

RPS27L 基因作为辐射损伤标志物的研究

李孝鑫^{1,2} 扈江伟³ 张学清² 沈丽萍² 李琳² 常诚² 王治东² 陈英^{1,2}

¹ (安徽医科大学 合肥 230032)

² (军事医学科学院放射与辐射医学研究所 北京 100850)

³ (解放军 307 医院 北京 100071)

摘要 以人外周血为研究对象, 研究照射后 RPS27L 基因的时间效应和剂量效应以及本底水平, 探究其作为辐射损伤早期生物标志物的可行性。采集 3 名健康成人外周血, 利用 γ 射线对其进行照射至吸收剂量分别为 0、0.5、1、2、4、6 和 10 Gy, 受照后 37 °C 培养 2、4、8、12 和 24 h, 利用实时荧光定量 PCR 检测 RPS27L 基因的表达变化, 并分析在 37 个健康人个体中的本底水平。结果显示, 受照后的 4、8、12 和 24 h RPS27L 基因表达变化显著, 而且具有很好的剂量依赖关系; 在不同年龄和性别的个体中 RPS27L 本底水平相对稳定。因此, RPS27L 基因具有作为新的辐射损伤标志物的潜力。

关键词 核辐射, RPS27L, 基因表达变化, 实时荧光定量 PCR, 生物标志物

中图分类号 TL71

DOI: 10.11889/j.1000-3436.2015.rj.33.050205

在大规模核与辐射事故医学救援中, 对辐射暴露人群的受照剂量进行快速有效的估算是救治的关键。现有的生物剂量估算方法主要有染色体畸变分析和微核分析等细胞遗传学方法^[1-2], 这些方法虽然具有稳定性好、灵敏度高等特点, 但都需要 2-3 d 进行细胞培养, 周期长; 并且在显微镜下观察计数需要熟练的技术, 分析工作量大, 无法满足辐射事故中对大规模受照人群进行快速、高通量检测的需求。在不断改进现有生物剂量计的同时, 寻找更为快速、简便、灵敏和高通量的生物剂量计成为放射生物剂量学的迫切要求。

随着分子生物学技术的深入发展, 基因水平的生物标志物因其快速、简便和灵敏的特点而有可能被用作新型辐射生物剂量计。Amundson 等^[3-5]首次探究了外周血淋巴细胞中 mRNA 作为电离辐射损伤生物标志物的可行性, 发现 DDB2、CDKN1A 和 XPC 基因在 0.2-2 Gy 照射后 24 h 和 48 h 具有线性剂量-效应关系, 并且通过对放疗病人的研究证实, 电离辐射能够诱导 CDKN1A、DDB2 和 GADD45A

基因的表达变化, 而且体内体外照射后剂量效应相似。本实验室前期利用基因芯片技术筛选到包括 RPS27L 基因在内的多个辐射敏感基因, 这些辐射敏感基因具有本底水平差异小, 剂量依赖性好等特点。RPS27L 是一种直接受 p53 调节的靶基因, 参与 DNA 损伤反应, 在维持基因组稳定性中起着重要的作用。据相关文献报道, 目前对于 RPS27L 的研究主要集中在 P53 诱导的机制通路以及某些癌症研究方面^[6-8]。

本研究以人外周血为材料, 采用实时荧光定量 PCR 技术, 研究 RPS27L 基因在不同吸收剂量和不同收集时间的表达水平变化, 以及在健康人群的本底水平, 探究 RPS27L 基因作为早期辐射损伤生物标志物的可行性。

1 材料与方法

1.1 血样收集

实验分为受照组和本底组。受照组对采集到的

基金资助: 全军医学科技“十二五”科研项目(BWS11J018)、全军后勤科研重大项目(AWS14C014)和解放军 307 医院院创新基金(JS-2014-04)项目资助

