

正常肺组织急性重离子照射后基因标志物分析

耿继武¹, 周兆明², 山常国², 文磊², 刘浩³, 成杰⁴, 周美娟³, 陈龙华⁵, 蔡林波², 周成²

1. 广东省职业病防治院/广东省职业病防治重点实验室, 广东 广州 510300; 2. 广东三九脑科医院肿瘤综合治疗科, 广东 广州 510510; 3. 南方医科大学公共卫生学院放射医学系, 广东 广州 510515; 4. 上海交通大学医学院附属仁济医院, 上海 200127; 5. 南方医科大学南方医院放疗科, 广东 广州 510515

【摘要】目的:探索急性重离子辐射后早期差异表达的基因,以期查找出可提示重离子辐射的潜在基因标志物。**方法:**采用8~10周龄C57BL/6雌性小鼠,随机分为照射组(12.5 Gy)和空白对照组(0 Gy),分组进行重离子全肺野照射或假照,于照射后2、24 h提取肺组织,借助基因芯片进行全基因组转录水平分析;予以实验动物梯度剂量照射,观察重离子敏感基因在照射后第7天的量效关系。**结果:**小鼠肺组织经重离子照射后2 h, Trp53inp1、Phlda3、Ddit4l、Gtse1、Sesn2、Bbc3、Mdm2、Ptp4a1、Pmaip1与Osgin1等基因mRNA表达水平出现与辐射相关的显著增加;而同一时间点, Wisp2、IL33、Dido1、Efcab4a、Myo1f等5个基因显著下调。在照射后24 h, Phlda3、Ddit4l、Trp53inp1、Gtse1、Sesn2、Exoc4、Ephx1、Thyn1、Ei24等9个基因表达水平也出现了显著上升;而Gpihbp1、Sla、Hist1h3ah、Stc1、Cd2等5个基因则出现显著下调。急性期重离子辐射敏感基因在7 d梯度剂量照射实验被证实呈显著剂量依赖性上升趋势。**结论:**研究发现Trp53inp1、Phlda3、Sesn2、Gtse1与Ddit4l等5个可作为检测肺组织受到高线性能量传递射线辐射后发生应激反应的潜在基因标志物,这些应激反应敏感基因仍有待在基因表达水平和蛋白水平的进一步验证。

【关键词】高能粒子射线;应激反应;放射性肺损伤;全基因组分析;生物标志物

【中图分类号】R312;R146

【文献标志码】A

【文章编号】1005-202X(2019)02-0136-06

Transcriptional analysis of gene signatures in normal lung tissues after an acute exposure to heavy-ion irradiation

GENG Jiwu¹, ZHOU Zhaoming², SHAN Changguo², WEN Lei², LIU Hao³, CHENG Jie⁴, ZHOU Meijuan³, CHEN Longhua⁵, CAI Linbo², ZHOU Cheng²

1. Guangdong Key Laboratory of Occupational Disease Prevention and Treatment/Guangdong Province Hospital for Occupational Disease Prevention and Treatment, Guangzhou 510300, China; 2. Department of Radiation Oncology, Guangdong Sanjiu Brain Hospital, Guangzhou 510510, China; 3. Department of Radiation Medicine, School of Public Health, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China; 4. Renji Hospital, Shanghai Jiaotong University School of Medicine, Shanghai 200127, China; 5. Department of Radiation Oncology, Nanfang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China

Abstract: Objective To investigate the potential gene-signatures for normal tissue stress response after an acute exposure of heavy-ion irradiation in lung. **Methods** Female C57BL/6 mice aging 8-10 weeks old were randomly assigned into irradiation group (12.5 Gy) and non-irradiation group (0 Gy). The mice in irradiation group were exposure to heavy-ion irradiation, while those in non-irradiation group were exposure to sham irradiation. Gene chip was used to carry out genome-wide transcriptional analysis on lung tissues which were extracted at 2 and 24 hours after irradiation. Moreover, a dose-escalated irradiation was performed on mice to analyze the dose-effect relationship of heavy ion-sensitive genes at the 7th day after irradiation. **Results** At 2 hours after irradiation, the mRNA expression levels of Trp53inp1, Phlda3, Ddit4l, Gtse1, Sesn2, Bbc3, Mdm2, Ptp4a1, Pmaip1, and Osgin1 were found to be substantially up-regulated in mice lung tissues, while the mRNA expression levels of Wisp2, IL33, Dido1, Efcab4a, and Myo1f were apparently down-regulated. At 24 hours after irradiation, the expression levels of 9 genes, namely

【收稿日期】2018-09-07

【基金项目】国家自然科学基金青年科学基金(81703166)

