

苯接触工人外周血 T 细胞受体 TCR V β 亚家族基因多态性分析

陈嘉榆¹, 刘薇薇¹, 黄振倩¹, 巫进明¹, 陈少华², 杨力建², 李扬秋²

(1. 广州市第十二人民医院, 广东 广州 510620; 2. 暨南大学医学院血液病研究所, 广东 广州 510632)

摘要:目的 了解苯接触工人外周血 TCR V β 亚家族 T 细胞的分布及其克隆性, 寻找防治苯中毒的免疫指标。方法 采用 RT-PCR 扩增 6 例不同工龄低浓度苯接触工人外周血单核细胞的 TCR V β 24 个亚家族的互补决定区 3(CDR3), 产物进一步经基因扫描分析确定 T 细胞的克隆性, 并与 8 名健康人作对照。结果 8 名健康者表达全部 V β 亚家族, PCR 产物呈多峰图像(多克隆)。苯接触工人随工龄不同, 外周血损伤的情况不同而出现 V β 表达减少, PCR 产物出现寡克隆或双克隆改变。结论 低浓度苯接触工人的外周血 T 细胞的 TCR V β 亚家族表达出现限制性, 部分 V β 亚家族呈克隆性增殖, 可能由于苯损害 T 细胞而造成机体免疫的不同改变。该方法有望成为预防和诊治苯中毒的一项免疫指标。

关键词: TCR V β 基因; 基因扫描; T 细胞; 克隆性; 苯接触

中图分类号: R135.1; R114 文献标识码: A 文章编号: 1002-221X(2003)03-0148-04

Gene polymorphism of peripheral blood TCR V β subfamily in benzene-exposed workers

CHEN Jia-yu¹, LIU Wei-wei¹, HUANG Zhen-qian¹, WU Jin-ming¹, CHEN Shao-hua², YANG Li-jian², LI Yang-qi²

(1. Department of Internal Medicine, Guangzhou Municipal Twelfth People's Hospital, Guangzhou 510620, China; 2. Institute of Hematologic Diseases, Medical School of Jinan University, Guangzhou 510632, China)

Abstract; Objective To investigate the distribution and clonal efficiency of peripheral blood TCR V β subfamily in benzene-exposed workers thereby find out an immune index for the prevention and therapy of benzene poisoning. **Method** The complementarity determining region 3 (CDR3) of TCR V β with variable region genes in T cells from the mononuclear cells (MNC) of peripheral blood in 6 cases of low concentration benzene-exposed workers were amplified using RT-PCR, the products were further analyzed for identifying the clonal efficiency of T cells with genescan. As control, MNCs from healthy donors ($n=8$) were analyzed. **Result** 24 TCR V β subfamilies were all expressed in T cells from healthy donors, the PCR products showed multi-peak feature in genescan. Whereas, the number of expressed TCR V β subfamilies was obviously reduced in that of benzene-exposed workers with the time of benzene exposure and the injury of hemopoietic function. Oligoclonal and biconal phenomena in T cells from benzene-exposed workers could be seen by genescan. **Conclusion** The restricted expression of TCR V β subfamilies was found in T cells from low concentration benzene-exposed workers and there was some clonal expansion of partially TCR V β subfamilies which might be a specific immune response after T cells damaged by benzene. This change probably becomes a helpful immune index to the prevention and therapy of benzene poisoning.

Key words: TCR V β gene; Genescan; T cell; Clonality; Benzene exposure

苯引起白细胞减少、再障、白血病已众所周知, 但其致病的原因仍是目前探索的问题。我们利用基因扫描方法分析 T 细胞受体 (TCR V β) 基因 24 个亚家族的互补决定区 3 (CDR3) 的长度, 了解苯接触工人各亚家族 T 细胞的分布和克隆性特点, 并与正常人作对比, 以了解苯对免疫功能的影响。

1 材料与方法

1.1 受检对象

选取 6 例苯作业工人 (男 4 人, 女 2 人), 年龄

20~67 岁。均来自同一工厂, 工种为擦胶工、开机工, 其中工龄 < 1 年 1 例, > 1 年 2 例, > 5 年 2 例, > 10 年 1 例。进厂时体检均健康。车间空气苯浓度 0.88 mg/m³, 属低浓度苯接触。每天工作 7.5~8 h。同时选 8 名健康人作为对照。

