文章编号:1000-5404(2009)15-1443-04

论著

CML患者外周血TCR Vδ亚家族T细胞的谱系变化研究

杨 毅[1*],张翼婷[2*],李志雄[1*],陈少华[3],杨力建[3],李扬秋[3] (暨南大学医学院:[1]临床医学系2005级,[2]临床医学系2006级,[3]血液病研究所,广州 510632)

摘 要:目的 了解慢性粒细胞白血病(chronic myeloid leukemia,CML)患者慢性期(chronic phase, CP)和缓解期(complete remission, CR)外周血T细胞受体(T cell receptor, TCR)Vδ亚家族T细胞的分布和克隆性情况。**方法** 利用RT-PCR扩增8例CML-CP和8例CML-CR患者外周血T细胞中8个Vδ亚家族基因的互补决定区(CDR3),了解TCR Vδ亚家族T细胞的分布和利用情况;阳性产物进一步经基因扫描分析CDR3长度,从而了解其克隆性。10例健康人外周血作为对照。**结果** 8例CML-CP患者外周血T细胞平均表达(3.25±0.89)个Vδ亚家族,主要以Vδ1、Vδ2和Vδ3的表达为主,而8例CR期患者则平均表达(3.50±0.76)个Vδ亚家族,主要集中在Vδ1、Vδ2、Vδ3和Vδ8中表达;两组与健康对照组(3.50±0.52)比较无统计学意义。此外,Vδ8表达频率在CML-CR患者(5/8)中略高于健康人(3/10)和CML-CP患者(2/8)。基因扫描绝大多数患者和健康人外周血TCR Vδ亚家族T细胞均存在克隆性增殖现象,主要以Vδ1-Vδ3为主,但在CML-CR患者中,表达Vδ7亚家族的两例样本均呈克隆性增殖,这在10例健康人中均未检测到。**结论** 3组样本的外周血T细胞中TCR Vδ谱系和克隆性增殖类似,提示CML患者T细胞免疫抑制可能并不主要累及TCR Vδ谱系变化,并在CML-CR期所出现了一些不同的Vδ表达和克隆模式。

关键词:CML;TCR Vδ基因;基因扫描;克隆性
中图法分类号:R392.11;R394.2;R733.72 **文献标识码**:A

Changes in pattern of TCR Vδ repertoire in peripheral blood from CML patients

YANG Yi[1*], ZHANG Yi-ting[2*], LI Zhi-xiong[1*], CHEN Shao-hua[3], YANG Li-jian[3], LI Yang-qiu[3] ([1]Grade 2005 of Undergraduate, [2]Grade 2006 of Undergraduate, [3]Institute of Hematology, Medical College, Jinan University, Guangzhou 510632, China)

Abstract: Objective To investigate the distribution and clonality of TCR Vδ repertoire T cells in peripheral blood mononuclear cells with chronic myeloid leukemia (CML) at chronic phase (CP) and complete remission (CR). **Methods** The CDR3 of TCR Vδ 8 subfamily genes were amplified in mononuclear cells of peripheral blood from CML patients in CP (8 cases) and CR (8 cases) phases for observation of the usage of TCR Vδ repertoire by RT-PCR. The positive PCR products were further labeled with fluorescence and analyzed by genescan technique for the CDR3 size for evaluation of the clonality of the detectable TCR Vδ T cells. A total of 10 cases of healthy adults served as controls. **Results** The mean values of detectable TCR Vδ subfamilies were (3.25±0.89) in patients with CML-CP, predominantly in Vδ1, 2 and Vδ3, whereas (3.5±0.76) of 8 Vδ subfamily T cells were expressed in patients with CML-CR, predominantly in Vδ1, 2, 3 and Vδ8. There was no significant difference between the above groups and the healthy adults (3.5±0.52). In addition, a higher frequency expression of Vδ8 could be found from peripheral blood in CR phase (5/8) rather than from that in CP phase (2/8) and from that of the healthy adults (3/10). Genescan analysis showed that the majority of PCR products from both CML and healthy adults displayed clonal expansion, predominantly in Vδ1, Vδ2 and Vδ3. Clonal expanded Vδ7 subfamily T cells, however, could be identified from two patients in CR phase but not in all of 10 healthy adults. **Conclusion** The similar distribution and clonal pattern of TCR Vδ repertoire T cells can be found in peripheral blood from the three groups, suggesting that the cellular immunosuppression of CML patients might not be mainly involved in the alteration of TCR Vδ repertoire. In CML-CR groups, the expression and clonal pattern of some Vδ repertoires are different from those in other groups, which needs further studies.

