

# 系统性红斑狼疮患者血浆 sHLA - G 表达及其影响因素分析

吴凤霞 武丽君 罗雄燕 杨明辉 刘宁涛 库尔班江 谢传美 宋小芸  
唐 中 张国元 周京国 赵 岩 曾小峰 袁国华

**摘 要** **目的** 检测系统性红斑狼疮(SLE)患者血浆可溶性 HLA - G(sHLA - G)水平,并分析 HLA - G 基因多态性、病情及药物治疗对其表达的影响。**方法** 酶联免疫吸附法(ELISA)检测其中 96 例 SLE 患者及 74 名正常人血浆 sHLA - G 水平。聚合酶链式反应(PCR)检测 HLA - G 14bp 插入/缺失多态性基因,收集记录 SLE 疾病活动性指数(SLEDAI)和药物治疗情况,并分析基因多态性、病情及药物治疗对 sHLA - G 表达的影响。**结果** 血浆 sHLA - G 水平在 SLE 患者为  $230.2 \pm 192.2$  U/ml,显著高于健康体检者的  $118.3 \pm 38.1$  U/ml( $P = 0.0001$ );HLA - G 14bp 插入/缺失多态性位点和基因型在血浆 sHLA - G 水平增高和正常 SLE 患者中的分布无显著性差异( $P > 0.05$ );但血浆 sHLA - G 水平增高的 SLE 患者较血浆 sHLA - G 水平正常患者病情更重( $P = 0.027$ ),易出现中枢神经系统受累( $P = 0.007$ )。激素、免疫抑制剂及抗疟药等不同药物治疗在血浆 sHLA - G 水平增高和正常 SLE 患者间亦无统计学差异( $P > 0.05$ )。**结论** SLE 患者血浆 sHLA - G 水平增高,而且与 SLE 病情较重、中枢神经系统受累有关,提示 sHLA - G 在 SLE 病理过程中可能发挥重要作用。

**关键词** 系统性红斑狼疮 人白细胞抗原 G sHLA - G 基因多态性

**Expression of Plasma Soluble HLA - G and Factors Involving Influencing its Expression Levels in Patients with Systemic Lupus Erythematosus.** Wu Fengxia, Wu Lijun, Luo Xiongyan, Yang Minghui, Liu Ningtao, Kuer Banjiang, Xie Chuangmei, Song Xiaoyun, Tang Zhong, Zhang Guoyuan, Zhou Jingguo, Zhao yan, Zeng Xiaofeng, Yuan Guohua. Institute of Rheumatology and Immunology, Affiliated Hospital of North Sichuan Medical College, Sichuan 637000, China

**Abstract Objective** To determine plasma soluble HLA - G (sHLA - G) levels in patients with systemic lupus erythematosus (SLE), and to analyze factors involving influencing its expression levels. **Methods** Plasma samples were collected from 96 SLE patients and 74 healthy controls, and soluble HLA - G (sHLA - G) levels were determined by enzyme - linked immunosorbent assay. Polymerase chain reaction (PCR) was performed to detect the genotypes of HLA - G 14bp ins/del polymorphism. Individual clinical information, including drug therapy, was collected in detail from SLE patients, and the disease activity was assessed by the disease activity index for lupus patients (SLEDAI). **Results** Plasma concentration of sHLA - G was significantly higher in SLE patients than that in healthy controls [ $(211.8 \pm 182.5)$  U/ml vs  $(118.3 \pm 38.1)$  U/ml,  $P = 0.0001$ ]. No significant difference was found in HLA - G 14bp ins/del allelic frequencies and genotype distributions between SLE patients with increased sHLA - G level and patients with normal sHLA - G level ( $P > 0.05$ ). However, the patients with increased levels of sHLA - G had higher incidence of central nervous system involvement ( $P = 0.007$ ) and more severe disease activity ( $P = 0.027$ ) in comparison with patients with normal plasma sHLA - G levels. Finally, the expression of plasma sHLA - G was not influenced by the treatment with glucocorticoids, immunosuppressive agents or antimalarials. **Conclusion** The increased production of sHLA - G indicates that sHLA - G may play an important role in the pathogenesis of SLE. The expression of sHLA - G may be associated with disease activity and severity of lupus patients, but be independence of HLA - G 14bp ins/del polymorphism and drug treatment.

