

• 专 论 •

中药毒性研究的思路与方法

王宇光, 马增春, 梁乾德, 汤响林, 高 月*

军事医学科学院放射与辐射医学研究所 药理毒理研究室, 北京 100850

摘 要: 中药不良反应事件在国际上的出现, 中药安全性问题逐渐受到重视。除经典的毒理学评价外, 近年来在中药安全性研究领域包括中药毒性研究方面也涌现出了许多新的思路和方法, 有效拓展了中药毒性研究的深度和广度, 并从中发现了一些有价值的线索。对近年来关于中药毒性研究的相关思路和方法进行梳理分析和归纳总结, 并结合相关工作, 综述了中药毒性研究进展, 提出加强中药毒性研究有重要意义, 并有助于指导中药的安全合理应用。

关键词: 中药; 毒性; 药物代谢酶; 不良反应; 安全性

中图分类号: R285.53 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2012)10-1875-05

Thoughts and methods for toxicity study on Chinese materia medica

WANG Yu-guang, MA Zeng-chun, LIANG Qian-de, TANG Xiang-lin, GAO Yue

Department of Pharmacology and Toxicology, Institute of Radiation and Irradiation Medicine, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100850, China

Abstract: The safety issues of Chinese materia medica (CMM) have been gradually taken seriously along with the CMM side effects increasing in the worldwide use. Except the classic toxicology evaluation, more new ideas and methods were emerged in the field of safety evaluation including toxicity study on CMM, which effectively expands the depth and width of toxicity study on CMM and many valuable clues have been found. Recent advances in thoughts and methods of study on CMM toxicity are reviewed and summarized and the importance of the study in this field is highlighted, which may guide the safety use of CMM.

Key words: Chinese materia medica (CMM); toxicity; drug metabolism enzyme; side effects; safety

中药与化学药相比通常被认为具有使用安全、不良反应少等优点, 但由于中药所含的化学成分复杂, 因此很难对其所引起的不良反应做出科学的解释。随着中药不良反应事件在国际上的出现, 使得中药的安全性问题逐渐显现, 因此中药毒性研究亟待加强, 特别是思路创新和相关技术平台的建立。应充分利用国际通用的毒性研究方法和技术平台, 结合中药特点和中医理论, 建立符合中药自身特点的中药毒性研究基础数据库和技术平台显得尤为重要。

1 有毒中药毒性的系统研究

有毒中药具有明确的治疗功效, 但同时其含有的有效成分也是毒性成分, 应用不当时极易产生不良反应, 甚至引发中毒或危及生命。有毒中药主要特点是其有效成分治疗窗比较窄, 治疗用药时极易

引起中毒反应。中医临床实践证明有毒中药往往又具有显著而独特的治疗效果, 因此对其开展系统毒理学研究对合理、安全的使用此类中药具有重要意义, 特别是搞清楚量效-毒效关系, 在合理的剂量范围内应用此类药物显得尤为重要。

1.1 有毒中药的安全性评价研究

中药复方、单味药及其有效成分的毒性涉及机体多个系统或器官。我国是中药产业大国, 中药在临床被广泛使用, 因此按国际认可的标准评价中药的安全性是中药走向国际市场的重要基础^[1]。在有毒中药安全性评价具体实施过程中, 应以中医药理论为指导, 使有毒中药安全性评价工作既有严格的标准操作规程, 同时兼顾中医药的用药特点, 保证研究的最终成果能科学阐释中药毒性的本质, 准确

收稿日期: 2011-10-08

基金项目: 国家重点基础研究发展计划 (2011CB505304); 国家自然科学基金资助项目 (81073149); 北京市自然科学基金资助项目 (7112110)

作者简介: 王宇光, 男, 博士, 副研究员, 研究方向为中药及天然药物药理毒理研究。Tel: (010)66932201 E-mail: wang_yuguang@139.com

*通讯作者 高 月 Tel: (010)66931312 E-mail: gaoyue@nic.bmi.ac.cn

描述中药毒性产生的靶器官或致毒机制,逐步实现发展创新中药毒理学理论的目的,建立中药基础毒理学研究数据库,从而有利于正确评价和客观对待中药的不良反应^[2-3]。

1.2 有毒中药的毒代动力学研究

毒代动力学是运用药代动力学的原理和方法,定量地研究毒性剂量下药物在动物体内的吸收、分布、代谢、排泄过程和特点,进而探讨药物毒性发生和发展的规律。毒代动力学研究的主要目的不只是获得动力学数据,如毒性成分的血浆浓度、血浆半衰期等,而是将动力学数据和动物的毒性反应有机结合起来进行科学分析,使剂量-毒性反应关系实现量化表达,才能对临床安全使用具有指导意义。

