

常用中药肝毒性成分代谢与毒理研究进展

张 凯¹, 董晓敏², 王 琦¹, 汪晓娟^{1*}

1. 阜阳市人民医院 药剂科, 安徽 阜阳 236000

2. 阜阳市附小学校, 安徽 阜阳 236000

摘 要: 近年来, 随着我国医药卫生健康产业的稳步发展, 中医药逐步获得世界人民的认可和信赖, 中药在临床治疗和养生保健方面的使用量逐步攀升, 其研究价值也日益凸显。然而, 中药在使用过程中伴随的毒副作用也引起广泛的关注, 因中药制剂服用不当所导致肝功能损害时有发生。迫切需要深入研究和整理中药肝毒性机制, 保障常用中药的临床安全有效。在查阅近几年来常见中药肝毒性相关文献的基础上, 从代谢与分子方面深入分析常用中药肝毒性成分的毒理机制, 以期对中药肝毒性研究提供新思路, 为中药临床合理使用提供有益参考。

关键词: 中药; 肝毒性; 毒性成分; 代谢; 毒理

中图分类号: R285 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2018)22-5435-13

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2018.22.031

Research progress on metabolism and toxicology of hepatotoxic components in common Chinese materia medica

ZHANG Kai¹, DONG Xiao-min², WANG Qi¹, WANG Xiao-juan¹

1. Department of Pharmacy, Fuyang People's Hospital, Fuyang 236000, China

2. Fuyang Attached Primary School, Fuyang 236000, China

Abstract: In recent years, with the steady development of the medicine and health industry in China, Chinese medicine has gradually been recognised and trusted by people around the world, its application amount has being increased in clinic and health care. The worth of its research is also becoming more and more prominent. However, the toxicity and side effects of Chinese materia medica (CMM) have aroused widespread attention, the increasing number of patients with liver function damage has occurred. Thereby, it is urgent to further analyse and study the mechanism of liver toxicity of CMM to ensure the clinical safety and efficacy of common CMM. Based on the latest literatures about hepatotoxicity of common CMM in recent years, the present study analyzed the major mechanism of hepatotoxicity of CMM from the perspective of metabolism and toxicology, in order to provide a novel approach for hepatotoxicity investigation of CMM, and offer the useful reference for the rational application of CMM in clinic.

Key words: Chinese materia medica; hepatotoxicity; toxic ingredient; metabolism; toxicology

肝脏是人体内药物代谢的最主要器官, 也是重要的解毒器官。化学合成药物和中药入血成分在肝脏代谢的同时, 往往由于其结构本身带有特殊官能团, 生成潜在的毒性代谢物, 会对肝脏造成直接或间接的损伤。药物性肝损伤 (drug-induced liver injury, DILI) 是指应用临床治疗剂量的药物时, 机体受药物或其代谢产物产生的毒性作用, 或发生过敏反应所引起的肝损害^[1-2]。DILI 是导致发达国家急性肝衰竭患病的首要诱因, 也是美国食品药品监

督管理局 (FDA) 对药物采取药物黑框警告的最主要原因^[3-5]。我国 DILI 临床案例也较为常见, 其中由中药所诱发的肝损伤病例已超过 45.43%^[6], 是引起药物肝损害的首要原因。由于中药本身含有毒性成分、加工炮制工艺不当、与其他中药或化学药配伍不当、过量或长期服用所引起急性或慢性肝损害日趋见多^[7], 严重者甚至危及患者的生命安全。

中药本身是一个复杂化合物库, 成分复杂, 其中绝大部分中药成分本身并无毒性, 然而某些特定

收稿日期: 2018-06-13

作者简介: 张 凯 (1990—), 男, 药师, 硕士, 研究方向为临床药学与药物安全性评价。Tel: 18355857801 E-mail: zhangkaify@163.com

*通信作者 汪晓娟, 女, 副主任药师, 主要从事临床药学、药事管理、药物检测与评价和药物经济学研究。E-mail: wangxiaojuanfy@163.com

成分在代谢过程中,其特殊官能团在体内特殊药物代谢酶催化下,生物转化成潜在的毒性化合物,对肝脏造成直接或间接损伤。反应性代谢产物(reactive metabolite)是指药物经代谢酶代谢活化(metabolic activation)后形成的反应性中间体,通常具有亲电性,可与体内的亲核试剂含硫化合物如谷胱甘肽、半胱氨酸结合,或与生物大分子蛋白质、DNA 结合引起蛋白变性、DNA 交联,从而诱发体内毒性反应。本文综述了近年来常见中药肝毒性成分的研究进展,从代谢和毒理两方面着手分析,分类阐述引起肝毒性的主要成分(生物碱、萜类、蒽醌以及苯丙素类化合物等),以期对中药肝毒性产生规律的发现及中药临床安全用药提供有益借鉴。

1 具肝毒性生物碱类成分的代谢与毒理机制研究

目前发现多种中药生物碱成分对肝脏均有不同程度的损害,常见具有肝毒性的生物碱类成分主要有吡咯里西啶类生物碱(千里光碱、倒千里光碱、山冈橐吾碱、天芥菜碱等)、二萜类生物碱(乌头碱、次乌头碱、新乌头碱等)^[8-9]、异喹啉类生物碱(蝙蝠葛碱、青藤碱等)^[10]、吲哚类生物碱(吴茱萸次碱)^[11-12]、喹诺里西啶类生物碱(苦参碱和氧化苦参碱)^[13]。近年来吡咯里西啶类生物碱所诱发的肝毒性得到国际上的广泛关注,其代谢与毒理机制研究也较为透彻,以吡咯里西啶类生物碱为例,阐述其代谢与致毒机制。

吡咯里西啶生物碱(pyrrolizidine alkaloids, PAs)是一类 2 个吡咯烷骈和共用氮原子的一类生物碱,因此又称为双稠吡咯啉生物碱,具有显著的肝毒性。在自然界中分布广泛,主要分布在菊科的千里光属 *Senecio* L.、橐吾属 *Ligularia* Cass.、款冬属 *Tussilago* L.、泽兰属 *Eupatorium* L. 和菊三七属 *Gynura* Cass. nom. cons., 豆科的猪屎豆属 *Crotalaria* Linn., 紫草科的聚合草属 *Symphytum* L. 和天芥菜属 *Heliotropium* L., 兰科的羊耳蒜属 *Liparis* L. C. Rich. 植物中^[14-15]。目前含有该类成分并被《中国药典》2015 年版收录的中药品种有千里光 *Senecio scandens* Buch. -Ham. ex D. Don、款冬花 *Tussilago farfara* L.、返魂草 *Aster tataricus* L. f.、佩兰 *Eupatorium fortunei* Turcz.、野马追 *Eupatorium lindleyanum* DC.、一点红 *Tmlia sonchifolia* (L.) DC.、紫草 *Lithospermum erythrorhizon* Sieb. et Zucc.。该类成分也在欧美多种药用植物中广泛分布,并可通过传统草药、茶饮、谷物食品或沿着牧草、蜜源或食

物链逐级传递,如蜂蜜、蛋奶制品、面包、肉类等被人类摄食,可引起人体急性肝损伤,严重者甚至死亡,引起了世界各国的普遍关注^[16-17]。

PAs 的结构对其毒性有着重要的影响,研究表明双稠吡咯啉环中 C-1,2 位不饱和双键是其毒性必需基团,若其双键饱和,则毒性表现大大减弱,甚至表现为无毒。另外,其千里光酸(necine acid)环上酯基取代数目和空间位阻也可影响 PAs 的代谢活化,从而影响其毒性^[18]。根据骨架取代官能团不同,C-1,2 不饱和 PAs 可分为 5 类:(+)-倒千里光碱 [(+)-retronecine]、奥索千里光裂碱(otonecine)、(-)-supinidine、(+)-crotanecine 和 (+)-天芥菜碱 [(+)-heliotridine]。其中倒千里光碱型(野百合碱和倒千里光碱)、奥索千里光裂碱型和天芥菜碱型 3 种类型的毒性报道较多^[19]。

目前关于 PAs 诱导肝毒性最经典公认的机制为“代谢吡咯(metabolic pyrroles)”学说,即毒性由吡咯啉环代谢活化所致^[18,20]。代谢吡咯的形成主要起始于肝药酶细胞色素 P450 超家族(CYP)的催化激活^[21]。其代谢过程涉及一系列的电子级联传递反应,导致 C-1,2 不饱和双键环氧化,形成 C-3 或 C-8 位的羟基取代的烯丙醇酯活性中间体;由于该氧化中间体比较活泼,极易脱水形成高亲电性的脱氢 PAs (DHPAs)或吡咯醇酯(DHR ester),即为吡咯代谢物(或初级毒性代谢物)。Otonecine 型的 PAs 经脱甲基后可通过以上途径脱氢化形成吡咯醇酯(图 1)。吡咯醇酯可水解掉千里光酸环形成双稠吡咯啉环^[18,22-24]。吡咯代谢物具有较强的电负性,生成后迅速进入细胞质中,与含巯基氨基酸(半胱氨酸、乙酰半胱氨酸)、小分子肽类(GSH)亲核官能团(巯基、氨基、羟基)结合,生成毒性加成物。另外一部分吡咯代谢物则迅速降解,生成一系列的次生毒性代谢物,如组织结合吡咯(tissue-bound pyrroles)、谷胱甘肽吡咯结合物(7-GSH-DHR)、吡咯醇(dehydroretronecine, DHR)等^[19]。这些“反应”导致了肝细胞在解毒中又不断的“中毒”,形成恶性循环,不可逆性地造成肝细胞功能紊乱、坏死直至组织损伤。肝脏是 CYPs 的主要分布器官,所以肝脏是 PAs 致毒受损的最大靶器官。另外,代谢 DHR 与大分子蛋白或核酸(DNA、RNA)交联,产生肺毒性和基因毒性(致癌、致突变)^[25-27]。药物代谢酶和转运体对 PAs 的代谢和转运有着重要的影响,研究表明,retrorsine 型 PAs 可

