

文章编号: 1007-4627(2014)04-0533-05

# MicroRNA-19b 通过下调 *BTG1* 增加重离子 辐射诱导的基因组不稳定性

吴鑫<sup>1, 2</sup>, 华君瑞<sup>1</sup>, 丁楠<sup>1</sup>, 胡文涛<sup>1</sup>, 何进鹏<sup>1</sup>,  
徐帅<sup>1, 2</sup>, 裴海龙<sup>1, 2</sup>, 周光明<sup>1</sup>, 王菊芳<sup>1</sup>

(1. 中国科学院近代物理研究所, 兰州 730000;  
2. 中国科学院大学, 北京 100049)

**摘要:** 重离子束放疗可有效杀死肿瘤细胞。研究表明: 重离子束能引起癌细胞的基因异常, 引发基因组不稳定性。*BTG1* 作为一个重要的 G0/G1 期相关蛋白, 具有强烈的抗细胞增殖能力。以碳离子辐射为手段, 通过蛋白质印迹杂交技术发现: 人肾癌 786-O 细胞中 *BTG1* 能够对重离子辐射应激产生应答。同时, 荧光定量 PCR 结果显示碳离子辐照后, *BTG1* 转录本与 microRNA-19b 的表达水平呈负相关变化。瞬时转染 microRNA-19b 类似物于人肾癌 786-O 细胞中, 能够抑制由碳离子辐射引起的 *BTG1* 蛋白上调, 并增加细胞的微核发生率。因此 microRNA-19b 能够通过抑制 *BTG1* 的表达, 增加重离子辐射诱导的细胞基因组不稳定性。

**关键词:** 重离子; *BTG1*; microRNA-19b; 基因组不稳定性

**中图分类号:** R339.5<sup>+</sup>7; Q279      **文献标志码:** A      **DOI:** 10.11804/NuclPhysRev.31.04.533

## 1 引言

重离子束放疗一直以来被视为是最优越的治疗癌症的方法之一。近年来的研究显示: 重离子及其它类型的电离辐射能够引起细胞死亡, 也可导致细胞遗传的改变<sup>[1]</sup>。重离子辐射会导致小鼠骨髓细胞中发生延迟性的染色体畸变<sup>[2]</sup>。仓鼠上皮样卵巢细胞受到 X 射线照射后, 经染色体融合导致的基因重组频率增加<sup>[3]</sup>。小鼠父代受到电离辐射后, 子代小鼠精原细胞中微卫星多态性频率升高<sup>[4]</sup>。这些结果表明: 电离辐射会导致细胞产生基因组中的染色体畸变、染色体大片的融合或重组以及细胞遗传的异常。而这些都可视作是基因组不稳定的不同结果。

关于产生基因组不稳定的机制较为复杂。有研究显示受电离辐射后的人非息肉结肠癌中的基因 *hms1* 和 *hms2* 可能在基因组不稳定的产生中

起到控制作用<sup>[5]</sup>。在癌细胞中, *p53* 这类抑癌基因的功能丧失, 会消除辐射诱导的 G1 期阻滞, 进而产生辐射诱导的基因组不稳定<sup>[6]</sup>。值得关注的是, G1 期周期蛋白 Gln2 的下调, 能够通过抑制有效的前复制复合体的聚合, 导致细胞基因组不稳定的增加<sup>[7]</sup>。因此重离子等电离辐射引起的 G1 期周期蛋白的水平改变可能与细胞的基因组不稳定有关。

*BTG1* (B cell translocation gene 1) 是 *BTG* 家族中的一个成员。该家族的所有成员 (*BTG1*, *BTG2/PC3/Tis21*, *BTG3/ANA*, *BTG4/PC3B*, *Tob1/Tob*, 和 *Tob2*) 是和细胞周期进程相关的基因<sup>[8]</sup>。在多种类型的细胞中证实 *BTG1* 在 G0/G1 期细胞中高表达<sup>[9]</sup>。我们之前的研究发现 *BTG1* 的高表达导致人肾癌 786-O 细胞 G0/G1 期细胞比例增加; 而且在电离辐射条件下, microRNA-19b (miR-19b) 是一个能够调控 *BTG1* 表达的 microRNA。因此, 我们推

收稿日期: 2014-01-18;    修改日期: 2014-03-03

基金项目: 国家重点基础研究发展规划(973计划)项目(2010CB834201); 中国科学院战略先导研究项目(XDA01040411); 国家自然科学基金资助项目(U1232125,31270895)

作者简介: 吴鑫(1985-), 男, 湖北宜昌人, 博士, 从事辐射生物学研究; E-mail: wuxin@impcas.ac.cn

通信作者: 王菊芳, E-mail: jufangwang@impcas.ac.cn.

