

DOI: 10.3779/j.issn.1009-3419.2003.02.05

# 非小细胞肺癌患者 T 细胞受体 V 表达和克隆性研究

周昕熙 李锦添 吴一龙 王思愚 杨学宁 陈诗萍

**【摘要】** 目的 了解非小细胞肺癌 (non-small-cell lung cancer, NSCLC) 患者外周血淋巴细胞 (PBL)、肿瘤浸润淋巴细胞 (TIL) 及非癌肺组织淋巴细胞中 T 细胞受体 (TCR) V 优势表达情况及优势亚家族的克隆性分布。方法 收集 24 例 NSCLC 患者外周血、肺癌组织和非癌肺组织, 提取 RNA, 经反转录多聚酶链反应 (RT-PCR), 扩增 TCR V 24 个亚家族基因的互补决定区 3 (CDR3), PCR 产物进一步经基因扫描分析, 以 10 例正常人外周血结果作对照, 比较不同来源 T 细胞 TCR V 亚家族的表达情况。结果 NSCLC 患者仅存在部分亚家族的 T 细胞, 其中 TCR V 5 的表达率在 TIL 中 (6/18, 33.3%) 明显高于 PBL (1/24, 4.2%) 和非癌肺组织 (0/12),  $P$  值均  $<0.05$ , 而且 6 例表达 V 5 的 TIL 中 2 例为寡克隆增殖, 4 例为多克隆增殖。结论 NSCLC 患者 TCR V 24 个亚家族呈倾斜性分布和克隆性增殖, 提示 NSCLC 的 TIL 中可能存在肿瘤相关抗原 (TAA) 刺激引起的特异性 T 细胞免疫反应。

**【关键词】** 肺肿瘤 T 细胞受体 T 细胞克隆性 互补决定区 3 (CDR3)

**【中图分类号】** R734.2

**Study on clonal expression of T cells bearing dominant TCR V in non-small-cell lung cancers** ZHOU Xinxi, LI Jintian, WU Yilong, WANG Siyu, YANG Xuening, CHEN Shiping. Tumor Center, Sun Yat-sen University of Medical Sciences, Guangzhou, Guangdong 510060, P. R. China

**【Abstract】** **Objective** To investigate the distribution of TCR V subfamily T clonal cells in peripheral blood lymphocytes (PBL), tumor infiltrating lymphocytes (TIL) and lymphocytes in non-cancerous lung tissues of patients with non-small-cell lung cancer (NSCLC) and to see the inclination of the T cell antigen receptor (TCR) V subfamilies' expression. **Methods** Complimentarily determining region 3 (CDR3) of TCR 24 variable region genes was analyzed in PBL, TIL and lymphocytes in non-cancerous lung tissues from 24 NSCLC cases with reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) and gene scan techniques to identify the distribution and clonality of TCR V subfamily T cells. **Results** Only a portion of V T cells were found in patients with NSCLC, whereas 24 TCR V subfamily T cells were detected in 10 healthy controls. V 5 subfamily was expressed mostly in TIL and the frequency of V 5 in TIL (6/18, 33.3%) was much higher than that of PBL (1/24, 4.2%) and T cells infiltrating non-cancerous lung tissues (0/12) ( $P < 0.05$ ). Oligoclonal T cells were found in 2 cases with V 5 subfamily and polyclonal T cells in 4 cases. **Conclusion** There are dominant and clonal TCR V subfamilies expressed in TIL of NSCLC patients, which may be the tumor associated antigens (TAA) specific.

**【Key words】** Lung neoplasms T cell antigen receptor (TCR) T cell clonality Complimentarily determining region 3 (CDR3)

This study was provided by a grant from Scientific Research Fund of Health Ministry (to WU Yilong) (98-2-377).

