

• 药理与临床 •

马兜铃酸 I 致大鼠肾损伤后血清 miRNA 差异表达的研究

张 良^{1,2}, 杨召聪^{1,2}, 顾亚琴^{1,2}, 钱知知^{1,2}, 许 立^{1,2}

1. 南京中医药大学药学院, 江苏 南京 210023

2. 江苏省中药药效与安全性评价重点实验室, 江苏 南京 210023

摘要: 目的 筛选马兜铃酸 I (AAI) 致大鼠肾损伤后血清中差异表达的微小 RNA (micro RNA, miRNAs), 为阐明 miRNAs 调控马兜铃酸肾病的机制研究提供靶标并奠定研究基础。方法 SD 雄性大鼠随机分为对照组及 AAI (2.25 mg/kg) 组, 连续 ip 给药 14 d 造成肾损伤模型后, 对大鼠肾脏进行 HE 染色观察肾损伤程度。利用 miRNAs 芯片技术寻找 AAI 组及对照组大鼠血清中差异表达的 miRNAs, 预测靶基因, 采用实时定量 PCR (qRT-PCR) 验证芯片结果的可靠性, 并对部分结果进行信号通路分析。结果 HE 染色显示 AAI 组大鼠肾脏出现不同程度的病变; miRNAs 芯片结果显示有 5 个 miRNAs (miR-10a-3p、miR-207、miR-3594-3p、miR-874-3p、miR-9a-3p) 表达明显上调, 无明显下调的 miRNAs, 并预测 Rheb11、Usp10 等 16 种基因为差异表达的 miRNAs 靶基因; qRT-PCR 验证结果与芯片结果基本一致; 信号通路分析结果显示 MAPK 信号通路等相关性较大。结论 芯片分析得到的差异表达的 miRNAs 可能与 AAI 致肾毒性机制相关, 为进一步深入研究特定 miRNAs 的调控机制提供新的靶点, 并为后期生物信息学层次的研究提供有效依据。

关键词: 马兜铃酸 I; 肾损伤; 微小 RNA; 靶基因; 表达差异; 马兜铃酸肾病

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2016)11-1903-05

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2016.11.015

Study on differential expression of miRNA in serum of rats after renal injury induced by aristolochic acid I

ZHANG Liang^{1,2}, YANG Zhao-cong^{1,2}, GU Ya-qin^{1,2}, QIAN Zhi-zhi^{1,2}, XU Li^{1,2}

1. School of Pharmacy, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China

2. Jiangsu Key Laboratory for Pharmacology and Safety Evaluation of Chinese Materia Medica, Nanjing 210023, China

Abstract: Objective To screen the miRNA differential expression profile in serum of rats after renal injury induced by aristolochic acid I, (AAI) to identify the target of miRNA in the mechanism of aristolochic acid nephropathy (AAN), and to make further study on the mechanism of AAN. **Methods** Eighteen male SD rats were randomly divided into two groups, control group and AAI group (2.25 mg/kg). Rats were ip injected with AAI once daily for 14 d. On day 14, blood collected was used for the determination of miRNA in serum by miRNA microarray; Renal pathological changes were examined by HE staining. The miRNA that expressed significantly different would be verified by real time quantitative PCR (qPT-PCR). Target genes were predicted using bioinformatics as well as Pathway analysis did. **Results** HE staining revealed that kidneys were damaged with different degrees. By significance analysis of microarray based on microarray screening, significantly different expression of five miRNA (miR-10a-3p, miR-207, miR-3594-3p, miR-874-3p, and miR-9a-3p) which were up-regulated were obtained, while there were no miRNAs which were down-regulated. qPT-PCR approved the results as well. It was suggested that 16 genes, such as Rheb11 and Usp10, might be the target genes. Pathway analysis showed a greater correlation between MAPK signaling pathways. **Conclusion** The differential expressed miRNAs obtained by gene analysis might be related with AAI and further studies on the mechanism of some miRNA would be a new target of gene therapy and provide an effective basis for the further studies of bioinformatics.

