

基于靶标循环放大策略的双色荧光传感体系探索何首乌“九蒸九晒”炮制过程中不同蒸制次数对肾细胞的减毒作用

高 涵¹, 刘史佳², 庞会明², 田蒋为^{1*}, 戚 进^{1*}

1. 中国药科大学中药学院, 江苏 南京 211198

2. 江苏省中医院 药学部, 江苏 南京 210029

摘要: **目的** 通过采用所建立的双色荧光传感体系 nanoflare 测定肾细胞分泌的 *miR-21* 和 *miR-200c* 表达, 观察经“九蒸九晒”炮制后的制首乌对肾细胞的毒性作用。**方法** 生首乌和不同炮制次数制首乌的水提取物与肾细胞孵育后, 利用双色荧光传感体系 nanoflare 对给药前后细胞培养基中的 *miR-21* 和 *miR-200c* 进行定量检测。**结果** 通过比较不同炮制次数的何首乌水提取物的毒性, 发现伴随着炮制次数的增加, 双色荧光传感体系的荧光恢复强度在不断减弱, 制首乌水提取物处理后的细胞培养基中 *miR-21* 和 *miR-200c* 的表达在不断减少, 说明在炮制过程中毒性逐渐减弱, 炮制至第 9 次时毒性明显减弱, 对肾细胞未产生明显毒性, 表明制首乌水提取物对肾细胞的毒性随炮制次数增加在不断降低。**结论** 生首乌毒性很强, 而经炮制后的制首乌毒性逐渐减弱, 在炮制次数超过 9 次后基本无毒, 表明通过“九蒸九晒”在细胞水平可以达到减毒的作用, 为制首乌炮制工艺与质量标准的完善提供参考。

关键词: 药物性肾损伤; 微小 RNA; 靶标循环放大策略; 何首乌; 炮制减毒; 九蒸九晒

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2022)08-2383-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2022.08.015

A dual-color fluorescence sensing system based on target cycle amplification strategy to explore attenuating effect of different steaming times on kidney cells in process of “nine times steaming and nine times sunning” of *Polygoni Multiflori Radix*

GAO Han¹, LIU Shi-jia², PANG Hui-ming², TIAN Jiang-wei¹, QI Jin¹

1. School of Traditional Chinese Pharmacy, China Pharmaceutical University, Nanjing 211198, China

2. Department of Pharmacy, Jiangsu Province Hospital of Chinese Medicine, Nanjing 210029, China

Abstract: Objective To detect the expressions of *miR-21* and *miR-200c* secreted by kidney cells by using the established dual-color fluorescence sensing system, and observe the effects of decrease toxicity of processed Heshouwu (*Polygoni Multiflori Radix*) after “nine times steaming and nine times sunning” on kidney cells. **Methods** After kidney cells being incubated with water extracts of crude and processed *Polygoni Multiflori Radix* with different preparation times, two-color fluorescence sensor system was used to quantitatively detect *miR-21* and *miR-200c* in cell culture media before and after administration. **Results** By comparing the toxicity of the water extracts of *Polygoni Multiflori Radix* with different processing times, with the increasing of processing times, the fluorescence recovery intensity of two-color fluorescence sensor system was constantly weakened, and expressions of *miR-21* and *miR-200c* in cell culture media treated with water extracts of processed *Polygoni Multiflori Radix* was reduced, which indicating that toxicity gradually weakened during the processing. The toxicity was significantly weakened at the ninth time, and the toxic effect on kidney cells was not significant, indicating that the toxicity of water extracts of processed *Polygoni Multiflori Radix* to kidney cells was continuously reduced with the increasing of processing times. **Conclusion** Raw *Polygoni Multiflori Radix* is toxic, but the toxic of

收稿日期: 2021-12-17

基金项目: 江苏省中医药科技发展专项 (2020ZX11); 江苏省中医药管理局科技项目 (JD2019SZ14)

作者简介: 高 涵, 女, 博士生, 研究方向为中药生物技术。E-mail: gaohan71231@126.com

*通信作者: 戚 进, 男, 博士, 教授, 博士生导师, 主要从事中药分析研究。E-mail: qijin-cpu@cpu.edu.cn

田蒋为, 男, 博士, 副教授, 博士生导师, 主要从事中药生物技术研究。E-mail: jwitian@cpu.edu.cn

processed *Polygoni Multiflori Radix* is gradually weakened. After processing more than nine times, processed *Polygoni Multiflori Radix* is basically non-toxic, indicating that “nine times steaming and nine times sunning” can achieve attenuation at cell level, which can provide a reference for the improvement of processing technology and quality standards of *Polygoni Multiflori Radix*.

