

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2022.10.013

TCR 组库检测方法及应用的研究进展

Research progress on test methods and applications of TCR repertoire

周健 综述;任秀宝,颜次慧 审阅(天津医科大学肿瘤医院 生物技术研究室,生物治疗科,国家肿瘤临床医学研究中心,天津市“肿瘤防治”重点实验室,天津市恶性肿瘤临床医学研究中心,天津市肿瘤免疫与生物治疗重点实验室,天津 300070)

[摘要] 近年来以T细胞为基础的肿瘤免疫治疗发展迅速,但对部分肿瘤患者有效,因此亟待探索有效的检测方法和预测指标。T细胞受体(TCR)是T细胞抗原识别的关键分子。T细胞在胸腺成熟过程中经历了TCR基因重排,形成了TCR高度多样性,体内所有TCR类型与数量组成TCR组库。借助免疫组库测序技术可得到特定时期肿瘤患者TCR组库的信息,如TCR多样性、克隆性等特点,为个体化肿瘤免疫治疗方案的选择以及疗效预测提供了新线索。二代测序技术和单细胞测序技术的发展极大地扩展了TCR组库研究的深度与广度,极大地促进其在肿瘤免疫治疗领域的应用。本文通过对TCR组库测序应用领域、测序方法及其统计学评估指标进行综述,展示了TCR组库检测作为新型生物标志物来预测及评估患者预后的潜能,为个体精准化肿瘤免疫治疗提供新策略。

[关键词] T细胞受体;T细胞受体组库;单细胞测序;免疫检查点;肿瘤免疫

[中图分类号] R730.4; R730.51 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385x(2022)10-0956-06

T细胞受体(T cell receptor, TCR)组库是特定时间内机体免疫循环中T淋巴细胞克隆的总和,可反映特定时间点机体对外界刺激的应答能力,其多样性与机体免疫力的强弱相关^[1-2]。通常,高多样性TCR组库代表免疫系统功能正常,对病毒及其他病原体感染有良好的调控作用^[3]。TCR组库会随着疾病的发生发展而改变,反映不同疾病情况下机体的免疫系统状态,其已成为免疫学研究领域的热点。二代测序技术的发展使得免疫组库高通量测序成为可能,促进了免疫组库测序(immune repertoire sequencing, IR-Seq)技术在肿瘤免疫、自身免疫疾病等方面的广泛应用。本文介绍了TCR组库在肿瘤免疫领域的应用、批量测序与单细胞测序两类测序方法、测序数据的分析方法及其多样性、重叠性等相关指标,通过介绍这些指标在肿瘤免疫检查点阻断(immune checkpoint blockade, ICB)疗法中的应用,展示其作为免疫治疗生物标志物的潜能,以期在肿瘤免疫治疗提供新思路。

1 TCR组库检测的重要性

近年来,随着免疫治疗的飞速发展,利用机体免疫系统清除肿瘤细胞成为肿瘤研究领域的热点,但是由于肿瘤免疫治疗存在耐药和低应答等问题,仅有一小部分肿瘤患者能从中获益,因此限制了其临床应用。研究机体健康与疾病状态下TCR组库的特征有助于人们更好地认识免疫系统,阐明T细胞在肿瘤免疫治疗中的变化规律及其发挥功能的机制。

基于健康状态和疾病状态下机体免疫系统特点,TCR组库分析可作为生物标志物,监测机体免疫状态并且预测患者预后,提高肿瘤免疫治疗的应答率。同时TCR组库分析在ICB疗法中具有重要参考价值,分析TCR多样性可以为不同患者选择何种ICB提供依据^[4]。此外,在过继细胞疗法(adoptive cellular therapy, ACT)中,通过IR-Seq对TCR双链进行测序得到T细胞的克隆组成信息,来筛选肿瘤高特异性的T细胞,减少正常组织的毒性损伤,同时对治疗前后TCR变化分析来评价免疫治疗的有效性及其预后,表明IR-Seq可以优化ACT的治疗效果,具有巨大潜力^[5]。肿瘤疫苗是通过利用肿瘤相关抗原激活体内肿瘤特异性免疫反应的一种治疗方法,因其对肿瘤细胞的杀伤具有持久性而受到青睐。基于TCR多样性受抗原的影响,利用IR-Seq可以发现患者体内新生抗原,直观地评价疫苗接种后的免疫反应;通过对细胞毒性T细胞转录谱进行测序,为抗原选择、免疫细胞活化及抗原识别提供信息,促进治疗性肿瘤疫苗的发展^[6]。IR-Seq可以得到患者某一时期体内TCR的完整信息,在ICB、ACT、肿瘤疫苗等多种免疫治疗方法中发挥作用,对肿瘤免疫治疗的发展具有极大的促进作用。

