

【综述】

肝毒性生物标志物研究进展

侯衍豹, 黄妍, 马莉, 刘静*, 申秀萍, 张宗鹏

天津药物研究院新药评价有限公司 天津市新药非临床评价技术工程中心, 天津 300301

摘要: 药物肝毒性是医药界关注的重要问题。及时准确地评价药物的肝毒性, 寻找特异性强、灵敏度高的肝毒性生物标志物对新药研发及保证临床用药安全具有重要意义。针对传统的肝毒性生物标志物(包括谷氨酸氨基转移酶、天冬氨酸氨基转移酶、谷氨酸脱氢酶等), 以及新发现的生物标志物(血清 F 蛋白、嘌呤核苷磷酸酶、激肽原对氧磷酶)进行综述, 为药物肝毒性的研究及防治提供参考。

关键词: 肝毒性; 生物标志物; 谷氨酸氨基转移酶; 天冬氨酸氨基转移酶; 血清 F 蛋白; 嘌呤核苷磷酸酶

中图分类号: R994 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-6376 (2017) 12-1804-07

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2017.12.027

Research progress in biomarkers of liver toxicity

HOU Yan-bao, HUANG Yan, MA Li, LIU Jing, SHEN Xiu-ping, ZHANG Zong-peng

Tianjin Institute of Pharmaceutical Research Drug Safety Assessment Co. Ltd., Tianjin Engineering Research Center of drug preclinical assessment technology, Tianjin 300301, China

Abstract: Drug hepatotoxicity is an important concern in the medical profession. Timely and accurate evaluation of drug hepatotoxicity and specific and sensitive biomarkers of liver toxicity are important for the research and development of new drugs and the safety of clinical medication. In this paper, traditional hepatotoxic biomarkers (including glutamate aminotransferase, aspartateaminotransferase, glutamate dehydrogenase, etc.) as well as newly discovered biomarkers (serum F protein, purine nucleoside phosphate Enzymes, kinin paraoxonase) were reviewed for the study and prevention of drug hepatotoxicity.

Key words: liver toxicity; biomarkers; glutamate aminotransferase; aspartateaminotransferase; serum F protein; purine nucleoside phosphate enzymes

肝脏是药物体内代谢的主要脏器, 同时也是药物毒性反应的重要靶器官, 药物引起的肝脏毒性是阻碍新药研发的主要原因之一, 也是急慢性肝脏疾病的重要诱因之一^[1]。在众多药物不良反应研究中, 肝毒性研究被美国食品药品监督管理局(FDA)放于首位。药物所致肝毒性按损伤部位大致分为肝细胞毒性、胆汁淤积性肝毒性和混合性肝毒性3种类型^[2]。目前与肝脏毒性相关的传统生物标志物, 如丙氨酸氨基转移酶(ALT)、天门冬氨酸氨基转移酶(AST)等已经应用近50年之久, 但其灵敏度与特异性不高的问题一直存在。

如今, 只通过检测传统生物标志物仅可判定一

部分药物的肝毒性, 这种研究现实已经很难被医学界接受^[3]。因此, 为了能够及时、有效、准确地检测药物肝毒性, 需要在加深传统生物标志物研究的基础上, 加快寻找新的、验证潜在的肝毒性生物标志物。本文针对传统的肝毒性生物标志物[包括ALT、AST、谷氨酸脱氢酶(GLDH)等], 以及新发现的、潜在的生物标志物(血清F蛋白、嘌呤核苷磷酸酶、激肽原对氧磷酶)进行综述, 为药物肝毒性的深入研究及防治提供参考。

1 传统的生物标志物

1.1 ALT

检测血清ALT活性水平评价药物肝毒性是目

收稿日期: 2017-08-16

基金项目: 国家科技重大新药创制项目(2015ZX09501004); 天津市科技计划项目(16PTGCCX00090)

作者简介: 侯衍豹(1990—), 男, 硕士, 研究方向为药理学。Tel: (022)84845247 E-mail: houyb@tjipr.com

*通信作者 刘静, 研究方向为药理学。E-mail: liuj@tjipr.com

前最常用的临床检测手段,并被视为肝脏损伤临床生化检测的“金标准”^[4]。ALT虽然灵敏度很高,但缺乏特异性(肌肉损伤也可引起ALT水平升高)。同工酶技术的出现让ALT的研究得到进一步加深,研究证实ALT存在ALT1、ALT2两种同工酶,两者不同之处在于ALT1是胞浆蛋白,ALT2是线粒体蛋白^[5]。

Miyazaki等^[6]在Beagle犬的研究中利用同工酶技术,在肝脏中仅检测到ALT1,在骨骼肌中检测到ALT1和ALT2。因此得出结论:血清ALT1是引起总血清ALT升高的主要因素,有利于提高ALT检测的特异性,但还有待于进一步的研究验证。

