

8例B细胞淋巴瘤的T细胞基因CD4 V4突变及其相关蛋白的表达

苏祖兰¹, 金亦¹, 张子康², 邵春奎¹, 吴秋良³, 赵美卿³, 冯志英¹, 侯景辉³

(中山医科大学 1. 附属第三医院病理科, 广东 广州 510630; 2. 附属第三医院核医学科, 广东 广州 510630; 3. 附属肿瘤医院病理科, 广东 广州 510060)

摘要:【目的】检测B细胞淋巴瘤组织中T细胞的CD4 V4基因突变情况及其相应病例的Fas/FasL、CD4、bcl-2和Cyclin D1蛋白表达特征。【方法】PCR-SSCP技术筛选检测56例B细胞淋巴瘤CD4分子的V4外显子突变状况。用免疫组化方法检测有突变的B细胞淋巴瘤组织中L26、UCHL1、CD3、Fas、FasL、bcl-2和Cyclin D1蛋白表达情况。【结果】8例/56例(14.2%)T细胞CD4 V4外显子有变异。其中小淋巴细胞性淋巴瘤(small lymphocyte lymphoma, SLL)和淋巴母细胞性淋巴瘤(lymphoblastic lymphoma, LBL)的Fas、FasL和CD4蛋白均为弱或无表达;滤泡性淋巴瘤(follicular lymphoma, FL)3项均强表达;3例弥漫性大B细胞淋巴瘤(diffuse large B cell lymphoma, DLBL)和1例套细胞淋巴瘤(mantle cell lymphoma, MCL)Fas和FasL强表达, CD4无或弱表达。Fas和FasL双强表达的4例, 均有bcl-2和/或Cyclin D1过表达。【结论】B细胞淋巴瘤中CD4 V4基因有突变, 并提示这种突变与细胞死亡和细胞周期调控异常有关。

关键词: 抗原, CD4/遗传学; 突变; FasL蛋白; 原癌基因蛋白质c-bcl-2; 细胞周期蛋白D1; 淋巴瘤, B细胞
中图分类号: R730.23 文献标识码: A 文章编号: 1000-257X(2000)04S0-0098-04

CD4 V4 Mutation of T Cells and Its Relative Protein Expression in 8 Cases of B Cell lymphoma

SU Zu-lan¹, JIN Yi¹, ZHANG Zi-kang², SHAO Chun-kui¹, WU Qiu-liang³,
ZHAO Mei-qing³, FENG Zhi-ying¹, HOU Jing-hui³

(1. Third Affiliated Hospital, Sun Yat-sen University of Medical Sciences, Guangzhou 510630, China;
2. Affiliated Tomor Hospital, Sun Yat-sen University of Medical Sciences, Guangzhou 510060, China)

Abstract: 【Objective】Detection of mutation in CD4 V4 exon and expression of proteins associated with Fas, FasL, bcl-2, CD4 and Cyclin D1 in B cell lymphoma. 【Methods】The exon V4 mutation of CD4 gene was examined on 56 cases of B cell lymphoma specimens by means of PCR-SSCP and the expression of proteins of CD3, CD4, Fas, FasL, bcl-2 and Cyclin D1 by immunohistochemistry. 【Results】The V4 mutation rate of CD4 gene was 14.2% (8/56). Among them, CD4, Fas, FasL expressed weak or none in both SLL and LBL; on the contrary, FL was strong; 3/4 cases of DLBL and 1 case MCL expressed both Fas and FasL strong, but CD4 not expressed. Occasionally, they express bcl-2 and /or Cyclin D1 strong too. 【Conclusion】There are CD4 V4 mutation in B cell lymphoma and abnormal regulators of cell cycle and death.

