

DOI:10.3724/SP.J.1008.2013.01317

· 论 著 ·

基因熔解曲线谱型图技术分析肺结核患者 CD4⁺ T 细胞受体 β 链可变区基因多态性

张冬梅¹, 孙晓雷^{1*}, 段义农¹, 汤伟², 周鸣鸣¹, 李正欣¹, 张菊¹, 张洁¹

1. 南通大学医学院病原生物学教研室, 南通 226019

2. 南通大学附属医院传染科, 南通 226019

[摘要] **目的** 利用荧光定量 PCR 结合基因熔解曲线谱型图 (gene melting curve spectratyping, GMCS) 技术分析肺结核病患者外周血 CD4⁺ T 细胞中 T 细胞受体 (TCR) β 链可变区 (BV) 基因多态性。**方法** 提取 15 例健康人和 30 例肺结核患者外周血单个核细胞 (peripheral blood mononuclear cell, PBMC) 中的总 RNA, 反转录成 cDNA, 以 26 个人 TCR BV 基因家族设计上游引物, 共同的 TCR β 链恒定区 (BC) 基因设计下游引物, 荧光定量 PCR 扩增 26 个 TCR BV 基因家族谱系, 样品谱系用荧光定量 PCR 中的 DNA 熔解曲线进行分析。**结果** 在 15 例健康人外周血 T 细胞 TCR β 链中, 同一 BV 位点 PCR 产物的熔解曲线谱型相同。但是与健康人相比, 30 例肺结核患者的外周血 TCR β 链 26 个 BV 位点熔解曲线谱型存在差异, 差异比率为 6.7%~33.3%, 差异具有显著性 ($P<0.05$, $P<0.01$)。此外, 26 个位点中有 13 个位点熔解曲线谱型差异比率 $\geq 20\%$ 。**结论** 荧光定量 PCR 结合 GMCS 技术分析 TCR BV 基因家族谱系情况, 方法稳定、简便, 能较好地监测肺结核患者外周血 T 细胞 TCR 的 β 链谱型。

[关键词] CD4 阳性 T 淋巴细胞; T 细胞受体 β 基因; 遗传多态现象; 肺结核

[中图分类号] R 392.22 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2013)12-1317-06

Gene melting curve spectratyping technique in analyzing polymorphism of T-cell receptor beta chain variable region in CD4⁺ T cells of tuberculosis patients

ZHANG Dong-mei¹, SUN Xiao-lei^{1*}, DUAN Yi-nong¹, TANG Wei², ZHOU Ming-ming¹, LI Zheng-xin¹, ZHANG Ju¹, ZHANG Jie¹

1. Department of Pathogen Biology, College of Medicine, Nantong University, Nantong 226019, Jiangsu, China

2. Department of Infectious Diseases, the Affiliated Hospital of Nantong University, Nantong 226019, Jiangsu, China

[Abstract] **Objective** To analyze the polymorphism of the T-cell receptor (TCR) beta chain variable region (BV) gene family spectratyping of peripheral blood CD4⁺ T cells in tuberculosis patients by gene melting curve spectratyping (GMCS) technique combined 24 h fluorescence quantitative (FQ)-PCR. **Methods** The total RNA of peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) from 15 healthy blood donors and 30 tuberculosis patients were used to obtain the cDNA. The cDNAs were amplified by FQ-PCR using 26 different forward primers and the same reverse primer, and the spectratype was analyzed by DNA melting curve. **Results** The DNA melting curves of each TCR BV family in 15 healthy donors showed the same spectratype. However, the DNA melting curves of 26 TCR BV families showed different spectratypes in 30 tuberculosis patients compared with healthy blood donors, and the different rate was from 6.7% to 33.3%. The result indicated that the difference rate of 26 TCR BV families in tuberculosis patients was significantly different from that of healthy blood donors ($P<0.05$, $P<0.01$). In addition, the different rates of 13 TCR BV families (totally 26 families) in tuberculosis patients were more than 20%. **Conclusion** This study suggests that FQ-PCR combined with GMCS is a convenient and stable method for detecting the TCR beta gene repertoire in the peripheral blood of tuberculosis patients.

