

# 低剂量率中子-伽玛射线混合照射对 大鼠肝细胞 CYP7A1 基因 mRNA 表达的影响

欧阳可汉<sup>1</sup> 沈先荣<sup>1,2</sup> 何颖<sup>2</sup>

<sup>1</sup> (海军工程大学核能科学与工程系 武汉 430033)

<sup>2</sup> (海军医学研究所 上海 200433)

**摘要** 将60只大鼠随机分成4组,即照射14 d的混合照射组20只、14 d的空白对照组10只、照射31 d的混合照射组20只、31 d的空白对照组10只。照射组每天用低剂量率<sup>60</sup>Co γ-射线(0.0167 Gy·h<sup>-1</sup>)照射2 h和<sup>252</sup>Cf中子(0.028 mGy·h<sup>-1</sup>)照射20 h,在照射14 d、31 d后,各处死20只受照大鼠及10只对照大鼠,提取肝脏总RNA,用实时荧光定量PCR技术检测肝脏中CYP7A1基因及参与调控该基因表达的核受体—PPARα(Peroxisome proliferator activated receptor α)、FXR(Farnesoid X receptor)、PXR(Pregnane X receptor)、HNF4α(Hepatocyte nuclear factor 4α)和LXRα(Liver X receptor α)的转录水平。结果表明:混合照射14 d后,大鼠肝细胞CYP7A1基因mRNA表达显著下调至空白对照组的44%( $p<0.01$ ),PXR基因mRNA表达上调至空白对照组的1.69倍,PPARα、FXR、HNF4α及LXRα基因mRNA表达无明显变化;混合照射31 d后,大鼠肝细胞CYP7A1基因mRNA表达显著下调至空白对照组的22%( $p<0.01$ ),PXR基因mRNA表达显著上调至空白对照组的2.34倍( $p<0.01$ ),PPARα、FXR、HNF4α及LXRα基因mRNA表达无明显变化。一定时期内,低剂量率中子-γ射线混合照射导致大鼠肝细胞CYP7A1基因的表达随着受照剂量的增加而显著下降,其机制可能是混合照射上调了PXR基因的表达,而PXR对CYP7A1基因表达起抑制作用。

**关键词** 低剂量率, <sup>60</sup>Co γ-射线, 中子, CYP7A1 基因, 大鼠

**中图分类号** R811.5, TL71

**DOI:** 10.11889/j.1000-3436.2014.rj.32.040204

低剂量率电离辐射对健康的影响是学术界和公众十分关注的问题。而在一些存在放射性的工作场所中,如核电站,存在中子-γ射线混合照射。研究低剂量率中子-γ射线混合照射对机体的影响对维护职业受照人群的健康具有重大意义。Wong等<sup>[1]</sup>研究发现原子弹爆炸幸存者的血清胆固醇水平相对较高,认为其与电离辐射水平相关。胆固醇代谢异常将导致一些疾病的产生,比如动脉粥样硬化等心血管疾病,阿尔茨海默病等神经系统疾病<sup>[2-3]</sup>。肝脏作为唯一能够将体内过多的胆固醇转化为胆汁酸的器官,对胆固醇代谢起着至关重要的作用。肝脏的胆固醇代谢异常将导致一些疾病的发生,比如胆汁淤积、黄疸病、胆结石,使肝功能出现大范围异常<sup>[4-5]</sup>。同时胆固醇代谢和其他一些物质(葡萄糖、脂肪酸)的代谢途径还存在相互交叉。因此,当一个代谢系

统被扰乱,将会出现更大范围的异常。故低剂量率电离辐射对机体胆固醇代谢的作用及其机制值得深入研究。

胆固醇 7α-羟化酶(CYP7A1)是胆固醇转化为胆汁酸经典途径的主要限速酶,它在胆固醇代谢中起着重要的作用<sup>[6]</sup>。本研究采用低剂量率中子-γ射线混合照射大鼠,在照射14 d(γ射线累积照射剂量为0.4676 Gy、中子累积照射剂量为7.84 mGy)和31 d(γ射线累积照射剂量为1.0354 Gy、中子累积照射剂量为17.36 mGy)后采集样本,运用实时荧光定量PCR法对肝脏细胞CYP7A1基因及调控其表达的核转录因子的mRNA水平进行检测。旨在研究低剂量率中子-γ射线混合照射对大鼠胆固醇分解代谢关键分子胆固醇 7α-羟化酶(CYP7A1)基因表达的影响,并初步探讨其可能机制,为阐明低剂量率中

基金资助: 全军医学科技十二五重大项目(AWS11J003)资助

第一作者: 欧阳可汉,男,1990年10月出生,海军工程大学核能科学与工程系硕士在读,核科学与技术专业, E-mail: oykh1990@126.com

通讯作者: 沈先荣,博士,教授, E-mail: xianrong\_sh@163.com

收稿日期: 初稿 2014-03-31; 修回 2014-05-03

子- $\gamma$  射线混合照射对胆固醇代谢影响的作用机制奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 试剂与仪器

BIO RAD Chromo 4 实时荧光定量 PCR 仪、Trizol reagent (Invitrogen 公司)、SYBR Green Premix Ex Tap<sup>TM</sup>(TaKaBa, 宝生物工程大连有限公司)、微量紫外分光光度计 NanoDrop 1000(Thermo 公司)、DL2000 Marker、琼脂糖。

### 1.2 动物分组及处理

购买雄性 Wistar 大鼠 60 只 (上海西普尔-必凯实验动物有限公司), 动物饲养于海军医学研究所。编号后按随机数字表法分为 4 组: (1)14 d 后处死的空白对照组 10 只; (2)14 d 后处死的混合照射组 20 只; (3)31 d 后处死的空白对照组 10 只; (4)31 d 后处死的混合照射组 20 只。照射组在海军医学研究所辐照室进行照射, 照射条件为: 与  $^{60}\text{Co}$  源距离为 4.38 m,  $\gamma$  射线照射剂量率为  $0.0167 \text{ Gy} \cdot \text{h}^{-1}$ , 每天照射 2 h, 同时与  $^{252}\text{Cf}$  源距离为 0.75 m, 中子剂量率

