

• 综 述 •

抗体多样性的研究进展

何涛君 综述, 陆学东 审校

(深圳市福田区人民医院检验科, 广东深圳 518033)

关键词: 抗体多样性; 基因重排; 突变; 核苷酸插入**DOI:** 10.3969/j.issn.1673-4130.2014.09.025**文献标识码:** A**文章编号:** 1673-4130(2014)09-1147-03

关于抗体多样性的遗传起因, 科学家曾经提出了 2 种解释理论: 一是生殖系理论, 认为所有抗体都由专一基因负责, 该理论的问题在于, 面对如此众多的抗体, 生物体内的基因数目无法满足需求; 二是体细胞突变理论, 认为抗体基因可以发生突变和重组, 该理论能够解释较少的基因即可产生大量微小差异的抗体。目前这 2 个理论都缺乏相关的实验支持。

日本学者利根川进利用限制酶酶切和重组 DNA 解决了这个难题, 他们首先纯化抗体的 mRNA, 然后将其与 DNA 杂交, 并计算产生抗体的基因数目, 结果表明基因数目远远少于抗体数目, 因此, 否定了生殖系理论^[1]。1976 年, 利根川进将胚胎细胞(不产生抗体)和骨髓瘤细胞(产生抗体)中抗体轻链基因的分布情况进行了比较, 发现在胚胎期不同抗体基因的距离较远, 而在骨髓瘤细胞中这些基因距离靠近, 这个设计精密且令人信服, 的实验说明生殖细胞在发育成 B 淋巴细胞的过程中, 抗体基因出现了重分布现象^[2]。他们在此基础上对抗体基因的重分布现象及机制进行了全面研究。在随后 5 年中用一系列证据确定了体细胞突变理论的正确性^[3-5], 即抗体多样性是由于 B 淋巴细胞中抗体基因片段的染色体重组和突变所造成^[6]。1987 年, 利根川进由于“抗体多样性产生遗传机制的发现”而独享了该年度的诺贝尔生理学及医学奖。

随着分子生物学新技术和新方法的不断涌现和应用, 分子免疫学基本理论取得了重大的突破, 后基因组时代将继续完成对免疫相关分子的认识。在研究抗体多样性的产生机制方面, 许多科学家都做出了相应的贡献: 1965 年 Bennet 首先提出“2 个基因编码一条多肽链”假说, 认为免疫球蛋白的 V 区和 C 区是由分隔存在的基因所编码, 在淋巴细胞发育过程中, 这 2 个基因发生易位而重排在一起。1976 年利根川进应用 DNA 重组技术证实了这一假说, 发现编码一条免疫球蛋白多肽链的基因是由各个分隔开的 DNA 片段经剪接重排而形成。还有另外 2 位科学家哈佛大学的里德(Philip Leder)和加州理工学院的胡德(Leroy Hood)也在该领域做出了卓越贡献, 与利根川进一起因在抗体多样性机制阐释中的贡献而分享 1987 年拉斯克基础医学奖^[7]。目前, 世界各国的科学家在前辈的研究基础上, 继续完善对抗体多样性机制的探讨, 并做出了一系列重大的贡献。

1 抗体多样性的定义及产生机制

由于胚系 V-D-J 基因片段重排, V-D-J 连接多样性, 体细胞高频突变, N 区插入以及 L、H 链相互随机配对等机制, 体内可产生数目众多且具有不同特异性的抗体, 这被称为抗体多样性。从抗体多样性的定义中, 可以把抗体多样性的产生机制大致归纳为以下 5 个方面: (1) 编码免疫球蛋白基因的多样性——原始因素; (2) 随机重排产生的多样性——主要因素;

(3) H、L 链的随机组合; (4) 核苷酸插入; (5) 体细胞的高频突变。

1.1 编码抗体基因的多样性——原始因素

1.1.1 克隆选择学说对抗体产生多样性的解释 动物出生后, 体内约有 10^7 个免疫细胞克隆, 能产生各种抗体, 足够抗原选择。抗原与特异性淋巴细胞的抗原受体结合, 相应的克隆即被选择, 进而增殖分化产生抗体。面对自然界中无穷多的抗原, 机体必须产生大量相应的特异性抗体以应对, 但怎样才能使机体内为数不多的基因产生如此多的抗体呢?

