

· 综述 ·

转录组学技术在中药肝毒性研究中的应用

谢丽华^{1,2}, 樊星², 李泽君^{1,2}, 熊克朝^{1,2}, 呼丹², 刘悦², 吴纯启², 丁日高², 王茜莎^{1*}, 王全军^{2*}

1. 广东药学院, 广东 广州 510006

2. 军事医学科医学院毒物药物研究所, 抗毒药物与毒理学国家重点实验室(军事医学科学院), 国家北京药物安全评价研究中心, 北京 100850

摘要: 转录组学是功能基因组学研究中最活跃的领域之一, 是一门在整体水平研究细胞中所有基因转录及转录调控规律的学科, 在基础医学、生物学、微生物学和药学等领域已有广泛的应用。在中药研究领域, 该技术能从基因水平通过比较药物作用前后基因表达谱的变化对中药药理和毒理等方面进行评价。对该技术在中药研究领域的进展进行综述, 主要介绍了转录组学技术在中药肝损伤筛选生物标志物和中药所致肝损伤机制研究中的应用, 为该技术在中药领域的研究和发展提供有价值的参考。

关键词: 转录组学; 中药肝毒性; 生物标志物; RT-PCR; 基因芯片

中图分类号: R285.53 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2015)10-1536-06

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2015.10.024

Application of transcriptomic technologies in hepatotoxicity induced by Chinese materia medica

XIE Li-hua^{1,2}, FAN Xing², LI Ze-jun^{1,2}, XIONG Ke-zhao^{1,2}, HU Dan², LIU Yue², WU Chun-qi², DING Ri-gao², WANG Xi-sha¹, WANG Quan-jun²

1. Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, China

2. National Beijing Center for Drug Safety Evaluation and Research, State Key Laboratory of Toxicology and Medical Countermeasures, Academy of Military Medical Sciences, Institute of Pharmacology and Toxicology, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100850, China

Abstract: As a science of cell genetic transcription and transcriptional regulation at the unitary level, transcriptomics has been applied in basic medicine, biology, microbiology, pharmacy, and so on. In the study on Chinese materia medica (CMM), transcriptomics is used to evaluate the efficacy and toxicity by comparing the changes of gene expression profile before and after drug treatment. To provide the valuable references for the research the development of transcriptomic technology, this article reviewed the progress of its application in CMM research, especially in biomarker screening and mechanism elucidating on the hepatotoxicity induced by CMM.

Key words: transcriptomics; hepatotoxicity induced by Chinese materia medica; biomarkers; RT-PCR; gene chip

转录组学(transcriptomics)是功能基因组学研究的重要组成部分, 是一门在整体水平上研究细胞中所有基因转录及其转录调控规律的学科, 其目的在于提供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。融合了物理学、生物学、计算机等多项科学技术, 具有高效、快捷、并行处理及分析自动化等特点, 已经广泛用于微生物学、医学、农学、药学等诸多领域。

收稿日期: 2015-01-06

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81001254); 重大新药创制科技重大专项(2013ZX09302303, 2012ZX09301-001-008)

作者简介: 谢丽华(1990—), 女, 硕士研究生, 研究方向为药物毒理学。E-mail: 13520552853@163.com

*通信作者 王全军, 博士, 研究员, 研究方向为药物毒理学与药物临床前安全性评价。E-mail: wangquanjunbeijing@163.com
王茜莎, 博士, 副教授, 研究方向为中药新药药理学。E-mail: serann1122@gmail.com

药源性肝损伤 (drug-induced liver injury, DILI) 是药物研发失败、使用受限甚至退市的主要原因之一,也是引发肝病的重要原因之一。在 FDA 批准上市的药物中,80%以上的黑框警告药物属于严重肝损伤药物^[1]。根据目前为止的相关报道,在药物性肝损伤的患者中,中药引起肝损害占了 4.8%~32.6%^[2],越来越引起人们的重视。由于中药的复杂性,其相对于化学药所引发的肝脏毒性作用机制更为复杂,可能涉及的肝毒性作用机制主要涉及到肝细胞的直接损伤、氧化损伤和代谢损伤等。这些机制的研究通常都是以动物模型为基础,以生化指标和组织病理结果为毒性检测终点,对于化学药或其他化合物来说,生化指标和组织病理学终点的检查,基本能够很好地揭示其毒性作用机制,但由于中药本身的复杂性、毒性的发生时间相对较长和临床使用剂量相对较小、指标灵敏性相对较低等原因,对于中药肝脏毒性作用机制的研究,有必要采用更加灵敏和特异性更强的分析技术。

