

· 研究原著 ·

文章编号 1000-2796(2007)06-0534-03

## 异基因造血干细胞移植后嵌合状态的追踪监测

张庆霞<sup>1,2</sup>, 严江伟<sup>1,2</sup>, 焦章平<sup>2</sup>, 唐晖<sup>2</sup>, 霍振义<sup>2</sup>, 王静<sup>2</sup>, 高俊薇<sup>2</sup>, 杨剑<sup>2</sup>, 朱晓君<sup>2</sup>, 马万山<sup>2</sup>, 贾淑琴<sup>2</sup>, 刘雅诚<sup>2</sup> ( <sup>1</sup>中国科学院研究生院, 北京 100049, <sup>2</sup>北京市公安局刑侦总队法医检验鉴定处, 北京 100085 )

### A tracking detection on chimerism after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation

ZHANG Qing-Xia<sup>1,2</sup>, YAN Jiang-Wei<sup>1,2</sup>, JIAO Zhang-Ping<sup>2</sup>, TANG Hui<sup>2</sup>, HUO Zhen-Yi<sup>2</sup>, WANG Jing<sup>2</sup>, GAO Jun-Wei<sup>2</sup>, YANG Jian<sup>2</sup>, ZHU Xiao-Jun<sup>2</sup>, MA Wan-Shan<sup>2</sup>, JIA Shu-Qin<sup>2</sup>, LIU Ya-Cheng<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Post-graduate College, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China, <sup>2</sup>Forensic Medical Examination and Identification Center, Beijing Public Security Bureau, Beijing 100085, China

**【Abstract】** AIM: To evaluate the chimerism after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation by analysing multi-loci of short tandem repeats (STR). **METHODS:** Thirty-one patients who had received allogeneic hematopoietic stem cell transplantation were evaluated. Their 9 STR loci and Amelogenin gene were amplified by fluorescent multiplex PCR. PCR products were separated by using DNA Sequencer and analyzed by using GeneScan and Genotyper. **RESULTS:** Seven patients showed full donor chimeras at the first test, and converted into mixed chimeras at the last test; 4 of them died, and the others relapsed. Four patients' blood changed from full donor chimeras to full receptor genotype. One patient changed from mixed chimeras to full donor chimeras, and he had no evidence of relapse. One patient had mixed chimerism at all times and died. Eighteen of the 31 patients had full donor chimeras at all times, and 16 of them survived leukemia-freely, but 2 died. **CONCLUSION:** The system of fluorescent multiplex amplification of STRs had a high power of discrimination, and this detection method is sensitive, exact and rapid. It is a valuable tool for studying the engraftment, graft rejection, and relapse after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. At the same time, it is necessary to combine it with the clinical syndrome, and to detect STR of the patient's blood earlier, for providing a basis for early intervention of clinical treatment.

**【Keywords】** allogeneic hematopoietic stem cell transplantation;

收稿日期 2006-08-21; 接受日期 2006-09-20

通讯作者: 刘雅诚. Tel: (010) 62909018 Email: yachengliu@163.com

作者简介: 张庆霞. 硕士生(导师刘雅诚), 法医. Tel: (010)

62909017 Email: qingxiangzhang@sina.com

tandem repeat sequences; gene amplification; chimerism

**【摘要】** 目的: 应用荧光标记短串联重复序列(STR)复合扩增技术, 探讨多个 STR 基因座在异基因造血干细胞移植后嵌合体状态评估中的作用. 方法: 对 31 例移植后患者进行追踪检验, 分别 PCR 复合扩增各病例组常染色体 9 个 STR 基因座和 Amelogenin 基因座, 扩增产物经 DNA 自动分析仪分离后, GeneScan 扫描, Genotyper 分型. 结果: 7 例患者血由第 1 次检验结果与供者 STR 分型一致变为混合型, 4 例死亡, 3 例复发; 4 例患者血由第 1 次检验结果与供者一致变为受者自身型, 均死亡, 1 例患者血由混合型变为与供者 STR 分型一致, 无复发, 1 例患者血两次检验均为混合型, 已死亡, 其余 18 例患者血均与供者血 STR 分型一致, 其中 16 例目前预后较好, 2 例已死亡. 结论: 复合扩增 STR 基因座具有较高的个体识别力, 检测灵敏、准确、快速, 在对异基因造血干细胞移植患者的植入情况进行动态检测的研究中, 对移植植物植入或被排斥、疾病复发均有预警作用, 同时必须结合临床症状, 及时地进行 STR 检测, 以便于早期实施临床干预治疗.

