

# 早期乳腺癌患者化疗前后外周血T细胞TCR $\beta$ CDR3组库动态变化特征

杨丽文<sup>1#</sup> 孙素红<sup>2#</sup> 张天<sup>1#</sup> 段芳芳<sup>1</sup> 贺晓燕<sup>1</sup> 马锐<sup>1</sup> 马龙<sup>1</sup> 石彬<sup>3</sup> 姚新生<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup>遵义医学院免疫学教研室, 贵州省免疫学研究生教育创新基地, 遵义 563003;

<sup>2</sup>遵义医学院附属医院甲乳外科, 遵义 563003; <sup>3</sup>遵义医学院检验医学系, 遵义 563003)

**摘要** 该文采用高通量测序(high-throughput sequencing, HTS)技术分析早期乳腺癌患者化疗前后外周血T细胞TCR  $\beta$  CDR3(T-cell receptor beta chain complementarity determining region 3)组库的组成及动态变化特征, 初步探讨化疗对T细胞的可能影响及化疗前后患者T细胞的应答功能状态。以病理活检确诊为T<sub>1</sub>N<sub>0</sub>M<sub>0</sub>期乳腺癌患者为研究对象, 选取进行6期TAC[多西他赛(docetaxel, T)、吡柔比星(pirarubicin, A)、环磷酰胺(cyclophosphamide, C)]化疗方案。化疗的3例志愿患者(P1、P2、P3)分别于化疗前、第3期化疗后、第6期化疗后采集外周血分选出单个核细胞(peripheral blood mononuclear cells, PBMCs), 提取其总DNA; 利用多重PCR建立TCR  $\beta$  CDR3组库进行HTS; 采用Immuno SEQ和IMGT-High-V-quest系统对TCR  $\beta$  CDR3序列进行组成和特征分析。结果表明: (1) P1、P2、P3在第3期化疗后的CDR3组库多样性[用反辛普森指数(1/DS)表示]相比化疗前均升高; 第6期化疗后, P1和P3相比第3期化疗后CDR3组库多样性降低, 但P2相比第3期化疗后CDR3组库多样性升高; (2) P1和P3在第3期化疗后CDR3组库高频克隆(大于1%)较化疗前出现降低, 而第6期化疗后CDR3组库高频克隆相比第3期化疗后明显升高; P2第3期化疗后和化疗前相比CDR3组库高频克隆无变化, 但第6期化疗后明显降低; (3) P1和P2化疗前后出现部分TRBV基因取用丢失与重新取用, P3的TRBV基因取用未发生明显改变; P2和P3化疗后部分TRBV与TRBJ优势配对消失。早期乳腺癌患者TAC化疗的前、中、后期, 其外周血T细胞TCR  $\beta$  CDR3组库表现出个体化的多样性和特征性改变, 可能与TAC对个体T细胞的抑制或杀伤相关。监测CDR3组库的组成及动态变化可为化疗对T细胞的影响及化疗前后“个体化”的T细胞免疫状态评估提供基础。

**关键词** 高通量测序技术; T细胞CDR3组库; 乳腺癌; 化疗

## The Dynamic Characteristics of TCR $\beta$ CDR3 Repertoire of Peripheral Blood T Cells Before and After Chemotherapy in the Early Stage of Breast Cancer Patients

Yang Liwen<sup>1#</sup>, Sun Suhong<sup>2#</sup>, Zhang Tian<sup>1#</sup>, Duan Fangfang<sup>1</sup>, He Xiaoyan<sup>1</sup>,  
Ma Rui<sup>1</sup>, Ma Long<sup>1</sup>, Shi Bin<sup>3</sup>, Yao Xinsheng<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup>Department of Immunology, Research Center for Medicine & Biology, Innovation & Practice Base for Graduate Students Education, Zunyi Medical University, Zunyi 563003, China; <sup>2</sup>Department of Breast Surgery, the First Affiliated Hospital of Zunyi Medical University, Zunyi 563003, China; <sup>3</sup>Department of Laboratory Medicine, Zunyi Medical University, Zunyi 563003, China)

收稿日期: 2017-11-17

接受日期: 2018-03-21

国家自然科学基金(批准号: 81441048)和贵州省科技厅联合基金(批准号: 黔科合LH字[2014]7584)资助的课题

#共同第一作者

\*通讯作者。Tel: 0851-28642716, E-mail: immunology01@126.com

Received: November 17, 2017

Accepted: March 21, 2018

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.81441048) and Guizhou Provincial Science and Technology Department Joint Fund (Grant No.[2014]7584)

#These authors contributed equally to this work

\*Corresponding author. Tel: +86-851-28642716, E-mail: immunology01@126.com

网络出版时间: 2018-06-01 15:37:34

URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20180601.1537.018.html>

**Abstract** Using high-throughput sequencing (HTS) technology, analysis of the dynamic change characteristics and composition of T cell of T-cell receptor beta chain complementarity determining region 3 (TCR  $\beta$  CDR3) repertoire in peripheral blood before and after chemotherapy with breast cancer patients in the early period, preliminary discussion on the possible effect of chemotherapy on T cells and T cell response function status before and after chemotherapy patients. The pathological biopsy diagnosed patients with T<sub>1</sub>N<sub>0</sub>M<sub>0</sub> breast cancer as the research object, a six periods TAC (T: docetaxel; A: pirarubicin; C: cyclophosphamide) chemotherapy in three volunteers patients (P1, P2, P3), before chemotherapy, after the third periods of chemotherapy and the sixth periods of chemotherapy, then collected the peripheral blood and separated the PBMC, respectively, and extracted genomic DNA. Using the multiple PCR to construct human TCR  $\beta$  CDR3 repertoire and HTS, then using Immuno SEQ and IMGT-High-V-QUEST analysis the composition and characteristics of TCR  $\beta$  CDR3 sequences. The results suggest that after the third period of treatment, CDR3 repertoire diversity (the inverse Simpson index) was higher than before chemotherapy in P1, P2, P3. After the six period of treatment, compared with the third period of treatment, CDR3 repertoire diversity decreased in P1 and P3, but increased in P2. After the third period of treatment, in P1 and P3 patients, CDR3 repertoire high-frequency clones (greater than 1%) lower than the chemotherapy before. And after the sixth period of treatment, CDR3 repertoire high-frequency clones increased significantly compared with the third treatment. In P2 patient, there was no changes in the high-frequency clones in CDR3 repertoire after the third period of treatment compared with before chemotherapy, but after the sixth period of treatment, it was significantly reduced. The partial *TRBV* gene usage was lost and reused before and after chemotherapy in P1 and P2, and the *TRBV* gene usage of P3 did not change significantly; the partial *TRBV* and *TRBJ* advantage pairing were disappeared after chemotherapy in P2 and P3. In conclusion, the early breast cancer patients before, during and after TAC chemotherapy which the peripheral blood T cells TCR  $\beta$  CDR3 repertoire had a variety of individualized and characteristic changes, it may be associated with TAC suppression or killing of individual T cells, the composition and dynamic changes of CDR3 repertoire can be used to provide a basis for the effects of chemotherapy on T cells and the “individualized” T cell immune status assessment before and after chemotherapy.