$0.028 \text{ mGy} \cdot \text{h}^{-1}$ , 每天照射 20 h。期间动物自由饮食饮水。在照射 14 d ( $\gamma$  射线累积照射剂量  $0.4676 \text{ Gy}$ 、中子累积照射剂量  $7.84 \text{ mGy}$ )、31 d ( $\gamma$  射线累积照射剂量  $1.0354 \text{ Gy}$ 、中子累积照射剂量  $17.36 \text{ mGy}$ ) 后, 马上处死空白对照组大鼠 10 只、混合照射组大鼠 20 只。迅速取出肝脏, 制成单细胞悬液, PPS 洗 2 次后备用。

### 1.3 肝脏总 RNA 的提取及 cDNA 合成

采用 Trizol 法提取总 RNA, 紫外分光光度计测定 260 nm 与 280 nm 处吸光度 ( $A$ ) 的比值, 即  $A_{260}/A_{280}$ , 然后进行总 RNA 定量,  $-80^\circ\text{C}$  下冷冻备用。cDNA 合成是按照逆转录试剂盒操作说明书进行, 取 5000 ng 的总 RNA, 加 20  $\mu\text{L}$  的试剂, 再加双蒸水至总体积为 100  $\mu\text{L}$ 。

### 1.4 实时定量 PCR 引物的设计合成

根据 GenBank 中基因信息, 应用 Primer Primer 5 软件设计用于实时定量 PCR 实验检测的目的基因和内参基因引物序列。引物由上海生工生物技术有限公司合成, 并且纯化质检合格, 具体信息见表 1。

表 1 用于实时定量 PCR 测定的基因引物序列  
Table 1 Primers of genes used for RT-PCR

| 基因<br>Gene     | 数据库<br>Accession | 引物<br>Primer | 产物长度 / bp<br>Length      |
|----------------|------------------|--------------|--------------------------|
| $\beta$ -actin | NM_031144.2      | F            | TAAAGACCTCTATGCCAACACAGT |
|                |                  | R            | CACGATGGAGGGGCCGGAATCATC |
| CYP7A1         | NM_012942.2      | F            | AGCCAAGTCAAGTGTC         |
|                |                  | R            | TTCGCTTCTTCCAACCAC       |
| LXR $\alpha$   | NM_031627.2      | F            | TGTCATCAAGGGAGCAG        |
|                |                  | R            | CAGCCACCAACTTCTCAATC     |
| PXR            | NM_052980.2      | F            | AACTACCAACCTCCCTCCAA     |
|                |                  | R            | GTTTCCGTGTCGAACATCGT     |
| HNF4 $\alpha$  | NM_022180.2      | F            | GCAAGGGATTCTTCAGGAGG     |
|                |                  | R            | TCTTATCTTTGTCTACCACGCACT |
| PPAR $\alpha$  | NM_013196.1      | F            | ACGCTGGGTCCTCTGGTT       |
|                |                  | R            | GTCTTGGCTCGCCTCTAA       |
| FXR            | NM_021745.1      | F            | GGCAACTGCGTGATGGATA      |
|                |                  | R            | AGGAGGGTCTGCTGGTCTA      |

### 1.5 实时定量 PCR 检测基因表达

先分别对 14 d 和 31 d 样品进行混装: 10 只空白对照组大鼠的 cDNA 等量混装成为 3 管, 其中 2

管是由随机选取的等量的 3 只大鼠的 cDNA 样本混合, 1 管是由等量的 4 只大鼠的 cDNA 样本混合; 20 只混合照射组大鼠的 cDNA 等量混装成为 6 管, 其中 4 管是由随机选取的等量的 3 只大鼠的 cDNA

样本混合，2 管是由随机选取的等量的 4 只大鼠的 cDNA 样本混合。PCR 实验时每个样品设立 3 个平行孔。用实时定量 PCR 试剂盒，以不同浓度梯度的 cDNA 样本，分别建立目的基因和内参基因( $\beta$ -actin)扩增的标准曲线，判断实时定量 PCR 的扩增效率。采用优化条件中达到最佳扩增效率的 cDNA 样本和引物量进行检测<sup>[7]</sup>。20  $\mu$ L 反应体系中包括：SYBR 10  $\mu$ L，双蒸水 8  $\mu$ L，上下游引物各 0.5  $\mu$ L，cDNA 样本 1  $\mu$ L。PCR 扩增条件为 95  $^{\circ}$ C 预变性 3 s；95  $^{\circ}$ C 变性 10 s，60  $^{\circ}$ C 退火延伸 30 s 的条件下循环 41 次，每次循环结束后进行荧光检测。扩增结束后于 1  $^{\circ}$ C 的梯度逐步升温至 95  $^{\circ}$ C 进行熔解曲线分析，确定扩增产物的特异性。

## 1.6 实时定量 PCR 数据分析

分别测定每个样本的目的基因和内参基因( $\beta$ -actin)扩增的  $C_t$  值，然后采用相对定量方法分析每个样本目的基因的  $\Delta C_t$  值( $\Delta C_t$  值=目的基因  $C_t$  值-内参基因  $C_t$  值)，再依据  $\Delta\Delta C_t$ (实验组  $\Delta C_t$ -对照组  $\Delta C_t$ ) 计算出  $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 。当目的基因与内参基因的扩增效率接近时， $2^{-\Delta\Delta C_t}$  的值就表示实验组样本中的目的基因相对于对照组样本中的目的基因转录水平变化倍数<sup>[7]</sup>。以靶基因相对表达变化 2 倍以上为有差异。

## 1.7 统计学处理

数据采用 SPSS17.0 统计软件包分析处理，结果以  $\bar{x} \pm s$  表示，两组间差异比较采用  $t$  检验。显著性水平  $\alpha=0.05$ 。

## 2 结果

### 2.1 肝脏总 RNA 质量

各样本的总 RNA 其  $A_{260}/A_{280}$  都在 1.8-2.0 之间，纯度较好。随机挑选的 6 个样品的总 RNA 的琼脂糖凝胶电泳图(图 1)有清晰的三条带。故提取的各样本总 RNA 质量合格。

