

心脏移植中 HLA-Ⅱ 类抗原基因配型的实验研究

北京市心肺血管疾病研究所 首都医科大学附属北京安贞医院(100029)

董 然 陈宝田 邱长春* 石 镜

摘要 建立人类白细胞抗原(HLA)-Ⅱ型抗原 4 个基因位点 DRB₁、DQA₁、DQB₁、DPB₁ 的聚合酶链式反应—单—链构象多态分析(PCR—SSCP)配型方法。实验分三部分:1. 通过预实验确定使用 PCR—SSCP 检测 HLA—DRB₁、DA₁、DQB₁、DPB₁ 4 个位点的实验条件;2. 使用以上方法对 1 例拟行心脏移植的患者在 127 例健康人群中基因位点的检测配型;3. 对配型一致及不一致的供体和受体,进行体外混合淋巴细胞培养(MLC),以检验这种基因配型方法的可靠性。通过 PCR—SSCP 的检测配型,在 127 例供体中,2 例 DRB₁ 位点、2 例 DQA₁ 位点、3 例 DQB₁ 位点、2 例 DPB₁ 位点与受体相一致。体外 MLC 证实与受体不一致的供、受体 MLC 中,受体淋巴细胞呈高度增殖反应;而与受体某一位点一致的供体,其 MLC 中受体淋巴细胞增殖反应明显降低($P < 0.01$)。PCR—SSCP 是一种快速、准确的 HLA-Ⅱ 类抗原基因位点检测配型的方法。

关键词 器官移植 HLA-Ⅱ 类抗原基因配型 PCR—SSCP

Experimental Research of Genotyping for HLA Class Ⅱ Antigens in Cardiac Transplantation

Dong Ran, Chen Baotian, Qiu Changchun, et al.

Beijing Heart, Lung and Blood Vessel Medical Center—Anzhen Hospital(100029)

Abstract To establish a genotyping method for HLA-DRB₁, DQA₁, DQB₁ and DPB₁ polymorphic loci Polymerase Chain Reaction—Single Strand Conformation Polymorphism (PCR-SSCP). The experiment is divided into three steps: To set up the experimental conditions of PCR-SSCP for detecting and typing HLA-DRB₁, DQA₁, DQB₁ and DPB₁ loci through pre-experiment; Then by using the method of PCR-SSCP, we genotyped for HLA class Ⅱ between one heart transplantation recipient and 127 cases of health people. In order to determine the reliability of this genotyping method, we carried out mixed lymphocyte cultures (MLC) with cells from the recipient and donors, including the mismatched and matched donors ascertained by PCR-SSCP typing. By genotyping in 127 cases using PCR-SSCP analysis, we have gotten donors who are compatible with the recipient for one locus of HLA class Ⅱ gene. Of which, two were identical to the recipient for DRB₁ locus, two for DQA₁, three for DQB₁ locus and two for DPB₁ locus. MLCs performed donors respectively showed that the lymphocytes of the recipient had high proliferation response in MLCs with mismatched donors and significant lower response ($P < 0.01$) in MLCs with one-locus identical donors. Conclusion: PCR-SSCP genotyping is a rapid and accurate method for detecting and typing HLA Class Ⅱ genes.

Key words: Organ transplantation; HLA Class Ⅱ genotyping; PCR-SSCP

人类白细胞抗原(Human Leucocyte Antigen, HLA)是引起器官移植后排斥反应的重要因素,特别是 HLA-Ⅱ 类抗原在排斥反应中递呈抗原,参与免疫识别及激活,具有调节机体排斥反应的功能^[1]。在心脏移植中,供、受体 HLA-Ⅱ 类抗原一致时,早期排

斥反应频率低、反应轻,晚期移植心脏血管病变(Cardiac Allograft Vasculopathy, CAV)发生率低,移植术后近、远期疗效好^[2]。但由于目前 HLA-Ⅱ 类抗原的配型方法耗时长、费用高,而且不能于移植术前进行供体的配型。本实验目的是建立一种快速、简单、准