**【关键词】** 异基因造血干细胞移植; 串联重复序列; 基因扩增; 嵌合状态

**【中图分类号】** R733.7 **【文献标识码】** A

### 0 引言

异基因造血干细胞移植是通过异体的造血干细胞植入受体体内而获得造血和免疫功能重建的医疗手段. 供者细胞在受者体内的形成情况及动态变化是临床预测疾病复发倾向的一项指标, 因此移植后动态检测嵌合状态对判断移植效果、实施临床早期干预治疗具有重要的意义<sup>[1]</sup>. 短串联重复序列(short tandem repeat, STR)是基因组染色体上的一些简单重复序列, STR 具有高度多态性和体细胞稳定性, STR-PCR 现已成为鉴别不同个体 DNA 的强有力的工具, 故 STR 方法可用于对异基因造血干细胞移植患者的植入情况进行动态检测的研究<sup>[2]</sup>. 我们采用复合扩增荧光标记 STR 技术, 对 31 例异基因造血干细胞移植患者的植入情况进行动态检测, 评价移植后的嵌合状态.

## 1 对象和方法

**1.1 对象** 2002-02/2006-07 在北京大学人民医院和北京道培医院接受异基因造血干细胞移植的患者 31(男 19,女 12)例,年龄 15~52(平均 32)岁。其中,慢性粒细胞白血病 6 例,急性淋巴细胞白血病 9 例,红白血病 2 例,骨髓增生异常综合征 2 例,急性粒细胞白血病 6 例,急性单核细胞白血病 3 例,急性粒-单核细胞白血病 2 例,地中海贫血 1 例。接受有血缘关系供者移植 27 例,无血缘关系供者 4 例。供受体性别相合 28 例,性别不合 3 例。主要试剂及仪器:DNA 提取选用 Chelex-100,使用美国 ABI 公司 ProfilerPlus™ 试剂盒,扩增 D3S1358, vWA, FGA, D8S1179, D21S11, D18S51, D5S818, D13S317, D7S820 等 9 个常染色体基因座和 1 个性别基因座。内标 ROX-500 及等位基因梯 Ladder、上样液去离子甲酰胺(Promega 公司);DNA 聚合酶(ABI 公司);3100 DNA 序列分析仪和 9700 型 PCR 扩增仪(美国 ABI 公司);GeneScan 3.1 软件,Genotyper 2.1 软件(ABI 公司)。

### 1.2 方法

**1.2.1 样本采集** 分别取供者静脉血 0.5 mL、受者口腔黏膜脱落细胞、受者移植后 1 mo 左右静脉血 1 份及根据临床需要受者移植后 2 mo 以上的静脉血 1 份或多份。

**1.2.2 DNA 提取** 取 5  $\mu$ L 全血至内有 1 mL 去离子水的离心管中,倒转混匀 10 min 后,18 138 g 离心 3 min 弃上清,加入 50 g/L Chelex-100 200  $\mu$ L;将沾取口腔黏膜脱落细胞的棉签加入到离心管中,直接加入 50 g/L Chelex-100 200  $\mu$ L。56℃温育 30 min,旋涡振荡,100℃加热 8 min,再旋涡振荡,18 138 g 离心 3 min,取上清液为扩增模板 DNA。

**1.2.3 PCR 复合** ProfilerPlus™ 扩增反应总体积为 20  $\mu$ L,其中 Mix 8.4  $\mu$ L,引物 2.0  $\mu$ L,Gold Taq DNA 聚合酶 0.4  $\mu$ L( $5 \times 10^6$  U/L,ABI 公司),模板 DNA 2.0  $\mu$ L,去离子水 7.2  $\mu$ L,用 PCR 仪进行 DNA 扩增。扩增热循环条件:95℃预变性 11 min,94℃变性 1 min,59℃复性 1 min,72℃延伸 1 min,28 个循环;最后 60℃延伸 45 min 后,4℃保存备用。

