

文章编号: 1001-098X(2002)04-0177-03

· 放射医学 ·

基因芯片技术在放射生物学研究领域的应用

李雨^①, 李瑶^②

摘要: 机体对电离辐射反应非常复杂, 受许多分子调节途径控制, p53就是这样的应激途径之一。已经知道它涉及100多个基因的活动, 这些应激基因活动具有某种细胞特异性, DNA芯片技术可以完整地研究整个细胞或器官全部基因变化, 可以通过基因分析发现对电离辐射的基因反应差异, 从而建立一种新的分子放射生物学方法。应用该技术已经初步发现一些新的辐射反应基因活动, 在不同基因背景这些基因活动变化很大, 提示生物细胞对环境有害因素反应的复杂性及其在正常组织和肿瘤分化增殖过程中基因调控的重要意义, 这种技术也可能成为肿瘤治疗和其他环境毒理研究的检测和预测方法。

关键词: 基因芯片; 放射生物学; 电离辐射

中图分类号: Q345.2, Q78 **文献标识码:** A

The application of radiobiological study by gene chip technique

Li Yu, Li Yao

(^① Department of Navy Radiation Medicine, Second Military Medical University; ^② Institute of Genetics of Fudan University of China, Shanghai 200433, China)

Abstract: The responses to ionizing radiation are complex and are regulated by a number of overlapping molecular pathways. One such stress-signaling pathway involves p53, which regulates the expression of over 100 genes already identified. It is also becoming increasingly apparent that the pattern of stress gene expression has some cell type specificity. It may be possible to exploit these differences in stress gene responsiveness as molecular markers through the use of a combined informatics and functional genomics approach. The techniques of microarray analysis potentially offer the opportunity to monitor changes in gene expression across the entire set of expressed genes in a cell or organism. It again highlights the importance of a cellular context to genotoxic stress responses; it also raises the prospect of expression profiling of cell lines, tissues, and tumors. Such profiles may have a predictive value in cancer therapy regimens, or identification of exposures to environmental toxins.

Key words: gene chip; radiobiology; irradiation

细胞或组织器官的复杂分子调节系统可以对多种环境毒理因素起反应。这些环境毒理因素有创伤、营养缺乏、代谢毒物、紫外线和电离辐射以及其他DNA损伤因子等。机体的生理应激反应是通过复杂的信号网络实现的, 在分子水平, 不同的环境应激可能拥有一些共同的通路, 其终末效应却往往

是不同的。随着对细胞环境应激反应过程复杂性了解的不断深入, 越来越使人们认识到经典的研究单个生物分子的方法已经不能解决这样的问题。基因芯片技术提供了一种可以实时检测数千乃至数万个基因表达变化的手段, 已有实验室建立了专门检测电离辐射信号反应通路的基因芯片技术^[1], 该技术同样也可以用来检测其他环境毒理因素作用, 以及从器官和整体生物学水平进行同样研究。

收稿日期: 2002-04-26

作者简介: ①李雨 (1956-), 男, 河南开封人, 第二军医大学海军医学系放射医学教研室 (上海, 200433) 博士, 副教授, 主要从事分子放射生物学研究。

②李瑶 (1965-), 女, 四川达川人, 复旦大学遗传研究所 (上海, 200433) 博士后, 副教授, 主要从事分子生物学及基因芯片技术的研究。

审校者: 第二军医大学放射医学教研室 郑秀龙

1 已建立的基因芯片技术

由于实验手段所限, 在20世纪80年代, 有人猜测哺乳类细胞缺乏明显的电离辐射导致DNA损伤的应激基因反应, 尽管当时已经发现酵母菌有约

1%的辐射反应基因^[9]。后来陆续发现,电离辐射和其他DNA损伤因子可以引起许多哺乳类细胞中多达数百种基因变化,其中有一些可能是特异性对辐射损伤反应(如一些DNA损伤修复基因和机体内潜伏病毒基因激活等),更多的则是电离辐射触发许多非特异性损伤的“共同通路”反应基因,如生长因子、细胞周期蛋白和许多原癌基因的活动等等^[9]。它们通常亦可出现于许多其他生理应激反应过程中,如DNA碱基损伤因子导致早期反应基因c-fos、c-jun表达,可以见于许多其他生理反应。

