

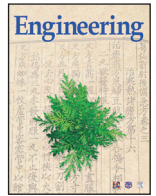


ELSEVIER

Contents lists available at ScienceDirect

Engineering

journal homepage: www.elsevier.com/locate/eng



Research
Traditional Chinese Medicine—Review

中药安全性研究——方法、应用与前景

高月^{a,*}, 梁爱华^b, 范晓辉^c, 胡利民^d, 郝斐然^a, 李遇伯^d

^a Institute of Radiation Medicine, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100850, China

^b Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China

^c Pharmaceutical Informatics Institute, College of Pharmaceutical Sciences, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China

^d Tianjin State Key Laboratory of Modern Chinese Medicine, School of Chinese Materia Medica, Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300193, China

ARTICLE INFO

Article history:

Received 11 July 2018

Revised 6 November 2018

Accepted 15 November 2018

Available online 11 January 2019

关键词

中药

安全性

方法和技术平台

毒性

机制

摘要

在 2000 多年的历史长河中, 中医药体系收集和汇总了丰富的临床经验。但是, 在其越来越吸引世界关注的同时, 中药不良反应的频繁发生阻碍了中药的现代化和国际化进程。不同于化学药品和生物制剂, 中药毒性和安全性研究的难点主要在于其成分的复杂性和药物-机体相互作用的不可预测性。大多数有总体疗效的中药均具有多成分、多途径和多靶点的典型机制。考虑到中药毒性的渐进性和不可预测性、毒素和安全剂量的模糊性以及长时间中药给药的个体差异, 笔者系统地建立了针对中药毒性评价的关键技术。这些技术主要包括在早期阶段结合药物毒理基因组学和代谢组学发现中药毒性、中药剂量与毒性关系的鉴定方法, 以及探索中药相互作用的综合技术, 例如根据药物代谢酶和受体途径进行快速筛选测试。特别地, 笔者提出了一种利用分子毒理学评价中药安全性的新技术体系, 该体系已经在中药配伍禁忌、质量控制和过敏原发现等研究中得到了很好的验证。本文将详细介绍这种关键技术平台的应用, 其应用包括模式生物、毒物生物标志物、磁悬浮技术以及在川楝子 (*Fructus toosendan*)、决明子 (*Semen cassiae*)、何首乌 (*Polygonum multiflorum*) 和补骨脂 (*Fructus psoraleae*) 的毒性研究中应用的网络毒理学和计算毒理学。

© 2018 THE AUTHORS. Published by Elsevier LTD on behalf of Chinese Academy of Engineering and Higher Education Press Limited Company This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

1. 引言

中药的首次临床应用距今已有2000多年的历史。在此期间积累了丰富的用药经验。事实上, 中药品种的药材道地性、中药处理方法的规范性、药物剂型的可行性、煎药给药的规范性、安全剂量的合理性和不同体质的特异性与“四性五味”“升降沉浮”“归经”“合并用药禁忌”等原则共同形成了一套完善的中药理论和标准[1,2], 而且数千年的实践证明, 这套理论和方法是有效和科学的。然而, 中药安全事故频繁发生, 导致中药安全成为中药现

代化和国际化进程中的瓶颈——这种情况引起了中国和世界的广泛关注[3]。

为了指导新中药的安全性评价, 1993年, 中华人民共和国卫生部药物政策与管理司(2018年更名和重组为中华人民共和国国家卫生健康委员会药物政策与基本药物制度司)特组织专家团队编写了《中药新药研究指南(药理学 毒理学)》。在2005年、2007年和2008年, 国家食品药品监督管理局(2013年更名和重组为国家食品药品监督管理局, 2018年更名和重组为中华人民共和国国家市场监督管理总局国家药品监督管理局)发布了

* Corresponding author.

E-mail address: gaoyue@bmi.ac.cn (Y. Gao)

许多有关中药研究和应用的指南。2014年,国家食品药品监督管理局修订了中药相关的研究说明。随着这类说明的制定和完善,中药安全性研究更加规范且逐渐与国际标准接轨。

不同于化学药物和生物制剂的安全性评价,中药毒性和安全性研究的难点主要来自中药的复杂性和药物-机体相互作用的不可预测性。中药包含复杂的成分,这些成分通过多种途径和多个靶点发挥作用。中药中的活性成分和有毒物质相互作用、相互制约。这种复杂的相互作用系统在机体和多种成分之间呈现为一种非线性的关系。因此,药物的完整性和复杂性决定了中药毒性研究的关键环节[4-6]。

通过重点关注长时间使用中药时发生中毒的渐进性和不可预测性、中药中有毒物质的不确定性、安全剂量的模糊性、毒性机制的复杂性和不同体质的特异性,笔者首次建立了系统匹配的中药安全性研究关键技术平台。此外,笔者结合药物毒理基因组学和代谢组学构建了一种中药早期毒性发现技术[7-9]。本文还涉及针对中药剂量-毒性研究的毒性评价方法及通过快速筛选药物代谢酶和受体途径研究中药相互作用等技术[10,11]。这些综合技术,尤其是新兴的适合中药配伍禁忌、质量控制和过敏原发现研究的分子毒理学技术,构成了一套新的中药安全性评价技术体系。这些技术系统地揭示了常见的有不良反应的中药[即中药注射剂、马兜铃酸、吡咯里西啶类生物碱、重金属、外用有毒物质以及“十八反”(出于安全考虑,同一处方中不能同时使用某两味药的规律,因为共有18对这样的药物,所以称为“十八反”)]的物质基础、代谢特征、配伍禁忌和毒性发生机制。作为这项工作的结果,5味有毒中药因其外用功能而被纳入《中国药典》(2010版),并发现了10种中药注射剂的过敏性特征。这些成就极大地促进了中药分子毒理学的发展。

