

天然植物药肝脏内DNA加合物的研究进展

夏彤

中国中医科学院广安门医院, 北京 100053

摘要: 天然药物包括植物药、动物药和海洋药物, 在我国天然植物药的使用有悠久的历史。但是随着现代科学技术的发展, 马兜铃酸肾病的发现, 人们逐渐对天然植物药的安全性产生了怀疑。此后多年, 陆续从天然植物药中分离了多种有肝肾毒性的化合物。重点围绕已知的化合物代谢形成DNA加合物的过程阐述天然植物药致突变致癌分子机制的研究进展。

关键词: 天然植物药; DNA加合物; 致突变; 遗传毒性

中图分类号: R282.71 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-6376(2019)01-0219-07

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2019.01.035

Advances in research on DNA adducts in liver of natural botanicals

XIA Tong

Guang'anmen Hospital, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100053, China

Abstract: Natural medicines include botanicals, animal medicines and marine medicines. In China, there is a long history of the use of natural botanicals. However, with the development of modern science and technology, the discovery of aristolochic acid nephropathy, people have gradually doubted the safety of natural botanical drugs. Since then, many compounds with liver and kidney toxicity have been isolated from natural botanicals. This paper focuses on the research progress of molecular mechanisms of mutagenic carcinogenesis of natural botanicals by the process of known compound metabolism in the form of DNA adducts.

Key words: natural botanicals; DNA adduct; mutagenic; genotoxicity

天然药物包括植物药、动物药和海洋药物, 不完全等同于中药或中草药。近年来, 天然药物的研究越来越热门, 国家大力提倡发展中药、中成药以及各民族药。天然植物药及中成药在我国属于基本用药, 过去数千年, 天然植物药的毒性以中药学中大毒、有毒、小毒、无毒等模糊的概念区分, 但是对于天然植物药的遗传毒性, 少有记述。近几十年, 对天然植物药的不良反应不时见诸报章, 例如比较著名的“马兜铃肾病”。为此, 国际医学界有“中草药肾病(Chinese herbs nephropathy)”的说法, 提出一个值得临床关注的中药毒性问题。但是由于国外缺少中医理论指导, 似乎改名为“植物药滥用性肾病”更恰当。2015年8月17日, FDA药物评价和研究中心更新了《植物药研发工业指南》(Botanical Drug Development Guidance for Industry)。该《指南》影响着世界各国对于天然药物管理法规的制定, 对中药以及其他天然药物进入美

国市场的重要指导文件。2018年6月26日美国FDA向美国中医药协会(ACMA)发警告信, 要求协会不得在美国销售未经证实安全的中药制品。

对天然植物药, 传统思维认为“中药应用了几千年没有发现毒副作用”, 但FDA客观慎重看待既往人体用药历史的数据。因此, 既要重视既往的天然药物有效性数据, 同时也要看到过去的局限性。目前为止, FDA批准的植物药只有2种, 对于天然药物首先需要考虑的是安全性。中国有多个天然植物药品种在FDA申请INDs(Investigational New Drug Application), 也有部分项目进入临床III期研究, 但是距离NDA(New Drug Application)和上市尚有很长的路要走。

2001年以来, CFDA不良反应监测系统通报了多起天然植物药引起的肝损伤: 包括壮骨关节丸、白蚀丸、痔血胶囊、雷公藤制剂、仙灵骨葆制剂、何首乌及其中成药制剂。同时发布了可能引起肝损

收稿日期: 2018-08-31

第一作者: 夏彤, E-mail: xiatong2015@126.com

害的常用中草药:麻黄、菊三七、鱼胆、雷公藤、关木通、黄药子、苦楝(川楝子)、青黛、苍耳子、柴胡等。

对于天然植物药的急性毒性和慢性毒性现已有很多著述,但是对于上述易于引起药物性肝损伤的天然植物药及中成药完整的遗传毒理学研究较少,相关的遗传毒理评价较为简单,因此对于天然植物药中能够引起DNA加合物的文章并不多见。本文综述了现有对天然植物药在体内代谢过程中与DNA产生DNA加合物的研究进展,以期为将来天然植物药的安全性评价提供参考。

