

宫颈癌细胞辐射敏感性与 *IER5* 基因的关系

吉 晨¹, 吴玉梅¹, 李秀楠¹, 周平坤²

(1.首都医科大学附属北京妇产医院, 北京 100006; 2. 军事医学科学院辐射与放射研究所, 北京 100006)

摘要: [目的] 通过 RNA 干扰技术致基因沉默和基因过表达的方法研究 *IER5* 基因与宫颈癌 SiHa 细胞系辐射敏感性的相关性, 探讨 *IER5* 基因不同表达的细胞系对辐射敏感性的差异。[方法] 构建 *IER5* 沉默及过表达的真核表达载体, 转染细胞并筛选出稳定表达的细胞系, 经 Western Blot 和 Real-time PCR 鉴定成功。观察 *IER5* 基因不同表达的 3 种细胞系的形态; 对细胞系进行 4Gy 的辐射后使用 CCK-8 检测细胞生长曲线; 对细胞系进行 10Gy 的辐射后使用流式细胞仪检测细胞凋亡情况; 对细胞系进行 4Gy 的辐射后使用流式细胞仪检测不同时间点细胞周期的情况。[结果] *IER5* 基因沉默使 SiHa 细胞略有增大, 照射后的细胞增殖速度加快; 而其过表达可使 SiHa 细胞缩小呈圆形, 并且细胞增殖速度有所减慢。*IER5* 沉默导致辐射诱导的 SiHa 细胞凋亡率降低, 过表达可促进辐射诱导的 SiHa 细胞凋亡, 其凋亡在照射后 48h 最为显著。照射后细胞周期的 G₂-M 期阻滞效应随 *IER5* 表达含量的降低而升高, *IER5* 基因沉默促进细胞的增殖分裂。[结论] *IER5* 基因与宫颈癌 SiHa 细胞的增殖、凋亡和细胞周期的变化及对辐射的反应有明显相关性, *IER5* 基因可能可提高宫颈癌细胞对放射的敏感性。

关键词: *IER5* 基因; SiHa 细胞; 细胞系构建; 辐射敏感性; 宫颈肿瘤

中图分类号: R737.33 **文献标识码:** A **文章编号:** 1671-170X(2017)04-0305-07

doi: 10.11735/j.issn.1671-170X.2017.04.B011

The Relationship Between Radiosensitivity of Cervical Cancer Cells and *IER5* Gene

Ji Chen, WU Yu-mei, LI Xiu-nan, et al.

(Beijing Obstetrics and Gynecology Hospital Affiliated to Capital Medical University, Beijing 100006, China)

Abstract: [Objective] Using RNA interference and gene overexpression method to make *IER5* gene silence and overexpression, in order to research the correlation between *IER5* gene with cervical cancer cells SiHa's radiation sensitivity, to explore the differences of radiotherapy sensitivity in different *IER5* gene expression of cell lines. [Methods] *IER5* silence and overexpression eukaryotic expression vectors was established, transfected SiHa cells and select stably expressing cell lines, and verified the cell line by Western Blot and Real-time PCR turns out the cell line to be successfully established. Observing the change in cell morphology of three kinds of cell lines; Using CCK-8 to measure cell growth curve after 4Gy of radiation; Using the flow cytometry to detect cell apoptosis after 10Gy of radiation; Using the flow cytometry to detect cell cycles after 4Gy of radiation in different timing. [Results] *IER5* gene silencing SiHa cells increased in volume slightly, and the speed of cell proliferation after radiation had increased. And *IER5* gene overexpression could make SiHa cells shrink assumes as circle, and cell proliferation had slowed down. *IER5* gene silencing resulted in the decrease of SiHa cells apoptosis rate induced by radiation, and *IER5* gene overexpression could promote the SiHa cells apoptosis rate induced by radiation. The result presented most significant apoptosis rate appears in 48-hour after radiation. The G₂-M phase retardation effect in cell cycle after radiation was promoted along with the decreasing of *IER5* expression, which indicates *IER5* gene silencing can promote cell proliferation. [Conclusion] *IER5* gene has significant correlation with cervical cancer SiHa cell lines' proliferation, apoptosis, cell cycles and response to radiation. *IER5* gene can improve the sensitivity of cervical cancer cells to radiation.

Subject words: *IER5* gene; SiHa cells; cell lines construction; radiosensitivity; cervical neoplasms

IER5 基因(Immediate Early Response gene 5)是

早期反应家族中的一员, 人 *IER5* 基因在 NCBI 基因库中编号为 NM_016545.4, 全长 2350bp, 主要参与对外界刺激的快速应答及细胞周期的调节等^[1]。国内外多位学者通过基因芯片技术等发现多种组织细胞经辐射后, 其 *IER5* 基因的转录或翻译成倍增加^[2],

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81272888)

通讯作者: 吴玉梅, 主任医师; 首都医科大学附属北京妇产医院妇科肿瘤科, 北京市东城区骑河楼大街 17 号(100006); E-mail: chenxi8932spring.student@sina.com

