

· 综述 ·

# 毒理学技术在中药保健食品评价应用中的研究进展

李晗<sup>1</sup>, 张广平<sup>1</sup>, 雷蕾<sup>2</sup>, 陈腾飞<sup>1</sup>, 叶祖光<sup>1\*</sup>

(1. 中国中医科学院 中药研究所, 北京 100700;

2. 中国中医科学院 中医药信息研究所, 北京 100700)

**[摘要]** 我国中医药宝库含有丰富的可以药食两用的中药,以该类中药作为原料是指导中药保健食品研制的基础。在养生和降低疾病发生风险方面,中药保健食品具有诸多优势。同时伴随国家“健康中国2030”的实施,急需开发一系列具有中医药特点的中药复方保健食品,满足国家及社会需求。随着现代化科学研究水平不断提高,但是中药保健食品原料的安全性科学评价方面研究缺乏,造成目前保健食品风险评估理论与技术严重不足。因此对此类原料中重要成分的毒性预警与评价已成为的食品安全问题的当务之急。毒理学在人类健康风险评估中具有重要作用,毒理学的分支学科也不断涌现。计算毒理学技术,单层培养细胞模型的体外预警与评价技术,体外诱导活性筛选工程细胞株的体外预警与评价技术,微流控芯片技术的体外预警与评价技术与体内毒理学技术等已成为该领域毒性预测与评价的重要研究工具。毒理学技术的迅速发展,使食品安全和人类生命健康得到有力的保障,并将有效促进我国保健食品产业的安全生产,保障终端产品的品质和安全,不仅具有巨大社会意义,也对整个行业的技术进步有积极的引领作用,并产生可观的经济效益。本文就近段时间以来可用于预测与评价中药保健食品原料中的重要成分的毒理学新方法与应用作一综述。

**[关键词]** 中药保健食品; 毒理学; 计算毒理学; 体外模型; 动物模型

**[中图分类号]** R22;R242;R2-031;R285.5;R287 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2020)06-0201-08

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfx.20192423

**[网络出版地址]** <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20190903.1344.006.html>

**[网络出版时间]** 2019-09-03 14:11

## Toxicological Technology in Evaluation and Application of Traditional Chinese Medicine Healthcare Food

LI Han<sup>1</sup>, ZHANG Guang-ping<sup>1</sup>, LEI Lei<sup>2</sup>, CHEN Teng-fei<sup>1</sup>, YE Zu-guang<sup>1\*</sup>

(1. Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China;

2. Institute of Information on Traditional Chinese Medicine, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China)

**[Abstract]** China is rich in herbs that can be used as medicine and food. The application of this kind of traditional Chinese medicine (TCM) as raw material is the basis for guiding the development of TCM healthcare food. TCM healthcare food has advantages in keeping in good health and reducing the risk of disease. At the same time, with the implementation of "Healthy China 2030", it is urgent to develop a series of herbal compound healthcare food with the characteristics of TCM to meet the national and social needs. With the development of scientific research, however, there is a lack of research on the scientific evaluation of the safety of TCM healthcare food raw materials, which results in insufficient risk assessment theory and technology of healthcare food at present. Therefore, the prediction and evaluation of the toxicity of important components in this kind of raw materials has become an urgent task of food safety. Toxicology plays an important role in human health risk assessment, and its

**[收稿日期]** 20190514(006)

**[基金项目]** 国家重点研发计划项目(2018YFC1602103)

**[第一作者]** 李晗,博士,助理研究员,从事中药药理研究,Tel:010-84252805,E-mail:wzf38@126.com

**[通信作者]** \*叶祖光,博士生导师,研究员,从事中药药理研究,Tel:010-84252805,E-mail:yezuguang@vip.sina.com

sub-disciplines have been constantly emerging. Computational toxicology, monolayer culture cell model technology, *in vitro* induced activity screening engineering cell technology, microfluidic chip technology and *in vivo* toxicology technology have become important research tools for toxicity prediction and evaluation in this field. With the rapid development of toxicology technology, food safety and human life and health can be effectively guaranteed. It will effectively promote the safety production of healthcare food industry in China and guarantee the quality and safety of terminal products. It has a great social significance, plays a positive leading role in the technological progress of the whole industry, and generates considerable economic benefits. This paper reviews recent advances and applications of new toxicological methods and models for predicting and evaluating important ingredients in TCM healthcare food raw materials.

[ **Key words** ] traditional Chinese medicine functional food; toxicology; computational toxicology; *in vitro* model; animal model

自 20 世纪 80 年代以来,保健食品作为一类适宜于特定人群食用,不以治疗疾病为目的,并且对人体不产生任何急性、亚急性或者慢性危害,具有调节机体功能的食品<sup>[1]</sup>,在我国食品领域上飞速地发展起来。“药食同源”为中医理论的重要组成部分,也是指导中药保健食品研制的基础<sup>[2]</sup>。因此以含有药食两用原料以及中药为主,研发的带有我国传统中医特色的保健食品在养生保健行业发挥着举足轻

重的作用。同时作为一种特殊食品,其不同于药品的食用特点在于其服用时间更长、受用人群更广。若中药保健食品中的原料有不安全因素,则对人类健康影响更大<sup>[3]</sup>,列举部分中药保健食品的重要成分及其潜在的毒性作用(表 1)。针对中药保健食品注册数量不断增加的现状,本文将用于对中药保健食品中重要成分的毒理学预警与评价技术的研究进行综述。

