

DOI:10.3724/SP.J.1008.2012.01293

· 论 著 ·

基因芯片结合生物信息学筛选辐射损伤恢复期造血相关的枢纽基因

杨悦^{1,2}, 张晶¹, 王寅², 张金元², 王泽剑¹, 沈翰林¹, 殷明^{1*}, 沈旭东^{2*}

1. 上海交通大学药学院神经药理组, 上海 200240
2. 解放军 455 医院内科, 上海 200052

[摘要] **目的** 研究小鼠在接受亚致死剂量辐射刺激后,在损伤修复阶段小鼠骨髓全基因组表达的改变。**方法** 以 4 Gy ⁶⁰Co γ 射线辐射刺激小鼠,取辐射刺激后 0、3、7、11、21 d 的小鼠骨髓细胞 RNA 样本进行基因芯片分析,通过聚类分析、功能分析和动态网络分析等生物信息学方法,全面挖掘在辐射损伤小鼠骨髓的修复阶段起关键作用的基因及其信号通路,并就筛选得到的关键基因的蛋白表达行进一步分析。**结果** 与未经辐照组相比,辐照损伤后的骨髓组织全基因表达谱显示出 1 302 个显著性差异基因。通过聚类及功能分析后发现免疫反应(主要是造血作用)的相关基因在辐照损伤修复阶段的机体功能恢复中发挥重要作用。基因芯片结合生物信息学分析构建了显著性差异基因的共表达网络,最终筛选出 25 个枢纽基因,分别参与了免疫反应(包括造血作用)及转录调节/核小体组装两大生物学过程。重要节点 CCL3 在辐射后通过自发抑制及增加蛋白水解酶 CtsG 对其的降解而促进造血干细胞的增殖。**结论** 基因芯片结合生物信息学分析筛选得到的 25 个基因可能是辐射损伤反应相关的枢纽基因;重要节点 CCL3 在辐射后通过自发下调及增加蛋白水解以促进造血干细胞的增殖。

[关键词] 实验性辐射损伤;骨髓;造血干细胞;微阵列分析;计算生物学

[中图分类号] R 818 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2012)12-1293-08

Microarray combined with multiple bioinformatics for identifying hub hematopoietic genes during recovery phase of irradiation injury

YANG Yue^{1,2}, ZHANG Jing¹, WANG Yin², ZHANG Jin-yuan², WANG Ze-jian¹, SHEN Han-lin¹, YIN Ming^{1*}, SHEN Xu-dong^{2*}

1. Group of Neuropharmacology, School of Pharmacy, Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200240, China
2. Department of Internal Medicine, No. 455 Hospital of PLA, Shanghai 200052, China

[Abstract] **Objective** To investigate the changes of global gene expression during bone marrow recovery period following sublethal ionizing radiation (IR) in mice. **Methods** The mice were exposed to 4 Gy of ⁶⁰Co γ irradiation, and RNA samples were extracted from bone marrow cells at day 0, 3, 7, 11 and 21 after irradiation and were subjected to microarray analysis for identifying differentially expressed genes. Multiple bioinformatics analyses, including clustering analysis, gene ontology (GO) analysis, and dynamic gene network analysis, were conducted to identify key hub genes, pathways and biological processes during bone marrow recovery phase. Analysis was also made for the protein of the identified hub genes. **Results** Compared with non-IR stimulation group, 1 302 differential genes were identified by global gene expression profiling of the irradiation-damaged bone marrow. Clustering and GO analyses revealed that the immune response (especially hematopoiesis) associated genes played a critical role in the body function recovery after IR injury. Twenty-five of the differential genes were defined as the hub genes participating in two pathways including immune response and transcription/nucleosome assembly. Key node CCL3 improved the proliferation of hematopoietic stem cells (HSCs) by spontaneous down-regulation and increased degradation by CtsG. **Conclusion** The 25 genes identified by microarray analysis and bioinformatics analyses may play critical roles in recovery phase after IR. Key node CCL3 may increase the proliferation of HSCs by spontaneous down-regulation and increase of protein hydrolyzation.

[Key words] experimental radiation injuries; bone marrow; hematopoietic stem cells; microarray analysis; computational biology

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2012, 33(12):1293-1300]

[收稿日期] 2012-07-11 **[接受日期]** 2012-11-20

[基金项目] 军队医学研究基金 (09MA027, 10MA025). Supported by PLA Medical Research Grant (09MA027, 10MA025).

[作者简介] 杨悦, 硕士生. E-mail: michelle_luna@msn.com

* 通信作者(Corresponding authors). Tel: 021-34204736, E-mail: myin@sju.edu.cn; Tel: 021-62801570, E-mail: shxd455@sina.com

目前,随着放射性物质的广泛应用(包括放疗及意外事故等),人们暴露于电离辐射(ionizing radiation, IR)的机会日益增多,而骨髓造血功能紊乱是最常见的由电离辐射损伤引起的反应^[1]。关于电离辐射损伤分子生物学机制的研究几乎都集中于辐射后损伤期的表达变化^[2-5],而本实验则关注于辐射损伤后期的骨髓造血功能修复阶段。我们针对辐照前后机体基因的表达的差异,利用全基因组表达谱芯片技术结合生物信息学分析方法,试图找到与高剂量辐射后骨髓恢复期相关的基因及关键通路,并就枢纽基因进行深入探讨,为解释该期病理生理学变化机制奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料及辐照实验 选用体质量 18~22 g、7~8 周龄、SPF 级 BALB/c 雄性小鼠(购自上海西普尔-必凯实验动物有限公司)。SDS 裂解液、BCA 蛋白浓度测定试剂盒购自碧云天生物技术有限公司;小鼠抗 CCL3 ELISA 试剂盒购自 Peprtech 公司;小鼠抗 β -actin 抗体(sc-47778)购自 Santa Cruz 公司;小鼠蛋白水解酶 CtsG 抗体(AP5663c)购自 Abcam 公司。Bestar™ Real time PCR Master Mix (SYBR Green 法)购自上海星汉生物科技有限公司。

