

7 Gy γ 射线照射后 4h 小鼠骨髓差异表达基因的初步研究

饶亚岚 陈肖华 王琳 廖于峰 董波 丛悦 张军权 高玲 李峰生 毛秉智

【摘要】 目的 为探讨急性放射病骨髓损伤的分子机制, 研究整体照射条件下, 辐射前后骨髓基因表达的变化。方法 运用抑制消减杂交、cDNA 阵列杂交及 Northern 杂交等方法, 筛选 C57BL/6J 小鼠受 7Gy ^{60}Co γ 射线照射后 4h 骨髓组织差异表达基因。结果 筛选到一系列辐射后可能表达升高的基因, 其功能涉及细胞周期调控、抗氧化、DNA 损伤修复和造血免疫, 实验确证 CDKN1A 及 S100A8 基因的差异表达。结论 辐射后差异表达基因的功能说明骨髓受辐射后即发生哺乳细胞普遍发生的辐射效应(如 DNA 损伤、细胞周期阻滞、过氧化反应), 同时骨髓的造血免疫功能及神经内分泌调节发生改变。

【关键词】 骨髓; 辐射损伤; 基因表达谱; 小鼠, 近交 C57BL

【中图分类号】 Q345*.2 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1673-4114(2007)04-0245-03

Preliminary research on differentially expressed genes in mouse bone marrow 4h after 7Gy γ -ray radiation in vivo

RAO Ya-lan, CHEN Xiao-hua, WANG Lin, LIAO Yu-feng, DONG Bo, CONG Yue, ZHANG Jun-quan, GAO Lin, LI Feng-sheng, MAO Bing-zhi

(1st Department, Beijing Institute of Radiation Medicine, Beijing 100850, China)

【Abstract】 Objective To explore the molecular mechanism of bone marrow injury of acute radiation syndrome, gene expression of bone marrow in mice after whole body irradiation was studied. **Methods** The molecular biology technology including suppression subtractive hybridization, cDNA array hybridization and Northern hybridization were used to study differential gene expression of mRNA level in bone marrow of C57BL/6J mouse 4h after 7Gy ^{60}Co γ -ray radiation in vivo. **Results** A series possibly induced genes after irradiation were obtained. The function of these genes related to cell cycle control, anti-oxidation, DNA repair, and hematopoiesis-immune response. The differential expression of CDKN1A and S100A8 gene were validated by further experiment. **Conclusions** The function of those differentially expressed genes after irradiation illuminated that radiation effects, such as DNA damage, cell cycle arrest and oxidation reaction which often happened in mammalian cells, also took place in bone marrow cells after irradiation. Furthermore, the hematopoiesis-immune function and the neuroimmunoendocrine regulation in bone marrow were also changed.

【Key words】 Bone marrow; Radiation injuries; Gene expression profiling; Mice, inbred C57BL

骨髓型急性放射病是以骨髓等造血组织损伤为基本病变。为探索骨髓辐射损伤的分子机制, 有必要研究整体照射条件下辐射前后骨髓基因表达的变化。本室已有的研究表明, C57BL/6J 纯系小鼠受 7.5Gy γ 射线一次全身照射相当于中重度骨髓型急性放射病模型。Ammundson 等^[1]认为, 对于快速繁

殖的细胞, 大剂量照射后 4h, 某些辐射诱导表达基因 mRNA 水平达高峰。为了寻找早期辐射诱导基因并保证获取较充分的骨髓组织总 RNA, 我们选择辐射后 4h 这个时间点进行研究。

1 材料和方法

1.1 动物分组

C57BL/6J 纯系小鼠, 雌性, 质量 18~22g, 由本院实验动物中心提供。同批动物随机分为照射组和正常对照组。照射组动物用本所 ^{60}Co γ 射线照

基金项目: 国家自然科学基金项目 (30400119)

作者单位: 100850, 北京军事医学科学院放射与辐射医学研究所一室

通讯作者: 陈肖华 (E-mail: chenxh@nic.bmi.ac.cn)

