

SO₂ 长期吸入对大鼠肺组织基因表达谱的影响^{*}

孟紫强^{**} 秦国华 白巨利 张建彪 杨振华 张欣

(山西大学环境医学与毒理学研究所 太原 030006)

摘要 采用 Affymetrix 的基因芯片 (RAE230A) 技术, 研究了 SO₂ 长期动态吸入 (14 mg/m³, 1 h/d, 共 30 d) 后大鼠肺组织基因表达谱的改变. 结果表明, 与对照组 (CK) 相比, SO₂ 长期吸入后大鼠肺组织表达上调的基因有 173 个, 其中包括 79 个已知基因和 94 个新基因, 而表达下调的基因有 85 个, 其中包括 46 个已知基因和 39 个新基因. 表明: (1) 长期吸入 SO₂ 的大鼠肺基因表达谱与其 CK 相比, 表达有差异的基因涉及到脂肪酸代谢、免疫、炎症、氧化应激、原癌基因、肿瘤抑制基因和细胞外基质等, 表明低剂量长期吸入 SO₂ 在体内的机理非常复杂; (2) SO₂ 高剂量短期吸入与低剂量长期吸入后, 大鼠肺组织基因表达谱的改变很不一致, 表明二者在体内的作用机理不同; (3) SO₂ 可引起多种基因的表达发生改变, 这意味着多种基因的表达是易变的、不稳定的, 在肺组织中可能存在着 SO₂ 诱发的表达不稳定型基因组. 表 1 参 19

关键词 SO₂; 肺; 大鼠; 基因芯片; 基因表达

CLC X174

Alteration of Gene Expression Profiles in Rat Lungs Exposed to Sulfur Dioxide for Long Time^{*}

MENG Ziqiang^{**}, QIN Guohua, BAI Juli, ZHANG Jianbiao, YANG Zhenhua & ZHANG Xin

(Institute of Environmental Medicine and Toxicology, Shanxi University, Taiyuan 030006, China)

Abstract Affymetrix GeneChip (RAE230A) analysis was conducted to study the gene expression profiles in the lungs of Wistar rats exposed to SO₂ for long time (14 mg/m³, 1 h/day, for 30 days). It was found that 173 genes, including 79 known genes and 94 novel genes, were up-regulated, and 85 genes, with 46 known and 39 novel ones, were down-regulated in the lungs of rats exposed to SO₂ compared with control group. It could be concluded that (1) the discriminating genes in lungs of rats exposed to SO₂ for long time included those involved in fatty acid metabolism, immune, inflammatory, oxidative stress, oncogene, tumor suppressor and extracellular matrix. The mechanism of low-dose and long-term exposure to SO₂ was very complex; (2) SO₂ exerted its effects by different mechanisms *in vivo* at high-dose and short-term inhalation and at low-dose and long-term inhalation; and (3) expression of many genes in rat lungs was changed by SO₂, which implied that the gene expression was changeable and unstable, and there was a genome that its expression might be changed by SO₂. Tab 1, Ref 19

Keywords sulfur dioxide (SO₂); lung; rat; GeneChip analysis; gene expression

CLC X174

二氧化硫 (SO₂) 是一种普遍存在的大气污染物, 以低浓度存在于普通大气中, 以高浓度存在于某些工作场所. 近年来研究表明, SO₂ 吸入可诱导小鼠骨髓细胞染色体畸变 (CA) 及微核 (MN) [1, 2]; SO₂ 及其衍生物也可以诱导人血淋巴细胞 CA、MN 和姐妹染色单体交换 (SCE) [3, 4]. 最近研究观察到, SO₂ 的衍生物还会引起大鼠海马 CA1 神经元及背根神经的钠电流和延迟性外向钾电流的改变 [5~7]; 近来还发现 SO₂ 及其衍生物是全身性毒物, 不仅可引起小鼠肺组织, 还可引起小鼠其它多种器官的 DNA 损伤和氧化损伤 [8, 9]. 然而, 有关 SO₂ 及其衍生物毒

性机理的报道并不多见. 为了进一步探讨 SO₂ 的分子毒作用机制, 本文采用了 Affymetrix 公司的大鼠基因表达谱芯片 (RAE230A) 对长期吸入 SO₂ 的大鼠的肺组织基因表达谱变化进行了研究.

1 材料与方法

1.1 化学试剂与仪器

SO₂ 标准气体, 纯度为 99.99%, 购自北京氮谱北分气体工业有限公司; Trizol, SuperScript II 反转录酶购自 Invitrogen Life Technologies; RNeasy Mini Kit 购自 QIAGEN; Enzo RNA Transcript Labeling Kit 购自 Affymetrix; 其余均为分析纯. 基因芯片 Rat Expression RAE230A array (RAE230A) 及 Test3 array 购自 Affymetrix. 所用主要仪器有 Hybridization Over 640, Fluidics Station 400 和 G2500A GeneArray Scanner, 均为 Affymetrix 公司产品.

收稿日期: 2005-06-27 接受日期: 2005-07-25

^{*} 国家自然科学基金资助项目 (No. 30230310, No. 20477023) 和山西省自然科学基金资助项目 (No. 20031092) Supported by the National Natural Science Foundation of China and the Natural Science Foundation of Shanxi, China

^{**} 通讯作者 Corresponding author (E-mail: zqmeng@sxu.edu.cn)

1.2 SO₂动态吸入染毒处理

采用本室建立的方法^[3]进行.将雄性 Wistar 大鼠 6 只(体重在 180~200 g,由山西省中医研究院动物房提供)随机分为 2 组,每组 3 只;SO₂长期动态吸入染毒组,每天 1 h,连续 30 d 吸入 SO₂ (14 mg/m³),其对照组(CK)在同一大小的染毒箱中接受相同时间的过滤的新鲜空气.吸入染毒结束 18 h 后,将大鼠处死,取出肺组织,立即置于液氮保存.

