

· 临床论著 ·

不同 T 细胞亚群 T 细胞受体删除环含量的评价

孟庆才 朱鏐变 郝禹 周海卫 董晓君 李彤 赵红心 孔雅娴 蔺洁 曾辉

【摘要】 目的 评价脓毒症等疾病对胸腺输出功能的影响,建立 T 细胞受体删除环(TREC)的检测方法。**方法** 构建 TREC 质粒标准品,应用实时定量 PCR 法绘制标准曲线。选择不同年龄健康人的血液样本,提取其外周血单个核细胞(PBMCs),通过流式细胞术分选出不同亚群的 T 细胞,检测 TREC 含量(拷贝/T cell)。**结果** 10 例健康人血液 PBMCs 分选的不同 T 细胞亚群均检出 TREC。 $CD4^+CD45RA^+$ 及 $CD8^+CD45RA^+$ 初始 T 细胞亚群中 TREC 平均含量均高于相应 $CD45RO^+$ 记忆 T 细胞亚群的含量,差异具有统计学意义($P < 0.05$),且均随着年龄增长呈逐步下降趋势。**结论** 建立实时定量 PCR 检测 TREC 的方法,用于评价胸腺 T 细胞的输出。

【关键词】 T 细胞受体删除环;胸腺输出;T 细胞亚群

Evaluation of the content of T cell receptor excision circles in different T cell subpopulations MENG Qing-cai, ZHU Liu-luan, HAO Yu, ZHOU Hai-wei, DONG Xiao-jun, LI Tong, ZHAO Hong-xin, KONG Ya-xian, LIN Jie, ZENG Hui. Institute of Infectious Diseases, Beijing Ditan Hospital, Capital Medical University; Beijing Key Laboratory of Emerging Infectious Diseases, Beijing 100015, China

Corresponding author: ZENG Hui, Email: zenghui@ccmu.edu.cn; LIN Jie, Email: linjie1998@126.com

【Abstract】 Objective To evaluate the influence of the recent thymic emigrant by sepsis disease, a method to detect T cell receptor excision circle (TREC) was found. **Methods** The TREC plasmid standard sample was established and the standard curve was drawn by real-time PCR. Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were separated from healthy peripheral blood and T cell subpopulations were sorted by flow cytometer. Real-time PCR was applied to detect the content of TREC (copies/cell) in these T cell subpopulations. **Results** The detectable rate of TREC was 100% (10/10). The content of TREC in $CD4^+CD45RA^+$ T and $CD8^+CD45RA^+$ T cells were significantly higher than that in $CD4^+CD45RO^+$ T cells and $CD8^+CD45RO^+$ T cells ($P < 0.05$), respectively. The content of TREC in these T cell subpopulations gradually declined with the age increasing. **Conclusions** The method that could be applied to evaluate the recent thymic emigrant was established by detecting the content of TREC in T cell subpopulations with real-time PCR.

【Key words】 T cell receptor excision circle (TREC); Recent thymic emigrant (RTE); T cell subpopulations

胸腺是机体重要的免疫器官,在 T 细胞发育成熟过程中发挥了重要的作用。研究发现,脓毒症^[1]、HIV 感染^[2]、肿瘤^[3]和移植物抗宿主病^[4]等多种疾病均可导致胸腺萎缩及功能下降。早期研究通过观察胸腺的大小来衡量其功能,但由于胸腺生

理结构的特殊性,直接评价胸腺大小存在较大困难。

胸腺细胞的 T 细胞受体删除环(T cell receptor excision circles, TREC)是淋巴细胞在胸腺成熟过程中 TCR 基因重排的产物^[5]。自胸腺输出的约 70% 的 T 细胞含有 1 或 2 个 TREC^[6]。TREC 可作为胸腺 T 细胞输出的分子标记用来衡量胸腺的功能^[4],其含量是评价胸腺输出功能的一个重要指标。为评价脓毒症等疾病对胸腺输出功能的影响,本研究建立了检测 TREC 的方法,并对不同 T 细胞亚群的 TREC 含量进行初步评价。

