

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

罗 微¹, 马 骊¹, 姚新生¹, 邹红云¹, 温 茜¹, 阮光萍¹, 王小宁²(¹南方医科大学生物技术学院分子免疫学研究所, 广东 广州 510515; ²华南理工大学生物科学与工程学院, 广东 广州 510641)

摘要:目的 探讨系统性红斑狼疮(SLE)患者外周血 T 细胞 TCR β 链 CDR3 谱系漂移, 为 SLE 的免疫应答机制和个性化治疗研究提供基础。方法 采用免疫扫描谱型分析技术, 分析 5 例正常献血员的 CDR3 分布特征及 5 例 SLE 患者 PBMC 中 T 细胞 TCR β 链 CDR3 的优势利用情况, 对克隆性增生 T 细胞的 CDR3 区进行序列分析。结果 5 例正常献血员 PBMC TCR BV CDR3 谱型均呈高斯分布, 5 例活动型 SLE 患者 24 TCR BV CDR3 家族均出现不同的优势表达, 对单/寡克隆性增生 T 细胞 β 链 CDR3 区基因进行测序, 证实存在不同的 CDR3 序列。结论 SLE 活动期外周血 T 细胞 TCR β 链 CDR3 谱系出现明显漂移, 提示 CDR3 的选择性表达可能与 SLE 的免疫发病机理有关, 特异应答的 T 细胞 TCR CDR3 序列的确定, 将为 SLE 的发病机制研究和个性化治疗提供新的方法与手段。

关键词: 系统性红斑狼疮; T 淋巴细胞受体; 互补决定区 3; 免疫扫描谱型分析; 基因扫描

中图分类号: R593 文献标识码: A 文章编号: 1673-4254(2006)08-1128-04

Complementarity-determining region 3 analysis of T cell receptor beta chain variable region in peripheral blood mononuclear cells of patients with systemic lupus erythematosus

LUO Wei¹, MA Li¹, YAO Xin-sheng¹, ZOU Hong-yun¹, WEN Qian¹, RUAN Guang-ping¹, WANG Xiao-ning²

¹Institute of Molecular Immunology, School of Biotechnology, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China; ²School of Bioscience and Bioengineering, South China University of Technology, Guangzhou 510641, China

Abstract: Objective To analyze the drift of the complementarity-determining region 3 (CDR3) of T cell receptor (TCR) beta chain variable region (TCR BV) in peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) of patients with systemic lupus erythematosus. **Methods** Immunoscope spectratyping techniques was used to analyze the distribution of TCR β chain CDR3 in 5 normal blood donors and the dominant CDR3 in the PBMCs in 5 SLE patients. Sequence analysis of the CDR3 region in monoclonal or oligoclonal T cells was performed. **Results** The spectratypes of TCR BV gene CDR3 region showed Gaussian distribution in the 5 normal blood donors. The 5 SLE patients, however, displayed anomalous proliferation and oligoclonal expansion of the T cells was observed in different TCR BV families with different CDR3 sequences. **Conclusion** Noticeable drift of TCR β chain CDR3 can be seen in active SLE, indicating possible association of selective expression of TCR with immune pathogenesis in SLE. Determination of specific TCR CDR3 sequence provides a new means for studying the pathogenesis and personalized treatment of SLE.

Key words: systemic lupus erythematosus; T cell receptor; complementarity determining region 3; immunoscope spectratyping; gene scanning

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 β -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 β 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),

基金项目:国家 973 子课题基金资助项目(2001CB510008)

Supported by National 973 Program (2001CB510008)

作者简介:罗 微(1981-),女,在读硕士生,E-mail:LuoWei_421@163.com

通讯作者:马 骊,副教授,E-mail:maryhmz@126.com,电话:020-61648322;

