

李哲,蔡方舟,李丹,等. LCMV-CL13 慢性感染小鼠模型的建立及其 BCR 突变分析 [J]. 中国实验动物学报, 2022, 30(2): 177-184.

Li Z, Cai FZ, Li D, et al. Establishment of chronic infection mouse model by LCMV-CL13 virus and analysis of BCR mutation [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2022, 30(2): 177-184.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2022.02.004

LCMV-CL13 慢性感染小鼠模型的建立及其 BCR 突变分析

李哲,蔡方舟,李丹,陈倩,苑一真,王卫*

(北京协和医学院比较医学中心,中国医学科学院医学实验动物研究所,新发再发传染病动物模型研究北京市重点实验室,卫健委人类疾病比较医学重点实验室,北京 100021)

【摘要】 目的 建立淋巴细胞性脉络丛脑膜炎病毒 LCMV-CL13 慢性感染小鼠模型,分析其作为 B 细胞受体高频突变研究模型的可能性。方法 C57BL/6N 小鼠经尾静脉途径接种 2×10^6 PFU 剂量 LCMV-CL13 病毒,感染后第 10、20、30、40、50、60、70 天采集样品,通过 qPCR 检测组织病毒载量,流式检测分析外周血 CD4⁺T、CD8⁺T、CD19⁺B 细胞及脾生发中心 B 细胞比例,免疫组库测序分析 BCR V 区基因丰度及突变率。结果 在 LCMV-CL13 病毒感染小鼠体内检测到 1×10^6 copies/ μ L 水平的病毒复制;在感染平台期,小鼠外周血 CD4⁺T 细胞比例逐渐升高 ($13.15\% \pm 0.72\%$),CD8⁺T 细胞先降低 ($2.17\% \pm 0.40\%$) 后逐渐恢复 ($6.65\% \pm 0.52\%$),CD19⁺B 细胞以及生发中心 B 细胞比例分别增加至 ($40.32\% \pm 0.46\%$) 和 ($10.03\% \pm 0.60\%$);测序结果证明 BCR 重链 V 基因使用频率下降,突变率显著性升高 ($P < 0.05$)。结论 成功建立 LCMV-CL13 慢性感染小鼠模型;此模型可用于 BCR 突变研究,为研究慢性病毒感染导致的 B 细胞高频突变奠定了基础。

【关键词】 淋巴细胞性脉络丛脑膜炎病毒;高频突变;生发中心 B 细胞;B 细胞受体

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847 (2022) 02-0177-08

Establishment of chronic infection mouse model by LCMV-CL13 virus and analysis of BCR mutation

LI Zhe, CAI Fangzhou, LI Dan, CHEN Qian, YUAN Yizhen, WANG Wei*

(Comparative Medicine Center, Peking Union Medical College (PUMC). Institute of Medical Laboratory Animal Science, Chinese Academy of Medical Sciences (CAMS). Beijing Key Laboratory for Animal Models of Emerging and Reemerging Infectious. NHC Key Laboratory of Human Disease Comparative Medicine, Beijing 100021, China)

Corresponding author: WANG Wei. E-mail: wangw@cnilas.org

【Abstract】 **Objective** To establish an LCMV-CL13 chronic infection mouse model and analyze its use for B cell somatic hypermutation research. **Methods** C57BL/6N mice were inoculated with 2×10^6 plaque-forming units of LCMV-CL13 virus via tail vein injection. The tissue viral load was then detected by quantitative polymerase chain reaction on days 10, 20, 30, 40, 50, 60, and 70 post-infection. The CD4⁺ and CD8⁺T cell and CD19⁺B cell ratios in peripheral blood and the germinal center B cell percentage of the spleen were determined by flow cytometry, and the gene abundance and BCR V region mutation rate were analyzed using immune repertoire technology. **Results** LCMV-CL13-infected mice maintained a tissue viral load of 1×10^6 copies/ μ L virus. The percentage of CD4⁺T cells in the peripheral blood gradually increased in the infection plateau phase to ($13.15\% \pm 0.72\%$), while the percentage of CD8⁺T cells first decreased to ($2.17\% \pm$

【基金项目】 国家自然科学基金面上项目 (81873963),医科院创新工程项目 (2021-I2M-1-035)。

Funded by the National Natural Science Foundation of China (81873963), Innovation Engineering Project of the Academy of Medical Sciences (2021-I2M-1-035)

【作者简介】 李哲 (1996—),女,在读硕士研究生,研究方向:比较医学专业。Email: lizhelxz@163.com

【通信作者】 王卫 (1981—),副研究员,硕士生导师,研究方向:病原生物学。Email: wangw@cnilas.org

0.40%) and then gradually recovered to (6.65% ± 0.52%), and the percentages of CD19⁺ B cells and germinal center B cells increased to (40.32% ± 0.46%) and (10.03% ± 0.60%), respectively. Sequencing result demonstrated that the frequency of V gene usage decreased and the mutation rate of the heavy chain CDR3 V gene increased 1.7-fold with increasing infection time. **Conclusions** We successfully established a LCMV-CL13 chronic infection mouse model. This model can be used to study BCR mutations, and provides a research tool for investigating B cell somatic hypermutation caused by chronic viral infection.

