

· 基础研究 ·

龟甲中具有潜在药理活性的 miRNA 初步筛选[△]陈铭阳¹, 胡小松¹, 许贞¹, 任广喜¹, 芦海生², 刘春生^{1*}

(1. 北京中医药大学 中药学院, 北京 102488; 2. 中国中医科学院 望京医院, 北京 100102)

[摘要] 目的: 对龟甲中存在的 miRNA 进行提取并测序, 并对具有潜在药理活性者进行初步筛选。方法: 对生龟甲进行 miRNA 转录组测序, 选出 count 值超过 10 000 的 miRNA, 并利用实时荧光定量 PCR 技术在龟甲、乌龟背甲、黄喉拟水龟背甲 RNA 中分别测定其拷贝数。结果: 转录组数据中共筛选得到 3 条 miRNA, 其中 1 条为已知的 xtr-miR-22; 2 条为未知, 分别命名为 NW-006642957-1-500 和 NW-006622633-1-195。荧光定量 PCR 结果显示 xtr-miR-22 在龟甲及乌龟背甲中拷贝数明显高于同属动物黄喉拟水龟, 且其靶基因预测结果显示其能够靶向调控 PML 基因的表。结论: 生龟甲在炮制加工后存在未降解的 miRNA, 其中 xtr-miR-22 具有治疗早幼粒细胞白血病的潜在药理活性。

[关键词] 龟甲; miRNA; 筛选研究

Study on Preliminary Screening of miRNAs with Potential Pharmacological Activity in *Plastrum Testudinis*CHEN Ming-yang¹, HU Xiao-song¹, XU Zhen¹, REN Guang-xi¹, LU Hai-sheng², LIU Chun-sheng^{1*}

(1. School of Chinese Materia Medica, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 102488, China

2. Wangjing Hospital of CACMS, Beijing 100102, China)

[Abstract] **Objective:** To extract and sequence the miRNA in *Plastrum Testudinis*, and screen preliminarily the potential pharmacological activity. **Methods:** Transcriptome analyses were carried out on *Plastrum Testudinis*, and the miRNAs which have counts of more than 10 000 were selected. The copy number of these miRNAs in *Plastrum Testudinis*, *Chinemys reevesii*, *Mauremys mutica* were measured respectively by qRT-PCR. **Results:** 3 miRNAs were selected from the transcriptome data: xtr-miR-22, NW-006642957-1-500 and NW-006622633-1-195. The results of qRT-PCR showed that the copy numbers of xtr-miR-22 in *Plastrum Testudinis*, *Chinemys reevesii* were significantly higher than that of the counterpart in *Mauremys mutica*. The target gene prediction confirmed that xtr-miR-22 target expression of PML Gene. **Conclusion:** The miRNAs do exist in *Plastrum Testudinis* after deep-processing, and xtr-miR-22 which was discovered in *Plastrum Testudinis* have potential pharmacological activity to treat promyelocytic leukemia.

[Keywords] *Plastrum Testudinis*; miRNA; screening studies

doi:10.13313/j.issn.1673-4890.20171104002

龟甲是一种常用中药, 具有滋阴潜阳、益肾强骨、养血补心、固经止崩的功效, 常用于阴虚潮热、骨蒸盗汗、头晕目眩、虚风内动、筋骨痿软、心虚健忘、崩漏经多等症^[1]。现代研究发现, 龟甲具有抗氧化活性^[2-3]、提高机体免疫力^[4]、促骨髓间充质干细胞增殖分化^[5-9]等多种药理作用。已有报道的活性成分有无机元素^[10-11]、甾体类^[12-14]、氨基酸与多肽类^[15-16]、多酚类^[17]等。但是, 目前龟甲的代表活性成分依然尚不清楚。

中医药的临床实践已经有几千年历史, 但许多已被证明有确切疗效的中药依靠现有的分子医学理论依然无法给出合理的解释, 提示了中药中存在着未知的药效机制。微小核糖核苷酸(micro ribonucleic acid, miRNA)是指一类长度为 20 ~ 22 nt、能够调控基因表达的非编码小分子 RNA^[18], 其广泛存在于动物、植物体内, 并通过与靶基因互补或不完全互补的方式在转录后水平调节基因表达。研究表明, miRNA 能作为一种信号分子在不同生命体间传播,