小鼠采用全身一次性⁶⁰Co γ 射线照射,辐照剂量为 4 Gy。将其随机分组,包括空白对照组和 4 组辐照损伤实验组。小鼠在各时间点(0、3、7、11、21 d)当天眼眶取血,并进行外周血白细胞、血小板及红细胞计数分析;之后颈椎脱臼法处死,取左右股骨,收集全骨髓细胞进行骨髓有核细胞(BMNC)计数、骨髓细胞提取、基因芯片实验及蛋白质检测。

1.2 基因芯片实验 采用 Illumina's Mouse WG-6 BeadChips(Illumina Inc., San Diego, CA)进行全基因组表达谱检测。使用 Illumina TotalPrep RNA Amplification Kit (Ambion, Applied Biosystems, Foster City, CA)进行 cRNA 扩增和生物素化,所有的操作按照 RNA 扩增试剂盒说明书进行。

将 5 个经生物素标记和扩增后的 cRNAs 样本按照标准操作规范杂交到 Illumina Mouse-6 Expression BeadChips 上,使用 Illumina iScan Reader 扫描杂交图像,并通过 Illumina's GenomeStudio 应用软件使用平均标准化计算方法(average normalization algorithms),将数据标准化后输出文本文件,包含每个样本中所有基因的原始信号(original sig-

nal)值、平均信号强度(average signal)值、信号检测 P 值(detection P value)、差异分值(diffscore)、基因名称(symbol)等。 P 值使用误判率(false discovery rate, FDR)进行矫正。统计学显著性分析采用 Student's t 检验,差异基因的筛选标准:实验组或对照组中任何一组中为有效基因($P < 0.05$),且实验组样本差异分值小于 -13 或大于 13。所有的实验数据已经储存于 GEO 公共数据库(accession number: GSE28195)。

1.3 基因芯片数据生物信息学分析 用全面的基因芯片分析和生物信息学分析方案筛选与电离辐射损伤后修复期密切相关的枢纽基因,包括聚类分析(clustering analysis)、功能分析[gene ontology (GO) analysis]和动态网络分析(dynamic gene network analysis)。整体实验流程如图 1。

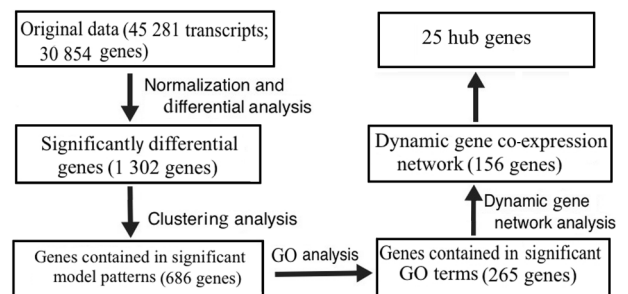


图 1 生物信息学分析筛选电离辐射相关枢纽基因和信号通路流程图

Fig 1 Flow chart of bioinformatics analyses for selecting hub genes and pathways related to IR

GO: Gene ontology; IR: Ionizing radiation

1.3.1 聚类分析 使用 STEM 1.3.6 软件(short time-series expression miner, <http://www.cs.cmu.edu/jernst/stem/>)^[4]将筛选得到的显著性差异基因进行聚类分析。根据软件操作规范,制定需要分析的基因列表,选择 Mouse(EBI)作为功能注释基因库,基因定位库使用 *Mus musculus* (Ensembl/Biomart),设定时间表达模块数后执行操作,得到显著性差异基因的表达模块(后称为聚类相),以 $P < 0.001$ 为显著性筛选标准。

1.3.2 差异基因的功能显著性分析 基于 NCBI Gene Ontology 数据库对这些基因进行 GO 注释^[5],得到基因参与的所有 GOs,利用 Fisher 精确检验和 χ^2 检验,计算每个 GO 的显著性水平和误判率,并用误判率来校准 P 值^[6],从而筛选出差异基因所体现的显著性 GO($P < 0.05$)。利用 European Bioinfor-

matics Institute (EBI) 数据库对实验结果进行人工分析。

1.3.3 构建随辐射时间变化的基因共表达网络 利用落在显著性功能项里的基因经标准化后构建基因共表达网络,用于寻找基因间相互作用的关系^[7]。为每对基因计算 Pearson 相关系数,并以此选择显著性关联基因对用于构建基因网络^[8]。

1.4 Real-time PCR 验证基因芯片结果 本实验使用 10 μ l 反应体系,包括 5 μ l 2 \times SYBR Green Real-time PCR Master Mix,0.3 μ mol/L 引物及 1 μ l 模板 cDNA。反应条件:94 $^{\circ}$ C 5 min;94 $^{\circ}$ C 30 s;50~65 $^{\circ}$ C 30 s;72 $^{\circ}$ C 30 s;循环 40 次;72 $^{\circ}$ C 10 min,设置熔解曲线。使用 GAPDH 作为内参进行定量。引物序列见表 1。基因表达的改变采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 方法进行计算,并采用 SPSS 11.0 软件 one-way ANOVA 的统计方法进行显著性分析。

