

PCR 检测急性淋巴细胞白血病 T 细胞抗原受体 γ 基因重排

戴木水^① 洪文德 庞国元 罗绍凯 彭爱华

(中山医科大学附属第一医院血液病研究室;广州,510080)

提 要 应用多聚酶链反应技术体外扩增 20 例初治或复发的急性淋巴细胞白血病(ALL)T 细胞抗原受体, (TCR γ) 基因重排, 结果显示: 15 例病人出现约 400bp 的扩增产物, 阳性检出率为 75%(15/20), 产物电泳带位置略有差异提示其重排亚型的多样性。标准人急性 T 淋巴细胞白血病细胞株 CCRF-CEM 细胞携带 TCR γ 基因重排, 为阳性对照, 而正常骨髓及 Raji 细胞检测阴性, 为阴性对照。用系列稀释法证明本实验敏感性在 10^{-5} 水平以上。我们还探讨了该法在急性淋巴细胞白血病基因诊断、微量残留白血病的监测及自体骨髓移植体外净化效果的评价上的应用价值。该法不需寡核苷酸探针杂交、无需对扩增产物进行测序、且费时短、检出率高, 提示有重要的临床意义。

主题词 多聚酶链反应; 白血病, 淋巴细胞性; 基因重排, T 细胞抗原受体

中图分类号 R733.71

随着分子生物学的进展, 白血病的研究已从单纯形态学、细胞遗传学领域发展到分子水平。检测白血病特异性分子标记可用于基因诊断、分型及监测微量残留病(MRD)、指导治疗等^[1]。急性淋巴细胞白血病(ALL)有多种基因异常如 TCR, IgH 重排及各种染色体易位等^[2], 其中 TCR γ 基因重排几乎见于全部 T-ALL 和 40%~70% B-ALL。本研究选用适当引物, 应用多聚酶链反应(PCR)技术检测 ALL 病人 TCR γ 基因重排并探讨其临床应用价值。

1 材料与方 法

1.1 病例资料

20 例急性淋巴细胞白血病(ALL)骨髓取自本院血液科及儿科住院病例, 其中初治 18 例, 复发 2 例。原始淋巴细胞(原淋)+幼稚淋巴细胞(幼淋)占骨髓有核细胞比例为 $84.33\% \pm 14.26\%$ 。根据 1985 年法美英修订白血病分型标准(FAB)分型: 第一型(L₁)6

例, 第二型(L₂)14 例。男性 11 例, 女性 9 例; 年龄 4~63 岁, 平均 24.35 ± 15.83 岁。正常骨髓 1 例取自本院胸外科非恶性血液病患者手术切除的肋骨, 用于阴性对照, 其骨髓造血功能属正常。

1.2 细胞株来源

Raji、CCRF-CEM 细胞株分别引自本校肿瘤研究所病毒室及上海医科大学生化室, 置于 10% 小牛血清的 RPMI-1640(pH7.0, Gibco 公司产品)培养液中传代培养, 使用时收集离心沉淀细胞用于抽提 DNA。

1.3 抽提及定量

常规酚/氯仿法抽提正常骨髓、ALL 病人骨髓及 Raji、CCRF-CEM 细胞株细胞之 DNA, 并测定其波长为 260nm、330nm 处紫外光吸收的 OD 值以计算其 DNA 含量, 再用 $0.1 \times TE$ 液配成浓度为 $0.25 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ 。

1.4 寡核苷酸引物

参照 Taylor 等^[3]序列合成一对引物, 分别为: 5'-CCC TCT ATT ACC TTG GAA

^① 第一作者, 1966 年出生, 男, 硕士、医师

ATG -3'; 5'-TCT TCC AAC TTG GAA GGG AGA -3'。由上海细胞生物研究所人工合成。前者与 $J_{\gamma 1}$ 、 $J_{\gamma 2}$ 基因片段中 -21bp 核苷酸序列互补^[4]；后者与 $V_{\gamma 1.2.3.4}$ 及 $V_{\gamma 5P}$ 、 $V_{\gamma 8}$ 基因片段中 -21bp 核苷酸序列相同，与 $V_{\gamma 6}$ 基因相应序列差 4bp，与 $V_{\gamma 5}$ 、 $V_{\gamma 7}$ 基因相应序列仅差 1bp^[5]，故可用于扩增 TCR_{γ} ($V_{\gamma 1-8}$ - $J_{\gamma 1-2}$ 基因重排，产物约 400bp。使用时用 0.1 × TE 液配成浓度为 5 μmol/L。