Key words: antigen, CD4/genetics; mutation; FasL protein; proto-oncogene proteins c-bcl-2; cyclin D1; lymphoma, B-cell

B细胞淋巴瘤是恶性淋巴瘤中最常见的类型, 其发病机理仍未阐明。Lukes等认为本病发生与B

收稿日期: 2000-06-01

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(39870328)

作者简介: 苏祖兰(1944-), 女, 四川重庆人, 博士, 研究员

© 1994-2019 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

淋巴细胞的正常分化或转化途径受阻有关。鉴于 T 细胞对 B 细胞的分化和转化调节作用十分重要, 有必要弄清楚 B 细胞淋巴瘤中的 T 细胞状况。大量研究已经表明在 B 细胞淋巴瘤组织中, T 细胞数量、表型和亚群比例乃至功能均有明显异常^[3-6]。也有个别作者注意到 CD4 分子 HIV 受体 CCR5-delta32 缺失可使患 AIDS 相关淋巴瘤的危险性降低 3 倍。但是迄今尚未查见 B 细胞淋巴瘤中 T 细胞 CD4 分子本身基因 V4 外显子突变的报道。我们采用 PCR-SSCP 方法, 检测 56 例 B 细胞淋巴瘤石蜡包埋组织标本中 CD4 的 V4 外显子的基因突变情况, 并且了解与细胞周期调控和死亡有关的蛋白表达特征。为探讨 CD4 V4 基因变化在 B 细胞淋巴瘤发病过程中的意义提供实验依据。

1 材料和方法

1.1 材料

中山医科大学附属三院和附属肿瘤医院 1995~1999 年活检切除的未经治疗的淋巴瘤石蜡包埋活检组织标本 70 例, 采用 WHO97 分类标准, 根据形态和免疫组化标记结合临床表现重新诊断分类, 得到 56 例 B 细胞淋巴瘤。对该 56 例 B 细胞淋巴瘤用 PCR-SSCP 检测 CD4 V4 突变, 有突变的病例再增加作部分免疫标记作为分析对象。另设 20 例良性淋巴组织作对照。

1.2 PCR-SSCP

1.2.1 DNA 制备 按说明书进行。每例石蜡包埋标本切片 5 μ 厚, 共 5 张, 常规烤片脱蜡, 自然干燥。另将组织刮入 1.5 mL 塑料离心管中, 加入 70 μ L 消化液 (含 10 mmol/L Tris-HCl, pH8.0, 1 mmol/L EDTA, 10 ml/L 吐温-20, 150 mg/L Proteinase K, PK), 37 $^{\circ}$ C 过夜。煮沸 10 min 灭活 PK。高速离心后取上清作为 DNA 模板, 置 -20 $^{\circ}$ C 备用。

1.2.2 PCR 根据文献^[6]选择 V4 引物序列, 由上海生物工程公司合成。序列如下: 正义链 5'-GCC ACT CAG CTC CAG AAA-3', 反义链 5'-CTT GAT GTT GGA TTC CAG-3' 反应体系 (每个反应管总反应体系为 25 μ L): ddH₂O, 10 \times buffer, 10 mmol/L dNTPs, 引物 1, 引物 2, DNA 模板, Tag 酶。扩增条件: 94 $^{\circ}$ C 5 min, 温度降至 80 $^{\circ}$ C, 加酶 7 min 之后, 94 $^{\circ}$ C 变性 1 min, 55 $^{\circ}$ C 1 min, 72 $^{\circ}$ C 1 min 共 35 个循环。最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。取样

品 1 μ L 加 5 μ L 扩增产物混匀, 于 15 mg/L 琼脂糖凝胶中电泳, EB 染色, 在紫外分析仪上观察, 若在 201 bp 处出现橙黄色条带, 可用于 SSCP 分析。

1.2.3 SSCP 分析 PCR 扩增产物加入变性剂充分混匀, 瞬间离心, 沸水浴 10 min, 立即冰浴, 5 min 后在 80 mg/L 聚丙烯酰胺凝胶上电泳, 100 V, 快速上样, 400 V 10 min 后, 110 V 电泳 20 h。100 mL/L 乙醇和 11.3 mL/L 硝酸短暂浸泡电泳后的聚丙烯酰胺凝胶, 再 12 mmol/L 硝酸银浸泡 20 min, 振摇至现出条带, 100 mL/L 醋酸浸泡 2 min 终止反应。结果判断: 可见棕黄色的电泳条带。B 细胞淋巴瘤的标本与良性相比, 出现条带增多、减少或位置改变, 即为基因突变证据。

