

microRNA-122作为新药肝毒性早期评价标志物的相关分析

匡雨琼,刘亮,许飞飞,陈芸,苏钰文*

南京医科大学药学院,江苏 南京 211166

[摘要] 目的:探讨microRNA-122(miR-122)在新药肝细胞毒性早期评价中的应用价值。方法:建立对乙酰氨基酚诱导的小鼠原代肝脏细胞损伤模型,对细胞培养上清中miR-122含量以及传统细胞毒性标志物乳酸脱氢酶(lactic dehydrogenase, LDH)含量分别进行测定,对二者进行平行比对和相关性分析,初步探讨miR-122在新药肝细胞毒性早期评价中的作用;采用多种潜在肝脏毒性物质诱发的小鼠原代肝脏细胞损伤模型,进一步验证miR-122在肝细胞毒性早期评价中的应用价值。结果:在对肝细胞毒性早期评价中,miR-122和LDH呈现良好相关性($r>0.9$);与LDH相比,miR-122具有更高的灵敏性。结论:miR-122作为新药肝细胞毒性早期评价标志物具有潜在应用价值。

[关键词] 药源性肝损伤;肝细胞毒性;生物标志物;miR-122

[中图分类号] R965.3

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2018)03-322-06

doi: 10.7655/NYDXBNS20180308

Analysis of microRNA-122 as a biomarker for early evaluation of drug hepatotoxicity

Kuang Yuqiong, Liu Liang, Xu Feifei, Chen Yun, Su Yuwen*

School of Pharmacy, NMU, Nanjing 211166, China

[Abstract] **Objective:** To investigate the value of microRNA-122 (miR-122) in the evaluation of hepatotoxicity at the early stage. **Methods:** Based on mouse primary liver cell injury models induced by acetaminophen, the concentrations of miR-122 and traditional cytotoxic marker lactic acid dehydrogenase (LDH) in the cell culture supernatant were measured parallelly, and followed by the correlation analysis. Besides, multiple cellular models induced by different potential hepatotoxic substances were established, and the concentrations of miR-122 and LDH in supernatant were analyzed and compared. The advantage of miR-122 for hepatotoxicity evaluation was further verified. **Results:** There were well correlations between miR-122 and LDH for hepatotoxicity evaluation ($r > 0.9$); Moreover, miR-122 demonstrated higher sensitivity compared with LDH. **Conclusion:** miR-122 has potential application value as a biomarker for early evaluation of drug hepatotoxicity.

[Key words] drug induced liver injury; hepatotoxicity; biomarker; miR-122

[Acta Univ Med Nanjing, 2018, 38(03):322-327]

安全性评价是新药研发的重要组成部分,也是各国药品监督管理机构批准候选药物进入临床试验及上市的重要依据。新药研发机构、制药工业界和监管机构通过引入早期评价、早期淘汰机制,进行早期毒性筛选和机理研究。然而,上市后因为药物不良反应而撤市的事件仍不断发生。新药的肝脏毒性评价是药物安全性评价不可或缺的部分,药

[基金项目] 江苏省高校自然科学研究面上项目(14KJB310005);南京医科大学科技发展基金重点项目(2014NJMUZD018);国家自然科学基金面上项目(21675089)
*通信作者(Corresponding author), E-mail: suyuwen@njmu.edu.cn

源性肝损伤(drug-induced liver injury, DILI)也是全球范围内造成药物从市场撤回、被限用和拒批的重要原因。目前发现能引起肝损伤的小分子化学药物包括对乙酰氨基酚(acetaminophen, APAP)、奎尼丁、他克林、溴芬酸、胺碘酮和氯丙嗪等。近年来,中药引发的肝损伤问题也受到越来越多的关注^[1-2]。临床上报道的引发DILI的中药有五倍子、雷公藤、黄药子和千里光等^[3-4]。

