论著

文章编号:1000-5404(2005)03-0230-04

# RDP1258对人外周血单核细胞增殖能力及HO-1活性的影响

易善红[1],宋 波[2],汪泽厚[3] (第三军医大学:[1]新桥医院泌尿外科,全军肾脏病中心,重庆 400037,[2]西南医院全军泌尿外科中心,重庆 400038;[3]解放军空军总医院泌尿外科,北京 100036)

**提 要:目的** 观察一种新型HLA衍生肽(RDP1258)针对人外周血单核细胞由丝裂原以及同种异体抗原刺激导致的增殖能力的影响,并探讨其机制。**方法** 人工固相合成RDP1258,$^3$H-TdR掺入法观察其在体外对人外周单核细胞增殖反应的影响,以酶化学法观察其对淋巴细胞血红素氧合酶-1(heme oxygenase-1, HO-1)活性的影响。**结果** RDP1258可显著抑制人外周血单核细胞的转化及MLR增殖反应;该肽体外降低HO-1活性呈现出剂量依赖性。**结论** RDP1258能够显著抑制人外周单核细胞经丝裂原或同种抗原刺激引起的增殖反应,这种作用可能是通过影响HO-1活性而达到的。

**关键词**:HLA衍生肽;混合淋巴细胞反应;血红素氧合酶-1

**中图法分类号**:R329.28; R331.14; R341.6 **文献标识码**:A

# Effects of RDP1258 on proliferation and heme oxygenase-1 activities of human peripheral blood mononuclear cells

YI Shan-hong[1], SONG Bo[2], WANG Ze-hou[1] ([1]Department of Urology, Xinqiao Hospital, Chongqing 400037, [2]Urology Research Center, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038; [3]Department of Urology, General Hospital of Air Force of PLA, Beijing 100036, China)

**Abstract: Objective** To observe the effects of a novel HLA-derived peptide, RDP1258, on the human peripheral blood mononuclear cell (PBMC) proliferation to ConA and MLR, and to investigate the mechanisms. **Methods** Peptide RDP1258 was chemically synthesized. The effects of the peptide on alloreactive cytotoxic activities of human PBMCs were observed using $^3$H-TdR incorporation method. RDP1258, HLA-B2702.75-84, and control peptide were administrated respectively in every experiment. The activity of heme oxygenase-1 (HO-1) was analyzed by the enzymochemical method. **Results** The results showed that the synthetic HLA-derived peptide could obviously inhibit the proliferation of human PBMCs and inhibited HO activity in a dose-dependent manner *in vitro*. **Conclusion** HO-1 might participate in the inhibitory effect of RDP1258 on the proliferation of human PBMCs induced by mitogen and isoantigen.

**Key words**: HLA-derived peptide; mixed leukocyte reaction; heme oxygenase-1

诱导供体特异性免疫耐受是解决同种异体器官移植排斥反映问题的理想方法。当前研究表明HLAⅠ类分子的特定序列,尤其是α1区的重链序列衍生的多肽具有临床上重要的免疫调节功能。汪泽厚等[1]研究发现,对应于HLA-B2702链的75-84合成多肽可显著抑制CTL的细胞毒功能,且延长了小鼠移植心肌的存活时间。器官移植动物实验表明,HLA衍生肽2702.75-84在联合应用亚临床剂量的环孢素A时能够延长同种移植物的存活期,诱导移植免疫耐受[2,3]。尽管HLAⅠ类分子衍生肽已经显示出了较好的免疫调节作用,但现有的衍生肽疗效仍不令人满意,因此优化筛选新型HLAⅠ类衍生肽是该研究领域的突破点。最近研究表明,通过计算机辅助设计的HLAⅠ类分子B2702.75-84的类似物——RDP1258具有更加显著的免疫调节活性,且具备体内空间结构稳定、降解速度慢等特点,可望成为预防和治疗移植排斥反应的新型药物[4]。因此,本研究观察了一种经微机分子模拟设计的新型HLA衍生肽,在体外对人外周血单核细胞增殖功能的影响以及对细胞HO-1酶活性的作用。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

RPMI1640及胎牛血清为Gibco公司产品;丝裂霉素C为日本协和发酵工业株氏会社产品,$^3$H-TdR为上海原子核研究所

基金项目:国家新药基金资助项目(9690105184)
Supported by the National Fund for New Drug Development (9690105184)

