文章编号:1000-5404(2006)16-1671-04

论著

非霍奇金淋巴瘤IgH基因重排分析及其意义

杨 华,肖庆邦,刘华庆,邓 飞 (遵义医学院病理学教研室,遵义 563003)

提 要:目的 探讨免疫球蛋白重链(IgH)基因重排的检测在非霍奇金淋巴瘤(NHL)中的诊断价值。**方法** 用半巢式和混合聚合酶链式反应(PCR)方法,联合使用IgH FR3A、FR2A、FR1家族特异性引物Mixtures(VH1、VH2、VH3)检测44例B-NHL患者、1例未分型淋巴瘤、15例T-NHL患者和5例淋巴结反应性增生患者IgH基因克隆性重排情况。**结果** ①采用FR3A引物,44例B-NHL有37例出现克隆性IgH基因重排,检测率为84%(37/44);采用FR2A引物,有27例出现克隆性IgH基因重排,检测率为61%(27/44);采用FR1家族特异性引物Mixtures(VH1、VH2、VH3)与J区(JHb、JHc)引物,有34、33例出现克隆性IgH基因重排,检测率为77%、75%(34/44、33/44);结合FR3A、FR2A、FR1家族特异性引物Mixtures(VH1、VH2、VH3),总检测率为95%(42/44)。②15例T-NHL有4例出现克隆性IgH基因重排,而5例LRH未出现克隆性IgH基因重排。③1例免疫组化未分型的NHL经PCR检测后明确了分型,为B细胞性淋巴瘤。**结论** 联合采用多对引物可提高检测阳性率;IgH基因克隆性重排检测对鉴别B细胞淋巴瘤和淋巴结反应性增生以及T细胞淋巴瘤有重要意义。

关键词:非霍奇金淋巴瘤;B细胞淋巴瘤;基因重排;聚合酶链反应
中图法分类号:R392.11;R446.62;R733.4 **文献标识码**:A

Analysis of IgH gene rearrangement and its significance in non-Hodgkin lymphoma

YANG Hua, XIAO Qing-bang, LIU Hua-qing, DENG Fei (Department of Pathology, Zunyi Medical College, Zunyi 563003, China)

Abstract: **Objective** To explore the significance of detecting IgH gene rearrangement in diagnosis of non-Hodgkin lymphoma. **Methods** By using family-specific primers mixtures (VH1, VH2, VH3) for IgH FR3A, FR2A, FR1 genes, clonal IgH gene rearrangement was detected by heminested and multiplex PCR in 44 cases of B-NHL, 1 undifferentiated lymphoma, 15 T-NHL and 5 lymphonode reactive hyperplasia. **Results** Clonal IgH gene rearrangement was detected in 36 of 44 B-NHL (positive rate 82%) by using FR3A primers, 27 of 44 B-NHL (positive rate 61%) by using FR2A primers. By using FR1 family-specific primers mixtures (VH1, VH2, VH3) and JH (JHb, JHc), clonal IgH gene rearrangement was demonstated respectively in 34/33 of 44 B-NHL (positive rate 77%, 75%). The total positive rate was 95% (42/44) by combined family-specific primers mixtures (VH1, VH2, VH3) of FR3A, FR2A, FR1 gene. Four of 15 T-NHL revealed clonal IgH gene rearrangement, while 5 LRH had no clonal IgH gene rearrangement. One NHL unclassified by immunohistochemical methods was classified definitely as B cell-derived lymphoma by PCR. **Conclusion** The detection rate of IgH gene rearrangement can be improved by combined usage of several pairs of primers, especially family-specific primers. Detecting clonal IgH gene rearrangement is significant in the procedure of differential diagnosis for B/T-NHL and reactive hyperplasia.

