DOI:10.16016/j.1000-5404.2004.04.013
第26卷第4期 第三军医大学学报 Vol. 26, No. 4
314 2004年2月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Feb. 2004

论著

文章编号:1000-5404(2004)04-0314-03

HLA衍生肽对大鼠脾细胞增殖功能及HO-1活性的影响

易善红[1],宋 波[2],汪泽厚[3],张艮甫[1],崔志刚[4] (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]空军总医院泌尿外科,北京 100036;[4]总装备部医院泌尿外科,北京 100042)

提 要:目的 观察一种新型组织相容性白细胞抗原(histocompatibility leukocyte antigen, HLA)衍生肽(RDP1258)的免疫抑制功能并探讨其机制。方法 人工固相合成一种HLA衍生肽(RDP1258),用^{3}H-TdR法观察其在体外对大鼠脾细胞增殖反应的影响,以酶化学法观察其对脾细胞血红素氧合酶-1(heme oxygenase-1, HO-1)活性的影响。结果 RDP1258可显著抑制淋巴细胞转化及MLR的增殖反应;该肽体外降低HO活性呈现出剂量依赖性。结论 RDP1258能够显著抑制大鼠脾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;混合淋巴细胞培养;血红素氧化酶-1
中图法分类号:Q516; R322.21; R329.2 文献标识码:A

Effects of HLA-derived peptide on proliferation and heme oxygenase-1 activity of rat spleen cells

YI Shan-hong[1], SONG Bo[2], WANG Ze-hou[3], ZHANG Gen-fu[1], CUI Zhi-gang[4]([1]Renal Diseases Research Center, Department of Urinary Surgery, Xinqiao Hospital, Chongqing 400037; [2]Urology Surgery Research Center, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038; [3]Department of Urology, General Hospital of Air Force of PLA, Beijing 100036; [4]Department of Urology, Hospital of General Military Equipment Department of PLA, Beijing 100042, China)

Abstract: Objective To investigate the immunosuppression function of a novel HLA-derived peptide, RDP1258, and its mechanisms. Methods A peptide derived from HLA, RDP1258, was chemically synthesized by artificial solid phase synthesis. Effects of the peptide on alloreactive cytotoxic activity of rat spleen cells and heme oxygenase-1 (HO-1) activity were observed using ^{3}H-TdR method and enzyme chemistry method, respectively. Results The synthetic HLA-derived peptide could obviously inhibit the proliferation of rat spleen cells and mixed lymphocyte reaction, and reduce HO activity in a dose-dependent manner *in vitro*. Conclusion RDP1258 can significantly inhibit the proliferation of rat spleen cells induced by mitogen and isoantigen possibly by means of affecting HO-1 activity.

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

研究表明新型组织相容性白细胞抗原(histocompatibility leukocyte antigen, HLA)Ⅰ类分子特定序列,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。进一步的研究表明,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]。多种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[2,3]。以亲和层析法研究显示,HLA衍生肽的作用机制可能与血红素氧合酶-1有关[4]。本实验观察了一种经计算机设计的HLA衍生肽在体外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。

1 材料与方法

1.1 材料来源

1.1.1 主要试剂 RPMI1640、胎牛血清(GIBCO),丝裂霉素C

基金项目:国家新药基金资助项目(1999A002)
Supported by the National Fund for New Drug Development (1999A002)
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:2003-01-07;修回日期:2003-11-05

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

(日本), ^{3}H-TdR(上海), 血晶素(Hemin)、刀豆素 A(ConA)(sigma); 还原性辅酶Ⅱ(BM)。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。

1.1.2　动物　　健康近交系大鼠。供体为 Lewis(RT1^{l}) 大鼠, 受体为 Fisher 344(RT1^{lvl}), 均购自北京医科大学实验动物学部, 体质量均为 200~250 g。

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, CP): FLWGPRALL, 由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(TFA)水溶液/1‰TFA 乙腈水溶液。纯度> 95%, 低温冷冻干燥后分装备用。

1.3　大鼠脾细胞悬液的制备

F344 近交系大鼠经肌肉或皮下注射 1% 戊巴比妥钠(100 mg/kg)麻醉后, 强力碘消毒皮肤, 取脾脏, 剥膜后剪碎, 经 100 目不锈钢网滤过, 用 NH_4Cl-Tris 液裂解红细胞, 1 000 r/min, 4 ℃下离心 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。

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(2×10^6/ml)后加入 96 孔细胞培养板, 每孔含 200μl 淋巴细胞液悬液, 设 3 复孔, 内含最适 ConA 浓度(5.0 μg/ml) 及不同浓度的 RDP1258, 5%CO_2、37 ℃培养箱中培养 48 h, 终止培养前 16 h, 每孔加 ^{3}H-TdR 3.7$\times 10^4$ Bq。由液体闪烁计数仪测定 cpm 值(脉冲数/min)。