表 1 中药保健食品原料典型风险物质及其潜在的毒性作用

Table 1 Typical risk substances and potential toxicity of traditional Chinese medicine healthcare food

药材名称	潜在毒性成分	潜在毒性作用
人参	人参皂苷 Rb <sub>1</sub>	胚胎毒性,给药质量浓度 $\geq 15 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,卵黄囊生长受抑制,血管分化不良;浓度较高时,可诱发胚胎畸形,包括脑部发育异常、体位未翻转、心包腔扩大等,严重者可见腹凸 <sup>[4]</sup>
三七	三七总皂苷	肝毒,三七总皂苷 $450 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 组动物体质量显著下降,肝功能指标天门冬氨酸氨基转移酶(AST)和丙氨酸氨基转移酶(ALT)显著升高,组织病理学检查出现肝细胞及肾小管上皮细胞变性、坏死 <sup>[5]</sup>
何首乌、决明子、番泻叶、大黄	蒽醌类成分	肝肾毒性,大黄提取物的毒性剂量范围 $10 \sim 12 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ ,大黄总蒽醌的毒性剂量范围在 $135 \sim 4\ 500 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ <sup>[6]</sup> ;肠毒性,决明子乙醇提取物 $5, 25, 35, 45 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 剂量组均能使大鼠结肠、直肠、肠系膜淋巴结色素沉积,肠系膜淋巴结反应性增生 <sup>[7]</sup>
苦杏仁、桃仁、郁李仁	苦杏仁苷	苦杏仁苷对人的毒性在 $0.5 \sim 3 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ,中毒表现为头疼、呕吐、恶心、腹胀痛、头晕、身体变虚弱、意识模糊、抽搐、心跳变慢 呼吸衰竭、昏迷,甚至死亡 <sup>[8]</sup>
吴茱萸	吴茱萸碱、吴茱萸次碱	肝毒性, $2.4 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 吴茱萸次碱使肝细胞活力均下降,且 $4 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 吴茱萸次碱使肝细胞上清液中的 AST、ALP 和乳酸脱氢酶(LDH)水平均升高。小鼠静脉给予 $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 吴茱萸次碱 7 d,血清中的碱性磷酸酶(ALP)水平有显著的上升,病理学检查发现约 1/3 的小鼠肝脏出现肝细胞核分裂增多 <sup>[9]</sup>
薄荷	薄荷醇	脑损伤,大鼠口服薄荷油 $100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 28 d,发展成剂量依赖型脑损伤即小脑内形成脓胞样空洞 <sup>[10]</sup>
蒺藜	蒺藜皂苷	肝毒性,生蒺藜高、低( $72, 18 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ )剂量组的 ALT、AST 水平与正常组相比显著升高,肝组织呈现明显的病理学变化 <sup>[11]</sup>

### 1 计算毒理学在毒性预警中的应用

近段时间以来,有关中药保健食品原料的安全性问题已成为社会讨论的热点事件。与此同时,原料中所含有中药的不良反应和毒性也成为当今学术

界研究的难点之一。基于复杂中医药理论体系指导下的中药保健食品毒性预警与评价难度大,并且传统毒理学实验周期长、成本高、通量低,剂量效应外推困难,无法满足保健食品的毒性测试需求<sup>[12]</sup>。

计算毒理学 (computational toxicology) 已经在合成药物毒性安全性评价中得到广泛应用<sup>[13]</sup>。国外文献报道显示,计算毒理学除应用于合成化学成分之外,亦可用于天然化学成分的毒性预测,这为中药保健食品原料中风险物质的计算预警研究提供了基础。计算毒理学作为一门应用数学及计算机模型来预测、阐明化合物的毒副作用及作用机制的学科,致力于对受试物化学结构与其毒性对应关系的方法进行深入研究,以便进行受试物毒性的预测实验<sup>[14]</sup>。

定量构效关系 (QSAR) 可通过使用数学模型来描述分子结构和分子的某种生物活性特别是毒性效应之间的联系,用来预测其他已知结构化合物的潜在毒性<sup>[15]</sup>。李雅秋等<sup>[16]</sup>从 Side Effect Resource 数据库和 Toxicity Reference Database 数据库收集了 789 个不具有心脏毒性的化合物以及近 1 200 个具有心脏毒性的化合物作为 QSAR 的训练集,用于构建有关中药化学成分心脏毒性的定量构效关系模型,该模型采用 ADMET Predictor 软件对描述符进行计算、筛选后,利用人工神经网络构建 QSAR 模型,内部验证结果表明该模型灵敏度为 78%,特异度为 77%,约登指数和马修斯相关系数均为 0.54。高雅等<sup>[17]</sup>运用 PC 微机构建中草药中重要成分 QSAR 模型预测毒性数据库。该数据库包含了化学结构式子库、基本化学信息子库、毒性实验数据子库和毒性 QSAR 预测数据子库这 4 个子库。该数据库可对中药成分的毒性评价的方式进行探索,推进中草药成分的毒性识别工作以及中药现代化的进程。雷蕾等<sup>[18]</sup>采用 Mold2 软件对训练集中 105 个和测试集中 25 个化学成分进行分子描述符计算,并采用随机森林算法和支持向量机算法构建模型,筛选出最优模型用于进行中药化学成分与药物代谢酶 CYP2C19 相互作用预测研究。该模型对 2010 年版《中国药典》中 10 个大毒中药(天仙子、马钱子、斑蝥等)所含的化学成分进行了预测,发现斑蝥中的 3 个成分具有抑制 CYP2C19 的作用,提示斑蝥单味药材可能会对 CYP2C19 产生抑制作用。在临床联合用药时,可能会引起不良的药物相互作用。

