

• 流式细胞术临床应用专题 •

TRBC1、TRBC2 双染的流式细胞术检测对 T 细胞淋巴瘤细胞克隆性判断的临床价值研究*

宋 铭¹, 陈煜娟², 程沈菊¹, 罗 珊¹, 武 坤^{1△}

1. 云南省检验医学重点实验室/云南省医学检验临床医学研究中心/昆明医科大学第一附属医院医学检验科, 云南昆明 650032; 2. 云南省临沧市人民医院血液内科, 云南临沧 677000

摘要:目的 探讨 T 细胞受体 β 链恒定区 (TRBC)1、TRBC2 双染的流式细胞术检测对 T 细胞淋巴瘤 (TCL) 细胞克隆性判断的临床价值。方法 回顾性收集昆明医科大学第一附属医院 2022 年 5 月至 2025 年 8 月应用 TRBC1 单染 (TCL 患者 28 例、非 TCL 患者 48 例) 及 TRBC1、TRBC2 双染 (TCL 患者 18 例、非 TCL 患者 25 例) 的骨髓样本资料。根据诊断结果将入选患者分为 TCL 组 (46 例) 与非 TCL 组 (73 例)。采用流式细胞术设门圈定淋巴细胞, 结合 CD3、CD5 等表型标志, 分析骨髓 $\alpha\beta$ -T 细胞、CD4⁺T 细胞、CD8⁺T 细胞亚群中 TRBC 的表达特征。结果 TRBC1 单染患者中, 非 TCL 组患者主要呈多克隆表达, TCL 组患者主要呈单克隆表达。TRBC1 单染诊断 CD4⁺CD8⁻、CD4⁻CD8⁺TCL 的灵敏度为 94%, 特异度为 96%, 阳性预测值为 91%。然而, 2 例非 TCL 组患者的 TRBC1 表达率表现为单克隆, 难以将反应性增生与肿瘤性单克隆区分, 易导致假阳性, 对于免疫表型为 CD4⁻CD8⁻的患者 TRBC1 表达缺失时, 不能简单判断为 TRBC2 表达。TRBC1、TRBC2 同步检测中, 非 TCL 均显示多克隆表达, TCL 均为单克隆表达, 以 TRBC2⁺及 CD4⁻CD8⁺类 TCL 高发。非 TCL 中 CD4⁺T 细胞的 TRBC2 表达率高于 CD8⁺T 细胞, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。与非 TCL 组相比, TCL 组 $\alpha\beta$ -T 细胞、CD4⁺CD8⁻TCL 患者中的 CD4⁺T 细胞、CD4⁻CD8⁺TCL 患者中的 CD8⁺T 细胞的 TRBC2/TRBC1, 明显偏离正常范围, 差异有统计学意义 ($P < 0.001$)。TRBC1、TRBC2 双染诊断 CD4⁺CD8⁻、CD4⁻CD8⁺TCL 灵敏度为 100%、特异度达 97%、阳性预测值为 94%, 能更好地区分反应性与克隆性增生。结论 流式细胞术 TRBC1、TRBC2 同步检测是诊断 TCL 的高效工具, 与 TRBC1 单染相比有更高的准确性和鉴别能力, 可精确判断 T 细胞克隆性及 TRBC 亚型, 对临床诊疗具有重要指导价值。

关键词:流式细胞术; T 细胞受体 β 链恒定区; T 细胞淋巴瘤; T 细胞克隆

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2026.05.004 **中图法分类号:**R446;R733.1

文章编号:1673-4130(2026)05-0540-10

文献标志码:A

Clinical application value of TRBC1 and TRBC2 dual-staining flow cytometry for clonal assessment in T-cell lymphoma*

SONG Ming¹, CHEN Yujuan², CHENG Shenju¹, LUO Shan¹, WU Kun^{1△}

1. Yunnan Key Laboratory of Laboratory Medicine/Yunnan Province Clinical Research Center for Laboratory Medicine/Department of Clinical Laboratory, the First Affiliated Hospital of Kunming Medical University, Kunming, Yunnan 650032, China; 2. Department of Hematology, The People's Hospital of Lincang City, Lincang, Yunnan 677000, China

Abstract: Objective To explore the clinical application value of T cell receptor beta constant region (TRBC)1 and TRBC2 dual-staining flow cytometry for clonal assessment in T-cell lymphoma (TCL). **Methods** Bone marrow samples were retrospectively collected from patients in the First Affiliated Hospital of Kunming Medical University between May 2022 and August 2025. Among them, 28 TCL and 48 non-TCL patients underwent TRBC1 single-staining, and 18 TCL and 25 non-TCL patients underwent TRBC1 and TRBC2 dual-staining. Based on the final diagnosis, the enrolled patients were divided into a TCL group ($n=46$) and a non-TCL group ($n=73$). Flow cytometry was used to gate lymphocytes and, in combination with phenotypic markers such as CD3 and CD5, to analyze the expression characteristics of TRBC in bone marrow $\alpha\beta$ -T cells, CD4⁺T cells,

* 基金项目: 国家自然科学基金地区科学基金项目 (82560038); 云南省/昆医大附一院重大科技专项 (2023zdp05); 云南省科技人才与平台计划临床医学研究中心专项 (202505AJ310006)。

作者简介: 宋铭, 女, 硕士研究生在读, 主要从事血液病临床流式检测应用研究。△ 通信作者, E-mail: wukun@ydy. cn。

and CD8⁺ T cell subsets. **Results** Among patients with TRBC1 single staining, patients in the non-TCL group mainly showed polyclonal expression, while patients in the TCL group mainly showed monoclonal expression. The sensitivity of TRBC1 single staining for diagnosing CD4⁺CD8⁻ and CD4⁻CD8⁺ TCL was 94%, the specificity was 96%, and the positive predictive value was 91%. However, the expression rate of TRBC1 in the two non-TCL patients showed monoclonal, which was difficult to distinguish between reactive hyperplasia and neoplastic monoclonal, and easily led to false positive. For patients with CD4⁻CD8⁻ immunophenotype, when TRBC1 expression was absent, it could not be simply judged as TRBC2 expression. In the simultaneous detection of TRBC1 and TRBC2, non-TCL showed polyclonal expression, while TCL showed monoclonal expression. TRBC2⁺ and CD4⁻CD8⁺ Type TCL were more prevalent. The TRBC2 expression rate of CD4⁺ T cells in non-TCL CD4⁺ T cells was higher than that of CD8⁺ T cells, and the difference was statistically significant ($P < 0.01$). Compared with the non-TCL group, the TRBC2/TRBC1 ratio of CD4⁺ T cells in $\alpha\beta$ -T cells and CD4⁺CD8⁻ TCL patients in the TCL group, and the CD8⁺ T cells in CD4⁻CD8⁺ TCL patients, deviated significantly from the normal range, and the difference was statistically significant ($P < 0.001$). The sensitivity, specificity and positive predictive value of TRBC1 and TRBC2 double staining in the diagnosis of CD4⁺CD8⁻ and CD4⁻CD8⁺ TCL were 100%, 97% and 94%, which could better distinguish reactive and clonal hyperplasia. **Conclusion** Simultaneous detection of TRBC1 and TRBC2 by flow cytometry is an efficient tool for diagnosing TCL. Compared with single staining of TRBC1, it has higher accuracy and discriminatory ability, and can accurately determine the clonality of T cells and TRBC subtypes, which has important guiding value for clinical diagnosis and treatment.

