

• 论著—研究报告 •

应用 TRBC1 鉴别 T 细胞克隆的研究

马耀坤^{1,2} 郑金娥^{3,4} 李小青^{3,4} 宋亮亮¹ 刘伟^{3,4} 李娟^{3,4} 商芳影¹ 张雨中¹ 杜雯^{3,4}

[摘要] 目的:研究使用流式细胞术 T 细胞抗原受体 β 恒定区 1(TRBC1) 基因单克隆抗体鉴别 T 细胞克隆方法的可靠性。方法:回顾 2021 年 6 月—2022 年 2 月的 78 例样本,分别使用流式细胞术 TRBC1 标记法、T 细胞抗原受体可变区 β 链(TCRV β)法及分子 T 细胞抗原受体(TCR)重排法,通过几种方法比较得到 TRBC1 判断 T 细胞克隆的可行性。并比较 TRBC1 法在不同疾病中的表达及与其他相关 CD 分子的共表达情况是否存在差异。结果:使用 TRBC1 法的表达率 $<15\%$ 和 $>85\%$ 作为克隆阳性判断标准,与 TCRV β 法及 TCR 重排法判断克隆性比较,差异无统计学意义($P=1.000, 0.250$);且其 kappa 值分别为 0.871 和 0.873,为高度吻合性。在不同疾病 T 细胞克隆判断中,除 TCR γ/δ 淋巴瘤外,在其他疾病 T 细胞克隆判断上均差异无统计学意义($P>0.05$)。TRBC1 的表达率与 CD2、CD3、CD4、CD5、CD7、CD8、TCR α/β 表达均无相关性($|r|<0.3$),可作为独立的判断因素。结论:使用 TRBC1 法同其他方法比较具有较高的一致性,方法可靠;且其经济高效,试验方法简单,值得临床作为 T 系克隆的判断方法进行推广。

[关键词] T 细胞克隆;流式细胞术;TRBC1;单克隆抗体

DOI:10.13201/j.issn.1004-2806.2023.04.008

[中图分类号] R329.2 **[文献标志码]** A

Identification of T cell clones by TRBC1

MA Yaokun^{1,2} ZHENG Jine^{3,4} LI Xiaoqing^{3,4} SONG Langlang¹ LIU Wei^{3,4}
LI Juan^{3,4} SHANG Fangying¹ ZHANG Yuzhong¹ DU Wen^{3,4}

(¹Flow Cytometry Laboratory, Wuhan Kindstar Medical Laboratory Co., Ltd, Wuhan, 430074, China; ²Taikang Medical School[School of Basic Medical Sciences] of Wuhan University; ³Department of Stem Cell, Union Hospital Affiliated to Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology; ⁴Biological Targeted Therapy, Key Laboratory in Hubei) Corresponding author: DU Wen, E-mail: mtxydw@hotmail.com

Abstract Objective: To investigate the reliability of flow cytometry TRBC1 monoclonal antibody in identifying T cell clones. **Methods:** Reviewing seventy-eight samples from June 2021 to February 2022, TRBC1 method, TCRV β method and TCR rearrangement method were respectively used to compare the feasibility of TRBC1 to identify T cell clones. The expression of TRBC1 with different CD molecules and in different diseases was compared. **Results:** When TRBC1 expression rate in $<15\%$ and $>85\%$ was used as the criterion for determining clonal positive, compared with TCRV β method and TCR rearrangement method, the P values were 1.000 and 0.250 respectively, and there was no significant difference. The kappa values were 0.871 and 0.873, respectively, indicating high consistency. There was no significant difference in the clonal judgment of T cells in different diseases except TCR γ/δ lymphoma($P>0.05$). CD2, CD3, CD4, CD5, CD7, CD8, TCR α/β expression and TRBC1 expression had no correlation($|r|<0.3$), which could be used as an independent diagnostic factor. **Conclusion:** Compared with other methods, TRBC1 method may have a high consistency. It may be economical, efficient and simple. It is worthy of clinical application as a judgment method of T-line cloning in clinical practice.

