

黄芪饮片 miRNA 谱及热力学的稳定性研究

沈朝斌, 蔡红, 郁兰

上海中医药大学附属上海市中西医结合医院, 上海 200082

摘要: 目的 为更好了解药用黄芪微小 RNA (miRNA) 被机体摄入和吸收的情况, 试图建立黄芪 miRNA 谱, 为今后黄芪饮片药理学研究奠定基础。方法 以经干燥、高温和微波处理的黄芪煎煮液为样本, 采用高通量深度测序方法以获取未知的 miRNA 序列。结果 经测序得到药用黄芪 9 931 049 个小 RNA 读数。经与 miRBase 21 数据库所有植物种类潜在发卡型结构比对, 分析和构建了黄芪饮片煎煮液 miRNA 谱, 并确定了 1 个保守的 miRNA 和 9 个新发现的 miRNA。经进一步生物学信息分析, 发现 12 种 I 类小干扰性 RNA (small interfering RNAs, siRNAs) 序列, 其 5' 端对热力学不稳定, 3' 端种子区域对热力学高度稳定。结论 首次揭示了经热力学处理后黄芪饮片的 miRNA 谱, I 类 siRNAs 是潜在的可利用的植物药的生物化学分子, 有助于今后中药在表观遗传学方面的深入研究。

关键词: 微小 RNA; 膜荚黄芪; 高通量测序; 小干扰性 RNA; 热力学稳定性; 中药

中图分类号: R282.12 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2015)20-3079-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2015.20.020

miRNA library and thermodynamic stability of *Astragali Radix* decoction pieces

SHEN Chao-bin, CAI Hong, YU Lan

Affiliated Shanghai TCM-Integrated western Medicine Hospital, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200082, China

Abstract: Objective To establish a small RNA library of *Astragalus membranaceus*, in order to understand the intake and absorption of miRNAs in human body, and to lay the foundation for pharmacological research of *Astragali Radix* decoction pieces (ARP). **Methods** The decoction of *A. membranaceus* after desiccation, high temperature and microwave treatment was used as sample, and using high-throughput sequencing technology, the unknown miRNA sequence was obtained. **Results** Totally 9 931 049 small RNA sequences were identified from ARP by the high-throughput sequencing technology. After compared with all hairpin-forming precursors in miRBase 21 database, the miRNA library of ARP decoction was established, and one conserved miRNA and 9 novel miRNA sequences were confirmed. Twelve class I small interfering RNAs (siRNAs) were obtained by further bioinformatic analysis and we found that the 5' terminal was unstable while the 3' terminal was stable thermodynamically. **Conclusion** The miRNAs expression profiles of ARP is first revealed by thermodynamic treatment. Our study suggests that class I siRNA can be used as a potential biochemistry components of phytomedicine, which might contribute to the epigenetic studies on Chinese materia medica.

Key words: miRNA; *Astragalus membranaceus* (Fisch) Bge.; high-throughput sequencing technology; small interfere RNA; thermodynamic stability; Chinese materia medica

黄芪属被子植物门、双子叶植物纲、原始花被亚纲、蔷薇目、豆科植物。我国使用的药用黄芪有蒙古黄芪 *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bge. var. *mongholicus* (Bge.) Hsiao 或膜荚黄芪 *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bge. 的干燥根。黄芪是临床常用品种之一,《中国药典》2015 年版记载黄芪具有补气固表、利尿托毒、排脓、敛疮生肌等功效^[1]。

膜荚黄芪主要含有的化学成分包括多糖、皂苷、黄酮、氨基酸和微量元素等^[2]。临床和实验室研究证实黄芪具有显著的免疫调节功能和抗肿瘤等作用^[3-7]。虽然膜荚黄芪全基因组学尚未被解码,但其全转录组和表达序列标志 (expressed sequence tag, EST) 已完成检测^[8]。742 721 个高质量序列读数中包括了已知的 9 893 个独特序列。这将有利于今后黄芪的

收稿日期: 2015-06-21

基金项目: 上海市中医药发展办公室中西医结合重点专病基金资助项目 (zxbz2012-003)

作者简介: 沈朝斌 (1961—), 男, 主任医师, 教授, 硕士生导师, 研究方向为免疫学。Tel: (021)65415910 E-mail: sbsys1303@aliyun.com

