

肝豆灵对 Wilson 病模型大鼠肝组织 miRNA-122 表达的影响

沈 斌¹, 鲍远程², 蒋怀周³, 张 娟², 王艳昕², 方 向²

(1. 湖北中医药大学, 湖北 武汉 430065; 2. 安徽中医药大学第一附属医院脑病中心, 安徽 合肥 230031; 3. 安徽中医药大学中医临床学院, 安徽 合肥 230038)

[摘要]目的 研究肝豆灵对 Wilson 病(Wilson’s disease, WD)大鼠肝组织 miRNA-122 表达的影响,探究其保护肝脏的机制。**方法** 将 24 只 Wistar 大鼠随机分为空白对照组、模型组、青霉胺组和肝豆灵组。铜负荷喂养 8 周后,分别用青霉胺、肝豆灵以成人等效剂量灌胃,空白对照组及模型组均以等量生理盐水灌胃,每组均灌胃 4 周。观察各组大鼠肝功能及肝组织 miRNA-122 的表达水平。**结果** 肝豆灵和青霉胺均可显著降低 WD 大鼠异常升高的血清丙氨酸氨基转移酶(alanine aminotransferase, ALT)、天冬氨酸氨基转移酶(aspartate aminotransferase, AST)、总胆红素(total bilirubin, TBil) ($P<0.05$, 或 $P<0.01$),显著升高 WD 大鼠肝组织异常降低的 miRNA-122 表达水平($P<0.01$)。肝豆灵降低血清 ALT、AST 和 TBil 的作用及升高肝组织 miRNA-122 表达的作用显著优于青霉胺($P<0.05$, 或 $P<0.01$)。**结论** 肝豆灵保护 WD 大鼠肝功能的作用与其上调肝组织 miRNA-122 的表达有关。

[关键词]肝豆状核变性;肝豆灵;青霉胺;miRNA-122

[中图分类号]R742.4;R285.5 **[文献标志码]**A **[DOI]**10.3969/j.issn.2095-7246.2014.06.017

肝豆状核变性(hepatolenticular degeneration, HLD), 又称 Wilson 病(Wilson disease, WD), 是一种常染色体隐性遗传性铜代谢障碍疾病。在 WD

临床病程中,以肝脏损害表现最为常见,首发症状中也最为多见。笔者在运用肝豆灵片治疗 WD 的过程中,发现其对肝脏具有保护作用。因此,笔者通过复制 WD 大鼠模型,探究肝豆灵的保肝作用机制,以期临床防治 WD 患者肝损害提供实验依据。

基金项目:国家自然科学基金项目(81202691)

作者简介:沈斌(1980-),男,博士研究生,主治医师

通信作者:鲍远程,1640748037@qq.com

1 材料

1.1 动物 实验用清洁级 Wistar 大鼠 24 只,雌性,

Effects of Naringenin-Cu Complex on Proliferation and Apoptosis of Hep-G2 Cells

DONG Jian-jian¹, CHENG Nan², HAN Yong-zhu²

(1. Graduate Division of Anhui University of Chinese Medicine, Anhui Hefei 230038, China; 2. Affiliated Hospital of Neurology Institute, Anhui University of Chinese Medicine, Anhui Hefei 230061, China)

[Abstract] **Objective** To observe the effects of naringenin-Cu complex on the proliferation and apoptosis of human hepatocellular carcinoma HepG2 cells *in vitro* and to investigate its action mechanism. **Methods** HepG2 cells cultured *in vitro* were treated with different concentrations of naringenin-Cu complex. MTT assay was used to determine the growth inhibition rate of HepG2 cells; the effect of naringenin-Cu complex on the apoptosis of HepG2 cells stained with 4',6-diamidino-2-phenylindole was evaluated under a fluorescence microscope; the apoptosis rate of HepG2 cells was determined by flow cytometry; the expression of Bcl-2, Bax, and Caspase-3 in HepG2 cells was measured by Western blot. **Results** Naringenin-Cu complex significantly inhibited the proliferation of HepG2 cells in a dose-dependent manner (within a certain range of concentrations). The fluorescence microscopy showed that HepG2 cells treated with naringenin-Cu complex had marked apoptotic features, with the apoptosis rate increasing in a dose-dependent manner. Naringenin-Cu complex upregulated the expression of Bax and Caspase-3 in HepG2 cells but suppressed the expression of Bcl-2, with a certain dose dependence. **Conclusion** Naringenin-Cu complex can inhibit the proliferation of HepG2 cells and induce their apoptosis, possibly by upregulating the expression of Bax and Caspase-3 and suppressing the expression of Bcl-2.

