

1、3、5月龄BALB/c小鼠的外周血与脾脏BCR H-CDR3组库的构成

李月红^{1#} 潘雨蓉^{1#} 孙素红^{2#} 马龙¹ 石彬³ 马锐¹ 姚新生^{1*}

(¹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 563000; ²遵义医学院附属医院甲乳外科, 遵义 563000; ³遵义医学院检验医学系, 遵义 563000)

摘要 B细胞是机体适应性免疫的主要成分, 是介导特异性体液免疫应答的主要细胞群, 主要依靠B细胞受体(B cell receptor, BCR)与抗原发生应答反应。BCR的可变区为互补决定区(complementarity determining region, CDR)包括CDR1、CDR2、CDR3, 其中CDR3具有最丰富的多样性。该文通过高通量测序并分析1、3、5月龄小鼠BCR重链(heavy chain, H)-CDR3组库的多样性、CDR3区的基因/氨基酸的组成特性和各亚家族的偏向取用等, 结果发现, 小鼠在发育过程中, 其外周免疫器官(脾脏)和外周血BCR H-CDR3组库存在相应的动态变化。该研究探索了机体在发育过程中, BCR H-CDR3组库的构成变化, 为病理条件下BCR H-CDR3组库的研究提供基础数据。

关键词 BALB/c小鼠; B细胞受体重链-CDR3组库; 发育

The Composition of BCR H-CDR3 Repertoires in Peripheral Blood and Spleen from 1, 3, 5 Months Old BALB/c Mice

Li Yuehong^{1#}, Pan Yurong^{1#}, Sun Suhong^{2#}, Ma Long¹, Shi Bin³, Ma Rui¹, Yao Xinsheng^{1*}

(¹Department of Immunology, Zunyi Medical College, Immunology Innovation Base of Postgraduate Education in Guizhou Province, Zunyi 563000, China; ²Department of Thyroid and Breast Surgery, Affiliated Hospital of Zunyi Medical College, Zunyi 563000, China; ³Department of Medical Laboratory, Zunyi Medical College, Zunyi 563000, China)

Abstract B cell is the main component of adaptive immunity and the main cell group mediating specific humoral immune response. It mainly depends on the B cell receptor (BCR) to take part in antigen response. The variable region of B cell receptor is a complementary determinant region (CDR), consisting of CDR1, CDR2, CDR3, among them, CDR3 has the most abundant diversity. This article through high-throughput sequencing analyzes BCR heavy chain (H)-CDR3 repertoire diversity, composition characteristics of CDR3 region gene or amino acids and bias usage in each subfamily gene of 1, 3, 5 months old mice, finds that BCR H-CDR3 repertoires of peripheral immune organs (spleen) and peripheral blood exist the corresponding dynamical change during the development of mice. The results of this study are helpful to explore the changes of BCR H-CDR3 repertoire during the development of organism and to provide basic data for the study of BCR H-CDR3 repertoire under pathological conditions.

Keywords BALB/c mice; BCR H-CDR3 repertoire; development

收稿日期: 2017-06-06 接受日期: 2017-08-02

国家自然科学基金(批准号: 81660269)资助的课题

[#]共同第一作者

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

Received: June 6, 2017 Accepted: August 2, 2017

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.81660269)

[#]These authors contributed equally to this work

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

网络出版时间: 2017-09-08 10:18:35 URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20170908.1018.002.html>

在发育、成熟和衰老过程中, 机体免疫系统发生着变化, 其中, 免疫细胞(包括B细胞和T细胞)的数量、功能都发生相应的变化^[1]。在与抗原发生应答过程中, B细胞受体(B cell receptor, BCR)起关键性作用, BCR是由两条重链(heavy chain, H)和两条轻链 κ/λ (light chain κ/λ)组成的四聚体, BCR的可变区为互补决定区(complementarity determining region, CDR)包括CDR1、CDR2和CDR3, 其中, CDR3多样性最丰富, 是决定B细胞识别抗原肽的关键部位。机体发育过程中, BCR重链-互补决定区3(heavy chain-complementarity determining region 3, H-CDR3)组库多样性也发生相应的变化。早期研究显示, 与胚胎时期或新生儿时期相比, 成年个体T细胞和B细胞受体库多样性丰富, 末端脱氧核苷酸转移酶(terminal deoxynucleotidyl transferase, TDT)表达增加, 导致核苷酸随机插入增加而产生多样性的受体库^[2-5]。近期, Sethna等^[6]研究者进一步对胚胎期和幼年小鼠的外周血和胸腺T细胞受体库变化进行了研究, 也发现在小鼠出生到约1个月, TDT表达升高, T细胞受体库多样性逐渐增加。然而, 在机体发育过程中, 对B细胞受体库的多样性研究较少, 特别是对幼年、成年、老年小鼠外周血和脾脏的BCR H-CDR3组库的研究。本文通过对幼年(1月龄)、成年(3月龄)、老年(5月龄)的BALB/c小鼠的外周血与脾脏BCR H-CDR3组库的多样性、CDR3区的基因/氨基酸的组成特性、各亚家族的偏向取用等进行研究, 揭示机体生长发育过程中BCR H-CDR3组库的构成变化, 为病理条件下BCR H-CDR3组库的研究提供基础数据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 动物 从常州卡文斯实验动物中心(Cavins Experimental Animal Center, CAVENS)购买4周龄SPF级健康的BALB/c小鼠, 引入遵义医学院中心实验室动物实验中心(SPF级条件)饲养, 选取同窝1、3、5月龄各1只雌性BALB/c小鼠。该动物实验通过了遵义医学院中心实验室动物实验中心伦理委员会批准。

