

· 综述 ·

中药毒理学研究中体外细胞毒性的评价指标及检测方法

陈海媚, 谢晓芳, 彭成*

(成都中医药大学 中药资源系统研究与开发利用省部共建国家重点实验室培育基地, 成都 611137)

[摘要] 中药毒性是客观存在的,目前大多数中药毒性作用机制尚不明确,国内外研究均处在探索和积累阶段。面对中药现代化发展的需要,对有毒中药的毒性进行定性和定量分析,阐明毒性发生机制,建立评价中药毒性级别的客观实验数据和中药安全性的评价模式显得越来越重要。在继承传统的基础上,借鉴现代毒理学的研究思路、手段和方法,将基因组学、蛋白质组学以及代谢组学等新方法应用于中药毒性标志物挖掘和毒性机制等方面也已得到越来越多的应用。而体外细胞毒性评价作为传统动物模型毒性评价的替代方法正是在这一基础上发展起来的,在发现早期、轻微和隐匿的中药毒性上具有显著优势。且基于人类细胞或细胞系的体外毒理学检测途径的定量自动化高通量检测与筛选,更是提高了中药毒理学的检测效率。查阅近年来国内外文献,系统地梳理和综述关于体外细胞毒性实验的优势、特殊性、评价指标和检测方法,探讨其存在的问题,发展和完善中药毒性的研究体系。

[关键词] 中药毒理学; 体外细胞毒性; 评价指标; 检测方法

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2017)22-0202-09

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2017220202

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20170906.1351.034.html>

[网络出版时间] 2017-09-06 13:51

In Vitro Cytotoxicity Evaluation Indicator and Test Methods Applied in Toxicology of Traditional Chinese Medicine

CHEN Hai-mei, XIE Xiao-fang, PENG Cheng*

(State Key Laboratory Breeding Base of Systematic Research & Development and Utilization of Chinese Medicine Resources Co-Constructed by Sichuan Province and Ministry of Education, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 611137, China)

[Abstract] The toxicity of traditional Chinese medicine (TCM) is an objective existence. At present, most of the toxic mechanism of TCM is unclear, and the research is still at the phase of exploration and accumulation at home and abroad. To meet the modern development of TCM, it is very important to establish the objective experimental data of toxic grades and the safety evaluation model. Genomics, proteomics and metabolomics have been increasingly applied in identifying TCM toxic markers and toxic mechanism. Besides, *in vitro* cytotoxicity evaluation, as an alternative method for evaluating traditional toxicity with animal models, has been widely studied and applied. It also has a distinct advantage in diagnosing early, slight, hidden toxicity. Besides, the quantitative automation high throughput detection and screening based on human cells or cell lines have helped improve the toxicology detection efficiency. The preponderance, particularity, evaluation index and detection methods for *in vitro* cytotoxicity tests are reviewed to discuss the existing problem, with the aim to develop

[收稿日期] 20170314(012)

[基金项目] 国家自然科学基金重点项目(81630101);国家中药标准化项目(ZYBZH-C-SC-51)

[第一作者] 陈海媚,在读硕士,从事中药药理与毒理研究, E-mail:792035502@qq.com

[通讯作者] *彭成,研究员,博士生导师,从事中药药理与毒理研究, E-mail:pengchengchengdu@126.com

and improve the research system of TCM toxicity.

[Key words] toxicology of traditional Chinese medicine; cytotoxicity *in vitro*; evaluation indicator; detection method

中药毒理学是研究中药对生物体有害效应、机制、安全性评价与危险度评定的科学,即研究有毒中药与机体之间相互关系的一门学科。中药毒性的传统研究主要是从中药有毒成分、配伍、毒性评价指标、动物选择等方面展开,大多数为啮齿类动物和非啮齿类动物的急性毒性和长期毒性实验,特殊毒性和靶器官毒性的研究相对少,近年来开始重视,毒性评价指标也主要集中在组织形态学变化及生化指标上^[1-2]。虽然这类方法在评估中药对机体潜在危害的实际应用中发挥了重要作用,但随着中医药事业和毒理学的发展,尤其是新形势下未可预知的中药安全性事件的频发,简单的检测评估与筛选手段已不能满足这一需求,使得中药毒副作用的判断标准及客观数据的研究显得越来越重要。

在中医药国际化进程中,随着复杂性科学和系统生物学在中医药研究思路和实践中的应用,从整体到分子的许多现代先进研究技术和手段都成为基本研究条件,这一思路也符合中药毒性“成分复杂”、“表现多样”的特点,可指导中药毒性研究的开展^[3-5]。而“精准医学”的提出更是对中药毒性研究提出了挑战,如何提高中药安全性,避免中药注射剂等系列安全性事件的发生,是中药毒理学研究的重要任务。在这一大背景下,迫切需要采用更先进、更灵敏的方法,从分子生物学、毒代动力学、遗传毒理学、生理毒理学等不同层次和领域全面认识中药毒性。而体外培养的人源或动物源细胞实验正是在这一背景下逐步发展起来,作为传统动物模型毒性评价的替代方法和补充方法,体外细胞毒性实验正得到越来越多的研究和应用^[6]。

结合近年来科研人员对中药毒性及作用机制的药理研究成果,研究人员对中药毒性评价有了新的认识,其毒性作用机制逐步清楚。不同于传统动物模型毒性评价以组织形态学及生化指标为检测点,体外细胞毒性实验将基因组学、蛋白质组学以及代谢组学等新方法应用于中药毒性标志物挖掘和毒性机制等方面。且基于人类细胞或细胞系的体外毒理学检测途径的定量自动化高通量检测与筛选,更是提高了中药毒理学的检测效率,这极大的丰富了中药毒性评价体系的内涵,进一步实现中药毒性的早期预警。笔者旨在就体外细胞毒性实验的优势、

