

·放射生物学·

不同剂量⁶⁰Co γ射线照射正常人淋巴母细胞后的 差异表达基因分析

肖瑶 杨剑 高娴 秦阳华 孙顶 韩玲

【摘要】目的 研究不同剂量γ射线照射正常人淋巴母细胞 AHH-1 的基因差异表达, 探讨生物学效应的差异。**方法** ⁶⁰Coγ射线照射 AHH-1, 用人 cDNA 芯片检测照射后 8 h AHH-1 细胞和正常细胞 mRNA 表达, 将芯片分析数据进行聚类分析、判别比较, 筛选差异表达基因。**结果** 数据分析筛选后, 仅与 2.0 Gy 照射关系密切的差异表达基因 23 个; 仅在 0.5 Gy 照射中变化的基因 5 个; 2.0 Gy 与 0.5 Gy 两组比较变化一致的基因有 5 个。**结论** 不同剂量γ射线照射 AHH-1 诱导明显的基因差异表达, 其中部分基因表达的改变可能是辐射生物效应发生的关键因素。

【关键词】 剂量效应关系, 辐射; 基因表达谱; 淋巴母细胞

Different gene expression of normal lymphoblastoid cells which exposure to different dose of ⁶⁰Co γ-ray

XIAO Yao, YANG Jian, Gao Xian, QIN Yang-hua, SUN Ding, HAN Ling

(Department of Radiation Medicine in Navy Medicine Faculty, the Second Military Medical University, Shanghai 200433, China)

【Abstract】Objective To study on the gene expression of normal lymphoblastoid cells(AHH-1) which exposure to difference dose of ⁶⁰Co γ-ray, analyses the essential different biological effect. **Methods** Human AHH-1 normal line was irradiated by ⁶⁰Co γ-rays. Used human cDNA microarray to develop the transcriptional levels of the genes by hybridizing the mRNA of cells 8 h after exposed in different dose and the control cells. Cluster analysis, discrimination and bolting were used to filter the effective genes of differential expression. **Results** The results of data analysis showed 23 genes of differential expression closely related to biological effect of 2.0 Gy radiation, 5 genes express changed only by 0.5 Gy radiation, 5 genes express apparently both in 2.0 Gy and 0.5 Gy radiation. **Conclusion** The different dose γ-rays radiation-induced significant changes in gene expression, such as PAPLN, TP53INP1, PTENP1, FOS and TPR seem to be some important components of cellular radioresponse.

【Key words】 Dose-response relationship, radiation; Gene expression profiling; Lymphoblastoid cells

电离辐射是一把双刃剑, 在得到广泛应用的同时又会对人体组织产生危害。由于人体是一个极为复杂的有机体, 至今在辐射效应方面仍有许多问题尚不清楚, 比如致癌机制等。近年来辐射生物学方面的研究显示, 电离辐射能直接或间接上调或下调部分参与调控细胞辐射反应的基因表达, 这些基因在生命体的生理病理过程中起着重要作用。但是目前已经明确作用机制的与细胞辐射反应过程有关的基因及蛋白只有很少一部分, 而且大多是一些已知

基因。另外, 研究者已发现高、低剂量辐射产生的生物学效应机制不尽相同, 它们的区别和联系究竟在哪里? 哪些基因在辐射反应中发挥了重要作用? 为了系统地认识电离辐射对人体的影响, 进一步明确电离辐射生物学效应的机制, 就必须采取更准确、更便捷的高通量技术手段来分析研究, 最近发展起来的基因芯片技术就是最佳选择之一。本研究用人 cDNA 芯片检测不同剂量照射细胞和正常细胞的 mRNA 表达, 并应用生物信息学的方法, 通过差异基因表达分析、聚类分析、判别分析等对芯片数据进行筛选, 从大量的数据中提取出有意义的信息, 探讨不同剂量照射后生物学效应分子机制。

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(10575130)

作者单位: 200433 上海, 第二军医大学海军医学系放射医学教研室

通讯作者: 韩玲(E-mail:linghan8888@yahoo.com.cn)

