

低剂量 γ 射线辐照对人淋巴母细胞基因表达转录谱的影响

何颖 沈先荣 钱甜甜 王庆蓉 蒋定文 刘玉明 侯登勇 陈伟 李珂娴 刘琼
(海军医学研究所 上海 200433)

摘要 为探讨低剂量电离辐射生物效应作用机制, 本文研究了不同剂量单次辐照后, 人淋巴母细胞基因表达转录谱的变化。采用 0.1 Gy、0.5 Gy 和 1.0 Gy 剂量的 γ 射线照射人淋巴母细胞, 未照射细胞为对照组。照射后 4 h 提取细胞总 RNA, 用含有 45 033 个基因的人类全基因组表达谱芯片检测分析。对差异表达基因进行层次聚类分析、基因本体论分析和通路分析, 并用实时荧光定量 PCR 验证。结果表明, 3 个剂量组均上调表达的基因 1330 个, 下调表达的基因 1002 个。基因表达量与吸收剂量相关的基因共 18 个, 其中与剂量正相关的基因 16 个, 负相关的基因 2 个。层次聚类分析结果表明, 4 个实验组中, 0.1 Gy 和 1.0 Gy 照射组差异表达基因相似程度最高。这些差异表达的基因涉及到多条通路, 如细胞周期、p53 信号通路、碱基切除修复、RNA 转运和内质网蛋白加工等。实时荧光定量 PCR 检测结果表明, CASP9(caspase 9)mRNA 在照射后 4 h 随吸收剂量表达变化与基因芯片检测结果一致。基因芯片筛选出的差异表达基因有助于阐明低剂量辐射生物效应作用机理, 与辐射剂量相关的差异表达基因有可能成为低剂量辐射暴露的生物剂量计。

关键词 基因芯片, 低剂量电离辐射, 人淋巴母细胞, 基因本体论, 通路分析, 层次聚类分析

中图分类号 R811.5

低剂量电离辐射暴露的人群和几率远比大剂量照射事件或事故大, 如天然本底辐射、频繁的飞行活动、医学检查、不适当的居住环境、职业照射和空间活动等。低剂量电离辐射虽不足以引起临床可见的损伤, 但对低剂量暴露人群若不及时采取监测、危害评价和防护措施, 会对暴露人员带来远后效应的健康危害, 还可能造成人员严重的心理损害等。因此, 近年来低剂量电离辐射生物效应、作用机制及防护措施研究日益受到重视。研究表明, 低剂量电离辐射对生物机体的作用是通过调控基因的表达来实现的, 可以通过基因的表达变化来反映极低剂量的电离辐射^[1-3]。为了探讨低剂量电离辐射分子生物效应及其作用机制, 采用不同剂量 0.1、0.5 和 1.0 Gy γ 射线单次照射人淋巴母细胞, 选择照射后 4 h 时间点早期诱导表达基因进行分析研究。

1 实验材料和方法

1.1 细胞株和试剂

人淋巴母细胞 (AHH-1) 由第二军医大学防原

医学教研室惠赠; Trizol reagent 为 Invitrogen 公司产品; 全基因组表达谱芯片 Roche-NimbleGen (芯片型号 Human_HX12_expr) 由上海康成生物公司提供。

1.2 照射条件

复旦大学放射医学研究所, Gamma cell 40, ¹³⁷Cs(NORDION International Inc. CANADA), 剂量率为 0.162 Gy·min⁻¹, 剂量为 0、0.1、0.5 和 1.0 Gy。

1.3 细胞总 RNA 抽提

实验组经照射后和未照射对照组细胞置于 37℃、5% CO₂ 孵箱中继续培养 4 h, 随后每组样品取 1×10⁶ 细胞, 加 1 mL TRIzol, 裂解后提取总 RNA, Nanodrop ND-1000 检测样品 RNA 浓度和纯度, 进行变性琼脂糖凝胶电泳, 检测 RNA 纯度及完整性。

1.4 基因芯片检测分析

采用 NimbleGen One-Color DNA Labeling Kit 进行标记, 在 NimbleGen Hybridization System 中杂

基金项目: 全军计划科研项目 (AHJ09J012)、总后“十一五”科技攻关项目 (2009183006) 资助

第一作者: 何颖, 女, 1974 年 1 月出生, 2008 年于第二军医大学获博士学位, 从事辐射生物效应与医学防护研究, 副研究员

通讯作者: 沈先荣, Email: xianrong_sh@163.com

收稿日期: 初稿 2013-04-02, 修回 2013-05-16

交、洗片,用 Axon GenePix 4000B 芯片扫描仪扫描芯片,获得基因表达的荧光信号强度值。用 Nimble Scan 软件(2.5 V)对原始数据进行分析,Agilent Gene Spring 软件(11.0 V)进一步分析,每组样本重复 3 次芯片检测,通过基因表达的荧光信号强度比值分析得到差异表达基因。芯片上的单个基因设计了 3-5 个探针,以提高芯片检测的准确性。