目前,药物肝脏毒性的主要评价方法包括基于计算机的虚拟模拟、离体组织器官评价、体外靶细胞评价、动物体内评价,以及临床试验中和上市后

的不良反应监测与评价。体外靶细胞评价模型较其他模型具有试验个体差异小、毒性终点指标明确、结果可重复性高、药物耗量有限、操作简便快速可高通量化以及成本较低等优点,更适用于药物的肝脏毒性早期研究,在药物安全性评价与筛选中具有很好的应用前景^[5-6]。乳酸脱氢酶(lactic dehydrogenase, LDH)作为体外肝细胞毒性的传统指标,长期应用于药物肝细胞毒性的早期评价中。但是该检测指标存在一些缺陷。首先LDH广泛分布于肾脏、肝脏、骨骼肌、心肌、肺、胰腺等多种组织,不同组织中的活性普遍很高,临床上血清LDH增高对任何单一组织或器官都是非特异的;其次,临床样本保存条件不当或者保存时间过长会导致这些蛋白质活性丧失,检测值也会产生误差^[5-6]。随着对肝脏高丰度表达的microRNA-122(miR-122)研究不断深入,越来越多的报道证明miR-122可作为生物标志物用于多种肝脏疾病的诊断,包括肝癌、肝炎、DILI和酒精性肝病等^[6-15]。相对于诸如LDH这类成分复杂、易降解、易变性的蛋白分子,含量丰富且性质稳定

的miRNA更适宜作为生物标志物应用于临床^[7-10,16]。基于此,本研究开展了miR-122作为新药肝毒性早期评价标志物的相关分析。

本研究以小鼠原代肝细胞作为细胞模型,研究miR-122在包括小分子化合物、中草药和毒物在内的多种潜在肝脏毒性物质所致肝细胞损伤中的动态变化,并与传统肝细胞损伤指标LDH比较分析,探讨miR-122与DILI之间的关系,以期为新药研发过程中的肝毒性早期评价生物标志物提供新选择。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 药品、试剂与实验动物

肝脏毒性受试药相关信息请见表1,单味中药购自安徽省亳州市药材总公司,中药饮片符合2010年版《中华人民共和国药典》质量标准。作为肝毒性阴性对照药品的甘草酸(glycyrrhizic acid, GA)购自上海阿拉丁生化科技股份有限公司。

表1 肝脏毒性物质列表

Table 1 The list of liver hepatotoxic substances

序号	中文名称	英文或拉丁文名称	公司或产地
1	对乙酰氨基酚	acetaminophen, APAP	TCI
2	奎尼丁	quinidine	J&K
3	他克林	tacrine	SIGMA
4	五倍子	<i>calla Chinensis</i>	贵州
5	雷公藤	<i>Tripterygium wilfordii</i> Hook. f.	湖北
6	四氯化碳	carbon tetrachloride, CCl ₄	国药集团化学试剂公司

AMV 逆转录酶、dNTP、Taq DNA 聚合酶、MgCl₂ 溶液、逆转录缓冲液、PCR 缓冲液和 DEPC 水(大连 TaKaRa 公司);EVA Green 染料(Bio-Rad 公司,美国);胰岛素、地塞米松、T4、Hank's 平衡盐溶液(上海源培生物科技股份有限公司);胶原和胶原酶(Sigma 公司,美国);LDH 检测试剂盒(南京建成生物工程研究所);乙醇、苯酚等试剂均为分析纯(国药集团化学试剂公司)。

1.1.2 实验动物

SPF 级雄性 ICR 小鼠,体重(20 ± 2)g,购自上海西普尔-必凯(SIPPR-BK)实验动物有限公司。动物饲养温度为(22 ± 2)℃,湿度 60%~80%,12 h 明暗交替光照,自由饮水,基础饲料为 SPF 级实验小鼠全价颗粒饲料,购自江苏协同医药生物工程有限公司。动物适应性饲养 1 周后用于实验。

