

$^{60}\text{Co}\gamma$ -射线体外诱导人外周血淋巴细胞 XPC基因表达的实验研究

田梅, 秦宏冉, 刘建香, 潘艳, 朴春南, 阮健磊

(中国疾病预防控制中心辐射防护与核安全医学所, 北京 100088)

摘要: 目的 研究核苷酸切除修复 (NER) XPC基因在 $^{60}\text{Co}\gamma$ 射线照射致人外周血淋巴细胞损伤中的表达变化规律, 探讨 XPC作为新的电离辐射生物剂量计的可行性。方法 不同剂量 (0~8 Gy) $^{60}\text{Co}\gamma$ 射线照射后, 采用实时定量荧光 PCR法, 检测不同剂量及 5 Gy $^{60}\text{Co}\gamma$ 射线照射后不同时间外周血淋巴细胞 XPC基因表达水平。结果 随着照射剂量的增加, 外周血淋巴细胞中 XPC表达明显增高; 照射后 4 h XPC表达即开始增高, 24 h达峰值, 以后逐渐下降, 照射后 72 h仍高于 0 h组。结论 $^{60}\text{Co}\gamma$ 射线可诱导人外周血淋巴细胞 XPC的表达增强, 并具有剂量-效应关系及时间规律, 有望成为新的辐射生物剂量计。

关键词: γ 射线; XPC基因; 核苷酸切除修复; 实时定量荧光 PCR

中图分类号: R818.03 **文献标识码:** A **文章编号:** 1002-221X(2010)06-0409-03

Study on XPC expression of human lymphocytes induced by $^{60}\text{Co}\gamma$ -rays

TIAN Mei, QIN Hong-ran, LIU Jian-xiang, PAN Yan, PIAO Chun-nan, RUAN Jian-lei

(National Institute for Radiological Protection, Chinese Center for Disease Control and Prevention, Beijing 100088, China)

Abstract: Objective To investigate the changes of XPC mRNA expression after irradiation and the probability of it as a potential biological dosimeter. Methods Real-time PCR was used to detect the changes of XPC mRNA expression level after irradiated with gamma ray in doses ranging from 0 Gy to 8 Gy; the time course was 5 Gy in lymphocytes cells. Results The relative expression level of XPC in lymphocytes increased in a dose-dependent manner and showed good dose-effect relationship. The time course curve indicated that the expression of XPC starts to increase at 4 h after exposure, the peak was at 24 h, then decreased gradually after 5 Gy irradiation. The relative expression level after 72 h was still higher than that of 0 h group. Conclusion The expression of XPC gene is sensitive to irradiation; it could serve as a potential biological dosimeter.

Key words: γ -ray; XPC gene; nucleotide excision repair (NER); Real-time quantitation PCR

电离辐射对人类的损伤效应、防治方法及受照后的生物剂量估算与重建的研究是当前国内外放射医学及放射防护所面临的重要课题。外周血淋巴细胞的染色体畸变和微核率的变化是估算生物剂量的经典方法, 但具有一定的局限性。首先, 受照者一旦受到很高剂量的辐射 (>6 Gy), 用染色体畸变方法很难发现足够数量的中期分裂相来估算受照剂量; 其次, 培养分裂中期的淋巴细胞, 至少需要 48 h或更长时间; 第三, 需要有丰富阅片经验的技术人员; 第四, 不同实验室采用自己建立的不同的标准曲线进行估算, 难以标准化。因此, 急需寻找快速、高度可靠的高通量的新型生物剂量计。

核苷酸切除修复系统 (nucleotide excision repair, NER) 是机体 DNA损伤修复系统的重要组成部分,

是辐射引起的 DNA损伤的重要修复方式之一。着色性干皮病基因组 C (xeroderma pigmentosum group C, XPC) 基因是该系统的重要成员, 不仅是 DNA损伤识别因子及核苷酸切除修复的早期 DNA损伤感应器, 而且是 NER生物效应的限速蛋白^[1]。XPC基因表达产物为进化保守的 DNA修复酶, 可与 HR23B形成复合物, 参与 DNA的损伤识别和 NER修复的启动, 具有辨认和切除损伤 DNA的作用, 从而维持细胞的遗传稳定性^[2], 其基因突变可引起整个核苷酸切除通路的缺陷和着色性干皮病表型。电离辐射可诱导许多 DNA修复基因的转录^[3-5], 应激反应下 P53转导的 XPC基因即是其中之一。目前辐射诱导 XPC基因表达的研究还很少, 但较多的证据表明 XPC基因可在氧化和辐射条件下, 保护细胞, 减轻 DNA损伤。