1.1.2 对编码抗体基因多样性的研究 Lim 等^[8]在对促红细胞生成素受体的信号通路可诱导抗体表位的多样性变化的研究中, 指出促红细胞生成素受体是促红细胞生成素的天然配体, 两者结合可以刺激红细胞的增殖分化。Fait 等^[9]在对肯尼亚地区恶性疟原虫顶端膜抗原 1(apical membrane antigen-1, AMA-1)感染时等位基因的多样性和等位基因相应的天然、获得性特异性抗体的免疫应答反应中, 提到 AMA-1 可作为疟疾疫苗的候选基因, 因其广泛的等位基因的多样性确保了作为疫苗的潜能。人们发现 AMA-1 等位基因的 3 种抗原成分: AMA-1-3D7、AMA-1-FVO、AMA-1-HB3, 采用酶联免疫吸附测定(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)法检测等位基因对应的特异性抗体。以 AMA-1 作为疫苗接种产生的天然、获得性特异性抗体能保护肯尼亚人免受疟疾的感染。Hommel 等^[10]通过对孕妇感染恶性疟原虫变异体的抗原和抗体多样性研究, 指出 VAR2CSA 为主要的抗原表位, 抗体表位编码的可变区在 DBL3 结构域。分析全球的 VAR2CSA 和 DBL3 序列特点, 将有助于设计新型疫苗。

Lantto 等^[11]在人类抗体对天花相关的牛痘病毒(vaccinia virus, VACV)疫苗的天然多样性的研究中, 得到大量特异性抗体—VACV 免疫丙种球蛋白(VACV immune gamma globulin, VIG), VIG 可特异性识别和结合 VACV, 并具有潜在中和 VACV 的活性, 具有高度的保护性效能能在 VACV 感染的小鼠模型中得到了证实。Lisowska 等^[12]在对人类血清的研究中指出, 在移植排斥反应中, 抗 α 1-3 半乳糖抗体在异种移植排斥反应中构成主要障碍, 发挥了抵御微生物感染和治疗的生物学作用。

1.2 随机重排产生的多样性——主要因素

1.2.1 免疫球蛋白基因重排 免疫球蛋白胚系基因中, V、(D)、J 基因片段之间由内含子隔开, 通过基因片段的随机重排, 形成 V(D)J 连接, 再与 C 基因片段连接, 编码完整的免疫球蛋白多肽链。免疫球蛋白基因重排主要通过重组酶的作用实现。免疫球蛋白胚系基因重排程序首先是重链发生基因重排, 随后轻链重排。重链: 胚系基因 → D-J 连接 → V-DJ 连接;

轻链;胚系基因→V-J 连接。Prabakaran 等^[13]在分析人类脐带血细胞的抗体谱中,采用 2 种测序方法分析了 2 个婴儿脐带血的抗体库,明确了其 V-D-J 重排、重链互补性决定区(complementarity determining region, CDR)3 多样性和体细胞突变。通过对人类脐带血的抗体谱的研究,发现抗体谱具有基因和重链可变区 CDR3 的多样性,类似于成人免疫球蛋白系统,但 V-D-J 重组、交叉的多样性与其体细胞突变有明显的不同。

1.2.2 类别转换 类别转换指 B 淋巴细胞在受抗原刺激后,首先合成 IgM,然后转为合成 IgG、IgA 和 IgE 等的现象。由于免疫球蛋白的类型由重链决定,所以在重链重排时,在 V 区基因不变的情况下,C 基因发生重排,使最终基因产物的 V 区相同,而 C 区不同,即抗体识别的特异性相同,但免疫球蛋白分子的类型却发生了改变。Hancock 等^[14]在哮喘患者对呼吸道合胞病毒(respiratory syncytial virus, RSV)附属糖蛋白的获得性免疫应答研究中,严重哮喘患者体内可检测到抗糖蛋白 IgG1 和 IgG2,以及干扰素 γ (interferon γ , IFN- γ)和白细胞介素-10(interleukin-10, IL-10)的出现。Harker 等^[15]研究了一种理想的 RSV 疫苗,能够有效保护新生儿,在婴、幼儿体内通常以辅助性 T 淋巴细胞 2(helper T lymphocyte 2, Th2)为基础的免疫应答,并可诱导 IFN- γ 的产生。