Key words: CML; T-cell receptor Vδ gene; Genescan; T-cell clonality

---

基金项目:国家自然科学基金(30424003);广东省医学科研基金(A2008341);暨南大学第四批本科生科技创新工程项目(cx08092)
Supported by the Special Foundation of National Natural Science Foundation of China (30424003), the Medical Science Foundation of Guangdong Province (A2008341) and the Innovation Program of Fourth Batch of Undergraduates of Jinan University (cx08092)

作者简介:杨 毅,男,广东省化州市人,本科生。电话:(020)85220262,E-mail:lufiyy@163.com
*:同等贡献者
通信作者:陈少华,电话:(020)85220262,E-mail:jnshaohuachen@163.com

收稿日期:2008-09-16;**修回日期**:2008-10-30

多数血液肿瘤患者均存在明显的细胞免疫功能缺陷,我们前期研究已发现慢性粒细胞白血病(chronic myeloid leukemia,CML)患者外周血T细胞中T细胞受体(T-Cell receptor, TCR) Vα 和 Vβ 均存在限制性利用和克隆模式的改变,临床观察表明这种限制性表达程度与CML患者的免疫缺陷状况和病情恶化程度相关[1-3]。为了解CML患者的细胞免疫抑制是否也涉及TCR Vδ 亚家族T细胞,本研究进一步利用RT-PCR-基因扫描法分析CML慢性期(chronic phase, CP)和缓解期(complete remission, CR)的患者外周血TCR Vδ 8个亚家族的分布和克隆性情况,从而可以更全面地了解CML患者的T细胞免疫状态。

1 材料与方法

1.1 材料

集经细胞形态学、细胞化学、细胞和分子遗传学确诊的初发未治的慢性期和缓解期的CML患者外周血各8例(CP期:男性6例,女性2例,年龄33~45岁,中位年龄:38岁;CR期:男性5例,女性3例,年龄3~55岁,中位年龄:30岁),编号分别为B1-B8和C1-C8(来源于广东省人民医院,标本收集时间:2008年12月至2009年3月),健康成人志愿者外周血10例作为对照(来源于本研究所职工和学生,收集时间为2008年9月至2008年12月),编号为N1-N10。常规分离单个核细胞。

1.2 RNA提取和cDNA合成

RNA提取应用TRIzol试剂盒(Invitrogen, USA)并应用随机引物和反转录酶试剂盒(Superscript Ⅲ,Invitrogen, USA)反转录合成cDNA第一链。均按常规方法进行。

1.3 引物设计

根据TCRδ中Vδ的8个亚家族分别设计8条Vδ引物作为上游引物(Vδ1~8),并在Cδ区设计一共同下游引物Cδ,另外在Cδ引物上游再设计一荧光素标记的Cδ-fam引物作为标记PCR产物和基因扫描用(表1)。引物均由德国柏林TIB MOLBIOL公司合成[4]。

表1 用于TCR Vδ基因检测的引物序列

引物	序列
Vδ1	5′-GTGGTCGCTATTCTGTCAACT-3′
Vδ2	5′-GCTCCATGAAAGGAGAAGCGA-3′
Vδ3	5′-CACTGTATATTCAAATCCAGA-3′
Vδ4	5′-TGACACCAGTGATCCAAGTTA-3′
Vδ5	5′-TCTGCACATTGTGCCCTCCCA-3′
Vδ6	5′-TATCATGGATTCCCAGCC-3′
Vδ7	5′-GAACATCACAGCCACCCAGACCG-3′
Vδ8	5′-ACTTCCAGAAAGCAGCCAAA-3′
Cδ	5′-AACAGCATTCGTAGCCCAAGCAC-3′
Cδ- Fam	5′-Fam-GTTTATGGCAGCTCTTTGAAGGT-3′

