

AML-M₅ 细胞诱导 TCRV γ T 细胞 克隆性增殖研究

李扬秋, 杨力建, 陈少华, 王震, 吴秀丽, 张玉平, 陈盛亭

Clonal expansion of TCRV γ subfamily T cells induced by AML-M₅ cells

LI Yan-qiu, YANG Li-jian, CHEN Shao-hua, et al

Institute of Hematology, Medical College, Jinan University, Guangzhou 510632, China

Abstract: Objective To investigate the restricted usage and clonal expansion of TCRV γ subfamily T cells induced by AML-M₅ cells. **Methods** The mononuclear cells (MNC) from donor peripheral blood or cord blood were amplified by mixed lymphocyte and tumor culture (MLTC), induced by AML-M₅ cells from 2 patients respectively. The complementary determining region 3 (CDR3) of TCRV γ with variable region genes was amplified in T cells from the donor or cord blood before and after MLTC using RT-PCR, to detect the usage and feature of TCRV γ subfamilies. The positive products were further analyzed to identify the clonality of T cells by gene scan. **Results** Only 13 or 5 TCRV γ subfamilies were expressed in T cells from cord blood or donor, however, 24 TCRV γ subfamily T cells could be detected in T cells from both cord blood and donor at early stages after MLTC, whereas the number of expressed TCRV γ subfamilies was gradually reduced with prolonging the time of culture. Oligoclonal and biclonal T cell expansion predominated in V γ 21 could be identified in T cells from cord blood and donor induced by AML-M₅ cells by gene scan analysis. **Conclusion** Clonal expansion of TCRV γ subfamily T cells from cord blood or donor could be induced by AML-M₅ cells, which may be aspecific immuneresponse to AML-M₅ cell associated antigen.

Keywords: TCRV γ gene; Clonality; Leukemia; T cell culture; Gene scan

摘要:目的 了解急性髓细胞白血病(AML)M₅亚型细胞诱导 T 细胞的 TCRV γ 亚家族限制性利用和克隆性增殖情况。方法 采用混合淋巴细胞/肿瘤细胞培养(MLTC)方法,用 AML-M₅ 细胞体外诱导供者外周血和脐血的 T 细胞增殖,用 RT-PCR 扩增经 MLTC 前后获得细胞的 24 个 TCRV γ 亚家族基因的互补决定区(CDR3),了解病人各 V γ 亚家族的利用情况。并经基因扫描分析确定 M₅ 细胞诱导的 T 细胞克隆性特点。结果 脐血和供者外周血分别表达 13 和 5 个 TCRV γ 亚家族 T 细胞,经 MLTC 培养初期,则表达全部 24 个 V γ 亚家族,随着诱导时间的增加,诱导 T 细胞所表达的 V γ 亚家族逐渐减少。基因扫描显示 AML-M₅ 细胞诱导后的 T 细胞出现寡克隆和双克隆增殖改变,主要为 V γ 21 的克隆性增殖 T 细胞。结论 AML-M₅ 细胞可诱导 TCRV γ T 细胞克隆性增殖,这可能是对 AML-M₅ 细胞相关抗原的特异细胞免疫应答的结果。

关键词: 白血病; TCRV γ 基因; 克隆性; T 细胞培养; 基因扫描

中图分类号: R733.7 文献标识码: A 文章编号: 1000-8578(2003)05-0349-05

0 引言

T 细胞受体(TCR)重排过程中,形成一个高度可变区(V_ND_NJ 区),称为互补决定区 3(CDR3),不同重排(不同克隆)时,其 CDR3 长度不同,故利用这一特点,通过检测 TCRV γ 24 个亚家族的 CDR3 长度,可以了解机体 T 细胞不同亚家族的分布及其克

隆性,这是目前检测 T 细胞克隆性的最佳方法^[1,2]。本研究利用 RT-PCR 和基因扫描方法分析经急性髓细胞白血病 M₅ 亚型(AML-M₅)细胞诱导和培养不同时间的异体 T 细胞的 TCRV γ 24 个亚家族基因的优势选用和克隆性情况。