1.2 方法

1.2.1 苯作业及对照者同时进行外周血细胞分类计数、CD4⁺、CD8⁺ 测定及外周血单个核细胞分离, RNA 提取及 cDNA 合成均按常规方法进行。

1.2.2 反转录-多聚酶链反应 (RT-PCR) 据 V β 24 个亚家族基因设计相应的 24 个 V β 特异性上游引物并在 C β 区设 C β 下游引物, 另外, 在 C β 引物的左侧分别设一荧光素标记的 C β -Fam 引物 (C β -Fam 5'-Fam

收稿日期: 2002-12-12; 修回日期: 2003-02-18

基金项目: 广东省医学科学技术研究基金课题 (A2001602)

作者简介: 陈嘉榆 (1949-), 男, 广州市人, 副主任医师, 主要从事职业因素对血液损伤的临床研究。

CACAGCGACCTCGGGTGGG) 和一生物素标记的 C_β-Bio 引物 (C_β-Bio 5'-Bio-CACAGCGACCTCGGGTGGGAA), 供基因扫描和序列分析之用^[1]。引物由德国柏林 TIB 生物公司合成。PCR 操作按常规方法进行。总反应体积为 25 μl, 其中含 1 μl cDNA, 0.1 mmol/L dNTP (dATP, dCTP, dGTP 和 dTTP), 任一 V_β 和 C_β 引物的浓度均为 0.5 μmol/L, 1.25 U Taq 聚合酶, 所用试剂均为 Perkin Elmer 公司产品。共进行 40 个循环: 94 °C, 1min (首次 3 min); 60 °C, 1 min; 72 °C, 1 min (末次 10 min); 结束后保存于 4 °C 中, 各反应均设阳性和阴性对照, 产物于质量分数 2.5% 琼脂糖中电泳分析。每一受检对象分别以一 V_β (1~24) 与 C_β 引物共进行 24 次 PCR 检测。

1.2.3 T 细胞克隆性 (CDR3 长度) 分析

1.2.3.1 标记 PCR 产物 (runoff reaction) RT-PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳分析出现阳性带者, 进一步经引物 C_β-Fam 进行不对称 PCR 扩增, 以得到荧光素标记的单链 PCR 产物, 总反应体积为 10 μl, 含 2 μl 首次 PCR 产物, 0.1 μmol/L C_β-Fam, 3 mmol/L MgCl₂, 0.2 mmol/L dTNP, 0.25 U Taq 聚合酶, 反应共进行 35 个循环, 退火温度由 60 °C 改为 66 °C, 其余同前。

1.2.3.2 基因扫描 (genescan) 分析 取荧光素 (fam) 标记的产物 1 μl, 加入 2.5 μl 甲酰胺, 0.5 μl 标准品 (ABI GENESCAN 500 TAMRA, 其中含有不同大小的用荧光素 Tamra 标记的 DNA 片段) 及 0.5 μl 加样缓冲液 (含葡聚糖蓝 50 mg/ml 和 EDTA 25 mmol/L), 94 °C 变性 4 min 后于质量分数 6% 聚丙烯酰胺凝胶, 373A DNA 序列分析仪 (ABI, Perkin Elmer 公司) 中电泳及分析结果。通过软件 672 (基因扫描) 分析, 激光扫描及计算机收集电泳过程中不同时间所出现的不同强度和颜色的荧光素, 而显示出不同位置、高度、颜色和形态的峰。峰的位置、高度和形态分别表示产物的量和均一性。峰的形态可表现为单峰、一主峰及个别矮峰或多峰图像,