目前,计算毒理学在我国中药领域的应用研究尚属新兴阶段,在我国保健食品领域尚未开展。采用计算毒理学方法可高效地对受试物中进行危险评定、药物开发和监管决策,但由于此品类物质所含成分具有冗杂的特性,使得该部分的毒性预测工作更具有挑战。

## 2 体外毒理学在毒性评价中的应用

现阶段,体外实验已经成为应用于中药保健食品中重要成分的主要实验方法之一<sup>[19]</sup>。随着科技的发展,国际上已大规模地使用培养细胞进行受试物体外毒性的早期预警与评价研究<sup>[20]</sup>,研究者从细胞生长、增殖活性、细胞周期、细胞形态、细胞代谢功能和细胞的转运功能、细胞结构损伤和细胞凋亡等多个方面进行受试物对机体毒性预警与评价实验。

**2.1 单层培养细胞模型的体外预警与评价方法**  
单层培养的肝毒性预警与评价细胞系主要有以原代肝细胞, L-02, HepG2 和 Hepa RG 等细胞为平台。单层培养的肾毒性预警与评价细胞系主要有原代肾细胞,人肾小管上皮细胞系 HK-2 和 HC,猪肾小管上皮细胞系 (LLC-PK1),犬肾小管上皮细胞 (MDCK) 等(表 2)。研究多采用 MTT 比色法检测受试物对细胞活性的半数抑制浓度 ( $IC_{50}$ ),结合培养液中各个酶指标的变化数据,作为该毒性效应标志物;并且实验利用已知公认的毒物对该方法进行验证。戴伟等<sup>[21]</sup>选用人原代肝细胞、人原代肾细胞、中国仓鼠肺成纤维细胞和 HepG2 细胞为平台,用噻唑蓝 (MTT) 比色法检测常见保健食品原料大黄、苍术、红花的水提物对细胞活性的  $IC_{50}$ 。同时用生化学方法检测培养液中 ALT, AST, LDH 指标的变化。实验发现大黄和苍术水提液对原代肝、肾细胞的  $IC_{50}$  和酶漏出量明显升高时的浓度,与 CHL 和 HepG2 细胞相近,在此实验条件下,未表现出对肝、肾细胞存在靶毒性;红花对原代肾细胞的  $IC_{50}$  与 CHL 与 HepG2 细胞相近,但相关酶漏出量显著升高时的质量浓度 ( $0.003 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 低于 CHL 与 HepG2 细胞,提示红花在低浓度可引起肾细胞的损伤。王子建等<sup>[22]</sup>利用 MTT 比色法测定何首乌水提取物及其主要成分二苯乙烯苷、大黄素-8-O- $\beta$ -D-葡萄糖苷、大黄素和大黄素甲醚对 L-02 细胞活力的影响,实验发现随着药物浓度的增加,何首乌水提取物和大黄素对细胞活力的抑制效果增强,  $IC_{50}$  分别为  $7.290 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  和  $0.082 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ,同时二苯乙烯苷、大黄素-8-O- $\beta$ -D-葡萄糖苷和大黄素甲醚在实验浓度范围内对 L-02 细胞活力的抑制作用不明显。

**2.2 体外诱导活性筛选工程细胞株的体外预警与评价方法**  
HepG2 细胞是最有代表性和使用频率最高的细胞系,同时细胞表面有大量的 IGF II 受体表达<sup>[23]</sup>,但是在普通培养条件下,细胞中几乎难以检测到 CYP450。人体特别是肝脏中含有多种氧化酶和结合酶,其中 CYP450 作为人体重要的 I 相代

表 2 单层培养细胞模型

Table 2 Monolayer culture cell model

体外模型	靶器官	优点	缺点
HepG2	肝脏	常用的一种肿瘤细胞系,培养简单,可以对受试物引起肝损伤的毒性剂量进行合理估计	细胞色素 P450(CYP450),转运体等表达量低,难以检测
L-02	肝脏	正常成人肝细胞系,存在紧密连接和桥粒,拥有典型的肝细胞形态学特征	转运体及相关酶含量低,难以进行诱导实验
HepaRG	肝脏	具有类似肝脏祖细胞的双向分化能力,且增殖能力较强	培养过程相对复杂,花费较大
原代肝细胞	肝脏	相关功能蛋白表达及维持方面均优于传代细胞系	获取工作复杂,存活时间短,无法维持肝细胞的极性和代谢功能
HEK293	肾脏	人源的永生化细胞系,增殖能力较强	来源不明且具有不期望的特征不用于体外肾毒性评价
HK-2	肾脏	人源的永生化细胞系,表达近端小管特异的刷状边缘酶,上皮细胞标志物以及单羧酸转运体 I 和基底转运体	缺少单层膜基底侧转运体影响药物吸收
原代肾近端小管细胞	肾脏	药物代谢酶,如谷氨酰半胱氨酸合成酶,谷酰基转移酶, GST 和 CYP450 高表达	获取工作复杂,存活时间短,个体差异传代过程中功能改变

