

实时定量 PCR 分析 CML 患者胸腺近期输出功能

耿素霞¹, 李扬秋¹, 杨力建¹, 陈少华¹, 韩素芳¹, 周羽斌², 陈青山³

Recent Thymic Output Function in Patients with Chronic Myelogenous Leukemia by Real Time PCR Analysis

GENG Su-xia¹, LI Yan-qiu¹, YANG Li-jian¹, CHEN Shao-hua¹, HAN Su-fang¹, ZHOU Yu-bing², CHEN Qing-shan³

1. Institute of Hematology, Medical College of Jinan University, Guangzhou 510632, China; 2. Dept. of Biochemistry, 3. Dept. of Epidemiology

Abstract: Objective To quantitatively analyze the T-cell receptor excision DNA circles (TREC) in CD3⁺, CD4⁺ or CD8⁺ T cells, evaluating the thymic output function in patients with chronic myelogenous leukemia (CML). **Methods** Quantitative detection of T-cell receptor excision DNA circles (TREC) in DNA of peripheral blood mononuclear cells from 8 cases with CML, CD4⁺ or CD8⁺ cells from 3 cases with CML were performed by real-time PCR (TaqMan) analysis. And the TREC number was related to the number of T-cells by determination of the number of CD3⁺-positive cells. 9 normal individuals served as controls. **Results** A dramatic reduction of TREC values in patients with CML was showed. The mean value of TREC was 0.1 ± 0.22 copies/1000 T cells in CML patients and 6.84 ± 4.71 copies/1000 T cells in normal individuals, respectively ($P < 0.01$). In five out of eight CML cases no TREC copies could be detected in peripheral blood, and low value of TREC could be identified in selected CD4⁺ or CD8⁺ cells. **Conclusion** This is, to our knowledge, the first description of TREC level in CML patients. These results show a prominent reduction of TREC levels in CML.

Keywords: TREC; Recent thymic output function; CML; Real-time PCR

摘要:目的 了解慢性粒细胞白血病(CML)患者 CD3⁺、CD4⁺和 CD8⁺细胞中 T 细胞受体重排删除 DNA 环(TREC)的含量,从而推测 CML 患者的胸腺近期输出功能。方法 利用实时定量 PCR (TaqMan)方法检测 8 例 CML 患者外周血单个核细胞、3 例 CML 患者 CD4⁺和 CD8⁺细胞中 TREC 的水平。并根据外周血中 CD3 阳性率计算 CD3⁺细胞中 TREC 水平。9 例正常人外周血作为对照。结果 CML 患者中 TREC 含量为 0.1 ± 0.22 /1000 T 细胞,明显低于正常人 TREC 水平(6.84 ± 4.71 /1000 T 细胞, $P < 0.01$)。其中 5 例患者外周血单个核细胞中未能检测到 TREC,经分选 CD4⁺和 CD8⁺细胞后,2 例可以检测到低水平的 TREC。结论 本研究首先报道了 CML 患者 TREC 水平情况,结果显示其胸腺近期输出功能明显降低。

关键词: TREC; 胸腺近期输出功能; 慢性粒细胞白血病; 实时定量 PCR

中图分类号: R371.22 文献标识码: A 文章编号: 1000-8578(2004)06-0317-03

0 引言

信号结合 T 细胞受体重排删除环(signal joint T-cell receptor excision DNA circles, sjTREC, 简称 TREC)是 T 细胞受体基因重排过程中删除的 DNA 环,可作为胸腺近期输出功能的指标^[1-3]。自 TREC 定量分析方法报道以来,已应用于 HIV 感染、HAART 治疗以及造血干细胞移植后胸腺输出功能

和免疫重建的评价^[1,4]。细胞免疫功能缺陷是影响肿瘤和白血病尤其是淋巴细胞肿瘤患者抵抗肿瘤的一个重要因素,本研究采用实时定量 PCR 方法分析慢性粒细胞白血病患者外周血 CD3⁺、CD4⁺及 CD8⁺细胞中 TREC 的含量特点。