第一作者: 李孝鑫, 女, 1989 年 3 月出生, 2013 年毕业于鲁东大学, 现为安徽医科大学在读硕士研究生, 遗传学专业, 研究方向细胞遗传学生物剂量估算, E-mail: ldx217@yeah.net; 并列第一作者: 扈江伟, 男, 1973 年 12 月出生, 2012 年毕业于军事医学科学院, 病理学与病理生理学博士, E-mail: hjw56@163.com

通讯作者: 陈英, 博士生导师, 研究员, E-mail: yingchen_29@163.com; 王治东, 助理研究员, 放射医学博士, E-mail: wangzhidong1977@126.com

收稿日期: 初稿 2015-06-10; 修回 2015-07-19

血样进行不同剂量的照射和不同时间的培养, 观察血样中的 RPS27L 基因的表达变化; 本底组为不同年龄段和性别的正常人群血样, 研究 RPS27L 基因的本底水平。受照组: 采集 3 名健康成人 (A、C 为男性, B 为女性, 均无吸烟史、无饮酒史, 近期未接受 X-射线检查等放射影响, 近期无服药史。采样时 A、B、C 年龄分别为 26、25 和 24 岁) 外周血各 42 mL, EDTA 抗凝。将每份抗凝血平均分为 7 份, 每份 6 mL。本底组: 采集 37 名不同年龄组健康人外周血 2 mL, EDTA 抗凝。

1.2 照射和血样培养

37 ℃ 水浴恒温条件下用钴-60 放射源 γ 射线 (剂量率为 $1.14 \text{ Gy} \cdot \text{min}^{-1}$) 分别单次照射 0.5、1、2、4、6 和 10 Gy, 设立未受照 (0 Gy) 血样对照。将照射后血样置于 37 ℃、浓度为 5% CO_2 培养箱中分别培养 2、4、8、12 和 24 h, 收集全血。

表 1 RPS27L 和 β -actin 引物与探针序列
Table 1 The primer and probe sequence of RPS27L and β -actin

序列名称 Sequence name	序列(5'-3') Sequence	产物大小 / bp Product size
RPS27L	引物正向序列 Forward primer sequence	81
	引物反向序列 Reverse primer sequence	
	探针序列 Probe sequence	
	引物正向序列 Forward primer sequence	
β -actin	引物反向序列 Reverse primer sequence	71
	探针序列 Probe sequence	
	引物正向序列 Forward primer sequence	
	引物反向序列 Reverse primer sequence	

1.5 实时荧光定量 PCR 检测基因表达

采用 Taqman 探针两步法进行实时荧光定量 PCR 检测, 用 MyiQ™2 多重实时荧光定量 PCR 仪和实时荧光定量 PCR 试剂, 按照使用说明进行样品检测。每个样品检测 3 个复孔, 以 β -actin 为内参基因, 反应结束后输出数据, 进行基因的表达水平分析。

1.6 统计学分析

受照组采用 $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ ($\Delta\text{CT} = \text{CT}_{\text{目的基因}} - \text{CT}_{\text{内参基因}}$, $\Delta\Delta\text{CT} = \Delta\text{CT}_{\text{受照组样品}} - \Delta\text{CT}_{\text{对照组样品}}$) 的相对定量分析

1.3 全血总 RNA 提取及 cDNA 反转录

利用 RNAiso Blood 全血裂解液 (Cat#9112, TaKaRa), 加入 3 倍血样体积的裂解液, 吹打混匀待完全裂解后用氯仿、异丙醇和无水乙醇提取 RNA, 测定浓度和纯度。用 PrimeScript™ RT reagent Kit with gDNA Eraser 反转录试剂盒 (Cat#RR047A, TaKaRa) 按 $1 \mu\text{g}$ mRNA 的量根据操作说明书进行反转录。

1.4 引物探针设计合成

由吉玛公司根据 NCBI 数据库检索 RPS27L 和 β -actin 基因序列信息进行引物和探针设计, 设计合成的引物和探针序列见表 1。正、反向引物和探针序列为 5'-3', RPS27L 和 β -actin 产物分别为 81 bp 和 71 bp。