特殊性、评价指标和检测方法的相关研究进行整理和归纳,希望能对相关领域的研究提供一定的参考。

1 体外细胞毒性实验在中药毒理学研究中的优势

体外细胞毒性实验是一种在离体状态下模拟生物体生长环境,检测生物医用材料及制品、浸提液、化学物质(药物)等作用于细胞基本结构或生理过程所造成的细胞死亡、细胞溶解和细胞生长抑制(非程序性死亡)的方法。周期短、成本低和作用机制易于探明等优势使体外细胞毒性实验得以快速发展,它不仅减少了动物的使用,且基于人类细胞或细胞系的体外毒理学检测途径的定量自动化高通量检测与筛选,更是提高了中药毒理学的检测效率^[7]。由于人源细胞的引入而使结果更有说服力,使之得到更广泛的应用。相对于复杂的体内实验,所有体外细胞毒性实验都是简化了的监测事件,具有快速、经济、易于量化和可重复性好的特点,符合替代(replacement),减少(reduction)和优化(refinement)的动物福利“3R”原则^[8]。此外,包括全自动膜片钳、超高分辨激光共聚焦技术等先进分子生物学技术用于体外细胞毒性实验,在发现早期、轻微和隐匿的中药毒性和机制具有显著优势。体外细胞毒实验检测标准和评价体系的更加客观、规范、被国际认可,可逐渐消除与国际毒理学术界交流的障碍,对中药毒理学研究的科学化、规范化、现代化和国际化具有重要的促进作用和学术意义^[9]。

2 中药毒性研究在体外细胞毒性实验中的特殊性

首先,中药的毒性研究必须遵循传统的中医药理论。在中药药性理论的指导下,从系统生物学角度出发,以中医辨证论治为核心,结合分子、基因水平等研究手段进行中药毒性的全方位评价^[10]。中药的毒性研究是基于传统认识并结合现代应用的研究,有别于天然药物的毒性研究。其次,成分的多样性、复杂性和模糊性是中药的突出特点,其对机体的药效和毒性作用是一个整体效应^[11]。中药提取物与化学单一成分不同,当受试药物直接加入体外反应体系,可能因含有大量杂质成分,渗透压, pH, 鞣质, 无机盐等许多非特异性理化因素,会严重干扰实验,产生假阳性或假阴性结果,在判断中药毒性物质基础上存在争议,难以得到科学性的认可。在这一点上,体外细胞毒性实验在中药毒性研究中的应用

有一定的局限性。

日本学者田代真一教授于 1980 年代提出“药物血清”的概念^[12],是指将受试物经口给予动物后,取其血清作为药物源加入离体反应体系。将这种实验方法引入到中药研究中,克服了中药粗提物理化性质与杂质对实验结果的干扰,且实验条件接近于药物在体内产生效应的内环境,它能反映中药中可吸收成分的直接作用,也能反映中药在机体作用下产生的代谢物和内源性物质的间接结果,比较真实地反映药物在体内的实际作用。在此基础上发展的“中药血清药理学”已成为一种常用的适合中药特点的中药药理实验方法,为中药尤其复方的药理作用研究提供了一条行之有效的途径,推动了中药药理研究方法学的进步,提高了中药体外实验的可信性和可靠性,得到广泛应用^[13]。陆海英等^[14]在研究中药抗纤灵方对转化生长因子- β_1 (TGF- β_1) 刺激后,肾小管上皮细胞 (TECs) 中肝细胞生长因子 (HGF) 受体 c-Met 及其下游丝裂原激活的蛋白激酶 (MAPK) 信号分子的调控作用时,即采用了不同含药血清处理经 TGF- β_1 刺激的 HK-2 细胞来探讨其作用机制。俞发荣等^[15]采用苍耳子药物血清培养人脑神经胶质瘤细胞 (H4 细胞) 48 h 后,用四甲基偶氮唑蓝 (MTT) 比色法和流式细胞仪检测其对 H4 细胞凋亡的影响。邱华等^[16]采用白花香莲解毒方药物血清作用于 HepG2. 2. 15 细胞,通过 MTT 比色法,酶联免疫吸附试验 (ELISA), 逆转录 PCR (RT-PCR) 等方法来检测药物毒性。成细华等^[17]采用滋阴益气活血解毒中药含药血清对脂肪酸孵育 HepG2 细胞,发现含药血清能够调节固醇调节元件结合蛋白-1c (SREBP-1c) 和死亡因子 (Fas) 的表达,改善混合脂肪酸诱导的 HepG2 细胞脂肪性变。由此,可进一步将“药物血清”的概念应用于中药毒性研究,即形成“中药血清毒理学”,为中药毒性研究开辟了一个新领域^[18]。

3 体外细胞毒性的评价指标及检测方法

体外细胞毒性评价所用的细胞根据受试物的不同而不同,但其基本原则是一致的,即能够尽量精确地反映毒物毒性,且有易于培养、连续操作性强的特点。评价指标一般包括细胞的活力、形态、结构、数量及各项生理病理指针,并针对不同的指标选择不同的检测方法。查阅文献,列举出近年来基于体外细胞毒性实验的高通量筛选技术,见表 1。

3.1 细胞活力 细胞活力是检测细胞生长状态最简单直接的评价指标。细胞经受试药物作用后,可

表 1 基于体外细胞毒性实验的高通量筛选技术

Table 1 High-throughout screening technique based on *in vitro* cytotoxicity test

高通量细胞毒性筛选	类别
影响因素	细胞株,微孔板性能的差异 ^[19]
模型	离子通道筛选模型,受体筛选模型,报告基因筛选模型,细胞增殖筛选模型 ^[20]
检测技术	荧光检测技术,化学发光检测技术,放射性活性检测技术 ^[21]