Key words: aristolochic acid I; renal injury; miRNA; target gene; differential expression; aristolochic acid nephropathy

收稿日期: 2016-01-22

基金项目: 国家自然科学基金青年基金资助项目 (30701106); 江苏省科技厅自然科学基金面上项目 (BK2012852); 江苏省高校优势学科建设工程资助项目 (2011XYZ4-003)

作者简介: 张 良, 男, 博士, 副教授, 硕士生导师, 研究方向为中药毒理学。E-mail: zhangl_1999@163.com

马兜铃酸 I (aristolochic acid I, AAI) 是马兜铃酸 (aristolochic acid, AA) 的主要毒性成分, 长期服用含此类物质的中药可导致马兜铃酸肾病 (aristolochic acid nephropathy, AAN) 的发生^[1-2], 很多国家现已采取相应政策来管理含此类成分的中药, 但仍有部分群体不恰当的服用含 AA 的中药, AAN 病例还时有发生, 阐明 AAI 致肾毒性的发病机制仍具有重要意义。

Micro RNAs (miRNAs) 是一类在生物体内广泛存在的长度约 22 nt 的小分子非编码 RNA, 它可以通过与靶基因 mRNA 的靶位点结合, 抑制蛋白的合成或诱导该基因 mRNA 的降解, 从而参与基因的表达调控^[3]。目前 miRNAs 功能涉及到生物体的干细胞分化、分子免疫机制、细胞内信号转导、肿瘤发生及各种疾病和病毒感染等^[4-6]。已有研究显示, miRNAs 与 AA 的基因毒性^[7]、肾近曲小管上皮细胞的周期阻滞^[8]等过程密切相关。本课题组前期研究发现大鼠给予 AAI 2.25 mg/kg 剂量条件下, 肾脏就已出现明显的病变^[9]。本研究将采用 miRNAs 芯片法筛选出 AAI 致大鼠肾损伤后血清中表达明显发生变化的 miRNAs, 并预测相关靶基因, 对部分 miRNAs 进行信号通路分析, 从分子水平探讨 AAN 的发病机制。

1 材料

1.1 动物

8 周龄 SD 大鼠 18 只, 清洁级, 体质量 220~250 g。合格证号 SCXK (浙) 2008-0033, 购自浙江省实验动物中心。分笼饲养, 周围环境通风, 温度 22~25 °C、湿度 50%~60%, 动物实验操作严格按照《江苏省实验动物管理办法》规定执行。

1.2 药品与试剂

AAI (质量分数 ≥98%, 批号 20130201), 河南省科技医药研究所; Trizol 试剂 (美国 Life Technologies 公司); 氯仿 (成都科龙化工试剂厂); 异丙醇 (南京化学试剂有限公司); DEPC 水 (上海碧云天生物技术研究所); 逆转录试剂盒 (上海生工生物工程有限公司); PolyAcryl Carrier (美国 MRC 公司); Quanti Fast SYBR Green PCR kit (德国 Qiagen 公司); 所有引物由上海生工生物工程有限公司提供。

1.3 主要仪器

荧光定量 PCR 仪 (美国 Bio-rad 公司); 梯度 PCR 仪 (美国 Applied Biosystems 公司); 多功能

酶标仪 (美国 BioTek 公司); 低温离心机 (德国 Eppendorf); 石蜡包埋机 (日本樱花 Tissue-TEK); 切片机 (美国 Thermo 公司)。