本文采用 Real-time PCR技术研究不同剂量 $^{60}\text{Co}\gamma$ -射线照射正常人永生化淋巴细胞后 XPC mRNA的表达水平、量效关系及时程变化规律, 探讨 XPC mRNA作为核应急及辐射事故剂量估算指标的可能性。

收稿日期: 2010-09-01

基金项目: 中国疾病预防控制中心辐射安全所 2009年专项工作

作者简介: 田梅 (1968-), 女, 博士后, 副研究员, 主要从事辐射生物效应研究。

1 材料与方法

1.1 细胞系

正常人外周血淋巴细胞永生细胞系 32F 本室建系保存。实验前进行复苏, 培养至指数增长期, 以备照射。

1.2 细胞照射和培养

采用 ^{60}Co 射线照射细胞。 ^{60}Co 射线照射由北京市辐射中心提供。吸收剂量率为 0.5 Gy/min。吸收剂量分别为 0、0.5、1、2、4 和 8 Gy。照射后细胞置于 5% CO_2 培养箱 37℃ 培养, 于培养后 4 h 收获细胞。

时效关系研究: 吸收剂量为 5 Gy 细胞照射后置于 5% CO_2 培养箱 37℃ 培养, 分别于照射后 0、4、8、12、24、48 和 72 h 收获细胞。

1.3 淋巴细胞 mRNA 的提取

将收获的细胞用磷酸盐缓冲液 (Phosphate buffered saline, PBS) 洗涤, 离心, 收集细胞。加入适量 Trizol (Invitrogen) 裂解后按试剂说明书抽提核糖核酸 (ribonucleic acid, RNA)。RNA 准确定量后于一 80℃ 保存备用。

1.4 cDNA 的合成

所有实验组均取 5 μg 等量的 RNA 用 Super Script III First Strand Synthesis System for RT-PCR (Invitrogen) 进行 cDNA 逆转录合成, 逆转录总体积为 20 μl , 具体操作按照产品说明书进行。

1.5 引物设计和合成

依据 Genebank 数据库中 XPC 基因和 β -Actin 基因序列, 用 Primer Express 软件设计引物序列如下:

XPC-F 5'-TAAGAACCCCTCTGTATGCC-3'
XPC-R 5'-TTCTCCAAGCCTCACCCTCT-3'
actin162-F 5'-ACTTAGTTCGGTACACCCCTTCT-3'
actin162-R 5'-GACTGCTGTACCTTCACCGT-3'

1.6 实时定量荧光 PCR (real time PCR)

采用 SYBR 实时荧光 PCR 方法, 用 Applied Biosystems 公司 (ABI) PRISM 7500 fast 实时荧光 PCR 仪, 按照 7500 fast 用户手册操作。PCR 试剂为 Power SYBR Green PCR Master Mix (ABI)。聚合酶链反应 (polymerase chain reaction, PCR) 程序为 95℃ 10 min, 随后 95℃ 30 s, 60℃ 30 s, 72℃ 30 s 共 40 个循环。每个样品做 3 个平行样。在每次反应结束后进行溶解曲线分析, 以排除非特异性二聚体产物的影响。每次反应均以 β -Actin 为对照, 同时设立无引物空白对照组。

1.7 定量分析和统计分析

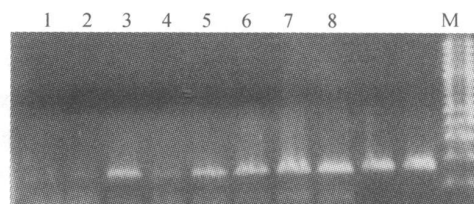
实验结果采用 Applied Biosystems 7500 Sequence Detection Software (SDS) 相对定量和 Origen 6.0 软件