1.2 AST

AST也是传统的肝毒性生物标志物之一,AST在多个脏器中都有表达导致特异性不高,这也是阻碍其应用的主要原因。Solter等^[7]研究发现ALT合成可被微囊藻素抑制,导致血清ALT水平活性降低而掩盖肝损伤,此时可通过检测AST水平验证药物的肝毒性。

另有研究得出结论ALT与AST的比值能够排除肝外干扰的因素^[4]。AST同工酶的初步研究证实其有细胞质AST和线粒体AST两种同工酶。但笔者查阅相关文献未见到这两种AST同工酶与血清中总AST关系的报道,因此AST同工酶分析方法还需要进一步深入的研究。

1.3 GLDH

GLDH是近几年发现的肝毒性生物标志物,与传统生物标志物相比,它的优势在于分布特异性(GLDH绝大部分分布于肝脏);不易受到药物抑制和诱导;灵敏度高,肝毒性检测中GLDH升高幅度远高于ALT;持续时间更长(半衰期约16h)。O'Brien等^[8]研究发现在多种肝损伤大鼠模型中,血清GLDH活性的肝脏特异性要高于ALT、AST。但仍存在一些问题,如在研究中发现GLDH能被对乙酰氨基酚(APAP)代谢产物的共价结合物明显抑制。

1.4 乳酸脱氢酶(LDH)

LDH多作为肝细胞毒性体外检测的标准生物标志物^[9],极少用于体内肝毒性的检测。化学物质的肝细胞毒性大小,用给药后细胞泄漏到培养液中的LDH活性与全部细胞死亡后的LDH活性比值来衡量^[10]。

1.5 血清总胆固醇(TC)、三酰甘油(TG)

岳志刚等^[11]研究结果显示脂肪肝患者肝细胞

受损后,首先ALT与AST会先后进入血液,导致血清ALT与AST水平升高。随着肝细胞进一步受损,血清TC、TG水平也会明显升高,这提示肝脏已经受到严重的损伤。

2 肝胆毒性评价生物标志物

碱性磷酸酶(ALP)、 γ -谷氨酰转氨酶(GGT)、总胆红素(TB)在人体肝脏内广泛分布,当药物引起肝胆疾病或者肝胆功能受损时血清中ALP、GGT、TB含量会发生明显的变化时,是肝、胆功能检查中的一项重要检测项目,可用于鉴别肝脏系统疾病。

2.1 GGT

血清中GGT含量升高被认为是肝胆管损伤,具有很高的灵敏度,但特异性不高。在临床前研究中,大鼠血清GGT显著增加伴随着胆管增生或坏死时;犬血清GGT可以作为胆汁淤积的生物标志物,且具有相当高的特异性。但是GGT的增加可以被部分药物诱导,例如犬给予强的松后能引起GGT增加,因此笔者认为血清中GGT含量升高不一定引起胆汁淤积或胆管增生。

2.2 ALP

ALP也是肝胆管效应和胆汁淤积的主要标志物之一^[12]。在人体中,ALP的检测可以作为药物诱导的胆汁淤积的生物标志物^[13]。但在大鼠体内,由于动物进食能引起血清ALP迅速升高,此时结合GGT的变化预测大鼠的胆汁淤积可信度较高。此外,众多文献报道除了药物引起的肝损伤以外,其他因素如骨骼病变和怀孕等也能够引起ALP的增加^[14]。因此,ALP应该与ALT和AST联合起来共同评价肝毒性,其本身并不能作为胆汁淤积型肝损伤的特异生物标志物。

2.3 TB

TB能够直接反映肝脏的整体功能^[15],是临床上广泛应用的肝毒性评价生物标志物。在急性肝损伤患者中,TB与病变严重程度具有良好的相关性。Fabris等^[16]报道当血液性疾病、红细胞溶血、结合能力受损或其他条件下也能引起血清TB的增加,因此TB也不是完全的肝毒性特异性生物标志物。所以TB与其他标志物合用才有评价肝毒性的实际意义。

3 新的或潜在的肝毒性生物标志物

3.1 血清F蛋白

临床研究发现,肝细胞损伤的患者血清中F蛋

白含量有比较明显的增加^[4]，比传统生物标志物具有更好的灵敏度和特异性，并与肝损伤的组织病理学评价能良好地对应起来。笔者在研究中并未发现检测血清 F 蛋白的商用试剂盒，因此这个问题值得引起相关研究者重视，以加快相关产品的开发。

3.2 苹果酸脱氢酶 (MDH)

当组织损伤时 MDH 才会在血清中检测到。在临床研究中，Kawai 等^[17-19]发现肝硬化患者血清中的 MDH 活性远高于非肝硬化病人并与组织病理学检查结果相一致，且 MDH 活性测定评估肝损伤的严重程度比 AST 更有意义。但笔者在研究中发现血清 MDH 活性和心脏损伤也有相关性，因此在研究中仍需与其他标志物联合使用。

