网络出版时间:2023 - 07 - 13 16:37:48 网络出版地址:https://kns.cnki.net/kcms2/detail/34.1065.R.20230713.1440.042.html

甘草酸介导 miRNAs 对大鼠酒精性肝损伤的保护作用

从美丽,马依热·努尔买卖提,周 蓓,陈瑞花,王 忠,朱虎虎,赵效国

摘要 目的 探讨 miRNAs 在甘草酸治疗大鼠酒精性肝损伤过程中的作用及其机制。**方法** 将 45 只雄性 SD 大鼠随机分成甘草酸组(灌胃 56% 白酒和甘草酸)、模型组(灌胃 56% 白酒)和对照组(灌胃蒸馏水),给药 8 周后采集血液和肝组织。检测血清天冬氨酸氨基转移酶(AST)及丙氨酸氨基转移酶(ALT)水平;提取肝组织 RNA,大鼠 miRNA 芯片检测,对 miRNA 表达量进行分析,对差异 miRNA 进行靶基因预测,并采用 Gene Ontology(GO)和 KEGG Pathway 富集分析了解差异 miRNA 的功能,使用 Cytoscape 构建差异 miRNA-mRNA-Pathway 调控网络进一步筛选调控关键 miRNA 与通路,qRT-PCR 对挑选的 miRNA 进行表达量验证分析。**结果** 与模型组相比,甘草酸组能改善肝组织病变,降低肝血清 AST 和 ALT 水平($P < 0.05$)。通过比较分析甘草酸组和模型组芯片数据,共筛选出差异表达 miRNA 13 个($P < 0.05$, *fold change* ≥ 1.5),其中上调 10 个,下调 3 个。差异 miRNA 靶基因 GO 分类注释显示,差异 miRNA 主要与细胞黏附、抗氧化活性、代谢过程、生物过程调控、细胞杀伤、免疫系统等功能相关。差异 miRNA 靶基因 KEGG Pathway 通路分析显示,MAPK 信号通路、mTOR 信号通路、Ras 信号通路、Hippo 信号通路、PI3K-Akt 信号通路、wnt 信号通路、细胞凋亡等信号通路可能在甘草酸改善酒精性肝损伤病变过程中发挥着重要的调控作用。**结论** 该研究建立了甘草酸治疗大鼠酒精性肝损伤的 miRNA 表达谱,提示 miR-615、miR-107-3p 和 miR-292-5p 可能在甘草酸治疗酒精性肝损伤过程中起着重要的作用。

关键词 酒精性肝损伤;甘草酸;miRNA;信号通路;芯片
中图分类号 R 332
文献标志码 A **文章编号** 1000 - 1492(2023)08 - 1374 - 06
doi:10.19405/j.cnki.issn1000 - 1492.2023.08.021

酒精性肝损伤(alcoholic liver disease,ALD)又称酒精性肝病,已成为一个全球性的健康问题[1]。酗酒是引起酒精性肝损伤的主要原因,长期大量饮酒会引起脂肪变性、脂肪性肝炎、肝硬化及终末期肝细胞癌[2]。甘草酸(glycyrrhizic acid,GL)是甘草的主要活性成分,具有保肝、抗氧化、抗炎、抗病毒、免疫调节和抗肿瘤作用,能增强肝脏的解毒功能,减轻肝脏损伤等药理作用,在预防和治疗酒精性肝病中已被应用[3]。然而,甘草酸治疗酒精性肝损伤的分子机制及作用靶点仍有待阐明,该研究利用 miRNA 芯片技术检测甘草酸在治疗大鼠酒精性肝损伤过程中 miRNA 表达变化,探讨其可能的作用机制和潜在的作用靶点。

1 材料与方法

1.1 动物和试剂 健康 SPF 级雄性 SD 大鼠 45 只,体质量 180 ~ 220 g,新疆医科大学实验动物中心提供,合格证号:SCXK(新)2018-0002。在新疆医科大学屏障环境实验室中完成,合格证号:SYXK(新)2018-0003。56°牛栏山二锅头购于北京顺鑫农业股份有限公司(批号:20160430);甘草酸购于上海麦克林生化科技有限公司。miRNeasy Mini Kit(货号:271004)购于德国 QIAGEN 公司。miRcute Plus miRNA First-Strand cDNA Kit(货号:KR211)购于天根生化科技(北京)有限公司;ChamQ Universal SYBR qPCR Master Mix(货号:Q712-02)购于南京诺唯赞生物技术股份有限公司。

