

DOI:10.3724/SP.J.1008.2009.00291

## 寻常型天疱疮患者外周血 T 细胞受体 $\beta$ 链可变区 CDR3 基因克隆谱型分析

王茜<sup>1</sup>, 曾抗<sup>1\*</sup>, 周浩<sup>2</sup>, 孙乐栋<sup>1</sup>, 周再高<sup>1</sup>

1. 南方医科大学南方医院皮肤科, 广州 510515

2. 南方医科大学公共卫生学院流行病学系, 广州 510515

**[摘要]** **目的:**探讨寻常型天疱疮(PV)患者外周血 T 细胞受体(TCR)互补决定区(CDR3)基因谱型变化,了解克隆扩增的 T 细胞与自身免疫性疾病的相互关系。**方法:**采用免疫扫描谱型分析技术,分析 6 例正常人外周血单个核细胞 TCR  $\beta$  链可变区(BV) CDR3 谱型分布特征以及 6 例 PV 患者 CDR3 谱型变化情况。**结果:**6 例正常人 TCR BV CDR3 谱型均符合正态分布,6 例 PV 患者 TCR BV CDR3 谱型均出现多态性降低, BV 亚家族单/寡克隆增生。**结论:**PV 患者外周血 TCR 可变区  $\beta$  链 CDR3 谱型异常可能与 PV 发病有关。

**[关键词]** 寻常型天疱疮; T 淋巴细胞受体; 互补决定区 3; 基因多态性

**[中图分类号]** R 593.2 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2009)03-0291-04

### Spectratyping analysis of complementarity-determining region 3 of T-cell receptor beta chain variable region in peripheral blood mononuclear cells of patients with pemphigus vulgaris

WANG Qian<sup>1</sup>, ZENG Kang<sup>1\*</sup>, ZHOU Hao<sup>2</sup>, SUN Le-dong<sup>1</sup>, ZHOU Zai-gao<sup>1</sup>

1. Department of Dermatology, Nanfang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China

2. Department of Epidemiology, School of Public Health and Tropical Medicine, Southern Medical University, Guangzhou 510515

**[ABSTRACT]** **Objective:** To analyze the changes 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 pemphigus vulgaris (PV), so as to understand the association of proliferated T cells with autoimmune diseases. **Methods:** Immunoscope spectratyping technique was used to analyze the distribution of TCR  $\beta$  chain CDR3 in 6 normal blood donors and the dominant CDR3 in the PBMCs in 6 PV patients. **Results:** The spectratypes of TCR BV subfamily CDR3 region was in a Gaussian distribution manner in all the 6 normal blood donors. The 6 PV patients, however, displayed abnormal proliferation, and oligoclonal expansion of the T cells was observed in TCR BV families with different CDR3 sequences. **Conclusion:** The abnormal spectratypes of TCR BV subfamily CDR3 region in the peripheral blood of PV patients might be related to the pathogenesis of PV.

**[KEY WORDS]** pemphigus vulgaris; T cell receptor; complementarity determining region 3; genetic polymorphism

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2009, 30(3): 291-294]

天疱疮是一组累及皮肤和黏膜的自身免疫性表皮内大疱病,而寻常型天疱疮(PV)是最常见的一型,其发生、发展与免疫、遗传等因素有关。一直以来研究较多的是针对表皮内桥粒芯糖蛋白(Dsg)的 IgG 型自身抗体,但除了 B 细胞的功能异常产生致病性抗体外, T 细胞介导的细胞免疫在天疱疮的致病机制中也发挥了相当重要的作用<sup>[1]</sup>。近年来,肿瘤、移植排斥、自身免疫性疾病等病理状态下 T 细胞的应答与耐受方面的研究取得较大进展<sup>[2-7]</sup>, T 细胞受体(TCR) $\beta$

链互补决定区(CDR3)是 TCR 与抗原肽结合、开启免疫应答的重要位点,在正常人中呈现多态性。本研究对正常人及 PV 患者外周血 TCR  $\beta$  链可变区(BV) CDR3 基因谱型进行分析,以期发现疾病相关的 T 细胞克隆,为 PV 的发病机制研究提供基础。