[△] [基金项目] 公益性行业科研专项(201507002-4-2)

* [通信作者] 刘春生, 教授, 博士生导师, 研究方向: 药用植物和分子生药学; E-mail: max_liucs@263.net

跨物种对基因表达起到调控作用^[19]。2011年,张辰宇课题组报道了一项重大发现,植物 miRNAs 可以通过饮食的方式进入人体血液和组织,它们可以通过调控人体内靶基因表达而影响人体生理功能^[20]。2014年,该课题组进一步发现中药金银花中的 miR2911 能在动物体内传递并被吸收,并可通过靶向调控 PB1、PB2 基因抑制 H1N1、H5N1、H7N9 病毒的复制来治疗流感^[21]。

尽管外源 miRNA 药效机制的相关研究在植物中已经取得一些成果,并有许多相关文献的支持^[22-24],但在药用动物中的研究还是空白,龟甲等常用动物药中是否也有稳定存在的 miRNAs 尚不清楚。笔者利用转录组测序、实时荧光定量 PCR 及计算机模拟技术对龟甲可能存在活性的功能 miRNA 进行初步筛选,为龟甲及其他动物药中新型活性成分的开发提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料

龟甲购自河北安国药材市场,经北京中医药大学刘春生教授鉴定为《中华人民共和国药典》所载龟甲正品。乌龟及黄喉拟水龟购自广州水产品市场。样品信息如表 1 所示。

表 1 龟甲及相关测试样品信息

样品编号	样品描述	基原物种
1	龟甲	乌龟 <i>Chinemys reevesii</i>
2	乌龟标本的背甲	乌龟 <i>Chinemys reevesii</i>
3	黄喉拟水龟标本的背甲	黄喉拟水龟 <i>Mauremys mutica</i>

1.2 总 RNA 提取

分别取适量龟甲、新鲜乌龟背甲、新鲜黄喉拟水龟背甲,使用无水乙醇洗净后捣碎,置于 -80 °C 冷冻过夜后,再在真空低温冷冻条件下冻干备用。

总 RNA 的提取选用 mirVana™ miRNA Isolation Kit (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) 试剂盒,分别提取上述 3 个样品的总 RNA,采用琼脂糖凝胶电泳分析 RNA 降解程度, Nanodrop 检测 RNA 纯度以及 Agilent2100 检测 RNA 完整性。

1.3 miRNA 文库构建和测序

采用 Illumina TruSeq Small RNA 试剂盒构建龟甲 miRNA 文库。以 total RNA 为起始样品, 1 μg 为起始量,分别在 miRNA 的 3'端和 5'端加上接头,然后

使用随机引物反转录成 cDNA。随后经过 PCR 扩增 (11 ~ 12 个循环),对 cDNA 文库进行富集,再采用 6% Novex TBE PAGE 进行文库纯化。使用 TBS380 (Picogreen) 对文库定量, cBot 上进行桥式 PCR 扩增后利用 HiSeq 测序平台,进行 SE50 测序(由上海美吉生物公司完成)。其流程如图 1 所示。

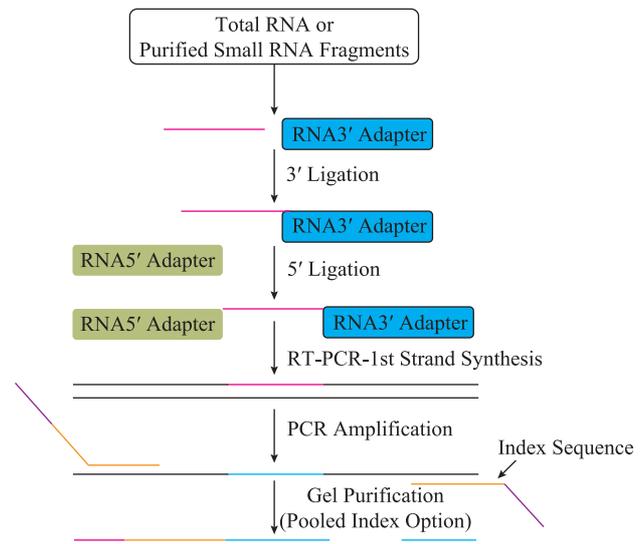


图 1 龟甲 miRNA 文库构建流程

1.4 测序信息分析

测序信息分析采用 Fastx-Toolkit (http://hannonlab.cshl.edu/fastx_toolkit/)与上海美吉生物自主开发软件,流程图如图 2 所示。