1.2 模型制备 将 45 只 SD 大鼠随机分成甘草酸组、模型组和对照组,模型组每只大鼠按 10 ml/(kg·d)的剂量白酒灌胃;甘草酸组在灌胃白酒的同时,每只按 11.75 mg/(kg·d)的剂量,给予甘草酸灌胃;对照组每天给予同等剂量的蒸馏水灌胃。持续灌胃 8 周后,所有大鼠禁食 12 h,剖取肝脏,放入液氮中保存。

1.3 血清天冬氨酸氨基转移酶(aspartate aminotransferase,AST)及丙氨酸氨基转移酶(alanine aminotransferase,ALT)测定 使用兽用全自动生化分析仪(型号:BS-240VET,深圳迈瑞生物医疗电子股份有限公司),测定血清 AST 和 ALT 水平。

1.4 肝脏 miRNA 的提取 取 30 mg 肝脏组织使用 miRNeasy Mini Kit 提取 miRNA,抽提所得 miRNA 使用 NanoDrop ND-2000 分光光度计进行 miRNA 定量,并使用 Agilent Bioanalyzer 2100 进行 miRNA 质

2023 - 05 - 12 接收
基金项目:新疆维吾尔自治区自然科学基金(编号:2021D01C247)
作者单位:新疆医科大学动物实验中心,乌鲁木齐 830011
作者简介:从美丽,女,硕士,实验师,责任作者,E-mail: congmeili@126.com

量检测。miRNA 质控标准为 RIN ＞7 且 28S/18S ＞0.7。

1.5 芯片实验 采用 Agilent Rat miRNA（8×15 K）V21.0 芯片（design ID：070154）（美国安捷伦公司）检测甘草酸组和模型组大鼠肝脏中 miRNA 表达。对样本中的 miRNA 分子进行荧光标记，在滚动杂交炉中进行芯片杂交，杂交完成后在洗缸中洗片。

1.6 GO 注释和 KEGG 通路分析 利用基因本体（gene ontology，GO）数据库（https://www.geneontology.org）对差异 miRNA 靶基因进行 GO 分类注释，包括生物学过程、细胞组分、分子功能；利用 KEGG Pathway（Kyoto Encyclopedia of genes and genomes）数据库对差异 miRNA 靶基因进行信号通路分析。GO 注释及 KEGG 通路分析均以 $P<0.05$ 作为显著性富集标准。

1.7 差异 miRNA-mRNA-Pathway 调控网络构建 使用 miRWalk 预测软件对差异 miRNA 进行靶基因预测，结合能大于等于 28 为筛选条件，之后将靶基因导入 String 数据库计算蛋白质之间的互作关系，置信度≥0.4，degree 大于 1 为筛选条件；同时联合 KEGG Pathway 富集结果及 String 计算结果导入 Cytoscape 软件中进行网络可视化。

1.8 Real-time PCR 实验 以 U6 为内参对挑选的差异 miRNA 进行实时荧光定量 PCR 实验，根据 miRNA 序列设计特异性引物，引物由生工生物工程（上海）股份有限公司合成；使用 miRcute Plus miRNA First-Strand cDNA Kit 试剂盒将 RNA 反转录成 cDNA；50 μl 反应体系中加入上下游引物（10 μmol/L）各 2 μl，ChamQ Universal SYBR qPCR Master Mix 25 μl，cDNA 5 μl，补水至 50 μl。反应条件为：95 ℃、5 min；95 ℃、15 s，60 ℃、1 min，共 40 个循环。采用 ΔΔCt 法计算基因的相对表达量。

1.9 芯片数据分析 芯片结果采用 Agilent Microarray Scanner 进行扫描，用 Feature Extraction software 11.5 读取原始数据，质控合格的数据采用 R 包 Quantile 算法进行归一化处理。采用 *t* 检验分析数据，通过 *P* 值和 *fold change* 值对结果进行差异筛选和统计，本研究将 $P<0.05$、*fold change* ≥1.5 设定为显著差异表达的阈值。

