

# 山豆根致大鼠肝损伤外周血 microRNA 早期变化特征研究

盛云华<sup>1,2</sup> 金若敏<sup>1</sup> 姚广涛<sup>1</sup> 周璐<sup>1</sup> 乔靖怡<sup>1</sup>

**摘要** **目的** 探讨山豆根致肝损伤外周血微小 RNA (microRNA, miRNA) 的早期变化特征, 寻找肝损伤早期外周血 miRNA 标志物。**方法** 60 只 Wistar 大鼠随机分为山豆根组和对照组, 每组 30 只, 分别给予山豆根水煎液 12 g/kg (2 mL/100 g) 和等容量蒸馏水灌胃。于给药 3、7、14、28 天和停药后 28 天分批处理动物, 取血清, 测定常规血液生化指标 ALT、AST、TBIL、碱性磷酸酶 (ALP)、总蛋白 (TP) 和白蛋白 (ALB) 水平, 计算球蛋白 (GLO) 水平; 取肝组织进行 HE 染色, 观察病理形态学变化。同时分别取两组大鼠给药 7、14、28 天全血进行 miRNA 芯片检测, 筛选差异表达 miRNA, 并进行 RT-PCR 验证。**结果** 山豆根组给药 7~28 天 ALT 明显升高 ( $P < 0.05$ ), 组织病理学检查显示肝组织于给药 28 天出现肝细胞变性肿大。外周血 miRNA 芯片检测中, 给药 7、14、28 天上调差异表达 miRNA 分别有 11 个、22 个、13 个, 下调差异表达 miRNA 分别有 1 个、13 个、2 个。对给药 7、14、28 天共有差异表达 miRNA 通过靶基因预测和 pathway 分析发现, 参与调控信号转导、细胞间相互作用、细胞骨架、免疫相关的差异表达 miRNA 可能参与了肝损伤的进程。时效高峰在 7 天的 miR-291a-5p 的 RT-PCR 验证显示, miR-291a-5p 在外周血和肝组织的表达基本一致。**结论** miR-291a-5p 可在早期提示肝脏的损伤, 可作为山豆根致肝损伤早期标志物之一。

**关键词** 山豆根; 肝损伤; 微小 RNA; 标志物

Study on Early Change Features of microRNA in the Peripheral Blood of *Sophorae Tonkinensis* Radix et Rhizoma Induced Liver Injury Rats SHENG Yun-hua<sup>1,2</sup>, JIN Ruo-min<sup>1</sup>, YAO Guang-tao<sup>1</sup>, ZHOU Lu<sup>1</sup>, and QIAO Jing-yi<sup>1</sup> 1 Research Center for Drug Safety Evaluation, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai (201203), China; 2 Center for Drug Safety Evaluation, Shanghai Institute of Food and Drug Testing, Department of Pharmacotoxicity, Shanghai Institute of Food and Drug Testing, Shanghai (201203), China

**ABSTRACT** **Objective** To study early change features of microRNA (miRNA) in the peripheral blood of *Sophorae Tonkinensis* Radix et Rhizoma induced liver injury rats, and to look for the miRNA biomarkers in the peripheral blood of early liver injury. **Methods** Sixty Wistar rats were randomly divided into the control group and the *Sophorae Tonkinensis* Radix et Rhizoma (abbreviated as STRR) group, 30 in each group. Rats in the STRR group was administered with STRR decoction at 12 g/kg (2 mL/100 g), while equal volume of the distilled water was given to those in the control group. Rats were anesthetized on day 3, 7, 14, and 28, and 28 days after withdrawal. The serum samples were withdrawn. The alanine aminotransferase (ALT), aspartate transaminase (AST), total bile (TBIL), alkaline phosphatase (ALP), total protein (TP), and albumin (ALB) were detected. The globulin (GLO) level was calculated. HE staining was performed on the liver tissue to observe the pathomorphological changes. The whole blood was collected on day 7, 14, and 28 to perform the microarray test. The differentially expressed miRNAs were screened and verified by RT-PCR. **Results** The ALT activity obviously increased on day 7~28 in the STRR group ( $P < 0.05$ ). The histopathological results showed the degeneration and swelling of the liver cells on day 28. In the microarray test, there were 11, 22, and 13 up-regulatedly expressed miRNAs on day 7, 14, and 28, respectively. There were 1, 13, 2 down-regulatedly expressed miRNAs on day 7, 14, and 28, respectively. By target gene prediction and pathway analysis of differ-

基金项目:国家重点基础研究发展计划(973 计划)项目(No. 2009CB522807);国家科技重大专项资助项目(No. 2009ZX09502-002)

作者单位:1.上海中医药大学药物安全评价研究中心(上海 201203);2.上海市食品药品监督管理局药物安全评价中心 上海市食品药品检验所药理毒理室(上海 201203)

通讯作者:金若敏, Tel:021-51322401, E-mail:rmj801@126.com

entially expressed miRNA on day 7, 14, and 28, they involved in regulating and controlling signal transduction, cellular interaction, cytoskeleton. Differentially expressed miRNA might possibly participate in the process of liver injury. The RT-PCR result of the expression of miR-291a-5p with the peak time efficiency on day 7 showed that the expressions of miR-291a-5p in the peripheral blood and the liver tissue were basically identical. Conclusion miR-291a-5p could early indicate the liver injury, which could be taken as one of an early marker in STRR induced liver injury.