1 材料和方法

1.1 样本 经细胞形态学和组织化学按 FAB 诊断标准确诊的 AML-M₅ 病人 2 例(编号 P1 和 P2)分别用于诱导 T 细胞增殖,健康足月孕妇自然顺产产妇脐血 1 例(编号 C1),供者外周血 1 例(C2),C1 和

收稿日期:2003-01-20; 修回日期:2003-02-19

基金项目:国家自然科学基金资助项目(39870358);广东省自然科学基金资助项目(980705);广州市科委重点科技攻关计划资助项目(98-z-039-01);广东省医学科研基金资助项目(A1999271)

作者单位:510632 广州暨南大学医学院血液病研究所

C2 分别与 AML-M₅ 细胞等培养后,收集培养 7 天 (C1-A)、15 天 (C1-B)、20 天 (C1-C)、24 天 (C1-D)、14 天 (C2-A)、27 天 (C2-B) 和 41 天 (C2-C) 等 7 份标本。T 细胞株 Molt-4 作为单克隆对照,10 例正常人作为多克隆对照,B 细胞株 Raji 作为阴性对照。

1.2 外周血单个核细胞和白血病分离 按常规方法分离患者、成人外周血或脐血的单个核细胞 (MNC)。应用 MACS 磁珠分选仪和 CD3 磁珠单抗 (Miltenyi-Biotec 公司) 分选 AML-M₅ 患者外周血 CD3⁺ 细胞 (主要为 M₅ 细胞),操作方法按说明书进行。

1.3 T 细胞诱导和培养 以成人或脐血 MNC 细胞为效应细胞,经丝裂霉素 C (mitomycinC, MMC, Sigma 公司) 处理的 M₅ 细胞作为刺激细胞而进行混合淋巴细胞培养 (MLTC)。通过磁珠分选的 M₅ 细胞配成 1×10^7 /mL 的细胞悬液,加入 MMC 溶液使其终浓度为 50 μg/mL,置于 37 ℃,5% CO₂ 饱和湿度培养箱孵育 1h。然后用含 15% AB 血清的 RPMI 1640 洗涤 4 遍,调至 1×10^6 /ml 作为刺激细胞。成人或脐血 MNC 细胞 (终浓度 1×10^6 /mL) 按效靶比 10:1 的比例加入刺激细胞,置于诱导体系培养,诱导体系包括:10% 灭活人 AB 血清、10% 人血白蛋白、抗 CD3 单抗 (1 μg/mL)、IL-2 (500U/mL)、2-ME (50 μmol/L)、L-谷氨酰胺 (2mmol/L) 及 G、S 各 100U/mL。3~5 天后以扩增体系 [15% 人 AB 血清、2% 人血白蛋白、IL-2 (500U/mL)、2mmol/L L-谷氨酰胺及 G、S 各 100U/mL] 并补加刺激细胞,如此循环。根据 T 细胞扩增情况而定期收集一部分培养的 T 细胞进行相关的检测。

1.4 RNA 提取和 cDNA 合成 RNA 提取应用 RNazol 试剂盒 (Gibco,BRL) 并应用随机引物和反转录酶试剂盒 (SuperscriptII,Gibco,BRL) 反转录合成 cDNA 第一链。均按常规方法进行。

1.5 引物 用于非标记 PCR 的 24 个 V 引物和一 C 引物,用于 runoffreaction 的 5' 端荧光素标记的 C-fam 引物由德国柏林 TIBMOBBIOL 公司合成^[2-4]。