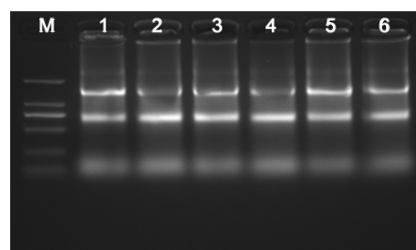


图 1 样品总 RNA 的琼脂糖凝胶电泳  
Fig.1 Gel images of the total RNA of liver samples

### 2.2 实时定量 PCR 扩增的标准曲线相关系数和产物的确定分析

$\beta$ -actin、CYP7A1、PXR、LXR、PPAR $\alpha$ 、FXR、HNF4 $\alpha$  基因扩增曲线正常( $R^2$  为 0.995-0.999)扩增效率为 95%-105%。结果说明，实时定量 PCR 检测系统建立成功且准确可靠，完全满足实时定量 PCR 检测优化条件，可以应用相对定量  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  方法进行分析计算。熔解曲线分析显示基因的熔解曲线峰形均单一-锐利，说明扩增产物无非特异信号干扰，扩增反应具有较好的特异性(图 2)。琼脂凝胶电泳显示所得扩增产物均为目的条带(图 3)。

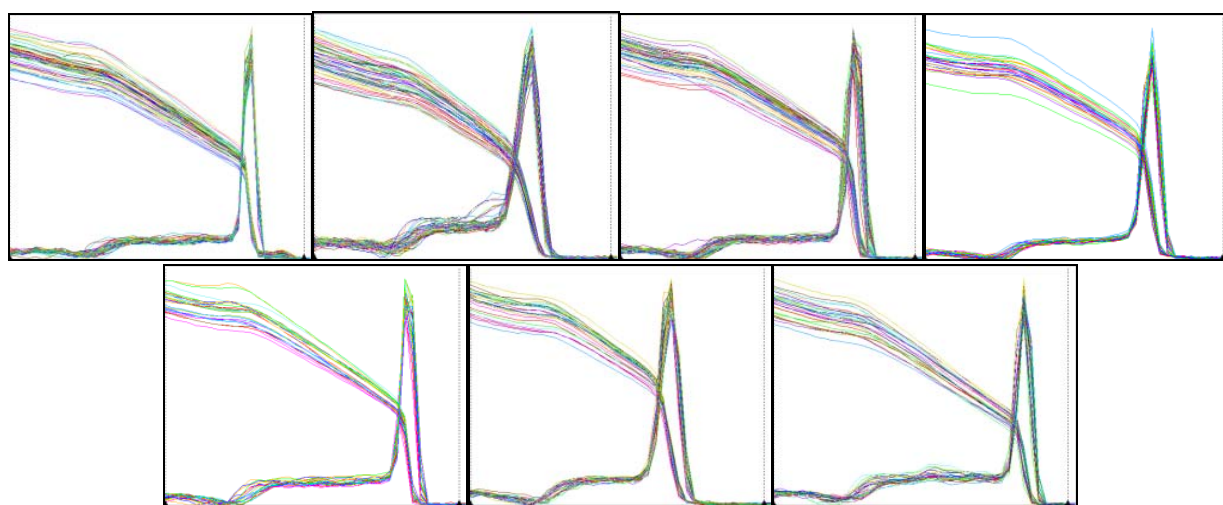


图 2 基因的熔解曲线：上排从左到右依次为 $\beta$ -actin、CYP7A1、PXR 和 FXR，下排从左到右为 LXR $\alpha$ 、HNF4 $\alpha$  和 PPAR $\alpha$   
Fig.2 Dissociation curves of genes. From the left to the right are  $\beta$ -actin, CYP7A1, PXR, FXR in the upper row and LXR $\alpha$ , HNF4 $\alpha$ , and PPAR $\alpha$  in the bottom row

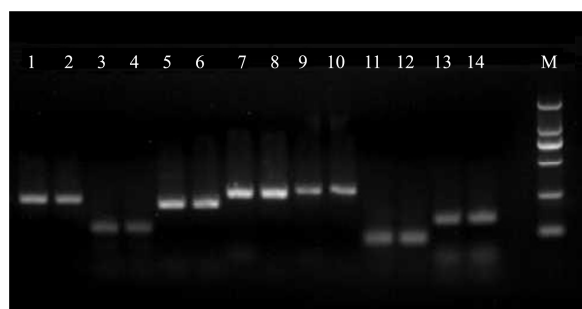


**图3** 基因的PCR扩增产物琼脂糖凝胶电泳  
M: DNA marker DL2000; 1:  $\beta$ -actin(受照 14 d 后的样品); 2:  $\beta$ -actin(受照 31 d 后的样品); 3: CYP7A1(受照 14 d 后的样品); 4: CYP7A1(受照 31 d 后的样品); 5: PXR(受照 14 d 后的样品); 6: PXR(受照 31 d 后的样品); 7: FXR(受照 14 d 后的样品); 8: FXR(受照 31 d 后的样品); 9: LXR $\alpha$ (受照 14 d 后的样品); 10: LXR $\alpha$ (受照 31 d 后的样品); 11: HNF4 $\alpha$ (受照 14 d 后的样品); 12: HNF4 $\alpha$ (受照 31 d 后的样品); 13: PPAR $\alpha$ (受照 14 d 后的样品); 14: PPAR $\alpha$ (受照 31 d 后的样品)

**Fig.3** Gel images of the PCR products of genes. M: DNA marker DL2000; 1:  $\beta$ -actin(sample was irradiated for 14 d); 2:  $\beta$ -actin(sample was irradiated for 31 d); 3: CYP7A1(sample was irradiated for 14 d); 4: CYP7A1(sample was irradiated 31 d); 5: PXR(sample was irradiated for 14 d); 6: PXR(sample was irradiated for 31 d); 7: FXR(sample was irradiated for 14 d); 8: FXR(sample was irradiated for 31 d); 9: LXR $\alpha$ (sample was irradiated for 14 d); 10: LXR $\alpha$ (sample was irradiated for 31 d); 11: HNF4 $\alpha$ (sample was irradiated for 14 d); 12: HNF4 $\alpha$ (sample was irradiated for 31 d); 13: PPAR $\alpha$ (sample was irradiated for 14 d); 14: PPAR $\alpha$ (sample was irradiated for 31 d);

