

对乙酰氨基酚诱导的急性肝损伤大鼠血浆 miR-122 表达的变化

王 雁, 汤纳平, 富 欣, 殷承胜, 季龙凤, 杨琛懋, 黄欢夏, 马 璟
(中国医药工业研究总院国家上海新药安全评价研究中心, 上海 201203)

摘要:目的 探讨血浆微 RNA(miR)-122 在药物性肝损伤中的变化及其在肝毒理临床前评价中的作用。方法 SD 雄性大鼠单次 ig 给予对乙酰氨基酚 0, 625 和 1250 mg·kg⁻¹, 并于给药后 1.5, 3, 6, 12, 24, 36 及 96 h 采集血样。以乙酰氨基酚诱导急性肝损伤大鼠血浆中稳定表达的 miR-103 为校正基因, 实时定量逆转录 PCR(RT-qPCR)法检测不同时间点大鼠血浆 miR-122 的表达。测定血浆中不同时间点谷丙转氨酶(GPT)和谷草转氨酶(GOT)和肝组织病理学检查。结果 组织病理学观察结果显示, 与正常对照组相比, 大鼠分别 ig 给予对乙酰氨基酚 625 mg·kg⁻¹ 1.5 和 3 h 后, 肝组织病理无明显变化, 给药后 6 和 12 h, 肝腺泡 III 带出现明显的空泡样变性和肝窦充血, 给药后 24 h 肝腺泡 III 带有明显的细胞坏死; 而 36 h 时基本恢复正常; 而对乙酰氨基酚 1250 mg·kg⁻¹ 组给药后 24 和 36 h 时肝腺泡 III 带有明显的细胞坏死。与正常对照组相比, 大鼠分别 ig 给予对乙酰氨基酚 625 和 1250 mg·kg⁻¹ 后 12 和 24 h, 血清 GPT 和 GOT 均有显著性升高($P < 0.05$), 且对乙酰氨基酚 1250 mg·kg⁻¹ 组大鼠血清 GPT 活性均是对照组 2 倍以上。与正常对照组相比, 血浆 miR-122 在大鼠给予对乙酰氨基酚 1250 mg·kg⁻¹ 1.5 h 即升高 3.6 倍($P < 0.05$), 并且持续升高, 12 h 达峰值后开始下降, 96 h 恢复正常水平; 大鼠给予 625 mg·kg⁻¹ 对乙酰氨基酚给药后 6 h, 血浆 miR-122 升高 5.2 倍, 12 h 达峰值后开始下降, 36 h 恢复正常水平。肝损伤大鼠血浆 miR-122 不同时间点的表达水平与肝损伤 GPT 和 GOT 变化相似。结论 循环 miR-122 可能成为药物性肝损伤临床前和临床早期检测的理想的血液学分子标志物。

关键词: 对乙酰氨基酚; 肝损伤; miR-122; 动力学

中图分类号: Q7, R971.1 文献标志码: A 文章编号: 1000-3002(2013)05-0854-06

DOI: 10.3867/j.issn.1000-3002.2013.05.015

药物诱导的肝损伤是终止药物研发和撤市的主要原因之一^[1-2]。近 60 年以来, 评价药物性肝损伤和区分不同类型肝损伤的指标主要是依据对血液中酶的检测, 如广泛使用的丙氨酸氨基转移酶 (glutamic pyruvic transaminase, GPT) 和天冬氨酸氨基转移酶 (glutamic oxaloacetic transaminase, GOT)。但这些指标在肝外损伤如骨骼肌损伤、肠胃损伤中也能检测到升高^[3-4], 其结果并不总是与组织病理学检测结果一致^[5]。随着高通量分子生物学技术发展, 新的肝损伤生物标志物被报道, 比如对氧磷酶 1, 血清 F 蛋白等^[6-7], 但均因技术局限

而不能被推广。微 RNA(microRNA, miR) 分子可以在体液循环中稳定存在^[8], 从而为 miR 作为非侵袭性生物标志各种疾病的预防和诊断方面的应用奠定了基础。

miR-122 是较早被发现且研究较为详细的一种 miR。2002 年, Lagos-Quintana 等^[9]通过对成年小鼠各种组织细胞中多种 miR 系统克隆和测序以及进一步鉴定, 发现 miR-122 仅在肝组织细胞中表达且是肝细胞中表达量最高的 miR, 进一步研究证明, 循环 miR-122 在药物诱导的肝损伤中要早于传统指标升高且能有效区分肝损伤与肝外损伤^[10-11], 并且其定量检测技术实时定量逆转录 PCR(RT-qPCR) 检测范围广、重复性好和灵敏度高, 但是, 目前一些文献报道循环 miR 相对定量普遍使用的被认为表达恒定的管家基因会随着实验条件、样品类型等不同而表达不稳定^[12-13], 因此, 使用适合不同实验条件的稳定内参基因对于 RT-qPCR 获得准确结果非常重要。