1.10 统计学处理 采用 SPSS 21.0 软件进行分析，计量资料实验数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示。两组间比较采用 *t* 检验，以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 甘草酸对大鼠酒精性肝损伤的影响 大鼠连续灌胃乙醇后会导致肝脏损伤、脂肪变性，主要表现为血清 AST 和 ALT 水平升高，差异有统计学意义（$t=11.366$，$P<0.05$；$t=7.784$，$P<0.05$）；甘草酸可改善乙醇引起的血清 AST 和 ALT 升高，差异有统计学意义（$t=7.526$，$P<0.05$；$t=6.448$，$P<0.05$）。见图 1。HE 染色后，正常组肝脏结构清晰，边界清楚；模型组有明显的肝细胞脂肪变性，部分肝细胞肿胀、变性坏死，有少量炎性细胞浸润，细胞核固缩；甘草酸组病理改变明显减少，部分损伤细胞得到修复，肝脏组织结构与正常组比较无明显差异。见图 2。提示本研究造模成功，且甘草酸保护效果明显，可用于 miRNA 基因芯片分析。

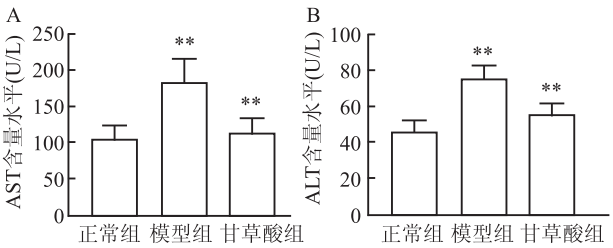

图 1 甘草酸对大鼠血清 AST 和 ALT 水平的影响

A：血清 AST 水平；B：血清 ALT 水平；与正常组比较：**$P<0.01$

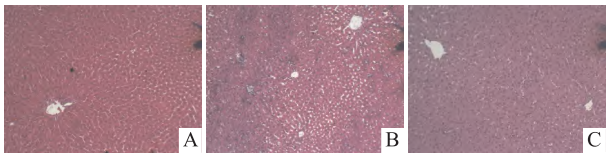

图 2 各组大鼠肝脏组织形态 HE 染色 ×100

A：正常组；B：模型组；C：甘草酸组

2.2 差异表达 miRNA 分析 以 $P<0.05$，*fold change* ≥1.5 为差异筛选标准，对甘草酸组和模型组间差异表达 miRNA 进行筛选，芯片分析结果显示，甘草酸组显著差异表达 miRNA 有 13 个，其中表达上调的有 10 个，下调的有 3 个，上调的 miR-295-5p、miR-292-5p、miR-190b-5p 和 miR-291b，下调的 miR-107-3p、miR-181b-1-3p 差异较为显著。见表 1。图3展示了甘草酸组与模型组之间差异表达miRNA

表 1 差异表达 miRNA 信息表

miRNA	*P* 值	差异倍数	表达	miRNA	*P* 值	差异倍数	表达
miR-295-5p	6.19E-04	3.22	上调	miR-291a-5p	1.24E-02	1.56	上调
miR-292-5p	9.21E-04	2.27	上调	miR-802-5p	1.94E-02	1.51	上调
miR-190b-5p	4.79E-02	1.84	上调	miR-129-1-3p	1.97E-03	1.51	上调
miR-291b	6.78E-06	1.72	上调	miR-107-3p	2.52E-03	1.71	下调
let-7a-2-3p	2.96E-03	1.69	上调	miR-181b-1-3p	1.49E-02	1.67	下调
miR-122-5p	5.93E-03	1.69	上调	miR-615	5.05E-03	1.59	下调
miR-293-5p	1.03E-03	1.61	上调				