进行分析。

2 结果

2.1 普通 PCR 扩增产物特异性验证

琼脂糖凝胶结果显示, 扩增产物特异性好, 产物大小与理论值吻合。结果见图 1。



注: 1-0 Gy 2-0.1 Gy 3-0.5 Gy 4-1 Gy

5-2 Gy 6-4 Gy 7-8 Gy M-Marker

图 1 PCR 分析 XPC mRNA 的表达水平

2.2 不同剂量 ^{60}Co 射线照射后 4 h 淋巴细胞 XPC 基因 mRNA 表达的剂量 效应关系

如图 2 所示, 0~8 Gy γ 射线照射后 4 h 淋巴细胞 XPC 基因相对表达水平随照射剂量的增加而有逐渐增加的趋势。照射组 XPC 相对表达水平分别是 0 Gy 假照组的 1.5~4 倍, 具有良好的剂量 效应关系。

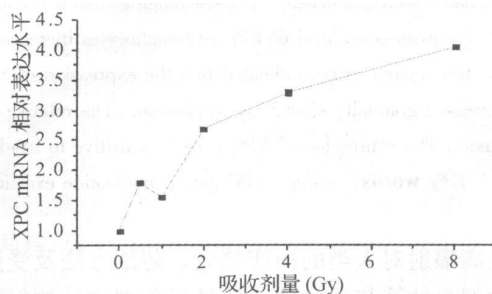


图 2 不同剂量 ^{60}Co 射线照射后 4 h XPC mRNA 的相对表达水平

2.3 ^{60}Co 射线照射淋巴细胞后 XPC 基因 mRNA 表达的时程关系 (见图 3)

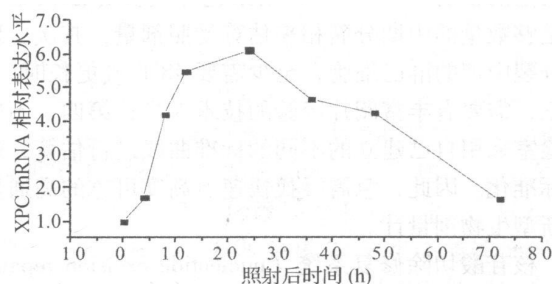


图 3 5 Gy ^{60}Co 射线照射后不同时间 XPC mRNA 的相对表达水平

如图 3 所示, 随着照射后培养时间的不断延长, XPC 基因 mRNA 的相对表达水平逐渐增高, 到 24 h 增高到 0 h 的 6 倍达峰值, 以后逐渐下降, 到 72 h 时降

到最低,但仍高于 0 h组,具有良好的时间变化规律。

3 讨论

人类细胞中基因组 DNA不断受到内源性和环境因素的损伤,如放射治疗诊断设备的大量投入、家庭装饰装修规模的扩大、核武器的研究和储备及核恐怖事件的可能发生对普通人群造成的辐射损伤及恐慌,使得在核与辐射突发事件中如何快速对受照人群进行辐射危险评估和辐射剂量估算以及照射后特定时间内的危险监测工作变得越来越重要。

目前,基因表达以其快速、灵敏的变化表现出作为生物剂量检测系统特有的优势,电离辐射可诱导 DNA多种形式的损伤和突变,随着分析技术的发展,人们正利用各种手段寻找具有良好剂量响应的 DNA损伤修复指标作为生物剂量标志物。

Amundson等^[6]利用 cDNA微阵列的研究表明,0.2~2 Gy的¹³⁷Cs γ 射线照射人外周血淋巴细胞,照射后 24 h和 48 h均可监测到 XPC基因的表达增高,并且有很好的线性关系;而在辐射后 4 h和 72 h检测,这种线性关系较弱。Wiebalk等^[7]利用 5 Gy的¹³⁷Cs γ 射线照射人外周血淋巴细胞后 4 h亦得到同样的结果。Holl等^[8]分析了全身照射小鼠及干细胞移植病人受照前及受照后 6 h基因表达谱变化,发现了一系列可以预示机体是否受照及受照程度的基因(50~1 000 cGy),其中 XPC基因与二者均具有很强的相关性。上述结果表明,XPC基因的辐射诱导表达具有良好的剂量-效应关系,有望发展为辐射暴露的分子标志物或新型生物剂量计。