资料和方法

一、标本来源

本研究选取无先天性或继发性免疫缺陷疾病的健康人血液标本共 10 例,其中男性 6 例,女性 4 例;

DOI:10.3877/cma.j.issn.1674-1358.2013.01.009

基金项目:病毒活化 TLR3 信号抑制淋巴造血的机制研究(No. 81101251);北京市卫生系统高层次卫生技术人才培养计划(No. 2009-2-13)

作者单位:100015 北京,首都医科大学附属北京地坛医院(孟庆才、朱鏐变、郝禹、周海卫、赵红心、孔雅娴、曾辉);新发突发传染病研究北京市重点实验室(孟庆才、朱鏐变、郝禹、周海卫、孔雅娴、曾辉);首都医科大学附属北京安贞医院(蔺洁);上海交通大学(董晓君);北京中医药大学(李彤)

通讯作者:曾辉,Email:zenghui@ccmu.edu.cn;

蔺洁,Email:linjie1998@126.com

年龄 10~20 岁。

二、方法

1. TREC 质粒标准品的构建:采用聚合酶链反应(PCR)方法在人基因组 DNA 中扩增 TREC 特异性的基因片段,引物序列如下,上游引物:5'-CTAGC AAGCTTCACATCCCTTTCAACCATGCT-3' (含有 *Hind* III 酶切位点),下游引物:5'-CTAGTGGATCCG CCAGCTGCAGGTTTAGG-3' (含有 *Bam* HI 酶切位点)。利用 DNA 凝胶回收试剂盒(威格拉斯,中国)回收 PCR 产物。经 *Hind* III 和 *Bam* HI (TaKaRa,日本)双酶切 PCR 产物及 pcDNA3.1 载体(Life,美国),置于 37℃ 水浴 3 h 后再次回收酶切产物。紫外分光光度计测量(Eppendorf,德国)所得 DNA 片段的浓度,经 T4 DNA 连接酶(Takara,日本)与 pcDNA3.1 载体连接,将连接产物转化至 Trans 5α 感受态(Transgen,中国)大肠埃希菌中。应用质粒提取试剂盒(威格拉斯,中国)提取菌液中的质粒,经过 *Hind* III 和 *Bam* HI 双酶切鉴定后,选取阳性克隆进行测序鉴定。采用 TREC 序列正确的重组质粒作为标准品,将其浓度分别调整为 10^1 拷贝/5 μl、 10^2 拷贝/5 μl、 10^3 拷贝/5 μl、 10^4 拷贝/5 μl、 10^5 拷贝/5 μl、 10^6 拷贝/5 μl 和 10^7 拷贝/5 μl。

2. 流式细胞术分选不同亚群的 T 细胞:取新鲜血液按照文献叙述方法提取外周血单个核细胞(peripheral blood mononuclear cells, PBMCs)^[7]。采用抗-CD3-PerCP、抗-CD4-PE、抗-CD8-FITC 和抗-CD45RA-APC(BD,美国)进行流式抗体染色, BD Aria II(BD,美国)进行流式分选。将分选所得的 CD4⁺CD45RA⁺ T、CD4⁺CD45RO⁺ T、CD8⁺CD45RA⁺ T 和 CD8⁺CD45RO⁺ T 细胞冻存于 -80℃ 冰箱中。

3. 不同亚群 T 细胞 DNA 的提取:将分选出的不同亚群 T 细胞按照 10 000 cells/μl 的比例加入细胞裂解液(含 10 mmol/L Tris-HCl、100 μg/ml 蛋白酶 K),置于 56℃ 金属浴中,1 200 r/min 摇动孵育 1 h,随后 95℃ 孵育 10 min;经 12 000 r/min 高速离心 1 min,上清为细胞总 DNA,置于 -20℃ 冰箱中。

4. Real-time PCR 反应条件:采用 SYBR Green real-time PCR 方法检测 TREC 含量。反应条件为 50℃, 2 min; 95℃, 10 min; 95℃, 15 s, 60℃, 1 min 重复 45 个循环。单次实验同时扩增 3 个副孔,记录 TREC 质粒标准品与实验样本的 Ct 值。