Key words: non-Hodgkin lymphoma; B cell-derived lymphoma; gene rearrangement; polymerase chain reaction

恶性淋巴瘤(malignant lymphoma, ML)是淋巴结和(或)结外部位淋巴组织免疫细胞的实体瘤,来源于淋巴细胞或组织细胞的恶变。国际上统一分为霍奇金淋巴瘤(Hodgkin lymphoma, HL)和非霍奇金淋巴瘤(non-Hodgkin lymphoma, NHL)两大类[1]。

NHL是一类具有很强异质性的淋巴瘤,从免疫学角度分T细胞和B细胞两型。NHL组织学形态多样,形态学结合免疫组化能确诊70%~80%的病例,其余20%~30%常与反应性病变难以区别。淋巴瘤病理诊断是临床工作的难点之一,一般通过细胞形态学、免疫

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30160030)
Supported by the National Natural Science Foundation of China(30160030)
作者简介:杨 华(1971-),女,贵州省松桃县人,硕士,讲师,主要从事恶性淋巴瘤方面的研究。电话:(0852)8608382,E-mail:cy720620@sina.com
通讯作者:邓 飞,电话:(0852)8651063,E-mail:mdproffeideng@hotmail.com
收稿日期:2005-08-02;**修回日期**:2006-03-12

组化、临床特征等对淋巴瘤进行诊断和分类。免疫组化染色可鉴定淋巴瘤的类型，但无法解决上述良恶性鉴别难题。近年来，国外用分子生物学技术证实，细胞增殖的单克隆性可协助肿瘤的诊断。本研究应用PCR方法检测NHL中的IgH基因重排情况，探讨其在淋巴瘤诊断中的价值。

1 材料与方法

1.1 材料

收集遵义医学院及贵州省人民医院病理科的自1998年1月至2004年3月NHL石蜡包埋标本60例。男性45例，女性15例，男:女为3:1。年龄2~77岁，平均年龄43.28岁。原发于淋巴结的结内NHL 28例，原发于胃肠道的结外NHL12例，原发于其他组织的结外NHL 20例。所有病例均根据2001年最新WHO分类[2]，进行HE、PAS染色的组织形态学观察，以及CD20、CD45RO、CD79a、CD4、CD5、CD8、CyclinD1、BCL-2、Ki-67等的免疫表型测定。其中B细胞淋巴瘤(BL) 44例，包括弥漫性大B细胞淋巴瘤(DLBCL) 20例，滤泡性淋巴瘤(FL) 8例，套细胞淋巴瘤(NCL) 7例，黏膜相关性淋巴组织淋巴瘤(MALT) 6例，B慢性淋巴细胞性白血病/小淋巴细胞性淋巴瘤(B-CLL/SLL) 1例，B前淋巴细胞淋巴瘤/白血病B-PLL 1例，伯基特淋巴瘤BL 1例；标记不满意未分型淋巴瘤1例；同时选取15例T细胞淋巴瘤及5例淋巴结反应性增生病例作为对照。

1.2 石蜡包埋组织基因组DNA的提取

对照镜下组织学形态尽量剔除蜡块上肿瘤周边正常组织，切取7~8 μm厚切片10张(不超过25 mg)，每例分别把肿瘤组织放入2 ml Eppendorf管内。二甲苯溶蜡及乙醇水化，干燥样品。按基因公司提供的DNA抽提试剂盒说明书抽提DNA。以紫外分光光度计测量每例DNA样本在波长为260 nm及280 nm时的光密度，计算DNA的浓度及纯度，其$D(260)/D(280)$值介于1.65~1.85，对样本不纯者，重复抽提。

1.3 引物设计

引物设计参照Segal等[3]的方法，由上海生工生物工程技术服务有限公司合成。IgH基因重排PCR扩增分别采用半巢式PCR和混合PCR，半巢式PCR扩增IgH基因的CDRⅢ、CDRⅡ区。另采用家族性多引物混合(Mixtures)进行混合PCR扩增IgH基因的CDRI区。序列如下：FR1 family specific primers (5′-3′)：VH1：CCTCAGTGAAGGTCTCCTGCAAGG，VH2：TCCTGCGCTGGTGAAAGCCACACA，VH3：GGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCA，FR3 A：ACACGGC(C/T)GT(G/A)TATTACTGT，FR2 A：TGG(A/G)TCCG(C/A)CAG(G/C)C(T/C)(T/C)CNGG，JHa：ACCTGAGGAGACGGTGACC，JHb：GTGACCAGGGTNCCTTGGCCCCAG，JHc：TGAGGAGACGGTGACCAGGATCCCTTGGCCCCAG。