**Keywords** HTS; T cell CDR3 repertoire; breast cancer; chemotherapy

乳腺癌为女性最常见的恶性肿瘤之一, 发病率和死亡率在世界范围内呈上升趋势<sup>[1]</sup>。化疗是临床乳腺癌患者的常规治疗手段之一, 对降低癌细胞的远处转移, 提高患者5年生存率等方面起到重要作用, 但化疗药物在杀伤肿瘤细胞的同时亦能直接或间接杀伤免疫细胞, 导致机体总体免疫功能低下和免疫无能<sup>[2-4]</sup>。目前, 早期乳腺癌患者化疗过程中, 缺乏对机体特异免疫应答系统损害和恢复的有效动态监测与评估, 特别是个体的T细胞, 在机体抗病毒、抗肿瘤等应答中发挥关键作用。那么化疗引起整个白细胞低下时, 对T细胞的多样性、克隆性等将会产生怎样影响? 本研究采用高通量测序技术, 监测早期乳腺癌患者化疗前、中、后外周血T细胞TCR  $\beta$  CDR3(T-cell receptor beta chain complementarity determining region 3)组库的组成和动态变化, 初步

探讨化疗对T细胞的可能影响及化疗前、中、后期患者T细胞应答功能状态。

## 1 材料与方法

### 1.1 病例资料

研究对象均来源于遵义医学院附属医院甲乳外科, 3例T<sub>1</sub>N<sub>0</sub>M<sub>0</sub>期乳腺癌志愿患者(P1、P2、P3)经过病理切片确诊, 均排除传染病史(伤寒、结核、肝炎等)、外伤史、输血史、严重并发症(心、肝、肾、脑、造血系统等)和其他自身免疫性疾病。3例志愿者肝肾功能正常, 治疗前未使用任何影响免疫功能的药物。本研究经过遵义医学院医学伦理委员会批准, 所有受试者均知情同意。3例患者手术后, 均采用TAC[多西他赛(docetaxel, T)、吡柔比星(pirarubicin, A)、环磷酰胺(cyclophosphamide, C)]化疗方案: 多西他赛

75 mg/m<sup>2</sup> iv, d1; 阿霉素50 mg/m<sup>2</sup> iv, d1; 环磷酰胺500 mg/m<sup>2</sup> iv, d1, 21天为1周期, 共6个周期。本研究分别在患者术后首次化疗前(P1-1、P2-1、P3-1)、第3期化疗结束后[即化疗中(P1-2、P2-2、P3-2)]、第6期化疗结束后[即化疗后(P1-3、P2-3、P3-3)]的3个时间点采集患者外周血为实验研究样本。

## 1.2 主要仪器及试剂

Illumina高通量测序仪购自美国Illumina公司, 由ImmunoSEQ公司完成HTS测序; DNA提取试剂盒QIAamp DNA Mini Kit(Cat.No.51304)购自德国QIAGEN公司; DNA stable Tube Kit购自美国Biomatrix公司; Ficoll淋巴细胞分离液购自北京索莱宝科技有限公司。

## 1.3 方法

采用Ficoll淋巴细胞分离液分离患者每份外周血中的单个核细胞(PBMC), 用QIAamp DNA Mini Kit试剂盒提取总DNA, DNA样本采用DNA stable Tube Kit寄送美国华盛顿医学院Adaptive Biotechnologies Immuno SEQ公司, 由公司负责完成各样本质控检测、T细胞TCR  $\beta$  CDR3建库、Illumina高通量测序等。公司完成的HTS测序的各样本CDR3组库数据, 采用Immuno SEQ和IMGT/High V-QUEST系统(<http://www.imgt.org>)、Prism 5软件(GraphPad)及Excel 2010

分析每个样本TCR  $\beta$  CDR3序列的组成和特征<sup>[5-7]</sup>。

## 2 结果

### 2.1 P1、P2、P3的性别、年龄、病理分型。

3例早期乳腺癌患者术前均经病理组织学确诊为乳腺浸润性导管癌II级, 有可测量的病灶, 肝肾功能正常并且治疗前未使用任何影响免疫功能的药物, 患者基本信息见表1。

### 2.2 P1、P2、P3在TAC化疗前、中、后的白细胞总数( $1 \times 10^9/L$ )

P1、P2、P3在TAC化疗前、中、后的白细胞总数分别为P1-1: 5.17, P1-2: 4.43, P1-3: 4.72; P2-1: 6.11, P2-2: 5.66, P2-3: 5.96; P3-1: 5.86, P3-2: 5.05, P3-3: 3.52。对照白细胞总数的参考值( $3.5 \sim 9.5 \times 10^9/L$ ), 均在正常范围之内, 但3例患者化疗中和化疗后的白细胞总数均比化疗前降低。

### 2.3 P1、P2、P3在TAC化疗前、中、后外周血T细胞TCR $\beta$ CDR3序列数

由Adaptive Biotechnologies公司采用HTS获得的TCR  $\beta$  CDR3序列总序列数目, 通过Immuno-SEQ和IMGT/High V-QUEST系统, 筛选分析后的总(Total) CDR3、有效(Productive) CDR3、独特(Unique) CDR3序列数(表2)。T细胞CDR3组库的HTS测序结果中,

表1 P1、P2和P3性别、年龄、病理分型

Table 1 P1, P2 and P3 gender, age, pathological type

患者	性别	年龄	乳腺癌分期
Patients	Gender	Age	Staging of breast cancer
P1	Female	38	Invasive ductal carcinoma II
P2	Female	44	Invasive ductal carcinoma II
P3	Female	42	Invasive ductal carcinoma II

表2 P1、P2和P3化疗前、中、后CDR3总CDR3序列数、有效CDR3序列数和独特CDR3序列数

Table 2 The CDR3 repertoire with total CDR3 sequences, productive CDR3 sequences and unique CDR3 sequences before, during and after chemotherapy in P1, P2 and P3