2. 中药安全性研究关键技术平台的建立

为了实现特定的中药毒性和安全性评价,迫切需要建立一个符合中药毒性特征的安全性评价平台。平台包含多种方法,适用于中药毒性研究的诸多方面;它包括中药毒性发现方法、中药毒理学研究的适用方法、中药相互作用的研究方法、中药减毒技术等。这个平台支持使用最前沿的尖端技术,包括基因组学、代谢组学、基于药物代谢酶和受体途径的快速筛选方法、计算毒理学以及分子毒理学。

2.1. 基于药物毒理基因组学和代谢组学的中药早期毒性发现技术

本文汇总了毒理基因组学、宏基因组测序、质谱流式细胞技术[即飞行时间质谱技术(CyTOF)]、外泌体、模式生物和代谢组学等新兴的“组学”技术,并且将这些技术与高通量测序、高内涵筛选、网络药理学等其他技术相结合。笔者结合药物毒理基因组学和代谢组学构建了早期毒性检测平台;接着利用这个平台研究了中药的早期安全性预测。基于对各种商业基因芯片的平台转移能力的系统研究,笔者提出了一种针对该平台的毒理学基因组数据整合分析方法。此方法涉及一种改进的准确度高达92%的决策森林法(IDF)。此外,在该平台上建立了基于黄曲霉毒素B₁等特定常见中药生物毒素的基因表达谱芯片检测方法;这种方法比传统的血清生化指标和组织病理学检查方法更灵敏[7-9]。

2.2. 针对中药剂量-毒性研究的急性毒性评估方法

采用常见的毒理学和生物信息学相关方法,首次提出了针对中药剂量-毒性关系研究的急性毒性评价方法。目前常用的毒性评价方法不适合中药剂量-毒性关系的研究。本文以“十八反”为研究对象,以小鼠死亡率为研究指标。分别以1:1配伍、27均匀设计和剂量固定的半数致死量(LD₅₀)开展急性毒性实验。结果显示,1:1配伍实验提供的实用数据太少;与之相反,27均匀设计实验产生了充足的配伍毒性数据,但这些数据过于庞大、分散,不适合分析和汇总。在不同配伍条件下,固定剂量的半数致死量实验不仅获得了与1:1配伍和27均匀设计实验相同的数据,还提供了可用于增减毒性的配伍比例,所以这种实验方法最适合中药的剂量-毒性研究[12,13]。因此,该实验对中药配伍毒性评价方法的研究贡献最大。

2.3. 基于药物代谢酶和受体途径研究中药相互作用的快速筛选方法

利用相关的分子生物学方法,提出了基于孕烷X受体(PXR)-CYP3A4、组成型雄甾烷受体(CAR)3-CYP2B6和芳香烃受体(AhR)-CYP1A1途径研究药物相互作用的快速筛选方法。这些方法主要涉及下列内容:构建双远端增强子和近端启动子线性串联的分泌型荧光素酶报告基因;构建体外筛选的细胞系;报告基因技术的可靠性试验;以及后者在快速筛选中药化学成分相互作用中的应用。利用这些体外筛选技术,笔者筛查

了人参皂苷和乌头碱等常见的中药成分，并获得了具有潜在CYP450抑制/诱导作用的靶向化合物。这些方法能提供一种重要的适用于中药配伍毒性研究和中药配伍毒物代谢产物分析的手段[14]。

2.4. 结合计算毒理学和分子毒理学的中药毒性机制研究技术

采用相关的生物信息学方法，建立了结合计算毒理学和分子毒理学研究中药毒性机制的技术。在SuperCYP和HIT等数据库的基础上，提出了基于药物配伍规律的计算毒性方法。由于Cocktail探针药物法能自发提供多种亚酶的探针药物，因此通过测量生物样本中每种探针代谢产物的代谢速率，可以同时获得多种代谢酶的特征。在逆转录聚合酶链反应（RT-PCR）和蛋白质印迹法的基础上，提出了一种测量大鼠体内细胞色素P450亚酶活性的方法，并建立了药物相互作用平台[15-18]。

2.5. 涉及多种成分配伍的优化减毒技术

利用相关的网络毒理学方法，建立了基于知识模型和网络调控的涉及多种成分配伍的优化减毒技术。系统地分析了基于分子结构的常见药物毒性预测[定量结构-毒性关系（QSTR）]方法，发现该方法的预测能力不太理想。定量结构-毒性关系方法的问题分为3类：已知毒性机制；未知毒性机制，但已知作用模式；以及未知毒性机制、未知作用模式。提出了基于毒性机制、毒性作用模式和统计模型的系统建模预测方法，这种方法提高了药物毒性预测的准确性。研究了基于支持向量机（SVM）、 k -最近邻算法（ k -NN）和最近质心的综合毒性预测方法，并开发了能快速计算和分析中药毒物的软件。通过这种方式，建立了优化的减毒技术[19]。

2.6. 发现中药注射剂中过敏原的新方法

在相关的临床症状、病理机制和复杂细胞生物学机制的基础上，建立了一种中药注射剂的类过敏反应评价系统。基于血管通透性的增加（类过敏反应的主要病理机制），建立了大鼠和小鼠细胞模型和实验模型，从而可以快速、客观和定量地分析中药注射剂诱发的类过敏反应。通过模拟类过敏反应的某些临床症状（如皮肤改变、血压下降和呼吸困难），利用比格犬模型建立了变应原性评价方法。通过已知的阴性对照和阳性对照以及借助具有诱发临床类过敏反应风险的药物，验证了这些方法的灵敏度和可靠性。这些方法形成