Key words: flow cytometry; T cell receptor beta constant region; T-cell lymphoma; T-cell clone

T 细胞淋巴瘤(TCL)是一组异质性较强的恶性淋巴瘤^[1], 占有非霍奇金淋巴瘤的 10%~15%, 侵袭性强、预后差, 5 年生存率相对较低^[2]。不同 TCL 亚型在临床表现、病理特征等方面存在明显差异^[3-4], 使得准确诊断和分类困难。目前诊断依赖于免疫表型异常、组织病理学、免疫组化、分子生物学技术(如 TCR 基因重排或二代测序等)^[5]。然而, 这些方法存在操作复杂、耗时长、对样本质量要求高, 不适用于快速筛查等局限性^[6]。流式细胞术作为血液肿瘤诊断的重要工具, 能够高效分析细胞免疫表型特征^[7], 但在 TCL 诊断中, 传统的流式分析方法缺乏同 B 细胞肿瘤中 κ 、 λ 轻链限制那样直接可靠的克隆性评估标志物^[8]。

T 细胞受体(TCR)是 T 细胞识别抗原的关键分子, 由 α 、 β 或 γ 、 δ 两条链组成, 其中, α 、 β 型 TCR 占外周血 T 细胞的 95% 以上^[9-10]。T 细胞受体 β 链恒定区(TRBC)中的 TRBC1 和 TRBC2 编码的蛋白序列高度同源, 存在的氨基酸差异为 T 细胞的克隆性分析提供了分子基础^[11]。TCR β 链基因重排使得 T 细胞只表达 TRBC1 或 TRBC2 中的一种, 类似于 B 细胞表面 κ 、 λ 轻链的表达, 这一互斥表达模式为流式细胞术检测 T 细胞克隆性提供了理论基础, 并且使其成为靶向治疗的理想靶点^[12-13]。已有研究证实, 通过流式细胞术检测 TRBC1 的表达情况可作为诊断 T 细胞淋巴瘤增殖性疾病(T-CLPD)的有效手段^[14-15]。因此, 发展一种基于 TRBC1 和 TRBC2 同步检测的流式细胞

术检测方法, 能够快速、准确评估 T 细胞克隆性, 对提高 TCL 的诊断准确性具有重要意义。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取 2022 年 5 月至 2024 年 5 月在昆明医科大学第一附属医院(以下简称本院)行 TRBC1 单染的 T 细胞淋巴瘤患者 28 例[男 16 例, 女 12 例, 年龄 59(40, 72)岁]及非 TCL 患者 48 例[男 24 例, 女 24 例, 年龄 55(38, 68)岁], 基本信息见表 1。另选取 2024 年 5 月至 2025 年 8 月在本院行 TRBC1、TRBC2 双染的 TCL 患者 18 例[男 8 例, 女 10 例, 年龄 47(41, 70)岁], 非 TCL 患者 25 例[男 10 例, 女 15 例, 年龄 55(32, 62)岁], 基本信息见表 2。根据诊断结果将入选患者分为 TCL 组(46 例)与非 TCL 组(73 例), 两组患者年龄、性别差异无统计学意义($P > 0.05$)。本研究已通过医院医学伦理委员会审批[审批号:(2025)伦审 QL 第一号]。

表 1 TCL 组患者样本信息(n)

诊断	TRBC1 单染	TRBC1、TRBC2 双染
T 淋巴瘤母细胞性淋巴瘤	1	1
胃肠 TCL	2	0
原发性皮肤 TCL	1	0
外周 TCL	2	2
血管免疫母细胞性 TCL	2	0
TCL 未分型	7	4

续表 1 TCL 组患者样本信息 (n)

诊断	TRBC1 单染	TRBC1、TRBC2 双染
间变大细胞淋巴瘤	0	1
成熟 TCL	0	1
T 细胞大颗粒淋巴细胞白血病	13	9
合计	28	18

表 2 非 TCL 组患者样本信息 (n)

诊断	TRBC1 单染	TRBC1、TRBC2 双染
贫血	14	5
淋巴肿大	3	1
发热	7	8
感染	2	3
甲状腺结节	1	0
不明原因细胞减少	14	7
MDS	3	0
脾大	4	1
合计	48	25

1.2 纳入与排除标准 TCL 组纳入标准:符合 2022 年世界卫生组织 TCL 诊断标准;临床资料完整,能够积极配合观察。排除标准:合并其他恶性肿瘤;伴有心、肝、肾功能不全;精神疾病;妊娠期或哺乳期女性。非 TCL 组纳入标准:无重大疾病、家族病史。排除标准同 TCL 组排除标准。所有参与者及家属均签署知情同意书。

1.3 方法

1.3.1 主要试剂、仪器、软件 试剂:红细胞裂解液(10 倍浓缩红细胞裂解液)、磷酸盐缓冲液(PBS)。配制红细胞裂解液:80.2 g NH₄Cl、8.4 g KHCO₃、0.37 g 乙二胺四乙酸(EDTA)与 2 g 牛血清白蛋白(BSA)混合,用纯水定容至 1 L 配制 10 倍浓缩红细胞裂解液;采用 HCL 或 KOH 调节 pH 值至 7.2~7.4,再用 10 倍浓缩红细胞裂解液与去离子水 1:9 稀释,4 °C 冷藏保存。抗体:荧光标记的小鼠抗人单克隆抗体 CD45-Percep/Cy5.5、CD4-FITC、CD7-PE、CD5-APC、CD3-PE/Cy7、CD8-APC/Cy7、TCR-αβ-FITC、TCR-γδ-PE、CD45RO-PE、CD45RA-APC、CD57-FITC、TRBC1-APC、TRBC2-PE,见表 3。仪器软件:采用 BD FACSCanto II 流式细胞仪(美国 BD 公司)获取细胞,采用 BD FACSDiva 软件(美国 BD 公司)和 Kaluza(美国贝克曼库尔特公司),分析获取 50 000 个有核细胞,获取至少 2 000 个淋巴细胞。

1.3.2 标本采集及检测 使用肝素抗凝管采集骨髓样本,离体 24~48 h 内进行检测。取混匀肝素抗凝的骨髓标本 2 mL,加入 8 mL 稀释后的红细胞裂解液,