1.1.2 试剂和仪器 小鼠外周血淋巴细胞分离液、细胞洗涤液、红细胞裂解液、DNA Marker、Loading Buffer均购自Tiange公司; DNA提取试剂盒QIAamp DNA MiniKit购自QIAGEN公司; DNA stable Tube Kit购自Biomatrix公司。C Tube和

GentleMACS全自动温和组织处理器购自美天旎公司。

1.2 方法

1.2.1 DNA样本提取及测序 选取同窝1、3、5月龄各1只雌性BALB/c小鼠, 分别取脾脏和外周血, 解离组织分离得到单个核细胞(peripheral blood mononuclear cells, PBMC), 提取各样本基因组DNA, 用1%琼脂糖凝胶进行电泳进行鉴定。提取实验样本DNA后, 送美国Adaptive Biotechnologies Immuno SEQ公司, 每个样品都由Adaptive Bio-technologies Immuno SEQ公司进行质检、建库和Illumina高通量测序(high-throughput sequencing, HTS), 每个样本只通过一次HTS, 就可获得完整和可靠的CDR3序列。SEQ公司自开展CDR3组库技术以来, 就建立了公共的数据库, 从而提供每个样品的原始CDR3序列。

1.2.2 各小鼠样本BCR H-CDR3组库分析 对高通量测序获得的基因序列, 运用美国Adaptive Biotechnologies Immuno SEQ公司的Immuno SEQ软件以及IMGT/HighV-QUEST软件对原始序列进行筛选, 这些软件可根据小鼠BCR *V_{DJ}*基因数据库, 自动分析出每条基因序列BCR H-CDR3组库的组成^[7-8]。该实验通过Adaptive Biotechnologies Immuno SEQ测序及对原始序列的筛选后, 运用Excel、GraphPad Prism 5和Draw Venn Diagram等软件对筛选后总的序列, 进行对比并分析BCR H-CDR3组库的特征。

2 结果

2.1 1、3、5月龄BALB/c小鼠脾脏和外周血基因组DNA样本琼脂糖凝胶电泳结果

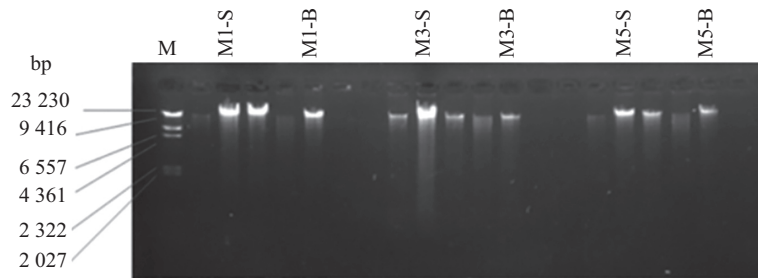
采用1%的琼脂糖凝胶电泳法分析6个基因组DNA样本, 结果显示, DNA样本提取良好, 有轻微降解现象(图1)。

2.2 1、3、5月龄BALB/c小鼠BCR H-CDR3组库高通量测序总序列数据

每个样本通过Immuno SEQ测序并经过IMGT/HighV-QUEST筛选后获得数据见表1, 其中, 1、3、5月龄BALB/c小鼠脾脏比外周血测到的总序列多。

2.3 1、3、5月龄BALB/c小鼠外周血和脾脏IGHV、IGHD、IGHJ取用频率相似

本文不仅比较了1、3、5月龄BALB/c小鼠外周血和脾脏BCR H-CDR3组库IGHV、IGHD、IGHJ



M: marker; M1-S: 1月龄小鼠脾脏; M1-B: 1月龄小鼠外周血; M3-S: 3月龄小鼠脾脏; M3-B: 3月龄小鼠外周血; M5-S: 5月龄小鼠脾脏; M5-B: 5月龄小鼠外周血。下文其他图表中缩写代表相同意义。

M: marker; M1-S: spleens of one month old mice; M1-B: peripheral blood of one month old mice; M3-S: spleen of three months old mice; M3-B: peripheral blood of three months old mice; M5-S: spleen of five months old mice; M5-B: peripheral blood of five months old mice. Abbreviations means the same thing in the following figures and tables.

