

X射线照射对人外周血淋巴细胞 miRNA 表达谱影响的初步研究

宋秀军¹, 卢敬泰¹, 牛冬梅², 赵广利¹, 吕进¹, 王硕¹, 李娜¹, 张阳东¹

(1. 火箭军特色医学中心, 北京 100088; 2. 火箭军 96606 部队医院, 河南洛阳 471003)

摘要: **目的** 探讨 X 射线照射人外周血淋巴细胞后 miRNA 表达谱的变化, 为寻找新的辐射损伤生物标志物奠定基础。**方法** 采集健康成年男性外周血, 给予 2Gy 与 4Gy X 射线照射后分别于 12h 和 24h 分离外周血淋巴细胞, 提取各组细胞总 RNA, 采用 Taqman 低密度流体芯片技术检测照射组与对照组的 miRNA 表达谱差异, 并选取 4 种 miRNAs 进行 PCR 单管验证。**结果** 2Gy 与 4Gy X 射线照射人外周血淋巴细胞 12h 可诱导 283 种 miRNAs 表达上调, 473 种 miRNAs 表达下调; 2Gy 与 4Gy X 射线照射人外周血淋巴细胞 24h 可诱导 464 种 miRNAs 表达上调, 331 种 miRNAs 表达下调。其中, 2Gy 与 4Gy X 射线照射后, 有 20 种 miRNAs 同时表现出时间反应性, 即随着照射时间的延长而升高, 其升高倍数为 0.25~27.43 倍; 8 种 miRNA 随着照射时间的延长而降低, 其下调倍数为 0.11~13.84 倍。其次, 照射 12h 与 24h 后, 外周血淋巴细胞中仅发现 2 种 miRNAs 表现出剂量反应性, 即随着照射剂量的升高而升高, 其升高倍数为 0.16 至 1.12 倍; 24 种 miRNAs 随着剂量的增加而降低, 其下调倍数为 0.08~45.34。**结论** 人外周血淋巴细胞经 2Gy 与 4Gy X 射线照射后, 不同时间点可筛选出多种差异表达的 miRNAs, 这些差异表达的 miRNAs 表现出一定的时间和剂量反应性, 可能是辐射损伤评估的潜在指标。

关键词: X 射线; 外周血淋巴细胞; miRNA; 生物标志物

中图分类号: R818.74; R392.11 **文献标识码:** A **文章编号:** 1671-7414 (2022) 01-159-05

doi: 10.3969/j.issn.1671-7414.2022.01.032

Preliminary Study on miRNA Expression Profile of Human Peripheral Blood Lymphocytes Irradiated by X-ray

SONG Xiu-jun¹, LU Jing-tai¹, NIU Dong-mei², ZHAO Guang-li¹, LÜ Jin¹, WANG Shuo¹, LI Na¹, ZHANG Yang-dong¹

(1. PLA Rocket Force Characteristic Medical Center, Beijing 100088, China; 2. 96606 Military Hospital of Rocket Army, Henan Luoyang 471003, China)

Abstract: **Objective** To investigate the changes of miRNA expression profile in human peripheral blood lymphocytes after X-ray irradiation, and lay a foundation for finding new biomarkers of radiation injury. **Methods** Peripheral blood samples were collected from healthy adult males. After 2 Gy and 4 Gy X-ray irradiation, peripheral blood lymphocytes were isolated at 12 hours and 24 hours, respectively. Total RNA was extracted from each group. TaqMan low density fluid chip technology was used to detect the difference of miRNA expression profile between the irradiation group and the control group. 4 kinds of miRNAs were selected for PCR single tube validation. **Results** The expression of 283 miRNAs was up-regulated and 473 miRNAs was down regulated by 2Gy and 4Gy X-ray irradiation for 12 hours. The expression of 464 kinds of miRNAs were up-regulated and 331 kinds of miRNAs were down regulated by 2Gy and 4Gy X-ray irradiation for 24 hours. Among them, 20 kinds of miRNAs showed time responsiveness after 2Gy and 4Gy X-ray irradiation, that was, they increased with the extension of irradiation time, and the increase fold was 0.25 to 27.43. 8 miRNAs decreased with the prolongation of irradiation time, and the down-regulation fold ranged from 0.11 to 13.84. Secondly, only 2 kinds of miRNAs were found in peripheral blood lymphocytes after 12 hours and 24 hours of irradiation, which showed dose-response, that was, they increased with the increase of irradiation dose, and the increase fold was 0.16 to 1.12. 24 kinds of miRNAs decreased with the increase of dose, and the down-regulation fold was 0.08 to 45.34. **Conclusion** The changes of miRNA expression in peripheral blood were different at different time points after 2Gy and 4Gy X-ray irradiation. The differentially expressed miRNAs show a certain time and dose response, which may be a potential indicator of radiation damage assessment.

