植物来源的磷脂酰胆碱可介导抗肺纤维化小RNA (HJT-sRNA-m7)进入哺乳动物细胞

杜润超^{1†}, 梁竹^{1†}, 许剑涛^{1†}, 赵妍¹, 李晓芸¹, 张艳丽¹, 赵丹丹¹, 陈茹萱^{1,2}, 刘洋^{3,4},
Trupti Joshi^{3,4}, 常佳慧¹, 王志清¹, 张延旭¹, 朱锦东¹, 刘强¹, 许东^{3,4}, 蒋澄宇^{1,5*}

1. 中国医学科学院&北京协和医学院基础医学院, 医学分子生物学国家重点实验室, 北京 100005;

2. 中国医学科学院&北京协和医学院, 北京协和医院内科, 北京 100730;

3. Department of Computer Science, Informatics Institute, and Christopher S. Bond Life Science Center, University of Missouri, Columbia, MO 65211, USA;

4. Department of Health Management and Informatics and Office of Medical Research, School of Medicine, University of Missouri, Columbia, MO 65212, USA;

5. 四川大学华西医院生物治疗国家重点实验室, 生物治疗协同创新中心, 成都 610000

† 同等贡献

* 联系人, E-mail: chengyujiang@gmail.com

收稿日期: 2017-10-12; 接受日期: 2017-11-06; 网络版发表日期: 2018-03-18

国家重点基础研究发展计划(批准号: 2015CB553406)、国家自然科学基金(批准号: 81230002, 81490531)和教育部创新团队项目(批准号: IRT1121, B08007)资助

摘要 肺纤维化是慢性进行性疾病, 死亡率高, 临床上除肺移植之外尚无其他明显有效治疗手段. 本研究发现, 来源于中药大花红景天(*Rhodiola crenulata*)的小RNA, HJT-sRNA-m7, 可以显著降低纤维化因子的表达, 在细胞和动物水平上均可改善纤维化症状. 此外, 本研究组在红景天熬制的汤汁中提取鉴定了一百多种脂质, 其中大部分脂质也同时存在于中药蒲公英(*Taraxacum mongolicum*)、穿心莲(*Andrographis paniculata*)和金银花(*lonicera japonica*)中. 选取其中两种磷脂酰胆碱PC(18:0/18:2)和PC(16:0/18:2), 使之与植物小RNA形成脂质体, 发现其可促进HJT-sRNA-m7等小RNA进入人肺和胃肠道细胞, 降低纤维化靶基因的表达. 实验结果揭示了植物来源小RNA通过脂质复合物进入人体的可能途径, 为siRNA的临床应用提供了新的口服递送途径.

关键词 磷脂, 细胞摄取, 抗纤维化, 红景天小RNA

肺纤维化(pulmonary fibrosis, PF)是严重危害生命的慢性弥漫性间质性肺疾病^[1], 可由多种病因引发, 如病毒感染、有毒有害物质的暴露(二氧化硅、石棉、

碳粉)及某些药物等, 此外还有一类不明病因的肺纤维化-特发性肺纤维化(idiopathic pulmonary fibrosis, IPF)^[2]. 该疾病的重要特征是肺内基质稳态的破坏和

引用格式: 杜润超, 梁竹, 许剑涛, 等. 植物来源的磷脂酰胆碱可介导抗肺纤维化小RNA (HJT-sRNA-m7)进入哺乳动物细胞. 中国科学: 生命科学, 2018, 48: 469–481, doi: [10.1360/N052017-00216](https://doi.org/10.1360/N052017-00216)

英文版见: Du J, Liang Z, Xu J, et al. Plant-derived phosphocholine facilitates cellular uptake of anti-pulmonary fibrotic HJT-sRNA-m7. Sci China Life Sci, 2018, 61, in press, <https://doi.org/10.1007/s11427-017-9026-7>

肺组织结构的重塑, 肺泡上皮细胞和血管内皮细胞受损, 释放细胞因子, 促进成纤维细胞增殖并分化成肌成纤维细胞, 致细胞外基质蛋白和胶原沉积, 最终引起肺结构的损害^[2,3]。细胞因子(如TGF β)在肺纤维化的发生和发展中扮演着重要角色^[4]。随着对肺纤维化发病分子机制研究的不断深入, 已经发现并确认多种抗肺纤维化的新药物靶点, 但疗效甚微, 肺移植仍然是唯一明显有效的治疗手段^[5]。

最近研究发现, 植物来源的小RNA (small RNAs) 可以通过口服, 从植物转移到动物, 进而调控动物体内基因的表达, 即小RNA在植物界和动物界之间可以实现“基因跨物种调控”(cross-kingdom gene regulation)。张辰宇等人^[6]发现, 稻米中的微小核酸miR-168a可以通过日常食物摄取的方式进入体内, 调控低密度脂蛋白受体衔接蛋白1 (low density lipoprotein receptor adapter protein 1, LDLRAP1)的mRNA, 从而抑制其在肝脏中的表达。上述研究成果发表至今, 国际上陆续发表了十余篇重复实验和相关研究。部分重复实验的结果表明其测出的植物miRNA可能是污染^[7]。但是另一些实验结果证实了跨界基因调控的现象, 在哺乳动物中发现更多植物小RNA, 其中金银花来源的miR-2911可以靶向甲型流感病毒, 具有抗病毒的效果^[8], 此外人体血浆中还发现细菌、真菌等来源的小RNA^[9~12]。上述研究结果表明, 外源小RNA可能会通过调控人体靶基因表达的方式影响人体的生理功能, 进而发挥生物学作用。随着对肺纤维化治疗手段以及microRNA的深入研究, Cushing等人^[13]和Ji等人^[14]发现miR-29与miR-486-5p具有很好的抗肺纤维化效果。

