文章编号:1000-5404(2009)14-1399-02

短篇论著

铅接触及铅中毒工人外周血T细胞CD3ζ基因的表达特点

刘思初[1*],潘焕玉[1*],徐 媛[1*],李 菏[1],杨力建[1],刘薇薇[2],陈嘉榆[3] ([1]暨南大学医学院血液病研究所,广州 510632;广州市第十二人民医院:[2]职业病科,[3]血液科,广州 510620)

摘 要:目的 了解铅接触及铅中毒工人外周血中T细胞信号传导分子CD3ζ基因表达水平,为铅接触和铅中毒工人免疫系统损害的机制提供资料。**方法** 利用SYBR GreenⅠ荧光定量PCR分别检测10例铅接触工人、6例铅中毒工人和20例正常人外周血单个核细胞的CD3ζ基因表达情况,以β2微球蛋白基因(β2M)作为内参,根据相对定量公式($2^{-\triangle Ct}$)计算铅接触、铅中毒工人与正常人CD3ζ基因表达水平差异。**结果** 正常人、铅接触和铅中毒工人外周血CD3ζ基因表达水平分别为(3.01±2.11)、(11.4±13.3)和(2.42±3.01)。与正常人相比,铅接触工人外周血CD3ζ基因表达上升($P<0.05$)。与铅接触工人相比,铅中毒工人CD3ζ基因表达下降($P<0.05$)。**结论** 铅接触及铅中毒工人中外周血T细胞CD3ζ基因表达异常,提示机体接触铅后T细胞活化过程存在障碍。

关键词: 铅;CD3ζ基因;实时定量PCR

中图法分类号: R392-33;R394.2;R595.2 **文献标识码:** A

铅是一种重要的工业原料,也是环境污染物。慢性铅中毒可引起神经、消化、血液等系统损伤[1-3]。铅中毒后T淋巴细胞亚群免疫活性降低[4]。本研究通过对T细胞活化过程中最重要的信号传递分子之一CD3ζ基因进行定量分析,以期进一步了解接触铅及铅中毒工人细胞免疫功能缺陷的原因。

1 资料与方法

1.1 临床资料

采集接触铅工人外周血标本10例,全部为男性,年龄25~48(32.7±7.2)岁,工龄平均6.96(0.5~23)年;铅中毒工人外周血标本6例,其中男性5例,女性1例,年龄33~40(36.0±2.5)岁,工龄平均7.65(2~27)年;健康体检者外周血标本20例,其中男性14例,女性6例,年龄23~45(30.7±9.45)岁。所有标本由广州市第十二人民医院提供。接触铅及铅中毒工人均有职业接触铅史。

1.2 方法

1.2.1 RNA提取和cDNA合成 按常规方法分离抗凝外周血标本中单个核细胞。RNA提取应用TRIzol试剂盒,并应用随机引物和反转录酶试剂合成cDNA。

1.2.2 引物设计 CD3ζ基因上游引物:5′-GCCAGAACCAGCTCTATAAC-3′,下游引物:5′-TAGGCCTCCGCCATCTTATC-3′,扩增目的片段长度166 bp[5]。β2M内参上游引物:5′-TACACTGAATTCACCCCCAC-3′,下游引物:5′-CATCCAATCCAAATGCGGCA-3′,扩增目的片段长度145 bp。

1.2.3 扩增效率一致性检测 将Jurkat细胞cDNA倍比稀释,分别以1、10^{-1}、10^{-2}、10^{-3}、10^{-4}、10^{-5}和10^{-6}的Jurkat细胞cDNA为模板,进行实时定量PCR检测CD3ζ基因和β2M基因扩增效率是否一致。

1.2.4 SYBR GreenⅠ实时定量PCR 每一标本分别进行CD3ζ基因和β_2M基因检测。总反应体积为25 μl,包括2.5×RealMastrMix 11.25 μl,0.4 mmol/L上、下游引物以及1 μl cDNA。在95 ℃、2 min变性后,共进行45个循环扩增,每一循环包括95 ℃ 15 s,62 ℃ 1 min,80 ℃ 1 s。并在80 ℃和82 ℃ 2次读板。

1.2.5 PCR产物分析 对熔解曲线进行分析,同时进行20 g/L琼脂糖凝胶电泳,以确定产物是否为所扩增的目的片段。

1.2.6 CD3ζ基因相对定量分析 以β2M为内参照,利用实时定量PCR获得的CD3ζ基因和β2M基因Ct值,采用相对定量法($2^{-\triangle Ct}\times100\%$[6],$\triangle Ct=Ct_{CD3\zeta}-Ct_{\beta2M}$)计算铅接触、铅中毒工人与正常人CD3ζ基因表达的相对量。

基金项目: 国家自然科学基金(30424003);暨南大学2008年国家大学生创新性实验计划项目(081055911);暨南大学第四批本科生科技创新工程项目(cx08092);暨南大学2008年挑战杯大学生课外学术科技创新活动研究项目

Supported by the National Natural Science Foundation of China (30424003), the 2008 National Experimental Program for Undergraduates of Jinan University, the Innovation Program for Fourth Batch of Undergraduates of Jinan University (cx08092) and the Project of the "2008 Challenge Cup" Extracurricular Sci & Tech Innovation Activity of Jinan University

