

# 原代肝细胞的分离培养及其在药物研发中的应用

## Separation and Primary Cultivation of Hepatocytes and its Application in Drug Research and Development

罗丹,刘华钢

LUO Dan, LIU Hua-gang

(广西医科大学药理学教研室,广西南宁 530021)

(Department of Pharmacology, Guangxi Medical University, Nanning, Guangxi, 530021, China)

**摘要:**原代肝细胞分离培养无需特殊装置,易于开展,且排除了血液、神经、体液等因素的影响,生长环境易于人工严格控制。利用原代肝细胞进行体外实验,与其他体外及体内实验方法相比,有自身显著的优点。原代肝细胞模型是药效筛选、毒性筛选、药物代谢与生物转化、药物相互作用、药物致癌性检测的理想模型,为新药研究提供重要的参考资料,提高了新药研发的效率。随着实验方法和实验技术的不断成熟,原代肝细胞在药物研发中将有着更加广泛的应用。

**关键词:**肝细胞 原代培养 体外筛选 药物代谢

**中图分类号:**R965.1 **文献标识码:**A **文章编号:**1005-9164(2006)04-0334-04

**Abstract:** The separation and primary cultivation of hepatocytes is not only easy to be operated without special equipments, but also eliminates the influences of blood, neuron, humor etc. and the culture condition is easy to control strictly. Comparing with other methods both in vitro and in vivo, primary hepatocytes have their own advantages. The isolated hepatocytes model is also an ideal in vitro model for drug action screening, toxicity screening, drug metabolism and biotransformation, drug interactions, drug carcinogenicity, providing the important datum and raising the efficiency in new drug research. With the development of the isolated technique and culturing method, primary hepatocytes are more widely used in the drug R&D.

**Key words:** hepatocyte, primary culture, screening in vitro, drug metabolism

生命科学的迅速发展,使人们对潜在药物靶点、内源性配体和底物的化学结构有了更多的认识。化学工作者运用组合化学技术在计算机的辅助下,为发现新药提供了大量的系列新化合物实体(New Chemical Entities, NCEs)<sup>[1]</sup>。传统的动物体内试验方法不仅耗费大量人力财力,而且实验周期长,因此,如何快速对NCEs进行生物活性和毒性检测成为人们研究热点。近年来,利用体外培养肝细胞对NCEs进行生物活性、毒性评价、代谢特点等方面的研究已经广泛应用于药物研发过程中。本文就原代肝细胞的分离及原代培养和原代肝细胞在药物研发中的应用作简要综述。

### 1 原代肝细胞的分离及原代培养

分离培养肝细胞技术的发展已有几十年的历史,目前以大鼠、小鼠、猴、猪、狗、兔、鸭等作为肝源的原代培养肝细胞已广泛用于医学各领域<sup>[2]</sup>。体外分离培养人肝细胞最接近体内肝脏生理环境,但来源有限。

#### 1.1 肝细胞的分离技术

肝细胞分离技术主要有机械法、螯合法、酶消化法。早在20世纪40年代人们就开始通过剪碎、挤压、震荡等机械方法分离肝细胞,但这些方法对细胞损伤严重,获取的肝细胞数量少且活性低。随后,人们又尝试用EDTA(乙二胺四乙酸二钠)、EGTA(乙二醇-双-(2-氨基乙基)四乙酸)等螯合剂来分离肝细胞但效果仍不理想。20世纪60年代中期Howard等结合机械法和酶消化法成功分离活性较好的肝细胞,后经

收稿日期:2006-06-06

修回日期:2006-10-12

作者简介:罗丹(1980-),男,江苏邗江人,硕士研究生,主要从事抗肿瘤新药研究与开发工作。

Seglen 进一步完善,形成了经典的两步胶原酶灌流法<sup>[3]</sup>。

### 1.1.1 常用的分离方法

目前,文献报道各种分离方法多为在 Seglen 法的基础上的改良,主要内容为:先从门静脉用预热的无钙、含氧及螯合剂的前灌流液,冲出血细胞和钙离子,再用含胶原酶的后灌流液灌流至组织软化,除去被膜、撕碎、过滤、低速离心、清洗获得细胞测定活性<sup>[4]</sup>。可用 Percoll 密度梯度分离液进一步纯化肝细胞,纯化后获得的肝细胞纯度可达 90% 以上<sup>[5]</sup>。

