

DNA 微阵列技术在辐射诱导基因表达研究中的运用

饶亚岚 陈肖华 毛秉智

(军事医学科学院放射医学研究所 北京 100850)

摘要 综述了辐射诱导基因表达的复杂性,以及近年来 DNA 微阵列技术在辐射诱导基因表达研究中的运用,并就辐射诱导基因可能为放射病诊断治疗研究提供新思路进行探讨。

关键词 DNA 微阵列, 辐射诱导基因, 辐射损伤

中图分类号 Q691.8, Q812, R818

就分子水平而言,辐射能诱导细胞基因表达的改变,细胞受辐射后的命运很大程度上由基因表达的改变所决定,受辐射调控表达的基因可称之为辐射诱导基因。在过去近 20 年中,辐射及其它基因毒性因子(genotoxic stress)引起生物效应的分子机制的研究取得很大的进展。基因毒性因子诱发细胞基因转录变化首先在简单真核生物酵母中得到证实,酵母基因组 1% 以上基因表达有变化,类似复杂的转录反应也很快在哺乳动物细胞中得到证实。近年来,越来越多的基因被证实为含辐射在内的基因毒性因子所诱导,这样的基因成百上千,而且仍在不断增加^[1]。辐射诱导基因的表达随辐射条件和所处生理环境的不同呈现复杂多变的特征。自 1995 年 Stanford 大学的 Schena 等^[2]首次成功运用 cDNA 微阵列技术定量比较基因表达变化以来, DNA 微阵列技术已运用于肿瘤、其它组织和疾病、细胞周期、衰老等多方面基因表达与寻找特异功能基因的研究^[3]。近年来,将此项技术运用到辐射诱导基因表达的研究取得一些结果,促进了该领域研究的发展,本工作就此内容作一综述。

1 辐射诱导基因表达的复杂性

受辐射诱导的基因的生物功能复杂多样,这类辐射诱导基因包括编码转录因子、信号传递分子、细胞因子的基因,以及参与细胞生长、增殖和周期调控等的基因。在这些受辐射诱导而表达变化的基因中,有些基因如参与 DNA 修复的基因表达仅在基因毒性因子刺激条件下改变,表达的改变具特异性;有些基因在各种损伤条件下表达均改变;还有一些基因如细胞因子和癌基因参与广泛的生理过程。现已知在哺乳动物细胞中有多条信号传递途径能被 DNA 损伤因子

活化,继而诱导大量靶基因表达的改变。在基因毒性因子活化的复杂信号传递网络中,p53 是重要的基因转录调节因子^[1]。

细胞对基因毒性因子的应激反应因细胞及基因毒性因子类型的不同而不同,很多研究结果支持这个观点。例如,测定含 ML-1 在内的 6 株粒系—淋巴系细胞、2 株肺癌细胞、2 株乳腺癌细胞、2 株结肠癌细胞共 12 株不同细胞系受电离辐射、烷化剂 MMS、紫外线刺激后细胞中 12 条辐射相关基因的表达变化,结果不同基因在不同细胞株、受不同基因毒性因子刺激后的表达变化趋势不同^[4]。这 12 条辐射相关基因中,有的基因受电离辐射诱导表达依赖于细胞中野生型 p53 的存在,如 FRA-1 和 ATF3,其 p53 相关性在小鼠整体实验中也得到证实,但也有基因是非 p53 依赖的;有的基因受辐射诱导而不为 MMS 诱导,表达出对辐射刺激因子有特殊的反应性,也有的基因对各种损伤因子具有广泛的反应性,如 ATF3。又如,Western 杂交实验表明^[5],人乳腺上皮细胞受电离辐射后 p53 及其下游靶基因 p21WAF1 (又称 CIP1/WAF1 或 CDKN1A) 表达均未升高,但该细胞受紫外线照射后 p53 和 p21WAF1 被诱导表达,而与人乳腺上皮细胞同基因型的成纤维细胞受电离辐射后,p53 及 p21WAF1 蛋白被诱导表达。辐射诱导基因表达如此复杂,原因可能是信号传递的复杂多样,哺乳动物细胞中有多条应激反应信号途径,一些信号途径仅在特定细胞中可被激活,而在转化、恶变细胞中信号途径有可能被破坏。因此,在特定细胞株中研究辐射诱导基因表达的结果不具有普遍意义。