【作者简介】耿继武,副主任医师,从事辐射卫生防护工作,E-mail: 1044161@qq.com

【通信作者】周成,副研究员,从事临床放射治疗与放射生物学研究,E-mail: czhou.rob@gmail.com

Phlda3, Ddit4l, Trp53inp1, Gtse1, Sesn2, Exoc4, Ephx1, Thyn1 and Ei24 were increased remarkably, while the expression levels of Gpihbp1, Sla, and Hist1h3ah were obviously down-regulated. The most up-regulated gene-panel after acute exposure to heavy-ion irradiation was further validated by 7 days of dose-escalated irradiation. **Conclusion** Five genes, namely Trp53inp1, Phlda3, Sesn2, Gtse1 and Ddit4l, can be taken as the potential markers for detecting the stress response of lung tissues after high-linear energy transfer irradiation. Further investigations on PCR and protein levels are needed to substantiate these findings.

Keywords: heavy charged particle radiotherapy; stress response; radiation-induced lung injury; genome-wide transcriptional analysis; biomarker

前言

质子重离子是经回旋或同步加速器加速产生的带电高能粒子射线(^1H 、 ^{12}C),是目前国际上最前沿的放射肿瘤治疗技术^[1]。相比常规X线放疗而言,质子重离子具有独特的物理剂量空间分布优势(布拉格峰)^[2]以及更强的生物学效能与细胞杀伤效应,比如增加致死性DNA损伤同时减少对于细胞周期和氧合依赖性^[3]。得益于这一重要特性,重离子对常规放疗抵抗与乏氧的肿瘤仍然具有较好的治疗效果。在过去20年的临床实践中,以碳离子为基础的重离子放疗已经取得令人欣喜的疗效^[4]。在早期非小细胞肺癌中,日本放射线研究所采用重离子放疗已从早期的18次分割放疗逐步减少到9次、4次甚至单次分割治疗即可取得满意的治疗效果^[5-7]。

肺是一个放射敏感器官,这一点从广岛、长崎核爆炸幸存者跟踪研究或核设施职业暴露人员出现的肺癌高发病率已得到充分证实^[8-9]。常规X线引起的放射性肺损伤,已有大量较为深入的研究和阐述^[10-12]。但是和世界范围内高线性能量传递(LET)射线应用不断推广相比,高能粒子射线对于正常组织的生物学效应及毒副作用研究却显得非常缺乏。本研究旨在通过高LET射线辐射诱导小鼠肺组织损伤模型,基于全基因组芯片探讨肺组织受重离子辐射后出现的应激性转录调控,以及潜在的放射敏感基因标志物,从而进一步理解正常组织对高能粒子射线的应激反应机制并寻找可靠的急性期射线暴露生物标志物。

1 材料与方法

1.1 动物实验分组及照射剂量

采用8~10周龄C57BL6雌性小鼠,SPF级饲养。照射前经异氟烷诱导麻醉后,转移至专用小鼠胸部照射装置并妥善固定。采用重离子束进行全肺野照射,肺野置于布拉格峰中间,峰值宽度30 mm。实验动物随机分为空白对照组(12只)和照射组(12只),照射组予以单次12.5 Gy重离子射线照射;空白对照组不接受照射(0 Gy)。于照射后2、24 h分别采用颈

椎脱臼法处死小鼠并提取新鲜肺组织,经TRIzol处理后-20℃冻存用于进一步提取mRNA。重离子梯度剂量照射(剂量爬坡)实验共分为7组,分别接受0、7.5、10.5、12.5、14.5、17.5、20.0 Gy重离子全肺野照射。剂量爬坡实验于照射后7 d分别采用颈椎脱臼法处死小鼠并提取新鲜肺组织,经TRIzol处理后-20℃冻存用于进一步提取mRNA。

1.2 基因芯片及数据分析

TRIzol处理肺组织经RNeasy Mini Kit(Qiagen)分离提取总RNA。为了避免DNA污染,用DNase I(Qiagen)处理RNA。纯化的RNA在45.0 μL无核酸酶的水中洗脱,并置于-20℃储存。使用NanoDrop ND-1000分光光度计(PEQlab)评估RNA浓度和纯度。使用2100Bioanalyzer(Agilent)和相应的RNA Nano Chip测定RNA样品的完整性和纯度。基于全基因组基因表达阵列对样品进行分析。使用自带软件包进行表达矩阵的生成、数据注释和处理。在随后的统计测试中,对数据进行log2转换以说明基因的表达上升或者下降。mRNA相对表达量的倍数计算方法:倍数变化(fold-change) $=2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}=2^{-(\Delta\text{Ct}_{\text{实验组}}-\Delta\text{Ct}_{\text{对照组}})}$; $\Delta\text{Ct}=\text{Ct}_{\text{待测样品}}-\text{Ct}_{\text{内参}}$ (Ct为反应管中荧光强度达到设定阈值时所经历的循环数)。为分析不同时间点辐射与基因表达趋势关系,采用Rv3.4.4软件包进行supervised与non-supervised聚类分析,包括主成分分析、层次聚类、K均值聚类和自组织映射来识别剂量相关基因表达。敏感基因剂量-效应曲线采用非线性回归拟合分析。