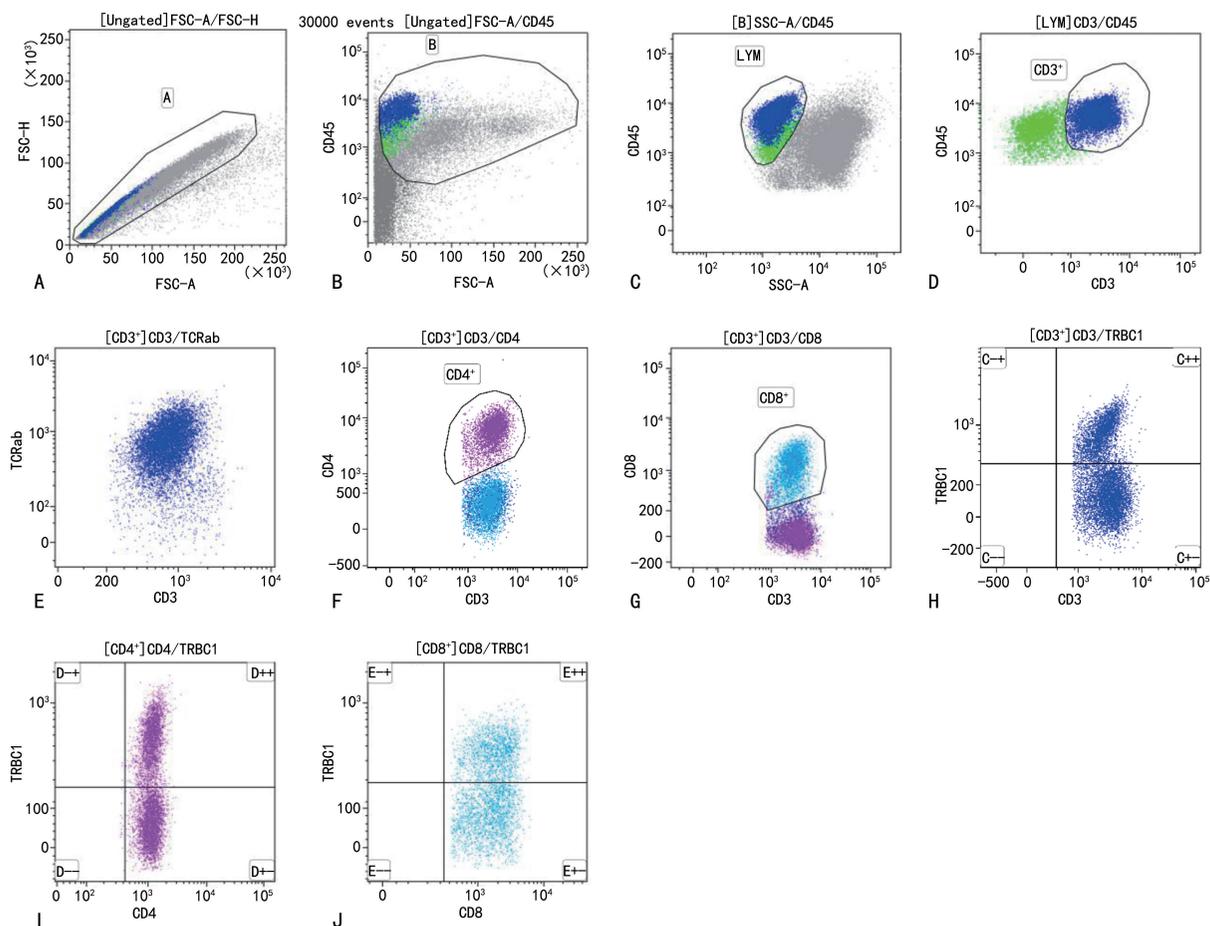
溶血 15 min,1 700 r/min 离心 5 min,弃去上清后,加 8 mL PBS 重悬细胞团,振荡后再次 1 700 r/min 离心 5 min,弃去上清,加入适量 PBS,过滤后加于每管。按照单克隆荧光抗体组合方案,各管加入相应抗体,避光 15 min,加入红细胞裂解液 1 mL,1 700 r/min 离心 5 min,弃去上清,加入 2 mL PBS,振荡后 1 700 r/min 离心 5 min,弃去上清,加入 0.13 mL PBS 振荡,2~4 h 内上机检测。

设门:去粘连细胞、去碎片后圈定淋巴细胞、T 淋巴细胞,根据 CD3 的表达进行门控,αβ-T 细胞根据 TCRαβ 和 CD3 进行门控。在 αβ-TCD3⁺、αβ-TCD4⁺、αβ-TCD8⁺ 的亚群中分析 TRBC1 和 TRBC2 的表达。图 1 A~J 为 TRBC1 单染的设门策略,图 2 A~I 为 TRBC1、TRBC2 双染的设门策略。定义阈值:CD4/CD8 比值异常判断界值为 <1.5 和 >2.5;TRBC1 单染使用 TRBC1 的表达率 <15%、>85% 作为单克隆判断标准^[15];TRBC1、TRBC2 双染使用 TRBC1 或 TRBC2 的表达率 <15%、>85% 作为单克隆判断标准^[16]。

表 3 流式细胞术单克隆抗体

靶向分子	荧光素	克隆号	厂家
CD45	Percep/Cy5.5	HI30	美国 BD 公司
CD3	PE/Cy7	SK7	美国 BD 公司
CD7	PE	M-T701	美国 BD 公司
CD5	APC	L17F12	美国 BD 公司
CD4	FITC	SK3	美国 BD 公司
CD8	APC	SK1	美国 BD 公司
TCRαβ	FITC	WT31	美国 BD 公司
TCR-γδ	FITC	11F2	美国 BD 公司
CD45RO	PE	UCHL1	美国 BD 公司
CD45RA	APC	L48	美国 BD 公司
CD57	FITC	HNK-1	美国 BD 公司
TRBC1	APC	JOVI.1	郑州凯普瑞公司
TRBC2	PE	CBI.105	郑州凯普瑞公司

1.4 统计学处理 采用 SPSS27.0 和 GraphPad Prism10.0 完成统计分析与制图。计数资料以频数和百分率表示,采用 χ² 检验。根据数据分布类型,呈偏态分布的计量资料以 M(Q₁, Q₃) 表示,两组间比较采用 Mann-Whitney U 检验,多组间比较采用 Kruskal-Wallis H 检验,多重比较通过 Bonferroni 校正法调整显著性值。对单染及双染 CD4⁺CD8⁻ TCL、CD4⁻CD8⁺ TCL 患者克隆性表达的临床诊断效能分析分别采用受试者工作特征(ROC)曲线,获取曲线下面积(AUC)、95%CI、灵敏度、特异度等。取双侧检验,以 P<0.05 为差异有统计学意义。



注：A~J 为 TRBC1 单染的设门策略。

图 1 TRBC1 单染流式细胞设门

2 结 果

2.1 TRBC1 单染的表达情况 非 TCL 组患者以 CD4/CD8 比值正常占比较高, TRBC1 的表达以多克隆为主, 2 例为单克隆表达, 见图 3、4 及表 4。TRBC1 在 $\alpha\beta$ -T 细胞中的表达率为 37.25% (32.73%, 41.20%), CD4⁺T 细胞中 TRBC1 的表达率为 40.75% (36.13%, 67.86%), CD8⁺T 细胞的表达率为 36.30% (33.05%, 41.48%), CD4⁺T 细胞的表达率高于 CD8⁺T 细胞, 差异有统计学意义 ($P=0.01$), 见表 5。

TCL 组患者 TRBC1 表达率以单克隆为主, 1 例表现为多克隆。TCL 组 $\alpha\beta$ -T 细胞、CD4⁺CD8⁻TCL 中的 CD4⁺T 细胞、CD4⁻CD8⁺TCL 中的 CD8⁺T 细胞的 TRBC1 表达率与非 TCL 组相比具有显著克隆性, 呈限制性表达, 见图 3、4 及表 4。免疫表型以 CD4⁻CD8⁺、CD4⁺CD8⁻ 为主, 其中 CD4⁻CD8⁺TCL 中 CD8⁺T 细胞的 TRBC1 表达率明显高于 CD4⁺T 细胞, CD4⁺T 细胞中 TRBC1 表达率为 35.43% (31.85%, 37.95%) 呈多克隆表达, CD8⁺T 细胞表达为 89.33% (84.85%, 95.80%) 呈单克隆表达, 见表 4; CD4⁺CD8⁻TCL 中 CD4⁺T 细胞的 TRBC1 表达率为 88.34% (85.25%, 96.40%) 明显高于 CD8⁺T 细胞的表达率 31.41% (28.93%, 35.00%), 表现出显

著的单克隆性, 见图 4、表 5。

2.2 TRBC1、TRBC2 双染的表达情况 25 例非 TCL 组患者 TRBC 的表达情况表现为 TRBC1 和 TRBC2 混合表达, CD4/CD8 比值以正常为主。 $\alpha\beta$ -T 细胞、CD4⁺T 细胞和 CD8⁺T 细胞亚群 TRBC2、TRBC1 表达率均呈多克隆表达; TRBC2⁺TCL 患者 CD8⁺T 细胞表达明显高于 CD4⁺T 表达, 差异有统计学意义 ($P<0.01$)。见表 6、7 及图 5。

