

人外周血淋巴细胞照射后 6 小时差异基因表达谱的变化

李建国, 秦秀军, 张伟, 许超琪, 李炜宾, 党旭红, 左雅慧

中图分类号: Q691 文献标识码: A 文章编号: 1004-714X(2011)01-0041-02

【摘要】 目的 从基因水平上为放射性从业人员的健康损伤提供依据。方法 利用人全基因组基因芯片技术对离体人外周血淋巴细胞 0.1 Gy、0.2 Gy、0.5 Gy、1.0 Gy 四个剂量水平上照射 6 h 的辐射差异基因进行了筛选和分析。结果 0.1 Gy 照射 6 h 的差异基因有 1 177 条; 0.2 Gy 照射 6 h 的差异基因有 1 922 条; 0.5 Gy 照射 6 h 的差异基因有 492 条; 1.0 Gy 照射 6 h 的差异基因有 2 615 条; 4 个照射剂量点的共同差异基因有 114 条; 同时 RT-PCR 结果显示, EGR1、TAIAP1 及 HLA-DMB 3 个基因的相对定量结果与芯片检测结果趋势是一致的。结论 本研究在离体外周血淋巴细胞不同剂量照射 6 小时的研究过程中发现了许多有意义的差异基因, 这将为进一步辐射差异基因的筛选和辐射损伤机制的研究提供依据。

【关键词】 辐射; 淋巴细胞; 基因芯片; 差异表达基因

Differential Expression Gene Profiling in Human Lymphocyte after 6h Irradiated. LI Jian-guo, QIN Xiu-jun, ZHANG Wei et al. *Department of Radiation Medicine and Environment Medicine, China Institute for Radiation Protection, Taiyuan 03006 China*

【Abstract】 Objective To provide the evidence of health damage for the staff irradiated from the gene level. **Methods** The study analyzed the differential transcriptional profile of normal human lymphocyte and human lymphocyte irradiated with 0.1 Gy, 0.2 Gy, 0.5 Gy, 1.0 Gy by whole genome chip after 6h irradiated. **Results** The results showed that there were 1177 differentially expressed genes with 0.1 Gy after 6h irradiation, and there were 1922 differentially expressed genes with 0.2 Gy after 6h irradiation, and there were 492 differentially expressed genes with 0.5 Gy after 6h irradiation, 2 615 differentially expressed genes with 1.0 Gy after 6h irradiation, 114 differentially expressed genes in 4 dose points after 6h irradiation. RT-PCR results indicated that the relative quantity's result of EGR1, HLA-DMB and TAIAP1 was consistent with gene chip data. **Conclusion** The study found many significant different genes in human lymphocyte with different doses after 6h irradiation, which will provide a basis for the further radiation-different-genes and the mechanism of radiation damage.

【Key words】 Radiation; Lymphocyte; Gene Chip; Differential Expression Gene

基因芯片技术是伴随着人类基因组计划的实施而发展起来的新兴生物学技术,它具有高通量、高集成、微型化和自动化的特点^[1,2]。目前已被应用于生物学研究的各个领域,辐射生物学领域的研究也不例外。而高密度的基因芯片不仅针对性不强,产生繁琐的实验数据,而且耗费大量资金,为此已有人针对肿瘤研制出了不同的诊断芯片^[3-5]。本研究主要是在 0.1 Gy、0.2 Gy、0.5 Gy、1.0 Gy 四个剂量水平照射 6 h 进行了离体人外周血淋巴细胞辐射差异基因的筛选,为进一步辐射差异基因的筛选和辐射损伤机制的研究提供依据。

1 材料与方法

1.1 血样采集 选择 4 名无放射性接触史、无急慢性疾病、不吸烟、年龄在 25~35 岁之间的健康男性作为供血者,每人静脉取血 100 ml 肝素抗凝。

1.2 外周血淋巴细胞的分离 用等体积的 D-hanks 液在无菌条件下稀释混匀新鲜采取的肝素抗凝血,沿离心管壁加到等体积淋巴细胞分离液的液面上,以 2 000 转/min 离心 20 min。离心结束后,离心管液面分为四层,从上到下依次为血浆层、环状乳白色淋巴细胞层、透明分离液层及红细胞层,小心吸取第二层淋巴细胞至离心管中,并加等体积 D-hanks 液,以 2 000 转/min 离心 10 min,倒掉上清液,同样方法再重复洗涤一次,然后用计数板在显微镜下计数。

