

GGTA1^{-/-} 五指山小型猪 SLA I 类基因分子特征及与 HLA 相似性分析

蒋应弟^{1,2}, 曾国敏^{2,3}, 石宁宁², 李西睿², 纪慧丽², 潘登科^{2*}, 滚双宝^{1*}

(1. 甘肃农业大学动物科学技术学院, 兰州 730070; 2. 中国农业科学院北京畜牧兽医研究所农业部畜禽遗传资源与种质创新重点实验室, 北京 100193; 3. 甘肃农业大学生命科学技术学院, 兰州 730070)

【摘要】 目的 明晰 α -1,3 半乳糖基转移酶基因敲除 (GGTA1^{-/-}) 的五指山小型猪 SLA 经典 I 类基因分子结构特征及其与人 HLA 的相似性, 对研究异种器官移植细胞性排斥反应具有重要意义。方法 采集 6 头祖代 GGTA1^{-/-} 五指山小型猪耳组织, 利用 RT-PCR 对 SLA I 类基因 (SLA-1、SLA-3、SLA-2) 扩增、克隆及测序, 对序列进行 BLAST 分析, 并采用生物信息学方法对 SLA I 类基因分子结构特征及其与人 HLA 的同源性进行分析。结果 测序分析表明, 共获得 6 条等位基因序列, 其中 4 条为已公布的等位基因 (SLA-1 * 0703、SLA-2 * 1102、SLA-3 * 0401、SLA-3 * 0403), 另 2 条为新等位基因 (SLA-1 * 0401wz01、SLA-2 * 11wz01)。五指山小型猪与人 HLA 同源性为 70.5% ~ 72.1%。SLA-1 * 0401wz01、SLA-1 * 0703、SLA-2 * 11wz01、SLA-2 * 1102 和 SLA-3 * 0401 的 CD8 + 分子识别的关键结合域与人 HLA 氨基酸序列比对, 均仅在位点 225、228 处发生了突变 (T→S、T→M), 其他位点高度保守。SLA-2 * 11wz01 和 SLA-2 * 1102 与人 HLA I 类基因 NK 细胞抑制性受体 (killer inhibitory receptor, KIR) 结合区氨基酸同源性较高, 在 NKTA-1 亚型结合域内仅有 1 个氨基酸差异, 而在 NKTA-2 和 NKTA-3 亚型结合域内有 2 个氨基酸差异。结论 从免疫细胞介导的异种排斥反应角度出发, GGTA1^{-/-} 五指山小型猪 SLA I 类基因氨基酸序列与人 HLA 高度相似, 可作为未来猪-人异种器官移植的良好供体之一。

【关键词】 GGTA1^{-/-}; 五指山小型猪; SLA; 异种移植; 免疫排斥

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2016)04-0375-06

Doi: 10.3969/j.issn.1005-4847.2016.04.008

Characterization of swine leukocyte antigen class I genes and homology analysis of the similarity to HLA in GGTA1^{-/-} Wuzhishan minipigs

JIANG Ying-di^{1,2}, ZENG Guo-min^{2,3}, SHI Ning-ning², LI Xi-rui²,
JI Hui-li², PAN Deng-ke^{2*}, GUN Shuang-bao^{1*}

(1. College of Animal Science and Technology, Gansu Agricultural University, Lanzhou 730070, China;

2. Key Laboratory of Farm Animal Genetic Resource and Germplasm Innovation of Ministry of Agriculture, Institute of Animal Science, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100193;

3. College of life Science and Technology, Gansu Agricultural University, Lanzhou 730070)

【Abstract】 Objective This study was aimed to characterize the swine leukocyte antigen (SLA) class I genes of GGTA1^{-/-} Wuzhishan minipigs and compare their similarity to human leukocyte antigen (HLA). It has important implications for understanding the cellular rejection in xenotransplantation. **Methods** Specimens of ear tissue from six founding GGTA1^{-/-} Wuzhishan minipigs were collected, and the SLA class I genes (SLA-1, SLA-3, SLA-2) were amplified by RT-PCR. Purified products were cloned into pEASY-T1 vectors and sequenced, followed by BLAST alignment and using bioin-

