

·基础研究·

# 放射性肺损伤小鼠晚期转录水平特征性基因标志物的研究

周兆明<sup>1</sup> 马思聪<sup>2</sup> 文磊<sup>1</sup> 成杰<sup>3</sup> 刘浩<sup>4</sup> 陈龙华<sup>5</sup> 周美娟<sup>4</sup> 周平坤<sup>6</sup>  
蔡林波<sup>1</sup> 周成<sup>1</sup>

<sup>1</sup>广东三九脑科医院肿瘤科, 广州 510510; <sup>2</sup>德国癌症研究中心, 海德堡 69120; <sup>3</sup>上海交通大学医学院附属仁济医院妇产科 200127; <sup>4</sup>南方医科大学公共卫生学院放射医学系, 广州 510515; <sup>5</sup>南方医科大学南方医院放疗科, 广州 510515; <sup>6</sup>军事科学院军事医学研究院辐射医学研究所, 北京 100850

通信作者: 周成, Email: [czhou.rob@gmail.com](mailto:czhou.rob@gmail.com)

**【摘要】目的** 研究不同剂量 X 射线照射小鼠肺部后的差异基因并进行转录水平分析, 探讨小鼠放射性肺损伤(RILI)潜在的基因标志物。**方法** 8 周龄 C57BL6 雌性小鼠 96 只, X 射线单次照射分为 3 组(12 只/组): 对照组(未接受照射)、中等剂量组(MD 组, 10 Gy 单次照射)、高剂量组(HD 组, 20 Gy 单次照射), 余 60 只分为 5 组进行 X 射线全肺野梯度剂量照射。采用全基因组表达芯片对小鼠肺组织进行 RNA 检测并生成基因表达矩阵, 使用 R 语言软件包进行基因表达数据转换, 对特征性基因标志物表达水平进行验证与数学建模, 对 HD 组小鼠基因表达水平进行基因本体论生物学功能基因集富集分析。采用经典贝叶斯检验方法进行组间基因表达差异的比较, 采用线性回归模型分析 2 组独立数据的关联程度(关联系数为  $R^2$ )。**结果** MD 组和 HD 组小鼠照射后肺组织转录组学分析, 共筛选出 RILI 差异表达基因 539 个, 其中差异最显著的 5 个基因为 *Phlda3*、*Fgg*、*Kng1*(上调基因)和 *Ptprb*、*Kit*(下调基因)。梯度剂量 X 射线分次照射实验结果证实, 3 个上调基因均随 X 线剂量的增加而表达增强; 2 个下调基因则随剂量的上升而表达降低。上调基因的逻辑回归模型拟合程度较高( $\chi^2=11.66$ ,  $R^2=0.88$ ); 下调基因的表达值与剂量具有良好的相关性( $R=-0.95$ ,  $R^2=0.89$ )。基因集富集分析结果显示, 上调基因富集于 p53 信号通路、固有免疫反应等生物学过程, 下调基因富集于细胞代谢、肺部发育等生物学过程。**结论** 上调基因 *Phlda3*、*Fgg*、*Kng1* 与下调基因 *Ptprb*、*Kit* 可作为客观反应 RILI 严重程度的潜在基因标志物, 为日后开展临床与辐射防护相关应用奠定前临床基础。

**【关键词】** X 射线; 放射治疗剂量; 放射性肺损伤; 转录组; 生物标志物

**基金项目:** 国家自然科学基金(81703166)

DOI: [10.3760/cma.j.issn.1673-4114.2019.04.008](https://doi.org/10.3760/cma.j.issn.1673-4114.2019.04.008)

## Transcriptional investigation of biomarkers for late radiation-induced lung toxicity in mice

Zhou Zhaoming<sup>1</sup>, Ma Sicong<sup>2</sup>, Wen Lei<sup>1</sup>, Cheng Jie<sup>3</sup>, Liu Hao<sup>4</sup>, Chen Longhua<sup>5</sup>, Zhou Meijuan<sup>4</sup>, Zhou Pingkun<sup>6</sup>, Cai Linbo<sup>1</sup>, Zhou Cheng<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Oncology, Guangdong Sanjiu Brain Hospital, DGuangzhou 510510, China; <sup>2</sup>Germany Cancer Research Center, Heidelberg 69120, Germany; <sup>3</sup>Department of Gynecology and Obstetrics, the affiliated Renji Hospital of Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200127, China; <sup>4</sup>Department of Radiation Medicine, School of Public Health, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China; <sup>5</sup>Department of Radiation Oncology, Nanfang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China; <sup>6</sup>Institute of Radiation Medicine, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100850, China

Corresponding author: Zhou Cheng, Email: [czhou.rob@gmail.com](mailto:czhou.rob@gmail.com)

**【Abstract】 Objective** To investigate differentially regulated genes after whole thoracic X-ray exposure and to explore the potential gene markers at transcriptome levels of radiation-induced lung injury (RILI) at transcriptome levels in mice. **Methods** A total of 96 C57BL6 female mice aged 8 weeks were divided into three groups by single X-ray irradiation, namely. control group (no irradiation), medium dose group (MD group, 10 Gy single irradiation), and high dose group (HD group, 20 Gy single irradiation). Whole thoracic X-ray irradiation was delivered to the remaining 60 mice with a wide range of doses and fractionations. Whole genome expression chips were used in the detection of RNA in mouse lung tissues and gene expression data were converted by the R language software. Classical Bayesian test was used in exploring differentially expressed genes between groups. The expression levels of key genes were validated and mathematically analyzed, and gene ontology biological function enrichment analysis was performed. The correlation degree between two groups with independent data was analyzed by regression model (correlation coefficient is  $R^2$ ). **Results** According to medium vs. high dose irradiations, the differentially regulated genes(539 genes) were selected. Then, the top five most significant genes were identified, namely, *Phlda3*, *Fgg*, *Knlg1* (up-regulated genes) and *Ptprb*, *Kit* (down-regulated genes). Dose escalation studies confirmed that the transcriptional status of the five gene signatures correlated well with radiation doses. The expression levels of the three up-regulated genes increased with the boost of X-ray dose (logistic regression model  $\chi^2=11.66$ ,  $R^2=0.88$ ); whereas the expression levels of the two down-regulated genes decreased with the boost in X-ray dose (linear regression  $R=-0.95$ ,  $R^2=0.89$ ). Gene set enrichment analysis revealed that up-regulated genes were associated with p53 signaling and innate immune response; whereas the down-regulated genes were enriched in biological processes, such as cell metabolism and lung development. **Conclusions** Up-regulated genes *Phlda3*, *Fgg*, *Knlg1*, as well as the down-regulated genes, *Ptprb* and *Kit*, can be used as potential genetic markers to indicate the severity of RILI. This finding sheds light on the mechanism involved in the radiation protection evidenced by mRNA biomarkers.