2 结果

小鼠肺组织经重离子12.5 Gy照射后2 h,实验组相比空白对照组显著上调的基因如图1a所示。其中,Trp53inp1(Tumor Protein P53 Inducible Nuclear Protein 1, 肿瘤蛋白P53诱导核蛋白1)、Phlda3(Pleckstrin Homology-Like Domain Family A Member 3, Pleckstrin同源域家庭成员3)、Ddit4l(DNA Damage Inducible Transcript 4 Like, DNA损伤诱导型转录本4样蛋白)与

Gtse1(G2 And S-Phase Expressed Protein 1, G2和S期表达蛋白1)4个基因表达最为明显,平均上调2.0~2.2倍(图1b)。基因Sesn2(Sestrin 2, Hypoxia-Induced Gene, 缺氧诱导基因)与Bbc3(BCL2 Binding Component 3, BCL2结合成分3)两者次之,平均上调幅度约为1.4倍。其他基因如Mdm2(MDM2 Proto-Oncogene, MDM2原

癌基因)、Ptp4a1(Protein Tyrosine Phosphatase Type IVA, Member 1, 蛋白酪氨酸磷酸酶IVA型成员1)、Pmaip1(Phorbol 12-Myristate 13-Acetate Induced Protein 1, PMA诱导蛋白1)以及Osgin1(Oxidative Stress Induced Growth Inhibitor 1, 氧化应激诱导生长抑制剂1)也均观察到上调幅度1.1~1.2倍。