基金项目: 中国博士后科学基金面上项目 (2014M552667)。

作者简介: 宋秀军 (1979-), 女, 硕士, 主管技师, 主要从事放射生物学研究, E-mail: songxiujun1979@163.com。

通讯作者: 张阳东 (1970-), 男, 博士, 主任技师, 主要从事基础医学研究, E-mail: zhangyd262@163.com。

Keywords: X-ray; peripheral blood lymphocytes; miRNA; biomarker

电离辐射对人体造成严重伤害, 长期影响健康, 甚至导致肿瘤^[1-2]。在职业暴露及辐射事故中, 对辐射损伤做出及时有效的评估是当前研究的热点之一。因此, 寻找合适的生物标志物对早期快速筛查接触人群具有重要意义。目前国内外学者通过研究已将多种 miRNAs 用于肿瘤诊断、治疗和预后判断的生物标志物^[3-4]。本研究通过低密度流体芯片技术, 分析筛选经 X 射线诱导的外周血淋巴细胞差异表达的 miRNAs, 为寻找新的辐射相关的生物标志物提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 研究对象 采集 7 例健康成年男性外周血液标本。受试者平均年龄 32 周岁。所有受试者均征得书面知情同意, 研究方案经火箭军特色医学中心伦理委员会批准。

1.2 仪器与试剂 直线加速器(由火箭军特色医学中心放疗科提供, 瑞典 Elekta 公司 Precise 型); 实时荧光定量 PCR 仪 (ABI7900, ABI 公司); PRMI 1640 培养液和胎牛血清均购自美国 Gibco 公司; microRNA 提取试剂盒 (mirVana™ miRNA Isolation Kit)、microRNA 逆转录试剂盒 (TaqMan® MicroRNA Reverse Transcription Kit)、miRNA 引物和探针、microRNA 定量检测试剂 (TaqMan® Universal PCR Master Mix)、miRNA 低密度流体芯片 (Taqman Low Density Array, TLDA) 均购自美国 ABI 公司。

1.3 方法

1.3.1 样本的采集与分组: 所有受试者均采集外周血各 20 ml, 分别用 2Gy 与 4 Gy X 射线 (吸收剂量率为 1.0Gy / min) 体外照射, 于 12h 和 24h 分离淋巴细胞。以未照射的人外周血淋巴细胞为对照组。

1.3.2 miRNA 的提取: 用 microRNA 提取试剂盒提取各组细胞总 RNA。具体步骤如下: 加入 600 μl 裂解液 3min, 充分裂解细胞; 加入 1.25 倍体积的无水乙醇, 充分混匀; 将混合液吸入至过滤柱内, 10 000 r/min 离心 15s, 弃去管内液体; 加入 700 μl miRNA Wash Solution 1, 离心 10s, 弃去管内液体; 加入 500 μl miRNA Wash Solution 2/3, 按以上步骤离心, 弃去管内液体, 重复此步骤; 将离心柱重新放入收集管内, 离心 1min; 加入 50 μl Nuclease-free Water, 离心 30s, 洗脱 RNA。

1.3.3 miRNA 芯片检测: 采用 Taqman 低密度流体芯片检测不同剂量照射后人外周血淋巴细胞 miRNA 表达谱变化。TaqManArray MicroRNA 芯片分为 A, B 板, 可同时检测 760 种成熟 miRNAs 的表达。加入特异性茎环引物反转录获得的 cDNA 后,

采用 ABI PRISM 7900 测序仪进行差异表达 miRNA 的筛选。反应条件为: 50℃ 2min; 95℃ 10min; 95℃ 15s, 60℃ 1min, 共 45 个循环, 获得每种 miRNA 特异性扩增曲线。

