

论著 · 临床研究

儿童急性淋巴细胞白血病 T 细胞受体重排删除环与严重感染相关性研究

罗成娟 江华 陈静 戴家乐 沈小钰 薛惠良
汤静燕 罗长缨 潘慈 沈树红 周敏 顾龙君

(上海交通大学医学院附属上海儿童医学中心,上海 200127)

【摘要】目的 定量检测急性淋巴细胞白血病(急淋)患儿不同阶段外周血中信号连接/结合 T 细胞受体重排删除环(sjTRECs)水平的变化,以评价其作为预测化疗后严重感染指标的可行性。**方法** 共收集初发急淋患儿(初发组, $n=30$)、早期强化化疗结束后白细胞恢复且未感染患儿(化疗组, $n=36$)、化疗后严重感染患儿(感染组, $n=30$)及正常同龄儿童(正常组, $n=50$)外周血标本共 146 份,通过 FQ-PCR 法检测其 sjTRECs 水平,并进行组间比较。**结果** 正常组平均 sjTRECs 为 (394 ± 270) copies/ 10^3 MNC,高于其他 3 组($P < 0.05$);化疗组 sjTRECs 水平低于初发组 [(96 ± 78) copies/ 10^3 MNC vs (210 ± 219) copies/ 10^3 MNC, $P < 0.05$];感染组 sjTRECs 水平最低,仅为 (48 ± 40) copies/ 10^3 MNC。**结论** 监测急淋患儿化疗后 sjTRECs 水平变化可能有助于早期预测机体严重感染的发生。
[中国当代儿科杂志,2011,13(6):466-470]

【关键词】 T 细胞受体重排删除环;急性淋巴细胞性白血病;感染;儿童
【中图分类号】 R725.5 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1008-8830(2011)06-0466-05

Correlation between blood T-cell receptor rearrangement excision circles levels and severe infection in children with acute lymphoblastic leukemia

LUO Cheng-Juan, JIANG Hua, CHEN Jing, DAI Jia-Le, SHEN Xiao-Yu, XUE Hui-Liang, TANG Jing-Yan, LUO Chang-Ying, PAN Ci, SHEN Shu-Hong, ZHOU Min, GU Long-Jun. Department of Hematology/Oncology, Shanghai Children's Medical Center, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 200127, China (Jiang H, Email: hua-jiang@163.com)

Abstract: Objective This study quantitatively examined signal joint T-cell receptor rearrangement excision circles (sjTRECs) levels in peripheral blood of children with acute lymphoblastic leukemia (ALL) at different stages in order to evaluate the role of sjTRECs in predicting severe infection postchemotherapy. **Methods** sjTRECs levels in peripheral blood were measured by fluorescent quantitation-polymerase chain reaction in 30 children with newly diagnosed ALL, 36 children with ALL who accepted chemotherapy but were not infected, 30 children with ALL who had severe infection after chemotherapy, and 50 normal children. **Results** Blood sjTRECs levels in the normal group (394 ± 270 copies/ 10^3 MNC) were significantly higher than those in the other three groups ($P < 0.05$). Blood sjTRECs levels in the chemotherapy group without infection (96 ± 78 copies/ 10^3 MNC) were significantly lower than those in the newly diagnosed ALL group (210 ± 219 copies/ 10^3 MNC) ($P < 0.05$). The chemotherapy group with severe infection showed the lowest blood sjTRECs levels (48 ± 40 copies/ 10^3 MNC) in the four groups. **Conclusions** The measurement of blood sjTRECs levels might be helpful for predicting the occurrence of severe infection postchemotherapy in children with ALL.