1 天然植物药的遗传毒性

药物的遗传毒性是在代谢过程中能够直接或间接引起遗传物质DNA或RNA的损害,从而引起细胞突变。遗传毒性可以导致癌症、畸形、代谢疾病或者生殖障碍等各种类型的疾病。

一方面,遗传毒性的损伤发生在遗传物质上,这类毒性效应在临床无法被准确识别与防治;另一方面,药物的遗传毒性包括了致畸性和致癌性,可能引起后代的健康问题,可能产生隔代效应。遗传毒性试验能有效预测化合物的致癌能力,超过90%的致癌物,其遗传毒性试验结果为阳性。尽管天然植物药经过数千年应用,相对安全,但是由于缺乏科学的研究和统计,仅凭各个医家各自记录医案中的不良反应,使得现代社会对天然植物药遗传毒性缺少认识^[1]。

在遗传毒性领域,对天然植物药这一类研究较少。在21世纪后才有研究人员对单味天然植物药和中成药复方、植物药单体化合物进行遗传毒性的研究。目前已有的实验证实苍术苷在肝微粒体酶的作用下,可代谢产生具有遗传毒性的物质^[2];雄黄会导致体内外细胞染色体畸变,且突变型呈剂量相关性^[3-4];汉防己甲素具有潜在的遗传毒性,可导致DNA链发生断裂^[5];大黄等多种植物药的提取物可导致人淋巴细胞突变,并抑制其分裂增殖^[6];马兜铃能够诱导DNA损伤,并导致tk基因突变^[7]。

以上这些研究表明,天然植物药是具有潜在遗传毒性的,并且不是根据数千年传承下来的实践和感性的判断。理性的研究结论更能够为天然植物药的发展提供安全可靠的指导。近几十年随着检测手段的发展,对DNA加合物的检测方法更多样、更灵敏。研究人员通过这一方向,能够更快速、更方便的预测和揭示天然植物药遗传毒性的来源。

2 天然植物药DNA加合物的研究

DNA加合物是药物遗传毒性最常见的机制。

当外源化合物在体内代谢过程中与DNA发生结合时,这种加合物一旦躲过DNA的损伤修复,有可能在存在DNA加合物的基因位点发生突变错误配对,而这种错误的配对易引起细胞突变甚至癌变。

天然药物的DNA加合物最早被发现源于“中草药肾病”事件。上世纪90年代比利时学者Vanherweghem等研究,一些年轻妇女为了减肥,服用了含有广防己、厚朴等中药成分的茶饮后出现慢性肾功能衰竭,并将此称之为“中草药肾病”。之后对于中草药肾病的研究越来越多,相关人员通过研究提出中草药肾病主要与服用中药中的马兜铃酸(AA)成分有关,有了“马兜铃酸肾病”(aristolochic acid nephropathy, AAN)一说。目前在Web of Science文献检索可以找到7篇高被引论文,最早一篇为Vanherweghem等^[8]于1993年发表在Lancet的论文,引用率高达近1300次(Google学术);中国知网上以“马兜铃酸肾病”为关键词搜索的中文文献有574篇,最早一篇为1995年孙阳发表的“中药马兜铃酸肾病与巴尔干肾病”^[9]。之后又有更多的人员发现马兜铃酸肾病患者多伴有泌尿系统肿瘤,阐明马兜铃酸致突变和致癌的分子学基础成为其毒性研究的重中之重。在研究马兜铃酸致突变和致癌的机制中,马兜铃酸与DNA形成的加合物出现在了研究学者的视野中。早在1988年,李英等^[10]用P32后标记法在中草药肾病患者的肾组织中检测到马兜铃酸-DNA(AA-DNA)加合物,同时在口服马兜铃酸的大鼠胃、肾、肝等以及用马兜铃酸体外培养的组织检测到类似的DNA加合物。

由于国内外对马兜铃酸毒性的作用机制、早期诊断及治疗方法等开展了较多深入研究,AA-DNA加合物在体内代谢合成的过程最先被发现。在马兜铃属和细辛属植物中,含量相对较多且导致基因突变的主要成分是马兜铃酸I(AA I)和马兜铃酸II(AA II)^[11]。马兜铃酸在体内经过相关代谢酶活化后,与脱氧腺苷和脱氧鸟苷反应生成马兜铃酸内酰胺(aristolactam, AL)DNA加合物(图1展示了AA-DNA加合物途径——I相代谢:硝基还原反应),蓄积在细胞内,当蓄积的DNA加合物躲过DNA自身的损伤修复后,将导致TP53基因发生异位突变^[12]。