表 1 Real-time PCR 引物序列

Tab 1 Primer sequences for real-time PCR

Gene	Sequence (5'→3')	Size (bp)
GAPDH	AGC CTC GTC CCG TAG ACA	315
	CAC CAG TAG ACT CCA CGA CA	
Ccl3	CAA GTC TTC TCA GCG CCA T	158
	ATC TGC CGG TTT CTC TTA GTC A	
Ctsg	AAA CCT TTC ACA CGA GCA G	137
	ATC TTT CCA GAA CCG TTG CTT	
Ctsk	GGG CCA GGA TGA AAG TTG TA	106
	CAC TGC TCT CTT CAG GGC TT	
Cxcl12	ACA TCG CCA GAG CCA ACG TCA	111
	TCG GGT CAA TGC ACA CTT GTC T	
Pten	ACT GCA CGA ATA ATA AGG CAT	152
	TAA AAT TGA AGC CCT AAT CCC	
Thy1	CCC TCC TCT AAA ACA CGA GCC T	119
	ATC CCC TTC CTG CAC GGA CT	

1.5 ELISA 法检测 CCL3 蛋白表达变化 检测骨髓微环境中 CCL3 分子表达水平,将已知浓度蛋白标准品及冻干后的未知浓度样品加入到 96 孔聚苯乙烯酶标板中,分别加入 CCL3 抗体、生物素标记的二抗、显色液,孵育、显色,测定各反应孔光密度(D_{450})值及背景光密度(D_{620})值。

1.6 蛋白质印迹法检测 CtsG 蛋白的表达变化 用 BCA 法测定蛋白质含量。在 80~120 V 电压下行 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳,转膜,5% 胎牛血清封闭。常规方法分别加入 CtsG 以及内参 β -actin 的一抗及二抗孵育后,ECL 显色,成像仪拍照。

1.7 统计学处理 蛋白表达数据均以 $\bar{x}\pm s$ 表示,应用 SPSS 13.0 统计软件进行 t 检验,检验水平(α)为 0.05。

2 结果

2.1 辐射损伤小鼠模型构建 通过外周血细胞计数和 BMNC 计数评价电离辐射造成的骨髓损伤模型(图 2)。BMNC 在辐照后第 3 天达到最低,之后逐渐恢复,在第 21 天的时候已基本恢复到正常水平。白细胞在辐照后第 3 天显著降低,血小板在第 7 天的时候达到最低值,之后逐渐恢复,两者均在 21 d 的时候已经恢复到正常值的范围。红细胞有小幅下降,并在 21 d 时恢复。说明小鼠辐照损伤模型构建成功。

2.2 基因芯片实验 对从小鼠全骨髓细胞收集得到的总 mRNA 进行基因芯片分析,并将辐照损伤组的基因表达相与未辐照对照组的基因表达相进行统计学比较分析,筛选出了 1 302 个显著性差异表达的基因。

2.3 差异表达基因聚类分析 选用 STEM 1.3.6 软件分析显著性差异基因的时间表达模型,将具有相似表达变化趋势的基因聚集到一个模块中,得到具有相似的生物学功能和相互作用的图彤。

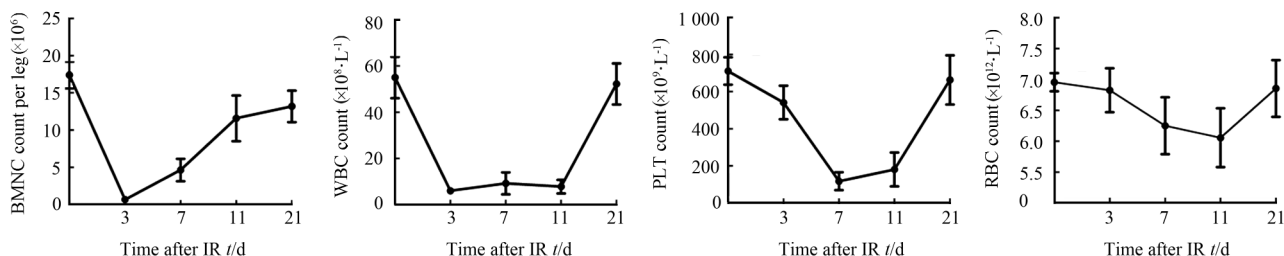


图 2 小鼠血细胞辐照后的变化

Fig 2 Blood cell counts in mice after ionizing radiation (IR)

BMNC: Bone marrow nuclear cell; WBC: White blood cell; PLT: Platelet; RBC: Red blood cell. We used 6-8 mice at each time point. $\bar{x}\pm s$

经过软件分析,得到 11 个显著性聚类相($P < 0.001$),总共包含 686 个基因。其中 6 个显著性聚类相中的基因表达变化趋势符合刺激后可能发生的生理变化(先下调后恢复或先上调后恢复),因此,认为这 6 个聚类相是重要的表达变化趋势。为了探索每个显著性聚类相内基因的功能,我们利用 STEM 1.3.6 软件中 GO 分析功能,对每个模块内的基因基于 EBI 数据库进行了基因功能分析,高度富集的功能类别包括:代谢过程、应激反应、免疫反应(包括造血作用)和细胞成分组装等。

2.4 基于聚类分析的基因功能分析 采用全面的 GO 分析方法研究落在显著性聚类相内的显著性表达差异基因(共 686 个基因)在 GO 中的分布状况^[9],以更加详细地阐明实验中导致样本差异的基因在功能上的体现^[6]。将 $P < 0.05$ 作为筛选显著性功能项的标准,得到了 265 个落在显著性功能项内的差异基因。