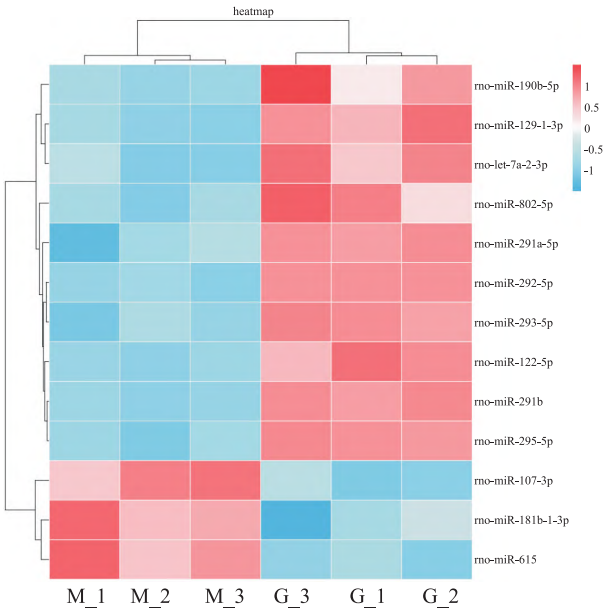

图 3　甘草酸组与模型组差异 miRNA 的聚类图

M_1、M_2、M_3：模型组；G_3、G_1、G_2：甘草酸组

聚类图。

2.3　差异 miRNA GO 富集分析　使用 miRWalk 对差异 miRNA 进行靶基因预测，结合能≥28 的靶基因共有 913 个。为更好地了解差异 miRNA 可能参与的生物学功能，对这些靶基因进行 GO 富集分析。结果显示差异表达 miRNA 主要与细胞黏附、抗氧化活性、代谢过程、生物过程调控、细胞杀伤、免疫系统等功能相关。图 4 展示了差异 miRNA 靶基因参与的 GO 功能。

2.4　差异 miRNA Pathway 富集分析　为进一步探讨甘草酸在治疗酒精性肝损伤病变过程中所涉及的信号通路，对差异 miRNA 靶基因进行了 KEGG Pathway 富集分析。结果显示，以 $P<0.05$ 为显著标准，共有 108 个信号通路被显著富集，主要涉及 MAPK 信号通路、mTOR 信号通路、Ras 信号通路、Hippo 信号通路、PI3K-Akt 信号通路、wnt 信号通路、FoxO 信号通路、细胞凋亡、癌症等信号通路。图 5 列出了差异 miRNA 靶基因参与的部分信号通路。

2.5　差异 miRNA-mRNA-Pathway 网络构建　通过 String 数据库在线分析差异 miRNA 靶基因编码蛋白质间的相互作用关系，同时联合 KEGG Pathway 富集分析结果进行关联分析，结果显示：有 12 个 miRNA 与肝损伤相关通路有关联，见图 6。从图中可以看出：miR-615、miR-107-3p、miR-292-5p 位于网络中心枢纽，为甘草酸治疗酒精性肝损伤的关键 miRNA；同时，MAPK 信号通路、mTOR 信号通路、PI3K-Akt 信号通路、Ras 信号通路、Hippo 信号通路、凋亡信号通路为关键信号通路，参与多个 miRNA 及