1.3 探针制备

用 Trizol 试剂提取 RNA 并经 RNeasy Mini Kit 纯化后溶解于无 RNA 酶的水中,保存于 -80 ℃ 待用.用 SuperScript II 反转录酶进行 cDNA 的合成,然后经酚/氯仿抽提、乙醇沉淀后,用 Enzo RNA Transcript Labeling Kit 进行 cRNA 的合成及生物素标记.

1.4 芯片的杂交、洗涤及扫描

标记好的 cRNA 首先与 Test3 Array 杂交、洗涤、扫描以检验 cRNA 的质量;质检合格的样品再与 RAE230A 芯片杂交、洗涤及检测.cRNA 与芯片在杂交箱(Hybridization Oven 640)中于 45 ℃ 杂交 16 h,然后将芯片在洗涤站(Fluidics Station 400)中洗涤、染色,并用扫描仪(GeneArray Scanner G2500A)扫描.所得结果用专用软件(Microarray Suite Version 5.0)进行分析.

1.5 数据分析

每只大鼠的肺组织均作为一个样品进行 RNA 提取、cDNA 和 cRNA 合成,并与芯片杂交.在统计分析时,3 只实验组大鼠与

3 只 CK 大鼠进行两两成对,比较它们同一基因的表达水平;这样,同一基因均得到 9 个成对比较的基因表达分析结果.用以下标准判定某基因表达在实验组与 CK 之间有无差异:在实验组与 CK 之间该基因表达的 9 个成对大鼠比较中,如有 6 对基因表达变化方向一致(均上调或均下调),且基因的表达变化与 CK 相比在 1.5 倍以上时,则判定该基因为有差异表达的基因.

2 结果及讨论

2.1 探针检出分析

本研究采用的 Affymetrix 基因表达谱芯片为大鼠 RAE230A 片,该芯片共有 15 923 个探针,检出率为 40% 以上即表明芯片、样品及操作均达到合格标准,从而保证了数据的可靠性.本实验中,CK 最高检出 69.3%,最低检出 60.7%,平均检出 64.27%;SO₂染毒组最高检出 63.8%,最低检出 61.3%,平均检出 62.63%.这些结果表明,本研究所获得的数据可靠并具有可比性.

2.2 长期吸入 SO₂后大鼠肺组织有差异表达的基因

SO₂ (14 mg/m³)长期吸入后表达上调的基因有 173 个,其中包括 79 个已知基因和 94 个新基因,新基因中有 20 个功能未知基因和 74 个 EST;而表达下调的基因有 85 个,其中包括 46 个已知基因和 39 个新基因,新基因中有 5 个功能未知基因和 34 个 EST.表 1~5 列出了长期吸入 SO₂后大鼠肺组织全部有差异表达的已知基因.

表 1 长期吸入 SO₂ (14 mg/m³) 后大鼠肺中有差异表达的基因
Table 1 Discriminating genes in lungs of rats exposed to SO₂ at 14 mg/m³ for long time

分类 Classification	基因库号 GenBank accession No.	基因名字 Gene name	FC	备注 Note
脂肪酸合成 Fatty acid synthesis	gb: NM_016987.1	ATP 柠檬酸裂解酶 ATP citrate lyase (Acly)	2.0	* 1
	gb: BI296153	乙酰辅酶 A 羧化酶 Acetyl-coenzyme A carboxylase (Acac)	1.6	* 2
	gb: NM_022193.1	乙酰辅酶 A 羧化酶 Acetyl-coenzyme A carboxylase (Acac)	1.6	* 3
	gb: NM_017332.1	脂肪酸合酶 Fatty acid synthase (Fasn)	2.3	* 4
	gb: AI179334	脂肪酸合酶 Fatty acid synthase (Fasn)	2.4	* 5
	gb: NM_012600.1	苹果酸酶 1 Malic enzyme 1 (Me1)	2.6	* 6
	gb: M30596.1	苹果酸酶 1 Malic enzyme 1 (Me1)	3.0	* 7
	gb: J02585.1	硬脂酰辅酶 A 脱氢酶 1 Stearoyl-coenzyme A desaturase 1 (Scd1)	5.8	* 8b
	gb: BE107760	硬脂酰辅酶 A 脱氢酶 2 Stearoyl-coenzyme A desaturase 2 (Scd2)	2.3	* 9
	gb: NM_031841.1	硬脂酰辅酶 A 脱氢酶 2 Stearoyl-coenzyme A desaturase 2 (Scd2)	2.0	* 10
脂肪酸氧化 Fatty acid oxidation	gb: D90109.1	脂肪酸辅酶 A 连接酶,长链 2 Fatty acid coenzyme A ligase, long chain 2	2.7	
	gb: BI277523	脂肪酸辅酶 A 连接酶,长链 2 Fatty acid coenzyme A ligase, long chain 2	2.0	
免疫 Immune response	gb: NM_031559.1	肉碱棕榈酰转移酶 1a Carnitine palmitoyltransferase 1, liver (Cpt1a)	-1.7	* 13
	gb: NM_013200.1	肉碱棕榈酰转移酶 1b Carnitine palmitoyltransferase 1b (Cpt1b)	1.9	* 14
	gb: NM_012645.1	RT1 类 Ib 基因 RT1 class Ib gene (Aw2) (RT1Aw2)	-1.7	* 16
	gb: AJ243338.1	RT1 类 Ib 基因 RT1 class Ib gene (Aw2) (RT1Aw2)	-1.7	* 17
	gb: M24026.1	RT1 类 Ib 基因 RT1 class Ib gene (Aw2) (RT1Aw2)	-1.5	* 18
	gb: I40364.1	RT1 类 Ib 基因 RT1 class Ib gene (Aw2) (RT1Aw2)	-1.6	* 19
	gb: NM_012646.1	RT1 类 Ib 基因,类 H2-TL-, grc 区 RT1 class Ib gene, H2-TL-like, grc region (N1) (RT1-N1)	-2.0	* 20
	gb: BM389513	MHC 类 II 抗原 RT1. B-1 β 链 Rat mRNA for MHC class II antigen RT1. B-1 beta-chain	-1.8	* 21
	gb: NM_053373.1	肽聚糖识别蛋白 Peptidoglycan recognition protein (Pglyrp)	-2.0	
	gb: AF245172.1	鸟嘌呤脱氨酶 Guanine deaminase (Gda)	1.7	b
炎症反应 Inflammatory response	gb: AI234860	磷脂酶 A2, IB Phospholipase A2, group IB (Pla2g1b)	1.7	* 22
	gb: D88586.1	嗜曙红细胞阳离子蛋白 Eosinophil cationic protein (ECP)	-1.6	b