1.6 RT-PCR PCR 按已报道的方法进行^[2-4]。总反应体积为 25 μL,其中含 1 μL cDNA,任一 V 引物 (24 个 V 引物之一) 和 C 引物 (0.5 μmol/L),0.1 mM dNTP, 1.25 U Taq 聚合酶 (PerkinElmer) 和 1 × PCR 缓冲液。反应在 PCR 扩增仪 (PerkinElmer) 中进行,共进行 40 循环,每一循环包括:94 ℃、1min (首次 3min),60 ℃、1min 和 72 ℃、1min (末次 10min),最后 PCR 产物保存于 4 ℃ 中。

1.7 T 细胞克隆性分析

1.7.1 Runoffreactions (标记 PCR 产物) 10 μL 的反应体系含 2 μL 的未标记的 PCR 产物、0.1 μmol/L C-fam 引物、3mmol/L MgCl₂, 0.2 mmol/L dNTP, 0.25 U Taq 聚合酶和 PCR 缓冲液 (PerkinElmer)。PCR 共进行 35 循环,退火温度为 66 ℃,余同上^[3,4]。

1.7.2 基因扫描分析 (CDR3 长度分析) 有关操作步骤按使用指南进行。荧光素标记的 PCR 产物 (2 μL) 加入 2.5 μL 甲酰胺,0.5 μL Genescan-500 Tamra 分子量标准品 (ABI,PerkinElmer) 和 0.5 μL 加样缓冲液 (Dextran50mg/mL,EDTA25mmol/L, Genescan-500TamraKit),经 94 ℃、4min 变性后,于 6% 聚丙烯酰胺凝胶中电泳,经 373ADNA 序列仪 (ABI,PerkinElmer) 的基因扫描 672 分析软件分析产物的长度和荧光素强度,不同位置和高度的峰表示产物的大小和含量;峰的形态提示产物的均一性 (克隆性),当 PCR 产物中所含的 DNA 扩增片段大小一致时,其电泳迁移率完全相同,同一时间点通过扫描探头,显示一单峰图象,提示 PCR 产物来自于 CDR3 长度完全相同的 T 细胞,即单克隆的细胞;而一主峰和少数小峰图象提示产物主要来自同一克隆即为寡克隆性;而多峰图象提示多克隆性^[1-4]。

2 结果

2.1 MLTC 结果 经 MLTC 后,两份标本 T 细胞均得到良好增殖,以脐血 T 细胞增殖较快。根据 T 细胞增殖情况分别收集不同培养时间 T 细胞,进行 TCRV 谱系分析和 T 细胞克隆性鉴定。

2.2 TCRV 亚家族 T 细胞的表达情况 RT-PCR 扩增结果:2 例 AML-M₅ 患者外周血中仅可检测到 2 个和 5 个 V 亚家族 T 细胞,脐血和供者外周血仅分别表达 13 和 5 个 V 亚家族 T 细胞,T 细胞培养早期 TCRV 明显增加至表达全部 24 个 V 亚家族 (C1-A 和 C2-A),而培养后期 T 细胞表达的 V 亚家族逐渐减少,见表 1。正常人表达全部 TCRV 亚家族,而 Molt-4、则表达单一 TCRV 2 的 T 细胞,B 细胞株 Raji 则为阴性。

2.3 T 细胞克隆性分析结果 基因扫描分析结果显示:Molt-4 的 V 2 的 PCR 产物均呈单峰图象 (单克隆);部分诱导后 T 细胞的 V 亚家族出现寡克隆或双克隆情况,两例 T 细胞均出现 V 21 的克隆性 T 细胞,在 V 5、V 8 和 V 15 等亚家族也出现克隆增殖趋势或寡克隆增殖 (有多峰图形逐渐转向一主峰的趋势),见图 1、2。2 例 AML-M₅ 患者均存在寡克隆性增殖 T 细胞,而大多数诱导前后 T 细胞的 PCR 产物与正常人一样均呈多峰图象 (多克隆),见表 1。