1 材料和方法

1.1 主要材料

正常人淋巴瘤细胞 AHH-1 由军事医学科学院馈赠。含 10% 灭活的胎牛血清的 DMEM 培养液购于 Gibco 公司。总 RNA 抽提试剂 Trizol 由美国 invitrogen 公司提供。Affymetrix HG-133A plus 2.0 芯片由上海基因有限公司(上海)制备。芯片数据基因聚类、分析使用 Microsoft excel 软件, Expressions2go、Affymetrix、NCBI、EBI.ac.uk 等为 Internet 免费资源网站上的在线软件和数据库。

1.2 方法

1.2.1 芯片制备

吸收剂量为 0.5 Gy 和 2.0 Gy ^{60}Co 射线, 分别照射 AHH-1 (未经照射为对照组), 照射剂量率为 0.36 Gy/min。照射后 8 h 按 Trizol 试剂盒说明书的常规方法提取总 RNA, 得到的总 RNA 用分光光度计测定其浓度和纯度, 取总 RNA 1 μg 在 1% 甲醛-琼脂糖凝胶中电泳检测 RNA 的完整性。总 RNA 纯化后合成双链 cDNA 和 cRNA, 将 cRNA 片段化并用变性胶电泳进行质检, 确保片段化 cRNA 为 35~200 bp。先将测试芯片在 Genechip hybridization oven 640 芯片杂交箱中预杂交 10 min, 再将片段化的 cRNA 样本与含有 38 000 个人源基因的 cDNA 探针杂交。在 Genechip fluidics station 450 全自动芯片洗脱工作站上运行洗脱程序, Gene Array™ scanner 3000 高分辨率扫描仪上扫描芯片^[1], 应用 GCOS 软件对扫描的数据进行分析, 然后应用 Normalization 方法处理, 将数据用 Lowess 方法进行归一化, 最后以照射组与对照组同一基因点信号强度的比值的对数 (ratio 值) 的标准确定差异表达基因。

1.2.2 数据分析

本实验采用 Affymetrix HG-133A plus 2.0 芯片, 其覆盖了人类全部表达基因的 1/2。在数据分析时, 原始数据首先筛选掉信号强度值过小以及数值归一化后 $P>0.05$ 的数据^[2]; 使用在线软件工具进行聚类, 在生物信息数据库中搜索基因信息; 与聚类前的数据进行比较, 从数据中筛选出差异表达显著的 [即上调或下调比率大于 2 (ratio>1)] 的具有统计学和生物学意义的基因; 最后针对有意义的基因搜索数据库, 查找重要基因的功能以及基因间的相互

作用和联系。

2 结果

2.1 RNA 完整性检测

与正常对照 AHH-1 比较, 2.0 Gy 和 0.5 Gy 照射后的 AHH-1 样品中 28s 和 18s RNA 比例合适, 无降解现象 (见图 1)。

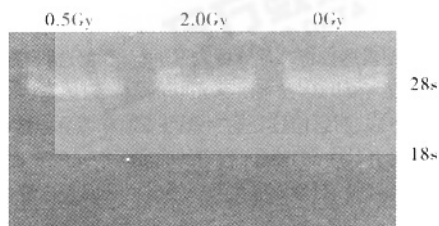


图 1 不同剂量照射 AHH-1 细胞后总 RNA 琼脂糖凝胶电泳结果

2.2 基因芯片的分析结果

通过初步分析筛选, 2.0 Gy 和 0.5 Gy 与正常 AHH-1 基因表达谱比较, 2.0 Gy 与 0.5 Gy 照射细胞差异表达基因筛选结果见表 1。

表 1 2.0 Gy 和 0.5 Gy 照射 AHH-1 后芯片检测基因差异表达的结果

	上调基因数	下调基因数	合计
2.0Gy vs 对照	50	2	52
0.5Gy vs 对照	6	6	12
2.0Gy vs 0.5Gy	64	6	70

从各组数据中可以看出各组间数据间重复率较高, 为了进一步的分析和提取信息, 对数据采用 excel 函数计算分析, 用聚类分析软件进行聚类, 发现这些差异表达的基因中, 细胞膜、细胞连接和转运相关类别占了绝大部分, 同时它们参与了转录、翻译、细胞周期、离子转运、细胞凋亡、氧化还原、氧化磷酸化等反应。芯片结果假阳性数据筛去后相对可靠, 分析结果有较高的可信度, 并可以进一步挖掘深层信息。

