



长链非编码RNA XR_923426参与调控电离辐射诱导的微丝骨架变化

张雨 沈陆恒 周光明 裴海龙

Long Non-coding RNA XR_923426 Participates in the Regulation of Microfilament Dynamics Induced by Ionizing Radiation

ZHANG Yu, SHEN Luheng, ZHOU Guangming, PEI Hailong

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.11804/NuclPhysRev.39.2022061>

引用格式:

张雨, 沈陆恒, 周光明, 裴海龙. 长链非编码RNA XR_923426参与调控电离辐射诱导的微丝骨架变化[J]. *原子核物理评论*, 2022, 39(4):505–511. doi: 10.11804/NuclPhysRev.39.2022061

ZHANG Yu, SHEN Luheng, ZHOU Guangming, PEI Hailong. Long Non-coding RNA XR_923426 Participates in the Regulation of Microfilament Dynamics Induced by Ionizing Radiation[J]. *Nuclear Physics Review*, 2022, 39(4):505–511. doi: 10.11804/NuclPhysRev.39.2022061

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

细胞松弛素B阻断微核法鉴定男性个体辐射敏感性的方法初探

Preliminary Study on Male Individual Radiosensitivity by Cytochalasin-B Blocked Micronucleus Assay

原子核物理评论. 2021, 38(3): 339–344 <https://doi.org/10.11804/NuclPhysRev.38.2021036>

和厚朴酚对非小细胞肺癌细胞的辐射增敏效应

Radiosensitizing Effect of Honokiol on Non-small Cell Lung Carcinoma Cells

原子核物理评论. 2019, 36(1): 104–110 <https://doi.org/10.11804/NuclPhysRev.36.01.104>

电离总剂量对纳米SRAM器件单粒子翻转敏感性的影响

Impact of Total Ionizing Dose on Single Event Upset Sensitivity of Nano-SRAMs Devices

原子核物理评论. 2019, 36(3): 367–372 <https://doi.org/10.11804/NuclPhysRev.36.03.367>

氧化钆纳米粒子对A549肺癌细胞的辐射增敏效应研究

Radiosensitizing Effect of Gadolinium Oxide Nanoparticles on Human Non-small Cell Lung Cancer A549 Cells

原子核物理评论. 2019, 36(3): 373–378 <https://doi.org/10.11804/NuclPhysRev.36.03.373>

一种应用于HIRFL-CSR上的非拦截式剩余气体电离束流剖面探测器(英文)

A Residual Gas Ionization Profile Monitor Developed for HIRFL-CSR

原子核物理评论. 2017, 34(4): 773–778 <https://doi.org/10.11804/NuclPhysRev.34.04.773>

基于细胞红外光谱预测乙酰化细胞的辐射敏感性

Prediction of Radiosensitivity of Acetylated Cell Through FTIR Spectroscopy

原子核物理评论. 2017, 34(4): 790–796 <https://doi.org/10.11804/NuclPhysRev.34.04.790>

文章编号: 1007-4627(2022)04-0505-07

长链非编码 RNA XR_923426 参与调控电离辐射诱导的微丝骨架变化

张雨, 沈陆恒, 周光明, 裴海龙[†]

(苏州大学医学院放射医学与防护学院, 江苏 苏州 215123)

摘要: 细胞微丝骨架是多功能亚细胞结构, 是电离辐射的感受器也是效应器。为了明确长链非编码 RNA(lncRNA) 是否参与调控电离辐射引起的微丝骨架动力学变化, 采用 Swinholide A 处理诱导细胞微丝骨架解聚之后, 进行 lncRNA 组学分析并验证差异表达的 lncRNA; 采用鬼笔环肽染色和微丝网络结构分析等方法评价电离辐射引起微丝骨架动力学变化的程度。结果发现, 微丝骨架解聚后, lncRNA XR_923426 的表达下调; 人为上调 lncRNA XR_923426 的表达水平能够显著缓解辐射导致的微丝骨架结构异常和微丝网络连接减少。这些发现为微丝通过 lncRNA 调控辐射导致细胞死亡或肿瘤转移的机制提供了新的研究思路, 有望成为肿瘤治疗和正常组织辐射防护的新靶点。