三、统计学处理

采用 SPSS 13.0 统计学软件进行分析。不同亚群 T 细胞 TREC 含量采用配对样本 *t* 检验,以 $\alpha = 0.05$ 为水准,以 $P < 0.05$ 判定为差异具有统计学意义。

结 果

一、TREC 标准品质粒的构建

通过 PCR 方法得到的 TREC 特异性序列(约 250 bp),将其酶切产物克隆至 pcDNA3.1 载体中,经 *Hind* III 和 *Bam* HI 双酶切鉴定呈阳性结果后,进行测序鉴定证实 TREC-1 和 TREC-2 均为阳性克隆。

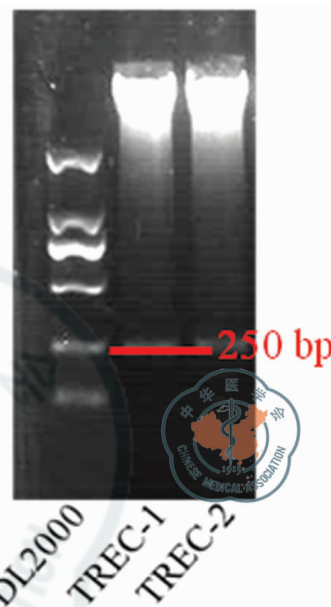


图 1 TREC 质粒酶切结果

二、标准曲线的建立

不同浓度的 TREC 质粒经 real-time PCR 反应扩增曲线(图 3)。当模板浓度为 $10^7 \sim 10^1$ 拷贝/5 μl 时,标准曲线线性相关系数 $R^2 = 0.998$ (图 4),标准曲线斜率为 -3.371。本方法检验 TREC 的下限为 10^1 拷贝/5 μl。

三、健康人血液 PBMCs 不同亚群 T 细胞的 TREC 水平

PBMCs 经过流式抗体染色后可由 BD Aria II 流式细胞仪分选出 CD4⁺CD45RA⁺ T、CD4⁺CD45RO⁺ T、CD8⁺CD45RA⁺ T 和 CD8⁺CD45RO⁺ T 细胞 4 种 T 细胞亚群(图 5)。本研究检测了 10 例健康人外周血 PBMCs 不同亚群 T 细胞的 TREC 水平(图 6),以验证本实验方法可行性,结果显示其阳性检出率为 100%。其中 CD4⁺CD45RA⁺ 初始 T 细胞所含 TREC 拷贝数显著高于 CD4⁺CD45RO⁺ 记忆 T 细胞($P < 0.05$); CD8⁺CD45RA⁺ T 细胞所含 TREC 拷贝数也显著高于 CD8⁺CD45RO⁺ T 细胞($P < 0.05$)。随着年龄增长,T 细胞中 TREC 含量呈逐渐下降趋势(图 7)。