2 中药复方毒性的系统研究

2.1 机体参与的中药配伍毒性研究

中药配伍的毒性研究多为化学层面的研究,特别是配伍前后方剂化学成分或毒性成分的变化研究确实为阐明中药配伍毒性提供了物质基础方面的证据,但这种研究思路仅能够反映中药配伍毒性的一个层面,只是单纯考虑了药物自身之间组合对彼此毒性成分的影响或变化,而忽视了药物在治疗疾病过程中机体对毒性成分产生的影响及其与药物配伍毒性规律之间的关系,因此存在片面性。许多中药在成百上千的方剂中都具有相同的药性和相似的配伍关系,如甘草因具有“调和诸药,缓解药物毒性、烈性”的药性而在许多方剂中使用,这种配伍规律的普遍性如果仅从化学的角度研究,可能对于一个或几个方剂的配伍规律能够加以阐明,但并不代表甘草配伍机制的普遍性和共通性,因为与甘草配伍的中药甚多且成分各异,甘草不可能对各类中药在煎煮过程中化学成分的变化都产生相同的影响,所以应该更多地从机体角度去加以阐明。因此可以设想方剂中具有普遍配伍规律的药物作用在机体的某个环节或靶点,这些环节或靶点会对与其配伍的其他中药产生相同的作用,从而使不同的方剂在配伍应用于机体后达到减毒增效的目的,即形成了配伍规律;若不同的方剂在配伍应用于机体后毒性增加,即形成了配伍禁忌。可以从机体角度对方剂配伍毒性进行研究,即机体参与下的中药复方配伍毒性研究。

药物代谢酶(细胞色素 P450)作为机体对药物或外源物代谢的最主要功能蛋白,符合具有维持机体正常生理功能或对药物产生重要影响蛋白质靶点特征,细胞色素 P450 是最重要的 I 相药物代谢酶,

其在维持机体内环境的稳态及代谢对机体有害的物质方面发挥重要作用。因此可以设想方剂中的个药是否作用于细胞色素 P450 酶系统,影响了细胞色素 P450 酶的活性进而对方剂中的其他药物包括毒性中药相关成分的代谢和药理效应产生影响,使配伍药物的特性和毒性效应发生改变而形成了中药间相互作用,而这种药物代谢酶参与下形成的具有普遍性中药间相互作用可能即为某些配伍规律或配伍禁忌在机体上的真实反映和客观存在。中药方剂含有多种单味中药,因此中药配伍存在与 P450 酶有关的中药间相互作用的机会可能更多;同时中药不论其成分多么复杂,但在体内起作用的物质基础仍然属于化学成分范畴,同样面临着机体即 P450 酶对其的代谢。这样中药配伍就符合基于药物代谢酶产生药物相互作用的两个基本要素,即药物对 P450 酶产生影响,受到影响的 P450 酶再作用于复方中毒性成分,改变毒性成分的代谢特征,这就是基于 P450 酶的中药配伍毒性研究的分子基础。基于这种推论,中药配伍禁忌中同样存在由 P450 酶参与的药物相互作用。这种研究思路可以归结为将现代药理学中药物相互作用的分子基础——P450 酶引入中药配伍毒性研究中,通过酶活性分析、分子生物学技术和现代色谱技术等综合分析中药对 P450 酶活性、mRNA 及蛋白表达水平的影响;进一步通过液质联用技术结合体外代谢试验对复方中典型的毒性成分的代谢特征进行深入分析,从而实现较系统的中药复方对药物代谢酶的影响研究,并有针对性地对中药复方毒性成分代谢和配伍毒性的相互作用机制进行系统挖掘,发现基于药物代谢酶的中药相互作用模式,进而发现配伍禁忌的科学内涵和配伍毒性规律,为临床用药提供理论依据。方法学上可采用体外代谢酶共培养如肝微粒体法、原代肝细胞培养法、肠膜代谢、肠内容物代谢、肠微粒体代谢技术,研究中药对药物转运蛋白和药物代谢酶的诱导或抑制作用;并与它们的代谢途径和药动学行为相结合,探讨配伍应用时可能引起的相互作用,进而阐明中药毒效体内物质基础。可采用可同步进行多级碎裂和精确质量测定的超高效液相-飞行时间质谱(UPLC-Q-TOF-MS),进行生物样品中微量药物及超微量药物的高通量、高灵敏度的定量分析;利用药物代谢产物快速鉴定软件 Metabolynx 进行体内外药物代谢产物快速鉴定等,从而对中药毒性实现较全面的分析。