**Key words** Lupus erythematosus; Systemic; Human leukocyte antigen G; Soluble HLA - G; Polymorphism

基金项目:卫生部重大疾病研究资助项目(2008BA159B02)

作者单位:637000 南充,川北医学院风湿免疫研究所(吴凤霞、罗雄燕、杨明辉、谢传美、唐中、张国元、周京国、袁国华);乌鲁木齐,新疆维吾尔自治区人民医院风湿科(武丽君、宋小芸、库尔班江);四川省遂宁市中心医院风湿科(刘宁涛);北京协和医院风湿科(赵岩、曾小峰)

通讯作者:袁国华,电子信箱:ghuayuan1996@yahoo.com

人白细胞抗原 G(HLA - G)是一种非经典的 I 类组织相容性复合体(MHC)分子,在体内存在膜型和可溶型 2 种形式。大量的研究结果证实,HLA - G 可在免疫调节和免疫耐受中发挥重要的生物学作用<sup>[1]</sup>。近期的研究发现,自身免疫性疾病如溃疡性

结肠炎、多发性硬化、类风湿关节炎患者中 HLA - G 表达发生了改变,推测其可能在自身免疫性疾病的病理生理过程中发挥重要作用<sup>[2]</sup>。系统性红斑狼疮(SLE)是一种累及多系统和多器官的自身免疫性疾病,本研究对 SLE 患者血浆中可溶性 HLA - G (sHLA - G)水平进行检测,并分析 HLA - G 基因多态性、病情及药物治疗对其表达的影响。

对象与方法

1. 研究对象:2007 年 12 月~2009 年 2 月在川北医学院、新疆维吾尔自治区人民医院和遂宁市人民医院确诊为 SLE 的患者 96 例,其中男性患者 8 例,女性患者 88 例,年龄 36.1 ± 13.9 岁,病程 1 个月~25 年,中位病程 1 年,所有患者均符合 1997 年美国风湿病学会修订的 SLE 诊断标准<sup>[3]</sup>。详细收集所有患者的临床资料,包括症状、体征、实验室检查结果以及检查前 1 个月内的药物治疗情况。按照文献<sup>[4]</sup>报道的方法计算狼疮疾病活动指数(SLEDAI)积分。同时选择 74 例年龄和性别匹配的健康体检者作为对照。

2. 血浆 sHLA - G 检测:分别抽取上述患者及对照者空腹静脉血 2ml,用肝素抗凝,2500r/min 离心 10min,血浆于 - 30℃ 保存备用。血浆 sHLA - G 的检测采用酶联免疫吸附法(ELISA),试剂盒购自武汉中美科技有限公司(产品编号 E1856h),操作按试剂盒说明书中的步骤进行。

3. HLA - G 14bp 插入/缺失多态性分析:所有患者及对照人群均采集外周 EDTA 抗凝血 2ml。取混匀全血 750μl 按照

外周血基因组 DNA 提取试剂盒说明书提取基因组 DNA,试剂盒购自北京天根生化公司(TIANampDNA Blood Kit,目录号 DP318 - 03)。HLA - G 14bp 插入/缺失多态性分析采用多聚酶链式反应(PCR 反应)。PCR 反应引物由北京博迈德生物有限公司合成,序列如下:正向引物 5' - GTG ATG GGC TGT TTA AAG TGT CAC C - 3',反向引物 5' GGA AGG AAT GCA GTT CAG CAT GA - 3', PCR 反应条件:变性 94℃、2min;循环反应:94℃、30s,60℃、30s,72℃、1min,30 个循环;延伸反应:72℃、5min。PCR 反应完成后取 5μl 产物进行 3% 琼脂糖凝胶电泳,凝胶成像仪下观察并直接计数 HLA - G 14bp 插入/缺失多态性基因型。HLA - G 14bp 插入位点 PCR 产物为 224bp,14bp 缺失位点为 210bp。

4. 统计学方法:采用 SPSS11.5 统计软件,组间计量资料的比较采用 *t* 检验,百分率或阳性率的比较采用  $\chi^2$  检验, $P < 0.05$  提示有统计学意义。