与常规生化指标和组织病理学毒性终点相比,基因的改变更为灵敏和直接,经过近 20 年的发展,检测基因改变的技术如转录组学已经获得快速的发展,在毒理作用机制方面已经获得了很好的应用。转录组学技术能从 cDNA 文库中筛选新功能基因,能更直接得到功能基因的信息,从而获得药物毒性作用信息。其作为一种应用潜力广阔的毒性评价和作用机制研究方法,在阐释调控作用机制和筛选合适的早期生物标志物等方面显示了重要的应用价值。现对常见中药的肝毒性以及转录组学技术在中药肝毒性研究中的应用进行简要论述。

1 致肝损伤常见中药

近年来,由于中药所致肝损伤事件的报道不断增多,人们对中药肝毒性也有了越来越多的认识和研究,肝损伤是个复杂的生物学过程,造成的原因也是多方面的,无特异性而表现出多样性,作用机制与化学药药源性肝病相似。近年来调查发现,我国三分之一的药源性肝损伤为中药所致^[2],国内外许多学者对有关中药毒性评价的技术方法与应用研究做了很大努力,希望能为中药毒性的评价方法和技术指导原则提供理论基础,也可为典型有毒中药如雷公藤、黄药子、何首乌、山豆根等的毒性机制研究提供研究示范,推动中药毒性研究的发展,进而推进中药的安全用药。

1.1 雷公藤

雷公藤 *Tripterygium wilfordii* Hook. f. 作为我国传统医学中一种常用的中药,具有祛风除湿、消肿止痛、通经活络等功能,其所致的肝毒性居单味中药肝损伤的首位^[3]。其所含生物碱、二萜类及苷类成分既是有效成分又是毒性成分,雷公藤内酯醇 (triptolide, TP) 是其主要成分,可影响线粒体中的二次 β 氧化和过氧化反应,或增加 NO 的释放,介导肝细胞的凋亡^[4]。大鼠 ip 雷公藤甲素后,肝库普弗细胞表面标志抗原 CD68 表达明显上调,血清中肿瘤坏死因子 (tumor necrosis factor, TNF) 水平增加,可能是雷公藤甲素引起急性肝损伤的机制之一。

1.2 黄药子

黄药子 *Dioscorea bulbifera* L. 是薯蓣科薯蓣属植物黄独的块茎,为常用中药材,具有抗肿瘤、抗炎、抗病毒和抗甲状腺肿等药理作用^[5]。其肝毒性成分主要是以黄毒素 B 为代表的二萜内酯类,引起线粒体氧化损伤,抑制肝脏抗氧化酶和药物代谢酶活性。有研究表明,黄药子能使谷胱甘肽 S-转移酶 (glutathione S-transferase, GST) 和透明质酸酶 (hyaluronidase, Hyase) 基因显著上调,而显著下调与蛋白质、核酸合成相关基因的表达,说明在给药早期激发肝脏解毒应急反应,中毒后期发生肝纤维化和肝硬化。在配伍方面,当与黄药子配伍可拮抗肝细胞内 grp78 和 bad 基因表达上调,并可防治停药后肝纤维化的发生^[6]。

