

# 某氡温泉周边居民外周血血浆中 miRNAs 的表达

刘春旭 田梅 潘艳 高刚 刘建香

**【摘要】 目的** 探讨河北省某地氡温泉对周围居民外周血血浆中 miR-16、miR-106b、miR-449a、miR-34a 和 let-7g 表达的影响。**方法** 采用简单随机抽样法,抽取某地氡温泉周边居民 41 人;同时简单随机抽取生活习惯相似,但未长期接触过氡温泉的居民 46 人。采用实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 方法定量检测所有受检者血浆 miRNAs 的表达水平。**结果** 在氡温泉组血浆中,miR-16、miR-106b、miR-449a 和 let-7g 的表达显著高于健康对照组 ( $Z = -2.278, -3.835, -2.719, -2.721, P < 0.05$ )。miR-16、miR-106b、miR-449a 和 let-7g 的表达改变与氡暴露因素有关 ( $t = 2.154, 3.711, 2.319, 2.015, P < 0.05$ ),而与年龄、性别、吸烟和饮酒等因素无关。miR-34a 在氡温泉组和健康对照组血浆中的表达差异无统计学意义。**结论** miR-16、miR-106b、miR-449a 和 let-7g 可作为识别氡暴露的潜在生物学指标。

**【关键词】** 氡温泉; 血浆; miRNAs

**Expression of miRNAs in peripheral blood plasma of the residents surrounding hot springs with radon** Liu Chunxu, Tian Mei, Pan Yan, Gao Gang, Liu Jianxiang. Key Laboratory of Radiological Protection and Nuclear Emergency, China CDC, National Institute for Radiological Protection, Chinese Center for Disease Control and Prevention, Beijing 100088, China  
Corresponding author: Liu Jianxiang, Email: jxliu@163.com

**【Abstract】 Objective** To investigate the expressions of miR-16, miR-106b, miR-449a, miR-34a and let-7g in peripheral blood plasma of the residents surrounding hot springs with radon in Hebei province. **Methods** A total of 41 randomly selected residents surrounding hot springs with radon were considered as the radon group, and 46 residents with same living habit but without contact with hot springs were considered as control. The miRNAs in the peripheral blood plasma of these two groups were detected with qRT-PCR. **Results** The levels of miR-16, miR-106b, miR-449a and let-7g in the radon group were significantly higher than those in control group ( $Z = -2.278, -3.835, -2.719, -2.721, P < 0.05$ ). Alterations of these miRNAs were associated with radon exposure ( $t = 2.154, 3.711, 2.319, 2.015, P < 0.05$ ) but had no relationship with age, sex, smoking and drinking factors. No significant difference was observed in the plasma levels of miR-34a between the two groups. **Conclusions** miR-16, miR-106b, miR-449a and let-7g could be applied as potential biomarkers for radon exposure.

**【Key words】** Hot springs with radon; Plasma; miRNAs

氡( $^{222}\text{Rn}$ )是继吸烟之后导致肺癌的第二大危险因素。氡吸入体内后,其衰变产生的 $\alpha$ 粒子可在人的呼吸系统沉积,造成辐射损伤,引发肺癌。居民长期生活在高氡温泉周围的环境中,受到氡及其子体的持续性和累积性作用。miRNAs 是一类长度约为 22 个核苷酸的内源性非编码小分子 RNA,通

过与靶 mRNA 碱基配对参与基因转录后调控活动。目前,大多数研究已证实 miRNAs 在电离辐射引起的细胞反应中起着重要的调节作用。本研究在前期研究的基础上,探讨氡温泉对周围居民外周血血浆中 miR-16、miR-106b、miR-34a、miR-449a 和 let-7g 表达的影响。

## 资料与方法

1. 研究对象:河北省平山县居民,纳入标准为无急、恶性疾病,无嗜烟酒等。氡温泉组为采用简单随机方法抽取的该地氡温泉周边居民,共 41 人。赵

DOI:10.3760/cma.j.issn.0254-5098.2015.03.006

基金项目:国家自然科学基金(31100606)

