

CML 细胞抗原相关 TCR V α 13/V β 21 和 V α 18/V β 21 寡克隆 T 细胞及其 CDR3 序列特点

查显丰¹, 李扬秋^{1,2}, 陈少华¹, 杨力建¹, 卢育洪¹, 张涛¹

(暨南大学 1. 医学院血液病研究所; 2. 再生医学教育部重点实验室, 广东 广州 510632)

[摘要] 目的: 分析慢性粒细胞白血病(CML)病人的克隆性增殖 T 细胞及其 CDR3 序列的特点。方法: 利用 RT-PCR 和基因扫描分析 1 例 CML 患者外周血单个核细胞中的 TCR V α 和 V β 基因的互补决定区(CDR3), 了解各 V α 和 V β 亚家族的限制性表达情况和 T 细胞克隆性增殖特点, 寡克隆的 PCR 产物再进行序列分析。结果: 该病人外周血 T 细胞表达 18 个 TCR V α 和 12 个 TCR V β 亚家族, 其中 V α 13、V α 18、V β 1 和 V β 21 亚家族呈寡克隆性。CDR3 序列分析获得 3 个 TCR 克隆基因序列, 分别为 V α 13NJ α 49、V α 18NJ α 50 和 V β 21ND β NJ β 2.7。结论: 获得 1 例 CML 病人外周血克隆性增殖 $\alpha\beta$ + T 细胞的 3 个 TCR 基因 CDR3 序列, 提示病人可能存在与 CML 细胞抗原相关的 V α 13/V β 21 或 V α 18/V β 21 T 细胞克隆。

[关键词] 慢性粒细胞白血病; T 细胞受体; 基因扫描; CDR3; 克隆性

[中图分类号] R392.11 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1000-9965(2008)06-0538-05

CML cell antigens associated TCR V α 13/ V β 21 and V α 18/V β 21 oligoclonal T cell and the feature of its CDR3 sequence

ZHA Xian-feng¹, LI Yang-qiu^{1,2}, CHEN Shao-hua¹, YANG Li-jian¹, LU Yu-hong¹, YU Zhi¹

(1. Institute of Hematology, Medical College; 2. Key Laboratory for Regenerative Medicine of Ministry of Education, Jinan University, Guangzhou 510632, China)

[Abstract] **Aim:** To investigate the clonal expansion and the feature of CDR3 sequence of T cells in the patient with chronic myelogenous leukemia (CML). **Methods:** The complementary determining region 3 (CDR3) of TCR V α and V β subfamilies genes were analyzed using RT-PCR and genescan techniques in peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) from the a case with CML, to detect the usage and clonality feature of TCR V α and V β subfamilies. The oligoclonal PCR products were analyzed by sequencing to define the sequence of CDR3. **Results:** 18 V α and 12 V β subfamily T cells could be identified in the CML case, and the products from V α 13, V α 18, V β 1 and V β 21 subfamilies displayed oligoclonal expansion. The CDR3 sequences from 3 oligoclonal TCR genes were identified in V α 13NJ α 49, V α 18NJ α 5 and V β 21ND β NJ β 2.7 respectively. **Conclusion:** 3 TCR CDR3 sequences from clonal expansion $\alpha\beta$ + T cell in PBMCs from the CML case were identified, suggesting that it might exist TCR V α 13/

[收稿日期] 2008-06-06

[基金项目] 国家高技术发展计划(863)资助项目(2006AA02Z114); 国家自然科学基金专项基金项目(30424003); 广东省自然科学基金项目(05103293); 血液病学国务院侨办重点学科建设基金项目

[作者简介] 查显丰(1981-), 男, 硕士研究生, 研究方向: 白血病分子免疫学

通讯作者: 李扬秋, Tel: 020-85226877; E-mail: juyangqiuli@163.com

V β 21 or V α 18/V β 21 oligoclonal T cell specific for CML cell antigens.

