

# 急性肝损伤模型鼠血清中 microRNAs 绝对定量与肝损伤程度的相关性研究

左忆楠<sup>1,2</sup>, 何学令<sup>2</sup>, 施雪旋<sup>1,2</sup>, 魏诗航<sup>1,2</sup>, 尹海林<sup>2</sup>△

1. 四川大学生命科学学院(成都 610065); 2. 四川大学实验动物中心(成都 610041)

**【摘要】** 目的 观察四氯化碳(CCl<sub>4</sub>)诱导的大鼠急性肝损伤模型和对乙酰氨基酚(APAP)诱导的小鼠急性肝损伤模型血清中 microRNAs(miR-122, miR-451, miR-92a, miR-192)的绝对定量随时间的变化情况,并分析血清中 microRNAs 绝对定量与对乙酰氨基酚诱导的小鼠急性肝损伤组织病理评分之间的相关性。方法 建立 CCl<sub>4</sub>(1.5 mL/kg)诱导的大鼠急性肝损伤模型和 APAP(160 mg/kg)诱导的小鼠急性肝损伤模型,收集建模过程中各时间点的血清,通过 MiRbay™ SV miRNA 检测试剂盒对血清中 microRNAs 的含量进行绝对定量,探究血清中 microRNAs 的变化情况。同时收集 APAP 诱导的小鼠急性肝损伤模型中各时间点的肝损伤组织,进行组织病理染色、组织病理评分;随后对小鼠血清中 microRNAs 的绝对定量与肝损伤组织病理评分进行相关性分析。结果 在两种急性肝损伤模型中,均发现血清中 miR-122 和 miR-192 的绝对定量在肝损伤 8 h 或 2 h 就出现明显的升高,在 24 h 左右维持在最高的水平,72 h 逐渐下降至正常水平。miR-92a 在 CCl<sub>4</sub> 诱导的大鼠急性肝损伤模型中,出现波动性的变化,无明显的变化规律,miR-451 则出现了轻微下降的趋势。miR-92a 和 miR-451 在 APAP 诱导的小鼠肝损伤进展中,均有逐渐下降的趋势,在 48 h 到达最低点,随后开始恢复。相关性分析发现,小鼠血清中 miR-122 和 miR-192 的绝对定量与 APAP 诱导的小鼠肝损伤组织病理评分(DILI-PSS)呈现良好的正相关(分别为  $r=0.7413, P<0.05$ ;  $r=0.7883, P<0.01$ )。结论 血清中 microR-122 和 microR-192 的绝对定量在大鼠或小鼠急性肝损伤后 24 h 左右达峰,72 h 降低,并且与 APAP 诱导的小鼠急性肝损伤组织病理评分具有良好的相关性。

**【关键词】** 肝损伤 microRNAs 绝对定量 相关性

**The Correlation Between MicroRNAs in Serum and the Extent of Liver Injury** ZUO Yi-nan<sup>1,2</sup>, HE Xue-ling<sup>2</sup>, SHI Xue-xuan<sup>1,2</sup>, WEI Shi-hang<sup>1,2</sup>, YIN Hai-lin<sup>2</sup>△. 1. College of Life Sciences, Sichuan University, Chengdu 610065, China; 2. Laboratory Animal Center, Sichuan University, Chengdu 610041, China