作者简介:易善红(1970-),男,河南省息县人,博士,主治医师,讲师,主要从事肿瘤防治生物学治疗及器官移植免疫耐受方面的研究。电话:(023)68774624

收稿日期:2004-09-17;修回日期:2004-12-20

生产。Hemin(血晶素)、ConA(刀豆素 A)为 Sigma 公司产品；还原性辅酶Ⅱ为美国 BM 公司产品。无关对照肽(control peptide，CP)序列为：FLWGPRALI，由全军免疫学研究所吴玉章教授惠赠。

### 1.2　HLA 衍生肽的合成

RDP1258 的氨基酸序列：RNleNleNleRNleNleNleGY（Nle 为异亮氨酸)；HLA-B2702.75-84 的序列：RENLRIALRY。在固相多肽合成仪法上采用标准 Fmoc 方案合成。起始选用 0.25 mmol/L HMP 树脂，按照所设计多肽序列使肽链逐个从羧基端(C 端)向氨基端(N 端)延伸合成。多肽合成结束后加入 10 ml 切割液(含 EDT 0.25 ml，TFA 9.5 ml，去离子水 0.25 ml)，混匀后室温反应 90 min，将多肽从树脂上裂解下来，同时去除氨基酸的侧链保护性集团。G4 玻砂漏斗过滤去除树脂，乙醚沉淀得到粗肽产物。合成肽使用 waters 600 HPLC 仪 $C_{18}$ 柱进行纯化，流动相为 1‰三氟乙酸(TFA)水溶液/1‰TFA 乙腈水溶液。纯度 > 95%时，低温冷冻干燥后，－20 ℃保存备用。

### 1.3　人外周血单核细胞悬液的制备

取健康献血员肝素抗凝外周血 10 ml，Ficoll-Hypaque 法分离单核细胞，$NH_4Cl$-Tris 液裂解红细胞，1 000 r/min，4 ℃，离心 10 min，用无血清 RPMI1640 漂洗细胞悬液 2 次，后以含 20%胎牛血清的 RPMI1640 培养液重悬，调整细胞密度为 $1\times10^9$/L。

### 1.4　淋巴细胞转化实验

将分离的淋巴细胞悬于含 20%胎牛血清 RPMI1640 培养液，调整细胞浓度($1\times10^9$/L)后加入 96 孔细胞培养板，每孔含 200 μl 淋巴细胞液悬液，设 3 复孔，内含最适 ConA 浓度(5.0 mg/L)及不同浓度的 RDP1258、HLA-B2702.75-84 及对照肽，5% $CO_2$、37 ℃培养箱中培养 48 h，终止培养前 12 h，每孔加 $^3$H-TdR $3.7\times10^{10}$ Bq。液闪计数仪测定 Bq 值(脉冲数/min)。

### 1.5　单向混合淋巴细胞反应(MLR)

分离人外周血单核细胞，以丝裂霉素 C(浓度 25 mg/L)处理细胞悬液，37 ℃培养 30 min，作为刺激细胞。与反应细胞按1∶1比例混合，两者浓度均为 $1\times10^9$/L，混匀后加入 96 孔培养板，每孔 200 μl，加入不同浓度的 RDP1258、HLA-B2702.75-84 及对照肽。37 ℃培养 120 h，终止前 16 h，每孔加 $^3$H-TdR $3.7\times10^{10}$ Bq。液闪计数仪测定 Bq 值。

### 1.6　HO-1 活性测定

据 HO-1 降解血红素生成胆红素的原理，测定样品反应物中胆红素生成量代表 HO-1 活性。取人外周单核细胞以 0.4 mol $KH_2PO_4$ 冷缓冲液(pH 7.4)重悬，匀浆后低温(4 ℃)、高速离心 15 min (15 000 r/min)，去除脂层，收集上清液。－70 ℃保存的淋巴细胞匀浆上清液 20 μl，加入 4.5 mmol NADPH 40 μl，肝组织匀浆上清液 20 μl(作为胆绿素还原酶的来源)、0.1 mol $KH_2PO_4$ 冷缓冲液(pH 7.4)1.8 ml，最后加入 2 mmol Hemin 40 μl，置 37 ℃暗处 30 min，将反应物棕色小瓶置于冰上以终止反应。以不含 NADPH 的样品作空白对照，在分光光度计上用 463 nm 和 530 nm 双波长测定胆红素生成量(胆红素摩尔吸光系数为 40 $nm^{-1}\cdot cm^{-1}$)。