3.3 嘌呤核苷磷酸酶 (PNP)

PNP 主要位于肝细胞、血管内皮细胞等的细胞质中，在哺乳动物体内组织分布比较广泛，因此其特异性也不高。PNP 也是在肝脏出现坏死时才会在血中检测到。Misra 等^[18]发现大鼠给予内毒素引起肝细胞坏死，血清 PNP 升高出现的时间要早于 ALT。

查阅文献发现 PNP 临床报道较少，因此，PNP 可以成为潜在的肝毒性生物标志物，还需要开展更多的临床验证工作。

3.4 对氧磷酶 (PON 1)

与其他标志物不同，PON 1 含量下降与肝损伤有一定的相关性。Meneses-Lorente 等^[20]使用蛋白质组学方法证明了 PON 1 活性可以作为药物引起的肝损伤的潜在的生物标志物。但是 PON 1 不仅在肝脏中产生，文献^[21]报道 PON 1 活性下降可能与一系列疾病有关，如动脉粥样硬化、血管炎和慢性肝损伤，因此其与肝损伤的特异性不是很高，但其仍具有很高的应用价值。

3.5 激肽原

激肽原在肝脏和肾脏中都普遍存在，是大鼠特异性表达的糖蛋白和主要急性期反应蛋白。Adler 等^[22]使用大鼠肝胆管损伤模型开展了激肽原与传统肝毒性评价指标的比较研究，发现血清激肽原更加灵敏。但未查阅到人类激肽原相关的研究报道，因此，还需要进一步验证激肽原在临床上的应用。

3.6 谷胱甘肽-S-转移酶 α (GST α)

GST α 主要位于肝小叶中心细胞，这与 ALT 和 AST 不同，因此能够更加灵敏地反映肝脏代谢区的损伤^[23]。在临床研究中，多名过量服用 APAP 的患

者体内均检测到 GST α 的异常升高，其中半数以上患者 GST α 的水平增加了 2 倍以上^[24]。在 CCl₄ 大鼠肝毒性模型研究中，GST α 在较低程度肝损伤时就会被检测到，比 AST 出现时间更早、灵敏度更高，并且 GST α 能够伴随着肝损伤的好转快速地恢复到正常水平，这是传统标志物不具备的特点。此外，Rees 等^[25]研究发现，肌肉坏死时并不引起 GST α 水平的变化，这表明 GST α 可以用来区分肝损伤和肌肉损伤。

3.7 精氨酸酶 I

精氨酸酶 I 分布以肝脏最多，虽然在其他脏器及肌肉中也有分布。在急慢性肝损伤的研究中发现，精氨酸酶 I 升高的时间及程度均要超过 ALT、AST 的变化^[26]。另外，有肝毒性的相关研究表明精氨酸酶 I 比大多数标志物有更高的肝组织特异性^[27]。但关于精氨酸酶 I 的报道仍不够全面，还需要进行更多的深入研究。

3.8 精氨酰琥珀酸裂解酶 (ASAL)

ASAL 以肝细胞含量最多。临床研究发现，肝炎患者血清 ASAL 明显增高^[28]。有研究对比了 ASAL 和 ALT 及 AST 对判断慢性肝病的敏感度和特异度，结果显示 ASAL 的敏感度和特异度都要高于 ALT 及 AST^[29]。因此，ASAL 是有开发潜力的肝损伤标志物，需要进行深入探讨。

3.9 总胆汁酸 (TBA)

TBA 含量超过胆汁中有机酸的一半，经过一系列循环及被重吸收后，胆汁中的 TBA 绝大多数被肝细胞摄取，因此血清中 TBA 含量特别少。TBA 也是唯一可以同时反映肝脏合成和代谢、分泌状态和细胞损伤的指标^[30-31]。TBA 的含量变化在急、慢性肝炎等肝脏疾病的诊断中有重要的意义。急性肝炎时，由于肝脏排泄和摄取 TBA 的功能降低，导致血中 TBA 含量明显升高。在慢性肝炎患者中，TBA 与 ALT 的升高基本平行。TBA 的测定对肝病诊断具有较高的敏感性，是评价肝功能的一项既灵敏，又十分重要的指标。

3.10 血清前白蛋白 (PA)

血清 PA 在肝内合成降低后，可迅速在外周血中检测出来，能够良好地反映早期肝脏合成功能的改变^[32]。文献^[33]报道在肝脏出现疾病时，血清 PA 的变化要早于清蛋白被发现，且在各型肝炎患者检测中，PA 的异常率明显高于清蛋白。因此与血清清蛋白相比较，血清 PA 更能灵敏地反映肝细胞

损害^[32, 34-35]。

3.11 羟脯氨酸 (Hyp)