作者简介: 刘思初,女,广东省广州市人,暨南大学医学院临床医学系2005级本科生。电话:(020)38214418,E-mail:lsc_csl@163.com

*:同等贡献者

通信作者: 李 菏,电话:(020)85220262,E-mail:libo517@hotmail.com

收稿日期: 2008-09-20;**修回日期:** 2008-10-21

1.3 统计学分析

采用 SPSS 13.0 统计软件进行 t 检验。

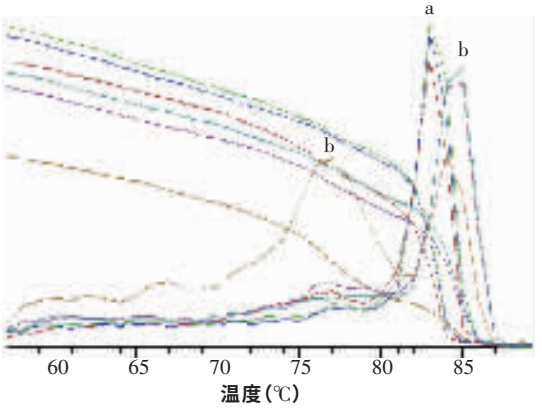
2 结果

2.1 扩增效率一致性分析

以 Jurkat 细胞株 cDNA 的 log 值作为横坐标，ΔCt 作为纵坐标，得出直线的斜率为 0.015，R = 0.179，说明 CD3 ζ 基因和 β2M 基因的扩增效率一致。

2.2 PCR 产物的确定分析

2% 琼脂糖凝胶电泳分析显示 PCR 产物片段大小正确。标本的 β2M 基因产物熔解曲线峰值均在 83 ℃，正常人 CD3 ζ 基因产物熔解曲线峰值均在 85 ℃，其中 1 例铅中毒工人 CD3 ζ 基因产物的熔解曲线有杂峰出现（图 1）。



a:β2M 熔解曲线；b:CD3 ζ 熔解曲线

图 1 铅接触及铅中毒工人熔解曲线

2.3 CD3 ζ 基因在铅接触及铅中毒工人外周血中的表达

正常人 CD3 ζ 基因表达水平为(3.01 ± 2.11)，铅接触工人 CD3 ζ 基因表达水平(11.4 ± 13.3)则明显上升，两组间有显著性差异($P < 0.05$)。1 例铅中毒工人 CD3 ζ 基因未检出，5 例铅中毒工人外周血 CD3 ζ 基因表达水平为(2.42 ± 3.01)，与正常人相比表达下降；与铅接触相比，铅中毒工人 CD3 ζ 基因表达下降，并且两组间有显著性差异($P < 0.05$)。

3 讨论

既往对铅细胞免疫毒性的研究多集中在各 T 细胞亚群的变化上，而对其相关机制研究不多。研究表明，铅通过影响 DNA 的合成直接抑制 T 淋巴细胞的功能[7]。

作为细胞免疫的主要成分 T 淋巴细胞，其活化与增殖依赖于 TCR 与 CD3 的相互作用。TCR/CD3 复合物中 CD3 分子含 γ、δ、ε、ζ 或 γ、δ、ε、ζ、η 链。CD3 ζ 链的细胞质区有 3 个 ITAM 基序，介导 TCR/CD3 信号传导，在细胞内外的跨膜信号级联传递过程中起着关键性中介作用。血液肿瘤患者和苯中毒工人中均发现 CD3 ζ 基因表达发生变化[8,9]。但在铅接触、铅中毒工人中细胞免疫功能缺陷是否与 CD3 ζ 基因表达水平变化有关，目前尚少见相关报道。

本研究结果显示，铅接触工人 CD3 ζ 基因表达水平与正常人相比，表达明显上升。铅接触工人外周血 CD3 ζ 基因表达上升可能因为与低浓度铅接触后，可以增强 $CD4^+$ T 细胞的增殖作用[10]。T 淋巴细胞的增殖与活化的增强，相应地可引起 CD3 ζ 基因表达水平上升。而在铅中毒工人 CD3 ζ 基因表达的缺失和下降必然引起机体免疫系统功能缺陷。

参考文献：

[1] 李华强，曾小奇，王正虹. 重庆市两所幼儿园儿童血铅水平调查及相关因素的分析[J]. 第三军医大学学报，2003，25(22)：2043－2045.

[2] 蔡贵实，朱秀芳. 职业性铅中毒的预防和治疗[J]. 亚太传统医药，2008，4(10)：59－60.

[3] 郭新景，何天有，郭廷瑞，等. 某油脂化工厂铅作业人员健康情况调查[J]. 河南预防医学杂志，2008，19(5)：342－343.

[4] 蒋玉红，刘 凯，王 涛，等. 铅中毒儿童外周血 T 淋巴细胞免疫活性改变及临床意义[J]. 中国儿童保健杂志，2006，14(5)：520－521.

[5] Atkinson T P，Hall C G，Goldsmith J，*et al*. Splice variant in TCRzeta links T cell receptor signaling to a G-protein-related signaling pathway[J]. Biochem Biophysi Res Commun，2003，310(3)：761－766.

[6] Stams W A，den-Boer M L，Beverloo H B，*et al*. Sensitivity to L-asparaginase is not associated with expression levels of asparagine synthetase in t(12;21) + pediatric ALL[J]. Blood，2003，101(7)：2743－2747.

[7] 金海丽. 铅毒性的研究进展[J]. 广东微量元素科学，2004，11(10)：9－14.

[8] 李 茁，李扬秋，杨力建，等. 接触苯及苯中毒工人外周血 T 细胞中 CD3ζ 基因的表达与分析[J]. 细胞与分子免疫学杂志，2007，23(5)：447－449.

[9] 陈 思，李扬秋，陈少华，等. 急性髓细胞性白血病病人 TCRζ 链基因表达特点[J]. 循证医学，2007，7(1)：54－57.

[10] Farrer D G，Hueber S，Laiosa M D，*et al*. Reduction of myeloid suppressor cell derived nitric oxide provides a mechanistic basis of lead enhancement of alloreactive $CD4^+$ T cell proliferation[J]. Toxicol Appl Pharmacol，2008，229(2)：135－145.

（编辑 王 红）