表 2 中列出了 5 个在 2.0 Gy 照射组和 0.5 Gy 照射组中均明显变化的基因, 它们的变化趋势一致, 其中有 4 个基因上调, 1 个下调。推测它们可能与照射剂量大小无关, 仅与照射有关。其中 Bcl2 相关蛋白 X 基因表达细胞凋亡抑制蛋白, 很多文献报道在照射后该抑制蛋白上调^[3], 在我们的数据中也均上调。

表3列出了23个2.0 Gy照射组分别与对照组和0.5 Gy照射组比较同时变化的基因,说明这些基因仅在2.0 Gy照射后表达才发生变化,在0.5 Gy照射组与对照组比较无明显改变,因此很可能与辐射剂量效应相关,其中包括一个cDNA克隆(Affy探针号:230304_at)和一个功能未知基因(Affy探针号:215450_at)。

虽然表3中的基因上调与下调的规律是一致的,但是观察到它们的表达比值并不完全相同,这有可能是实验中的误差引起,但在后面的表格数据资料表明,这些细微变化并非可以忽略。

表4中列出了5个2.0 Gy照射组与0.5 Gy照射组比较和0.5 Gy照射组与对照组比较中均明显变化的基因,并且结果显示,它们的变化趋势并不

一致,甚至完全相反。这些基因与表2和表3中的数据均没有重合,并且这5个基因都是如此,推测它们仅在0.5 Gy照射后表达改变;也有可能高剂量使得基因的表达变化正好相反,但是表4中的基因表达变化比值是一致的,在原始数据中也都是一致的,且这5个基因在2.0 Gy照射后无明显变化,那么只能得出一个结论:这些基因只在低剂量照射后表达明显改变。

3 讨论

通过比较和分析2.0 Gy和0.5 Gy γ射线照射AHH-1细胞诱导的差异表达基因,从大量的芯片数据中获取了一些比较有意义的信息,找到了5个2.0 Gy和0.5 Gy照射后同时变化的基因,其中Bcl-2

表2 2.0 Gy和0.5 Gy照射AHH-1细胞后同时变化的基因

Affy 探针号	基因简称	比值*		基因全称
		2.0 Gy vs 对照	0.5 Gy vs 对照	
226435_at	PAPLN	1.8	1.4	papilin, 原肠(胚)形成糖蛋白
1566147_a_at	LOC375010	1.6	1	假定蛋白 LOC375010
237737_at	LOC401131	1.6	1	假定蛋白 LOC401131
208478_s_at	BAX	1	1.1	Bcl2 相关蛋白 X
1564069_at	-**	-1	-1.4	cDNA FLJ36668 fis, 克隆号 UTERU2003926

