科学通报 2020 年 第 65 卷 第 5 期: 392 ~ 400
论 文
《中国科学》杂志社
SCIENCE CHINA PRESS

基于关联网络的空间辐射防护分子靶标的辨识与预测

谢达菲[1], 关华[1], 樊婵[2], 胡赛[3], 刘晓丹[1], 谢漪[4], 王豫[1], 张红[4*], 周平坤[1*]

1. 军事科学院军事医学研究院辐射医学研究所放射生物学研究室, 北京 100850;
2. 湖南医药学院检验医学院, 怀化 418000;
3. 南华大学公共卫生学院, 衡阳 421300;
4. 中国科学院近代物理研究所, 兰州 730000

* 联系人, E-mail: zhangh@impcas.ac.cn; zhoupk@bmi.ac.cn

2019-09-26 收稿, 2019-10-16 修回, 2019-10-17 接受, 2019-12-27 网络版发表
国家自然科学基金(11705283)、中国科学技术协会“青年人才托举工程”项目(CSTQT2017003)、全军医学科技青年培育计划孵化项目(17QNP037)和军事医学科学院军事医学创新基金(2017CXJJ18)资助

摘要 空间辐射对航天员健康的危害制约人类的空间探索活动, 对其中重离子成分的医学防护研究是对抗空间辐射人体健康威胁的关键之一. 本研究以地面装置模拟空间辐射环境, 用0.5和2 Gy剂量的碳离子($^{12}C^{6+}$)辐照正常人淋巴母细胞AHH-1, 照前0.5 h分别用两种已知的辐射防护药物处理细胞, 照后4 h用基因表达芯片测量细胞基因表达谱, 构建辐射损伤相关基因表达量调节网络. 运用基于模拟退火的迭代搜索算法辨识不同剂量$^{12}C^{6+}$辐照及防护药物作用下的辐射相关基因激活子网, 依据节点的连接度预测出*PPM1A*, *RIF1*, *CASP3*, *TFE3*和*RIN1*等潜在的空间辐射损伤防护高关联度基因. 进一步的富集分析表明, 这些基因显著富集的分子功能类别主要与转录调节、激活子活性等有关; 细胞定位类别主要是核体、染色体等; 生物过程类别主要与信号转导、RNA代谢和细胞定位调节等有关. 进一步在Hela细胞上通过Western blotting实验证明, 0.5和2 Gy剂量$^{12}C^{6+}$辐照后, *RIF1*基因表达量显著上升, 辐照后4 h的相对表达率达到对照组的2倍以上. 这种辨识方法通过计算分析理性预测和发掘潜在的辐射损伤防护高关联度人类基因, 为重离子辐射损伤医学防护研究提供了新的策略和内容. 辨识所得分子靶标为有针对性地进行空间辐射损伤防护药物的研发提供了候选靶标, 为细胞响应电离辐射及防护药物作用的分子机制研究提供了线索与支持, 对于空间辐射损伤防护技术的提升具有重要的意义.

关键词 基因表达谱, 蛋白质相互作用网络, 药物靶标, 重离子, 模拟退火算法

随着我国载人航天工程的快速发展, 飞船交互对接、航天员出舱活动和长期载人飞行等已成为重要的前沿方向. 在此过程中, 航天员面临暴露于复杂空间辐射环境的健康威胁. 研究表明, 空间辐射引起放射性白内障[1], 促进阿尔茨海默氏病的发展[2], 增加癌症和心脑血管疾病的风险[3~5], 是制约人类空间探索的重要因素之一[6]. 然而, 目前国际上主要依靠物理屏蔽的手段加以防护, 缺乏有效的防治药物[7]. 空间辐射中含有13%的生物效应更强的重离子成分, 如碳、铁、氧等. 所占比例虽然不高, 但其具有高能量、强穿透力、高电荷等特点, 更容易穿透一般的物理防护材料, 威胁高于其他射线. 因此, 重离子辐射损伤的特异性防护是空间辐射防护的关键内容之一, 也是载人航天领域的重要战略需求[8]. 通过生物信息学技术, 从大规模实验数据中发掘出有重要功能和对抗辐射损伤潜力的分子靶标, 可为重离子辐射生物效应分子机制的研究提供线

引用格式: 谢达菲, 关华, 樊婵, 等. 基于关联网络的空间辐射防护分子靶标的辨识与预测. 科学通报, 2020, 65: 392–400
Xie D F, Guan H, Fan C, et al. Identification and prediction of molecular targets related to space radiation protection based on associated networks (in Chinese). Chin Sci Bull, 2020, 65: 392–400, doi: 10.1360/TB-2019-0437

© 2019《中国科学》杂志社

索, 进而提高以药物为主体的空间辐射损伤防护技术.

空间辐射诱导细胞损伤的一个重要方式是导致DNA损伤. 其作用方式有两种: 一是通过带电粒子与DNA分子的相互作用引起DNA双链断裂[9,10], 导致基因组不稳定性[11]; 二是通过生成自由基对DNA造成间接损伤[12]. 空间辐射还会导致染色体变异率增加[13], 引起微核的形成与变异[14,15], 造成染色体组重排, 这可能是辐射致癌的起始步骤[16]. 此外, 空间辐射还会影响细胞凋亡和周期的调节[12,17].

