

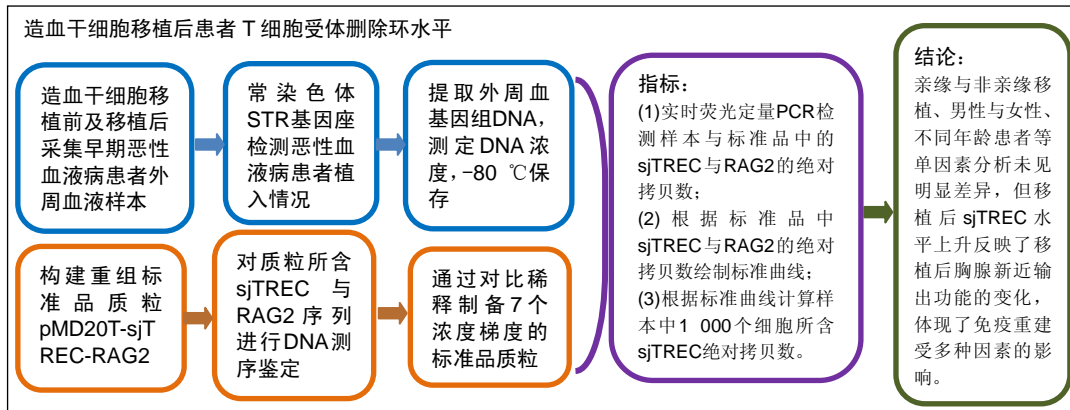
## 造血干细胞移植后免疫重建早期T细胞受体删除环的检测分析

王 坤, 韩俊永, 陈金烟, 刘慎敏, 薛士杰, 金静君(福建省医学科学研究院免疫研究所, 福建省医学测试重点实验室, 福建省福州市 350001)

DOI:10.3969/j.issn.2095-4344.0621

ORCID: 0000-0002-2823-4373(金静君)

文章快速阅读:



王坤, 女, 1982 年生, 湖北省恩施市人, 汉族, 2007 年武汉大学毕业, 硕士, 助理研究员, 主要从事基础免疫学方面的研究。

通讯作者: 金静君, 研究员, 福建省医学科学研究院免疫研究所, 福建省医学测试重点实验室, 福建省福州市 350001

中图分类号: R394.2

文献标识码: B

稿件接受: 2018-05-19



文题释义:

**T 细胞受体删除环:** 来自骨髓的前 T 淋巴细胞在胸腺内经过 T 细胞受体(T-cell receptor, TCR)基因重排, 形成  $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ 、 $\delta$  4 种 T 细胞受体, 并以异源二聚体的形式组成  $\alpha\beta$  TCR 和  $\gamma\delta$  TCR, 其中外周血 T 细胞中 95% 以上是  $\alpha\beta$  T 细胞。在形成  $\alpha\beta$  T 细胞过程中, TCR  $\alpha$  发生重排, 删除的 DNA 片段重组形成环状结构, 称为 T 细胞受体删除环(T-cell receptor excision circle, TREC 或者 signal joint T-cell receptor excision circle, sjTREC)。在进一步的重排中, 可以形成另一个删除环, 称为编码结合 TREC(code joint T-cell receptor excision circle, cjTREC)。

**异基因造血干细胞移植:** 是指将供者正常的造血干细胞移植给经过大剂量放、化疗的恶性血液病患者, 代替患者体内病理性或缺陷造血干细胞, 并重建造血和免疫功能, 在恶性血液病治疗方案中, 目前是最有效的根治手段。重视异基因造血干细胞移植后早期免疫重建的监测, 给予尽早干预, 能提高患者无病生存率和降低死亡率。

摘要

**背景:** 目前对于造血干细胞移植后的免疫监测缺乏直接明确的检测指标, 利用不断改良的实时定量荧光 PCR 技术监测 T 细胞受体删除环(T-cell receptor excision circle, TREC 或 signal joint T-cell receptor excision circle, sjTREC)拷贝数来反映胸腺新近功能, 从而评估免疫重建水平, 指导预后治疗。

**目的:** 检测造血干细胞移植患者免疫重建早期 T 细胞受体删除环水平, 分析移植方式、年龄、疾病类型、性别等因素的影响。

**方法:** 采用 Taq Man 探针, 实时定量荧光 PCR 技术检测 29 例健康正常人, 19 例造血干细胞移植前患者, 6 例造血干细胞移植后患者的外周血 1 000 个细胞中所含 sjTREC 拷贝数。

**结果与结论:** ①正常对照组 1 000 个细胞中所含 sjTREC 拷贝数为  $26.99 \pm 29.3$ , 随年龄增加而降低, 男女性别 sjTREC 水平无明显差异; 患者组移植前 sjTREC 水平低于正常对照组且差异有显著性意义( $P=0.006$ );

②6 例患者移植后 1 个月时 sjTREC 水平上升, 移植后 6 个月时 sjTREC 水平下降; ③移植后 6 个月时 2 例 HLA 半相合亲缘移植与 4 例 HLA 全相合非亲缘移植患者 sjTREC 水平接近; ④结果表明, 移植前患者胸腺功能严重受损, 在移植后 1 个月出现短暂上升后下降的趋势可能与胸腺应激性反应相关; 亲缘与非亲缘移植、男性与女性、不同年龄患者等单因素分析未见明显差异, 但移植后 sjTREC 水平上升反映了移植后胸腺新近输出功能的变化, 体现了免疫重建受多种因素的影响。

**关键词:**

T 细胞受体删除环; 异基因造血干细胞移植; 免疫重建; 胸腺功能; 干细胞

**主题词:**

造血干细胞移植; 基因重排; T 淋巴细胞; 胸腺; 组织工程

**基金资助:**

福建省属公益类科研院所基本科研专项(2014R1031-2); 福建省医学创新课题(2016-CXB-2)

**缩略语:**

异基因造血干细胞移植: allogeneic hematopoietic stem cell transplantation, allo-HSCT; T 细胞受体删除环: T-cell receptor excision circle, TREC 或者 signal joint T-cell receptor excision circle, sjTREC