**【Key words】** X-Rays; Radiotherapy dosage; Radiation-induced lung injury; Transcriptome; Biomarkers

**Fund program:** National Natural Science Foundation of China (81703166)

DOI: [10.3760/cma.j.issn.1673-4114.2019.04.008](https://doi.org/10.3760/cma.j.issn.1673-4114.2019.04.008)

以 X 射线为代表的光子射线在现代医学影像学检查与肿瘤治疗中有着不可替代的作用<sup>[1]</sup>, 包括 CT、数字化 X 射线成像在内的多种影像学检查已成为各种胸部、纵膈、心血管疾病以及介入治疗中最常用的辅助检查手段。值得注意的是: 一方面, 随之而来的正常组织射线暴露风险近年来也被广泛关注<sup>[2]</sup>; 另一方面, 放疗是肺癌及纵膈肿瘤、淋巴瘤的重要治疗手段之一。放射性肺损伤 (radiation-induced lung injury, RILI) 是胸部放疗的常见并发症, 也是限制肿瘤根治剂量的关键因素之一<sup>[3-4]</sup>。肺部作为辐射敏感器官, 经电离射线作用后可能引起放射性肺炎及肺纤维化等并发症<sup>[5-6]</sup>。

目前, 临床上或辐射防护领域仍然缺乏有效监测与评价 RILI 晚期改变的分子生物学标志物。当前对放射性肺炎或合并肺纤维化疾病的诊断主要依

赖于临床生化指标、影像学以及肺功能等检查手段。受肺部的代偿功能影响, 这些常规检查往往在灵敏度、特异度方面相对不足, 而且结果容易出现滞后性, 尚不能及时、准确地反映晚期慢性肺部病理生理学改变。纤维支气管镜结合有效基因标志物检查可显著提高早期辐射相关肺损伤的检出率, 从而为肺损伤相关疾病的精准诊疗提供有力证据。此外, RILI 小鼠模型因其与人类有极为相似的慢性炎症和纤维发生改变特征, 是研究放射性肺部不良反应、特发性肺纤维化等疑难疾病机制的理想模型。本研究基于不同剂量 X 射线全肺野照射晚期小鼠肺组织, 使用全基因组芯片研究辐射相关的差异表达基因, 结合信号通路富集分析探讨 RILI 潜在的基因标志物, 并进行数学建模来预测与提示放射性肺疾病的发生、发展程度。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物、分组及照射

8周龄 C57BL6 雌性小鼠共 96 只, 购自广东省医学实验动物中心 [许可证号: SCXK(粤)2013-0002], 无特定病原体 (SPF) 级动物房饲养, 温度 (23±1)℃, 相对湿度 (55±5)%, 压力差 ≤10 Pa, 每日光照 12 h, 自由摄食饮水。①X 射线单次照射实验共分 3 组 (12 只/组): 对照组 (未接受照射)、中等剂量组 (MD 组, 小鼠接受 10 Gy 单次照射)、高剂量组 (HD 组, 小鼠接受 20 Gy 单次照射)。②X 射线全肺野分次剂量爬坡 (梯度剂量照射) 实验共分 5 组 (12 只/组): 未接受照射 (0 Gy 组)、5 次 3 Gy 照射 (15 Gy 组)、5 次 4 Gy 照射 (20 Gy 组)、5 次 6 Gy 照射 (30 Gy 组) 和 5 次 8 Gy 照射 (40 Gy 组)。每日照射 1 次, 连续照射 5 d。使用异氟烷诱导配合氯胺酮麻醉小鼠, 妥善固定后采用医用直线加速器 (德国西门子公司, 6MVX 型) 进行全肺野照射, 剂量率为 3 Gy/min。

### 1.2 RNA 样本的处理及检测

所有小鼠均于照射后 24 周予以断颈处死, 取新鲜肺部组织并用 TRIzol 试剂 (赛默飞世尔中国) 处理, 置于 -20℃ 冰箱冻存储存。采用 RNeasy Mini Kit (德国 Qiagen 公司) 提取肺部 RNA, 使用 DNase I (德国 Qiagen 公司) 去除 DNA, 排除 DNA 污染, 无核酸酶水洗脱纯化 RNA, 样本置于 -20℃ 冰箱冻存储存。采用 NanoDrop ND-1000 分光光度计 (德国 PEQlab GmbH 公司) 初步测定 RNA 浓度, 使用美国安捷伦科技 (中国) 有限公司的 2100 生化分析仪进一步测定 RNA 浓度以确认样本的完整性和纯度。采用全基因组表达芯片 (美国 Illumina 公司的小鼠 Sentrix-6 V2 全基因组芯片, BD-201-0202) 进行 RNA 检测, 使用自带软件包处理芯片信号并生成基因表达矩阵。

### 1.3 数据转换与差异基因的分析

采用 R 语言软件 (3.4.2 版本) 进行基因表达数据转换, 使用 Limma 软件包<sup>[7]</sup> 进行数据背景校正、标准化、数据汇总并报告差异表达基因, 包括表达值  $\log_2$  对数转换, 设定基因表达变化倍数 (fold change, FC) ≥2, 即  $\log_2(\text{FC}) > 1$  或  $\log_2(\text{FC}) < -1$ , 且  $P < 0.05$  为差异表达基因, 得到小鼠受到不同剂量 X 射线照射后肺部差异表达基

