可靠的研究体外毒理学的模型。其优点是几乎可以从任何动物包括人类获取, 整个肝脏或活组织都可作为材料来源, 并且能够冰

冻保存^[5], 大大减少了实验动物的使用量。同时, 可以检测多种化合物多个浓度的细胞毒性, 为体外高通量筛选模型的建立奠定了基础。其缺点是, 它不能测量胆汁的成分, 缺少器官特异性的细胞间相互作用, 也没有完整的解剖学上的结构^[4]。

肝细胞培养的方法学已经研究了多年, 很多已确立的有关细胞分离、培养、冰冻保存的方法还在不断完善^[5]。最早期分离肝细胞采用的是胶原酶和透明质酸酶分离法^[6], 很快发展为原位肝脏分离。后来, 又建立了两步胶原酶灌流分离方法^[3,7]。这项技术在大鼠、猴、猪、狗、兔及人类肝脏细胞短期培养方法中不断得到改进, 现已大量被使用^[4]。在细胞长期培养过程中, 往往采取添加基质膜、用胶原做成“三明治”模型^[3,7-9]或将肝细胞和上皮细胞共培养^[4,7]等手段来达到维持肝实质细胞生物学特性的目的。最近, 有很多研究围绕肝实质细胞和星形细胞(HSC)共培养方面进行。HSC 可以分泌细胞外基质, 例如胶原、蛋白多糖和糖蛋白, 同时也能分泌肝脏生长因子(HGF)、表皮生长因子(EGF)和转化生长因子 α (TGF α)。很多研究表明, 这种共培养方法可以显著提高肝细胞的存活时间和存活率^[10,11]。此外, 也有研究者采用胎鼠的肝脏作为体外模型的材料来源, 胎鼠的肝细胞繁殖力较强, 而免疫原性则较弱, 对冰冻保存和局部缺血造成的肝损伤有较强的抵抗力, 但是胎鼠肝脏的代谢酶系统还没有完全成熟, 在进行体外毒理学实验时不能完全代表成熟个体^[12]。

肝细胞培养已用于毒理研究的很多方面, 其中较为重要的就是结合细胞功能和细胞毒性的研究方法来研究药物肝脏毒性的机制。在细胞水平上, 可以采用的方法有细胞毒性方法〔例如, 乳酸脱氢酶(LDH)释放、碘化丙啶(propidium iodide)的摄取〕、功能学方法(测试 CYP450 水平)或者形态学方法^[1,13,14]。

使用正常肝细胞的主要局限是肝细胞样本的来源有限, 往往要受到安全性、伦理和经济条件等方面的限制。另一个重要的问题则是如何保证正常肝脏细胞功能的稳定性。最近的研究表明, 有 3 种因子可以维持原代肝脏功能的稳定性, 即可溶性因子、细胞外基质成分和细胞间的相互作用^[2]。然而, 不管培养条件如何, 在原代培养几天以后, 肝脏细胞的表型都会发生变化。未来的研究中可能还要面临解决肝脏细胞复制因子的课题。因此, 研究者需要不断改善肝脏体外模型的培养条件, 尽可能的维持肝脏细胞在体外的功能, 并在体外可以循环使用肝脏细胞, 同时将肝脏细胞体外模型应用于长期毒性实验和致癌实验。

1.2 离体肝脏模型

与原代肝细胞模型相比, 灌流后分离的离体肝脏更接近在体情况。早期, 离体肝脏用于治疗肝昏迷和肝移植, 并利

收稿日期: 2004-02-04 接受日期: 2004-06-14

作者简介: 蔡 燕, 中国科学院上海分院上海药物研究所在读博士, 主要从事大鼠原代肝细胞模型在毒理学方面应用的研究。

* 联系作者 E-mail: jren@mail.shcnc.ac.cn Tel: (021) 50806031 Fax: (021) 50806031

用其进行生理学方面的研究。此后,多数研究则注重于建立一个可靠的离体肝脏模型。这种模型的优点就是保留了肝脏完整的三维结构,细胞间可以相互作用,同时也可以实时收集胆汁并进行成分分析。此外,如果用血液作为灌流液的话,还可以测量血液动力学的参数。目前,很多药物或者化合物引起的肝脏毒性研究中都采用了这一模型,并应用此模型成功地检测了很多化合物^[2]。

