

再生障碍性贫血儿童 TCR V_β 亚家族 T 细胞克隆性增殖及其与 HLA-DRB1*15 的关系

黄永兰, 黄绍良, 包蓉, 张绪超, 吴燕峰
(中山大学附属第二医院儿科, 广东广州 510120)

摘要【目的】探讨再生障碍性贫血(再障)儿童 TCR V_β 24 个亚家族 T 细胞克隆性及其与 HLA-DRB1*15 的关系。【方法】再障儿童 17 例(SAA 14 例, MAA 3 例), 采用 RT-PCR 和基因扫描分析外周血或骨髓 TCR V_β 24 个亚家族基因的表达和克隆性, SSP-PCR 检测 HLA-DR。【结果】再障儿童外周血 T 细胞仅表达 4-22 个 V_β 亚家族, 而正常儿童外周血 T 细胞几乎表达所有 V_β 亚家族。12 例(包括初诊 SAA 4 例, CR 4 例, 复发 1 例和 MAA 3 例)再障儿童存在不同程度 T 细胞克隆性增殖, 但个体间差异较大, 正常外周血和骨髓均为多克隆性 T 细胞。5 例 HLA-DRB1*15(+) 患儿中 4 例(80%)有寡克隆 T 细胞, 而 12 例 HLA-DRB1*15(-) 患儿中仅 3 例(25%)见寡克隆 T 细胞, 两组比较差异具有显著意义(P<0.05)。伴寡克隆 T 细胞的 6 例 SAA 儿童经免疫抑制治疗后达 CR; 不伴寡克隆 T 细胞的 5 例 SAA 儿童接受免疫抑制治疗, 其中 CR 1 例, PR 2 例, 无效 1 例, 死亡 1 例。【结论】大多数再障儿童存在 T 细胞克隆性增殖, 寡克隆 T 细胞多见于 SAA, 尤其是 HLA-DRB1*15(+) 的 SAA 儿童。TCR V_β T 细胞克隆的检测对进一步了解再障免疫功能状态、预测免疫抑制治疗效果具有一定的参考价值。

关键词: 再生障碍性贫血; TCR V_β 基因谱; T 细胞克隆; HLA-DR

中图分类号: R725.5

文献标识码: A

文章编号: 1672-3554(2006)01-0165-04

Clonal Expansion of TCR V_β Repertoire and Its Relationship to HLA-DRB1*15 in Children with Aplastic Anemia

HUANG Yong-lan, HUANG Shao-liang, BAO Rong, ZHANG Xu-chao, WU Yan-feng
(Department of Pediatrics, Second Affiliated Hospital, SUN Yat-sen University, Guangzhou 510120, China)

Abstract【Objective】To investigate the expression pattern and clonality of TCR V_β repertoire and its relationship to HLA-DRB1*15 genotype in children with aplastic anemia (AA). 【Methods】The expressions of all the V_β subfamily genes were evaluated by using RT-PCR and V_β-CDR3 size distribution was analyzed by Genescan to determine the presence of V_β subfamily clonal expansion in 17 pediatric AA patients. HLA-DRB1*15 was tested by SSP-PCR. 【Results】Only 4-22 TCR V_β subfamily genes were expressed in peripheral blood cells in AA patients while almost all of the V_β subfamily genes were expressed in controls. Clonal expansion of T-cells was identified from 12 patients including 4 untreated severe AA, 4 complete remission, 1 relapse, and 3 moderate AA patients, but the V_β subfamily of T-cell clones was different in each case. Oligoclonal T-cell was showed in four out of five patients bearing HLA-DRB1*15, while it was showed in 3 out of 12 patients with HLA-DRB1*15(-) (P<0.05). Complete remission was resulted from immunosuppressive therapy in 6 patients with oligoclonal T-cell. Among the five patients without oligoclonal expansion of T cells, who accepted immunosuppressive therapy, one got complete remission, two partial remission, one unresponsive and the other died. 【Conclusions】The majority of children with AA showed clonal expansion of T cells. Oligoclonal T-cells can be detected in severe AA patients, especially in those bearing HLA-DRB1*15. The analysis of clonality of TCR V_β repertoire will be helpful to understand the immune pathological mechanism and predict the responsiveness to immunosuppressive treatment in AA.