表 2 6 例苯接触工人和正常人 TCR V_β 分布及克隆性特点

受检者	工龄 (年)	WBC (× 10 ⁹ /L)	亚 家 族 名 称																								
			V ₁	V ₂	V ₃	V ₄	V ₅	V ₆	V ₇	V ₈	V ₉	V ₁₀	V ₁₁	V ₁₂	V ₁₃	V ₁₄	V ₁₅	V ₁₆	V ₁₇	V ₁₈	V ₁₉	V ₂₀	V ₂₁	V ₂₂	V ₂₃	V ₂₄	
正常人群			全 部 为 poly																								
例 1	0.8	8.3	poly	poly	poly	poly															poly	poly					
例 2	1.5	4.0	oligo	poly	poly	ot					poly			ot	poly	oligo	poly	poly	poly	poly	poly	poly				poly	li
例 3	4.5	3.3	bi	poly	bi	poly															poly	poly					
例 4	7.0	2.9	bi	poly	poly	poly															poly	oligo	oligo				
例 5	7.0	5.1	poly	poly	poly	poly	poly				ot			poly	poly	poly	poly			oligo	poly	poly				poly	
例 6	19.0	4.1	poly	poly	oligo	poly	poly							poly	oligo	oligo					poly	poly				poly	

注: poly—多克隆, oligo—寡克隆, bi—双克隆, ot—寡克隆趋势。

分别表示产物中所含的 DNA 片段大小相同、绝大多数 DNA 片段大小相同或 DNA 片段大小不一。这 3 种情况分别提示产物来自单克隆、寡克隆和多克隆的 T 细胞^[1]。

2 结果

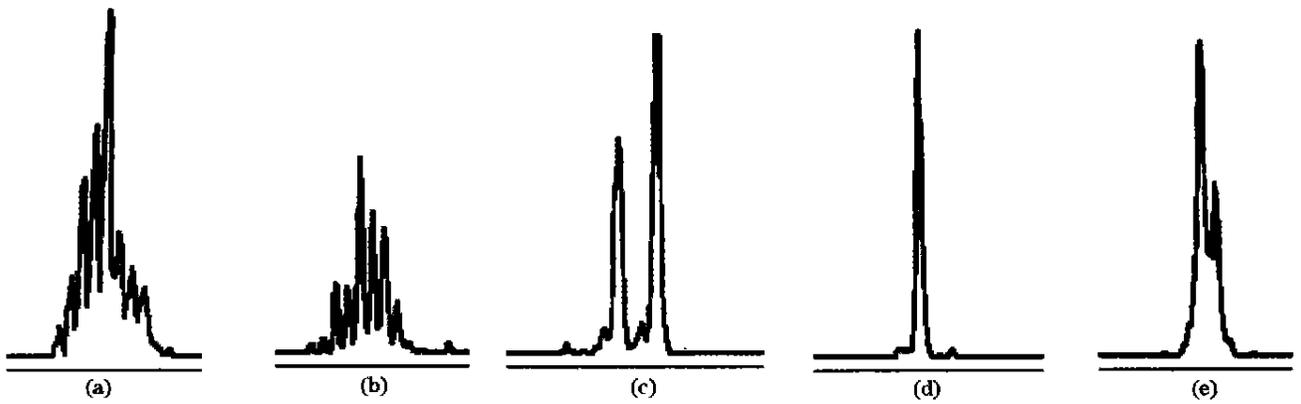
2.1 受检人员血液学检查结果 (见表 1)

表 1 苯接触工人及正常对照者的血液学情况

受检对象	WBC (× 10 ⁹ /L)	Hb (g/L)	PLT (× 10 ⁹ /L)	CD ₄ ⁺	CD ₈ ⁺
例 1	8.3	133	145	53.84	19.51
例 2	4	140	141	38.87	37.53
例 3	7.1	99	33	21.43	59.37
例 4	2.9	106	110	44	64.52
例 5	5.1	140	113	40	37.5
例 6	4.1	128	225	29.47	18.28
对照 1	5.6	135	152	59.69	39.53
对照 2	5.4	138	145	50	32.85
对照 3	6.1	140	158	52.63	36.15
对照 4	6.2	142	151	48.71	32.28
对照 5	5.8	139	153	47.06	37.5
对照 6	5.2	140	148	51.72	34.4
对照 7	5.4	140	162	44.6	36.3
对照 8	6.3	143	171	53.22	39.44