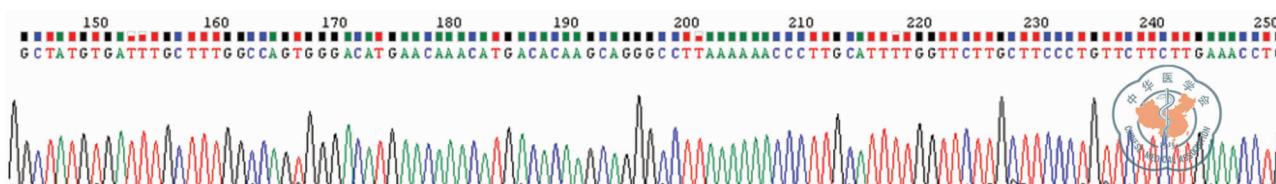


图 2 TREC 质粒酶切结果

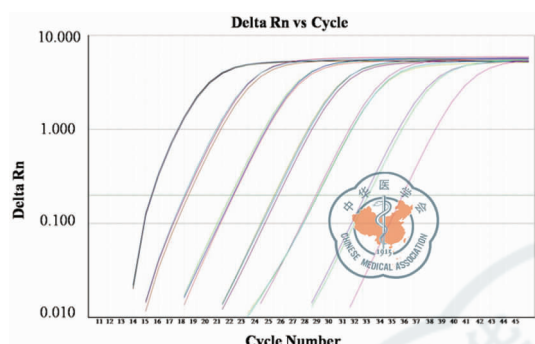


图 3 real-time PCR 扩增标准品的扩增曲线图谱

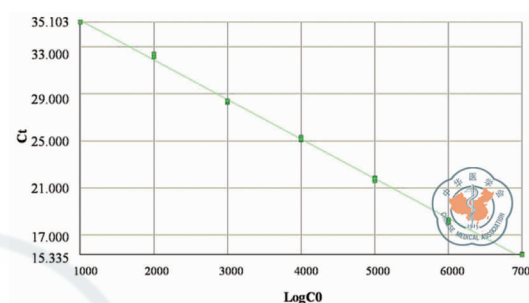


图 4 real-time PCR 方法检测人的 TREC 标准曲线图

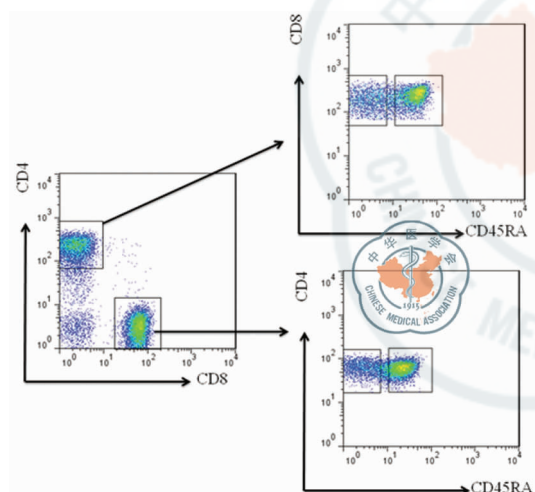


图 5 BD Aria 分选出的不同 T 细胞亚群

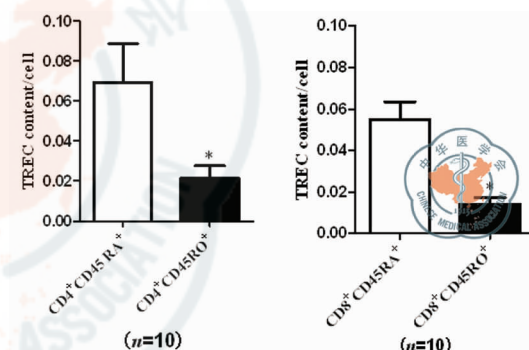


图 6 不同 T 细胞亚群中所含 TREC 的比例

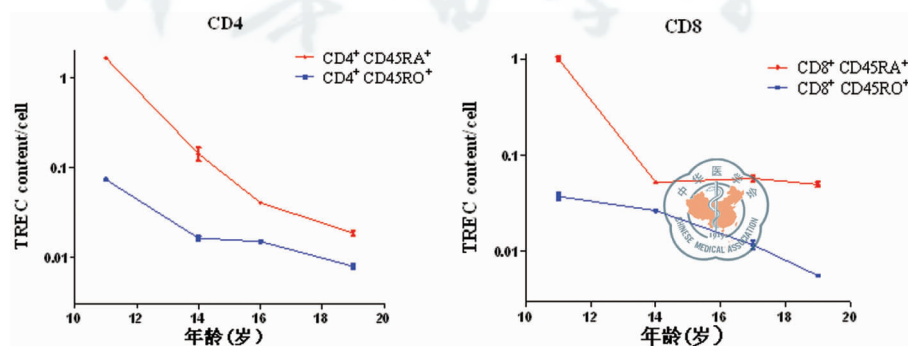


图 7 不同年龄个体 T 细胞亚群所含 TREC 的比例

讨 论

胸腺是 T 细胞发育成熟的场所,在胸腺发生的 T 细胞阴性选择和阳性选择是免疫学重要的生物学事件。脓毒症等疾病对胸腺的功能有一定抑制作用,其可引起胸腺形态明显缩小,同时胸腺 T 细胞输出能力明显下降。如何评价脓毒症等疾病所导致的胸腺功能的改变,一直倍受广泛关注。