△ Corresponding author, E-mail: yin37143@163.com

**【Abstract】 Objective** To investigate the correlation between the absolute quantification of the microRNAs (miR-122, miR-451, miR-92a, miR-192) in serum during acute liver injury and the extent of liver injury on rat models of CCl<sub>4</sub> induced acute liver injury and mice models of acetaminophen (APAP) induced acute liver injury. Furthermore, to investigate the correlation between the absolute quantification of microRNAs in serum and the drug induced liver injury pathological scoring system (DILI-PSS). **Methods** The acute liver injury model in rat by CCl<sub>4</sub> (1.5 mL/kg), and the acute liver injury model in mice by APAP (160 mg/kg) were established. The serum at different time points on both models were collected respectively. The absolute quantification of microRNAs in serum were detected by using MiRbay™ SV miRNA Assay kit. Meanwhile, the pathological sections of liver tissue of the mice at each time point were collected to analyze the correlation between microRNAs and the degree of liver injury. **Results** In CCl<sub>4</sub>-induced rat acute liver injury model and APAP induced mouse acute liver injury, miR-122 and miR-192 appeared to be rising significantly, which remained the highest level at 24 h after treatment, and declined to the normal level after 72 h. In CCl<sub>4</sub>-induced rat acute liver injury model, the change of miR-92a was fluctuated and had no apparent rules, miR-451 declined gradually, but not obviously. In mice acute liver injury model induced by APAP, miR-92a and miR-451 in the progress of liver injury declined gradually, reached the lowest point at 48 h, and then recovered. The result of correlation analysis indicated that miR-122 and miR-192 presented a good positive correlation with the DILI-PSS ( $r=0.7413, P<0.05$ ;  $r=0.7883, P<0.01$ ). **Conclusion** The absolute quantification of miR-122 and miR-192 in serum has the highest level in 24 h, then decrease in 72 h, in both drug-induced and chemical liver injury. In addition, both the two microRNAs have good correlation with DILI-PSS in APAP-induced liver injury models.

**【Key words】** Liver injury microRNAs The absolute quantification Correlation

近年来,药物引起的肝损伤逐年增加。例如,在发达国家,对乙酰氨基酚(APAP)作为镇痛药物的过量使用是引起急性肝脏衰竭死亡的主要原因。同时药物引起的肝损伤发病进展较快,对人类健康的危害较大,因此发现体内肝损伤标志物来评价肝损伤程度对于肝损伤的诊断、治疗、预后显得至关重要。肝损伤标志物目前主要为临床上应用已久的丙氨酸氨基转移酶(ALT)和天冬氨酸氨基转移酶(AST)。ALT和AST虽然对肝损伤具有较好的指示作用,但是由于其对肌肉、肾脏等组织损伤也具有指示作用<sup>[1-2]</sup>,因此对肝损伤的组织特异性并不是很高。尽管目前临床上普遍认为,肝损伤的程度不能仅仅依靠ALT、AST来评价,但与此同时,并没有更加特异、准确的肝损伤标志物可供选择。因此发现更加特异、有效、安全的肝损伤标志物对于肝损伤相关疾病的诊断和治疗以及新药毒理评价至关重要<sup>[3]</sup>。microRNAs是一类在真核生物界普遍存在、具有多种重要功能的短链非编码RNA<sup>[4-6]</sup>。通过对肝损伤标志物的大规模筛选,目前已有多种microRNAs被发现在肝损伤过程中发生变化,其中就包括miR-122、miR-192、miR-92a、miR-451等<sup>[7]</sup>。在多种类型的肝损伤(如酒精性肝损伤、药物性肝损伤、病毒性肝损伤)中,miR-122在血浆中的分泌量相对于对照组明显升高,与ALT具有很好的正相关性<sup>[2,8-9]</sup>。在药物诱导的肝损伤中,患者血浆中的miR-192也呈现高表达,与传统肝损伤指标ALT/AST也具有很好的相关性,且响应时间早于传统的ALT标志物<sup>[10-11]</sup>。miR-92a和miR-451也被认为在药物性肝损伤过程中会发生变化,随着肝损伤进展会有一定程度的下降,并且在肝病中也扮演着重要调节作用<sup>[12-13]</sup>,但是关于其与肝损伤的相关性还需进一步研究。尽管在目前的报道中,相对定量的microRNAs与ALT呈现正相关,但是microRNAs与肝损伤组织病理评分是否具有良好的相关性却少见报道。本次实验旨在探讨在四氯化碳(CCl<sub>4</sub>)诱导的大鼠急性肝损伤模型和APAP诱导的小鼠急性肝损伤模型中,血清中microRNAs的绝对定量变化情况,并进一步探究血清中microRNAs的绝对定量与APAP诱导的小鼠急性肝损伤组织病理程度之间的相关性。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物

