

电离辐射诱导 BALB/c 小鼠骨髓细胞基因表达谱的研究

刘红岩 从玉文 善亚君 王金惠 苑晓玲 赵振虎 陈家佩

(军事医学研究院放射医学研究所 北京 100850)

摘要 利用基因芯片技术研究了辐射后小鼠骨髓细胞基因表达谱的变化。结果发现在芯片上 8079 个基因中, 有 660 个基因的表达有明显差异, 其中 354 个基因的表达量增高, 306 个基因的表达量下降。在差异基因中功能或部分功能已知基因有 222 个, 对其中差异 2.5 倍以上基因进行分析, 发现表达差异基因涉及细胞凋亡、细胞周期、信号转导、免疫与应激、核酸合成、转运蛋白与通道蛋白等多个方面, 其中以信号转导和免疫应激相关基因所占比例较多, 反映出辐射对细胞损伤的多靶点、多层次及多通路的特点, 深入研究这些辐射相关基因在造血辐射损伤中的作用, 可为放射病治疗、肿瘤放疗提供新的靶点和方法。

关键词 基因芯片, 离子辐射, 基因表达谱

中图分类号 Q691.5

电离辐射能引起细胞发生复杂的反应, 包括周期调节、突变及凋亡等^[1]。在分子水平上, 电离辐射可激活 p53 等蛋白的表达, 改变蛋白定位, 引起信号级联反应和在转录水平上诱导 BAX、MCL1、GADD34 等特异基因的表达^[2]。以往人们在辐射诱导基因表达研究方面做了大量工作, 但由于技术条件的限制, 研究只限于少量基因, 而新发展起来的基因芯片技术, 为大规模研究细胞在辐射前后基因表达谱的改变提供了可能。近年来, 不同实验室应用基因芯片技术研究了不同细胞(株)在不同辐射条件下基因表达的变化^[3, 4], 发现细胞基因背景不同、辐照条件有异, 诱导的差异表达基因也不尽相同。骨髓造血细胞增殖活跃, 对辐射敏感且成分复杂, 如包含不同分化层次的造血细胞, 以及多种多样的造血基质细胞, 因此研究骨髓造血细胞辐射后基因表达的变化, 将会获得辐射后造血系统整体变化信息, 目前这方面尚无文献报道。应用基因芯片技术观察了致死性照射后小鼠骨髓造血细胞基因表达谱的变化, 寄希望发现更多的辐射反应基因, 为放射病治疗、肿瘤放疗提供新的靶点和方法。

1 材料和方法

1.1 实验动物

BALB/c 小鼠, 体重 18—22g, 雌雄各半, 8—10 周龄, 购于军事医学科学院实验动物中心。

1.2 照射条件

利用本所 ^{60}Co γ 线照射源, 一次全身照射剂量 8.5Gy, 照射剂量率为 2.08Gy/min。

1.3 骨髓细胞总 RNA 的提取

分别将照射后 4h 及未照射 BALB/c 小鼠取双侧股骨, 用 DMEM 培养液冲出骨髓细胞, 离心, 弃上清, 用 TRIzol Reagent(购自 GIBCO 公司)按说明书步骤提取总 RNA, 甲醛凝胶电泳检测总 RNA 质量。将照射细胞总 RNA 定义为实验组, 未照射细胞总 RNA 定义为对照组。

1.4 探针制备, 芯片杂交

对照组用 cy3-dCTP 标记, 实验组用 cy5-dCTP 标记, 按博星基因芯片有限责任公司芯片杂交试剂盒操作步骤进行。芯片为博星表达谱芯片 MGEC-80s。

1.5 荧光扫描和结果分析

用 GenePix4000B 扫描仪扫描芯片, 观察杂交结果, 用 GenePix Pro3.0 软件分析结果。

2 结果

2.1 总 RNA 提取结果

甲醛凝胶电泳结果见图 1, 用 BECKMAN DU-600 测 OD260/OD280 值: 实验组为 2.00, 对照

第一作者: 刘红岩: 女, 1990 年 10 月出生, 2002 年毕业于军事医学科学院, 在读博士研究生, 主要从事辐射医学研究
通讯联系人: 从玉文
收稿日期: 初稿 2003-07-25, 修回 2003-09-15

组为 2.10。说明总 RNA 质量较好。或部分功能已知基因进行分类，结果见表 1。

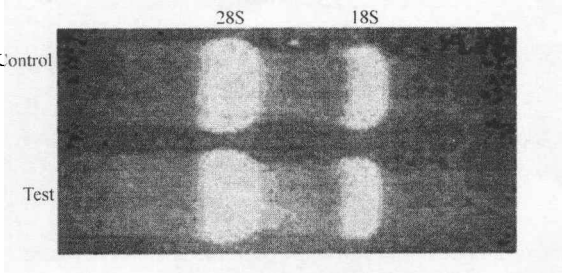


Fig.1 Formaldehyde agarose electrophoresis of RNA.

