

## · 综述 ·

## 中药肾毒性机制研究现状及评价方法研究进展

郭晓<sup>1,2</sup>, 王萌<sup>1</sup>, 朱彦<sup>1,2</sup>, 刘洋<sup>3\*</sup>, 郝彧<sup>4</sup>

1. 天津中医药大学, 天津市现代重点实验室-省部共建国家重点实验室培育基地, 现代中药发现与制剂技术教育部工程研究中心, 天津 300193
2. 天津国际生物医药联合研究院, 天津 300457
3. 天津中医药大学中医学院, 天津 300193
4. 天津中医药大学 图书馆, 天津 300193

**摘要:** 中药是传统医学宝库重要的组成, 近年来中医药在特定优势病种上取得的功效使其作为补充及替代医学在世界各地日益受到重视。有效性和安全性是药物应用的两大准则, 针对中药的临床应用, 仅仅强调其治疗作用是不够的, 对其毒副作用的研究应更加关注。由于对中药安全性问题认识存在不足, 自行、盲目、长期、大量服用中药导致的中药药源性损伤事件近期逐年增多, 尤其是服用中药后引起的肾脏损伤。通过检索近 20 年国内外有关中药引起肾损害的实验和临床研究文献, 对中药肾毒性研究现状进行总结并针对其发生机制进行深入分析, 特别是归纳并展望了较为前沿的中药肾毒性评价方法, 并分析了其优势和可行性, 以期对中药肾毒性的早期发现和安全性评价研究提供支持。

**关键词:** 中药; 肾毒性机制; 评价与筛选方法; 肾毒性评价; 药源性肝损伤

**中图分类号:** R285      **文献标志码:** A      **文章编号:** 0253-2670(2015)23-3581-11

**DOI:** 10.7501/j.issn.0253-2670.2015.23.023

## Research status of nephrotoxicity mechanism of Chinese materia medica and progress in study on evaluation methods

GUO Xiao<sup>1,2</sup>, WANG Meng<sup>1</sup>, ZHU Yan<sup>1,2</sup>, LIU Yang<sup>3</sup>, HAO Yu<sup>4</sup>

1. Engineering Research Center of Modern Chinese Medicine Discovery and Preparation Technique, Tianjin State Key Laboratory of Modern Chinese Medicine, Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300193, China
2. Tianjin International Joint Academy of Biotechnology and Medicine, Tianjin 300457, China
3. Department of Traditional Chinese Medicine, Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300193, China
4. Library, Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300193, China

**Abstract:** As a complementary and alternative medicine, Chinese materia medica (CMM) is an important component in the treasure-house of traditional Chinese medicine (TCM) with increasing attention all over the world. Efficacy and safety are the two principles of CMM. At the same time, the adverse reaction of CMM should be paid more attention. Drug abuse and drug-drug interaction are the main cause of kidney damage. In the paper, nearly 100 experimental and clinical papers concerning on renal toxicity of CMM from domestic and foreign databases in the past 20 years were searched. In particular, the evaluation methods of CMM were summarized, and the advantages and feasibility of the method were analyzed, in order to provide the support for the early detection of renal toxicity of CMM and safety assessment of CMM.

**Key words:** Chinese materia medica; nephrotoxicity mechanism; evaluation and screening method; nephrotoxicity evaluation; drug-induced hepatic injury

收稿日期: 2015-05-04

基金项目: 国家自然科学基金青年基金项目(81202850); 科技部国际合作项目(2013DFA1620); 天津市高等学校“创新团队培养计划”(TD2-5031)

作者简介: 郭晓(1990—), 女, 硕士在读, 研究方向为制剂分析。Tel: 18812680283 E-mail: 1402295162@qq.com

\*通信作者 刘洋, 博士, 副教授, 主要从事临床中药学研究。Tel: 15802211656 E-mail: yliu66@126.com

中药大多来源于天然植物、动物和矿物质，且遵循中医药指导原则，辨证论治、组方应用灵活，在许多疾病的治疗中都有理想的疗效。传统观念普遍认为，相比化学药，其毒性和副作用相对较小，应用较为安全。随着中医药事业的飞速发展，中药的使用范围不断扩大，制药工艺不断丰富，其不良反应事件发生率也呈现增加的趋势。自 20 世纪 60 年代起，中药所致的肾损害病例被陆续报道，引起了世界各国药事管理部门和学界的广泛关注。

肾脏血流量丰富，占心输出量的 25%，因此大量药物可随血流到达肾脏引起病变。肾脏耗氧量高，肾组织代谢率高，多种酶作用活跃，故易受损伤；若在缺血缺氧状况下，肾脏的负担加重，更易造成损伤。肾脏的逆流倍增机制使许多药物在肾小管腔内被浓缩，到达肾髓质乳头区的浓度甚高，使肾小管细胞变性坏死发生率增高。肾脏为多种药物或其代谢产物进行排泄过滤的场所，故药物或其代谢产物在滤过、重吸收、排泄过程中易损伤肾脏，特别在肾功能不全时更明显。

## 1 中药及其制剂肾毒性的发现与研究现状

1964 年，吴松寒<sup>[1]</sup>最先报道了服用大剂量木通煎剂引起急性肾衰竭的病例。1993 年，比利时学者 Vanherweghem 等<sup>[2]</sup>发现 9 名妇女接受含有中药成分的减肥食疗后，出现快速进展的间质纤维化肾炎，最终将研究重点集中于 1990 年诊所处方中开始加入的防己和厚朴 2 味中药。匈牙利学者 Kakuk<sup>[3]</sup>也报道了使用含防己和厚朴的草药减肥茶引起的特发型急进性肾间质纤维化。1997 年，Tanka 等<sup>[4]</sup>报道了在日本关西地区 4 例病人因服用中成药引起了间质性肾损害，其中 3 例服用的是当归四逆加吴茱萸生姜汤，1 例服用的是含有关木通的健康茶。1999 年，英国《柳叶刀》杂志报道了 2 名妇女因服用含关木通的草药茶治疗湿疹导致晚期肾衰竭事件<sup>[5]</sup>。由于国外学者认为此类肾间质纤维化病例均由中药引起，故将这类特殊的肾病命名为“中草药肾病”（Chinese herb nephropathy, CHN）。Krumme 等<sup>[6]</sup>应用薄层色谱分析法检测发现上述肾脏损害病例主要是由于广防己和关木通等含有的马兜铃酸（aristolochic acid, AA）所引起，故胡世林等<sup>[7]</sup>建议用“马兜铃酸肾病”（aristolochic acid nephropathy, AAN）来取代“中草药肾病”。

2000 年 5 月—2001 年 4 月，美国食品药品监督管理局（FDA）2 次发表公告，提醒本土医药专业人士

注意植物（食品及药品）中具有肾毒性的相应成分，并列出了停止进口、制造和销售已知含有和怀疑含有马兜铃酸的多种中药和中成药清单，发布了决定取消包括八正散、当归四逆加吴茱萸生姜汤、导赤散、甘露消毒丹、龙胆泻肝汤、排石汤、小蓟饮子等 13 种含马兜铃酸的中成药的进口、销售及使用的批文。2001 年 11 月—2012 年 4 月，我国国家药品不良反应监测中心发布了 47 期《药品不良反应信息通报》，共涉及 51 种中药材及制剂，其中被通报肾毒性的中成药有冠心苏合丸、龙胆泻肝丸、舒肝理气丸、莲必治注射液、二十五味松石丸、维 C 银翘片、雷公藤制剂等，占总通报中成药比例的 32%。12 741 例不良反应（ADR）中，已明确肾毒性者 174 例，尚有大部分有全身系统损害的患者未记录在案，由此可见中药肾毒性应予以高度重视<sup>[8]</sup>。通过检索中国知网（CNKI），总结了近 20 年有肾毒性报道的中药复方制剂及引起肾毒性的中药或成分，见表 1。

