

核工业某厂放射工作人员与非放射工作人员的MDM2基因表达调查与分析

刘建功 党旭红 刘红艳 张忠新 段志凯 左雅慧

【摘要】目的 探讨核工业某厂放射工作人员与非放射工作人员辐射敏感基因表达的差异。**方法** 采集了3名健康人外周血进行⁶⁰Co γ 射线照射,建立辐照后鼠双微体基因2(MDM2)表达的剂量-效应关系,抽取核工业某厂96名工作人员(49名放射工作人员、47名非放射工作人员)外周血,利用实时荧光定量PCR技术检测放射工作人员外周血中MDM2基因的表达情况。**结果** 在0~2 Gy剂量范围内,MDM2的表达水平随照射剂量增加而上升。某厂96名工作人员外周血MDM2基因表达水平的检测分析结果表明,非放射工作人员年龄因素对外周血MDM2基因表达无影响($F=2.11, P>0.05$);放射工作人员外周血MDM2基因表达与非放射工作人员相比,差异具有统计学意义($t=7.78, P<0.05$)。**结论** 电离辐射可以诱导人离体外周血MDM2基因表达改变,且基因表达与照射剂量存在一定的剂量相关性,MDM2有望成为核工业放射工作人员健康调查的敏感指标。

【关键词】 辐射, 电离; 基因表达; 健康调查; MDM2基因; 外周血

Investigation and analysis of MDM2 expression level in radiation-exposed workers and non-radiation-exposed workers Liu Jianguo, Dang Xuhong, Liu Hongyan, Zhang Zhongxin, Duan Zhikai, Zuo Yahui. Division of radiological medicine, Institute of Radiation Medicine and Environmental Medicine, China Institute for Radiation Protection, Taiyuan 030006, China

Corresponding author: Duan Zhikai, Email: duanzhikai@cirp.org.cn

【Abstract】 Objective To investigate the difference of radiation-sensitive gene expression between radiation-exposed and non-radiation-exposed workers in a nuclear industry factory. **Methods** Peripheral blood samples from 3 healthy volunteers were exposed to ⁶⁰Co γ -rays at different doses. Exposure of murine double minute 2(MDM2) mRNA expression to ionizing radiation was observed. MDM2 gene expression levels were detected in peripheral blood from 96 workers (i.e., 49 radiation-exposed workers and 47 non-radiation-exposed workers) in a nuclear industry factory by using real-time PCR. **Results** The MDM2 expression levels of peripheral blood samples from 3 healthy volunteers exposed to ⁶⁰Co γ -rays increased with an increased dose of 0 Gy to 2 Gy. Moreover, the relationship between the ratio of MDM2 mRNA/ β -actin and irradiation dose represents certain line correlation, which was fit by Origin 7.5 software. The detection and analysis results of MDM2 gene expression levels in nuclear factory workers showed no statistically significant difference between different age groups and MDM2 gene expression levels in the peripheral blood of non-radiation-exposed equilibrium distribution of staff ($F=2.11, P>0.05$). Therefore, age factor had no effect on MDM2 gene expression. The MDM2 gene in the peripheral blood of radioactivity staff was statistically significant to radiation-exposed workers ($t=7.78, P<0.05$). **Conclusions** Ionizing radiation can induce changes in gene expression from human peripheral blood, and this process is dose-related. MDM2 gene expression levels may be a new radiosensitive index in health examination survey in the future.

【Key words】 Radiation, ionizing; Gene expression; Health surveys; Murine double minute 2 gene; Peripheral blood

DOI: 10.3760/cma.j.issn.1673-4114.2015.05.015

作者单位: 030006 太原, 中国辐射防护研究院放射医学与环境医学研究所放射效应研究室

通信作者: 段志凯 (Email: duanzhikai@cirp.org.cn)

随着核工业系统相关产业的快速发展,职工接触放射性等职业危害因素的机会增加。通过对核工业某厂职业人员的健康调查发现,放射工作人员外

周血淋巴细胞染色体畸变率和微核细胞率与非放射工作人员没有明显差异。虽然染色体畸变是生物剂量剂的金标准,但是染色体畸变和微核检查的灵敏度限制了其在放射工作人员健康调查中的应用。