收稿日期: 2016-04-25; **修回日期:** 2016-06-27

可见该基因与细胞辐射后的生物学改变密切相关。宫颈癌Ⅱ_{a2}期以上患者以根治性放疗作为主要治疗手段,由于个体差异,患者对放射治疗的敏感性不同。因此,我们研究 *IER5* 基因与放射生物学效应的关系,以及如何引起肿瘤细胞凋亡,以期找到提高宫颈癌放疗的疗效、进一步降低宫颈癌的复发率及死亡率的靶基因。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 细胞培养

人宫颈鳞癌 SiHa 细胞购自国家实验细胞资源共享平台,培养基为 MEM-EBSS+10%胎牛血清,在 5%二氧化碳 37℃ 恒温的孵箱中培养。

1.1.2 质粒、菌株

质粒 pSilencer 4.1-CMV、pCMV-Tag 2B 为本实验室保存, DH5 α 感受态细胞购自北京天根生化科技有限公司。

1.1.3 辐射

利用军事医学科学院辐射与放射医学研究所的 ⁶⁰Co γ 射线,于室温下对处于对数生长期的细胞进行照射。

1.2 方法

1.2.1 构建 *IER5* 基因沉默的 SiHa 细胞系

利用在线 siRNA 设计软件 (WhiteHead), 根据载体 pSilencer4.1-CMV 的质粒图谱^[3]设计 siRNA 引物,参考小干扰 RNA 设计原则^[4-6],进行初步设计挑选,与 NCBI genbank 中 BLAST 进行比对,去除与其他物种基因片段同源性高的序列,最终设计出 4 组 siRNA 及一组阴性对照。将上述 5 对寡核苷酸片段送交公司合成后进行 PCR,与酶切后的载体分别进行琼脂糖凝胶电泳, DNA 切胶回收后将目的片段与载体连接,连接产物经琼脂糖凝胶电泳鉴定后切胶回收得到目的质粒。转化感受态细胞 DH5 α 并进行扩大培养,提取质粒后送交公司测序,使用 DNASTar 软件将测序结果与所设计的序列进行比对一致。根据瞬时转染 Western Blot 结果,稳定转染质粒 2 号、3 号、阴性对照 n 及空载,转染 24h 后,开始加药筛选培养,根据预实验中的 SiHa 细胞潮霉素 B 死亡曲线,加入终浓度为 50 μ g/ml 的潮霉素 B 培养

液, 3d 更换一次含药培养液, 每天观察细胞死亡情况, 12d 后形成肉眼可见的单克隆, 挑取单克隆进行扩大培养, 使用 25 μ g/ml 的潮霉素 B 维持筛选压力。最终构建出稳定表达 *IER5* 基因沉默的 SiHa 细胞系 (IER5-siRNA-SiHa), 经 Real-time PCR 和 Western Blot 鉴定成功。

1.2.2 构建 *IER5* 基因过表达的 SiHa 细胞系

在 NCBI 中搜索 *IER5* 基因, 找到其 mRNA 序列中编码区域 (CDS), *IER5* 的 CDS 为 402~1385 的碱基序列, 共 984bp, 翻译成含有 327 个氨基酸的蛋白质。根据实验要求和实验室条件选择载体 pCMV-Tag 2B, 结合酶切分析在线工具 WebCutter2.0, 挑选出双酶切的酶为: HindⅢ-HF 和 Xho I。根据引物设计原则设计出 *IER5* 基因的上下游引物序列, 并送公司合成。对引物进行 PCR 后, 将引物与载体分别进行双酶切及琼脂糖凝胶电泳, DNA 切胶回收后将目的片段与载体连接, 连接产物经琼脂糖凝胶电泳鉴定后切胶回收得到目的质粒。转化感受态细胞 DH5 α 并进行扩大培养, 提取质粒后送交公司测序, 使用 DNASTar 软件将测序结果与所设计的序列进行比对一致。根据瞬时转染 Western Blot 结果, 稳定转染质粒 3、6、13 号及空载, 转染 24h 后, 开始加药筛选培养, 根据预实验中的 SiHa 细胞 G418 死亡曲线, 加入终浓度为 1000 μ g/ml 的 G418 培养液, 3d 更换一次含药培养液, 每天观察细胞死亡情况, 14d 后形成肉眼可见的单克隆, 挑取单克隆进行扩大培养, 使用 500 μ g/ml 的 G418 维持筛选压力。最终构建出稳定表达 *IER5* 基因过表达的 SiHa 细胞系 (IER5-overexpressing-SiHa), 经 Real-time PCR 和 Western Blot 鉴定成功。

1.2.3 倒置显微镜下观察细胞系的形态差异

在放大倍数相同的条件下观察 IER5-siRNA-SiHa 细胞、正常 SiHa 细胞和 IER5-overexpression-SiHa 细胞的形态、大小等特征, 并拍照。

1.2.4 CCK-8 检测细胞生长曲线

将处于对数生长期的 IER5-siRNA-SiHa 细胞、正常 SiHa 细胞和 IER5-overexpression-SiHa 细胞消化入离心管中, 制备成细胞悬液; 进行 4Gy 的照射后, 将 3 种细胞分别传入 96 孔板中, 利用电子细胞计数仪计数后, 每孔接种 5000 个细胞, 每种细胞做 3 个复孔, 共接种 8 行, 每孔加入 200 μ l 正常培养