关键词: 电离辐射; 长链非编码 RNA; 微丝; 细胞骨架

中图分类号: R811.5 **文献标志码:** A **DOI:** 10.11804/NuclPhysRev.39.2022061

1 背景

肌动蛋白是真核细胞中常见的高度保守蛋白。在非肌肉细胞中, 肌动蛋白占有所有细胞蛋白的 1%~5%; 而对于肌肉细胞, 肌动蛋白甚至高达 10%。在真核细胞中, 我们可以区分两种主要的肌动蛋白形式: 球状 G-肌动蛋白和原纤维 F-肌动蛋白。球状 G-肌动蛋白是 43 kDa 的单体, 而纤维状是由 G-肌动蛋白聚合产生的长链极性聚合物。球形单体和聚合态的纤维肌动蛋白之间的转换叫做微丝细胞骨架动力学。微丝细胞骨架动力学是一个动态的过程, 这个过程与细胞所处的细胞周期阶段相关^[1-2]。细胞利用微丝骨架来移动、极化、分裂和维持多细胞组织内的结构。肌动蛋白结构的重组和肌球蛋白/微丝之间的形态转换影响众多细胞过程, 例如细胞分裂、细胞分化和死亡^[3-4]; 在病理事件(例如癌症转化)^[5]、细胞对外部刺激(例如机械刺激)以及化学药品^[6]的反应中起作用。

细胞骨架动力学调控是细胞生物学最重要的过程之一。同样, 细胞骨架动力学失衡的机制和生物学效应研究是现代生物医学研究领域中最令人兴奋的前沿领域之一。电离辐射可以破坏微丝细胞骨架的网状结构, 导致

微丝的网状连接和分支变少, 但是部分微丝也会受电离辐射影响形成应力纤维^[7], 其中的复杂调控机制并没有完全阐明微丝细胞骨架动力学调控与辐射敏感性的关系。构成微丝的肌动蛋白影响细胞的运动、侵袭、极性、生存和生长, 肿瘤可以操纵微丝细胞骨架以获得生长优势, 因此微丝也可能成为未来抗肿瘤靶点的关键蛋白^[8]。迄今为止, 国内外对调控辐射诱导微丝细胞骨架动力学的生物大分子研究较少。

本工作使用微丝细胞骨架解聚剂 Swinholide A 解聚细胞微丝骨架后, 通过长链非编码 RNA(lncRNA) 芯片筛选表达变化的 lncRNA。探讨 lncRNA 在辐射诱发细胞骨架动力学失衡中的关键作用, 研究应对微丝细胞骨架动力学失衡的具体机制, 为阐明辐射损伤的机制研究提供新的理论依据。

2 材料与方法

2.1 细胞培养

本文所用到的细胞系 Calu-1 和 H1299 均来自于 ATCC 细胞库。细胞培养液由 DMEM 高糖培养基 (Gibco, 澳洲)、10% 胎牛血清 (Gibco, 澳洲)、另外添

收稿日期: 2022-05-18; 修改日期: 2022-06-05

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (82073480); 大学生创新创业训练计划项目 (2020xj055)

作者简介: 张雨 (2001-), 女, 江苏苏州人, 本科在读, 从事放射生物学研究; E-mail: 18896517621@163.com

[†] 通信作者: 裴海龙, E-mail: hlpei@suda.edu.cn

加 1% 青霉素和链霉素混合液 (其中青霉素工作浓度为 100 U/mL, 硫酸链霉素的工作浓度为 0.1 mg/mL) 配置而成。细胞在 37 °C 培养箱培养, CO₂ 的体积分数为 5%。

2.2 照射条件

本文中所有的射线处理均为 X 射线。主要采用苏州大学放射医学与辐射防护国家重点实验室仪器平台的 PXi X-RAD 225Cx/SmART 小动物放疗模拟定位机进行 (Precision X-Ray Inc., 美国)。管电压 225 kV, 照射功率 3 kW, 开放野剂量率为 4.48 Gy/min。细胞照射剂量为 4 Gy, 照射后 2 h 收集细胞样品。

2.3 lncRNA 芯片实验

细胞密度达到 80% 后, 加入 100 nmol/L Swinholide A 处理 6 h, 然后用 RNA 提取试剂盒 (碧云天, 中国) 收集总 RNA; 样品总 RNA 利用 NanoDrop ND-2000 (Thermo Scientific, 美国) 定量后逆转录为 cDNA; 进而用 Cyanine-3-CTP (Cy3) 标记的 cDNA; 标记好的 cDNA 和芯片杂交, 洗脱后利用 Agilent Scanner G2505C (Agilent Technologies) 扫描得到原始图像; 采用 Feature Extraction 软件 (version 10.7.1.1, Agilent Technologies, 美国) 进行数据分析和处理; 统计变化差异并采用 *T* 检验进行差异 lncRNA 筛选, 筛选的标准为上调或者下调倍数变化值 ≥ 2.0 倍且 $P \leq 0.05$ 。