8周龄SPF级BALB/c小鼠52只,8周龄SD

大鼠12只,由四川大学实验动物中心提供〔生产许可证:scxk(川)2013-026,使用许可证:syxk(川)2013-185〕。

### 1.2 试剂盒与药品

APAP悬液(泰诺,上海强生制药有限公司);苏木素-伊红染液(Beyotime CO105-1);CCl<sub>4</sub>分析纯(Sigma);DMSO(Sigma);中性快干胶(无锡江原实业技贸公司);miRbay™ SV miRNA单管反应检测试剂盒(成都诺恩生物科技有限公司)。

### 1.3 仪器

光学显微镜(Olympus BX60);石蜡切片机(LEICA KM2235);全自动生化检测仪(Roche);离心机(Thermomorsvall ST16);PCR仪(Labnet Multigene)。

### 1.4 方法

#### 1.4.1 CCl<sub>4</sub>诱导的大鼠急性肝损伤模型的建立

健康雄性SD大鼠12只,体质量为170~200g。新鲜配制体积分数为50%的CCl<sub>4</sub>植物油溶液,以1.5 mL/kg腹腔注射。在CCl<sub>4</sub>处理之前(即0h),处理之后8h、24h、72h分别采集SD大鼠尾静脉血200 μL,收集血清,用以检测血清中microRNAs绝对定量的变化情况。

#### 1.4.2 APAP诱导的小鼠肝损伤模型的建立

BALB/c小鼠52只,雌雄各半。对小鼠进行称重后,随机分成5组,其中空白对照组(APAP给药前,即0h)4只,其余4组各12只,分别为APAP给药后2h、24h、48h、72h实验组,确保每组小鼠的平均体质量均在22g左右,并且雌雄各半。APAP给药浓度为160 mg/kg,给药方式为灌胃。按照分组情况,分别于相应时点称量小鼠体质量、采集小鼠眼球处血液500 μL(收集血清,用以检测血清中microRNAs绝对定量的变化情况)后处死小鼠。每组随机选取2只,取出肝脏,称量肝脏质量,肝脏组织经体积分数为4%的多聚甲醛固定过夜。

#### 1.4.3 血清中microRNAs定量检测

血清中microRNAs的绝对定量使用miRbay™ SV miRNA单管反应检测试剂盒。血清中待测的microRNAs首先经过与其对应的特异性的欧米伽引物杂交后,经过PCR获得特异性的PCR产物。由于每种microRNAs对应的特异性的欧米伽引物带有荧光标记而且长度不同,因此经过PCR得到的产物能够通过荧光片段长度多态性分析进行区别,进一步通过PCR产物的荧光强度与同一反应体系下制作的标准曲线对比,就能够检测出血清中目标

microRNAs 的绝对定量<sup>[14]</sup>。

**1.4.4 APAP 诱导的小鼠急性肝损伤组织病理染色与评价** APAP 诱导的小鼠急性肝损伤模型中, 分别于给药前(空白对照组)和给药后 2 h、24 h、48 h、72 h 取血后处死小鼠, 各时间点随机选取 2 只小鼠, 取出肝脏组织。生理盐水洗涤, 体积分数为 4% 的多聚甲醛溶液浸泡 2 d。随后经过脱水, 石蜡包埋, 切片, HE 染色后封片。在显微镜 100 倍放大倍数下, 观察病理切片, 主要观察肝脏组织的整体结构、肝细胞空泡化、嗜伊红细胞浸润、肝细胞坏死区域等指标, 病理评分参照 DILI-PSS。DILI-PSS 评分系统<sup>[15]</sup>是通过病理观察大量药物性肝损伤样本后, 总结出的评价肝组织损伤程度的评价体系, 主要观察肝细胞脂肪变性、肝细胞胆汁淤积、肝细胞凋亡、坏死区域、嗜伊红白细胞浸润等指标的病理情况。DILI-PSS 评分分值越大, 肝损伤程度越重。

**1.4.5 统计学方法** 实验结果均用 Graphpad Prism6 软件进行统计分析。实验结果中血清

microRNAs 绝对定量的原始数据用  $\bar{x} \pm s$  表示, 使用经对数转换后的数据进行多组间比较(采用方差分析)和组间两两比较(采用 Dunnett 检验); 相关性采用绝对定量的原始数据进行 Pearson 相关性分析。P<0.05 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 血清中 microRNAs 绝对定量在 CCl<sub>4</sub> 诱导的大鼠急性肝损伤模型中的变化情况

