

丹参、生地黄中 miRNA 在人体血液中 分离、鉴定及表达分析

王宇亮¹, 王颖芳^{2*}, 杨泽民², 王光昀¹, 韩彬², 贾真², 陈艳芬², 胡旭光²

(1. 河南省中医院, 郑州 450002; 2. 广东药学院, 广州 510006)

[摘要] 目的: 通过 Northern 印迹杂交 (Northern blot) 验证丹参、生地黄中微小核糖核酸 (miRNA) 的存在, 及水煎服用后通过消化道可进入人体血液中。方法: 根据已知丹参、生地黄 miRNA 序列设计合成 10 条 (丹参 4 条, 地黄 6 条) 特异的 LNA 反义寡核苷酸探针, 并用地高辛标记。在室温 25 ℃ 条件下, 用通用植物 miRNA 提取试剂盒和血液 (液体样本) miRNA 提取试剂盒, 并按照试剂盒提供的操作步骤提取新鲜丹参、地黄以及服用丹参、生地黄水煎剂后人体血液的 Total RNA, 在变性条件下 (15% 的尿素变性) PAGE 电泳分离小 RNA, 转膜、交联、杂交和检测。结果: Northern blot 表明, 丹参只有 2 种 miRNA 即 miR 156 和 miR157 表达, 生地黄 miR5140, miR5139, miR 5138, miR 5137, miR 5142, miR 5141 等 6 种 miRNA 均有表达。丹参处理组无 miRNA 表达, 生地黄处理组中有 miR5140, miR5137, miR5141 等 3 种 miRNA 表达。结论: 验证了丹参、生地黄中 miRNA 的存在, 初步证明了生地黄经水煎后部分 miRNA 可通过消化道进入人体血液中, 为研究 miRNA 在中药疗效的作用机制提供了新的思路和策略。

[关键词] 丹参; 生地黄; miRNA; Northern blot

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)19-0121-04

Isolation, Identification and Analysis of the Expression Profile of miRNA from *Salvia miltiorrhiza* and *Rehmannia glutinosa* in Human Blood

WANG Yu-liang¹, WANG Ying-fang^{2*}, YANG Ze-min², WANG Guang-yun¹,
HAN Bin², JIA Zhen², CHEN Yan-fen², HU Xu-guang²

(1. Henan Chinese Medicine Hospital, Zhengzhou 450002, China;

2. Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, China)

[Abstract] **Objective:** To verify whether the micro ribonucleic acid (miRNA) in *Salvia miltiorrhiza* and *Rehmannia glutinosa*, and their miRNA could enter human body blood through the digestive tract after oral administration. **Method:** At room temperature of 25 ℃, based on published miRNA sequences of *S. miltiorrhiza* (4) and *R. glutinosa* (6), 10 DIG-labeled antisense probes were synthesized. The total RNAs from *S. miltiorrhiza* and *R. glutinosa* were extracted with Plant Micro RNA extraction kit, and the total RNAs from human blood were extracted with blood miRNA extraction kit, followed the steps provided by the kit, and then loaded onto 15% denaturing polyacrylamide gel and hybridized with the appropriate DIG-labeled probes. **Result:** Northern blotting detected miR156 and miR157 in *S. miltiorrhiza*, and all the 6 miRNAs of miR5140, miR5139, miR 5138, miR 5137, miR 5142 and miR 5141 in *R. glutinosa*, and 3 miRNAs (miR5140, miR5137 and miR5141) in the test group which tested with *R. glutinosa*. **Conclusion:** These results present the evidence of miRNA in *S. miltiorrhiza* and *R. glutinosa*, and the miRNAs of miR5140, miR5137 and miR5141 from *R. glutinosa* could enter human body blood through the digestive tract after water frying. Further studies on the functions of these miRNAs may offer new

[收稿日期] 20120703(009)

[基金项目] 广东省自然科学基金博士启动项目(7300243)

[第一作者] 王宇亮, 硕士, 主治医师, 从事消化系统疾病临床和基础研究, Tel: 13653822100, E-mail: 150306757@qq.com

[通讯作者] * 王颖芳, 博士/博士后, 讲师, 从事中药抗肿瘤及方剂配伍研究, Tel: 020-39352182, E-mail: smi_ling@163.com

insights and may lead to novel approaches to the development of Chinese traditional medicine.