了一个综合评价系统，实现了中药注射剂类过敏反应研究方法的突破。实验中，笔者首次发现和确认了青霉素类过敏反应的新机制，这一发现颠覆了青霉素过敏为I类超敏反应的传统观念。由此提出了一种新的观点，即既往青霉素过敏史并不是绝对的禁忌症[20]。

2.7. 早期靶器官毒性预测的生物标志物筛查、确认和优化方法

这些方法以大鼠为研究对象。在靶向不同器官的有毒药物给药后，病理和生化指标未见明显异常，进而筛查了早期靶器官毒性评价的内源性生物标志物。使用SVM和受试者工作特征（ROC）曲线等多元统计方法验证、优化和鉴定了最佳预测生物标志物。鉴定出心脏毒性反应的10种特异性生物标志物[如左旋肉碱和溶血卵磷脂（LPC）（14:0）][21]；鉴定出早期肾毒性的5种生物标志物[即胸苷、LPC（16:1）、LPC（18:4）、LPC（20:5）和LPC（22:5）]，同时SVM的预测率高达95.8%[22]；鉴定出肝毒性的10种早期生物标志物[如LPE（16:1）、LPC（14:0）、LPE（18:2）、LPC（16:1）]，同时SVM模型的预测率高达94.9%[23]。

2.8. 中药制剂安全性评价的体外多参数细胞成像方法

美国食品药品监督管理局（FDA）建议，通过人类细胞模型进行早期安全性筛查以减少动物实验。为了在机制上理解中药制剂诱发的副作用，将具有高通量和低成本特点的体外多参数细胞成像方法作为动物实验的替代方案。通过对HepG2和L02细胞系进行高内涵分析（使用美国马萨诸塞州沃尔瑟姆市铂金埃默公司的Operetta CLS系统），分析了中药注射剂的上市后肝毒性再评价（穿琥宁注射液、穿心莲注射液、香丹注射液、丹红注射液、苦参碱注射液）[24]。确定了线粒体膜电位、细胞膜完整性、细胞内和细胞外离子流强度、细胞膜渗透性以及细胞活力。这种方法有望成为更灵敏的中药注射剂体外肝毒性实验的理想模型。此外，笔者发现何首乌（*Polygonum multiflorum*）中的芦荟大黄素、大黄素、大黄酸和没食子酸在其浓度为 $100 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时将显著降低细胞活力。由于线粒体质量和线粒体膜电位明显增加，何首乌的肝毒性可能与经线粒体介导的细胞凋亡有关[25]。

3. 中药安全性研究关键技术平台的应用

3.1. 中药毒性的物质基础分析

中药毒物的含量通常很低，以致于难以检测；此外，

这些毒物的代谢非常复杂,且受煎药方法和时间等多种因素的影响。笔者首次建立了中药“十八反”中每对相克药物的化学指纹图谱、毒物差异指纹图谱、相关的质谱数据库和检索方法。比较了不同煎药方法[即一次煎煮、一次煎煮后组合、组合煎煮(两药共同煎煮得到提取液)、组合后煎煮(取两药分别煎煮,将提取液合并后再煎煮)]以及时间(即30 min、60 min、90 min和120 min)。根据比较结果,提出了组合煎煮和组合后煎煮更容易引起毒物结晶的观点。以人参/藜芦为例,研究发现,组合煎剂、一次煎煮后的组合煎剂以及组合后的煎剂的化学成分各有不同,其中藜芦碱、蒜藜芦碱、环巴胺、玉红介芬胺、红藜芦碱和3-当归酰棋盘花胺的含量变化很大。与一次煎煮后的组合煎剂相比,组合煎剂中含有更多蒜藜芦碱、玉红介芬胺和红藜芦碱。此外,与组合后的煎剂相比,组合煎剂中含有相当多的藜芦碱、略多的蒜藜芦碱和原人参二醇、较少的计米丁碱和3-当归酰棋盘花胺[26]。结果表明,人参和藜芦配伍毒性增加的主要原因在于蒜藜芦碱、棋盘花碱、藜芦碱等藜芦类固醇生物碱毒物的浓度增加以及人参皂苷等活性成分的浓度下降。因此,建议通过改变煎药方法和时间来降低毒性。

在煎服乌头(*Aconitum carmichaelii*)并将其分别与半夏(*Rhizoma pinelliae*)、瓜蒌(*Fructus trichosanthis*)和白芩组合时,乌头碱、中乌头碱、次乌头碱、10-OH-乌头碱、10-OH-中乌头碱和脱氧乌头碱等双酯型二萜生物碱含量显著增加。在乌头和贝母[贝母(*Fritillaria cirrhosa*)、花贝母(*Fritillaria verticillata*)]组合煎煮后,次乌头碱含量增加。乌头和川贝母的配伍毒性较低,且活性成分无明显变化。但是,乌头和黄花贝母的配伍毒性显著增加,疗效降低。这种物质基础表明乌头与川贝母可能并不相克,而这种可能性已经得到了临床验证。同时,研究发现与乌头相克的贝母是黄花贝母。半夏、瓜蒌、川贝母、白芩和白芩与乌头配伍时毒性增加的原因在于乌头碱、中乌头碱、次乌头碱、10-OH-乌头碱、10-OH-中乌头碱和脱氧乌头碱等双酯型生物碱毒物溶解物的增加和水解作用的抑制[27]。因此,本研究从化学变化的角度解释了中药配伍毒性增加(和疗效降低)的物质基础。同时,本研究为临床用药提供了重要参考。