1.3 何首乌

临床报道何首乌 *Polygonum multiflorum* Thunb. 有一定肝毒性,症状类似急性肝炎^[7],其生品比制品毒性更大,而且醇提取物比水提物的毒性大。何首乌肝毒性成分集中在亲脂部位,大黄素表现较强的诱导肝细胞凋亡的特性,是核转录因子- κ B (nuclear factor- κ B, NF- κ B) 信号途径的抑制因子,而大黄酸具有清除羟自由基的作用,且可能集中于醇提物部位。研究发现何首乌肝损伤作用不仅与肿瘤坏死因子和肝细胞凋亡有关,而且与脂质过氧化和遗传性肝脏 P450 代谢酶缺陷有关^[8],与 CCl₄ 所致的细胞膜脂质过氧化有所不同^[9]。这对长期服用何首乌所致的肝毒性进行合理检测,加强何首乌炮制减毒的标准研究有重要的意义。

1.4 山豆根

山豆根为豆科植物越南槐 *Sophora tonkinensis* Gagnep. 的干燥根及根茎,分离得到生物碱类成分

有 20 多种, 以苦参碱为主, 其对胰腺癌、肝癌、肺癌、恶性黑色素瘤等多种癌细胞株均有抑制和杀伤作用^[10]。虽然山豆根有保肝作用, 但是在一定情况下又具有肝毒性、神经毒性等多种不良反应, 严重阻碍了其临床疗效的发挥和应用。基因检测结果显示, 肝组织中 9-顺式视黄酸类 X (RXR) 明显增多, 通过过氧化酶体增殖物激活型受体 (PPARs) 信号通路引起下游 LPL 和 CYP7A1 基因表达的上调, 从而引发脂质代谢紊乱, 造成肝损伤。

2 转录组学技术在中药所致肝损伤研究中的应用

随着科学技术的不断发展, 很多学者开展了转录组学技术在药物性肝损伤方面的研究, 如逆转录-聚合酶链反应 (reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR) 技术对基因 (细胞因子、生长因子、转录因子等) 表达进行定量检测, 进而阐明基因免疫致病途径和调控机制, 这在分子生物学领域是个较大的突破^[11], 在临床应用中可以做到绝对定量, 在科研中可以做到相对定量, 所取得的结果更为可靠^[12]。基因芯片 (gene chip) 是毒理学研究的一个理想技术平台, 是近年来发展的新分子生物学研究工具, 它的主要特点是高通量、微型化和自动化, 广泛应用于筛选差异基因表达谱研究^[13]。已有的环境毒理芯片及人肝脏表达谱芯片的研究成果, 对开展中药肝脏细胞毒性研究具有现实与直接的指导作用, 其研究所使用的基本硬件 miRNA 芯片技术能筛选出一组与病症相关的基因或蛋白质作为药物作用的靶点, 在基因、蛋白质等分子水平阐明中药的作用机制^[14], 而且也能为中药肝毒性的早期生物标志物的研究及肝毒性的早期监测提供新的思路与方法。

2.1 转录组学技术在中药肝损伤筛选生物标志物中的应用

目前国际上认可的临床前安全性评价技术指导原则中, 有关肝毒性的评价由于灵敏度、稳定性和特异性较差而不能为其提供早期信息, 因此早期生物标志物的发现对于肝毒性的早期预警尤为重要。随着分子生物学技术的发展, 国内外采用具有较高一致率和高效性的转录组学技术, 能对各时间点差异表达的靶基因预测并进行大规模、单样本、二阶段的精确定量验证, 寻找可用于疾病生物剂量估算的分子标志物。研究表明人类总共有二千多个 miRNA 参与了中药有效成分对肿瘤的调控^[15], 其中微小 RNA (miRNA-122a、miRNA-199 等)、癌相关特异蛋白 (sGPC-3、

HS-AFP、HS-GGT、GP-73 等) 和癌相关通路关键信号分子 (IGF-II、TGF- β 1、TNF- α 、NF- κ B 等) 都是诊断肝癌相关的标志物^[16], 为机体的生理或病理状况提供重要信息, 目前寻找和发现有价值的生物标志物已经成为一个重要的研究热点。