[收稿日期] 2013-04-07 **[接受日期]** 2013-06-16

[基金项目] 南通市科技计划项目 (S2008049, BK2013027), 江苏省高等学校大学生实践创新训练计划 (201313993012X)。Supported by Science and Technology Plan Project of Nantong (S2008049, BK2013027) and the Training Programs of Innovation and Entrepreneurship for Undergraduates of Jiangsu Province (201313993012X)。

[作者简介] 张冬梅, 博士, 讲师。E-mail: romly80@sohu.com

* 通信作者 (Corresponding author)。Tel: 0513-85051735, E-mail: sxl@ntu.edu.cn

[Key words] CD4-positive T-lymphocytes; T cell receptor beta genes; genetic polymorphism; pulmonary tuberculosis
[Acad J Sec Mil Med Univ, 2013, 34(12): 1317-1322]

结核病是由结核分枝杆菌(*Mycobacterium tuberculosis*, MTB)引发的传染性疾病,是危及人类健康的主要传染病之一。根据世界卫生组织的估算,目前我国结核病年发病人数占全球发病人数的11%,居全球第2位,是全球22个结核病高负担国家之一。近年来,我国每年报告肺结核发病人数约100万,始终位居全国甲乙类传染病报告的前列^[1]。

在对抗结核病的免疫反应中,T细胞介导的细胞免疫应答起着重要作用。正常人外周血95% T淋巴细胞的T细胞受体(T-cell receptor, TCR)由 α 、 β 两条多肽链组成。 α 链由胚系基因中的 α 链可变区(AV)、结合区(AJ)、恒定区(AC)重排形成,AV末端和AJ前端及中间插入的核苷酸序列组成了TCR α 链互补决定区3(complementarity determining region 3, CDR3); β 链由胚系基因中的 β 链可变区(BV)、多变区(BD)、结合区(BJ)、恒定区(BC)重排形成,由BV末端、BD片段、BJ前端及BV-BD与BD-BJ之间插入的核苷酸序列组成了TCR β 链CDR3,而BV是最易出现变异的基因区域。不同的T细胞克隆具有不同长度或不同序列的TCR CDR3基因,形成CDR3基因谱型的多样性。CDR3区的长度和序列决定了TCR的结构及其特异性,因此测定特定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细胞功能和状态^[2]。

本研究利用实时定量PCR结合基因熔解曲线谱型图(gene melting curve spectratyping, GMCS)技术扩增TCR特异性BV基因片段,分析不同临床类型肺结核患者各PCR产物的GMCS谱型特征及特异性T细胞的分布,了解肺结核患者T细胞对结核抗原的应答特点,为在混合性T细胞群中检出抗原特异性的T细胞提供明确的分子诊断依据。

1 材料和方法

1.1 研究对象 选取南通市第六人民医院肺结核病患者30例,男17例、女13例,每例患者抽取外周血8~10 mL。浸润期或进展期13例,溶解播散期8例,吸收好转期5例,硬结钙化期4例。入组标准:

(1)年龄36~64岁,已确诊为肺结核活动期;(2)无肿瘤、病毒及其他细菌感染或自身免疫性疾病。同时选择15例正常献血员作为对照,男9例、女6例,年龄30~48岁,每例抽取外周血8~10 mL。

1.2 主要试剂及仪器 Ficoll淋巴细胞分离液(上海试剂二厂),总RNA提取试剂盒(Omega公司),cDNA第一链合成试剂盒和PCR试剂(FBI-MBI公司),GeneScan-500-TAMRA(500 ROX)标准品(Applied Biosystems公司),TRIzol试剂(Invitrogen公司),SYBR[®] Premix Ex Taq[™](TaKaRa公司),免疫磁珠法CD4⁺T细胞分选试剂盒(Miltenyi Biotech公司),人CD3和CD4单克隆抗体(北京宝赛生物技术有限公司)。7500型定量PCR仪(Applied Biosystems公司)。引物由上海生工生物工程技术有限公司合成。