本文制定了雄黄和朱砂等含重金属中药的安全性评价方法;研究了内脏中总砷、无机砷(iAs^{III} 和 iAs^V)和有机砷(砷胆碱、砷甜菜碱、甲基砷和二甲基砷)的分布情况,及总砷的累积特征及其与毒性的关系。研究表明,雄黄中的砷主要分布和累积在血液中,这可能是其应用于白血病治疗的作用机制之一。研究发现,雄黄中有毒的无机

砷(iAs^{III})可以迅速转化为毒性较低的二甲基砷。该结果为客观地认识雄黄的安全性提供了一些实验依据。本文进一步研究了数量、时间与毒性的关系。同时,笔者阐明了可溶性汞的分布和累积特征以及其与毒性的关系[28]。这项工作为雄黄给药的安全剂量以及安全给药时间提供了科学依据。

3.2. 系统揭示有毒中药的生物学机制

3.2.1. 马兜铃酸

国际上首次报道了马兜铃酸肾病,给中药的国际化带来了负面影响。使用建立的中药安全平台,笔者发现了一种通过诱导CYP1A2降低马兜铃酸毒性的机制。建立了针对急性肾损伤、慢性肾间质纤维化、突变和肿瘤发生的评价平台。本文研究了马兜铃酸单体关木通(*Caulis aristolochiae manshuriensis*)和龙胆泻肝丸的急性肾毒性、慢性肾毒性、致癌性。结果发现,含马兜铃酸的中药诱发了急性肾损伤、慢性肾损伤和肾肿瘤的发生。研究表明,细胞色素P450酶在含马兜铃酸的中药的毒性发生和发展中至关重要。不同细胞色素P450酶对马兜铃酸有不同的影响,这也是马兜铃酸毒性存在个体差异的主要原因。笔者首次发现,结合CYP3A4诱导物和含马兜铃酸的中药可以增强毒性,而结合CYP1A2诱导物和含马兜铃酸的中药可以降低毒性[29-32]。这一发现表明,可以通过结合CYP1A2诱导物避免或缓解含马兜铃酸的中药的药物不良反应。由此,本研究有助于实现含马兜铃酸的中药的临床合理给药。本研究也有助于消除国际上对中药的负面看法。

3.2.2. 肝毒性吡咯里西啶类生物碱

肝毒性吡咯里西啶类生物碱(HPA)广泛存在于上百种药草中。这类生物碱是毒性最高的植物性肝毒性物质。笔者建立了药物肝毒性分析和评价体系,阐明了新发现的HPA的毒性机制,从而首次证明HPA是一种复合型肝毒性物质。HPA通过直接氧化应激和间接胆汁淤积诱发肝损伤。本文发现HPA通过调控线粒体依赖型细胞凋亡诱发肝毒性的新机制。该机制阐明了利用吡咯里西啶类生物碱(PA)诱导肝毒性实验中观察到的年龄和性别差异。该机制还揭示了肝代谢酶系统、肝细胞线粒体凋亡途径、谷胱甘肽抗氧化系统和胆汁酸调节系统对HPA有重要的调节作用。本报告首次发现,在没有奥索千里光裂碱型肝毒性吡咯里西啶类生物碱代谢激活的情况下可以产生毒性。因此,这一发现再次颠覆了国际上关于HPA毒性必须经过代谢激活的观念[33-37]。

千里光 (*Senecio scandens*) 和千柏鼻炎片中均含PA, 两者的毒性均得到了系统的研究。千里光经证明具有潜在的胚胎毒性, 因此需要进一步研究其生物碱总量的毒性。本研究首次证明, 千里光的水提取物、其生物碱总量和含千里光的千柏鼻炎片均显示出显著的胚胎毒性。实验结果显示, 它们对骨骼畸形的影响非常严重[38]。这些发现表明, 千里光以及千柏鼻炎片可能对胎儿发育有潜在风险。在体外全胚胎培养系统的5个PA (野百合碱、千里光宁、倒千里光碱、千里光菲灵碱和氧化苦参碱) 治疗组中发现了明显的胚胎毒性。这5种PA通过影响尾神经管、视听嗅觉系统、颚突和肢芽等胎儿器官的形态分化引起胎儿畸形。结果发现, 倒千里光碱、千里光碱和野百合碱通过一种诱导热休克蛋白 (HSP) HSP70和HSP90表达的机制来产生胚胎毒性[39–42]。根据这些发现, 建议在妊娠期间格外重视千里光。

3.2.3. 重金属

中药中有多种矿物药含重金属。砷和汞等重金属被认为是处方的重要组成部分。一些矿物药的主要成分中含重金属, 以致于其数量超出了重金属污染的标准限值。部分中药重金属过量问题已经引起了国际关注。

本文在模拟胃酸和模拟体外肠道的条件下研究了朱砂的物种转化。通过红外光谱分析判断, 朱砂在模拟胃酸条件下的浸出物可能是 $\text{Hg}_3\text{S}_2\text{Cl}_2$ 。利用诸多成熟的谱学方法 [即红外光谱、电喷雾电离质谱 (ESI-MS)、拉曼光谱和X射线吸收光谱] 研究了模拟肠道条件下朱砂的浸出物。结果发现, 这些浸出物可能是各种汞硫复合物, 其主要成分为 $\text{HgS}_2(\text{OH})^-$ 。据推断, 活性成分可能是肠道吸收的多硫化汞复合物。通过肠道细菌将朱砂代谢为剧毒甲基汞的机会不大。大多数代谢产物是多硫化汞。利用蛋白质组学方法建立了硫化汞 (HgS) 的化学探针 (即“诱饵”), 并将其用于寻找和“钩住”神经细胞中的特异性靶向蛋白。这项实验的目的是找出朱砂的主要成分 HgS 发挥其药理作用或毒理作用的靶向蛋白[43]。