本研究利用荧光定量 PCR技术研究了淋巴细胞体外接受不同剂量⁶⁰Co γ 射线照射后的量效及时程变化,结果表明 0~8 Gy γ 射线照射后 4 h淋巴细胞 XPC基因相对表达水平有随照射剂量的增加而逐渐增加的趋势,分别是 0 Gy假照组的 1.5~4倍,具有良好的剂量-效应关系(0.5 Gy照射后相对表达较高可能与实验所选用的剂量率较高所造成的误差,或者与 XPC基因在高低剂量不同范围作用机制不同有关,还需进一步实验证实),并且随着照射后培养时间的不断延长,

XPC基因 mRNA的相对表达水平逐渐增高,到 24 h增高到正常的 6倍达峰值,以后逐渐下降,到 72 h降到最低但仍高于初始水平即 0 h组,具有良好的时间变化规律。所采用的 Real-time PCR法是一种高效敏感的 mRNA检测方法,其准确性和特异性比以往的 Northern等检测 mRNA的方法有很大的提高。本研究为新型辐射生物剂量计的研究提供了一定的理论依据。目前关于基因表达作为生物剂量计的研究较多,但不同的实验室所得到的结果差异较大,其原因与所选择的基因、射线种类、细胞种类、剂量率及检测手段等因素有关,因此虽然基因表达检测具有敏感、快速、高通量等优点,但与实际应用仍有较大距离,选择稳定适宜的具有较宽剂量响应范围的目的基因及最佳的可进行标准化的检测方法将是未来的研究重点。

参考文献:

- [1] Sugawara K, Shin-ju Y, Iwai S, et al. A molecular mechanism for DNA damage recognition by the xeroderma pigmentosum group C protein complex [J]. DNA Repair (Amst), 2002, 1 (1): 95-107.
- [2] Sugawara K, Ng Y, Masunagi C, et al. Xeroderma pigmentosum group C protein complex is the initiator of global genome nucleotide excision repair [J]. Molecular Cell, 1998, 2: 223-232.
- [3] Tusher V G, Tibshirani R, Chu G. Significance analysis of microarrays applied to the ionizing radiation response [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2001, 98: 5116-5121.
- [4] Heintz A N, Shackelford R E, Imes C L, et al. Identification of distinct and common gene expression changes after oxidative stress and gamma and ultraviolet radiation [J]. Mol Carcinog, 2003, 37 (2): 65-82.
- [5] Rieger K E, Chu G. Portrait of transcriptional responses to ultraviolet and ionizing radiation in human cells [J]. Nucleic Acids Res, 2004, 32 (16): 4786-4803.
- [6] Amundson S A, Do K T, Shahab S, et al. Identification of potential mRNA biomarkers in peripheral blood lymphocytes for human exposure to ionizing radiation [J]. Radiat Res, 2000, 154: 342-346.
- [7] Wiebalk K, Schmezer P, Knipp S, et al. In vitro radiation induced expression of XPC mRNA as a possible biomarker for developing adverse reactions during radiotherapy [J]. Int J Cancer, 2007, 121 (10): 2340-2345.
- [8] Holl K D, Resman Garrett G, Muramori Nelson J, Chao, et al. Gene expression signatures that predict radiation exposure in mice and humans [J]. PLoS Med, 2007, 4 (4): 9106.

《职业卫生与应急救援》杂志征稿、征订

《职业卫生与应急救援》杂志是由国家科委批准、上海市安全生产监督管理局主管,上海市职业安全健康研究院、上海市职业病防治院主办,以化学事故应急救援为特色内容的全国性职业卫生专业期刊,是中华预防医学会系列杂志。本刊宗旨是提高职业卫生水平,普及应急救援知识。主要读者是职业卫生及职业病临床医务人员,有关教学科研人员、各级工矿保健、民防救灾、安全技术、劳动保护和企业管理人员等。主要栏目有“信息动态”、“法律法规”、“知识论坛”、“应急救援”、“安全卫生监督”、“论著”、“讲座”、“调查研究”、“学术交流”、“科普知识”、“海外透视”等。欢迎广大作者投稿。投稿邮箱:zyws@chinajournal.net.cn

本刊为双月刊。国内统一刊号:ISSN 1007-1326 CN31-1719/R 每期定价 8元,全年 48元(含邮资)。2011年度杂志征订工作已开始,欢迎订阅。编辑部地址:上海市中漕路 94号,邮编:200030 联系人:张英。电话:021-54894373 传真:021-54894374