虽然可能存在许多信号反应通路被电离辐射所激活,p53仍是目前倍受关注的一个焦点。所以,有人提出了以p53为中心的机体应激反应共同调节通路假说^[9],其基本要点为:辐射对DNA的损伤触发核内共济失调性毛细血管扩张症突变基因激酶等,辐射对细胞膜损伤触发一系列酶促反应的“瀑布效应”(通过一些转录因子如核因子κB实现),这些因素都直接导致p53的变化,进而发挥广泛生理功能;p53本身又具所谓“序列特异性转录因子”功能,在人类基因序列中存在200~300个p53结合位点,目前已经发现100多个基因活动受p53调节,提示机体电离辐射反应涉及庞大而复杂的分子调节系统。

研究还发现,对电离辐射的基因反应是变化多端的,来源于不同组织的细胞株、同一组织来源而性状不一的细胞株,其基因辐射反应各异。在不同人类肿瘤细胞株受照后的基因反应中,ATF3和FRA1因其与p53的特殊关系尤受关注,继续应用p53野生型株以及裸鼠实验,证实了这两个基因的确受p53调控,同样的方法也证实其他受p53调控的基因存在^[9]。

为了回顾性研究核事故受照人员剂量及健康状况,已经应用诸如外周血淋巴细胞染色体畸变、红细胞膜特殊葡萄糖基突变以及电子束测定牙釉质等不同方法作为受照剂量计,芯片技术因其快速和大容量信息也有可能成为该领域一种新的检测手段。有人研究了受照0.2 Gy以上3 d内淋巴细胞一些基因的变化^[9],其中一些基因表达量与受照剂量正相关,但是若达到实际应用水平还需要进一步的重复实验。

2 基因芯片技术不断完善

已经有多种基因芯片技术问世,如基因表达序

列分析(serial analysis of gene expression, SAGE),寡核苷酸微阵列和cDNA微阵列等,后者是用聚合酶链反应(polymerase chain reaction, PCR)技术扩增制备的cDNA“印刷”在玻片或者尼龙基质上,任何被克隆的EST(expressed sequence tag, 表达序列标签)序列均可用这种芯片分析,其效果优于抗体分析技术,甚至可以用于整段基因识别。

目前,巨大的EST克隆文库已经建立,其中可能包括约5万个人类基因,而人类基因组计划的初步研究结果提示,人类基因总数为3~4万个^[7],以目前的芯片技术,有可能已经囊括全部人类基因,现在的问题是如何更正确合理地去发现和证实它,而随之发展的蛋白芯片技术将有助于解决这一问题。

应用人类恶性淋巴瘤细胞株作的实验,观察到受照射后46个基因发生变化,进一步用常规的单个探针杂交技术与芯片技术的实验结果比较,发现二者的相关系数为0.79($P < 0.0001$),可认为基因芯片技术是一种类似于逆转录PCR的中等精确度的实验手段^[9]。

芯片技术获得的信息量是空前巨大的,必须依靠计算机技术加以解决。有许多相关的计算机数据库系统可供使用,如著名的NCI-ADS(National Cancer Institute's antineoplastic drug screen, 美国国立癌症研究所的抗肿瘤药物筛选)系统,收集了60种人类肿瘤细胞系的300种以上特殊生物分子标志,以及它们对7万种药物因子的反应资料数据。“Cluster”可以通过分析比较靶分子和作用因子来发现其内在规律。一些专用的芯片数据分析判读系统也在迅速发展之中。还存在专有基因信息数据库——EST库、Cluster库、全长基因数据库以及各种国际公开数据库——Genbank、embl、swiss-prot、pir、sp-tremble、em-tags(est, gss)等等。这些强大的生物分析软件和信息检索软件可迅捷、高质获取所需生物信息,可以提供包括基因序列分析和拼接、引物设计、ePCR(电子PCR)、电子race、核酸序列结构分析、基因功能预测服务、蛋白质结构分析和功能预测、专利服务等各项研究的必要信息^[9]。

基因芯片技术可以通过单次杂交检测数千乃至更多基因变化,而常规方法已不能提供合适的统计学意义分析。对于小样本分析, $P = 0.01$ 已经可以达到实验要求,而对于一次检测1 000个基因来说,其随机误差数已达到100个基因,显然,对这种现

象进行进一步统计学研究就很有必要了,有人为此设计制作了“芯片意义分析(significance analysis of microarrays, SAM)系统”。

