DOI:10.16016/j.1000-5404.1993.03.001

论著

T 细胞性 NHL 抗原受体基因重排分析*

张建中** 晏良遂 （第三军医大学基础部病理学教研室）630038

白 炎 朱元晓 郑建强 王建安 沈倍奋 （军事医学科学院基础医学研究所）100000

提 要 应用 Southern blot 和 PCR 技术对 13 例 T 细胞免疫表型的 NHL 进行基因重排分析。结果显示，11 例(86%)肿瘤出现 TCRβ 基因克隆性重排，其中 10 例(91%)伴有 TCRγ 基因重排。提示基因重排分析是确立 NHL 克隆性和细胞源性的敏感而特异的标记。

关键词 淋巴瘤，非何杰金氏；基因重排；Southern blot；多聚酶链反应

在我国，T 细胞非何杰金氏淋巴瘤(T-NHL)的发生率明显高于西方国家[1]。因其生物学行为侵袭性 高度恶性；组织学复杂多变，从形态上很难判断其细胞源性；加之免疫表型上尚缺乏克隆性标记，故其诊断、分型以及预后评估等方面仍然存在许多问题[2,3]。为此，本研究对 27 例 NHL 进行免疫和基因分型，探讨 T-NHL 组织学免疫表型和基因类型之间的关系，为此类肿瘤的诊治提供分子生物学基础。

1 材料与方法

1.1 标本

本校附属一、二院 1989～1990 年间活检中 NHL 新鲜组织标本 27 例。将其分为三份：一份经 10%甲醛溶液固定，满足组织学诊断；一份经 OCT 包埋直接冰冻切片或放置－70℃以下保存；另一份经锡箔纸包裹放入液氮中冻存。

1.2 组织学研究

所有标本均经常规制片，HE、PAS、网状纤维染色。按全国淋巴瘤协作组标准(成都，1985)进行形态学分型。

1.3 免疫表型分析

应用抗淋巴细胞分化抗原 McAbs：CD_2、CD_3、CD_4、CD_5、CD_8、CD_{14}、CD_{19}、CD_{22}和 Igκ、λ，ABC 试剂盒进行免疫组化染色。30%以上瘤细胞膜出现棕色反应产物为阳性。

1.4 基因重排分析

1.4.1 Southern blot 分析 T 细胞受体 β 链(TCRβ)基因：用含 440bp $C\beta_1$ 片段重组质粒(英国 ICRF 实验室)，经转染、扩增、提取、酶切和标记等步骤，制备^{32}P 探针。肿瘤组织 DNA 按常规方法提取。10～15μg 基因组 DNA 分别经 BamHI、EcoRI 和 Hind Ⅲ 消化，用 0.7%琼脂糖凝胶电泳分离酶切片段，并转印至硝酸纤维膜上。在含甲酰胺的杂交体系中杂交 24 h，严谨洗膜，于－40℃放射自显影 1～3 d。此外，也用同样方法分析免疫球蛋白重链(JH)和轻链(Ck)基因构型改变。

1.4.2 PCR 扩增 TCRγ 基因重排片段：TCRγ 基因引物包括 5 个 V 区片段($V_{2\sim4,8,9}$)和 3 个 J 区片段[4]。PCR 反应体积为 25μl，含模板 DNA 0.5～1μg、引物 0.125μg、Taq 酶 0.4～0.5u。采用 45 个周期混合引物 PCR 扩增。产物经 2%琼脂糖凝胶电泳观察。

2 结果

2.1 组织学分型(表 1)

* 国家自然科学基金资助项目

** 现在北京第五一四医院病理科，100101

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

表 1 27 例 NHL 组织学类型和免疫表型

Tab 1 Histological types and immunophenotypes in 27 cases of non-Hodgkin's lymphoma

histological types	No. of cases	immunophenotypes		
		B cell	T cell	uncertain
small lymphocytic	2	1	1	
mixed, cleaved and noncleaved	1	1		
small noncleaved	3	2	1	
plasmacytoid lymphocytic	1			1
large noncleaved	5	3		2
lymphoblastic	3	1	2	
immunoblastic	3	1	2	
clear cell	2		2	
pleomorphic	3		3	
AIBL-like	1		1	
unclassified	3	2	1	
	27	11	13	3

2.2 免疫表型

13 例 T 细胞肿瘤(表 1)均不同程度地表达 T 细胞分化抗原,其中 9 例显示一种或多种全 T 细胞抗原(CD_2、CD_3 或 CD_5)丢失;6 例为 CD_4 表型,3 例为 CD_8 表型,2 例同时表达 CD_4 和 CD_8,2 例 CD_4 和 CD_8 均为阴性。此外,有 2 例分别表达 CD_{14} 和 CD_{19} 抗原。