能因药物毒性作用抑制细胞生长,甚至引起细胞死亡,或者因药物激活作用促进细胞增殖,且这些效应都会直观的反映在活细胞数量上,因此,评价细胞活力是反映细胞数量和状态的简单而有效的方法。目前应用较多的是检测方法是化学比色法,如染色排除法,利用台盼蓝^[22]可穿透变细胞膜与解体的 DNA 结合,使其着色,而活细胞能阻止染料进入细胞内,故可以鉴别死细胞与活细胞。MTT 比色法^[23]及类原理的 XTT 法^[24], MTS 法^[25], WST-1 法^[26], CCK8 法或称 WST-8 法^[27],用于检测细胞的存活和增殖。利用活细胞线粒体中的琥珀酸脱氢酶能将外源性检测试剂还原为水不溶性的蓝紫色结晶甲臜 (Formazan) 并沉积在细胞中,而死细胞无此功能,再用酶标仪测定吸光度 A,在一定细胞数范围内,检测试剂结晶形成的量与细胞数成正比,以此来判断活细胞数量。氯化三苯基四氮唑脱氢酶还原法 (TTC 法)^[28]是利用细胞中脱氢酶 (LDH) 在胞浆内含量丰富,正常时不能通过细胞膜,当细胞受损伤或死亡时可释放到细胞外,此时细胞培养液中 LDH 活性与细胞死亡数目成正比,用比色法测定,并与靶细胞对照孔 LDH 活性比较,可计算效应细胞对靶细胞的杀伤力。磺基罗丹明 B 法 (SRB 法)^[29],是在酸性条件下可特异性地与细胞内蛋白结合的染料,染色后再用 Tris 碱液溶解 SRB,酶标仪检测其 A 以反映细胞状态和数量。该方法与 MTT 比色法类似,但其形成的 SRB 不像 MTT 比色法中甲臜那样容易变色,染色后干燥可放置较长时间,更适合于规模细胞培养实验的使用^[30]。陈虹宇等^[31]在双氢青蒿素 (DHA) 对癌细胞和正常细胞的毒性差异的研究中,采用 MTT 比色法检测细胞存活率,结果显示不同浓度的 DHA 处理 24 h 后,2 种细胞存活率均显著降低,DHA 对 A549 和 HBE 细胞的半数抑制浓度 (IC₅₀) 分别为 61.55 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 87.83 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。汪美汐等^[32]在何首乌中大黄素 (Emodin) 对 LO2 肝细胞细胞毒性机制的研究中,不同浓度 Emodin 处理

LO2 细胞,通过 MTS 法检测细胞的存活率,测定 LDH 释放率评价细胞损伤程度,结果显示,随着 Emodin 浓度的增加,呈现明显的细胞损伤效应,细胞的存活率逐渐降低并呈现浓度和时间依赖性;同时,LDH 释放率在给药 48 h 较空白组均明显增高。齐晓艳等^[33]在三七皂苷 R_1 对顺铂细胞毒性影响的研究中,采用磺基罗丹明 B 法观察三七皂苷 R_1 作用不同时间以后对 HeLa 细胞增殖的抑制作用,结果显示,三七皂苷 R_1 对 HeLa 细胞增殖具有一定的抑制作用,可明显增强顺铂的细胞毒性作用。

3.2 细胞形态学 细胞形态学即研究细胞及各组成部分的显微结构和亚显微结构,包括表现细胞生命现象的生物大分子结构。受试药物对体外细胞的毒性作用可直接体现在细胞形态结构上,引起细胞形态结构的异常,因此,细胞形态学检测也是反映体外细胞毒性最直观的评价指标之一。目前,常用倒置相差显微镜、荧光显微镜、倒置荧光显微镜、透射电子显微镜等仪器来完成对细胞显微结构及亚显微结构的观察。孙平等^[34]利用倒置相差显微镜来观察不同浓度莪术醇对 B16-F10 细胞状态的影响,结果显示,正常组细胞呈贴壁生长,细胞大小均一,实验组细胞变圆,其贴壁状态差,出现悬浮于培养基的现象,细胞明显变形,出现明显的细胞死亡现象。徐丽君等^[35]在川芎嗪抑制人视网膜母细胞瘤 WERI-Rb1 细胞增殖的机制研究中,利用荧光显微镜观察 WERI-Rb1 细胞形态及密度变化,结果显示,空白组细胞密度约为 85%,细胞呈圆形,聚集呈葡萄串样;川芎嗪处理细胞 48 h 后,细胞密度约为 30% ~ 40%,细胞呈圆形,可聚集呈葡萄状,但聚集现象明显减弱,可见散在的单个细胞贴壁。任艳青等^[36]在栀子、连翘等中药配方颗粒对体外肝细胞毒性的研究中,以人正常肝细胞 LO2 为研究对象,采用 Hoechst33258 荧光染色法观察细胞核形态,结果显示,显微镜下 $1\ 000\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 栀子配方颗粒组细胞核浓染,并呈现出明显的核固缩;其余各给药组细胞与正常组细胞相比,细胞核形态无明显差异,均未观察到明显的凋亡特征,细胞呈均匀淡染的蓝色荧光,核形态完好。任历等^[37]在大黄鞣质对人肾小管上皮细胞毒性作用及量-毒关系的研究中,采用倒置显微镜下观察细胞形态,结果显示,正常组细胞生长状态旺盛,伸展性良好;大黄鞣质各给药组作用于细胞 48 h 后,细胞出现不同程度的形态改变,但程度相对较轻,主要是细胞变得狭长,呈长梭形,但细胞空泡化,变形,融合等现象不明显。

