论著

文章编号:1000-5404(2005)17-1748-04

RDP1258免疫调节功能在大鼠体内实验研究

易善红[1],宋 波[2],叶 钢[1],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)的体内免疫抑制功能并探讨其机制。**方法** 人工固相合成HLA衍生肽(RDP1258),以^{3}H-TdR法观察其在体内对大鼠脾细胞增殖反应的影响;与HO-1酶活性激动剂HEMIN及拮抗剂ZNPP相对比,采用酶化学法及免疫组化方法观察其对体内脾细胞血红素氧合酶-1(heme oxygenase-1, HO-1)活性的影响。**结果** RDP1258体内应用可显著抑制淋巴细胞转化及MLR的增殖反应;该肽能够明显提高体内HO-1活性,并增强HO-1的表达。**结论** RDP1258体内应用能够显著抑制大鼠脾细胞由丝裂原或同种抗原引起的增殖反应,这种作用可能是通过影响HO-1活性而达到的。

关键词: RDP1258;HLA衍生肽;混合淋巴细胞反应;血红素氧化酶-1

中图法分类号: Q516; R392.1 **文献标识码:** A

Study of the immunomodulatory effect of RDP1258 *in vivo*

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

Abstract: Objective To observe the immunosuppressive function of a novel HLA-derived peptide, RDP1258, and to investigate the mechanisms *in vivo*. **Methods** A peptide derived from HLA, RDP1258, was chemically synthesized. The effects of the peptide on alloreactive cytotoxic activities of rat spleen cells *in vivo* were observed using ^{3}H-TDR method. As compared with the HO-1 inducer hemin and the HO-1 inhibitor zinc protoporphyrin (ZnPP), the HO enzyme activity was analyzed by enzyme chemistry method. **Results** The *in vivo* administration of the synthetic HLA-derived peptide can obviously inhibit the proliferation of rat spleen cells stimulated by isoantigen and mitogen, and resulted in upregulation of splenic heme oxygenase activity and rapid upregulation of HO-1 protein expression. **Conclusion** RDP1258 inhibits the proliferation of rat spleen cells induced by mitogen and isoantigen probably through enhancing the HO-1 activity.

Key words: RDP1258; HLA-derived peptide; mixed leukocyte reaction; heme oxygenase-1

HLA Ⅰ类分子的特定序列,尤其是α1区的重链序列衍生的多肽,具有临床上比较重要的免疫调节功能。对应于HLA-B7以及HLA-B2702链的75-84合成多肽能够抑制CTL细胞和NK细胞的细胞分化以及细胞毒功能,且没有等位基因特异性[1]。器官移植动物试验表明,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。尽管HLA衍生肽的免疫调节作用已经越来越受到关注,但其作用机制仍不十分清楚。采用亲和层析法研究发现,HLA衍生肽的作用机制可能与血红素氧合酶-1有关[2]。本实验观察了一种经计算机设计的HLA衍生肽在体内对大鼠脾细胞增殖功能的影响以及对细胞HO-1酶活性的作用。

基金项目: 国家新药研究基金资助项目(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, E-mail:yshh881@126.com

收稿日期: 2004-02-01;**修回日期:** 2005-03-25

1 材料与方法

1.1 主要试剂

RPMI1640、胎牛血清(GIBCO),丝裂霉素C(日本),^{3}H-TdR(上海),Hemin(血晶素)、ConA(刀豆素A)(sigma);还原性辅酶Ⅱ(BM)。Znpp(锡原卟啉)为美国ALEXIC产品;Beckman液体闪烁测定仪、低温离心机(美国),Bio20型紫外可见光