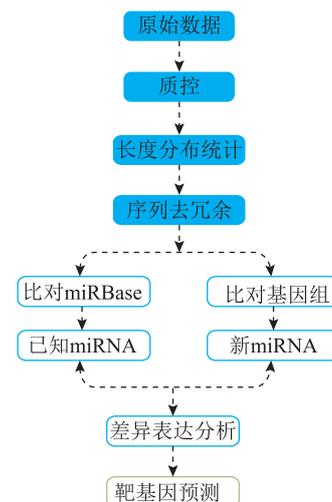


图 2 龟甲测序信息分析流程图

1.4.1 数据质控和长度分析统计 原始数据下机之后,先统计原始数据的数据量、碱基质量等信息。随后对原始数据进行去接头、去除含未知碱基序列、

去低质量碱基序列、长度筛选处理,获得 clean small RNA 序列,并对高质量的测序结果(clean reads)进行长度分布统计。原始的 FASTQ 数据里面含有带接头、低质量的序列(reads),为了保证后续生物信息分析的准确性,需要对 raw reads 进行质量控制,得到 clean reads,之后的生物信息分析会基于 clean reads 进行。具体质控步骤:1)去除 reads 中的 3' 接头序列,去除由于接头自连等原因导致没有插入片段的 reads;2)剪切 3' 端测序质量较低的碱基(质量值小于 20);3)去除含未知碱基 N 的 reads;4)去除长度过短的 reads(<18nt);5)去除长度过长的 reads(>32 nt)。

1.4.2 序列去冗余、miRNA 鉴定和表达量统计 首先,对 clean reads 进行相同序列合并(去冗余)处理,这样可以方便后续分析。随后,将去冗余之后的 clean reads 与 Rfam、miRBase 的基因组序列比对,鉴定出已知和新的 miRNA 分子,分别获得各自的表达量即 count 值。由于乌龟在 miRBase 中没有对应物种的 miRNA 序列信息,研究中选择近缘物种海龟的基因组作为参考,若有注释信息,就用参考基因组中的 miRNA 序列注释测得的 miRNA,将其余不能比对的 sRNA 比对到参考基因组上,截取其周围序列,使用软件进行二级结构预测,根据预测结果利用 Dicer 酶切位点信息、能量值等特征进行过滤,鉴定出新的 miRNA。对所有已知和新预测 miRNA 进行表达量统计,并利用 Transcripts Per Million(TPM)进行表达量的均一化处理。

1.4.3 靶基因预测和功能分析 对分析得到的已知和新预测的 miRNA 利用 miRanda 软件(www.microrna.org)进行靶基因预测。由于本研究中主要探究的是龟甲中具有药效活性的 miRNA,因此

补充使用 TargetScan 预测工具(www.targetscan.org)对表达量较高的 miRNA 进行人转录组中靶基因预测。

1.5 实时荧光定量 PCR

1.5.1 引物设计 实验选用转录组测序中 count 值超过 10 000 的 miRNA 进行绝对定量验证。选定测试基因后设计引物,如表 2 所示。

1.5.2 标准曲线的制备 将目的基因合成后克隆到质粒中,测定质粒浓度并计算其拷贝数,对照品以 $0.18 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 的初始质量浓度进行 10 倍梯度稀释,每个质量浓度设置 3 个重复进行实时荧光定量 PCR 反应,并绘制扩增曲线。以对照品拷贝数的对数值为横坐标(X),以测得的目的基因的 Ct 值为纵坐标(Y)构建标准曲线并计算得出线性方程。NW-006622633-1-195 的标准曲线为 $Y = -3.012X + 34.137$, $r = 0.993$; NW-006642957-1-500 的标准曲线为 $Y = -3.38X + 35.568$, $r = 0.998$; xtr-mir-22 的标准曲线为 $Y = -3.415X + 34.446$, $r = 0.993$, 线性关系均良好。

