

# X射线诱导人外周血淋巴细胞 GADD45 和 p21 基因表达上调

傅春玲<sup>1</sup> 童建<sup>1</sup> 江伟威<sup>1</sup> 张军宁<sup>2</sup> 洪承皎<sup>1</sup>

<sup>1</sup>(苏州大学放射医学与公共卫生学院 苏州 215007)

<sup>2</sup>(苏州大学附属第一医院 苏州 215006)

**摘要** 应用实时荧光逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)方法,定量分析不同剂量X射线体外照射对人外周血淋巴细胞GADD45和p21基因表达的影响,探讨了运用mRNA水平变化作为电离辐射生物剂量计的可能性。结果表明:经1、2、3、5Gy X射线照射后24h, GADD45和p21基因表达均明显上调。GADD45基因表达在1—5Gy照射剂量范围内呈指数相关。p21基因表达在1—3Gy照射剂量范围内呈线性剂量效应关系,但5.0Gy照射后,其表达不再继续增加。结果表明,X射线照射后人外周血淋巴细胞GADD45和p21基因的表达在一定剂量范围内呈剂量依赖性上调,GADD45更适合发展为核事故受照射人员的分子生物剂量计。

**关键词** 生长抑制和DNA损伤诱导基因45, p21, 基因表达变化, 电离辐射, 外周血淋巴细胞

**中图分类号** R811, R818.03

电离辐射诱导一些特殊基因表达的改变,有可能作为新的分子生物标记物,用于估算细胞的受照剂量。其中调控细胞G<sub>1</sub>期阻滞的p53下游效应基因生长抑制和DNA损伤诱导基因45(GADD45)<sup>[1]</sup>和p21基因尤其引人关注。当DNA受到辐射损伤后,GADD45和p21基因表达增强,诱导受损细胞停滞于G<sub>1</sub>期,抑制细胞进入S期进行DNA复制及细胞增殖。研究发现,人外周血淋巴细胞在受到中、低剂量照射时GADD45和p21基因表达呈剂量依赖性上调<sup>[1,2]</sup>。本实验运用实时荧光逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)方法,研究人外周血淋巴细胞GADD45和p21基因在中高剂量X射线照射后的变化规律,探讨其作为电离辐射生物剂量计的可能性。

## 1 材料和方法

### 1.1 血样

选择无急慢性疾病、非放射性工作者、年龄在22—24岁之间、半年内无射线和化学毒物接触史,无病毒感染史,不吸烟的健康男性为供血者,静脉取血,肝素抗凝。

### 1.2 淋巴细胞分离

用等体积的D-hanks液稀释混匀肝素抗凝血

液,沿离心管壁加到等体积的淋巴细胞分离液上,2000r/min离心30min,吸取中间层淋巴细胞于10mL离心管中,加D-hanks液至10mL,1000r/min离心10min,重复洗涤一次,计数,用含有10%灭活小牛血清、100u/mL青霉素,0.01%链霉素的RPMI-1640培养液稀释细胞至 $1.0 \times 10^6$ /mL,  $2.0 \times 10^6$ /瓶分装于25mL培养瓶中,置5% CO<sub>2</sub>培养箱37℃平衡1h待处理。

### 1.3 照射和培养

照射源为苏州大学附属第一人民医院放疗科西门子KD-2直线加速器,可产生6MV X射线。照射野为10cm×10cm,照射剂量率为200cGy/min。照射剂量分别为1.0、2.0、3.0、5.0Gy;照射后置于5% CO<sub>2</sub>培养箱37℃培养,于照射后24h用磷酸盐缓冲液(PBS)洗涤、离心、收获细胞,置-80℃冰箱保存待用。同时设立未照射的对照组。

### 1.4 细胞mRNA的分离提取及cDNA的合成

淋巴细胞mRNA提取,用Dynalbiotech公司的Dynabeads mRNA DIRECT™试剂盒提取,然后用Invitrogen公司的Superscript™ II RT进行cDNA逆转录合成,逆转录总体积为20μL,引物为Oligo(dT) 18,具体操作依据产品说明书。每个样品重复2次