[Key words] *Salvia miltiorrhiza*; *Rehmannia glutinosa*; miRNA; Northern blot

微小核糖核酸(micro ribonucleic acid, miRNA)是现代生物医学中一个重要的调节分子,在自然界动、植物中普遍存在。19~24 核苷酸长度的内源性单链非编码 miRNA,与靶基因 mRNA 通过碱基配对方式引导 RNA 沉默复合体(RNA-induced silencing complex, RISC)降解 mRNA 或阻碍其翻译,在转录后水平负调节基因表达,从而参与细胞一系列重要进程,包括在肿瘤的发生发展过程中起到调控的枢纽作用^[1-3]。

南京大学张辰宇研究小组^[4]发现,植物所含有的 miRNA 能够通过消化道进入人体血液和器官组织,然后通过调控人体内靶基因表达的方式,影响人的生理功能。他们已经发现了至少一种情况,miRNA 能够通过这种方式影响人体健康:进食过多的大米会增加患代谢紊乱综合征的可能^[4]。作为主要来源于动植物的中药中,同样存在有 miRNA。中药 miRNA 可能是中药作用的有效成分和物质基础。因此,本研究对服用丹参、生地黄水煎剂的患者血液中 miRNA 进行鉴定,研究中药中 miRNA 可以通过消化道进入体内血液循环。通过已知的丹参和生地黄 miRNA 序列合成探针,采用 Northern blotting 证实丹参、地黄中 miRNA 的存在,并分析了丹参和地黄经过水煎后,地黄部分 miRNA 可通过消化道进入人体血液中。

1 材料

1.1 植物 新鲜丹参(*Salvia miltiorrhiza*)、生地黄(*Rehmannia glutinosa*)由焦作大良怀药科技有限公司提供,并由河南中医学院苗明三教授鉴定。

1.2 水煎液 各取丹参、生地黄 30 g,分别加水煎煮 0.5 h,煎 2 次,混合 2 次溶液,浓缩至 30 mL。

1.3 试剂 血液(液体样本)miRNA 提取试剂盒(北京百泰克生物技术有限公司,RP5901)、通用植物 microRNA 提取试剂盒(北京百泰克生物技术有限公司,RP5331),BrightStar-Plus nylon membranes(Ambion 公司,T2232),14-30 ssRNA ladder marker(TaKaRa 公司,D3416),地高辛 RNA 标记试剂盒(Roche 公司,SP6/T7),X 光片、定影、显影试剂购自广州鼎国生物技术公司,其他 RNA 实验所用耗材及生化试剂均购自广州威佳生物科技有限公司。

1.4 仪器设备 Centrifuge 5415D 型台式高速离心机(德国 Eppendorf 公司),GeneGenius 型全自动凝

胶成像及分析系统(美国 Syngene 公司),M-20 型紫外透照仪(美国 UVP 公司),TL-2000 紫外交联仪(美国 UVP 公司),HB-1000 杂交炉(美国 UVP 公司),Thermo Finnpiptette 单道可调移液器(美国 Thermo Electron 公司),Bio-Rad 真空转移器(美国 Bio-Rad 公司),DU800 型紫外分光光度计(美国 Beckman Coulter 公司),EPS-601 型电泳仪(芬兰 Amersham Pharmacia 生物技术公司),DYC-24B 型电泳槽(北京六一仪器厂)。

2 方法

2.1 受检人群及分组 32 例受检人群(其中女性 18 例,男性 14 例)来源于河南省中医院体检门诊,排除高血压、心脏病、糖尿病及自身免疫性疾病,年龄(30.36±4.27)岁。分为空白对照组(CK)为 10 人(女性 5 例,男性 5 例)、丹参处理组(A 组)11 例(女性 6 例,男性 5 例)、地黄处理组(B 组)11 例(女性 7 例,男性 4 例)。

