

## ● 临床论著 ●

引用:王佳,吴兆黎. 脉康汤对高脂血症患者血浆 microRNA 表达谱的影响[J]. 湖南中医杂志,2022,38(4):1-5.

# 脉康汤对高脂血症患者血浆 microRNA 表达谱的影响

王 佳,吴兆黎

(湖南省人民医院/湖南师范大学附属第一医院,湖南 长沙,410016)

**[摘要]** 目的:应用微小 RNA(miRNA)基因表达谱芯片技术筛查 miRNA 在高脂血症及脉康汤治疗前后患者血浆中的差异表达,旨在进一步探索脉康汤治疗高脂血症的分子机制。方法:在本院中西医结合门诊筛选出符合中西医诊断标准的患者 10 例,选择同年龄段正常人 10 例,测定受试者血压、血糖、血脂和体质指数(BMI),分别抽取外周血,常规提取总 RNA,作 miRNA 芯片。取 10 例患者中经脉康汤口服治疗显效的典型病例 1 例,治疗前后分别抽取外周血,提取总 RNA,作 miRNA 芯片检测 miRNA 表达谱。对差异表达的 miRNA 进行实时荧光定量聚合酶链反应(qRT-PCR)验证。结果:高脂血症患者与正常人的 miRNA 芯片差异表达谱与脉康汤治疗显效的典型病例治疗前后的 miRNA 芯片差异表达谱中有 11 条 miRNA 差异表达一致,其中有 7 个 miRNA(miR-122、miR-146a、miR-125a-5p、miR-208b、miR-370、miR-197、miR-365)上调,4 个 miRNA(miR-33a、miR-182-5p、miR-103、miR-542)下调,与 qRT-PCR 结果基本相符。结论:高脂血症患者血浆中 miRNA 的表达有明显改变,经脉康汤治疗后也随之前向相反方向改变,提示血浆 miRNA 可作为预测脉康汤降脂预后的新型生物学标志物。

**[关键词]** 高脂血症;脉康汤;miRNA;基因表达谱;生物学标志物

**[中图分类号]**R259.892 **[文献标识码]**A DOI:10.16808/j.cnki.issn1003-7705.2022.04.001

## Effect of Maikang decoction on plasma microRNA expression profile of patients with hyperlipidemia

WANG Jia, WU Zhaoli

(Hunan Provincial People's Hospital/The First Affiliated Hospital of Hunan Normal University,  
Changsha 410016, Hunan, China)

**[Abstract]** Objective: To investigate the difference in the expression of microRNA (miRNA) before and after treatment with Maikang decoction in patients with hyperlipidemia using the miRNA gene expression microarray technique, and to further explore the molecular mechanism of Maikang decoction in the treatment of hyperlipidemia. Methods: A total of 10 patients who were screened out and met the diagnostic criteria based on traditional Chinese and Western medicine at the outpatient service of integrated traditional Chinese and Western medicine in our hospital were enrolled, and 10 normal individuals in the same age group were also enrolled. Blood pressure, blood glucose, blood lipids, and body mass index (BMI) were measured for all subjects; peripheral blood was collected to extract RNA and prepare miRNA microarray. Among the 10 patients, 1 patient who achieved marked response after oral administration of Maikang decoction was selected, and peripheral blood was collected before and after treatment to extract RNA and prepare miRNA microarray to measure microRNA expression profile. Quantitative real-time PCR (qRT-PCR) was performed for differentially expressed miRNAs for validation. Results: The differential

基金项目:湖南省科技计划项目(2014FJ3035);湖南省中医药科研计划项目(2017105)

第一作者:王佳,男,医学博士,副研究员,研究方向:代谢疾病的基础与临床

expression profile of miRNA microarray in hyperlipidemia patients and normal individuals were consistent with the differential expression profile of miRNA microarray in the typical case treated with Maikang decoction before and after treatment, and there were 11 differentially expressed miRNAs, among which 7 miRNAs (miR-122, miR-146a, miR-125a-5p, miR-208b, miR-370, miR-197, and miR-365) were upregulated and 4 miRNAs (miR-33a, miR-182-5p, miR-103, and miR-542) were downregulated, which was basically consistent with qRT-PCR results. Conclusion: There is a significant change in the expression of miRNAs in the plasma of patients with hyperlipidemia, with a change in the opposite direction after treatment with Maikang decoction, suggesting that plasma miRNA can be used as a new biomarker for predicting the prognosis after antihyperlipidemic treatment with Maikang decoction.