受辐射诱导的基因还因辐射剂量、辐射后间隔时间不同表达变化也不同^[6]。ML-1 细胞受 20Gy 电离辐射后 4h,一些基因如 CDKN1A、GADD45、MDM2、ATF3 和 BAX 等的表达达到峰值,而后在 24h 内迅速

全军医药卫生科研基金(01L018)资助

第一作者:饶亚岚,女,1976年3月出生,1996年毕业于武汉大学生物化学系(学士),现为军事医学科学院放射医学研究所放射医学专业,博士研究生

收稿日期:初稿 2002-03-22,修回 2002-04-22

下降到基础水平^[4]。人外周血淋巴细胞(PBL)受2Gy的 γ 射线体外照射,基因CDKN1A、DDB2和XPC在辐射后24h表达才达到峰值^[7]。ML-1细胞受到剂量低于50cGy的电离辐射时,基因CDKN1A和GADD45照射后2—3h内达到峰值,4h内下降^[8]。

研究辐射诱导基因表达的规律多在细胞水平进行,从动物整体水平研究各种细胞因子在机体受辐射后表达变化的研究也有所开展。用亚致死剂量的 γ 射线照射小鼠,检测照射后2—14d细胞因子表达水平。结果表明,IL-1 α mRNA照射后2—4d在骨髓组织中高表达,照射后7d在脾脏中高表达;IL-6 mRNA照射后2d在骨髓组织中高表达,照射后7—10d在脾脏中高表达;TNF- α mRNA照射后2d在骨髓组织中高表达,但照射后2—14d TNF- α mRNA在小鼠脾脏中却无明显变化。此3种细胞因子的蛋白在骨髓、脾脏、血清中的表达无改变^[9]。这些实验说明动物受辐射后,细胞因子表达水平的改变呈现时间相关性和所处组织器官相关性,而且细胞因子mRNA和蛋白水平的改变也可能不一致,这与基因转录后加工和翻译过程的复杂性有关。

2 DNA微阵列技术在辐射诱导基因表达研究中的运用

辐射诱导基因表达如此复杂,仅运用传统方法如Northern杂交对基因表达逐个进行分析不能满足此领域研究的需要。能高通量地同时分析成千上万个基因表达的功能基因组学方法如DNA微阵列技术已发展起来,并且越来越广泛地被受应用。应用这样的方法从分子水平研究辐射效应机制有利于我们更深入理解辐射诱导基因的表达调控和相互关系,还能发现更多辐射诱导基因。

DNA微阵列因靶分子形式不同,可分为cDNA微阵列和寡聚核苷酸微阵列。对cDNA微阵列而言,任何克隆的表达序列标签(EST)序列可由PCR扩增后点样制备微阵列。人、小鼠及其他生物物种的EST库日益庞大,为cDNA微阵列的制备提供靶分子来源。寡聚核苷酸微阵列是以寡聚核苷酸代表待筛选基因制备微阵列。根据由载体和探针标记方式不同,DNA微阵列主要有两种形式:其一以膜为载体、以放射性同位素标记探针的微阵列技术,缺点是需对两张杂交膜比较得出结果;其二以玻片为载体、以荧光标记探针的微阵列技术,优点是进行混合探针杂交利于比较,而且杂交信号扫描后更容易进行图象处理和数据分析,但需要较昂贵的仪器设备^[10]。条件许可的话,采用后一种方式进行分析。

