



## Jurkat 细胞TCR 基因重排对BV CDR3的影响

TCR $\beta$ 链可变区互补决定区3 (TCR BV CDR3)是TCR $\beta$ 链胚系基因片段重排过程中,由BV末端、BD片段、BJ前端以及重排时V-D与D-J之间的插入序列组成 ( $V_N D_N J$ ),对抗原的特异性识别发挥主要作用[1], [2]。不同克隆T细胞TCR CDR3长度及序列有所不同。目前报道,TCRBV 基因有26个亚家族,通过设计各家族上游引物和TCR BC下游引物,利用RT-PCR可扩增出特异性TCR  $\alpha\beta$ 细胞的 BV CDR3区,结合GeneScan和基因测序技术可以分析TCRBV CDR3谱系、CDR3长度和序列特点[3][4]。

我们发现代表 T细胞发育成熟阶段的人T细胞白血病细胞株Jurkat (TCR- $\alpha\beta$ +CD $^3$ +CD $^4$ +CD $^8$ -CD $^2$ +CD $^7$ +)同时表达重组激活基因RAG1和RAG2,并且证实Jurkat细胞有TCR BD2-BJ2基因重排的发生[5], [6]。本研究监测了Jurkat细胞在自身增殖传代过程中以及经不同因素刺激诱导后其TCR BV CDR3谱系及长度和序列变化情况,初步探讨Jurkat细胞TCR基因重排对其TCR CDR3区可能产生的影响作用,为进一步深入研究TCR基因重排奠定实验基础。

### 1 材料与方法

#### 1.1 细胞株与主要试剂

人T淋巴细胞白血病细胞株Jurkat购自上海细胞生物研究所,分泌抗CD3 单克隆抗体(anti-CD3 mAb)的杂交瘤细胞株12F6与 Burkitt's淋巴瘤细胞株Raji由本实验室保存;PBMC(peripheral blood mononuclear cell)由健康正常人静脉血分离。

RPMI 1640培养基(美国GIBCO 公司);胎牛血清(杭州四季青生物工程公司);植物血凝素(PHA),广东医药工业研究所产品;全反式维甲酸(retinoic acid, RA)、佛波醇-12-豆蔻酰-13-乙酸酯(phorbol 12-myristate 13-Acetate, PMA)、钙离子载体A23187、内毒素(LPS),均为Sigma 产品;葡萄球菌A蛋白(SPA)购自北京本元正阳基因技术股份有限公司;重组葡萄球菌肠毒素A (recombinant Staphylococcal enterotoxin A, rSEA),军事医学科学院制备产品;rhGM-CSF,北京瑞得合通药业有限公司;柱离心式RNA抽提试剂盒(安徽优品生物工程有限公司);RNA逆转录试剂盒(日本TOYOBO公司)。rTaq DNA聚合酶(MBI Fermentas 公司);DL2000 DNA Marker(TaKaRa大连宝生物有限公司);去离子甲酰胺:Sigma 产品;GeneScan-500-TAMRA(500 ROX)标准品:Applied Biosystems, USA。

#### 1.2 方法

1.2.1 细胞培养 细胞用含有10%胎牛血清的RPMI 1640培养基于37 °C、50 ml/L CO $_2$ 条件下培养;将Jurkat细胞批量扩增冻存,首批作为“标准株”,后续实验以此作标准参照;以人外周血PBMC为研究对照。PBMC采用Ficoll淋巴细胞分离液密度梯度法离心。

1.2.2 Jurkat细胞的刺激诱导 取对数生长期Jurkat细胞,按 $5 \times 10^5$ /孔的浓度加于12孔细胞培养板(复孔数为2),分别加入:① PHA (20  $\mu$ g/ml);② PMA(40 ng/ml)+A23187(0.5  $\mu$ mol/L);③ 抗CD3 mAb (1:100);④ rGM-CSF (2000 U/ml);⑤ SPA (100  $\mu$ g/ml);⑥ LPS (1  $\mu$ g/ml);⑦ RA(10  $\mu$

mol/L); ⑧ SEA (1 μg/ml); ⑨SEA+Raji (Jurkat:Raji 细胞数=1:10; SEA 1 μg/ml); 同时设⑩ 不加任何处理因素的对照组。平板置于37 °C、5%CO<sub>2</sub> 孵箱培养。①、②、③组于培养的第48 h收集各组细胞; 其余各组于第48 h换液, 补加相应浓度的各种刺激剂, 于培养的第72 h收集细胞。