1.4 RT-PCR扩增

利用TCR Vδ(Vδ1~Vδ8)亚家族上游引物和Cδ共同下游引物扩增各样本cDNA,总反应体积为20 μl,其中含1 μl cDNA,任一 Vδ 引物(Vδ1~Vδ8)和其相应的共同下游引物Cδ(0.5 μmol/L),0.1 mmol/L dNTP,1 U *Taq* 聚合酶,1.5 mmol/L $MgCl_2$ 和 1×PCR 缓冲液(Promega,USA)。反应在PCR扩增仪(Biometra,Germany)中进行,共进行40个循环,每一循环包括:94 ℃ 1 min(首次3 min),60 ℃ 1 min 和 72 ℃ 1 min(末次6 min),取8 μl PCR产物和2 μl 溴酚蓝于2.5%琼脂糖中电泳分析PCR结果。

1.5 T细胞克隆性分析

1.5.1 标记PCR产物 10 μl 的反应体系含2 μl 未标记的首次PCR阳性产物,0.1 μmol/L Cδ-fam 引物,1.5 mmol/L $MgCl_2$,0.2 mmol/L dNTP,1 U *Taq* 聚合酶和PCR缓冲液。PCR共进行35个循环,退火温度为66 ℃,余同上。

1.5.2 基因扫描分析(CDR3长度分析) 取2 μl 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,ABI)与标准品(GENESCAN™-500-LIZ™,Perkin Elmer,ABI,其中含有荧光素LIZ标记的不同大小的DNA片段)按体积20∶1比例配好的10 μl 混合液,94 ℃变性4 min,然后将样品加入96孔板,直接装载到已灌好POP-4 (Performance Optimized Polymer-4,ABI)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。当PCR产物中所含DNA扩增片段大小一致,其电泳时的迁移率完全相同,在同一时间点通过扫描,所显示的结果为一单峰图像,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像提示产物主要来自同一克隆即为寡克隆性;而多峰图像提示多克隆性[1,2]。

1.6 统计学分析

采用SPSS 11.5统计软件进行 *t* 检验。

2 结果

2.1 TCRVδ亚家族的表达特点

8例CP期CML患者外周血T细胞平均表达(3.25±0.89)Vδ个亚家族,主要以Vδ1、Vδ2和Vδ3的表达为主,而8例CR期患者则平均表达(3.50±0.76)个Vδ亚家族,主要集中在Vδ1、Vδ2、Vδ3和Vδ8中表达;从表达个数上看,前2组与健康对照组(3.50±0.52)比较尚无统计学差异。而从各个亚家族的表达情况看,3组样本外周血T细胞均全部表达TCR Vδ1和Vδ2亚家族;CML-CR患者的Vδ8表达频率(5/8)略高于健康人(3/10)和CML-CP患者(2/8),但尚无统计学差异;TCR Vδ4、5和Vδ6在CP期和CR期患者外周血中均未能检测到,而这几个亚家族在健康人中也未能检测到(Vδ4和Vδ5)或检测率很低(Vδ6),见图1。