图1 6个基因组DNA样本的琼脂糖凝胶电泳图

Fig.1 Agarose gel electrophoresis of 6 genomic DNA samples

表1 1、3、5月龄BALB/c小鼠BCR H-CDR3组库HTS序列数据

Table 1 The BCR H-CDR3 repertoire HTS sequencing data from 1, 3, 5 months old BALB/c mice

样本 Sample	总CDR3 区核苷酸 序列 Total CDR3 nucleotide	特异CDR3 区核苷酸 序列 Unique CDR3 nucleotide	特异CDR3 区核苷酸序 列与总核苷 酸序列比例 (%) Unique/ total (%)	总CDR3 区氨基酸 序列 Total CDR3 AA	特异CDR3 区氨基酸序 列 Unique CDR3 AA	特异CDR3 区氨基酸序 列与总氨基 酸序列比例 (%) Unique/ total (%)	总in-frame CDR3区氨 基酸序列 Total in frame CDR3 AA	特异in- frame CDR3区氨 基酸序 列 Unique in frame CDR3 AA	特异in-frame CDR3区氨 基酸序列与 总in-frame CDR3序列 比例(%) Unique/ total (%)
M1-S	460 358	324 022	70.384 79	359 061	251 925	70.162 17	339 489	209 410	61.683 88
M1-B	140 820	101 719	72.233 35	109 425	78 964	72.162 67	103 679	70 340	67.844 02
M1-Sum	601 178	425 741	70.817 79	468 486	330 889	70.629 43	443 168	279 750	63.125 05
M3-S	238 923	170 962	71.555 27	186 461	133 626	71.664 32	177 165	116 218	65.598 74
M3-B	10 836	8 097	74.723 15	8 375	6 258	74.722 39	7 934	5 797	73.065 29
M3-Sum	249 759	179 059	71.692 71	194 836	139 884	71.795 77	185 099	122 015	65.918 78
M5-S	121 507	84 066	69.186 14	96 160	66 591	69.250 21	90 871	59 370	65.334 38
M5-B	18 567	13 219	71.196 21	14 573	10 320	70.815 89	13 739	9 491	69.080 72
M5-Sum	140 074	97 285	69.452 58	110 733	76 911	69.456 26	104 610	68 861	65.826 40

M1-Sum: 1月龄小鼠外周血和脾脏序列总和; M3-Sum: 3月龄小鼠外周血和脾脏序列总和; M5-Sum: 5月龄小鼠外周血和脾脏序列总和。

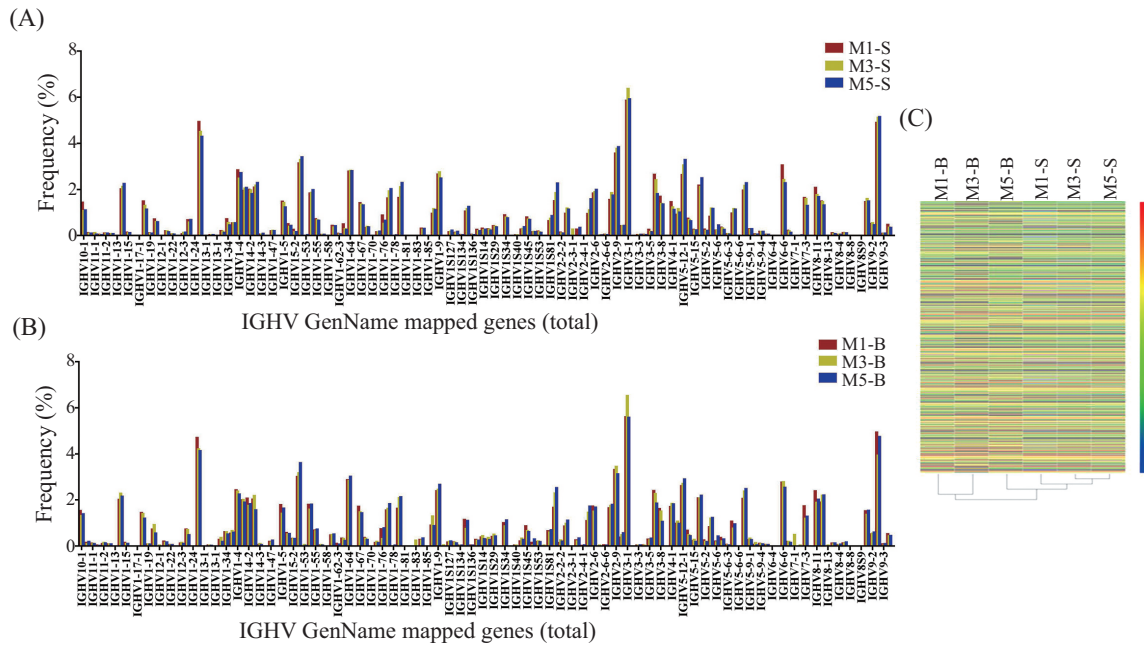
M1-Sum: the sum of the peripheral blood and spleen sequences in one month old mice; M3-Sum: the sum of the peripheral blood and spleen sequences in three months old mice; M5-Sum: the sum of the peripheral blood and spleen sequences in five months old mice.