## 2 引起肾毒性中药及其机制

### 2.1 含马兜铃酸中药的肾毒性机制

马兜铃酸为硝基菲类有机酸，主要由马兜铃酸 A、B、C、D、E 等及其衍生物组成。含马兜铃酸的中药达数十种，主要存在于马兜铃科（Aristolochiaceae）马兜铃属 *Aristolochia* L.、细辛属 *Asarum* L.，防己科（Menispermaceae）千金藤属 *Stephania* Leur.、蝙蝠葛属 *Menispermum* L.，木通科（Lardizabalaceae）木通属 *Akebia* decne.，毛茛科（Ranunculaceae）铁线莲属 *Clematis* L.，菊科（Compositae）川木香属 *Vladimiria* Iljin. 等。近些年，随着大量的临床报道和实验研究，马兜铃酸引起的肾毒性、致癌性和其他毒性陆续被发现，其对肾脏损害的机制主要有以下几种<sup>[51]</sup>。

**2.1.1 内质网应激反应** 内质网应激反应是细胞自身的一种保护性机制，适度的内质网应激可以恢复内质网和内环境的稳态、保持细胞的活性，对细胞具有保护作用。但是过于强烈或过长时间的内质网应激可以诱导一系列细胞因子大量释放并最终导致细胞凋亡<sup>[52]</sup>。相关研究发现马兜铃酸作用于人近端肾小管上皮细胞后可增强真核细胞翻译起始子-2a（eIF2a）磷酸化，增加 X 盒结合蛋白-1（XBP1）mRNA 剪接，使葡萄糖调节蛋白 78（GRP78）和增强子结合蛋白同源蛋白（CHOP）基因表达上调，这些变化都是典型的内质网应激反应涉及的通路。用 4-苯丁酸钠（4-PBA）前处理可以显著抑制马兜

表 1 近 20 年有肾毒性报道的中药制剂

Table 1 CMM preparations with renal toxicity reported in nearly 20 years

制剂名称	肾毒性病例数	毒性中药或成分	病理表现
雷公藤多苷片	17/55 例 ADR	雷公藤	常见急性肾小管坏死或急性间质性肾炎 <sup>[9]</sup>
冠心苏合丸	102	青木香	慢性肾功能损害 <sup>[10]</sup>
二十五味松石丸	1	木香马兜铃、朱砂、 船形乌头	蓄积中毒致肾功能严重损失 <sup>[11]</sup>
龙胆泻肝丸/汤	55	关木通	慢性肾小管间质性肾炎, 伴进行性肾功能衰竭 <sup>[12-20]</sup>
排石冲剂	3	关木通	慢性肾功能损伤 <sup>[21-23]</sup>
当归四逆加吴茱萸生姜汤	10	关木通	肾功能异常最终发展为肾功能衰竭 <sup>[24]</sup>
七叶皂苷钠注射液	37/505 例 ADR	七叶皂苷钠	肝肾功能损害 <sup>[25]</sup>
蜈蚣粉	1	蜈蚣	急性肾功能衰竭致死 <sup>[26]</sup>
莲必治注射液	126	穿心莲内酯	药源性肾损害, 以急性肾功能衰竭为最多 <sup>[27]</sup>
穿心莲内酯片	27	穿心莲内酯	急性肝肾功能损害 <sup>[28]</sup>
穿琥宁注射液	1	穿心莲内酯	严重血尿 <sup>[29]</sup>
斑蝥酒/酊	10	斑蝥素	尿频、排尿困难、血尿、少尿或无尿等 <sup>[30-32]</sup>
牛黄解毒片	1	人工牛黄	血尿, 伴有头晕、恶心等症状 <sup>[33]</sup>
三黄片	1	大黄	肉眼血尿, 停药后逐渐恢复正常 <sup>[34]</sup>
普乐宁	1	葛根素	一过性血尿 <sup>[35]</sup>
鸦胆子油乳剂	1	鸦胆子油	双肾刺痛 <sup>[36]</sup>
海藻玉壶汤	1	海藻甘草配伍不当	心悸、双下肢水肿等心肾损害 <sup>[37]</sup>
清开灵注射液	3	过敏反应引起	急性过敏性间质性肾炎致急性肾损害 <sup>[38-40]</sup>
脉络宁注射液	2	过敏反应引起	急性肾衰 <sup>[41]</sup>
云南白药	5/40 例 ADR	过敏反应引起	尿失禁、血尿、急性肾功能衰竭 <sup>[42-43]</sup>
中华跌打丸	1	过敏反应引起	过敏性肾炎 <sup>[44]</sup>
999 感冒灵冲剂	1	—	药物性皮炎并感染, 药物性肝损害 <sup>[45]</sup>
消栓灵	1	—	急性肾衰竭伴肝损伤 <sup>[46]</sup>
槟榔四消丸	1	—	血尿 <sup>[47]</sup>
复方丹参滴丸	1	—	血尿 <sup>[48]</sup>
复方丹参注射液	1	—	溶血尿毒综合征 <sup>[49]</sup>
强力宁	1	—	尿崩症 <sup>[50]</sup>

铃酸所引起的细胞凋亡, 该结果反映了内质网应激反应对马兜铃酸引起的细胞凋亡的重要作用。进一步研究表明, 用 *N*-乙酰半胱氨酸 (NAC) 或谷胱甘肽 (GSH) 前处理也可显著减少内质网应激反应相关蛋白的量并能减少细胞死亡, 进一步证明马兜铃酸可能是通过内质网应激反应引起细胞凋亡<sup>[53]</sup>。

**2.1.2 氧化应激** 机体的氧化应激反应与多种疾病的发生、发展相关, 当氧化应激发生时, 机体不能及时清除高水平的细胞活性氧, 从而引起脂质过氧化、DNA 氧化损伤及细胞凋亡等损害<sup>[54]</sup>。李振雪等<sup>[55]</sup>采用彗星实验检测健康雄性 SD 大鼠肾组织中的 DNA 链断裂程度并利用免疫组化法检测 8-羟基脱

氧鸟苷 (8-OHdG) 的表达情况, 结果证明含马兜铃酸中药可致肾组织活性氧增高, 进而引起 DNA 氧化性损伤。季文萱等<sup>[56]</sup>用马兜铃酸 20 mg/mL 刺激人近端肾小管上皮细胞 (HK-2) 48 h, 结果发现与对照组相比, 马兜铃酸组 HK-2 细胞活性明显被抑制, 细胞凋亡比例显著增加, 丙二醛 (MDA) 量明显增加, 谷胱甘肽过氧化物酶 (GSH-Px)、超氧化物歧化酶 (SOD) 活力明显下降。这一结果表明马兜铃酸诱导 HK-2 细胞凋亡的机制可能与其导致的氧化应激损伤有关。马兜铃酸可降低 HK-2 细胞的抗氧化酶活性, 导致氧化应激增强, 造成脂质过氧化。