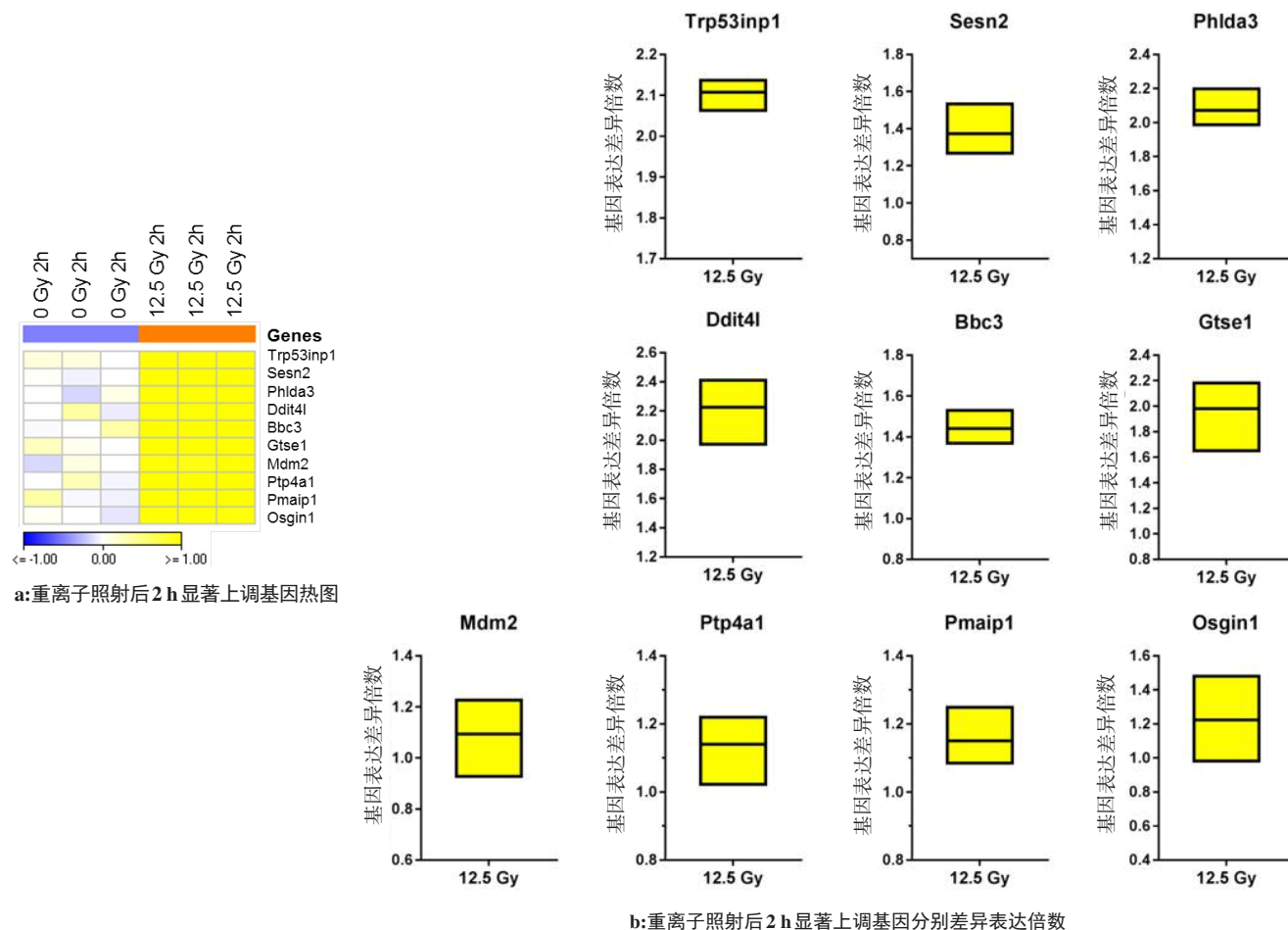


图1 小鼠肺组织经重离子 12.5 Gy 照射后 2 h 实验组相比对照组显著上调的基因表达变化情况

Fig.1 Up-regulated genes of normal lung tissues at 2 hours after 12.5 Gy heavy-ion irradiation vs non-irradiation

上述同一时间点,筛选到的显著下调基因如图2a所示。由图2可见,照射后 2 h 显著下调的基因相对较少,其中 Wisp2 (WNT1 Inducible Signaling Pathway Protein 2, WNT1 诱导信号通路蛋白 2) 与 IL33 (Interleukin 33, 白细胞介素 33) 基因在照射后 2 h 明显下调 (1.2 倍左右) (图 2b)。Dido1 (Death Inducer-Obliterator 1, 死亡诱导剂-湮灭者 1)、Efcab4a (Cracr2b, Calcium Release Activated Channel Regulator 2B, 钙释放激活通道调节器 2B)、Myo1f (Myosin IF, 肌球蛋白 IF) 仅出现了 0.95、0.68、0.65 倍的下调。

重离子射线照射后 24 h 的结果见图 3a, 结果显

示, Phlda3、Ddit4l 基因的平均表达水平相比 2 h 时间点出现升高, 分别达到 2.5、2.3 倍 (图 3b)。而 Trp53inp1、Gtse1、Sesn2 的表达水平比 2 h 时间点虽出现略微降低, 但仍然保持在较高的表达水平 (分别是 1.50、1.95、1.10 倍)。在 24 h 这一时间点, 还观察到一批新的上调基因如 Exoc4 (Exocyst Complex Component 4, Exocyst 复合成分 4)、Ephx1 (Epoxide Hydrolase 1, 环氧化物水解酶 1)、Thyn1 (Thymocyte Nuclear Protein 1, 胸腺细胞核蛋白 1)、Ei24 (EI24, Autophagy Associated Transmembrane Protein, 自噬相关跨膜蛋白) 分别为 1.90、1.80、1.45、1.20 倍。在照射后 24 h, 转录水平下调基因相比 2 h 明显增多。

