

究—以蔬菜农药残留为例[J]. 科技经济导刊, 2016(24):79-80.

我国农产品出口贸易的影响[J]. 农药科学与管理, 2019, 40

[15] 穆兰, 朴秀英, 陈晓初, 等. 韩国农药残留肯定列表制度对

(4):12-15.

## 综述

# 外源化合物肝毒性体外模型的研究现状和进展

曹鑫, 张雅楠, 王冬霞, 卢宇翔, 毛侃敏, 郝丽萍

(华中科技大学同济医学院公共卫生学院营养与食品卫生学系 食品营养与安全

湖北省重点实验室, 湖北 武汉 430030)

**摘要:** 肝脏是人体最为重要的器官之一, 在人体中承担着重要的消化和解毒功能。目前全球关于肝毒性的研究大多以动物为实验对象, 然而随着“3R”原则——替代(Replacement)、减少(Reduction)、优化(Refinement)在研究中得到更多的实行, 更多的体外毒理学模型被建立且运用到肝毒性的研究当中。这篇综述主要提供了对于一些体外肝毒性毒理学模型的简要、关键的评估, 以及对未来发展方向的展望。

**关键词:** 肝毒性; 肝癌细胞系; 3D肝脏模型; 肝损伤; 共培养

**中图分类号:** R155 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-8456(2021)06-0826-06

**DOI:** 10.13590/j.cjfh.2021.06.032

## Progress of *in vitro* models for xenobiotics hepatotoxicity evaluation

CAO Xin, ZHANG Ya'nan, WANG Dongxia, LU Yuxuan, MAO Kanmin, HAO Liping

(Hubei Key Laboratory of Food Nutrition and Safety, Department of Nutrition and Food Hygiene,

School of Public Health, Tongji Medical College, Huazhong University of

Science and Technology, Hubei Wuhan 430030, China)

**Abstract:** The liver is a vital organ, which is responsible for digestion and detoxification. Traditional studies on hepatotoxicity of xenobiotics are relied on *in vivo* animal models for data collection, however, animal tests are time consuming and expensive, and sometimes fail to predict human toxicity. To follow “3R” principle (Replacement, Reduction, Refinement), more *in vitro* models have become more popular for the assessment of hepatotoxicity. This review presents a brief overview and comparison of some *in vitro* liver models, as well as prospects for future development.

**Key words:** Hepatotoxicity; hepatoma cell lines; 3D liver model; liver injury; co-culture

肝脏 80% 由肝实质细胞构成, 并由其执行大部分肝脏功能。另外 20% 的肝脏部分由非实质细胞 (Non-parenchymal cells, NPCs) 组成。食品从种植、养殖到餐桌的每个环节都可能受到某种有毒有害物质或者微生物的污染, 导致产生的毒性物质被机体摄入从而累积在心脏、肝脏、肾脏等器官, 导致器官损伤从而对机体产生毒性反应, 其中肝脏充当最关键的代谢与解毒作用。

尽管在肝毒性领域建立了许多毒理学模型进行了大量的研究, 但由于难以掌握复杂的暴露情况, 且由于人体和各种动物模型之间存在种间差异和个体差异, 对外源化合物肝毒性的理解尚不完全清楚, 毒性研究也变得复杂<sup>[1]</sup>。随着组织工程、分子生物学等技术的发展, 近年来越来越多能够模拟人肝脏功能的体外模型被开发出来并用于肝毒性评价, 如研究中常见的肝细胞的 2D 及 3D 模型、肝细胞与其他细胞混合培养的共培养模型、肝脏切片以及微流控芯片等。

本篇综述将着重讨论上述多种体外肝毒性评估模型现状及发展, 并对其在肝毒性评价中的作用进行阐述。

## 1 2D 肝细胞模型

在肝细胞可以通过相应技术手段分离之后, 对

收稿日期: 2021-09-15

基金项目: 科技部国家重点研发计划“食品安全关键技术研发”专项  
(2018YFC1603101)