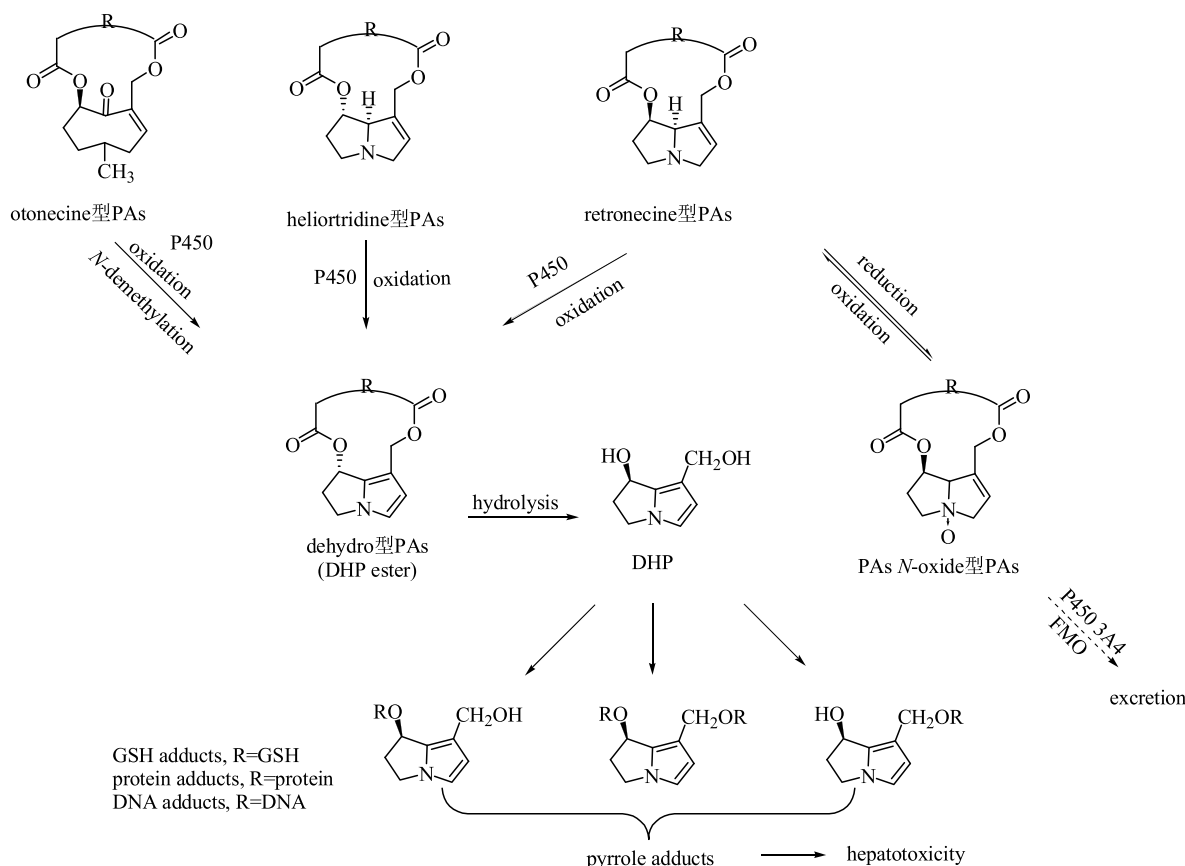


图 1 PAs 代谢活化致毒机制

Fig. 1 Metabolic activation of PAs leading to hepatotoxicity

通过抑制 MDCK 和 LLC-PK1 细胞内代谢酶 CYP3A4 和有机阳离子转运体 (OCTs) 表达, 抑制本身代谢和摄取, 引起药物在细胞内蓄积, 加剧肝毒性^[28]。类似地 monocrotaline 型 PAs 也可抑制转运体 OCT1 介导的药物摄取, 产生肝毒性^[29]。另外, 药物代谢酶 CYP 和黄素单氧化酶催化的氮氧化反应, 生成 *N*-氧化物, 使 PAs 极性增大, 促进排出体外, 毒性减弱^[30]。

PAs 所致肝毒性的相关临床生化分析是其诊断的重要手段, 采用 PAs 损伤人肝实质细胞和肝窦内皮细胞模型, 采用 UPLC-MS 方法, 可灵敏地检测到受损细胞中的代谢活性中间体 DHPAs 和 DHR 捕捉和交联胞内蛋白致毒的吡咯-蛋白加成物 (pyrrole-protein adducts)^[31]。在 15 例临床 PAs 引起的肝窦阻塞综合征患者^[32-33]和 5 例 PAs 氮氧化物引起的肝窦阻塞综合征患者的血清研究中^[34], 也检测到吡咯-蛋白加成物。因此吡咯-蛋白加成物可作为临床诊断 PAs 引起肝损伤的检测标志物。

PAs 所致肝毒性在临床主要表现为肝窦内皮细胞毒性和肝实质细胞毒性, 可分别发展为肝窦阻塞

综合征与肝硬化^[35]。实验小鼠给予 10 mg/kg DHPAs 后, 肝窦内皮细胞形态发生明显变化, 内皮细胞变为圆形, 并且膨胀、脱落, 导致血窦微循环堵塞, 这是肝窦阻塞综合征的典型症状, 因此 DHPAs 可作为实验肝窦阻塞综合征动物模型的诱导剂^[36]。PAs 致肝窦阻塞综合征患者初期表现为周围肝组织坏死、肝纤维化、肝结节增生、胆管增生等症状, 并最终恶化为肝硬化和肝衰竭。

氧化应激损伤是 PAs 导致肝损伤的主要机制之一, PAs 可通过氧化应激损伤肝细胞, 在肝内可迅速与抗氧化剂还原型谷胱甘肽 (GSH) 的巯基共价结合, 引起肝内 GSH 耗竭。胞内基质金属蛋白酶 (MMP) 是锌离子依赖性内源多肽酶家族, 主要功能是降解胞外基质和基底膜, 在多种 PAs 致毒过程中发挥关键作用。肝窦内皮细胞比肝实质细胞对 DHPAs 更加敏感, 这与胞内 MMP 密切相关, 在损伤过程中 MMP-9 更容易被肝窦内皮细胞所释放到胞外, 损伤周围细胞, 正常生理情况下 MMP-9 的活性可被 GSH 所调控和抑制, 但在肝损伤 GSH 耗竭情况下, MMP-9 活性较强, 可迅速水解和损伤周

围内皮细胞,导致血窦微循环堵塞,胆汁酸积累^[37]。另外, PAs 还可诱导肝细胞凋亡和炎症反应,在兰薊定 (echimidine)、天芥菜碱、senecione 和肾形千里光碱 (senkirkine) 处理的人原代肝细胞损伤模型中,全基因转录组分析发现,4 种 PAs 主要通过影响细胞周期、细胞死亡和癌症发展 3 条路径上的基因表达,上调转录因子 TP53、MYC、NFjB 和 NUPR1 的表达水平,通过抑制核转录因子 FXR、LXR、SREBF1/2 和 PPARa/c/d 表达,来干扰肝细胞胆汁酸合成^[38]。采用代谢组学和基因组学研究千里光宁 (senecionine) 致大鼠胆汁瘀积型肝损伤模型中,代谢组学分析表明总胆汁酸和结合型胆汁酸含量明显上升,这与其造成的胆汁瘀积密切相关。基因组学发现调控胆汁酸合成转运的基因明显被扰乱,胆汁酸合成基因 CYP7A1、BATT、NTCP、OATPS 表达明显下调,MRP3 表达明显上调,这与体内胆汁酸积累吻合^[39]。

2 具肝毒性萜类成分的代谢与毒理机制研究

2.1 雷公藤甲素 (triptolide)

雷公藤甲素主要是从卫矛科雷公藤属植物分离得到的松香烷型二萜内酯类化合物,从多种抗风湿药用植物雷公藤 *Tripterygium wilfordii* Hook. f.、昆明山海棠 *T. hypoglaucom* Hutch、东北雷公藤 *T. regelii* Sprague et Takeda 中均可分离得到。其具有抗肿瘤、抗炎、免疫调节等多种药理活性,目前在国内外被广泛研究与应用。然而,雷公藤甲素的肝脏、肾、心脏和生殖系统等多脏器毒性引起了人们的广泛关注,也极大地限制了其临床应用^[40]。

一般来说,雷公藤甲素经过常见的 I 相代谢反应羟化、水解反应,生成单羟化、二羟化、三羟化的代谢产物。随后原型和 I 相代谢产物又可通过硫酸化、葡萄糖醛酸化、GSH 加成,形成特定 II 相代谢物。雷公藤甲素发生环氧环开环代谢后可被 GSH 捕获,生成 GSH 代谢物,可在大鼠粪尿中检测到^[41]。采用 UPLC-MS 负离子模式检测雷公藤甲素在大鼠体内的代谢物,从尿中检测到 10 个代谢物,微粒体孵育中检测到 4 个代谢物。雷公藤甲素在体内的代谢反应主要有水解反应、羟基化等 I 相反应和与磺酸化、葡萄糖醛酸化和 GSH 加成等 II 相反应,而在体外微粒体中主要代谢反应是水解和羟化反应^[42]。采用 UPLC-MS 正离子模式检测到雷公藤甲素 38 个 I 相代谢物、9 个 II 相代谢物,其中发现 8 个新颖的 *N*-乙酰半胱氨酸加成物,主要 I 相代谢反应为羟基化、水解

