

CML 相关 TCRV 亚家族 T 细胞的克隆性分布特点

陈 思,李扬秋,陈少华,杨力建,卢育洪

Analysis of Clonal Expansion of TCR V Subfamily T Cells Associated with CML

CHEN Si,LI Yang-qiu,CHEN Shao-hua,YANG Li-jian,LU Yur-hong

Institute of Hematology, Medical College, Ji'nan University, Guangzhou 510632, China

Abstract :Objective To investigate the distribution and clonality of TCR V subfamily T cells in patients with chronic myeloid leukemia (CML). **Methods** The CDR3 size of TCR V 29 subfamily genes was amplified in peripheral blood mononuclear cells from 10 cases with CML using RT-PCR, to observe the usage of TCR V repertoire, the PCR products were further analyzed by genescan technique for detection of the CDR3 size, to evaluate clonality of TCR V T cells. **Results** 1~21 V subfamily T cells could be identified from different samples in CML cases, predominantly in V 3, 4, 8, 10, 14. Oligoclonal (clonal expansion) T cells were identified in V 1, 2, 3, 4, 5, 8, 10, 12, 14, 15, 16, 19, 21 and 23 subfamilies. **Conclusion** The selected usage and clonal expansion of TCR V subfamily T cells from peripheral blood could be found in patients with CML, it may be related to CML associated antigen. Distribution of V subfamily clonal expansion displays individual specificity.

Key words: TCRV gene; T cell; Chronic myeloid leukemia; RT-PCR; Genescan

摘 要:目的 了解慢性粒细胞白血病(CML)患者外周血 TCR V 亚家族 T 细胞的克隆性分布特点。方法 采用 RT-PCR 扩增 10 例 CML 患者外周血的单个核细胞的 TCR V 29 个亚家族基因,分析其 TCR V 亚家族的利用情况。PCR 产物进一步经基因扫描分析,了解其 CDR3 长度以判断 T 细胞的克隆性。结果 不同病人外周血中所能检测出的 V 亚家族数量不等(1~21 个),以 V 3、V 4、V 8、V 10 和 V 14 为常见,并在 V 1、V 2、V 3、V 4、V 5、V 8、V 10、V 12、V 14、V 15、V 16、V 19、V 21 和 V 23 中发现克隆性生长 T 细胞。结论 CML 病人外周血 T 细胞的 TCR V 亚家族选用呈现明显的选择性并出现克隆性 T 细胞,这可能与机体对白血病相关抗原产生特异性免疫有关,且克隆性增殖 V 亚家族分布以个体特异性为主。

关键词: TCRV 基因; T 细胞克隆性; 慢性粒细胞白血病; RT-PCR; 基因扫描

中图分类号: R733.74 文献标识码: A 文章编号: 1000-8578(2007)03-0168-03

0 引言

利用 T 细胞受体(TCR)基因谱系分析可以了解机体各种亚家族 T 细胞的分布情况。多数肿瘤病人都存在不同程度的细胞免疫功能缺陷。我们的前期研究已经发现 CML 病人 TCR V 亚家族 T 细胞存在克隆性增殖情况^[1],为更全面了解 CML 病人的 T 细胞免疫状态,本研究分析 10 例 CML 患者外周血 29 个 TCR V 亚家族 T 细胞的表达及其克隆性特点,从而了解 CML 病人 T 细胞免疫功能情况。

1 材料与方法

1.1 标本

经细胞形态学、细胞化学、细胞和分子遗传学确诊的初发未治慢性粒细胞白血病(CML)10 例。收集肝素抗凝外周血标本,分离单个核细胞,按常规方法进行。同时,10 例正常人外周血样本作为对照。

1.2 RNA 提取及 cDNA 合成

应用 TRIzol 试剂盒(Gibco BRL)提取 RNA。应用随机引物和反转录酶试剂盒(Gibco BRL)合成 cDNA 第 1 链,均按常规方法进行。

1.3 引物

根据 V 29 个亚家族基因设计相应的 29 个 V 特异性上游引物,并在 C 区设一无标记的 C 1 下游引物和一荧光标记的 C 2-fam 引物,引物均由德国柏林 TIB 公司合成^[2,3]。

1.4 RT-PCR

每一标本分别以 V 1-29/C 29 对引物进行 29

收稿日期:2006-09-11;修回日期:2006-10-10

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30270579);广东省自然科学基金重点资助项目(23001,05103293);血液病学国务院侨办重点学科基金

作者单位:510632 广州,暨南大学医学院血液病研究所

作者简介:陈思(1982-),女,硕士在读,主要从事血液肿瘤免疫学研究

次 PCR 检测。PCR 操作按总反应体积为 20μl,其中含 1μl cDNA,任一 V 引物(29 个 V 引物之一)和 C 引物(0.5 mmol/L),0.1 mmol/L dNTP,1.25 U Taq 聚合酶和 1 ×PCR 缓冲液(试剂为 Promega 公司产品)中进行,40 个循环,94 1min(首次 3min),60 1min,72 1min(末次 10min),结束后保存于 4 中。PCR 产物于 2.5%琼脂糖凝胶(溴化乙锭染色)中电泳分析结果^[1-4]。