谢酶系统,其对内源物与外源物的代谢过程和相互作用发挥着重要影响<sup>[24]</sup>。CYP450 诱导的主要机制为配体依赖性的核受体及其转录因子介导的靶基因调控转录水平的改变。李晗等<sup>[25]</sup>构建含有药物代谢酶启动子的 pGluc-CYP1A1/2B6/3A4 分泌型荧光素酶报告基因质粒和含有芳香烃受体(AhR),组成雄甾烷受体(CAR)和孕烷 X 受体(PXR)核受体编码区序列的表达质粒 pcDNA3.1-hAhR/CAR/PXR,并将表达质粒与报告基因质粒共同转染 HepG2 细胞,建立了具有筛选功能的体外诱导活性筛选工程细胞株,并利用该细胞株对常见的 5 类中药中所含 26 种单体成分进行筛选。发现人参皂苷 Rc, Re, Rf 和 Rg<sub>1</sub> 均有诱导 CYP1A1 作用;补骨脂中的 4 种单体成分补骨脂素、异补骨脂素、补骨脂二氢黄酮与异补骨脂查尔酮均有诱导 CYP2B6 作用;乌头碱、新乌头碱、次乌头碱、乙酰乌头碱、乌头原碱和苯甲先酰乌头碱均可降低 CYP3A4 荧光素酶活性。此结果提示使用这些中药单体成分作为保健食品,长期服用极有可能对人 CYP450 的产生影响,当这些成分与经过 P450 酶代谢药物同时服用或前后贯用可能会引发药物药物相互作用。王君燕等<sup>[26]</sup>选用人基因组 DNA 为模板扩增得到 UGT1A1 的近端和远端启动子序列,将其连接到 pGL3 载体后构建 pGL3-PXRE 重组质粒,并将其与 PXR 表达质粒共同转染 HepG2 细胞后,筛选了南五味子、金银花、白术、苍术、甘草、何首乌、川芎、赤芍和银杏叶提取物等常见的中药保健品原料,结果显示南五味子、白术和川芎提取物能激活 PXR,启动 UGT1A1 的转

录,从而说明以上几种中药对 UGT1A1 具有潜在的诱导作用。而金银花、甘草、何首乌、苍术、赤芍和银杏叶的提取物对 PXR 没有激活作用。该体外诱导活性筛选工程细胞株不仅可用于对药物代谢酶的活性进行检测,还能用于为研究这种诱导作用的机制提供思路。该技术现可以大规模筛查通过激活 AhR/CAR/PXR 进而上调 CYP1A1/2B6/3A4 表达的化合物,用于对食物-药物或者药物-药物相互作用的潜在可能性进行预测。

**2.3 三维立体(3D)细胞模型的体外预警与评价方法** 现阶段,研究者大量使用单层培养模型,该模型操作简单,检测迅速,但由于二维(2D)培养的细胞缺乏细胞之间接触和细胞与胞外基质间的联系,处于无极化形态,培养一段时间即出现生长抑制,丧失了器官的异质性<sup>[27]</sup>,该模型局限于急性受试物毒性的检测,不适用于长期重复的研究工作<sup>[28-30]</sup>。三维立体(3D)细胞模型是利用具有三维结构的不同材料的载体与不同种类的细胞共同培养的<sup>[31-32]</sup>,该模型可以实现细胞在载体的立体空间中生长、迁移,构成三维的细胞-载体复合物。现已被证实多种 3D 细胞均能够较好的维持其极化状态与细胞功能,相比于 2D 细胞,该类型细胞更适合于进行长时间的培养<sup>[33-34]</sup>。李丹丹等<sup>[35]</sup>采用磁悬浮 3D 培养技术通过优化 3D HepG2 细胞单个球体的细胞数量、培养时间及培养基体积成功建立了 3D 细胞模型。实验发现,相比于 2D 细胞,该模型中大多数 I 相, II 相药物代谢酶、核受体、药物转运体及与肝细胞相关的特异标志性分子 ALB 均呈现高表达,并且该模型还

具有强大的糖原储存功能,因此该模型能持续培养 7 d 以上,故与 2D 细胞模型相比更符合中药保健食品的实际使用情况。李婷婷等<sup>[36]</sup>利用液滴重叠法构建 HepG2 和 L-02 的 3D 细胞模型,HepG2 和 L-02 细胞白蛋白表达分别提高 6.7 和 2.5 倍,且在 21 d 时,尿素生成水平分别提高 15.5 和 8.3 倍,实验发现 HepG2 细胞构建的 3D 细胞模型优于 L-02 细胞。研究者利用该模型对何首乌中易感物质顺式二苯乙烯苷 (*cis*-SG) 的肝损伤作用进行评价,研究发现在 3D 细胞模型上采取单次给药方式,其 IC<sub>50</sub> 为已知阳性药环孢霉素的 1.9 倍,并且其光学异构体反式二苯乙烯苷 (*trans*-SG) 的 IC<sub>50</sub> 为 *cis*-SG 的 4.1 倍,结果显示与前期整体动物水平的毒性强弱相符,*cis*-SG 在 3D 细胞模型上采用重复给药方式的 IC<sub>50</sub> 进一步降低,推测长期大量使用何首乌可能增大肝损伤作用。