经分析,在高剂量电离辐射损伤后的恢复期发挥主要作用的生物学过程包括:应激反应、细胞成分组装、细胞过程(细胞增殖和黏附)和信号转导。

2.5 基因共表达网络分析 将落在显著性功能里

的 265 个基因用于构建基因共表达网络,并用 k-core 表示网络特征值^[8]。利用基因-样本矩阵,构建基因间相互作用网络,根据网络中各基因的位置函数计算出该基因在网络中的关系强度,即基因的网络特征值。用显著性的目标趋势所属基因构建表达调控的动态网络,从动态网络中得到关键调控基因。构建的基因共表达网络见图 3。

根据图 3 中的结果,圆圈代表基因,直线代表基因间存在的调控关系。圆圈大小代表某基因产物与其他基因产物相互作用的能力,该相互作用的能力用 degree 量化。通过基因共表达网络得到了 2 个主要子网络,图 3 左侧的子网络包含 15 个 k-core=6 的基因;图 3 右侧的子网络包含 10 个 k-core=9 的基因。我们将这 25 个基于基因原始信号值、并通过计算模拟的方法预测得到的基因作为在辐照损伤恢复期的重要基因。

通过 EBI 数据库对 k-core > 5 的基因进行功能分析,我们发现:k-core=9(即位于图 3 右侧的子网络的基因)主要参与免疫过程;而 k-core=6(即位于图 3 左侧的子网络)的基因主要参与核小体组装、转录调节和信号转导。

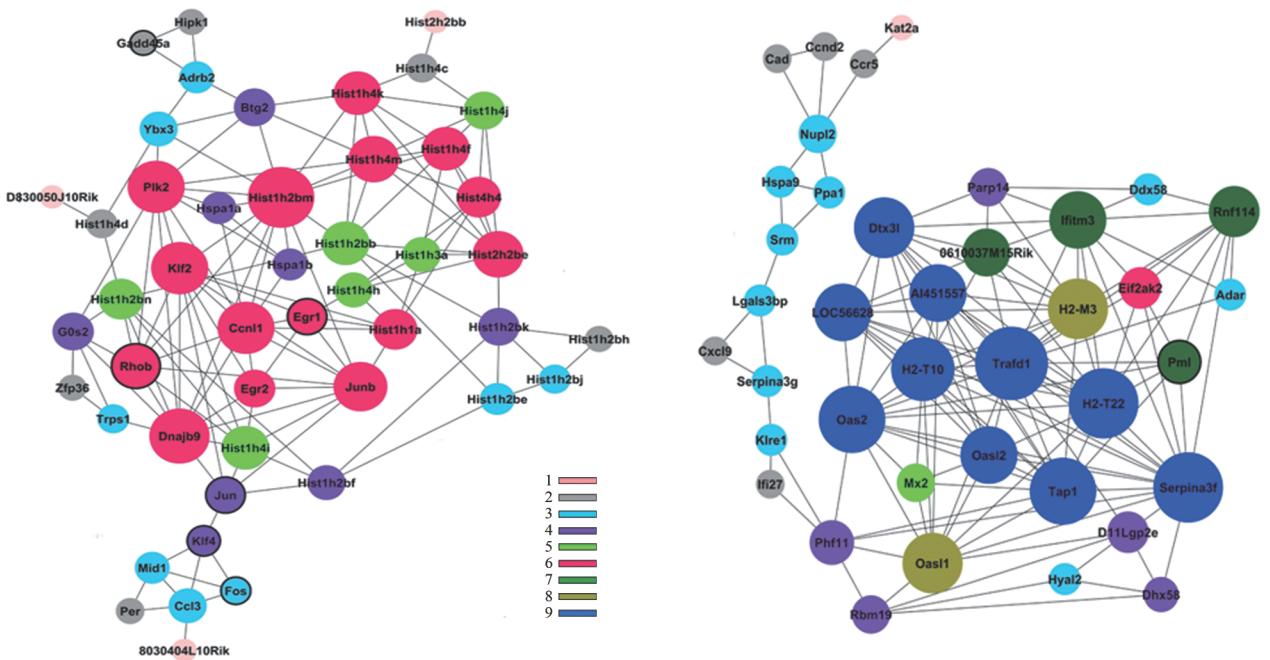


图 3 基因共表达网络

Fig 3 Gene co-expression network

Genes contained in significant gene ontology (GO) terms were analyzed and identified by gene co-expression network with the k-core algorithm. Nodes represent the gene; edges indicate the interaction between genes. All the nodes were marked with k-core values. Genes with higher k-core values are more centralized in the network and have a stronger capacity of modulating adjacent genes

2.6 Real-time PCR 验证基因芯片结果 本实验采用 real-time PCR 相对定量的方法验证基因芯片结果, 并采用处理芯片实验样本同样的方法进行样本制备, 每个时间点重复 3 次。选择验证的基因包括

6 个基因: *Ccl3*、*Ctsg*、*Ctsk*、*Cxcl12*、*Pten* 和 *Thy1*。结果显示基因变化趋势与芯片结果有很好的匹配, 说明该芯片结果可以用于信息学分析。见图 4。