取用频率, 还比较了相同月龄不同部位(外周血或脾脏)的基因取用, 结果均无明显差异。我们发现, 随着月龄变化, 小鼠外周血和脾脏 $IGHV$ 都高频取用 $IGHV3-1$ 、 $IGHV1-26$ 、 $IGHV9-2-1$ (图2A和图2B)。 $IGHV-J$ 基因配对取用分析, 3种月龄小鼠外周血的 $IGHV-J$ 基因配对取用都很相似, 其中, 3月龄和5月龄最为相似。3种月龄小鼠脾脏 $IGHV-J$ 基因配对取用相似程度稍低, 其中, 1月龄和3月龄较为相似(图2C)。

2.4 1、3、5月龄BALB/c小鼠外周血和脾脏BCR H-CDR3组库氨基酸取用和长度分布构成

BCR H-CDR3的氨基酸组成和结构是B细胞

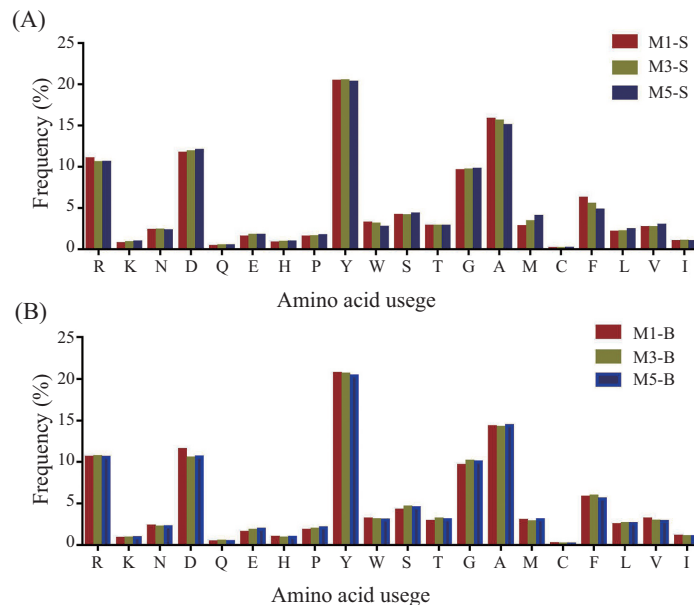
受体对特异性抗原结合的关键。我们通过对不同月龄BALB/c小鼠外周血和脾脏BCR H-CDR3组库氨基酸的取用进行分析发现, 3种月龄小鼠外周血和脾脏的氨基酸取用相同, 无明显差异, 都高频取用酪氨酸、丙氨酸、天冬氨酸、精氨酸(图3)。随后, 我们又对小鼠外周血和脾脏BCR H-CDR3氨基酸序列的长度分布进行比较, 发现外周血和脾脏BCR H-CDR3氨基酸序列的长度呈钟形分布, 均在11个氨基酸左右, 且随月龄的增加, 氨基酸的长度逐渐增加, 均具有统计学意义($P < 0.01$, 图4)。



A: 不同月龄小鼠脾脏BCR H-CDR3组库中(total in-frame CDR3)*IGHV*基因家族取用频率比较; B: 不同月龄小鼠外周血BCR H-CDR3组库中(total in-frame CDR3)*IGHV*基因家族取用频率比较; C: 不同月龄小鼠外周血和脾脏6个样本BCR H-CDR3组库中(total in-frame CDR3)*V-J*基因配对取用频率分布比较。图C中下方为颜色标尺, 数字代表取用频率, 颜色越红*V-J*基因配对取用频率越高, 右侧用聚类表示不同的*V-J*基因配对取用的相似程度, 相隔越近*V-J*基因配对取用频率分布越相似。

A: total in-frame *IGHV* usage distribution of H-CDR3 repertoire in spleen of different months old mice; B: total in-frame *IGHV* usage distribution of H-CDR3 repertoire in blood of different months old mice; C: the comparisons of total in-frame H-CDR3 *V-J* gene pair usage distribution of 6 samples from peripheral blood and spleen of different months old mice were compared. In figure C, the color bar was below, and the number represent the frequency. The more red the color was, the higher the frequency of the *V-J* gene pair. On the left, the similarity of the *V-J* gene pairs in different samples were expressed by clustering, and the closer the *V-J* gene pair was, the more similar the frequency distribution was.

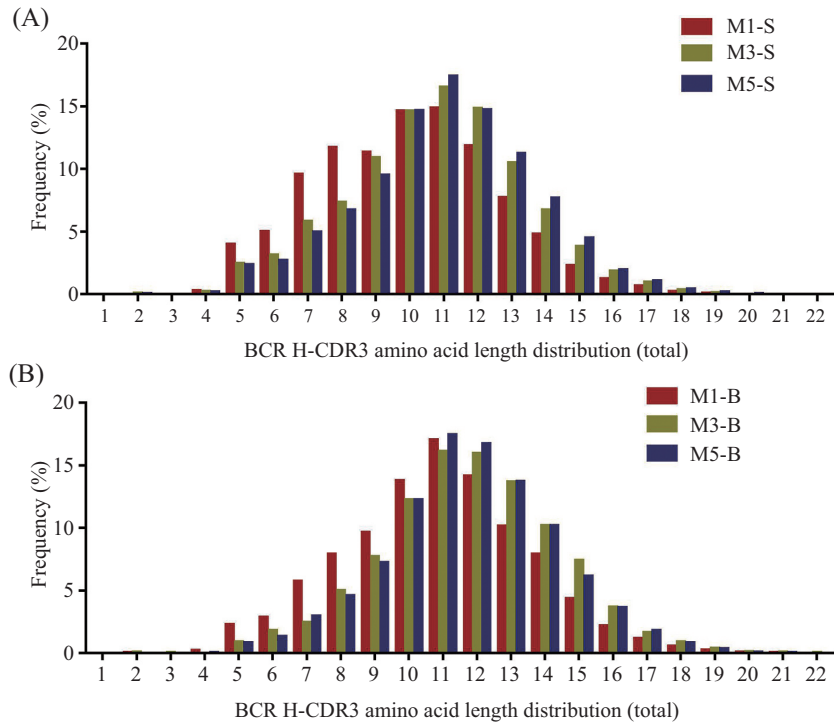
图2 *IGHV*基因家族取用频率分析
Fig.2 *IGHV* gene family usage distribution



