

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

边育红¹, 庄朋伟¹, 王丽², 周慧芳¹, 张艳军^{1*}

1. 天津中医药大学, 天津 300193

2. 天津市传染病医院, 天津 300192

摘要: 随着科学技术的不断发展, 人类发现新化合物的种类和数量不断增加, 但这些化合物最终成为药品到上市销售是一个周期长、操作复杂、资金投入大且失败率很高的过程。因此, 寻找能够确切、快速、敏感反映外源性化合物对生物体毒性作用的安全性评价模型已成为现代药理学研究的热点。近年来不断涌现出应用各种先进的生物学手段及平台进行药物毒性评价的方法, 这些方法在一定程度上克服了传统毒理学药物毒性评价的缺点, 不仅为药物安全性评价及应用奠定了基础, 同时也节约了大量的人力、物力和财力。就药物毒性预测及潜在毒性评价方法进行综述, 并对其在中药安全性评价方面的应用前景进行展望。

关键词: 药物毒性评价; 基因组学; 代谢组学; 胚胎干细胞; 安全性评价

中图分类号: R285.53 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2011)12-2379-07

Research progress on discovery of drug potential toxicity and perspective on safety evaluation of Chinese materia medica

BIAN Yu-hong¹, ZHUANG Peng-wei¹, WANG Li², ZHOU Hui-fang¹, ZHANG Yan-jun¹

1. Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300193, China

2. Tianjin Hospital of Infectious Diseases, Tianjin 300192, China

Abstract: Following the development of science and technology, the number and variety of newly discovered compounds are increasing. However, it is a long process for the new compounds to become clinic medicines into the market eventually as well as be costly and difficult to manipulate with high failure rate. So it has been a hot point of modern pharmacy to set up a precise, fast, and sensitive model to evaluate the toxic effect of exogenous compounds on bio-organism. In recent years, large members of advanced biological methods and platforms for evaluating the drug toxicity have been put into use constantly. These methods not only overcome the shortcomings of traditional toxicology and lay the foundation for drug safety evaluation, but also save a lot of manual labour, material resources, and financial resources. In this paper, we are going to review on the methods of drug toxicity predetermination and potential toxicity evaluation and also give an overlook of their application on the safety evaluation of CMM.

Key words: evaluation of drug toxicity; genomics; metabonomics; embryonic stem cells; safety evaluation

新药的安全性评价技术目前已经成为创新药物研发的瓶颈之一。寻找能够确切、快速、敏感反映外源性化合物对生物体毒性作用的评价技术与模型已成为当前药物安全性评价亟待解决的重大问题。动物实验是传统的新药安全性评价常用手段之一, 然而, 以实验动物病理学和相关生化指标作为毒性评价标准不仅耗时长、工作量大、评价效率相对较低^[1-2], 而且从动物得到的数据并不总能预测在人体上实际发生的情况。震惊世界的反应停(沙利度胺)

事件不仅揭示了动物和人对药物反应的差异, 也揭示了药物体内毒性筛选的局限性。2007年美国国家研究委员会(US National Academy of Sciences, NAS)发布的报告“21世纪毒性检测: 远景和战略”指出: “随着毒理基因组学、生物信息学、系统生物学和计算毒理学的发展和进步可能将在以整体动物实验的基础上的毒性测试转变到以体外实验测试为主的新方法”, 并以对化学物质进行广泛评定、使用更加快速且成本低、效率高的方法、减少实验动物

收稿日期: 2011-10-10

基金项目: 国家重点基础研究发展计划(“973”计划)项目资助(2011CB505302); 国家自然科学基金资助(NO81072741); 长江学者和创新团队发展计划资助(IRT0973)

作者简介: 边育红(1968—), 女, 天津中医药大学中医学学院, 研究方向为干细胞、表观遗传学。E-mail: yan.bian515@gmail.com

*通讯作者 张艳军 Tel: (022)59596223 E-mail: zyjsunye@163.com

网络出版时间: 2011-11-02 网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/12.1108.R.20111102.1504.001.html>

的使用为毒性评价主要目标^[3]。因此, 引进先进的生物学技术和新的评价平台, 通过细胞、细胞株或细胞成分(最好是来自人体的)来鉴定生物过程的变化, 将有助于提高药物安全性评价效率, 为新药的研发奠定基础。本文就药物毒性评价中组学技术的应用以及药物毒性评价平台的发展现状进行综述, 并对其在中药安全性评价方面的应用进行展望。