【Keywords】 lymphocytic choriomeningitis virus; somatic hypermutation; germinal center B cell; B cell receptor

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

人类免疫缺陷病毒 (human immunodeficiency virus, HIV)、甲型肝炎病毒 (hepatitis B virus, HBV)、丙型肝炎病毒 (hepatitis C virus, HCV) 等慢性病毒感染威胁全球人类健康,是全球公共安全的重要威胁^[1-2],亟待研发能有效抑制慢性病毒感染的策略。具有高频突变特点的广谱中和抗体 (broadly neutralizing antibodies, bNAbs) 被证明可抑制特定病毒的多种突变毒株^[3],成为控制慢性病毒感染的希望所在。体细胞高突变 (somatic hypermutation, SHM) 是指抗体可变区 (variable region, V) 基因发生高频率点突变^[4],增加抗体基因的遗传多样性和亲和力^[5],是 bNAbs 诱导的关键环节。因此,SHM 为抗体亲和力成熟和抗体多样性的产生提供了分子基础,也是优化抗体依赖性免疫反应的关键^[6]。

尽管进行了多年的深入研究,但影响抗体基因发生 SHM 以及 SHM 靶向机制尚不清楚,原因之一是缺乏可用于 SHM 研究的动物模型。建立可用于 SHM 研究的动物模型具有重要意义,淋巴细胞性脉络丛脑膜炎病毒克隆 13 (lymphocytic choriomeningitis virus clone 13, LCMV-CL13) 感染,作为全身性慢性病毒感染模型被广泛使用,并被用于研究驱动人类慢性病毒感染的机制^[7-8]。为了深入探究 SHM 发生机制,本文使用 LCMV-CL13 病毒尾静脉感染 C57BL/6N 小鼠,分析感染小鼠中出现持续的生发中心 (germinal center, GC) 反应,及 B 细胞受体 (B cell receptor, BCR) V 基因的突变情况,分析其作为 B 细胞受体高频突变研究模型的可能性,以期 SHM 实验研究提供借鉴,同时为抗体生成、进化机制研究奠定实验基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

80 只 SPF 级雌性 C57BL/6N 小鼠,周龄为 6 ~ 8 周,体重约 18 ~ 22 g,购自北京维通利华实验动物

技术有限公司【SCXK(京)2016-0006】。实验动物的饲养及实验操作在中国医学科学院医学实验动物研究所动物生物安全二级实验室 (ABSL-2) 【SYXK(京)2019-0039】进行。饲养及实验环境:室内温度 22 ~ 25℃,湿度 40% ~ 70%,12 h 光照/黑暗循环;动物在笼内自由摄食饮水。本实验过程遵循 3R 原则,已获得中国医学科学院医学实验动物研究所实验动物使用与管理委员会 (IACUC) 的批准 (WW21001)。

1.1.2 病毒株

淋巴细胞性脉络丛脑膜炎病毒克隆 13 株 (lymphocytic choriomeningitis virus clone 13, LCMV-CL13) 由第三军医大学叶丽林教授赠送,由本课题组扩增。扩增后的病毒液经 RNA 提取及 PCR 扩增后送由中美泰和公司测序鉴定为目的序列,噬斑法检测病毒滴度为 1.72×10^7 PFU/mL。

1.1.3 主要试剂与仪器

RPMI 1640 培养基 (Gibco; C22400500BT)、PBS (Gibco; C10010500BT)、GK1.5 抗体 (Bio X cell; BE0003-1-100)、抗凝剂 (索莱宝; G0280)、RNA 提取试剂盒 (RNeasy Mini Kit; 74104)、RNA 逆转录试剂盒 (Revert Aid First Strand cDNA Synthesis Kit; K1632)、实时荧光定量 PCR 试剂盒 (TB Green[®] Premix Ex Taq[™] II; RR820A)、总 RNA 提取试剂盒 (Mag MAX[™] mir Vana[™] Total RNA Isolation Kit; A27828)、BCR 建库试剂盒 (KC-Digital[™] Stranded BCR-seq Library Prep Kit for Illumina, DT0811-02, Seq Health)、红细胞裂解液 (BD FACS[™] Lysing Solution; 349202),流式抗体及染色方案见表 1。

高速冷冻型离心机 (SCIOLOGEX, 美国)、多用途冷却离心机 (HITACHI, 日本)、普通 PCR 仪 T100[™] Thermal Cycler (Bio-Rad, 美国)、实时荧光定量 PCR 仪 Quant Studio[™] 3 Real-Time PCR System (Applied Biosystems[™], 美国)、流式仪型号为 BD FACS Aria II (BD, 美国)。

表 1 抗体使用一览表

Table 1 List of used antibodies

组别 Panel	抗体 Antibody	克隆号 Clone	公司 Company
外周血流式 Peripheral blood flow	FITC anti-mouse CD45	30-F11	Biologend
	PerCP/Cyanine5.5 anti-mouse CD3	17A2	Biologend
	PE/Cyanine7 anti-mouse CD19	6D5	Biologend
	PE anti-mouse CD4	GK1.5	Biologend
	APC anti-mouse CD8a	53-6.7	Biologend
脾流式 Spleen flow	FITC anti-mouse/human CD45R/B220	RA3-6B2	Biologend
	PerCP/Cyanine5.5 anti-mouse CD19	6D5	Biologend
	PE anti-mouse/human GL7 Antigen	GL7	Biologend
	APC anti-mouse CD95 (Fas)	SA367H8	Biologend