表 1 AML-M₅ 细胞诱导 TCRV 亚家族 T 细胞优势表达及其克隆性特点

subfamily	N	P1	C1	C1-A	C1-B	C1-C	C1-D	P2	C2	C2-A	C2-B	C2-C
V 1	poly ^{*1}	oligo ^{*2}	poly	poly	ot					poly	poly	
V 2	poly	ot ^{*3}	poly	poly	poly	poly	poly			poly	poly	poly
V 3	poly		poly	poly	poly	poly	poly		poly	poly	poly	poly
V 4	poly			poly						poly		
V 5	poly		poly	poly	poly	oligo	oligo		poly	ot	poly	poly
V 6	poly			poly						oligo	poly	
V 7	poly		poly	poly	poly	ot	poly			poly	poly	poly
V 8	poly	oligo	poly	poly	ot	oligo	poly	poly		poly		ot
V 9	poly	oligo	poly	poly	ot					poly		
V 10	poly	oligo	oligo	poly	poly				oligo	poly		ot
V 11	poly			poly	poly					poly		
V 12	poly			poly						poly		
V 13	poly		poly	poly	poly	bi ^{*4}	ot	oligo	bi	poly	poly	poly
V 14	poly		poly	poly						poly	poly	poly
V 15	poly		poly	poly	ot					oligo		
V 16	poly			poly						oligo		
V 17	poly			poly						oligo		
V 18	poly			poly						poly		
V 19	poly		poly	poly						poly		
V 20	poly			poly						poly		
V 21	poly		poly	poly	poly	oligo	oligo		poly	poly	oligo	bi
V 22	poly			poly						poly		
V 23	poly			poly						poly		
V 24	poly			poly						poly		

注: *¹:多克隆; *²:寡克隆; *³:克隆趋势; *⁴:双克隆; N: 正常人, P1 和 P2: 2 例 AML-M₅ 患者外周血 PBMC, C1: 脐血 PBMC, C1-A ~ C1-D: 分别为 C1 经诱导 7、15、20 和 24 天细胞, C2: 动员后供者 PBMC, C2-A ~ C2-C 分别为 C2 经诱导后 14、27 和 41 天细胞