本实验使用前期工作筛选的在大鼠急性肝损伤血浆中稳定表达的内源性校正基因 miR-103^[14],

基金项目: 国家科技重大专项(2012ZX09302002); 国家科技重大专项(2012ZX09505-001-003); 国家自然科学基金(81273603)

作者简介: 王 雁(1986 -), 女, 硕士研究生, 主要从事肝分子毒理学研究, Tel: 18801969892, E-mail: hanyan20061123@126.com; 马 璟(1963 -), 女, 研究员, 博士, 博士生导师, 主要从事药物毒理学研究。

通讯作者: 马 璟, E-mail: jma@ncdser.com, Tel: (021)50801763

定量检测了血浆 miR-122 在不同程度肝损伤发生、发展过程中不同时间点的表达,评价血浆 miR-122 作为早期肝损伤灵敏生物标志物的可能性。

1 材料与方法

1.1 仪器和试剂

Hitachi 7060 全自动生化分析仪(日本 Hitachi 集团);Excelsior ES 组织脱水机、Histocentre 3 型组织包埋机、NanoDrop 1000 分光光度仪和台式高速低温离心机(美国 Thermo 公司);RM2135 型旋转石蜡切片机和 ST5020HE 染色仪(美国 Leica 公司),PHY-III 病理组织漂烘仪(常州市中威电子仪器有限公司);Axioscope. A1 荧光显微镜(德国 Zeiss 公司),实时 PCR 仪(美国 Applied Biosystems 公司),对乙酰氨基酚,购自 Sigma-Aldrich 中国有限公司,羧甲基纤维素钠(CMC-Na),购自国药集团;焦碳酸二乙酯化学试剂;mirVana™ 小干扰 mRNA(miRNA)分离试剂盒,购自美国 Ambion 公司;miScriptSYBR® Green PCR Kit PCR, miScript 逆转录试剂盒,购自德国 Qiagen 公司;Trizol LS,购自美国 Invitrogen 公司。

1.2 动物

雄性 SD 大鼠,6~7 周龄,SPF 级,90 只,体质量 160~180 g,由上海西普尔-必凯实验动物有限公司提供,动物许可证号:SCXK(沪)2008-0016。大鼠饲养温度 20~26℃,相对湿度 40%~70%,12/12 h 明暗交替,SPF 环境自由进食、饮水。动物适应 1 周后开始实验,实验前至少禁食 12 h,不禁水,给药后正常进食和进水。

1.3 动物分组给药和样本的采集

大鼠 ig 给予对乙酰氨基酚 625 和 1250 mg·kg⁻¹ ($n=42$),溶媒对照组 ($n=6$) ig 给予 0.5% CMC-Na 10 ml·kg⁻¹。其中溶媒对照组大鼠在单次 ig 给药后 24 h 解剖,对乙酰氨基酚组分别于给药后 1.5, 3, 6, 12, 24, 36 和 96 h 时每组各取 6 只大鼠,腹主动脉采取足够的血清及血浆用于临床生化指标检测和总 RNA 的提取。

1.4 大鼠肝组织病理形态学观察

大鼠腹主动脉采血后放血处死,解剖大鼠摘取肝,取肝左外叶和右外叶,用生理盐水洗涤,在 10% 多聚甲醛中固定至少 2 d,修样,脱水,石蜡包埋,切成 5 μm 厚的肝组织切片,HE 染色后光镜下观察。