作者简介: 曹鑫 男 硕士生 研究方向为食品污染物风险评估

E-mail: caoxin3733@foxmail.com

通信作者: 郝丽萍 女 教授 研究方向为营养与食品卫生学

E-mail: haolp@mails.tjmu.edu.cn

于肝细胞的 2D 培养成为肝毒性研究常用的简易体外模型。常用的体外 2D 肝细胞模型有:(1)原代肝细胞(Primary human hepatocytes, PHH);(2)肝癌细胞系;(3)干细胞来源的肝细胞。

### 1.1 PHH

PHH 在肝毒性研究中被认为是细胞模型中的金标准<sup>[2]</sup>。PHH 在被分离之后能够表现出优良的特征,如代谢酶活性、肝脏特异性蛋白的表达、白蛋白的产生等<sup>[3]</sup>。然而,该细胞同时存在诸多缺陷,例如:(1)肝脏特异性功能的丧失:PHH 在体外培养条件下其特异性肝功能丧失严重,如细胞色素 P450 (Cytochrome P450, CYP450) 的表达水平低下;(2)原代肝细胞的分离过程比较复杂困难,供体稀缺及供体间的个体变异,会影响研究的可重复性<sup>[4]</sup>。

尽管存在与培养、分离、成本、供体间变异等相关的困难,在肝毒性评价中 PHH 仍被广泛使用。哺乳动物的细胞在体内的 3D 环境下生长,因此 2D 细胞培养在重建这种天然的体内微环境方面是低效的<sup>[5]</sup>。研究表明,改善和保留 PHH 的肝脏特异性功能的一种方法是培养 3D 细胞模型<sup>[6]</sup>,另外将 PHH 细胞与其他细胞类型共培养也可以很好地保留肝脏的特异性功能<sup>[7]</sup>。

### 1.2 肝癌细胞系

已被用于毒理学研究的肝癌细胞系包括:HepG2、C3A、HepaRG 和 Huh7 等。这些细胞系的使用克服了供体间个体变异的问题,并且具有相对稳定的表型,易于实验操作且拥有更长的生命周期。但是肝癌细胞系的主要缺点是肝脏关键代谢酶的表达水平较低,通常具有较低的代谢能力<sup>[8-10]</sup>。

HepG2 细胞系自 20 世纪 70 年代分离以来,在毒理学和药理学评估领域进行了广泛的研究<sup>[11]</sup>。HepG2 细胞具有许多优势,例如:(1)核转录因子(Nuclear transcription factor, Nrf2)表达水平较高,这对于药物代谢和毒性反应必不可少;(2)较易获得,无限增殖以及供体间无显著变异确保研究结果的可重复性;(3)实验室操作简单,具有简易的培养方案。然而研究表明,HepG2 与 PHH 相比 CYP 表达水平较低,不能完全代表体内肝细胞的表型,因此单独利用 HepG2 细胞系检测许多肝毒性化合物是不够准确的<sup>[12]</sup>。

HepaRG 细胞系是另一种源自肝癌患者的细胞系,与 HepG2 细胞相比,具有许多独特的特点和功能。与 PHH 相比,HepaRG 细胞表达更多的 II 相代谢酶和更高的膜转运蛋白活性<sup>[13]</sup>。HepaRG 细胞以低密度接种时,会表现出细长的未分化形态,之后

进行分裂,并在汇合后形成典型的肝细胞样集落,并被胆管上皮样细胞包围。另外,许多研究报道 HepaRG 细胞 CYP450 表达水平增强以及肝脏特异性功能的改善<sup>[4, 14]</sup>。GUILLOUZO 等<sup>[15]</sup>研究证明 HepaRG 细胞系与 HepG2 细胞系相比,对肝脏代谢介导的毒性更加敏感,研究发现 HepaRG 细胞表达各种 CYP(1A2、2B6、2C9、2E1、3A4)、核受体、组成型雄烷受体和孕烷 X 受体的水平与 PHH 中的水平相当,上述发现表明,HepaRG 细胞具有取代 PHH 进行代谢和毒性研究的潜力。HepaRG 细胞作为肝毒性评价模型的主要限制之一是复杂的培养程序。HepaRG 细胞在一定的培养条件下,能够分化为肝细胞样和胆管上皮样细胞,与其它细胞系相比,这种分化培养需要花费更多时间和费用,另外需要专门的培养基,这意味着培养 HepaRG 细胞的成本可能比其它细胞系昂贵许多,作为研究工具其可用性受到限制<sup>[16]</sup>。