因, 所有热图的图例均为  $\log_2(\text{FC})$  值。使用 R 语言软件包对差异基因进行聚类分析, 分析小鼠在接受梯度 X 射线照射后上述差异基因的表达情况。

### 1.4 质谱蛋白质组学的检测

使用 SDS-PAGE 凝胶电泳分离蛋白质裂解物, 将得到的凝胶切成 13 个切片, 用胰蛋白酶消化并依文献 [8] 所述进行质谱分析, 即蛋白提取后, 使用纳升级超高效液相色谱 (美国特世公司) 连接至美国 Thermo Fisher Scientific 公司的 LTQ Orbitrap 质量分析器, 将所得肽混合物进行在线偶联。使用 MaxQuant 软件 (<http://www.coxdocs.org>, 版本 1.5.3.8) 和小鼠 UniProt 数据库 (<https://www.uniprot.org>) 分析串联质谱 (LC-MS/MS) 原始数据。使用 MaxQuant 内置 MaxLFQ 算法进行蛋白定量并采用 Perseus 软件 (<http://www.coxdocs.org>, 版本 1.5.2.4) 进行数据转换和评估。

### 1.5 基因表达剂量-效应曲线

为进一步验证与研究基因标志物转录水平的改变与辐射剂量的直接关联, 对小鼠进行分次梯度剂量照射后, 小鼠肺部上述 RILI 特征性基因标志物表达水平进行验证与数学建模, 采用 Mathematica 8.0 软件 (<http://www.wolfram.com/mathematica>) 与 OriginPro 8.0 软件 (<https://www.originlab.com>) 进行建模。根据基因芯片结果, 分别取上调、下调基因转录水平改变  $\log_2(\text{FC})$  的平均值为纵坐标, 不同梯度照射剂量为横坐标, 建立剂量-效应曲线。上调基因表达水平与 X 射线剂量关系拟合方程式为  $y = A1 + (A2 - A1) / (1 + 10^{((\text{LOG}x0 - x) * p)})$ , 其中  $A1 = -0.06553 \pm 0.18433$  (最低点),  $A2 = 1.48593 \pm 0.15206$  (最高点),  $\text{LOG}x0 = 19.9841 \pm 2.74032$  (中心点),  $p = 0.07618 \pm 0.0284$  (曲线斜率)。下调基因表达水平与 X 射线剂量呈明显负相关, 拟合方程式为  $y = a + b * x$ , 其中  $a = 0.02218 \pm 0.13125$  (截距)、 $b = -0.03551 \pm 0.00434$  (斜率)。

### 1.6 生物信息学分析

对基因表达水平进行基因集富集分析<sup>[9]</sup>, 进行基因本体论<sup>[10]</sup> 与京都基因和基因组百科全书通路<sup>[11]</sup> 的基因集富集分析, 采用聚类分析识别相关基因的表达水平。采用 R 语言软件 clusterProfiler 软件包<sup>[12]</sup> 进行生物信息学分析, 以  $P < 0.01$  且  $Q < 0.01$  作为筛选条件, 使用 ggplot2 软件包作图。

### 1.7 统计学分析

使用 Limma 软件包<sup>[7]</sup>中经典贝叶斯检验方法进行组间差异表达基因分析,采用 GraphPad Prism 7 软件进行辐射剂量相关基因表达数据分析及作图。采用线性回归模型分析两组独立数据的关联程度,以皮尔森  $R^2$  表示两者关联系数。 $P < 0.05$  表示差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 RILI 差异表达基因的筛选

不同剂量 X 射线照射后小鼠肺组织基因芯片的分析结果显示,MD 组出现 125 个显著差异表达基因,其中 32 个基因表达上调、93 个基因表达下

调(图 1 中 A、C、D)。HD 组接受单次照射后,基因表达差异表现更为明显,共出现 414 个显著差异表达基因,其中 263 个基因表达上调、151 个基因表达下调(图 1 中 B、E、F)。

### 2.2 RILI 基因标志物的分析结果

对 MD 组、HD 组小鼠已筛选出的差异表达基因进行韦恩图分析,结果发现有 13 个共同差异表达基因(图 2 中 A)。选取其中差异性表达最显著的 5 个基因作为 RILI 潜在特征性基因标志物,包括 3 个显著上调基因 [PH 同源域家族 A 成员 3 (pleckstrin homology like domain family A member 3, *Phlda3*)、纤维蛋白原  $\gamma$  链(fibrinogen gamma chain, *Fgg*)、激肽原 1(kininogen 1, *Knpl*)] 和 2 个下调