基;4~6h 细胞贴壁后,准备 CCK-8 培养液:1ml 正常培养液+100 μ l CCK-8, 吸干 96 孔板第一行中的 9 个孔中的培养液, 向 1~10 号孔分别加入 100 μ l CCK-8 培养液,10 号孔为空白对照孔;孵育 2h 后使用酶标仪在 450nm 单波长处测其吸光值;第 2~8d 同一时间重复上述实验;每种细胞 3 个复孔取平均值,根据 OD 值描绘细胞照射后的生长曲线。

1.2.5 流式细胞仪检测照射后的细胞凋亡

在 10Gy 剂量的照射后使用 Annexin V-FITC 细胞凋亡试剂盒及流式细胞仪检测 IER5 不同表达的 SiHa 细胞系在照射后 0、24、48、72h 其细胞凋亡情况。

1.2.6 流式细胞仪检测照射后的细胞周期

在 4Gy 剂量的照射后不同时间点(0、1、2、4、8、12、24、36、48h)检测 3 种细胞系的细胞周期情况,观察 IER5 基因对 SiHa 细胞经照射后细胞周期的影响。

2 结果

2.1 IER5 基因的小干扰 RNA 序列

siRNA 靶 1(444bp):SENSE:CTGGGCAAGATC-TACAACTCG;ANTISENSE:GACCCGTTCTAGATGT-TGAGC。代入得到双链寡核苷酸模板:5'-GATC-CGGGCAAGATCTACAACTCGTTCAAGAGACGAGT-TGTAGATCTTGCCCAGA-3';3'-GCCCCGTTCTAGAT-GTTGAGCAAGTTCTCTGCTCAACATCTAGAACGG-GTCTTCGA-5'。

siRNA 靶 2 (1200bp):SENSE:GCTAACCTCAT-CAGCATCTTC;ANTISENSE:CGATTGGAGTAGTCG-TAGAAG。5'-GATCCTAACCTCATCAGCATCTTCTT-CAAGAGAGAAGATGCTGATGAGGTTAGCA-3';3'-GATTGGAGTAGTCGTAGAAGAAGTTCTCTCTTCTA-CGACTACTCCAATCGTTTTCGA-5'。

siRNA 靶 3 (1862bp):SENSE:CGCACAGGA-TTTCCTAAGACG;ANTISENSE:GCGTGTCTTAAAG-GATTCTGC。5'-GATCCCACAGGATTTCTTAAAGACG-TTCAAGAGACGTCTTAGGAAATCCTGTGCGA-3';3'-GGTGTCTTAAAGGATTCTGCAAGTTCTCTGCAG-AATCCTTTAGGACACGCTTTCGA-5'。

siRNA 靶 4(481bp):SENSE:GCATCAAGCTG-

CATAAGAACC;ANTISENSE:CGTAGTTCGACGTA-TTCTTGG。5'-GATCCATCAAGCTGCATAAGAACCT-TCAAGAGAGGTTCTTATGCAGCTTGATGCA-3';3'-GTAGTTCGACGTATTCTTGGAAAGTTCTCTCCAAGA-ATACGTCCGAACCTACGTTTTCGA-5'。

阴性对照 1200bp (靶 2) 打乱:SENSE:GTCACCATTCCAAGCACTTCT;ANTISENSE:CAGT-GGTAAGGTTCTGTAAGA;5'-GATCCCACCATTCCA-AGCACTTCTTTCAAGAGAAGAAGTGCTTGGAATG-GTGACA-3';3'-GGTGGTAAGGTTCTGTAAGAAAG-TTCTCTTCTTCACGAACCTTACCACTGTTTTCGA-5'。

2.2 IER5 基因沉默稳定表达的细胞系鉴定结果

使用潮霉素 B 成功筛选出稳定转染的 IER5-siRNA-SiHa 细胞系及对照细胞系,通过 Western Blot 从蛋白水平半定量验证(Figure 1)以及进一步通过 Real-Time PCR 从 mRNA 水平定量验证(Figure 2)细胞系。Western Blot 中使用 β -actin 来标定蛋白上样量,Real-Time PCR 中使用 β -actin 作为内参基因。两者结果均显示构建的 IER-siRNA-SiHa 细胞系中 IER5 基因成功沉默。