1.2 方法

1.2.1 中草药水提取物制备

分别称取 100 g 中草药饮片,粉碎后于室温浸泡于 1 L 蒸馏水中 2 h(质量体积比为 1:10),煎煮 1 h 后收集水提取液,连续 2 次煎煮,合并 2 次水提取液,4 000 r/min 离心 10 min 取上清,(45 ± 5)℃ 旋转蒸发至 100 mL,计算其所含生药量即得。

1.2.2 小鼠原代肝细胞培养

ICR 小鼠乌拉坦麻醉并固定后,采用两步灌注法制备肝脏原代细胞,用加有激素(胰岛素、地塞米松、T4)的培养基重悬细胞。细胞进行统一计数后,随机铺入胶原包被的培养皿中,4 h 后更换培养基,用于后续试验。

1.2.3 miR-122 的 qRT-PCR 检测

由于作为内参的 U6 和 5S rRNA 在血清样本中

存在降解,通过血清体积来标准化不同血清样本的 miRNA 含量。取 100 μL 待检样本,采用苯酚氯仿法抽提 RNA,溶于 20 μL DEPC 水后,冻存于 $-80\text{ }^\circ\text{C}$ 备用。置于 ABI Prism 7500 荧光定量 PCR 仪进行荧光定量 PCR 反应(EVA Green 染料法),其反应程序为 $95\text{ }^\circ\text{C}$ 5 min; $95\text{ }^\circ\text{C}$ 15 s, $60\text{ }^\circ\text{C}$ 1 min,40 个循环。引物

序列见表 2。对荧光定量 PCR 检测得到的 miRNA 的 C_t 值以相对定量的方法进行数据分析:miRNA 的相对表达量用 $2^{-\Delta C_t}$ 公式计算,其中 $\Delta C_t=C_{t(\text{Toxicon})}-C_{t(\text{Control})}$ [18]。

1.2.4 LDH 的检测

取待测细胞培养上清 20 μL 加入测定孔,并分别加入基质缓冲液 25 μL ,辅酶 I 5 μL 。同时设立

表 2 miR-122 的 qRT-PCR 引物合成序列

Table 2 Primers used to perform qRT-PCR of miR-122

名称	序列 (5'→3')
mmu-miR-122-5p(Accession No. MIMAT0000246)	uggagugugacaaugguguuug
Stem-loop primer	CTCAACTGGTGTCTGGAGTCGGCAATTCAGTTGAGCAAACACC
Forward primer	ACACTCCAGCTGGGTGGAGTGTGACAAATGG
Universal reverse primer(URP)	TGGTGTCTGGAGTCCG

空白孔,加入双蒸水 25 μL ,基质缓冲液 25 μL 。每孔加入 25 μL 2,4-二硝基苯肼。混匀, $37\text{ }^\circ\text{C}$ 温浴 15 min。每个孔均加入 250 μL 0.4 mol/L NaOH。混匀,室温放置 5 min。采用酶标仪在 450 nm 波长测定吸光度,培养上清中的 LDH 含量以 $D(450\text{ nm})$ 读值表示,样品吸光度值=测定吸光度值-空白吸光度值。

1.2.5 原代肝细胞损伤模型的建立

以 APAP 为工具药物,在小鼠原代肝细胞上建立不同剂量诱导的肝细胞药物损伤模型。以传统肝细胞毒性指标 LDH 来质控 APAP 肝细胞损伤模型的建立。分别以 6 种不同的肝脏毒性物质处理细胞作为试验组,GA 处理作为阴性对照组,DMSO 处理作为溶剂对照组进行试验。取 24 孔板,随机接种 4×10^5 个/mL 的小鼠肝原代细胞,在培养箱中预培养 24 h 后加入相应药物,分别在给药后的 12、24、48 h 测定细胞培养上清中的 LDH 和 miR-122 的含量,并对二者进行平行比对和相关性分析,探讨 miR-122 作为肝毒性早期评价生物标志物的潜在应用价值。

1.3 统计学方法

使用 R 软件(version 3.4.2)及 multcomp package (version 1.4-8)进行数据统计分析。数据以均值 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,各组间的差异先进行方差分析,再进行试验组和阴性对照组之间的 Dunnett- t 检验, $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 APAP 肝细胞损伤模型的建立

