

低剂量 γ -射线照射人淋巴母细胞 诱导 BTG2 基因 mRNA 变化

何颖 沈先荣 钱甜甜 王庆蓉 蒋定文 陈伟

(海军医学研究所 上海 200433)

摘要 为观察低剂量 γ -射线对人淋巴母细胞 AHH1 B 细胞转位基因 2(B cell translocation gene 2, BTG2)基因 mRNA 表达水平的影响,探讨 BTG2 基因作为低剂量范围辐射生物剂量计的可能性,采用 0–1.0 Gy γ -射线照射人淋巴母细胞,照射后不同时间点(0–72 h)提取细胞总 RNA,采用实时荧光定量 PCR 方法检测 BTG2 基因的表达变化,分析该基因的时间–剂量效应关系。结果表明,照射后 BTG2 基因转录水平表达在低剂量范围呈剂量依赖增加,照射后 24 h 达峰值,之后逐渐下降,在 48 h 和 72 h 时处于平台期,在 168 h 恢复至初始水平。BTG2 基因对低剂量电离辐射敏感,有较好的剂量效应和时间效应关系,具有开发为低剂量辐射生物剂量计的潜力。

关键词 低剂量电离辐射,人淋巴母细胞,BTG2,基因表达,实时荧光定量 PCR

中图分类号 R811.5, TL72

DOI: 10.11889/j.1000-3436.2015.rj.33.010202

关于低剂量电离辐射对公众或职业人群的健康影响一直存在激烈的争议^[1–5]。有证据表明低剂量的低能线密度辐射可激活持续的无错误的 DNA 损伤修复系统^[6–11],但是人们仍然高度关注低剂量电离辐射的致癌效应及危害评价,并开展了众多相关研究。生物标志物可用作低剂量电离辐射危害评价的重要指标。近年来,国内外相关实验室相继报道了一些低剂量辐射的生物标志物,如 CDKN1A、GADD45A 和 MDM2 基因等^[12–13]。此外,研究发现 γ -H2AX 的磷酸化表达与 DNA 双链断裂数量及吸收剂量之间存在较好的量效关系,是辐射诱发 DNA 双链断裂的最为敏感的生物标志物,也是最有潜力的电离辐射生物剂量计,但其表达水平随着时间的延长而迅速降低,限制了其临床应用^[14–15]。这些生物标志物具有开发为生物剂量计的潜力,为进一步精确诊断和评价低剂量电离辐射对机体的损伤效应提供手段。迄今为止,低剂量范围的电离辐射生物剂量计的研究尚处于探索阶段,因此,有必要寻找对低剂量电离辐射敏感的生物标志物并将其开发为新型的生物剂量计。本研究采用实时荧光定量 PCR

法,检测分析人淋巴母细胞 BTG2 基因在 0–0.1 Gy γ -射线照射后 mRNA 水平的剂量效应和时间效应关系,探讨其变化规律及其作为低剂量电离辐射生物剂量计的可能性。

1 材料与方法

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 和 M-MLV 反转录酶为 Invitrogen 公司产品;SYBR Premix Ex Taq 为 Takara 公司产品。

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, 吸收剂量分别为 0、0.1、0.2、0.5、0.8 和 1.0 Gy。

1.3 总 RNA 抽提及 cDNA 合成

实验组经照射后和未照射对照组细胞置于

基金资助: 全军计划科研项目(AHJ09J012)资助

第一作者: 何颖, 女, 1974 年 1 月出生, 2008 年获第二军医大学理学博士学位, 主要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, 博士, 研究员, E-mail: xianrong_sh@163.com

收稿日期: 初稿 2014-10-27; 修回: 2014-12-08

37 ℃、5% CO₂ 孵箱中继续培养 0、4、24、48、72 和 168 h, 随后每组样品取 1×10^6 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。用 Invitrogen 公司的 M-MLV 反转录酶对抽提的人淋巴母细胞总 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。

1.4 引物设计

依据 NCBI 数据库中的 β -actin 和 BTG2 基因序列, 用 Primer premier 5 软件设计实时荧光定量 PCR 的相应引物, β -actin: 上游引物: 5' TGTGTTGGCGTACAGGTCTTTG 3', 下游引物: 5' GGGAAATCGTGCGTGACATTAAG 3', BTG2: 上游引物: 5' GAACTGTTGCGTGCTTGA 3', 下游引物: 5' ACCTTGCTTGCTCCCTCT 3'。引物由上海捷瑞生物工程有限公司(GENERay)合成。