测 *BTG1* 和细胞 G0/G1 期相关的蛋白可能与细胞基因组不稳定性有关, 而 miR-19b 对于 *BTG1* 的调控可能影响重离子辐照后细胞的基因组不稳定性。

## 2 材料与方法

### 2.1 材料

人肾癌 786-O 细胞培养所用试剂 RPMI-1640 培养基购自美国 GIBCO 公司, 胎牛血清购自美国 Hyclone 公司, 人肾癌 786-O 细胞购自中国科学院上海生命科学研究院细胞资源中心。MicroRNA 类似物由中国广州锐博公司合成, miR-19b 类似物序列为 5'-UGUGCAAUCCAUGCAAACUGA-3'。转染试剂 Lipofectamine 2000 购自美国 Invitrogen 公司。RNA 提取试剂 Trizol 试剂购自美国 Invitrogen 公司。荧光定量 PCR 检测试剂盒购自美国 Promega 公司。荧光定量 PCR 检测基因的引物序列: *BTG1*, 5'-TCCATAATCCATCCCCAAGA-3' 和 5'-GGATGCAATCCTGGACATTT-3'; *GAPDH*, 5'-GTGGACCTGACCTGCCGTCT-3' 和 5'-GGAGGAGTGGGTGTCGCTGT-3', 以上引物由中国上海生工公司合成。荧光定量 PCR 检测 miR-19b 及内参 U6 的茎环引物由中国广州锐博公司合成。吖啶橙(AO)由德国进口, 兰州鹏程生物制剂公司分装。

### 2.2 方法

#### 2.2.1 细胞培养

人肾癌 786-O 细胞在 RPMI-1640 培养基(含 5 mmol/L 谷氨酰胺、体积分数为 10% 的胎牛血清、100 U/mL 青霉素和 50 U/mL 链霉素)中于 37 °C、体积分数为 5% 的 CO<sub>2</sub> 条件下常规培养传代。

#### 2.2.2 细胞瞬时转染

以无义的短片段 RNA 作为阴性对照(NC), 将 miR-19b 类似物瞬时转染细胞。当细胞生长至 50% ~ 60% 汇合时, 采用 Lipofectamine 2000 转染试剂将上述小 RNA 转染细胞, 并在 5 h 后更换新鲜培养基, 正常培养 18 h 后进行辐照, 于对应时间点进行蛋白样品收集和 RNA 样品收集。

#### 2.2.3 荧光定量 PCR

收集的细胞经过 Trizol 处理, 采用异丙醇及氯仿法提取总 RNA, 使用 Promega 公司反转录试剂盒, 针对基因采用 Oligo(dT) 反转录, microRNA 采用茎

环引物进行反转录。得到的 cDNA 稀释至合适浓度, 采用 Promega 荧光定量 PCR 试剂进行检测。

#### 2.2.4 Western blot 分析

使用 RIPA 细胞裂解缓冲液裂解细胞, Bradford 法测定细胞裂解液中总蛋白的含量, 12% SDS-PAGE 胶进行电泳, 经过转膜、封闭、I 抗(*BTG1*, *GAPDH*)、II 抗(辣根过氧化物酶偶联的羊抗兔抗体)孵育, 最后 ECL 法显影曝光。

#### 2.2.5 微核实验

将细胞种植于盖玻片上, 进行瞬时转染及辐照, 36 h 后 PBS 清洗 2 遍, 甲醇固定细胞 15 min, 吸掉甲醇, 使玻片自然干燥。吖啶橙配制成 1 mg/mL 工作液, 染色 1 min 后, PBS 清洗 2 次, 在荧光显微镜下镜检。每张片子观察 500 个以上的双核细胞, 记录微核的总数量。观察结果以微核/双核细胞表示: 微核/双核细胞 = 微核总数/观察双核细胞总数。