在生理学范围内,离体肝脏模型在维持肝脏功能方面是非常复杂的,在长期培养过程中,这些模型的功能是不可能完整保留的。通常离体肝脏的培养时间不是很长,只有 2~3 h,每个离体肝脏只能用于检测一个或者几个化合物,利用率相对其他模型来说比较低。胆汁的分泌也只能维持 1~3 h^[2],所用动物的数量也不能大幅度减少。此外,建立模型的费用非常昂贵,并受到伦理学方面的限制,所以,到目前为止还没有人类的离体肝脏模型。但是,近年来利用诸如免疫组化^[1,15~17]、逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)^[17,18]、Northern 印迹^[17,19]、mRNA 原位杂交^[20,21]或者摄取实验^[22]这些形态学方法和分子生物学方法,可以显著改善该模型的使用。

1.3 肝脏切片模型

建立于 1923 年的肝脏切片模型^[23]与前两种模型相比,既不缺乏相关细胞之间的相互作用,也不像离体肝脏模型那样过于复杂,功能和体内肝脏比较接近。但是,该模型无法收集胆汁进行分析,不同切片之间细胞的一致性也不高。肝脏精密切片(precision-cut slice)技术是在近几年发展起来的^[1,24~26],它保留了肝脏组织结构和细胞-细胞间基质的相互作用,可以在 2~3 d 内进行实验研究^[4]。适用于实验的肝脏精密切片厚度范围为 150~300 μm ^[27],研究化合物在肝脏切片中的代谢情况时常用的厚度则是 200~250 μm ^[27,28]。切片的厚度和培养条件将直接影响化合物在肝脏切片中的代谢情况,因此根据不同化合物的代谢特点选择最佳厚度的切片是该模型一个重要研究内容。随着新的组织切片技术的发展,已经可以解决传统肝脏切片模型中存在的氧分布和营养分布不均匀等问题,然而,胆汁成分及功能性参数仍然无法测量。

1.4 肝细胞系模型

肝脏细胞系的特点是具有相对的无限生长能力和较高的存活率。从肝肿瘤或者转染了病毒或其他细胞 DNA 的肝细胞中可以获取肝细胞系。目前已建立了多种肝细胞系,但没有可以表达完整肝脏代谢酶系的肝细胞系^[4]。此外,细胞系的基因型和表现型也经常发生改变,没有一个细胞系模型可以保留完整的组织特异性功能,完全模拟体内情况。研究者正在用编码人类 CYPs 的 cDNA 转染人类肝脏细胞,在转基因小鼠体内表达人类代谢酶系。最近,有一个非常有趣的制备肝细胞系的方法,就是从转基因小鼠获取肝细胞^[29]。此外,从病变产生前的胎鼠肝脏获取的肝非实质细胞在高级培养基中培养,数月内即有很高的分化能力。另一方面,非实质肝细胞系的建立,使单独培养肝脏上皮细胞成为可能^[4]。

肝细胞系的发展为体外肝脏模型的发展提供了一个新的空间,但是,维持肝细胞的正常功能却非常困难。从人类肝脏制备细胞系可能是一种最好的选择,但也受到如何维持正常功能的限制。所以,肝脏细胞系方面的研究仍需深入。

1.5 亚细胞模型

亚细胞模型即组织匀浆,微粒体,纯化的细胞器如线粒体、细胞核等^[30,31]。上述亚细胞成分都可以应用于药物或化合物引起的肝脏毒性的研究。肝脏 S9^[32]和微粒体早就被认为是体外突变实验中激活外来化合物较好的代谢体系^[5,33]。它们都保留了代谢酶的活性,可对其代谢产物进行结构分析,但是微粒体内的代谢和二相代谢酶反应不相关,不能完全代表体内的情况。分离的线粒体可用来研究化合物对氧化磷酸化、ATP 合成和脂肪酸 β -氧化的影响。分离的细胞核则可以进行基因转录分析^[2]。但是,上述这些亚细胞体外模型也只是在短期内有效。