[Chin J Contemp Pediatr, 2011, 13(6):466-470]

Key words: T cell receptor rearrangement excision circle; Acute lymphoblastic leukemia; Infection; Child

急性淋巴细胞性白血病(急淋)是儿童最常见的恶性肿瘤。在儿童急性白血病治疗相关死亡原因中,感染是最重要的原因之一,而且有相当一部分患儿的严重感染是在骨髓造血功能恢复后发生。因此如何早期发现患儿严重感染的可能性并及时有效地进行干预治疗,将有助于提高患儿的长期生存率。

[收稿日期]2010-11-18;[修回日期]2011-02-21
[基金项目]上海市卫生局课题(项目编号:2007142)。
[作者简介]罗成娟,女,硕士,住院医师。
[通信作者]江华,主治医师。

化疗可引起患儿的细胞免疫功能受损,而 T 淋巴细胞是细胞免疫的重要组成成分,只有经过胸腺内成熟的 T 淋巴细胞才具有完整的免疫识别能力,因此胸腺功能的损害是感染发生的最重要原因之一。

信号连接/结合 T 细胞受体重排删除环 (signal joint T-cell receptor excision DNA circles, sjTRECs) 是在 T 细胞受体重排过程中删除的一段环状 DNA,为游离基因,且不随 T 细胞的分裂而扩增,其含量代表了 TCR 基因初始重排时 Naive T 细胞的含量,故可以作为胸腺的近期输出功能指标^[1]。有研究发现,sjTRECs 水平高低可以作为预测患儿造血干细胞移植后 T 细胞重建的指标^[2]。因此患儿外周血 sjTRECs 水平变化可能是判断化疗后胸腺功能损害程度的有效指标。

本研究通过实时荧光定量 PCR 法检测不同时期急淋患儿外周血 sjTRECs 水平的变化,以评价化疗对患儿胸腺输出功能的影响,并探讨其在预测化疗后严重感染中的作用。

1 资料与方法

1.1 研究对象

共收集 2008 年 5 月至 2009 年 10 月间在我院住院治疗的 96 例急淋患儿的临床资料及外周血标本,其中化疗后重症肺部感染(感染组)患儿 30 例(男 18 例,女 12 例,男:女 = 1.5:1),中位年龄 7.0 (1.5 ~ 15) 岁;新诊断(初发组)患儿 30 例(男 15 例,女 15 例,男:女 = 1:1),中位年龄 4(1.3 ~ 13) 岁;早期强化化疗后外周血白细胞水平基本恢复且未感染(化疗组)患儿 36 例(男 21 例,女 15 例,男:女 = 1.4:1),中位年龄 6(3 ~ 14) 岁;另收集 50 例正常同龄儿童(正常组)外周血标本作为对照组,中位年龄 5(3 ~ 12) 岁。4 组标本采集时间分别为:初发组为疾病确诊后化疗开始前;化疗组于第 4 次化疗结束后白细胞基本恢复 ($>3 \times 10^9/L$) 且未感染时;感染组于严重肺部感染发生且白细胞 $>2.5 \times 10^9/L$ 时;正常组则于门诊体检时采集标本。4 组儿童的性别、年龄及白细胞计数差异均无统计学意义,见表 1。所有急淋患儿均进入 scmc-2005-ALL-protocol 方案^[3] 化疗。感染患儿的确诊依据均根据临床症状和影像学检查结果;化疗组患儿则根据化疗方案分组原则分为中危组 ($n = 20$) 和低危组 ($n = 16$)。

抽取上述儿童外周血 3 ~ 5 mL,EDTA 抗凝,使用 FlexGene DNA Kit (250) (QIAGEN Cat No.

51206) 试剂盒提取外周血样品的基因组 DNA, -80℃ 冰箱保存。

表 1 各组基本情况

	年龄(岁)	性别(例)		白细胞计数($\times 10^9/L$) ($\bar{x} \pm s$)
		男	女	
正常组	5(3 ~ 12)	27	23	7.2 $\pm$ 2.4
初发组	4(1.3 ~ 13)	15	15	6.1 $\pm$ 4.2
化疗组	6(3 ~ 14)	21	15	9.0 $\pm$ 8.6
感染组	7(1.5 ~ 15)	18	12	4.9 $\pm$ 2.1
χ^2 或 F 值	1.216	0.711		1.947
P 值	0.455	0.701		0.153

1.2 实时荧光定量 PCR 法检测 sjTRECs 含量

1.2.1 引物和探针的设计与合成 基本原则是从 TCR δ 基因组序列中于 δ Rec 基因片段的下游设计一上游引物和在上游设计一下游引物,并在该扩增片段中间设计一荧光素标记探针,因 sjTRECs 是 TCR 的胚系基因上被重组酶切下并组成环行 DNA 的产物,故设计引物时反向引物与其他基因不同,应与前向引物方向相反。选取 TCR α 链的恒定区(C α)的一段基因做为内参基因。引物及探针由大连宝生物工程有限公司合成,探针荧光素 5'连 FAM,3'连 TAMRA。具体引物及探针序列见表 2。