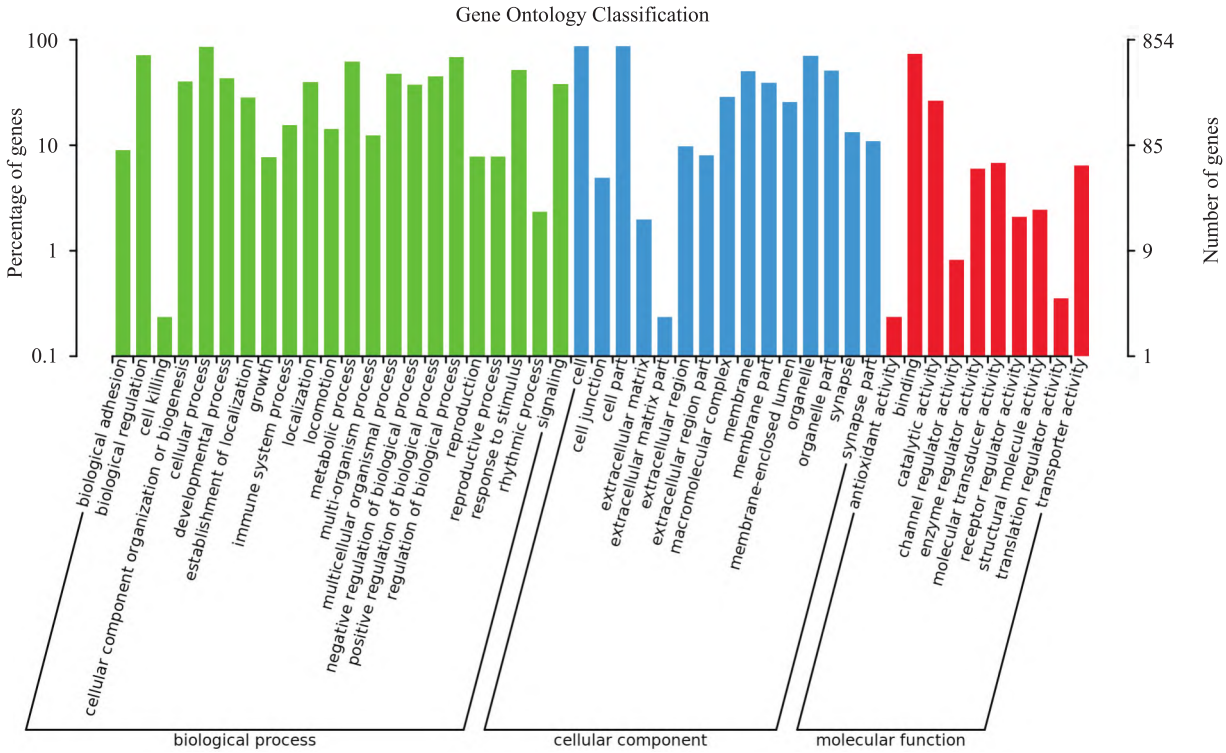

图 4　差异 miRNA 参与的 GO 条目

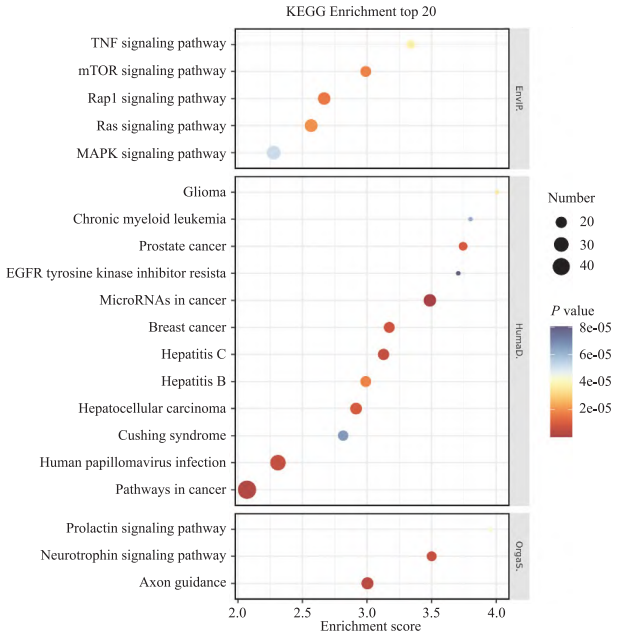

图 5　差异 miRNA 参与的部分信号通路

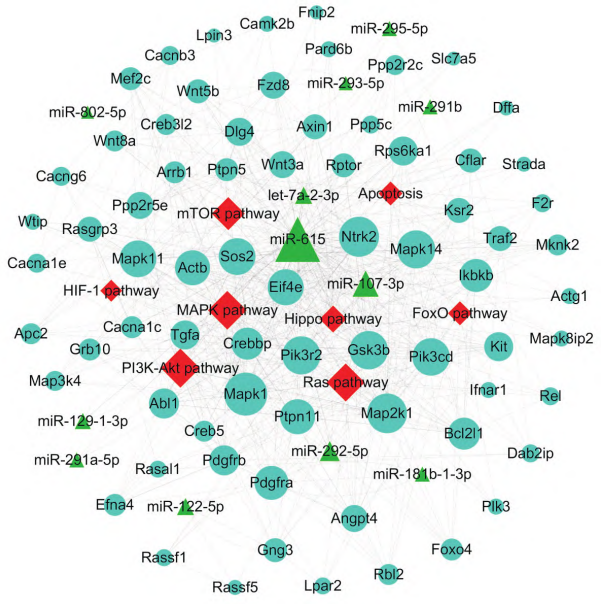

图 6　差异 miRNA-mRNA-Pathway 调控网络

相关靶基因的调控。

2.6　荧光定量 PCR 分析　选取 4 个 miRNA，其中上调 miRNA 2 个，为 miR-295-5p、miR-292-5p；下调 miRNA 2 个，分别为 miR-107-3p、miR-615，以 U6 为内参，对其进行荧光定量 PCR 验证分析。qPCR 结果显示以上 4 个 miRNA 在甘草酸组与模型组间表达变化模式与 miRNA 芯片结果一致（图 7），表明该研究利用 miRNA 芯片检测获得的差异 miRNA 结果是准确可信的。

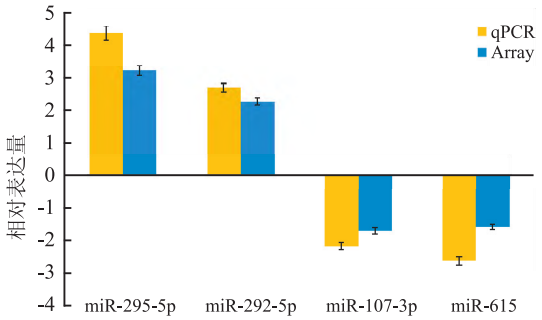

图 7　差异 miRNA 的 qRT-PCR 结果

3　讨论

ALD 仍然是全球发病和死亡的主要原因，更是我国严重的健康问题。甘草酸具有抗炎、抗氧化、免疫调节、抗病毒和抗肿瘤作用，同时具有心脏包含和神经保护作用，在治疗许多疾病方面具有巨大的应用潜力[4]；已被应用于肝病、皮肤炎症性疾病、淋巴样恶性肿瘤、新冠病毒等疾病治疗中[5-7]。