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(No.81972722)

[作者简介] 周健(1997—),男,硕士生,主要从事肿瘤免疫学研究, E-mail: zhou915003@163.com

[通信作者] 颜次慧, E-mail: cihuiyan@tmu.edu.cn;任秀宝, E-mail: renxiubao@tjmuch.com

除了对肿瘤治疗领域意义重大外, TCR 组库还可以在感染性疾病、自身免疫病等领域中发挥巨大价值, 例如, MURARO 等^[7]利用 TCR 组库监测接受自体干细胞移植的多发性硬化患者治疗前后外周血 CD4⁺、CD8⁺ T 细胞 TCR 克隆型变化及其与疗效的关系, 发现治疗前主要的 CD4⁺ T 细胞克隆型在治疗后被有效清除且出现了大量新的克隆型, 而治疗前主要的 CD8⁺ T 细胞克隆型未在治疗后被清除, 治疗后 CD8⁺ TCR 组库只是在原有克隆型基础上发生了比例和数量的变化, 并且发现治疗无效的患者其 TCR 组库多样性较低。

2 TCR 组库测序方法

T 细胞抗原识别依赖于 TCR 与抗原肽-主要组织相容性复合物 (major histocompatibility complex, MHC) 的相互作用^[8]。TCR 是由两条肽链构成的异源二聚体, 包括 $\alpha\beta$ TCR 和 $\gamma\delta$ TCR, 具有 $\alpha\beta$ TCR 的 T 细胞是适应性免疫的主要参与者, 是病毒感染、自身免疫病和肿瘤免疫研究的重点^[9]。TCR 双肽链均包含恒定区 (constant region, C) 和可变区 (variable region, V), 根据 TCR V 区识别特性不同, 将 V 区分为 3 个互补决定区 (complementarity-determining region, CDR) 1、2、3。CDR1 和 CDR2 基因由种系 DNA 基因编码, 而 CDR3 基因是 V(D)J 重组连接多样性的产物, TCR 多样性主要体现在 CDR3 的多样性上^[10-11]。TCR 和抗原肽-MHC 分子复合物识别过程中, CDR1 α 、CDR1 β 、CDR2 α 和 CDR2 β 与 MHC 接触, 而 CDR3 α 和 CDR3 β 直接与抗原肽接触。然而, 并不是所有识别均严格按此识别模式, 6 个 CDR 可能均参与抗原肽的识别^[12]。因此, 在 TCR 测序过程中, 检测所有的 CDR 序列可能获得更为精确的 TCR 与抗原肽识别信息。

在 TCR 研究早期, 由于技术上的限制很难建立全面的 TCR 组库, 直到二代测序技术的应用, 可以同时为数百万个 TCR 序列分析。通过 IR-Seq 可以对 TCR 组库中的 α 、 β 两条肽链同时进行分析, 且包含全部 CDR 区, 促进了 TCR 分析领域的快速发展。

在进行 TCR 测序分析前, 首先需考虑测序样本的来源。基因组 DNA 和 RNA 均可用于 TCR 测序, 但各具优缺点。由于 DNA 自身比较稳定, 且每个细胞内的拷贝数稳定, 因此可以直接定量克隆频率^[13]。然而, 基于 DNA 的测序方法的敏感性较低, 且未考虑等位基因排斥、缺失目的基因表达水平的信息, 可能会导致测序结果的错误。与之相反, RNA 稳定性较差, 不同细胞其 TCR 的 mRNA 表达水平不尽相同, 因此影响 TCR 定量; 但是 mRNA 包含最终的 TCR 产物并提供表达水平信息, 其敏感性较高, 较常被用于 TCR