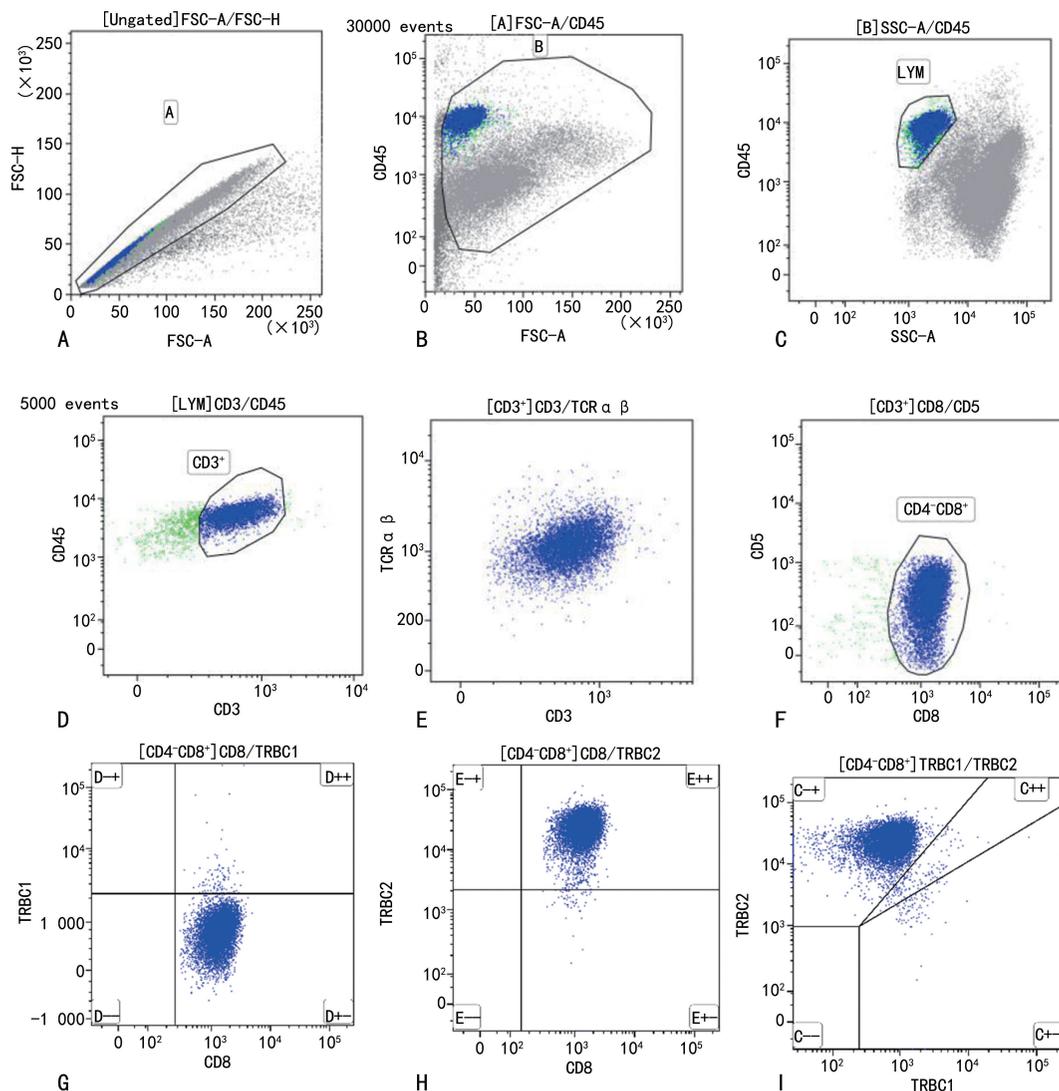
在 18 例 TCL 组患者中, TRBC2⁺TCL 患者占比较高, CD4/CD8 的比值以异常为主, 免疫表型以 CD4⁺CD8⁻、CD4⁻CD8⁺ 为主; CD4⁻CD8⁻ 的 TCL 患者表现出 TRBC1、TRBC2 表达缺失, 其余表型 TCL 患者的所有疾病类别中均观察到 TRBC1 限制性或 TRBC2 限制性, 均表现为单克隆性。见表 6、图 5。

在 CD4⁻CD8⁺TCL 患者中, TRBC2⁺的 $\alpha\beta$ -T 细胞 TRBC2 的表达率为 87.92% (84.89%, 92.53%), 呈单克隆表达, 而 CD8⁺T 细胞 TRBC2 的表达率 (呈单克隆表达) 明显高于 CD4⁺T 细胞 (呈多克隆表达), 差异有统计学意义 ($P<0.001$); 在 CD4⁺CD8⁻TCL 患者中, TRBC2⁺的 $\alpha\beta$ -T 细胞 (呈单克隆表达) 的表达率、CD4⁺T 细胞的表达率明显高于 CD8⁺T 细胞的表达率, 差异有统计学意义 ($P<0.001$)。见表 7。

与非 TCL 组患者相比, CD4⁺CD8⁻TCL、CD4⁻

CD8⁺TCL 的 TRBC2/TRBC1 比值明显偏离正常范围(0.18~5.70),如 CD8⁺T 细胞在非 TCL 组中 TRBC2/TRBC1 比值为 1.16(0.64, 2.06),在 CD4⁻

CD8⁺TCL 组 TRBC1⁺患者中比值为 0.14(0.10, 0.16),TRBC2⁺患者中比值为 9.75(8.02,48.86),差异有统计学意义($P < 0.01$),见表 8、图 6。