1.4.1 聚类分析 采用层次聚类法对样本进行聚类分析,根据样本表达谱的相似性将样本划分成不同组别。

1.4.2 GO 分析 基因本体论(Gene ontology, GO)分析对差异表达基因的生物学功能进行注释,筛选出实验组和对照组之间具有显著差异的 GO 条目。GO 条目从生物学过程(Biological process)、分子功能(Molecular function)和亚细胞组分(Cellular component)3 个方面对基因的功能进行分类。

1.4.3 Pathway 分析 通路(Pathway)分析筛选出实验组和对照组之间具有显著差异的通路。通路主要来自 KEGG 数据库。

1.5 实时荧光定量 PCR 检测

1.5.1 cDNA 合成 用 Invitrogen 公司的 M-MLV 反转录酶对抽提的人淋巴母细胞的总 RNA 进行 cDNA 逆转录合成,逆转录总体积为 20 μ L,总 RNA 为 1 μ g,引物为 Oligo(dT)18,具体操作依据产品说明书。

1.5.2 引物设计 依据 NCBI 数据库中的 β -actin、CASP9(caspase 9)、BTG2(BTG family, member 2)、CCNG1(cyclin G1)和 E2F7(E2F transcription factor 7)基因序列,用 Primer 5 软件设计实时荧光定量 PCR 的相应引物, β -actin: forward Primer 5'tgtgttgccgtacaggtctttg 3', reverse primer 5'gggaaatcgtgcgtgacattaag 3'; CASP9: forward primer 5'cgaaactaacaggcaagca 3', reverse primer 5'tcaccaaatcctccagaac 3'; BTG2: forward primer 5'gaactgttgccgtgcttga 3', reverse primer 5'accttgctgtcctct 3'; CCNG1: forward primer 5'gccactgaaaggagaaatagc 3', reverse primer 5'aatgatagacaatgccaacacag 3'; E2F7: forward primer 5'ttctactcttggtgctctc 3', reverse primer 5'tgacatcactggacttagg 3'。由上海捷瑞生物工程有限公司(GENERay)合成。

1.5.3 实时荧光定量 PCR 采用 SYBR 实时荧光

定量 PCR 方法,用 BIO-RAD 公司的 Chromo4 实时荧光 PCR 检测仪,按照用户手册操作。PCR 试剂为: SYBR-Green Premix Ex Taq (TaKaRa)。PCR 程序为: 95 $^{\circ}$ C 3 min; 95 $^{\circ}$ C 10 s; 60 $^{\circ}$ C 30 s; 共 40 个循环。每个样品重复做 3 个平行样,在每次反应结束后进行熔解曲线分析,以排除非特异性 PCR 产物的影响。每次反应均以 β -actin 为对照。

1.5.4 定量分析 采用相对定量法,以看家基因 β -actin 为内参,照射组样品的靶基因定量为对照组样品的 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 倍, $\Delta\Delta CT$ =照射组样品 ΔCT - 对照组样品 ΔCT ,变化倍数 2 倍以上认为有显著差异。

2 结果

2.1 与吸收剂量相关的差异表达基因

采用的 Human_HX12_expr 全基因组表达谱芯片含有 45033 个基因,适合高通量差异表达基因筛选。检测基因表达的荧光信号强度值,以差异两倍以上基因确定为差异表达基因。结果显示,0.1 Gy 组与对照组比较得到差异表达 2 倍以上的基因共 12549 个,其中上调表达基因 7410 个,下调表达基因 5139 个;0.5 Gy 组与对照组比较得到差异表达 2 倍以上的基因共 13227 个,其中上调表达基因 7635 个,下调表达基因 5592 个;1.0 Gy 组与对照组比较得到差异表达 2 倍以上的基因共 12921 个,其中上调表达基因 7559 个,下调表达基因 5364 个。3 个剂量组均上调表达的基因 1330 个,下调表达的基因 1002 个。基因表达量与剂量相关的基因共 18 个,其中,与剂量正相关的基因 16 个,负相关的基因 2 个(见表 1)。

2.2 聚类分析结果

层次聚类法对 4 个组别的样本进行聚类分析,结果表明,组间基因表达谱相似程度最高的是 0.1Gy 组和 1.0 Gy 组,其次是 0.5 Gy 组,最后是对照组(见图 1)。

2.3 差异表达基因相关的生物学过程

与对照组比较,3 个剂量组差异表达基因按照富集倍数(Fold enrichment)值大小排序,富集倍数越大,相关性越大。列出相关性较大的前十位生物学过程,其相关性从至上至下降序排列,如表 2 所示。