**KEYWORDS** *Sophorae Tonkinensis Radix et Rhizoma*; liver injury; microRNA; biomarker

微小 RNA (microRNA, miRNA) 是一类内源性表达的、约有 18 ~ 24 个核苷酸的、非蛋白编码的小 RNA 分子, 这些小 RNA 分子主要通过转录后水平对靶 mRNA 起着负性调节作用<sup>[1]</sup>。miRNA 在医学领域中的应用日益受到研究者的重视, 越来越多的研究报道显示 miRNA 在化学性和酒精性肝损伤<sup>[2]</sup>、肝炎病毒感染<sup>[3]</sup>、肝癌<sup>[4]</sup>及其他癌症<sup>[5-7]</sup>等疾病诊断中可作为诊断生物标志物。动物实验研究亦表明 miRNA 在对乙酰氨基酚所致小鼠肝毒性模型中可作为比常规肝功能指标更为灵敏、更为早期的肝损伤生物标志物<sup>[8]</sup>。山豆根为豆科植物越南槐 (*Sophorae Tonkinensis Radix et Rhizoma*) 干燥根及根茎, 性味苦寒, 有毒。现代文献屡见服用山豆根中毒的报道, 其毒性多因过量服用引起, 其不良反应主要包括胃肠道反应和神经毒性反应<sup>[9,10]</sup>。笔者前期研究发现大鼠连续 26 天灌胃山豆根 12 g/kg, 可造成肝功能指标 ALT 水平显著升高, 肝细胞超微结构检查可见细胞核变形有肿胀趋势, 核膜皱缩, 毛细胆管扩张, 滑面内质网略扩张<sup>[11]</sup>。本研究以山豆根致肝损伤模型大鼠为研究对象, 结合常规肝毒性评价指标——临床生化和肝组织病理形态学检查, 重点观察外周血 miRNA 表达谱变化, 以期筛选肝毒性的早期 miRNA 生物标志物, 为药物性肝损伤的早期评价提供实验依据。

## 材料与方法

1 动物 Wistar 大鼠 60 只, SPF 级, 雌雄各半, 体重 100 ~ 120 g, 由上海西普尔-必凯实验动物有限公司提供, 动物合格证号: SCXK(沪)2008-0016。动物均在上海中医药大学实验动物中心 SPF 级饲养室饲养, 室内温度控制在 20 ~ 25 °C, 湿度为 40% ~ 70%, 工作照度 12 h 明/12 h 暗。实验期间, 动物自由饮水。

2 药物制备 山豆根, 产地: 广西, 批号: 0903125, 购于四川新荷花中药饮片有限公司, 经上海中医药大学中药学院李西林副教授鉴定系为豆科植物越南槐 (*Sophora tonkinensis* Gapnep.) 的干燥根及根茎。药液制备: 称取山豆根药材, 加水浸泡 1 h 后,

先煎煮 0.5 h, 过滤, 再加水煎煮 0.5 h, 合并 2 次滤液, 浓缩至 0.6 g 生药/mL, 4 °C 冷藏, 备用。参照 2010 年版《中国药典》山豆根含量测定方法对山豆根药材及其水煎液中苦参碱、氧化苦参碱含量进行测定, 作为山豆根药材及其水煎液的质量控制。山豆根中苦参碱含量为 0.414%, 氧化苦参碱含量为 0.580%; 山豆根水煎液中苦参碱含量为 3.65 mg/mL, 氧化苦参碱含量为 0.03 mg/mL。

3 主要试剂 ALT 试剂盒, R1, 批号: L922, R2, 批号: L917; AST 试剂盒, R1, 批号: B023, R2, 批号: L917; 碱性磷酸酶 (ALP) 试剂盒, R1, 批号: B018, R2, 批号: J916, 均由日本世诺临床诊断制品株式会社生产。总蛋白 (TP) 试剂盒, R1, 批号: L091241; 白蛋白 (ALB) 试剂盒, R1, 批号: L100211, 均由上海复星长征医学科学有限公司生产。TBIL 试剂盒, R1, 批号: ER731, R2, 批号: ER733, 由日本和光纯药工业株式会社生产。TRI reagent BD, 批号: TB-12 购自美国 MRCgene 公司。miR-CURY LNA™ microRNA Array (含有 1 891 条探针), 批号: 208402, miR-CURY™ 芯片标记试剂盒, 批号: 208032-A, 杂交试剂盒, 批号: 208021, 均购自丹麦 Exiqon 公司。FQ-PCR 试剂盒, 购自上海达为科生物科技有限公司。DEPC 处理水, 购自上海赛百盛基因公司。