2.2 6 例工人 TCR V_β 亚家族的表达情况 (表 2、图 1)

8 例正常人外周血表达全部 V_β 亚家族 T 细胞, 呈多峰图像, 即多克隆性。6 例苯接触人员与正常人相比, 其表达情况有所不同。表现为: (1) 6 例苯接触人员在 V₄、V₈、V₉、V₁₀、V₁₂、V₂₄ 均不表达; (2) 接触工龄 < 1 年且血象没有改变者, 除表达减少外, 全部以多克隆形式表达 (见例 1)。 (3) 接触工龄 > 1 年, 外周血白细胞在 4.0 × 10⁹/L, 除表达减少外, 还表现出寡克隆、双克隆和寡克隆趋势改变; 而出现血小板或白细胞减少的工人, 可见在 V_β 1 中为双克隆和寡克隆的表达 (见例 2、3、4)。 (4) 在无血常规改变时 (例 1、5), 前 10 个 V_β 均为多克隆表达, V₄、V₇~₁₀ 均不表达。



图(a)、(b) 正常人多克隆表达图型; 图(c) 例4 $V_{\beta}1$ 表达产物呈双克隆图型; 图(d) 例4 $V_{\beta}20$ 表达产物呈单克隆图型; 图(e) 例2 $V_{\beta}5$ 表达产物呈单克隆趋势图型

图1 受检者 TCR V_{β} 亚家族表达情况

3 讨论

3.1 目前诊断苯中毒仍停留在细胞学形态检查, 寻找客观预防和诊治的指标更显著。近年研究表明, 苯对人体血液系统的损伤, 其原因之一是通过抑制 T 淋巴细胞的增殖而损伤机体的免疫功能^[3,4], 因此找寻 T 细胞受损的依据, 可望作为监测苯作业工人预防中毒的一项指标。国内外近年对 T 细胞的研究进展很快, 并证实 TCR(T 细胞受体) 包含 TCR α 、 β 、 γ 、 δ 4 种多肽链, 它由可变区(V 区)、高变区(D 区)、结合区(J 区)和恒定区(C 区)4 部分基因片段编码而成。在 T 细胞发育过程中 V 区、D 区和 J 区进行完全重排而形成具有功能的 TCR 基因。重排过程中, V 区和 D 区之间、D 区和 J 区之间可存在不同数量的碱基对, 称为 N 区; 此外, D 区重排时可形成一个可变的区域, 称之为互补决定区 3(CDR3)^[2,4], 不同克隆 T 细胞 TCR 重排时 CDR3 的长度和碱基序列有所不同, 这就是 TCR 特异的识别抗原的区域和特异性。而人体外周血 T 细胞主要携带 TCR α/β 的 T 细胞。已报道 V_{β} 区有 24 谱系(亚家族), 即 $V_{\beta} 1 \sim 24$ ^[5,6], 利用其特性可精确分析不同 TCR V_{β} 亚家族 T 细胞的表达和克隆性, 以了解 T 细胞的功能状况。由于正常人的 T 细胞 β 基因重排是随机的, 故其外周血 T 细胞表达具有多家族、多克隆的特点, 能够表达所有 24 个 V_{β} 亚家族 T 细胞, 这也是机体正常情况下具有各种功能 T 细胞的一种完整的免疫功能状态^[8]; 当出现缺失时, 表明 T 细胞部分功能缺乏^[7], 本次受检的 8 例正常人 TCR V_{β} 24 个亚家族为多克隆的全表达, 结果与文献一致。

3.2 6 例苯接触工人 TCR V_{β} 亚家族的基因表达减少, 即使接触苯 9 个月, 且没有出现血液学改变者(例 1), 也可见在 V_4 、 V_8 、 V_9 、 V_{10} 、 V_{12} 、 V_{24} 出现不表达的情