王小宁,教授,E-mail:xnwang@21cn.net,电话:020-87114240

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(2×10^6 细胞)中的总 RNA,取 $1 \mu\text{g}$ 样品总 RNA 为模板,用 OligdT 作引物,反应体系为 $40 \mu\text{l}$,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 $50 \mu\text{l}$,含 cDNA 模板 $1 \mu\text{l}$, 2 mmol/L dNTP $5 \mu\text{l}$, $10 \times$ Buffer $5 \mu\text{l}$, 25 mmol/L 氯化镁 $3 \mu\text{l}$, TCR BV 上游引物 $1.8 \mu\text{l}$ (所有 TCR BV 上下游引物的应用浓度均为 $10 \mu\text{mol/L}$), 下游共用 TCR BC-FAM 引物 $1.8 \mu\text{l}$, Taq DNA 多聚酶 1.25 U 。反应条件为: $94 \text{ }^\circ\text{C}$ 变性 3 min ; $94 \text{ }^\circ\text{C}$ 1 min , $55 \text{ }^\circ\text{C}$ 1 min , $72 \text{ }^\circ\text{C}$ 1 min , 35 个循环; $72 \text{ }^\circ\text{C}$ 10 min 延伸。PCR 产物 $8 \mu\text{l}$ 在 1.5% 的琼脂糖凝胶进行电泳,余 $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ 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 $2 \mu\text{l}$, 加入 $2 \mu\text{l}$ 去离子甲酰胺, $0.5 \mu\text{l}$ 变性胶上样缓冲液 (25 mM EDTA, 50 mg/ml blue dextran), $94 \text{ }^\circ\text{C}$ 变性 4 min 后,每管取 $2 \mu\text{l}$ 在 373 DNA 序列分析仪(ABI, PerkinElmer)中电泳 2 h (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 $4 \mu\text{l}$ 为模板, 对应家族的上游引物和不带 FAM 标记的下游引物各 $2 \mu\text{l}$, 10 mmol/L dNTP $1 \mu\text{l}$, $10 \times$ Buffer $5 \mu\text{l}$, 25 mmol/L MgCl_2 $3 \mu\text{l}$, Taq DNA 聚合酶 1.25 U 重新进行 PCR, 总反应体积为 $50 \mu\text{l}$ 。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 $100 \sim 500 \text{ bp}$ 之间出现明显条带(图 1, 2)。