Hyp 是胶原分解产物之一。李玉白等^[36]研究发现: 正常情况下, 血清中 Hyp 含量在限量范围内波动; 肝毒性损伤早期时胶原分解大于合成, Hyp 明显增加, Hyp 的增加几乎和电镜下肝细胞损伤同时出现, 所以测定血清中 Hyp 含量可作为肝细胞损伤早期诊断指标。但是这方面的报道较少, 因此针对其检测药物肝毒性灵敏度及特异性研究还需要加强。

3.12 细胞色素 C

Miller 等^[37]发现, 细胞色素 C 在 APAP 及 D-半乳糖胺给药的大鼠实验中, 伴随 ALT 及 GOT 的变化也达到峰值, 是潜在的线粒体毒性的生物标志物。其在药物性肝损伤研究中, 是有潜力的标志物。

3.13 还原型谷胱甘肽与氧化型谷胱甘肽含量及比值

还原型谷胱甘肽 (GSH) 在肝细胞内合成, 通过肝细胞外排将 GSH 分别转运到胆汁和血液^[38]。GSH 在发挥抗氧化作用时, 自身被氧化为氧化型谷胱甘肽 (GSSG), 因此, 通过测定血液、肝或胆汁中 GSSG 和 GSH 的含量及比值, 可以反映药物引起的细胞和组织内的氧化应激反应。

Yang 等^[39]报道单次灌喂给予小鼠 APAP 后在 24 h 内分段取材观察, 发现小鼠血浆中 ALT 及 AST 在给药后 1~3 h 内开始明显升高, 而且肝中的变化时间与 ALT 和 AST 的变化一致。因此 GSH/GSSG 比值具有一定的研究价值, 在今后的研究中应该更加引起关注以便能够应用于临床。

3.14 丙二醛 (MDA)

MDA 是生物体内自由基氧化的最终产物之一, MDA 含量的增多能加剧细胞膜的损伤, 且具有细胞毒性。因此在肝损伤中, 可通过 MDA 含量了解氧化过程, 以间接测定损伤程度。王秋红等^[40]研究表明, 与正常对照组比较, 肝损伤模型组 MDA 含量升高, 具有极显著差异 ($P < 0.001$)。

3.15 对乙酰氨基酚 (APAP)-半胱氨酸加合物

APAP-蛋白加合物只有当肝细胞坏死时释放入血才可被检测到, 它是当给予大鼠过量 APAP 后, 经过氧化应激反应氧化产物 N-乙酰-对-苯醌亚胺 (NAPQI) 耗竭 GSH 后, 剩余的 NAPQI 与细胞蛋白质分子共价结合形成。目前研究得出的结论是血液中 APAP-蛋白加合物可以作为 APAP 引起肝损伤的生物标志物^[41-45], 检测方法多采用高效液相色谱

谱法。

3.16 肝活素 (HPS)

翟华立等^[46]研究表明, 正常小鼠血清中的 HPS 水平约为 195 ng/mL, 当出现肝损伤后, 血清中 HPS 的水平开始上调, 约为正常小鼠的 7 倍; 升高幅度远远大于传统生物标志物, 并且随着肝损伤的好转, 血清中 HPS 的水平与 ALT、AST 及肝组织坏死程度一致开始下降, 并趋于正常水平, 敏感性较好。这表明 HPS 可以作为小鼠的肝损伤血清标志物。

3.17 高迁移率族蛋白 (HMGB1)

HMGB1 在体内各组织中分布较广, 是肝损伤炎症反应中的关键蛋白。Craig 等^[47]对比了肝损伤患者及健康人血清中的 HMGB1, 结果发现肝损伤患者血清中 HMGB1 明显升高, 出现趋势与 ALT 有显著的相关性, 但较 ALT 更加灵敏。因此在预测肝损伤上 HMGB1 有较高的研究空间。

3.18 吡咯-蛋白加合物

在土三七引起肝窦阻塞综合征的研究中, 发现吡咯-蛋白加合物可以作为一个重要的标志物。Gao 等^[48]通过超高效液相-质谱 (UHPLC-MS) 法检测土三七引起肝窦阻塞症患者血液中的吡咯-蛋白复合物, 结果发现吡咯-蛋白复合物在所有患者的血液中被检测到。因此, 吡咯-蛋白加合物可以作为土三七引起肝窦阻塞综合征的重要标志物, 但有关细节仍需进一步证实。

3.19 线粒体鸟氨酸氨甲酰转移酶 (OCT)

OCT 主要存在于肝细胞线粒体中, 是肝脏特异性酶, 有研究证实 OCT 与传统标志物一样, 其也是在肝细胞受损时被检测到血清中, 且绝大部分来自于肝脏^[49]。因此 OCT 可作为检测肝细胞损伤的特异性标志物。