4 主要仪器 日立 7080 全自动生化分析仪 (日本日立贸易有限公司); Olympus BH-2 光学显微镜 (奥林巴斯光学株式会社); Agilent1100 高效液相色谱仪; Nandrop ND-1000 instrument (美国 Nandrop 公司制造); TY8824 Axon GenePix 4000B 扫描仪 (美国 Axon 公司); 杂交仪 (美国 NimbleGen 公司); Real-time PCR 检测仪 (7500 Sequence Detection System, 美国 ABI); 6/10S 手持式超细匀浆机 (上海弗鲁克流体机械制造有限公司)。

5 分组与给药 60 只大鼠按随机区组分为对照组和山豆根组, 每组 30 只。山豆根组给予山豆根水煎液 12 g/kg (2 mL/100 g, 相当于临床用量的 120 倍) 灌胃, 对照组灌胃等容量蒸馏水, 连续给药 3、7、14、28 天。

6 血液生化指标检测及肝组织病理形态学检查

两组分别于给药3、7、14、28天和停药后28天各处理6只大鼠。以25%乌拉坦溶液1g/kg麻醉动物,取2mL全血采用EDTA抗凝,用于miRNA芯片检测;剩余全血5000r/min,4℃离心15min,取血清,采用全自动生化仪测定ALT、AST、TBIL、ALP、TP和ALB水平,计算球蛋白(GLO)水平。HE染色对肝组织进行病理形态学检查。

**7 芯片检测** 采用Trizol法抽提总RNA,经质量检测合格后采用miRCURY™芯片标记试剂盒对抽提的总RNA样本进行标记,标记后的样本与miRCURY LNA™ microRNA Array芯片进行杂交,miRNA芯片探针信号采用Axon GenePix 4000B芯片扫描仪进行扫描, GenePix pro V6.0软件读取原始信号值(Foreground),处理数据。

**8 差异表达miRNA的筛选** GenePix pro V6.0软件读取原始信号值,经背景值的校正、中位数标准化处理后,采用差异倍数(fold change, FC)计算方法,以FC≥1.30或FC≤0.77为标准进行差异表达miRNA的筛选。

**9 miRNA靶基因预测** 差异表达miRNA靶基因采用targetscan V5.1数据库(<http://www.targetscan.org/>)进行预测。

**10 靶基因pathway分析** 经预测的靶基因采用DAVID数据库(<http://david.abcc.ncifcrf.gov/>)进行pathway分析。通过显著性P值、误判率和靶向性富集度3个方面综合评价pathway的重要程度。pathway的筛选标准为P<0.05。DAVID数据库对pathway的分析引用京都基因与基因组百科全书(Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, KEGG)数据库对靶基因进行相关代谢学途径分析。

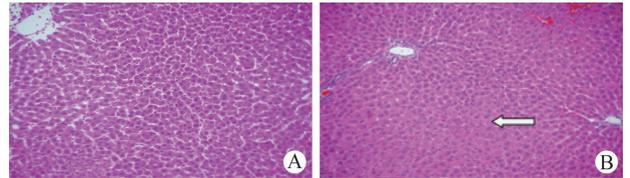
**11 给药7、14、28天共有差异表达miRNA时效关系** 各时间点差异表达miRNA随给药时间延长均可绘制时效曲线,根据FC值,筛选7、14、28天共有差异表达miRNA时效高峰在药物干预早期(7天)的miRNA。

**12 差异表达miRNA的RT-PCR验证** 对于芯片筛选具有早期性差异表达的miRNA进行RT-PCR验证,同时进行肝组织中差异表达miRNA的验证。

**13 统计学方法** 应用SPSS 16.0统计软件,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,相同时间点两组间比较采用t检验, P<0.05为差异有统计学意义。

**结 果**

**1 两组大鼠血液生化指标及肝组织病理形态学比较(表1,图1)** 与对照组同期比较,山豆根组于给药7、14、28天ALT明显升高(P<0.05),停药28天恢复正常;ALP于给药14天明显升高(P<0.05),停药28天恢复正常;AST、TBIL、TP、ALB、GLO变化不明显。光镜下观察,山豆根组于给药28天1只大鼠肝组织出现肝细胞变性肿大,停药28天恢复;两组给药3、7、14天及停药28天大鼠组织病理形态学均无明显变化。



注:A为对照组;B为山豆根组;箭头所示为肝细胞肿大  
图1 两组大鼠给药28天肝组织病理形态学比较 (HE染色, ×200)