**[Keywords]** hyperlipidemia; Maikang decoction; microRNA; gene expression profile; biomarker

MicroRNAs (miRNAs) 是一种小的非编码调控 RNA, 在转录后水平反向调节其靶基因的表达。越来越多的研究证实外周血 miR-142-3p、miR-335、miR-205 等多个 miRNA 已成为心血管疾病、肺动脉高压、肿瘤等进展和预后的新型标志物<sup>[1-3]</sup>。高脂血症 (hyperlipemia, HLP) 作为一种人体脂质代谢异常的亢进“模型”, 临床上主要表现为血浆血脂含量高于正常水平, 是一种对人体危害极大的心血管系统病症<sup>[4]</sup>。本项目前期发现, 针对高脂血症之脾虚肝郁、痰浊血瘀证患者, 运用脉康汤治疗有较好的效果。然而, 脉康汤治疗高脂血症的分子机制尚不清楚, 高脂血症患者治疗前后血浆中是否出现 miRNA 表达水平的差异? 血浆 miRNA 是否能够作为脉康汤降脂预后的一项新型标志物? 目前尚未见相关报道。因此, 本项目拟通过比较高脂血症患者与正常人, 以及高脂血症患者服用脉康汤前后血浆 miRNA 的表达谱变化, 对进一步探讨脉康汤治疗高脂血症的作用机制和分子基础、评估患者病情发展和治疗效果具有重要意义, 并为临床采用干预 miRNA 的方法以治疗高脂血症提供了前期实验基础。

## 1 研究对象

1.1 一般资料 选择 2017 年 10 月至 2018 年 1 月湖南省人民医院中西医结合门诊收治的高脂血症患者 10 例为研究对象, 其中男 6 例, 女 4 例; 平均年龄 (53±7) 岁。选择同年龄段正常人 10 例, 其中男 5 例, 女 5 例; 平均年龄 (52±8) 岁。2 组一般资料比较, 差异无统计学意义 ( $P>0.05$ ), 具有可比性。该研究已通过我院医学伦理委员会批准。

### 1.2 诊断标准

1.2.1 西医诊断标准 符合《中国成人血脂异常

防治指南 (2016 年修订版)<sup>[5]</sup> 中高脂血症的诊断标准。在正常饮食情况下, 禁食 12~14 h 后检测血脂, 其结果符合下列 4 项之一: 1) 总胆固醇 (TC)  $\geq 5.2$  mmol/L; 2) 三酰甘油 (TG)  $\geq 1.70$  mmol/L; 3) 低密度脂蛋白 (LDL-C)  $\geq 3.4$  mmol/L; 4) 高密度脂蛋白 (HDL-C)  $\leq 1.0$  mmol/L。

1.2.2 中医辨证标准 参照《中药新药临床研究指导原则》<sup>[6]</sup> 及文献<sup>[7]</sup> 中的相关标准拟定痰浊血瘀证的辨证标准。符合舌暗红、苔腻及脉弦涩或弦滑, 同时具备痰浊证 (头重如裹、呕恶痰涎、胸闷气短、肢麻沉重) 和血瘀证 (胸胁胀闷、心烦不安、心前区刺痛) 中各 1 个或 1 个以上症状者, 可明确辨证。

1.3 纳入标准 1) 符合上述西医诊断和中医辨证标准; 2) 年龄 35~75 岁; 3) 原发性高脂血症; 4) 未经过调脂治疗或虽曾服用调脂药物、但已停药 2 周以上, 血脂水平符合诊断标准; 5) 能全程配合治疗, 并签署知情同意书。

1.4 排除标准 1) 近 2 周曾采用其他治疗性降脂措施; 2) 正在使用肝素、甲状腺素、类固醇或免疫抑制剂等影响血脂水平药物; 3) 因肾病综合征、甲状腺功能减退、糖尿病等引起的继发性高脂血症; 4) 合并有肝炎或者肝功能异常、肾功能异常或消化、造血系统等严重原发性疾病; 5) 患有精神类疾病。