况, 可能由于接触苯这一特殊抗原刺激引起 TCR 特异重排, 机体产生优势的克隆性 T 细胞而影响其他亚家族 T 细胞的表达所致; 也可能是机体免疫功能受到影响的缘故, 如骨髓移植后的病人在其免疫功能重建未健全时, 可表现为部分亚家族 T 细胞的表达缺乏^[7]。
3.3 出现血液学改变的工人 $V_{\beta}1$ 呈单克隆或双克隆表达, 另外, 在 $V_{\beta} 1 \sim V_{\beta} 10$ 之间出现双克隆或寡克隆改变时, 苯作业工人血象均有不同程度的改变(例 2、3、4), 这是否为苯接触的特异性改变, 尚需寻找更多的病例来证实。在例 3、例 4 可见, 有 $CD4^+$ 和 $CD8^+$ 比例倒置及血象异常者, TCR V_{β} 除表达减少外, 还出现 V_1 双克隆改变, 在其他免疫性血液疾病中也可见有相应的克隆性 T 细胞的表达^[9], 这是否为苯接触后 T 细胞受损的一个免疫学的改变反应, 亦需进一步观察。

由于此次分析例数尚少, 且未作再障和白血病的病例分析, 仅从现有 6 例资料中观察到低浓度接触苯的工人外周血中 T 细胞亚家族的改变有异于正常人; 在 $V_{\beta}1$ 中出现双克隆或单克隆时接触者表现出血象异常, 这是一个较有倾向性的改变, 但有待于积累资料进一步探讨。总之, 本研究分析了苯接触工人外周血 TCR V_{β} 各亚家族 T 细胞的分布特点和克隆性改变的情况, 补充了苯接触后机体 T 细胞变化的有关资料, 为建立苯接触和苯中毒的细胞免疫诊断指标和易感性分析提供了基础研究资料。

参考文献:

[1] Puisieux I, Even J, Pannetier C, et al. Oligoclonality of tumor-infiltrating lymphocyte from human melanomas[J]. Immunol, 1994, 153: 2807.
[2] 李扬秋, 汪明春, Sieger W, et al. 利用基因扫描分析 TCR V_{β} 亚家族 CD3 长度的方法检测 AML 的 T 细胞克隆性[J]. 肿瘤, 1997, 17: 435.
[3] Li Q, Kasten Jolly J, Yen Y, et al. Reversal of hydroquinone-mediated suppression of T cell proliferation by transfection of the M₂ subunit of ribonur

cleotide reductase[J]. Toxicol Appl Pharmacol 1998, 150(1): 154.

[4] Farris GM, Robinson SN, Wong BA, et al. Effects of benzene on splenic, thymic & femoral lymphocytes in mice[J]. Toxicology, 1997, 118(2-3): 137.

[5] Jorgensen JL, Esser U, Gorth BF, et al. Mapping T cell receptor-peptide contacts by variant peptide immunization of single-chain transgenics[J]. Nature, 1992, 335: 224-230.

[6] Wilson RK, Lai E, Concannon P, et al. Structure, organization and polymorphism of murine and human T cell receptor α and β chain gene families[J]. Immunol Rev, 1988, 100: 149-172.

[7] Ferradini, Roman S, Azocar J, et al. Studies on the human T cell receptor α/β variable region gene. II. Identification of four additional $V\beta$ subfamilies [J]. Eur J Immunol 1991, 21: 935-942.

[8] 陈少华, 李扬秋, 杨力建, 等. 脐血中 TCR $V\beta$ 亚家族 T 细胞的分布和克隆性分析[J]. 中国病理生理杂志, 2002, 18(6): 662-665.

[9] 李扬秋. 应用 TCR $V\beta$ 基因谱分析血液病与免疫性疾病的 T 细胞克隆性[J]. 中国实验血液学杂志, 1999, 7(3): 182.