Key words: drug-induced kidney injury; microRNAs; target circulating amplification strategy; *Polygoni Multiflori Radix*; toxicity-attenuating effect of processing; nine times steaming and nine times sunning

何首乌是蓼科植物何首乌 *Polygonum multiflorum* Thunb. 的干燥块根, 由于其生品有小毒, 临床上多以其炮制品——制首乌入药。制首乌性温, 味甘涩, 归肝、肾经, 具有补肾乌须、补益精血等功效^[1], 为著名的滋补类中药。近年来, 国内外不断出现含制首乌的相关复方、制剂导致肝、肾毒性的报道^[2-5], 引起了相关部门和科研工作者的高度关注。有学者认为其原因可能与其近现代炮制方法的改变有关。有研究者对其“九蒸九晒”炮制工艺进行了大量研究, 也证实了“九蒸九晒”对何首乌的肝毒性有明显的减毒作用^[6-12]。然而, 此前的研究主要集中于“九蒸九晒”炮制工艺过程中化学成分的变化和不同蒸制次数对肝毒性的影响, 却很少有研究探索“九蒸九晒”法对何首乌致肾毒性的影响。其中的主要原因之一可能与肾毒性产生的生物标志物丰度较低, 因此难于检测有关。

随着科学技术的快速发展, 分析生物标志物已经成为了解和分类疾病发病机制的一类多学科方法。由于蛋白质的多样性, 且对蛋白质的测定具有易出现假阳性、费时、需要专门仪器等诸多缺点, 因此基于蛋白质类生物标志物的评估往往具有一定的挑战性。相反, 参考理想标志物的规定, 细胞外 miRNA 符合标准^[13]: miRNA 在不同的体液中可以被轻易获取; miRNA 可以保持很高的稳定性; miRNA 序列在物种间具有高度的保守性; miRNA 与特定组织或病理状态相关。

迄今为止, 在肾脏的毒性生物学标志物探索方面, 针对 miRNA 的工作非常注重于对尿液的研究, 因为它直接衍生自肾脏, 并且尿液研究是一种非侵入性的研究方法。此外, 由于胞外 miRNA 在物种间的高度保守性和在体液中容易取样的便捷性^[14], 细胞外的 miRNA 作为生物学标志物在药物研发中具有更多的优势: 科学家们研究在细胞培养液中存在着的 miRNA 主要表现在探索其在细胞间通讯联系中的潜在作用, miRNA 可以从受损伤的肾脏细胞中被释放出来, 因此, 经药物诱导损伤的细胞和未经药物处理的正常细胞的培养基具有不同的

miRNA 谱^[15]。研究发现, miR-21 的表达与肾小球和肾小管间质的肾脏发病密切相关, 而肾小管细胞坏死是药物性肾损伤的主要发病机制之一, miR-21 在整个过程中发挥着重要的转录后调控作用^[16-17], 同时, 在患有急性肾损伤的病患的尿液中 miR-21 和 miR-200c 的表达显著增加; 使用造影剂泛亚氨酸处理原代近端肾小管上皮细胞后, 细胞培养基中 miR-21、miR-200c 和 miR-423 的表达显著增加^[18], 可以看出, miR-21 和 miR-200c 与药物性肾损伤有着密切的联系, 其参与肾组织损伤的调节, 是近年来被发现的药物性肾损伤相关的新型生物标志物^[19]。

本课题组前期已建立一种靶标循环放大策略的双色荧光传感体系 nanoflare 用于对 miR-21 和 miR-200c 的荧光检测^[20]。如图 1 所示, 纳米金颗粒 (Au nanoparticles, AuNPs) 被分别用 FAM 和 Cy5 标记的 DNA 发卡检测链 H_1 和 H_2 功能化, DNA 发卡检测链 H_1 和 H_2 分别设计用于响应 miR-21 和 miR-200c。在没有靶标 miRNAs 存在的条件下, 由于分子内杂交的阻滞, 在 AuNPs 上修饰的 DNA 发卡检测链 (H_1 和 H_2) 和 DNA 发卡燃料链 (F_1 和

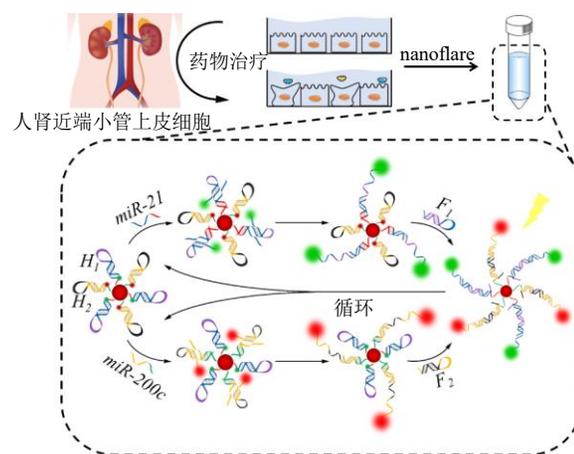


图 1 靶标循环放大策略的双色荧光传感体系在药物性肾损伤过程中同时灵敏检测 miRNA-21 和 miRNA-200c 的示意图^[20]