每次电泳均设正常淋巴组织对照。共作了 20 例良性对照。

1.3 免疫组化

对 T 细胞的 CD4 V4 外显子有变异的 B 细胞淋巴瘤的 8 例标本增加作 Fas, FasL, CD4, bcl-2 和 CyclinD1 等标记检测。均用鼠抗人单克隆抗体 (DAKO 或迈新公司), 采用 SLAB 法, 按说明书进行。微波法或高压法修复抗原。DAB 显色, 苏木素复染。结果判断: 按病理常规通用标准采用半定量记数, 按阳性细胞占切片中肿瘤组织内总细胞数的比例分为 4 级, 即 < 25%: -, 25%~50%: +, 50%~75%: ++, > 75%: +++, 其中 FasL 和 bcl-2 为核和浆阳性, UCHL1, CD3, CD4, L26 均为膜阳性。每次染色用良性淋巴组织 (或扁桃体) 作对照, 并另设 PBS 代替第一抗体作为阴性对照。

2 结果

56 例 B 细胞淋巴瘤中 CD4 V4 外显子有基因变异病例 8 例, 其中突变 6 例, 缺失 2 例。突变电泳条带见图 1, 见第 3, 4 泳带箭头处出现泳带增多现象。

这 8 例的临床和病理特点: 男 5 例, 女 3 例; 6 例为 56~68 岁的中老年人, 1 例 2 岁, 1 例 5.5 岁。肿瘤累及部位广泛, 2 例为肠道, 1 例鼻咽部, 其余为颌下、腹股沟、锁骨上等处淋巴结肿大。2 例为复发。组织学代表性图象见图 2。

由表 1 可见, 各 1 例 SLL 和 LBL 的 Fas, FasL 和 CD4 均为弱或无表达, 1 例 FL 上述 3 项均强表达; Fas, FasL 双强表达的 4 例均有 bcl-2 和/或 Cyclin D1 强表达, 其中 3 例为 DLBL, 1 例为 MCL。

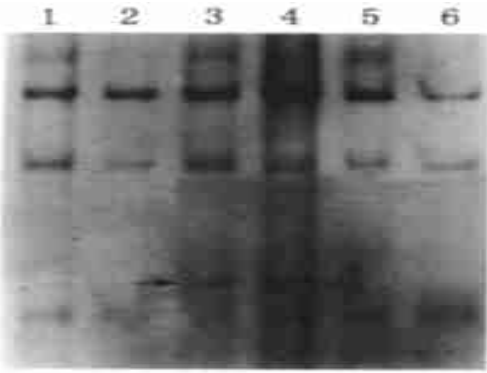


图 1 PCR-SSCP 的某一次电泳条带照片。

Fig. 1 PCR-SSCP, one of series times of electrophoresis

1: Benigh lymphoid tissue (as a control); 3: 5 in table 1, follicular cell lymphoma grade II (FL-II); → or ←: mutation line; 4: 6 in table 1, defuse large b cell lymphoma (DLBL); 2, 5, 6: No any more mutaion in this time of electoporesis

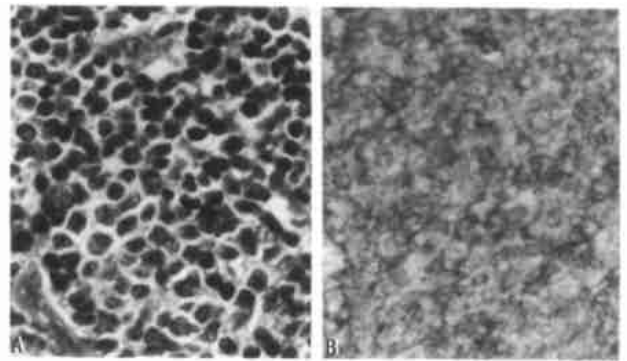


图 2 例 5 有 CD4V4 基因突变的滤泡性 B 细胞淋巴瘤的病理组织形态和免疫组化

Fig. 2 Case 5 morphological change and immunological marker of follicular B cell lymphoma with mutation of CD4 V4 exon