1.5 T 细胞克隆性分析

1.5.1 标记 PCR 产物

该反应主要是将首次 TCRV PCR 产物上荧光素,10μl 的反应体系含 2.5μl 的未标记的 PCR 产物、0.1μmol/L C-fam 引物、2.5 mmol/l MgCl₂, 0.2mmol/L dNTP,0.25U Taq 聚合酶和 PCR 缓冲液(Promega 公司),PCR 共进行 35 个循环,退火温度为 66,余同上^[1-4]。

1.5.2 基因扫描分析(CDR3 长度分析)

有关操作步骤按使用指南进行。取 2μl 荧光素 Fam 标记的 PCR 产物加入高质量的去离子甲酰胺(Hi-Di Formamide)与标准品(ABI,Perkin Elmer GENESCAN™ -500-LIZ™,其中含有荧光素 LIZ 标记的不同大小的 DNA 片段)按 20:1 比例配好的 10μl 混合液,94 变性 4min,然后将样品加入 96 孔板,直接装载到已灌好 POP-4 (Performance Optimized Polymer-4)胶的 3100 DNA 序列分析仪上进行电泳,电泳所采集结果经基因扫描分析软件分析产物的长度和荧光强度。

2 结果

2.1 TCRV 亚家族 T 细胞的表达情况

10 例 CML 患者外周血 T 细胞所表达的 TCRV 亚家族数量差别很大,少则仅表达 1 个 V 亚家族(C3),多则表达 21 个亚家族(C10),在表达频率上,以 V 3(100%)为最高,V 4、V 10、V 14(80%)次之,而全部病人都未能检测到 V 6、V 7、V 9、V 24、V 28、V 29,见表 1。正常人则表达绝大部分 V 亚家族。

2.2 T 细胞克隆性分析结果

10 例 CML 患者中除 2 例外,其他患者均存在寡克隆、双克隆或克隆性增生趋势的 T 细胞,在 V 1、V 2、V 3、V 4、V 5、V 8、V 10、V 12、V 14、V 15、V 16、V 19、V 21 和 V 23 中发现克隆性生长 T 细胞。多数患者出现 1~2 个 V 亚家族的克隆性 T 细胞,而个别患者(C10)出现 8 个 V 亚家族的克隆性 T 细胞,见表 1、图 1。患者其余的 V 亚家族 PCR 产物呈多峰图像(多克隆)。

表 1 CML 患者外周血 T 细胞中 TCR V 亚家族表达和克隆性

V 亚家族	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	C9	C10
V 1										O
V 2	P	P		O	P			P	P	
V 3	P	P	OT	OT	P	P	P	P	P	P
V 4	P	P		O	P	P		P	P	P
V 5								O		P
V 8		O		P	P	P		P	P	P
V 10	P	P		P	O	O	P	P		P
V 11								P		
V 12				P	P	P		P	P	O
V 13		P		P					P	P
V 14	P	P		P	P	P		P	P	B
V 15									OT	B
V 16										O
V 17										P
V 18				P						P
V 19	P	P		P		P		OT		O
V 20										P
V 21		P							OT	O
V 22				P	P	P		P	P	P
V 23									P	OT
V 25		P							P	P
V 26		P		P					P	P
V 27				P		P			P	

P:多克隆;O:寡克隆;OT:寡克隆增殖趋势;B:双克隆

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 1989 年,并经过不断的创新,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。鉴于外周血以携带 TCR V / 的 T 细胞为多数,故多利用 TCR V 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。在既往的研究中,我们已建立了 RT-PCR 和基因扫描分析了 TCRV 24 个亚家族的 CDR3 长度,了解 CML 患者 V 亚家族的优势利用和克隆性特点的方法。通过研究发现 CML 患者均出现不同程度的 TCR V 亚家族倾斜性分布情况,多为表达 10 个 V 亚家族,明显抑制的患者仅存在 1~2 个 V 亚家族 T 细胞,轻者则可以接近正常的 24 个 V 亚家族。可能与肿瘤相关抑制物的抑制某些 TCR V 亚家族的表达有关,也可能与肿瘤相关抗原的存在限制某些亚家族的利用有关^[1]。

