

doi:10.3969/j.issn.1000-9760.2011.06.020

TCR β 链 CDR3 谱系与病毒感染相关研究进展

周建伟 高素平 孔 翠 史 硕
(济宁医学院附属医院, 山东 济宁 272029)

关键词 TCR; CDR3; 病毒感染

中图分类号: R392.11 文献标志码: A 文章编号: 1000-9760(2011)12-440-03

T 细胞受体(T cell receptor, TCR)是 T 淋巴细胞特异性识别抗原的受体,也是所有 T 细胞的特征性表面标志。T 细胞应答是通过 TCR 互补决定区(Complementary determining region, CDR)与各种特异的抗原结合,从而产生各种克隆 T 细胞,不同克隆 T 细胞具有不同长度或序列的 TCR CDR3 区,TCR CDR3 谱型能很好地反映 T 细胞的功能和状态。病毒抗原诱导的 T 细胞免疫应答参与了病毒感染引起的炎症过程,研究病毒感染者的 TCR CDR3 谱序有助于了解 TCR 各基因家族的取用状态,并为病毒感染性疾病的预防、诊断与治疗提供新的思路和依据。

1 TCR β 链 CDR3 的结构特征及谱序飘移

T 细胞在人和小鼠的大多数淋巴组织中主要是以 TCR $\alpha\beta$ 型表达存在的,约占 95%^[1]。在 TCR 胚系基因的形成过程中,TCR β 链按等位排斥的方式先于 TCR α 链的重排,能较好反映 T 细胞的 TCR 特征。根据各 TCR BV 基因的同源性特点,将 67 个 TCR BV 基因则被分为 24 个基因家族,即 TCR BV1-TCR BV24,其中 TCR BV5 与 TCR BV13 各有 2 个亚家族。

TCR β 二聚体是由胞外、胞内和跨膜区三部分组成,每条肽链胞外区均有两个结构区域,即靠近氨基端的可变区和靠近细胞膜的恒定区。TCR β 肽链可变区又各有三个互补决定区。在这三个互补决定区中,CDR1、CDR2 是 TCR 受 MHC 限制的结合部位;只有 CDR3 区是直接与各种抗原肽接触结合的核心部位。TCR β CDR3 区由 BV 基因片段末端、BD 基因片段、BJ 基因片段前端及 V、D 与 D、J 之间插入的核苷酸序列组成。在 T 淋巴细胞发育过程中,V、D 和 J 基因片段呈非连续性分布并经历了重排,首先在胸腺前 T 细胞阶段,D 与 J 各选其一相连成 DJ 片段,而后在成熟 T 细胞阶段 V 与 DJ 再相连成完整的 VDJ 片段。由于编码

CDR3 区 V、(D)、J 各种基因片段的数量多,再加上选择的随机性,排列组合的多样性以及氨基酸在连接处的随机插入,使得 CDR3 具有高度多样性,从而造就了 TCR $\alpha\beta$ 的高度多样性,理论上推测其数目高达 $10^{15} \sim 10^{18}$ 。使得多种多样的抗原肽基本上都能找到相对应的特异性 TCR,相当于在人体形成了 T 淋巴细胞库。理论上不同 T 细胞克隆具有不同序列的 TCR CDR3 基因,形成了多种多样的 TCR AV 和 TCR BV CDR3 谱型。CDR3 区的长度和序列决定其空间结构特征,从而决定 TCR 的特异性。一种 CDR3 序列代表一个 T 细胞克隆,和同一 MHC 肽复合物结合的大部分克隆 T 细胞有着相同的 BV 片段和 CDR3 长度^[2-4]。测定特定 CDR3 序列出现的频率可以反映特定 T 细胞克隆扩增的程度,从而反映 T 细胞功能状态。

正常人 T 细胞 TCR 基因重排是完全随机的,不同的 TCR 使 T 细胞表现为多家族和多克隆性。而在疾病状态下,某一种抗原肽刺激可以引起具有特定的 CDR3 区的 T 细胞扩增,即出现优势扩增的 T 细胞克隆,表现为某 TCR BV 亚家族的单克隆和寡克隆基因重排^[5];也就是说,与正常人 CDR3 基因谱系相比发生了谱系飘移。