测序^[14]。

选择合适的 TCR 测序材料后, 接着根据研究目的选择测序方法, TCR 组库测序可按照分析水平不同, 分为批量测序和单细胞测序两种类型。

2.1 TCR 批量测序

采用批量测序的 TCR 高通量测序主要分为 3 类: (1) 多重 PCR。多重 PCR 是目前使用较多的批量测序方法, 针对多个目的基因, 多重 PCR 是采用多对引物混合于扩增体系, 实现 CDR3 区域特异性扩增。多重 PCR 存在扩增偏倚, 导致某些等位基因的扩增优于其他等位基因, 从而掩盖产物真实的相对丰度^[15]。在实验设计中, 可以通过改变引物浓度^[16]、使用分子条形码^[17]的方式来纠正结果偏倚。(2) 巢式 PCR 或 5' 末端快速扩增技术 (5'RACE)。此方法以 RNA 为模板, 依赖于逆转录酶的末端转移酶活性, 在第一次链 (即 cDNA) 合成至 cDNA 分子的 3' 端时添加一段非模板 dCTP 序列, 然后利用含有互补 oligo(G) 延伸链的模板切换寡核苷酸合成 mRNA 完整 5' 端的 cDNA 链^[18], 因此一对结合 5' 端和固定序列的引物足以扩增全部 TCR 基因, 通常会覆盖到完整的 V 基因, 保留完整的 TCR 和 VDJ 区域^[14]。(3) 目标区域靶向捕获。利用 RNA 探针直接从 gDNA 或者 RNA 测序文库中捕获 TCR 序列, 进行进一步扩增。这种方法需要一定数量的 PCR 循环, 但是受 PCR 偏好性影响小。此方法可以同时处理 α 和 β 链, 也可以分开处理, 后者处理结果将更加准确^[19-20]。

批量测序作为较常使用的方法, 主要缺点是它只能提供单条 TCR 链频率的信息, 无法提供 α 、 β 链的配对信息, 而 α 和 β 链配对真正反映了 T 细胞在体内的生物学功能, 以更为准确地评估 TCR 功能和抗原特异性。为此, HOWIE 等^[21]提出了基于同一样本的多重测序和组合分析对 TCR 链配对的新概念, 此种方法被称为 pairSEQ, 需要大量样本来实现配对, 具有一定的局限性。

2.2 TCR 单细胞测序

单细胞分离技术的发展使得捕获成对 TCR α 、 β 链信息成为可能。最早使用显微技术 (如激光显微切割和显微移液) 分离单个 T 细胞, 再进行多重 PCR 和一代测序^[22], 这些方法存在耗时且效率低的弊端。目前, 分离单个细胞的常用方法是采用流式细胞分选技术^[23], 这一方法的优势为能够基于表型特征来选择感兴趣的 T 细胞亚群进行单细胞测序, 这在分析罕见 T 细胞亚群时十分有用。此外, 由于该方法高读取率和覆盖率的特点, 可获得高置信度的 TCR 序列。利用这一方法首次揭示了人类和小鼠抗原特异性 CD8⁺ T 细胞对病毒感染应答的克隆多样性^[24-25]。近

年来,通过使用单细胞条形码标记单个细胞再进行后续高通量测序也得到发展。HAN等^[26]通过使用单细胞条形码策略可以增加测序细胞的规模,除了测定 α 、 β 两条TCR链外,还可以对与细胞功能相关的特定基因进行测序。然而,这些方法检测的细胞数量有限,只能对数百至数千个细胞进行测序。

TCR单细胞测序的另一个策略是基于乳剂的PCR技术。其利用微流体技术,产生大量油包水乳滴捕获单个细胞,这一方法显著增加后期用于测序分析的细胞数。乳滴相当于一个微型反应室,包含逆转录体系,细胞在其中裂解释放的mRNA通过逆转录PCR合成cDNA,同时标记细胞标签,随后进行测序。SPINDLER等^[27]提出了一种高通量方法,即将TCR的识别与功能测试联系起来,以使用基于微流体的系统确定TCR反应性和亲和力。

单细胞测序技术能够将单个细胞的转录谱与TCR信息联系起来,从而更为全面精准地研究T细胞在免疫应答中的作用。目前,有两种单细胞转录谱联合TCR组库测序的方法:一是从单细胞RNA测序数据中计算重建TCR链,依赖于对齐和从头组装步骤,以识别TCR的起始读取并重建TCR链,包括单细胞TCR测序(scTCR-seq)^[28]、VDJPuzzle^[29]等方法。通过将TCR序列与基因表达相结合,促进了T细胞克隆表型动力学的研究。如STUBBINGTON等^[30]利用TraCeR方法追踪沙门菌感染的CD4⁺T细胞的分化轨迹,揭示了同一克隆型T细胞可以有不同的分化轨迹,即抗原反应性T细胞命运的异质性。二是结合基因表达谱与特异性扩增TCR基因片段,在单个细胞水平将转录谱分析与靶向扩增TCR链相结合,得到TCR与T细胞表型的配对组合^[31]。YOST等^[32]通过5'RNA扩增同时进行单细胞RNA测序和TCR测序的方法追踪了基底细胞癌患者在抗程序性死亡蛋白-1(programmed cell death-1, PD-1)治疗前后的T细胞克隆动态变化,研究结果显示,治疗后扩增的CD8⁺T细胞克隆主要由治疗前肿瘤中缺失的T细胞克隆组成,这表明ICB招募新克隆至肿瘤部位是其发挥激活抗肿瘤免疫反应的机制之一^[33-34]。

