

肝毒性 microRNA 生物标志物研究进展

康慧君 苗玉发 霍 艳 黄芝瑛 李 波

摘 要 药物性肝毒性是导致药物不良反应的主要原因之一,肝毒性生物标志物能早期预测肝毒性的发生和避免肝毒性的发生,其种类有蛋白质、细胞因子、酶类以及 RNA 等。外周循环血中的 microRNA(miRNA)是一类内源性表达的非编码 RNA,具有良好的稳定性及高度的组织器官特异性,有望成为替代传统酶学标志物的新型肝毒性生物标志物。

关键词 肝毒性 生物标志物 miRNA

[中图分类号] R991

[文献标识码] A

肝毒性是药物研发失败或上市药物被召回的主要原因之一,美国 FDA 批准上市的药物中,80% 以上的黑框警告药物属于严重肝毒性药物。目前,在国内外临床前安全性评价技术指导原则中,有关肝毒性评价的指标主要涉及常规临床生化指标、活性代谢产物以及免疫相关的指标等^[1]。然而这些常规毒理学指标的灵敏性、稳定性或特异性并不十分理想。例如,肝毒性评价的经典指标丙氨酸转氨酶(alanine-transaminase,ALT)虽然具有很高的敏感度,但特异性较差,必须结合其他指标来综合判断。近年来,随着蛋白质组学和基因组学技术的发展,使高通量筛选灵敏、可靠的肝毒性生物标志物成为可能。microRNA(miRNA)是一种由 19~24 个核苷酸组成的单链非编码 RNA,它不能被翻译并最终生成蛋白质,但是,已经证明这些小 RNA 分子可以与靶 mRNA 结合,在生长、增殖、细胞信号转导以及细胞凋亡过程中发挥关键的基因表达调控作用^[2]。目前,在人、小鼠和大鼠等体内发现的 miRNA 约有 1400、720 和 400 种,miRDB 和 mirecords 等数据库都收录了这些种属的 miRNA 数据,并且提供了可能的 mRNA 靶序列。资料显示,在临床研究中,已发现多种疾病特异性的血清 miRNA 生物标志物,预计可以为癌症、肿瘤等疾病

的早期诊断提供敏感、特异和简单的临床诊断方法。比如,miR-145、miR-155 和 miR-382 可以初步诊断乳腺癌疾病;miR-129-3p、miR-767-3p 和 miR-877 的组合有望成为结直肠癌筛查和早期诊断的指标;miR-122 可作为急性肝炎、肝损伤的候选标志物;miR-1246 可作为食管鳞状细胞癌的诊断和预后的标志物;尿中 miR-30a-5p 可以作为儿童原发性肾病综合征诊断和预后的生物标志物等^[3-8]。

一、不同类型肝毒性及 miRNA 标志物

药物所致肝毒性按损伤部位大致分为肝细胞毒性、胆汁淤积性肝毒性和混合性肝毒性 3 种类型^[9]。按损伤缓急又可分为急性肝毒性和慢性肝毒性,而慢性肝毒性一般表现为脂肪变性、肝纤维化、肝硬化及肝癌等渐进性变化过程。以下主要就不同类型肝毒性相关的 miRNA 做简要总结。

1. 肝细胞毒性及 miRNA 标志物:在对乙酰氨基酚(acetaminophen, APAP)和四氯化碳(carbon tetrachloride, CCl₄)诱导的大鼠体内肝毒性模型和 APAP 诱导的大鼠体外肝细胞毒性模型中,Fukushima 等^[10]研究了大鼠肝组织和体外肝细胞中的 miRNA,结果发现 miR-298 和 miR-370 与肝细胞线粒体损伤密切相关。在过量 APAP 诱导的小鼠肝毒性模型中,Wang 等^[11]从小鼠的组织和血液中,检测到近 100 个 miRNA 的表达改变。其中,miR-22、miR-101b、miR-122、miR-133a、miR-135、miR-192、miR-193 和 miR-486 等 8 个 miRNA 均与肝损伤有较强的时效关系。对不同剂量、不同时间点血液中的 miRNA 的研究显示,miR-122 和 miR-192 预测肝细胞毒性的敏感度都高于 ALT。在 APAP 和噻吡二胺(methapyrilene, MP)诱导的大鼠肝毒性模型中,Yamaura 等^[12]研究发现血液发生变化的 miRNA