2.3 基因构型

2.3.1 TCRβ 基因:表 2 为 TCRβ 基因的胚系构型。胚系基因以外的新带出现或原胚系条带的消失即意味着该基因发生了重排[5]。13 例 T-NHL 中有 11 例出现一条或两条以上 TCRβ 基因重排条带和/或原胚系基因缺失(图 1,表 3)。2 例 TCRβ 基因为胚系构型,其中 1 例显示 JH 基因重排(图 2)。复查切片发现这一例表达 T 细胞抗原的细胞多呈散在或灶性分布,可能为反应性 T 细胞。2 例出现 TCRβ 和 JH 基因双重排,其中 1 例伴有 Ck 基因重排(图 3)。

表 2 TCRβ 和 Ig 基因胚系构型

Tab 2 Germline configuration of T-cell receptor beta chain and immunoglobulin genes

gene probes	germline restriction sizes (kb)		
	BamHI	EcoRI	Hind Ⅲ
TCRβ	22.6	10.5, 3.7	8, 3
JH	17	16	11
Ck		12	

表 3 13 例 T 细胞淋巴瘤的基因构型

Tab 3 Genotypic profile of 13 cases of T-cell lymphomas

immunophenotype	genes														
	TCR					JH					Ck				
	R	R	R	G	G	G	R	R	R	G	G	R	G	G	G
T-cell lymphoma	9	1	1	1	1	9	1	1	1	1	9	1	1	1	1

R=rearrangement; G=germline configuration

2.3.2 TCRγ 基因:TCRγ 基因克隆性重排阳性扩增条带在 170～230bp 之间。11 例出现 TCRβ 基因重排的 T-NHL 中有 10 例可见阳性扩增条带(图 4),另 1 例虽经重复扩增仍为阴性。而 B 细胞表型的 NHL 亦有 3 例(11%)为阳性。作为对照的反应性淋巴组织增生和非淋巴性肿瘤均为阴性。

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

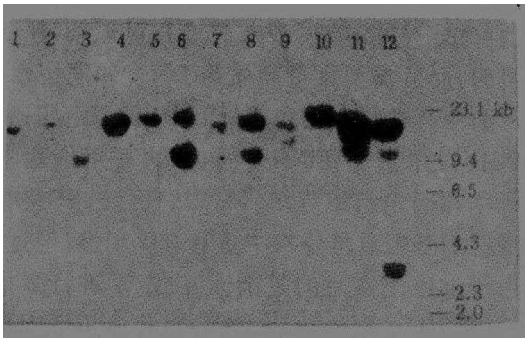


图 1 T-NHL 中 TCRβ 基因重排分析放射自显影图
图示第 2、3、6、7、8、9、11、12 道出现 TCRβ 基因重排，BamHI 酶切，Southern blot

Fig 1 **Southern blot analysis of the TCRβ chain gene in patients with lymphomas**
Lane 2, 3, 6～9, 11, 12 show TCRβ gene rearrangements whereas the others are in germline configuration. DNA was digested with Bam Ⅱ and hybridized with a probe specific for the constant region of the TCRβ chain gene.

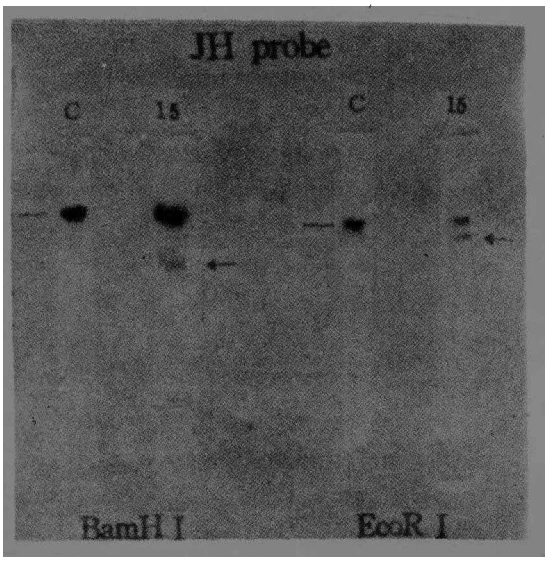


图 2 T 细胞优势性 B 细胞淋巴瘤出现 JH 基因重排（箭头）
C 为胚系基因对照（横杠）

Fig 2 **A case of T-cell-predominant B-cell lymphoma shows JH gene rearrangement (arrow)**
Dashes indicate germline bands