1.4 IgH扩增条件

1.4.1 半巢式PCR法 用一致性V区引物(FR3A或FR2A)，J区引物(JHa及JHb)行半巢式PCR反应检测IgH基因克隆性重排。第1轮PCR采用FR3A(FR2A)和JHa，行40个周期循环反应。每一周期由：变性94 ℃ 1 min，退火55 ℃(63 ℃)1 min 30 s(40 s)，72 ℃延伸1 min 30 s(40 s)组成。扩增产物取1 μl作为模板DNA，行第2轮扩增，引物改用FR3A(FR2A)和JHb，再行40个周期的反应。所有循环最后72 ℃延伸7 min，保持在4 ℃结束。

1.4.2 混合PCR法 应用FR1家族特异性引物Mixtures(VH1，VH2，VH3)与J区的JHa进行第1轮扩增。反应条件：变性95 ℃ 1 min，退火59 ℃ 1 min，72 ℃延伸1 min，共35个循环，72 ℃延伸7 min，4 ℃结束反应。第2轮扩增以第1轮产物1 μl为模板，Mixtures(VH1，VH2，VH3)分别与J区的JHb、JHc为引物，条件同第1轮。所用PCR扩增仪为美国产PTC-100™型。

1.4.3 PCR反应总体系 在50 μl反应体系中含50~500 ng DNA模板，10×PCR buffer 5 μl，$MgCl_2$ 3 μl，0.2 mmol/L dNTP 1 μl，0.5 μmol/L引物1和引物2各1 μl，2 U *Taq* DNA聚合酶。以上PCR均以无DNA样本做阴性对照。

1.5 PCR产物检测

取8 μl PCR扩增产物与2 μl 6×上样缓冲液混合，加入2%琼脂糖凝胶(含溴化乙锭)电泳槽孔中，同时加DNA分子量标准，0.5×TBE缓冲液、电流25 mA、电压100~120 V电泳约45 min，紫外线灯下观察并利用凝胶成像分析系统成像。

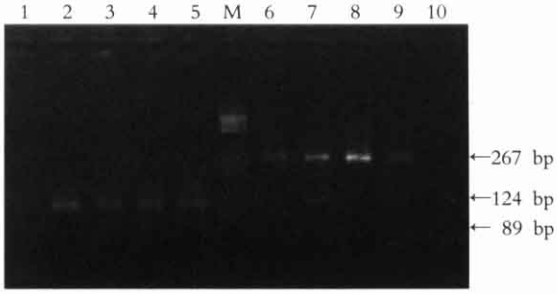
1.6 统计学处理

采用SPSS 10.0件行χ^2检验。

2 结果

2.1 结果判断标准

与标准DNA分子质量对照，在期待目的条带范围内出现1~2条特异性清晰条带为阳性，IgH FR2A的片段长度为230~270 bp；IgH FR3A为80~120 bp；IgH FR1(Mixtures)为80~90 bp；模糊、散发性条带(Smear)为阴性(图1、2)。



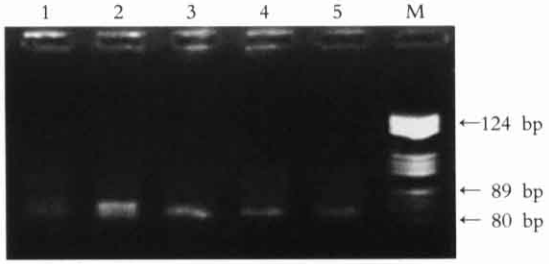
M：DNA标准；1：空白对照；2-5：引物FR3A基因重排；6-9：引物FR2A基因重排；10：淋巴结反应性增生组织

图1 B-NHL克隆性IgH(FR3A、FR2A)基因重排检测结果

2.2 IgH基因产物检测结果

经半巢式PCR扩增后，采用FR3A、FR2A引物，分别对44例B-NHL行IgH基因重排的检测，分别在37例、27例B-NHL中检测到IgH基因重排特异性条带(图1)。结合FR3A、FR2A检测，44例B-NHL中共有39例检测到发生IgH基因的克隆性重排。FR3A、FR2A、FR3A+FR2A在44例B-NHL IgH基因克隆性重排总检出率分别为84%、61%、89%。采用混合PCR法，将FR1家族特异性引物Mixtures(VH1，VH2，VH3)分别与J