目前研究发现,除AA能与DNA形成加合物外,还有其他天然植物药中的成分也在代谢过程中和DNA形成加合物,并产生与AA-DNA类似的影响,如现在已知的天然植物药就有菊科植物千里光

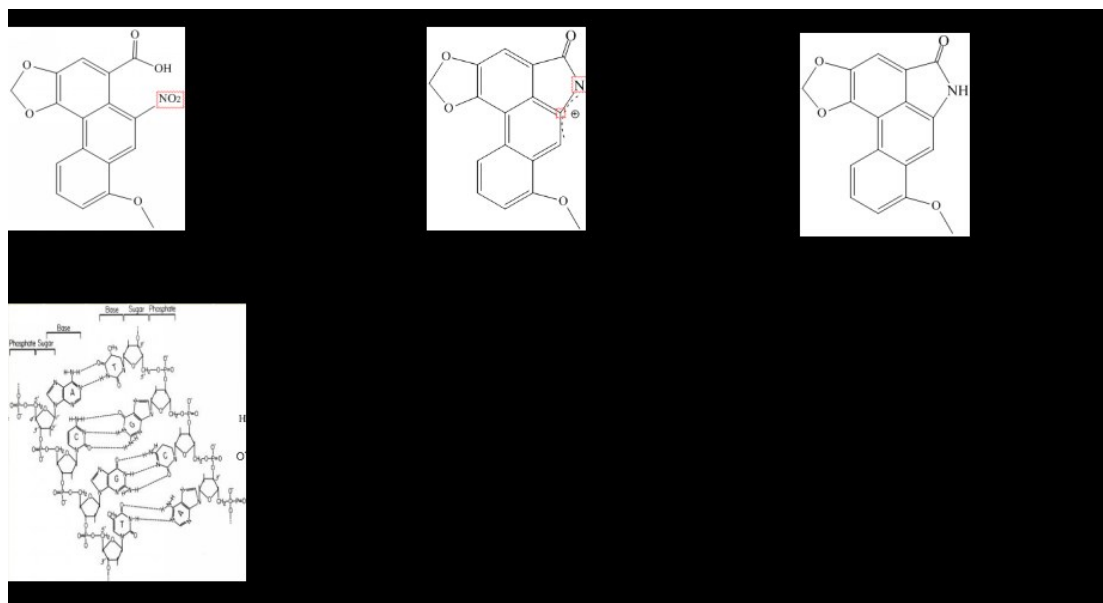


图1 马兜铃酸体内I相代谢途径

Fig.1 Phase I metabolic pathway in aristolochic acid

Senecio scandens Buch.-Ham. ex D. Don、茜草科植物茜草 *Rubia cordifolia* L.。这些天然植物药成分在体内代谢的过程中皆有可能和DNA形成加合物,主要包括DHP-DNA、Luc-N⁶-DNA^[13-14],其在体内相关的合成代谢的过程也被逐一发现。但具体的影响暂不明确,有待继续深入研究发现。

千里光为菊科千里光属植物,其主要成分为生物碱、挥发油和萜类物质,引起肝毒性的主要成分为吡咯里西啶类生物碱(pyrrolizidine alkaloids, PAs),包括野百合碱、克氏千里光碱等。通过小鼠精子畸形试验,于增杰等^[15]发现千里光提取物在高剂量下能够引起雄性小鼠精子畸形。夏启松等发现千里光乙醇提取物导致小鼠肝脏基因表达谱显著变。图2展示的是野百合碱导致DHP衍生DNA加合物生成和肝癌形成的代谢途径。据调查,欧美一些国家的蜂蜜中也含有PAs,主要由于蜜源植物本身含有PAs。茜草是茜草科茜草属植物,另一类常用中草药,国外有研究证实茜草中Lucidin能够与DNA产生加合物。在代谢研究过程中发现,茜草的提取物在体内的代谢过程中,Lucidin有增长趋势^[16]。国内对于茜草及其成方制剂研究发现,茜草具有轻微毒性^[17]。图3展示的则是茜草中Lucidin与DNA产生Luc-N⁶-DNA加合物的过程^[18]。

通过对上述具有遗传毒性的物质代谢路径分析,在有肝微粒体酶参与的情况下,I相代谢过程中,天然植物药的某些化学成分可能会产生能够与DNA加合的物质,这些化合物具有潜在的遗传毒

