

·论著·

新生儿有限的免疫球蛋白重链可变区基因多样性

肖昕,周晓光,熊爱华

[摘要] 目的 比较正常新生儿和健康成人免疫球蛋白重链可变区(IgH)基因的可变区基因片段(V_H)、多样化基因片段(D)和连接区基因片段(J_H)的使用, V_H 上的突变,N区-D基因片段-N区(NDN)长度以及开放性阅读框(ORF)等情况,探讨新生儿IgH重排基因特征及其多样性。方法 10例正常足月新生儿脐血和8例健康成人外周血DNA被抽提,IgH基因被扩增、克隆和测序。结果 ①对于 V_H 和D的使用,新生儿和成人相似,即 V_{H3} 使用率最高, V_{H7} 使用率最低,D2被优先使用;而对于 J_H 的使用,新生儿和成人不同,即新生儿偏倚使用 J_{H3} ,成人使用 J_H 则趋向随机化。②新生儿和成人IgH重排基因的 V_H -D- J_H 连接点处均有N区插入,但新生儿的NDN长度[(21.2 $\pm$ 5.7) bp]短于成人[(26.6 $\pm$ 6.5) bp]。③新生儿的IgH基因序列无碱基缺失而成人存在;新生儿IgH基因少有体突变(29.2%),而77.1%的成人IgH基因存在体突变。④新生儿有ORF的IgH基因序列为91.7%,而成人100%。结论 正常新生儿和健康成人的IgH重排基因序列存在着异型性。新生儿的IgH重排基因已处于活化状态,但由于 V_H ,D和 J_H 的偏倚使用,NDN短以及少有突变,其多样性有限。

[关键词] 新生儿;免疫球蛋白;重链可变区基因

[中图分类号] R329.2⁺3 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1008-8830(2000)03-0129-03

Limited Diversity of the Immunoglobulin Heavy Chain Variable Region Gene in Neonates

XIAO Xin, ZHOU Xiao Guang, XIONG Ai Hua

Perinatal Medical Center, First Affiliated Hospital of the Medical College of Jinan University, Guangzhou 510632

[Abstract] **Objective** To compare the features and diversity of the immunoglobulin heavy chain variable region (IgH) gene in neonates and adults. **Methods** DNA was extracted from the cord blood of 10 full-term neonates and from the peripheral blood of 8 adults. The IgH gene was amplified using the nested PCR technique, and then cloned and sequenced. **Results** The usage of variable (V_H) and diversity (D) segments in neonates was similar to that in adults: V_{H3} and D2 usage were preferred, while V_{H7} was incidentally used. With respect to the usage of joining segments (J_H), there was a bias towards J_{H3} in neonates, while there was a tendency to randomize in adults. N region inserts at the V_H -D- J_H point of rearranged IgH existed in both neonates and adults. The N region-D gene-N region (NDN) length in neonates was (21.2 $\pm$ 5.7) base pairs (bp), which was shorter than that in adults [(26.6 $\pm$ 6.5) bp]. There was no base loss in the neonatal IgH gene, whereas there was some loss in adults. Neonates had a much lower somatic mutation rate (29.2%) than adults (77.1%). Open reading frames (ORF) occurred in the rearranged IgH gene of neonates and adults at the ratio of 91.7% and 100%, respectively. **Conclusions** Differences in IgH gene rearrangement exist between neonates and adults. Rearranged IgH of neonates is in an activated condition, but its diversity is limited secondary to preferential selection of V_H , D and J_H segments, short NDN and decreased somatic mutation rate.