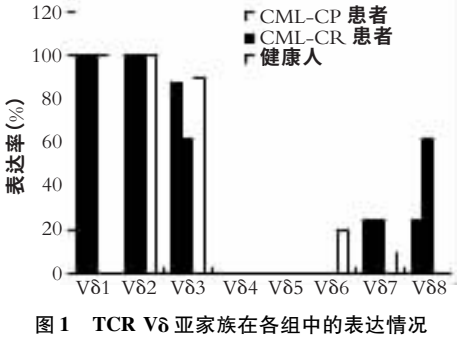
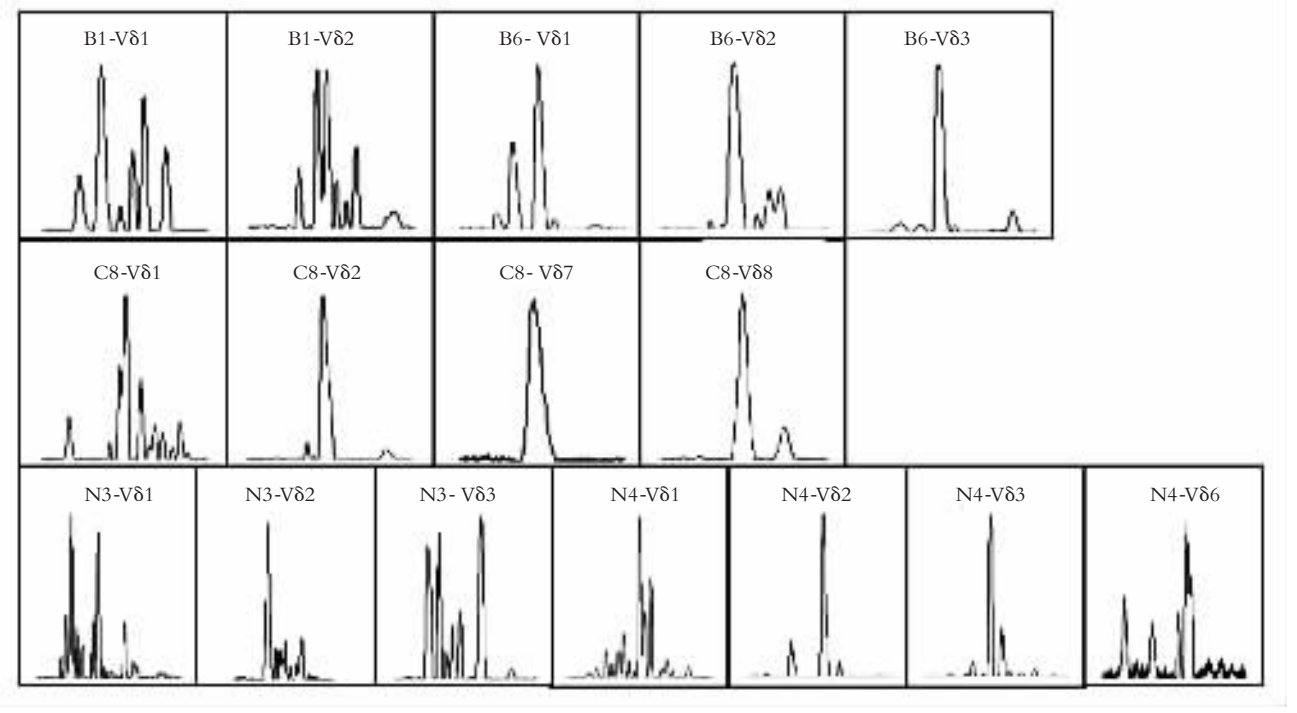
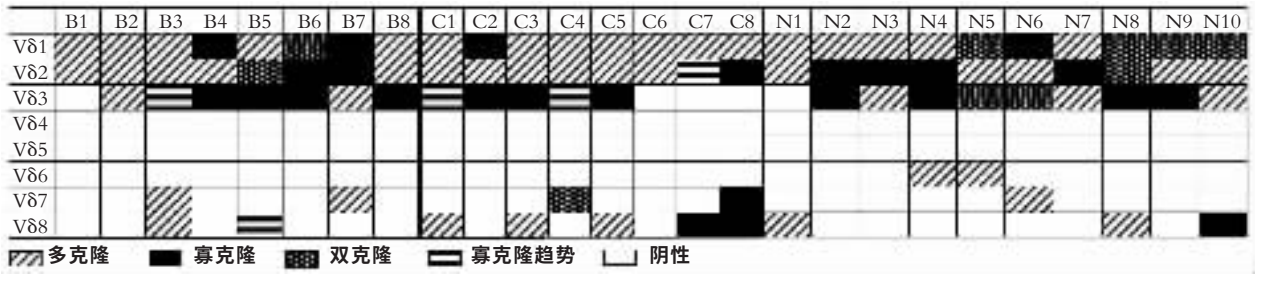


图1 TCR Vδ亚家族在各组中的表达情况



B1 的 Vδ1 和 Vδ2 均呈多克隆图像,B6(Vδ1 ~ Vδ3), C8(Vδ2、7、8)均呈克隆模式改变,分别呈寡克隆或双克隆;N3 和 N4 的 Vδ2 及 N4 的 Vδ3 呈寡克隆,其余家族呈多克隆