**1.2.4 扩增产物的分离及检测** 将扩增产物 1  $\mu$ L 与上样缓冲液 10  $\mu$ L(内含 9.8  $\mu$ L 去离子甲酰胺和 0.2  $\mu$ L 内标 Rox-500)95℃变性 3 min,用 DNA 序列分析仪进行电泳分离与检测。GeneScan 3.1 软件进行基因扫描后,利用 Genotyper 2.1 软件进行结果分析,以 Allele Ladder 为标准判读各基因座基因型。

## 2 结果

**2.1 实验成功率** 在 31 例患者中共采集了 152 份样本进行 PCR-STR 分析,均得到满意的 STR 分型结果。

**2.2 移植患者检验结果的比较** 7 例患者血由第一次检验结果与供者 STR 分型一致变为混合型;4 例患者血由第 1 次检验与供者分型一致变为受者自身型;1 例患者血由混合型变为与供者 STR 分型一致;1 例患者血检验均为混合型;其余 18 例患者血两次检验均与供者血 STR 分型一致。31 份口腔黏膜脱落细胞的分型结果,有 4 份为混合型。

**2.3 移植患者的转归** 7 例由与供者 STR 分型一致变为混合型;4 例死亡,3 例复发;4 例患者血由第 1 次检验结果与供者一致变为受者自身型,均死亡;1 例由混合型变为与供者 STR 分型一致,无复发;1 例患者血检验均为混合型,已死亡;2 例患者虽然检验结果均与供者 STR 分型一致,但死亡;其余 16 例患者血均与供者血 STR 分型一致,目前预后较好。

## 3 讨论

干细胞移植后的状态包括完全供者嵌合状态(CC,即在所分析的血细胞中,只有供者型的遗传标记存在)和混合嵌合状态(MC,有供者和受者血细胞遗传标记以一定比例共存的混合体存在)<sup>[3]</sup>。有研究表明,移植前受者与供者外周血和口腔黏膜的 DNA 均不同,供者细胞植活后,受者外周血出现供者的微卫星类型,而受者的口腔黏膜细胞仍然为自己原来的类型<sup>[4]</sup>。在本研究的第 1 次检验结果中,29 份患者移植后血液与供者 STR 分型一致,达到完全供者嵌合状态。其中 4 例患者口腔黏膜脱落细胞的分型结果为混合型,我们分析是由于在提取口腔黏膜的过程中混有血液细胞所致,患者黏膜细胞所表现的是其原有的 DNA 分型,血液细胞所表现的是现有的 DNA 分型,故混有血液的口腔黏膜表现为混合型。

受者细胞部分的迅速或明显增加与移植物排斥或早期复发有关<sup>[5]</sup>,本研究中,7 个病例首次检验为完全供者嵌合状态,而末次检验时则为混合嵌合状态,预后均不好。因此阶段性地使用 STR 监测受者可以识别出那些转变为 MC 的患者。

混合嵌合状态因其检测到的时期不同,供受者细胞比例的不同,意义也不同。病例 18,急性粒细胞白血病,在移植后 12 d 检测患者外周血为混合嵌合状态,在移植后 60 d 呈完全供者嵌合状态,分析其原因与 O'Reilly 等<sup>[6]</sup>的研究结果一致,他们利用微卫星的长度多态性,对骨髓移植后的患者进行嵌合状态的检

测发现移植后 7~14 d 可以检测到供者来源的细胞,受者细胞的逐渐消失则发生在 14 d 或更晚。因此在移植后早期可检测到短暂的混合嵌合状态,以后逐渐转化为完全的供者嵌合状态。病例 10 为急性淋巴细胞白血病,移植后 30 d 患者外周血为混合嵌合状态,移植后 60 d 仍为混合嵌合状态,在移植后短期内立即检测到持续存在的混合嵌合状态预示移植物的排斥反应和疾病的早期复发<sup>[7]</sup>,该患者于术后第 120 日死于原发病。

