

PCR 技术在 B 细胞淋巴瘤诊断中的应用^①

孙晓非^② 管忠震 何友兼 崔景华 廖海 陈火胜

(中山医科大学肿瘤医院内科;广州,510060)

提 要 应用聚合酶链反应(PCR)技术从 DNA 水平测定 B 细胞非霍奇金淋巴瘤的单克隆起源,以用于淋巴瘤的诊断。40 例标本检测的阳性结果为: B 细胞淋巴瘤 13/15 例, T 细胞淋巴瘤 0/3 例, 霍奇金病 0/3 例, 慢性淋巴结炎 0/8 例, 非淋巴源性肿瘤 0/11。与组织学及免疫组化诊断符合率为 87%。本研究在把分子生物学的新方法用于 B 细胞淋巴瘤的临床诊断方面作出初步的探索。

关键词 聚合酶链反应; B 细胞淋巴瘤; 单克隆起源

中图分类号 R730.43

目前淋巴瘤的诊断主要依靠组织学, 细胞学及免疫组化, 利用基因探针可测定免疫球蛋白(Ig)或 T 细胞受体基因重排以鉴别 B 或 T 细胞疾患。但此技术复杂, 费时, 其实际应用价值大为降低。近年来迅速发展起来的 PCR 技术, 则可通过体外 DNA 扩增来检测 Ig 重链基因重排。方法简单、迅速, 具有临床实用价值。我们从活检组织中提取 DNA, 应用 PCR 技术检测 B 细胞淋巴瘤的单克隆起源, 用于淋巴瘤的诊断, 取得了预期的结果。

1 材料与方 法

1.1 检测对象及 DNA 提取方法

临床淋巴结活检组织标本 39 例, 淋巴结穿刺标本 1 例, 共 40 例。其中 B 细胞非霍奇金淋巴瘤(B-NHL)15 例, T 细胞非霍奇金淋巴瘤(T-NHL)3 例, 霍奇金病(HD)3 例, 淋巴结慢性炎症 8 例, 非淋巴源性肿瘤 11 例。所有病例均经组织学及免疫组织化学确定诊断。

DNA 提取方法: 将上述标本研磨成匀浆后, 加入 TNES 2.5ml (50mmol/L Tris-HCl, pH7.6, 100mmol/L NaCl, 20mmol/L ED-

TA-Na₂, pH8, 1% SDS)。蛋白酶 K 25 μ l (10mg/ml), 混匀后置 55 $^{\circ}$ C 水浴 3~4h, 再加蛋白酶 K 25 μ l, 混匀后放在 37 $^{\circ}$ C 水浴过夜。用等体积苯酚分别抽提 2 次后, 再用等体积氯仿: 异戊醇(24:1)抽提 1 次。加入 1/10 3mol/L NaAc 混匀, 与 2.5 倍体积的冰冻无水乙醇混匀, 即见絮状大分子 DNA 析出, 将其挑至 1.5ml 离心管中, 加入预冷的 75% 乙醇洗 2 次, 离心去上清, 自然干燥后, 加入适量 TE, 溶解 DNA 沉淀, -20 $^{\circ}$ C 保存备用。

1.2 PCR 方法

引物 I 来源于免疫球蛋白重链可变区(VH)的第三框架区, 序列为: 5' CTGTCGACACGGCCGTGTATTACTG3'。引物 II 来源于免疫球蛋白重链结合区(JH), 序列为: 5' AACTGCAGAGGAGACGGTGACC3'。上述引物是由上海实生生物细胞技术公司合成。

PCR 反应混合液总体积 50 μ l。含有 10 \times buffer 5 μ l, 2.5mmol/L MgCl₂ 3 μ l, dNTP5 μ l, 引物 I 1 μ l (10 OD/100 μ l), 引物 II 1 μ l (10 OD/100 μ l), 标本 DNA 1 μ l, 双蒸水 34 μ l。96 $^{\circ}$ C 10min 预变性后加入 Taq DNA 聚合酶 2U, 摇匀, 复盖 30 μ l 石蜡油以防蒸发。然后置于 cetus PCR 扩增仪中, 循环

^① 卫生部青年科研基金资助课题;

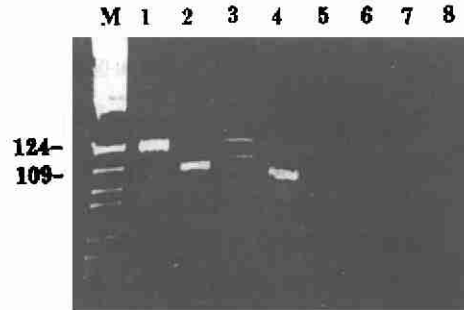
^② 第一作者, 36 岁, 女, 主治医师; 第六作者, 中山医科大学微生物教研室博士

30个周期,每个周期由变性期 94℃ 1min,退火期 55℃ 1min,延伸期 73℃ 1min,3个变温期组成。每次试验均设置阳性、阴性对照,阳性对照是一例经临床、形态学、免疫组化确诊的 B 细胞淋巴瘤,阴性对照则为非淋巴源性肿瘤。将 10 μ l PCR 扩增产物,在 8% 聚丙烯酰胺凝胶中电泳 1.5h,电压 120V,缓冲液为 TBE,然后用溴化乙啶染色 10min,紫外线下观察结果并摄影。

2 结果

15 例 B 细胞淋巴瘤,经 PCR 扩增后 13 例出现 1 至 2 条明显扩增的 DNA 条带。大小约为 100~120bp 左右。3 例霍奇金病,3 例 T 细胞淋巴瘤,8 例淋巴结慢性炎症,11