性。研究人员需要有针对性的对已证实具有遗传毒性的天然植物药进行研究,进一步确认天然植物药遗传毒性的分子基础。

3 天然植物药DNA加合物研究中的方法

现有的天然植物药DNA加合物的发现历程:临床不良反应的监测报告→肝损害发生→遗传毒理学研究→天然植物药DNA加合物的发现。这过程中已经发生众多肝损害事件,严重者甚至引起2.9%患者死亡^[19]。随着检测技术的发展,研究者可以通过高通量筛选的方法,寻找可能导致DNA加合物的天然植物药单体化合物,用以作为临床指导。

现有天然植物药遗传毒性的评价方法主要推荐两组:(1)细菌回复突变试验(AMES试验)、染色体损伤的体外细胞遗传学试验(体外中期相染色体畸变试验或体外微核试验)或体外小鼠淋巴瘤细胞Tk基因突变试验、体内遗传毒性试验;(2)AMES试验、两种不同组织进行的体内遗传毒性试验。

上述两种方法主要用于验证天然植物药的遗传毒性安全性。而现有的DNA加合物的研究方法可以应用于寻找具有遗传毒性物质的分子基础包括了³²P后标记法、ELISA法、HPLC-EC/UV法、LC-MS法、GC-MS法,详见表1。

近年来检测分析技术的快速迭代发展,质谱仪发展出了三重四级杆质谱(QqQ)、飞行时间质谱(TOF)、傅里叶变换质量分析器(Qrbitrap),质谱仪的定性定量能力有了质的飞越。合适的质谱检测器可以实现极低检出限,非常适合用于DNA加合

