

γ 射线辐照对 SD 大鼠淋巴细胞基因表达谱的影响

秦秀军 张伟 李建国 尹晶晶 周晋源 闻建华

(中国辐射防护研究院 太原 030006)

摘要 研究了 2.0 Gy γ 射线照射对大鼠血液淋巴细胞基因表达谱变化的影响。通过体内、外实验,用 2.0 Gy ^{60}Co γ 射线照射后 24 h,提取血液中淋巴细胞的 RNA,用基因芯片技术检测淋巴细胞基因表达谱的变化。结果表明,照射后 24 h,体外和体内共同的差异表达基因有 1322 条,其中下调表达有 497 条,上调表达有 633 条,有 192 条表达不一致。结合基因功能注释(Gene ontology, GO)数据库,共同涉及到的生物过程、细胞组分、分子功能分别有 53、19、28 个。结合 KEGG 数据库,共同包含的 pathway 有 12 条通路。此外,还发现了 Serpinb2、Creb3l2、Pacrg、Vamp1 和 Il16 等与辐射相关的基因。

关键词 辐照, 淋巴细胞, 基因芯片, 基因表达谱, 大鼠

中图分类号 TL99, R818.74

电离辐射对细胞的作用过程是一个复杂的级联信号放大过程,它包括了多种细胞功能的调节过程,诸如细胞周期阻滞、DNA 修复、细胞凋亡以及蛋白质修饰等,而这些变化核心的原因是由于基因的表达发生了变化^[1]。基因芯片又称 DNA 微阵列,出现于 20 世纪 90 年代。其原理是将待测样品用荧光分子标记后,与已知芯片上的 DNA 或寡核苷酸片段杂交,通过荧光扫描及计算机分析获得大量的基因信息,其突出特点在于能够对微量样本中的核酸序列信息进行快速、准确、高通量的检测和分析^[2]。

前期,本实验室研究了不同受照剂量及照后不同时间点人外周血淋巴细胞差异基因表达的变化,并对辐射相关基因进行了筛选^[1,3,4]。本文主要通过体内、外实验,研究 2.0 Gy γ 射线照射后 24 h 对大鼠淋巴细胞基因表达的影响,以期为后续的辐射生物效应研究及健康危害评价提供相关信息。

1 实验材料和方法

1.1 实验材料

雄性 SD 大鼠购自军事医学科学院实验动物中心,生产许可证号: SCXK-(军)2007-004,合格证号: 00130908;淋巴细胞分离液、D-hanks 液由北京索来宝科技有限公司提供;RPMI1640 培养基由 GIBCO 公司提供;RNA 提取试剂盒 Trizol 购自 Invitrogen 公司;Agilent SurePrint G3 Rat Gene Ex-

pression 8×60 K 芯片由上海欧易生物医学科技有限公司提供。

1.2 动物分组

实验分为体外实验和体内实验,均设对照组和照射组,每组 3 只大鼠,共 12 只。体外实验,动物先经腹主动脉采血,提取淋巴细胞至 RPMI1640 培养基中,37℃ 培养箱过夜后,接受 γ 射线照射,照射 24 h 提取 RNA。体内实验,动物经 γ 射线全身照射,24 h 后经腹主动脉采血,分离淋巴细胞,提取 RNA。

1.3 辐照方法

由中国辐射防护研究院附属医院提供 ^{60}Co γ 射线照射,吸收剂量为 2.0 Gy,剂量率 117.1 cGy/min。

1.4 淋巴细胞及 RNA 提取

每只大鼠经腹主动脉采血 5 mL,肝素抗凝,用等体积的 D-hanks 液在无菌条件下稀释混匀,沿离心管壁加到等体积淋巴细胞分离液的液面上,以 2000 r/min 离心 20 min (离心半径 15 cm)。离心结束后,小心吸取第二层淋巴细胞层,并加等体积 D-hanks 液,以 2000 r/min 离心 10 min,倒掉上清液,同样方法再重复洗涤一次。总 RNA 的提取按照 Trizol 试剂盒说明书进行。总 RNA 的纯化按照 QIAGEN RNeasy Kit 试剂盒说明书进行。