3.2.4. 乌头

根据以往的研究, 笔者发现类固醇激素的代谢途径与药物诱发的心脏毒性密切相关。因此, 笔者利用半自动高通量同位素标记衍生化超高效液相色谱/多反应监测 (UPLC/MRM) 技术平台建立了一种快速、准确、灵敏的新方法, 用于定量批样本中含有的类固醇激素[44–46]。

乌头作为一味重要的中药药物, 经常导致心律失常。

利用上述的高通量检测方法, 在乌头给药后取得大鼠心脏组织, 并将其用于蛋白质组学和代谢组学研究。研究发现, 硫酸脱氢表雄酮 (DHEA-S) 等类固醇激素与心脏毒性密切相关。进一步的功能分析显示, 肾上腺细胞中的胆固醇通过20,22-裂解酶产生孕烯醇酮, 通过17,20-裂解酶发生催化作用形成脱氢表雄酮 (DHEA); 最后, 经肾上腺素磺酸盐 (Hss) 催化形成DHEA-S。一定浓度的DHEA不仅可以抑制氧化应激血管平滑肌细胞炎症因子 [即 H_2O_2 诱导的单核细胞趋化蛋白-1 (MCP-1)] 中信使核糖核酸 (mRNA) 的表达, 还可以抑制细胞内氧化产物丙二醛的形成。这些发现表明, 可以通过DHEA的直接抗氧化机制实现其抑制作用。

3.2.5. 决明子与何首乌

曾有研究[47]发现胆汁酸代谢与药物诱发的肝损伤密切相关。取常用中药决明子的乙醇提取物管饲小鼠14 d。尽管这种提取物明显抑制了肝脏胆汁酸外排泵 (BSEP) 的表达并提高了胆汁酸浓度, 但小鼠肝脏生化标志物没有发生显著变化或者形态变化。然而, 在 α -萘甲腈诱发的小鼠胆汁淤积的小鼠模型中, 发现血液中吸收的决明子成分中的蒽醌类化合物抑制了BSEP且明显加重了胆汁淤积肝损伤。这一发现表明蒽醌类化合物是胆汁淤积的主要物质基础。在临床中, 应避免药物与带有引起胆汁淤积倾向的决明子的配伍[48]。此外, 研究显示, 何首乌提取物可以影响胆汁酸转运蛋白, 进一步加速小鼠肠道内胆汁酸的循环, 使胆汁酸代谢异常小鼠体内的胆汁淤积显著增加, 加重肝损伤。这些发现为合理的临床用药提供了依据。

3.2.6. 其他

研究揭示了甘草可以调和各种药物的分子生物学机制, 发现可以通过蛋白激酶C (PKC) 途径调节甘草和甘草酸。甘草和甘草酸可以直接激活PXR, 诱导CYP3A4基因和蛋白质的表达, 调节石胆酸与SHP、CYP7A1和CYP3A11等关键代谢基因的合成。此过程可以代谢中药中的有毒物质。通过报告基因和电泳迁移率变动分析 (EMSA) 再次证实了这一结果。甘草通过PXR对CYP3A的诱导作用加速有毒中药相关成分的代谢, 这是一个关键的环节。甘草利用CYP3A的诱导作用降低了有毒中药的效力, 进而导致相克的配伍, 笔者主要依据这一点验证了药物的相互作用[49]。这一发现揭示了数千年来中医使用甘草调和各种药物背后的科学依据。

3.3. 经典中药配伍理论的确凿证据

中药“十八反”是最具代表性的经典中药配伍禁忌理论。根据细胞色素P450酶活性、信使核糖核酸和蛋白质的表达水平以及毒物的变化,笔者首次研究了中药配伍禁忌“十八反”的科学性。一项对乌头与半夏、贝母、白芍、瓜蒌和白芩的拮抗作用的研究表明,在乌头对抗除白芍之外的其他植物药时,乌头对CYP3A和CYP1A2均有抑制作用。这种作用在瓜蒌和半夏中尤其显著,这两味中药的蛋白质和酶活性也相应地受影响。但是,乌头主要通过CYP3A和CYP1A2代谢,使CYP3A和CYP1A2的抑制作用降低了乌头碱的去除效率并增加了其在体内的接触和毒性,从而产生配伍禁忌。因此,为了避免出现基于药物代谢酶的配伍禁忌,建议谨慎使用有毒物质为CYP3A和CYP1A2基质的中药。细胞色素P450酶的抑制作用与体内瓜蒌、半夏和白芩活性的物质基础一致。本文中,配伍禁忌机制可能涉及代谢抑制,并且与毒性生物碱渗出物的增加有关。乌头碱与贝母仅在酶的代谢方面存在差异,而乌头碱与白芍仅在物质基础方面存在差异。

在藜芦与丹参(*Radix Salviae miltiorrhizae*)、苦参(*Radix Sophorae flavescens*)或人参组合时,细胞色素P450酶的数量与CYP3A和CYP2E1的活性受到不同程度的抑制。当人参参与藜芦组合时,诱导了CYP1A酶活性,其与信使核糖核酸的水平保持一致;当人参参与藜芦组合时,细胞色素P450酶与物质基础保持一致,有毒生物碱渗出物增加是配伍禁忌的主要原因;当与藜芦组合时,丹参和苦参仅抑制了CYP3A的酶活性水平。细辛(*Asarum sieboldi*)、南沙参(*Radix Adenophorae*)和玄参(*Radix Scrophulariae*)与藜芦的物质基础水平不完全保持一致。

