



论文

聚合物介导的红细胞免疫修饰: 聚合物分子大小在血细胞抗原识别中的效果

王敦成^①, KYLUIK Dana L.^{①②}, MURAD Kari L.^③, TOYOFUKU Wendy M.^①, SCOTT Mark D.^{①②*}

① Canadian Blood Services, Vancouver, BC, V6T 1Z3, Canada;

② Centre for Blood Research and the Department of Pathology and Laboratory Medicine, University of British Columbia, Vancouver, BC, V6T 1Z3, Canada;

③ Department of Biology, College of St. Rose, Albany, NY, 12208, USA

* 联系人, E-mail: mdscott@interchange.ubc.ca

收稿日期: 2010-12-01; 接受日期: 2011-04-25

Canadian Blood Services 和 Canadian Blood Services-Canadian Institutes of Health Research(CBS-CIHR) Partnership Fund, Canada Foundation for Innovation 和 the Michael Smith Foundation for Health Research 资助项目

本文观点不一定代表加拿大联邦政府观点

摘要 降低血型抗原的异体免疫水平对于慢性输血病人有很重要的临床意义. 利用甲氧基聚乙二醇修饰红细胞的策略, 可以免疫修饰血型抗原以降低红细胞的异体免疫水平. 本研究显示, 抗体识别非 ABO 的水平随甲氧基聚乙二醇的分子大小和浓度的升高而显著下降, 分子量大的多聚体的免疫保护作用比分子量小的显著. 同时, 动物实验表明, 甲氧基聚乙二醇修饰的异种红细胞(羊红细胞)以及同种不同品系(C57Bl/6)或自体(Balb/c)红细胞的体内免疫原性均明显降低. 与对照相比, 小鼠接受甲氧基聚乙二醇修饰的绵羊血, 发现抗绵羊红细胞的抗体产生降低了 90%. 与对照相比, 两次输入甲氧基聚乙二醇修饰的绵羊血的小鼠, 抗绵羊血抗体产生降低了 80%. 尤为重要的是, 甲氧基聚乙二醇修饰的自体血细胞没有诱导新抗原的产生, 也没有 IgG 或 IgM 应答. 以上结果表明, 聚合物对红细胞的免疫修饰可以安全有效地降低异体免疫的水平, 具有潜在的输血医学临床应用价值.

关键词

甲氧基聚乙二醇
红细胞
血型抗原
小鼠
异体免疫

安全有效的临床输血技术是 20 世纪最重要的医学进展之一. 该临床医疗技术挽救了数以百万人的生命, 但至今对此开展的研究还不是很广泛. 许多证据表明, 慢性输血病人会产生很多异体免疫的临床问题. 实际上, 这些问题会因为非 ABO/RhD 抗原配型的难度, 耗时和昂贵而变得更为复杂. 但是这些配型对于慢性反复输血的镰刀型和地中海型贫血病病

人尤为重要^[1-3]. 事实上, 约高达 35%的镰刀型贫血病人有明显的针对非 ABO/RhD 抗原的异体免疫产生(如红细胞存活时间缩短、轻度的发烧等)^[4,5], 其中有些病人甚至对临床实验室严格配型的血液都会产生输血反应, 甚至危及生命.

目前, 已出现几种临床策略试图解决红细胞异体免疫问题, 包括从低度预防策略和异体免疫发生

后的对策, 到全面筛选献血者和受血者的敏感抗原^[6,7], 但后者代价昂贵, 而且异体免疫一般需要重复的抗原刺激才会产生^[8]. 不进行严格的血型配型虽然可以减少医疗开支, 但是这样等同于不筛选献血者的传染病原而只进行感染后的治疗, 显然这样做会引起很大争议. 所以, 研发实用而经济的技术来降低红细胞抗原的异体免疫水平具有很重要的临床价值.

目前使用的红细胞和其他血细胞甲氧基聚乙二醇共价修饰表明, 利用多聚体修饰红细胞有一定的实用价值, 可以降低输血异体免疫水平, 对已经产生血型免疫的病人也可以治疗^[9-20]. 为了进一步研究这些“免疫修饰”的红细胞, 观察了多聚体的分子量效应. 此外, 用自体、异体和异种的红细胞输血动物模型观察了修饰后的红细胞的免疫原性和红细胞的存活和功能.

1 材料与方法

1.1 红细胞和人抗血清

献血者签署英属哥伦比亚大学血液研究中心和病理系献血知情表. 使用肝素钠采血试管采血(BD Vacutainer, BD, Franklin Lakes, NJ, USA), 血样立即处理. 女性和男性献血者比例为 1:1. 等离子生理盐水洗涤红细胞 3 次. 采用专用的血清分离收集管(SST Vacutainer tubes, BD, Fairview, NJ)对血清进行采集, 冻存于-70℃. 化学试剂均购自 Sigma Chemical Co (St. Louis, MO).

1.2 制备聚乙二醇修饰的红细胞

为了研究红细胞血型抗原免疫修饰的聚合物分子量效应, 观察了 2~30 kD 甲氧基聚乙二醇(单一功能型, 每个链有一个结合位点)的功能. Cyanuric chloride 激活的甲氧基聚乙二醇(C-mPEG, 5 kD)和未激活的溶解的甲氧基聚乙二醇(sol-mPEG, 5 kD)购自 Sigma Chemical Co(St. Louis, MO, USA). Benzotriazolyl carbonate-甲氧基聚乙二醇购自 Nektar Therapeutics (San Carlos, CA, USA). Succinimidyl valerate-甲氧基聚乙二醇购自 Laysan Bio, Inc.,(Arab, AL, USA).

人红细胞的共价修饰按本实验室先前发表的方法^[9-11,14]进行. 聚乙二醇在专用的缓冲液中制备(50 mmol/L 磷酸氢二钾, 105 mmol/L 氯化钠, pH 8.0). 红细胞修饰在一个微量混合仪上完成(12%红血球容量), 以确保均一充分的化学修饰. 修饰在室温下进行, 时

间为 30 或 60 min. 修饰后的红细胞用 PBS 洗 3 次. 对照组为缓冲液孵育的红细胞, 用来检测红细胞的修饰处理是否对免疫复合体的结合有影响. 红细胞和可溶性甲氧基聚乙二醇(无法修饰红细胞膜)的结合作为对照.