2 TCR CDR3 基因谱序研究方法

目前,TCR CDR3 谱型研究方法主要有:多重 PCR 技术,PCR-DNA 印迹(Southern blot),PCR-单链构象多态性(SSCP),个别序列分析,流式细胞仪 β 链抗体检测法等。前两种方法通过半定量检测 PCR 产物来判断各 V 区谱系的 T 细胞表达情况,根据某些谱系的 PCR 产物的明显增加间接推断 T 细胞的克隆性增殖。而 SSCP 是一种检测单链 DNA 碱基变化的敏感方法。

近年来,免疫扫描谱型分析技术,或称免疫指纹分析技术(Immunoscope spectratyping technique),也逐渐应用到 TCR 谱序分析^[1,6]。相对上

述 T 细胞技术,其优点是对 T 细胞的监测除能在样品中找到单克隆和寡克隆增生的 T 细胞,提供 T 细胞应答库的组成信息(不同家族出现偏峰、表达频率的变化),而不需要对样本进行特殊的处理,同时可根据克隆性增生 T 细胞对机体的利弊,分别采用促进和抑制特异 T 细胞增殖(抗相对应 TCRBV 家族的单抗或对 TCRBV 基因的干扰等手段),可为疾病的个性化治疗提供新的思路与方法,而且,免疫扫描谱型分析技术可动态监测 TCR 的变化,可提供疾病免疫应答状况变化的辅助指标。其基本原理为:提取样本的总 RNA,反转录成 cDNA,根据 β 链 24 个 TCR BV 基因家族设计相应的 24 个 β 链特异性上游引物,从共同的 TCR BC 基因设计 1 个 C β 下游引物,每个样本分别先进行 β 链 1/C β ~ β 链 24/C β 共 24 管 PCR 扩增,扩增的产物再经过琼脂糖电泳、聚丙烯酰胺凝胶电泳、基因扫描等分析后判断 T 细胞克隆增殖,如出现单克隆或寡克隆产物则进一步分离纯化,进行 DNA 序列分析,了解其 CDR3 的核苷酸序列和结构^[7]。近来,Zhou JW 等^[8]以荧光定量 PCR 溶解曲线技术检测大肠癌患者外周血及组织中的 TCR CDR3 的谱序飘移,其基本原理为:FQ-PCR 中的 SYBR Green 荧光染料能非特异性的与所有的 DNA 双链结合,适于多种目的产物的检测,其中的“熔点曲线”的检测功能是在 PCR 扩增完成后进行,在 95℃ 条件下扩增产物处于解链状态,SYBR Green 全部游离,荧光信号强度最低;退火至 55℃ 条件下扩增产物全部复性,SYBR Green 全部结合到 dsDNA 上,荧光信号强度最强;当 PCR 产物从一定温度开始缓慢上升至 95℃ 时,扩增产物双链 DNA 随温度升高逐渐变性解离产生单链,嵌到双链中荧光染料随之释放出来,反应中的荧光信号相应衰减,仪器自动实时检测反应管中荧光信号的变化(如每升高 0.2℃ 检测 1 次),最后绘制出扩增产物荧光信号随温度变化的溶解曲线,对荧光信号强度变化的负一次导数与温度作图,得到相应 PCR 产物的溶解曲线峰图。理论上,不同大小、不同基因组成的 PCR 产物,其溶解曲线峰型图不一样,从而可以检测出 TCR BV 家族的谱序飘移。

3 TCR β 链 CDR3 与病毒感染相关研究进展

随着 TCR 研究的不断深入,乙肝病毒(HBV)、巨细胞病毒(CMV)、人类免疫缺陷综合征病毒(HIV)等病毒感染患者外周血或组织的 TCR BV CDR3 的研究越来越受到人们重视。其

中研究最多的是乙肝患者的 TCR 谱序飘移。

Soroosh P^[9]通过分析健康志愿者注射乙肝疫苗前后,外周血 CD8⁺ T 细胞 TCR AV 和 TCR BV 基因家族的变化,结果显示乙肝疫苗接种后部分 CD8⁺ T 细胞 TCR BV3 基因亚家族呈单克隆性增生,估计可能与乙肝抗原表位有关。另外,乙肝疫苗无应答者 TCR CDR3 谱型明显不同于有应答者,无应答者 CD4⁺ T 细胞亚群可见 BV5.2 基因家族存在显著性差异($P<0.01$),即优势利用;而在 CD8⁺ T 细胞亚群各家族并无优势利用。

