

# 1 例心脏移植受者 HLA-G5 表达动态观察

肖 漓 石炳毅 蔡明 周文强

**摘 要** 目的 研究心脏移植受者外周血 HLA-G5 表达变化。方法 采用酶联免疫吸附法、蛋白印迹法检测 1 例心脏移植受者手术前、术后外周血 HLA-G5 表达。结果 HLA-G5 表达在术前和术后 1 周均无表达, 4 周后出现表达, 并逐渐增高, 16 周后趋于稳定。结论 HLA-G5 阳性表达可能与心脏移植受者的术后状况有一定的相关性, HLA-G5 阳性表达可能保护移植植物不受损伤, 并延缓或抑制排斥反应的发生。

**关键词** 人白细胞抗原 G5 主要组织相容性复合体; 心脏移植

中图分类号 R392.4 文献标识码 A 文章编号 1002-3208(2007)04-0422-03

**Study of the HLA-G5 expression in 1 case of heart recipient** XIAO Li SHI Bingyi CAI Ming ZHOU Wenqiang  
Second Hospital Attached to PLA General Hospital Beijing 100091

**【Abstract】 Objective** To investigate the expression change of human histocompatibility antigen G5 (HLA-G5) in one heart recipient. **Methods** Measured the HLA-G5 Level in peripheral blood Second Hospital Attached to PLA General Hospital Beijing 100091 by ELISA and Western blot. **Results** The HLA-G5 expression was negative before operation and 1 week after operation, positive 4 week after operation, increased gradually and got stable 16 weeks after operation. **Conclusion** The positive HLA-G5 expression may be correlated with postoperative condition of heart recipient. The positive HLA-G5 expression may protect graft from being damaged and delay or suppress the happening of rejection.

**【Key words】** human leukocyte antigen G5, major histocompatibility complex, heart transplantation

HLA-G 基因属于 MHC 非经典 I 类基因, 它拥有 15 个等位基因, 能够编码 7 种不同的蛋白, 即 HLA-G1~G7。HLA-G1~G4 为膜性分子, HLA-G5~G7 为可溶性分子。HLA-G5 分子可通过抑制介导移植植物排斥反应的主要效应细胞的功能而发挥免疫抑制作用, 如与 NK 细胞的杀伤抑制性受体 (KIR, killed inhibitory receptor) 结合从而抑制其杀伤活性、与 CD4+T 细胞表面的 KIR 结合抑制其增殖, HLA-G 还以其特有的  $\alpha 3$  区与 CD8+T 细胞结合而诱导其凋亡。因此 HLA-G 可视为一种免疫耐受诱导分子, 在临床上具有潜在的应用前景, 对防治和监测器官移植排斥反应具有重要意义。本研究通过采用酶联免疫吸附法、蛋白印迹法检测 1 例心脏移植受者手术前、术后外周血 HLA-G5 表达, 研究心脏移植受者外周血 HLA-G5 表达变化。

## 1 材料和方法

### 1.1 临床资料

2004 年 5 月在解放军总院第二附属医院全军器官移植中心行心脏移植的 1 例受者, 男性, 42 岁, 系终末期扩张型心肌病。

### 1.2 血清采集

采集心脏移植受者术前, 术后 1 天、1 周、4 周、8 周、16 周、24 周、32 周外周血 3 ml 常规方法离心提取血清。

### 1.3 ELISA 检测

ELISA 检测步骤如下: ① MEM-G9 抗体包被反应板, 每孔  $100\mu\text{l}$  1 h; ② PBST 洗涤 3 次; ③ 每孔  $100\mu\text{l}$  血清加入反应孔, 同时作阴性及阳性对照, 孵育 1 h; ④ 洗涤 3 次, 方法同 (2); ⑤ 加入 HRP 标记的  $\beta 2$  微球蛋白  $35^\circ\text{C}$  孵育 1 h; ⑥ 洗涤 3 次, 方法同 (2); ⑦ 加底物溶液, 每孔  $100\mu\text{l}$  置  $35^\circ\text{C}$  暗处显色, 注意观察阳性标准血清对照孔; ⑧ 加入终止液  $50\mu\text{l}$  静置 5 min; ⑨ 用 450 nm 波长测定各反应孔