续表 1 Continuous

抗氧化剂 Antioxidant	gb: AB030829.1	碳酸酐酶 3 Carbonic anhydrase 3 (Ca3)	2.0	* 23b
	gb: AF014009.1	过氧化还原酶 6 Peroxiredoxin 6 (Prdx6)	1.6	* 24
	gb: AF202115.1	血浆铜蓝蛋白 Ceruloplasmin (CP)	-1.9	* 25
	gb: NM_012532.1	血浆铜蓝蛋白 Ceruloplasmin (CP)	-1.7	* 26
原癌基因 Oncogene	gb: BF415939	c-fos 原癌基因 c-fos oncogene (c-fos)	2.0	* 27
	gb: NM_133397.1	类 v-ets 骨髓成红细胞增多症病毒 E26 原癌基因 v-ets erythroblastosis virus E26 oncogene like (avian) (Erg)	1.6	* 28
	gb: BI288619	v-jun 恶性毒瘤病毒 17 原癌基因同族体 v-jun sarcoma virus 17 oncogene homolog (avian) (Jun)	2.1	* 29
肿瘤抑制基因 Tumor suppresser	gb: NM_017061.1	赖氨酰氧化酶 Lysyl oxidase (Lox)	-2.3	* 30
	gb: BI304009	赖氨酰氧化酶 Lysyl oxidase (Lox)	-1.5	* 31
细胞外基质 Extracellular matrix	gb: NM_031050.1	Lumican (Lum)	1.6	
	gb: NM_019164.1	Chondroadherin (Chad)	2.4	
	gb: NM_017087.1	双糖链蛋白聚糖 Biglycan (Bgn)	-1.5	* 32
	gb: U65656.1	基质金属蛋白酶 2 (72 KDa IV 型胶原酶) Matrix metalloproteinase 2 (72 KDa type IV collagenase) (Mmp2)	-1.6	* 33
	gb: NM_022221.1	嗜中性的胶原酶 Neutrophil collagenase (Mmp8)	-2.0	* 34
	gb: AF034218.1	透明质酸酶 2 Hyaluronidase 2 (Hyal2)	-1.8	* 35
	gb: Z78279.1	胶原 1 型 α1 Collagen, type 1, alpha 1 (Col1α1)	-2.1	* 36
	gb: BI285575	胶原 1 型 α1 Collagen, type 1, alpha 1 (Col1α1)	-2.1	* 37
	gb: BM388837	前胶原 I 型 α2 Procollagen, type I, alpha 2 (Col1a2)	-1.7	* 38
	gb: AF305418.1	前胶原 II 型 α1 Procollagen, type II, alpha 1 (Col2α1)	1.7	* 39
	gb: BI275716	胶原 III 型 α1 Collagen, type III, alpha 1 (Col3α1)	-1.6	* 40
	gb: AI230238	前胶原 X 型 α1 Procollagen, type X, alpha 1 (Col10α1)	2.9	b
	gb: AI235948	巢蛋白 Nidogen (entactin) (Nid)	-1.5	* 41
	gb: J04035.1	弹性蛋白 Elastin (Eln)	-2.5	* 42
	gb: NM_012656.1	分泌性富半胱氨酸的酸性糖蛋白 Secreted acidic cysteine rich glycoprotein (Sparc)	-1.7	* 43
	gb: D28875.1	分泌性富半胱氨酸的酸性糖蛋白 Secreted acidic cysteine rich glycoprotein (Sparc)	-1.6	* 44
细胞识别 Cell recognition	gb: AA945737	趋化因子受体 Chemokine receptor (LCR1) (Cxcr4)	1.6	
	gb: U54791.1	趋化因子受体 Chemokine receptor (LCR1) (Cxcr4)	1.8	
	gb: NM_012513.1	脑引发的神经营养因子 Brain derived neurotrophic factor	1.5	
细胞内信号 Cell-cell signaling	gb: NM_053822.1	S100 钙结合蛋白 A8 (钙粒蛋白 A) S100 calcium-binding protein A8 (calgranulin A) (S100a8)	-2.0	
	gb: NM_053587.1	S100 钙结合蛋白 A8 (钙粒蛋白 B) S100 calcium-binding protein A9 (calgranulin B) (S100a9)	-1.5	
	gb: NM_021654.1	间隙连接膜通道蛋白 α4 Gap junction membrane channel protein alpha 4 (Gja4)	-2.0	
细胞支持 Cell adhesion	gb: NM_012976.1	外源凝集素, 半乳糖结合, 可溶性的 5 Lectin, galactose binding, soluble 5 (Lgals5)	-1.5	
细胞生长 Cell growth	gb: AA944827	骨形态发生蛋白 2 Bone morphogenetic protein 2 (Bmp2)	-1.6	
细胞增殖 Cell proliferation	gb: AI008792	DNA 结合抑制剂 2 Inhibitor of DNA binding 2, dominant negative helix-loop-helix protein (Id2)	2.0	
细胞周期 Cell cycle	gb: NM_133572.1	细胞分裂周期 25B Cell division cycle 25B (Cdc25b)	-2.2	
钠通道 Sodium channel	gb: AA685184	钠通道 β3 Sodium channel beta 3 subunit (Scnb3)	-1.7	
激素 Hormone	gb: NM_012703.1	甲状腺激素反应蛋白 Thyroid hormone responsive protein (Thrsp)	4.4	b
	gb: AI169092	甲状腺激素反应蛋白 Thyroid hormone responsive protein (Thrsp)	3.3	b
	gb: NM_053469.1	hepcidin 抗菌肽 Hecpidin antimicrobial peptide (Hamp)	1.9	
	gb: NM_012612.1	尿钠排泄肽前体 A Natriuretic peptide precursor type A (Nppa)	3.4	
肌肉相关 Muscle	gb: AI711147	心肌 α 肌动蛋白 1 Actin alpha cardiac 1 (Actc1)	1.6	b
	gb: NM_019131.1	原肌球蛋白 1α Tropomyosin 1, alpha (Tpm1)	2.6	b
	gb: AF372216.1	原肌球蛋白 1α Tropomyosin 1, alpha (Tpm1)	1.6	
	gb: AF370889.1	原肌球蛋白 1α Tropomyosin 1, alpha (Tpm1)	3.1	b
	gb: NM_017144.1	肌钙蛋白 1-III 型 Troponin 1, type 3 (Tnni3)	5.5	b
	gb: NM_012676.1	肌钙蛋白 T2 Troponin T2 (Tnni2)	3.5	b
	gb: NM_017240.1	肌浆球蛋白重链 7 Myosin heavy chain, polypeptide 7 (Myh7)	2.8	
	gb: NM_017239.1	肌浆球蛋白重链 6 Myosin heavy chain, polypeptide 6 (Myh6)	4.4	b
	gb: NM_057144.1	富半胱氨酸蛋白 3 Cysteine-rich protein 3 (Csrp3)	1.8	b