结果见表 1。miR-122 和 miR-192 在 CCl<sub>4</sub> 处理早期(8 h)开始逐渐升高, 24 h 达到最高水平, CCl<sub>4</sub> 处理后 72 h 则出现大幅下降。miR-92a 和 miR-451 在 CCl<sub>4</sub> 诱导的肝损伤早期(8 h)均有下降趋势, 但是 miR-92a 随后出现波动性变化, 而 miR-451 则一直呈下降的趋势。

### 2.2 血清中 microRNAs 绝对定量在 APAP 诱导的小鼠急性肝损伤模型中的变化情况

结果见表 2。miR-122 和 miR-192 在 APAP 处

表 1 microRNAs 在 CCl<sub>4</sub> 诱导的大鼠急性肝损伤模型中的血清绝对定量/(拷贝数/μL)

Table 1 The expression level of microRNAs in serum of CCl<sub>4</sub>-induced acute liver injury models/(copies/μL)

Time	miR-122	miR-192	miR-92a	miR-451
0 h	1 921±288	5 496±888	335 321±38 095	598 342±29 892
8 h	8 297 956±1 704 659**	1 061 600±329 187**	180 226±14 615**	426 296±111 852
24 h	23 520 392±6 440 298**	3 743 813±456 940**	1 072 990±14 615**	313 914±26 176
72 h	2 075±519	9 265±1 097	106 465±12 937**	290 433±47 837

\* P<0.05, \*\* P<0.01, vs. 0 h

表 2 microRNAs 在 APAP 诱导的小鼠急性肝损伤模型中的血清绝对定量/(拷贝数/μL)

Table 2 The expression level of microRNAs in serum of APAP-induced acute liver injury models/(copies/μL)

Time	miR-122	miR-192	miR-92a	miR-451
0 h	9 704±2 083	26 676±5 420	155 561±36 937	10 345 684±844 267
2 h	189 614±95 633**	112 936±23 049**	71 457±8 084*	10 497 014±272 810
24 h	820 380±508 824*	536 488±306 098	69 197±9 355*	9 342 598±1 060 833
48 h	758 078±316 456*	555 124±225 969*	36 483±4 003**	8 542 118±523 115
72 h	92 486±32 603**	131 415±30 914**	62 410±9 578*	9 956 152±527 593

\* P<0.05, \*\* P<0.01, vs. 0 h

理早期(2 h)开始逐渐升高, 处理后 24 h 和 48 h 均保持较高水平, 处理后 72 h 则出现下降趋势。miR-92a 和 miR-451 在 APAP 诱导的急性肝损伤早期即呈现逐渐下降趋势, 在 APAP 处理 48 h 后血清中含量下降至最低水平, 处理 72 h 后出现上升趋势。

### 2.3 APAP 诱导的小鼠急性肝损伤模型建立与组织病理评价

在 APAP 诱导的小鼠急性肝损伤模型中, 小鼠的肝脏质量、肝脏质量/体质量比例随着 APAP 诱导的肝损伤进展变化情况见图 1。在 APAP 处理后 2 h 有轻微升高, 24 h 升高到最高点, 之后开始逐渐恢复至正常水平。肝组织的病理切片显示(图 2),

空白对照组肝组织结构完整, 肝细胞边界清晰, 核位

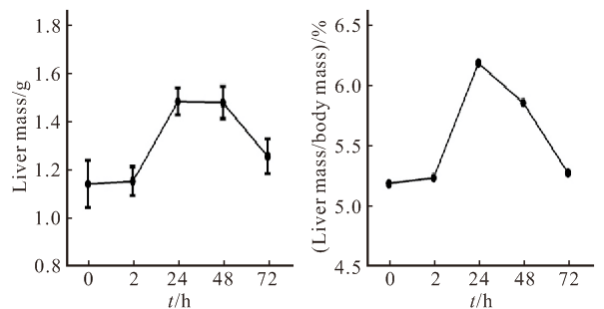


图 1 APAP 诱导的小鼠急性肝损伤模型肝脏质量变化情况

Fig 1 The liver mass of acute liver injury model induced by APAP

于细胞中央。APAP 处理后 2 h 出现轻微的肝损伤,组织结构较为完整,但是出现了轻微的脂肪变性和凋亡小体。APAP 处理后 24 h 和 48 h 时,肝细胞空泡化严重,凋亡小体普遍存在,嗜伊红细胞浸润,出现肝损伤坏死区域,肝损伤程度严重。

