

· 基础研究 ·

千金子制霜前后提取物对人胚肾细胞HEK293的
体外毒性作用[△]

杨子烨, 张桂梅, 王佩华, 王慧楠, 姜明瑞, 张婧秋, 岳珠珠, 王志成, 王英姿*

北京中医药大学 中药学院, 北京 102488

[摘要] 目的: 比较千金子制霜前后提取物对正常人胚肾细胞 HEK293 的影响, 探究千金子制霜减毒的作用机制。**方法:** 采用 HEK293 细胞为体外模型, 随机分为对照组, 千金子生品低、中、高质量浓度 (100、200、400 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) 组和千金子霜品低、中、高质量浓度 (100、200、400 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) 组。细胞体外培养后, 分别给予等体积的无血清培养液和千金子生品、霜品提取物溶液, 各组均设置 3 个复孔。采用 CCK-8 法评价细胞存活率, 利用倒置显微镜观察细胞数量及形态变化; 碘化丙啶 (PI) 染色法和 Annexin V-FITC/PI 双重染色法检测细胞周期和凋亡情况; 试剂盒法检测细胞上清液中乳酸脱氢酶 (LDH)、谷胱甘肽 (GSH)、肌酐 (Cr) 和细胞裂解液中尿素氮 (BUN) 水平。**结果:** 与对照组比较, 千金子生品各质量浓度组 HEK293 细胞存活率降低, 细胞形态异常, 细胞数量减少, G_0/G_1 、 G_1/G_2 期细胞比例明显降低, S 期细胞比例明显增加, 细胞凋亡率升高 ($P<0.01$), LDH、BUN、Cr 水平升高 ($P<0.05$, $P<0.01$), GSH 水平降低 ($P<0.01$); 与千金子生品组比较, 千金子霜品相应质量浓度可显著增加 HEK293 细胞存活率 ($P<0.01$), 改善细胞形态, 增加 G_0/G_1 期、 G_1/G_2 期细胞比例, 降低 S 期细胞比例, 同时能明显降低 LDH、BUN、Cr 水平 ($P<0.05$, $P<0.01$), 提高 GSH 水平 ($P<0.01$)。**结论:** 千金子制霜后可能通过减轻细胞周期阻滞和细胞氧化损伤改善肾细胞功能、减少细胞凋亡, 从而降低体外肾毒性。

[关键词] 千金子; 制霜减毒; HEK293 细胞; 肾毒性

[中图分类号] R285.5 **[文章编号]** 1673-4890(2022)05-0831-06

doi: 10.13313/j.issn.1673-4890.20210922001

***In vitro* Toxicity of Euphorbiae Semen Before and After Crystallization on Human Embryonic Kidney 293 Cells**YANG Zi-ye, ZHANG Gui-mei, WANG Pei-hua, WANG Hui-nan, JIANG Ming-rui, ZHANG Jing-qiu, YUE Zhu-zhu,
WANG Zhi-cheng, WANG Ying-zi**School of Chinese Materia Medica, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 102488, China*

[Abstract] **Objective:** To explore the mechanism of Euphorbiae Semen (ES) after crystallization on attenuating toxicity by comparing the effect of ES on human embryonic kidney 293 (HEK293) cells before and after crystallization. **Methods:** HEK293 cells were cultivated as the *in vitro* model, and they were randomly divided into a control group, three low, medium, and high-dose ES groups (100, 200, and 400 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), and three low, medium, and high-dose ES Pulveratum (ESP) groups (100, 200, and 400 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$). The cells after cultivation in each group were given equal volumes of serum-free medium, ES extracts, and ESP extracts, respectively, and each group was set up with three duplicate wells. The cell counting kit-8 (CCK-8) method was used to evaluate the survival rate of cells, and the inverted microscope was used to observe the number and morphological changes of cells. The propidium iodide (PI) staining and Annexin V-FITC/PI double staining were used to detect the cell cycle and apoptosis. The reagent kit method was used to detect the content of lactate dehydrogenase (LDH), glutathione (GSH), and creatinine (Cr) in cell supernatant, and blood urea nitrogen (BUN) in cell lysate. **Results:** Compared with the control group, the survival rate of HEK293 cells reduced, and the number of cells decreased with abnormal cell morphology in all ES groups. The ratio of cells in G_0/G_1 and G_1/G_2 phase significantly reduced, whereas that in S phase significantly increased as well as the cell apoptosis rate ($P<0.01$). In the ES groups, the levels of