### 1.1.2 肝细胞分离应注意的问题

目前常用的肝细胞分离方法由于操作环节多,技术要求高,易污染等多方面原因而常导致分离失败。因此在分离过程中需要注意以下几点:(1)灌注前的肝素化。肝内凝血常导致灌流阻力大,延长灌注时间,降低胶原酶消化效果,导致肝细胞产量和活力下降。供肝体在门静脉插管前先肝素化抗凝,可以有效的防止肝内凝血,使肝脏充分灌注消化,提高肝细胞产率<sup>[6]</sup>。(2)门静脉灌注。由于门静脉血管较细插管困难,有人用下腔静脉、腹主动脉等插管灌注,也获得成功<sup>[7]</sup>。但由于门静脉供应肝脏约 3/4 的血液,显然门静脉灌注在产量和活性方面是优于其他灌注方法的。(3)灌流液的配制及灌流条件的控制。前灌流液通常为含 EDTA 的无钙缓冲液,后灌流液通常含胶原酶 II 型或 IV 型的缓冲液,消化酶的浓度一般在 0.05%~0.1%,可以循环使用;前后灌流液的灌流时间过短达不到效果,过长则使得肝细胞缺血缺氧时间过长而影响分离活性;灌流速度不能过快,否则,会由于冲击力造成机械损伤;灌流液的温度通常为 37℃,这也是胶原酶的工作温度<sup>[6]</sup>。通常在灌流液中加入适量 HEPES 以稳定灌流液的 pH 值,使得在灌注过程中的肝细胞稳定于生理范围内。

## 1.2 原代肝细胞的培养

肝细胞属于高度分化的类上皮细胞,在体内与其他细胞及细胞外基质共同维持肝脏的三维结构,分离出的肝细胞离开体内微环境,极易失去肝细胞的特异性功能而去分化甚至死亡。因此,肝细胞培养的关键在于培养微环境中的可溶性因子、培养基质的成分和构象<sup>[8]</sup>。此外,培养液的温度、pH 值、渗透压、各种添加物等也是重要的影响因素。

### 1.2.1 培养方法

肝细胞的培养方法主要有单层培养法和悬浮培

养法两种。

1.2.1.1 单层培养法 这种方法是由培养器皿提供平面支架,供分离出有活性的肝细胞增殖、分化。直接种植于培养器皿表面的肝细胞不易贴壁,存活数量少,特异性功能维持时间短。众多研究表明<sup>[8]</sup>,在提供细胞外基质的条件下,肝细胞可形成特定的形态,表现出完整的特异性功能。由此产生了单层胶培养技术和双层胶培养技术(又称为三明治培养法),这两种技术可明显延长肝细胞存活时间,并长期保持白蛋白分泌及细胞色素 P450 的活性<sup>[8]</sup>。

1.2.1.2 悬浮培养法 这是高密度、长期培养肝细胞的方法。常见的技术有:载体粘附培养法、球形聚集培养法、微囊肝细胞培养法、中空纤维管培养法<sup>[9]</sup>。这些方法都是根据肝细胞的生长特性,配合高分子材料,尽可能的提供给肝细胞接近于体内的生存环境,从而获得大量、高密度、特异性功能好的肝细胞。

### 1.2.2 培养介质

肝细胞培养介质由基础培养基与各种添加物构成,常用的基础培养基有 RPMI1640、DMEM、Williams'E、M199、Leibovitz15 等。国内实验室常在基础培养基中加入血清促进肝细胞增殖<sup>[10]</sup>。国外学者则多采用无血清培养基以避免血清对纤维细胞生长的促进作用<sup>[11]</sup>。如 Hepatozyme-SFM 是专门为大鼠、猴等原代肝细胞培养而设计的无血清培养基,在促肝细胞贴壁、维持肝细胞形态和功能及抑制非肝实质细胞生长方面优点突出。常用的化学添加物种类较多,应根据研究目的不同选取。如各种氨基酸、激素、生长因子、烟碱、抗坏血酸、苯巴比妥、微量元素等有利于肝细胞增殖及功能维持,2% 的 DMSO(二甲基亚砷)对肝细胞的诱导分化功能作用明显<sup>[12]</sup>。

## 2 原代肝细胞在药物研发中的应用

培养体系中的肝细胞可以很好的模拟体内肝脏的生理环境,在研究外源性化合物的生物活性、毒性、毒理机制、代谢命运和致癌性检测等方面有许多优势,被认为是药物临床前毒性检测的可靠模型<sup>[13]</sup>。