和去饱和反应, *N*-乙酰半胱氨酸加成物的产生是由于代谢形成活性中间体与被半胱氨酸捕获相关^[43]。

不同于 PAs 通过代谢活化产生毒性,雷公藤甲素本身具有强烈的毒性,其毒性官能团核心在于结构中的环氧环,而代谢途径则可使雷公藤甲素脱毒。在添加 GSH 微粒体孵育, GSH 加成代谢物被检测到 (图 2)。使用 GSH 耗竭剂 *L*-丁硫醚-*S*,*R*-磺酰亚胺 (BSO) 和 CYP 广谱抑制剂 1-氨基苯并三唑 (ABT) 均可增强其在大鼠体内的毒性^[44]。药物代谢相关酶 CYP450 对雷公藤甲素毒性密切相关。在三明治培养的鼠肝细胞模型中,添加 CYP 广谱抑制剂 ABT 可通过抑制其代谢,增加其诱导的细胞毒性,另外, *P*-糖蛋白诱导剂或抑制剂可影响雷公藤甲素外排,从而影响其肝毒性^[45]。雷公藤甲素也对药物代谢酶表现出不同程度的抑制作用,可在转录和蛋白水平上降低小鼠肝脏中 CYP3A、CYP2C9、CYP2C19 和 CYP2E1 底物亲和性、活性和表达^[46-47]。在鼠微粒体和三明治培养的鼠肝细胞细胞中,雷公藤甲素对 CYP3A 具有弱的抑制作用,并呈现时间和浓度依赖性,添加 CYP3A 的诱导剂可增加 CYP3A 的代谢,缩短雷公藤甲素代谢半衰期^[48]。CYP450 还原酶敲除的小鼠表现为肝毒性明显加重^[46]。雷公藤甲素可能通过上调肝细胞膜药物转运相关的有机阴离子转运体 Oatp2 表达和下调多药耐药相关蛋白 Mrp2 表达,扰乱肝内胆红素和胆汁酸代谢排泄平衡,这可能是雷公藤甲素诱导肝损伤的机制之一^[49]。

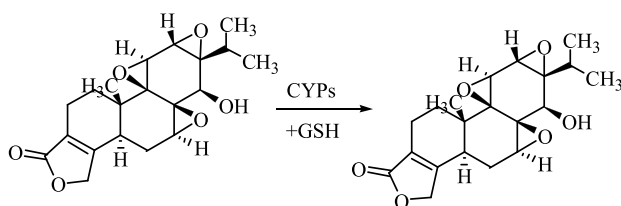


图 2 雷公藤甲素与 GSH 代谢结合模式

Fig. 2 Binding model of triptolide and GSH

关于雷公藤甲素毒性机制,主要表现在细胞凋亡和自噬、炎症因子、胆汁酸代谢功能紊乱、氧化应激等方面。细胞凋亡和自噬是雷公藤甲素致肝毒性的主要机制之一,雷公藤甲素体外诱导正常人肝细胞株 L-02 凋亡可能与上调 Caspase-3、9 的活性有关^[50]。雷公藤甲素可引起 L-02 细胞凋亡,可能与其促进活性氧 (ROS) 生成、氧化应激反应、抑制细胞膜 ATPase 活性、降低线粒体膜电位和促进

细胞凋亡因子释放有关^[51]。另外,有研究表明胞内钙离子的释放及 p38MAPK 的磷酸化可能参与了雷公藤甲素引起的 L-02 细胞毒性^[52]。0.8 mg/kg 雷公藤甲素 ig 给予大鼠 12 h 后,可诱导小鼠肝组织发生炎细胞浸润、结构破坏、细胞坏死及代偿性增生;透射电镜下亦可见肝细胞内细胞骨架结构异常、细胞器大量脱落、自噬体明显增多;增殖细胞核抗原(PCNA)及 TUNEL 染色结果表明,雷公藤甲素可显著诱导肝细胞凋亡,这表明肝细胞自噬性凋亡是雷公藤甲素诱导急性肝损伤的关键病理环节^[53]。Western blotting 和免疫荧光法均表明雷公藤甲素对 Hepg2 细胞肝毒性可通过上调自噬相关蛋白 LC3II 与 Beclin1 蛋白水平的表达,同样表明其能够引起自噬相关蛋白 LC3 表达的增多,均具有一定的浓度依赖性。雷公藤甲素造成 Hepg2 肝细胞损伤的机制可能与过氧化损伤以及其介导的自噬过度激活有关。

雷公藤甲素所致的肝损伤可能通过激活免疫相关的 Toll 样受体 4 (TLR4) 信号,增加炎症因子白细胞介素-17 (IL-17)、IL-6 的表达,影响 T 辅助细胞 17 (Th17) 特异性转录因子 ROR- γ t,进而促进 Th17 细胞活化,增强其致炎功能^[54]。使用抗 IL-17 单克隆抗体中和小鼠体内 IL-17 后,其肝毒性减弱。相反,当雷公藤甲素与重组 IL-17 共同作用,雷公藤甲素所诱导的肝毒性显著加重,说明 IL-17 介导参与了雷公藤甲素肝毒性^[55]。另外,T 淋巴细胞 Th17/Tregs 的失衡在雷公藤甲素诱导肝损伤起了明显作用,表现为 Th17 细胞数量明显上升,Tregs 细胞数量明显下降,Th17 和 Tregs 数目比值与上升的转氨酶水平呈正相关^[56]。除此之外,雷公藤甲素会导致胆汁酸代谢异常,报告基因转入胆汁酸调节基因 FXR 过表达后,其诱导的肝毒性加剧,相反 FXR 敲除沉默后可加剧雷公藤甲素诱导的肝毒性。在动物毒性中,FXR 激动剂 GW4064 可减弱雷公藤甲素诱导的小鼠肝毒性,缓解肝结构紊乱、结构受损、GSH 耗竭、脂质过氧化^[57]。Sirt1/FXR 信号通路可减弱雷公藤甲素诱导的肝损伤,在肝损伤中,FXR 受体下游胆汁酸转运体 BSEP 表达显著降低,胆汁酸合成酶胆固醇 7 α -羟化酶 (CYP7A1) 表达明显升高。Sirt1 激动剂 SRT1720 和 FXR 激动剂奥贝胆酸 (OCA) 可明显减弱雷公藤甲素诱导的肝损伤^[58]。

系统组学是分析雷公藤甲素毒性较全面的手段,全基因组微阵列分析表明雌性小鼠肝脏中 3 329 个基因表达受雷公藤甲素影响,发生明显变化,主

要涉及到胰岛素信号通路代谢、细胞周期、氧化应激和细胞凋亡,这与体内 Caspase-3 活性上升和血清葡萄糖含量、GSH/氧化型谷胱甘肽 (GSSG) 值、葡萄糖-6-磷酸酶活性、磷酸烯醇式丙酮酸羧激酶活性、肝糖原水平降低结果一致。另外,糖皮质激素和胰岛素样生长因子 1 可能参与雷公藤甲素引起的肝毒性,这表明雷公藤甲素可影响肝脏氧化还原状态,降低血糖和诱导肝细胞凋亡,这与胰岛素信号通路、糖代谢途径、细胞应激途径密切相关,有助于阐明雷公藤甲素诱导肝毒性的机制^[59]。靶向鞘酯组学联合转录组学揭示,雷公藤甲素所致大鼠肝毒性出现了明显的鞘酯紊乱,鞘酯神经酰胺 (鞘氨醇) 和鞘磷脂 (SMS)、鞘氨醇 (SPH) 含量明显上升,二氢神经酰胺 (DHCER) 和己糖基神经酰胺 (HEXEVER) 含量显著降低,肝脏中的调控鞘酯代谢的酶 kdsr、CerS2、CerS4、CerS5 和 CerS6 的表达也相应发生变化,长链 (C₁₆~C₂₀) 鞘酯明显增加,饱和 DHCER 和 DHCER 含量发生明显变化^[60]。

2.2 黄独素 B (diosbulbin B)

克罗烷二萜内酯类化合物是按其结构可分为含呋喃型二萜和不含呋喃型二萜,其中含呋喃环的黄独素类化合物表现出明显的肝毒性。呋喃型克罗烷二萜在自然界中主要分布在薯蓣科的黄独属 *Dioscorea* L., 木防己属 *Cocculus* DC.^[61], 唇形科的香科科属 *Teucrium* Linn.^[62]、筋骨草属 *Ajuga* Linn.^[63]、黄芩属 *Scutellaria* Linn.^[64], 马鞭草科的紫珠属 *Callicarpa* Linn.^[65] 植物中,其中在黄独 *Dioscoreae bulbiferae* L.、粉防己 *Stephania tetrandra* S. Moore、金果榄 *Tinospora capillipes* 含量较高。黄独^[66]和粉防己^[67]在临床应用过程中都曾发生过严重的肝毒性不良反应,据现代研究可能与其所含呋喃二萜相关。