射源一次全身照射 7 Gy, 照射剂量率 220 cGy/min, 照射后 4 h 测定各项指标。

1.2 骨髓单细胞悬液制备

小鼠颈椎脱臼处死, 取股骨, 以 1 ml 生理盐水冲出每根股骨的骨髓细胞, 制成单细胞悬液。

1.3 骨髓有核细胞计数

取 20 μ l 骨髓单细胞悬液加 380 μ l 3% 冰乙酸混合溶解红细胞, 滴少量细胞悬液于计数板在显微镜下进行有核细胞计数。

1.4 骨髓组织总 RNA 的提取

用 Trizol 试剂 (Invitrogen 公司) 提取骨髓单细胞悬液中的总 RNA, 具体操作按试剂说明书进行。

1.5 流式细胞仪测定骨髓细胞周期与凋亡

乙醇固定骨髓单细胞悬液, 碘化丙啶染色, 流式细胞仪检测, 具体操作按文献[2]进行。

1.6 Atlas™ Mouse Stress Array 杂交

从正常对照组及照射组小鼠骨髓提取总 RNA 分别标记 32 P, 分别与两张 Atlas™ Mouse Stress Array (Clontech 公司) 杂交, 具体操作按试剂说明书进行。Atlas™ Mouse Stress Array 为已知的 140 个应激基因构成的 cDNA 阵列。

1.7 联合抑制消减杂交和 cDNA 阵列杂交筛选

照射组小鼠骨髓总 RNA 为实验方 (tester), 正常对照组动物骨髓总 RNA 为驱动方 (driver), 利用 PCR-Select™ cDNA Substraction Kit (Clontech 公司) 进行抑制消减杂交分离差异表达序列标签 (expressed sequence tags, ESTs)。进一步将分离得到的 ESTs 点制 cDNA 阵列, 分别与来自实验方和驱动方的总 RNA 制成的 32 P 标记的探针进行杂交。具体[3]操作按文献进行。

1.8 地高辛标记探针

以小鼠骨髓总 RNA 反转录得到的 cDNA 为模板, 聚合酶链反应 (polymerase chain reaction, PCR) 扩增 S100A8、CDKN1A 及 GAPDH 的 cDNA 片段。所用引物序列分别为 S100A8 上游为 5' > ATCACCATGCCCTCTACAAGA <3', 下游为 5' > TGCTACTCCTTGTGGCTGTCT <3'; CDKN1A 上游 5' > ATGTCCAATCCTGGTGATG <3', 下游为 5' > TCTTGTCCCTCCCAGGTC <3'; GAPDH 上游 5' > CCATGGAGAAGCCGGGG <3', 下游为 5' > CAAAGTTGTCATGGATGACC <3'。取上述三基因的 PCR 产物 1 μ l 为模板, 进行二次 PCR, 脱氧三磷

酸胸苷和地高辛标记的脱氧三磷酸尿苷 (Roche 公司) 以 9:1 比例加入 PCR 反应体系。

1.9 RNA 狭缝及 Northern 杂交

小鼠骨髓总 RNA 经多孔过滤加样器 (RNA 狭缝杂交) 或甲醛变性胶电泳分离 (Northern 杂交) 后抽真空转移到尼龙膜, 与上述地高辛标记的探针杂交, 所用试剂为 Dig High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit II (Roche 公司)。具体操作参考《分子克隆 (第二版)》^[4]及试剂说明书进行。

2 结果

2.1 7Gy 照射后 4 h 小鼠骨髓细胞变化

正常对照组小鼠骨髓有核细胞数为 $(2.09 \pm 0.30) \times 10^7$ cell/股骨 (n=5), 7Gy γ 射线照射后 4 h 小鼠骨髓有核细胞数为 $(1.26 \pm 0.30) \times 10^7$ cell/股骨 (n=5), 与正常对照组比较, 照射后小鼠骨髓有核细胞数明显减少 ($t=4.37, P<0.01$), 照射组约为正常对照组的 60.3%。正常对照组小鼠骨髓总 RNA 量为 $(35.7 \pm 1.8) \mu$ g/股骨 (n=5), 照射组小鼠骨髓总 RNA 量为 $(25.8 \pm 2.1) \mu$ g/股骨 (n=5), 与正常对照组比较, 照射后小鼠骨髓总 RNA 量明显减少 ($t=8.0, P<0.01$), 照射组约为正常对照组的 72.2%。7Gy γ 射线照射后 4 h 小鼠骨髓细胞 S 期细胞减少, G₂-M 期细胞增加, 凋亡细胞增加 (见表 1)。

表 1 小鼠骨髓细胞周期与凋亡的变化 ($\bar{x} \pm s, n=5$)