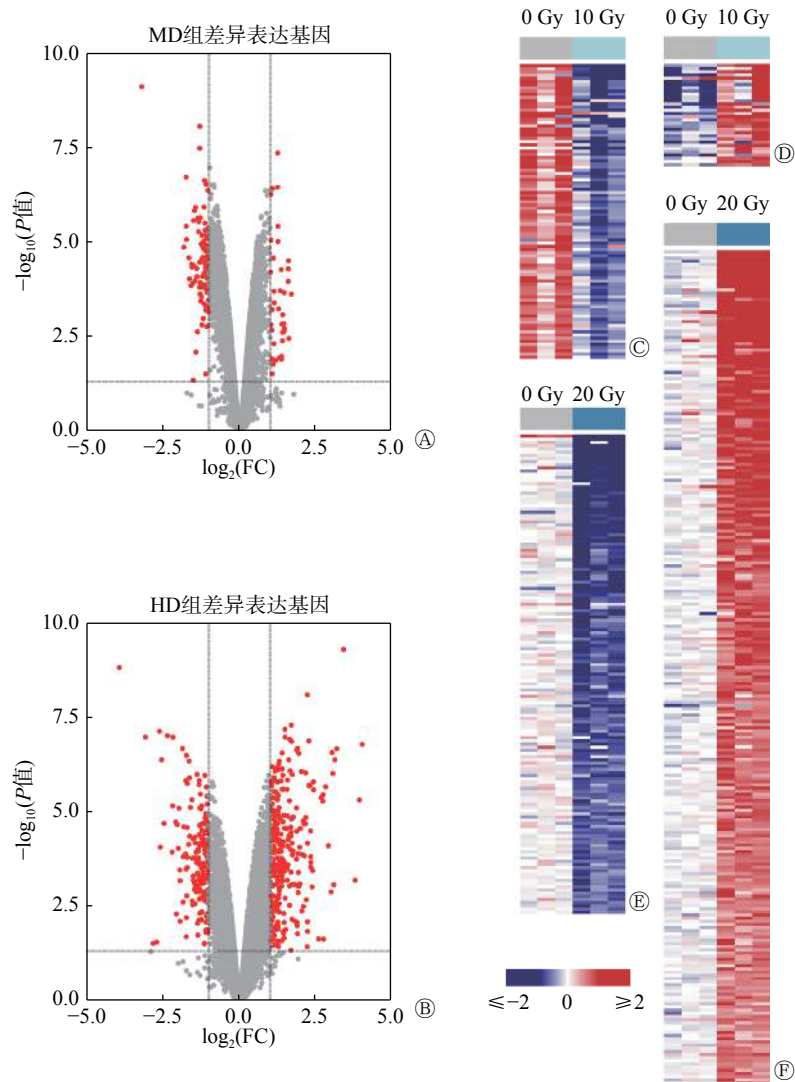


图 1 中等剂量(MD)组、高剂量(HD)组差异表达基因的火山图(A-B)与基因表达热图(C-F) 图中, MD 组: 10 Gy 单次照射; FC: 变化倍数; HD 组: 20 Gy 单次照射。

Fig. 1 Volcano plots(A-B) and heatmaps of differentially expressed genes (C-F) in medium dose(MD) and high dose(HD) groups



基因 [蛋白质酪氨酸磷酸酶, B型受体 (protein tyrosine phosphatase, receptor type B, *Ptprb*), KIT原癌基因受体酪氨酸激酶 (KIT proto-oncogene receptor tyrosine kinase, *Kit*)] (表 1)。该基因标志物组合在不同剂量照射组的表达趋势差异明显 (图 2 中 B-C)。选取其中两个上调基因进行蛋白质组学验证后结果显示, HD 组相比对照组 *Fgg*、*Kng1* 的表达差异倍数上升约为 2 倍左右 (图 2 中 D)。

### 2.3 基于 RILI 基因标志物表达水平的数学建模

梯度剂量照射后肺组织基因芯片结果显示,

3 个特征性上调表达基因 (*Phlda3*、*Fgg*、*Kng1*) 均随 X 射线剂量的增加而表达增强; 2 个特征性下调表达基因 (*Ptprb*、*Kit*) 则随剂量的上升而表达降低 (图 3 中 A)。这一结果与单次照射实验结果一致, 提示该基因标志物组合对不同剂量、不同分次 X 射线照射均具有较强的辐射敏感性。上调基因 (*Phlda3*、*Fgg*、*Kng1*) 的平均值通过逻辑回归模型建模, 模型拟合程度较高 ( $\chi^2=11.66, R^2=0.88$ ) (图 3 中 B)。下调基因 (*Ptprb*、*Kit*) 进行线性回归分析后结果显示, 下调基因表达水平与 X 射线剂量呈明

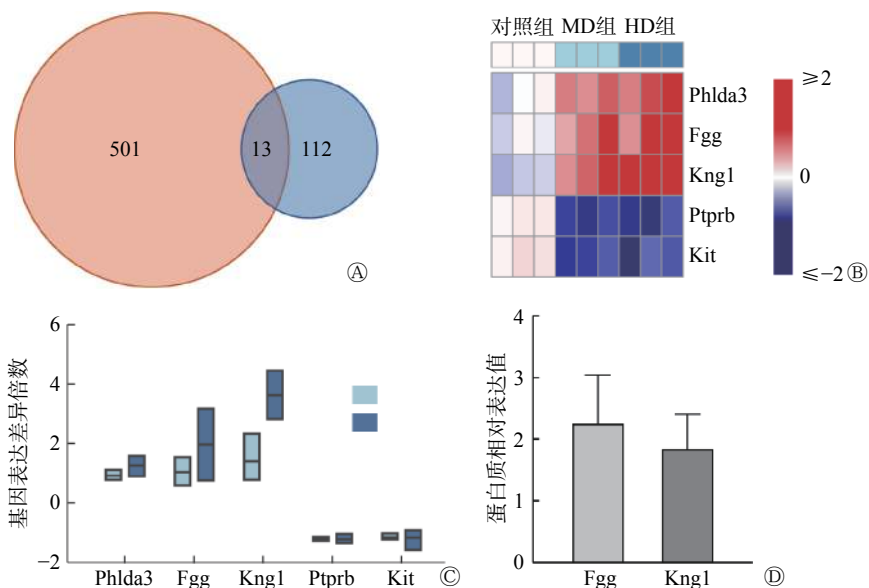


图 2 MD 组和 HD 组共同差异表达基因分析结果 图中, A: 韦恩图分析获得 13 个差异基因; B: 表达热图及聚类分析 (对照组: 未接受照射; MD 组: 10 Gy 单次照射; HD 组: 20 Gy 单次照射); C: MD、HD 组共同差异基因与对照组比较的表达倍数变化。D: HD 组与对照组 *Kng1*、*Fgg* 蛋白表达水平的比较。Phlda3: PH 同源域家族 A 成员 3; *Fgg*: 纤维蛋白原  $\gamma$  链; *Kng1*: 激肽原 1; *Ptprb*: 蛋白质酪氨酸磷酸酶, B 型受体; *Kit*: KIT 原癌基因受体酪氨酸激酶。