作者单位:100088 北京,中国疾病预防控制中心辐射防护与核安全医学所 辐射防护与核应急中国疾病预防控制中心重点实验室

通信作者:刘建香,Email:jxliu@163.com

表 1 研究对象基本资料分析结果

组别	例数	年龄(岁)	性别(例)		吸烟(例)		饮酒(例)	
			男	女	是	否	是	否
氡温泉组	41	50.54 ± 8.04	16	25	24	17	26	15
健康对照组	46	54.04 ± 10.46	20	26	23	23	36	10
$\chi^2$ 值		1.737 <sup>a</sup>	0.177		0.636		2.333	
P 值		>0.05	>0.05		>0.05		>0.05	

注:<sup>a</sup>采用 *t* 检验,为 *t* 值

孟奇等<sup>[1]</sup>检测结果显示,该地温泉水中氡的浓度为(102 ± 11.4) Bq/L,室内氡浓度 6 个月均值为(41.9 ± 18.6) Bq/m<sup>3</sup>。同时,随机抽取与其距离约 11.2 km 生活习惯相似但未长期接触过氡温泉的其他村居民作为健康对照组,共 46 人。全部研究对象均签署知情同意书。氡温泉组和健康对照组两组居民的年龄、性别、吸烟和饮酒情况差异均无统计学意义,具有可比性,见表 1。

2. 血浆 miRNAs 提取:乙二胺四乙酸二钾(EDTA-k2)抗凝真空采血管收集静脉血,用 TRIzol LS 试剂和 miRNeasy 试剂盒(德国 Qiagen 公司)提取所有样品血浆 miRNAs(液相分离前加入 25 fmol 的 cel-miRNA-39 做外源性内参),-80 °C 冻存备用。

3. cDNA 的合成:用 TaqMan miRNA 反转录试剂盒(美国 ABI 公司),以总 miRNAs 各 2.0 μl 为模板合成 cDNA,反应体系包括:100 mmol/L dNTP,0.1 μl;反转录酶,0.5 μl;10 × 反转录缓冲液,0.75 μl;RNA 酶抑制剂,0.1 μl;miRNA 反转录引物,0.5 μl;miRNA,2.0 μl。反应条件:16 °C 30 min,42 °C 30 min,85 °C 5 min。

4. 引物设计和合成:miRNA 引物及探针由美国 ABI 公司 TaqMan miRNA assays 试剂盒提供,探针序列分别为:cel-miR-39:5' UCACCGGGUGUAAA UCAGCUUG 3'; hsa-miR-16:5' UAGCAGCACGUA AAUAUUGGCC 3'; hsa-miR-106b:5' UAAAGUGCU GACAGUGCAGAU 3'; hsa-miR-449:5' UGGCAGU GUAUUGUUAGCUGGU 3'; hsa-let-7g:5' UGAGGUA GUAGUUUGUACAGUU 3'; hsa-miR-34a:5' UGGC AGUGUCUUAGCUGGUUGU 3'。

5. 实时荧光定量 PCR:应用 TaqMan PCR system(美国 ABI 公司)在 7500 快速实时荧光 PCR 仪(美国 ABI 公司)检测 miR-16、let-7g、miR-106b、miR-449a 和 miR-34a 的表达水平。Real-time PCR 反应:95 °C,10 min 预变性;95 °C,15 s 变性;60 °C,1 min 退火延伸,50 个循环进行扩增。通过循环阈值(Ct 值)来量化 miRNAs 的相对表达水平,由于 Ct 值 >

40 时可能会出现非特异性扩增,因此 Ct 值 > 40 则舍弃。本研究选择 cel-miR-39 作为 qRT-PCR 实验的内参来标化实验数据。每个样品重复 3 次,用 2<sup>-ΔCt</sup> 公式来计算经内参 cel-miR-39 标化后的相对表达量,ΔCt = 靶 miRNA 的平均 Ct 值 - 内参的平均 Ct 值。

6. 统计学处理:采用 SPSS 16.0 软件,对基本资料进行 *t* 检验和  $\chi^2$  检验,用 Mann-Whitney *U* 检验比较 miRNAs 在氡温泉组和健康对照组血浆中的差异表达,选择氡暴露、年龄、性别、吸烟和饮酒等变量,采用强迫引入法拟合多重线性回归,分析 miRNAs 的差异性表达和居民氡暴露因素的关系。*P* < 0.05 为差异有统计学意义。