1 不同组学技术在药物毒性评价中的应用

随着科学技术的不断发展, 药物毒理学检测和分析技术也在朝着更高效、灵敏、快速的方向发展, 实现了从早期的宏观整体动物水平到组织器官再到微观的细胞分子水平的跨越。组学技术(omics technology)随着系统生物学(systems biology)的产生和发展应运而生, 主要包括基因组学、转录组学、蛋白质组学和代谢组学等技术。组学技术把生物体作为一个完整的系统进行研究, 运用相应的技术手段考察生物体由于外界环境、病理生理刺激或遗传修饰引起的不同内源性物质变化及其变化规律。因其具有高通量、特异性、快速的特点, 组学技术可以在较小毒性剂量下检测生物体内基因组、蛋白质组和代谢组发生的变化, 现已广泛应用于药物毒性评价及其中毒机制的相关研究。因此, 在新药研发的初始阶段, 通过分析转录组、蛋白质组和小分子代谢产物的变化, 有望在更短的时间且更低的药物浓度下观察药物潜在毒性作用。

1.1 转录组学在毒性评价中的应用

转录组(transcriptome)是特定细胞在某一功能状态下产生的所有 RNA 的总和。同一细胞在不同的生长时期及生长环境下, 其基因表达情况是不完全相同的, 具有特定的空间性和时间性特征。转录组学(transcriptomics)是一门在整体水平上研究某一时刻某一细胞中基因全部转录本种类、结构和功能及转录调控规律的学科, 其目的在于提供构成生物全部基因的表达调节系统和全部蛋白质的功能相互作用等信息, 以及实现对生物及细胞功能的全部情况的解析等^[4-5]。目前用于转录组数据获得和分析的方法主要有杂交技术的芯片技术, 包括 cDNA 芯片和寡聚核苷酸芯片; 序列分析的基因表达系列分析(serial analysis of gene expression, SAGE)和大规模平行信号测序系统(massively parallel signature sequencing, MPSS)。基于先进的检测手段和分析技术, 具有高通量、微型化和自动化的特征, 转录组学也在现代毒理学研究中发挥着重要作用。转录

组学可以快速从基因组水平分析药物作用后基因表达的改变, 从而发现毒性药物作用的分子机制^[6]。有研究报道, 运用该技术有可能在疾病发生的早期阶段或是在临床生化指标及病理组织学的改变出现之前观察到药物作用后对机体产生的损伤^[7]。

Mori 等^[8]给予大鼠 3 种典型的心脏毒性药物, 分别于 8、24 h 后运用表达谱芯片寻找心脏毒性潜在基因标志物。实验结果表明, 36 个基因在 3 种药物中共同表达为上调, 分析显示, 这些基因涉及了趋药性、组织再生、细胞增殖调控等生物功能, 最终选择了在 3 种药物中共同高表达的 5 个基因: Spp1、Fhl1、Timp1、Ccl7、Reg3b 作为潜在心脏毒性基因标志物。Huang 等^[9]以化学方法诱导大鼠肝损伤, 运用基因芯片技术检测肝损伤大鼠血液, 分析得出一些潜在生物标志物, 然后用相同的方法分析乙酰氨基酚引起肝毒性大鼠的肝脏组织, 实验数据得出两者精确度在 92.1%。这一结果表明, 运用转录组学方法分析得出潜在生物标志物可以作为药物引起肝损伤的潜在生物标志物。吴兆毅等^[10]将 50 $\mu\text{g/L}$ 五氯酚作用于斑马鱼胚胎, 运用基因芯片技术对样品进行分析, 得到 smad 2、smad 5、bmp 4、bmp 7 等涉及抗氧化、信号传导等多个生物功能的差异表达基因, 为揭示五氯酚的发育毒性的潜在生物标志物奠定基础。上述研究表明, 利用基因组学方法可对生物整体的基因动态变化进行分析, 从而较全面地反映生物体的生理及病理状态, 得到潜在毒性标志基因, 进而可以有效地评估药物的毒性作用。

1.2 蛋白质组学在毒性评价中的应用

蛋白质组学是从整体角度研究生物体蛋白质组成成分、表达水平、修饰状态、相关功能及其动态变化规律的学科, 主要技术手段包括双向凝胶电泳(2-D)、质谱分析和图像数据处理系统以及生物信息学分析相关软件和数据库^[11]。蛋白质组学技术可以通过比较毒性药物作用前后特定组织器官或是细胞蛋白质表达谱的变化, 筛选出差异性表达蛋白, 再通过其他分析技术寻找确切、敏感的潜在生物标志物。现代研究发现这些差异蛋白的出现一般要远早于目前临床应用的病理学终点或生化指标。因此应用蛋白质组学技术可以在比传统方法剂量更低、时间更短的情况下鉴定出毒性作用^[12]。