如何确定化合物是否为某一或某些 P450 亚酶的底物,即确定究竟哪种或哪几种亚酶参与了化合物的代谢,对于发现潜在的药物相互作用至关重要。FDA 指导原则中建议采用人肝组织进行新化合物经 P450 代谢特征的鉴定,包括新鲜分离的肝脏切片、新鲜制备或冷冻保存的人原代肝细胞、亚细胞组分 S9、肝微粒体或重组 DNA 表达的特定亚酶。如果体内数据显示 P450 酶对新化合物的代谢清除贡献率大于 25%,应进一步采用人肝微粒体或重组酶确定究竟哪几种亚酶参与了该药物的代谢。利用大鼠微粒体体外抑制试验对乌头碱的体外代谢产物及参与代谢的亚酶进行鉴定,对乌头碱体外代谢特征有了基本的描述^[4]。尽管乌头碱的中毒机制及靶器官已经明确,但对于乌头碱的代谢知之甚少,特别是细胞色素 P450 参与的代谢。由于乌头碱的血药浓度及其毒性效应与 P450 酶之间密切相关,且长期配伍用药会影响 P450 酶的表达并产生药物相互作用。因此无论作为一种毒性成分还是配伍应用时的中毒因素,代谢物结构的鉴定及参与代谢的 P450 亚酶的确定有利于更深入了解其中毒机制和发现可能的药物间的相互作用,从而避免潜在的药物不良反应发生。P450 亚酶抑制剂已被证明是鉴定参与药物亚酶类型的有效工具,P450 亚酶的鉴定可以与特定的毒理反应建立联系。乌头中含有一系列高毒性的二萜类生物碱如乌头碱、甲基乌头碱等对心脏和神经系统有明显毒性,为了探明参与乌头碱代谢的 P450 亚型,考察了各种 P450 亚酶的选择性抑制剂对乌头碱消除速率的影响。研究显示 CYP3A 抑制剂三乙酰夹竹桃毒素在 100 $\mu\text{mol/L}$ 可强烈地抑制乌头碱的代谢达 84%,并且该抑制作用呈浓度依赖性,同时所有三乙酰夹竹桃毒素考察的浓度范围内(0.5~100 $\mu\text{mol/L}$),乌头碱消除速率和 CYP3A 的酶活性之间具有明显的相关性。同时观察到 CYP1A2 抑制剂在一定程度上抑制了乌头碱的代谢,而 CYP2E1、CYP2D1 和 CYP2B1/2 未产生明显的抑制效应。由此得出乌头碱的代谢主要由 CYP3A 催化,CYP1A2 也有一定贡献。CYP3A 或 CYP1A 抑制剂与乌头碱单体或中药复方提取物(含乌头)配伍应用时可能会降低乌头碱的代谢而加重中毒效应,在临床用药过程中应格外小心。从另一个侧面为十八反中乌头与瓜蒌、半夏、白及和贝母等配伍应用时会产生严重的毒性反应,提供了基于药物代谢酶层面的实验证据(图 1)。

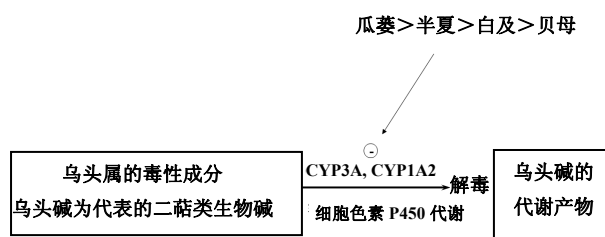


图 1 基于药物代谢酶的乌头配伍药对毒性机制

Fig. 1 Toxicity mechanism of aconitum compatibility based on drug metabolism enzyme

2.2 基于代谢组学的中药配伍毒性研究

代谢组学是以生物体内低相对分子质量物质的动态规律变化来表征生物体的生理病理变化趋势,并最终还原相关联的生物事件以揭示生物体的生理病理变化实质和机制的一种全新的组学技术。代谢组学所研究的对象是机体整个代谢网络的终端产物,其反映了机体的真实状态并能代表机体整体功能,这一点与中医药治疗疾病时强调整体性的思想具有一致性。代谢组学研究中药毒性特别是复方整体的毒性,能更快、更准确地发现毒性物质及其毒性规律,尤其对于多靶点的综合性毒性反应,代谢组学可从多个角度进行全面评价,有利于中药的研发和临床合理应用。从代谢组学角度解释中药毒性作用机制,是中药毒理研究思路的拓展和与生命有机体对接研究的最有力工具之一^[5]。

