

基因芯片表达分析 4 Gy γ 射线对小鼠骨髓 c-kit 阳性细胞影响

张俊伶 路璐 李德冠 孟爱民

【摘要】目的 利用基因芯片技术分析经 4 Gy γ 射线照射后 c-kit(CD117, 正常表达于干祖细胞表面的细胞因子受体) 阳性细胞与代谢过程相关的基因及信号通路表达变化。**方法** 利用磁珠分选系统分选出骨髓 c-kit 阳性细胞。实验分为对照组、4 Gy 照射组。取 1×10^6 个 c-kit 阳性细胞进行照射, 照射剂量率为 0.99 Gy/min。照射后将细胞培养 18 h 后取出, 进行全基因组的高通量基因芯片检测, 并进行 Gene Ontology 聚类分析和 Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes 信号通路分析。**结果** 4 Gy γ 射线照射引起 c-kit 阳性细胞包括 Pld5、Neu2、Bpgm、Alas2、Sat1、Rdh16、Mccc1、Sat2、Smug1、Cml5、Adhfe1、Idh3a、Slc27a5 在内的 13 个基因表达上调 3 倍以上, 包括 Accs2、Phgdh、Psat1、Glb1、Gpam、Dus3l、Fuca2、Impdh1、Dlat、Glb1、Enpp4、Prim2、Mettl10、Slc27a2、Dera、Qdpr、Dus1l、Cdy12、Dhodh、Srr、Spr、Mical2 在内的 22 个基因表达下调 3 倍以上, 这些基因主要参与嘌呤代谢、嘧啶代谢、三羧酸循环等信号通路。**结论** 4 Gy γ 射线照射能引起 c-kit 阳性细胞中与代谢过程相关的许多基因表达发生变化, 这些变化的基因有待进一步的实验验证。

【关键词】 原癌基因蛋白质 c-kit; 寡核苷酸序列分析; 辐射, 电离; 细胞代谢

Expression changes of genes in c-kit positive cells after 4 Gy γ -ray irradiation: a gene chip analysis Zhang Junling, Lu Lu, Li Deguan, Meng Aimin. Tianjin Key Laboratory of Radiation Medicine and Molecular Nuclear Medicine, Institute of Radiation Medicine, Chinese Academy of Medical Sciences, Tianjin 300192, China

Corresponding author: Meng Aimin, Email: ai_min_meng@126.com

【Abstract】Objective To analyze the metabolic process-related genes and pathway variations in the c-kit (CD117, a cytokine receptor expressed on the surface of hematopoietic stem cells) positive cells after 4 Gy irradiation by using gene chip technology. **Methods** c-kit positive cells were sorted by microbead separation system. Two groups were involved: control group and 4 Gy irradiation group. A total of 1×10^6 c-kit positive cells received 4 Gy irradiation at a dose rate of 0.99 Gy/min. After the two groups were cultured for 18 h, all the cells were collected and detected by gene chip arrays. Data were processed and analyzed via Gene Ontology and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes pathways. **Results** After 4 Gy γ -ray irradiation, 13 metabolic process-related genes were up-regulated more than 3 times: Pld5, Neu2, Bpgm, Alas2, Sat1, Rdh16, Mccc1, Sat2, Smug1, Cml5, Adhfe1, Idh3a, and Slc27a5. Additionally, 22 genes were down-regulated more than 3 times: Accs2, Phgdh, Psat1, Glb1, Gpam, Dus3l, Fuca2, Impdh1, Dlat, Glb1, Enpp4, Prim2, Mettl10, Slc27a2, Dera, Qdpr, Dus1l, Cdy12, Dhodh, Srr, Spr, and Mical2. These genes were involved in pyrimidine metabolism, purine metabolism, and citrate cycle (TCA cycle) pathways. **Conclusion** Many variations of genes and pathways in c-kit positive cells existed after 4 Gy irradiation. However, further laboratory technology is required to confirm these variations.