1.5　单向合淋巴细胞培养(MLR)

分离 Lewis 大鼠脾细胞, 以丝裂霉素 C(25μg/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, 两者浓度均为 1×10^6/ml, 混匀后加入 96 孔培养板, 每孔 200μl, 加入不同浓度的 HLA 衍生肽及对照肽。37 ℃培养 120 h, 终止前 16 h, 每孔加 ^{3}H-TdR 3.7$\times 10^4$ Bq。由液体闪烁计数仪测定 cpm 值(脉冲数/min)。

1.6　血红素氧合酶Ⅰ(heme oxygenase Ⅰ, 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 大鼠脾脏组织用 0.1 mol/L 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 20μl, 加入 4.5 mmol/L NADPH 40μl, 肝组织匀浆上清液 20μl(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/L KH_2PO_4 冷缓冲液(pH 7.4) 1.8 ml, 最后加入 2 mmol Hemin 40μl, 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 mm/cm)。

1.7　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, 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 衍生肽对大鼠脾细胞转化功能的影响

与空白组相比, 无关对照肽对淋巴细胞转化没有影响。RDP1258 对由 ConA 引起的淋巴细胞转化具有显著的抑制作用, 与对照肽及空白组比较, 相差显著($P<0.05$)。在 RDP1258 浓度为 50μg/ml, 抑制达最大值, 增加 HLA 肽浓度, 未见进一步影响淋巴细胞的转化能力。

2.2　HLA 衍生肽对大鼠脾细胞 MLR 的影响

表 1 显示, 无关对照肽对 MLR 没有影响, RDP1258 则对引起淋巴细胞的增殖具有显著的抑制作用, 与对照肽比较, 相差显著($P<0.05$)。RDP1258 的最大抑制浓度为 80μg/ml。

2.3　合成 HLA 衍生肽对大鼠脾细胞内 HO-1 活性的影响

图 1 显示 HLA 衍生肽具有较明显的体外血红素加氧酶−1 抑制作用, 且呈剂量依赖性, 与对照肽相比, 相差显著($P<0.05$)。RDP1258 的半数抑制浓度约 20μmol/L。

表 1　HLA 衍生肽对 MLR 中 ^{3}H-TdR 掺入值的影响($\bar{x}\pm s$)

Tab 1　Effects of HLA-derived peptide on ^{3}H-TdR incorporation value in MLR ($\bar{x}\pm s$)

Group	Concentration (μg/ml)					
	0	10	20	40	80	160
RDP1258	12 430±330	9 650±210	6 740±290 #	2 380±450 #	870±140 #	940±160 #
CP	12 380±350	10 350±240	11 340±230	12 050±390	13 670±330	11 480±340

#: $P<0.05$ *vs* CP

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

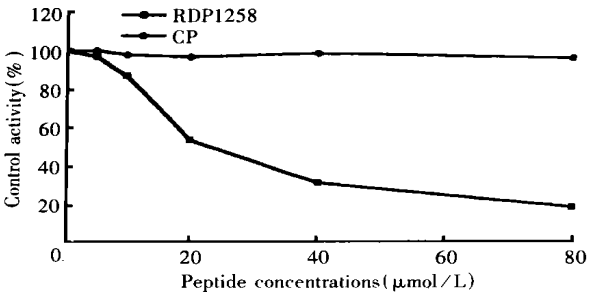


图1 HLA衍生肽对体外HO-1酶活性的作用

Fig 1 Effects of HLA-derived peptide on HO-1 activity *in vitro*

3 讨论

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。

最早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，该多肽是根据计算机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[7]。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，质谱分析序列正确，纯度高。应用于体外淋转及MLR试验中发现该肽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。

Iyer等[4]以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。研究中表明，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。本试验中表明HLA衍生肽RDP1258具有较强的体外抑制大鼠脾细胞HO-1活性的作用，且呈现出剂量依赖性，同MLR抑制试验中观察到的剂量依赖性相似，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。血红素加氧酶是血红素代谢过程中的起始、限速酶，其生理功能为催化血红素，降解生成胆绿素、一氧化碳和亚铁。近年来的研究结果表明，HO的生物学效应并不局限于此，其催化产物同样具有重要的生物学功能，主要表现为胆绿素及其还原产物胆红素和亚铁的抗氧化损伤及CO的血管调节作用。因此，胆红素的生理作用，是否包括免疫抑制作用将成为以后研究的方向。Woo等[8]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[9]。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，等待进一步的研究。

参考文献：

[1] 汪泽厚，朱锡华，潘进勇，等. 人工合成HLA衍生肽对CTL和NK细胞毒功能的影响[J]. 中国免疫学杂志，2001，17(9)：463－465.

[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] 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.

[5] Parham P, Clayberger C, Zorn S L. *et al*. Inhibition af 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]. Nature Biotechnol, 1998, 16(8): 748－752.

[8] 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.

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

（编辑 郭建秀）

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net