Fig. 1 Schematic illustration of hairpin DNAs-fueled nanoflare for simultaneous and sensitive detection of miRNA-21 and miRNA-200c during drug-induced kidney injury with target catalytic recycling amplification^[20]

F_2) 保持完整, 并且染料 FAM 和 Cy5 的荧光被 AuNPs 淬灭, 此时, 几乎没有荧光背景。相反, 当用肾毒性药物刺激人肾近端小管上皮细胞 (renal proximal tubule epithelial cells, RPTEC) 时, miRNAs 分泌到细胞外的环境中, 一旦双色荧光传感体系 nanoflare 遇到互补的 miRNAs 靶标, 即细胞经刺激分泌出的 *miR-21* 和 *miR-200c*, 则杂交双链 H_1 -miR-21 和 H_2 -miR-200c 将会形成, 从而产生用于 miRNAs 检测的 FAM 和 Cy5 的双色荧光。在 DNA 发卡检测链和靶标 miRNAs 杂交后, DNA 发卡燃料链将与单链 DNA 发卡检测链暴露出的黏性末端完美配对, 从而形成更稳定的杂交双链体, 并且目标物 miRNAs 可以释放以进行下一步结合, 从而实现靶标循环扩增检测。与化学反应中的催化剂相似, 目标物 miRNAs 在整个过程中引发了循环扩增反应的开始, 同时又完好地从反应中离开, 起到了“催化”的作用。因此, 该双色荧光传感体系 nanoflare 可以以 1:n 的信号输出而不是 1:1 的等效反应比响应 miRNAs, 可以成功地用于检测和评估药物诱导的损伤的肾细胞中低丰度的 miRNAs。

本研究旨在探讨经“九蒸九晒”炮制后的制首乌水提取物对肾细胞的毒性, 通过使用所建立的双色荧光传感体系测定肾细胞分泌的 *miR-21* 和 *miR-200c* 的表达, 观察经炮制后的制首乌对肾细胞的毒性作用。

1 材料

1.1 细胞

RPTEC 购自美国 ATCC。

1.2 药材

生何首乌样品 (S0) 产地为广东德庆, 年份为 2019, 经戚进教授鉴定为蓼科植物何首乌 *P. multiflorum* Thunb. 的干燥块根

1.3 药品与试剂

无菌 PBS 溶液 (批号 KGB50)、胰蛋白酶 (批号 KGY0012)、DMEM/F12 高糖培养基 (批号 KGM12500H-500)、MTT 细胞增殖和细胞毒性测定试剂盒 (批号 KGA311) 购自南京凯基生物科技发展有限公司; 胎牛血清 (批号 F2442) 购自美国 Sigma 公司; PureZOL RNA 分离试剂 (批号 7326880) 购自美国 Bio-Rad 公司; miRNA 1st Strand cDNA Synthesis Kit (批号 MR101-02)、miRNA Universal SYBR qPCR Master Mix (批号 MQ101-02) 购自南京诺唯赞生物科技有限公司; 其他试剂均为市售分

析纯。

1.4 仪器

L-80XP 型超高速冷冻离心机、Allegra 64R 型高速离心机 (美国贝克曼库尔特科学仪器); 低速离心机 (长沙湘智离心机仪器有限公司); EL-x800 型酶标仪 (美国 Bio Tek 公司); Milli-Q 超纯水仪 (美国 Millipore 公司); 细胞培养箱、超低温冰箱 (美国 Thermo Fisher Scientific 公司); 恒温水浴锅 (常州国华电器有限公司)。

2 方法

2.1 不同炮制次数制首乌水提取物对细胞毒性的影响

本课题组前期已对生何首乌 (S0) 完成了从“一蒸一晒” (S1) 到“十二蒸十二晒” (S12) 的不同次数的炮制, 晒蒸的方法参照《中国药典》2020 年版一部 (通则 0213), 每次实验严格控制操作的温度和时间。本研究使用的是不同炮制次数制首乌的水提取物。将不同炮制次数的制首乌水提取物分别用无胎牛血清的 DMEM/F12 培养基稀释成终质量浓度为 1、2、5、10、20、50、100 mg/mL 的溶液, 经 0.22 μm 微孔滤膜滤过备用。