**2.1.3 AA-DNA 加合物** 马兜铃酸在体内可以通

过硝基还原代谢生成马兜铃内酰胺<sup>[57]</sup>,并在一系列酶[胞质酶、微粒体酶类和醌氧化还原酶(NADPH)等]的作用下与DNA形成AA-DNA加合物,导致细胞损伤,促进肾间质纤维化过程的发生,因此该加合物在肾脏蓄积也可能是马兜铃酸肾毒性的机制之一<sup>[58]</sup>。AA-DNA加合物首先在患者的肾组织中检测到,在ig马兜铃酸的大鼠胃、肾和肝等组织中也发现相似的加合物<sup>[59]</sup>。研究发现这种DNA加合物可以促发肾间质纤维化过程的发生,而其他原因引起的肾病中未发现有DNA加合物,因此,这可能是马兜铃酸导致人类和动物肿瘤形成的主要原因。另有体外研究<sup>[60]</sup>发现,马兜铃酸与肾小管上皮细胞共培养14h即可出现AA-DNA加合物。体内研究显示,大鼠ig马兜铃酸后可引起蛋白尿、氨基葡萄糖苷酶(NAG)升高等症状。应用LC-MS对大鼠肾脏组织进行分析,发现在一次ig给予马兜铃酸5或30mg/kg后,大鼠的肾脏均可检测出脱氧腺苷-DNA加合物、脱氧胞苷-DNA加合物;而脱氧鸟苷-DNA加合物只有在高剂量组大鼠肾脏才能被发现。临床报道在AAN患者的肾脏组织中也检测到AA-DNA加合物<sup>[61]</sup>。脱氧腺苷-DNA加合物可以引起基因A-T突变<sup>[62]</sup>,使原癌基因ras突变进而活化,抑癌基因p53也因突变而失去活性,最终导致细胞增殖分化异常,并引起肿瘤的发生。

## 2.2 雷公藤甲素、姜黄素通过氧化应激诱导细胞凋亡

活性氧自由基(ROS)是机体内最常见的自由基,正常情况下,该类自由基在抗菌、消炎和抑制肿瘤等方面均有重要意义。而当某些外源性药物入侵时,机体抗氧化体系可能会发生紊乱,ROS代谢平衡失调,ROS大量蓄积,从而导致生物膜和大分子物质发生脂质过氧化损伤,这一过程称为氧化应激。相关实验证实,ROS的大量蓄积以及随之产生的氧化应激是外源性毒物导致肾损伤的重要机制,会对肾脏造成结构和功能损伤<sup>[63]</sup>。

雷公藤甲素是雷公藤中的一种二萜类环氧化物,常用于治疗风湿性关节炎、肝炎等多种疾病。Yang等<sup>[64]</sup>将雷公藤甲素通过腹腔内注射到雄性SD大鼠,研究其诱导的细胞凋亡,观察到了ROS的产生和上调的内源性蛋白(BAX)和外源性蛋白(Fas、FasL)的凋亡途径;组织学检查显示,以肾小管上皮细胞脱落、坏死及肾小管栓塞为特征的肾脏结构损害为主。雷公藤甲素会明显抑制大鼠肾组织内SOD与GSH-Px的活性,并明显增加大鼠肾组织氧

化应激标志物MDA的表达量,且上述变化均呈明显的剂量依赖性,并与肾功能损伤程度密切相关。雷公藤甲素对HK-2细胞的毒性作用及其机制研究表明,雷公藤甲素同时激活死亡受体介导的外源性通路和线粒体内源性通路诱导HK-2细胞凋亡,且2条通路对细胞凋亡的作用基本相当。而糖皮质激素类药物氢化可的松可通过抑制内外凋亡通路拮抗雷公藤甲素引起的HK-2细胞凋亡<sup>[65]</sup>。

应用人胚肾细胞(HEK-293)观察ROS在姜黄素引起的细胞毒性中的作用研究显示,高于10 $\mu$ g/mL剂量的姜黄素作用于HEK-293细胞1h,即可引起细胞内ROS生成量显著增大( $P<0.05$ 、 $0.01$ ),并呈量效关系,由此证明姜黄素能引起HEK-293细胞ROS量增加<sup>[66]</sup>。观察自由基清除剂聚乙二醇-过氧化氢酶(PEG-catalase)和聚乙二醇-超氧化物歧化酶(PEG-SOD)对姜黄素细胞毒作用的影响时发现,PEG-catalase预处理组的细胞存活率与相同浓度的姜黄素处理组相比,差异无统计学意义,而PEG-SOD预处理1h就能明显降低姜黄素对HEK-293细胞生长的抑制作用,作用48h的 $IC_{50}$ 值为( $38.98\pm 1.23$ ) $\mu$ g/mL,比姜黄素单独处理组的 $IC_{50}$ 值( $21.96\pm 0.80$ ) $\mu$ g/mL显著升高( $P<0.05$ ),表明PEG-SOD对姜黄素的细胞毒性有抑制作用。PEG-SOD的主要作用是清除超氧化物阴离子,PEG-catalase则主要是清除过氧化氢。由此说明姜黄素的细胞毒性是由超氧化物阴离子增加造成的,但PEG-SOD并未完全抑制其细胞毒性,提示超氧化物阴离子增加并不是姜黄素细胞毒性的全部原因,可能还有其他因素在姜黄素的细胞毒性中发挥作用。

## 2.3 含草酸盐中药诱导肾细胞凋亡机制

草酸盐高含量的食物或药物可能会诱发急性草酸盐肾病<sup>[67]</sup>。五敛子属五敛子含有高量的草酸盐,Fang等<sup>[68]</sup>用犬肾小管上皮细胞(MDCK)和雄性SD大鼠研究了五敛子引起的急性肾损伤机制,发现草酸盐引起的急性肾损伤不仅通过其结晶的焦管状沉积阻塞效应介导,也可直接引起细胞凋亡机制而介导。草酸盐在低浓度时诱导的细胞凋亡和高浓度时诱导的典型的DNA分裂和胞质空泡化<sup>[69]</sup>及细胞坏死,都可以通过细胞核的肿胀证实<sup>[70]</sup>。草酸盐结晶的形成和高草酸尿症都能导致细胞凋亡。草酸盐结晶的形成在肾脏的过渡时间太短,目前尚无法解释其形成和细胞死亡之间的关系。一种假设的机制是磷脂酰丝氨酸的再分配。磷脂酰丝氨酸通常作

为巨噬细胞吞噬和移除受损细胞的信号,被重新分配的磷脂酰丝氨酸也可以作为晶体形成的附着位点<sup>[71]</sup>。在草酸盐大量存在的肾小管细胞中可观察到氧化应激、核因子- $\kappa$ B 的降解和神经酰胺(一种细胞增殖,分化和凋亡或坏死性细胞死亡的标记物)的增加。

#### 2.4 其他中药引起肾毒性

某些中药及其制剂所含毒性成分能直接或间接导致肾小管损伤甚至坏死。王青秀等<sup>[72]</sup>研究了大黄素对 HK-2 细胞周期的影响,发现大黄素在体外对 HK-2 的增殖具有明显的抑制作用,可引起细胞乳酸脱氢酶(LDH)漏出率增加,细胞空泡化,细胞周期发生 S 期阻滞等,表明大黄素具有潜在的导致肾近曲小管损伤的肾脏毒性。邱丽颖等<sup>[73]</sup>研究合欢皮总皂苷对小鼠肾毒性,结果显示,合欢皮总皂苷可降低肾组织 SOD 和 GSH-Px 活性,可能是导致肾组织细胞凋亡的原因之一。另外,合欢皮总皂苷除使肾小管环氧合酶-1(COX-1)表达增加外,对其他部位 COX-1 表达无明显影响,可能是引起肾小管上皮细胞变性损伤的原因之一。而 COX-2 的表达明显增加,与细胞凋亡增多和 Bcl-2 表达下降的结果不一致,表明合欢皮皂总苷对肾脏的毒性除表现在诱导肾细胞凋亡外,还通过增强 COX-2 的过度表达引起肾损伤,机制较为复杂有待进一步研究。祝建辉等<sup>[74]</sup>通过研究泽泻对 1/2 肾切除大鼠的影响,探讨病理条件下泽泻的肾毒性作用。结果表明,泽泻水煎剂对正常大鼠肾脏并无明显毒性作用,但 20 g/kg 长期服用和 50 g/kg 短期服用泽泻水煎剂均可致 1/2 肾切除大鼠残肾间质炎症细胞浸润和肾小管损害。鱼胆汁含有的组胺样物质和鱼胆汁毒素等主要经过肾脏排泄,也可直接损害肾小管导致肾小管坏死<sup>[75]</sup>。苍耳子主要毒性成分可能是毒蛋白,能损害肾脏、肝脏等内脏实质细胞,使其发生混浊、肿胀、坏死,导致毛细血管渗透性增高,引起广泛出血<sup>[76]</sup>。