	细胞比例 (%)			
	G ₀ -G ₁ 期	S 期	G ₂ -M 期	凋亡率
正常对照组	75.91 \pm 1.57	19.81 \pm 1.83	4.29 \pm 0.35	0.22 \pm 0.23
照射组	72.90 \pm 2.41	15.86 \pm 1.74*	11.23 \pm 1.82*	14.09 \pm 2.48*
t 值	2.34	3.52	8.37	12.45

*: 与正常对照组比较, $P<0.01$

2.2 7Gy 照射后 4h 小鼠骨髓中表达升高的基因

由 Atlas™ Mouse Stress Array 杂交, 得到 7Gy γ 射线照射后 4 h 小鼠骨髓中可能达到升高的已知基因有 CDKN1A、CAT、HO1、CYP2E1 和 MPG。联合抑制消减杂交和 cDNA 阵列杂交筛选到 7Gy γ 射线照射后 4 h 小鼠骨髓中可能表达升高的已知基因有 S100A8、IFIT1、NPG、Hba1 和一种小鼠未命名蛋白。以与看家基因 GAPDH 的杂交信号比值 (ratio) 为 1:1 进行校正, 上述基因与来自于照射组和正常对照组探针的杂交信号比值在 6 倍以上。这些表达升高的基因功能涉及细胞周期调控、抗氧

化、DNA 损伤修复及造血免疫(见表 2)。其中未知功能的小鼠未命名蛋白(BAC40925.1)与抑制消减杂交方法分离到的多个克隆对应。

表 2 7Gy γ 射线照射后 4h 小鼠骨髓可能表达升高的基因

基因功能	基因名称	Genbank 号
细胞周	CDKN1A (周期蛋白依赖性	U09507
期调控	蛋白激酶抑制蛋白 1A)	
抗氧化	CAT (过氧化氢酶)	L25069
	HO1 (血红素加氧酶 1)	M33203
	CYP2E1 (一种细胞色素	L11650
	P450 家族成员)	
DNA 损	MPG (甲基嘌呤糖基化酶)	U10420
伤修复		
免疫造血	S100A8 (一种钙结合蛋白)	NM_013650.1
	IFIT1 (一种为干扰素 α 诱	XM_123409.1
	导的蛋白)	
	NPG (嗜中性颗粒蛋白)	U95002.1
	Hba1 (珠蛋白 α 链)	AK012755.1
未知功能	小鼠未命名蛋白	BAC40925.1

2.3 γ 射线照射后小鼠骨髓中 CDKN1A 与 S100A8 基因表达升高的进一步验证

抑制消减杂交和 cDNA 阵列实现一次分离多量差异表达基因,但具有一定的假阳性,仍需进行逐个基因的实验验证。RNA 狭缝杂交可见 7 Gy 照射后 4h 小鼠骨髓中 CDKN1A 基因 mRNA 水平明显升高(见图 1)。Northern 杂交检测比较小鼠受不同剂量 γ 射线照射后不同时间骨髓中 S100A8 mRNA 的水平,可见 3.5 Gy 照射后 4、24h 及 7Gy 照射后 4h 骨髓中 S100A8 mRNA 有升高趋势(见图 2)。

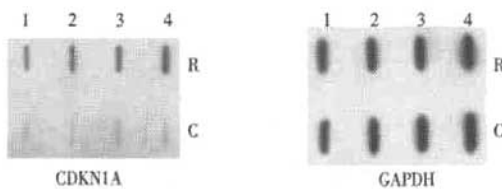


图 1 RNA 狭缝杂交法检测 7Gy γ 射线照射后 4h(R)及正常对照(C)小鼠骨髓中 S100A8 mRNA 水平

3 讨论

C57BL/6J 小鼠 7Gy ^{60}Co γ 射线照射后 4h 骨髓有核细胞约为对照的 60%,而总 RNA 约为对照的 72%。Limanni 等^[5]的研究表明,B6D2F1 雌性小鼠受亚致死剂量 7.75Gy γ 射线照射后 48h,骨髓有核细胞约为对照的 6%,骨髓总 RNA 约为对照的 25%,变化的趋势和我们的结果一致。C57BL/6J 小鼠 7Gy γ 射线照射后 4h,骨髓细胞发生了 G₂-M 期阻滞(G₂-M 细胞比例增加)、S 期延迟(S 期细胞

