

- 10 Bradley JC. *Int J Oral Surg*, 1981; 10(suppl): 71-76
- 11 McGregor AD et al. *Br J Oral Maxillofac Surg*, 1989; 27: 371-374
- 12 Kluth EV. *J Prosth Dent*, 1988; 59(2): 195-201
- 13 Koka VN. *J Laryngol*, 1990; 104(4): 305-307
- 14 Marx RE. *Oral Surg*, 1988; 66(2): 177-178
- 15 Marunick MT. *Oral Surg*, 1989; 68(5): 582-585
- 16 Levendag PC. *J Prosth Dent*, 1990; 63(6): 665-670
- 17 Wong F et al. *Oral Surg*, 1988; 66: 176-178
- 18 Marx RE. *J Oral Maxillofac Surg*, 1983; 41: 351-357
- 19 Epstein JB. *J Oral Maxillofac Surg*, 1987; 45: 104-110
- 20 Berger RP. *J Oral Maxillofac Surg*, 1990; 48: 82-84
- 21 孙勇刚等. *中华口腔医学杂志*, 1989; 24(4): 194-196
- 22 Marx RE. *Oral Surg*, 1987; 64(4): 379-390
- 23 Dainbrain R. *Rev Stomatol Chir Maxillofac*, 1993; 94: 140-147
- 24 Aitasalo K. *Plast Reconstr Surg*, 1986; 77: 256-265
- 25 孙勇刚等. *中华口腔医学杂志*, 1989; 24(6): 343-346
- 26 孙勇刚等. *中华口腔医学杂志*, 1990; 25(1): 12-14

(收稿日期: 1994-07-25)

TCR 基因突变分析技术及其在辐射生物学中的应用

中国医学科学院放射医学研究所(天津, 300192) 陈振军 王知权 王继先综述

摘要:综述了 TCR 体细胞基因突变检测技术的原理、特点及其在生物剂量学中的应用。研究表明,对于急性受照,TCR 基因突变频率与受照剂量有明显的剂量效应关系;但 TCR 却不适于作为一终生生物剂量计以估算早先受照个体的受照剂量,对于长期慢性小剂量的受照情况,目前尚无明确的结论。

关键词:TCR 生物剂量计

随着核能的广泛应用,来自电离辐射的可能危害已受到人们的普遍关注,因此,正确估算个人受照剂量成为辐射生物学中急待解决的主要课题之一。采用物理方法准确估算剂量有时非常困难,存在着很大的局限性。因此,建立和发展能广泛应用的生物剂量计就变得日益迫切。

业已证明,体外培养淋巴细胞,检查其染色体畸变频率,在受照剂量估算中是一个非常好的生物学指标^[1],但识别、检测畸变的染色体费时费力,且需要很高的专业技术,不适于对受照群体进行快速、大规模的检测。近年来出现的体细胞基因突变分析技术^[2-5],克服

了染色体畸变分析的不足,成了辐射生物剂量学研究的新方向。新近建立的 TCR(T-Cell antigen Receptor)基因突变分析技术,便是其中一个很有发展前途的生物剂量计^[6-8]。

1 TCR 突变检测系统

1.1 TCR 的一般生物学特点

TCR 是外周 CD4、CD8T 淋巴细胞表面的一种蛋白受体,在对抗原的识别和由 T 细胞介导的免疫应答过程中起重要作用。TCR 本身为异质性二聚体,由 α 、 β 或 γ 、 δ 双链组成,其两对等位基因(α 、 δ)和(β 、 γ)分别位于 14 和 7 号染色体上。在正常的 T 细胞成熟过