之前的工作发现一些化合物可有效降低空间辐射对航天员健康的影响. 机体组织受到辐射后会立即产生自由基和活性氧, MitoQ[18]和茶多酚[19]等抗氧化剂在电离辐射暴露期间可有效清除自由基、活性氧, 减轻分子损伤, 改善细胞应答[20]. 另一种抗氧化剂维生素A可降低辐射引起的炎性基因表达, 抑制肿瘤发生[21]. 其他研究较多的抗氧化剂类药物还包括维生素B、C、 E[22,23]、甘露醇[24]、辅酶Q10[25]和硒[26]等, 它们具有长期的应用史, 在一定的剂量范围内无毒, 可阻止或减轻航天飞行中多种电离辐射引起的生物损伤效应. 其次, 一些蛋白酶抑制剂也可抑制射线的有害生物学效应. 例如, 金属蛋白酶抑制剂ilomastat通过促进血液和免疫细胞的恢复降低辐射对机体的损伤[27]. 包曼-伯克(Bowman-Birk)型大豆蛋白酶抑制剂能够有效抗癌、抗炎, 对抗空间辐射引起的表型改变[23,28], 正在被开发为辐射诱导癌发生的干预药物. 此外, 巯基化合物PrC-210可有效治疗放射性白内障[29]. 尽管如此, 已有防护药物依然存在品种少、疗效有限、毒副作用较大、作用机理不明确等问题, 迫切需要特异对抗空间辐射的有效防护药物.

系统研发药物的重要技术基础是药靶辨识. 近年来, 可用于药靶发现的数据库资源迅速增加, 为理性预测空间辐射损伤防护高关联度分子靶标提供了新的思路和条件. GEO(Gene Expression Omnibus)[30]收录了化合物作用、感染等多种扰动相关的基因芯片数据, 也包含与辐射损伤有关的基因表达量信息, 其变化在一定程度上反映了机体对辐射作用的响应情况. Reactome[31]和HPRD(Human Protein Reference Database)[32]等提供的关于蛋白质相互作用(protein-protein interaction, PPI)网络和生物学通路的数据资源阐释了已知蛋白质之间的互联关系. GO(Gene Ontology)[33]和KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes Pathways)[34]则提供了多个物种基因的生物学功能、定位和通路信息, 对于进一步明确关键响应基因在辐射诱导损伤中的作用及其分子机制具有重要的意义.

本研究首次建立了基于基因表达谱和激活子网辨识算法的精确识别碳离子($^{12}C^{6+}$)辐射损伤高关联度基因的技术体系, 从辐照实验测得的大数据中辨识潜在的空间辐射损伤防护高关联度人类基因并进行富集分析和实验验证, 为辐射损伤防护药物的发现和辐射生物效应机制的探索奠定基础.

1 材料与方法

(ⅰ) 辐照实验与药物干预. 正常人淋巴母细胞AHH-1分为对照组、辐照组和药物处理组. 细胞在含10%胎牛血清的DMEM培养液、5% CO_2中, 置于37°C孵箱恒温培养. 运用中国科学院近代物理研究所兰州重离子加速器研究装置冷却储存环(HIRFL-CSR)[35]分别对辐照组和药物处理组细胞进行0.5和2 Gy剂量的$^{12}C^{6+}$辐照. 剂量率为5~7 Gy/min, 初始能量为80 MeV/u, 坪区传能线密度(linear energy transfer, LET)为50 keV. 所用辐射防护药物523和VND3207纯度大于98%, PBS稀释成1 mmol/L工作液. 523正规名称为尼尔雌醇, 2015年收入中国药典[36]. VND3207可促进DNA损伤修复, 是对γ射线、α粒子和重离子辐射损伤都有防护作用的化合物. 细胞接种于96孔板, 每孔200 μL细胞悬液(4×10^3个细胞), 于辐照前0.5 h分别加入523或VND3207工作液, 使523在细胞悬液中的终浓度为5 mg/kg, VND3207在细胞悬液中的终浓度为50 mg/kg.

(ⅱ) 基因表达谱的收集与整合. 辐照前1 h收集对照组细胞, 辐照后4 h收集辐照组和药物处理组细胞. 利用Illumina生产的BD-103-0204型基因芯片获得辐照前后和药物干预下细胞的基因表达谱. 每组细胞进行2组平行重复实验, 仅保留基因表达量大于0且P值小于0.05的情形. 对于仅有1组平行实验数据满足上述条件的基因, 取该结果为基因表达量; 对于2组平行实验数据都满足上述条件的基因, 取2次结果的平均值作为基因表达量. 对于同一个基因不同探针或转录本得到的数据, 取最大值作为基因表达量. 进一步筛选, 仅保留辐照后、药物干预后表达量都发生变化且调节方向相反的基因用于后续分析.

(ⅲ) 人类蛋白质相互作用网络. 人类蛋白质相互作用(protein-protein interaction, PPI)数据来自HPRD数据库. 去除冗余蛋白和自相互作用蛋白, 得到9469个蛋

白质之间的36918对相互作用关系. 以蛋白质为节点构建PPI网络, 如果两个蛋白质之间存在相互作用关系, 就用1条直线连接它们形成边. 节点大小依据其连接度确定.