化学成分研究表明,黄药子的毒性成分主要是黄独素类化合物。黄独素 B 目前的研究较为透彻,以黄独素 B 为例,阐述该类化合物的代谢和毒理作用机制。黄独素 B 其本身并不具有毒性,而是进入体内之后,在 CYP3A 酶催化下,结构中的呋喃环经代谢活化生成开环的顺烯二醛 (*cis-enedial*) 的活性中间体^[68],该中间体可在大鼠体内捕获半胱氨酸、乙酰半胱氨酸、谷胱甘肽,分别生成相应加成的代谢物 (图 3),此类加成代谢物在添加半胱氨酸或 GSH 的人微粒体和鼠微粒体孵育实验中也得到有效验证。另外,黄独素 B 还可与肝脏蛋白质的

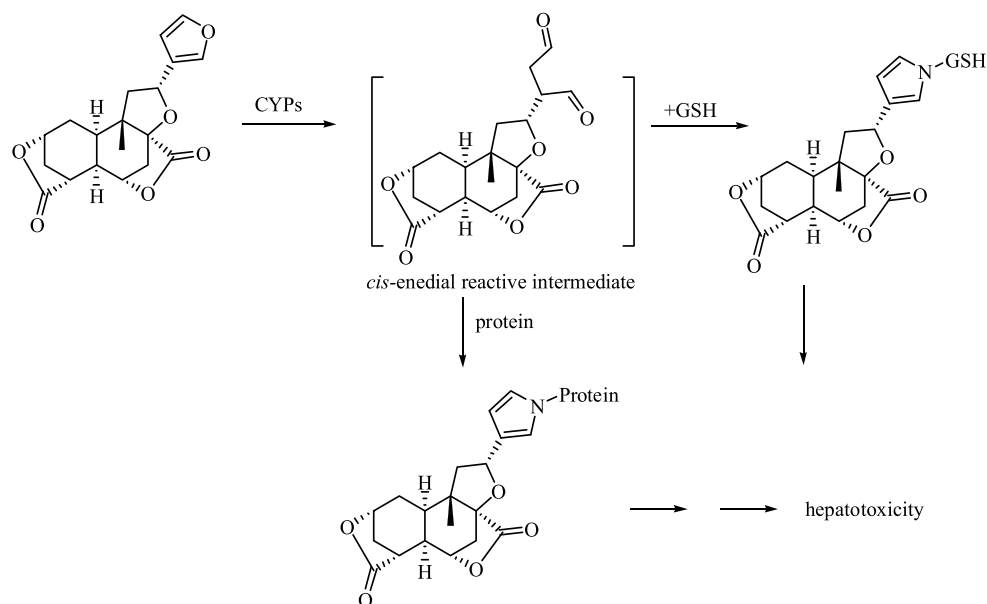


图 3 黄独素 B 代谢活化致毒机制

Fig. 3 Metabolic activation of diosbulbin B leading to hepatotoxicity

半胱氨酸巯基和赖氨酸氨基发生共价结合而引起肝毒性。对黄独素 B 进行选择性的结构改造, 对呋喃环进行还原使之生成四氢呋喃所得到的四氢黄独素 B 则不会导致大鼠产生肝毒性, 因此说明呋喃环是黄独素 B 产生毒性的关键基团^[69]。另有研究表明, 黄独素 B 也可通过 CYP3A4 代谢活化, 对大鼠肝原代细胞、HepG2 和 L02 细胞产生明显的细胞毒作用, CYP3A4 抑制剂酮康唑通过抑制其代谢活化, 可抑制黄独素 B 诱导大鼠原代细胞和 CYP3A4 转染 HepG2 和 L02 细胞的细胞毒性^[69]。另外, 给予小鼠 50 mg/kg 黄独素 B, 发现小鼠肝脏药物外排型转运体 Mrp2 表达下降, 阻碍肝内胆红素、胆汁酸及毒性物质外排, 从而造成其在体内及肝内的蓄积, 加剧其本身造成的肝毒性, 可能是黄独素 B 引起药源性肝损伤的机制之一^[70]。

以 GSH 和对溴苄胺为捕获剂, 可建立高灵敏度、高选择性的有毒呋喃化合物的筛查技术, 来分析表征黄独素 B 活性中间体烯二醛与交联蛋白的相互作用, 实验发现半胱氨酸和赖氨酸残基均可与黄独素 B 通过半胱氨酸加成、希夫碱 (schiffs base)、半胱氨酸/赖氨酸交联 3 种方式形成共价相互作用, 并呈现时间和剂量依赖性。CYP3A4 特异性抑制剂酮康唑预处理可抑制 CYP3A4 对黄独素 B 代谢活化, 减少黄独素 B 和蛋白交联物形成, 从而减轻其毒性。共服用 CYP3A4 诱导剂地塞米松或丁硫氨酸磺西汀促进黄独素 B 代谢活化, 黄独素 B 和蛋白交

联物形成则会增加, 毒性也会相应增加。上述结果显示黄独素 B 和肝蛋白加合物的水平与肝毒性的严重程度呈正相关。因此, 黄独素 B 与肝蛋白加合物可作为诊断黄独素 B 诱导肝损伤的标志物^[71]。另外, 通过顺烯二醛和匙孔血蓝蛋白联合合成抗原, 免疫家兔后获得血清, 酶联免疫吸附实验 (ELISA) 显示免疫家兔具有高滴度的抗血清。免疫印迹分析表明, 顺烯二醛修饰的牛血清白蛋白 (BSA) 是以浓度依赖性的方式获得多克隆抗体, 竞争性 ELISA 法和竞争性免疫印迹分析确定其特异性。使用该抗体进行免疫印迹分析发现黄独素 B 损伤后的肝脏中存在多条化学发光带^[72]。

关于黄独素 B 及其类似物的毒理机制研究, 目前报道比较多的是通过氧化应激、GSH 耗竭损伤肝脏。当 200 mg/kg 黄独素 B ig 给予小鼠时, 血清中的丙氨酸转氨酶 (ALT)、天冬氨酸转氨酶 (AST) 和碱性磷酸酶 (ALP) 水平明显升高, 血清中肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 含量也明显升高, 并能够显著诱导肝组织中氧化应激血红素氧合酶-1 (HO-1) 的表达, 表明由 TNF- α 介导的炎症肝损伤以及氧化应激损伤可能是黄独素 B 所致急性肝毒性的机制之一^[73]。在 16、32、64 mg/kg 黄独素 B 连续灌服小鼠 12 d 的毒性研究中, 小鼠肝脏明显受损, 肝脏 HE 染色显示肝细胞肿胀, 肝组织中丙二醛 (MDA) 含量增加, 而与氧化应激相关的酶包括谷胱甘肽过氧化物酶 (GSH-Px)、谷胱甘肽-S-转移酶 (GST)、

铜/锌超氧化物歧化酶 (CuZnSOD)、锰超氧化物歧化酶 (MnSOD) 和过氧化氢酶 (CAT) 活性均显著降低。与酶活性一致, CuZn SOD 和 CAT 基因的表达明显下降, 综合表明氧化应激损伤是黄独素 B 造成小鼠肝脏损伤机制之一^[74]。黄独素 B 对体外培养的人正常肝细胞株也表现强烈的细胞毒性, 使胞内 GSH 水平下降, 而 ROS 含量显著上升, 而抗氧化剂 *N*-乙酰半胱氨酸则可明显逆转黄独素 B 对肝细胞的毒性作用, 由此表明黄独素 B 致毒机制也可能与其引起肝细胞氧化应激损伤有关^[75]。在代谢组学研究黄独素 B 所致小鼠肝毒性实验中, UPLC-MS 分析血清中胆汁酸含量, 牛磺酸结合型的胆汁酸含量明显升高, 与肝毒性诊断物 ALT 和 AST 活性呈现良好的相关性, 因此, 以牛磺酸结合型为主的胆汁酸可作为评价黄独素 B 致小鼠肝毒性的生物标志物^[76]。

2.3 川楝素 (toosendanin)

川楝素最早是从楝科植物川楝 *MeLia toosendan* Sieb. et Zucc. 和苦楝 *M. azedarach* Linn. 的树皮或果实中提取的柠檬苦素型四环三萜化合物, 也是川楝、苦楝的主要药效成分, 亦是常见的植物源农药 (杀虫剂)。川楝子在临床使用中会出现肝脏损伤的现象, 毒理学研究发现川楝素具有明显的肝脏毒性, 类似的化合物还有印楝素 (azadirachtin)^[77]。代谢研究表明呋喃环是川楝素的毒性官能团, 川楝素中的呋喃环在 CYP3A4 的介导下生成了 3-取代的烯二醛中间体。该中间体易与 GSH 反应生成 3-吡咯啉-2-酮的结合物, 此外, 可与巯基形成不稳定的 S-结合物。肝细胞和 CYP3A-null 小鼠实验证明川楝素导致的肝毒性与其代谢活化关系密切, CYP3A 介导的代谢活化能减弱川楝素引起的肝毒性, 且这一过程与胆汁酸水平的改变相关。以 GSH 为捕获剂的人肝微粒体代谢研究中, 发现川楝素的多种 GSH 结合物, 提示有反应性代谢物的生成, 并且这些 GSH 结合物的生成能够被酮康唑完全抑制; 大鼠体内毒性研究显示 ig 给药前给予酮康唑能够降低川楝素的肝毒性。当代谢活化被抑制后, 川楝素可通过诱导小鼠肝脏中 CYP7A1、Ost β 和 Mrp4 基因水平使血浆和肝脏中胆汁酸水平显著升高, 川楝素诱导的肝毒性也增加^[78-79]。

在 10 $\mu\text{mol/L}$ 川楝素处理体外培养致大鼠原代肝脏细胞损伤研究中, 川楝素可以增加大鼠原代肝脏细胞凋亡相关的 Caspase-8、9 和 3 的活性, 提示