1.3.4 结果判读 miRNA 相对表达量计算方法: 以对照组中 U6 miRNA 的表达量为内参, $\Delta\Delta Ct$ 法^[5-6] 计算各组 miRNA 相对对照组表达量的倍数。公式为: $\text{Fold change} = -\Delta\Delta Ct = -(\Delta Ct_{\text{实验组}} - \Delta Ct_{\text{对照组}})$; $\Delta Ct = Ct_{\text{待测样品}} - Ct_{\text{内参}}$ 。结果判读: 表达结果以 ≥ 2 和 < -2 为结果表达异常。

1.4 统计学分析 使用 SPSS 19.0 软件进行数据统计分析, 数据以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 组间采用独立样本 t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 X 射线照射人外周血淋巴细胞差异表达的 miRNAs 经 2 Gy 与 4 Gy X 射线照射人外周血淋巴细胞 12h 或 24h 后, 对 760 种 miRNAs 进行差异表达的筛选。结果显示, 经 2Gy X 射线照射 12h 后表达升高的 miRNAs 有 178 种, 表达降低的 miRNAs 有 32 种; 2Gy X 射线照射 24h 后表达升高的 miRNAs 有 343 种, 表达降低的 miRNAs 有 28 种。经 4Gy X 射线照射 12h 后表达升高的 miRNAs 有 105 种, 表达降低的 miRNAs 有 441 种; 经 4Gy X 射线照射 24h 后表达升高的 miRNAs 有 121 种, 表达降低的 miRNAs 有 303 种。

2.2 X 射线照射人外周血淋巴细胞 miRNA 的时间反应性 为筛选出具有时间效应性的 miRNAs, 对差异表达的 miRNAs 进一步分析。结果发现, 2 Gy X 射线照射人外周血淋巴细胞 12h 和 24h 可以诱导 48 种随时间的延长而表达上调的 miRNAs, 53 种随时间的延长而表达下调的 miRNAs, 见图 1a, 1b; 4Gy X 射线照射人外周血淋巴细胞 12h 和 24h 可诱导 32 种随时间的延长而表达上调的 miRNAs, 14 种随时间的延长而表达下调的 miRNAs, 见图 1a, 1b。其中 20 种 miRNAs 同时表现出时间反应性, 即随着照射时间的延长而升高, 其升高倍数为 0.25~27.43 倍, 见图 1a, 2。8 种 miRNA 随着照射时间的延长而降低, 其下调倍数为 0.11~13.84 倍, 见图 1b。

2.3 X 射线照射人外周血淋巴细胞 miRNA 的剂量反应性 为筛选出具有剂量效应性的 miRNAs, 对差异表达的 miRNAs 进一步分析。结果发现, 经 2Gy 和 4Gy X 射线照射人外周血淋巴细胞 12h 后, 可以诱导 12 种随剂量的增加而表达上调的 miRNAs, 45 种随剂量的增加而表达下调的

miRNAs, 见图 3a, 3b; 经 2Gy 和 4Gy X 射线照射人外周血淋巴细胞 24h 后, 可诱导 19 种随剂量的增加而表达上调的 miRNAs, 56 种随剂量的增加而表达下调的 miRNAs (见图 3a, 3b)。2Gy 与 4Gy X 射线照射人外周血淋巴细胞 12h 或 24h 可以诱导 34 种 miRNAs 随剂量的增加而表达上调及 77 种 miRNAs 随剂量的增加而表达下调, 且表现出特定时间点的剂量反应性; 其中仅有 2 种 miRNAs 同时表现出对 2Gy 与 4Gy 的剂量反应性, 即随着照射剂量的升高而升高, 其升高倍数为 0.16~1.12 倍, 见图 3a, 4。24 种 miRNAs 同时表现出对 2Gy 与 4Gy 的剂量反应性, 随着剂量的增加而降低, 其下调倍数为 0.08~45.34, 见图 3b。

