

## ·放射生物学·

## C57 小鼠受照后胸腺细胞基因表达谱的变化

李智恒 李雨

**【摘要】目的** 研究受 1Gy 射线照射后一个月, C57 小鼠胸腺细胞基因表达谱的变化。**方法** 使用 Agilent 小鼠 oligo 基因芯片技术, 观察受照射小鼠和非受照射小鼠两组间的基因差异表达。**结果** 在所观察小鼠 21319 个基因中, 107 个基因在受照射小鼠胸腺组织中表达上调 2 倍以上(其中 13 个上调 4 倍以上), 9 个基因表达下调超过 200%(其中 2 个下调超过 400%), 这些变化基因涉及细胞的一些基本代谢活动。**结论** 变化明显的基因功能涉及胚胎发育, 组织形成与维持, 免疫与应激、蛋白合成、凋亡、信号转导等, 上调基因的数量远多于下调基因数量, 其中编码角蛋白在胚胎发育中的作用值得注意。在变化明显的上调和下调基因功能中都涉及到 PI3-K, 也是一个值得继续关注现象。

**【关键词】** 基因表达谱; 电离辐射; 胸腺; 小鼠, 近交 C57

**【中图分类号】** Q345.2 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1673-4114(2007)04-0240-05

### Profiling of differentially expressed genes induced by ionizing radiation in thymus cells of C57 mice

LI Zhi-heng, LI Yu

(Department of Radiation Medicine in Navy Faculty, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China)

**【Abstract】Objective** Microarrays was used to text changes of gene expression of thymus cell in C57 mice one moth after exposed to 1 Gy  $\gamma$ -ray irradiation. **Methods** The difference of gene express between irradiated and un-irradiated mice being analysis by Agilent mouse oligo microarrays. **Results** In the observed 21319 known genes, 107 up-regulated at least 2-fold (13 excess 4-fold); whereas 9 genes were down-regulated 2-fold (2 more 4-fold). The function of theses genes are known as some basic metabolic process. **Conclusions** The gene changed in the experiment involved embryo development, organ formation and maintain, immunity or stress, protein compose, apoptosis, signal transduction. The number of gene is much more than that of down-regulated. It ought to be noticed that the gens which coding homy protein in embryo development, and ought also to be noticed that the gens which involve the function of PI3-K.

**【Key words】** Gene expression profiling; Ionizing radiation; Thymus; Mice, indred C57

电离辐射可以导致复杂的生物效应, 对于人类的社会实践活动来说, 辐射的远后效应更应受到重视, 因为无论作为从业者或者是在核事故情况下, 受到照射的人群数量是很大的, 这种受照射的特点之一就是全身受到均匀的较小剂量照射, 其主要危害是辐射导致的远后效应<sup>[1]</sup>。这种辐射对机体的损伤和修复并存, 临床过程漫长, 症状复杂, 在分子生物学水平表现为多靶点、多层次及多通路的特点, 深

入研究这种情况下辐射相关基因的活动过程无论在理论和实践上都有重要的意义。

以往人们在辐射诱导基因表达研究方面做了大量工作, 但由于技术条件的限制, 研究只限于少量基因, 而新发展起来的基因芯片技术, 为大规模研究细胞在辐射前后基因表达谱的改变提供了可能, 已经有不同实验室应用基因芯片技术研究了不同细胞株, 甚至整体动物受照射后特定组织基因表达的变化<sup>[2]</sup>。幼年生物胸腺细胞增殖活跃, 对辐射敏感且成分均一, 研究其辐射后基因表达的变化, 将会在整体动物情况下获得辐射后该细胞系统整体基因变化信息。本研究应用基因芯片技

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(30270421)

作者单位: 200433 上海, 第二军医大学海军医学系放射医学教研室

通讯作者: 李雨(E-mail: liyuyaoming@hotmail.com)

术观察了小剂量照射后小鼠胸腺细胞基因表达谱的变化,目的是为了更准确了解小剂量照射以后的辐射反应基因,为研究人类辐射远后效应提供新的理论和实践依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验动物