2 方法

2.1 肾损伤模型的制备

18 只大鼠随机分为对照组 (10%二甲基亚砷+20%聚乙二醇 600+70%生理盐水) 和 AAI 组 (2.25 mg/kg)^[10]。大鼠于笼中适应性喂养 3 d, 自由进水, 连续 ip 给药 14 d, 末次给药后禁食不禁水 12 h, 颈总动脉取全血 6 mL, 3 000 r/min 离心后取血清, 冻存备用; 处死大鼠, 迅速摘除肾脏, 用 PBS 漂洗后, 一侧肾脏放入 10%甲醛中固定, 用于病理检查分析, 另一侧肾脏于液氮中保存, 用于其他检测。

2.2 病理组织固定、切片及 HE 染色

取肾组织, 切成小块浸泡在 4%中性甲醛溶液中 3 d; 用蒸馏水洗涤组织块后放入 70%乙醇中过夜; 经脱水、透明、石蜡包埋、切片后, 用多聚赖氨酸封片于玻璃载玻片上, 进行苏木素伊红 (HE) 染色, 光镜下观察 AAI 对大鼠肾组织损伤的情况。

2.3 总 RNA 的提取和芯片检测

对照组及 AAI 组各随机取 3 例样本的大鼠血清, 采用 Trizol 法提取总 RNA, 其样本采用琼脂糖凝胶电泳进行质控分析, 分光光度法进行定量分析。分离出的 miRNAs, 基于 μ ParafloTM 微流体 miRNAs 检测探针进行实验。取 RNA 样品 5~8 μ g, 进行靶标制备, 在总 RNA 3'端用 Poly A 聚合酶加上 poly A 尾, 并用于荧光标记。杂交反应在 μ Paraflo 微流体芯片上过夜进行。RNA 与相应探针杂交后, 与标记特异性结合的 Hy3 染料在微流体芯片上循环流动进行染色。利用激光扫描仪 (Axon GenePix 4000B, Molecular Device) 采集杂交图像, 并使用 GenePix Pro 6.0 图像分析软件进行图像数字化转换, 并使用 LOWESS 过滤进行信号归一化。计算两种检测信号的比值和 *t* 检验的 *P* 值, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义, 比值 >1.5 为显著表达差异。整个杂交和分析实验由上海康成生物公司完成, 合同编号 H1311169。

2.4 靶基因预测

根据 microRNA 生物信息学数据库 miRBase (<http://www.mirbase.org/>)、miRDB (<http://mirdb.org/miRDB/>)、miRanda (<http://www.microrna.org-microrna/home.do>) 对 miRNAs 芯片中 5 个表达有明显差异的 miRNAs 进行检索, 将结果导出并比对, 将 3 个数据库中共有的基因作为核心靶基因。

2.5 miRNAs 的 qRT-PCR 验证

miRNAs 的反转录体系为 20 μ L, 其中 2 \times miRNA RT Solution mix 10 μ L, miRNA RT Enzyme mix 2 μ L, Total RNA/micro RNA 2 μ g/100 ng, RNase-free water. 反转录程序: 37 $^{\circ}$ C、60 min, 85 $^{\circ}$ C、5 min, 4 $^{\circ}$ C 速冷。qRT-PCR 反应体系 20 μ L, 其中 1 μ L 模板(逆转录产物), 2 μ L 引物混合物(10 μ mol/L), 10 μ L 2 \times SYBR green, 7 μ L 水。反应条件: 95 $^{\circ}$ C、5 min, 95 $^{\circ}$ C、30 s, 60 $^{\circ}$ C、30 s, 40 个循环。以 U6 为内参基因, 以 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ (C_t 值代表循环阈值) 表示基因的表达量, 部分引物序列见表 1。