苏钰文等^[17]通过提取血清 miRNA 和 qRT-PCR 方法检测, 对 19 种来自不同产地的中药进行了研究, 发现了在血清 miRNA-122 的时间相关性和剂量相关性分析中, 与血清丙氨酸氨基转移酶 (ALT) 和天冬氨酸氨基转移酶 (AST) 相比, 血清 miRNA-122 与肝脏组织病理学改变具有良好的相关性和高敏感性, 表现为更早期和更大幅度地显著升高, 说明其可作为中药肝损伤的新型候选诊断标志物^[18], 为中药肝脏毒性的临床前安全性评价提供新的参考。研究发现黄药子和阳性药对乙酰氨基酚均可以引起肝脏组织 miRNA 表达谱的变化, 对 miRNA 表达谱进行聚类分析可以发现黄药子和阳性药对乙酰氨基酚均可引起其特异性的 miRNA 变化, 且可以和正常对照组的 miRNA 表达谱区分开来, 对血清 miRNA 的 qRT-PCR 检测, 发现血清 miRNA-122 可以作为黄药子所引起的药源性肝损伤的潜在生物标志物^[19]。这说明 qRT-PCR 是目前检测血清的主要方法, 该方法快速、便捷, 精确度和灵敏度可满足临床需求。

盛云华等^[20]在山豆根致肝损伤模型中, 取两组大鼠给药时间不同的外周血 miRNA 芯片, 检测出差异表达基因, 并对共有差异表达 miRNA 进行靶基因预测和 Pathway 分析, 发现差异表达 miRNA 能调控与肝脏密切相关的 Wnt/ β -catenin 信号通路和 T 细胞受体信号通路; 对时效高峰的 miRNA-291a-5p 进行 RT-PCR 验证显示其可作为诊断山豆根致肝损伤早期生物标志物之一。这说明了转录组学技术可用于发现药物致肝损伤的早期生物标志物, 为中药肝毒性的早期生物标志物的研究及肝毒性的早期监测提供新的思路和方法。

近年来, 随着组学技术研究的不断深入, 其中转录组学为肝毒性生物标志物的研究提供了新的技术手段, 为肝细胞恶性转化相关分子标志的发现以及肝癌相关信号通路的阐明, 动态监测肝细胞恶性转化和探讨肝癌的发生机制, 肝癌的诊断、复发监测和治疗带来新的契机^[21]。例如, 目前国内外研究比较热门的外周循环血中的 miRNA, 具有良好的稳定性及高度的组织器官特异性, 通过转录组学技术表达谱的变化特性来筛选出新的具有更高专属性和灵敏度的肝毒

性基因组学生物标记物具有重要的价值,有望成为替代传统酶学标志物的新型肝毒性生物标志物^[22]。

2.2 转录组学技术在中药所致肝损伤机制研究中的应用

现代药理学研究已明确,药物作用都有其靶基因,靶基因也是中药作用的最本质的指标。转录组学是功能基因组学中重要的组成部分,是率先发展起来的。利用转录组学技术开展中药的肝脏毒性评价研究,不仅可以初步判断毒性大小、毒性靶标,还可以通过同时测定药物引起的基因表达谱的改变及特定基因的变化情况,在短时间内检测出药物对肝脏的影响和推测出药物产生效用的机制。在肝损伤不同发病阶段相关代谢酶、氧化因子、免疫基因和凋亡因子等靶基因的分离鉴定及其转录调控机制研究,以及各阶段基因转录谱和转录调控网络的构建,是转录组学研究极富竞争性的领域。现已发现越来越多的中药具有潜在的肝毒性,并涉及许多不同的肝损伤机制,细胞色素 P450 (CYP450) 酶系的生物活性、免疫功能异常反应、肝细胞凋亡及脂质过氧化等均参与中药致肝损伤的发病机制。

2.2.1 P450 酶系代谢异常

要了解药物致肝损伤的机制,首先需了解药物在肝中的代谢特点,在生物体内 CYP450 家族成员是主要的 I 相药物代谢酶,具有多基因型和遗传多态性^[23]。CYP450 依赖性生物活化是一种重要的肝毒性机制,但其与 CYP 基因多态性关系还不是很明确,随着基因分型技术的发展,CYP 基因多态性研究取得很大进步。