*: 比值为负表示下调; **: “-”为未知。

表3 仅在2.0 Gy照射AHH-1细胞后表达变化的基因*

Affy 探针号	基因简称	比值		基因全称
		2.0 Gy vs 对照	2.0 Gy vs 0.5 Gy	
225912_at	TP53INP1	2	1.3	肿瘤蛋白 p53 可诱导的核内蛋白
231534_at	CDC2	1.9	2.1	细胞分裂周期蛋白 2, G ₁ -S 期和 G ₂ -M
217494_s_at	PTENP1	1.8	1.7	磷酸酶和张力蛋白同系物(在大部分肿瘤细胞中突变), 假基因 1
222487_s_at	RPS27L	1.7	1.5	核糖体蛋白 S27 相似的
206942_s_at	PMCH	1.5	1.5	原黑色素-治疗激素
202838_at	FUCA1	1.3	1	岩藻糖苷酶, alpha-L-1, 组织
213868_s_at	DHRS7	1.3	2	脱氢/还原酶成员 7
228881_at	PARL	1.2	1.9	早老素相关类似菱形蛋白
1553749_at	FAM76B	1.1	1.7	家族序列相似蛋白 76, 成员 B
202028_s_at	RPL38	1.1	1.5	核糖体蛋白 L38
214056_at	MCL1	1.1	1.5	骨髓细胞白血病毒序列 1(Bcl2-相关)
217383_at	PGK1	1.1	1.2	磷酸甘油酸酯激酶 1
221943_x_at	RPL38	1.1	1.6	核糖体蛋白 L38
221960_s_at	RAB2	1.1	2	Rab2, ras 癌基因家族
223925_s_at	MTPN	1.1	1.2	重组胰岛素样生长因子
213087_s_at	EEF1D	1	1.4	真核转录延长因子 1 [鸟(嘌呤核) 苷酸置换蛋白]
213813_x_at	FTL	1	1.3	铁蛋白, 轻多肽
215450_at	-**	1	1.7	-
216450_x_at	HSP90B1	1	1.3	热休克蛋白 90 β (Grp94) 成员 1
216504_s_at	SLC39A8	1	1.1	溶质携带者家族 39(锌运载体), 成员 8
234347_s_at	DENR	1	1.4	密度调节蛋白
230304_at	-	-1.4	-1	cDNA 克隆 IMAGE:30332316
206110_at	HIST1H3H	-1	-1.1	组蛋白 1, H3h

*: 这些基因在0.5 Gy照射组和对照组比较无明显改变, 比值为负表示下调; **: “-”为未知。

表4 仅在0.5 Gy照射AHH-1细胞后表达变化的基因*

Affy 探针号	基因简称	比值**		基因全称
		2.0 Gy vs 0.5 Gy	0.5 Gy vs 对照	
208844_at	VDAC3	1.5	-1.2	电压门控离子通道3
209189_at	FOS	1.1	-1.2	v-fos FBJ 鼠骨肉瘤癌基因同系物
215220_s_at	TPR	1.0	-1	易位的启动子区域 (激活 MET 癌基因)
205594_at	ZNF652	-1.4	1.2	锌指蛋白652
211767_at	GINS4	-1.2	1.3	GINS 复合物亚单元4(Sld5 同系物)

*: 这些基因在受到2.0 Gy照射时变化均不明显; **: 比值为负表示下调。

相关蛋白 X 基因在以往的研究中已证明它与辐射致癌有着密切的关系^[4], 其余4个基因目前未见与辐射相关的文献报道, 有待深入研究。Kramerova 等^[5]发现, 细胞外原肠(胚)糖蛋白形成基因可能在细胞发育过程中通过调节金属蛋白酶而参与细胞重排。

另外, 在排除低剂量照射对AHH-1产生的影响后, 23个基因(见表3)仅在受到较高剂量照射时才发生明显变化, 推测对较高剂量照射引起的生物效应机制的研究可以重点着手于这些基因。Okamura 等^[6]研究发现, 肿瘤蛋白 p53 诱导的核蛋白1基因在有丝分裂细胞中参与调节了 p53 诱导的细胞凋亡过程。Tomasini 等^[7]发现, 肿瘤蛋白 p53 诱导的核蛋白1基因的过表达导致 G₁ 期终止, 促进细胞的凋亡。磷酸酶和张力蛋白磷酸酶同系物基因是1997年发现的抑癌基因, 其拮抗酪氨酸激酶等磷酸化酶的活性而抑制肿瘤的发生、发展。Dahia 等^[8]发现, 磷酸酶和张力蛋白同系物基因/磷酸酶和张力蛋白同系物假基因1复合基因编码双特异性磷酸酶, 在一种常染色体显性综合征考登病中表达突变。