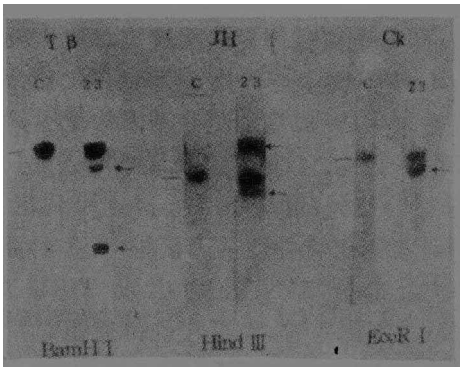


图 3 B-NHL 显示 TCRβ 和 JH 基因双重排（箭头），同时伴有 Ck 基因重排
C 为胚系基因（横杠）

Fig 3 **Soutnern blot analysis of a case of B-cell lymphoma shows JH, TCRβ and Ck gene rearrangements (arrow)**
Dashes indicate germline bands

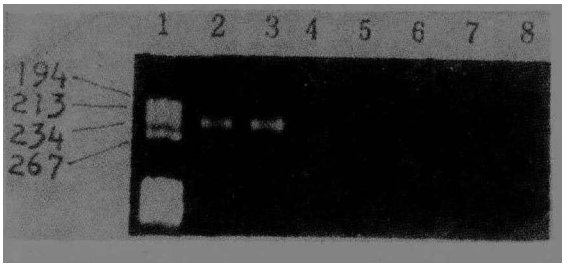


图 4 PCR 扩增 TCRγ 基因重排电泳图
1：pBR322/Hae Ⅲ；2、3：T-NHL；4：B-NHL；5：非淋巴性肿瘤；6：空白对照；8：Jurkat 细胞

Fig 4 **PCR analysis of TCR gamma gene rearrangements using mixed TCRγ primers**
Lane 1: pBR322/Hae Ⅲ; Lanes 2, 3: T-cell lymphomas; Lane 4: B-cell lymphomas; Lane 5: non-lymphoid tumor; Lane 6: a negative control; Lane 7: nalm-6 cell; Lane 8: Jurkat cell

3 讨论

淋巴瘤在分化过程中，抗原受体基因不断发生有序的重排，使散在的基因片段连接成能表达的 V-D-J 基因。多克隆性淋巴组织增生时，Ig 和 TCR 基因结构是高度不均一

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

的，即每一克隆选择的重排位点和片段长度各不相同，无单一优势克隆；而淋巴瘤为单克隆性增生，组成瘤细胞在基因构型上具有高度的一致性。这种优势克隆细胞数量只要超过 1%～2%，用 Southern blot 和 PCR 技术即可检测出特异性基因重排[4,5]。本研究显示，大部分 T-NHL 均出现 TCRβ 和/或 TCRγ 基因重排，而反应性淋巴组织和绝大部分 B-NHL 上述基因均为胚系状态。提示克隆性基因重排的检出是确定淋巴细胞增生的克隆性和细胞源性的一项客观、敏感而特异的诊断指标，是对形态学和免疫表型分析的重要补充。

T-NHL 的发病率，世界各地报告不一。日本东南部和加勒比海地区发病率达 75% 以上，而欧美地区报告为 20%左右。台湾[6]和苏州地区[1]报告分别为 42.3%和 48.9%，说明我国是 T-NHL 的高发区。本结果从基因水平上进一步证实了这一点。

饶有兴趣的是，本组有 2 例出现 TCRβ 和 JH 双基因重排。这种现象可能与 Ig 和 TCR 基因具有相同的重组信号，重排时所需的重组酶系亦可能相同有关[7]。我们认为，这种畸异重排可能是瘤细胞基因构型的异质性及其所致多潜能分化的一种表现形式。若同时伴有 Ck 基因重排则支持 B 细胞源性，而伴 TCRγ 基因重排则为 T 细胞源性。在这种情况下，一种基因往往是不完全重排，不伴有 mRNA 及蛋白产物的表达，故在免疫表型上往往是单一的。

本研究还发现，确有极少数 T-NHL 病例未能检出 TCRβ、γ 基因重排。这除与检测技术还不够敏感有关以外，亦可能存在一些少见类型的重排[4,5,8]。Foroni 等[9]报告 TCRδ 基因可先于 α、β 链基因在 T 细胞早期阶段即可能发生重排。因此，TCR 各链基因的综合分析可能有助于深化对 T 细胞肿瘤生物学行为的理解。