[△] [基金项目] 国家自然科学基金项目 (82074021)

* [通信作者] 王英姿, 教授, 研究方向: 中药制剂新技术与中药炮制原理; Tel: 010-84738615, E-mail: wangyzi@sina.com

LDH, BUN, and Cr in SE groups were increased ($P<0.05$, $P<0.01$), and the content of GSH was decreased ($P<0.01$). Compared with the ES group, the corresponding concentration in the ESP groups significantly increased the survival rate of HEK293 cells ($P<0.01$) and improved cell morphology, thus increasing the ratio of cells in G_0/G_1 and G_1/G_2 phase and decreasing that in S phase. At the same time, it can significantly reduce the levels of LDH, BUN, and Cr were reduced ($P<0.05$, $P<0.01$), and activity of GSH was increased ($P<0.01$). **Conclusion:** The possible mechanism of ES after crystallization on attenuating nephrotoxicity *in vitro* is improving renal cell function and reducing cell apoptosis by alleviating cell cycle arrest and cell oxidative damage.

[Keywords] Euphorbiae Semen; crystallization to attenuate toxicity; HEK293 cells; nephrotoxicity

千金子系大戟科大戟属植物续随子 *Euphorbia lathyris* L. 的干燥成熟种子, 味辛, 性温, 归肝、肾、大肠经, 具有泻下逐水、破血消癥之功^[1], 可用于水肿、痰饮、二便不通、积滞腹胀、瘀血经阻, 外治疣赘、顽癣^[2-3]。千金子作为泻下逐水药中的有毒中药, 常制霜减毒后使用, 但毒性一直制约着千金子的临床应用。目前初步研究认为, 千金子炮制减毒的机制主要与制霜后二萜醇酯类化合物含量降低有关, 有研究表明千金子制霜后千金子素 L_1 、千金子素 L_2 、千金子素 L_3 、千金子素 L_8 的含量明显降低^[4-6]。

近年来文献报道大戟科中药多具有肾毒性^[7-10], 但未见对千金子肾毒性作用的研究。人胚肾细胞 HEK293 是源于胚胎肾脏组织的永生化细胞, 常用于中药的体外肾毒性研究^[11-12], 因此本研究以 HEK293 细胞为研究对象, 通过比较千金子制霜前后提取物对 HEK293 细胞的毒性差异, 为探讨千金子制霜减毒的作用机制提供新思路, 为千金子的临床安全应用提供参考。

1 材料

千金子饮片 (安徽沪谯中药饮片厂, 批号: 1203070692) 经北京中医药大学刘春生教授鉴定为大戟属续随子 *Euphorbia lathyris* L. 的干燥成熟种子。千金子生品及霜品提取物均为实验室自制。

DMEM 培养基 (批号: 10569044)、胎牛血清 (批号: 10091-418)、胰酶 (批号: 15050057)、青霉素-链霉素双抗 (批号: 15140122)、磷酸盐缓冲液 (PBS, 批号: C10010500BT) 均购于美国 Thermo 公司; 细胞增殖检测试剂盒 (批号: C35006)、细胞凋亡检测试剂盒 (批号: C1062S)、细胞周期检测试剂盒 (批号: C1052S) 均购于上海碧云天生物技术有限公司; 乳酸脱氢酶 (LDH) 检测试剂盒 (批号: A020-2)、谷胱甘肽 (GSH) 检测试剂盒