【基金项目】 国家重点基础研究发展计划 (编号: 2015CB554103)。

【作者简介】 蒋应弟 (1986 -), 女, 硕士研究生, 研究方向: 动物遗传育种与繁殖。E-mail: 529149896@qq.com

【通讯作者】 滚双宝 (1967 -), 男, 博士, 教授, 主要从事动物遗传育种。E-mail: gunsbb@gsau.edu.cn

潘登科 (1972 -), 男, 博士, 副研究员, 主要从事转基因猪模型。E-mail: pandengke2002@163.com

formatc analysis to characterize the SLA class I genes and compare with the similarity to HLA. **Results** A total of six alleles were detected, among them alleles were previously reported (SLA-1 * 0703, SLA-2 * 1102, SLA-3 * 0401, SLA-3 * 0403), and the other were novel (SLA-1 * 0401wz01, SLA-2 * 11wz01). The homology between alleles of SLA class I genes in Wuzhishan minipigs and HLA was from 70.5% to 72.1%. The homology analysis of critical amino acid residues on HLA binding with human CD8⁺ molecules showed that SLA-1 * 0401wz01, SLA-1 * 0703, SLA-2 * 11wz01, SLA-2 * 1102 and SLA-3 * 0401 occurred mutant at amino acid positions 225 and 228 (T→S, T→M), whereas the other loci were highly conserved. There was a high homology at amino acid level between SLA-2 * 11wz01, SLA-2 * 1102 and HLA class I genes which are NK cell KIRs binding sites. **Conclusions** The amino acid sequences of SLA class I genes of *GGTA1*^{-/-} Wuzhishan minipigs have a high homology to HLA. From the point of view of cell-mediated xenograft rejection, the amino acid sequences of SLA class I genes of *GGTA1*^{-/-} Wuzhishan minipigs have a high homology to HLA, therefore, Wuzhishan minipigs may become a good potential donor for pig-human xenotransplantation.

[Key words] *GGTA1*^{-/-}; Wuzhishan minipigs; Swine leukocyte antigen, SLA; Xenotransplantation; Immune rejection

Corresponding author: GUN Shuang-bao, E-mail: gunsb@gsau.edu.cn; PAN Deng-ke, Email: pandengke2002@163.com

α -1,3 半乳糖基转移酶基因敲除 (*GGTA1*^{-/-}) 猪的诞生有效克服了异种移植时超急性排斥反应的发生, 随后细胞性排斥成为目前亟待解决的问题^[1-4]。免疫细胞介导的异种排斥反应可分为适应性细胞反应和固有细胞免疫反应。其中适应性免疫细胞主要指 T 淋巴细胞, 而固有免疫细胞包括自然杀伤 (natural killer, NK) 细胞、单核吞噬细胞、中性粒细胞和树突状细胞 (DC) 等。研究报道猪白细胞抗原 (swine leukocyte antigen, SLA) 是引起异种移植细胞性免疫排斥的遗传因素之一^[5-7]。异种移植引起的 CD8⁺ T 细胞免疫排斥反应的大小主要取决于供体细胞表面 SLA I 类分子与被 CD8⁺ 分子识别的 HLA 分子的同源性^[8-9]。人 NK 细胞的活性受表面抑制性受体的调控。当抑制受体识别自身 MHC I 分子后, 对 NK 细胞毒作用产生抑制性信号, 避免 NK 细胞对自体细胞的攻击^[10]。但异种移植时, 人 NK 细胞抑制性受体不能识别 SLA I 分子, 因而不能向 NK 细胞受体提供抑制性信号, 从而产生抗猪的 NK 细胞毒作用^[11]。