1.6 基因工程细胞模型

在酵母、细菌、昆虫细胞和非肝脏细胞中转染编码人类肝脏 CYPs 的 cDNA,使代谢酶具有正常稳定的表达,这样就可以利用这种模型研究药物代谢过程中 CYPs 的作用,进而研究药物对 CYPs 的抑制或诱导作用及药物与其结合情况^[34]。最近,已经成功得到转染了二相酶系 cDNA 的基因工程细胞^[35,36]。这个模型中的细胞存活率较高,可以同时表达一个或者多个人类 CYPs^[37],但它仅适用于某些特殊研究,并且代谢酶表达水平和体内相比也有较大的差异。

2 肝脏体外模型在毒理学方面的应用

2.1 毒性研究中的指标

利用肝脏体外模型进行化合物肝脏毒性研究时采用的指标通常可以分为非特异性指标和特异性指标两类。非特异性指标通常用来评价细胞的不可逆损伤,其选择的依据包括体内体外的一致性、可信性、可重复性、敏感性、简易性及种属特异性。特异性指标可以特异反映出肝脏在受到外来化合物作用时肝脏功能的改变。表 1 列出了常用的上述两类指标。

表 1 肝脏体外模型在化合物肝脏毒性研究中常用的指标

指标性质	参 数
非特异性	形态学参数
	细胞核和细胞质改变
	液泡聚集
	脂质小体形成
	细胞器结构改变
	生化参数
	^{51}Cr 的释放
	蛋白质或 DNA 含量
	K^+ 浓度和 Ca^{2+} 流量
	MTT 比色
特异性	过氧化脂质
	药物与细胞大分子的共价结合
	尿素合成
	肝糖原合成
	CYPs 的诱导或抑制
	平滑内质网的增生
	过氧化体(微体)的变化
	溶酶体同心膜变化

2.2 肝脏体外模型中使用的检测方法

2.2.1 检测细胞质膜紊乱的方法

检测膜完整性的方法 质膜完整性的改变是细胞不可逆损伤的指标,检测细胞存活率最常用的方法是台盼蓝拒染实验和噻唑蓝(MTT)比色法。此外,有很多酶可以用来监测细胞的存活情况,最常用的方法是检测 LDH 的释放。但是,在人类肝细胞中 LDH 不能作为一个可靠指标,因为与啮齿类动物相比,其敏感性较差^[38,39]。

此外,细胞色素 C 的释放也是常用的检测指标之一。药物对肝脏的损伤,一定程度上表现为引起肝细胞的凋亡。在线粒体途径的细胞凋亡过程中,细胞色素 C 从线粒体的内膜释放到胞浆中,所以可以通过检测胞浆中细胞色素 C 的含量来判断化合物是否引起了细胞凋亡^[40]。

细胞凋亡的另一个指标是⁵¹Cr 的释放,它可以衡量膜的完整性。但是,因为细胞必须先用同位素定位,应用尚有局限。

检测质膜可逆性改变的方法 在细胞失去活性之前,膜对离子及大分子的渗透性会发生改变。在受损细胞中经常可以观察到细胞内 K⁺ 的减少和 Ca²⁺ 流量改变。加入琥珀酸盐后细胞耗氧量的改变也是细胞可逆性损伤之前的一个重要指标^[2]。

2.2.2 检测细胞亚细胞水平改变的方法

除了化合物直接作用于细胞膜引起毒性之外,细胞在丧失膜的完整性之前就会产生亚细胞水平的改变。电子显微镜可以观察到这种亚细胞结构的改变。除了检测细胞亚细胞结构的改变之外,还可以检测细胞功能上的改变。功能学上的指标是建立在能量守恒基础上的,例如,ATP 含量^[41]和代谢活性,乳酸/丙酮酸比值,蛋白质的新合成。分泌蛋白和细胞内新合成蛋白都可以测量。细胞代谢失调通常远远早于细胞损伤之前,所以只有非常明显并且具有重复性的指标才可以用来衡量细胞毒性。

2.2.3 检测其他可逆性细胞紊乱指标的方法

还有一些可逆性细胞紊乱指标也可以用来检测潜在的细胞损伤,但是,它们没有精确的作用位点。最常使用的有检测谷胱甘肽(GSH)含量、过氧化脂类、活性化合物和细胞大分子的结合^[2]等方法。

2.2.4 形态学方法

研究者也经常使用形态学方法来研究肝脏体外模型。例如,使用流式细胞仪去检测药物作用后细胞核形态改变、染色质折叠情况及 DNA 的完整性^[2]。也有研究者使用微核实验、肝脏冰冻切片等传统方法,用以判断药物的毒性作用。

