

# γ射线诱发培养淋巴细胞 TCR 基因突变的剂量-效应关系

刘长安

(北京大学第三医院肿瘤与放射病研究室, 北京 100083)

**摘要:** 目的 探讨γ射线诱发培养淋巴细胞 T 细胞受体 (TCR) 基因突变的剂量-效应关系。方法 以不同剂量 (0~4.0 Gy) 的γ射线照射新鲜分离的健康成人外周血淋巴细胞, 植物血凝素脉冲刺激 2 h 后, 用白细胞介素-2 培养 7 d, 用单克隆抗体直接免疫荧光标记流式细胞术检测 TCR 基因突变频率 (TCR MF)。应用 SAS 统计软件包编写的程序进行辐射剂量-效应曲线的拟合和筛选。结果 培养 7 d 后, TCR MF ( $10^{-4}$ ) 随照射剂量  $D$  (Gy) 的增加而增高, 最佳拟合曲线为二次多项式模型, 其方程式可描述为:  $TCR MF = 2.74 + 6.05D + 7.60D^2$  ( $F = 36.237.16$ ,  $P < 0.01$ , 经校正的  $R^2 = 0.9999$ )。结论 TCR 基因突变作为一种有潜力的生物剂量计可能用于近期辐射照射生物剂量的估算。

**关键词:** 辐射照射; 基因突变; T 细胞受体基因; 剂量-效应模型; 生物剂量计

中图分类号: R14; Q754 文献标识码: A 文章编号: 1002-221X(2005)01-0023-03

## The dose-response relationship of T-cell receptor gene mutation induced by gamma-ray in cultured lymphocytes

LIU Chang-an

(Department of Cancer and Radiation Sickness, Peking University Third Hospital, Beijing 100083, China)

**Abstract:** **Objective** To investigate the dose-response relationship of T-cell receptor (TCR) gene mutation induced by gamma-ray in cultured lymphocytes. **Method** Freshly isolated peripheral lymphocytes from healthy adult donors were irradiated with gamma-ray in doses ranging from 0 Gy to 4.0 Gy and cultured with interleukin-2 for 7 days after phytohemagglutinin pulse stimulation for 2 h. The mutant frequencies of TCR gene (TCR MF) were detected by flow cytometry with direct immunofluorescence. Radiation dose-response curves were fitted and an optimal mathematical model for it was selected with programs programmed with Statistical Analysis System (SAS) soft package.

**Result** TCR MF (unit is  $10^{-4}$ ) increased dose  $D$  (in Gy) dependently after cultured for 7 days. Data were found to be fitted optimal by a quadratic polynomial dose-response model, which could be described by the formula  $TCR MF = 2.74 + 6.05D + 7.60D^2$  ( $F = 36.237.16$ ,  $P < 0.01$ , adjusted  $R^2 = 0.9999$ ). **Conclusion** It is suggested that TCR gene mutation, which served as a potential biological dosimeter, may be applied for the estimation of biological dose for recent radiation exposure.

**Key words:** Radiation exposure; Gene mutation; T-cell receptor gene; Dose-response model; Biological dosimeter

尽管 T 细胞受体 (T cell receptor, TCR) 基因位于常染色体上, 但却类似于女性 X 性染色体上的基因, 在功能上呈单倍性。如在活性基因上发生单个突变, 即可导致 TCR 突变体表型的产生。TCR  $\alpha$ 、 $\beta$  链只有在与另一蛋白 CD3 结合形成 TCR  $\alpha\beta$ /CD3 复合体后, 才能转运到 T 细胞膜表面而发挥作用。如果  $\alpha$  或  $\beta$  基因中任何一个发生突变, 则形成的异常复合体无法被转运到 T 细胞表面。因此, 只要通过流式细胞术检测 CD3 分子在细胞表面存在的情况, 就可判断 TCR $\alpha$  或  $\beta$  基因是否发生突变而异常表达。不直接检测 TCR  $\alpha$ 、 $\beta$  复合体的主要原因是, 虽然也有 TCR  $\alpha$ 、 $\beta$  复合体的荧光标记抗体, 但它们在流式细胞仪的测定过程中不能很好地区分正常细胞与突变细胞的荧光信号<sup>[1,2]</sup>。