表 1 辐射剂量相关基因
Table 1 Radiation dose-dependent genes

序列号 SEQ_ID	基因名称 Gene name	概述 Descriptions	归一化强度 Normalized intensity			
			0 Gy	0.1 Gy	0.5 Gy	1.0 Gy
BC038808	APOBEC3F	载脂蛋白 B mRNA 编辑酶, 催化多肽样 3F Apolipoprotein B mRNA editing enzyme, catalytic polypeptide-like 3F	131.31	425.89	605.84	795.66
NM_015684	ATP5S	ATP 合酶, H ⁺ 运输, 线粒体 F0 复合体亚单位 (B 因子) ATP synthase, H ⁺ transporting, mitochondrial F0 complex, subunit s (factor B)	52.53	142.74	181.57	287.71
BC084541	ATP6AP2	ATP 酶, H ⁺ 运输, 溶酶体附属蛋白 2 ATPase, H ⁺ transporting, lysosomal accessory protein 2	93.92	293.54	394.05	657.62
BC030579	B3GNT2	尿苷二磷酸-N-乙酰葡萄糖胺: β 半乳糖 β -1, 3-N-乙酰葡萄糖氨基转移酶 2 UDP-GlcNAc:betaGal beta-1, 3-N-acetylglucosaminyltransferase 2	111.94	353.13	465.13	573.59
NM_006763	BTG2	B 细胞转位基因家族成员 2 BTG family, member 2	133.78	1104.87	1506.34	1951.78
NM_017917	C14orf10	染色体 14 开放阅读框 10 Chromosome 14 open reading frame 10	136.51	344.46	484.21	592.48
NM_001229	CASP9	天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶 9, 凋亡相关半胱氨酸肽酶 Caspase 9, apoptosis-related cysteine peptidase	332.09	798.84	1113.36	1345.73
NM_004060	CCNG1	细胞周期蛋白 G1 Cyclin G1	122.62	632.47	851.06	1168.01
NM_203394	E2F7	E2F 转录因子 7 E2F transcription factor 7	145.86	706.17	908.44	1285.96
NM_001035005	LOC497661	假定的 NF κ B 活化蛋白 putative NF κ B activating protein	164.51	387.86	558.45	883.32
BC014573	MDS025	假定的蛋白 MDS025 Hypothetical protein MDS025	134.53	625.43	781.34	1067.85
NM_018657	MYNN	肌神经蛋白 Myoneurin	71.93	199.12	316.58	385.68
BC013705	PANK3	泛酸激酶 3 Pantothenate kinase 3	50.44	152.87	205.88	270.69
NM_001198	PRDM1	PR 域包含 1, 含 ZNF 域 PR domain containing 1, with ZNF domain	79.86	379.85	492.46	810.21
NM_004654	USP9Y	泛素特异肽酶 9, Y 染色体连锁 Ubiquitin specific peptidase 9, Y-linked	63.74	237.73	286.35	396.82
NM_153231	ZNF550	锌指蛋白 550 Zinc finger protein 550	52.26	149.11	173.99	237.31
NM_001218	CA12	碳酸酐酶 XII Carbonic anhydrase XII	885.21	406.90	185.19	71.37
NM_002769	PRSS1	蛋白酶, 丝氨酸, 1 (胰蛋白酶 1) Protease, serine, 1 (trypsin 1)	1394.84	636.34	420.90	76.76

与 3 个剂量组均相关的生物学过程有: SCF 依赖蛋白酶体泛素依赖的蛋白分解代谢过程, rRNA 转录, snRNA 代谢过程, snRNA 加工过程等。0.1 Gy 组和 0.5 Gy 组均与糖酵解调节有关; 0.1 Gy 组和 1.0 Gy 组均与中胚层细胞分化、中胚层细胞命运定型有关。0.1 Gy 组与死亡受体介导的凋亡和 vitamin D 反应相关; 0.5 Gy 组与 DNA 损伤反应/p53 介导的凋亡、假尿苷合成、丝氨酸家族氨基酸合成、淋巴细胞共刺激和 T 细胞共刺激相关; 1.0 Gy 组则与复制后修复、蛋白去稳定作用、流体剪切应激反应和组蛋白赖氨酸去甲基化有关。

2.4 差异表达基因相关的细胞组份

与对照组比较, 3 个剂量组差异表达基因按照富集倍数大小降序排列, 列出相关性较高的前十位细胞组份, 如表 3 所示。与 3 个剂量组均相关的亚细胞组份有: 前核糖体, PcG 蛋白复合体, Integrator 复合体, IkappaB 激酶复合体, SCF 泛素连接酶复合体, 纤维胶原等。0.1 Gy 和 0.5 Gy 组均与 SWI/SNF 复合体, 0.1 Gy 和 1.0 Gy 组均与 WASH 复合体、浓缩的核内染色体的着丝粒有关。0.1 Gy 组还与高尔基管腔有关, 0.5 Gy 组与前核、

CUL RING 泛素激酶复合体有关, 1.0 Gy 组与核内膜、中间体有关。

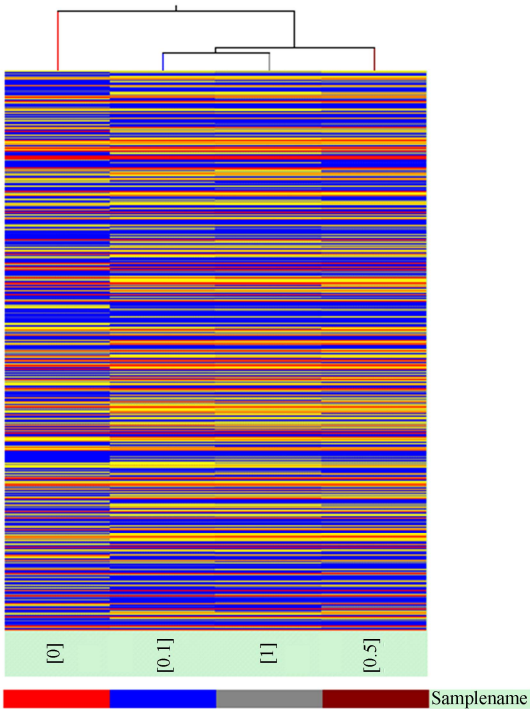


图 1 4 种不同条件的层次聚类结果[0]0 Gy, [0.1]0.1 Gy, [0.5]0.5 Gy, [1.0]1.0 Gy
Fig.1 The results of hierarchical clustering under four different conditions