### 2.1 肝细胞在药物活性筛选方面的应用

目前,原代肝细胞在药效学的早期筛选方面还主要应用于保肝降酶新药,一般多是在原代肝细胞培养的基础上建立肝细胞损伤模型,再与受试化合物共同孵育一定时间,最后检测肝细胞活性。如李波等<sup>[14]</sup>采用原代培养大鼠肝细胞 Fe<sup>2+</sup> 氧化损伤模型研究赤豆

莪果总黄酮提取物对氧化损伤肝细胞的抗氧化保护作用。孙燕荣等<sup>[15]</sup>采用四氯化碳肝损伤模型,通过检测二咖啡奎宁酸对受损肝细胞增殖及凋亡的影响证明其保护作用。倪秀雄等<sup>[16]</sup>检测了肝细胞刺激因子对环磷酰胺所致原代小鼠肝细胞损伤的保护作用,讨论了肝细胞刺激因子作为一种高效的肝细胞特异性保护剂应用于临床化疗的可能性。近年来,HBV(乙型肝炎病毒)感染的原代肝细胞模型用于抗肝炎药物筛选的研究也成为热点。Kock 等<sup>[17]</sup>去感染树鼯原代肝细胞获得理想的病毒感染效率。黄正明等<sup>[18]</sup>利用鸭乙肝病毒(DHBV)感染后的雏鸭分离培养原代肝细胞获得 DHBV-DNA 阳性的鸭原代肝细胞,为抗肝炎药物筛选提供了细胞活性和细胞内 DHBV-DNA 两个比较理想的客观指标。

## 2.2 肝细胞在药物毒性筛选方面的应用

肝细胞的代谢功能使其对外源性化合物的毒性较其他细胞更为敏感,故肝细胞是体外毒性筛选主要对象<sup>[19]</sup>。对于 NCEs 的毒性筛选常先用建株细胞了解其大致毒性范围,然后用原代肝细胞进行毒性筛选<sup>[19]</sup>。常用的衡量肝毒性的指标较有:(1)细胞形态学方面可通过普通显微镜观察药物作用后细胞形态的改变,电子显微镜下观察药物作用后各细胞器的改变,流式细胞仪检测药物作用后细胞核的形态改变、染色质的折叠情况及 DNA 的完整性<sup>[20]</sup>。(2)细胞膜的完整性最常用的是通过 LDH 的检测<sup>[19]</sup>。<sup>51</sup>Gr 的释放和细胞色素 C 的释放是细胞凋亡的检测指标同时也反映了细胞膜的完整性<sup>[21]</sup>。细胞内离子 K<sup>+</sup>、Na<sup>+</sup>、Ca<sup>2+</sup> 的水平反映了细胞的通透性<sup>[22]</sup>。(3)细胞活率,台盼蓝染色、MTT 法、<sup>[3</sup>H]-TdR 法都是检测细胞活率的方法<sup>[22]</sup>。(4)肝细胞的生物转化及代谢指标,ATP 含量、白蛋白合成、胆固醇和脂蛋白的合成、CYPs 水平和活性、血清酶(GOT、GPT 等)水平、过氧化脂质等都可以从不同角度反映肝细胞的状态<sup>[19]</sup>。

## 2.3 原代肝细胞在药物代谢方面的应用

经过初期筛选,生物活性好、毒性低的化合物需继续进行代谢途径、消除速率、相关酶的诱导和抑制、药物间的相互作用方面的研究,全面了解这些化合物的代谢特征。而肝细胞是评价外源性化合物很好的体外模型,尤其在代谢途径和消除速率方面与体内肝脏代谢有可比性<sup>[23]</sup>。通过体外简单、快速获得这些化合物的代谢资料以推断这些化合物在人体内是否安全有效。进入体内的外源性化合物多数在肝脏进行生物

转化,形成各种代谢产物,这些代谢产物或是产生药理效应或是产生毒性作用。Stephanie 等<sup>[24]</sup>利用新鲜分离的鼠肝细胞检测了香豆素的代谢产物,发现香豆素经肝细胞代谢产生的香豆素环氧化物和该环氧化物的代谢产物 o-羟苯乙醛是引起肝毒性的主要原因。Yoshihiro 等<sup>[25]</sup>利用新鲜分离的肝细胞考察了十几种化合物的体外清除率,并与体内血浆清除率比较,发现两种方法一致性较好,在药物研发中有很好的应用前景。

