

小剂量辐射致小鼠血液中 microRNA 表达改变

李刚强¹ 濮亚斌² 王寅³

¹ 解放军四五五医院病理科 ² 解放军四五五医院普外科 ³ 解放军四五五医院药剂科

摘要: 目的 探讨 ^{60}Co γ 射线小剂量辐射损伤对小鼠血液 microRNA 的影响及意义。方法: SPF 级 C57BL/6J 小鼠接受 0.5Gy 全身照射后, 分别于照射后 6h、24h 进行外周血白细胞计数。同时应用 Agilent microRNA 生物芯片筛选小鼠血液中差异表达 microRNA。结果 microRNA 芯片筛选出辐射后 6h 小鼠中差异表达 miRNA 共 11 个, 其中 7 个上调, 4 个下调。照射 24h 小鼠中差异表达 miRNA 共 32 个, 其中 13 个上调, 19 个下调。且与未照射组比较表达差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。0.5Gy 照射后, 6h 和 24h 外周血白细胞总数与对照组相比无统计学意义 ($P > 0.05$)。miRNA 表达变化优于血液中白细胞的变化。结论 microRNA 在血浆中差异表达与辐射损伤有关, 其有望成为辐射损伤新的血液标志物。

关键词: 小剂量辐射; 微 RNA; 基因表达谱;

microRNA changes induced by low dose radiation in mouse

LI Gang-qiang, PU Ya-bin, Wang Yin. Department of pathology, 455th hospital of PLA, Shanghai, 200052

[Abstract] **Objective** To investigate the differential expression profiles of miRNA induced by low dose radiation in mouse peripheral blood and to explore their main function and significances. **Methods** After SPF C57BL/6J mice expose to 0.5Gy single whole body radiation, total number of peripheral WBC were measured at 6h and 24h. The changes of miRNA expression in peripheral blood were by using Agilent miRNA microarrays after radiation of 6h and 24h. **Results** After 6h with 0.5Gy $\text{Co } \gamma$ irradiation, miRNA microarray revealed that 11 miRNA were differentially expressed, in which 7 miRNA up-regulated, 4 miRNA down-regulated. After 24h with 0.5Gy $\text{Co } \gamma$ irradiation, there are 32 miRNA were differentially expressed, in which 13 miRNA up-regulated, 19 miRNA down-regulated. Compared with control group, the total number of peripheral WBC didn't decreased obviously ($P < 0.05$). **Conclusion** miRNA were involved in the regulation of low dose radiation damage, and miRNA expression signatures derived from mouse blood maybe be use as new biomarkers for exposure to low dose radiation.

[Key words] low dose radiation; miRNA; gene expression profile;

随着放射物质的广泛应用, 放射源日益增多。公众受到小剂量电离辐射

(low dose radiation LDR) 的危险发生率逐渐增加。与大剂量辐射相比, 小剂量辐射暴露尚不足以引起临床可观察症状, 但可能造成暴露人群健康的远期危害, 包括辐射致癌^[1]。miRNA 是一组内源性非编码 RNA, 长度 18-25 个核苷酸, 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。研究显示其与多种疾病有密切联系^[2-3]。本研究采用 miRNA 芯片技术筛选小剂量照射引起小鼠血液中差异表达的 miRNA, 同时进行外周血白细胞计数计数, 旨在探讨 miRNA 在辐射诱导机体损伤中的意义。

1 材料和方法

1.1 实验动物及处理 试验用 C57BL/6 雄性小鼠 16 只, 6-8 周龄 (上海西普尔-必凯试验动物中心), 随机分为两组, 未照射组 6 只, 照射组 10 只。照射组在第二军医大学海医系医学研究所辐照室进行照射。为避免外界其他条件对小鼠的检测结果的影响, 每个动物笼子中置放小鼠不超过 3 个, 以免限制其自由活动。同时照射前小鼠已单独放置在 11x8x6cm 的笼子里 24 小时。⁶⁰Co γ 射线剂量 0.5Gy 照射, 剂量率为 10Gy/h。照射后 6h 和 24h 摘除动物眼球取血。

1.2 外周血象检测 照射后取血 500 μ l, 注入 2ml 血细胞分析仪稀释液中, 用全自动血细胞分析仪 poch-100i (日本 sysmex) 检测外周血 WBC 数。

1.3 miRNA 芯片检测

1.2.1 所用芯片为 Agilent 小鼠 miRNA 21.0 芯片, 包括 2549 个成熟 miRNA。

采用 Recoverall™ Total Nucleic Acid Isolation 试剂盒, 根据生产厂商提供的标准操作流程提取总 RNA。总 RNA 经 Agilent Bioanalyzer 2100 电泳质检合格后备用。