GUPTA 等<sup>[17]</sup>利用转录组测序技术对 2D 培养条件下的 PHH、HepG2 和 HepaRG 等体外肝细胞模型进行了研究比较,结果显示在基因表达水平上,HepG2 细胞与 PHH 细胞的相似性较差,与 HepG2 细胞相比,HepaRG 细胞与活体肝脏之间的差异表达基因明显减少,但相似程度仍然低于 PHH。

### 1.3 干细胞来源的肝细胞

胚胎干细胞(Embryonic stem cell, ESC)、间充质干细胞(Mesenchymal stem cell, MSC)及诱导多能干细胞(Induced pluripotent stem cells, iPSCs)为毒理研究中的肝细胞重要潜在来源。干细胞经过诱导可分化发育成肝祖细胞,后者可进一步增殖分化为成熟的类肝细胞和类胆管细胞。相比于 PHH,干细胞来源的肝细胞在体外可以进行长时间培养且大量增殖,另外生物学特性相类似,是体外肝毒性评价的良好细胞模型。

有研究显示 iPSCs 诱导分化的肝细胞可以用于评价药物的肝毒性:中药雷公藤干预剂量和细胞的肝功能指标(谷草转氨酶、谷丙转氨酶)呈一定正相关性,且与抗氧化指标(超氧化物歧化酶、谷胱甘肽)呈一定负相关性,结果在正常肝细胞中得到验证<sup>[18]</sup>。KIM 等<sup>[19]</sup>将 PHH、HepG2 与 ESC 来源的肝细胞经不同药物(大黄素、没食子酸、薯蓣皂苷、苍术苷)干预,发现大黄素与没食子酸对 HepG2 细胞形成毒性反应,但未在 PHH 和 ESC 来源的肝细胞发现;苍术苷对于 PHH 和 ESC 来源的肝细胞具有毒性,但对于 HepG2 细胞没有肝毒性,结果提示 ESC 来源的肝细胞在肝毒性评价上与 PHH 的结果同步。

干细胞来源的肝细胞为肝毒性评估提供了一种潜在工具,随着相关研究的进行与技术的完善,干细胞来源的肝细胞有望成为肝毒性评价的高敏感性、高特异性的体外模型。

## 2 肝脏切片

由于早期研究中干细胞培养缺乏肝细胞异质性,且培养过程中肝细胞容易恶化,SMITH等<sup>[20]</sup>于1985年发明了精确切割肝脏切片(Precision-cut liver slices, PCLS)并作为毒性测试的体外模型使用。与其他体外模型相比,肝脏切片具有许多理想的特性。与原代肝细胞分离不同,肝脏切片不需要与蛋白水解酶一起孵育,因此细胞间的相互作用和其他细胞成分在很大程度上不会受到干扰,肝脏切片是一个更类似于体内肝脏的模型。另外,在许多模型中,分离的条件因物种而异,而不同物种的肝脏切片均可采用相同的程序来制备和孵育,从而使该模型特别适用于种间研究。PCLS主要用于研究化合物的代谢,或研究以肝细胞死亡为中心的毒性作用。由于肝切片自发的纤维化反应,2005年以来,PCLS模型多被用于研究促纤维化和抗纤维化化合物的性质<sup>[21]</sup>。

肝切片已在肝毒性研究领域得到了广泛利用,该系统的主要优点是肝脏微环境保持完好,存在所有类型的肝细胞以及CYP450高活性<sup>[22]</sup>。2010年GRAAF等<sup>[23]</sup>发表了一份关于人和大鼠肝脏切片建立的标准,迄今为止仍是研究人员PCLS培养的参考方法。然而,人体的供体肝脏组织来源有限,并且从不同供体的肝脏存在异质性,个体差异性意味着研究的可重复性可能难以实现,另外切片不可避免导致肝细胞死亡,最终触发细胞修复和再生反应,所以为了降低纤维化的影响,肝脏切片局限于较短的培养周期<sup>[24]</sup>。