方法, 以 β -actin 为内参基因; 本底组采用绝对定量分析, 利用建立的标准曲线计算 100 个拷贝数 β -actin 对应 cDNA 中含有 RPS27L 拷贝数。采用 SPSS 17.0 统计软件进行 t 检验分析, $p < 0.05$ 代表具有显著性差异。

2 结果

2.1 实时荧光定量 PCR 检测方法的建立

2.1.1 反应温度优化, 确定反应条件

反应温度的优化, 退火温度采用 58–62 ℃ 共 5 个温度梯度, 对扩增数据分析表明, 在这一温度范

围内 CT 值没有明显差别,说明 PCR 反应在这一温度范围内稳定。选择 60 ℃作为退火延伸温度。通过以上实验最终确定反应程序为: 94 ℃, 3 min; 94 ℃, 20 s; 60 ℃, 30 s; 共 40 个循环。

2.1.2 标准曲线的建立

对质粒标准品进行 6×10^8 – 6×10^2 个拷贝数共 7

个稀释梯度的检测,得到 CT 值间隔约为 3.32 的均匀扩增曲线(图 1a);以质粒拷贝数的对数作为横坐标,CT 值作为纵坐标,对所得数据拟合得:

$y = -3.6308x + 42.329, R^2 = 0.9955$

该标准曲线的线性关系良好(图 1b)。

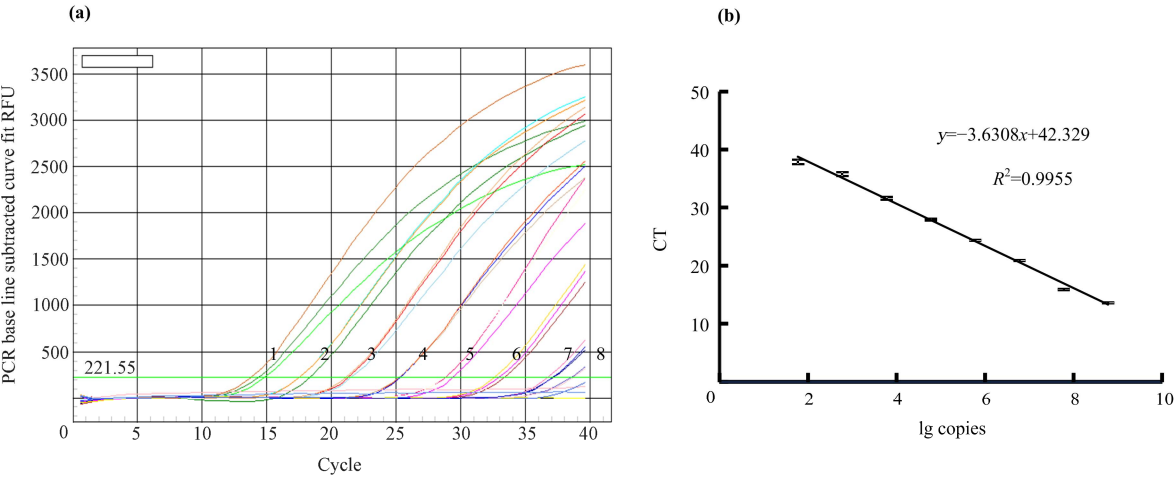


图1 RPS27L 基因实时荧光定量 PCR 扩增标准曲线的建立

(a) RPS27L 基因在相应拷贝数下的扩增曲线(1–8 分别为 6×10^8 、 6×10^7 、 6×10^6 、 6×10^5 、 6×10^4 、 6×10^3 、 6×10^2 个拷贝数和阴性); (b) RPS27L 的标准曲线方程

Fig.1 Establishment of standard curves for quantitative real-time PCR amplification of RPS27L gene

(a) Amplification curves of RPS27L in the corresponding copy (number 1–8 respectively represent 6×10^8 , 6×10^7 , 6×10^6 , 6×10^5 , 6×10^4 , 6×10^3 , 6×10^2 copy number and negative); (b) RPS27L's standard curve equation