DOI: 10.3760/cma.j.issn.1673-4114.2015.02.003

基金项目: 国家自然科学基金海外合作基金项目(81129020); 国家重点基础研究发展计划(“973”项目)重大专项(2011CB964800-G); 国家自然科学基金面上项目(81372928); 国家自然科学基金青年项目(81402633); 协和青年基金资助和中央高校基本科研业务费专项资金资助项目(33320140033)

作者单位: 300192, 中国医学科学院放射医学研究所, 天津市放射医学与分子核医学重点实验室

通信作者: 孟爱民(Email: ai_min_meng@126.com)

【Key words】 Proto-oncogene proteins c-kit; Oligonucleotide array sequence analysis; Radiation, ionizing; Metabolic process

电离辐射能够引起造血系统损伤,包括急性骨髓抑制和持久性骨髓损伤,前者主要是快速增殖的造血祖细胞(hematopoietic progenitor cell, HPC)损伤所致,后者主要是由于电离辐射引起的造血干细胞(hematopoietic stem cell, HSC)损伤所致。已有的研究显示,电离辐射引起HSC和HPC损伤的机制主要是细胞内活性氧升高激活下游一系列信号通路,最终引起造血系统急性损伤和HSC、HPC衰老^[1]。应用系列抗氧化剂能够部分缓解电离辐射引起的造血干祖细胞损伤。细胞内活性氧水平升高同样引起细胞代谢发生变化^[2],细胞代谢是近年研究的热点,也是细胞最基本、最重要的活动之一。代谢通路在肿瘤的发生发展、糖尿病、衰老等病理生理过程中发挥着重要作用^[3-5],然而在电离辐射引起造血系统损伤中的作用却少有研究。c-kit又称为CD117,是正常表达于干祖细胞表面的细胞因子受体。c-kit阳性细胞是一群经过富集的富含HPC和HSC的一类细胞,利用磁珠分选系统能在短时间内快速分选出大量的c-kit阳性细胞,对c-kit阳性细胞电离辐射损伤的研究能够初步反映HPC和HSC的损伤情况。因此,本研究以c-kit阳性细胞为对象,利用基因表达谱芯片技术筛选出经4 Gy γ 射线照射后在代谢过程中表达发生变化的基因,并分析这些基因的性质和功能,为寻找电离辐射引起造血系统损伤的分子机制奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试剂与仪器

无血清扩增培养基 SFEM 购自美国 Stem Cell Technologies 公司; c-kit 磁珠和磁珠分选柱购自德国美天旎公司; ¹³⁷Cs γ 射线辐射源(型号 USD, Autocell40)购自加拿大原子能有限公司。

1.2 实验动物

无特定病原体级 C57BL/6 雄性小鼠 10 只, 体质量 21~23 g, 8~10 周龄, 购自中国北京维通利华实验动物有限公司, 合格证号 SCXK(京)2012-0001。小鼠饲养于我所实验动物中心。

1.3 c-kit 阳性细胞分离

无菌分离小鼠双侧股骨胫骨, 去除表面附着肌

肉, 将全部股骨胫骨放入研钵内, 轻轻研磨直至骨髓细胞完全释放, 裂解红细胞后对获取的细胞进行计数。按照每 1×10^8 个细胞加入 20 μ l 的 c-kit 磁珠, 室温孵育 15 min, 孵育结束后加入 5 ml PBS, 以离心半径 25 cm, 1500 r/min, 离心 5 min。离心完毕用 10 ml PBS 重悬细胞, 利用磁珠分选系统进行 c-kit 阳性细胞分离^[6]。

1.4 实验分组

实验分为 2 组, 其中, 对照组: 取含 1×10^7 个 c-kit 阳性细胞的悬液 1 ml 加入至 2 ml 离心管内, 作为未照射对照组; 4 Gy 照射组: 在对照组基础上进行 4 Gy γ 射线照射。每组设置 6 个平行孔。

1.5 基因芯片表达谱分析

照射组细胞照射后在 37 $^{\circ}$ C、5%CO₂ 培养箱中培养 18 h, 之后取出, 以离心半径 25 cm, 1500 r/min, 离心 5 min 后弃上清。加入 1 ml 体积的 Trizol 试剂, 交由上海康成生物工程有限公司进行全基因组的基因芯片分析后, 再进行 Gene Ontology(GO)聚类分析和 Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG)信号通路分析。

1.6 统计学方法

差异表达上调及下调 3 倍以上的参与代谢过程的基因带入 KEGG 数据库进行信号通路分析, 结果采用 Fisher 精确检验进行统计学分析, 以 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 基因表达芯片散点图

在基因表达芯片散点图上, 每个点代表 1 个基因探针, X 轴表示对照组 c-kit 阳性细胞信号强度, Y 轴表示照射组 c-kit 阳性细胞信号强度。散点图中共有 3 条斜线, 最上端的斜线代表上调超过 2 倍的差异基因, 最下端的斜线代表下调超过 2 倍的差异基因, 由图 1 可见, 电离辐射引起 c-kit 阳性细胞的许多基因的表达发生显著改变。