续表 1 Continuous

钙离子结合 Calciumion binding	gb: AW520914	集钙蛋白 2 Calsequestrin 2 (Casq2)	1.9	
	gb: NM_017290.1	ATPase, Ca + + 转运 ATPase, Ca + + transporting, cardiac muscle, slow twitch 2 (ATP2a2)	1.6	
	gb: NM_017309.1	蛋白磷酸酶 3, 调节亚单位 B, α 1 Protein phosphatase 3, regulatory subunit B, alpha isoform, type 1 (Ppp3r1)	2.9	a
	gb: BI290034	磷酸蛋白受体 Phospholamban (Plm)	2.1	
	gb: AI231802	磷酸蛋白受体 Phospholamban (Plm)	1.7	
	gb: BF283732	膜联蛋白 III Annexin III (Anx3)	-1.6	
信号转导 Signal transduction	gb: BE112453	Enigma 同族体 Enigma homolog (Enh)	2.0	
	gb: NM_031530.1	小诱导细胞因子 A2 Small inducible cytokine A2 (Scya2)	1.9	
	gb: NM_053826.1	丙酮酸盐脱氢酶激酶 1 Pyruvate dehydrogenase kinase 1 (Pdk1)	1.7	
	gb: NM_012719.1	生长激素抑制素受体 1 Somatostatin receptor 1 (Sstr1)	1.7	
	gb: NM_012719.1	ADP-核糖基化因子 3 ADP-ribosylation factor 3 (Arf3)	2.1	
	gb: AI598401	前病毒整合位点 1 Proviral integration site 1 (Pim1)	2.1	a
	gb: BG668493	stathmin-like 2 (Stmn2)	-1.7	
	gb: NM_133380.1	白介素 4 受体 Interleukin 4 receptor (Il4r)	-1.9	
	gb: AF411318.1	金属硫蛋白 Metallothionein (MT)	-1.6	
	gb: BE101336	类 κ 因子 9 Kruppel-like factor 9 (Klf9)	-1.7	
电子转移 Electron transport	gb: NM_012812.1	细胞色素 C 氧化酶 6a2 Cytochrome c oxidase, subunit VIa, polypeptide 2 (Cox6a2)	3.2	b
	gb: NM_012682.1	解偶联蛋白 1 Uncoupling protein 1 (Ucp1)	5.6	
	gb: NM_019354.1	解偶联蛋白 2 Uncoupling protein 2 (Ucp2)	-1.9	
	gb: NM_031010.1	花生四烯酸 12-脂肪氧化酶 Arachidonate 12-lipoxygenase	-1.7	
骨化调节 Regulation of ossification	gb: BE107528	Smad5 (Madh5)	1.9	
	gb: AI409634	Best5 蛋白 Best5 protein (Best5)	-1.8	
胆固醇生物合成 Cholesterol biosynthesis	gb: NM_031840.1	Farensyl diphosphate synthase (Fdps)	1.5	
	gb: M33648.1	3-羟基-3-甲基戊二酰辅酶 A 合成酶 2 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A synthase 2 (Hmgcs2)	-3.3	
发育 Development	gb: NM_053601.1	Neuronatin (Nnat)	-1.8	
转运 Transport	gb: NM_134326.1	白蛋白 Albumin (Alb)	3.4	a
	gb: NM_024162.1	脂肪酸结合蛋白 3 Fatty acid binding protein 3 (Fabp3)	2.5	b
	gb: M_053365.1	脂肪酸结合蛋白 4 Fatty acid binding protein 4 (Fabp4)	3.7	b
	gb: NM_053910.1	血小板-白细胞 C 激酶底物同族体, Sec7 和卷曲螺旋域 1 Pleckstrin homology, Sec7 and coiled/coil domains 1 (Pscd1)	1.9	
	gb: AB039825.1	α 2u 球蛋白 PGCL4 alpha-2u globulin PGCL4 (OBP3)	2.0	
	gb: NM_019157.1	水蛋白 7 Aquaporin 7 (Aqp7)	1.8	
	gb: NM_021588.1	肌球蛋白 Myoglobin (Mb)	3.1	
	gb: NM_012751.1	溶质转运 2-4 Solute carrier family 2, member 4 (Slc2a4)	2.4	
	gb: NM_031818.1	氯细胞内通道 4 Chloride intracellular channel 4 (Clc4)	1.7	
	gb: BE113640	溶质转运 4-1 Solute carrier family 4, member 1 (Slc4a1)	-1.7	
	gb: AA891661	水蛋白 1 Aquaporin 1 (Aqp1)	-1.5	
	gb: NM_031703.1	水蛋白 3 Aquaporin 3 (Aqp3)	-2.1	
	gb: AW672589	NF- κ B 抑制因子 α Nuclear factor of kappa light chain gene enhancer in B-cells inhibitor, alpha (Nfkbia)	-1.9	* 15
	gb: NM_012551.1	早期生长因子 1 Early growth response 1 (Egr1)	2.3	
转录调节 Regulation of transcription	gb: NM_019194.1	促甲状腺胚胎因子 Thyrotroph embryonic factor (Tef)	2.9	
	gb: AF286470.2	固醇调节元件结合因子 1 Sterol regulatory element binding factor 1 (Srebf1)	1.7	* 11
	gb: AI230048	D 位点白蛋白结合蛋白 D Site albumin promoter binding protein (Dbp)	2.0	
	gb: NM_031678.1	周期同族体 2 Period homolog 2 (Per2)	1.9	
	gb: NM_012780.1	芳香烃受体核转运蛋白 Aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator (Arnt)	1.6	
	gb: BF419200	CCAAT/增强结合蛋白 (C/EBP) δ CCAAT/enhancerbinding, protein (C/EBP) delta (Cebpd)	-2.1	* 12
	gb: NM_031786.1	三重基元蛋白 3 Tripartite motif protein 3 (Trim3)	-1.6	
	gb: BE107346	真核启动子 5 Eukaryotic initiation factor 5 (eIF-5) (Eif5)	1.5	
翻译 Translation				
翻译后修饰 Post translational modification	gb: AF062741.1	丙酮酸盐脱氢酶磷酸(酯)酶同工酶 2 Pyruvate dehydrogenase phosphatase isoenzyme 2 (Pdp2)	1.6	
	gb: M18769.1	唾液酸转移酶 1 Sialyltransferase 1 (Siat1)	1.5	
	gb: BI300565	一去整合蛋白和金属蛋白酶域 10 A disintegrin and metalloprotease domain 10 (Adam10)	1.6	