按照 miRNA Complete Labeling and Hyb Kit 标准程序对实验样品 RNA 中 miRNA 分子进行荧光标记和杂交试验。在滚动杂交炉中, 55℃, 20rpm, 滚动杂交 20 小时。杂交完成后在洗缸中洗片。芯片结果采用 Agilent Microarray Scanner 进行扫描, 用 Feature Extraction Software 10.7 读取数据, 最后采用 Gene Spring Software 11.0 进行归一化处理。

1.3 统计学方法 采用 SPSS10.0 软件进行统计处理。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示，组间比较采用成组 t 检验。组间数据相关性采用 pearson 相关检测。P<0.05 为差异有显著意义。

2 结果

2.1 低剂量照射前后差异表达的 miRNA miRNA 芯片杂交信号强度由绿-黑-红依次增加。倍数差异 Fold Change: 是将两个标准化以后得信号相处所得的值，即 Fold Change=SignalA/SignalB。差异表达为 Fold Change>2 或<0.5。照射组 6h 小鼠中差异表达 miRNA 共 11 个，其中 7 个上调，为 miRNA-137, miRNA-138,miRNA-196, miRNA-383, miRNA-466, miRNA-669, miRNA-878; 其中 4 个下调，为 miRNA-1, miRNA-133, miRNA-203, miRNA-206。照射组 24h 小鼠中差异表达 miRNA 共 32 个，其中 13 个上调，为 miRNA-124, miRNA-129, miRNA-137, miRNA-138, miRNA-196, miRNA-219, miRNA-376, miRNA-382, miRNA-410, miRNA-455, miRNA-466, miRNA-669, miRNA-7; 其中 19 个下调，为 let-7, miRNA-122, miRNA-141, miRNA-181, miRNA-18, miRNA-200, miRNA-203, miRNA-290,miRNA-291, miRNA-299, miRNA-29, miRNA-34, miRNA-429, miRNA-483, miRNA-486, miRNA-665, miRNA-675, miRNA-712, miRNA-96。

表 1 照射后 6h 差异表达的 miRNAs

miRNA	未照射组	照射组	倍数	P 值
表达增高				
miRNA-137	-2.988±0.925	4.908±0.737	26.99	<0.05
miRNA-138	-3.168±0.832	4.899±0.845	26.82	<0.05
miRNA-196	-2.345±1.012	3.713±0.963	11.73	<0.05
miRNA-383	-2.015±0.683	3.541±0.594	7.548	<0.05
miRNA-466	-1.179±0.637	2.428±0.918	4.939	<0.05
miRNA-669	-2.669±1.071	3.808±0.998	13.30	<0.05
miRNA-878	-3.155±0.712	4.889±1.181	26.64	<0.05
表达降低				
miRNA-1	13.722±1.473	8.882±1.595	0.342	<0.05
miRNA-133	12.896±1.661	8.465±1.386	0.447	<0.05
miRNA-203	9.299±0.862	4.499±0.641	0.356	<0.05
miRNA-206	11.516±0.734	6.386±0.937	0.286	<0.05

表 2 照射后 24h 差异表达的 miRNAs

miRNA	未照射组	照射组	倍数	P 值
表达增高				
miRNA-124	-3.109± 0.597	4.574±0.795	21.42	<0.05
miRNA-129	-3.138± 0.617	4.667±0.937	22.84	<0.05
miRNA-137	-3.587± 1.184	6.552±1.785	84.32	<0.05
miRNA-138	-2.138± 0.597	4.162±0.963	16.13	<0.05
miRNA-196	-3.035± 0.437	4.552±0.792	21.09	<0.05
miRNA-219	-3.063± 0.587	4.642±0.596	22.42	<0.05
miRNA-376	-3.253± 0.317	4.480±0.485	23.06	<0.05
miRNA-382	-2.285± 0.467	4.386±0.787	18.79	<0.05
miRNA-410	-2.168± 0.482	4.228± 0.571	16.85	<0.05
miRNA-455	-3.129± 0.389	4.586± 0.453	21.59	<0.05
miRNA-466	-2.353± 0.417	3.901± 0.485	13.43	<0.05
miRNA-669	-2.753± 0.589	4.077± 0.487	15.17	<0.05