CYP3A 是一种重要的 CYP450 酶系,其在肝脏和肠道中的量最丰富,CYP3A 约占成年人肝脏 CYP450 酶总量的 25%,临床中约有 60% 的药物经 CYP3A 催化代谢,CYP3A 也能催化许多内源性物质的代谢,如睾酮和可的松的 6 β -羟化代谢。Han 等^[24]通过转录组学的方法,对大鼠 ig TP 和 TP+甘草次酸 (glycyrrhetic acid, GA),采用 RT-qPCR 技术,发现 CYP3A1 的 mRNA 表达水平显著上调;提高了 CYP3A 对睾酮 6 β -羟化反应活性,表明 TP 诱导 CYP3A 活性增加可能是 TP 在肝脏清除加快的重要原因,合用 GA 可促进 TP 的肝清除从而其降低肝毒性,验证了 TP 和 GA 与 CYP3A 底物药物共用时,可能发生药物的相互作用。

Chen 等^[25]应用高密度 cDNA 谱片技术找出差异表达基因,发现黄药子给药后诱导 CYP2A/CYP3A 基因表达上调,肝病诊断的敏感指标 GST

仅在给药组显著上调,说明黄药子对肝脏 CYP 有明显的诱导作用,后期使得毒物积累而损伤肝脏。

综合以上药物性肝损伤在 CYP 遗传因素方面的机制研究结果,发现部分药物导致的肝损伤发生机制与 CYP 基因多态性相关。因此开展 CYP 基因多态性研究,不仅为科学指导临床个性化用药或合理的联合用药,以降低药物性肝损伤的几率,也为研究药物性肝损伤机制提供理论思路与指导方向。

2.2.2 引起免疫性损伤

免疫性肝损伤是疾病发生的重要步骤,它决定了疾病的转归或发生发展,免疫因子在体内的基因表达调控是研究的关键。其中微球体家族 (MAPEG) 成员谷胱甘肽 S 转移酶 1 (gultathione S transferases, mGST1)、谷胱甘肽 S 转移酶 2 (mGST2)、谷胱甘肽 S 转移酶 3 (mGST3)、白三烯 C4 合成酶 (leukotriene C4 synthase, LTC4S)、5-脂氧酶激活蛋白 (5-lipoxygenase activating protein, FLAP) 和前列腺素 E 合成酶 (prostaglandin E synthase-1, mPGES) 作为体内重要的自体活性物质和脂类介质,在调节肝脏生理和病理过程中起着重要作用,因此,从免疫性肝损伤出发,应用组学技术对其研究可为临床寻找有效、可靠的肝病治疗方法提供实验依据。

刀豆蛋白 A (concanavalin A, ConA) 是从大刀豆中提取出来的一种植物血凝素,奇罗杨^[26]采用 RT-PCR 对 ConA 诱导雄性小鼠肝损伤进行研究,发现注射 ConA 后 LTC4S、mGST₂、mGST₃ 的表达明显上调,而 mPGES 并无明显的改变,其结果与 Western blotting 法得出的结果一致,说明涉及的细胞因子 (NO、TNF- α 等) 和 MAPEG 家族调控与其肝毒性有关,表明其所致肝毒性机制与免疫性损伤有关。李敏等^[27]通过 ConA 诱导的雄性小鼠肝损伤模型,RT-PCR 法检测肝脏细胞 RNA,发现其主要通过结合 NK-1R,参与了小鼠免疫性肝炎的发生和发展,进一步扩大和加重炎症反应,为认识肝脏炎症以及肝炎的防治提供新的思路。

药物引起的免疫介导性肝损伤一般具有特异质,相对较少,但往往较为严重。药物在肝内代谢过程中产生的反应性中间产物在免疫介导的药物性肝损伤发病过程中发挥重要作用,有研究表明,T 细胞介导肝炎、肝癌及骨桥蛋白在炎症性肝病 (如酒精和非酒精性脂肪肝) 中起着重要作用^[28]。