Wang Kun, Master, Assistant researcher, Immunology Research Institute of Fujian Academy of Medical Sciences, Fujian Provincial Key Laboratory of Medical Analysis, Fuzhou 350001, Fujian Province, China

Corresponding author: Jin Jing-jun, Researcher, Immunology Research Institute of Fujian Academy of Medical Sciences, Fujian Provincial Key Laboratory of Medical Analysis, Fuzhou 350001, Fujian Province, China

## Measurements of T-cell receptor excision cycles in early stage of immune reconstitution after hematopoietic stem cell transplantation

Wang Kun, Han Jun-yong, Chen Jin-yan, Liu Shen-min, Xue Shi-jie, Jin Jing-jun (Immunology Research Institute of Fujian Academy of Medical Sciences, Fujian Provincial Key Laboratory of Medical Analysis, Fuzhou 350001, Fujian Province, China)

### Abstract

**BACKGROUND:** Currently, there is no direct and explicit detection index for immune surveillance after hematopoietic stem cell transplantation. The copy number of T-cell receptor excision circle (TREC or signal joint T-cell receptor excision circle, sjTREC) that reflects the recent function of the thymus is monitored by using constantly improved real-time quantitative PCR technology, thereby assessing the level of immune reconstitution and guiding prognosis treatments.

**OBJECTIVE:** To analyze the influence of transplantation approach, type of diseases, age, and sex in early stage of immune reconstitution after hematopoietic stem cell transplantation by investigating the level of sjTREC in the peripheral blood.

**METHODS:** The number of sjTREC copies per 1 000 cells in the peripheral blood in control group ( $n=29$ ), before-group ( $n=19$ ), and after-group ( $n=6$ ) were detected using absolute quantitative real-time PCR with TaqMan probes.

**RESULTS AND CONCLUSION:** In the 1 000 cells, the number of sjTREC copies in the control group was  $26.99 \pm 29.3$  and it decreased with age but no difference existed between male and female. Compared with the control group, the level of sjTREC was significantly lowered in the before-group ( $P=0.006$ ). After transplantation, the level of sjTREC was rapidly increased within 1 month, and then decreased at 6 months. No obvious differences were found in the level of sjTREC after half-matched HLA related donor transplantation in two cases and full-matched HLA unrelated donor transplantation in four cases. All the findings indicate that the thymus function in patients is seriously impaired before transplantation, and the changes of sjTREC copies that are transiently increased and then decreased at 1 month after transplantation may be related to the stress response of the thymus in the early immune reconstitution period. Although there are no differences between related and unrelated donors, male and female, or different ages, the increased level of sjTREC reflects the changes of thymus function after transplantation, indicating that a variety of factors contribute to immune reconstitution.

**Subject headings:** Hematopoietic Stem Cell Transplantation; Gene Rearrangement, T-Lymphocyte; Thymus Gland; Tissue Engineering

**Funding:** the Basic Research Special Fund for Scientific Research Institutes for Public Welfare, No. 2014R1031-2; Fujian Medical Innovation Topics, No. 2016-CXB-2

## 0 引言 Introduction

对于接受异基因造血干细胞移植 (allogeneic hematopoietic stem cell transplantation, allo-HSCT) 的患者, T 细胞恢复是其获得免疫重建的关键<sup>[1-2]</sup>。2000 年 Elhasid 等<sup>[3]</sup>报道, 在 allo-HSCT 早期, 造血系统已经开始重建, 各类血细胞数量、功能逐步恢复, 并且明显早于免疫系统 T、B 等主要免疫细胞数量和功能的重建, 这种情况将显著增加感染和罹患肿瘤的风险, 因此, 重新建立一个多样化的 T 细胞库对减少机会感染、增强宿主对恶性疾病复发防御十分重要<sup>[4]</sup>。

胸腺是人类 T 淋巴细胞发育和成熟的主要器官, 来自骨髓的前 T 淋巴细胞在胸腺内由双阴性发育为双阳性时发生了 T 细胞受体 (T-cell receptor, TCR) 基因重排, TCR  $\alpha$  重排时通过片段  $\delta$ Rec 和  $\psi$ J $\alpha$  删除的  $\delta$  基因 (位于  $\alpha$  基因座 V 区与 J 区之间) 片段重组形成 DNA 环状结构, 称为 T 细胞受体删除环 (T-cell receptor excision circle, TREC 或者 signal joint T-cell receptor excision circle, sjTREC), 它十分稳定的游离在细胞中, 并不随着细胞的分裂增殖而扩增, 它是 TCR 基因重排的副产物, 它的数量代表了初始 T 细胞 (naïve T-cell) 数量<sup>[5]</sup>, 因此, 1998 年 Douek 等<sup>[6]</sup>提出胸腺新近输出功能可以通过定量检测 sjTREC 拷贝数了解胸腺来源的初始 T 细胞数量来实现, 从而评估免疫重建水平。

目前, 国外课题组对免疫缺陷患者的胸腺功能研究有持续报道<sup>[7-8]</sup>, 提示胸腺在免疫重建中的重要作用, 因此应重视 allo-HSCT 早期胸腺新近输出功能的监测, 以达到尽早干预, 改善预后的目标。

## 1 对象和方法 Subjects and methods

1.1 设计 造血干细胞移植后免疫重建早期 T 细胞受体删除环检测分析。

1.2 时间及地点 实验于 2014 年 12 月至 2017 年 6 月在福建省医学科学研究院免疫研究所完成。

1.3 对象 于 2014 至 2017 年在福建医科大学附属协和医院血液科接受造血干细胞移植治疗的患者, 根据知情同意原则共跟踪随访 19 例造血干细胞移植患者, 男 14 例, 女 5 例; 年龄 3-54 岁; 部分患者由于疾病进展、失访或资料不全, 最终纳入移植后统计分析的有 6 例, 其中急性髓系白血病 1 例, 急性单核细胞性白血病 1 例, 急性淋巴细胞白血病 3 例, 再生障碍性贫血 1 例。根据移植方式不同, HLA 全相合非亲缘异基因造血干细胞移植 4 例, HLA 半相合亲缘异基因造血干细胞移植 2 例。在移植前、移植后 1 个月、移植后 6 个月采集患者外周血 2-5 mL, EDTA 抗凝处理。