(ⅳ) jActiveModules. 激活子网的搜索运用Cytoscape软件的插件jActiveModules完成. 设置搜寻子网数为5, 运行插件得到5个最为可能的显著差异表达基因激活子网. 统计各子网中节点的连接度并排序, 据此预测潜在的辐射损伤防护高关联度基因. 该插件运用基于模拟退火的迭代搜索算法, 既考虑了基因表达的差异性, 又考虑了其相关性, 建立了激活子网综合辨识准则, 有效减少了假阳性结果, 并且能够获得由完整的关联信息揭示的通路信息, 这些数据具有重要的生物学意义.

(ⅴ) Western Blotting. 使用RIPA蛋白裂解液提取细胞总蛋白, BCA法测定蛋白浓度. 进行6%聚丙酰胺凝胶电泳, 在200 mA冰浴条件下, 将蛋白转移至NC膜上. 在5%(w/v)脱脂牛奶的TBST溶液中室温封闭1 h, 加入一抗(A300-568A, BETHYL, 1:1000)4°C孵育过夜, 用TBST洗3次, 再加入二抗(1:4000)室温孵育1 h. 用TBST洗3次后, 用Bio-Rad ChemiDocXRS+曝光系统对NC膜进行ECL曝光显色, 用ImageJ软件进行灰度分析.

2 结果与讨论

2.1 碳离子($^{12}C^{6+}$)辐照对细胞基因表达的影响

重离子辐照致细胞DNA损伤与γ射线等电离辐射相比, 基因表达情况不同. 已有研究发现的γ射线辐照后4 h显著差异表达的基因如*ATF3*, *E2F1*, *PCNA*和*RAD51*等[37], 在0.5和2 Gy剂量$^{12}C^{6+}$辐照后表达量变化均在1倍以下. *ATM*[38], *PARP3*[39,40]和*LIG4*[41,42]等与辐射致细胞DNA损伤密切相关的基因, 在$^{12}C^{6+}$辐照后表达量也没有发生显著的变化. 可以推测, 重离子辐射损伤效应及其分子机制与其他射线不同, 特异性高关联度基因的辨识是相应防护药物发现的基础.

我们分别用0.5和2 Gy剂量的$^{12}C^{6+}$辐照细胞, 发现其在不同剂量辐照条件下的基因表达不同. 约73.7% (8683/11776)的基因在2 Gy剂量辐照条件下的表达量大于0.5 Gy剂量的情形. 其中*CXorf21*基因在2 Gy剂量辐照下的表达量是0.5 Gy剂量的9.76倍, 其他表达量相差6倍以上的基因还包括*LOC400304*, *CCDC41*和*ZNF594*等, 共15个. 由此可见细胞对不同剂量辐射诱导损伤的响应存在差异, 针对不同辐照剂量和防护药物作用的潜在关键分子靶标具有特异性.

2.2 0.5 Gy剂量碳离子($^{12}C^{6+}$)辐照、523药物干预相关基因表达量调节网络的构建

整合对照组、0.5 Gy剂量$^{12}C^{6+}$辐照组和523药物干预组细胞的基因表达谱. 判断辐照组与对照组相比、药物干预组与辐照组相比基因表达量的调节方向, 计算调节倍数, 选取辐照后、药物干预下表达量都发生变化且调节方向相反的基因映射到PPI网络上(表S1), 得到如图1(a)所示0.5 Gy剂量$^{12}C^{6+}$辐照、523药物干预相关基因表达量调节网络. 该网络包含3726个节点和7460条边, 其主体是一个由2778个节点和7366条边构成的最大联通子网.

2.3 显著差异表达基因激活子网的辨识

运用jActiveModules在上述基因表达量调节网络中辨识显著差异表达基因激活子网. 图1(b)所示是辨识所得5个激活子网之一, 为联通网络, 包含334个节点和681条边. 其他激活子网见图S1(a), 各激活子网节点属性见表S2.

2.4 潜在辐射损伤防护关键分子靶标的预测

由于辐照后细胞对化合物的响应情况与防护药物发现关系密切, 我们筛选出所有激活子网中药物处理组与辐照组相比基因表达量变化大于2倍的节点, 作为潜在关键分子靶标(表1), 并依据药物干预后表达量的变化倍数排序.

运用同样的方法分别构建0.5 Gy剂量$^{12}C^{6+}$辐照、VND3207药物干预, 2 Gy剂量$^{12}C^{6+}$辐照、523药物干预和2 Gy剂量$^{12}C^{6+}$辐照、VND3207药物干预相关基因表达量调节网络(图S2), 各基因表达量及其变化情况见表S1. 辨识显著差异表达基因激活子网(图S1(b~d)), 各子网节点属性见表S2. 筛选出子网中药物处理组与辐照组相比基因表达量变化大于2倍的节点, 作为潜在辐射损伤防护关键分子靶标(表2). 这些基因显著响应$^{12}C^{6+}$辐射, 尤其是已有防护药物作用, 对辐射因素较为敏感, 将其作为候选辐射损伤防护药物靶标, 便于有针对性地进行辐射防护药物的筛选与药效评价. 同时可为重离子辐射致细胞损伤规律和分子机制的研究提供线索, 在特异对抗空间辐射药物发现中具有一定的提示