分光光度计。

1.2　HLA 衍生肽的合成

HLA 衍生肽的序列：RDP1258：RNleNleNleRNleNleNleGY（Nle 为异亮氨酸）。无关对照肽（control peptide，Control P）：FLWGPRALI，由第三军医大学全军免疫学研究所吴玉章教授惠赠。采用固相合成法，利用 Fmoc 标准方案，在固相多肽合成仪上进行合成。合成肽使用 Waters 600 HPLC 仪 C_{18} 柱进行纯化，流动相为 1‰三氟乙酸水溶液/1‰TFA 乙腈水溶液。多肽产物最终纯度 >95%，低温冷冻干燥后分装备用。

1.3　实验动物及分组

实验均采用健康近交系大鼠，供体为 Lewis（$RT1^l$）大鼠，受体为 Fisher 344（$RT1^{lvl}$），均购自中国科学院实验动物学部，体质量均为 200 ~ 250 g。受体鼠 F344 完全随机法分为 5 组，每组 5 只：肽处理组（RDP 1258）、对照肽组（Control P）、Hemin 激动组、ZnPP 抑制组及正常对照组（Normal）。

1.4　药物干预方法及指标检测

肽处理组为 RDP1258 腹腔注射，5 mg/kg；对照肽组为对照肽以 5 mg/kg 腹腔注射；Hemin 激动组为腹腔注射血晶素 125 μmol/kg；ZnPP 抑制组为腹腔注射锡原卟啉 125 μmol/kg。正常对照组为腹腔注射生理盐水 10 ml/kg。各组处理 24 h 后取脾组织进行以下指标的检测。

1.5　淋巴细胞转化实验

F344 近交系大鼠经麻醉后，无菌取脾脏，剥膜后剪碎，经 100 目不锈钢网滤过，用 NH_4 Cl-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 重悬，调整细胞密度为 1×10^6/ml 后加入 96 孔细胞培养板，每孔含 200 μl 细胞悬液，设 3 复孔，内含最适 ConA 浓度（5.0 μg/ml），5% CO_2、37 ℃培养箱中培养 48 h，终止培养前 16 h，每孔加 ^{3}H-胸腺嘧啶 3.7×10^4 Bq。由液体闪烁计数仪测定 cpm 值（脉冲数/min）。

1.6　单向混合淋巴细胞培养（MLR）

分离供体 Lewis 大鼠脾细胞，以丝裂霉素 C（浓度 25 μg/ml）处理脾细胞悬液，37 ℃培养 30 min，作为刺激细胞。与反应细胞（F344 脾细胞）按 1∶1 比例混合，二者浓度均为 1×10^6/ml，混匀后加入 96 孔培养板，每孔 200 μl。37 ℃培养 120 h，终止前 16 h，每孔加 ^{3}H-胸腺嘧啶 3.7×10^4 Bq。液体闪烁计数仪测定 cpm 值（脉冲数/min）。

1.7　HO-1 活性测定

根据 HO-1 降解血红素生成胆红素和 CO 原理，测定样品反应物中胆红素生成量代表 HO-1 活性。取 F344 大鼠脾组织用 0.1 mol KH_2PO_4 冷缓冲液（pH 7.4）充分漂洗后，加 4 倍容积的同种缓冲液，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 ℃保存的脾细胞匀浆上清液 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，取自同一大鼠的肝脏，以去除肝 HO-1 的干扰）、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（nmol · mg^{-1} · h^{-1}），胆红素摩尔吸光系数为 40 nm/cm。

1.8　HO-1 的免疫组化染色检测

采用 4% 多聚甲醛固定、石蜡包埋脾组织块切片，厚度 5 μm，常规 HE 染色后光镜检查。免疫组织化学染色采用同种切片常规脱蜡，10% 正常山羊血清置室温 10 min，一抗（1∶2 500 鼠单克隆抗 HO-1 抗体）4 ℃过夜。再滴加生物素标记的二抗（1∶200 羊抗鼠 IgG）孵育 30 min 后滴加 1∶200 辣根酶标记的链霉卵白素，孵育 30 min 后 DAB 显色。光镜下观察细胞浆呈现黄褐色或褐色颗粒为阳性细胞，采用图像分析法进行定量分析。