2.2 时间效应和剂量效应关系

对 7 个剂量点和 5 个时间点的样品进行实时荧光定量 PCR 检测。结果显示,与未受照组相比,在照射后 4、8、12 和 24 h 4 个时间点 RPS27L 基因表达水平均明显增加,呈现较好的剂量依赖性。而照射后 2 h,各剂量 RPS27L 表达均未增加,且与 0 Gy

比无显著性差异。对照射后 RPS27L 进行时间效应分析,如表 2 所示。不同剂量照射后 4 h, RPS27L 表达量均明显增加,在照射后 8 h 达到峰值 9.975 ± 1.205 ,而后 12、24 h 逐渐下降,在照射后 24 h 仍然高于未受照组,且与 0 Gy 比各剂量点均具有显著性差异。

表 2 不同剂量照射后不同时间 RPS27L 相对表达水平

Fig.2 The relative expression level of RPS27L after irradiation with different doses and time

($\bar{X} \pm s$)

剂量 / Gy Dose	照后时间 Time after irradiation / h				
	2	4	8	12	24
0	1.000±0.000	1.000±0.000	1.000±0.000	1.000±0.000	1.000±0.000
0.5	0.963±0.196	1.450±0.156 [#]	2.963±0.685 [#]	2.019±0.361 [#]	1.755±0.038 [*]
1	0.851±0.205	2.427±0.489 [#]	4.789±0.597 [*]	2.293±1.336	2.103±0.166 [*]
2	1.339±0.415	2.636±0.301 [#]	6.538±0.985 [*]	3.158±1.251	2.272±0.086 [*]
4	1.628±0.554	3.007±0.685 [#]	7.308±1.502 [*]	3.370±1.214 [#]	2.450±0.602 [#]
6	1.570±0.516	3.612±0.842 [#]	8.228±1.823 [*]	4.094±1.274 [#]	2.831±0.509 [#]
10	1.526±0.682	3.883±0.808 [#]	9.975±1.205 [*]	4.440±1.914	3.350±1.244 [#]

注: [#] $p<0.05$, ^{*} $p<0.01$ 。

Note: [#] $p<0.05$, ^{*} $p<0.01$.

2.3 剂量-效应曲线拟合

对受照后 RPS27L 进行剂量-效应分析,如表 2。在 7 个连续受照剂量下表达水平依次增加,10 Gy 时达到最高,呈现出良好的剂量依赖关系。对具有显著性差异的 4 个时间组进行线性回归分析,曲线中 y 为 RPS27L 基因照射后的相对表达水平, x 为

受照剂量。结果如图 2, 得到方程: 4 h, $y=0.7608\ln(x)+2.141$, $R^2=0.9594$ (图 2a); 8 h, $y=2.1686\ln(x)+4.3925$, $R^2=0.9636$ (图 2b); 12 h, $y=0.8334\ln(x)+2.4676$, $R^2=0.9684$ (图 2c); 24 h, $y=0.4786\ln(x)+2.023$, $R^2=0.9204$ (图 2d)。4 个方程的 R^2 值均大于 0.9, 说明 RPS27L 基因表达具有良好的剂量依赖关系。