### 3 中药肾毒性的评价与筛选方法

药物肾毒性研究的传统方法主要为动物实验,但动物实验所需样品量大,部分中药成分提取、分离、纯化比较困难<sup>[77]</sup>。更为重要的是,随着国际上使用实验动物倡导“3R”即减少(reduction)、替代(replacement)、优化(refinement)的原则,寻找合适的体外研究方法对药物的肾毒性评价及早期筛选已经成为重要的发展方向。

#### 3.1 体外肾细胞模型

肾细胞体外模型<sup>[78]</sup>是最常用的药物肾毒性体外评价模型之一,可进行体外药物肾毒性的预测和评价。药物造成肾损伤的机制较为复杂,主要是通过影响细胞内外环境,引起细胞功能、代谢及增殖能力的改变,导致细胞形态发生变化。而中药肾毒性体外细胞模型的建立和应用可以弥补传统研究方法实验成本高、工作量大、周期长等不足,在为中药的肾毒性研究提供新的方法、数据支撑的基础上,更能为中药新药研发、体外早期肾毒性快速筛选和中药资源挖掘提供技术支持。目前,常用的肾细胞模型有猪肾小管上皮细胞(pig kidney proximal tubular epithelial cell, LLC-PK1)、犬肾小管上皮细胞(madin-darby canine kidney type, MDCK)、美洲负鼠肾小管上皮细胞(opossum kidney proximal tubular epithelial cell, OK)、大鼠近端肾小管上皮细胞(normal rat kidney cell, NRK-52E)、小鼠原代肾小管上皮细胞(renal tubular epithelial cells, RTECs)、人肾近曲小管上皮细胞(human kidney proximal tubular epithelial cell, HK-2)及人胚肾细胞(human embryonic kidney cells, HEK-293/HKC)等<sup>[78-79]</sup>。肾小管细胞已广泛用于药物肾损伤的机制、先导化合物的筛选和系列化合物肾毒性的比较研究,已成功应用于中药成分的肾毒性研究。用基于肾小管细胞的体外肾毒性研究方法对化学成分明确的中药进行肾毒性评价,不失为一种高通量筛选肾毒性中药、阐明肾毒性作用机制较好的途径和方法。

MDCK 细胞是一种犬肾小管细胞,其特点是具有细胞汇合后表达分化的上皮细胞特性,拥有典型的选择性阳离子上皮细胞旁通道和大量能反映早期肾损伤的肾小管刷状缘酶。MDCK 细胞已被广泛应用于抗肿瘤药 NPC-14686、顺铂、环磷酰胺及其异构体异环磷酰胺等药物的肾毒性研究<sup>[80]</sup>。近年来也有研究者将 MDCK 细胞应用于中药肾毒性的评价研究。陈松杰<sup>[81]</sup>采用 MDCK 细胞模型研究广防己的肾毒性,探讨 MDCK 细胞模型作为中药肾毒性体外评价方法的可行性。实验选择苦参和马兜铃作为阴性对照与阳性对照,通过 MTT 法测定细胞存活率,倒置显微镜下观察细胞形态及 LDH 法检测细胞膜损伤。发现给药 24 h 后,各浓度的广防己组与阳性对照马兜铃组的细胞存活率均明显下降,细胞形态皱缩变圆,部分细胞破裂脱落。通过比较 LDH 的释放率,马兜铃与广防己对 MDCK 细胞膜

的损伤明显高于阴性对照苦参组 ( $P < 0.01$ )。证明含有 AA 成分的马兜铃和广防己均可明显抑制 MDCK 细胞的存活, 且存在浓度依赖性; 结合细胞学形态的观察结果表明, 马兜铃和广防己皆有细胞毒作用。因此, 体外 MDCK 细胞模型可用于中药肾毒性的研究和评价。

HK-2 细胞的功能更加接近原代培养的肾小管上皮细胞, 已经成为研究药物肾毒性及肾小管损伤机制的重要细胞模型<sup>[82]</sup>。将 HK-2 细胞用于研究补骨脂酚及其与补骨脂素联合应用的体外肾毒性, 并对其毒性作用机制进行初探<sup>[83]</sup>。结果显示, 较高浓度 (30、40  $\mu\text{mol/L}$ ) 的补骨脂酚、补骨脂酚与补骨脂素合用分别与 HK-2 细胞作用 24 h, LDH 的释放率明显增高 ( $P < 0.01$ ), 并呈浓度依赖性; 倒置显微镜观察细胞形态变化, 发现 HK-2 细胞随着药物浓度的增高, 作用时间延长, 细胞收缩、变小、变圆和破裂脱落现象愈加明显。补骨脂酚 (40  $\mu\text{mol/L}$ )、补骨脂酚与补骨脂素合用组均可诱导 HK-2 细胞发生不同程度的凋亡, 并且引起明显的细胞死亡。补骨脂酚 (10、20、30、40  $\mu\text{mol/L}$ )、补骨脂酚与补骨脂素合用均影响细胞周期, 表现为 G<sub>2</sub> 期细胞减少, G<sub>1</sub> 和 S 期增加或减少。因此, 补骨脂酚肾毒性作用机制初步分析可能为直接损伤细胞膜, 引发细胞凋亡, 抑制细胞内的 DNA 合成, 阻滞细胞的有丝分裂, 抑制细胞增殖等。而在大鼠肝匀浆 S9 作用下, 受试药物作用 4 h, 只有高浓度的补骨脂酚和补骨脂酚与补骨脂素合用组对 HK-2 细胞的存活率有一定的抑制作用 ( $P < 0.01$ ), 其他浓度的补骨脂酚和补骨脂酚与补骨脂素合用组均未对细胞存活率表现出抑制作用; 补骨脂酚与补骨脂素合用组还表现出促进细胞生长的作用。与对应的未加肝匀浆 S9 的各組比较, 表明经过肝 S9 代谢活化系统的作用, 补骨脂酚的毒性明显降低, 提示补骨脂酚经肝微粒体酶代谢后, 可能转化为无毒或者低毒的物质。

## 3.2 探针技术

**3.2.1 基于肾功探针的药动学方法评价肾毒性** 为了全面阐述中药吸收、分布、代谢、排泄的体内过程, 推动中药现代化, 中药药动学成为近年来兴起的中药研究新领域。肾功探针法是采用一些对肾脏较为敏感的探针剂来评价肾脏功能, 与传统肾功能评价方法 (生化及病理组织学检查) 相比, 是一种应用于新药、环境污染物及工业毒物的灵敏、快速

的肾毒性评价方法。对氨基马尿酸和菊糖是药动学研究中 2 种常用的肾功探针剂。对氨基马尿酸及菊糖清除率与肾功能的关系为对氨基马尿酸在机体内代谢不与血浆蛋白结合, 无蓄积性, 当其随血液流经肾脏时, 全部由肾小球滤过、肾小管排泄至管腔, 不在肾小管内被重吸收。因此, 对氨基马尿酸的血浆清除率就等于肾脏的每分钟血浆流量。菊糖不参与任何化学反应, 不与血浆蛋白结合, 分布于细胞外液, 并且菊糖从机体清除时, 只从肾小球滤过, 不经过肾小管重吸收或排泄, 体内既不能合成也不能分解。因此, 菊糖能准确反映肾小球滤过功能, 其清除率即可代表肾小球滤过率 (GFR)。由于菊糖与对氨基马尿酸在体内特殊的代谢特点, 其肾清除率已成为国际上公认的评价肾脏功能的敏感指标。