1.5 血清 GPT 和 GOT 的检测

参照 GPT 和 GOT 生化试剂盒说明书使用 Hitachi-7060 型全自动生化分析仪检测所有大鼠血

清中 GPT 和 GOT 的活性。

1.6 血浆总 RNA 的提取

血浆按照张毅等^[11]方法,分别经过 1600 × *g*, 4℃, 10 min 和 16 000 × *g*, 4℃, 10 min 离心 2 次后,取 500 μl 血浆置于无 RNA/DNA 酶的离心管中,并加入 625 μl 的 Trizol LS,混匀,室温静置 5 min 后于 -80℃ 低温保存。取 1.3 中已加入 Trizol LS 的血浆,加入 167 μl 的氯仿,混匀,置室温 10 min, 12 000 × *g*, 4℃ 离心 15 min,使水相和有有机相分离。小心取上层水相液体,移至新的 Ep 管中。之后参照 miRNA 分离试剂盒说明书中的步骤提取总 RNA,用分光光度计测定 RNA 在 260 nm 处的吸光度(absorbance, *A*),以 $A_{260\text{ nm}}/A_{280\text{ nm}}$ 及 $A_{260\text{ nm}}/A_{230\text{ nm}}$ 评估提取的总 RNA 的浓度和质量。只有 $A_{260\text{ nm}}/A_{280\text{ nm}}$ 在 1.7~2.0 之间, $A_{260\text{ nm}}/A_{230\text{ nm}}$ 接近 2.0 的样品才被用于进一步的 RT-qPCR 定量分析。

1.7 逆转录及定量 PCR 检测 miR-122 的表达

20 μl 逆转录体系包括 5 × 逆转录缓冲液 4 μl, 逆转录混合液 1 μl, DEPC 水 5 μl, RNA 模板 10 μl, 混匀后置于 37℃ 60 min, 95℃ 5 min, 得到的产物保存在 -80℃ 条件下或立即进行下一步反应。合成的 cDNA 用于实时定量 PCR, 20 μl 体系包括 2 × SYBR Green Mix 10 μl, 反向引物 0.5 μl (试剂盒中提供), 正向引物 1 μl (由 Invitrogen 合成), 焦碳酸二乙酯水 7.5 μl, cDNA 模板 1 μl。反应条件为 95℃, 酶活化 15 min; 95℃ 变性 15 s, 60℃ 退火延伸 1 min, 共 40 个循环。采用前期实验确认的急性肝损伤稳定表达的内源性基因 miR-103 为校正基因,按照文献方法 [15] 计算 miR-122 相对表达量计算公式为 $2^{-\Delta\Delta Ct} = 2^{[(Ct_{miR-122} - Ct_{miR-103})_{给药组} - (Ct_{miR-122} - Ct_{miR-103})_{对照组}]}$ 。

1.8 统计学分析

实验结果数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 13.0 统计软件分析。血清 GPT 和 GOT 及血浆 miR-122 相对含量组间比较采用方差分析 (ANOVA) 或 Kruskal-Wallis 检验,并使用 Dunnett *t* 检验, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 对乙酰氨基酚对肝组织病理形态学的影响

给药后不同时间点肝组织病理形态学观察结果(图 1)显示,对乙酰氨基酚 625 mg·kg⁻¹ 药后 12 h 肝腺泡 III 带出现空泡样变性、肝窦充血(图 1A5), 给药后 24 h 肝腺泡 III 带出现细胞坏死并且有大量的炎症细胞浸润(图 1A6), 而给药后 36 h 基本恢复正常(图 1A7); 对乙酰氨基酚 1250 mg·kg⁻¹ 给药

后 6 h 肝腺泡 III 带出现空泡样变性、肝窦充血(图 1B4), 给药后 12 h 空泡样变性细胞增多, 且 III 带有明显的细胞坏死、炎症细胞浸润(图 1B5), 24 h 后肝细胞坏死区域扩大, 肝索紊乱且大量炎症细胞聚集(图 1B6), 36 h 后仍观察到肝腺泡 III 带炎症细胞浸润(图 1B7)。由此可知, 对乙酰氨基酚 $1250 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 组肝损伤发生的时间早于 $625 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 组, 且损伤持续时间较长, 肝损伤区域广泛。

2.2 对乙酰氨基酚对 GPT 和 GOT 活性的影响

与溶媒对照组相比, 对乙酰氨基酚 625 和 $1250 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 组大鼠血清 GPT 从 12 h 开始有显著性升高, 一直持续到 24 h 达到最高值, 36 h 开始恢复正常水平, 并且对乙酰氨基酚 $1250 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 组 GPT 的活性均是对照组的 2 倍以上(图 2A)。如图 2B 所示, 对乙酰氨基酚 $1250 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 组大鼠

血清 GOT 的活性 6 h 与对照组相比就有显著性升高 ($P < 0.05$), 12 ~ 24 h GOT 活性均高于对照组的 2 倍以上, 对乙酰氨基酚 $625 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 组大鼠血清 GOT 活性在对乙酰氨基酚暴露 12 h 有显著性升高, 并且对乙酰氨基酚给药组大鼠血清 GOT 的活性在给药后 96 h 较对照组仍有显著性升高 ($P < 0.05$)。

