



论文

隐形微球表面吸附血浆蛋白的蛋白质组学分析

Yevgeniya Le^{①②③}, 李丽^{①②}, 王敦成^{①②}, Mark D. Scott^{①②③*}

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

② Centre for Blood Research, University of British Columbia, Vancouver, BC, V6T 1Z3, Canada;

③ Department of Pathology and Laboratory Medicine, University of British Columbia, Vancouver, BC, V6T 1Z3 Canada

* 联系人, E-mail: mdscott@mail.ubc.ca

收稿日期: 2011-11-24; 接受日期: 2011-12-28

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

摘要 细胞和生物材料表面的甲氧基聚乙二醇(mPEG)修饰是一项具有广阔应用前景的非药理性免疫调节技术,但由于细胞的不稳定性,目前对其表面与血浆间相互作用的认识还不够深入。本实验采用相对稳定的乳胶微球作为模型,来研究其表面对血浆蛋白的吸附。结果显示,血浆总蛋白的吸附水平随着mPEG修饰浓度和分子量的增加而降低,未修饰的乳胶微球表面蛋白吸附量为 (159.9 ± 6.4) ng/cm², mPEG修饰后,蛋白吸附量分别下降至 (18.4 ± 0.8) ng/cm² (1 mmol/L 2 kD SCmPEG)和 (52.3 ± 5.3) ng/cm² (1 mmol/L 20 kD SCmPEG)。聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)和同位素标记相对和绝对定量的质谱技术(iTRAQ-MS)分析表明,在PEG修饰微球表面的蛋白质吸附层中,参与免疫系统活化的蛋白质丰度明显下降。因此,免疫修饰细胞和材料的生物学效应是通过降低抗原性及减弱表面与大分子间相互作用来实现的。

关键词

聚乙二醇修饰

免疫修饰

同位素标记相对和绝对定量技术
质谱分析

聚苯乙烯乳胶微球

蛋白质组学

采用生物制品和生物材料作为治疗制剂的临床干预措施逐渐增多。传统生物制品包括血液、血液成分以及用于移植的捐献组织等,而纯化蛋白质、细胞治疗和有发展潜力的基因治疗制剂已成为新生物制品。天然或人工合成的生物材料被越来越多地应用到与生物系统相关的医疗器械领域,如人工置换关节、支架、导管等^[1,2]。然而对于这些材料而言,生物相容性是评价其性能的关键因素,预防免疫识别和后续产生的宿主免疫反应对于防止治疗失败和严重医学后果的发生至关重要。

为获得生物相容性,通常需要对生物材料表面进行修饰,以最大程度降低蛋白质相互作用以及材料表面的蛋白质吸附,从而减少免疫识别,达到表面“抗吸附”效果。类似的免疫调控方式也可以应用于生物制品。细胞和组织的免疫修饰是指为抑制细胞与其他细胞、大分子及病毒间的相互作用,而对细胞表面进行生物物理学和生物学遮蔽^[3-6]。将这种“生物材料”修饰方式应用于组织工程能够有效地抑制外源细胞异体识别,尤其在输血和移植医学领域具有广阔应用前景。通过将甲氧基聚乙二醇(mPEG; mPEG修

饰)或其他低免疫原性聚合物与细胞膜表面蛋白质共价结合而形成细胞免疫屏障. 修饰后形成的聚合物掩盖了细胞表面抗原位点以及表面电荷, 从而降低了免疫识别的风险. 该非药理性技术在预防移植细胞和组织免疫排斥方面具有明显的优势, 而且不存在与目前应用的免疫抑制治疗相关的内在毒性和健康风险. 研究表明, 该生物组织工程方法不仅可以抑制抗体结合, 减少异体识别并降低免疫原性, 而且能有效阻断病毒入侵所依赖的受体-配体间的相互作用, 同时对细胞活力和功能的影响极小.

然而由于生物细胞的不稳定性, 聚合物修饰对细胞-血浆间相互作用的影响难以阐明. 因此, 本研究采用相对稳定的乳胶微球作为模型(直径为 1.2 或 8 μm), 全面测试聚合物修饰对血浆与生物细胞及生物材料间的界面-大分子相互作用的影响. 应用流式细胞术, 蛋白质定量检测和聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)等方法分析 mPEG 修饰浓度和分子量对乳胶微球表面血浆总蛋白及特定蛋白吸附水平的影响. 采用同位素标记相对和绝对定量技术(isobaric tag for relative and absolute quantification, iTRAQ)与质谱分析技术(mass spectrometry, MS)进一步评价未

修饰和 mPEG 修饰乳胶微球表面的血浆蛋白吸附水平差异. 本实验结果为人血浆与 mPEG 生物工程化界面相互作用的深入研究提供了依据.