1.2.3 总RNA 提取与RNA逆转录 收集各组细胞, PBS洗涤2~3次后采用试剂盒提取细胞总RNA, 在核酸蛋白分析仪(BECKMAN DU530)上鉴定RNA纯度和浓度, -70 °C保存备用; 取样品总RNA约1 μg, 加到20 μl反应体系中按试剂盒说明进行逆转录。

1.2.4 PCR扩增TCR BV 基因26个亚家族 参照文献[3], [4][7]合成TCR BV 基因家族上游引物26条, TCR BC 下游5'端带FAM标记引物1条, TCR BC对照引物2条; 引物由Invitrogen 上海英骏生物技术有限公司合成, 引物序列见表1。

表1 TCR BV 26 家族、TCR BC-FAM 及 TCR BC 对照引物序列  
Tab.1 Primer sequences of TCR BV 26 families, TCR BC-FAM and TCR BC control

| TCRBV primers  | Sequences(5'-3')          | TCRBV primers     | Sequences(5'-3')         |
|----------------|---------------------------|-------------------|--------------------------|
| TCR BV1S1A1N1  | GCACAACAGTTCCCTGACTTGAC   | TCR BV13S2A1T     | GGTGAGGGTACAACAGGCC      |
| TCR BV2S1      | TCATCAACCATGCAAGCCTGACCT  | TCR BV14S1        | GTCTCTCGAAAAGAGAAGAGGAAT |
| TCR BV3S1      | GTCTCTAGAGAGAAGAAGGAGCGC  | TCR BV15S1        | AGTGTCTCTCGACAGGCACAGGCT |
| TCR BV4S1A1T   | ACATATGAGAGTGGATTGTGATT   | TCR BV16S1A1N1    | AAAGAGTCTAAACAGGATGAGTCC |
| TCR BV5S1A1T   | ATACTTCAGTGAGACACAGAGAAAC | TCR BV17S1A1T     | CAGATAGTAAATGACTTTCAG    |
| TCR BV5S2      | TTCCTAACTATAGCTCTGAGCTG   | TCR BV18S1        | GATGAGTCAGGAATGCCAAAGGAA |
| TCR BV6S1A1N1  | AGGCCTGAGGGATCCGTCTC      | TCR BV19S1P       | CAATGCCCCAAGAACGCACCCTGC |
| TCR BV7S1A1N2T | CCTGAATGCCCAACAGCTCTC     | TCR BV20S1A1N2    | AGCTCTGAGGTGCCCCAGAATCTC |
| TCR BV8S1      | ATTTACTTTAACAACAACGTTCCG  | TCR BV21S1        | GATTCACAGTTGCCTAAGGA     |
| TCR BV9S1A1T   | CCTAAATCTCCAGACAAAGCTCAC  | TCR V22S1A2N1T    | CAGAGAAGTCTGAAATATTCGA   |
| TCR BV10S1P    | CTCCAAAAACTCATCCTGTACCTT  | TCR BV23S1A2T     | GATCGATTCTCAGCTCAACAG    |
| TCR BV11S1A1T  | TCAACAGTCTCCAGAATAAGGACG  | TCR BV24S1A3T     | AAAGATTTAACAATGAAGCAGAC  |
| TCR BV12S1A1N2 | AAAGGAGAAGTCTCAGAT        | TCR BC-FAM        | TTCTGATGGCTCAAACAC       |
| TCR BV13S1     | CAAGGAGAAGTCCCAAT         | TCR BC sense      | GTCGCTGTGTT GAGCCATCAGAA |
|                |                           | TCR BC anti-sense | GTG CAC CTC CTT CCC ATT  |