Key words T cell clones; flow cytometry; TRBC1; monoclonal antibody

淋巴瘤是起源于淋巴结和淋巴组织的恶性肿

瘤,有多种诱发因素、不同的临床表现和免疫组织化学特征。T 系淋巴瘤是一种来源于 T 淋巴细胞克隆性增殖的疾病,随着流式细胞术在淋巴瘤诊断中发挥的作用越来越大,临床上对流式细胞术在 T 淋巴瘤诊断上提出了新的要求^[1]。由于一些免疫性原因也会导致 T 淋巴细胞的抗原表达变化,判

¹ 武汉康圣达医学检验所有限公司流式细胞实验室(武汉, 430074)

² 武汉大学泰康医学院(基础医学院)

³ 华中科技大学同济医学院附属协和医院干细胞科

⁴ 生物靶向治疗研究湖北省重点实验室

通信作者:杜雯, E-mail: mtxydw@hotmail.com

断 T 淋巴细胞的克隆性变成为了流式细胞术诊断 T 系淋巴瘤的难题。但是相较于判断 B 淋巴细胞的克隆性^[2]而言,在判断 T 细胞克隆性时,由于缺乏敏感性和特异性,使得在诊断过程中存在一定的困难。传统流式细胞术采用 T 细胞抗原受体可变区 β 链(TCRV β 法),检测 T 细胞受体 β 链(TCR β)的 70% 克隆来判断 T 细胞的克隆,但其检测费用较高,耗费人工,临床报告解释较困难,限制了其在临床上的应用。分子生物学方面,应用 T 淋巴细胞抗原受体(TCR)的基因重排技术,分析恶性 T 淋巴细胞基因的单克隆性成为了区别 T 系淋巴瘤和正常或反应性淋巴组织增生性病变的重要手段^[2]。

近来,在对抗 TCR 单克隆抗体的筛选显示,JOVI-1 对 TCR β 的恒定区 1 域(TRBC1)具有很高的特异性^[3]。TRBC1 与 TRBC2 在 TCR 重排后表达 α/β 链时是随机表达,和 kappa 与 lambda 在 B 淋巴细胞中表达是多克隆的相似,TRBC1 的阳性群与 TRBC2 的阳性群在 T 淋巴细胞中也均有表达^[4-5]。而 TRBC1 与 TRBC2 的表达受限也成为判断 T 细胞克隆性的一种简易方法^[6]。由于缺乏 TRBC2 的商业化试剂,本文以 TRBC1 为研究对象,研究证实正常人的 TRBC1(+)与 TRBC1(-)的比例范围为 1 : 1~1 : 2,但大多数实验室以 TRBC1 的表达率 <15% 或 >85% 作为判断克隆性的标准^[7]。和 TCRV β 法一样,检测 TRBC1 方法判断 T 细胞克隆的一个已知局限性是部分 T 细胞表面不表达 TRBC1 或 TRBC2,这些 T 细胞包括 γ/δ T 细胞和表面 CD3 阴性肿瘤(成熟和不成熟)^[8]。

1 材料与方法

1.1 材料

回顾性分析 2021 年 6 月—2022 年 2 月初发时怀疑 T 系淋巴瘤的患者 78 例,基本信息见表 1。其中,基于临床及病理结果、细胞学、免疫学、分子生物学和遗传学等辅助检查综合诊断后,可明确诊断 66 例为 T 系淋巴瘤的患者。

表 1 样本的基本信息 例

性别	>50 岁	≤50 岁	合计
男	23	15	38
女	25	15	40
合计	48	30	78

1.2 流式细胞术

1.2.1 标本要求 使用肝素或 EDTA 抗凝的骨髓或外周血标本,在样本离体 48 h 内进行检测。

1.2.2 使用抗体 TCRV β (试剂公司:Beckman,货号:IM3497),即 TCRV β 法;TRBC1 抗体 panel: TRBC1-FITC(试剂公司:凯普瑞,货号:STRB-CFI04,克隆号:JOVI-1)/TCR α/β -APC(试剂公

司:Biolegend,货号:306719,克隆号:IP26)/TCR γ/δ -PE(试剂公司:BD,货号:347907,克隆号:11F2)/CD45-PerCp(试剂公司:Dako,货号:PR70101,克隆号:2D1),即 TRBC1 法。

1.2.3 处理流程 将 10^6 个细胞与 TCRV β 试剂和 TRBC1 抗体 panel 分别混合后,避光孵育 20 min,加入 1 mL 的 1X 红细胞裂解液,避光孵育 10 min;使用 1500 r/min 离心 5 min,弃上清;加入 1 mL PBS,使用 1000 r/min 离心 5 min,弃上清;加入 300 μ L 固定液重悬上机。

1.2.4 仪器 FACS Canto II 获取 5 万个细胞。

1.2.5 分析 使用 DIVA 软件对 TCRV β 与 TRBC1 抗体 panel 进行分析,得出 TCRV β 的是否存在克隆,并通过 TRBC1 分析 TRBC1 的阳性表达情况及阳性群与阴性群的比例,判断是否存在克隆。