基金项目:国家“重大新药创制”科技重大专项基金资助项目(2012ZX09302001);国家“重大新药创制”新药研究开发关键技术研究基金资助项目(2012ZX09505001-004);中国食品药品检定研究院中青年基金课题资助项目(2012B4)

作者单位:510006 广州,中山大学(康慧君、黄芝瑛);100176 北京,中国食品药品检定研究院(苗玉发、霍艳、李波)。注:唐慧君和苗玉发为并列第一作者

通讯作者:黄芝瑛,电子信箱:hzhying@mail.sysu.edu.cn;李波,电子信箱:libo@nifdc.org.cn

共 285 个,其中上调的 283 个,下调 2 个。进一步与不同类型肝毒性的研究结果进行对比,发现这两个模型中明显上调的与肝细胞损伤相关的 miRNA 有 10 个,分别是 miR - 200a、let - 7c - 1、miR - 503、miR - 337 - 3p、miR - 10b、miR - 34c、miR - 327、miR - 351、miR - 704 和 miR - 410。另外,APAP 模型特异的与肝细胞损伤相关的 miRNA 有 12 个,上调的是 miR - 592、miR - 296 - 2、miR - 367、miR - 19a、miR - 344 - 3p、miR - 218 - 1、miR - 10a 和 miR - 217,下调的是 miR - 103、miR - 141、miR - 764 - 5p 和 miR - 132。MP 模型特异的与肝细胞损伤相关的 miRNA 有 11 个,上调的是 miR - 697、miR - 200c、miR - 879、miR - 30c - 1、miR - 149 和 miR - 29b;下调的是 miR - 687、miR - 30a、miR - 29b、miR - 744 和 miR - 181c。这 23 个 miRNA 或许可以提示肝细胞毒性所致肝损伤的特异损伤区域。

有研究者在 APAP 和 CCl₄ 大鼠肝毒性模型的尿中分别检测到 44 个和 28 个上调的 miRNA,其中相同的 10 个为 miR - 291a - 5p、let - 7b、miR - 330、miR - 296、miR - 34c、miR - 664、miR - 434、miR - 185、miR - 484 和 miR - 433。此研究结果提示肝毒性特异的 miRNA 不仅存在于外周血中,在尿和体液中也可能存在^[13]。

2. 胆汁淤积性肝毒性及 miRNA 标志物:多种肝胆管异常可导致胆汁阻塞或者淤积性肝损伤。Yam-aura 等^[12]在胆管结扎的大鼠胆汁淤积性肝毒性模型中,发现了区别于其他模型的 2 个特异性肝损伤 miRNA 标志物:miR - 190 和 miR - 743b。在胆管结扎诱导的 Balb/c 小鼠急性胆汁淤积性肝毒性模型中,Yang 等^[14]发现 miR - 34 的下调和 miR - 210 的上调与缺氧诱导因子(hypoxia - inducible factor, HIF) α 的激活关系密切,而 HIF 已知与肝细胞缺氧癌变有关。

胆固醇 7 α - 羟化酶(cholesterol 7 α - hydroxylase, CYP7A1)与胆汁酸的合成密切相关,而 miR - 122a 和 miR - 422a 可以结合编码 CYP7A1 的 mRNA,抑制相应的转录翻译,从而阻断体内胆汁酸的合成,参与肝损伤过程^[15]。另外,在小鼠体内的研究显示,miR - 33 通过作用于 ATP 结合盒转运蛋白 B11(ATP - binding cassette, sub - family B, member 11, ABCB11)、ATP 结合盒转运蛋白 G5/8(ATP - binding cassette, sub - family G, member 5/8, ABCG5/ABCG8)、ATP 结合盒转运蛋白 B4(ATP - binding

cassette, sub - family B, member 4, ABCB4) 和氨磷脂转运蛋白 8B1(ATPase, aminophospholipid transporter, class I, type 8B, member 1, ATP8B1) 等 4 种转运蛋白,参与固醇类物质造成的胆汁淤积性肝毒性^[16]。除了通过影响 mRNA 的转录引起肝损伤外,de Aguiar Vallim 等^[17]发现 miR - 144 还能作用于一种胆汁酸受体(farnesoid X receptor, FXR),通过降低血清高密度脂蛋白水平而诱导肝毒性产生。

3. 非酒精性脂肪性肝病等混合性肝毒性及 miRNA 标志物:非酒精性脂肪性肝病(nonalcoholic fatty liver disease, NAFLD)是指除酒精和其他明确损伤因素外所致的以肝细胞内脂肪过度沉积为主要特征的临床病理综合征,是一种与胰岛素抵抗和遗传易感性密切相关的获得性代谢应激性肝损伤。非酒精性脂肪性肝炎(non - alcoholic steatohepatitis, NASH)是 NAFLD 最严重的表现。