红景天系景天科(*Crassulaceae*)红景天属(*Rhodiola* L.)植物, 生长于海拔超过800~3000 m的高原高寒地带, 如西藏。最早记载于约2000年前前的《神农本草经》, 用于抗衰老。希腊的《药物志》(*De Materia Medica*)对其也有记载。最近, 杨洁^[15]的临床研究发现红景天注射液可以改善肺纤维化患者的症状。因此, 本实验旨在探究中药红景天中具有抗肺纤维化效应的小RNA, 进而研究其发挥作用的机制。

1 材料与方法

1.1 细胞及培养

人胚肺成纤维细胞系(MRC-5)、人非小细胞肺癌

细胞系(A549)、人胚肾细胞系(HEK293T)以及人胃癌细胞系(NCI-N87)均购自中国医学科学院基础医学研究所细胞资源中心; MRC-5细胞用MEM培养基(Gibco公司, 美国)培养, A549细胞用Ham's F-12培养基(HyClone公司, 美国)培养, HEK-293T细胞用DMEM培养基(Gibco公司)培养, NCI-N87细胞用RPMI-1640培养基(HyClone公司)培养; 培养基使用前加入胎牛血清(浓度10%) (FBS, Gibco公司)、青霉素(100 U/mL)和链霉素(100 μ g/mL); 细胞均培养于37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂培养箱中。

1.2 主要仪器与试剂

真空旋转蒸发仪(SY-5000, 上海亚荣生化仪器厂); 戴安UltiMateTM 3000高效液相色谱仪; Orbitrap Elite组合式质谱仪(Thermo Fisher Scientific, 美国); Kinetex C18 液相色谱柱(100 mm $\times$ 2.1 mm, 1.9 μ m, Phenomenex, 美国)。

细胞实验所用的HJT-sRNA-1~8模拟物及阴性对照(negative control)和动物实验使用的胆固醇修饰的HJT-sRNA-m7 (HJT-sRNA-m7 agomir)及阴性对照(agomiR-NC), 均购自广州市锐博生物科技有限公司; miRNA提取试剂盒(miRNeasy Mini Kit)购于QIAGEN (德国); RNA提取试剂TRIzol和转染试剂Lipofectamine 2000, Lipofectamine RNAimax均购于Invitrogen (美国); 逆转录试剂盒(High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit)购自Applied Biosystems (美国); TaqMan探针及引物购于Invitrogen; LightCycler 480 SYBR Green购自Roche (瑞士); BCA试剂盒购自天根生化科技有限公司(北京); 双荧光素酶报告基因载体psiCHECK-2和双荧光素酶报告基因检测试剂盒均购自Promega公司(美国); 野生型和突变型双荧光素酶报告基因质粒由生工生物工程股份有限公司(上海)合成; 人重组TGF- β 1蛋白购自Pepro Tech公司(苏州); 注射用盐酸博莱霉素购自日本株式会社(日本); 马松染色试剂盒和免疫组化试剂盒均购自武汉赛维尔生物科技有限公司; PC (18:0/18:2), #850468C和PC (16:0/18:2), #850458C购自Avanti Polar Lipids公司(美国); 大豆磷脂购自上海太伟药业有限公司。

1.3 红景天

大花红景天(HJT, *Rhodiola crenulata*)购于宁波海

曙千草生物科技有限公司; 红景天苷(成都圣露药业, A0076); 红景天素(维克奇生物科技, 85571-15-9); 络赛琳(维克奇生物科技, 84954-93-8); 络塞维(成都圣露药业, A0078).

红景天煎煮的方法: 将大花红景天饮片(根)于1 L 双蒸水中浸泡30 min后, 煮沸35 min得到400 mL汤汁, 经15~20 μm 滤膜过滤. 所得滤液经真空旋转蒸发仪于60 r/min, 60℃水浴条件下旋转蒸发浓缩30 min, 至终体积100 mL.

1.4 高通量测序及生物信息学分析

红景天小RNA使用试剂盒miRNeasy Mini Kit提取, 小鼠(*Mus musculus*)总RNA使用TRIzol裂解液提取. 红景天和小鼠肺组织小RNA测序使用Illumina Hi-Seq2500平台测序, 36SE, 由北京贝瑞和康生物技术股份有限公司完成; 生物信息学分析测序结果, 首先使用“cutadapt”工具去除接头序列, 然后去除长度小于18 nt的序列, 将小鼠肺组织的测序结果与小鼠基因组比对, 去除比对上的序列后再与红景天小RNA序列比对, 选出可能进入小鼠肺的红景天小RNA, 然后计算小鼠灌胃红景天12, 24, 48 h后肺组织中红景天小RNA的丰度, 筛选出丰度排名前8的序列HJT-sRNA-m1~m8 (表1), 所有的比对过程均使用BLAST的“blastall”工具, 其中 $e < 0.001$.

