

# 恶性淋巴细胞增殖病细胞分化与 基因重排研究\*

王鲁群 张明琪 朱平<sup>①</sup> 宋素芹 张洪清<sup>①</sup> 周越

(山东医科大学附属医院血液病研究室, 济南 250012; <sup>①</sup>天津第二医学院, 天津 300203)

**关键词** 恶性淋巴细胞增殖病、分化抗原、聚合酶链反应、免疫球蛋白基因重排、T细胞受体基因重排

恶性淋巴细胞增殖病是淋巴细胞在不同分化阶段发生恶性转化造成克隆性增殖的常见病。常规形态学和组织细胞化学分析不能明确克隆性增殖的细胞起源及其分化阶段, 而利用抗淋巴细胞分化抗原单克隆抗体 (McAbs), 则可以识别绝大多数恶性淋巴细胞增殖病的细胞分化起源, 但还不能鉴定少数未分化肿瘤的细胞源性, 更不能特异地识别恶性细胞。本研究将 McAbs 免疫酶标和体外基因扩增聚合酶链反应 (PCR) 技术结合起来分析淋巴细胞表面分化抗原及免疫球蛋白重链 (IgH) 和 T 细胞受体 (TCR) 基因重排, 借以探讨恶性淋巴细胞增殖克隆的分化起源与基因重排的规律和相关性及其在临床研究中的应用价值。

## 1 材料与方 法

### 1.1 标本来源

标本来自经形态学、免疫细胞化学和组织病理学确诊的 42 例不同类型恶性淋巴细胞增殖病。其中急性淋巴细胞白血病 (ALL) 26 例、慢性淋巴细胞白血病 (CLL) 5 例、急性未分化细胞白血病 (AUL) 5 例、非何杰金淋巴瘤 (NHL) 6 例, 均为初发病例。以 3 例急性非淋巴细胞白血病 (ANLL) 和 2 例正常人外周血为非淋巴细胞增殖对照。采用淋巴细胞分离液 (比重 1.077) 常规分离收集肝素抗凝静脉血、骨髓或淋巴结单细胞悬液中的单个核细胞。

### 1.2 McAbs 检测

采用碱性磷酸酶-抗碱性磷酸酶桥联免疫酶标技术 (APAAP)<sup>[1]</sup>。所选系列 McAbs 包括: CD<sub>1</sub>, CD<sub>2</sub>, CD<sub>3</sub>, CD<sub>4</sub>, CD<sub>5</sub>, CD<sub>7</sub>, CD<sub>8</sub>, CD<sub>38</sub>; CD<sub>9</sub>, CD<sub>10</sub>, CD<sub>19</sub>, CD<sub>20</sub>, Cy $\mu$ , SmIg, HLA-DR; CD<sub>13</sub>, CD<sub>14</sub>, CD<sub>33</sub> 等, 分别由军事医学科学院基础医学研究所和中国医学科学院血液学研究所提供。

### 1.3 寡核苷酸引物设计

Ig 基因引物选自编码 IgH 基因第三互补决定区 (CDR-III) 附近的核苷酸序列 D-J 基因片段; TCR 基因引物分别选自 TCR <sub>$\gamma$</sub>  和 TCR <sub>$\delta$</sub>  基因的 V 和 J 区基因片段。三种引物的核苷酸序列见参考文献[2]。采用 Beckman DNA 合成仪固相三酯法合成, 聚丙烯酰胺凝胶电泳法纯化合成的引物。

1992-09-08 收稿, 1992-10-08 收修改稿。

\* 山东省科委资助课题。

### 1.4 聚合酶链反应 (PCR)

按 Madisen<sup>[3]</sup> 描述方法提取染色体基因组 DNA。据 Saiki<sup>[4]</sup> 建立的 PCR 方法进行基因扩增。50  $\mu$ l 反应液中含模板 DNA 0.5  $\mu$ g, 67mmol/L Tris-HCl(pH8.8), 6.7mmol/L  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 10mmol/L  $\beta$ -巯基乙醇, 0.17mg/ml BSA, 6.7  $\mu$ mol/L EDTA, 3mmol/L  $\text{MgCl}_2$ , 4  $\times$  dNTP 各 200  $\mu$ mol/L, 寡核苷酸引物各 50pmol/L, Taq DNA 聚合酶 1.5U。加酶前 95 $^\circ\text{C}$  预变性 10min, 继后为 30 周期 DNA 扩增循环, 包括 93 $^\circ\text{C}$  变性 60s, 55 $^\circ\text{C}$  退火 60s, 72 $^\circ\text{C}$  延伸 120s。取扩增反应液 12  $\mu$ l, 经 6% 聚丙烯酰胺凝胶电泳; 溴化乙啶 (EB) 染色后, 紫外分析仪观察结果照像分析。