在实体肿瘤中, 一定量的淋巴细胞浸润肿瘤部位, 称为肿瘤浸润淋巴细胞 (TIL), TIL 往往代表了机体对肿瘤的特异性免疫反应。肿瘤及其周围明显的淋巴细胞浸润常提示较好的预后<sup>[1,2]</sup>。电镜观察显示, 肿

瘤细胞周围的 TIL 激活并产生对肿瘤细胞的破坏作用<sup>[3]</sup>。TIL 中一些寡克隆扩增的 T 细胞克隆可能为肿瘤相关抗原刺激下具特异性杀伤作用的效应细胞<sup>[4~6]</sup>。利用 T 细胞受体 (TCR) 基因重排时其互补决定区 3 (CDR3) 的高度多样性和 V 基因 24 个亚家族的特点, 应用反转录 - 多聚酶链反应 (RT-PCR) 和基因扫描分析方法检测 T 细胞 V 亚家族分布及克隆

本研究受卫生部科学研究基金 (98-2-377) 资助

作者单位: 510060 广州, 中山大学肿瘤防治中心 (周昕熙, 李锦添, 王思愚、杨学宁、陈诗萍), 附属第三医院 (吴一龙)

性是近年来新开展的研究肿瘤免疫的方法<sup>[7]</sup>。本研究利用该方法分析 24 例非小细胞肺癌(NSCLC)患者外周血、TIL、非癌肺组织 T 细胞 TCR V 的表达情况,比较不同部位来源的 T 细胞的亚家族分布及其克隆性特点。

## 1 材料与方法

**1.1 标本** 收集自 1999 年 8 月至 2001 年 7 月在中山医科大学肿瘤医院接受手术治疗并经病理组织学证实为 NSCLC 的 24 例患者外周血、肿瘤组织、非癌肺组织标本。患者术前未接受其它抗癌治疗。其中男 18 例,女 6 例,年龄 32~70 岁,平均年龄 59 岁。经病理切片染色观察有鳞癌 9 例,腺癌 15 例。另取 10 例正常人外周血作为对照。

**1.2 RNA 提取和反转录合成 cDNA** 外周血淋巴细胞分离按常规方法进行。新鲜肺癌组织和非癌肺组织经匀浆后应用 TRAzol 试剂盒(Gibico, BRL)进行 RNA 提取。并应用随机引物和反转录酶试剂盒(Superscript, Gibico, BRL)合成 cDNA 第一链。

**1.3 反转录-多聚酶链反应(RT-PCR)** 根据已报道的 24 个 V 亚家族基因分别设计 24 个上游引物 V 1~V 24,在 C 区设一共同的下游引物。在 C 引物内侧设一荧光素标记的 C-Fam 引物作基因扫描分析用。引物的核苷酸序列如表 1,由德国 TIB MOLBIOL 公司合成。PCR 操作按已报道的方法进行<sup>[7]</sup>,总反应体系为 20  $\mu$ l,含 cDNA 1.5  $\mu$ l, Taq 聚合酶 1.25 U,各组分的最终浓度分别为 V 上游引物(24 个 V 亚家族之一)和 C 下游引物各 0.5  $\mu$ mol/L, dNTP (dATP, dCTP, dGTP 和 dTTP) 0.1 mmol/L, 1 $\times$ PCR 缓冲液(10 mmol/L Tris-HCl, pH 9.0, 50 mmol/L KCl, 1.5 mmol/L MgCl<sub>2</sub> 和 0.1% Triton X-100), PCR 试剂为 Promega 公司产品。反应程序为:解链温度 94 $^{\circ}$ C, 1 min(首次为 3 min);退火温度 60 $^{\circ}$ C, 1 min;延伸温度 72 $^{\circ}$ C, 1 min(末次为 7 min),共进行 35 个循环。各反应均设阴性对照。PCR 产物于 2.0% 琼脂糖(溴化乙锭染色)凝胶中电泳分析 PCR 结果。