1.3 双相分配实验

对照和聚乙二醇化的红细胞在水双相分配系统中进行^[13], 包括 PEG8000 和 Dextran T500(分子量约 5×10^6 Da, Sigma). PEG 和 Dextran 的浓度用折射率检测. 对照或修饰的红细胞悬浮于 1 mL PEG8000 中, 均匀混合. 0.5 mL PEG-RBC 和 0.5 mL Dextran T500 混合. 在 PEG 层的红细胞定量之前, 双相系统在室温静置 20 min 以达分离目的. 检测结果用上层 PEG 相所检测的总血红蛋白百分比来表示, 至少是 3 次独立实验的统计结果.

1.4 抗 A/B 抗体介导的红细胞凝集

用改进的血小板凝集计来检测聚合物对抗血清介导的红细胞凝集的影响^[9,10]. 该方法在检测定量重复性方面效果较好. 在 450 μ L 的对照和聚乙二醇化的红细胞(A 血型)悬液(6%的红细胞比积)中加入 20 μ L 的抗 A 血清(或人抗血清), 检测红细胞凝集.

1.5 用流式细胞术检测红细胞血型抗原

血型抗原的抗体购自 Immucor, Inc.(Norcross, GA, USA). 采用流式细胞术对免疫修饰的效果进行定量(FACSCalibur; BD Biosciences, San Jose, CA, USA)^[12-14]. 每个样品至少检测和搜集 20000 个细胞. 对照和聚乙二醇修饰的红细胞稀释到 3%的红细胞比积, 然后加入等体积的抗红细胞抗体. 红细胞和抗体复合体在 37℃孵育 30 min. 孵育后, 红细胞用生理盐水洗 2 次. 将 Fluorescein isothiocyanate (FITC)-抗人 IgG-Fc 的特异二抗(Sigma, 1:50 稀释于生理盐水中)(50 μ L)加入到每个样品中, 37℃孵育 30 min. 红细胞用生理盐水洗 2 次, 用 1%甲醛固定. 红细胞血型抗原的免疫修饰效果用抗原阳性细胞的百分比和平均细胞荧光密度来计算.

1.6 体内红细胞存活研究

为了评价不同的甲氧基聚乙二醇的修饰效果, 利用小鼠输血模型^[9,12,13], 进行了体内红细胞存活研

究. 红细胞用 SVA-mPEG 处理, 方法如前所述. mPEG 的浓度是 0~2 mmol/L, 主要基于小鼠红细胞体积较小(相应地, 红细胞上的 mPEG 结合位点也较少), 而且比人红细胞脆性大. 小鼠红细胞用细胞膜嵌合的荧光进行标记(PKH-26, Sigma). 流式细胞术用来检测红细胞的体内存活, 直到红细胞被体内循环系统清除(对于同品系的未修饰的红细胞, 大约需 50 天). 外周血里的红细胞存活用阳性荧光红细胞的百分比来表示^[11]. 每个聚乙二醇修饰浓度至少采用 5 只小鼠来测试.

1.7 体内红细胞免疫原性

体内免疫原性研究采用了两个遗传背景不同的品系(C56BL/6 和 Balb/c, 分别是 H-2K^b 和 H-2K^d 阳性)^[21,22]. 供体鼠的红细胞和羊红细胞(Cocalico, Reamstown, PA, USA)用生理盐水洗 3 次, 重悬于 12%的红细胞比积. 红细胞悬液用 C-mPEG 来修饰, 修饰浓度分别为 0, 1.2 和 5 mmol/L, 在 PBS(pH 9.2) 中进行, 4°C, 30 min. 修饰后, 细胞在生理盐水中洗 3 次, 重悬为 50%的红细胞比积, 用于输血.

受体小鼠(Balb/c, 每组 24 个小鼠)通过腹腔注射 500 μ L 对照或甲基聚乙二醇修饰的 C57Bl/6 或 Balb/c 小鼠的红细胞. 此过程重复 3 次, 每次间隔 50 天. 每次输血完成后, 一组 8 只小鼠被处死, 收集血清样品, 分析抗供体红细胞的抗体产生, 包括 IgG 和 IgM. 抗体定量用血清和未修饰的供体红细胞孵育, 随后加入 PE 荧光标记的小鼠二抗 IgG 或 FITC 荧光标记的 IgM. 二抗的结合用流式细胞术来检测.

对照和修饰的羊红细胞免疫原性用小鼠体内实验来检测. 小鼠的血清在输血后 14 天收集, 利用流式细胞术来检测抗羊红细胞抗体. 对一些小鼠还进行了 2 次输血(初次输血后 14 天), 血清在初次输血后 28 天收集, 并检测抗羊红细胞抗体. 小鼠输血量是总血量的 10%, 每组小鼠至少包括 8 只小鼠.

1.8 统计分析

所有数据均采用 $\bar{x} \pm SD$ 来表示, 每个实验研究至少重复 3 次. 显微镜观测有代表性的结果. 统计分析使用 SPSS V16.0 软件(Statistical Products and Services Solutions, SPSS Inc., Chicago, IL, USA)进行. 比较组间差异用一维变量分析(ANOVA), 然后进行 Tukey post-hoc 测试. 比较 2 个平均值, 采用独立变

量的 *t* 检验, $P < 0.05$ 认为有显著性差异.