Estep 等^[18]选取 NASH 患者与非 NASH 患者的肝组织进行比较研究,结果发现 7 个有意义的差异 miRNA:miR - 132、miR - 150、miR - 433、miR - 28 - 3p、miR - 511、miR - 517a 和 miR - 671。Zheng 等^[19]在脂肪变性的人肝细胞体外模型中,检测出 32 个差异性 miRNA,其中,miRNA - 10b 作用于过氧化物酶体增殖剂激活受体 α (peroxisome proliferators - activated receptor - α , PPAR - α),通过改变蛋白的表达而发挥肝毒性作用。Cermelli 等^[20]利用 NAFLD 患者的血清研究发现,NASH 患者血清中的 miR - 122、miR - 34a 和 miR - 16 较 NAFLD 患者明显升高,由此提示这 3 个 miRNA 有可能是 NASH 的生物标志物。研究同时发现,miR - 122 和 miR - 34a 与肝脏的纤维化和炎症等过程的发生、发展密切相关。

Ahn 等^[21]在 C57BL/6 小鼠脂肪性肝炎模型中研究发现,miR - 467b 的表达明显低于正常对照组,提示 miR - 467b 的下调与脂肪性肝损伤有关,为脂肪性肝损伤的潜在生物标志物。另有研究显示,在高脂肪饮食、蛋氨酸胆碱缺乏饮食(methionine choline - deficient diet, MCDD)和 CCl₄ 腹腔给药诱导的大鼠肝脂肪性病变或慢性肝纤维化损伤模型中,miR - 449c、miR - 410 和 miR - 10b 也有成为预测混合性或慢性肝毒性的新型标志物的可能^[12]。Roderburg 等在不同品系小鼠中进行的系统性研究显示,miRNA29 家族(miR - 29a、miR - 29b 和 miR - 29c)与肝纤维化病变的关联性极大,并在临床肝纤维化患者的血清中得到了验证。有研究者提出,肝纤维化的过程可能与

肝星状细胞 (hepatic stellate cells, HSCs) 的激活有关, 同时, 该研究还显示 miR - 29 同时存在于肺纤维化和心脏纤维化的患者血清中, 因此, miR - 29 标志物的器官特异性有待进一步验证。Ji 等在大鼠肝星状细胞体外研究中, 检测到激活的 HSC 中存在 15 个差异 miRNA, 上调的是 miR - 130a、miR - 27b、miR - 455、miR - 30c、miR - 27a、miR - 450、miR - 130b、miR - 30a、miR - 30d 和 miR - 19b, 下调的是 miR - 9、miR - 721、miR - 301、miR - 520b 和 miR - 520c, 其中 miR - 27a 和 miR - 27b 的上调与 HSC 的激活密切相关。

二、问题与展望

国内外文献报道中, 多数是对癌症、肿瘤患者的外周血的 miRNA 标志物进行检测, 并已发现多种疾病特异性的血清 miRNA 生物标志物。miRNA 标志物能够在人体内得以确立及验证, 主要因为人体疾病有明确的诊断标准。相比较而言, miRNA 作为新型生物标志物在动物模型中的研究并不多, 主要因为在不同动物种属的疾病模型、不同药物诱导的疾病模型、甚至相同药物不同剂量诱导的疾病模型中, 都可能出现不同的 miRNA 变化。比如, 本实验室在 CCl₄ 诱导的肝细胞毒性模型中, 在给药后 24h 时间点, 检测到上调的 miRNA 20 个, 下调的 21 个, 其中仅有 miR - 664 与文献报道一致^[13]。因此, miRNA 标志物在动物中的研究, 还需要对动物模型种类、诱导模型的药物种类、诱导模型的药物剂量、甚至不同的样本采集时间点等因素进行归一化, 才能得到可靠的研究结果。

此外, 尽管已经建立包含小鼠、大鼠、狗、鸡、斑马鱼和恒河猴等试验动物的 miRNA 序列的数据库, 但是, 食蟹猴作为临床前研究中最重要和最广泛使用的非人灵长类实验动物之一, 还没有相应 miRNA 背景数据库, 这也是今后研究的重点方向。