近年来,一些投入巨额资金、历时十几年开发出的新药上市后,由于药物间代谢相互作用而撤出市场,不仅给患者带来极大的危害,也给企业造成巨大损失<sup>[26]</sup>。因此,药物间代谢性相互作用的研究越来越受到人们的重视。而临床前通过人肝细胞研究药物代谢性相互作用,预测药物体内相互作用过程,被认为是最佳的试验系统<sup>[27]</sup>。药物对 CYPs 的诱导和抑制是药物代谢相互作用的主要机制,目前研究多集中于此。Seva 等<sup>[28]</sup>利用人肝细胞证明了抗癫痫药苯巴比妥(PB)或苯妥英(PH)能够增加解热镇痛药对乙酰氨基酚(APAP)的肝毒性,并证明了 PB 或 PH 通过对 CYP 的抑制减少了 APAP 的糖脂化,使 APAP 的羟化代谢产物增多,进而增加了肝毒性。通过体外试验预测体内相互作用过程用于药物开发过程中的应用,将大大减少药物上市后因为严重相互作用而导致的严重后果。

## 2.4 原代肝细胞在药物致癌性检测方面的应用

用原代肝细胞检测 NCEs 的致癌性,属于遗传毒理学方面的研究内容,目的在于发现新合成化合物是否引起机体遗传物质发生突变。在致突变试验方法中 Ames 试验是最常用的方法,其原理是利用组氨酸缺陷型的鼠伤寒沙门氏菌突变株检测受试物是否可使突变型鼠伤寒沙门菌株回复为野生型。Staiano 等<sup>[29]</sup>于 1983 年巧妙的将 Ames 标准测试菌株 TA98 与大鼠肝细胞共同孵育,首次建立了一种原核真核检测体系,通过利用肝细胞的代谢作用,模拟了体内化合物经过肝脏生物转化后的代谢产物引起 TA98 的突变回复情况,研究者利用乙酰氨基苄衍生物检测时发现引起培养体系中的原代肝细胞被高分化的鼠肝癌细胞所取代,原因是该种化合物引起了原代肝细胞的 DNA 链的断裂并且造成剂量依赖性。这一方法随后成为检测新药遗传毒性的常用方法,如 Reyes 等<sup>[30]</sup>利用这一体系,检测了新抗阿米巴药的遗传毒性。21

世纪,基因组学技术的发展扩展了原代肝细胞在体外检测新药遗传毒性的应用前景,并以其省时、高效、精确度高等优点成为目前的研究热点。Beekman 等<sup>[23]</sup>通过抗组胺药噻吩甲吡胺作用于鼠原代肝细胞在不同实验室和使用不同统计学方法的基因组学检测的比较研究中,认为原代肝细胞模型具有良好的药物潜在毒性预测作用。体外原代肝细胞研究化合物致癌性的应用目前还存在一些不同观点,但此法应用前景较好,值得深入研究。

### 3 结束语

原代肝细胞分离无需特殊装置,易于开展,且排除了血液、神经、体液等因素的影响,生长环境易于人工严格控制,兼备体外试验和整体动物试验的优点。原代肝细胞培养技术的不断发展,使得肝细胞在体外能够保持更好的活性及功能。同时,冻存技术的不断成熟,增加了肝细胞试验的灵活性、最大限度的利用了有限的肝源(如人肝)、保证了试验的可重复性。随着实验方法和实验技术的不断成熟,原代肝细胞在药物研发中将有着更加广泛的应用。