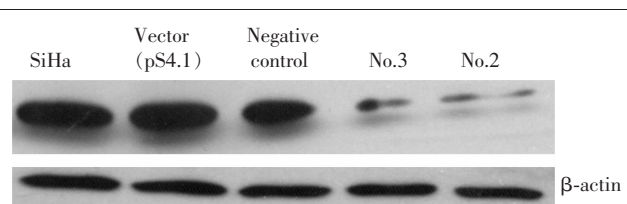


Figure 1 Western blot result of IER5-siRNA-SiHa cell lines

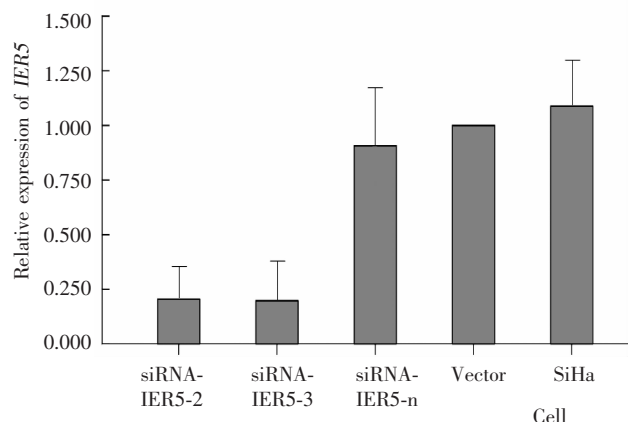


Figure 2 IER5-siRNA-SiHa cell lines mRNA results by Real-Time PCR

2.3 *IER5* 基因过表达的上下游引物

Up-primer: 5' TGCAAGCTTATGGAGTTCAAGCTGGAG 3' (27nt)。Tm1=66.12℃, Tm2=57.62℃, GC%=48.15%;

Down-primer: 5' TAACTCGAGTCAGAAGGCCACGATG 3' (25nt)。Tm1=66.22℃, Tm2=56.71℃, GC%=52%。

2.4 *IER5* 基因过表达稳定表达的细胞系鉴定结果

使用 G418 成功筛选出稳定转染的 *IER5*-overexpression-SiHa 细胞系及对照细胞系, 通过 Western Blot 从蛋白水平半定量验证 (Figure 3) 以及进一步通过 Real-Time PCR 从 mRNA 水平定量验证 (Figure 4) 细胞系。Western Blot 中使用 β -actin 来标定蛋白上样量, Real-Time PCR 中使用 β -actin 作为内参基因。两者结果均显示构建的 *IER*-overexpression-SiHa 细胞系中 *IER5* 基因成功过表达。

2.5 *IER5* 基因不同表达的 SiHa 细胞形态变化

在倒置显微镜放大倍数相同的条件下观察到 *IER5* 基因敲低的细胞略大于正常 SiHa 细胞, 其形态包括梭形、菱形、三角形、长梭形等; 而 *IER5* 基因过表达的细胞比正常 SiHa 细胞小, 其形态多为圆形, 亦有长梭形及梭形 (Figure 5)。

2.6 辐射后细胞生长曲线变化

辐射后 *IER5* 沉默的 SiHa 细胞增殖速度加快, *IER5* 过表达的 SiHa 细胞增殖速度减慢。CCK-8 法检测照射后 3 种细胞系的生长曲线 (Figure 6) 可以看出, 第 3d 时 3 种细胞的增殖差异开始显现, 随后增殖速度的差异逐渐明显, *IER5* 基因沉默的细胞系在经照射后的增殖速度显著高于 *IER5* 基因过表达的细胞系和正常 SiHa 细胞系。

2.7 辐射后的细胞凋亡情况

通过对 3 种细胞系进行 10Gy 的照射后, 在不

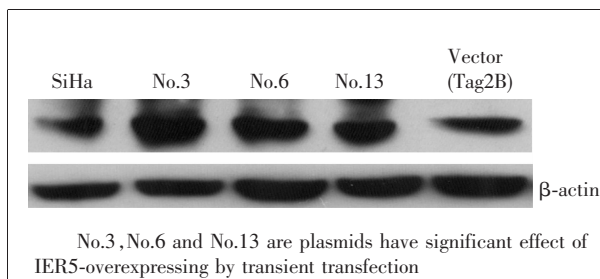


Figure 3 Western blot result of *IER5*-overexpression-SiHa cell lines

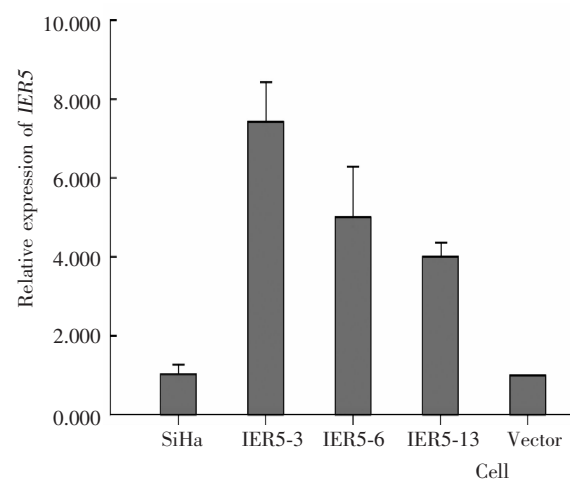


Figure 4 *IER5*-overexpression-SiHa cell lines mRNA results by Real-Time PCR

同时时间点收集细胞 (正常未照射、0、24、48、72h), 结果显示 *IER5* 沉默导致辐射诱导的 SiHa 细胞凋亡率降低, *IER5* 过表达可促进辐射诱导的 SiHa 细胞凋亡, 其凋亡在照射后 48h 最为显著 (Figure 7)。