Amacher 等^[13]给予 SD 大鼠 4 种不同毒性机制的化合物, 分别收集血清及肝脏组织, 应用 2-D-MS 技术进行蛋白质组学分析。实验结果得出维生素 D

结合蛋白、双氧磷酶、视黄醇结合蛋白、苹果酸脱氢酶、F 蛋白、嘌呤核苷磷酸化酶可能作为药物引起肝毒性潜在蛋白生物标志物。在肾毒性评价方面,有文献报道^[14],给予大鼠庆大霉素 60 mg/kg,收集 2、3、8 d 尿液,经蛋白质组学分析得出,尿液中 *N*-乙酰- β -*D*-氨基葡萄糖苷酶 (NAG) 和 γ -谷氨酰基转移酶 (GGT) 显著升高,这种变化与肾脏近曲小管病理变化同时出现,而在庆大霉素 40 mg/kg 剂量组尿液中 NAG、GGT 无显著变化,由此推断 NAG 和 GGT 可以作为庆大霉素引起肾损伤的早期生物标志物。Alm 等^[15]选用具有神经发育毒性的 PBED-99 作用于小鼠新生大脑海马区和纹状体,观察药物作用后蛋白质组的变化。实验结果显示,大部分差异蛋白都参与蛋白激酶信号通路,并认为这些差异蛋白可能是 PBDE-99 诱导的神经毒性的生物标志物。由此可见,利用蛋白质组学技术通过检测经药物刺激后器官组织或细胞的蛋白质组的方法,可以在临床前研究中早期预测药物毒性,并通过相关鉴定手段最终找到新的毒性生物标志物。

1.3 代谢组学在毒性评价中的应用

代谢组学是继基因组学、转录组学和蛋白质组学之后提出的一个新概念^[16],由 Nicholson 教授及其同事于 1999 年正式提出,主要研究生物体由病理生理刺激或遗传因素改变所致内源性代谢产物的变化。代谢组学可以全面和高通量地研究生物体内的代谢途径,其分析手段主要以血液和尿液、细胞、细胞培养液、组织等生物样品为研究对象,运用高效液相色谱 (HPLC)、气相色谱质谱联用 (GC-MS)、液相色谱质谱联用 (LC-MS)、核磁共振 (NMR) 等分离分析技术,对待测样品进行系统的测定和分析,然后使用相关的数据处理软件,如主成分分析 (PCA)、偏最小二乘-判别分析 (PLS-DA)、支持向量机 (support vector machine) 等进行分析,最终获得相应的代谢通路和生物标志物^[17-18]。作为一门新兴的学科,代谢组学从研究生物体整体代谢变化出发,全面反映药物作用后生物体内各个组织器官代谢的变化,并可发现药物毒性及不良反应的情况。因此,代谢组学作为毒理学研究中一种重要的手段,广泛应用于药物毒性早期评价及其机制研究等多项领域。

Boudonck 等^[19]通过 GC-MS、LC-MS 联用的方法探讨基于代谢组学早期肾毒性生物标志物的预测。SD 大鼠给予有明确肾毒性药物庆大霉素、顺

铂和妥布霉素后,分别于 1、5、28 d 收集肾脏组织和尿液进行检测。结果表明单次给药后,尿液中聚胺类和氨基酸类量升高,其升高时间早于肾脏形态损伤和临床上肾毒性生化指标。因此这些代谢产物可以作为评价药物引起肾脏损伤的潜在生物标志物。目前,代谢组学对中药毒性的评价也已有了相关的报道。梁琦等^[20]将广防己和粉防己 ig 给予 SD 大鼠,分别收集血液和尿液进行质谱分析,实验结果显示药物组大鼠尿液中主要变化的代谢物有柠檬酸、2-酮戊二酸、牛磺酸、马尿酸盐、氮氧三甲胺 (TMAO)、肌酐;血液中主要变化代谢物有不饱和脂肪酸、3-羟基丁酸、丙酮、乙酰乙酸、肌酐等。李建新等^[21]以核磁共振结合模式识别技术和主成分分析法探讨雷公藤甲素对大鼠尿液代谢产物的影响,实验结果显示,给药后尿样中甘氨酸、醋酸盐、甜菜碱以及丙酮水平显著提高。分析药物毒性机制可能首先是肾脏皮层 S1 受损,然后肾乳头受损,最后肾脏皮层 S3 段受到损伤。代谢组学具有巨大的应用潜力和科学价值,其可以在损伤较小的情况下(主要检测的体液是血清、尿液和唾液等)评价药物的毒性作用,具有灵敏、快速等优势,可更快、更准确地发现毒性物质和毒性规律。因此,代谢组学可在临床前毒理学的研究中发挥重要作用,并在临床前毒性作用机制的研究中显示出强大的潜力。