结 果

1. 血浆 sHLA - G 水平检测结果:血浆 sHLA - G 在正常对照为 118.3 ± 38.1U/ml,在 SLE 患者为 230.2 ± 192.2U/ml,两者比较具有显著性统计学意义的差异( $t = 5.07, P = 0.0001$ )。

2. HLA - G 基因 14bp 插入(+14)/缺失(-14)多态性对血浆 sHLA - G 水平的影响:HLA - G 基因 14bp 插入/缺失多态性位点和基因型频率在正常人与 SLE 患者中的分布均无显著性差异(表 1)。

表 1 SLE 患者及正常对照人群 HLA - G 等位基因及基因型分布 [ $n(\%)$ ]

| 基因           | 对照组 ( $n = 74$ ) | SLE ( $n = 96$ ) | <i>P</i> | OR (95% CI)           |
|--------------|------------------|------------------|----------|-----------------------|
| HLA - G 等位基因 |                  |                  |          |                       |
| + 14         | 61 (41.2)        | 89 (46.4)        | 0.344    | 0.811 (0.526 ~ 1.251) |
| - 14         | 87 (58.8)        | 103 (53.6)       | 0.344    | 1.232 (0.799 ~ 1.900) |
| HLA - G 基因型  |                  |                  |          |                       |
| + 14/+ 14    | 15 (20.3)        | 28 (29.2)        | 0.186    | 0.617 (0.301 ~ 1.265) |
| + 14/- 14    | 31 (41.9)        | 33 (34.4)        | 0.316    | 1.376 (0.737 ~ 2.571) |
| - 14/- 14    | 28 (37.8)        | 35 (36.4)        | 0.854    | 1.061 (0.567 ~ 1.986) |

我们将正常人组血浆 sHLA - G 水平的均值 + 3D (230.2U/ml) 作为正常上限,血浆 sHLA - G 水平升高者在 74 名正常人中无一例,在 96 例 SLE 患者

中有 33 例 (34.4%)。63 例血浆 sHLA - G 水平正常和 33 例血浆 sHLA - G 水平增高 SLE 患者中 HLA - G 等位基因及基因型分布见表 2。

表 2 HLA - G 等位基因及基因型频率在 sHLA - G 水平正常和增高 SLE 患者中的分布 [ $n(\%)$ ]

| 组别                  | HLA - G 等位基因 |           |           | <i>P</i>                                 | HLA - G 基因型 |           |           |           | <i>P</i>                                 |
|---------------------|--------------|-----------|-----------|------------------------------------------|-------------|-----------|-----------|-----------|------------------------------------------|
|                     | <i>n</i>     | + 14      | - 14      |                                          | <i>n</i>    | + 14/+ 14 | + 14/- 14 | - 14/- 14 |                                          |
| 正常人组                | 148          | 61 (41.2) | 87 (58.8) |                                          | 74          | 15 (20.3) | 31 (41.9) | 28 (37.8) |                                          |
| sHLA - G 水平正常 SLE 组 | 126          | 56 (44.4) | 70 (55.6) | 0.590 <sup>a</sup>                       | 66          | 19 (30.2) | 18 (28.5) | 26 (41.3) | 0.209 <sup>a</sup>                       |
| sHLA - G 水平增高 SLE 组 | 66           | 31 (47.0) | 35 (53.0) | 0.432 <sup>a</sup><br>0.738 <sup>b</sup> | 33          | 9 (27.3)  | 15 (45.4) | 9 (27.3)  | 0.521 <sup>a</sup><br>0.221 <sup>b</sup> |

a. 与正常人组比较;b. 与 sHLA - G 水平正常 SLE 患者比较

3. SLE 病情活动和严重程度对血浆 sHLA - G 水平的影响:血浆 sHLA - G 水平正常和血浆 sHLA - G

水平增高 SLE 患者的临床和实验室资料对照结果见表 3。由表 3 可见:血浆 sHLA - G 水平增高 SLE 患

者神经系统受累发生率明显高于血浆 sHLA - G 水平正常的 SLE 患者 ( $P = 0.007$ )。同时,前者的病情活

动积分显著高于后者 ( $P = 0.027$ )。

表 3 血浆 sHLA - G 水平增高和正常的 SLE 患者的临床和实验室对照结果 [ $n(\%)$ ]