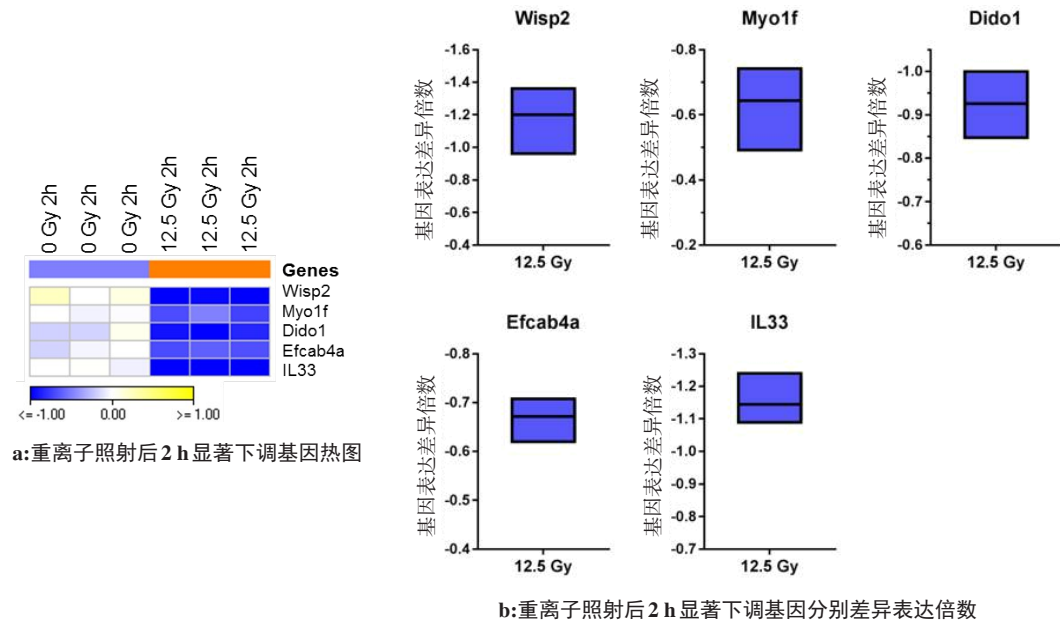


图2 小鼠肺组织经重离子 12.5 Gy 照射后 2 h 实验组相比对照组显著下调的基因表达变化情况

Fig.2 Down-regulated genes of normal lung tissues at 2 hours after 12.5 Gy heavy-ion irradiation vs non-irradiation

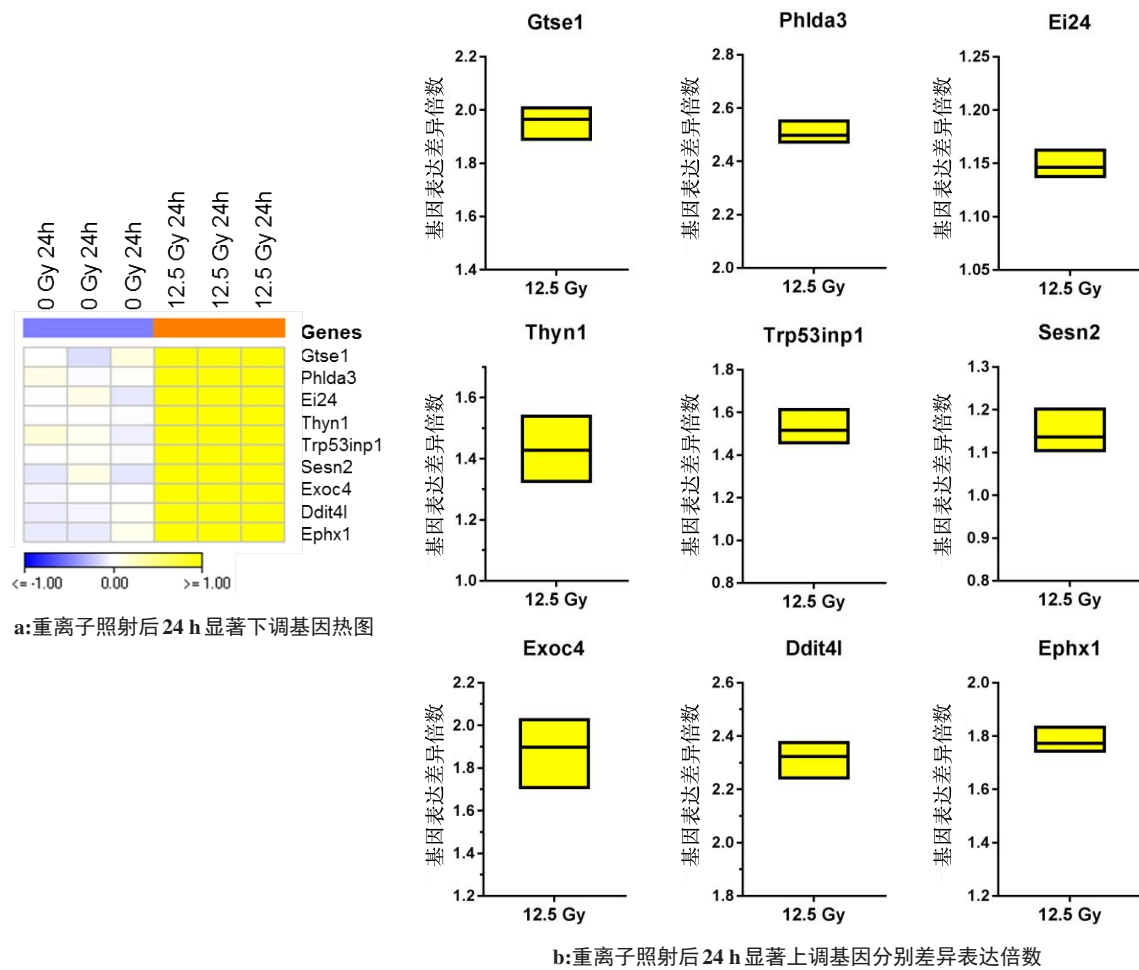


图3 小鼠肺组织经重离子 12.5 Gy 照射后 24 h 实验组相比对照组显著上调的基因表达变化情况

Fig.3 Up-regulated genes of normal lung tissues at 24 h after 12.5 Gy heavy-ion irradiation vs non-irradiation