样本名称	总CDR3	有效CDR3	独特CDR3
Samples	Total CDR3	Productive CDR3	Unique CDR3
P1-1	1 942 163	1 642 586	47 822
P1-2	1 182 347	992 920	25 664
P1-3	1 257 212	1 070 180	23 956
P2-1	249 681	195 192	1 543
P2-2	1 381 733	1 097 797	19 899
P2-3	1 078 365	870 311	51 477
P3-1	962 785	797 539	21 458
P3-2	1 111 927	907 948	19 732
P3-3	994 258	822 164	16 343

每份样本CDR3的有效序列在80万条左右,每份样本CDR3的独特序列在2万条左右,基本保证了CDR3序列的测序深度和CDR3数据的完整性。其中,P2患者治疗前的样本CDR3有效序列为19万条,但CDR3的独特序列只有1 500多条,考虑P2患者在化疗前可能存在大量的T细胞克隆性增生。

## 2.4 P1、P2和P3在TAC化疗前、中、后CDR3组库多样性对比分析

根据每个样本TCR  $\beta$  CDR3组库的组成,本实验研究引入公认的反辛普森指数(the inverse Simpson's diversity index,  $1/D_s$ ),分析各样本的CDR3组库多样性, $1/D_s$ 越高,多样性则越高。结果发现,P1、P2、P3在化疗中TCR  $\beta$  CDR3组库的多样性均比化疗前升高。P1和P3在化疗后比化疗中降低,但P2在化疗后比化疗中出现升高(图1)。

## 2.5 P1、P2、P3在TAC化疗前、中、后CDR3组库的克隆比例分布

为了评估3例患者化疗前、中、后TCR  $\beta$  CDR3组库克隆增殖水平是否会出现相应的变化,分析了各样本克隆增殖频率,我们将克隆增殖频率分为6个区间,分别为小于0.1%、0.1%~0.2%、0.2%~0.3%、0.3%~0.4%、0.4%~0.5%、大于0.5%。结果发现,P1、P2、P3在TAC化疗前、中、后,TCR  $\beta$  CDR3组

库序列多数为小于0.1%的序列;在0.1%~0.5%的区间,3例早期乳腺癌患者TAC化疗前、中、后无明显区别;但在大于0.5%的CDR3序列中,P1和P3在化疗中明显较化疗前降低,而在化疗后又明显比化疗中升高。P2在化疗中与化疗前比较无区别,但化疗后降低(图2)。对大于0.5%的CDR3序列进一步分析发现,P1、P2、P3在TAC化疗前、中、后主要差异表现在大于1%的CDR3序列数,而在0.5%~1.0%之间的CDR3序列比例无明显区别(图3)。

## 2.6 P1、P2、P3在TAC化疗前、中、后CDR3组库中TRBV的取用和频率分析

通过分析P1、P2、P3在化疗前、中、后CDR3组库的各TRBV基因亚群在总序列中的频率发现,P1、P2、P3均出现了TRBV19、TRBV2、TRBV7-9亚基因家族的高频取用;P2和P3同时存在TRBV6-1亚基因家族高频取用;P1表现为TRBV27高频取用。P1和P2在化疗前后均出现TRBV基因的取用丢失与重新取用现象:P1化疗前的TRBV12-4在化疗中及化疗后均取用丢失;P2在化疗中较化疗前重新取用TRBV1、TRBV12-2、TRBV12-4、TRBV16、TRBV5-3、TRBV5-7与TRBV6-7,在化疗后较化疗中重新取用TRBV7-1,而P3在化疗前后未出现TRBV基因的取用丢失及重新取用(图4)。

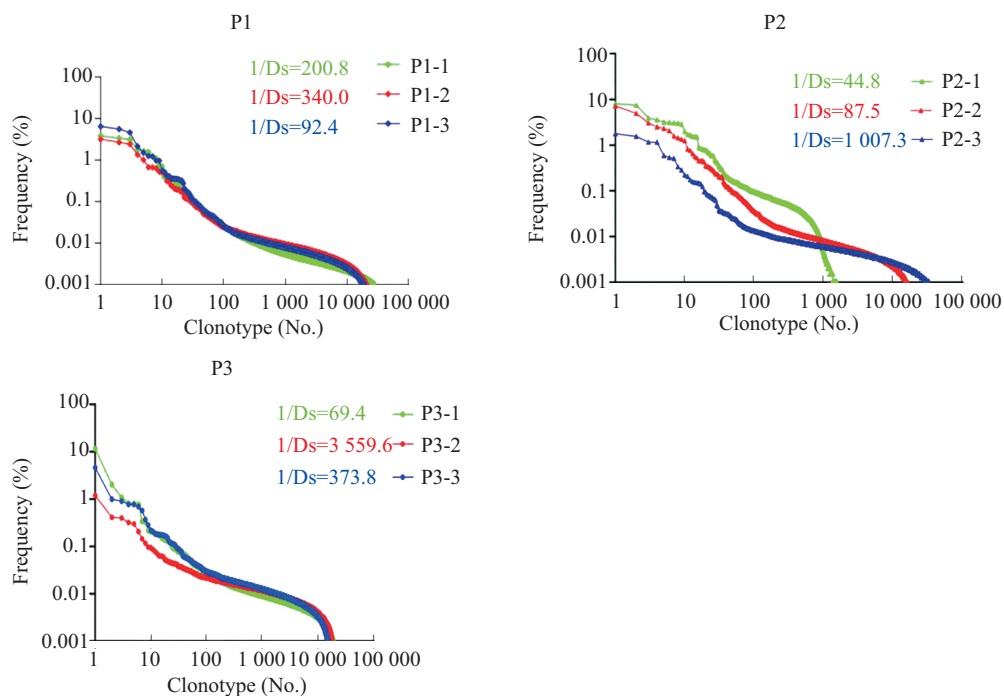


图1 P1、P2、P3化疗前、中、后CDR3组库反辛普森指数( $1/D_s$ )分析图

Fig.1 CDR3 repertoire's inverse Simpson's diversity index ( $1/D_s$ ) analysis diagram before, during and after chemotherapy in P1, P2 and P3