3.20 系统生物学技术发现的肝毒性生物标志物

传统的毒理学研究方法多基于动物模型, 结论的得出主要依赖于生化指标和组织病理结果, 缺乏灵敏性和特异性, 而且并不能提示毒性机制。目前由基因组学、分子生物学、蛋白质组学、代谢组学构成的系统生物学的出现完美地解决了这一问题。通过系统生物学发现了大量的与肝毒性相关的生物标志物, 且与传统生物标志物相比有较大的优势, 以下暂将这些生物标志物按研究方法进行分类, 随着研究的深入, 有可能进行重新分类。

3.20.1 基因组学中的肝毒性生物标志物 近年

来,基因组学的快速发展为肝毒性生物标志物的研究提供了新的技术手段。在基因组学研究中微RNA(miRNA)被发现可以作为肝毒性的潜在生物标志物,且具有很高的灵敏度和特异性^[50]。国外学者Fukushima等^[51-53]在研究中发现miR-298和miR-370与肝细胞线粒体损伤密切相关;miR-190和miR-743b在胆管结扎的大鼠胆汁淤积性肝毒性模型中有别于其他肝损伤模型;在小鼠肝毒性模型的研究中,从小鼠的组织和血液中,检测到近百个miRNA的表达改变,其中miR-22、miR-193、miR-133a和miR-486等均与肝损伤有较强的时效关系;在小鼠脂肪性肝炎模型中发现,模型组的miR-467b的表达显著低于正常对照组,提示miR-467b为脂肪性肝损伤的潜在生物标志物。国内学者汤纳平等^[54]通过研究发现血浆miR-122在APAP诱导诱导的大鼠急性肝损伤中的改变有很高的灵敏度,可作为药源性肝损伤的生物标志物。

3.20.2 分子生物学中的肝毒性生物标志物 吴茱萸可导致肝脏损伤目前已被医学界认同,廖文强等^[55]采用多肽芯片技术探究了吴茱萸肝脏毒性的分子标记物,共获得几百个由抗体芯片检测得到的结果,并对多肽芯片的结果用Western blotting法进一步验证得出结论:吴茱萸可致小鼠肝脏CDK8、CK1e和Erk的蛋白表达量上调及stat3、Src的蛋白表达量下调。

3.20.3 蛋白质组学的肝毒性生物标志物 在肝毒性的早期信号研究中,利用蛋白质组学技术寻找尿液、血液中药物引起肝毒性的特异性蛋白质作为生物标志物,为药源性肝损伤的早期判断提供了帮助,在APAP导致的小鼠肝损伤模型的研究中发现CA3、HSP60、AK4、SOD1、CA3和钙调蛋白(CaM)等多种在肝损伤中均发生改变,其中SOD1和CA3的升高与血浆中ALT的升高同步,且CaM的含量明显升高时血浆中ALT水平却无明显变化^[56-57]。由此认为CA3、HSP60、AK4、SOD1、CA3和CaM等蛋白质,尤其是CaM可以作为临床APAP引起肝损伤的潜在生物标志物。

3.20.4 代谢组学中的肝毒性生物标志物 当前代谢组学技术的广泛应用,在血清样本或尿样中也鉴定了许多肝毒性生物标志物,如血清眼科酸和8-羟基-2'-脱氧鸟苷和辛酰肉碱等^[58-59]。马致洁^[60]通过代谢组学的方法在何首乌药物肝损伤患者的血清标本中筛选出40个内源性生物标志物,标志物主

要包括溶血卵磷脂类化合物、磷脂酰乙醇胺类化合物以及胆固醇等其他化合物,为中药毒性研究提供了很好的借鉴。

张艳花等^[61]应用¹H-NMR代谢组学方法研究了高剂量CCl₄致大鼠急性肝损伤模型,并利用正交偏最小二乘法判别分析法判断血清中代谢物谱的模式变化规律,最终确认了包括脂类、葡萄糖、丙酮酸、乳酸等6个与CCl₄致肝损伤相关的标志物。

4 结语

目前,传统肝毒性生物标志物由于其灵敏度及特异性存在的问题,对药物引起的肝损伤不能及时准确地进行检测判断,已经不能满足当前临床用药安全及新药研发上市的要求。因此基于在原有生物标志物的基础上,进一步深入研究并利用新技术开展新的探索,在此过程中发现了越来越多新的肝毒性生物标志物。例如,同工酶特异性检测方法的建立,发现了一些传统肝毒性生物标志化化合物的同工酶,提高了标志物检测的灵敏度及特异性;系统生物学是寻找新标志物的生力军,组学技术为肝毒性研究带来了更多的候选生物标志物,其中miRNA作为肝毒性生物标志物具有很好的应用前景;代谢组学、蛋白质组学的研究也发现了一大批内源性生物标志物和特异性蛋白。与传统肝毒性生物标志物相比,一些新的标志物具有较高的灵敏度及特异性。但仍存在许多问题:不是所有的新标志物都有足够的灵敏度和特异性;这些新标志物均还未得到广泛认可,还需要进一步研究;许多新标志物检测的方法较复杂,常规的临床检测方法不能检出;需要开发新的试剂盒等。新技术的出现给肝毒性生物标志物的寻找提供了极大的帮助,但是这些以推测机制为基础的组学相关生物标志物多采用单一组学技术评价药物的(尤其是中药)肝毒性,且绝大多数用于单一成分的研究。而且由于大多数生物标志物在种属差异、组织分布、半衰期、作用机制等多方面均存在差异,因此单一标志物不能完全预测药物是否造成肝损伤以及损伤的程度等,使用多个肝毒性生物标志物联合评价仍然是目前比较现实的做法。