通过以菊糖、对氨基马尿酸作为肾功能评价的探针剂, 研究不同剂量关木通煎剂对大鼠肾脏的毒性及其机制, 并与传统生化及病理组织学检查方法比较<sup>[84]</sup>。实验通过连续 4 周 ig 给予大鼠不同剂量 (生药 1、2.5、5、10、15 g/kg) 的关木通煎剂, 给药后一定时间静脉输注菊糖及对氨基马尿酸, 检测其在不同时间点的血、尿浓度, 通过其肾清除率等动力学参数, 反映大鼠的肾功能状况。结果发现, 大鼠连续 4 周 ig 给予关木通煎剂后, 5 个给药组的菊糖及对氨基马尿酸清除率显著低于对照组 ( $P < 0.01$ ), 并呈剂量依赖性; 而在病理及生化检查中, 仅有 2 个剂量 (15、10 g/kg) 组出现异常, 表现为肾小管上皮细胞坏死与空泡样变性、血肌酐及尿素氮增高等。该实验结果证明连续给予大鼠关木通煎剂 4 周后, 肾脏功能受到不同程度的损伤。

**3.2.2 基于荧光探针的中药肾毒性物质筛查** 荧光探针大多是含有共轭双键体系的有机化合物, 容易吸收近紫外区或可见光区的激发光, 而发射出可见光区的光。荧光探针只能吸收或发射一定波长范围内的光, 探针的发射波长总是大于其激发波长, 该波长差值称为 Stokes 位移。荧光探针技术结合生物成像包括活体成像和细胞成像, 尤其是利用量子点荧光探针的非入侵性活体成像, 可对多种疾病的检测和诊断 (如癌症) 提供一种更为先进的方法和手段。用荧光探针进行活细胞成像目前已发展成为生物学研究最重要的技术之一, 广泛应用于流式细胞术、免疫分析、分子生物学、细胞分析、细胞凋亡、细胞毒性检测及对肿瘤细胞的识别等多个领域的研究。

赵筱萍等<sup>[85]</sup>创建了一种基于荧光探针 FDA 与

HK-2 细胞的肾毒性物质快速筛查方法。选择有肾毒性报道的 4 种药物顺铂、两性霉素 B、盐酸阿霉素和马兜铃酸 A 作为阳性对照, 无肾毒性的 4 种物质叶酸、格列苯脲、盐酸苯海拉明和马来酸依那普利作为阴性对照验证模型的准确性, 证明该模型可用于筛查肾毒性物质。使用该模型对《中国药典》2010 年版收载的 32 种有毒中药进行规模化筛查, 发现巴豆、常山、蛇床子、香加皮、川楝子、重楼、吴茱萸等 14 种中药材的 31 个组分对 HK-2 细胞有明显的细胞毒性, 提示这些中药材可能含有肾毒性成分。

### 3.3 基于数学模型的中药成分肾毒性预测

近年来, 随着计算毒理学的发展, 应用定量构效关系 (quantitative structure-activity relationship, QSAR) 可以直接基于分子结构预测化合物的生物活性, 协同优化动物实验设计, 减少实验动物的使用和实验费用, 目前已被广泛应用于药物设计过程中的化合物毒性预测<sup>[86]</sup>。

在对药物成分肾毒性预测实验中, 以化学药不良反应数据库 (side effect resource, SIDER)<sup>[88]</sup>中搜集到的 876 个有肾毒性相关不良反应的化合物作为构建肾毒性预测模型的训练集, 并对其进行文本分析, 发现其中 344 个有肾毒不良反应记录, 532 个无肾毒不良反应记录。分别使用 k-近邻 (k-nearest neighbor, KNN) 算法和支持向量机 (support vector machine, SVM) 算法构建模型, 并采用 10 折交叉验证方法 (10-fold cross-validation) 对模型构建方法进行评估。对于 KNN 算法, 构建模型时 k 值的选取为 1、3、5 和 7, 距离计算方法采用欧式距离计算方法。基于不同的 k 值 KNN 算法模型对自身训练集中数据的预测效果显示对有肾毒性 (正集) 化合物的预测准确率, k 值由高至低的排序为  $1 > 3 > 7 > 5$ ; 对无肾毒性 (负集) 化合物预测准确率 k 值由高至低的排序为  $7 > 3 > 5 > 1$ 。对训练集总体化合物预测准确率, k 值由高至低的排序为  $7 > 3 > 5 > 1$ 。由以上 3 方面分析发现, k 值为 3 时, 模型的预测准确率相对较高, 而鉴于有肾毒性预测准确率对研究有着更加重要的意义, 因此选取 k 值为 1 时所建立的模型为最优模型 (对正集预测准确率相对最高)。利用 SVM 算法构建的肾毒性预测模型对训练集中化合物的预测结果显示其总准确率可以达到 80.25%, 而对有肾毒性化合物和无肾毒性化合物的预测准确率也分别达到 63.37% 和 91.17%。因此, 从预测数据可以

得知 SVM 构建的模型对训练集中化合物具有较好的拟合性, 体现了该算法较优异的区分数据能力。

分别利用建立的 KNN 和 SVM 算法构建的模型对外部测试集中的 20 种中药成分进行肾毒性预测, KNN 模型中, 仅有 k 为 1 时所构建的模型对正集的预测准确率高于负集, 而且, 此时的模型对正集的预测准确率也最高。因此, 通过外部实验测试集的验证, 再次证实了当 k 为 1 时所构建 KNN 模型的优越性。SVM 预测结果显示, 只有 10 个化合物被成功的预测, 其正确率为 45.45%。SVM 模型对外部测试集中无肾毒性中药成分预测正确率为 75% (成功预测 8 个中的 6 个), 但该模型对有肾毒性的 14 个中药成分预测成功的只有 4 个, 占总数的 28.57%。因此, SVM 模型不能很好地对外部测试集进行肾毒性预测。相对而言, 选用 KNN 构建的模型较好, 多数模型对正集的预测准确率远低于负集, 而当 k 为 1 时所构建的 KNN 模型对外部测试集中正集的预测准确率稍大于对外部测试集中负集的预测准确率, 同时, 当 k 为 1 时所构建的 KNN 模型对常见的有肾毒性表现的中药成分雷公藤甲素、马兜铃酸 A 和高陆皂苷甲等均预测准确。因此, 推荐 KNN 算法 (k=1) 构建的模型为最优模型。利用 KNN 和 SVM 算法建立预测中药成分肾毒性的 QSAR 模型并对其结果进行比较, 验证了基于数学模型的中药肾毒性预测方法的可行性, 并在一定程度上为大量的中药成分的肾毒性早期预测提供了参考。随着中药资源庞大的成分信息不断进入训练集, 模型可进一步完善和优化, 其结果为日后中药复杂体系肾脏毒性预测提供参考。

### 3.4 生物芯片技术筛选中药肾毒性物质

生物芯片 (bio-chip) 技术是指将生物分子 (寡聚核苷酸、基因组 DNA、cDNA、多肽、抗原、抗体等) 以阵列形式固定于支持物的表面, 然后与已标记的待测生物样品靶分子进行杂交或相互作用后, 通过特定仪器对反应信号的强度进行检测分析, 从而判断样品中靶分子的种类与数量的一项生物分析技术。由于生物活性物质微小, 以点阵的方式排列在硅基上, 很像计算机芯片, 因此被称为“生物芯片”<sup>[88]</sup>。生物芯片技术融合了微加工技术、生物学、物理学、计算机等多项科学技术, 具有高效、快速、并行处理及自动化分析的特点, 应用前景广泛, 因而近几年成为研究的热点。中药物种繁多, 成分复杂, 多靶点作用, 给其应用和研究带来许多困难。一些新的研究思路如血清