° 事故报道 °

一起炊事员铅中毒事故的调查

A survey on an accidental poisoning by lead

潘宝忠, 相 葵

(泉州市卫生防疫站, 福建 泉州 362000)

蓄电池业铅污染和用铅壶温酒饮服引起的铅中毒屡见报道, 而食堂炊事员铅中毒却极为罕见。本文将某蓄电池厂食堂炊事员发生铅中毒的调查结果报告如下。

1 现场调查

某蓄电池有限公司于 1994 年建厂投产, 现有员工 976 人, 厂区与生活区分开, 食堂位于生活区内, 食堂、单身宿舍和伙房东南面与厂电解车间仅距离 8 m, 食堂的西南面与组装车间相邻, 相距约 6 m。食堂共有员工 7 人, 男 4 人, 女 3 人, 均无铅作业史和接触史, 饮用水为自来水。

2 方法与结果

2.1 空气铅浓度测定

用宏伟 FC-80 型粉尘采样器在伙房、食堂、单身宿舍、电解车间、组装车间各采集空气 100 L, 用火焰原子吸收分光光度法进行测定, 结果见表 1。

表 1 空气铅质量浓度测定结果 mg/m³

采样点	质量浓度	超标倍数
组装车间	1.8	35
电解车间	1.0	19
伙 房	0.10	1.0
食堂宿舍	0.11	1.2

由表 1 可见, 与炊事员相关的伙房和食堂宿舍内的铅烟、铅尘均超过国家最高容许浓度(铅尘 0.05 mg/m³)。

2.2 饮用水及相关物品铅含量测定

为确切掌握炊事员铅中毒的有关情况, 我们采集饮用水和食堂抹布 250 g、员工上衣 1 件, 同时于非铅作业厂食堂采取抹布 250 g 和员工上衣 1 件, 分别置于容桶内用 5 L 水浸泡 30 min 后搓洗, 分别取洗涤水用火焰原子吸收分光光度法进行测定, 结果见表 2。

表 2 样品铅含量测定结果

组别	mg/L			
	开水	自来水	抹布洗涤水	上衣洗涤水
样品	0.04	0.03	11.20	3.40
对照	0.03	0.03	0.05	0.06

结果显示 2 份水样含铅量均未超过国家饮用水标准。而炊事员所使用的抹布和上衣洗涤水铅含量分别达 11.2、3.4 mg/L, 提示食堂用品铅污染严重。

2.3 体检

对 7 名炊事员按铅作业职业性体检进行检查, 结果显示血铅 0.32 ~ 1.20 mg/L, 平均为 0.66 mg/L, 0.5 mg/L 以上的有 4 人; 尿粪卟啉(++) 1 人, (+) 5 人; 轻度贫血 1 人。结合血铅、体征等, 最后经市职业中毒诊断组诊断为慢性轻度铅中毒 1 人, 铅吸收 3 人。

2.4 典型病例

患者, 男, 30 岁, 1999 年 6 月进厂任炊事员, 无铅接触史和既往史。2000 年 8 月 24 日因脐周时有疼痛、乏力、四肢酸痛就诊于我站职业病门诊。实验室检查: 血铅 1.2 mg/L, 血红蛋白 110 g/L, 白细胞 $4.4 \times 10^9/L$, 尿粪卟啉(++), 诊断为慢性轻度铅中毒。经注射质量分数 20% 依地酸二钠钙和口服金维他后症状缓解。治疗 3 个疗程后, 自觉良好, 一星期后查血铅 0.36 mg/L, 继续治疗 1 疗程后, 血铅降至 0.14 mg/L。

3 讨论

调查结果表明, 某蓄电池厂的铅污染已严重影响到生活区, 由于食堂位于生产车间的下风侧及相距太近等原因, 伙房和食堂单身宿舍内空气中铅浓度分别超标 1 倍以上; 食堂抹布和员工上衣铅含量分别是对照组的 223 倍和 55.7 倍, 足以说明蓄电池厂的铅尘、铅烟对食堂污染的严重程度。按 GB11659-89《铅蓄电池厂卫生防护距离标准》要求, 蓄电池厂与居住区相距至少应在 400 m 以上, 该蓄电池厂的食堂与生产车间相距仅 6~8 m, 是造成食堂炊事员铅中毒的主要原因; 另外, 不排除个人卫生意识差等因素影响。厂方在治理车间铅污染的同时, 也应尽快搬迁厂食堂, 并做好食堂员工的个人卫生宣传教育工作。

收稿日期: 2002-02-19; 修回日期: 2002-05-21

作者简介: 潘宝忠 (1953-), 男, 福建泉州人, 副主任医师, 从事劳动卫生工作。