## 1.4 T 细胞克隆性分析

**1.4.1 标记 PCR 产物(run off reaction)** RT-PCR 产物经电泳分析出现阳性带者,进一步经荧光素标记的下游引物 C-Fam 进行不对称 PCR 扩增,以得到荧光素标记的单链 PCR 产物。总反应体系为 20  $\mu$ l,其中含首次 PCR 产物 5  $\mu$ l, Taq 聚合酶 1.25 U, C-Fam 3 mmol/L,共进行 35 个循环,退火温度为 60 $^{\circ}$ C,其余同上。

表 1 引物序列

Tab 1 Sequences of the primers

Primer	Sequence
V 1	5-CCGCACAACAGTTCCTGACTTGC-3
V 2	5-GGCCACATACGA GCAA GGCGTCGA-3
V 3	5-CGCTTCTCCCGGATTCTGGA GTCC-3
V 4	5-TTCCCA TCA GCCGCCAAACCTAA-3
V 5	5-AGCTCTGAGCTGAATGTGAACGCC-3
V 6	5-TCTCAGGTGTGATCCAAA TTCGGG-3
V 7	5-CCTGAATGCCCAACAGCTCTCTC-3
V 8	5-CCATGATGCGGGGACTGGA GTTGC-3
V 9	5-TTCCCTGGA GCTTGGT GACTCTGC-3
V 10	5-CCACGGA GTCA GGGGACACAGCAC-3
V 11	5-TGCCA GGCCTCACA TACCTCTCA-3
V 12	5-TGTCACCA GACTGGGAACCAACAC-3
V 13	5-CACTGCGGTGTACCCA GGA TATGA-3
V 14	5-GGGCTCGGCTTAA GGCA GACCTAC-3
V 15	5-CA GGCACA GGCTAAA TTCTCCCTG-3
V 16	5-GCCTGCA GAACTGGA GGA TTCTGG-3
V 17	5-CTGCTGAATTTCCCAAA GA GGGCC-3
V 18	5-TGCCCA GAA TCTCTCA GCCTCCA-3
V 19	5-TCCTCTCACTGTGACA TCGGCCCA-3
V 20	5-AGCTCTGAGGTGCCCA GAA TCTC-3
V 21	5-TCCAACCTGCAAGGCTTGACTACT-3
V 22	5-AA GTGATCTTGCCTGTGTCCCCA-3
V 23	5-GCA GGGTCCA GGTCA GGACCCCCA-3
V 24	5-CCCA GTTTGTAAA GCCA GTGACCC-3
C	5-CGGGCTGCTCCTTGA GGGGCTGCT-3
C-Fam	5-Famr CACA GCGACCTCGGGTGGG-3
2M5	5-TACACTGAA TTCCACCCCCAC-3
2M3	5-CACTCAATCCAAATGCGGCA-3

**1.4.2 基因扫描(Genescan)分析及结果判定** 取荧光素 Fam 标记的 PCR 产物 2.5  $\mu$ l 于 0.2 ml 离心管,加入标准品(ABI, Perkin Elmer GENESCAN-500-TAMARA,其中含有荧光素 TA-MARA 标记的不同大小的 DNA 片段)0.5  $\mu$ l 和上样缓冲液(GENESCAN-500-TAMARA 试剂盒,含葡聚糖 50 g/L, EDTA 25 mmol/L)0.5  $\mu$ l, 99.5% 甲酰胺 1.5  $\mu$ l。95 $^{\circ}$ C 变性 5 min 后于 ABI 377 DNA 自动序列分析仪(ABI, Perkin Elmer 公司)上 6% 聚丙烯酰胺凝胶中电泳,收集资料。具体操作步骤按使用指南进行。通过分析仪中的基因扫描 GENOTYPER 2.0 分析软件对计算机收集的结果进行分析。根据电泳过程中不同时间所出现的不同强度、不同颜色的荧光素,相应地显示出不同位置、高度、颜色和形状的峰。峰的位置表示产物的大小,峰的高度表示产物的量,峰的形态表示产物的均一性。如果产物中所含的 DNA 片段大小完全相同,基因扫描分析显示为单一峰;如果绝大多数 DNA 片段大小相同,则显示为一主峰及个别极低的小峰;如果产物中 DNA 片段参差不齐,则呈多峰图像;三者分别提