以上测序方法旨在准确地重现TCR序列,然而由于某些特定的TCR序列间可能仅存在一个核苷酸的差别,这增加了TCR测序分析的难度,需要慎重区分PCR测序错误、序列差异和低频克隆型。基于分子标签(unique molecular identifier, UMI)技术的应用较好地解决了以上难题。UMI技术是在cDNA合成过程中附加的随机DNA序列,可唯一标记单个cDNA分子,即在cDNA合成过程中引入独特的UMI来区分单个RNA分子,并将PCR扩增和测序错误的

影响降至最低,以及利用算法纠正错误数据^[35-36]。UMI技术具有两个主要优点:(1)通过对每个UMI进行一次计数,可以恢复样本中TCR序列的原始分布,从而可以更准确地量化TCR克隆频率;(2)通过将标记有相同UMI的序列分成一组,进行一致性推算可以纠正PCR和测序错误。然而,这种准确性可能会以低敏感度为代价,因为稀有克隆可能会因为UMI的读取深度不同而被过滤掉^[37]。因此,应根据实验目的的不同来决定是否选用UMI技术。

3 TCR组库数据分析

目前,有多种计算和统计方法可用于数据分析,获得原始数据后第一步即将数据转换成表达矩阵的形式,如h5ad和loom等,之后通过质控得到过滤后的数据,即有意义的序列,质控的目的是为了去除不合格数据。然后,进行降维和聚类,通过注释得到人们熟知的基因。下一步是可视化免疫组库,包括克隆型丰度、多样性和V(D)J使用等^[38]。

虽然TCR结构的多样性使得对免疫系统的分析具有挑战性,但是将不同时间点不同组织内的TCR序列变化进行分析,即TCR组库动力学变化作为炎症性疾病或肿瘤的免疫检测指标,以及免疫治疗反应的生物标志物正成为近年研究热点,尤其在ICB疗法中具有重要参考价值。因此,出现了免疫组库可视化模型和统计相关的描述性指标,来估计组库的多样性等特征。

3.1 TCR多样性

在TCR组库中,多样性包含了克隆组成,即独特TCR序列的丰富度和每种序列的均匀度两方面含义^[39]。多数多样性指数源于信息论,用以量化生态系统的生物多样性。常用的指数有香农指数(Shannon index)、基尼-辛普森指数(Gini-Simpson index)、基尼系数(Gini coefficient)等。

香农指数大常意味着克隆丰富度高、分布越均匀,对低频读数较其他指数敏感。因此,低频读数的变化对香农指数的影响较大^[40]。与香农指数相比,基尼-辛普森指数强调高频读数,该指数高表明TCR克隆分布均匀,指数低表示TCR克隆富集^[39,41]。

3.2 克隆性(clonality)

衡量克隆性的常用指标是1-香农指数/生产性独特序列数量的对数,克隆性指数为0时,表示种群的多样性极高或整个T细胞群里不存在增殖情况;克隆性指数为1时,表示种群为单克隆性^[42]。

3.3 均匀度(evenness)

多样性均匀度50(diversity evenness 50, DE50)被认为是给定数据集中均匀度的指标。按照从高到

低的顺序汇总读取数量, DE50 表示在 50% 的帧内读取可以找到多少个独特的读取。低值表示高克隆性水平, 即细胞群内增殖活跃。均匀度 (Pielou) 指数是衡量均匀度的另一指标, 其意义与 DE50 相同; 1-Pielou 指数经常被用于衡量克隆性, 0 代表高度多样性且不同克隆型频率一致的种群, 1 代表单克隆种群; 1-Pielou 指数对寡克隆更敏感^[43]。

3.4 不均匀性(inequality)

基尼系数衡量序列频率分布的均匀性, 其取值在 0 和 1 之间, 0 表示所有克隆都具有相同的频率, 1 代表完全不平等, 表明样本的寡克隆性。该指数可用于衡量样本中不同克隆型之间频率分布的均匀情况^[44-45]。

3.5 重叠性(overlap measures)

重叠性即两组数据相似程度的度量, 常用 M-H 指数 (Morisita-Horn index) 和 Jaccard 指数。M-H 指数解释了两个组库之间共享的 TCR 数量及丰度, 取值在 0 和 1 之间; Jaccard 指数衡量组库之间的相似性, 定义为交集除以样本集并集, 它的范围也在 1 到 0 之间, 其中 1 表示完全重叠, 0 表示不重叠^[38-39]。