RPTEC 用含 20% 胎牛血清的 DMEM/F12 高糖培养基, 于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 进行常规培养。取处于对数生长期的细胞, 以 1×10^4 /孔接种于 96 孔板中, 每孔 200 μL , 培养 24 h; 弃去培养液, 分别加入 200 μL 已配制好的生首乌 (S0) 和不同炮制次数 (S1~S12) 制首乌水提取物 (终质量浓度分别为 1、2、5、10、20、50、100 mg/mL) 培养 24 h, 对照组加入不含药物的培养基, 在 96 孔板上留出一列不接种细胞, 作为调零孔 (即空白组), 并且每种药物在每个质量浓度下设置至少 5 个复孔; 使用 MTT 活细胞检测系统对生首乌和不同炮制次数制首乌水提取物处理下的 RPTEC 活力进行检测, 计算细胞存活率, MTT 工作液质量浓度为 5 mg/mL, 使用 Origin 2018 软件绘制质量浓度-细胞存活率曲线。

$$\text{细胞存活率} = (A_{\text{实验}} - A_{\text{空白}}) / (A_{\text{对照}} - A_{\text{空白}})$$

2.2 细胞培养基中总 RNA 的提取

RPTEC 以 1×10^7 /孔接种于 6 孔板中, 每孔 2 mL, 培养 24 h; 弃去培养液, 分别用不同炮制次数制首乌水提取物 (20 mg/mL) 孵育 24 h, 对照组加入不含药物的培养基, 取 500 μL 上清液, 与 1 mL PureZOL 试剂混合置于 RNase-free 离心管中, 孵育 5 min; 加入氯仿后充分摇动 RNase-free 离心管, 离心分离上层水相, 并将其收集到新的 RNase-free 离

心管中；将异丙醇添加到水相中混合 5 min，4 °C、12 000×g 离心 10 min；将 RNA 沉淀物用 75%乙醇洗涤，4 °C、7 500×g 离心 5 min；吸去乙醇，将纯化的 RNA 重新悬浮于 50 μL DEPC 水中。

2.3 双色荧光传感体系检测制首乌诱导肾细胞损伤后 miRNAs

取 50 μL “2.2” 项下提取出的细胞培养基中的总 RNA，与 5 nmol/L 双色荧光传感体系 nanoflare 在 200 μL 的总体积中于 37 °C 孵育 1 h，待反应溶液冷却至室温时，使用荧光酶标仪检测反应后的恢复的荧光信号强度，通过 492 nm 波长的激发光激发，收集发射图谱中 518 nm 波长出的 FAM 的荧光强度数据，荧光发射收集范围为 500~660 nm；通过 648 nm 波长的激发光激发，收集发射图谱中 668 nm 波长出的 Cy5 的荧光强度数据，荧光发射收集范围为 650~760 nm。

2.4 qRT-PCR 实验

使用 miRNA 1st Strand cDNA Synthesis Kit 逆转录 cDNA 样品。在 RNase-free 离心管中配制混合液：2 μL 5×gDNA Wiper Mix 和 8 μL 已提取的 RNA 样品，吹打均匀后于 42 °C 孵育 2 min；加入 1 μL 2 μmol/L stem-loop primer，2 μL 10×RT Mix，2 μL HiScript II Enzyme Mix 和 5 μL RNase-free ddH₂O，分别依次在 25 °C、5 min，50 °C、15 min 和 85 °C、5 min 下进行孵育；产物即为所合成的 cDNA 链，可立即用于 qRT-PCR 反应，或保存在 -20 °C 中用于随后的实验。使用 miRNA Universal SYBR qPCR Master Mix 对逆转录出的 cDNA 链进行 qRT-PCR 分析，使用 2^{-ΔΔCt} 法计算经不同炮制次数制首乌处理的 RPTEC 中 miR-21 和 miR-200c 的相对表达量。引物序列见表 1。

2.5 统计分析

通过 Origin 2018 软件对数据进行处理分析，数

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequences

引物	序列 (5'→3')
U6_forward	CTCGCTTCGGCAGCAC
U6_reverse	AACGCTTCACGAATTTGCGT
miR-21_forward	GCGCGTAGCTTATCAGACTGA
miR-21_reverse	AGTGCAGGGTCCGAGGTATT
miR-21_reverse transcription	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGG-TATTCGCACTGGATACGACTCAACA
miR-200c_forward	CGCGTAATACTGCCCAGGTAAT
miR-200c_reverse	AGTGCAGGGTCCGAGGTATT
miR-200c_reverse transcription	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGG-TATTCGCACTGGATACGACTCCATC