1 材料与方法

1.1 标本

经细胞形态学、细胞组化和细胞及分子遗传学确诊的 CML 患者 8 例(男 6 例,女 2 例),年龄 16 ~ 59 岁。收集单个核细胞,一部分细胞用于检测 CD3 细胞阳性率(应用 CD3 单抗和免疫荧光标记方法),

收稿日期:2004-02-17; 修回日期:2004-04-14

基金项目:国家自然科学基金(30270579)、广东省自然科学基金重点项目(23001)和广东省教育厅“千百十工程”优秀人才培养基金项目(Q 校 02022)

作者单位:1. 510632 广州,暨南大学医学院血液病研究所,2. 生化教研室,3. 流行病学教研室

另一部分细胞按常规方法(酚抽提法)提取 DNA, 其中 3 例标本的部分单个核细胞分别利用 CD4 和 CD8 单抗和免疫磁珠分选法(MCAS)分选 CD4⁺ 和 CD8⁺ T 细胞后(按产品说明操作), 采用 QIAamp DNAMiniKit 仪分别提取 DNA(按产品说明操作), 同时收集 9 例正常人外周血单个核细胞作对照。

1.2 引物设计

从 TCR 基因组序列 (ACCESSION AE000661) 中于 Rec 基因片段的下游设计一下游引物(T1)和在 J 的上游设计一上游引物(T2), 引物的方向恰好与一般的 PCR 引物相反, 并在该扩增片段中间设一荧光素标记探针 (T3)^[5,6]; 选择 RAG2 基因作为细胞定量对照, 分别在 RAG2 基因组序列 (ACCESSIONM94633) 中设计一对引物(R1 和 R2)及一荧光素标记探针(R3)^[5,6]。

1.3 RAG2-TRECs 标准品的构建

利用 TOPOTACloning Kit (Invitrogen, 荷兰) 将 RAG2 和 TRECs 的基因片段克隆到 TOPOTA 载体上, 根据凝胶电泳和分光光度计检测结果, 将标准品 DNA 浓度分别调整为 10⁷、10⁶、10⁵、10⁴、10³、10²和 10/2 μLDNA 等 7 组。

1.4 实时定量 PCR (real-timePCR)

每一标本分别进行两次 RAG2 和两次 TRECs 的检测, 总反应体积为 50μL, 其中含 100ng 基因组 DNA 或标准品, 0.5 μmol/L 各引物, 0.2mmol/L dNTP, 1.5U AmpliTaqGold (Roche), 0.1 μmol/L 的 6FAM-TAMRA 探针和 PCR 缓冲液(含 4mmol/L MgCl₂)。在 95、10min 变性后, 共进行 45 次循环扩增, 每一循环包括 95、30sec 和 64、1min。反应在 ABI PRISM7000 Sequence Detector (PE 公司) 中进行^[5,6]。

1.5 统计学处理

各组样本中 TRECs 含量以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 显著性检验用两独立样本 *t* 检验。

2 结果

经实时定量 PCR 分析获得样本中 RAG2 和 TRECs 的绝对数值, 然后根据每个细胞含两个 RAG2 拷贝的规律, 换算成每 1000 个细胞中 TRECs 的含量, 计算公式为: $n=2 \times 1000 \times [\text{TREC}(1) + \text{TREC}(2)] / [\text{RAG2}(1) + \text{RAG2}(2)]$ 。而根据免疫荧光检测单个核细胞中 CD3 细胞的阳性率, 可从所检测的单个核细胞中 TRECs 含量计算 CD3⁺ 细胞中 TRECs 含量, 计算公式为: $n = (\text{TRECs} / 1000 \text{ 单个核细胞}) / \text{CD3}^+ \%$ 。