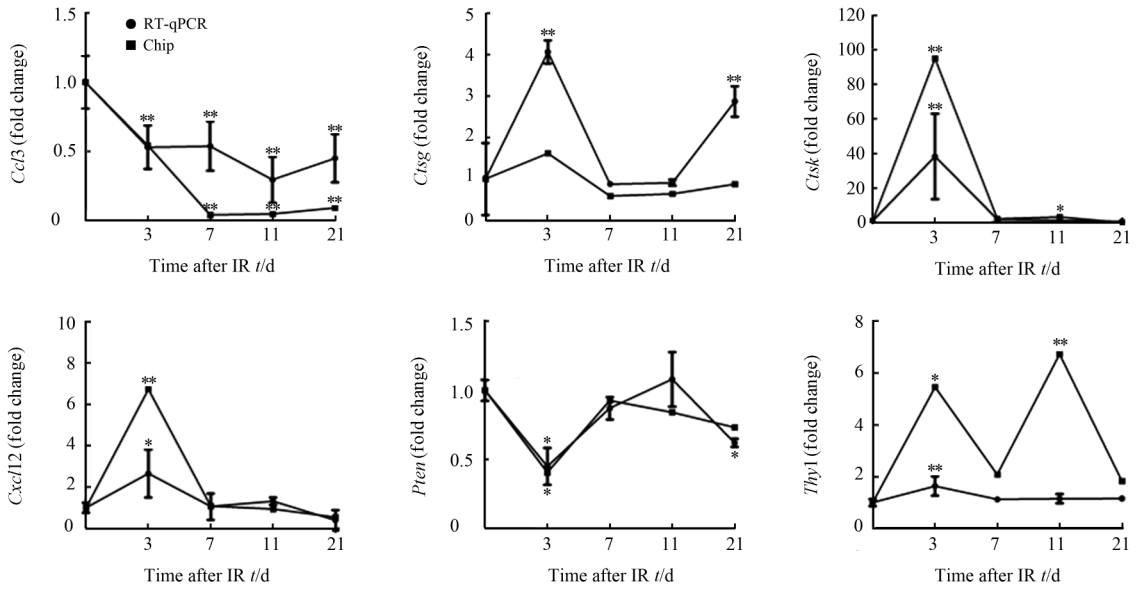


图 4 Real-time PCR 验证基因芯片结果

Fig 4 Validation of microarray results by real-time PCR

IR: Ionizing radiation. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs 0 day; $n = 3$, $\bar{x} \pm s$

2.7 ELISA 法检测 CCL3 蛋白表达变化结果 小鼠接受辐射刺激后, 骨髓微环境中可溶性趋化因子 CCL3 蛋白的表达于 3 d 时降至最低值, 并随时间延长逐渐恢复(图 5)。

2.8 蛋白质印迹法检测 GtsG 蛋白表达变化结果 小鼠接受辐射刺激后, 骨髓细胞裂解液中蛋白水解酶 CtsG 的表达在第 3 天升高, 之后表达量逐步减少, 在 21 d 时又再次升高。条带分析结果见图 6。

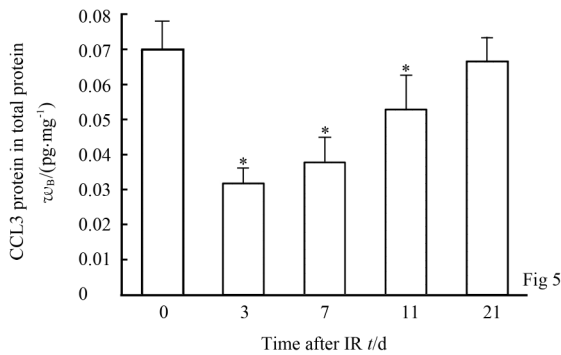


图 5 CCL3 蛋白在辐射小鼠骨髓中的表达变化

Fig 5 Change of CCL3 protein in mice bone marrow after IR

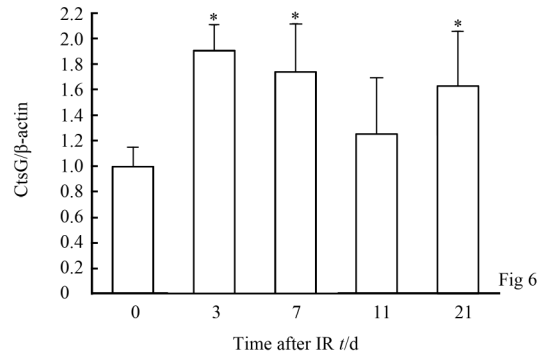


图 6 CtsG 在辐射小鼠骨髓细胞中的表达变化

Fig 6 Change of CtsG protein in mice bone marrow cells after IR

IR: Ionizing radiation. * $P < 0.05$ vs 0 day; $n = 3$, $\bar{x} \pm s$

3 讨论

骨髓组织对电离辐射的高度敏感性往往会引起造血细胞的大量死亡,最终导致白细胞、血小板和红细胞等血细胞严重缺乏,使辐照患者产生血液系统、免疫系统疾病甚至引发肿瘤、死亡等。根据文献报道,非致死性辐射损伤骨髓组织通过细胞内机制和细胞外机制激活造血干细胞(hemopoietic stem cell, HSCs)自我更新(包括增殖和分化)相关的信号通路使得损伤骨髓组织得以恢复^[10-12]。HSCs存在于造血微环境(HSC niche)中,HSCs的支持细胞(HSC supporting cells),或称为骨髓基质细胞(marrow stromal cells, MSCs)通过产生膜结合蛋白和分泌性蛋白调节 HSCs 生物学过程(包括 HSCs 自我更新和维持、分化、增殖等)^[10]。为了全面了解电离辐射恢复期(辐射后 0~21 d)组成 HSCs 微环境细胞的基因表达变化,全骨髓细胞(主要是骨髓基质细胞)被用于基因芯片实验。通过检测全基因组基因的表达变化,以探寻在辐射损伤恢复期参与造血作用的关键基因。本实验主要关注损伤骨髓的恢复阶段,到目前为止尚未见有关辐射损伤恢复期骨髓基质细胞全基因表达的报道。