3.3 细胞周期与细胞凋亡 细胞周期和细胞凋亡都是生命的基本现象,是维持体内细胞数量动态平衡的基本措施,在胚胎发育、造血、免疫系统的成熟以及维护正常组织和器官的细胞恒定与生长平衡,乃至机体衰老方面都起着重要作用,也是药物导致毒性的基本原理。在中药抗癌药物筛选中,许多抗癌药物都是通过最终触发肿瘤细胞凋亡通路达到治疗的目的,因此,有关周期和凋亡的研究在中药毒理学领域已经广泛开展,其检测方法显得非常重要。流式细胞仪 (FCM) 流体喷射技术、激光光学技术、电子技术和计算机技术等集于一体,较其他方法有不可比拟的优越性,既可定性又可定量,且具有简单、快速和敏感性高的特点,可进行多参数和活体细胞分析。CHENG 等^[38]在甘遂三萜烯衍生物对大鼠肠上皮细胞株细胞周期影响的研究中,采用碘化丙啶 (PI) 染色,由流式细胞术分析细胞周期的分布,结果显示甘遂三萜烯衍生物主要是通过阻滞细胞周期 G_0/G_1 期来抑制细胞增殖,并呈剂量依赖性。彭岳等^[39]在白花丹醌对人肝星状细胞株 (HSC-LX2) 细胞毒性作用的研究中,采用 PI 染色法检测各周期细胞 DNA 的含量及细胞晚期凋亡率,结果显示, G_0/G_1 期细胞的比例发生升高,而 S 期 + G_2/M 期细胞总数降低,且细胞的晚期凋亡率明显增高;表明白花丹醌对 HSC-LX2 具有明显的细胞毒性,原因为将细胞周期阻滞在 G_0/G_1 期而阻止细胞的分裂增殖,并诱导细胞发生凋亡。翟晶等^[40]在蛇葡萄素钠对人肺腺癌 SPC-A-1 细胞、人正常胚肺 MRC-5 细胞毒性作用的研究中,采用流式细胞仪检测细胞周期和细胞凋亡,结果显示, $25\sim 100\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 蛇葡萄素钠可使 SPC-A-1 细胞增殖阻滞于 S 期, G_0/G_1 期细胞明显减少,且呈浓度依赖性, $50, 100\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 蛇葡萄素钠可使 SPC-A-1 细胞发生明显凋亡,而蛇葡萄素钠对 MRC-5 细胞周期及凋亡的影响不明显,表明蛇葡萄素钠对肿瘤细胞具有较强的毒作用,对正常细胞毒性较小。LIANG 等^[41]在人参皂苷-Rg₅ 对人类宫颈癌细胞凋亡影响的研究中,利用流式细胞仪检测细胞凋亡,结果显示人参皂苷-Rg₅ 可诱导细胞凋亡,具有抑制宫颈癌 HeLa 细胞生长的作用。陈志红等^[42]在探讨重楼总皂苷对 CNE-2Z 人鼻咽癌细胞周期和细胞凋亡的影响中,采用 Hoechst-PI 双染、流式细胞仪观察重楼总皂苷对 CNE-2Z 细胞周期及凋亡的影响,结果显示,重楼总皂苷可抑制 CNE-2Z 细胞的增殖,阻滞细胞于 S 期,从而诱导细胞凋亡。

3.4 离子通道调控 细胞膜上离子通道既能调节

细胞内外的渗透压,也是维持细胞膜电位的重要分子,如神经细胞要进行讯号传导,即是靠离子的进出以造成膜电位的变化。近年来,离子通道已经成为体外细胞毒性研究中备受关注的研究目标,在体外细胞毒性实验中,由于其灵敏、简便,并可反映活细胞内离子通道活性的特点,使离子通道模型评价正受到越来越多的关注^[43]。离子通道结构和功能的研究是各种技术的综合应用,包括电压和电流钳位技术、单通道电流记录技术、通道蛋白分离、纯化等生化技术、人工膜离子通道重建技术、通道药理学、基因重组技术及一些物理和化学技术。SUN 等^[44]在乌头碱诱发大鼠乳鼠心肌细胞凋亡机制的研究中,发现乌头碱能够调控 Ca^{2+} 处理蛋白,上调促凋亡蛋白的表达,并且下调抗凋亡蛋白 B 淋巴细胞瘤-2(Bcl-2) 的表达,增加 MAPK 的磷酸化,尤其是 p-p38/p38,结果显示乌头碱能够显著增加乳鼠心肌细胞 Ca^{2+} 超载导致心率失常,最终通过 p38 增殖蛋白激酶的磷酸化诱发心肌细胞凋亡的发生。李旻等^[45]在蟾酥的心脏毒性研究中,发现蟾酥和强心苷类物质类似,可以通过与心肌 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$ 酶 α 亚基结合抑制其活性从而导致 Na^+ 浓度升高,可刺激反向 $\text{Na}^+ / \text{Ca}^{2+}$ 交换电流的增强而致细胞内 Ca^{2+} 超载, Ca^{2+} 超载可诱发钙释放,进而导致心室动作电位异常、心律失常和心肌收缩功能紊乱、细胞损伤或死亡等。贾元威等^[46]在探讨豆腐果苷对 hERG 钾离子电流的影响及潜在心脏毒性的研究中,采用全细胞膜片钳技术检测不同浓度豆腐果苷对 hERG 通道电流活动,结果显示,豆腐果苷对 hERG 钾通道的 IC_{50} 约为 $47 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$,比临床常规剂量下人体内浓度高 1 000 倍以上。

3.5 细胞代谢 细胞代谢组学是以体外细胞为研究对象,通过体内体外因素的作用,对细胞内代谢物的变化进行定性、定量分析,探索代谢物变化与生理病理变化的相互关系和动态规律^[47]。细胞能量代谢的水平可以通过细胞耗氧率 OCR^[48],细胞酸化率 ECAR^[49],中间代谢产物^[50] 比如氨基酸, NADH, ADP 等含量的变化反映。腺嘌呤核苷酸等是维持细胞正常生长必需的能量物质,测定 ATP 及其他代谢产物的含量变化可以判定细胞的生长状态,对研究细胞能量代谢功能有着重要的意义^[51]。与其他方法相比,体外细胞代谢组学表现出了更多独特的优势,如容易控制实验变化、高度重复性、低成本、结果更易解释等^[52]。在阐明药物的作用机制上,代谢组学在中药毒性评价方面得到越来越多的应用。