[Key words] chronic myelogenous leukemia; T cell receptor; genscan; CDR3; clonality

T 细胞受体(T cell receptor, TCR)是 T 细胞表面特异性识别抗原的分子,可分为 TCR α/β 和 TCR γ/δ 两种类型,外周血 T 细胞主要为 TCR α/β 的 T 细胞。TCR 重排过程中,形成一高度可变区—VN(D)NJ 区,称为互补决定区 3(CDR3),不同重排其 CDR3 长度不同。利用这一特点,通过检测 29 个 TCR V α 和 24 个 V β 亚家族的 CDR3 长度,可以了解机体 T 细胞不同亚家族的分布及其克隆性^[1]。本研究采用目前检测 CDR3 长度最灵敏的 RT-PCR 及基因扫描技术来分析 1 例 CML 患者外周血单个核细胞中 29 个 TCR V α 亚家族和 24 个 V β 亚家族分布及其克隆性增殖等情况,以期获得 CML 抗原相关的 TCR 克隆和基因序列^[2]。

1 材料和方法

1.1 标本

经细胞形态学、组织化学和细胞遗传学确诊的 1 例慢性粒细胞白血病患者(女,19 岁)外周血单个核细胞,1 例正常人作为对照。

1.2 主要试剂

RNAzol 试剂盒购自 Gibco/BRL 公司;随机引物和反转录酶试剂盒(PowerScript™ Reverse)购自美国 BD 公司;Taq 聚合酶和 pGEM® -T Easy 载体试剂盒均购自 Promega 公司;高质量的去离子甲酰胺(Hi-DiFormamide)、GeneScan-500 (LIZ) Size STD Kit、BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit 和 POP-4 (Performance Optimized Polymer-4) 胶均购自美国 PerkinElmer 公司。

1.3 主要仪器

PCR 扩增仪购自德国 Biometra 公司;3100-Avant 全自动遗传分析仪购自美国 ABI 公司。

1.4 RNA 提取和 cDNA 合成

按常规方法用 RNAzol 试剂盒提取所收集的外周血单个核细胞的 RNA,并应用随机引物和反转录酶试剂盒(PowerScript™ Reverse)反转录合成 cDNA 第一链,然后以 RT-PCR 检测 β 2 微球蛋白基因确定合成 cDNA 的质量。

1.5 RT-PCR 扩增

根据 29 个 V α 和 24 个 V β 亚家族的 cDNA 序

列,分别设计 29 个 V α 亚家族的上游引物和一个 C α 下游引物,24 个 V β 亚家族的上游引物和一个 C β 的下游引物,并分别在 C α 和 C β 引物的上游各设计一个荧光素标记引物(C α -Fam 和 C β -Fam),用于基因扫描分析。引物由德国柏林 TIB 生物公司合成,引物序列按文献^[2-3]。PCR 扩增按常规方法进行。总反应体系 20 μ L,其中含 1 μ L cDNA 产物,任一 V α 或 C β 引物(29 个 V α 或 C β 引物之一)和 C α 或 C β 引物(0.5 μ mol/L),0.1 mmol/L dNTP,1.25 U Taq 聚合酶,1 \times PCR 缓冲液,同时设置阳性和阴性对照。反应在 PCR 扩增仪中进行,共进行 40 个循环,94 $^{\circ}$ C 1 min (首次为 3 min);退火 60 $^{\circ}$ C 1 min;延伸 72 $^{\circ}$ C 1 min(末次为 10 min),反应结束后于 4 $^{\circ}$ C 保存。PCR 产物于 25 g/L 琼脂糖凝胶(溴化乙锭染色)中电泳分析结果^[1,4]。