注:A~I 为 TRBC1、TRBC2 双染的设门策略。

图 2 TRBC1、TRBC2 双染流式设门策略

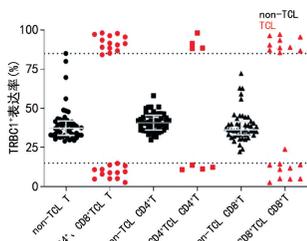


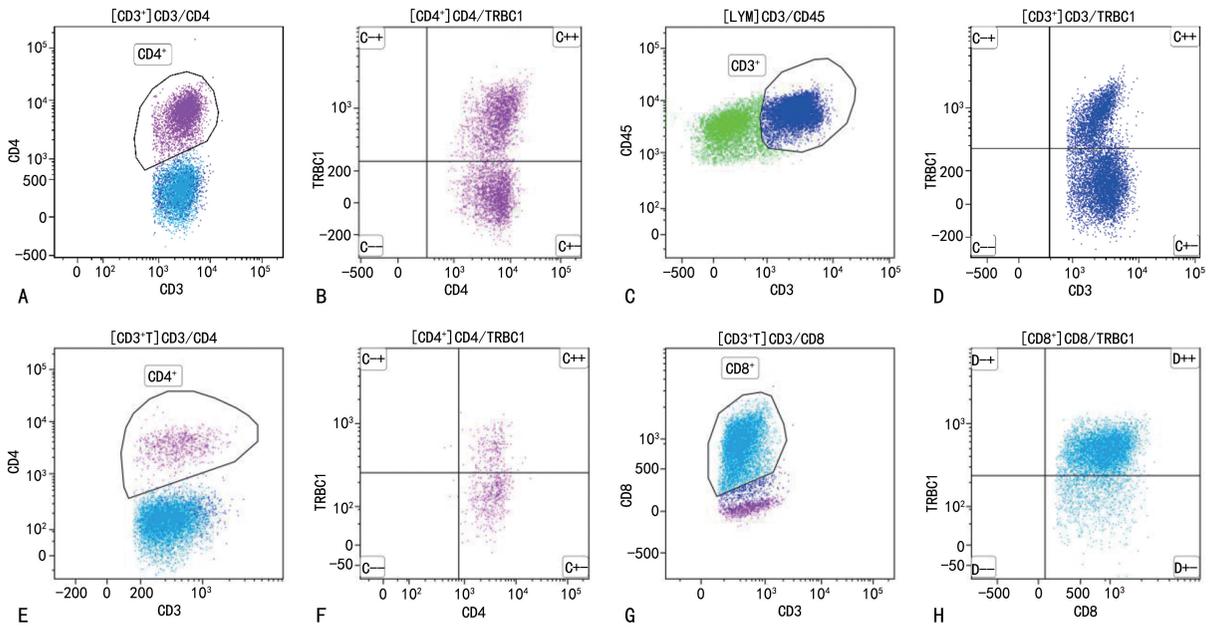
图 3 TCL 组与非 TCL 组患者 TRBC1 单染克隆性表现

2.3 TRBC1、TRBC2 单染与双染的诊断效能 TRBC1 诊断 CD4⁺CD8⁻、CD4⁻CD8⁺TCL 的 AUC 为 0.98(95%CI:0.95~1.00),灵敏度为 94%,特异度为 96%,阳性预测值为 91%。TRBC1、TRBC2 同步检测诊断 CD4⁺CD8⁻、CD4⁻CD8⁺TCL 的 AUC 为 1.00,灵敏度为 100%、特异度为 96%、阳性预测值为 94%。

表 4 TRBC1 单染免疫表型分析[n(%)]

组别	n	CD4/CD8		TRBC1 克隆性		免疫表型			
		正常	异常	单克隆	多克隆	CD4 ⁺ CD8 ⁻	CD4 ⁻ CD8 ⁺	CD4 ⁺ CD8 ⁺	CD4 ⁻ CD8 ⁻
非 TCL 组	48	42(87.50)	6(12.50)	2(4.17)	46(95.83)	—	—	—	—
TCL 组	28	4(14.29)	24(85.71)	27(96.43)	1(3.57)	7(25.00)	18(64.29)	1(3.57)	2(7.14)

注:—表示无数据。



注:A、B为1例非TCL患者CD4⁺T细胞中TRBC1呈多克隆表达;C~H分别为1例CD4⁻CD8⁺TCL患者CD3⁺T细胞、CD4⁺T细胞、CD8⁺T细胞中TRBC1表达情况。

图4 TCL组与非TCL组患者TRBC1单染表达特征

表5 TRBC1单染在αβ-T、CD4⁺T、CD8⁺T细胞中的表达情况[M(Q₁, Q₃), %]

组别	n	TRBC1单染	αβ T TRBC1	CD4 ⁺ T TRBC1	CD8 ⁺ T TRBC1	H/Z	P
非TCL组	48	—	37.25(32.73, 41.20) ^{ab}	40.75(36.13, 67.86) ^a	36.30(33.05, 41.48) ^b	7.69	0.01
TCL组							
CD4 ⁺ CD8 ⁻	7	TRBC1 ⁺	87.75(86.12, 88.40) ^a	88.34(85.25, 96.40) ^a	31.41(28.93, 35.00) ^b	10.83	<0.01
		TRBC1 ⁻	10.71(5.05, 11.25)	13.70(13.50, 13.75)	—	15.32	<0.01
CD4 ⁻ CD8 ⁺	18	TRBC1 ⁺	87.13(84.59, 88.62) ^a	35.43(31.85, 37.95) ^b	89.33(84.85, 95.80) ^a	23.52	<0.01
		TRBC1 ⁻	8.11(6.80, 12.78)	—	12.40(5.95, 14.35)	12.71	*<0.01

注:—表示无数据;经Kruskal-Wallis H检验差异有统计学意义,随后进行两两比较,同行字母相同表示差异无统计学意义,字母不同表示差异有统计学意义;*表示Z值。

表6 TRBC1、TRBC2双染免疫表型分析[n(%)]

组别	n	CD4/CD8		CD45RA, RO		TRBC1, TRBC2	
		正常	异常	CD45RA ⁺	CD45RO ⁺	TRBC1 ⁺	TRBC2 ⁺
非TCL组	25	19(76.00)	6(24.00)	—	—	25(100.00)	—
TCL组	18	5(27.78)	13(72.22)	7(38.89)	11(61.11)	6(33.33)	12(66.67)

组别	n	TRBC1、TRBC2克隆性		免疫表型			
		单克隆	多克隆	CD4 ⁺ CD8 ⁻	CD4 ⁻ CD8 ⁺	CD4 ⁺ CD8 ⁺	CD4 ⁻ CD8 ⁻
非TCL组	25	0(0.00)	25(100.00)	—	—	—	—
TCL组	18	18(100.00)	0(0.00)	6(33.33)	11(61.11)	0(0.00)	1(5.56)

注:—表示无数据。

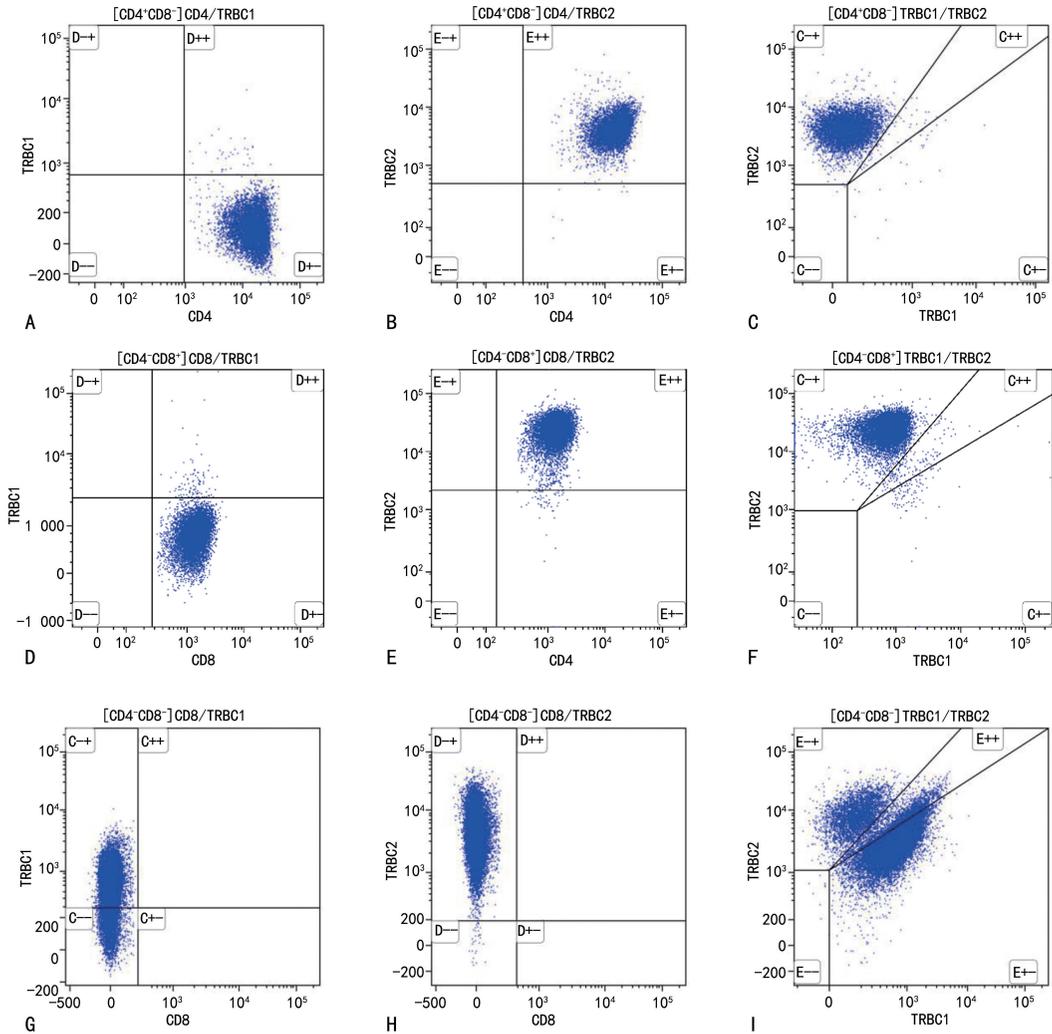
表7 TRBC1、TRBC2双染在αβ-T、CD4⁺T、CD8⁺T细胞中的表达情况[M(Q₁, Q₃), %]