表 2 sjTREC 及内参 C α 的引物和探针序列

基因	序列
靶基因 TREC	前向引物 5'-CCATGCTGACACCTCTGGTT-3'
	反向引物 5'-TCGTGAGAACGGTGAATGAAG-3'
	探针 5'-FAM-CACGGTGATGCATAGGCACCTGC-TAMRA3'
内参 C α	前向引物 5'-CCTGATCCTCTTGTCCACAG-3'
	反向引物 5'-GGATTAGAGTCTCTCAGCTGCTACA-3'
	探针 5'-FAM-ATCCAGAACCCTGACCTGCCG-TAMRA3'

1.2.2 sjTRECs 和 C α 标准曲线的建立 首先在普通温度梯度 PCR 仪上调试最适反应温度、退火温度及最适引物、探针和模板量,以期能得到大量的目的片段。将得到的 PCR 产物通过凝胶电泳纯化后割胶回收,估计浓度,再将目的基因片段与 PMD19-T vector 连接,然后将连接产物转化入 DH-5 α 感受态细胞。将转化后的 DH-5 α 菌株进行筛选,摇菌,部分菌液抽提质粒并送公司(Invitrogen,上海)测序验证,测序验证后部分剩余菌液保种,部分抽提质粒,测质粒 dsDNA 浓度,将浓度换算成拷贝数,再按浓度要求稀释成 10^7 、 10^6 、 10^5 、 10^4 、 10^3 、 10^2 copies/ μ L,经实时荧光定量 PCR 建立标准曲线。

1.2.3 实时荧光定量 PCR 每一例标本同时进行 2 次 sjTRECs 和内参 C α 检测,反应体系为

25 μL ,其中含基因组或标准品 DNA 2 μL , Premix Ex Taq(TaKaRa, code D332A) 12.5 μL ,前向、反向引物(10 μM)各 0.25 μL ,探针(5 μM) 0.25 μL , DDH_2O 10.75 μL 。反应在 ABI Prism 7000 Sequence Detector 上进行;反应条件为 95 $^{\circ}\text{C}$ 1 min 变性后, 95 $^{\circ}\text{C}$ 15 s,60 $^{\circ}\text{C}$ 1 min 共 40 个循环。

1.3 统计学分析

所有统计学分析在 SPSS 13.0 上进行。多组间比较采用 One-Way-ANOVA 法或 R * C 表法,组间两两比较采用 Tamhane 法,对数据不符合正态分布者,显著性检验采用非参数检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 sjTRECs 和内参 C α 的绝对定量

在实时荧光定量 PCR 反应中,结合一个含有淬火者(TAMRA)和一报告者(FAM) 荧光素的探针,在反应过程中 TaqDNA 聚合酶将探针分离,使淬火者与报告者荧光素分离,从而显示了报告者荧光素,当该荧光素达到一定数量时,便可被检测到。根据其达到检测的最低基数所需的循环数(Ct 值)与标准曲线比较,从而确定其样本中所含的绝对基因拷贝数。

2.2 各组 sjTRECs 相对含量

由于标本的差异,需要将 sjTRECs 的绝对定量转化为相对定量以使样本具有可比性。由于每个细胞中含有两个 C α 基因,因此,根据公式(sjTRECs 绝对含量/C α 绝对含量) $\times 2 \times 1000$ 就可以计算出每

1000 个单个核细胞中 sjTRECs 的相对含量。

正常组、初发组、化疗组及感染组 sjTRECs 的相对含量分别为 394 ± 270 、 210 ± 219 、 96 ± 78 及 48 ± 40 copies/ 10^3 MNC。不难看出,感染组 sjTRECs 相对含量最低,而正常组最高,其次为初发组。化疗组及感染组的 sjTRECs 含量明显低于初发组($P < 0.05$ 或 0.01),而感染组 sjTRECs 水平明显低于化疗组($P < 0.05$);同时将初发组、感染组及化疗组同正常组比较,发现这 3 组 sjTRECs 水平均明显低于正常组。见表 3、图 1。