1.3 H、L 链的随机组合 编码一条免疫球蛋白重链、轻链的基因是由胚系中多个分开的 DNA 片段经剪切重排而成。重链 V 区的基因由 V、D、J 3 个基因片段组成,轻链 V 区基因由 V、J 2 个基因片段组成。Chen 等^[16]对人类抗体库结构域中重、轻链 CDR3 多样性进行了研究,同源转换人类抗体之间重链的 CDR2、CDR3 至人重链可变区 V 区相应的位置可诱导 CDR1 的改变。从抗体库中可选择一些高亲和性、结合某些抗原的抗体,但因其有限的多样性而不能结合其他抗原。他们还设计了新的抗体库,包含非同源 CDR 的转移,用轻链的 CDR3 取代重链的 CDR1,在一个抗体的 V 区结合多样片段,如轻链 CDR3-重链 CDR3-重链 CDR2 结构,这样抗体库的多样性将增加 10^{10} 倍以上。新型抗体库不仅作为抗体库结构域存在的补充成分,还可作为探索人类抗体结构域的折叠和稳定机制的研究工具。

1.4 核苷酸插入、碱基的突变

1.4.1 核苷酸插入 Mahmoud 等^[17]对限制重链 CDR3 的多样性及抗体对细菌聚合多糖类 $\alpha_1 \rightarrow \alpha_3$ 葡聚糖的免疫应答进行了研究,通过聚合酶链反应(polymerase chain reaction, PCR)扩增技术对葡聚糖特异性重链 V 区的 DNA 扩增,然后对重链 CDR3 进行测序分析,揭示了在 V-D 连接部位存在天门冬氨酸残基。重链的 CDR 具有抗葡聚糖的作用,其抗葡聚糖的应答更多依赖于出生后 N 核苷酸的插入,免疫应答的效果更强。González-Muñoz 等^[18]在氨基酸剪切的多样性造成了抗体亲和力进化的多样性研究中提到抗体是一类特殊的蛋白质,能够适应为数众多的抗原的结合位点的高亲和力、高特异性。抗体的序列、结构以及抗体与抗原的相互关系是由氨基酸发挥主导作用,但不能区分氨基酸主要在原发性,还是继发性免疫应答中发挥作用。

1.4.2 碱基的突变 分析并扫描单链 DNA 的过程中,活化诱导胞嘧啶核苷脱氨酶(activation-induced cytidine deaminase, AID)偶然脱去氨基使胞嘧啶变成了尿嘧啶,保证了突变的多样性。虽然没有合适的 DNA 修复酶,但这将有助于更好地了解 AID 介导的抗体多样性的产生。Nagaoka 等^[19]也认为基因组调节的不稳定与抗体的多样性紧密相关。

1.5 体细胞的高频突变 体细胞的高频突变和有效重组是 B 淋巴细胞导致的抗体多样性的识别机制。这 2 种机制都与 AID 酶有关,这种酶结合到单链 DNA 上,在转录过程中激活免疫球蛋白相关基因,并催化胞嘧啶核苷转变为尿嘧啶核苷。Pavri 等^[20]在对 AID 介导的抗体多样性的研究中发现,抗体的成熟需要经过种类转换重组和体细胞的高频突变,这 2 种方式都是通过 AID 介导的。虽然种类转换重组和体细胞的高频突变的形成机制不同,前者是一种删除重组的反应,后者是一种无模板的核苷酸替代,但是两者都受相同的酶(即 AID)调节。通过 AID 介导的脱氨基作用可以使单链 DNA 的胞嘧啶核苷变成尿嘧啶核苷,突变通常发生于 U、G 的错配或是尿嘧啶 DNA 的糖基化修饰损伤。错配修饰因子 MSH2 及误差倾向性多聚酶也将发挥作用。

1.6 抗体多样性的其他机制 Pollard 等^[21]在抗体多样性的研究中,提到采用特殊免疫佐剂可刺激天然免疫应答,增加抗体对免疫应答的宽度。通过疫苗的诱导作用可帮助增强抗体控制抗原的变异,避免变异的抗原进入机体的免疫系统。Russell 等^[22]在流感病毒多样性导致抗体多样性研究中,指出人类免疫系统与流感病毒的斗争可定义为多样性,这是因为重复暴露到多样性流感病毒的血凝素(hemagglutinin, HA)抗原,其变异非常迅速,只有接种不同的疫苗亚型才能保护人类免除季节性和区域性的流感大流行。