1.3 引物序列 以26个人TCR BV基因家族设计引物,实时定量PCR引物共26对,它们有各自不同的上游引物,并共用1条下游引物。引物序列见表1。

1.4 外周血T细胞分离 采用Ficoll淋巴细胞分离液密度梯度法离心获得外周血单个核细胞(peripheral blood mononuclear cell, PBMC)。重悬后,37℃、50 mL/L CO₂条件下培养2 h,去除贴壁细胞,再置尼龙毛管中,37℃孵育45 min,用20 mL培养液冲洗出T细胞。

1.5 总RNA提取与cDNA合成 分离出外周血标本中PBMC,按试剂盒条件,提取活动性肺结核患者和正常献血员PBMC(2×10^6 个细胞)中的总RNA,取1 μ g样品总RNA为模板,用Oligo(dT)作引物,反应体系为40 μ L,每标本做2个反应,按cDNA合成试剂盒条件合成cDNA。

1.6 流式细胞术检测CD3⁺T细胞及CD4⁺T细胞的比例 采集静脉血100 mL,用EDTA-Na₂抗凝,冰浴中保存,立即送实验室检测。用Ficoll淋巴细胞分离液分离PBMC,再使用CD4⁺T细胞分选试剂盒按说明书进行CD4⁺T细胞分离。根据荧光确定细胞门,每份标本计数 2×10^5 个细胞,计算出表达CD3⁺或CD4⁺细胞的百分率,用阴性对照设定阳性染色细胞的cut-off值。

表 1 TCR BV 基因家族引物序列

Tab 1 Sequences of TCR BV gene family primers

Primer	Sequence (5'-3')	Size (bp)
BV1	gcacaacagttccctgacttgcaac	24
BV2	tcatcaacctgcaagcctgacct	24
BV3	gtctctagagagaagaaggagcgc	24
BV4	acatatgagagtggatttgcatt	24
BV5.1	atacttcagtgagacacagagaaac	25
BV5.2	ttcctaactatagctctgagctg	24
BV6	aggcctgagggatccgtctc	20
BV7	cctgaatgcccaacagctctc	22
BV8	atttacttaacaacaacgttcgg	24
BV9	cctaatactccagacaaagctcac	24
BV10	ctccaaaaactcatctgtacctt	24
BV11	tcaacagctctccagaataaggacg	24
BV12	aaaggagaagtctcagat	18
BV13.1	caaggagaagtcccaat	18
BV13.2	ggtgaggggtacaactgcc	18
BV14	gtctctcgaaaagagaagaggaat	24
BV15	agtgctctcgacagggcacaggct	24
BV16	aaagagtctaaacaggatgagctc	24
BV17	cagatagtaaatgactttcag	21
BV18	gatgagtcaggaatgccaaggaa	24
BV19	caatgcccaagaacgcaccctgc	24
BV20	agctctgaggtgccccagaatctc	24
BV21	gattcacagttgcctaagga	24
BV22	cagagaagtctgaaatattcga	24
BV23	gatcgattctcagctcaacag	24
BV24	aaagattttaacaatgaagcagac	25
BC ^a	ttctgatggctcaaacac	24

^a: Reverse primer. TCR BV: T-cell receptor beta chain variable region

1.7 荧光定量 PCR 结合 GMCS 技术分析 TCR BV 家族基因谱系 PCR 反应体系为 20 μL, 含 cDNA 模板 1 μL, dNTP 0.5 μL, 10× Buffer 2 μL, 25 mmol/L MgCl₂ 1.5 μL, TCR BV 上游引物 0.8 μL, 下游共用 TCR BC-FAM 引物 0.8 μL (所有引物的浓度均为 10 μmol/L), ddH₂O 12.4 μL, Taq DNA 聚合酶 1 μL (0.675 U)。每样本共进行 26 个反应, 以 βactin 作为内参。反应条件: 94℃ 预变性 3 min, 94℃ 20 s, 56℃ 30 s, 72℃ 30 s, 共 45 个循环。荧光信号检测: 每个循环结束后, 在 80℃ 保持 2 s 后仪器自动检测收集荧光信号。熔解曲线: PCR 最后 72℃ 延伸 8 min。反应孔的温度从 78℃ 以 0.2℃/s 递增速率升至 95℃, 同时收集信号并分析。比较每个样本的 GMCS 谱型, 总或单峰差异比率(%) = 差异样本数/