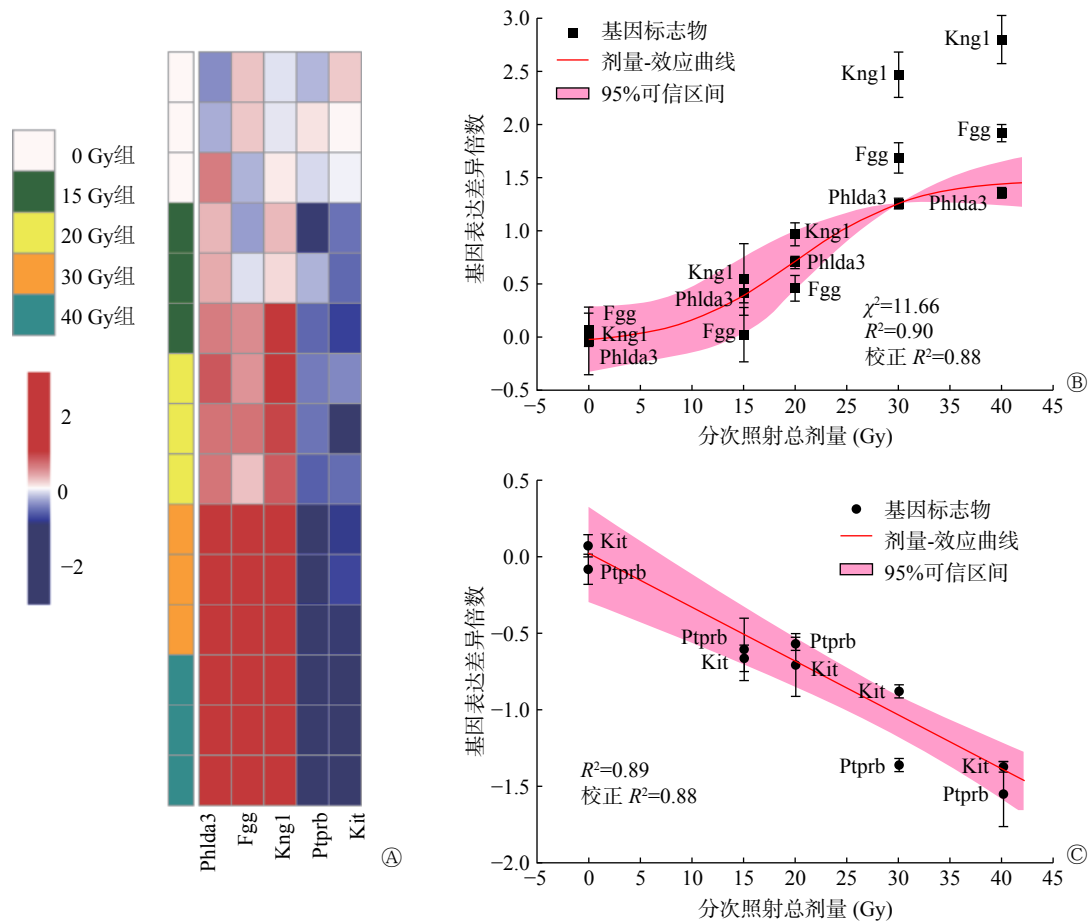
Fig. 2 Analysis of common difference genes in medium dose (MD) and high dose (HD) groups

表 1 小鼠经 X 线全肺野照射后 MD、HD 组最显著共同表达基因的信息

Table 1 The most significant co-expression genes in medium dose (MD) and high dose (HD) groups after whole lung X-ray irradiation in mice

基因名称	表达	MD组		HD组		基因功能
		log <sub>2</sub> (FC)	P值	log <sub>2</sub> (FC)	P值	
PH同源域家族A成员3	上调	1.02	0.000	1.36	0.000	作为p53的直接靶点, 抑制Akt蛋白活性, 增强细胞凋亡。
纤维蛋白原 $\gamma$ 链	上调	1.12	0.000	2.04	0.004	通过增强血小板P-选择素表达, 在炎症、血栓形成和止血过程中发挥作用。
激肽原1	上调	1.69	0.000	3.91	0.000	具有激肽原生理功能, 促进炎症因子释放、抑制血小板聚集。
蛋白质酪氨酸磷酸酶, B型受体	下调	-1.30	0.000	-1.32	0.000	在血管生成和血管重塑过程中发挥重要作用。
KIT原癌基因受体酪氨酸激酶	下调	-1.30	0.000	-1.32	0.000	通过磷酸化PIK3R1激活AKT1信号通路, 抑制细胞凋亡。

注: 表中, MD组: 10 Gy 单次照射; HD组: 20 Gy 单次照射; FC: 变化倍数。



**图 3** 显著差异基因表达差异倍数与梯度 X 射线照射剂量的相关性分析 图中, A: 基因表达热图; B、C: 差异表达基因与分次照射剂量拟合曲线。0 Gy 组: 未接受照射; 15 Gy 组: 5 次 3 Gy 照射; 20 Gy 组: 5 次 4 Gy 照射; 30 Gy 组: 5 次 6 Gy 照射; 40 Gy 组: 5 次 8 Gy 照射。Phlda3: PH 同源域家族 A 成员 3; Fgg: 纤维蛋白原  $\gamma$  链; Kng1: 激肽原 1; Ptprb: 蛋白质酪氨酸磷酸酶, B 型受体; Kit: KIT 原癌基因受体酪氨酸激酶。

**Fig. 3** Correlation analysis between expression fold changes of difference genes and gradient X-ray exposure dose

显著相关( $R=-0.95$ ,  $R^2=0.89$ )(图 3 中 C)。

## 2.4 基因集富集分析

### 2.4.1 KEGG 通路集富集分析

对 MD 组和 HD 组小鼠基因表达水平进行 KEGG 通路基因集富集分析, 结果显示 2 组小鼠上调表达差异基因在 p53、氧化磷酸化等多条信号通路出现富集(图 4 中 A), 这提示 X 射线照射后小鼠肺部可能出现上述信号通路上调。p53 信号通路先导基因分析结果显示, MD、HD 组分别有 23 个、26 个基因的上调表达对 p53 信号通路上调产生作用(图 4 中 B、C)。