五指山小型猪是目前我国异种器官移植研究常用实验动物之一。国内关于五指山小型猪 SLA I 类基因的研究大多集中在多态性较高的外显子或单个基因的克隆分析^[12-14], 对 SLA I 类基因全长 cDNA 序列结构特征分析及与人 HLA 相似性报道较少。利用体细胞核移植技术获得的 *GGTA1*^{-/-} 五指山小型猪已被多次应用于异种器官移植临床前研究^[15-16], 鉴于此, 本研究以 *GGTA1*^{-/-} 五指山小型猪为研究对象, 通过对其 SLA 经典 I 类基因 (SLA-1、SLA-2、SLA-3) 分子结构特征研究及与人 HLA 相似性分析, 为筛选更适合异种移植研究的 *GGTA1*^{-/-} 五指山小型猪提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 材料

采集 6 头祖代 7~8 月龄、体重在 10~40 kg 普通级的 *GGTA1*^{-/-} 五指山小型猪耳组织样本, 液氮中保存。

动物组织总 RNA 提取试剂盒购自北京天根生化科技有限公司; 反转录试剂盒、pEASY-T1 Simple Cloning Kit 购自北京全式金生物技术有限公司; TaKaRa LA *Taq* 聚合酶、2×GC Buffer II 购自宝生物工程 (大连) 有限公司; DNA 纯化回收试剂盒、DH10b 感受态细胞购自中美泰和生物技术 (北京) 有限公司。

1.2 方法

1.2.1 RNA 的提取及反转录

提取样本的总 RNA; 用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测总 RNA 质量; 采用反转录试剂盒将 RNA 反转录为 cDNA, -20℃ 保存备用。

1.2.2 SLA-1、SLA-3 和 SLA-2 基因的扩增

参考 GenBank 中 SLA I 类基因序列, 用 Laser-gene 7.1 软件包中的 PrimerSelect 软件分别设计 SLA-1 和 SLA-3 扩增引物, SLA-2 扩增引物引用 Gao 等^[19]的研究, 引物由中美泰和生物技术 (北京) 有限公司合成。引物序列及退火温度见表 1。PCR 反应体系: 10.0 μL 2×GC buffer II, 上下游引物 (10 μmol/L) 各 1.0 μL, 0.4 μL dNTPs (10 mmol/L), 0.1 μL La *Taq* 酶, 1.0 μL cDNA 模板, 6.5 μL ddH₂O, 总反应体系为 20 μL。PCR 扩增程序: 95℃ 预变性 5 min; 95℃ 变性 30 s, 表 1 中各退火温度 30 s, 72℃ 延伸 80 s, 35 个循环; 72℃ 延伸 10 min, 16℃ 保存。

表 1 SLA I 类基因的扩增引物

Tab.1 PCR primers information of the SLA class I genes

基因座 Gene loci	正/反向引物(5' - 3') Primer sequences	退火温度/℃ Annealing temperature	引用 Reference
SLA-1	F:AGACCCCGAGGCTGAGGATCAT R:AGGCAGCTGCAGAAACAGGAGTCA	62	-
SLA-3	F:TGGAGCTGGAAGTGGATCAG R:CAGACTCCGAGGCTGAGGATC	62	-
SLA-2	F:CCACAGAATCTCCGCAGATTCC R:CCGACACAGACACATTCAAATGCT	55	[19]

1. 2. 3 基因的克隆及序列分析

PCR 产物用纯化试剂盒切胶回收,克隆并经阳性鉴定后送中美泰和生物技术(北京)有限公司进行双向测序,每个基因座筛选至少 8 个以上阳性单克隆菌液进行测序,利用 Lasergene 7.1 软件包中的 SeqMan 程序对获得的序列进行剪切拼接,拼接序列通过 BLAST (http://www. ncbi. nlm. nih. gov/BLAST/) 比对分析,新等位基因的序列提交至 GenBank 并获取相应序列号。

1. 2. 4 同源性分析

使用 MegAlign 软件在氨基酸水平上对五指山小型猪与 NIH 小型猪、人和鼠 SLA I 类等位基因同源性分析,且与被 CD8⁺ 分子识别的 HLA 关键结合域氨基酸相似性、与 HLA I 类基因 KIR 结合区氨基酸相似性进行比较。