有关应用cDNA微阵列筛选辐射诱导基因的研究,

Amundson等^[4,6]做了很多工作,其实验基本过程是:代表不同靶基因的cDNA片段PCR扩增后直接点在玻片上构成cDNA微阵列;从受辐射和未受辐射样品分别提取mRNA,经一步反转录,分别标记染料Cy3、Cy5制备成探针;等量的、标记不同染料的探针与同一玻片上的cDNA微阵列杂交;经洗涤后的玻片由荧光扫描仪扫描。Cy3、Cy5被激发不同荧光,cDNA微阵列上不同靶基因在受辐射和未受辐射样品中表达量的相对比率(ratio)由Cy3、Cy5荧光强度的比值表示,以看家基因ratio为1:1进行校正。cDNA微阵列技术筛选差异表达基因方法的具体操作过程可见相应网址,如www.nhgri.nih.gov/DIR/Microarray/main.html。由于此技术是同时对阵列中长短、GC含量不一的成千上万条cDNA片段同时进行杂交筛选,而且cDNA片段经处理后交联于玻片呈现除单链外的多种形态,不能排除假阳性结果的存在。所以,一般用传统的单一探针定量杂交法如Northern杂交方法验证微阵列杂交的结果^[10]。

Amundson^[4]首先应用cDNA微阵列研究了p53野生型的ML-1细胞受辐射后基因表达的改变。ML-1经20Gy的 γ 射线照射后4h提取细胞的mRNA,以未照射细胞为对照,与由1.2K ESTs构成cDNA微阵列的杂交。结果有38条序列的表达为电离辐射诱导升高,11条序列的表达为辐射抑制,其中30条序列首次报道与辐射相关。这些辐射相关基因参与细胞内各种代谢途径,如CIP/WAF1、GADD45、MDM2、c-MYC参与细胞生长的调节;FAS、IAP-1、BCL-X参与细胞凋亡;ATF3、RELB、FRA1、c-FOS、JUN-B参与细胞信号传递;TOP2和DNA连接酶III参与DNA代谢。在此研究中,低丰度的转录本也能被检测到,如基因GADD45和CIP1/WAF1在未受辐射细胞中表达量约为 10^{-5} 。DNA微阵列杂交得出基因表达量的相对比率(ratio)与单一探针杂交得到的结果基本一致,证明此方法得到的结果是可信的^[1,4]。

随后Amundson^[7]以人外周血淋巴细胞(PBL)为模型进行研究。PBL经2Gy的 γ 射线体外照射后24h提取细胞的mRNA,以未照射细胞为对照,与由6.7K ESTs构成的cDNA微阵列杂交。结果芯片上48条序列的表达为辐射诱导升高,7条序列的表达为辐射抑制。

进一步实验,ML-1细胞受不同剂量 γ 射线照射后不同时间的mRNA与由6.7K ESTs构成的cDNA微阵列杂交。结果表明,不同条件的辐射诱导基因有部分的重叠,但差异很明显(见图1)。运用cDNA微阵列技术,从整体水平研究辐射诱导基因也有报道^[6],小鼠受2Gy γ 射线照射后24h,从不同组织提取mRNA,与由4.1K ESTs

构成的 cDNA 微阵列杂交, 结果不同组织中辐射诱导表达的基因差异明显, 辐射诱导基因在机体中的表达是组织特异的, 胸腺、脾脏两种造血组织中辐射诱导基因数目多, 而且与其他组织器官如肝脏相比, 两种造血组织中辐射诱导基因更相似 (见图 2)^[6]。

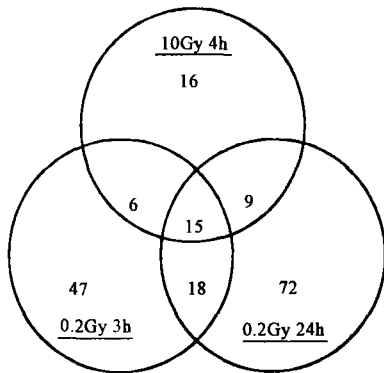


Fig.1 Venn diagram showing the number of genes expressed at elevated levels in ML-1 cells at various times after irradiation with 10 or 0.2Gy γ -rays^[6].

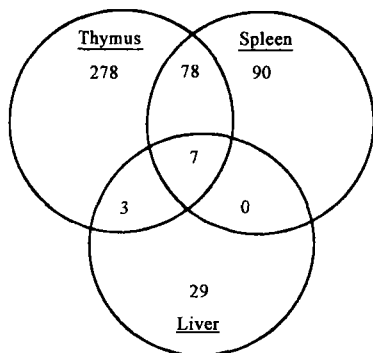


Fig.2 Venn diagram showing the number of genes expressed at elevated levels in various mouse tissues harvested 24h after irradiation with 2Gy γ -rays^[6].

