

高通量测序技术检测 T&B 细胞 CDR3 受体库在临床中的应用

张天 孙素红

【摘要】 高通量测序技术是 DNA 测序发展历程的一个里程碑, 它为现代生命科学以及医学领域的研究提供了前所未有的机遇, 在此基础上与临床疾病诊断、预后评估以及基因靶向治疗相结合, 可提高临床诊断和治疗、方便监测疾病进展。本文将对高通量测序技术检测 T&B 淋巴细胞 CDR3 受体库在临床中的应用进行简要综述。

【关键词】 高通量测序技术; T/B 淋巴细胞; CDR3 受体库; 临床应用

High-throughput sequencing detection T&B lymphocyte CDR3 receptor library in clinical application Zhang Tian, Sun Suhong. *Breast Surgery of Medical College Affiliated Hospital of Zunyi Medical College, Zunyi 563000, China*

Corresponding author: Sun Suhong, Email: ssh8636693@aliyun.com

【Abstract】 High-throughput sequencing technology is a milestone in the development course of DNA sequencing, which provides unprecedented opportunities for the modern-life science and medical research. On this basis and clinical disease diagnosis, prognosis assessment and targeted therapy, the combination of genes can improve the clinical diagnosis and treatment and easy to monitor disease progression. This article for high-throughput sequencing technologies to detect T&B lymphocyte CDR3 receptor library in the clinical application were reviewed.

【Key words】 High-throughput sequencing; T&B lymphocyte; CDR3 receptor library; Clinical application

一、高通量测序 (HTS) 技术与 TCR&BCR CDR3 受体库概述

1. HTS技术简介: 全基因组测序是解读生命的一种有效途径, Sanger等于 1970 年发明的双脱氧测序法被称为第一代测序技术, 在过去的 30 多年中一直在DNA测序领域占据着主要地位。HTS技术又称“下一代测序技术”或“深度测序”或“第二代测序”技术, 是对传统测序的一次革命性改变, 一次能对几十万到几百万DNA分子进行序列测定, 使得对一个物种的转录组和基因组进行全貌细致的分析成为可能。

2. TCR&BCR CDR3 受体库 (repertoire) 的组成: T 淋巴细胞和 B 淋巴细胞分别介导特异性细胞免疫和体液免疫, 它们是机体免疫系统的重要组成

部分, 主要依靠 T 细胞受体 (T cell receptor, TCR) &B 细胞受体 (B cell receptor, BCR) 与抗原发生应答反应, 目前研究已证实 TCR&BCR 是 T&B 细胞在发育过程中, 由胚系 V、D、J、C 基因片断重排和体细胞高频突变等机制而形成多样性的抗原互补决定区 (CDR1、CDR2、CDR3), 其中“CDR3 区”(又称超变区) 组成最具多样性的 CDR3 受体库。

由于 CDR3 区是淋巴细胞识别抗原的主要部位, 其长度及多样性都会影响它对抗原的识别与亲和力, 故其特异性可以认为是基因重组和体细胞高频突变的结果, CDR3 序列多变的特征为抗原的选择提供一个多样化的细胞受体库。通过分析 CDR3 受体库, 能为临床更好地监测和分析生理及病理状态下机体的免疫状况及免疫细胞的发生、发展机制提供新思路、新方法和手段^[1-2]。

二、HTS 技术检测 T/B 细胞受体库的应用现状
1986 年美国科学家、诺贝尔奖获得者杜尔贝科 (Renato Dulbecco) 提出了“人类基因组计划”,

DOI:10.3877/cma.j.issn.1674-0785.2014.09.033

基金项目: 贵州省遵义市红花岗区 2010 科学技术项目和教育
部新世纪人才项目 (NCET-10-0095)

作者单位: 563000 贵州省, 遵义医学院附属医院甲乳外科 (张天、孙素红); 贵州省免疫学研究生教育创新基地 (张天)