2.3 肝脏体外模型检测细胞毒性和遗传毒性化合物

2.3.1 细胞毒性化合物的筛选

不管是悬浮培养还是贴壁培养的肝细胞,都可以在同一个培养体系中用不同的指标、多个浓度来筛选多种未知毒性的化合物。

用新鲜分离的肝实质细胞可以在短时间内进行研究,正常肝细胞的敏感性要高于肝脏肿瘤细胞,后者的代谢酶活性相对较低。

当所需检测的都是结构相关的化合物时,原代肝细胞是

一个较好的筛选模型。肝脏毒性化合物,尤其是那些需要经过生物转化才引起细胞损伤的化合物,对体外的大鼠肝细胞或者人类肝细胞往往比对非肝脏细胞的毒性要大。

体外模型的使用建立在它可以方便解释体内情况的特点之上,为了比较体内体外的情况,最常用的参数就是组织学参数、LD₅₀和血清酶活性水平^[2]。一般,体内和体外实验在区别肝脏毒性物质和非肝脏毒性物质时的相关性是比较好的。如果出现不一致性,那可能是所检测的化合物本身的性质或者检测所用的指标或者方法不同所引起的。事实上,不能仅用一种体外模型来检测所有的化合物,如果得到更多的体内体外实验不一致的结果,将会帮助研究者建立一个更完善的体外检测体系。

另一个问题是体内实验毒性剂量和体外实验的毒性浓度之间的关系。这种关系必须要运用药代动力学观点来解释,该问题还有待解决。

2.3.2 遗传毒性化合物的筛选

由于化合物和 DNA 的共价结合会引起 DNA 的损伤、DNA 的损伤修复、细胞表形的改变及染色体或染色单体水平的畸变,所以,很多种体外模型可以用来检测未知化合物的遗传毒性。原代肝细胞因为保留了严格的激活和失活平衡机制,很适用于定量地测定各种化合物的遗传毒性。

在研究中大量使用的 DNA 修复实验如程序外 DNA 合成法,只需要少量的细胞就可以完成,是应用人类肝细胞检测遗传毒性化合物较好的方法^[42],但是该方法检测的是 DNA 的改变而非 DNA 的突变。

3 肝脏体外模型在药物毒性高通量筛选中的应用

目前,已有实验室使用冰冻人类肝细胞来筛选具有潜在肝脏毒性的化合物。在 96 孔板或 384 孔板中培养肝细胞,分别给予不同浓度的待测化合物,作用 24 h 后用检测细胞毒性常用的方法(如 MTT 法和 ATP 发光法)来检测化合物对肝细胞的损伤,初步检测化合物对肝细胞的毒性作用^[31]。通常所采用的细胞毒性高通量筛选方法包括:细胞膜酶(LDH)的释放量测定、细胞染色检测及大分子合成检测等。所使用的指标则包括:MTT^[31]、ATP 发光强度^[41]、GSH 浓度、中性红摄取、Alamar 蓝代谢及 LDH 的释放等。而目前比较成熟的高通量筛选方法则为 MTT 法、ATP 发光法、中性红摄取检测和 Alamar 蓝代谢法,用来测定药物作用后细胞活性。目前,利用大鼠原代肝细胞模型筛选潜在肝脏毒性的化合物是最常采用的手段之一。In Vitro Technologies 公司实验人员已利用冰冻人类肝细胞检测了氯丙嗪、双氯芬酸、他莫昔芬、雌二醇、氯氮平、乙炔雌二醇、氯化镉等化合物的肝脏毒性,并由此计算出相应的半数抑制率(EC₅₀)值,为上述化合物肝脏毒性的研究提供了实验依据。同时研究者也发现,不同的提供者提供的肝脏细胞对肝脏毒性化合物的反应并不一致,存在着个体差异^[43~46]。

作者所在的实验室已初步开展了大鼠肝脏原代细胞的培养,相关的高通量指标检测及毒性机制方面的研究。采用 MTT、LDH 释放、中性红摄取、ATP 发光、GSH 和自由基等指标

