

· 综述 ·

药用植物 miRNA 的研究进展[△]

张萌, 孙芮, 张楠, 赵岩松*

北京中医药大学 中医学院, 北京 102488

[摘要] 微小 RNA(miRNA)是一类长约 22 个核苷酸的小分子单链 RNA,可以在转录后水平调控基因表达,对人体的生长、发育、生理和病理过程具有重要的调控作用。有研究发现,中药的植物 miRNA 可以被稳定吸收进入体内,而发挥其特异性的药理作用。中药 miRNA 的研究极大地提高了现代药理研究对中药有效成分的认知水平,也为疾病治疗提供了新的途径,更为中药研究提供了一种新的研究思路与方法。

[关键词] 微小 RNA; 中药; 研究进展

[中图分类号] R282.71 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1673-4890(2020)07-2103-05

doi:10.13313/j.issn.1673-4890.20191015003

Research Progress of miRNA in Medicinal Plants

ZHANG Meng, SUN Rui, ZHANG Nan, ZHAO Yan-song*

Beijing University of Traditional Chinese Medicine, Beijing 102488, China

[Abstract] miRNA is a kind of small single stranded RNA with about 22 nucleotides, which can regulate gene expression at the post transcription level and plays an important role in human growth, development, physiology and pathology. It has been found that plant miRNA of traditional Chinese medicine (TCM) can be stably absorbed into the body to play its specific pharmacological role. The research on miRNA of TCM has greatly improved the cognitive level of modern pharmacological research on the effective components of TCM, and also provides a new way of treatment for diseases, as well as a new research idea and method for TCM research.

[Keywords] miRNA; traditional Chinese medicines; research progress

微小 RNA(microRNA, miRNA)是一种由内源性基因编码的非编码单链 RNA 分子,由约 22 个核苷酸组成。miRNA 在动植物以及一些病毒中普遍存在。miRNA 作为一种导向分子,通过碱基配对与靶 mRNA 结合,抑制靶 mRNA 转录后的剪切或翻译,影响蛋白质的表达,从而调节机体的生理功能^[1]。有学者发现,miRNA 在细胞分化、凋亡、增殖及肿瘤形成等不同调控途径中发挥着重要作用^[2-4]。近年来,有关动物体 miRNA,尤其是人体 miRNA 在疾病中的作用成为生命科学研究的重点。

已有研究发现,外源性的植物 miRNA 在人体内可稳定存在^[5],也有研究发现,一些中药中的 miRNA 具有一定的药理活性^[6]。近年来,中药中所包含的

植物 miRNA 成为新的研究关注点,本文对中药 miRNA 的研究现状进行综述。

1 中药中存在大量 miRNA

自 Lee 等^[7]首次在秀丽隐杆线虫突变体中发现 miRNA 以来,人们对这种长度为 19~24 nt 的非编码单链 RNA 进行了越来越多的研究。近年来成为各个学科研究的热点内容,从生命科学到临床医学,从植物培育再到食品安全等,miRNA 广泛存在于自然界的动植物中。以动植物为主要来源的中药,其中也存在大量 miRNA。近 10 年来,关于中药 miRNA 的研究飞速发展,韦春香等^[8]利用高通量测序及生物信息技术预测到黄芪中所含的 miRNA 及其靶基

[△] **[基金项目]** 北京中医药大学青年教师培育项目(2016-JYB-JSPY-004);国家自然科学基金面上项目(81873214);北京中医药薪火传承“3+3”工程项目(2016-SZ-C-64)

* **[通信作者]** 赵岩松,教授,研究方向:中医温病学、中医妇科学;E-mail: zyschn@163.com

因,并验证得到 miR2118 和 miR166 可能参与了黄芪的干旱胁迫应答;周怀香^[9]利用高通量测序技术在不同品种天麻的箭麻与禾麻的花、茎、芽与块茎 4 个组织中测得大量天麻 miRNA;向静等^[10]也在甘草水煎剂中发现了丰富的甘草 miRNA;马月等^[11]在地黄中测得大量 miRNA;同时,人参、丹参、桑叶等中药的 miRNA 也在研究中被发现^[12-14]。

随着研究的不断推进,这些在中药中发现的 miRNA 与中药药效是否有关? miRNA 广泛参与调控生物体的机能,那么植物 miRNA 是否能跨物种进入人和动物体内,调控人和动物的生理机能?其在人与动物的生理病理过程中又发挥什么作用呢?这些问题都值得深入研究与探讨。