**2 总RNA的质量控制** 紫外检测下,各时间点对照组和山豆根组样本A260/A280均在1.8~2.1之间,凝胶电泳中,总RNA28s和18s两条带清晰,28s/18s均大于1.5,总RNA质量合格,完整性好,无降解及污染现象。

**3 差异表达miRNA的筛选结果(表2~4,图2)** 山豆根组给药7、14、28天3个时间点的差异表达miRNA见表2~4。给药7、14、28天差异表达上调的miRNA分别为11个、22个、13个,差异表达下调miRNA分别为1个、13个、2个。

表1 两组大鼠血液生化指标比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	n	时间	ALT (IU/L)	AST (IU/L)	TBIL (μmol/L)	ALP (IU/L)	TP (g/L)	ALB (g/L)	GLO (g/L)
对照	6	给药3天	27.00 ± 1.79	109.33 ± 4.59	0.64 ± 0.11	341.50 ± 130.06	48.90 ± 1.25	26.95 ± 0.42	21.95 ± 1.09
		给药7天	27.17 ± 3.49	127.83 ± 13.23	0.65 ± 0.09	323.50 ± 105.73	50.93 ± 1.32	28.07 ± 0.28	22.87 ± 1.12
		给药14天	38.33 ± 9.85	115.17 ± 7.31	0.66 ± 0.07	310.33 ± 119.47	55.18 ± 1.85	30.13 ± 0.78	25.05 ± 1.32
		给药28天	44.83 ± 5.19	163.67 ± 36.63	0.46 ± 0.08	349.33 ± 80.97	52.83 ± 3.26	29.42 ± 1.44	23.42 ± 1.88
		停药28天	37.00 ± 6.07	103.33 ± 15.16	0.55 ± 0.13	232.33 ± 70.53	61.48 ± 2.34	30.33 ± 0.66	31.15 ± 2.14
山豆根	6	给药3天	44.17 ± 14.96	98.17 ± 5.98	0.53 ± 0.14	524.50 ± 165.71	50.90 ± 2.44	28.00 ± 0.92	22.90 ± 1.61
		给药7天	59.50 ± 13.58*	126.33 ± 16.19	0.63 ± 0.05	542.17 ± 115.24	50.53 ± 1.87	28.15 ± 0.66	22.38 ± 1.28
		给药14天	57.40 ± 5.90*	135.17 ± 49.36	0.72 ± 0.10	482.00 ± 55.59*	55.98 ± 3.35	30.63 ± 0.98	25.35 ± 2.46
		给药28天	68.00 ± 9.23*	154.33 ± 32.38	0.41 ± 0.06	535.00 ± 91.70	51.48 ± 2.47	29.07 ± 1.19	22.42 ± 1.47
		停药28天	42.17 ± 9.52	94.83 ± 18.39	0.46 ± 0.05	313.17 ± 126.19	61.02 ± 1.83	30.22 ± 0.65	30.80 ± 1.69

注:与对照组同期比较, \*P<0.05

表 2 给药 7 天差异表达 miRNA

ID	名称	FC	P	变化
46251	miR-1193-3p	6.259399341	0.012238458	↑
11245	miR-433 *	3.148378377	0.055519039	↑
42752	miR-872 *	2.401405972	0.004434274	↑
42826	miR-300-5p	2.154478685	0.025469413	↑
145798	miR-142-5p	1.667541737	0.085075363	↑
28944	miR-667	1.638269476	0.127913455	↑
42724	miR-34b *	1.629735685	0.195545711	↑
31388	miR-291a-5p	1.522955939	0.124229534	↑
11208	miR-207	1.481902625	0.197408443	↑
28547	miR-675	1.480881983	0.037446898	↑
42540	miR-494	1.386361084	0.440965181	↑
145633	let-7d *	0.748265276	0.467249918	↓