目前,常用的方法有试剂盒检测,超高效液相色谱(UPLC),气相色谱与质谱联用技术(GC-MS/MS),四级杆飞行时间质谱(QTOF/MS),核磁共振波谱仪等。谢辉辉等^[53]在乌头碱及其代谢产物苯甲酰乌头原碱的生殖毒性机制研究中,采用 GC-MS 分析获得细胞代谢轮廓,结果表明,乌头碱和苯甲酰乌头原碱主要通过影响氨基酸代谢对 BeWo 细胞产生生殖毒性作用。施洁瑕等^[54]在应用代谢组学探讨芫花酯甲对人肝细胞 LO2 毒性作用的研究中,采用 UPLC-QTOF/MS 对细胞代谢物进行分析,结果显示,正常组及芫花酯甲组间的 LO2 细胞代谢物存在明显差异,共鉴定出 5 个细胞代谢物峰面积显著下调,与细胞毒性强度的相关系数为 $-0.53 \sim -0.96$,5 个代谢物峰面积显著上调,与细胞毒性强度的相关系数为 $0.72 \sim 0.99$,代谢物包括磷脂类和脂肪酸类等,主要涉及甘油磷脂代谢、鞘脂代谢、脂肪酸氧化、花生四烯酸代谢和有丝分裂原激活蛋白激酶细胞凋亡等相关信号通路。史栋栋等^[55]在木犀草素抑制 MCF-7 细胞增殖的研究中,采用 GC-TOF/MS 对加药细胞和未加药细胞代谢物进行指纹图谱分析,结果显示共有 10 种细胞代谢差异物,推测木犀草素可能是通过阻碍核酸代谢中的磷酸戊糖途径抑制 MCF-7 细胞的增殖。

3.6 受体水平 细胞膜或胞内的受体能识别并特异地结合有生物活性的化学信号物质(配体),从而激活一系列生物化学反应,最终导致该信号物质特定的生物效应,如介导细胞间信号转导、细胞间黏合、胞吞等过程,也常常成为药物致毒的靶点。随着对受体研究的深入,许多高灵敏度检测技术被应用于受试药物的筛选,这使得基于受体的药物细胞毒性评价能够高效、快速地进行,也被成功应用于中药毒性研究。目前,常使用激光扫描共聚焦显微镜、高内涵细胞分析仪、蛋白免疫印迹法等来检测细胞受体水平的表达。WU 等^[56]在中药提取物白花丹素抑制多发性骨髓瘤细胞增殖的机制研究中,采用蛋白免疫印迹法检测自噬相关蛋白表达,发现其能够明显的抑制人多发性骨髓瘤细胞自噬相关蛋白表达,结果显示白花丹素能抑制细胞增殖,并通过下调 PI3K/Akt-mTOR 通路诱发细胞的凋亡。JI 等^[57]在乌头碱对人胰腺癌细胞凋亡的研究中,通过蛋白免疫印迹方法检测 MIacapa-2 和 PANC-1 细胞株凋亡调控因子 Bax, cl-Caspase-3, cl-Caspase-9 蛋白表达,结果显示乌头碱能下调抗凋亡因子的表达,其可能与影响 NF- κ B 信号传导通路有关。CAO 等^[58]在

川楝素抑制恶性胶质瘤细胞增殖的机制研究中,采用蛋白免疫印迹法检测恶性胶质瘤细胞株 U87 和 C6 的雌激素受体 β 和 p53 的表达,结果显示川楝素抑制恶性胶质瘤细胞增殖,其雌激素受体 β 和 p53 是评价恶性胶质瘤敏感度的生物标志物。LIU 等^[59]在蟾毒灵抑制胰腺癌细胞增殖的机制研究中,采用蛋白免疫印迹法检测细胞株 BePc3 和 Sw1990 的细胞周期相关蛋白 D1 和细胞周期蛋白 E1 的表达,结果显示蟾毒灵抑制细胞周期蛋白的表达,由此上调 p27 的表达,这可能是蟾毒灵抑制胰腺癌细胞增殖的作用机制之一。YU 等^[60]在中药方剂补中益气汤增强顺铂对肺癌细胞株 A549/DDP 细胞毒性的研究中,采用对凋亡相关蛋白和自噬相关蛋白 LC3-II 和 ATG7 表达的检测,表明补中益气汤能够通过激活细胞凋亡和自噬的氧化应激逆转顺铂的耐药性,以此增强顺铂对肺癌细胞株 A549/DDP 增殖抑制作用,而补中益气汤和顺铂的协同作用可能代表一种新颖的治疗非小细胞肺癌的临床治疗方法。

3.7 基因水平 在体外细胞毒性评价中,基因水平的检测主要是指基于报告基因技术对受试物进行的检测和筛选。报告基因筛选模型是利用转基因技术将目的基因与报告基因嵌合后导入受体细胞,然后检测受试物作用于这些细胞时基因的表达状况,以评价受试物对细胞毒性作用并筛选出目标物^[6]。WANG 等^[61]在中药臭灵丹提取物抑制流感病毒活性的研究中,通过细胞毒性实验评估其对流感病毒的抑制作用,采用实时荧光定量 PCR 和 Bio-Plex 悬液芯片技术检测细胞因子和趋化因子,结果显示臭灵丹提取物主要通过作用于病毒早期阶段的复制(0~6 h)来广泛抑制流感病毒活性。CHANG 等^[26]在中药车前草提取物芳香醇诱导白血病细胞和宫颈癌细胞的细胞周期阻滞研究中,采用基因芯片技术检测细胞凋亡可能存在的机制,结果显示芳香醇能促进淋巴瘤细胞株 U937 和宫颈癌细胞株 HeLa 基因 p53, p21, p27, p16, p18 的表达,诱导 U937 细胞 G_0/G_1 期周期阻滞和 HeLa 细胞 G_2/M 期周期阻滞。DU 等^[62]在体外实验参附注射液改变黑色素瘤免疫微环境的研究中,采用实时荧光定量 PCR 检测人黑色素瘤 A375 细胞 mRNA 的表达,并用酶联免疫吸附试验(ELISA)检测细胞因子白细胞介素-10(IL-10), TGF- β 和血管内皮生长因子(VEGF)的含量,结果显示参附注射液显著降低了 mRNA 的表达和免疫细胞因子的释放,表明参附注射液增加细胞毒