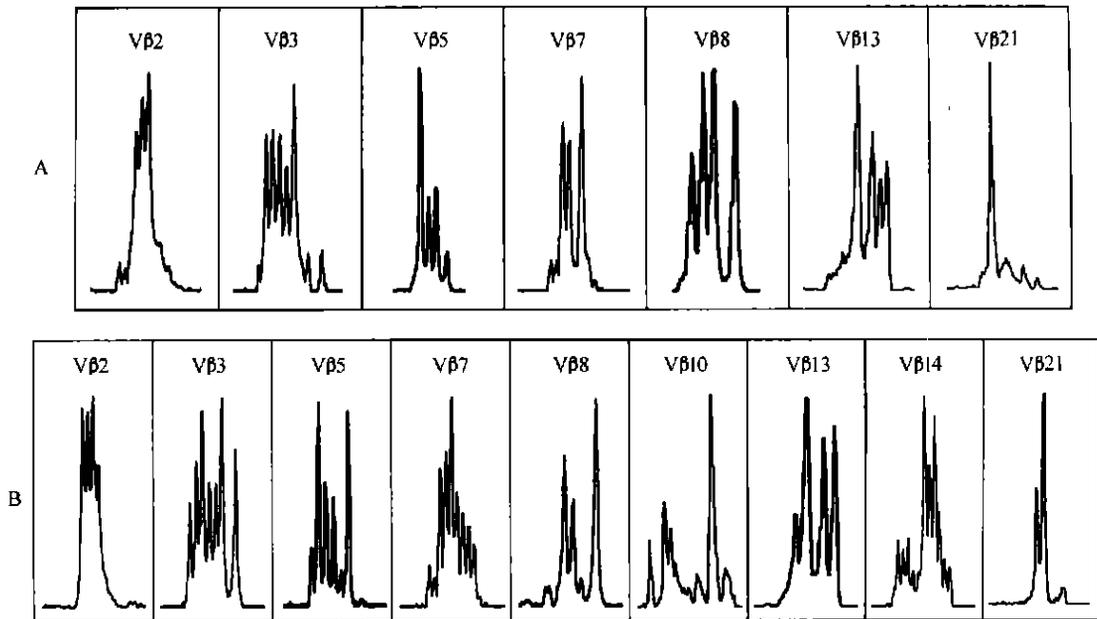


图 1 脐血和供者外周血 T 细胞经 AML-M₅ 细胞诱导后克隆性增殖情况

A: C1-D 标本, B: C2-C 标本, 可见 A 图中的 V 5 和 V 21 呈一主峰图形(寡克隆), V 21 (B 图) 呈双峰图形(双克隆), V 13 (A 图)、V 8 (B 图) 和 V 10 (B 图) 呈寡克隆趋势, 余为多克隆图形

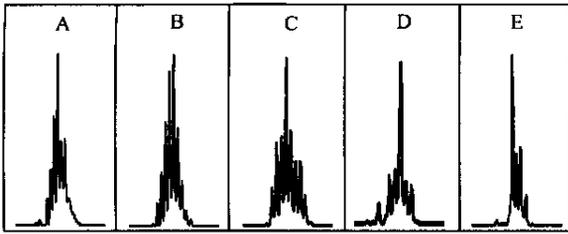


图 2 MLTC 前后脐血 TCRV 5 T 细胞克隆性增殖情况从 A(CI)、B(CI-A)、C(CI-B) 呈多峰图象 (多克隆) 逐渐转化为 D(CI-C) 和 E(CI-D) 的一主峰的图象 (寡克隆性增殖)

3 讨论

在 TCR 的 CDR3 特点发现之后,利用其作为分析 T 细胞克隆性的方法始于 1939 年,经过不断的改进,于 1994 年首次报道的 RT-PCR- 基因扫描- 序列分析方法成为目前最为灵敏的分析方法,特异性强、快捷、方便和客观,为国外众多研究人员所采用^[1,2,5]。鉴于外周血以携带 TCR / 的 T 细胞为多数,故多利用 TCRV 或 V 基因亚家族结合 CDR3 特点分析 TCR 的优势利用及其克隆性。在以往工作的基础上,本研究利用该方法分析 AML-M₅ 细胞诱导 T 细胞扩增后,各 TCRV 24 个亚家族的优势利用情况及其 CDR3 特点。

正常人外周血 T 细胞的 TCR 重排应是随机的,即呈多家族和多克隆,而 T 细胞株为来自同一克隆的细胞,则应该只表达单家族和单克隆,本文检测的 T 细胞株的结果完全与之相符,也显示基因扫描方法的正确性和可靠性^[3-5]。在特异性抗原刺激下,机体产生特异地针对性的克隆性 T 细胞,有报道黑色素瘤等肿瘤组织的浸润性 T 细胞 (TIL) 和外周血中出现 TCRV 的优势利用和克隆性增殖^[2,6]。本研究分析 2 例 AML-M₅ 患者外周血 T 细胞的情况,提示仅存在 2 个和 5 个 V 亚家族 T 细胞,出现严重缺失和克隆性增殖情况,这与我们前期研究结果相似,可能与机体对特异性白血病相关抗原的反应有关^[4]。

异基因造血干细胞移植作为细胞免疫治疗对 AML 的治疗取得了较好的成果,但 GVHD 的问题仍然严重影响治疗效果,研究表明 GVHD 和 GVL 是由不同的 T 细胞亚群所介导,且与某些 TCRV 亚家族有关,但有关研究报道较少^[7-8]。如果能通过 TCRV 亚家族克隆性分析而区分介导 GVHD 和 GVL 的 T 细胞克隆,可能对提高异基因造血干细胞移植的效果十分有意义。本研究利用 AML-M₅ 细胞作为白血病细胞相关抗原诱导脐血和供者 T 细胞扩增,并进行了 TCRV 优势选用和克隆性