1.9　统计学处理

计数资料用 χ^2 检验；计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示，采用 SPSS 10.0 软件进行方差分析及组间多重比较。

2　结果

2.1　HLA 衍生肽对大鼠脾细胞转化功能的影响

与正常对照组相比，无关对照肽对淋巴细胞转化没有影响。RDP1258 组表现出对由 ConA 引起的淋巴细胞转化具有显著的抑制作用，与对照肽及正常对照组比较，相差显著（$P < 0.05$）。

2.2　HLA 衍生肽对大鼠脾细胞 MLR 的影响

从表 1 可见：体内应用无关对照肽后，观察到其对大鼠脾细胞因同种异体淋巴细胞引起的增值反应无明显影响，而 RDP1258 对淋巴细胞的增殖具有显著的抑制作用，二者比较相差显著（$P < 0.01$）。Hemin 激动组与 Znpp 组相比，大鼠脾细胞转化能力降低明显（$P < 0.01$）。不同剂量（5、10 mg）体内应用，组间相比无显著性差异（$P > 0.05$）。

表 1　RDP1258 对体内 MLR 的影响（min^{-1}）

Tab 1　Effect of HLA derived peptide on MLR *in vivo* (min^{-1})

Group	RDP1258	Control P	Hemin	Znpp	Normal
5 mg	1120 ± 320▲	9970 ± 870	1250 ± 290	8970 ± 940	11250 ± 980
10 mg	1050 ± 340▲	9820 ± 880	1170 ± 310	8820 ± 830	10870 ± 990

▲：$P < 0.01$，*vs* control P

2.3　合成 HLA 衍生肽对大鼠脾细胞内 HO-1 活性的影响

HLA 衍生肽具有较明显的体内血红素加氧酶-1 上调作用，与对照肽相比相差显著（$P < 0.05$）。但增加作用时间，组间相比无显著性差异，见表 2。

表 2　RDP1258 对 HO-1 酶活性的体内影响（nmol · mg^{-1} · h^{-1}）

Tab 2　Effect of RDP1258 on HO-1 activity *in vivo* (nmol · mg^{-1} · h^{-1})

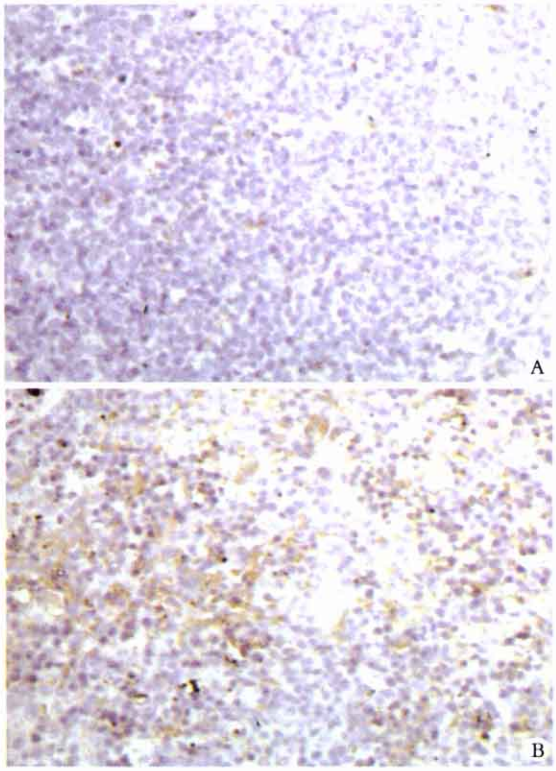
Group	RDP1258	Control P	Hemin	Znpp	Normal
24 h	1200 ± 321▲	250 ± 62	1570 ± 334	175 ± 45	200 ± 28
48 h	1350 ± 427▲	320 ± 74	1880 ± 518	165 ± 34	195 ± 19