## 1.4 免疫印迹

1.4.1 试剂 单抗 MEM-G 9mb 为 ALEXIS 产品、抗体 Anti  $\beta$ 2-microglobulin HRP 为 Dako 公司产品电泳仪 EC250-9Q 酶标反应板; ELISA 检测仪 (美国博乐 550)。

### 1.4.2 12% SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳

(1) 分离胶 去离子蒸馏水 1.92 ml 30% 聚丙烯酰胺 2.4 ml 1.5 mol/l TrisHCl (pH=8.8) 1.56 ml 10% SDS 60  $\mu$ l 新配制的 10% 过硫酸铵 60  $\mu$ l TEMED 2.4  $\mu$ l 总体积 6 ml 迅速混匀后注入垂直板电泳槽, 留出灌注积层胶所需的体积。小心在上覆一层正丁醇, 室温聚合 30 min 倾出正丁醇, 用去离子水洗涤凝胶顶部数次以除去未聚合的丙烯酰胺, 用纸巾吸净残留液体。

(2) 积层胶 量取去离子蒸馏水 1.4 ml 30% 聚丙烯酰胺 0.33 ml 1.0 mol/l TrisHCl (pH=6.8) 0.25 ml 10% SDS 20  $\mu$ l 新配制的 10% 过硫酸铵 20  $\mu$ l TEMED 2.0  $\mu$ l 总体积 2 ml 迅速混匀后注入分离胶之上, 小心插入 Teflon 梳子, 室温聚合 30 min 小心移出梳子, 洗涤除去未聚合的丙烯酰胺, 滤纸巾吸净残留液体。

(3) 上样与电泳 取收集 100  $\mu$ l 上清点样, 积层胶用 60V 电泳至分离胶后, 120V 约 90 min 取出凝胶做好标记后于脱色摇床用考马斯亮兰振荡染色 6 h 脱色液脱色至背景完全透明。

1.4.3 转移电泳 剪 6 张 Whatman 滤纸 (面积要比膜小) 和 1 张 Hybond-C Extra 硝酸纤维素膜, 把膜放入去离子水中浸泡, 6 张 Whatman 滤纸放入适量转移缓冲液中浸湿; 电泳结束后, 拆卸凝胶, 做好标记。将膜与凝胶放入转移缓冲液中浸泡 20 min 安装转移装置: 由阳极到阴极依次放置三层滤纸、硝酸纤维素膜、凝胶、三层滤纸, 精确对齐, 小心排出气泡, 放置好夹层; 接通电源, 循环水制冷, 以 20 mA 稳流转移过夜; 切断电源, 取出转移膜, 在其左上角作方向标记; 转移膜上的蛋白质染色。转移结束后, 取出转移膜, 用 1  $\times$  TBS 中漂洗一下, 剪下一条, 放到丽春红 S 染液 [0.5% 丽春红 S (质量浓度), 1% 冰醋酸 (体积分数)] 中染色 5 min 蛋白带出现后, 于室温用去离子水漂洗数次硝酸纤维素滤膜, 用铅笔在背面标出蛋白带的位置。

转移膜分别移入第一抗体中, 于室温平缓摇动 1 h 正常人血清作阴性对照; 取出膜用 TBST 溶液平缓摇动洗膜 10 min  $\times$  3 次; 将膜分别转移至加入辣根酶标记二抗的封闭液中, 室温平缓摇动 1 h 取出膜用 TBST 溶液平缓摇动洗膜 10 min  $\times$  3 次; 将漂洗过的膜转移至 10 ml AP 缓冲液中避光显色; 显色 2 ~ 3 min 后终止显色反应; 最后将检测结果进行照相。