尽管甘草酸已被作为预防和治疗 ALD 的替代方案，但具体的分子机制及作用靶点并不是很清楚。本研究通过检测甘草酸组和模型组肝脏 miRNAs 变化，探讨 miRNA 在甘草酸治疗酒精性肝损伤过程中发挥的作用及调控的通路，了解甘草酸作用的具体分子机制和靶点。

miRNA 是一类非编码单链小 RNA，可以通过促进靶基因降解或抑制翻译调控靶基因表达[8]。miRNA 几乎参与了人类所有的生理和病理过程，如细胞分化和增殖、代谢、炎症、信号转导、免疫、肿瘤发生等；miRNA 越来越被认为是各种疾病发病机制的关键分子，并且是疾病诊断或治疗的潜在生物标志物[9]；但 miRNA 在甘草酸治疗大鼠酒精性肝损伤过程的作用机制并不明确。为进一步明确甘草酸在治疗大鼠酒精性肝损伤过程中 miRNA 的潜在作用机制及作用靶点，通过甘草酸灌胃治疗酒精性肝损伤，并使用 miRNA 芯片对肝组织检测分析，发现甘草酸组较模型组存在 13 个差异 miRNA，说明 miRNA 在甘草酸治疗大鼠酒精性肝损伤过程中有着重要作用，是甘草酸引起的多个 miRNA 异常表达或失活的复杂生物学过程。

差异表达 miRNA 中的 miR-107 已证实在 ALD 患者肝脏中 miR-107 表达增加，但在健康肝脏或病毒性肝炎受试者中却没有增加[10]；在甘草酸组中 miR-107 表达下降，提示甘草酸可使 miR-107 表达