## 结 果

1. miRNAs 在氡温泉组和健康对照组血浆中的差异表达:miR-16、miR-106b、miR-34a、miR-449a 和 let-7g 在氡温泉组血浆中的表达水平显著上调(*Z* = -2.278、-3.835、-2.084、-2.719、-2.721,*P* < 0.05),见表 2,以上各 miRNAs 两组 *F*<sub>C 中位数</sub>(表示倍数变化)分别为 1.23、1.65、1.43、1.91 和 1.82。

表 2 miRNAs(2<sup>-ΔCt</sup>) 在 41 例氡温泉组 and 46 例健康对照组血浆中表达

组别	miRNAs	中位数	<i>P</i> <sub>25</sub>	<i>P</i> <sub>75</sub>
氡温泉组	miR-16	2.77	1.90	6.16
	miR-106b(×10 <sup>-2</sup> )	3.74	2.56	7.86
	miR-34a(×10 <sup>-4</sup> )	2.64	1.74	4.86
	miR-449a(×10 <sup>-6</sup> )	8.46	5.29	15.33
	let-7g(×10 <sup>-2</sup> )	1.98	1.14	3.27
健康对照组	miR-16	2.26	1.22	3.17
	miR-106b(×10 <sup>-2</sup> )	2.26	1.20	2.26
	miR-34a(×10 <sup>-4</sup> )	1.85	1.21	3.35
	miR-449a(×10 <sup>-6</sup> )	4.43	2.28	7.86
	let-7g(×10 <sup>-2</sup> )	1.09	0.54	2.07

注:*P*<sub>25</sub>. 下四分位数;*P*<sub>75</sub>. 上四分位数;两组间各 miRNAs 比较,*Z* = -2.278、-3.835、-2.084、-2.719、-2.721,*P* < 0.05

2. miRNAs 表达与各因素的回归分析:选择氡暴露、年龄、性别、吸烟和饮酒等变量,采用强迫引

入法拟合多重线性回归。结果显示, miR-16、miR-106b、miR-449a 和 let-7g ( $t = 2.154、3.711、2.319、2.015, P < 0.05$ ) 的差异性表达和居民氡暴露因素呈正相关, 而不能认为与年龄、性别、吸烟和饮酒等因素有显著性相关 ( $P > 0.05$ )。但是对于 miR-34a ( $t = 1.772, P = 0.08$ ) 的表达改变还不能认为与氡暴露有关, 同样与年龄、性别、吸烟和饮酒等因素也没有显著性相关 ( $P > 0.05$ ), 见表 3。

表 3 所有受检者外周血血浆中 miRNAs 表达水平相关因素的多重线性回归

变量	<i>b</i>	<i>S<sub>b</sub></i>	$\beta$	<i>t</i> 值	<i>P</i> 值
<b>miR-16</b>					
常数项	3.435	1.710	—	2.009	0.048
氡暴露	1.274	0.591	0.233	2.154	0.034
年龄	-0.024	0.030	-0.082	-0.788	0.433
性别	-0.136	0.887	-0.024	-0.153	0.879
吸烟	1.452	0.832	0.242	1.746	0.085
饮酒	0.666	0.798	0.109	0.834	0.407
<b>miR-106b</b>					
常数项	0.044	0.020	—	2.240	0.028
氡暴露	0.025	0.007	0.387	3.711	0.000
年龄	0.000	0.000	-0.132	-1.308	0.194
性别	0.010	0.010	0.149	0.968	0.336
吸烟	0.004	0.010	0.054	0.408	0.684
饮酒	0.001	0.009	0.013	0.101	0.919
<b>Let-7g</b>					
常数项	0.029	0.016	—	1.811	0.074
氡暴露	0.011	0.006	0.222	2.015	0.047
年龄	0.000	0.000	-0.112	-1.042	0.300
性别	0.001	0.008	0.010	0.062	0.951
吸烟	0.003	0.008	0.057	0.401	0.689
饮酒	0.007	0.008	0.125	0.927	0.357
<b>miR-449a</b> ( $\times 10^{-6}$ )					
常数项	-8.918	0.000	—	-0.737	0.464
氡暴露	7.026	0.000	0.283	2.319	0.024
年龄	0.013	0.000	0.009	0.074	0.941
性别	8.303	0.000	0.327	1.683	0.097
吸烟	-9.004	0.000	-0.339	-1.944	0.056
饮酒	-1.811	0.000	-0.066	-0.434	0.665
<b>miR-34a</b> ( $\times 10^{-6}$ )					
常数项	0.000	0.000	—	2.708	0.008
氡暴露	91.900	0.000	0.204	1.772	0.080
年龄	-2.811	0.000	-0.121	-1.065	0.290
性别	0.163	0.000	0.000	0.002	0.998
吸烟	-2.022	0.000	-0.004	-0.027	0.979
饮酒	-28.140	0.000	-0.055	-0.374	0.709