2.3 基于基因组学及芯片技术的中药配伍毒性研究

传统毒理学研究由于使用大量动物进行研究,受到各种制约因素和动物保护等方面的限制,越来越难以满足实际需求,替代毒理学是毒理学发展的新趋势,其作为早期毒性筛查具有传统毒理学无可比拟的优势。随着人类基因组学和分子生物学技术的迅猛发展,基因芯片技术在生命科学的各个领域得到广泛应用。基因芯片技术可代替传统的动物毒理学实验进行早期的毒性筛查和线索发现。毒理芯片技术从基因组水平上研究药物与基因表达的相互影响,通过基因表达图谱研究候选药物的毒性作用机制、确定毒性生物标志物及预测潜在的毒性。毒理芯片技术的特点是可以获取庞大而精确的数据信息,具有其他技术无法比拟的优势,特别是在毒性线索发现阶段可以给出海量的信息,有助于更深入的毒性机制研究。该技术的应用有助于改变中药毒理学传统研究方式,更加精确地描述中药毒性作用机制,从分子水平揭示中药毒性的特点,从而更好

地诠释中药的作用机制与不良反应。基于传统中医药整体观的特点,中医药研究只有从生物整体性的角度出发,将分子水平的最新技术与中医药的辨证论治相结合,才能从根本上解决中医药研究中的技术难题^[6]。

2.4 基于液质联用技术的中药配伍毒性成分谱研究

中药配伍化学层面的研究多集中在某个或某类化学成分的研究,并不能整体反映配伍前后化学成分的变化。中药化学组成非常复杂,因此,对中药配伍化学成分的研究提出了较高要求。目前,对于乌头与半夏、贝母配伍的研究主要集中于检测配伍后乌头中双酯型生物碱量的变化^[7-8],以及临床应用和药理方面的研究,对其全面的化学成分变化及配伍规律的研究较少^[9]。如果要对乌头配伍的药对的毒性成分谱进行全面分析,特别是对乌头中生物碱的变化谱进行分析,高效液相色谱(HPLC)是当前研究中药配伍化学成分(尤其是小分子物质)的主要技术方法。但相对于中药及中药配伍后的复杂体系,其分离的效能(分离度、灵敏度)和效率(分离速度)不尽如人意。超高效液相色谱(UPLC)采用粒径 1.7 μm 的色谱柱填料,能获得更高的柱效,并且在更宽的线速度范围内柱效保持恒定,因而有利于提高流动相体积流量,缩短分析时间,提高分析通量。通过性能优越的色谱柱,精确梯度控制的 UPLC 泵,低扩散、低交叉污染的自动进样系统及高速检测器,使 UPLC 的峰容量、分析效率、

灵敏度较常规 HPLC 有了很大的提高,为复杂体系的分离分析提供了良好的平台。目前 UPLC 在其开展的中药分离分析中发挥着重要的作用,缩短分析时间、增加峰容量、提高灵敏度是 UPLC 用于中药分析的显著特点。另一方面,中药及中药配伍复杂的化学成分,还要求分析方法有较好的定性鉴别能力。UPLC-Q-TOF-MS 是当提高色谱定性鉴别能力的主要途径。由于 TOF-MS 可以给出色谱峰化学成分相对分子质量和结构碎片质荷比关键的结构信息,对于判断色谱峰含何种化学成分以及判定不同色谱之间色谱峰的同一性提供了重要依据。为了更有效地鉴定结构,质谱系统应具备高质量分辨率,即能给出分子离子或碎片离子的精确的质量信息,同时还可以进行串联质谱分析(MS/MS),即通过将某一离子打碎,分析碎片来判定结构。另外,如果能综合运用多种检测手段,如综合运用质谱检测器(MS)、二极管阵列检测器(DAD)、蒸发光散射检测器(ELSD)等,则能进一步提高色谱的定性鉴别能力。分析研究策略见图 2。本实验室利用 UPLC-Q-TOF-MS 技术对乌头配伍半夏后乌头碱类成分的变化趋势进行了较好的诠释,一方面发现了配伍后特征性毒性成分,同时也发现不同煎煮条件下毒性成分的溶出变化规律与毒性密切相关^[10]。