电离辐射诱发的基因表达变化与被照射细胞及生物体的生物学反应密切相关。电离辐射作为一种物理损伤因素,通过使细胞内的水分子电离产生自由基或直接损伤 DNA 等靶分子,并以此作为信号分子,再通过转录或转录后激活,诱导一系列基因表达和生化级联反应,最终引起细胞结构和功能的改变,导致细胞周期休止、细胞转化和凋亡等改变^[1-3]。因此,辐射诱导的基因表达变化将为辐射损伤评价提供新的研究思路和方法^[4-5]。

1 材料和方法

1.1 主要试剂及仪器

外周血总 RNA 提取试剂盒 RNeasy pure (天根生化科技有限公司,北京);反转录试剂盒 PrimeScript™ RT reagent Kit、实时荧光定量 PCR 试剂盒 SYBR® Premix Ex Taq™ II (Perfect Real Time) (宝生物工程(大连)有限公司,大连);Rotor-Gene 6000 荧光定量 PCR 仪(Corbett Life Science 公司,澳大利亚)。

1.2 离体血液样本采集

选择近期无放射性物质接触史的 3 名健康男性为供血者,年龄 24~29 岁,在无菌条件下静脉取血 9 ml,分装到 9 个乙二胺四乙酸抗凝管中,备用。

1.3 照射和培养

采用中国辐射防护研究院附属医院⁶⁰Co 治疗机进行 γ 射线照射,照射剂量率为 0.313 Gy/min,照射剂量分别为 0、0.05、0.1、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 和 2.0 Gy,误差范围为 $\pm 0.3\%$,源皮距 80 cm,照射野 20 cm \times 20 cm,照射完后于 37℃ 静置培养 2 h。

1.4 放射工作人员外周血样本采集

外周血样品取自核工业某厂 96 名职工,其中,49 名为放射工作人员,47 名为非放射工作人员。在无菌条件下每人抽取外周血 1 ml 到乙二胺四乙酸抗凝管中,期间反复轻轻摇动,防止凝血。

1.5 外周血总 RNA 提取

采用外周血总 RNA 提取试剂盒提取总 RNA,

获得的总 RNA 直接用于 cDNA 的合成。

1.6 外周血 cDNA 的合成

采用反转录试剂盒完成 cDNA 的合成,cDNA 合成的反转录反应体系为:5 \times PrimeScript Buffer 4 μ l,总 RNA 16 μ l,反应体系总体积为 20 μ l。反转录反应条件为:37℃,15 min(反转录反应);85℃,5 s(反转录酶的失活反应)。

1.7 实时荧光定量 PCR 引物的设计及合成

本实验中目的基因为人鼠双微体基因 2(murine double minute 2, MDM2),所选内参基因为人 β -actin 基因。MDM2 基因全序列来自 GeneBank,实时荧光定量 PCR 的引物序列设计见表 1,序列合成委托宝生物工程(大连)有限公司合成。

表 1 实时荧光定量 PCR 引物设计

Table 1 The primers for real time fluorescent quantitation PCR

基因名称	引物序列 (5'→3'方向)
MDM2	上游引物: ATCTACAGGGACGCCATCGAA
	下游引物: TGAAACTGAATCCTGATCCAACCA
β -actin	上游引物: TGGCACCCAGCACAATGAA
	下游引物: CTAAGTCATAGTCCGCCTAGAAGCA

注:表中,MDM2:鼠双微体基因 2。

1.8 志愿者和放射工作人员外周血基因表达的实时荧光定量 PCR 检测

利用实时荧光定量 PCR 仪,采用 Comparative Delta-delta Ct 法,以看家基因 β -actin 作为内参,相对定量照射后样品靶基因的表达水平。实时荧光定量 PCR 的反应体系为:SYBR® Premix Ex Taq™ II (2 \times)12.5 μ l、cDNA 2~2.5 μ l、PCR Forward Primer (10 μ mol/L)1 μ l、PCR Reverse Primer (10 μ mol/L)1 μ l,放入 ddH₂O 至反应总体积为 25 μ l。反应条件为:95℃,10 s(1 个循环);95℃,5 s,60℃,20 s(40 个循环)。

1.9 统计学分析

数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,采用 SPSS 统计学软件进行单因素方差分析, $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 MDM2 基因相对表达量

计算 3 名志愿者离体外周血经照射后在每个剂量点其 MDM2 基因相对表达量(其中,MDM2 基因相对表达量=MDM2 mRNA/ β -actin mRNA),然后对