国际原子能机构(CPR/9/027)资助

第一作者:傅春玲,女,1962年3月出生,1990年在四川大学医学院获硕士学位,现苏州大学放射医学与公共卫生学院在读博士,放射医学专业

通讯联系人:童建

收稿日期:初稿 2003-12-25,修回 2004-02-25

RNA 提取和 cDNA 合成。

### 1.5 引物设计和合成

依据 NCBI 数据库中的  $\beta$ -actin、GADD45、p21

基因序列, 用 ABI 公司 Primer Express 软件设计实时荧光定量 PCR 的相应引物, 引物序列见表 1, 由上海生物工程技术服务有限公司 (Sangon) 合成。

**Table 1** The Primer sequences of  $\beta$ -actin, GADD45 and p21

Gene	Accession	Oligo	Sequence	Product size
$\beta$ -actin	X00357	Forward Primer	5' TCCACCTTCCAGCAGATGTG 3'	75bp
		Reverse Primer	5' GCATTGCGGTGGACGAT 3'	
GADD45	M 60974	Forward Primer	5' CGAGGACGACGACAGAGATGT 3'	74bp
		Reverse Primer	5' TGT CGTTCTCGCAGCAAAAC 3'	
p21	NM 000389	Forward Primer	5' TGGAGACTCTCAGGGTCGAAA 3'	65bp
		Reverse Primer	5' GGCGTTTGG AGTGGTAGAAATC 3'	

### 1.6 实时荧光定量 PCR

采用 SYBR 实时荧光 PCR 方法, 用 ABI PRISM<sup>®</sup> 7000 序列检测仪, 按照 7000 用户手册操作。PCR 试剂为: 1 $\times$ SYBR<sup>®</sup>Green PCR Master Mix 购自 ABI 公司, 引物各 200nmol L<sup>-1</sup>, 模板 10—50ng。PCR 程序为: 50 $^{\circ}$ C (2min), 95 $^{\circ}$ C (10min), 然后 95 $^{\circ}$ C (15s), 60 $^{\circ}$ C (1min), 40 个循环。每个样品重复 3 次定量 PCR, 在每次 PCR 反应结束后进行熔解曲线分析以排除非特异性 PCR 产物的污染。每个样品的  $\beta$ -actin 和靶基因分管同板相同条件扩增, 每次反应均做空白对照。同时通过对无 cDNA 合成的 RNA 提取样品进行 PCR 扩增以排除 DNA 污染的可能。

### 1.7 琼脂糖凝胶电泳

PCR 产物在 2.5% 琼脂糖凝胶电泳, 稳压 80V, 时间 1h, Marker 为 MBI 公司的 GeneRuler<sup>™</sup> 50bp DNA Ladder; 溴乙淀染色, 用 BioRAD 公司 Gel Doc2000<sup>™</sup> Chemi Doc<sup>™</sup> 染胶成像系统照相分析排除非特异性 PCR 产物的污染。

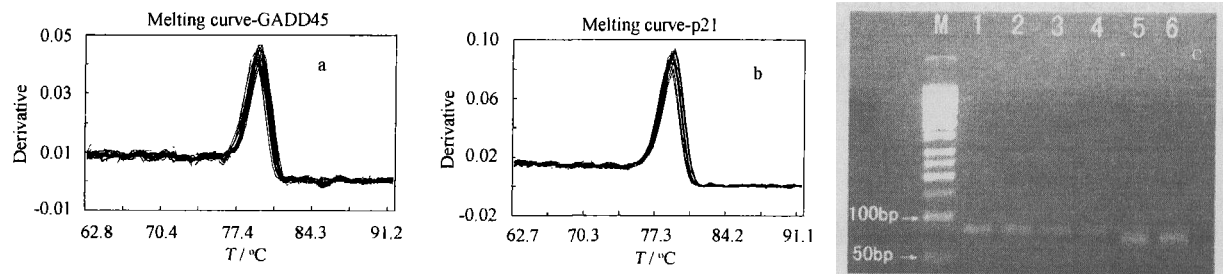
### 1.8 定量方法和统计分析

用比较  $C_T$  (Threshold cycle,  $C_T$ ) 方法<sup>[3]</sup>以看家基因  $\beta$ -actin 为内参, 相对定量照射后样品靶基因的表达水平, 即以未照射标准样品的靶基因表达量为 1, 照射样品靶基因定量均为标准样品的  $n$  倍。计算公式为: 照射样品靶基因表达量 =  $2^{-\Delta\Delta C_T}$ ;  $\Delta\Delta C_T$  = 照射样品  $\Delta C_T$  - 标准样品  $\Delta C_T$  (详见表 2)。数据输入 Microsoft Excel2000 软件中, 用 SPSS10.0 进行单因素方差分析和回归分析。