注: *b*, 回归系数; *S<sub>b</sub>*, 标准误;  $\beta$ , 标准化偏回归系数。“—”为无数据

## 讨 论

早有研究证实电离辐射能够诱发肿瘤, 并且高 LET 辐射 (如  $\alpha$  粒子) 比 X 射线和  $\gamma$  射线具有更强的辐射损伤效应<sup>[2-3]</sup>。氡温泉对周围居民的辐射损伤主要是通过氡及其子体在其衰变过程中产生  $\alpha$  粒子引起的, 因此了解其生物学作用非常重要。目前的研究主要集中在  $\alpha$  粒子辐射对细胞系 miRNAs 表达改变的影响, 而  $\alpha$  粒子辐射对人外周血血浆中 miRNAs 表达改变的研究则很少。本研究的重点是分析  $\alpha$  粒子辐射对人外周血血浆中 miRNAs 表达的影响。

本研究中, 由于氡温泉组和健康对照组资料为正偏态分布, 且转换后的资料分布也不理想, 所以采用秩和检验。研究发现血浆中 miR-16、miR-106b、miR-34a、miR-449a 和 let-7g 在氡温泉组的表达水平均显著增加, 分别是健康对照组的 1.23、1.65、1.43、1.91 和 1.82 倍。将氡暴露、年龄、性别、吸烟和饮酒等因素引入多重线性回归分析时, miR-16、miR-106b、miR-449a 和 let-7g 的表达改变与氡暴露因素有关, 而与年龄、性别、吸烟和饮酒等因素无关。但是对于 miR-34a, 还不能认为其表达改变与氡暴露相关。

在 Wagner-Ecker 等<sup>[4]</sup>关于人内皮细胞的研究中发现, 2 Gy X 射线作用后 let-7g 和 miR-16 均有不同程度的表达上调。同样, Chaudhry 等<sup>[5]</sup>研究发现, miR-16、miR-106b 和 let-7g 不但表达上调, 而且发现这些 miRNAs 表达的改变可能呈时间依赖性。此外, 也有研究发现在电离辐射作用后 miRNAs 的表达改变与照射剂量和细胞类型有关<sup>[6-7]</sup>。目前大部分研究的 miRNAs 表达改变大多是在较大剂量的低 LET 辐射作用下发生的。而在高 LET 辐射作用下, Chauhan 等<sup>[8]</sup>研究发现 3 种细胞系 (人肺腺癌细胞 A549、人单核细胞白血病细胞 THP-1 和人肺成纤维细胞 HFL) 在 0.5、1 和 1.5 Gy 的  $\alpha$  粒子辐射作用下 miRNAs 表达各不相同且互不重叠, 同样的细胞系不同剂量下 miRNAs 表达改变也有不同。这表明  $\alpha$  粒子辐射作用于不同细胞类型或不同剂量所引起的基因调控网络也不同。综上所述, 辐射可以诱导基因调控网络的生物学效应, 而这些生物学效应随着细胞类型、辐射类型、剂量和受照时间的不同而改变。miR-449a 与肿瘤抑制因子 miR-34 家

族具有相同的种子序列,具有促进细胞周期阻滞,诱导细胞凋亡的作用<sup>[9-11]</sup>。目前,关于 miR-449a 与电离辐射的研究报道很少。本研究发现 miR-16、miR-106b、miR-449a 和 let-7g 4 个 miRNAs 表达均上调,研究结果虽然与上述大部分研究结果一致<sup>[4-7]</sup>,但是温泉氡属于低剂量高 LET 辐射,Chauhan 等<sup>[8]</sup>认为高 LET 辐射可能激活与低 LET 辐射不同的生物效应途径,甚至 Cha 等<sup>[12]</sup>认为低剂量辐射可能通过控制 miRNA 的表达抑制恶性肿瘤的进展。故本研究中 miRNAs 表达上调的具体机制还有待于进一步研究。对于在相同的辐射类型  $\alpha$  粒子作用下,本研究结果与 Chauhan 等<sup>[8]</sup>研究发现的 miR-16 下调结果不同,其原因可能是由于照射剂量不同所致。