人体受到电离辐射照射之后数月, 才可以检测到 T

淋巴细胞的 TCR 基因突变表型的表达, 因此, TCR 基因突变作为生物剂量计 (biological dosimeter) 常用于受照后较长时间 (数月、数年乃至几十年) 受照者生物剂量的估算<sup>[3,4]</sup>。本文参照 Ishioka 等<sup>[5]</sup>报道的方法, 以不同剂量的γ射线体外照射健康成人外周血淋巴细胞, 植物血凝素 (PHA) 脉冲式刺激后用重组人白细胞介素-2 (rhIL-2) 短期培养, 观察 TCR 基因突变表型的表达及其辐射剂量-效应关系, 以探讨 TCR 基因突变检测用于辐射照射后早期估算受照者生物剂量的可能性。

### 1 材料与方法

#### 1.1 主要试剂

异硫氰酸荧光素 (FITC) 标记的小鼠抗人 CD4 单克隆抗体 (McAb), 藻红蛋白 (PE) 标记的小鼠抗人 CD3 (McAb), 均为 Ancell 产品, 分别以 FITC 和 PE 标记的小鼠 IgG<sub>1</sub>McAb (BD 公司产品); PHA-P 和碘化丙啶 (Sigma); rhIL-2 购自中化通通生物工程有限公司。

#### 1.2 血样采集及淋巴细胞分离

选择不患慢性疾病、非放射性工作者, 一年内无

收稿日期: 2004-04-05; 修回日期: 2004-05-08

基金项目: 国家科技部社会公益研究专项资金项目 (2001DIB20108)

作者简介: 刘长安 (1968-), 男, 陕西富平人, 硕士, 副研究员,

研究方向: 放射医学, 核事故医学应急救援

射线和化学毒物接触史、无烟酒嗜好的 7 名健康男性青年为供血者。无菌条件下穿刺肘正中静脉采集外周血 20 ml, 体外肝素抗凝 (20 IU/ml)。采血后立即应用常规密度梯度离心法分离淋巴细胞, RPMI 1640 培养液洗涤 2 次, 最后加入含质量分数 10% 新生牛血清的 RPMI 1640 培养液, 计数并调整细胞密度为  $1 \times 10^6$  个/ml。每份血分装到 8 个试管中, 以备照射。

### 1.3 照射与细胞培养

采用 Gamma Cell 1000 数控细胞照射仪 (MDS Nordion, Canada) 体外照射新鲜分离的成人外周血淋巴细胞, 以  $^{137}\text{Cs}$  为照射源, 其总放射性活度为 24 05 TBq。吸收剂量率 62.5 mGy/s。每个样品照射剂量分别为 0 (对照组)、0.125 Gy、0.25 Gy、0.5 Gy、1.0 Gy、2.0 Gy、3.0 Gy、4.0 Gy。照射后培养液中加入 PHA-P 5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , 于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$ 、饱和湿度条件下培养 2 h。用含质量分数 2.5% 新生牛血清的 EBSS 平衡盐溶液洗涤 2 次。将细胞重新悬浮于含质量分数 10% 新生牛血清的 RPMI 1640 培养液, 计数并调整细胞密度为  $1 \times 10^5$  个/ml, 加入 rhIL-2 100U/ml, 于上述条件下继续培养 7 d。

### 1.4 TCR 基因突变频率测定

1.4.1 直接免疫荧光抗体标记 调整细胞密度为  $1 \times 10^7$  个/ml, 各取细胞悬液 100  $\mu\text{l}$  加入 2 支试管。第 1 管加入 FITC-人 CD4 McAb (1:50 稀释)、PE-人 CD3 McAb (1:50 稀释) 各 80  $\mu\text{l}$ ; 第 2 管加入以 FITC 及 PE 标记的小鼠 IgG<sub>1</sub> McAb 各 20  $\mu\text{l}$  作为非特异对照。4  $^{\circ}\text{C}$  避光孵育 45 min。pH 7.4 的 PBS 洗涤 3 次。加入 PBS 1 ml 重新悬浮细胞。