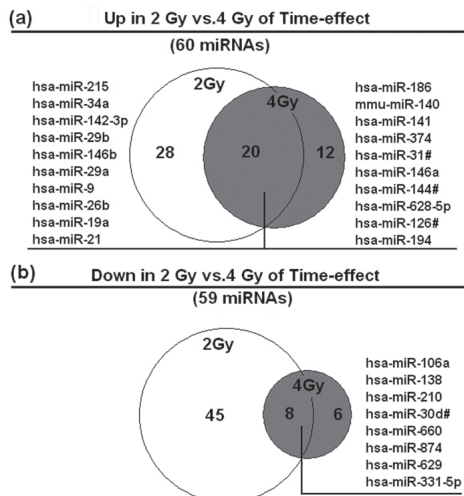


图 1 X 射线照射人外周血淋巴细胞具有时间反应性差异表达的 miRNAs

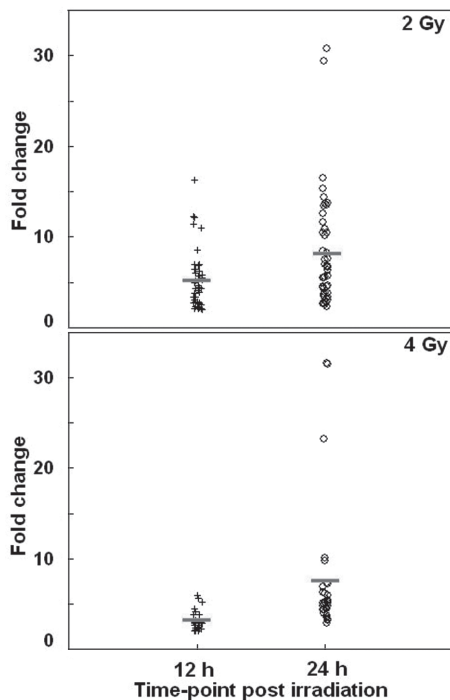


图 2 X 射线照射人外周血淋巴细胞具有时间反应性且表达上调的 miRNAs

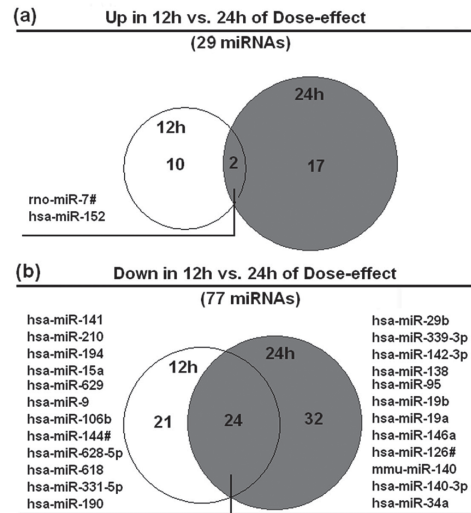


图 3 X 射线照射人外周血淋巴细胞具有剂量反应性差异表达的 miRNAs

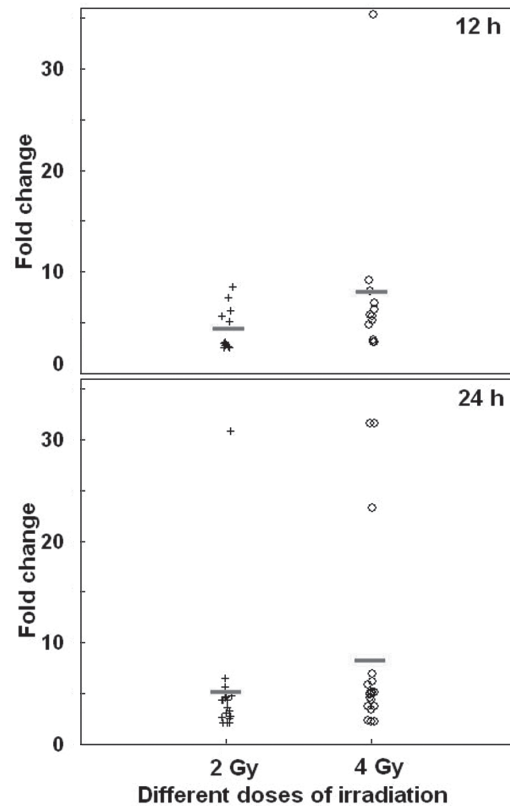
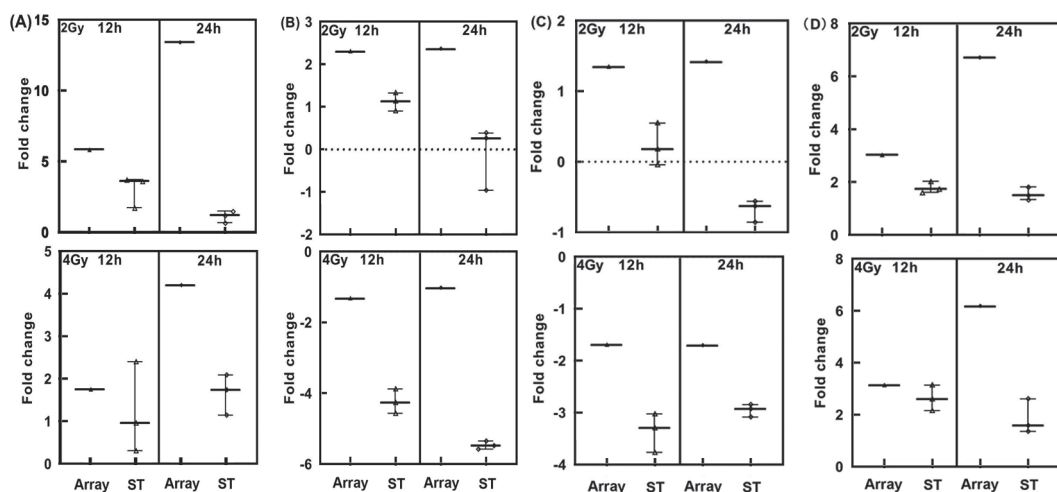


图 4 X 射线照射人外周血淋巴细胞具有剂量反应性且表达上调的 miRNAs

2.4 四种差异表达的 miRNAs PCR 单管验证 选取一种在芯片结果中具有时间反应性且表达上调的 miRNA 即 has-miRNA-21, 三种在芯片结果中不同时间点和剂量点表达升高或降低的 miRNAs 即 has-miRNA-424, has-miRNA-505 和 has-miRNA-423-5p 进行 PCR 方法的单管验证, 其与芯片结果不完全一致, 总体表现为表达水平低于芯片检测水平, 见图 5。



注: A.miR-424; B.miR-505; C.miR-423-5p; D.miR-21; ST:single tube

图5 四种差异表达的 miRNAs PCR 单管验证

3 讨论