2.3 对乙酰氨基酚诱导肝损伤大鼠血浆中 miR-122 的动力学变化

由图 3 可见, 与溶媒对照组相比, 对乙酰氨基酚 $1250 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 组大鼠血浆 miR-122 1.5 h 升高 3.6 倍, 12 h 升高 200 倍左右达到峰值, 36 h 仍然是对照组的 8.8 倍, 36 h 几乎恢复正常水平。对乙酰氨基酚 $625 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 组血浆 miR-122 6 h 开始升高, 12 h 升高 67 倍左右达到峰值, 36 h 几乎恢复

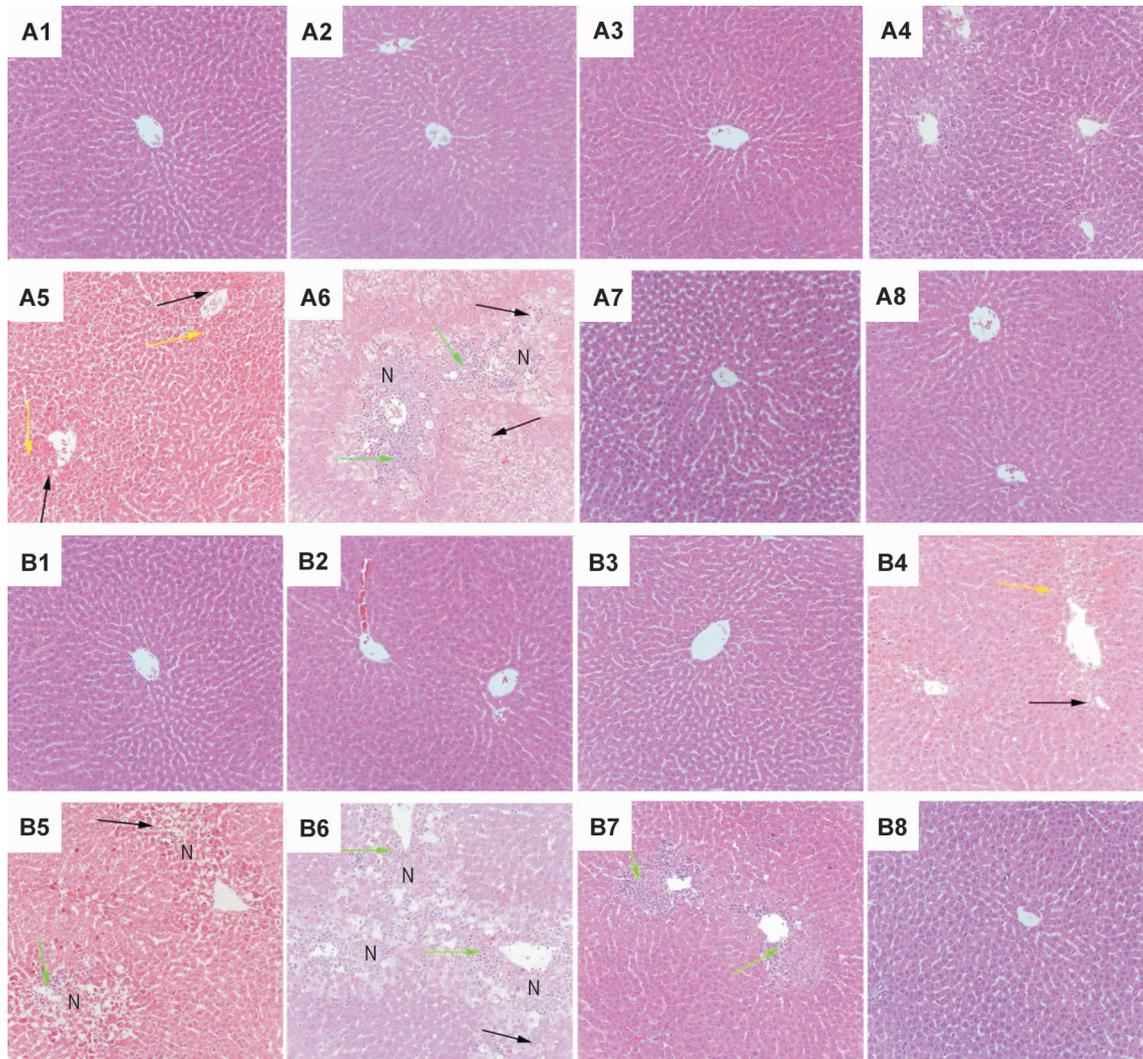


Fig. 1 Liver histopathology of rats given acetaminophen (APAP) (HE $\times 200$). Rats were ig given APAP 0 (normal control), 625 and $1250 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, the liver samples were collected at 0, 1.5, 3, 6, 12, 24, 36 and 96 h after administration. A1 – A8: APAP $625 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ group at 0, 1.5, 3, 6, 12, 24, 36 and 96 h after administration. B1 – B8: APAP $1250 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ group at 0, 1.5, 3, 6, 12, 24, 36 and 96 h after administration. Black arrows: vacuolated hepatocytes; yellow arrows: congestion in sinusoids; green arrows: inflammatory cells; N: centrilobular necrosis.

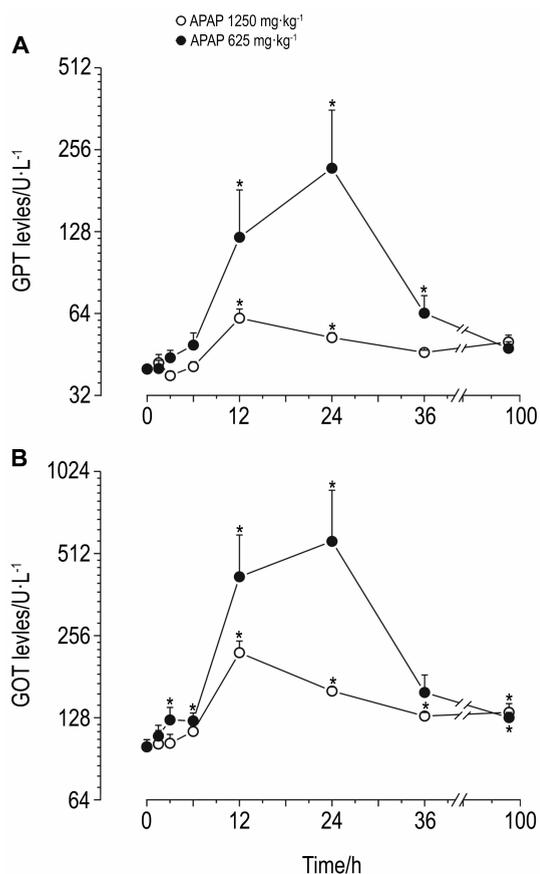


Fig. 2 Changes in serum glutamic pyruvic transaminase (GPT) (A) and glutamic oxaloacetic transaminase (GOT) activities (B) of rats with acute liver injury induced by APAP. $\bar{x} \pm s$, $n = 6$. * $P < 0.05$, compared with 0 h (control).

正常水平。由图 3 看出, 血浆 miR-122 在对乙酰氨基酚给药的含量变化呈现出剂量依赖性, 且对乙酰氨基酚 1250 mg·kg⁻¹ 给药后 1.5 ~ 12 h 的变化呈现出明显的时间依赖性 ($r = 0.952$, $P = 0.048$)。

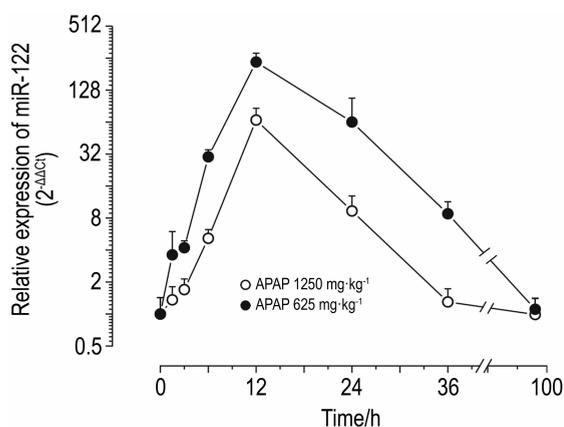


Fig. 3 Changes in miR-122 expression in plasma of rats with acute liver injury induced by APAP. Endogenous miR-103 was used as the normalizer^[14]. $\bar{x} \pm s$, $n = 6$.