#### 2.2.6 细胞电离辐射条件

实验室用辐照源为 X 射线 RX-650, 剂量率为 0.8 Gy/min (100 KeV, 5 mA)。细胞种于  $\phi 35$  mm 皿中, 长至 60% ~ 70% 汇合度时进行辐照。重离子辐照实验在中国科学院近代物理研究所重离子加速器装置的深层治癌终端进行, 束流为能量 165 MeV/u 的 <sup>12</sup>C<sup>6+</sup> 离子束。细胞样品置于坪区照射, 剂量为 2 Gy。

#### 2.2.7 统计学处理

实验均重复 3 次以上, 所有数据均采用 mean  $\pm$  SE 表示, 用 Excel 进行数据处理, 使用 *t* 检验进行两样本均数比较,  $P^* < 0.05$  为显著性差异,  $P^{**} < 0.01$  为极显著性差异。

## 3 实验结果

### 3.1 *BTG1* 对碳离子束辐射的响应

前人的研究结果显示许多和细胞增殖有关的基因能够对电离辐射产生响应。之前的研究结果显示 *BTG1* 能够对多种细胞外环境胁迫产生应答。例如: 采用 X 射线, 血清饥饿以及二甲亚砜的处理均会导致细胞内 *BTG1* 蛋白水平增高。为了探讨 *BTG1* 是否能够响应于重离子辐射, 我们采用 2 Gy 的碳离子束辐照人肾癌 786-O 细胞, 并在 0, 2, 4, 8, 12, 16 和 24 h 检测细胞内源性 *BTG1* 蛋白变化。Western blot 结果显示: 在重离子辐照后 2 h, *BTG1* 蛋白表

达量相对于0 h时有明显上调(如图1所示)。这说明 *BTG1* 是一个细胞外环境胁迫应答分子, 参与重离子辐射引起的应答反应。

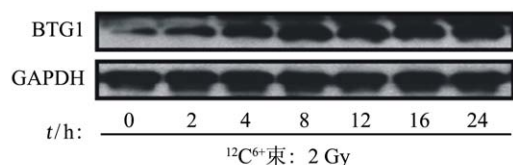


图1 *BTG1* 对碳离子束辐射的响应

人肾癌786-O细胞受2 Gy碳离子束辐照, 于相应时间点收集蛋白, western blot检测 *BTG1* 蛋白变化。GAPDH作为内参。

### 3.2 碳离子束辐射条件下, 人肾癌786-O细胞中 miR-19b 与 *BTG1* 表达呈负相关

已经确定了 miR-19b 是一个调控 *BTG1* 表达的 microRNA。上调 miR-19b 能够降低细胞中 *BTG1* 蛋白水平。通过2 Gy的碳离子束辐照人肾癌786-O细胞, 在0, 2, 4, 8和16 h检测细胞内源性 *BTG1* 转录本及 miR-19b 的变化, 发现 *BTG1* 转录本呈现先增高后降低的变化趋势, 而 miR-19b 的变化则表现出先降低后升高的变化趋势, 二者的变化呈负相关性(如图2所示)。这些结果进一步证实了 miR-19b 与 *BTG1* 之间的负调控关系, 提示碳离子辐射可能通过下调 miR-19b 表达量, 解除了对 *BTG1* 转录本的翻译抑制作用, 从而使得 *BTG1* 表达量上调。

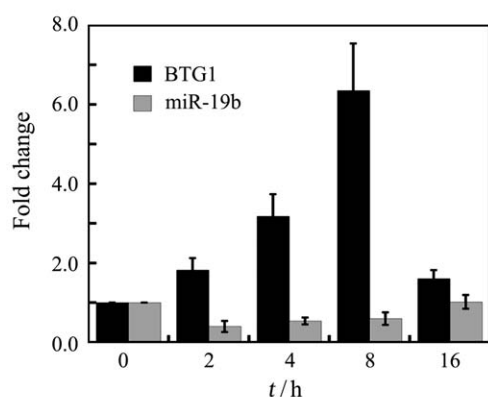


图2 *BTG1* 转录本与 miR-19b 表达的负相关性  
碳离子束辐照786-O细胞, 对应时间点 *BTG1* 转录本变化及 miR-19b 变化, U6及 GAPDH 作为内参。