1.5 实时荧光定量 PCR

采用 SYBR 实时荧光定量 PCR 方法, 用 Chromo4 (BIO-RAD 公司) 实时荧光 PCR 检测仪, 按照用户手册操作。PCR 反应程序为: 95 ℃ 3 min; 95 ℃ 10 s; 60 ℃ 30 s; 共 40 个循环。每个样品重复做 3 个平行样, 每次反应结束后进行熔解曲线分析, 排除非特异性 PCR 产物的影响。以 β -actin 为内参, 同时设置空白对照组。

1.6 定量方法和统计分析

采用相对定量法, 以看家基因 β -actin 为内参, 以未照射对照组样品的靶基因表达量为 1, 照射组样品的靶基因定量为对照组样品的 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 倍, $\Delta CT = CT_{\text{目的基因}} - CT_{\text{内参基因}}$, $\Delta\Delta CT = \Delta CT_{\text{照射组样品}} - \Delta CT_{\text{对照组样品}}$ 。采用 MJ OptionMonitor Analysis Software V3.1 和 Excel 软件对结果进行分析。

2 结果

2.1 低剂量 γ -射线照射 AHH-1 细胞后 BTG2 基因 mRNA 表达的时间效应关系

不同剂量 ^{137}Cs γ -射线照射 AHH-1 细胞后, 在不同时间点收集细胞, 实时荧光定量 PCR 结果显示, 各剂量点 BTG2 基因表达变化趋势基本一致,

即随着时间的推移 BTG2 基因 mRNA 表达水平不断增高, 在 24 h 时达到最高, 随后开始逐渐降低, 在 48 h 和 72 h 时处于平台期, 但仍显著高于未照射组, 至 168 h 时 BTG2 基因 mRNA 表达水平降至接近 0 h 的表达水平, 时间-效应曲线见图 1。

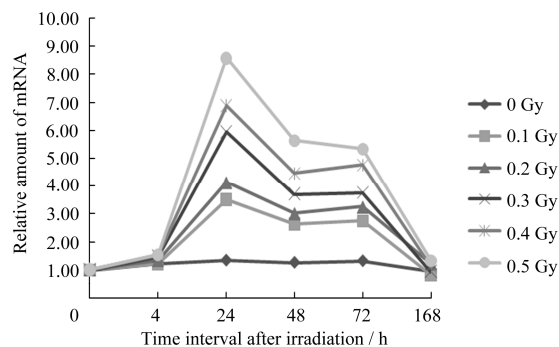


图 1 0–1.0 Gy γ -射线照射后 BTG2 基因表达变化的时间-效应曲线

Fig.1 Time-response curves of BTG2 gene expression after 0-1.0 Gy γ -ray irradiation

2.2 低剂量 γ -射线照射 AHH-1 细胞 BTG2 基因 mRNA 表达的剂量效应关系

不同剂量 ^{137}Cs γ -射线照射后, AHH-1 细胞中 BTG2 基因 mRNA 表达水平随着吸收剂量的增加而增加, 呈现出一定的剂量-效应关系。

照射后 24 h, 与未照射组比较, 0.1 Gy 照射组 BTG2 基因上调 2.61 倍, 0.2 Gy 照射组 BTG2 基因上调 3.06 倍, 0.5 Gy 照射组 BTG2 基因上调 4.41 倍, 0.8 Gy 照射组 BTG2 基因上调 5.10 倍, 1.0 Gy 照射组 BTG2 基因上调 6.36 倍, 拟合剂量-效应曲线方程为: $y = 4.612x + 1.757$, $R^2 = 0.939$, 其中 y 为 BTG2 基因在 mRNA 水平的相对表达量, x 为吸收剂量(Gy), 如图 2。

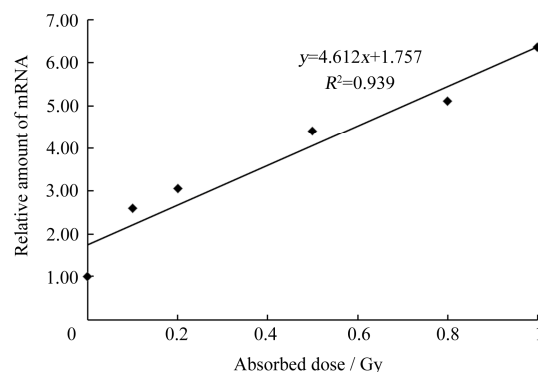


图 2 照射后 24 h BTG2 基因表达的剂量-效应曲线
Fig.2 The dose-response curve of BTG2 gene expression at 24 h post-irradiation