有 18 例患者多次检验均与供者血 STR 分型一致,其中 16 例目前预后较好,提示连续完全供者嵌合状态与较低的疾病发生率相关联。病例 14 和 17 虽然取得了完全供者嵌合状态,但后来出现了复发病状并死亡。De Weger 等<sup>[3]</sup>总结了 52 例骨髓移植患者,在 17 例复发患者中,有 14 例移植后早期检测只有供者 STR 片段,达到完全供者嵌合状态,但在临床复发前 3 mo 就能检测到 STR-GS( gene scan )复发<sup>[8]</sup>。病例 14 和 17 在第二次检验时尚未出现临床复发病状,故 STR 呈完全供者嵌合状态,患者在出现复发病状后未能及时进行 STR 检测。本研究中,移植后首次检验时间一般在 1 mo 左右,旨在判断是否移植成功。术后复查主要是根据临床需要,判断是否复发,术后复查时间各病例不同,以后的研究要注意确定复查时间,对可能复发的高危患者,应积极并连续地检测嵌合状态,推荐至少每月检测一次,以便及早地给予干预性治疗。有些 STR 分型显示 2~4 个等位基因,同时表现出供者的基因型和受者的基因型<sup>[9]</sup>,对移植后患者出现混合 STR 图谱进行分析,我们发现上述 9 个 STR 基因座在出现混合分型的灵敏度上无明显差异。对混合 STR 图谱,在有信息的基因座上,可对供者/受者细胞比例进行定量<sup>[10]</sup>。针对某一基因座,利用 GeneScan 软件得到各等位基因的峰高和峰面积值,利用公式(供者来源的等位基因峰面积总和/所有等位基因峰面积总和×100%)计算供者细胞成分所占百分比。但当供/受者在某一基因座基因分型相同时,该方法存在一定的局限性。

由于 STR 方法无法确定混合嵌合状态中受者细胞的种类,因此在判断混合嵌合体与临床复发之间的

关系时,应结合临床症状和疾病特异性指标,作出更为准确的分析。

致谢 感谢西安交通大学医学院法医系朱波峰老师、感谢北京大学人民医院血研所刘代红老师和北京道培医院孙瑞娟老师的大力帮助和支持。

## 【参考文献】

- [1] Dubovsky J, Daxberger H, Fritsch G, et al. Kinetics of chimerism during the early post-transplant period in pediatric patients with malignant and non-malignant hematologic disorders: Implications for timely detection of engraftment, graft failure and rejection [J]. *Leukemia*, 1999, 13(12): 2059-2069.
- [2] Frankel W, Chan A, Corringham RE, et al. Detection of chimerism and early engraftment after allogeneic peripheral blood stem cell of bone marrow transplantation by short tandem repeats [J]. *Am J Hematol*, 1996, 52(4): 281-287.
- [3] De Weger RA, Tilanus MG, Scheidel KC, et al. Monitoring of residual disease and guided donor leucocyte infusion after allogeneic bone marrow transplantation by chimerism analysis with short tandem repeats [J]. *Br J Haematol*, 2000, 110(3): 647-653.
- [4] 朱平,李健为,薛海鹏,等.应用微卫星标志作为异基因骨髓移植供者细胞植活的证据[J].*中华血液学杂志*, 2000, 21(1): 46-47.
- [5] Miflin G, Stainer CJ, Carter GI, et al. Comparative serial quantitative measurements of chimerism following unmanipulated allogeneic transplantation of peripheral blood stem cells and bone marrow [J]. *Br J Haematol*, 1999, 107(2): 429-440.
- [6] O'Reilly J, Meyer B, Stoner M, et al. Very early analysis of graft establishment after allogeneic bone marrow transplantation using the polymerase chain reaction [J]. *Br J Haematol*, 1993, 85(1): 169-172.
- [7] 任雅丽,朱平.异基因骨髓移植后嵌合状态的研究进展[J].*中国实验血液学杂志*, 2002, 10(2): 168-172.
- [8] 石慧文,朱平.异基因骨髓移植或脐血移植后用微卫星分析的意义[J].*国外医学输血及血液学分册*, 2002, 25(6): 508-511.
- [9] 孙宏钰,吕德坚,曾艳红,等.造血干细胞移植植入存活检定技术的应用性研究[J].*中华检验医学杂志*, 2003, 26(3): 169-171.
- [10] Evett IW, Gill PD, Lambert JA. Taking account of peak areas when interpreting mixed DNA profiles [J]. *J Forensic Sci*, 1998, 43(1): 62-69.

编辑 王睿