基因芯片分析是一种能够同时检测全基因组表达情况的有效工具。但是高通量数据也存在着高可变性、低重复性和非特异性干扰等缺陷^[13],因此本实验在重复 3 次的基础上,采用分步的生物信息学分析方法,包括聚类分析、GO 分析、基因共表达网络分析等,弥补芯片实验的不足。我们对 1 302 个差异表达基因进行综合全面功能分析和聚类分析后,发现免疫反应(包括造血作用)、应激反应、细胞过程(细胞增殖和黏附)和信号转导过程是与电离辐射相关的主要生物学过程,在辐照损伤的恢复期可能发挥着重要作用。以往的研究也显示,激活的免疫细胞能够产生多种造血细胞因子,刺激多系 HSCs 数量的恢复^[14]。我们通过基因共表达网络的分析最终得到 2 个主要的子网络,共包含 25 个枢纽基因。其中 10 个 k-core=9 的基因主要参与免疫反应(包括造血作用);15 个 k-core=6 的基因主要参与转录调节和核小体组装的生物学过程。

HSCs 存在于骨髓微环境中,并与微环境中的其他细胞发生细胞间的相互作用,从而决定干细胞的命运^[10]。正常情况下,骨髓腔中大部分的 HSCs 处于静息状态,当机体受到外界刺激(如电离辐射)

后,造血微环境的平衡状态发生改变,大量血细胞 DNA 链断裂或错配而造成细胞死亡,进而造成骨髓血细胞库的耗竭(包括激活态的 HSCs 的大量死亡),而引起全血细胞减少及骨髓抑制^[15]。倘若此时不能激活静息期的 HSCs 的增殖、分化,不能及时补充功能性的血细胞,则会造成机体长时间全血细胞减少症,甚至造成死亡。因此,改变 HSCs 的命运,促进干细胞增殖、分化和自我更新,是修复骨髓损伤的重要机制^[2]。

目前关于辐射损伤恢复期代偿及失代偿机制的报道大多集中在细胞因子或趋化因子的研究上。已知趋化因子是一类小分子细胞因子家族蛋白,相对分子质量小(约 8 000~13 000),通过与 G 蛋白偶联受体的相互作用诱导细胞骨架重排以及多种细胞的定向迁移^[16-18],使淋巴细胞等在炎症部位积聚,并激活这些细胞,从而引起免疫反应^[19-20]。趋化因子对 HSCs 增殖、分化的作用也屡有报道,如基质细胞衍生因子(SDF-1)/CXCL12 与 HSCs 表面相应受体 CXCR4 结合后,能够促进 HSCs 的归巢及增殖^[21],并且通过保持 HSCs 的静息态从而提高造血始/祖细胞的长期存活率^[22-24];IL-8/CXCL8 以及巨噬细胞炎性蛋白 2 (MIP-2)/CXCL2 则在与 CXCR2 受体结合后对 HSCs 具有动员作用^[25-26]等。然而,趋化因子的功能活性可以由中性粒细胞分泌的丝氨酸蛋白酶(包括 CtsG, elastase, 以及 proteinase 3)的蛋白水解作用清除^[27]。在我们的结果中,对最终得到的 25 个枢纽基因进行进一步分析后发现:趋化因子 CCL3 的基因存在于共表达网络中,是一个枢纽基因,并且其 mRNA 表达量在经受辐射刺激后有显著下调;此外蛋白水解酶 CtsG 的 mRNA 水平在辐射后有显著性改变,其中在辐射刺激 3 d 后, mRNA 表达量达到正常水平的 4 倍。由于研究发现该蛋白水解酶对趋化因子 CCL3 具有降解作用,从另一方面上可能影响 CCL3 在机体受辐射刺激后的作用,所以,我们对趋化因子 CCL3 及其蛋白水解酶 CtsG 这两个关键节点进行综合分析,探讨这两者在辐射小鼠动物模型上的蛋白表达水平的改变情况。

趋化因子 CCL3/巨噬细胞炎性蛋白 1 α (MIP-1 α)是 CC 趋化因子家族的一员,由 92 个氨基酸构成,并由成熟的血细胞诱导分泌,包括单核细胞、T 淋巴细胞、B 淋巴细胞、NK 细胞等^[28-30]。由于 CCL3 能够抑制造血始/祖细胞的增殖,维持 HSCs 在静息水平,因此可以保护细胞毒素对多向祖细胞

造成的损伤,在体内、体外的实验中抑制细胞内 DNA 合成是 HSCs 的增殖抑制剂^[31-35]。至今为止已发现的 CCL3 的受体有 CCR1 与 CCR5。而蛋白水解酶 CtsG 是一类中性粒细胞分泌的丝氨酸蛋白酶(NSPs),已知 NSPs 除了其自身对蛋白的水解作用外,还参与了病原体的杀伤及炎症反应,是一类多功能酶。其中 CtsG 被证实可以水解 CCL3 的两种异构体,从而改变趋化因子的生物活性,使之失活^[36]。在我们的结果中,可以发现 CCL3 在辐射刺激后的蛋白表达趋势是先降低,随后逐渐恢复,其 mRNA 变化趋势则呈现持续降低的趋势。此外,蛋白水解酶 CtsG 的蛋白趋势则与 mRNA 改变相吻合。