照射后 48 h, 与未照射组比较, 0.1 Gy 照射组 BTG2 基因上调 2.09 倍, 0.2 Gy 照射组 BTG2 基因上调 2.37 倍, 0.5 Gy 照射组 BTG2 基因上调 2.92 倍, 0.8 Gy 照射组 BTG2 基因上调 3.51 倍, 1.0 Gy 照射组 BTG2 基因上调 4.44 倍, 拟合剂量-效应曲线方程分别为: $y=2.847x+1.487$, $R^2=0.928$, 如图 3。

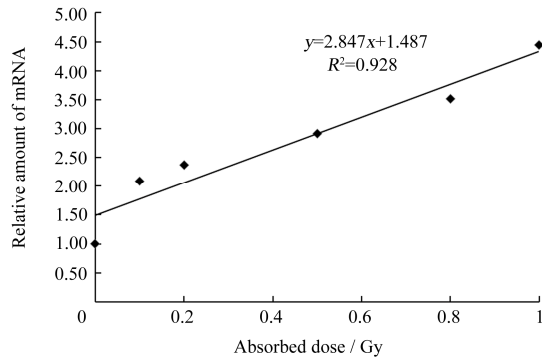


图 3 照射后 48 h BTG2 基因表达的剂量-效应曲线
Fig.3 The dose-response curve of BTG2 gene expression at 48 h post-irradiation

照射后 72 h, 与未照射组比较, 0.1 Gy 照射组 BTG2 基因上调 2.07 倍, 0.2 Gy 照射组 BTG2 基因上调 2.44 倍, 0.5 Gy 照射组 BTG2 基因上调 2.83 倍, 0.8 Gy 照射组 BTG2 基因上调 3.58 倍, 1.0 Gy 照射组 BTG2 基因上调 4.01 倍, 拟合剂量-效应曲线方程分别为: $y=2.559x+1.545$, $R^2=0.910$, 如图 4。

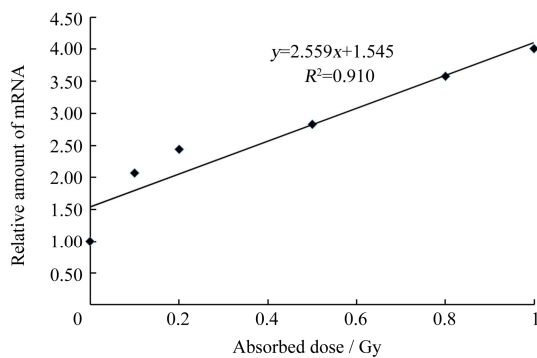


图 4 照射后 72 h BTG2 基因表达的剂量-效应曲线
Fig.4 The dose-response curve of BTG2 gene expression at 72 h post-irradiation

3 讨论

电离辐射可以诱导某些基因表达改变, 有可能成为生物标志物用于受照剂量的估算。目前, 国内外对于大剂量急性照射后基因的表达变化研究已有大量报道。但是, 关于低剂量电离辐射诱导的转录水平表达呈剂量依赖的基因研究报道不多。在我们前期实验中, 全基因组芯片检测分析了低剂量电离

辐射诱导的差异表达基因, 这些差异表达基因大多与细胞周期和细胞凋亡有关^[16]。其中, 随电离辐射剂量递增的 BTG2 基因引起了我们的关注。

B 细胞转位基因 2 (B cell translocation gene 2, BTG2), 又名 PC3 (Pheocromocytoma cell-3)、TIS21 (TPA-induced sequence 21), 是 1991 年 Bradbury 等^[17]从 PC 12 细胞中筛选出的一种分泌型蛋白, 具有抗增殖特性, 命名 PC3 基因。同年, Herschman 等^[18]用肿瘤促进剂 TPA (12-O-tetradecanoylphorbol-13) 作用于 NIH3T3 细胞株诱导产生了相同的基因序列, 命名为 TIS21 基因。1998 年, Zhu 等^[19]又用 p53 和 p73 诱导表达了与 PC3/TIS21 同源的人类基因 BTG2。BTG2 是具有抗增殖作用特性的瞬时早期反应基因, 参与了细胞分化、发育、凋亡和肿瘤细胞抑制等各种生理及病理过程并发挥着重要作用^[20-23]。电离辐射导致 DNA 损伤, 诱导 BTG2 活化, 继而抑制周期素 D 1 使细胞周期停滞在 G 1 期, DNA 复制被抑制, 使受损细胞得到充分修复, 同时, 抑制周期素 D1 可活化增殖细胞核抗原(PCNA)共同参与对损伤的 DNA 的修复。因此, BTG2 被认为是联系细胞周期和 DNA 损伤修复的桥梁。最近有研究报道 BTG2 可以调节 DNA 双链断裂(DNA double strand breaks, DSBs)的修复和凋亡, BTG2 表达可促进 DSBs 修复, 并通过激活 Mre11 和 PRMT 1(protein arginine methyltransferase 1), 阻碍磷酸化的 ATM (S198)将损伤信号传导至 Chk2 (T68)和 p53 (S20), 从而减少细胞凋亡^[24]。