续表 1 Continuous

代谢 Metabolism	gb: AA848319	乳酸脱氢酶 B Lactate dehydrogenase B (Ldhb)	1.7	
	gb: NM_012530.1	肌氨酸激酶,肌肉型 Creatine kinase, muscle (Ckm)	2.0	
	gb: NM_057125.1	过氧化物酶体生物发生因子 6 Peroxisomal biogenesis factor 6 (Pex6)	2.1	
	gb: NM_080886.1	固醇-C4-类甲基氧化酶 Sterol-C4-methyl oxidase-like (Sc4mol)	1.5	
	gb: NM_013089.1	糖原酶 2 Glycogen synthase 2 (Gys2)	5.3	
	gb: NM_021664.1	DNaseII-类酸性 Dnase DNaseII-like acid DNase (Dlad)	1.7	
	gb: U08027.1	甘油-3-磷酸脱氢酶 2 Glycerol-3-phosphate dehydrogenase 2	1.5	
	gb: NM_022215.1	甘油-3-磷酸脱氢酶 Glycerol 3-phosphate dehydrogenase (Gpd3)	3.2	
	gb: U36771.2	甘油-3-磷酸酰基转移酶, 线粒体内 Glycerol-3-phosphate acyl-transferase, mitochondrial (Gpam)	1.5	
	gb: D87247.1	6-磷酸果糖-2-激酶/果糖-2,6-磷酸氢盐酶 3 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-biphosphatase 3 (Pfkfb3)	2.0	
	gb: B1295900	二氢硫辛酰胺乙酰转移酶 Dihydroipoamide acetyltransferase (Dlat)	2.0	
	gb: AA850780	海藻糖酶 Trehalase (Treh)	1.7	
	gb: NM_013197.1	氨基乙酰丙酸合酶 2 Aminolevulinic acid synthase 2 (Alas2)	-2.1	
	gb: NM_031315.1	胞质乙酰辅酶 A 硫酯酶 1 Cytosolic acyl-CoA thioesterase 1 (Cte1)	-2.3	
	gb: Y00714.1	碱性磷酸酶,组织非特异性 Alkaline phosphatase, tissue-nonspecific (Alpl)	-1.6	
	gb: A1717733	对氧磷酶 1 Paraoxonase 1 (Pon1)	-1.8	
	gb: NM_022592.1	转羟乙醛酶 Transketolase (Tkt)	1.6	
I 相反应酶 Phase I reactions enzyme	gb: NM_012542.1	细胞色素 P450IIA3 Cytochrome P450, subfamily IIA (phenobarbital-inducible)/(Cytochrome P450 IIA3) (CYP2A3a)	1.8	b
其它 Other	gb: Z18877.1	25 寡腺苷酸合成酶 25 oligoadenylate synthetase (Osa1)	-1.5	