1.4.2 流式细胞仪检测 采用 FACSscan 型流式细胞仪 (Becton-Dickinson, USA), 激发光源为 15 mW 氩离子激光, 波长 488 nm。检测前用 DNA 交联剂碘化丙啶染色, 以去除其中死细胞的荧光信号干扰。采用双参数模式, 设定淋巴细胞“门” (gate), 每个试管样品收集“门”内细胞  $2 \times 10^5$  个。用 CellQuest 软件分析处理数据。按以下公式计算 TCR 基因突变频率 (TCR MF)。

$$\text{TCR MF} (\times 10^{-4}) = [\text{CD3}^- \text{CD4}^+ \text{计数} / (\text{CD3}^+ \text{CD4}^+ \text{计数} + \text{CD3}^- \text{CD4}^+ \text{计数})] \times 10^4$$

式中  $\text{CD3}^- \text{CD4}^+$  为 TCR 基因突变细胞表型,  $\text{CD3}^+ \text{CD4}^+$  为正常细胞表型。

### 1.5 统计学处理

TCR MF 以  $\bar{x} \pm s$  表示, 以  $t$  检验分析不同剂量照射组与对照组均数的差异。在微型计算机上, 采用世界卫生组织 (WHO) 提出的 4 种数学模型<sup>[6,7]</sup> 和相应的 SAS 程序<sup>[8]</sup> 进行辐射剂量-效应曲线的拟合、回归系数检验 ( $F$  检验) 及拟合度检验。

## 2 结果

### 2.1 不同剂量 $\gamma$ 射线照射诱发 TCR 基因的突变频率

$\gamma$  射线体外照射健康成人外周血淋巴细胞, PHA-P 脉冲式刺激后用 rhIL-2 短期培养 7 d, TCR MF 随照射剂量的增加而增高, 各照射剂量组 (0.125 ~ 4.0 Gy) 的 TCR MF 与对照组比较, 差异均有显著性 ( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ ), 见表 1。

表 1 不同剂量  $\gamma$  射线照射诱发 TCR 基因的突变频率 ( $\bar{x} \pm s$ )

照射剂量 (Gy)	n	TCR MF ( $\times 10^{-4}$ )
0	7	2.4 $\pm$ 0.2
0.125	7	3.5 $\pm$ 0.4 *
0.25	7	4.7 $\pm$ 0.9 **
0.50	7	7.8 $\pm$ 1.1 **
1.0	7	17.3 $\pm$ 2.4 **
2.0	7	44.7 $\pm$ 8.6 **
3.0	7	89.1 $\pm$ 14.4 **
4.0	7	148.8 $\pm$ 23.7 **

与对照组比较, \*  $P < 0.05$  \*\*  $P < 0.01$

### 2.2 $\gamma$ 射线照射诱发 TCR MF 的辐射剂量-效应曲线的拟合与筛选

拟合结果输出  $\gamma$  射线照射诱发 TCR MF 的剂量-效应曲线回归方程式、回归系数检验、校正的拟合指数 ( $R_{\text{adj}}^2$ ) 见表 2。非线性 (NLIN) 迭代过程已达到收敛标准。曲线拟合的好坏可由剩余平方和 ( $Q$ ) 的大小来衡量。如果  $Q$  对总平方和 ( $L_{yy}$ ) 的比例越小, 说明实际观察值与估计值越接近, 曲线拟合得越好, 这种拟合度可用相关指数 ( $R^2$ ) 来表示。 $R^2$  越接近于 1, 表示拟合得越好。由于各数学模型的自变量数目不同, 在比较不同模型曲线的拟合度时,  $R_{\text{adj}}^2$  比  $R^2$  准确。从结果上看, 4 条曲线均成立 (回归系数显著性检验,  $P$  值均小于 0.01)。根据  $R_{\text{adj}}^2$ , 在 0 ~ 4.0 Gy 范围内, 拟合的最佳数学模型为二次多项式 ( $\text{TCR MF} = 2.74 + 6.05D + 7.60D^2$ )。

