

# $\gamma$ 射线照射后大鼠血清基质金属蛋白酶浓度和活性的变化

乐晨 李海军 程赢 闵锐

(第二军医大学海军医学系放射医学教研室 上海 200433)

**摘要** 以不同剂量 $\gamma$ 射线对大鼠进行全身照射,于照后24 h用ELISA试剂盒检测血清中MMP-2和9的浓度,底物明胶酶谱法检测血清基质金属蛋白酶的活性。结果表明,与其他各剂量组相比,5 Gy和6 Gy照射组,大鼠照射后24 h,血清MMP-2的浓度显著升高( $p < 0.01$ ),MMP-2的活性也随照射剂量增加而增加。而各照射剂量组血清MMP-9浓度和活性变化则无明显差别。结果显示,受照大鼠血清MMP-2浓度和活性的变化具有提示生物受照剂量的潜能。

**关键词**  $\gamma$ 射线,基质金属蛋白酶,生物剂量

**中图分类号** Q691, R14, R81

在放射伤员的医学救治中,快速准确测定人员受照剂量对伤员的分类诊断,科学合理救治及预后决策具有十分重要的作用。物理方法检测人员受照剂量准确而可靠,但在一些人员没有佩戴个人剂量计,或可用物理方法检测剂量但无法重建辐照环境的场合,用生物方法评估人员受照剂量是唯一可行的方法。然而,至今为止,能快速分析检测伤员受照剂量的生物指标和分析方法不多,实用的更少。为解决这一问题,近年来,发达国家投入大量资金开展相关研究,以寻找新的、适合早期快速分析和能准确反映受照剂量的生物指标、相应的检测技术和评价方法体系<sup>[1,2]</sup>。基质金属蛋白酶(Matrix Metalloproteinases, MMPs)是一组功能上依赖锌离子,能广泛降解细胞外基质的蛋白酶家族。在机体稳态环境中,MMPs的表达和活化水平很低,但在许多病理条件下,如炎症疾病、肿瘤生长和转移等情况下,其表达和活化水平会出现一些变化<sup>[3]</sup>。一些研究相继表明,肺癌及乳腺癌患者放疗前后,前列腺癌患者放疗后,以及体外培养的胶质母细胞瘤、ECV304及HUVEC细胞经照射后MMPs的浓度及活性均发生与照射剂量相关的变化<sup>[4]</sup>。但MMPs的这些变化与辐照剂量的相关程度如何?是否具有发展成评估生物受照剂量指标的潜能尚未见研究。

本工作拟通过对SD大鼠受不同剂量 $\gamma$ 射线全身照射后24 h血清MMP-2和MMP-9的浓度和活性变化的分析,观察其与照射剂量的相关性,评价其指示生物受照剂量的可能性。

## 1 材料与方法

### 1.1 动物和照射

雄性SD大鼠(Sprague-Dawley Rats),质量180~220 g,购自上海斯莱克斯实验动物有限责任公司,清洁级。实验动物分为2批,每批7组,每组4只。动物在<sup>60</sup>Co $\gamma$ 射线治疗机有效照射视野内进行垂直全身辐照,剂量率为45 cGy/min,分别照射0、1、2、3、4、5和6 Gy。

### 1.2 标本的制作

照射后24 h,乙醚吸入法麻醉大鼠,心脏采血,4℃静置1 h,320 g离心20 min,收集血清,每管100  $\mu$ L分装,-80℃冻存,待检。

### 1.3 MMPs浓度检测

血清MMPs浓度测定按照商品化ELISA试剂盒操作说明书进行,实验重复3次。方法简述如下:等比稀释一组标准品,分别于相应酶标板的反应孔中加入100  $\mu$ L标准品和100  $\mu$ L血清样本,置37℃孵育60 min。洗板后,每孔加入100  $\mu$ L 1 $\times$ Anti-rat MMP-2(或9) Biotin反应液,置37℃孵育30 min。洗板后每孔加入100  $\mu$ L 1 $\times$ HRP,置37℃孵育30 min。再次洗板后每孔加入100  $\mu$ L TMB,置37℃孵育箱内避光温育15 min。每孔加入100  $\mu$ L终止液,轻轻混匀30 s,静置15 min,450 nm测OD值两次,取平均值。

