DOI:10.16016/j.1000-5404.2003.04.032
第25卷第4期 第三军医大学学报 Vol. 25, No. 4
2003年2月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Feb. 2003

文章编号:1000-5404(2003)04-0347-02

技术方法

PCR检测非霍奇金淋巴瘤IgH和TCRβ基因重排

Rearrangement analysis of immunoglobulin heavy chain and T cell receptor β in non-Hodgkin's lymphoma by PCR method

章 容,郭乔楠,麻 莉,辛 榕 (第三军医大学附属西南医院病理学研究所,重庆 400038)

提 要:目的 探讨PCR方法检测IgH和TCRβ基因重排在非霍奇金淋巴瘤(NHL)诊断中的临床意义。方法 用PCR方法检测40例非霍奇金淋巴瘤和5例慢性淋巴结炎的基因重排情况。结果 20例B细胞NHL中检测出19例IgH基因重排,20例T细胞NHL中检测出17例TCRβ基因重排。结论 PCR方法检测NHL中IgH和TCRβ基因重排具有敏感、特异的优点,在非霍奇金淋巴瘤的诊断中具有重要价值。

恶性淋巴瘤(Malignant lymphoma,简称淋巴瘤)是常见肿瘤之一,其中非霍奇金淋巴瘤(Non-Hodgkin's lymphoma,NHL)占90%以上。在淋巴瘤的病理诊断中,区分淋巴细胞的良性反应性增生和恶性增生(淋巴瘤)一直是临床病理诊断的难题,单凭形态学分析常常难以作出判断,尤其是慢性淋巴结炎的假恶性征象、高分化淋巴瘤、淋巴组织反应性增生与少数恶性瘤细胞共存等情况下。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。淋巴细胞成熟过程中免疫球蛋白(Ig)和T细胞受体(TCR)基因重排现象的发现,为检测淋巴细胞的克隆性增生提供了理论基础。本研究应用PCR方法检测非霍奇金淋巴瘤中的IgH和TCRβ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

收集本院2001年非霍奇金淋巴瘤石蜡包埋标本40例,男27例,女13例,年龄15~84岁。原发于淋巴结的结内非霍奇金淋巴瘤15例,原发于胃肠道的结外非霍奇金淋巴瘤16例,原发于其它组织的结外非霍奇金淋巴瘤9例。经组织学检查及免疫组化分型,其中CD3,CD45RO阳性,CD20,CD19阴性即T细胞型20例,CD20,CD19阳性,CD3,CD45RO阴性即B细胞型20例,另取反应性增生性慢性淋巴结炎5例作对照。

1.2 DNA提取

石蜡包埋组织5 μm厚切片10张,置于Eppendoff管内,二甲苯溶蜡及乙醇水化各3次,干燥样品。按Omega公司提供的DNA抽提试剂盒说明书抽提DNA。

1.3 PCR引物及扩增条件

免疫球蛋白重链(IgH)基因引物序列为:Primer1:5′-CTGTCGACAC GGCCG TGTAT TACTG-3′,Primer 2:5′-ACCTG CAGAG GAGAC GGTGA CC-3′,Primer1为IgH基因V区同源序列,Primer 2为J区同源序列,所期望扩增片段大小在100~150 bp之间。T细胞受体链(TCRβ)基因引物:Primer 1:5′-TCA TGG TGT AAC ATT GTG GGG AC-3′,Primer 2:5′-AGC ACC GTG AGC CTG GTG CC-3′,Primer1为TCR基因D区同源序列,Primer 2为J区同源序列。所期望扩增片段大小在60~70 bp左右。PCR反应体积100 μl,其中模板(DNA含量0.5~1 μg)2 μl,引物1和引物2(50 pmol/μl)各2 μl,10 buffer 10 μl,Mg^{2+} 4 μl,dNTP8 μl,Taq酶0.5 μl,三蒸水67.5 μl,反应液覆盖适量石蜡油以防蒸发,均采用半重叠PCR方法扩增以期增加敏感性和特异性。每轮扩增后,72℃延伸7 min,以保证链延伸反应彻底进行,无DNA样本做阴性对照。所用PCR扩增仪为美国产AMPLITRON^{R}I型。

1.3.1 IgH扩增条件 35个循环,循环开始前94℃预变性5 min,循环结束后72℃延伸10 min,每一循环由变性94℃ 30 s,退火55℃ 30 s和延伸72℃ 2 min组成。

1.3.2 TCRβ扩增条件 39个循环,循环开始前93℃预变性10 min,循环结束后72℃延伸10 min,每一循环由变性93℃ 1 min,退火55℃ 1 min和延伸72℃ 1 min组成。

1.4 PCR扩增产物的电泳分析

取上述PCR产物10 μl,加入2.5 μl 5× 加样缓冲液,在2%琼脂糖中电泳,电泳结束后在紫外灯下观察,并于凝胶成像仪上扫描存图分析。

2 结果

2.1 IgH基因产物

经免疫组化分析证实的20例B-NHL石蜡包埋组织中,有19例扩增出阳性单克隆性条带,阳性率95%(19/20),阳性条带位于100~150 bp,为单一的重排条带。T-NHL中无1例扩增出单克隆IgH基因重排条带,见图1,表1。5例慢性淋巴结炎标本中,均出现浅淡的均匀弥漫带。

作者简介:章 容(1974-),女,重庆市长寿县人,技师,主要从事病理学技术方面的研究。电话:(023)68752246
通信作者:郭乔楠,电话:(023)68752246
收稿日期:2002-08-10;修回日期:2002-12-20