### 1 材料和方法

1.1 研究对象 抽取 6 例 PV 患者外周血,抗凝管装存,每管 10 ml。患者均来自本院皮肤科,5 男 1

**[收稿日期]** 2008-09-11

**[接受日期]** 2008-10-21

**[基金项目]** 国家自然科学基金(30771937), Supported by National Natural Science Foundation of China (30771937) .

**[作者简介]** 王茜, 博士生. E-mail: wangqian120@126.com

\* 通讯作者(Corresponding author). Tel: 020-61641981, E-mail: npfk@fimmu.com

女,均具有典型 PV 的临床表现,经临床和组织病理确诊,并排除其他传染性、肿瘤性疾病。同时选择 6 例正常献血员,3 男 3 女,作为对照。

1.2 主要材料及试剂 血液 RNA 抽提试剂盒 (TaKaRa),cDNA 合成和 PCR 试剂(Omega),凝胶回收试剂盒 (TaKaRa),去离子甲酰胺(Sigma)等。

1.3 引物设计与合成 按照参考文献<sup>[8-10]</sup>合成 TCR BV CDR3 谱型分析上游引物 26 条,下游引物 TCR BC 5'端带 FAM 荧光标记 1 条,TCR BC 对照引物 1 对。引物由北京赛百盛基因技术有限公司合成。

1.4 总 RNA 提取和 cDNA 合成 分离出外周血单个核细胞(PBMC),按 RNA 提取试剂盒步骤提取正常人和 PV 患者 PBMC 中的总 RNA,取 10 μl 总 RNA 为模板,用 Oligo(dT)作引物,反应体系为 30 μl,每标本做 6 个反应,按 cDNA 合成试剂盒条件合成 cDNA。

1.5 PCR 扩增 TCR BV 家族 CDR3 区段 cDNA 每例样本做 27 个 PCR 反应管,PCR 反应体积为 30 μl,含 cDNA 模板 1 μl,2 mmol/L dNTP 3 μl,10× Buffer 3 μl,上游引物 2 μl,下游引物 2 μl,Taq DNA 聚

合酶 1 μl,余加去 RNase 酶的重蒸水补齐。反应条件为:94℃ 预变性 3 min;94℃ 1 min,57℃ 1 min,72℃ 1 min;35 个循环;72℃ 10 min 延伸。PCR 产物 8 μl 在 1%琼脂糖凝胶上进行电泳,其余-20℃ 保存备用。

1.6 TCR BV 家族 CDR3 谱型多态性分析 将得到的 PCR 产物在含 40%尿素的 6%变性聚丙烯酰胺凝胶电泳道上进行电泳;PCR 产物 10 μl 加等量的含去离子甲酰胺变性胶上样缓冲液,95℃ 加热变性 5 min,冰浴中骤冷,每管取 2 μl 在 373DNA 序列分析仪 (ABI)中电泳 2 h。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,以显示出不同的位置、高度、颜色和形态的峰。

### 2 结果

2.1 正常献血员和 PV 患者 PBMC TCR BV 家族 CDR3 的 PCR 结果 正常献血员和 PV 患者 TCR BV 家族 CDR3 区段及 TCR β 链恒定区(BC)对照的 PCR 产物 1%琼脂糖凝胶电泳结果显示,在 100~600 bp 均出现明显条带。图 1 为正常献血员-1 和 PV-1 的电泳结果。

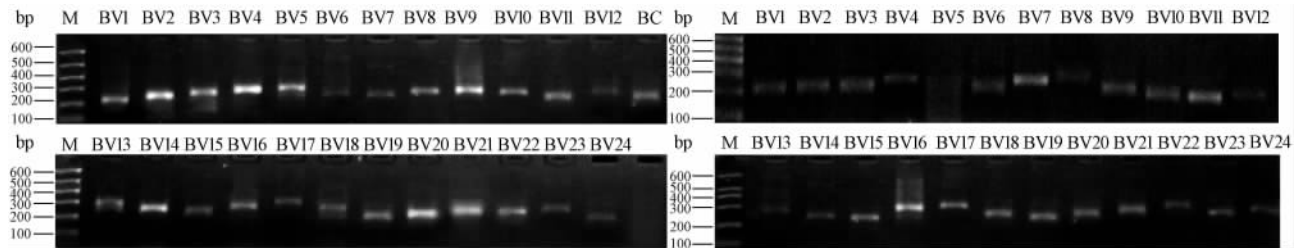


图 1 正常献血员-1(左)和 PV-1(右)TCR BV 家族的 PCR 产物电泳图

Fig 1 Electrophoresis of PCR products of TCR BV family in a normal control-1(left)and PV-1 patient(right)