A: 1、3、5月龄BALB/c小鼠脾脏BCR H-CDR3氨基酸(total in-frame CDR3)取用频率比较; B: 1、3、5月龄BALB/c小鼠外周血BCR H-CDR3氨基酸(total in-frame CDR3)取用频率比较。横坐标代表20种氨基酸的缩写。

A: BCR H-CDR3 repertoires total in-frame amino acid usage distribution in spleen of 1, 3, 5 months old BALB/c mice; B: BCR H-CDR3 repertoires total in-frame amino acid usage distribution in blood of 1, 3, 5 months old BALB/c mice. The abscissa represents 20 amino acid abbreviations.

图3 BCR H-CDR3组库氨基酸取用分析
Fig.3 BCR H-CDR3 repertoires amino acid usage distribution

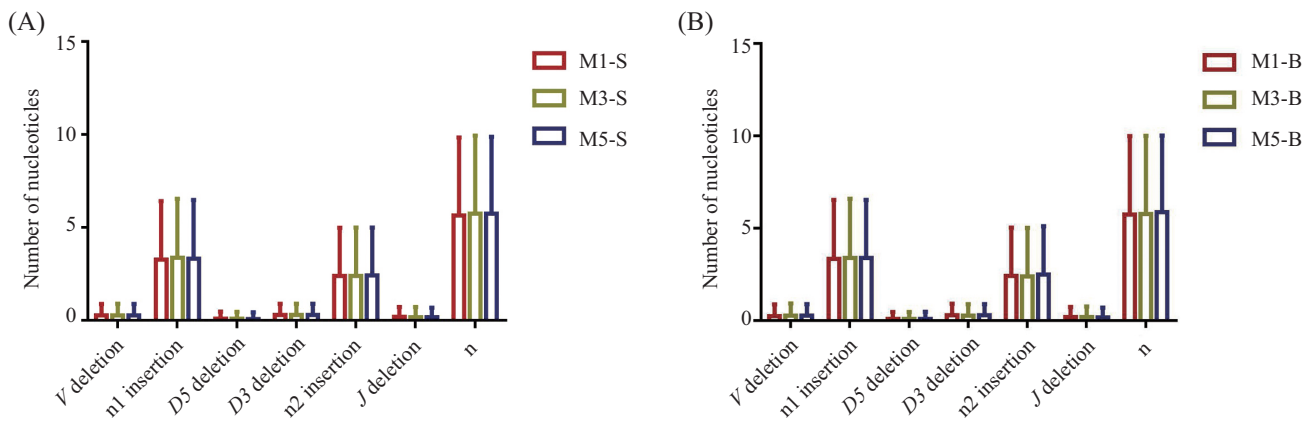


A: 1、3、5月龄BALB/c小鼠脾脏BCR H-CDR3组库氨基酸(total in-frame CDR3)的长度分布; B: 1、3、5月龄BALB/c小鼠外周血BCR H-CDR3组库氨基酸(total in-frame CDR3)的长度分布。横坐标代表氨基酸长度数值。

A: BCR H-CDR3 total in-frame amino acid length usage distribution in spleen of 1, 3, 5 months old BALB/c mice; B: BCR H-CDR3 total in-frame amino acid length distribution in blood of 1, 3, 5 months old BALB/c mice. The abscissa represents amino acid length value.

图4 BCR H-CDR3组库氨基酸长度分布的取用分析

Fig.4 Amino acid length usage distribution of BCR H-CDR3 repertoires



A: 1、3、5月龄BALB/c小鼠脾脏BCR H-CDR3组库的插入和缺失分布结果; B: 1、3、5月龄BALB/c小鼠外周血BCR H-CDR3组库的插入和缺失分布结果(n=n1 insertion+n2 insertion)。

A: statistical analysis of BCR H-CDR3 repertoire insertions and deletions in spleen of 1, 3, 5 months old BALB/c mice; B: statistical analysis of BCR H-CDR3 repertoire insertions and deletions in blood of 1, 3, 5 months old BALB/c mice (n=n1 insertion+n2 insertion).

图5 插入(n1、n2、n)和缺失(V、J、D5、D3)分析

Fig.5 Statistical analysis of insertions (n1, n2, n) and deletions (V, J, D5, D3)