由于 Southern blot 技术相对烦杂，耗资费时，而且需要大量高质量 DNA 和同位素，从而使其在临床上实用价值受限。与之相比，PCR 技术较简便，不需同位素，可用细胞学标本和固定组织等多种材料。因此，PCR 在淋巴瘤基因重排分析中更具有实用性。但是，由于淋巴瘤本身的复杂性，决定了进行多指标综合研究的必要性。基因重排分析不能作为确立诊断的唯一标准。对于某些复杂病例，详尽的免疫表型分析乃至组织学研究仍不失为重要诊断手段。

（本研究承蒙史景泉教授、程天民教授、陈意生教授悉心指导，张哉根讲师、柳凤轩教授等协助收集标本，在此一并表示衷心感谢！）

参考文献

1. 周 镇 金嘉宽 杨 侃，等。苏州无锡市恶性淋巴瘤病理和免疫表型特征研究。淋巴瘤学刊，1988；9：165
2. Picker JL, Weiss LM, Mederios LJ, et al. Immunophenotypic criteria for the diagnosis of non-Hodgkin's lymphoma. Am J Pathol, 1987; 128: 181
3. Warnke RA, Rouse RV. Limitation encountered in the application of tissue section immunodiagnosis to the study of lymphoma and related disorder. Hum Pathol, 1985; 16: 326
4. Trainer KJ, Brisco MJ, Wan JH, et al. Gene rearrangements in B- and T-lymphoproliferative disease detected by the polymerase chain reaction. Blood, 1991; 78: 192
5. Cossman J, Uppenkamp M, Sundeen J, et al. Molecular genetics and the diagnosis of lymphoma. Arch Pathol Lab Med, 1988; 112: 117
6. Su JJ. Pathologic and immunologic characterization of malignant lymphomas in Taiwan. Am J Clin Pathol, 1985; 84: 715
7. Yancopoulos GD, Blackwell TK, Suh H, et al. Introduce T cell receptor variable region gene segments recombine in pre-B cell: evidence that B

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

and T cell use a common recombinase. Cell, 1986; 44: 251

8. Knowles DM. Immunophenotypic and antigen receptor gene rearrangement analysis in the T cell neoplasias. Am J Pathol, 1989; 134: 756

9. Foroni L, Laffan M, Bochm T, et al. Rearrangement of the T-cell receptor delta genes in human T-cell leukemias. Blood, 1989; 73: 559

(收稿: 1992-11-04; 修回: 1993-05-10)

A study on antigen receptor gene rearrangements in 13 cases of T-cell non-Hodgkin's lymphoma

Zhang Jianzhong, Bai Yan, Yan Liangsui, et al (Deparment of Pathology, Third Military Medical College, Chongqing, 630038)

Abstract The beta and gamma chain gene rearrangements of the T-cell receptors (TCR) were studied with Southern blot hybridization and polymerase chain reaction in 13 cases of non-Hodgkin's lymphoma with T-cell phenotype. It was found that 11 out of the 13 cases (86%) exhibited TCR beta gene rearragnement and 12 out of the 13 (91%) displayed TCR gamma gene rearrangement. The findings suggest that gene rearrangements are more sensitive and specific markers to establish T-cell monoclonality and lineage and helpful to the morphological diagnosis and immunophenotyping for non-Hodgkin's lymphoma.

Key wrods lymphoma, non-Hodgkin's; gene rearrangement; blotting, Southern; polymerase chain reaction

个案与短篇

脑脊液乳酸脱氢酶测定的临床意义

周 活* 薛 强 (第三军医大学西南医院检验科) 630038

King 氏发现脑出血和脑肿瘤的脑脊液(CSF)中乳酸脱氢酶(LDH)的活性增加。近年来,有关血中 LDH 的研究颇多,但对 CSF-LDH 活性的变化报道较少。为了探讨 CSF-LDH 活性对临床诊断的价值,我院对 31 例脑出血和 12 例闭塞性脑血管病患者及 10 例健康成人的 CSF-LDH 进行检测,现将观察结果报道如下:

1 对象和方法

1.1 观察对象

均为门诊及住院病人。患者组:采集患者 CSF 43 例(男 28,女 15,年龄 20～77 岁);正常对照组:正常 CSF 10 例。

1.2 测定方法

CSF-LDH 总活性根据生物化学及检验技术介绍的比色法测定[1]。

2 结果

脑出血组 31 例 CSF-LDH 总活性均在 95u 以上,其中 23 例(74.19%)>200u,最高达 480u;闭塞性脑血管病 12 例和正常对照组 10 例除 1 例(56u)外,其它均在 50u 以下。闭塞性脑血管病与正常对照

(下转 202 页)

* 武警四川省总队重庆医院

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