2.4 RT-PCR 实验

细胞在 4 Gy 照射后 2 h, 将 TRIzol 试剂 (Invitrogen, 美国) 按照每 1×10^6 个细胞加入 1 mL 的量加入培养皿中。将加入 TRIzol 裂解的细胞样品在冰上静置 2 min 后, 用移液器反复吹打, 直至所有的细胞都被裂解完毕。用 RNA 提取试剂盒提取 TRIzol 中的总 RNA 并用 NanoDrop 测定总 RNA 浓度。抽取 1 μ g RNA, 采用 All-in One TM RNA qRT-PCR 检测试剂盒 (Genecopoeia, 美国) 将 RNA 逆转录为 cDNA 备用。采用 SYBR Green PCR master Mix 荧光定量试剂盒 (GeneCopoeia, 美国) 进行测定。所有目的基因或 RNA 的引物由上海生工生物技术有限公司 (上海, 中国) 合成, PCR 引物序列见表 1。PCR 程序采用 Chromo4 系统 (Bio-Rad, 美国), 然后分别预变性 95 °C 5 min、变性 95 °C 5 s、退火 60 °C 20 s、延伸 72 °C 20 s, 共设计 42 个循环。用 Ct 数值比较法检测基因的表达差异。设置独立的 3 次生物学重复。

2.5 细胞骨架染色

将细胞种植在预置 15 mm 直径圆形玻璃片的培养皿中, 细胞在 4 Gy X 射线照射后 2 h 或 100 nmol/L

表 1 引物序列

lncRNA 或 基因名称	引物序列 5'-3'	扩增产物 长度(bp)
<i>GAPDH</i>	正向: ATTCCACCCATGGCAAATTCC 反向: GACTCCACGACGTACTCAGC	145
<i>XR_923281</i>	正向: GCCAAGGTTTGTAGCTGTGC 反向: TGGTTTCAGGACAACGCAGT	276
<i>XR_930632</i>	正向: AAGGGAAAGTCCTGAACGCC 反向: GCAACTCTCCTCTACTCGC	152
<i>XR_942150</i>	正向: AGCACAGACCTCAGGGTGAA 反向: TATGTGGAGGCTGACTCCCT	732
<i>XR_001755972</i>	正向: CAAAGGGAAGCCGTAGCAGA 反向: GCTCAGACCAGACAGGGTTC	266
<i>XR_002956697</i>	正向: AGGCTGCCTTAAAACCCAG 反向: TGAGGTCAACACGATTTCGT	114
<i>XR_923639</i>	正向: GGTTCATCCCATCCGCCCT 反向: AAAAACCAGCAGAGTCCACCT	202
<i>XR_01739734</i>	正向: AGCGACAAAGACGGTTTCCT 反向: ACCTTTCCGCCAGTGCATA	264
<i>XR_923426</i>	正向: GAAGTGGACAGGGAGCATT 反向: CAGTAGGCTTGTTCCTTGCC	129

Swinholide A 处理后 6 h 后, 在培养皿中加入用预热的 4% 多聚甲醛室温固定 15 min 后, 使用 PBS 润洗培养皿并覆盖细胞, 向培养皿中加入工作浓度 5 μ g/mL 的 Fluo488 标记的鬼笔环肽 (Phalloidin, CST, 美国) 染色 20 min。最后, 用 PBS 洗去鬼笔环肽染色液, 用 DAPI (Sigma, 美国) 染核后, 将 15 mm 玻璃片取出并在共聚焦显微镜下镜检、拍照、获取实验数据。

2.6 数据分析

对获取的数据进行双尾 Student's *t* 检验比较。目标基因或 RNA 的表达统计为平均值 \pm SEM。在所有实验中, *P* 值小于 0.05 被认为有显著差异, 其中 *P* 值小于 0.05 标记为 *, *P* 值小于 0.01 标记为 **, *P* 值小于 0.001 标记为 ***。使用 GraphPad Prism 7 软件 (GraphPad Software Inc., 美国) 作图并统计。

3 结果

3.1 X 射线辐射对细胞微丝形态的影响

为了研究电离辐射对微丝形态的影响, 采用 4 Gy X 射线照射细胞后 2 h, 用 37 °C 的 4% 多聚甲醛固定细胞并采用鬼笔环肽染色。结果如图 1 所示, 相较于假照射组, 4 Gy X 射线对 H1299 细胞 (a) 和 Calu-1 细胞 (b) 的微丝形态影响都很大。辐射导致微丝的丝状结构减少、点状或片状结构的微丝增加。通过微丝分支网络分析显示, 4 Gy X 射线导致 H1299 和 Calu-1 细胞中的微丝分支和网络结构都显著减少。