M; Marker; BC; Control

2.2 正常人对照和 PV 患者 TCR BV GeneScan 672 软件自动分析结果 6 例正常献血员 TCR BV 24 个功能性家族基因均呈现 8 个以上条带的中间高、两端低的钟型峰图,符合正态分布,相邻两条条带大小相差 3 bp。图 2 为正常献血员-1 完整扫描图,图中 X 轴的相位差为各 PCR 产物的大小,Y 轴不同高度的峰为各 CDR3 的表达频率,反映了 T 细胞的多克隆群体。6 例 PV 患者在部分 TCR BV 家族 CDR3 多态性表达降低,可见 T 细胞单/寡克隆性增生,表现为单峰、寡峰及偏峰(表 1)。

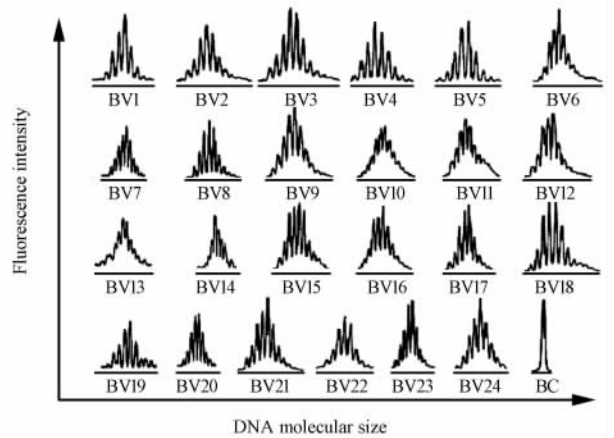


图 2 正常献血员-1 PBMC 的 TCR β 链 CDR3 谱型基因扫描图

Fig 2 TCR β chain CDR3 distribution profiles in PBMCs of normal control-1 analyzed by GeneScan

### 3 讨论

数以百万计的各种 TCR 分子组成的 TCR 库赋予免疫系统识别外来抗原的巨大潜力,CDR3 是外来抗原肽结合的关键位点,是构成 TCR 分子特异性

的主要结构,因此 CDR3 域的谱型变化能够反映 T 细胞功能状态,帮助我们了解 T 细胞免疫与疾病发生、发展、变化的关系<sup>[11]</sup>。

表 1 PV 患者 TCR BV 出现单/寡克隆增生及偏移峰型的家族

Tab 1 Monoclonal/oligoclonal expansion and skewing subfamily of TCR BV in PV patients

Patient	Example of TCR BV			
	Monoclonal/oligoclonal expansion			Skewing subfamily
PV-1				
PV-2				
PV-3				
PV-4				
PV-5				
PV-6				

本研究通过分析正常人与 PV 患者外周血 TCR BV CDR3 区段基因谱型来反映自身反应性 T 细胞的特征。6 例正常人外周血单个核细胞的 24 个 TCR BV 家族的 CDR3 谱型的 PCR 产物在 6% 的测序凝胶上呈现出超过 8 条以上的条带,TCR BC 对照组为单条条带,与其他研究结果一致<sup>[10]</sup>,说明正常人淋巴细胞中 TCR $\beta$  链 CDR3 呈现多态性。6 例 PV 患者的部分 TCR BV 家族可见 T 细胞单克隆增生,也可见寡克隆增生,表现为基因谱型中某些家族克隆性增大,且条带少于 8 个,而另一些家族表达量很低甚至缺失。综合 6 个病例基因扫描异常结果,发现在不同的 BV 家族可以看到多个单/寡克隆条带,其中 BV1、BV3、BV7、BV13、BV23、BV 24 家族各出现 1 次单/寡克隆条带;BV5、BV9、BV14、BV17 家族各出现 2 次单/寡克隆条带,且 BV14 还出现 2 次偏移;BV10、BV22 家族各出现 3 次单/寡克隆条带。因此 TCR 在 BV10、BV14、BV22 克隆性增殖的表达频率较高,但未发现 PV 共同使用的 BV 家族。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<sup>[12-13]</sup>。正常人 TCR BV24 亚家族几乎全部表达,而在感染性疾病(HIV、病毒感染等)、肿瘤、自身免疫性疾病(SLE 等)研究中报道 TCR  $\beta$  链 CDR3 可以观察到部分出现寡克隆峰和单克隆峰,甚至出现部分 BV 链的缺失。在没有抗原诱导下,TCR BV 链 CDR3 的分布是随机