据以 $\bar{x} \pm s$ 表示，多组间比较采用的是单因素方差分析的方法。

3 结果

3.1 不同炮制次数制首乌水提取物对肾细胞毒性的影响

本研究通过给予细胞生首乌 (S0) 和经过 12 次蒸晒炮制次数 (S1~S12) 的制首乌水提取物，考察以上各水提取物对肾细胞的半数抑制浓度 (half inhibitory concentration, IC₅₀)，初步评价肾细胞系用于体外药物诱导的肾毒性研究的可行性，并根据在生首乌和不同炮制次数制首乌水提取物处理下的肾细胞的凋亡情况，确定接下来实验中所使用的水提取物质量浓度。生首乌和不同炮制次数制首乌水提取物与肾细胞孵育 24 h 后，计算不同质量浓度下肾细胞的存活率，使用 Origin 2018 软件进行拟合，绘制肾细胞的生存曲线 (图 2)，得到生首乌和不同炮制次数制首乌水提取物对 RPTEC 的 IC₅₀ 值 (表 2)，随着何首乌炮制次数的增加，其水提取物对肾细胞的 IC₅₀ 值不断增加，反映出水提取物的毒性不断下降。选择 20 mg/mL 的水提取物进行后续实验，使用已经合成的双色荧光传感体系 nanoflare 对生首乌和不同炮制次数制首乌水提取物诱导的肾细胞损伤后的靶 miR-21 和 miR-200c 的表达进行研究。

3.2 双色荧光传感体系用于肾细胞损伤后 miRNAs 分析

如图 3 所示，在使用生首乌 (S0) 和经过 12 次蒸晒炮制次数 (S1~S12) 的制首乌水提取物处理后的细胞培养基中，双色荧光传感体系可以很明显检测到所提取的 miR-21 和 miR-200c 表达有不同程度地升高；随着何首乌炮制次数的增加，FAM 和 Cy5 2 种荧光的恢复强度在不断减弱，表明其水提取物处理后的细胞培养基中的 miR-21 和 miR-200c 的含量在不断减少。并且相比于没有用药物处理过的正常 RPTEC，经水提取物处理后的 RPTEC 分泌的 miR-21 和 miR-200c 的表达整体偏高；同时，观察到在超过 9 次炮制次数后，FAM 和 Cy5 2 种荧光的恢复强度的减弱程度减缓，说明炮制超过 9 次后的制首乌 (S9~S12) 的毒性减弱的程度相当，也表明双色荧光传感体系可以准确地区分正常细胞和经药物诱导的细胞。