1.6 T 细胞克隆性分析

(1)标记 PCR 产物 RT-PCR 产物经电泳分析出现阳性带者进一步以 C α -Fam 或 C β -Fam 下游引物进行不对称扩增,得到荧光标记的单链 PCR 产物。总反应体系为 10 μ L 含 2.5 μ L 首次 PCR 产物,0.1 μ mol/L C α -Fam 或 C β -Fam 引物,2.5 mmol/L MgCl₂,0.2 mmol/L dNTP,PCR 缓冲液和 0.25 U Taq 聚合酶,共进行 35 个循环,退火温度为 66 $^{\circ}$ C,余同上^[1,4]。

(2)基因扫描分析(CDR3 长度分析) 取 2 μ L 荧光素 Fam 标记的 PCR 产物加入高质量的去离子甲酰胺与 GeneScan-500 (LIZ) Size Standard 按 20:1 比例配好的 10 μ L 混合液,经 94 $^{\circ}$ C 变性 4 min,然后将样品加入 96 孔板,直接装载到已灌好 POP-4 胶的 3100-Avant 全自动遗传分析仪上进行电泳和基因扫描,然后经基因扫描分析软件分析结果。

1.7 PCR 产物序列分析

(1)PCR 产物纯化和克隆 将首次 PCR 产物电泳切胶,并利用 E. Z. N. A 凝胶回收试剂盒纯化 PCR 产物,按试剂盒操作指南进行。10 μ L 反应体系包含 1.2 μ g pGEM® -T Easy 载体(50 ng/ μ L),1 μ L T4 DNA 连接酶(600 U/ μ L),1 μ L T4 DNA 连接酶的 10 \times 连接缓冲液,4 $^{\circ}$ C 过夜。次日取 5 μ L 连接产物加入 100 μ L DH5 α 高效率感受态细胞中进行转化。

转化后的感受态细胞加于含有氨苄青霉素的固体 LB 培养基平板上,37 ℃ 培养箱中过夜,待菌落生长后,X 每个培养皿随机挑选数个单菌落,分别置于 100 μL LB 培养液中,混匀后进行菌落 PCR 检测。随机挑出 4~6 个克隆的阳性产物进一步进行序列分析。

(2) 序列分析 核苷酸序列分析应用 BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing 试剂盒,将菌落 PCR 产物电泳切胶纯化,干燥后重悬于 7 μL 的去离子水中,进一步电泳确定产物完好后,进行 BigDye 标记,总反应体系 5 μL,包括 1 μL BigDye Terminator、1.6 μL 0.4 μM 上游或下游引物,1 μL 纯化后产物。反应条件:96 ℃ 10 s(首次 1 min)、50 ℃ 5 s、60 ℃ 4 min,PCR 共进行 25 个循环。尔后进一步采用酒精/EDTA/NaAc 法纯化测序产物,干燥后加入 10 μL HI-Di 甲酰胺,于 95 ℃ 变性 4 min 后立即冰上冷却至少 4 min,然后直接装载到 3100-Avant 全自动遗传分析仪上进行毛细管电泳,最后经 Sequencing analysis Software 3.7 分析软件进行序列分析。