2 结果与分析

2.1 SLA I 类基因的扩增

GGTA1^{-/-} 五指山小型猪耳组织总 RNA 电泳结果(图 1A),显示:RNA 质量较好;SLA-1、SLA-2 和 SLA-3 均有特异性扩增条带,大小分别为 1200 bp、1231 bp 和 1300 bp,与预期扩增结果一致(图 1B)。

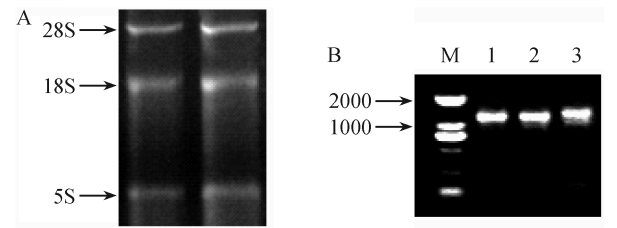


图 1 总 RNA(A)及 SLA-1(B. 1)、SLA-2(B. 2)、SLA-3(B. 3)基因

Fig.1 A: Agarose gel assay of the total RNA;
B: Agarose gel assay of RT-PCR amplification of SLA-1, SLA-2 and SLA-3 genes

2.2 SLA I 类基因序列分析

在 GGTAl^{-/-} 五指山小型猪 SLA-1、SLA-2、

SLA-3 基因座上均获得 2 条序列,经 BLAST 分析,SLA-1 基因中的 1 条为新等位基因,将序列提交于 GenBank,获得其序列号:SLA-1 * 0401wz01 (Accession No: KT715501),另 1 条 SLA-1 * 0703 已报道;SLA-3 基因中 2 条等位基因序列均已被报道,分别为 SLA-3 * 0401 (Accession No: AF464011)、SLA-3 * 0403 (Accession No: KT715502);SLA-2 基因中的 SLA-2 * 1102 (Accession No: JQ361654)为已发现的等位基因,另外 1 条为新的等位基因,将其提交于 GenBank,获得序列号:SLA-2 * 11wz01 (Accession No: KT194213)。将 SLA-1 和 SLA-2 基因座上的新等位基因分别与 NCBI 中相应等位基因核苷酸比对发现新等位基因的高变异位点主要集中在第 2、3 外显子上,其他位点相对保守。

2.3 SLA I 类基因在个体中的分布

6 头 GGTAl^{-/-} 五指山小型猪个体中 SLA 经典 I 类基因座上共获得 6 条等位基因序列,6 个等位基因在个体中的分布情况见表 2。

2.4 SLA I 类等位基因的同源性分析

将本研究获得等位基因序列与美国 NIH 小型猪、人及鼠相应等位基因在氨基酸水平进行同源性比较,发现五指山小型猪 SLA I 类等位基因序列与 NIH 小型猪在氨基酸水平上同源性在 83.2% ~ 100% 之间,与人 HLA 同源性为 70.5% ~ 72.1%。SLA-1 * 0401wz01 与 NIH 猪 SLA-1 * 0401 相比,核苷酸序列仅在位点 564 处发生同义突变(G→C),与人 HLA 同源性高达 70.8%;SLA-2 基因座上等位基因 SLA-2 * 11wz01、SLA-2 * 1102 与 NIH 小型猪相应等位基因同源性高达 92.1%,与人 HLA 同源性高达 71.3%,与鼠的同源性仅为 62.2%;SLA-3 基因座上等位基因 SLA-3 * 0401、SLA-3 * 0403 与 NIH 小型猪相应等位基因同源性高达 94.5%,与人的同源性高达 72.1%。各等位基因的同源性比对情况见表 3。

表 2 SLA I 类基因座上等位基因的分布

Tab. 2 Distribution of alleles in the SLA classical I genes loci

个体 Individuals	SLA I 类基因座 SLA class I genes loci		
	SLA-1	SLA-3	SLA-2
60	0401wz01/0703	0403/0401	11wz01
01	0401wz01/0703	0403/0401	11wz01/1102
1203	0401wz01/0703	0403/0401	11wz01/1102
1212	0703	0401	11wz01/1102
1316	0703	0401	11wz01/1102
1220	0401wz01/0703	0403/0401	11wz01/1102