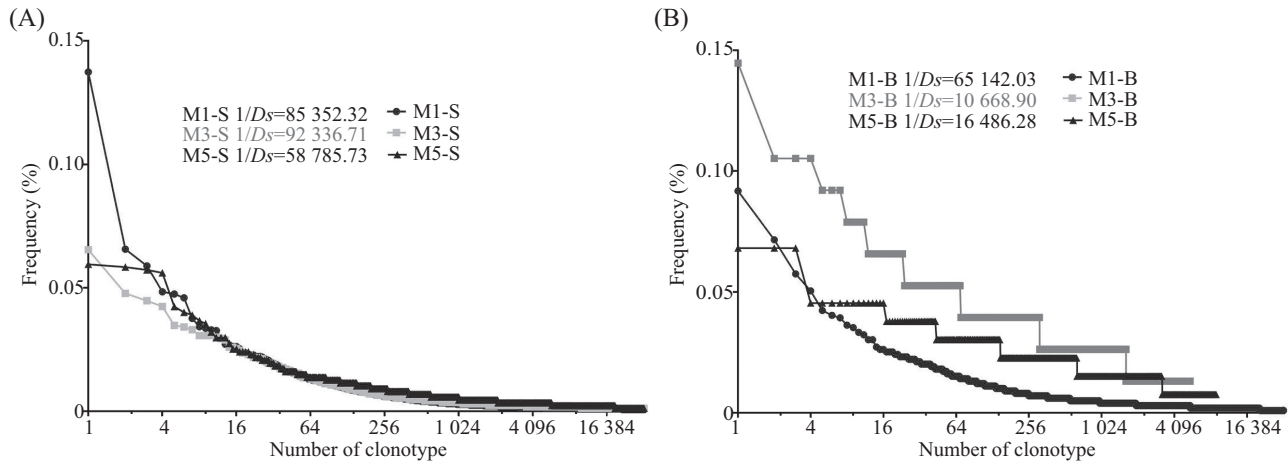
2.5 1、3、5月龄BALB/c小鼠外周血和脾脏BCR H-CDR3组库中(total in-frame CDR3)的缺失(deletion)和插入(insertion)

BCR胚系基因重组时, V、D、J基因片段连接点可发生核苷酸的插入和缺失, 是形成CDR3区多样性的

主要机制^[9]。我们对不同月龄小鼠外周血和脾脏 BCR H-CDR3组库插入和删除分析显示, 无明显差异(图5)。

2.6 1、3、5月龄BALB/c小鼠脾脏和外周血BCR H-CDR3(total in-frame CDR3)组库多样性分析

为了比较不同月龄小鼠外周血和脾脏BCR

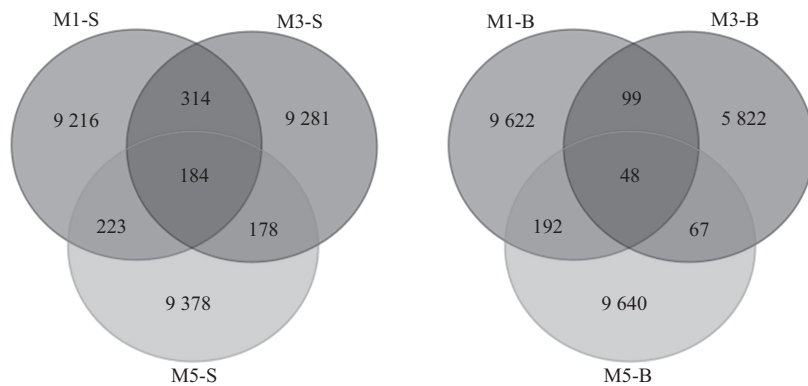


A: 1、3、5月龄BALB/c小鼠脾脏BCR H-CDR3(total in-frame CDR3)组库的多样性动态变化; B: 1、3、5月龄BALB/c小鼠外周血BCR H-CDR3(total in-frame CDR3)组库的多样性动态变化。

A: the dynamic change of BCR H-CDR3 repertoire total in-frame amino acid sequences diversity in spleen of 1, 3, 5 months old BALB/c mice; B: the dynamic change of BCR H-CDR3 repertoire total in-frame amino acid sequences diversity in blood of 1, 3, 5 months old BALB/c mice.

图6 BCR H-CDR3组库多样性分析

Fig.6 Diversity analysis of BCR H-CDR3 repertoire



A: 不同月龄脾脏BCR H-CDR3组库克隆重叠数目; B: 不同月龄外周血BCR H-CDR3组库克隆重叠数目。

A: the number of BCR H-CDR3 repertoire unique productive amino acid overlapping clones sequences in spleen of different age mice; B: the number of BCR H-CDR3 repertoire unique-productive amino acid overlapping clones sequences in peripheral blood of different age mice.

图7 BCR H-CDR3组库unique productive氨基酸序列重叠数目

Fig.7 The number of BCR H-CDR3 repertoire unique productive amino acid overlapping clones sequences

H-CDR3组库的多样性, 是否会出现相应的动态改变, 本文引入了公认的反辛普森指数(1/Ds), 可用于判断群落的多样性, 反辛普森指数校正公式为: $1/Ds = 1/\sum\{ni \times (ni-1)\} / \{n \times (n-1)\}$, ni指第i条序列(unique productive sequence)的总数, 1/Ds越高多样性则越多。目前, 反辛普森指数已广泛应用于疾病和生理条件下T和B细胞CDR3组库多样性的变化的评估^[10-11], 本文也应用1/Ds从克隆水平来分析BCR H-CDR3组库多样性的变化。

通过对1、3、5月龄小鼠外周血与脾脏BCR H-CDR3(total in-frame CDR3)组库对比分析发现, 随着月龄变化, 外周血和脾脏BCR H-CDR3组库存在