2 结果

细胞膜修饰可以改变细胞膜表面的生物物理特性, 可以用双相(Dextran: PEG)分离系统的特征来表示. 如图 1 所示, 修饰的红细胞的生物物理分离特征与修饰浓度和聚合物的分子大小相关. 大分子聚合物在低浓度修饰时也可以更有效地将修饰的红细胞推进到 PEG 层. 如图 1(A)所示, 2 kD 的聚合物只有在比较高的浓度时才有明显的区分效果, 从而红细胞分布在 PEG 层. 而 20 和 30 kD 的 SVA-mPEG 修饰的红细胞即使在很低的浓度也可以快速分布到 PEG 层, 最大的分离效果在 ≥ 0.5 mmol/L 发生. 叠合对照或 SVA-mPEG 修饰的红细胞的光学和荧光影像表明, 即使在相对较低的修饰浓度(1 mmol/L SVA-mPEG-20 kD)红细胞也会被均匀地修饰. 尤其重要的是, 不同的连接物分子在分相实验中区别不大, 它们有类似的反应性和水解率.

聚合物的长度对于阻止红细胞表面的 A/B 抗原识别尤为重要. 如图 2 所示, 2, 5 和 20 kD 的聚合物都对抗血清介导的红细胞凝集有一定的保护作用, 而且与分子大小和浓度相关, 长分子链的聚合物明显有更强的抑制凝集的效果(图 2(A)~(C)). 该发现与 PEG-Dextra 两项分配的结果相吻合. 如图 2(C)所示, 20 kD 的聚合物修饰浓度 ≥ 1.2 mmol/L 时, 抗 A 血清介导的凝集完全被抑制. 修饰效果和 pH 以及修饰反应时间相关(图 2(D)). 聚合物浓度为 2.5 mmol/L, 分子量为 5 kD 的 SPA-mPEG 修饰 30 和 60 min 后, pH 8.0 和 9.2 之间没有明显差别. 相似地, 60 min 修饰反应对于抑制抗 A 血清介导的凝集有明显的抑制作用.

本实验研究了抗 A/B 抗原的免疫修饰效果, 尚未获得“万能红细胞”的效果, 因为免疫修饰无法绝对保证没有任何潜在的抗原性. 然而, 免疫修饰非 ABO 血型抗原依然有很重要的临床意义. Rh 血型系统, 尤其是 RhD 在中国乃至全世界的输血医学中尤为重要. 如图 3 所示, mPEG 可以有效地掩饰 RhD, Rhc 和 RhE 抗原, 而且该免疫修饰效果是聚合物浓度和分子大小相关的. 抗原表位的免疫修饰水平可以用绝对的掩饰(阳性细胞百分数, 图 3)和平均细胞荧光水平改变来表示(mean cell fluorescence, MCF, 图 3(A)和(B)). 聚合物的大小是决定免疫修饰效果至关重要的

因素. 在 2~3 mmol/L 浓度时, 20 kD 聚合物的效果明显强于 2 kD($P<0.001$)或 5 kD($P<0.01$), 结果用抗原阳性的百分数来表示. 与抗原阳性百分数相比, 修饰后的细胞的 MCF 受分子大小影响更加显著. 与 2 或 5 kD 的免疫修饰效果相比, 20 kD 聚合物有效掩饰了 RhD 和 Rhc 抗原, 抗体结合水平明显降低. 细胞 MCF 的降低显著影响了供体红细胞的抗原性效应. 尤为重要, 如图 1 所示, 连接物的影响不大, 因为 5 kD 的 C-mPEG 和 BTC-mPEG, 20 kD 的 SPA-mPEG 和 BTC-mPEG 的掩饰效果接近. 不同连接物之间小的差别可能是因为连接物化学水解半衰期不同 (BTC-mPEG 和 SPA-mPEG 半衰期分别是 13.5 和 16.5 min), 修饰时间是 60 min.

其他的非 ABO 血型抗原包括 Kidd(Jk^a , Jk^b), Kell(k)和 Duffy(Fy^a)也被聚合物有效地掩饰. 如图 4 所示, 2, 5 和 20 kD 的聚合物可以有效地掩饰 Jk^a , Jk^b , k, Fy^a 等抗原. 但是聚合物的分子量大小掩饰血型抗原的效果有所区别. 在图 4 所示的血型抗原中, k 抗原最容易被掩饰, 2 kD 的聚合物即产生很好的掩饰效果. 但是 2 kD 的聚合物无法有效地掩饰 Jk^b ($P>0.05$), 只能微弱地覆盖 Jk^a 血型抗原($P<0.05$).

20 kD 的聚合物可以对 Jk^a 和 Jk^b 产生显著的保护效果($P<0.001$), 虽然对 Jk^a 的保护效果略好. 可见, 抗原的特性(相对于膜表面的高度)是选择多聚体的决定因素.

以体外研究来阐述红细胞免疫修饰的效果对于这个技术的临床应用有很好的预示作用, 同时, 体内研究的效果和稳定性更为重要. 利用小鼠输血模型进行的实验研究表明, 免疫修饰红细胞的体内存活没有受到影响, 说明修饰过程没有改变红细胞的稳定性和正常功能. 如图 5(A)所示, 同品系供体细胞的免疫修饰没有诱导新抗原的产生, 对照和 mPEG-红细胞在 1~3 次重复输血后(长达 180 天)没有产生 IgG 或 IgM. 更重要的是, 聚合物免疫修饰的同种异体红细胞(C57Bl/6 输给 Balb/c)与对照相比, 没有诱导抗体产生($P<0.001$), 表明免疫修饰的红细胞有潜在的临床应用前景(图 5(C)). 该效果在 3 次重复输血后依然保持(约 180 天). 与修饰后的红细胞相比, 未修饰的对照同种异体红细胞诱导产生了明显的抗体反应, 虽然这些抗体没有明显影响供体细胞的循环时间. 免疫修饰效果提供了有效的异种红细胞(羊)的免疫保护作用($P<0.001$, 图 5(D)).