核辐射事故的发生往往具有不可预测性,会给公众造成严重后果。寻找准确、简便、快速的辐射应急反应生物标志物具有重要意义。目前有以染色体畸变为代表的细胞遗传学技术是辐射生物剂量的金标准^[7-8]。此外,美国哥伦比亚大学研发了自动化分析淋巴细胞微核和淋巴细胞 γ -H2AX 的技术平台^[9], REPIN 等^[10]利用此技术平台实现微量血淋巴细胞微核分析并建立了剂量上限为 5Gy 的剂量效应曲线。但是这些评估方法有其局限性,非常费时而且难以广泛应用,因此寻找能够早期快速评估辐射损伤程度的微创生物标志物更具有明显的优势。

miRNAs 广泛存在于真核生物中,在细胞增殖、分化、凋亡及基因调控中起重要作用^[11]。近年来,miRNAs 作为微创生物标志物已显示良好的应用前景,被应用于筛查肿瘤等复杂疾病^[12-14]。因其独特的优势,如采集方便、在室温下或经过反复冻融循环后的相对稳定性、可高通量快速检测、高特异度和敏感度等特点,所以是一种理想的生物标志物^[15-16]。动物实验研究中发现,miRNA 在血浆中的差异表达与辐射损伤有关^[17]。电离辐射可以影响特定 miRNA 的表达水平,并具有辐射剂量和时间依赖性^[18]。

目前,国内外关于人外周血淋巴细胞中 miRNAs 作为辐射生物剂量剂的研究相对较少。因此,本研究应用低密度流体芯片技术,对不同剂量 X 射线照射后人外周血淋巴细胞中 760 种 miRNAs 的表达水平进行初步分析。结果发现,在 2 Gy 与 4 Gy X 射线照射后,20 种 miRNAs 随着照射时间的延长而升高,8 种 miRNA 随着照射时间的延长而降低,其中部分 miRNAs 照射后表达升高,与 SONG 等^[19]