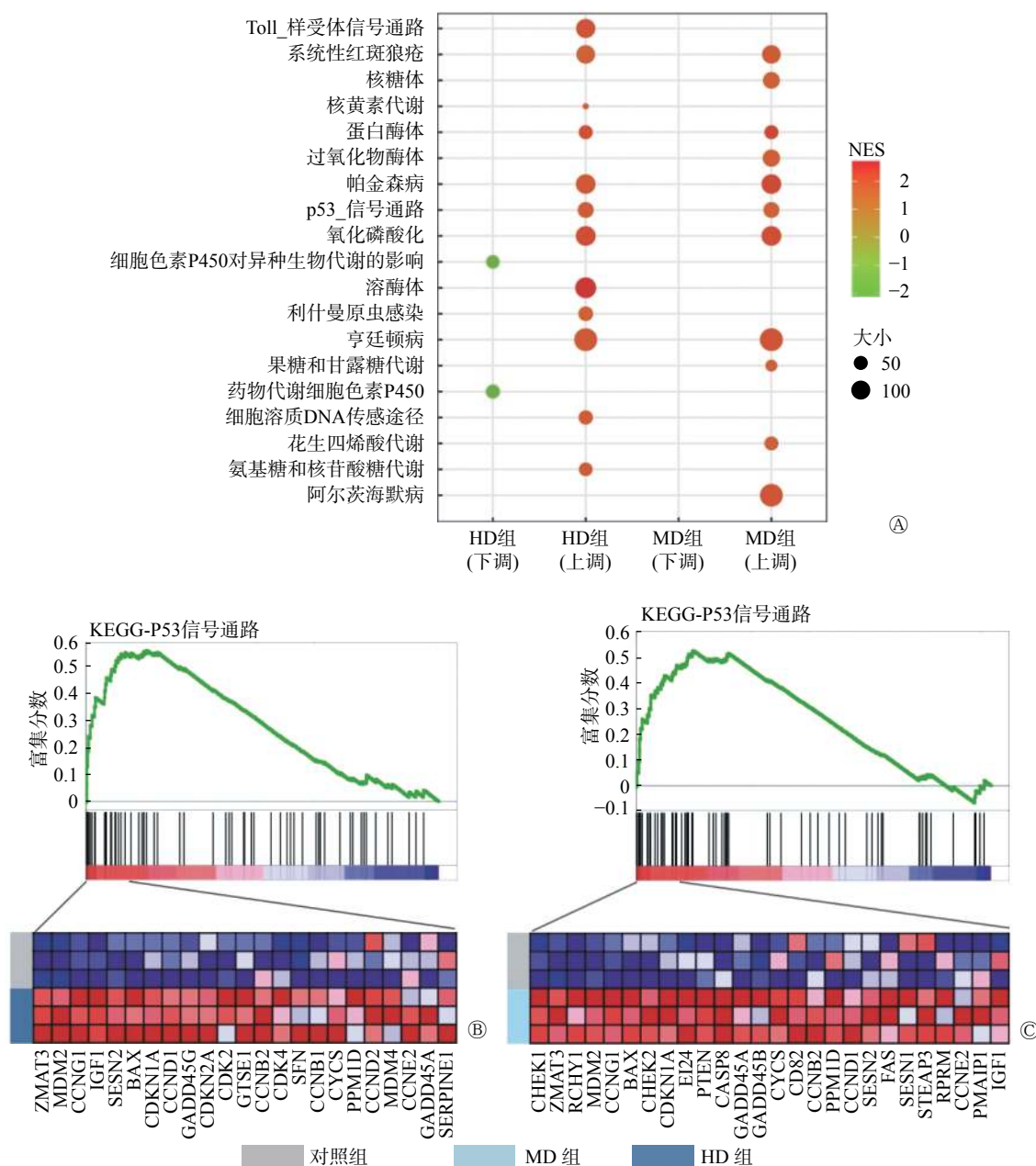
### 2.4.2 基因本体论基因集富集分析

对 HD 组小鼠基因表达水平进行基因本体论生物学功能基因集富集分析, 结果显示上调基因富集于固有免疫反应激活生物学过程(图 5 中 A), 下调基因则富集于肺部发育和气管发育等生物学过程

(图 5 中 B、C)。先导基因分析结果显示, 49 个基因的上调表达对激活固有免疫反应生物学过程产生作用, 分别有 11 个基因、12 个基因的下调表达对抑制肺泡发育及肺细胞分化的生物学过程产生作用。

## 3 讨论

针对疾病进展过程寻找可靠的生物标志物是“精准医学”不可或缺的组成部分。基因标志物作为最直接快速有效的诊断手段之一, 其筛选与应用可在疾病诊断、发展、治疗以及疗效监测等多个方面发挥显著作用。寻找放射性肺疾病相关基因标志物一直以来也是研究的热点和难点<sup>[13]</sup>。迄今为止, 临床和放射防护领域针对间质性肺疾病的分子标志物检测主要依靠血清学或蛋白质水平, 如涎液化糖链抗原-6、表面活性蛋白 A、基质金属蛋白酶 7、



**图 4** MD组和HD组基因表达KEGG通路基因集富集分析结果 图中, A: KEGG通路集富集分析结果图, 红色点代表上调通路, 绿色点代表下调通路, 点的大小代表富集于该信号通路的基因数目。NES>0表示该信号通路上调, NES<0表示该信号通路下调。B-C: p53信号通路富集分析结果图及相关基因表达热图, 深红色至深蓝色代表基因表达水平由高到低。对照组: 未接受照射; MD组: 10 Gy 单次照射; HD组: 20 Gy 单次照射; NES: 标准化富集分数。FDR: 错误发现率。

**Fig. 4** Gene set enrichment analysis for KEGG in high dose (HD), medium dose (MD) groups and heatmap for associated genes in certain pathways

骨桥蛋白和东氨蛋白酶等, 尚未开展基于转录水平基因标志物改变的肺损伤监测和诊断<sup>[14-15]</sup>。本研究借助已建立成熟的小鼠 RILI 模型, 为寻找可靠基因标志物开展临床前实验研究, 分别从中、高等两个辐照剂量入手, 首先寻找肺组织辐射相关差异表达基因, 并在此基础上, 根据已筛选出的敏感基因进一步寻找 RILI 潜在的基因标志物, 并借助蛋白