1.5 实时荧光定量PCR (qRT-PCR)

实时荧光定量PCR检测mRNA表达水平, 用裂解液TRIzol提取总RNA, 1.5 μg 总RNA根据逆转录试剂盒的方法反转录为cDNA后进行实时荧光定量PCR反

应, *UBC*作为内参基因, 基因引物序列见网络版附表1; 茎环法实时荧光定量PCR (SYBR Green染料法)检测小RNA表达水平, *U6*作为内参基因, 茎环法引物序列见网络版附表1; 实时荧光定量PCR (TaqMan探针法)检测小RNA表达水平, 用TRIzol提取总RNA, 使用Taq-Man microRNA逆转录试剂盒逆转录为cDNA, *U6*作为内参; 采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算目标mRNA和小RNA的相对表达量.

1.6 蛋白质免疫印迹

细胞经RIPA裂解液(50 mmol/L Tris-HCl, pH 7.5, 150 mmol/L NaCl, 1.0% Triton X-100, 20 mmol/L EDTA, 1 mmol/L Na_3VO_4 , 1 mmol/L NaF, 100 $\times$ 蛋白酶抑制剂cocktail)裂解, 4℃, 13523 $\times$ g离心15 min, 取上清, BCA法检测蛋白浓度. 蛋白质样品通过SDS-PAGE聚丙烯酰胺凝胶电泳分离后, 湿转(300 mA恒流, 120 min), 转膜后取出PVDF膜置于封闭液(3% BSA), 室温封闭1 h, 加入相应的一抗. α -SMA抗体(#ab7817)购自Abcam公司(美国), fibronectin抗体(#F7387)购自Sigma Aldrich公司(美国), GAPDH抗体(#Mab5465)购自杭州联科生物技术有限公司. 4℃孵育过夜后, 加入辣根过氧化物酶标记二抗孵育, ECL检测试剂盒显影, 凝胶成像系统照相, Image J软件分析灰度值, 对各组蛋白表达差异进行分析.

1.7 生物信息学预测靶基因

使用RNAhybrid软件预测HJT-sRNA-m7潜在的靶基因, 其中最小结合能(MFE)低于-20 kcal/mol, 选择MFE最低的前3个结合位点进一步验证. 预测基因为

表1 小鼠肺中的红景天序列及其丰度值^{a)}

No	Name	Sequence (5'→3')	Length	mouse-12 h	mouse-24 h	mouse-48 h
1	HJT-sRNA-m1	UGUCUCGUACCGUGAGUAAUAAUGCG	26	340150	355850	1935284
2	HJT-sRNA-m2	GCUGAGAUGAAGCACUGUAGCUC	23	297722	395950	1675941
3	HJT-sRNA-m3	GUUAUUCAGUAAUCCAGGAUAGGCU	26	249784	368065	1517784
4	HJT-sRNA-m4	UCUGAGGUAGUAGGUUGUAUGGUUUAU	26	280317	310220	1481979
5	HJT-sRNA-m5	GUAUGUAAACAUCUCGACUGGAAGCU	27	182211	214662	1153613
6	HJT-sRNA-m6	GUUAUGAGGUAGUAGAUUGUAUAGU	25	181290	225631	1089623
7	HJT-sRNA-m7	UGAGGUAGUAGGUUGUGUGGUUGUAAGC	28	193719	186923	1042201
8	HJT-sRNA-m8	GACGGUCGUACCGUGAGUAAUAAUGCGA	28	158447	194570	1027960

a) 按照小鼠肺中小RNA的丰度排名前8的序列

TGF- β 激活的Smad信号通路相关基因, 其3'-UTR序列下载自UCSC数据库。

1.8 双荧光素酶报告基因验证HJT-sRNA-m7靶基因

HEK293T细胞经胰酶消化后加入48孔板培养24 h后, 使用转染试剂Lipofectamine RNAimax瞬时转染HJT-sRNA-m7模拟物和阴性对照(终浓度100 nmol/L), 24 h后使用转染试剂Lipofectamine 2000每孔转染300 ng野生型psiCHECK2-3'-UTR及突变型psiCHECK2-3'-mUTR质粒, 转染后8, 14或24 h按照双荧光素酶报告基因检测试剂盒步骤收取细胞样品检测表达量。

1.9 实验动物及分组

所有动物实验过程都通过了中国医学科学院&北京协和医学院基础医学院动物管理委员会批准。8周龄雄性C57BL/6J小鼠购自并饲养于中国医学科学院基础医学研究所实验动物中心。自由进食、饮水, 饲养1周后开始实验。

测序实验小鼠分组, 分为3组, 每组3只, 连续灌胃3天红景天, 每天1次, 300 μ L/次, 最后一次灌胃结束后的12, 24和48 h收取小鼠全肺并用TRIzol法提取总RNA, 进行小RNA测序。