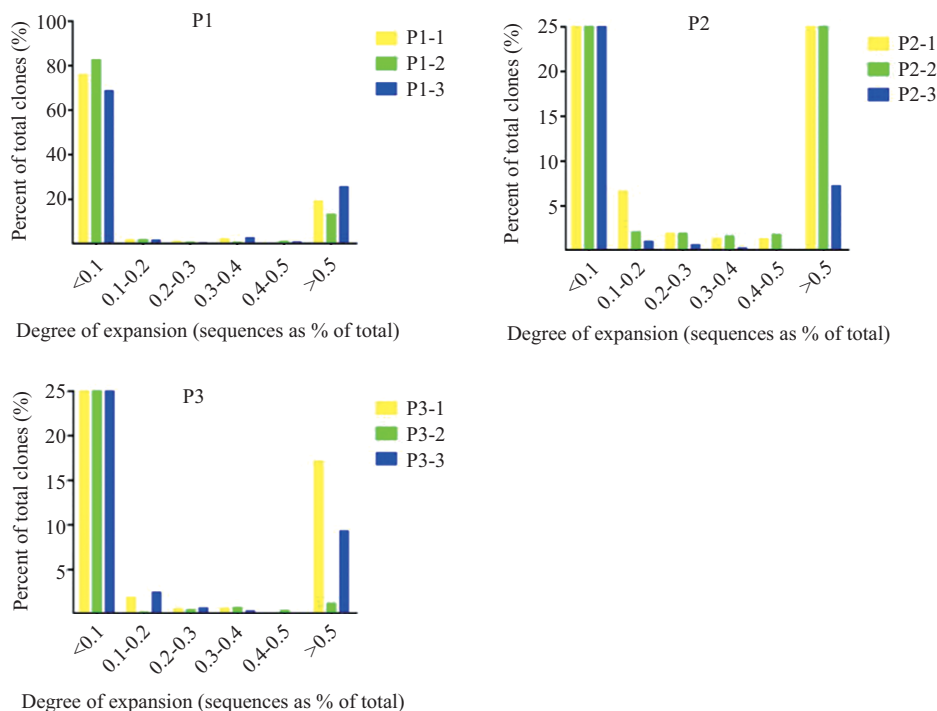


图2 P1、P2、P3化疗前、中、后CDR3组库中小于0.1%、0.1%~0.5%、大于0.5%的CDR3序列克隆增殖比例分布  
 Fig.2 CDR3 repertoire's clone proportion distribution before, during and after chemotherapy in P1, P2, P3 (<0.1%, 0.1%-0.5%, >0.5%)

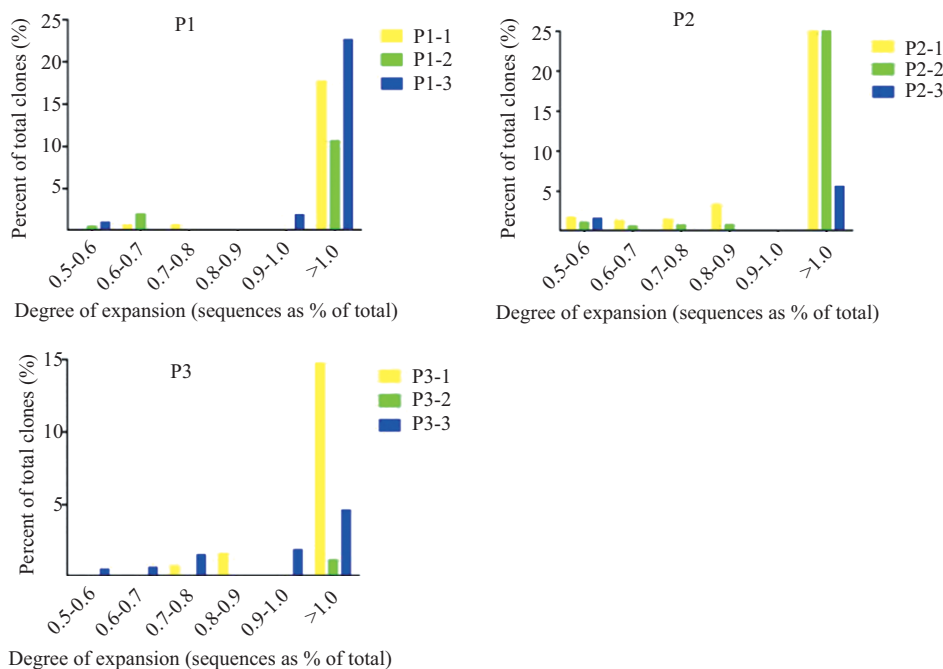


图3 P1、P2、P3化疗前、中、后CDR3组库中0.5%~1.0%和大于1.0%的CDR3序列克隆增殖比例分布  
 Fig.3 CDR3 repertoire's clone proportion distribution before, during and after chemotherapy in P1, P2, P3 (0.5%-1.0% and >1.0%)

### 2.7 P1、P2、P3在TAC化疗前、中、后CDR3组库的TRBV与TRBJ配对

P1、P2、P3在化疗前、中、后表现出不同的TRBV与TRBJ优势配对(>2%)。P1患者化疗前后

优势配对(未改变): TRBV7-9与TRBV2-7、TRBV6-4与TRBV2-7、TRBV27与TRBV1-1、TRBV5-4与TRBV1-1; P2化疗后优势配对的TRBV2与TRBV2-3、TRBV28与TRBV2-1、TRBV5-4与TRBV1-1取用丢失;