SAM系统通过基于基因特异性 t 检验方法进行基因显著性变化分析。经过重复实验,给每一个相关基因赋予一定的“刻度(score)”,若实验数据超出该期望阈值变化,即意味着可信度降低,这种基因可视为假阳性。检测阈值可以随样本多少加以调整,当然假阳性也随之变化。应用人类淋巴细胞株GM14660和GM08925照射5Gy后分析发现,在观察的6800个基因中,有34个发生变化,将分析系统中的“阈值系数”分别调整至0.3、0.2和0.1时,有意义的变化基因数则相应分别为92、170和184;在这34个变化基因中有19个与细胞周期活动有关(细胞周期素、有丝分裂因子、磷酸化酶等);有4个基因与DNA损伤修复有关(其中有核苷酸切除修复酶,却没有发现与电离辐射导致DNA双链断裂相关修复酶的活动),还有4个基因与细胞凋亡有关,其余的基因功能尚不明确^[9]。

3 建立基因芯片技术的深远意义

日益成熟的基因芯片技术已经使研究大范围基因变化及其产物间存在的相互作用、综合分析某些生命现象成为可能,具有划时代的革命意义。国内外相关公司和科研机构竞相进行基因芯片的研制,已经推出了一批很有价值的产品。可以预见的是,该技术在放射生物学领域亦大有作为。例如,许多研究都证实,在辐射致癌剂量范围内,辐射诱导的突变率极低,推断在辐射致癌的发生过程中,更重要的是许多基因调节过程异常,其中涉及大量基因的开关及其调节,经过一个漫长的、错综复杂的、此消彼长的基因调节过程而出现^[10],应用基因芯片技术可以实时检测这些基因,可以在这些浩瀚的基因变化中寻找其蛛丝马迹;再如,应用基因芯片技术研究辐射敏感人群,就有可能更直接、更准确发现人类异常辐射反应基因,可以从基因表达水平了解辐射生物效应发生机理,甚至有可能回答生命科学的一些根本性问题,还可能进一步完善成为

筛选辐射敏感人群、诊断辐射致癌的有力工具。笔者根据这个思路目前在俄罗斯准备对切尔诺贝利核事故受照人员基因变化进行相关研究。已有资料显示,在不同基因背景,这些辐射反应基因活动的变化很大,提示生物细胞对环境有害因素反应的复杂性,也提示基因调控在正常组织和肿瘤分化增殖过程中的重要意义,因此,基因芯片技术也可能发展成为肿瘤治疗和其他环境毒理研究的检测和预测方法。

参考文献:

- [1] Amundson SA, Bitterner M, Meltzer P, et al. Induction of gene express as a monitor of exposure to ionizing radiation [J]. *Radiat Res*, 2001, 156(5): 657-661.
- [2] Fomace Jr AJ, Alamo IJ and Hollander MC. DNA damage-inducible transcripts in mammalian cells[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1988, 85: 8800-8804.
- [3] Fomace AJ. Mammalian genes induced by radiation; activation of genes associated with growth control [J]. *Ann Rev Genet*, 1992, 26: 507-526.
- [4] Amundson SA, Myers TG and Fornace AJ. Roles for p53 in growth arrest and apoptosis: Putting on the brakes after genotoxic stress [J]. *Oncogene*, 1998, 17: 3287-3300.
- [5] Amundson SA, Bittner M, Chen YD, et al. cDNA microarray hybridization reveals complexity and heterogeneity of cellular genotoxic stress responses[J]. *Oncogene*, 1999, 18: 3666-3672.
- [6] Amundson SA, Shahab S, Bittner M, et al. Identification of potential mRNA markers in peripheral blood lymphocytes for human exposure to ionizing radiation [J]. *Radiat Res*, 2000, 154: 342-346.
- [7] Venter JC, Adams MD, Myers EW, et al. The sequence of the human genome[J]. *Science*, 2001, 291: 1304-1351.
- [8] Koch PCA, Momenan R, Amundson SA, et al. Estimation of relative mRNA content by filter hybridization to a polynucleotide probe[J]. *Biotechniques*, 2000, 29: 712-714.
- [9] Scherf L, Ross DT, Waltham M, et al. A gene expression database for the molecular pharmacology of cancer [J]. *Genet*, 2000, 24: 236-244.
- [10] Tusher VG, Tibshirani R and Chu G. Significant analysis of microarrays applied to the ionizing radiation response [J]. *PNAS*, 2001, 98(9): 5116-5121.
- [11] 李雨. 辐射致癌研究进展 [J]. *国外医学·肿瘤学分册*, 2000, 增刊: 206.