肺纤维化模型的构建、分组及给药: 随机将C57BL/6J小鼠分为4组, 分别为生理盐水组3只, 博来霉素组10只, 博来霉素+agomiR-NC组10只, 博来霉素+HJT-sRNA-m7组10只, 采用气管滴注博来霉素(3.5 U/kg)诱导小鼠肺纤维化, 博来霉素+agomiR-NC组和博来霉素+HJT-sRNA-m7组给予8 mg/kg agomiR-NC或HJT-sRNA-m7 agomir, 对照组给予生理盐水, 体积均为100 μ L, 各组均于21天后处死并收集待测样本。

1.10 肺组织羟脯氨酸含量的测定

取右肺组织经冷冻干燥仪至恒重, 称重后于6 mol/L盐酸中剪碎、匀浆, 120 $^{\circ}$ C裂解3 h后, 按照羟脯氨酸检测试剂盒说明书测定羟脯氨酸含量。

1.11 H&E染色及马松染色

各组取左肺组织, 4%多聚甲醛固定24 h, 梯度乙醇脱水, 石蜡包埋, 4 μ m切片, 按说明进行HE染色及马松

染色, 高倍镜下观察肺组织细胞结构及间质纤维组织胶原蛋白沉积。

1.12 免疫组织化学

小鼠肺组织石蜡切片常规置于二甲苯、梯度酒精中脱蜡、水化, 然后用抗原修复液修复, 随后于3%过氧化氢溶液(稀释于10%磷酸缓冲盐溶液(phosphate buffer saline, PBS))浸泡15 min消除内源性过氧化物酶活性, 然后用5%羊血清在室温下封闭10 min, 随后4 $^{\circ}$ C孵育一抗(fibronectin抗体(ab2413), COL3A1抗体(ab7778)以及 α -SMA抗体(ab7817)均购自Abcam)过夜, 剩余操作按照免疫组化试剂盒操作。

1.13 脂质提取及高效液相色谱-二级质谱连用技术

采用Bligh&Dyer法提取红景天熬煮汤汁中的脂质^[16], 高效液相色谱-二级质谱连用分析由上海敏芯信息科技有限公司完成。色谱条件: 柱温为45 $^{\circ}$ C; 流速0.4 mL/min; 二元梯度洗脱, 70%流动相A 2 min; 线性增加至少20 min至100%流动相B; 100% B 2 min; 70% A 5 min; 进样量4 μ L; 阴离子模式质谱条件: 源喷射电压为3.0 kV; 加热毛细管温度300 $^{\circ}$ C; 鞘气流速为45 Arb; 辅助气流速为15 Arb; 扫气流速为1 Arb; s-lens RF水平 30%; 扫描范围 m/z 200~1500; 正离子模式质谱条件: 源喷射电压为2.5 kV; 加热毛细管温度350 $^{\circ}$ C; 鞘气流速为45 Arb; 辅助气流速为10 Arb; 扫气流速为1 Arb; s-lens RF水平60%; 扫描范围 m/z 200~1500; 分析软件: Thermo SIEVE 2.1 Qualitative分析软件(Thermo Fisher Scientific, 美国)和SIMCA-P+13.0 (Umetrics, 瑞典)。

1.14 脂质体制备

大豆磷脂, PC(18:0/18:2)和PC(16:0/18:2)的乙醚溶液, 终浓度分别为3.75, 12.5和12.5 μ g/mL, 按磷脂乙醚溶液:RNA溶液=5:1 (V/V)加入RNA溶液, 混匀后超声3 min, 于55 $^{\circ}$ C挥发除去乙醚, 然后水化得到脂质体溶液。

1.15 荧光原位杂交

HJT-sRNA-m7荧光原位杂交采用的5'-Cy3标记DNA探针序列如下: 5'-GCTTACAACCACACAACC-

TACTACCTCA-3'; 对照探针: 5'-CAGTACTTTTGTG-TAGTACAA-3'; U6探针: 5'-TTTGCGTGTCAT-CCTTGCG-3'; 荧光原位杂交方法参见文献^[17]. 具体实验步骤: 实验分为4组, 分别是未经处理的A549细胞、HJT-sRNA-m7自由摄取组、PC(18: 0/18: 2)或PC(16: 0/18: 2)脂质体对照组、PC(18: 0/18: 2)或PC(16: 0/18: 2)-HJT-sRNA-m7脂质体组, 其中HJT-sRNA-m7的终浓度为200 nmol/L, A549经处理3 h后, PBS洗3次, 4%多聚甲醛固定20 min, 用含蛋白酶K的PK缓冲液(0.5 mol/L EDTA, 1 mol/L Tris-HCl pH 7.4~7.5, 20 mg/mL 蛋白酶K)透化10 min后, PBS洗3次, 0.1 mol/L TEA浸泡10 min, PBS缓冲液洗去. 加入杂交缓冲液(50%甲酰胺, 5×SSC, 5×Denharts'溶液, 250 μg/mL酵母RNA, 500 μg/mL鲑鱼精子DNA)于杂交盒中室温预杂交1 h以上, 去除后加入杂交溶液(1 nmol/L DNA探针) 40℃孵育过夜, 之后用40℃的5×SSC浸泡20 min后, 然后用40℃ 0.2×SSC洗涤3次, 每次20 min, 0.2×SSC室温洗涤5 min, 然后用B1缓冲液(0.1 mol/L Tris-HCl, pH 7.4~7.5, 150 mmol/L NaCl)洗涤2次, 每次5 min, 最后用PBS洗涤3次, 滴加Prolong Diamond Antifade Mountant with DAPI (Invitrogen, 美国)后封片, 使用ZEISS LSM780显微镜观察.