### 3.3 瞬时转染 miR-19b 能够抑制碳离子辐射诱导的 *BTG1* 上调

为了检测转染 miR-19b 类似物能否在碳离子辐

射条件下, 有效地降低细胞中内源性 *BTG1* 表达水平, 我们向人肾癌786-O细胞中瞬时转染 miR-19b 类似物。之前的研究确定了在转染 miR-19b 类似物后, 786-O细胞中的 *BTG1* 表达水平在24 h开始降低。因此我们在转染换液6 h后, 再正常培养18 h开始碳离子束照射。Western blot结果显示: 辐照后4 h, *BTG1* 蛋白水平升高。以照射零点为对照时间点, 在24和48 h均有明显升高(如图3所示)。但在经过瞬时转染 miR-19b 类似物, 碳离子束辐照后4 h, *BTG1* 蛋白水平有明显降低; 并在24和48 h *BTG1* 蛋白均保持较低水平(如图4所示)。该实验结果表明: 瞬时转染 miR-19b 能够抑制重离子辐射诱导的 *BTG1* 上调。

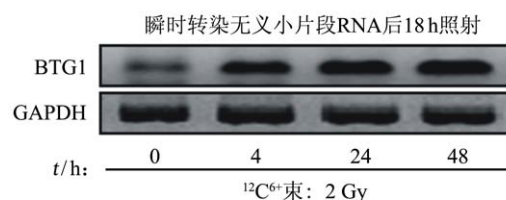


图3 无义小片段 RNA 对 *BTG1* 蛋白表达的影响  
瞬时转染无义小片段 RNA 于786-O细胞中, 转染后18 h进行碳离子束辐照, 于0, 4, 24和48 h收集总蛋白, western blot检测细胞内源性 *BTG1* 蛋白变化。GAPDH作为内参。

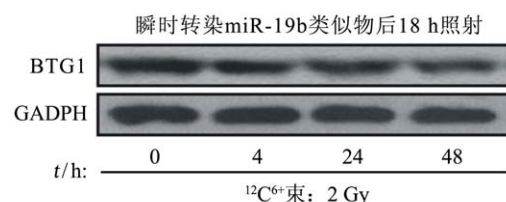


图4 MiR-19b 类似物对 *BTG1* 蛋白表达的影响  
瞬时转染 miR-19b 类似物于786-O细胞中, 转染后18 h进行碳离子束辐照, 于0, 4, 24和48 h收集总蛋白, western blot检测细胞内源性 *BTG1* 蛋白变化。GAPDH作为内参。

### 3.4 *BTG1* 蛋白水平的降低导致重离子辐射诱导的细胞微核数增加

根据前人的研究得知 G1 期周期蛋白的下调导致细胞基因组不稳定性增加<sup>[10]</sup>。为了探究 *BTG1* 的下调对癌细胞基因组不稳定性的影响, 我们将 miR-19b 类似物瞬时转染786-O细胞中6 h后更换新鲜培养基, 正常培养18 h后, 再进行2 Gy碳离子束照射。经细胞松弛素B处理后, 检测36 h 786-O 双核细胞中微核

数量(786-O 细胞的倍增时间为 18~24 h, 选择 1 到 2 倍倍增时间之间来检测细胞中微核数量, 因此选择 36 h 时间点), 并予以统计随机挑选的 500 个双核细胞中微核总数量。统计结果发现: 相对于未转染的对照组, 转染 miR-19b 类似物后, 786-O 双核细胞的微核数量显著增加(如图 5 所示), 表明 BTG1 表达量的下调增加了碳离子束辐射诱导的癌细胞基因组的不稳定性。

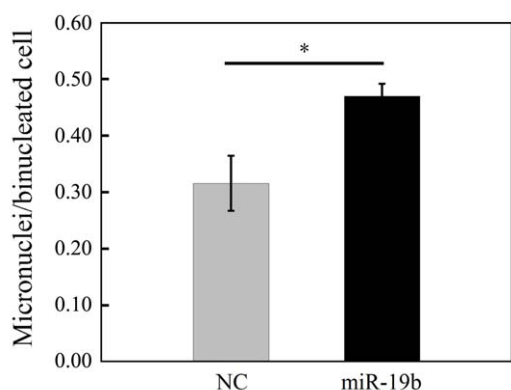


图 5 MiR-19b 对辐照后双核细胞中微核数量的影响  
统计双核细胞中的微核数, 每个样品至少统计 500 个双核细胞。瞬时转染 786-O 细胞 NC 及 miR-19b 后 36 h 统计。数据采用平均值 ± 标准误差表示, 采用 *t* 检验进行两样本均数比较,  $P^* < 0.05$  为显著性差异,  $P^{**} < 0.01$  为极显著性差异。