## 2 结果

### 2.1 SYBRGreen 荧光定量 RT-PCR 扩增特异性验证

熔解曲线分析显示  $\beta$ -actin、GADD45、p21 基因均为单峰, 并且 PCR 扩增产物的琼脂糖凝胶电泳也均显示为单一条带, 表明 PCR 扩增均为特异性的扩增, 见图 1。



**Fig.1** Specific amplification of PCR reaction.

- The  $T_m$  of GADD45 PCR production is clearly shown as a single peak in a derivative plot.
- The  $T_m$  of p21 PCR production is clearly shown as a single peak in a derivative plot.
- According to agarose gel electrophoresis, the  $\beta$ -actin(1, 2), GADD45(3, 4), p21(5, 6) end products of PCR are a single band of the predicted size

## 2.2 X 射线照射后人外周血淋巴细胞 GADD45 基因表达的剂量效应关系

X 射线照射后 24h 时, 人外周血淋巴细胞 GADD45 基因表达随着照射剂量的增加而上升, 见

表 2。经 SPSS10.0 回归分析检验, 存在剂量-效应关系, 数据经曲线拟合符合指数模型, 其回归方程  $\hat{y}=1.0948 e^{(0.4516x)}$  ( $p=0.0007$ )  $r^2=0.986$ 。

Table 2 Dose-response change of GADD45 gene expression

Irradiation dose / Gy	$\Delta C_T$	$\Delta \Delta C_T$	Fold <sup>(1)</sup>
	$\beta$ -actin-GADD45	Irradiation sample $\Delta C_T$ -control $\Delta C_T$	
0.0	-8.97±0.13	-0.00±0.13	1.0
1.0	-8.00±0.12	-0.97±0.12	2.0
2.0	-7.46±0.12	-1.51±0.12	2.8
3.0	-7.05±0.15	-1.92±0.15	3.8
5.0	-5.55±0.05	-3.42±0.05	10.7

<sup>(1)</sup> Fold =  $2^{-\Delta \Delta C_T}$ , n=3

## 2.3 X 射线照射后人外周血淋巴细胞 p21 基因表达的剂量效应关系

X 射线照射后 24h 时, 各剂量组人外周血淋巴细胞 p21 基因表达均显著高于对照组 ( $p<0.001$ ), 在 1—3Gy 剂量范围随着照射剂量的增加而上升,

至 3.0Gy 照射后达到峰值, 5.0Gy 照射后其表达不再增加, 见表 3。对 0—3.0Gy 照射后基因表达改变进行回归分析表明存在线性剂量效应关系, 其线性回归方程。  $y=1.069+0.659X$  ( $p=0.004$ )  $r=0.996$ 。

Table 3 Dose-response change of p21 gene expression

Irradiation dose / Gy	$\Delta C_T$	$\Delta \Delta C_T$	Fold
	$\beta$ -actin-p21	Irradiation sample $\Delta C_T$ -control $\Delta C_T$	
0.0	-5.74±0.10	-0.00±0.10	1.0
1.0	-4.87±0.13 <sup>(1)</sup>	-0.87±0.13	1.8
2.0	-4.46±0.07 <sup>(1)</sup>	-1.28±0.07	2.4
3.0	-4.15±0.13 <sup>(1)</sup>	-1.59±0.13	3.0
5.0	-4.36±0.07 <sup>(1)</sup>	-1.38±0.07	2.6

<sup>(1)</sup>  $p<0.001$ , vs 0 Gy, Group, n=3

## 3 讨论

随着近年来对电离辐射致 DNA 损伤分子机制研究的不断深入, 已发现电离辐射能够诱导一些基因表达。这些基因被称为 DNA 损伤诱导基因 (DNA damage inducible, DDI)<sup>[4]</sup>。阐明这些基因表达变化 (Gene expression change, GEC)<sup>[2,5]</sup> 的规律有可能发展出新的辐射效应分子生物标志物 (Radiation-responsive biomarker), 并用于进行辐射剂量估算。