总样本数 × 100%。

1.8 统计学处理 应用 SPSS 15.0 统计软件进行统计学分析, 数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两组间比较采用配对 *t* 检验。检验水准(α)为 0.05。

2 结果

2.1 外周血 CD4⁺ T 细胞的分离检测 为检测 CD4⁺ T 细胞中的 TCR 基因 GMCS 谱型, 实验利用免疫磁珠法分离健康人和结核病患者外周血 CD4⁺ T 细胞。结果(图 1)显示, CD3 抗体标记经流式细胞术检测纯度达到 (98.2 ± 2.6)%, 同时 CD4 抗体标记经流式细胞术检测纯度达到 (89.6 ± 4.5)%, 得率 80% 以上, 采集 8~9 mL 外周血可以满足后续实验用量。结果表明免疫磁珠法分离 CD4⁺ T 细胞可以满足后续实验的质和量要求。

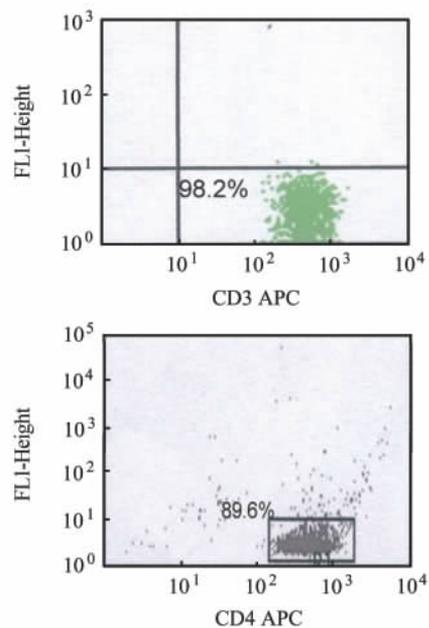


图 1 流式细胞术检测磁珠分离纯化后结核病患者外周血 T 细胞纯度

Fig 1 Flow cytometry in detection of T cell purity from peripheral blood mononuclear cells of tuberculosis patients

2.2 健康人 CD4⁺ T 细胞 TCR BV 基因家族谱型特征 应用 GMCS 方法分析 15 例健康人 CD4⁺ T 细胞 TCR BV 基因家族谱型。为全面分析 TCR β 链基因多态性特点, 实验选取了 26 个位点进行熔解谱型分析, 并以 βactin 为对照。结果(图 2)显示, 15 例健康人的 BV 基因家族熔解曲线谱型以多峰为