(批号: A006-2-1)、尿素氮 (BUN) 检测试剂盒 (批号: C013-2-1)、肌酐 (Cr) 检测试剂盒 (批号: C011-2-1) 均购于南京建成科技有限公司; 实验用水由密理博纯水仪制备。

IX51 型倒置相差显微镜 (日本 Olympus 公司); 311 型 CO_2 恒温培养箱、1550 型酶标仪 (美国 Thermo 公司); HR1500-IIA2 型生物安全柜 (海尔集团); 5424 型离心机 (德国 Eppendorf 公司); Milli-Q Biocel 型纯水机 (美国 Millipore 公司); AUW120 D220D 型分析天平 (日本岛津公司); BD-C6 型流式细胞仪 (美国 BD 公司)。

HEK293 细胞来自美国模式菌种收集中心 (ATCC) 细胞库。

2 方法

2.1 千金子生品、霜品提取物及供试品溶液的制备

千金子霜品由本实验室采用压制法对千金子去油制霜而成, 参考《中华人民共和国药典》2020 年版千金子霜项下方法^[1], 取适量千金子, 去皮取净仁, 碾碎如泥, 经微热, 压榨除去大部分油脂, 含油量符合要求后, 取残渣研制成符合规定的松散粉末。制备的千金子霜含油量为 19.2%。

分别称取千金子生品、霜品 250 g 置于量瓶中, 加 95% 乙醇加热回流提取 3 次。将提取液放冷后滤过, 合并滤液, 减压回收至无醇味, 加适量水分散, 以等体积石油醚为溶剂萃取 3 次, 回收溶剂得千金子生品、霜品石油醚提取物。

取相当于生药量 0.32 g 的千金子生品、霜品提取物, 加入二甲基亚砜 (DMSO) 50 mL, 制成生药质量浓度为 $6.4 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的母液, 以 DMEM 培养基等比例稀释, 得质量浓度分别为 12.5、25.0、50.0、100.0、200.0、400.0、800.0、1 600.0、3 200.0、6 400.0 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的供试品溶液, 各供试品溶液以 0.22 μm 的滤膜滤过后, 备用。

2.2 细胞培养

HEK293常规培养于含10%胎牛血清和1%双抗的DMEM培养基中,置于37℃、CO₂体积分数5%、相对湿度70%~80%的培养箱中培养。当细胞密度达80%~90%时,用胰蛋白酶消化,按照1:4进行传代,取状态良好的细胞进行实验。

2.3 CCK-8法检测HEK293细胞存活率

将处于对数生长期的HEK293细胞接种于96孔板中,每孔5000个细胞,培养过夜。待细胞生长到汇合状态,加入质量浓度分别为12.5、25.0、50.0、100.0、200.0、400.0、800.0、1600.0、3200.0、6400.0 μg·mL⁻¹的各千金子供试品溶液,同时设置空白组(只加入等体积的DMEM培养基)和对照组(只加入细胞和等体积的DMEM培养基),每组设置5个复孔,处理48 h后每孔加入CCK-8溶液10 μL。在37℃孵育1 h后,利用酶标仪测定450 nm处的吸光度(A),按照公式(1)计算细胞存活率。

$$\text{细胞存活率} = \frac{A_{\text{给药组}} - A_{\text{空白组}}}{A_{\text{对照组}} - A_{\text{空白组}}} \times 100\% \quad (1)$$

2.4 细胞数目及形态观察

选择对数生长的HEK293细胞,以1×10⁵个/孔均匀接种于6孔板,分为对照组,千金子生品低、中、高质量浓度(100、200、400 μg·mL⁻¹)组和千金子霜品低、中、高质量浓度(100、200、400 μg·mL⁻¹)组。细胞置于CO₂恒温培养箱中培养24 h,各给药组分别加入相应质量浓度的千金子生品和霜品提取物溶液1 mL。对照组给予等体积无血清细胞培养液,每组分别设3个复孔。于CO₂恒温培养箱中培养48 h后,置于倒置相差显微镜下观察HEK293细胞数目及细胞形态,并拍照。