A: HE, 40×10; B: L26(CD20)positive cells (FL), SLAB, 40×10

表 1 8 例 B 细胞淋巴瘤免疫标记特征

Table 1 Immunological Markers of 8 cases B cell lymphoma

Case	Sex	Age(yr)	Subtype	L26	UCLH-1	CD3	CD4	Fas	FasL	bcl2	CyclinD1
1	F	56	SLL	+++	-/+	-/+	-	+/-	-	+/-	-
2	F	66	DLBL	+++	-/+	-/+	-	+++	+++	++	-
3	F	2	MCL	+++	-	-/++	-/+	+++	+++	++	+++
4	M	59	DLBL	+++	-/+	-/++	-/+	+++	+	+/-	+/-
5	M	69	FL-II	+++	-	-/++	-/++	++	+++	++	-
6	M	62	DLBL	+++	-/++	-/++	-/+	++	+	-/+	+/-
7	M	68	DLBL	+++	-/++	-/++	-	++	+++	+++	+++
8	M	5	LBL	+++	-/+	-/+	-/+	-	+/-	-	-

Note: F: female; M: male; -/++: tumor cells/ reactive cells, if no “/” means tumor cells condition; SLL: small lymphocyte lymphoma; MCL: mantle cell lymphoma; DLBL: defuse large B cell lymphoma; FL-II: follicular cell lymphoma grade II; LBL: lymphoblastic lymphoma

3 讨论

T 细胞在免疫反应中总是处于核心地位,而在其中发挥更大作用的 Th1 和 Th2 细胞均属于 CD4 阳性细胞,我们认为,在 B 细胞淋巴瘤这种免疫系统的恶性肿瘤,也应该遵循这个原则。我们早期的研究和其它很多文献已经报道 B 细胞淋巴瘤中的 T 细胞有亚型和数量异常,主要表现为 CD4 减少,CD8 增多或不变,CD4/CD8 比值下降^[2,3]。后来的研究发现 B 细胞淋巴瘤中的 T 细胞有明显功能异常,如 1993 年 Ohnishi 用加入抗 T 细胞单克隆抗体方法,使原有 B 细胞淋巴瘤进入冬眠状态^[4],而 1995 年 Herbert 则用动物实验发现,CD4 细胞可使 B 细胞淋巴瘤演变为 B 细胞转化的终末状态浆细胞

瘤^[5],从而说明 CD4 细胞不仅在 B 细胞转化过程中,而且在 B 细胞淋巴瘤的形成中均具有重要作用。与此同时,对 CD4 细胞基因变异及其在 B 细胞淋巴瘤发生发展中的可能意义应该引起足够重视^[8]。一个有代表性的实例是 AIDS 患者最常伴发的恶性肿瘤,除了 Kaposi's 肉瘤,就是 B 细胞淋巴瘤,而 AIDS 患者的 CD4 细胞被杀灭减少或称凋亡增多是重要特征,这之间的功能联系十分值得重视。新近有研究发现,人为改变 CD4 分子上的 HIV 受体基因 CCR5-delta32 结构,可以使 HIV 相关 B 细胞淋巴瘤的感染危险性减少达 3 倍之多^[9]。CD4 是 55 000 ku 的蛋白分子,存在于 MHC 限制的 II 类分子的辅助/诱导 T 细胞上,属于 Ig 超家族成员,它也是 HIV 结合受体,通过感染 CD4 细胞,机体疾患 AIDS。

基于上述考虑,本文侧重对 B 细胞淋巴瘤的反

应性 CD4 T 细胞的结构基因 V4 外显子进行基因变异检测,虽然只检测了一个外显子 V4,却发现了 8 例/56 例(14.2%)的病例有变异,即 B 细胞淋巴瘤中的 CD4 阳性 T 细胞的确存在基因突变。本研究结果恰好支持了这个设想,这在 B 细胞淋巴瘤发病机理的研究中是一个突破。如果把 4 个外显子均检测,可能发现更多的问题。