动态变化, 且变化趋势完全不同。如图6显示, 3月龄小鼠脾脏的BCR H-CDR3组库多样性比1、5月龄小鼠丰富; 然而, 小鼠外周血1月龄CDR3组库多样性最为丰富。因此, 随着月龄变化, 小鼠外周血和脾脏BCR H-CDR3(total in-frame CDR3)组库的多样性存在不同的动态变化。

2.7 Total productive氨基酸序列数据, 对比分析6个样本BCR H-CDR3组库克隆重叠率

通过对unique productive氨基酸序列数据的重叠分析, 发现3种不同月龄的小鼠脾脏重叠条数184条, 而外周血为48条(图7)。另外, 我们对total productive氨基酸序列数据进行分析, 发现不同月龄

表2 不同月龄小鼠外周血和脾脏6个样本BCR H-CDR3组库克隆重叠序列数目及比例

Table 2 The number and proportion of BCR H-CDR3 total productive amino acid repertoire overlapping sequences in 6 samples of peripheral blood and spleen of different age mice

样本 Sample	重叠数/重叠率 Number of the repertoire/ratio of the repertoire					
	M1-B	M1-S	M3-B	M3-S	M5-B	M5-S
	M1-B	29 916/100%	16 130/19.08%*	1 585/4.23%	7 639/11.46%*	2 300/5.34%#
M1-S	16 130/19.08%*	54 623/100%	5 358/8.61%#	15 657/17.14%*	6 712/9.90%#	11 473/13.49%*
M3-B	1 585/4.23%	5 358/8.61%#	7 590/100%	2 963/6.68%#	414/1.99%	1 429/3.76%
M3-S	7 639/11.46%*	15 657/17.14%*	2 963/6.68%#	36 742/100%	3 251/6.51%#	6 739/10.03%*
M5-B	2 300/5.34%#	6 712/9.90%#	414/1.99%	3 251/6.51%#	13 190/100%	2 501/5.73%#
M5-S	5 071/8.40%#	11 473/13.49%*	1 429/3.76%	6 739/10.03%*	2 501/5.73%#	30 429/100%

重叠率计算方法为 $[(A \cap B)/(A \cup B)]$ 即重叠率=(两样本重叠序列数/两样本序列之和) $\times 100\%$; *为公共序列比例大于10%, #为公共序列比例介于5%~10%。

The overlap ratio of the repertoire calculated as $[(A \cap B)/(A \cup B)]$; * is overlap rate $>10\%$ and # is overlap rate between 5%-10%.

脾脏重叠率较高(超过10%), 而外周血重叠率很低(在5%左右)(表2)。

3 讨论

正常个体的BCR, 在V、D、J基因片段重排及V-D和D-J连接时插入或剪接核苷酸序列的组成、类型转换和高频突变, 从而产生丰富的多样性。因此, 单个人体BCR通过重链、轻链本身的多样性及重链、轻链配对组合的多样性, 亦能形成至少 10^{11} 种以上BCR^[12]。这种丰富的多样性, 几乎能使正常机体对所有入侵的异物产生应答^[13]。B细胞抗原识别功能就体现在了BCR H-CDR3的多样性上, BCR H-CDR3多样性高, 机体免疫防御能力就越强; 相反, BCR H-CDR3多样性低, 则抗原应答能力就弱, 这时机体就易感染流感、乙肝等疾病。近期, 随着HTS技术发展, 可通过克隆跟踪、组库性能、公共克隆等完整地解析CDR3受体库的多样性, 并在肿瘤、移植免疫、自身免疫和老龄化免疫等多种生理和病理状态下, 动态监测CDR3受体库多样性的变化, 从而达到检测适应性免疫反应的目的^[14]。

本文选取正常幼年(1月龄)、成年(3月龄)、老年(5月龄)的小鼠, 初步探讨生长发育过程中小鼠的外周血和脾脏BCR H-CDR3组库的动态变化。通过测序, 并对BCR H-CDR3组库进行分析发现, 3种月龄小鼠外周血和脾脏V、D、J基因片段和氨基酸优势取用相同, 无明显差异, 这些优势取用和之前研究报告小鼠V、D、J基因片段和氨基酸优势取用结果相同^[12], 因此, 机体生长发育过程中, V、D、J基因片段取用和氨基酸优势取用不会发生显著变化。通

过V-J配对分析, 发现3种月龄小鼠脾脏V-J配对取用变化较大, 而3种月龄小鼠外周血变化较小。其中, 成年和老年小鼠外周血V-J配对取用相似度高, 而与幼年小鼠相比, 相似度均低。另外, 不同月龄外周血和脾脏V-J配对取用存在一定差异, 这是机体生长发育造成的还是其他原因, 尚不清楚。3种月龄小鼠外周血和脾脏CDR3氨基酸长度分析, 显示小鼠氨基酸长度在11个氨基酸左右, 与之前报道小鼠CDR3氨基酸平均长度为 11.5 ± 1.9 个氨基酸相符^[15]。我们还发现, 随月龄的增加, 编码的氨基酸长度逐渐增加, 且差异有统计学意义。在对V、D、J基因片段重排中的插入和缺失进行分析时, 发现3种月龄小鼠外周血和脾脏BCR H-CDR3核苷酸随机插入数量无明显差异。因此, 随月龄的增加, 氨基酸长度逐渐增加, 是突变还是其他原因引起的, 仍不清楚。