其中以 Gpihbp1 (Glycosylphosphatidylinositol Anchored High Density Lipoprotein Binding Protein 1,

糖基磷脂酰肌醇锚定高密度脂蛋白结合蛋白1)、Sla (Src Like Adaptor, Src类适配体)、Hist1h3ah(Histone

Cluster 1 H3A Family Member H, 组蛋白簇 1 H3A 家族成员 H) 最为显著, 分别达到 1.60、1.40、1.35 倍。

Cd2 与 Stc1 基因居其次, 分别下调是 1.1、0.8 倍(图 4)。

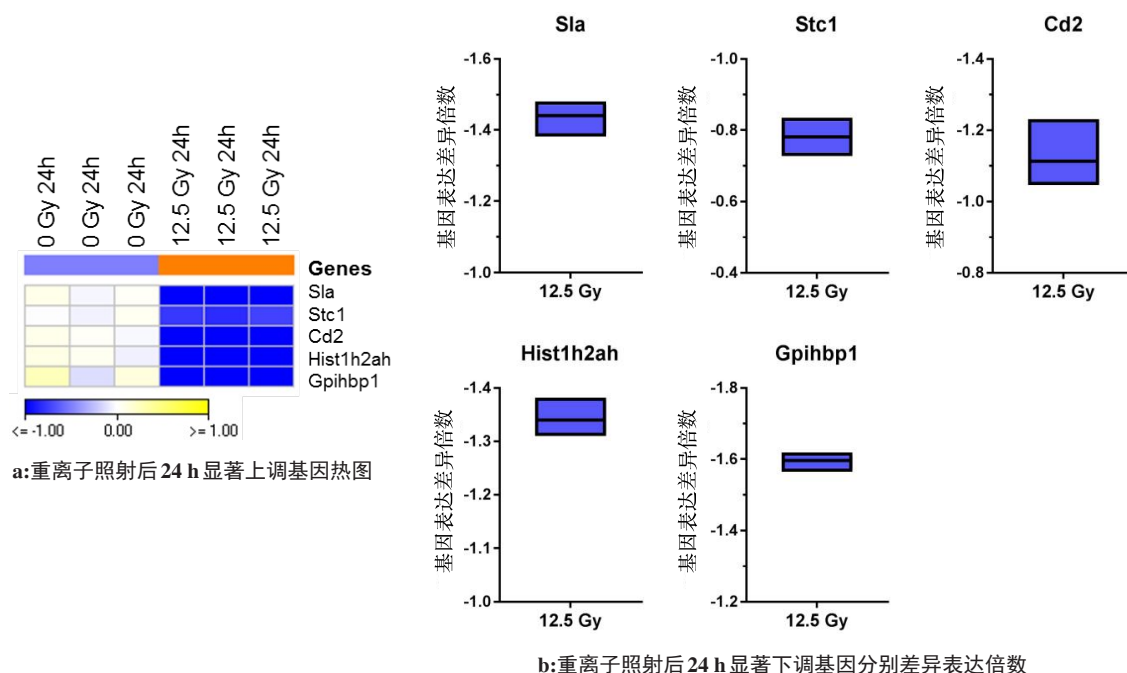


图 4 小鼠肺组织经重离子 12.5 Gy 照射后 24 h 实验组相比对照组显著下调的基因表达变化情况

Fig.4 Down-regulated genes of normal lung tissues at 24 hours after 12.5 Gy heavy-ion irradiation vs non-irradiation

根据上述对照射后肺组织应激反应期 2、24 h 两个不同时间点的显著表达基因进行维恩分析后显示, Trp53inp1、Phlda3、Sesn2、Gtse1 与 Ddit4l 这 5 个基因的 mRNA 表达水平有助于提示受高能粒子射线辐射后正常肺组织应激反应的潜在基因标志物(图 5)。进一步采用重离子梯度剂量照射后 7 d 的小鼠肺组织进行转录芯片检测, 结果表明, 由上述 5 个基因构成的基因组合的表达水平随辐射剂量增加而上调(图 6a), 并经非线性回归分析获得基于敏感基因平均表达强度的剂量-效应曲线、拟合程度良好(图 6b) ($\text{adjusted } R^2=0.60$)。