通讯作者, 孙素红, Email: ssh8636693@aliyun.com

使得我们可以从分子水平上更全面地认识自我。如今, HTS 技术在肿瘤学研究、临床治疗和诊断上具有多方面应用, 比如它为肿瘤的研究提供了一种与基因芯片技术互补的新工具; 在遗传疾病方面可对如唐氏综合征等进行无创筛查; 并可为微生物鉴定方面提供序列信息, 解决了以往通过分离进行逐一鉴定所产生的判断误差和缺陷, 从而大大缩短诊断时间并能使结果更加精确; 还可应用于肥厚性心脏病、耐药基因、转录调控的检测、淋巴系白血病的诊断等研究中^[3-6]。

1. HTS 在临床疾病诊断中的应用: 目前, 临床上 10%~15% 的 T/B 细胞参与的淋巴组织疾病不易确诊, 例如人类免疫系统缺陷病, 其发病机制包括 TCR 等位基因的发育和信号通路基因突变, 这些因素将直接影响其功能以及多样性, 研究发现此类患者相比于正常对照组 TCR CDR3 β 链多样性会显著降低且 CDR3 氨基酸取用发生偏向^[7]。

T&B 细胞是适应性免疫的主要组成部分, 是人体重要的免疫防御系统, 若其不能发挥正常功能, 疾病就可能迅速发展, 严重者造成死亡。HTS 因其可全面评估免疫系统淋巴受体基因的多样性, 在 T/B 细胞 CDR3 受体库的研究中取得了较多成果, 借助于 HTS 及相关的序列分析方法, 使得研究者对个体不同免疫状态下 T/B 细胞受体库的分析成为了可能, 并可提高 T/B 淋巴细胞恶性肿瘤的诊断效率^[8]。比如 Emerson 等^[9]就利用深度测序技术对卵巢癌患者癌组织及外周血 T 细胞受体 β 链 (TCRB) 基因重排序列进行特征分析, 发现卵巢癌患者癌组织与外周血 T 细胞克隆类型具有显著差异, 数据分析结果提示肿瘤局部组织与外周的细胞免疫类型不同, 同时这项研究也说明了 HTS 技术可用于临床疾病免疫状态的监测。一些自身免疫性疾病如系统性红斑狼疮 (SLE) 和 IgG4⁺胆管炎发病机制复杂且目前尚未被阐明, 通过 HTS 技术分析 SLE 患者所有自身抗体 BCR CDR3 区基因的多态性或 V/J 基因等取用将为 SLE 的发病机制提供基础数据, 为 SLE 个体化治疗提供很好的 CDR3 靶标^[10]; IgG4⁺胆管炎, 临床诊断主要依靠检测血清抗体与疾病水平, 其灵敏度很低难以做出早期诊断, 延误最佳治疗时期, 而利用 HTS 检测与疾病相关 IgG4⁺B 细胞克隆则具有更高的诊断效果^[11]。良/恶性淋巴瘤是临床和病理上比较复杂的淋巴系肿瘤, 利用 HTS 核酸检测基因突变频率, 测定血液/淋巴器官细胞序

列不仅能加深我们对体液免疫反应的理解, 同时测序获得的 DNA 序列信息可对免疫球蛋白基因亚型进行分类, 下一代测序技术为评估细胞的基因组成和变化以及深入分析个体免疫频谱奠定了技术基础, 同样有研究数据显示 454 测序系统可用于慢性淋巴细胞白血病诊断, IMGT 数据库及软件可对恶性淋巴克隆、表征、突变状态等进行分析, 在了解疾病发病机制、诊断、促进分子靶向治疗的发展中极具价值, 有望广泛应用于临床^[12-14]。

2. HTS 监测疾病进展及评估治疗效果: 已有研究证实 TCR/BCR 与抗原相互作用可产生针对该种抗原的效应 T/B 细胞, 但是 TCR/BCR 本身也是一种潜在的自身反应性抗原。有资料显示结合 TCR β 链克隆多样性的测序分析结果, 可深入了解初始/记忆 CD4⁺ T 细胞体外抗原激活后上调的特征表面标记, 区分克隆型识别限制性 HLA-II 的致病性抗原和自身抗原寡克隆, 监测个体 T 细胞克隆扩增水平以及构成 CDR3 β 链氨基酸序列, 可为后续对抗原特异性 CD4⁺ T 细胞动力学研究、抗原决定区序列变化、特异性疫苗接种免疫疗法治疗癌症和自身免疫性疾病提供数据基础^[15]。