1.3 细胞培养 将提取出来的淋巴细胞用含 13% 的灭活小牛

血清、200 U/ml 青霉素、200 ug/mg 链霉素的 RPMI-1640 培养液分别装于 25 mL 的培养瓶中,并置于 37℃、5% CO₂ 培养箱培养。

1.4 细胞照射 将培养过夜的淋巴细胞用中国辐射防护研究院实验用钴-60 辐照装置照射,一次性照射剂量分别为 0.1 Gy、0.2 Gy、0.5 Gy、1.0 Gy 四个剂量,照射剂量率为 31.93 cGy/min,源皮距 80.5 cm,误差范围在 0.3%。

1.5 总 RNA 提取 经过照射的淋巴细胞迅速放回 37℃、5% CO₂ 培养箱继续培养,并分别于照射 6 h 用 Trizol 提取照射组及未照射组淋巴细胞总 RNA,并经琼脂凝胶电泳检测和紫外分光光度计定量合格后, -80℃ 保存备用。

1.6 探针标记与杂交 参照 Illumina TotalPrepRNA 扩增试剂盒进行 RNA 的扩增和纯化;杂交试剂配制及芯片杂交;室温孵育;E1BC 洗液、乙醇的室温洗涤及染色;干燥。

1.7 差异表达基因的荧光扫描和分析 通过 BeadScan 扫描和数据获取软件对芯片灰度扫描图进行分析,得到芯片上每个基因点的原始信号值,即所有有效重复点的前景信号值减去背景信号值的平均值,然后利用 BeadStudio 数据分析软件进行分析处理。判定基因差异表达的标准是通过 DiffScore 值来体现的,DiffScore 是一种差异分值,它体现一个探针在两种组织中的差异表达程度,当 DiffScore 值大于 20 或小于 -20 时才认为有差异表达,DiffScore 值大于 20 认为是高表达,小于 -20 认为是低表达。

1.8 RT-PCR 对基因芯片结果的验证 采用 SYBR Green 实时荧光定量 PCR 技术对所筛选的 3 个有差异表达且有意义的基因进行验证,分别是 EGR1、TAIAP1、HLA-DMB,并以 B-actin 为内参控制基因。用 ABI Prism 7 900 进行实时 PCR 扩增,每样品做 3 个平行样,并用 ABI Prism 7 900 Sequence Detection System 软件进行分析。

基金项目:中国核工业集团公司基金项目(编号:61609080201)

作者单位:中国辐射防护研究院辐射医学与环境医学研究所,山西太原 030006

作者简介:李建国(1976~),男,山西运城人,助理研究员,硕士,研究方向:辐射生物效应和辐射损伤防护药物研究。

2 结果

本研究采用的是美国 Illumina 公司 Human - 6 全基因组表达谱微珠芯片 ,它可以同时获得 37 000 个转录子的表达情况 ,并且具有样本需求量少(每张芯片仅需 50 ~ 100ng 总 RNA 样本) 、50 碱基的全长探针设计提供更可靠的特异性和敏感度、冗余度设计(每个点重复 30 倍) 提供更准确地数据等特点 ,非常适合高通量水平上的生物学领域研究。本研究通过对 0. 1Gy、0. 2Gy、0. 5Gy、1. 0Gy 四个剂量水平照后 6h 点离体人外周血淋巴细胞基因芯片结果与未照射组的结果进行分析比较 ,有如下实验结果:

- 2.1 0. 1Gy 照后 6h 的差异基因结果 离体人外周血淋巴细胞在 0. 1Gy 剂量水平上照后 6h 点与未照射组进行比较 ,所筛选出的差异基因有 1177 条 ,其中上调表达有 690 条 ,下调表达有 487 条。(具体的差异基因数量详见表 1)。
- 2.2 0. 2Gy 照后 6h 的差异基因结果 离体人外周血淋巴细胞在 0. 2Gy 剂量水平上照后 6h 点与未照射组进行比较 ,所筛选出的差异基因有 1 922 条 ,其中上调表达有 827 条 ,下调表达有 1 095 条。(具体的差异基因数量详见表 1)。
- 2.3 0. 5Gy 照后 6 h 的差异基因结果 离体人外周血淋巴细胞在 0. 5Gy 剂量水平上照后 6h 点与未照射组进行比较 ,所筛选出的差异基因有 492 条 ,其中上调表达有 251 条 ,下调表达有 245 条(具体的差异基因数量详见表 1)。
- 2.4 1. 0Gy 照后 6 h 的差异基因结果 离体人外周血淋巴细