给予小鼠原代肝细胞 APAP 0、1、5、20 mmol/L,并分别在 12、24、48 h 测定细胞培养上清中 LDH 的含量(图 1)。给药后 12 h,20 mmol/L APAP 处理可引起

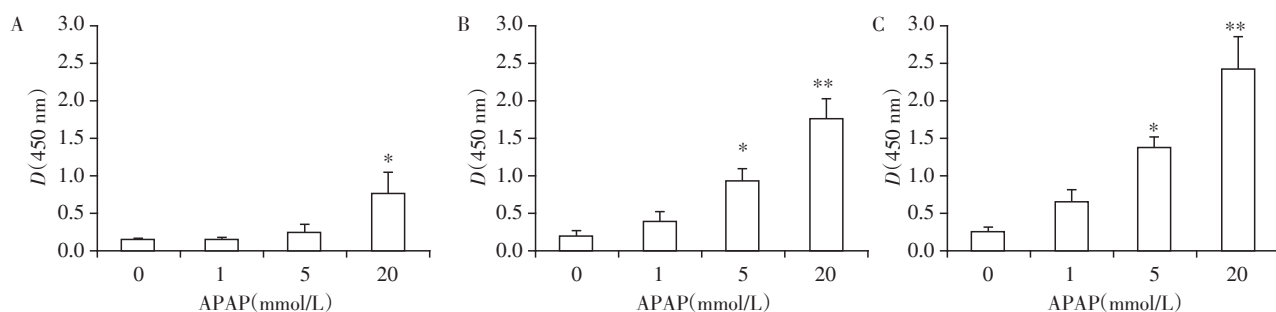
细胞内的 LDH 大量释放至培养上清,其含量与对照组相比差异有统计学意义。给药后 24 h,1 mmol/L APAP 可引起 LDH 含量升高 2 倍左右,5、20 mmol/L APAP 处理可引起 LDH 含量显著升高。给药后 48 h,1 mmol/L APAP 处理,LDH 含量为溶剂对照组的约 2.5 倍,5、20 mmol/L APAP 可引起 LDH 含量显著升高(图 1)。

2.2 miR-122 在 APAP 肝细胞损伤中的变化

给药后 12 h,5 mmol/L APAP 处理组与溶剂对照组相比,培养上清中 miR-122 含量就已经升高 2 倍以上($P < 0.01$);20 mmol/L APAP 处理组 miR-122 含量与溶剂对照组相比升高 5 倍多($P < 0.001$)。给药后 24 h 和 48 h,5、20 mmol/L APAP 处理均可引起 miR-122 含量升高,差异有统计学意义(图 2)。对比图 1,发现在相同剂量和相同时间下,相比 LDH,miR-122 含量均变化更大,表现出更高的灵敏度。与此同时,将 3 个时间点下 3 个剂量组的数据以不同检测指标分为 LDH 和 miR-122 两组,进行相关性分析,结果显示 miR-122 和 LDH 存在良好相关性($r=0.917$),初步表明 miR-122 可以作为肝脏细胞毒性评价的生物标志物(图 3)。