因此, 临床上了解机体异常状态下 T&B 细胞变化及与疾病的相互作用十分必要, 利用 HTS 技术可在 DNA 水平上分析 T&B 淋巴细胞基因重排特征, 克隆类型和抗原应答特异性, 评估免疫系统多样性、免疫相关疾病如急性淋巴细胞白血病、SLE 等的诊断和治疗以及监测疾病进展。已有研究证实, 免疫球蛋白和它们的近亲特异性 T 细胞受体识别蛋白质表达结构, 容易成为自身免疫原, 例如风湿因子是自身抗体针对 gamma 重链构象决定簇, 采用合成肽技术和建立重组 T 细胞受体库自身抗体针对区域标记的 α/β T 细胞受体分析健康个体, 可以深入地了解抗体改变水平以及 IgM 或同型免疫球蛋白作用的自然生理过程^[16]。TCR CDR3 受体库, 包括 CDR3 长度/CDR3 谱系/CDR3 偏向的研究被广泛应用于机体生理条件下 T 细胞的进化、发育、分化等, 这些研究结果可能有助于进一步研究人类细胞基因的重组机制, 以及在健康和疾病状态下细胞 CDR3 基因谱系漂移机制^[17]。2009 年 Freeman 等^[18]成功将 Illumina Solexa 测序技术运用到 TCR CDR3 受体库解析以来, 大规模实行免疫受体位点基因重排 DNA 测序, 可以对机体进行直接检测和跟踪免疫多样性和克隆淋巴细胞数量在生理和病理情况

下的变化水平,分析单个DNA分子特定DNA片段免疫效应功能。

随后,CDR3受体库很快被应用到血液病等的微小残留病克隆跟踪诊断,如:通过比较老年/青年患者之间血和脾BCR CDR3长度分布,可检测骨髓增生异常综合征。Wu等^[19]通过对43组急性T淋巴细胞白血病患者治疗29d后最小残余病灶进行评估,HTS检测TCRB和TCRG克隆多样性,流式细胞术对异常T淋巴母细胞鉴定进行比较,发现HTS测定TCRB和TCRG能够确定恶性克隆水平以及后续微小残留病灶,其结果与流式细胞术一致,研究证实这项技术降低了微小类病灶的诊断阈值;利用HTS监测T淋巴细胞异常克隆增生引起的淋巴瘤、同种异体造血细胞移植后微小残余病灶恶性克隆CDR3序列所占比例同样具有特异性及敏感性,所得研究结果结合临床实践在细胞水平上分析致病性基因、蛋白质,确定可行的生物标记物,不仅能深入了解疾病的发生、发展、缓解和恶化过程,同时可提高自身免疫病的诊断敏感性以及准确性、进行急性淋巴细胞白血病/淋巴瘤的诊断与治疗效果的评估、移植后免疫系统多样性的恢复水平的评估;免疫系统再生能力与老龄化免疫系统性能研究;HSC移植时T细胞耗尽与造血干细胞移植应用;免疫治疗以及病毒公共克隆TCR系列等研究^[20-28]。下一代测序技术检测淋巴细胞受体基因,具有方便临床诊断、监测患者免疫系统和疾病进展、预防疾病复发等作用,在临床研究免疫系统诸多领域展现出创新性应用研究前景。

三、展望

HTS的诞生可以说是基因组学研究领域一个具有里程碑意义的事件,TCR/BCR CDR3受体库的解析一直是研究T/B细胞生理/病理的基础和核心内容,在2009年以前,各实验室主要采用免疫指纹技术等来监测CDR3谱系的偏向而提供有限的信息,随着HTS技术在CDR3受体库研究中进行克隆跟踪、组库性能、公共克隆等的完整解析,动态监测人体适应性免疫反应在肿瘤、移植免疫、自身免疫、老龄化免疫等多种生理和病理状态下应用。

目前,临床治疗肿瘤、自身免疫性疾病常采用的放/化疗、骨髓移植后免疫抑制剂的使用等,常会影响到机体免疫功能,可直接或间接杀死免疫细胞,导致免疫系统功能低下或免疫无能,减弱机体抵抗力。然而,临床目前仍缺乏系统的监测指标。