确、又经济的 HLA-II 类抗原基因配型方法。

实验方法

1 实验对象 1 例先天性心脏病患者拟为心脏移植受体, 127 例随机健康人群为供体。

2 DNA 样本制备及 PCR 扩增 取 5ml 外周血, EDTA 抗凝, 按 Stafford 报道方法^[3], 制备浓度为 0. 2 μ g/ml 的基因组 DNA 样本。编码 HLA-II 类抗原多态位点 HLA-DRB₁、DQA₁、DQB₁、DPB₁ 的是其第二外显子基因片段, 引物序列及扩增条件如表 1、2^[4,5]。PCR 产物鉴定: 取 5ml 扩增产物加 1 μ l 载体缓冲液在 2% 琼脂糖凝胶电泳, 100v \times 20min, 紫外灯下观察。

表 1 特异性引物序列

扩增片段	引物序列
DRB ₁ 第 二外显子	DRB ₁ 5'-3'-TGTCATTTCTTTCAATGGGACG DRB ₁ 3'-5'-TCGCCGCTGCACTGTGAAG
DQA ₁ 第 二外显子	DQA ₁ 5'-3'-GGTGTAACCTGTACCAG DQA ₁ 3'-5'-GGTAGCAGCGGTAGAGTTG
DQB ₁ 第 二外显子	DQB ₁ 5'-3'-TGCTACTTCAACCAACGGGGAC DQB ₁ 3'-5'-CCACCTCGTAGTTGTGTCTGC
DPB ₁ 第 二外显子	DPB ₁ 5'-3'-GAGAGTGGCGCCTCCGCTCAT DPB ₁ 3'-5'-CTCACTCCCGAACC CGGCCG

表 2 PCR 扩增条件

	变性温度 时间	退火温度 时间	延伸温度 时间	扩增片段 长度
DRB ₁	95℃1min	55℃2min	72℃2min	240bp
DQA ₁	95℃1min	55℃2min	72℃2min	225bp
DQB ₁	95℃1min	55℃2min	72℃2min	214bp
DPB ₁	95℃1min	60℃1min	72℃2min	327bp

表 3 SSCP 实验条件

分析片段	胶浓度 (%)	交联度	甘油	电泳条件	时间 (h)	温度 (℃)
DRB ₁	12	50: 1	1%	恒流 5m AMP	8	4
DQA ₁	10	50: 1	无	恒流 7. 5m AMP	7	4
DQB ₁	10	50: 1	1%	恒流 7. 5m AMP	7	4
DPB ₁	8	50: 1	无	恒压 5V/cm	5	室温 20

结 果

1. PCR 扩增 供、受体 128 例 PCR 扩增产物经电泳鉴定均见清晰亮带

3 SSCP 配型 (1) 确定 SSCP 的实验条件 在预实验中对胶浓度、交联度、电泳条件、温度及胶中甘油含量 5 个因素, 固定 4 个因素而改变一个条件, 反复试验寻找能够分辨 DNA 多态性的实验条件。(2) 为 1 例心脏移植受体 (R) 行 SSCP 配型 取 5 μ l PCR 产物, 加 10 μ l 反应终止液 (98% 甲酰胺、20mM EDTA、0. 01% 溴酚蓝), 96℃变性 5min, 取出迅速插入冰水中, 对 DRB₁、DQA₁、DQB₁、DPB₁ 各位点采用预实验中确定的 SSCP 条件 (表 3) 进行电泳分析, 电泳结束后均采用硝酸银染色显示单链 DNA 电泳条带。

4 MLCs 验证 PCR-SSCP 配型 实验分为对照组和实验组; 对照组又分为阴性和阳性对照组。按 Olerup 报道方法进行 MLC^[6]。取 10ml 外周血肝素抗凝, 用淋巴细胞分离液分离单个核细胞, 悬于完全培养液中, 调整浓度为 2 \times 10⁶/ml, 用经丝裂霉素 C 处理后的自身淋巴细胞为阴性对照组; 取 20 例经 PCR-SSCP 配型证实与受体 HLA-II 类基因不一致的供体为阳性对照组; 实验组: 与受体 HLA-II 类基因某个位点相一致的供体淋巴细胞和受体淋巴细胞混合培养。取供体及部分受体细胞, 调整浓度为 2 \times 10⁶/ml, 在 96 孔板中进行混合培养, 每对 MLC 设 4 个复孔。加样完毕后用微量搅拌器搅拌 5 min, 置 37℃5%CO₂ 培养箱中培养 5 天, 每孔加入 ³H-T α R, 终浓度为 0. 5 μ Ci/孔, 培养 16h 收集于 49 型玻璃纤维纸上, 加少量 5% 三氯醋酸固定, 置 70~80℃烤箱中烤干, 用液闪仪记数 cpm 值, 每孔以 4 个复孔 cpm 平均值为准。