2.2 电离辐射诱导与代谢过程相关的表达上调 3 倍以上的基因

GO 聚类分析结果显示, 与对照组比较, 照射组经 4 Gy γ 射线照射后参与代谢过程(GO 通

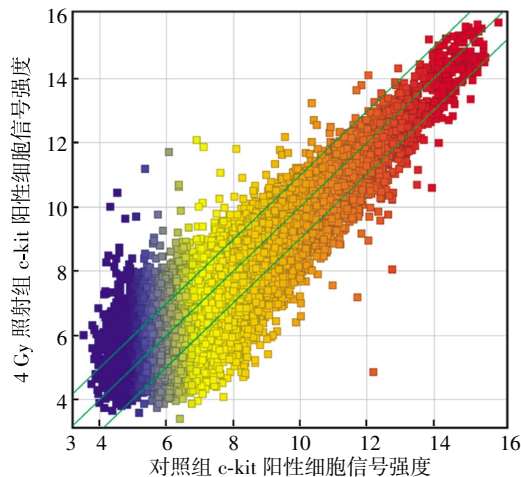


图1 c-kit 阳性细胞基因表达谱芯片杂交信号散点图

Fig.1 Scatter plots for hybridization signals by gene expression in c-kit positive cells

路编号: 0008152) 的差异表达基因中, 62 个基因表达上调 2 倍以上, 其中 13 个基因表达上调 3 倍以上(表 1)。

2.3 电离辐射诱导与代谢过程相关的表达下调 3 倍以上的基因

GO 聚类分析结果显示, 与对照组比较, 照射组经 4 Gy γ 射线照射后参与代谢过程(GO 通路编号: 0008152)的差异表达基因中, 89 个基因表达下调 2 倍以上, 其中 22 个基因表达下调 3 倍以上(表 2)。

2.4 电离辐射诱导的差异表达基因所在信号通路分析

将上述差异表达上调及下调 3 倍以上的参与代谢过程的基因带入 KEGG 数据库进行信号通路分析(Fisher 精确检验, $P < 0.05$), 涉及 8 条信号通路(表 3)。

3 讨论

电离辐射能够引起骨髓 HSC 损伤, 已有研究显示, 引起损伤的机制主要包括以下几方面: ①通过 p53-p53 up-regulated modulator of apoptosis(puma) 途径引起 HSC 凋亡; ②通过激活 Granulocyte colony-stimulating factor/Signal transducers and activators of transcription 3/basic leucine zipper transcription factor (G-CSF/Stat3/BATF) 依赖的分化调控点促进 HSC 分化; ③通过 Reactive oxygen species-p38 mitogen-activated protein kinase(ROS-p38MAPK)途径诱导 HSC 衰老; ④HSC 微环境损伤导致其损伤^[7]。然而, 应用以上各种信号通路激活剂或抑制剂不能完全缓解电离辐射引起的 HSC 损伤, 因此需要对电离辐射引起的其他信号通路变化进行深入研究。细胞代谢是细胞生命活动的重要形式之一, 主要包括糖代谢、脂质代谢、线粒体和三羧酸循环代谢、

表 1 4 Gy γ 射线照射后与代谢过程相关的表达上调 3 倍以上的基因

Table 1 Metabolic process related genes up-regulated more than 3 times after 4 Gy γ -ray irradiation

基因名称	中文全称	英文全称	基因序列号	变化倍数
Pld5	磷脂酶 D5	phospholipase D5	AK082725	5.045
Neu2	细胞质唾液酸酶	neuraminidase2	AF139059	4.683
Bpgm	2, 3-二磷酸甘油酸变位酶	2, 3-bisphosphoglycerate mutase	BC004589	4.527
Alas2	红细胞氨基乙酰丙酸合成酶 2	aminolevulinic acid synthase 2, erythroid	NM_001102446	3.888
Sat1	精胺 N1 乙酰转移酶样蛋白 1	spermine N1-acetyl transferase-like 1	XM_136025	3.343
Rdh16	视黄醇脱氢酶 16	retinol dehydrogenase 16	BC089612	3.325
Mccc1	甲基丁烯酰辅酶 A 羧化酶 1	methylcrotonoyl-Coenzyme A carboxylase 1	AK160184	3.313
Sat2	精胺 N1 乙酰转移酶 2	spermine N1-acetyl transferase 2	BC061227	3.254
Smug1	单链选择性单功能的尿嘧啶 DNA 糖基化酶	Single-strand selective monofunctional uracil DNA glycosylase	AK204061	3.240
Cml5	-	camello-like 5	BC024605	3.224
Adhfe1	含铁乙醛脱氢酶 1	alcohol dehydrogenase, iron containing, 1	AK050178	3.084
Idh3 α	异柠檬酸脱氢酶 3 α	isocitrate dehydrogenase 3(NAD+) alpha	AK146717	3.034
Slc27a5	溶质运载蛋白 27 号家族(脂肪酸运输)成员 5	solute carrier family 27(fatty acid transporter), member 5	BC145823	3.010