生物合成和生物化学改良研究,同时黄芪的代谢和生物合成通路也被明确。

微小 RNA (microRNA、miRNA) 是一类小的内源性非编码 RNA。它们来源于 miRNA 初级转录产物 (primary transcripts miRNA, pri-miRNAs), 具有 1 个发夹型结构^[9]。在植物中, miRNA 是通过直接裂解转录物调节靶基因^[10-11]或抑制其转录水平^[12]。miRNA 对植物的生长发育和逆境胁迫 (stress responses) 起着重要的调节作用^[13]。赵春丽等^[14]也研究了地黄栽培种 85-8 的 miRNA 对地黄生长发育、逆境胁迫响应和代谢调控的影响。Wu 等^[15]采用高通量测序技术对新鲜人参的各部位确定了 miRNA 谱以及靶基因的预测。

自从首次发现植物拟南芥 miRNA 后, miRNA 的研究飞速发展^[16]。到目前为止, 已确定了 206 种 24 521 个 miRNA 基因, 根据 miRNA 基因库 (miRBase 21) 资料显示, 经计算机分析处理已明确 30 424 个成熟 miRNA 序列^[17]。但目前尚未见对热力学处理后中药饮片 miRNA 图谱研究的文献报道。

中药饮片是植物药原材料经干燥炮制加工后的特殊药品, 一般经中医师处方后煎煮饮用。本课题组以黄芪饮片为实验材料, 试图建立中药饮片经煎煮后 miRNA 谱, 为今后研究潜在的调节靶基因的 miRNA 奠定基础。

1 材料

黄芪饮片由养和堂中药饮片公司提供 (批号 140924), 10 g/袋, 经上海中医药大学附属上海市中西医结合医院药剂科主管药师王嵩鉴定为生黄芪, 基原植物为豆科黄芪属植物膜荚黄芪 *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bge.。黄芪产地为甘肃省陇西县。

2 方法

2.1 黄芪煎煮液制备

参照文献方法^[18], 用微波炉 (功率 325 W) 加热 2 min, 干燥灭菌, 然后用灭菌注射用水 100 mL 浸泡 30 min。将黄芪浸泡溶液置微波炉加热 (功率 525 W) 6 min, 移去黄芪, 得到黄芪煎煮液, 冷却备用。

将冷却后的黄芪煎煮液置入超滤容器装置 (产品号 VFPES122250, 美国 Membrane Solutions LLC 公司, 该装置滤膜孔径为 0.22 μm), 收集滤液 1 mL 于无菌干燥试管。

收集滤液以 1:9 体积加入 Trizol 试剂 (美国

Invitrogen 公司), 并立即用聚乙烯薄膜覆盖封口, 置 -20 $^{\circ}\text{C}$ 保存待测。

2.2 小分子 RNA cDNA 文库构建和高通量测序

2.2.1 RNA 样本质量控制 使用 NanoDrop ND-1000 设备纯化和确定黄芪煎煮液总 RNA 的量, 并建立样本质量控制报告。

2.2.2 文库构建和测序 将样本总 RNA 用于小分子 RNA 文库构建。经纯化后的小分子 RNA 分别经 5' 和 3' 接头连接后经 RT-PCR 扩增, 形成小分子 RNA 的 cDNA 文库, 直接用于深度测序。长度控制在 130~150 bp, 相当于 15~30 核苷酸 (nucleotide, nt) 小分子 RNA^[19]。RNA 深度测序使用 Agilent 2100 Bioanalyzer 设备, 由康成生物技术有限公司完成。

2.3 序列的初步分析

采用美国 Agilent 公司 Illumina HiSeq 2000 测序仪测序得 15~30 nt 序列, 通过去接头、去低质量、去污染、统计序列长度分布等过程完成初级分析^[20]。将初级分析得到的序列进行分类注释, 以获得样品中包含的各组分及表达量信息。剩余的小分子 RNA 序列与 miRNA 数据库 (miRBase 21) 所有植物的 miRNA 序列进行比对, 得到样品中已知 miRNA 的量、首位点碱基分布及表达丰度等信息。

2.4 生物信息学分析

使用 novoalign 10.1 软件 (Novocraft Technologies Sdn Bhd) 对已知所有的植物 miRNA 序列进行对比, 确定 miRNA 特征。通过前体序列分析, 确定其茎环结构和成熟 miRNA 序列。后期采用手工方法查找经热力学处理后的黄芪所含 miRNA, 并与 miRNA 数据库 (miRBase 21) 标准序列比对差异, 建立经热力学处理后黄芪饮片的 miRNA 谱。