miRNA-7	-2.183± 0.390	3.786± 0.912	12.40	<0.05
表达降低				
let-7	4.091±0.619	-3.322± 0.287	0.059	<0.05
miRNA-122	9.726±1.661	4.743±1.992	0.316	<0.05
miRNA-141	6.772±0.337	-0.042±0.541	0.089	<0.05
miRNA-181	3.541±0.665	2.986±0.785	0.108	<0.05
miRNA-18	3.979±0.734	-3.323±0.914	0.063	<0.05
miRNA-200	6.538±0.416	-3.312±0.566	0.011	<0.05
miRNA-203	2.166± 0.782	-2.121±1.012	0.223	<0.05
miRNA-290	4.058± 0.647	-3.332±0.917	0.060	<0.05
miRNA-291	1.409±0.539	-3.002± 0.391	0.470	<0.05
miRNA-299	2.838±0.297	-2.698± 0.582	0.216	<0.05
miRNA-29	1.385±0.287	-3.028± 0.680	0.469	<0.05
miRNA-34	5.674±0.4853	-0.626± 0.107	0.013	<0.05
miRNA-429	5.972±0.817	-3.121±0.517	0.016	<0.05
miRNA-483	2.905±0.732	-3.121±0.386	0.134	<0.05
miRNA-486	3.467±0.587	-3.022±0.881	0.090	<0.05
miRNA-665	3.869±0.617	-2.329±0.487	0.272	<0.05
miRNA-675	1.502± 0.317	-2.321±0.228	0.353	<0.05
miRNA-712	9.169±0.287	4.499±0.988	0.393	<0.05
miRNA-96	4.552±0.797	1.367±0.566	0.165	<0.05

2.2 外周血白细胞总数

照射 6h、24h 和 72h 后取血样进行外周白细胞检测，结果如表 2 所示。
照射后 6h、24h 后白细胞数量基本正常，72h 后白细胞数量轻度增高, 差异无统计学意义（ $P>0.05$ ）。

表 2 Co 射线对小鼠外周血白细胞的影响

类别	白细胞计数 /(10^9 /L)	P 值
----	---------------------	-----

未照射	4.86±0.83	
照射后 6d	4.51±0.38	>0.05
照射后 24h	4.92±0.63	>0.05

3. 讨论

电离辐射引起的急性辐射损伤症状(ARS)，常常表现为恶心、呕吐、腹泻、皮肤损伤、和骨髓功能低下，内出血和死亡^[4]。以往对电离辐射的生物效应研究主要集中在大剂量一次性照射引起的生物体损伤，包括对造血系统的损伤、对免疫系统的损伤以及对代谢系统的损伤等。近年来随着核工业的发展，有可能接受低剂量辐射（LDR）人群数量逐年增加。传统的检测方法如淋巴细胞削减或细胞基因学分析都是非常费时费力的。目前已有报道淀粉酶、C 反应蛋白及其他蛋白的表达水平作为辐射标志物的作用^[5]。但这些标志物易于如炎症或细菌感染等生理学影响。积极寻找更加敏感有效的标志物，是目前研究的方向。

miRNA 广泛分布于多个物种之中，miRNA 不编码蛋白质。人类 miRNA 的基因在 RNA 聚合酶 II 或 III（少数情况下）的作用下，转录成初级 miRNA(pri-miRNA)。RNA 聚合酶 III 剪切后形成一段具有发夹环结构的长度为 70-80nt 的前体 miRNA(per-miRNA)，经 Dicer 酶剪切生成成熟 miRNA。成熟 miRNA 主要通过目标 miRNA 分子的 3' 端非编码区域(3'-UTR)不完全互补配对，抑制该 mRNA 的翻译，调节靶基因的表达。在转录后水平调控基因表达，从而起着调控细胞分化、生长、增殖、代谢、凋亡等功能^[6-7]。miRNA 的表达具有高度的保守性、时序性和组织特异性，其中细胞特异性或组织特异性是 miRNA 表达的主要特点^[8]。近来研究显示人类体液中存在 miRNA，其物理性状非常稳定，更为重要的是，血清中的 miRNA 水平可以反映机体的不同生理状况。而且血浆中 miRNA 水平非常稳定，能够抵抗核糖核酸酶的降解^[9-10]。这些特点意味着 miRNA 可能非常适合作为一种生物标志物。在植物中，一些

环境条件如营养、水分、酸碱度和温度的变化会引起 miRNA 表达改变。在组织缺氧状态下 miRNA 表达也发生改变，因此推测 miRNA 在外界毒性因素引起的应激反应中发挥作用^[11-12]。因此我们应用 miRNA 生物芯片的方法检测系统全面的筛选 0.5Gy 照射小鼠 6h 和 24h 后血浆中相关的 miRNA，我们发现照射组 6h 小鼠中差异表达 miRNA 共 11 个，其中 7 个上调，其中 4 个下调。照射组 24h 小鼠中差异表达 miRNA 共 32 个，其中 13 个上调，其中 19 个下调，且与未照射小鼠比较表达差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。辐射 24h 后 MiRNA 的表达明显多于辐射后 6 小时。这些发现也许可以解释辐射损伤及伴随的修复。辐射既能诱导某些 miRNA 的表达，同时也能抑制某些 miRNA 的表达。辐射对于 miRNA 表达水平的调节通常与辐射敏感性调节功能有关。电离辐射产生 DNA 损伤，如核苷碱基损伤、交联、DNA 单链和双链断裂等，其中双链断裂是导致各种辐射生物效应的关键损伤形式。miRNA 参与辐射后 DNA 损伤主要通过靶向 DNA 损伤相关基因进行调节 miRNA-基因调控网络^[13-14]。我们通过搜索两个关于 miRNA 的 databases，分别为 microRNAdb (<http://bioinfo.au.tsinghua.edu.cn/microRNAdb>) 和 miRNAmap(<http://mirnamap.mbc.nctu.edu.tw/>)，我们研究了试验结果异常表达的 miRNA 的组织分布。MiRNA 涉及的靶基因均非常广泛，miRNA 在电离辐射效应中参与的调节功能也非常复杂，涉及到细胞周期，细胞分化、转录调控、信号转导通路、免疫激活等。随着研究的深入，电离辐射特异性 miRNA 的功能及作用机制将会逐渐清晰。