人类细胞的 GADD45 基因是一种可以被 X 射线强烈诱导, 产生反应性表达改变的基因<sup>[1,6]</sup>。电离

辐射诱导的 GADD45 基因表达依赖于细胞中野生型 p53 的存在及其功能实现<sup>[7]</sup>。当受照细胞中有野生型 p53 存在时, GADD45 基因表达升高, 并可发生 G<sub>1</sub> 期阻滞 (G<sub>1</sub> arrest)。GADD45 作为 p53 基因的下游基因而在 DNA 修复与细胞周期 G<sub>1</sub>/S 期检查点之间起沟通联系作用<sup>[8]</sup>。体外实验时, 这种作用被证实是通过刺激受损 DNA 的切除修复以及抑制 DNA 受损细胞进入 S 期实现的。阻滞在 G<sub>1</sub> 期的细胞, 如果 DNA 损伤能够修复则进入下一个细胞周期, 否则启动细胞凋亡 (Apoptosis) 过程。GADD45 与 DNA 辐射损伤密切相关的生物学功能, 使其成为分子辐射生物学的研究焦点之一。

Grace 等<sup>[1]</sup>用正常人外周全血细胞, 进行 RT-PCR 测定, 发现照射后 24—48h, GADD45 的表达量在 1.0—3.0Gy 之间存在着线性的剂量效应关系。Fornace 等<sup>[9]</sup>也曾经报道过, 人骨髓细胞性白血病细胞系 ML-1 细胞在 2—50cGy 剂量范围内有线性剂量效应关系。本次实验采用人外周血淋巴细胞, 在较宽的剂量范围 (1—5.0Gy) 证实存在剂量效应关系, 并发现在受到 3Gy 以上照射后, GADD45 基因表达上调加速, 经回归分析和曲线拟合更符合指数模型。

由于 GADD45 本身所具有的辐射相关生物学效应, 其基因表达在照射后的剂量依赖性上调和结果的可重复性, 以及可在照射后 2—72h 内维持 (未发表结果)。我们认为, GADD45 基因表达有望发展为常规辐射生物剂量计的一个辅助指标, 用于事故受照人员的剂量快速估算, 以指导临床诊断和治疗的救援工作。

p21 是最先被发现的 CDK (Cyclin dependent kinase) 抑制因子, 也是 p53 参与 G<sub>1</sub> 期阻滞调控的下游分子开关。其过量表达时, 可抑制 CDK 活性和 Rb 的磷酸化使细胞停滞于 G<sub>1</sub> 期, 还可通过与周期蛋白/CDK 复合物及 PCNA 结合阻断 DNA 复制。大量实验结果表明电离辐射作用后, 多种细胞发生 G<sub>1</sub> 期阻滞的同时伴有 p21 表达的增高<sup>[10,11]</sup>。人外周血淋巴细胞在受到 0.2—2.0Gy  $\gamma$  射线后, p21 基因表达呈剂量依赖性上调<sup>[2]</sup>, 有可能发展为新的辐射效应生物标志物。本研究结果表明, 经 1—5Gy X 射线照射后, 人外周血淋巴细胞 p21 基因均显著高于对照组, 在 1—3Gy 照射剂量范围内其基因表达的上调, 且呈线性剂量效应关系, 与 Amundson 报道类似<sup>[2]</sup>; 但 3Gy 以上照射后, 不再继续上升, p21 基因表达上调呈平台效应, 在一定剂量达到饱和。因此, p21 基因单独不适于估算 3Gy 以上照射剂量。但鉴于其表达在中低照射剂量范围内呈线性剂量效应关系, 可以结合其它靶基因如 GADD45 作为辐射效应生物标志物用于照射剂量的估算。

