



## 系统性红斑狼疮患者外周血T细胞TCR $\beta$ 链CDR3谱系漂移和序列鉴定

系统性红斑狼疮(SLE)病变可以累及患者全身多个系统和器官,其发生发展与遗传因素、环境诱发因素和免疫系统功能紊乱有关,其中机体的免疫功能紊乱起着至关重要的作用[1]。SLE中大多数致病性抗体是T细胞依赖的[2],T细胞受体(TCR)是T细胞识别抗原并被激活的关键环节,TCR的选择性表达可能与SLE的免疫发病机理有关,但T细胞是如何被诱导出自身反应性TCR的机制未明。目前研究发现,在SLE的炎症活动期,有部分TCR  $\beta$ -链可变区(TCR BV)亚家族呈单/寡克隆性增生,但进一步研究其完整基因序列的较少。本研究利用免疫谱型分析技术,在筛选出单/寡克隆性增生的TCR $\beta$ 链的基础上,进一步测定CDR3区的基因序列,为SLE的免疫发病机制和个性化治疗研究提供基础。

### 1 材料和方法

#### 1.1 材料

1.1.1 病例选择 3例SLE患者来源于南方医院皮肤科,2例SLE患者来自中山医科大学第三附属医院免疫风湿科。5例患者全部为女性,均符合美国风湿病学会1982年修订的诊断标准。同时选择5例正常献血员作为对照。

1.1.2 主要试剂 总RNA提取试剂盒(Omega),cDNA合成和PCR试剂(FBI-MBI),GeneScan-500-TAMRA(500 ROX)标准品(Applied Biosystems,ABI,USA),去离子甲酰胺(Sigma),凝胶回收试剂盒(Omega)等。

#### 1.2 方法

按照参考文献合成TCR BV CDR3谱型分析引物[3],[4]。

1.2.1 总RNA提取和cDNA合成 分离出外周血标本中单个核细胞,按试剂盒条件,提取SLE和正常献血员PBMC( $2 \times 10^6$ 细胞)中的总RNA,取1  $\mu$ g样品总RNA为模板,用OligdT作引物,反应体系为40  $\mu$ l,每标本做3个反应,按试剂盒条件合成cDNA。

1.2.2 TCR BV PCR PCR反应体积为50  $\mu$ l,含cDNA模板1  $\mu$ l,2 mmol/L dNTP 5  $\mu$ l,10 $\times$ Buffer 5  $\mu$ l,25 mmol/L氯化镁3  $\mu$ l,TCR BV上游引物1.8  $\mu$ l(所有TCR BV上下游引物的应用浓度均为10  $\mu$ mol/L),下游共用TCR BC-FAM引物1.8  $\mu$ l,Taq DNA多聚酶1.25 U。反应条件为:94  $^{\circ}$ C变性3 min;94  $^{\circ}$ C 1min,55  $^{\circ}$ C 1 min,72  $^{\circ}$ C 1min,35个循环;72  $^{\circ}$ C 10 min延伸。PCR产物8  $\mu$ l在1.5%的琼脂糖凝胶进行电泳,余-20  $^{\circ}$ C保存备用。

1.2.3 GeneScan分析 取TCR BV 各家族带荧光标记的PCR 产物2  $\mu$ l,加入2  $\mu$ l去离子甲酰胺,0.5  $\mu$ l变性胶上样缓冲液(25mM EDTA,50mg/ml blue dextran),94  $^{\circ}$ C变性4min后,每管取2  $\mu$ l在373 DNA序列分析仪(ABI,PerkinElmer)中电泳2h(6%变性聚丙烯酰胺凝胶),计算机收集电泳过程中不同时间所出现的不同颜色和强度的荧光素,以显示出不同位置、高度、颜色和形态的峰,GeneScan 672软件自动分析[5]。

1.2.4 测序 经GeneScan分析后,对SLE单寡克隆增生的TCR BV家族,取相应带荧光标记的PCR产物4  $\mu$ l为模板,对应家族的上游引物和不带FAM标记的下游引物各2  $\mu$ l,10 mmol/L dNTP 1  $\mu$ l,10 $\times$ Buffer 5  $\mu$ l,25 mmol/L MgCl<sub>2</sub> 3  $\mu$ l,Taq DNA聚合酶1.25 U重新进行PCR,总反应体积为50  $\mu$ l.PCR产物琼脂糖凝胶回收纯化,送invitrogen上海英骏生物技术有限公司测序。