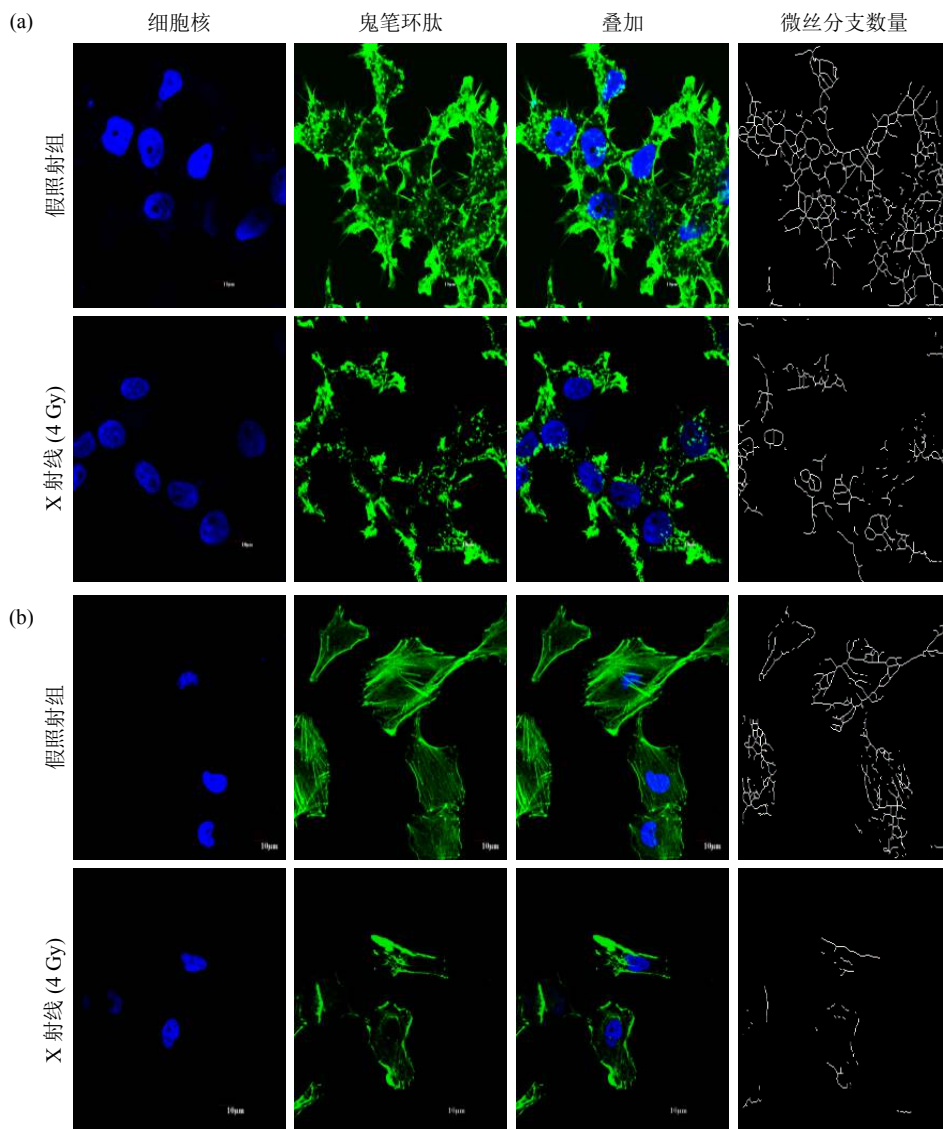


图 1 X 射线对细胞微丝结构的影响(在线彩图)

(a) H1299 细胞微丝染色和网络结构分析; (b) Calu-1 细胞微丝染色和网络结构分析。

3.2 细胞骨架解聚后 lncRNA 芯片数据分析

为了研究微丝骨架相关的 lncRNA, 采用 Swinholide A 处理细胞 6 h 后收集样品并进行芯片检测。结果如图 2(a) 所示, 与对照组 (二甲基亚砜) 相比, Swinholide A 处理后细胞的细胞骨架形态完全破坏, 微丝出现了明显的片段化, 完整的丝状结构消失, 细胞的微丝变成点状片段, 结果证实微丝骨架确实被解聚。lncRNA 芯片结果显示对照组的 3 组样品和 Swinholide A 处理的 3 组样品的主成分聚类清楚, 分群明确。芯片结果显示与对照组相比, Swinholide A 处理后共有下调表达 lncRNA 68 个, 上调表达 lncRNA 892 个。图 2(b) 展示了 Swinholide A 导致微丝解聚后差异表达最显著的 6 条 lncRNA, 其中上调表达的 lncRNA 包括 XR_923281、XR_930632 和 XR_001755972; 下调表达的 lncRNA 包