### 2.3 低剂量率中子- $\gamma$ 射线混合照射后大鼠肝细胞 CYP7A1 基因 mRNA 表达的变化

图4显示各基因表达的检测结果,表明大鼠肝脏于全身混合照射14 d和31 d后基因扩增曲线良好。将空白对照组肝细胞 CYP7A1 基因 mRNA 表达水平设为 1,并据此确定混合照射组肝细胞 CYP7A1 基因 mRNA 的相对表达量。表2所列为用实时荧光定量 PCR 技术检测得到的各基因的  $C_t$  值、 $\Delta C_t$  值( $\Delta C_t$  值=目的基因  $C_t$  值-内参基因  $C_t$  值),再依据  $\Delta\Delta C_t$ (实验组  $\Delta C_t$ -对照组  $\Delta C_t$ )计算出相对表达倍数  $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 。图5显示,在受照14 d后( $\gamma$ 射线累积照射剂量为0.4676 Gy、中子累积照射剂量为7.84 mGy),混合照射组大鼠肝细胞 CYP7A1 基因 mRNA 表达下调至空白对照组的44% ( $p<0.01$ ),有非常显著差异;在受照31 d后( $\gamma$ 射线累积照射剂量为1.0354 Gy、中子累积照射剂量为17.36 mGy),混合照射组大鼠肝细胞 CYP7A1 基因 mRNA 表达下调至空白对照组的22% ( $p<0.01$ ),有非常显著差异。在一定时期内,大鼠肝细胞 CYP7A1 基因 mRNA 表达随着受照剂量的增加而显著下降。

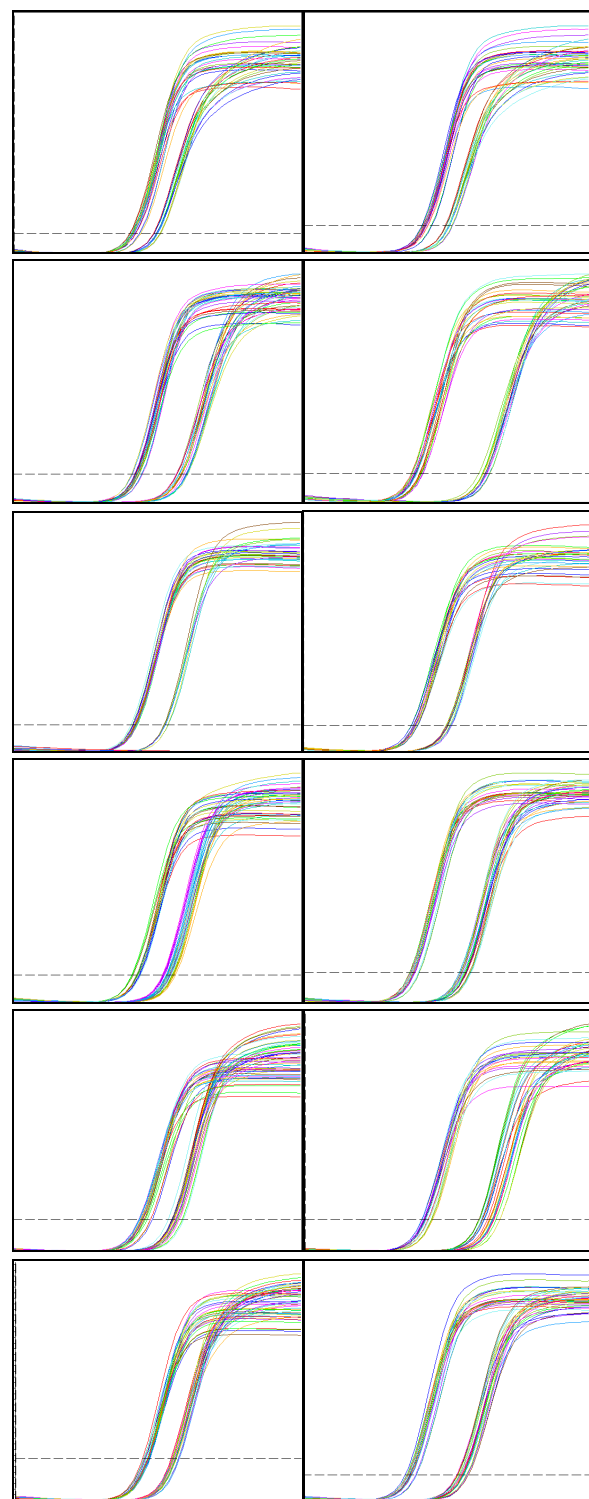


**图4** 照射14 d和31 d后大鼠肝脏基因表达实时定量PCR检测的扩增曲: 左边为照射14 d后的样本,右边为照射31 d后的样本: 从上至下依次为 CYP7A1+ $\beta$ -actin、PPAR $\alpha$ + $\beta$ -actin、FXR+ $\beta$ -actin、LXR $\alpha$ + $\beta$ -actin、HNF4 $\alpha$ + $\beta$ -actin

**Fig.4** Amplification curves of genes in liver assayed with RT-qPCR after radiated for 14 d and 31 d, respectively. Samples radiated for 14 d on the left side and samples radiated for 31 d on the right side. From up to down are CYP7A1+ $\beta$ -actin, PPAR $\alpha$ + $\beta$ -actin, FXR+ $\beta$ -actin, LXR $\alpha$ + $\beta$ -actin, and HNF4 $\alpha$ + $\beta$ -actin.