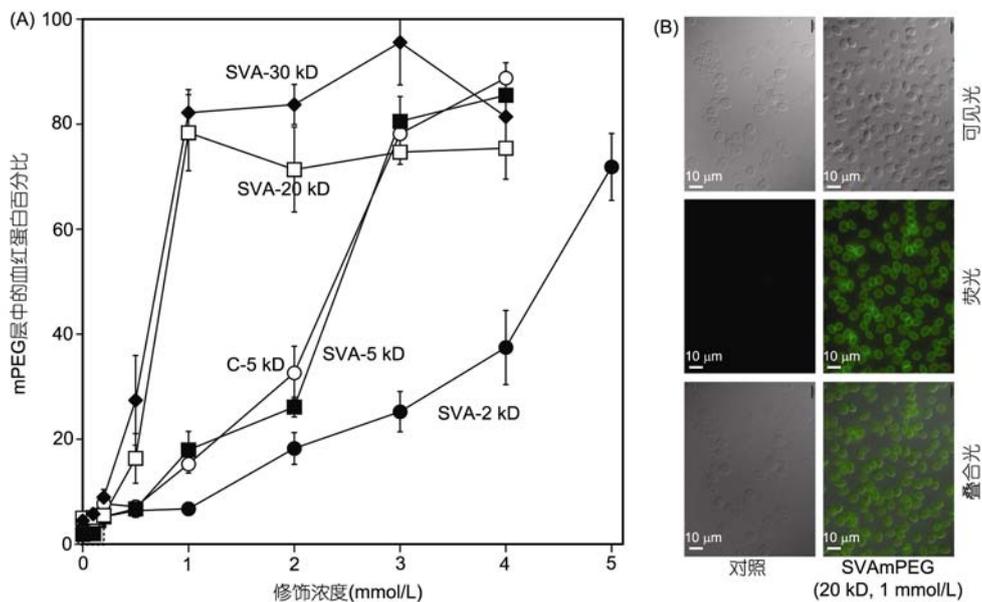


图 1 聚合物的分子大小和浓度的分相分离

(A) 在双相 Dextra-PEG 分离系统中, 甲氧基聚乙二醇修饰的红细胞倾向于聚集在聚乙二醇层. 与小分子量的聚合物(2 或 5 kD)相比, 大的聚合物(20 和 30 kD)明显增强分离效果; (B) 分离效果和免疫修饰效果有很好的相关性. 而且被修饰的红细胞表面的甲氧基聚乙二醇是均匀的 (荧光甲氧基聚乙二醇 SVAmPEG, 20 kD, 1 mmol/L 浓度). 利用微分干涉显微镜技术比较对照组和修饰后的红细胞

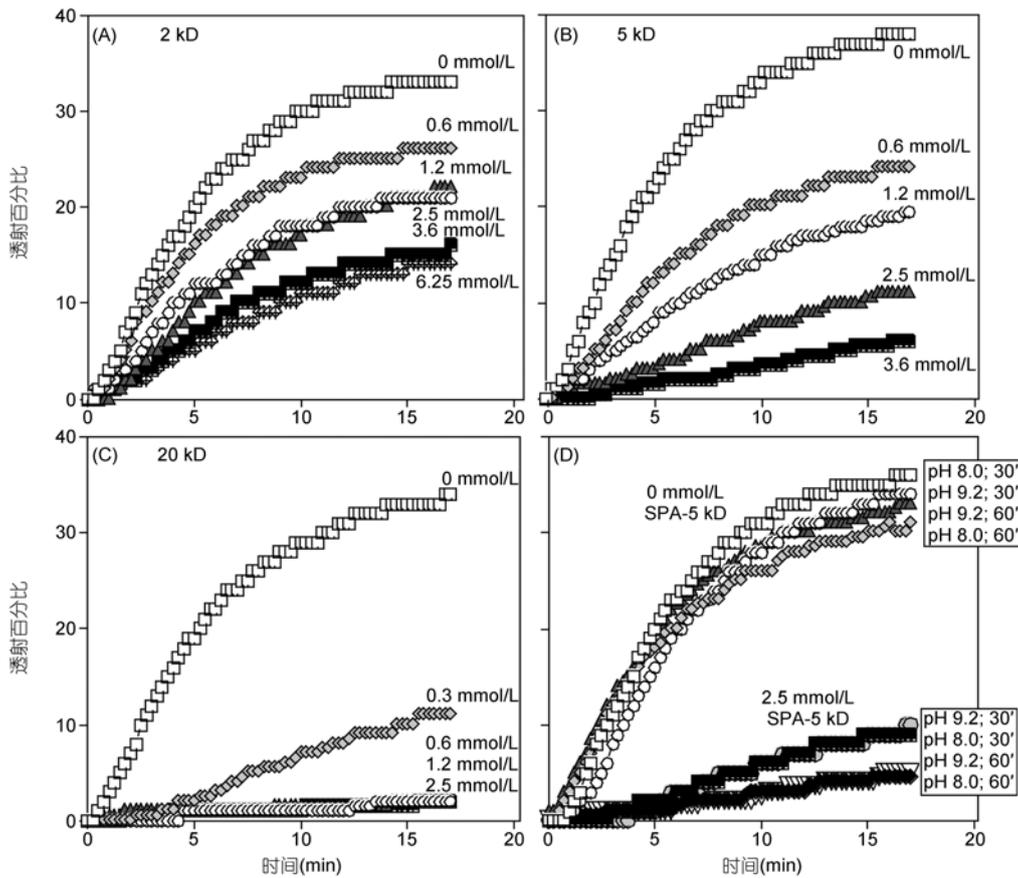


图2 甲氧基聚乙二醇的分子大小和浓度显著影响红细胞凝集水平

利用抗 A 抗血清和用不同大小的 SPA-甲氧基聚乙二醇(A) 2 kD; (B) 5 kD; (C) 20 kD)修饰 A 血型红细胞的液相凝集比较。所有的 SPA-甲氧基聚乙二醇均减弱红细胞凝集。但当分子量增加时,抑制红细胞凝集所需的浓度会降低。结果显示了超过 5 个独立实验的可重复结果(D)。凝集实验显示,修饰时间和 pH 的改变并未显著影响聚合物的效应