括 XR_0029-56697、XR_923639 和 XR_923426。为了确定芯片数据的准确性, 开展了荧光定量 PCR 实验验证。结果如图 2(c) 所示: 8 条候选 lncRNA 的表达倍数与芯片结果不完全一致, 但是表达趋势与芯片数据相符。其中下调表达最显著的是 XR_923426, 与对照组相比下调了 3.597 ± 0.32 倍, $P=0.0051$ 。筛选和富集 XR_923426 共表达的 mRNA 并进行 GO(Gene Ontology) 聚类分析, 描述其生物学功能。通过 GO 聚类分析中的细胞定位 (Cellular Component, GO-CC) 分析和分子功能 (Molecular Function, GO-MF) 分析展示 XR_923426 共表达 mRNA 的可能行使的分子功能、所处的细胞环境、以及参与的生物学过程。如图 2(d) 结果显示, XR_923426 富集的大部分基因的分子功能 (GO-MF) 都与微丝、微丝结合蛋白、细胞骨架、跨膜转运等通路相关。

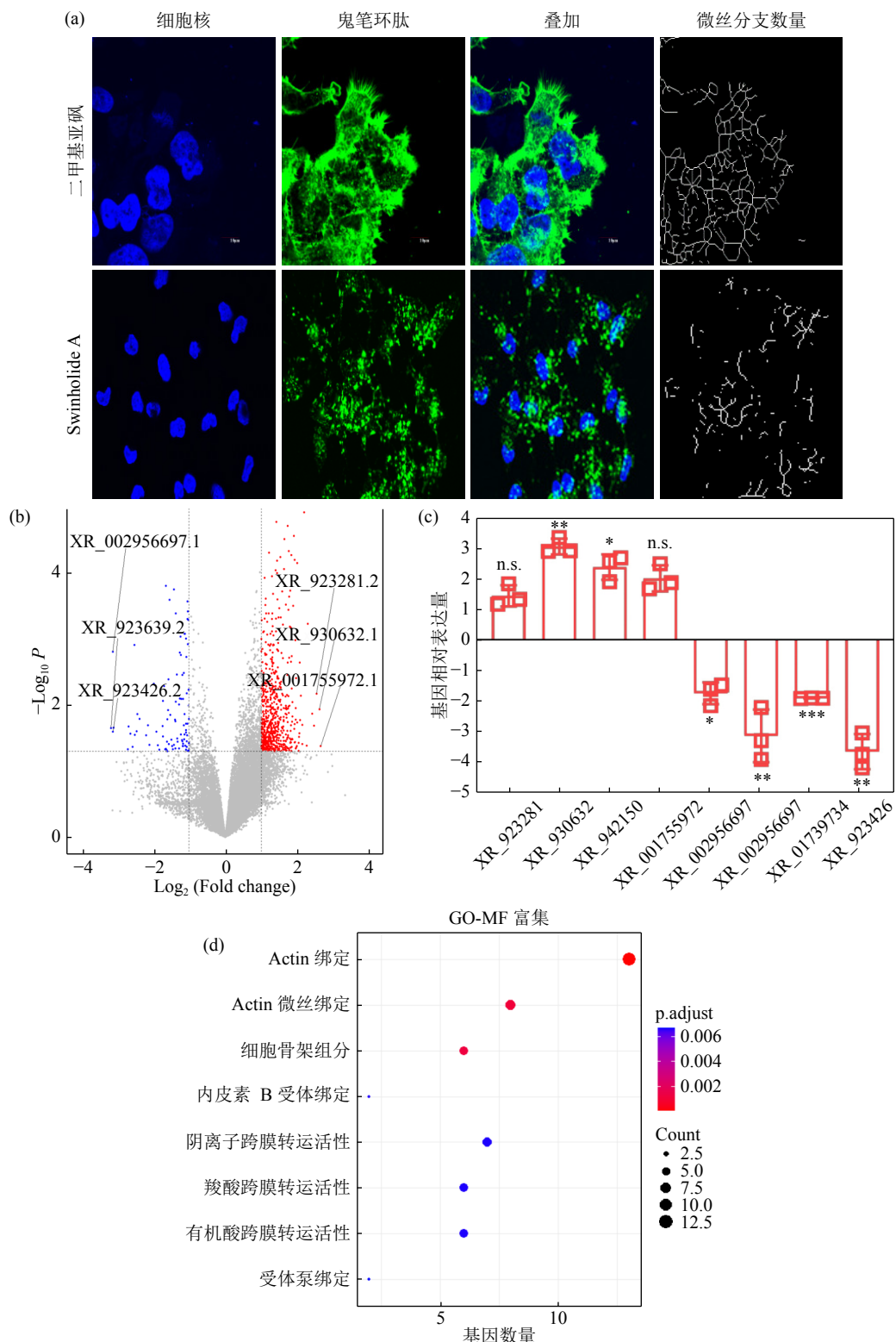


图 2 Swinholidide A 处理细胞后的 lncRNA 芯片检测结果 (在线彩图)

(a) Swinholidide A 处理 H1299 细胞后微丝骨架染色和网络结构分析; (b) 差异表达 lncRNA 的火山图; (c) 上调和下调表达最显著的 lncRNA PCR 验证; (d) 图 (b) 中差异表达最显著的 lncRNA 共表达基因的 GO-MF 分析。

3.3 XR_923426 对电离辐射导致微丝解聚的影响

为了进一步验证差异表达的 lncRNA 对电离辐射导致的微丝解聚的影响, 采取过表达的方式, 增加细胞照

射后下调表达最明显的 XR_923426 的含量, 并观察微丝骨架的形态。首先采用 RT-PCR 方法检测各处理组 XR_923426 的表达量, 结果如图 3(a) 所示, 与对照组相