机体接受辐射刺激后,首先引起细胞内的 DNA 双链断裂及错配,造成大量成熟血细胞及激活态的 HSCs 的死亡,全血细胞数目大幅度降低,机体处于骨髓抑制状态,严重情况下甚至造成死亡。此时需要 HSCs 的迅速增殖,并进一步分化成成熟的功能型血细胞来补充辐射造成的全血细胞减少,及时弥补刺激造成的损伤。由于趋化因子 CCL3 对 HSCs 的增殖具有抑制作用,因此在机体经受辐射刺激后的恢复阶段前期,一方面,自发下调具有抑制 HSCs 增殖作用的 CCL3;另一方面,促进 CtsG 的表达,增加蛋白水解酶对 CCL3 的水解作用,从而促进 HSCs 的增殖。两方面共同作用,降低骨髓微环境中趋化因子 CCL3 的蛋白浓度,促进 HSCs 的增殖。而随着细胞数量的恢复,骨髓抑制状况得到缓解,前期 HSCs 大量增殖生成的幼稚血细胞,此阶段需要进一步分化为功能型的血细胞以促进机体恢复,故机体对 CCL3 的抑制作用逐渐减弱,降解 CCL3 的蛋白水解酶 CtsG 水平也逐渐降低(第 11 天时基本恢复至正常水平)。因此在血细胞计数恢复正常值的第 21 天,CCL3 的表达量也恢复至正常值。然而,可以发现在 21 d 时 CtsG 的蛋白浓度又再次增高,这可能是由于蛋白水解酶 CtsG 对多个细胞因子及趋化因子都有降解作用,其自身同时也参与了免疫及炎症反应,因此对 CtsG 的影响是多因素的,而 CCL3 及 CtsG 的相互作用有待整体动物模型的进一步证实。

综上所述,我们通过基因芯片的方法检测小鼠全骨髓细胞在辐照损伤恢复期的全基因组表达谱变化,并利用多种生物信息学分析策略了解电离辐射相关的枢纽基因,最终以 CCL3 及 CtsG 作为两个关键的节点进行进一步分析。我们的结果表明辐射后

骨髓组织基因表达相在辐射损伤期和恢复期存在着很大的差异;免疫反应在骨髓辐射损伤后的恢复中发挥着最为重要的作用;趋化因子 CCL3 在辐射损伤修复阶段通过机体自发抑制及增加 CtsG 对其降解两方面促进了 HSCs 的增殖,从而帮助机体恢复。

4 利益冲突

所有作者声明本文不涉及任何利益冲突。

[参考文献]

- [1] Prise K M, Schettino G, Folkard M, Held K D. New insights on cell death from radiation exposure[J]. *Lancet Oncol*, 2005, 6: 520-528.
- [2] Dai J M, Sun D C, Lin R X, Yang J, Lou S, Wang S Q. Microarray analysis of differentially expressed genes in mouse bone marrow tissues after ionizing radiation[J]. *Int J Radiat Biol*, 2006, 82: 511-521.
- [3] Taki K, Wang B, Nakajima T, Wu J, Ono T, Uehara Y, et al. Microarray analysis of differentially expressed genes in the kidneys and testes of mice after long-term irradiation with low-dose-rate gamma-rays[J]. *J Radiat Res*, 2009, 50: 241-252.
- [4] Zhao W, Chuang E Y, Mishra M, Awwad R, Bisht K, Sun L, et al. Distinct effects of ionizing radiation on *in vivo* murine kidney and brain normal tissue gene expression[J]. *Clin Cancer Res*, 2006, 12: 3823-3830.
- [5] Mahmoud-Ahmed A S, Atkinson S, Wong C S. Early gene expression profile in mouse brain after exposure to ionizing radiation[J]. *Radiat Res*, 2006, 165: 142-154.
- [6] Herodin F, Drouet M. Cytokine-based treatment of accidentally irradiated victims and new approaches[J]. *Exp Hematol*, 2005, 33: 1071-1080.
- [7] Cheshier S H, Morrison S J, Liao X, Weissman I L. *In vivo* proliferation and cell cycle kinetics of long-term self-renewing hematopoietic stem cells[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, 96: 3120-3125.
- [8] Bianchi G, Galotto M, Cancedda R, Quarto R. Bone marrow stromal damage after chemo/radiotherapy: occurrence, consequences and possibilities of treatment[J]. *Leuk Lymphoma*, 2001, 42: 863-870.
- [9] Ashburner M, Ball C A, Blake J A, Botstein D, Butler H, Cherry J M, et al. Gene ontology: tool for the unification of biology. The gene ontology consortium[J]. *Nat Genet*, 2000, 25: 25-29.
- [10] Kiel M J, Morrison S J. Uncertainty in the niches that maintain haematopoietic stem cells[J]. *Nat Rev Immunol*, 2008, 8: 290-301.
- [11] Han W, Yu Y, Liu X Y. Local signals in stem cell-based bone marrow regeneration[J]. *Cell Res*, 2006, 16: 189-195.
- [12] Pawlik A, Alibert O, Baulande S, Vaigot P, Tronik-Le Roux D.