区的 JHb、JHc 进行第 2 轮扩增,在 44 例 B-NHL 分别检出有 34 例、33 例发生 IgH 基因的克隆性重排(图 2)。结合 JHb、JHc 检测,检测到发生 IgH 基因克隆性重排共有 40 例。检出率分别为 77%、75%、91%。结合 FR3A + FR2A + FR1 (Mixtures),在 44 例 B-NHL 检测到 42 例发生 IgH 基因的克隆性重排,总检出率为 95%。阳性条带多为单一的重排条带,但也有少部分标本出现 2 条和 3 条寡克隆条带。



1:淋巴结反应性增生组织; 2, 3:引物 FR1(Mixes + JHb)基因重排; 4, 5:引物 FR1(Mixes + JHc)基因重排; M:DNA 标准

图 2　B-NHL 克隆性 IgH(FR1)基因重排检测结果

采用 FR3A 引物,44 例 B-NHL 检测到 37 例发生 IgH 基因的克隆性重排,检出率为 84%;15 例 T-NHL 检测到 4 例发生 IgH 基因的克隆性重排,检出率为 27%。5 例淋巴结反应性增生组织 PCR 扩增产物经电泳后呈涂抹状(smear)(图 1),表明未扩增出 IgH 基因重排特异性条带。1 例标记不满意未分型的 NHL 经 PCR 扩增后出现 IgH(FR3A、FR2A)基因重排特异性条带。

2.3　B-NHL 不同病理类型 IgH 基因产物检测结果

44 例 B-NHL,采用 FR3A、FR2A、FR1 (Mixtures + JHb/JHc)引物,在 DLBCL 中检测到 IgH 基因重排分别为 18 例(90%)、14 例(70%)、16 例(80%)/15 例(75%),3 种引物结合总检测率为 100%;在 MCL 中检测到 IgH 基因重排分别为 7 例(100%)、5 例(71%)、6 例(86%)/5 例(71%),3 种引物结合总检测率为 100%;FL 中分别检测到 5 例(63%)、3 例(38%)、6 例(75%)/6 例(75%)出现 IgH 基因重排,3 种引物结合总检测率为 88%;MALT 分别检测到 4 例(67%)、3 例(50%)、4 例(67%)/4 例(67%)出现 IgH 基因重排,3 种引物结合总检测率为 83%。另外 B-PLL,采用 FR1(Mixtures + JHb)引物未检测到 IgH 基因重排条带,BL 采用 FR2A 引物未检测到 IgH 基因重排条带,其余引物在 B-PLL、B-CLL/SLL、BL 中均为阳性结果,出现 IgH 基因重排条带。

64 例石蜡包埋标本 IgH(FR3A)基因重排检测结果,B-NHL 阳性 37 例,阴性 7 例;T-NHL 阳性 4 例 ,阴性 11 例;淋巴结反应性增生 5 例均为阴性。基因重排的检出率在 B-NHL 与 T-NHL 及 LRH 间的差异有显著性($P<0.05$)。

3　讨论

1994 年修正的欧洲和美国淋巴类肿瘤分类建议(revised European-American lymphoma classification of lymphoid neoplasms, REAL)及其后发表的 WHO 淋巴组织肿瘤分类,均联合应用形态学特征、免疫表型特征、细胞遗传学特征、分子生物学特征和临床特征来定义淋巴瘤的每个疾病项,分子水平特征已成为鉴别各种类型淋巴瘤的重要手段之一。目前认为,随着 B 淋巴细胞的不断分化成熟,其免疫球蛋白重链基因结构 V、D、J、C 区会不断发生重排组合,即在 B 淋巴细胞分化过程中不断进行 IgH 基因重排[4]。在正常人和反应性淋巴组织增生等疾病中,因为每个淋巴细胞都有自己的重排形式,基因重排各式各样,是多克隆性的。所以 PCR 扩增产物片段长短不一,序列也不同。电泳后见不到克隆性重排条带而呈弥漫性一片现象。而淋巴瘤是淋巴细胞不同分化阶段的恶性克隆性增殖所致的肿瘤,一般都是同一突变细胞克隆性增生的结果,肿瘤细胞为单克隆性,所以 PCR 产物电泳后呈一条带或几条带。因此 PCR 分析 IgH 基因重排,即能区分单克隆性或多克隆性增生,可作为诊断淋巴瘤的一种方法[5]。