注: 表中, “-” 表示未查到此项。

表 2 4 Gy γ 射线照射后与代谢过程相关的表达下调 3 倍以上的基因

Table 2 Metabolic process related genes down-regulated more than 3 times after 4 Gy γ -ray irradiation

基因名称	中文全称	英文全称	基因序列号	变化倍数
Acss2	乙酰辅酶 A 合成酶短链家族成员 2	acyl-CoA synthetase short-chain family member 2	BC051432	5.076
Phgdh	3-磷酸甘油脱氢酶	3-phosphoglycerate dehydrogenase	BC086668	4.661
Psat1	磷酸丝氨酸转氨酶 1	phosphoserine aminotransferase 1	AK153093	4.525
Nat10	N-乙酰转移酶 10	N-acetyltransferase 10	BC034516	4.494
Glb1	β -半乳糖苷酶 1	galactosidase, beta 1	AK171760	4.295
Gpam	线粒体甘油三磷酸酰基转移酶	glycerol-3-phosphate acyltransferase, mitochondrial	BC019201	4.280
Dus3l	二氢尿嘧啶合成酶 3 样	dihydrouridine synthase 3-like	BC023942	4.187
Fuca2	岩藻糖苷酶类 2	fucosidase, alpha-L-2	AK163042	4.053
Impdh1	肌苷单磷酸脱氢酶 1	inosine 5'-monophosphate dehydrogenase 1	AK171139	3.898
Dlat	二氢硫辛酰胺 S 乙酰转移酶(丙酮酸脱氢酶 E2 组分)	dihydrolipoamide S-acetyltransferase(E2 component of pyruvate dehydrogenase complex)	BC031495	3.708
Enpp4	外核苷酸焦磷酸酶/磷酸二酯酶 4	ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase 4	AK157622	3.677
Prim2	DNA 引物酶, p58 亚基	DNA primase, p58 subunit	BC019500	3.649
Mettl10	甲基转移酶样 10	methyltransferase like 10	BC116375	3.638
Slc27a2	溶质运载蛋白 27 号家族成员 2	solute carrier family 27, member 2	BC013442	3.515
Dera	2-脱氧核糖-5-磷酸醛缩酶	2-deoxyribose-5-phosphate aldolase	BC016218	3.393
Qdpr	醌型二氢喋呤还原酶	quinoid dihydropteridine reductase	BC002107	3.385
Dus1l	二氢尿嘧啶核苷合成酶 1 样	dihydrouridine synthase 1-like	AK147967	3.251
Cdy12	染色体区域蛋白, Y 染色体 2	chromodomain protein, Y chromosome-like 2	NM_029441	3.192
Dhodh	二氢乳酸脱氢酶	dihydroorotate dehydrogenase	BC019542	3.155
Srr	丝氨酸消旋酶	serine racemase	BC011164	3.055
Spr	墨蝶呤还原酶	sepiapterin reductase	AK004941	3.046
Mical2	微管相关单氧酶, 钙调蛋白和 LIM 区域 2	microtubule associated monooxygenase, calponin and LIM domain containing 2	AK220353	3.035

表 3 差异表达基因的 KEGG 通路富集分析

Table 3 KEGG pathway enrichment analysis of differentially expressed genes

通路名称	涉及基因
嘌呤代谢	Impdh1, Prim2
嘧啶代谢	Prim2, Dhodh
初级胆汁酸生物合成	Slc27a5
真核生物核糖体合成	Nat10
柠檬酸循环(三羧酸循环)	Dlat
DNA 复制	Prim2
RNA 转运	Dhodh
mRNA 监测通路	Dhodh