此次实验采用实时荧光定量 PCR 法, 定量分析 BTG2 基因在 0.1–1.0 Gy 低剂量 γ -射线照射后 mRNA 水平的剂量效应关系以及时间效应关系。结果发现, 在 0.1–1.0 Gy γ -射线照射后, AHH-1 细胞中 BTG2 基因 mRNA 表达水平随着吸收剂量的增加而增加, 不同剂量照射后, BTG2 基因 mRNA 表达水平随时间变化趋势一致。即 BTG2 基因在照射后 24 h 表达最高, 随后逐渐下降, 在 48 h 和 72 h 时处于平台期, 但仍显著高于未照射组; 在照射后 24、48 和 72 h, 定量检测得到 BTG2 基因表达与受照剂量呈线性关系, 并具有较好的重复性。

本次实验结果提示, BTG2 基因对电离辐射敏感, 在低剂量范围内存在较好的剂量效应关系和重复性, 有可能作为一个新的生物标志物, 单独或与其他基因联合应用于低剂量电离辐射暴露人员的受照剂量估算和危害评价。

参考文献

- 1 Feinendegen L E. Evidence for beneficial low level radiation effects and radiation hormesis [J]. *British Journal of Radiology*, 2005, **78**(925): 3-7.
- 2 Wagner L K. The “Healthy worker effect”: science or prejudice? [J]. *Radiology*, 2003, **229**(1): 16-17.
- 3 Wakefort R. Radiation in the workplace-a review of studies of the risks of occupational exposure to ionizing radiation [J]. *Journal of Radiological Protection*, 2009, **29**(2A): A61-79.
- 4 Brenner D J, Doll R, Goodhead D T, *et al.* Cancer risks attributable to low doses of ionizing radiation: assessing what we really know [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 2003, **100**(24): 13761-13766.
- 5 Mullenders L, Atkinson M, Paretzke H, *et al.* Assessing cancer risks of low-dose radiation [J]. *Nature Reviews Cancer*, 2009, **9**(8): 596-603.
- 6 Zyugikov N A, Coates P J, Pally J M, *et al.* Lack of nontargeted effects in murine bone marrow after low-dose *in vivo* X-irradiation [J]. *Radiation Research*, 2011, **175**(3): 322-327.
- 7 Elmore E, Lao X Y, Kapadia R, *et al.* Low doses of very low-dose-rate low-LET radiation suppress radiation-induced neoplastic transformation *in vitro* and induce an adaptive response [J]. *Radiation Research*, 2008, **169**(3): 311-318.
- 8 Sakai K, Nomura T, Ina Y. Enhancement of bio-protective function by low dose/dose-rate radiation [J]. *Dose-response*, 2006, **4**(4): 327-332.
- 9 Ishii-Ohba H, Kobayashi S, Nishimura M, *et al.* Existence of a threshold-like dose for γ -ray induction of thymic lymphomas and no susceptibility to radiation-induced solid tumors in SCID mice [J]. *Mutation Research*, 2007, **619**(1-2): 124-133.
- 10 Shimada Y, Nishimura M, Amasaki Y, *et al.* Interaction of low dose radiation and other factors [J]. *Health Physics*, 2011, **100**(3): 278-279.
- 11 Kakinuma S, Nishimura M, Amasaki Y, *et al.* Combined exposure to X-irradiation followed by N-ethyl-nitrosourea treatment alters the frequency and spectrum of Ikaros point mutations in murine T-cell lymphoma [J]. *Mutation Research*, 2012, **737**(1-2): 43-50.
- 12 Amundson S A, Shahab S, Bittner M, *et al.* Identification of potential mRNA markers in peripheral blood lymphocytes for human exposure to ionizing radiation [J]. *Radiation Research*, 2000, **154**(3): 342-346.
- 13 Amundson S A, Lee R A, Koch-Paiz C A, *et al.* Differential responses of stress genes to low dose-rate irradiation [J]. *Molecular Cancer Research*, 2003, **1**(6): 445-452.
- 14 Böcker W, Iliakis G. Computational methods for analysis of foci: validation for radiation-induced γ -H2AX foci in human cells [J]. *Radiation Research*, 2006, **165**(1): 113-124.
- 15 Kuo L J, Yang L X. γ -H2AX-A novel biomarker for DNA double-strand breaks [J]. *In Vivo*, 2008, **22**(3): 305-309.
- 16 何颖, 沈先荣, 钱甜甜, 等. 低剂量 γ 射线辐照对人淋巴瘤细胞基因表达转录谱的影响 [J]. *辐射研究与辐射工艺学报*, 2013, **31**(5): 050203(10).