表 2 差异表达基因的生物学过程
Table 2 Biological process of different expression genes

No. 序号	生物学过程 Biological process		
	0.1 Gy	0.5 Gy	1.0 Gy
1	中胚层细胞分化	代谢过程	snRNA 代谢过程
	Mesodermal cell differentiation	snRNA metabolic process snRNA	snRNA metabolic process
2	中胚层细胞命运定型	snRNA 加工	snRNA 加工
	Mesodermal cell fate commitment	snRNA processing	snRNA processing
3	SCF-依赖蛋白酶体泛素依赖蛋白分解代谢过程	rRNA 转录	SCF-依赖蛋白酶体泛素依赖蛋白分解代谢过程
	SCF-dependent proteasomal ubiquitin-dependent protein catabolic process	rRNA transcription	SCF-dependent proteasomal ubiquitin-dependent protein catabolic process
4	rRNA 转录	DNA 损伤反应, p53 介导的信号转导诱导凋亡	复制后修复
	rRNA transcription	DNA damage response, signal transduction by p53 class mediator resulting in induction of apoptosis	Postreplication repair
5	初级胚层形成有关的细胞命运定型	假尿苷合成	中胚层细胞分化
	Cell fate commitment involved in the formation of primary germ layers	Pseudouridine synthesis	Mesodermal cell differentiation

(续表)

No. 序号	生物学过程 Biological process		
	0.1 Gy	0.5 Gy	1.0 Gy
6	死亡受体介导的凋亡诱导 Induction of apoptosis via death domain receptors	糖酵解调节 Regulation of glycolysis	rRNA 转录 rRNA transcription
7	维生素 D 响应 Response to vitamin D	丝氨酸家族氨基酸生物合成过程 Serine family amino acid biosynthetic process	中胚层细胞命运定型 Mesodermal cell fate commitment
8	糖酵解调节 Regulation of glycolysis	SCF-依赖蛋白酶体泛素依赖蛋白分解代谢过程 SCF-dependent proteasomal ubiquitin-dependent protein catabolic process	蛋白去稳定作用 Protein destabilization
9	snRNA 代谢过程 snRNA metabolic process	淋巴细胞共刺激 Lymphocyte costimulation	流体剪切应激反应 Response to fluid shear stress
10	snRNA 加工 snRNA processing	T 细胞共刺激 T cell costimulation	组蛋白赖氨酸去甲基化 Histone lysine demethylation

表 3 差异表达基因的细胞组份

Table 3 Cellular components of different expression genes

序号 No.	细胞组份 Cellular components		
	0.1 Gy	0.5 Gy	1.0 Gy
1	前核糖体 Preribosome	集成复合体 Integrator complex	集成复合体 Integrator complex
2	PcG 蛋白复合体 PcG protein complex	前核 Pronucleus	前核糖体 Preribosome
3	集成复合体 Integrator complex	IkappaB 激酶复合体 IkappaB kinase complex	泛素连接酶复合体 SCF ubiquitin ligase complex SCF
4	WASH 复合体 WASH complex	前核糖体 Preribosome	纤维胶原 Fibrillar collagen
5	IkappaB 激酶复合体 IkappaB kinase complex	SWI/SNF 型复合体 SWI/SNF-type complex	IkappaB 激酶复合体 IkappaB kinase complex
6	SCF 泛素连接酶复合体 SCF ubiquitin ligase complex	SCF 泛素连接酶复合体 SCF ubiquitin ligase complex	PcG 蛋白复合体 PcG protein complex
7	浓缩的核内染色体, 着丝粒区域 Condensed nuclear chromosome, centrometric region	PcG 蛋白复合体 PcG protein complex	WASH 复合体 WASH complex
8	SWI/SNF 复合体 SWI/SNF complex	CUL RING 泛素激酶复合体 CUL RING ubiquitin ligase complex	核内膜 Nuclear Inner membrane
9	高尔基管腔 Golgi lumen	SWI/SNF 复合体 SWI/SNF complex	中间体 Midbody
10	纤维胶原 fibrillar collagen	纤维胶原 Fibrillar collagen	浓缩的核内染色体, 着丝粒区域 Condensed nuclear chromosome, centrometric region