表 1 用于 miRNAs real-time PCR 的部分引物

Table 1 Primers used to perform real-time PCR of miRNAs

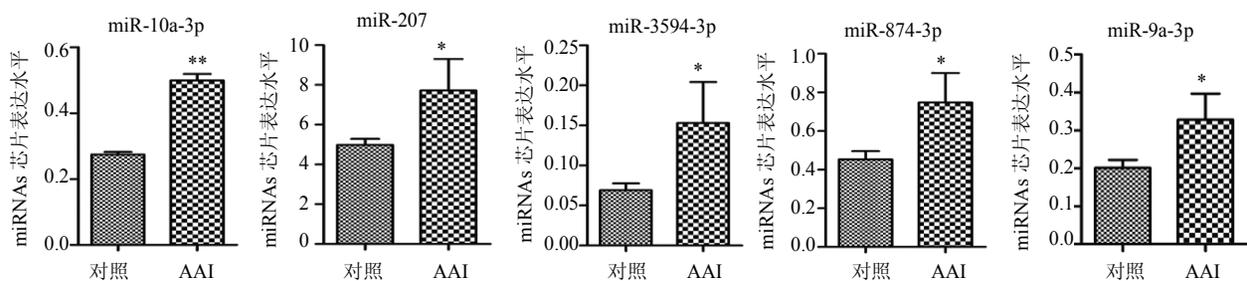
引物	引物序列 (5'→3')
miR-10a-3p-RT	CAAATTCGTATCTAGGGGAATA
miR-10a-3p-F	CGCAAATTCGTATCTAGGGGAA
miR-3594-3p-RT	CACACCGCCTCTGCCCGCTAGT
miR-3594-3p-F	CACACCGCCTCTGCC
miR-9a-3p-RT	ATAAAGCTAGATAACCGAAAGT
miR-9a-3p-F	GCGCATAAAGCTAGATAACCGA
U6-R	AACGCTTCACGAATTGCGT
U6-F	CTCGCTTCGGCAGCAC

2.6 部分 miRNAs 的信号通路分析

根据 KEGG (Kyoto Encyclopedia of Gene and Genomes) 数据库 (<http://www.genome.jp/kegg/>), 对芯片检测出的 miRNAs 靶基因进行信号通路显著性分析。分析结果采用 Fisher 精确检验和卡方检验进行统计, $P < 0.05$, $FDR < 0.05$ 则认为差异具有统计学意义。

2.7 统计分析

采用 GraphPad Prism 6 软件进行相关统计分析, 组间数据采用单因素方差分析, 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。



与对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$, 下同
* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs control group, same as below

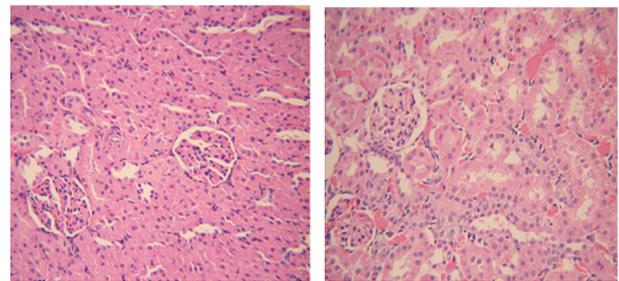
图 2 大鼠血清中差异表达显著上调的 miRNAs

Fig. 2 miRNAs with significant up-regulation of differential expression in serum of rats

3 结果

3.1 AAI 致大鼠肾损伤的病理变化

连续给药 14 d 后, 取大鼠肾脏进行 HE 染色, 光学显微镜下观察其病理改变。对照组大鼠肾脏肾小管未见水肿, 间质血管未见充血和炎细胞浸润, 肾皮质内肾小球未见充血, 肾小球无硬化现象; AAI 组肾脏肾小管上皮细胞轻度水样变性, 间质血管轻度充血, 偶见炎细胞浸润现象, 已出现明显病变。结果见图 1。本课题组前期研究^[9]显示, 2.25 mg/kg AAI 连续 ip 给药 14 d 后, 大鼠血清中肌酐 (Cr)、尿素氮 (BUN) 水平明显升高 ($P < 0.05$); 结合本实验结果说明 2.25 mg/kg AAI 可造成大鼠肾损伤。