2.8 辐射后的细胞周期情况

IER5 基因沉默后比正常 SiHa 细胞及 *IER5* 基因过表达的细胞系在经照射后细胞增殖速度加快,

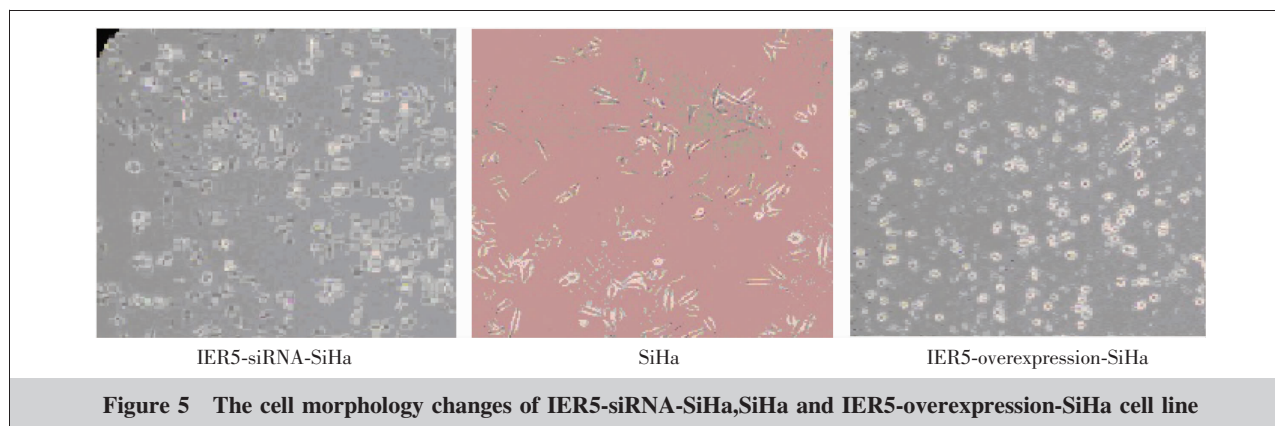
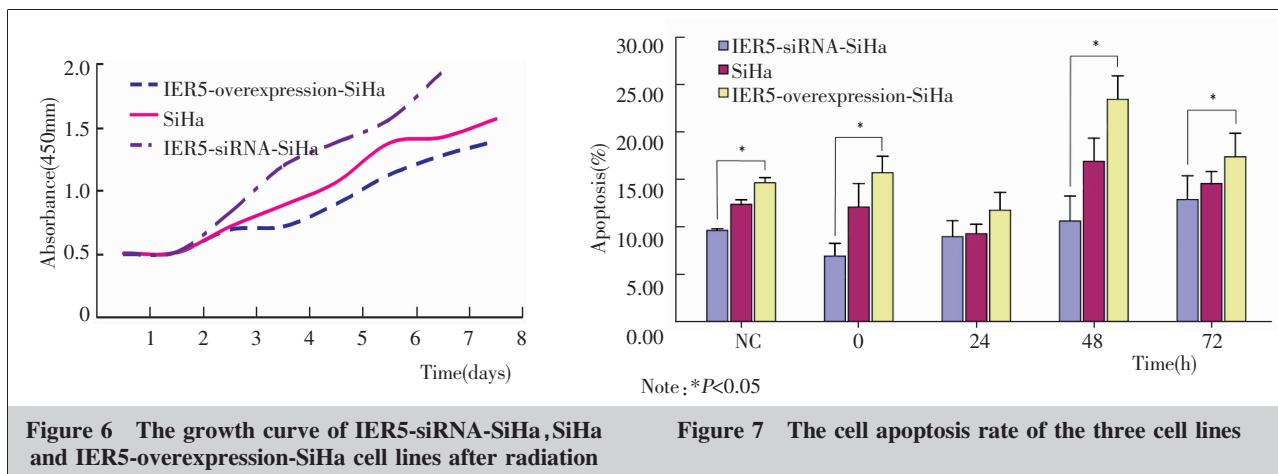


Figure 5 The cell morphology changes of *IER5*-siRNA-SiHa, SiHa and *IER5*-overexpression-SiHa cell line