2 中药 miRNA 可跨界进入机体

植物 miRNA 通常经过了甲基化修饰,较为稳定,不易降解^[15]。植物 miRNA 的结构与人体 miRNA 的结构非常相似,但不完全相同。已经发现,外源性的植物 miRNA 可以通过消化系统或血液系统进入动物体内,调节组织和细胞的功能^[16]。

早在 2011 年,Zhang 等^[17]就发现了植物 miRNA 可跨界调控动物的基因表达,他们采用 solexa 测序法检测了人血浆中的 miRNA,发现约有 30~50 条外源性的植物 miRNA,其中 miRNA-156a 和 miRNA-168a 的丰度较高。随后以玉米和大米等食物中广泛存在的植物 miRNA-168a 为研究焦点,研究者发现 miRNA-168a 可通过肠道吸收并稳定存在于哺乳动物的不同组织与器官中。随着研究的进一步推进,研究者发现,miRNA-168a 可以通过与肝脏中相应靶基因 mRNA 低密度脂蛋白受体蛋白 1(low-density lipoprotein receptor adapter protein 1, LDLRAP1)的外显子相互作用抑制其蛋白的翻译,从而影响血脂代谢,此研究开辟了植物 miRNA 跨界调控动物基因表达研究的新方向。此后,多项研究也证明,外源性的植物 miRNA 在动物血液和组织中可被检测到,并具有生物学功能^[18-22]。

同样的跨界现象在中药研究中发现,这种跨界现象参与中药药效的发挥。王宇亮等^[23]通过 Northern 印记杂交法验证丹参、生地黄水煎剂中 miRNA 的存在,并可经通过口服经消化道进入人体血液中;Zhou 等^[24]在 2015 年发现,中药金银花中的 miRNA2911 能在水煎液中稳定存在,并能够被人体吸收;随后 Huang 等^[25]分别从 10 种中药水煎剂

(半枝莲、柴胡、穿心莲、紫花地丁、黄芩、金银花、连翘、蒲公英、夏枯草、鱼腥草)中提取出 miRNA,同时提取了人服用中药水煎剂后的血细胞和灌胃中药水煎剂的小鼠肺组织中的 miRNA 序列,进行大量生物信息学分析,计算发现其中有大量中药来源的 miRNA。同时 Du 等^[26]在红景天熬制的汤汁中提取鉴定了 100 多种脂质,其中大部分脂质也存在于中药蒲公英、穿心莲和金银花中,选取其中 2 种磷脂酰胆碱,使之与中药 miRNA 形成脂质体,发现该脂质体可促进红景天等 miRNA 进入人肺和胃肠道细胞。并且在体内外实验证明了从中药煎煮液中提取的具有热稳定性的成分疗效更好^[27],实验结果揭示了中药来源的 miRNA 通过脂质复合物进入人体的可能途径。诸多中药 miRNA 的研究结果也证明,中药 miRNA 也是中药的活性成分之一,其不同以往对中药的研究及其进入人体调节其他分子作用机制的研究,中药 miRNA 可以直接调控人体靶基因 mRNA 的表达,这为中药的现代研究提供了新的方向。

3 中药 miRNA 对机体的作用

3.1 调节脂质代谢

最早对中药 miRNA 进行研究的 Zhang 等^[17]发现,存在于大米中的 miR-168a 可以从饮食中获取进入动物体内,并且在很多动物的血清和组织内均可检测到。同时发现,大米中存在的植物 miR-168a 可以与小鼠和人的脂蛋白中密度低的受体蛋白(即接头蛋白)的 mRNA 结合,抑制肝脏中靶基因 mRNA 的表达,降低血浆中低密度脂蛋白的清除率,从而影响胆固醇的代谢。

3.2 调节免疫功能

邵红伟等^[6]采用通用植物 miRNA 快速提取试剂盒提取甘草水煎剂中的 miRNA,所得 miRNA 经 DNaseI 处理后进行电泳鉴定;分别利用甘草水提物、甘草酸、甘草次酸和甘草 miRNA 处理体外培养的健康人外周血单个核细胞(peripheral blood mononuclear cells, PBMC),24 h 后,发现从甘草水煎剂中确实能够提取到 miRNA,进一步印证了 miRNA 的稳定性。对体外培养 PBMC 作用结果表明,与空白对照组比较,经甘草 miRNA 刺激的 PBMC 发生了明显的抱团,细胞数量显著增多。随后,向静等^[10]将从甘草水煎剂中提出的 miRNA 与合成的甘草 miRNA 模