恢复,进而保护肝脏损伤。乙醇和 LPS 可以使 let-7 表达下调进而激活肝星状细胞,而肝星状细胞在肝纤维化发展中起着重要作用,该研究表明甘草酸可以使 let-7 表达上调。miR-181-3p 通过调控通过 TLR4-NF-κB 途径的信号传导,增加脂多糖敏感性,进而调控酒精对小鼠的肝损伤[11]。miR-122 也已经被证实与酒精性肝损伤、肝纤维化的进展有着密切联系[12]。miR-291b 可以通过调控靶标 Tollip 抑制 NF-κB 信号通路,导致更多的肝脏炎症[13]。miR-615 已被证实在肝癌、恶性胶质瘤、淋巴瘤等多种肿瘤组织找那个异常表达,与肿瘤细胞的增殖、迁移、侵袭等存在密切关系[14]。这些 miRNA 在甘草酸治疗酒精性肝损伤过程发生变化,说明他们在甘草酸治疗酒精性肝损伤过程中发挥着重要作用。

GO 富集分析显示,差异 miRNA 主要与细胞黏附、抗氧化活性、代谢过程、生物过程调控、细胞杀伤、免疫系统等功能相关。乙醇可以增加活性氧的产生和脂质过氧化,同时增加肝细胞的氧化应激,并诱导细胞凋亡,在 ALD 发病和发展中起着重要作用[15];研究提示甘草酸和这些生物功能相关。甘草酸治疗酒精性肝损伤的过程涉及复杂的基因调控网络的改变,本研究使用了蛋白互作网络结合 KEGG 信号通路联合分析甘草酸在治疗肝损伤过程中 miRNA 调控网络的变化,更加清晰展示 miRNA – 靶基因 – 信号通路之间的调控关系及程度。从差异 miRNA 中筛选出了 miR-615、miR-107-3p、miR-292-5p 关键节点 miRNA,以及 MAPK 信号通路、mTOR 信号通路、PI3K-Akt 信号通路、Ras 关键信号通路,提示甘草酸可能是通过这几个关键 miRNA 和信号通路调控下游目标分子进而减轻肝脏损伤。

该研究探讨了甘草酸在治疗大鼠酒精性肝损伤过程中 miRNA 表达谱的变化,以及关键 miRNA 与信号通路的筛选,为 ALD 的靶向治疗提供重要的理论依据。研究提示 miR-615、miR-107-3p、miR-292-5p 可通过 MAPK 信号通路、mTOR 信号通路、PI3K-Akt 信号通路、Ras 等信号通路调控下游靶标进而减轻酒精性肝损伤,但具体的调控机制仍需进一步实验验证。

参考文献

[1] 孙 玉,王惠惠,王晓宇,等. 基于高通量测序技术分析肠道菌群在酒精性肝损伤小鼠中的变化[J]. 安徽医科大学学报,2022,57(6):860 – 6.

[2] Sharma P, Arora A. Clinical presentation of alcoholic liver disease and non-alcoholic fatty liver disease: spectrum and diagnosis[J]. Transl Gastroenterol Hepatol,2020,5:19.

[3] Li X, Sun R, Liu R. Natural products in licorice for the therapy of liver diseases: progress and future opportunities[J]. Pharmacol Res, 2019, 144: 210 – 26.

[4] Lv X, Zhu Y, Deng Y, et al. Glycyrrhizin improved autophagy flux *via* HMGB1-dependent Akt/mTOR signaling pathway to prevent doxorubicin-induced cardiotoxicity[J]. Toxicology, 2020, 441:152508.

[5] Kowalska A,Kalinowska-Lis U. 18β-Glycyrrhetinic acid: its core biological properties and dermatological applications[J]. Int J Cosmet Sci, 2019, 41: 325 – 31.

[6] Zhao Z, Xiao Y, Xu L, et al. Glycyrrhizic acid nanoparticles as antiviral and Anti-inflammatory agents for COVID-19 treatment [J]. ACS Appl Mater Interfaces, 2021, 13(18): 20995 – 1006.

[7] 陈世林, 洪汝涛, 刁 磊, 等. 水飞蓟素对大鼠急性酒精性肝损伤的保护作用[J]. 安徽医科大学学报, 2010,45(2):209 – 12.

[8] Ambros V. The functions of animal microRNAs[J]. Nature, 2004,431: 350 – 5.

[9] Szabo G, Bala S. MicroRNAs in liver disease[J]. Nat Rev Gastroenterol Hepatol,2013, 10: 542 – 52.