示 PCR 产物来自单克隆(monoclonal)、寡克隆(oligo-clonal)和多克隆(polyclonal)的 T 细胞<sup>[8]</sup>。

1.5 统计学处理 计数资料率的比较采用  $\chi^2$  检验,小样本资料采用四格表精确概率检验。

## 2 结果

2.1 T 细胞中 TCR V 亚家族的表达情况 10 例正常人外周血 T 细胞表达所有 24 个 V 亚家族。24 例 NSCLC 患者外周血 T 细胞均仅表达部分 TCR V 亚家族,分别表达 1~7 个 V 亚家族,平均表达 2.7 个 V 亚家族,其中 V 16 的表达频率最高,为 8/24 (33.3%);由于部分肿瘤组织和非癌肺组织内浸润 T

细胞较少或者没有,低于检测水平,因此仅检出 18 例肿瘤组织和 12 例非癌肺组织 T 细胞的亚家族表达情况。TIL 分别表达 1~7 个 V 亚家族,平均表达 2.5 个 V 亚家族,其中 V 5 的表达频率最高,为 6/18 (33.3%)。非癌肺组织分别表达 1~4 个 V 亚家族,其中 V 17 的表达频率最高,为 3/12 (25.0%)。比较 T 细胞 TCR V 5、V 16、V 17 三个亚家族在不同组织表达频率的差异,结果如表 2;V 5 在 TIL 的表达频率(6/18, 33.3%)显著性高于 PBL (1/24, 4.2%)、非癌肺组织(0/12),  $P$  值均  $< 0.05$ ;V 16 和 V 17 在三个部位来源 T 细胞的表达频率均无显著性差异。

表 2 三个部位来源的 T 细胞 TCR V 5、V 16、V 17 表达频率的差异

Tab 2 Comparison of TCR V 5, V 16 and V 17 expressions in T cells from the different tissues

Subfamilies	Source of T cells	<i>n</i>	No. of positive	Comparison between	$\chi^2$ value	<i>P</i> value
V 5	Lung cancer tissues <sup>1</sup>	18	6	1 and 2	4.375	$< 0.05$
	Peripheral blood <sup>2</sup>	24	1	1 and 3	-	0.024
	Non-cancerous lung tissues <sup>3</sup>	12	0			
V 16	Lung cancer tissues <sup>1</sup>	18	3	1 and 2	0.926	$> 0.05$
	Peripheral blood <sup>2</sup>	24	8	2 and 3	-	0.45
	Non-cancerous lung tissues <sup>3</sup>	12	2			
V 17	Lung cancer tissues <sup>1</sup>	18	2	1 and 3	-	0.13
	Peripheral blood <sup>2</sup>	24	2	2 and 3	-	0.46
	Non-cancerous lung tissues <sup>3</sup>	12	3			

2.2 T 细胞克隆性表达情况 对所有 V 5 的阳性的产物进一步行基因扫描分析,结果如图 1,6 例表达 V 5 的 TIL 中,4 例呈多峰图像(多克隆),2 例呈个别小峰基础上的单一主峰图像(寡克隆);1 例表达 V 5 的外周血 T 细胞呈多克隆表达;10 例正常人 PBL 全部呈多克隆表达。

