

# X射线诱发大鼠淋巴细胞 TCR基因突变的剂量-效应关系

石燕, 刘伟, 侯殿俊, 马娅, 乔建维, 卢峰, 商希梅

中图分类号: Q691 文献标识码: A 文章编号: 1004-714X(2010)02-0138-02

**【摘要】** 目的 探讨 X射线诱发大鼠外周血淋巴细胞 TCR基因突变的剂量-效应关系。方法 以不同剂量(0~3 Gy)的 X射线照射新鲜分离的大鼠外周血淋巴细胞, PHA、ConA、IL-2协同刺激培养 7 d, 流式细胞仪检测 TCR 突变频率。结果 大鼠淋巴细胞体外培养 7 d后, TCR 突变频率随照射剂量的增加而增加, 二者存在良好的剂量-效应关系, 最佳拟合曲线为二次多项式模式, 回归方程为:  $TCRMF = 1.615 + 9.979D + 1.712D^2$  ( $F = 146.781$ ,  $P < 0.01$ ,  $R_{adj}^2 = 0.864$ )。结论 本研究结果显示: X射线诱发大鼠外周血淋巴细胞 TCR 基因突变频率与照射剂量间存在良好的剂量-效应关系。

**【关键词】** TCR 剂量-效应关系; 生物剂量计

The Dose-response Relationship of T-cell Receptor Gene Mutation of Rat Peripheral Blood Lymphocytes Induced by X-ray SHI Yan, LIU Wei, HOU Dian-jun et al. Institute of Radiation Medicine, Shandong Academy of Medicine Sciences, Jinan 250062, China

**【Abstract】** Objective To investigate the dose-response relationship of T-cell receptor from rat peripheral blood lymphocyte induced by X-ray. Methods Freshly isolated peripheral lymphocytes from rat were irradiated with X-ray ranged from 0 Gy to 3 Gy and cultured with phytohemagglutinin Concanavalin A and interleukin-2 27 days. The mutant frequencies of TCR gene were detected by flow cytometry. Results TCR genes mutation increases with the dose increase in the cultured rat lymphocytes 7 days and it exists favourable dose-response relationship. Data were found to be fitted out optimal by a quadratic polynomial dose-response model which could be described by regression equation:  $TCRMF = 1.615 + 9.979D + 1.712D^2$  ( $F = 146.781$ ,  $P < 0.01$ ,  $R_{adj}^2 = 0.864$ ). Conclusion The favourable dose-response relationship between TCRMf induced by X-ray and dose can be found from this study.

**【Key words】** TCR; Dose-response Relationship; Biological Dosimeter

TCR是T淋巴细胞表面的一种蛋白受体,由 $\alpha$ 、 $\beta$ 或 $\gamma$ 、 $\delta$ 双链组成,其双链只有与CD<sub>3</sub>分子结合成复合体后才能发挥生物学作用。由于功能上的单倍性,发生在有活性的TCR基因的单个突变即可导致表现型TCR突变体的产生,因此可通过检测CD<sub>3</sub>分子的表达情况来判断是否发生突变。TCR突变分析法具有采血量少、检测耗时短、反应灵敏等特点,已被众多学者用于评估人体辐射损伤的研究<sup>[1-3]</sup>,结果显示:TCR突变频率与照射剂量之间存在良好的剂量-效应关系。但此技术尚不成熟,未得到实际应用,需进一步深入研究。笔者参照Shikata<sup>[4]</sup>报道,采用培养法对分离的大鼠外周血淋巴细胞进行PHA、ConA、IL-2协同刺激培养,使TCR突变表型在7 d内得以表达,观察突变频率与照射剂量的关系,以探讨TCR突变技术作为生物剂量计的可行性,并为进一步深入的研究打下基础。