**2.4 微流控芯片技术的体外预警与评价方法** 超高通量化、微量化、均质检测以及可以进行多靶点、多指标及多通道检测均为细胞水平风险物质的筛选的优点,有利于全面了解药物的作用途径和作用机制。在中药保健食品风险物质中所含的大量化合物进行快速、高效筛选的同时,如何兼顾降低试剂消耗与成本是体外模型发展过程的重要目标。现阶段常用的体外筛选与评价方法存在一些局限,如 96,384 孔板等试剂耗损量大、加样过程繁琐难和样品分配度较大、相对应的检测仪器昂贵等。而基于微机电加工技术的微流控芯片技术是指将常规生物和化学相关领域中所涉及的样品制备、分离、反应、检测等基本操作单元集成或基本集成到一块面积只有几平方厘米大小的芯片上<sup>[37-39]</sup>,这种芯片具有高速筛选功能并且拥有试剂消耗少、易于集成等一系列优点。伴随生物学科技的不断进步,在药物筛选与评价领域中,微流控芯片技术已经涵盖了从分子到整体各个水平。针对分子水平,该技术可深入研究核酸、蛋白质和微量酶以及其相互作用的机制;针对细胞水平,利用该技术独特的封闭且稳定的培养环境及体外操作技术可用于细胞之间或细胞与外界微环境之间相互作用机理的研究;针对整体水平,该技术可对微小生物的生理过程和机能进行严密可控研究<sup>[40]</sup>。细胞水平微流控芯片毒性预警系统旨在通过构建具有不同种类的芯片来对细胞进行培养,同时给与受试物,并利用自动化的装置进行检测,收集受试物与细胞相互作用的数据,从而对受试物进行分析、筛选。近段时间以来,在药物合成与筛选、疾病诊断

与治疗等生命科学领域,微流控芯片技术得到了广泛应用,并已成为本世纪最炙手可热的科学技术之一<sup>[41-42]</sup>。研究发现微流控芯片分析技术用于天然产物活性成分的筛选是可行的,并且具有很大的优越性。有研究利用微流控芯片技术,选择小蓟不同部位的提取物抗肺癌活性作为基础,同时建立小蓟不同用药部位的指纹图谱,通过灰色关联度的分析方法对小蓟不同部位的成分与药效进行“谱效关系”分析,并采用对照品比较验证,对小蓟诱导肺癌 A549 细胞凋亡用药部位进行了精准分析<sup>[43-44]</sup>。李中玉<sup>[45]</sup>利用微流控芯片技术设计并构建了基于器官环境模拟的仿生的肾小球模型,整合的肝-肾模型以及含有肝、乳腺癌细胞、肺癌细胞和胃上皮细胞多细胞共培养模型,为受试物测试等研究提供了重要的体外毒理学评价体系。张潇丹<sup>[46]</sup>建立了基于微流控芯片技术的细胞水平的抗氧化活性分析和 5-LOX 抑制活性分析的细胞芯片和测试系统,并选择款冬花不同提取物为研究样本,系统的测试和比较了款冬花不同提取物对低浓度内源性自由基及高浓度自由基的清除作用,并且深入研究了其对 5-LOX 抑制活性,该分析结果对款冬花有效部位的分离及临床用药有一定的指导意义。

### 3 体内毒理学在毒性评价中的应用

以离体细胞或组织为主要代表的体外评价模型仅仅反映出药物在某一特定生理过程中产生的毒性作用,而整体生理过程部分并不能较好地模拟;毒理学评价模型的经典方法是以啮齿类动物模型为基础的体内评价模型,实验并以发病率、死亡率、脏器系数、生化指标和组织病理结果等作为毒性检测终点,该种类的模型可从整体水平上对受试物的毒性作用进行直观地反映<sup>[47]</sup>。

早在 20 世纪 50 年代,由我国中央卫生研究院营养学系与卫生部药品生物鉴定检定所率先开展了食品毒理学研究,其中特别关注利用动物模型进行急性毒性实验方法的研究,研究主要包括各种途径的 LD<sub>50</sub> 测试,LD<sub>50</sub> 计算方法的探讨<sup>[48]</sup>。与此同时,随着我国经济的快速提升和科学技术的飞速发展,我国已相继建立了基于动物模型的急性毒性、长期毒性、蓄积毒性、生殖发育毒性与遗传毒性等毒性评价方法<sup>[49]</sup>。瞿飘飘<sup>[50]</sup>利用 ICR 小鼠和 SD 大鼠模型考察了紫皮石斛洋参片的急性毒性和 30 d 喂养实验。实验发现,ICR 小鼠和 SD 大鼠持续到实验结束均未出现中毒症状和死亡情况,且体质量均稳定增加,急性毒性实验结果判定紫皮石斛洋参片的大、

小鼠雌、雄性经口毒性最大耐受剂量为  $16 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ ，为无毒级；30 d 喂养实验结果显示，各剂量组，大鼠体质量、周摄食量与对照组比较均无显著性差异，说明低、中、高 3 个给药剂量组各项指标均未见与紫皮石斛洋参片呈现相关的毒性反应，可判定紫皮石斛洋参片 30 d 喂养实验结果为阴性。贾秀秀等<sup>[51]</sup>利用 ICR 小鼠和 Wistar 大鼠模型考察了人参林蛙油类保健食品食用安全性，结果显示该受试物小鼠急性毒性实验属无毒级；小鼠骨髓细胞微核试验结果阴性，表明该受试物未见致突变作用；对小鼠精子无致畸作用。30 d 喂养未见异常，Ames 实验结果阴性，以上结果说明在一定实验剂量范围内该保健品对实验动物机体未见明显的毒性作用，无致突变作用。