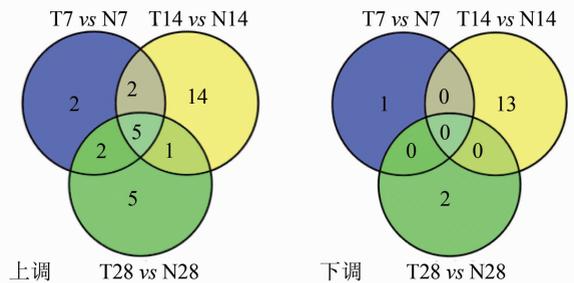
注: ↑代表上调; ↓代表下调; \*表示暂无靶基因信息; 表 3、4 同

表 3 给药 14 天差异表达 miRNA

ID	名称	FC	P	变化
11245	miR-433 *	2.661008	0.299023	↑
13143	miR-301a	2.417205	0.042659	↑
146008	miR-26b	2.322404	0.314532	↑
145968	let-7d	2.218809	0.067645	↑
42826	miR-300-5p	1.989854	0.261368	↑
11053	miR-32	1.975082	0.298974	↑
146086	miR-30a	1.775711	0.033831	↑
46251	miR-1193-3p	1.754318	0.464224	↑
11235	miR-351	1.642994	0.332264	↑
42540	miR-494	1.605381	0.135003	↑
28191	miR-30e	1.558862	0.008157	↑
10967	miR-16	1.556235	0.028724	↑
42462	miR-883 *	1.524102	0.486356	↑
10997	miR-19a	1.482665	0.131641	↑
42866	miR-451	1.415286	0.069309	↑
42724	miR-34b *	1.414152	0.104664	↑
146112	miR-30b-5p	1.391350	0.230143	↑
31388	miR-291a-5p	1.370414	0.183051	↑
17280	miR-15b	1.338692	0.306713	↑
10998	miR-19b	1.337158	0.126912	↑
42650	miR-17-5p	1.320013	0.403106	↑
11208	miR-207	1.302656	0.124138	↑
42467	miR-129	0.269873	0.191560	↓
42917	miR-551b	0.534604	0.404879	↓
42630	miR-140 *	0.609648	0.033084	↓
11105	miR-378	0.609750	0.107491	↓
28547	miR-675	0.630088	0.219400	↓
29575	miR-32 *	0.650576	0.183253	↓
28944	miR-667	0.661244	0.450172	↓
19582	miR-106b	0.674682	0.081770	↓
17749	let-7b	0.684155	0.035690	↓
145841	miR-23b	0.701716	0.153516	↓
11030	miR-26a	0.738298	0.396720	↓
42752	miR-872 *	0.742635	0.621080	↓
11039	miR-29a	0.754499	0.337360	↓

表 4 给药 28 天差异表达 miRNA

ID	名称	FC	P	变化
46251	miR-1193-3p	4.031829	0.039994	↑
145633	let-7d *	2.758959	0.001613	↑
11245	miR-433 *	2.196935	0.112797	↑
28547	miR-675	1.939798	0.033022	↑
42826	miR-300-5p	1.873428	0.134218	↑
17953	miR-183 *	1.857055	0.104560	↑
42540	miR-494	1.787063	0.017020	↑
10967	miR-16	1.471329	0.205757	↑
42752	miR-872 *	1.392970	0.373518	↑
42917	miR-551b	1.356934	0.184676	↑
31388	miR-291a-5p	1.320750	0.056134	↑
146011	let-7a	1.306938	0.338574	↑
17749	let-7b	1.306055	0.368314	↑
29872	miR-340-5p	0.673895	0.147143	↓
42866	miR-451	0.737638	0.171423	↓



注: T 为山豆根组; N 为对照组; T 7 vs N7 表示 7 天时山豆根组与对照组比较有差异表达的 miRNA; T14 vs N14、T 28 vs N28 同

图 2 山豆根组给药 7、14、28 天差异表达 miRNA

4 miRNA 靶基因预测结果(表 5) 本实验对以下 3 部分 miRNA 进行了靶基因预测:(1)7 天时差异表达 miRNA;(2)7 天差异表达 miRNA 在 14 天时仍表现为差异表达的 miRNA;(3)在 28 天时仍表现为差异表达的 miRNA。各时间点差异表达 miRNA 个数以及各时间点能检索到的差异表达 miRNA 个数见表 5。7、14、28 天的 5 个共有差异表达 miRNA 为 miR-142-5p、miR-207、miR-291a-5p、miR-300-5p、miR-494。

表 5 各时间点差异表达 miRNA 和 targetscan 检索到的 miRNA (个)

给药时间	上调		下调	
	7 天差异表达 miRNA	targetsca 检索到的 miRNA	7 天差异表达 miRNA	targetsca 检索到的 miRNA
7 天	11	5	1	0
14 天	7	4	0	0
28 天	5	3	0	0

### 5 靶基因 pathway 分析结果

#### 5.1 7 天差异表达 miRNA 调控的 pathway

山豆根 12 g/kg 连续给药 7 天,主要影响细胞的信号转导通路(Wnt、TGF-β、ErbB、MAPK、mTOR 和 Insulin 信号转导通路)、细胞间相互作用(Focal adhesion、Adherens junction)、细胞骨架(Regulation of actin cytoskeleton)、免疫相关(Endocytosis、Leukocyte transendothelial migration)和蛋白质的水解(Ubiquitin mediated proteolysis),另外,还有部分与神经和癌症相关的通路。

#### 5.2 7 天差异表达 miRNA 在 14 天所调控的 pathway

7 天差异表达 miRNA 在 14 天仍表现为差异表达者有 4 个,其主要影响细胞的信号转导通路(Wnt、ErbB 和 TGF-β 信号转导通路)、细胞骨架(Regulation of actin cytoskeleton)、细胞间相互作用(Focal adhesion、Adherens junction)、免疫相关(Endocytosis)、蛋白质的水解(Ubiquitin mediated proteolysis),另外还有部分与神经相关的通路。