表 2 照射后各基因 mRNA 表达水平  
Table 2 The mRNA level of the genes after radiated

| 扩增的基因<br>Amplified<br>genes | 分组<br>Groups           | $\beta$ -actin 基因 $C_{t1}$ 值<br>$C_t$ value of $\beta$ -actin<br>gene | 扩增基因的 $C_{t2}$ 值<br>$C_t$ value of the<br>amplified gene | $\Delta C_t$ | $\Delta\Delta C_t$ | $2^{-\Delta\Delta C_t}$ |
|-----------------------------|------------------------|-----------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------|--------------|--------------------|-------------------------|
| CYP7A1                      | 14 d 空白对照组             | 15.5±0.14                                                             | 18.81±0.26                                               | 3.31±0.32    | 1.18±0.28          | 0.44±0.07**             |
|                             | Control group of 14 d  |                                                                       |                                                          |              |                    |                         |
|                             | 14 d 混合照射组             | 15.59±0.47                                                            | 20.08±1.22                                               | 4.49±1.05    |                    |                         |
|                             | Radiated group of 14 d |                                                                       |                                                          |              |                    |                         |
|                             | 31 d 空白对照组             | 14.76±0.54                                                            | 18.01±0.18                                               | 3.25±0.48    | 2.21±0.06          | 0.22±0.02**             |
|                             | Control group of 31 d  |                                                                       |                                                          |              |                    |                         |
| HNF4 $\alpha$               | 31 d 混合照射组             | 14.87±0.33                                                            | 20.33±0.91                                               | 5.46±0.98    |                    |                         |
|                             | Radiated group of 31 d |                                                                       |                                                          |              |                    |                         |
|                             | 14 d 空白对照组             | 16.25±0.07                                                            | 20.18±0.16                                               | 3.93±0.19    | 0.07±0.02          | 0.95±0.02               |
|                             | Control group of 14 d  |                                                                       |                                                          |              |                    |                         |
|                             | 14 d 混合照射组             | 16.27±0.29                                                            | 20.27±0.35                                               | 4±0.18       |                    |                         |
|                             | Radiated group of 14 d |                                                                       |                                                          |              |                    |                         |
| FXR                         | 31 d 空白对照组             | 14.35±0.31                                                            | 18.8±0.29                                                | 4.45±0.5     | 0.19±0.03          | 0.87±0.02               |
|                             | Control group of 31 d  |                                                                       |                                                          |              |                    |                         |
|                             | 31 d 混合照射组             | 14.57±0.37                                                            | 19.21±0.54                                               | 4.64±0.41    |                    |                         |
|                             | Radiated group of 31 d |                                                                       |                                                          |              |                    |                         |
|                             | 14 d 空白对照组             | 17.31±0.17                                                            | 21.67±0.3                                                | 4.36±0.4     | -0.19±0.04         | 1.14±0.03               |
|                             | Control group of 14 d  |                                                                       |                                                          |              |                    |                         |
| PPAR $\alpha$               | 14 d 混合照射组             | 17.31±0.24                                                            | 21.48±0.32                                               | 4.17±0.19    |                    |                         |
|                             | Radiated group of 14 d |                                                                       |                                                          |              |                    |                         |
|                             | 31 d 空白对照组             | 15.84±0.39                                                            | 20.61±0.4                                                | 4.77±0.37    | 0.55±0.03          | 0.68±0.02               |
|                             | Control group of 31 d  |                                                                       |                                                          |              |                    |                         |
|                             | 31 d 混合照射组             | 15.94±0.29                                                            | 21.26±1.04                                               | 5.32±0.82    |                    |                         |
|                             | Radiated group of 31 d |                                                                       |                                                          |              |                    |                         |
| LXR $\alpha$                | 14 d 空白对照组             | 15.91±0.17                                                            | 22.09±0.3                                                | 6.18±0.31    | -0.54±0.12         | 1.45±0.13               |
|                             | Control group of 14 d  |                                                                       |                                                          |              |                    |                         |
|                             | 14 d 混合照射组             | 16.02±0.46                                                            | 21.66±0.58                                               | 5.64±0.33    |                    |                         |
|                             | Radiated group of 14 d |                                                                       |                                                          |              |                    |                         |
|                             | 31 d 空白对照组             | 15.71±0.7                                                             | 22.66±0.59                                               | 6.95±0.31    | -0.41±0.12         | 1.32±0.09               |
|                             | Control group of 31 d  |                                                                       |                                                          |              |                    |                         |
| PXR                         | 31 d 混合照射组             | 15.03±0.42                                                            | 21.57±0.44                                               | 6.54±0.42    |                    |                         |
|                             | Radiated group of 31 d |                                                                       |                                                          |              |                    |                         |
|                             | 14 d 空白对照组             | 17.87±0.26                                                            | 21.66±0.36                                               | 3.79±0.15    | 0.16±0.02          | 0.89±0.02               |
|                             | Control group of 14 d  |                                                                       |                                                          |              |                    |                         |
|                             | 14 d 混合照射组             | 17.88±0.19                                                            | 21.83±0.2                                                | 3.95±0.22    |                    |                         |
|                             | Radiated group of 14 d |                                                                       |                                                          |              |                    |                         |
| PXR                         | 31 d 空白对照组             | 14.51±0.55                                                            | 23.63±0.78                                               | 9.12±0.46    | -0.5±0.18          | 1.4±0.2                 |
|                             | Control group of 31 d  |                                                                       |                                                          |              |                    |                         |
|                             | 31 d 混合照射组             | 14.55±0.44                                                            | 23.17±0.65                                               | 8.62±0.5     |                    |                         |
|                             | Radiated group of 31 d |                                                                       |                                                          |              |                    |                         |
|                             | 14 d 空白对照组             | 17.74±0.14                                                            | 22.68±0.36                                               | 4.94±0.31    | -0.76±0.03         | 1.69±0.04               |
|                             | Control group of 14 d  |                                                                       |                                                          |              |                    |                         |
| PXR                         | 14 d 混合照射组             | 17.69±0.37                                                            | 21.87±0.4                                                | 4.18±0.3     |                    |                         |
|                             | Radiated group of 14 d |                                                                       |                                                          |              |                    |                         |
|                             | 31 d 空白对照组             | 15.25±0.32                                                            | 23.37±0.33                                               | 8.12±0.3     | -1.23±0.03         | 2.34±0.05**             |
|                             | Control group of 31 d  |                                                                       |                                                          |              |                    |                         |
|                             | 31 d 混合照射组             | 15.71±0.38                                                            | 22.6±0.39                                                | 6.89±0.4     |                    |                         |
|                             | Radiated group of 31 d |                                                                       |                                                          |              |                    |                         |

注:  $\Delta C_t = C_{t2}$  (扩增基因) -  $C_{t1}$  ( $\beta$ -actin 基因),  $\Delta\Delta C_t = \Delta C_{t1}$  (照射组) -  $\Delta C_{t1}$  (对照组), \*\*,  $p < 0.01$ 。  
Note:  $\Delta C_t = C_{t2}$  (Amplification gene) -  $C_{t1}$  ( $\beta$ -actin gene),  $\Delta\Delta C_t = \Delta C_{t1}$  (Radiated group) -  $\Delta C_{t1}$  (Control group), \*\*,  $p < 0.01$ .