2 结果

2.1 TCR Vα 和 Vβ 亚家族 T 细胞的表达情况

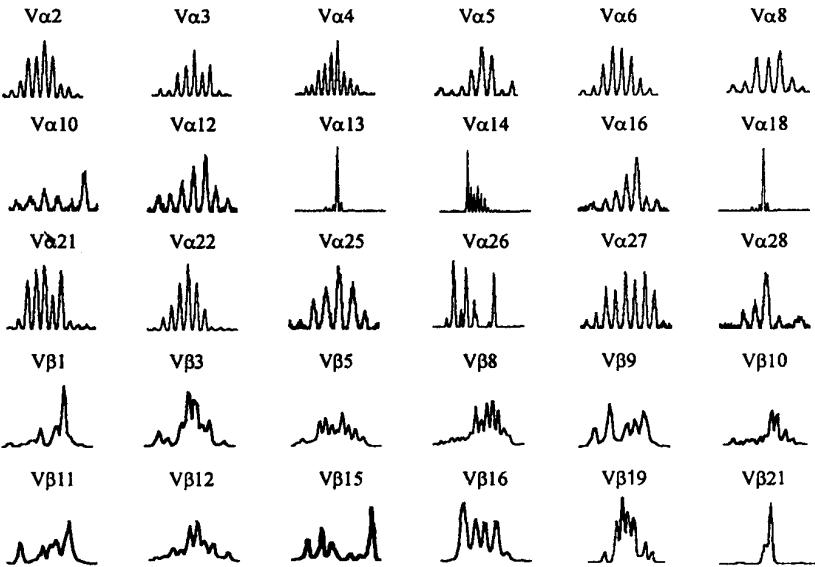
所检测的 CML 病人外周血 T 细胞中仅表达 Vα2~Vα6、Vα8、Vα10、Vα12~Vα14、Vα16、Vα18、Vα21、Vα22 和 Vα25~Vα28 亚家族基因,而正常人表达绝大多数 Vα 亚家族基因。CML 病人仅表达 Vβ1、Vβ3、Vβ5、Vβ8~Vβ11、Vβ13、Vβ15、Vβ16、

Vβ19 和 Vβ21 亚家族基因,而正常人表达除 Vβ20 外的其他亚家族基因。

2.2 T 细胞克隆性分析结果

由于 Vα(Vβ) 和 Cα(Cβ) 引物是固定的,故 Vα/Cα 或 Vβ/Cβ 所扩增的 PCR 产物的大小决定于 CDR3 区的长度,不同 T 细胞克隆的 PCR 产物长度和浓度会不同,通过了解 PCR 产物片段大小均一性情况,便可了解体内 T 细胞克隆存在的情况。荧光素标记的产物经自动序列分析仪中的基因扫描分析软件分析,在电泳过程中所收集的不同位置和高度 的峰表示产物的大小和含量;峰的形态提示产物的均一性即克隆性,当 PCR 产物中所含的 DNA 扩增片段大小一致,其电泳时的迁移率完全相同,在同一时间通过扫描探头,所显示的结果为一单峰图像,提示 PCR 产物自 TCR Vα 或 Vβ 的 CDR3 序列完全相同的 T 细胞,即克隆性细胞,而一主峰和少数小峰图像提示产物主要来自同一克隆即为寡克隆性,双峰图像提示双克隆性,多峰图像提示多克隆性,图像介于多克隆性与寡克隆性图象之间呈一主峰明显高于其他峰的图象有向寡克隆发展趋势提示寡克隆增殖趋势^[1]。

本例 CML 患者的 Vα13、Vα18、Vβ1 和 Vβ21 产物呈一主峰及个别矮峰图象(寡克隆),Vα14 PCR 产物呈多克隆下降趋势,其余 Vα 和 Vβ 亚家族 PCR 产物呈多峰多克隆图像(图 1)。



Vα13、Vα18、Vβ1 和 Vβ21 呈寡克隆,Vα14 呈寡克隆下降趋势,其余为多克隆。

图 1 1 例 CML 病人 TCR Vα 和 Vβ 亚家族基因扫描分析结果

2.3 CDR3 序列分析结果

对寡克隆性的 Vα13、Vα18 和 Vβ21 PCR 产物进行测序分析,结果显示:Vα13 寡克隆在重排过程中选用 Jα49 区,在 V 区与 Jα49 区之间有 12 个碱基 (GGGATGAGGCGG) 插入;Vα18 寡克隆在重排过程中选用 Jα50 区,在 V 区与 Jα50 区之间插入 GGAGGG 6 个碱基;Vβ21 寡克隆在重排过程中利用

DB1 和 Jβ2.7 区,在 V 区和 D 区之间插入 C 和 T 两个碱基,在 D 区和 J 区之间插入一个 T,CDR3 序列所编码的氨基酸分别为 GDEAD、GG 和 LRV (表 1)。Vβ1 基因 PCR 产物经多次序列分析未能获得克隆性序列。所获得 3 个 TCR 基因序列已经递交到 Genebank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) 已被接受,登陆号码分别是:EU589347、EU770971 和 EU379940。