2.2.3 肝细胞过度凋亡

细胞凋亡是多细胞生物共有的程序性自动死亡现象,也是毒物导致细胞损伤

的常见机制之一，在肝细胞损伤中发挥重要的作用。其中线粒体与细胞凋亡有着密不可分的关系，作为第 2 信使的 Ca^{2+} 、细胞色素 C (cytochrome C, Cyt-C)、B 淋巴细胞瘤-2 基因 (B-cell lymphoma-2, Bcl-2)、含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶 (cysteiny l aspartate specific proteinase, caspase) 家族等通过影响线粒体信号通路转导而影响细胞凋亡。

柴智等^[29-30]在逍遥散通过影响 CYP450 酶系对雷公藤致肝损伤的保护实验中，采用 RT-PCR 检测肝组织，发现逍遥散能通过诱导 CYP450 酶而上调抗凋亡基因 bcl-2 mRNA 水平，下调促凋亡基因 bax、caspase-3 mRNA 水平，引起线粒体膜电位水平下降，Cyt-C 释放增加，进而抑制雷公藤致肝细胞过度凋亡而引发的肝毒性。

陈勇等^[31]应用高密度 cDNA 谱片技术研究了黄药子给药后对小鼠肝脏基因表达谱的影响，通过实验发现共同差异表达基因主要参与了肝细胞凋亡、蛋白质折叠与泛素化等生物过程；说明黄药子使肝细胞核酸与蛋白质合成受阻，还可能抑制了肝细胞的自我修复与再生能力，这对肝毒性机制研究具有十分重要的意义^[32]。

值得注意的是，线粒体在细胞凋亡过程中起着枢纽作用，其膜内外电位差和通透性发生改变，导致细胞凋亡。细胞增殖和凋亡水平与细胞周期调控息息相关，如细胞周期蛋白、细胞周期蛋白依赖性激酶抑制因子 (p53、p21、p19)^[33]等靶基因都参与肝毒性。

2.2.4 引起脂质过氧化反应 生理情况下，机体在生成自由基的同时活性氧清除体系也在消除自由基，维持体内氧自由基的相对平衡，当二者不平衡时，细胞膜受到氧自由基攻击，发生脂质过氧化反应，最终加重组织细胞的损伤。氧化损伤机制是中药致肝毒性损伤的第一大机制，也是引起肝损伤的主要机制^[34]。其中丙二醛 (MDA)、超氧化物歧化酶 (SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶 (GSH-Px) 等相关指标在中药肝毒性损伤机制中的作用、生物学意义与肝毒性的相关程度的分析还不是很明确，为进一步明确这种关系，可通过转录组学技术进行研究，为制定早期临床预警方案和诊疗措施奠定基础。

夏启松等^[35]通过 cDNA 微阵列技术研究千里光对小鼠肝毒性作用机制，在给药早期 CYP3A 表达显著上调，给药后期山梨醇脱氢酶基因表达下调，导致蛋白质变性，表明千里光可抑制小鼠肝细胞

DNA 转录以及蛋白质合成相关酶的活性；GSH-Px 基因差异表达下调，同时丙酮酸激酶 (ATP) 和烯醇化酶 (NSE) 基因差异表达均显著上调，表明千里光给药后期小鼠肝细胞有癌变趋势，提示千里光可引起脂质过氧化反应从而导致肝毒性。

Kiela 等^[36]在研究印度乳香提取物治疗结肠炎的实验中，用基因芯片技术分析肝脏基因的表达谱时发现，与脂质代谢有关的大量基因表达失调，表明高剂量给药时，该药具有肝毒性。证明该技术是中药毒性快速筛选及其机制研究的一种有力手段。