3.3 qRT-PCR 分析

使用 qRT-PCR 检测 miR-21 和 miR-200c 表达的变化，对上述检测结果的准确性进行验证。如图 4

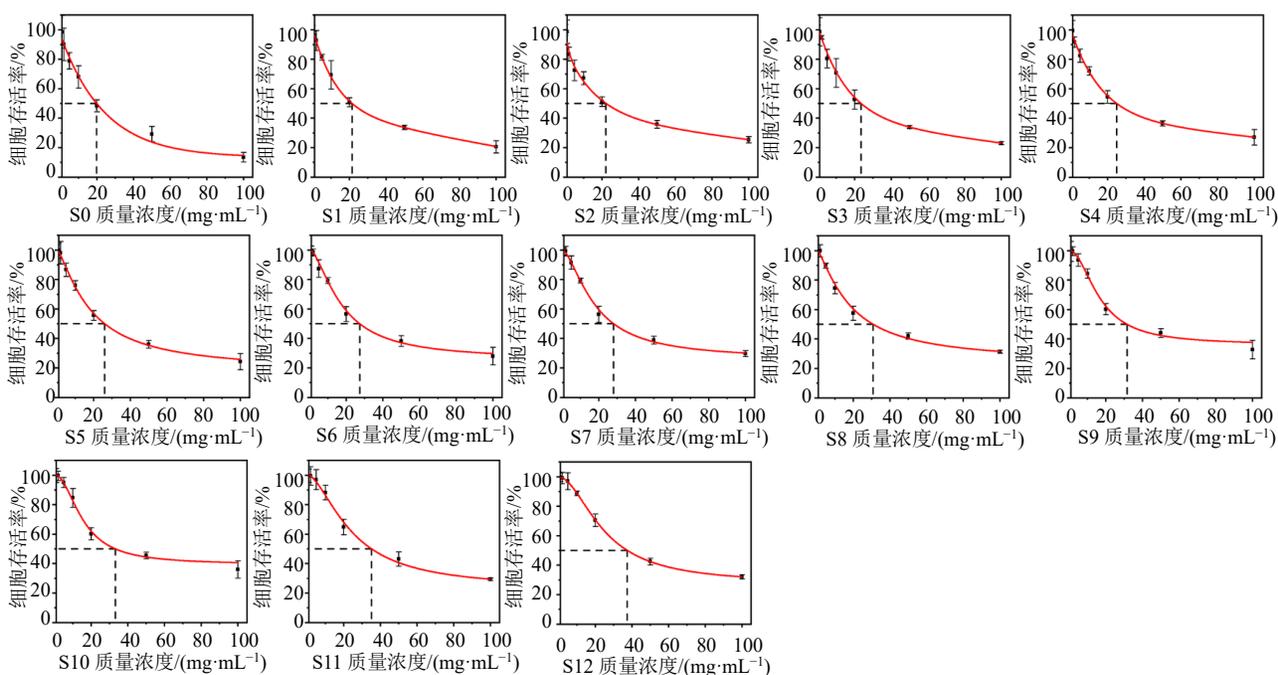


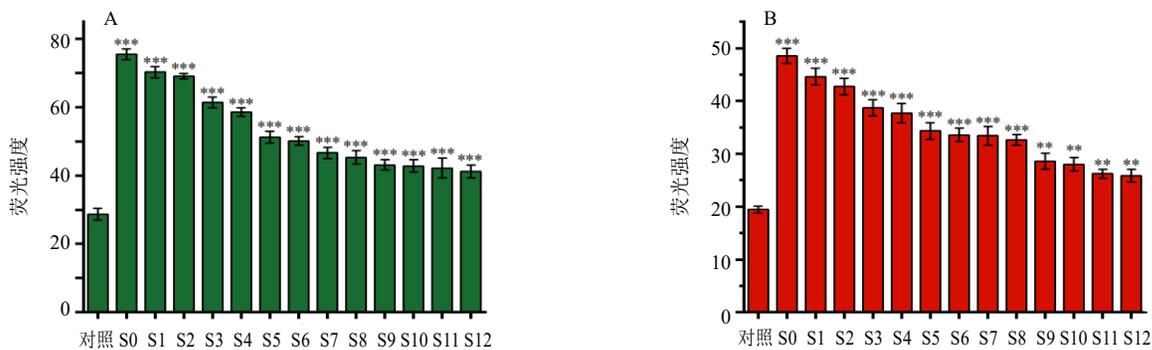
图2 生首乌 (S0) 和不同炮制次数制首乌水提取物 (S1~S12) 对 RPTEC 的细胞存活率的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Fig. 2 Effect of *Polygoni Multiflora Radix* (S0) and water extracts of *Polygoni Multiflora Radix* with different processing times (S1—S12) on cell viability of RPTEC ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

表2 生首乌 (S0) 和不同炮制次数制首乌水提取物 (S1~S12) 对 RPTEC 的 IC₅₀ 值

Table 2 IC₅₀ values of *Polygoni Multiflora Radix* (S0) and water extracts of *Polygoni Multiflora Radix* with different processing times (S1—S12) on RPTEC

水提取物	IC ₅₀ /(mg·mL ⁻¹)	水提取物	IC ₅₀ /(mg·mL ⁻¹)
生首乌 (S0)	19.82	制首乌 (S7)	28.13
制首乌 (S1)	21.42	制首乌 (S8)	30.83
制首乌 (S2)	22.12	制首乌 (S9)	31.53
制首乌 (S3)	23.52	制首乌 (S10)	33.13
制首乌 (S4)	24.92	制首乌 (S11)	35.14
制首乌 (S5)	26.03	制首乌 (S12)	37.44
制首乌 (S6)	27.33		



与对照组比较: **P<0.01 ***P<0.001

P<0.01 *P<0.001 vs control group

图3 双色荧光传感体系检测生首乌和制首乌水提液处理的 RPTEC 培养基中 518 nm 处 miR-21 (A) 和 668 nm 处 miR-200c (B) 的荧光强度 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 3 Fluorescence intensities at 518 nm for detection of miR-21 (A) and 668 nm for detection of miR-200c (B) in culture media of RPTEC treated with raw and processed *Polygoni Multiflora Radix* by two-color fluorescence sensing system ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

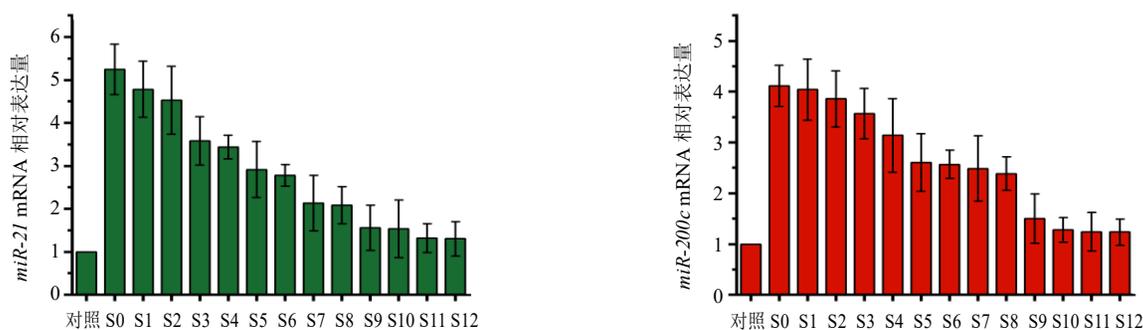


图 4 qRT-PCR 检测生首乌和制首乌水提液处理的 RPTEC 培养基中 *miR-21* 和 *miR-200c* mRNA 的相对表达量

Fig. 4 Relative mRNA expression levels of *miR-21* and *miR-200c* in culture media of RPTEC treated with raw and processed *Polygoni Multiflori Radix* by qRT-PCR