胞在 1. 0Gy 剂量水平上照后 6h 点与未照射组进行比较 ,所筛选出的差异基因有 2 615 条 ,其中上调表达有 1 267 条 ,下调表达有 1 348 条。(具体的差异基因数量详见表 1)。

2.5 4 个剂量水平上照后 6 h 的共同差异基因结果 离体人外周血淋巴细胞在 0. 1Gy、0. 2Gy、0. 5Gy、1. 0Gy 四个剂量水平上照后 6h 与未照射组相比较 ,所筛选出的共同差异基因有 114 条 ,其中上调表达有 条 ,下调表达有 条 ,并且 GADD45A (Homo sapiens growth arrest and DNA - damage - inducible) 、ZNF154 基因(Homo sapiens zinc finger protein 154) 等基因体现出了一定的剂量效应关系(具体的差异基因数量详见表 1)。

2.6 实时荧光定量 RT - PCR 对差异表达基因的验证结果 结果显示 ,EGR1(早期响应因子 1) 、HLA - DMB(主要组织相容复合体) 及 TAIAP1 (细胞凋亡调节抑制基因) 三个基因的溶解曲线在不同剂量点及不同时间点均为单峰 ,表明上述基因均为特异性产物;通过对 EGR1(早期响应因子 1) 、HLA - DMB(主要组织相容复合体) 及 TAIAP1 (细胞凋亡调节抑制基因) 基因的扩增曲线进行相对定量结果分析。相对定量比值的计算公式: $Fold = 2^{-\Delta\Delta C_t} = 2^{-(\Delta C_{t1} - \Delta C_{t2})}$ 式中 $\Delta C_{t1} - \Delta C_{t2} = (C_t \text{ 待测基因 样本 1} - \Delta C_t \text{ 管家基因 样本 1}) - (C_t \text{ 待测基因 样本 2} - \Delta C_t \text{ 管家基因 样本 2})$ 并将各剂量及照后不同时间点与基因芯片检测的 Diffscore 值进行比较 ,发现这三个基因的 RT - PCR 结果与基因芯片检测结果的差异表达趋势是一致的 ,扩增引物、扩增条件及扩增的相对定量结果分别见表 2、表 3。

表 1 外周血淋巴细胞不同剂量在照后 6h 的差异基因结果				
照射剂量点	差异表达基因	上调表达基因	下调表达基因	共同差异表达基因
0. 1Gy	1177	690	487	4 个剂量点的共同差异表达基因数量为 114 ,其中上调 62 条 ,下调 52 条。
0. 2Gy	1 922	827	1 095	
0. 5Gy	496	251	245	
1. 0Gy	2 615	1 267	1 348	

表 2 RT - PCR 扩增基因的引物序列及扩增条件		
基因简名	扩增的引物序列	PCR 的扩增条件
EGR1	F: 5' AAGTTTCACGTCTTGGTGCCT 3'	95℃ for 10min 94℃ for 10s , 60℃ for 50s 72℃ for 20s , 40 cycles
	R: 5' GCTCAGCCCTCTTCCTATTT 3'	
TAIAP1	F: 5' CTGTGGAGGAAGAACCTAAAT 3'	95℃ for 10min 94℃ for 10s , 60℃ for 50s 72℃ for 20s , 40 cycles
	R: 5' GGATGAGTAAACAAGGCAAAT 3'	
HLA - DMB	F: 5' GACCTCATTCCTGGGACTATGC 3'	95℃ for 10min 94℃ for 10s , 60℃ for 50s 72℃ for 20s , 40 cycles
	R: 5' GGGTCTTTAACTCCCTTCCTCA 3'	
B - actin	F: 5' CCTCTCCCAAGTCCACACAG 3'	95℃ for 10min 94℃ for 10s , 60℃ for 50s 72℃ for 20s , 40 cycles
	R: 5' GGGCACGAAGGCTCATCATT 3'	