表 1 1 例 CML 患者外周血克隆性增殖 T 细胞 CDR3 区序列及其编码蛋白序列

V 片段	DNA 序列			蛋白序列		
	V 区	CDR3	J 区	V 区	CDR3	J 区
Vα13	tatttctgtgctg	gggatgaggcgg	acaccggtaccagttc (Jα49)	YFCA	GDEAD	TGNQF
Vα18	ctctgtgccttt	ggaggg	acctctacgacaaggt (Jα50)	LCAF	GG	LLRQG
Vβ21	gccagcagctta	ctcagggt	ctacgagcagtacttc (Jβ2.7)	ASSL	LRV	YEQYF

3 讨论

T 细胞受体在受到抗原刺激后,TCR 基因发生重排,而形成针对抗原的特异性 TCR,通过基因扫描分析发现其呈寡克隆性分布,可能是机体针对抗原的直接反应。本研究中 CML 患者外周血 T 细胞仅表达部分 TCR Vα 和 Vβ 亚家族,与既往的检测结果相似^[5],不表达的亚家族可能是受到免疫抑制,而所表达的 Vα 和 Vβ 亚家族中,大部分呈多克隆性表达,少部分寡克隆性表达,与正常人外周血 T 细胞中绝大多数的亚家族呈多克隆表达的情况不同,提示在恶性肿瘤病人外周血中 TCR Vα 和 Vβ 亚家族 T 细胞呈倾斜性分布或称为优势利用。

本研究中所发现的 CML 病人的 Vβ21 寡克隆 T 细胞与本研究组以前的研究结果相一致^[5-6];进一步对 Vβ21 亚家族的 CDR3 进行序列分析,其利用的 J 片段是 Jβ2.7,与以前报道的 3 例 CML 病人的 Vβ21 寡克隆的 T 细胞的 CDR3 所利用的 J 片段 (Jβ2.3、Jβ2.1 和 Jβ1.3) 不同^[6],结果显示 Vβ21 克隆性增殖的 T 细胞可能是机体对肿瘤相关抗原的一种直接反应,在同种肿瘤的不同病人中发现 Vβ21 寡克隆 T 细胞利用 J 区不同可能跟个体免疫反应和 MHC 限制性抗原等多种因素有关。在 CML 中,由于其细胞遗传学改变特点 t(9,22)(q34;q11)而形成 bcr-abl 融合基因,病人能产生针对 bcr/abl 肽的 CTL^[7],Vβ21 寡克隆增殖性 T 细胞可能是针对 bcr-

abl 融合蛋白而产生特异性克隆。

在既往的研究中,本研究组已建立了 RT-PCR 和基因扫描分析了 TCRVα 29 个亚家族的 CDR3 长度,了解 CML 患者 Vα 亚家族的优势利用和克隆性特点的方法^[8]。研究发现 CML 病人外周血 T 细胞的 TCR Vα 亚家族选用呈现明显的选择性并出现克隆性 T 细胞,这同样也与机体对白血病相关抗原产生特异性免疫有关,且克隆性增殖 Vα 亚家族分布以个体特异性为主^[8]。本研究发现 CML 患者 Vα13 和 Vα18 PCR 产物呈寡克隆性增殖,Vα14 PCR 产物呈多克隆下降趋势,未发现与以往实验结果相同的寡克隆,体现了克隆性增殖 Vα 亚家族分布以个体特异性为主,可能跟肿瘤的异质性、个体免疫反应差异、机体内外部环境因素、存在多种肿瘤抗原和单一肿瘤抗原存在多种表位等因素有关。TCRα 基因由于不含有 D 区,故仅有 V 区和 J 区发生重排^[1]。人类有 61 个 Jα 基因片段其中有 3 个假基因 (Jα51、59 和 60)^[9],对 Vα13 和 Vα18 亚家族的 CDR3 进行序列分析显示它们分别利用 Jα49 和 Jα50 区重排,这种重排编码的 TCRα 链 CDR3 区蛋白可能特异结合 CML 肿瘤抗原。很多研究表明,TCRα 链比 TCRβ 链多样性更多,识别抗原肽主要依靠 TCRα 链^[10-11],因此分析 TCR α 链 CDR3 区的特点对了解 CML 的细胞免疫的特性和特异性免疫治疗的研究