1.16 统计学分析

定量结果以 $\bar{x} \pm SE$ 形式出示. 两组之间参数比较用非配对 t 检验. 统计学数据用GraphPad Prism5软件分析. $P < 0.05$ 被认为有统计学意义.

2 结果

2.1 HJT-sRNA-m7明显改善TGF- β_1 诱导的MRC-5细胞纤维化

通过对红景天和灌胃红景天的小鼠肺组织小RNA测序结果的生物信息学分析, 去除与小鼠基因组比对上的序列后, 得到小鼠肺组织中的红景天来源的小RNA序列, 并按照小鼠肺组织中红景天小RNA的丰度进行排序, 合成了丰度最高的前8条小RNA, 序列见表1. 首先构建了TGF- β_1 诱导MRC-5细胞纤维化的模型, 筛选具有抗肺纤维化效应的红景天小RNA. 其中, 给予HJT-sRNA-m7后, α -平滑肌肌动蛋白(α -SMA)、纤连蛋白(fibronectin)和I型胶原(COL1A1) mRNA表

达显著下降($P < 0.01$), 同时 α -SMA和fibronectin的蛋白水平显著降低($P < 0.01$) (图1, 网络版附图1). 而且与对照组相比, α -SMA和fibronectin的mRNA和蛋白水平呈剂量梯度下降($P < 0.01$) (网络版附图2). 结果表明, HJT-sRNA-m7可以明显改善TGF- β_1 诱导的MRC-5细胞的纤维化.

2.2 HJT-sRNA-m7靶基因为 α -SMA, fibronectin和COL3A1

为了阐明HJT-sRNA-m7抗肺纤维化作用的分子机制, 通过RNAhybrid预测其靶基因, $MFE < -20$ kcal/mol, HJT-sRNA-m7与预测靶基因(α -SMA, fibronectin, COL1A1, COL3A1, SMAD4和TGF- β) 3'-UTR潜在的结合位点见网络版附表1. 本课题组构建了预测的靶基因3'-UTR结合序列的双荧光素酶报告基因载体, 双荧光素酶活性实验结果表明, HJT-sRNA-m7能直接靶向作用于 α -SMA, fibronectin和COL3A1 (图2和网络版附图3).

2.3 HJT-sRNA-m7缓解博来霉素诱导的小鼠肺纤维化

进一步使用HJT-sRNA-m7模拟物(HJT-sRNA-m7 agomir)干预博来霉素(bleomycin)诱导的小鼠肺纤维化. 选取博来霉素处理后21天作为肺纤维化干涉观测终点. 结果见图3, 包括肺组织羟脯氨酸含量, 病理切片H&E染色, Masson染色及 α -SMA, fibronectin和COL3A1免疫组织化学结果. 结果表明, HJT-sRNA-m7干预组小鼠肺组织较Ctrl组羟脯氨酸含量显著下降. H&E染色结果显示, HJT-sRNA-m7干预组纤维化面积明显减少, 且病变较轻. Masson染色结果显示, HJT-sRNA-m7干预组胶原沉积明显减少. α -SMA, fibronectin和COL3A1免疫组织化学结果显示, HJT-sRNA-m7干预组表达水平显著降低. 以上结果均提示, HJT-sRNA-m7可减轻博来霉素诱导的小鼠肺纤维化.

2.4 植物来源的磷脂介导HJT-sRNA-m7进入人体细胞

发现HJT-sRNA-m7在体外和体内水平均具有明显的抗肺纤维化作用后, 试图研究外源性植物来源的小RNA如何通过口服方式进入哺乳动物细胞. 目前有效递送核酸的方式之一是通过脂质体包裹^[18]. 因此,

图 1 在TGF- β 1诱导的MRC-5肺纤维化细胞模型上筛选具有抗纤维化效应的红景天小RNA (网络版彩图)

转染MRC-5细胞100 nmol/L红景天小RNA HJT-sRNA-1~8模拟物或模拟物对照(negative control) 48 h后, 给予3 ng/mL的TGF- β 1刺激, 48 h后收取细胞样品进行RT-qPCR及Western blot检测分析。A和B: 利用RT-qPCR技术检测MRC-5细胞中纤维化因子 α -SMA (A)和fibronectin (B)的mRNA相对表达水平; C: Western blot检测MRC-5细胞中纤维化因子 α -SMA和fibronectin的蛋白表达水平; D和E: 纤维化因子 α -SMA (D)和fibronectin (E)相对于内参GAPDH的相对灰度值。与对照组相比, *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$ 。定量结果以 $\bar{x} \pm SE$ 形式出示。数据来自3次独立重复实验。两组之间参数比较用非配对 t 检验