雄性 C57 纯系小鼠,体质量 18~22g, 8~10 周龄,购于第二军医大学实验动物中心。

### 1.2 照射条件

利用本校  $^{60}\text{Co}$   $\gamma$  射线照射源,一次全身照射剂量 1Gy,照射剂量率为 1.0 Gy/min。

### 1.3 小鼠胸腺细胞总 RNA 的提取和芯片杂交

分别将照射后 1 个月及未照射雄性 C57 纯系小鼠各 50 只断颈处死,取出完整胸腺组织,用 4℃ 的 1640 培养液清洗后离心,干冰保存送至生物芯片国家工程研究中心,按照 Agilent 实验原理及步骤提取总 RNA、总 RNA 质量检测、荧光标记 cRNA 合成、荧光探针纯化、芯片杂交和数据分析。

使用 2 张 Agilent 小鼠 oligo 芯片,芯片产品目录号为 G4121A,芯片编号为 5278 号和 5279 号。

实验标记方法采用 Agilent 放大标记方法,其中受照射实验组 RNA(1 号)采用荧光 cy3 标记,对照组 RNA(2 号)RNA 采用荧光 cy5 标记。

### 1.4 荧光扫描和结果分析

芯片结果采用 Agilent 扫描仪进行扫描,

Image 软件读取数据扫描,然后采用 Feature Extration 进行 Normalize 处理分析,最后得出 ratio 值 cy3/cy5,即实验组/对照组。差异基因筛选标准为 ratio  $\geq 2$  为上调基因, ratio  $\leq 0.5$  为下调基因。

芯片实验结果符合质控标准:(1)检测率:5278 号为 91.27%, 5279 号为 92.29%;(2)变异系数平均值(CV 值,%):5278 号为 6.21%, 5279 号为 4.97%;(3)片间重复性:92.38%;(4)总体评价:各芯片荧光信号强度强且均一,重复点 CV 值变化小,综合结果显示各项指标均明显优于合同指标。

## 2 结果

### 2.1 总 RNA 提取结果

胸腺组织经过 RNA 抽提,再进行 1% 琼脂糖电泳和 lab-on-chip (芯片实验室)电泳鉴定,质量合格,进行下一步实验。

### 2.2 差异表达基因筛选结果

对芯片荧光结果进行分析显示,在所观察的小鼠胸腺细胞 21 319 个基因中,107 个基因在受照射小鼠胸腺细胞中表达上调 2 倍以上(其中 13 个上调 4 倍以上),9 个基因表达下调超过 200%(其中 2 个下调超过 400%),这些表达差异基因涉及细胞的许多基本代谢活动(免疫与应激、核酸合成、凋亡、细胞周期、信号转导、转运蛋白与通道蛋白等),上调幅度超过 4 倍的基因分析具体数据见表 1,下调幅度超过 200%的基因分析具体数据见表 2。

表 1 C57 小鼠受照后胸腺细胞中 13 个上调 4 倍以上的基因

基因库编号	5278 号 cy3/cy5	5279 号 cy3/cy5	编码产物
NM_007443	4.425659	4.250989	微球蛋白 $\alpha$ 1
AJ011413	4.013518	4.276692	白蛋白 1
NM_008645	4.940664	5.123877	鼠球蛋白 1
AK009600	4.89396	3.048518	乙醇脱氢酶 7(类)或 $\sigma$ 多缩氨基酸
NM_010556	6.473105	5.368194	白细胞介素 3
NM_008475	11.83334	11.95896	角质素复合体 2, 基本基因 4
AK014554	4.262068	3.757834	蛋白磷酸酶 2, 调节亚单位 B(B56)
AK009036	7.082026	4.929089	成年鼠舌肌蛋白
M65237	5.012856	4.778448	鼠球蛋白 2
NM_008631	6.502062	7.491841	金属硫蛋白 4
AK011118	4.498797	4.267971	纤维蛋白原, $\beta$ 多缩氨基酸
NM_028798	7.342403	7.132328	鼠肌蛋白
NM_008508	11.15123	11.10709	角蛋白