基金项目: 山西省实验动物专项基金(2010k05)资助

第一作者: 秦秀军,男,1979 年 9 月出生,2006 年于山西医科大学获硕士学位,助理研究员,研究方向: 辐射生物效应,

E-mail: qxj19982000@163.com

收稿日期: 初稿 2013-01-15, 修回 2013-03-06

1.5 探针标记与杂交

通过一步法合成 cDNA 第一链和第二链, Cy3-CTP 标记 cRNA 合成、纯化, 在 260 nm 和 280 nm 测定吸光度值来确定样品的浓度和纯度。60℃温浴 30 min 进行片段化, 冰浴 1 min 加入杂交缓冲液, 混匀。上芯片, 65℃ 17 h, 10 r/min 滚动杂交。洗涤后进行扫描。

1.6 芯片扫描和数据分析

Agilent 扫描仪中扫描, 分辨率为 5 μm , 扫描仪自动以 100%和 10% PMT 各扫描一次, 用 Agilent 软件将两次结果合并。用 Feature Extraction 进行处

理分析。最后应用 GENESPRING12.0 进行 Quantile normalization。差异基因筛选标准为: 差异倍数大于或等于 3 且 $p \leq 0.05$ 。

1.7 RT-PCR 验证

为了验证芯片结果, 我们以 ACTB 为内参基因, 选择表达下调基因 Trmt61a 和表达上调基因 Enc1 进行验证, 引物设计及扩增条件见表 1。实验重复 3 次, 结果取 3 次的平均值。采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法, 计算 2 条基因表达量的比值, 其值大于 1 表示相对于对照样本, 该基因表达上调; 反之则表达下调。

表 1 引物序列及 PCR 扩增条件
Table 1 Primer sequences and the amplification conditions for real-time PCR

基因名称 Gene name	引物序列 Sequences of the primers	PCR 扩增条件 PCR amplification conditions
Trmt61a	F: 5' TGTCTTCTGAGAGGGAACC 3' R: 5' CCCAGGAAAGCTGTGGA 3'	95℃ for 15 min, 95℃ for 10s, 60℃ for 30 s, 72℃ for 20 s, 40 cycles
Enc1	F: 5' GGACTGTTACGATCCGAC 3' R: 5' TCCTTGGTTTGCTCTGCATTA 3'	95℃ for 15 min, 95℃ for 10s, 60℃ for 30 s, 72℃ for 20 s, 40 cycles
ACTB	F: 5' GCGTCCACCCGCGAGTACAA 3' R: 5' ACATGCCGAGCCGTTGTCG 3'	95℃ for 15 min, 95℃ for 10 s, 60℃ for 30 s, 72℃ for 20 s, 40 cycles

2 结果

本研究采用的是安捷伦基于 G3 平台最新设计的大鼠表达谱芯片, 涵盖 30003 条基因、核酸及蛋白数据。通过体内、外实验, 研究了 2.0 Gy γ 射线照射后, 大鼠淋巴细胞基因表达谱的变化。

2.1 体外实验

淋巴细胞体外照射后 24 h 与对照组的差异表达基因有 6925 条, 其中上调表达基因有 2814 条, 下调表达基因有 4111 条。结合基因功能注释 (Gene ontology, GO) 数据库, 对差异基因进行功能分类, 包括生物过程、细胞组分、分子功能, 各有 457、81、169 个功能簇。