表 2  $\gamma$  射线照射诱发 TCR MF 的辐射剂量-效应曲线回归方程式、回归系数与拟合度检验

数学模型	回归方程式	F 值	校正的拟合指数 ( $R_{\text{adj}}^2$ )
线性无阈模式	$\text{TCR MF} = -7.61 + 34.87D$	123.95	0.946 1
幂函数模式	$\text{TCR MF} = 14.52D^{1.67}$	693.89	0.997 4
二次多项式模式	$\text{TCR MF} = 2.74 + 6.05D + 7.60D^2$	36 237.16	0.999 9 *
二次方程模型	$\text{TCR MF} = 5.31 + 9.09D^2$	3 040.74	0.997 7

注: ① TCR MF 为  $\gamma$  射线照射诱发 TCR 基因的突变频率 ( $\times 10^{-4}$ ),  $D$  为辐射剂量 (Gy)。② 回归系数显著性检验: 各式  $P$  值均小于 0.01。

\* 最佳拟合数学模型。

## 3 讨论

在核事故和放射事故的医学应急响应中, 尽快估算受照人员的辐射生物剂量对于伤员分类和辐射损伤的诊断、治疗和预后估计具有重要意义。所谓生物剂量计是

指用以估算受照剂量的生物体系, 这一生物体系受到照射后的反应与受照剂量之间存在某种定量关系, 从而可用来估算受照的剂量。当前常用于事故发生后早期受照剂量估算的较为可靠的生物剂量计有: 外周血淋巴细胞染色体畸变分析<sup>[9]</sup>, 外周血淋巴细胞微核测定<sup>[7]</sup>, 人体生物材料(骨、牙釉、指甲等)和某些佩带物品的电子自旋共振(ESR)分析技术<sup>[10]</sup>等。

本文参照 Ishioka 等报道的方法<sup>[3]</sup>, 证实了  $\gamma$  射线(低 LET 射线)照射的离体淋巴细胞经 PHA-P 脉冲式刺激后用 rhIL-2 短期培养, 可以大大缩短 TCR 基因突变表型表达的时间, 在辐射照射后 1 周内即可检出, TCR 基因的突变频率呈辐射剂量依赖性增高, 利用 SAS 程序拟合的最佳辐射剂量-效应曲线为二次多项式模式。二次多项式是低 LET 高剂量率照射时进行剂量-效应曲线拟合经常可以得到的一种模式<sup>[8]</sup>。实验结果提示, 利用这一改良的 TCR 基因突变频率检测方法, 拟合出不同辐射类型、不同剂量率的辐射剂量-效应刻度曲线, 可应用于电离辐射事故受照者早期受照剂量的估算, 是一个潜在的生物剂量计。该方法与染色体畸变分析相比, 培养时间较长但检测分析简便快捷。当然, 由于实验仪器、试剂和方法的差异, 各辐射生物剂量实验室应建立自己的剂量-效应刻度曲线, 并选择和事故条件接近的刻度曲线进

行剂量估算。

#### 参考文献:

- [1] 夏寿萱. 体细胞基因突变 [A]. 金瑾珍. 放射生物剂量估计 [M]. 北京: 军事医学科学出版社, 2002. 98-137.
- [2] Kyoizumi S, Akiyama M, Hirai Y, et al. Spontaneous loss and alteration of antigen receptor expression in mature CD4<sup>+</sup> T cells [J]. J Exp Med 1990; 171: 1981-1999.
- [3] Kyoizumi S, Umeki S, Akiyama M, et al. Frequency of mutant T lymphocytes defective in the expression of the T-cell antigen gene among radiation-exposed people [J]. Mutat Res 1992; 265: 173-180.
- [4] Iwamoto KS, Hirai Y, Umeki S, et al. A positive correlation between T-cell-receptor mutant frequencies and dicentric chromosome frequencies in lymphocytes from radiotherapy patients [J]. J Radiat Res 1994; 35: 92-103.
- [5] Ishika N, Umeki S, Hirai Y, et al. Stimulated rapid expression in vitro for early detection of in vivo T-cell receptor mutations induced by radiation exposure [J]. Mutat Res 1997; 390: 269-282.
- [6] World Health Organization. Methods for the analysis of human chromosome aberrations [R]. Geneva: The World Health Organization, 1973.
- [7] WS/T 187-1999 淋巴细胞微核估算受照剂量方法 [S].
- [8] 刘长安. SAS 在辐射剂量-效应研究中的应用 [J]. 中国工业医学杂志, 2001, 14 (1): 10-12.
- [9] GB/T 12715-1991. 染色体畸变分析估计生物剂量的方法 [S].
- [10] The International Atomic Energy Agency, The World Health Organization. Diagnosis and treatment of radiation in injuries Safety Reports Series No. 2 [R]. Vienna: The International Atomic Energy Agency, 1998.