1.2 方法

1.2.1 动物分组及感染

80 只 C57BL/6N 小鼠分成两组。其中 70 只为实验组,用于感染模型构建;10 只设立为对照组。实验组 C57BL/6N 小鼠感染前 1 d 腹腔注射 500 μg CD4 抗体,感染当天经尾静脉注射 LCMV-CL13 病毒 2×10^6 PFU,感染后第 2 天再次经腹腔注射 500 μg CD4 抗体^[9];对照组小鼠经腹腔及尾静脉注射同等体积的 PBS。

1.2.2 LCMV-CL13 感染小鼠体重监测

C57BL/6N 小鼠感染后,每日观察小鼠临床表现,包括一般状况、体态、毛发、饮食、活动、排便等。感染后前 15 d 每天称重 1 次,感染 15 d 后每 4 d 称重 1 次。

1.2.3 组织采集

病毒感染后第 10、20、30、40、50、60、70 天收集动物血液及组织样本。具体地,从小鼠眼眶静脉丛取血 100 μL 置于装有 10 μL EDTA.2K 抗凝剂 (10X) 的 EP 管中,用于流式检测;排尽血液后,脱颈椎处死小鼠收集肠、肾、肝、脑组织,用于病毒载量检测;收集脾充分研磨制备单细胞悬液,用于流式检测。

1.2.4 组织病毒载量检测

使用 RNA 试剂盒提取小鼠肠、肾、肝、脑组织 RNA,反转录试剂盒将 RNA 反转录为 cDNA,采用 SYBR Green 染料法检测组织中 LCMV-CL13 病毒载量^[9]。

1.2.5 外周血淋巴细胞比例检测

取小鼠外周血 100 μL 置于流式管中,同时加入流式荧光抗体 CD45-FITC、CD3-PerCP/Cyanine5.5、CD4-PE、CD8a-APC 和 CD19-PE/Cyanine7 各 5 ~ 10 μL ,室温避光孵育 30 min,裂解红细胞,PBS 洗涤 2

次,2%多聚甲醛固定,流式上机检测荧光信号。

1.2.6 脾淋巴细胞比例检测

取小鼠脾置于 RPMI 1640 不完全培养基充分研磨,经 70 μm 滤网过滤、裂解红细胞,制备获得单细胞悬液。加入流式荧光抗体 CD45R/B220-FITC、CD19-PerCP/Cyanine5.5、GL7-PE、CD95 (FAS)-APC 各 5 ~ 10 μL ;冰上避光孵育 20 min,2%多聚甲醛固定,流式上机检测荧光信号。采用 Flow Jo V10 对多色流式细胞仪上机结果进行分析。

1.2.7 免疫组库建库、测序

制备小鼠脾单细胞悬液,分离淋巴细胞,由武汉康测科技有限公司进行建库、测序。具体地,提取细胞总 RNA、逆转录获取单链 cDNA、UID (Unique Identifier) 标记、使用免疫球蛋白亚型 (IgM、IgA、IgG、IgD、IgE、IgK 和 IgL) 的特异性引物 (gene specific primer, GSP) 进行 PCR 扩增和文库构建,运用高通量测序技术检测靶向扩增后 B 细胞 CDR3 区域^[10]。

1.2.8 生物信息学分析

首先,使用 MiXCR (v3.0.3) 软件^[11],将纠错和去重后的数据与国际免疫遗传学数据库 IMGT (<http://www.imgt.org>) 的 V、D、J 基因片段进行比对^[12]。获取比对结果并开展后续深度分析。其次,数据多样性指标至关重要,多样性与免疫应答密切相关^[13]。采用 Shannon entropy 指数^[14] 计算样本 IGH 组成多样性,Shannon entropy 值越大,说明样本多样性越高。