2 药物毒性评价平台

近年来,国内外药物毒性评价研究发展迅速,在研究的思路和观念上发生了巨大转变。在整体动物实验中 3R (减少 reduction、替代 replacement 和优化 refinement) 概念^[22]的提出,使得人们在药物毒性初步评价阶段逐步采用体外筛选评价模型替代整体动物实验。

体外毒理实验具有快速、敏感、特异性高、条件易控等优点,可以避免使用大批动物进行长时间毒理研究,不仅可以节省动物及人力投入^[23],还可缩短实验周期,增加实验的敏感性,在药物毒理评价与深入的细胞分子毒效等研究中起到重要作用,目前已有报道利用毒性靶器官细胞对药物进行毒理研究,并取得了一定进展^[24]。随着毒理学替代法研究的迅速发展,体外替代实验的研究平台从一般的细胞、组织培养延伸到诱导性多能干细胞 (ips)。胚胎干细胞是一种存在于早期胚胎中的具有全能性细胞,可分化成 3 个胚层的细胞。近年来,胚胎干细胞的无限增殖和多分化潜能的特点成为人们研究

的重点。由于其全能性且对药物作用反应迅速、敏感性高、干扰因素少的优点,现已作为一种全面评价药物体外毒性的重要评价工具。

2.1 动物模型实验

在药物毒理学研究中,传统的毒理学研究方法通常以动物模型为基础,以发病率、死亡率、生化指标和组织病理结果等作为毒性检测终点。裘奇等^[25]通过肾脏组织形态学和相应生化指标的变化,观察木通所致大鼠急性肾损伤作用。研究表明,应用大剂量木通后生化出现氮质血症、蛋白尿、糖尿、低渗尿及尿 NAG 酶升高等变化,同时观察到急性肾小管坏死等组织形态学改变,因此得出大剂量木通可导致大鼠急性肾功能衰竭。在肝毒性评价方面,杨洪军等^[26]通过 ig 给予大鼠栀子水提物、醇提物、栀子苷,观察动物外观、行为、体质量、肝指数、生化指标及病理学变化。实验结果表明三者具有肝毒性,且栀子苷是栀子肝毒性的主要物质基础。除大鼠、小鼠外,家兔和 Beagle 犬也是常用的实验动物模型。何永明等^[27]运用家兔评价中药麻黄的心脏毒性,以连续 ig 给药的方式考察药物作用 7 d 后,家兔心率、心电图、血液中心肌酶谱及心肌的病理组织变化。结果表明麻黄对家兔的心脏功能和结构有明显的损伤,而且在一定范围内呈现剂量累积效应。李华等^[28]给予 Beagle 犬不同浓度的雷公藤多苷,于给药后不同时间点检测天冬氨酸氨基转移酶、肌酸激酶、乳酸脱氢酶和心肌钙蛋白的变化情况,动物死亡后检测组织病理变化。结果证明雷公藤多苷致 Beagle 犬急性中毒主要表现为心肌细胞的损伤,并发现心肌钙蛋白是心肌早期损伤的敏感指标,可作为未来临床诊断的早期参考标志物。

尽管传统的动物实验可以较好地反映药物对动物整体的毒性作用,但所涉及的指标多缺乏高灵敏性和特异性,描述性指标多,提示毒性机制的内容较少,且都需要大量的时间、精力以及实验动物。近年来许多科研机构采用体外模型代替动物模型进行药物潜在毒性研究。

2.2 体外模型实验

体外模型实验主要通过体外培养待测组织、细胞,研究外源性有害因子对其损伤作用的规律,探讨毒性作用机制,并做出相应毒性评估。体外毒性测试有快速、价廉、实验条件可控、结果易于定量等诸多优点,目前广泛应用于毒理学的各项实验研究。

2.2.1 离体组织器官 离体组织器官培养是指应用

从动物体内分离出器官或组织,在模拟体内的生理条件下,体外进行培养的方法。该方法可以使分离出来的组织器官保持正常的结构与功能,以便在可控条件下进行相关研究^[29]。张彩霞等^[30]应用玻璃管架法培养鸡胚股骨,观察 4 种生物材料的毒性。通过组织学观察和电镜的超微结构变化检查发现男性依赖性假体修复件硅橡胶可导致部分细胞器结构模糊,粗面内质网数目变少,显示了轻微的毒性反应,其他 3 种材料未见异常。离体心脏、肝脏、肾脏也广泛用于中药、化学物质及有机溶剂等器官毒性的检测^[31-33]。