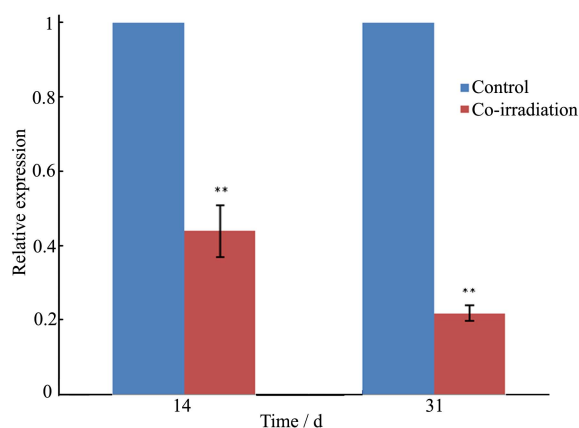


图5 CYP7A1 基因 mRNA 相对于内参 $\beta$ -actin 基因 mRNA 的表达水平, 将空白对照组肝细胞 CYP7A1 基因 mRNA 表达水平设为 1, \*\*,  $p < 0.01$

Fig.5 CYP7A1 mRNA gene expression in the liver. Results are expressed as a ratio to  $\beta$ -actin mRNA level. The mRNA levels of control rats were arbitrarily set at 1, \*\*,  $p < 0.01$

## 2.4 低剂量率中子- $\gamma$ 射线混合照射后大鼠肝细胞中调控 CYP7A1 基因的核受体 mRNA 表达的变化

如图 6 所示, 在照射 14 d ( $\gamma$  射线累积照射剂量

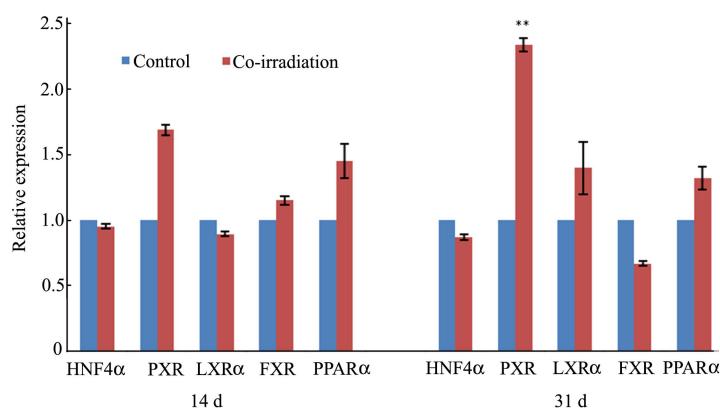


图6 肝脏中调控 CYP7A1 基因 mRNA 表达的核受体 mRNA 相对于内参 $\beta$ -actin 参基因 mRNA 的表达水平, 将空白对照组的各基因 mRNA 表达水平设为 1, \*\*,  $p < 0.01$

Fig.6 The mRNA level of the nuclear receptors that could regulate the transcription of CYP7A1 gene in the liver. Results are expressed as a ratio to  $\beta$ -actin mRNA level. The mRNA levels of control rats were arbitrarily set at 1, \*\*,  $p < 0.01$

## 3 讨论

小剂量低剂量率电离辐射所致的人体效应越来越受到人们的关注。胆固醇代谢作为健康的一部分, 它的异常将会导致疾病的发生, 比如胆石病<sup>[8]</sup>。对于小剂量电离辐射对胆固醇代谢造成的影响, 国内外进行的研究相对较少, 尤其是低剂量率中子- $\gamma$  射线混合照射研究。本文主要研究了在低剂量率中子- $\gamma$  射线混合照射下肝脏胆固醇转化为胆汁酸的主要

限速酶 CYP7A1 基因 mRNA 表达的变化。研究发现: 在照射 14 d ( $\gamma$  射线累积照射剂量为 0.4676 Gy、中子累积照射剂量为 7.84 mGy) 和 31 d ( $\gamma$  射线累积照射剂量为 1.0354 Gy、中子累积剂量为 17.36 mGy) 后, 混合照射组大鼠肝细胞 CYP7A1 基因 mRNA 表达分别下调至空白对照组的 44% ( $p < 0.01$ ) 和 22% ( $p < 0.01$ )。说明低剂量率  $\gamma$  和中子混合照射在照射一段时期内对大鼠肝细胞 CYP7A1 mRNA 相对表达水平有着显著的影响。

肝脏胆固醇 7 $\alpha$ -羟化酶(CYP7A1)基因 mRNA 的表达受各种核受体和转录因子的调控。肝 X 受体  $\alpha$ (LXR $\alpha$ )、过氧化物酶体增值物激活受体  $\alpha$ (PPAR $\alpha$ )、肝细胞核因子 4 $\alpha$ (HNF4  $\alpha$ )都能够刺激上调 CYP7A1 基因的转录表达,而法尼醇 X 受体(FXR)、孕烷受体(PXR)能够抑制 CYP7A1 基因的转录表达。肝 X 受体(LXR $\alpha$ )能被配体氧化型固醇激活,并且它能够和维甲酸受体 $\alpha$ (RXR $\alpha$ )结合后形成异源二聚体,异源二聚体 LXR $\alpha$ -RXR $\alpha$ 将与 CYP7A1 基因启动子区的 siteI 位点结合,进而调控 CYP7A1 基因的转录<sup>[9]</sup>。Zhang 等<sup>[10]</sup>给野生型和 LXR $\alpha$  基因敲除的 C57BL/6J 老鼠喂食 LXR $\alpha$ 激活剂,发现野生型老鼠 CYP7A1 基因 mRNA 表达显著增加,但 LXR $\alpha$ 基因敲除老鼠观察不到明显变化。研究表明 HNF4 $\alpha$ 是 CYP7A1 基因的重要调控因子,它能够与位于 CYP7A1 基因启动子区胆汁酸响应元件 II(BAREII)的 DR-1 序列结合,进而促进 CYP7A1 基因的转录。另外,如果 HNF4 $\alpha$ 结合位点发生突变,CYP7A1 基因启动子活性将会显著下降,表明 HNF4 $\alpha$ 对于 CYP7A1 基因转录的基本水平至关重要<sup>[11]</sup>。Cheema 等研究发现,PPAR $\alpha$ 被配体激活后,能够与 RXR $\alpha$ 结合形成 PPAR $\alpha$ -RXR $\alpha$ 二聚体,PPAR $\alpha$ -RXR $\alpha$ 能够与 CYP7A1 启动子区 siteI 位点结合,进而调控 CYP7A1 基因的转录<sup>[12]</sup>。石如玲等<sup>[13]</sup>通过邻苯二甲酸二异辛酯激活大鼠 PPAR $\alpha$ 的表达,发现肝脏中 CYP7A1 基因表达加强。Cao 等<sup>[14]</sup>研究发现黄连生物碱提取物能够通过上调 CYP7A1 基因正向调控因子 PPAR  $\alpha$ 表达,而使 CYP7A1 基因表达上调,最终导致高脂质膳食的大鼠肝脏中胆固醇浓度降低。FXR 能够通过 FXR-SHP、FXR-FGF15 途径来抑制 CYP7A1 基因的转录。肝同系物受体 1(LRH-1)是促进 LXR $\alpha$ 激活 CYP7A1 基因转录的辅助因子<sup>[15]</sup>。在肝脏中,胆汁酸能够激活 FXR,而后 FXR 调控异源二聚体小分子伴侣(small heterodimer partner, SHP)转录,SHP 会和 LRH-1 结合成异源二聚体,导致 CYP7A1 基因启动子募集的辅助激活因子减少,CYP7A1 基因转录下降。另外,FXR 被激活后,大鼠纤维母细胞生长因子 FGF15 的分泌和表达将增加,而 FGF15 将与 FGFR4 结合,从而激活 JNK 途径,使 CYP7A1 基因的转录表达受到抑制<sup>[16]</sup>。与正常小鼠相比,PXR 基因敲除的小鼠 CYP7A1 基因的表达减少近 2 倍。另外,对小鼠喂食 PCN 后,发现它能够显著抑制 CYP7A1 基因