2.5 碘化丙啶(PI)染色法检测细胞周期

选择对数生长的HEK293细胞,细胞分组及处理同2.4项下。培养48 h后,各给药组分别加入相应质量浓度的千金子生品和霜品提取物溶液1 mL。对照组加入等体积无血清细胞培养液,每组分别设置3个复孔。在培养箱中培养48 h后,收集细胞,并用PBS重复洗涤,弃去上清液后,加入预冷的70%乙醇1 mL固定,轻轻吹打混匀,在4℃放置过夜。染色前用PBS洗去固定液,1000×g离心5 min。加入PI/RNase staining buffer 0.5 mL混匀,避光条件

染色30 min后,使用流式细胞仪在激发波长488 nm红色荧光下检测。

2.6 Annexin V-FITC/PI双染法检测细胞凋亡

选择对数生长的HEK293细胞,细胞分组及处理同2.4项下。在细胞培养箱中培养48 h后,用0.25%胰酶消化处理贴壁细胞,用预冷的PBS溶液重复洗涤,1000×g离心5 min,弃上清。加入Binding Buffer 300 μL于样品管中使细胞悬浮,再加入Annexin V-FITC 5 μL及PI 10 μL,避光条件孵育15 min,最后用流式细胞仪进行检测。

2.7 试剂盒检测生化指标

选择对数生长的HEK293细胞,细胞分组及处理同2.4项下。培养48 h后收集细胞上清液,按试剂盒说明书检测上清液中BUN、Cr、LDH水平。每孔细胞用PBS溶液重复洗涤后,加入RIPA细胞裂解液裂解30 min,收集细胞,4℃、12000 r·min⁻¹离心10 min(离心半径为8.4 cm),取上清液,按照试剂盒的说明书测定细胞裂解液中GSH水平。

2.8 统计学处理

采用SAS 9.4软件对实验数据进行统计分析,各组数据以($\bar{x} \pm s$)表示,多组间比较采用单因素方差分析(ANOVA),两组间比较采用t检验。以P<0.05为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 千金子制霜前后对HEK293细胞存活率的影响

CCK-8结果表明,作用于HEK293细胞48 h后,与对照组比较,千金子生品组质量浓度为50.0~6400.0 μg·mL⁻¹时,细胞存活率呈剂量依赖性降低(P<0.01);与千金子生品相应质量浓度组比较,千金子霜品组质量浓度为50.0~1600.0 μg·mL⁻¹时,细胞存活率显著升高(P<0.01),且呈量-效关系,见表1。

3.2 千金子制霜前后对HEK293细胞数目及形态的影响

结果显示,对照组HEK293细胞数目多且形态呈梭形,细胞间隙较小,生长情况良好。与对照组比较,千金子生品组细胞数目减少、形态皱缩、体积变小、细胞间隙变大、凋亡小体增加。随着千金子生品剂量增加,死亡细胞数目增加。与千金子生

表1 千金子生品和霜品对HEK293细胞存活率的影响
($\bar{x} \pm s$, $n=5$)

组别	质量浓度/ $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	A	细胞存活率/%
空白组		0.05±0.00	
对照组		0.96±0.01	100.00
千金子生品组	12.5	0.94±0.02	98.63±2.37
	25.0	0.91±0.02	95.17±2.13
	50.0	0.88±0.01**	91.55±0.85
	100.0	0.66±0.03**	67.65±3.70
	200.0	0.54±0.02**	54.33±2.58
	400.0	0.49±0.02**	48.89±2.68
	800.0	0.46±0.04**	45.16±3.88
	1 600.0	0.39±0.01**	37.74±1.08
	3 200.0	0.37±0.02**	35.61±2.73
千金子霜品组	6 400.0	0.34±0.02**	32.61±2.50
	12.5	0.96±0.01	100.00±1.34
	25.0	0.96±0.02	99.05±2.33
	50.0	0.95±0.04 ^{###}	99.29±4.25
	100.0	0.83±0.03 ^{###}	86.50±1.69
	200.0	0.70±0.03 ^{###}	72.19±3.26
	400.0	0.65±0.03 ^{###}	66.15±2.92
	800.0	0.56±0.03 ^{###}	56.67±2.85
	1 600.0	0.46±0.03 ^{###}	45.95±3.87
3 200.0	0.40±0.03	39.25±2.97	
6 400.0	0.34±0.03	32.59±3.19	