2.2 差异表达基因筛选结果

对芯片荧光结果进行分析，发现在芯片上 8079 个基因中，有 660 个基因的表达有明显差异，其中 354 个基因的表达量增高，306 个基因的表达量下降。在差异基因中功能或部分功能已知基因有 222 个，这其中表达量增高的有 96 个，表达量下降的有 126 个（杂交信号强度数据散点见图 2）。对功能

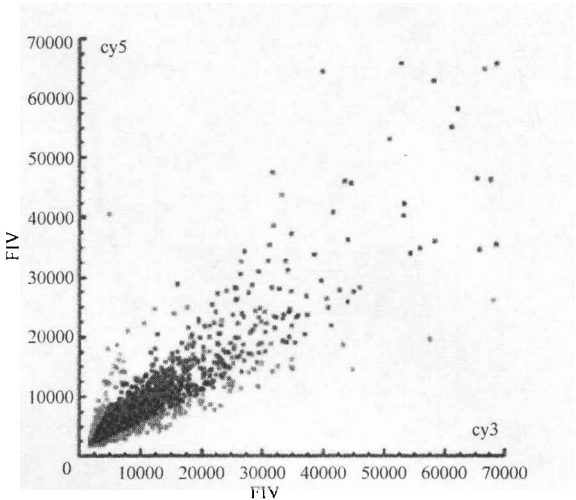


Fig.2 Scatterplots of intensity values of cDNA array, hybridized with two labeled samples of RNA. The X axes is cy3 intensity values. The Y axes is cy5 intensity values. FIV stands for fluorescence intensity values. Each spot is a gene hybridized signal in array.

Table.1 Different functional groups of function known or inferred genes

Function	Change	Accession	Definition
Signal transduction	Upregulated	M36033	Protein tyrosine phosphatase, receptor type, A
	Upregulated	M36778	Guanine nucleotide binding protein, alpha o
	Upregulated	U03856	Protein tyrosine phosphatase, receptor type, C polypeptide-associated protein
	Downregulated	L35236	Mus musculus (clone m3F12) mitogen activated protein (MAP) kinase stress activated protein B mRNA, complete cds
	Downregulated	J02809	Growth accentuating protein 43
	Downregulated	NM_013784	Mus musculus phosphatidylinositol glycan, classN (Pign), mRNA
	Downregulated	D86214	Mus musculus mRNA for Ca2+ dependent activator protein for secretion, complete cds
	Downregulated	D86238	Neuropeptide Y receptor Y2
Immunity or defense response	Upregulated	J03857	Mouse B-cell-specific glycoprotein (B29) mRNA, complete cds
	Upregulated	X13450	Murine B lymphocyte lineage restricted mb-1 mRNA
	Upregulated	U73744	Mus musculus heat shock 70 protein (Hsc70) gene, complete cds
	Upregulated	D13208	Mouse gene for mu chain association protein (8hs20)
	Upregulated	J04170	CD72 antigen
	Upregulated	L46768	Proteoglycan 2, bone marrow
	Downregulated	AF028722	Mus musculus fetal globin inducing factor mRNA, complete cds
	Downregulated	AF232828	Mus musculus ventral neuron-specific protein 1 NOVA1 (Nova1) mRNA, partial cds
Nucleic acid correlated	Downregulated	X04653	Mouse mRNA for Ly-6 alloantigen (Ly-6E.1)
	Upregulated	X04123	Mouse mRNA for terminal deoxynucleotidyltransferase (TdT)
	Upregulated	U19604	DNA ligase I, ATP-dependent
	Upregulated	D26089	Mini chromosome maintenance deficient 4 homolog(S. cerevisiae)
	Upregulated	U89506	Mus musculus Mlark mRNA, complete cds
	Upregulated	AF071184	Mus musculus formin binding protein 21 mRNA, complete cds
	Downregulated	U28068	Neurogenic differentiation

(续表 1)