3 结果与分析

3.1 黄芪小分子 RNA 的基本描述

经 Agilent 2100 Bioanalyzer 对黄芪煎煮液样本的 RNA 深度测序, 获得初步描述性结果。黄芪煎煮液深度测序后可得到 9 931 049 读数, 这些读数代表了 4 606 460 种类型的小分子 RNA 片段, 其中成熟 miRNA 序列为 24 994 条。序列长度分布和读数见表 1。小分子 RNA 分布呈斜率直线分布, 各长度类型随核苷酸增长而减少。长度为 16~20 nt 读数为 3 875 742, 占总数的 48.12%, 为主要部分。这类小分子 RNA 经常被视为小干扰性 RNA (small

表 1 黄芪小分子 RNA 种类分析 (长度分布和读数)

Table 1 Category analysis on miRNA from *A. membranaceus* (length distribution and reading)

去接头修剪后 读数长度/nt	全部读数	去接头修剪后 读数长度/nt	全部读数
16	497 115	24	206 146
17	484 864	25	164 923
18	446 749	26	115 767
19	436 296	27	88 301
20	394 291	28	60 094
21	371 321	29	41 130
22	326 557	30	25 141
23	267 047		

interfere RNA, siRNA)。其中 16 nt 占 12.83%, 17 nt 占 12.51%。而长度在 20~24 nt 占 40.39%。20~24 nt 长度的 RNA 往往被认为主要是 miRNA。本次研究发现小分子 RNA 数量上高于可能的 miRNA。24~30 nt 所占比例较低。

3.2 黄芪成熟 miRNA 及前体分析

使用 Novoalign10.1 软件对黄芪煎煮液与已知所有植物 miRNA 序列进行对比, 仅得到 1 个豆科 MIR6300 保守序列。鉴于黄芪煎煮液是经历了干燥、储存、加热和微波等热力学处理后的标本, 本实验采用了手工查找对比方法, 研究发现有 510 种前体 miRNA 序列, 分别属于 23 个家族。根据文献报道^[21]设置读数阈值为 10, 其中读数超过 10 的有 11 个序列 (表 2)。对高丰度表达的 miRNA 继续进行分析, 研究表明其中存在 46 个保守或非保守或缺不全的 miRNA 序列, 这些 miRNA 的长度在 15~21 nt, 大多短于 miRBase 21 同名序列。它们在大豆

表 2 前体 miRNA 主要种类 (读数>10) 和读数

Table 2 Main categories and reading of miRNAs precursors (reading > 10)

miRNA 前体种类	读数	miRNA 前体种类	读数
miR8175	25	miR2916	254
miR5054	11	miR894	16
miR5368	23	miR398	17
miR6300	35	miR1103	34
miR9728	11	miR398b	17
miR2592b	19		

Glycine max Merr.、拟南芥 *Arabidopsis thaliana* Heynh. 和水稻 *Oryza sativa* Watt. 等植物上均存在进化上的保守性, 以豆科类 miRNA 种类表达为最多见 (表 3)。其中高度保守并耐高温和微波等处理的仅 1 个 miRNA (tcc-miR396d)。而新发现的非保守并耐高温和微波等处理的 miRNA 有 9 个序列, 包括 miR166i、miR396 和 miR5077 (表 4)。其中 miR396 家族序列包含了 7 个相同序列 (mdm-miR396e、mdm-miR396f、mdm-miR396g、pab-miR396b、pab-miR396c、ptc-miR396f、ptc-miR396g-5p)。

3.3 黄芪煎煮液的 miRNA 根据种子区域分类的表

文献报道^[22], 根据经热力学处理后核苷酸结构特性与 siRNA 靶基因识别功能的相互作用, 将 siRNA 分为 3 类, 其中 I 类 siRNA 分子具有最强烈的基因沉默效应, I 类 siRNA 的鉴别标准为 3'端 1~7 核苷酸位点 (种子区域) 上有 4~7 个 A 或 U [(A+U) ≥ 57%]。结果显示, 黄芪煎煮液有 5 个 miRNA 序列符合 I 类 siRNA 结构标准 (表 3), 分别为