张光文等^[10]采用免疫指纹技术对 8 例 CHB 患者炎症活动期外周血 TCR BV 家族基因进行分析,结果是 8 例 CHB 患者均出现一个或多个 TCR BV 家族单克隆或寡克隆性增生。进一步对克隆性增生 T 淋巴细胞 β 链 CDR3 区测序,证实存在不同的 CDR3 序列。还有学者证实了 CHB 患者的 TCR BV 家族存在单克隆性或寡克隆性增生,并且克隆增生的基因家族 CDR3 区是不同长度或序列的氨基酸序列,对部分 TCR α 链、TCR β 链的可变区结构进行模拟,显示克隆增生的 T 细胞同样不具有相同的 TCR CDR3 空间构型,但是各增生 T 细胞克隆 CDR3 区具有部分相同的氨基酸基序,说明克隆增生的 T 细胞有可能识别抗原肽的相同部分,但由于病毒抗原变异及 HLA 型别不同又有所差异^[11-12]。

慢性单纯疱疹病毒(HSV-1)感染的病人,通过检测其对病毒颗粒蛋白 22 中 49-57 氨基酸发生特异识别 CD8⁺ T 细胞的优势表位,来检测 CD8⁺ TCR 基因家族的优势增生,结果发现 80% 的患者出现 TCR BV12.4 克隆增生,在全部 50 个发生克隆增殖的 TCR BV 家族中,有 12 个为 TCR BV12.4。这说明 TCR BV12.4 作为特异识别 HSV-1 特异表位的基因家族,可能在机体抵抗病毒感染的免疫应答中具有重要作用^[13-14]。

Ren GL 等^[15]利用测序仪对扩增的 PCR 产物进行扫描,定量分析 HIV-1 感染者 TCR CDR3 区多样性变化特征及其与病毒载量的相关性。结果显示, HIV-1 感染者和正常人相比较其 CD8⁺ T 细胞的 TCR 基因多样性明显减少,部分 TCR BV 基因家族 CDR3 区的高斯分布破坏;TCR 的紊乱与病毒载量呈正相关($r=0.771, P<0.05$); HIV-1 感染引起患者 TCR 多样性的改变不仅表现在不同 BV 基因家族上,而且也表现在 CDR3 长度上,其中感染者 BV2、BV4、BV5、BV17、BV20、BV21、BV23 及 BV24 基因家族的变化与正常人存在统计学差异。

Luo W^[16] 研究巨细胞病毒蛋白 pp65 特异应答的 CD8⁺ TCR 的飘移特征,发现除 α 链外,TCR β 链的 BV3、BV14、BV21、BV23、BV11 基因家族发生限制性取用,并且这些家族均含有 L(XT)G(X)A 的相似序列。其优势增生家族则为 BV12.4、BV6.5、BV18^[17-18]。

4 展望

目前,研究者普遍认为 TCR BV 优势增生家族在抗病毒免疫中起着重要作用,而某些基因家族的限制性取用则是导致病毒持续感染的主要因素,所以增强 TCR BV 优势家族的克隆增殖,解除某些家族的限制性取用逐渐成为人们研究的热点^[19-20]。相信不久的将来,随着研究的深入,根据不同病毒抗原导致不同个体的 TCR BV 基因家族 CDR3 的不同飘移特征,针对 TCR 的个性化治疗将成为临床治疗病毒感染的新的思路 and 手段。

参考文献:

- [1] Xin-Sheng Yao, Zheng-Jun X, Li M, et al. Analysis of the CDR3 region of alpha/beta T-cell receptors (TCRs) and TCR BD gene double-stranded recombination signal sequence breaks end in peripheral blood mononuclear cells of T-lineage acute lymphoblastic leukemia[J]. Clin Lab Haematol, 2006, 28(6): 405-415.
- [2] 马锐,周建伟,胡雅丽,等. 荧光定量 PCR 溶解曲线分析技术检测多系统萎缩患者 TCR β 链 CDR3 谱序初探[J]. 遵义医学院学报, 2009, 32(1): 1-4.
- [3] Tanaka Y, Nakasone H, Yamazaki R, et al. Single-cell analysis of T-cell receptor repertoire of HTLV-1 Tax-specific cytotoxic T cells in allogeneic transplant recipients with adult T-cell leukemia/lymphoma[J]. Cancer Res, 2010, 70(15): 6181-6192.
- [4] Reiser JB, Legoux F, Machillot P, et al. Crystallization and preliminary X-ray crystallographic characterization of a public CMV-specific TCR in complex with its cognate antigen [J]. Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun, 2009, 65(11): 1157-1161.
- [5] Yao XS, Diao Y, Sun WB, et al. Analysis of the characteristics of CDR3 polymorphism and length distribution of TCR alpha chain in peripheral blood of normal human[J]. Cell Mol Immunol 2007, 4(3): 215-220.
- [6] Zhang XL, Li YQ, Chen SH, et al. The feature of clonal expansion of TCR Vbeta repertoire, thymic recent output function and TCRzeta chain expression in patients with immune thrombocytopenic purpura[J]. Int J Lab Hematol, 2009, 31(6): 639-648.
- [7] 姚新生, 马骊, 温茜, 等. 监测 TCR CDR3 飘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, 27(6): 571-573.
- [8] Zhou JW, Ma Rui, Luo Rong, et al. Primary exploration of molecular and spectratyping features of CDR3 of TCR β chain in the peripheral blood and tissue of patients with colorectal carcinoma[J]. Concer Epidemiol, 2010, 34(6): 733-740.
- [9] Soroosh P, Shokri F, Azizi M, et al. Analysis of T-cell receptor beta chain variable gene segment usage in healthy adult responders and nonresponders to recombinant hepatitis B vaccine. [J]. Scand-J-Immunology, 2003, 57(5): 423-431.
- [10] 张光文, 姚新生, 马世武, 等. 慢性乙型肝炎患者外周血 T 淋巴细胞受体谱系分析及互补决定区 3 序列测定[J]. 中华肝脏病杂志, 2006, 14(1): 23-24.
- [11] Xin-heng Yao, Guang-wen Zhang, Lia Ma, 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, 10(18): 10-17.
- [12] Maru Y, Yokosuka O, Imazeki F, et al. Analysis of T cell receptor variable regions and complementarity determining region 3 of infiltrating T lymphocytes in the liver of patients with chronic type B hepatitis[J]. Intervirology, 2003, 46(5): 277-288.
- [13] Dong L, Li P, Oenema T, et al. Public TCR use by herpes simplex virus-2-specific human CD8 CTLs[J]. J Immunol, 2010, 184(6): 3063-3071.
- [14] Facco M, Brun P, Baesso I, et al. T cells in the myenteric plexus of achalasia patients show a skewed TCR repertoire and react to HSV-1 antigens[J]. Am J Gastroenterol, 2008, 103(7): 1598-609.
- [15] Ren GL, Chen JP, Jia MM, et al. T cell receptor diversity of CD8⁺ T lymphocytes and its association with viral load in individuals with HIV-1 infection[J]. Zhonghua Yu Fang Yi Xue Za Zhi, 2009, 43(5): 404-408.
- [16] Luo W, Ma L, Wen Q, et al. Analysis of the conservation of T cell receptor alpha and beta chain variable regions gene in pp65 peptide-specific HLA-A* 0201-restricted CD8⁺ T cells [J]. Cell Mol Immunol, 2009, 6(2): 105-10.
- [17] Price, DA, Brenchley JM, Ruff LE, et al. Avidity for antigen shapes clonal dominance in CD8⁺ T cell populations specific for persistent DNA viruses[J]. J Exp Med, 2005, 202(10): 1349-1361.
- [18] Trautmann L, Rimbart M, Echasserieau K, et al. Selection of T cell clones expressing high-affinity public TCRs within human cytomegalovirus-specific CD8 T cell responses[J]. J Immunol, 2005, 175(9): 6123-6132.
- [19] Stauss HJ, Cesco-Gaspere M, Thomas S, et al. Monoclonal T-cell receptors; new reagents for cancer therapy[J]. Mol Ther, 2007, 15(10): 1744-1750.
- [20] Schub A, Schuster IG, Hammerschmidt W, et al. CMV-specific TCR-transgenic T cells for immunotherapy[J]. J Immunol, 2009, 183(10): 6819-6830.

(收稿日期 2011-09-05)