按照传统观点, 辐射导致基因表达变化应该是随着剂量改变呈现递进性的关系, 可是表4数据并不符合这一关系, 这5个基因数据提示我们, 一些基因只受低剂量辐射影响或者只在低剂量辐射反应中发挥作用, 较高剂量照射对它们几乎没有影响。这可能是存在一些非随机的变化导致细胞产生一种不稳定的现象, 或者是对外界刺激的适应性现象。锌指蛋白652基因表达锌指蛋白家族652号蛋白, 其功能不详, 但在我们的芯片中重复出现并表达下调明显。易位的启动子区域基因表达染色体的易位启动子, 能够激活 MET 癌基因(一种表达肝细胞生长因子受体蛋白激酶的基因), 在体外丝氨酸和苏氨酸残基均需要磷酸化激活, 是一种受体型的跨膜蛋白(质)酪氨酸激酶。Greco 等^[9]发现, 甲状腺癌的原癌基因的酪氨酸激酶区可由易位的启动子区域

基因的5'端重排后形成, 将两基因融合后可形成一个新的乳头状甲状腺癌基因。Hase 等^[10]发现, 在有丝分裂细胞分裂末期易位的启动子区域基因与核膜孔复合体相互作用。Krull 等^[11]在人子宫颈腺癌传代细胞系中发现, 易位的启动子区域基因在核孔蛋白中构成了核内篮状结构的支架。v-fos FBJ 鼠骨肉瘤癌基因同系物 (v-fos FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog, FOS) 为原癌基因 FOS 家族一员。Tratner 等^[12]发现, 细胞受到刺激时 FOS 蛋白早期表达可调节 RNA 转录, FOS 蛋白可被环磷酸腺苷激酶磷酸化。Liu 等^[13]发现, 通过 FOS 的 siRNA 阻断转化生长因子 β1 分泌, 可以抑制癌细胞的迁移和分裂。Zhang 等^[14]发现, FOS 促进可卡因与大脑中 D1 神经受体相互作用, 使其易发生持久的反应。Sasaki 等^[15]发现, 持久的细胞外信号调节激酶5的活动抑制了 FOS, E3 泛素连接酶调节了 FOS 的核输出量。综合以上分析表明, 这些低剂量辐射引起的差异表达基因与癌基因表达、肿瘤发生有关, 这为解释低剂量辐射效应及致癌机制提供了一些有利的证据。

参 考 文 献

- [1] Yang K, Cai Z, Li J, et al. A stable gene selection in microarray data analysis[J]. BMC Bioinformatics, 2006, 7: 228.
- [2] Albanesea J, Martensa K, Karkanitesa LV, et al. Multivariate analysis of low-dose radiation-associated changes in cytokine gene expression profiles using microarray technology[J]. Exp Hematol, 2007, 35(4Suppl1): 47-54.
- [3] Chaudhry MA. Bystander effect: Biological endpoints and microarray analysis[J]. Mutat Res, 2006, 597(1-2): 98-112.
- [4] Lindsay KJ, Coates PJ, Lorimore SA, et al. The genetic basis of tissue responses to ionizing radiation [J]. Br J Radiol, 2007, 80 (Spec1): S2-S6.
- [5] Kramerova IA, Kawaguchi N, Fessler LI, et al. Papilin in development: a pericellular protein with a homology to the ADAMTS metalloproteinases[J]. Development, 2000, 127(24): 5475-5485.
- [6] Okamura S, Arakawa H, Tanaka T, et al. p53-inducible gene, regulates p53-dependent apoptosis [J]. Mol Cell, 2001, 8 (1): 85-94.