表 3 黄芪 miRNA 谱及与 miRBase 21 数据库的对比

Table 3 Profile of miRNAs identified from *A. membranaceus* and comparison with miRBase 21 database

miRNA 名称	核苷酸序列 (5'→3')	nt	miRBase 21 数据库核苷酸序列 (5'→3')	nt
ata-miR5168-5p	GUUGUCGUCUGGUUCA	16	GGGUUGUUGUCUGGUUCAAGG	21
ath-miR401	AACUGGUGUCGACCG	15	CGAAACUGGUGUCGACCGACA	21
ath-miR5660	CAGGAGGUUAGUGCAAUG	18	CAGGUGGUUAGUGCAAUGGAA	21
ath-MIR8175	CCCCGGCAGCGGCGCC	16	GAUCCCCGGCAACGGCGCCA	21
bdi-miR5054	CCCCACGGUGGGCGCC	16	UCCCCACGGUCGGCGCCA	18
bdi-miR7735-3p	CGCCGGUCGGAGCCAC	16	CCGGUCGGAGCCAAGAGACGGGC	24
bdi-miR7777-5p.1	UGGGUAGAACUGCCUCU	17	CUUUGGUUGGGUAGAACUACC	21
cca-miR6117	CCGGGUUGAAGACAUU	16	GGUUAGGUUGAUCGGGUUGAAGAC	24
cme-miR166i	UCUCGGACCAGGCUUCAUUCU	21	UCGGACCAGGCUUCAUUCUC	20

续表 3

miRNA 名称	核苷酸序列 (5'→3')	nt	miRBase 21 数据库核苷酸序列 (5'→3')	nt
cme-miR396e	UUCCACGGCUUUCUUGAACU	20	UUCCACGGCUUUCUUGAACUG	21
cpa-miR8155	CCUGGCUCUGAUACC	15	UAACCUGGCUCUGAUACCA	19
csi-miR3953	UUCUGUAAGCCGUCGA	16	UUGAGUUCUGCAAGCCGUCGA	21
gma-miR171a	UCGUUGAGCCGUGCCA	16	UGAGCCGUGCCAAUAUCACGA	21
gma-miR171i-3p	UUCGUUGAGCCGUGCC	16	UUGAGCCGUGCCAAUAUCACG	21
gma-miR4995	GGCAGUGGCUUGGUU	15	AGGCAGUGGCUUGGUUAAGGG	21
gma-miR5368	AGGGACAGUGUCAGGUAG	18	GGACAGUCUCAGGUAGACA	19
gma-miR5783	CGGAGACGACGGCGGGG	17	GACGACGACGGGGAGGACGCGC	22
gma-miR6300	UCGUUGUAGUAUAGUGGUAAG	21	GUCGUUGUAGUAUAGUGG	18
gma-miR862a	CUUUGAAGGAAUAGA	16	UGCUGGAUGUCUUUGAAGGAAU	21
gma-miR9728	ACCCGGAGAACUGAAACA	18	CGCAGAACUGAAACAAGUUGA	21
gma-miR9728	ACCCGGAGAACUGAAACA	18	CGCAGAACUGAAACAAGUUGA	21
hbr-miR6173	UAAACGAUGGAUACU	15	AGCCGUAAACGAUGGAUACU	20
lus-miR171i	UUCGUUGAGCCGUGCC	16	UUGAGCCGUGCCAAUAUCACG	21
mdm-miR396f	UUCCACGGCUUUCUUGAACU	20	UUCCACGGCUUUCUUGAACUG	21
mdm-miR396g	UUCCACGGCUUUCUUGAACU	20	UUCCACGGCUUUCUUGAACUG	21
mtr-miR2603	GUCCCUGCCCUUUGUA	16	UUUGGUAAUUGGUCCUUGCACUU	22
mtr-miR7696a-3p	AUGAGAACUUGAAGGACC	18	UUGAAUUAUGAGAACUUGAAG	21
osa-miR5072	CCCCAGCGGAGUCGCC	16	CGAUUCCCCAGCGGAGUCGCCA	22
osa-miR5077	GUUCACGUCGGGUUCACCA	19	GUUCGCGUCGGGUUCACCA	19
osa-miR5083	CUACAAUUAUCUGACC	16	AGACUACAAUUAUCUGAUCA	20
osa-miR5800	CGGAACGGCUGCUUC	15	CCCGGCUAUCGGAACGGCUGC	21
pab-miR3711	GGCGCUAGAAGGAGGGC	17	UGGCGCUAGAAGGAGGGCCU	20
pab-miR396b	UUCCACGGCUUUCUUGAACU	20	UUCCACGGCUUUCUUGAACUU	21
pab-miR396c	UUCCACGGCUUUCUUGAACU	20	UUCCACGGCUUUCUUGAACUU	21
peu-miR2916	UUGGGGGCUCGAAGACGAUC	20	UGGGGACUCGAAGACGAUCAU	23
ppe-miR1511-3p	CCUGGCUCUGAUACC	15	ACCUGGCUCUGAUACCAUAAAC	21
ppt-miR894	UUCACGUCAGGUUCACC	17	CGUUUCACGUCGGGUUCACC	20
ptc-miR396f	UUCCACGGCUUUCUUGAACU	20	UUCCACGGCUUUCUUGAACUG	21
ptc-miR396g-5p	UUCCACGGCUUUCUUGAACU	20	UUCCACGGCUUUCUUGAACUU	21
rgl-miR5139	CCUGGCUCUGAUACC	15	AAACCUGGCUCUGAUACCA	19
smo-miR396	UUCCACGGCUUUCUUG	16	UUCCACGGCUUUCUUGAACC	20
tcc-miR160a	GUUCUCCUGGCUCUCCUGA	19	UGCCUGGCUCUCCUGAAUGCCA	21
tcc-miR396d	UUCCACGGCUUUCUUGAACUU	21	UUCCACGGCUUUCUUGAACUU	21
vvi-miR160b	GUUCUCCUGGCUCUCCUGA	19	UGCCUGGCUCUCCUGAAUGCCAUC	23
zma-miR398b-5p	CGGGGGACGGACUGGGAA	18	GGGGCGGACUGGGAACACAUG	21