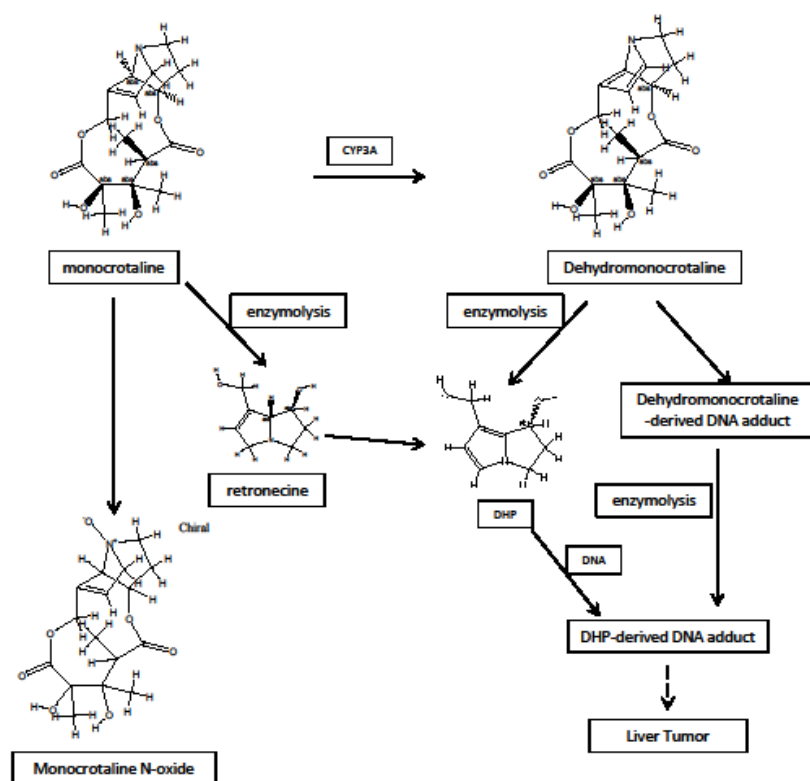


图2 野百合碱的代谢激活和解毒途径

Fig.2 Proposed metabolic activation and detoxification pathways of monocrotaline

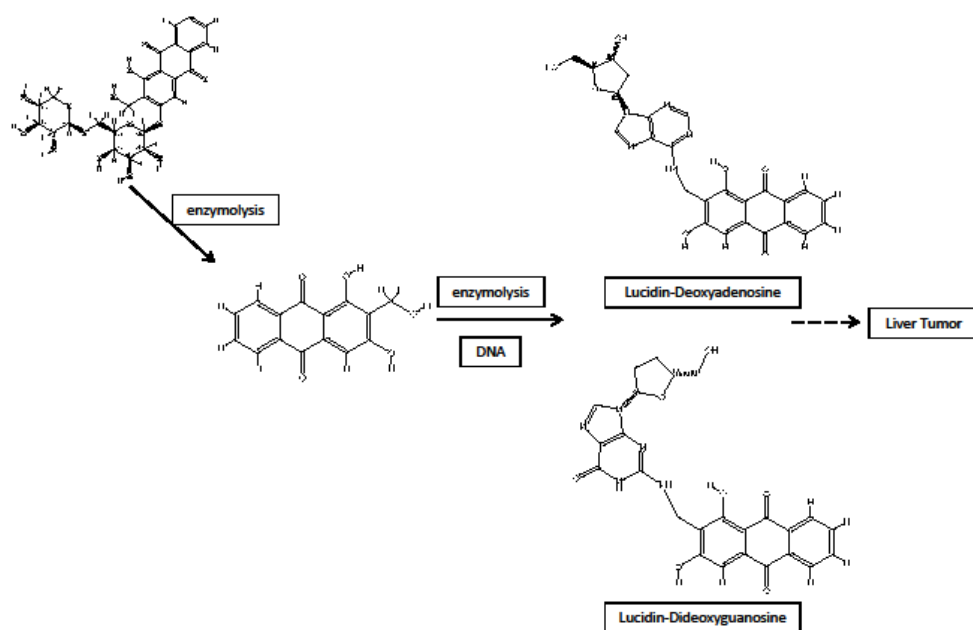


图3 Lucidin与DNA产生的加合物的途径

Fig. 3 Pathway of adducts produced by Lucidin and DNA

表1 可用于寻找具有遗传毒性物质的DNA加合物研究方法

Table 1 Methods can be used to search for DNA adducts with genotoxic substances

方法名称	灵敏度	简要评价
³² P标记法	能够在平均每1010DNA中发现1个DNA加合物.	对DNA结构变化具有高灵敏度只要10ugDNA片段就能进行试验.,不仅适用于未知结构的DNA加合物检测,还适用于混合物质引起的DNA加合物检测,适用于天然植物药及中成药制剂这种混合成分的检测,同时保留有高灵敏度.
ELISA法	平均每107个DNA中发现1个DNA加合物.	适用于高通量地筛选会跟DNA产生加合物的化学成分,对于单一化学物质的快速筛选具有很高的经济性.
HPLC-EC分析法	平均每105-106DNA中发现1个DNA加合物.	局限性较大,灵敏度不足,需要跟其他技术联用才能更快速的分离鉴定DNA加合物.
GC-MS法	平均每107个DNA中发现1.6~240个DNA加合物.	选择性好,能够快速根据离子碎片推断结构,但操作需要经过多步操作,富集过程复杂,要的较多的检测材料,1.6g脱氧鸟苷.
HPLC-ESI-MS分析法	平均每108DNA中发现7个DNA加合物.	对DNA加合物具有极高灵敏度.

物的检测,并快速鉴定DNA加合物的结构.甚至通过MALDI-TOF-MS可以鉴定出DNA加合物在基因中的结合位点^[20].

同时液相色谱技术发展出了多种技术:高效液相色谱、超高效液相、微流液相色谱和二维液相色谱.通过新型液相与适当质谱仪的联用,通过色谱更高效地将干扰物与DNA加合物分离,进入质谱检测器后,质谱仪本身的分辨率和灵敏度,对于DNA加合物的鉴定更加准确.合理LC/MS检测方法对于加合物材料的要求少至2.5 μg DNA^[21].

4 天然植物药DNA加合物检测方法进展

4.1 富集DNA加合物

DNA加合物作为一种体内的生物标志物,其在组织中的含量是及其微量的,文献报道的检出在 $1 \times 10^{-4} \sim 1 \times 10^{-10}$.这种情况下,如何富集DNA加合物对于检出能力是一个极大的考验.现有的主要手段就是通过加大前处理的检测材料或者通过固相微萃取SPE快速富集^[22].其中,在线固相微萃取,对于现有的检测方法而言是一个相对高效的富集方法,其对样品损耗少,同时能够有效去除生物样品中基质对于目标检测物质的干扰^[23].