## 3 共培养模型

共培养是指将两种或两种以上不同类型的细胞混合在一起培养,可以在2D或3D培养环境中完成。共培养模型的关键特征在于三种细胞之间的相互作用:细胞-细胞相互作用、细胞-细胞外基质(Extracellular matrix, ECM)相互作用和通过细胞因子传递信号。

现有研究证明,肝细胞在和其他特定细胞类型一起培养的情况下可以改善其生命周期和功能,自20世纪70年代末以来,有研究探讨NPC和肝细胞共培养的效果<sup>[25]</sup>。鉴于肝脏内在的多种细胞的复杂性,单独培养的PHH的毒理学检测能力有限,

PHH和NPCs共同培养可以更好地代表肝脏的内环境<sup>[26]</sup>。研究表明,使用NPCs培养PHH不仅可以增加肝脏的特异性功能,还可以提高PHH培养的生命周期<sup>[27]</sup>。此外,肝癌细胞系也被用于建立体外共培养模型,ODA等<sup>[28]</sup>为了模拟天然肝脏的免疫细胞微环境,将HepG2细胞与外周血单个核细胞(Peripheral blood mononuclear cell, PBMC)共同培养,凭此模型成功地检测到多种药物性肝损伤的潜在生物标志物。

近来一项研究将肝星状细胞(Hepatic stellate cells, HSCs)和一种人肝星状细胞系(Lieming Xu-2, LX-2)及一种特殊的肝祖细胞系(Immortalized bipotential murine oval liver, BMOL)共同培养,发现在HSCs细胞中纤维化相关因子水平明显下降,促纤维化基因表达明显抑制,为肝纤维化研究提供了一种良好的模型<sup>[29]</sup>。

目前对于共培养模型的研究重点逐渐转移到3D共培养上,在3D共培养模型中,不仅多种细胞类型之间可以相互作用,而且可以以类似于肝脏内环境的生理方式生长<sup>[26]</sup>。

## 4 3D肝脏模型

3D肝脏模型的概念最早是1959年由德国的Pohl博士<sup>[30]</sup>提出。肝细胞的2D培养常作为分析肝毒性机制的短期研究,然而肝细胞在标准的2D培养条件下,缺乏细胞-细胞相互作用和细胞-ECM相互作用,难以维持长期肝脏结构和功能,且有可能短期内去分化变为无特异性肝功能的细胞,这阻碍了肝毒性预测的准确性。但是在3D模型条件下,肝细胞之间紧密接触,可以进行细胞通讯并产生ECM,所以接近于体内的肝脏细胞,在几天甚至几周的时间内可以保持胆管结构、白蛋白分泌、尿素产生功能以及I/II相代谢酶的水平<sup>[13]</sup>。

PHH及HepG2、HepaRG和Huh7等细胞系已被尝试建立3D肝脏模型,但只有PHH形成的球体模型在肝毒性物质干预时在生理与病理上类似于天然肝脏。BELL等<sup>[3]</sup>通过蛋白组学技术分析显示,与新鲜分离的人原代肝细胞相比,2D单层培养的PHH细胞和PHH球体模型各有358和132种差异表达的蛋白质,表明3D肝脏模型的蛋白表达水平与机体肝脏更为接近。

由于原代肝细胞的表型、分泌能力和代谢活性与原生肝脏相似,从不同物种的肝脏分离的原代肝细胞已被认为是建立3D肝脏模型的合适细胞来源。但由于原代肝细胞较难获得,且存在供体之间的个体差异,所以提出由肝癌细胞系作为建立3D

肝脏模型的细胞来源。在 HepG2 球体模型中,典型的肝功能标志物如(甲胎蛋白、血清白蛋白)以及肝细胞分化标志物(如  $\alpha$ -1-抗胰蛋白酶和 HNF4 $\alpha$ )显著增加,表明 HepG2 球体模型相较于 2D 模型更接近天然肝脏的蛋白表型<sup>[31]</sup>。与 HepG2 相比,C3A 球体模型酶活性和白蛋白/尿素分泌水平可保持在 35 d 以上,Huh 球体模型与原代肝细胞在代谢酶表达水平上更为接近<sup>[32]</sup>。HepaRG 细胞也被用于肝脏球体模型的建立,毒物诱导的胆汁淤积可以使用 HepaRG 球体模型来实现,并且目前有详细的技术草案<sup>[33]</sup>。