正常人样本依据知情同意原则取自福建省医学科学研究院门诊部筛选的健康体检者, 男 17 例, 女 12 例, 中位年龄 25 岁。采集外周血 2-5 mL, EDTA 抗凝处理。

**主要仪器和试剂:** Synergy2 型多功能酶标仪 (美国 Bio-tek 公司); 7500 型荧光定量 PCR 仪 (美国 AB 公司); Platinum<sup>®</sup> 定量 PCR 预混液试剂盒 (美国 Invitrogen 公司); PowerPlex<sup>®</sup> 21 系统 (美国 Promega 公司); 3130 型遗传分析仪 (美国 AB 公司); Mighty TA 克隆试剂盒 (日本 Takara 公司); Wizard<sup>®</sup> 基因组 DNA 纯化试剂盒 (美国 Promega 公司); QIAGEN<sup>®</sup> 质粒纯化试剂盒 (德国 QIAGEN 公司); 核酸内切酶 (日本 Takara 公司); 引物、探针合成及 DNA 测序由生工生物工程 (上海) 股份有限公司完成。

## 1.4 方法

**1.4.1 外周血基因组DNA提取** 采用Chelex-100法从血样中提取DNA<sup>[9]</sup>;采用Wizard<sup>®</sup>基因组DNA纯化试剂盒抽提外周血全基因组DNA,测定DNA纯度及浓度,编号后冻存于-80℃冰箱备用,用于实时定量荧光PCR检测。

**1.4.2 造血干细胞移植患者植入证据检测** 选用PCR扩增短串联重复序列法(short tandem repeat, STR)证实造血干细胞植活情况,利用PowerPlex<sup>®</sup>21系统检测21个STR基因座的基因型。按照说明书进行PCR反应,经3130型遗传分析仪毛细管电泳后,用GeneMapper ID v3.2软件分析各基因座的基因型。

### 1.4.3 标准品制备

(1)引物序列的设计(表1):根据sjTREC序列(ACCESSION AE000521)设计引物T1、T2,根据sjTREC环形DNA的结构特点,只有引物T1、T2方向与普通引物相反,在形成环形结构时,引物T1、T2才能顺利进行扩增;根据RAG2序列(ACCESSION M94633)设计引物R1、R2;Taq Man探针选用FAM荧光报告基团和TAMRA淬灭基团标记。

(2)构建重组质粒pMD20T-sjTREC-RAG2(图1):在暨南大学李扬秋教授惠赠的sjTREC质粒基础上重新构建标准品质粒pMD20T-sjTREC-RAG2,含有sjTREC和RAG2两个片段。sjTREC片段由引物T1、T2扩增,经载体pMD20T的TA克隆位置平端连接,通过蓝白斑筛选挑取白斑阳性克隆,提取pMD20T-sjTREC质粒;RAG2片段由引物R1、R2扩增,经BamH I、EcoR I酶切,回收形成黏性末端与pMD20T-sjTREC质粒连接,提取质粒pMD20T-sjTREC-RAG2进行酶切电泳初步鉴定后送DNA测序。

(3)各梯度标准品的制备:使用质粒大提试剂盒提取重组质粒pMD20T-sjTREC-RAG2,保存于去离子水中,作为质粒原液,检测A<sub>260</sub>值,换算DNA浓度,计算每微升质粒原液的拷贝数。每微升质粒原液的拷贝数=(质粒原液DNA浓度/质粒pMD20T-sjTREC-RAG2相对分子质量)×6×10<sup>14</sup>,根据计算结果,首先用去离子水将质粒原液稀释为0.5×10<sup>7</sup>拷贝/μL,然后采用倍比梯度稀释法将其依次稀释为以下6个浓度梯度:0.5×10<sup>6</sup>,0.5×10<sup>5</sup>,0.5×10<sup>4</sup>,0.5×10<sup>3</sup>,0.5×10<sup>2</sup>,5拷贝/μL。将以上7个浓度梯度的质粒样本作为标准品组,-20℃保存待用。

**1.4.4 实时定量荧光PCR** 对所有样本进行实时定量荧光PCR检测<sup>[10]</sup>,其中标准品组共7个浓度梯度,阴性对照组、阳性对照组各2个平行样本,每个待测样本需要进行2次sjTREC和2次RAG2检测,首先根据样本DNA浓度,定量100 ng样本DNA模板,按照Platinum<sup>®</sup>定量PCR预混液试剂盒说明书,配制50 μL PCR反应体系,置于7500型荧光定量PCR仪上进行扩增程序,50℃ 2 min;95℃ 2 min;进入95℃ 15 s,60℃ 30 s共计45个循环,结束扩增。

首先根据标准品7个浓度梯度的Ct值绘制标准曲线(相关系数R<sup>2</sup>>0.99),由此得到样本中RAG2与sjTREC的绝对拷贝数值;然后根据RAG2在人类基因中每个细胞中稳定表达2个拷贝的特点,确定检测样本中所含细胞数;最后

根据sjTREC绝对拷贝数值,利用公式换算1 000个细胞中所含sjTREC的拷贝数。

1 000个细胞中sjTREC拷贝数=2×1 000×(sjTREC<sub>1</sub>+sjTREC<sub>2</sub>)/(RAG2<sub>1</sub>+RAG2<sub>2</sub>)(注:sjTREC<sub>1</sub>和sjTREC<sub>2</sub>表示2次检测sjTREC绝对拷贝数的结果;RAG2<sub>1</sub>和RAG2<sub>2</sub>表示2次检测RAG2绝对拷贝数的结果)。