FC: 变化倍数 (SO₂ 吸入组/对照组); *: 在结果与讨论中提到的基因。a: 在短期实验组与长期实验组表达变化一致的基因 (均为上升或均为下降); b: 在短期实验组与长期实验组表达变化不一致的基因 (一组上升但另一组下降, 短期实验结果见《中国公共卫生》杂志, 待发表) FC: Fold of change (SO₂ exposure group/control); *: The genes described in Results and Discussion; a: The genes whose expressions in both short- and long- term groups were changed in the same direction (up- or down- regulated); b: The genes whose expressions in both short- and long- term groups were changed in different directions (up- and down- regulated)

2.2.1 脂肪酸合成和氧化 编码参与脂肪酸代谢酶的基因, 包括 ATP 柠檬酸裂解酶 (Acly)、乙酰辅酶 A 羧化酶 (Acac)、脂肪酸合酶 (Fasn)、苹果酸酶 (Me) 和硬脂酰辅酶 A 脱氢酶 (Scd) (表 1: *1 ~ *10), 这些基因在受到各种营养物质和激素作用时, 都呈现出共调节状态^[10]。在此次实验中大鼠长期吸入 SO₂ 后, 它们同样表现出共同上调。

在本实验中, Srebf1 上调了 1.7 倍, 而 Cebpdl 下调了 2.1 倍 (表 4: *11, *12)。这些结果表明, 长期吸入 SO₂ 的大鼠其肺中脂肪酸合成酶基因表达的增高与 Srebf-1c 的上调有关。

在细胞质中, 肉碱棕榈酰转移酶 1 (Cpt1) 可抑制脂肪酸的氧化。虽然 Cpt1 的两个同工酶变化方向不一致 (表 1: *13, *14), 但长期吸入 SO₂ 对大鼠肺中脂肪酸的降解会产生影响。

2.2.2 免疫、炎症和氧化应激 长期吸入 SO₂ 的大鼠肺中 NF- κ B 抑制因子 α (Nfkbia) 表达下调 (表 4: *15), Nfkbia 是 NF- κ B 的 3 个主要抑制蛋白之一。NF- κ B 转录因子是一组结构上相关的真核转录因子, 它们参与调控免疫、炎症反应、生长发育、细胞生长和程序性死亡等。这些因子在很多种疾病状态下都处于激活状态, 包括癌症、关节炎、炎症、哮喘、神经变性疾病和心血管异常等。Nfkbia 的下调可引起 NF- κ B 的激活, 这可能会对 SO₂ 诱发肺部炎症和细胞损伤的产生和发展有重要作用。

主要组织相容性复合体 (MHC 类 I 和 II) 是 NF- κ B 直接的靶基因^[11], 在 SO₂ 长期吸入实验中均有所下调 (表 1: *16 ~ *21)。免疫抑制可导致感染几率的增加, 也可能使癌症发生的危险率提高。

Ca²⁺ 依赖的磷脂酶 A2 (pla2g1b) 也属于 NF- κ B 的靶基因^[12], 它在 SO₂ 长期吸入实验中表达上调 (表 1: *22)。已知它与人类的多种临床炎症过程相关^[13]。

在本次实验中, SO₂ 长期吸入引起碳酸酐酶 3 (Ca3) 和过氧化还原酶 6 (Prdx6) 表达上调而血浆铜蓝蛋白 (Cp) 表达下调 (表 1: *23 ~ *26)。Cp 在血浆中主要负责转运铜离子, 在铁离子的动态平衡中也起着重要作用, 同时也是一种有效的抗氧化剂, 它的功能与铁氧化酶和超氧化物歧化酶相似^[14]。Ca3 也可以防止氧化损伤, 细胞中少量的自由基会使 Ca3 过表达从而会影响生长信号途径^[15]。Prdx6 包含一个有氧化还原活性的半胱氨酸 (Cys⁴⁷), 是一种具有非硫 GSH-Px 和 PLA₂ 两种活性的双功能酶^[16]; 脂质过氧化产物经 PLA₂ 水解为自由的脂肪酸氢过氧化物后, 再转变为多种有毒的终产物如醛和环氧化物; Prdx6 可促进膜功能的恢复, 通过其过氧化物酶与 PLA₂ 的结合消除过氧化磷脂^[17]。Ca3 和 Prdx6 的高表达可能是对由低浓度的 SO₂ 所引起的氧化应激的适应反应, 而 SO₂ 对 Cp 表达的抑制可能是由于 Cp 不能有效的适应所致。