检测了多种肝脏毒性药物。

肝脏体外模型除了作为筛选细胞毒性药物的工具以外,也可以用于药物代谢研究的高通量筛选。肝细胞中有完整的代谢酶系,所以它是一个较好的研究药物代谢的系统。目前,在该模型中已可以用液相色谱法/质谱法来监测药物的代谢情况^[47,48],通过药物代谢产物的情况来分析药物代谢的稳定性。也可以用荧光法,通过检测 CYPs 和底物重组后发出的荧光来判断药物对 CYPs 的作用,从而推断药物在体内的代谢情况^[49]。因为药物的代谢机制和药物本身的药理作用及毒理作用都是息息相关的,所以通过研究药物的代谢情况,也可以同时对药物的毒性进行研究。

4 肝脏体外模型的发展前景

除本文所介绍的 6 种主要肝脏体外模型外,肝脏干细胞模型可能是未来体外毒理研究的另一个途径。胆囊上皮细胞、卵圆细胞和其他一些不易分化的前期肝脏干细胞研究已有所突破^[2],但是,这些成果对肝脏组织研究的推进仍显不足。另一方面,最近的研究表明,肝脏可以从骨髓干细胞中直接再生^[4,50],肝脏干细胞研究有了新的可能性。但值得注意的是,在使用肝脏干细胞作为体外研究模型之前,必须先就如何控制肝脏前期细胞的分化进行大量的研究。

近几年,研究者逐步开展了肝细胞大规模培养的研究。很多实验室采用旋转细胞培养系统进行大规模的肝细胞悬浮培养研究。用电镜检测后发现肝细胞间有紧密的细胞连接,内质网和线粒体结构完整,一相酶和二相酶的功能及白蛋白合成情况正常。并且,该模型中培养的肝细胞在体外存活时间较长,可达 30~60 d^[51,52]。也有研究者将微载体技术与旋转生物反应器结合进行肝细胞三维培养,在体外长期培养 HepG2 肝脏肿瘤细胞系^[53]、大鼠原代肝细胞^[54]及正常人类肝细胞^[52],实验结果表明,在旋转生物反应器内经微载体扩增而获得的肝细胞具有细胞数量多、密度大和活性好的特点。

现存的肝脏体外模型各具特点,优缺点都十分明显,研究者必须根据不同化合物及不同研究目的来选择合适的模型进行化合物的肝脏毒性研究。

5 结语

过去数十年中,人类和动物肝脏细胞体外模型已初步建立,而且这些模型在药物代谢和毒性实验中的作用也被证明。研究者的迫切任务是规范这些实验方法,使其可以被大多数研究机构所普遍接受。如果从体外模型可以成功地获得大量的药物毒性信息,那么早在药物发现阶段,这些体外结果就可以用来推测药物在体内的安全情况。但是,必须认识肝脏细胞体外培养早期表型的改变及肝脏来源的限制仍然存在,在将来的研究中,如何进一步优化培养条件,获得具有完整功能的细胞系将是最大的挑战。而一些新技术,例如激光扫描共聚焦技术等的应用,可以促进更敏感、更可靠的药物毒性实验的发展。

6 参考文献:

- [1] Groneberg DA, Grosse-Siestrup C, Fischer A. *In vitro* model to study hepatotoxicity[J]. *Toxicol Pathol*, 2002, **30**(3):394-399.
- [2] Guillouzo A. Liver cell models in *in vitro* toxicology[J]. *Environ Health Perspect*, 1998, **106**(Suppl 2):511-532.
- [3] Seglen PO. Preparation of isolated rat liver cells[J]. *Methods Cell Biol*, 1976, **13**:29-83.
- [4] Battle T, Stacey G. Cell culture models for hepatotoxicology[J]. *Cell Biol Toxicol*, 2001, **17**(4-5):287-299.
- [5] Li AP, Gorycki PD, Hengstler JG, Kedderis GL, Koebe HG, Rahmani R, *et al.* Present status of the application of cryopreserved hepatocytes in the evaluation of xenobiotics; consensus of an international expert panel[J]. *Chem Biol Interact*, 1999, **121**(1):117-123.
- [6] Berry MN, Friend DS. High-yield preparation of isolated rat liver parenchymal cells: a biochemical and fine structural study[J]. *J Cell Biol*, 1969, **43**(3):506-520.
- [7] Li AP. Primary hepatocyte cultures as an *in vitro* experimental model for the evaluation of pharmacokinetic drug-drug interaction[J]. *Adv Pharmacol*, 1997, **43**:103-130.
- [8] Li AP. Primary hepatocyte cultures as an *in vitro* experimental model for xenobiotic metabolism and toxicology[J]. *Comm Toxicol*, 1998, **6**(3):199-220.
- [9] Lee J, Morgan JR, Tompkins RG, Yamush ML. Proline-mediated enhancement of hepatocyte function in a collagen gel sandwich culture configuration[J]. *FASEB J*, 1993, **7**(6):586-591.
- [10] Kristensen DB, Kawada N, Imamura K, Miyamoto Y, Tateno C, Seki S, *et al.* Proteome analysis of rat hepatic stellate cells[J]. *Hepatology*, 2000, **32**(2):268-277.
- [11] Uyama N, Shimahara Y, Kawada N, Seki S, Okuyama H, Iimuro Y, *et al.* Regulation of cultured rat hepatocyte proliferation by stellate cells[J]. *Hepatology*, 2002, **36**(5):590-599.
- [12] Arahuetes RM, Sierra E, Codesal J, Garcia Barrutia MS, Arza E, Cubero J, *et al.* Optimization of the technique to isolate fetal hepatocytes, and assessment of their functionality by transplantation[J]. *Life Sci*, 2001, **68**(7):763-772.
- [13] Berry MN, Grivell AR, Grivell MB, Phillips JW. Isolated hepatocytes, present and future[J]. *Cell Biol Toxicol*, 1997, **13**(4-5):223-233.
- [14] Guillouzo A, Morel F, Fardel O, Meunier B. Use of human hepatocyte cultures for drug metabolism studies[J]. *Toxicology*, 1993, **82**(1-3):209-219.
- [15] Copple BL, Moulin F, Hanumegowda UM, Ganey PE, Roth RA. Thrombin and protease-activated receptor-1 agonists promote lipopolysaccharide-induced hepatocellular injury in perfused livers[J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2003, **305**(2):417-425.
- [16] Lim S, Groneberg D, Fischer A, Oates T, Caramori G, Mattos W, *et al.* Expression of heme oxygenase isoenzymes 1 and 2 in normal and asthmatic airways; effect of inhaled corticosteroids[J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2000, **162**(5):1912-1918.
- [17] Groneberg DA, Nickolaus M, Springer J, Doring F, Daniel H, Fischer A. Localization of the peptide transporter PEPT2 in the lung; implication for pulmonary oligopeptide uptake[J]. *Am J Pathol*, 2001, **158**(2):707-714.