▲：$P < 0.01$，*vs* control P

2.4　免疫组化结果

正常对照组及对照肽注射组、Znpp 注射组大鼠脾组织呈

弱阳性染色，以胞浆着色为主；RDP1258 肽注射组及 Hemin 注射组呈阳性染色。经图像分析及方差比较显示：RDP1258 组与正常组及对照肽组相比相差显著；与 Hemin 组比较无显著性差异，见图 1A、B。



A：Control；B：RDP1258

图 1 HO-1 的表达 （SABC ×200）

Fig 1 Heme oxygenase-1 expression （SABC ×200）

3 讨论

组织相容性白细胞抗原（histocompatibility leukocyte antigen，HLA）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由位于第 6 号染色体短臂（6p21.3），称为主要组织相容性复合体（major histocompatibility complex，MHC），具有高度多态性，分别编码 HLA Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ类分子。小鼠称 H-2 复合体，位于第 17 号染色体，大鼠称为 RT1。HLA Ⅰ类分子广泛分布于有核细胞表面，由重链（α）和轻链（βm2）组成，其中 α 链由 MHC 基因编码，细胞外肽结合区包括 α1、α2、α3 等 3 个功能区，X 射线晶体分析显示，α1 和 α2 的 α 螺旋和 β 片层构成沟状的肽结合槽，肽结合槽两端，富含保守氨基酸，大多带极性侧链，分别与抗原肽（8～11 个氨基酸残基）的 N 和 C 端氨基酸残基形成氢链，将抗原肽固定于槽中。α3 为与 CD8 相互作用区，βm2 由第 15 号染色体编码，通过非共价键与 α 链结合，维持Ⅰ类分子的天然构型。

最早 Parham 等[3]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。本实验中所用 HLA 衍生肽 RDP1258 与 HLA-B2702.75-84 衍生肽同源，该多肽是根据计算机分析其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[4]。本实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，质谱分析序列正确，纯度高。体外淋转及 MLR 实验中作者发现，RDP1258 能够抑制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[5]。本试验发现 RDP1258 在体内应用后，仍具有较强的免疫抑制作用，表现在大大减弱大鼠脾细胞对丝裂原及同种异体抗原的增殖反应。

亲和层析法研究表明 HLA 衍生肽的作用机制可能与 HO-1 有关[2]。另有研究表明，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，而在体内则能提高 HO-1 酶活性。此前作者实验研究表明，本实验中发现 HLA 衍生肽 RDP1258 具有较强的体外大鼠脾细胞 HO-1 活性的抑制作用，且呈现出剂量依赖性[5]。本实验结果提示，HLA 衍生肽体内应用后，能够迅速上调 HO-1 酶活性，并促进 HO-1 蛋白的表达，与 HO-1 酶激动剂血晶素 Hemin 的作用相似。出现这种体外与体内应用差异性可能是因 HO-1 酶活性降低后，导致血红素积累，进而引起酶化学的负反馈作用，促进了 HO-1 酶活性的增加。因此，我们有理由相信 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。

本研究表明，HO-1 酶激动剂血晶素（Hemin）体内应用，不但能够上调 HO-1 的活性，且可抑制大鼠脾细胞的免疫增殖反应，表现出一定的免疫调节作用。HO-1 系统被认为是，在应激状态下细胞免受损伤的保护机制中的主要因素，现阶段的研究表明，该系统亦具有较强的免疫调节功能。当前 HO-1 与器官移植的相关研究已经有所报道。Redaelli 等[6]采用一过性高热

刺激大鼠后，随后可检测到肾组织内 HO-1 酶活性明显增加，同时发现该方法能够较好地保护异型大鼠移植肾功能，显著延长大鼠移植肾存活时间。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，进而诱导出大鼠肝移植的移植免疫耐受状态[7]。