主,无明显的弱峰或强峰,少数为单峰类型,即 BV24 为单峰型,其余位点为多峰型,TCR BC 对照组也为

单峰型。说明健康人 TCR 的熔解曲线谱型显示了极为丰富的多态性。

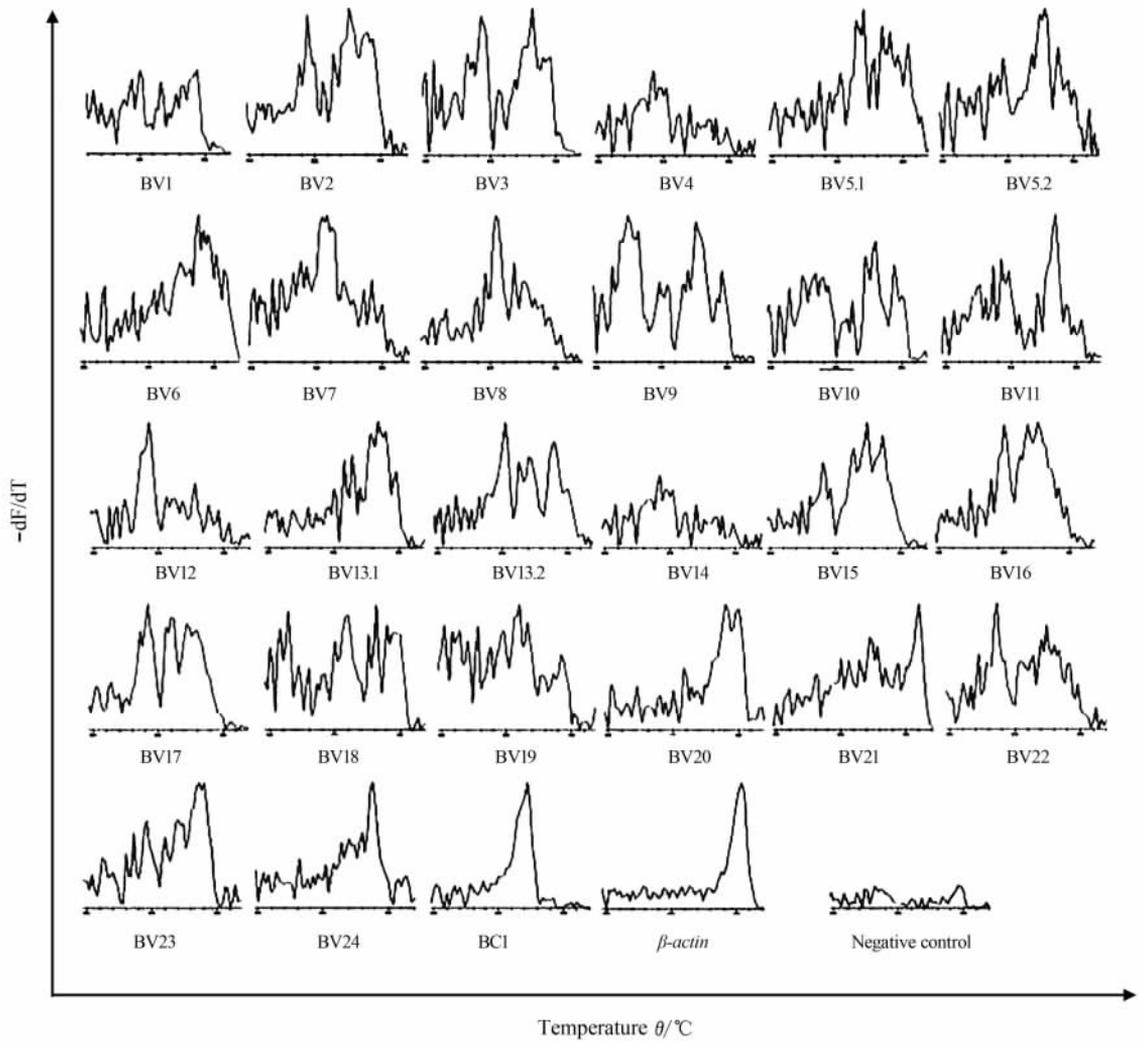


图 2 健康献血者 TCR BV 基因家族熔解曲线谱型(15 例健康献血者 PCR 结果代表图)

Fig 2 TCR BV gene families of 15 healthy donors as analyzed by gene melting curve spectratyping

TCR BV: T-cell receptor beta chain variable region

2.3 肺结核患者 CD4⁺ T 细胞 TCR BV 基因家族谱型特征 应用 GMCS 方法分析 30 例肺结核患者 CD4⁺ T 细胞 BV 基因家族谱型,结果(图 3)显示,与健康人相比,肺结核患者 26 个位点都存在熔解曲线谱型差异,差异比率范围是 6.7%~33.3%,除 BV5.1 位点外,其余 25 个位点熔解曲线谱型均具有显著差异($P < 0.05$, $P < 0.01$)。有 13 个位点(BV2、BV3、BV5.2、BV10、BV11、BV13.1、BV13.2、BV15、BV16、BV19、BV20、BV21、BV24)差异比率均 $\geq 20\%$,这些位点被认为是差异的“热点”。其中 12 个熔解曲线谱型差异“热点”中包含单峰差异的形式;5 个位点(BV3、BV13.1、BV15、

BV19、BV20)单峰熔解曲线谱型差异比率 $\geq 20\%$,5 个单峰型位点见图 4。结果提示,肺结核病患者相对健康人 TCR 显示较少的多态性,这可能与体内结核杆菌相关抗原占优势,引起相对单一的 T 细胞免疫反应有关。