的,但在某特定抗原刺激后,TCR BV 基因可对该抗原产生特异性识别,并能使带有该基因的 T 细胞得到优势扩增。因此 TCR BV 家族 CDR3 谱型反映了 TCR 的克隆性。本研究对 PV 患者外周血单个核细胞的 TCR BV 家族 CDR3 谱型研究发现,部分亚家族出现单克隆峰和寡克隆峰,甚至出现部分 BV 链的缺失,提示 PV 的抗原可能在 T 细胞上得到优势扩增。

下一步我们将加大病例的样本量,筛选 PV 共同的 BV 家族并进行测序,对 CDR3 氨基酸序列进行比较,发现共同使用的氨基酸基序,进而了解 TCR BV 亚家族单/寡克隆改变与天疱疮相关致病因素之间的关系,为天疱疮的发病机制研究提供新的方法和手段。

(志谢 本实验得到南方医科大学南方医院皮肤科和南方医科大学公共卫生学院流行病学实验室全体人员的支持和帮助,在此一并表示感谢!)

#### [参考文献]

- [1] 顾艳,郑捷. T 细胞介导的细胞免疫在寻常型天疱疮中的作用[J]. 上海交通大学学报:医学版,2007,27:457-460.
- [2] Ostenstad B, Sioud M, Lea T, Schlichting E, Harboe M. Limited heterogeneity in the T-cell receptor V-gene usage in lymphocytes infiltrating human colorectal tumours[J]. Br J Cancer, 1994,69:1078-1082.
- [3] Peoples G E, Yoshino I, Douville C C, Andrews J V, Goedegebuure P S, Eberlein T J. TCR V beta 3<sup>+</sup> and V beta 6<sup>+</sup> CTL recognize tumor-associated antigens related to HER2/neu expression in HLA-A2<sup>+</sup> ovarian cancers[J]. J Immunol, 1994, 152:4993-4999.
- [4] Hirokawa M, Matsutani T, Saitoh H, Ichikawa Y, Kawabata Y, Horiuchi T, et al. Distinct TCRAV and TCRBV repertoire and CDR3 sequence of T lymphocytes clonally expanded in blood and GVHD lesions after human allogeneic bone marrow transplantation[J]. Bone Marrow Transplant, 2002,30:915-923.
- [5] Guillet M, Brouard S, Gagne K, Sébille F, Cuturi M C, Delsuc M A, et al. Different qualitative and quantitative regulation of V beta TCR transcripts during early acute allograft rejection and tolerance induction[J]. J Immunol, 2002,168:5088-5095.
- [6] Goldstein I, Simon A J, Ben Horin S, Matzri S, Koltakov A, Langevitz P, et al. Synovial VLA-1<sup>+</sup> T cells display an oligoclonal and partly distinct repertoire in rheumatoid and psoriatic arthritis[J]. Clin Immunol, 2008,128:75-84.
- [7] Fraser P A, Lu L Y, DeCeulaer K, Schur P H, Fici D, Awdeh Z, et al. CD4 TCRBV CDR3 analysis in prevalent SLE cases from two ethnic groups[J]. Lupus, 1999,8:311-319.
- [8] 姚新生,马骊,温茜,邹红云,阮光萍,王小宁. 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, 2006,26:571-573.
- [9] Han M, Harrison L, Kehn P, Stevenson K, Currier J, Robinson

M A. Invariant or highly conserved TCR alpha are expressed on double-negative (CD3<sup>+</sup> CD4<sup>-</sup> CD8<sup>-</sup>) and CD8<sup>+</sup> T cells[J]. J Immunol, 1999, 163: 301-311.

[10] Gorski J, Yassai M, Zhu X, Kissela B, Kissela B, Keever C, et al. Circulating T cell repertoire complexity in normal individuals and bone marrow recipients analyzed by CDR3 size spectratyping. Correlation with immune status[J]. J Immunol, 1994, 152: 5109-5119.

[11] 刘继华, 朱平. 基因指纹图谱探索胚胎淋巴细胞克隆发生的规律[J]. 中国优生与遗传杂志, 2002, 10: 1-3.

[12] Takeuchi T, Tsuzaka K, Abe T, Yoshimoto K, Shiraishi K, Kamada H, et al. T cell abnormalities in systemic lupus erythematosus[J]. Autoimmunity, 2005, 38: 339-346.

[13] Kedzierska K, La Gruta N L, Stambas J, Turner S J, Doherty P C. Tracking phenotypically and functionally distinct T cell subsets *via* T cell repertoire diversity[J]. Mol Immunol, 2008, 45: 607-618.