本文通过对样本克隆重叠分析, 发现随月龄增加, 脾脏克隆重叠率逐渐降低, 但都稳定在10%以上, 而外周血克隆重叠率很低。这表明, 不同月龄小鼠的脾脏中存在多种相同的B细胞克隆而不同月龄外周血中多种相同的B细胞克隆较少。这说明, 随月龄的变化, 小鼠外周血中B细胞变化大, 这与骨髓等免疫器官克隆产生B细胞后再输出到外周血有关, 因此, B细胞输出变化较大、极不稳定。通过反新普森指数分析发现, 相同月龄同只小鼠脾脏的BCR H-CD3受体库多样性比外周血丰富, 且随月龄增加, 小鼠外周血和脾脏受体库的多样性都发生了动态变化, 其中, 脾脏BCR H-CD3受体库多样性最丰富时期是成年期(5月龄), 而外周血是幼年期(1月龄)。成年小鼠脾脏BCR H-CD3受体库多样性最丰

富, 这可能是由于成年小鼠脾脏组织发育完善, 使得BCR H-CD3受体库多样性最丰富, 因此, 成年小鼠机体免疫力强。幼年小鼠外周血BCR H-CD3受体库最丰富的时间与之前研究者报道外周血T细胞库多样性最丰富的时间相同^[6], 而成年和老年BCR H-CD3受体库多样性逐渐降低, 这是否是骨髓输出减少造成的, 有待进一步的探讨。

参考文献 (References)

- 1 Globerson A, Effros RB. Aging of lymphocytes and lymphocytes in the aged. *Immunology* 2000; 21(10): 515-21.
- 2 Feeney AJ. Lack of N regions in fetal and neonatal mouse immunoglobulin V-D-J junctional sequences. *Exp Med* 1990; 172: 1377-90.
- 3 Bogue M, Gilfillan S, Benoist C, Mathis D. Regulation of N-region diversity in antigen receptors through thymocyte differentiation and thymus ontogeny. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89(22): 11011-5.
- 4 Komori T, Okada A, Stewart V, Alt FW. Lack of N regions in antigen receptor variable region genes of TdT-deficient lymphocytes. *Science* 1993; 261(5125): 1171-5.
- 5 Gilfillan S, Dierich A, Lemeur M, Benoist C, Mathis D. Mice lacking TdT: Mature animals with an immature lymphocyte repertoire. *Science* 1993; 261(5125): 1175-8.
- 6 Sethna Z, Elhanati Y, Dudgeon CS, Callan CG Jr, Levine AJ, Mora T, *et al.* Insights into immune system development and function from mouse T-cell repertoires. *Proc Natl Acad Sci USA* 2017; 114 (9): 2253-8.
- 7 Alamyar E, Duroux P, Lefranc MP, Giudicelli V. IMGT tools for the nucleotide analysis of immunoglobulin (IG) and T cell receptor (TR) V-(D)-J repertoires, polymorphisms, and IG mutations: IMGT/V-QUEST and IMGT/HighV-QUEST for NGS. *Methods Mol Biol* 2012; 882: 569-604.
- 8 Li S, Lefranc MP, Miles JJ, Alamyar E, Giudicelli V, Duroux P, *et al.* IMGT/HighV QUEST paradigm for T cell receptor IMGT clonotype diversity and next generation repertoire immunoprofiling. *Nat Commun* 2013; 4: 2333.
- 9 Reiche S, Dwai Y, Bussmann BM, Horn S, Sieg M, Jassoy C. High inter-individual diversity of point mutations, insertions, and deletions in human influenza virus nucleoprotein-specific memory B cells. *PLoS One* 2015; 10(6): e0128684.
- 10 Metcalf D. The colony-stimulating factors and cancer. *Nat Rev Cancer* 2010; 10(6): 425-34.
- 11 Ulich TR, del Castillo J, McNiece I, Watson L, Yin SM, Andresen J. Hematologic effects of recombinant murine granulocyte-macrophage colony-stimulating factor on the peripheral blood and bone marrow. *Am J Pathol* 1990; 137(2): 369-76.
- 12 Glanville J, Zhai W, Berka J, Telman D, Huerta G, Mehta GR, *et al.* Precise determination of the diversity of a combinatorial antibody library gives insight into the human immunoglobulin repertoire. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009; 106(48): 20216-21.
- 13 Boyd SD, Gaëta BA, Jackson KJ, Fire AZ, Marshall EL, Merker JD, *et al.* Individual variation in the germline Ig gene repertoire inferred from variable region gene rearrangements. *Immunol* 2010; 184(12): 6986-92.
- 14 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. *中华临床医师杂志(电子版)*[Zhang Tian, Sun Suhong. High-throughput sequencing detection T&B lymphocyte CDR3 receptor library in clinical application. *Chin J Clinicians (Electronic Edition)*] 2014; 9(8): 1739-42.
- 15 Shi B, Ma L, He X, Wang X, Wang P, Zhou L, *et al.* Comparative analysis of human and mouse immunoglobulin variable heavy regions from IMGT/LIGM-DB with IMGT/HighV-QUEST. *Theor Biol Med Model* 2014; 11: 30.