除 cDNA 微阵列外, 将寡聚核苷酸微阵列运用于辐射诱导基因表达的研究文献[11]已报道。采用的寡聚核苷酸微阵列为 Affymetrix 公司产品, 此微阵列上的寡聚核苷酸序列代表 6.8K 条靶基因, 微阵列设计原理是: 根据靶基因序列原位合成多对二十聚核苷酸链, 每对寡聚核苷酸其中一些与靶基因部分序列完全一致, 另一条寡聚核苷酸链中仅一个碱基不与靶基因序列配对。RNA 制备的探针与寡聚核苷酸微阵列多次杂交, 根据探针与微阵列中代表不同靶基因的寡聚核苷酸序列对杂交信号强弱进行统计学分析, 从而判断不同靶基因在不同来源 RNA 的表达是否具显著性差异。人淋巴瘤细胞株受 5Gy 电离辐射后 4h, 收集 RNA, 与此寡聚核苷酸微阵列杂交分析, 结果有 34 条基因是辐射诱导基因, 这些基因有的参与细胞周期、细胞凋亡、

DNA 修复, 还有的基因功能未明。实验认为, 此方法筛选的差异基因假阳性率低于 cDNA 微阵列技术。

研究不同辐射条件下基因表达变化获得的数据越来越多, 需由生物信息学及统计学方法进行分析, 寻找反映不同辐射条件的表达变化的基因, 这些生物信息学及统计学方法已成功运用于肿瘤诊断及药物研制。简单地说, 数据分析需要开发软件以帮助进行统计学分析, 比较同一微阵列上各点数据及不同微阵列间的数据, 得出规律性的结论; 进一步, 使不同来源 (微阵列分析来源数据、DNA 序列测定数据、及各类公共数据库) 的信息整合 (integration of information)^[3,12]。辐射诱导基因这方面的研究还刚刚开始, Kim 等^[13]以其建立的统计分析方法, 对辐射诱导基因表达的有关数据进行了分析, 得出辐射相关基因表达的相互协调关系, 验证了其统计分析方法的可行性。可以说, 这一问题的解决仅有生物学科的实验研究是远远不够的, 需要数理统计学、生物信息学、计算机科学等学科的大力协作。

3 辐射诱导基因为放射病诊断治疗研究提供了新思路

对受辐射剂量的快速判断是放射病分型分度诊断的关键。剂量、射线性质和照射后时间不同, 导致诱导的基因表达不同, 运用高通量基因表达检测技术如 DNA 微阵列技术, 筛选不同条件下的辐射诱导基因, 有可能找到一些特异基因, 监测此类基因表达的变化有可能指示受辐射具体情况, 这将是一种新型辐射生物剂量计^[6]。筛选不同辐射条件下的辐射诱导基因是寻找这种新型辐射生物剂量计的第一步, 目前已取得初步结果。人外周血淋巴细胞是敏感、易于取样的材料, 经 γ 射线体外照射后, 3 条基因 DDB2、CDKN1A、XPC 在 0.2—2Gy 照射剂量照射后 24—48h 内表达量与照射剂量呈线性正相关, 而且来自不同正常个体的不受辐射的 PBL 细胞中此 3 条基因表达量差异不大^[7]。初步的体内 (in vivo) 实验还表明, 小鼠接受 0.2—2Gy 剂量照射后 1d, 在若干组织 (尤其脾、胸腺) 中有表达变化的基因, 这些研究结果十分令人鼓舞。获得的特异性表达变化的基因经严格验证后, 有可能通过 PCR 等快速、廉价的方法进行检测, 由这些基因的表达情况推测受照射的具体情况, 具有快速、无伤害、自动化的特点, 可实现对大量人群所受辐射剂量的快速检测, 当然要实现真正这一步还有很长的路要走。