2.2 探针 根据已发表的丹参和地黄 miRNA 序列设计探针,并由中美泰和生物技术(北京)有限公司合成。见表 1。

2.3 试验处理 在 25℃ 条件下,CK 与用药组晚饭 8 点后不再进食(除白开水),次日晨 08:00,A 组服用丹参水煎剂 30 mL,B 组服用生地黄水煎剂 30 mL,CK 服用蒸馏水 30 mL。各组分别在 30 min,1,2,4 h 采血,将各组 4 个时间段采集的血液进行混合,获得血液样本。

2.4 microRNA 的提取 血液 miRNA 提取:抽取受检人群的抗凝血 2 mL,按血液(液体样本)miRNA 提取试剂盒的说明提取 miRNA,在 260 nm 和 280 nm 波长条件下采用吸光度(A)测定和 15% 的尿素变性聚丙烯酰胺凝胶电泳检测样品总 RNA 质量。

植物 miRNA 提取:分别剪取新鲜丹参及生地黄根 2.0 g,按照通用植物 microRNA 提取试剂盒的说明提取 miRNA,分别编号为 a,b。采用 A 测定和 15% 的尿素变性聚丙烯酰胺凝胶电泳检测样品总 RNA 质量。

2.5 Northern blot 杂交 配置 15% 的尿素变性聚丙烯酰胺凝胶,分别取 15 μg 样本以及 5 μL 小 RNA 相对分子质量 marker 上样,在 1×TBE 电泳缓冲液,200 V 条件下,电泳 90 min,至溴酚蓝跑至胶底,将胶取下置于盛有 1×TBE 溶液的瓶皿中,将 Marker

表 1 探针序列

名称	序列(5'-,3')	来源数据库	数据库中编号	家族
丹参 <i>S. miltiorrhiza</i>	UUGACAGAAGAUAGAGAGCAC	microPC	MNEST045887	miR157
	UUUUUUUCUUCUUCUGCAUA	miRNEST	MNEST002588	no hits
	UGACAGAAGAUAGAGAGCAC	microPC	MNEST046109	miR157
	CAGAAGAUGAGAGCAC	microPC	MNEST044901	miR156
生地黄 <i>R. glutinosa</i>	GCUGGUGAAGAUUUGGUG	miRBase	MNEST041037	miR 5140
	AAACCUGGCUCUGAUACCA	miRBase	MNEST041036	miR 5139
	AAAAAUCGUUAGGCCGUA	miRBase	MNEST041035	miR 5138
	AGCGGAGAAGACGAUGGGCU	miRBase	MNEST041034	miR 5137
	AUAUUGAUUGAUAAAGUGAU	miRBase	MNEST041039	miR 5142
	AGACCCGACGCGACUGACAGAUAA	miRBase	MNEST041038	miR 5141

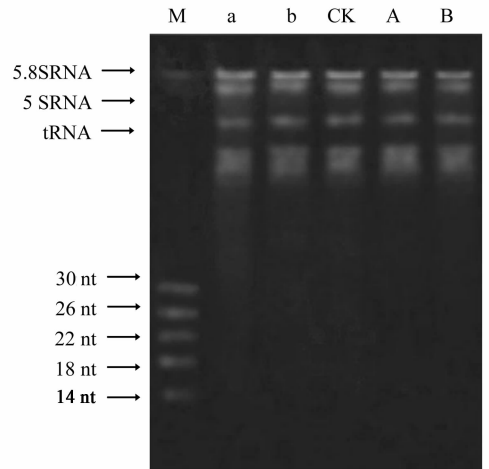
泳道切下后用 EB 染色,紫外灯下观察,在白纸上标记条带至加样孔的距离。其余带有样品的胶在 0.25 × TBE 转印缓冲液中 0.2A 半干转印 40 min,转印完成后,用铅笔将膜标记,保持湿润,在紫外交叉仪下交联,120 mj 40 s,然后将膜转入已预热 32 °C 的 20 mL 预杂交液中预杂交 2 h,结束后倒掉预杂交液加入含有 8 μL 标记探针的 20 mL 杂交液中,42°过夜^[5]。