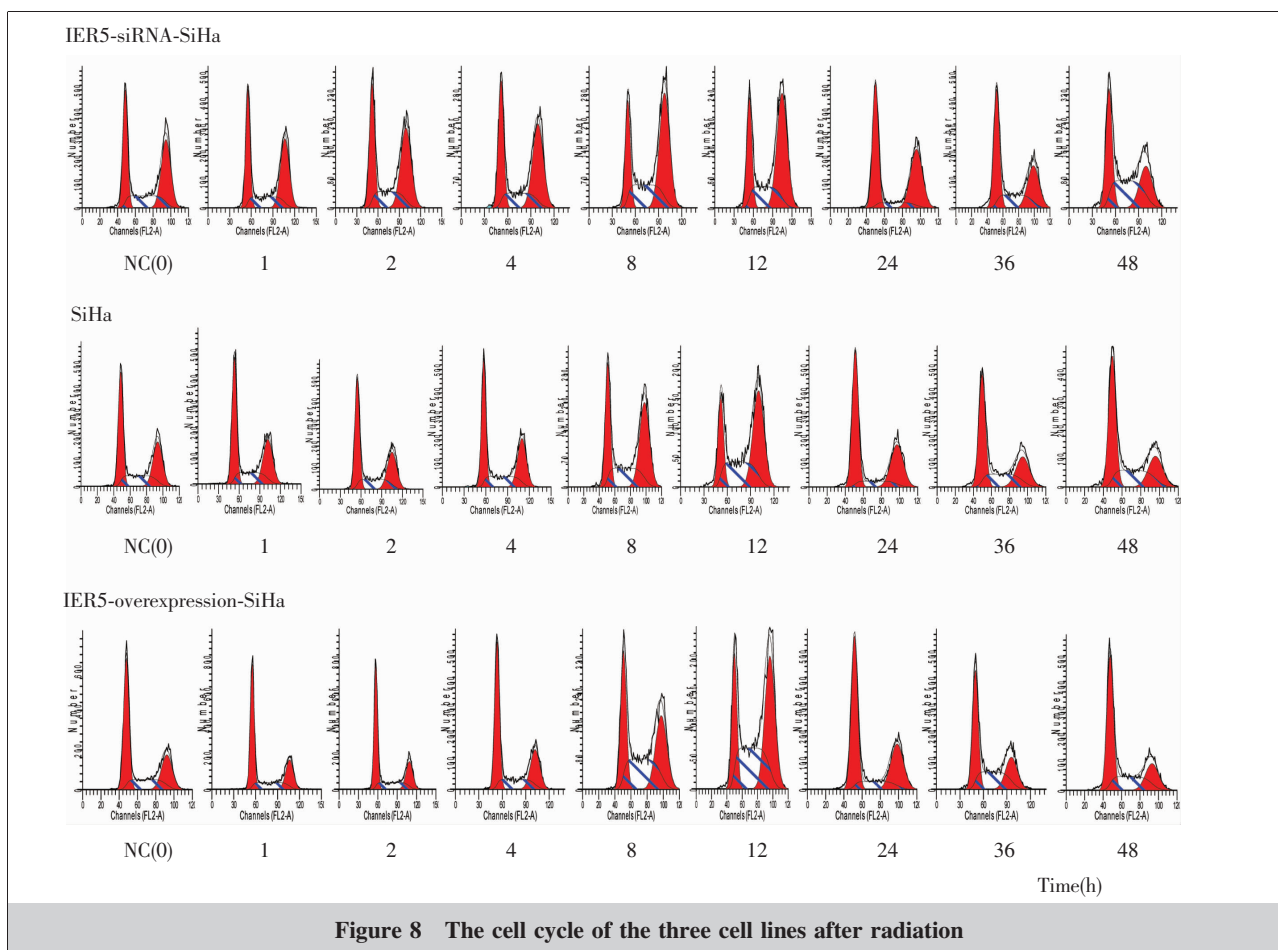


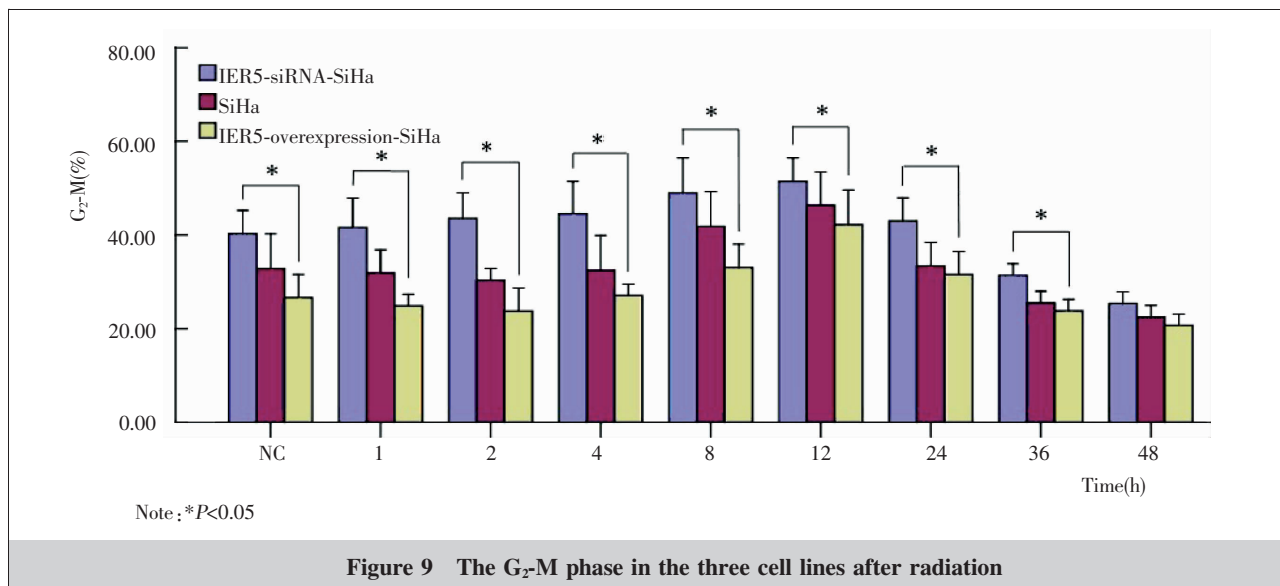
且照射后其凋亡率较两者有明显下降,考虑与细胞周期的变化相关。4Gy 剂量照射后不同时间点 3 种细胞系的细胞周期情况见 Figure 8。