[Key words] naringenin-Cu complex; HepG2 cell; apoptosis; Caspase-3; Bcl-2; Bax

月龄均为3个月,平均体质量(200±20)g,购于安徽医科大学实验动物中心,动物生产许可证号为SCXK(皖)2013-01。动物房为普通级饲养室,实验前先适应性饲养1周后,随机数字表法分为4组,每组6只,分别为空白对照组、模型组、青霉胺组、肝豆灵组。

1.2 仪器 ASCA全自动生化分析仪:美国 Microgenics 仪器公司;HH-W21-600 型电热恒温水浴箱:上海医用恒温设备厂;FA2004 型电子天平:上海天平仪器厂;XK96-B 混匀器:江苏姜堰新康仪器厂;101-A 恒温干燥箱:宁波自动化仪表厂;洁净工作台:上海博迅实业有限公司医疗设备厂;9700 型基因扩增仪:美国 Applied Biosystems 公司;引物设计软件:Primer 5.0;ViiA 7 实时荧光定量 PCR 系统:美国 Applied Biosystems 公司。

1.3 试剂 硫酸铜(批号 201203):中科铜都粉体新材料股份有限公司;TRIzol 试剂(P/N15596-018):美国 Invitrogen 公司;反向引物:上海百力格生物技术有限公司;PCR 引物:由上海康成生物有限公司合成;试剂为国产分析纯,武汉康盛医药科技有限公司产品。

1.4 试验药物 肝豆灵由安徽中医药大学第一附属医院制剂室提供(批号为皖药制字 Z20050071),每盒150片,每片0.3g,主要由石菖蒲、丹参、姜黄、莪术、郁金、黄连、大黄、金钱草等药物组成。

2 方法

2.1 模型复制 从实验第1天开始,除空白对照组予以普通饲料,其余3组均参照文献[1]复制铜负荷大鼠模型,即予含硫酸铜1.0g/kg的饲料和0.185%硫酸铜的水,喂养12周;各组大鼠每天自由进食并自由饮水。

2.2 给药方法

2.2.1 肝豆灵组:从第7周第1天开始,每日每只大鼠按0.486g/kg将肝豆灵溶于生理盐水予以灌胃,每日1次,共6周。

2.2.2 青霉胺组:从第7周第1天开始,每日每只大鼠予以青霉胺0.09g/kg,每日1次,共6周。

2.2.3 空白对照组和模型组:给予等容量生理盐

水,连续6周。

2.3 标本留取 各组动物在第13周实验结束后,禁食12h,处死动物。乙醚麻醉,腹主动脉取血进行肝功能生化检测。取肝组织液氮速冻后存于-80℃冰箱,用于miRNA-122检测。

2.4 肝功能检测 血清丙氨酸氨基转移酶(alanine aminotransferase,ALT)、天冬氨酸氨基转移酶(aspartate aminotransferase,AST)和总胆红素(total bilirubin,TBil)由全自动生化分析仪测定。

2.5 RNA提取 采用TRIzol法提取RNA。每50~100mg组织样品,加入1mL TRIzol 试剂,用电动匀浆器进行匀浆。所加样品体积不能超过匀浆此样品所使用的 TRIzol 试剂体积的10%。按照 RecoverAll™ 总核酸提取试剂盒(Ambion, Austin)的操作说明书,从组织悬液中提取总RNA。紫外分光光度计用于评估RNA的浓度和纯度。将所有RNA样品置于-80℃冰箱保存备用。