采用 IgH FR3A 基因引物,本研究结果显示 44 例 B-NHL 中有 37 例(FR3A)检测出 IgH 基因克隆性重排,阳性率为 84%,与田晓峰等[6]报道相符。15 例 T-NHL 中有 4 例检测出 IgH 基因克隆性重排,阳性率为 27%。而 5 例淋巴结反应性增生组织无 1 例出现 IgH 基因克隆性重排条带。B-NHL 与 T-NHL 及 LRH 间基因重排检测阳性率有显著性差异,说明 IgH 基因引物对 B-NHL 的克隆性和细胞源性的确定有很高的特异性和灵敏性,具有重要价值。对区别 B-NHL、T-NHL 及 LRH 有重要作用,可用于淋巴瘤的诊断和分型。本组 1 例免疫组化未分型的 NHL 经 PCR 检测后明确了分型,为 B 细胞性淋巴瘤。

理论上,采用 PCR 方法可检测到所有 B-NHL 发生 IgH 基因克隆性重排,但在实际临床检测过程中,由于种种原因并不能 100% 检测到。早期应用 PCR 方法检测 B-NHL IgH 基因克隆性重排大都采用单对引物进行,其假阴性较高,阳性率维持在 26.8% ~70%[7]。产生假阴性的原因是由于 IgH 基因重排的多样性及重排区域的广泛性,使单对引物不能完全与之匹配,导致扩增失败。如对检测阴性的标本改用针对 FR1,FR2 设计的家族性特异引物进行扩增,可提高检出率。Zwicky 等[8]用针对 CDR3 的保守引物加 FR1 的家族特异引物可扩增 90% B-NHL。

本研究对于 IgH 基因重排检测采用半巢式扩增,用针对 CDR3、CDR2 的保守引物加 FR1 的家族特异引物进行扩增。在 44 例 B-NHL 中,单纯应用 FR3A 检出率为 84%(37/44),应用 FR2A 检出率为 61%(27/44);结合应用 FR3A + FR2A 总检出率为 89%(39/44),采用 FR3A + FR2A + FR1 检测总阳性率为 95%

(42/44)。有文献报道使用针对 FR1 设计的 7 个亚家族特异性的引物可检测出大多数 B 细胞恶性肿瘤,但需分别对所有病例进行 7 个不同的 PCR 反应,较为复杂,不适合临床应用。因此本实验中在联合应用 FR3A、FR2A 检测的基础上,再应用针对 FR1 设计的混合引物(VH1、VH2、VH3)同时与 J 区引物(JHb、JHc)进行扩增,使检测总阳性率达到 95%,这样既减少了由于组合上多样性而引起的假阴性,较大幅度地提高了 IgH 克隆性重排检测率,又避免了检测的复杂性,可适于临床应用。因此在有条件情况下,某些病例采用 FR3A、FR2A 引物 PCR 检测结果为阴性时,可再辅以 FR1 混合引物检测,以最大程度地减少假阴性的发生,提高 IgH 克隆性重排检测率。

研究还表明 IgH 基因克隆性重排的检测率除技术水平、标本固定、保存因素外,与恶性淋巴瘤的肿瘤细胞起源密切相关[9]。肿瘤细胞起源于原始淋巴细胞,亦称生发中心前(pre-GC)原始 B 细胞,表达未突变 VH 区基因,PCR 检测 IgH 基因克隆性重排表现高检出率,包括 B-淋巴母细胞性白血病/淋巴瘤,套细胞淋巴瘤等。另一组起源于记忆 B 细胞,由生发中心产生,并以细胞含 VH 区基因体细胞超突变为特征(GC 及 GC 后记忆 B 细胞),PCR 方法检测率相对较低一些。后者含 B-NHL 的大部分亚型,例如浆细胞瘤、MALT、弥漫性大细胞型淋巴瘤等。在后 1 组中,引物结合点处突变是导致 PCR 较低检测率的一个原因。采用 FR3A 引物,本研究示 MCL IgH 基因克隆性重排检测率为 100%,而 MALT 及 FL 分别仅为 67% 及 63%,与文献报道相符合。

本组 44 例 B-NHL 的 IgH 基因重排大部分为单一条带,但也有 2~3 重排带,其原因可能为 2 个等位基因均发生了重排,也可能存在少数 B 细胞性克隆增生,由于克隆间差异,出现 1 个以上基因重排带[10]。