## 1 材料和方法

**1.1 动物及分组** 实验动物为健康Wistar大鼠,平均体重245~48 g,由山东大学实验动物中心提供;随机分成对照组和5实验组,每组8只。

**1.2 主要试剂** RPMI-1640培养基为美国GIBCO公司产品;HEPES 2-巯基乙醇、丙酮酸钠由Solarbio公司提供;重组人白介素-2购自长春长生基因药业股份有限公司;大鼠淋巴细胞分离液购自天津市津脉基因测绘技术有限公司;植物凝集素(IHA)购自广州医学工业研究所;刀豆蛋白(ConA)、异硫氰酸荧光素(FITC)标记的小鼠抗大鼠CD<sub>4</sub>抗体为美国Invitrogen公司产品;藻红蛋白(PE)标记的小鼠抗大鼠CD<sub>3</sub>抗体及非特异同型对照FITC标记的小鼠Ig<sub>2a</sub>、PE标记的小鼠Ig<sub>3</sub>均为美国Sigma公司产品。

基金项目:山东省自然科学基金(Y2007C151)

作者单位:山东省医学科学院放射医学研究所,山东 济南 250062

作者简介:石燕(1982~),女,在读硕士研究生。研究方向:辐射效应。

**1.3 照射条件** 采用clinac 23EX医用直线加速器照射,能量6 MeV,照射距离100 cm,剂量率200 cGy/min。照射剂量分别为0.0、5.0、7.5、1.0、2.0和3.0 Gy,照射过程中使细胞保持在(37±1)℃的恒温中。

**1.4 普通培养基的制备** 由RPMI-1640培养液(含L-谷氨酰胺)、2 g/L NaHCO<sub>3</sub>、25 mmol/L HEPES、20%灭活新生牛血清、50 μmol/L 2-巯基乙醇、1 mmol/L 丙酮酸钠及适量抗生素组成, pH值7.2。

**1.5 淋巴细胞刺激液的制备** 无菌取大鼠静脉血,基础培养基洗涤两次,按全血:培养液为0.5:4的浓度种于普通培养基中,同时加入2 μg/ml ConA和2.5 μg/ml PHA,于37℃、5% CO<sub>2</sub>培养箱中培养48 h,取上清液作为淋巴细胞刺激液。

**1.6 淋巴细胞的分离** 无菌取大鼠静脉血各2 ml,肝素抗凝,加入等量的生理盐水稀释,后缓慢加入到含有3 ml淋巴细胞分离液的刻度离心管中,2 000 离心15 min,吸取淋巴细胞, RPMI-1640洗涤两次,最后加入含普通培养基的12孔板中已照射。

**1.7 细胞照射与培养** 按上述照射条件照射,照后根据细胞数多少调节细胞密度,同时培养基中加入2 μg/ml ConA、2.5 μg/ml IHA、100 U/ml IL-2、20%淋巴细胞刺激液,置于37℃、5% CO<sub>2</sub>浓度的培养箱中培养,根据生长情况进行换液或传代7 d后收集细胞。

**1.8 TCR基因突变频率的测定**

**1.8.1 直接免疫荧光标记抗体** 收集细胞, PBS洗涤2次,调整细胞密度为 $1 \times 10^7$  /ml,各取细胞悬液100 μl加入两支试管,第一支加入异硫氰酸荧光素(FITC)标记的小鼠抗大鼠CD<sub>4</sub>抗体2.5 μl,藻红蛋白(PE)标记的小鼠抗大鼠CD<sub>3</sub>抗体1.25 μl,第二支FITC标记的小鼠Ig<sub>2a</sub>、PE标记的小鼠Ig<sub>3</sub>各10 μl作为非特异同型对照;4℃避光15 min, PBS洗涤2次,最后加入PBS重悬细胞。