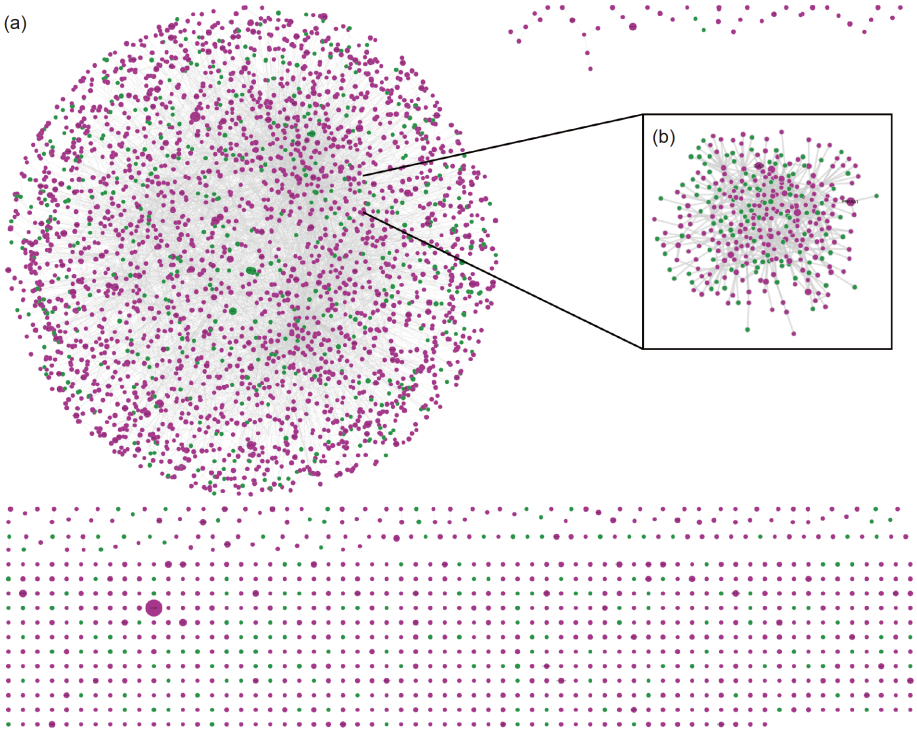


图 1 从0.5 Gy剂量碳离子($^{12}C^{6+}$)辐照、523药物干预相关基因表达量调节网络(a)中辨识显著差异表达基因激活子网(b). 红色节点表示表达量上调的基因, 绿色节点表示表达量下调的基因. 节点大小与基因表达量变化的倍数相关, 对于表达量变化倍数大于2的节点, 标注其基因名

Figure 1 Identifying activated subnetworks of significantly differentially expressed genes (b) from the network of gene expression regulation of cells treated with 0.5 Gy of carbon ions ($^{12}C^{6+}$) and 523 (a). Red nodes correspond to up-regulated genes while green ones correspond to down-regulated genes. Size of the nodes is proportional to their fold changes. Nodes with fold changes greater than 2 were marked

表 1 0.5 Gy剂量碳离子($^{12}C^{6+}$)辐照、523药物干预的潜在关键分子靶标

Table 1 Potential essential molecular targets of cells treated with 0.5 Gy of carbon ions ($^{12}C^{6+}$) and 523

基因	药物干预后调节方向	药物干预后调节倍数	辐照后调节方向	辐照后调节倍数
PPM1A	上调	2.475	下调	1.861
TSC22D1	上调	2.449	下调	4.842
RIF1	上调	2.406	下调	1.629
GMEB1	上调	2.369	下调	1.891
PDCD6IP	上调	2.355	下调	1.414
PRKAA1	上调	2.329	下调	2.199
GDI1	上调	2.195	下调	2.705
JAK1	上调	2.185	下调	2.447
CUL5	上调	2.045	下调	1.420
CREB1	上调	2.036	下调	2.416
ATXN2L	上调	2.032	下调	2.627

作用.

2.5 潜在辐射损伤防护高关联度基因富集分析

运用The Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery(DAVID)在线工具对辨识所得潜在关键分子靶标进行基因富集分析(gene set enrichment analysis, GSEA). 结果表明, 从细胞定位的角度看, 关键分子靶标最为显著富集的分类包括核体、转录因子

表 2 不同剂量碳离子($^{12}C^{6+}$)辐照、不同辐射损伤防护药物干预下的潜在关键分子靶标

Table 2 Potential essential molecular targets of cells treated with different doses of carbon ions ($^{12}C^{6+}$) and radioprotective agents

基因	辐射剂量 (Gy)	干预药物	药物干预后调节方向	药物干预后调节倍数	辐照后调节方向	辐照后调节倍数
CASP3	0.5	VND3207	下调	2.475	上调	1.010
IFI16	0.5	VND3207	下调	2.369	上调	1.059
PSMD11	0.5	VND3207	下调	2.195	上调	1.055
SMN1	0.5	VND3207	上调	2.045	下调	1.672
TFE3	2.0	523	上调	3.064	下调	1.455
GTF2A1	2.0	523	下调	3.002	上调	1.695
PPM1A	2.0	523	下调	2.469	上调	1.342
BDP1	2.0	523	下调	2.414	上调	1.485
KRT18	2.0	523	下调	2.335	上调	2.426
RIN1	2.0	VND3207	下调	3.255	上调	1.143
ATRX	2.0	VND3207	下调	2.934	上调	1.818
C1orf103	2.0	VND3207	下调	2.549	上调	1.591
SMN1	2.0	VND3207	下调	2.361	上调	1.138
RAPSN	2.0	VND3207	下调	2.143	上调	1.405
SMAD7	2.0	VND3207	下调	2.054	上调	1.314
PFN1	2.0	VND3207	上调	2.049	下调	1.077

复合物和细胞连接等; 从分子功能的角度看, 关键分子靶标主要富集在转录调节活性、转录激活子活性和酶激活子活性等类别; 对于生物过程, 其最为富集的分类是RNA代谢调节、细胞内信号转导和神经元死亡调节等(图2).