2.6 miRNAs 反转录和实时荧光定量 RT-PCR 扩增 ①cDNA 的合成:RT 混合反应液由2μL dNTP、2μL 10×RT Buffer、0.3μL RT 特异引物、1000ng 总 RNA、0.1μL MMLV 反转录酶、0.3μL RNA 酶抑制剂组成,加无 RNA 酶水至20μL。②RT-PCR 反应:在9700型基因扩增仪中进行,16℃30min,42℃40min,85℃5min。反应结束后,将其放在冰上待用或-20℃保存。实时荧光 PCR 反应采用美国 Life Technologies 公司的 ViiA 7 实时荧光定量 PCR 反应体系。体系配置中有5μL 2×Master Mix、0.5μL 10μmol/L 的 PCR 特异引物 F、0.5μL 10μmol/L 的 PCR 特异引物,引物序列见表1,最后加双蒸水至8μL。③实时 PCR 反应条件:95℃,10min;40个 PCR 循环(95℃,10s;60℃,60s)。为了建立 PCR 产物的熔解曲线,扩增反应结束后,按照“95℃,10s→60℃,60s→95℃,15s”的顺序控制反应温度,并从60℃缓慢加热到99℃(每秒升高0.05℃)。各样品的目的 miRNA 和内参(U6)分别进行实时定量 PCR 反应。数据采用 2^{-ΔΔC_T} 法进行分析。

表1 实时定量 PCR 使用引物列表

基因名	双向引物序列	退火温度/℃	产物长度/bp
U6	上游:5'-GCTTCGGCAGCACATATACTAAAAT-3'	60	89
	下游:5'-CGCTTCACGAATTTGCGTGTTCAT-3'		
rno-miR-122	上游:5'-GGGTGGAGTGTGACAATGG-3'	60	63
	下游:5'-GTGCGTGTCTGGAGTCG-3'		

2.7 统计学方法 采用 SPSS 19.0 统计软件进行统计学分析。呈正态分布且离散趋势较小的连续型

变量采用“均数±标准差($\bar{x}\pm s$)”进行统计学描述。多组间均数比较,采用单因素方差分析;采用 LSD 法进行均数的多重比较。 $P<0.05$ 表示差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 各组大鼠肝功能比较 与空白对照组比较,模

表 2 各组大鼠肝功能指标比较($\bar{x}\pm s$)

组 别	n	ALT/(U/L)	AST/(U/L)	TBil/(μ mol/L)
空白对照	6	18.87±4.14	27.22± 5.73	6.97±1.35
模 型	6	56.06±7.53 $\triangle\triangle$	65.06± 7.36 $\triangle\triangle$	34.18±4.43 $\triangle\triangle$
青霉胺	6	38.02±8.69 $\triangle\triangle\#$	48.42±10.70 $\triangle\#$	25.33±3.20 $\triangle\triangle\#$
肝豆灵	6	24.63±8.00 $\triangle\triangle\#$	34.99± 9.30 $\triangle\triangle\#$	15.77±5.40 $\triangle\triangle\#$

注:与空白对照组比较, $\triangle\triangle P<0.01$;与模型组比较, $\# P<0.05$, $\#\# P<0.01$;与青霉胺组比较, $* P<0.05$, $** P<0.01$ 。

3.2 各组大鼠肝组织 miRNA-122 表达水平比较 与空白对照组比较,模型组 miRNA-122 表达水平显著降低($P<0.01$),与模型组比较,青霉胺组、肝豆灵组 miRNA-122 表达水平显著升高($P<0.05$,或 $P<0.01$);肝豆灵组 miRNA-122 表达水平显著高于青霉胺组($P<0.05$)。见表 3。

表 3 各组大鼠肝组织 miRNA-122 表达水平比较($\bar{x}\pm s$)

组 别	n	MiR-122 相对值
空白对照	6	2.98±0.43
模 型	6	1.06±0.26 $\triangle\triangle$
青霉胺	6	1.85±0.32 $\triangle\triangle\#$
肝豆灵	6	2.41±0.42 $\triangle\triangle\#$

注:与空白对照组比较, $\triangle P<0.05$, $\triangle\triangle P<0.01$;与模型组比较, $\#\# P<0.01$;与青霉胺组比较, $* P<0.05$ 。