1.5.3 绝对定量拷贝数计算 3 个 miRNA 在各样品中进行实时荧光定量 PCR 实验后,根据其 Ct 值重合在标准曲线上的位置计算出目的基因在样品中的绝对拷贝数。

2 结果与分析

2.1 龟甲 miRNA 转录组测序结果分析

2.1.1 原始数据 原始数据统计结果显示,共产出 11 021 113 条原始序列,总碱基数为 562 076 763 bp,碱基错误率为 0.010 6%,Phred 数值大于 20、30 的碱基占总体碱基的百分比分别为 99.42% 和 98.15%,GC 含量为 55.33%。

表 2 龟甲测序实时荧光定量 PCR 实验引物

基因名	引物名称	引物序列
xtr-miR-22-5p	xtr-miR-22-5p-S1(逆转录引物)	GAGTAGACCAATGGGTTTCATTTCTGGGTCTTATTCTATTCCATTGGTCTACTCAAAGCT
	xtr-miR-22-5p-F(上游引物)	GTCGAGTTCTTCAGTGGCA
nw-006622633-1-195	1_195-S1(逆转录引物)	GAGTAGACCAATGGGTTTCATTTCTGGGTCTTATTCTATTCCATTGGTCTACTCACAGTT
	1_195-F(上游引物)	GATGAAGCTGCCAGTTGAAG
nw-006642957-1-500	1_500-S1(逆转录引物)	GAGTAGACCAATGGGTTTCATTTCTGGGTCTTATTCTATTCCATTGGTCTACTCAAGCCT
	1_500-F(上游引物)	GCTCACTGGGTGCTGT
探针序列	miRNA-P2	TCTATTCCATTGGTCTACT
通用下游引物	miRNA-R2	TGGGTTTCATTTCTGGGTCTT

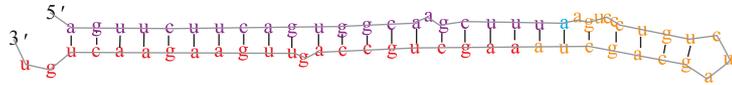
表5 新预测 miRNA 的部分 count 值统计结果

miRNA 名称	Counts
NW-006642957-1-500	19 129
NW-006622633-1-195	10 441
NW-006615969-1-77	4606
NW-006656176-1-604	4543
NW-006633404-1-349	4538
NW-006631183-1-317	3736
NW-006637514-1-452	3088
NW-006657619-1-615	3071

表6 新预测 miRNA 的部分 TPM 值统计结果

miRNA 名称	TPM
NW-006642957-1-500	266 509.70
NW-006622633-1-195	145 313.20
NW-006656176-1-604	63 140.88
NW-006615969-1-77	63 071.22
NW-006633404-1-349	63 071.22
NW-006631183-1-317	52 036.89
NW-006637514-1-452	42 980.94
NW-006657619-1-615	42 771.96

Provisional ID :NW-006622633-1-195
 Score total :5 327.4
 Score for star read(s) :3.9
 Score for read counts :5 317.1
 Score for mfe :1.8
 Score for randfold :1.6
 Score for cons.seed :3
 Total read count :10 441
 Mature read count :10 430
 Loop read count :0
 Star read count :11



Provisional ID :NW-006642957-1-500
 Score total :0.5
 Score for star read(s) :-1.3
 Score for read counts :0
 Score for mfe :1
 Score for randfold :-2.2
 Score for cons.seed :3
 Total read count :19 129
 Mature read count :19 129
 Loop read count :0
 Star read count :0