分析,结果发现,在诱导早期原来未表达的 TCR V 亚家族均得到表达,提示 IL-2 和 CD3 单抗的刺激可以非特异地提高各亚家族表达,早期 T 细胞以非特异性增殖为主,而随着培养时间的增加,培养 T 细胞中表达的 TCRV 亚家族明显减少,并出现克隆性增殖 T 细胞,提示在 M₅ 细胞相关抗原的诱导下,部分 T 细胞进行选择性和特异性扩增,呈克隆性大量增殖,从而影响其他 V 亚家族的增殖,而表现为选择性或优势利用的特点。结果显示 2 例出现克隆性增殖的 T 细胞主要集中在 V 21,提示此克隆可能与 M₅ 细胞相关抗原有关,有可能是对 M₅ 细胞具有特异性杀伤作用的 T 细胞,但有待进一步的细胞杀伤性研究加以证明。而在各组 T 细胞中所出现的克隆性增殖或克隆趋势 T 细胞,由于缺乏明显的共性,有待进一步证明其性质,是否与白血病抗原有关的效应克隆还是与 GVHD 有关的克隆。

理论上和从我们检测 10 例正常人外周血 T 细胞的情况看,正常人几乎表达全部 24 个 TCRV 亚家族 T 细胞,但本研究中供者外周血 T 细胞仅表达 5 个 TCRV 亚家族,并出现克隆性增殖 T 细胞,可能与供者 T 细胞在干细胞动员后产生某些改变有关,我们在其他病例研究中也曾发现类似问题(结果未显示),尚未见有关研究资料,未能有满意的解释。而脐血 T 细胞仅表达 13 个 TCRV 亚家族,可能与脐血中所含 T 细胞部分缺失的特点有关,我们曾对 15 例脐血 T 细胞的分析发现类似情况^[9]。

总之,本研究所报道的 M₅ 细胞诱导异体 T 细胞克隆增殖的情况,对进一步研究 AML 病人的特异性过继性细胞免疫治疗有一定的意义。

参考文献:

- [1] Assaf C, Hummel M, Di ppele E, et al. High detection rate of T cell receptor beta chain rearrangements in T cell lymphoproliferations by family specific polymerase chain reaction in combination with the GeneScan technique and DNA sequencing [J]. Blood, 2000, 96 (2): 640-646.
- [2] Puiseux I, Even J, Pannetier C, et al. Oligoclonality of tumor-infiltrating lymphocytes from human melanomas [J]. J Immunol, 1994, 153 (6): 2807-2818.
- [3] 李扬秋, 汪明春, 吴幼华. 利用基因扫描分析 TCRV 亚家族的 CDR3 长度的方法检测 T 细胞克隆性 [J]. 中国免疫学杂志, 1998, 14 (1): 48-50.
- [4] Li Y, Yan g L, Chen S, et al. Identification of peripheral blood T cell clonalities in acute myeloid leukemia by CDR3 size analysis of TCRV repertoire using RT-PCR and gene scanning analysis [J]. Chin Med J, 2002, 115 (1): 69-71.
- [5] Liu D, Callahan JP, Dau PC. Intrafamily diversity of the T cell receptor chain CDR3 region [J]. J Immunol Methods, 1995, 187 (1): 139-150.

- [6] thorstren P, Guldberg P, Gronbeak K, et al. In situ T cell responses against melanoma: a comparison of peripheral blood mononuclear cells from melanoma patients and healthy controls. *J Immunol*, 1999, 163 (1): 443-447.
- [7] Li Y, Dux X, Xu M, et al. Stable clonal expansion of TCRV β 6, 17 and 19 T cell subsets in GVHD cases using a gene scanning analysis. *J Chin Med J*, 2001, 114 (5): 489-492.
- [8] Epperson DE, Margolis DA, McOlash L, et al. In vitro T cell receptor V β repertoire analysis identifies T cell families mediate graft-versus-leukemia and graft-versus-host responses after human leukocyte antigen mismatched sibling stem cell transplantation. *J Br J Hematol*, 2001, 114 (1): 57-62.
- [9] 陈少华, 李扬秋, 杨力建, 等. 脐血中 TCRV β 亚家族 T 细胞的分布和克隆性分析. *中国病理生理杂志*, 2002, 18 (6): 662-665. (周永红校对)