表 2 C57 小鼠受照后胸腺细胞中 9 个下调超过 200% 的基因

基因库编号	5278 号 cy3/cy5	5279 号 cy3/cy5	编码产物
NM_013559	0.48092	0.455545	热休克蛋白 105
BC962745	0.44449	0.400387	免疫球蛋白 kappa 可变链 8(V8)
NM_008843	0.44417	0.377264	泌乳素
NM_008648	0.17226	0.149645	尿蛋白 4
NM_009802	0.3303	0.311965	碳酸酐酶 6
BY104651	0.46821	0.418974	类似于心钠素肽原-鼠(LOC230899) mRNA
BC024677	0.22984	0.135814	雄激素复合蛋白 $\beta$
NM_009463	0.49587	0.551776	解耦联蛋白 1, 线粒体
NM_031188	0.36071	0.388323	尿蛋白 1

### 3 讨论

胸腺是动物生命发育和代谢过程中重要的器官之一,其细胞成分相对均一,取材方便,实验结果容易分析,是整体动物实验常用的观察对象。在放射生物学领域也经常采用这种方法。总的来看,本实验涉及变化基因的数量不多,大部分基因表达变化不明显,但分析了在本实验中变化明显的一些基因功能,可以发现很多值得注意的线索。

#### 3.1 受照射以后小鼠胸腺细胞表达水平上调 4 倍以上的 13 个基因

上调变化最为明显(10 倍以上)的基因是 NM\_008475 和 NM\_008508。这两个基因都是属于编码小鼠角蛋白的功能基因,近年受到较多关注。据报道, NM\_008475 在小鼠的眼角膜蛋白发育过程不可或缺<sup>[9]</sup>,在肠上皮细胞完整性的维持起重要作用,其突变可导致小鼠毛发异常<sup>[9]</sup>。而 NM\_008508 的研究更受关注,2000 年以来 Pubmed 收录的有关 NM\_008508 的报告近 70 篇,可以将其归纳为以下几个方面:首先是该基因通过复杂的信号调节活动参与广泛的胚胎发育过程<sup>[9]</sup>,参与核因子- $\kappa$ B 介导的细胞周期素表达,控制脊椎动物胚胎基板发育,该基因活动与转录因子 c-rel 和 RelA 控制胚胎和成年的表皮增生和其动态平衡相关<sup>[9]</sup>, p63 和 p53 都可以影响该基因参与胚胎四肢、颌面和皮肤形态的发生,还有证据显示该基因活动异常可以导致角质层缺乏并导致新生幼鼠死亡<sup>[9]</sup>。另一个方面是其对动物皮肤、毛发形态和功能的影响,该基因突变小鼠可以存活但出现脱发和皮肤增

生肥厚,促进牛皮癣发生,皮肤创伤愈合障碍<sup>[9]</sup>,还有报告称该基因与促进皮肤鳞状上皮癌发生的蛋白酶样基因类似。该基因活动的其他方面报告涉及眼癌患者亲属中异常的表皮分化和间叶组织相互作用<sup>[9]</sup>,甲状腺腺素相关的蛋白触发胚胎乳房发育和乳头皮肤组织的分化<sup>[9]</sup>,苍蝇的卵子和绒毛发生和小鼠的精子生成<sup>[10]</sup>等。尚未见到有关电离辐射与该基因活动相关的报告,但作为一种致畸致癌因子,电离辐射在细胞遗传学研究中具有特殊的应用价值,鉴于该基因活动主要涉及生命发生的基本阶段,而癌症发生过程也是一个细胞组织增殖失控幼稚化的过程,故继续深入研究该基因受电离辐射作用的变化过程及其机理是很有必要的。

受照射后胸腺组织表达水平上调 5~7 倍的有 4 个基因: NM\_010556、AK009036、NM\_008631 和 NM\_028798。其中, NM\_010556 是细胞因子白细胞介素 3 的编码基因,胸腺是幼年动物的主要免疫器官之一,与白细胞介素 3 的产生和调节息息相关,而白细胞介素 3 在辐射损伤中的重要调节作用,在治疗辐射损伤过程的临床应用价值已经受到长期的关注。本实验显示的 NM\_010556 表达增加应该是一种机体受照以后的代偿性调节反应,这种反应可能是胸腺组织直接受照所致,也可能是全身复杂的神经体液调节所致,其基因表达变化和白细胞介素 3 水平和其他细胞因子水平关系,以及和机体整个损伤修复过程有何关系,也是一个值得继续关注的问题。AK009036 和 NM\_028798 都是小鼠蛋白编码基因, NM\_008631 则编码一种小鼠金属