## 2.4 血清中 microRNAs 绝对定量与 APAP 诱导的

## 小鼠急性肝损伤组织病理程度的相关性分析

实验结果显示(图 3),血清中 miR-122 和 miR-192 绝对定量与 APAP 诱导的小鼠急性肝损伤病理评分均呈现正相关关系( $r=0.7413, P<0.05$ ;  $r=0.7883, P<0.01$ )。血清中 miR-92a 和 miR-451 绝对定量与 APAP 诱导的小鼠急性肝损伤病理评

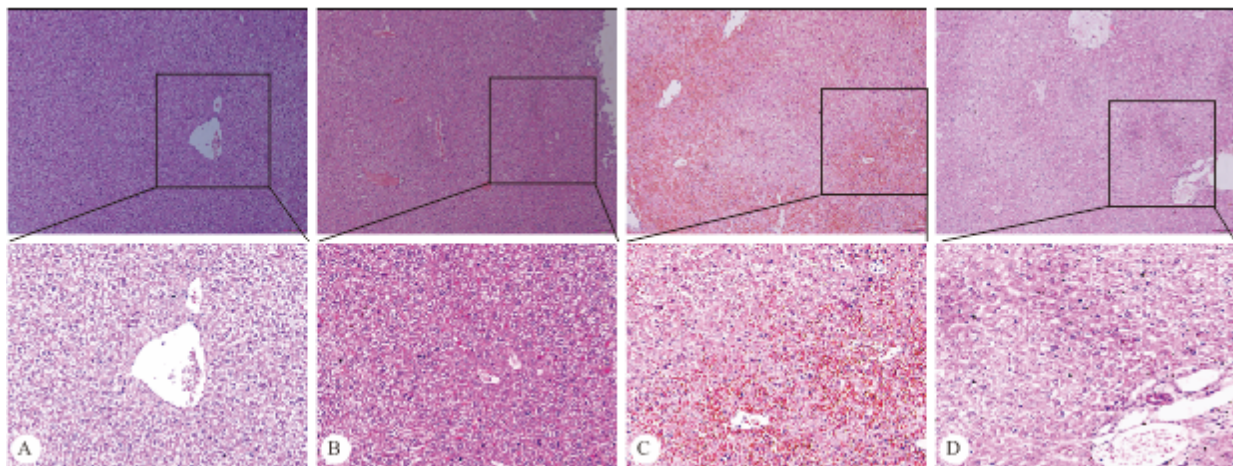


图 2 APAP 诱导的小鼠急性肝损伤模型肝脏病理切片。HE  $\times 100$

Fig 2 The pathological section of acute liver injury induced by APAP. HE  $\times 100$

A: Blank control group; B: 2 h; C: 24 h; D: 48 h

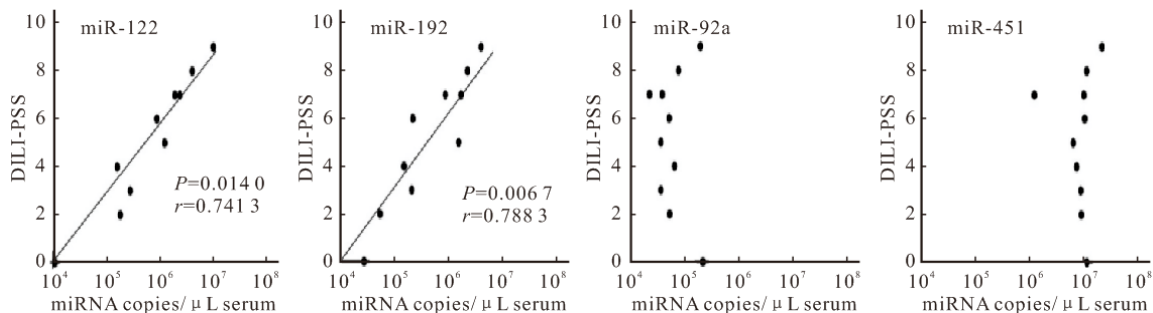


图 3 血清中 microRNAs 的表达与 APAP 诱导的小鼠急性肝损伤病理评分的相关性

Fig 3 The correlation between expression of microRNAs in serum and histopathologic score of APAP induced acute liver injury