在利用动物模型进行保健食品的安全性评价实验时，对某种原料物质致癌性与致突变性的判定是安全性评价工作中极为重要的一部分<sup>[52]</sup>。通过致突变性的筛选实验，可以最大限度的减少人类通过饮食摄入“三致”物质的可能性，降低畸胎和肿瘤的发生率。长期的肿瘤流行病学研究以及动物致癌实验是目前传统的致癌物的评价手段，但该类工作量繁重，花费巨大。同时由于“三致”物质诱发的基因突变对完整的动物表型可能存在潜在的影响，并且由于组织特异性的差异性及相关内源性基因不敏感，需要选用更为合适的模型来判定某种物质是否具有致突变性<sup>[53]</sup>。

现阶段越来越多的转基因动物用于致突变检测模型的构建，该模型可用于测定受试物的致突变性。该技术是通过多重复制染色体中载体的报道基因来对突变进行检测，实验多利用观测突变的频率和突变的分子机制来对突变评估，同时其能够对突变发生的靶器官与化学致癌物的靶器官是否相一致进行判定，并且可以实现致突变性和致癌力相关性的定量分析<sup>[54]</sup>。近年，我国成功构建了 xylE/ICR 转基因小鼠致突变检测模型，并同时构建了多种转基因致突变测试系统<sup>[55-56]</sup>。

#### 4 小结与展望

“药食同源”是我国古人在食物和药物发现与使用过程中的智慧结晶。美国是全球最大的膳食补充剂 (dietary supplement) 市场，在产品类别、原料及形态等方面，美国膳食补充剂与我国的保健食品具有某种程度的相似性。在美国，膳食补充剂是指以维生素、氨基酸、矿物质、草药 (或其他草本植物) 或以上成分经浓缩、配方、提取或混合后形成的产品，以便提高人体每日总摄入量，进而补充膳食。在原

料监管方面，如果厂家使用新膳食成分，则应严格按照《21CFR 190.6 膳食补充剂新原料上市前备案要求》，在上市前至少 75 d 向 FDA 提交安全性资料进行备案<sup>[57]</sup>。并由企业进行相关证明或者委托 FDA 请有关单位对新膳食成分进行安全性评价，判断原料成分是否安全。然而，目前我国的保健食品原料标准均为企业自拟标准，未进行统一管理。中药保健食品作为食品产业的重要组成部分，急需一套针对中药保健食品中原料典型风险物质进行毒理学预测与安全性评价的研究。笔者认为，针对中药保健品毒性物质的早期预警、早期发现阶段适宜采用计算毒理学。研究者可通过全面收集国内外有关中药化合物毒理数据以及对化学毒性预测模型的改进，可构建一套适用于中药保健品毒性预测的计算机系统。该系统可以预测和筛选受试物的毒性，为后续的毒性实验提供优先导向，并为其风险评估提供有价值的初步信息。接下来，研究者可以选用体外诱导活性筛选工程细胞株，3D 细胞模型和微流控芯片等代替传统的毒理学体外实验技术，阐明中药保健食品风险物质的毒性作用模式，为获得安全风险评估与防控技术提供理论依据。最后选用以啮齿类动物模型代表的经典毒理学评价模型开展急性毒性、亚急性毒性和亚慢性毒性等整体实验动物研究。该思路践行 21 世纪毒性测试理念，将人源细胞系，3D 组织培养和器官芯片等替代毒理学方法与生物信息学、数据挖掘和计算机科学技术相结合，再选用我国丰富的药食同源原料，结合传统中医药文化的优势，研发质量安全可靠，且具有确切中医体质辨识的功效的中药保健食品，确保我国保健食品的蓬勃发展，推动我国特色中医药在国际上的影响力。

#### [参考文献]

- [1] 田明,房军.中国保健食品原料管理基本现状及改进建议[J].食品与机械,2019,35(1):12-14,119.
- [2] 单峰,黄璐琦,郭娟,等.药食同源的历史和发展概况[J].生命科学,2015,27(8):1061-1069.
- [3] 赵梓邯,张琳,李文斌,等.中药毒性与安全性评价研究进展[J].中国实验方剂学杂志,2018,24(20):208-216.
- [4] 柳鹏,许雅君,殷惠军,等.人参皂苷 Rb<sub>1</sub> 对小鼠胚胎发育毒性的体外实验研究[J].卫生研究,2005,34(2):175-177.
- [5] 韩刚,孙辉业,董延生,等.三七总皂苷对大鼠肝脏肾脏的毒性作用[J].中国新药杂志,2006,15(24):2115-2118.