Key words: aplastic anemia; TCR V_β repertoire; T-cell clone; HLA-DR

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2006, 27(2):165-168, 172]

收稿日期: 2005-06-16

作者简介: 黄永兰(1965-), 女, 湖北宜都人, 中山大学附属第二医院在职博士生, 广州市妇婴医院儿科主任医师, 黄绍良教授, 博士生导师, 通讯作者。E-mail: hshl@gzsums.edu.cn

再生障碍性贫血(再障)的病因和发病机制仍不十分明确,临床和实验研究表明细胞免疫紊乱在再障的发生和发展中起重要作用。从再障患者骨髓中分离培养的 T 细胞克隆与自身 CD34+ 细胞共培养可抑制造血祖细胞集落形成^[1]。近来,利用 T 细胞受体(T cell receptor, TCR) V_H 24 个亚家族基因谱(repertoire)互补决定区 3 (complementarity determining region 3, CDR3) 长度的高度多样性特点,采用反转录-多聚酶链反应(RT-PCR)和基因扫描(genescan)分析 CDR3 长度检测 T 细胞克隆性已广泛应用于免疫性疾病的研究^[2]。本文通过对 17 例再障儿童外周血或骨髓 TCR V_H 24 个亚家族基因的表达及克隆性分析,探讨 T 细胞克隆性增殖与疾病严重程度、免疫抑制治疗(immunosuppressive therapy, IST)效果及人类白细胞抗原(human leukocyte antigen, HLA)-DRB1*15 基因位点的关系,评价 T 细胞克隆检测的临床意义。

1 对象和方法

1.1 对象

根据第四届全国再障学术会议提出的再障诊断标准^[3]及 Camitta 等^[4]病情分型标准,于 2004 年 3 月至 2005 年 3 月我院儿科确诊特发性获得性再障儿童共 17 例,其中轻型再障(moderate aplastic anemia, MAA) 3 例,重型再障(severe AA, SAA) 14 例(初诊 7 例,IST 后完全缓解 4 例、部分缓解 2 例、复发 1 例)。男 10 例,女 7 例,年龄 2~13 岁,平均 9 岁。以 3 例正常儿童外周血和 1 例正常儿童骨髓为对照。SAA 完全缓解(complete remission, CR)判断标准为外周血中性粒细胞计数(absolute granulocyte count, ANC) $>1.5 \times 10^9/L$, 血红蛋白(hemoglobin, Hb) $>110 g/L$, 血小板 $>100 \times 10^9/L$, 部分缓解(partial remission, PR)为 ANC $>0.5 \times 10^9/L$, Hb $>80 g/L$, 血小板 $>20 \times 10^9/L$, 复发指血象恢复正常后再次回到 SAA 水平。强化 IST 指抗胸腺细胞免疫球蛋白(ATG)+环孢素+甲泼尼龙的联合治疗。

1.2 方法

1.2.1 RNA 提取和 cDNA 合成 取外周静脉血 3.5 mL 或左髂骨后棘骨髓 2.5 mL,肝素钠抗凝,按常规分离单个核细胞(mononuclear cells, MNCs),采用 TRIzol(Gibco)提取总 RNA,SuperScrip II RT 试剂盒(Gibco)合成 cDNA 操作按说明书进行。

1.2.2 RT-PCR 用于非标记 PCR 的 24 个 V 引物和 1 个 C 引物,以及用于标记 PCR 产物的 5 端荧光素标记 C - Fam 引物均由德国柏林 Tib Molbid 公司合成(暨南大学血液研究室赠送)^[2]。每个样本分别进行 V_H 1/C - V_H 24/C 共 24 次 PCR,每次 PCR 总反应体积为 20 μL ,以正常人外周血 cDNA 作阳性对照,以不含 cDNA 的反应体系为阴性对照,反应在 Biometra UNO II PCR 扩增仪中进行,共 40 个循环。变性温度:94 1 min(首次 3 min),退火温度:60 1 min,延伸温度 72 1 min(末次 10 min)。PCR 产物于 4 保存。取 5 μL PCR 产物于 25 g/L 琼脂糖凝胶(溴化乙啶染色)中电泳,以 100 bp DNA ladder 为对照,参照各个 V 产物的分子大小(bp)在紫外分光光度计下观察,阳性者进一步行荧光标记 PCR。

1.2.3 标记 PCR 采用 C - Fam 进行不对称 PCR,总反应体积 10 μL ,其中含 2.5 μL 首次 PCR 产物,1.5 μL 1 mmol/L C - Fam,共 35 个循环,退火温度为 66 1 min,余条件同上。反应产物于 4 保存。