硫蛋白, 它们的功能尚不很明了。

受照小鼠胸腺组织表达水平上调4倍左右的基因分别是 NM\_007443、AJ011413、NM\_008645、AK009600、AK014554、M65237、AK011118, 令人感兴趣的是, 几种球蛋白基因上调都位于这个范围, 还涉及生化代谢酶类和胚胎发育过程的一过性蛋白。其中比较受到关注的是编码微球蛋白  $\alpha 1$  的 NM\_007443, 缺乏该微球蛋白小鼠增加肿瘤肺部转移率<sup>[12]</sup>, 这种微球蛋白可以抑制人类卵巢癌侵袭和转移, 并伴有磷脂酰肌醇 3-激酶(phosphoinositide 3-kinase, PI3-K)抑制相关的基因活动<sup>[13]</sup>。这种微球蛋白亦称为尿胰蛋白酶抑制因子, 这是一种从人尿中分离出来的糖蛋白, 它可以抑制多种丝氨酸蛋白酶的活性, 如胰蛋白酶、 $\alpha$ -糜蛋白酶、多形核中性粒细胞弹力蛋白酶、白细胞组织蛋白酶 G、透明质酸酶等, 尿胰蛋白酶抑制因子生理功能十分广泛, 对肿瘤的作用及其临床应用价值也逐渐得到重视, 它通过抗氧化作用机制抵御细菌内毒素导致的肺部损伤, 继发全身炎性反应导致的器官损伤<sup>[14]</sup>。该基因活动涉及肿瘤的发生与转移, 涉及感染发生的内毒素临床损伤, 与一些辐射敏感性遗传病密切相关, 尤其是伴有 PI3-K 抑制相关的基因活动, 是一个值得注意的现象。

### 3.2 受照射以后小鼠胸腺组织表达水平下调超过200%的9个基因

下调超过500%的基因2个: NM\_008648 和 BC024677。NM\_008648 编码成年鼠尿蛋白4, BC024677 编码雄激素复合蛋白  $\beta$ , 有关这两个基因的研究报告不多。

其余下调200%~500%的7个基因分别是: NM\_013559、BG962745、NM\_008843、NM\_009802、BY104651、NM\_009463、NM\_031188。这些基因大部分与能量代谢和水电质代谢相关, 这部分基因表达受到抑制可能说明受照射小鼠全身器官功能已经开始失代偿。

下调基因中 NM\_013559(热休克蛋白105)的相关报告较多, 大部分都是研究其作为信号调节物质, 通过细胞凋亡作用影响胚胎发育。小鼠早期胚胎受照射其颌面组织细胞的热休克蛋白105表达变化亦与细胞凋亡有关<sup>[15]</sup>。热休克蛋白105可能是通过抑制 ATPase 活性对整个热休克蛋白家族进行一种旁路负调节作用<sup>[16]</sup>。热休克蛋白105促进氧应激

导致小鼠胚胎 F9 细胞凋亡, 其机制是通过 p38 通路增加细胞色素 C 释放、促进凋亡而影响胚胎形成, 这种促进凋亡作用因细胞种类不同而各异, 例如对神经原细胞似乎表现为抗凋亡作用<sup>[17]</sup>。细胞实验和动物实验都说明, 抑制肿瘤细胞的凋亡会导致热休克蛋白105水平增高<sup>[18]</sup>。热休克蛋白105的过度表达可以增加小鼠 CT26 肿瘤的免疫原性<sup>[19]</sup>。