## 2 结果

(1) ELISA 法检测 HLA-G5 表达结果 术前和术后 1 周无表达, 4 周后出现表达, 并逐渐增强, 16 周后趋于稳定 (图 1)。

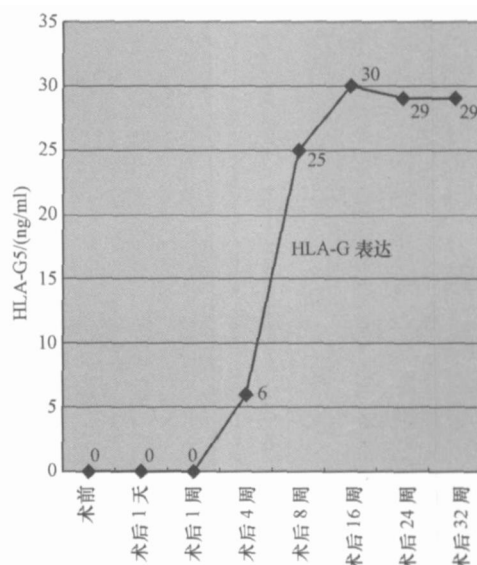


图1 一例心脏移植受者 HLA-G5 表达动态观察

Fig1 HLA-G5 expression in a heart recipient

(2) Western blotting 法检测 HLA-G5 表达结果 1、2 为阴性对照, 3 为阳性对照, 4 为空白对照, 5 为检测样品, 心脏移植受者外周血呈阳性 (图 2)。

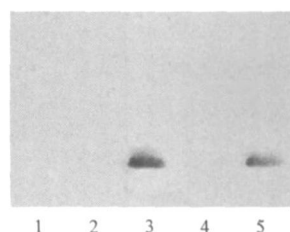


图2 心脏移植受者 HLA-G5 western blotting 检测结果

Fig2 HLA-G5 expression in heart recipient by western blotting

## 3 讨论

HLA-G5 的检测结果吻合, 与国外的报道一致。Lila 等通过对 51 名心脏移植受者心内膜表达的跨膜型 HLA-G 和血清中的可溶性 HLA-G 的检测发现 HLA-G 的表达有利于移植心脏的存活。在 51 例心脏移植患者中, 9 例的活检和血清中存在 HLA-G, 且急性排斥反应发生率低于 HLA-G 阴性的患者, 无慢性排斥反应发生; 而 15 例 HLA-G 阴性患者全部发生了慢性排斥反应。这提示 HLA-G 可能具有减轻和防止排斥反应的发生诱导免疫耐受的潜力, 从而细胞免疫机制是介导移植排斥反应的主要机制, 其中 T 细胞和 NK 细胞是最主要的效应细胞; NK 细胞可不经致敏而非特异性杀伤移植物细胞; CTL 可特异性地攻击移植物, 在急性排斥反应中发挥主要作用。因此抑制受者 NK 细胞和 CTL 活性可以有效控制移植排斥反应。HLA-G 可抑制 NK 细胞杀伤活性、抑制同种反应性 T 细胞增殖、诱导同种反应性 T 细胞凋亡, 从而防治排斥反应。

本组 1 例心脏移植受者术后存活至今, 术后应用 FK506、布累迪宁、强的松三联方案进行免疫抑制治疗, 心功能恢复正常, 生活质量良好, 未出现急性排斥反应。该例受者 HLA-G5 在术前和术后 1 天, 1 周无表达, 4 周后表达逐步增强, 16 周到达高峰。据