2.5 差异表达基因相关的分子功能

与对照组比较, 3 个剂量组差异表达基因按照富集倍数大小降序排列, 列出相关性较高的前十位分子功能, 如表 4 所示。软件分析发现, 0.1 Gy 组、0.5 Gy 组和 1.0 Gy 组差异表达基因与下列分子功能均相关: 氨基己糖苷酶活性、LRR 结合; 0.1 Gy 组和 1.0 Gy 组均与血小板来源的生长因子结合和组蛋白脱甲基酶活性相关; 0.1 Gy 和 0.5 Gy 组均与信号序列结合和核苷酸激酶活性有关; 0.5 Gy 组和 1.0 Gy 组均与组蛋白甲基转移酶活性和乙酰转移酶活性相关。0.1 Gy 组还与肌醇/磷脂酰肌醇磷酸酶活性、鸟苷酸激酶活性、tRNA 甲基转移酶活性和胰岛素受体底物结合有关, 0.5 Gy 组与假尿苷合成酶活性、p53 结合、Vitamin D 受体结合和 RNA 聚合酶 III 转录因子活性有关, 1.0 Gy 组与 DNA N-转葡

糖基酶活性、钠-钾交换 ATP 酶活性和雌二醇 17-β 脱氢酶活性有关。

2.6 差异表达基因相关的通路

与对照组比较, 3 个剂量组差异表达基因按照富集得分 (Enrichment score) 值大小降序排列, 富集得分=-log10(P 值), 富集得分越高, 相关程度越大, 列出相关性较高的前十位通路, 如表 5 所示。与 3 个剂量组均相关的通路有: 细胞周期、p53 信号通路、内质网内的蛋白加工、碱基切除修复、RNA 转运、剪接体、非小细胞细胞肺癌。0.1 Gy 组和 0.5 Gy 组均与磷脂酰肌醇信号系统有关; 0.1 Gy 组和 1.0 Gy 组均与 MAPK 信号通路有关; 0.1 Gy 组还与系统性红斑狼疮有关, 0.5 Gy 组与胰岛素信号通路、神经胶质瘤有关, 1.0 Gy 组与 Fc γ 受体介导的吞噬作用、泛素介导的蛋白水解有关。

表 4 差异表达基因的分子功能
Table 4 Molecular function of different expression genes

No. 序号	分子功能 Molecular function	0.1 Gy	0.5 Gy	1.0 Gy
1	氨基己糖苷酶活性 Hexosaminidase activity	氨基己糖苷酶活性 Hexosaminidase activity	氨基己糖苷酶活性 Hexosaminidase activity	氨基己糖苷酶活性 hexosaminidase activity
2	LRR 结合 LRR domain binding	LRR 结合 LRR domain binding	LRR 结合 LRR domain binding	DNA N-转葡萄糖基酶活性 DNA N-glycosylase activity
3	核苷酸激酶活性 Nucleoside kinase activity	核苷酸激酶活性 Nucleoside kinase activity	假尿苷合成酶活性 Pseudouridine synthase activity	LRR 结合 LRR domain binding
4	血小板来源的生长因子结合 Platelet-derived growth factor binding	血小板来源的生长因子结合 Platelet-derived growth factor binding	p53 结合 p53 binding	组蛋白脱甲基酶活性 histone acetyltransferase binding
5	信号序列结合 Signal sequence binding	信号序列结合 Signal sequence binding	维生素 D 受体结合 Vitamin D receptor binding	血小板来源的生长因子结合 Platelet-derived growth factor binding
6	组蛋白脱甲基酶活性 Histone demethylase activity	组蛋白脱甲基酶活性 Histone demethylase activity	组蛋白甲基转移酶活性 (H3-K4 特异) Histone methyltransferase activity (H3-K4 specific)	乙酰转移酶活性 Adenylyltransferase activity
7	肌醇/磷脂酰肌醇磷酸酶活性 Inositol or phosphatidylinositol phosphatase activity	肌醇/磷脂酰肌醇磷酸酶活性 Inositol or phosphatidylinositol phosphatase activity	核苷酸激酶活性 Nucleoside kinase activity	钠-钾交换 ATP 酶活性 Sodium:potassium-exchanging ATPase activity
8	tRNA 甲基转移酶活性 tRNA methyltransferase activity	tRNA 甲基转移酶活性 tRNA methyltransferase activity	RNA 聚合酶 III 转录因子活性 RNA polymerase III transcription factor activity	组蛋白甲基转移酶活性 (H3-K4 特异) Histone methyltransferase activity (H3-K4 specific)
9	胰岛素受体底物结合 Insulin receptor substrate binding	胰岛素受体底物结合 Insulin receptor substrate binding	乙酰转移酶活性 Adenylyltransferase activity	组蛋白脱甲基酶活性 Histone demethylase activity
10	鸟苷酸激酶活性 Guanylate kinase activity	鸟苷酸激酶活性 Guanylate kinase activity	信号序列结合 Signal sequence binding	雌二醇 17-β 脱氢酶活性 Estradiol 17-beta-dehydrogenase activity