在下调基因中有关 NM\_009463 的报告也不少, 其编码小鼠细胞线粒体中一种与质子传递有关的解耦联蛋白, 参与机体肾上腺素“非颤抖产热”冷适应反应的一种特殊蛋白质, 通过线粒体解耦联作用动员棕色脂肪产能, 构成机体的冷应激反应组成部分<sup>[20]</sup>。该蛋白可以增加小鼠胸腺内含有活性氧分子产物的数量, 以调节小鼠胸腺细胞能量流状态和去向<sup>[21]</sup>, p38 有丝分裂原激活的蛋白激酶通过环磷酸腺苷循环调节这个棕色脂肪解耦联蛋白的基因转录过程。值得注意的是, 有实验说明胰岛素促进脂肪细胞解耦联蛋白表达增加是通过 PI3-K 信号传递系统进行的<sup>[22]</sup>, 如前所述, 电离辐射对机体的作用与 PI3-K 存在很深渊源。另有转基因小鼠实验表明, 解耦联蛋白选择性影响静息状态肌肉并降低其 IIb 型肌纤维含量<sup>[23]</sup>。遗传突变小鼠实验显示, 这种解耦联蛋白在维持肌-神经接头正常功能方面也起作用<sup>[24]</sup>, 还发现其涉及  $\beta$ -肾上腺素、环磷酸腺苷介导的一种新的肠舒缓运动<sup>[25]</sup>。

另一种下调基因 NM\_031188 编码一种成年鼠尿蛋白1, 对其亦有一些相关研究报告。该基因位于4号染色体, 小鼠4号染色体与5号染色体具有大量相似守恒序列(尤其是小鼠5号染色体12号位点), 与人类9号和1号染色体也存在同源现象<sup>[26]</sup>, 与人类骨髓型急性白血病基因和其他一些原癌基因有同源关系<sup>[27]</sup>。

### 3.3 结语

1 Gy  $\gamma$  射线照射 C57 小鼠一个月后胸腺细胞基因表达谱变化实验结果显示, 上调基因的数量远多于下调基因数量, 反映在这种实验条件下的基因活动以代偿性增加为主。上调基因编码角蛋白在胚胎发育中的作用值得注意, 在变化明显的上调和下调基因功能中都涉及到 PI3-K 也是一个值得继续关注的现象。本实验初步揭示了受照射小鼠胸腺的一些变化基因, 深入分析这些变化的基因与辐射反应可能有关的一些功能及其意义, 将为今后深入研究