上述指标被广泛用于 TCR 组库分析。然而, 由于 TCR 组库高度多样性以及测序方法局限性, 一个基因库中克隆的频率分布及其丰富度在很大程度上是有偏差的, 因为只有一小部分基因库被分析, 导致采样不足, 重复采样是生成更具可比性数据的常用策略之一^[9]。

4 TCR 组库分析在 ICB 治疗中的应用

利用机体的免疫系统清除肿瘤细胞是进行免疫治疗的核心内容, 是目前肿瘤研究的热点。基于肿瘤细胞逃逸 T 细胞杀伤作用的机制, 开发了多种阻断免疫检查点重新激活 T 细胞活性的免疫治疗方法。针对细胞毒性 T 淋巴细胞相关蛋白 4 (cytotoxic T lymphocyte associated protein 4, CTLA4) 和 PD-1 的抑制剂已在多种肿瘤治疗中显示良好的疗效^[46]。尽管肿瘤免疫治疗进展迅速, 但是只有小部分肿瘤患者受益, 如基于 PD-1/PD-L1 的 ICB 疗法只对少数患者有效, 因此亟须特异的生物标志物筛选这一人群, 以便在肿瘤治疗前就能明确潜在的 ICB 治疗有效人群。

HAN 等^[42]研究发现, 基于 TCR 多样性指标的生物标志物可预测非小细胞肺癌患者对抗 PD-1 治疗的反应, 通过对 PD-1⁺CD8⁺ T 细胞的 TCR β 链的 CDR3 区用多重 PCR 法进行测序发现, ICB 治疗前 TCR 多样性指标香农指数高的患者无进展生存期 (PFS) 更长, ICB 治疗后 TCR 克隆性增加的患者 PFS 更高。

关于外周血中 TCR 多样性与抗 CTLA-4 治疗的

相关性尚无定论, 一些研究发现在 ICB 治疗前外周血 TCR 多样性高的患者生存期延长^[47]。在抗 CTLA-4 单一疗法中发现, 治疗前后 TCR 测序重叠性 M-H 指数偏低, 抗 CTLA-4 治疗促进 TCR 组库多样性指标香农指数增加, 这表明抗 CTLA-4 治疗可以促使新的 T 细胞克隆产生并促使 TCR 组库的更新; 而外周血中 TCR 多样性增加与免疫治疗相关不良反应有关, 其中可能也增加了导致免疫相关不良反应克隆, 是抗 CTLA-4 治疗常伴随自身免疫反应的副作用的原因之一^[48-49]。CHA 等^[50]通过对抗 CTLA-4 治疗的转移性前列腺癌患者和转移性黑色素瘤患者 TCR β 链测序发现, 总生存期 (OS) 的延长与在基线水平保持高频克隆有关, 相反, OS 缩短的患者, 其高频克隆随治疗而下降, 结果表明免疫治疗效果的提高与较少的克隆损失有关。

5 结语

免疫治疗对部分肿瘤患者有着积极的治疗效应, 如何筛选出对免疫治疗有效的患者是目前的研究热点。TCR 组库的动力学变化可作为生物标志物应用于肿瘤免疫治疗中, 对疗效监测和预后评估具有重要作用, 并有助于免疫治疗作用机制的深入研究。近年来, 随着测序技术的发展, 越来越多的方法可用于测量和评估 TCR 组库的多样性。但是, 由于缺少免疫组库分析的金标准, 因此需要谨慎使用不同的 TCR 检测方法。此外, 虽然深度测序增强了获取 TCR 多样性的能力, 但小体积采样可能引起 TCR 组库检测的偏离, 导致对总体多样性估计的不准确性, 从而限制了对 TCR 组库动力学变化的研究。未来, 需要开发合适的方法以准确评估 TCR 组库的真实多样性。因此, TCR 组库在肿瘤免疫治疗领域的应用前景与挑战并存。

[参考文献]

- [1] LIU H M, PAN W J, TANG C L, *et al.* The methods and advances of adaptive immune receptors repertoire sequencing[J/OL]. *Theranostics*, 2021, 11(18): 8945-8963[2022-05-04]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8419057/>. DOI:10.7150/thno.61390.
- [2] AVERSA I, MALANGA D, FIUME G, *et al.* Molecular T-cell repertoire analysis as source of prognostic and predictive biomarkers for checkpoint blockade immunotherapy[J/OL]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(7): E2378[2022-05-04]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7177412/>. DOI:10.3390/ijms21072378.
- [3] LAYDON D J, BANGHAM C R M, ASQUITH B. Estimating T-cell repertoire diversity: limitations of classical estimators and a new approach[J/OL]. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 2015, 370(1675): 20140291[2022-05-04]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26150657/>. DOI:10.1098/rstb.2014.0291.