的研究结果较为一致,说明 X 射线照射后淋巴细胞中 miRNAs 的表达是个动态的过程;2 种 miRNAs 随照射剂量增加而表达上调,24 种 miRNAs 随剂量增加而表达下调,说明随着 X 射线照射后时间的延长,miRNAs 的表达与剂量相关。上述研究结果中发现,有 4 种 miRNAs 即 has-miR-629, has-miR-138, has-miR-210 和 has-miR-331-5p 同时表现出剂量和时间反应性,即随着照射剂量的增加及照射后时间的延长而表达下调,这与侯殿俊等^[20]报道的人外周血 miRNA-150 的变化规律相一致,提示这四种 miRNA 作为辐射生物剂量标志物可能更具有可行性。从芯片结果和 PCR 单管验证结果相比较发现,4 种 miRNAs 在时间和剂量的表达趋势上并不完全一致,这是否和本研究中样本数较少有关,还有待进一步的证实。

综上所述,本研究通过对外周血淋巴细胞 miRNA 表达谱分析发现,X 射线既能够诱导部分 miRNAs 的表达,也能够抑制部分 miRNAs 的表达,这些差异表达的 miRNAs 表现出一定的时间和剂量反应性,为进一步寻找评估辐射损伤的生物标志物奠定了实验基础。在后续的实验研究中,我们将探索对表现出时间和剂量反应性的 miRNAs,增加时间点和射线照射的剂量范围,制作时间剂量效应曲线,进一步验证其作为辐射损伤标志物的可行性。

参考文献:

- [1] KREUZER M. Cancer risk from low-dose ionizing radiation[J]. Der Radiologe, 2017, 57(7): 517-518.
- [2] KEIL A P, RICHARDSON D B. Quantifying cancer risk from radiation[J]. Risk Analysis, 2018, 38(7): 1474-1489.
- [3] MISHRA S, YADAV T, RANI V. Exploring miRNA based approaches in cancer diagnostics and therapeutics[J]. Critical Reviews in Oncology