- Transcriptome characterization uncovers the molecular response of hematopoietic cells to ionizing radiation[J]. *Radiat Res*, 2011, 175:66-82.
- [13] von Mering C, Bork P. Teamed up for transcription[J]. *Nature*, 2002, 417:797-798.
- [14] Li G, Wang X, Wu L, Zhang W, Chen H, Xie Y, et al. *Ex vivo* activated immune cells promote survival and stimulate multilineage hematopoietic recovery in myelosuppressed mice[J]. *J Immunother*, 2005, 28:420-425.
- [15] Kulkarni S, Ghosh S P, Hauer-Jensen M, Kumar K S. Hematological targets of radiation damage[J]. *Curr Drug Targets*, 2010, 11:1375-1385.
- [16] Butcher E C, Williams M, Youngman K, Rott L, Briskin M. Lymphocyte trafficking and regional immunity[J]. *Adv Immunol*, 1999, 72:209-253.
- [17] Campbell J J, Butcher E C. Chemokines in tissue-specific and microenvironment-specific lymphocyte homing[J]. *Curr Opin Immunol*, 2000, 12:336-341.
- [18] Zlotnik A, Yoshie O. Chemokines: a new classification system and their role in immunity[J]. *Immunity*, 2000, 12:121-127.
- [19] Krieg C, Boyman O. The role of chemokines in cancer immune surveillance by the adaptive immune system[J]. *Semin Cancer Biol*, 2009, 19:76-83.
- [20] Navarini-Meury A A, Conrad C. Melanoma and innate immunity-active inflammation or just erroneous attraction? Melanoma as the source of leukocyte-attracting chemokines[J]. *Semin Cancer Biol*, 2009, 19:84-91.
- [21] Sharma M, Afrin F, Satija N, Tripathi R P, Gangenahalli G U. Stromal-derived factor-1/CXCR4 signaling: indispensable role in homing and engraftment of hematopoietic stem cells in bone marrow[J]. *Stem Cells Dev*, 2011, 20:933-946.
- [22] Sugiyama T, Kohara H, Noda M, Nagasawa T. Maintenance of the hematopoietic stem cell pool by CXCL12-CXCR4 chemokine signaling in bone marrow stromal cell niches[J]. *Immunity*, 2006, 25:977-988.
- [23] Broxmeyer H E, Kohli L, Kim C H, Lee Y, Mantel C, Cooper S, et al. Stromal cell-derived factor-1/CXCL12 directly enhances survival/antiapoptosis of myeloid progenitor cells through CXCR4 and Gi proteins and enhances engraftment of competitive, repopulating stem cells[J]. *J Leukoc Biol*, 2003, 73:630-638.
- [24] Lataillade J J, Clay D, Dupuy C, Rigal S, Jasmin C, Bourin P, et al. Chemokine SDF-1 enhances circulating CD34⁺ cell proliferation in synergy with cytokines; possible role in progenitor survival[J]. *Blood*, 2000, 95:756-768.
- [25] Pelus L M, Broxmeyer H E. Chemokine axes in hematopoietic stem cell mobilization[M]//Parnham M J. *Progress in inflammation research; chemokine biology; basic research and clinical application*. Vol. 2. Basel: Birkhauser Verlag AG, 2007: 125-144.
- [26] Pelus L M, Fukuda S. Peripheral blood stem cell mobilization: the CXCR2 ligand GRObeta rapidly mobilizes hematopoietic stem cells with enhanced engraftment properties[J]. *Exp Hematol*, 2006, 34:1010-1020.
- [27] Bank U, Ansorge S. More than destructive; neutrophil-derived serine proteases in cytokine bioactivity control[J]. *J Leukocyte Biol*, 2001, 69:197-206.
- [28] Ziegler S F, Tough T W, Franklin T L, Armitage R J, Alderson M R. Induction of macrophage inflammatory protein-1 beta gene expression in human monocytes by lipopolysaccharide and IL-7[J]. *J Immunol*, 1991, 147:2234-2239.
- [29] Kim J J, Tsai A, Nottingham L K, Morrison L, Cuning D M, Oh J, et al. Intracellular adhesion molecule-1 modulates beta-chemokines and directly costimulates T cells *in vivo*[J]. *J Clin Invest*, 1999, 103:869-877.
- [30] Krzysiek R, Lefèvre E A, Zou W, Foussat A, Bernard J, Portier A, et al. Antigen receptor engagement selectively induces macrophage inflammatory protein-1 α (MIP-1 α) and MIP-1 α chemokine production in human B cells[J]. *J Immunol*, 1999, 162:4455-4463.
- [31] Lord B I, Mori K J, Wright E G, Lajtha L G. An inhibitor of stem cell proliferation in normal bone marrow[J]. *Br J Haematol*, 1976, 34:441-445.
- [32] Lord B I, Dexter T M, Clements J M, Hunter M G, Gearing A J H. Macrophage inflammatory protein protects multipotent hematopoietic cells from the cytotoxic effects of hydroxyurea *in vivo*[J]. *Blood*, 1992, 79:2605-2609.
- [33] Wright E G, Lord B I. Regulation of CFU-S proliferation by locally produced and endogenous factors[J]. *Biomed Exp*, 1977, 27:215-218.
- [34] Graham G J, Wright E G, Hewick R, Wolpe S D, Wilkie N M, Donaldson D, et al. Identification and characterisation of an inhibitor of haemopoietic stem cell proliferation [J]. *Nature*, 1990, 344:442-444.
- [35] Clements J M, Craig S, Gearing A J H, Hunter M G, Heyworth C M, Dexter T M, et al. Biological and structural properties of MIP-1 α expressed in yeast[J]. *Cytokine*, 1992, 4:76-82.
- [36] Ryu O H, Choi S J, Firatli E, Choi S W, Hart P S, Shen R F, et al. Proteolysis of macrophage inflammatory protein-1 α isoforms LD78beta and LD78alpha by neutrophil-derived serine proteases[J]. *J Biol Chem*, 2005, 280:17415-17421.