2.6 碳离子($^{12}C^{6+}$)辐照对HeLa细胞*RIF1*基因表达的影响

我们进一步在HeLa细胞上验证预测所得关键分子靶标*RIF1*响应$^{12}C^{6+}$辐照的情况. 分别对HeLa细胞进行0.5和2 Gy剂量的$^{12}C^{6+}$辐照, 通过Western Blotting技术测量其对*RIF1*基因表达的影响. 结果表明, 0.5 Gy剂量$^{12}C^{6+}$辐照后, *RIF1*蛋白表达量显著升高, 辐照后4 h的表达量为对照组的2.3倍(图3(a)); 2 Gy剂量$^{12}C^{6+}$辐照趋势相同, 辐照后4 h的表达量为对照组的3.1倍(图3(b)). 由此可见, 辐照前后*RIF1*基因显著差异表达, 该基因在Hela细胞中响应$^{12}C^{6+}$辐照损伤, 是可能的辐射损伤防护高关联度基因.

与传统的通过高通量筛选研发药物的策略相比, 基于计算技术理性分析识别可能的药靶基因, 重点针对靶向候选药靶的化合物进行测试, 可为实际的大规模筛查提供方向、缩小范围、节省时间、节约成本. 这为基于系统生物学和网络药理学的分析方法建立辐射损伤防护药物研发技术平台奠定了基础. 另一方面, 探明细胞通过哪些分子靶标响应电离辐射和化合物作用, 可以为辐射损伤规律和机理的探究提供线索与思路, 是进一步研究其如何在辐射诱导反应中发挥作用的重要前提和基础.

3 结论

本研究以重离子加速器模拟空间重离子射线, 整合不同剂量$^{12}C^{6+}$辐照和已有防护药物作用下AHH-1细胞基因表达谱, 结合PPI数据构建辐射损伤相关基因表达量调节网络. 运用基于模拟退火的迭代搜索算法从中辨识显著差异表达基因激活子网, 筛选出*PPM1A*, *RIF1*, *CASP3*, *TFE3*和*RIN1*等一系列针对不同剂量$^{12}C^{6+}$辐射和不同防护药物作用的潜在辐射损伤防护高关联度基因, 并在Hela细胞中对*RIF1*基因的表达进行了实验验证. 富集分析表明, 这些基因主要集中在转录调节、酶活性和细胞通信等类别中. 该技术方法及辨识所得分子靶标将在空间辐射损伤防护新思路的探索和重离子辐射效应机制的研究中发挥重要作用.

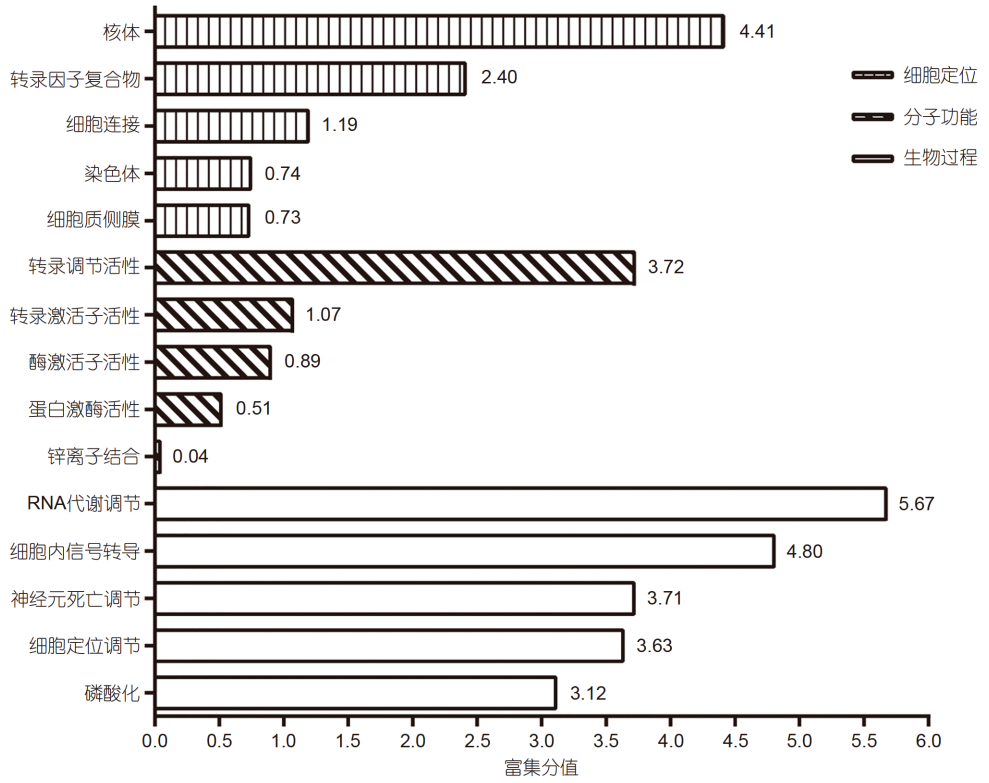


图 2 潜在辐射响应关键分子靶标的富集类别
Figure 2 Enriched clusters of potential essential molecular targets related to radiation protection