Lee 等^[23]在模拟和预测流感病毒 A 感染后的获得性免疫应答中,为了量化病毒复制与获得性免疫的相互关系开发了一种二室模型。这种保真性模型证实了 $CD4^+$ Th 的辅助作用、抗体的持续和随后的免疫消耗性实验, $CD8^+$ T 淋巴细胞分泌的细胞因子能有效清除病毒并辅助中和抗体发挥作用。

Verma 等^[24]比较流感病毒 H1N1 在青年人和老年人之间的感染,证实了老年人体内比青年人和儿童针对 HA1 结构域的多样性和高亲和性的抗体,2009 年 H1N1 流感病毒流行时有几个意料之外的特性,值得一提的是老年人群的低发病率和低病死率。这些发现表明了长期记忆的 B 细胞或浆细胞的迅速激活产生回顾性免疫应答,将有助于解释与年龄相关的 H1N1 流感病毒的发病率和病死率的模式。

2 展 望

抗体库的库容量及多样性是衡量抗体库质量的重要技术指标。理论上,抗体库容量越大,多样性越好,筛选到针对任意抗原表位抗体的概率也就越大,亲和力也可能越高。天然抗体库是由体内重排的抗体基因构成,其产生的克隆均为有效克隆,即 100% 具有活性^[25]。对于天然抗体库而言,广泛的基因来源不仅有助于消除不同个体之间的差异,更重要的是可以增加基因来源的多样性。同时,在建库过程中,将轻、重链基因分别插入载体的相应位置,有助于增加轻、重链基因组合的多样性,对提高抗体库质量意义重大。

邵红霞等^[26]对天然人源 IgG Fab 噬菌体抗体库的构建及多样性分析的研究中,将 300 名健康志愿者的外周血淋巴细胞作为抗体库基因的来源,有利于增加抗体库基因来源的多样性,为构建高质量的抗体库奠定了基础。构建的天然人源 IgG Fab 噬菌体抗体库基因多样性良好,重链 VH3 基因家族存在优势表达。轻、重链基因的不同组合进一步增加了抗体的多样性。利用抗体库技术还可以对抗体轻、重链可变区,特别是 6 个互补决定区进行定向突变,以获得具有更好特异性和更强亲和力的抗体,进一步增加了抗体库的多样性,从而完善和补充现有的抗体库。

参考文献

- [1] Hozumi N, Tonegawa S. Evidence for somatic rearrangement of immunoglobulin genes coding for variable and constant regions [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1976, 73(10):3628-3632.
- [2] Tonegawa S. That great time in Basel [J]. *Cell*, 2004, 116(2 Suppl):S99-101.
- [3] Brack C, Hiram M, Lenhard-Schuller R, et al. A complete immunoglobulin gene is created by somatic recombination [J]. *Cell*, 1978, 15(1):1-14.
- [4] Bernard O, Hozumi N, Tonegawa S. Sequences of mouse immunoglobulin light chain genes before and after somatic changes [J]. *Cell*, 1978, 15(4):1133-1144.
- [5] Lenhard-Schuller R, Hohn B, Brack C, et al. DNA clones containing mouse immunoglobulin kappa chain genes isolated by in vitro packaging into phage lambda coats [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1978, 75(10):4709-4713.
- [6] Tonegawa S. Somatic generation of antibody diversity [J]. *Nature*, 1983, 302(5909):575-581.
- [7] 郭晓强. 自动测序仪的发明者——记科学家胡德 [J]. *生物学通报*, 2005, 40(6):58-59.
- [8] Lim AC, Ketchum RR, Borges L, et al. A diversity of antibody epitopes can induce signaling through the erythropoietin receptor [J]. *Biochemistry*, 2010, 49(18):3797-3804.
- [9] Faith HO, Weedall GD, Verra F, et al. Plasmodium falciparum apical membrane allele-specific antibody responses to Infect [J]. *Immunol*, 2010, 78(11):4620-4625.
- [10] Hommel M, Elliott SR, Soma V, et al. Evaluation of the antigenic diversity of placenta-binding Plasmodium falciparum variants and the antibody repertoire among pregnant women [J]. *Infect Immun*, 2010, 78(5):1963-1978.
- [11] Lantto J, Haahr Hansen M, Rasmussen SK, et al. Capturing the natural diversity of the human antibody response against vaccinia virus [J]. *J Virol*, 2011, 85(4):1820-1833.
- [12] Lisowska E, Duk M. Diversity of natural anti- α -galactosyl antibodies in human serum [J]. *Adv Exp Med Biol*, 2011, 705:571-583.
- [13] Prabakaran P, Chen W, Singarayan MG, et al. Expressed antibody repertoires in human cord blood cells; 454 sequencing and IMGT/HighV-QUEST analysis of germline gene usage, junctional diversity, and somatic mutations [J]. *Immunogenetics*, 2012, 64(5):337-350.
- [14] Hancock GE, Scheuer CA, Sierzeza R, et al. Adaptive immune re-