在上述差异表达的 4 个 miRNAs 中,除 miR-449a 和 let-7g 上调接近 2 倍外,其余 miRNAs 表达上调幅度不大,可能是由于本研究中的倍数变化采用中位数之比计算所得,因为中位数不是利用全部观察值计算出来的,它只与位次集中的观察值大小有关,不能反映全部观察值的平均水平。所以在计算中位数倍数变化时,可能损失了部分信息。

此外,研究发现 miR-34a 在氡温泉组的表达水平高于健康对照组( $P = 0.08$ )。秦宏冉等<sup>[13]</sup>对四川省降扎异常高氡温泉对周围居民外周血中 miRNA 的表达分析中发现,高氡组 miR-34a 和 miR-34b 表达明显上调,分别是健康对照组的 15.7 倍和 351.24 倍。至于本研究未检测到差异有统计学意义,可能是因为样本量较小,或者是因为所研究地区氡水平低于四川省降扎地区,需要增加样本量进行深入探讨。

综上所述,miR-16、miR-106b、miR-449a 和 let-7g 在氡温泉组居民血浆中的表达水平显著上调,可能具有作为氡致辐射损伤的早期标志物的潜在价值。但是其表达显著上调的具体机制还有待于进一步研究。

## 参 考 文 献

- [ 1 ] 赵孟奇,崔宏星,尚兵,等. 河北平山温泉氡水平与剂量贡献[J]. 中国辐射卫生,2012,21(1):30-32.
- [ 2 ] Little MP, Hall P, Charles MW. Are cancer risks associated with exposures to ionising radiation from internal emitters greater than those in the Japanese A-bomb survivors? [J]. Radiat Environ Biophys, 2007, 46(4):299-310.
- [ 3 ] Belyakov OV, Prise KM, Trott KR, et al. Delayed lethality, apoptosis and micronucleus formation in human fibroblasts irradiated with X-rays or alpha-particles[J]. Int J Radiat Biol, 1999, 75(8):985-993.
- [ 4 ] Wagner-Ecker M, Schwager C, Wirkner U, et al. MicroRNA expression after ionizing radiation in human endothelial cells[J]. Radiat Oncol, 2010, 5: 25.
- [ 5 ] Chaudhry MA, Omaruddin RA, Brumbaugh CD, et al. Identification of radiation-induced microRNA transcriptome by next-generation massively parallel sequencing[J]. J Radiat Res, 2013, 54(5): 808-822.
- [ 6 ] Chaudhry MA, Sachdeva H, Omaruddin RA. Radiation-induced micro-RNA modulation in glioblastoma cells differing in DNA-repair pathways[J]. DNA Cell Biol, 2010, 29(9):553-561.
- [ 7 ] Chaudhry MA, Kreger B, Omaruddin RA. Transcriptional modulation of micro-RNA in human cells differing in radiation sensitivity[J]. Int J Radiat Biol, 2010, 86(7):569-583.
- [ 8 ] Chauhan V, Howland M, Wilkins R. Effects of  $\alpha$ -particle radiation on microRNA responses in human cell-lines[J]. Open Biochem J, 2012, 6:16-22.
- [ 9 ] Lizé M, Klimke A, Dobbstein M. MicroRNA-449 in cell fate determination[J]. Cell Cycle, 2011, 10(17):2874-2882.
- [ 10 ] Lizé M, Pilarski S, Dobbstein M. E2F1-inducible microRNA 449a/b suppresses cell proliferation and promotes apoptosis[J]. Cell Death Differ, 2010, 17(3):452-458.
- [ 11 ] Liu YJ, Lin YF, Chen YF, et al. MicroRNA-449a enhances radiosensitivity in CLI-0 lung adenocarcinoma cells[J]. PLoS One, 2013, 8(4): e62383.
- [ 12 ] Cha HJ, Seong KM, Bae S, et al. Identification of specific microRNAs responding to low and high dose gamma-irradiation in the human lymphoblast line IM9[J]. Oncol Rep, 2009,22(4): 863-868.
- [ 13 ] 秦宏冉,田梅,高刚,等. 异常高氡温泉周围居民外周血中肺癌相关基因和 miRNA 的表达[J]. 中华放射医学与防护杂志,2012, 32(1):31-34.

(收稿日期:2014-07-17)