

DOI:10.3724/SP.J.1008.2009.00825

MiR-122 稳定转染细胞系的建立及其脂代谢特征

章亚南[△], 王芳[△], 杨富, 殷一旋, 张玲, 孙树汉*

第二军医大学基础部医学遗传学教研室, 上海 200433

[摘要] **目的:** 利用稳定表达人 miR-122 前体的表达载体, 转染低表达 miR-122 的人肝癌细胞系 HepG2 细胞, 获得过量表达 miR-122 的稳定转染细胞系, 探讨 miR-122 对肝脏细胞脂代谢的影响及其机制。 **方法:** 对已构建完成的表达质粒 pEZX-hsa-mir-122 和对照质粒 pEZX-mir-control 进行酶切鉴定, 对酶切正确的克隆进行 DNA 测序, 测序正确的克隆应用脂质体试剂转染, 绿色荧光蛋白表达监测转染效率, 应用嘌呤霉素筛选稳定转染细胞系, 实时定量 PCR 在 RNA 水平鉴定 miR-122 的表达, 蛋白质印迹法从靶分子水平验证 miR-122 的抑制功能, 尼罗红染色观察细胞内脂质。 **结果:** pEZX-hsa-mir-122 质粒成功转染 HepG2 细胞, 质粒携带的 miR-122 前体序列整合到细胞基因组中, 获得过量表达 miR-122 的 HepG2 细胞株, 细胞内成熟体 miR-122 可抑制靶基因的翻译, 细胞内脂质明显增加。 **结论:** 人 miR-122 前体序列可整合在 HepG2 细胞基因组中, 过量表达 miR-122 的 HepG2 细胞出现脂质代谢异常。

[关键词] 人 miR-122; 稳定转染; 脂代谢; 嘌呤霉素; HepG2 细胞

[中图分类号] R 589.2 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2009)07-0825-05

Establishment of hsa-mir-122 stably transfected-HepG2 cell line and its lipid metabolism characteristics

ZHANG Ya-nan[△], WANG Fang[△], YANG Fu, YIN Yi-xuan, ZHANG Ling, SUN Shu-han*

Department of Medical Genetics, College of Basic Medical Sciences, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China

[ABSTRACT] **Objective:** To establish a HepG2 cell line stably overexpressing hsa-mir-122 by transfecting the HepG2 cells with pEZX-hsa-mir-122 vectors, so as to observe the influence of miR-122 on the lipid metabolism in the liver cells. **Methods:** The constructed pEZX-hsa-mir-122 and pEZX-mir-control plasmids were identified by restriction enzyme digestion and the right clones by sequencing were subjected to sequencing. And the right clones by sequencing were transfected by LipofectamineTM. The transfection efficiency was assessed by green fluorescent protein expression. The stably transfected cell lines were screened by Puromycin. The expression of miR-122 was examined by real-time PCR. The inhibitory function of miR-122 was testified by Western blotting assay. Nile red was used to observe the content of lipid in HepG2 cells stably overexpressing hsa-mir-122. **Results:** HepG2 cells were successfully transfected with pEZX-hsa-mir-122 and pEZX-mir-control plasmids. The precursor miRNA sequences were integrated into the genome of HepG2 cells stably overexpressing miR-122. Compared with the control HepG2 cells, the HepG2 cells overexpressing miR-122 contained more lipid in the cytoplasm. **Conclusion:** The miR-122 precursor sequence can integrate into the genome of HepG2 cells. The increase of miR-122 level in HepG2 cells can result in abnormal metabolism of lipid.

[KEY WORDS] hsa-mir-122; stable transfection; lipid metabolism; puromycin; HepG2 cell

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2009, 30(7): 825-829]

MicroRNAs (miRNAs) 是一类大小约 21~23 个碱基的单链非编码 RNA, 是由具有发夹结构的约 70~90 个碱基大小的单链 RNA 前体经过 Dicer 酶加工后生成, 为内源性小 RNA^[1]。依据碱基配对原则, miRNAs 同靶信使 RNA(mRNA) 的 3' 非翻译区 (3'-UTRs) 结合, 介导 mRNA 的降解, 从而在转录