1.5 PCR 反应

反应总体积 100 μl，含模板 DNA 1 μg，引物各 1.0 μmol/L，dNTP 各 200 μmol/L，Tris-HCl (pH8.5) 10mmol/L，KCl 50mmol/L，MgCl₂ 1.5mmol/L，BSA 20mg/L。反应前先置 95℃ 变性 10min，并迅速置 4℃ 冰浴中，再加 Tag DNA 聚合酶 (Boehringer Mannheim 公司产品) 2.5U，于 94℃ 1min，55℃ 2min，72℃ 3min，共 30 个循环，最后一个循环 72℃ 持续至 10min，并迅速置于 4℃ 冰浴中，用于下述电泳。

1.6 电泳及观察

取 PCR 扩增产物 10 μl，于 2% 琼脂糖凝胶中电泳，溴化乙锭 (EB, 1 μg/μl) 染色，紫外灯下观察并照像。

1.7 系列稀释法测定本实验敏感性

用正常骨髓细胞 DNA 按 10 倍系列稀释 CCRF-CEM 细胞株 DNA，取各稀释度 DNA 1 μg，分别行上述 PCR 扩增，观察其产物带消失的最高稀释度。

2 结果

2.1 标准阳性及阴性对照

CCRF-CEM 细胞株 DNA 扩增产物见 -400bp 清晰条带，其下模糊带为引物二聚体 (图 1)，提示它携带 TCR_{γ} 基因重排，与文献报道一致^[3]。Taylor 用限制性内切酶酶切电泳分析证实 CCRF-CEM 细胞两条等位基因均含 TCR_{γ} 基因重排，其重排类型为 $V_{\gamma 3/4}$ - $J_{\gamma 1/2}$ 。提示该细胞株细胞仅含胚系基因，故未见该特异性重排产物，可作阴性对照。

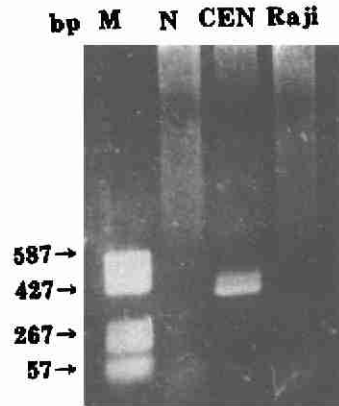


图 1 CCRF-CEM 细胞扩增结果

产物带约 400bp，而正常骨髓 (N)，Raji 细胞阴性 (M 为 PBR332Hae I 标准分子量)

2.2 ALL 病人扩增结果

用 PCR 方法扩增 20 例 ALL 病人骨髓细胞 DNA，结果显示 15 例有 TCR_{γ} 基因重排，阳性检出率为 75% (15/20)，部分扩增产物见图 2。其片段长度均约 400bp，不同病例之间产物带位置略有差异，可能提示重排亚型的多样性。

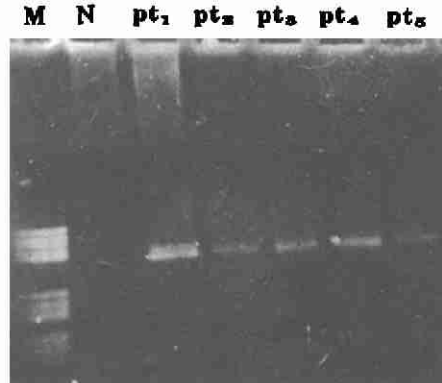


图 2 ALL 病人 (pt) 骨髓细胞 DNA 扩增结果

产物片段长度均约 400bp，但病例之间略有差异

2.3 本实验敏感性的测定

用 1 μg CCRF-CEM 细胞 DNA 作系列稀释，并对各稀释度 DNA 同时行 PCR 扩增，结果显示：于 10⁻⁵ 稀释度仍清晰可见上述产物带，10⁻⁶ 稀释度仍隐约可见，而 10⁻⁷ 稀