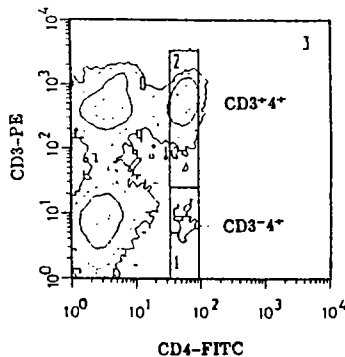
程中,类似于免疫球蛋白(Ig)基因,TCR 基因也进行一系列的分子重组。不同的 TCR 重组决定了 T 淋巴细胞对不同抗原的特异性。一般认为,在个体发育过程中,如 γ, δ 基因表达, α, β 基因处于关闭状态;如 α, β 基因开始表达, γ, δ 基因则关闭^[9]。有人^[10]认为这是一种等位性排除(allelic exclusion)现象,即每对等位基因中只有一个能够表达。因此,尽管 TCR 基因位于常染色体上,但却类似于女性中 X 染色体上的基因,在功能活性上呈单倍性。发生在有活性的 TCR 基因的单个突变,即可导致表现型 TCR 突变体的产生。TCR α, β 链只有在与另一蛋白质分子 CD3 结合,形成完整的分子复合体 TCR $\alpha\beta/CD3$ 后,才能被正常转运到细胞膜上。如 TCR α, β 基因中任何一个发生突变,所造成的有缺陷的 TCR $\alpha\beta/CD3$ 复合体就会因不能被正常转运到细胞表面而只能累积于细胞质中,这一点已在体外培养的 TCR 突变 T 细胞系的研究中得以证实^[11]。由于 TCR $\alpha\beta/CD3$ 复合体的完整性决定着 TCR α, β 基因在细胞表面的表达情况,可以通过检测 CD3 分子在细胞表面的存在与否间接研究 TCR α, β 基因在 T 细胞表面的表达情况,即 TCR 基因的突变频率(Mutation Frequency, MF)。不直接检测 TCR α, β 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。

1.2 TCR 流式细胞分析技术的检测原理

分离的外周血白细胞的体外染色由两种荧光抗体完成,一是由 FITC (Fluorescein isothiocyanate, 绿色荧光) 标记的 CD4 抗体——Leu3; 二是由 PE (Phycoerythrin, 红色荧光) 标记的抗 CD3 抗体——Leu4。经染色后,正常的 T 淋巴细胞(CD3⁺4⁺)的荧光表现整体上为桔红色(红+绿);而 TCR α, β 基因突变体 T 细胞(CD3⁻4⁺)的荧光表现则为绿色。监测前用 DNA 交联剂碘化丙啶(Propidi-

um iodide, PI) 染色,以去除其中死细胞的荧光信号干扰,PI 可对死细胞的胞核进行染色,从而使其红色荧光信号大大增强,使它们在分析图中远离其它细胞的信号峰。如图显示了 TCR 的流式细胞分析情况。

流式细胞仪所配备的计算机可同时记录三类荧光信号,图中窗口 1 收集突变细胞 CD3⁻4⁺ 的荧光信号。窗口 2 记录 CD3⁺4⁺ 细胞的荧光信号,窗口 3 收集所有细胞的荧光信号。TCR MF 可通过 1, 2 窗口记录的数值计算出来。



TCR 流式细胞分析原理图

2 TCR 分析系统的特点及应用

2.1 特点

作为一种新的辐射生物剂量计,TCR 分析技术与其他几种体细胞基因突变分析系统相比,有其独到的特点。

(1) 由于 TCR 分析技术测得的 TCR MF 较高(正常人平均 2.5×10^{-4}),要得到统计学上允许的最低 MF 所需要的样本血量较少(约为 1ml),而 HPRT(次黄嘌呤磷酸核糖转移酶)及 HLA(人类白细胞抗原)分析技术用量很大(约 10~20ml),虽然 GPA(Glycophorin A, 血红糖蛋白)分析技术用量也很少(约 1ml),但它所检测的红细胞在血中含量最为丰富,实测中所需的细胞数则很大。

(2) TCR 分析技术检测的淋巴细胞无需固定,因此分析时间大为缩短,仅约需 5 小时。

GPA 技术则需对红细胞进行繁琐的固定,耗时较长(至少2天);HPRT 及 HLA 分析技术所需时间就更长,因其依靠的克隆或集落形成需要至少2周的培养时间。

(3)TCR 技术对实验对象没有特殊限制,实验者可对检出的突变 T 细胞进行体外克隆扩增培养,再对 TCR 基因本身作进一步的研究。而 GPA 技术则仅限于 MN 血型杂合子个体,分析范围仅占人群的一半。另外,由于红细胞无核,故不可能对其突变细胞进行体外克隆扩增培养而做进一步的分析。