猜想植物的脂质成分可能与其小RNA形成脂质体。将中草药熬煮成汤汁服用的传统方式一直延续至今, 患者通常服用汤汁治疗疾病。所以, 假设在汤汁的熬煮过程中植物的脂质可能与溶出的小RNA形成脂质体, 介导小RNA进入细胞发挥跨物种基因调控功能。本课题组提取分离了红景天熬煮汤汁中的脂质, 通过高效液相色谱-质谱连用法(HPLC-MS/MS), 鉴定出一百多种脂质(图4、网络版附表2和附表3)。LaManna等人^[19]和Pierrat等人^[20]发现, 磷脂可以介导核酸进入细胞。因

此, 从中草药汤汁中鉴定出的脂质里选择了两种磷脂, PC(18:0/18:2)和PC(16:0/18:2)制备脂质体, 介导HJT-sRNA-m7进入细胞, 磷脂名称及结构见图4。将上述人工制备的HJT-sRNA-m7脂质体加入细胞, 然后使用多种Q-PCR技术检测HJT-sRNA-m7的表达量。实验结果表明, 中草药来源的PC(18:0/18:2)和PC(16:0/18:2)以及大豆磷脂制备的脂质体均可介导HJT-sRNA-m7进入人胃肠道细胞NCI-N87, 人胚肺成纤维细胞MRC-5和人非小细胞肺癌细胞A549 (图4和网络版附图4)。此

图2 HJT-sRNA-m7靶基因是 α -SMA, fibronectin和COL3A1 (网络版彩图)

转染HEK293T细胞HJT-sRNA-m7模拟物或模拟物对照(negative control) 24 h后, 转染含有 α -SMA (A), fibronectin (B)和COL3A1 (C) 3'-UTR野生型或突变型片段的psiCHECK-2质粒, 12 h后检测荧光素酶活性, 所有的海肾荧光素酶活性与萤火虫荧光素酶活性相比较。数据表示为 $\bar{x} \pm \text{SE}$ 。与对照和野生型质粒组相比较, *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$ 。数据来自3次独立重复实验

外, 双荧光素酶活性实验结果显示, PC(18:0/18:2)和PC(16:0/18:2)递送的HJT-sRNA-m7可以降低COL3A1野生型质粒组中荧光素酶活性水平, 而不影响突变型的活性(图4), 表明HJT-sRNA-m7进入人体细胞且调控基因表达。

2.5 植物来源的磷脂介导的HJT-sRNA-m7在细胞中的定位

本课题组进而通过原位杂交实验观测HJT-sRNA-m7进入细胞的情况。实验结果显示, PC(18:0/18:2)和PC(16:0/18:2)制备的HJT-sRNA-m7脂质体可以将其递送至细胞中, 主要定位在细胞质, 而非细胞核(图5)。

2.6 PC(18:0/18:2)和PC(16:0/18:2)可介导多种小RNA进入人体细胞

本课题组同时合成了其他植物来源的小RNA, sly-miR168b, Pab-miR3711, CXL-sRNA-17和PGY-sRNA-6, 序列见网络版附表5。结果显示, PC(18:0/18:2)和PC(16:0/18:2)制备的脂质体均可将上述小RNA递送至人胃肠道细胞NCI-N87, 人胚肺成纤维细胞MRC-5和人非小细胞肺癌细胞A549中(图6、网络版附图5, 附图6和附表4)。综上, 本研究表明, 植物来源的两种磷脂酰胆碱PC(18:0/18:2)和PC(16:0/18:2)可能与小RNA形成脂质体介导其进入细胞, 为外源性植物RNA进入人体, 调控人体基因表达提供了一种可能的方式。

图3 HJT-sRNA-m7缓解博来霉素诱导的肺纤维化

给予C57BL/6J小鼠气管注射100 μL生理盐水($n=3$)、博来霉素(BLM, 3.5 U/kg) ($n=10$)或同时给予博来霉素和8 mg/kg agomir-NC ($n=10$)以及博来霉素和8 mg/kg HJT-sRNA-m7 agomir ($n=10$), 第21天收取小鼠肺组织样品。A: 小鼠右肺中羟脯氨酸的含量; B: H&E染色代表图, 标尺, 100 μm; C: 马松三色法染色和α-SMA, fibronectin, COL3A1免疫组织化学染色代表图, 标尺, 100 μm; D: 马松三色法染色及α-SMA, fibronectin, COL3A1免疫组织化学染色图片经Image J软件定量分析结果。与BLM-agomir-NC组相比较, *: $P<0.05$; **: $P<0.01$ 。数据表示为 $\bar{x}\pm SE$

图 4 植物来源的磷脂促进HJT-sRNA-m7进入人体细胞(网络版彩图)