川楝素可能激发 Caspases 依赖的细胞凋亡过程, 并能够诱发原代细胞 ROS 生成。在体外肝毒性研究中, 5、10 $\mu\text{mol/L}$ 川楝素处理大鼠原代肝脏细胞 1 h 内, 胞内磷酸化 ERK1/2 和磷酸化应激活化蛋白激酶 (JNK) 的水平显著升高。原活化蛋白激酶 MEK1/2 抑制剂 PD98059 可通过激活 ERK1/2 增强川楝素的肝细胞毒性, 提示 ERK1/2 激活能改善川楝素对肝细胞的细胞毒性。JNK 抑制剂 SP600125 能减轻川楝素的肝细胞毒性, 提示 JNK 的激活会损伤肝细胞。丝裂原活化蛋白激酶 (MAPKs) 信号转导通路激活后, 对川楝素的肝脏细胞毒性会起不同的作用^[80], 通过以上分析表明, 细胞凋亡在川楝素肝损伤中发挥了重要作用。MicroRNA 和信使 mRNA 表达谱分析发现, 川楝素所引起的小鼠肝毒性的 mRNA 和 miRNA 基因变化具有明显的时间和剂量依赖性。连续给予 8 d 川楝素 (80 mg/kg) 可引起小鼠严重肝损伤, 川楝素所造成肝损伤表现为小鼠肝内 GSH 耗竭、肝细胞线粒体功能障碍及脂质代谢紊乱, 可能是其主要肝毒性机制^[81]。

2.4 柴胡皂苷

柴胡皂苷是从柴胡 *Bupleurum chinense* (Wall. ex Hk. f. et Thoms.) S. H. Fu、大叶柴胡 *B. longiradiatum* Turcz. 等柴胡属植物中分离出的三萜皂苷, 也是其有效成分。虽然柴胡属于常见保肝中药, 具有解表退热、疏肝解郁、升举清气之功效, 但是目前研究表明柴胡水提物^[82]、柴胡总皂苷^[83]及单体成分柴胡皂苷 a (saikosaponin a)、柴胡皂苷 d (saikosaponin d) 都具有肝毒性, 这可能与使用剂量不当有关。研究表明, 连续给予 51.2~125.0 g/kg 柴胡总皂苷粗品 15 d, 可造成大鼠明显的肝损伤, 使血清中 ALT、AST 水平升高, 肝指数增大; HE 染色显示受损肝脏表现出不同程度的肝细胞水肿和脂肪变性^[84]。在其进一步的毒性机制研究中, 柴胡总皂苷粗提物可导致肝损伤大鼠血清中总巯基 (-SH) 量增加, 并使血和肝内氧化应激相关的 MDA、GSH 含量增加, SOD、GSH-Px 活性下降, 表明柴胡总皂苷粗提物诱导的肝毒性与肝细胞脂质过氧化作用和抗氧化剂巯基损耗相关^[85]。在体外培养的人肝细胞 L02 研究中, 柴胡皂苷 a 也可通过氧化损伤机制, 降低 L02 细胞 SOD 活性, 升高 MDA 和乳酸脱氢酶 (LDH) 含量, 破坏细胞膜, 使细胞发生损伤而发挥毒性, 而非通过诱导细胞凋亡产生肝细胞毒性^[86]。另外, 柴胡皂苷 d 也可使人肝细胞

L02 LDH 释放率增高,溶血实验发现其毒性作用呈剂量依赖性^[87]。柴胡皂苷肝毒性研究目前还停留于表面,其毒性官能团不清,其相关代谢和相关毒性机制仍需进一步深入探讨。

3 具有肝毒性蒽醌类成分的代谢与毒理机制研究

蒽醌类化合物在自然界中主要分布在蓼科植物中,大黄素(emodin)是一种主要存在于蓼科植物中的蒽醌类成分,在常用中药大黄 *Rheum palmatum* L.、何首乌 *Fallopia multiflora* (Thunb.) Harald.、虎杖 *Polygonum cuspidatum* Houtt 中含量较高,具有广泛的药理学作用。何首乌虽然是一种常见补益类药材,但在临床应用中发现肝损伤不良反应^[88]。何首乌总蒽醌 20 g/kg 连续 ig 3 周,可使大鼠发生严重肝损伤,HE 染色显示大鼠肝细胞坏死和炎症细胞浸润。何首乌总蒽醌通过代谢活化,形成活泼的环氧化的亲电反应性代谢物,随后开环与胞内的 GSH 共价结合生成大黄素-GSH 加成物,在大鼠胆汁检测到该加成物也证实了以上结果^[89]。在大黄素体内外代谢研究中,微粒体孵育检测到大

黄素 3 个常规的羟化代谢产物,体外重组酶揭示 CYP1A2、CYP2C19 和 CYP3A4 是其氧化代谢的主要 I 相代谢酶,体内代谢揭示大鼠胆汁中检测到原型药物可被亲电的半胱氨酸和 GSH 加成,此类加成物有助于解释大黄素的肝毒性(图 4)^[90]。类似地,在大黄素甲醚代谢研究中,3 个新颖大黄素甲醚(physcion)与乙酰半胱氨酸加成代谢产物也在鼠微粒体和大鼠尿中检测到^[91]。药物 II 相代谢相关的葡萄糖醛酸转移酶 UGT1A1 是催化胆红素形成胆红素葡萄糖醛酸结合的主要酶,若 UGT1A1 酶被抑制,则可导致胆汁代谢异常,因此在 UGT1A1 在胆汁淤积性肝损伤中发挥了重要的作用,通过考察大黄素对该酶的抑制作用预测其肝毒性,大黄素在人微粒体、鼠微粒体和 rUGT1A1 体外孵育体系中对 UGT1A1 酶均有中等程度的抑制作用,且抑制类型均为竞争型抑制,其米氏常数(K_i)分别为 5.400 ± 0.956 、 10.020 ± 0.611 、 4.850 ± 0.528 。因此,大黄素可抑制 UGT1A1 酶活性,而导致胆红素代谢异常^[92]。

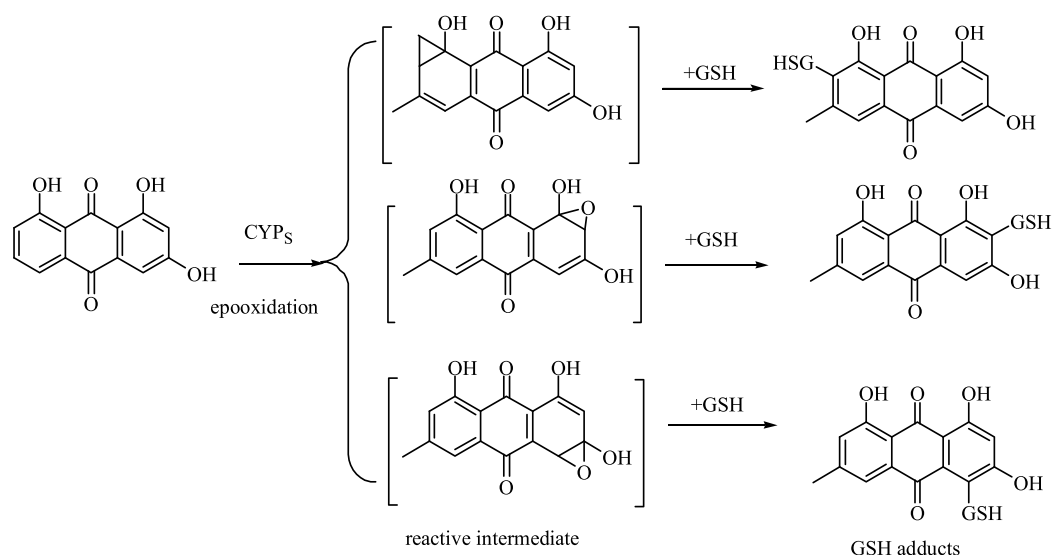


图 4 大黄素代谢活化致毒机制

Fig. 4 Metabolic activation of emodin leading to hepatotoxicity

大黄素、大黄酸在终浓度 6.25~50 $\mu\text{mol/L}$ 时,随着浓度的增加、作用时间的延长对人肝 L02 细胞和 BEL 细胞的损伤加大、抑制率增加。在大黄素对体外培养的肝细胞 L02 损伤研究中,给药 48 h 培养后,LDH 释放率明显升高。采用 PCR 进行相关肝药酶基因分析,大黄素能诱导 CYP450 各亚型 mRNA 表达增加,并可剂量依赖性诱导 CYP1A1、

CYP1B1 的表达^[93]。另外,脂多糖(LPS)可加剧大黄素引起大鼠的肝损伤,共用组血清中炎症因子肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、IL-1b 和 IL-6 水平明显升高。这可能与两者协同的致炎作用相关^[94]。高内涵成像分析发现在浓度为 100 $\mu\text{mol/L}$ 时,芦荟大黄素、大黄素、大黄酸均可引起 HepG2 细胞数目的明显下降,芦荟大黄素还引起胞核的肿胀,导致细胞

核面积增大^[95]。此外,芦荟大黄素可显著抑制 HepaRG 细胞增殖,诱导细胞凋亡,通过 Fas 死亡途径与 ROS 线粒体途径产生肝损伤作用^[96]。

4 具有肝毒性苯丙素类成分的代谢与毒理机制研究

黄樟醚(safrole)是存在于细辛 *Asarum sieboldii* Miq. 根部^[97]、肉豆蔻 *Myristica fragrans* Houtt. 挥发油中的一类简单苯丙素类化合物。黄樟醚的亚甲氧基苯基和烯丙基苯的亚结构经过 CYP450 代谢作用形成活性中间体, Cocktail 法表明黄樟醚可抑制 CYP1A2 活性,鼠微粒体孵育产生的活性中间体 1,2-二羟基-4-烯丙基苯(1,2-dihydroxy-4-allyl benzene)