2.3 miR-122 与药物肝细胞损伤的关联性分析

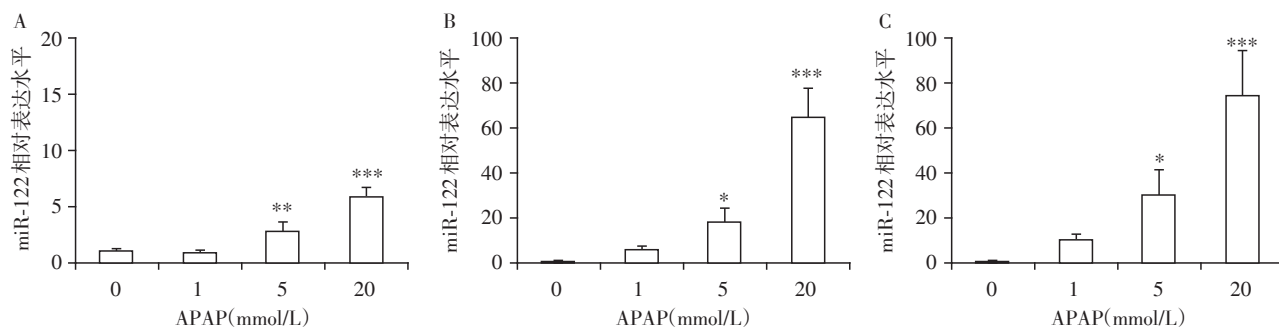
肝保护药 GA 20 mmol/L 给药作为阴性对照组,其中,LDH 和 miR-122 两个指标间的相关性也较低($r=0.533$,图 4A、B)。图 4C~N 分别为 20 mmol/L APAP、20 mmol/L 奎尼丁、20 mmol/L 他克林、2 mg/mL 五倍子、2 mg/mL 雷公藤和 20 mmol/L 四氯化碳,各组研究结果均表明,与 LDH 相比,miR-122 呈现出更好的敏感性,且 LDH 和 miR-122 两个指标间的相关性均较高,分别为 0.901、0.963、0.931、0.897、0.916



A: 不同剂量 APAP 给药后 12 h 的 LDH 含量; B: 不同剂量 APAP 给药后 24 h 的 LDH 含量; C: 不同剂量 APAP 给药后 48 h 的 LDH 含量。与 0 mmol/L 的溶剂对照组相比, * $P < 0.01$, ** $P < 0.001$, $n=3$ 。

图1 不同剂量 APAP 肝损伤模型在处理 12、24、48 h 的 LDH 含量

Figure 1 Concentrations of LDH in APAP liver injury cellular models treated with different doses of APAP after 12 h, 24 h and 48 h treatment



A: 不同剂量 APAP 给药后 12 h 的 miR-122 含量; B: 不同剂量 APAP 给药后 24 h 的 miR-122 含量; C: 不同剂量 APAP 给药后 48 h 的 miR-122 含量。与 0 mmol/L 溶剂对照组相比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, $n=3$ 。

图2 不同剂量 APAP 肝损伤模型在处理 12、24、48 h 的 miR-122 含量

Figure 2 Concentrations of miR-122 in APAP liver injury cellular models treated with different doses of APAP after 12 h, 24 h and 48 h treatment