1.3 TCR 重排

采用多重 PCR 的方法,检测 TCR 基因(TCR β 、TCR γ 、TCR δ)重排来反映 T 淋巴细胞的克隆情况,即 TCR 重排法。

1.4 统计学处理

采用 SPSS 26.0 和 GraphPad Prism 8 完成统计分析与制图,TRBC1 法 2 种判断是否存在克隆的一致性检验、TRBC1 法与 TCRV β 法判断是否存在克隆的一致性检验及 TRBC1 法与 TCR 重排法判断是否存在克隆的一致性检验使用 McNear 检验,并通过 kappa 值确定其吻合程度;TRBC1 的阳性率判断克隆的一致性采用 *t* 检验;TRBC1 法、TCRV β 法及 TCR 重排法的 3 种方法反映 T 细胞克隆一致性比较采用 χ^2 检验;TRBC1 的表达与各 CD 分子的表达相关性采用 Pearson 系数。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

TRBC1 的阳性细胞群与阴性细胞群比例 >1 : 1 和 <1 : 2 作为判断标准(比例判断法)与以使用 TRBC1 的表达率 <15% 和 >85% 作为判断标准(表达率判断法)的一致性比较,差异有统计学意义($P < 0.05$),见表 2。

表 2 TRBC1 的 2 种判断标准比较 例

方法	表达率判断法			
	阳性	阴性	合计	
比例判断法	阳性	40	18	58
	阴性	2	18	20
合计		42	36	78

比例判断法与表达率判断法分别与 TCRV β 法的一致性比较,使用比例判断法时差异有统计学意义($P < 0.05$);而使用表达率判断法时 $P > 0.05$,kappa 为 0.871 > 0.750 有高度吻合性,见表 3。

表 3 TCRVβ 法与 TRBC1 2 种判断方法的比较 例

方法	比例判断法			表达率判断法			
	阳性	阴性	合计	阳性	阴性	合计	
TCRVβ 法	阳性	37	4	41	39	2	41
	阴性	21	16	37	3	34	37
合计	58	20	78	42	36	78	

比例判断法与表达率判断法分别与 TCR 重排法的一致性比较, 2 种方法均差异无统计学意义($P>0.05$), 但使用表达率判断法作为判断标准与 TCR 重排法吻合性较高($kappa=0.873$), 见表 4。另有 5 例 TCR 重排阳性患者为 γ/δ T 淋巴瘤, 而在使用 TRBC1 作为判断 T 细胞克隆的标准时与

TCRVβ 一样, 仅针对 TCR α/β 阳性^[10-11], 故统计分析时已去除(以下涉及 TCR 重排统计时, 皆同)。

表 4 TCR 重排法与 TRBC1 2 种判断方法比较 例

方法	比例判断法			表达率判断法			
	阳性	阴性	合计	阳性	阴性	合计	
TCR 重排法	阳性	24	5	29	26	3	29
	阴性	11	8	19	0	19	19
合计	35	13	48	26	22	48	

分别以 TCRVβ 和 TCR 重排 2 种方法阳性和阴性的 2 组患者中进行 TRBC1 的表达一致性检验, 见图 1~4, TRBC1 的阳性表达率差异无统计学意义($P>0.05$)。

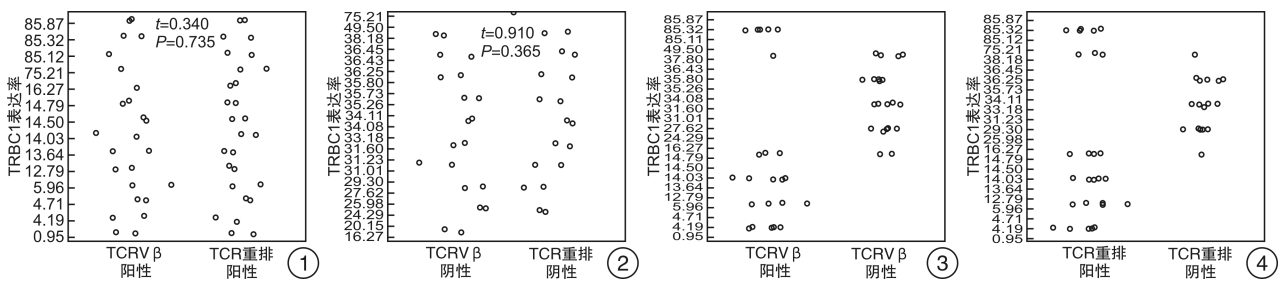


图 1 TCRVβ 和 TCR 重排阳性中 TRBC1 表达; 图 2 TCRVβ 和 TCR 重排阴性中 TRBC1 表达; 图 3 TCRVβ 法与 TRBC1 的阳性表达; 图 4 TCR 重排法与 TRBC1 的阳性表达