3 种细胞经照射后均表现出了明显的 G_2 -M 期阻滞,且此效应随 IER5 表达含量的升高而降低;且 3 种细胞的 G_2 -M 期阻滞均于照射后 12h 明显升高,照射后 12h 为细胞增殖的一个高峰。见 Figure 9。

3 讨论

目前已有多位国内外学者利用基因芯片技术筛选出 IER5 是辐射诱导表达上调的基因^[7-10],猜测其可能也与宫颈癌放疗的疗效密切相关。作为慢动力早期反应基因家族中的一员,根据其行特性,IER5 这类基因可能在细胞生长的控制中有重要作





用^[11],通过磷酸化或降解来调节细胞有丝分裂及对辐射的反应。虽然已有许多实验证据证明辐射后多种组织中 *IER5* 的含量升高,尤其是宫颈癌组织中^[12],本研究则通过改变 SiHa 细胞系中 *IER5* 基因的表达,进一步研究 *IER5* 基因对辐射后细胞增殖、凋亡及细胞周期变化的影响。

本研究利用 RNA 干扰技术和基因重组技术成功构建了 *IER5* 基因沉默和基因过表达的两种稳定表达的 SiHa 细胞系。倒置显微镜下 *IER5* 基因敲低后其细胞形态较正常 SiHa 细胞有所增大,而过表达后细胞形态略小,虽然并没有直接实验或理论依据证实细胞形态上的变化与细胞增殖之间的必然联系,但通过对细胞状态、数量的观察可以反映其存活及增殖状态,结合 3 种细胞系经辐射后的生长曲线,其细胞状态与细胞增殖速度的情况是相符合的。

对 *IER5*-siRNA-SiHa 细胞系、正常 SiHa 细胞系以及 *IER5*-overexpression-SiHa 细胞系进行 4Gy 的 γ 射线照射处理后,利用 CCK-8 试剂每天进行检测,发现其生长速度随 *IER5* 表达水平递减,说明 *IER5* 基因的过表达可以抑制辐射后的 SiHa 细胞增殖,这与课题组前期实验中 HeLa 细胞的结果相一致。DNA 是电离辐射产生生物效应的靶分子,*IER5* 基因的不同表达影响了辐射后细胞的生长速度,在一定程度上与 DNA 的损伤和修复有关,后续实验将完善对 DNA 损伤修复的机制研究,进一步推测该基因的影响辐射敏感性的作用机制。

在检测辐射后 3 种细胞的凋亡情况后,发现 *IER5* 沉默导致辐射诱导的 SiHa 细胞凋亡率降低,*IER5* 过表达可促进辐射诱导的 SiHa 细胞凋亡,其凋亡率的差异在照射后 48h 最为显著,辐射后的细胞凋亡率与细胞系中 *IER5* 基因的含量呈正相关。结果表明早期反应基因可在细胞经辐射后迅速应答,影响细胞的凋亡途径,而由于 *IER5* 基因为慢动力早期反应基因家族的成员,其转录可有 60~90min 的延迟^[13],因而细胞凋亡差异的显现在 48h 才最为突出。细胞损伤凋亡的途径有多种,如死亡受体途径、线粒体途径等,我们在进一步研究中将探索 *IER5* 基因在辐射致细胞损伤后细胞凋亡过程中的作用机制。

关于 *IER5* 不同表达的细胞系在照射后细胞周期的变化,*IER5* 基因敲低的细胞系的 G₂-M 期阻滞明显延长,从而促进细胞的增殖,引起细胞生长速度的加快;反之,*IER5* 基因的过表达则起着相反的作用。这与测定的生长曲线的结果有相同的趋势,表明 *IER5* 基因有抑制 SiHa 细胞增殖的作用,与 HeLa 细胞所研究的结果相一致。细胞凋亡是放射线诱导细胞死亡的主要方式^[14],它作用于人体,产生氧自由基,引起 DNA 的断裂,我们通过初步检测放射后的细胞凋亡与 *IER5* 基因之间的关系,显示随着 *IER5* 基因含量升高,细胞凋亡逐渐增多,可见 *IER5* 基因的沉默可以导致放射后的细胞凋亡^[15-17]。

处于细胞周期不同时相对放射线的敏感性不

同,一般G₂期和M期较G₀期、G₁期和S期的敏感性高^[18],这与细胞各个周期的主要合成物质不同相关。因此,在辐射后,处于G₂期和M期的细胞最先被杀死,再通过细胞周期再分布调整各时期细胞的数量。本实验结果显示,*IER5*基因沉默的细胞系其处于G₂期的细胞比例明显增多,随着*IER5*含量的升高,其G₂期的比例逐渐降低,即*IER5*基因提高了SiHa细胞对辐射的敏感性,使凋亡率增加,而处于分裂期的细胞减少。Jansová等^[19]也证实了位于1号染色体的*IER5*基因在细胞有丝分裂的过程中起着重要作用;*IER5*还可以作为评估辐射剂量的标志物^[20]。