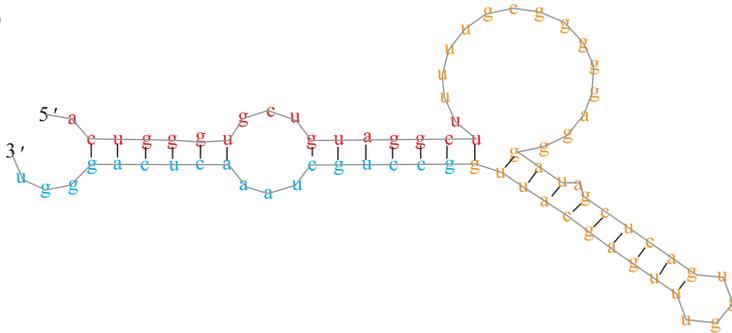


图6 NW-006622633-1-195 和 NW-006642957-1-500 的二级结构

2.1.5 靶基因预测 Count 值最高的已知 miRNA (xtr-miR-22) 的靶基因预测结果如表 7 所示, 在人转录组

中靶基因预测结果如表 8 所示, 得分最高的是 PML 基因, 为早幼粒细胞白血病相关基因。

表7 xtr-mir-22 靶基因预测结果

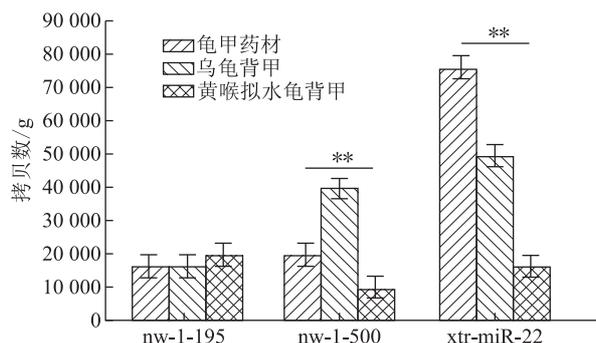
靶基因	靶位点得分	靶位点自由能	靶基因 ID	靶基因名称
ma15712	180	-28.95	gene14538	LOC102945809
ma15921	176	-28.67	gene14739	LOC102935775
ma14789	175	-27.30	gene13703	ARF5
ma12880	174	-25.13	gene11922	LOC102933737
ma15713	172	-23.36	gene14539	LOC102946038
ma14730	171	-26.77	gene13651	CDH20
ma3821	171	-26.66	gene3677	MPP1
ma3822	171	-26.66	gene3677	MPP1
ma3823	171	-26.66	gene3677	MPP1
ma14987	170	-25.71	gene13875	LOC102937824

表8 xtr-mir-22 靶基因预测结果

靶基因同源基因	代表的转录产物	基因名称
PML	ENST00000435786.2	Promyelocytic leukemia
ALX3	ENST00000369792.4	ALX homeobox 3
H3F3C	ENST00000340398.3	H3 histone, family 3C
KRTAP1-5	ENST00000361883.5	Keratin associated protein 1-5
SELPLG	ENST00000388962.3	Selectin P ligand
C10orf53	ENST00000374113.3	Chromosome 10 open reading frame 53
C5orf24	ENST00000394976.3	Chromosome 5 open reading frame 24
PDSS1	ENST00000376215.5	Prenyl (decaprenyl) diphosphate synthase, subunit 1

2.2 实时荧光定量 PCR 实验结果分析

实验选用 count 值超过 10 000 的 1 条已知 miRNA (xtr-miR-22) 和 2 条新预测 miRNA (NW-006622633-1-195, NW-006642957-1-500) 进行绝对定量验证, 对各样品中 3 条 miRNA 的拷贝数进行计算, 每个样品进行 3 个重复, 结果如图 7 所示。



注: nw-1-195 及 nw-1-500 分别代表 2 条新预测 miRNA (NW-006622633-1-195, NW-006642957-1-500); ** 表示该 miRNA 在各样品中的拷贝数有统计学差异 ($P < 0.01$)。