在今后的研究中,需要继续寻找更加理想的生物标志物,或对已发现的标志物进行更加深入广泛的研究以便找到最佳的搭配组合,或让潜在的生物标志物尽早服务于药物开发与临床应用。总之,为了更加合理安全地用药,及时准确地评价药物的肝毒性任重而道远。

参考文献

- [1] 贺雷艳, 郭瑶雪, 李 春, 等. 药物性肝损伤生物标志物研究进展 [J]. 药学学报, 2015, 50(8): 959-960.
- [2] Benichou C. Criteria of drug-induced liver disorders. Report of an international consensus meeting [J]. J Hepatol, 1990, 11: 272-276.
- [3] Xu J J, Henstock P V, Dunn M C, et al. Cellular imaging predictions of clinical drug-induced liver injury [J]. Toxicol Sci, 2008, 105(1): 97-105.
- [4] Ozer J, Ratner M, Shaw M, et al. The current state of serum biomarkers of hepatotoxicity [J]. Toxicology, 2008, 245(3): 194-205.
- [5] Yang R Z, Park S, Reagan W J, et al. Alanine aminotransferase isoenzymes: molecular cloning and quantitative analysis of tissue expression in rats and serum elevation in liver toxicity [J]. Hepatology, 2009, 49(2): 598-607.
- [6] Miyazaki M, Rosenblum J S, Kasahara Y, et al. Determination of enzymatic source of alanine aminotransferase activity in serum from dogs with liver injury [J]. J Pharmacol Toxicol Meth, 2009, 60(3): 307-315.
- [7] Solter P, Liu Z. Decreased hepatic ALT synthesis is an outcome of subchronic microcystin-LR toxicity [J]. Toxicol Appl Pharmacol, 2000, 164(2): 216-220.
- [8] O'Brien P J, Slaughter M R, Polley S R. Advantages of glutamate dehydrogenase as a blood biomarker of acute hepatic injury in rats [J]. Lab Animal, 2002, 36(3): 313-321.
- [9] Ramachandran R. Histological patterns in drug-induced liver disease [J]. J Clin Pathol, 2009, 62(6): 481-492.
- [10] Bopp S K. Comparison of four different colorimetric and fluorometric cytotoxicity assays in a zebrafish liver cell line [J]. BMC Pharmacol, 2008, 8(2): 8. DOI: 10.1186/1471-2210-8-8.
- [11] 岳志刚. 血清学相关指标检验在脂肪肝诊断中的应用分析 [J]. 中国实验诊断学, 2013, 17(6): 1120-1121.
- [12] Ramaiah S K. A toxicologist guide to the diagnostic interpretation of hepatic biochemical parameters [J]. Food Chem Toxicol, 2007, 45(9): 1551-1557..
- [13] Wright T M. Risperidone-and quetiapine-induced cholestasis [J]. Ann Harmaother, 2007, 41(9): 1518-1523.
- [14] Reust C E, Hall L. Clinical inquiries what is the differential diagnosis of an elevated alkaline phosphatase (AP) level in an otherwise asymptomatic patient [J]. J Fam Prac, 2001, 50(6): 496-497.
- [15] Monitoring for hepatotoxicity: what is the predictive value of liver "function" tests [J]. Clinic Pharmacol Therap, 2009, 85(3): 331-334.
- [16] Fabris L, Cadamuro M. The patient presenting with isolated hyperbilirubinemia [J]. Dig Liver Dis, 2009, 41(6): 375-381.
- [17] Kawai M. Clinical usefulness of malate dehydrogenase and its mitochondrial isoenzyme in comparison with aspartate aminotransferase and its mitochondrial isoenzyme in sera of patients with liver disease [J]. Clinic Biochem, 1990, 23(4): 327-334.