4.2 LC-MS检测寻找DNA加合物

天然植物药具有成分复杂的特点,在体内及体外代谢过程中会产生各种不同的代谢产物,天然植物药的单体成分特别是可能对DNA产生影响的成分都是极其微量的,所以普通的HPLC很难达到对这些成分的有效分离和检出.就此需要用到UPLC甚至Nano-LC,只有更高效的分离,才能对于产物进行有效鉴定,Feng等^[24]通过UPLC-MS分离鉴定了

32种人参皂苷的代谢产物.

现有报道中提到利用LC-ESI-QqQ质谱仪通过惰性气体向DNA加合物准分子离子施加CID电压后,稳定的DNA加合物可能会产生一个116 Da的中性丢失^[25].通过中性丢失扫描的方法,能够在 10^4 个DNA中发现1个DNA加合物^[26],通过固相萃取等高效的富集方法,能够进一步提高LC-MS方法对于DNA的检出限.同时应用MALDI-MS确定DNA加合物在DNA序列中的位点^[27],鉴别DNA序列的损伤修复.

4.3 天然植物药DNA加合物的体外与体内孵育

体外孵育DNA加合物具有很成熟的方法,Saha等^[28]采用氧化苯乙烯与脱氧鸟苷体外共孵育,采用GC/MS方法检测到了氧化苯乙烯DNA加合物.不仅可以采用单独A、G、C、T核苷与目标天然植物药提取物或者天然植物药单体化合物孵育,还可以参考Deforce等^[29]的方法,将目标天然植物药提取物或天然植物药单体化合物与小牛胸腺DNA孵育,并通过消化剪切等手段检测.

除了以上两种体外孵育的方法,还可以参考Chan等^[30]的方法,对大鼠采用灌胃等方法,摄入定量的天然植物药提取物或天然植物药单体化合物,提取天然植物药主要代谢组织肝脏及肾脏组织中的DNA,并通过LC-MS检测分析天然植物药DNA加合物.

4.4 天然植物药DNA加合物体内孵育中的不足

天然植物药DNA加合物体内孵育有很大的优势,可以快速鉴定发现DNA加合物,能够准确阐述天然植物药肝损伤的分子学基础,为天然植物药

炮制过程中增效减毒提供指导,明确天然植物药的安全使用剂量。

然而在天然植物药加合物的体内外孵育中,如何确定天然植物药或者天然植物药单体化合物的剂量是一个很重要的问题。比如,在已知的能够产生肝毒性的天然植物药中马兜铃酸有多个种类,毒性各不相同,但是不同种类马兜铃酸在马兜铃属植物中含量差异极大^[31],在孵育过程中需要避免这个问题。

5 天然植物药的DNA加合物研究意义

乌日汗等^[32]将暴露相关的剂量估算模型(Exposure Related Dose Estimating Model, ERDEM)应用在能够与DNA产生加合物的苯并(a)芘代谢中,构建PBPK/PD模型,反应苯并(a)芘的暴露风险。在天然产物中可以应用ERDEM,通过输入暴露DNA加合物的化学参数,在人体中的产生路径、代谢方式等,天然植物药的暴露时间等多项数据,模型计算输出后,用以估算DNA加合物产生后在人体内形成加合物的可能性^[33]。采用ERDEM的估算,能够对天然药物中的微量成分进行模拟,灵敏度高^[34]。Stiborová等^[35]认为特定DNA加合物在肾组织中的持久性非常长(长达20年),不仅可以用作评估AA暴露和AA诱导的UUC的生物标志物,还可以用于其酶促活化和解毒的机制评价。

6 展望

近年来天然植物药的肝毒性问题引起了公众的极大关注。2014年7月,原国家食品药品监督管理总局1个月内连续发布3条对于何首乌应用的风险提示。但是由于天然植物药经常与化学药联用,导致肝损伤成因复杂。目前国家食品药品监督管理局发布的《药物遗传毒性研究技术指导原则》也是主要针对化学药品,化学药品没有天然植物药的复杂性,该原则对天然植物药与药物遗传毒性的关联性较难判断,导致学界和群众对于天然植物药的安全性认识分化严重,常有过度夸大或者轻视的情况发生。事实上,持续进行的相关研究已经指导了临床用药。用于治疗肺寒痰饮的细辛中马兜铃酸主要集中在其地上部分^[36],在2005版以后的《中国药典》,细辛入药部位已经修订为地下部分(根及根茎),马兜铃酸含量极低。龙胆泻肝丸中马兜铃科的关木通早已修改成毛茛科的川木通。含有马兜铃科广防己的方剂或中成药,很多已经改为不含马兜铃酸的防己科植物粉防己。