拟物作用于 PBMC, 进一步证明甘草的 miRNA 具有显著的免疫调节功能, 随后通过 RT-PCR 对其模式识别受体 (pattern recognition receptor, PRR) 基因及一部分转录因子、信号分子和细胞因子的基因表达变化进行分析。结果发现, 甘草的 miRNA 对人免疫细胞的基因表达具有明显的调节作用, 能够明显抑制 T 细胞分化相关基因以及炎症和凋亡相关基因的表达。

3.3 抗病毒作用

2015 年, Zhou 等^[24]在金银花的 miRNA 中发现了具有直接针对广谱的甲型流感病毒的 miRNA2911。miRNA2911 在金银花煎剂中高度稳定, 连续饮用或灌胃给予金银花煎剂导致小鼠外周血和肺中 miRNA2911 水平显著升高。生物信息学预测和荧光素酶报告基因测定显示, miRNA2911 可以靶向各种甲型流感病毒, 包括甲型 H1N1 流感病毒、甲型 H5N1 流感病毒和甲型 H7N9 流感病毒。

3.4 抗炎症作用

周怀香^[9]发现, 天麻中 Gas-miR01 和 Gas-miR02 能够通过胃肠道进入小鼠体内, 同时发现, Gas-miR01 和 Gas-miR02 可以靶向核因子激活的 B 细胞 κ -轻链增强 (NF- κ B) 信号通路上的 3 个关键炎症相关基因 A20、肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 和人核因子 κ B 抑制蛋白 α (I κ B α), 表明天麻特有的 2 个 miRNA 分子可能是重要的植物 miRNA, 可以跨物种调控 NF- κ B 信号通路上的相关基因, 从而参与动物的免疫和炎症反应等重要生理过程。

Li 等^[27]在蒲公英的水煎剂中提取了一种由脂质、miRNA 等组成的外泌体样纳米颗粒, 命名为汤剂体。蒲公英汤剂体与蒲公英汤剂都降低了人非小细胞肺癌 (A549) 细胞中聚肌胞苷酸诱导的促炎因子生成。同时, 由脂质和蒲公英 miRNA 等组成的汤剂体抗炎作用比蒲公英汤剂更强。

3.5 抗纤维化作用

Du 等^[26]从红景天的根部提取 miRNA 进行研究。首先, 对红景天 miRNA 灌胃小鼠的肺组织进行高通量测序, 人工合成在小鼠肺中发现的丰度最高的 8 条红景天来源 miRNA 序列, 并在细胞模型上进行抗肺纤维化功能筛选。结果发现, HJT-s RNA-m7 是其中抗纤维化功能最显著的 miRNA。后续研究表明, HJT-s RNA-m7 可以直接靶向肺纤维化发生发展中的

关键蛋白 α -平滑肌肌动蛋白 (α -SMA)、纤连蛋白 (fibronectin) 及 III 型胶原蛋白 (COL3A1), 并在博来霉素诱导的小鼠肺纤维化模型中被证明具有较好的疗效。

3.6 调节肠道菌群

徐鹏程^[28]对不同组小鼠在灌胃甘草水煎剂、灌胃甘草 miRNA156 和尾端注射甘草 miRNA156 后, 取小鼠新鲜粪便提取基因组 DNA 进行测序分析, 其中甘草 miRNA 减少了拟杆菌门, 增多了变形菌门, 证明甘草 miRNA156 对小鼠肠道菌群和肠道组织免疫系统均发挥着显著调节作用。

3.7 其他作用

Zhang 等^[29]在最新的研究中发现, 中药冬虫夏草中的 miRNA 及其靶基因的表达作用与冬虫夏草的功效完全相同。该研究组采用高通量测序和生物信息学方法对冬虫夏草中保守的 miRNA 和新型 miRNA 进行鉴定。共鉴定出 40 个保守的 miRNA, 预测出 31 个新的 miRNA 和 23 个前体 miRNA 候选基因编码。此外, 还预测了其在人体内的潜在靶基因, 并对这些基因进行分析。生物信息学分析表明, 保守型和新型 miRNA 的靶基因参与了发育、代谢和免疫的过程, 起到抗肿瘤、降血压、刺激免疫系统的作用, 为冬虫夏草的功效研究奠定了基础。