3名志愿者离体外周血MDM2基因表达水平进行统计分析,结果见表2。

表2 照射后各个剂量点的MDM2基因相对表达量

radiation dose	
照射剂量(Gy)	相对表达量
0	1
0.05	1.14±0.15
0.1	1.39±0.14
0.2	2.28±0.22
0.4	2.02±0.18
0.6	2.07±0.15
0.8	1.93±0.20
1.0	2.72±0.10
2.0	3.49±0.22

注:表中,MDM2:鼠双微体基因2。

2.2 照射后MDM2基因表达的剂量-效应关系

将不同剂量点的MDM2基因表达水平通过Origin分析软件分析,得到电离辐射后MDM2基因表达变化规律(图1),由图可见,MDM2基因表达水平随着照射剂量的增加呈现上升的趋势。

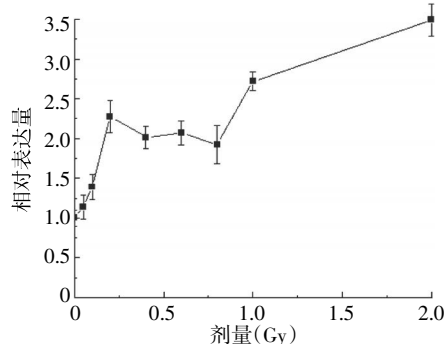


图1 电离辐射后鼠双微体基因2表达水平的变化

Fig.1 The change of gene expression of murine double minute 2 exposed to ionizing radiation

2.3 非放射工作人员不同年龄段人群外周血MDM2基因表达水平比较

对非放射工作人员不同年龄段人群外周血MDM2基因表达进行单因素方差分析,结果表明,非放射工作人员不同年龄段人群的外周血MDM2基因表达水平分布均衡,差异无统计学意义($F=2.11, P>0.05$)(表3)。

2.4 非放射工作人员不同性别人群外周血MDM2基因表达水平比较

对非放射工作人员不同性别人群外周血MDM2

表3 非放射工作人员不同年龄段人群外周血MDM2基因表达水平比较

Table 3 Comparison of MDM2 gene expression in peripheral blood of non-radiation-exposed workers among different age groups

年龄(岁)	人数	平均年龄(岁)	MDM2基因表达水平
20~29	13	25.46±1.71	1.38±0.81
30~39	10	37.50±1.35	0.79±0.38
40~50	24	43.25±3.00	1.40±0.96

注:表中,MDM2:鼠双微体基因2。

基因表达水平与性别的相关性进行研究,其中,男性组24人、女性组23人,结果发现男性组MDM2基因的平均表达量为 $0.92±0.22$,女性组MDM2基因的平均表达量为 $0.75±0.35$,说明MDM2基因表达水平与性别无关($t=2.35, P>0.05$)。

2.5 放射工作人员和非放射工作人员外周血MDM2基因表达水平比较

对放射工作人员和非放射工作人员外周血MDM2基因表达水平进行统计学 t 检验,其中放射工作人员组基因表达平均水平为 $1.00±0.18$,非放射工作人员基因表达平均水平为 $1.58±0.21$,结果表明,两者外周血MDM2基因的表达水平差异具有统计学意义($t=7.78, P<0.05$)。

3 讨论

MDM2基因位于人染色体Dq14.3~15^[6],最初发现于一种致瘤性小鼠成纤维细胞中,后来发现其在人体和小鼠的正常组织中广泛地表达,表明其可能与细胞的生理功能密切相关。电离辐射可以通过诱发p53基因激活导致DNA损伤,而MDM2是p53的下游基因,p53蛋白可作为转录因子调控其下游MDM2基因表达,因此,电离辐射对MDM2的基因表达能产生一定的影响^[7-8]。

本研究采集了3名健康人的离体外周血进行⁶⁰Co γ 射线照射,以 β -actin作为内参基因,探索辐照后MDM2基因表达的剂量-效应关系。初步的实验结果表明,在0~2 Gy剂量范围内,MDM2的mRNA相对表达水平随照射剂量的增加而呈现上升趋势,具有剂量依赖性。进一步收集并完成了核工业某厂49名放射工作人员与47名非放射工作人员的生物样品检测,结果发现MDM2基因表达水平与年龄、性别等因素无关,放射工作人员和非放射工作人员的MDM2基因表达水平差异具有统计学