## 4 讨论

我们之前的研究发现人肾癌 786-O 细胞中 BTG1 能够对 X 射线照射, 血清饥饿处理及二甲亚砜处理等多种细胞外环境胁迫产生应答。有趣的是, 采用同样剂量的 X 射线照射人胚肺成纤维细胞 MRC-5, 却未发现 BTG1 的明显变化, 同样我们也发现 MRC-5 细胞相对于其它细胞对于 X 射线具有更强的辐射耐受性。目前对于这一现象还无法解释。但有报道显示 BTG1 在正常组织和正常细胞中的表达量较高<sup>[11-12]</sup>, 提示 BTG1 含量的高低可能在细胞抵抗细胞外环境辐射刺激的过程中发挥作用。

多篇文献报道了 BTG1 能够参与细胞周期进程的调控。最初其首要生理功能被界定为强烈的抗细胞增殖功能, 并在多种处于静息期的细胞中高表达, 随着细胞周期的推进而呈现周期性变化<sup>[13]</sup>。在我们的研究中发现, 重离子和 X 射线辐射后的癌细胞中 BTG1 表达量上调, miR-19b 表达量下调, 而且能够在显微镜下观察到受到电离辐射后的细胞分裂相细胞数目

急剧下降。因此我们推测 BTG1 的上调抑制了受胁迫后的细胞增殖, 可能为细胞修复 DNA 损伤提供条件。而 miR-19b 是否参与该过程目前仍不清楚。

BTG1 在细胞中能够与多种蛋白分子发生相互作用。其中 PRMT1(Protein Arginine Methyltransferase 1, 蛋白精氨酸甲基转移酶 1) 蛋白能够与 BTG1 发生直接的相互作用<sup>[14]</sup>。PRMT1 催化 S-腺苷甲硫氨酸胍基中精氨酸残基的甲基转移, 很早就发现组蛋白作为甲基的底物受体, 可被 PRMT1 催化精氨酸上的甲基化修饰<sup>[15-16]</sup>。而与 BTG1 的结合会导致 PRMT1 促甲基转移酶活性的增强<sup>[17]</sup>。因此我们推测在重离子及 X 射线辐射条件下, miR-19b 下调解除了对 BTG1 表达的抑制, 使得 BTG1 表达量上调, 促进 PRMT1 甲基转移酶活性, 这种活性的增强可能直接导致表观遗传学水平上的改变, 从而对下游基因的表达进行重新编程。BTG1 可能由此途径参与细胞辐射应答过程。

近年来多篇文献报道了 miR-19b 的生理学功能。2009 年 Olive 等<sup>[18]</sup>的研究结果显示 miR-19b 是属于具有原癌属性的 miR-17-92 家族中的成员。2011 年 Liang 等<sup>[19]</sup>报道了 miR-19b 与乳腺癌细胞的化疗抗性有关。2012 年 Gantier<sup>[20]</sup>的研究表明 miR-19b 能够调控 NF-kappa B 信号通路, 并在该信号通路的信号传递中发挥重要作用。而 NK-kappa B 信号通路与癌症的发生发展有重要联系<sup>[21]</sup>。在本研究中发现 miR-19b 能够通过调控 BTG1 的表达影响癌细胞基因组的不稳定性, 这暗示 miR-19b 可能通过影响细胞基因组的不稳定性参与癌症的发生过程。

在本研究中, 我们发现 miR-19b 能够通过下调 BTG1 的表达, 增加碳离子诱导的癌细胞微核数量, 这暗示 BTG1 表达量的下调能够增加重离子诱导的基因组不稳定性。这将为探索重离子诱导的癌细胞基因组不稳定性发生机制提供新思路和新切入点。

## 参考文献:

- [1] SUZUKI M, TSURUOKA C, UCHIHORI Y, *et al.* Uchu Seibutsu Kagaku, 2002, **16**(3): 109.
- [2] KADHIM M, MACDONALD D, GOODHEAD D, *et al.* Nature, 1992, **355**(6362): 738.
- [3] WATSON G E, POCOCK D A, PAPWORTH D, *et al.* International Journal of Radiation Biology, 2001, **77**(4):