早期有研究通过检测 T 细胞表面的 CD31 分子来评价胸腺的输出情况^[8]。胸腺新输出的 CD31⁺thymic naïve CD4⁺ T 细胞自我分裂有两种活化方式,一种是受 TCR 分子刺激后,会诱导自身 CD31 表达的下调,从而转化为 CD31⁻centralnaïve CD4⁺ T。但受到 TCR 刺激所下调的 CD31,一段时间后仍有可能重新表达 CD31。第二种方式是 T 细胞受细胞因子的刺激而发生增殖,但这种增殖会保留其自身的表型,即 CD31⁺ naïve CD4⁺ T,因此,其所代表的胸腺输出会出现部分假阳性的情况,均会对胸腺输出的评价造成影响。

1987 年,美国某研究小组发现在胸腺细胞中存在一种环状的 DNA 结构,即 TREC^[9]。TREC 产生于 T 细胞发育的过程中,TCR- α 基因重排时将其中间位置的 TCR- δ 位点的片段删除,随后 TCR- δ 位点两侧的 δ Rec 和 ψ J α 相互连接形成一个环状的结构。由于 TREC 并不随细胞有丝分裂而复制,TREC 的含量会随着细胞的分裂而被稀释^[9]。对 T 细胞中 TREC 水平的检测能够很好地反映胸腺的起源^[10],其含量代表着初始 T 细胞从胸腺输出时的数量^[11]。1999 年 Zhang 等^[12]首次报道了 TREC 在 PBMCs 中的含量随着年龄的增加而逐渐减少,提示胸腺功能可能会随着年龄的增长而逐渐减弱。本研究结果也对此作了很好的佐证。

除 PBMCs 直接用于 TREC 水平检测之外^[12],还有干血斑样本检测法^[13]、外周血样本检测法^[14]、磁珠分选的 CD4⁺ T 细胞检测法^[15]以及本研究主要应用的流式细胞仪分选的不同亚群 T 细胞可用于检测 TREC 含量的方法。虽然,多种标本都能通过对 TREC 的检测以评价胸腺的功能,但 2003 年 Hazaenberg 等^[10]研究提出 T 细胞的寿命及其分裂均可能影响 TREC 对胸腺输出的评价。首先,一个健康的成年人约 10^7 个 T 细胞,并且 T 细胞的寿命约为 1 000 ~ 10 000 d,导致 T 细胞中 TREC 检测时得到的结果并不能很好的反映近期胸腺的输出情况;其次,TREC 的水平会随着细胞分裂而降低,导致 TREC 在初始 T 细胞中的水平远高于记忆 T 细胞。随着年龄增长,外周血初始 T 细胞比例逐渐下降,记

忆 T 细胞比例上升,上述变化同样会影响 TREC 的结果评价。

鉴于上述影响因素,本研究采用流式细胞术分选不同亚群的 T 细胞 (CD4⁺ CD45RA⁺ T、CD4⁺ CD45RO⁺ T、CD8⁺ CD45RA⁺ T 和 CD8⁺ CD45RO⁺ T 细胞),应用绝对定量 real-time PCR 分别检测以上细胞亚群的 TREC 含量。此方法不仅能够很好的避免以上多种实验方法的缺陷,且能针对不同的 T 细胞亚群所含有的胸腺原始细胞输出的比例进行较好的检测和验证。本研究发现,初始 T 细胞 TREC 含量高于记忆 T 细胞 TREC 表达,且二者均随年龄增长逐渐下降。因此,该方法避免了初始 T 细胞的数目变化对检测带来的影响。但急性感染所导致的淋巴细胞增殖对该检测的影响尚需进一步评价。本课题组的后续研究可能为临床医生在治疗感染性疾病、肿瘤以及造血干细胞移植等与免疫相关疾病提供可靠的实验室诊断指标,为患者疾病预后的评价及临床用药提供理论性的指导。