2.6 曝光检测 将膜从杂交管取出,放入盛有 20 mL 2 × SSC,0.1% SDS 溶液平皿中,在室温下振荡洗涤 3 次,每次 15 min。用镊子将膜取出转入装有 20 mL 洗涤缓冲液平皿中振荡洗涤 5 min。杂交和洗涤后,在洗涤缓冲液中浸润 5 min,20 mL 阻断液中孵育 30 min,20 mL 抗体液(1:20 000 稀释抗体)中孵育 30 min,用 30 mL 洗涤液洗涤 2 次,每次 15 min。15 mL 检测缓冲液中平衡 4 min。在膜上滴加 500 μL 发光底物液 CDP-star,室温放置 10 min,将膜用保鲜膜封好后暗室中 X 片压片曝光 30 min^[5]。

3 结果

3.1 Total RNA 电泳鉴定 分别取 2 μg 样本的 Total RNA 与 5 μL RNA 相对分子质量标准,15% 尿素变性聚丙烯酰胺凝胶电泳鉴定。结果显示 5.8,5 SRNA,tRNA 等主带清晰可见,相对分子质量标准条带也清晰可见,说明所提总 RNA 无降解(图 1)。

3.2 Total RNA 质量分析 各组将所提取 RNA 样品 1 μL RNA,稀释 100 倍后,在波长 260,280 nm 处测定吸光度,计算 A₂₆₀/A₂₈₀ 的比值得到纯度,结果如表 2 所示,各组 A₂₆₀/A₂₈₀ 值范围在 1.900 3 ~ 2.041 3,表明所提取的 RNA 纯度较优。结合 Total RNA 电泳鉴定结果,样品可用于后续试验。



M. 14-30nt ssRNA ladder marker;a. 丹参;
b. 生地黄;CK. 空白对照血样;
A. 服丹参水煎液血样;B. 服生地黄水煎液血样(图 2 同)

图 1 Total RNA PAGE 电泳鉴定

3.3 丹参和生地黄 miRNA Northern blot 验证 选择在数据库中已知的丹参、生地黄 miRNA 进行试验验证。丹参有 miR 156 (microPC) 和 miR157 (microPC) 2 种 miRNA 表达,生地黄 6 种 miRNA 均有表达,由此,验证了丹参和生地黄中 miRNA 的存在。

表 2 Total RNA 质量检测

样品	A ₂₆₀	A ₂₈₀	A ₂₆₀ /A ₂₈₀
丹参	0.002 9	0.001 4	2.041 3
生地黄	0.003 1	0.001 6	1.972 0
空白血样	0.002 0	0.001 0	2.009 6
服丹参血样	0.001 8	0.000 9	1.900 3
服生地黄血样	0.003 4	0.001 7	2.010 3

3.4 血液 miRNA Northern blot 验证 CK 无表达,在丹参处理组中,a 组和 A 组未同时出现同一条带,

表明丹参 miRNA 经高温水煎后,其 miRNA 可能被破坏,无法被人体吸收;在生地黄处理组中,b 组和 B 组同时检测到 miR5140,miR5137 和 miR5141 的表达(图 2),由此验证了生地黄经水煎后,部分 miRNA 不会被破坏,并且可通过消化道进入人体血液中。