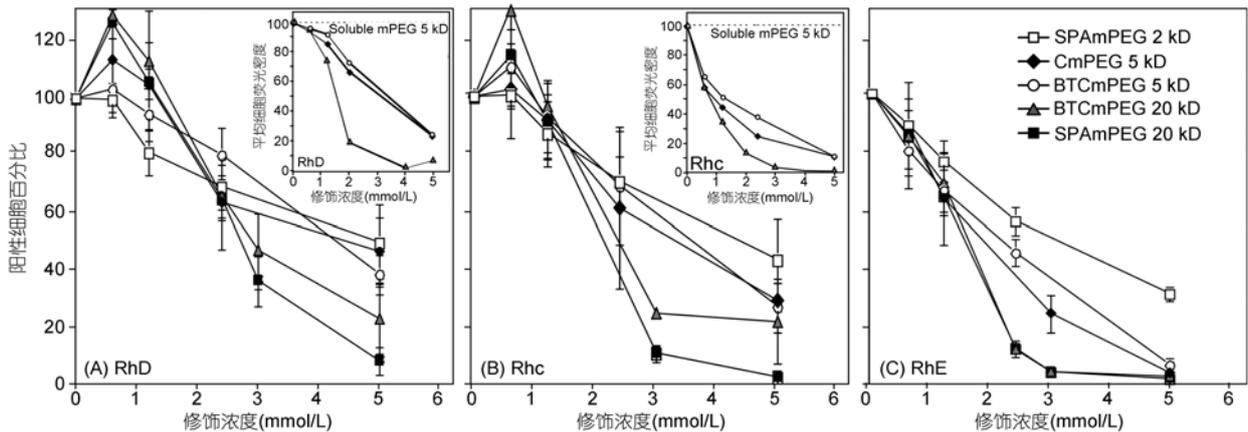


图3 聚合物有效地免疫修饰 Rh 血型抗原

抗 RhD(A), 抗 Rhc(B)和抗 RhE(C)抗体结合在甲氧基聚乙二醇修饰后明显减弱, 结果用降低的阳性红细胞百分数和平均荧光密度来表示(A)和(B)。结合能力减弱是修饰浓度(0~5 mmol/L)和聚合物分子大小的共同效应(2, 5 和 20 kD)。特别重要的是, 由(A)和(B)所示, 非活性的聚乙二醇没有免疫修饰效果, 平均荧光密度没有显著改变。人红细胞用 0~5 mmol/L 的活性甲氧基聚乙二醇修饰。结果至少是 3 个独立实验的 $\bar{x} \pm SD$

3 讨论

红细胞的抗原性很高, 副反应包括临床不显著和临床显著. 在少数民族中, 非 ABO/RhD 的血型抗原表位相对较普遍. 事实上, 非 ABO/RhD 血型导致的输血反应也主要是在少数民族中被发现^[4,23]. 异体免疫水平也与受血者的输血次数成正比. 从而, 非 ABO/RhD 血型抗原的异体免疫在需要反复输血治疗的少数民族病人(镰刀型贫血或地中海贫血病人)上尤为严重^[1,4,24].

非 ABO/RhD 红细胞抗原的异体免疫的后果是病人需要紧急输血时几乎不可能找到合适配型的供血者^[25]. 临床上用以防止异体免疫的方法包括用浓

缩红细胞来代替全血(防止白细胞免疫), 非常全面的输血前的血型抗原配型与使用特定的红细胞供体. 尽管使用了这些昂贵且相对成熟的技术手段, 在镰刀贫血病人和地中海贫血病人中, 临床显著的异体免疫比例依然超过 30%^[26]. 因此, 很多实验室和临床医生都对将供体筛选(考虑到花费和效果)作为一个预防策略持迟疑态度.

综上所述, 需要一个经济有效且可行的降低或者防止异体免疫的办法. 由此, 免疫修饰红细胞有其临床应用价值^[20]. 如本文所述, 通过采用小鼠输血模型, 红细胞免疫修饰成功地掩饰了 ABO 和非 ABO 血型抗原(图 2~4)以及供体细胞的免疫原性(图 5). 该掩饰的多聚体浓度在体外和体内都未影响人和鼠的红