3 展望

中药引起的肝毒性是一个复杂的生物学过程，是其中多个成分共同作用的结果。近年来各种组学技术已经逐步运用到中医药研究中，并取得了积极进展。其中转录组学多用于毒理学、药物作用机制和新药研发、疾病诊断等方面，运用转录组学技术研究中药肝毒性的转录组信息，系统了解药物毒性的基因表达调控的规律，构建基因调控网络，已经成为当前生物医学领域备受关注的热点问题。它能够从整体到细胞，甚至是蛋白质与基因水平进行较为全面的评价，从而可以快速准确地发现中药毒性物质，筛选潜在的生物标记物并进行毒靶研究。但是目前预测中药肝毒性的毒理转录组学数据库还处于建立完善阶段，转录组学技术用于评价的研究较少，使用一种或者少数几种方法很难满足研究的要求，所以技术“整合化”已经成为发展趋势，随着现代科技迅速发展，精密肝切片法、肝细胞及亚细胞模型体外实验法及各种组学技术的联合使得从分子、基因、细胞等多个水平上找出新的生物标记物，阐明中药肝毒性机制成为可能，将会为中药肝毒性研究和研发保护肝脏的药物提供借鉴。

参考文献

- [1] Chen M, Vijay V, Shi Q, *et al.* FDA-approved drug labeling for the study of drug-induced liver injury [J]. *Drug Discov Today*, 2011, 16(15/16): 697-703.
- [2] 刘平, 袁继丽, 倪力强. 重视中药的肝损伤问题 [J]. *中国新药与临床杂志*, 2007, 26(5): 388-392.
- [3] 薛璟, 贾晓斌, 谭晓斌, 等. 雷公藤的肝毒性研究及 ADME/Tox 评价思路 [J]. *中草药*, 2009, 40(4): 656-658.
- [4] Fu Q, Huang X, Shu B, *et al.* Inhibition of mitochondrial respiratory chain is involved in triptolide-induced liver injury [J]. *Fitoterapia*, 2011, 82(2): 1241-1248.
- [5] 赵许杰, 闫雪生, 孙丹丹, 等. 黄药子的药理作用和