在甘草与海藻、大戟(*Radix Euphorbiae pkinensis*)和芫花(*Flos Genkwa*)发生协同作用时,诱导了CYP3A和信使核糖核酸的表达和活性,尤其是在海藻与大戟协同时。甘草对CYP3A的诱导作用加速了相关中药毒物的代谢。这种相克作用主要反映在诱导作用导致中药药效下降。本研究首次揭示了甘遂与甘草配伍的机制。这两味药配伍后,CYP1A2和CYP2E1的活性增强,数量增加,CYP1A2和CYP2E1主要激活了与许多癌症密切相关的前致癌物和前毒物。所以这种配伍增加了患癌症的可能性。因此,本研究为临床应用提供了重要的理论依据。

根据肾上腺髓质分泌儿茶酚胺的事实,笔者首次揭示了左金丸寒热药配伍的科学性及其减毒增效机制。以经典的左金丸寒热药配伍为研究对象。黄连通过抑制细胞内钙离子的浓度抑制乙酰胆碱、藜芦碱和钾刺激的高水平儿茶酚胺的分泌。吴茱萸通过增加细胞内钙离子的浓度诱导儿

茶酚胺的分泌。在黄连对抗吴茱萸(6:1)时,黄连强烈对抗肾上腺髓质细胞的儿茶酚胺分泌和细胞内钙离子的浓度。因此,本研究为寒热药配伍的临床应用提供了科学依据。

笔者根据靶器官毒性的代谢组学数据独立开发了Ma-Tox Pre软件[1-3,50-52]。当前的v1.0版本(软件注册码:2016SR154181)支持肝、心脏和肾毒性的早期预测。以“十八反”中半夏、瓜蒌、贝母和白芩对抗乌头为研究对象,使用MaTox Pre软件搜索乌头的心脏毒性;在其他单味药中未找到心脏毒性的结果。此外,乌头与其他单味药的组合显示心脏毒性增加[53,54]。

3.4. 促进创新药物的研发

可以在建立的关键技术平台上进行创新药开发。本文筛选和研究了各种中药和复方的有效部位和组成。通过这种方式,笔者发现了11种代表中药早期毒性的化合物,包括人参皂苷F2、五味子甲素和靛蓝。这些化合物中,每种均可以通过PXR激活。这一发现降低了新药因安全问题而惨遭淘汰的风险。在毒性一般评价和关键技术平台的基础上,本文对新药进行了103次安全性评价,从而促进了创新药物的开发进程。

4. 中药安全性研究的未来展望

中药安全性评价不是一项轻松的任务,它仍有很长的路要走。需要建立一套重视中药安全性评价的科学体系,特别是需要更深入地研究通过中药配伍和加工降低毒性。需要进一步讨论中药配伍和加工中化合物变化的规律以及中药配伍、加工和毒性效应之间的关系。相关部门应制定中药安全性研究的总体方案。对于经常使用的中药和其他化合物,应逐步开展创新的、精心设计的和系统的安全性研究。最后,应建立控制中药毒性的体系以及指导临床用药和新药开发的技术体系。

Compliance with ethics guidelines

Yue Gao, Aihua Liang, Xiaohui Fan, Limin Hu, Feiran Hao, and Yubo Li declare that they have no conflict of interest or financial conflicts to disclose.

References

- [1] Wang G, Sheng L, Wang X. Ideas and methods in the research of four properties