药物化学、系统生物学等被用于中药的研究。近年来,生物芯片技术在中药研究领域也取得了较多进展<sup>[89]</sup>,将中药研究与蛋白组学、基因组学等系统生物学内容联系起来,在蛋白质、基因等分子水平阐明中药的作用机制,为中药现代化,特别是中药毒理学研究提供了新的思路和方法<sup>[90]</sup>。

目前,已有关于全基因组芯片用于筛选大黄总蒽醌对大鼠肾脏毒性作用靶点的研究<sup>[91]</sup>。通过对 ig 大黄总蒽醌的大鼠肾脏相关组织基因表达差异的观察,发现在给药组中有 143 条基因表达上调,101 条基因表达下调。大黄总蒽醌给药组基因芯片分析结果显示,大黄总蒽醌可引起大鼠代谢相关通路中胆固醇代谢、脂代谢相关基因出现显著差异表达,向着负方向调控。类固醇和糖皮质激素生成减少,皮质激素分解增加;脂肪酸合成下降,β-氧化增加,电子传递链氧化磷酸化解偶联;糖原合成增加,进入糖酵解的葡萄糖-6-磷酸减少,己糖支路葡萄糖直接氧化增加;甾体激素合成减少,花生四烯酸类物质合成减少。代谢过程中的能量以热量形式释放,而不是作为化学能提供细胞生命活动需求,这可能是大黄素体外抗细胞增殖的重要原因。通过功能聚类考察凋亡相关通路发现 caspase3、p53 和 granzyme B 都发生不同程度的下调,丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)级联通路研究表明,细胞丝裂原活化蛋白酶 E 基因表达量减少,直接导致 p38 表达上调,该酶直接参与 p38 MAPK 通路引起细胞凋亡。细胞凋亡过程可能会牵涉到多种蛋白酶的协同作用和连锁酶解反应(瀑布效应),发现位于连锁反应之首的蛋白酶将具有重要意义。研究也发现一些与凋亡相关基因的促凋亡变化,如氧化应激通路中,与 DNA 转录相关的核因子 1/X 表达下降;与 DNA 损伤和凋亡信号传导相关的血红素加氧酶表达上升;细胞周期通路中的细胞周期相关蛋白 CD1 表达下降,CD1 调控细胞从 G<sub>1</sub> 期进入 S 期;蛋白酶体通路中的泛素基因表达上升,而泛素标记的蛋白被认为进入降解程序;小染色体维持缺陷基因 6 表达下降,其作用是与染色体 DNA 的复制相关。这些变化都可能直接或者相互协同导致大黄总蒽醌产生肾脏毒性。

采用基因芯片技术研究环维黄杨星 D(CVB-D)对大鼠肾脏基因表达谱的影响,初步探索其对肾脏毒性的作用机制<sup>[92]</sup>。结果表明 CVB-D 组与空白组比较,共筛选出 309 条差异表达的基因,其中表达上调基因有 147 条,下调基因有 162 条,涉及细胞

周期相关基因、凋亡通路相关基因、Ca<sup>2+</sup>信号通路相关基因、MAPK 信号级联等。初步证明 CVB-D 肾毒性可能与细胞周期、凋亡通路, Ca<sup>2+</sup>信号通路异常及 MAPK 信号级联调控相关。

#### 4 展望

引起中药肾毒性的因素很多,一方面某些中药药效物质基础研究缺乏、临床证据缺乏完善记录,造成对其中所含毒性成分认识不足;另一方面组方在临床使用过程中存在配伍不当、药材来源混淆或误用、炮制不当或未经炮制、用药剂量过大、用药时间过长、中西药联合用药不当等问题,均不同程度地造成中药肾脏损伤。

中药在我国用于临床已有 2 000 多年的历史,但其毒副作用的研究才刚刚起步。现有中药肾毒性研究方法的不断推进,从不同角度丰富了中药安全性评价研究,具有高灵敏度、高通量、高准确性特点的高内涵筛选技术(high content analysis, HCA),可以在不破坏细胞完整性的前提下同时检测细胞中多个靶点的多个参数,适用于药物早期大规模毒性筛选和机制研究<sup>[93-95]</sup>。利用近几年发展起来的多能干细胞技术(induced pluripotent stem, iPS)进行药物的毒性评价对于早期发现药物毒性,减少药物研发成本具有极大的价值<sup>[96-97]</sup>。目前, HCA 和 iPS 技术的结合已被成功应用于肝脏和心脏毒性评价<sup>[98-100]</sup>,其多指标、高内涵等特性也同样适用于中药肾毒性研究,为更快速、经济有效的评价中药安全性提供更多的可能。提高中药肾毒性评价技术,重视中药肾毒性问题,将适用的仪器、技术、方法应用于中药肾毒性评价研究,可进一步加强中药安全性评价研究的科学内涵,推动中药产业化、现代化、国际化发展。

#### 参考文献

- [1] 吴松寒. 木通所致急性肾衰竭 2 例报告 [J]. 江苏中医, 1964, 5(10): 12-13.
- [2] Vanherweghem J L, Depierreux M, Tielemans C, et al. Rapidly progressive interstitial renal fibrosis in young women: association with slimming regimen including Chinese herbs [J]. *Lancet*, 1993, 341(8842): 387-391.
- [3] Kakuk G. Phytotherapy causing nephropathy [J]. *Orv Hetil*, 2000, 141(47): 2555-2558.
- [4] Tanka A, Shinkai S, Kasuno K, et al. Chinese herb nephropathy in the Kansai area: a warning report [J]. *Nihon Jinzo Gakkai Shi*, 1997, 39(4): 438-440.
- [5] Lord G M, Tagore R, Cook T, et al. Nephropathy caused