有着重要的意义。一个有功能的 TCR 必须是 TCR α 和 TCR β 形成异源二聚体,才能发挥抗原识别作用,以往研究只能了解其中一条链的优势利用趋势。本研究同时分析 CML 病人 T 细胞 V α 和 V β 克隆性,了解到在同一 CML 患者 T 细胞上的表达情况,找到特异性针对肿瘤相关抗原的 V α / β 寡克隆性 T 细胞;CML 病人可能存在 V α 13/ β 21 和 V α 18/ β 21 克隆性 T 细胞现象,其 CDR3 序列也被基因库接受登记,推测其可能是针对肿瘤抗原的特异性 T 细胞,为研究特异性免疫治疗提供基础研究。

[参考文献]

- [1] 李扬秋. 血液肿瘤免疫治疗学[M]. 北京:人民卫生出版社, 2005: 379-382.
- [2] GENEVEE C, DIU A, NIERAT J, et al. An experimentally validated panel of subfamily-specific oligonucleotide primers (V α -w29/V β 1-w24) for the study of human T cell receptor variable V gene segment usage by polymerase chain reaction[J]. Eur J Immunol, 1992, 22(5): 1261-1269.
- [3] H hnH, NEUKIRCH C, FREITAGK, et al. Longitudinal analysis of T-cell receptor (TCR)-V α and-V β repertoire in CDS+ T cells from individuals immunized with recombinant hepatitis [J]. Clin Exp Immunol, 2002, 129(2): 309-317.
- [4] LI Y, YANG L, CHEN S, et al. The TCR V β repertoire usage of T cells from cord blood induced by chronic myelogenous leuke-mia-associated antigen[J]. Hematology, 2005, 10(5): 387-392.
- [5] 李扬秋, SIEGERT W, SCHMIDT C A. 基因扫描分析 CML 病人外周血的 T 细胞克隆性[J]. 肿瘤防治研究, 1998, 25: 23-26.
- [6] 李扬秋, 陈少华, 杨力建, 等. CML 病人 TCR V β 21 寡克隆 T 细胞及其 CDR3 序列特点[J]. 免疫学杂志 2000, 16(3): 189-192.
- [7] BOCCHIA M, KORONTSVIT T, XU Q, et al. Specific human cellular immunity to bcr-abl oncogene-derived peptides[J]. Blood, 1996, 87(9): 3587-3592.
- [8] 陈思, 李扬秋, 陈少华, 等. CML 相关 TCRV α 亚家族 T 细胞的克隆性分布特点[J]. 肿瘤防治研究, 2007, 34(3): 168-170.
- [9] GUSTAVO GLUSMAN, LEE ROWEN, INYOUL LEE, et al. Comparative genomics of the human and mouse T cell receptor loci[J]. Immunity, 2001, 15(3): 337-349.
- [10] HENNECKE J, CARFL A, WILEY D C. Structure of a covalently stabilized complex of a human $\alpha\beta$ T-cell receptor, influenza HA peptide and MHC class II molecule, HLA-DR1[J]. EMBO J, 2000, 19(21): 5611-5624.
- [11] REISER J B, DARNAULT C, GUIMEZANES A, et al. Crystal structure of a T cell receptor bound to an allogeneic MHC molecule[J]. Nat Immunol, 2000, 1(10): 291-297.

[责任编辑:朱颖娜]