- [ 6 ] 邓诺. 大黄及其总蒽醌肝肾毒性研究[D]. 北京: 中国中医科学院, 2018.
- [ 7 ] 高芑, 隋海霞, 刘海波, 等. 决明子乙醇提取物的亚慢性毒性研究[J]. 中国食品卫生杂志, 2004, 16(5): 410-415.
- [ 8 ] PEREZ J J. Amygdalin analogs for the treatment of psoriasis[J]. Future Med Chem, 2013, 5(7): 799-808.
- [ 9 ] 张茜, 周绮, 金若敏, 等. 吴茱萸次碱对肝肾毒性的初步研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(8): 221-225.
- [ 10 ] NAIR B. Final report on the safety assessment of *Mentha piperita* (peppermint) oil, *Mentha piperita* (peppermint) leaf extract, *Mentha piperita* (peppermint) leaf, and *Mentha piperita* (peppermint) leaf water [J]. Int J Toxicol, 2001, 20 (Suppl. 3): 61-73.
- [ 11 ] 曲福舟, 李欢欢, 王运浩, 等. 蒺藜炒制对长期给药大鼠肝肾毒性的影响[J]. 山东中医杂志, 2016, 35(4): 347-349.
- [ 12 ] 徐海滨. 毒理学的发展是实施食品安全保障的技术支撑[J]. 中国食品卫生杂志, 2009, 21(4): 304-308.
- [ 13 ] LUECHTEFELD T, ROWLANDS C, HARTUNG T. Big data and machine learning to revamp computational toxicology and its use in risk assessment [J]. Toxicol Res, 2018, 7(5): 732-744.
- [ 14 ] 姚碧云, 周宗灿. (Q)SAR 方法在毒性预测中的应用和进展[J]. 毒理学杂志, 2015, 29(6): 406-410.
- [ 15 ] HUANG S H, TUNG C W, FÜLÖP F, et al. Developing a QSAR model for hepatotoxicity screening of the active compounds in traditional Chinese medicines [J]. Food Chem Toxicol, 2015, 78(4): 71-77.
- [ 16 ] 李雅秋, 王旗. 构建用于预测中药化学成分心脏毒性的定量构效关系模型[J]. 北京大学学报: 医学版, 2017, 49(3): 551-556.
- [ 17 ] 高雅, 姚碧云, 周宗灿. 中草药重要成分的 QSAR 预测毒性数据库的建立[J]. 毒理学杂志, 2015, 29(6): 399-401.
- [ 18 ] 雷蕾, 王新洲, 张黎, 等. 中药化学成分与 CYP2C19 相互作用预测研究—基于定量构效关系 (QSAR) 模型[J]. 中国现代中药, 2015, 17(5): 424-426, 430.
- [ 19 ] 林卫华, 吴志刚. 我国近年食品毒理学应用与研究进展[J]. 中国热带医学, 2014, 14(8): 1019-1022.
- [ 20 ] SIVARAMAN A, LEACH J K, TOWNSEND S, et al. A microscale in vitro physiological model of the liver; predictive screens for drug metabolism and enzyme induction [J]. Curr Drug Metab, 2005, 6(6): 569-591.
- [ 21 ] 戴伟, 顾光, 高芑, 等. 原代肝、肾细胞培养在保健食品原料毒性筛选中的应用 [J]. 中国食品卫生杂志, 2010, 22(3): 233-236.
- [ 22 ] 王子建, 李浩, 李登科, 等. 何首乌水提取物及其主要成分对人肝细胞 L02 中 CYP1A2、CYP2C9 和 CYP2E1 mRNA 表达的影响 [J]. 中草药, 2017, 48(23): 4912-4920.
- [ 23 ] YAO N, YAO D, WANG L, et al. Inhibition of autocrine IGF-II on effect of human HepG2 cell proliferation and angiogenesis factor expression [J]. Tumour Biol, 2012, 33(5): 1767-1776.
- [ 24 ] MICHALETTS E L. Update: clinically significant cytochrome P450 drug interactions [J]. Pharmacotherapy, 1998, 18(1): 84-112.
- [ 25 ] 李晗, 王宇光, 高月, 等. 孕烷 X 受体对细胞色素 P450CYP3A 基因表达的调控在中药配伍禁忌及中药毒性早期预测中的应用 [J]. 中国药理学与毒理学杂志, 2015, 29(6): 967-972.
- [ 26 ] 王君燕, 余露山, 曾苏. 人孕烷 X 受体介导的 UGT1A1 报告基因模型的建立及初步应用 [J]. 中国药理学杂志, 2012, 47(14): 1105-1109.
- [ 27 ] 江卫民, 张伟康, 李东栋, 等. 微米阵列结构聚合物薄膜的制备及其对细胞三维培养的影响 [J]. 生物工程学报, 2018, 34(11): 135-144.
- [ 28 ] HEWITT N J, LECHÓN M J, HOUSTON J B, et al. Primary hepatocytes: current understanding of the regulation of metabolic enzymes and transporter proteins, and pharmaceutical practice for the use of hepatocytes in metabolism, enzyme induction, transporter, clearance, and hepatotoxicity studies [J]. Drug Metab Rev, 2007, 39(1): 159-234.
- [ 29 ] WILKENING S, STAHL F, BADER A. Comparison of primary human hepatocytes and hepatoma cell line Hepg2 with regard to their biotransformation properties [J]. Drug Metab Dispos, 2003, 31(8): 1035-1042.
- [ 30 ] GUGUEN-GUILLOUZO C, GUILLOUZO A. General review on *in vitro* hepatocyte models and their applications [J]. Methods Mol Biol, 2010, 640: 1-40.
- [ 31 ] LEE J, CUDDIHY M J, KOTOV N A. Three-dimensional cell culture matrices: state of the art [J]. Tissue Eng Part B Rev, 2008, 14(1): 61-68.
- [ 32 ] BENES F M, LANGE N. Two dimensional versus three-dimensional cell counting: a practical perspective [J]. Trends Neurosci, 2001, 24(1): 11-17.
- [ 33 ] GUNNESS P, MUELLER D, SHEVCHENKO V, et al. 3D organotypic cultures of human HepaRG cells: a tool for *in vitro* toxicity studies [J]. Toxicol Sci, 2013, 133(1): 67-78.
- [ 34 ] KAZUO T, KENJI K, YASUHITO N, et al. 3D spheroid culture of hESC/hiPSC-derived hepatocyte-like cells for