[本文编辑] 贾泽军

• 读者 作者 编者 •

### 中草药名称中文、拉丁文及英文对照表(十八)

汉语拼音名	中文名	拉丁名	英文名
Niuxixi	牛西西	<i>Radix Rumicis Patientiae</i>	Patience Dock Root
Nongjili	农吉利	<i>Herba Crotalariae</i>	Purpleflower Crotalaria Herb
Nuodaogen	糯稻根	<i>Radix Oryzae Glutinosae</i>	Glutinosae Rice Root
Nuzhenzi	女贞子	<i>Fructus Ligustri Lucidi</i>	Glossy Privet Fruit
Oujie	藕节	<i>Nodus Nelumbinis Rhizomatis</i>	Lotus Rhizome Node
Paiqiancao	排钱草	<i>Ramulus et Folium Phyllodii Pulchelli</i>	Beautiful Phyllodium Twig and Leaf
Pandaozeng	拳倒甍	<i>Radix Ceratostigmatis</i>	Ceratostigma Root
Pangdahai	胖大海	<i>Semen Scaphii Lychmophori</i>	Boat-fruited Scaphium Seed
Panlongshen	盘龙参	<i>Radix seu Herba Spiranthis Lanceae</i>	Chinese Ladiestresses Root or Herb
Paotongguo	泡桐果	<i>Fructus Paulowniae</i>	Fortune Paulownia Fruit / Royal Paulownia Fruit
Peilan	佩兰	<i>Herba Eupatorii</i>	Fortune Eupatorium Herb
Pengqiju	澎蜇菊	<i>Herba Wedeliae</i>	Chinese Wedelia Herb
Pengsha	硼砂	<i>Borax</i>	Borax
Pihancao	辟汗草	<i>Herba Meliloti Suaveolentis</i>	Daghestan Sweetclover Herb
Pijihua	啤酒花	<i>Flos Humuli Lupuli</i>	European Hop Flower
Pingbeimu	平贝母	<i>Bulbus Fritillariae Ussuriensis</i>	Ussuriensis Fritillary Bulb
Pipaye	枇杷叶	<i>Folium Eriobotryae</i>	Loquat Leaf
Pugongying	蒲公英	<i>Herba Taraxaci</i>	Mongolian Dandelion Herb
Puhuang	蒲黄	<i>Pollen Typhae</i>	Cattail Pollen
Qiancao	茜草	<i>Radix Rubiae</i>	India Madder Root
Qianghuo	羌活	<i>Rhizoma Notopterygii</i>	Incised Notopterygium Rhizome / Forbes Notopterygium Rhizome
Qianhu	前胡	<i>Radix Peucedani</i>	Root
Qianjinba	千金拔	<i>Radix Flemingiae Philippinensis</i>	Philippine Flemingia Root
Qianjinteng	千金藤	<i>Radix Stephaniae Japonicae</i>	Japanese Stephania Root
Qianjinzi	千金子	<i>Semen Euphorbiae</i>	Caper Euphorbia Seed
Qianliguang	千里光	<i>Herba Senecionis Scandentis</i>	Climbing Groundsel Herb
Qiannianjian	千年健	<i>Rhizoma Homalomenae</i>	Obscured Homalomena Rhizome
Qianniuzi	牵牛子	<i>Semen Pharbitidis</i>	Pharbitis Seed
Qianqucai	千屈菜	<i>Herba Lythri Salicariae</i>	Purple Lythrum Herb
Qianrihong	千日红	<i>Flos Gomphrenae</i>	Globeamaranth Flower
Qianshi	芡实	<i>Semen Euryales</i>	Gordon Euryale Seed
Qidagu	漆大姑	<i>Folium Glochidii Eriocarpi</i>	Eriocarpous Glochidion Leaf
Qigucao	漆姑草	<i>Herba Saginae Japonicae</i>	Japanese Pearlwort Herb
Qincai	芹菜	<i>Herba Apii</i>	Wildcelery Herb
Qingdai	青黛	<i>Indigo Naturalis</i>	Natural Indigo
Qingfen	轻粉	<i>Calomelas</i>	Calomel
Qingfengteng	青风藤	<i>Caulis Sinomenii</i>	Ovientvine
Qinghao	青蒿	<i>Herba Artemisiae</i>	Sweet Wormwood Herb
Qingmengshi	青礞石	<i>Lapis Chloriti</i>	Biotite Schist and Mica / Carbonate Schist by Chloritization
Qingmuxiang	青木香	<i>Radix Aristolochiae</i>	Slender Dutchmanspipe Root
Qingpi	青皮	<i>Pericarpium Citri Reticulatae Viride</i>	Green Tangerine Peel