**1.5 主要观察指标** 造血干细胞移植前和移植后1,6个月外周血1 000个细胞中sjTREC绝对拷贝数。

**1.6 统计学分析** 采用SPSS 17.0软件对所检测的各组拷贝数进行统计学分析,应用单因素方差分析及两独立样本t检验来比较各组之间的差异,P<0.05为差异有显著性意义。

## 2 结果 Results

**2.1 造血干细胞移植病例植入存活状况** 收集的6例造血干细胞移植患者样本均获得满意的20个STR基因座基因型和1个性别基因座基因型的分型结果(图2),患者移植后STR表型均完全表现为供者源型,未检测到供受者嵌合状态。

### 2.2 标准品制备

**2.2.1 构建重组质粒pMD20T-sjTREC-RAG2及鉴定结果** 对重组质粒pMD20T-sjTREC-RAG2用T1、T2与R1、R2进行PCR扩增,得到的片段大小与文献[10]报道的RAG2片段(244 bp)和sjTREC片段(362 bp)大小一致(图3)。DNA测序结果显示,sjTREC片段在重组质粒342 bp处插入,RAG2片段在735 bp处插入(图4),经核对其序列表达与文献[10]报道一致。

**2.2.2 标准品曲线** 在制备实时荧光绝对定量PCR体系时,根据质粒pMD20T-sjTREC-RAG2标准品的7个浓度梯度:0.5×10<sup>7</sup>,0.5×10<sup>6</sup>,0.5×10<sup>5</sup>,0.5×10<sup>4</sup>,0.5×10<sup>3</sup>,0.5×10<sup>2</sup>,5拷贝/μL,每个反应体系加入2 μL标准品,使反应体系中起始DNA模板量分别为1×10<sup>7</sup>,1×10<sup>6</sup>,1×10<sup>5</sup>,1×10<sup>4</sup>,1×10<sup>3</sup>,1×10<sup>2</sup>,10拷贝,根据7个浓度梯度标准品扩增的Ct值,绘制标准曲线(图5,6)。RAG2标准曲线斜率=-2.788 670,截距=36.805 401,R<sup>2</sup>=0.998 5;sjTREC标准曲线斜率=-3.218 531,截距=41.414 780,R<sup>2</sup>=0.997 076。两条标准曲线的R<sup>2</sup>均大于0.99。

### 2.3 sjTREC水平的比较分析

**2.3.1 正常健康人群sjTREC平均水平** 29例正常健康对照组外周血每1 000个细胞中的sjTREC拷贝数为26.99±29.33。按年龄将正常健康对照组分为20岁以下(n=14)与21-30岁(n=15)两组,其外周血1 000个细胞中sjTREC拷贝数分别为34.08±34.99与20.37±22.059,进行两独立样本的t检验,P=0.018,差异有显著性意义(图7)。按性别分组,男性组(n=17)和女性组(n=12) sjTREC拷贝数分别为27.91±33.45,25.68±23.65,男女之间差异无显著性意义。

**2.3.2 移植前、移植后外周血中sjTREC平均水平比较** 移植前患者(n=19)外周血1 000个细胞中sjTREC拷贝数为6.97±9.50,与正常对照组进行两独立样本的t检验,P=0.006,差异有显著性意义。按年龄分析,其中20岁以

表 1 sjTREC、RAG2 引物及 Taq Man 荧光探针合成序列  
Table 1 Primers of sjTREC, RAG2 and Taq Man fluorescent probe sequences

名称	序列	位置	方向或酶切位点
T1	5'-GCT GAA CTT ATT GCA ACT CGT GAG-3'	140 298-140 275 bp	δRec 片段下游 104 bp 处
T2	5'-AAC AGC CTT TGG GAC ACT ATC G-3'	228 986-229 007 bp	ψJα 片段上游 258 bp 处
R1	5'-GAT AGG ATC CGC AAC ATG GGA AAT GGA ACT G -3'	2 160-2 180 bp	含有 BamH I 酶切位点
R2	5'-GCG AAT TCG GTG TCA AAT TCA TCA TCA CCA TC -3'	2 404-2 381 bp	含有 EcoR I 酶切位点
F1	5'-FAM-CAC GGT GAT GCA TAG GCA CCT GC- TAMRA -3'	229 272-229 294 bp	sjTREC 探针
F2	5'-FAM-CCC CTG GAT CTT CTG TTG ATG TTT GAC TGT TTG-TAMRA-3'	2 289-2 321 bp	RAG2 探针

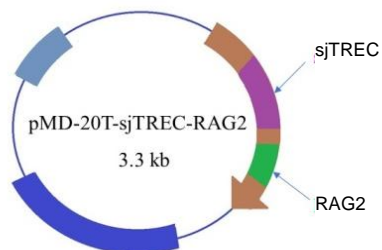


图 1 重组质粒 pMD20T-sjTREC-RAG2 构建示意图  
Figure 1 Construction of recombinant plasmid pMD20T-sjTREC-RAG2

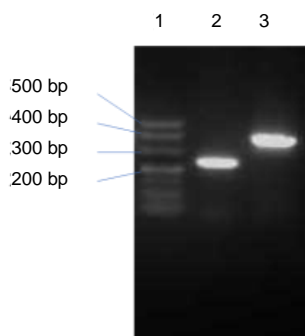


图 3 RAG2、sjTREC 片段 2%琼脂糖凝胶电泳图  
Figure 3 2% agarose gel electrophoresis of RAG2 and sjTREC fragments  
图注: 1: DNA Marker(DL500); 2: RAG2 片段(244 bp); 3: sjTREC 片段(362 bp)。

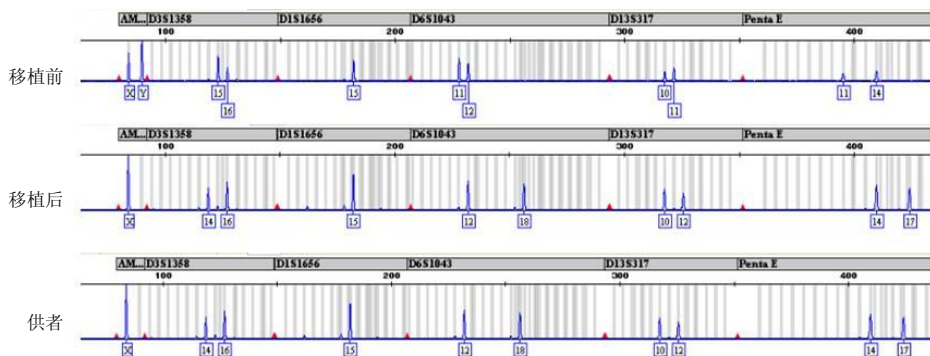


图 2 患者造血干细胞移植前后及供者 DNA-STR 基因座基因型  
Figure 2 DNA-STR locus genotype of the donor and patient before and after hematopoietic stem cell transplantation