采用 SYBRgreen 实时荧光定量 RT-PCR 检测 mRNA 具有简便易行, 高灵敏度、高重现性, 定量准确、误差小、全封闭检测, 杜绝产物污染导致假阳性等优点, 但一般认为此法的特异性不高。本研究利用 ABI 公司 Primer Express 软件设计实时荧光定量 PCR 的相应引物进行 PCR 扩增, 获得了高特异性。同时利用含 ROX 染料的 1×SYBR<sup>®</sup>Green PCR

Master Mix 试剂避免了加样误差, 利用细胞内表达相对稳定的基因作为内部参照, 避免 mRNA 提取等对定量的影响, 保证了检测的特异性、实验体系的稳定性和结果的可重复性。此外, 实时荧光定量 RT-PCR 定量分析易于标准化, 便于不同实验室间的结果比较和质量控制。因此, 利用实时荧光定量 RT-PCR 技术检测特定靶基因表达的改变作为分子生物剂量计可弥补现在常用的检测方法如 CB 微核法、染色体畸变分析法时间较长, 操作繁琐等缺陷, 因而具有良好的应用前景。

**致谢** 本文在江苏省放射医学与辐射防护重点实验室完成。特此感谢!

### 参考文献

- 1 Grance M B, McLeland C B, Blakely W F. *Int J Radiat Biol*, 2002, **78**(11): 1101-1121
- 2 Amundson S A, Do K T, Shahab S *et al.* *Radiat Res*, 2000, **154**(3): 342-346
- 3 ABI Applied biosystems. User Bulletin #2. ABI Prism 7700 sequence Detection System, <http://docs.Appliedbiosystems.com/pebiiodocs/04303859.pdf>. 2001. 11-15
- 4 Kastan M B, Onyekwere O, Sidransky D *et al.* *Cancer Res*, 1991, **51**(23): 6304-6311
- 5 Blakely W F, Prasanna P G, Grace M B *et al.* *Radiat Prot Dosimetry*, 2001, **97**(1): 17-23
- 6 Smith M L, Fornace A J Jr. *Mutat Res*, 1996, **340**(2-3): 109-124
- 7 Zhan Q, Bae I, Kastan M B *et al.* *Cancer Res*, 1994, **54**(10): 2755-2760
- 8 Kearsley J M, Coates P J, Prescott A R *et al.* *Oncogene*, 1995, **11**(9): 1675-1683
- 9 Fornace A J Jr, Amundson S A, Do K T *et al.* *Mil Med*, 2002, **167**(2 suppl): 13-15
- 10 Torres M, Al-Buhairi M, Alsbeih G. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 2004, **58**(2): 479-484
- 11 傅海青, 鞠桂芝, 苏旭等. 辐射研究与辐射工艺学报, 2000, **18**(2): 86-90  
FU Haiqing, JU Guizhi, SU Xu *et al.* *J Radiat Res Radiat Process*, 2000, **18**(2): 86-90

## GADD45 and p21 gene expression up regulated by X-ray in human peripheral blood lymphocytes

FU Chunling<sup>1</sup> TONG Jian<sup>1</sup> JIANG Weiwei<sup>1</sup> ZHANG Junning<sup>2</sup> HONG Chengjiao<sup>1</sup>

<sup>1</sup> (School of Radiation Medicine and Public Health, University, Suzhou 215007)

<sup>2</sup> (No1 Affiliated Hospital, Suzhou, Suzhou 215006)

**ABSTRACT** SYBR real time RT-PCR method was applied to study the expression profiles of the Growth Arrest and DNA Damage gene 45(GADD45) and p21 induced by X-rays in human peripheral blood lymphocytes *in vivo*. Results show that GADD45 and p21 gene expressions in human PBLs at 24h after 1, 2, 3, 5Gy X-ray irradiation were increased significantly. A linear dose response relationship could be established for the GADD45 gene expression over the dose range from 1.0Gy to 5.0Gy and for the p21 gene expression over the dose range from 1.0Gy to 3.0Gy 24h after X-ray irradiation respectively. Results suggest that the relative level of the GADD45 and p21 gene expression in human PBLs is dose dependent under the experimental conditions, indicating that the GADD45 gene may serve as a potential biological dosimeter in future radiation accident dose assessment.

**KEYWORDS** GADD45, p21, Gene expression change, Ionizing radiation, PBLs

**CLC** R811, R 818.03