注:与对照组比较,** $P<0.01$;与千金子生品相应质量浓度组比较,^{###} $P<0.01$ 。

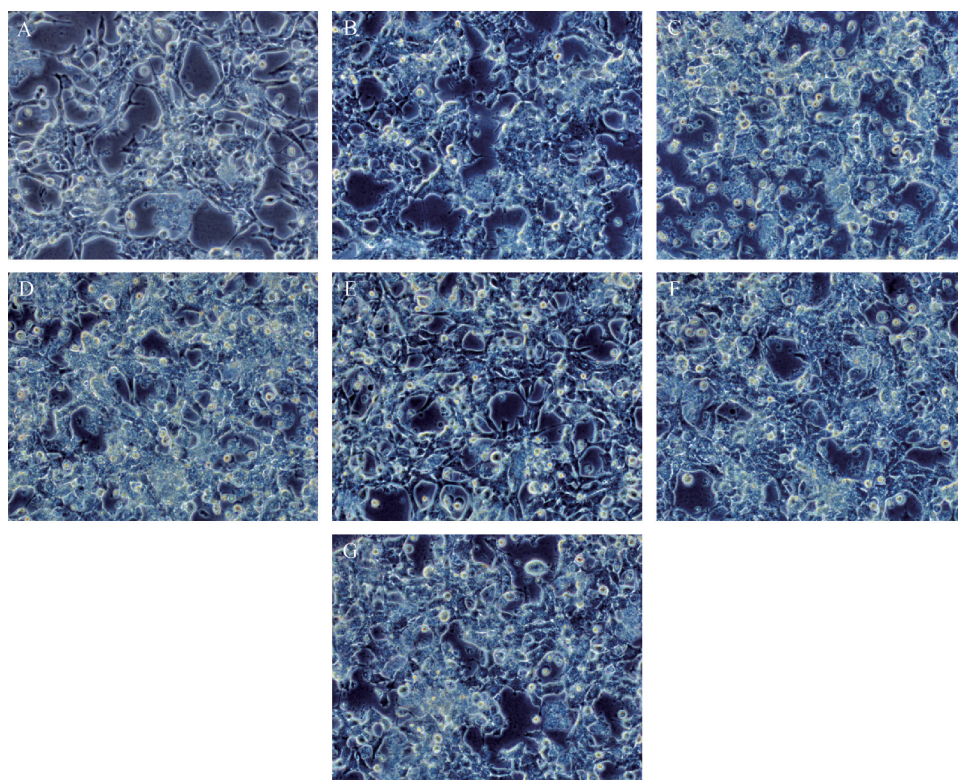
品组比较,千金子霜品相应质量浓度组细胞数目增加、形态皱缩的情况得以改善、细胞间隙缩小、凋亡小体减少、死亡细胞数目减少,且呈剂量依赖性,见图1。

3.3 千金子制霜前后对HEK293细胞周期的影响

流式细胞仪检测结果发现,与对照组比较,千金子生品各质量浓度组HEK293细胞 G_0/G_1 、 G_2/M 期比例显著降低($P<0.05$, $P<0.01$),S期细胞比例显著升高($P<0.01$)。与千金子生品组比较,千金子霜品相应质量浓度组S期细胞比例显著降低($P<0.01$), G_2/M 期细胞比例升高($P<0.05$, $P<0.01$),提示千金子生品可导致HEK293细胞周期阻滞,而制霜后可明显降低S期细胞比例,升高 G_2/M 期细胞比例,结果见表2。