- [4] KRUGER S, ILMER M, KOBOLD S, *et al.* Advances in cancer immunotherapy 2019 - latest trends[J/OL]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2019, 38(1): 268[2022-05-04]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6585101/>. DOI:10.1186/s13046-019-1266-0.
- [5] EARLMAN A H, HWANG M S, KONIG M F, *et al.* Targeting public neoantigens for cancer immunotherapy[J]. *Nat Cancer*, 2021, 2(5): 487-497. DOI:10.1038/s43018-021-00210-y.
- [6] TIAN G Y, LI M Q, LV G Y. Analysis of T-cell receptor repertoire in transplantation: fingerprint of T cell-mediated alloresponse [J/OL]. *Front Immunol*, 2022, 12: 778559[2022-05-04]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8790170/>. DOI: 10.3389/fimmu.2021.778559.
- [7] MURARO P A, ROBINS H, MALHOTRA S, *et al.* T cell repertoire following autologous stem cell transplantation for multiple sclerosis [J/OL]. *J Clin Invest*, 2014, 124(3): 1168-1172[2022-05-04]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3934160/>. DOI: 10.1172/JCI171691.
- [8] JOGLEKAR A V, LI G D. T cell antigen discovery[J]. *Nat Methods*, 2021, 18(8): 873-880. DOI:10.1038/s41592-020-0867-z.
- [9] ARSTILA T P, CASROUGE A, BARON V, *et al.* A direct estimate of the human alphabeta T cell receptor diversity[J]. *Science*, 1999, 286(5441): 958-961. DOI:10.1126/science.286.5441.958.
- [10] DAVIS M M, BJORKMAN P J. T-cell antigen receptor genes and T-cell recognition[J]. *Nature*, 1988, 334(6181): 395-402. DOI: 10.1038/334395a0.
- [11] SZETO C, LOBOS C A, NGUYEN A T, *et al.* TCR recognition of peptide-MHC- I : rule makers and breakers[J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 22(1): 68. DOI:10.3390/ijms22010068.
- [12] LANZAROTTI E, MARCATILI P, NIELSEN M. T-cell receptor cognate target prediction based on paired α and β chain sequence and structural CDR loop similarities[J/OL]. *Front Immunol*, 2019, 10: 2080[2022-05-04]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6724566/>. DOI:10.3389/fimmu.2019.02080.
- [13] PASETTO A, LU Y C. Single-cell TCR and transcriptome analysis: an indispensable tool for studying T-cell biology and cancer immunotherapy[J/OL]. *Front Immunol*, 2021, 12: 689091[2022-05-04]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34163487/>. DOI: 10.3389/fimmu.2021.689091.
- [14] ROSATI E, DOWDS C M, LIASKOU E, *et al.* Overview of methodologies for T-cell receptor repertoire analysis[J/OL]. *BMC Biotechnol*, 2017, 17(1): 61[2022-05-04]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5504616/>. DOI:10.1186/s12896-017-0379-9.
- [15] WU J H, WANG X, LIN L Y, *et al.* Developing an unbiased multiplex PCR system to enrich the *TRB* repertoire toward accurate detection in leukemia[J/OL]. *Front Immunol*, 2020, 11: 1631[2022-05-04]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7423970/>. DOI:10.3389/fimmu.2020.01631.
- [16] CARLSON C S, EMERSON R O, SHERWOOD A M, *et al.* Using synthetic templates to design an unbiased multiplex PCR assay [J/OL]. *Nat Commun*, 2013, 4: 2680[2022-05-04]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24157944/>. DOI:10.1038/ncomms3680.
- [17] FÜRST D, TSAMADOU C, NEUCHEL C, *et al.* Next-generation sequencing technologies in blood group typing[J/OL]. *Transfus Med Hemother*, 2020, 47(1): 4-13[2022-05-04]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7036580/>. DOI:10.1159/000504765.