- drug toxicity testing [J]. *Biomaterials*, 2013, 34 (7): 1781-1789.
- [35] 李丹丹, 汤响林, 谭洪玲, 等. 3D HepG2 细胞药物肝毒性评价模型的建立及其在药物安全性评价中的应用[J]. *中国中药杂志*, 2016, 41(7): 1313-1317.
- [36] 李婷婷, 李瑞红, 刘振兴, 等. 基于类器官 3D 培养的何首乌易感物质肝毒性评价[J]. *药学报*, 2017, 52(7): 1048-1054.
- [37] WEIGL B H, BARDELL R, CABRERA C R. Lab-on-a-chip for drug development [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2003, 55(3): 349-377.
- [38] ELALI J, SORGER P K, JENSEN K F. Cells on chips [J]. *Nature*, 2006, 442(7101): 403-411.
- [39] KIMURA H, SAKAI Y, FUJII T. Organ/body-on-a-chip based on microfluidic technology for drug discovery [J]. *Drug Metab Pharmacokinet*, 2018, 33(1): 43-48.
- [40] 马超, 申少斐, 赵磊, 等. 生命分析微流控芯片的多尺度应用: 从分子水平到个体水平 [J]. *分析测试学报*, 2015, 34(3): 246-256.
- [41] YEO L Y, CHANG H C, CHAN P P Y, et al. Microfluidic devices for bioapplications [J]. *Small*, 2011, 7(1): 12-48.
- [42] REGEHR K J, DOMENECH M, KOEPEL J T, et al. Biological implications of polydimethylsiloxane-based microfluidic cell culture [J]. *Lab Chip*, 2009, 9(15): 2132-2139.
- [43] 王鹤辰, 樊佳新, 包永睿, 等. 基于灰色关联法研究胆矾中元素对 A549 细胞的体外抑制作用 [J]. *中国现代应用药学*, 2017, 34(11): 1522-1525.
- [44] 樊佳新, 王帅, 孟宪生, 等. 基于微流控芯片技术的荆芥诱导肺肿瘤细胞凋亡谱效关系研究 [J]. *药学报*, 2017, 52(1): 126-131.
- [45] 李中玉. 基于微流控技术的体外毒理学评价新体系构建及初步应用 [D]. 大连: 大连理工大学, 2017.
- [46] 张潇丹. 基于微流控细胞芯片的款冬花提取物抗氧化和 5-LOX 抑制活性测试 [D]. 重庆: 重庆大学, 2016.
- [47] DAMBACH D M, ANDREWS B A, MOULIN F. New technologies and screening strategies for hepatotoxicity: use of *in vitro* models [J]. *Toxicol Pathol*, 2005, 33(1): 17-26.
- [48] 冯丁山. 食品毒理学新技术应用进展 [J]. *食品安全导刊*, 2018(18): 88-89.
- [49] 廖明阳. 我国药物毒理学研究现状与展望 [J]. *中国药理学与毒理学杂志*, 2015, 29(5): 727-728.
- [50] 瞿飘飘. 保健食品紫皮石斛洋参片的功能和毒理学研究 [D]. 杭州: 浙江工业大学, 2015.
- [51] 贾秀秀, 吴晓刚, 孟令仪, 等. 人参林蛙油类保健食品安全性评价研究 [J]. *中国卫生工程学*, 2017, 16(2): 129-131, 134.
- [52] 冯继农. 在食品安全性毒理学评价中体外细胞短测试验的选择 (综述) [J]. *中国食品卫生杂志*, 1993(1): 44-47.
- [53] 曹洁, 印木泉. 基于质粒的转基因小鼠致突变检测模型的研究进展 [J]. *中国公共卫生*, 2000, 16(6): 570-571.
- [54] KREWSKI D, ACOSTA JR D, ANDERSON M, et al. Toxicity testing in the 21<sup>st</sup> century: a vision and a strategy [J]. *Reprod Toxicol*, 2008, 25(1): 136-138.
- [55] 陈建泉, 罗金平, 黄建, 等. xylE 转基因小鼠的繁育及其纯合子的筛选 [J]. *中国比较医学杂志*, 2003, 13(4): 200-203.
- [56] 董田甜, 任雁, 邹莉波, 等. 转基因小鼠模型在致癌实验中的应用进展 [J]. *环境与职业医学*, 2011, 28(8): 509-511.
- [57] 王慧, 尹译, 朱炯, 等. 美国保健食品监管及标准现状 [J]. *食品安全质量检测学报*, 2019, 10(1): 19-24.

[责任编辑 张丰丰]