- sponses of patients with asthma to the attachment (G) glycoprotein of respiratory syncytial virus [J]. *J Infect Dis*, 2001, 184(12):1589-1593.
- [15] Harker JA, Lee DC, Yamaguchi Y, et al. Delivery of cytokines by recombinant virus in early Life alters the immune response to adult lung infection [J]. *J Virol*, 2010, 84(10):5294-5302.
- [16] Chen WZ, Zhu ZY, Feng Y, et al. A large human domain antibody library combining heavy and light chain CDR3 diversity [J]. *Mol Immunol*, 2010, 47(4):912-921.
- [17] Mahmoud TI, Schroeder HW Jr, Kearney JF. Limiting CDR-H3 diversity abrogates the antibody response to the bacterial polysaccharide α 1 \rightarrow 3 dextran [J]. *J Immunol*, 2011, 187(2):879-886.
- [18] González-Muñoz A, Bokma E, O'shea D, et al. Tailored amino acid diversity for the evolution of antibody affinity [J]. *MAbs*, 2013, 4(6):664-672.
- [19] Nagaoka H, Tran TH, Kobayashi M, et al. Preventing AID, a physiological mutator, from deleterious activation: regulation of the genomic instability that is associated with antibody diversity [J]. *Int Immunol*, 2010, 22(4):227-235.
- [20] Pavri R, Nussenzweig MC. AID targeting in antibody diversity [J]. *Adv Immunol*, 2011, 110:1-26.
- [21] Pollard AJ, Hill AV. Antibody repertoire: embracing diversity [J]. *Sci Transl Med*, 2011, 3(93):89-93.
- [22] Russell CJ. Stalking influenza diversity with a Universal antibody [J]. *N Engl J Med*, 2011, 365(16):1541-1542.
- [23] Lee HY, Topham DJ, Park SY, et al. Simulation and prediction of the adaptive immune response to influenza A virus infection [J]. *J Virol*, 2009, 83(14):7151-7165.
- [24] Verma N, Dimitrova M, Carter DM, et al. Influenza virus H1N1pdm09 infections in the young and old; evidence of greater antibody diversity and affinity for the hemagglutinin globular head domain (HA1 Domain) in the elderly than in young adults and children [J]. *J Virol*, 2012, 86(10):5515-5522.
- [25] Gorny MK, Wang XH, Williams C, et al. Preferential use of the VH5-51 gene segment by the human immune response to code for antibodies against the V3 domain of HIV-1 [J]. *Mol Immunol*, 2009, 46(5):917-926.
- [26] 邵红霞, 章黎, 杨彬, 等. 天然人源 IgG Fab 噬菌体抗体库的构建及多样性分析 [J]. *中国免疫学杂志*, 2010, 26(11):1007-1010, 1015.

(收稿日期:2013-12-26)

• 综 述 •

不同血糖指标诊断糖尿病的价值比较

马文彬 综述, 张云良[△] 审校

(保定市第一中心医院内分泌科, 河北保定 071000)

关键词: 糖尿病; 诊断; 果糖胺; 糖化清蛋白; 糖化血红蛋白

DOI: 10. 3969/j. issn. 1673-4130. 2014. 09. 026

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2014)09-1149-03

日益加快的城市化、营养过剩和缺乏运动所致的相对短时间内糖尿病的爆发性增长是一场针对全球公共卫生事业的危

机。如何有效预防和延缓其发生, 早期诊断和及时治疗是方法之一。目前国内沿用口服葡萄糖耐量试验(oral glucose toler-