miRNA 名称前缀缩写: ata-山羊草, ath-拟南芥, bdi-二穗短柄草, cca-刺菜蓟, cme-香瓜, cpa-番木瓜, csi-甜柳橙, gma-大豆, hbr-巴西橡胶树, lus-胡麻, mdm-苹果, mtr-蒺藜状苜蓿, osa-水稻, pab-挪威云杉, peu-胡杨, ppe-桃花, ppt-苔藓, ptc-杨树, rgl-地黄, smo-江南卷柏, tcc-可可树, vvi-葡萄, zma-玉米, 下同

miRNA name prefix abbreviation: ata-*Aegilops tauschii*, ath-*Arabidopsis thaliana*, bdi-*Brachypodium distachyon*, cca-*Cynara cardunculus*, cme-*Cucumis melo*, cpa-*Carica papaya*, csi-*Citrus sinensis*, gma-*Glycine max*, hbr-*Hevea brasiliensis*, lus-*Linum usitatissimum*, mdm-*Malus domestica*, mtr-*Medicago truncatula*, osa-*Oryza sativa*, pab-*Picea abies*, peu-*Populus euphratica*, ppe-*Prunus persica*, ppt-*Physcomitrella patens*, ptc-*Populus trichocarpa*, rgl-*Rehmannia glutinosa*, smo-*Selaginella moellendorffii*, tcc-*Theobroma cacao*, vvi-*Vitis vinifera*, zma-*Zea mays*, same as below

表 4 黄芪中新发现的非保守的 miRNA 种类

Table 4 Novel non-conserved miRNAs identified from *A. membranaceus*

miRNA 名称	核苷酸序列 (5'→3')	nt
cme-miR166i	UCUCGGACCAGGCUUCAUUCU	21
cme-miR396e	UUCCACGGCUUUCUUGAACU	20
mdm-miR396f	UUCCACGGCUUUCUUGAACU	20
mdm-miR396g	UUCCACGGCUUUCUUGAACU	20
osa-miR5077	GUUCACGUCGGGUUCACCA	19
pab-miR396b	UUCCACGGCUUUCUUGAACU	20
pab-miR396c	UUCCACGGCUUUCUUGAACU	20
ptc-miR396f	UUCCACGGCUUUCUUGAACU	20
ptc-miR396g-5p	UUCCACGGCUUUCUUGAACU	20

miR5139、miR6173、miR396、miR8155 和 miR166i。其中 miR396 家族序列包含了 8 个相同序列 (mdm-miR396e、mdm-miR396f、mdm-miR396g、pab-miR396b、pab-miR396c、ptc-miR396f、ptc-miR396g-5p、ttc-miR396d)。同时除了这类 miRNA 与保守和新的非保守 miRNA 序列有部分重叠之外,均显示了经热力学处理后明显 miRNA 链的断裂,以 5'端的断裂为主,但种子区域呈现了高度稳定(表 5)。