## 2 结果

### 2.1 正常人对照和SLE病人PBMC TCR BV 的PCR结果

正常献血员和SLE病人的PBMC TCR BV24家族及TCR BC对照的PCR产物1.5%琼脂糖凝胶电泳图,在100~500 bp之间出现明显条带(图1,2)。

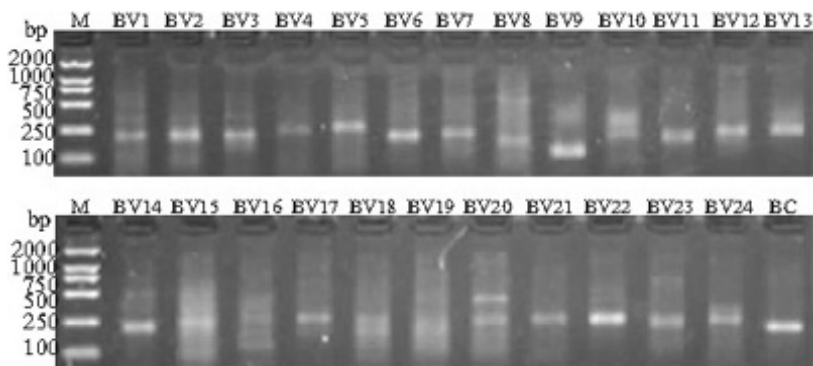


图1正常人对照1的TCR BV 24家族和TCR BC对照的PCR产物1.5%琼脂糖凝胶电泳图

Fig.1 1.5% agarose gel electrophoresis of the PCR products of TCR BV family in a normal control

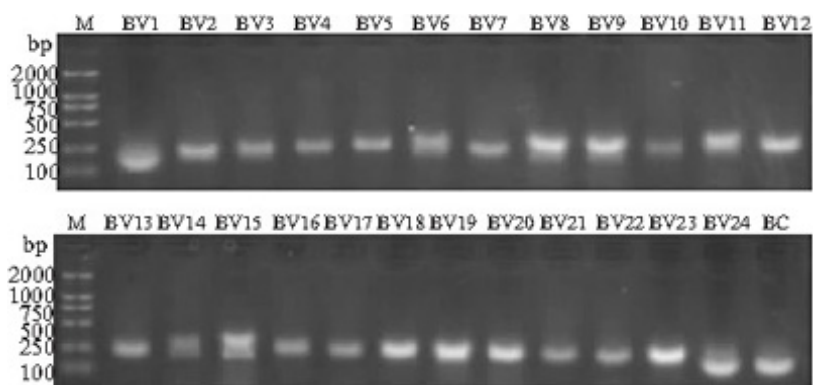


Fig.2 1.5% agarose gel electrophoresis of the PCR products of TCR BV family in SLE patient

图2 SLE病例1的TCR BV 24家族和TCR BC对照的PCR产物1.5%琼脂糖凝胶电泳图

### 2.2 正常人对照和SLE患者TCR BV GeneScan 672软件自动分析的激光扫描结果

正常献血员PBMC TCR BV各家族均为8个以上的中间高两端低的钟型峰图,呈高斯分布,相邻两条条带大小相差3bp(图3),5例SLE患者分别于不同的家族出现单峰、寡峰和偏峰图,其中SLE-1列出完整扫描图(图4),余病例仅列出异常峰图(表1)。X轴的相位差为各PCR产物的大小,Y轴不同高度的峰为相应PCR产物的荧光密度,即各CDR3的表达频率,正常多克隆增生呈大于8个峰的钟型峰图,单克隆为单峰,寡克隆少于8个峰(图4中异常家族均用下划线标出)。

表 1 SLE 患者 TCR BV 出现单克隆、寡克隆增生及扫描峰型偏移的家族

Tab.1 Monoclonal expansion, oligoclonal expansion and skewing family of TCR BV in the SLE patients