本研究中 9 例正常人外周血中 TRECs 拷贝数为 (4.53 ± 3.62) / 1000PBMC, (6.84 ± 4.71) / 1000CD3⁺ 细胞, 8 例 CML 患者 TRECs 拷贝数为 (0.02 ± 0.06) / 1000PBMC, (0.1 ± 0.22) / 1000CD3⁺ 细胞, 与正常人相比, 无论是从 PBMC 或更为精确地从 CD3⁺ 细胞水平中看患者外周血中 TRECs 含量明显下降, 其差别有显著性意义 ($P = 0.0032$, $P = 0.0011$), 且 8 例中有 5 例单个核细胞中未检测到 TRECs。3 例外周血单个核细胞分选的 CD4⁺ 和 CD8⁺ 细胞中, 其中有 1 例 CD4⁺ 和 CD8⁺ 细胞中均未检测到 TRECs; 有 2 例仅 CD4⁺ 或 CD8⁺ 细胞检测到 TRECs 存在, 见表 1。

表 1 患者外周血中 TRECs 检测结果

No.	TRECs/ 1000 cells	CD3 (%)	TRECs/1000 Tcells	TRECs/1000 CD4 ⁺ cells	TRECs/1000 CD8 ⁺ cells
C1	0.1695	26.67	0.6356	ND	ND
C2	0.0127	42.5	0.0298	ND	ND
C3	0	23.72	0	0	0
C4	0	19.64	0	0.1781	0
C5	0	56.89	0	ND	ND
C6	0	28.91	0	0	0.0405
C7	0.0072	4.71	0.1522	ND	ND
C8	0	11.01	0	ND	ND
$\bar{x} \pm s$	0.02 ± 0.06		0.1 ± 0.22		

ND: 未检测

3 讨论

目前的观点认为: 只有通过了解胸腺的近期功能, 即胸腺在近期输出的初始 (naive) T 细胞的数量, 才能真正了解胸腺功能, 它代表了 T 细胞增殖能力的潜能, 能真正明确机体 T 细胞的增殖能力。但多年来一直未有合适的指标反应胸腺近期输出功能, 直到 1998 年 Douek 等报道利用定量 PCR 检测 TRECs 推算 naiveT 细胞的数量, 从而定量胸腺近期输出功能^[1,3]。TRECs 是 TCR 基因重排过程中的副产物, 为游离基因, 并不随 T 细胞的进一步分裂而扩增, 其含量代表了 TCR 基因初始重排形成功能性 TCR 基因时的 naiveT 细胞的含量, 每一个 naiveT 细胞含有两个 TRECs, 所以利用实时荧光定量 PCR 技术便可以检测和定量 TRECs, 确定 naiveT 细胞的含量而了解胸腺的近期输出功能^[1,7]。

目前 TRECs 定量分析主要用于 HIV-1 感染、AIDS 和白血病造血干细胞移植后免疫重建的评价。我们的前期工作也在检测正常人外周血 T 细胞和胸腺细胞, AML 患者和苯中毒患者近期胸腺输出功能中予以报道^[5,6], 而用于肿瘤和白血病患者

移植前 T 细胞免疫功能和改变的研究不多。在国外,仅有 CML 患者异基因造血干细胞移植后 TREC 检测情况的报道^[7],有关 CML 患者外周血 TRECs 的水平国内外尚未见研究资料。

本研究首先检测了 8 例 CML 患者外周血单个核细胞中 TRECs 的水平,并进一步通过其 CD3 细胞阳性率,计算出 CD3⁺细胞中 TRECs 的含量,可以更为确切的反应 T 细胞的总体 TRECs 水平。因为在白血病患者中不同个体外周血单个核细胞中所含 T 细胞的比例差异较大,只有通过精确计算 T 细胞中 TRECs 的含量,才能够进行个体之间和不同组别之间的比较。本研究结果显示,正常人平均每 1000 个 T 细胞中 TRECs 拷贝数为 6.84 ± 4.71;而本研究中的 8 例 CML 患者中,有 5 例在至少 1000 个 T 细胞中未检测到 TRECs,其余 3 例 CML 患者 TRECs 的含量也很低。提示 CML 患者胸腺近期输出功能明显低下,TCR 重排后形成的初始 T 细胞数量减少,或是在肿瘤相关抗原的刺激下 T 细胞克隆性扩增、可能是患者免疫功能降低的主要原因,这与以往所检测到的 CML 患者外周 T 细胞免疫功能低下,与 TCRV β 亚家族 T 细胞缺失等结果相符合^[8],也进一步说明了 CML 患者细胞免疫功能缺陷的根本原因。