表 3 SLA-1、SLA-2、SLA-3 等位基因氨基酸同源性比较

Tab. 3 Comparison of MHC class I alleles in terms of amino acid homology among Wuzhishan minipigs, NIH minipigs, mice and humans

等位基因 Alleles	<i>I * 0701</i>	<i>I * 0401</i>	<i>2 * 0401</i>	<i>2 * 0301</i>	<i>3 * 0301</i>	<i>3 * 0602</i>	A * 0201	H-2D ^b
SLA-1 * 0401wz01	93. 4	100	88. 4	90. 3	87. 6	87. 3	71. 0	60. 5
SLA-1 * 0703	93. 4	91. 4	87. 3	89. 5	88. 1	87. 3	70. 8	62. 0
SLA-2 * 11wz01	89. 8	88. 9	91. 4	92. 1	87. 6	87. 0	71. 3	62. 6
SLA-2 * 1102	90. 1	90. 3	91. 8	91. 0	89. 0	88. 1	70. 5	62. 9
SLA-3 * 0401	89. 0	87. 0	91. 4	88. 7	93. 6	83. 2	72. 1	63. 2
SLA-3 * 0403	88. 1	86. 7	90. 0	88. 6	93. 4	93. 6	71. 0	62. 8

注: A * 0201 表示人群中出现频率较高的 HLA-A * 0201 基因; 斜体表示 NIH 小型猪 SLA-1、SLA-2、SLA-3 基因座上出现频率较高的等位基因, 依次为: SLA-1 * 0701 (AF464036)、SLA-1 * 0401 (AF464002)、SLA-2 * 0401 (AF014006)、SLA-2 * 0301 (AF014004)、SLA-3 * 0301 (AF014003)、SLA-3 * 0602 (DQ303227)。H-2D^b 表示鼠的相应等位基因。

Note. A * 0201 stands for HLA-A * 0201, a class I allele with the highest frequency in human populations. Italic stands for alleles, a class I allele with the highest frequency in the NIH populations minipigs, as follows: SLA-1 * 0701 (AF464036), SLA-1 * 0401 (AF464002), SLA-2 * 0401 (AF014006), SLA-2 * 0301 (AF014004), SLA-3 * 0301 (AF014003), and SLA-3 * 0602 (DQ303227). H-2Db stands for corresponding mouse alleles.

2.5 SLA I 类分子与被 CD8⁺ 分子识别的 HLA 分子序列的同源性比较

将五指山小型猪 SLA I 类 SLA-1、SLA-2、SLA-3 座位上的等位基因推测得到氨基酸序列与被 CD8⁺ 分子识别结合的 HLA-A * 0201 关键氨基酸序列区域进行比对 (表 4)。结果显示, SLA-1 * 0401wz01、SLA-1 * 0703、SLA-3 * 0401、SLA-2 * 1102 和 SLA-2 * 11wz01 等位基因都仅在位点 225 和 228 处发生突变, 由苏氨酸 (Thr)→丝氨酸 (Ser)、苏氨酸 (Thr)→蛋氨酸 (Met), 说明 SLA-1 * 0401wz01、SLA-1 *

0703、SLA-3 * 0401、SLA-2 * 1102 和 SLA-2 * 11wz01 与人 CD8⁺ 受体结合所必需的关键氨基酸残基高度相似。但 SLA-3 * 0403 等位基因在位点 225 处由苏氨酸 (Thr)→甘氨酸 (Gly), 在位点 228 处由苏氨酸 (Thr)→蛋氨酸 (Met), 并在位点 227~228 之间插入 4 个氨基酸, 依次为: 谷氨酰胺 (Gln)、丝氨酸 (Ser)、谷氨酰胺 (Gln)、酪氨酸 (Tyr)。鼠的 H-2D^b 等位基因氨基酸序列分别与被 CD8⁺ 分子识别并结合的 HLA-A * 0201 关键氨基酸序列区域比对发现, H-2D^b 有 4 个位点发生了突变。