3 讨论

- 3.1 电离辐射对早期生长应答因子(EGR) 的影响 在本研究过程中发现早期生长应答因子 - 1(EGR1) 在 0. 1Gy、0. 2Gy、0. 5Gy、1. 0Gy 四个照射剂量照后 6h 均出现了差异表达; 早期生长响应基因 2(EGR2) 在 0. 1Gy、0. 2Gy、0. 5Gy、1. 0Gy 四个照射剂量照后 6h 点均出现了差异表达。已有研究表明^[6] ,在 EGR1 基因的调控序列中含有 6 个保守的 CC(A/T) 6GG 结构域 ,而这些结构域可感受细胞内外的理化刺激诸如自由基、电离辐射等 ,继而诱导基因的高表达; 还有研究^[7] 利用 EGR1 基因的辐射诱导性 ,将 EGR1 基因启动子与肿瘤杀伤基因进行耦联 ,构建了辐射诱导性基因表达调控系统。在 GeneBank 数据库功能研究中认为 EGR 是与细胞间信号转录有关的基因。
- 3.2 电离辐射对生长抑制、DNA 损伤基因(GADD45) 的影响 Grace 等^[8] 研究后认为 ,生长抑制、DNA 损伤基因(Growth arrest and DNA damage gene 45 ,GADD45) 位于 p53 基因的下游 ,与辐射诱导细胞周期阻滞关系密切。徐丽砂等^[9] 研究了照射

剂量与 GADD45 基因表达的关系 ,对其作为辐射生物剂量计的可行性进行了探讨。本研究过程中发现 GADD45A 在 0. 2Gy、0. 5Gy、1. 0Gy 照后 6h 点均出现了差异表达 ,同时在 0. 1Gy 照后 6h 点还发现了 GADD45G 也出现了差异表达 ,而在 Gene-Bank 数据库功能研究中认为 GADD45 是与 DNA 修复、细胞凋亡及细胞周期调控等功能有关的基因。

3.3 电离辐射对丝/苏氨酸激酶(BRSK1) 的影响 本研究过程中发现 0. 2Gy 照后 6hBRSK1 均出现了差异表达 ,并且本研究室在离体外周血淋巴细胞 0. 2Gy 剂量水平上前期筛选过程中也发现了 BRSK1 在 12h、24h 点的差异表达^[10] ,而在 Gene-Bank 数据库功能研究中认为 BRSK1 是与电离辐射响应有关的基因。

3.4 电离辐射对肿瘤坏死因子(TNF) 的影响 在本研究过程中发现肿瘤坏死因子受体 10B(TNFRSF10B) 、肿瘤坏死因子相互作用蛋白 1(TNIP1) 及肿瘤坏死因子 α 诱导蛋白 8(TN-FAI8L2) 在 0. 1Gy、0. 2Gy、0. 5Gy、1. 0Gy 四个剂量照后 6h 均出现了差异表达。而在 GeneBank 数据库功能研究(下转第 45 页)

[4] 卫生部卫政法发[2008]13 号 ,卫生部关于成立第六届卫生部卫生标准委员会的通知[Z]. 2008.

[5] 卫生部卫政法函[2010]820 号 ,卫生部办公厅关于征集 2011 年度卫生标准制修订计划项目的通知[Z]. 2010.

[6] 卫生部卫政法综便函[2010]78 号 ,卫生部政法司关于卫生标准“十二五”发展规划有关工作的通知[Z]. 2010.

[7] GB/T 1.1 - 2009 标准化工作导则 第 1 部分: 标准的结构和编写[S]. 2009.

[8] 卫生部卫政法综便函[2010]132 号 ,卫生部政法司关于编

制 2010 年卫生标准制修订计划的通知[Z]. 2010.

[9] 卫生部卫政法发[2009]36 号 ,卫生部关于印发《卫生标注审查管理办法》、《卫生标准制(修) 订项目管理办法》和《卫生标准专业委员会工作量化评价办法》的通知[Z]. 2009.

[10] 财行[2007]29 号 ,财政部、质检总局、国家标准委关于印发《国家标准制修订经费管理办法》的通知[Z]. 2007.

(收稿日期:2010 - 09 - 13)

(上接第 42 页) 中认为 TNF 是与免疫响应、细胞凋亡、细胞分化及信号转导等有关的基因。曹明富等^[11] 经研究后认为肿瘤坏死因子可调节细胞对电离辐射的敏感性 ,而在肿瘤病人放疗时使用 时 ,则能提高病人正常组织对电离辐射的抗性 ,增加肿瘤对放疗的敏感性。