4 讨论

目前临床常采用 ALT 和 AST 作为肝损伤的标记物,这两种转氨酶在人体多个组织中均有分布,缺乏特异性^[2]。在病毒性肝炎、脂肪肝、药物性肝炎、肝癌、酒精性肝炎等肝脏疾病中,ALT 因肝细胞损伤或通透性增加,释放入血引起血液中 ALT 升高。WD 模型大鼠因铜过量沉积引起肝组织破坏,ALT 升高。肝特异性 miRNA-122 作为首个临床药物受到越来越多的关注^[3],miRNA-122 可能参与了肝脏的发育分化^[4],在维持肝脏的正常功能代谢上起着重要的作用^[5-6],在目前常见的肝脏疾病(如病毒性肝炎、肝癌、肝硬化)中起到了很重要的调控作用^[7-10]。一些研究发现血浆 miRNA-122 水平与 ALT 水平呈正相关关系,且升高的时间段更早,推测 ALT 可作为肝损伤的早期标志物^[10]。

前期大量的基础和临床研究^[12-14]发现,WD 肝损伤的基本病机为湿热内蕴、痰瘀互结,具有通腑利尿、化痰散结作用的中药专方肝豆灵片,可以改善 WD 患者的肝功能指标。肝豆灵片以石菖蒲、丹参

型组 ALT、AST、TBil 水平显著升高($P<0.01$);与模型组比较,青霉胺组和肝豆灵组 ALT、AST、TBIL 水平显著降低($P<0.01$);肝豆灵组 ALT、AST 和 TBIL 水平显著低于青霉胺组($P<0.05$,或 $P<0.01$)。见表 2。

为君药,石菖蒲辟秽开窍、宣气逐痰;丹参专入血分,内达脏腑,能化瘀滞,与丹参共奏祛痰化瘀之功。姜黄破血行气、通经止痛;莪术行气破血、消积止痛;郁金行气化瘀、清心解郁、利胆退黄。三药合用软坚散结,共为臣药。大黄泻热通腑、凉血解毒、逐瘀通经,《日华子本草》谓大黄“通宣一切气,调血脉,利关节,泄壅滞、水气,四肢冷热不调,温瘴热痰,利大小便,并敷一切疮疖痈毒”。黄连泻火解毒、清热燥湿。大黄、黄连共为佐药,奏清热通腑之功。金钱草利水通淋、清热解毒、散瘀消肿,又可引诸药入肝胆经,为使药。纵观全方,肝豆灵不仅以通腑利湿之法促进铜毒的排出,同时佐以化痰散结之法以治“积聚”“癥瘕”,标本同治。

本研究结果表明,WD 模型大鼠血清 ALT、AST、TBil 显著升高,肝豆灵可显著降低异常升高的 ALT、AST 和 TBIL,同时肝豆灵能够提高肝组织中 miRNA-122 的表达水平。结果提示,肝豆灵改善肝功能的机制可能与上调肝组织中 miRNA-122 的表达有关。

参考文献:

[1] Pulverer BJ,Kyriakis JM,Avruch J,et al. Phosphorylation of c-jun mediated by MAP kinases[J]. Nature, 1991,353(6345):670-674.

[2] 俸家富,涂植光. 肝功能相关的血清酶学研究进展[J]. 医学综述,2007,13(3):225-230.

[3] Young DD,Connelly CM,Grohmann C,et al. Small molecule modifiers of microRNA miR-122 function for the treatment of hepatitis C virus infection and hepatocellular carcinoma[J]. J Am Chem Soc,2010,132(23):7976-7981.

[4] Gao Y,He Y,Ding J,et al. An insertion/deletion polymorphism at miRNA-122-binding site in the interleukin-1 α 3' untranslated region confers risk for hepatocellular carcinoma[J]. Carcinogenesis,2009,30(12):2064-2069.

[5] Bhattacharyya SN,Habermacher R,Martine U,et al. Relief

of microRNA-mediated translational repression in human cells subjected to stress[J]. *Cell*,2006,125(6):1111-1124.