对照

AAI

图 1 AAI 给药 14 d 后大鼠肾脏组织病理变化

Fig. 1 Pathological changes in kidney tissue of rats after 14 d of AAI administration

3.2 miRNAs 芯片检测结果

AAI 致大鼠肾损伤后, 利用 miRNAs 芯片对对照组和 AAI 组大鼠血清进行检测, 与对照组血清相比, miRNAs 芯片筛选出 5 个差异表达明显上调的 miRNAs, 分别是 miR-10a-3p、miR-207、miR-3594-3p、miR-874-3p、miR-9a-3p, 表达变化见图 2; 此次芯片检测中无显著下调的 miRNAs。

3.3 qRT-PCR 验证

以 U6 为内参对芯片筛选出的差异表达的

miRNAs 进行 qRT-PCR 验证, 记录 C_t 值, 使用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算结果并统计, 结果显示与对照组相比, miR-10a-3p、miR-207、miR-3594-3p 表达均明显上调, miR-874-3p、miR-9a-3p 表达呈升高趋势, 如图 3 所示, 说明 qRT-PCR 结果与 miRNAs 芯片结果基本一致, 本研究的芯片结果基本真实

可靠。

3.4 靶基因预测结果

对芯片筛选出的差异表达的 5 个 miRNAs, 通过 miRBase、miRDB、miRanda 3 种靶基因预测数据库预测该 5 种 miRNAs 的靶基因, 选出在 3 种数据库中出现基因作为潜在靶基因, 结果见表 2。

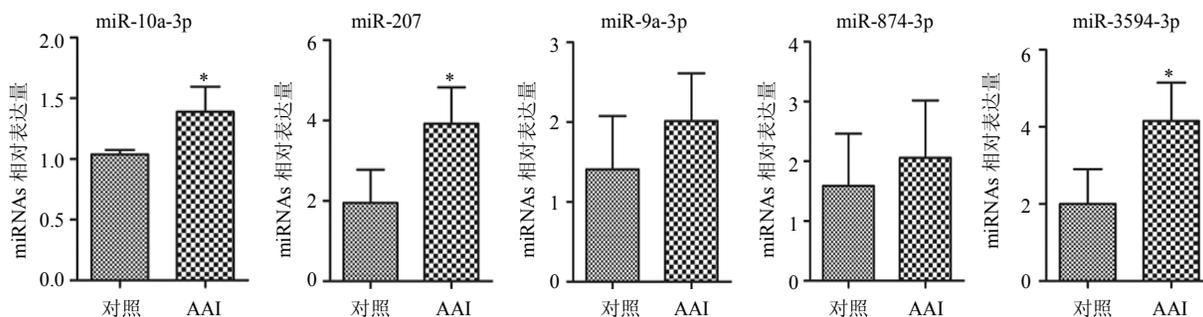


图 3 各 miRNA 的 qRT-PCR 检测结果

Fig. 3 Determination of qRT-PCR in each miRNA

表 2 miRNAs 的靶基因预测

Table 2 Target gene prediction of miRNAs

miRNA	靶基因	靶基因描述
miR-10a-3p	Rheb11	Ras homolog enriched in brain like 1
miR-10a-3p	Usp10	ubiquitin specific peptidase 10
miR-207	Trim39	tripartite motif-containing 39
miR-207	Slco2b1	solute carrier organic anion transporter family, member 2b1
miR-207	Cdk9	cyclin-dependent kinase 9
miR-207	Tm2d2	TM2 domain containing 2
miR-9a-3p	Mtfmt	mitochondrial methionyl-tRNA formyltransferase
miR-9a-3p	Itgb1	integrin, beta 1
miR-9a-3p	Tcea1	transcription elongation factor A (SII) 1
miR-9a-3p	Onecut1	one cut homeobox 1
miR-9a-3p	Myh10	myosin, heavy chain 10, non-muscle
miR-9a-3p	Stc1	stanniocalcin 1
miR-9a-3p	Pfkm	phosphofructokinase, muscle 1
miR-9a-3p	Id4	inhibitor of DNA binding 4
miR-874-3p	Slc6a18	solute carrier family 6, member 18
miR-874-3p	Nr2c2	nuclear receptor subfamily 2, group C, member 2