A: HPLC-MS/MS鉴定出的红景天汤汁提取脂质中的13类脂质。TG: 甘油三酯; MGDG: 单半乳糖甘油二酯; DG: 甘油二酯; Cer: 神经酰胺; So: 鞘氨醇; PE: 磷脂酰乙醇胺; dmePE: 二甲基磷脂酰乙醇胺; LPC: 溶血卵磷脂; PC: 磷脂酰胆碱; Pet: 磷脂酰乙醇; MG: 单酰基甘油; PAF: 血小板活化因子; FA: 脂肪酸; B: 磷脂酰胆碱PC(18:0/18:2)和PC(16:0/18:2)的名称及结构; C和D: 分别用转染试剂Lipofectamine RNAiMAX、大豆磷脂、PC(18:0/18:2)和PC(16:0/18:2)介导HJT-sRNA-m7进入A549细胞, 终浓度为200 nmol/L, 3 h后通过RT-qPCR SYBR Green染料法(C)和TaqMan探针法(D)检测A549细胞中HJT-sRNA-m7相对于U6的表达量; E: 数字化微滴PCR检测A549细胞中HJT-sRNA-m7的表达量; F: 用转染试剂Lipofectamine RNAimax, PC(18:0/18:2)和PC(16:0/18:2)介导HJT-sRNA-m7模拟物进入HEK293T细胞, 终浓度为400 nmol/L, 6 h后转染含有COL3A1 3'-UTR野生型或突变型片段的psiCHECK-2质粒, 16 h后检测荧光素酶活性, 所有的海肾荧光素酶活性与萤火虫荧光素酶活性相比较。数据表示为 $\bar{x} \pm \text{SE}$ 。*: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$ 。数据来自3次独立重复实验

图 5 HJT-sRNA-m7在A549细胞中的定位

A和B: 荧光原位杂交实验(FISH)检测A549细胞, 直接加入HJT-sRNA-7的A549细胞或加入磷脂PC(18:0/18:2) (A)或磷脂PC(16:0/18:2) (B)与HJT-sRNA-7的脂质体混合液的A549细胞中HJT-sRNA-7的定位. DAPI核染色为蓝色, Cy3标记的HJT-sRNA-7 DNA探针显示为红色

3 讨论

综上所述, 在TGF- β_1 诱导的MRC-5细胞纤维化模型上对红景天的主要化学成分进行抗肺纤维化功能筛

选. 由于并未发现红景天中主要化学成分具有显著抗纤维化的作用(网络版附图7), 因此从红景天的根部提取小RNA进行后续研究(网络版附图7). 首先, 对灌胃

图 6 植物来源的磷脂介导多种植物的小RNA进入MRC-5细胞(网络版彩图)

A~D: 使用大豆磷脂、磷脂PC(18:0/18:2)以及磷脂PC(16:0/18:2)分别介导不同植物来源小RNA sly-miR168b-5p (A), Pab-miR3711 (B), CXL-sRNA-17 (C)和PGY-sRNA-6 (D) 进入MRC-5细胞, 终浓度为200 nmol/L, 3 h后收取样品, 通过RT-qPCR检测细胞内其相对于U6的表达量. 数据表示为 $\bar{x} \pm \text{SE}$. *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$. 数据来自3次独立重复实验

给红景天RNA的小鼠肺组织进行高通量测序, 人工合成小鼠肺中发现的丰度最高的8条红景天来源小RNA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-sRNA-m7是其中抗纤维化功能最显著的小RNA (表1). 后续研究表明, HJT-sRNA-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具有较好的疗效. 此外, 在包括红景天在内的4种中药汤剂中共发现138种脂质成分, 并证实其中的2种sn-甘油-3-磷脂酰胆碱可以有效促进HJT-sRNA-m7等不同来源的不同序列小RNA进入人体肺和胃肠道细胞. 该研究成果揭示了植物来源脂质可促进小RNA进入人体细胞的新途径.

传统的中药服用方式是将中草药(包括茎、根、

树皮等)用水煎煮, 使其化学成分溶出. 患者服用汤汁以减轻其病症. 由于中药汤剂中的大多数成分均是水溶性的, 因此植物小RNA在煎煮过程中自然溶于其中(图7E). 虽然汤剂来源的小RNA片段长度与microRNA相似, 仍需通过进一步的研究来确定这些小RNA是microRNA还是降解产生的RNA片段.

由于天然核酸递送效率可能不高, 且合成的单链RNA在细胞中可能不稳定, 利用Lipofectamine RNAi-max转染人工合成的双链RNA来研究红景天来源小RNA的功能. 后续实验需进一步研究被人体吸收的植物来源RNA存在的真实稳定状态.