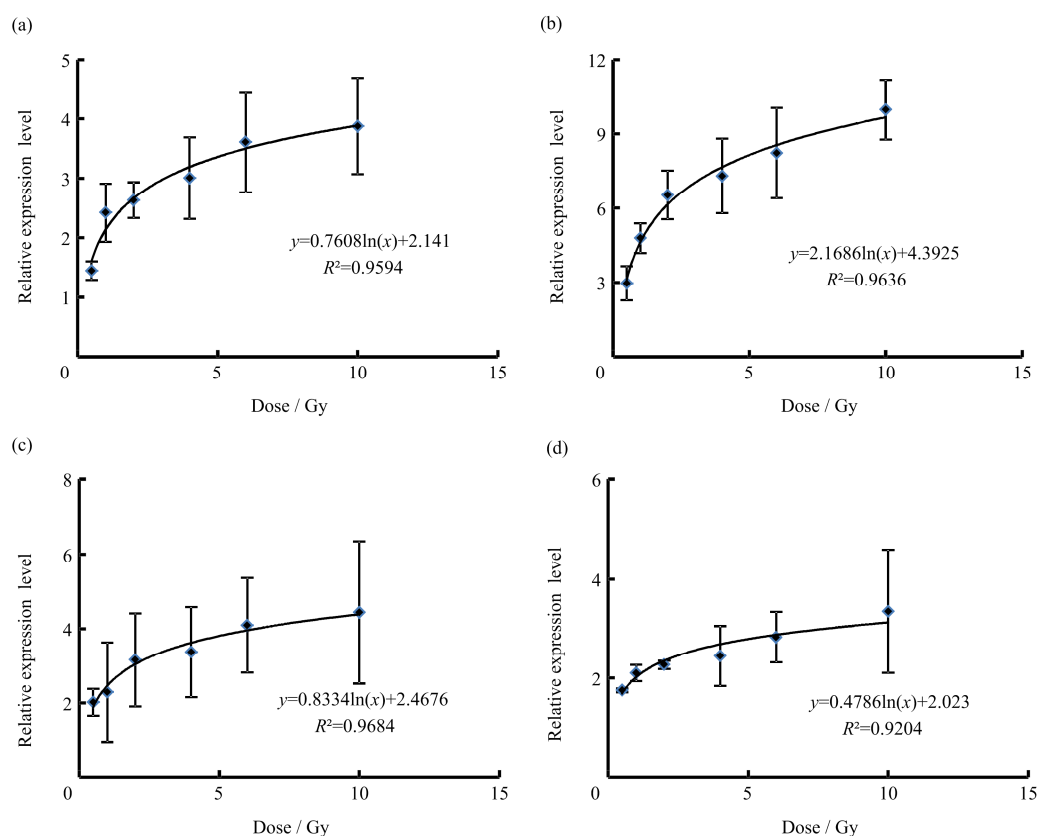


图 2 照射后 4 h (a)、8 h (b)、12 h (c)和 24 h (d)剂量-效应曲线及拟合方程
Fig 2 Dose effect curves and equations after 4 h (a), 8 h (b), 2 h (c) and 24 h (d) irradiation

2.4 本底差异水平分析

理想的辐射损伤标志物不仅要求良好的剂量-效应相关性,而且需要不受年龄、性别和个体差异等影响,才能对受照人群的暴露情况进行评估。个体间本底水平和差异性分析的研究,我们通过对 37 名健康人(男性 20 人,女性 17 人)血样进行 RPS27L 的本底水平差异分析(图 3a),RPS27L 拷贝数的均值为 1.436 ± 0.196 ,波动范围在 1.050–1.760 之间,变异系数为 13.6%,表明本底水平差异较小,相对

均一。通过对不同年龄组和性别组的分析,结果显示,RPS27L 表达水平在年龄 21–30、31–40 和 41–50 岁组分别为 1.411 ± 0.217 、 1.400 ± 0.147 和 1.481 ± 0.218 ,两两组间 p 值分别为 0.752、0.121 和 0.061,均大于 0.05,说明 RPS27L 在年龄组之间无显著性差异(图 3b);RPS27L 表达水平,男性为 1.465 ± 0.193 、女性为 1.402 ± 0.199 , $p=0.364$,两性之间无显著性差异(图 3c)。由此得出,RPS27L 基因不受年龄、性别和个体差异的影响,具有作为辐射损伤标志物的潜力。