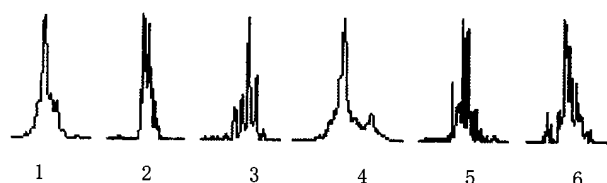


图 1 TIL 中 V 5 的克隆性表达情况

其中 1、4 为寡克隆表达,2、3、5、6 为多克隆表达

Fig 1 The clonal expression of V 5 in TIL

1 and 4: oligoclonal; 2, 3, 5 and 6: polyclonal

## 3 讨论

肿瘤免疫主要是细胞免疫,T 细胞在肿瘤免疫中起着重要作用,T 细胞识别抗原是通过其表面的 T 细

胞受体对抗原呈递细胞表面抗原肽-主要组织相容性复合物(MHC)的认知来实现的。由体细胞胚系基因片段的重排形成功能性的 TCR 使得 T 细胞有识别各种抗原的能力。在 TCR V 区、D 区、J 区发生重排形成功能 TCR 的过程中,V 区和 D 区之间,D 区和 J 区之间可存在不同数量的碱基对,称之为 N 区,另外 D 区重排时可长可短,形成一个高变区域互补决定区 3(CDR3)。不同克隆 T 细胞重排时 CDR3 长度及碱基序列的不同,构成了 TCR 特异性识别抗原最主要的区域,决定了 TCR 的特异性<sup>[9]</sup>。每一个 T 细胞携带一个特异性的 TCR 克隆型,每一个克隆型负责对某一抗原的特异性应答<sup>[10]</sup>,故对 CDR3 长度及序列的检测是一种独特的检测 T 细胞克隆的方法。CDR3 基础上的基因扫描方法是近年来开展起来的较先进的 TCR 分析方法<sup>[7]</sup>。

本组采用 CDR3 特异性的亚家族引物分析了 24 例 NSCLC 患者外周血、肿瘤组织、非癌肺组织中 T 细胞 TCR V 的表达情况,发现与正常人外周血 TCR V 表达 24 个亚家族相比,NSCLC 患者外周血呈现局

限性的 TCR V 亚家族表达。人们在多种实体肿瘤中均发现了 TCR 的限制性表达<sup>[11]</sup>,认为是在特异性抗原刺激下 T 细胞呈选择性的优势生长和克隆性增殖所造成的。在这些限制性表达的 TIL 中发现一些克隆性生长的 T 细胞具有自身肿瘤细胞特异性的杀伤作用<sup>[5]</sup>,提示肿瘤患者 TCR 的限制性表达可能是因为 TIL 选择性地使用一个或几个 TCR V 基因片段来应答肿瘤部位长期的抗原刺激<sup>[12]</sup>。由于实体肿瘤患者全身和局部免疫环境的复杂性和多样性,只有部分限制性表达 TCR 的 T 细胞克隆是肿瘤抗原相关性的<sup>[13]</sup>。本组分别比较了 NSCLC 患者外周血、肿瘤组织、非癌肺组织 T 细胞 TCR V 亚家族的表达频率,发现 TIL 中以 V 5 的表达频率最高,且 TIL 中 V 5 的表达频率显著高于 PBL 和非癌肺组织 T 细胞。提示可能存在 NSCLC 相关的 V 选择性表达。

为了验证这种 NSCLC 患者优势 V 5 亚家族的出现是肿瘤抗原选择性刺激机体 T 细胞作用的结果,本组采用基因扫描技术分析了这些 T 细胞的 CDR3 长度,从而推断优势 V 亚家族 T 细胞的克隆性情况。结果显示在 6 个表达 TCR V 5 亚家族的 NSCLC 患者 TIL 中,有 2 个呈现寡克隆的表达。这种 V 5 的优势表达和克隆性表达可能是肺癌相关抗原长期刺激下,携带着抗原特异性识别的 TCR 的 T 细胞活化和增殖,最终导致克隆性的 T 细胞反应,并在肿瘤组织中聚集<sup>[14]</sup>。Gelber 等对接种于 C57BL/6J 小鼠的 Lewis 肺癌克隆进行研究,发现 TCR V 5 单克隆抗体能除去相对应的抗原而促进肿瘤生长<sup>[15]</sup>,提示 TCR V 5 克隆性 T 细胞具自身肿瘤杀伤作用,能抑制肺癌细胞的生长。通过对 NSCLC 患者体内这些克隆性 T 细胞对自身肿瘤的特异性杀伤作用的研究,将有助于明确这些 T 细胞亚群的功能,并有可能以 TCR 为治疗靶点,从而改进 NSCLC 的免疫治疗策略。