在临床试验中,自体造血干细胞移植后自身免疫系统重建尚缺乏有效的治疗评估方法,再生淋巴细胞CDR3克隆多样性功能难以评估。已有研究者利用HTS检测TCR β 发现自体造血干细胞移植会使机体CD4⁺和CD8⁺T细胞系发生改变,移植前TCR优势克隆移植后未能检测到,受者机体形成新的克隆类型;相比之下CD8⁺T细胞克隆水平移植前后没有显著变化,治疗失败的患者T细胞克隆显著减少多发生于免疫重建的早期,这些结果说明免疫调节治疗中细胞特性变化丰富,实时监测致病性或保护自体造血干细胞移植后T细胞克隆多样性十分重要^[29]。中晚期肿瘤患者选择放/化疗,首先考虑的是对肿瘤细胞的杀伤作用,将药物对免疫系统的抑制及其他副作用放在第二位,因此需要监测患者治疗过程中免疫状态以制订合理的方案,而HTS技术具有监测临床患者治疗前后组织/外周血淋巴细胞水平和变化情况的功能,可用于检测临床患者免疫细胞与免疫微环境动态变化以确定治疗后实施免疫主、被动治疗的最佳时间和策略,可为临床治疗提供数据参考。

参 考 文 献

- [1] 王小妹. B细胞 BCR CDR3 受体库的高通量测序分析概况[J]. 中国免疫学杂志, 2011, 27(10): 947-950.
- [2] 王鹏, 贺晓燕, 王小妹, 等. T细胞 TCR CDR3 受体库的高通量测序分析概况[J]. 现代免疫学, 2011, 6: 17.
- [3] Morrissy AS, Morin RD, Delaney A, et al. Next-generation tag sequencing for cancer gene expression profiling[J]. Genome Res, 2009, 19(10): 1825-1835.
- [4] Tyner JW, Deininger MW, Loriaux MM, et al. RNAi screen for rapid therapeutic target identification in leukemia patients[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2009, 106(21): 8695-8700.
- [5] Li N, Ye M, Li Y, et al. Whole genome DNA methylation analysis based on high throughput sequencing technology[J]. Methods, 2010, 52(3): 203-212.
- [6] Fabris S, Cutrona G, Agnelli L, et al. High-Throughput Sequencing For The Identification Of NOTCH1 mutations In Early Stage Chronic Lymphocytic Leukemia: Biological and Clinical Implications[J]. Blood, 2013, 122(21): 1622-1622.
- [7] Yu X, Almeida J, Darko S, et al. Human syndromes of immunodeficiency and dysregulation are characterized by distinct defects in T-cell receptor repertoire development[J]. Journal of Allergy and Clinical Immunology, 2014, 133(4): 1109-1115.
- [8] Gazzola A, Mannu C, Rossi M, et al. The evolution of clonality testing in the diagnosis and monitoring of hematological malignancies[J]. Therapeutic Advances in Hematology, 2014, 5(2): 35-47.
- [9] Emerson RO, Sherwood AM, Rieder MJ, et al. High-throughput sequencing of T-cell receptors reveals a homogeneous repertoire of tumour-infiltrating lymphocytes in ovarian cancer[J]. J Pathol, 2013, 231(4): 433-440.