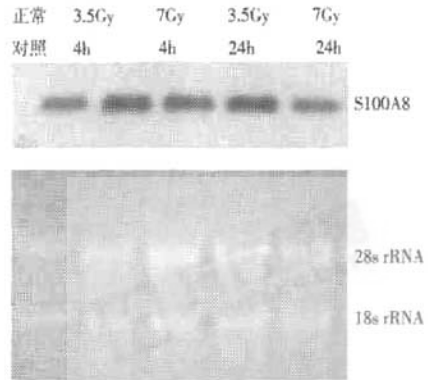


图 2 Northern 杂交法检测小鼠受不同剂量 γ 射线照射后不同时间骨髓中 S100A8 mRNA 水平

比例减少)及细胞凋亡。辐射引起的细胞周期紊乱和细胞凋亡是机体对外界刺激的保护性反应,前者保护单个细胞,后者保护整个机体。

我们筛选到小鼠受大剂量照射后早期骨髓可能表达升高的基因,其功能涉及细胞周期调控(如 CDKN1A)、抗氧化(如 CAT、HO1、CYP2E1)以及 DNA 损伤修复(如 NPG),说明骨髓受辐射后即发生哺乳细胞普遍发生的辐射效应。骨髓是重要的造血免疫器官,大剂量照射后早期小鼠骨髓中参与造血免疫过程的基因表达升高(如 S100A8、IFIT1、NPG 和 Hba1),而且这些基因的表达大多受神经内分泌调节,说明骨髓受辐射后其造血免疫功能及神经内分泌调节发生改变。值得一提的是,抑制消减杂交法分离到的多个克隆对应一种小鼠未命名蛋白 BAC40925.1,此蛋白是由其全长 cDNA 序列推测得来的功能未知的全新蛋白^[6],而且该序列也与中等纤维蛋白结合的基因组 DNA 序列相似,功能与 DNA 重组和修复相关^[3,7]。

我们实验确证了 γ 射线照射后小鼠骨髓中 CDKN1A 与 S100A8 基因表达升高。CDKN1A 为周期蛋白依赖的蛋白激酶抑制蛋白,调节细胞周期与凋亡,其表达升高与此时骨髓细胞呈现细胞周期紊乱和凋亡相关,CDKN1A 分子是理想的新型生物剂量计分子^[8]。S100A8 是一种钙结合蛋白,S100 家族成员,为多功能分子,与转化生长因子 β 有功能类似性,参与生长、分化、发育及免疫炎症反应过程,尤其与髓系细胞分化相关,S100A8 低剂量时为趋化因子起促炎性作用,高剂量时通过其抗氧化起抗炎性作用^[9,10]。

(下转第 256 页)

丝分裂延迟,乃至细胞代谢功能的改变,肿瘤细胞失去繁殖能力,最终出现细胞损伤,甚至凋亡^[2,3],从而达到较明显的治疗效果。

4.2 ¹²⁵I 粒子的活度选择和数量的计算

¹²⁵I 粒子活度的选择是经临床使用后认可的,最佳剂量为 22.2 MBq (0.6 mCi)/枚^[4,5]。然后,根据肠镜、钡剂灌肠检查的结果确定病变长度和范围,再结合支架的直径测算出病变的面积。¹²⁵I 粒子的有效作用范围为 1.3 cm²,用面积值除以1.3即可算出所需的¹²⁵I 粒子数量。由于肠腔内环形菜花状增生的癌被植入的支架压迫,厚度一般不超过 1 cm,故厚度可忽略不计。例如:本例患者复发灶狭窄长度为 7 cm,植入支架的直径为 1.9 cm,病变面积即为 1.9 cm × 3.14 (圆周率) × 7 cm = 41.76 cm²,粒子数为 41.76 cm²/1.3 cm² = 32.1,故选择 32 枚粒子。考虑到阻断癌细胞可能发展的路径,在病变的边缘多分布一些粒子有时也是必要的。

4.3 支架和植入器的选择

我们采用顺应性好的针织型机制支架,在支架的两端加上了硅胶软边以减少刺激。

4.4 疗效和并发症

由于接受支架植入术的患者不需要长期住院,

因此,定期随访是很重要的,在随访中要注意观察支架植入是否准确、支架的柔顺性、支架植入后是否移位、粒子是否脱落、是否造成出血穿孔、是否出现放射性溃疡和肠瘘等严重并发症,这些都关系到治疗的成败。