提供有益线索。

### 参 考 文 献

- 1 BEIR VII report (2006). Health Risks From Exposure to Low Levels of Ionizing Radiation, National Research Council, US National Academy of Sciences. National Academy Press, Washington.
- 2 刘红岩, 从玉文, 善亚君. 电离辐射诱导 BALB/c 小鼠骨髓细胞基因表达谱的研究. 辐射研究与辐射工艺学报, 2003, 21(1): 33-35.
- 3 Qin P, Piechocki M, Lu S, et al. Localization of basement membrane-associated protein isoforms during development of the ocular surface of mouse eye. Dev Dyn, 1997, 209 (4): 367-376.
- 4 Ness S L, Edelman W, Jenkins T D. Mouse keratin 4 is necessary for internal epithelial integrity. J Biol Chem, 1998, 273 (37): 23904-23911.
- 5 Schmidt-Ullrich R, Tobin D J, Lenhard D, et al. NF-kappaB transmits Eda A1/EdaR signalling to activate Shh and cyclin D1 expression, and controls post-initiation hair placode down growth. Development, 2006, 133 (6): 1045-1057.
- 6 Gugasyan R, Voss A, Varigos G, et al. The transcription factors c-rel and RelA control epidermal development and homeostasis in embryonic and adult skin via distinct mechanisms. Mol Cell Biol, 2004, 24 (13): 5733-5745.
- 7 Okuyama R, Nguyen BC, Talora C, et al. High commitment of embryonic keratinocytes to terminal differentiation through a Notch1-caspase 3 regulatory mechanism. Dev Cell, 2004, 6(4): 551-562.
- 8 Nieuwenhuis E, Motoyama J, Barnfield P C, et al. Mice with a targeted mutation of patched2 are viable but develop alopecia and epidermal hyperplasia. Mol Cell Biol, 2006, 26(17): 6609-6622.
- 9 Ruiz S, Segrelles C, Bravo A, et al. Abnormal epidermal differentiation and impaired epithelial-mesenchymal tissue interactions in mice lacking the retinoblastoma relatives p107 and p130. Development, 2003, 130 (11): 2341-2353.
- 10 Foley J, Dann P, Hong J, et al. Parathyroid hormone-related protein maintains mammary epithelial fate and triggers nipple skin differentiation during embryonic breast development. Development, 2001, 128 (4): 513-525.
- 11 Dai X, Schonbaum C, Degenstein L, et al. The ovo gene required for cuticle formation and oogenesis in flies is involved in hair formation and spermatogenesis in mice. Genes Dev, 1998, 12(21): 3452-3463.
- 12 Yagyu T, Kobayashi H, Matsuzaki H, et al. Enhanced spontaneous metastasis in bikunin-deficient mice. Int J Cancer, 2006, 118 (9): 2322-2328.
- 13 Kobayashi H, Suzuki M, Kanayama N, et al. Genetic down-regulation of phosphoinositide 3-kinase by bikunin correlates with suppression of invasion and metastasis in human ovarian cancer HRA cells. J Biol Chem, 2004, 279 (8): 6371-6379.
- 14 Inoue K, Takano H, Shimada A, et al. Urinary trypsin inhibitor protects against systemic inflammation induced by lipopolysaccharide. Mol Pharmacol, 2005, 67(3): 673-680.
- 15 Gashegu J, Vanmuylder N, Philippson C, et al. Correlation of Hsp110 expression with caspase-3 and -9 during apoptosis induced by in vivo embryonic exposition to retinoic acid or irradiation in early mouse craniofacial development. Orthod Craniofac Res, 2006, 9(2): 84-92.
- 16 Yamagishi N, Ishihara K, Hatayama T, et al. Hsp105alpha suppresses Hsc70 chaperone activity by inhibiting Hsc70 ATPase activity. J Biol Chem, 2004, 279(40): 41727-41733.
- 17 Yamagishi N, Ishihara K, Saito Y. Hsp105alpha enhances stress-induced apoptosis but not necrosis in mouse embryonal f9 cells. J Biochem, 2002, 132(2): 271-278.
- 18 Hosaka S, Nakatsura T, Tsukamoto H, et al. Synthetic small interfering RNA targeting heat shock protein 105 induces apoptosis of various cancer cells both in vitro and in vivo. Cancer Sci, 2006, 97 (7): 623-632.
- 19 Wang XY, Li Y, Manjili MH, et al. Hsp110 over-expression increases the immunogenicity of the murine CT26 colon tumor. Cancer Immunol Immunother, 2002, 51(6): 311-319.
- 20 Shabalina IG, Petrovic N, Kramarova TV, et al. UCP1 and defense against oxidative stress. 4-Hydroxy-2-nonenal effects on brown fat mitochondria are uncoupling protein 1-independent. J Biol Chem, 2006, 281(20): 13882-13893.
- 21 Carroll AM, Haines LR, Pearson TW, et al. Identification of a functioning mitochondrial uncoupling protein 1 in thymus. J Biol Chem, 2005, 280(16): 15534-15543.
- 22 Valverde AM, Arribas M, Mur C, et al. Insulin-induced up-regulated uncoupling protein-1 expression is mediated by insulin receptor substrate 1 through the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling pathway in fetal brown adipocytes. J Biol Chem, 2003, 278 (12): 10221-10231.
- 23 Couplan E, Gelly C, Goubern M, et al. High level of uncoupling protein 1 expression in muscle of transgenic mice selectively affects muscles at rest and decreases their IIB fiber content. J Biol Chem, 2002, 277(45): 43079-43088.
- 24 Blanco G, Pritchard C, Underhill P, et al. Molecular phenotype of the mouse ky mutant reveals UCP1 up regulation at the neuromuscular junctions of dystrophic soleus muscle. Neuromuscul Disord, 2004, 14(3): 217-228.
- 25 Shabalina I, Wiklund C, Bengtsson T, et al. Uncoupling protein-1: involvement in a novel pathway for eta-adrenergic, cAMP-mediated intestinal relaxation. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2002, 283(5): C1107-C1116.
- 26 Szpirer C, Riviere M, Szpirer J, et al. Assignment of 12 loci to rat chromosome 5: evidence that this chromosome is homologous to mouse chromosome 4 and to human chromosomes 9 and 1 (1p arm). Genomics, 1990, 6(4): 679-684.
- 27 Ceci JD, Siracusa LD, Jenkins NA, et al. A molecular genetic linkage map of mouse chromosome 4 including the localization of several proto-oncogenes. Genomics, 1989, 5(4): 699-709.

(收稿日期: 2006-12-11)