此推测受者术后心功能良好的原因之一, 很可能 HLA-G5 的阳性表达发挥了积极的作用, 保护移植物不受损伤, 并延缓或抑制排斥反应的发生。

### 参考文献

- [ 1 ] Garosella ED, Rouas-Freiss N, Paul Dausset J. HLA-G: A tolerance molecule from the major histocompatibility complex. *Immunol Today*. 1999; 20( 2): 60 - 62
  - [ 2 ] Nemine Lila, Catherine Amrein MD, Romain Guillemin MD et al. Human Leukocyte Antigen-G Expression After Heart Transplantation Is Associated with a Reduced Incidence of Rejection. *Circulation*. 2002; 23( 105): 1949 - 1956
  - [ 3 ] Thellin O, Coumans B, Zorzi W, et al. Tolerance to foeto-placental "graft": ten ways to support a child for nine months. *Curr Opin Immunol*. 2000; 12( 6): 731 - 737
  - [ 4 ] Garosella ED, Moreau B, LeMaout J et al. HLA-G molecules from maternal-fetal tolerance to tissue acceptance. *Adv Immunol*. 2003; 84: 199 - 252
  - [ 5 ] 龚非力. 医学免疫学. 北京: 科学出版社, 2002
  - [ 6 ] Vera-Rehmann, Annika Busenmann, Monica Lindemann et al. Detection of HLA-G5 Secreting Cells. *Human Immunology*. 2003; 64( 11): 1017 - 24
- ( 2006 - 06 - 20 收稿, 2006 - 08 - 08 修回 )

( 上接第 407 页 )

材料成骨活性评价方法, 这将为骨替代材料成骨效应评价提供参考。

### 参考文献

- [ 1 ] Joyce ME, Jingushi S, Bolander ME. Transforming growth factor-beta in the regulation of fracture repair. *Orthop Clin North Am*. 1990; 21( 1): 199
- [ 2 ] Mundy GR. Regulation of bone formation by bone morphogenic protein and other growth factors. *Clin Orthop Relat Res*. 1996; 324: 24
- [ 3 ] 李文, 岑远坤. 骨缺损整复中的生长因子载体材料. *中国口腔种植学杂志*, 1998; 3( 4): 187
- [ 4 ] 余英, 朱明华, 曾怡等. 生物活性陶瓷人工骨复合材料的理化性能测试. *职业卫生与病伤*, 2003; 18( 2): 88
- [ 5 ] 梁戈, 胡蕴玉, 郑昌群等. 多孔  $\beta$ -TCP/BMP 复合人工骨的研制和动物体内的相关研究. *中华骨科杂志*, 1998; 18( 2): 75
- [ 6 ] 徐彬. 羟基磷灰石种植体的动物实验研究( J ). *口腔材料器械杂志*, 1993; 2( 4): 20

- reactivity on bone formation and bone cell function. *Biomaterials*. 1999; 20: 2287
- [ 8 ] 朱明华, 曾怡, 孙涛, 等. 新型生物活性陶瓷复合人工骨效应的实验研究. *中国修复重建外科杂志*, 2005; 19( 3): 168
  - [ 9 ] 谢德明. BMP/PIA 复合骨细胞培养支架材料. *暨南大学学报*, 2000; 24: 92
  - [ 10 ] 方丽茹, 翁文剑, 沈鸽, 等. 骨组织工程支架及生物材料研究. *生物医学工程学杂志*, 2003; 20( 1): 148
  - [ 11 ] 朱明华, 曾怡, 孙涛, 等. 生物陶瓷与细胞外基质对成骨细胞生长及代谢影响. *北京生物医学工程杂志*, 2005; 24( 1): 18
  - [ 12 ] Carl A, Kirker H. Potential applications and delivery strategies for bone morphogenetic proteins. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2000; 43: 65
  - [ 13 ] 宁聪琴. 硬组织替换用羟基磷灰石复合材料的进展. *生物医学工程学杂志*, 2003; 20( 3): 550
  - [ 14 ] 葛建华, 王迎军. 可吸收性骨科材料类型及发展. *生物医学工程学杂志*, 2004; 21( 1): 151

( 2006 - 09 - 29 收稿 )