通过对天然植物药DNA加合物的检测,分析确

定天然植物药中有可能产生DNA加合物并引起DNA损伤的成分,并结合计算毒理学、临床数据监测,有效地预测天然植物药的肝毒性,减少中成药及天然植物药在临床应用中的风险,明确肝毒性的分子学基础及其机制,能够更好的促进中医药的走向世界。

参考文献

- [1] 韩佳寅, 易 艳, 梁爱华, 等. 中药遗传毒性研究思路和方法 [J]. 中国中药杂志, 2015, 40(14): 2696-2700.
- [2] 杨桂蓉, 喻 凯, 陆彩鹏, 等. 苍术苷的致突变 AMES 试验研究 [J]. 中华中医药学刊, 2013(3): 637-638.
- [3] 孙恩亨, 卜新柱, 钱怡宁, 等. 中药雄黄的致突变性实验研究 [J]. 中国中医基础医学杂志, 1998(11): 52-52.
- [4] 赵 源, 吴文斌, 汤家铭. 雄黄致体内染色体畸变 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(14): 245-249.
- [5] 曹易懿, 栾 洋, 任 进. 汉防己甲素的遗传毒性评价 [J]. 毒理学杂志, 2010(2): 172-174.
- [6] 董伟华, 郑智敏, 刘桂亭. 中药大黄、槐米、红花提取物的致突变作用 [J]. 郑州大学学报(医学版), 1991(4): 330-333.
- [7] 陆 华, 马康目, 孙 皎, 等. Ames 试验与 MLA 试验检测两味含马兜铃酸中药的致突变性 [J]. 癌变·畸变·突变, 2007, 19(6): 484-486.
- [8] Vanherweghem J L, Tielemans C, Abramowicz D, et al. Rapidly progressive interstitial renal fibrosis in young women: association with slimming regimen including Chinese herbs [J]. Lancet, 1993, 341(8842): 387-391.
- [9] 孙 阳. 中药马兜铃酸肾病与巴尔干肾病 [J]. 国际泌尿系统杂志, 1995(2): 58-59.
- [10] 李 瑛, 曾彩虹. 马兜铃酸肾毒性作用及其机制研究 [J]. 肾脏病与透析肾移植杂志, 2003, 12(6): 558-563.
- [11] 柏兆方, 徐 广, 王伽伯, 等. 马兜铃酸及其衍生物致癌性研究进展及应对措施 [J]. 药学进展, 2018(3): 164-169.
- [12] 宋海波, 任经天, 杨 乐, 等. 马兜铃酸毒性研究进展及风险因素分析 [J]. 中国中药杂志, 2014, 39(12): 2246-2250.
- [13] Wang Y P, Jian Y, Beger R D, et al. Metabolic activation of the tumorigenic pyrrolizidine alkaloid, monocrotaline, leading to DNA adduct formation *in vivo* [J]. Cancer Lett, 2005, 2(1): 74-79.
- [14] Ishii Y, Okamura T, Inoue T, et al. Chemical structure determination of DNA bases modified by active metabolites of lucidin-3-O-primeveroside [J]. Chem Res Toxicol, 2010, 23(1): 134-141.
- [15] 陈进军, 于增杰, 林红英, 等. 千里光提取物的小鼠骨髓微核试验 [J]. 中兽医医药杂志, 2007, 26(1): 20-22.
- [16] 司 南, 王宏洁, 杨 健, 等. 茜草中 Lucidin, Lucidin-3-O-