1.3 统计学分析

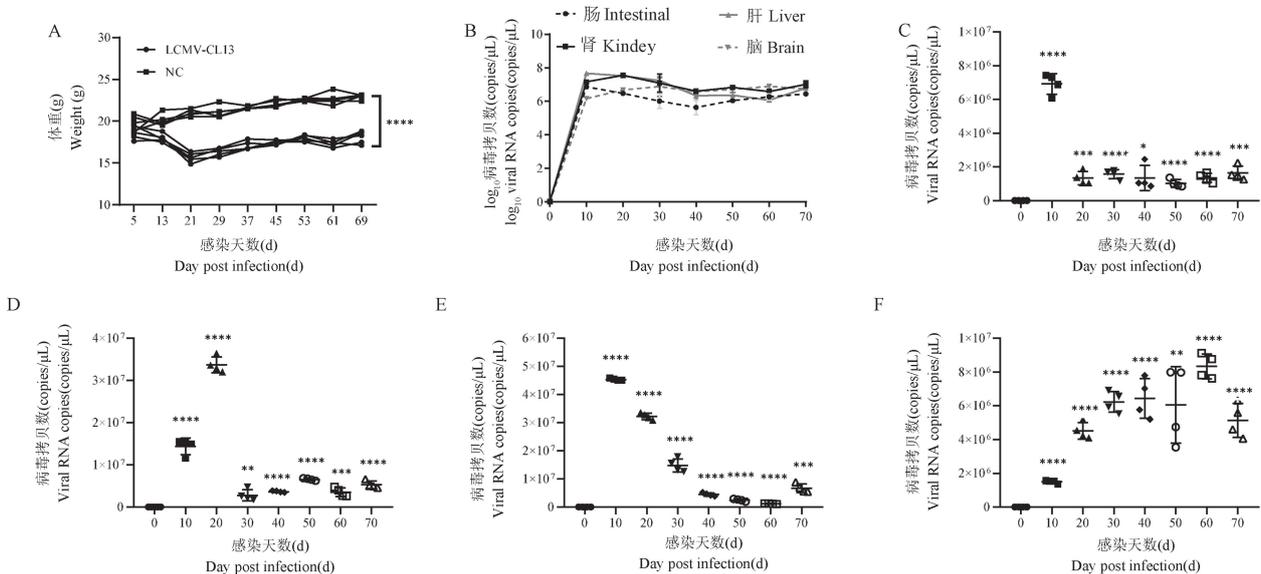
实验数据使用 GraphPad Prism 8 软件进行作图和统计分析,以平均值 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,采用单因素方差分析,两组间均数比较采用 *t* 检验, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 LCMV-CL13 病毒在小鼠体内维持慢性感染状态

为了解 LCMV-CL13 病毒对 C57BL/6N 小鼠的致病情况,每天观察小鼠疾病表现,监测体重变化,小鼠感染后第 7 天出现明显疾病表现,如竖毛、弓背、体重下降等症状,感染后 21 d 体征逐渐恢复;在感染后 32 d 体重下降最为明显,并再次出现明显竖毛、弓背、体重下降等症状,感染后 40 d 体征逐渐恢复,可能受自身免疫反应影响^[15],感染后实验组动物较对照组体重明显下降($P < 0.0001$),说明病毒感染可对小鼠致病(图 1A)。为检测 LCMV-CL13 病毒在 C57BL/6N 小鼠体内的复制扩增情况,每

10 d 采集小鼠肠、肾、肝、脑组织提取病毒 RNA,使用实时荧光定量 PCR 测定病毒载量。根据组织病毒载量结果,感染可分为急性感染期(0 ~ 10 d)及平台期(10 ~ 70 d)(图 1B)。急性感染期,小鼠组织病毒载量迅速上升,在肠(7×10^6 copies/ μ L)、肝(4.5×10^7 copies/ μ L)组织维持高水平复制;而后组织病毒载量逐渐降低并保持在 10^6 copies/ μ L 水平(图 1C、1E),进入平台期,主要在肾(3.5×10^7 copies/ μ L)、脑(4.5×10^6 copies/ μ L)组织维持高水平复制;之后在肾组织病毒载量逐渐降低并保持在 10^7 copies/ μ L 水平复制,在脑组织中病毒载量逐渐升高并保持在 6×10^6 copies/ μ L 水平复制(图 1D、1F)。综上结果表明,LCMV-CL13 病毒可在 C57BL/6N 小鼠维持较高水平的病毒载量及慢性感染。



注:A:C57BL/6N 小鼠感染 LCMV-CL13 后体重变化;B:C57BL/6N 小鼠感染 LCMV-CL13 后组织病毒载量变化趋势;C、D、E、F:C57BL/6N 小鼠感染 LCMV-CL13 后肠、肾、肝、脑组织的病毒载量;与阴性对照组相比,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$,*** $P < 0.001$,**** $P < 0.0001$ 。

图 1 LCMV-CL13 小鼠感染模型体重、组织病毒载量的动态变化

Note. A. Changes in body weight of C57BL/6N mice after infection with LCMV-CL13. B. The tissue viral load trend of C57BL/6N mice infected with LCMV-CL13. C、D、E、F. Viral load in the intestine, kidney, liver, and brain tissues of C57BL/6N mice infected with LCMV-CL13. Compared with the negative control group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$.

Figure 1 Dynamic changes of body weight and tissue viral load of LCMV-CL13 mouse infection model

2.2 病毒感染引起 CD8⁺T 细胞耗竭、CD19⁺B 细胞增加

为了解 LCMV-CL13 慢性感染是否会导致小鼠外周血适应性免疫细胞(CD4⁺T、CD8⁺T 及 CD19⁺B 细胞)的动态变化,在不同时间点收集外周血进行流式检测。结果发现,与未感染状态相比,GK1.5 抗体先清除 CD4⁺T 细胞,感染后 20 d 开始 CD4⁺T 细胞比例随感染时间延长而恢复,感染后第 70 天可

达到 $13.15\% \pm 0.72\%$ (图 2)。CD8⁺T 细胞比例先降低后增加;在感染后 10 d 占比($9.49\% \pm 1.31\%$),随着感染的持续,感染后 40 d 降低最明显($2.17\% \pm 0.40\%$);随之 CD8⁺T 细胞比例开始升高,感染后 70 d CD8⁺T 细胞比例可达到($6.65\% \pm 0.52\%$)(图 2),但未恢复到正常水平。CD19⁺B 细胞比例在感染前 40 d 无明显变化,感染后 40 d 比例逐渐升高,感染后 70 d 达到($40.32\% \pm 0.46\%$)(图