2.2.2 毒性靶器官细胞

目前,寻找药物毒性靶器官及应用靶器官细胞进行药物毒性评价已经是药物毒理学研究的重要工作之一^[34]。从动物体内分离毒性靶器官的细胞,并对其进行培养、纯化,得到单一类型的细胞进行毒理学研究。该方法可以定向研究药物对某一器官的毒性作用及其机制,且具有快速、敏感、节约实验动物等优点,已在药物毒性机制、潜在毒性生物标记物的研究中广泛使用。许勇芝等^[35]用马兜铃酸作用于肾小管上皮细胞,发现 10 mg/L 马兜铃酸 A 可使细胞凋亡率显著增高。张志华等^[36]体外培养人肝细胞,将异烟肼、利福平、异烟肼与利福平联合、乙酰肼、异烟肼代谢物肼分别作用于肝细胞 48 h 后,采用 MTT 法,以乳酸脱氢酶(LDH)为检测指标,揭示异烟肼与利福平合用及肼对人肝细胞具有细胞毒性作用,其中肼的肝细胞毒性作用最强。在心脏毒性的评价中,桂春等^[37]采用原代培养的大鼠心肌细胞,检测紫草素对心肌的毒性作用。结果表明大于 1.3 $\mu\text{mol/L}$ 的紫草素对心肌细胞有毒性作用,其作用机制可能与启动细胞凋亡机制有关。由此可见,经哺乳动物原代培养或转化得到的毒性靶器官细胞系,已用于药物潜在毒性的筛选。尽管毒性靶器官细胞可以较好地评价药物在该靶器官的毒性,但就其来源和细胞特性等方面均具有一定的缺陷。永生化的细胞较原代细胞在来源上容易获得、培养条件更加简单,但这种细胞多经过肿瘤细胞或病毒的转染,与正常细胞有所区别。原代细胞可以较好地保持原有细胞的特点,更加适用于潜在药物的毒性评价,但是原代细胞具有获取较难、传代次数较少、生长较缓慢等缺点。在毒性评价方面,毒性靶器官细胞只能单一评价该靶器官毒性,不能全面评价药物对机体的整体毒性作用。因此寻找更好的替代细胞是提高毒性实验准确度的必要措施。

2.2.3 胚胎干细胞 目前的药效实验或者毒性实验多是针对某一特定组织或器官的毒性反应进行研究,有时难以发现药物其他方面的毒性。胚胎干细胞是一种高度未分化细胞,其优势在于可以全面地反映药物作用后引起的生物体内各个组织的生理变化,全面反映药物不良反应的情况,具有对药物作用反应迅速、敏感性高等优点。因此胚胎干细胞可以作为一种重要的体外药物毒性评价工具,用于毒理学实验研究。

由于胚胎干细胞具有潜在的发育优势,因此早在 20 世纪初就已建立了胚胎干细胞测试并将其用于测评化学物质胚胎毒性的体外替代方法^[38]。Genschow 等^[39-41]在一个预测模型中进行 3 个独立的胚胎干细胞测试实验(诱导向心肌方向分化、胚胎干细胞活力试验和成纤维细胞活力试验),来评价化学物质的胚胎毒性,精确度大于 78%。欧洲替代方法验证中心(ECVAM)应用人胚胎干细胞进行胚胎发育毒性检测,结果表明,与在体实验结论的符合率达到 82%,其中强胚胎毒性的符合率达到 100%; van Dartel 等^[42]选用 5 种发育毒性的药物和一种无发育毒性的药物分别作用于小鼠胚胎干细胞 0、24、48 h,应用基因芯片检测技术,共得到 26 条差异表达基因,通过相应生物信息学和统计学分析,提示这些差异基因可以用于鉴别由于发育毒性物质所引起的损伤。zur Neiden 等^[43]以肌球蛋白重链基因为研究对象,运用 PCR 技术考察药物作用分化的小鼠胚胎干细胞后该基因的变化,指出该基因可能作为预测胚胎毒性的一个检测终点。

West 等^[44]将具有不同级别致畸作用的药物和无致畸作用的药物分别作用于胚胎干细胞,运用代谢组学技术对样品进行分析,实验结果显示许多小分子物质的量发生变化,如 γ -氨基丁酸量显著增加,不对称二甲基精氨酸量显著降低,这些小分子物质可作为药物致畸作用的潜在生物标志物。

胚胎干细胞诱导分化的器官特异性细胞也可用于药物潜在毒性的筛选。Cezar 等^[45]培养人胚胎干细胞来源的神经前体细胞,选用神经发育毒性明确的丙戊酸盐作用于上述细胞,收集细胞上清液进行 LC-MS 检测分析,结果表明,色氨酸代谢的中间产物犬尿素的量有显著的升高,并通过 RT-PCR 进行了验证,得出犬尿素及其代谢产物可以作为癫痫药物发育毒性的候选生物标志物。将小鼠胚胎干细胞诱导分化为心肌细胞的方法也已被用于心脏毒性的