SSCP 配型实验条件见表 3。1 例受体配型得到 9 例供体的 HLA-II 类基因某一位点与受体相一致, 其中 2 例 DRB₁、2 例 DQA₁、3 例 DQB₁、2 例 DPB₁ 位点与受体相应位点一致。



图 1 受体与供体 1 及供体 2 的 PCR-SSCP 图谱

±7.18, SI 为 1.0 (设定值), 受体淋巴细胞无明显增殖反应; 阳性对照组 cpm 值为 1701.13±139.32, 受体淋巴细胞呈高度增殖反应; 实验组中受体淋巴细胞反应性均明显降低, 与阳性对照组相比 $P < 0.01$, 结果见表 4。

表 4 MLCs 液闪计数结果 (cpm)

组别	X±SD	SI	RR
阴性对照组	145.33±7.18	1	0
DRB ₁ 配合	1224.30±87.32	8.42	0.66
DQA ₁ 配合	1372.34±69.19	9.44	0.74
DQB ₁ 配合	1417.31±81.22	9.75	0.80
DPB ₁ 配合	1285.87±98.72	8.84	0.71
阳性对照组	1707.13±139.34	11.75	1.0

注: 本组 cpm 为 81.42±6.71; SI: 刺激指数, SI=试验组 cpm/阴性对照组 cpm; RR: 相对反应值 RR=(阳性对照组 cpm-试验组 cpm)/(阳性对照组 cpm-阴性对照组 cpm)

讨 论

一、心脏移植 HLA-II 类抗原基因配型的发展及临床意义 心脏移植是治疗终末期心脏病的有效措施。术后排斥反应及晚期发生的移植心脏血管病变 (CAV) 是影响患者临床疗效的主要原因^[2]。研究表明: 供、受体之间 HLA-II 类抗原的配型程度与移植后

CAV 发生率同患者存活时间有密切关系^[2]。无疑, 如果能够在术前选择 HLA-II 类抗原一致或部分一致的供体进行移植, 将会提高心脏移植的近远期疗效。但是由于供体缺血时间有限, 目前 HLA-II 类抗原的配型需时较长, 因此在心脏移植中仅为回顾性研究。

HLA-II 类抗原传统配型有血清学和细胞学两种, 需大量标准血清及纯合子分型细胞, 耗时大、精确性差 (DR 抗原血清学配型与基因配型相比错配率达 25%^[27])。随着聚合酶链式反应 (PCR) 技术广泛应用及 HLA 复合体等位基因碱基序列的阐明, 基因配型迅速发展, 目前已有近十种基因配型方法, 常用的有序列特异性寡核苷酸探针配型 (PCR-SSO), 限制性片段长度多态分析 (RFLP), 序列特异性引物 PCR 扩增 (PCR-SSP), 等位基因特异性寡核苷酸探针 (ASO) 配型, 异源双链分析配型, 反向杂支配型等^[8~10]。这些配型技术原理各异, 但技术条件均要求较高, 需合成大量探针或需昂贵的限制性内切酶, 方法建立困难, 不可能在短时间内完成多个供体的筛选配型, 故临床应用仍有相当距离。

二、PCR-SSCP 配型的特点 PCR-SSCP 分析技术基本原理: 在非变性条件下, 单链 DNA 分子自身折叠成一定空间结构, 这种空间结构由单链 DNA 分子的碱基序列所决定。因此长度相同的单链 DNA 分子在非变性胶中电泳时, 碱基序列不同的单链 DNA 泳动速度及距原点的距离均不相同, 造成了不同的电泳带型 (SSCP 带型)^[11]。可以看出 PCR-SSCP 配型不需确定供、受体 HLA-II 类基因的基因编码, 只需比较两者的 SSCP 带型是否一致, 即可确定供、受体是否配合^[5]。