目前, 笔者实验室正在采用二代测序技术, 对食蟹猴外周血中的 miRNA 以及肝毒性发生后的 miRNA 标志物进行研究, 期望能填补本领域的空白。鉴于经典酶学肝毒性标志物的局限性, 新型 miRNA 标志物研究受到关注并进展较快, 但特异性强、敏感度高的肝毒性 miRNA 标志物得到广泛验证并应用于临床诊断和临床前药物安全性评价领域仍需时日。

参考文献

1 EMEA. Non clinical guideline on drug induced hepatotoxicity [EB/OL]. [2008 - 08 - 30]. http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/

- document_library/Scientific_guideline/2009/09/WC500003355.pdf
- 2 Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function [J]. Cell, 2004, 116 (2): 281 - 297
- 3 Mitchell PS, Parkin RK, Kroh EM, *et al.* Circulating microRNAs as stable blood - based markers for cancer detection [J]. PNAS, 2008, 105 (30): 10513 - 10518
- 4 Kloosterman WP, Plasterk RH. The diverse functions of microRNAs in animal development and disease [J]. Dev Cell, 2006, 11: 441 - 450
- 5 Lu J, Getz G, Miska EA, *et al.* MicroRNA expression profiles classify human cancers [J]. Nature, 2005, 435: 834 - 838
- 6 Baltimore D, Boldin MP, O'Connell RM, *et al.* MicroRNAs: new regulators of immune cell development and function [J]. Nat Immunol, 2008, 9: 839 - 845
- 7 Lynn FC, Skewes - Cox P, Kosaka Y, *et al.* MicroRNA expression is required for pancreatic islet cell genesis in the mouse [J]. Diabetes, 2007, 56: 2938 - 2945
- 8 Latronico MV, Catalucci D, Condorelli G. Emerging role of microRNAs in cardiovascular biology [J]. Circulation Research, 2007, 101: 1225 - 1236
- 9 Benichou C. Criteria of drug - induced liver disorders. Report of an international consensus meeting [R]. Journal of Hepatology, 1990, 11: 272 - 276
- 10 Fukushima T, Hamada Y, Yamada H, *et al.* Changes of micro - RNA expression in rats liver treated by APAP or carbon tetrachloride - regulation role of micro - RNA for RNA expression [J]. Journal of Toxicological Sciences, 2007, 32 (4): 401 - 409
- 11 Wang K, Zhang S, Marzolf B, *et al.* Circulating microRNAs, potential biomarkers for drug - induced liver injury [J]. National Acad Sciences, 2009, 106: 4402 - 4407
- 12 Yamaura Y, Nakajima M, Takagi S, *et al.* Plasma microRNA profiles in rat models of hepatocellular injury, cholestasis, and steatosis [J]. PLoS One, 2012, 7 (2): e30250
- 13 Yang X, Greenhaw J, Shi Q, *et al.* Identification of urinary microRNA profiles in rats that may diagnose hepatotoxicity [J]. Toxicological Sciences, 2012, 125 (2): 335 - 344
- 14 Yang HP, Tony L, Peng J, *et al.* A mouse model of cholestasis - associated cholangiocarcinoma and transcription factors involved in progression [J]. Gastroenterology, 2011, 141 (1): 378 - 388
- 15 Song KH, Li T, Owsley E, *et al.* A putative role of microRNA in regulation of cholesterol 7alpha - hydroxylase expression in human hepatocytes [J]. Journal of Lipid Research, 2010, 51: 2223 - 2233
- 16 Allen RM, Marquart TJ, Albert CJ, *et al.* MiR - 33 controls the expression of biliary transporters, and mediates statin - and diet - induced hepatotoxicity [J]. EMBO Mol Med, 2012, 4: 882 - 895
- 17 de Aguiar Vallim TQ, Tarling EJ, Kim T, *et al.* MicroRNA - 144 regulates hepatic ATP binding cassette transporter A1 and plasma high - density lipoprotein after activation of the nuclear receptor farnesoid X receptor [J]. Circulation Research, 2013, 112: 1602 - 1612
- 18 Estep M, Armistead D, Hossain N, *et al.* Differential expression of miRNAs in the visceral adipose tissue of patients with non - alcoholic

- fatty liver disease [J]. *Aliment Pharmacol Ther*, 2010, 32:487 - 497
- 19 Zheng L, Lv GC, Sheng JF, *et al*. Effect of miRNA - 10b in regulating cellular steatosis level by targeting PPAR - α expression, a novel mechanism for the pathogenesis of NAFLD [J]. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 2010, 25:156 - 163
- 20 Cermelli S, Ruggieri A, Marrero JA, *et al*. Circulating microRNAs in patients with chronic hepatitis C and non - alcoholic fatty liver disease