使用 TRBC1 抗体阳性率 $<15\%$ 和 $>85\%$ 作为克隆性判断标准(图 5, 6)、TCRVβ 检测、TCR 重排的一致性比较, 3 种方法在判断克隆性差异无统计学意义($P>0.05$), 见表 5。

表 5 使用 TRBC1 法、TCRVβ 法及 TCR 重排法比较 例

方法	阳性	阴性	合计
TRBC1 法	26	22	48
TCRVβ 法	26	22	48
TCR 重排法	29	19	48

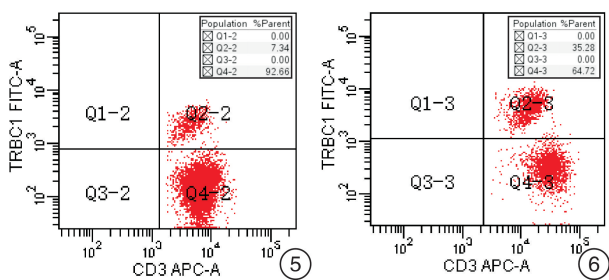


图 5 TRBC1 判断为阳性; 图 6 TRBC1 判断为阴性

在 66 例已知诊断的情况下使用 TRBC1 的阳性表达率 $<15\%$ 和 $>85\%$ 作为克隆性判断标准、TCRVβ 检测、TCR 重排的一致性比较, 见表 6、7。除 TCR $\gamma/\delta(+)$ T 淋巴瘤以外的其他疾病判断差异无统计学意义($P>0.05$)。

比较 TRBC1 与各 CD 分子之间的表达, 见图 7、图 8, 其 Pearson 系数的绝对值均 <0.3 , 为无相关性。

表 6 不同疾病使用 3 种方法一致性比较

疾病名称	例数	TCRVβ 检测	TCR 重排	TRBC1 阳性	结论
γ/δ T 淋巴瘤	5	阴性	阳性	阴性	不一致
T 淋巴细胞增殖 ¹⁾	22	阴性	阴性(8 例无 TCR 重排)	阴性	一致
T 细胞幼淋巴细胞白血病	2	阳性	无	阳性	一致
T 细胞幼淋巴细胞白血病	1	阴性	阳性	阳性	不一致
成人 T 细胞白血病/淋巴瘤	6	阳性	阳性(2 例无 TCR 重排)	阳性	一致
外周 T 细胞淋巴瘤	8	阳性	阳性(3 例无 TCR 重排)	阳性	一致
血管母 T 细胞淋巴瘤	7	阳性	阳性(3 例无 TCR 重排)	阳性	一致

¹⁾ T 淋巴细胞占淋巴细胞比例增高。

表 7 T 大颗粒细胞淋巴瘤使用 TRBC1 法、TCRVβ 法及 TCR 重排法比较

方法	阳性	阴性	合计
TRBC1 法	13	2	15
TCRVβ 法	13	2	15
TCR 重排法	15	0	15
合计	41	4	45

3 讨论

TRBC1 单抗作为 JOVI-1 对 TCRβ 的恒定区 1 域的高度特异性的抗体^[9-10], 考虑可用于鉴别 T

细胞的克隆性。通过比较使用 TRBC1 的阳性与阴性比例 1 : 1 和 <1 : 2 作为判断标准与以使用 TRBC1 的阳性表达率 <15% 和 >85% 作为判断标准^[7], 考虑两者作为判断 T 细胞克隆性的标准差异有统计学意义 (P < 0.05)。两者与 TCRVβ 进行比较, 前者 P < 0.05, 而后者 P > 0.05, 且 kappa 值为 0.871; 同时, 两者与 TCR 重排法进行比较, 差异均无统计学意义。但前者的 kappa 值为 0.262, 为低吻合性; 后者的 kappa 值为 0.873, 呈现出高度吻合性。故推荐使用 TRBC1 抗体阳性率 <15% 和 >85% 作为判断克隆阳性的标准。

