

血清受体酪氨酸激酶 AXL 可作为电离辐射 剂量估算的生物指标

刘琼 何颖 沈先荣 蒋定文 侯登勇 刘玉明

(海军医学研究所防护医学研究室 上海 200433)

摘要 为探讨血清 AXL 是否可作为电离辐射剂量估算的生物指标, 本文研究了急性照射后不同时间点血清 AXL 浓度变化与电离吸收剂量的相关性, 并分析了不同时间点 AXL 基线表达的稳定性。采用雄性 C57BL/6 小鼠为辐照对象, 分3个时间点采样, 每个时间点随机选取100只小鼠, 再随机分为5组, 每组20只: 其中对照组1组, 辐照组4组。辐照组小鼠接受⁶⁰Co 一次性照射, 受照剂量分别为1、3、5和7 Gy, 于照射前和照射后24、48、72 h 留存血清样本, 血清 AXL 浓度经定量细胞因子芯片检测与分析。结果表明, 未照射小鼠 AXL 表达基线稳定, 正常值范围为(186.6±44.20) pg/mL; 辐照后24、48和72 h, 血清 AXL 含量随吸收剂量增大而减少, 且血清 AXL 含量 ln 值与吸收剂量呈线性相关, 血清可作为电离辐射剂量估算的生物指标。

关键词 受体酪氨酸激酶, 细胞因子, 生物剂量计, 电离辐射

中图分类号 R818.04, TL72

DOI: 10.11889/j.1000-3436.2015.rj.33.030204

受照剂量估算是核事故伤员分类诊断和治疗的重要环节^[1]。当发生大规模核事故和核袭击时, 大量伤员未佩戴物理剂量计, 因此, 利用生物剂量计进行剂量估算显得尤为重要。此外, 相对物理剂量计, 生物剂量方法更能直观地反映电离辐射对机体的损伤程度^[2]。然而, 传统的生物标志物, 尤其是细胞遗传学标志物, 包括染色体畸变、淋巴细胞微核率等, 由于实验条件要求高、分析时间长、结果需要专业人员评估等限制, 不适用于大规模快速剂量诊断^[3-4], 因此, 有必要寻找新型、快速、可靠的电离辐射生物剂量指标。细胞因子, 如血清 Flt-3L, 由于采样方便、检测手段简单, 已成为电离辐射剂量估算指标研究的热点。为了筛选与吸收剂量相关的细胞因子, 我们前期利用高通量芯片技术, 初步证实辐照后6 h 血清 AXL 浓度变化与吸收剂量相关。在此基础上, 本文进一步研究了血清急性照射后不同时间点血清 AXL 浓度变化与电离吸收剂量的相关性, 并分析了不同时间点 AXL 基线表达的稳定性, 以阐明血清 AXL 是否可作为电离辐射剂量估算的生物指标。

1 材料和方法

1.1 实验动物

雄性 C57BL/6 小鼠, 7 周龄, 体重(19±1) g, 购自上海斯莱克实验动物有限责任公司, 动物质量合格证号: 2007000534826, 实验动物生产许可证号码 SCXK (沪) 2007-0005。

1.2 辐照与分组

辐照在第二军医大学钴-60 源室进行, 300 只小鼠被随机分为5组, 每组60只: 其中对照组1组, 辐照组4组。辐照组小鼠分别接受1、3、5和7 Gy 一次性全身照射, 剂量率为0.78 Gy/min。

1.3 血清样本采集

正常对照小鼠以及辐照小鼠分别随机选取20只, 于照后24、48和72 h 经眼球取血, 全血于37℃ 凝血1 h, 3000 r/min × 15 min 离心, 分离上层血清, 以100 μL/管分装于离心管中。分装好的血清保存于

基金资助: 上海市科学技术委员会医学引导类科研项目(10411969300)、上海市科学技术委员会自然科学基金(13ZR1418500)和全军计划科研项目(AHJ09J012)资助

第一作者: 刘琼, 女, 1979年1月出生, 2009年于第二军医大学获博士学位, 从事辐射生物效应与医学防护研究, 助理研究员, E-mail: liuqiong8001@hotmail.com;

通讯作者: 沈先荣, 博士, 研究员, E-mail: xianrong_sh@163.com

收稿日期: 初稿 2015-02-06; 修回 2015-03-25

-80℃冰箱。检测前6 h,从冰箱取出血清,置于4℃融化,每只小鼠样品选15 μL制备混合血清。

1.4 血清 AXL 浓度检测

取100 μL混合血清,利用细胞因子芯片检测 AXL 浓度(芯片名称为: RayBio® Custom Mouse Quantibody® Array 芯片,定制于 RayBiotech 公司)。检测采用双抗体夹心法,通过 Cy3 荧光强度扫描读取数据,根据 AXL 标准品绘制标准曲线,并通过标准曲线定量血清 AXL 浓度。