造血系统更新活跃，对辐射高度敏感，辐射能引起严重的造血实质细胞损伤。白细胞最先受累，极期持续低下，随后血小板数量会急剧降低，出血风险加大，紧跟着红细胞降低引起贫血。在辐射损伤时，白细胞一般于 3 天左右下降幅度最大^[15-16]。我们研究显示辐射后 6h 和 24h 白细胞略有下降。它们于未辐射组比较差异无统计学意义。结果分析说明 miRNA 检测差异表达早于白细

胞变化。

总之，本研究通过表达差异性分析，发现差异表达与低剂量辐射损伤的关系，为低剂量辐射暴露人群的辐射损伤提供诊断用生物标记物，为药物研发提供针对性强的新靶点。可以弥补血液白细胞检测早期诊断敏感性低的不足，是辐射损伤诊断的潜在血浆标志物。。当然还需要进一步扩大样本量及前瞻性的研究来证实。

参考文献

- [1] Suzuki K, Yamashita S. Low-dose radiation exposure and carcinogenesis[J]. *Jpn J Clin Oncol*, 2012, 42(7): 563-568
- [2] Okamura K, Phillips MD, Tyler DM, et al. The regulatory activity of microRNA species has substantial influence on microRNA and 3'UTR evolution. *Nat Struct Mol Biol*, 2008, 15(4): 354-363
- [3] Calin GA, Croce CM. MicroRNA signatures in human cancers[J]. *Nat Rev Cancer*, 2006, 6(11): 857-866
- [4] Waselenko JK, Macvittie TJ, Blakely WF, et al. Medical management of the acute radiation syndrome: recommendation of the strategic national stockpile radiation working group[J]. 2004, 140: 1037-1051
- [5] Blakely WF, Ossetrova NI, Whitnall MH, et al. Multiple parameter radiation injury assessment using a nonhuman primate radiation model-biodosimetry applications. *Health Physics*, 2010, 98: 153-159
- [6] Farh KK, Grimson A, Jan C, et al. The widespread impact of mammalian MicroRNAs on mRNA repression and evolution. *Science*, 2005, 310(5755): 1817-1821
- [7] Kinder CA, Martienssen RA. Spatially restricted microRNA directs leaf polarity through ARGONAUTE1. *Nature*, 2004, 428(6978): 81-84
- [8] Hornstein E, Mansfield JH, Yekta S, et al. The microRNA mir-196 acts upstream of Hoxb8 and shh in limb development. *Nature*, 2005, 438: 671-674
- [9] Gilad S, Meiri E, Yogeve Y, et al. Serum microRNAs are promising novel biomarkers. *Plos One*, 2008, 3(9): 3138-3145
- [10] Chim SS, Shing TK, Hung EC, et al. Detection and characterization of placental microRNAs in maternal plasma[J]. *Clin Chemistry*, 2008, 54: 482-490
- [11] Shukla LI, Chinnusamy V, Sunkar R. The role of microRNAs and other endogenous small RNAs in plant stress responses[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2008, 1799(11): 743-748
- [12] Kulshreshtha R, Ferracin M, Wojcik SE, et al. A microRNA signature of hypoxia[J]. *Mol Cell Biol*, 2007, 27(5): 1859-1867

[13]Wan G, Mathur R, Hu X, et al. microRNA response to DNA damage[J]. Trends Biochim Sci, 2011,36(9):478-484

[14]Fokas E, Prevo R, Hammond EM, et al. Targeting ATR in DNA damage response and cancer therapeutics[J]. Cancer Treat Rev, 2014, 40(1): 109-117

[15] Povinelli B, Kokolus KM, Curtin L, et al. The influence of metabolic stress on radiosensitivity of hematopoietic stem and progenitor cells[J]. Blood, 2013,122(21):2447-2451

[16]Hu ZQ, Xing YL, Qian YY, et al. Anti-radiation damage effect of polyethylenimine as a toll-like receptor 5 targeted agonist[J]. J Radiat Rese, 2013,54(2):243-250