#### 5.3 7 天差异表达 miRNA 在 28 天所调控的 pathway

7 天差异表达 miRNA 在 28 天仍表现为差异表达的有 3 个,其主要影响细胞的信号转导通路(Wnt、TGF-β 信号转导通路)、蛋白质的水解(Ubiquitin mediated proteolysis)、细胞骨架(Regulation of actin cytoskeleton)、细胞间相互作用(Focal adhesion)、免疫相关(Endocytosis)。

#### 5.4 7、14、28 天共有差异表达 miRNA 时效关系

以 7、14、28 天 3 个时间点共有的 5 个表达上调 miRNA 作 FC 对时间的变化曲线(FC-T 曲线),筛选到时效高峰在 7 天的 3 个上调的差异表达 miRNA,其差异表达 FC 见表 6。经 targetscan 数据库检索到 miR-291a-5p 和 miR-300-5p, pathway 分析结果:miR-291a-5p 调控的靶基因在落入的 pathway,主要与信号通路(ErbB、Wnt、T cell receptor signaling pathway)、细胞间相互作用(Focal adhesion)和细胞骨架(Regulation of actin cytoskeleton)相关;miR-300-5p 调控的靶基因在落入的 pathway 共有 2 条,主要与神经系统相关。

表 6 时效高峰在 7 天的上调的差异表达 miRNA

ID	名称	FC			峰值时间
		T7/N7	T14/N14	T28/N28	
31388	miR-291a-5p	1.522 956	1.370 414	1.320 750	7 天
42826	miR-300-5p	2.154 479	1.989 854	1.873 428	7 天
11245	miR-433*	3.148 378	2.661 008	2.196 935	7 天

注:T7/N7 代表 7 天时山豆根组与对照组比较的差异表达倍数;T14/N14、T28/N28 同;\*表示暂无靶基因信息

### 6 外周血 miRNA 在芯片和肝组织中表达的

RT-PCR 验证结果(表 7) 山豆根致肝损伤外周血 miR-291a-5p 的芯片验证结果显示:与对照组同期比较,山豆根组给药 7 天 miR-291a-5p 表达显著升高( $P < 0.01$ ),给药 28 天表达显著降低( $P < 0.01$ )。肝组织验证结果显示:与对照组同期比较,山豆根组给药 7、14 天 miR-291a-5p 表达显著升高( $P < 0.01$ ),28 天表达亦有升高趋势( $P > 0.05$ )。

表 7 两组大鼠外周血和肝组织 miR-291a-5p 表达比较 (% ,  $\bar{x} \pm s$ )

组别	n	时间	miR-291a-5p 表达	
			外周血	肝组织
对照	6	给药 7 天	0.14 ± 0.06	0.20 ± 0.03
		给药 14 天	0.20 ± 0.08	0.23 ± 0.07
		给药 28 天	0.21 ± 0.05	0.36 ± 0.18
山豆根	6	给药 7 天	0.30 ± 0.10*	1.24 ± 0.59*
		给药 14 天	0.28 ± 0.12	1.23 ± 0.51*
		给药 28 天	0.13 ± 0.03*	0.50 ± 0.37

注:与对照组同期比较,\* $P < 0.01$

### 讨 论

miRNA 主要通过与其靶 mRNA 的 3'非翻译区(3'-untrans-atedregion,3'-UTR)互补性结合,在转录后水平发挥 RNA 介导的基因沉默(RNA-mediated gene silencing)<sup>[12]</sup>,miRNA“种子序列”(含有 7 个核苷酸,第 2~8 个核苷酸)与其靶 mRNA 的 3'-UTR 互补性结合程度及稳定性决定了 mRNA 的受抑制程度。miRNAs 参与细胞增殖和定向分化、发育、凋亡、免疫应答、心血管发育和重建以及脂类代谢等基本生命活动的实时广泛精细调控<sup>[13-16]</sup>,并与种疾病的发生发展密切相关<sup>[17]</sup>。

在正常状态下外周血 miRNA 的种类及其表达丰度可能处于一个相对平衡的状态,而当机体内受到外界刺激而发生组织、器官的代谢异常或器质性病变会促使受损细胞组织内源性 miRNA 释放到外周,表现为特定疾病状态下某些外周血 miRNA 的表达水平发生显著性变化。因此本实验对山豆根所致肝损伤大鼠外周血 miRNA 的变化进行了研究,并结合常规临床生化和肝组织病理学检查,分析肝损伤早期外周血 miRNA 的变化,以期寻找肝损伤早期的 miRNA 标志物。

结果显示,山豆根给药 7~28 天血清 ALT 明显升高( $P < 0.05$ ),给药 28 天大鼠出现肝细胞肿大,提示山豆根 12 g/kg 连续给药 28 天可引起肝功能性指标和肝组织形态学变化。本实验对肝损伤早期差异表达