化疗低危组 sjTRECs 相对含量为(154 ± 65) copies/ 10^3 MNC,明显高于中危组的相对含量 [(58 ± 62) copies/ 10^3 MNC], $P < 0.01$ 。

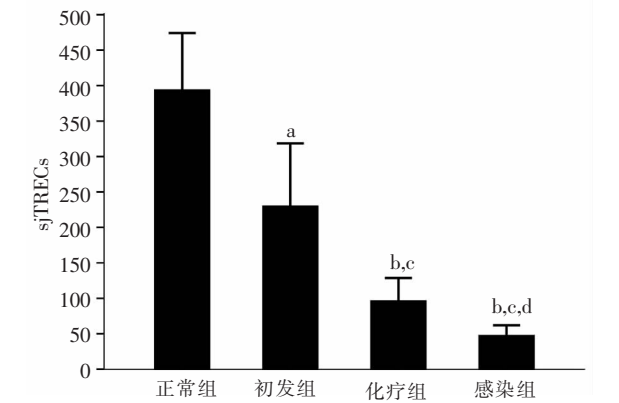


图 1 各组 sjTRECs 水平 a:与正常组比较, $P < 0.05$; b:与正常组比较, $P < 0.01$; c:与初发组比较, $P < 0.05$; d:与化疗组比较, $P < 0.05$

表 3 4 组 sjTREC 和 C α 的绝对和相对定量结果 (copies/ 10^3 MNC)

	sjTRECs 绝对定量		C α 绝对定量		sjTRECs 相对含量	
	$\bar{x} \pm s$	中位值(范围)	$\bar{x} \pm s$	中位值(范围)	$\bar{x} \pm s$	中位值(范围)
正常组	6955 $\pm$ 8047	2276(17 ~ 34108)	43304 $\pm$ 121320	10737(128 ~ 813910)	394 $\pm$ 270	371(24 ~ 1111)
初发组	5669 $\pm$ 8265	3197(213 ~ 33003)	86135 $\pm$ 98167	55505(3861 ~ 370387)	210 $\pm$ 219 ^a	129(18 ~ 829)
化疗组	2078 $\pm$ 3317	675(5 ~ 13767)	42325 $\pm$ 108256	14772(390 ~ 541078)	96 $\pm$ 78 ^{b,c}	73(1 ~ 289)
感染组	3822 $\pm$ 6839	1284(9 ~ 32955)	319194 $\pm$ 620267	93329(622 ~ 2510000)	48 $\pm$ 40 ^{b,c,d}	38(0.1 ~ 131)
F 值	—		—		11.318	
P 值	—		—		< 0.01	

a:与正常组比较, $P < 0.05$; b:与正常组比较, $P < 0.01$; c:与初发组比较, $P < 0.01$; d:与化疗组比较, $P < 0.05$

3 讨论

机体免疫功能的下降或损害,是白血病患者感染增加的主要原因。机体免疫包括体液免疫和细胞免疫,前者与 B 细胞功能相关,并可以通过输注人

血免疫球蛋白等进行补充,而后者则是 T 细胞功能相关。因此,如何评价儿童急性白血病患者化疗后 T 细胞功能损害程度是判断患者感染易感性的关键。但迄今为止,T 细胞受体的各种组成成分尚不明了,获得特异的 T 细胞克隆特异性抗体十分困难^[4]。由于 T 细胞可以在外周扩增,但这些外周扩

增的T淋巴细胞由于没有经过胸腺的免疫呈递而不具有特异的免疫识别能力,因此几乎没有相应的细胞功能,这也限制了T淋巴细胞检测在临床中的指导意义。胸腺是人体调控免疫的最重要的器官之一,是T淋巴细胞分化、发育、成熟的场所,在建立自身免疫耐受,维持机体免疫自稳等方面起着十分重要的作用,其功能状态直接决定机体细胞免疫功能,并间接影响体液免疫,如其功能异常则可诱发多种免疫性疾病。只有在胸腺内成熟的T细胞可获得特异的抗原识别能力,从而获得特异性免疫能力^[5],一旦胸腺功能受损,则在胸腺成熟的具有特异免疫能力的T细胞数量将下降,并最终导致患者感染可能性增加。早期研究也已证明,大剂量化疗对于肿瘤患者胸腺功能具有损害,它能使患者的胸腺细胞生成能力下降、成熟T细胞数量减少以及免疫功能下降^[6]。因此,寻找合适的指标评价化疗后急性白血病患儿的胸腺功能,对于预测化疗后感染易感性具有重要意义。