表 5 经热力学处理的黄芪煎煮液 I 类 siRNA 序列与已知数据库的比较

Table 5 Comparison on class I siRNA sequences from extract of *A. membranaceus* after thermodynamic treatment and known miRBase 21 database

miRNA 名称	miRBase 21 数据库序列与检测 所获得的序列比较 (5'→3')
miRBase 21	UAACCUGGCUCUGAUACCA
cpa-miRNA8155	CCUGGCUCUGAUACC
miRBase 21	AGCCGUAAACGAUGGAUACU
hbr-miR6173	UAAACGAUGGAUACU
miRBase 21	AAACCUGGCUCUGAUACCA
rgl-miR5139	CCUGGCUCUGAUACC
miRBase 21	UCGGACCAGGCUUCAUUCUC
cme-miR166i	UCUCGGACCAGGCUUCAUUCU
miRBase 21	UUCCACGGCUUUCUUGAACUG
miR-396 家族	UUCCACGGCUUUCUUGAACU

方框内为种子区域

Boxes indicate seed region

4 讨论

黄芪是中医最常用的植物药之一,以往的研究大多在其化学成分方面进行探索。黄芪的化学成分包括皂苷、多糖和黄酮等物质^[23],但提纯的单一成分在实验研究和临床治疗中均未很好显现其疗效。即使在其他中药研究中,单一化学成分能证明其有效作用部位的也很少,如青蒿素和三氧化二砷等,而植物药的多靶点的治疗理论尚缺乏足够的依据。

绝大多数真核细胞都具有通过 20~24 nt RNA 实施基因转录沉默的保守机制,miRNA 是小分子 RNA 中的一类重要的内源性分子。随着非编码小分子 RNA 在基因沉默中作用的明确和高通量测序技术的发展,使得生物界纷纷将研究重点从 DNA 基因组学转入表观遗传学。随着 miRNA 在人类各种疾病研究的进展,已将大量的特异性 miRNA 作为生物标记物,并期待 miRNA 可直接用于疾病治疗。

不同于农业部门对 miRNA 的研究,医学研究的目的主要是针对人类疾病的防治。中药原材料经加工、销售、储存、配制和煎煮等直至患者服用具有相当复杂漫长的过程,与一般植物 miRNA 分析研究目的和方法存在很大差异,植物 miRNA 分析的主要目的是观察植物进化过程、便于增产改良以及对抗逆境胁迫等,均采用新鲜植物的各个部位作为观察研究对象。而中药饮片 miRNA 研究目的是考虑在热力学作用下小分子 RNA 的稳定性。

中药主要包括植物药、动物药和矿物药等种类,在临床绝大部分中医处方中使用药物仍以植物药为主。从人体口服吸收药物角度考虑,除了化学成分外并不能排除吸收植物小分子 RNA 的可能性,虽然这可能涉及跨物种(cross-kingdom)遗传影响,但也不是没有例外^[24]。本研究的目的在于从实际使用的植物药即中药煎煮后服用的状况中明确小分子 RNA 的存在,便于今后寻找可能的靶基因,以探索黄芪的药理作用机制。

本研究首先检测到了黄芪经炮制、加热和微波作用后仍存在丰富的长度不等的 15~30 nt 小分子 RNA。与其他中药 miRNA 研究不同^[14-15],本研究使用的黄芪饮片煎煮液不是新鲜植物标本,是经炮制、储存、加热和微波等处理加工的,尤其经热力学和微波的物理处理,小分子 RNA 链的断裂应在意料之中,因此 16~20 nt 所占比例最高。黄芪煎煮液经高通量测序后呈现丰富的小分子 RNA 数量,与其他研究无可比性,同时经文献检索也未发现国