3.5 miRNAs 的信号通路分析

根据预测出的靶基因, 对其进行信号通路分析, AAI 组大鼠与对照组相比较, 差异 miRNAs 参与了多个信号通路的调节, 富集度较高的为过氧化物酶体 (rno04146)、MAPK 信号通路 (rno04010)、多巴胺能突触 (rno04728)、黏蛋白型-O-多糖生物合成 (rno00512)、酮体的合成与降解 (rno00072) 等途径, 见图 4。

4 讨论

AA 具有广泛的药理作用, 具有抗感染、镇痛、利尿、抗生育活性、抗肿瘤及调节血压等功效^[11-12],

尽管 AA 可诱发 AAN, 引起了世人的警觉, 但由于不合理的用药使得 AAN 事件时有发生, 增强人们对 AAN 的认识和提高 AAN 的可治愈性仍是解决此类事件的关键。

近年来, miRNAs 的功能研究越来越受到人们的重视, 动物源 miRNAs 主要是通过与靶基因 mRNA 的 3'端非编码区域 (3'UTR) 不完全或完全互配对结合, 在翻译水平上特异性抑制基因的表达。miRNAs 功能研究的关键在于其调控靶基因的确 定, 但由于 miRNAs 和靶基因的作用位点并不完全匹配, 一个 mRNA 能被很多 miRNAs 调控, 形成一

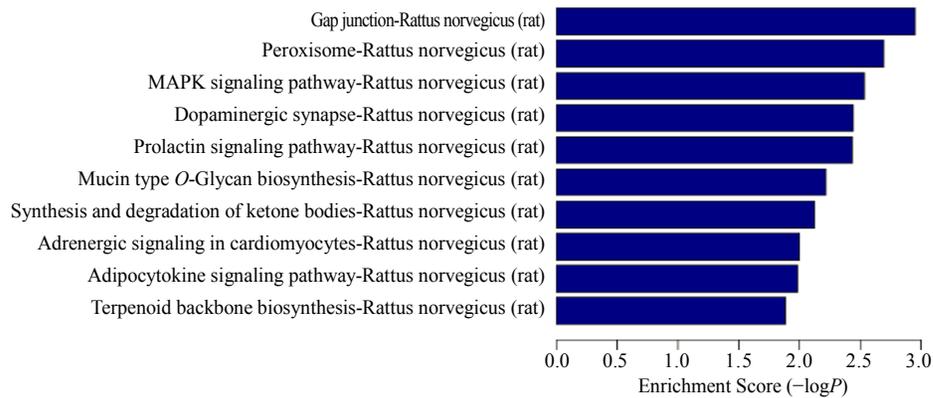


图 4 miRNA 的 Pathway 分析 (部分)

Fig. 4 Pathway analysis of miRNA (part)

个十分复杂的转录后调控网络,导致应用传统方法鉴定靶基因十分困难。miRNAs 芯片技术能在特定的时间点筛选出不同样本间的差异 miRNAs 表达情况,是一种新型的高通量筛选技术,已在很多复杂性疾病的研究中进行探索并得到广泛的应用,如 microRNA-206 与乳腺癌的发病、转移密切相关^[13-14],在 AAN 研究方面,已有研究显示,miRNAs 与 AA 的基因毒性^[7]、肾近曲小管上皮细胞的周期阻滞^[8]等过程密切相关,但 miRNAs 在 AA 或 AAI 诱导的肾毒性疾病中其他发病过程的相关研究还未见报道。