- [10] Guo W, Smith D, Aviszus K, et al. Somatic hypermutation as a generator of antinuclear antibodies in a murine model of systemic autoimmunity[J]. *J Exp Med*, 2010, 207(10): 2225-2237.
- [11] Maillette de Buy Wenniger LJ, Doorenspleet ME, Klarenbeek PL, et al. Immunoglobulin G4+ clones identified by next-generation sequencing dominate the B cell receptor repertoire in immunoglobulin G4 associated cholangitis[J]. *Hepatology*, 2013, 57(6): 2390-2398.
- [12] Sakata-Yanagimoto M, Enami T, Yokoyama Y, et al. Disease-Specific Mutations in Mature Lymphoid Neoplasms-Recent Advances[J]. *Cancer Science*, 2014.
- [13] Georgiou G, Ippolito GC, Beausang J, et al. The promise and challenge of high-throughput sequencing of the antibody repertoire[J]. *Nature Biotechnology*, 2014, 32(2): 158-168.
- [14] Niklas N, Pröll J, Weinberger J, et al. Qualifying high-throughput immune repertoire sequencing[J]. *Cellular Immunology*, 2014, 288(1): 31-38.
- [15] Estorninho M, Gibson VB, Kronenberg-Versteeg D, et al. A Novel Approach to Tracking Antigen-Experienced CD4 T Cells into Functional Compartments via Tandem Deep and Shallow TCR Clonotyping[J]. *The Journal of Immunology*, 2013, 191(11): 5430-5440.
- [16] Marchalonis JJ, Schluter SF, Wang E, et al. Synthetic autoantigens of immunoglobulins and T-cell receptors: their recognition in aging, infection, and autoimmunity[J]. *Proc Soc Exp Biol Med*, 1994, 207(2): 129-147.
- [17] Yao XS, Diao Y, Sun WB, et al. Analysis of the CDR3 length repertoire and the diversity of TCR alpha chain in human peripheral blood T lymphocytes[J]. *Cell Mol Immunol*, 2007, 4(3): 215-220.
- [18] Freeman JD, Warren RL, Webb JR, et al. Profiling the T-cell receptor beta-chain repertoire by massively parallel sequencing[J]. *Genome Res*, 2009, 19(10): 1817-1824.
- [19] Wu D, Sherwood A, Fromm JR, et al. High-throughput sequencing detects minimal residual disease in acute T lymphoblastic leukemia[J]. *Science Translational Medicine*, 2012, 4(134): 134ra63.
- [20] Weng WK, Armstrong R, Arai S, et al. Minimal Residual Disease Monitoring with High-Throughput Sequencing of T Cell Receptors in Cutaneous T Cell Lymphoma[J]. *Science Translational Medicine*, 2013, 5(214): 214ra171.
- [21] Pickman Y, Dunn-Walters D, Mehr R. BCR CDR3 length distributions differ between blood and spleen and between old and young patients, and TCR distributions can be used to detect myelodysplastic syndrome[J]. *Phys Biol*, 2013, 10(5): 056001.
- [22] Giannoni F, Hardee CL, Wherley J, et al. Allelic exclusion and peripheral reconstitution by TCR transgenic T cells arising from transduced human hematopoietic stem/progenitor cells[J]. *Mol Ther*, 2013, 21(5): 1044-1054.
- [23] Chapman M, Warren III EH, Wu CJ. Applications of next-generation sequencing to blood and marrow transplantation[J]. *Biol Blood Marrow Transplant*, 2012, 18(1): S151-S160.
- [24] van Heijst J, Ceberio I, Lipuma LB, et al. Quantitative assessment of T cell repertoire recovery after hematopoietic stem cell transplantation[J]. *Nat Med*, 2013, 19(3): 372-377.
- [25] Brentjens RJ, Davila ML, Riviere I, et al. CD19-targeted T cells rapidly induce molecular remissions in adults with chemotherapy-refractory acute lymphoblastic leukemia[J]. *Sci Transl Med*, 2013, 5(177): 177ra38.
- [26] Grupp SA, Kalos M, Barrett D, et al. Chimeric antigen receptor-Modified T cells for acute lymphoid leukemia[J]. *N Engl J Med*, 2013, 368(16): 1509-1518.
- [27] Parameswaran P, Liu Y, Roskin KM, et al. Convergent antibody signatures in human dengue[J]. *Cell Host Microbe*, 2013, 13(6): 691-700.
- [28] Robins H. Immunosequencing: applications of immune repertoire deep sequencing[J]. *Curr Opin Immunol*, 2013, 25(5): 646-652.
- [29] Muraro PA, Robins H, Malhotra S, et al. T cell repertoire following autologous stem cell transplantation for multiple sclerosis[J]. *The Journal of Clinical Investigation*, 2014, 124(3): 1168.

(收稿日期: 2014-03-25)

(本文编辑: 戚红丹)

张天, 孙素红. 高通量测序技术检测 T&B 细胞 CDR3 受体库在临床中的应用 [J/CD]. 中华临床医师杂志: 电子版, 2014, 8(9): 1739-1742.