## 2 研究方法

2.1 药物干预方法 给予患者脉康汤治疗。方药组成: 丹参 15 g, 川芎 10 g, 菊花 10 g, 白芍 10 g, 钩藤 10 g, 黄芪 20 g, 葛根 10 g, 茯苓 10 g, 山楂 15 g。中药由我院制剂室煎药机煎取, 每剂煎制成 2 袋, 150 ml/袋。口服, 1 袋/次, 2 次/d, 连续服用 4 周。所有患者坚持遵守用药剂量和随访计划, 在研究期间保持低胆固醇饮食。

## 2.2 观察指标

2.2.1 基本资料收集 制定统一表格,询问研究对象年龄、性别、吸烟、病史等,体检包括血压[收缩压(SBP)、舒张压(DBP)]、身高、腰围和体质量等一般情况,了解其体质量指数(BMI)等。

### 2.2.2 实验室指标

2.2.2.1 血糖、血脂常规检测 抽取空腹外周静脉血,用全自动生化分析仪测定血糖[空腹血糖(FBG)、餐后 2h 血糖(2hPG)]、糖化血红蛋白(HbA1c)、TC、TG、LDL-C 和 HDL-C 的水平。

2.2.2.2 miRNA 表达谱芯片杂交检测 分别将 10 例患者与同年龄段 10 例正常人的血浆用 Trizol 常规抽提总 RNA。取等量 10 例患者的 RNA 混合为治疗组,取等量 10 例正常人的 RNA 混合为正常组。2 组样品采用 miR 晶芯 microRNA 微阵列试剂盒(CapitalBio 公司)进行 microRNA 芯片杂交,利用 LuxScan10K/A 双通道激光扫描仪(CapitalBio 公司)进行图像扫描,LuxScan 3.0 图像分析软件(CapitalBio 公司)对芯片图像进行数据分析。治疗组标准值是正常组标准值的 2 倍或 0.5 倍即认为存在显著性上调或下调趋势。

10 例患者经脉康汤治疗 4 周后,以疗效最佳病例作为典型病例,取其治疗前后外周血。同前法作治疗前后的 miRNA 芯片杂交,以差异为 2 倍的标准来确定治疗前相对治疗后差异表达的 miRNA。

2.2.2.3 实时荧光定量 PCR(qRT-PCR)检测患者血浆相关 miRNA 的表达水平 采集受试者肘静脉全血 4 ml,以枸橼酸钠抗凝,4℃ 2500 r/min 离心 10 min,收集血浆,分装后置-20℃冰箱冻存,实验前取出置室温下解冻待测。以 U6 为内参,Trizol 法提取总 RNA,RNA 反转录为 cDNA,然后进行定时定量 PCR。反应条件:95℃,5 min;95℃,15 s;60℃,20s;72℃,20s;共 40 个循环。反应结束得到各反应管循环阈值 Ct,采用 2- $\Delta\Delta$ Ct 值表示 miRNA 相对含量,实验重复 3 次。

2.3 统计学方法 采用 SPSS 19.0 统计软件进行数据分析,计量数据用均数±标准差( $\bar{x}\pm s$ )表示,2 组间均数比较采用 *t* 检验,多组间比较采用单因素方差分析,以  $P<0.05$  为差异有统计学意义。

## 3 研究结果

3.1 2 组受试者的一般情况 治疗组男 6 例,女

4 例,吸烟者 4 例(均为男性)。正常组男 5 例,女 5 例,吸烟者 4 例(均为男性)。2 组性别、年龄、SBP、DBP、BMI、TC、HDL-C、FBG 和 2hPG、HbA1c 水平比较,差异无统计学意义(均  $P>0.05$ )。与正常组比较,治疗组 TG 和 LDL-C 水平明显升高,差异有统计学意义(均  $P<0.05$ )。(见表 1)

表 1 2 组受试者的一般情况( $\bar{x}\pm s$ )