3D 肝脏模型培养是一个快速发展的领域,研究人员致力于还原体内肝脏微环境的复杂性,以改善培养细胞的肝脏特异性功能和生命周期<sup>[11]</sup>。现有许多 3D 肝脏模型可以有效模拟肝脏复杂的微环境,包括水凝胶、基于支架培养技术的肝脏模型、肝脏球体模型,其中对于球体模型的使用越来越精细,并且被更多地用于研究外源化合物渗透作用、代谢和肝毒性等领域<sup>[34-36]</sup>。

## 5 展望

随着对检测性更好的体外肝脏模型的需求增加,新兴的细胞 3D 培养技术和生物反应器技术等已越来越多地被应用于外源化合物的肝毒性评估<sup>[37]</sup>。这些更复杂的培养技术和生物反应器技术有潜力恢复体内肝脏复杂的生理特点,如肝窦内的化合物溶质和氧气梯度,从而能够更好地再现体内肝脏复杂的微环境<sup>[38]</sup>。

在毒理学研究当中,研究人员一直在不断开发用于毒理学研究的多种 3D 体外肝脏模型。迄今为止,3D 肝脏球体模型显示出对肝毒性进行评估的良好前景,但是其通常是静态的,并且在多个细胞类型的架构和结合方面受到了限制,能一定程度上类似于体内的天然肝脏,这可能是肝毒性研究的一个较好的选择,但还需进一步的开发。同时研究人员开始研究更复杂的微流控芯片和生物反应器技术等潜在候选模型。微流控芯片和生物反应器技术可在严格受控的环境下模拟组织和器官生理功能,通过仿生单元装置到达传统的 2D 或 3D 培养系统无法到达的组织和器官功能水平。它们还能对细胞的遗传、代谢过程进行高分辨率、实时成像的体外分析<sup>[39]</sup>。该技术可应用于毒性生物标志物的筛选、临床药物筛选等,对于体外替代毒理学模型的建立具有重要价值。除了实验性方法外,计算机模拟技术也可被应用于毒理学研究当中,虚拟组织模型(Virtual tissue models, VTMs)是一种空间动态计

算机模型,基于现有的实验数据所建立而成,用于捕捉组织细胞间的相互作用,VTMs 可配合模块化开源共享代码(CompuCell3D)使用,目前已应用于初步的组织模拟,如血管生成、年龄相关的黄斑变性、眼睛发育、肝脏毒性、多囊肾疾病等。VTMs 可以为相关研究提供部分线索,但因 VTMs 倾向于经验推导,所以对其结果必须进行实验验证<sup>[40]</sup>。作为一种低成本、高效的毒理学数学模型,展示了体外替代毒理学技术的前景。

为了提高肝毒性研究的特异性与敏感性,减少研究的时间成本,针对不同类型肝毒性的各种新型检测方法日益受到关注。新型的分析技术通常会结合生物信息学、数据挖掘等,如 GUPTA 等<sup>[17]</sup>利用转录组测序技术对多种体外肝脏模型(多种肝癌细胞系、诱导多能干细胞、三维肝微组织等)与人肝组织进行比较,分析之间的差异表达基因,判定这些模型与人肝组织的相似性。