4 中药 miRNA 的研究意义

4.1 有利于进一步阐明中药作用机制

中药 miRNA 作为新发现的中药活性物质之一, 不同于以往研究中中药有效成分的作用机制。中药来源的 miRNA 可以直接调节动物靶基因的表达, 因此, 对中药 miRNA 跨界调控作用的研究将极大推动中药作用机制的研究, 最终形成中药 miRNA-mRNA-蛋白质-疾病治疗的路线图。

4.2 为发展现代中医药理论提供切入点

随着现代科学研究方法不断改进, 研究领域不断扩展, 中医药理论也不断丰富其内涵。miRNA 的发现更为现代中医药理论的发展提供了新的方向。中医归经理论是中医理论的重要组成部分, 其是指中药作用的选择性和中药作用的方向性, 即中药对人体不同部位的选择性作用。也就是说, 某一种药归某一经脉, 意味着中药有选择地对其所属的某一脏腑或经脉的功能影响较大, 但对其他脏腑或经脉

的功能影响很小或没有影响^[30]。那么中药成分是如何在分子层面对疾病发挥作用的?不同中药进入人体后的靶点分布是怎样的?这种分布与中药的归经理论及对传统中药作用的认知有怎样的关联?这些问题都值得深入探索。中药 miRNA 为中药理论研究提供一种新颖的方法,也为揭开中药药理作用的微观本质,探索中药归经理论实质提供了新的研究思路和方法。

4.3 为中药核酸制剂的开发提供依据

miRNA 技术不仅可以研究发病机制和药物作用机制,还可以作为核酸制剂研究新的药物。越来越多的研究表明,miRNA 的模拟物或拮抗剂可以通过上调或下调机体中一些 miRNA 表达从而调控靶基因,以此来调节细胞功能,干预疾病发展^[31-32]。随着 RNA 技术的进步及世界范围内第一个 RNA 干扰(RNA interference, RNAi)药物的诞生,加快我国中药 miRNA 开发创新的研究势在必行^[33]。中药属天然药物,不良反应发生率低,具有较好的人体相容性,中药 miRNA 作为口服基因靶向治疗剂具有巨大潜力。同时,miRNA 技术也是中药基因组学的重要组成部分,为深入挖掘中药的潜在功效提供有效的研究思路与技术手段。

5 问题与展望

中药是中华民族瑰宝之一,但目前对于中药的研究,主要集中在次级代谢产物的研究上,例如黄酮、皂苷等。对初级代谢产物的活性研究,例如核酸、蛋白质等尚未引起广大研究者重视。随着 miRNA 作为中药活性物质可跨界调控机体功能被陆续证实,中药 miRNA 技术为中药活性成分及其对机体作用机制的研究提供了新的研究思路与方法。相信随着中药 miRNA 探究的继续深入,更广泛的中药药理作用会进一步被揭示出来,未来中医药将更受世界瞩目。