表 4 五指山小型猪 SLA I 类分子与被 CD8⁺ 分子识别的 HLA 氨基酸序列的同源性比较

Tab. 4 Comparison of the homology of CD8⁺-binding amino acid sequences recognized with SLA class I molecules between humans and Wuzhishan minipigs

等位基因 Alleles	223	224	225	226	227					228
HLA-A * 0201	D	Q	T	Q	D	-	-	-	-	T
SLA-1 * 0401wz01	+	+	S	+	+	-	-	-	-	M
SLA-1 * 0703	+	+	S	+		-	-	-	-	M
SLA-2 * 11wz01	+	+	S	+	+	-	-	-	-	M
SLA-2 * 1102	+	+	S	+	+	-	-	-	-	M
SLA-3 * 0401	+	+	S	+	+	-	-	-	-	M
SLA-3 * 0403	+	+	G	+	+	<i>Q</i>	<i>S</i>	<i>Q</i>	<i>Y</i>	M
H-2Db	E	L	T	+	+	-	-	-	-	M

注: 斜体字母表示插入的氨基酸; “+”表示与人的 HLA-A * 0201 氨基酸相同; “-”表示缺失的氨基酸; HLA-A * 0201 人群中出现频率较高的等位基因。

Note. The italic stands for inserted amino acids. “+” indicates that the amino acids are identical to human HLA-A * 0201. “-” indicates that the deleted amino acid. A * 0201 stands for HLA-A * 0201, a class I allele with the highest frequency in human populations.

2.6 SLA I 类基因与 HLA I 类基因 KIR 结合区重要氨基酸的比较分析

表 5 为 SLA I 类基因与 HLA I 类基因 KIR 结合区关键氨基酸的比较分析。从表中可以看出,SLA-2 * 11wz01 和 SLA-2 * 1102 与人 HLA I 类基因 KIR 结合区氨基酸同源性较高,在 NKTA-1 亚型结合域内仅有 1 个氨基酸差异,而在 NKTA-2 和 NKTA-3

亚型结合域内存在 2 个氨基酸差异。SLA-1 * 0401wz01 基因与人 HLA I 类基因 KIR 结合区氨基酸差异较大,在 3 种亚型结合域内均只有一个氨基酸相同。SLA-1 * 0703、SLA-3 * 0401 和 SLA-3 * 0403 基因与人 HLA I 类基因 KIR 结合区氨基酸同源性介于 SLA-2 * 11wz01 和 SLA-1 * 0401wz01 之间。

表 5 SLA I 类分子与 HLA I 类分子中 KIR 的配体氨基酸序列比较

Tab. 5 Comparison of amino acid residues that NK cell KIRs binding sites of HLA class I genes with corresponding SLA class I genes

等位基因 Alleles	NKTA-1				NKTA-2				NKTA-3						
	77	78	79	80	77	78	79	80	77	78	79	80	81	82	83
HLA I 类分子	N	L	R	K	S	L	R	N	N	L	R	I	A	L	R
SLA-1 * 0401wz01	G	-	N	T	G	-	N	T	G	-	N	T	L	R	G
SLA-1 * 0703	-	-	N	N	N	-	N	N	-	-	N	N	L	R	G
SLA-2 * 11wz01	-	-		T	N	-	-	T	-	-	-	T	-	-	G
SLA-2 * 1102	-	-	-	T	N	-	-	T	-	-	-	T	-	-	G
SLA-3 * 0401	-	-	K	N	N	-	K	N	-	-	K	N	L	R	G
SLA-3 * 0403	-	-	K	-	N	-	K	K	-	-	K	K	L	R	G

注: NKTA-1/2/3 表示 3 种与 KIR 结合的 HLA 氨基酸残基序列;“-”表示与人的 HLA 氨基酸序列相同。
Note. NKTA-1, NKTA-2 and NKTA-3 stand for three kinds of HLA amino acid residues which binding to KIRs. “-” indicates that the amino acid residues are identical to that in human HLA class I.