总之,开发更加与体内肝脏生理学特征类似的体外肝脏模型,需要多学科之间的相互协作,并能够在研究中更加准确地评估外源化合物的肝脏毒性。

## 参考文献

- [1] DAMALAS C A, ELEFTEROHOORINOS I G. Pesticide exposure, safety issues, and risk assessment indicators [J]. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 2011, 8 (5): 1402-1419.
- [2] GÓMEZ-LECHÓN M J, TOLOSA L, CONDE I, et al. Competency of different cell models to predict human hepatotoxic drugs [J]. *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology*, 2014, 10 (11): 1553-1568.
- [3] BELL C C, HENDRIKS D F G, MORO S M L, et al. Characterization of primary human hepatocyte spheroids as a model system for drug-induced liver injury, liver function and disease [J]. *Scientific Reports*, 2016, 6: 25187.
- [4] GODOY P, HEWITT N J, ALBRECHT U, et al. Recent advances in 2D and 3D *in vitro* systems using primary hepatocytes, alternative hepatocyte sources and non-parenchymal liver cells and their use in investigating mechanisms of hepatotoxicity, cell signaling and ADME [J]. *Archives of Toxicology*, 2013, 87 (8): 1315-1530.
- [5] LEE H J, AHN J, JUNG C R, et al. Optimization of 3D hydrogel microenvironment for enhanced hepatic functionality of primary human hepatocytes [J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2020, 117 (6): 1864-1876.
- [6] LAUSCHKE V M, SHAFAGH R Z, HENDRIKS D F G, et al. 3D primary hepatocyte culture systems for analyses of liver diseases, drug metabolism, and toxicity: Emerging culture paradigms and applications [J]. *Biotechnology Journal*, 2019, 14 (7): 1800347.
- [7] COLLINS D P, HAPKE J H, ARAVALLI R N, et al. Development of immortalized human hepatocyte-like hybrid cells