- [J]. *PLoS One*, 2011, 6(8): e23937
- 21 Ahn JY, Lee HJ, Chung CH, *et al*. High fat diet induced downregulation of microRNA - 467b increased lipoprotein lipase in hepatic steatosis [J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2011, 414: 664 - 669

(收稿日期:2014 - 04 - 08)

(修回日期:2014 - 04 - 18)

淀粉样变心脏病的治疗进展

梁 峰 胡大一 沈珠军 范中杰

[中图分类号] R547

[文献标识码] A

淀粉样变性的病理包括多种蛋白质沉着于各个器官系统。英国 5100 例淀粉样变患者的主要分型比例为,免疫球蛋白轻链(AL)型占 67%、继发(AA)型占 12%、甲状腺素运载蛋白(ATTR)型占 6.6%、老年全身性淀粉样变性(野生型甲状腺素运载蛋白)(Senile)型占 3.3%,其他型包括纤维蛋白原和载脂蛋白突变产生的淀粉样变性,未定型占 4% 的病例。由于某些类型的检出率低(如老年全身性淀粉样变性),故以上数据并不能准确反映每种类型真实的发生率和比例。如果该种疾病不进行治疗,心脏明显受累患者的后果必然是死亡。影响淀粉样变心脏病预期寿命的主要因素包括淀粉样变的类型、全身受累的程度尤其是心脏受累程度。虽然淀粉样变心力衰竭的相关治疗一直无进展,但治疗淀粉样变的内在病理过程获得重大的进展^[1]。

利尿剂治疗心力衰竭需严密监测,袢利尿剂和保钾利尿剂(螺内酯或依普利酮)具有协同作用,但应严密监测低血压的风险。血管紧张素转换酶抑制剂(ACEI)、血管紧张素受体拮抗剂(ARB)、 β 受体阻滞剂和地高辛耐受性差。低血压可能需要弹力袜和血管加压素 α 受体激动剂米多君。现在仍无证据显示

胺碘酮或置入型除颤器能改善患者的生存率^[2]。由于淀粉样浸润导致心房机械功能障碍,所以心房常重度扩张,可能合并或不合并心房颤动,意味着有选择性华法林抗凝治疗。由心脏淀粉样变导致的心力衰竭总体治疗进展在过去文献中进行了详尽的描述和讨论^[3,4]。

一、免疫球蛋白轻链(AL)淀粉样变

美国每年 AL 淀粉样变新发病例 2000 例,就诊时年龄中位数为 55 ~ 60 岁。约一半患者心脏明显受累。受累的器官包括肾脏(通常表现为严重蛋白尿)、心脏、神经(周围和自主神经病变)、胃肠道(体重下降,胃肠运动紊乱)、肝脏(碱性磷酸酶升高而转氨酶正常,很少出现黄疸)。淀粉样浸润致毛细血管脆性增加,导致紫癜性皮肤病变合并轻微创伤紫癜和眶周紫癜。

AL 淀粉样变的预后取决于累及器官的数量和严重性,心脏受累预后最差,如果不治疗充血性心力衰竭发病后患者生存中位数约 6 个月。AL 心脏淀粉样变死亡的原因为进展性心力衰竭或猝死。猝死最常起因于心室骤停或电机械分离。

轻链型淀粉样变性,是由于免疫球蛋白轻链转化成纤维样淀粉基质并沉积。疾病进展的治疗和淀粉样蛋白的溶解现在得以实现。获得明显的疗效前可能需要几个月的治疗。

1. AL 淀粉样变治疗的简介:AL 淀粉样变疾病缓解治疗的变迁一直紧随着多发性骨髓瘤领域的进展,但通常是一种快速致命性疾病。治疗的关键是快速去除致淀粉样变的前体蛋白,由于免疫球蛋白轻链组

基金项目:北京市卫生系统高层次卫生技术人才培养项目(2009 - 3 - 68);首都医学发展科研基金资助项目(2009 - 3261)

作者单位:102600 首都医科大学大兴医院心内科(梁峰);100044 北京大学人民医院心脏中心(胡大一);100730 中国医学科学院北京协和医院心内科(沈珠军、范中杰)

通讯作者:范中杰,电子信箱:fanzhongjie@gmail.com