- [18] Mattes WB, Li AP. Quantitative reverse transcriptase/PCR assay for the measurement of induction in cultured hepatocytes[J]. *Chem Biol Interact*, 1997, **107**(1–2):47–61.
- [19] Groneberg DA, Hartmann P, Dinh QT, Fischer A. Expression and distribution of vasoactive intestinal polypeptide receptor VPAC (2) mRNA in human airways[J]. *Lab Invest*, 2001, **81**(5):749–755.
- [20] Groneberg DA, Doring F, Nickolaus M, Daniel H, Fischer A. Expression of PEPT2 peptide transporter mRNA and protein in glial cells of rat dorsal root ganglia[J]. *Neurosci Lett*, 2001, **304**(3):181–184.
- [21] Fischer TC, Hartmann P, Loser C, Springer J, Peiser C, Dinh QT, et al. Abundant expression of vasoactive intestinal polypeptide receptor VPAC2 mRNA in human skin[J]. *J Invest Dermatol*, 2001, **117**(3):754–756.
- [22] Groneberg DA, Doring F, Eynott PR, Fischer A, Daniel H. Intestinal peptide transport: *ex vivo* uptake studies and localization of peptide carrier PEPT1 [J]. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2001, **281**(3):G697–G704.
- [23] Ekins S. Past, present and future applications of precision-cut liver slices for *in vitro* xenobiotic metabolism[J]. *Drug Metab Rev*, 1996, **28**(4):591–623.
- [24] Brendel K, Fisher RL, Krumdieck CL, Gandolfi AJ. Precision-cut rat liver slices in dynamic organ culture for structure-toxicity studies [J]. *J Am Coll Toxicol*, 1990, **9**:621–627.
- [25] Gandolfi AJ, Wijeweera J, Brendel K. Use of precision-cut liver slices as an *in vitro* tool for evaluating liver function[J]. *Toxicol Pathol*, 1996, **24**(1):58–61.
- [26] Parrish AR, Gandolfi AJ, Brendel K. Precision-cut tissue slices: applications in pharmacology and toxicology[J]. *Life Sci*, 1995, **57**(21):1887–1901.
- [27] Bach PH, Vickers AEM, Fisher R, Baumann A, Brittebo E, Carlile DJ, et al. The use of tissue slices for pharmacotoxicological studies [J]. *Altern Lab Anim*, 1996, **24**:893–923.
- [28] Price RJ, Renwick AB, Arton PB, Brian Houston J, Lakes BG. Influence of slice thickness and culture conditions on the metabolism of 7-ethoxycoumarin in precision-cut rat liver slices[J]. *Altern Lab Anim*, 1998, **26**(4):541–554.
- [29] Paul D, Höhne M, Pinkert C, Piasecki A, Ummelmann E, Brinster RL. Immortalized differentiated hepatocyte lines derived from transgenic mice harboring SV40 T-antigen genes[J]. *Exp Cell Res*, 1988, **175**(2):354–362.
- [30] Wrighton SA, Ring BJ, VandenBranden M. The use of *in vitro* metabolism techniques in the planning and interpretation of drug safety studies[J]. *Toxicol Pathol*, 1995, **23**(2):199–208.
- [31] Li AP, Lu C, Brent JA, Pham C, Fackett A, Ruegg CE, et al. Cryopreserved human hepatocytes: characterization of drug-metabolizing enzyme activities and applications in higher throughput screening assays for hepatotoxicity, metabolic stability, and drug-drug interaction potential[J]. *Chem Biol Interact*, 1999, **121**(1):17–35.
- [32] Li AP. Overview: hepatocytes and cryopreservation – a personal historical perspective[J]. *Chem Biol Interact*, 1999, **121**(1):1–5.
- [33] Ames BN, Mccann J, Yamasaki E. Methods for detecting carcinogens and mutagens with the *Salmonella*/mammalian-microsome mutagenicity test[J]. *Mutat Res*, 1975, **31**(6):347–364.
- [34] Guengerich FP, Gillam EM, Ohmori S, Sandhu P, Brian WR, Sari MA, et al. Expression of human cytochrome P450 enzymes in yeast and bacteria and relevance to studies on catalytic specificity[J]. *Toxicology*, 1993, **82**(1–3):21–37.
- [35] Lavoie L, Tremblay A, Mirault ME. Distinct oxidoreductase phenotypic of human T47D cells transfected by rat glutathione *S*-transferase Yc expression vectors[J]. *J Biol Chem*, 1992, **267**(6):3632–3636.
- [36] Guengerich FP, Gillam EM, Shimada T. New applications of bacterial systems to problems in toxicology[J]. *Crit Rev Toxicol*, 1996, **26**(5):551–583.
- [37] Oesch F, Diener B. Cell systems for use in studies on the relationship between foreign compound metabolism and toxicity[J]. *Pharmacol Toxicol*, 1995, **76**(5):325–327.
- [38] Le Bot MA, Bégué JM, Kernaeguen D, Robert J, Ratanasavanh D, Airiau J, et al. Different cytotoxicity and metabolism of doxorubicin, daunorubicin, epirubicin, esorubicin and idarubicin in cultured human and rat hepatocytes[J]. *Biochem Pharmacol*, 1988, **37**(20):3877–3887.
- [39] Mallédant Y, Siproudhis L, Tanguy M, Clerc C, Chesné C, Saint-Marc C, et al. Effects of halothane on human and rat hepatocyte cultures[J]. *Anesthesiology*, 1990, **72**(3):526–534.
- [40] Gómez-Lechón MJ, O'Connor E, Castell JV, Jover R. Sensitive markers used to identify compounds that trigger apoptosis in cultured hepatocytes[J]. *Toxicol Sci*, 2002, **65**(2):299–308.
- [41] Cree IA, Andreotti PE. Measurement of cytotoxicity by ATP-based luminescence assay in primary cell cultures and cell lines[J]. *Toxicol In Vitro*, 1997, **11**:553–556.
- [42] Butterworth BE, Smith-Oliver T, Earle L, Loury DJ, White RD, Doolittle DJ, et al. Use of primary cultures of human hepatocytes in toxicology studies[J]. *Cancer Res*, 1989, **49**(5):1075–1084.
- [43] Lu C, Pham CD, Dixon KR, Sakai Y, Silber PM, Li AP. A high throughput screening assay for hepatotoxicity using cryopreserved human hepatocytes. <http://www.invitrotech.com/filelib/ATPPoster.pdf>.
- [44] Li AP, Lloyd S, Silber PM, Sakai Y. High throughput screening for drug toxicity. <http://www.invitrotech.com/filelib/SBS2001.pdf>.
- [45] Cryopreserved human hepatocyte high-throughput screening protocol: 96-well ATP cytotoxicity assay. <http://www.invitrotech.com/filelib/CryoHepATPTox9610April 2003.pdf>
- [46] Cryopreserved human hepatocyte high-throughput screening protocol: 96-well metabolic stability assay. <http://www.invitrotech.com/filelib/CryoHepMetStab19 November 2001.pdf>
- [47] Ramanathan R, McKenzie DL, Tugnait M, Siebenaler K. Application of semi-automated metabolite identification software in the drug discovery process for rapid identification of metabolites and the cytochrome P450 enzymes responsible for their formation[J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2002, **28**(5):945–951.
- [48] Ma Y, Lang L, Kiesewetter DO, Eckelman WC. Liquid chromatography-tandem mass spectrometry identification of metabolites of three phenylcarboxyl derivatives of the 5-HT_{1A} antagonist, *N*-(2-(4-(2-methoxyphenyl)-1-piperazinyl)ethyl)-*N*-(2-pyridyl) trans-4-fluorocyclohexanecarboxamide (FCWAY), produced by human and rat hepatocytes[J]. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2002,