3 讨论

miR 是主要参与细胞的发育、分化、增殖和凋亡等重要的生理病理过程^[16-17], 可广泛存在于血液、尿液和脑脊液等各种生物体液中^[18], 而循环 miR 据报道有望成为癌症、心血管疾病、自身免疫疾病等的诊断指标。研究循环 miR 在组织损伤中的表达变化, 有助于从分子水平了解药物性肝损伤的机制。

miR-122 是一个调节肝发育的“肝特异性 miR”^[19]。研究表明, 在生理状态下, miR-122 参与肝细胞发育、分化代谢, 以及肝细胞应急应答等。应用反义寡聚核苷酸抑制肝 miR-122 的表达, 肝功能受损, 胆固醇合成下降, 说明 miR-122 对维持肝正常功能起着重要作用^[20]。综合 miR-122 上述特性, 使它成为了检测肝损伤潜在的理想生物标志物。

血浆中 miR-122 的检测主要使用 RT-qPCR 技术, 但是很多因素都将会影响 miR 的最终定量结果^[12]。因此, 选择一个合适稳定的内参基因对于获得精确的 RT-qPCR 结果非常重要。因为循环 miR-122 定量常用的内参基因在血液中的稳定性不同于 miR^[21], 因此, 并不适合作为血浆 miR-122 的内参校正基因。尽管有实验使用外源的基因 (如线虫 miR-39) 作为校正基因, 但因 miR 在血液循环中主要以膜性结构包裹或以蛋白结合的形式存在, 如 miR-122 主要以 Argonaute2-miR-122 的形式存在^[22-23], 而外源合成或纯化的校正基因加入血液后可能与内源 miR 的提取效率、逆转录效率以及扩增效率不同, 达不到内参基因校正的目的, 因此, 本实验使用了前期工作筛选的在急性肝损伤模型中稳定表达的内源性基因 miR-103 对结果进行校正, 保证了 miR-122 定量检测结果的可靠性^[14]。

对乙酰氨基酚诱导的大鼠肝损伤与临床肝损伤病理过程极为相似, 因此本实验采用了常用的解热镇痛抗炎药对乙酰氨基酚制造大鼠急性肝损伤, 并且使用在以往的研究中均未发现其对肝有影响的 0.5% CMC-Na 作为助溶剂^[24]。本实验结果表明, miR-122 在对乙酰氨基酚 1250 mg·kg⁻¹ 给药后 1.5 h 就有显著性升高, 对乙酰氨基酚 625 mg·kg⁻¹ 给药后 6 h 有显著性升高, 均早于肝损伤评价“金标准”GPT 升高, 这与 Wang 等^[10]使用的小鼠急性肝损伤模型所得结论一致。另外, 肝损伤大鼠血浆 miR-122 的升高幅度较传统指标更大, 因此, 血浆 miR-122 是肝损伤检测更灵敏的指标。本实验结果表明, 血浆 miR-122 与肝损伤传统指标血清转氨酶的变化趋势基本相似, 但是血浆 miR-122 达峰时间及开始下降时间均早于血清 GPT 和 GOT 的变化,

这可能与血浆 miR-122 与血清转氨酶的半衰期不同所致。与肝组织病理学结果比较显示,出现病理改变时血浆中 miR-122 的表达显著性升高,并且随着肝损伤的加重而持续升高;肝组织病理改变出现恢复时,血浆 miR-122 的表达水平立即下降,与肝损伤的程度呈一致性。

因此,结合血清生化指标 GPT, GOT 及肝组织病理形态学变化,通过对血浆 miR-122 在大鼠急性肝损伤血浆中动力变化趋势的分析,得知血浆 miR-122 在对乙酰氨基酚给药后的含量变化呈剂量依赖性,且在对乙酰氨基酚给药后的 12 h 内含量变化呈现出明显的时间依赖性。较传统指标升高幅度大,能更早检测到肝损伤;与组织病理改变一致。因此,血浆 miR-122 的变化与肝组织损伤密切相关,对肝损伤的发生、发展有良好的预测和预后能力。鉴于肝损伤的发病机制是一个复杂的过程,将血浆 miR-122 与肝损伤的其他检测指标组合使用,有望显著提高诊断的灵敏性和准确性。

总之,相对于成分比较复杂,血液中易降解和检测技术局限的潜在的蛋白生物标志物,循环 miR-122 在肝组织中高表达,在其他组织中表达很低甚至检测不到,种属间高度保守,血液中主要以 Argonaute2-miR-122 形式存在从而抵制 RNA 酶的降解^[22],可以使用特异性强、灵敏度高和定量准确的 RT-qPCR 检测技术,因此,循环 miR-122 更有望成为药物性肝损伤评价的新指标。相信随着更广泛的临床前和临床实验的验证以及 miR 核苷酸技术的发展和推广,循环 miR-122 将会成为药物性肝损伤安全评价的一个新的理想的血液学检测指标。