HO-1 酶活性改变导致抗炎症反应及免疫调节作用的机制并不是十分清楚，当前的研究表明上述作用可能与 HO-1 酶解血红素产生的代谢产物有关[8]。体外实验观察到，胆绿素及其代谢终产物胆红素都具有较强的抗氧化作用和抗补体激活作用，并表现在对丝裂原引起的淋巴细胞增殖的抑制作用，且能大大减轻 NK 细胞介导的杀伤效应。因此，胆红素是否具有潜在的免疫抑制作用，可能成为将来移植免疫实验研究新的突破点。作为一种细胞内的气体介质，CO 以及血红素本身均通过抗炎症及抗凋亡机制发挥细胞保护作用，并在器官移植领域显示出诱人的应用前景。

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] 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.

[3] 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.

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

[5] 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.

[6] Redaelli C A, Wagner M, Kulli C, *et al*. Hyperthermia-nduced HSP expression correlates with improved rat renal isograft viability and survival in kidneys harvested from non-heart-beating donors[J]. Transpl Int, 2001, 14(6): 351－360.

[7] Ke B, Buelow R, Shen X D, *et al*. Heme oxygenase 1 gene transfer prevents CD95/Fas ligand-ediated apoptosis and improves liver allograft survival *via* carbon monoxide signaling pathway[J]. Hum Gene Ther, 2002, 13(10): 1189－1199.

[8] Song R, Kubo M, Morse D, *et al*. Carbon monoxide induces cytoprotection in rat orthotopic lung transplantation *via* anti-nflammatory and anti-poptotic effects[J]. Am J Pathol, 2003, 163(1): 231－242.

（编辑 栾 嘉）

文章编号：1000-5404(2005)17-1751-01

个案与短篇

皮肤蝇蛆病 10 例诊治

Diagnosis and treatment of 10 cases of myiasis cutis

曹发龙 （青海省人民医院皮肤科，西宁 810007）

近年来发现皮肤蝇蛆病有逐渐增多的趋势，且随着流动人员的增加，发病从牧区转向城市。我院从 1991 年 5 月到 2004 年 5 月，共诊治 10 例皮肤蝇蛆病患者，现总结如下。

1 临床资料

1.1 一般资料

10 例皮肤蝇蛆病患者均为我院门诊病人，女 6 例、男 4 例，最小年龄 6 岁，最大 40 岁，4 例世居在青海牧区，4 例生活在城市（从牧区调入城市工作者，其中 1 例为兽医），2 例为牧区打工者，藏族 6 人，汉族 4 人，8 例否认有明显外伤史，2 例有外伤史，10 例均有明显马、牛、羊接触史，8 例有蝇、蚊虫间接接触史，2 例蝇直接接触史，2 例 1 月份发病，4 例 3 月份发病，3 例 5 月份发病，2 例 1 月份发病，1 例 8 月份发病。

1.2 临床表现

10 例患者均对其自身疾病有自卑和恐惧感。皮肤损害疖肿型 7 例，匐行疹型 3 例；幼虫出现部位：四肢 2 例，背部 3 例，腹部 3 例，眼睑 2 例，数个幼虫以上的 9 例，单个幼虫 1 例。8 例有游走性疼痛伴瘙痒，2 例无明显症状，10 例均无明显浅表淋巴结肿大，均无内脏损害。

1.3 虫体形态学及实验室检查

经有关虫体形态学检查 6 例为牛皮蝇Ⅱ龄幼虫，2 例为牛皮蝇Ⅰ龄幼虫，另 2 例为蚊皮蝇Ⅰ龄幼虫。7 例血常规正常，3 例白细胞较正常稍高；8 例嗜酸性细胞升高，最高为 0.60，最低

（下转 1755 页）

作者简介：曹发龙（1964－），男，青海省西宁市人，主治医师，主要从事皮肤性病科临床方面的研究。电话：(0971)8066243

收稿日期：2004-11-06；修回日期：2005-03-21