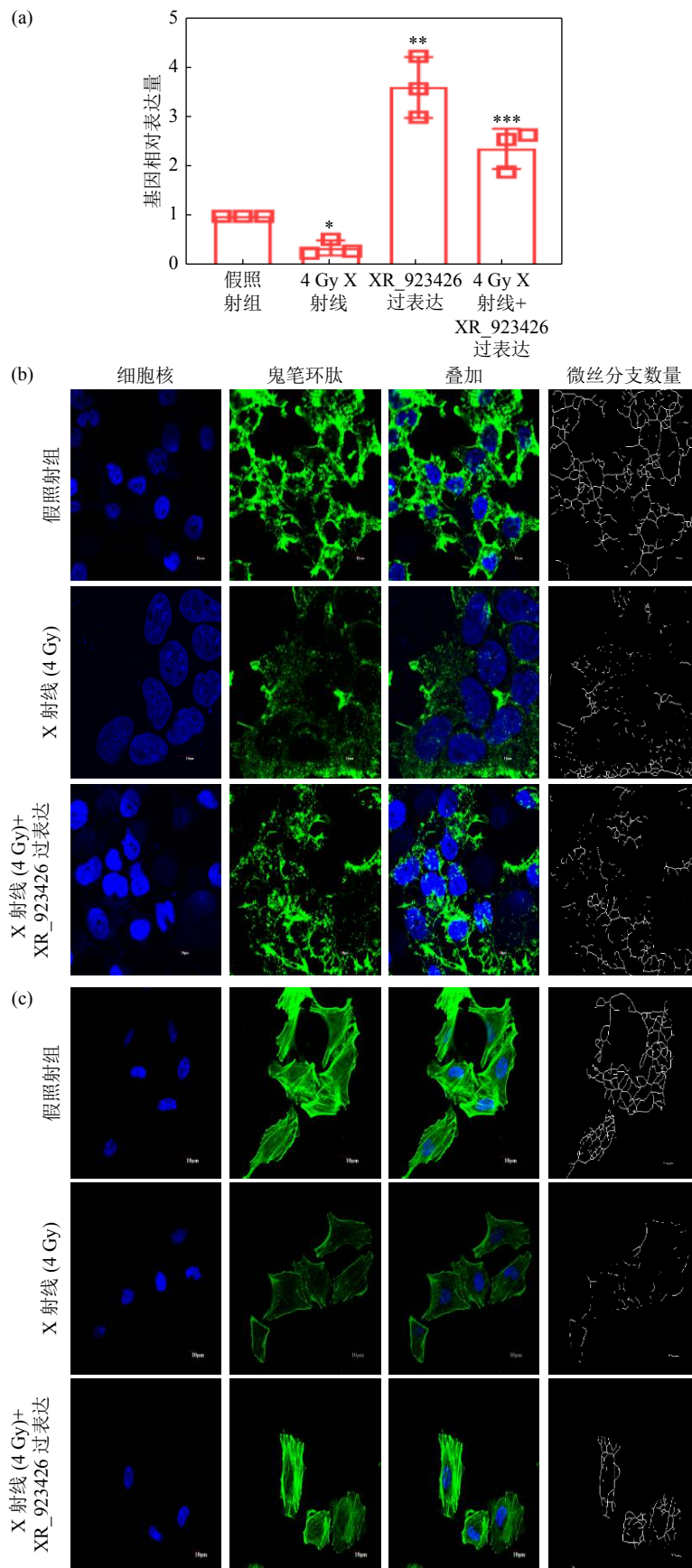


图 3 X 射线及其 XR_923426 对细胞微丝结构的影响 (在线彩图)

(a) XR_923426 相对表达量; (b) H1299 细胞微丝染色和网络结构分析; (c) Calu-1 细胞微丝染色和网络结构分析。

比, 4 Gy X射线辐照后 XR_923426 表达量为 0.367 ± 0.087 倍; XR_923426 过表达组表达量为 3.586 ± 0.352 倍; X射线辐照同时过表达 XR_923426 组的表达量为 2.353 ± 0.233 倍。XR_923426 过表达能够抵消 X射线导致的表达量降低。微丝形态分析结果显示, 无论在 H1299 细胞 [图 3(a)] 还是在 Calu-1 细胞 [图 3(b)] 中, 与 4 Gy X射线照射组相比, 4 Gy X射线照射再过表达 XR_923426 后微丝的片段化减少, 完整的丝状结构增加, 微丝的密度和分支也均增加, 结果说明 XR_923426 可以缓解电离辐射导致的微丝解聚。

4 讨论

微丝具有聚合、解聚和分支能力, 可以创建高度动态的网络, 使细胞能够与环境相互作用并对环境做出反应, 例如通过调节膜结构的流动性参与内吞、巨噬细胞吞噬和细胞融合等不同囊泡形成过程。微丝通过动力学转换在辐射敏感性调控等诸多过程中发挥重要的作用 [9]。本文中报道 XR_923426 能够缓解辐射诱导的细胞微丝骨架解聚, 但是微丝细胞骨架动力学失调后的结果并不是简单地导致死亡或者运动能力失衡, 而是一个非常复杂的过程, 需要更多的实验证据才能明确其具体的功能。