的 miRNA 在 14 天和 28 天的变化进行了分析。

对各时间点差异表达 miRNA 的靶基因预测和 pathway 分析显示,在肝损伤的进程中,Wnt、TGF- $\beta$  信号转导通路、细胞间相互作用、细胞骨架、免疫相关的细胞内吞受到差异表达的 miRNA 的调控,可能参与了肝损伤的进程,提示这些 pathway 与肝损伤关系密切。

差异表达 miRNA 随给药时间的变化,呈现一定的时效关系。时效高峰在 7 天的 miRNA 参与了损伤的发生、发展,并且在早期就能体现。对时效高峰在 7 天的差异表达 miRNA 进行验证,考察其变化能否提示损伤的进程。

7、14、28 天共有的 5 个差异表达 miRNA,发现有 3 个上调 miRNA 的差异表达高峰在 7 天,即在早期就能表现出差异表达,通过 targetscan 数据库对 miRNA 的靶基因进行预测,并采用 DAVID 数据库对 miRNA 调控的靶基因进行 pathway 的分析发现,miR-300-5p 主要与神经细胞的分化有关,miR-291a-5p 与 Wnt 信号转导通路、T 细胞受体(T Cell receptor, TCR)信号通路、细胞骨架以及细胞间相互作用等相关。

miR-291a-5p 能调控 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路,Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路与肝脏密切关系,肝细胞生长、再生,肝脏谷氨酰胺的代谢,自由基引起的氧化应激及肝癌的形成均与  $\beta$ -catenin 有关<sup>[18-21]</sup>。另外,miR-291a-5p 亦可调控 TCR 信号通路,TCR 是由膜蛋白组成的复合物,参与激活 T 细胞和抗原呈递过程。TCR 的激活可以引起胞内信号级联反应,调节细胞增殖、分化和凋亡<sup>[22]</sup>。TCR 与抗原的结合能引起下游蛋白的酪氨酸磷酸化,进而引起细胞外信号调节激酶(ERK)、c-Jun N-端激酶(JNK)、NF- $\kappa$ B 等通路的活化<sup>[23-25]</sup>。而肝细胞的凋亡与 ERK、JNK 等 MAPK 通路密切相关,肝细胞的炎症反应同 NF- $\kappa$ B 亦密切相关<sup>[26-29]</sup>。

miR-291a-5p 在芯片验证和肝组织验证中结果基本一致,外周血中 miRNA 的变化可提示肝组织中 miRNA 的变化,肝损伤的过程中 miR-291a-5p 所调控的 pathway 可能参与损伤的进程。由此推测,通过检测外周血中 miR-291a-5p 的表达可提示肝脏的损伤。miR-291a-5p 可能作为山豆根致肝损伤早期的损伤标志物之一。miRNA 芯片技术可用于发现药物致肝损伤的早期生物标志物,为中药肝毒性的早期生物标志物的研究及肝毒性的早期监测提供了新的思路与方法。

## 参 考 文 献

- [1] Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function [J]. *Cell*, 2004, 116(2): 281-297.
- [2] Zhang Y, Jia Y, Zheng R, et al. Plasma microRNA-122 as a biomarker for viral-, alcohol-, and chemical-related hepatic diseases [J]. *Clin Chem*, 2010, 56(12): 1830-1838.
- [3] Li LM, Hu ZB, Zhou ZX, et al. Serum microRNA profiles serve as novel biomarkers for HBV infection and diagnosis of HBV-positive hepatocarcinoma [J]. *Cancer Res*, 2010, 70(23): 9798-9807.
- [4] Yamamoto Y, Kosaka N, Tanaka M, et al. MicroRNA-500 as a potential diagnostic marker for hepatocellular carcinoma [J]. *Biomarkers*, 2009, 14(7): 529-538.
- [5] Huang Z, Huang D, Ni S, et al. Plasma microRNAs are promising novel biomarkers for early detection of colorectal cancer [J]. *Int J Cancer*, 2010, 127(1): 118-126.
- [6] Tsujiura M, Ichikawa D, Komatsu S, et al. Circulating microRNAs in plasma of patients with gastric cancers [J]. *Br J Cancer*, 2010, 102(7): 1174-1179.
- [7] Bishop JA, Benjamin H, Cholak H, et al. Accurate classification of non-small cell lung carcinoma using a novel microRNA-based approach [J]. *Clin Cancer Res*, 2010, 16(2): 610-619.
- [8] Wang K, Zhang S, Marzolf B, et al. Circulating microRNAs, potential biomarkers for drug-induced liver injury [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009, 106(11): 4402-4407.
- [9] 徐峰. 山豆根中毒 5 例 [J]. *广东医药杂志*, 1999, 20(11): 900.
- [10] 杨德全, 杨勤. 山豆根临床中毒 3 例分析 [J]. *实用中医药杂志*, 2005, 21(7): 437.
- [11] 李峰杰, 姚广涛, 金若敏, 等. 山豆根致大鼠肝毒性研究 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2010, 16(12): 190-192.
- [12] Farh KK, Grimson A, Jan C, et al. The widespread impact of mammalian microRNAs on mRNA repression and evolution [J]. *Science*, 2005, 310(5755): 1817-1821.
- [13] Zhang J, Jima DD, Jacobs C, et al. Patterns of microRNA expression characterize stages of human B-cell differentiation [J]. *Blood*, 2009, 113(19): 4586-4594.