KEGG pathway 结果显示, 差异表达的基因涉及到 41 条信号转导通路。

2.2 体内实验

淋巴细胞在体内照射后 24 h 与对照组的差异表达基因有 3938 条, 其中上调表达基因有 2278 条, 下调表达基因有 1660 条。

结合 GO 数据库, 对差异基因进行功能分类, 涉及到生物过程、细胞组分、分子功能各有 291、83、123 个功能簇。

KEGG pathway 结果显示, 差异表达的基因涉及到 38 条信号转导通路。

2.3 体内、外实验的共同差异表达基因

体外照射和体内照射的淋巴细胞涉及到的共同差异表达基因共有 1322 条 (见图 1)。其中共同下调表达有 497 条, 共同上调表达有 633 条, 192 条表达不一致。

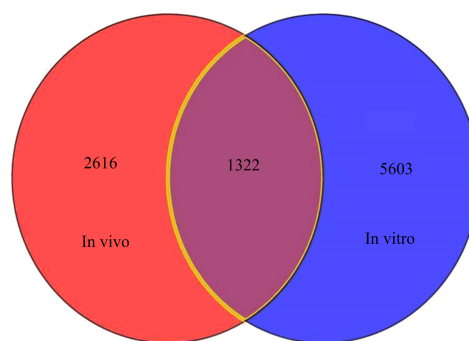


图 1 体内、外实验差异表达基因交集图
Fig.1 The intersection diagram of differentially expressed genes in vivo and in vitro

结合 GO 数据库, 差异基因中, 共同涉及到的生物过程、细胞组分、分子功能分别有 53、19、28 个功能簇。结合 KEGG 数据库, 共同包含的 Pathway 有 12 条通路, 具体见表 2。

表 2 体内、外实验共同涉及的 KEGG 通路分析
Table 2 KEGG analysis of pathway involved in both *in vitro* and *in vivo*

Pathways	ID	Pathways	ID	Pathways	ID	Pathways	ID
Purine metabolism	Pkm2	Chemokine signaling pathway	Ccl2	Adherens junction	Smad2	Amoebiasis	Casp3
	Pde3b		Jak3		Mapk1		Col2a1
	Pde2a		Ptk2		Ptpn6		Ptk2
	Polr1b		Ptk2b		Lef1		Fn1
	Pde6h		Cxcl5		Ctnna1		Serpibn2
	Pde5a		Lyn	Leukocyte transendothelial migration	Ptk2		Cd14
	RGD1309906		Mapk1		Ptk2b		Serpibn10
	Prim2		Gng8		Rassf5		Serpibn6a
	Nt5c3		Ppbp		Vav2		Col11a2
	Polr1e		Ccl12		Rhoh	Staphylococcus aureus infection	Selp
	Ak7		Ccr7		Ctnna1		Cfd
	Gucy1a3		Ccl24		Itk		Masp2
	LOC681193		Foxo3		Jam2		Fcgr2b
Focal adhesion	Col2a1	Hematopoietic cell lineage	Vav2	Tuberculosis	Camk2d		Cfb
	Ptk2		Ccr6		Lamp2	Rheumatoid arthritis	RT1-Da
	Fn1		Itk		Casp3		Cxcl5
	Capn2		LOC685513		Fcer1g		Angpt1
	Col5a3		Cxcr6		Cd74		Il23a
	Flt4		Epor		Cd14		Ccl12
	Zyx		Cd9		Mapk1		RT1-Da
	Mapk1		Cd3d		Il23a		Ltb
	Mylk		Cd37		Coro1a		Atp6v1a
	Vav2		Cd5		Fcgr2b		
Primary immunodeficiency	Pip5k1b		Cd14		RT1-Da		
	Tap2	Leishmaniasis	Cd55		RGD1564571		
	Jak3		Il3ra		Tlr6		
	Cd3d		RT1-Da		Rfx5		
	Cd40		Cd3g		Mapk1		
	Rfx5		Ms4a1		Ptpn6		
	Cd19		Cd19		RT1-Da		
	Cd79a		Gp1ba				