分不相关。

## 3 讨论

随着新药研发成本与日俱增,新药研发的效率对于国民经济发展至关重要,因此建立准确、安全的药物肝损伤评价体系显得尤为关键<sup>[3,15-16]</sup>。目前,主要依靠 Hy'S 法则<sup>[17]</sup>,即联合血清中 ALT( $>3$  倍正常值上限)和总胆红素(TBL)( $>2$  倍正常值上限)的上升区间来判断新药是否具有肝损伤毒性,但临床上发现了多起通过 Hy'S 法则的新药上市后却出现了普遍肝功能衰竭的事件,导致药物停止上市。

因此如何更加客观、有效地依据肝损伤标志物反映肝损伤情况,是目前临床上新药评价和肝脏疾病评价及预后亟待解决的问题<sup>[18]</sup>。

目前肝损伤的标志物主要依靠 ALT 和 AST,但已有多篇文献报道 ALT 和 AST 也能指示其他组织的损伤情况,不能特异性地指示肝损伤程度,最终造成临床上不可挽回的后果。近年来发现,肝脏组织特异性表达的 microRNAs 有可能成为潜在的更加具有特异性的肝损伤标志物,越来越多的 microRNAs 被发现与肝损伤相关<sup>[19-20]</sup>,其中以 miR-122 以及 miR-192 报道最多<sup>[21]</sup>。值得一提的

是,目前已有研究称血液中的基因转录组水平也能反映肝损伤情况,这提示未来肝损伤标志物的进展不能仅仅局限于生化检测以及 microRNAs 检测<sup>[22]</sup>。

本次实验通过新近报道的 microRNAs 绝对定量检测技术,对 CCl<sub>4</sub> 诱导的大鼠急性肝损伤模型和 APAP 诱导的小鼠急性肝损伤模型中血清 microRNAs 进行绝对定量分析,发现血清中 miR-122 和 miR-192 的绝对定量在各时间点有明显变化规律,而另外两个候选的肝损伤标志物 miR-92a 和 miR-451 规律性不明显。同时,我们发现血清中 miR-122 和 miR-192 绝对定量与对应小鼠的肝损伤组织病理程度呈现正相关,能够很好地指示 APAP 诱导的小鼠急性肝损伤的组织病理评分。但是因为组织样品质量等问题,未能检测 72 h 组织病理情况。血清中 miR-92a 和 miR-451 与小鼠的肝损伤组织病理程度不相关。本次实验首次对 microRNAs 绝对定量检测技术与急性肝损伤组织病理评价之间的相关性进行报道,进一步探究 microRNAs 作为急性肝损伤标志物的可能性,为以后通过 microRNAs 建立更加明确、客观的肝损伤评级体系奠定了基础。在此基础上,探讨 microRNAs 的绝对定量能否区分不同肝损伤类型,将是我们未来的研究重点。