2.2.3 原癌基因和肿瘤抑制基因 SO₂ 长期吸入实验中, 原癌基因 Jun, c-fos 和类 v-ets 骨髓成红血细胞增多症病毒 E26 原癌基因 (avian) (Erg) 表达均上调 (表 2: *27 ~ *29), 而一种肿瘤抑制基因赖氨酰氧化酶 (Lox) 的表达下调 (表 2: *30 ~ *31)。SO₂ 吸入使原癌基因过表达, 并使肿瘤抑制基因表达下调, 可能会导致肿瘤的发生。

2.2.4 细胞外基质 (ECM) 在 SO₂ 的长期吸入实验中, 很多与 ECM 相关的基因表达下调 (表 2: *32 ~ *44)。研究表明, 细胞功能及其应答受其外围 ECM 的影响, ECM 对维持细胞的结构及其功能完整性起着重要的作用^[18]。显然 ECM 组分的分解及其产物平衡的任何改变都会导致病理状态的产生。富半胱氨酸的酸性糖蛋白 (Sparc) 包含一组钙结合的糖蛋白, 它们是由许多不同种类的细胞分泌的 (表 2: *43, *44); 它们的抗粘附作用可使细胞的形状发生改变, 而这又会破坏细胞基质间的交互作用。Sparc 可与各

种分子包括阳离子(Ca^{2+} , Cu^{2+} , Fe^{2+})、生长因子及 ECM 蛋白等等互相作用^[19]。这表明 SO_2 及其衍生物可能会调节细胞基质的交互作用,影响细胞支持、扩展和信号传导,导致一系列生物功能发生变化,包括细胞生长、细胞移动、细胞分化、细胞外基质的合成和组织形态发生。

2.2.5 短期与长期 SO_2 吸入对基因表达的作用不同 与短期 SO_2 吸入对基因表达影响的研究结果(《中国公共卫生》,待发表)相比,长期 SO_2 吸入对基因表达的作用明显不同。短期 SO_2 吸入引起的 31 个表达上调的基因中,在长期 SO_2 吸入实验中只有 3 个表达也上调,而 26 个表达未见变化,甚至有 2 个表达下调;在短期 SO_2 吸入实验 30 个表达下调的基因中,在长期 SO_2 吸入实验中有 14 个表达未见变化,却有 16 个表达反而上调,未见任一基因表达下调。进一步比较表明,表达变化不一致的基因主要有脂肪酸结合蛋白(Fabps),甲状腺激素反应蛋白(Thrsp)和一些肌肉组分。到目前为止,对这些结果尚不能做出解释,但至少说明长期低剂量和短期高剂量吸入 SO_2 的作用机理不同。对此,尚待进一步研究。

3 讨论

研究表明, SO_2 及其体内衍生物亚硫酸盐和亚硫酸氢盐可引起体外培养的 CHO-AS52 细胞 gpt 基因(黄嘌呤-鸟嘌呤磷酸核糖转移酶的编码基因)突变,也可引起哺乳动物细胞 DNA 损伤及染色体断裂。然而, SO_2 对细胞基因组表达谱的影响尚未见文献报道。本文研究了较低浓度 SO_2 (14 mg/m^3) 动态吸入染毒 30 d (每天 1 h) 对大鼠肺组织细胞基因表达谱的影响,结果发现, SO_2 可以引起 258 个基因表达水平的改变,其中表达上调的有 173 个基因,表达下调的有 85 个基因。这些结果表明, SO_2 可以引起多种基因表达发生改变,说明相当数量的基因其表达过程是一种非常不稳定的生物学过程,容易受到环境有毒有害化学物的作用而发生改变。这类表达易受外界因素影响而改变的基因不仅数量多而且种类各异,构成了一个基因群,建议称这些基因群为表达不稳定型基因组。对于特定的环境化学物质可能有其特殊的表达不稳定型基因组。在本研究条件下, SO_2 吸入可引起大鼠肺组织细胞 258 个基因表达水平发生改变,这 258 个基因就可称之为在本实验条件下“表达不稳定型 SO_2 基因组”。这一概念是否可成为环境因素对基因表达谱影响的共同规律,尚待进一步研究。

根据分子生物学中心法则,DNA 通过基因转录(即表达)而形成 mRNA,后者通过“翻译”合成蛋白质。环境因素引起的基因表达谱的改变,将引起多种 mRNA 和多种蛋白质合成速率的变化,从而使细胞内多种蛋白质之间的平衡破坏,导致细胞代谢和生理功能紊乱,可直接影响细胞的生长、分化和凋亡,可间接影响基因组的稳定型甚至基因突变和 DNA 损伤。因此,研究有毒有害因素对基因组表达谱的影响,确定不同环境化学物质各自的表达不稳定基因组,对于深入探讨环境因素毒性作用的分子机理及其防护有重要价值。