检测。30 余种心脏毒性药物应用于诱导分化的心肌细胞后,其生理机能及基因表达与预期结果相一致^[46-47]。目前许多科研机构采用人胚胎干细胞诱导分化为心肌细胞或肝细胞用于心脏及肝脏毒性评价,尽管还存在有分化细胞的高可变性、异常基因组型、分化操作方法标准化等问题,这一测试体系仍可在药物开发早期进行心脏、肝脏毒性的预测,并有望改进药物筛选模式^[48]。

由此可见,鉴于胚胎干细胞的多向分化潜能,可将待测物加入由胚胎干细胞向某一组织器官分化过程中的过度细胞,进而克服采用单一类型终末分化细胞不能全面评价待选药物对组织器官毒性的缺陷。胚胎干细胞的应用将有效缩短实验周期并有利于实验的标准化,而且可以克服使用终末细胞研究只能单一预测药物靶器官毒性的缺陷^[49]。作为良好的转染载体,胚胎干细胞可以表达多种报告基因,能够满足研发早期高通量筛选的需求。人胚胎干细胞克服了使用其他哺乳动物来源的细胞种属间差异的问题,真实地反映了人类细胞的生物特性,能更客观地反映药物对人体的毒性。此外,还可通过建立不同种族或地区的人类胚胎干细胞系进一步反映种族或地区间的生物特征差异^[50],各种组学技术已广泛应用于药物毒性评价各个领域,应用人胚胎干细胞结合各种组学技术可以更好地分析药物对人体潜在毒性作用,有望筛选出器官特异性的标志基因或生物学标记。

3 展望

传统中医药是我国的医药宝库,而中药以其独特的疗效越来越受到世界的关注。虽然在传统观念中,中药较西药用药更为安全,不良反应更少,但不断出现的不良反应事件^[51],使得中药配伍用药安全性成为临床一个不容忽视的问题。目前对于中药配伍用药的研究,多集中于化学方面的研究,主要考察配伍前后药物化学成分的变化。这样的研究方法,往往不能全面地评价机体在药物配伍使用中的影响作用。况且,中药配伍禁忌众多,如中药“十八反、十九畏”等^[52],虽被广泛使用,但其作用机制并不明确。因此,中药安全性评价急需一套全面、敏感的评价方法。组学技术与胚胎干细胞联合使用,既可以克服传统评价方法灵敏度低、需要大量实验动物的缺点,又可以借助胚胎干细胞多能性的特点,从整体水平上评价中药配伍的毒性作用。综上所述,干细胞结合组学方法有望成为中药毒性评价及中药