### 1.7　统计学处理

计数资料用 $\chi^2$ 检验；计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示，进行方差分析和 $t$ 检验。采用本校数学教研室数理统计程序包(SPMR)处理。

## 2　结果

### 2.1　HLA 衍生肽对人外周单核细胞转化能力的影响

RDP1258、HLA-B2702.75-84 对由 ConA 引起的淋巴细胞转化能力具有抑制作用，无关对照肽则没有影响。RDP1258 衍生肽的抑制作用较强，与 HLA-B2702.75-84 比较，相差显著($P<0.05$)。20 mg/L 时 RDP1258 的抑制作用最强，见图 1。

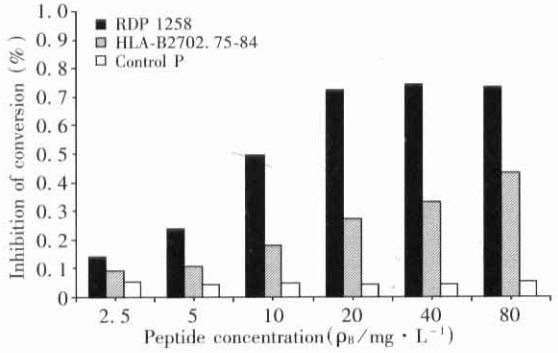



**图 1　RDP1258 对体外人外周血单核细胞转化能力的影响**

**Fig 1　Effects of RDP1258 on $^3$H-TdR incorporation of PBMC transformation *in vitro***

### 2.2　HLA 衍生肽对人外周单核细胞 MLR 的影响

RDP1258 具有较明显的体外 HO-1 抑制作用，呈剂量依赖性，与对照肽相比，相差显著($P<0.01$)。RDP1258 的半数抑制浓度约 40 mg/L。HLA-B2702.75-84 衍生肽的体外 HO-1 抑制作用较 RDP1258 弱，二者相差显著($P<0.05$)，见表 1。

### 2.3　合成 HLA 衍生肽对淋巴细胞内 HO-1 活性的影响

RDP1258 具有较明显的体外 HO-1 抑制作用，呈剂量依赖性，与对照肽相比，相差显著($P<0.01$)。RDP1258 的半数抑制浓度约 20 mg/L。HLA-B2702.75-84 衍生肽的体外 HO-1 抑制作用较 RDP1258 弱，二者相差显著($P<0.05$)，见图 2。

**表 1　RDP1258 对 MLR $^3$H-TdR 掺入值的影响($\bar{x}\pm s$)**

**Tab 1　Effects of RDP1258 on $^3$H-TdR incorporation of MLR of PBMCs *in vitro* ($\bar{x}\pm s$)**

| Groups | Concentration (mg/L) | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | 0 | 10 | 20 | 40 | 80 | 160 |
| RDP1258 | 22 177 ± 1 317 | 7 155 ± 818 | 2 585 ± 431 #* | 984 ± 352 #* | 877 ± 205 #* | 944 ± 181 #* |
| HLA-B2702.75-84 | 25 895 ± 1 334 | 17 713 ± 1 256 | 13 584 ± 957 | 7 524 ± 1 021 | 3 931 ± 595 | 2 743 ± 2 78 |
| Control peptide | 22 348 ± 1 235 | 20 712 ± 1 453 | 22 541 ± 1 245 | 22 357 ± 1 487 | 23 419 ± 1 154 | 21 731 ± 1 365 |