内外有同类实验研究。

黄芪煎煮液标本经高通量测序后, 所得数据由计算机软件进行生物信息学分析, 仅得到豆科类 MIR6300 保守序列, 经多家基因和生物信息技术公司分析, 均认为测序所得结果无法进行现有计算机软件生物信息学分析, 因而改为手工对比分析。从 510 种成熟 miRNA 序列中检索出 46 个高丰度表达的 miRNA, 这些 miRNA 在大豆、拟南芥和水稻等植物上均存在进化上的保守性, 以豆科类 miRNA 种类表达为最多见(表 1), 符合黄芪植物种类品系特征。其中能耐受高温、干燥和微波等物理条件的仅 miR396 家族, 呈高度保守。另发现新的非保守的 miRNA 9 个(表 2), 除了 miR166i 和 miR5077 外, 均为 miRNA396 家族成员, 大部分序列仅 1 个核苷酸与 miRBase 21 数据库有差异。同时核苷酸长度均在 19~21 nt。结果表明, 在黄芪煎煮液中最能耐受热力学条件的大部分为 miR396 家族成员。

siRNA 在 RNA 诱导静默复合物(RNA-induced silencing complex, RISC)中的作用可能存在 2 种结果: 一种是导致 RNA 静默; 另一种导致脱靶效应^[25]。热力学决定了小分子 RNA 介导的基因沉默的干扰活性, 其决定因素在于种子区域的保守性, 即 siRNA 的种子区域与 miRNA 经 Watson-Crick 碱基配对的稳定性。可将 siRNA 分为 3 类: I 类 siRNA 有强大的基因沉默作用, 它在 3'→5' 1~7 个核苷酸位置上有 4~7 个 A 或 U(腺嘌呤/尿嘧啶), 也就是在 7 个核苷酸位点上 A+U 的比例≥57%, 同时在 19 个核苷酸位点上为 G 或 C(鸟嘌呤/胞嘧啶)。III 类 siRNA 很少有基因沉默作用, 它在 3'→5' 1~7 个核苷酸位置上以 G 或 C 为主。II 类 siRNA 的基因沉默作用介于 I 类和 III 类之间^[22]。文献报道^[26], 经热力学处理的在 5'端不稳定的小分子 RNA 链十分有利于进入并保留在 RISC 中。本实验研究发现, 有 12 个小分子 RNA 序列符合 I 类 siRNA(表 3)。I 类 siRNA 在基因沉默机制中作用最强, 其最有可能成为具有药用价值的物质基础分子。

虽然本实验得到了以上探索性的结果, 但未将新鲜黄芪药材作为对照分析样本, 因此在确定其物种的表观遗传学特征和基因保守性方面有待进一步研究。本实验使用微波加热技术的目的在于实验的可重复性、可操作性和规范性, 以模拟常规中药煎制方法获取研究样本, 探索真实的能进入人体的黄芪小分子 RNA 的种类, 为进一步探索黄芪在多种

疾病治疗中 miRNA 的能效和作用机制提供参考性基础数据。

5 小结

利用基因高通量深度测序方法, 首次明确黄芪饮片煎煮液中含有大量小分子 RNA, 并确定其 miRNA 谱。经干燥、炮制、加热和微波处理, 仍存在保守或非保守的 miRNA, 同时存在 12 个 I 类 siRNA 分子, 黄芪中 miR396 家族对热力学最稳定。黄芪中小分子 RNA 的药用价值有待进一步研究探索。

志谢: 本实验得到上海交通大学附属第一人民医院检验中心谢匡成老师理论方面的指导。

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2010.
- [2] Ma X Q, Shi Q, Duan J A, *et al.* Chemical analysis of *Radix astragali* (Huangqi) in China: A comparison with its adulterants and seasonal variations [J]. *J Agric Food Chem*, 2002, 50(17): 4861-4866.
- [3] Chen J, Zhang X, Wang Y, *et al.* Formononetin promotes proliferation that involves a feedback loop of microRNA-375 and estrogen receptor alpha in estrogen receptor-positive cells [J]. *Mol Carcinog*, 2015. doi: 10.1002/mc.22282.
- [4] Chen J, Ge B, Wang Y, *et al.* Biochanin a promotes proliferation that involves a feedback loop of microRNA-375 and estrogen receptor alpha in breast cancer cells [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2015, 35(2): 639-646.
- [5] Wang N, Liu J, Xie F, *et al.* miR-124/ATF-6, a novel lifespan extension pathway of *Astragalus* polysaccharide in *Caenorhabditis elegans* [J]. *J Cell Biochem*, 2015, 116(2): 242-251.
- [6] Jin M, Zhao K, Huang Q, *et al.* Structural features and biological activities of the polysaccharides from *Astragalus membranaceus* [J]. *Int J Biol Macromol*, 2014, 64: 257-266.
- [7] Huang G C, Lee C J, Wang K T, *et al.* Immunomodulatory effects of hedysarumpolybotrys extract in mice macrophages, splenocytes and leucopenia [J]. *Molecules*, 2013, 18(12): 14862-14875.
- [8] Liu X B, Ma L, Zhang A H, *et al.* High-throughput analysis and characterization of *Astragalus membranaceus* transcriptome using 454 GS FLX [J]. *PLoS One*, 2014, 9(5): e95831.
- [9] Bartel D P. MicroRNAs: genomics, biogenesis,