参考文献:

- [1] Watkins PB. Drug safety sciences and the bottleneck in drug development [J]. *Clin Pharmacol Ther*, 2011, **89**(6):788-790.
- [2] Chen M, Vijay V, Shi Q, Liu Z, Fang H, Tong W. FDA-approved drug labeling for the study of drug-induced liver injury [J]. *Drug Discov Today*, 2011, **16**(15-16):697-703.
- [3] Nathwani RA, Pais S, Reynolds TB, Kaplowitz N. Serum alanine aminotransferase in skeletal muscle diseases [J]. *Hepatology*, 2005, **41**(2):380-382.
- [4] Bailey WJ, Holder D, Patel H, Devlin P, Gonzalez RJ, Hamilton V, et al. A performance evaluation of three drug-induced liver injury biomarkers in the rat: alpha-glutathione S-transferase, arginase 1, and 4-hydroxyphenyl-pyruvate dioxygenase [J]. *Toxicol Sci*, 2012, **130**(2):229-244.
- [5] Ozer J, Ratner M, Shaw M, Bailey W, Schomaker S. The current state of serum biomarkers of hepatotoxicity [J]. *Toxicology*, 2008, **245**(3):194-205.
- [6] Ferré N, Marsillach J, Camps J, Mackness B, Mackness M, Riu F, et al. Paraoxonase-1 is associated with oxidative stress, fibrosis and FAS expression in chronic liver diseases [J]. *J Hepatol*, 2006, **45**(1):51-59.
- [7] Ashamiss F, Wierzbicki Z, Chrzanowska A, Scibior D, Pacholczyk M, Kosieradzki M, et al. Clinical significance of arginase after liver transplantation [J]. *Ann Transplant*, 2004, **9**(3):58-60.
- [8] Mitchell PS, Parkin RK, Kroh EM, Fritz BR, Wyman SK, Pogosova-Agadjanyan EL, et al. Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, **105**(30):10513-10518.
- [9] Lagos-Quintana M, Rauhut R, Yalcin A, Meyer J, Lendeckel W, Tuschl T. Identification of tissue-specific microRNAs from mouse [J]. *Curr Biol*, 2002, **12**(9):735-739.
- [10] Wang K, Zhang S, Marzolf B, Troisch P, Brightman A, Hu Z, et al. Circulating microRNAs, potential biomarkers for drug-induced liver injury [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009, **106**(11):4402-4407.
- [11] Zhang Y, Jia Y, Zheng R, Guo Y, Wang Y, Guo H, et al. Plasma microRNA-122 as a biomarker for viral-, alcohol-, and chemical-related hepatic diseases [J]. *Clin Chem*, 2010, **56**(12):1830-1838.
- [12] Huggett J, Dheda K, Bustin S, Zumla A. Real-time RT-PCR normalisation; strategies and considerations [J]. *Genes Immun*, 2005, **6**(4):279-284.
- [13] Brattelid T, Aarnes EK, Helgeland E, Guvaåg S, Eichele H, Jonassen AK. Normalization strategy is critical for the outcome of miRNA expression analyses in the rat heart [J]. *Physiol Genomics*, 2011, **43**(10):604-610.
- [14] Wang Y, Tang N, Hui T, Wang S, Zeng X, Li H, et al. Identification of endogenous reference genes for RT-qPCR analysis of plasma microRNAs levels in rats with acetaminophen-induced hepatotoxicity [J/OL]. *J Appl Toxicol*, <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jat.2864/abstract>
- [15] Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-ΔΔCT} method [J]. *Methods*, 2001, **25**(4):402-408.
- [16] Lee RC, Feinbaum RL, 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.
- [17] Krol J, Loedige I, Filipowicz W. The widespread regulation of microRNA biogenesis, function and decay [J]. *Nat Rev Genet*, 2010, **11**(9):597-610.
- [18] Weber JA, Baxter DH, Zhang S, Huang DY, Huang KH, Lee MJ, et al. The microRNA spectrum in 12 body fluids [J]. *Clin Chem*, 2010, **56**(11):1733-1741.
- [19] Chang J, Nicolas E, Marks D, Sander C, Lerro A, Buendia MA, et al. miR-122, a mammalian liver-specific microRNA, is processed from hcr mRNA and may downregu-