性,可能与其抑制免疫细胞因子的释放和抑制相关基因的表达有关,且参附注射液对免疫微环境的调节可为黑色素瘤提供辅助治疗。ZHANG 等^[63]在雷公藤多苷对肝脏潜在毒性的研究中,采用寡核苷酸微阵列检测肝脏基因表达的变化,并用 PCR 法检测过氧化物酶体增殖物激活受体(PPAR)的表达,结果显示总共 1 312 个基因发生显著变化,其中上调 582 个基因的表达。

多成分、多靶点、多途径是中药药物作用的代表性特征,同时也是造成中药研究难度大的关键所在,毒理芯片技术即是在解决此类问题的基础上诞生的,其原理是根据基因组技术和脱氧核糖核酸微阵列测定基因表达,特定基因的表达就可以作为被测样品毒性信息的标记物,常被用于药物毒理机制的研究和中药毒性的筛选以及预测^[64]。现阶段,多种较为成熟的毒理芯片也已经相继问世,美国国立环境卫生研究所(NIEHS)分子致癌机制实验室研发的一种名为 Tox Chip 的 DNA 芯片,能够灵敏地检测有害化学物质对人体基因表达的作用;Gen Logic 公司的 Flow-thru 芯片和其建立的庞大的基因表达数据库,能够用于检测药物对生物体的影响以及确认药物靶点并进行毒性预测^[65]。在中药毒理学研究中,运用毒理芯片技术可排除不必要的干扰因素,在基因表达水平上客观、形象地描述中药的毒性作用基因表达的相互影响,能够对准确地进行中药毒性的定性、定位及定量的整体评价^[66]。此外,中草药又以其多成分协同作用及代谢后不同机制的多途径多靶点协同作用为突出代表,在中草药抗癌药物的筛选中,体外细胞毒性实验也发挥了其不可替代的优势作用,以细胞信号为导向, DNA, 细胞构架及微管为靶点的定向新型抗癌药物的研究与开发。目前,基于分子水平和细胞水平的高通量药物筛选模型在抗肿瘤研究中应该较为广泛^[67-70]。

4 结语与展望

一方面,相对于动物养殖及动物实验操作的复杂性,体外细胞实验方法的确具有速度快、成本低等诸多优势,但是细胞毒性评价只是针对体外单细胞水平做出毒性评估,而受试动物就其代谢、免疫等系统则比单个细胞要复杂得多。中药的药效和毒性作用更是以整体性和与机体的互动为基础的,因此,基于体外细胞毒性实验的结果,只是一种潜在毒性,必须有整体动物实验的验证。而另一方面,随着现代分子生物学技术的快速发展,自动化检测技术和计算机技术的不断进步和引入,基于细胞分子水平的

体外细胞毒性评价方法将越来越灵敏,越来越高速、高效和低成本,对中药毒性机制的评价和潜在毒性的发现将具有越来越重要的意义。

[参考文献]

[1] 刘泰,张志伟. 中药毒理研究常用方法研究进展[J]. 中华中医药杂志,2014,29(1):205-207.

[2] 彭成. 中药毒理学的构建和内涵[J]. 中药与临床,2013,4(1):1-6.

[3] 罗超应,罗磐真,李锦宇,等. 基于复杂性科学探讨中药安全性[J]. 中华中医药杂志,2016,31(8):2929-2932.

[4] 潘国凤,朱晓新,张晓东. 系统生物学与中药有效组分的研究[J]. 世界科学技术—中医药现代化,2008,10(2):5-11.

[5] 刘昌孝. 系统生物学与中药现代研究(一)[J]. 天津中医药大学学报,2006,25(3):115-118.

[6] 刘涛,郭辰,赵晓红. 毒理学研究中的体外细胞毒性评价[J]. 生命科学,2014,26(3):319-324.

[7] Krewski D, Acosta Jr D, Andersen M, et al. Toxicity testing in the 21st century: a vision and a strategy[J]. J Toxicol Environ Health B Crit Rev, 2010, 3(2/4):51-138.

[8] Andersen M E, Krewski D. The vision of toxicity testing in the 21st century: moving from discussion to action[J]. Toxicol Sci, 2010, 117(1):17-24.

[9] 孙蓉,张丽美,尹建伟,等. 分子生物学技术在中药毒理学研究中的应用前景[J]. 药物警戒,2006,3(6):339-341.

[10] 彭成. 中药毒理学新论[J]. 中药与临床,2014,5(1):1-5.

[11] 彭成,王昌恩,林娜. 有毒中药毒效相关性基础研究的意义与实践[J]. 中药与临床,2008,24(1):71-73.

[12] 田代真一. 和汉药的实验的研究における诸问题-invit-rog 实验の問題[J]. 和汉医药学会志,1991(3):218-221.

[13] 王洪武,倪青,林兰. 中药含药血清的研究进展及其在中医学中的应用[J]. 北京中医药,2008,27(9):698-701.

[14] 陆海英,刘克剑,张悦,等. 中药抗纤灵方含药血清对 TGF- β_1 刺激的 HK-2 细胞 c-Met 及其下游 MAPK 信号分子的调控作用[J]. 中国病理生理杂志,2010,26(1):154-157.

[15] 俞发荣,谢明仁,张琛,等. 苍耳子药物血清对 H4 细胞毒性作用的实验研究[J]. 中国临床研究,2013,26(3):209-210.