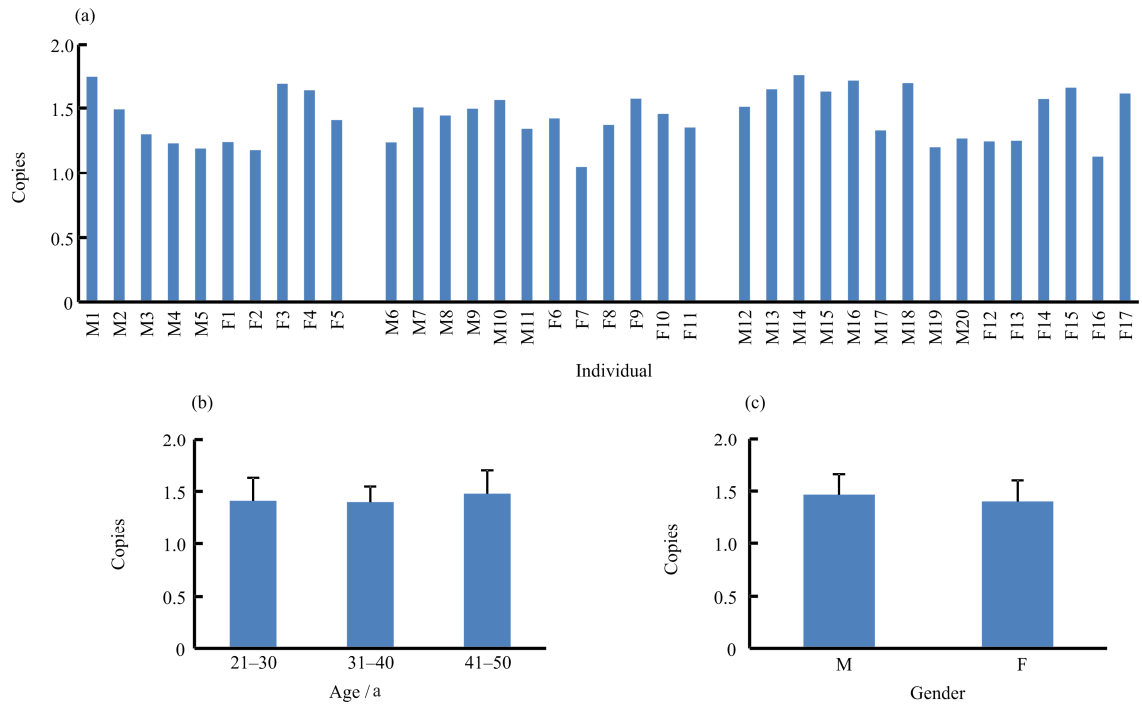


图3 个体本底水平及其差异性分析, M代表男性, F代表女性: (a)37个个体本底水平, 拷贝数为100个 β -actin内参基因对应的RPS27L基因的拷贝数; (b)年龄组差异; (c)性别差异

Fig.3 Individual background level and its difference analysis, M represents male, F represents female: (a) 37 individual's background level and the copy number is the RPS27L corresponding to 100 β -actin; (b) Diversity of age; (c) Diversity of gender

3 讨论

本实验分析不同剂量 γ 射线照射后外周血中RPS27L的表达变化,并分析37名健康人RPS27L基因的本底表达水平。首次报道RPS27L以剂量依赖的方式受到 γ 射线诱导表达,并发现RPS27L在37名健康人中本底值表达相对均一,提示RPS27L具有用于辐射生物剂量估算的可能性。

国内外研究者对基因用于生物剂量计的可行性和不足之处进行了深入探讨。文献^[9-11]通过高低剂量照射和实验室之间的比较,发现基因表达具有很好的剂量效应、稳定性和准确性,证实了用于快速生物剂量计的可行性。文献^[12-14]分别采用qPCR和qNPA方法对CDKN1A、DDB2等基因照射后进行研究,发现根据部分基因的表达变化能够判断个体是否受照。Tucker等^[15-16]通过小鼠体内照射研究基因的表达变化,发现在 <6 Gy时,ASTNR、CDKN1A、GDF15和ATM 4个基因线性剂量关系显著,模拟的线性方程的实际剂量和预测剂量非常接近,但剂量超过6 Gy后出现饱和趋势无法准确估计6 Gy以上的受照剂量。