**1.8.2 流式细胞仪检测** 采用Beckman coulter EPIC-XL型

流式细胞仪, 单光子激光光源, 波长 495nm。采用双参数模型, 设定淋巴细胞“门”, 每支试管样品收集细胞  $1 \times 10^5$  个, 按以下公式计算 TCR突变频率 ( $\times 10^{-4}$ ):

$$\text{TCRMF} = \frac{\text{CD}_3^- \text{CD}_4^+ \text{ 计数}}{(\text{CD}_3^- \text{CD}_4^+ \text{ 计数} + \text{CD}_3^+ \text{CD}_4^+ \text{ 计数})}$$

式中:  $\text{CD}_3^- \text{CD}_4^+$  为 TCR基因突变细胞表型,  $\text{CD}_3^+ \text{CD}_4^+$  为正常细胞表型。

1.9 统计学分析 采用 SPSS17.0 统计软件对 TCR突变频率进行检验, 拟合辐射剂量—效应曲线, 进行回归系数检验和拟合优度检验。

2 结果

2.1 不同剂量 X射线诱发大鼠外周血淋巴细胞 TCR基因突变频率的辐射剂量—效应关系 由表 1 可以看出, 大鼠淋巴细胞经不同剂量 X射线 (0~3 Gy) 照射, PHA、ConA、IL-2 协同刺激培养 7 d TCR基因突变频率随照射剂量的增加而增加, 各剂量组的 TCRMF 与对照组比较, 差异均有统计学意义 ( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ )。各剂量组间的比较亦具有统计学意义。TCRMF 与辐射剂量 D 之间的相关系数  $r$  为 0.927 相关系数检验  $P < 0.01$ 。这说明 TCR 突变频率与照射剂量之间存在良好的线性关系。

表 2 辐射诱发 TCRMF 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	$R^2_{adj}$
线性模式	$\text{TCRMF} = -0.523 + 15.254D$	280.956	0.856
二次多项式模式	$\text{TCRMF} = 1.615 + 9.979D + 1.712D^2$	146.781	0.864
指数模式	$\text{TCRMF} = 3.596 @^{99D}$	223.820	0.826
幂函数模式	$\text{TCRMF} = 12.382D^{-2.13}$	214.708	0.860

注:  $R^2_{adj}$  为校正的拟合指数, D 为辐射剂量; 回归系数显著性检验: 各式  $P < 0.01$

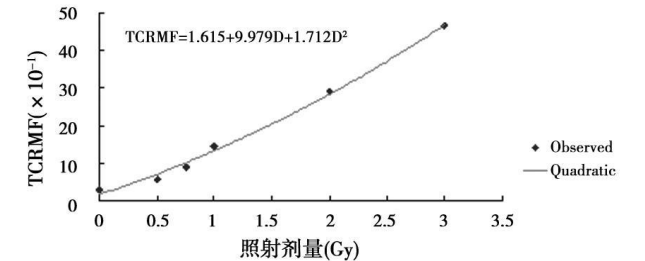


图 1 0~3 Gy 剂量范围二次多项式模式拟合曲线

3 讨论

随着分子生物学技术的广泛应用, 体细胞基因突变检测技术应用于生物剂量计得以迅速发展, 在一定程度上弥补了物理剂量估算的不足, 用于辐射生物剂量估算的体细胞基因突变包括 HPRT 基因、GPA 基因、TCR 基因等。对 TCR 基因而言, 由核辐射引起的及体外诱发人外周血淋巴细胞 TCR 基因突变的研究较多, 而对辐射诱发的大鼠淋巴细胞 TCR 基因突变及其辐射剂量—效应关系的报道较少。本文采用体外培养法对 X 射线诱发的大鼠 TCR 基因突变进行研究, 意在观察量—效关系是否存在, 并为进一步研究打下基础。