参 考 文 献

- 1 张卫梅,孔雅娟,栗雅杰,等. 脓毒症导致小鼠胸腺萎缩的原因探讨. 中华实验和临床感染杂志(电子版),2012,6(2):97-100.
- 2 Douek DC, McFarland RD, Keiser PH, et al. Changes in thymic function with age and during the treatment of HIV infection. *Nature*, 1998,396(6712):690-695.
- 3 Christie B, Moremen JR, Christie B, et al. Thymic carcinoma: incidence, classification and treatment strategies of a rare tumor. *Am Surg*,2012,78(7):E335-E337.
- 4 Junge S, Kloeckener-Gruissem B, Zufferey R, et al. Correlation between recent thymic emigrants and CD31⁺ (PECAM-1) CD4⁺ T cells in normal individuals during aging and in lymphopenic children. *Eur J Immunol*,2007,37(11):3270-3280.
- 5 Le Douarin N, Corbel C, Bandeira A, et al. Evidence for a thymus-dependent form of tolerance that is not based on elimination or anergy of reactive T cells. *Immunol Rev*,1996,149(2):35-53.
- 6 Verschuren MC, Wolvers-Tettero IL, Breit TM, et al. Preferential rearrangements of the T cell receptor-delta-deleting elements in human T cells. *J Immunol*,1997,158(3):1208-1216.
- 7 Lang PO, Mitchell WA, Govind S. Real time-PCR assay estimating the naive T-cell pool in whole blood and dried blood spot samples: pilot study in young adults. *J Immunol Methods*,2011,369(1-2):133-140.
- 8 Hazenberg MD, Otto SA, Cohen Stuart JW, et al. Increased cell division but not thymic dysfunction rapidly affects the T-cell receptor excision circle content of the naive T cell population in HIV-1 infection. *Nat Med*,2000,6(9):1036-1042.
- 9 Okazaki K, Davis DD, Sakano H. T cell receptor beta gene sequences in the circular DNA of thymocyte nuclei: direct evidence for intramolecular DNA deletion in V-D-J joining. *Cell*,1987,49(4):477-485.
- 10 Hazenberg MD, Borghans JA, de Boer RJ, et al. Thymic output: a

- bad TREC record. Nat Immunol, 2003, 4(2):97-99.
- 11 欧雪玲, 梁伟英, 姚亚楠, 等. 实时荧光定量 PCR 检测正常人外周血 sjTREC 含量的研究. 中华临床医师杂志:电子版, 2010, 4(7):995-1002.
 - 12 Zhang L, Lewin SR, Markowitz M. Measuring recent thymic emigrants in blood of normal and HIV-1-infected individuals before and after effective therapy. J Exp Med, 1999, 190(5):725-732.
 - 13 Lang PO, Govind S, Dramé M, et al. Comparison of manual and automated DNA purification for measuring TREC in dried blood spot (DBS) samples with qPCR. J Immunol Methods, 2012, 31, 384(1-2):118-127.
 - 14 Lorenzi AR, Patterson AM, Pratt A, et al. Determination of thymic function directly from peripheral blood: a validated modification to an established method. J Immunol Methods, 2008, 339(2):185-194.
 - 15 Hug A, Korpö M, Schröder I, et al. Thymic export function and T cell homeostasis in patients with relapsing remitting multiple sclerosis. J Immunol, 2003, 171(1):432-437.
- (收稿日期:2012-09-10)
(本文编辑:孙荣华)

孟庆才, 朱鏐变, 郝禹, 等. 不同 T 细胞亚群 T 细胞受体删除环含量的评价[J/CD]. 中华实验和临床感染病杂志:电子版, 2013, 7(1):41-45.