PCR 反应总体系50 μl, 含2 μl cDNA 模板, 5μl 10× PCR buffer, 10 mmol/L dNTP 1μl, 25 mmol/L MgCl<sub>2</sub> 3μl, 10 μmol/L的上、下游引物各2 μl, 1 U/μl 的rTaq酶1 μl, 去离子水34 μl。循环条件为: 94 °C 预变性3 min, 主循环(94 °C 1 min、60 °C 1 min、72 °C 1min)35个循环, 72 °C 延伸10 min。扩增产物经1.5 %琼脂糖凝胶电泳分析, 发现阳性带者进一步作TCR GeneScan分析。

1.2.5 TCR GeneScan 分析 取TCR BV阳性家族PCR产物2 μl(下游引物带FAM荧光标记), 分别加入0.5 μl GeneScan-500-TAMRA(其中含有不同大小的荧光素Tamra标记的DNA片段), 2 μl去离子甲酰胺, 0.5 μl变性胶上样缓冲液(25 mmol/L EDTA, 50 mg/ml blue dextran), 94 °C变性4 min后, 每管取2 μl于6%聚丙烯酰胺凝胶, 373 DNA序列分析仪(ABI, PerkinElmer公司)中电泳, 通过分析软件672分析结果, 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。

1.2.6 核苷酸序列分析 TCR GeneScan 分析发现单克隆或寡克隆的产物, 进一步进行测序分析 TCR BV CDR3的一级核苷酸序列。

## 2 结果

### 2.1 Jurkat 细胞TCR BV CDR3谱系

RT-PCR 产物凝胶电泳图显示, “标准株” Jurkat细胞TCR BV家族中, 仅 BV8家族显出一条特异性条带(图1)。经不同因素刺激诱导后的Jurkat细胞TCR BV家族均只显出BV8特异性条带(结果未显示)。而正常人PBMC TCR BV家族RT-PCR 产物在1.5%琼脂糖凝胶上电泳, 各家族均显出一条特异性条带(图 2)。

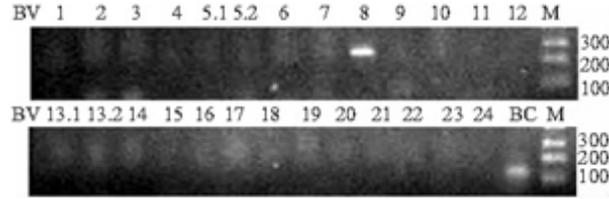


图 1 Jurkat TCR BV家族 RT-PCR产物琼脂糖凝胶电泳图  
 Fig.1 1.5% agarose gel electrophoresis of RT-PCR products of TCR BV families of Jurkat cells  
 Lanes: 1-24: 24 TCR BV1 families; BC: BC control; M: DNA marker

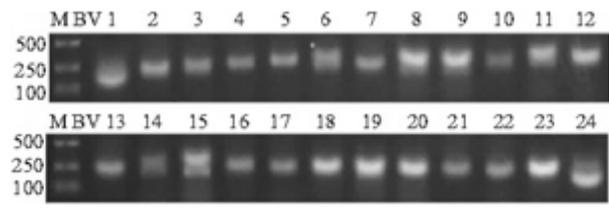


图 2 正常人PBMC TCR BV家族RT-PCR产物琼脂糖凝胶电泳图  
 Fig.2 1.5% agarose gel electrophoresis of RT-PCR product of TCR BV families of normal human PBMC  
 Lanes 1-24: 24 TCR BV1 families.\*TCR BV5.2, 13.2 families and BC control is not shown

2.2 TCR GeneScan结果

“标准株”以及不同因素作用组的Jurkat细胞TCR BV8产物在6%变性聚丙烯酰胺凝胶电泳上基因扫描结果显示，各组BV8家族均只出现一条带，利用GeneScan 672软件对基因扫描图的峰型自动分析表明PCR产物均呈单峰，即为单克隆家族；而正常人PBMC TCR BV各家族在6%变性聚丙烯酰胺凝胶电泳基因扫描结果显示均为多条条带，峰型自动分析，各家族均呈多峰，显示为多克隆家族。“标准株”Jurkat和PBMC TCR BV8 RT-PCR产物GeneScan峰型分析结果见图3。