我们在预实验中观察到胶浓度、交联度、甘油含量、电泳时电压或电流强度及电泳湿度影响 SSCP 对单链 DNA 多态性分析的

件,反复试验,得到较为稳定的实验条件如表 3。应用这种实验条件,对 127 例健康人群的 HLA-II 类基因 4 个位点 DRB₁、DQA₁、DQB₁ 及 DQP₁ 进行检测,与受体比较完成配型。整个配型只需 10h,与其它基因配型相对比,PCR-SSCP 具有快速、经济、简单的特点,尤其适用于较多样本的检测和筛选,有利于器官移植的临床应用。

三、MLCs 验证 结果表明当受体淋巴细胞与经 PCR-SSCP 证实与受体不配合的供体淋巴细胞混合培养时,呈现出高度增殖反应;当与受体的 HLA-II 类基因某一个位点相配合的供体淋巴细胞混合培养时,受体淋巴细胞增殖反应明显降低($P < 0.01$)。这说明 PCR-SSCP 配型与体外混合淋巴细胞培养是一致的。Rood 指出:HLA 配型的实验是建立一种能够快速、准确预测 MLC 反应的技术^[12]。本组实验结果说明:PCR-SSCP 是一种快速、经济、与 MLC 相一致的 HLA-II 类抗原基因配型的方法。不足之处是这种配型方法不能获得受体及供体的等位基因编码,可结合其他的基因检测技术加以完善。

参考文献

- 1 赵相茂. HLA 分型原理及应用. 上海科学技术出版社, 1982: 103.
- 2 Jarcho J, Naftel DC, Kirkin JK, et al. Dose HLA mismatch affect the influence of rejectin response after cardiac transplantation? A multi-clinical inatitution study. J Heart Lung Transplant, 1992, 121: 577.
- 3 Stafford DW, Blin N. A general method for isolation of high mollecular weight DNA from eukaryotes. Nucleic Acid Res, 1978, 3: 2303
- 4 Carning M, Miller T, White M, et al. Typing of

- HLA-DQA₁ and DQB₁ Using DNA single-strand confirmation polymorphism. Hum Immunol, 1992, 33: 208.
- 5 Hoshino S, Kimura A, Fukuda Y, et al. PCR-SSCP analysis of polymorphism in DPA₁ and DPB₁ genes: A simple, economocal and rapid method for histo-compatibility testing. Hum Immunol, 1992, 33: 98.
- 6 Olerup O, Moller E, Persson U. HLA-DP incompatibilities might induce significant proliferation in primary mixed lymphocyte cultures in HLA-a, b, DR, DQ, compatible individuals; Implications for allogenic bone marrow transplantation. Tissue Antigens, 1990, 36: 194.
- 7 Opele G. For the collaborative transplant study: Surval of DNA HLA-DR typed and matched cadaver kidney transplants. Lancet, 1991, 338: 461.
- 8 Olerup O, Zetterquist H. HLA-DR typing by PCR-amplification with sequence-specific primers in 2 hours: an alternative to serological DR typing in clinical practice including donor-recipient matching in cadaveric transplantation. Tissue Antigens 1992, 39.
- 9 Saiki RK, Bugawan TL, Horn GT, et al. Analysis of enzymatically amplified betaglobin and HLA-DQ DNA with allele-specific olignudeotide probes. Nature, 1986, 324: 163.
- 10 Kaneshige T, Murayama A, Hirasawa T, et al. Rapid and practical HLA class II genotyping by reverse dot blotting. Transplant Proc, 1993, 25: 194.
- 11 Orita M, Suzuki Y, Sekiya T, et al. Rapid and sensitive detection of point mutations and DNA polymorphisms using the polymerase chain reaction. Genomics, 1989, 5: 874
- 12 Schroeijers WEM, Van Rood JJ, et al. HLA-DR and HLA-DP induce comparable proliferation in primary mixed lymphocyte culture. Tissue Antigen, 1988, 32: 145.