2), 显著高于未感染状态。综上所述, GK1.5 抗体注射成功耗尽了小鼠体内 CD4⁺T 细胞, 帮助病毒感染; CD8⁺T 细胞在感染过程出现持续耗竭, 后随着

CD4⁺T 细胞比例增加而部分恢复; CD19⁺B 细胞比例受慢性病毒感染影响逐渐增加, 提示病毒诱发了显著的体液免疫反应。

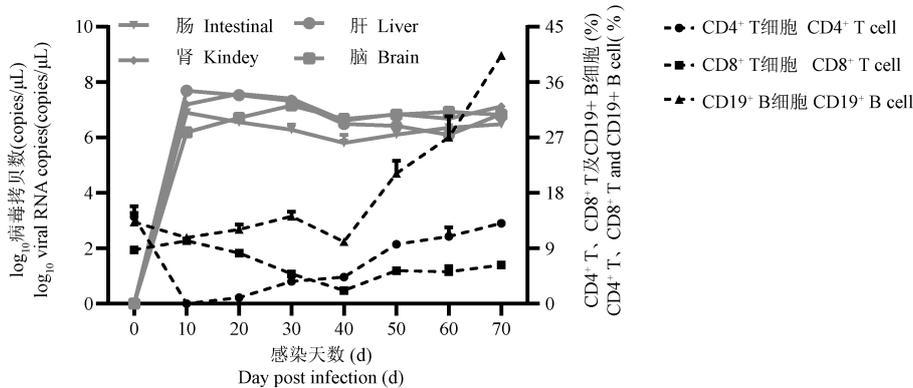


图2 感染后不同时间点, 病毒拷贝数与外周血 CD4⁺T、CD8⁺T、CD19⁺B 细胞比例变化

Figure 2 Trend of virus RNA copies and the proportion of CD4⁺T, CD8⁺T, and CD19⁺B cells in the peripheral blood at different time points after infection

2.3 病毒感染诱导 GC B 细胞比例增加

生发中心是免疫反应发生时, B 细胞在其中增殖、生长和突变的特殊区域。为了研究 B 细胞的成熟及 BCR 的突变, 本文研究了 LCMV-CL13 感染后脾生发中心 B 细胞的变化趋势, 我们对 LCMV-CL13 慢性感染小鼠脾中特异性 GC B 细胞 (B220⁺CD19⁺GL7⁺FAS⁺) 进行流式检测。结果发现, 急性期感染

中, GC B 细胞比例急剧下降, 感染后第 40 ~ 70 天, GC B 细胞比例由 (2.28% ± 2.68%) 增加至 (10.03% ± 0.60%) (图 3)。提示我们 LCMV-CL13 病毒感染初期可能对脾产生急性损伤, 感染平台期尤其感染后 30 ~ 70 d, GC B 细胞增加速率较快, 提示这一时期病毒特异性 GC B 细胞增殖较快, 发生针对病毒的体液免疫反应。