2.4 RT-PCR 对差异表达基因的验证结果

两个验证基因 *Trmt61a* 和 *Enc1* 的扩增曲线平滑, 每条曲线均有明显的指数扩增期 (见图 2、3), 说明该 PCR 检测具有较好的敏感性。两个基因的溶

解曲线均为单一峰 (见图 2、3), 未出现其他异常波形, 说明扩增产物单一, PCR 扩增的特异性较好。

应用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法相对定量分析, 结果表明各基因表达变化水平的趋势与芯片结果一致, 芯片数据可靠。扩增的相对定量结果见表 3。

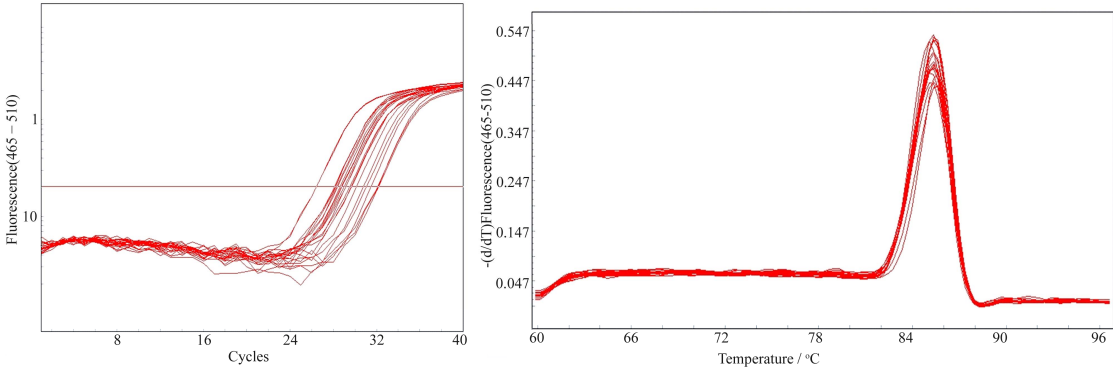


图 2 *Trmt61a* 基因的扩增曲线和溶解曲线
Fig.2 Amplification curves and melting curves of *Trmt61a* gene

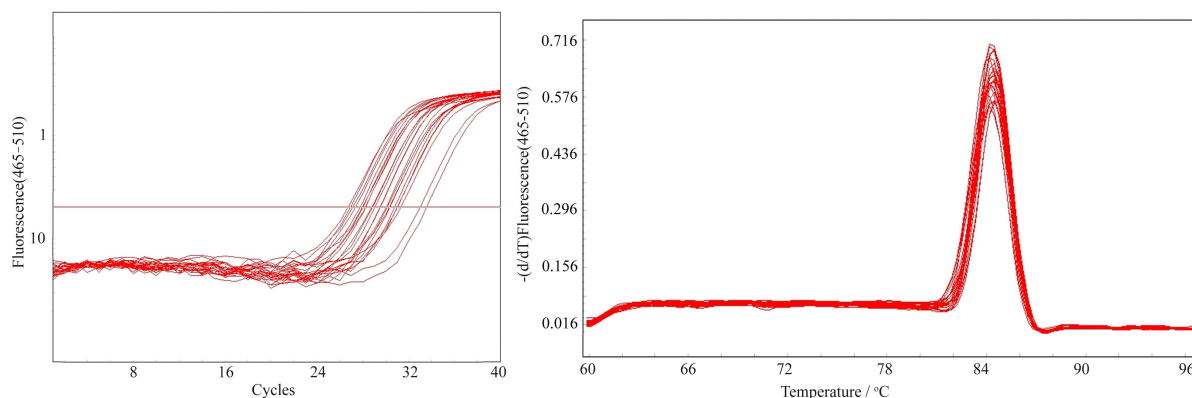


图3 Enc1 基因的扩增曲线和溶解曲线
Fig.3 Amplification curves and melting curves of Enc1 gene

表3 RT-PCR 扩增的相对定量结果
Table 3 Relative quantitative results of the real-time PCR amplification