和 1'-羟基黄樟素(1'-hydroxylsafrole)可被 GSH 捕获,生成 GSH 加成物(图 5)^[98]。黄樟醚是潜在肝毒性或肝癌诱导物,主要与活性中间体黄樟醚-2,3-环氧化物(safrole-2,3-oxide, SAFO)密切相关。使用彗星尾距和微核双核细胞法分析表明黄樟醚-2,3-环氧化物以剂量依赖性对 HepG2 细胞表现出细胞毒性,给药 24、48 h 的半数中毒浓度(TC₅₀)分别为 361.9、193.2 μmol/L。60 mg/kg 黄樟醚-2,3-环氧化物长期 ig 给予小鼠,小鼠肝脏会发生显著病理损伤,其邻近中央静脉的肝细胞表现出空泡化和气球样变性^[99]。

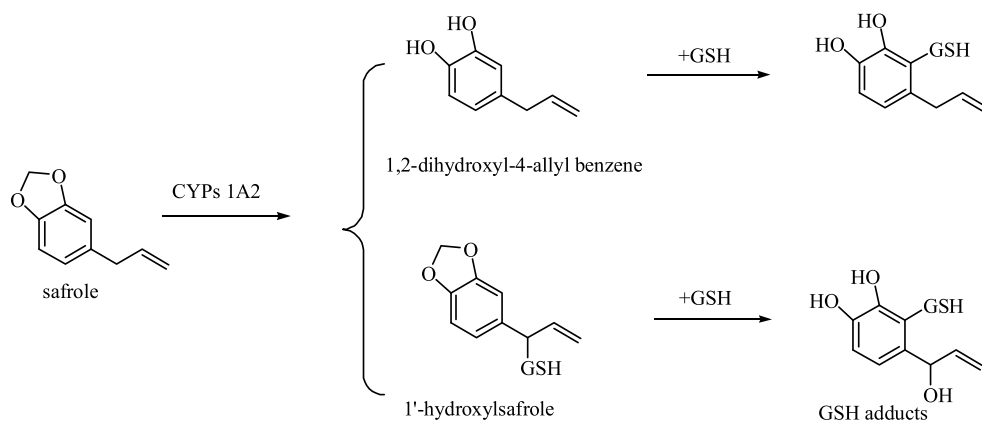


图 5 黄樟醚代谢活化致毒机制

Fig. 5 Metabolic activation of safrole leading to hepatotoxicity

在大鼠体内毒性研究中,黄樟醚剂量依赖性诱导血清中 ALT 和 AST 水平升高,使用抗氧化剂维生素 E、去铁胺、乙酰半胱氨酸可减轻黄樟素诱导的肝损伤。相反,使用谷胱甘肽合成抑制剂丁硫氨酸砷胂则可加剧黄樟素诱导的肝损伤,这表明黄樟素主要诱导肝部氧化应激损伤^[100]。使用 LC/MS 和 32P 同位素标记技术成功在嚼槟榔的肝癌患者的癌组织中检测到黄樟醚与 DNA 加成物,表明其存在致癌的可能性^[101]。

5 中药肝损伤的防治策略

诱发药源性肝损伤的因素既包括药物本身的毒性,也与患者的体质和代谢状态和服用不当等密切相关,因此,为防治中药所引起的肝损伤,笔者认为应采取如下的防治策略:(1)重视中药肝毒性,提高临床中医师和中药师认知,加强患者的科普教育,使患者了解肝损伤典型的症状,从而做到早发现、早治疗。(2)建立肝毒性的中药材和化学成分数据库,收录在临床使用中药及其制剂所导致的肝损伤病例,记录产生肝毒性的服用剂量和时间等关

键信息。对于肝毒性单体成分,应阐明其肝毒性的分子机制。(3)坚持合理使用中药,避免长期或大剂量服用毒性药材。切忌滥用药物,慎用或忌用有肝损伤的中药,对原有肝功能不全或肝衰竭的患者用药更是应该谨慎;严格控制中药用量和服用期限,注意个体体质、年龄、性别、种族的差异,因人而异适当调整剂量。(4)加强对肝毒性药材及其制剂质量的管控,建立毒性成分分析检测标准,完善和规范中药的生产、加工炮制、保存、制剂工艺等全过程质量控制。在剂量、疗程、配伍、给药途径等环节应有严格的规定,以防止因使用不当而致中毒。(5)服药期间,对使用具有潜在肝毒性中药的患者进行及时有效的血-毒性成分浓度检测,并及时监测毒副反应,定期对患者血象、尿液、肝功能等进行检查。一旦发现肝损伤,应及时撤药去除诱因。对肝损伤进行分型诊断,建立相应的专属治疗策略,达到中药肝损伤可防可治的目标。

6 结语

中药用药安全性问题受到了广泛的重视,其肝

毒性问题严重地限制了其临床应用。中药所引起的药物性肝损伤也是限制中药现代化发展、走向国际化的难题,因此合理使用中药,做到减毒控毒是中药发展和临床应用的重大目标。目前,我国尚未建立全面成熟的中药肝损害监测体系,迫切需要药监部门和临床药学的有效监管和严格控制。近年来,随着化学分析方法的进步,越来越多的中药肝毒性代谢成分被发现,这些毒性成分或是本身产生毒性或代谢活化产生毒性,随着相关的毒性机制的不断深入研究,使其毒理作用越来越明晰。针对有毒成分如何进行严格监控,确保临床用药安全,是亟需解决的重大问题。

参考文献

- [1] Dakhoul L, Ghabril M, Chalasani N. Drug-induced chronic liver injury [J]. *J Hepatol*, 2018, doi: 10.1016/j.jhep.
- [2] Yamashita Y I, Imai K, Mima K, et al. Idiosyncratic drug-induced liver injury: A short review [J]. *Hepatol Commun*, 2017, 1(6): 494-500.
- [3] Clark J, Mcgoey L. The black box warning on philanthrocapitalism [J]. *Lancet*, 2016, 388(10059): 2457-2459.
- [4] Cosyns B, Droogmans S. 'Black box warning' on food and drug administration criteria for drug-induced heart valve disease? [J]. *Eur Heart J Cardiovasc Imag*, 2015, 16(2): 154-155.
- [5] Zeidan A M, Gore S D, Davidoff A J. US food and drug administration black box warning and its impact on the use of erythropoiesis-stimulating agents: Thinking outside the box [J]. *J Clin Oncol*, 2017, 35(28): 3264.
- [6] 孙润菲, 孙明瑜. 中草药诱导肝损伤的研究进展 [J]. *中国医刊*, 2017, 52(3): 13-17.
- [7] 吴豪, 钟荣玲, 夏智, 等. 潜在肝毒性中药的成分研究进展 [J]. *中国中药杂志*, 2016, 41(17): 3209-3217.
- [8] 雷怀成, 易建华, 刘涛. 乌头碱中毒肝细胞凋亡的观察 [J]. *毒理学杂志*, 2004, 18(3): 199-200.
- [9] 张开乔, 卓萃, 刘茜, 等. 乌头碱中毒的法医学研究进展 [A] // 证据理论与科学国际研讨会论文集 [C]. 北京: 中国政法大学 2009.
- [10] 孙蓉, 王晨. 北豆根毒性研究进展 [J]. *中国药物警戒*, 2009, 6(9): 546-549.
- [11] 曹思硕, 杜军. 吴茱萸毒理学研究进展 [J]. *毒理学杂志*, 2017, 31(5): 396-400.
- [12] 张茜, 周绮, 金若敏, 等. 吴茱萸次碱对肝肾毒性的初步研究 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2011, 17(8): 221-225.
- [13] 郭秋平, 金若敏. 苦参碱和氧化苦参碱致小鼠肝毒性比较 [J]. *中国药理学与毒理学杂志*, 2016, 30(7): 736-740.
- [14] Dreger M, Stanisławska M, Krajewskapatan A, et al. Pyrrolizidine alkaloids-chemistry, biosynthesis, pathway, toxicity, safety and perspectives of medicinal usage [J]. *Herba Polonica*, 2009, 55(4): 127-147.
- [15] Wiedenfeld H. Plants containing pyrrolizidine alkaloids: toxicity and problems [J]. *Food Add Contam*, 2011, 28(3): 282-292.
- [16] Edgar J A, Colegate S M, Bopprā M, et al. Pyrrolizidine alkaloids in food: A spectrum of potential health consequences [J]. *Food Add Contam*, 2011, 28(3): 308-324.
- [17] Merz K H, Schrenk D. Interim Relative potency factors for the toxicological risk assessment of pyrrolizidine alkaloids in food and herbal medicines [J]. *Toxicol Lett*, 2016, doi: org/10.1016/j.toxlet.2916.05.002.
- [18] Ruan J, Yang M, Fu P, et al. Metabolic activation of pyrrolizidine alkaloids: insights into the structural and enzymatic basis [J]. *Chem Res Toxicol*, 2014, 27(6): 1030-1039.
- [19] Chen M, Li L, Zhong D, et al. 9-Glutathionyl-6,7-dihydro-1-hydroxymethyl-5H-pyrrolizine is the major pyrrolic glutathione conjugate of retronecine-type pyrrolizidine alkaloids in liver microsomes and in rats [J]. *Chem Res Toxicol*, 2016, 29(2): 180-189.
- [20] Wang C C, Xia Q, Li M, et al. Metabolic activation of pyrrolizidine alkaloids leading to phototoxicity and photogenotoxicity in human HaCaT keratinocytes [J]. *J Envir Sci Health Part C Envir Carcinog Ecotoxicol Rev*, 2014, 32(4): 362-384.
- [21] Merz K H, Schrenk D. Interim relative potency factors for the toxicological risk assessment of pyrrolizidine alkaloids in food and herbal medicines [J]. *Toxicol Lett*, 2016, 263: 44-57.
- [22] Neuman M G, Cohen L, Opris M, et al. Hepatotoxicity of pyrrolizidine alkaloids [J]. *J Pharm Pharm Sci*, 2015, 18(4): 825-843.
- [23] Yan X, Hong K, Feng J, et al. Identification of toxic pyrrolizidine alkaloids and their common hepatotoxicity mechanism [J]. *Int J Mol Sci*, 2016, 17(3): 318.
- [24] Yang X, Li W, Sun Y, et al. A Comparative study of hepatotoxicity of pyrrolizidine alkaloids retrorsine and monocrotaline [J]. *Chem Res Toxicol*, 2017, 30(2): 532-539.
- [25] Chen T, Mei N, Fu P P. Genotoxicity of pyrrolizidine alkaloids [J]. *J Appl Toxicol*, 2010, 30(3): 183-196.