图7 3个 miRNA 在各样品中的拷贝数计算结果

将实验获得的数据采用 SAS8.2 软件进行处理及单因素方差分析, 结果显示 NW-006622633-1-195 在龟甲、乌龟动物背甲及乌龟同属动物黄喉拟水龟的背甲中拷贝数无明显统计学差异 ($P > 0.05$), 而 NW-006642957-1-500 及 xtr-mir-22 在各样品中拷贝数差异均有统计学意义 ($P < 0.01$), 其中 xtr-miR-22 在乌龟背甲中的拷贝数显著高于黄喉拟水龟背甲, 在龟甲中的拷贝数显著高于乌龟背甲。

3 结论与讨论

本研究中采用 miRNA 转录组高通量测序对龟甲中可能存在的 miRNA 的结构进行预测, 共得到三条 count 值超过 10 000 的 miRNA 序列: xtr-miR-22,

NW-006642957-1-500 以及 NW-006622633-1-195。实时荧光定量 PCR 实验结果显示 xtr-miR-22 在乌龟背甲中的拷贝数明显高于同属的常用混伪品基原动物黄喉拟水龟的背甲, 且其在龟甲中未发生明显的降解, 可能为龟甲中具有药理活性的 miRNA。靶基因预测结果显示 xtr-miR-22 可作用于 PML 基因以抑制其表达, 而 PML 基因的表达能够抑制早幼粒细胞白血病 HL-60 细胞凋亡并促进其增殖^[25], 因此 xtr-miR-22 具有潜在的治疗早幼粒细胞白血病的药理活性。

尽管目前已有很多有关龟甲药效及其物质基础的报道, 但由于龟甲本身成分极为复杂, 这些研究多数停留于提取物及动物或细胞的表观变化上, 而鲜有触及作用机制和药效物质基础的报道。有研究表明, 益血生胶囊和补髓生血解毒汤等含龟甲的制剂能够治疗急性白血病化疗后的全血细胞减少症并降低不良反应^[26-27], 龟甲在其中主要起到改善骨髓造血机制、提高机体免疫力的作用。虽然与本研究在龟甲中发现的 xtr-miR-22 的靶基因预测结果并不一致, 但考虑到计算机靶基因预测具有局限性, 且 miRNA 在时空表达中往往能够靶向调控多个基因, 因此并不能排除 miRNAs 作为龟甲中具有生物活性的药效物质, 笔者后续将设计靶向验证实验加以验证。

张辰宇课题组^[21]在金银花 miR2911 的研究中证实植物类中药中存在结构极其稳定的 miRNA, 不仅在高温煎煮中没有发生大量降解, 而且能够通过胃肠道后由肠上皮细胞传递至其他组织和器官, 并通过靶向调控基因发挥其生物活性。对于人与小鼠等哺乳动物, 植物 miRNA 属于外源 miRNA, 其结构与动物 miRNA 有一定区别, 尚且能够跨界调控动物的基因, 提示动物药中的 miRNA 亦具有通过胃肠道传

递进入人体内并调控人基因的潜力。

本研究以龟甲为例,首次测序并验证了中药动物药中存在 miRNAs,可能为中药中一类新型的具有药理作用的活性物质,为中药动物药活性物质研究及中药新药开发提供了新的思路及理论依据。