表 5 差异表达基因的通路
Table 5 Pathways of different expression genes

No. 序号	通路 Pathways		
	0.1 Gy	0.5 Gy	1.0 Gy
1	细胞周期 Cell cycle	细胞周期 Cell cycle	p53 信号通路 p53 signaling pathway
2	p53 信号通路 p53 signaling pathway	胰岛素信号通路 Insulin signaling pathway	细胞周期 Cell cycle
3	内质网内的蛋白加工 Protein processing in endoplasmic reticulum	神经胶质瘤 Glioma	碱基切除修复 Base excision repair
4	碱基切除修复 Base excision repair	RNA 转运 RNA transport	内质网内的蛋白加工 Protein processing in endoplasmic reticulum
5	系统性红斑狼疮 Systemic lupus erythematosus	非小细胞细胞肺癌 Non-small cell lung cancer	剪接体 Spliceosome
6	RNA 转运 RNA transport	内质网内的蛋白加工 Protein processing in endoplasmic reticulum	Fc γ 受体介导的吞噬作用 Fc gamma R-mediated phagocytosis
7	剪接体 Spliceosome	p53 信号通路 p53 signaling pathway	RNA 转运 RNA transport
8	非小细胞细胞肺癌 Non-small cell lung cancer	磷脂酰肌醇信号系统 Phosphatidylinositol signaling system	非小细胞细胞肺癌 Non-small cell lung cancer
9	磷脂酰肌醇信号系统 Phosphatidylinositol signaling system	碱基切除修复 Base excision repair	泛素介导的蛋白水解 Ubiquitin mediated proteolysis
10	MAPK 信号通路 MAPK signaling pathway	剪接体 Spliceosome	MAPK 信号通路 MAPK signaling pathway

2.7 实时荧光定量 PCR 检测

^{137}Cs γ 射线不同剂量 (0、0.1、0.5 和 1 Gy) 照射后 4 h, 淋巴瘤细胞 BTG2、CASP9、CCNG1、E2F7 的 mRNA 表达水平的变化见图 2。

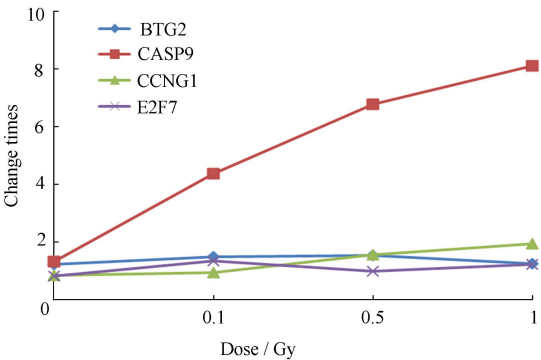


图 2 不同低剂量 γ 射线照射后目的基因 mRNA 表达变化
Fig.2 mRNA expressions of target genes after different low-dose γ -rays irradiation

由图 2 可知, 与对照组比较, 各剂量组 BTG2、CCNG1 和 E2F7 的 mRNA 表达变化不显著; CASP9 mRNA 的表达随剂量变化而显著递增, 吸收剂量为 0.1 Gy 时, 变化倍数为 4.35 倍; 0.5 Gy 时, 变化倍数为 6.77 倍; 1.0 Gy 时, 变化倍数为 8.11 倍。

3 讨论

基因芯片技术使高通量检测基因表达成为可能, 成为研究生物学机制的有力工具。Fachin 等^[4]采用基因芯片技术检测暴露于低剂量电离辐射职业人群淋巴瘤细胞的基因表达谱, 认为鉴定获得的一些差异表达基因可以用作慢性低剂量电离辐射暴露人群健康评价的生物标志物。实验中, 用含有 45 033 个基因的人类全基因组表达谱芯片检测分析不同剂量 0.1、0.5 和 1.0 Gy γ 射线单次照射后 4 h, 人淋巴瘤细胞的早期诱导差异表达基因, 发现与辐射剂

量正相关的基因 16 个,负相关的 2 个;进一步采用实时荧光定量 PCR 法对 4 个与细胞凋亡和细胞周期相关的基因 CASP9、BTG2、CCNG1 和 E2F7 的 mRNA 表达水平验证分析,发现 CASP9 mRNA 表达随剂量变化而显著递增,与辐射剂量呈明显正相关。

采用基因芯片检测辐射后细胞基因转录谱,不但可以筛选获得电离辐射生物标志物^[5,6],还可以用于电离辐射生物效应分子机制的分析。通过高通量地检测分析数千甚至上万个基因的表达变化,阐明电离辐射诱导生物效应的作用机理。电离辐射诱导了一系列复杂的生物反应,低剂量电离辐射生物效应更是有着多样性和复杂性的特征。研究表明,低剂量电离辐射生物效应根据辐射剂量的不同,呈现出适应性反应、旁效应和超敏感反应。适应性反应的辐射诱导剂量一般在 1–5 cGy,超敏感反应的剂量大小通常在 0.2–0.5 Gy 内^[7–9]。本实验中基因芯片检测结果发现,与未照射组比较,0.5 Gy 组差异表达基因较 0.1 Gy 组和 1.0 Gy 组多,对基因芯片结果进行层次聚类分析,发现各组间基因表达谱相似程度最高的是 0.1 Gy 组和 1.0 Gy 组,其次是 0.5 Gy 组,最后是 0 Gy 对照组。推测该现象与细胞在受到 0.5 Gy γ 射线单次照射后发生超敏感反应有关。