- [18] Misra M K, Khanna A K, Sharma R. Serum malate dehydrogenase (MDH) in portal hypertension--its value as a diagnostic and prognostic indicator [J]. Indian J Med Sci, 1991, 45(2): 31-34.
- [19] Zieve L, Anderson W R, Dozeman R, et al. Acetaminophen liver injury: sequential changes in two biochemical indices of regeneration and their relationship to histologic alterations [J]. J Lab Clin Med, 1985, 105(5): 619-624.
- [20] Meneses-Lorente G, Guest P C, Lawrence J, et al. A proteomic investigation of drug-induced steatosis in rat liver [J]. Chem Res Toxicol, 2004, 17(5): 605-612.
- [21] Ng C J, Bourquard N, Grijalva V, et al. Paraoxonase-2 deficiency aggravates atherosclerosis in mice despite lower apolipoprotein-B-containing lipoproteins: anti-atherogenic role for paraoxonase-2 [J]. J Biol Chem, 2006, 281(40): 29491-29500.
- [22] Adler M, Hoffmann D, Ellinger-Ziegelbauer H, et al. Assessment of candidate biomarkers of drug-induced hepatobiliary injury in preclinical toxicity studies [J]. Toxicol Lett, 2010, 196(1): 1-11.
- [23] Muller P Y. Tissue-specific, non-invasive toxicity biomarkers: translation from preclinical safety assessment to clinical safety monitoring [J]. Exp Opin Drug Metab Toxicol, 2009, 5(9): 1023-1038.
- [24] Beckett G J, Foster G R, Hussey A J, et al. Plasma glutathione S-transferase and F protein are more sensitive than alanine aminotransferase as markers of paracetamol (acetaminophen)-induced liver damage [J]. Clinic Chem, 1989, 35(11): 2186-2189.
- [25] Rees G W, Trull A K. Evaluation of an enzyme-immunometric assay for serum alpha-glutathione S-transferase [J]. Annal Clin Biochem, 1995, 32(Pt 6): 575-583.
- [26] Murayama H, Ikemoto M, Fukuda Y, et al. Advantage of serum type-I arginase and ornithine carbamoyl transferase in the evaluation of acute and chronic liver damage induced by thioacetamide in rats [J]. Clinica Chimica Acta, 2007, 375(1/2): 63-68.
- [27] Ashamiss F, Wierzbicki Z, Chrzanowska A, et al. Clinical significance of arginase after liver transplantation [J]. Annal Transplant, 2004, 9(3): 58-60.
- [28] Stéphenne X, Najimi M, Sibille C, et al. Sustained engraftment and tissue enzyme activity after liver cell transplantation for argininosuccinate lyase deficiency [J]. Gastroenterology, 2006, 130(4): 1317-1323.
- [29] 俸家富, 陈婷梅, 涂植光, 等. 血清精氨酸代琥珀酸裂解酶的测定在肝病诊断中的意义 [J]. 中华肝脏病杂志, 2007, 15(7): 521-524.
- [30] 周炳能, 袁水斌. 血清总胆汁酸测定在肝胆疾病中的临床价值 [J]. 实验与检验医学, 2009, 27(2): 196-197.
- [31] 陈亿长, 林漫燕. 血清总胆汁酸测定在肝胆疾病中的临床应用 [J]. 实用医技杂志, 2005, 12(5): 1282-1283.
- [32] 赵华清, 闫明先. 慢性肝病患者血清前白蛋白和总胆