3 讨论

结核患者的免疫功能指标在结核病的诊断、治疗和预后判断中有重要的临床意义,而 T 细胞在对抗结核杆菌的过程中行使主要的免疫功能。T 细胞识别抗原的分子基础是其表面 TCR 与抗原肽-HLA 复合物相结合,CDR3 区是 TCR 直接与抗原

肽接触的位点, 在抗原识别中最关键, 一种 CDR3 序列代表一个 T 细胞克隆, 通过 TCR CDR3 谱型分析及序列测定, 可筛选出高表达的单克隆抗原特异性

T 细胞, 对疾病的诊断和治疗具有重要意义, 并可以反映 T 细胞功能状态^[2-3]。

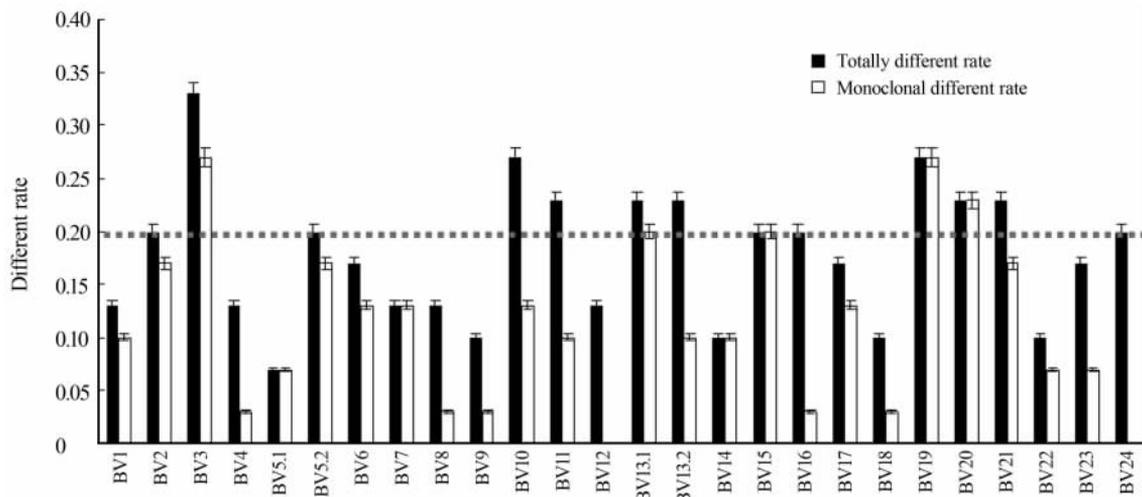


图 3 肺结核患者 TCR BV 基因家族熔解曲线谱型图数据分析

Fig 3 TCR BV gene families of tuberculosis patients as analyzed by gene melting curve spectratyping

TCR BV: T-cell receptor beta chain variable region

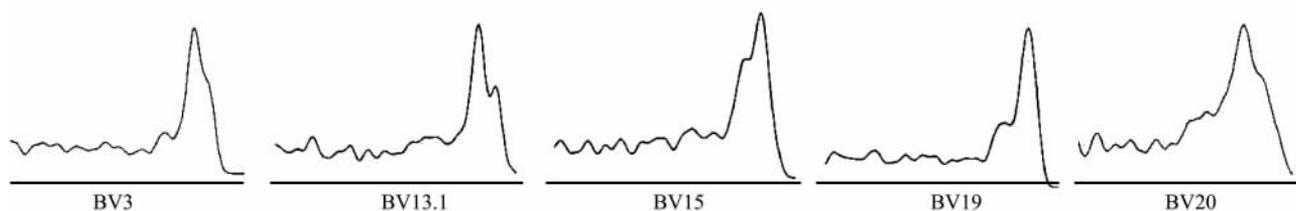


图 4 表现为单峰型的肺结核患者 TCR BV 家族基因熔解曲线谱型图

Fig 4 Monoclonal peak of TCR BV gene families in the tuberculosis patients by gene melting curve spectratyping analysis