### 参 考 文 献

- 1 Schumacher K, Haensch W, Roefzaad C, et al. Prognostic significance of activated CD8(+) T cell infiltrations within esophageal carcinomas. *Cancer Res*, 2001, 61(10): 3932-3936.
- 2 Michael-Robinson JM, Biemer-Huttmann A, Purdie DM, et al. Tumour infiltrating lymphocytes and apoptosis are independent features in colorectal cancer stratified according to microsatellite instability status.

- Gut, 2001, 48(3): 360-366.
- 3 Wei YQ(魏于全), Hang ZB. In situ observation of lymphocyte-tumor cell interaction in human lung carcinoma. *Immunol Invest*, 1989, 18(9-10): 1095-1105.
- 4 Maccalli C, Farina C, Sensi M, et al. TCR beta-chain variable region-driven selection and massive expansion of HLA-class II-restricted antitumor CTL lines from HLA-A\*0201+ melanoma patients. *J Immunol*, 1997, 158(12): 5902-5913.
- 5 Angevin E, Kremer F, Gaudin C, et al. Analysis of T-cell immune response in renal cell carcinoma: polarization to type I-like differentiation pattern, clonal T-cell expansion and tumor-specific cytotoxicity. *Int J Cancer*, 1997, 72(3): 431-440.
- 6 Pilch H, Hohn H, Neukirch C, et al. Antigen-driven T-cell selection in patients with cervical cancer as evidenced by T-cell receptor analysis and recognition of autologous tumor. *Clin Diagn Lab Immunol*, 2002, 9(2): 267-278.
- 7 Li Y, Yang L, Chen S, et al. Clonal expansion T cells identified in acute monoclonal leukemia by CDR3 size analysis of TCR V beta repertoire using RT-PCR and genescan. *Chin Med J (Engl)*, 2002, 115(1): 69-71.
- 8 吴一龙,杨学宁,李锦添,等.基因扫描分析非小细胞肺癌患者外周血和骨髓 T 细胞克隆性增殖及分布特点. *癌症*, 2000, 19(3): 204-207.
- 9 Jorgensen JL, Esser U, Fazekas de St Groth B, et al. Mapping T-cell receptor-peptide contacts by variant peptide immunization of single-chain transgenics. *Nature*, 1992, 355(6357): 224-230.
- 10 Weidmann E, Elder EM, Trucco M, et al. Usage of T-cell receptor V beta chain genes in fresh and cultured tumor-infiltrating lymphocytes from human melanoma. *Int J Cancer*, 1993, 54(3): 383-390.
- 11 Halapi E. Oligoclonal T cells in human cancer. *Med Oncol*, 1998, 15(4): 203-211.
- 12 Gold DP. TCR V gene usage in autoimmunity. *Curr Opin Immunol*, 1994, 6(6): 907-912.
- 13 Hayashi K, Yonamine K, Masuko-Hongo K, et al. Clonal expansion of T cells that are specific for autologous ovarian tumor among tumor-infiltrating T cells in humans. *Gynecol Oncol*, 1999, 74(1): 86-92.
- 14 Duncan SR, Elias DJ, Roglic M, et al. T-cell receptor biases and clonal proliferations in blood and pleural effusions of patients with lung cancer. *Hum Immunol*, 1997, 53(1): 39-48.
- 15 Gelber C, Eisenbach L, Feldman M, et al. T-cell subset analysis of Lewis lung carcinoma tumor rejection: heterogeneity of effectors and evidence for negative regulatory lymphocytes correlating with metastasis. *Cancer Res*, 1992, 52(23): 6507-6515.

(收稿:2002-03-15 修回:2002-06-01)

(本文编辑 张世雯)