3 讨论

SLA I 类分子是引起细胞性排斥反应的核心因素和器官移植配型的重要位点^[17],因此,明确猪 SLA 基因分子结构特征及与 HLA 同源性对异种器官移植配型具有重要的意义。SLA 基因已知的 NIH 小型猪是目前国际异种器官移植研究常用的实验小型猪模型,且已被多次应用于猪-人血管性器官移植。本研究以 NIH 小型猪 SLA I 类基因分子序列为参考,比较 *GGTA1*^{-/-} 五指山小型猪 SLA I 类基因与人 HLA 同源性高低。*GGTA1*^{-/-} 五指山小型猪 SLA-1、SLA-3、SLA-2 基因座上各等位基因与人 HLA-A * 0201 同源性在 70.5% ~ 72.1% 之间,与 NIH 小型猪相似性为 83.2% ~ 100%。五指山小型猪 SLA I 类分子与人 HLA 同源性范围和 Chen 等^[18]对巴马、云南版纳猪和贵州香猪 SLA-1、SLA-2 基因分子与人 HLA 同源性相近。可见猪-人异种移植时,供受体之间 SLA 编码的膜蛋白不可能完全相同,只能选择 SLA 同源性较高的供受体进行异种移植。

已有研究表明 HLA 第 223 ~ 228 个氨基酸是与 CD8⁺ 分子受体相互作用的关键结合域^[18]。本研究 SLA-1 * 0401wz01、SLA-1 * 0703、SLA-2 * 11wz01、SLA-2 * 1102 和 SLA-3 * 0401 与人 HLA-A * 0201 氨基酸序列比较发现,由苏氨酸(Thr)→丝氨酸(Ser)、苏氨酸(Thr)→蛋氨酸(Met),其他位点高度

保守,这与 Gao 等^[19]在巴马猪上研究报道一致。除此之外 SLA-3 * 0403 等位基因在位点 225 处由苏氨酸(Thr)→甘氨酸(Gly),在位点 228 处由苏氨酸(Thr)→蛋氨酸(Met),并在位点 227 ~ 228 之间插入 4 个氨基酸,这种多个氨基酸插入关键结合域有可能引起强烈的免疫排斥反应,即 SLA I 类分子本身作为外来抗原被人 T 细胞间接识别,这有待于对五指山猪 SLA 经典 I 类基因功能及与人的 CD8⁺ T 细胞免疫位点进一步研究。

为解决因猪血管内皮细胞表达的 SLA I 类分子与 HLA I 类分子中 KIR 的配体序列不匹配,而引起的猪血管损伤问题,等 Sasaki^[20]将多态性较小且能和 3 种人 KIR 相匹配的 HLA-G 基因转入猪内皮细胞,体外功能实验表明,人 NK 细胞对猪内皮细胞的攻击明显减弱。本研究中 SLA-2 * 11wz01 和 SLA-2 * 1102 与人 HLA I 类基因 KIR 结合区仅有 1(NKTA-1)或 2(NKTA-2、NKTA-3)个氨基酸差异,SLA-2 * 11wz01 和 SLA-2 * 1102 这种高度的同源性是否说明人 NK 细胞能明显降低对 *GGTA1*^{-/-} 五指山小型猪血管内皮细胞的攻击,有待于进一步研究。

综上所述,从免疫细胞介导的异种排斥反应角度出发,*GGTA1*^{-/-} 五指山小型猪 SLA I 类基因氨基酸序列与人 HLA 高度相似,与人免疫细胞受体的配体关键结合域相似性较高,可作为未来猪-人异种器官移植的良好供体之一。