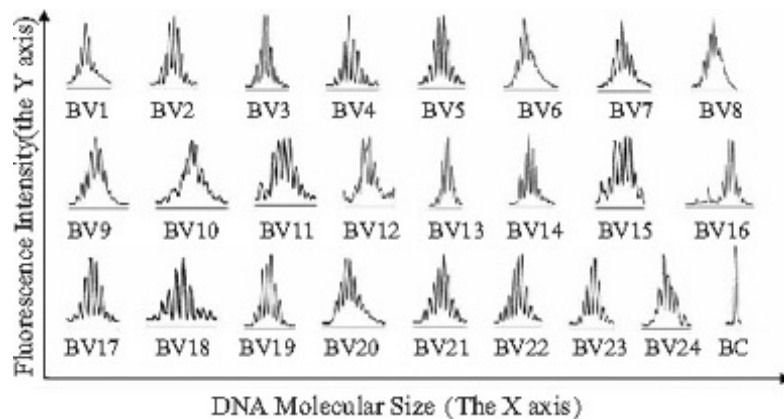
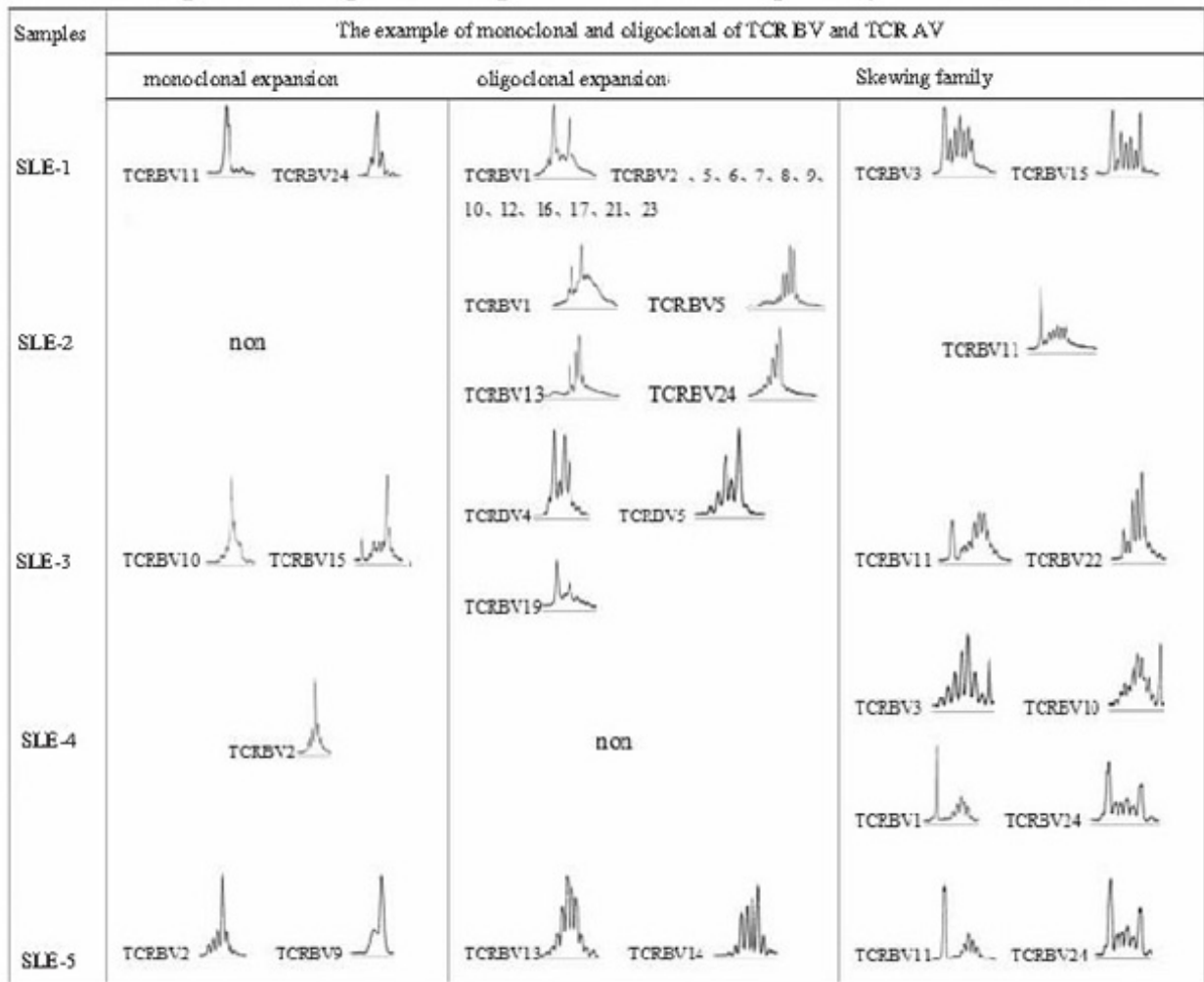


图3 正常供血者-1 PBMC的TCR  $\beta$  CDR3谱型基因扫描分析图

Fig.3 TCR  $\beta$  chain VDJC junction (CDR3 size) distribution profiles in PBMCs of a normal control analyzed by GeneScan