- and five tastes. *Chin J Mod Drug Appl* 2013;7(19):235–7. Chinese.
- [2] Li W, Zhang X, Sui F, Dai L, Huo H, Jiang T. Study progress on natures and tastes of Chinese herbs. *Chin J Exp Tradit Med Formulae* 2015;21(12):227–30.
- [3] Ng AWT, Poon SL, Huang MN, Lim JQ, Boot A, Yu W, et al. Aristolochic acid and their derivatives are widely implicated in liver cancers in Taiwan and throughout Asia. *Sci Transl Med* 2017;9(412):eaan6446.
- [4] Wang Y, Li C, Qiu Q, Guo S, Han J, Wu Y, et al. Study of collaborative evaluation system on synergistic pharmacological effect of Chinese formula with multicomponents and multi-targets. *Sci Sin Vitae* 2016;46(8):1029–32. Chinese.
- [5] Zhang J. Chinese traditional medicine is characterized by inducing multi-target effects. *Chin J Pharmacol Toxicol* 2015;29(S1):3. Chinese.
- [6] Zeng KW, Tu PF. Recent progress on the methodology for target study of traditional Chinese medicine. *Sci Sin Chim. Epub* 2018 Sep 5. Chinese.
- [7] Han L, Wang Y, Yue G. Application of pregnane X receptor's regulation of induction of cytochrome P-450 CYP3A to incompatibility of traditional Chinese medicine and toxicity predetermination. *Chin J Pharmacol Toxicol* 2015;6:967–72. Chinese.
- [8] Chao H, Tang X, Jie L, Liang Q, Wang Y, Ma Z, et al. Metabonomics study of aqueous extract of *Fructus psoraleae* on serum of rats based on UPLC/QTOF-MS. *Pharmacol Clin Chin Materia Medica* 2016;32(1):22–6.
- [9] Wang Y, Feng Q, He P, Zhu L, Chen G. Genomics approach of the natural product pharmacology for high impact diseases. *Int J Genomics* 2018;2018:9468912.
- [10] Wen L, Wei F. Relationship among dosage, effect and toxicity of the ingredients in a Chinese herbal formula. *Chin J Exp Tradit Med Formulae* 2009;15(5):84–7. Chinese.
- [11] Ma ZC, Wang YG, Tan HL, Liang QD, Xiao CR, Tang XL, et al. Interactions between drug metabolizing enzymes and traditional Chinese medicine. *World Chin J Digestion* 2016;24(7):994–1001.
- [12] Zhang X, Wang Y, Liang Q, Ma Z, Xiao C, Tan H, et al. The correlation between chemical composition, as determined by UPLC-TOF-MS, and acute toxicity of *Veratrum nigrum* L. and *Radix Paeoniae alba*. *Evid Based Complement Alternat Med* 2014:892797.
- [13] Lin X, Guo X, Zhang Y, Wei J, Jin H. Experimental study on acute and repeated dose toxicity of traditional Chinese medicine Kangguan Granule on juvenile rats. *Chin J Pharmacovigilance* 2017;14(11):653–6. Chinese.
- [14] Li H, Wang Y, Ma Z, Tan H, Xiao C, Tang X, et al. Study on the induction of drug metabolizing enzyme CYP1A1 activity by ginsenoside Rc, Re, Rf and Rg1. *Chin Pharmacol Bull* 2016;32(9):1217–23. Chinese.
- [15] Bakire S, Yang X, Ma G, Wei X, Yu H, Chen J, et al. Developing predictive models for toxicity of organic chemicals to green algae based on mode of action. *Chemosphere* 2018;190:463–70.
- [16] Sanderson DM, Earnshaw CG. Computer prediction of possible toxic action from chemical structure; the DEREK system. *Hum Exp Toxicol* 1991;10(4):261–73.
- [17] Zhu Y, Ye Z. Computational toxicology and its application in toxicity study of traditional Chinese medicine. *Chin New Drugs* 2011;20(24):2424–9. Chinese.
- [18] Valerio LG Jr, Arvidson KB, Chanderbhan RF, Contrera JF. Prediction of rodent carcinogenic potential of naturally occurring chemicals in the human diet using high-throughput QSAR predictive modeling. *Toxicol Appl Pharmacol* 2007;222(1):1–16.
- [19] Fan X, Zhao X, Jin Y, Shen X, Liu C. Network toxicology and its application to traditional Chinese medicine. *Chin J Chin Materia Medica* 2011;36(21):2920–2.
- [20] Han J, Yi Y, Li C, Zhang Y, Wang L, Zhao Y, et al. Involvement of histamine and RhoA/ROCK in penicillin immediate hypersensitivity reactions. *Sci Rep* 2016;6(1):33192.
- [21] Li Y, Ju L, Hou Z, Deng H, Zhang Z, Wang L, et al. Screening, verification, and optimization of biomarkers for early prediction of cardiotoxicity based on metabolomics. *J Proteome Res* 2015;14(6):2437–45.
- [22] Li Y, Deng H, Ju L, Zhang X, Zhang Z, Yang Z, et al. Screening and validation for plasma biomarkers of nephrotoxicity based on metabolomics in male rats. *Toxicol Res* 2016;5(1):259–67.
- [23] Li Y, Wang L, Ju L, Deng H, Zhang Z, Hou Z, et al. A systematic strategy for screening and application of specific biomarkers in hepatotoxicity using metabolomics combined with ROC curves and SVMs. *Toxicol Sci* 2016;150(2):390–9.
- [24] Wang M, Liu C, Dong R, He S, Liu T, Zhao TC, et al. Safety evaluation of Chinese medicine injections with a cell imaging-based multiparametric assay revealed a critical involvement of mitochondrial function in hepatotoxicity. *Evid Based Complement Alternat Med* 2015;2015(7):379586.
- [25] Ma Z, Zhao J, Dong R, Cui Y, Wang M, Zhu Y. Hepatotoxicity study of extracts and main components in *Polygonum multijiorum* using high content analysis. *Chin Herb Med* 2016;22:4021–9.
- [26] Liang Y, Wang Y, Liang Q, Ma Z, Xiao C, Tan H, et al. Correlation between changes of alkaloids in combination of *Veratrum nigrum* and ginseng and animal toxicity. *Chin Tradit Herbal Drugs* 2012;43(08):1574–9. Chinese.
- [27] Liang Y, Wang Y, Liang Q, Liu H, Ma Z, Xiao C, et al. UPLC/Q-TOF-MS based the diversity of toxiferous composition of the toxicity of animals and in different combination of *Veratrum nigrum* and ginseng. *J Chin Mass Spectrom Soc* 2012;33(5):257–64. Chinese.
- [28] Xu H, Hao F, Wang M, Ren S, Li M, Tan H, et al. Influences of realgar-indigo naturalis, a traditional Chinese medicine formula, on the main CYP450 activities in rats using a cocktail method. *Evid-based Compl Alt* 2017;2017(9):1–9.