[Key words] Neonate; Immunoglobulin; Heavy chain variable gene

体液免疫反应中,抗原抗体的结合有赖于分子 间的结构互补性,免疫球蛋白重链可变区

[基金项目] 本课题受国家自然科学基金(39800175)和广东省自然科学基金(980713)资助

[作者简介] 肖昕,男,1963年出生,医学博士,副教授,副主任医师,硕士生导师,儿科教研室副主任。

[作者单位] 510632 广州,暨南大学医学院附属第一医院围产医学中心(肖昕); 510010 广州,广东省妇幼保健院新生儿科(周晓光); 510632 广州,暨南大学医学院药理教研室(熊爱华)

(Immunoglobulin heavy chain variable region, IgH) 是抗原特异性结合部位,其氨基酸组成和序列的多样化使得抗体分子能适应千差万别的抗原分子^[1]。IgH 基因重排多样性是 IgH 多样化的基础,它通过可变区基因片段(V_H) - 多样化基因片段(D) - 连接区基因片段(J_H) 的连接多样性和不精确性、非胚系基因编码碱基序列(N 区)的插入以及 V_H 的体突变等达到^[1~3]。

本研究系统地分析正常足月新生儿的 IgH 重排基因序列中的 V_H 和 J_H 的使用、V_H 的体突变率、N 区 - D 基因片段 - N 区(NDN) 长度和开放性阅读框(Open reading frame, ORF) 等情况,并与健康成人的 IgH 重排基因序列进行比较,探讨新生儿 IgH 重排基因特征及其多样性。

1 对象与方法

1.1 对象

10 例胎龄为 37~41 周、已排除宫内细菌和/或病毒感染的新生儿(母亲在整个妊娠期也无细菌或病毒感染史)和 8 名健康成人志愿者(22~35 周岁) 被选为研究对象。

1.2 方法

分别留取新生儿脐血和成人外周血 0.2 ml,肝素抗凝。应用微量血 DNA 抽提试剂盒(QI-Aamp™,德国 QIAGEN 公司)抽提 DNA。使用 PTC-100 型 PCR 仪(美国 MJ RESEARCH INS 公司)对 IgH 基因进行两次扩增(套式 PCR),第一、二套引物的碱基顺序分别为:5' CAGGTACAGCTGCA GCA GTCA G 3' 和 5' TGA GGA GACGGT-GACC 3', 5' TGGA TCCGCCA GGCTCTCNGG 3' 和 5' GTGACCA GGGTNCCTTGCCCCAG 3'。扩增次数和条件为:在 5 个循环的变性 94℃3 min,退火 56℃3 min 和延伸 72℃2 min 后,紧接着 35 个循环的变性 94℃20 s、退火 45℃30 s 和延伸 72℃2 min。5%聚乙酰胺凝胶电泳分离 DNA 扩增物(多克隆性),其长度分别是 280~300 bp 和 240~260 bp。使用 LigA Tor plus Ligase 试剂盒(德国 R&D Systems 公司产品,内有作为载体的 pUAg 质粒、大肠杆菌感受态细胞和连接酶)进行克隆筛选。使用 ABI377 型 DNA 序列自动分析仪(美国 PERKIN ELMER 公司)测定 DNA 序列。所获得的所有 IgH 序列先与基因库中的胚系基因序列进行比较,以确定 V_H,D 和 J_H 的使用、N 区插入、NDN 长度、体突

变以及 ORF 等情况,然后将新生儿与成人的 IgH 重排基因进一步对比分析(结果用统计软件 SPSS for Windows 程序处理, *t* 检验或 χ^2 检验测试差异显著性),以确定新生儿 IgH 基因特征及其多样性。

2 结果

对 10 例新生儿的 60 个克隆和 8 名成人的 48 个克隆的 IgH 基因序列的 V_H,D 和 J_H 使用、N 区插入、NDN 长度、碱基缺失、V_H 上的体突变以及 ORF 等的分析和比较结果如下:

2.1 V_H 的使用

表 1 所见,在新生儿和成人,全部 7 个 V_H 家族均被使用,其中 V_H3 使用率最高,其次是 V_H5 和 V_H1(新生儿)/V_H2(成人),V_H7 使用率最低;对 V_H1 和 V_H2 的使用率,新生儿分别高于和低于成人,其余 V_H 的使用率,两者间无明显差异。