[6] Girard M, Jacquemin E, Munnich A, et al. miR-122, a paradigm for the role of microRNAs in the liver[J]. *J Hepatol*,2008,48(4):648-656.

[7] Díaz-Toledano R, Ariza-Mateos A, Birk A, et al. *In vitro* characterization of a miR-122-sensitive double-helical switch element in the 5' region of hepatitis C virus RNA[J]. *Nucleic Acids Res*,2009,37(16):5498-5510.

[8] Chen Y, Shen A, Rider PJ, et al. A liver-specific microRNA binds to a highly conserved RNA sequence of hepatitis B virus and negatively regulates viral gene expression and replication[J]. *FASEB J*, 2011, 25 (12): 4511-4521.

[9] Wang S, Qiu L, Yan X, et al. Loss of microRNA 122 expression in patients with hepatitis B enhances hepatitis B virus replication through cyclin G₁-modulated P53 activity[J]. *Hepatology*,2012,55(3):730-741.

[10] Karakatsanis A, Papaconstantinou I, Gazouli M, et al. Expression of microRNAs, miR-21, miR-31, miR-122, miR-145, miR-146a, miR-200c, miR-221, miR-222, and miR-223 in patients with hepatocellular carcinoma or intrahepatic cholangiocarcinoma and its prognostic significance[J]. *Mol Carcinog*,2013,52(4):297-303.

[11] 李祥云, 陈兆军, 潘峰, 等. Micro-RNA-122 在不同时期慢性乙肝患者外周血浆中表达变化的研究[J]. *中国卫生检验杂志*,2013,23(4):874-876.

[12] 杨文明, 韩辉, 鲍远程, 等. 中医对肝豆状核变性病因病机及辨证论治的探索[J]. *北京中医药大学学报: 中医临床版*, 2012, 19(4): 6-9.

[13] 杨文明, 鲍远程, 张波, 等. 肝豆状核变性诊疗方案[J]. *中医药临床杂志*, 2012, 24(11): 1130-1131.

[14] 汪瀚, 杨文明, 鲍远程. 从铜毒论治肝豆状核变性初探[J]. *安徽中医学院学报*, 2009, 28(5): 4-6.

(收稿日期:2014-06-07)

Effect of Gandouling on miRNA-122 Expression in Liver Tissues in Rat Model of Wilson’s Disease

SHEN Bin¹, BAO Yuan-cheng², JIANG Huai-zhou³, ZHANG Juan², WANG Yan-xin², FANG Xiang²

(1. Hubei University of Chinese Medicine, Hubei Wuhan 430065, China; 2. Encephalopathy Center, The First Affiliated Hospital of Anhui University of Chinese Medicine, Anhui Hefei 230031, China; 3. College of Clinical Chinese Medicine, Anhui University of Chinese Medicine, Anhui Hefei 230038, China)

[Abstract] **Objective** To study the effect of Gandouling on the miRNA-122 expression in liver tissues of rats with Wilson’s disease (WD) and to explore the action mechanism of Gandouling in liver protection. **Methods** Twenty-four Wistar rats were randomly divided into blank control group, model group, penicillamine group, and Gandouling group. All rats except those in the blank control group were given copper-overloaded diets for 8 weeks. Then, the penicillamine group and Gandouling group received penicillamine and Gandouling, respectively, by gavage at human-equivalent doses, while the blank control group and model group received an equal volume of normal saline by gavage; intragastric administration was performed for 4 weeks in each group. The liver function and hepatic miRNA-122 expression in each group were measured. **Results** Both Gandouling and penicillamine significantly reduced the levels of alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), and total bilirubin (TBil) ($P<0.05$ or $P<0.01$), which were abnormally elevated in rats with WD, and significantly increased miRNA-122 expression ($P<0.01$), which was significantly reduced in the liver tissues of rats with WD. Gandouling was significantly superior to penicillamine in reducing serum ALT, AST, and TBil levels and increasing hepatic miRNA-122 expression ($P<0.05$ or $P<0.01$). **Conclusion** Gandouling can protect the liver function of rats with WD, possibly by increasing hepatic miRNA-122 expression.

[Key words] Wilson’s disease; Gandouling; penicillamine; miRNA-122