| 项目                         | sHLA - G 水平正常 ( $n = 63$ ) | sHLA - G 水平增高 ( $n = 33$ ) | $P$   |
|----------------------------|----------------------------|----------------------------|-------|
| 年龄 (岁) ( $\bar{x} \pm s$ ) | 34.2 $\pm$ 15.4            | 32.6 $\pm$ 14.1            | 0.372 |
| 病程 (月) ( $\bar{x} \pm s$ ) | 37.4 $\pm$ 31.7            | 34.2 $\pm$ 32.1            | 0.461 |
| 皮疹                         | 44 (69.8)                  | 19 (57.6)                  | 0.229 |
| 光过敏                        | 13 (20.6)                  | 10 (30.3)                  | 0.292 |
| 口腔溃疡                       | 21 (33.3)                  | 8 (24.2)                   | 0.357 |
| 关节炎/关节痛                    | 48 (76.2)                  | 23 (69.7)                  | 0.491 |
| 浆膜炎                        | 15 (23.8)                  | 11 (33.3)                  | 0.319 |
| 肾炎                         | 43 (69)                    | 25 (76)                    | 0.442 |
| 血液系统受累                     | 38 (60.3)                  | 22 (66.7)                  | 0.542 |
| 神经系统受累                     | 3 (4.76)                   | 8 (24.2)                   | 0.007 |
| 补体 C3 降低                   | 44 (69.8)                  | 20 (60.6)                  | 0.362 |
| 抗 dsDNA 阳性                 | 40 (63.5)                  | 19 (57.6)                  | 0.572 |
| ANA 阳性                     | 63 (100)                   | 33 (100)                   | 0.833 |
| SLEDAI, $\bar{x} \pm s$    | 8.27 $\pm$ 4.62            | 10.70 $\pm$ 5.37           | 0.027 |

4. 药物治疗对 sHLA - G 水平的影响:糖皮质激素(简称激素)、免疫抑制剂以及抗疟药物(氯喹和羟基氯喹)被普遍用于 SLE 的治疗,而这些药物对其他免疫分子的调节作用已得到证实,为了解这些药物对 sHLA - G 在 SLE 患者表达的影响,我们比较了血浆 sHLA - G 水平正常或升高患者中激素、激素联合免疫抑制和(或)抗疟药物治疗情况,结果显示在血浆 sHLA - G 水平升高的 SLE 患者中用激素冲击者占 33.3%,明显多于血浆 sHLA - G 水平正常患者的 14.3% ( $P = 0.029$ ),而其他药物的使用情况在两组间无显著性差异( $P$  均  $> 0.05$ )。

## 讨 论

HLA - G 基因属于非经典 HLA - Ib 类基因,具有 23 个等位基因(16 个位于外显子,7 个位于内含子),编码 7 种 HLA - G 分子,即 HLA - G<sub>1</sub> ~ HLA - G<sub>7</sub><sup>[5]</sup>。在生理状况下,HLA - G 主要表达于胚胎滋养层细胞、胸腺上皮细胞和眼角膜细胞<sup>[1]</sup>。但近期的研究发现,HLA - G 在肿瘤、病毒感染、器官移植等多种病理状态也有高表达,说明 HLA - G 分子在一些疾病的过程中可能发挥重要作用。

大量的研究结果证实,HLA - G 具有极强的免疫调节作用,主要表现为:①通过与自然杀伤细胞(NK)表面的 Ig 样受体(killer cell Ig - like receptor, KIR)直接作用,抑制 NK 细胞的溶细胞功能,并能诱导 NK 细胞凋亡;②抑制 CD4<sup>+</sup>T 细胞增生和诱导 CD8<sup>+</sup>T 细胞凋亡;③促使 Th1 反应向 Th2 漂移,Baricordi OR 等在近期的报告指出,HLA - G 可抑制 Th1 型细胞因子表达,促使 Th2 型细胞因子分泌增多,同时 Th2 分泌