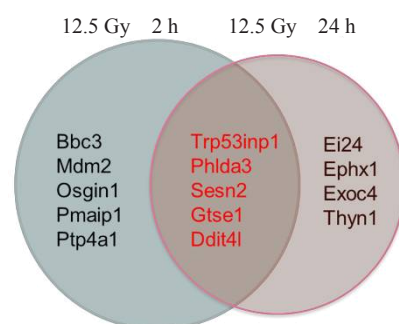


图 5 维恩图分析显示经重离子照射后应激反应期不同时间点(2、24 h)均显著表达的基因

Fig.5 Venn analysis revealed 5 most up-regulated genes at 2 and 24 hours after heavy-ion exposure

3 讨论

肺癌或其他胸部肿瘤放射治疗引起的放射性肺炎或肺纤维化一直是临床较为关注的问题^[13-15]。然而, 目前临床上仍缺乏能够用来准确提示与评估治疗过程中正常组织放射性肺损伤的早期基因标志物。在细胞生物学研究中, 当细胞受到各种外界条件刺激(如营养缺乏、射线引起 DNA 损伤、缺氧、温度休克等)后, 可迅速出现基因表达的改变从而影响一系列的蛋白质合成^[16]。这一细胞在转录水平的重要应激机制, 为我们探索正常组织放射性损伤基因标志物提供了崭新的思路。尽管小鼠放射性肺损伤模型长期以来在放射生物学与剂

量毒副作用研究中被广泛使用^[17], 但这一重要模型在探索高能粒子射线辐射应激反应生物标志物方面尚属首次^[18-19]。

本实验采用重离子短期(2、24 h)照射小鼠肺部, 并利用基因芯片进行肺部基因表达水平检测, 筛查出一系列经过照射后发生显著上调或下调的基因。这些对重离子照射敏感的基因, 是潜在提示受照射后短期内转录水平的应激反应的基因。此外, Trp53inp1、Phlda3、Sesn2、Gtse1 与 Ddit4l 这 5 个基因的 mRNA 表达水平在梯度剂量重离子照射 7 d 后均出现显著上调, 提示这些

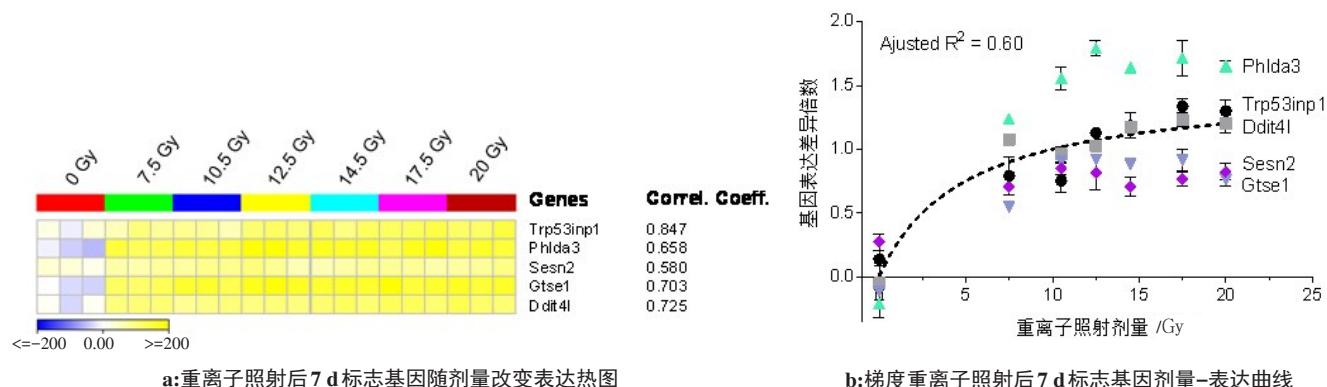


图6 接受梯度剂量重离子射线照射后 7 d 急性期敏感基因组合随重离子剂量升高的表达改变和剂量-效应曲线

Fig.6 Expression levels and dose-response curves of 5 selected gene-signatures at the 7th day after dose-escalated heavy-ion irradiation

基因与高LET射线辐射后肺组织应激反应可能存在一定的关联,可作为潜在的转录水平标志物。今后我们将对这些“潜在标志基因”进行基因表达水平及蛋白表达水平的进一步验证和分析,以排除统计过程或其他原因引起的误差。此外,这些早期显著改变的基因可能与DNA损伤以及修复相关通路有关,但是否与后期肺炎、肺纤维化的发病机制存在一定关联也有待进一步探索。