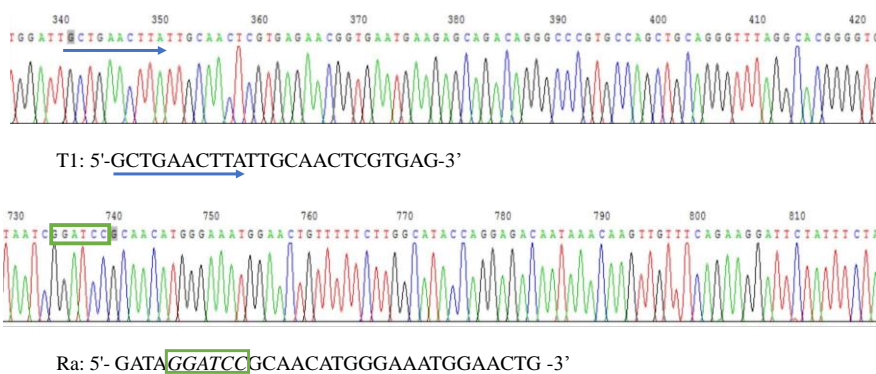


图 4 重组质粒 pMD20T-sjTREC-RAG2 测序结果  
Figure 4 Sequencing results of recombinant plasmid pMD20T-sjTREC-RAG2

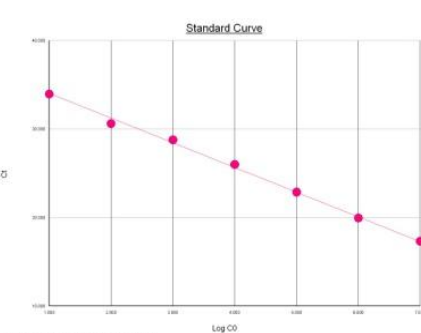


图 5 RAG2 实时定量荧光 PCR 标准品曲线  
Figure 5 Standard curve of RAG2 real-time quantitative PCR

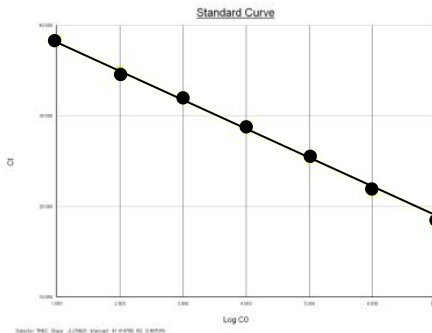


图 6 sjTREC 实时定量荧光 PCR 标准品曲线  
Figure 6 Standard curve of sjTREC real-time quantitative PCR

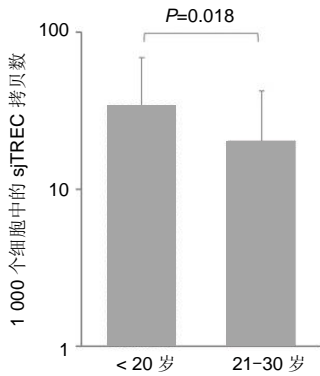


图7 不同年龄正常对照组 T 细胞受体删除环(sjTREC)水平比较  
Figure 7 Comparison of sjTREC levels in the normal control group at different ages

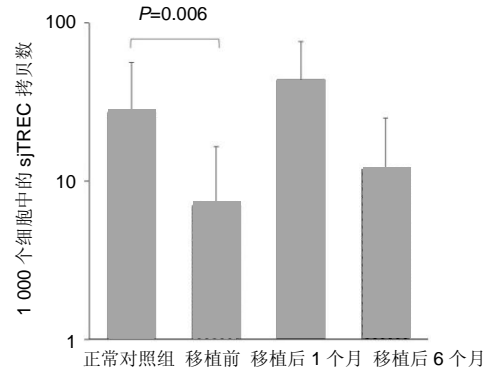


图8 造血干细胞移植前、移植后与正常对照组 T 细胞受体删除环(sjTREC)水平比较  
Figure 8 Comparison of sjTREC levels between patients before and after transplantation and normal controls

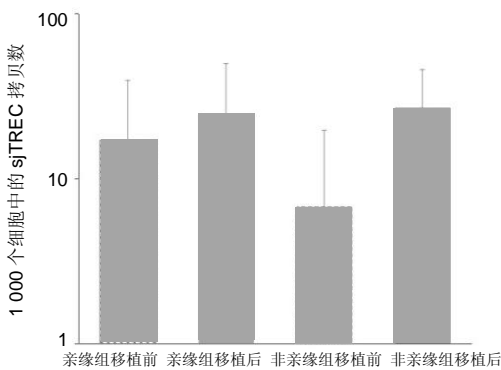


图9 亲缘组与非亲缘组 T 细胞受体删除环(sjTREC)水平比较  
Figure 9 Comparison of sjTREC levels between relatives and unrelated groups

### 3 讨论 Discussion

allo-HSCT患者处于长期的免疫缺陷状态<sup>[12]</sup>, 导致移植后很多年仍然存在高风险的机会感染。免疫缺陷的产生机制是多因素的<sup>[13-14]</sup>, 但胸腺功能的缺陷受损, 直接导致移植后供者干细胞来源的T细胞的再生能力急剧减弱。目前, allo-HSCT早期患者免疫功能的重建机制并不完全清楚。但是有研究表明, 通过检测胸腺近期输出的初始T细胞数量来反映免疫重建早期机体T细胞的增殖能力和胸腺再生输出功能<sup>[15]</sup>。因此, 检测allo-HSCT后重建早期的胸腺输出初始T细胞的数量, 是评估免疫功能重建非常重要的指标。Douek等<sup>[6]</sup>于1998年首次报道, 通过定量分析T细胞群中特异的DNA删除产物可以明确近期的胸腺输出功能, 是初始T细胞的特异性标志, 也就是说测定sjTREC含量代表了TCR基因重排时初始T细胞的含量, 对于移植后免疫重建早期的患者, 则反映了胸腺的新近输出功能。