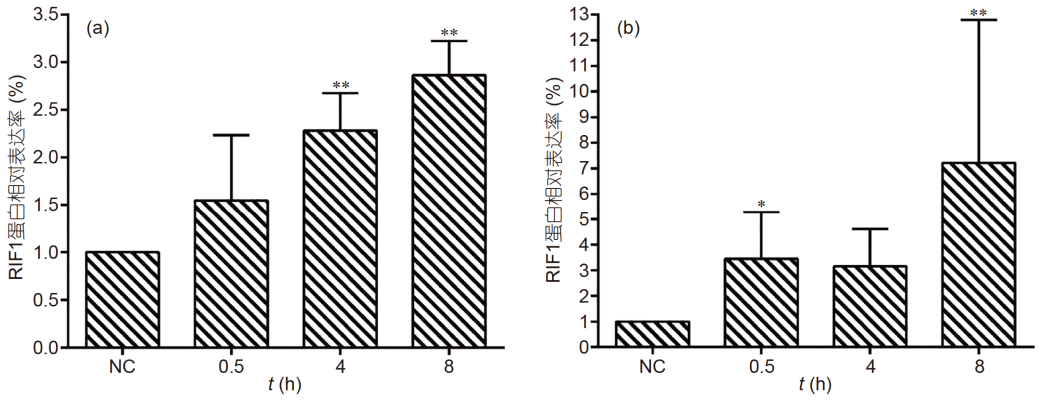


图 3 碳离子($^{12}C^{6+}$)辐照后*RIF1*基因的蛋白相对表达量变化情况. *表示P<0.05, **表示P<0.01. (a) 0.5 Gy剂量$^{12}C^{6+}$辐照的情形; (b) 2 Gy剂量$^{12}C^{6+}$辐照的情形
Figure 3 Effects of carbon ions ($^{12}C^{6+}$) on expression of *RIF1*. Results presented are the means ± SD of each group. *P<0.05 relative to control and **P<0.01 relative to control. (a) The case of cells irradiated by 0.5 Gy of $^{12}C^{6+}$; (b) the case in 2 Gy of $^{12}C^{6+}$

参考文献

1 Hamada N, Sato T. Cataractogenesis following high-LET radiation exposure. Mutat Res, 2016, 770: 262–291
2 Rudobeck E, Bellone J A, Szücs A, et al. Low-dose proton radiation effects in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease—Implications for space travel. PLoS One, 2017, 12: e0186168
3 Cucinotta F A, To K, Cacao E. Predictions of space radiation fatality risk for exploration missions. Life Sci Space Res, 2017, 13: 1–11