表 8 TRBC1 的表达率与各 CD 分子的表达率相关性

类型	CD2	CD3	CD4	CD5	CD7	CD8	TCRα/β
Pearson 系数(r)	-0.093	-0.164	-0.081	-0.012	-0.145	-0.127	0.055
r	0.093	0.164	0.081	0.012	0.145	0.127	0.055

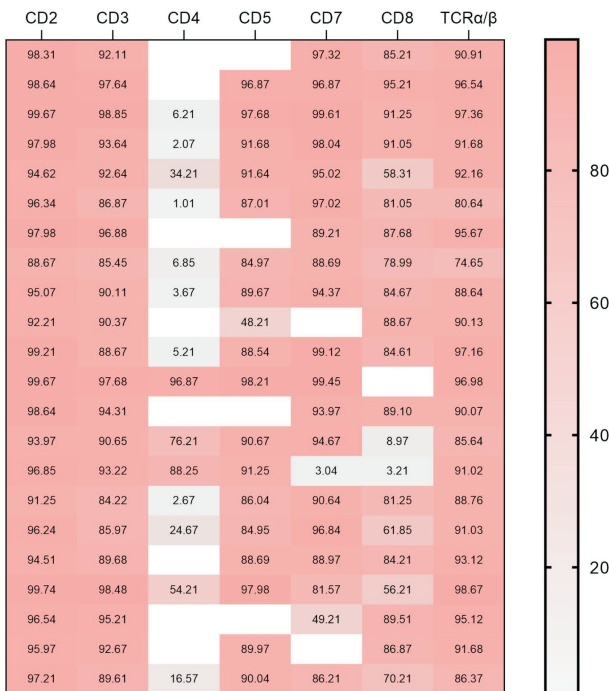


图 7 TRBC1 阳性各 CD 分子表达

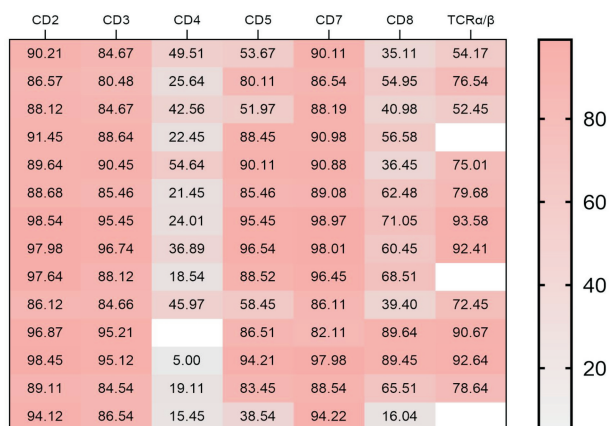


图 8 TRBC1 阴性各 CD 分子表达

以 TRBC1 抗体阳性率 <15% 和 >85% 作为判断克隆阳性的标准, 分别分析 TCRVβ 法和 TCR 重排法的阳性组和阴性组标本中 TRBC1 的表达率并进行比较。2 种方法阳性和阴性的 2 组标本中 TRBC1 的表达率均差异无统计学意义。

进一步统计采用 TRBC1 的阳性表达率 <15% 和 >85% 作为克隆阳性判断标准, 与经典的使用流式细胞术检测 TCRVβ 法和分子 TCR 重排法 3 者进行比较, 3 种方法在克隆性判断上差异无统计学意义。与同为流式细胞术检测的 TCRVβ 法比较, TRBC1 检测具有操作简便、分析简单、价格较低等优点。

有 4 例标本用 3 种方法检测结果不完全一致。按照疾病细分, 有 1 例 ALCL 的标本 TRBC1 和 TCR 重排为阳性, TCRVβ 为阴性; 2 例 T-LGL 患者, TCRVβ 法和 TRBC1 法时均为阴性, TCR 重排为阳性。还有 1 例诊断未明患者 TCRVβ 和 TCR 重排为阳性, TRBC1 为阴性。其他患者 3 种方法检测结果均一致。在 T-LGL 患者比较分析, 发现 2 例标本结果不一致, 不排除因为 TCRVβ 法和 TRBC1 法均判断蛋白水平, 而 TCR 重排法检测 DNA 水平, 二者存在差异。是否该疾病中蛋白水平可能会有较多阴性情况出现, 尚待更多的数据进行研究探讨。在 T 细胞增殖性疾病和其他成熟 T 系肿瘤亚类中, 除 ALCL 外, 其他疾病几种方法比较均差异无统计学意义, 但由于分析病例数较少, 还需累积更多病例进一步验证。