- 409.
- [4] FAN Y J, WANG Z, SADAMOTO S, *et al.* International Journal of Radiation Biology, 1995, **68**(2): 177.
- [5] FISHEL R, LESCOE M K, RAO M R, *et al.* Cell, 1994, **77**(1): 1.
- [6] MAO J H, LI J, JIANG T, *et al.* Oncogene, 2005, **24**(53): 7924.
- [7] TANAKA S, DIFFLEY J F. Genes & Development, 2002, **16**(20): 2639.
- [8] WINKLER G S. Journal of Cellular Physiology, 2010, **222**(1): 66.
- [9] ROUAULT J P, RIMOKH R, TESSA C, *et al.* EMBO Journal, 1992, **11**(4): 1663.
- [10] SIDOROVA J M, BREEDEN L L. Mutation Research, 2003, **532**(1-2): 5.
- [11] ZHAO Y, GOU W F, CHEN S, *et al.* International Journal of Molecular Sciences, 2013, **14**(10): 19670.
- [12] SHENG S H, ZHAO C M, SUN G G. Journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine, 2014, **35**(4): 3317.
- [13] ZHU R, ZOU S T, WAN J M, *et al.* Oncology Reports, 2013, **30**(5): 2137.
- [14] BERTHET C, GUEHENNEUX F, REVOL V, *et al.* Genes Cells, 2002, **7**(1): 29.
- [15] HUANG S M, LITT M, FELSENFELD G. Genes & development, 2005, **19**(16): 1885.
- [16] STRAHL B D, BRIGGS S D, BRAME C J, *et al.* Curr Biol, 2001, **11**(12): 996.
- [17] LIN W J, GARY J D, YANG M C, *et al.* Journal of Biological Chemistry, 1996, **271**(25): 15034.
- [18] OLIVE V, JIANG I, HE L. International Journal of Biochemistry & Cell Biology, 2010, **42**(8): 1348.
- [19] LIANG Z, LI Y, HUANG K, *et al.* Pharmaceutical Research, 2011, **28**(12): 3091.
- [20] GANTIER M P, STUNDEN H J, MCCOY C E, *et al.* Nucleic Acids Research, 2012, **40**(16): 8048.
- [21] JIANG Z, WU W, QIAN M L. Cancer Cell International, 2012, **12**(1): 8.

## MicroRNA-19b Enhances Heavy Ion Induced Genomic Instability by Down-regulation of *BTG1*

WU Xin<sup>1, 2</sup>, HUA Junrui<sup>1</sup>, DING Nan<sup>1</sup>, HU Wentao<sup>1</sup>, HE Jinpeng<sup>1, 2</sup>, XU Shuai<sup>1, 2</sup>,  
PEI Hailong<sup>1, 2</sup>, ZHOU Guangming<sup>1</sup>, WANG Jufang<sup>1</sup>

(1. Institute of Modern Physics, Chinese Academy of Sciences, Lanzhou 730000, China;

2. University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

**Abstract:** Heavy ion radiotherapy is a curative treatment for human malignancies and offers hopeful prospects for the treatment of cancer. Recent studies demonstrate that heavy ion irradiation leads to not only cell killing but also genomic instability. Expression of *BTG1* inhibits the proliferation of cells and plays important roles in the progress from G0/G1 to S phase in cell cycle. In this study, we found that *BTG1* was inducible in human renal cancer 786-O cells in the presence of carbon ion irradiation. Meanwhile, the results of qRT-PCR analyses displayed an inverse relationship between expression of *BTG1* and microRNA-19b at different times. The up-regulation of *BTG1*, which was induced by carbon ion irradiation, was inhibited by microRNA-19b mimic transfected into 786-O cells. Subsequently, down-regulation of *BTG1* increased the number of micronuclei in bi-nucleated cell of 786-O cells. Thus, we speculate that microRNA-19b leads to enhancement of heavy ion irradiation induced genomic instability by inhibiting the expression of *BTG1* gene.

**Key words:** heavy ion; *BTG1*; microRNA-19b; genomic instability

**Received date:** 18 Jan. 2014; **Revised date:** 3 Mar. 2014

**Foundation item:** National Basic Research Development Program of China(973 Program)(2010CB834201); Strategic Priority Research Program of Chinese Academy of Sciences(XDA01040411); National Natural Science Foundation of China( U1232125, 31270895)

**Corresponding author:** WANG Jufang, E-mail: jufangwang@impcas.ac.cn.

<http://www.npr.ac.cn>