#：$P<0.01$，*vs* control peptide；*：$P<0.05$，*vs* HLA-B2702.75-84

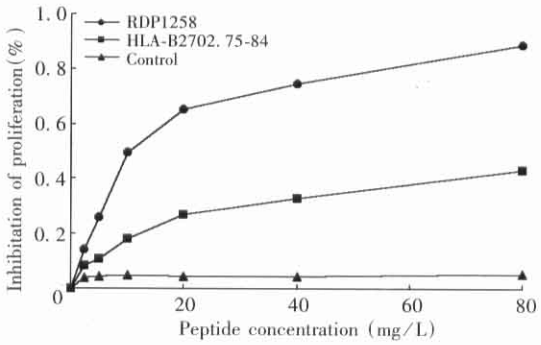



**图2 RDP1258对体外HO-1酶活性的作用**

**Fig 2 Effects of RDP1258 on HO-1 activity *in vitro***

## 3 讨论

引起移植免疫应答的抗原称为移植抗原，又称组织相容性抗原。主要组织相容性抗原是引起移植排斥的主要抗原。人的主要组织相容性抗原为人类白细胞抗原(human leukocyte antigen, HLA)，即组织相容性白细胞抗原。它是一组淋巴细胞表面蛋白分子，参与细胞间的相互识别和免疫反应等许多重要功能，是诱导同种组织器官移植排斥反应的主要抗原。编码HLA分子的基因在人类是位于第6号染色体短臂(6p21.3)，具有高度多态性，分别编码HLAⅠ、Ⅱ、Ⅲ类分子。

动物和临床研究已证实，器官移植受体抗原呈递细胞所呈递的供者HLA肽段较为单一，即受体的同种抗原特异性T细胞仅识别供体的少数几个主要HLA分子表位。这就有可能利用人工合成的特定HLA肽段，阻断受体对移植器官的抗原呈递，防止排斥反应的发生或诱导免疫耐受。1987年Parham等[5]首次用序列比较和单克隆抗体对HLA肽一定区域的反应性等方法确定了起主要作用的HLA-α2氨基酸区域，用人工合成相当于α2区域的肽能抑制CTL的溶破效应，诱导受者产生抗原特异性免疫耐受。在体外HLA-B2702.75-84衍生肽能抑制淋巴细胞由丝裂原或同种抗原引起的增殖反应和CTL前体细胞分化，并能抑制CTL对靶细胞的溶破作用[6]。

本试验中所用HLA衍生肽RDP1258与HLA-B2702.75-84衍生肽同源，该多肽是Grassy等[7]采用计算机分子模拟技术分析该同源十肽链库中各肽的静电学、动力学、及三维结构的结果，结合大鼠心脏移植模型的筛选而得到。本试验中采用固相合成法，利用Fmoc标准方案，在固相多肽合成仪上合成多肽RDP1258以及前导肽HLA-B2702.75-84，质谱分析序列正确，纯度高。文献[8]早前于体外大鼠脾细胞淋转及MLR发现，RDP1258肽具有较强的免疫抑制作用。本研究表明，应用于体外淋转及MLR试验中该肽能够抑制人外周血淋巴细胞由丝裂原或同种抗原引起的增殖反应，具有较强的免疫抑制作用，呈现出明显的剂量依赖性。与HLA-B2702.75-84衍生肽相比较，RDP1258的效价提高了8倍以上。

采用亲和层析法研究表明，HLA衍生肽的作用机制可能与血红素氧合酶-1(heme oxygenase-1, HO-1)有关[9]。研究中显示，具有较好的诱导器官移植免疫耐受的HLA衍生肽均具有很好的体外HO-1酶活性抑制作用。本试验中显示HLA衍生肽RDP1258具有较强的体外抑制人外周单核细胞HO-1活性的作用，且呈现出剂量依赖性，同MLR试验中观察到的剂量依赖性相似，进一步表明HLA衍生肽是通过影响细胞内血红素氧合酶-1的活性，进而通过某种途径达到免疫抑制的结果。

HO-1是催化降解血红素蛋白的微粒体酶系统，血红素分子既作为HO-1的底物又构成该酶活性的辅基。HO-1是在应激状态下细胞免受损伤的保护机制中的主要因素，现阶段的研究显示其亦具有较强的免疫调节功能[10]。HO-1的细胞保护作用及免疫调节功能应当归结于对血红素蛋白的降解及其降解产物(包括胆绿素、CO和游离铁)的病理生理作用。作为一种细胞内的气体介质，一氧化碳以及血红素本身均能够影响NO合成酶的活性，进而调节NO(一种参与到炎症发生和免疫反应的重要效应分子)的产生[11]。$Fe^{2+}$也是一种有效的氧化剂，它通过结合铁蛋白，而抑制可能产生的氧化应激。体外试验证明，胆绿素具有较强的抗氧化作用和补体抑制作用。而且胆绿素还原成胆红素后，后者同样具有重要作用。胆红素在正常血清浓度时，是一种很强的内源性抗氧化剂。另有实验证明，体内胆红素在发挥抗氧化作用的同时，可降低机体的免疫应答。有作者认为，胆绿素还原成胆红素后，后者具有重要的抗氧化作用，胆红素能够抑制丝裂原和同种抗原引起的淋巴细胞的增殖反应、IL-2的产生、以及NK细胞介导的细胞毒作用[12]。另外，在临床黄疸及肝衰患者中，能够观察到胆红素淤积造成的这种免疫力低下的临床表现。因此，胆红素是否具有潜在的免疫抑制作用，将会成为以后研究的方向。