## 2 结 果

### 2.1 恶性细胞分化起源与基因重排

42 例病例中, 表达 B 细胞分化抗原者 23 例, 分别起源于 B 祖细胞 (HLA-DR<sup>+</sup>), 前前 B 细胞 (HLA-DR<sup>+</sup>, CD<sup>+</sup><sub>10</sub><sup>-</sup>, CD<sup>+</sup><sub>9</sub>), 前 B 细胞 (HLA-DR<sup>+</sup>, CD<sup>+</sup><sub>9</sub>, CD<sup>+</sup><sub>10</sub><sup>-</sup>, CD<sup>+</sup><sub>20</sub><sup>-</sup>, Cy $\mu$ <sup>+/-</sup>) 和成熟 B 细胞 (SmIg<sup>+</sup>), 5 例 CLL 均起源于成熟 B 细胞; 20 例 (87%) 检测到 IgH 基因重排, 呈现约 110bp 扩增带 (100—120bp), 9 例 (39%) TCR <sub>$\gamma$</sub>  基因重排, 3 例 (13%) TCR <sub>$\delta$</sub>  基因缺失。11 例表达 T 细胞分化抗原者分别起源于早期胸腺细胞 (CD<sup>+</sup><sub>38</sub>, CD<sup>+</sup><sub>7</sub>, CD<sup>+</sup><sub>2</sub><sup>-</sup>, CD<sup>+</sup><sub>5</sub><sup>-</sup>), 中期胸腺细胞 (CD<sup>+</sup>) 和成熟胸腺细胞 (CD<sup>+</sup><sub>3</sub>, CD<sup>+</sup><sub>7</sub>/CD<sup>+</sup><sub>8</sub>); 9 例 (83%) 检测到 TCR <sub>$\gamma$</sub>  基因重排, 呈现约 190bp 扩增带, 5 例 (45%) 发生 TCR <sub>$\delta$</sub>  基因重排或缺失, 重排带 > 580bp; 仅 1 例 NHL 发生 IgH 基因重排。3 例同时表达 T、B 细胞分化抗原的双表型 ALL, 均检测到 IgH 和 TCR <sub>$\gamma$</sub>  基因双重重排。5 例 AUL 中, 3 例仅表达 CD<sup>+</sup><sub>38</sub>, 另 2 例无任何分化抗原表达, 其中 4 例发现 TCR <sub>$\gamma$</sub>  基因重排或 TCR <sub>$\delta$</sub>  基因缺失, 均未见 IgH 基因重排, 见表 1 和图 1。

表 1 恶性淋巴细胞增殖病细胞起源与基因重排

细胞起源	分 类	例数	基 因 重 排		
			IgH	TCR <sub><math>\gamma</math></sub>	TCR <sub><math>\delta</math></sub> <sup>a)</sup>
B 细胞 (n = 23)	ALL	15	13	8	2
	CLL	5	4	0	0
	NHL	3	3	1	1
T 细胞 (n = 11)	ALL	8	0	6	4
	NHL	3	1	3	1
T, B 细胞 (n = 3)	双标 ALL	3	3	3	0
非 T 非 B 细胞 (n = 5)	AUL	5	0	3	2

a) 包括缺失。

### 2.2 残留恶性细胞检测

2 例 B-ALL, 1 例初发时检测到 IgH 和 TCR <sub>$\gamma$</sub>  基因双重重排, 临床诱导完全缓解后, IgH 基因重排消失, 但仍可检测到减弱的 TCR 基因重排带。另 1 例初发时具有 IgH 基因重排, 缓解后仍可检测到很弱的 IgH 基因重排带。

此外, 3 例 ANLL 和 2 例正常人外周血标本均未检测到 IgH, TCR <sub>$\gamma$</sub>  和 TCR <sub>$\delta$</sub>  基因重排。