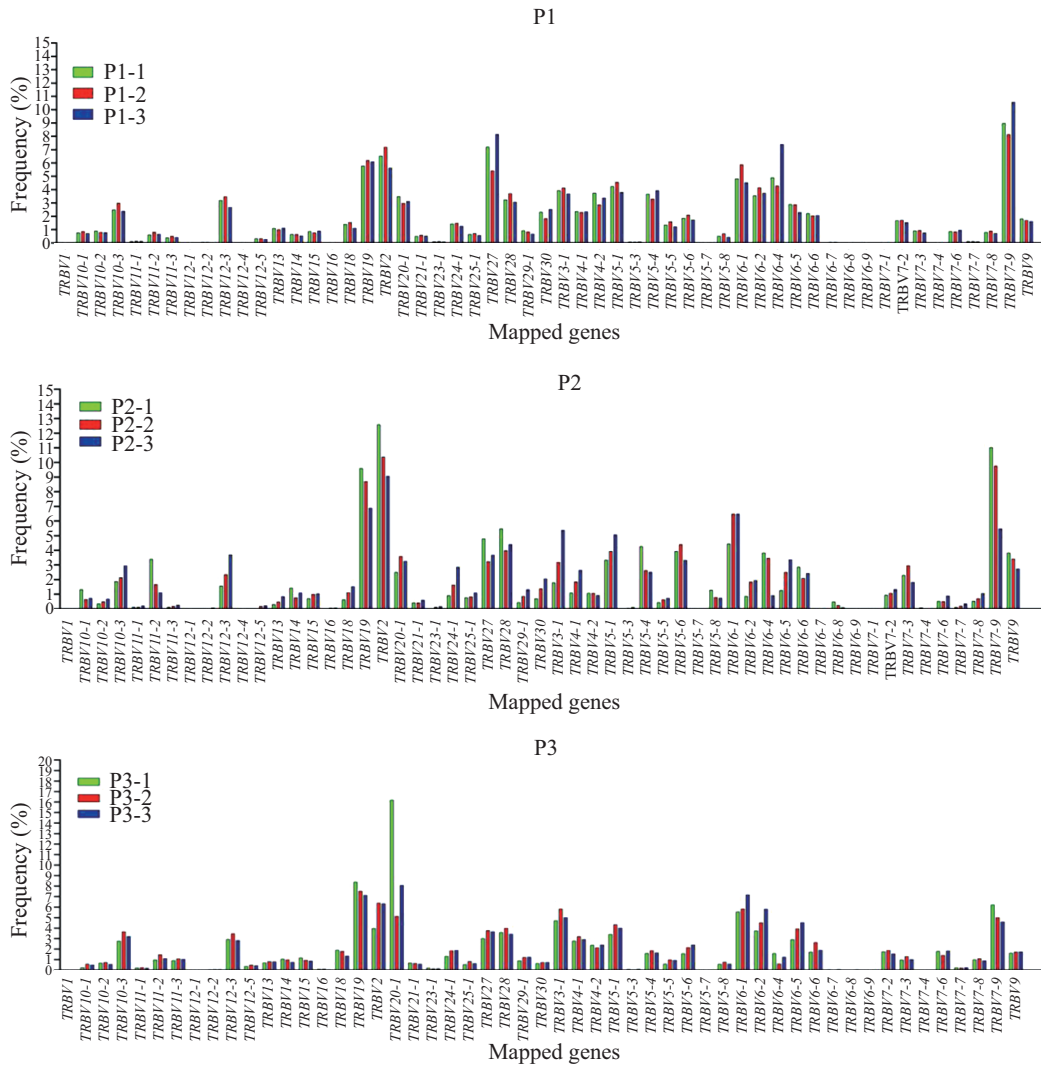


图4 P1、P2、P3化疗前、中、后CDR3组库TRBV基因家族取用比例图

Fig.4 CDR3 repertoire with TRBV genes usage proportion before, during and after chemotherapy in P1, P2 and P3

P3化疗后优势配对TRBV19与TRBV2-1、TRBV7-9与TRBV1-4取用丢失。

## 2.8 P1、P2、P3在TAC化疗前、中、后CDR3组库的CDR3长度及氨基酸取用

P1、P2、P3在化疗前、中、后CDR3长度分布相似,均表现为13个氨基酸为主的标准钟型分布,CDR3区长度跨度主要为5~23个氨基酸,集中在9~16个氨基酸长度。P1、P2、P3在化疗前后总氨基酸取用比例相似,未发生明显改变,CDR3在相对保守的105、106、107、115、116、117位点分别高频取用丙氨酸、丝氨酸、丝氨酸、谷氨酸、谷氨酰胺与酪氨酸(图5)。

## 2.9 P1、P2、P3在TAC化疗前、中、后CDR3组库重叠序列分析

P1、P2、P3在化疗前、中、后CDR组库中独

特序列重叠数分别为1 035条、251条与347条。在各自3个时间点重叠率的相互比较中,每个个体3个时间点公共重叠的CDR3比较少,除P2化疗前因独特CDR3偏少其重叠的CDR3比率较高外,其他不同时间点之间的相互比较,重叠CDR3所占的比率均较低,提示TAC化疗对患者公共的CDR3区无明显影响(图6和表3~表5)。

## 3 讨论

近年来,乳腺癌发病率持续上升,随着人们健康意识的提高和对乳腺癌普查范围的扩大和规范,更多的早期乳腺癌患者得以及时发现并获得良好的治疗机会。化疗作为早期乳腺癌治疗的主要手段之一被广泛应用,如何动态监测和评估早期乳腺癌患者化疗期间及化疗后,免疫系统损伤和逐渐恢复情