- by Chinese herbs in the UK [J]. *Lancet*, 1999, 354(9177): 481-482.
- [6] Krumme B, Endmeir R, Vanhaelen M, *et al*. Reversible Fanconi syndrome after ingestion of a Chinese herbal remedy containing aristolochic acid [J]. *Nephrol Dial Transplant*, 2001, 16(2): 400-402.
- [7] 胡世林, 许有玲. 从马兜铃酸问题看中药国际化 [J]. *世界科学技术—中药现代化*, 2001, 3(2): 5-8.
- [8] 郭志丽, 荆志伟, 杨卫彬, 等. 对中成药肾毒性与风险管理思考 [J]. *药物流行病学杂志*, 2013, 22(2): 62-63.
- [9] 印成霞. 55 例雷公藤多甙片/雷公藤多苷片致不良反应文献分析 [J]. *中国药物警戒*, 2013, 10(8): 478-482.
- [10] 史文慧, 郭 蓉, 罗朝利, 等. 102 例冠心病苏合丸相关性肾损害不良反应分析 [J]. *中国药物应用与监测*, 2011, 8(5): 297-299.
- [11] 卢海儒, 刘志勤. 二十五味松石丸引起严重肾功能损害 [J]. *药物不良反应杂志*, 2003(6): 413.
- [12] 张 印, 窦永起. 服龙胆泻肝丸引起肾毒性 1 例 [J]. *中国中药杂志*, 2002, 27(8): 633.
- [13] 张 青, 于永洋. 龙胆泻肝丸致慢性肾损害 31 例 [J]. *山东中医杂志*, 2002, 21(12): 724.
- [14] 舒占钧, 王魁亮. 龙胆泻肝丸致慢性肾功能衰竭 1 例报道 [J]. *新疆中医药*, 2003, 21(2): 21-22.
- [15] 常红军, 齐晓涟, 林晓兰, 等. 龙胆泻肝丸致马兜铃酸肾病 [J]. *药物不良反应杂志*, 2003(1): 42-43.
- [16] 潘彩明. 龙胆泻肝丸致急性肾功能衰竭 1 例 [J]. *中国中西医结合杂志*, 2004, 24(3): 279.
- [17] 陶靖环. 龙胆泻肝汤致严重肾功能损害 [J]. *药物流行病学杂志*, 2004, 13(6): 351.
- [18] 杨春林, 霍敏英. 龙胆泻肝丸致肾功能衰竭 2 例 [J]. *药物不良反应杂志*, 2003(2): 110-111.
- [19] 张学顺, 郭仲平, 孙博平. 龙胆泻肝丸致肾损害 1 例报告 [J]. *山东医药*, 2005, 45(20): 73.
- [20] 郭 蓉, 史文慧, 罗朝利, 等. 龙胆泻肝丸致慢性间质性肾炎 16 例临床报告 [J]. *中国中医药科技*, 2009, 16(4): 277.
- [21] 王济东, 徐煜英, 袁凤宝. 长期服用排石冲剂致慢性肾衰 1 例 [J]. *实用医学杂志*, 2002, 18(4): 426.
- [22] 梅小斌, 叶志斌, 崔若兰, 等. 中药排石冲剂引起慢性间质性肾炎一例报告 [J]. *第二军医大学学报*, 2002, 23: 1321.
- [23] 王雪涛, 李 云. 排石冲剂导致肾损害 1 例 [J]. *首都医药*, 2005(8): 39.
- [24] 马红梅, 张伯礼. 当归四逆加吴茱萸生姜汤和关木通肾毒性报告概况 [J]. *中草药*, 1999, 30(1): 76.
- [25] 谢晓燕, 李清芳, 张惠霞, 等. 505 例注射用七叶皂苷钠不良反应的文献分析 [J]. *中国药物警戒*, 2014, 11(4): 229.
- [26] 赵鹏俊, 邹永祥. 口服蜈蚣粉致急性肾功能衰竭死亡 1 例 [J]. *中国中药杂志*, 1998, 23(2): 117.
- [27] 陈国盛. 莲必治注射液致药源性肾损害 126 例分析 [J]. *今日药学*, 2014, 24(6): 444-446.
- [28] 张玉萌, 栗晓东, 刘 萍, 等. 穿心莲制剂引起急性肾毒性的文献回顾性分析 [J]. *中国药物应用与监测*, 2010, 7(6): 360-362.
- [29] 何 心. 穿琥宁注射液致严重血尿 1 例 [J]. *实用医学杂志*, 2008, 24(17): 2992.
- [30] 吕均香, 渠鹏程, 赵宝泉. 斑蝥外用致急性肾损害 1 例 [J]. *实用医药杂志*, 2005, 22(6): 521.
- [31] 王明臣, 任占屹. 斑蝥酒中毒致上消化道出血及肾损害 1 例报告 [J]. *河南中医*, 1989(1): 25.
- [32] 杨来计, 包佐义. 外用斑蝥酊引起肾脏损害 8 例 [J]. *河北中西医结合杂志*, 1996, 5(3): 146.
- [33] 杨素平. 口服牛黄解毒片致血尿 1 例 [J]. *药物流行病学杂志*, 1999, 8(1): 51.
- [34] 崔文刚. 服三黄片致血尿一例 [J]. *中国中药杂志*, 1990, 15(2): 54.
- [35] 常景梅. 普乐林致一过性血红蛋白尿 1 例 [J]. *中华流行病学杂志*, 1998, 19(6): 360.
- [36] 甄键存, 牛家祺. 鸦胆子油乳剂致咳嗽、双肾刺痛 1 例 [J]. *中国医院药学杂志*, 1995, 15(2): 84.
- [37] 刘观湘. 海藻甘草配伍致心肾损害 1 例 [J]. *陕西中医*, 1996, 17(11): 521.
- [38] 关铭华. 清开灵注射液致急性肾功能衰竭 [J]. *药物不良反应杂志*, 1999(1): 53.
- [39] 邓少玲. 清开灵注射液致药物热和急性肾功能衰竭 [J]. *药物不良反应杂志*, 2002(1): 49-50.
- [40] 孟定德. 清开灵注射液致血尿 1 例报告 [J]. *中国社区医师: 医学专业*, 2012, 14(12): 288.
- [41] 乔丽潘, 岳 华. 脉络宁过敏致急性肾衰 2 例 [J]. *新疆中医学*, 1997, 15(3): 40.
- [42] 窦传敏. 云南白药致尿失禁 [J]. *山东中医杂志*, 1992, 11(1): 53.
- [43] 许有录, 张 元, 张志君. 云南白药致血尿 1 例 [J]. *四川医学*, 1998, 19(1): 91.
- [44] 卢国玲, 杜顺英. 服中华跌打丸致过敏性肾炎一例 [J]. *中国中药杂志*, 1992, 17(7): 434.
- [45] 刘仁全, 张慧峨. 999 感冒灵冲剂致药物性皮炎和肝肾损害 [J]. *药物不良反应杂志*, 2002(2): 121.
- [46] 罗书平, 李卫华. 消栓灵致急性肾功能衰竭伴肝损伤 1 例报告 [J]. *北京医学*, 2000, 22(3): 182.
- [47] 颜立文. 槟榔四消丸致血尿 1 例 [J]. *实用中医内科杂志*, 2000, 14(3): 16-17.
- [48] 杨国民, 赵秀珍, 牟成全. 复方丹参滴丸致血尿 1 例 [J]. *中国医院药学杂志*, 2003, 23(6): 351.