### 参 考 文 献

- [1] SLANKAMENAC K, BREITENSTEIN S, CLAVIEN PA, *et al.* Development and validation of a prediction score for postoperative acute renal failure following liver resection. *Ann Surg*,2009,250(5):720-728.
- [2] ZHANG Y, JIA Y, SUN SH, *et al.* Plasma microRNA-122 as a biomarker for viral-, alcohol-, and chemical-related hepatic diseases. *Clin Chem*,2010,56(12):1830-1838.
- [3] VERMA S, KAPLOWITZ N. Diagnosis, management and prevention of drug-induced liver injury. *Gut*,2009,58(11):1555-1564.
- [4] BARTEL DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*,2004,116(2):281-297.
- [5] KASINSKI AL, SLACK FJ. Epeigenetics and genetics. MicroRNAs en route to the clinic; progress in validating and targeting microRNAs for cancer therapy. *Nat Rev Cancer*,2011,11(12):849-864.
- [6] LI Z, RANTA TM. Therapeutic targeting of microRNAs: current status and future challenges. *Nat Rev Drug Discov*,2014,13(8):622-638.
- [7] SHI Q, YANG X, MENDRICK DL. Hopes and challenges in using microRNAs as translational biomarkers in drug induced liver injury. *Biomark Med*,2013,7(2):307-315.
- [8] BALA S, PETRASEK J, MUNDKUR S, *et al.* Circulating microRNAs in exosomes indicate hepatocyte injury and inflammation in alcoholic, drug-induced and inflammatory liver diseases. *Hepatology*,2012,56(5):1946-1957.
- [9] ANTOINE DJ, DEAR JW, LEWIS PS, *et al.* Mechanistic biomarkers provide early and sensitive detection of acetaminophen-induced acute liver injury at first presentation to hospital. *Hepatology*,2013,58(2):777-787.
- [10] WANG K, ZHANG S, MARZOLF B, *et al.* Circulating microRNAs, potential biomarkers for drug-induced liver injury. *Proc Natl Acad Sci U S A*,2009,106(11):4402-4407.
- [11] STARKEY LPJ, DEAR J, PLATT V, *et al.* Circulating microRNAs as potential markers of human drug-induced liver injury. *Hepatology*,2011,54(5):1767-1776.
- [12] HUANG JY, ZHANG K, CHEN DQ, *et al.* MicroRNA-451: epithelial mesenchymal transition inhibitors and prognostic biomarker of hepatocellular carcinoma. *Oncotarget*,2015,6(21):18613-18630.
- [13] YANG W, DOU C, WANG Y, *et al.* MicroRNA-92a contributes to tumor growth of human hepatocellular carcinoma by targeting FBXW7. *Oncol Rep*,2015,34(5):2576-2584.
- [14] 胡锡琪. 药物性肝炎组织病理学评分探讨. *肝脏*,2010,15(5):317-319.
- [15] XIE XP, TANG F, YANG Z, *et al.* MicroRNA-derived fragment length polymorphism assay. *Sci Rep*,2015,5:9356. doi: 10.1038/srep09356.
- [16] WATKINS PB, SELIGMAN PJ, PEARS JS, *et al.* Using controlled clinical trials to learn more about acute drug-induced liver injury. *Hepatology*,2008,48(5):1680-1689.
- [17] LEWIS JH. The art and science of diagnosing and managing drug-induced liver injury in 2015 and beyond. *Clin Gastroenterol Hepatol*,2015,13(12):2173-2189.
- [18] RE VL, HAYNES K, FORDE KA, *et al.* Risk of acute liver failure in patients with drug-induced liver injury: evaluation of Hy's Law and a new prognostic model. *Clin Gastroenterol Hepatol*,2015,13(13):2360-2368.
- [19] KRAUSKOPF J, CAIMENT F, CLAESSEN SM, *et al.* Application of high-throughput sequencing to circulating microRNAs reveals novel biomarkers for drug-induced liver injury. *Toxicol Sci*,2015,143(2):268-276.
- [20] CHURCH RJ, OTIENO M, MCDUFFIE JE, *et al.* Beyond miR-122: identification of microRNA alterations in blood during a time course of hepatobiliary injury and biliary hyperplasia in rats. *Toxicol Sci*,2016,150(1):3-14.
- [21] STARKEY LPJ, MERZ M, COUTTET P, *et al.* Serum microRNA biomarkers for drug-induced liver injury. *Clin Pharmacol Ther*,2012,92(3):291-293.
- [22] FANNIN RD, GERRISH K, SIEBER SO, *et al.* Blood transcript immune signatures distinguish a subset of people with elevated serum ALT from others given acetaminophen. *Clin Pharmacol Ther*,2016,99(4):432-441.

(2016-07-21 收稿,2016-11-18 修回)

编辑 余琳