本实验室前期通过基因芯片技术筛选到RPS27L为辐射诱导高表达基因^[17]。He等^[8]在2007年首次报道了RPS27L基因,通过全基因组芯片分析确定P53直接诱导RPS27L的表达,RPS27L反过来促进细胞凋亡,同时RPS27L还参与DNA损伤反应,在调节细胞周期检查点、DNA修复、染色体稳定性中起着重要的作用。已有文献表明^[18-19],P53基因为电离辐射诱导激活,提示辐射后可能会促进RPS27L表达。对于该基因的报道主要集中在P53诱导的机制通路以及某些癌症的研究,没有与辐射损伤相关的报道。

本研究发现,外周血受到不同剂量 γ 射线照射后,在4、8、12和24 h,RPS27L表达呈现剂量依赖性增加,且0.5 Gy受照组显著高于未受照的对照组,提示该基因的检测下限可达0.5 Gy。时间效应分析提示,在各受照剂量组,照后4 h RPS27L表达开始上调,8 h达到峰值,而后逐渐下降,在照后24 h仍高于未照射的对照组,提示RPS27L可用于照后4-24 h范围内的初步剂量估算。对4个时间点的剂量效应进行线性拟合,得出 R^2 都在0.92以上的线性方程。对本底水平的分析,发现RPS27L本

底值为 1.436 ± 0.196 , 波动范围在 1.050–1.760, 相对均一, 而且本底值不受年龄和性别因素影响 (图 3 b 和 3 c)。

本研究对 RPS27L 照射后表达变化的时间效应和剂量效应关系进行了分析, 提示其可用于照射后 4–24 h 之内的剂量估算, 估算剂量范围 0.5–10 Gy。下一步将通过临床肿瘤放疗病人和动物实验的体内验证, 进一步评价其作为辐射生物剂量计的可行性。

参考文献

- 1 Suto Y, Hirai M, Akiyama M, *et al.* Biodosimetry of restoration workers for the Tokyo Electric Power Company (TEPCO) Fukushima Daiichi nuclear power station accident [J]. *Health Physics*, 2013, **105**(4): 366-373. DOI: 10.1097/HP.0b013e3182995e42.
- 2 Ropolo M, Balia C, Roggieri P, *et al.* The micronucleus assay as a biological dosimeter in hospital workers exposed to low doses of ionizing radiation [J]. *Mutation Research*, 2012, **747**(1): 7-13. DOI: 10.1016/j.mrgentox.2012.02.014.
- 3 Amundson S A, Shahab S, Bittner M, *et al.* Identification of potential mRNA biomarkers in peripheral blood lymphocytes for human exposure to ionizing radiation [J]. *Radiation Research*, 2000, **154**(3): 342-346.
- 4 Amundson S A, Bittner M, Meltzer P, *et al.* Biological indicators for the identification of ionizing radiation exposure in humans [J]. *Expert Review of Molecular Diagnostics*, 2001, **1**(2): 211-219.
- 5 Amundson S A, Grace M B, McLeland C B, *et al.* Human *in vivo* radiation-induced biomarkers: gene expression changes in radiotherapy patients [J]. *Cancer Research*, 2004, **64**(18): 6368-6371.
- 6 Huang C J, Yang S H, Lee C L, *et al.* Ribosomal protein S27-like in colorectal cancer: a candidate for predicting prognoses [J]. *PLoS One*, 2013, **8**(6): e67043. DOI: 10.1371/journal.pone.0067043.
- 7 Li J, Tan J, Zhuang L, *et al.* Ribosomal protein S27-like, a p53-inducible modulator of cell fate in response to genotoxic stress [J]. *Cancer Research*, 2007, **67**(23): 11317-11326.
- 8 He H, Sun Y. Ribosomal protein S27L is a direct p53 target that regulates apoptosis [J]. *Oncogene*, 2007, **26**(19): 2707-2716.
- 9 Knops K, Boldt S, Wolkenhauer O, *et al.* Gene expression in low- and high-dose-irradiated human peripheral blood lymphocytes: possible applications for biodosimetry [J]. *Radiation Research Society*, 2012, **178**(4): 304-312.
- 10 Badie C, Kabacik S, Balagurunathan Y, *et al.* Laboratory intercomparison of gene expression assays [J]. *Radiation Research*, 2013, **180**(2): 138-148. DOI: 10.1667/RR3236.1.
- 11 Dressman H K, Muramoto G G, Chao N J, *et al.* Gene expression signatures that predict radiation exposure in mice and humans [J]. *PLoS Medicine*, 2007, **4**(4): e106.
- 12 Brzóska K, Kruszewski M. Toward the development of transcriptional biodosimetry for the identification of irradiated individuals and assessment of absorbed radiation dose [J]. *Radiation and Environmental Biophysics*, 2015, **54**(3): 353-363. DOI: 10.1007/s00411-015-0603-8.
- 13 Shinde S M, Orozco C, Brengues M, *et al.* Optimization of a microfluidic mixing process for gene expression-based bio-dosimetry [J]. *Quality Engineering*, 2010, **23**(1): 59-70.
- 14 Brengues M, Liu D, Korn R, *et al.* Method for validating radiobiological samples using a linear accelerator [J]. *EPJ Techniques and Instrumentation*, 2014, **1**(1): 1-13.
- 15 Tucker J D, Joiner M C, Thomas R A, *et al.* Accurate gene expression-based biodosimetry using a minimal set of human gene transcripts [J]. *International Journal of Radiation Oncology · Biology · Physics*, 2014, **88**(4): 933-939. DOI: 10.1016/j.ijrobp.2013.11.248.
- 16 Tucker J D, Divine G W, Grever W E, *et al.* Gene expression-based dosimetry by dose and time in mice following acute radiation exposure [J]. *PLoS One*, 2013, **8**(12): e83390. DOI: 10.1371/journal.pone.0083390.
- 17 王治东, 沈丽萍, 林仲武, 等. 利用基因芯片筛选辐射损伤早期生物标志物[J]. *辐射研究与辐射工艺学报*, 2014, **32**(5): 050205. DOI: 10.11889/j.1000-3436.2014.rrj.32.050205.
- WANG Zhidong, SHEN Liping, LIN Zhongwu, *et al.* Screening of biomarker for radiation injury using microarray [J]. *Journal of Radiation Research and Radiation Processing*, 2014, **32**(5): 050205. DOI: 10.11889/j.1000-3436.2014.rrj.32.050205.
- 18 Mirzayans R, Andrais B, Scott A, *et al.* Ionizing radiation-induced responses in human cells with differing tp53 status [J]. *International Journal of Molecular*