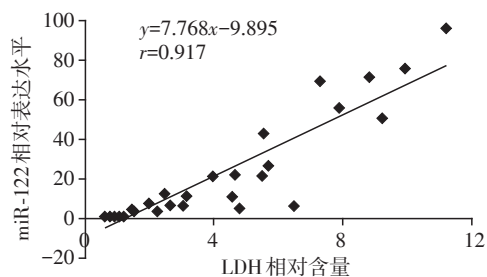


图3 LDH 含量和 miR-122 含量的相关性分析

Figure 3 Correlation analysis between the concentrations of miR-122 and LDH

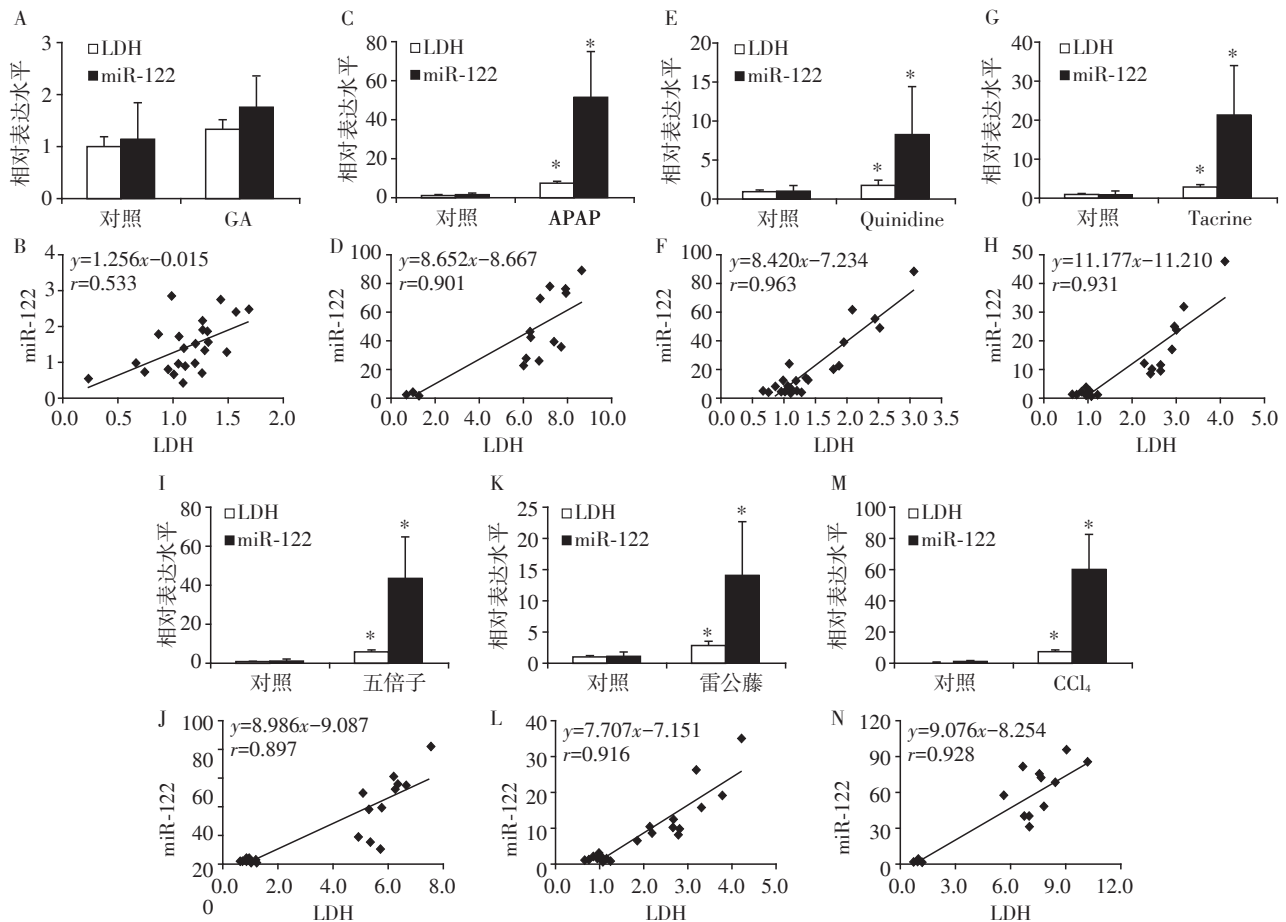
和 0.927。进一步将以上多种药物诱发肝细胞损伤模型中的 LDH 和 miR-122 变化的数据进行相关性分析,结果显示 miR-122 和 LDH 存在良好的相关性 ($r=0.904$, 图 5)。

3 讨论

药物的肝细胞毒性是药物研发失败或上市后引起 DILI 而导致撤市的主要原因之一。如果能够利用敏感而特异的生物标志物在早期对新药的肝

脏毒性进行评价,将有望缩短药物研发周期,节约动物用量,降低药物研发成本,还将为上市药物的合理使用与药物警戒提供参考依据和研究思路。

原代肝细胞是进行新药早期毒性评价的经典细胞载体^[17-19]。人源肝脏组织来源有限且成本很高,用其制备获得的原代肝细胞虽然是最佳研究对象,但在实际应用中,难以满足高通量化合物筛选的基本需求^[18];虽然人多能性干细胞诱导分化肝细胞的技术不断发展进步,但所获得的肝样细胞未能完全模拟原代肝细胞的正常功能,比如细胞色素 P450 酶亚型的表达水平和比例方面的重要问题尚待进一步解决^[19]。因此在临床前的新药早期毒性评价中,鼠源原代肝细胞备受青睐,虽然与人源细胞存在种属上的差异,但其相对容易获得,而且几乎包含了肝脏所有的药物代谢酶及相应辅助因子,代谢功能与体内肝细胞相似,具有高活性与高代谢能力,能较好反映药物在体内代谢的情况^[17-18]。本研究采用小鼠原代肝细胞作为载体,稳定建立了多种药物的肝细胞损伤模型,用于分析 miR-122 作为标志