图 2　2 例 CML-CP(B1、B6)、1 例 CML-CR(C8)和 2 例健康人(N3、N4)外周血 TCR Vδ 亚家族的基因扫描结果



B1 ~ B8:8 例 CML-CP 患者;C1 ~ C8:8 例 CML-CR 患者;N1 ~ N10:10 例健康人

图 3　TCR Vδ 亚家族在各组中的分布和克隆性特点示意图

2.2　T 细胞克隆性分析结果

基因扫描结果显示,6/8 例 CP 期和 7/8 例 CR 期 CML 患者外周血 TCR Vδ 亚家族 T 细胞均出现克隆性增殖现象,而 10 例健康人中有 9 例也出现了克隆模式的改变,主要以 Vδ1、2 和 Vδ3 为主,Vδ3 亚家族在 3 组中出现的频率最高,有的样本还同时在不同亚家族中呈克隆模式的改变,如 B6 样本在 Vδ1 中呈双克隆,在 Vδ2 和 Vδ3 中均呈寡克隆性,而 C8 样本则在 Vδ2,7 和 Vδ8 中均呈寡克隆性。在 CML-CR 患者中,表达 Vδ7 亚家族的两例样本均呈克隆性增殖,这在 10 例健康人及 8 例 CP 期患者中均未检测到(图 2、3)。

3　讨论

TCR 有 α、β、γ 和 δ 4 种肽链,分别以 TCRγδ 和 TCRαβ 两种异源二聚体形式表达于 T 细胞表面,T 细胞可根据其表面表达的 TCR 类型而分为 αβ + T 细胞和 γδ + T 细胞,前者为外周血 T 细胞的主要成分(90%),γδ + T 细胞在外周血中仅占 1% ~ 10%。αβ + T 细胞的免疫应答为 MHC 限制性,而 γδ + T 细胞则为非 MHC 限制性。尽管 γδ + T 细胞的功能尚不完全清楚,但近年的研究提示其在抗病毒和抗肿瘤中具有重要的作用[5-8]。我们的系列研究主要通过分析 TCR Vα 和 Vβ 亚家族分析已经提示 CML 患者存在明显的 T 细胞免疫功能缺陷[1,2],而有关 TCR Vδ 亚家族的谱系改变如何则未有研究资料。故在既往研究的基础上,本研究继续分析和比较 CML-CP 和 CML-CR 患者 TCR Vδ 亚家族基因谱系的变化情况。

TCRδ 基因由重组的 VDJ 和 C 区组成,TCRδ 的可变区(V 区)可以分为 8 个亚家族。由于 TCR 基因重排时所形成的 CDR3 高度多样化,不同克隆 T 细胞的 TCR 重排时,其 CDR3 长度和序列有所不同,据 TCR 基因的特点,采用 RT-PCR 扩增和基因扫描法即可检测各亚家族 T 细胞的分布和克隆性,故本研究采用该方法分析了

CML 患者 CP 期和 CR 期各 8 例,结果显示 8 例 CML-CP 患者外周血 T 细胞与 CR 组以及健康对照组一样全部表达 TCR Vδ1 和 Vδ2 亚家族,TCR Vδ4、5 和 Vδ6 在 CP 期和 CR 期患者外周血中均未能检测到,而这几个亚家族在健康人中也未能检测到或检测率很低,与 TCR Vα 和 Vβ 基因谱系在健康人外周血中呈全谱系表达和多克隆分布的特点有所不同,多数研究都认为 TCR Vδ 亚家族在健康人中有选择性利用的情况,主要以 Vδ1 和 Vδ2 为主。从 CML 患者的 TCR Vδ 谱系分布特点可见其与健康人没有明显的差异,有一点不同的是 CML-CR 患者的 Vδ8 的表达频率(5/8)略高于健康人(3/10)和 CML-CP 患者(2/8),这是否与其 T 细胞免疫恢复有关有待进一步扩大标本量进行研究。

在未受任何抗原刺激下,TCR 基因的重排是随机的,表现为多家族和多克隆性,而当受到特异性抗原刺激后,TCR 谱系会呈现优势表达并出现克隆模式的改变。在正常情况下,TCR Vβ 亚家族呈多克隆性,然而与 Vβ 亚家族有所不同,TCR Vδ 亚家族在正常人中也常可检测到克隆性增殖的 T 细胞,这种克隆模式的改变还有随年龄增加而明显的趋势。本研究在大部分健康人和 6/8 例 CP 期患者外周血 TCR Vδ 亚家族中均检测到了克隆性增殖的 T 细胞,并均主要集中在 Vδ1、2 和 Vδ3 中,该结果也提示 CML 患者 Vδ 亚家族的克隆增殖模式与健康人类似,但值得注意的是表达 Vδ7 的 2 例 CR 期样本均呈克隆模式的改变,Vδ7 在健康人中出现频率很低,这种变化是否与某些抗原特异的增殖有关,还有待进一步研究。

参考文献:

[1] 陈 思,李扬秋,陈少华,等. CML 相关 TCR Vα 亚家族 T 细胞的克隆性分布特点[J]. 肿瘤防治研究, 2007, 34(3):168 - 170.