1.2.4 基因扫描 取荧光标记 PCR 产物 2 μL ,加甲酰胺与 GeneScan 500 LIZ 分子标准品混合物(20:1)10 μL 混匀,95 5 min 变性,冰上冷却,采用 ABI Prism 3100 遗传分析仪于 60 g/L 聚丙烯酰胺凝胶电泳,基因扫描软件自动分析产物的分子长度和荧光强度,结果以峰形图表示。峰的位置、高度和形态分别代表产物的大小、含量和均一性(克隆性)。正常人外周血 V_H CDR3 呈“铃状”多峰图形(>5 个峰),提示为多克隆性 T 细胞;单峰图形提示为单克隆性 T 细胞;一主峰和少数(3 个)小峰图形提示产物主要来自同一克隆即寡克隆 T 细胞;主峰大于次峰 1 倍以上且明显失去“铃状”的多峰图形称为图形异常,提示存在一定数量克隆性增殖 T 细胞。

1.2.5 HLA-DRB1*15 检测 取 200 μL EDTA 抗凝血,采用 QIAamp DNA 试剂盒提取 DNA,One Lambda 公司 HLA-DR 位点 SSP-PCR 试剂盒检测 DR 位点基因型,操作按说明书进行。

1.3 统计学处理

两个样本率的比较采用 u 检验。

2 结果

2.1 TCR V_H 亚家族基因谱表达

11 例再障儿童外周血 TCR V 亚家族基因 RT-PCR 产物电泳结果显示, 再障患儿外周血 T 细胞仅表达 4~22 个 V 亚家族, 其中 V 1、V 5、V 9、V 13 均呈阳性表达, 而 V 11、V 12、V 16、V 20、V 22、V 23 和 V 24 的表达频率较低。正常对照儿童外周血 T 细胞几乎表达所有 V 产物。6 例 SAA 儿童骨髓 T 细胞表达 5~15 个 V 产物, 正常骨髓可检测 9 个 V 产物。再障儿童外周血和骨髓 TCR V 基因谱的表达与病情严重程度及疾病缓解状态无关。

2.2 TCR V 亚家族 T 细胞克隆性

基因扫描提示, 正常儿童外周血和骨髓 TCR V CDR3 均呈“铃状”多峰图形。17 例再障儿童中, 12 例 (70.6%) 表现为不同程度的 TCR V 亚家族 T 细胞的克隆性增殖, 但个体间差异较大, 其中 7 例 SAA 出现 1-3 个 V 亚家族寡克隆 T 细胞 (初诊 SAA 2 例, CR 4 例, 复发 1 例, 以 P1-P7 表示), (图 1), 伴或不伴其他 V CDR3 图形异常 (图 2); 5 例 (初诊 SAA 2 例、MAA 3 例, 以 P8-P12 表示, 图 2) 为单纯图形异常。对其中 1 例具有寡克隆 T 细胞的 SAA-CR 患儿 (P2, HLA-DRB1*15) 同时复查骨髓和外周血样本, 结果显示骨髓和外周血 TCR V T 细胞的表达及克隆性基本一致, 与前次 (间隔 6 个月) 的外周血结果相似, 均存在 V 19 寡克隆 T 细胞。

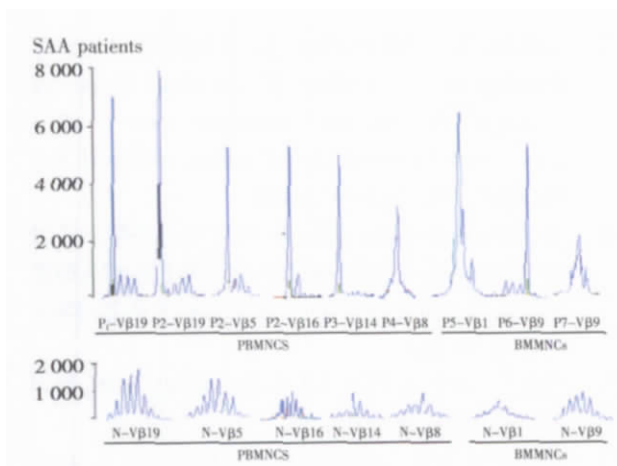


图 1 TCR V CDR3-寡克隆 T 细胞

Fig.1 TCR V CDR3 size distribution patterns - Oligoclonal T- cells

N: normal control; P1, P5:untreated SAA patients; P2 ,P3 ,P4 and P7: complete remission patients; P6: relapsed patient