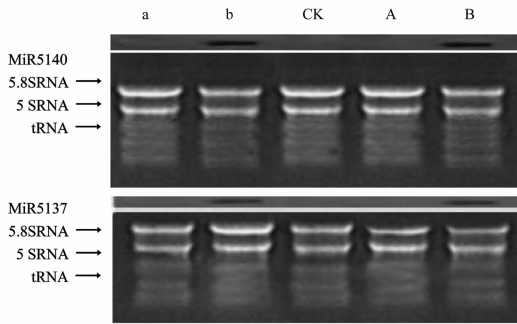


图 2 miRNA 表达分析

4 讨论

随着分子生物学的发展,对 miRNAs 的研究已经成为目前一大热点,由于植物中的 miRNA 是一种仅由 19~24 个核苷酸组成的短链核糖核酸,同时在植物中,miRNA 会被进行甲基化修饰,即在其两端加上甲基,把它“加固”,因此其结构非常牢固,因而植物 miRNA 分子不容易被破坏^[6]。南京大学张辰宇小组研究发现^[4],植物所含有的 miRNA 能够通过消化道进入人体血液和器官组织,进一步研究发现给小鼠注射大量的 miR168a(他们发现的 10 余种 miRNA 之一),发现小鼠的低密度脂蛋白受体结合蛋白(low density lipoprotein receptor adapter protein 1, LDLRAP1)受到了调控,影响了胆固醇的代谢过程。因此,中药中所含的 miRNA,可能是其一类新的活性成分^[7],在中药治疗疾病时作为一种干预因素参与了对疾病的治疗。中药 miRNA 可能是中药作用的有效成分和物质基础,miRNA 相关机制可能是中药疗效的作用机制之一。

因此,本研究选取在化学成分、药理活性、临床制剂和临床用途等方面已进行研究和探讨的中药材丹参和地黄作为研究对象^[8-11],通过 Northern blot 直接验证的方法,验证了丹参、生地黄植物体内 miRNA 的存在,并验证了服用生地黄水煎剂,生地黄的 miR5140, miR5137, miR5141 等 3 种 miRNA 可通过消化道进入人体。这为研究中药中 miRNA 在治疗疾病过程中的作用机制提供了参考。

随着 Solexa 等高通量测序技术的快速发展以及生物信息学的逐步完善,对 miRNA 的研究分析会更加简便、全面、深入。通过对 miRNA 的研究,有助于我们研究丹参、地黄中 miRNA 在药理作用中发挥的作用机制,为研究其药效提供新的思路和策略。

[参考文献]

- [1] Llave Cesar, Xie Zhixin, Kasschau Kristin D. Cleavage of Scarecrow-like mRNA targets directed by a class of arabidopsis miRNA [J]. Science, 2002, 297(5589): 2053.
- [2] Lee R C, Feinbaum R L, Ambros V. The C. elegans heterochronic gene lin-4 encodes small RNAs with antisense complementarity to lin-14 [J]. Cell, 1993, 75(5): 843.
- [3] Zhang B, Pan X, Cobb G P, et al. MicroRNAs as oncogenes and tumor suppressors [J]. Dev Biol, 2007, 302(1): 1.
- [4] Lin Zhang, Dongxia Hou, Xi Chen, et al. Exogenous plant MIR168a specifically targets mammalian LDLRAP1: evidence of cross-kingdom regulation by microRNA [J]. Cell Research, 2011, 22(2012): 107.
- [5] 郑培明, 吴锦霞, 顾金保, 等. 白纹伊蚊 miRNA 的分离、鉴定及表达谱的初步分析 [J]. 南方医科大学学报, 2010, 30(4): 677.
- [6] 王波, 冯晓黎, 张富春. 植物中 microRNA 的合成及在发育和抗逆中的作用 [J]. 植物生理学通讯, 2006, 42(3): 581.
- [7] 李沧海, 姜廷良. 微小核糖核酸在中药研究中的应用 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(6): 279.
- [8] 刘静, 戴忠, 王钢力, 等. 丹参活性成分及相关分离分析方法研究进展 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(11): 288.
- [9] 杨光义, 叶方, 雷震, 等. 正交试验设计优选丹参半仿生集成提取工艺 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(17): 40.
- [10] 傅超美, 张臻, 廖婉, 等. 丹参在化妆品领域的应用前景 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(5): 239.
- [11] 郭建华, 田成旺, 张铁军, 等. 鲜地黄中梓醇及水苏糖的闪式提取工艺优选 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(11): 13.

[责任编辑 聂淑琴]