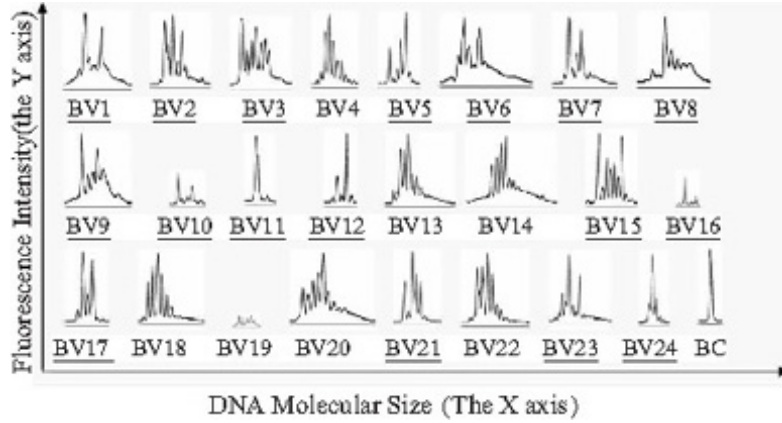


图4 SLE-1 PBMC的TCR β CDR3谱型基因扫描分析图

Fig. 4 TCR β chain VDJC junction (CDR3 size) distribution profiles in PBMC of a SLE patient analyzed by GeneScan

### 2.3 5例SLE患者部分单/寡克隆BV家族测序后CDR3长度的分析结果

根据测序结果，按DDBJ、GenBank及IMGT库中TCR VDJC标准基因序列，发现5例SLE中存在不同大小的CDR3序列(表2)。

表 2 5 例 SLE 病人 TCR BV 单寡克隆增生家族的 CDR3 基因和蛋白序列分析

Tab. 2 CDR3 gene and protein sequence of the monoclonal or oligoclonal expansion TCR β in the SLE patients

Samples	TCR V beta junctional sequence CD3(BV N ED <sub>2</sub> N BJ)				
	TCRBV			TCRBJ	
SLE1					
BV11	TCTCAGTACCTC S Q Y L	TGTGCC AGCAGC C A S S	CCG GGG GCC CTA CGG GGC TAC ACC P G A L R G Y T	TT CGGT F G	TCGGGGACCAGG S G T R
BV24	GCCATGTACTTG A M Y L	TGCGCC ACCAGC C A T S	AGA GGG ACA GTA TCC TAC GAG CAG TAC R G T V S Y E Q Y	TTCGGG F G	CCGGGC ACCAG P G T R
SLE2					
BV13	GCCCTT TAT CTT A L Y L	TGCGCC AGC AGC C A S S	CTAGAACAG GGG GCGCGCGCAGAT ACGCAGTA L E O G A <u>R A D</u> T Q Y	TTTGGC F G	CCAGGC ACCCG P G T R
BV24	GCCATGTACTTG A M Y L	TGTGCC ACCAGC C A T S	AGA GAT AAC CTC AGA GCA GAT AAT GAG CAG TTC R D N L <u>R A D N E Q F</u>	TTCGGG F G	CCAGGC ACCCG P G T R
SLE3					
BV4	AGCATAAATCTC S I N L	TGCATCGTCAGA C I V R	GIT GGG GGG GGG TTC AAT GAG CAGTT C V <u>G G G</u> F <u>N E Q F</u>	TTCGGG F G	CCAGGC ACCAGG P G T R
BV5	TCTGTGTACTTC S V Y F	TGTTCCAGCAGT C S S S	TTG GGC GGG GGA TCC ATC AAT GAG CAG L <u>G G G</u> S I <u>N E Q</u>	TTCGGG F G	CCAGGGACACGG P G T R
SLE4					
BV24	GCCATGTACTTG A M Y L	TG CAC CAC CAG C T T S	AGCCGGGGGGAGCAACGATGAGCAAGTTC S R G S <u>N D E Q F</u>	TTCGGG F G	CCAGGC ACCCTC P G T L
SLE5					
BV2	AGCT TCTACATC	TGCATCAGCAGC	GGTGGGGGGGGGGGCAACGATGAGCAGTTC	TTCGGG	CCAGGC ACCAGG

### 3 讨论

活组织病理检查和尸解显示在病人炎症部位例如唾液腺和肾脏等部位有明显的T淋巴细胞浸润, 这些T细胞抗多种自身抗原, 在SLE的免疫发病机理中占有至关重要的地位[5]。