mRNA 的水平<sup>[17]</sup>。但是 PXR 基因敲除的小鼠,PCN 对其 CYP7A1 基因表达的抑制作用将失效。故 PXR 能够通过减少其基础表达和抑制其表达两方面使 CYP7A1 基因表达失调<sup>[18]</sup>。Jonker 等<sup>[19]</sup>研究发现 PXR 能够抑制 CYP7A1 基因的转录,使 PXR 能够成为治疗胆固醇代谢异常疾病的靶标。

为了研究实验对照组 CYP7A1 mRNA 变化可能机制,我们同样运用了实时定量 PCR 法检测了 LXR $\alpha$ 、PPAR $\alpha$ 、HNF4 $\alpha$ 、FXR、PXR 基因 mRNA 的相对表达水平,通过数据分析发现混合照射组 LXR $\alpha$ 、PPAR $\alpha$ 、HNF4  $\alpha$ 、FXR 基因 mRNA 的表达水平相对于空白对照组无明显变化。但是在照射 14 d 后,混合照射组大鼠肝细胞 PXR 基因 mRNA 表达上调至相应空白对照组的 1.69 倍。在照射 31 d 后,混合照射组大鼠肝细胞 PXR 基因 mRNA 表达上调至相应空白对照组的 2.34 倍( $p<0.01$ ),有非常显著差异。故 CYP7A1 mRNA 表达下调可能机制是混合照射在一段时期内上调了其负调控基因 PXR mRNA 的表达。

另外,除了各种核受体和转录因子的调控,CYP7A1 mRNA 表达水平还受到其它因素的影响。Park 等<sup>[20]</sup>发现对 C57BL/6 鼠注射胰岛素后,肝细胞 SHP 基因 mRNA 表达上升,且胰岛素诱导级联信号通路使胰岛素  $\beta$  细胞转录因子(FOXO1)失活,进而使 CYP7A1 基因的表达受到抑制。Kim 等<sup>[21]</sup>研究发现在正常和受压状态下,抑癌因子 P53 都能通过增加 SHP 量来降低 CYP7A1 水平。Henkel 等研究发现持续喂食 FVB/NJ 小鼠胆固醇膳食 12 周能够诱导肝细胞肿瘤坏死因子 $\alpha$  (TNF  $\alpha$ )和白介素 1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ )表达,而该 2 种因子能够通过各自的途径对 CYP7A1 的表达进行负向调控<sup>[22]</sup>。对于小剂量的低剂量率中子- $\gamma$  射线混合照射对 CYP7A1 基因 mRNA 表达造成的影响可能是多因素共同作用的,为了更加深入、全面的解释其机制还需进一步研究。

总之,本研究发现低剂量率中子- $\gamma$  射线混合照射一段时期后,大鼠肝细胞 CYP7A1 基因 mRNA 表达显著下调,而它的负调控基因 PXR 基因 mRNA 表达明显上升。故一定时期内低剂量率中子- $\gamma$  射线混合照射可能通过显著上调大鼠肝细胞 PXR 基因 mRNA 表达而使肝细胞 CYP7A1 基因 mRNA 表达下降。但是肝细胞 CYP7A1 基因 mRNA 表达显著下降可能不是单一因素造成的,还有其他因素的共同作用,这一点尚需进一步研究。