所示, 经生首乌和不同炮制次数制首乌水提物处理的 RPTEC 培养基中的 *miR-21* 和 *miR-200c* mRNA 相对表达量出现了不同程度地变化, 总体而言, 测得的 *miR-21* 和 *miR-200c* 的表达水平与双色荧光传感体系所检测的结果对应。

4 讨论

中药炮制是按临床用药需求及药物自身性质, 采用一定的方法将中药材加工成中药饮片的技术, “九蒸九晒” 是中药材处理中比较常见的炮制手段, 常用于何首乌、黑芝麻、地黄、黄精等药材的处理, 从宋代伊始沿用至清代, 人们通过使用“九蒸九晒”的方式减小中药材对人体的毒性^[21]。而其中的“九”, 除了有“九次”的含义之外, 在古语中还泛指“多次”, 何首乌是典型的生熟异治的药材, 本研究基于对何首乌传统炮制方法的考证, 针对“九蒸九晒”这一具有特色的炮制方法, 研究何首乌炮制过程中毒性的演变规律; 同时, 关于何首乌的研究主要集中在其对于肝脏的毒性方面, 本研究创新性使用新型纳米材料纳米金与核酸组装的双色荧光传感体系, 针对经过“九蒸九晒”炮制后的制首乌水提物对肾细胞的毒性进行了检测, 通过使用所建立的双色荧光传感体系测定药物性肾损伤相关生物标志物 *miR-21* 和 *miR-200c* 的表达, 观察经炮制后的制首乌对肾细胞的毒性作用, 考察了何首乌经炮制后的肾脏毒性, 为具有潜在肾毒性药物的筛选及机制研究和临床安全用药的指导提供了新的方法。

在本课题组的前期工作中, 通过构建不同肾毒性药物的肾细胞体外模型, 证明了在肾毒性药物诱导肾细胞损伤后, 细胞培养基中的 *miR-21* 和 *miR-200c* 的表达出现了不同程度地增加; 本研究通过使用所建立的双色荧光传感体系测定肾细胞分泌的

miR-21 和 *miR-200c* 的表达, 观察经炮制后的制首乌对肾细胞的毒性作用。首先使用生首乌水提物和本课题组前期已完成“一蒸一晒”(S1)到“十二蒸十二晒”(S12)的不同次数的炮制的制首乌水提物建立肾细胞体外模型, 并且根据质量浓度-细胞存活率曲线, 选择合适的给药质量浓度; 其次, 使用双色荧光传感体系 nanoflare 成功对给药前后细胞培养基中的 *miR-21* 和 *miR-200c* 进行定量检测, 发现伴随着炮制次数的增加, 培养基中测得的 *miR-21* 和 *miR-200c* 的表达均在一定程度上减少, 同时观察到在超过 9 次炮制次数后, *miR-21* 和 *miR-200c* 的表达没有显著性变化。通过比较不同炮制次数的何首乌水提物的肾细胞毒性, 可知在炮制过程中毒性逐渐减弱, 炮制至第 9 次时毒性显著减弱, 其后随着炮制的再进行, 对肾细胞的毒性作用变化不大, 基本趋于稳定。通过结合 qRT-PCR 技术对肾毒性生物标志物 *miR-21* 和 *miR-200c* 的测定, 在炮制 9 次之后, *miR-21* 和 *miR-200c* 的表达接近对照组水平, 对于何首乌“九蒸九晒”炮制品对肾小管的毒性仍需进一步研究。生首乌毒性很强, 而通过“九蒸九晒”后的制首乌基本无毒, 表明通过“九蒸九晒”在细胞水平可以达到减毒的作用, 未来有望进一步用于活体实验进行探讨, 以上研究结果可以为制首乌炮制工艺与质量标准的完善提供一定的参考。

本研究将双色荧光传感体系用于探究以炮制后的制首乌为代表的中药材对肾细胞的毒性作用, 旨在探索经炮制处理后的中药材的毒性变化, 因双色荧光传感体系的检测具有普适性, 有望用于更多具有潜在肾毒性药物的筛选及机制的研究中; 创新性使用现代新型纳米材料 AuNPs, 结合荧光检测技术, 发展无创、高灵敏、快速响应的荧光传感器,

实现了对何首乌经不同炮制后毒性变化的快速识别；同时，以生首乌和不同炮制次数制首乌的水提物作为模型药物，可以为更多中药材在炮制过程中的毒性演变规律研究提供新的方向。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

[1] 刘梦娇, 蒲俊安, 戴冰, 等. 何首乌“九蒸九晒”炮制工艺优选及对 L02 肝细胞生长的影响 [J]. 中国中医药信息杂志, 2020, 27(4): 70-73.