4 结论

本研究发现,短期吸入 SO_2 后大鼠肺有 61 个基因表达显著变化(《中国公共卫生》,待发表),长期吸入 SO_2 后大鼠肺有 258 个基因表达显著变化。只有 3 个基因的表达在短期和长期 SO_2 吸入实验中变化趋势一致,表明长期低剂量和短期高剂量吸入 SO_2 在体内的作用机理不同;短期吸入 SO_2 的大鼠肺基因表达谱与其对照组相比,与氧化磷酸化相关的一些基因的表达发生了更为显著地变化,表明高剂量短期吸入 SO_2 可能导致线粒体功能的恶化;长期吸入 SO_2 的大鼠肺基因表达谱与其对照组相比,表达有差异的基

因涉及到脂肪酸代谢、免疫、炎症、氧化应激、原癌基因、肿瘤抑制基因和细胞外基质,表明低剂量长期吸入 SO_2 在体内的作用更为复杂、严重。

References

- Meng ZQ, Zhang B, Ruan AD, Sang N, Zhang JB. Micronuclei induced by sulfur dioxide inhalation in mouse bone-marrow cells *in vivo*. *Inhal Toxicol*, 2002, **14**: 303 ~ 309
- Meng ZQ, Zhang B. Induction effects of sulfur dioxide inhalation on chromosomal aberrations in mouse bone marrow cells. *Mutagenesis*, 2002, **17**: 215 ~ 217
- Meng ZQ, Zhang LZ. Chromosomal aberrations and sister-chromatid exchanges in lymphocytes of workers exposed to sulphur dioxide. *Mutat Res*, 1990, **241**: 15 ~ 20
- Meng ZQ, Zhang LZ. Cytogenetic damage induced in human lymphocytes by sodium bisulfite. *Mutat Res*, 1992, **298**: 63 ~ 69
- Meng ZQ (孟紫强), Sang N (桑楠). Effect of SO_2 derivatives on sodium currents in acutely isolated rat hippocampal CA1 neurons. *Acta Physiol Sin* (生理学报), 2002, **54** (3): 267 ~ 270
- Du ZQ, Meng ZQ. Modulation of sodium current in rat dorsal root ganglion neurons by sulfur dioxide derivatives. *Brain Res*, 2004, **1010**: 127 ~ 133
- Du ZQ, Meng ZQ. Effects of derivatives of sulfur dioxide on transient outward potassium currents in acutely isolated rat hippocampal neurons. *Food & Chem Toxicol*, 2004, **42**: 1211 ~ 1216
- Meng ZQ. Oxidative damage of sulfur dioxide on various organs of mice: sulfur dioxide is a systemic oxidative damage agent. *Inhal Toxicol*, 2003, **15**: 181 ~ 195
- Meng ZQ, Qin GH, Zhang B, Bai JL. DNA damaging effects of sulfur dioxide derivatives in cells from various organs of mice. *Mutagenesis*, 2004, **19**: 465 ~ 468
- Jump DB, Clarke SD. Regulation of gene expression by dietary fat. *Annu Rev Nutr*, 1999, **19**: 63 ~ 90
- Haddad JJ. Antioxidant and prooxidant mechanisms in the regulation of redox(y)-sensitive transcription factors. *Cellular Signalling*, 2002, **14**: 879 ~ 897
- Rossi A, Kapahi P, Natoli G, Takahashi T, Chen Y, Karin M, Santoro MG. Anti-inflammatory cyclopentenone prostaglandins are direct inhibitors of I κ B kinase. *Nature*, 2000, **403**: 103 ~ 108
- Nevalainen TJ, Haapamäki MM, Grönroos JM. Roles of secretory phospholipases A2 in inflammatory diseases and trauma. *Biochim Biophys Acta*, 2000, **1488**: 83 ~ 90
- Floris G, Medda R, Padigalia A, Music G. The physiopathological significance of ceruloplasmin: a possible therapeutic approach. *Biochem Pharmacol*, 2000, **60**: 1735 ~ 1741
- Saarnio J. Distribution of carbonic anhydrase isoenzyme IX, MN/CA IX, in normal and neoplastic gastrointestinal and hepatobiliary tissues. Its potential value as a new biomarker and comparison of its expression with that of isoenzymes I, II, IV, V, and VI. Oulu, Finland: Oulu University Library, 2000. 23
- Chen JW, Dodia C, Feinstein SI, Jain MK, Fisher AB. 1-Cys peroxiredoxin, a bifunctional enzyme with glutathione peroxidase and phospholipase A₂ activities. *J Biol Chem*, 2000, **275**: 28421 ~ 28427
- Salmon M, Dedessus Le, Moutier J, Wenders F, Chiarizia S, Eliaers F, Remacle J, Royer V, Pascal T, Toussaint O. Role of the PLA₂-independent peroxiredoxin VI activity in the survival of immortalized fibroblasts exposed to cytotoxic oxidative stress. *FEBS Lett*, 2004, **557**: 26 ~ 32
- Sawhney RS, Wood LS, Vogeli G. Molecular cloning of the bovine I (IV) procollagen gene (Col 4A1) and use in investigating the regulation of expression of type IV procollagen by retinoic acid in bovine lens epithelial cells. *Cell Biol Int*, 1997, **21**: 501 ~ 510
- Yan Q, Sage EH. SPARC, a matricellular glycoprotein with important biological functions. *J Histochem Cytochem*, 1999, **47**: 1495 ~ 1506