- HE Ying, SHEN Xianrong, QIAN Tiantian, *et al.* Effects of low dose γ -ray on transcription profiles of human lymphoblastoid cells [J]. *Journal of Radiation Research and Radiation Processing*, 2013, **31**(5): 050203(10).
- 17 Bradbury A, Possonti R, Shooter E M, *et al.* Molecular cloning of PC3, a putatively secreted protein whose mRNA is induced by nerve growth factor and depolarization [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 1991, **88**(8): 3353-3357.
- 18 Fletcher B S, Lira R W, Varnum B C, *et al.* Structure and expression of TIS21, a primary response gene induced by growth factors and tumor promoters [J]. *Journal of Biological Chemistry*, **266**(22): 14511-14518.
- 19 Zhu J, Jiang J, Zhou W, *et al.* The potential tumor suppressor p73 differentially regulates cellular p53 target genes [J]. *Cancer Research*, 1998, **58**(22): 5061-5065.
- 20 Rouault J P, Falette N, Guehennoux F, *et al.* Identification of BTG2, an antiproliferative p53-dependent component of the DNA damage cellular response pathway [J]. *Nature Genetics*, 1996, **14**(4): 482-486.
- 21 Walden P D, Lefkowitz G K, Ficazzola M, *et al.* Identification of genes associated with stromal hyperplasia and glandular atrophy of the prostate by mRNA differential display [J]. *Experimental Cell Research*, 1998, **245**(1): 19-26.
- 22 Alexander D B, Sarah P, Razorenova G V, *et al.* A systematic search for downstream mediators of tumor suppressor function of p53 reveals a major role of BTG2 in suppression of Ras-induced transformation [J]. *Genes & Development*, 2006, **20**(2): 236-252.
- 23 In Kyoung L. TIS21 /BTG2/PC3 as a link between ageing and cancer: cell cycle regulator and endogenous cell death

- molecule [J]. Journal of Cancer Research and Clinical Oncology, 2006, **132**(4): 417-426.
- 24 Choi K S, Kim J Y, Lim S K, *et al.* TIS21(/BTG2/PC3) accelerates the repair of DNA double strand breaks by enhancing Mre11 methylation and blocking damage signal transfer to the Chk2(T68)-p53(S20) pathway [J]. DNA Repair, 2012, **11**(12): 965-975.

Changes of BTG2 gene mRNA expression induced by low-dose γ -rays in human lymphoblastoid cells

HE Ying SHEN Xianrong QIAN Tiantian WANG Qingrong JIANG Dingwen CHEN Wei

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

ABSTRACT The aim is to investigate the effects of low-dose γ -rays on gene expression of BTG2 and the probability of it as bio-dosimeter. AHH-1 lines were irradiated with γ -rays of 0–1.0 Gy. Total RNA of cells was extracted at 0–168 h after irradiation, and real-time quantitative PCR was used to detect BTG2 gene expression. The relationships between the dose or time and gene expression were analyzed. After irradiation, the BTG2 gene expression increased in a dose-dependent form. Its peak expression was at 24 h after irradiation, and then the BTG2 gene expression gradually decreased to platform stage at 48 h and 72 h, and finally returned to the level of 0 h at 168 h. BTG2 gene is sensitive to irradiation and has potential in usage as biological dosimeter for its good dose and time-effect relationships.

KEYWORDS Low-dose ionizing radiation, Human lymphoblastoid cells, BTG2, Gene expression, Real-time quantitative PCR

CLC R811.5, TL72