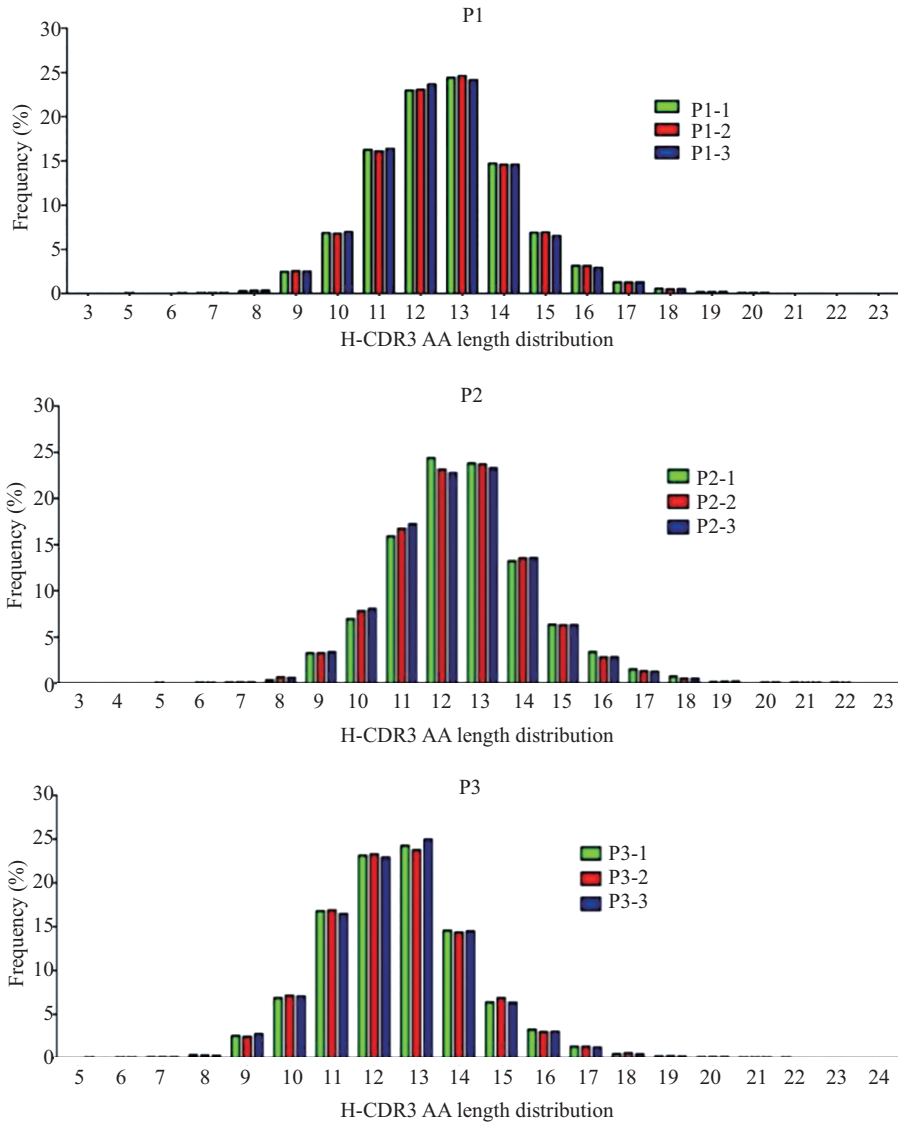


图5 P1、P2、P3化疗前、中、后CDR3组库中CDR3区氨基酸长度分布

Fig.5 CDR3 repertoire amino acid (AA) length distribution before, during and after chemotherapy in P1, P2 and P3

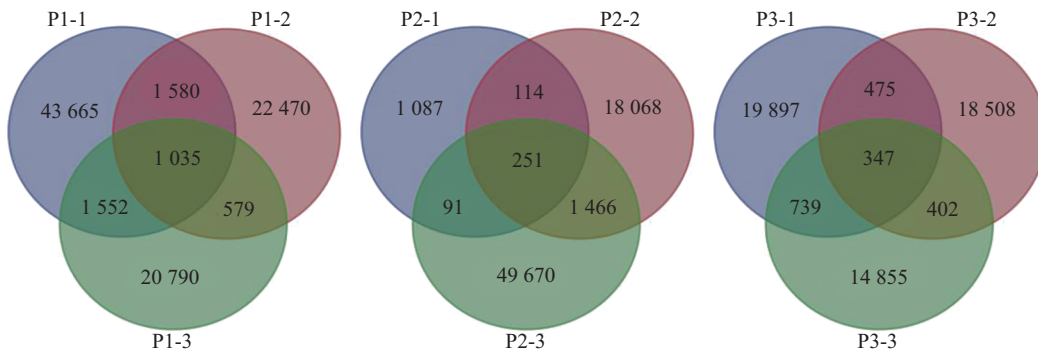


图6 P1、P2、P3化疗前、中、后CDR3组库中独特CDR3序列重叠数分析

Fig.6 CDR3 repertoire unique CDR3 sequence overlaps before, during and after chemotherapy in P1, P2, P3

况, 是该领域急需研究和回答的关键科学问题, 也是临床医生和早期乳腺癌(T<sub>1</sub>N<sub>0</sub>M<sub>0</sub>)患者在治疗前后最为关注的问题之一。

T细胞TCR  $\beta$  CDR3组库的解析一直是研究T细胞生理与病理的基础和核心内容<sup>[8]</sup>。人外周血T细胞库中有超过90%的T细胞是由 $\alpha\beta$ 链组成, 其中

表3 P1化疗前、中、后外周血CDR3组库中独特氨基酸序列重叠统计分析

样本名称 Samples	独特氨基酸重叠序列占总序列比率 The ratio of the unique amino acid overlap sequence accounts for total sequences		
	P1-1	P1-2	P1-3
P1-1	47 832/47 832 (100%)	2 615/25 664 (10.19%)	2 587/23 956 (10.80%)
P1-2	2 615/47 832 (5.47%)	25 664/25 664 (100%)	1 614/23 956 (6.74%)
P1-3	2 587/47 832 (5.41%)	1 614/25 664 (6.29%)	23 956/23 956 (100%)

表4 P2化疗前、中、后外周血CDR3组库中独特氨基酸序列重叠统计分析

样本名称 Samples	独特氨基酸重叠序列占总序列比率 The ratio of the unique amino acid overlap sequence accounts for total sequences		
	P2-1	P2-2	P2-3
P2-1	1 543/1 543 (100%)	365/19 899 (1.83%)	342/51 478 (0.66%)
P2-2	365/1 543 (23.66%)	19 899/19 899 (100%)	1 717/51 478 (3.34%)
P2-3	342/1 543 (22.16%)	1 717/19 899 (8.63%)	51 478/51 478 (100%)

表5 P3化疗前、中、后外周血CDR3组库中独特氨基酸序列重叠统计分析

样本名称 Samples	独特氨基酸重叠序列占总序列比率 The ratio of the unique amino acid overlap sequence accounts for total sequences		
	P3-1	P3-2	P3-3
P3-1	21 458/21 458 (100%)	822/19 732 (4.17%)	1 086/16 343 (6.65%)
P3-2	822/21 458 (3.83%)	19 732/19 732 (100%)	749/16 343 (4.58%)
P3-3	1 086/21 458 (5.06%)	749/19 732 (3.80%)	16 343/16 343 (100%)

$\beta$ 链最先发生重排, 通过不连续功能性V/D/J/C基因片段重排和核苷酸的随机插入、剪接、二次重排等, 形成多样性的抗原互补决定区(CDR1、CDR2、CDR3), 而CDR3是与抗原特异性结合的关键区域, 直接反应TCR多样性, 对CDR3区基因序列的分析可以了解相应T细胞克隆增殖情况, 进一步反映T细胞功能状态<sup>[9]</sup>。化疗对免疫系统T细胞的损伤主要为应激性损伤, 同时, 也可能存在选择性的抑制或杀伤T细胞, 机体免疫系统随着化疗的结束将逐渐恢复与重建, 针对这种过程, 目前可利用HTS技术动态监测T细胞TCR  $\beta$  CDR3组库, 来探讨化疗药物对T细胞的影响及机体T细胞应答功能状态的评估<sup>[10-11]</sup>。