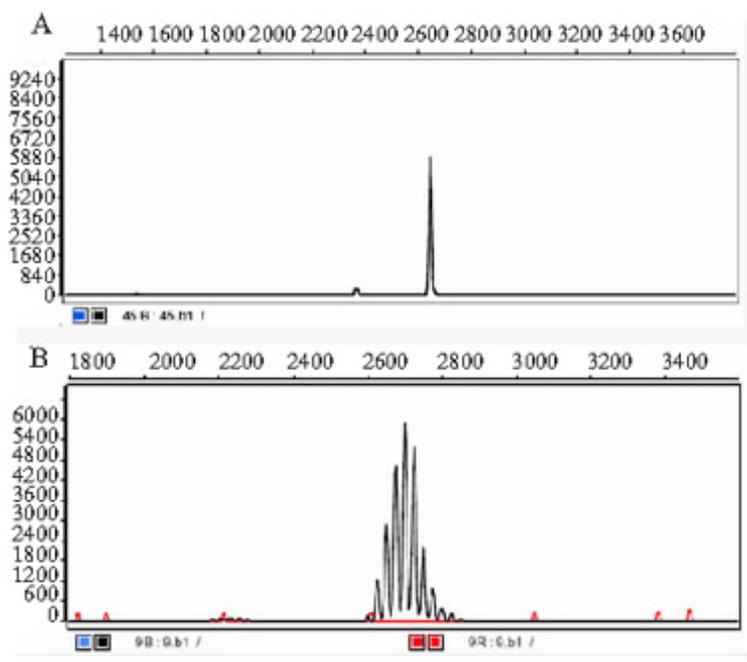


图 3 Jurkat、PBMC TCR BV8家族 RT-PCR产物基因扫描峰型分析  
 Fig.3 TCR BV8  $\beta$  chain VDJC junction (CDR3 size) distribution profiles in Jurkat cells (A) and PBMCs (B)  
 The X axis of each plot corresponds to the number of nucleotides, and the Y axis to fluorescence intensity.

## 2.3TCR BV8 CDR3区序列分析

对“标准株”Jurkat TCR BV8 RT-PCR产物(不带荧光标记)进行序列测定,分析和确定其CDR3区核苷酸(和相应的氨基酸)序列,以及BD及BJ所属片段,结果表明:Jurkat TCR  $\beta$ 链CDR3区为BV8S1NBD1NBJ1S2。序列测定结果如下:

```
1ATGATTTCAGGGATGCCCGAGGATCGATTCTCAGCTAAGATGCCTAATGCATCATTTCTCCA60
1 D S G M P E D R F S A K M P N A S F S T 20
61CTCTGAAGATCCAGCCCTCAGAACCCAGGGACTCAGCTGTGTACTTCTGTGCCAGCAGTT120
21 L K I Q P S E P R D S A V Y F C A S S F 40
121TCTCGACCTGTTTCGGCTAACTATGGCTACACCTTCGGTTTCGGGGACCAGGTTAACCGTT180
41 S T C S A N Y G Y T F G S G T R L T V V 60
181TAGAGGACCTGAACAAGGTGTTCCACCCGAGGTCGCTGTGTTTGTAGCCATCAGAAGCAG240
61 E D L N K V F P P E V A V F E P S E A E 80
241AGATCTCCACACCCAAAAA260
81 I S H T Q K
```

CASS至F G之间的序列即为 Jurkat TCRBV8 CDR3序列。以此序列作为Jurkat TCR BV8 CDR3标准参照序列。

对Jurkat在培养传代过程中以及经刺激诱导后各组Jurkat 细胞TCR BV8 RT-PCR产物进行序列分析,结果表明:各组 TCR BV8 CDR3区长度和序列均与“标准株”一致,表明CDR3长度和序列未发生变化(测序结果资料未显示)。

## 3 讨论

本研究结果表明, Jurkat细胞是表达TCR BV8家族的单克隆细胞株, Jurkat TCR BD2-BJ2 重排可能是一“无效”过程,重排过程并不能产生BV8以外的新的TCR BV亚家族而引起 BV CDR3谱系漂移,且对CDR3长度和一级核苷酸序列也未产生影响。结果提示,重排对BV CDR3区抗原识别特异性并未产生影响,但尚不能排除重排引起TCR改变的可能性。