意义。

随着分子生物学技术的发展,国内学者已开展了大量分子水平辐射生物效应的研究,部分学者以人外周血淋巴细胞为研究对象进行了大量辐射敏感基因的筛选,但分子生物学检测指标在核工业放射工作人员中的应用研究鲜有报道,所以有必要深入研究基因表达作为检测指标在核工业放射工作人员的健康检查中的可行性。

本研究将前期离体外周血筛选出的敏感基因检测指标试用于核工业放射工作人员的健康体检,结果发现,放射工作人员和非放射工作人员的MDM2基因表达水平差异具有统计学意义,这是本研究的一个亮点,但目前还不能作为常规手段应用于核工业健康调查中,还需要进行进一步的现场验证。

参 考 文 献

[1] 周学平,王红阳,杨广顺,等. MXR7 基因的克隆及其在人正常和肿瘤组织中的表达[J]. 中华实验外科杂志, 1999, 16(2): 144-146.

[2] 方宁波,李勇. MXR7 基因与原发肝癌关系的研究进展[J]. 南昌大学学报: 医学版, 2013, 53(5): 97-100.

[3] Izetti P, Hautefeuille A, Abujamra AL, et al. PRIMA-1, a mutant p53 reactivator, induces apoptosis and enhances chemotherapeutic cytotoxicity in pancreatic cancer cell lines[J]. Invest New Drugs, 2014, 32(5): 783-794.

[4] Tremosini S, Forner A, Boix L, et al. Prospective validation of an immunohistochemical panel (glypican 3, heat shock protein 70 and glutamine synthetase) in liver biopsies for diagnosis of very early hepatocellular carcinoma[J]. Gut, 2012, 61(10): 1481-1487.

[5] Masuzaki R, Karp SJ, Omata M. New serum markers of hepatocellular carcinoma[J]. Semin Oncol, 2012, 39(4): 434-439.

[6] Tu JB, Li QY, Jiang F, et al. Pingyangmycin stimulates apoptosis in human hemangioma-derived endothelial cells through activation of the p53 pathway[J]. Mol Med Rep, 2014, 10(1): 301-305.

[7] Gato WE, Mcgee SR, Hales DB, et al. Time-Dependent regulation of apoptosis by AEN and BAX in response to 2-Aminoanthracene dietary consumption[J]. Toxicol Int, 2014, 21(1): 57-64.

[8] 祝峙,冯真,张晶,等. 生长抑制因子1剪接变异体调控p53信号通路诱导肝癌细胞凋亡[J]. 肿瘤基础与临床, 2013, 26(5): 369-375.

(收稿日期: 2015-03-16)

(上接第 406 页)

人体的自吸收和放射性核素半衰期的影响,也没有考虑 γ 射线最高能量的因素,因此其结果还有待项目控制效果评价时现场测量的验证。

参 考 文 献

[1] 吴茜,张建华,王荣福. 放射性核素在分化型甲状腺癌诊疗中的应用现状和进展[J]. 肿瘤学杂志, 2014, 20(11): 904-907.

[2] 孙嘉伟,许晓君,蔡秋茂,等. 中国甲状腺癌发病趋势分析[J]. 中国肿瘤, 2013, 22(9): 690-693.

[3] Organization for Economic Co-operation and Development. Health at a Glance: Europe 2012[M]. Paris: OECD, 2012.

[4] Organization for Economic Co-operation and Development. Health at a Glance 2013: OECD Indicators[M]. Paris: OECD, 2013.

[5] 中华人民共和国卫生部医政司. 核医学诊断与治疗规范[M]. 北京: 科学出版社, 1997.

[6] 李德平,潘自强. 辐射防护手册: 第三分册(辐射安全)[M]. 北京: 原子能出版社, 1990.

[7] 陈春燕,韩春彩,李军. 使用 ^{131}I 治疗甲状腺癌的工作场所的辐射防护设计[J]. 中国辐射卫生, 2014, 23(3): 247-249.

[8] 池晓华,刘峰,李贵平,等. 距离在甲状腺癌患者 ^{131}I 治疗中的屏蔽作用[J]. 南方医科大学学报, 2014, 34(2): 286-288.

[9] 胡凤琼,庞华,杨俊卿,等. 甲状腺癌患者大剂量 ^{131}I 治疗的辐射防护研究[J]. 重庆医学, 2014, 43(17): 2252-2253.

(收稿日期: 2015-06-26)