3.4 千金子制霜前后对HEK293细胞凋亡的影响

与对照组比较,千金子生品各质量浓度组HEK293细胞的早期凋亡率、晚期凋亡率、总凋亡率显著升高($P<0.05$, $P<0.01$),呈剂量依赖性;与千金子生品组比较,千金子霜品相应质量浓度组可显著降低细胞早期凋亡率、晚期凋亡率及总凋亡率($P<0.01$),且呈剂量依赖性,结果见表3。



注: A. 对照组; B~D. 千金子生品低、中、高质量浓度组; E~G. 千金子霜品低、中、高质量浓度组。

图1 倒置显微镜下观察千金子生品和霜品对HEK293细胞形态的影响($\times 200$)

表2 千金子生品和霜品对HEK293细胞周期的影响 ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	质量浓度/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	周期占比/%		
		G_0/G_1	S	G_2/M
对照组		45.33±1.19	23.30±1.47	24.23±1.27
千金子生品组	100	34.80±3.59**	37.67±1.07**	18.93±0.06*
	200	30.90±0.87**	40.07±2.17**	17.03±1.93**
	400	29.07±1.16**	43.80±2.01**	13.97±0.91**
千金子霜品组	100	41.27±2.15	27.43±2.00 [#]	21.80±0.70 [#]
	200	34.60±1.63	32.33±3.11 [#]	20.80±0.95 [#]
	400	33.23±3.59	39.00±2.09 [#]	18.50±0.52 [#]

注:与对照组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$;与千金子生品相应质量浓度组比较,[#] $P<0.05$,[#] $P<0.01$;表3~4同。

表3 千金子生品和霜品对HEK293细胞凋亡的影响 ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	质量浓度/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	早期凋亡率/%	晚期凋亡率/%	总凋亡率/%
对照组		3.47±0.40	0.27±0.06	3.87±0.12
千金子生品组	100	12.13±0.06*	0.47±0.06*	12.60±0.12**
	200	17.80±0.20**	0.93±0.06**	18.73±0.26**
	400	24.77±0.06**	1.60±0.00**	26.37±0.06**
千金子霜品组	100	8.20±0.10 [#]	0.30±0.00 [#]	8.50±0.10 [#]
	200	11.17±0.21 [#]	0.47±0.06 [#]	11.63±0.27 [#]
	400	17.60±0.20 [#]	0.93±0.06 [#]	18.53±0.26 [#]

3.5 千金子制霜前后对HEK293细胞肾功能指标的影响

与对照组比较,千金子生品各质量浓度组HEK293细胞中GSH水平显著降低($P<0.01$),LDH活性显著升高($P<0.01$),BUN、Cr水平显著升高($P<0.05$, $P<0.01$)。与千金子生品组比较,千金子霜品相应质量浓度能显著提高HEK293细胞中GSH水平($P<0.01$),降低LDH活性和BUN、Cr水平($P<0.05$, $P<0.01$),且具有一定的剂量相关性,见表4。

4 讨论

中药体外肾损伤可降低肾细胞存活率,导致细胞形态变差,BUN、Cr溢出而进入血浆。BUN、Cr是机体的蛋白质代谢产物,反映氮的分解和肾的排泄功能,常用于肾脏疾病和药物性肾组织损伤的监测和诊断^[13-14],其含量变化与肾细胞损伤程度直接相关。LDH是广泛分布于肾细胞内的生化酶,正常时不能透过细胞膜,当细胞受损或缺氧时外泄到培养液中,故LDH细胞外活力增高程度与肾损伤程度

密切相关^[15-17]。氧化损伤是导致肾损伤发生的机制之一,GSH是一种细胞质中普遍存在的抗氧化物,在细胞内能清除过氧化物代谢产物,保护细胞免受氧化性伤,当GSH水平下降,机体氧自由基的清除能力降低,可导致机体出现严重的脂质过氧化反应^[18],造成组织细胞损伤。综上,当肾细胞受到损伤时,机体内氧化指标和肾功能指标异常,抑制细胞增殖,促进细胞凋亡。