扩增的基因名称 Amplified gene name	组别 Group	C_t 值 C_t values	ACTB C_t 值 C_t values of ACTB	比值 Ratio
Trmt61a	Control group in vitro	28.12	21.65	1.00
	Experimental group in vitro	31.99	25.03	0.71
	Control group in vivo	26.56	17.91	1.00
	Experimental group in vivo	29.79	17.37	0.07
Enc1	Control group in vitro	33.03	21.65	1.00
	Experimental group in vitro	31.42	25.03	31.85
	Control group in vivo	30.63	17.91	1.00
	Experimental group in vivo	29.34	17.31	1.69

3 讨论

基因功能注释是使用有控制的词汇表和严格定义的概念关系,以有向无环图方式表示的跨越原核生物与真核生物各物种的基因功能分类体系。GO 分析将基因功能划分为生物过程、细胞组分和分子功能三个维度,纠正了传统功能分类体系中常见的维度混淆问题。

本研究发现:体外照射和体内照射动物淋巴细胞表达的差异基因涉及到的生物过程有 53 个,其中主要有细胞凋亡、抗凋亡调控、信号转导、DNA 复制、DNA 损伤反应、小 GTP 酶介导的信号转导、Fc 受体介导的信号转导通路调控、蛋白磷酸化等。细胞组分方面,分布多见于胞膜及膜性细胞器。涉及到的分子功能主要与结合有关,包括 DNA 结合、ATP 结合、GTP 结合、糖结合、蛋白激酶结合、组蛋白结合、金属离子结合等。此外还有氧化还原酶活性、水解酶活性、转移酶活性、GTP 酶活性、铜分子伴侣活性等。

细胞信号转导通路(Pathway)是多个蛋白间相互作用,共同调节细胞功能和代谢活动的过程。目

前,KEGG (Kyoto encyclopedia of genes and genomes)是常用的有关 Pathway 的主要公共数据库之一。其特点在于让研究者由基因组至细胞层次做一整合性连结,并对生命现象做一系列分析。

将本次实验结果结合 KEGG 数据库分析,体内、外实验共同包含的 pathway 有 12 条通路。分别为嘌呤代谢、粘着斑、原发性免疫缺陷、趋化因子信号转导通路、造血干细胞系、粘附连接、白细胞跨内皮迁移、结核病、利什曼病、阿米巴病、金黄色葡萄球菌感染、类风湿关节炎等通路。其中涉及共同差异表达基因最多的是趋化因子信号转导通路,有 18 条基因差异表达。

此外,在差异表达的基因中还有一些跟以往报道相同的基因,如 Serpinb2、Creb3l2、Pacrg、Vamp1、Il16 等。Fachin 等^[5]利用基因芯片技术研究人外周血淋巴细胞在 10、25、50 cGy γ 射线照射后基因表达的变化,结果发现在这 3 个不同剂量照射下共同差异表达的基因有 34 条,其中上调表达基因包括 Serpinb2,下调表达基因包括 Creb3l2。Fachin 等^[6]还对职业暴露的放射工作人员用基因芯片技术对其淋巴细胞的基因表达变化进行了监测。发现 78 条表达有差异的基因。其中包括 Pacrg 基因表达上

调, Vamp1、Il16 基因表达下调。

综上所述, 由于基因芯片技术具有快速、高效和高通量的特点, 故近年来在辐射分子生物学领域得到广泛关注和应用, 并取得了重要进展。然而辐射对生物体的作用是一系列复杂的连锁过程, 该技术也存有明显不足。由于基因表达的调控可发生在多种层次和多个水平上, 基因的功能具有多样性、复杂性的特点, mRNA 水平的变化有时不能完全反映实际情况, 还需要从蛋白水平、转录调控等多个角度进行验证^[7]。因此, 下一步我们将对该研究得到的结果进行更深入的研究, 以期辐射生物效应的研究提供依据。