由于既往缺乏能直接反映近期胸腺输出功能的指标,只能借助于一些间接的手段,比如通过免疫表型方法间接测定循环中处于naive T细胞的数量^[7]或通过胸部CT等影像学方法测定胸腺的体积,分析胸腺指数(thymic index, TI)从而间接地了解胸腺输出功能的情况。但事实上,具有naive T细胞表型的T细胞并不一定就是胸腺近期输出功能的确切标记,而且由于其在成熟过程中的寿命并不一致,从而使情况变得非常复杂,而后一种方法,由于胸腺输出功能与胸腺体积并不相关^[8],故此方法也不可行。直到1998年, Douek等^[9]首先报道可以通过定量检测分析存在于T细胞内的sjTRECs来直接反映胸腺近期输出功能。sjTRECs是胸腺T细胞成熟过程中, sjTRECs细胞受体基因 α 等位基因重排时候被切除部分的DNA形成的环状附加产物,它只存在于T细胞成熟过程中以及胸腺细胞和成熟T淋巴细胞中,不能被复制,也不能备份,并在随后的细胞增殖分化过程中逐渐被稀释^[10-11],由于sjTRECs连接处DNA序列并非细胞本身基因组组成成分,通过检测该处序列能准确反映胸腺的细胞形成和输出能力,存在特异性高,且敏感性强的特点。因此, sjTRECs作为一个判断T细胞免疫重建的确切指标,随着其定量检测方法的建立和成熟,已被广泛应用于免疫缺陷病(包括先天性和获得性)的诊断和疗效评价,血液肿瘤病人的胸腺功能评价及各种方式造血干细胞移植后免疫重建的评价当中^[12-13]。

已有研究证实化疗可以显著降低肿瘤患者的

sjTRECs水平^[1]。本研究证实了这一点:化疗后急淋患儿外周血 sjTRECs水平明显低于初诊未治患儿,其中低危组患儿 sjTRECs水平明显高于中危组患儿,提示这种损伤程度与化疗强度呈正相关。当然,在本研究中也发现检测出的 sjTRECs含量差异较大,考虑与样本量相对较少,而个体之间的差异性较大有关,可能可以通过增加样本量来减少这种个体差异。

另外,在临床工作中我们发现,并发严重感染但血液中白细胞不低的患儿其感染通常进展迅速且非常严重,常难以及时发现和有效治疗,相反,白细胞降低的患儿的感染,则往往在白细胞恢复后迅速得到控制。因此本研究特别选择了白细胞不低并出现严重肺部感染的患儿,结果发现,虽然这些患儿的白细胞计数并不低,但其 sjTRECs水平明显低于初发未治者及化疗后外周血白细胞恢复且未感染儿,从而表明这类病儿的胸腺功能受损更为严重。因此可以认为,外周血细胞计数与细胞免疫功能的恢复并不完全一致,胸腺功能受损是感染发生的重要原因之一。这也提示我们,患者外周血 sjTRECs水平变化可能是判断化疗后胸腺功能损害程度的有效指标。本研究还发现,初发未治急淋患儿的 sjTRECs水平同样明显低于正常同龄儿童,提示急淋患儿在发病时即存在胸腺功能异常。

因此,本研究认为,通过对急淋患儿化疗前后不同时期外周血 sjTRECs水平的检测可以了解患儿的胸腺输出功能情况,以评价患者的免疫状态,并据此预测化疗后患儿严重感染发生的可能性,将为及时进行有效干预和选择合适的治疗方案提供了可能的客观指标和理论依据,这对于减少严重感染发生率和化疗后感染相关死亡率,提高白血病患儿的生存率和生存质量具有重要意义。

[参 考 文 献]