4 Barcellos-Hoff M H, Blakely E A, Burma S, et al. Concepts and challenges in cancer risk prediction for the space radiation environment. Life Sci Space Res, 2015, 6: 92–103
5 Coleman M A, Sasi S P, Onufrak J, et al. Low-dose radiation affects cardiac physiology: Gene networks and molecular signaling in cardiomyocytes. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2015, 309: 1947−1963
6 Zhao L, Mi D, Sun Y Q. Issues and challenges of space radiation risk assessment in manned deep space exploration missions (in Chinese). Chin Sci Bull, 2018, 63: 1523–1537 [赵磊, 宓东, 孙野青. 载人深空探索中空间辐射风险评估所面临的问题和挑战. 科学通报, 2018, 63: 1523−1537]
7 Zhao L, Shang Y X, Yuan S, et al. Research progress of space radiation protection technologies in manned deep space exploration missions (in Chinese). Chin Sci Bull, 2019, 64: 2087–2103 [赵磊, 尚钰轩, 袁爽, 等. 载人深空探索中空间辐射防护技术的研究进展. 科学通报 2019, 64: 2087–2103]
8 Bláha P, Koshlan N A, Koshlan I V, et al. Delayed effects of accelerated heavy ions on the induction of HPRT mutations in V79 hamster cells. Mutat Res, 2017, 803-805: 35–41
9 Lu T, Zhang Y, Wong M, et al. Detection of DNA damage by space radiation in human fibroblasts flown on the International Space Station. Life Sci Space Res, 2017, 12: 24–31
10 Lu T, Zhang Y, Kidane Y, et al. Cellular responses and gene expression profile changes due to bleomycin-induced DNA damage in human fibroblasts in space. PLoS One, 2017, 12: e0170358
11 Kadhim M, Salomaa S, Wright E, et al. Non-targeted effects of ionising radiation—Implications for low dose risk. Mutat Res, 2013, 752: 84–98
12 Moreno-Villanueva M, Wong M, Lu T, et al. Interplay of space radiation and microgravity in DNA damage and DNA damage response. NPJ Microgravity, 2017, 3: 14
13 George K, Rhone J, Beitman A, et al. Cytogenetic damage in the blood lymphocytes of astronauts: Effects of repeat long-duration space missions. Mutat Res, 2013, 756: 165–169
14 Snijders A M, Mannion B J, Leung S G, et al. Micronucleus formation in human keratinocytes is dependent on radiation quality and tissue architecture. Environ Mol Mutagen, 2015, 56: 22–31
15 Chen W R, Feng Y J, Liu J G, et al. Effects of space radiation on micronucleus of lymphocyte, peroxided lipid of serum and antioxidant activity in astronauts (in Chinese). Chin Sci Bull (Chin Ver), 2001, 20: 1676−1682 [陈蔚如, 冯英进, 刘绛光, 等. 宇宙辐射对飞行人员淋巴细胞微核及血清过氧化脂质和抗氧化活性的影响. 科学通报, 2001, 20: 1676−1682]
16 Turker M S, Grygoryev D, Lasarev M, et al. Simulated space radiation-induced mutants in the mouse kidney display widespread genomic change. PLoS One, 2017, 12: e0180412
17 Battista N, Meloni M A, Bari M, et al. 5-Lipoxygenase-dependent apoptosis of human lymphocytes in the International Space Station: Data from the ROALD experiment. FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol, 2012, 26: 1791–1798
18 Gan L, Wang Z, Si J, et al. Protective effect of mitochondrial-targeted antioxidant MitoQ against iron ion ^{56}Fe radiation induced brain injury in mice. Toxicol Appl Pharmacol, 2018, 341: 1–7
19 Zhao B L. Antioxidation of tea polyphenols (in Chinese). Chin Sci Bull (Chin Ver), 2002, 16: 1206−1210 [赵保路. 茶多酚的抗氧化作用. 科学通报, 2002, 16: 1206−1210]
20 Li W, Ge C, Yang L, et al. CBLB502, an agonist of toll-like receptor 5, has antioxidant and scavenging free radicals activities *in vitro*. Int J Biol Macromol, 2016, 82: 97–103
21 Burns F J, Tang M, Frenkel K, et al. Induction and prevention of carcinogenesis in rat skin exposed to space radiation. Radiat Environ Biophys, 2007, 46: 195–199
22 Kim H J, Ha J H, Kim S W, et al. Effects of combined treatment of sodium hypochlorite/ionizing radiation and addition of vitamin B(1) on microbial flora of oyster and short-necked clam. Foodborne Pathog Dis, 2011, 8: 825–830
23 Kennedy A R, Zhou Z, Donahue J J, et al. Protection against adverse biological effects induced by space radiation by the Bowman-Birk inhibitor and antioxidants. Radiat Res, 2006, 166: 327–332
24 Kong F Q, Wang X, Ni M N, et al. Effects of DNA concentration on radiation-induced DNA damage (in Chinese). Chin Sci Bull (Chin Ver), 2007, 24: 2826−2831 [孔福全, 王潇, 倪嵋楠, 等. 辐射致DNA损伤中DNA浓度的影响. 科学通报, 2007, 24: 2826−2831]
25 Lulli M, Witort E, Papucci L, et al. Coenzyme Q10 protects retinal cells from apoptosis induced by radiation *in vitro* and *in vivo*. J Radiat Res, 2012, 53: 695–703
26 Hosseinimehr S J. The protective effects of trace elements against side effects induced by ionizing radiation. Radiat Oncol J, 2015, 33: 66–74
27 Li X M, Tan Y, Huang C Q, et al. MMP inhibitor ilomastat improves survival of mice exposed to γ-irradiation. Biomed Environ Sci, 2018, 31: 467–472
28 Clemente A, Sonnante G, Domoney C. Bowman-Birk inhibitors from legumes and human gastrointestinal health: Current status and perspectives. Curr Protein Pept Sci, 2011, 12: 358–373
29 Kleiman N J, Stewart F A, Hall E J. Modifiers of radiation effects in the eye. Life Sci Space Res, 2017, 15: 43–54

30 Barrett T, Wilhite S E, Ledoux P, et al. NCBI GEO: Archive for functional genomics data sets—Update. Nucleic Acids Res, 2013, 41: D991–D995
31 Fabregat A, Jupe S, Matthews L, et al. The reactome pathway knowledgebase. Nucleic Acids Res, 2018, 46: D649–D655
32 Keshava Prasad T S, Goel R, Kandasamy K, et al. Human protein reference database—2009 update. Nucleic Acids Res, 2009, 37: D767−D772
33 The Gene Ontology Consortium. The gene ontology resource: 20 years and still GOing strong. Nucleic Acids Res, 2019, 47: D330–D338
34 Kanehisa M, Sato Y, Furumichi M, et al. New approach for understanding genome variations in KEGG. Nucleic Acids Res, 2019, 47: D590–D595
35 Xia J W, Zhan W L, Wei B W, et al. Heavy ions research facility in Lanzhou (HIRFL) (in Chinese). Chin Sci Bull, 2016, 4: 467−477 [夏佳文, 詹文龙, 魏宝文, 等. 兰州重离子加速器研究装置HIRFL. 科学通报 2016, 4: 467−477]
36 Liu Y R, Huang R Q, Xiao B K, et al. ^{1}H NMR metabolic profiling analysis offers evaluation of Nilestriol treatment in ovariectomised rats. Mol Cell Endocrinol, 2014, 387: 19–34
37 Akerman G S, Rosenzweig B A, Domon O E, et al. Alterations in gene expression profiles and the DNA-damage response in ionizing radiation-exposed TK6 cells. Environ Mol Mutagen, 2005, 45: 188–205
38 Koturbash I, Merrifield M, Kovalchuk O. Fractionated exposure to low doses of ionizing radiation results in accumulation of DNA damage in mouse spleen tissue and activation of apoptosis in a p53/Atm-independent manner. Int J Radiat Biol, 2017, 93: 148–155
39 Belousova E A, Kutuzov M M, Ivankina P A, et al. A new DNA break repair pathway involving PARP3 and base excision repair proteins. Dokl Biochem Biophys, 2018, 482: 233–237
40 Fenton A L, Shirodkar P, Macrae C J, et al. The PARP3- and ATM-dependent phosphorylation of APLF facilitates DNA double-strand break repair. Nucleic Acids Res, 2013, 41: 4080–4092
41 Mo L J, Song M, Huang Q H, et al. Exosome-packaged miR-1246 contributes to bystander DNA damage by targeting LIG4. Br J Cancer, 2018, 119: 492–502
42 Jun S, Jung Y S, Suh H N, et al. *LIG4* mediates Wnt signalling-induced radioresistance. Nat Commun, 2016, 7: 10994