后抑制编码蛋白基因的表达^[2]。越来越多的证据显示, miRNAs 调控了动物体内许多重要的生物过程。此外, miRNAs 还参与了病毒感染、心血管疾病和神经肌肉疾病的发生、发展, 对肿瘤的形成和进展也有重要作用^[3~5]。

miR-122 是肝特异性表达的一种 miRNAs, 研

[收稿日期] 2009-02-16 **[接受日期]** 2009-05-25

[基金项目] 国家自然科学基金(30671829)。Supported by National Natural Science Foundation of China (30671829)。

[作者简介] 章亚南, 博士, 副教授。E-mail: zyn_smmu@126.com; 王芳, 博士, 副教授。E-mail: wfsjz@163.com

[△]共同第一作者(Co-first authors)。

* 通讯作者(Corresponding author)。Tel: 021-81871053, E-mail: shsun@vip.sina.com.cn

究^[6]显示 miR-122 在成年动物的肝脏中表达丰度最高,大约占肝细胞中总 microRNA 的 70%。目前已经证实^[7-9]小鼠、土拨鼠和人的肝脏中有 miR-122 的表达,人的原代肝细胞和部分肝细胞系均有 miR-122 的表达,如小鼠 Hepa1-6 细胞和人 Huh7 细胞。生物功能研究发现,miR-122 参与了脂质代谢和丙型肝炎病毒的细胞内复制,也同肝细胞的应激性损伤和肿瘤发生有关。

Krützfeldt 等^[10]在小鼠体内的研究证实,使用“antagomirs”抑制小鼠体内 miR-122,可显著下调小鼠血浆胆固醇;随后,Elmén 等^[11]在非人灵长类动物体内连续应用 miR-122 的抑制剂 LNA-antimiR 数天,亦可使血浆总胆固醇发生持续的、可逆的下降。虽然从小鼠到灵长类动物,从小动物到大动物,miR-122 的体内抑制均起到的很好的降低血浆胆固醇的作用,但 miR-122 参与胆固醇代谢的确切机制仍不清楚,虽然在 Esau 等^[7]的研究中,利用基因芯片技术发现在小鼠肝脏 miR-122 被抑制后,有些脂代谢基因发生差异表达,但所发现的基因 mRNA 均不是 miR-122 的靶分子,miR-122 调节脂代谢的确切机制并不清楚,有必要在细胞、分子水平进一步研究 miR-122 的脂代谢调节功能。差异性表达是功能基因组研究最常使用的方法,本课题组在前期研究中使用了针对 miR-122 的小干扰 RNA 和 miR-122 的模拟剂进行转染研究,但转染过程对细胞的代谢有明显影响,而且转染后的 RNA 干扰效果仅能维持数天,不利于脂代谢功能的研究(结果待发表),鉴于此,本研究利用 miR-122 的表达载体建立过量表达 miR-122 的稳定转染细胞系,并对稳转细胞的脂质代谢特征进行了初步研究。

1 材料和方法

1.1 主要材料和试剂 MiR-122 前体表达克隆购自复能基因公司。质粒提取试剂盒购自 Omega 公司;转染试剂脂质体 LipofectamineTM 2000 为 Invitrogen 公司产品;Puromycin 购自 InvivoGen 公司;PrimeScript RT reagent Kit 购自 TaKaRa 公司;兔抗人阳离子氨基酸转运蛋白(cationic amino acid transporter, CAT-1)抗体购自 Abcam 公司;HRP 标记的羊抗兔 IgG 购自上海普飞公司;化学发光试剂 Supersignal ECL 购自 Hyclone Pierce 公司; Nile red(尼罗红)染料购自上海杰美基因医药科技有限公司,