- Sciences, 2013, **14**(11): 22409-22435. DOI: 10.3390/ijms141122409.
- 19 Tchelebi L, Ashamalla H, Graves P R. Mutant p53 and the response to chemotherapy and radiation [J]. Sub-cellular Biochemistry, 2014, **85**: 133-159. DOI: 10.1007/978-94-017-9211-0_8.

Study on RPS27L gene as a marker of radiation damage

LI Xiaoxin^{1,2} HU Jiangwei³ ZHANG Xueqing² SHEN Liping² LI Lin²
CHANG Cheng² WANG Zhidong² CHEN Ying^{1,2}

¹(Medical University of Anhui, Hefei 230032, China)

²(Institute of Radiation Medicine, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100850, China)

³(The 307th Hospital of PLA, Beijing 100071, China)

ABSTRACT In order to explore RPS27L's possibility as a biomarker of radiation damage, we studied its time-response and dose-response after irradiation as well as its background level. Three healthy adults' peripheral blood was exposed to gamma-rays with 0, 0.5, 1, 2, 4, 6, and 10 Gy, separately and cultured for 2, 4, 8, 12, and 24 h respectively. RPS27L's expression change was detected by quantitative real-time PCR. We also analyzed its background level in 37 individuals. The results showed that RPS27L had a significant difference at 4, 8, 12, 24 h and a great dose-independent response. There was also a uniform background level of RPS27L among different age and gender. Thus, RPS27L is of great potential to be a new biomarker of radiation.

KEYWORDS Nuclear radiation, RPS27L, Gene expression change, Quantitative real-time PCR, Biomarker

CLC TL71