TCR BV: T-cell receptor beta chain variable region

机体感染结核杆菌后, 决定病程转归的一个重要因素是 T 细胞的应答能力及反应状况。CDR3 分子作为克隆性 T 细胞的标记分子是活化的第一信号, 并且在免疫应答中起着重要的作用。随着医疗技术的发展, TCR 表达产物成为新型结核疫苗重要的候选位靶点, 如 Mt**9.8** (Rv0287) 位点的免疫抗体在小鼠和豚鼠体内实验结果均证实了对抗结核分枝杆菌感染的有效性^[4]。总的来说, 关于肺结核患者 TCR 的研究^[5-6]中, 大部分相关研究主要关注的是 β 链情况。

黄艳等^[7]通过对结核性胸膜炎患者胸水、肺结核患者肺泡灌洗液中 T 细胞的全长 TCR α 、 β 链基因序列进行测序, 结合网络资源, 分析患者局部 T 细胞所属的 TCR 家族及其 CDR3 序列。采用 CDR3 谱型分析可更直接找到抗原相关 TCR 家族及其 CDR3 序列。已有学者通过体外抗原刺激或直接检测患者体内 T 细胞 CDR3 谱型, 寻找结核抗原

相关 TCR 家族^[8]。2003 年, Caccamo 等^[9]用结核蛋白衍生物 PPD-RT23 体外刺激结核患者 PBMC, 发现部分 TCR BV 家族 T 细胞出现单/寡克隆增殖, 推测这些 T 细胞对 PPD-RT23 特异。2 年后, 意大利科学家们发现结核杆菌保护性抗原 16-kD 在体外主要激活 TCR BV2 家族, 进一步研究发现, 该家族 CDR3 区存在保守序列, 推测这些序列与 16-kD 抗原的识别有关^[10]。2007 年, 德国学者 Jacobsen 等^[11]分析了 8 例结核患儿 (2 例重症) 和 8 例潜伏感染者外周血 CD8⁺ T 细胞 β 链 CDR3 谱型, 发现结核患儿和潜伏感染者均存在明显的 CD8⁺ T 细胞单/寡克隆增殖, 2 例重症结核患儿体内 60% 以上 CD8⁺ T 细胞都属 BV16 家族, 且包含相同的 CDR3 序列。Tully 等^[12]认为, 分析外周血 T 细胞所获得的结果反映的是全身的免疫维持状态, 而感染部位 T 细胞则反映局部免疫状态。他们对 5 例潜伏患者进行肺穿刺活检, 分析肉芽肿组织周围淋巴细胞

(granuloma-associated lymphocytes, GALs) 的 CDR3 谱型,发现患者 GALs 中存在单克隆扩增 BV 家族,提示这些 TCR 家族在抗结核免疫保护反应中发挥重要作用。

本研究通过荧光定量 PCR 结合 GMCS 技术分析结核病患者和健康人 PCR 产物的 TCR BV 各位点谱型,结果显示 15 例健康人外周血 T 细胞 26 个 TCR BV 家族的 CDR3 谱型多为多峰特性,提示健康人的 TCR 显示了极为丰富的多态性,TCR BC 对照组为单峰型;30 例结核患者 TCR BV 基因谱型与健康人相比,CD4⁺ T 细胞 BV 基因家族 25 个位点熔解曲线谱型有明显改变,差异比率为 6.7%~33.3%,并存在 13 个差异“热点”,熔解曲线谱型差异主要表现为单峰型谱型增多。

利用 GMCS 检测主要有以下优点:(1)灵敏度高,只需患者 5 mL 外周血即可满足实验的需求;(2)诊断快速,能早期诊断结核感染,整个过程可以在 24 h 内完成,相对于痰培养时间大大缩短;(3)检测方便,检验样品只需要外周血,活动性肺结核、肺外结核、潜伏性结核感染及免疫抑制的结核患者均能检测;(4)可进行疗效评估,当结核分枝杆菌被清除后,效应 T 淋巴细胞消失,因此测定效应 T 淋巴细胞可预测机体是否清除了结核分枝杆菌,进行临床疗效评估^[13]。然而,由于结核分枝杆菌感染后的免疫反应与结核病的发生、发展和转归的关系尚未完全明了,至今所有的免疫诊断方法包括 GMCS 检测尚不能完全鉴别潜伏性结核感染与活动性结核感染。