观察项目	正常组(10 例)	治疗组(10 例)
年龄(岁)	52±8	53±7
SBP(mm Hg)	113±15	121±11
DBP(mm Hg)	66±6	70±8
BMI(kg/m <sup>2</sup> )	22.7±2.5	22.6±2.4
TC(mmol/L)	4.24±0.54	4.82±0.73
TG(mmol/L)	1.24±0.28	3.57±1.45 <sup>a</sup>
LDL-C(mmol/L)	2.26±0.41	3.97±0.80 <sup>a</sup>
HDL-C(mmol/L)	1.35±0.53	1.18±0.26
FBG(mmol/L)	4.8±1.0	4.8±1.1
2hPG(mmol/L)	7.0±1.9	6.8±2.0
HbA1c(%)	5.30±0.80	5.17±0.78

注:与正常组比较,<sup>a</sup> $P<0.05$ 。

3.2 总 RNA 浓度纯度检测和 miRNA 芯片杂交结果 样品总 RNA 质量符合 miRNA 芯片的实验要求,可以进行芯片实验。治疗组与正常组杂交获 89 个差异表达 miRNA,典型病例脉康汤治疗前后杂交获 62 个差异表达 miRNA。在这 2 组差异表达 miRNA 谱中都出现的差异表达 miRNA 共有 14 个,其中又有 11 个 miRNA 在 2 组差异表达中表达量的调节一致,即都出现表达上调或表达下调,只有 3 个差异表达量调节相反。在这 11 个表达量调节一致的 miRNA 中,上调者 7 个,下调者 4 个。(见表 2、3)

表 2 治疗组和正常组比较共同出现差异表达的 miRNA

miRNA	治疗组标准值/正常组标准值	表达趋势
miR-122	16.36	↑
miR-146a	13.84	↑
miR-125a-5p	10.21	↑
miR-208b	8.95	↑
miR-370	5.67	↑
miR-197	3.72	↑
miR-365	2.45	↑
miR-33a	0.12	↓
miR-182-5p	0.15	↓
miR-103	0.25	↓
miR-542	0.34	↓

表3 典型病例治疗前后比较共同出现  
差异表达的 miRNA

miRNA	治疗前标准值/治疗后标准值	表达趋势
miR-122	15.85	↑
miR-146a	14.41	↑
miR-125a-5p	11.56	↑
miR-208b	8.78	↑
miR-370	6.86	↑
miR-197	4.12	↑
miR-365	2.05	↑
miR-33a	0.11	↓
miR-182-5p	0.11	↓
miR-103	0.25	↓
miR-542	0.32	↓

3.3 qRT-PCR 验证 miRNA 表达 为证实 miRNA 表达谱数据的可靠性,选择4个显著差异表达的 miRNA 进一步行 qRT-PCR,包括 miR-122、miR-146a、miR-33a 和 miR-182-5p。治疗组血浆 miR-122 和 miR-146a 表达水平分别是正常组的 (15.63±0.22) 和 (11.78±0.23) 倍,而 miR-33a 和 miR-182-5p 表达水平分别是正常组的 (0.10±0.01) 和 (0.18±0.01) 倍,差异均有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。同样,治疗前的典型病例血浆 miR-122、miR-146a 表达水平分别是治疗后的 15.80 和 13.66 倍;而 miR-33a 和 miR-182-5p 表达水平分别是治疗后的 0.11 和 0.16 倍。(见表4)

表4 qRT-PCR 验证差异表达的 miRNA

组别	miR-122	miR-146a	miR-33a	miR-182-5p
正常组	1	1	1	1
治疗组	15.63±0.22	11.78±0.23	0.10±0.01	0.18±0.01
典型病例治疗前	15.80	13.66	0.11	0.16
典型病例治疗后	1	1	1	1

## 4 讨 论

高脂血症是威胁人类健康的主要疾病之一,它不仅是一个独立的疾病,还是高血压病、高血糖、心脑血管疾病等的重要危险因素。目前,诸多临床实践表明,中医药治疗和干预高脂血症具有独特的优势<sup>[8-9]</sup>。本项目前期研究发现,针对高脂血症之脾虚肝郁、痰浊血瘀证,运用脉康汤治疗收效较好。脾虚气弱,运化无力,饮食水谷不能化生气血精微,营养周身,反致水化为饮,湿聚成痰;肝失疏泄,气机失畅,气病及血,血液循行不畅,瘀阻痰生;痰瘀互结,日久脉络受损。脉康汤以健脾、疏肝、化痰、