lncRNA 是内源性转录的 RNA 分子, 能够调节染色体重塑 [10]、基因剪辑 [11]、促进或抑制转录和翻译等若干功能 [12]。现在诸多报道显示电离辐射会导致 lncRNA 的表达变化, 有些 lncRNA 也可以直接调控微丝细胞骨架动力学。研究发现, 辐射诱导表达的 *LNC CRYBG3* 直接结合 G-actin 的 ¹⁴Ser, 抑制 G-actin 的聚合和缢缩环的形成, 导致周期阻滞。*LNC CRYBG3* 与 G-actin 的结合阻断了 MAL 的核定位, 从而使血清应答因子 (SRF) 无法结合即时早期响应基因的启动子区, 导致 JUNB 和 Arp3 等基因的表达受阻, 从而抑制肿瘤增殖、粘附、运动和迁徙 [13]。这项研究结果揭示了一种新型的 lncRNA-微丝调控通路, 提示 lncRNA 有可能作为靶向微丝细胞骨架调控细胞的辐射敏感性。

lncRNA 的活性部分依赖于基因组的位置, 比如肌动蛋白纤维相关蛋白 1 反义 RNA1 (*AFAP1-ASI*) 定位于蛋白质编码基因 (*AFAP1*) 的反义链上, *AFAP1-ASI* 的表达可通过反向调控 *AFAP1* 功能调节肌动蛋白纤维的完整性。*AFAP1-ASI* 的表达可增加 *AFAP1* 的蛋白水平和 mRNA 水平 [14]。*AFAP1* 作为连接 Src 家族成员和其他与肌动蛋白微丝相关的信号蛋白的接头蛋白发挥重要的功能 [14]。因此, *AFAP1-ASI* 是一种潜在的评价细胞辐射敏感性或肿瘤放射治疗效果的诊断和预后生物标记

物。本文中报道的 lncRNA XR_923426 也具有调控微丝细胞骨架动力学的作用, 但是 XR_923426 在受照射组织器官或肿瘤组织中的表达模式和潜在的功能作用尚不清楚, 需要后续的研究以明确其功能, 并探索基于 lncRNA 疾病诊断和基因治疗的可行性。