## 参考文献

- 1 Wong F L, Yamada M, Sasaki H, *et al.* Effects of radiation on the longitudinal trends of total serum cholesterol levels in the atomic bomb survivors [J]. *Radiation Research*, 1999, **151**(6): 736-746.
- 2 Shao B, Tang C, Sinha A, *et al.* Humans with atherosclerosis have impaired ABCA1 cholesterol efflux and enhanced HDL oxidation by myeloperoxidase [J]. *Circulation Research*, 2014, **114**: 303-454.
- 3 Pierrot N, Octave J N. Cholesterol, neuronal activity and Alzheimer disease [J]. *Medecine Sciences*, 2014, **30**(3): 244-246.
- 4 Kusters A, Jirsa M, Groen A K. Genetic background of cholesterol gallstone disease [J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*, 2003, **1637**(1): 1-19.
- 5 Rutherford A E, Pratt D S. Cholestasis and cholestatic syndromes [J]. *Current Opinion in Gastroenterology*, 2007, **23**(3): 232-236.
- 6 Clayton P T. Disorders of bile acid synthesis [J]. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 2011, **34**(3): 593-604.
- 7 Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>-ΔΔCt</sup> Method [J]. *Methods*, 2001, **25**(4): 402-408.
- 8 Di Ciaula A, Wang D Q H, Bonfrate L, *et al.* Current views on genetics and epigenetics of cholesterol gallstone disease [J]. *Cholesterol*, 2013(3): 1-11.
- 9 Gupta S, Pandak W M, Hylemon P B. LXR $\alpha$  is the dominant regulator of CYP7A1 transcription [J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2002, **293**(1): 338-343.
- 10 Zhang Y, Breevoort S R, Angdisen J, *et al.* Liver LXR $\alpha$  expression is crucial for whole body cholesterol homeostasis and reverse cholesterol transport in mice [J]. *The Journal of Clinical Investigation*, 2012, **122**(5): 1688.
- 11 Stroup D, Chiang J Y L. HNF4 and COUP-TFII interact to modulate transcription of the cholesterol 7 $\alpha$ -hydroxylase gene (CYP7A1) [J]. *Journal of Lipid Research*, 2000, **41**(1): 1-11.
- 12 Cheema S K, Agellon L B. The murine and human cholesterol 7 $\alpha$ -hydroxylase gene promoters are differentially responsive to regulation by fatty acids mediated *via* peroxisome proliferator-activated receptor  $\alpha$  [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2000, **275**(17): 12530-12536.
- 13 石如玲, 姜玲玲. 过氧化物酶体增殖剂激活受体  $\alpha$  对大鼠胆汁酸合成代谢的影响 [J]. *河北医科大学学报*, 2005, **26**(3): 161-163.
- SHI Ruling, JIANG Lingling. Effects of peroxisome proliferator-activated receptor  $\alpha$  on bile acid biosynthesis in rats [J]. *Journal of Hebei Medical University*, 2005, **26**(3): 161-163.
- 14 Cao Y, Bei W, Hu Y, *et al.* Hypcholesterolemia of Rhizoma Coptidis alkaloids is related to the bile acid by up-regulated CYP7A1 in hyperlipidemic rats [J]. *Phytomedicine*, 2012, **19**(8): 686-692.
- 15 Oosterveer M H, Mataki C, Yamamoto H, *et al.* LRH-1-dependent glucose sensing determines intermediary metabolism in liver [J]. *The Journal of Clinical Investigation*, 2012, **122**(8): 2817.
- 16 Matsubara T, Li F, Gonzalez F J. FXR signaling in the enterohepatic system [J]. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 2013, **368**(1): 17-29.
- 17 Li Y C, Wang D P, Chiang J Y. Regulation of cholesterol 7  $\alpha$ -hydroxylase in the liver. Cloning, sequencing, and regulation of cholesterol 7  $\alpha$ -hydroxylase mRNA [J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 1990, **265**: 12012-12019.
- 18 Kliewer S A, Willson T M. Regulation of xenobiotic and bile acid metabolism by the nuclear pregnane X receptor [J]. *The Journal of Lipid Research*, 2000, **43**: 359-364.
- 19 Jonker J W, Liddle C, Downes M. FXR and PXR: potential therapeutic targets in cholestasis [J]. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 2012, **130**(3): 147-158.
- 20 Park W H, Pak Y K. Insulin-dependent suppression of cholesterol 7 $\alpha$ -hydroxylase is a possible link between glucose and cholesterol metabolisms [J]. *Experimental & Molecular Medicine*, 2011, **43**(10): 571-579.
- 21 Kim D H, Lee J W. Tumor suppressor p53 regulates bile acid homeostasis via small heterodimer partner [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2011, **108**(30): 12266-12270.
- 22 Henkel A S, Anderson K A, Dewey A M, *et al.* A chronic high-cholesterol diet paradoxically suppresses hepatic CYP7A1 expression in FVB/NJ mice [J]. *Journal of Lipid Research*, 2011, **52**(2): 289-298.

## Effects of low dose rate neutron-gamma ray mixed irradiation on CYP7A1 mRNA expression in rat liver

OUYANG Kehan<sup>1</sup> SHEN Xianrong<sup>1,2</sup> HE Ying<sup>2</sup>

<sup>1</sup>(Department of Nuclear Science and Engineering, Naval University of Engineering, Wuhan 430033, China)

<sup>2</sup>(The naval Medical Research Institute, Shanghai 200433, China)

**ABSTRACT** The aim was to analyze the effects of low dose rate neutron-gamma mixed irradiation on the mRNA expression of hepatic cholesterol 7 $\alpha$ -hydroxylase (CYP7A1) gene in the rat and its potential mechanism. Sixty rats were randomly divided into 4 groups: irradiated group in which 20 rats were irradiated for 14 d; control group in which 10 rats were sham irradiated for 14 d; irradiated group in which 20 rats were irradiated for 31 d; control group in which 10 rats were sham irradiated for 31 d. The irradiated rats were irradiated with low dose rate <sup>60</sup>Co  $\gamma$ -rays at 0.0167 Gy·h<sup>-1</sup> for 2 h and <sup>252</sup>Cf neutron at 0.028 mGy·h<sup>-1</sup> for 20 h. After being irradiated for 14 d and 31 d, 20 irradiated rats and 10 control rats were killed respectively. The total RNA was extracted from livers. The real-time PCR was used to detect the expression level of hepatic CYP7A1 gene and some nuclear receptor genes, such as peroxisome proliferator activated receptor alpha (PPAR $\alpha$ ), farnesoid X receptor (FXR), pregnane X receptor (PXR), hepatocyte nuclear factor 4 alphas (HNF4 $\alpha$ ) and liver X receptor alpha (LXR $\alpha$ ), which involved in CYP7A1 transcriptional regulation. The results showed that the mRNA level of hepatic CYP7A1 gene in the irradiated rats which were irradiated for 14 d significantly decreased by 44% ( $p<0.01$ ) of that in the control group rats, the mRNA level of hepatic PXR gene in the irradiated rats which were irradiated for 14 d increased by 1.69-fold of that in the control group rats, while the mRNA levels of PPAR $\alpha$ , FXR, HNF4 $\alpha$  and LXR $\alpha$  in the irradiated rats which were irradiated for 14 d did not change significantly compared with the control rats; the mRNA level of hepatic CYP7A1 gene in the irradiated rats which were irradiated for 31 d rather significantly decreased by 22% ( $p<0.01$ ) of that in the control rats, the mRNA level of hepatic PXR gene in the irradiated rats which were irradiated for 31 d significantly increased by 2.34-fold ( $p<0.01$ ) of that in the control rats, while the mRNA levels of PPAR $\alpha$ , FXR, HNF4 $\alpha$  and LXR $\alpha$  in the irradiated rats which were irradiated for 31 d didn't change significantly compared with the control rats. Thus, after exposure to low dose rate neutron- $\gamma$  rays co-irradiation in a period, the mRNA level of hepatic CYP7A1 gene in the rat significantly decreased with the accumulation of the absorbed dose. The possible mechanism of the change was that the co-irradiation led to the significant increase transcriptional level of PXR gene, but PXR repressed the transcription of CYP7A1 gene.

**KEYWORDS** Low dose rate, <sup>60</sup>Co  $\gamma$ -rays, Neutron, CYP7A1 gene, Rat

**CLC** R811.5, TL71