#### 参考文献:

- [1] BURBAUM J J. Miniaturization technologies in HTS: how fast, how small, how soon [J]. *Drug Discovery Today*, 1998, 3(7): 313-322.
- [2] BATTLE T, STACEY G. Cell culture models for hepatotoxicology [J]. *Cell Biology and Toxicology*, 2001, 17(4-5): 287-299.
- [3] SEGLEN P O. Preparation of isolated rat liver cells [J]. *Methods Cell Biology*, 1976, 13: 29-83.
- [4] FRANZISKA BOESS, MARKUS KAMBER, SIMONA ROMER, et al. Gene expression in two hepatic cell lines, cultured primary hepatocytes, and liver slices compared to the in vivo liver gene expression in rats: possible implications for toxicogenomics use of in vitro systems [J]. *Toxicological Sciences*, 2003, 73(2): 386-402.
- [5] BERNARD J, REGINALD FRYE, TIMOTHY S, et al. Induction and inhibition of cytochromes P450 by the ST John's Wort constituent hyperforin in human hepatocyte cultures [J]. *Drug Metabolism and Disposition*, 2004, 32(5): 512-518.
- [6] 姚云清, 张定风, 黄爱龙, 等. 低浓度胶原酶原位循环灌注法用于原代大鼠肝细胞分离 [J]. *现代医药卫生*, 2001, 17(2): 84-85.
- [7] 陈慧梅, 廖红, 高静. 肝细胞培养方法研究进展 [J]. *细胞生物学杂志*, 2002, 24(3): 163-166.
- [8] YINGJIE WANG, HONGLING LIU, HAITAO GUO, et al. Primary hepatocyte culture in collagen gel mixture and collage sandwich [J]. *World Journal of Gastroenterology*, 2004, 10(5): 699-702.
- [9] TOH Y C, NG S, KHONG Y M, et al. A configurable three-dimensional microenvironment in a microfluidic channel for primary hepatocyte culture [J]. *Assay and Drug Development Technologies*, 2005, 3(2): 169-176.
- [10] 周星辉, 王丙力, 谭焕然. 大鼠肝实质细胞原代培养模型的研究及其功能鉴定 [J]. *中国临床药理学与治疗学*, 2005, 10(7): 743-746.
- [11] ROBERT J, THOMAS, RENA BHANDARI, DAVID A BARRETT, et al. The effect of three-dimensional co-culture of hepatocytes and hepatic stellate cells on key hepatocyte functions in vitro [J]. *Cells Tissues Organs*, 2005, 181(2): 67-79.
- [12] 徐哲, 白雪帆, 黄长彤. 肝细胞原代培养的常用添加物 [J]. *国外医学: 流行病学传染病学分册*, 2002, 29(6): 356-359.
- [13] MATHIEU V, PEGGY P, SARAH S, et al. Involvement of cell Junction in hepatocyte culture functionality [J]. *Critical reviews in toxicology*, 2006, 36(4): 299-318.
- [14] 李波, 赵青威, NADINE WEBER, 等. 赤豆荚果黄酮提取物对原代培养大鼠肝细胞氧化损伤的保护作用 [J]. *营养学报*, 2005, 27(5): 397-405.
- [15] 孙燕荣, 董俊兴, 吕秋军, 等. 二咖啡酰奎宁酸对大鼠肝原代细胞保护作用的研究 [J]. *解放军药理学学报*, 2004, 20(2): 81-84.
- [16] 倪秀雄, 姚琦, 黄自强, 等. 肝细胞刺激因子对环磷酰胺致小鼠肝细胞损伤的保护作用 [J]. *福建医科大学学报*, 2004, 38(2): 155-157.
- [17] KOCK J, NASSAL M, MACNELLY S, et al. Efficient infection of primary Tupaia hepatocytes with purified human and woolly monkey hepatitis B virus [J]. *Journal of Virology*, 2001, 75(11): 5084-9.
- [18] 黄正明, 杨新波, 曹文斌, 等. 乙型肝炎体外实验模型的方法学研究 [J]. *解放军药理学学报*, 2005, 21(6): 433-436.
- [19] GUILLOUZO A. Liver cell models in vitro toxicology [J]. *Environmental Health Perspectives*, 1998, 106(2): 511-532.
- [20] STEFAN WILKENING, FRANK STAHL, AUGUSTINUS BADER. Comparison of primary human hepatocytes and hepatoma cell line HepG2 with regard to their biotransformation properties [J]. *Drug Metabolism and Disposition*, 2003, 31(8): 1035-1042.
- [21] COMEZ-LECHON M J, O CONNOR E, CASTELL J V, et al. Sensitive markers used to identify compounds that trigger apoptosis in cultured hepatocytes [J]. *Toxicological Sciences*, 2002, 65(2): 299-308.

(下转第 341 页 Continue on page 341)

概率的情况下,具有十字交叉路口的车道车辆密度在红绿灯信号周期较短时,车道车辆密度较高,此时车辆拥堵严重,如延长红绿灯信号周期或允许车辆在交叉路口转向行驶,可降低车辆密度,改善交通状况,达到科学管理和有效控制车流的高效运行。

#### 参考文献:

- [1] BIHAM O, MIDDLETON A, LEVINE D. Self-organization and a dynamic transition in traffic-flow models[J]. *Phys Rev A*, 1992, 46: R6124-R6127.
- [2] CHOWDHURY D, SCHADSCHNEIDER A. Self-organization of traffic jams in cities: effects of stochastic dynamics and signal periods[J]. *Phys Rev E*, 1999, 59: R1311-R1314.
- [3] NAGEL K, SCHRECKENBERG M. A cellular automaton model for freeway traffic [J]. *J Phys I (France)*, 1992, 2: 2221-2229.
- [4] BROCKFELD E, BARLOVIC R, SCHADSCHNEIDER A, et al. Optimizing traffic lights in a cellular automaton model for city traffic[J]. *Phys Rev E*, 2001, 64: 056132
- [5] TAN H L, ZHANG C Y, KONG L J, et al. Traffic flow influenced by traffic light and turning probability for a

crossroad[J]. *Int J Mod Phys B*, 2004, 18(17-19): 2658-2662.