TagMan探针实时定量荧光PCR绝对定量检测技术是目前应用最成熟、最广泛、高度特异的定量PCR技术<sup>[16]</sup>, 它能有效避免在流式细胞术检测中由于抗体的非特异性而带来的误差。目前通过流式细胞术检测采用多荧光标记外周血CD3<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup>初始细胞, 而这些抗原特异性表型不能准确代表初始T细胞, 在某些情况下, 记忆性CD8<sup>+</sup>T细胞也会表达这些初始表型。同时, Douck等<sup>[17]</sup>也报道外周血中sjTREC水平的上升较初始T细胞的上升能更早被检测到。在目前定量PCR实验操作中, DNA模板的取样都是以体积或质量为标准, 无法进行严格意义上的细胞数目的比较。为解决这一问题, 此次实验选择RAG2看家基因作为参比对照, 构建的标准品质粒同时含有sjTREC与RAG2两个片段。由于每一个细胞中含有2个RAG2基因且表达量恒定, 同一样本的sjTREC与RAG2扩增均在相同条件下同时进行, 因此, 环境等因素的干扰较小, 通过绝对定量标准曲线换算获得同一样本中RAG2的起始DNA拷贝数, 由此来计算起始样本所含细胞的绝对数量, 从而可以对单个细胞或者细胞数量相同时所含的sjTREC拷贝数进行比较, 避免了在比较相同DNA含量的样本时, 可能由于所含细胞数目不同而产生的误差, 从而可以提升精确度。为方便比较, 实验通过RAG2作对照参比换算1 000个细胞中sjTREC的

下患者( $n=7$ )拷贝数为 $7.62\pm 11.86$ ; 21岁以上患者( $n=12$ )拷贝数为 $6.59\pm 8.40$ , 进行两独立样本的 $t$ 检验,  $P=0.592$ , 差异无显著性意义。按性别分析, 男性( $n=14$ )拷贝数为 $8.75\pm 10.52$ ; 女性( $n=5$ )拷贝数为 $1.99\pm 1.96$ , 进行两独立样本的 $t$ 检验,  $P=0.071$ , 差异无显著性意义。

移植后1个月患者( $n=5$ )外周血1 000个细胞中sjTREC拷贝数为 $43.49\pm 32.80$ ; 移植后6个月患者( $n=4$ )外周血1 000个细胞中sjTREC拷贝数为 $11.83\pm 13.13$  (图8)。

按移植方式分析<sup>[11]</sup>, HLA半相合亲缘移植患者( $n=2$ )移植前拷贝数为 $17.05\pm 22.28$ , 移植后6个月拷贝数为 $24.26\pm 25.50$ ; HLA全相合非亲缘移植患者( $n=4$ )移植前拷贝数为 $6.74\pm 12.85$ , 移植后6个月拷贝数为 $28.30\pm 19.12$ (图9)。

按疾病类型分析, 6例患者涉及4种疾病分型, 移植前的sjTREC水平均很低, 移植后1个月时1例3岁急性淋巴细胞白血病亲缘移植患者sjTREC水平最高, 为 $78.362\ 4$ 拷贝, 但其他2例22岁和19岁急性淋巴细胞白血病患者sjTREC水平很低, 为 $1.513\ 2$ ,  $8.609\ 1$ 拷贝; 同时1例44岁再生障碍性贫血患者未检出sjTREC, 1例急性髓系白血病患者和1例急性单核细胞性白血病患者sjTREC水平居中, 5例检出的sjTREC范围从 $1.513\ 2-78.362\ 4$ 拷贝, 差异很大。

拷贝数。

随着移植技术、HLA配型技术、术后综合治疗水平的不断发展,allo-HSCT已成为目前治疗白血病等恶性血液性疾病的重要手段<sup>[18-19]</sup>。对造血干细胞移植患者首先通过STR遗传标记进行植入情况监测<sup>[20]</sup>,6例患者移植后1个月及6个月均表现出与供者源一致的STR基因座分型,未出现嵌合或受者源分型,提示植入状态良好。

2000年Douck等<sup>[17]</sup>首先发现多发性骨髓瘤自体移植后100 d可检测到sjTREC,从而证实了造血干细胞移植后成人胸腺具备T细胞免疫重建能力,对于造血干细胞移植后sjTREC恢复状况,一般认为受年龄、移植方式、慢性移植抗宿主病及放化疗对胸腺的损伤程度等因素的影响<sup>[21-23]</sup>。作者根据收集的病例资料从移植方式、年龄、疾病类型和性别4个方面入手,分析了6例恶性血液病患者allo-HSCT后免疫重建早期胸腺新近输出功能的变化。

从正常对照组的sjTREC拷贝数平均水平分析,随着年龄增长而逐渐降低,与Ringhoffer等<sup>[24]</sup>报道的在健康志愿者中sjTREC水平呈每年0.7%下降的趋势一致,也符合sjTREC水平在青春期达到最高值成年后逐渐衰退的胸腺发育特点,也验证了采用荧光定量PCR技术检测sjTREC水平的有效性,反映了体内新生T细胞水平。正常对照组男女性别在sjTREC水平上无明显差异,可能与正常对照组年龄比较集中有关。

移植前19例患者外周血1 000个细胞中sjTREC拷贝数平均水平与正常对照组差异有显著性意义( $P=0.006$ ),提示恶性血液病患者在移植前接受不同程度的药物或者放化疗方案处理,损伤了胸腺免疫功能,表现出sjTREC水平明显低于正常人,这也提示患者胸腺功能受损会成为影响移植后免疫系统恢复重建的重要因素。移植前患者胸腺功能明显低下,在不同年龄患者中表现为无明显差异,这可能由于患者的年龄、基础疾病、治疗方案、胸腺的损伤程度等多个因素共同影响,单从年龄方面分析并不全面。在性别方面,有文献报道过在HIV感染的免疫缺陷患者中,男性的sjTREC水平低于女性<sup>[25-26]</sup>,考虑是由于女性的激素水平有利于保护胸腺功能,但文中未发现明显性别差异,是否与恶性血液病的疾病特点、移植前的治疗方案等有关需要进一步的研究。