细胞周期是细胞生命活动的动态过程,从功能角度分成 G_0/G_1 期、S期和 G_2/M 期^[19]。当细胞受到一定的刺激后,细胞周期运转过程会出现障碍,不能使细胞平稳正常进入下一个时期,造成细胞周期阻滞直接导致细胞凋亡,抑制细胞增殖。细胞凋亡是细胞程序化死亡,经一系列基因活化及调控细胞有序的、自主的主动死亡过程,在细胞内稳态、细胞衰老和机体生长发育等方面发挥着重要作用^[20]。当肾细胞受到损伤时,能够引起其细胞周期明显阻滞,从而抑制细胞增殖与分化,促进细胞凋亡。

表4 各组HEK293细胞上清液中LDH、BUN、Cr水平及细胞内GSH水平 ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	质量浓度/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	GSH/ $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$	LDH/ $\text{mIU}\cdot\text{mL}^{-1}$	BUN/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	Cr/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$
对照组		18.425±0.322	45.072±6.028	0.018±0.034	6.038±2.095
千金子生品组	100	10.607±0.199**	369.001±26.540**	0.062±0.013*	12.765±2.740*
	200	8.450±0.199**	704.977±22.919**	0.111±0.020*	16.591±3.020**
	400	4.933±0.193**	946.451±12.925**	0.163±0.021**	18.965±1.140**
千金子霜品组	100	16.555±0.513 [#]	107.983±22.773 [#]	0.036±0.002 [#]	6.301±0.457 [#]
	200	12.981±0.366 [#]	208.107±5.698 [#]	0.042±0.007 [#]	8.543±1.648 [#]
	400	11.542±0.336 [#]	398.984±30.942 [#]	0.069±0.012 [#]	9.467±2.285 [#]

本研究从细胞增殖与凋亡、氧化损伤及肾细胞功能角度初步探讨了千金子制霜前后提取物对HEK293细胞的毒性损伤及作用机制,实验结果表明,千金子生品对HEK293细胞增殖有明显的抑制作用,呈一定的量-效关系,并使细胞形态变差;千金子霜品对HEK293细胞增殖的抑制作用明显降低,可提高其存活率,并改善细胞形态。结合文献^[21-25]及本实验结果分析,千金子生品造成肾细胞损伤可能有以下几种途径:1)降低HEK293细胞在G₀/G₁期、G₂/M期的比例,升高S期的比例,明显抑制S期向G₂/M期的转化,导致细胞复制受阻,减慢细胞分裂速度,降低细胞存活率,促进细胞凋亡。2)造成肾细胞氧化损伤,机体内积聚过多氧自由基,引发过氧化脂质反应,从而降低LDH和GSH水平,导致肾细胞膜损伤及细胞代谢异常,从而促进细胞凋亡。3)使肾细胞膜受损,BUN、Cr等通过细胞膜溢出细胞进入血浆,肾功能异常,造成HEK293细胞过度凋亡。千金子制霜后可通过减轻细胞氧化损伤,改善肾细胞功能损伤,减少细胞凋亡从而降低肾毒性,这为进一步阐明千金子制霜减毒的机制提供了参考。