参考文献

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:一部[S]. 北京:中国医药科技出版社,2015:180-181.
- [2] 谢学明,李熙灿,钟远声,等. 龟板体外抗氧化活性的研究[J]. 中国药房,2006,17(18):1368-1370.
- [3] 黄春花,钟远声,谢学明,等. 两种不同产地龟板抗氧化活性研究[J]. 现代预防医学,2007,34(5):828-830.
- [4] 顾迎寒,卢先明,蒋桂华,等. 不同品种龟甲滋阴作用的对比研究[J]. 时珍国医国药,2007,18(6):1417-1418.
- [5] 李熙灿,谢学明,黄春花,等. 龟板醇提物对大鼠骨髓间充质干细胞氧化损伤的修复及其抗脂质过氧化作用[J]. 中草药,2007,38(7):1043-1046.
- [6] 黎晖,周健洪,陈东风,等. 龟甲对大鼠骨髓间充质干细胞向成骨分化的影响[J]. 中药新药与临床药理,2005,16(3):11.
- [7] 周健洪,陈东风,黎晖,等. 龟板含药血清对大鼠骨髓间充质干细胞体外增殖的影响[J]. 广州中医药大学学报,2005,22(1):35-38.
- [8] 杜少辉,陈东风,李伊为,等. 龟板对脑缺血大鼠骨髓间充质干细胞移植后转分化为神经元的影响[J]. 中华医学杂志,2005,85(3):65-67.
- [9] Chen D F, Zeng H P, Du S H, et al. Extracts from plastrum Testudinis promote proliferation of rat bone-marrow derived mesenchymal stem cells [J]. Cell Proliferation, 2005, 85(3):205-207.
- [10] 汪禄祥,董宝生,刘家富. 药用龟板的氨基酸和矿质元素分析[J]. 广东微量元素科学,2005,12(11):42-44.
- [11] 骆达. 龟甲中促皮肤和骨修复愈合作用成分分析研究[D]. 天津:天津医科大学,2008.
- [12] 雷钧涛,蔡柏玲. 薄层扫描法测定龟甲中胆甾4,6-二烯-3醇的含量[J]. 医药导报,2005,24(11):1050-1051.
- [13] 姜大成,崔健,姜辉. 13种龟板化学成分比较[J]. 中药材,2000,23(2):66-67.
- [14] 陈薇,曾和平,王春燕,等. 中药龟板提取物化学成分及其调控鼠骨髓间充质干细胞(rMSCs)增殖活性的实验研究[J]. 化学学报,2007,65(3):265-270.
- [15] 方达任,张克兰,刘焱文. 龟板,鳖甲炮制前后化学成分的变化[J]. 中国药学杂志,1989,24(1):26-28.
- [16] 程显隆. 胶类药材质量控制关键技术研究[D]. 北京:北京中医药大学,2014.
- [17] 高姚湘,陈东风,李熙灿. Folin-Ciocalteu 比色法测定龟甲多酚含量的研究[J]. 科技创新导报,2010(1):6-7.
- [18] Shenouda S K, Alahari S K. Micro RNA function in cancer: oncogene or a tumor suppressor[J]. Cancer Metastasis Rev, 2009,28(3/4):369-378.
- [19] Liang H, Zen K, Zhang J. New roles for micro RNAs in crossspecies communication[J]. RNA Biol, 2013,10(3):367-370.
- [20] Zhang L, Hou D, Chen X, et al. Exogenous plant MIR168a specifically targets mammalian LDLRAP1: evidence of cross-kingdom regulation by microRNA[J]. Cell Res, 2012,22(1):107-126.
- [21] Zhou Z, Li X, Liu J, et al. Honeysuckle-encoded atypical microRNA2911 directly targets influenza A viruses[J]. Cell Res, 2015,25(1):39-49.
- [22] Rizzi A, Raddadi N, Sorlini C, et al. The stability and degradation of dietary DNA in the gastrointestinal tract of mammals; implications for horizontal gene transfer and the biosafety of GMOs[J]. Crit Rev Food Sci Nutr, 2012,52(2):142-161.
- [23] Ivashuta S I, Petrick J S, Heisel S E, et al. Endogenous small RNAs in grain: semi-quantification and sequence homology to human and animal genes[J]. Food Chem Toxicol, 2009,47(2):353-360.
- [24] Thomas C E, Ehrhardt A, Kay M A. Progress and problems with the use of viral vectors for gene therapy[J]. Nat Rev Genet, 2003,4(5):346-358.
- [25] Gao Y M, Zhong L, Zhang X, et al. PML(NLS-) Inhibits Cell Apoptosis and Promotes Proliferation in HL-60 Cells[J]. Int J Med Sci, 2013,10(5):498-507.
- [26] 王真,刘宝文. 补髓生血解毒汤降低化疗诱导急性早幼粒细胞白血病毒副作用临床观察[J]. 实用中医内科杂志,2013,27(10):63-65.
- [27] 梁立新,李来秀. 益血生胶囊治疗急性白血病化疗后全血细胞减少症45例[J]. 辽宁中医杂志,2009,36(4):558-559.

(收稿日期 2017-11-04)