1.5 数据分析

分析不同时间点 AXL 基线时,表达采用多样本 F 检验, $p < 0.05$ 时认为统计差异显著。AXL 浓度与吸收剂量相关性采用单因素回归分析。

2 结果和讨论

2.1 血清 AXL 正常值表达稳定

由于正常值表达稳定性是血清 AXL 浓度能否作为辐射生物剂量估算生物指标的先决条件,因此,我们首先检测了血清 AXL 正常表达范围。我们分别在3个时间点(24、48和72 h)检测了空白对照组小鼠血清 AXL 含量(每个时间点20只,共60只)。根据 AXL 标准曲线和 AXL 检测限(27.0–10000 pg/mL),得到不同时间点检测的血清 AXL 浓度(图1)。通过 F 检验可知, $p = 0.768$, 大于0.05,可知,各时间点之间 AXL 表达没有显著差异,正常小鼠血清浓度范围为(186.6±44.20) pg/mL。

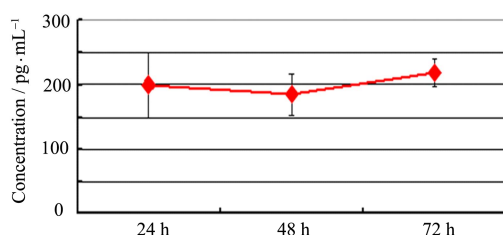


图1 血清 AXL 基线浓度变化
Fig.1 Baseline level of AXL concentration in plasma

2.2 血清 AXL 浓度与吸收剂量相关

为研究血清 AXL 浓度与吸收剂量的相关性,小鼠分别接受了1、3、5和7 Gy γ -射线一次性全身照射,辐照后24 h和48 h分别检测血清 AXL 浓度变化,结果如图2所示。由图2可知,照后24 h,当吸收剂量仅为1 Gy时,AXL 平均浓度即由

186.6 pg/mL(正常值均值)下降到97.90 pg/mL,当受照剂量7 Gy时更下降到31.8 pg/mL;说明24 h时,血清 AXL 含量的变化与吸收剂量相关。进一步通过回归分析可知,照后24 h,血清 AXL 含量 $\ln$ 值与吸收剂量呈线性相关($R^2 = 0.9035$),回归方程见公式(1), (其中 y 为吸收剂量, x 为血清 AXL 含量)。

$$y = -4.032\ln(x) + 20.354 \quad (1)$$

同样,如图2所示,照后48 h,血清 AXL 含量 $\ln$ 值与吸收剂量也呈线性相关,回归方程见公式(2), $R^2 = 0.9577$ 。

$$y = -4.328\ln(x) + 22.265 \quad (2)$$

然而,与照后24 h相比,当剂量低于5 Gy时,AXL 平均浓度有所回升,但仍然低于正常水平,这提示时间对血清 AXL 浓度与辐照剂量相关性有一定影响。

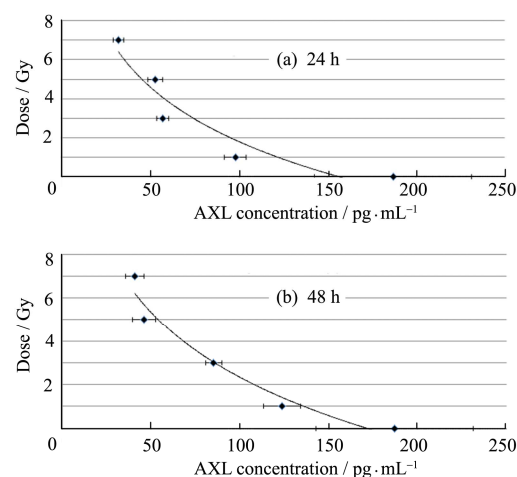


图2 辐照后24 h和48 h血清 AXL 浓度变化
Fig.2 Evaluation of serum AXL concentration at 24 and 48 h post-exposure

2.3 血清 AXL 浓度与吸收剂量相关性受时间因素的影响

为了进一步探讨时间因素对血清 AXL 浓度与辐照剂量相关性的影响,我们分别采集了辐照后24、48和72 h小鼠血清,检测血清中 AXL 含量变化。结果表明:不同时间点,血清 AXL 含量均随吸收剂量增大而减少,且有显著剂量-效应关系(图2和图3);照后24 h血清 AXL 浓度最低,剂量小于5 Gy时,血清 AXL 浓度在48 h和72 h有所回升,而当剂量大于5 Gy时,血清 AXL 浓度回升不显著(图3)。

由于时间因素所致，各时间点所得的回归方程有所不同，根据不同时间点各自的回归方程，就可利用血清 AXL 浓度值估算出辐照剂量。以 48 h 为

例，当小鼠血清 AXL 含量为 85.2 pg/mL (3 Gy 辐照均值) 时，将 85.2 作为 x ，代入相应公式(2)，计算辐照剂量估值(y)为 3.03 Gy。