组别	n	TRBC双染	αβ-T	CD4 ⁺ T	CD8 ⁺ T	H/Z	P
非TCL组	25	TRBC1 ⁺	36.27(27.13, 49.26) ^b	40.37(34.64, 53.36) ^a	38.12(25.27, 54.31) ^{ab}	4.50	0.04
		TRBC2 ⁺	48.51(38.85, 62.31) ^c	50.56(41.27, 61.56) ^b	53.43(44.86, 72.07) ^a	9.94	<0.01
TCL组							
CD4 ⁺ CD8 ⁻	6	TRBC1 ⁺	87.54(86.37, 88.91) ^b	90.93(91.48, 93.86) ^a	37.4(31.48, 44.83) ^c	11.43	<0.01

续表 7 TRBC1、TRBC2 双染在 $\alpha\beta$ -T、CD4⁺T、CD8⁺T 细胞中的表达情况[M(Q₁, Q₃), %]

组别	n	TRBC 双染	$\alpha\beta$ -T	CD4 ⁺ T	CD8 ⁺ T	H/Z	P
CD4 ⁻ CD8 ⁺	11	TRBC1 ⁻	11.30(9.06, 3.64)	8.25(1.34, 12.26)	—	-2.26*	0.02
		TRBC2 ⁺	88.38(87.99, 89.71) ^b	91.79(87.14, 97.09) ^a	59.57(55.45, 65.35) ^c	13.94	<0.01
		TRBC2 ⁻	12.37(8.78, 14.03)	6.21(3.22, 11.76)	—	-2.02*	0.04
		TRBC1 ⁺	87.39(84.56, 89.62) ^b	36.55(31.21, 44.65) ^c	89.73(86.77, 91.63) ^a	18.07	<0.01
		TRBC1 ⁻	10.79(5.23, 14.06)	—	5.12(2.17, 12.18)	-1.93*	0.04
		TRBC2 ⁺	87.92(84.89, 92.53) ^a	54.38(48.85, 61.18) ^b	88.07(85.84, 97.80) ^c	21.13	<0.01
		TRBC2 ⁻	12.37(7.50, 15.21)	—	5.53(2.57, 13.07)	-2.43*	0.01

注：—表示无数据；经 Kruskal-Wallis H 检验差异有统计学意义，随后进行两两比较，同行上标字母相同表示差异无统计学意义，不同表示差异有统计学意义；*表示 Z 值。



注：A~C 为 1 例 CD4⁺CD8⁻TCL 患者 CD4⁺T 细胞群 TRBC1、TRBC2 呈单克隆表达；D~E 为 1 例 CD4⁻CD8⁺ 细胞淋巴瘤患者 CD8⁺T 细胞群 TRBC1、TRBC2 呈单克隆表达；G~I 为 1 例 CD4⁻CD8⁻TCL 患者 TRBC1、TRBC2 呈表达缺失。

图 5 TRBC1、TRBC2 双染典型的单型性表达

表 8 $\alpha\beta$ -T、CD4⁺T、CD8⁺T 细胞中 TRBC2⁺/TRBC1⁺ 表达情况[M(Q₁, Q₃), %]

组别	n	TRBC 双染	$\alpha\beta$ -T	CD4 ⁺ T	CD8 ⁺
			TRBC2 ⁺ /TRBC1 ⁺	TRBC2 ⁺ /TRBC1 ⁺	TRBC2 ⁺ /TRBC1 ⁺
非 TCL 组	25	—	1.09(0.90, 1.57) ^c	1.06(0.88, 1.37) ^b	1.16(0.64, 2.06) ^b
TCL 组					
CD4 ⁺ CD8 ⁻	6	TRBC1 ⁺	0.13(0.10, 0.19) ^d	0.03(0.02, 0.04) ^c	0.98(0.56, 1.17) ^b
		TRBC2 ⁺	6.51(5.93, 7.38) ^b	11.09(8.79, 43.39) ^a	

续表 8 $\alpha\beta$ -T、CD4⁺T、CD8⁺T 细胞中 TRBC2⁺/TRBC1⁺ 表达情况[M(Q₁, Q₃), %]

组别	n	TRBC 双染	$\alpha\beta$ -T	CD4 ⁺ T	CD8 ⁺
			TRBC2 ⁺ /TRBC1 ⁺	TRBC2 ⁺ /TRBC1 ⁺	TRBC2 ⁺ /TRBC1 ⁺
CD4 ⁻ CD8 ⁺	11	TRBC1 ⁺	0.14(0.11, 0.17) ^d	1.34(0.77, 1.85) ^b	0.14(0.10, 0.16) ^e
		TRBC2 ⁺	7.52(6.38, 17.85) ^a		9.75(8.02, 48.86) ^a
H			31.35	28.36	25.71
P			<0.001	<0.001	<0.001

注：—表示无数据；经 Kruskal-Wallis H 检验差异有统计学意义，随后进行两两比较，同列上标字母相同表示差异无统计学意义，不同表示差异有统计学意义。

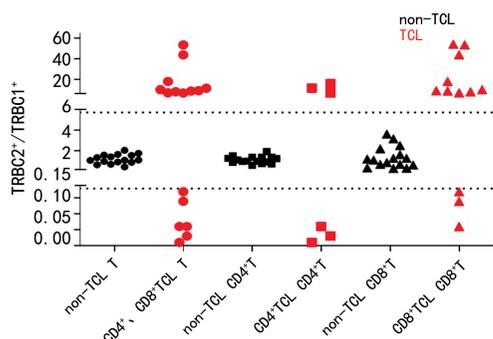


图 6 TCL 组与非 TCL 组患者 TRBC1、TRBC2 克隆性表现

3 讨论

TCL 为一种异质性疾病，病因复杂，诊断难度大，常因与反应性 T 细胞增生难以区分而延误。TRBC1 抗体的问世为流式细胞术评估 T 细胞克隆性带来了突破，近期 TRBC2 抗体也已逐步应用于流式检测^[16-19]。本研究通过引入 TRBC1、TRBC2 双染策略，深入探讨 TRBC1、TRBC2 双染在 TCL 诊断中的优势，评估其在克服 TRBC1 单染局限性、提高诊断准确性等方面的临床价值。