本研究应用高通量测序技术检测早期乳腺癌志愿患者(P1、P2和P3)TAC化疗前、中、后外周血T细胞TCR  $\beta$  CDR3组库的组成和动态变化特征。血常规检测结果发现, 3例患者在化疗中、化疗后, 外周血的白细胞总数均比化疗前降低, 但根据参考值均在正常范围之内。因本研究的血常规和CDR3组库为同一时间采取外周血进行检测, 避免了化疗后白细胞明显下降而无法评估T细胞CDR3组库和T细胞功能状态的状况。

另外, 有研究学者之前利用CDR3谱系的复杂性评分系统来评估结直肠癌化疗前后TCR组库的多样性, 发现结直肠癌患者TCR组库化疗后较化疗前

多样性降低, 考虑是化疗药物的影响<sup>[12]</sup>。本研究通过对T细胞CDR3组库多样性的动态对比分析发现, 在化疗中, 3例早期乳腺癌患者CDR3组库的多样性(1/Ds)较化疗前均增加, 因为化疗中外周血采集时间点时的白细胞总数下降不明显, 考虑TAC杀伤了呈高频克隆增生的T细胞(可能为机体克隆增生的抗肿瘤细胞), 而造成个体整体水平上CDR3组库多样性较化疗前升高。在化疗后, P1和P3的CDR3组库的多样性, 相比化疗中显著降低, 可能是TAC持续治疗的应激性损伤了高克隆比例的T细胞。但P2患者因为化疗前CDR3组库的多样性特别低, 因此在两次化疗后的时间监测点上, 出现CDR3组库的多样性的升高, 可能和机体高克隆T细胞减少后, 多克隆T细胞的逐渐恢复相关, 亦提示P2患者对TAC化疗有较高的耐受性, 而且化疗前、中、后P2白细胞总数几乎无改变(P2-1: 6.11、P2-2: 5.66、P2-3: 5.96), 也提示P2对TAC的耐受程度较高。进一步分析T细胞CDR3组库高频率序列比例发现, 3例患者的CDR3组库高频率序列比例的动态变化和CDR3组库多样性变化表现完全一致, 提示TAC主要损伤高频克隆的T细胞, 表现出非特异的抑制或杀伤。

T细胞CDR3组库*TRBV*的取用频率及*TRBV-TRBJ*的配对分析发现, P1、P2、P3存在各自独特的*TRBV*高频取用和*TRBV-TRBJ*优势配对, 这种高频的*TRBV*或*TRBV-TRBJ*配对的个体化特征的存在, 考虑主要和肿瘤抗原引起的特异T细胞克隆增生相关, 本课题在前期的30例乳腺癌(外周血和局部肿瘤组织)CDR3谱系*TRAV*和*TRBV*高频取用研究中曾发现类似的表现<sup>[13-14]</sup>。Ito等<sup>[15]</sup>早期在乳腺癌研究中, 也发现患者外周血存在*TRBV*寡克隆增生的CD8<sup>+</sup>T细胞, 且高于淋巴结。本研究发现, P1、P2、P3在化疗前、中、后, *TRBV*取用的丢失和*TRBV-TRBJ*配对的频率变化与消失现象, 可能和TAC对高频的*TRBV*(或*TRBV-TRBJ*配对)造成应激性损伤相关, 也不排除TAC对T细胞存在一定的选择性抑制或杀伤。进一步从总体上分析T细胞CDR3组库CDR3区长度分布和氨基酸取用发现, 3例患者在化疗前、中、后均未发生明显改变。此结果与之前研究报告的健康人CDR3区长度分布和氨基酸取用一致<sup>[16]</sup>, 提示TAC化疗, 并没有从总体上改变早期乳腺癌患者外周血T细胞TCR  $\beta$  CDR3组库的长度分布与氨基酸取用。

本实验通过分析3例早期乳腺癌患者, 在TAC

化疗前、中、后外周血T细胞TCR  $\beta$  CDR3组库的组成和动态变化特征, 发现TAC化疗和CDR3组库的多样性、克隆性变化存在一定的联系, 同时影响CDR3组库的*TRBV*等高频取用。但因为乳腺癌患者外周血T细胞克隆/寡克隆增生本身的复杂性和个体差异, 以及乳腺癌发生发展过程中, 机体免疫系统的改变, 很难对TAC影响个体T细胞的机制和效应变化做出准确的评估<sup>[17]</sup>。近年来, 针对肿瘤组织中的肿瘤浸润性T细胞(TIL)的分析越发成熟。Luo等<sup>[18]</sup>利用基因扫描技术检测结直肠癌(CRC)患者化疗前后TCR的多样性, 发现TCR组库的多样性变化与CRC患者的整体身体状况呈正相关, 治疗后缓解的患者比疾病进展期的患者具有更广泛的TCR组库多样性, 这表明监测TCR组库的多样性可能对治疗效果评估和预后具有潜在价值。Andrea等<sup>[19]</sup>利用谱系扫描技术分析卵巢癌患者肿瘤组织与外周血之间TIL TCR  $\beta$  CDR3组库的差异, 结果发现, 外周血中TCR  $V\beta$ 的亚家族呈高斯分布的多克隆模式, 而肿瘤组织的*V\beta*的亚家族表现为寡克隆和高度的偏向性。而连续的肿瘤抗原刺激可能引起T细胞的克隆增殖, 但会导致某些TCR基因家族的单克隆或寡克隆扩张, 并导致CDR3谱系的不平衡分布, 这表明了T细胞组库免疫功能受到了限制<sup>[20]</sup>。最近, David等<sup>[21]</sup>发现, 乳腺癌患者采用免疫治疗后[cryoablation, single-dose anti-CTLA-4 (ipilimumab) or cryoablation+ipilimumab], TIL  $\beta$  CDR3组库的相应变化, 提示在早期乳腺癌患者的免疫治疗中, TIL  $\beta$  CDR3组库可用作治疗效果的评估指标。在TAC化疗的过程中, 监测外周血T细胞TCR  $\beta$  CDR3组库的组成及动态变化, 结合机体外周血白细胞总数和淋巴细胞比例的变化, 可较为全面的了解患者T细胞的总体状况及应答效应, 特别对化疗前、中、后“个体化”的T细胞免疫状态评估提供详细的基础数据。随着HTS监测TCR  $\beta$  CDR3组库在临床研究中的应用, 如何结合早期乳腺癌患者本身外周血T细胞的特征与化疗可能造成的影响, 将是早期乳腺癌患者化疗中T细胞免疫评估的方向<sup>[22]</sup>。对TCR  $\beta$  CDR3组库有关序列的分析可以帮助我们不同免疫状态下的T细胞进行检测, 采用CDR3作为乳腺癌的治疗靶标可以为乳腺癌的治疗研究等提供基础。