A、B:GA 溶剂对照组和试验组细胞培养上清中 LDH 和 miR-122 含量及其相关性分析;C、D:APAP 溶剂对照组和试验组细胞培养上清中 LDH 和 miR-122 含量及其相关性分析;E、F:Quinidine 溶剂对照组和试验组细胞培养上清中 LDH 和 miR-122 含量及其相关性分析;G、H:Tacrine 溶剂对照组和试验组细胞培养上清中 LDH 和 miR-122 含量及其相关性分析;I、J:五倍子溶剂对照组和试验组细胞培养上清中 LDH 和 miR-122 含量及其相关性分析;K、L:雷公藤溶剂对照组和试验组细胞培养上清中 LDH 和 miR-122 含量及其相关性分析;M、N:CCL₄溶剂对照组和试验组细胞培养上清中 LDH 和 miR-122 含量及其相关性分析。LDH 和 miR-122 含量分别与相应的溶剂对照组相比,**P* < 0.001,*n* = 12。

图4 给药后 24 h 时各组 LDH 和 miR-122 含量及其相关性分析

Figure 4 Concentrations of miR-122 and LDH and their correlation analysis

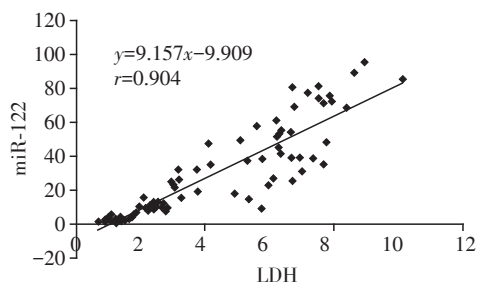


图5 各组药物的 LDH 含量和 miR-122 含量的总相关性分析
Figure 5 Total correlation analysis between miR-122 and LDH

物在新药肝毒性早期评价中的应用价值。

本研究通过制备培养小鼠原代肝细胞,参考传统肝毒性标志物 LDH,以肝毒性工具药 APAP 建立小鼠原代肝细胞损伤模型,测定细胞培养上清中的 miR-122 含量。通过分析 miR-122 和 LDH 的变化程

度及关联性,发现两个指标的相关性良好($r > 0.9$),此外,与 LDH 比较,miR-122 在肝损伤模型中的升高程度更大,出现统计学差异的时间点更早,体现出更高的灵敏性。在此基础上,分别给予小鼠原代肝细胞不同的肝毒性药物和毒物,包括奎尼丁、他克林、五倍子、雷公藤、四氯化碳,以建立多种药物损伤模型。测定并分析每种损伤模型下 LDH 和 miR-122 在培养上清中的含量,发现在更广泛的潜在毒性物质诱导的小鼠原代肝脏细胞损伤模型中,LDH 和 miR-122 仍表现出良好相关性。与培养上清中的 LDH 相比,miR-122 含量在不同药物所致肝细胞损伤模型中的变化幅度都更大,进一步证实了 miR-122 对于肝细胞毒性的评价具有更高灵敏性。

本研究结果提示,肝脏特异性 miR-122 较 LDH 具有更高的灵敏性,作为新药肝毒性的早期评价潜

在生物标志物,具有一定应用前景。然而,新药安全性评价对试验通量往往也有较高要求,将miR-122标志物广泛应用于新药早期肝脏毒性筛选,基于细胞模型的高通量筛选体系还有待进一步探索和建立。

[参考文献]