## 氯仿致中毒性肝损伤 1 例报告

### Toxic hepatic injury caused by chloroform. A case report

吕红波, 石晓虹, 郎振为

(北京地坛医院, 北京 100011)

#### 1 病例资料

患者男性, 26 岁, 因乏力、食欲差、尿黄 1 个月, 加重伴意识不清 5 d 于 2004 年 3 月 12 日以病毒性肝炎、亚急性重型收入院。

患者因工作接触氯仿 20 d 后于 2004 年 1 月 26 日开始出现间断发热(39.7℃), 伴有乏力、食欲差、尿黄, 但无恶心呕吐, 期间仍坚持工作, 病情加重, 出现思维反应迟钝, 定向力、计算力减弱直至昏迷。期间两次转院均诊断为亚急性重型肝炎, 经保肝、脱水及支持治疗, 3 月 23 日, 患者意识清晰, 但仍有高度乏力, 重度黄疸, 继续内科保肝、脱氨、退黄及支持治疗, 于 2004 年 6 月 12 日行肝穿, 肝穿当天皮肤巩膜中度黄染, 其他生命体征平稳。肝功能检查: ALT 47.0 U/L, AST 110.0 U/L, TBL 127.4  $\mu$ mol/L, DBIL 68.6  $\mu$ mol/L,  $\gamma$ -GT 209 U/L, TBA 70.9  $\mu$ mol/L。患者既往无肝炎病史, 无血液及血制品输注史, 否认其他疾病史。工作时将氯仿由一桶倒入另一桶, 一般防护, 每天工作 8 h, 室内通风不良。同一车间无其他人发病。患者发病前偶有饮酒, 饮白酒 200~250 ml。

## · 病例报告 ·

无药物过敏及手术外伤史。

病理检查: 肝穿组织一条长 2 cm, 边缘锯齿状, 灰黄灰褐相间。镜下见肝小叶结构消失, 呈现多处的亚大块坏死及桥形坏死, 残存肝细胞呈结节性再生, 可见肝细胞内淤胆。坏死组织内较多的炎细胞浸润, 其中以淋巴细胞和嗜酸性粒细胞多见。在坏死塌陷的网状纤维中可见到胞浆极度膨大的残存肝细胞。坏死区与残存肝细胞交界处小胆管增生淤胆。Masson 染色见结节周围胶原沉积, 网状纤维染色肝组织免疫组织化学检测 HBsAg(-)、HBeAg(-)、HBcAg(-)。病理诊断: 氯仿中毒性肝坏死伴早期肝硬化。

#### 2 讨论

氯仿是一种亲肝性毒物, 可经过吸入、口服和皮肤接触中毒, 主要作用于中枢神经系统并可损伤肝肾。本例患者起病急, 并且以发热、乏力、食欲差、尿黄为首发症状, 继而出现神经系统症状如意识恍惚、定向力差及昏迷。血生化检查患者转氨酶明显升高, 同时伴有尿素氮的升高(9.0 mmol/L), 提示有肝、肾功能的损害。患者各种病毒标志物阴性, 可排除病毒性肝炎。虽然患者发病前偶有饮酒, 但只可能作为协同因素, 结合工作中氯仿接触史, 提示中毒性肝损伤的可能。从镜下来看, 再生肝细胞团周围的纤维为支架塌陷, 并有胶原沉积。同时肝组织未发现明显脂肪变性, 排除了酒精性肝病的诊断。结合发病前接触史及镜下特点诊断为氯仿中毒性肝坏死伴早期肝硬化。