总之,通过检测 T 细胞 TCR BV 谱型监测结核患者的免疫功能,可以帮助确诊结核菌的感染情况,也可为疗效和预后判断提供依据。另外,分析结核患者 TCR 的 BV 熔解曲线谱型为特异性 T 细胞免疫治疗研究提供基础,同时也将有助于肺结核患者治疗性多肽表位疫苗的研发。

4 利益冲突

所有作者声明本文不涉及任何利益冲突。

[参考文献]

- [1] Zhao Y, Xu S, Wang L, Chin D P, Wang S, Jiang G, et al. National survey of drug-resistant tuberculosis in China[J]. N Engl J Med, 2012, 366: 2161-2170.
- [2] 胡云良, 杨介钻, 倪莉, 姚新生. 正常人外周血 $\alpha\beta$ T 细胞 TCR β 链 CDR3 多态性和长度分析[J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2007, 23: 492-498.
- [3] Rowen L, Koop B F, Hood L. The complete 685-kilobase DNA sequence of the human beta T cell receptor locus[J]. Science, 1996, 272: 1755-1762.
- [4] Coler R N, Dillon D C, Skeiky Y A, Kahn M, Orme I M, Lobet Y, et al. Identification of *Mycobacterium tuberculosis* vaccine candidates using human CD4⁺ T-cells expression cloning[J]. Vaccine, 2009, 27: 223-233.
- [5] 周明乾, 罗微, 马骊, 温茜, 黄永塔, 王小宁. 结核患者外周血 $\alpha\beta$ T 细胞 CDR3 谱系研究[J]. 广东医学, 2008, 29: 1283-1285.
- [6] Jacobsen M, Detjen A K, Mueller H, Gutschmidt A, Leitner S, Wahn U, et al. Clonal expansion of CD8⁺ effector T cells in childhood tuberculosis[J]. J Immunol, 2007, 179: 1331-1339.
- [7] 黄艳, 张建波, 江丽芳, 方毅敏, 余新炳, 董涛, 等. 结核性胸膜炎胸水 CD4⁺ 与 CD8⁺ T 细胞的 TCR 和 CDR3 谱型分析[J]. 中华微生物学和免疫学杂志, 2007, 27: 807-809.
- [8] 罗微, 张笑冰, 黄永塔, 郝佩佩, 姜振民, 温茜, 等. 38kD 抗原特异 TCR 基因修饰 T 细胞的抗结核抗原活性研究[J]. 科学通讯, 2012, 57: 1657-1665.
- [9] Caccamo N, Barera A, Di Sano C, Meraviglia S, Ivanyi J, Hudecz F, et al. Cytokine profile, HLA restriction and TCR sequence analysis of human CD4⁺ T clones specific for an immunodominant epitope of *Mycobacterium tuberculosis* 16-kDa protein[J]. Clin Exp Immunol, 2003, 133: 260-266.
- [10] Samanta B, Mez G, Das K P, Ghose A C, Hudecz F, Sen P C. Efficacy of the phosphorylation of synthetic peptides by purified catalytic subunit of PKA (PKAcat) from bovine lens depends on the amino acid sequence of the peptides[J]. J Pept Res, 2005, 65: 445-449.
- [11] Jacobsen M, Detjen A K, Mueller H, Gutschmidt A, Leitner S, Wahn U, et al. Clonal expansion of CD8⁺ effector T cells in childhood tuberculosis[J]. J Immunol, 2007, 179: 1331-1339.
- [12] Tully G, Kortsik C, Höhn H, Zehbe I, Hitzler W E, Neukirch C, et al. Highly focused T cell responses in latent human pulmonary *Mycobacterium tuberculosis* infection[J]. J Immunol, 2005, 174: 2174-2184.
- [13] 马锐, 罗荣, 孙万邦, 姚新生. “荧光定量 PCR 熔解曲线法”监测人 TCR β 链 CDR3 谱系漂移技术的建立[J]. 免疫学杂志, 2009, 25: 446-451.

[本文编辑] 商素芳, 孙岩