1.2 细胞复苏与培养 液氮中取出 HepG2 细胞,37℃水浴化冻,快速放入含 10%胎牛血清、0.5%青

链霉素的 MEM 液体培养液中,置于 37℃、5% CO₂ 培养箱中孵育,生长至 90%密度时传代,转染前 1 d 换无抗生素的培养液过夜。

1.3 细胞转染和转染效率的观察 转染前 1 d 取对数生长期的 HepG2 细胞以 2×10^5 /孔的密度接种于 24 孔板。无抗生素 MEM 培养液(10% FBS)培养过夜。待细胞贴壁生长达 80%融合时,弃去细胞培养液,用无血清培养液洗涤细胞 1 次,然后按脂质体转染试剂 LipofectamineTM 2000 的说明书将提取并纯化的 pEZX-hsa-mir-122 质粒及对照质粒转染 HepG2 细胞,转染后 4 h 更换培养液,用含 6 μg/ml 的嘌呤霉素(puromycin)培养液培养,48 h 观察瞬时表达情况,3~4 d 后当对照组细胞大部分死亡时,根据嘌呤霉素最小致死浓度试验,改用 4 μg/ml 的嘌呤霉素维持筛选,每 2~3 d 换液传代,2 周后抗性克隆初步形成,在荧光显微镜下观察其绿色荧光的强度。在细胞融合达 80%时,将细胞移至 6 孔板培养,筛选单克隆至培养瓶中扩增,并在细胞的对数生长期收集细胞,进行各项实验。

1.4 实时定量 PCR 检测 miR-122 的表达 筛选到的 HepG2-miR-122 单克隆细胞扩增培养后接种到 60 mm 培养皿中,待细胞生长到 80%融合时,PBS 洗 3 遍,TRIzol 裂解细胞提取总 RNA。RNA 定量后,用 PrimeScript RT reagent Kit 进行 RT-PCR,20 μl 体系中 1 μg RNA 为模板,逆转录生成 cDNA(用 ddH₂O 稀释 5 倍备用),再以 cDNA 为模板,分别对 miR-122 和 U6 内参进行实时定量 PCR 扩增,扩增过程及荧光信号检测数据储存和分析均由 Corbett 公司 Rotor-Gene 实时定量 PCR 仪完成,使用 SDS 1.1 软件对结果进行计算和分析。每个样品设 3 个复孔,以 U6 作为内参,实验重复 3 次。计算 Ct 均值,应用相对定量法(ΔΔCt)进行定量分析。

1.5 蛋白质印迹法观察 miR-122 靶分子 CAT-1 表达 冰上加入裂解液裂解细胞,提取总蛋白,经变性后取 100~200 μg 总蛋白进行 SDS-PAGE,电转移蛋白到聚偏二氟乙烯(polyvinylidene difluoride, PVDF)膜上。5%脱脂奶粉室温封闭 2 h,分别加入兔抗人 CAT-1 抗体(1:500,4℃孵育过夜。TBST 洗涤液洗膜 3 次,每次 10 min。加入辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG(1:2 000),室温摇动 1 h,洗膜。增强型化学发光底物(enhanced chemiluminescence, ECL)显影,曝光胶片。用 Chemilmager 5500 成像分析系统(Alpha Innotech)扫描并记录光密度。以 β-actin 为内对照,蛋白表达强度以 CAT-1 蛋白表达光密度与 β-actin 光密度的比值表示。

1.6 尼罗红染色观察稳定转染 miR-122 的 HepG2 细胞系中游离脂肪酸 将稳定转染的 HepG2 细胞接种到盖玻片上,待细胞贴壁生长达 60% 融合时, PBS 洗涤细胞 1 次,细胞同尼罗红染料(100 ng/ml) 室温孵育 5 min,吸出尼罗红染料后用 PBS 洗涤 2 次,50%甘油 PBS 封片,荧光显微镜观察。

1.7 统计学处理 所有计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用方差分析, $P < 0.05$ 为差异有显著性。

2 结果

2.1 表达质粒构建图和测序结果 本研究中购买的 miR-122 表达克隆,应用了基于猫免疫缺陷病的慢病毒系统构建的载体骨架。RNA 聚合酶 III 型的 H1 启动子驱动转录前体 miRNA 的茎环前体(大约有 150 核苷酸长度)。随后通过 RNAi 的酶系加工生成成熟的 miRNA。并在同一载体的 CMV 启动子的驱动下共表达报告基因 eGFP,双顺反子下游的嘌呤霉素筛选基因也同时表达,可用于监测 miRNA 表达和筛选稳定转染细胞。图 1 显示的是构建在 pEZX-MR01 上的 hsa-mir-122 表达载体。质粒酶切鉴定后进行克隆测序,测序引物是 Forward: 5'-GCC CTG CAA TAT TTG CAT GTC GCT-3',图 2 显示的是表达质粒的测序结果,公司提供的 hsa-mir-122 前体序列是:5'-ccu uag cag agc ugu gga gug uga caa ugg ugu uug ugu cua aac uau caa acg cca uua uca cac uaa aua gcu acu gcu agg c-3',经软件比对,从测序的第 99 位碱基开始至 184 位碱基,与已知序列 100% 匹配(图 2),克隆正确。