在 TRBC1 单染分析中，有研究报道健康人群的 TRBC1 表达呈多克隆性，TRBC1 的表达率为 15%~85%^[15]，正常和反应性 CD4⁺T 和 CD8⁺T 细胞的 TRBC1⁺ 平均表达量分别为 43% 和 35%，CD4⁺T 细胞表达率高于 CD8⁺T 细胞，大多数研究将克隆阈值设定为 TRBC1 表达率 <15% 或 >85%^[20-21]。本研究在非 TCL 组患者中也观察到多克隆 TRBC1 表达模式，CD4⁺T 细胞 TRBC1 表达率高于 CD8⁺T 细胞，与既往健康人群报道一致，而非 TCL 组患者中有 2 例 TRBC1 的表达率达到克隆阈值，这可能是由于生理性免疫应答(如 EB 病毒感染、自身免疫性疾病等)引起的反应性克隆性 T 细胞扩增。此外，意义未明的 T 细胞克隆性增殖(T-CUS)在健康人或非肿瘤患者中普遍存在，其微小 T 细胞克隆可能导致 TRBC1 阳性比例暂时性偏离正常范围，TRBC1 单染可能将这种寡克隆反应性增生误判为单克隆，从而无法很好地识别 T-CUS^[22]。有研究发现，TRBC1 单染在区分反应性克隆与肿瘤克隆方面的挑战，尤其是在 T-CUS

和 T 细胞大颗粒淋巴细胞白血病(T-LGLL)之间存在免疫表型重叠，使得鉴别诊断尤为困难^[22-23]。TRBC1 单染与 TRBC1、TRBC2 双染的 TCL 组均以 T-LGLL 占比较高，TRBC1、TRBC2 作为克隆标志物，在 T-LGL 中其克隆 T 细胞更容易获得，常用于流式细胞术分析^[24]。在淋巴瘤发生免疫表型转移的情况下，其与反应性增殖或残留细胞的鉴别也尤为困难^[22]，而 TRBC1 在检测小克隆 T 细胞群体方面具有较高的敏感性，但是其存在一定的局限，单染可能会将寡克隆反应性增生误判为单克隆，不能很好地识别 T-CUS。TRBC1 和 TRBC2 同步检测能够快速识别 T-CUS，进行精确诊断。有研究表明，TRBC1 和 TRBC2 双染可以有效解决 TRBC1 单染中“TRBC1-dim”的模糊结果，并通过 TRBC1 和 TRBC2 的表达率及 TRBC2:TRBC1 比例来更清晰地界定克隆性^[16,25-26]。

在 TRBC 双染结果分析中，多数研究也将克隆阈值设定为 TRBC1 或 TRBC2 表达率 <15% 或 >85%。25 例非 TCL 组患者均表现为多克隆表达，18 例 TCL 患者的骨髓标本中，无论何种疾病类别均观察到 TRBC1 或 TRBC2 限制性表达。TCL 组患者的 $\alpha\beta$ -T 细胞、CD4⁺CD8⁻TCL 中的 CD4⁺T 细胞、CD4⁻CD8⁺TCL 中的 CD8⁺T 细胞的 TRBC 表达率与非 TCL 组相比具有显著的克隆性，表明了 TRBC 限制性是肿瘤患者 T 细胞亚群特有的特征。TCL 患者 CD4/CD8 以异常为主，提示机体细胞免疫功能紊乱。值得注意的是，以 CD4⁻CD8⁺的 TCL 表型高发单克隆性，TRBC2⁺TCL 占比较高(67%)，这对预测适合 TRBC1 和 TRBC2 靶向治疗的患者群体具有重要意义^[13]，未来可重点开发以 TRBC2 为靶向治疗方向的治疗方案。本研究中，TRBC1 和 TRBC2 同步检测的灵敏度、特异度、阳性预测值均高于 TRBC1 单染，显著提升了诊断效能。

然而，TRBC1 单染的 TCL 患者中观察到两例 TCL 患者免疫表型为 CD4⁻CD8⁻，表现为 TRBC1 表达缺失。这种情况下，肿瘤样本不能简单推断为 TRBC2 单克隆。TRBC1 表达缺失可能是由于缺乏表面 CD3、TCR(“裸 T 细胞”表型)或者是 $\gamma\delta$ -T 细胞(不表

达 TRBC1 和 TRBC2), 属于 TRBC1 单染无法直接识别的特殊恶性克隆^[8]。本研究还在 TRBC1、TRBC2 双染结果中观察到有 1 例 CD4⁻CD8⁻ 的 TCL 患者, 在 TRBC1、TRBC2 双染下 TRBC 表达缺失, TCR- $\gamma\delta$ 未提示为 $\gamma\delta$ -T 细胞, 而是由于缺乏表面 CD3、TCR (裸 T 细胞表型), TRBC1 和 TRBC2 均阴性。这类肿瘤无法通过常规 TRBC 标记识别, 易被漏诊。

根据 HORAN 等^[16]报道健康人群总 T 细胞 TRBC2/TRBC1 比值中位数为 1.6(1.3~2.0), CD4⁺与 CD8⁺T 细胞分别为 1.3(1.2~1.6)和 1.8(1.5~2.7), 并且 TRBC1 和 TRBC2 表达相对稳定的比例为区分恶性克隆提供了可靠参考^[17]。本研究结果发现, TCL 的肿瘤细胞由于 TRBC1、TRBC2 的表达异常而使 TRBC2/TRBC1 比值明显偏离正常范围, 进一步反映其限制性表达。非 TCL 组患者骨髓中 TRBC2/TRBC1 比值略低于普遍研究中健康人群, TRBC1 表达略有升高, 这种变化可能由于组织特异性免疫特征, 说明在不同组织来源样本中 TRBC1、TRBC2 的表达存在一定的差异, 也提示应建立基于组织来源(外周血、骨髓、淋巴结等)的参考区间。

TRBC1、TRBC2 双染凭借其其对 TRBC 限制性表达的高灵敏度(可达 10^{-5})与特异度, 显著提升了微小残留病(MRD)的检测能力, 对于早期识别复发、评估疗效与预后至关重要, TRBC1、TRBC2 同步检测已成为流式细胞术检测 MRD 检测的重要工具^[27-28]。近期研究指出, PD-1 和 TRBC1 联合泛 T 细胞抗体可以灵敏地监测微小残留疾病, 不受肿瘤 T 细胞抗原漂移的影响^[28]。这意味着即使肿瘤细胞表面抗原发生变化, TRBC1 或 TRBC2 作为相对稳定的肿瘤特异性标志物, 仍能有效地追踪 MRD, 为临床决策提供及时准确的信息。

在治疗指导方面, TRBC1、TRBC2 同步检测能为新兴的靶向治疗提供关键信息^[13, 29-30]。目前针对 TRBC1 或 TRBC2 的 CAR-T 疗法已进入临床试验阶段^[31], 为复发、难治性患者提供了新的希望。然而, 研究也发现了一些耐药机制, 如 TRBC1 和 TRBC2 使用的克隆异质性及 TCR 表达的缺失, 可能成为 TRBC 导向的 CART 细胞疗法的原发性耐药机制^[30]。

TRBC1、TRBC2 双染技术在 TCL 的精准医疗中前景广阔。随着对 TCL 分子机制认识的深入, 更多 TRBC 靶向治疗药物的研发, 这一技术将发挥越来越重要的作用。然而, 本研究的样本量相对较小, 特别是双染组, 需要扩大 TCL 样本量, 在更大规模、多中心的队列中进行验证, 以提高结果的普遍性和统计学效力。另外, 由于 TCR $\gamma\delta$ 阳性 T 细胞和 CD3 阴性细胞(如良性胸腺细胞、CD3 阴性肿瘤)在 TRBC 染色中既不表达 TRBC1, 也不表达 TRBC2, 故需联合 CD3、