PBMNCs: peripheral blood mononuclear cells; BMMNCs: bone marrow MNCs; Y- axis: relative fluorescence units

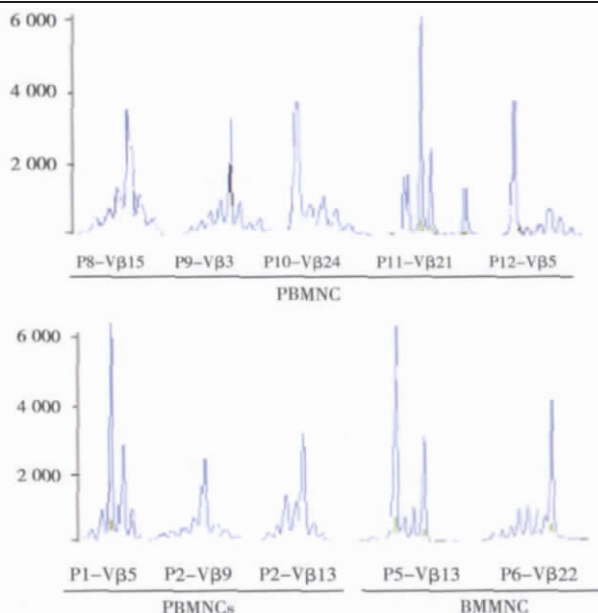


图 2 TCR V CDR3——图形异常

Fig.2 TCR V CDR3 size distribution patterns - skewed patterns

P1- P9: SAA patients; P10- P12: MAA patients ;Y- axis, relative fluorescence unit

2.3 T 细胞克隆性增殖与免疫抑制治疗效果的关系

7 例伴寡克隆 T 细胞的 SAA 患儿, 除 1 例复发者失访外, 其余 6 例经 IST (强化 IST 5 例, 单用环孢素 1 例) 均达 CR; 5 例未发现寡克隆 T 细胞的 SAA 患儿经 IST (强化 IST 4 例, 单用环孢素 1 例), 结果死亡 (单用环孢素) 无效和 CR 各 1 例, PR 2 例。3 例 MAA 患儿均伴有 CDR3 图形异常, 其中 1 例经强化 IST 后病情明显改善, 外周血 ANC>1.5×10⁹/L, Hb>100 g/L, 血小板>50×10⁹/L; 2 例单用环孢素治疗者均无效。

2.4 T 细胞克隆性增殖与 HLA-DRB1*15 的关系

17 例再障儿童中, 5 例 HLA-DRB1*15 (+), 其中 4 例 (80%) 存在寡克隆 T 细胞; 另 12 例 HLA-DRB1*15 (-) 患儿中 3 例 (25%) 有寡克隆 T 细胞, 两组比较, 差异具有统计学意义 (u=2.115, P<0.05)。

3 讨论

在 T 细胞发育过程中, TCR 基因重排时, 由于 V、D 和 J 区之间连接时有不同数量的碱基对 (N 区) 随机插入, 且 D 区重排时可长可短, 故形成一个高度可变区域, 这一可变区域 (V_N D_N J) 即为

CDR3。外周血 T 细胞主要为携带 TCR V 的 T 细胞,正常外周血 T 细胞表达所有的 V 亚家族。本文资料显示,正常儿童外周血 T 细胞几乎表达所有的 V 亚家族,而再障儿童外周血 T 细胞仅表达 4~22 个 V 亚家族,主要分布在 V 1、V 5、V 9、V 13、V 19。再障儿童的这种 TCR V 亚家族倾向性分布的原因尚不清楚,在白血病和骨髓移植后亦可见类似情况^[9],可能是由于抗原特异性的克隆性 T 细胞的优势增殖而影响其他 V 亚家族的基因重排所致。已经证明,不同亚家族 T 细胞各自具有相应的功能,正常的免疫功能表现为具有稳定的和多样性的基因谱型^[9],再障患儿 TCR V 亚家族的倾向性分布可能是细胞免疫功能紊乱所致。