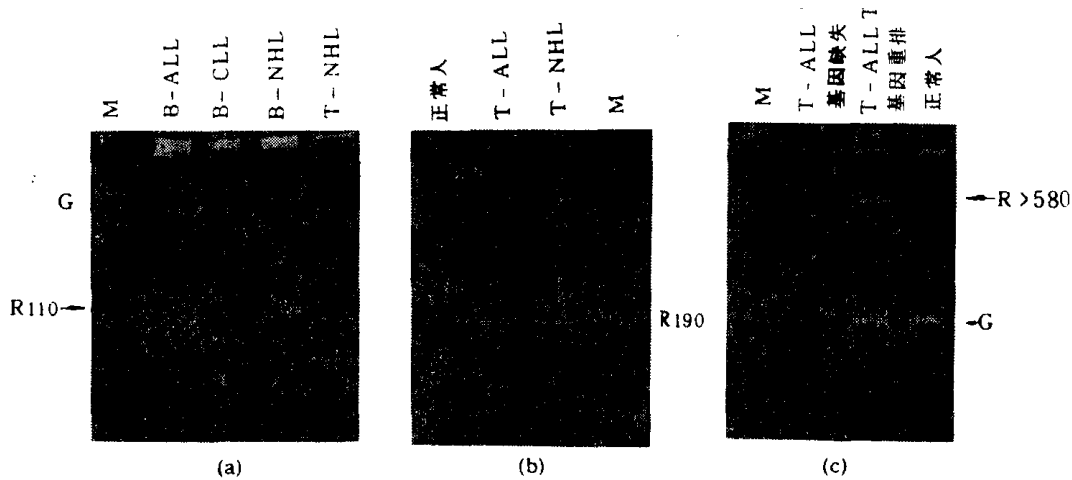


图 1 PCR 扩增 IgH 和 TCR $_{\gamma,\delta}$  的基因重排  
(a) IgH 基因重排(约 110bp), (b) TCR $_{\gamma}$  基因重排(约 190bp), (c) TCR $_{\delta}$  基因重排或缺失(重排带 > 580bp)

### 3 讨 论

造血祖细胞或淋巴前体细胞向 B 或 T 细胞定向分化过程中, Ig 或 TCR 基因发生有序重排, 同时伴随细胞表面分化抗原的规律性表达。不同细胞克隆或分化阶段具有特异性重排类型和系列表面分化抗原的表达, 据此能够确定克隆增殖的淋巴细胞源性及其分化阶段<sup>[5]</sup>。本研究结果表明, 起源于 B 细胞不同分化阶段包括 B 祖, 前前 B, 前 B 和成熟 B 细胞的恶性淋巴细胞克隆, 均存在克隆性 IgH 基因重排。TCR 基因重排具有一定顺序性, 起源于早期胸腺细胞的克隆增殖 (2 例 CD $_{38}^{+}$ , CD $_{7}^{+}$  者) 存在 TCR $_{\delta}$  基因重排, 伴或不伴有 TCR $_{\gamma}$  基因重排; 起源于中期胸腺细胞者 (3 例 CD $_{38}^{-}$ , CD $_{7}^{+/-}$ , CD $_{7}^{+/-}$ , CD $_{7}^{+/-}$ ) 具有 TCR $_{\gamma}$  基因重排; 伴随晚期成熟 T 细胞标记 CD $_{3}$  分化抗原表达, 出现 TCR $_{\gamma}$  基因重排和 TCR $_{\delta}$  基因缺失。表达 T、B 细胞分化抗原的双标记淋巴细胞克隆具有 IgH 和 TCR $_{\gamma}$  基因双重重排, 目前认为可能与某淋巴细胞前体亚群恶性转化相关<sup>[6]</sup>。非淋巴细胞克隆性增殖 (ANLL) 和正常人多克隆淋巴细胞群未发现克隆性 IgH 和 TCR 基因重排。此结果证明, IgH 和 TCR 基因重排与 B 和 T 细胞及其不同分化阶段具有良好相关性, 可作为淋巴细胞克隆性增殖的肿瘤性分子标志, 用于恶性肿瘤克隆起源的鉴别。值得注意的是表达不成熟 B 细胞分化抗原的增殖克隆常出现 TCR $_{\gamma}$  基因系间交叉重排, 与克隆细胞起源于尚未定向分化的淋巴前体细胞以及调控 Ig 和 TCR 基因重排的重组酶系功能异常等诸多因素有关<sup>[7]</sup>, 有待深入研究。

缺乏免疫标记的未分化细胞克隆通常认为起源于尚未定向分化的多潜能干细胞, 目前尚无法鉴定其确切细胞起源。本研究涉及 3 例仅表达 CD $_{38}$  抗原和 2 例无任何分化抗原表达的 AUL, 基因重排分析证实 4 例存在 TCR $_{\gamma}$  和/或 TCR $_{\delta}$  基因重排或缺失, 未见 IgH 基因重排, 推测其增殖细胞起源于淋巴前体细胞或早期 T 细胞。2 例完全缓解的 B-ALL 经基因重排 PCR 扩增证明均存在形态学和免疫学无法鉴别的残留肿瘤细胞。表明淋巴细胞抗原受体基因重排分析不仅能够鉴定缺乏分化抗原表达的未分化恶性增殖克隆的淋巴细胞源性, 而且经 PCR 扩增可用于恶性淋巴细胞增殖病早期诊断和治疗后微小残留病的检测, 为早期治疗

及改善预后奠定了基础,具有重要的临床应用和学术价值。

### 参 考 文 献

- [1] 张明琦等, 中华血液学杂志, 1990, 11(1): 40.
- [2] 朱平等, 科学通报, 1991, 36(19): 1506.
- [3] Madisen, L. *et al.*, *Am. J. Med. Genet.*, 1987, 27: 397.
- [4] Saiki, R.K. *et al.*, *Science*, 1988, 239: 487.
- [5] Griessor, H. *et al.*, *Blood*, 1989, 73: 1402.
- [6] Uckun, F.M. *et al.*, *Blood*, 1989, 73: 1000.
- [7] Griesinger, F. *et al.*, *J. Clin. Invest.*, 1989, 84: 506.