表 3 RT - PCR 扩增的相对定量结果				
扩增目的基因 ¹⁾	照射剂量点	Ct 均值	定量比值	DiffScore
EGR1	0. 1Gy	29. 10	12. 27	29. 10
	0. 2Gy	29. 32	14. 99	23. 35
	0. 5Gy	29. 40	5. 51	36. 47
	1. 0Gy	32. 51	5. 69	31. 47
	0Gy	29. 59	1	0
OTAIAP1	0. 1Gy	28. 75	2. 84	23. 17
	0. 2Gy	28. 06	5. 42	24. 94
	0. 5Gy	28. 27	4. 34	61. 30
	1. 0Gy	31. 24	2. 10	54. 12
	0Gy	26. 84	1	0
HLA - DMB	0. 1Gy	23. 91	1. 09	- 63. 53
	0. 2Gy	24. 41	1. 23	- 114. 89
	0. 5Gy	23. 84	0. 71	- 82. 33
	1. 0Gy	26. 48	1. 21	- 23. 30
	0Gy	21. 06	1	

注: 1) 管家基因 B - actin: 0 对照组的 Ct 均值为 15. 81; 0. 1Gy 的 Ct 均值 15. 85; 0. 2Gy 的 Ct 均值依次为 16. 59; 0. 5Gy 的 Ct 均值 16. 70; 1. 0Gy 的 Ct 均值 16. 62。

3. 5 电离辐射对 TP53 细胞凋亡调节抑制基因(TRIAP1) 的影响 在本研究过程中发现及 0. 1Gy、0. 2Gy、0. 5Gy、1. 0Gy 照后 6h 均发现了 TP53 细胞凋亡调节抑制基因(TRIAP1) 有差异表达 ,而在 GeneBank 数据库功能研究中认为 TRIAP1 是与 DNA 损伤、细胞凋亡及细胞周期抑制中由 P53 族基因引起的信号转导。

4 结论

总之 ,本研究在 0. 1Gy 、0. 2Gy、0. 5Gy、1. 0Gy 四个剂量水平上照后 6h 的研究过程中发现了许多有意义的差异基因 ,这将为进一步辐射差异基因的筛选和辐射损伤机制的研究提供

依据。

参考文献:

[1] Schena M ,Shalon D ,Davis RW ,et al. Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray [J]. Science ,1995 ,270(5235) : 467 - 470.

[2] Schena M ,Shalon D ,Heller R ,et al. Parallel human genome analysis: Microarray based expression monitoring of 1000 genes [J]. Proc Natl Acad Sci USA ,1996 ,93(20) : 10614 - 10 619.

[3] 郭万峰 ,王升启 ,黄坚 ,等. 电离辐射相关低密度寡核苷酸基因芯片的制备 [J]. 第四军医大学学报 ,2006 ,27(1) : 66 - 69.

[4] Yao J ,Feng B. Combined cDNA array comparative genomic hybridization and serial analysis of gene expression analysis of breast tumor progression [J]. Cancer Res ,2006 ,4 065.

[5] Sanch EZ - Carbayo M ,Soccin ND ,Lozano J ,et al. Defining molecular profiles of poor outcome in patients with Invasive bladder caner using oligonucleotide microarrays [J]. Clinical Oncology ,2006 ,24(5) : 778 - 789.

[6] 蒋鸣 ,许建华 ,陈森清. Egr - 1 基因辐射诱导表达的研究 [J]. 江苏预防医学 ,2008 ,19(4) : 64 - 66.

[7] 王富友. Egr - 1 基因启动子介导肿瘤基因放疗的研究进展 [J]. 疾病控制杂志 ,2004 ,8(5) : 456 - 459.

[8] Grace MB ,McIeland CB ,Blakely WF. Real - time quantiat tive RT - PCR assay of GADD45 gene expression changes as a biomaker for radiation biodosimertry [J]. INT J Radiat Biol , 2002 ,78(11) : 1 101 - 1 121.

[9] 徐丽砂 ,艾文胜 ,蒋本荣 ,等. 电离辐射对外周血淋巴细胞 GADD45 基因表达的影响 [J]. 辐射研究与辐射工艺学报 ,2006 ,24(2) : 111 - 114.

[10] 李建国 ,闻建华 ,左雅慧 ,等. 0. 2Gyγ 射线照射人外周血淋巴细胞不同时间点差异基因表达谱研究 [J]. 辐射防护 ,2010 ,30(4) : 220 - 225.

[11] 曹明富 ,应蓓蓓 ,徐人尔. 7 - 5TNFα 和 β 对电离辐射诱导细胞凋亡效应的研究 [J]. 癌变 · 畸变 · 突变 ,1999 , 11(6) : 320.

(收稿日期:2010 - 08 - 17)