综上所述,本研究根据照射后应激反应阶段的小鼠肺组织进行全基因组转录水平分析,发现照射后2、24 h不同时间点的辐射相关显著表达基因,有助提示高能粒子射线照射后的正常肺组织转录水平改变。此外,发现 Trp53inp1、Phlda3、Sesn2、Gtse1 与 Ddit4l 这5个基因可作为检测肺组织高LET射线辐射后应激反应的潜在标志物。这些早期辐射敏感基因与DNA损伤修复、放射性肺炎与纤维化之间是否存在病理生理学关联仍有待进一步研究阐述。

【参考文献】

- [1] BAUMANN M, KRAUSE M, OVERGAARD J, et al. Radiation oncology in the era of precision medicine [J]. *Nat Rev Cancer*, 2016, 16: 234-249.
- [2] CHEN G T, CASTRO J R, QUIVEY J M. Heavy charged particle radiotherapy[J]. *Annu Rev Biophys Bioeng*, 1981, 10(1): 499-529.
- [3] SUIT H, DELANEY T, GOLDBERG S, et al. Proton vs carbon ion beams in the definitive radiation treatment of cancer patients [J]. *Radiother Oncol*, 2010, 95(1): 3-22.
- [4] KAMADA T, TSUJII H, BLAKELY E A, et al. Carbon ion radiotherapy in Japan: an assessment of 20 years of clinical experience [J]. *Lancet Oncol*, 2015, 16(2): e93-e100.
- [5] YAMAMOTO N, MIYAMOTO T, NAKAJIMA M, et al. A dose escalation clinical trial of single-fraction carbon ion radiotherapy for peripheral stage I non-small cell lung cancer [J]. *J Thorac Oncol*, 2017, 12(4): 673-680.
- [6] KARUBE M, YAMAMOTO N, NAKAJIMA M, et al. Single-fraction carbon-ion radiation therapy for patients 80 years of age and older with stage I non-small cell lung cancer [J]. *Int J Radiat Oncol Biol*

Phys, 2015, 95(1): 542-548.

- [7] MIYAMOTO T, BABA M, SUGANE T, et al. Carbon ion radiotherapy for stage I non-small cell lung cancer using a regimen of four fractions during 1 week [J]. *J Thorac Oncol*, 2007, 2(10): 916-926.
- [8] CARDIS E, VRIJHEID M, BLETNER M, et al. The 15-country collaborative study of cancer risk among radiation workers in the nuclear industry: estimates of radiation-related cancer risks [J]. *Radiat Res*, 2007, 167(4): 396-416.
- [9] PRESTON D L, RON E, FUNAMOTO S, et al. Solid cancer incidence in atomic bomb survivors: 1958-1998 [J]. *Radiat Res*, 2007, 168(1): 1-64.
- [10] YARNOLD J, BROTONS M C. Pathogenetic mechanisms in radiation fibrosis [J]. *Radiother Oncol*, 2010, 97(1): 149-161.
- [11] ZHOU C, JONES B, MOUSTAFA M, et al. Quantitative assessment of radiation dose and fractionation effects on normal tissue by utilizing a novel lung fibrosis index model [J]. *Radiat Oncol*, 2017, 12(1): 172.
- [12] BENTZEN S M. Preventing or reducing late side effects of radiation therapy: radiobiology meets molecular pathology [J]. *Nat Rev Cancer*, 2006, 6(9): 702-713.
- [13] REN C, JI T, LIU T, et al. The risk and predictors for severe radiation pneumonitis in lung cancer patients treated with thoracic reirradiation [J]. *Radiat Oncol*, 2018, 13(1): 69.
- [14] 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.
- [15] MARKS L B, YU X, VUJASKOVIC Z, et al. Radiation-induced lung injury [J]. *Semin Radiat Oncol*, 2003, 13(3): 333-345.
- [16] SPRIGGS K A, BUSHELL M, WILLIS A E. Translational regulation of gene expression during conditions of cell stress [J]. *Mol Cell*, 2010, 40(2): 228-237.
- [17] JACKSON I L, VUJASKOVIC Z, DOWN J D. Revisiting strain-related differences in radiation sensitivity of the mouse lung: recognizing and avoiding the confounding effects of pleural effusions [J]. *Radiat Res*, 2010, 173(1): 10-20.
- [18] PAN J, LI D, XU Y, et al. Inhibition of Bcl-2/xl with ABT-263 selectively kills senescent type II pneumocytes and reverses persistent pulmonary fibrosis induced by ionizing radiation in mice [J]. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 2017, 99(2): 353-361.
- [19] DOUGLAS B G, FOWLER J F. Fractionation schedules and a quadratic dose-effect relationship [J]. *Br J Radiol*, 1975, 48(570): 502-504.

(编辑:陈丽霞)