祛瘀为法,方中黄芪、茯苓、山楂健脾化痰;白芍、菊花、钩藤疏肝平肝;丹参、川芎活血化瘀;葛根升脾胃清阳,运化水湿。该方治疗高脂血症疗效较好,但其分子机制尚不明确。

miRNA 是一类长度约为 22 个核苷酸的内源性非编码蛋白质的单链小 RNA,目前有学者已针对不同组织和疾病表达谱发现 miRNA 表达存在明显的组织特异性,而血液中的 miRNA 具有可重生性、难降解性、高稳定性等特点<sup>[10]</sup>。外周血 miR-205、miR-142-3p、miR-335、miR-21 等多个 miRNA 已成为肿瘤、原发性高血压合并心力衰竭、肺动脉高压、败血症等进展和预后的新型标志物<sup>[1-3,11]</sup>。同时,miRNA 可通过上调或下调其表达水平,从而调节相应靶基因和蛋白的表达,减轻靶器官损害,因而可作为疾病新的治疗靶点,具有广泛的临床应用前景<sup>[12]</sup>。

本研究发现,治疗前治疗组与正常组比较,以及典型病例治疗前后比较,高脂血症患者血浆 miR-122、miR-146a、miR-33a 和 miR-182-5p 等 11 种 miRNA 水平发生明显的表达改变,后经 qRT-PCR 验证提示,高脂血症患者 miR-122、miR-146a 表达明显升高,miR-33a 和 miR-182-5p 表达明显降低。研究发现 miR-122 的表达对脂代谢的调节具有十分重要的作用。在对正常小鼠利用反义寡核苷酸技术抑制 miR-122 后发现小鼠血浆胆固醇水平降低,肝脏脂肪酸氧化增强,肝脏脂肪酸以及胆固醇的合成率下降<sup>[13]</sup>。使用同样的方法抑制肥胖小鼠 miR-122 的表达,发现血浆胆固醇水平下降,并且肝脏脂肪变性情况发生明显好转<sup>[13]</sup>。最新的研究发现,高脂饮食的仓鼠在其肝脏和心脏等组织均发现 miR-146a 的表达明显上调,表明 miR-146a 与脂质代谢紊乱密切相关<sup>[14]</sup>。miR-33 是在脂质代谢中研究最广泛的 miRNA,miR-33a/b 直接靶向并抑制 ATP 结合盒转运体 1 (ABCA1),ABCA1 是细胞胆固醇向载脂蛋白微粒和初期高密度脂蛋白(HDL)的关键转运体<sup>[15]</sup>。一项小鼠研究发现,使用分子生物学的技术抑制 miR-33 的生成,能使 ABCA1 基因的表达上调,且能使血浆 HDL 的增幅达 40% 左右<sup>[16]</sup>。另外,在高脂饮食大鼠的白色脂肪组织、骨骼肌、肝脏、胰腺和血液中均发现 miR-182-5p 的表达明显下调,这可

能与饮食中胆固醇含量增加有关<sup>[17]</sup>。

综上所述,高脂血症患者血浆中 miRNA 的表达有明显改变,经脉康汤治疗后也随之向相反方向改变,提示血浆 miRNA 可作为脉康汤降脂预后的重要指标。本研究对进一步探讨脉康汤治疗高脂血症的作用机制和分子基础、评估患者治疗效果具有重要意义,并为临床使用干预 miRNA 的方法以治疗高脂血症提供了一定的实验基础。