- 临床研究进展 [J]. 药物评价研究, 2012, 35(2): 147-148.
- [6] 汤青, 刘树民, 王加, 等. 黄药子及黄药子配伍当归对大鼠肝组织 grp78 和 bad 基因表达的影响 [J]. 药物不良反应杂志, 2010, 12(2): 91-94.
- [7] 俞捷, 谢洁, 赵荣华, 等. 何首乌肝脏不良反应研究进展 [J]. 中草药, 2010, 41(7): 1206-1210.
- [8] Liu T, Song Y, Chem H, et al. Matrine inhibits proliferation and induces apoptosis of pancreatic cancer cells *in vitro* and *in vivo* [J]. *Biol Pharm Bull*, 2010, 33(10): 1740-1741.
- [9] 李奇, 赵奎君, 赵艳玲, 等. 大剂量何首乌醇提取物致大鼠多脏器损伤研究 [J]. 环球中医药, 2013, 6(1): 1-6.
- [10] Qin X G, Hua Z, Shuang W, et al. Effects of matrine on HepG2 cell proliferation and expression of tumor relevant proteins *in vitro* [J]. *Pharm Biol*, 2010, 48(3): 275-276.
- [11] 吴婷, 陈金梅, 李莹. 实时荧光定量 PCR 技术研究进展及应用 [J]. 大家健康, 2014, 8(4): 12-13.
- [12] Deschahgt P, De Baere T, Van Simaey L, et al. Comparison of the sensitivity of culture, PCR and quantitative real-time PCR for the detection of *Pseudomonas aeruginosa* in sputum of cystic fibrosis patients [J]. *BMC Microbiol*, 2009, doi: 10.1186/1471-2180-9-244.
- [13] Wen W H, Bernstein L, Lescallett J, et al. Comparison of TP53 mutations identified by oligonucleotide microarray and conventional DNA sequence analysis [J]. *Cancer Res*, 2000, 60(10): 2716-2722.
- [14] 翟金萍, 邓月影, 郎爱东. 生物芯片技术用于中药研究的新进展 [J]. 药物生物技术, 2013, 20(1): 72-75.
- [15] 郑思道, 吴红金, 刘宇娜. microRNA 在现代中医药研究中的作用和意义 [J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2012, 10(7): 857-860.
- [16] 姚登福, 顾星. 肝细胞恶性转化与监测分子标志 [J]. 实用肝脏病杂志, 2013, 16(5): 389-391.
- [17] 苏钰文, 江振洲, 邢同岳, 等. 血清微小 RNA 在中药肝毒性临床前评价中的应用研究 [J]. 扬州大学学报, 2012, 33(2): 11-16.
- [18] Zhang Y, Jia Y, Zheng R, et al. Plasma microRNA-122 as a biomarker for viral-, alcohol-, and chemical-related hepatic diseases [J]. *Clin Chem*, 2010, 56(12): 1830-1838.
- [19] Su Y W, Chen X, Jiang Z Z, et al. A panel of serum microRNAs as specific biomarker for diagnosis of compound-and herb-induced liver injury in rats [J]. *PLoS One*, 2012, 7(5): 1-11.
- [20] 盛云华, 金若敏, 姚广涛, 等. 山豆根致大鼠肝损伤外周血 microRNA 早期变化特征研 [J]. 中国中西医结合杂志, 2013, 33(3): 385-390.
- [21] Masuzaki R, Karp S J, Omata M. New serum markers of hepatocellular carcinoma [J]. *Semin Oncol*, 2012, 39(4): 434-439.
- [22] Shi Q, Hong H, Senior J, et al. Biomarkers for drug-induced liver injury [J]. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol*, 2010, 4(2): 225-234.
- [23] Han F M, Peng Z H, Wang J J, et al. *In vivo* effect of triptolide combined with glycyrrhetic acid on rat cytochrome P450 enzymes [J]. *Acta Pharm Sin*, 2013, 48(7): 1136-1141.
- [24] Han F M, Zhang X M, Xia O S, et al. Gene expression profiling of mice liver tissue after intragastric administration of Chinese nutgall extract [J]. *Mol Cell Biol*, 2009, 42(2): 100-101.
- [25] Chen Y, Zhang X M, Han F M, et al. Gene expression profile analyses of mice livers injured by Leigongteng [J]. *World J Gastroenterol*, 2007, 13(26): 3619-3624.
- [26] 奇罗杨. 刀豆蛋白致小鼠免疫肝损伤 MAPEG 家族表达谱及环孢素调控 [D]. 杭州: 浙江大学, 2007.
- [27] 李敏, 金晓琨, 李卫东. 双氢青蒿素保护刀豆蛋白 A 诱导的小鼠肝损伤及机制探 [J]. 中国药理学通报, 2009, 25(5): 630-632.
- [28] Ingawale D K, Mandlik S K, Naik S R. Models of hepatotoxicity and the underlying cellular, biochemical and immunological mechanism (s): a critical discussion [J]. *Envir Toxicol Pharmacol*, 2014, 37(1): 126-127.
- [29] 柴智. 逍遥散对雷公藤致大鼠肝毒性的保护作用及其机制研究 [D]. 武汉: 湖北中医药大学, 2012.
- [30] 柴智, 周文静, 王永辉, 等. 逍遥散对雷公藤致大鼠急性肝损伤的保护作用 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(7): 170-172.
- [31] 陈勇, 夏启松, 程明, 等. 应用基因表达谱芯片研究黄药子对小鼠肝脏毒性机制 [J]. 分子细胞生物学报, 2006, 39(6): 568-572.
- [32] 姜宁, 陈启军. 生物基因组非蛋白质编码转录组学及研究进展 [J]. 中国基础科学, 2009, 6(3): 17-18.
- [33] 马嘉, 吴新安, 李蔚, 等. 雷公藤甲素对细胞增殖和凋亡的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(24): 283-286.
- [34] 孙蓉, 李素君, 黄伟, 等. 氧化损伤相关指标在中药肝毒性损伤机制中作用与研究进 [J]. 中药药理与临床, 2009, 25(1): 80-82.
- [35] 夏启松, 张晓鸣, 韩凤梅, 等. 千里光致小鼠肝损伤的基因表达谱分析 [J]. 中国药理学杂志, 2007, 42(20): 1529-1533.
- [36] Kiela P R, Midura A J, Kuscuoglu N, et al. Effects of *Boswellia serrata* in mouse models of chemically induced colitis [J]. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2005, 288(4): 798-808.