对各剂量组基因芯片检测结果进行 GO 和 Pathway 分析,GO 分析包括生物学过程、细胞组份和分子功能分析。生物学过程分析结果提示,小于 1.0 Gy 的低剂量 γ 单次电离辐射已经影响到了细胞的蛋白、核酸代谢,影响了蛋白的修饰和稳定;而不同剂量组生物学过程的差异再次证明了低剂量电离辐射生物效应的多样性。例如小于 0.5 Gy 时会影响糖酵解,0.5 Gy 照射时对免疫细胞产生明显的刺激作用,0.1 Gy 和 0.5 Gy 时诱导凋亡的分子机制不尽相同。电离辐射诱导细胞凋亡的分子机制已有较多报道^[10,11]。电离辐射时,ATM 和 DNA-PK 被激活,ATM 使 p53 磷酸化,破坏了 p53 与 Mdm-2 的相互作用,取消了 Mdm-2 对 p53 的抑制作用,诱导细胞凋亡,DNA-PK 也可使 p53 磷酸化,诱发细胞凋亡。P53 激活可通过线粒体和死亡受体两种途径导致细胞凋亡。Ahmadianpour 等^[12]报道了 1.5, 3.0 和 7.5 Gy γ 射线照射诱导 p53 非依赖途径的细胞凋亡。本次实验发现,0.1 Gy 诱导的是死亡受体

介导的细胞凋亡,相关的差异表达基因有 DAXX、DEDD2、NGFRAP1、DIABLO、BID、CASP3、CRADD、FADD、TNFRSF10B、TNFRSF10A、DEDD 和 CASP8AP2;0.5 Gy 诱导的则是 p53 介导的细胞凋亡,相关的差异表达基因有 HIPK1、PHLDA3、C16ORF5、IFI16、RPS27L、PML、PPP2R5C、USP28、BCL3、ISG20L1、TP53、DYRK2 和 TP73L。CASP9 是天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白水解酶 (Cysteiny aspartate specific protease, Caspase) 家族成员之一,是凋亡始动子,能在受体介导或线粒体介导的两种凋亡通路中发生活化并激活下游效应子,从而引发一系列凋亡相关事件。基因芯片检测和实时荧光定量 PCR 验证均表明,CASP9 是低剂量单次电离辐射早期诱导表达基因,随着辐射剂量增加,其表达水平也显著递增。结果提示,CASP9 在单次低剂量电离辐射诱导细胞凋亡中发挥了重要作用。分子功能分析结果提示,0.1 Gy 照射时已经影响了细胞的 DNA 损伤修复,0.5 Gy 时受照细胞的 DNA 损伤修复相关基因表达变化更多,可能与该剂量范围出现超敏感反应密切相关。Pathway 分析结果提示,低剂量 γ 单次照射诱导了参与细胞周期、细胞凋亡、碱基切除修复、RNA 转运、蛋白加工和剪接的基因表达变化,发现低剂量 γ 辐射生物效应与磷脂酰肌醇信号通路和 MAPK 信号通路密切相关。Dent 等^[13]综述了多条 MAPK 途径在细胞辐射应答中的作用,认为 MAPK 通路在受照细胞中发挥了重要作用。但是,MAPK 途径不是细胞对辐射应答的唯一途径,至少 PI3K 途径也同样重要。研究表明 PI3K 与 MAPK、PKA 和 PKC 等信号通路相互联系和影响,构成极其庞杂的 CROSS TALK,共同调节细胞的辐射应答^[14–18]。实验结果表明,0.1 Gy 照射时细胞差异表达基因与磷脂酰肌醇信号通路和 MAPK 信号通路均相关,0.5 Gy 和 1.0 Gy 时,受照细胞差异表达基因则分别与磷脂酰肌醇信号通路和 MAPK 信号通路相关。该结果再次证明低剂量电离辐射生物效应的多样性。

总之,本研究利用基因芯片技术和生物信息学技术,比较了 0.1 Gy、0.5 Gy 和 1.0 Gy 低剂量 γ 射线照射细胞的基因表达谱变化,揭示了 0.1 Gy 与 1.0 Gy 组基因表达变化的相似程度大于与 0.5 Gy 组的相似度,共有 18 个基因的表达变化与照射剂量正

或负相关, 深入研究有望作为低剂量电离辐射生物剂量计, CASP9 与照射剂量正相关, 是低剂量单次电离辐射早期诱导表达基因, 在单次低剂量电离辐射诱导细胞凋亡中发挥了重要作用。