释度该特异性产物则消失,说明本实验敏感性在 10^{-5} 水平以上。

3 讨论

T细胞抗原受体 γ 基因(TCR_{γ})定位于人7号染色体短臂1区5带(7p15),目前发现有15个 V_{γ} 、5个 J_{γ} 及2个 C_{γ} 位点,约160kb。功能性 V_{γ} 基因分4个亚组: $V_{\gamma 1}$ 有9个位点($V_{\gamma 1(1-8)}$)、 $V_{\gamma 2}$ 、 $V_{\gamma 3}$ 、 $V_{\gamma 4}$ 各1个位点($V_{\gamma 9-11}$),其中仅10个 V_{γ} (主要为 $V_{\gamma 1}$)、5个 J_{γ} (主要为 $J_{\gamma 1}$ 、 $J_{\gamma 2}$)与基因重排有关^[3,6]因此在ALL的诊断及其MRD的监测上有重要价值。但过去的DNA印迹杂交等不能发现1%~5%以下的微量残留白血病细胞(MRLC),而PCR技术可使其检测敏感性达 10^{-4} ~ 10^{-7} 水平^[2]。本实验用标准细胞株CCRF-CEM细胞DNA作系列稀释法PCR,证明其敏感性在 10^{-5} 水平以上,故有利于缓解期ALL MRD的检测。

Macintyre等^[6]据不同重排亚型分别设计相应引物行PCR扩增,并用相应寡核苷酸探针杂交,故适用于全部ALL的 TCR_{γ} 基因重排的检测,但该法设计引物多,费时长,应用受限。作者仅用1对引物扩增 $V_{\gamma 1}-J_{\gamma 1/2}$ 基因重排亚型,结果显示75%(15/20)ALL病人检测到 TCR_{γ} 基因重排,略低于Taylor^[3]等报道的85.7%(24/28),原因可能是我们将其两次PCR法简化为一次PCR,使实验更为简便易行。扩增产物均约400bp,但不同病例产物带位置之间略有差异,可能说明 TCR_{γ} 基因重排亚型的多样性。参予 $V_{\gamma 1}-J_{\gamma 1}$ 基因重排的位点包括 $V_{\gamma 1}$ ($V_{\gamma 1.2,3,4,5,6,7,8}$)及 $J_{\gamma 1}$ ($J_{\gamma 1.2}$),而ALL TCR_{γ} 基因重排主要是这些区域的异常,故本法适用于大部分ALL的 TCR_{γ} 基因重排的检测,且检出率较高。另外对扩增产物行限制性内切酶酶切电泳分析证实同一病人初治与复发期的 TCR_{γ} 基因重排亚型一致^[3],说明其重排类型较稳定,利于ALL同一病人MRD的检测。

本实验方法设计引物少,阳性率较高,无

需测序及寡核苷酸探针杂交,仅费数小时,提示其有重要的临床应用价值。本法检测阳性为ALL的诊断提供了分子水平的依据,对ALL缓解期 TCR_{γ} 基因重排的检测可用于其MRD的监测,并能判断其预后及评价治疗效果^[1]。我们也用本法检测了3例缓解期ALL TCR_{γ} 基因重排,1例第2次完全缓解的病人呈阳性,并于1个半月后再次复发,而另2例检测阴性的病人分别随访了5.5及6.0个月,仍持续完全缓解(未显示资料)。本法检测阳性不仅说明MRLC大于 10^{-5} 水平,而且主要说明其白血病克隆变异仍持续存在,成为白血病复发的根源。我们还用标准阳性细胞株CCRF-CEM模拟缓解期骨髓,用药物联合法对其实施体外净化,再用系列稀释法PCR评价其净化前后MRLC残留水平,结果显示有3log的净化白血病细胞作用^[7],提示其在自体骨髓移植(ABMT)体外净化效果的评价上也有重要意义。