- [1] Sugita J, Iwao N, Tanaka J, Kato N, Shiratori S, Wakasa K, et al. T cell receptor excision circle levels in CD94-expressing CD8 T cells during graft-versus-host disease[J]. *Leuk Lymphoma*, 2008, 49(7): 1306-1310.
- [2] Chen X, Barfield R, Benaim E, Leung W, Knowles J, Lawrence D, et al. Prediction of T-cell reconstitution by assessment of T-cell receptor excision circle before allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in pediatric patients[J]. *Blood*, 2005, 105(2): 886-893.
- [3] Liu Y, Chen J, Tang J, Ni S, Xue H, Pan C. Cost of childhood acute lymphoblastic leukemia care in Shanghai, China[J]. *Pediatr Blood Cancer*, 2009, 53(4): 557-562.
- [4] Pannetier C, Even J, Kourilsky P. T-cell repertoire diversity and clonal expansions in normal and clinical samples[J]. *Immunol To*

day, 1995, 16(4):176-181.

[5]

Min D, Taylor PA, Panoskaltis-Mortari A, Chung B, Danilenko DM, Farrell C, et al. Protection from thymic epithelial cell injury by keratinocyte growth factor: a new approach to improve thymic and peripheral T-cell reconstitution after bone marrow tansplantation[J]. Blood, 2002, 99(12): 4592-4600.

[6]

Mackall CL, Fleisher TA, Brown MR, Andrich MP, Chen CC, Feuerstein IM, et al. Age, thymopoiesis, and CD4⁺ T lymphocyte regeneration after intensive chemotherapy[J]. New Engl J Med, 1995, 332(3): 143-149.

[7]

Poulin J F, Viswanathan MN, Harris JM, Komanduri KV, Wieder E, Ringuette N, et al. Direct evidence for thymic function in adult humans[J]. J Exp Med, 1999, 190(4): 479-486.

[8]

Ye P, Kirschner DE. Reevaluation of T cell receptor excision circles as a measure of human recent thymic emigrants[J]. J Immunol, 2002, 168(10): 4968-4979.

[9]

Douek DC, McFarland RD, Keiser PH, Gage EA, Massey JM, Haynes BF, et al. Changes in thymic function with age and during the treatment of HIV infection[J]. Nature, 1998, 396(6712): 690-695.

[10]

Amariglio N, Lev A, Simon A, Rosenthal E, Spirer Z, Efrati O, et al. Molecular assessment of thymus capabilities in the evaluation of T-cell immunodeficiency[J]. Pediatr Res, 2010, 67(2): 211-216.

[11]

Lorenzi AR, Patterson AM, Pratt A, Jefferson M, Chapman CE, Ponchel F, et al. Determination of thymic function directly from peripheral blood: a validated modification to an established method [J]. J Immunol Methods, 2008, 339(2): 185-194.

[12]

Clave E, Busson M, Douay C, Peffault de Latour R, Berrou J, Rabian C. Acute graft-versus-host disease transiently impairs thymic output in young patients after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation[J]. Blood, 2009, 113(25): 6477-6484.

[13]

Kolte L, Ryder LP, Albrecht-Beste E, Jensen FK, Nielsen SD. HIV-infected patients with a large thymus maintain higher CD4 counts in a 5-year follow-up study of patients treated with highly active antiretroviral therapy[J]. Scand J Immunol, 2009, 70(6): 608-613.

(本文编辑:俞 燕)

· 消息 ·

《实用新生儿学》第四版出版

由邵肖梅、叶鸿瑁、丘小汕教授主编的《实用新生儿学》第四版于2011年1月正式出版。这一版继承了金汉珍、黄德珉和官希吉教授主编的前三版实用、先进的基本风格,所有章节都作了不同程度的修订,既注重临床医学新发展、新技术、新方法的具体介绍,又详细叙述了学科发展的新理论、新动态、新思路。本版对不少疾病的病因和发病机制有了新的阐述,对新的治疗方法、仪器和药物作了详尽的介绍。总字数比第三版增加了1/4。本版的编写队伍中,三分之二是具有博士学位、活跃在新生儿临床第一线的中青年医学专家,他们的加入使本版内容的与时俱进有了可靠的保证,是从事新生儿临床医务工作者案头必备的参考书。

因近期发现有不法分子盗版本书,请读者注意本书为人民卫生出版社出版,字数226万,售价156元,请到正规书店购买。