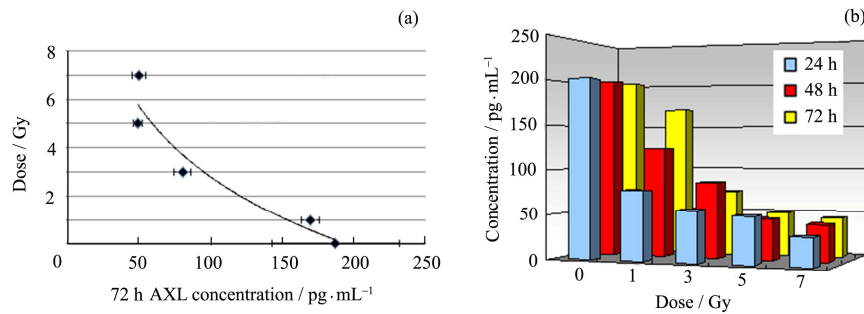


图 3 不同时间点血清 AXL 浓度变化
Fig.3 Evaluation of serum AXL concentration associated with time post-exposure

3 结论

受体酪氨酸激酶 AXL 又称为 Ufo、Ark 等，由 Axl 基因编码^[5]，可溶性 AXL 是膜蛋白通过蛋白水解作用释放到血清中的。AXL 大部分与 AXL 的配体 Gas6 形成络合物，参与膜蛋白调节细胞增殖、凋亡、黏附与转移功能^[6]。本文在前期大规模芯片筛查的结果上，进一步验证了小鼠 AXL 表达基线稳定，辐照后不同时间点，辐照血清 AXL 含量随吸收剂量增大而减少，且有显著的剂量-效应关系，阐明了血清 AXL 可作为电离辐射剂量估算的生物指标。此外，相对与传统生物指标，血清细胞因子 AXL 具有以下优势：(1)实验操作简单：可以用抗体芯片或 ELISA 方法完成 AXL 浓度检测，实验操作自动化程度高，不需要制片、镜检等复杂的操作。(2)实验样本处理和保存方便：可以使用血清或血浆样本，不需要细胞培养等样本处理过程；样本可以在常温保持一段时间，也可以冷藏或冷冻。(3)可以实现快速分析的目标：利用抗体芯片或 ELISA 方法检测 AXL 浓度仅需几个小时，而传统方法需要 3 d 左右。(4)结果客观、重复性好：抗体芯片或 ELISA 方法结果判断由仪器扫描分析，而传统方法要靠人工镜检完成，客观性和重复性不强。然而，血清 AXL 浓度与辐照剂量相关性受时间因素的影响，随着辐照后时间的延长，接受相对低剂量(≤ 3 Gy)辐照的小鼠血清 AXL 浓度逐渐恢复。因此，血清 AXL 浓度作为电离辐射剂量估算的生物指标在一定程度上受到了时间的制约，即血清 AXL 浓度指标适用于照后 72 h 内。

致谢 感谢陈伟助理研究员、王庆蓉高级实验师、莫琳芳助理研究员和李珂娟助理研究员在研究过程中给予无私的帮助和支持。

参考文献

- 1 Chaudhry M A. Biomarkers for human radiation exposure [J]. *Journal of Biomedical Science*, 2008, **15**: 557-563.
- 2 Swartz H M, Williams B B, Nicolalde R J, *et al.* Overview of Biodosimetry for Management of Unplanned Exposures to Ionizing Radiation [J]. *Radiation Measurement*, 2011, **46**: 742-748.
- 3 Wong K F, Siu L L, Ainsbury E, *et al.* Cytogenetic biodosimetry: what it is and how we do it [J]. *Hong Kong Medical Journal*, 2013, **19**: 168-173.
- 4 Vinnikov V A, Ainsbury E A, Maznyk N A, *et al.* Limitations Associated with Analysis of Cytogenetic Data for Biological Dosimetry [J]. *Radiation Research*, 2010, **174**: 403-414.
- 5 Hafizi S, Dahlbäck B. Signalling and functional diversity within the Axl subfamily of receptor tyrosine kinases [J]. *Cytokine and Growth Factor Reviews*, 2006, **17**(4): 295-304.
- 6 Li Y X, Wang X Q, Bi S J, *et al.* Inhibition of Mer and Axl receptor tyrosine kinases leads to increased apoptosis and improved chemosensitivity in human neuroblastoma [J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2015, **457**(3): 461-6.

Serum AXL as biomarker for acute radiation exposure

LIU Qiong HE Yin SHEN Xianrong JIANG Dingwen HOU Dengyong LIU Yuming

(Naval Medical Research Institute, Shanghai 200433, China)

ABSTRACT To assess the usability of serum AXL as a possible biomarker for acute radiation exposure, the baseline level and variations induced by radiation of serum AXL were analyzed. Three hundred male C57BL/6 mice were randomly divided into radiation groups ($n=240$) and the control ($n=60$). After ^{60}Co total-body irradiation at the dose of 1, 3, 5 or 7 Gy respectively, mice were sacrificed and their serums were collected at 24, 48, or 72 h separately. Serum AXL concentration were then analyzed by antibody array. The results suggested that baseline level of serum AXL expression hold steady (186.3 ± 44.20) pg/mL. Moreover, serum AXL concentration is inversely related to the radiation dose within 72 h after exposure. This study uncovers a strong correlation between serum AXL concentration and radiation dose, and serum AXL has a consequential ability to estimate radiation exposure as biomarker.

KEYWORDS AXL, Cytokine, Bio-dosimetry, Ionizing radiation

CLC R818.04, TL72