3 结语

凡是药物都具有两面性,即效、毒的属性。中药也不例外,用之得当,可以调偏扶正,产生治疗

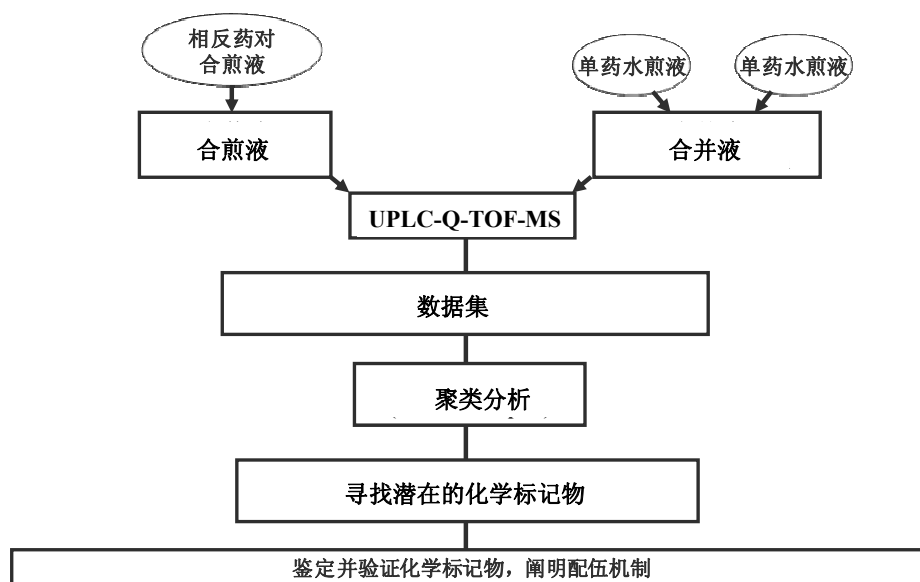


图2 基于 UPLC-Q-TOF-MS 中药配伍毒性成分的研究策略

Fig. 2 Research strategy of toxic components in CMM compatibility based on UPLC-Q-TOF-MS

作用;用之不当,则可动乱,产生不良反应。中药有毒无毒以及毒性强弱都是相对的,要通过中药毒理学系统研究发现致毒的靶器官,同时也要研究随着用药剂量的改变是否发生了效、毒之间的转换,以及在不同炮制、配伍、疾病症候特征等多个层面效、毒发生改变的机制,这样可以使确有疗效的有毒中药得到科学合理的使用,降低其毒性发生的概率,发挥其在治疗某些疾病的独特作用。如果不附加条件的认定中药有毒及毒性程度的大小,既不符合客观实际,也不利于中药科学合理应用,因此更需要注重特定条件下的中药毒性研究。中药毒性是中药某些成分在机体外因素(如炮制、配伍等)和特定机体状态下产生的药效作用之外的其他效应,因此研究应建立特定条件下的毒性评价,以及以此为依据的增效减毒研究,以最大限度发挥中药在特定条件下的药效,减少毒性发生,进而提高中药使用的安全性。

参考文献

- [1] 陆国才,袁伯俊,黄 矛,等.积极推进中药安全性评价现代化[J].中药新药与临床药理,2004,15(2):136-138.
- [2] 孙敬昌.关于中药毒性现代研究的几点设想[J].中医杂志,2009,50(7):649-650.
- [3] 边育红,庄朋伟,王 丽,等.药物潜在毒性发现技术及其在中药安全性评价中的应用展望[J].中草药,2011,42(12):2379-2385.
- [4] Wang Y G, Wang S Q, Liu Y X, *et al.* Identification of metabolites and P450 isozymes involved in the microsomal metabolism of aconitine [J]. *J Chromatogr B*, 2006, 844: 292-300.
- [5] 易建利.代谢组学在中医药的应用研究进展[J].湖南中医杂志,2008,24(3):114-115.
- [6] 孙 蓉,张丽美,王 丽,等.毒理芯片技术在中药毒理学研究中的应用及前景[J].药物警戒,2008,5(3):158-161.
- [7] Liu W L, Song F R, Liu Z Q. The chemical study on combination taboo of *Radix Aconiti* and *Pinellia* tuber [J]. *Chemistry*, 2008, 6: 435-438.
- [8] 董 欣,王淑敏,祝恩智,等.乌头属中药及其炮制品与浙贝母、川贝母配伍的化学研究[J].中草药,2012,43(2):265-269.
- [9] Weng X G, Nie S Q, Huang L Q. Determination of content changes of hypaconitine in preparations of aconite matching other herbs in “pinellia tuber, snakegourd fruit, fritillaria, japanese ampelopsis root and common bletilla tuber counteract aconite” by HPLC [J]. *Chin Pharm J*, 2004, 39: 57-59.
- [10] 王 超,王宇光,梁乾德,等.UPLC/Q-TOFMS分析十八反乌头半夏配伍化学成分的变化[J].药学报,2010,45(10):1301-1306.