[16] 邱华,陈月桥,石清兰. 白花香莲解毒方对 HepG2. 2. 15 细胞 HBV 表达和复制的影响[J]. 中华中医药杂志,2012,27(12):3228-3230.

[17] 成细华,程莉娟,绕春梅,等. 滋阴益气活血解毒中药含药血清对脂肪变性 HepG2 细胞 SREBP-1c 和 FAS 表达的影响[J]. 北京中医药大学学报,2014,37(12):812-815.

[18] 程源,王志斌,金家金. 以诃子为研究对象建立高内涵肝毒性分析方法与验证[J]. 中华中医药杂志,2016,31(30):1077-1080.

[19] 曲艳燕,吕秋军. 高通量细胞毒性筛选的研究进展[J]. 国外医学:药学分册,2002,29(4):237-241.

[20] 赵霞霞,郜瑞,李发荣. 基于细胞模型的高通量药物筛选[J]. 药物生物技术,2008,5(3):227-230.

[21] 李韶菁,杜冠华. 细胞水平的高通量药物筛选技术研究进展[J]. 中国药学杂志,2008,43(2):84-87.

[22] Boost M, Yau P, Yap M, et al. Determination of cytotoxicity of traditional Chinese medicine herbs, Rhizoma Coptidis, Radix Scutellariae, and Cortex Phellodendri, by three methods[J]. Cont Lens Anterior Eye, 2016, 39(2):128-132.

[23] SONG S J, LI L Z, GAO P Y, et al. Terpenoids and hexenes from the leaves of *Crataegus pinnatifida* [J]. Food Chem, 2011, 129(3):933-939.

[24] Le Roux K, Hussein A A, Lall N. *In vitro* chemopreventative activity of *Crotalaria agatiflora* subspecies *agatiflora* Schweinf [J]. J Ethnopharmacol, 2011, 138(3):748-755.

[25] XU K, PAN X, SUN Y J, et al. Psoralen activates cartilaginous cellular functions of rat chondrocytes *in vitro* [J]. Pharm Bio, 2015, 53(7):1010-1015.

[26] CHANG M Y, Shieh D E, CHEN C C, et al. Linalool induces cell cycle arrest and apoptosis in leukemia cells and cervical cancer cells through CDKs [J]. Int J Mol Sci, 2015, 16(12):28169-28179.

[27] Chik W I, ZHU L, FAN L L, et al. *Saussurea involucrata*: a review of the botany, phytochemistry and ethnopharmacology of a rare traditional herbal medicine [J]. J Ethnopharmacol, 2015, 172:44-60.

[28] 王跃华,何诗虹,郭翠平,等. 川贝母悬浮培养细胞活力测定条件的优化[J]. 西南农业学报,2014,27(4):1691-1694.

[29] 许希中,余进进. 鱼藤素对宫颈癌 HeLa 细胞生存活力和凋亡的影响[J]. 中国现代医学杂志,2014,24(7):10-13.

[30] 周思朗,屈艳妮,张健. 一种新的细胞计数方法磺基罗丹明 B 染色法[J]. 细胞与分子免疫学杂志,2005,21(5):663-664.

[31] 陈虹宇,谷仕艳,李欣洋,等. 双氢青蒿素对肿瘤细胞和正常细胞的毒性比较研究[J]. 现代预防医学,2017,44(2):301-305.