参 考 文 献

- [1] Cooper DK, Eksler B, Tector AJ. Immunobiological barriers to xenotransplantation [J]. *Int J Surg*, 2015, 23: 211–216.
- [2] Schmockel M, Nollert G, Shahmohammadi M, et al. Transgenic human decay accelerating factor makes normal pig function as a concordant species [J]. *J Heart Lung Transpl*, 1997, 16(7): 758–764.
- [3] Phelps CJ, Koike C, Vauht TD, et al. Production of Alpha 1,3 galactosyltransferase-deficient pigs [J]. *Science* 2003, 299 (5605): 411–414.
- [4] 郑道山, 冯冲, 朱彦宾, 等. 利用启动子缺陷型打靶载体敲除五指山小型猪 GGTA1 基因 [J]. *生物技术通讯*, 2011, 22: 458–462.
- [5] Donnelly CE, Yatko C, Johnson EW, et al. Human natural killer cells account for MHC class I restricted cytotoxicity of porcine cells [J]. *Cell Immunol*, 1997, 175: 171–178.
- [6] Yamada K, Sachs DH, DerSimonian H. Human anti-porcine xenogeneic T cell response. Evidence for allelic specificity of mixed leukocyte reaction and for both direct and indirect pathway of recognition [J]. *J Immunol*, 1995, 155: 5249–5256.
- [7] Bravery CA, Batten P, Yacoub MH, et al. Direct recognition of SLA-and HLA-like class II antigens on porcine endothelium by human T cells results in T cell activation and release of interleukin-2 [J]. *Transplantation*, 1995, 60: 1024–1032.
- [8] Xie J, Chen FX, Li NL, et al. Novel SLA class I alleles of Chinese pig strains and their significance in xenotransplantation [J]. *J Immunol*, 2000, 20: 136–139.
- [9] Vaiman M, Renard C, Lafage P, et al. Evidence for a histocompatibility system in swine (SLA-A) [J]. *Transplantation*, 1970, 10: 155–164.
- [10] Le Bas-Bernardet S, Blanche G. Current cellular immunological hurdles in pig-to-primate xenotransplantation [J]. *Transpl Immunol*, 2009, 21(2): 60–66.
- [11] Kitchens WH, Uehara S, Chase CM, et al. The changing role of natural killer cells in solid organ rejection and tolerance [J]. *Transplantation*, 2006, 81(6): 811–817.
- [12] 孙俊丽, 牟玉莲, 刘小林, 等. 五指山小型猪近郊系白细胞抗原 I 类 3 基因的研究 [J]. *中国农业科学*, 2007, 40(9): 2053–2061.
- [13] 顾茂松, 赵书红. 五指山小型猪 SLA-DQA 基因的 SNPs 及猪人 MHC I 类区自然杀伤细胞 KIRs 结合区氨基酸变异的比较分析 [D]. 硕士学位论文, 华中农业大学, pp. 24–31.
- [14] 吴群, 熊平, 陈实, 等. 近交系海南五指山猪 SLA 经典 I 类和 II 类分子序列分析 [J]. *现代医学免疫*, 2004, 24: 23–26.
- [15] 窦科峰, 李霄, 陶开山, 等. 异种肝移植现状与未来 [J]. *中国实用外科杂志*, 2014, 34: 14–18.
- [16] Ji HC, Li X, Yue SQ, et al. Pig BMSCs transfected with human TFPI combat species incompatibility and regulate the human TF pathway in vitro and in a rodent model [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2015, 36: 233–249.
- [17] Chadon P, Renard C, Vaiman M. The major histocompatibility complex in swine [J]. *Immunol Rev*, 1999, 167: 179–192.
- [18] Chen FX, Tang J, Li NL, et al. Novel SLA class I alleles of Chinese pig strains and their significance in xenotransplantation [J]. *Cell Res*, 2003, 13: 285–294.
- [19] Gao CX, Jiang Q, Guo D, et al. Characterization of swine leukocyte antigen (SLA) polymorphism by sequence-based and PCR-SSP methods in Chinese Bama miniature pigs [J]. *Dev Comp Immunol*, 2014, 45: 87–96.
- [20] Sasaki H, Xu XC, Smith DM, et al. HLA-G expression protects porcine endothelial cells against natural killer cell mediated xenogeneic cytotoxicity [J]. *Transplantation*, 1999, 67: 31–37.

[收稿日期] 2016-01-18