目前我们已经完成了*IER5*基因沉默和过表达的SiHa细胞系在细胞生长状态、增殖速度、细胞凋亡以及细胞周期等方面的实验,初步研究了*IER5*基因的功能,其可以参与辐射后细胞周期的调控,其过表达可以减少细胞分裂,促进辐射后的细胞凋亡,从而提高宫颈癌细胞对辐射的敏感性。但其参与的调节机制以及在体实验等方面的研究还将继续,结合临床样本的研究结果,最终为*IER5*在临床治疗中的应用打下基础。

参考文献:

- [1] Williams M, Lyu MS, Hunter K, et al. Ier5, a novel member of the slow-kinetics immediate-early genes [J]. *Genomics*, 1999, 55(3): 327–334.
- [2] Kis E, Szatmári T, Sáfrány G, et al. Microarray analysis of radiation response genes in primary human fibroblasts[J]. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 2006, 66(5): 1506–1514.
- [3] Gritz L, Davies J. Plasmid-encoded hygromycin B resistance: the sequence of hygromycin B phosphotransferase gene and its expression in *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Gene*, 1983, 25(2–3): 179–188.
- [4] Brummelkamp TR, Bernards R, Agami R. A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells[J]. *Science*, 2002, 296: 550–553.
- [5] Elbashir SM, Harborth J, Tuschl T, et al. Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells[J]. *Nature*, 2001, 411: 494–498.
- [6] Yao LB. *Experimental technology of Medical Molecular Biology*[M]. Beijing: People's Medical Publishing Houses, 2011. 296. [药立波. 医学分子生物学实验技术[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2011. 296.]
- [7] Wang HP, Long XH, Zhou PK, et al. Identification of differentially transcribed genes in human lymphoblastoid cells irradiated with 0.5 Gy of gamma-ray and the involvement of low dose radiation inducible CHD6 gene in cell proliferation and radiosensitivity[J]. *Int J Radiat Biol*, 2006, 82(3): 181–190.
- [8] Long XH, Zhao ZQ, Zhou PK, et al. Dose-dependent expression changes of early response genes to ionizing radiation in human lymphoblastoid cells [J]. *Int J Mol Med*, 2007, 19(4): 607–615.
- [9] Ding KK, Yang CJ, Zeng YJ, et al. Gamma-ray up-regulated holocarboxylase synthetase gene [J]. *Cell Mol Neurobiol*, 2009, 29(3): 383–389.
- [10] Ding KK, Shang ZF, Zhou PK, et al. Induced expression of the *IER5* gene by gamma-ray irradiation and its involvement in cell cycle checkpoint control and survival[J]. *Radiat Environ Biophys*, 2009, 48(2): 205–213.
- [11] Chaudhry MA, Chodosh LA, McKenna WG, et al. Gene expression profile of human cells irradiated in G1 and G2 phases of cell cycle[J]. *Cancer Lett*, 2003, 195: 221–233.
- [12] Ahn WS, Bae SM, Lee JM, et al. Searching for pathogenic gene functions to cervical cancer[J]. *Gynecol Oncol*, 2004, 93: 41–48.
- [13] Freter RR, Alberta JA, Hwang GY. Platelet-derived growth factor induction of the immediate-early gene MCP-1 is mediated by NF-kappaB and a 90-kDa phosphoprotein coactivator[J]. *J Biol Chem*, 1996, 271(29): 17417–17424.
- [14] Puck TT, Marcus PI. Action of x-rays on mammalian cells [J]. *J Exp Med*, 1956, 103(5): 653–666.
- [15] Jackson SP, Jeggo PA. DNA double-strand break repair and recombination: involvement of DNA-PK [J]. *TIBS*, 1995, 20: 412–415.
- [16] Brown JM, Wouters BG. Apoptosis, P53 and tumor cell sensitivity to anticancer agents [J]. *Cancer Res*, 1999, 59: 1391–1399.
- [17] Nishizuka Y. Intracellular signalling by hydrolysis of phospholipids and activation of protein kinase C [J]. *Science*, 1992, 258: 607–613.
- [18] Hornhardt S, Röbber U, Sauter W. Genetic factors in individual radiation sensitivity [J]. *DNA Repair (Amst)*, 2014, 16C: 54–65.
- [19] Jansová E, Koutná I, Kozubek S, et al. Comparative transcriptome maps: a new approach to the diagnosis of colorectal carcinoma patients using cDNA microarrays [J]. *Clin Genet*, 2006, 69(3): 218–227.
- [20] Li MJ, Wang WW, Min R, et al. Radiation dose effect of DNA repair-related gene expression in mouse white blood cells[J]. *Med Sci Monit*, 2011, 17(10): BR290–BR297.