## 参考文献 (References)

- 1 郑莹, 吴春晓, 张敏璐. 乳腺癌在中国的流行状况和疾病特

- 征. 中国癌症杂志(Zheng Ying, Wu Chunxiao, Zhang Minlu. The prevalence and disease characteristics of breast cancer in China. *China Oncology* 2013; 23(8): 561-9.
- 2 Mitachi Y, Murakawa Y, Okuno M, Kambe M, Kanamaru R, Takahashi H, *et al.* Subsets of peripheral blood lymphocytes and tumor infiltrating lymphocytes in cancer patients received chemotherapy. *Gan To Kagaku Ryoho* 1990; 17(3 Pt 2): 482-8.
- 3 Hong CY, Peng J, Wei YS, Peng HP, Yang H, Zhao CX, *et al.* The impact of chemotherapy-associated neutrophil/lymphocyte counts on prognosis of adjuvant chemotherapy in colorectal cancer. *BMC Cancer* 2013; 13(1): 177.
- 4 Layman RM, Ruppert AS, Lynn M, Mrozek E, Ramaswamy B, Lustberg MB, *et al.* Severe and prolonged lymphopenia observed in patients treated with bendamustine and erlotinib for metastatic triple negative breast cancer. *Cancer Chemother Pharmacol* 2013; 71(5): 1183-90.
- 5 Robins HS, Campregher PV, Srivastava SK, Wacher A, Turtle CJ, Kagsai O, *et al.* Comprehensive assessment of T-cell receptor beta-chain diversity in alpha beta T cells. *Blood* 2009; 114(19): 4099-107.
- 6 Carlson CS, Emerson RO, Sherwood AM, Desmarais C, Chung MW, Parsons JM, *et al.* Using synthetic templates to design an unbiased multiplex PCR assay. *Nat Commun* 2013; 4: 2680.
- 7 Lefranc MP. IMGT unique numbering for the variable (V), constant (C), and groove (G) domains of IG, TR, MH, IgSF, and MhSF. *Cold Spring Harb Protoc* 2011; 2011(6): 633-42.
- 8 王 鹏, 贺晓燕, 王小妹, 姚新生. T细胞TCR CDR3受体库的高通量测序分析概况. 现代免疫学杂志(Wang Peng, He Xiaoyan, Wang Xiaomei, Yao Xincheng. Study of the High-throughput sequencing analysis of T cell TCR CDR3 repertoire. *Current Immunology* 2011; 31(6): 445-9.
- 9 姚新生, 孙万邦. TCR beta链CDR3谱序与疾病研究概况及进展. 国际免疫学杂志(Yao Xincheng, Sun Wanbang. Study of the spectratyping of CDR3 length of TCR beta chain in diseases. *Int J Immunol* 2007; 30(4): 240-4.
- 10 Calis JJ, Rosenberg BR. Characterizing immune repertoires by high throughput sequencing: strategies and applications. *Trends Immunol* 2014; 35(12): 581-90.
- 11 Woodworth DJ, Castellarin M, Holt RA. Sequence analysis of T-cell repertoires in health and disease. *Genome Med* 2013; 5(10): 98.
- 12 Sherwood AM, Emerson RO, Scherer D, Habermann N, Buck K, Staffa J, *et al.* Tumor-infiltrating lymphocytes in colorectal tumors display a diversity of T cell receptor sequences that differ from the T cells in adjacent mucosal tissue. *Cancer Immunol Immunother* 2013; 62(9): 1453-61.
- 13 He XY, Yang WM, Tang WT, Ma R, Sun YP, Wang P, *et al.* TRAV gene expression in PBMCs and TILs in patients with breast cancer analyzed by DNA melting curve (FQ-PCR) technique for TCR alpha chain CDR3 spectratyping. *Neoplasma* 2012; 59(6): 693-9.
- 14 He Xiaoyan, Sun Suhong, Yang Weiming, Tang Wentai, Ma Rui, Zhang Tian, *et al.* TRBV gene expression in PBMCs and TILs in patients with infiltrating ductal breast carcinomas analyzed by a DNA melting curve (FQ-PCR) technique using TCR beta chain CDR3 spectratyping. *Journal of Zunyi Medical University* 2016; 39: 35-43.
- 15 Ito K, Fettes J, Khalili H, Hajdu S, Busch E, Pergolizzi R, *et al.* Oligoclonality of CD8<sup>+</sup> T cells in breast cancer patients. *Mol Med* 1997; 3(12): 836-51.
- 16 Ma L, Yang L, Shi B, He X, Peng A, Li Y, *et al.* Analyzing the CDR3 repertoire with respect to TCR-beta chain V-D-J and V-J rearrangements in peripheral T cells using HTS. *Sci Rep* 2016; 6: 29544.
- 17 Zandvoort A, Lodewijk ME, Klok PA, Timens W. Effects of multidose combination chemotherapy on the humoral immune system. *Clin Immunol* 2003; 107(1): 20-9.
- 18 Luo W, He WT, Wen Q, Chen S, Wu J, Chen XP, *et al.* Changes of TCR repertoire diversity in colorectal cancer after Erbitux (cetuximab) in combination with chemotherapy. *Am J Cancer Res* 2014; 4(6): 924-33.
- 19 Hagemann AR, Cadungog M, Hagemann IS, Hammond R, Adams SF, Chu CS, *et al.* Tissue-based immune monitoring I: tumor core needle biopsies allow in-depth interrogation of the tumor microenvironment. *Cancer Biol Ther* 2011; 12(4): 357-66.
- 20 Clemente MJ, Przychodzen B, Jerez A, Dienes BE, Afaible MG, Husseinzadeh H, *et al.* Deep sequencing of the T-cell receptor repertoire in CD8<sup>+</sup> T large granular lymphocyte leukemia identifies signature landscapes. *Blood* 2013; 122(25): 4077-85.
- 21 Page DB, Yuan J, Redmond D, Wen YH, Durack JC, Emerson R, *et al.* Deep sequencing of T cell receptor DNA as a biomarker of clonally expanded TILs in breast cancer after immunotherapy. *Cancer Immunol Res* 2016; 4(10): 835-44.
- 22 Hou XL, Wang L, Ding YL, Xie Q, Diaoy HY. Current status and recent advances of next generation sequencing techniques in immunological repertoire. *Genes Immun* 2016; 17(3): 153.