- [18] LIN Y H, HUNG S J, CHEN Y L, *et al.* Dissecting efficiency of a 5' rapid amplification of cDNA ends (5'-RACE) approach for profiling T-cell receptor beta repertoire[J/OL]. *PLoS One*, 2020, 15(7): e0236366[2022-05-04]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7377388/>. DOI:10.1371/journal.pone.0236366.
- [19] LINNEMANN C, HEEMSKERK B, KVISTBORG P, *et al.* High-throughput identification of antigen-specific TCRs by TCR gene capture[J]. *Nat Med*, 2013, 19(11): 1534-1541. DOI: 10.1038/nm.3359.
- [20] CAVAGNA R, GUINEA MONTALVO M L, TOSI M, *et al.* Capture-based next-generation sequencing improves the identification of immunoglobulin/T-cell receptor clonal markers and gene mutations in adult acute lymphoblastic leukemia patients lacking molecular probes [J/OL]. *Cancers (Basel)*, 2020, 12(6): E1505[2022-05-04]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7352935/>. DOI: 10.3390/cancers12061505.
- [21] HOWIE B, SHERWOOD A M, BERKEBILE A D, *et al.* High-throughput pairing of T cell receptor α and β sequences[J]. *Sci Transl Med*, 2015, 7(301): 301ra131. DOI: 10.1126/scitranslmed.aac5624.
- [22] CROSSLEY B M, BAI J F, GLASER A, *et al.* Guidelines for Sanger sequencing and molecular assay monitoring[J/OL]. *J Vet Diagn Invest*, 2020, 32(6): 767-775[2022-05-04]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7649556/>. DOI:10.1177/1040638720905833.
- [23] PAI J A, SATPATHY A T. High-throughput and single-cell T cell receptor sequencing technologies[J]. *Nat Methods*, 2021, 18(8): 881-892. DOI:10.1038/s41592-021-01201-8.
- [24] DASH P, MCCLAREN J L, OGUIN T H 3rd, *et al.* Paired analysis of TCR α and TCR β chains at the single-cell level in mice[J/OL]. *J Clin Invest*, 2011, 121(1): 288-295[2022-05-04]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3007160/>. DOI:10.1172/JCI44752.
- [25] SCHOBER K, VOIT F, GRASSMANN S, *et al.* Reverse TCR repertoire evolution toward dominant low-affinity clones during chronic CMV infection[J]. *Nat Immunol*, 2020, 21(4): 434-441. DOI:10.1038/s41590-020-0628-2.
- [26] HAN A, GLANVILLE J, HANSMANN L, *et al.* Linking T-cell receptor sequence to functional phenotype at the single-cell level [J/OL]. *Nat Biotechnol*, 2014, 32(7): 684-692[2022-05-04]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4337815/>. DOI: 10.1038/nbt.2938.
- [27] SPINDLER M J, NELSON A L, WAGNER E K, *et al.* Massively parallel interrogation and mining of natively paired human TCR $\alpha\beta$ repertoires[J/OL]. *Nat Biotechnol*, 2020, 38(5): 609-619[2022-05-04]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7224336/>. DOI:10.1038/s41587-020-0438-y.
- [28] LI X M, WANG C Y. From bulk, single-cell to spatial RNA sequencing[J]. *Int J Oral Sci*, 2021, 13(1): 36. DOI:10.1038/s41368-021-00146-0.
- [29] RIZZETTO S, KOPPSTEIN D N P, SAMIR J, *et al.* B-cell receptor reconstruction from single-cell RNA-seq with VDJPuzzle[J]. *Bioinformatics*, 2018, 34(16): 2846-2847. DOI:10.1093/bioinformatics/bty203.
- [30] STUBBINGTON M J T, LÖNNBERG T, PROSERPIO V, *et al.* T cell fate and clonality inference from single-cell transcriptomes[J]. *Nat Methods*, 2016, 13(4): 329-332. DOI:10.1038/nmeth.3800.