[10] McDaniel K, Huang L, Sato K, et al. The let-7/Lin28 axis regulates activation of hepatic stellate cells in alcoholic liver injury [J]. J Biol Chem, 2017, 292: 11336 – 47.

[11] Saikia P, Bellos D, McMullen M R, et al. MicroRNA 181b-3p and its target importin α5 regulate toll-like receptor 4 signaling in Kupffer cells and liver injury in mice in response to ethanol[J]. Hepatology, 2017, 66: 602 – 15.

[12] McCrae J C, Sharkey N, Webb D J, et al. Ethanol consumption produces a small increase in circulating miR-122 in healthy individuals[J]. Clin Toxicol (Phila), 206, 54: 53 – 5.

[13] Saikia P, Roychowdhury S, Bellos D, et al. Hyaluronic acid 35 normalizes TLR4 signaling in Kupffer cells from ethanol-fed rats *via* regulation of microRNA291b and its target Tollip[J]. Sci Rep, 2017, 7:15671.

[14] Gao W, Gu Y, Li Z, et al. miR-615-5p is epigenetically inactivated and functions as a tumor suppressor in pancreatic ductal adenocarcinoma[J]. Oncogene,2015,34:1629 – 40.

[15] Redza-Dutordoir M, Averill-Bates D A. Activation of apoptosis signalling pathways by reactive oxygen species[J]. Biochim Biophys Acta,2016,1863(12): 2977 – 92.

Glycyrrhizic acid-mediated protective effect of miRNAs on alcoholic liver injury in rats

Cong Meili, Mayire · Nuermaimaiti, Zhou Bei, Chen Ruihua, Wang Zhong, Zhu Huhu, Zhao Xiaoguo
(*Animal Laboratory Center of Xinjiang Medical University*, *Urumqi* 830011)

Abstract ***Objective*** To investigate the mechanism of miRNAs in glycyrrhizic acid treatment of alcohol-induced liver injury in rats. ***Methods*** 45 male SD rats were randomly divided into glycyrrhizin group, model group and control group. The rats in glycyrrhizin group were given 56% liquor and glycyrrhizin, the rats in model group were given 56% liquor, and the rats in control group were given distilled water for 8 weeks. The blood was collected and the serum was separated by centrifugation to detect the levels of aspartate aminotransferase (AST) and alanine aminotransferase (ALT). RNA were extracted from liver tissues, miRNAs were detected by rat miRNA microarray, and their expression levels were analyzed. The miRNA target genes of differential miRNA were predicted. Gene Ontology (GO) and KEGG Pathway enrichment analysis were used to understand the function of differential miRNA, and the differential miRNA-mRNA-Pathway regulatory network was constructed using Cytoscape to further screen the regulatory key miRNA and key pathways. qRT-PCR was used to verify the expression of selected miRNA. ***Results*** Compared with the model group, the glycyrrhizin group could significantly improve the liver tissue lesions, and reduce the liver serum AST and ALT levels ($P<0.05$). Compared the microarray data of glycyrrhizin group and model group, a total of 13 differentially expressed miRNA were screened ($P<0.05$, *fold change* $\geqslant 1.5$), of which 10 were up-regulated and 3 were down-regulated. The GO classification annotation of differential miRNA target genes showed that differential miRNA were related to cell adhesion, antioxidant activity, metabolic process, biological process regulation, cell killing, immune system and other functions. The KEGG Pathway analysis of differential miRNA target genes showed that MAPK signaling pathway, mTOR signaling pathway, Ras signaling pathway, Hippo signaling pathway, PI3K-Akt signaling pathway, wnt signaling pathway, apoptosis and other signaling pathways might play an important regulatory role in the improvement of alcoholic liver injury by glycyrrhic acid. ***Conclusion*** This study established the miRNA expression profile of glycyrrhizin in the treatment of alcoholic liver injury in rats, suggested that miR-615, miR-107-3p and miR-292-5p might play an important role in the treatment of alcoholic liver injury by glycyrrhizin.

Key words alcoholic liver injury; glycyrrhizic acid; miRNA; signaling pathway; microarray