配伍研究的新手段^[53-55], 并为中药开发、申报、临床监测的各个环节发挥指导作用。

参考文献

- [1] Matheis K A, Emmanuelle C, Gautier J C, *et al.* Cross-study and cross-omics comparisons of three nephrotoxic compounds reveal mechanistic insights and new candidate biomarkers [J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2010, doi: 10.1016/j.tap.2010-11-06.
- [2] 孔庆春, 姚金胜, 黄奕奕, 等. 毒性病理同行评议要求 [J]. *药物评价研究*, 2011, 34(5): 370-373.
- [3] National Research Council. *Toxicity Testing in the 21st Century: A Vision and a Strategy* [M]. Washington DC: National Academies Press, 2007.
- [4] Lander E S, Linton L M, Birren B, *et al.* Initial sequencing and analysis of the human genome [J]. *Nature*, 2001, 409(6822): 860-921.
- [5] Venter J C, Adams M D, Myers E W, *et al.* The sequence of the human genome [J]. *Science*, 2001, 291(5507): 1304-1351.
- [6] 周莉芳, 夏昭林. 基因组学时代的毒理学研究展望 [J]. *工业卫生与职业病*, 2010, 36(1): 60-63.
- [7] 杨涛, 杨琛懋, 钱蓓丽, 等. 毒理基因组学在肾毒性研究中的应用进展 [J]. *毒理学杂志*, 2006, 20(5): 340-342.
- [8] Mori Y, Kondo C, Tonomura Y, *et al.* Identification of potential genomic biomarkers for early detection of chemically induced cardiotoxicity in rats [J]. *Toxicology*, 2010, 271: 36-44.
- [9] Huang J, Shi W, Zhang J, *et al.* Genomic indicators in the blood predict drug-induced liver injury [J]. *Pharmacogen J*, 2010, 10: 267-277.
- [10] 吴兆毅, 胡平, 赵庆顺, 等. 利用基因芯片探讨五氯酚发育毒性的作用机制 [J]. *环境科学*, 2009, 30(11): 3382-3387.
- [11] Yanagida M. Functional proteomics current achievements [J]. *Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life*, 2002, 771(1/2): 89-106.
- [12] Tyers M, Mann M. From genomics to proteomics [J]. *Nature*, 2003, 422: 193-197.
- [13] Amacher D E, Adler R, Herath A, *et al.* Use of proteomic methods to identify serum biomarkers associated with rat liver toxicity or hypertrophy [J]. *Clin Chem*, 2005, 51(10): 1796-1803.
- [14] Kennedy S. Proteomic profiling from human samples: the body fluid alternative [J]. *Toxicol Lett*, 2001, 120: 379-384.
- [15] Alm H, Scholz B, Fischer C, *et al.* Proteomic evaluation of neonatal exposure to 2, 2', 4, 4', 5-pentabromodiphenyl ether [J]. *Environm Health Perspect*, 2006, 114(2): 254-259.
- [16] Nicholson J K, Lindon J C, Holmes E. Metabonomics: understanding the metabolic responses of living systems to pathophysiological stimuli via multivariate statistical analysis of biological NMR spectroscopic data [J]. *Xenobiotica*, 1999, 29(11): 1181-1189.
- [17] Caragea C, Sinapov J, Silvescu A, *et al.* Glycosylation site prediction using ensembles of support vector machine classifiers [J]. *BMC Bioinform*, 2007, 8: 438-450.
- [18] Beger R D, Sun J C, Schnackenberg L K. Metabolomics approaches for discovering biomarkers of drug-induced hepatotoxicity and nephrotoxicity [J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2010, 243: 154-166.
- [19] Boudonck K J, Mitchell M W, Nemet L, *et al.* Discovery of metabolomics biomarkers for early detection of nephrotoxicity [J]. *Toxicol Pathol*, 2009, 37: 280-292.
- [20] 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.
- [21] 李建新, 华嘉, 何翠翠. 中药毒性的代谢组学研究(I): 雷公藤甲素的肾脏毒性 [J]. *亚太传统医药*, 2007, 3(7): 41-45.
- [22] 吴纯启, 廖明阳. 国外药物毒理学发展趋势分析与展望 [J]. *国外医学: 药学分册*, 2001, 28(1): 5-9.
- [23] van Dartel D A M, Pennings J L A, Robinson J F, *et al.* Discriminating classes of developmental toxicants using gene expression profiling in the embryonic stem cell test [J]. *Toxicol Lett*, 2011, doi: 10.1016/j.toxlet.2010-12-19.
- [24] 武元峰, 栾洋, 戚新明, 等. 遗传毒性早期快速评价方法 [J]. *药物评价研究*, 2011, 34(4): 244-250.
- [25] 裘奇, 刘志红, 陈惠萍, 等. 木通所致大鼠急性肾损伤的实验观察 [J]. *肾脏病与透析肾移植杂志*, 1999, 8(1): 15-18.
- [26] 杨洪军, 付梅红, 吴子伦, 等. 栀子对大鼠肝毒性的实验研究 [J]. *中国中药杂志*, 2006, 31(13): 1091-1093.
- [27] 何永明, 钟钦卿, 王凯, 等. 麻黄对家兔心脏的毒性作用 [J]. *华中农业大学学报*, 2010, 29(4): 484-488.
- [28] 李华, 汤纳平, 马璟, 等. 雷公藤多甙对 Beagle 犬心脏毒性初探 [J]. *世界临床药物*, 2011, 32(4): 219-223.
- [29] 李勇, 李竹. 体外动物器官培养模型及其在外源性化学物发育毒性研究中的应用 [J]. *中国优生优育*, 1999, 10(4): 183-186.
- [30] 张彩霞, 励永明, 孟爱英, 等. 体外器官培养法评价四