本实验检测中显示同一病例可同时检测出两种引物及两种以上引物的阳性重排条带,分析其原因可能是其中一种引物扩增出的阳性重排条带反映了 B 细胞性肿瘤细胞的单克隆增殖,而其他引物所扩增出的阳性重排条带仅仅反映背景浸润的 B 淋巴细胞的寡克隆或亚克隆增殖。44 例 B-NHL 中有 2 例用以上引物均未扩增出 IgH 基因重排条带,考虑与以下因素有关:①模板的质量问题:石蜡包埋组织致 DNA 产生不同程度的降解,导致假阴性结果。②反应体系有抑制物的存在,一般认为组织内坏死、出血均能抑制 PCR 反应。③不排除引物设计方面存在一定的局限性,所设计的引物不可能覆盖全部的 IgH 的 V-D-J 重排方式。④各种试剂的质量与操作技术的严格与否均能影响阳性检出率。另外在 IgH 基因重排的 PCR 检测方面还存在着其他问题,如琼脂糖电泳加 EB 染色分辨率低,易导致假阴性;单克隆性 B 细胞增殖也可见于自身免疫性疾病。笔者体会:可采用多对引物来提高检测阳性率;固定组织要及时,可改进固定液,一般采用缓冲甲醛、丙酮或乙醇固定组织,则 DNA 保存较一般甲醛溶液为好,有条件的单位最好将组织冷藏于液氮或 -70 ℃冰箱。石蜡包埋的组织提取 DNA 过程中应避免 DNA 断裂并且要防止污染,避免假阳性;应用放射性标记的引物或 dNTP 进行 PCR,然后对产物电泳后放射自显影分析,或毛细管凝胶电泳(PCR-GS),以及变性梯度凝胶电泳等技术以提高判断准确性、客观性;分析判断结果时必须以病理形态为基础,结合临床及免疫表型;判断结果标准严格统一,防止主观因素。

参考文献:

[1] 赵继贤. 恶性淋巴瘤的分类进展[J]. 河北医药, 2004, 26(3): 218-220.

[2] JAFFE E S, HARRES N L, STEIN H, *et al*. World Health Organization Classification of Tumors: pathology and genetics of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues[M]. Lyon: IARC press, 2001: 10-11.

[3] SEGAL G H, JORGENSEN T, MASIH A S, *et al*. Optimal primer selection for clonality assessment by polymerase chain reaction analysis: . Low grade B-cell lymphoproliferative disorders of nonfollicular center cell type[J]. Hum Pathol, 1994, 25(12): 1269-1275.

[4] GUITART J, CAMISA C, EHRLICH M, *et al*. Long-term implications of T-cell receptor gene rearrangement analysis by Southern blot in patients with cutaneous T-cell lymphoma[J]. J Am Acad Dermatol, 2003, 48(5): 775-779.

[5] 王 萍, 王瑞年, 卢 健, 等. 非霍奇金淋巴瘤的 IgH 和 TCRδ 基因重排[J]. 临床与实验病理学杂志, 2002, 18(1): 21-23.

[6] 田晓峰, 许良中, 何开铃, 等. PCR 检测恶性淋巴瘤基因重排的方法学探讨[J]. 实用肿瘤杂志. 1999, 14(3): 180-181.

[7] 邢佩霓, 王 彤, 李梅生, 等. 多聚酶链反应结合酶切与异源双链形成分析检测白血病微小残留病[J]. 白血病, 1998, 7(2): 74-77.

[8] ZWICKY C S, MADDOCKS A B, ANDERSEN N, *et al*. Eradication of polymerase chain reaction detectable immunoglobulin gene rearrangement in non-Hodgkin's lymphoma is associated with decreased relapse after autologous bone marrow transplantation[J]. Blood, 1996, 88(9): 3314-3322.

[9] LIN C W, CHANG C L, LI C C, *et al*. Spontaneous regression of Kikuchi lymphadenopathy with oligoclonal T-cell populations favors a benign immune reaction over a T-cell lymphoma[J]. Am J Clin Pathol, 2002, 117(4): 627-635.

[10] 金 亦, 苏祖兰, 李迎春, 等. 非霍奇金淋巴瘤 IgH 及 TCRγ 基因重排的意义[J]. 中华血液学杂志, 2004, 25(10): 623-624.

(编辑 王 红)