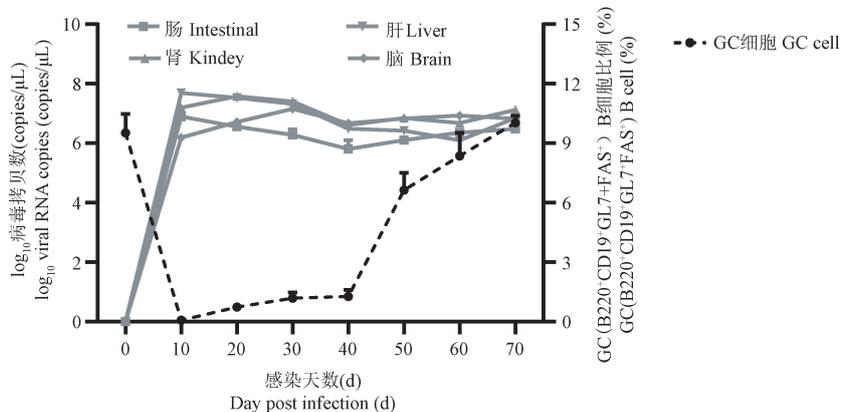


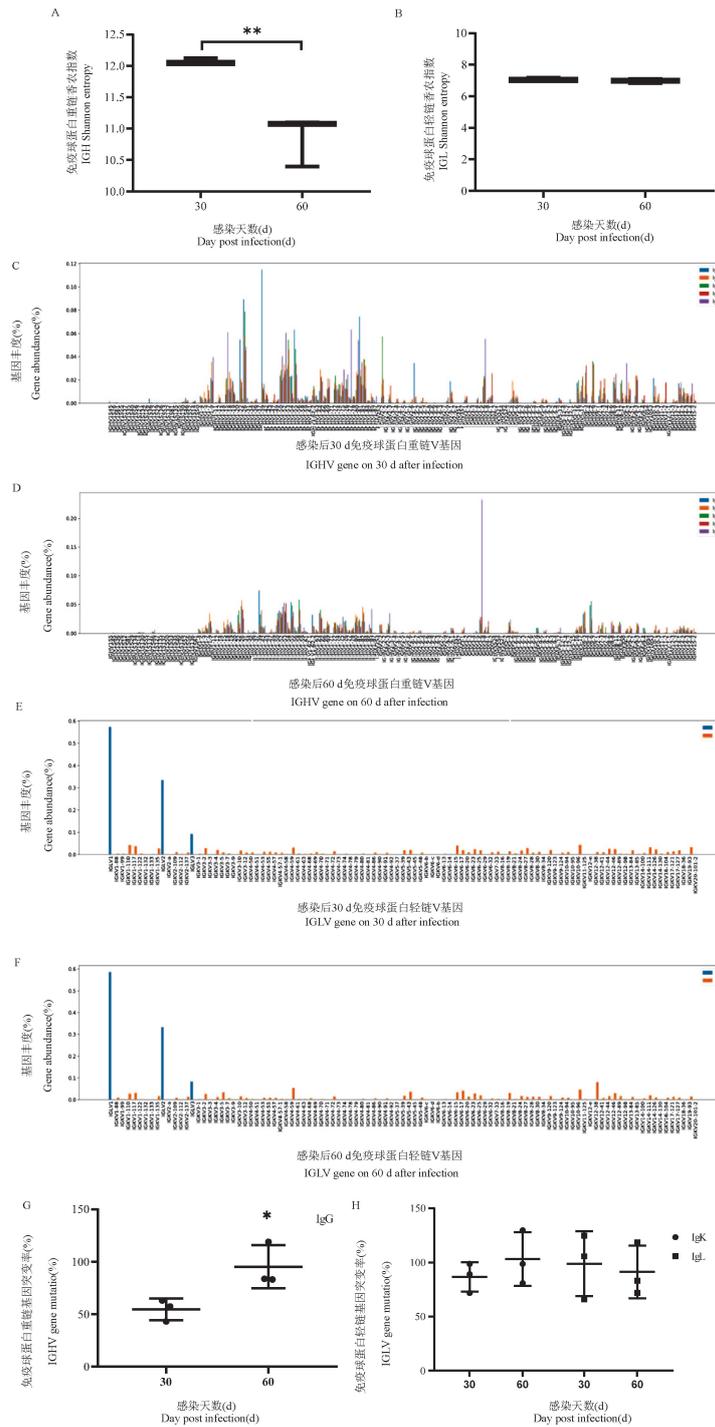
图3 感染后不同时间点, 病毒拷贝数与脾中 GC B (B220⁺CD19⁺GL7⁺FAS⁺) 细胞比例变化

Figure 3 Trend of virus RNA copies and the proportion of GC B cell (B220⁺CD19⁺GL7⁺FAS⁺) in the spleen at different time points after infection

2.4 样品多样性及 V 基因使用频率、突变率分析

BCR 是一种长在 B 淋巴细胞表面的免疫球蛋白分子 (immunoglobulin, Ig), 由重链及轻链构成, 与抗体同属于免疫球蛋白家族。BCR 库多样性主要受免疫球蛋白基因中 V、D、J 基因片段重组及 V-D-J 连接时发生核苷酸突变、插入或删除的影响。我们

采用香农指数 (Shannon index) 为组间多样性的评价指标。分析感染后 30 d 与感染后 60 d IGH、IGL 多样性以及 V 基因使用频率、突变率 (图 4), 重链多样性具有显著性差异 ($P < 0.01$) (图 4A), 轻链多样性无显著性差异 (图 4B), 重链 V 区基因片段中, 感染后 60 d 组 IGHV6-3、IGHV1-58、IGHV3-6 基因使用



注: A, B: 感染后 30、60 d, 重轻链多样性分析; C, D: 感染后 30、60 d, 重链 V 区基因使用频率分析; E, F: 感染后 30、60 d, 轻链 V 区基因使用频率分析, 横坐标表示 V 基因亚型, Y 轴表示每个基因表达丰度; G, H: 感染后 30、60 d, 重轻链 CDR3 V 基因突变率分析; 与感染后 30、60 d 数据相比, * $P < 0.05$ 。

图 4 分析感染后 30、60 d 重轻链多样性、V 基因丰度及突变率

Note. A, B. Diversity analysis of heavy and light chains at 30 and 60 days after infection. C, D. Frequency analysis of heavy chain V region gene usage 30 and 60 days after infection. E, F. Frequency analysis of light chain V region gene usage 30 and 60 days after infection. The X-axis represents V gene subtypes, and the Y-axis represents the expression abundance of each gene. G, H. Mutation rate analysis of heavy and light chain CDR3 V gene at 30 and 60 days after infection. Compared with data of 30 and 60 days after infection, * $P < 0.05$.