当前，HO-1与器官移植的相关研究已经有所报道。Woo等[13]采用HO-1酶激动剂CoPP处理大鼠后，大鼠体内HO-1活性增加，同时观察到包括淋巴细胞增殖能力、NK及CTL细胞杀伤活性等多方面的免疫抑制现象，并显著延长大鼠移植心脏的存活时间。最近有研究采用HO-1基因转移的方法，降低了CD95/Fas介导的细胞凋亡，进而产生大鼠肝移植的移植免疫耐受[14]。由此可以看出，HLA衍生肽的免疫抑制作用机制，尤其是HO-1酶活性的改变对淋巴细胞功能的影

响机制仍不是十分清楚，有待进一步的研究。

## 参考文献：


[1] 汪泽厚，崔志刚，朱锡华，等. 合成组织相容性抗原衍生肽延长小鼠移植心肌存活时间的实验研究[J]. 肾脏病与透析肾移植杂志，2002，11(4)：333－336.

[2] Nisco S, Vriens P, Hoyt G, *et al*. Induction of allograft tolerance in rats by an HLA class-I-derived peptide and cyclosporine A[J]. J Immunol, 1994, 152(8): 3786－3792.

[3] Hanaway M J, Geissler E K, Wang J, *et al*. Immunosuppressive effects of an HLA class I-derived peptide in a rat cardiac allograft model[J]. Transplantation, 1996, 61(8): 1222－1228.

[4] Cuturi M C, Christoph F, Woo J, *et al*. RDP1258, a new retionally designed immunosuppressive peptide, prolongs allograft survival in rats analysis of its mechanism of action [J]. Mol Med, 1999, 5(12): 820－832.

[5] Parham P, Clayberger C, Zorn S L, *et al*. Inhibition of alloreactive cytotoxic T lymphocytes by peptides from the α2 domain of HLA-A2 [J]. Nature, 1987, 325(6105): 625－628.

[6] Giral M, Cuturi M C, Nguyen J M, *et al*. Decreased cytotoxic activity of natural killer cells in kidney allograft recipients treated with human HLA-derived peptide [J]. Transplantation, 1997, 63(7): 1004－1011.

[7] Grassy G, Calas B, Yasri A, *et al*. Computer-assisted rational design of immunosuppressive compounds [J]. Nat Biotechnol, 1998, 16(8): 748－752.

[8] 易善红，宋　波，汪泽厚，等. HLA 衍生肽对大鼠脾细胞增殖功能及 HO-1 活性的影响[J]. 第三军医大学学报，2004，26(4)：314－316.

[9] Iyer S, Woo J, Cornejo M C, *et al*. Characterization and biological significance of immunosuppressive peptide D2702.75-84(E→V) binding protein: Isolation of heme oxygenase-1[J]. J Biol Chem, 1998, 273(5): 2692－2697.

[10] Coito A, Shaw G, Li J, *et al*. Selectin-mediated interactions regulate cytokine networks and macrophage heme oxygenase-1 induction in cardiac allograft recipients[J]. Lab Invest, 2002, 82 (1): 61－70.

[11] Katori M, Busuttil R W, Kupiec Weglinski J W. Heme oxygenase-1 system in organ transplantation [J]. Transplantation, 2002, 74(7): 905－912.

[12] Haga Y, Tempero M A, Zetterman R K. Unconjugated bilirubin inhibits *in vitro* major histocompatibility complex-unrestricted cytotoxicity of human lymphocytes[J]. Biochim Biophys Acta, 1996, 1316(1): 29－34.