国家自然科学基金(30370444)、全军医药卫生科研基金(06Q47)资助

第一作者:乐晨,男,1979年4月出生,2007年毕业于第二军医大学,获放射医学硕士学位,讲师

通讯联系人:闵锐

收稿日期:初稿 2008-12-15,修回 2009-02-25

## 1.4 MMPs 活性检测

明胶酶谱法检测 MMPs 活性的方法见文献[5], 实验重复 2 次。简述如下, 配置含 1 g/L 明胶的 10% 聚丙烯酰胺分离胶, 待其凝固后再配置 4% 的浓缩胶。取血清 5  $\mu$ L 与 20  $\mu$ L 样品稀释液、25  $\mu$ L 上样缓冲液充分混合, 室温静置 10 min 后取 5  $\mu$ L 上样。上样后静置 10 min, 同时跑两块胶。泳毕用孵育液振荡洗胶 3 次, 37  $^{\circ}$ C 低速振荡孵育 60 h, 过程中加入 20 mmol/L 的 EDTA 灭活 MMPs, 此时胶中显示活性蛋白的负染色带消失, 证实所检出的负染色带为具有活性的 MMPs。胶脱色漂洗后用成像仪扫描成像。

## 1.5 数据处理

采用 GraphPad Prism 软件拟合标准曲线和二项式方程, 由 OD 值得出血清 MMPs 的实际浓度值。采用  $\bar{x} \pm s$  及单因素方差分析 (LSD 检验)。

## 2 结果

### 2.1 照后 24 h 血清 MMP-2 和 MMP-9 的浓度变化

由于试剂盒的加样操作需要在 2 min 内完成, 为保证实验质量, 遂将同一批实验动物血清样本分两次检测, 第一次检测 0、2、4、6 Gy 各组样本, 第二次检测 1、3、5 Gy 各组样本。

标准曲线拟合方程式为:

$$AX^2 + BX + (C-Y) = 0$$

X 为浓度值, Y 为 OD 值。第一次检测拟合结果为:  $A=-7.184E-7$ ,  $B=0.002202$ ,  $C=0.02825$ ,  $R^2=0.9985$ ; 第二次检测拟合结果为:  $A=-4.747E-7$ ,  $B=0.002039$ ,  $C=-0.01956$ ,  $R^2=0.9992$ 。

将各剂量组所测 OD 值代入拟合方程得出血清 MMPs 的浓度。血清 MMP-2 浓度见图 1。

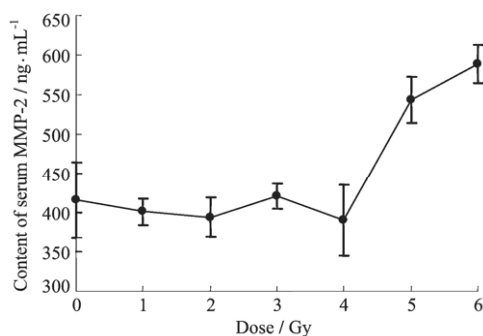


Fig.1 Concentration of MMP-2 in rat's serum after  $\gamma$ -irradiation with different doses ( $n=3$ )

结果表明, 0~4Gy 组 MMP-2 浓度基本在同一水平, 5 Gy 后明显升高。统计分析显示, 0~4 Gy 各组血清 MMP-2 浓度无显著性差异 ( $p>0.05$ ); 5 Gy 和 6 Gy 组比较无显著性差异 ( $p>0.05$ ); 而 5 Gy 或 6 Gy 组与 0~4 Gy 各组相比差异显著 ( $p<0.01$ )。

血清 MMP-9 的浓度分析见图 2, 表明各照射剂量组之间均无显著性差异。

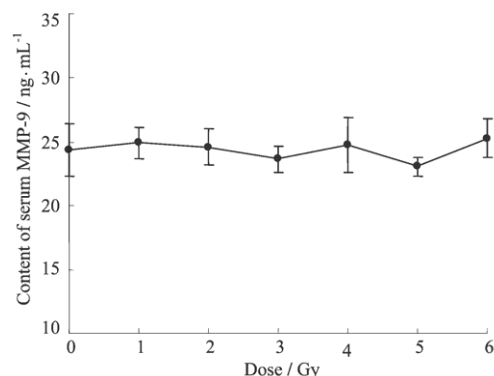


Fig.2 Concentration of MMP-9 in rat's serum after  $\gamma$ -irradiation with different doses ( $n=3$ )

### 2.2 照后 24 h 血清 MMP-2 和 MMP-9 的活性变化

明胶酶谱凝胶电泳结果表明, 不同剂量的  $\gamma$  线照射后对 MMP-9 蛋白无明显激活作用, 但对 MMP-2 则有激活作用, 尤其在高剂量时激活明显。见图 3。

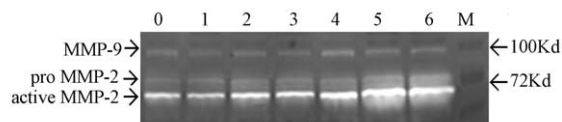


Fig.3 Zymograph profile of MMPs after  $\gamma$ -irradiation with different doses  
0~6 means different irradiation doses, M means protein standard of low molecule