Figure 4 Analysis of the diversity of heavy and light chains, the abundance and mutation rate of V gene on 30, 60 days after infection

频率高于感染后 30 d 组 ($P < 0.05$), 其他基因则在感染后 30 d 组表达更多或两组表达无统计学差异 (图 4C, 4D)。轻链 V 区基因片段中, 感染后 60 d 组基因使用频率与感染后 30 d 组无显著性差异 (图 4E, 4F)。可能是感染后 60 d 形成了针对抗原的特异性克隆。SHM 定义为 V 基因片段的突变频率, CDR3 区是抗原识别的重要部位, 其特异性是被认为是 SHM 突变的结果。为了确定此小鼠模型是否发生 SHM, 本实验分析不同时间点 CDR3 区域 V 基因突变率。突变率采用每 10 000 个碱基中发生突变的碱基数量表示。如图 4G, 4H 所示, 感染后 60 d 相比于感染后 30 d, 重链 V 基因突变率有显著性升高 ($P < 0.05$), 且突变率 $CDR3(60\text{ d})/CDR3(30\text{ d})$ 约为 1.7 倍。结果证明: 感染时间的增加, V 区基因点突变增高。综上, 提示 Ig 基因发生 SHM, 且突变产生针对病毒的特异性克隆, 造成多样性降低。

3 讨论

LCMV-CL13 慢性感染小鼠是一种广泛用于研究病毒慢性感染机制的动物模型, 为治疗人类慢性病毒性疾病和其他慢性疾病 (如癌症) 提供了宝贵的见解^[16-19], 包括抗原呈递的 MHC 限制、T 细胞效应功能和记忆^[20]; LCMV-CL13 感染小鼠在感染 8 d 后体重下降 20%, 具有明显临床疾病评分。感染后 1 ~ 5 周病毒保持高水平复制, 感染后 6 周血浆病毒滴度下降; 感染后 3 周内, $CD8^+$ T 细胞数量逐渐降低, $CD4^+$ T 细胞数量先升高后降低^[15]。至今为止, 该小鼠模型多用于 T 细胞研究。有研究证明, 成年小鼠在感染病毒时注射 CD4 单克隆抗体, 小鼠组织可终身保持高病毒水平^[21]。因此, 为建立慢性感染小鼠模型, 本实验通过先消耗 $CD4^+$ T 细胞再经尾静脉注射途径接种 LCMV-CL13 病毒, 感染后小鼠出现竖毛、弓背等体征, 体重出现明显下降、在检测期内组织病毒载量维持在相对较高水平。我们同时聚焦小鼠细胞、体液免疫反应。通过流式检测小鼠外周血 $CD4^+$ T 细胞、 $CD8^+$ T 细胞以及 $CD19^+$ B 细胞比例, 发现 $CD8^+$ T 细胞、 $CD19^+$ B 细胞比例随着 $CD4^+$ T 细胞比例的增加而增加, 这与慢性病毒感染研究结果相符合^[22]。以上结果证明, 我们成功建立 LCMV-CL13 慢性感染小鼠模型, 且小鼠外周适应性免疫反应较为强烈。

Ig 基因 SHM 在抗体介导的免疫反应中起关键作用。在抗病毒感染过程中, 生发中心 (germinal

center, GC) B 细胞发生 SHM 及类别转换 (class switch recombination, CSR) 诱导亲和力成熟, 丰富抗体可变区多样化、提高抗体中和活性^[23-24]。因此, GC B 细胞是产生有效体液免疫的关键所在^[25]。基于此, 我们流式检测 GC B 细胞比例, 发现感染前期 GC B 细胞比例急剧下降, 这可能与 IFN-I 诱导的炎症有关^[26]。在生发中心微环境中, GC B 细胞在暗区 (dark zone, DZ) 进行增殖和 Ig 基因 SHM, 在亮区 (light zone, LZ) 进行基于亲和力的选择^[27]。我们结果显示: 感染后第 40 ~ 60 天, GC B 细胞比例增加较快, 说明此阶段 GC B 细胞快速增殖。基于此, 我们推测感染后 40 ~ 60 d 可能发生 B 细胞高频突变。为了验证我们的假设, 分离感染后 30、60 d 脾 B 细胞进行 BCR 建库以及测序分析。对重链、轻链多样性以及 V 基因使用频率、突变进行比较分析。结果表明: 感染后 60 d 重链多样性降低, V 基因使用频率下降, 但 V 基因突变率增高 1.7 倍。表明 LCMV-CL13 慢性病毒感染模型发生 B 细胞高频突变, Ig V 基因突变率随感染时间逐渐增加, 产生病毒特异性克隆, 导致 BCR 库多样性降低。

SHM 可以增加免疫球蛋白对抗原识别和结合的亲和力, 虽然过去对 SHM 的分子机制进行了详细的研究, 但仍有很多内容尚未阐明。例如, 影响 SHM 发生的关键基因及调控基因尚未明确。在本研究中, 我们在成功建立 LCMV-CL13 慢性感染小鼠模型的基础上, 流式分析外周血、脾免疫细胞比例, 并首次对 B 细胞进行 BCR 突变分析, 初步探究 V 区基因使用频率、突变率随感染时间的变化情况。这为在 LCMV-CL13 慢性病毒感染小鼠模型中研究 B 细胞高频突变、探究中和抗体的形成机制提供了基础信息以及数据支持。本研究下一步将扩大组内样本数量, 从病毒与宿主共进化角度出发, 筛选影响 BCR 突变的关键基因以及 CDR3 序列特异性识别的抗原特征, 从而进一步探寻抗体生成及进化机制。

参 考 文 献 (References)