由于 TCR 和 TCR 是以异源二聚体表达于 T 细胞表面的,故在其 TCR V 存在克隆性 T 细胞,而这些 T 细胞又可能与 CML 相关抗原刺激有关。

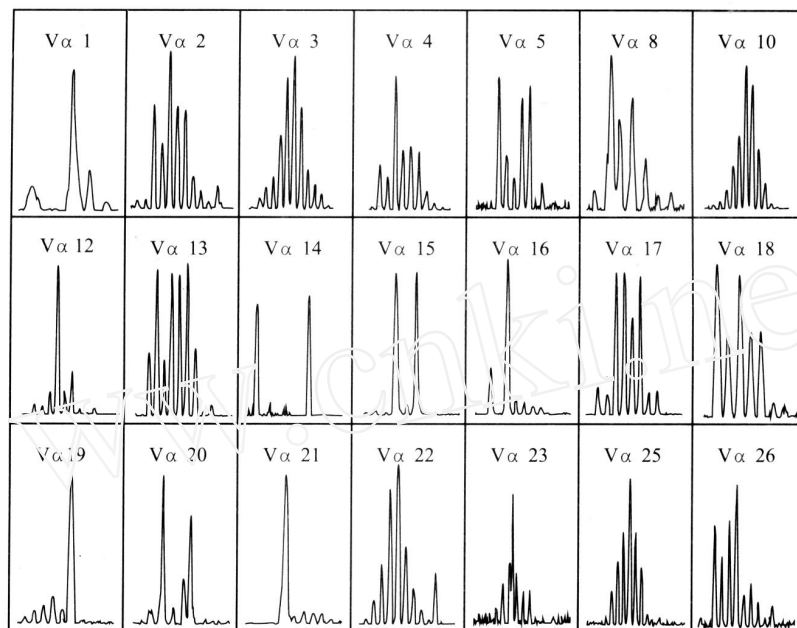


图 1 1 例 CML 病人(C10)外周血各 V 亚家族 PCR 产物基因扫描分析结果

所以,其 TCR V 亚家族也应该出现相应的克隆性增殖,从而组成一种克隆性增殖的 CD8^+ T 细胞,由于该方面并未在相关研究资料报道,故本研究首先通过 RT-PCR 和基因扫描分析 TCRV 29 个亚家族的 CDR3 长度,了解 CML 患者 V 亚家族的克隆性特点。正常情况下,T 细胞的 TCR V 的重排是随机的即呈多家族多克隆性。但在肿瘤患者中,机体 T 细胞在肿瘤细胞抗原的持续刺激下,某个或某些具肿瘤抗原高亲和力的 T 细胞克隆得到选择性生长,并形成某一亚家族的优势表达,提示肿瘤细胞相关抗原或免疫性疾病的一些有关抗原对机体的刺激作用而引起机体相应的细胞免疫反应,可以通过 T 细胞克隆性的分析手段加以了解和判断。本研究主要集中在了解 CML 患者 T 细胞的反应情况,结果发现 10 例 CML 病人中部分 V 亚家族 T 细胞的增殖受到抑制,不同病人中受抑制的 V 亚家族有所相同,V 6、V 7、V 9、V 24、V 28 和 V 29 亚家族在 CML 病人中完全受抑制,其他则在不同病人中表现不一,这可能与不同病人的反应性不同有关,它提示了患者 T 细胞免疫功能部分抑制状态的情况。基因扫描分析结果进一步显示部分患者存在克隆性增殖 T 细胞,这可能是机体对肿瘤相关抗原刺激产生的一种特异性细胞免疫反应的结果,克隆性 T 细胞多分布在不同亚家族,未见明显的倾向性,这可能是个体的细胞免疫反应存在差异的情况。这种克隆性增殖的 TCR V 亚家族 T 细胞的个体性是肿瘤患者的一个普遍现象,可能与个体特异性免疫和肿瘤的异质性有关,该结果也提示了对肿瘤患者细胞免

疫治疗的个体化的必要性。本研究中,有 4 例患者出现了 2 个或以上的 V 亚家族克隆性增殖 T 细胞,尤其是在 C10 患者可检测到 8 个 V 亚家族克隆性增殖 T 细胞,这种情况在检测 TCR V 亚家族 T 细胞也存在类似现象^[1,4],提示对 CML 细胞相关抗原的反应不仅局限于单个亚家族,可能与肿瘤抗原存在多个表位有关。本研究中,有 2 例患者未能检测到克隆性增殖 T 细胞,这可能与患者免疫功能低下而未能引起反应有关,也可能存在其他 TCR 的克隆性增殖情况。

总之,本研究首先分析了 CML 患者外周血 TCR V 亚家族 T 细胞的克隆性分布特点,提示大部分患者存在细胞相关的克隆性 T 细胞,对进一步研究特异性细胞免疫治疗工作十分有意义。

参考文献:

- [1] 李扬秋, Siegert W, Schmid 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): 23-25.
- [2] Genevec C, Diu A, Caignard A, et al. An experimentally validated panel of subfamily-specific oligonucleotide primers (V 1-29/V 1-24) for the study of human T cell receptor variable V gene segment usage by polymerase chain reaction[J]. Eur J Immunol, 1992, 22(5): 1261-1269.
- [3] Höhn H, Neukirch C, Freitag K, et al. Longitudinal analysis of T-cell receptor (TCR) α -V and β -V repertoire in CD8^+ T cells from individuals immunized with recombinant hepatitis B surface antigen[J]. Clin Exp Immunol, 2002, 129(2): 309-317.
- [4] Li Y, Yang L, Chen S, et al. The TCR V repertoire usage of T cells from cord blood induced by chronic myelogenous leukemia-associated antigen[J]. Hematology, 2005, 10(5): 387-392.

[编辑:安 凤]