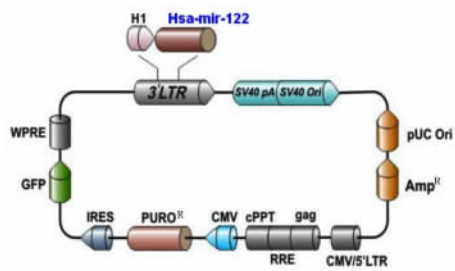


图 1 人 miR-122 表达质粒

Fig 1 pEZX-hsa-mir-122 plasmid

2.2 转染后细胞荧光密度 人 miR-122 前体表达质粒具有绿色荧光(EGFP)筛选标志,转染 3 d 后,荧光显微镜观察显示,HepG2 细胞内有明亮绿色荧光表达,转染效率达 60% 以上。图 3 显示 HepG2 细胞的转染效率。

2.3 miR-122 表达结果 本研究中采用 OmicsLink miRNA Expression Clone 表达系统,构建的 pEZX-

hsa-mir-122 质粒表达的是人 miR-122 的一种茎环结构,经 Dicer 酶切割后可得到成熟的 miR-122 结构:aac gcc auu auc aca cua aa u a。质粒转染后,经嘌呤霉素筛选和单克隆培养,并经实时定量 PCR 鉴定,获得了稳定表达人 miR-122 的 HepG2 细胞系。阳性克隆传代后重复进行实时定量 PCR 鉴定,结果显示,阳性克隆的 miR-122 的表达水平高于转染对照质粒的 HepG2 细胞,也明显高于未转染的 HepG2 细胞,差异有显著性($P < 0.05$)。

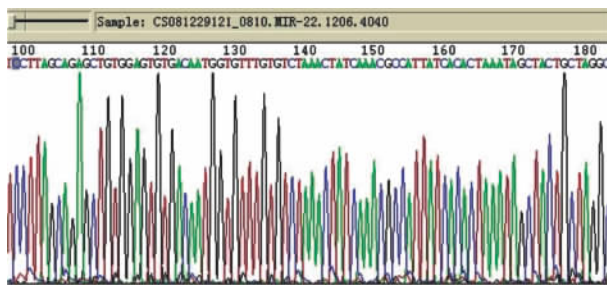


图 2 pEZX-hsa-mir-122 质粒测序结果

Fig 2 DNA sequence of pEZX-hsa-mir-122 plasmid

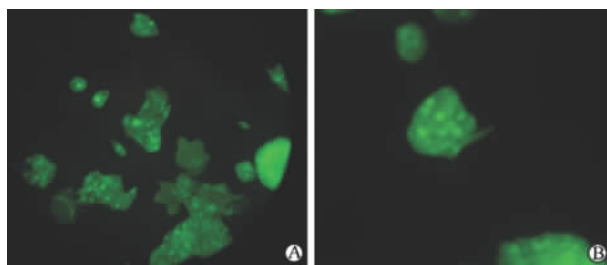


图 3 表达绿色荧光的 HepG2 细胞

Fig 3 HepG2 cells expressing green fluorescent protein

A: pEZX-hsa-mir-122 group; B: pEZX-mir-control group. Original magnification: $\times 100$

2.4 miR-122 靶基因 CAT-1 表达降低 本实验检测发现,在 pEZX-hsa-mir-122 稳转克隆中,CAT-1 蛋白表达水平明显降低,进一步证实了 miR-122 在 HepG2 细胞中的过量表达及其抑制活性(图 4)。