参考文献

- [1] CARRINGTON J C, AMBROS V. Role of microRNAs in plant and animal development [J]. Science, 2003, 301 (5631):336-338.
- [2] ZHANG B, PAN X, COBB G P, et al. MicroRNAs as oncogenes and tumor suppressors [J]. Dev Biol, 2007, 302(1):1-12.
- [3] JIANG Y W, CHEN L A. MicroRNAs as tumor inhibitors, oncogenes, biomarkers for drug efficacy and outcome predictors in lung cancer (review) [J]. Mol Med Rep, 2012, 5(4):890-894.
- [4] WANG R, SUN Y, YU W, et al. Downregulation of miRNA-214 in cancer-associated fibroblasts contributes to migration and invasion of gastric cancer cells through targeting FGF9 and inducing EMT [J]. J Exp Clin Cancer Res, 2019, 38(1):20.
- [5] 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.
- [6] 邵红伟, 何免, 陈嘉斯, 等. 甘草水煎剂中 miRNA 的提取及其对外周血单个核细胞的影响研究 [J]. 中药材, 2015, 38(7):1449-1453.
- [7] 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):843-854.
- [8] 韦春香, 肖自华, 黄曦, 等. 黄芪 miRNA 的预测及其干旱表达模式分析 [J]. 中草药, 2017, 48(1):155-164.
- [9] 周怀香. 天麻 miRNA 的鉴定与分析及其跨界调控初探 [D]. 杭州: 浙江理工大学, 2018.
- [10] 向静, 黄洁婷, 徐畅, 等. 甘草水提取物中 miRNA 对人免疫细胞基因表达的影响 [J]. 中国中药杂志, 2017, 42(9):1752-1756.
- [11] 马月, 胡毅翔, 张欢欢, 等. 地黄药效 microRNAs 的鉴定及其靶基因功能分析 [J]. 中国中医药科技, 2016, 23(4):416-420.
- [12] 王文娟, 何枝华, 陈艳琳, 等. 两种提取人参水煎液 miRNA 方法的比较 [J]. 广东药科大学学报, 2017, 33(5):595-599.
- [13] 贾凌. 桑树 miRNA 的鉴定及其在蚕桑互作中的功能研究 [D]. 重庆: 西南大学, 2015.
- [14] 邵芬娟. 丹参幼根小 RNA 的鉴定及小 RNA 通路关键酶基因家族的系统分析 [D]. 北京: 北京协和医学院, 2014.
- [15] SWAMINATHAN G, MARTIN-GARCIA J, NAVAS-MARTIN S. RNA viruses and microRNAs: Challenging discoveries for the 21st century [J]. Physiol Genomics, 2013, 45(22):1035-1048.
- [16] LIANG H, ZEN K, ZHANG J. New roles for microRNAs in cross-species communication [J]. RNA Biology, 2013, 10(3):367-370.
- [17] 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, 2011, 22(1): 107-126.
- [18] CHIN A R, FONG M Y, SOMLO G, et al. Cross-kingdom inhibition of breast cancer growth by plant miR159 [J]. Cell Res, 2016, 26(2): 217-228.
- [19] LIANG G, ZHU Y, SUN B, et al. Assessing the survival of exogenous plant microRNA in mice [J]. Food Sci Nutr, 2014, 2(4): 380-388.
- [20] MLOTSHWA S, PRUSS G J, MACARTHUR J L, et al. A novel chemopreventive strategy based on therapeutic microRNAs produced in plants [J]. Cell Res, 2015, 25(4): 521-524.
- [21] YANG J, FARMER L M, AGYEKUM A A A, et al. Detection of an abundant plant-based small RNA in healthy consumers [J]. PLoS ONE, 2015, 10(9): 249-256.
- [22] YANG J, FARMER L M, AGYEKUM A A, et al. Detection of dietary plant-based small RNAs in animals [J]. Cell Res, 2015, 25(4): 517-520.
- [23] 王宇亮, 王颖芳, 杨泽民, 等. 丹参、生地黄中 miRNA 在人体血液中分离、鉴定及表达分析 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(19): 121-124.
- [24] 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.
- [25] HUANG F, DU J, LIANG Z, et al. Large-scale analysis of small RNAs derived from traditional Chinese herbs in human tissues [J]. Sci China Life Sci, 2019, 62(3): 39-50.
- [26] DU J, LIANG Z, XU J, et al. Plant-derived phosphocholine facilitates cellular uptake of anti-pulmonary fibrotic HJT-sRNA-m7 [J]. Sci China Life Sci, 2017, 62(3): 309-320.
- [27] LI X, LIANG Z, DU J, et al. Herbal decoctosome is a novel form of medicine [J]. Sci China Life Sci, 2019, 62(3): 333-348.
- [28] 徐鹏程. 甘草及其 miRNA 对小鼠肠道菌群和免疫的影响 [D]. 广州: 广东药科大学, 2018.
- [29] ZHANG W, LI X, MA L, et al. Identification of microRNA-like RNAs in *Ophiocordyceps sinensis* [J]. Sci China Life Sci, 2019(3): 349-356.
- [30] 彭田芳, 李刚, 申攀. 中药归经浅议 [J]. 光明中医, 2017, 32(11): 1554-1556.
- [31] MCLAUGHLIN J, WITTE O N. Sustained suppression of Bcr-Abl-driven lymphoid leukemia by microRNA mimic [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2007, 104(51): 20501-20506.
- [32] STENVANG J, PETRI A, LINDOW M, et al. Inhibition of microRNA function by antimiR oligonucleotides [J]. Silence, 2012, 3(1): 1.
- [33] BENSON M D, WADDINGTON-CRUZ M, BERK J L, et al. Inotersen treatment for patients with hereditary transthyretin amyloidosis [J]. N Engl J Med, 2018, 379(1): 22-31.

(收稿日期: 2019-10-15 编辑: 王笑辉)