另外,发生基因突变的病例多数为弥漫性大 B 细胞淋巴瘤,支持与 B 淋巴细胞的转化和凋亡受阻有关。死亡基因蛋白 Fas/FasL、抗凋亡基因蛋白 bcl-2、影响细胞周期调控的 Cyclin D1 及 CD4 蛋白的检测发现,SLL 和 LBL 的 Fas、FasL 和 CD4 均为弱或无表达,说明未受抗原刺激的 B 细胞所对应的淋巴瘤也缺乏激活 B 细胞才有的 Fas 和 FasL 蛋白表达。1 例 FL 则均强表达,而且有 bcl-2 过表达,MCL 有 CyclinD1 特殊表达,DLCL 则或者强表达 Fas 和 FasL,或者表达 Cyclin D1,兼有 FL 和 MCL 的特征。有文献报道 FasL 诱导的死亡信号传导以 CD4 细胞为效应器^[7],本研究病例少,尚不能很好看出这个问题。

另外,有 4 例的 Fas 和 FasL 均为强阳性,按理该受体与配体结合应该发生正常生理性凋亡而不发生以 Fas 表达为主的 B 淋巴细胞聚集、恶变增殖的现象。但是从 bcl-2 和 CyclinD1 的免疫组化检测可见,这 4 例的 bcl-2 均为肿瘤细胞中等以上阳性,其中 2 例的 Cyclin D1 也明显阳性,提示这 4 例的 CD4 基因突变的同时,还出现了 B 细胞抗凋亡基因和细胞周期调控基因的表达异常。是否与 CD4 基因突变有因果关系,有待进一步探讨。至于 8 例发生 CD4 分子突变的病例多数为中老年,仅 2 例为幼儿,此现象是否有意义,也值得进一步研究。

本研究的意义在于,证实了 B 细胞淋巴瘤中的 CD4 细胞不仅是数量、分布和功能的异常,而且有结构基因 V4 外显子的突变。由于发生 CD4 基因变异的 B 细胞淋巴瘤病例又多伴有 CD4 蛋白、FasL 蛋白、bcl-2 蛋白及/或 Cyclin D1 的异常表达,提示在免疫系统的恶性肿瘤中也遵循免疫调节的一般规律,T 细胞在其中起着主导作用。对此,很值得积累更多病例,从激活 T 细胞淋巴因子受体及

信号传导过程等作进一步的深入研究。

(感谢本校遗传学教研室蒋玮莹副教授、博士,达安基因诊断中心王蒙老师、生物化学研究生童大跃同学等提供 PCR-SSCP 方法学帮助)

参考文献:

- [1] Jaffe E S, Harris N L, Diebold J, *et al.* World Health Organization classification of neoplastic diseases of the hematopoietic and lymphoid tissues. A progress report [J]. *Am J Clin Pathol*, 1999, 111(1 Suppl 1): S8.
- [2] Harris N L, Bhan A K. Distribution of T-cell subsets in follicular and diffuse lymphomas of B-cell type [J]. *Am J Pathol*, 1983, 113(2): 172.
- [3] 苏祖兰,陈钦材,陈彬. T_H 细胞与 IL2, IL2R 在 NHL 发病学中的作用 [J]. *中华病理学杂志*, 1988, 17(4): 273.
- [4] Ohnishi K, Bonavida B. Regulation of B-cell lymphoma growth in syngeneic SJL/J mice. Establishment of tumor dormancy following administration of anti-CD4 monoclonal antibody into tumor-bearing mice [J]. *Leukemia* 1993, 7(11): 1801.
- [5] Hilbert D M, Shen M Y, Rapp U R, *et al.* T cells induce terminal differentiation of transformed B cells to mature plasma cell tumors [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1995, 92(3): 649.
- [6] Hodge T W, Sasso D R, McDougal J S. Humans with OKT4 epitope deficiency have a single nucleotide base change in the CD4 gene, resulting in substitution of TRP240 for ARG240 [J]. *Hum Immunol*, 1991, 39(2): 99.
- [7] eF-Khatib M, Stanger BZ, Dogan H, *et al.* The molecular mechanism of FasL-mediated cytotoxicity by CD4+ Th1 Clones [J]. *Cell Immunol*, 1995, 163(2): 237.
- [8] 苏祖兰. B 淋巴瘤恶变机理研究进展 [J]. *中国科学基金*, 2000, 14(2): 72.
- [9] Dean M, Jacobson L B, McFarlane G, *et al.* Reduced risk of AIDS lymphoma in individuals heterozygous for the CCR5-delta32 mutation [J]. *Cancer Res* 1999, 59(15): 3561.

(编辑 黄小延,张敏瑞)