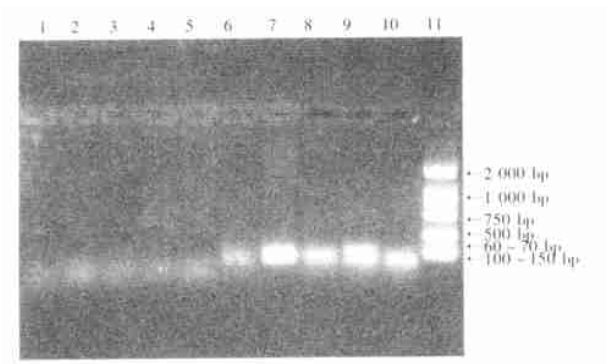
?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

2.2 TCRβ 基因产物

经免疫组化证实的20例 T-NHL 石蜡包埋组织中，有 17 例扩增出阳性单克隆条带，阳性率 85%（17/20），阳性条带位于 60～70 bp，为单一的重排条带。B-NHL 中无 1 例扩增出单克隆 IgH 基因重排条带，见表 1，图 1。5 例慢性淋巴结炎标本中，有 1 例为单一的重排条带，其余 4 例为均匀弥漫性条带。

表1 PCR 分析淋巴组织 IgH 和 TCR 基因重排（阳性例数/总例数）

非霍奇金淋巴瘤种类	IgH 基因重排	TCRβ 基因重排
B 型非霍奇金淋巴瘤	19/20	0
T 型非霍奇金淋巴瘤	0	17/20
慢性淋巴结炎	0/5	0/5



1～5：T 型非霍奇金淋巴瘤 TCRβ 基因重排；6：慢性淋巴结炎 IgH PCR 结果；7～10：B 型非霍奇金淋巴瘤 IgH 基因重排；11：DL2000 Marker

图1 2%琼脂糖凝胶电泳

3 讨论

以往采用限制性酶切分析和 Southern 杂交技术能够证实淋巴瘤中 Ig 基因和 TCRβ 基因发生克隆性重排[1]。但限制性酶切分析方法消耗的组织量多，并需要新鲜标本提取高分子量 DNA。而 Southern 杂交法费时费力，且容易污染，不适用于临床病理学检测。本研究应用 PCR 技术扩增 IgH 和 TCRβ 基因重排，以鉴定淋巴瘤的克隆性质。用 PCR 分析基因重排的原理是基于所用引物特异性结合 IgH 或 TCRβ 基因的 V 区和 J 区。在胚系状态下，V 区与 J 区片段是由数百碱基对所分隔开的，只有基因发生重排 V 区与 J 区靠近在一起时，才能得到有效扩增[2]。结果表明，此技术具有较高的特异性和敏感性，而且简便、快速，对于淋巴瘤的诊断和鉴别诊断具有重要价值。

在正常人和反应性淋巴组织增生等疾病中，因为淋巴细胞起源于多个克隆，基因重排各式各样，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，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 和 TCR 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[3,4]。

本研究结果显示 20 例 B-NHL 中有 19 例检出克隆性 IgH，阳性率 95%，与田晓峰等[5] 报道相符。T-NHL 中有 17 例检出克隆性 TCRβ，阳性率 85%，略高于余英豪等[6] 报道的 78.4%，而 5 例慢性淋巴结炎中无一例出现阳性条带，说明本实验所使用的 IgH 和 TCRβ 基因引物对 B-NHL 和 T-NHL 的克隆性和细胞源性的确定有很高的特异性和灵敏性，可常规用于淋巴瘤的诊断和分型。此外，表现在其它组织（如肝脏、结肠、肺部、血管等）的淋巴瘤，也可通过本方法加以早期鉴定和诊断。由于 PCR 检测淋巴瘤基因重排的影响因素较多，但只要摸索出固定的实验条件，如样品及加样量、PCR 条件、电泳条件等即可避免假阴性或假阳性结果，取得满意的实验结果。传统的方法（如常规 HE、免疫组化）对淋巴瘤在组织的早期浸润难以辨别，因为既有正常组织，又有淋巴细胞，难以与反应性 T 淋巴细胞浸润分开，而 PCR 检测 IgH 和 TCRβ 基因重排方法敏感、特异，可检测出早期恶性增殖的 T 细胞克隆。对于明确诊断，早期、正确的治疗具有重要价值。

关键词：PCR；非霍奇金淋巴瘤；基因重排
中图法分类号：R394.2；R733.404 文献标识码：B

参考文献：

[1] 朱梅刚. 恶性淋巴瘤的基因重排诊断[J]. 实用肿瘤杂志，1998，13(1)：5－7.

[2] Achille A，Scarpa A，Montresor M，*et al*. Routine application of polymerase chain reaction in the diagnosis of monoclonality of B-cell lymphoid proliferations[J]. Diagon Mol Pathol，1995，4(1)：14－24.

[3] 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.

[4] Chhanabhai M，Adomat S A，Gascoyne R D，*et al*. Clinical utility of heteroduplex analysis of TCR gamma gene rearrangements in the diagnosis of T-cell lymphoproliferative disorders[J]. Am J Clin Pathol，1997，108(3)：295－301.

[5] 田晓峰，许良中，何开玲，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.

[6] 余英豪，朱梅刚，季 卉，等. 聚合酶链反应扩增 T 细胞受体β 基因重排在检测 T 细胞淋巴克隆中的应用[J]. 中华血液学杂志，1994，4(15)：203－204.

（编辑 王 红）

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net