造血干细胞移植后1个月和6个月的sjTREC水平呈现上升后下降的趋势,由于样本例数限制未作统计分析,但提示在移植最初的1个月,初始T细胞表现为迅速增加后又迅速减少,与文献报道的胸腺应激性功能爆发现象类似<sup>[27]</sup>。移植后1个月sjTREC升高提示这个指标可反映机体内凶险的应激性反应,就是说胸腺对严重的T细胞缺失做出反应,使产量反弹。按移植方式分析,2例HLA半相合亲缘移植与4例HLA全相合非亲缘移植,由于样本量小,虽然未发现亲缘方式不同表现出的差异,但是与各自移植前比较,非亲缘HLA全相合患者sjTREC上升较明显,这可能是非亲缘移植患者移植前sjTREC水平更低,从而表现出较大的上升幅度。Weinberg等<sup>[21]</sup>发现非亲缘移植患者较亲缘移植患者sjTREC水平低,在移植后更容易发生移植抗宿主病,而

移植抗宿主病这一复杂的临床表现,能从多个方面对胸腺功能产生影响,特别是治疗移植抗宿主病的免疫抑制剂的的使用,对胸腺功能的影响明显,加大了免疫重建的难度。但Weinberg等<sup>[21]</sup>发现在25岁以下未有移植抗宿主病的骨髓移植患者在术后2个月sjTREC水平明显升高,1至2年达到最高值。此次研究的HLA全相合非亲缘移植与HLA半相合亲缘移植患者sjTREC水平在移植后6个月均有不同程度的上升,两种移植方式的sjTREC水平接近,因病例数少,未作统计学分析。目前国内外对于非亲缘移植与亲缘移植后sjTREC水平比较的报道观点不一,有的文献报道allo-HSCT后sjTREC水平重建需在移植后1至2年以上,且恢复水平主要受慢性移植抗宿主病等因素的影响<sup>[17]</sup>,根据移植方式特点及HLA匹配程度分析6例患者的移植后sjTREC水平,发现在小样本量的前提下,无法抛开移植抗宿主病、年龄、胸腺损伤程度等因素的影响,单独分析移植方式特点及HLA匹配程度两种因素的交叉共同影响是差异不明显的一个主要原因,且根据文中病例样本无法明确分辨移植方式是否比HLA匹配程度对T细胞免疫重建早期的影响更大。

按疾病类型分析,6例患者涉及4种疾病分型:急性淋巴细胞白血病3例、急性髓系白血病1例,急性单核细胞性白血病1例,再生障碍性贫血1例。在移植前sjTREC水平均很低,提示胸腺功能损伤,移植后1个月时1例3岁急性淋巴细胞白血病亲缘移植患者sjTREC水平最高,为78.362 4拷贝,是否与文献报道的胸腺应激性功能爆发现象类似<sup>[27]</sup>,需要进一步研究验证。另外2例22岁和19岁急性淋巴细胞白血病患者的检出值很低;与Ringhoffer等<sup>[24]</sup>报道的急性淋巴细胞白血病患者较其他患者有更低水平的sjTREC情况相同。1例未检出sjTREC出现在44岁再生障碍性贫血患者,考虑与患者的胸腺功能严重受损,移植抗宿主病及年龄因素有关。由于恶性血液病疾病类型复杂,文中收集的疾病类型还不够丰富和全面,未做统计分析。

目前,尚无全面的正常人外周血中sjTREC含量研究资料,检测方法、个体差异、环境因素导致不同研究组之间报道的数据差异很大。

总之,通过摸索与优化实验条件,建立实时定量荧光PCR检测外周血sjTREC的方法。初步的临床研究显示了allo-HSCT后sjTREC的动态变化趋势。由于造血干细胞移植后胸腺再生输出功能的恢复受诸多因素影响,机制复杂,需要增加样本量延长随访时间来进一步研究,达到对移植后免疫系统重建的监测作用,尽早干预,有效改善预后,提高无病生存率,降低死亡率。

**致谢:**感谢参与相关研究的造血干细胞移植患者和健康体检者的支持与配合;感谢福建医科大学附属协和医院血液研究所杨婷、任金华等老师给予的帮助;感谢暨南大学医学院血液病研究所李扬秋教授惠赠sjTREC质粒;感谢暨南大学医学院血液病研究所陈少华老师对课题的悉心指导。

**作者贡献:**实验设计为通讯作者,实验实施为第一作者,实验评估为通讯作者,资料收集为第二、三、四、五作者。第一作者成文,通讯作者审校,第一作者及通讯作者对文章负责。

**经费支持:** 该文章接受了“福建省属公益类科研院所基本科研专项(2014R1031-2)”、“福建省医学创新课题(2016-CXB-2)”的资助。所有作者声明,经费支持没有影响文章观点和对研究数据客观结果的统计分析及其报道。

**利益冲突:** 文章中应用的试剂包括美国 Invitrogen 公司荧光定量 PCR 试剂、美国 Promega 公司 PowerPlex<sup>®</sup>21 系统等,但是所有作者声明没有接受相关的经费支持,在课题研究和文章撰写过程,不存在利益冲突。

**伦理问题:** 研究的实施符合《赫尔辛基宣言》和医院对人体研究的相关伦理要求。文章的撰写与编辑修改后文章遵守了《观察性临床研究报告指南》(STROBE 指南)。参与研究的患病个体及其家属为自愿参加,所有供者、受者均对研究过程完全知情同意,并签署“知情同意书”。

**文章查重:** 文章出版前已经过 CNKI 反剽窃文献检测系统进行 3 次查重。

**文章外审:** 文章经国内小同行外审专家双盲外审,符合本刊发稿宗旨。

**作者声明:** 第一作者对研究和撰写的论文中出现的不端行为承担责任。论文中涉及的原始图片、数据(包括计算机数据库)记录及样本已按照有关规定保存、分享和销毁,可接受核查。

**文章版权:** 文章出版前杂志已与全体作者授权人签署了版权相关协议。

**开放获取声明:** 这是一篇开放获取文章,根据《知识共享许可协议》“署名-非商业性使用-相同方式共享3.0”条款,在合理引用的情况下,允许他人以非商业性目的基于原文内容编辑、调整和扩展,同时允许任何用户阅读、下载、拷贝、传递、打印、检索、超级链接该文献,并为之建立索引,用作软件的输入数据或其它任何合法用途。