例非淋巴源性肿瘤均未见有扩增的 DNA 条带,其诊断结果与组织学及免疫组化符合率为 87%(附表、附图)。



附图 PCR 扩增产物聚丙烯酰胺凝胶电泳
1~4. B-NHL; 5. T-NHL; 6. HD; 7. 慢性淋巴结炎;
8. 转移性鳞癌; M. DNA 分子量标记

附表 40 例淋巴结活检(穿刺)组织 PCR 结果

诊断	n	阳性(%)	阴性(%)
B-NHL ¹⁾	14	12(86)	2(14)
B-NHL(穿刺)	1	1(100)	0
T-NHL ²⁾	3	0	3(100)
慢性淋巴结炎	8	0	8(100)
HD ³⁾	3	0	3(100)
非淋巴源性肿瘤	11	0	11(100)
合计	40	13(33)	27(67)

1)B-NHL; B 细胞非霍奇金淋巴瘤; 2)T-NHL; T 细胞非霍奇金淋巴瘤; 3)HD; 霍奇金病

3 讨论

正常 B 淋巴细胞分化过程中, Ig 基因结构中的可变区(V), 多样区(D), 连接区(J)和恒定区(C)都随机进行重排。故每个 B 淋巴细胞克隆均具有特异的 Ig 基因重排。但这种重排仍保留有保守序列。PCR 技术是一种体外酶促合成特异性 DNA 片段的方法。在 PCR 过程中, 以 Ig 重链基因可变区的第三框架区和结合区(的序列作为引物, 进行 DNA 扩增。这种引物一般能产生长度大约为

100~120bp 的 DNA 片段。B 细胞淋巴瘤起源于单个恶性 B 淋巴细胞, 属于单克隆增生, PCR 扩增后可获得一条对此淋巴瘤独特的条带。淋巴结慢性炎症, 属于淋巴细胞多克隆增生, PCR 后不会产生一条独特的带, 但可以出现染色均匀的弥漫带。而 T 细胞淋巴瘤及其他非淋巴源性肿瘤则无此特异的 DNA 扩增。

本文 15 例 B 细胞淋巴瘤, 13 例获得一条或二条独特的带。与万景华、McCarthy, Kevin 等人报道相符^[1~3]。此 13 例阳性中, 12 例是单克隆增生, 表现为一条带。1 例是双克

隆增生,表现为二条带。Sklar J在1984年通过蛋白标记及DNA分子标记亦发现B细胞淋巴瘤存在双克隆增生,其发生率高达10%^[4]。本文1例占阳性病例的8%。PCR技术对淋巴瘤的标本要求不高,从淋巴结穿刺物中提取DNA也可作出诊断。本文有一例是经皮淋巴结穿刺标本,获得满意的结果。15例B-NHL中,有2例为阴性,可能此2例的Ig基因有不寻常的序列,不能被本研究中的引物所识别。

PCR技术能较快地从DNA水平检测淋巴瘤,操作相对简单,要求的DNA量少,敏感性和特异性较高,淋巴结穿刺标本也可以进行检测。如每次试验均设置阳性、阴性对照,电泳时设置DNA分子量标记,就能获得比较确切的结果。此法为淋巴瘤临床诊断,鉴别诊断提供了一种分子生物学的新方法。本方法在临床实际应用方面还可作进一步的探索。例如,可设计T细胞受体基因引物,检测T细胞淋巴瘤,也可对淋巴瘤残留病灶进行检测,对蜡块切片可进行回顾性分析及疾病

演变的历史研究等。

(承蒙中山医科大学遗传教研室许卫明博士,中山医科大学中心实验室、中山医科大学肿瘤医院门诊手术室、病理科、肿瘤研究所遗传室大力协助,特此表示衷心感谢)

参 考 文 献

- 1 万景华, Trainor KJ, Brisco MJ, et al. 应用多聚酶链反应(PCR)快速诊断克隆性B淋巴细胞增殖性疾患. 中华肿瘤杂志, 1990, 12(4): 242
- 2 McCarthy KP, Sloane JP, Wiedemann LM. Rapid method for distinguishing clonal from polyclonal B cell population in surgical biopsy specimen. J Clin Pathol, 1990, 43: 429
- 3 Trainor KJ, Brisco MJ, Story CJ, et al. Monoclonality in B-lymphoproliferative disorders detected at the DNA level. Blood, 1990, 75: 2220
- 4 Sklar J, Cleary ML, Thielemans K, et al. B-cell lymphoma. N Engl J Med, 1984, 311: 20

(1993-12-13 收稿 1994-08-27 修回)

DETECTING B CELL LYMPHOMA BY USING POLYMERASE CHAIN REACTION

Sun Xiaofei Guang Zhongzhen He Youqian Cui Jinghua Liao Hai Chen Huosheng

(Department of Medicine, Tumor Hospital, Sun Yat-Sen University of Medical Sciences, Guangzhou, 510060)

Monoclonality of B cell lymphoma at DNA level was detected by using the polymerase chain reaction (PCR). Of 40 clinical lymph node biopsy and aspiration specimens obtained from different kinds of diseases, the positive rates of detection were: 13/15(87%) for B cell lymphoma, 0/3 for T cell lymphoma, 0/3 for Hodgkin's disease, 0/8 for reactive lymphadenopathy and 0/11 for non-lymphoid tumor. The result above is consistent roughly with that from histology and immunohistochemistry examination. Our study shows that PCR technique is useful for clinical diagnosis of B cell lymphoma.

Key words polymerase chain reaction; B-cell lymphoma; monoclonality