核酸的有效递送是核酸药物治疗研究的关键, 也是新兴的核酸靶向治疗策略需要克服的关键技术问题. 目前核酸的主要递送方式是静脉注射, 消化道的生理屏障使得口服核酸进行治疗的途径难以实施^[21]. 出

乎意外地, 在中药汤剂中发现了100多种脂溶性成分, HPLC-MS/MS分析结果表明, 汤剂中提取的大部分脂质同时存在于红景天、穿心莲、蒲公英和金银花中(网络版附表2和附表3, 图4)。本实验结果表明, 进入人体消化道的脂质复合物可能促进了小RNA的吸收并使之随血液递送至其他组织器官。仍需进一步探究中药汤剂中脂质存在的天然形式, 为后续研究和大量制备提供依据。虽然实验中利用植物来源磷脂酰胆碱制备的脂质体和单链RNA都是人工合成与制备的, 但该结果提供了一种更便捷, 患者顺应性更高的口服递送

核酸药物的途径。

相较于转染试剂Lipofectamine RNAimax, PC(18:0/18:2)和PC(16:0/18:2)体外递送效率并不高, 这表明在天然的体内递送过程中, 可能存在其他形式, 也可能有更多的其他种类脂质参与其中。后续实验需进一步探究更多促进核酸吸收的其他植物来源脂质。综上所述, 本研究将开辟新的研究领域, 不仅从天然草药中筛选并鉴定出可靶向人体基因的小RNA药物, 而且发现了一种天然存在的, 可能更便捷有效的核酸口服递送途径。

致谢 感谢中国医学科学院&北京协和医学院基础医学院彭小忠教授和舒鹏程助理研究员在荧光原位杂交实验中给予的帮助。

参考文献

- 1 Selman M, King Jr. T E, Pardo A. Idiopathic pulmonary fibrosis: prevailing and evolving hypotheses about its pathogenesis and implications for therapy. *Ann Intern Med*, 2001, 134: 136–151
- 2 Gross T J, Hunninghake G W. Idiopathic pulmonary fibrosis. *N Engl J Med*, 2001, 345: 517–525
- 3 Kuhn Iii C, Boldt J, King Jr. T E, et al. An immunohistochemical study of architectural remodeling and connective tissue synthesis in pulmonary fibrosis. *Am Rev Respir Dis*, 1989, 140: 1693–1703
- 4 Scotton C J, Chambers R C. Molecular targets in pulmonary fibrosis. *Chest*, 2007, 132: 1311–1321
- 5 Urban P, Meredith I T, Abizaid A, et al. Polymer-free drug-coated coronary stents in patients at high bleeding risk. *N Engl J Med*, 2015, 373: 2038–2047
- 6 Zhang L, Hou D, Chen X, et al. Exogenous plant MIR168a specifically targets mammalian LDLRAP1: evidence of cross-kingdom regulation by microRNA. *Cell Res*, 2012, 22: 107–126
- 7 Dickinson B, Zhang Y, Petrick J S, et al. Lack of detectable oral bioavailability of plant microRNAs after feeding in mice. *Nat Biotechnol*, 2013, 31: 965–967
- 8 Zhou Z, Li X, Liu J, et al. Honeysuckle-encoded atypical microRNA2911 directly targets influenza A viruses. *Cell Res*, 2015, 25: 39–49
- 9 Beatty M, Guduric-Fuchs J, Brown E, et al. Small RNAs from plants, bacteria and fungi within the order Hypocreales are ubiquitous in human plasma. *BMC Genomics*, 2014, 15: 933
- 10 Liang G F, Zhu Y L, Sun B, et al. Assessing the survival of exogenous plant microRNA in mice. *Food Sci Nutr*, 2014, 2: 380–388
- 11 Liang H, Zhang S, Fu Z, et al. Effective detection and quantification of dietetically absorbed plant microRNAs in human plasma. *J Nutr Biochem*, 2015, 26: 505–512
- 12 Yang J, Hotz T, Broadnax L C, et al. Anomalous uptake and circulatory characteristics of the plant-based small RNA MIR2911. *Sci Rep*, 2016, 6: 26834
- 13 Cushing L, Kuang P P, Qian J, et al. miR-29 is a major regulator of genes associated with pulmonary fibrosis. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2011, 45: 287–294
- 14 Ji X, Wu B, Fan J, et al. The anti-fibrotic effects and mechanisms of microRNA-486-5p in pulmonary fibrosis. *Sci Rep*, 2015, 5: 14131
- 15 杨洁. 大株红景天注射液治疗特发性肺纤维化的临床研究. *中医临床研究*, 2014, 6: 8–9
- 16 Bligh E G, Dyer W J. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Physiol*, 1959, 37: 911–917
- 17 Silaharoglu A N, Nolting D, Dyrskjot L, et al. Detection of microRNAs in frozen tissue sections by fluorescence *in situ* hybridization using

- locked nucleic acid probes and tyramide signal amplification. [Nat Protoc](#), 2007, 2: 2520–2528
- 18 Kesharwani P, Gajbhiye V, Jain N K. A review of nanocarriers for the delivery of small interfering RNA. [Biomaterials](#), 2012, 33: 7138–7150
- 19 LaManna C M, Lusic H, Camplo M, et al. Charge-reversal lipids, peptide-based lipids, and nucleoside-based lipids for gene delivery. [Acc Chem Res](#), 2012, 45: 1026–1038
- 20 Pierrat P, Laverny G, Creusat G, et al. Phospholipid-detergent conjugates as novel tools for siRNA delivery. [Chem Eur J](#), 2013, 19: 2344–2355
- 21 Forbes D C, Peppas N A. Oral delivery of small RNA and DNA. [J Control Release](#), 2012, 162: 438–445