- [26] Xia Q, Ma L, He X, *et al.* 7-Glutathione pyrrole adduct-A potential DNA reactive metabolite of pyrrolizidine alkaloids [J]. *Chem Res Toxicol*, 2015, 28(4): 615-620.
- [27] Xia Q, Zhao Y, Tungeln L S V, *et al.* Pyrrolizidine alkaloid-derived DNA adducts as a common biological biomarker of pyrrolizidine alkaloid-induced tumorigenicity [J]. *Chem Res Toxicol*, 2013, 26(9): 1384-1396.
- [28] Tu M, Li L, Lei H, *et al.* Involvement of organic cation transporter 1 and CYP3A4 in retrorsine-induced toxicity [J]. *Toxicology*, 2014, 322(4): 34-42.
- [29] Tu M, Sun S, Wang K, *et al.* Organic cation transporter 1 mediates the uptake of monocrotaline and plays an important role in its hepatotoxicity [J]. *Toxicology*, 2013, 311(3): 225-230.
- [30] Naumann C, Hartmann T, Ober D. Evolutionary recruitment of a flavin-dependent monooxygenase for the detoxification of host plant-acquired pyrrolizidine alkaloids in the alkaloid-defended arctiid moth *Tyria jacobaeae* [J]. *Proceed Nat Acad Sci USA*, 2002, 99(9): 6085-6090.
- [31] Yang M, Ruan J, Fu P P, *et al.* Cytotoxicity of pyrrolizidine alkaloid in human hepatic parenchymal and sinusoidal endothelial cells: Firm evidence for the reactive metabolites mediated pyrrolizidine alkaloid-induced hepatotoxicity [J]. *Chemico-Biol Interact*, 2016, 243: 119-126.
- [32] Gao H, Ruan J Q, Chen J, *et al.* Blood pyrrole-protein adducts as a diagnostic and prognostic index in pyrrolizidine alkaloid-hepatic sinusoidal obstruction syndrome [J]. *Drug Design Dev Therapy*, 2015, 9: 4861-4868.
- [33] Ruan J, Gao H, Li N, *et al.* Blood pyrrole-protein adducts-A biomarker of pyrrolizidine alkaloid-induced liver injury in humans [J]. *J Envir Sci Health Part C Envir Carcinog Ecotoxicol Rev*, 2015, 33(4): 404-421.
- [34] Gao H, Li N, Wang J Y, *et al.* Definitive diagnosis of hepatic sinusoidal obstruction syndrome induced by pyrrolizidine alkaloids [J]. *J Digestive Diseases*, 2012, 13(1): 33-39.
- [35] 姚 军, 戚新明, 任 进. 野百合碱毒性机制研究进展 [J]. 毒理学杂志, 2014, doi: 10.16421/j. cnki.1002-3127.
- [36] Edgar J A, Molyneux R J, Colegate S M. Pyrrolizidine alkaloids: Potential role in the etiology of cancers, pulmonary hypertension, congenital anomalies, and liver disease [J]. *Chem Res Toxicol*, 2014, 28(1): 4-20.
- [37] Hanumegowda U M, Copple B L, Shibuya M, *et al.* Basement membrane and matrix metalloproteinases in monocrotaline-induced liver injury [J]. *Toxicol Sci*, 2003, 76(1): 237-246.
- [38] Luckert C, Hessel S, Lenze D, *et al.* Disturbance of gene expression in primary human hepatocytes by hepatotoxic pyrrolizidine alkaloids: A whole genome transcriptome analysis [J]. *Toxicology In Vitro*, 2015, 29(7): 1669-1682.
- [39] Xiong A, Yang F, Fang L, *et al.* Metabolomic and genomic evidence for compromised bile acid homeostasis by senecionine, a hepatotoxic pyrrolizidine alkaloid [J]. *Chem Res Toxicol*, 2014, 27(8): 775-786.
- [40] 骆永伟, 施 畅, 原 野, 等. 雷公藤甲素的毒理学研究进展 [J]. 毒理学杂志, 2009, 23(1): 74-77.
- [41] Liu J, Li L, Zhou X, *et al.* Metabolite profiling and identification of triptolide in rats [J]. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2013, 939(22): 51-58.
- [42] Peng Z H, Wang J J, Du P, *et al.* Identification of *in vivo* and *in vitro* metabolites of triptolide by liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2012, 70(11): 624-630.
- [43] Du F, Liu T, Liu T, *et al.* Metabolite identification of triptolide by data-dependent accurate mass spectrometric analysis in combination with online hydrogen/deuterium exchange and multiple data-mining techniques [J]. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 2011, 25(20): 3167-3177.
- [44] Du F, Liu Z, Li X, *et al.* Metabolic pathways leading to detoxification of triptolide, a major active component of the herbal medicine *Tripterygium wilfordii* [J]. *J Appl Toxicol*, 2014, 34(8): 878-884.
- [45] Zhuang X M, Shen G L, Xiao W B, *et al.* Assessment of the roles of P-glycoprotein and cytochrome P450 in triptolide-induced liver toxicity in sandwich-cultured rat hepatocyte model [J]. *Drug Metab Disp*, 2013, 41(12): 2158-2165.
- [46] Lu Y, Xie T, Zhang Y, *et al.* Triptolide induces hepatotoxicity via inhibition of CYP450s in rat liver microsomes [J]. *Bmc Compl Altern Med*, 2017, 17(1): 15.
- [47] 姚金成, 饶 健, 曾令贵, 等. 雷公藤甲素单次及多次给药对大鼠肝药酶活性的影响 [J]. 中国药房, 2010, 21(11): 961-964.
- [48] Shen G, Zhuang X, Xiao W, *et al.* Role of CYP3A in regulating hepatic clearance and hepatotoxicity of triptolide in rat liver microsomes and sandwich-cultured hepatocytes [J]. *Food Chem Toxicol*, 2014, 71(8): 90-96.
- [49] 周利婷, 曲晓宇, 陶婵娜, 等. 雷公藤甲素致小鼠肝损伤对转运体 Mrp2 和 Oatp2 的影响 [J]. 中国医院药学杂志, 2016, 36(21): 1844-1847.
- [50] 姚金成, 刘 颖, 胡 领, 等. 雷公藤甲素对 Caspase 诱导人肝细胞 L-02 凋亡机制的研究 [J]. 中国药房,