表 1 正常新生儿和健康成人 V _H 基因片段的使用率(%)							
Table 1. The usage percentage of V _H in neonates and adults (%)							
	V _H 1	V _H 2	V _H 3	V _H 4	V _H 5	V _H 6	V _H 7
新生儿	20.8	11.7	30.8	6.7	21.7	5.0	3.3
成人	10.4	20.8	32.3	6.3	24.0	4.2	2.1
χ^2	6.78	4.12	1.01	0.47	0.88	0.75	0.53
<i>P</i>	<0.01	<0.05	>0.05	>0.05	>0.05	>0.05	>0.05

2.2 J_H 的使用

从表 2 可见,在新生儿,J_H3 的使用率最高,其次是 J_H4,J_H6 和 J_H5,J_H2 偶被使用,J_H1 未被使用。在成人,J_H3,J_H4,J_H5 和 J_H6 的使用率相似,J_H1 和 J_H2 偶被使用;新生儿的 J_H3 使用率高于成人,其余 J_H 的使用率与成人无明显差异。

表 2 正常新生儿和健康成人 J _H 基因片段的使用率(%)						
Table 2. The usage percentage of J _H in neonates and adults (%)						
	J _H 1	J _H 2	J _H 3	J _H 4	J _H 5	J _H 6
新生儿	0	1.7	34.2	21.7	20.8	21.7
成人	2.1	4.2	24.0	25.0	18.8	26.0
χ^2	1.56	2.74	7.57	1.18	0.84	1.73
<i>P</i>	>0.05	>0.05	<0.01	>0.05	>0.05	>0.05

2.3 D 的使用, N 区的插入, NDN 长度及碱基缺失

在新生儿和成人,均优先使用 D2,使用率分别为47.9%和43.5%,差异无显著意义($\chi^2 = 0.98$, $P > 0.05$);在 $V_H - D - J_H$ 连接点处,均有数量不等(1~15个)的碱基插入(N区);新生儿和成人的 NDN 长度分别为 21.2 ± 5.7 bp 和 26.6 ± 6.5 bp,差异具有显著意义($t = 8.23$, $P < 0.01$)。新生儿的 IgH 重排基因中无碱基缺失,而在成人,6.3%的克隆有碱基缺失(3~12个)发生。

2.4 V_H 上的体突变

在新生儿,29.2%的 IgH 重排基因序列存在体突变,突变形式为 $A \rightarrow G$, $C \rightarrow G$, $T \rightarrow C$, $G \rightarrow T$ 或 $C \rightarrow T$ 的置换突变;而在成人,77.1%的序列有体突变,突变形式为 $C \rightarrow G$, $G \rightarrow T$, $C \rightarrow G$, $C \rightarrow T$ 或 $T \rightarrow C$ 的置换突变。

2.5 开放性阅读框(ORF)

91.7%的新生儿 IgH 重排基因阅读框处于开放状态;而 100%的成人 IgH 重排基因有 ORF,二者差异具有显著意义($\chi^2 = 6.65$, $P < 0.01$)。

3 讨论

编码人类 IgH 的胚系基因含有约 200 个 V_H (根据其同源性分为 7 个 V_H 基因家族), 20 个 D 和 6 个 J_H , 在 B 淋巴细胞发育和成熟过程中, V_H , D 和 J_H 被随机选择去形成 $D - J_H$ 和 $V_H - D - J_H$ 连接, 组成完整并具有功能的 IgH 重排基因^[1]。IgH 重排基因多样性决定其编码产物 - IgH 的第三互补决定区(CDR3)的氨基酸组成和序列多样化, 后者是决定 Ig 特异性和亲和力的基础^[1]。迄今为止, 仅国外有少数关于人类胎儿、新生儿和成人 IgH 重排基因片段特征的研究报告: Cuisinier 等发现人类胎儿优先使用接近 D 基因片段的 V_{H5} 和 V_{H6} ^[4], Choi 等的研究提示人类新生儿优先使用远离 D 基因片段的 V_{H3} ^[5]; 而成人 V_H 基因片段的使用是随机的, 既有 N 区的插入也有碱基的缺失, 既有抗原非依赖的内在性体突变也有抗原依赖的外在性体突变, 因而具有明显多样性^[5,6]。