TCR CDR3区是T细胞直接与抗原接触的位点, 一种CDR3序列代表一个T细胞克隆, 通过对TCR CDR3谱型分析及序列测定, 可筛选出单克隆高表达的自身反应性T细胞, 对疫苗研制和疾病的治疗有重要意义[6]。

本研究通过分析SLE病人单/寡克隆增生的T细胞TCR $\beta$ 链CDR3区基因序列及结构来反映自身反应性T细胞的特征。基因扫描的结果显示, 5例正常人各BV家族均呈正态分布的标准峰图, 而且各家族的表达频率相对均衡。而5例SLE病人都有明显的单峰、寡峰和偏峰出现, 某些家族表达频率较高, 且表达少于8种TCR BV CDR3, 而另一些家族表达量很低甚至消失。综合5个病例基因扫描的结果异常率(表1), 发现BV1、BV2、BV5、BV9、BV11、BV13和BV24单/寡克隆表达的频率相对较高, 与Sutmuller等人发现V $\beta$ 2与狼疮性肾炎发病有关相符[7]。至于病人个体选择的亚家族不同且每一个体同时出现多种单/寡克隆表达的TCR BV 家族则可能与个体不同的HLA表型和自身抗原的多样性有关。

这些表达量较高的单/寡克隆家族有可能就是来源于自身反应性T淋巴细胞[8], 我们通过对筛选出的BV家族进行测序, 进一步明确这些家族的序列。结果显示存在多种不同的BV、BJ、BD组合和不同类型与数目的氨基酸组成, 同时也存在一些共同基序。从表2可以看到, SLE-2的BV13和BV24共有R-A-D序列, 而SLE-2的BV24和SLE-3的BV4和BV5都测到了序列N-E-Q-F, 此外, SLE-4的BV24和SLE-5的BV2中都发现了N-D-E-Q-F, 与前面提到的N-E-Q-F仅相差一个氨基酸, 同时, 在SLE-3的BV4、BV5和SLE-5的BV2都存在G-G-G序列, 推测这些共同基序可能与自身抗原相关, 更多的病例分析将有助于进一步明确SLE相关的共同氨基酸序列及其与自身抗原和HLA之间的关系。

参考国内外关于SLE与TCR $\beta$ 链相关研究的实验和我们的结果, 需要进一步深入研究的工作有: 同时筛选出特异性增生自身反应T细胞的 $\alpha$ 链和 $\beta$ 链, 模拟TCR蛋白结构, 为SLE的免疫发病机制研究和个性化治疗提供基础。此外还可分选出特异性T细胞, 建立起自身反应性克隆增生的T细胞系, 并利用狼疮鼠动物模型, 试行采用针对抗特异性自身反应T细胞或TCR的抗体来去除或抑制这些攻击自身的T细胞克隆以研究治疗和预防SLE可能的新途径。

(责任编辑: 吴锦雅)

#### 参考文献:

- [1]刘 静, 舒强. 系统性红斑狼疮发病的免疫学机制[J]. 医学理论与实践, 2004, 17(4): 394-7.
- [2]Dayal A K, Kammer G M. The T cell enigma in lupus[J]. Arthritis Rheum, 1996, 39(1): 23-33.
- [3]姚新生, 马 骊, 温茜, 等. 监测TCR CDR3 漂移的免疫扫描谱型分析技术的建立与鉴定[J]. 中华微生物和免疫学杂志, 2006, 26(5): 572-4.
- [4]Yao XS, Zhang GW, Ma L , et al. Analysis of the CDR3 length of TCR  $\alpha\beta$  T cells in the peripheral blood of patients with chronic hepatitis B[J]. Hepatol Res, 2006, 35(5): 10-8.
- [5]Robert W. Hoffman. T cells in the pathogenesis of systemic lupus erythematosus[J]. Clin Immunol, 2004, 113(1): 4-13.
- [6]张 蕊. TCR BV CDR3谱型与自身免疫性疾病[J]. 国外医学·免疫学分册, 2002, 25(4): 208-

11.

[7]Sutmuller M, Baelde H, Ouelltte S, et al. T-cell receptor Vbeta gene expression in experimental lupus nephritis[J]. Immunology, 1998, 95(1): 18-25.

[8]Takeuchi T, Tsuzaka K, Abe T, et al. T cell abnormalities in systemic lupus erythematosus[J]. Autoimmunity, 2005, 38(5): 339-46.

---

[回结果列表](#)