- Hematology, 2016, 98: 12-23.
- [4] 芦嘉, 史伟峰. 血清 miRNA-720 和 miRNA-484 在结肠癌分期及早期诊断中的应用 [J]. 现代检验医学杂志, 2017, 32(1): 77-79, 83.
- LU Jia, SHI Weifeng. Application of serum miRNA-720 and miRNA-484 in the staging and early diagnosis of colon cancer [J]. Journal of Modern Laboratory Medicine, 2017, 32(1): 77-79, 83.
- [5] SCHMITTGEN T D, LIVAK K J. Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method [J]. Nature Protocols, 2008, 3(6): 1101-1108.
- [6] SCHMITTGEN T D, LEE E J, JIANG Jinmai. High-throughput real-time PCR [J]. Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.), 2008, 429: 89-98.
- [7] International Atomic Energy Agency. Cytogenetic dosimetry: Applications in preparedness for and response to radiation emergencies [R]. Vienna: IAEA, 2011.
- [8] 林仲武, 王琪, 王治东. 辐射生物剂量计的研究现状及发展方向 [J]. 中华放射医学与防护杂志, 2017, 37(10): 799-804.
- LIN Zhongwu, WANG Qi, WANG Zhidong. Overview of current situation and future development of radiation biodosimetry study [J]. Chinese Journal of Radiological Medicine and Protection, 2017, 37(10): 799-803.
- [9] GARTY G, TURNER H C, SALERNO A, et al. The decade of the RABIT (2005-15) [J]. Radiation Protection Dosimetry, 2016, 172(1/3): 201-206.
- [10] REPIN M, PAMPOU S, KARAN C, et al. RABIT-II: implementation of a high-throughput micronucleus biodosimetry assay on commercial biotech robotic systems [J]. Radiation Research, 2017, 187(4): 492-498.
- [11] LU T X, ROTHENBERG M E. MicroRNA [J]. The Journal of Allergy and Clinical Immunology, 2018, 141(4): 1202-1207.
- [12] ZHENG Mengyue, HOU Ling, MA Yu, et al. Exosomal let-7d-3p and miR-30d-5p as diagnostic biomarkers for non-invasive screening of cervical cancer and its precursors [J]. Molecular Cancer, 2019, 18(1): 76.
- [13] 赵格, 高琼, 余宗涛, 等. 肺癌患者血浆 miR-3151 表达水平与临床病理特征的相关性研究 [J]. 现代检验医学杂志, 2020, 35(5): 28-32.
- ZHAO Ge, GAO Qiong, YU Zongtao, et al. Study on the correlation between the expression of miR-3151 in plasma and clinicopathological features in patients with lung cancer [J]. Journal of Modern Laboratory Medicine, 2020, 35(5): 28-32.
- [14] 张筱东, 谢星星, 李佳, 等. 血清外泌体 miR-221 和 miR-378 水平检测在胃癌诊断中的应用研究 [J]. 现代检验医学杂志, 2020, 35(6): 52-55.
- ZHANG Xiaodong, XIE Xingxing, LI Jia, et al. Application study of serum exosome miR-221 and miR-378 detection in the diagnosis of gastric cancer [J]. Journal of Modern Laboratory Medicine, 2020, 35(6): 52-55.
- [15] BACKES C, MEESE E, KELLER A. Specific miRNA disease biomarkers in blood, serum and plasma: challenges and prospects [J]. Molecular Diagnosis & Therapy, 2016, 20(6): 509-518.
- [16] WANG Lin, ZHANG Lijuan. Circulating microRNAs as diagnostic biomarkers for motor neuron disease [J]. Frontiers in Neuroscience, 2020, 14: 00354.
- [17] 李刚强, 濮亚斌, 王寅. 小剂量辐射致小鼠血液中 microRNA 表达改变 [J]. 实用预防医学, 2016, 23(4): 405-408.
- LI Gangqiang, PU Yabin, WANG Yin. MicroRNA expression changes induced by low-dose irradiation in mice [J]. Practical Preventive Medicine, 2016, 23(4): 405-408.
- [18] 于海月, 葛常辉, 冯宝民. miRNA 调控辐射损伤相关信号通路研究 [J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2020, 36(6): 634-639.
- YU Haiyue, GE Changhui, FENG Baomin. Research on the related signaling pathways for radiation damage regulation by miRNA [J]. Chinese Journal of Biochemistry and Molecular Biology, 2020, 36(6): 634-639.
- [19] SONG Man, XIE Dafei, GAO Shanshan, et al. A biomarker panel of radiation-upregulated miRNA as signature for ionizing radiation exposure [J]. Life (Basel), 2020, 10(12): 361.
- [20] 侯殿俊, 马娅, 李洁清, 等. 电离辐射诱发人外周血 miRNA-150 表达水平的改变及意义 [J]. 中国辐射卫生, 2019, 28(6): 606-608, 613.
- HOU Dianjun, MA Ya, LI Jieqing, et al. Ionizing radiation induced miRNA-150 changes in peripheral blood [J]. Chinese Journal of Radiological Health, 2019, 28(6): 606-608, 613.
- 收稿日期: 2021-01-16
修回日期: 2021-04-16

(上接第 153 页)

- [19] CAI Zhen, TAO Jia, JIA Tianye, et al. Multicenter evaluation of the Xpert Carba-R assay for detection and identification of carbapenemase genes in sputum specimens [J]. Journal of Clinical Microbiology, 2020, 58(9): e00644-20.
- [20] SMITH M, DIEDEREN B, SCHARRINGA J, et al. Rapid and accurate detection of carbapenemase genes in Enterobacteriaceae with the Cepheid Xpert Carba-R assay [J]. Journal of Medical Microbiology, 2016, 65(9): 951-953.
- [21] 宋林键, 叶丽艳, 赵强, 等. 利用 GeneXpert 法检测耐碳青霉烯类肠杆菌科细菌耐药基因及耐药性分析 [J]. 国际检验医学杂志, 2019, 40(24): 2999-3002.
- SONG Linjian, YE Liyan, ZHAO Qiang, et al. Detection of Carbapenem-resistant genes in Enterobacteriaceae using the Gene Xpert molecular diagnostic system and the resistance analysis [J]. International Journal of Laboratory Medicine, 2019, 40(24): 2999-3002.
- 收稿日期: 2021-07-01
修回日期: 2021-09-18