- [32] 汪美汐,王宇光,徐焕华,等. 何首乌中大黄素对 L02 肝细胞 CYP 亚酶表达及细胞毒性的影响[J]. 中国药理学通报,2016,32(11):1543-1548.
- [33] 齐晓艳,张波,余美玲,等. 三七皂苷 R₁ 通过细胞缝隙连接对顺铂细胞毒性作用的影响[J]. 蚌埠医学院学报,2012,37(20):134-136.
- [34] 孙平,张春辉,邱静. 莪术醇诱导小鼠黑色素瘤 B16-F10 细胞凋亡作用研究[J]. 中药药理与临床,2016,32(4):12-15.
- [35] 徐丽君,吴南丹,杨颖,等. 川芎嗪抑制人视网膜母细胞瘤 WERI-Rb1 细胞增殖的机制研究[J]. 广东医学,2016,37(18):2721-2724.
- [36] 任艳青,李葆林,田宇柔,等. 栀子、连翘等中药配方颗粒体外肝细胞毒性研究[J]. 河北中医药学报,2017,32(1):43-46.
- [37] 任历,杨伟,张诗缙,等. 大黄鞣质对人肾小管上皮细胞毒性作用及量-毒关系研究[J]. 中药药理与临床,2015,31(4):132-135.
- [38] CHENG F F, YANG Y J, ZHANG L, et al. A natural triterpene derivative from euphorbia kansui inhibits cell proliferation and induces apoptosis against rat intestinal epithelioid cell line *in vitro*[J]. Int J Mol Sci,2015,16(8):18956-18975.
- [39] 彭岳,苗维纳,赵铁建,等. 白花丹醌对人肝星状细胞的细胞毒性及其机制的研究[J]. 时珍国医国药,2016,27(1):5-7.
- [40] 翟晶,王艳红,高明堂,等. 蛇葡萄素钠对肿瘤细胞及正常细胞毒性作用的比较[J]. 中药药理与临床,2016,32(4):8-11.
- [41] LIANG L D, HE T, DU T W, et al. Ginsenoside Rg₃ induces apoptosis and DNA damage in human cervical cancer cells[J]. Mol Med Rep,2015,11(2):940-946.
- [42] 陈志红,龚先玲,刘义. 重楼总皂苷对人鼻咽癌细胞 CNE-2Z 周期及凋亡的影响[J]. 中成药,2011,33(1):25-29.
- [43] Gill S, Gill R, Lee S S, et al. Flux assays in high throughput screening of ion channels in drug discovery[J]. Assay Drug Dev Technol,2003,1(5):709-717.
- [44] SUN G B, SUN H, MENG X B, et al. Aconitine-induced Ca²⁺ overload causes arrhythmia and triggers apoptosis through p38 MAPK signaling pathway in rats[J]. Toxicol Appl Pharmacol,2014,279(1):8-22.
- [45] 李旻,李华,汪溪洁,等. 蟾酥心脏毒性研究进展[J]. 中国药理学与毒理学杂志,2016,30(5):605-609.
- [46] 贾元威,汪旻晖,谢海棠,等. 应用膜片钳技术研究豆腐果苷对 hERG 钾通道电生理功能的影响[J]. 中国临床药理学与治疗学,2015,20(3):252-255.
- [47] WANG X, ZHANG A, HAN Y, et al. Urine metabolomics analysis for biomarker discovery and detection of jaundice syndrome in patients with liver disease[J]. Mol Cell Proteomics,2012,11(8):370-380.
- [48] 汪春龙,郭苗苗,吴艺琦,等. 生物能量分析仪在肿瘤细胞生物能量代谢中的应用研究[J]. 中国细胞生物学学报,2016,38(9):1066-1076.
- [49] 王江容,吴成雄,胡宁,等. 新型细胞微生理计的软件设计与实现[J]. 传感技术学报,2012,25(9):1077-1183.
- [50] WANG J Y, LIANG Y L, HAI M R, et al. Genome-wide transcriptional excavation of dipsacus asperoides unmasked both cryptic asperosaponin biosynthetic genes and SSR markers[J]. Front Plant Sci,2016,7(348):339-352.
- [51] 郑屹,陈赛慧,叶薇,等. 高效液相色谱检测细胞能量代谢物质的方法建立与应用[J]. 科技通报,2012,28(7):46-50.
- [52] Cuperlović-Culf M, Barnett D A, Culf A S, et al. Cell culture metabolomics: applications and future directions[J]. Drug Discov Today,2010,15(15/16):610-621.
- [53] 谢辉辉,谢彤,徐建亚,等. 基于代谢组学方法研究乌头碱和苯甲酰乌头原碱对 BeWo 细胞的毒性机制[J]. 分析化学研究学报,2015,43(12):1808-1813.
- [54] 施洁瑕,马宏跃,段金廛,等. 应用代谢组学探讨茺花酯甲对人肝细胞 L02 的毒性作用[J]. 中国药理学与毒理学杂志,2013,27(4):704-709.
- [55] 史栋栋,王桂明,况媛媛,等. 细胞代谢组学用于木犀草素抑制 MCF-7 细胞的机制研究[J]. 分析化学研究学报,2014,42(8):1088-1093.
- [56] WU H, DAI X Z, WANG E R. Plumbagin inhibits cell proliferation and promotes apoptosis in multiple myeloma cells through inhibition of the PI3K/Akt-mTOR pathway[J]. Oncol Lett,2016,12(5):3614-3618.
- [57] JI B L, XIA L P, ZHOU F X, et al. Aconitine induces cell apoptosis in human pancreatic cancer *via* NF- κ B signaling pathway[J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci,2016,20(23):4955-4964.
- [58] CAO L, QU D, WANG H, et al. Toosendanin exerts an anti-cancer effect in glioblastoma by inducing estrogen receptor β -and p53-mediated apoptosis[J]. Int J Mol Sci,2016,17(11):1928.
- [59] LIU X, XIAO X Y, SHOU Q Y, et al. Bufalin inhibits pancreatic cancer by inducing cell cycle arrest *via* the c-Myc/NF- κ B pathway[J]. J Ethnopharmacol,2016,193:538-545.
- [60] YU N, XIONG Y, WANG C. Bu-Zhong-Yi-Qi decoction, the water extract of Chinese traditional herbal medicine, enhances cisplatin cytotoxicity in A549/DDP

- cells through induction of apoptosis and autophagy[J]. Bio Med Res Int,2017,doi:10.1155/2017/3692797.
- [61] WANG Y T,ZHOU B X, LU J G, et al. Inhibition of influenza virus *via* a sesquiterpene fraction isolated from *Laggera pterodonta* by targeting the NF- κ B and p38 pathways[J]. BMC Complement Altern Med,2017,17(1):25.
- [62] DU J, CHENG B C, FU X Q, et al. *In vitro* assays suggest Shenqi Fuzheng injection has the potential to alter melanoma immune microenvironment [J]. J Ethnopharmacol,2016,194:15-19.
- [63] ZHANG Y, JIANG Z, XUE M, et al. Toxicogenomic analysis of the gene expression changes in rat liver after a 28-day oral *Tripterygium wilfordii* multiglycoside exposure [J]. J Ethnopharmacol, 2012, 141 (1): 170-177.
- [64] YUAN W, CHENG X, WANG P, et al. *Polytrichum commune* L. ex Hedw ethyl acetate extract-triggered perturbations in intracellular Ca²⁺ homeostasis regulates mitochondrial-dependent apoptosis [J]. J Ethnopharmacol,2015,172:410-420.
- [65] 王全军,廖明阳. 毒理芯片技术在药物毒理学中的应用[J]. 国外医学:药学分册,2003,30(2):110-113.
- [66] Cheek B J, Steel A B, Torres M P, et al. Chemiluminescence detection for hybridization assays on the flow-thru chip, a three-dimensional microchannel biochip[J]. Anal Chem,2001,73(24):5777-5783.
- [67] Zanela F, Lorens J B, Link W. High content screening: Seeing is believing [J]. Trends Biotechnol, 2010, 28 (5):237-245.
- [68] Comley J. High content screening [J]. Drug Discov World,2005,6(3):31-53.
- [69] Zheng W, Thorne N, Mckew J C. Phenotypic screens as a renewed approach for drug discovery [J]. Drug Discov Today,2013,18(21):1067-1073.
- [70] 孙蓉,张丽美,王丽,等. 毒理芯片技术在中药毒理学研究中的应用及前景[J]. 药物警戒,2008,5(3):158-161.

[责任编辑 张丰丰]