- primeveroside 及大叶茜草素在小鼠血浆中代谢趋势的初步研究 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(2): 113-115.
- [17] 王增涛. 紫茜抗癌胶囊指纹图谱及稳定性、毒性的研究 [D]. 延吉: 延边大学, 2009.
- [18] Yang Y, Yan J, Doerge D, et al. Metabolic activation of the tumorigenic pyrrolizidine alkaloid, riddelliine, leading to DNA adduct formation *in vivo* [J]. Chem Res Toxicol, 2001, 14(1): 101-109.
- [19] 周媛. 中国人群药物性肝损害的流行病学: 系统分析患者 21789 例 [D]. 上海: 第三军医大学, 2013.
- [20] Zhang L K, Ren Y, Rempel D, et al. Determination of photomodified oligodeoxynucleotides by exonuclease digestion, matrix-assisted laser desorption/ionization and post-source decay mass spectrometry [J]. J Am Soc Mass Spectr, 2001, 12(10): 1127-1135.
- [21] Ricicki E M, Soglia J R, Teitel C, et al. Detection and quantification of N⁷ - (Deoxyguanosin-8-yl) - 4-aminobiphenyl adducts in human pancreas tissue using capillary liquid chromatography-microelectrospray mass spectrometry [J]. Chem Res Toxicol, 2005, 18(4): 692-699.
- [22] Kao C Y, Giese R W. Measurement of N⁷ - (2'-hydroxyethyl)guanine in human DNA by gas chromatography electron capture mass spectrometry [J]. Chem Res Toxicol, 2005, 18(1): 70-75.
- [23] 刘磊. 生物样品自动化在线固相萃取—高效液相色谱分析方法学研究 [D]. 天津: 南开大学, 2013.
- [24] Feng G F, Liu S, Pi Z F, et al. Study on the I phase metabolism of ginsenoside *in vitro* by ultra performance liquid chromatography coupled with mass spectrometry [J]. J Chin Mass Spectr Soc, 2017, 38(4): 450-459.
- [25] Zubel T, Bürkle A, Mangerich A. Mass spectrometric analysis of sulfur mustard-induced biomolecular adducts: Are DNA adducts suitable biomarkers of exposure? [J]. Toxicol Lett, 2017, 293: 21-30.
- [26] Gangl E T, Turesky R J, Vouros P. Determination of *in vitro* - and *in vivo*-formed DNA adducts of 2-amino-3-methylimidazo [4, 5-f]quinoline by capillary liquid chromatography/ microelectrospray mass spectrometry [J]. Chem Res Toxicol, 1999, 12(10): 1019-1027.
- [27] Tretyakova N, Matter B, Ogdie A, et al. Locating nucleobase lesions within DNA sequences by MALDI-TOF mass spectral analysis of exonuclease ladders [J]. Chem Res Toxicol, 2001, 14(8): 1058-1070.
- [28] Saha M, Abushamaa A, Giese R W. General method for determining ethylene oxide and related N⁷, guanine DNA adducts by gas chromatography-electron capture mass spectrometry [J]. Journal of Chromatography A, 1995, 712(2): 345-354.
- [29] Deforce D. Analysis of the DNA adducts of phenyl glycidyl ether in a calf thymus DNA hydrolysate by capillary zone electrophoresis-electrospray mass spectrometry: evidence for phosphate alkylation [J]. Carcinogenesis, 1998, 19(6): 1077-1086.
- [30] Chan W, Yue H, Poon W T, et al. Quantification of aristolochic acid-derived DNA adducts in rat kidney and liver by using liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry [J]. Mut Res, 2008, 646(1): 17-24.
- [31] 田禾苗, 程雪梅, 王长虹, 等. HPLC法同时测定马兜铃中4种成分 [J]. 中成药, 2016, 38(3): 560-565.
- [32] 乌日汗. 应用暴露相关的剂量估算模型(ERDEM)为苯并(a)芘构建人体PBPK/PD模型的研究 [D]. 呼和浩特: 内蒙古医科大学, 2016.
- [33] Zhang X, Tsang A M, Okino M S, et al. A physiologically based pharmacokinetic / pharmacodynamic model for carbofuran in sprague-dawley rats using the exposure-related dose estimating model [J]. Toxicol Sci, 2007, 100(2): 345-359.
- [34] 巢迎妍, 张辉, 刘艳, 等. 应用暴露相关的剂量估算模型(ERDEM)构建甲胺磷的大鼠生理药代动力学/药效学(PBPK/PD)模型 [J]. 实用药物与临床, 2015, 18(2): 174-177.
- [35] Stiborová M, Arlt V M, Schmeiser H H. DNA adducts formed by aristolochic acid are unique biomarkers of exposure and explain the initiation phase of upper urothelial cancer [J]. Int J Mol Sci, 2017, 18(10): pii: E2144. doi: 10.3390/ijms18102144.
- [36] Michl J, Bello O, Kite G C, et al. Medicinally used asarum species: High-resolution LC-MS Analysis of aristolochic acid analogs and *in vitro* toxicity screening in HK-2 cells [J]. Front Pharmacol, 2017, 8: 215