- [31] TU A A, GIERAHN T M, MONIAN B, *et al.* TCR sequencing paired with massively parallel 3' RNA-seq reveals clonotypic T cell signatures[J/OL]. *Nat Immunol*, 2019, 20(12): 1692-1699[2022-05-04]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7528220/>. DOI:10.1038/s41590-019-0544-5.
- [32] YOST K E, SATPATHY A T, WELLS D K, *et al.* Clonal replacement of tumor-specific T cells following PD-1 blockade[J/OL]. *Nat Med*, 2019, 25(8): 1251-1259[2022-05-04]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6689255/>. DOI:10.1038/s41591-019-0522-3.
- [33] YOST K E, CHANG H Y, SATPATHY A T. Recruiting T cells in cancer immunotherapy[J]. *Science*, 2021, 372(6538): 130-131. DOI: 10.1126/science.abd1329.
- [34] 王琦, 蒋敬庭. 免疫细胞单细胞测序对肿瘤免疫治疗疗效预测的意义[J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2022, 29(5): 472-477. DOI 10.3872/j.issn.1007-385x.2022.05.012.
- [35] ZHU T, LIAO K Y, ZHOU R F, *et al.* ATAC-seq with unique molecular identifiers improves quantification and footprinting[J/OL]. *Commun Biol*, 2020, 3(1): 675[2022-05-04]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7666144/>. DOI:10.1038/s42003-020-01403-4.
- [36] YOU Y, TIAN L Y, SU S A, *et al.* Benchmarking UMI-based single-cell RNA-seq preprocessing workflows[J/OL]. *Genome Biol*, 2021, 22(1): 339[2022-05-04]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8672463/>. DOI:10.1186/s13059-021-02552-3.
- [37] BARENNE P, QUINIOU V, SHUGAY M, *et al.* Benchmarking of T cell receptor repertoire profiling methods reveals large systematic biases[J]. *Nat Biotechnol*, 2021, 39(2): 236-245. DOI: 10.1038/s41587-020-0656-3.
- [38] ARUNKUMAR M, ZIELINSKI C E. T-cell receptor repertoire analysis with computational tools-an immunologist's perspective[J]. *Cells*, 2021, 10(12): 3582. DOI:10.3390/cells10123582.
- [39] CHIFFELLE J, GENOLET R, PEREZ M A, *et al.* T-cell repertoire analysis and metrics of diversity and clonality[J]. *Curr Opin Biotechnol*, 2020, 65: 284-295. DOI:10.1016/j.copbio.2020.07.010.
- [40] CHAARA W, GONZALEZ-TORT A, FLOREZ L M, *et al.* RepSeq data representativeness and robustness assessment by Shannon entropy[J/OL]. *Front Immunol*, 2018, 9: 1038[2022-05-04]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5962720/>. DOI: 10.3389/fimmu.2018.01038.
- [41] XU S, BÖTTCHER L, CHOU T. Diversity in biology: definitions, quantification and models[J]. *Phys Biol*, 2020, 17(3): 031001. DOI: 10.1088/1478-3975/ab6754.
- [42] HAN J F, DUAN J C, BAI H, *et al.* TCR repertoire diversity of peripheral PD-1⁺CD8⁺ T cells predicts clinical outcomes after immunotherapy in patients with non-small cell lung cancer[J]. *Cancer Immunol Res*, 2020, 8(1): 146-154. DOI:10.1158/2326-6066.CIR-19-0398.
- [43] POSTOW M A, MANUEL M, WONG P, *et al.* Peripheral T cell receptor diversity is associated with clinical outcomes following ipilimumab treatment in metastatic melanoma[J/OL]. *J Immunother Cancer*, 2015, 3: 23[2022-05-04]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4469400/>. DOI:10.1186/s40425-015-0070-4.
- [44] HOGAN S A, COURTIER A, CHENG P F, *et al.* Peripheral blood TCR repertoire profiling may facilitate patient stratification for immunotherapy against melanoma[J]. *Cancer Immunol Res*, 2019, 7(1): 77-85. DOI:10.1158/2326-6066.CIR-18-0136.
- [45] ABELES J, CONWAY D J. The Gini coefficient as a useful measure of malaria inequality among populations[J]. *Malar J*, 2020, 19(1): 444. DOI:10.1186/s12936-020-03489-x.
- [46] LIU J N, KONG X S, HUANG T, *et al.* Clinical implications of aberrant PD-1 and CTLA4 expression for cancer immunity and prognosis: a pan-cancer study[J/OL]. *Front Immunol*, 2020, 11: 2048[2022-05-04]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7539667/>. DOI:10.3389/fimmu.2020.02048.
- [47] HOPKINS A C, YARCHOAN M, DURHAM J N, *et al.* T cell receptor repertoire features associated with survival in immunotherapy-treated pancreatic ductal adenocarcinoma[J/OL]. *JCI Insight*, 2018, 3(13): 122092[2022-05-04]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6124515/>. DOI:10.1172/jci.insight.122092.
- [48] ROBERT L, TSOI J, WANG X Y, *et al.* CTLA4 blockade broadens the peripheral T-cell receptor repertoire[J/OL]. *Clin Cancer Res*, 2014, 20(9): 2424-2432[2022-05-04]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4008652/>. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-13-2648.
- [49] 白日兰, 崔久嵬. 免疫检查点抑制剂治疗相关不良反应——新探索、新挑战[J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2021, 28(5): 419-430. DOI:10.3872/j.issn.1007-385x.2021.05.001.
- [50] CHA E, KLINGER M, HOU Y F, *et al.* Improved survival with T cell clonotype stability after anti-CTLA-4 treatment in cancer patients[J/OL]. *Sci Transl Med*, 2014, 6(238): 238ra70[2022-05-04]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4558099/>. DOI:10.1126/scitranslmed.3008211.

[收稿日期] 2022-05-05

[修回日期] 2022-08-30

[本文编辑] 党瑞山