- [7] Tomasini R, Samir AA, Carrier A, et al. TP53INP1s and homeodomain-interacting protein kinase-2(HIPK2) are partners in regulating p53 activity[J]. J Biol Chem, 2003, 278(39): 37722-37729.
- [8] Dahia PL, FitzGerald MG, Zhang X, et al. A highly conserved processed PTEN pseudogene is located on chromosome band 9p21 [J]. Oncogene, 1998, 16(18): 2403-2406.
- [9] Greco A, Pierotti MA, Bongarzone I, et al. TRK-T1 is a novel oncogene formed by the fusion of TPR and TRK genes in human papillary thyroid carcinomas[J]. Oncogene. 1992, 7(2): 237-242.
- [10] Hase ME, Cordes VC. Direct interaction with nup153 mediates binding of Tpr to the periphery of the nuclear pore complex[J]. Mol Biol Cell, 2003, 14(5): 1923-1940.
- [11] Krull S, Thyberg J, Björkroth B, et al. Nucleoporing as components of the nuclear pore complex core structure and Tpr as the architectural element of the nuclear basket [J]. Mol Biol Cells. 2004, 15(9): 4261-4277.
- [12] Tratner I, Ofir R, Verma IM. Alteration of a cyclic AMP-dependent protein kinase phosphorylation site in the c-FOS protein augments its transforming potential [J]. Mol Cell Biol. 1992, 12(3): 998-1006.
- [13] Liu G, Ding W, Liu X, et al. c-Fos is required for TGF-beta1 production and the associated paracrine migratory effects of human colon carcinoma cells[J]. Mol Carcinog, 2006, 45(8): 582-593.
- [14] Zhang J, Zhang L, Jiao H, et al. c-FOS facilitates the acquisition and extinction of cocaine-induced persistent changes [J]. J Neurosci, 2006, 26(51): 13287-13296.
- [15] Sasaki T, Kojima H, Kishimoto R, et al. Spatiotemporal regulation of c-FOS by ERK5 and the E3 ubiquitin ligase UBR1, and its biological role[J]. Mol Cell, 2006, 24(1): 63-75.

(收稿日期: 2007-09-01)

聚腺苷二磷酸核糖聚合酶抑制剂的作用机制和应用前景

黄晓菲 曹建平

【摘要】聚腺苷二磷酸核糖聚合酶家族由众多调控细胞进程的酶组成,其参与人体内多种生理及病理生理过程。近些年,人们对此酶及其抑制剂进行了广泛的研究,其中侧重于聚腺苷二磷酸核糖聚合酶抑制剂在辐射增敏、化学药物增敏、神经保护等方面所发挥的作用。现已有聚腺苷二磷酸核糖聚合酶抑制剂进入临床药物试验,预示其具有良好的应用前景。

【关键词】辐射耐受性; 药物耐受性; 聚腺苷二磷酸核糖聚合酶抑制剂

The mechanism of action of poly (ADP-ribose) polymerases inhibitors and its application perspective

HUANG Xiao-fei, CAO Jian-ping

(Department of Radiation Biology, School of Radiation Medicine and Public Health, Soochow University, Suzhou 215123, China)

【Abstract】 Poly (ADP-ribose) polymerases (PARP) constitute a family of enzymes involved in the regulation of many cellular processes. It plays a vital role in many physical and physiopathological processes. In the past ten years scientists have conducted extensive research on PARP and its inhibitors, among which the role of PARP inhibitors in radiosensitization, chemopotential and neuroprotection have been placed close attention. There have been several PARP inhibitors entering the clinical trials, which predicts its sound application perspectives.

【Key words】 Raditolerance; Drug tolerance; Poly(ADP-ribose)polymerase inhibitor

聚腺苷二磷酸核糖聚合酶[poly (adenosine diphosphate-ribose) polymerase, PARP]是一类存在

作者单位: 215123, 苏州大学放射医学与公共卫生学院放射生物教研室

通讯作者: 曹建平(E-mail: jpciao@suda.edu.cn)

于所有哺乳动物细胞及大部分真核生物细胞中的蛋白翻译后修饰酶,可被断裂的DNA链激活,并利用烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(nicotinamide adenine dinucleotide, NAD⁺)把腺苷二磷酸核糖转移到蛋白