的细胞因子 IL - 10 又可上调 HLA - G 的表达,从而导致免疫平衡由 Th1 向 Th2 漂移<sup>[6-9]</sup>。

近期的研究结果显示,HLA - G 在多种炎症疾病和自身免疫性疾病中表达发生改变,在哮喘患者的支气管上皮、溃疡性结肠炎患者的肠黏膜、银屑病患者的病损皮肤组织及炎性肌病患者的肌纤维组织中均观察到有 HLA - G 的表达<sup>[10-13]</sup>,表明 HLA - G 参与了这类疾病的病理生理过程。目前有关 HLA - G 在 SLE 病变中的作用研究甚少,仅有 2 篇报道。Rizzo R 等<sup>[2]</sup>检测了 60 例意大利人和 70 例丹麦人 SLE 患者的 sHLA - G 水平,结果显示两个人群中 SLE 患者 sHLA - G 水平均明显低于相应的正常对照组。Rodado 等<sup>[14]</sup>检测了 HLA - G 在 60 例西班牙人 SLE 患者中的表达,结果发现,血清 sHLA - G 水平在 SLE 患者均明显高于正常对照组,并在 SLE 的病变皮肤中检测到 HLA - G 的高表达。我们对 96 例 SLE 患者血浆 sHLA - G 检测结果显示,SLE 患者血浆 sHLA - G 水平明显高于正常对照组。造成上述研究组间结果不同的原因可能与 sHLA - G 的表达受到其基因多态性、患者病情及药物治疗等因素的影响有关。

有报道认为位于 HLA - G 第 8 外显子 3'非翻译区的 14bp 插入/缺失多态性位点(rs16375)可通过影响 sHLA - G 分子的表达水平而与 SLE 患病的易感性有关<sup>[15]</sup>。Chen XY 等<sup>[16]</sup>发现有着 +14bp/+14bp 基因型的个体血浆 sHLA - G 水平较另外 2 种基因型的个体明显降低。Rizzo R 等<sup>[2]</sup>对意大利人群中 200 例 SLE 患者进行 HLA - G 14bp 插入/缺失多态性进行 DNA 分型分析,并与相应人群中 451 名健康人对

照,结果发现,14bp 插入位点( + 14bp)和 + 14bp/ + 14bp 基因型频率在 SLE 患者中明显增高,而且伴随 sHLA - G 水平降低。但我们未发现 SLE 患者中 HLA - G 14bp 插入/缺失多态性与 SLE 的发病有显著性关联,而且在血浆 sHLA - G 水平增高的 SLE 患者中,其 HLA - G 14bp 插入/缺失多态性位点和基因型频率分布与正常人和血浆 sHLA - G 水平正常的 SLE 患者均无显著性差异,说明在 SLE 患者 sHLA - G 的表达上调与 HLA - G 14bp 插入/缺失多态性无关。

进一步分析 SLE 病情活动性和严重程度对血浆 sHLA - G 表达水平的影响发现,在血浆 sHLA - G 水平增高的患者中中枢神经系统受累发生率明显增高,患者的病情活动程度显著加重,表明 sHLA - G 表达水平的高低与 SLE 病情活动性和严重程度有关。这也可以解释 Rizzo R 等<sup>[2]</sup>观察 SLE 患者 sHLA - G 表达水平降低,而我们和 Rodado 等<sup>[14]</sup>则观察到 SLE 患者 sHLA - G 表达水平增高这一矛盾结果,因为在 Rizzo 等选择的病例中多为病情活动度相对较轻的患者(平均 SLEDAI = 2),而我们和 Rodado 等所检测的病例多为活动性病变患者。进一步说明 HLA - G 分子在 SLE 的病理过程中可能发挥重要作用。

激素和免疫抑制剂被广泛用于 SLE 的治疗。为观察这些药物是否对 sHLA - G 的表达有影响,我们对照了不同剂量激素治疗、以及激素联合免疫抑制剂和(或)抗疟药物治疗患者血浆 sHLA - G 表达情况,结果仅显示血浆 sHLA - G 增高 SLE 患者中激素冲击治疗者较多,此与 sHLA - G 增高患者的病情较重有关。未能显示出其他药物治疗影响 sHLA - G 的表达。Rodado 等也观察到激素、免疫抑制剂及抗疟药物均对 sHLA - G 产生无影响<sup>[14]</sup>。