另有 5 例 γ/δ T 淋巴瘤患者出现 TCR 重排阳性, 而使用 TRBC1 法及 TCRVβ 法均判断为阴性, 结果与前期研究一致^[11-12], 使用 TRBC1 作为判断 T 细胞克隆的标准时, 与 TCRVβ 一样, 针对 α/β T 细胞, 而对 γ/δ T 细胞, 使用该方法存在局限性。

通过对 T 系抗原进行分析, TRBC1 的表达率与其他泛 T 分子的表达率均无相关性 ($|r| < 0.3$), 表明 TRBC1 的表达与传统的 CD2、CD3、CD4、CD5、CD7、CD8、TCR α/β 等标志均不相关, 可作为独立的判断因子对 T 细胞克隆性进行判断。

本研究通过将 TRBC1 法与其他常用鉴别 T 系克隆的方法进行比较, TRBC1 法作为一种简单的流式鉴别 T 细胞克隆的方法, 同其他方法比较有较高的一致性, 其经济高效、实验方法简单, 值得临床作为 T 系克隆的判断方法进行推广。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Ni X, Maiti S, Redko A, et al. Monitoring malignant T-cell clones by direct TCR expression assay in patients with leukemic cutaneous T-cell lymphoma during extracorporeal photopheresis[J]. *Photodermatol Photoimmunol Photomed*, 2022, 38(2):158-168.
- [2] 商芳影, 郑金娥, 马耀坤, 等. 运用 CLLflow 积分系统诊断中国 B 细胞慢性淋巴细胞增殖性疾病的研究[J]. *临床血液学杂志*, 2021, 34(12):841-846.
- [3] Maciocia PM, Wawrzyniecka PA, Philip B, et al. Targeting the T cell receptor β -chain constant region for immunotherapy of T cell malignancies[J]. *Nat Med*, 2017, 23(12):1416-1423.
- [4] Chen M, Wang A, Liu S, et al. Analysis of the Expression of the TRBC1 in T lymphocyte tumors[J]. *Indian J Hematol Blood Transfus*, 2021, 37(2):271-279.
- [5] Horna P, Otteson GE, Shi M, et al. Flow Cytometric Evaluation of Surface and Cytoplasmic TRBC1 Expression in the Differential Diagnosis of Immature T-Cell Proliferations[J]. *Am J Clin Pathol*, 2022, 157(1):64-72.
- [6] Shi M, Jevremovic D, Otteson GE, et al. Single Antibody Detection of T-Cell Receptor $\alpha\beta$ Clonality by Flow Cytometry Rapidly Identifies Mature T-Cell Neoplasms and Monotypic Small CD8-Positive Subsets of Uncertain Significance[J]. *Cytometry B Clin Cytom*, 2020, 98(1):99-107.
- [7] Novikov ND, Griffin GK, Dudley G, et al. Utility of a Simple and Robust Flow Cytometry Assay for Rapid Clonality Testing in Mature Peripheral T-Cell Lymphomas[J]. *Am J Clin Pathol*, 2019, 151(5):494-503.
- [8] 杨瑞, 陈灿, 李沂玮, 等. 32 例 T 大颗粒淋巴细胞白血病的临床特征分析[J]. *临床血液学杂志*, 2020, 33(7):508-513.
- [9] Horna P. Single-Antibody Detection of T-Cell Receptor Beta Chain Monotypia Resolves Uncertainties in the Identification and Quantitation of Sézary Cells By Routine Flow Cytometry; Towards Accurate and Unequivocal Blood Staging of Cutaneous T-Cell Lymphomas[J]. *Blood*, 2019, 134(Suppl1):2848-2848.
- [10] Berg H, Otteson GE, Corley H, et al. Flow cytometric evaluation of TRBC1 expression in tissue specimens and body fluids is a novel and specific method for assessment of T-cell clonality and diagnosis of T-cell neoplasms[J]. *Cytometry B Clin Cytom*, 2021, 100(3):361-369.
- [11] Shi M, Olteanu H, Jevremovic D, et al. T-cell clones of uncertain significance are highly prevalent and show close resemblance to T-cell large granular lymphocytic leukemia. Implications for laboratory diagnostics[J]. *Mod Pathol*, 2020, 33(10):2046-2057.
- [12] Horna P, Shi M, Olteanu H, et al. Emerging Role of T-cell Receptor Constant β Chain-1 (TRBC1) Expression in the Flow Cytometric Diagnosis of T-cell Malignancies[J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(4):1817.

(收稿日期:2022-10-17)

(本文编辑:叶莎)