参考文献

- 1 Gruel G, Voisin P, Vaurijoux A, *et al.* Broad modulation of gene expression in CD4+lymphocyte subpopulations in response to low doses of ionising radiation [J]. *Radiat Res*, 2008, **170**(3): 335–344
- 2 Amundson S A, Bittner M, Meltzer P, *et al.* Induction of gene expression as a monitor of exposure to ionising radiation [J]. *Radiat Res*, 2001, **156**(5 Pt 2): 657–661
- 3 Franco N, Lamartine J, Frouin V, *et al.* Low-dose exposure to gamma rays induces specific gene regulations in normal human keratinocytes [J]. *Radiat Res*, 2005, **163**(6): 623–635
- 4 Fachinl A L, Mellol S S, Sandrin-garcia1 P, *et al.* Gene expression profiles in radiation workers occupationally exposed to ionizing radiation [J]. *J Radiat Res*, 2009, **50**(1): 61–71
- 5 Chaudhry M A. Biomarkers for human radiation exposure [J]. *J Biomed Sci*, 2008, **15**(5): 557–563
- 6 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 Res*, 2004, **64**(18): 6368–6371
- 7 Zhou P K, Xiang X Q, Sun W Z, *et al.* Adaptive response to mutagenesis and its molecular basis in a human T-cell leukemia line primed with a low dose of γ -rays [J]. *Radiat Environ Biophys*, 1994, **33**(3): 211–217
- 8 Rigaud O, Moustacchi E. Radioadaptation for gene mutation and the possible molecular mechanisms of the adaptive response [J]. *Mutat Res*, 1996, **358**(2): 127–134
- 9 Joiner M C, Marples B, Lambin P, *et al.* Low-dose hypersensitivity: Current status and possible mechanisms [J]. *Int J Radiat Oncology Biol Phys*, 2001, **49**(2): 379–389
- 10 Tichý A, Z á skodov á D, Rez á cov á M, *et al.* γ -radiation-induced ATM-dependent signalling in human T-lymphocyte leukemic cells, MOLT-4 [J]. *Acta Biochim Pol*, 2007, **54**(2): 281–287
- 11 Woo R A, Jack M T, Xu Y, *et al.* DNA damage-induced apoptosis requires the DNA-dependent protein kinase, and is mediated by the latent population of p53 [J]. *EMBO J*, 2002, **21**(12): 3000–3008
- 12 Ahmadianpour M R, Abdolmaleki P, Mowla S J, *et al.* γ radiation alters cell cycle and induces apoptosis in p53 mutant E6.1 Jurkat cells [J]. *Appl Radiat Isot*, 2013, **71**(1): 29–33
- 13 Dent P, Yacoub A, Fisher P B, *et al.* MAPK pathways in radiation responses [J]. *Oncogene*, 2003, **22**(37): 5885–5896
- 14 Zhan M, Han Z C. Phosphatidylinositol 3-kinase/AKT in radiation responses [J]. *Histol Histopathol*, 2004, **19**(3): 915–923
- 15 Kumar P, Miller A I, Polverini P J, *et al.* p38 MAPK mediates γ -irradiation-induced endothelial cell apoptosis, and vascular endothelial growth factor protects endothelial cells through the phosphoinositide 3-kinase-Akt-Bcl-2 pathway [J]. *J Biol Chem*, 2004, **279**(41): 43352–43360
- 16 Dent P, Yacoub A, Contessa J, *et al.* Stress and radiation-induced activation of multiple intracellular signaling pathways [J]. *Radiat Res*, 2003, **159**(3): 283–300
- 17 Affolter A, Drigotas M, Fruth K, *et al.* Increased radioresistance via G12S K-Ras by compensatory upregulation of MAPK and PI3K pathways in epithelial cancer [J]. *Head Neck*, 2013, **35**(2): 220–228
- 18 Toulany M, Schickfluss T A, Eicheler W, *et al.* Impact of oncogenic K-RAS on YB-1 phosphorylation induced by ionizing radiation [J]. *Breast Cancer Res*, 2011, **13**(2): R28. Doi: 10.1186/bcr2845

Effects of low dose γ -ray on transcription profiles of human lymphoblastoid cells

HE Ying SHEN Xianrong QIAN Tiantian WANG Qingrong JIANG Dingwen
LIU Yuming HOU Dengyong CHEN Wei LI Kexian LIU Qiong

(Naval Medical Research Institute PLA, Shanghai 200433, China)

ABSTRACT To investigate the mechanism of biological effects induced by low dose radiation, the alterations of transcriptional profiles of human normal lymphoblastoid cell AHH-1 lines irradiated with different doses of γ -rays were assayed. AHH-1 lines were irradiated with γ -rays of 0.1, 0.5, and 1.0 Gy, respectively, with the unirradiated cells as control group. Total RNA of irradiated cells was extracted 4 h after irradiation, and then cDNA microarray was used to detect the transcriptional profiles of the cells. The different expressions of genes were assayed by hierarchical cluster analysis, gene ontology and pathway analysis, and then identified by real-time Q-PCR. The results of real-time Q-PCR of CASP9 were in accordance with microarray assays. The microarray assays showed that there were 1 330 up-regulated genes and 1 002 down-regulated genes in three irradiated groups. Alterations of 18 genes expression were related with absorbed dose. Among these genes, 16 genes were positive relation, and 2 genes were negative relation with dose. The results of hierarchical cluster analysis indicated that the similarity of the expression profiles of 0.1 Gy and 1.0 Gy was the highest among 4 groups. These altered genes could be related to multiple signal transductions, such as cell cycle, p53 signal pathway, base excision repair, RNA transport, endoplasmic reticulum proteins processing pathways, and so on. These differential expressed genes detected by cDNA microarray would help to elucidate the mechanisms of biological effects of low dose irradiation. New biological dosimeter for low dose exposure might be developed from these dose-related genes.

KEYWORDS cDNA microarray, Low dose irradiation, Human lymphoblastoid cells, Gene ontology, Pathway analysis, Hierarchical cluster analysis

CLC R811.5