[13] Woo J, Iyer S, Cornejo M C, *et al*. Stress protein-induced immunosuppression: inhibition of cellular immune effector functions following overexpression of haem oxygenase (HSP 32) [J]. Transpl Immunol, 1998, 6(2): 84－93.

[14] Ke B, Buelow R, Shen X D, *et al*. Heme oxygenase-1 gene transfer prevents CD95/Fas ligand-mediated apoptosis and improves liver allograft survival *via* carbon monoxide signaling pathway [J]. Hum Gene Ther, 2002, 13(4): 1189－1199.


（编辑　龙　亮）

（上接 226 页）

酸氧化 20 min，蒸馏水洗，浸入六胺银工作液 1.5 h 左右(加温 62 ℃)，显微镜下观察基底膜染成深棕色为止，迅速入蒸馏水洗 3 次，0.2% 氯化金调色 2 min，蒸馏水洗，核固红染色 15 min，1% 磷钨酸分色 2 min，无水乙醇快速脱水，透明，封片。

### 1.3　试剂配制

1.3.1　六胺银工作液　　3% 六次甲基四胺水溶液 20 ml，3% 硼砂(四硼酸钠) 4 ml，将两液混合后依次加入 5% 硝酸银 10 ml，重蒸馏水 16 ml(用前配制，不重复使用)。

1.3.2　核固红溶液　　核固红 0.2 g，硫酸铝 5 g，蒸馏水 100 ml，将硫酸铝溶于蒸馏水加入核固红染料煮沸，冷却后，用前过滤。

1.3.3　磷钨酸试剂　　磷钨酸 1 g，溶于 95% 乙醇 100 ml。

## 2　结果

显微镜下可见肾小球和肾小管的基底膜呈清晰的黑色，胞核着红色，尿酸盐沉积于肾间质和肾小管内为团块或者放射状堆积呈黑色。可见肾小管上皮细胞有尿酸盐的沉积现象，表现为肾小管上皮细胞管腔面呈黑色，肾间质部分区域有嗜银纤维出现。

## 3　讨论

传统的尿酸盐显示法不能清晰地观察肾组织病变的细微变化，本法在显示尿酸盐沉积肾组织中的部位能够准确定位和定量比上述几种方法有优越性，显微镜下尿酸盐沉积在肾小管或肾间质中，一目了然。这是上述几种尿酸盐显示方法所不能达到的效果。

六胺银染色尿酸盐的作用机制：六胺银染色液化学性质比较稳定，硝酸银和硼酸盐都具有不被氧化亦不受还原的化学性质[1]，六次甲基四胺与硝酸银作用生成胺银络离子，加入硼酸盐后 H⁺ 增加，胺银络离子被破坏使银离子又回到溶液中。肾组织经高碘酸氧化后暴露出肾基膜上的醛基吸附银沉淀使肾基膜呈黑色，肾组织中的尿酸钠盐的钠离子被六胺银溶液中的银离子所置换为金属银而呈黑色。尿酸盐为针或团块状易与肾组织其它成份区别。也可根据尿酸盐的特性判断，尿酸盐具有在强日光下还原硝酸银的能力(呈玫瑰红色)[2]。在六胺银溶液的配制中硼酸盐的浓度要适当，硝酸银与硼酸盐的稀溶液生成棕色氧化银沉淀[1]。染液中硼酸盐的浓度较低时形成的银沉淀少着色较慢，颜色较均匀。硼酸盐的浓度较高则形成的银沉淀较多着色较快，且不均匀。六胺银染色试剂中六次甲基四胺、四硼酸钠、硝酸银的比例要适当，否则产生过量的胺银颗粒在组织浸染中形成黑色颗粒，严重影响组织病变的观察。其次在配制试剂和染色过程中避免与金属物质接触，一般在染色缸外观察切片染成深棕色时，取出蒸馏水洗后显微镜下观察，不需更换新染色液。

关键词：肾脏；六胺银；尿酸盐

中图法分类号：R446　　文献标识码：B

## 参考文献：


[1] 陈寿椿，唐春元，于肇德. 重要无机化学反应[M]. 第 3 版. 上海：上海科学技术出版社，1994. 1455.

[2] 刘奈昂，严汉汉，路英杰. 病理组织染色的理论方法和应用[M]. 北京：人民卫生出版社，1983. 125－126.


（编辑　薛国文）