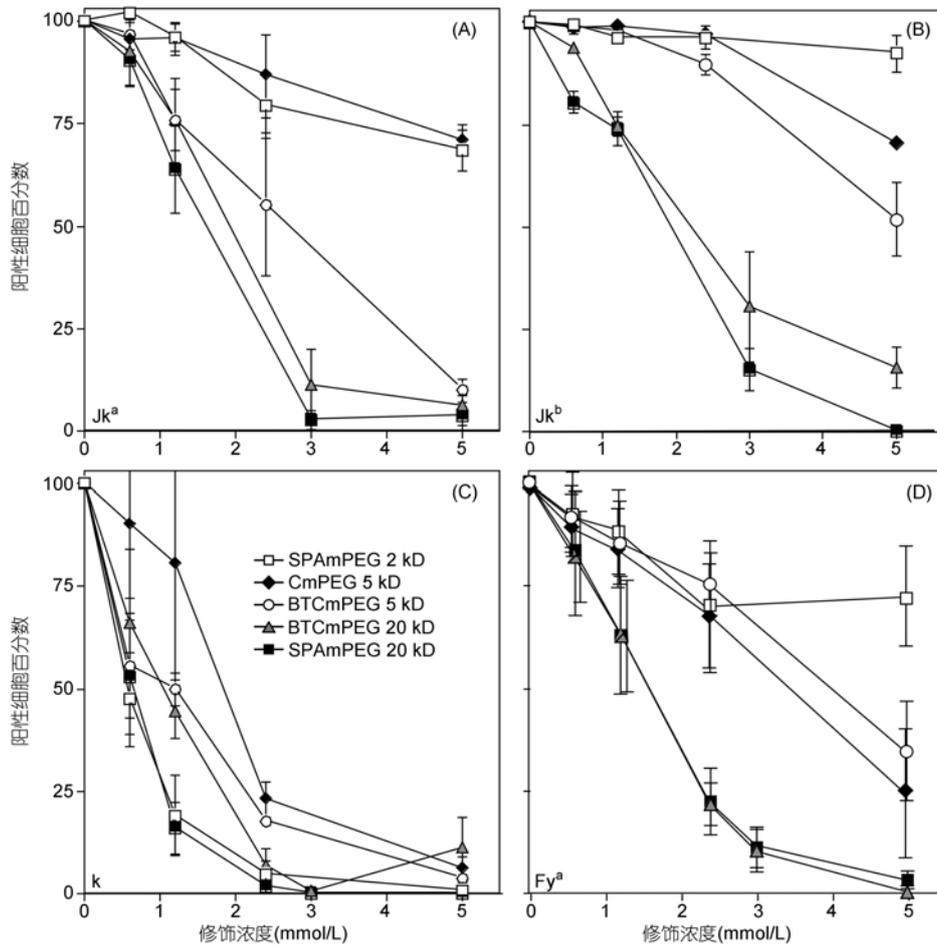


图 4 红细胞修饰后抗体识别水平被有效降低

Kidd(Jka(A)和 Jkb(B)), Kell(k(C)) 和 Duffy(Fya(D)). 图示 2, 5, 20 kD 聚合物的人红细胞抗原的掩饰效果. 流式细胞术至少搜集 2 万个细胞计数. 抗体阳性细胞的平均荧光强度在聚合物修饰后也明显下降, 表示聚合物有效地覆盖了红细胞表面的血型抗原

细胞的稳定性和功能. 而且该过程简便可行且安全经济, 可以应用于目前的血库技术中.

中等修饰浓度(≤ 2.5 mmol/L mPEG/ 0.6×10^9 红细胞/mL)有可能用到人红细胞上, 不完全掩饰 A/B 血型抗原, 修饰浓度可以掩饰临床显著的非 ABO 抗原. 尤为重要的是, 对于非 ABO 抗原, 无需完全掩饰就可以显著降低异体免疫的水平. 如表 1 所示, 异体免疫取决于抗原阳性的细胞数目, 细胞上的抗原分子

密度, 以及抗原递呈细胞的识别能力, 吞噬和递呈能力. 聚乙二醇修饰供体的红细胞可以显著降低抗原性: 抗原阳性的细胞数减少, 抗原密度降低, 修饰后的细胞不容易被吞噬, 以及修饰后的蛋白质抗原递呈水平降低^[9,20-22,27].

临床应用前景可以用红细胞免疫修饰对 Rhc 抗原的效果来表示. 如表 1 所示, 临床实验(如抗原的随机错配)显示, 一次随机错配后 Rhc 的免疫识别

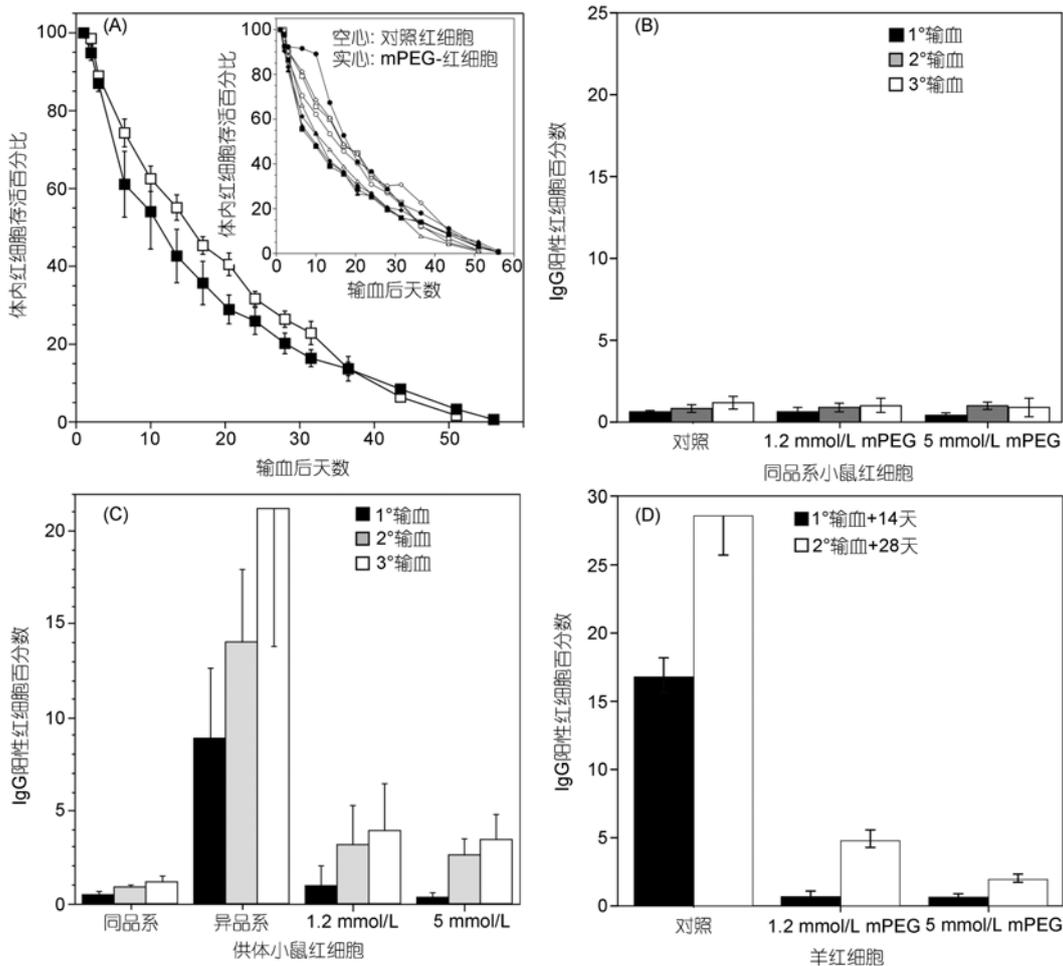


图5 聚合物修饰后的红细胞体内存活和免疫原性研究(同品系、不同品系和异种的红细胞输血)