- mechanism, and function [J]. *Cell*, 2004, 116(2): 281-297.
- [10] Jones-Rhoades M W, Bartel D P, Bartel B. MicroRNAs and their regulatory roles in plants [J]. *Annu Rev Plant Biol*, 2006, 57: 19-53.
- [11] Mallory A C, Vaucheret H. Functions of microRNAs and related small RNAs in plants [J]. *Nat Genet*, 2006, 38(Suppl): 31-36.
- [12] Brodersen P, Sakvarelidze-Achard L, Bruun-Rasmussen M, *et al*. Widespread translational inhibition by plant miRNAs and siRNAs [J]. *Science*, 2008, 320(5800): 1185-1190.
- [13] Carrington J C, Ambros V. Role of microRNAs in plant and animal development [J]. *Science*, 2003, 301(5631): 336-338.
- [14] 赵春丽, 李先恩, 都晓伟, 等. 地黄 microRNAs 和靶基因的生物信息学预测及验证 [J]. 中草药, 2014, 45(8): 1129-1135.
- [15] Wu B, Wang M, Ma Y, *et al*. High-throughput sequencing and characterization of the small RNA transcriptome reveal features of novel and conserved microRNAs in *Panax ginseng* [J]. *PLoS One*, 2012, 7(9): e44385.
- [16] Llave C, Kasschau K D, Rector M A, *et al*. Endogenous and silencing-associated small RNAs in plants [J]. *Plant Cell*, 2002, 14(7): 1605-1619.
- [17] Kozomara A, Griffiths-Jones S. miRBase: integrating microRNA annotation and deep-sequencing data [J]. *Nucl Acid Res*, 2014, 42: D68-D73.
- [18] 沈朝斌, 王 华, 季 玮, 等. 微波技术应用于中草药提成的研究 [J]. 中华实用中西医结合杂志, 1999, 12(3): 365-367.
- [19] Friedländer M R, Chen W, Adamidi C, *et al*. Discovering microRNAs from deep sequencing data using miRDeep [J]. *Nat Biotechnol*, 2008, 26(4): 407-415.
- [20] Bullard J H, Purdom E, Hansen K D, *et al*. Evaluation of statistical methods for normalization and differential expression in mRNA-Seq experiments [J]. *BMC Bioinformatics*, 2010, 11: 94. doi: 10.1186/1471-2105-11-94.
- [21] Turner M, Yu O, Subramanian S. Genome organization and characteristics of soybean microRNAs [J]. *BMC Genomics*, 2012, 13: 169. doi: 10.1186/1471-2164-13-169.
- [22] Ui-Tei K, Naito Y, Takahashi F, *et al*. Guidelines for the selection of highly effective siRNA sequences for mammalian and chick RNA interference [J]. *Nucl Acid Res*, 2004, 32(3): 936-948.
- [23] Ibrahim L F, Marzouk M M, Hussein S R, *et al*. Flavonoid constituents and biological screening of *Astragalus bombycinus* Boiss [J]. *Nat Prod Res*, 2013, 27(4/5): 386-393.
- [24] Liang H, Zhang S, Fu Z, *et al*. Effective detection and quantification of dietetically absorbed plant microRNAs in human plasma [J]. *J Nutr Biochem*, 2015, 26(5): 505-512.
- [25] Ui-Tei K, Nishi K, Takahashi T, *et al*. Thermodynamic control of small RNA-mediated gene silencing [J]. *Front Genet*, 2012, 3: 101. doi: 10.3389/fgene.2012.00101. eCollection 2012.
- [26] Liu J, Carmell M A, Rivas F V, *et al*. Argonaute2 is the catalytic engine of mammalian RNAi [J]. *Science*, 2004, 305(5689): 1437-1441.