- by fusion of multi-lineage progenitor cells with primary hepatocytes[J]. *PLoS One*, 2020, 15 (6): e0234002.
- [8] WRZESINSKI K, MAGNONE M C, HANSEN L V, et al. HepG2/C3A 3D spheroids exhibit stable physiological functionality for at least 24 days after recovering from trypsinisation [J]. *Toxicology Research*, 2013, 2 (3): 163-172.
- [9] VILLALVA-PÉREZ J M, RAMÍREZ-VARGAS M A, SERAFÍN-FABÍAN J I, et al. Characterization of Huh7 cells after the induction of insulin resistance and post-treatment with metformin [J]. *Cytotechnology*, 2020, 72 (4): 499-511.
- [10] HAN W J, WU Q, ZHANG X H, et al. Innovation for hepatotoxicity *in vitro* research models: a review[J]. *Journal of Applied Toxicology*, 2019, 39 (1): 146-162.
- [11] SOLDATOW V Y, LECLUYSE E L, GRIFFITH L G, et al. *In vitro* models for liver toxicity testing[J]. *Toxicol Res*, 2013, 2 (1): 23-39.
- [12] ATIENZAR F A, NOVIK E I, GERETS H H, et al. Predictivity of dog co-culture model, primary human hepatocytes and HepG2 cells for the detection of hepatotoxic drugs in humans [J]. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 2014, 275 (1): 44-61.
- [13] 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.
- [14] GERETS H H J, TILMANT K, GERIN B, et al. Characterization of primary human hepatocytes, HepG2 cells, and HepaRG cells at the mRNA level and CYP activity in response to inducers and their predictivity for the detection of human hepatotoxins[J]. *Cell Biology and Toxicology*, 2012, 28 (2): 69-87.
- [15] GUILLOUZO A, CORLU A, ANINAT C, et al. The human hepatoma HepaRG cells: A highly differentiated model for studies of liver metabolism and toxicity of xenobiotics [J]. *Chemico-Biological Interactions*, 2007, 168 (1): 66-73.
- [16] 李甲志, 王冰洁, 劳建乐, 等. 不同基底硬度在调控 HepaRG 细胞分化为肝细胞样细胞中的作用 [J]. *实用医学杂志*, 2017, 33(11): 1739-1743.
- [17] GUPTA R, SCHROODERS Y, HAUSER D, et al. Comparing *in vitro* human liver models to *in vivo* human liver using RNA-Seq [J]. *Archives of Toxicology*, 2021, 95 (2): 573-589.
- [18] 胡秋艳. 人 iPSCs 诱导类肝细胞及其用于中药肝毒性评价的初步研究[D]. 广州: 广州中医药大学, 2016.
- [19] KIM J H, WANG M, LEE J, et al. Prediction of hepatotoxicity for drugs using human pluripotent stem cell-derived hepatocytes [J]. *Cell Biology and Toxicology*, 2018, 34 (1): 51-64.
- [20] SMITH P F, GANDOLFI A J, KRUMDIECK C L, et al. Dynamic organ culture of precision liver slices for *in vitro* toxicology[J]. *Life Sciences*, 1985, 36 (14): 1367-1375.
- [21] PALMA E, DOORNEBAL E J, CHOKSHI S. Precision-cut liver slices: A versatile tool to advance liver research[J]. *Hepatology International*, 2019, 13 (1): 51-57.
- [22] THIELE G M, DURYEE M J, THIELE G E, et al. Review: precision cut liver slices for the evaluation of fatty liver and fibrosis[J]. *Current Molecular Pharmacology*, 2017, 10 (3): 249-254.
- [23] de GRAAF I A M, OLINGA P, de JAGER M H, et al. Preparation and incubation of precision-cut liver and intestinal slices for application in drug metabolism and toxicity studies[J]. *Nature Protocols*, 2010, 5 (9): 1540-1551.
- [24] DEWYSE L, REYNAERT H, VAN GRUNSVEN L A. Best practices and progress in precision-cut liver slice cultures [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2021, 22 (13): 7137.
- [25] LANGENBACH R, MALICK L, TOMPA A, et al. Maintenance of adult rat hepatocytes on C3H/10T1/2 cells [J]. *Cancer Research*, 1979, 39 (9): 3509-3514.
- [26] ROTH A, SINGER T. The application of 3D cell models to support drug safety assessment: Opportunities & challenges[J]. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2014, 69-70: 179-189.
- [27] LIN C, KHETANI S R. Micropatterned Co-cultures of human hepatocytes and stromal cells for the assessment of drug clearance and drug-drug interactions[J]. *Current Protocols in Toxicology*, 2017, 72 (1): 14.17.1-14.17.23.
- [28] ODA S, UCHIDA Y, ALEO M D, et al. An *in vitro* coculture system of human peripheral blood mononuclear cells with hepatocellular carcinoma-derived cells for predicting drug-induced liver injury [J]. *Archives of Toxicology*, 2021, 95 (1): 149-168.
- [29] GRATTE F D, PASIC S, ABU BAKAR N D B, et al. Previous liver regeneration induces fibro-protective mechanisms during thioacetamide-induced chronic liver injury[J]. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 2021, 134: 105933.
- [30] POHL W. Substructure and function of liver cell organoids[J]. *Munchener Medizinische Wochenschrift (1950)*, 1959, 101 (8): 334-336.
- [31] HURRELL T, LILLEY K S, CROMARTY A D. Proteomic responses of HepG2 cell monolayers and 3D spheroids to selected hepatotoxins[J]. *Toxicology Letters*, 2019, 300: 40-50.
- [32] ZHANG X H, JIANG T Y, CHEN D D, et al. Three-dimensional liver models: State of the art and their application for hepatotoxicity evaluation [J]. *Critical Reviews in Toxicology*, 2020, 50 (4): 279-309.
- [33] RAMAIAHGARI S C, FERGUSON S S. Organotypic 3D HepaRG Liver Model for Assessment of Drug-Induced Cholestasis [J]. *Methods Mol Biol*, 2019, 1981: 313-23.
- [34] ANDERSSON T B. Evolution of novel 3D culture systems for studies of human liver function and assessments of the hepatotoxicity of drugs and drug candidates[J]. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*, 2017, 121 (4): 234-238.
- [35] RAMAIAHGARI S C, 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]. *Archives of Toxicology*, 2014, 88 (5): 1083-1095.
- [36] GILLETTE B M, ROSSEN N S, DAS N, et al. Engineering extracellular matrix structure in 3D multiphase tissues [J]. *Biomaterials*, 2011, 32 (32): 8067-8076.
- [37] KNÖSPEL F, JACOBS F, FREYER N, et al. *In vitro* model for hepatotoxicity studies based on primary human hepatocyte cultivation in a perfused 3D bioreactor system[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2016, 17 (4): 584.
- [38] WILLIAMS D P, SHIPLEY R, ELLIS M J, et al. Novel *in vitro* and mathematical models for the prediction of chemical toxicity [J]. *Toxicology Research*, 2013, 2 (1): 40-59.
- [39] 厉海笛, 陈晓萍. 仿生微流控肝芯片研究进展[J]. *中国生*

物医学工程学报, 2018, 37(5): 625-30.

II: *in vitro* data and *in silico* models for predictive toxicology[J].

[40] KNUDSEN T B, KELLER D A, SANDER M, et al. FutureTox

Toxicological Sciences, 2015, 143 (2): 256-267.