- [1] Sarges P, Steinberg JM, Lewis JH. Drug-induced liver injury: highlights from a review of the 2015 literature [J]. Drug Safety, 2016, 39(9): 801-821
- [2] Lee WM, Senior JR. Recognizing drug-induced liver injury: current problems, possible solutions [J]. Toxicol Pathol, 2005, 33(1): 155-164
- [3] Su D, Li L. Trends in the use of complementary and alternative medicine in the United States: 2002-2007 [J]. J Health Care Poor Underserved, 2011, 22(1): 296-310
- [4] Nin Chau T, Cheung WI, Ngan T, et al. Causality assessment of herb-induced liver injury using multidisciplinary approach and Roussel Uclaf Causality Assessment Method (RUCAM) [J]. Clin Toxicol (Phila), 2011, 49(1): 34-39
- [5] Kotoh K, Kato M, Kohjima M, et al. Lactate dehydrogenase production in hepatocytes is increased at an early stage of acute liver failure [J]. Exp Ther Med, 2011, 2(2): 195-199
- [6] Kia R, Kelly L, Sison-Young RL, et al. MicroRNA-122: a novel hepatocyte-enriched *in vitro* marker of drug-induced cellular toxicity [J]. Toxicol Sci, 2015, 144(1): 173-185
- [7] Wang XW, Heegaard NH, Ørum H. MicroRNAs in liver disease [J]. Gastroenterology, 2012, 142(7): 1431-1443
- [8] Szabo G, Bala S. MicroRNAs in liver disease [J]. Nat Rev Gastroenterol Hepatol, 2013, 10(9): 542-552
- [9] Zen K, Zhang CY. Circulating MicroRNAs: a novel class of biomarkers to diagnose and monitor human cancers [J]. Med Res Rev, 2012, 32(2): 326-348
- [10] Su YW, Chen X, Jiang ZZ, et al. A panel of serum microRNAs as specific biomarkers for diagnosis of compound- and herb-induced liver injury in rats [J]. PLoS One, 2012, 7(5): e37395
- [11] Thulin P, Hornby RJ, Auli M, et al. A longitudinal assessment of miR-122 and GLDH as biomarkers of drug-induced liver injury in the rat [J]. Biomarkers, 2017, 22(5): 461-469
- [12] Nam HS, Hwang KS, Jeong YM, et al. Expression of miR-122 induced by liver toxicants in zebrafish [J]. Bio Med Research International, 2016, 2016: 1473578
- [13] Hayes CN, Chayama K. MicroRNAs as biomarkers for liver disease and hepatocellular carcinoma [J]. Int J Mol Sci, 2016, 17(3): 280
- [14] Lewis JH. The art and science of diagnosing and managing drug-induced liver injury in 2015 and beyond [J]. Clin Gastroenterol Hepatol, 2015, 13(12): 2173-89.e8
- [15] Vliegenthart A, Shaffer JM, Clarke JI, et al. Comprehensive microRNA profiling in acetaminophen toxicity identifies novel circulating biomarkers for human liver and kidney injury [J]. Sci Rep, 2015, 5: 1550
- [16] 陈曦, 杨承健, 韩志君, 等. microRNA-499在急性心肌梗死患者外周血中含量变化的研究 [J]. 南京医科大学学报(自然科学版), 2015, 35(1): 46-50
- [17] Bolleyn J, Fraczek J, Vinken M, et al. Effect of trichostatin A on miRNA expression in cultures of primary rat hepatocytes [J]. Toxicol In Vitro, 2011, 25(6): 1173-1182
- [18] Lecluyse EL. Human hepatocyte culture systems for the *in vitro* evaluation of cytochrome P450 expression and regulation [J]. Eur J Pharm Sci, 2001, 13(4): 343-368
- [19] Ware BR, Berger DR, Khetani SR. Prediction of drug-induced liver injury in micropatterned co-cultures containing iPSC-derived human hepatocytes [J]. Toxicol Sci, 2015, 145(2): 252-262

[收稿日期] 2017-02-21