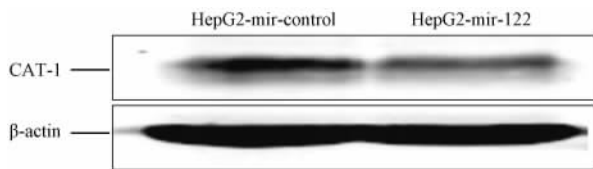


图 4 蛋白质印迹法检测 CAT-1

Fig 4 Western blotting analysis of CAT-1

2.5 细胞内脂质增加 图 5 显示,在 miR-122 稳转

细胞中,红色荧光明显增强,结果提示 miR-122 在 HepG2 细胞的高表达使细胞内脂质增加。

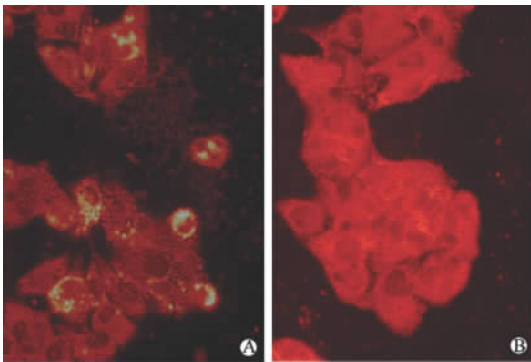


图5 尼罗红染色的 miR-122 稳定转染细胞系
Fig 5 Nile red stained HepG2 cells overexpressing hsa-mir-122

A: HepG2 cells transfected with pEZx-hsa-mir-122; B: HepG2 cells transfected with pEZx-mir-control. Original magnification: $\times 100$

3 讨论

脂性肝炎是一大类脂肪性肝脏疾病,大约有 15% 的患者会进展为肝硬化,最近的研究^[12]显示,脂性肝炎与肝脏 microRNA 表达谱的改变密切相关,使得 microRNA 成为新的 RNA 干扰治疗的靶点。Krützfeldt 等^[10]在小鼠体内应用“antagomirs”拮抗 miR-16、miR-192、miR-122 和 miR-194 发现,该拮抗剂的 RNA 干扰作用是特异的、有效的和持续的,尤其是 miR-122 体内 RNA 干扰实验发现,受试动物的血浆胆固醇明显降低,对受试动物基因表达谱进行分析确认,miR-122 调节了多个与胆固醇生物合成相关的基因,但后续实验并未明确与胆固醇合成相关的靶基因,也就是说,目前仍不清楚 miR-122 是通过哪些途径调节了脂代谢相关基因,建立 miR-122 相关的脂代谢细胞模型将大大促进其分子机制的研究。

HepG2 细胞和 Huh7 细胞是两个重要的肝癌细胞系,Chang 等^[13]的研究证实,Huh7 细胞高表达 miR-122 分子,平均每个细胞的拷贝数是 16 000;而 HepG2 细胞中 miR-122 表达很低,平均每个细胞的拷贝数不足 140 个。在肝脏脂代谢的机制研究中,HepG2 细胞因其活跃的脂代谢活性而被用于建立肝细胞脂质模型^[14-15],而 Huh7 细胞很少用于肝脏脂代谢研究中,2 个肝癌细胞的脂代谢差异是否与其 miR-122 的表达差异有关呢? miR-122 在细胞内的表达差异对细胞代谢有哪些影响呢?虽然小 RNA 模拟剂和抑制剂的转染可以用于相关的研究,但实验中发现,小 RNA 的作用持续时间短,不利于脂代谢情况的长期观察,尤其是在细胞代谢组学的研究

中,实验成本很高,结果的重复性也不好。在 HepG2 细胞中,miR-122 表达低,miR-122 的靶分子 CAT-1 高表达^[9],根据以上特性,本实验中将 hsa-mir-122 前体表达质粒转染 HepG2 细胞,成功建立了过量表达 miR-122 的 HepG2 细胞克隆,并应用 miR-122 的靶分子 CAT-1 进一步验证了 miR-122 在细胞内对靶分子的抑制效果。

MiR-122 是一个与脂代谢密切相关的调节性分子,它在 HepG2 细胞内由低表达达到过量表达,势必会对细胞的脂代谢发生影响,所以有必要观察稳转细胞系的脂代谢特征。脂类物质在机体中具有能量储备的作用,是膜结构的组成成份和细胞信号分子,细胞浆脂滴(lipid droplet)的形成是正常细胞生理过程,脂滴由中性脂质构成,作为脂肪酸能量储备,所以对中性脂肪的观察可直观体现肝细胞的脂代谢情况。尼罗红染料能特异性结合细胞内中性脂质,本实验通过尼罗红染色观察到 HepG2 细胞内 miR-122 的升高可引起细胞内脂滴的增加,稳定转染细胞系同对照相比,脂代谢差异明显,是研究 miR-122 对脂代谢调节作用的很好的细胞模型。