本研究将人类正常足月新生儿与健康成人的 IgH 重排基因序列进行了详细地分析和比较, 得出与以往有所不同的结果: 在新生儿和成人的 IgH 重排基因中, 大部分 V_H 的使用率是相似的, 仅在 V_{H1} 和 V_{H2} 的使用上存在着差别; 尽管全部 V_H 家族均有使用, 但仍以 V_{H3} 和 V_{H5} 的使用频率较高。根据

这些发现, 我们认为: 对于 V_H 的使用, 人类新生儿并不完全偏倚而成人也不完全随机。在 J_H 的使用、N 区插入、NDN 长度和碱基缺失方面, 新生儿与成人之间存在着异型性: 在新生儿, J_H 的使用呈明显偏倚现象, 即 J_{H3} 被优先使用, J_{H2} 偶被使用, J_{H1} 未被选择; 而在成人, J_{H3} , J_{H4} , J_{H5} 和 J_{H6} 使用率相似, J_{H1} 和 J_{H2} 也被选择, 表明成人对 J_H 使用已趋于随机化。与成人比较, 新生儿 IgH 重排基因上 N 区插入的数量少、NDN 短, 又无碱基缺失, 故其基因多样性有限。本研究另两个重要发现是: ①新生儿的部(29.2%) IgH 重排基因序列上也可出现少量点突变, 由于新生儿均已排除了宫内病毒或细菌感染(其母在整个孕期也无感染史), 提示这些突变与在成人 IgH 重排基因上发生的抗原依赖性外在性体突变完全不同, 属于抗原非依赖性内在性体突变。②新生儿大部分 IgH 重排基因的阅读框处于开放状态, 表明人类的早期生长发育阶段, IgH 基因已处于活化状态, 具有编码 IgH 的功能。

总之, 由于新生儿的 IgH 重排基因多样性有限, 故编码出来的 IgH (尤其 CDR3) 多样性有限, 使得抗体的特异性和亲和力较低; 一部分新生儿 IgH 重排基因阅读框仍处于未开放状态, 使得抗体形成也较少, 以至于新生儿比成人更易发生感染^[7]。

参 考 文 献

- [1] Tonegawa S. Somatic generation of antibody diversity [J]. Nature, 1983; 302(5909): 575 - 581.
- [2] Kepler TB, Borrero M, Rugerio B, et al. Interdependence of N nucleotide addition and recombination site choice in V(D)J rearrangement [J]. J Immunol, 1996; 157(10): 4451 - 4457.
- [3] Neuberger MS, Milstein C. Somatic hypermutation [J]. Curr Opin Immunol, 1995, 7(2): 248 - 254.
- [4] Cuisinier AM, Guigou V, Boubli L, et al. Preferential expression of V_{H5} and V_{H6} immunoglobulin genes in early human B - cell ontogeny [J]. Scand J Immunol, 1989, 30(4): 493 - 497.
- [5] Choi Y, Rickert MH, Ballow M, et al. Human IgH - V gene repertoire in neonatal cord blood, adult peripheral blood, and EBV - transformed cells [J]. Ann N Y Acad Sci, 1995, 764: 261 - 264.
- [6] Stollar BD. The expressed heavy chain V gene repertoire of circulating B cells in normal adults [J]. Ann N Y Acad Sci, 1995; 764(4): 265 - 274.
- [7] Bhat NM, Bieber MM, Teng NN. Heavy chain variable gene usage by human B - 1 lymphocytes and polyreactive autoantibodies [J]. Hum Antibodies, 1997; 8(3): 146 - 150.

(收稿日期: 1999 - 10 - 23 修回日期: 2000 - 01 - 06)

(本文编辑: 吉耕中)