参考文献

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:一部[M]. 北京:中国医药科技出版社,2020:36-37.
- [2] 张景珍,崔曰新,王思雨,等. 基于熵权法对千金子-甘草不同配伍比例的化学成分变化及体外肝毒性研究[J]. 中国现代中药,2020,22(3):433-440.
- [3] 李凤英,王英姿,李文华,等. 千金子制霜前后提取物中主要二萜醇酯类成分大鼠肠吸收特性研究[J]. 辽宁中医药大学学报,2017,19(5):35-38.
- [4] 侯晓蓉,万蕾蕾,占扎君,等. HPLC-ESI-MS测定千金子炮制前后千金二萜醇酯的含量[C]//中国药学会. 2010年中国药学会大会暨第十届中国药师周论文集. 北京:中国药学会,2010:8.
- [5] 李英霞,袁敏,陈永艳,等. HPLC测定千金子和千金子霜中两种泻下成分的含量[J]. 中成药,2010,32(3):440-443.
- [6] WANG H N, ZHANG J J, CUI Y X, et al. Chemical comparison of Semen Euphorbiae and Semen Euphorbiae Pulveratum by UPLC-Q-TOF/MS coupled with multivariate statistical techniques[J]. J Chin Pharm Sci, 2020, 29(7): 470-479.
- [7] 包勒朝鲁,那生桑. 大戟属药用植物的毒性及炮制减毒增效研究进展[J]. 世界科学技术—中医药现代化, 2018,20(4):585-591.
- [8] 何美菁. 醋甘遂炮制工艺与醋制减毒增效相关性的研究[D]. 太原:山西中医药大学,2019.
- [9] 曹艳,苏汉文,周志文,等. 甘遂及醋炙甘遂提取物对小鼠的肾脏毒性及利尿作用的研究[J]. 时珍国医国药, 2011,22(11):2711-2712.
- [10] 沈娟,唐于平,李淑娇,等. 基于因子分析的甘遂-甘草反药组合量-毒关系研究[J]. 中华中医药杂志,2015, 30(5):1531-1537.
- [11] 汪维佳,李照,华育晖,等. 半枝莲不同极性提取物对人胚肾细胞体外活性的影响[J]. 实用肿瘤杂志,2016, 31(3):228-231.
- [12] 孙航,杨慧海,王露露,等. 鹿茸水溶性蛋白对庆大霉素诱导HEK293细胞毒性的影响[J]. 毒理学杂志, 2019,33(2):133-138.
- [13] 邓诺,易艳,梁爱华,等. 大黄肾脏毒性部分机制研究[J]. 中国中药杂志,2018,43(13):2777-2783.
- [14] HERMIDA J, ROMERO R, TUTOR J C. Relationship between serum cystatin C and creatinine in kidney and liver transplant patients[J]. Clin Chim Acta,2002,316(1/2): 165-170.
- [15] COHEN J A, BRECHER M E, BANDARENKO N. Cellular source of serum lactate dehydrogenase elevation in patients with thrombotic thrombocytopenic Purpura[J]. J Clin Apher,1998,13(1):16-19.
- [16] EIGENTLER T K, FIGL A, KREX D, et al. Number of metastases, serum lactate dehydrogenase level, and type of treatment are prognostic factors in patients with brain metastases of malignant melanoma[J]. Cancer, 2011,117 (8):1697-1703.
- [17] 窦志华,许波,施忠,等. 大黄蒽醌类成分肝肾毒性和效应物质研究[J]. 中国临床药理学杂志,2018,34(10):1214-1217.
- [18] 黄伟,孙蓉. 益母草肾毒性与氧化损伤机制的相关性研究[J]. 中药药理与临床,2010,26(2):54-56.
- [19] BERTOLI C, SKOTHEIM J M, DE BRUIN R A M. Control of cell cycle transcription during G₁ and S phases[J]. Nat Rev Mol Cell Biol,2013,14(8):518-528.
- [20] 姚晓云,钊方芳. 凋亡在中医药治疗肝癌中的作用研究[J]. 实用癌症杂志,2020,35(6):1040-1044.
- [21] 梁馨苓. 急性肾损伤相关细胞学机制的新进展[J]. 中国血液净化,2017,16(1):1-3.
- [22] 梁世凯,许菲菲. 马兜铃酸对人肾小管上皮细胞细胞周期影响的实验研究[J]. 中国中西医结合肾病杂志, 2011,12(11):979-981,1038.
- [23] KING D W, SMITH M A. Proliferative responses observed following vancomycin treatment in renal proximal tubule epithelial cells[J]. Toxicol In Vitro,2004,18(6):797-803.
- [24] 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.
- [25] 李鸿鹏,徐兆发,郭美欣,等. 姜黄素对汞致大鼠肾损伤保护作用的实验研究[J]. 毒理学杂志,2016,30(3):233-236.

(收稿日期:2021-09-22 编辑:田苗)