注: 表中, KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes。

氧化还原代谢等代谢过程。成体干细胞通过代谢途径及信号通路为自我更新与定向分化等功能提供能

量, 从而实现细胞与周围环境信号及营养信号的相互应答, 维持机体的生命活动^[8]。由于以往研究很少涉及到电离辐射后 HSC 代谢通路发生的变化, 因此本研究利用高效基因芯片检测技术, 筛选出经 4 Gy γ 射线照射后的骨髓 c-kit 阳性细胞内发生表达变化的参与代谢过程的相关基因, 并分析这些基因参与的信号通路变化情况。0~10 Gy 的电离辐射主要引起造血系统损伤, 低于 3.5 Gy 的电离辐射主要引起成熟细胞及 HPC 等快速增殖细胞的损伤, 当骨髓细胞受到 4 Gy γ 射线照射后, HSC 及 HPC 均出现损伤^[7]。因此选用 4 Gy γ 射线照射剂量才能同时反映出造血干祖细胞的损伤情况。基因芯片技术能够同时、快速、准确地分析数以千计的基因组信息, 对所获取的信息进行分析后能够得到表

达发生变化的基因以及信号通路的很多有意义的信息,缩短了基因筛选的时间,提高了效率,具有重要的意义。本研究提示,与对照组比较,照射组经4 Gy γ 射线照射后差异表达基因共有6368个,差异表达2~3倍的上调基因比下调基因少740个,差异表达3倍以上的上调基因比下调基因少6个。经4 Gy γ 射线照射后,参与代谢过程的62个基因表达上调2倍以上,其中13个基因表达上调3倍以上;89个基因表达下调2倍以上,其中22个基因表达下调3倍以上。将这些表达上调及下调3倍以上的基因进行KEGG数据库的信号通路分析发现,表达上调3倍以上的基因Slc27a5参与到初级胆汁酸生物合成信号通路过程,表达下调3倍以上的基因Impdh1、Prim2、Dhohd、Dlat参与到嘌呤代谢、嘧啶代谢、三羧酸循环等代谢相关的信号通路, Nat10、Prim2、Dhohd基因参与到真核生物核糖体合成、DNA复制、RNA转运等细胞合成信号通路。说明受照射后的骨髓c-kit阳性细胞存在着代谢通路异常改变及DNA合成障碍。

综上所述,电离辐射能够引起很多代谢相关的基因及信号通路发生改变,本研究初步筛选出了这些尚未在辐射引起HSC损伤领域研究过的代谢相关基因,这一研究结果为探讨辐射引起HSC代谢变化的机制提供了思路。基因表达谱芯片分析是一种高通量的分析方法,具有高效、快速地获取大量基因表达变化信息的特点,在确定基因与基因间的相互关系,揭示疾病发生、发展的分子机制研究中起到了重要作用。然而,由于杂质、背景、实验操作等一系列人为因素的影响,确实会出现部分结果

假阳性的现象。可以通过增加平行样本及实验次数尽量减少假阳性结果的出现。针对出现的阳性结果,需要使用实时PCR及Western blot等方法进行mRNA水平和蛋白水平的验证,才能最终确定电离辐射引起了哪些代谢相关基因的变化,这也是笔者目前正在进行的一项重要工作。

参 考 文 献

- [1] Zhang H, Zhai Z, Wang Y, et al. Resveratrol ameliorates ionizing irradiation-induced long-term hematopoietic stem cell injury in mice [J]. *Free Radic Biol Med*, 2013, 54: 40-50.
- [2] Ghesquiere B, Wong BW, Kuchnio A, et al. Metabolism of stromal and immune cells in health and disease [J]. *Nature*, 2014, 511 (758): 167-176.
- [3] De Mas IM, Aguilar E, Jayaraman A, et al. Cancer cell metabolism as new targets for novel designed therapies [J]. *Future Med Chem*, 2014, 6(16): 1791-1810.
- [4] Yun JS, Ko SH. Avoiding or coping with severe hypoglycemia in patients with type 2 diabetes [J]. *Korean J Intern Med*, 2015, 30 (1): 6-16.
- [5] Kushiyama A, Tanaka K, Hara S, et al. Linking uric acid metabolism to diabetic complications [J]. *World J Diabetes*, 2014, 5 (6): 787-795.
- [6] Ema H, Morita Y, Yamazaki S, et al. Adult mouse hematopoietic stem cells: purification and single-cell assays [J]. *Nat Protoc*, 2006, 1(6): 2979-2987.
- [7] Shao L, Luo Y, Zhou D. Hematopoietic stem cell injury induced by ionizing radiation [J]. *Antioxid Redox Signal*, 2014, 20(9): 1447-1462.
- [8] Vacanti NM, Metallo CM. Exploring metabolic pathways that contribute to the stem cell phenotype [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2013, 1830(2): 2361-2369.

(收稿日期: 2015-01-21)