质组学进行蛋白水平的表达验证。

临床医师根据经典放射生物学 4R 原则(Repair, Reoxygenation, Redistribution, Repopulation), 普遍采用分次照射对肿瘤病灶进行根治或姑息治疗<sup>[16-17]</sup>。本研究第 2 部分实验模拟分割照射的方式, 采用梯度剂量爬坡、分次照射条件下的小鼠全肺野照射, 对潜在 RILI 基因标志物进行进一步的

验证, 结果证实该基因标志物组合与辐射剂量具有显著相关性。上述结论也为基于该敏感基因组合进行剂量-效应建模奠定了生物学基础。拟合模型结果显示, 上调基因 (*Phlda3*、*Fgg*、*Kngr1*) 平均表达倍数超过 1 倍以上提示有较严重的肺损伤风险, 其对应于约接受 25 Gy (分 5 次照射) 或以上剂量水平; 当下调基因组合 (*Ptprb*、*Kit*) 平均表达差异倍数减少超过 0.75 时, 提示有严重肺损伤风险, 其相对的辐射剂量也在 25 Gy (分 5 次照射) 水平。

近年来的研究报道, X 射线在肿瘤放疗过程中, 不仅对肿瘤细胞的 DNA 造成损伤, 同时也会造成炎症激活及促有丝分裂等信号通路激活<sup>[18]</sup>。本实验采用基因集富集分析的方法, 进行了 KEGG 信号通路富集和基因本体论生物学功能基因富集分析, 结果显示上调表达的差异基因往往与凋亡、溶酶体及吞噬体等信号通路激活相关, 可引起急性免疫应答、白细胞介导的免疫反应、髓系白细胞增殖及其介导的免疫应答等一系列生物学过程激活。而下调表达的基因则富集于细胞代谢关键酶细胞色素 P450, 维生素 A (抗肿瘤) 代谢等诸多细胞代谢通路, 这表明在高剂量 X 射线照射后, 肺部细胞代谢通路受抑制。此外, 肺部发育、气管发育、上皮细胞增殖及血管发生等重要的肺部生物学过程, 也受到抑制, 上述信号通路及生物学过程提示了晚期 RILI 的发生发展机制。

综上所述, 本研究通过全基因组芯片检测 X 射线照射后 24 周小鼠肺部基因并进行转录水平分析, 结果发现了可客观反应 RILI 严重程度的潜在基因标志物, 其中包括上调基因 *Phlda3*、*Fgg*、*Kngr1* 与下调基因 *Ptprb*、*Kit*。这些基因均属首次报道, 为将来开展临床与辐射防护相关应用奠定前临床基础。此外, 差异表达基因的富集分

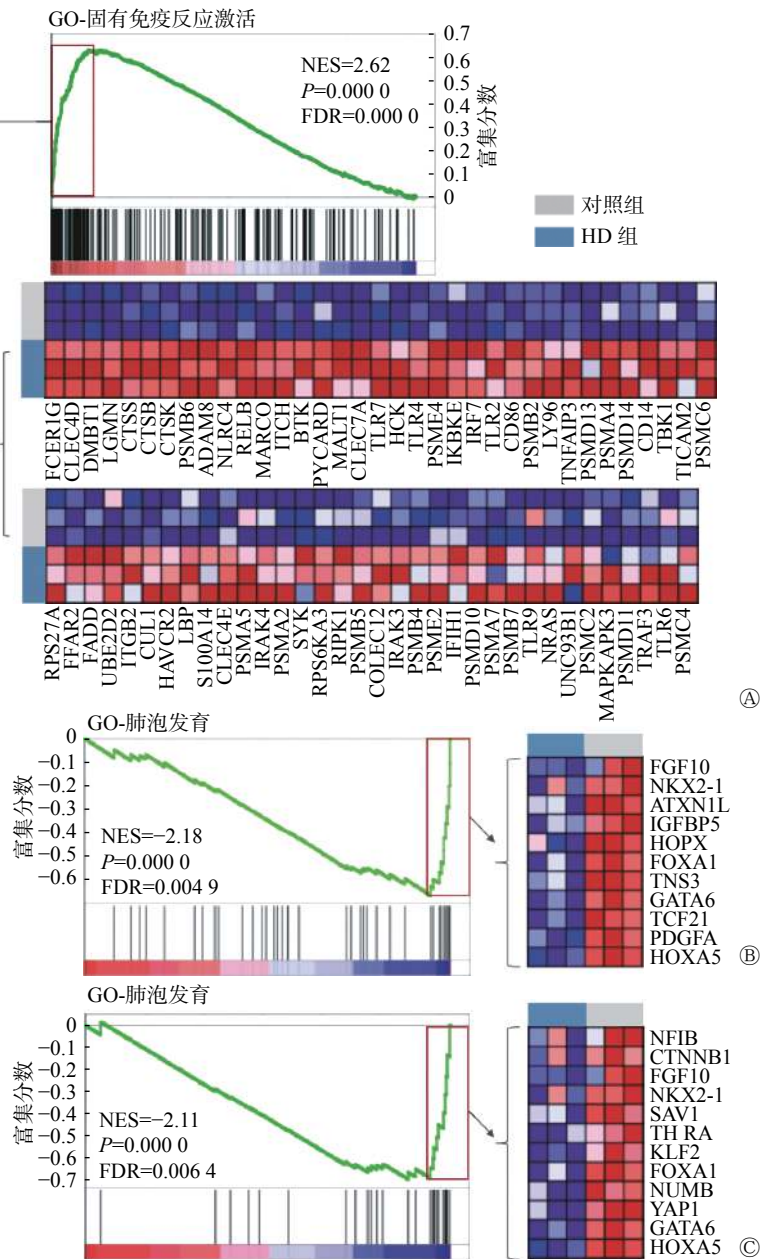


图 5 HD 组基因表达的基因本体论生物学功能基因集富集分析结果 图中, A: 固有免疫反应生物学过程相关基因表达上调; B: 肺泡发育生物学过程相关基因表达下调; C: 肺细胞分化生物学过程相关基因表达下调。基因表达热图中, 深红色至深蓝色代表基因表达水平由高到低。GO: 基因本体论; 对照组: 未接受照射; HD 组: 20 Gy 单次照射; NES: 标准化富集分数。FDR: 错误发现率。