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

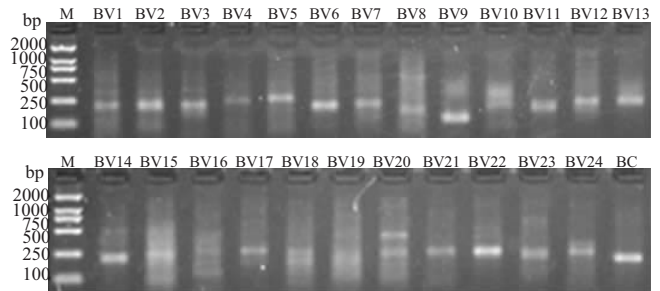


图 1 正常人对照 1 的 TCR BV 24 家族和 TCR BC 对照的 PCR 产物 1.5% 琼脂糖凝胶电泳图

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

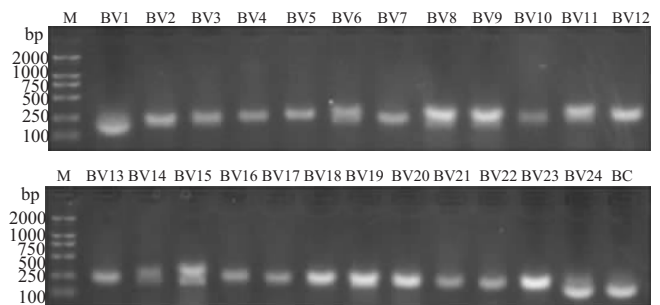


图 2 SLE 病例 1 的 TCR BV 24 家族和 TCR BC 对照的 PCR 产物 1.5% 琼脂糖凝胶电泳图

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

条条带大小相差 3 bp (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)。

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)。

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

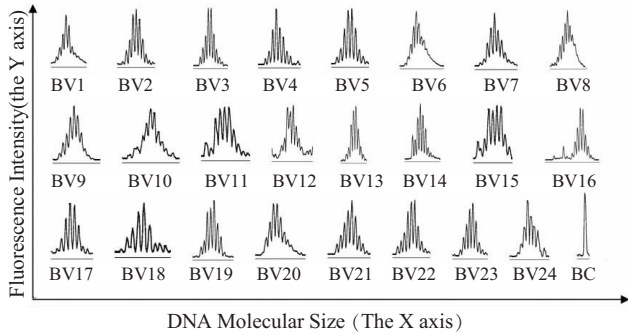


图 3 正常供血者 -1 PBMC 的 TCR β CDR3 谱型基因扫描分析图

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

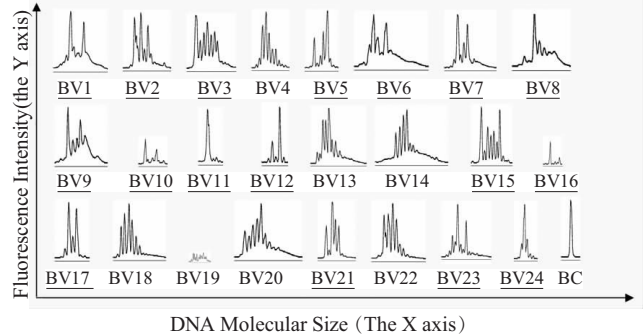


图 4 SLE-1 PBMC 的 TCR β CDR3 谱型基因扫描分析图

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

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

Samples	The example of monoclonal and oligoclonal of TCR BV and TCR AV		
	monoclonal expansion	oligoclonal expansion	Skewing family
SLE-1	TCRBV11, TCRBV24	TCRBV1, TCRBV2, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 16, 17, 21, 23	TCRBV3, TCRBV15
SLE-2	non	TCRBV1, TCRBV5, TCRBV13, TCRBV24	TCRBV11
SLE-3	TCRBV10, TCRBV15	TCRBV4, TCRBV5, TCRBV19	TCRBV11, TCRBV22
SLE-4	TCRBV2	non	TCRBV3, TCRBV10, TCRBV1, TCRBV24
SLE-5	TCRBV2, TCRBV9	TCRBV13, TCRBV14	TCRBV11, TCRBV24

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 β 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 Suttmuller

等人发现 V β 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

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 junktional sequence CD3(BV N BD _x 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	GCCATGTA CTG A M Y L	TGCGCCACCAGC 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	CCGGGCACCAG P G T R
SLE2					
BV13	GCCCTT TAT CTT A L Y L	TGCGCCAGC 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	CCAGGCACCCGG P G T R
BV24	GCCATGTA CTG A M Y L	TGTGCCACCAGC 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	CCAGGCACCCGG P G T R
SLE3					
BV4	AGCATAAACTC S I N L	TGCATC GTCAGA C I V R	GTT GGG GGG GGG TTC AAT GAG CAGTT C V <u>G G G</u> F <u>N E Q F</u>	TTCGGG F G	CCAGGCACCAGG P G T R
BV5	TCTGTGTA CTTC S V Y F	TGTTCAGCAGT 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	GCCATGTA CTG A M Y L	TG CAC CAC CAG C T T S	AGCCGGGGG GAGCAACGATGAGCAGTT C S R G S <u>N D E Q F</u>	TTCGGG F G	CCAGGCACGCTC P G T L
SLE5					
BV2	AGCT TCTACATC S F Y I	TGCATCAGCAGC C I S S	GGTGGGGGGGGGGCAACGATGAGCAGTT C <u>G G G G G</u> <u>N D E Q F</u>	TTCGGG F G	CCAGGCACCAGG P G T R

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 TCRβ 链相关研究的实验和我们的结果,需要进一步深入的工作有:同时筛选出特异性增生自身反应 T 细胞的 α 链和 β 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 可能的途径。

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 αβ 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] Suttmuller M, Baelde H, Ouellte 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.

(责任编辑:吴锦雅)