淋巴细胞抗原受体基因的重排受多因素调控,包括重组酶的表达、重组酶固有的生化特性、重组中DNA的识别和切割、DNA修复连接以及重组底物的易接近性等[8],其中重组底物的易接近性又要受到重组酶的转录、甲基化作用以及染色质结构的影响[9][10][11]。据报道,顺式作用元件对BV片段易接近性的调节作用有别于对BD/BJ片段易接近性的调节作用[12]。即便是在重组酶重组活性非常活跃并且BV基因片段易接近性较好的情况下,某些反式作用元件可能会调整重组酶的作用性能,使其利用和识别特殊的重组信号序列(recombination signal sequence, RSS)而阻止BV-BDJ重排事件[13][14]。这样,在Jurkat 中,当BD2-BJ2重排开始启动,而BD1-BJ1或者 BV-BDJ重排可能由于易接近性不够或其他一些阻滞因素而受抑制,正是由于这种部分片段的重排作用而未能改变 TCR BVCDR3区。

目前,虽未发现Jurkat细胞在TCR BD2-BJ2 重排过程中BV CDR3区变化,但Jurkat细胞发生的BD2-BJ2重排是否对BVCDR3区以外的其它区域的结构或功能产生了影响作用?此外,重排过程中是否出现BV8家族以外的其他BV亚家族的前体mRNA,但由于其表达的一过性特点,而未能被现有实验监测到? Jurkat细胞发生的TCR BD2-BJ2 重排在 Jurkat细胞中的功能和意义究竟如何,对TCR具有何种影响,这些都需要作进一步探讨和研究。

有丝分裂原PHA、蛋白激酶C活化剂PMA和钙离子载体A23187、抗-CD3 mAb以及超抗原SPA均为经典的T细胞活化剂; rhGM-CSF 是与造血细胞增殖和分化相关的细胞因子,也是多效的免疫刺激因子,具有扩大T细胞增殖等作用; LPS也是T细胞增殖活化和产生淋巴因子的一种潜在诱导剂[15]; SEA则是一种受到广泛研究的超抗原分子,以MHC II 类分子依赖或非依赖的方式与T细胞TCR  $\beta$ 链V区结合,从而激活大量T细胞并释放一系

列细胞因子, 具有强大的刺激免疫活性。SEA具有超抗原的一般特点, 其递呈不需要APC的加工处理, 可通过两条途径递呈给T细胞, 一是MHC II 类分子依赖途径, 需要表达MHC II 类分子的辅佐细胞参与。二是MHC II 类分子非依赖途径, 不需要MHC II 类分子参与[16]。本研究中, 我们采用了SEA单独诱导Jurkat细胞和以表达MHC II 类分子的Raji 细胞作为辅佐细胞的两种作用方式; 维甲酸是迄今研究的最强的分化诱导剂之一, 近年研究表明RA能抑制多种癌细胞的生长增殖, 诱导癌细胞分化维甲酸(并诱导部分细胞向良性分化)[17], [18]。

本研究中我们以上述具有T细胞活化和增殖作用或具有分化诱导作用的若干因素刺激和诱导Jurkat细胞。根据预实验观察结果, 在保证诱导细胞的活细胞百分数大于90%前提下尽可能选取最长作用时间, 我们针对不同作用因素分别选取了48 和72 h的作用时间。结果未发现不同诱导后的Jurkat TCR CDR3家族谱系及CDR3长度和序列变化, 表明通过 T 细胞活化和增殖途径以及分化诱导作用并不能引起TCR CDR3的改变。本研究目前未筛选出诱导Jurkat TCR CDR3 变化的“阳性”诱导因素, 但尚不能排除Jurkat 在“适当”刺激诱导作用下TCR CDR3发生变化的可能性。据Pam Fink等报道, V $\beta$ 5转基因小鼠的外周CD4<sup>+</sup> T细胞在内源性Mtv-8 (Mammary tumor virus)编码的一种外周耐受原的作用下发生T细胞受体的改变[19]。因此, 利用一些特异性抗原的刺激诱导作用, 或通过内源性抗原提呈途径来进一步筛选“阳性”诱导因素仍然具有一定可能性。