5 总结与展望

在本文中, 我们明确了电离辐射可以导致微丝细胞骨架解聚, 并引起微丝网络连接显著减少。在此基础上, 通过生物信息学方法筛选了响应微丝细胞骨架动力学调控的 lncRNA, 并验证 XR_923426 在辐射诱发微丝细胞骨架动力学失衡中的关键作用, 这有可能为临床肿瘤放疗过程中肿瘤细胞的增敏或正常组织的防护提供新的作用靶点。在后续的研究中, 仍然需要更多的数据来揭示 XR_923426 在辐射敏感性调控中的详细功能和机制, 以便寻求针对 lncRNA XR_923426 的肿瘤靶向治疗方案, 同时开发正常组织防护新策略。与此同时, 重离子治癌作为新兴的肿瘤放疗手段, 在我国也实现了临床应用。为进一步提高治疗的有效性和安全性, 更加深刻地揭示重离子治癌的优势, 靶向细胞骨架动力学调控的重离子束生物效应机理研究还有待深入。研究重离子和 X射线对微丝组装调控的差异, 对体现重离子治癌的优势、进一步优化重离子肿瘤放疗技术也具有重要意义。

参考文献:

- [1] DE LANEROLLE P, SEREBRYANNYY L. *Nat Cell Biol*, 2011, 13(11): 1282.
- [2] SELLERS JR. *J Muscle Res Cell Motil*, 2004, 25(6): 475.
- [3] SONOWAL H, KUMAR A, BHATTACHARYYA J, et al. *J Biomed Sci*, 2013, 20: 71.
- [4] BOHNERT K A, WILLET A H, KOVAR D R, et al. *Biochem Soc Trans*, 2013, 41: 1750.
- [5] SHANKAR J, NABI IR. *PLoS one*, 2015, 10(3): 0132759.
- [6] GRZANKA D, GRZANKA A, IZDEBSKA M, et al. *Oncol Rep*, 2010, 23(3): 655.
- [7] ASPARUHOVA M B, GELMAN L, CHIQUET M. *Scand J Med Sci Spor*, 2009, 19(4): 490.
- [8] KUBISTA M, AKERMAN B, NORDEN B. *Biochemistry*, 1987, 26(14): 4545.
- [9] BOERMA M, SRIDHARAN V, MAO XW, et al. *Mutat Res*, 2016, 770(B): 319.
- [10] GROSSI E, RAIMONDI I, GOŃI E, et al. *Nat Commun*, 2020, 11(1): 936.
- [11] AGARWAL V, BELL G W, NAM J W, et al. *eLife*, 2015, 4: 05005.
- [12] SAVIĆ N, BÄR D, LEONE S, et al. *Cell Stem Cell*, 2014, 15(6): 720.
- [13] PEI H, HU W, GUO Z, et al. *Cancer Res*, 2018, 78(16): 4563.
- [14] SHI X, ZHANG H, WANG M, et al. *Oncotarget*, 2017, 8(35): 58394.

Long Non-coding RNA XR_923426 Participates in the Regulation of Microfilament Dynamics Induced by Ionizing Radiation

ZHANG Yu, SHEN Luheng, ZHOU Guangming, PEI Hailong[†]

(School of Radiation Medicine and Protection, Medical College of Soochow University, Suzhou 215123, Jiangsu, China)

Abstract: Microfilament is a multi-functional sub-cell structure, and it is also a sensor for ionizing radiation. In order to clarify the regulatory effect of long non-coding RNAs(lncRNA) in the alteration of microfilament dynamics caused by ionizing radiation, Swinholide A was used to depolymerize the microfilament and then, the lncRNA chip was used to detect the differentially expressed lncRNAs. Microfilament staining and network/structure analysis were used to evaluate the changes in microfilament skeleton. It was found that the expression of lncRNA XR_923426 was decreased after the microfilament depolymerization. Meanwhile, the overexpression of lncRNA XR_923426 could significantly alleviate the microfilament depolymerization caused by ionizing radiation. This provides a new clue for the research on the regulatory relationship between lncRNA targeted microfilament dynamics and radiation induced tumor death or metastasis, which is expected to develop into a new target for tumor treatment or normal tissue protection.

Key words: ionizing radiation; long non-coding RNA; microfilament; cytoskeleton

Received date: 18 May 2022; **Revised date:** 05 Jun. 2022

Foundation item: National Natural Science Foundation of China(82073480); National Undergraduate Innovation and Entrepreneurship Program (2020xj055)

[†] **Corresponding author:** PEI Hailong, E-mail: hlpei@suda.edu.cn