- 2012, 23(43): 4036-4038.
- [51] 周 静, 张 磊, 吴 瑕, 等. 雷公藤甲素对 L-O2 细胞凋亡及 Caspase-3、ATPase、MMP、Ca²⁺的影响 [J]. 中药药理与临床, 2016, 32(6): 72-75.
- [52] 姚金成, 刘 颖, 胡 领, 等. 雷公藤甲素对人肝细胞 L-O2 钙离子及 P38MAPK 磷酸化的影响 [J]. 中国医院药学杂志, 2013, 33(10): 760-763.
- [53] 刘泽洲, 许可嘉, 张天娇, 等. 雷公藤甲素诱导小鼠急性肝损伤的形态学研究 [J]. 现代生物医学进展, 2015, 15(17): 3207-3211.
- [54] 于淑静, 魏彩冰, 陶 崑, 等. 雷公藤甲素致小鼠肝损伤的机制研究 [J]. 天然产物研究与开发, 2017, 29(3): 472-476.
- [55] Wang X, Jiang Z, Xing M, *et al.* Interleukin-17 mediates triptolide-induced liver injury in mice [J]. *Food Chem Toxicol*, 2014, 71(8): 33-41.
- [56] Wang X, Jiang Z, Cao W, *et al.* Th17/Treg imbalance in triptolide-induced liver injury [J]. *Fitoterapia*, 2014, 93(3): 245-251.
- [57] Jing J, Xiaozhe S, Zhongxiang Z, *et al.* Activation of the farnesoid X receptor attenuates triptolide-induced liver toxicity [J]. *Phytomed Int J Phytotherapy Phytopharmacol*, 2015, 22(10): 894-901.
- [58] Yang J, Sun L, Wang L, *et al.* Activation of Sirt1/FXR signaling pathway attenuates triptolide-induced hepatotoxicity in rats [J]. *Frontiers Pharmacol*, 2017, doi: org/10.3389/fphar.2017.00260.
- [59] Wang J, Jiang Z, Ji J, *et al.* Gene expression profiling and pathway analysis of hepatotoxicity induced by triptolide in Wistar rats [J]. *Food Chem Toxicol*, 2013, 58(3): 495-505.
- [60] Liang Q, Feng Q, Jia Z, *et al.* Integrated targeted sphingolipidomics and transcriptomics reveal abnormal sphingolipid metabolism as a novel mechanism of the hepatotoxicity and nephrotoxicity of triptolide [J]. *J Ethnopharmacol*, 2015, 170(5): 28-38.
- [61] 王 蓉, 马腾茂, 刘 飞, 等. 防己的药理作用及临床应用研究进展 [J]. 中国中药杂志, 2017, 42(4): 634-639.
- [62] 张 凯, 王绪礼, 王义坤, 等. 香科科属植物的化学成分和药理活性研究进展 [J]. 中南药学, 2016, 14(7): 735-741.
- [63] 蔡祯艳, 易刚强, 李云耀, 等. 筋骨草属植物中新克罗烷型二萜类成分的核磁共振谱图特征 [J]. 中南药学, 2014, 12(11): 1108-1112.
- [64] 曲桂武. 安徽半枝莲中新克罗烷型二萜化合物的发现及抗肿瘤活性研究 [D]. 青岛: 中国海洋大学, 2012.
- [65] 蒋 竞, 廖志新, 吉 民. 克罗烷型二萜的结构与核磁共振特征 [J]. 化工时刊, 2007, 21(12): 49-53.
- [66] 刘继荣. 黄药子引起中毒性肝炎 2 例 [J]. 药物不良反应杂志, 2002, 4(2): 129-130.
- [67] 梁 琦, 倪 诚, 颜贤忠, 等. 广防己、粉防己的肝肾毒性及代谢组学比较研究 [J]. 中国中药杂志, 2010, 35(21): 2882-2888.
- [68] Lin D, Li C, Peng Y, *et al.* Cytochrome P450-mediated metabolic activation of diosbulbin B [J]. *Drug Metab Disp Biol Fate Chem*, 2014, 42(10): 1727.
- [69] Li W, Lin D, Gao H, *et al.* Metabolic activation of furan moiety makes Diosbulbin B hepatotoxic [J]. *Archiv Toxicol*, 2016, 90(4): 863-872.
- [70] 曲晓宇, 周利婷, 张四喜, 等. 黄独素 B 致小鼠肝损伤过程中对肝外排型转运体 Mrp2 表达的影响 [J]. 中国医院药学杂志, 2016, 36(19): 1633-1636.
- [71] Wang K, Lin D, Guo X, *et al.* Chemical identity of interaction of protein with reactive metabolite of diosbulbin B *in vitro* and *in vivo* [J]. *Toxins*, 2017, 9(8): 249.
- [72] Hu Z, Zhou S, Zhang N, *et al.* Development of polyclonal antibodies for detection of diosbulbin B-derived *cis*-enedial protein adducts [J]. *Chem Res Toxicol*, 2018, 254: 64-69.
- [73] 牛成伟, 陆 宾, 季莉莉, 等. 黄独素 B 诱导小鼠急性肝损伤及其机制 [J]. 中国中药杂志, 2014, 39(7): 1290-1292.
- [74] Ma Y, Niu C, Wang J, *et al.* Diosbulbin B-induced liver injury in mice and its mechanism [J]. *Human Experim Toxicol*, 2014, 33(7): 729.
- [75] 马 敏, 江振洲, 阮金兰, 等. 黄药子二萜内酯类成分对肝细胞毒性的实验研究 [J]. 中国天然药物, 2011, 9(4): 280-285.
- [76] 徐 英, 陈崇崇, 杨 莉, 等. 基于胆汁酸代谢网络分析中药黄药子的肝毒性 [J]. 药学报, 2011, 46(1): 39-44.
- [77] 齐双岩, 金若敏, 刘红杰, 等. 川楝子致大鼠肝毒性机制研究 [J]. 中国中药杂志, 2008, 33(16): 2045-2047.
- [78] Yu J, Deng P, Zhong D, *et al.* Identification of amino acid and glutathione *N*-conjugates of toosendanin: bioactivation of the furan ring mediated by CYP3A4 [J]. *Chem Res Toxicol*, 2014, 27(9): 1598-1609.
- [79] 余京华. 川楝素代谢活化和致肝毒性机制研究 [D]. 北京: 中国科学院大学, 2015.
- [80] 张云海. 川楝素肝脏毒性机理研究 [D]. 上海: 中国科学院上海药物研究所, 2008.
- [81] 陆晓燕, 郑 洁, 纪 彩, 等. 基于毒理基因组学的川楝子肝毒性研究 [A] // 全国药物毒理学会论文集 [C]. 重庆: 中国毒理学会, 2016.

- [82] 孙 蓉, 吕丽莉, 王 丽, 等. 柴胡致大鼠肝毒性氧化损伤机制研究 [J]. 中药药理与临床, 2009, 25(1): 49-51.
- [83] 吕丽莉, 黄 伟, 于 晓, 等. 柴胡总皂苷粗提取物对大鼠肝毒性损伤作用研究 [J]. 中国药物警戒, 2009, 6(4): 202-206.
- [84] 黄 伟, 孙 蓉, 张作平. 柴胡总皂苷粗提物多次给药对大鼠肝毒性的"量-时-毒"关系研究 [J]. 中国中药杂志, 2010, 35(24): 3344-3347.
- [85] 黄 伟, 吕丽莉, 任海勇, 等. 柴胡总皂苷粗提物致大鼠肝毒性氧化损伤机制研究 [J]. 中草药, 2009, 40(S1): 227-229.
- [86] 李晓宇, 李晓骄阳, 孙 蓉. 柴胡皂苷 a 对人肝细胞 L-02 的体外肝毒性机制研究 [A] // 中国药学会大会暨中国药师周论文集 [C]. 南宁: 中国药学会, 2013.
- [87] 李 涛, 江振洲, 王 涛, 等. 柴胡皂苷 d 对人肝细胞 L-O2 体外毒性机制探讨 [J]. 中国临床药理学与治疗学, 2007, 12(4): 396-400.
- [88] 杨 倩, 李晓宇, 赵新妹, 等. 含何首乌的中成药不良反应系统分析 [J]. 中草药, 2017, 48(9): 1878-1887.
- [89] Jiang L L, Zhao D S, Fan Y X, *et al.* Detection of emodin derived glutathione adduct in normal rats administered with large dosage of *Polygoni Multiflori Radix* [J]. *Frontiers Pharmacol*, 2017, doi: org/10.3389/fphar.2017.00446.
- [90] Qin B, Yang X, Chen J, *et al.* Chemical reactivity of emodin and its oxidative metabolites to thiols [J]. *Chem Res Toxicol*, 2016, 29(12): 2114-2124.
- [91] Qin X, Peng Y, Zheng J. *In vitro* and *in vivo* studies of the electrophilicity of physcion and its oxidative metabolites [J]. *Chem Res Toxicol*, 2018, doi: 10.1021/acs.chemrestox.8b00026.
- [92] Zhang T, Dong D, Lu D, *et al.* Cremophor EL-based nanoemulsion enhances transcellular permeation of emodin through glucuronidation reduction in UGT1A1-overexpressing MDCKII cells [J]. *Int J Pharm*, 2016, 501(1/2): 190-198.
- [93] 汪美汐, 王宇光, 徐焕华, 等. 何首乌中大黄素对 L02 肝细胞 CYP 2A6 酶表达及细胞毒性的影响 [J]. 中国药理学通报, 2016, 32(11): 1543-1548.
- [94] Tu C, Gao D, Li X F, *et al.* Inflammatory stress potentiates emodin-induced liver injury in rats [J]. *Frontiers Pharmacol*, 2015, 6(233): 233.
- [95] 马 喆, 赵珺睿, 董冉冉, 等. 基于高内涵分析技术的何首乌提取物及其主要成分肝毒性研究 [J]. 中草药, 2016, 47(22): 4021-4029.
- [96] Tu C, Gao D, Li X F, *et al.* Inflammatory stress potentiates emodin-induced liver injury in rats [J]. *Frontiers Pharmacol*, 2015, 6(233): 233.
- [97] 严建业, 王元清, 王 炜, 等. 细辛中马兜铃酸 A 与黄樟醚的炮制减毒方法研究 [J]. 中草药, 2015, 46(2): 216-220.
- [98] Yang A H, Zhang L, Zhi D X, *et al.* Identification and analysis of the reactive metabolites related to the hepatotoxicity of safrole [J]. *Xenobiotica*, 2017, 48(11): 1-23.
- [99] Chiang S Y, Lee P Y, Lai M T, *et al.* Safrole-2',3'-oxide induces cytotoxic and genotoxic effects in HepG2 cells and in mice [J]. *Mutation Res-Genetic Toxicol Envir Mutagen*, 2011, 726(2): 234-241.
- [100] Liu T Y, Chen C C, Chen C L, *et al.* Safrole-induced oxidative damage in the liver of sprague-dawley rats [J]. *Food Chem Toxicol*, 1999, 37(7): 697-702.
- [101] Chung Y T, Chen C L, Wu C C, *et al.* Safrole-DNA adduct in hepatocellular carcinoma associated with betel quid chewing [J]. *Toxicol Lett*, 2008, 183(3): 21-27.