#### 参考文献:

- [1]Davis MM, Bjorkman PJ. T-cell antigen receptor genes and T-cell recognition [J]. Nature, 1988, 334(6181): 395-402.
- [2]Bentley GA, Boulot G, Karjalainen K, et al. Crystal structure of the beta chain of a T cell antigen receptor [J]. Science, 1995, 267(5206): 1984-7.
- [3]Sensi M, Parmiani G. Analysis of TCR usage in human tumors: a new tool for assessing tumor-specific immune responses [J]. Immunol Today, 1995, 16(12): 588-95.
- [4]Pannetier C, Even J, Kourilsky P. T-cell repertoire diversity and clonal expansions in normal and clinical samples [J]. Immunol Today, 1995, 16(4): 176-81.
- [5]邹红云, 马骊, 姚新生, 等. T细胞激活剂对Jurkat 细胞重组激活基因表达的影响[J]. 第四军医大学学报, 2006, 27(14): 1286-8.
- [6]邹红云, 马骊, 姚新生, 等. 人T细胞白血病细胞株Jurkat TCR基因重排的研究[J]. 癌症(待发表)
- [7]Puisieux I, Even J, Pannetier C, et al. Oligoclonality of tumor infiltrating lymphocytes human melanomas [J]. J Immunol, 1994, 153(6): 2807-18.
- [8]Hesse JE, Lieber MR, Gellert M, et al. Extrachromosomal DNA substrate in pre-B cells undergoes inversion or deletion at immunoglobulin V-(D)-J joining signals [J]. Cell, 1987, 49: 775-83.
- [9]Hessie DG, Schatz DG. Factors and forces controlling V(D)J recombination [J]. Adv Immunol, 2001, 78: 169-232.
- [10]Sleckman BP, Gorman JR, Alt FW. Accessibility control of antigen-receptor variable-region gene assembly: role of cis-acting elements [J]. Annu Rev Immunol, 1996, 14: 459-81.
- [11]Krange MS. V(D)J recombination becomes accessible [J]. J Exp Med, 2001, 193: F27-F30.
- [12]Mathieu N, Hempel WM, Spicuglia S, et al. Chromatin remodeling by the T cell receptor (TCR)-gene enhancer during early T cell development: implications for the control of TCR-locus recombination [J]. J Exp Med, 2000, 192: 625-36.
- [13]Bassing CH, Alt FW, Hughes MM, et al. Recombination signal sequences restrict chromosomal V(D)J recombination beyond the 12/23 rule [J]. Nature, 2000, 405: 583-6.

- [14]Khor B, Sleckman BP. Allelic exclusion at the TCR $\beta$  locus [J]. *Curr Opin Immunol*, 2002, 14: 230-4.
- [15]Ulmer AJ, Flad H, Rietschel T, et al. Induction of proliferation and cytokine production in human T lymphocytes by lipopolysaccharide (LPS)[J]. *Toxicology*, 2000, 152(1-3): 37-45.
- [16]薛 华, 何 生. 超抗原SEA研究进展 [J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2001, 8(2): 153-44.
- [17]汪 进, 曾志雄, 黄明辉, 等. 全反式维甲酸诱导人急性早幼粒白血病HL-60细胞分化的机制[J]. *药学学报*, 2004, 39(1): 22-8.
- Wang J, Zeng ZX, Huang MH, et al. Molecular mechanism of granulocytic differentiation of human promyelocytic leukemia HL-60 cells induced by all-trans retinoic acid [J]. *Acta Pharm Sin*, 2004, 39(1): 22-8.
- [18]杨 敏, 赵 泳, 林 晓. 全反式维甲酸对人卵巢癌细胞株COC1增殖分化的影响[J]. *重庆医科大学学报*, 2005, 30(1): 12-5.
- [19]McMahan CJ , Fink PJ. Receptor revision in peripheral T cells creates a diverse V  $\beta$  repertoire[J]. *J Immunol*, 2000, 165(12): 6902-7.

---

[回结果列表](#)