## 综述

## 芬太尼类物质检测方法的研究进展

孙婧<sup>1,2,3</sup>, 孙洁芳<sup>2,3</sup>, 郭巧珍<sup>2,3</sup>, 邵兵<sup>1,2,3</sup>

1. 中国农业大学 动物医学院 北京食品营养与人类健康高精尖创新中心, 北京 100193;
2. 北京市疾病预防控制中心 食物中毒诊断溯源技术北京市重点实验室, 北京 100013;
3. 北京市预防医学研究中心, 北京 100020)

**摘要:** 芬太尼类物质是实验室合成的强阿片类药物, 具有成瘾性高、制备简单和变造衍生容易等特点, 流入毒品市场后在全球范围内走私和非法滥用日益严重, 且中毒剂量微小, 可引起高致死率, 对各国的公共健康带来严重威胁。对此, 2018年联合国累计规定管制了21种芬太尼类物质, 2019年中国对芬太尼类物质实行整类管制, 以应对化解食用、注射毒品问题带来的风险危害, 保障人民身心健康。基于芬太尼类物质的危害, 通过对其性质、滥用方式、实验室检测方法及现场快速检测方法等方面展开综述, 并对检测技术的发展方向进行了简要展望, 期为毒品稽查工作领域研究提供技术参考。

**关键词:** 毒品; 芬太尼类物质; 检测方法

中图分类号: R155 文献标识码: A 文章编号: 1004-8456(2021)06-0831-11

DOI: 10.13590/j.cjfh.2021.06.033

### Research progress on the detection technology of fentanyl analogues

SUN Jing<sup>1,2,3</sup>, SUN Jiefang<sup>2,3</sup>, GUO Qiaozhen<sup>2,3</sup>, SHAO Bing<sup>1,2,3</sup>

1. Beijing Advanced Innovation Center for Food Nutrition and Human Health, College of Veterinary Medicine, China Agricultural University, Beijing 100193, China;
2. Beijing Key Laboratory of Diagnostic and Traceability Technologies for Food Poisoning, Beijing Center for Disease Prevention and Control, Beijing 100013, China;
3. Beijing Research Center for Preventive Medicine, Beijing 100013, China)

**Abstract:** Fentanyl analogues are laboratory-synthesized strong opioids with high addictive properties, simple preparation and easy derivatization. Their introduction to the drug market has shown increasing smuggling and illicit abuse worldwide. In addition, the toxic dose of fentanyl analogues is small, which can cause high mortality and pose a serious threat to public health in various countries. In this regard, 21 fentanyl-related substances were controlled by the United Nations cumulative regulations in 2018, and the Chinese government implemented the whole class control of fentanyl-related substances in 2019 in order to deal with the risk and harm caused by the problem of eating and injecting drugs, and protect people's physical and mental health. Based on the social harmfulness of fentanyl analogues, we reviewed their properties, abuse method, laboratory detection and on-site rapid detection method. The development of detection technology and method is also briefly prospected in order to provide technical reference for drug inspection research.

**Key words:** Drugs; fentanyl analogues; detection methods

目前, 国际上毒品滥用问题凸显, 《2021年世界

毒品问题报告》显示: 2020年全球约有2.75亿人使用毒品, 与其他毒品相比, 阿片类药物的非法使用对健康造成更大的负面影响<sup>[1-2]</sup>。芬太尼类物质是基于芬太尼化学结构修饰的强阿片类药物, 其麻醉和镇痛效果约是吗啡的50~10 000倍<sup>[3-4]</sup>, 具有成瘾性高、制备简单和变造衍生容易等特点。该类物质进入人体后主要作用于 $\mu$ 阿片受体, 从而产生轻松欢欣感, 但过量使用会引起呼吸中枢抑制, 造成严重后果。2010

收稿日期: 2021-10-08

基金项目: 国家重点研发计划(2018YFC1602700); 国家自然科学基金(U1736201)

作者简介: 孙婧 女 博士生 研究方向为食品中危害因子检测分析 E-mail: sunjingwir4sj@163.com

通信作者: 邵兵 男 研究员 研究方向为食品污染物分析 E-mail: shaobingch@sina.com