- [14] Guo CJ, Pan Q, Li DG, et al. miR-15b and miR-16 are implicated in activation of the rat hepatic stellate cell: an essential role for apoptosis [J]. *J Hepatol*, 2009, 50(4): 766–778.
- [15] Witwer KW, Sisk JM, Gama L, et al. MicroRNA regulation of IFN-beta protein expression: rapid and sensitive modulation of the innate immune response [J]. *J Immunol*, 2010, 184(5): 2369–2376.
- [16] Cordes KR, Srivastava D, Ivey KN. MicroRNAs in cardiac development [J]. *Pediatr Cardiol*, 2010, 31(3): 349–356.
- [17] Vickers KC, Remaley AT. MicroRNAs in atherosclerosis and lipoprotein metabolism [J]. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes*, 2010, 17(2): 150–155.
- [18] Tan X, Apte U, Micsenyi A, et al. Epidermal growth factor receptor: a novel target of the Wnt/beta-catenin pathway in liver [J]. *Gastroenterology*, 2005, 129(1): 285–302.
- [19] Cadoret A, Ovejero C, Terris B, et al. New targets of beta-catenin signaling in the liver are involved in the glutamine metabolism [J]. *Oncogene*, 2002, 21(54): 8293–8301.
- [20] Essers MA, de Vries-Smits LM, Barker N, et al. Functional interaction between beta-catenin and FOXO in oxidative stress signaling [J]. *Science*, 2005, 308(5725): 1181–1184.
- [21] Calvisi DF, Factor VM, Loi R, et al. Activation of beta-catenin during hepatocarcinogenesis in transgenic mouse models: relationship to phenotype and tumor grade [J]. *Cancer Res*, 2001, 61(5): 2085–2091.
- [22] Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14* [J]. *Cell*, 1993, 75(5): 843–854.
- [23] Reinhart BJ, Slack FJ, Basson M, et al. The 21-nucleotide *let-7* RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans* [J]. *Nature*, 2000, 403(6772): 901–906.
- [24] Lawrie CH, Gal S, Dunlop HM, et al. Detection of elevated levels of tumor-associated microRNAs in serum of patients with diffuse large B-cell lymphoma [J]. *Br J Haematol*, 2008, 141(5): 672–675.
- [25] Huang Z, Huang D, Ni S, et al. Plasma microRNAs are promising novel biomarkers for early detection of colorectal cancer [J]. *Int J Cancer*, 2010, 127(1): 118–126.
- [26] Jayakumar AR, Bethea JR, Tong XY, et al. NF-kappaB in the mechanism of brain edema in acute liver failure: studies in transgenic mice [J]. *Neurobiol Dis*, 2011, 41(2): 498–507.
- [27] Manna P, Ghosh M, Ghosh J, et al. Contribution of nano-copper particles to *in vivo* liver dysfunction and cellular damage: Role of IkappaBalpha/NF-kappaB, MAPKs and mitochondrial signal [J]. *Nanotoxicology*, 2012, 6(1): 1–21.
- [28] Hu ZH, Wang LL, Tang Q, et al. NF-kappaB levels in the liver of young rats with endotoxemic liver injury [J]. *Chin J Contemporary Pediatr*, 2010, 12(10): 804–808.
- [29] Jiang SQ, He N, Liu YH. Expression and significance of NF-kappaB p65 in ethanol induced acute liver cell damage in mice [J]. *Chin J Ind Hygiene Occupational Dis*, 2010, 28(11): 840–841.

(收稿:2012-01-04 修回:2012-05-20)

## 《Chinese Journal of Integrative Medicine》获国家自然科学基金资助

根据《国家自然科学基金条例》的规定和专家评审意见,国家自然科学基金委员会决定批准资助《Chinese Journal of Integrative Medicine》,资助类别为专项基金项目,亚类为重点学术期刊,资助项目起止年月:2013年1月—2014年12月。

《Chinese Journal of Integrative Medicine》是由中国中西医结合学会、中国中医科学院主办的同行评审杂志(月刊),旨在促进结合医学及替代医学的国际交流,及时发表结合医学或替代医学领域的最新进展、趋势以及临床实践、科学研究、教育、保健方面经验和成果的科技论文。主编为中国科学院院士陈可冀教授。2012年6月由汤姆森公司公布的2011期刊引证报告,本刊影响因子为0.799。

以此次资助为契机,本刊将进一步提高办刊质量,促使SCI影响因子进一步提升。欢迎中医及中西医结合工作者积极给本刊赐稿或组稿,积极参加本刊的审稿工作!营造我们自己的学术品牌!