- 种高分子材料毒性 [J]. 生物医学工程学杂志, 1991, 8(1): 27-32.
- [31] 李建军, 杨 艳. FPA 对离体心脏的作用及急性毒性实验 [J]. 泸州医学院学报, 2000, 23(1): 18-20.
- [32] 潘道波, 陈世民. 氨吡酮对离体大鼠灌注心脏布比卡因毒性作用的影响 [J]. 中华麻醉学杂志, 1999, 19: 169-171.
- [33] 丁选胜, 李 欧. 海藻甘草及其相配伍后的水提取物的肝毒性研究 [J]. 江苏中医药, 2002, 23(10): 51-54.
- [34] 孟凡翠, 徐为人, 张宗鹏, 等. 药物重要脏器毒性及其早期预测方法的探讨 [J]. 药物评价研究, 2011, 34(1): 8-14.
- [35] 许勇芝, 陈丽萍, 刘华锋, 等. 马兜铃酸致肾小管上皮细胞损伤中 p53 和 Caspase-3 活性的变化 [J]. 第四军医大学学报, 2009, 30(15): 1398-1401.
- [36] 张志华, 吴红海, 薛 改, 等. 异烟肼和利福平合用及异烟肼代谢物对人肝细胞的毒性作用 [J]. 中国医院药学杂志, 2010, 30(8): 632-635.
- [37] 桂 春, 陈蒙华, 林 松, 等. 乙酰紫草素对培养大鼠心肌细胞的毒性作用 [J]. 中药药理与临床, 2010, 26(6): 33-36.
- [38] Spielmann H, Pohl I, Doering B, *et al.* The embryonic stem cell test, an *in vitro* embryotoxicity test using two permanent mouse cell lines: 3T3 fibroblasts and embryonic stem cells [J]. *In Vitro Toxicol*, 1997, 10: 119-127.
- [39] Genschow E, Scholz G, Brown N, *et al.* Development of prediction models for three *in vitro* embryotoxicity tests in an ECVAM validation study [J]. *In Vitro Mol Toxicol*, 2000, 13: 51-66.
- [40] Genschow E, Spielmann H, Scholz G, *et al.* Validation of the embryonic stem cell test in the international ECVAM validation study on three *in vitro* embryotoxicity tests [J]. *Altern Lab Anim*, 2004, 32: 209-244.
- [41] Genschow E, Spielmann H, Scholz G, *et al.* The ECVAM international validation study on *in vitro* embryotoxicity tests: results of the definitive phase and evaluation of prediction models. European Centre for the Validation of Alternative Methods [J]. *Altern Lab Anim*, 2002, 30: 151-176.
- [42] van Dartel D A M, Pennings J L A, de la Fonteyne L J J, *et al.* Monitoring developmental toxicity in the embryonic stem cell test using differential gene expression of differentiation-related genes [J]. *Toxicol Sci*, 2010, 116(1): 130-139.
- [43] zur Nieden N I, Ruf L J, Kempka G. Molecular markers in embryonic stem cells [J]. *Toxicol in Vitro*, 2001, 15: 455-461.
- [44] West P R, Weir A M, Smith A M, *et al.* Predicting human developmental toxicity of pharmaceuticals using human embryonic stem cells and metabolomics [J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2010, 247(1): 18-27.
- [45] Cezar G G, Quam J A, Smith A M, *et al.* Identification of small molecules from human embryonic stem cells using metabolomics [J]. *Stem Cells*, 2007, 16(6): 869-882.
- [46] Denning C, Anderson D. Cardiomyocytes from human embryonic stem cells as predictors of cardiotoxicity [J]. *Drug Disc Today*, 2008, 5: 223-232.
- [47] Dick E, Rajamohan D, Ronksley J, *et al.* Evaluating the utility of cardiomyocytes from human pluripotent stem cells for drug screening [J]. *Biochem Soc Trans*, 2010, 38: 1037-1045.
- [48] Laposa R R. Stem cells for drug screening [J]. *J Cardio Pharmacol*, 2011, 58(3): 240-245.
- [49] Davila J C, Cezar G G, Thiede M, *et al.* Use and application of stem cells in toxicology [J]. *Toxicol Sci*, 2004, 79: 214-223.
- [50] 周会芳, 王 丽, 张艳军, 等. 胚胎干细胞的代谢组学方法在毒理学中的应用进展 [J]. 中国药理学通报, 2011, 27(2): 149-152.
- [51] 赵军宁, 杨 明, 陈易新, 等. 中药毒性理论在我国形成与创新的发展 [J]. 中国中药杂志, 2010, 35(7): 922.
- [52] 王宇光, 马增春, 张伯礼, 等. 基于药物代谢酶的中药十八反研究 [J]. 世界科学技术中医药现代化, 2011, 13(1): 36-40.
- [53] 王战国, 胡慧玲, 兰 轲, 等. 试论基于代谢组学与方证理论的药效学-药动学方法研究中中药复方配伍规律 [J]. 中草药, 2009, 40(2): 169-172.
- [54] 薛 璟, 贾晓斌, 郝 琨. 雷公藤的肝毒性研究及 ADME/Tox 评价思路 [J]. 中草药, 2009, 40(4): 655-658.
- [55] 张仲林, 彭 成, 刘宏伟. 生川乌对小鼠 Focal adhesion 信号通路毒性影响的实验研究 [J]. 中草药, 2009, 40(1): 75-78.