- [29] Chang SY, Weber EJ, Sidorenko VS, Chapron A, Yeung CK, Gao C, et al. Human liver-kidney model elucidates the mechanisms of aristolochic acid nephrotoxicity. *JCI Insight* 2017;2(22):e95978.
- [30] Wang K, Feng C, Li C, Yao J, Xie X, Gong L, et al. Baicalin protects mice from aristolochic acid I-induced kidney injury by induction of CYP1A through the aromatic hydrocarbon receptor. *Int J Mol Sci* 2015;16(7):16454–68.
- [31] Feng C, Xie X, Wu M, Li C, Gao M, Liu M, et al. Tanshinone I protects mice from aristolochic acid I-induced kidney injury by induction of CYP1A. *Environ Toxicol Pharmacol* 2013;36(3):850–7.
- [32] Levová K, Moserová M, Kotrbová V, Sulc M, Henderson CJ, Wolf CR, et al. Role of cytochromes P4501A1/2 in detoxication and activation of carcinogenic aristolochic acid I: studies with the hepatic NADPH:cytochrome P450 reductase null (HRN) mouse model. *Toxicol Sci* 2011;121(1):43–56.
- [33] Ji L, Liu T, Wang Z. Pyrrolizidine alkaloid clivorine induced oxidative injury on primary cultured rat hepatocytes. *Hum Exp Toxicol* 2010;29(4):303–9.
- [34] Wen L, Sun W, Liu K, Wang B, Wei Y, Chen D, et al. Research progress of pyrrolizidine alkaloids induced liver injury. *Infect Dis Info* 2017;30(4):209–11.
- [35] Rakba N, Melhaoui A, Rissel M, Morel I, Loyer P, Lescoat G. Irniine, a pyrrolidine alkaloid, isolated from *Arisarum vulgare* can induce apoptosis and/or necrosis in rat hepatocyte cultures. *Toxicol* 2000;38(10):1389–402.
- [36] Ji L, Chen Y, Liu T, Wang Z. Involvement of Bcl-xL degradation and mitochondrial-mediated apoptotic pathway in pyrrolizidine alkaloids-induced apoptosis in hepatocytes. *Toxicol Appl Pharmacol* 2008;231(3):393–400.
- [37] Han J, Liang A, Gao S. Research progress of especial toxicity and of pyrrolizidine alkaloids. *Chin J Chin Materia Medica* 2011;36(10):1397–401. Chinese.
- [38] Zhao Y, Liang A, Liu T, Li C, Wang X, Yi Y, et al. Study on embryonic toxicity of *Senecio scandens*, *Qianbai Biyanpian* and total alkaloid from *S. scandens* in rats. *Chin J Chin Materia Medica* 2010;35(3):373–7. Chinese.
- [39] Han JY, Yi Y, Liang AH, Zhang YS, Li CY, Zhao Y, et al. Embryotoxicity of *Senecionis Scandentis hebra* on *in vitro* cultured mouse embryos. *Acta Pharm Sin* 2014;49(9):1267–72. Chinese.
- [40] Han J, Liang A. Toxicity of senecionine on *in vitro* cultured mouse embryos. *Asian J Ecotoxicol* 2011;6(2):189–94. Chinese.
- [41] Han J, Liang A, Yi Y, Gao S, Nilsen OG. Toxicity of monocrotaline on *in vitro* cultured mouse embryos. *Asian J Ecotoxicol* 2011;36(4):484–7. Chinese.
- [42] Han J, Liang A, Yi Y. Developmental toxicity of retrorsine on mouse embryos *in vitro*. *Chin J Chin Materia Medica* 2011;36(14):1901–4. Chinese.
- [43] Xia F, Li A, Chai Y, Xiao X, Wan J, Li P, et al. UPLC/Q-TOFMS-based metabolomics approach to reveal the protective role of other herbs in An-Gong-Niu-Huang Wan against the hepatorenal toxicity of cinnabar and realgar. *Front Pharmacol* 2018;9:618.
- [44] Yin J, Xie J, Guo X, Ju L, Li Y, Zhang Y. Plasma metabolic profiling analysis of cyclophosphamide-induced cardiotoxicity using metabolomics coupled with UPLC/Q-TOF-MS and ROC curve. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2016;1033–1034:428–35.
- [45] Li A, Guo X, Xie J, Liu X, Zhang Z, Li Y, et al. Validation of biomarkers in cardiotoxicity induced by periplocin on neonatal rat cardiomyocytes using UPLC-Q-TOF/MS combined with a support vector machine. *J Pharm Biomed Anal* 2016;123:179–85.
- [46] Liu C, Sheng X, Wang Y, Yin J, Huang W, Fan Y, et al. A sensitive approach for simultaneous quantification of carbonyl and hydroxyl steroids using 96-well SPE plates based on stable isotope coded derivatization-UPLC-MRM: method development and application. *RSC Adv* 2018;8(35):19713–23.
- [47] Xu S, Li Z, Li H, Xue C. Effects of Veleriana extracts on bile acid metabolism and liver injury. *Her Med* 2011;30(3):298–301. Chinese.
- [48] Wang X, Han L, Li G, Peng W, Gao X, Klaassen CD, et al. From the cover: identification of natural products as inhibitors of human organic anion transporters (OAT1 and OAT3) and their protective effect on mercury-induced toxicity. *Toxicol Sci* 2018;161(2):321–34.
- [49] He Y, Ci X, Xie Y, Yi X, Zeng Y, Li Y, et al. Potential detoxification effect of active ingredients in liquorice by upregulating efflux transporter. *Phytomedicine* 2018;59:175–82.
- [50] Li Y, Zhang X, Zhou H, Fan S, Wang Y, Wang L, et al. Toxicity analysis of doxorubicin using plasma metabolomics technology based on rapid resolution liquid chromatography coupled with quadruple-time-of-flight mass spectrometry. *Anal Methods* 2014;6(15):5909–17.
- [51] Li Y, Hou Z, Wang Y, Wang L, Ju L, Zhang Z, et al. Screening and verification of linearly dependent biomarkers with acute toxicity induced by *Aconiti Radix* based on liquid chromatography-mass spectrometry-based metabolite profiling. *RSC Adv* 2015;5(126):103915–24.
- [52] Li Y, Liu C, Du J, Sheng X, Zhang Y. Plasma metabolic profiling analysis of *Cortex Periplociae*-induced cardiotoxicity based on UPLC/Q-TOF-MS. *RSC Adv* 2018;8(9):4937–45.
- [53] Li Y, Zhou H, Xie J, Ally MS, Hou Z, Xu Y, et al. A novel method for evaluating the cardiotoxicity of traditional Chinese medicine compatibility by using support vector machine model combined with metabonomics. *Evid Based Complement Alternat Med* 2016;2016(3):6012761.
- [54] Guo X, Gu C, Xu Y, Li Y, Zhang Y. Applicability of small molecule biomarkers of nephrotoxicity in evaluating toxicity of traditional Chinese medicines. *Drug Eval Res* 2017;40(4):472–8.