短篇个案

肾上腺皮质腺肿瘤 6 次手术 穆玉兰, 石敏, 刘鸣, 汤春生

关键词: 肾上腺; 肿瘤; 手术

中图分类号: R736.6 文献标识码: D

文章编号: 1000-8578 (2003) 05-0353-01

患者, 女, 37 岁, 因“左肾上腺肿瘤 5 次术后, 血压增高伴多饮、多食、肥胖、月经不规律 2 个月”于 2002 年 11 月 6 日入院。

既往病史: 患者 1990 年因无明显诱因出现肥胖、多食多饮、多尿、月经不规律以“左肾上腺瘤、库欣综合征”行“左肾上腺瘤切除术”, 病理为肾上腺皮质腺瘤。1992 年以局部复发了再次切除术, 病理同第一次。1994 年又出现上述症状经检查诊断为“左肾上腺瘤复发”行第三次切除术, 病理结果: 左肾上腺皮质癌。术后症状明显缓解。1998 年和 2000 年因同样症状起病分别进行了第 4 次、5 次手术。本次入院拟行第六次手

术。

入院查体: 一般情况良好, 精神佳, BP 20/14.7 kPa。向心性肥胖, 满月脸, 水牛背。实验室检查: F-8am 44.2 ug/dl, 4pm 41 ug/dl (2.5 ~ 12.5 ug/dl), A1: 0.29 ng/ml/h (1.95 ~ 3.99 ng/ml/h), A2: 684.4 (55.3 ~ 115.3 pg/ml), ALD: 112.8 pg/ml (65.2 ~ 295.7 pg/ml), ACTH <10 (<46 pg/ml)。B 超: 左侧腹腔内多发实性占位, 左肾多发结石。CT: 腹部及盆腔平扫示下腹及盆腔多发软组织块, 考虑为多处转移, 鞍区占位, 考虑垂体微腺瘤 (0.8cm × 0.9cm)。

手术: 盆腹腔内可见多个转移结节, 大小从 6cm × 5cm × 5cm 到 2cm × 2cm ×

1cm 不等, 主要位于阑尾系膜、横结肠、乙状结肠系膜、子宫阔韧带后叶及子宫直肠窝处, 边界清, 表面光滑, 活动度好并有蒂, 逐一切除。病理(诊断): 所送标本 11 个, 均为转移的肾上腺皮质腺癌。

讨论: 肾上腺皮质肿瘤可来自一种或多种肾上腺皮质细胞, 因而产生一种或多种过量的皮质类固醇, 如本例为肾上腺束状带肿瘤, 因产生过量皮质醇而出现特异的临床症状。肾上腺脂肪腺瘤切除疗效佳, 但皮质腺癌术后 5 年生存率仅为 9% ~ 13%。该例由肾上腺脂肪腺瘤恶变远处转移, 在 11 年间患者共进行了 6 次手术。现病人术后 2⁺ 个月, 一般情况良好。其在发病、复发次数及病程变化等方面具有以下特点: (1) 每次就诊前症状基本相同, 故患者能够及早就医并能及时切除病灶; (2) 平均每间隔两年复发一次; (3) 首发为肾上腺脂肪腺瘤, 之后恶变为肾上腺皮质腺癌; (4) 每次复发病灶都能完整切除, 术后恢复良好, 症状缓解明显; (5) 肾上腺皮质腺癌二次为原位复发, 第三次属于远处转移。

收稿日期: 2002-12-10; 修回日期: 2003-02-17
作者单位: 250021 济南, 山东省立医院妇产科

(李奇明校对)