(4)TCR 技术测出的突变细胞,经分选后在荧光显微镜下鉴定,证明记录的荧光信号绝大多数来自具有绿色荧光的 CD3⁻4⁺ 细胞,且非常稳定,因而省去了 GPA 技术中的细胞分选过程,大大简化了实验程序。

2.2 TCR 分析技术的应用及存在的问题

自从 TCR 分析技术建立以来,人们已采用本法进行了许多研究,取得了可喜的成绩,同时也发现了 TCR 法本身固有的一些问题。对急性受照者的近期研究表明,其 TCR 基因 MF 显著增高,且有明显的剂量效应关系。Kyoizumi 等^[7]研究了18名经¹³¹I 治疗的甲状腺癌患者,他们在近5年内均接受过不同放射性活度的¹³¹I 药物治疗。结果表明:实验组 TCR 基因 MF 与¹³¹I 给药的放射性活度呈显著的线性剂量效应关系, $MF = 1.86 \times 10^{-4} + 0.30 \times 10^{-4}D$, $P < 0.001$,其中 D 为给药的¹³¹I 放射性活度。因研究中有些病人在受检时已距最后一次放疗5年之久,说明 TCR MF 在受照后一定时间内仍能保持相对稳定。Seyama 等^[12]采用 TCR 技术研究了9名切尔诺贝利核电站事故受照者,结果表明其 TCR MF 与用染色体畸变估算的受照剂量非常一致。另外有人用非稳定性染色体畸变(Cu)、TCR 和 HPRT 等三项指标研究了44例子宫颈癌或宫颈癌患者,这些患者都接受过 X 射线(线性加速器)5~6周的放射治疗,照射频度每周5天,剂量2Gy/天,照射总量50~60Gy,从采

血到最后一次放疗的时间不等(1~93个月)。结果表明:患者的 TCR MF 较正常值显著增高,且与 Cu 有很明显的相关关系($r = 0.83$, $P < 0.001$),而 HPRT 与 Cu 却无明显相关。作者还发现,TCR MF 与 Cu 随时间递减的速率非常相似。这些结果与 Umeki 等^[13]的研究结果很一致,后者也曾研究了 TCR 与 Cu 的关系,实验对象有切尔诺贝利核电站事故受照者、受过放疗的宫颈癌患者及钚造影患者。结果表明:后两组 TCR MF 与 Cu 呈正相关,而在切尔诺贝利核电站受照者,采用 TCR 与 Cu 估算的受照剂量非常一致。Umeki 等^[14]还研究了体外培养的外周淋巴细胞,作者发现经不同剂量的 X 射线照射后,TCR MF 有着明显的剂量效应关系, $MF = 7.3 \times 10^{-4}D + 6.2 \times 10^{-4}D^2$,其中 D 为照射剂量(Gy)。

对某些长期受慢性小剂量照射人员的研究表明,其 TCR MF 显著增高^[14]。如曾在30~50年代进行过钚造影的个体,由于当时所用的造影剂中放射性元素 Th 长期存留体内,而不断使其受到照射。对他们进行的 TCR 研究表明,其 MF 显著增高,但因缺乏当时的用药记录而无法得知其可能的剂量效应关系。与 TCR 相反,作者对同批患者的 GPA 位点突变分析却表明,杂合型突变细胞($M\phi + N\phi$)和纯合型突变细胞(MM)VF 与对照组相比,均无明显升高。这可能是由于放射性元素 Th 在受检者体内的不同分布造成的。有报道表明,在人和大鼠的脾脏及骨髓中²³²Th 及其子体的放射性活度明显不同,前者是后者的6~10倍,而这两个器官正好分别是 T 细胞及红细胞前体细胞的聚集组织,即脾脏中 T 淋巴细胞所受的照射剂量要比骨髓中红细胞前体细胞高得多^[15,16]。这一结果并不能说明 TCR 技术优于 GPA 技术,但在一定程度上显示了 TCR 分析技术对 GPA 分析技术的补充性。