Function	Change	Accession	Definition
Apoptosis	Downregulated	NM_009761	Mus musculus BCL2/adenovirus E1B 19 kDa-interacting protein 3-like (Bnip3l), mRNA
Cell cycle	Upregulated	NM_011799	Mus musculus cell division cycle 6 homolog (<i>S. cerevisiae</i>) (Cdc6), mRNA
	Upregulated	AF222801	Mus musculus traube mRNA, complete cds
	Downregulated	Z37110	Cyclin G
Transport	Upregulated	U63419	Mus musculus mitochondrial uncoupling protein (Ucp) mRNA, nuclear gene encoding mitochondrial protein, complete cds
	Downregulated	X70060	M.musculus mRNA for gamma subunit of sodium potassium ATPase
	Downregulated	U70859	Mus musculus cationic amino acid transporter (CAT3) mRNA, complete cds
	Downregulated	M80251	ATPase, H ⁺ /K ⁺ transporting, beta polypeptide, gastric specific
Cytoskeleton	Upregulated	M20773	Myosin light chain, alkali, cardiac atria
	Upregulated	M13441	Mouse alpha-tubulin isotype M-alpha-6 mRNA, complete cds
	Downregulated	NM_008389	Mus musculus IAP promoted placental gene (lpp),mRNA
Protein correlated	Upregulated	X04123	Mouse mRNA for terminal deoxynucleotidyltransferase (TdT)
	Upregulated	Z54209	M.musculus rpS6 gene
	Downregulated	NM_013484	Mus musculus complement component 2 (within H-2S) (C2),mRNA
Metabolism	Downregulated	U27014	Sorbitol dehydrogenase 1
	Downregulated	L11333	Mouse carboxyesterase mRNA
	Downregulated	NM_009634	Mus musculus adenylosuccinate lyase (Adsl), mRNA
	Downregulated	D29987	Mouse mRNA for 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase, complete cds
Unclassified	Upregulated	AF069311	Mus musculus Rhesus blood group protein mRNA, complete cds
	Downregulated	X58169	T-complex protein 10a
	Downregulated	NM_008872	Mus musculus plasminogen activator, tissue (Plat), mRNA
	Downregulated	X05260	Spermiogenesis gene
	Downregulated	M69293	Inhibitor of DNA binding 2
	Downregulated	U97149	Pale ear

3 讨论

表达谱基因芯片是用于基因功能研究的一种基因芯片, 它可以研究不同组织或细胞在不同发育阶段、不同环境中基因表达的改变, 进而提示基因的功能^[5]。利用表达谱基因芯片可以获得大量研究领域相关基因的信息。通过对功能已知基因的分析, 我们发现辐射后差异表达基因涉及细胞凋亡、细胞周期、信号转导、免疫与应激、核酸、转运蛋白与通道蛋白等多个方面, 其中以信号转导和免疫应激相关基因所占比例较多, 反映出辐射对细胞损伤的多靶点、多层次及多通路的特点。辐射可使细胞在 DNA 水平上产生损伤^[6], 在差异表达基因中, 发现与 DNA 修复有关的基因例如 DNA ligase I 表达上升, 说明实验结果是可靠的。

在信号转导差异基因中, 蛋白酪氨酸磷酸酶表达量升高, 而蛋白激酶例如: MAPK10 表达量下降,

提示辐射可能通过影响磷酸化与去磷酸化平衡调节某些信号转导通路。辐射后免疫及应激相关基因如 Iga、Igb、Hspa8 大多表达量升高, 说明细胞辐射后发生活跃的免疫应激反应。在代谢相关基因中, 大多基因表达量下降, 推测辐射后细胞处于代谢缓慢阶段。另外, 大多转运蛋白、通道蛋白表达量下降, 而细胞骨架、细胞周期及凋亡相关基因也都有相应的改变。通过对一系列差异表达基因的分析, 我们对辐射引起的复杂反应有一个总体的了解, 为选择合适的感兴趣基因进行系统研究提供了参考。

参考文献

- 1 Zhao R, Gish K, Murphy M *et al.* Genes Dev 2000, **14** (8): 981-993
- 2 Amundson S A, Bittner M, Meltzer P *et al.* Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol. 2001, **129** (4): 703-710

- 3 Amundson S A, Bittner M, Chen Y *et al.* *Oncogene*. 1999, **18**(24): 3666-3672
- 4 Khodarev N N, Park J O, Yu J. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001, **98**(22): 12665-1270
- 5 Tusher V G, Tibshirani R, Chu G. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001, **98**(9):5116-5121
- 6 Eckardt-Schupp F, Klaus C. *Biochimie* 1999, **81**(1-2):161-171

Profiling of differentially expressed genes induced by ionizing radiation in bone marrow cells of BALB/c

LIU Hongyan CONG Yuwen SHAN Yajun WANG Jinhui YUAN Xiaoling ZHAO Zhenhu
CHEN Jiapi

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

ABSTRACT Microarrays except for cDNA expression arrays was used to profile changes in gene expression of bone marrow cell after exposed BALB/c to ionizing radiation (IR). The RNA from bone marrow cells was subjected to cDNA analysis on a microarray of 8079 known genes and ESTs. Data analysis showed that 660 genes changed at least 2-fold. among the 660 genes, 354 genes showed up-regulation in the radiated BALB/c, whereas 306 genes were down-regulated. 222 of the 660 genes are function known or inferred genes, which fell into categories of signal transduction, immunity or defense response, nucleic acid correlated, apoptosis, cell cycle, transport, metabolism etc. It is suggested that a variety of regulatory pathways in hematopoietic cells were affected by irradiation.

KEYWORDS Microarray, Ionizing radiation, Gene expression

CLC Q691.5