[参考文献]

- [1] Ambros V. The functions of animal microRNAs[J]. Nature, 2004,431:350-355.
- [2] Bartel D P. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions[J]. Cell, 2009,136:215-233.
- [3] Triboulet R, Mari B, Lin Y L, Chable-Bessia C, Bannasser Y, Lebrigand K, et al. Suppression of microRNA-silencing pathway by HIV-1 during virus replication[J]. Science, 2007,315:1579-1582.
- [4] Eisenberg I, Alexander M S, Kunkel L M. miRNAs in normal and diseased skeletal muscle[J]. J Cell Mol Med, 2009,13:2-11.
- [5] Calin G A, Croce C M. MicroRNA signatures in human cancers[J]. Nat Rev Cancer, 2006,6:857-866.
- [6] Girard M, Jacquemin E, Munnich A, Lyonnet S, Henrion-Caude A. miR-122, a paradigm for the role of microRNAs in the liver[J]. J Hepatol, 2008,48:648-656.
- [7] Esau C, Davis S, Murray S F, Yu X X, Pandey S K, Pear M, et al. miR-122 regulation of lipid metabolism revealed by *in vivo* antisense targeting[J]. Cell Metab, 2006,3:87-98.
- [8] Varnholt H, Drebbler U, Schulze F, Wedemeyer I, Schirmacher P, Dienes H P, et al. MicroRNA gene expression profile of hepatitis C virus-associated hepatocellular carcinoma[J]. Hepatology, 2008,47:1223-1232.
- [9] Bhattacharyya S N, Habermacher R, Martiny-Bar C, Janczuk S, Filipowicz W. Relief of microRNA-mediated translational repression in human cells subjected to stress[J]. Cell, 2006,125:1111-1124.
- [10] Krützfeldt J, Rajewsky N, Braich R, Rajeev K G, Tuschl T, Ma-

- noharan M, et al. Silencing of microRNAs *in vivo* with “antagomirs”[J]. *Nature*, 2005, 438: 685-689.
- [11] Elmén J, Lindow M, Schütz S, Lawrence M, Petri A, Obad S, et al. LNA-mediated microRNA silencing in non-human primates [J]. *Nature*, 2008, 452: 896-899.
- [12] Cheung O, Puri P, Eicken C, Contos M J, Mirshahi F, Maher J W, et al. Nonalcoholic steatohepatitis is associated with altered hepatic microRNA expression[J]. *Hepatology*, 2008, 48: 1810-1820.
- [13] Chang J, Nicolas E, Marks D, Sander C, Lerro A, Buendia M A, et al. miR-122, a mammalian liver-specific microRNA, is processed from her mRNA and may downregulate the high affinity cationic amino acid transporter CAT-1[J]. *RNA Biol*, 2004, 1: 106-113.
- [14] Wu X, Zhang L, Gurley E, Studer E, Shang J, Wang T, et al. Prevention of free fatty acid-induced hepatic lipotoxicity by 18beta-glycyrrhetic acid through lysosomal and mitochondrial pathways[J]. *Hepatology*. 2008, 47: 1905-1915.
- [15] Li Z, Berk M, McIntyre T M, Gores G J, Feldstein A E. The lysosomal-mitochondrial axis in free fatty acid-induced hepatic lipotoxicity[J]. *Hepatology*, 2008, 47: 1495-1503.

[本文编辑] 尹 茶

· 读者 作者 编者 ·

中草药名称中文、拉丁文及英文对照表(二十五)