CD56 或 TCR $\alpha\beta$ 、TCR- $\gamma\delta$ 等其他标志物进行检测, 以全面评估 T 细胞群体^[32], 并且需要排除非肿瘤性 TRBC1、TRBC2 异常, 如 EBV 感染相关 T 细胞增生^[33]。

综上所述, TRBC1、TRBC2 同步检测为 TCL 的诊断和治疗带来了新的机遇, 在常规分型诊断、克隆性判断、预后预测及治疗靶点选择中有重要临床价值。TRBC1、TRBC2 同步检测不仅克服了 TRBC1 单染的局限性, 提高了克隆性诊断的准确性和敏感性, 更在 MRD 监测和 CAR-T 细胞治疗等新兴靶向疗法中发挥了不可或缺的作用, 有望改善患者诊断流程和治疗效果, 提升患者生存质量与长期生存率。

参考文献

- [1] IYER A, HENNESSEY D, GNIADOCKI R. Clonotype pattern in T-cell lymphomas map the cell of origin to immature lymphoid precursors[J]. *Blood Adv*, 2022, 6(7): 2334-2345.
- [2] PIRIS M A. Peripheral T-cell lymphoma diagnosis: building a molecular tool[J]. *Haematologica*, 2020, 105(6): 1472-1474.
- [3] DE LEVAL L, GAULARD P, DOGAN A. A practical approach to the modern diagnosis and classification of T- and NK-cell lymphomas[J]. *Blood*, 2024, 144(18): 1855-1872.
- [4] ALAGGIO R, AMADOR C, ANAGNOSTOPOULOS I, et al. The 5th edition of the World Health Organization classification of haematolymphoid tumours: lymphoid neoplasms[J]. *Leukemia*, 2022, 36(7): 1720-1748.
- [5] LEFEBVRE M N, BORCHERDING N, REIS R J, et al. Molecular techniques drive cutting edge advancements in management of cutaneous T cell lymphoma[J]. *Front Immunol*, 2023, 14: 1228563.
- [6] SYRYKH C, GOREZ P, PÉRICART S, et al. Molecular diagnosis of T-cell lymphoma: a correlative study of PCR-based T-cell clonality assessment and targeted NGS[J]. *Blood Adv*, 2021, 5(22): 4590-4593.
- [7] JEVREMOVIC D, OLTEANU H. Flow cytometry applications in the diagnosis of T/NK-cell lymphoproliferative disorders[J]. *Cytometry Part B Clinical*, 2019, 96(2): 99-115.
- [8] 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.
- [9] MORATH A, SCHAMEL W W. $\alpha\beta$ and $\gamma\delta$ T cell receptors: similar but different[J]. *J Leukoc Biol*, 2020, 107(6): 1045-1055.
- [10] MAHE E, PUGH T, KAMEL-REID S. T cell clonality assessment: past, present and future[J]. *J Clin Pathol*,

- 2018,71(3):195-200.
- [11] 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.
- [12] MACIOCIA P M, WAWRZYŃIECKA P A, 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.
- [13] 周萌, 李慧. TRBC1 作为潜在靶点治疗 T 细胞来源肿瘤的研究进展[J]. 现代肿瘤医学, 2024, 32(6): 1163-1166.
- [14] HORNA P, OLTEANU H, JEVREMOVIC D, et al. Single-antibody evaluation of T-cell receptor β constant chain monotypia by flow cytometry facilitates the diagnosis of T-cell large granular lymphocytic leukemia[J]. Am J Clin Pathol, 2021, 156(1): 139-148.
- [15] NOVIKOV N D, GRIFFIN G K, 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.
- [16] HORNA P, WEYBRIGHT M J, FERRARI M, et al. Dual T-cell constant β chain (TRBC)1 and TRBC2 staining for the identification of T-cell neoplasms by flow cytometry [J]. Blood Cancer J, 2024, 14(1): 34.
- [17] CAPONE M, PERUZZI B, PALTERER B, et al. Rapid evaluation of T cell clonality in the diagnostic work-up of mature T cell neoplasms: TRBC1-based flow cytometric assay experience[J]. Transl Oncol, 2022, 26: 101552.
- [18] 马耀坤, 郑金娥, 李小青, 等. 应用 TRBC1 鉴别 T 细胞克隆的研究[J]. 临床血液学杂志, 2023, 36(4): 260-264.
- [19] 石韦华, 刘艳荣, 常艳, 等. TRBC1 和 TCR V β 两种流式细胞仪 T 细胞克隆性检测方法的对比分析[J]. 中国生物工程杂志, 2023, 43(12): 102-110.
- [20] BERG H, OTTESON G E, 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.
- [21] CASTILLO F, MORALES C, SPRALJA B, et al. Integration of T-cell clonality screening using TRBC-1 in lymphoma suspect samples by flow cytometry[J]. Cytometry B Clin Cytom, 2024, 106(1): 64-73.
- [22] SHI M, JEVREMOVIC D, OTTESON G E, 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 Part B Clinical, 2020, 98(1): 99-107.
- [23] NGUYEN P C, POTEZNY T, CHAN K L, et al. Computational flow cytometry reveals a high prevalence of TRBC1-restricted CD8⁺ T-cell subsets[J]. Leuk Lymphoma, 2025, 66(8): 1521-1525.
- [24] MUÑOZ-GARCÍA N, MORÁN-PLATA F, VILLAMOR N, et al. High-sensitive TRBC1-based flow cytometric assessment of T-cell clonality in $\alpha\beta$ -large granular lymphocytic leukemia[J]. Cancers, 2022, 14(2): 408.
- [25] 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.
- [26] VERMEER M H, MOINS-TEISSERENC H, BAGOT M, et al. Flow cytometry for the assessment of blood tumour burden in cutaneous T-cell lymphoma: towards a standardized approach[J]. Br J Dermatol, 2022, 187(1): 21-28.
- [27] PU Q, QIAO J, LIU Y, et al. Differential diagnosis and identification of prognostic markers for peripheral T-cell lymphoma subtypes based on flow cytometry immunophenotype profiles [J]. Front Immunol, 2022, 13: 1008695.
- [28] WANG C, ZHU L, LIU S, et al. PD-1 combined with TRBC1 and pan-T cell antibodies for robustly monitoring angioimmunoblastic T-cell lymphoma[J]. Front Med, 2022, 9: 962428.
- [29] FERRARI M, RIGHI M, BALDAN V, et al. Structure-guided engineering of immunotherapies targeting TRBC1 and TRBC2 in T cell malignancies [J]. Nat Commun, 2024, 15(1): 1583.
- [30] THIELE B, SCHMIDT-BARBO P, SCHULTHEISS C, et al. Oligoclonality of TRBC1 and TRBC2 in T cell lymphomas as mechanism of primary resistance to TRBC-directed CAR T cell therapies[J]. Nat Commun, 2025, 16(1): 1104.
- [31] Cwynarski K, Iacoboni G, Tholouli E, et al. TRBC1-CAR T cell therapy in peripheral T cell lymphoma: a phase 1/2 trial[J]. Nat Med, 2025, 31(1): 137-143.
- [32] MUÑOZ-GARCÍA N, LIMA M, VILLAMOR N, et al. Anti-TRBC1 antibody-based flow cytometric detection of T-cell clonality: standardization of sample preparation and diagnostic implementation [J]. Cancers, 2021, 13(17): 4379.
- [33] HIGDON L E, SCHAFFERT S, HUANG H, et al. Evolution of cytomegalovirus-responsive T cell clonality following solid organ transplantation[J]. J Immunol, 2021, 207(8): 2077-2085.