- 汁酸检测的临床价值 [J]. 泰山医学院学报, 2009, 30(3): 189-190.
- [33] 丁振若, 于文彬, 苏明权, 等. 现代检验医学 [M]. 北京: 人民军医出版社, 2007: 448-449.
- [34] 陆卫英, 孙莲娜. 血清前白蛋白在肝病中的临床意义 [J]. 临床肝胆病杂志, 2005, 21(1): 32-33.
- [35] 张淑艳, 熊惠顺. 肝病患者血清前白蛋白和白蛋白的检测及临床意义 [J]. 临床军医杂志, 2010, 38(2): 279-280.
- [36] 李玉白, 全建设, 刘劭钢, 等. 鹅膏毒肽致肝脏损伤的生化指标探讨 [J]. 实用医学杂志, 2006, 22(3): 252-253.
- [37] Miller T J, Knapton A, Adeyemo O, et al. Cytochrome c: a non-invasive biomarker of drug-induced liver injury [J]. J Appl Toxicol, 2008, 28(7): 815-828. DOI: 10.1002/jat. 1347.
- [38] 张雪莹, 杨 劲, 尹 雪, 等. 谷胱甘肽的肝脏转运及其在胆汁淤积中的作用 [J]. 药学报, 2009, 44(4): 327-332.
- [39] Yang X, Greenhaw J, Ali A, et al. Changes in mouse liver protein glutathionylation after acetaminophen exposure [J]. J Pharmacol Exp Therap, 2012, 340(2): 360-368.
- [40] 王秋红, 杨 欣, 王 蒙, 等. 黄芩与黄柏协同保护黄药子致肝毒性的实验研究 [J]. 中国中药杂志, 2016, 41(5): 898-903.
- [41] James L P, Capparelli E V, Simpson P M, et al. Acetaminophen-as-sociated hepatic injury: evaluation of acetamino-phen protein adducts in children and adolescents with acetaminophen overdose [J]. Clin Pharmacol Ther, 2008, 84(6): 684-690.
- [42] McGill M R, Lebofsky M, Norris H R, et al. Plasma and liver acetamino-phen-protein adduct levels in mice after acetamino-phen treatment: dose-response, mechanisms, and clinical implications [J]. Toxicol Appl Pharmacol, 2013, 269(3): 240-249.
- [43] James L P, Chiew A, Abdel-Rahman S M, et al. Acetaminophen protein adduct formation following low-dose acetamino-phen exposure: comparison of immediate-release vs extended-release formulations [J]. Eur J Clin Pharmacol, 2013, 69(4): 851-857.
- [44] Heard K J, Green J L, James L P, et al. Acetaminophen-cysteine ad-ducts during therapeutic dosing and following over-dose [J]. BMC Gastroenterol, 2011, 11: 20.
- [45] James L P, Alonso E M, Hynan L S, et al. Detection of acetamin-ophen protein adducts in children with acute liver failure of indeterminate cause [J]. Pediatrics, 2006, 118(3): e676-e681.
- [46] 翟华立, 陈 慧, 詹轶群, 等. 肝活素(HPS)一种新的小鼠急性肝损伤标志物 [J]. 军事医学, 2015, 39(7): 489-494.
- [47] Craig D G, Lee P, Pryde E A, et al. Circulating apoptotic and necrotic cell death markers in patients with acute liver injury [J]. Liver Int, 2011, 31(8): 1127-1136.
- [48] Gao H, Li N, Wang J Y, et al. Definitive diagnosis of hepatic sinusoidal obstruction syndrome induced by pyrrolizidinealkaloids [J]. J Digest Dis, 2012, 13(1): 33-39.
- [49] 乔靖怡, 周 璐, 金若敏, 等. 四氯化碳致大鼠肝损伤早期血清总胆汁酸, α -谷胱甘肽 S 转移酶, 嘌呤核苷酸化酶和鸟氨酸氨基甲酰转移酶的变化 [J]. 中国药理学与毒理学杂志, 2013, 7(4): 650-656.
- [50] Cortez M A. MicroRNA identification in plasma and serum: a new tool to diagnose and monitor diseases [J]. Exp Opin Biol Ther, 2009, 9(6): 703-711.
- [51] Fukushima T, Hamada Y, Yamada H. Changes of micro-RNA expression in rat liver treated by acetaminophen or carbon tetrachloride--regulating role of micro-RNA for RNA expression [J]. J Toxicol Sci, 2007, 32(4): 401-409.
- [52] Wang K, Zhang S, Marzolf B, et al. Circulating microRNAs, potential biomarkers for drug-induced liver injury [J]. Proc Nat Acad Sci USA, 2009, 106(11): 4402-4407.
- [53] Yamaura Y, Nakajima M, Takagi S, et al. Plasma microRNA profiles in rat models of hepatocellular injury, cholestasis, and steatosis [J]. PloS One, 2012, 7(2): e30250. DOI: 10.1371/journal.pone.0030250.
- [54] 汤纳平, 王 雁. 血浆 miR-122 作为药源性肝损伤生物标志物的研究及应用 [J]. 中国药理学与毒理学杂志, 2013, 27(3): 481.
- [55] 廖文强, 李 波, 李 莉, 等. 吴茱萸致小鼠肝毒性分子机制研究 [J]. 中国中药杂志, 2014, 39(24): 4866.
- [56] Yamamoto T, Kikkawa R, Yamada H. Investigation of proteomic biomarkers *in vivo* hepatotoxicity study of rat liver: toxicity differentiation in hepatotoxicants [J]. J Toxicol Sci, 2006, 31(1): 49-60.
- [57] van Swelm R P, Laarakkers C M, van der Kuur E C, et al. Identification of novel translational urinary biomarkers for acetaminophen-induced acute liver injury using proteomic profiling in mice [J]. PloS One, 2012, 7(11): e49524. DOI: 10.1371/journal.pone.0049524.
- [58] Beger R D, Sun J. Metabolomics approaches for discovering biomarkers of drug-induced hepatotoxicity and nephrotoxicity [J]. Toxicol Appl Pharmacol, 2010, 243(2): 154-166.
- [59] Lee M S, Jung B H, Chung B C, et al. Metabolomics study with gas chromatography-mass spectrometry for predicting valproic acid-induced hepatotoxicity and discovery of novel biomarkers in rat urine [J]. Int J Toxicol, 2009, 28(5): 392-404.
- [60] 马致洁. 何首乌肝毒性客观性, 临床标志物及损伤机制的初步研究 [D]. 成都: 成都中医药大学, 2013.
- [61] 张艳花, 王东琴, 李晓伟, 等. 基于 $^1\text{H-NMR}$ 代谢组学技术寻找 CCl_4 致大鼠急性肝损伤的代谢标志物 [J]. 药物评价研究, 2014, 37(1): 11-16.