#### 4 参考文献 References

- [1] Storek J, Dawson MA, Storer B, et al. Immune reconstitution after allogeneic marrow transplantation compared with blood stem cell transplantation. *Blood*. 2001;97(11):3380-3389.
- [2] Small TN. Immunologic reconstitution following stem cell transplantation. *Curr Opin Hematol*. 1996;3(6):461-465.
- [3] Elhasid R, Ben Arush MW, Pollack S, et al. Immune and hematopoietic reconstitution after transplantation of cord blood progenitor cells: case report and review of the literature. *Leukemia*. 2000;14(5):931-934.
- [4] Talvensaar K, Clave E, Douay C, et al. A broad T-cell repertoire diversity and an efficient thymic function indicate a favorable long-term immune reconstitution after cord blood stem cell transplantation. *Blood*. 2002;99(4):1458-1464.
- [5] Geenen V, Poulin JF, Dion ML, et al. Quantification of T cell receptor rearrangement excision circles to estimate thymic function: an important new tool for endocrine-immune physiology. *J Endocrinol*. 2003;176(3):305-311.
- [6] 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.
- [7] Ferrando-Martinez S, De Pablo-Bernal RS, De Luna-Romero M, et al. Thymic Function Failure Is Associated With Human Immunodeficiency Virus Disease Progression. *Clin Infect Dis*. 2017; 64(9):1191-1197.
- [8] De Voeght A, Martens H, Renard C, et al. Exploring the link between innate immune activation and thymic function by measuring sCD14 and TRECs in HIV patients living in Belgium. *PLoS One*. 2017;12(10):e0185761.
- [9] Walsh PS, Metzger DA, Higuchi R. Chelex 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material. *Biotechniques*. 1991;10(4):506-513.
- [10] 李扬秋,杨力建,陈少华,等. 实施定量PCR检测正常人外周血T细胞和胸腺细胞中sjTRECs水平[J]. *现代临床医学生物工程学杂志*, 2001, 7(6):397-400.
- [11] 王坤,金静君,杨婷,等. 荧光定量PCR检测T细胞受体删除环在亲缘与非亲缘异基因造血干细胞移植后免疫重建早期的应用[J]. *福建医药杂志*, 2017,39(5):139-143.
- [12] Parkman R, Weinberg K. Immunological reconstitution following hematopoietic stem cell transplantation. In: Thomas ED, Blume KG, Forman SJ, eds. *Hematopoietic Cell Transplantation*. 2nd ed. Oxford, England: Blackwell Science, 1999:704-711.
- [13] Ochs L, Shu XO, Miller J, et al. Late infections after allogeneic bone marrow transplantations: comparison of incidence in related and unrelated donor transplant recipients. *Blood*. 1995;86(10): 3979-3986.
- [14] Socié G, Stone JV, Wingard JR, et al. Long-term survival and late deaths after allogeneic bone marrow transplantation. Late Effects Working Committee of the International Bone Marrow Transplant Registry. *N Engl J Med*. 1999;341(1):14-21.
- [15] Hazenberg MD, Otto SA, de Pauw ES, et al. T-cell receptor excision circle and T-cell dynamics after allogeneic stem cell transplantation are related to clinical events. *Blood*. 2002;99(9):3449-3453.
- [16] 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.
- [17] Douek DC, Vescio RA, Betts MR, et al. Assessment of thymic output in adults after haematopoietic stem-cell transplantation and prediction of T-cell reconstitution. *Lancet*. 2000;355(9218): 1875-1881.
- [18] Aversa F, Terenzi A, Tabilio A, et al. Full haplotype-mismatched hematopoietic stem-cell transplantation: a phase II study in patients with acute leukemia at high risk of relapse. *J Clin Oncol*. 2005; 23(15):3447-3454.
- [19] Jiang Q, Xu LP, Liu DH, et al. Imatinib mesylate versus allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for patients with chronic myelogenous leukemia in the accelerated phase. *Blood*. 2011;117 (11):3032-3040.
- [20] Odriozola A, Riancho JA, Mijares V, et al. Chimerism detection by short tandem repeat analysis when donor and recipient genotypes are not known. *Clin Chim Acta*. 2012;413(5-6):548-551.
- [21] Weinberg K, Blazar BR, Wagner JE, et al. Factors affecting thymic function after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Blood*. 2001;97(5):1458-1466.
- [22] Storek J, Joseph A, Dawson MA, et al. Factors influencing T-lymphopoiesis after allogeneic hematopoietic cell transplantation. *Transplantation*. 2002;73(7):1154-1158.
- [23] Lewin SR, Heller G, Zhang L, et al. Direct evidence for new T-cell generation by patients after either T-cell-depleted or unmodified allogeneic hematopoietic stem cell transplantations. *Blood*. 2002; 100(6):2235-2242.
- [24] Ringhoffer S, Rojewski M, Döhner H, et al. T-cell reconstitution after allogeneic stem cell transplantation: assessment by measurement of the sjTREC/βTREC ratio and thymic naive T cells. *Haematologica*. 2013;98(10):1600-1608.
- [25] Ferrando-Martinez S, De Pablo-Bernal RS, De Luna-Romero M, et al. Thymic Function Failure Is Associated With Human Immunodeficiency Virus Disease Progression. *Clin Infect Dis*. 2017; 64(9):1191-1197.
- [26] Sutherland JS, Goldberg GL, Hammett MV, et al. Activation of thymic regeneration in mice and humans following androgen blockade. *J Immunol*. 2005;175(4):2741-2753.
- [27] Storek J, Joseph A, Espino G, et al. Immunity of patients surviving 20 to 30 years after allogeneic or syngeneic bone marrow transplantation. *Blood*. 2001;98(13):3505-3512.