#### 参考文献

- [1] SCHLOSSER K,TAHA M,DENG Y, et al. Discordant regulation of microrna between multiple experimental models and human pulmonary hypertension[J]. Chest,2015,148(2):481-490.
- [2] ZHANG JY,SUN MY,SONG NH, et al. Prognostic role of microRNA-205 in multiple human malignant neoplasms:A meta-analysis of 17 studies[J]. BMJ Open,2015,5(1):e006244.
- [3] 黄颖,伍伟锋.原发性高血压合并心力衰竭患者血浆 microRNA 表达谱的改变[J].中华高血压杂志,2017,25(7):673-676.
- [4] OH RC,TRIVETTE ET,WESTERFIELD KL. Management of Hypertriglyceridemia;Common questions and answers[J]. Am Fam Physician,2020,102(6):347-354.
- [5] 中国成人血脂异常防治指南修订联合委员会.中国成人血脂异常防治指南(2016年修订版)[J].中华心血管病杂志,2016,44(10):833-853.
- [6] 郑筱萸.中药新药临床研究指导原则[M].北京:中国医药科技出版社,2002:85.
- [7] 翁维良.血瘀证及活血化瘀中西医结合研究新进展——第二届全国活血化瘀研究学术会议纪要[J].中西医结合杂志,1987,7(3):190-191.
- [8] 齐学林,杨亚锋,刘春梅,等.调脂灵丸治疗2型糖尿病合并高脂血症的临床研究[J].河北中医,2019,41(10):1508-1511.
- [9] 任红微,王璇.何首乌治疗高脂血症临床疗效的Meta分析[J].湖南中医杂志,2019,35(1):110-112,133.
- [10] SUN K,LAI EC. Adult-specific functions of animal microRNAs[J]. Nat Rev Genet,2013,14(8):535-548.
- [11] OLIVIERI F,SPAZZAFUMO L,SANTINI G, et al. Age-related differences in the expression of circulating microRNAs:MiR-21 as a new circulating marker of inflammaging[J]. Mech Ageing Dev,2012,133(11-12):675-685.
- [12] INOUE J,INAZAWA J. Cancer-associated miRNAs and their therapeutic potential[J]. J Hum Genet,2021,66(9):937-945.
- [13] ESAU C,DAVIS S,MURRAY SF, et al. MiR-122 regulation of lipid metabolism revealed by in vivo antisense targeting[J]. Cell Metabolism,2006,3(2):87-98.
- [14] BARBALATA T,ZHANG L,DULCEANU MD, et al. Regulation of microRNAs in high-fat diet induced hyperlipidemic hamsters[J]. Sci Rep,2020,10(1):20549.
- [15] SEDGEMAN LR,MICHELL DL,VICKERS KC. Integrative roles of microRNAs in lipid metabolism and dyslipidemia[J]. Curr Opin Lipidol,2019,30(3):165-171.
- [16] RAYNER KJ,SHEEDY FJ,ESAU CC, et al. Antagonism of miR-33 in mice promotes reverse cholesterol transport and regression of atherosclerosis[J]. J Clin Invest,2011,121(7):2921-2931.
- [17] ZHOU J,MENG Y,TIAN S, et al. Comparative microRNA expression profiles of cynomolgus monkeys, rat, and human reveal that miR-182 is involved in T2D pathogenic processes[J]. Journal of Diabetes Research,2014,2014:760397.

(收稿日期:2021-08-28)

## 名医名方:小儿风热感冒方

张炜,男,主任中医师,南阳理工学院兼职教授,河南中医药大学硕士研究生导师。1985年8月毕业于河南中医学院(现河南中医药大学)中医系,第二批全国优秀中医临床人才。从事中医儿科工作37年,潜心于仲景学术研究,致力于中医儿科经方临床应用研究。

**组成:**葛根20~30g,桑叶6g,蝉蜕4g,荆芥(后下)6g,薄荷(后下)6g,浮萍4~6g,连翘10g,生石膏20~50g,甘草6g。(以上为体质量15kg小儿用量,临证随年龄、视病情增减。)

**功能:**辛凉解表、疏风散热。

**主治:**小儿感冒、上呼吸道感染、急性扁桃体炎、发疹性疾病(麻疹除外)等证属风热外袭者。

**用法:**每天1剂,水煎,早、中、晚饭前30min服。

**加减:**热毒盛者,咽喉红肿,加桔梗、金银花、牛蒡子;便秘者加大黄或合升降散;脉中取弦细微滑者,合龙胆泻肝汤加减;尺脉微者,加玄参;内热炽盛,体温甚高或将会出现高热(患儿烦躁、前额越摸越热、咽腔红肿、老红舌、脉滑数有力者),生石膏可用至30~50g。(郑亚飞,黄亚攀,张炜,http://www.entcm.com.cn/news.html?aid=192832)