- [6] 谭惠丽, 黄兵花, 李华兵, 等. 交通灯控制下主干道的交通流研究[J]. *物理学报*, 2003, 52(5): 1127-1131.
- [7] 杨青勇, 谭惠丽, 孔令江, 等. 元胞自动机双车道模型耦合效应研究[J]. *广西科学*, 2003, 10(1): 18-20.
- [8] 彭麟, 吴大艳, 刘贵泉, 等. 一维交通流元胞自动机 NS 模型的统计解耦处理[J]. *广西科学*, 2005, 12(1): 35-38.
- [9] CHEYBANI S, KERTÉSZ J, SCHRECKENBERG M. Nondeterministic Nagel-Schreckenberg traffic model with open boundary condition [J]. *Phys Rev E*, 2000, 63: 016108.
- [10] 薛郁, 董力耘, 戴世强. 一种改进的一维元胞自动机交通流模型及减速概率的影响[J]. *物理学报*, 2001, 50: 445-449.
- [11] 谭惠丽, 刘慕仁, 孔令江. 开放边界条件下改进的 Nagel-Schreckenberg 交通流模型的研究[J]. *物理学报*, 2002, 51(12): 2713-2718.

(责任编辑: 韦廷宗 邓大玉)

(上接第 337 页 Continue from page 337)

- [22] 蔡燕, 宫丽崑, 任进. 肝脏体外模型及其在毒理学方面的应用[J]. *中国药理学与毒理学杂志*, 2004, 18(5): 390-395.
- [23] JUSTINE L LAM, LESLIE Z BENET. Hepatic microsome studies are insufficient to characterize in vivo hepatic metabolic clearance and metabolic drug-drug interactions: studies of digoxin metabolism in primary rat hepatocytes versus microsomes[J]. *Drug Metabolism and Disposition*, 2004, 32(11): 1311-1316.
- [24] BORN S L, HU J K, LEHMAN-MCKEEMAN L D, et al. *O*-Hydroxyphenylacetaldehyde is a hepatotoxic metabolite of coumarin [J]. *Drug Metabolism and Disposition*, 2000, 28(2): 218-223.
- [25] YOSHIHIRO S, HIROYUKI T. A convenient in vitro screening method for predicting in vivo drug metabolic clearance using isolated hepatocytes suspended in serum [J]. *Drug Metabolism and Disposition*, 2000, 28(12): 1518-1523.
- [26] 赵冬梅, 李燕, 卢业斌. 药物代谢研究在新药开发中的作用[J]. *药学学报*, 2000, 35(2): 156-160.
- [27] GOMEZ-LECHON M J, DONATO M T, CASTELL J V, et al. Human Hepatocytes in primary culture: the choice to investigate drug metabolism in man [J].

*Current Drug Metabolism*, 2004, 5(5): 443-462.

- [28] KOSTRUBSKY S E, SINCLAIR J F, STORM S C, et al. Phenobarbital and phenytoin increased acetaminophen hepatotoxicity due to inhibition of UDP-Glucuronosyltransferases in cultured human hepatocytes [J]. *Toxicological Sciences*, 2005, 87(1): 146-155.
- [29] STAIANO N, ERICKSON L C, SMITH C L, et al. Mutagenicity and DNA damage induced by arylamines in the Salmonella/hepatocyte system[J]. *Carcinogenesis*, 1983, 4(2): 161-167.
- [30] REYES-LOPEZ M, VILLA-TREVINO S, ARRIAGA-ALBA M, et al. The amoebicidal aqueous extract from *Castela texana* possesses antigenotoxic and antimutagenic properties [J]. *Toxicology in Vitro*, 2005, 19(1): 91-97.
- [31] BEEKMAN J M, BOESS F, HILDEBRAND HEINRICH, et al. Gene expression analysis of the hepatotoxicant methapyrilene in primary rat hepatocytes: an interlaboratory study [J]. *Environmental Health Perspectives*, 2006, 114(1): 92-99.

(责任编辑: 韦廷宗)