总之,血浆 sHLA - G 水平在 SLE 患者中明显增高提示 sHLA - G 可能参与到 SLE 发病机制中,血浆 sHLA - G 水平高低主要取决于 SLE 病情严重性及活动性,而与 HLA - G 14bp 插入/缺失多态性及 SLE 药物治疗无关,具体机制尚有待进一步研究证实。

# 参考文献

- 1 Apps R, Gardner L, Moffett A. A critical look at HLA - G. Trends Immunol, 2008, 29: 313 - 321
- 2 Rizzo R, Hviid TV, Govoni M, et al. HLA - G genotype and HLA - G expression in systemic lupus erythematosus: HLA - G as a putative susceptibility gene in systemic lupus erythematosus. Tissue Antigens,

- 2008, 71: 520 - 529
- 3 Hochberg MC. Updating the American College of Rheumatology revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. Arthritis Rheum, 1997, 40(9): 1725
- 4 张文,李芹,曾学军,等. 五种系统性红斑狼疮活动指数的比较. 中华风湿病学杂志, 2001, 5(1): 35 - 38
- 5 Carosella ED, Moreau P, Lemaoult J, et al. HLA - G: from biology to clinical benefits. Trends Immunol, 2008, 29: 125 - 132
- 6 Baricordi OR, Stignani M, Melchiorri L, Rizzo R. HLA - G and inflammatory diseases. Inflamm Allergy Drug Targets, 2008, 7(2): 67 - 74
- 7 Rouas - Freiss N, Marchal RE, Kirszenbaum M, et al. The alpha1 domain of HLA - G1 and HLA - G2 inhibits cytotoxicity induced by natural killer cells: is HLA - G the public ligand for natural killer cell inhibitory receptors? Proc Natl Acad Sci USA, 1997, 94: 5249 - 5254
- 8 Lindaman A, Dowden A, Zavazava N. Soluble HLA - G molecules induce apoptosis in natural killer cells. Am J Reprod Immunol, 2006, 56(1): 68 - 76
- 9 Contini P, Ghio M, Poggi A, et al. Soluble HLA - A, - B, - C and - G molecules induce apoptosis in T and NK CD8<sup>+</sup> cells and inhibit cytotoxic T cell activity through CD8 ligation. Eur J Immunol, 2003, 33: 125 - 134
- 10 Nicolae D, Cox NJ, Lester LA, et al. Fine mapping and positional candidate studies identify HLA - G as an asthma susceptibility gene on chromosome 6p21. Am J Hum Genet, 2005, 76: 349 - 357
- 11 Torres M I, Le Discorde M, Lorite P, et al. Expression of HLA - G in inflammatory bowel disease provides a potential way to distinguish between ulcerative colitis and Crohn's disease. Int. Immunol, 2004, 16: 579 - 583
- 12 Aractingi S, Briand N, Le Danff C, et al. HLA - G and NK receptor are expressed in psoriatic skin: a possible pathway for regulating infiltrating T cells? Am J Pathol, 2001, 159: 71 - 77
- 13 Wiendl H, Mitsdoerffer M, Weller M. Express and protect yourself: the potential role of HLA - G on muscle cells and in inflammatory myopathies. Hum Immunol, 2003, 64: 1050 - 1056
- 14 Rosado S, Perez - Chacon G, Mellor - Pita S, et al. Expression of human leukocyte antigen - G in systemic lupus erythematosus. Hum Immunol, 2008, 69: 9 - 15
- 15 Hviid TV, Rizzo R, Melchiorri L, et al. Polymorphism in the 5' upstream regulatory and 3' untranslated regions of the HLA - G gene in relation to soluble HLA - G and IL - 10 expression. Hum Immunol, 2006, 67: 53 - 62
- 16 Chen XY, Yan WH, Lin A, et al. The 14 bp deletion polymorphisms in HLA - G gene play an important role in the expression of soluble HLA - G in plasma. Tissue Antigens, 2008, 72(4): 335 - 341

(收稿:2009 - 11 - 25)

(修回:2010 - 01 - 07)