目前研究结果显示, 大鼠 TCR 基因突变频率随照射剂量的增加而增加, 突变率可由照射剂量 0 Gy 时的  $2.68 \times 10^{-4}$  增高到 3 Gy 时的  $46.65 \times 10^{-4}$ 。这与文献 [5] 报道的人 TCR 基因突变及文献 [6] 中小鼠的 TCR 基因突变与照射剂量间的关系一致。大鼠 TCR 基因突变频率与照射剂量间存在良好的剂量—效应关系, 利用 SPSS 软件拟合的最佳数学模型为二次多项式模式:  $\text{TCRMF} = 1.615 + 9.979D + 1.712D^2$ , 校正的拟合指数  $R^2_{adj}$  为 0.867。生物剂量计必备的条件之一就是具有较高的灵敏度, 且与照射剂量有较好的相关性, 本研究表明, X 射线诱发的 TCR 突变频率与照射剂量间存在显著的相关性 ( $r = 0.927$ ,  $P <$

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

照射剂量 (Gy)	n	TCRMF ( $\times 10^{-4}$ )
0	8	$2.68 \pm 0.98$
0.5	8	$5.47 \pm 2.58^{1)}$
0.75	8	$9.01 \pm 0.27^{2)}$
1.0	8	$14.52 \pm 3.22^{2)}$
2.0	8	$29.07 \pm 7.99^{2)}$
3.0	8	$46.65 \pm 12.46^{2)}$

注: 各剂量组与对照组的比较, 1)  $P < 0.05$  2)  $P < 0.01$ 。  
2.2 不同剂量 X 射线诱发大鼠 TCR 基因突变的辐射剂量—效应关系曲线的建立 X 射线照射诱发大鼠 TCR 基因突变频率均随照射剂量的增加而增加, 利用 SPSS 软件进行曲线拟合结果见表 2。相关系数的平方  $r^2$  是应变量 Y 的总变异中归因于 X 的部分, 又称为确定系数, 此即 TCRMF 的变异可由 D 来解释的百分数,  $r^2$  越接近于 1, 说明曲线拟合的越好。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,  $R^2_{adj}$  (校正的拟合指数) 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  $R^2_{adj}$  在 0~3 Gy 范围内, 拟合的最佳数学模型为二次多项式。图 1 为拟合的最佳数学模型曲线。

0.01), 这为后期的深入研究提供了前提。  
由于照射射线种类、剂量率、样本量、实验条件等原因, 不同文献报道的一定剂量照射后的 TCR 突变频率及拟合的量效曲线参数不尽相同, 但 TCR 基因突变频率均呈照射剂量依赖性增高的趋势。TCR 基因突变分析技术作为一种新的潜在的生物剂量测定方法, 还需要大量实验的反复验证才能得以应用。

参考文献:

[1] Taoka Y, Takeichi N, Noso Y, et al. Increased T—cell receptor mutation frequency in radiation—exposed residents living near the Semipalatinsk nuclear test site [J]. Radiat Res (Tokyo), 2006, 47 Suppl A: A179—181.  
[2] Vershenya S, Biko J, Drozd V, et al. Dose response for T—cell receptor (TCR) mutants in patients repeatedly treated with 131 I for thyroid cancer [J]. Mutat Res 2004, 548 (1—2): 27—33.  
[3] 刘长安.  $\gamma$  射线诱发培养淋巴细胞 TCR 基因突变的剂量—效应关系 [J]. 中国工业医学杂志, 2005 18 (1): 23—25.  
[4] Ishikawa N, Umeki S, Hirai Y, et al. Stimulated rapid expression in vitro for early detection in vivo T—cell receptor mutations induced by radiation exposure [J]. Mutant Res 1997; 390: 269—282.  
[5] 侯殿俊, 马娅, 刘伟, 等. X 射线诱发外周血淋巴细胞 TCR 基因突变研究 [J]. 中华放射医学与防护杂志, 2009 29 (2): 151—154.  
[6] Kunugi N, Mei N, Goncharova T, et al. Measurement of mutant frequency in T—cell receptor (TCR) gene by flow cytometry after X—irradiation on EL—4 mice lymphoma cells [J]. Toxicol Sci 2007; 32 (4): 377—386.

(收稿日期: 2009—12—02)