补充材料

图S1 不同剂量碳离子($^{12}C^{6+}$)辐照和防护药物作用下显著差异表达基因激活子网
图S2 不同剂量碳离子($^{12}C^{6+}$)辐照和防护药物干预相关基因表达量调节网络
表S1 不同剂量碳离子($^{12}C^{6+}$)辐照和防护药物干预后映射到人类蛋白质相互作用网络上的基因表达量及变化情况
表S2 不同剂量碳离子($^{12}C^{6+}$)辐照和防护药物作用下显著差异表达基因激活子网节点属性

本文以上补充材料见网络版csb.scichina.com. 补充材料为作者提供的原始数据, 作者对其学术质量和内容负责.

Summary for “基于关联网络的空间辐射防护分子靶标的辨识与预测”

Identification and prediction of molecular targets related to space radiation protection based on associated networks

Dafei Xie[1], Hua Guan[1], Chan Fan[2], Sai Hu[3], Xiaodan Liu[1], Yi Xie[4], Yu Wang[1], Hong Zhang[4*] & Pingkun Zhou[1*]

[1] *Department of Radiobiology, Beijing Institute of Radiation Medicine, Beijing 100850, China;*
[2] *School of Laboratory Medicine, Hunan University of Medicine, Huaihua 418000, China;*
[3] *College of Public Health, University of South China, Hengyang 421300, China;*
[4] *Institute of Modern Physics, Chinese Academy of Sciences, Lanzhou 730000, China*
* Corresponding authors, E-mail: zhangh@impcas.ac.cn; zhoupk@bmi.ac.cn

The effect of cosmic radiation on astronauts is a major barrier for human space exploration. In particular, medical protection against heavy ion radiation-induced injury is one of the key approaches in counteracting cosmic radiation to humans. In recent years, with the rapid accumulation of high-throughput data including gene expression profiles and omics-based data such as protein-protein interactions (PPI), large-scaled network pharmacology analyses can now be conducted. Exploring human genes with potentially high correlation to protection against radiation is becoming an important component and a new approach in heavy ion radiation study owing to advances in rational computational methods based on systems biology techniques.

In this study, heavy ion accelerators were employed to simulate cosmic radiation and a pipeline was constructed to identify activated subnetworks of significantly differentially expressed genes and to predict essential genes related to radiation-induced injury protection. Human lymphoblastoid AHH-1 cells were irradiated with 0.5 or 2 Gy of carbon ions ($^{12}C^{6+}$). Two kinds of existing radioprotective agents 523 and VND3207 were separately used *in vitro* 0.5 h before irradiation. Gene expression profiles of the cells were obtained by microarray 4 h after irradiation without and with the treatment of radioprotective agents. The networks of gene expression regulation were constructed based on PPI integrated from Human Protein Reference Database (HPRD). Simulated annealing algorithm was then used to extract activated subnetworks and potential candidate molecular targets including *PPM1A*, *RIF1*, *CASP3*, *TFE3* and *RIN1* were proposed according to their degrees of connection. Further gene set enrichment analysis (GSEA) indicated significantly enriched clusters of the identified genes in molecular functions including transcription regulator activity, transcription activator activity, enzyme activator activity, protein kinase activity and zinc ion binding. The most enriched clusters in cell components included nuclear body, transcription factor complex, cell junction, chromosome and cytoplasmic side of membrane. The most enriched biological processes were regulation of RNA metabolism, intracellular signal transduction, regulation of neuron death, regulation of cellular component and phosphorylation. We further investigated the expression of *RIF1* before and after irradiation with 0.5 and 2 Gy of $^{12}C^{6+}$ in Hela cells by western blotting. Expression of *RIF1* increased significantly after irradiation and the relative expression in cells 4h after irradiation was greater than 2-fold that of the control. This study took gene correlation into consideration in addition to their differential expression. It provides promising candidates for further discovery of anti-radiation drugs and will be of importance in promoting cosmic radiation protection techniques in long-term manned space programs and deep space exploration missions. In addition, considerable support and clues may also be revealed from the data generated in this study for future research on the underlying mechanisms in radiation-induced injury and medical protection against cosmic radiation.

gene expression profiles, protein-protein interaction network, drug target, heavy ion, simulated annealing algorithm

doi: 10.1360/TB-2019-0437