[2] Li C Y, Niu M, Bai Z F, *et al.* Screening for main components associated with the idiosyncratic hepatotoxicity of a tonic herb, *Polygonum multiflorum* [J]. *Front Med*, 2017, 11(2): 253-265.

[3] 杨敏, 刘婷, 冯伟红, 等. 何首乌肝毒性物质基础研究 [J]. 中国中药杂志, 2016, 41(7): 1289-1296.

[4] 郜丹, 李晓菲, 尹萍, 等. 基于炮制减毒思想的何首乌肝毒性物质基础初步研究 [J]. 中草药, 2017, 48(10): 2044-2050.

[5] 郭延丽, 唐瑜, 刘巧, 等. 何首乌及其主要成分肝毒性机制的研究进展 [J]. 药物评价研究, 2021, 44(10): 2252-2261.

[6] 宋海波, 杜晓曦, 郭晓昕, 等. 基于中医药古籍的何首乌安全性及风险因素分析 [J]. 中国中药杂志, 2015, 40(5): 985-988.

[7] 崔鹤蓉, 柏兆方, 宋海波, 等. 从古今炮制方法演变探讨何首乌毒性的潜在影响因素 [J]. 中国中药杂志, 2016, 41(2): 333-339.

[8] 杨磊, 张曼华, 陈文明, 等. 基于经典与现代炮制方法对何首乌主要化学成分变化规律研究 [J]. 中华中医药杂志, 2018, 33(2): 770-772.

[9] 张语凡, 王蕾, 王鑫, 等. 何首乌不同炮制时间与方式的薄层特征图谱鉴别 [J]. 中华中医药杂志, 2018, 33(11): 5182-5185.

[10] Lv G Y, Lou Z H, Chen S H, *et al.* Pharmacokinetics and tissue distribution of 2,3,5,4'-tetrahydroxystilbene-2-O- β -D-glucoside from traditional Chinese medicine *Polygonum multiflorum* following oral administration to rats [J]. *J Ethnopharmacol*, 2011, 137(1): 449-456.

[11] Tu C, Gao D, Li X F, *et al.* Inflammatory stress potentiates emodin-induced liver injury in rats [J]. *Front Pharmacol*, 2015, 6: 233.

[12] Xu S F, Liu J, Shi J S, *et al.* 2,3,4',5-tetrahydroxystilbene-2-O- β -D-glucoside exacerbates acetaminophen-induced hepatotoxicity by inducing hepatic expression of CYP2E1, CYP3A4 and CYP1A2 [J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 16511.

[13] Weber J A, Baxter D H, Zhang S L, *et al.* The microRNA spectrum in 12 body fluids [J]. *Clin Chem*, 2010, 56(11): 1733-1741.

[14] McDonald J S, Milosevic D, Reddi H V, *et al.* Analysis of circulating microRNA: Preanalytical and analytical challenges [J]. *Clin Chem*, 2011, 57(6): 833-840.

[15] Kanki M, Moriguchi A, Sasaki D, *et al.* Identification of urinary miRNA biomarkers for detecting cisplatin-induced proximal tubular injury in rats [J]. *Toxicology*, 2014, 324: 158-168.

[16] Fujita S, Ito T, Mizutani T, *et al.* miR-21 Gene expression triggered by AP-1 is sustained through a double-negative feedback mechanism [J]. *J Mol Biol*, 2008, 378(3): 492-504.

[17] Li Y F, Jing Y, Hao J L, *et al.* microRNA-21 in the pathogenesis of acute kidney injury [J]. *Protein Cell*, 2013, 4(11): 813-819.

[18] Nassirpour R, Mathur S, Gosink M M, *et al.* Identification of tubular injury microRNA biomarkers in urine: Comparison of next-generation sequencing and qPCR-based profiling platforms [J]. *BMC Genomics*, 2014, 15(1): 485.

[19] Zarjou A, Yang S Z, Abraham E, *et al.* Identification of a microRNA signature in renal fibrosis: Role of miR-21 [J]. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2011, 301(4): F793-F801.

[20] Gao H, Li J W, Jia Y R, *et al.* A hairpin DNA-fueled nanoflare for simultaneous illumination of two microRNAs in drug-induced nephrotoxic cells with target catalytic recycling amplification [J]. *Analyst*, 2019, 144(24): 7178-7184.

[21] 秦宇雯, 张丽萍, 赵祺, 等. 九蒸九晒黄精炮制工艺的研究进展 [J]. 中草药, 2020, 51(21): 5631-5637.

[责任编辑 李亚楠]