| 汉语拼音名 | 中文名 | 拉丁名 | 英文名 |
|--------------------|-------|--|----------------------------------|
| Xianbaitou | 鲜白头 | <i>Bulbus Scillae Scilloidis</i> | Common Squill Bulb |
| Xiangbaizhi | 香白芷 | <i>Radix Angelicae Citriodora</i> | Lemonfragrant Angelica Root |
| Xiangfu | 香附 | <i>Rhizoma Cyperi</i> | Nutgrass Galingale Rhizome |
| Xiangjiapi | 香加皮 | <i>Cortex Periplocae</i> | Chinese Silkvine Root-bark |
| Xiangmao | 香茅 | <i>Herba Cymbopogonis Citrati</i> | Lemongrass Herb |
| Xiangmupi | 橡木皮 | <i>Cortex Querci Acutissimae</i> | Sawtooth Oak Bark |
| Xiangrikui | 向日葵 | <i>Clinanthium Helianthi</i> | Sunflower Receptacle |
| Xiangru | 香薷 | <i>Herba Moslae</i> | Chinese Mosia Herb |
| Xiangsizi | 相思子 | <i>Semen Abri Precatorii</i> | Coralhead Plant Seed |
| Xiangyuan | 香橼 | <i>Fructus Citri</i> | Citron Fruit |
| Xiangzhangmu | 香樟木 | <i>Ligum Cinnamomi Camphorae</i> | Camphorwood |
| Xianhecao | 仙鹤草 | <i>Herba et Gemma Agrimoniae</i> | Hairyvein Agrimonia Herb and Bud |
| Xianmao | 仙茅 | <i>Rhizoma Curculiginis</i> | Common Curculigo Rhizome |
| Xianrenzhang | 仙人掌 | <i>Caulis Opuntiae</i> | Cholla Stem |
| Xiantaocao | 仙桃草 | <i>Herba Veronicae Peregrinae</i> | Purslane Speedwell Herb |
| Xiaobaicheng | 小白撑 | <i>Radix Aconiti Heterotrichi</i> | Heterohairy Monkshood Root |
| Xiaobogu | 小驳骨 | <i>Herba Gendarussae</i> | Common Gendarussa Herb |
| Xiaofeipeng | 小飞蓬 | <i>Herba Conyzae Canadensis</i> | Horseweed Herb |
| Xiaofei yangcao | 小飞扬草 | <i>Herba Euphorbiae Thymifoliae</i> | Thymifolious Euphorbia Herb |
| Xiaoguoqiangwei | 小果蔷薇 | <i>Radix Rosae Cymosae</i> | Smallfruit Rose Root |
| Xiaohuixiang | 小茴香 | <i>Fructus Foeniculi</i> | Fennel Fruit |
| Xiaoji | 小蓟 | <i>Herba Cephalanoploris</i> | Common Cephalanoplos Herb |
| Xiaolianqiao | 小连翘 | <i>Herba Hyperici Erecti</i> | Erect St. John'swort Herb |
| Xiaowuxincai | 小无心菜 | <i>Herba Arenariae Serpyllifoliae</i> | Serpoletleaf Sandwort Herb |
| Xiatianju | 下田菊 | <i>Herba Adenostematis</i> | Common Adenostema Herb |
| Xiatianwu | 夏天无 | <i>Rhizoma Corydalis Decumbentis</i> | Decumbent Corydalis Tuber |
| Xiebai | 薤白 | <i>Bulbus Allii Macrostemii</i> | Longstamen Onion Bulb |
| Xiecao | 缬草 | <i>Radix Valerianae</i> | Valerian Root |
| Xiguapi | 西瓜皮 | <i>Exocarpium Citrulli</i> | Watermelon Peel |
| Xiheliu | 西河柳 | <i>Cacumen Tamaricis</i> | Chinese Tamarisk Twig |
| Xihonghua | 西红花 | <i>Stigma Croci</i> | Saffron |
| Xihuangcao | 溪黄草 | <i>Herba Rabdosiae Lophanthoidis</i> | Linearstripe Rabdosia Herb |
| Xingxiangtu'erfeng | 杏香兔耳风 | <i>Herba Alisliaee Fragrantis</i> | Frangrant Ainsliaea Herb |
| Xingxiucai | 星宿菜 | <i>Herba Lysimachiae Fortunei</i> | Fortune Loosestrife Herb |
| Xinming | 荜莢 | <i>Herba Thlaspis</i> | Boor's Mustard Herb |
| Xinshi | 信石 | <i>Arsenicum Sablimatum</i> | Arsenic Sublimate |
| Xinyi | 辛夷 | <i>Flos Magnoliae</i> | Biond Magnolia Flower |
| Xiongdan | 熊胆 | <i>Fel Ursi</i> | Bear Gall |
| Xionghuang | 雄黄 | <i>Realgar</i> | Realgar |
| Xishuai | 蟋蟀 | <i>Gryllus Chinensis</i> | Chinese Cricket |
| Xishuguo | 喜树果 | <i>Fructus Camptothecae Acuminatae</i> | Common Camptotheca Fruit |