- late the high affinity cationic amino acid transporter CAT-1 [J]. *RNA Biol*, 2004, **1**(2):106-113.
- [20] Krützfeldt J, Rajewsky N, Braich R, Rajeev KG, Tuschl T, Manoharan M, *et al.* Silencing of microRNAs *in vivo* with "antagomirs"[J]. *Nature*, 2005, **438**(7068):685-689.
- [21] Song J, Bai Z, Han W, Zhang J, Meng H, Bi J, *et al.* Identification of suitable reference genes for qPCR analysis of serum microRNA in gastric cancer patients[J]. *Dig Dis Sci*, 2012, **57**(4):897-904.
- [22] Arroyo JD, Chevillet JR, Kroh EM, Ruf IK, Pritchard CC, Gibson DF, *et al.* Argonaute2 complexes carry a population of circulating microRNAs independent of vesicles in human plasma[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2011, **108**(12):5003-5008.
- [23] Hunter MP, Ismail N, Zhang X, Aguda BD, Lee EJ, Yu L, *et al.* Detection of microRNA expression in human peripheral blood microvesicles [J]. *PLoS One*, 2008, **3**(11):e3694.
- [24] Yang X, Greenhaw J, Shi Q, Su Z, Qian F, Davis K, *et al.* Identification of urinary microRNA profiles in rats that may diagnose hepatotoxicity[J]. *Toxicol Sci*, 2012, **125**(2):335-344.

Changes in miR-122 expression in plasma of rats with acute liver injury induced by acetaminophen

WANG Yan, TANG Na-ping, FU Xin, YIN Cheng-sheng, JI Long-feng, YANG Chen-mao, HUANG Huan-xia, MA Jing

(National Shanghai Center for New Drug Safety Evaluation and Research, China State Institute of Pharmaceutical Industry, Shanghai 201203, China)

Abstract: **OBJECTIVE** To explore the changes and role of plasma microRNA (miR-122) in non-clinical evaluation of drug-induced liver injury. **METHODS** Male SD rats were ig given acetaminophen (APAP) 0 (control), 625 and 1250 mg·kg⁻¹. At 1.5, 3, 6, 12, 24, 36 and 96 h after administration, blood samples were collected. miR-103, as a suitable endogenous reference gene for plasma microRNAs quantification in rats with acetaminophen-induced hepatotoxicity, was employed to detect the expression of miR-122 in plasma samples with real-time quantitative reverse transcription PCR (RT-qPCR). The blood levels of glutamic pyruvic transaminase (GPT) and glutamic oxaloacetic transaminase (GOT) were detected and pathological changes in liver tissue were observed. **RESULTS** Histopathological examination showed that, compared with normal control group, there was no significant difference at 1.5 and 3 h after rats were ig given APAP 625 and 1250 mg·kg⁻¹. Vacuolated hepatocytes and congestion in sinusoids were observed in zone III at 6 and 12 h after administration, while at 24 h centrilobular necrosis was prominent in APAP 625 and 1250 mg·kg⁻¹ groups. Compared with normal control group, GPT and GOT in serum significantly increased at 12 and 24 h in APAP 625 and 1250 mg·kg⁻¹ groups, and GPT activity more than doubled in APAP 1250 mg·kg⁻¹ group. Compared with normal control group, plasma miR-122 increased by 5.2-fold at 6 h after administration in APAP 625 mg·kg⁻¹ and 3.6-fold at 1.5 h after administration in APAP 1250 mg·kg⁻¹. The level of plasma miR-122 continued to elevate but returned to normal at 36 h in APAP 625 mg·kg⁻¹ group and at 96 h in APAP 1250 mg·kg⁻¹ group, respectively. The course of plasma miR-122 levels displayed similar kinetics to GPT and GOT. **CONCLUSION** miR-122 Expression in plasma may become an ideal hematologic molecular marker for early detection of drug-induced liver injury in pre-clinical and clinical evaluation.

Key words: acetaminophen; liver injury; miR-122; kinetics

Foundation item: The project supported by National Science and Technology Major Project (2012ZX09302002); National Science and Technology Major Project (2012ZX09505001-003); and National Natural Science Foundation of China (81273603)

Corresponding author: MA Jing, E-mail: jma@ncdser.com, Tel: (021)50801763

(收稿日期: 2013-03-01 接受日期: 2013-07-08)

(本文编辑: 付良青)