Melenhorst 等^[7]利用 RT-PCR 和 SSCP 分析 7 例再障患者骨髓 TCR V 克隆性,3 例在 5~8 个亚家族出现克隆性细胞。Risitano 等^[9]采用流式细胞仪检测 TCR V T 细胞亦发现多数再障患者存在 T 细胞克隆性增殖。Zeng 等^[9]对 18 例成人再障患者的骨髓 TCR V 研究结果显示,5 例环孢素治疗依赖者(均呈 HLA-DRB1*1501)40%以上的 V 亚家族呈克隆性增殖,而环孢素治疗不能达到持续缓解或对环孢素治疗无效但对 ATG 治疗有效的再障患者,其 TCR V 各亚家族的分布和克隆性均正常。进一步分析显示 CD4+ T 细胞克隆可溶解自身的 CD34+细胞和抑制造血祖细胞集落形成,说明再障患者体内存在针对某一特定抗原刺激所产生的克隆性 T 细胞,这种克隆性 T 细胞具有造血抑制作用^[10]。本组患儿的外周血和骨髓亦发现 V 5、V 13 亚家族克隆性增殖 T 细胞,推测再障患儿体内的克隆性增殖 T 细胞与再障的发病有关。HLA-DRB1*15 基因型与多种自身免疫性疾病易感有关,再障人群中 HLA-DRB1*15 发生频率较对照人群显著增高,HLA-DRB1*15(+)再障患者对环孢素治疗具有良好的治疗反应^[11],我们的资料显示,HLA-DRB1*15(+)再障患儿更多见寡克隆 T 细胞,说明再障的发病与遗传易感性有关,当机体暴露于有害的环境(如病毒感染、化学、药物等)时 HLA-DRB1*15(+)者更容易触发针对造血系统的自身免疫反应。

T 细胞的克隆性增殖不仅见于 SAA 起病阶段,亦见于疾病完全缓解期和复发阶段,克隆性增殖 T 细胞的持续存在是否与疾病高复发率有关,仍有待于进一步观察。本文 1 例复发患儿(HLA-

DRB1*15)表现为 V 9 寡克隆性 T 细胞,而 V 9 克隆性增殖亦见于另 2 例 SAA-CR 儿童(P2,P7);另 1 例 SAA-CR 患儿(P3)停环孢素 2 年,外周血仍可见 V 14 寡克隆 T 细胞,骨髓细胞形态学检查再次出现以非造血细胞为主的骨髓小粒,巨核细胞数量减少,多次检查外周血白细胞 $4.0 \times 10^9/L$,为预防复发予环孢素治疗 4 个月,复查骨髓像见巨核细胞明显增多(175 个),非造血细胞为主的骨髓小粒明显减少。

一般认为再障是一种异质性疾病,免疫介导的骨髓抑制在 SAA 的发生和发展中地位已经受到重视,但有关 MAA 免疫功能状态的研究较少见。Howard 等^[12]对 22 例仅接受支持治疗的 MAA 儿童随访 66 个月结果显示,67%的患儿进展为 SAA。本文 3 例 MAA 儿童均存在 CDR3 图形异常,说明细胞免疫紊乱在 MAA 的发生和发展中亦具有重要意义。

本研究从 mRNA 水平揭示了 T 细胞克隆性增殖在儿童再障发生、发展中的作用,TCR V 亚家族 T 细胞克隆的检测对进一步了解疾病的免疫功能状态、预测 IST 效果和指导治疗具有一定的参考价值。

(衷心感谢暨南大学血液研究室李扬秋教授和陈少华老师在 RT-PCR 方面、广州市妇婴医院脐血库李焱在基因扫描方面的大力支持和帮助)

参考文献:

- [1] NAKAO S, TAKAMATSU H, YACHIE A, et al. Establishment of a CD4+ T cell clone recognizing autologous hematopoietic progenitor cells from a patient with immune-mediated aplastic anemia[J]. *Exp Hematol*, 1995, 23(5): 433-438.
- [2] 李扬秋,杨力建,陈少华,等. 供者淋巴细胞输注治疗慢性髓系白血病中移植抗白血病效应相关的克隆性增殖 T 细胞的研究[J]. *中华血液学杂志*, 2002, 23(10): 548-549.
- [3] 伍曼仪,黄绍良. 现代小儿血液病学[M]. 福州:福建科学技术出版社,2003:198.
- [4] CAMITTA B M, THOMAS E D, NATHAN D G, et al. A prospective study of androgens and bone marrow transplantation for treatment of severe aplastic anemia[J]. *Blood*, 1979, 53(3): 504-514.
- [5] 李扬秋,汪明春,杨力建,等. 基因扫描分析 B-CLL 的 TCR V 亚家族 T 细胞的表达和克隆性[J]. *中国*

(下转第 172 页 to page 172)