哺乳动物机体中, 造血组织是对辐射高度敏感的组织之一, 辐射诱导造血和免疫功能抑制, 威胁受辐射机体生命。电离辐射在造血干细胞、成熟血细胞、造血微环境细胞 (包括基质细胞、内皮细胞、淋巴细

胞、单核细胞等)各层次上影响造血。辐射损伤造血干祖细胞,并破坏造血细胞与其微环境间的通讯。文献[14]认为,少量基质细胞在其膜表面可能表达监护分子(guardian molecules),基质细胞通过这些分子与干细胞结合,防止干细胞分化,维持干细胞功能。如果监护分子存在,电离辐射可能的最初效应是损伤这些膜分子和/或干细胞上相应受体的功能或影响其表达,造成干细胞游离维持其生长的环境(niches)。另一方面,不同造血干细胞群辐射抗性的差异可能的原因是不同干细胞与监护分子结合能力的差异造成的。细胞表面的CD24分子与细胞辐射抗性有关,诱导CD24⁻白血病淋巴瘤细胞凋亡的辐射剂量远高于CD24⁺细胞的剂量,提示干细胞表面特异分子的表达与细胞辐射抗性和敏感性有关。由此作出推论,特异膜结合分子表达的异常可能成为辐射诱导损伤的标志^[15]。筛选辐射条件下造血细胞组织中辐射诱导表达变化的基因可能有助于寻找这种标志性的特异膜结合分子。

疾病中出现的病理性改变由基因表达的改变所决定,从基因差异表达角度探索辐射损伤致病机理,有可能为放射病防、诊、治研究提供新的发展思路,这是一个值得研究探索的问题。

参考文献

1 Fornace A J Jr, Amundson S A, Bittner M *et al.* Gene Expr, 1999, 7(4-6):387-400

- 2 Schena M, Shalon D, Davis R W *et al.* Science, 1995, 270(5235):467-470
- 3 Epstein C B, Butow R A. Curr Opin Biotechnol, 2000, 11(1):36-41
- 4 Amundson S A, Bittner M, Chen Y *et al.* Oncogene, 1999, 18(24):3666-3672
- 5 Meyer K M, Hess S M, Tlsty T D *et al.* Oncogene, 1999, 18(42):5795-5805
- 6 Amundson S A, Bittner M, Meltzer P *et al.* Radiat Res, 2001, 156(5 Pt 2):657-661
- 7 Amundson S A, Do K T, Shahab S *et al.* Radiat Res, 2000, 154(3):342-346
- 8 Amundson S A, Do K T, Fornace A J Jr. Radiat Res, 1999, 152(3):225-231
- 9 Chang C M, Limanni A, Baker W H *et al.* J Interferon Cytokine Res, 1997, 17(9):567-572
- 10 Duggan D J, Bittner M, Chen Y *et al.* Nature Genetics, 1999, 21(Suppl 1):10-14
- 11 Tusher V G, Tibshirani R, Chu G. PNAS, 2001, 98(9): 5116-5121
- 12 Van Hal N L, Vorst O, Van Houwelingen A M *et al.* J Biotechnol, 2000, 78(3):271-280
- 13 Kim S, Dougherty E R, Chen Y *et al.* Genomics, 2000, 67(2): 201-209
- 14 Muller-Sieburg C E, Deryugina E. Stem Cells, 1995, 13(5): 477-486
- 15 Karkanitsa L V. Stem Cells, 1997, 15(Suppl 2):71-73

APPLICATION OF DNA MICROARRAY IN RESEARCH OF RADIATION-INDUCED GENES

RAO Yalan CHEN Xiaohua MAO Bingzhi

(Institute of Radiation Medicine, Academy of Military Medical Science, Beijing 100850)

ABSTRACT The paper summarizes the complexity of gene expression induced by radiation, and describes applications of DNA microarray in research of radiation-induced genes in recent years. Progresses in studies on radiation-induced genes may provide a new direction for basic research of diagnosis and therapy of radiation injury.

KEYWORDS DNA microarray, Radiation-induced genes, Radiation injury

CLC Q691.8, Q812, R818