- [49] 王兴彬. 静滴复方丹参注射液致尿毒综合征 1 例 [J]. 中国医院药学杂志, 1997, 17(4): 187.
- [50] 宋玉和. 强力宁致尿崩症 1 例报告 [J]. 天津药学, 1998, 10(2): 74.
- [51] 彭金玲, 边育红, 王 丽, 等. 马兜铃酸肾毒性的研究进展 [J]. 环球中医药, 2013, 6(1): 59-64.
- [52] Katsoulis E, Mabley J G, Samai M, *et al.* Lipotoxicity in renal proximal tubular cells: Relationship between endoplasmic reticulum stress and oxidative stress pathways [J]. *Free Rad Biol Med*, 2010, 48(12): 1654-1662.
- [53] Zhu S H, Wang Y, Jin J, *et al.* Endoplasmic reticulum stress mediates aristolochic acid I-induced apoptosis in human renal proximal tubular epithelial cells [J]. *Toxicol In Vitro*, 2012, 26(5): 663-671.
- [54] Xie J, Guo Q. Apoptosis antagonizing transcription factor protects renal tubule cells against oxidative damage and apoptosis induced by ischemia-reperfusion [J]. *J Am Soc Nephrol*, 2006, 17(12): 3336-3346.
- [55] 李振雪, 耿成燕, 姜丽萍, 等. 关木通水煎剂致大鼠肾毒性及 DNA 损伤机制 [J]. 毒理学杂志, 2007, 21(6): 444-446.
- [56] 季文萱, 黄俊彦, 孟冬梅, 等. 马兜铃酸对肾小管上皮细胞氧化应激效应的作用 [J]. 山东医药, 2011, 51(25): 98-100.
- [57] 陈 敏, 宫丽崑, 任 进. 代谢酶在马兜铃酸肾病中的作用 [J]. 中草药, 2012, 43(2): 388-392.
- [58] Lebeau C, Debelle F D, Arlt V M, *et al.* Early proximal tubule injury in experimental aristolochic acid nephropathy: functional and histological studies [J]. *Nephrol Dial Transplant*, 2005, 20(11): 2321-2332.
- [59] 蒋贵仲, 陈 灵. 中药中马兜铃酸的毒性研究进展 [J]. 中国农学通报, 2008, 24(9): 84-86.
- [60] Wan C, Hao Y, Wing T P. Quantification of aristolochic acid-derived DNA adducts in rat kidney and liver by using liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry [J]. *Mutation Res*, 2008, 646(1/2): 17-24.
- [61] Cronin A J, Maidment G, Cook T, *et al.* Aristolochic acid as a causative factor in a case of Chinese herbal nephropathy [J]. *Nephrol Dial Transplant*, 2002, 17(3): 524-525.
- [62] de Jonge H, Vanrenterghem Y. Aristolochic acid: the common culprit of Chinese herbs nephropathy and Balkan endemic nephropathy [J]. *Nephrol Dial Transplant*, 2008, 23(1): 39-41.
- [63] Yilmaz H R, Iraz M, Sogut S, *et al.* The effects of erdosteine on the activities of some metabolic enzymes during cisplatin-induced nephrotoxicity in rats [J]. *Pharmacol Res*, 2004, 50(3): 287-290.
- [64] Yang F, Zhuo L, Ananda S. Role of reactive oxygen species in triptolide-induced apoptosis of renal tubular cells and renal injury in rats [J]. *Huazhong Univ Sci Technol Med Sci*, 2011, 31(3): 335-341.
- [65] Shu B, Duan W, Yao J, *et al.* Caspase 3 is involved in the apoptosis induced by triptolide in HK-2 cells [J]. *Toxicol In Vitro*, 2009, 23(4): 598-602.
- [66] 曹 军, 姜丽平, 耿成燕, 等. 活性氧在姜黄素对人胚肾 293 细胞细胞毒性中的作用 [J]. 毒理学杂志, 2009, 23(4): 260-263.
- [67] Allard T, Wenner T, Greten H J, *et al.* Mechanisms of herb-induced nephrotoxicity [J]. *Curr Chem*, 2013, 20(22): 2812-2819.
- [68] Fang H C, Lee P T, Lu P J, *et al.* Mechanisms of star fruit-induced acute renal failure [J]. *Food Chem Toxicol*, 2008, 46(5): 1744-1752.
- [69] Koul S, Fu S, Koul H. Oxalate exposure promotes reinitiation of the DNA synthesis and apoptosis of HK-2 cells, a line of human renal epithelial cells [J]. *Ann NY Acad Sci*, 2003, 10(10): 292-295.
- [70] Miller C, Kennington L, Cooney R, *et al.* Oxalate toxicity in renal epithelial cells: characteristics of apoptosis and necrosis [J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2000, 162(2): 132-141.
- [71] Jonassen J A, Kohjimoto Y, Scheid C R, *et al.* Oxalate toxicity in renal cells [J]. *Urol Res*, 2005, 33(5): 329-339.
- [72] 王青秀, 吴纯启, 杨红莲, 等. 大黄素对 HK-2 细胞周期增殖的影响 [J]. 毒理学杂志, 2007, 21(6): 440-443.
- [73] 邱丽颖, 李 倩, 许天蟾, 等. 合欢皮总皂苷所致小鼠肾毒性及其机制的研究 [J]. 毒理学杂志, 2011, 25(6): 431-434.
- [74] 祝建辉, 鲍晓荣, 何华平, 等. 泽泻肾毒性研究 [J]. 中药药理与临床, 2007, 23(3): 60-62.
- [75] 熊 英. 鱼胆中毒并发急性肾功能衰竭 12 例 [J]. 临床荟萃, 2005, 20(2): 104.
- [76] 车继敏, 罗 维. 可致肾脏毒性和肾脏保护作用的中药 [J]. 中国医药指南, 2013, 11(8): 269.
- [77] 王 旗, 刘 庆, 沈晓帆, 等. 基于细胞的中药成分肾毒性研究 [J]. 世界科学技术—中医药现代化, 2010, 12(4): 601-603.
- [78] 王 磊, 张金晓, 张宗鹏, 等. 肾细胞体外模型在药物评价与筛选中的应用 [J]. 华西药学杂志, 2012, 27(5): 597-599.
- [79] 周 倩, 姚广涛, 金若敏. 中药体外肝肾细胞毒性评价的研究进展 [J]. 时珍国医国药, 2013, 24(3): 718-720.
- [80] Ludwig T, Riethmuller C, Gekle M, *et al.* Nephrotoxicity of platinum complexes is related to basolateral organic

- cation transport [J]. *Kidney Int*, 2004, 66(1): 196-202.
- [81] 陈松杰. 基于 MDCK 细胞模型的广防己体外肾毒性评价 [J]. 今日药学, 2012, 22(4): 211-214.
- [82] Zhang L J, Mu X Q, Fu J L, *et al.* *In vitro* cytotoxicity assay with selected chemicals using human cells to predict target-organ toxicity of liver and kidney [J]. *Toxicol In Vitor*, 2007, 21(4): 734-740.
- [83] 江 芳, 周昕睿, 王 旗, 等. 补骨脂酚及其与补骨脂素联合的肾细胞毒性 [J]. 中国药理学与毒理学杂志, 2010, 24(1): 50-58.
- [84] 刘 斌, 王 莉, 王汉蓉, 等. 采用肾功探针评价关木通肾毒性 [J]. 中国药理通讯, 2004, 21(4): 32.
- [85] 赵筱萍, 吕 敏, 张伯礼. 一种基于荧光探针和 HK-2 细胞的中药肾毒性物质筛查方法及其应用 [J]. 中国中药杂志, 2013, 38(10): 1577-1580.
- [86] 王新洲, 朱永亮, 金若敏, 等. 基于数学模型的药物成分肾毒性预测 [J]. 中国新药杂志, 2014, 23(13): 1565-1578.
- [87] Wu S L, Yu B, Wang Y J, *et al.* Process and intermediates for the preparation of *N*-acylated-4-aryl-amino acid derivatives: WO 2010078440 [P]. 2010-08-07.
- [88] 管 艳, 苏式兵. 生物芯片技术及其在中医药研究中的应用进展 [J]. 中华中医药杂志, 2012, 21(2): 420-425.
- [89] 金 伟, 马昱澍, 程海鹏, 等. 生物芯片技术及在中药研究中的应用展望 [J]. 中草药, 2001, 32(11): 1054-1056.
- [90] 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.
- [91] 严 明, 张陆勇, 孙丽新, 等. SD 大鼠经口给予大黄总蒽醌的基因表达差异和肾脏毒性靶点研究 [J]. 中国药理学杂志, 2008, 43(1): 7-11.
- [92] 何 苗, 梁晓雯, 蒋宝平, 等. 基因芯片技术研究环境黄杨星 D 对大鼠肾脏基因表达的研究 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(10): 286-290.
- [93] Zock J M. Applications of high content screening in life science research [J]. *Comb Chem High Throughput Screen*, 2009, 12(9): 870-876.
- [94] Valet G. Cytomics as a new potential for drug discovery [J]. *Drug Discov Today*. 2006, 11(17/18): 785-791.
- [95] Wang M, Liu C X, Dong R R, *et al.* Safety evaluation of chinese medicine injections with a cell imaging-based multiparametric-assay revealed a critical involvement of mitochondrial function in hepatotoxicity [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2015, 2015: 1-13.
- [96] Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors [J]. *Cell*, 2006, 126(4): 663-676.
- [97] 安世民, 丁旭苹, 朱 亮. 基于诱导多能干细胞的高内涵筛选平台在药物研发中的应用 [J]. 中国新药杂志, 2015, 24(2): 171-176.
- [98] Sirenko O, Hesley J, Rusyn I, *et al.* High-content assays for hepatotoxicity using induced pluripotent stem cell-derived cells [J]. *Assay Drug Dev Technol*, 2014, 12(1): 43-54.
- [99] Gepignoli F, Charlot D, Whittaker R, *et al.* High throughput measurement of Ca<sup>2+</sup> dynamics for drug risk assessment in human stem cell-derived cardiomyocytes by kinetic image cytometry [J]. *J Pharmacol Toxicol Methods*, 2012, 66(3): 246-256.
- [100] Liang P, Lan F, Lee A S, *et al.* Drug screening using a library of human induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes reveals disease-specific patterns of cardiotoxicity [J]. *Circulation*, 2013, 127(16): 1677-1691.