组织中存在过表达,且可能是通过激活 BCL-2 发挥抗凋亡作用,从而促进皮肤肿瘤的形成和发展,为通过转基因或基因沉默等方法深入研究 COX-2 与皮肤肿瘤发生的关系及开展以 COX-2 为靶点治疗皮肤肿瘤的新思路提供了有力的证据。

参考文献:

- [1] THUN M J, NAMBOODIRE M M, CALLE E E, et al. Aspirin use and risk of fatal cancer [J]. *Cancer Res*, 1993, 53(6): 1322-1327.
- [2] 陆红,戈之铮,刘文忠,等. 环氧合酶-2 蛋白在结肠疾病中的表达[J]. *胃肠病学杂志*, 2000, 5(3):158-160.
- [3] MARAN E M. Epidemiological and clinical aspects of nonsteroidal anti-inflammatory drugs and cancer risks [J]. *J Environ Pathol Toxicol Oncol*, 2002, 21(2): 193-201.
- [4] 吕志强,张惠忠,李海刚,等. COX-2 和 iNOS 在肺癌组织中的表达及其临床意义[J]. *中山大学学报:医学科学版*, 2004, 25(2):153-156.
- [5] KAGOURA M, TOYODA M, MATSUI C, et al. Immunohistochemical expression of cyclooxygenase-2 in skin cancers[J]. *J Cutan Pathol*, 2001, 28(6):298-302.

- [6] TAKEDA K, KANEKURA T, KANZADI T. Negative feedback regulation of phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway by over-expressed cyclooxygenase-2 in human epidermal cancer cells[J]. *J Dermatol*, 2004, 31(7):516-523.
- [7] NIJSTEN T, COLPAERT CG, VERMEULEN P B, et al. Cyclooxygenase-2 expression and angiogenesis in squamous cell carcinoma of the skin and its precursors: a paired immunohistochemical study of 35 cases[J]. *Br J Dermatol*, 2004, 151(4):837-845.
- [8] SANO H, KAWAHITO Y, WILDER R L, et al. Expression of Cyclooxygenase-1 and -2 in human colon cancer[J]. *Cancer Res*, 1995, 55(17):3785-9.
- [9] KAMEI D, MURAKAMI M, NAKATANI Y, et al. Potential role of microsomal prostaglandin E synthase-2 in tumorigenesis [J]. *J Biol Chem*, 2003, 278(21): 19396-19405.
- [10] TSUJII M, DUBOIS R N. Alterations in cellular adhesion and apoptosis in epithelial cells overexpressing prostaglandin endoperoxide synthase-2 [J]. *Cell*, 1995, 83(3): 449-501.

(编辑 刘清海)



(上接第 168 页 from page 168)

实验血液学杂志, 1998, 6(3): 210-213.

- [6] GORSKI J, YASSAI M, ZHU X, et al. Circulating T cell repertoire complexity in normal individuals and bone marrow recipients analyzed by CDR3 size spectrotyping. Correlation with immune status [J]. *J Immunol*, 1994, 152(10): 5109-5119.
- [7] MELENHORST J J, FIBBE W E, STRUYK L, et al. Analysis of T-cell clonality in bone marrow of patients with acquired aplastic anemia[J]. *Br J Haematol*, 1997, 96(1): 85-91.
- [8] RISITANO A M, MACIEJEWSKI J P, GREEN S, et al. In vivo dominant immune responses in aplastic anaemia: molecular tracking of putatively pathogenetic T-cell clones by TCR beta-CDR3 sequencing [J]. *Lancet*, 2004, 364(9431): 355-364.
- [9] ZENG W, NAKAO S, TAKAMATSU H, et al.

Characterization of T-cell repertoire of the bone marrow in immune-mediated aplastic anemia: evidence for the involvement of antigen-driven T-cell response in cyclosporine-dependent aplastic anemia [J]. *Blood*, 1999, 93(9): 3008-3016.

- [10] ZENG W, MACIEJEWSKI J P, CHEN G, et al. Limited heterogeneity of T cell receptor BV usage in aplastic anemia[J]. *J Clin Invest*, 2001, 108(5): 765-773.
- [11] USMAN M, ADIL SN, MOATTER T, et al. Increased expression of HLA DR2 in acquired aplastic anemia and its impact on response to immunosuppressive therapy[J]. *J Pak Med Assoc*, 2004, 54(5): 251-254.
- [12] HOWARD S C, NAIDU P E, HU X J, et al. Natural history of moderate aplastic anemia in children [J]. *Pediatr Blood Cancer*, 2004, 43(5): 545-551.

(编辑 张恩健)