- [1] Lee MS, Park CH, Jeong YH, et al. Negative regulation of type I IFN expression by OASL1 permits chronic viral infection and $CD8^+$ T-cell exhaustion [J]. *PLoS Pathog*, 2013, 9 (7): e1003478.
- [2] Zehn D, Utzschneider DT, Thimme R. Immune-surveillance through exhausted effector T-cells [J]. *Curr Opin Virol*, 2016, 16: 49-54.
- [3] Koff WC, Burton DR, Johnson PR, et al. Accelerating next-

- generation vaccine development for global disease prevention [J]. *Science*, 2013, 340(6136): 1232910.
- [4] Odegard VH, Schatz DG. Targeting of somatic hypermutation [J]. *Nat Rev Immunol*, 2006, 6(8): 573-583.
- [5] Tarsalain A, Maman Y, Meng FL, et al. Ig Enhancers Increase RNA Polymerase II stalling at somatic hypermutation target sequences [J]. *J Immunol*, 2022, 208(1): 143-154.
- [6] Pilzecker B, Jacobs H. Mutating for good: DNA damage responses during somatic hypermutation [J]. *Front Immunol*, 2019, 10: 438.
- [7] Mbanwi AN, Wang C, Geddes K, et al. Irreversible splenic atrophy following chronic LCMV infection is associated with compromised immunity in mice [J]. *Eur J Immunol*, 2017, 47(1): 94-106.
- [8] Berghaler A, Flatz L, Hegazy AN, et al. Viral replicative capacity is the primary determinant of lymphocytic choriomeningitis virus persistence and immunosuppression [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2010, 107(50): 21641-21646.
- [9] He R, Yang X, Liu C, et al. Efficient control of chronic LCMV infection by a CD4 T cell epitope-based heterologous prime-boost vaccination in a murine model [J]. *Cell Mol Immunol*, 2018, 15(9): 815-826.
- [10] Pineda S, Sigdel TK, Liberto JM, et al. Characterizing pre-transplant and post-transplant kidney rejection risk by B cell immune repertoire sequencing [J]. *Nat Commun*, 2019, 10(1): 1906.
- [11] Bolotin DA, Poslavsky S, Mitrophanov I, et al. MiXCR: software for comprehensive adaptive immunity profiling [J]. *Nat Methods*, 2015, 12(5): 380-381.
- [12] Lefranc MP, Giudicelli V, Duroux P, et al. IMGT[®], the international ImMunoGeneTics information system[®] 25 years on [J]. *Nucleic Acids Res*, 2015, 43(Database issue): 413-422.
- [13] Kim D, Park D. Deep sequencing of B cell receptor repertoire [J]. *BMB Rep*, 2019, 52(9): 540-547.
- [14] Wu J, Liu D, Tu W, et al. T-cell receptor diversity is selectively skewed in T-cell populations of patients with Wiskott-Aldrich syndrome [J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2015, 135(1): 209-216.
- [15] Stamm A, Valentine L, Potts R, et al. An intermediate dose of LCMV clone 13 causes prolonged morbidity that is maintained by CD4⁺ T cells [J]. *Virology*, 2012, 425(2): 122-132.
- [16] Kim PS, Ahmed R. Features of responding T cells in cancer and chronic infection [J]. *Curr Opin Immunol*, 2010, 22(2): 223-230.
- [17] Barber DL, Wherry EJ, Masopust D, et al. Restoring function in exhausted CD8 T cells during chronic viral infection [J]. *Nature*, 2006, 439(7077): 682-687.
- [18] Virgin HW, Wherry EJ, Ahmed R. Redefining chronic viral infection [J]. *Cell*, 2009, 138(1): 30-50.
- [19] Wherry EJ. T cell exhaustion [J]. *Nat Immunol*, 2011, 12(6): 492-499.
- [20] Zinkernagel RM. Lymphocytic choriomeningitis virus and immunology [J]. *Curr Top Microbiol Immunol*, 2002, 263: 1-5.
- [21] Matloubian M, Concepcion RJ, Ahmed R. CD4⁺ T cells are required to sustain CD8⁺ cytotoxic T-cell responses during chronic viral infection [J]. *J Virol*, 1994, 68(12): 8056-8063.
- [22] Fahey LM, Brooks DG. Opposing positive and negative regulation of T cell activity during viral persistence [J]. *Curr Opin Immunol*, 2010, 22(3): 348-354.
- [23] Oreste U, Ametrano A, Coscia MR. On origin and evolution of the antibody molecule [J]. *Biology (Basel)*, 2021, 10(2): 140.
- [24] Lim CC, Choong YS, Lim TS. Cognizance of molecular methods for the generation of mutagenic phage display antibody libraries for affinity maturation [J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(8): 1861.
- [25] Weisel FJ, Mullett SJ, Elsner RA, et al. Germinal center B cells selectively oxidize fatty acids for energy while conducting minimal glycolysis [J]. *Nat Immunol*, 2020, 21(3): 331-342.
- [26] Fallet B, Narr K, Ertuna YI, et al. Interferon-driven deletion of antiviral B cells at the onset of chronic infection [J]. *Sci Immunol*, 2016, 1(4): eaah6817.
- [27] Attaf N, Baaklini S, Binet L, et al. Heterogeneity of germinal center b cells: new insights from single-cell studies [J]. *Eur J Immunol*, 2021, 51(11): 2555-2567.

[收稿日期] 2022-01-25