本研究利用基因微阵列分析技术探索 AAI 对大鼠肾脏造成损伤后血清中 miRNAs 表达谱的影响,发现 miR-10a-3p、miR-207、miR-3594-3p、miR-874-3p、miR-9a-3p 等 5 个 miRNAs 表达明显上调,无明显下调的 miRNAs; 利用 qRT-PCR 技术对芯片结果进行检验,该结果与 miRNAs 芯片结果基本一致,增加了本研究的可靠性,发生明显改变的 miRNAs 在 AAI 致大鼠肾损伤过程中的具体功能还有待研究。本课题组对差异表达 miRNAs 的靶基因进行预测及信号通路分析,寻找到 Rheb11、Usp10 等多个潜在靶基因,并发现 AAI 致肾损伤与过氧化物酶体途径、MAPK 信号通路途径等有很大关系,信号通路分析结果为 AAN 机制的深入研究提供了新方向的借鉴和理论基础,针对该结果,本课题组将对此次 miRNAs 芯片结果的生物信息学进行深入研究和验证,并做出充分的阐述。

通过以上研究,本课题组已初步找到一些可能与 AAI 致肾损伤相关的 miRNAs 和潜在靶基因,及相应的生物途径,这将为进一步阐明 AAN 的发病机制提供新的线索,为其预防、诊断和治疗提供新的依据。

参考文献

- [1] Cosyns J P. When is “aristolochic acid nephropathy” more accurate than “Chinese herbs nephropathy”? [J]. *Kidney Int*, 2002, 61: 1178.
- [2] Shibutani S, Dong H, Suzuki N, et al. Selective toxicity of aristolochic acids I and II [J]. *Drug Metab Dispos*, 2007, 35: 1217-1222.
- [3] Bartel D P. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function [J]. *Cell*, 2004, 116(2): 281-297.
- [4] 陈青云, 王青青. microRNA 对免疫系统发育和应答的调节作用 [J]. *浙江大学学报: 医学版*, 2010, 39(3): 326-332.
- [5] Ambros V. microRNAs 与疾病和发育 [J]. *生命科学*, 2010, 22(3): 229-233.
- [6] 吴家昌, 马琼, 邹贤飞, 等. miRNA 与细胞分化的研究进展 [J]. *现代生物医学进展*, 2010, 10(3): 567-572.
- [7] Meng F, Li Z, Yan J, et al. Tissue-specific microRNA responses in rats treated with mutagenic and carcinogenic doses of aristolochic acid [J]. *Mutagenesis*, 2014, 29(5): 357-365.
- [8] Jenkins R H, Davies L C, Taylor P R, et al. miR-192 induces G₂/M growth arrest in aristolochic acid nephropathy [J]. *Am J Pathol*, 2014, 184(4): 996-1009.
- [9] 杨召聪, 陆茵, 顾亚琴, 等. 马兜铃酸 I 对大鼠体内 PI3K/AKT/NF-κB 通路的影响 [J]. *南京中医药大学学报*, 2015, 31(3): 250-253.
- [10] 张良, 李雯, 江振洲, 等. 马兜铃酸 I 和马兜铃内酰胺 I 对大鼠肾小管损伤机制及其对肾脏水通道蛋白 1 表达的影响 [J]. *中药新药与临床药理*, 2011, 22(4): 359-364.
- [11] 陈孟兰, 朱正兰. 马兜铃属植物的药理作用研究进展 [J]. *武汉生物工程学院学报*, 2007, 3(1): 59-62.
- [12] 王潇晗, 张连学, 郜玉钢, 等. 含马兜铃酸中药减毒的研究进展 [J]. *中草药*, 2013, 44(22): 3241-3244.
- [13] Negrini M, Calin G A. Breast cancer metastasis: a microRNA story [J]. *Breast Cancer Res*, 2008, 10(2): 203.
- [14] Rao P K, Kumar R M, Farkhondeh M, et al. Myogenic factors that regulate expression of muscle-specific microRNAs [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103(23): 8721-8726.