由于 CML 患者外周血中 TRECs 水平明显低下,故本研究进一步分选了 3 例 CML 患者外周血 CD4⁺和 CD8⁺细胞亚群,直接检测纯化后 T 细胞的 TRECs 水平,同时也了解胸腺输出功能低下是否在 CD4⁺或 CD8⁺细胞有所不同,可以进一步明确 naive CD4⁺细胞和 naive CD8⁺细胞的水平。结果显示在经分选 CD4⁺和 CD8⁺细胞的 3 例 CML 患者中,其中 1 例的 CD4⁺和 CD8⁺细胞均未能检测到 TRECs,而 1 例的 CD4⁺细胞和另 1 例的 CD8⁺细胞均分别检测到极低水平的 TRECs (万分之一左

右)。提示通过分选 T 细胞有可能提高定量检测患者 TRECs 水平的敏感性,而更能明确患者胸腺输出功能的情况。但如果 CML 患者胸腺近期输出功能极度低下,通过该方法仍未能检测到,而进一步的方法有可能通过不断提高检测样本的 DNA 含量(即被检的细胞数量),检测到更低水平的 TRECs 含量。本研究所检测样本中含 CD4⁺或 CD8⁺细胞数量约 10000 个左右,有待进一步验证。

总之,我们的研究初步提供了 CML 患者外周血 CD3⁺、CD4⁺和 CD8⁺细胞中 TRECs 的含量,明确表明 CML 患者 TRECs 水平及胸腺输出功能明显降低。

参考文献:

- [1] Douek DC, McFarland RD, Keiser PH, et al. Changes in thymic function with age and during the treatment of HIV infection [J]. *Nature*, 1998, 396 (6712): 690-695.
- [2] Bertho JM, Demarquay C, Mouliant N, et al. Phenotypic and immunohistochemical analyses of the human adult thymus: evidence for an active thymus during adult life [J]. *Cell Immunol*, 1997, 179 (1): 30-40.
- [3] McFarland RD, Douek DC, Koup RA, et al. Identification of a human recent thymic emigrant phenotype [J]. *PNAS*, 2000, 97 (8): 4215-4220.
- [4] Douek DC, Vescio RA, Betts MR, et al. Assessment of thymic output in adults after hematopoietic stem cell transplantation and prediction of T cell reconstitution [J]. *Lancet*, 2000, 355 (9218): 1875-1881.
- [5] 李扬秋, 杨力建, 陈少华, 等. 实时定量 PCR 检测外周血 T 细胞和胸腺细胞中 TRECs 水平 [J]. *现代临床医学生物工程学杂志*, 2001, 7 (6): 397-400.
- [6] 韩素芳, 李扬秋, 周羽斌, 等. 苯中毒患者胸腺近期输出功能和 T 细胞亚群变化 [J]. *中国职业医学*, 2003, 30 (6): 2-4.
- [7] Hochberg EP, Chillemi AC, Wu CJ, et al. Quantitation of T cell neogenesis in vivo after allogeneic bone marrow transplantation in adults [J]. *Blood*, 2001, 98 (4): 1116-1121.
- [8] 李扬秋, Siegert W, Schmidt CA. 基因扫描分析 CML 病人外周血的 T 细胞克隆性 [J]. *肿瘤防治研究*, 1998, 25 (1): 23-26.

[编辑: 张麟; 校对: 杨卉]