(A) 同品系第一次输血, 第一次输血后对照(空心方格)和 BTC-mPEG(20 kD, 实心方格)修饰的小鼠红细胞的体内清除效率. 修饰后的红细胞用荧光脂肪酸标记(PKH-26), 存活用流式细胞术来检测. 每个聚乙二醇条件用 5 个实验小鼠的 $\bar{x} \pm SD$ 来表示; (B) 修饰的红细胞没有诱导新抗原的产生. 同品系的供体红细胞, 修饰后(1.2 或 5 mmol/L)以及对照组, 输血 1~3 次, 图示 IgG 阳性的红细胞. 小鼠 IgG 阳性红细胞用流式细胞术检测, 利用荧光标记的抗小鼠 IgG 二抗; (C) 不同品系的红细胞免疫原性在聚乙二醇修饰后明显减弱($P < 0.001$), 即使在 3 次输入不同品系修饰的红细胞后. 接受未修饰的供体对照红细胞的小鼠产生了较高水平的 IgG(但没有 IgM), 但修饰的红细胞没有检测到 IgG 的产生. 受体小鼠的 IgG 检测是利用流式细胞术; (D) 利用异种细胞(羊红细胞)来检测免疫修饰的效果. 羊红细胞用甲氧基聚乙二醇修饰(1.2 或 5 mmol/L). 在第一次或第二次输血后, 对照未修饰的红细胞 14 天后诱导了 IgG 的产生. 而修饰后的羊红细胞明显减弱了 IgG 的产生($P < 0.001$). 该效果在第二次输血后的 14 天也继续保持. (A)~(D) 小鼠输血的体积是总血量的 10%. 每组实验包括 8 只小鼠, 结果用阳性红细胞的 $\bar{x} \pm SD$ 表示

表 1 抗原分布及抗原的相对免疫原性

血型	抗原	免疫原性百分数 ^e	溶血输血反应	抗体	每个红细胞上的拷贝数
ABO	A, B	100	Yes	IgM	1×10 ⁶
Rh	D	50.00	Yes	IgG	10000~35000
	c	2.05	Yes	IgG	37000~85000
	E	1.69	Yes	IgG	450~25600
	e	0.56	Yes	IgG	13400~24400
	C	0.11	Yes	IgG	42000~56000
Kidd	Jk ^a	0.07	Yes	IgG	11000~14000
	Jk ^b	0.03	Yes	IgG	11000~14000
Duffy	Fy ^a	0.23	Yes	IgG	7000~13000
Kell	k	1.50	Yes	IgG	3500
	K	5.00	Yes	IgG	6000
MNS	S	0.04	Yes	IgG	>12000
	s	0.03	Yes	IgG	12000

^e: 示阴性受血者在一次输血后的免疫百分数^[28-30]

几率是 2%^[28-30]。如图 3 所示, 甲氧基聚乙二醇的掩蔽表现在抗原阳性细胞百分数和平均荧光密度均降低。该发现引出一个问题, Rhc 阳性的细胞在聚合物修饰后的剩余异体免疫机会是多少(如 20 kD 的聚合物, 2.5 mmol/L 浓度)。图 5 所示的体内老鼠模型的数据表明, 异体或异源的供体细胞的免疫原性在修饰后显著降低。这使得 2% 的免疫识别机会降低为 0.2% 或 0.02%。从而, 尽管个别病人会有异体免疫(即使是修饰后的血液), 但对于慢性输血病人群体, 异体免疫发生的几率显著降低到微弱水平。

事实上, 修饰后的红细胞(同系, 不同品系, 异种)的免疫原性明显降低。一些研究表明, 在某些情况下聚乙二醇有微弱的免疫原性, 在某些特定情况下, 可以诱导动物的免疫系统产生抗体^[31-34]。在动物模型中, 聚乙二醇需要和完全佐剂一起注射, 或把聚乙二醇和强免疫原融合在一起才能诱导抗体的产生^[31,32]。最近的研究表明, 少数正常的献血者体内有

抗聚乙二醇抗体^[33,34]。然而, 大多数长期的聚乙二醇化治疗所用的酶没有诱导产生抗聚乙二醇抗体。而且, 在本实验的小鼠输血模型中, 接受同系聚乙二醇处理的红细胞的小鼠没有产生任何抗体(包括 IgG, IgM)。更重要的是, 强免疫原性的异体或异种细胞在修饰后大大降低了小鼠的抗体反应。

综上所述, 用甲氧基聚乙二醇可以全面地修饰红细胞, 显著降低血型抗原的识别, 以及体内的免疫原性。免疫修饰效应来自于覆盖聚合物的生物物理特征, 可以降低细胞表面的电荷(阻断受体-配基的相互作用), 也可以产生空间位阻效应, 阻断抗体或细胞的结合^[20,35,36]。这些数据表明, 非 ABO/RhD 配型的红细胞在聚乙二醇处理后, 可显著降低免疫原性, 该技术的应用有很好的潜在临床应用价值, 可用于慢性反复接受输血的病人, 尤其对于镰刀型贫血和地中海贫血病人, 这些病人需要接受多次输血, 对于血型抗原的免疫水平相对较高。

参考文献

- 1 RH W, Lin D T, Hartwick M B. Alloimmunization following blood transfusion. Arch Pathol Lab Med, 1989, 113: 254-261
- 2 Ambruso D R, Githens J H, Alcorn R, et al. Experience with donors matched for minor blood group antigens in patients with sickle cell anemia who are receiving chronic transfusion therapy. Transfusion, 1987, 27: 94-98
- 3 Fluit C R, Kunst V A, Drenthe-Schonk A M. Incidence of red cell antibodies after multiple blood transfusion. Transfusion, 1990, 30:

532–535

- 4 Vichinsky E P, Earles A, Johnson R A, et al. Alloimmunization in sickle cell anemia and transfusion of racially unmatched blood. *New Eng J Med*, 1990, 322: 1617–1621
- 5 Michail-Merianou V, Pamphili-Panousopoulou L, Piperi-Lowes L, et al. Alloimmunization to red cell antigens in thalassemia: comparative study of usual versus better-match transfusion programmes. *Vox Sang*, 1987, 52: 95–98
- 6 McPherson M E, Anderson A R, Haight A E, et al. Transfusion management of sickle cell patients during bone marrow transplantation with matched sibling donor. *Transfusion*, 2009, 49: 1977–1986
- 7 Shulman I A. Prophylactic phenotype matching of donors for the transfusion of nonalloimmunized patients with sickle cell disease. *Immunohematology*, 2006, 22: 101–102
- 8 Castro O, Sandler S G, Houston-Yu P, et al. Predicting the effect of transfusing only phenotype-matched RBCs to patients with sickle cell disease: theoretical and practical implications. *Transfusion*, 2002, 42: 684–690
- 9 Scott M D, Murad K L, Koumpouras F, et al. Chemical camouflage of antigenic determinants: stealth erythrocytes. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, 94: 7566–7571
- 10 Murad K L, Mahany K L, Brugnara C, et al. Structural and functional consequences of antigenic modulation of red blood cells with methoxypoly(ethylene glycol). *Blood*, 1999, 93: 2121–2127
- 11 Bradley A J, Test S T, Murad K L, et al. Interactions of IgM ABO antibodies and complement with methoxy-PEG-modified human RBCs. *Transfusion*, 2001, 41: 1225–1233
- 12 Bradley A J, Murad K L, Regan K L, et al. Biophysical consequences of linker chemistry and polymer size on stealth erythrocytes: size does matter. *Biochim Biophys Acta*, 2002, 1561: 147–158
- 13 Bradley A J, Scott M D. Separation and purification of methoxypoly(ethylene glycol) grafted red blood cells via two-phase partitioning. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2004, 807: 163–168
- 14 Bradley A J, Scott M D. Immune complex binding by immunocamouflaged [poly(ethylene glycol)-grafted] erythrocytes. *Am J Hematol*, 2007, 82: 970–975
- 15 Armstrong J K, Meiselman H J, Fisher T C. Covalent binding of poly(ethylene glycol) (PEG) to the surface of red blood cells inhibits aggregation and reduces low shear blood viscosity. *Am J Hematol*, 1997, 56: 26–28
- 16 Armstrong J K, Meiselman H J, Wenby R B, et al. Modulation of red blood cell aggregation and blood viscosity by the covalent attachment of Pluronic copolymers. *Biorheology*, 2001, 38: 239–247
- 17 Hortin G L, Lok H T, Huang S T. Progress toward preparation of universal donor red cells. *Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol*, 1997, 25: 487–491
- 18 Tan Y, Qiu Y, Xu H, et al. Decreased immunorejection in unmatched blood transfusions by attachment of methoxypolyethylene glycol on human red blood cells and the effect on D antigen. *Transfusion*, 2006, 46: 2122–2127
- 19 Tan Y, Ji S, Li S, et al. Comparative assessment of normal and methoxypolyethylene glycol-modified murine red cells on swimming endurance and hippocampal injury in hypoxic mice. *Transfusion*, 2008, 48: 1954–1958
- 20 Le Y, Scott M D. Immunocamouflage: the biophysical basis of immunoprotection by grafted methoxypoly(ethylene glycol) [mpeg]. *Acta Biomater*, 2010, 6: 2631–2641
- 21 Chen A M, Scott M D. Immunocamouflage: prevention of transfusion-induced graft-versus-host disease via polymer grafting of donor cells. *J Biomed Mater Res A*, 2003, 67: 626–636
- 22 Chen A M, Scott M D. Comparative analysis of polymer and linker chemistries on the efficacy of immunocamouflage of murine leukocytes. *Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol*, 2006, 34: 305–322
- 23 Reid M E, Lomas-Francis C. *The Blood Group Antigen Facts Book*. San Diego: Academic Press, 2003
- 24 Issitt P D. Race-related red cell alloantibody problems. *Br J Biomed Sci*, 1994, 51: 158–167
- 25 Beattie K M, Shafer A W. Broadening the base of a rare donor program by targeting minority populations. *Transfusion*, 1986, 26: 401–404
- 26 Thompson A A. Advances in the management of sickle cell disease. *Pediatr Blood Cancer*, 2006, 46: 533–539
- 27 Murad K L, Gosselin E J, Eaton J W, et al. Stealth cells: prevention of major histocompatibility complex class II-mediated T-cell activation by cell surface modification. *Blood*, 1999, 94: 2135–2141
- 28 Hughes-Jones N C, Gardner B, Lincoln P J. Observation of the number of available c, D, and E antigen sites on red cells. *Vox Sang*, 1971, 21: 210–216
- 29 Masouredis S P, Sudora E, Mahan L, et al. Quantitative immunoferritin microscopy of Fy-a, Fy-b, Jk-a, U, and Di-b antigen site numbers on human red cells. *Blood*, 1980, 56: 969–977

- 30 Skov F, Hughes-Jones N C. Observations on the number of available C antigen sites on red cells. *Vox Sang*, 1977, 33: 170–174
- 31 Richter A W, Akerblom E. Antibodies against polyethylene glycol produced in animals by immunization with monomethoxy polyethylene glycol modified proteins. *Int Arch Allergy Appl Immunol*, 1983, 70: 124–131
- 32 Richter A W, Akerblom E. Polyethylene glycol reactive antibodies in man: titer distribution in allergic patients treated with monomethoxy polyethylene glycol modified allergens or placebo, and in healthy blood donors. *Int Arch Allergy Appl Immunol*, 1984, 74: 36–39
- 33 Armstrong J K, Hempel G, Koling S, et al. Antibody against poly(ethylene glycol) adversely affects PEG-asparaginase therapy in acute lymphoblastic leukemia patients. *Cancer*, 2007, 110: 103–111
- 34 Garratty G. Modulating the red cell membrane to produce universal/stealth donor red cells suitable for transfusion. *Vox Sang*, 2008, 94: 87–95
- 35 Sutton T C, Scott M D. The effect of grafted methoxypoly(ethylene glycol) chain length on the inhibition of respiratory syncytial virus (RSV) infection and proliferation. *Biomaterials*, 2010, 31: 4223–4230
- 36 Martin S. Fundamentals of Immunology for Blood Bankers. In: Harmening, ed. *Modern Blood Banking and Transfusion Practices*. 4th ed. Philadelphia, Pennsylvania: F.A. Davis Company, 1994. 43–68