Fig. 5 Gene set enrichment analysis for GeneOntology terms in high dose (HD) group and heatmap for associated genes in certain biological processes

析提示炎症、凋亡等通路激活, 细胞代谢、肺部发育等通路受到抑制, 同时对引起上述信号通路和生物学过程变化的相关基因进行了表达水平分析, 确认了相关信号通路和生物学过程的决定基因簇。这些与晚期 RILI 相关的差异表达基因、信号通路及生物学过程改变有关, 为进一步深入地研究 RILI 的发生发展机制提供了参考依据和理论基础。



**利益冲突** 本研究由署名作者按以下贡献声明独立开展, 不涉及任何利益冲突。

**作者贡献声明** 周兆明、马思聪负责数据的收集与分析、论文的撰写; 文磊、成杰、刘浩负责协助收集数据并处理数据; 陈龙华、周美娟负责技术指导、论文的修订等; 周平坤、蔡林波、周成负责设计实验思路、论文的审阅。

### 参 考 文 献

- [ 1 ] Lichter AS, Lawrence TS. Recent advances in radiation oncology[J]. *N Engl J Med*, 1995, 332(6): 371-379. DOI: 10.1056/NEJM199502093320607.
- [ 2 ] Nguyen HQ, To NH, Zadigue P, et al. Ionizing radiation-induced cellular senescence promotes tissue fibrosis after radiotherapy. A review[J]. *Crit Rev Oncol Hematol*, 2018, 129: 13-26. DOI: 10.1016/j.critrevonc.2018.06.012.
- [ 3 ] Xia CC, Chang PY, Zhang YY, et al. Therapeutic effects of bone marrow-derived mesenchymal stem cells on radiation-induced lung injury[J]. *Oncol Rep*, 2016, 35(2): 731-738. DOI: 10.3892/or.2015.4433.
- [ 4 ] Mehta V. Radiation pneumonitis and pulmonary fibrosis in non-small-cell lung cancer: Pulmonary function, prediction, and prevention[J]. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 2005, 63(1): 5-24. DOI: 10.1016/j.ijrobp.2005.03.047.
- [ 5 ] Dubray B, Henry-Amar M, Meerwaldt JH, et al. Radiation-induced lung damage after thoracic irradiation for Hodgkin's disease: the role of fractionation[J]. *Radiother Oncol*, 1995, 36(3): 211-217. DOI: 10.1016/0167-8140(95)01606-H.
- [ 6 ] Jenkins P, D'amico K, Benstead K, et al. Radiation pneumonitis following treatment of non-small-cell lung cancer with continuous hyperfractionated accelerated radiotherapy (CHART)[J]. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 2003, 56(2): 360-366. DOI: 10.1016/s0360-3016(02)04491-7.
- [ 7 ] Ritchie ME, Phipson B, Wu D, et al. *limma* powers differential expression analyses for RNA-sequencing and microarray studies[J]. *Nucleic Acids Res*, 2015, 43(7): e47. DOI: 10.1093/nar/gkv007.
- [ 8 ] Gould MK. Lung-Cancer Screening with Low-Dose Computed Tomography[J]. *N Engl J Med*, 2014, 371(19): 1813-1820. DOI: 10.1056/NEJMcp1404071.
- [ 9 ] Subramanian A, Tamayo P, Mootha VK, et al. Gene set enrichment analysis: A knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, 102(43): 15545-15550. DOI: 10.1073/pnas.0506580102.
- [ 10 ] Ashburner M, Ball CA, Blake JA, et al. Gene Ontology: tool for the unification of biology[J]. *Nat Genet*, 2000, 25(1): 25-29. DOI: 10.1038/75556.
- [ 11 ] Kanehisa M, Goto S. KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes[J]. *Nucleic Acids Res*, 2000, 28(1): 27-30. DOI: 10.1093/nar/28.1.27.
- [ 12 ] Yu GC, Wang LG, Han YY, et al. clusterProfiler: an R Package for Comparing Biological Themes Among Gene Clusters[J]. *OMICS*, 2012, 16(5): 284-287. DOI: 10.1089/omi.2011.0118.
- [ 13 ] Caudrillier A, Kessenbrock K, Gilliss BM, et al. Platelets induce neutrophil extracellular traps in transfusion-related acute lung injury[J]. *J Clin Invest*, 2012, 122(7): 2661-2671. DOI: 10.1172/JCI161303.
- [ 14 ] 李欢欢, 高宏生, 魏路清. 肺泡上皮来源的血清标志物对肺纤维化的诊断价值[J]. *武警医学*, 2015, 26(7): 729-731. DOI: 10.3969/j.issn.1004-3594.2015.07.026.
- Li HH, Gao HS, Wei LQ, et al. Diagnostic value of serum markers derived from alveolar epithelium for pulmonary fibrosis[J]. *Med J Chin PAPP*, 2015, 26(7): 729-731. DOI: 10.3969/j.issn.1004-3594.2015.07.026.
- [ 15 ] 魏路清, 彭守春. 间质性肺疾病的生物学标志物研究进展[J]. *中国实用内科杂志*, 2014, 34(8): 748-751. DOI: 10.7504/nk2014070104.
- Wei LQ, Peng SC. Progress in biological markers of interstitial pulmonary disease[J]. *Chin J Pract Internal Med*, 2014, 34(8): 748-751. DOI: 10.7504/nk2014070104.
- [ 16 ] Barendsen GW. Dose fractionation, dose rate and iso-effect relationships for normal tissue responses[J]. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 1982, 8(11): 1981-1997. DOI: 10.1016/0360-3016(82)90459-X.
- [ 17 ] Thames HD, Hendry JH. Fractionation in radiotherapy[M]. London: Taylor & Francis, 1987: 162-163, 222.
- [ 18 ] Citrin DE. Recent Developments in Radiotherapy[J]. *N Engl J Med*, 2017, 377(11): 1065-1075. DOI: 10.1056/NEJMra1608986.

(收稿日期: 2018-11-02)