[2] 耿素霞,李扬秋,陈少华,等. CML 患者 $CD4^+$ 和 $CD8^+$ T 细胞的 TCR Vβ 基因谱系和克隆性分析[J]. 中国免疫学杂志, 2007, 23(2):157 - 160.

[3] 张 琳,周 健,胡杰英. 慢性粒细胞白血病患者树突状细胞抗原加工递呈和迁移功能观察[J]. 郑州大学学报:医学版,2006,41(5):895 - 897.

[4] Yamamoto T, Hara T, Nanba E, *et al*. Abnormal expansion of peripheral gamma delta T cells in patients with neurologic disorders[J]. Brain Behav Immun, 1997,11(3):157 - 166.

[5] Evans P S, Enders P J, Yin C, *et al*. In vitro stimulation with a nonpeptidic alkylphosphate expands cells expressing Vgamma2-Jgamma1.2/Vdelta2 T-cell receptors[J]. Immunology, 2001, 104(1): 19 - 27.

[6] Hirokawa M, Horiuchi T, Kawabata Y, *et al*. Reconstitution of gammadelta T cell repertoire diversity after human allogeneic hematopoietic cell transplantation and the role of peripheral expansion of mature T cell population in the graft[J]. Bone Marrow Transplant, 2000, 26(2): 177 - 185.

[7] Girardi M, Oppenheim D E, Steele C R, *et al*. Regulation of cutaneous malignancy by gammadelta T cells[J]. Science, 2001, 294(5542): 605 - 609.

[8] Kode J, Dudhal N, Banavali S, *et al*. Clonal T-cell receptor gamma and delta gene rearrangements in T-cell acute lymphoblastic leukemia at diagnosis: predictor of prognosis and response to chemotherapy[J]. Leuk Lymphoma, 2004, 45(1):125 - 133.

(编辑 汪勤俭)

张绍祥副校长荣立二等功

为褒奖在抗震救灾、科学研究、军事训练等方面作出突出成绩的单位和个人,中央军委胡锦涛主席近日签署通令,给全军 15 个单位和 28 名个人分别记功。我校张绍祥副校长荣立二等功。

张绍祥副校长现为第三军医大学人体解剖学教授、博士生导师、重庆市数字医学研究所所长,是我国数字化人体的主要创始人和知名专家、国家杰出青年科学基金获得者、国家"新世纪百千万人才工程"国家级人选、总后"科技银星",荣获"重庆市优秀专业技术人才"荣誉称号。多年来,他献身国防、牢记使命,坚持走自主创新之路,在医学教育、科学研究领域拼搏奉献、建功立业,为军事医学做出了重要贡献。经过十余年的艰苦努力,牵头完成的研究项目"中国数字化人体数据集的建立",2007 年以第一完成人获国家科技进步二等奖。该项目属生命科学与信息科学的交叉领域,在数据集的连续性、分辨率、断面层厚、完整性、标本选用代表性等六个方面居国际领先水平。该数据集是一项具有完全自主知识产权的原创性成果,已加入国家科学数据共享工程体系,对推动我国与人体结构有关的多个领域的数字化进程和科技进步具有重大意义。该项目的完成,使我国成为继美国之后拥有本国数字化人体数据集的第二个国家,且在数据集的质量上超过美国,为我国占领该领域的学术前沿做出了重大贡献。此外,他还先后获得国家科技进步二等奖 2 项,国家教学成果二等奖、军队教学成果一等奖各 1 项,军队科技进步二等奖、三等奖各 2 项,"十五"全军后勤重大科技成果奖 1 项,重庆市科技进步一等奖 1 项。主编专著 3 部,参编专著 15 部,以第一作者和通信作者在国内外学术期刊上发表论文、综述 140 余篇,SCI 收录 10 篇。

张绍祥副校长现担任中国解剖学会副理事长、全军医学科学技术委员会解剖与组胚专委会副主任委员、重庆市解剖学会理事长等学术职务,并兼任《第三军医大学学报》第八届编委会副主任委员,《军医大学学报(英文版)》主编。