- 780(1):99–110.
- [49] Bapiro TE, Egnell AC, Hasler JA, Masimirembwa CM. Application of higher throughput screening (HTS) inhibition assays to evaluate the interaction of antiparasitic drugs with cytochrome P450s[J]. *Drug Metab Dispos*, 2001, **29**(1):30–35.
- [50] Petersen BE, Bowen WC, Patrene KD, Mars WM, Sullivan AK, Murase N, *et al.* Bone marrow as a potential source of hepatic oval cells[J]. *Science*, 1999, **284**(5417):1168–1170.
- [51] Brown LA, Arterburn LM, Miller AP, Cowger NL, Hartley SM, Andrews A, *et al.* Maintenance of liver functions in rat hepatocytes cultured as spheroids in a rotating wall vessel[J]. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*, 2003, **39**(1–2):13–20.
- [52] Khaoustov VI, Darlington GJ, Soriano HE, Krishnan B, Risin D, Pellis NR, *et al.* Induction of three-dimensional assembly of human liver cells by simulated microgravity[J]. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*, 1999, **35**(9):501–509.
- [53] Mitteregger R, Vogt G, Rossmanith E, Falkenhagen D. Rotary cell culture system (RCCS): a new method for cultivating hepatocytes on microcarriers[J]. *Int J Artif Organs*, 1999, **22**(12):816–822.
- [54] Lin KH, Maeda S, Saito T. Long-term maintenance of liver-specific functions in three-dimensional culture of adult rat hepatocytes with a porous gelatin sponge support[J]. *Biotechnol Appl Biochem*, 1995, **21**(Pt 1):19–27.

In vitro liver models and its application in toxicology

CAI Yan, GONG Li-Kun, REN Jin*

(State Key Laboratory of Drug Research, Shanghai Institute of Materia Medica,
Chinese Academy of Sciences, Shanghai 201203, China)

Abstract: The research of *in vitro* liver models is developed increasingly. The isolated hepatocytes, isolated perfused organs, tissue slices, liver cell lines, subcellular fractions and the genetically engineered cells are the most commonly used *in vitro* liver models nowadays, especially the isolated hepatocytes. The models mentioned above not only can be used to investigate the mechanisms of drug toxicology, but also the high throughout screening

of drug toxicology. For the future, there is a need for better culture conditions and more complete system of the drug toxicology research.

Key words: experiment models; liver; *in vitro*; toxicity tests; drug screening

* Corresponding author.