对早先急性受照情况的研究表明,实验

组 TCR MF 并未显著增加。RERF(日本放射影研)对广岛、长崎两市342名原爆幸存者的研究结果表明:原爆43~45年后,其 TCR MF 与所估算的剂量(DS86)无明显剂量效应关系,且与远距离受照的低剂量对照组相比,也无明显的增高。这说明 TCR MF 不很稳定,受照者体内 TCR 突变细胞经过四十多年的不断衰减,到现在检查时,已恢复到正常的本底水平。有研究表明 TCR MF 的半衰期约为2年。体外培养的突变细胞的克隆扩增实验表明,CD3⁺4⁺突变细胞在体外的生长情况很差,其克隆形成能力仅相当于正常 CD3⁺4⁺细胞的1/5~1/8^[6]。故而推测,缺乏完整 TCR/CD3复合体的突变细胞在体内环境的自然选择过程中处于不利地位,随着时间的推移而被逐渐淘汰。从这一点来看,TCR 就不能做为一个终生的生物剂量计。另外,TCR MF 随受检个体年龄的增长而明显增高。正常人中,年龄每增长10岁,TCR MF 平均增加 0.3×10^{-4} ^[7],这可能是由于随年龄的增长,个体接触环境中有害因素的机会增多,而其自身的突变损伤修复能力却明显降低。TCR MF 还有明显的性别差异,男性的 TCR MF 显著高于女性。有关这一现象,目前尚无令人信服的解释^[16]。

TCR 分析技术还可用于临床,对免疫功能进行检测。因为 TCR/CD3复合体在抗原识别及 T 细胞活化过程中起重要作用。Kyoizumi 等^[6]对共济失调性毛细血管扩张(AT)及范可尼氏贫血(FA)患者的研究表明,这两类疾病都伴有 DNA 修复功能缺陷及 T 细胞免疫力低下,患者的 TCR MF 很高,对其进行的体外突变细胞克隆扩增的进一步研究显示,这些突变确实来自 TCR 基因本身的变异。

总之,对于急性照射的近期研究,TCR 是一非常好的生物剂量计;但由于其本身的限制,TCR 并不适合作为一个终生生物剂量计来估算早年受照个体的受照剂量;对于长

期慢性小剂量受照情况,目前尚无明确的结论。如能得知 TCR 突变细胞在体内的衰减规律,也可用它估算剂量作为参考。

参 考 文 献

- 1 Awa AA et al. *Cancer Res*, 1988; 35: 175-189
- 2 Langlois RG et al. *Hum Genet*, 1986; 74: 353-362
- 3 Kyoizumi S et al. *Cancer Res*, 1989; 49: 581-588
- 4 Nakamura N et al. *Prog Clin Biol Res*, 1991; 372: 341-350
- 5 Nishiya I et al. *Flow Cytometry and Image Analysis for Clinical Application*(Akiyama M et al). Amsterdam: Elsevier Science Publishers BV, 1992: 335-338
- 6 Kyoizumi S et al. *J Exp Med*, 1990; 74: 1981-1999
- 7 Kyoizumi S et al. *Mutat Res*, 1992; 265: 173-180
- 8 Umeki S et al. Somatic mutation at the TCR loci as a biological dosimeter of radiation-exposed people. In: *International Conference on Radiation Effects and Protection*, Tokyo, Japan Atomic Energy Research Institute, 1992: 151-154
- 9 Kyoizumi S et al. *Immunol Letters*, 1991; 29: 197-204
- 10 Kronenberg MG et al. *Annu Rev Immunol*, 1986; 4: 529-591
- 11 Clevers H et al. *Annu Rev Immunol*, 1988; 6: 629-662
- 12 Seyama T et al. *J Radiat Res*, 1993; 34: 45
- 13 Umeki S et al. *J Radiat Res*, 1993; 34: 45
- 14 Umeki S et al. *Jpn J Cancer Res*, 1991; 82: 1349-1353
- 15 Kaul A et al. *Health Phys*, 1978; 35: 113-121
- 16 Norimura T et al. *J Univ Occup Environ Health*, 1989; 11: 287-297
- 17 Dewey WC et al. *Radiation Research: A Twentieth-Century Perspective. Volume I*; Congress Proceedings(Akiyama M et al). San Diego: Academic Press, 1992: 177-182

(收稿日期:1994-06-28)