该患者通过在直肠内行¹²⁵I 粒子支架植入治疗结肠癌复发后,症状消失,一般情况好转,结肠癌复发的菜花样病灶消失,狭窄的肠腔扩张,且未出现并发症,治疗效果较好。

参 考 文 献

- 1 申文江,王绿化,夏延毅.放射治疗学新技术进展.第一版.北京:北京科学技术出版社,2003.155-159.
- 2 沈瑜,糜福顺.肿瘤放射生物学.北京:中国医药科技出版社,2002.422-428.
- 3 阎尔坤.¹²⁵I 密封籽源用于肿瘤治疗的动物实验初步研究.国外医学·放射医学核医学分册,2005,29(4):161-163.
- 4 罗开元,李波,杨嵘,等.¹²⁵I 粒子组织间放射治疗恶性肿瘤的临床应用.中华医学杂志,2001,81(12):754-755.
- 5 罗开元,邵庆华,杨国凯,等.¹²⁵I 粒子植入在低位直肠癌保肛术中的应用.中华医学杂志,2005,85(19):1355-1356.

(收稿日期:2006-12-18)

(上接第 247 页)

已有研究报道,6Gy X 射线照射 MCF-7 细胞后 48~72 h, S100A8 被诱导表达,而且胞内 S100A8 mRNA 水平呈现辐射剂量效应关系^[11]。此外,大鼠肝部受 25Gy γ 射线照射后 6h S100A8 蛋白水平升高,而且其诱导表达可能与受辐射后肝部活性氧水平升高有关^[3]。我们正在深入开展 S100A8 的相关研究。

参 考 文 献

- 1 Amundson SA, Do KT, Shahab S, et al. Identification of potential mRNA biomarkers in peripheral blood lymphocytes for human exposure to ionizing radiation. *Radiat Res*, 2000, 154(3): 342-346.
- 2 董波,陈肖华,张浩,等.一种改进的用于测定细胞周期的细胞制备方法.军事医学科学院院刊,2002,26(2):124-129.
- 3 饶亚岚,陈肖华,张军权,等. SSH 方法分离大剂量照射后小鼠骨髓差异表达 EST 序列.中华放射医学与防护杂志,2003,23(3):167-169.
- 4 萨姆布鲁克 J, 弗里奇 EF, 曼尼阿蒂斯 T. 分子克隆实验指南. 第二版, 北京: 科学出版社, 1992. 345-374.
- 5 Limanni A, Baker WH, Chang CM, et al. c-kit ligand gene expression in normal and sublethally irradiated mice. *Blood*, 1995, 85 (9):

2377-2384.

- 6 Kawai J, Shinagawa A, Shibata K, et al. Functional annotation of a full-length mouse cDNA collection. *Nature*, 2001, 409 (6821): 685-690.
- 7 Tolstogonov GV, Wang X, Shoeman R, et al. Intermediate filaments reconstituted from vimentin, desmin, and glial fibrillary acidic protein selectively bind repetitive and mobile DNA sequences from a mixture of mouse genomic DNA fragments. *DNA Cell Biol*, 2000, 19 (11): 647-677.
- 8 Marchetti F, Coleman MA, Jones IM, et al. Candidate protein biosimulators of human exposure to ionizing radiation. *Int J Radiat Biol*, 2006, 82(9): 605-639.
- 9 Passey RJ, Xu K, Hume DA, et al. S100A8: emerging functions and regulation. *J Leukoc Biol*, 1999, 66(4): 549-556.
- 10 Grimbaldston MA, Geczy CL, Tedla N, et al. S100A8 induction in keratinocytes by ultraviolet A irradiation is dependent on reactive oxygen intermediates. *J Invest Dermatol*, 2003, 121(5): 1168-1174.
- 11 Slassen T, Port M, Nuyken I, et al. Radiation-induced gene expression in MCF-7 cells. *Int J Radiat Biol*, 2003, 79(5): 319-331.
- 12 Park EC, Yoon JB, Seong JS, et al. Effect of ionizing radiation on rat tissue: Proteomic and biochemical analysis. *Prep Biochem Biotechnol*, 2006, 36(1):19-35.

(收稿日期:2007-04-06)