## 3 讨论

MMPs 包括胶原酶、明胶酶, 基质溶解素等多种蛋白酶<sup>[6]</sup>。本研究拟通过观察基质金属蛋白酶浓度和活性的变化, 寻找能标示生物受照剂量的新生物指标, 主要基于对基质金属蛋白酶家族的以下认识: (1) 基质金属蛋白酶家族在体内广泛分布于各组织器官细胞中, 参与机体内各种生理生化过程, 其分布具有全身代表性; (2) 胸腺中的金属硫蛋白含量的变化与照射剂量间存在一定的量效关系, 但这种蛋白主要存在于胸腺、肝脏、肾脏等组织细胞中, 样品收集十分困难, 因而限制了通过该蛋白分析来指示生物受照剂量的实际应用。而基质金属蛋

白酶家族成员多,在许多血液细胞中都表达,血液容易获得,实用性强;(3)作为一种能指示受照剂量的生物指标,基质金属蛋白酶家族在不同个体之间的表达差异性较小,比较适合作为大量人群剂量筛查的生物指标;(4)最近国外肿瘤放射治疗生物学研究中发现,在受1~5 Gy 剂量照射的内皮细胞培养上清液中,基质金属蛋白酶含量随时间和吸收剂量发生变化,这种变化与受照剂量存在一定量效关系<sup>[7,8]</sup>。

实验结果初步显示,不同剂量 $\gamma$  线照射后24 h,血清MMP-9的浓度和活性变化与受照剂量的关系不明显,表明该指标不具有标示生物受照剂量的能力。而5 Gy 和6 Gy  $\gamma$  射线照射后24 h,血清MMP-2浓度和活性都明显升高,表明该指标与受照剂量存在一定的量效关系,在某种程度上具有作为指示生物受照剂量指标的潜能。初步研究发现,虽然被分析蛋白的浓度和活性变化与照射剂量间并不呈现线性关系,而呈现阈值效应,即具有所谓“阈值剂量”性质的“点效应”。由于生物剂量研究的复杂性,能得到具有这种性质明显变化的指标,通过指标的筛选和组合,形成“阵列”式指标体系,不

仅可扩大指标涵盖的剂量指示范围,也大大增强了指标的实用性能,不失为一种好的研究生物剂量方法策略。

### 参考文献

- 1 Amundson S A, Bittner M, Meltzer P, *et al.* *Expert Rev Mol Diagn.* 2001, **1**(2): 211-219
- 2 William F Blakely, Charles A S, Pataje G S, *et al.* *Health Phys.* 2005, **89**(5): 494-504
- 3 Meng Huee Lee, Gillian M. *Journal of Cell Science*, 2004, **117** (18): 4015-4016
- 4 Susskind H, Hymowitz M H, Lau Y H, *et al.* *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2003, **56**(4): 1161-1169
- 5 Thomas M L, Frances R B. *Analytical Biochemistry*, 1997, **249**(1): 24-28
- 6 Sudip Das, Malay Mandal, Tapati Chakraborti, *et al.* *Molecular and Cellular Biochemistry*, 2003, **253**(1-2): 31-40
- 7 Nirmala C, Jasti S L, Sawaya R, *et al.* *Int J Cancer*, 2000, **88**(5): 766-770
- 8 Araya J, Maruyama M, Sassa K, *et al.* *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2001, **280**(1): 30-38

## The changes in amount and activity of matrix metalloproteinases in rat's serum irradiated by $\gamma$ -rays

LE Chen LI Haijun CHENG Ying MIN Rui

(Radiation Department in Navy Medical Faculty, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China)

**ABSTRACT** Rats were whole body irradiated by  $\gamma$ -rays with different doses. A commercial ELISA kit was used to analyze the concentration of MMP-2 and MMP-9 in rat's serum. And Gelatin zymography electrophoresis was used to test the activity of serum MMPs at 24 h after irradiation. The results show that the amount and the activity of MMP-2 in rat's serum increase with increment of irradiation doses. Compared with 1~4Gy exposed groups a significant rising of MMP-2 has been found in 5 Gy and 6 Gy exposed groups ( $p < 0.01$ ). On the contrast, the amount and activity of MMP-9 in rat's serum have a little change at 24 hours after irradiation in all of exposed groups. It can be deduced that the changes with amount and activity of MMP-2 may be used as a potential indicator of exposed dose in organisms.

**KEYWORDS**  $\gamma$ -rays irradiation, Matrix metalloproteinase, Bio-dose

**CLC** Q691, R14, R81