参考文献

- 1 李建国, 闻建华, 左雅慧, 等. 0.2Gy γ 射线照射人外周血淋巴细胞不同时间点差异基因表达谱研究[J]. 辐射防护, 2010, **30**(4): 220-225
LI Jianguo, WEN Jianhua, ZUO Yahui, *et al.* Study of differential expression gene in human lymphocyte exposed to 0.2 Gy γ ray at different time points[J]. Radiat Prot, 2010, **30**(4): 220-225
- 2 李坤, 刘伟, 李洁清. 基因芯片技术在放射生物学领域的应用进展[J]. 中国辐射卫生, 2011, **20**(3): 381-383
LI Kun, LIU Wei, LI Jieqing. The application and progression of radiobiological study by gene chip technique[J]. Chin J Radiol Health, 2011, **20**(3): 381-383
- 3 李建国, 秦秀军, 张伟, 等. 人外周血淋巴细胞照射后 6 小时差异基因表达谱的变化[J]. 中国辐射卫生, 2011, **20**(1): 41-45
LI Jianguo, QIN Xiujun, ZHANG Wei, *et al.* Differential expression gene profiling in human lymphocyte after 6h irradiated[J]. Chin J Radiol Health, 2011, **20**(1): 41-45
- 4 李建国, 张伟, 许超琪, 等. 1.0 Gy ^{60}Co γ 射线诱导人淋巴细胞基因表达的改变[J]. 辐射防护通讯, 2010, **31**(3): 19-25
LI Jianguo, ZHANG Wei, XU Chaoqi, *et al.* Study of gene expression in human lymphocyte exposed to 1.0Gy ^{60}Co gamma ray[J]. Radiat Prot Bull, 2010, **31**(3): 19-25
- 5 Fachin A L, Mello S S, Sandrin-Garcia P, *et al.* Gene expression profiles in human lymphocytes irradiated in vitro with low doses of gamma rays[J]. Radiat Res, 2007, **168**(6): 650-665
- 6 Fachin A L, Mello S S, Sandrin-Garcia P, *et al.* Gene expression profiles in radiation workers occupationally exposed to ionizing radiation[J]. J Radiat Res, 2009, **50**(1): 61-71
- 7 满其航, 张超, 杜丽, 等. 基因芯片技术在辐射生物学领域的应用. 解放军医学杂志, 2009, **34** (11):1382-1384
MAN Qihang, ZHANG Chao, DU Li, *et al.* The application of gene chip technique in radiobiological study[J]. Med J Chin People's Liberation Army, 2009, **34** (11): 1382-1384

Effects of γ -rays irradiation on gene expression profiles of SD rat lymphocyte

QIN Xiujun ZHANG Wei LI Jianguo YIN Jingjing ZHOU Jinyuan WEN Jianhua

(China Institute for Radiation Protection, Taiyuan 030006, China)

ABSTRACT The gene expression changes of rat blood lymphocytes after 2.0 Gy γ -ray irradiation were studied. At 24 h after *in vitro* and *in vivo* irradiation with 2.0 Gy ^{60}Co γ -ray, RNA in blood lymphocyte was extracted and the changes in the gene expression profiles of lymphocytes were detected. The results showed that at 24 h after irradiation, the common genes being significantly expressed in *in vitro* and *in vivo* comprised 1,322 genes, including 497 down-regulated genes and 633 up-regulated genes. Further, 192 genes are inconsistent. Referring to the GO database, there are 53, 19, 28 functional clusters involved in biological processes, cellular components and molecular functions, respectively, and there are 12 pathways involved. In addition, some radiation-related genes such as Serpinb2, Creb3l2, Pacrg, Vamp1, Il16, and others were also found.

KEYWORDS Radiation, Lymphocyte, Gene chip, Gene expression profile, Rat

CLC TL99, R818.74