我们用CCRF-CEM细胞株及正常骨髓或Raji细胞株细胞DNA分别作阳性和阴性对照,从而保证了结果的可靠性。本组5例ALL病人检测阴性,可能是其本身无 TCR_{γ} 基因重排,或是少见的未被本对引物扩增的重排亚型,如 $V_{\gamma 1.1,4}$ 参予的重排等,其临床意义有待于进一步研究。

(衷心感谢本校基础学院生化室罗超权教授、伍新尧教授、杨英浩教授及周俊宜硕士给予作者无私的指导和帮助)

参 考 文 献

- 1 Negrin RS, Blume KG. The use of the polymerase chain reaction for the detection of minimal residual malignant disease. *Blood*, 1991, 78 : 225
- 2 戴木水,洪文德. 多聚酶链反应检测急性淋巴细胞白血病微量残留病的进展. *山西白血病*, 1993, 2 : 183
- 3 Taylor JJ, Rowe D, Williamson IK, et al. Detection of T-cell receptor γ chain V gene rear-

- rangements using the polymerase chain reaction; Application to the study of clonal disease cells in acute lymphoblastic leukemia. *Blood*, 1991,77 : 1989
- 4 Lefrane MP, Forster A, Rabbitts TH, et al. Rearrangement of two disease T-cell T-chain variable-region genes in human DNA. *Nature*, 1986,319 : 420
 - 5 Lefrane MP, Forster A, Bear R, et al. Diversity and rearrangement of the human T-cell rearranging T genes; nine germ-line variable genes belonging to two subgroups. *Cell*, 1986, 45 : 237
 - 6 Macintype EA, d'Auriol L, Duparc N, et al. Use of oligonucleotide probes directed against T cell antigen receptor gamma delta variable-(diversity)-joining junctional sequences as a general method for detecting minimal residual disease in acute lymphoblastic leukemias. *J Clin Invest*, 1990,86 : 2125
 - 7 戴木水,洪文德,庞国元,等. 用 PCR 技术评价微量残留白血病细胞体外净化的效果. *中华血液学杂志*, 1995,16 : 23

(1994-03-21 收稿 1994-10-20 修回)

USE OF THE POLYMERASE CHAIN REACTION FOR DETECTION OF TCR_T GENE REARRANGEMENTS IN ACUTE LYMPHOBLASTIC LEUKEMIAS

Dai Mushui Hong Wende Pang Guoyuan Luo Shaokai Peng Aihua

(Laboratory of Haematology, the First Affiliated Hospital of Sun
Yat-Sen University of Medical Sciences, Guangzhou, 510080)

Using the polymerase chain reaction (PCR) technique, we detected rearrangements in the TCR_T locus in 15 of 20 (75%) patients with acute lymphoblastic leukemias (ALL) at presentation or relapse. Analysis of the PCR products showed a single band of approximately 400bp in length, although slight variation in size of the products from different V gene subtypes was presented. CCRF-CEM cell line used as positive control carried rearranged TCR_T gene while normal bone marrow cells or Raji cell line used as negative control did not carry them. The sensitivity of this method was showed at above 10⁻⁵ level based on serial dilution. We also discussed its use in genetic diagnosis, in detection of minimal residual leukemic cells, in monitoring of ex vivo purging in ALL. Therefore, this is a rapid and specific method for the detection of TCR_T gene rearrangements in ALL without recourse to direct sequencing and southern blotting, suggesting an important clinical significance.

Subject headings polymerase chain reaction (PCR); leukemia, lymphoblastic; gene rearrangement, T-lymphocyte