1 材料与方法

1.1 乳胶微球模型与聚合物修饰

以脂肪胺聚苯乙烯乳胶微球(直径 1.2 μm ; Molecular Probes, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)为模型, 研究 mPEG 修饰对血浆蛋白与微球表面相互作用的影响. 如图 1 所示, 微球核心由带负电荷的疏水性聚苯乙烯聚合物构成, 此负电荷来自于后聚合反应残留的羧基基团(COO^-). 乳胶微球表面通过己烷链将伯胺基团(NH_2)共价结合于微球核心. 每一个微球表面平均含 3.5×10^7 个胺基基团, 用于共价修饰活化的 mPEG 聚合物.

将活化的琥珀酰亚胺碳酸酯甲氧基聚乙二醇(SC-mPEG)(Laysan Bio, Inc., Arab, AL, USA)溶于 PEG 缓冲液(50 mmol/L K_2HPO_4 , 105 mmol/L NaCl, pH 8.0), 然后置于 2.0%(质量体积比)脂肪胺聚苯乙烯乳胶微球水溶液中, 以获得特定的修饰终浓度(0~5

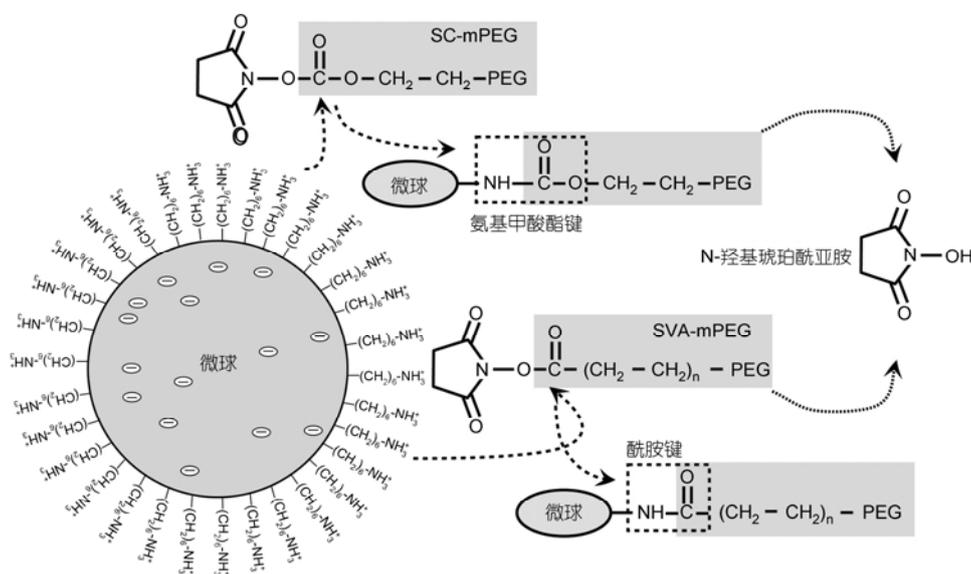


图 1 聚苯乙烯乳胶微球用于血浆蛋白吸附

乳胶微球由核心带负电荷的疏水性聚苯乙烯构成, 微球表面由伯胺基团修饰. 由于带正电的胺基基团数目远大于核心带负电的羧基基团而使整个微球呈带正电荷状态. 1.2 和 8.0 μm 的微球表面分别带有约 3.5×10^7 和 7.6×10^9 个胺基基团. 这些微球表面的胺基基团(或膜蛋白赖氨酸残基)在 SN1 取代反应中作为亲核性试剂与聚合物反应而生成自由的 N-羟基琥珀酰亚胺基团, 并在聚合物与微球间形成共价键. SC-mPEG 形成氨基甲酸酯键, SPA-和 SVA-mPEG 形成酰胺键

mmol/L). 样品持续混匀, 室温孵育 60 min, 随后洗涤 5 次去除未结合的 mPEG. 如图 1 所示, SC-mPEG 聚合物与微球以氨基甲酸酯键结合, 产生的 N-羟基琥珀酰亚胺被清洗去除. 将制备的终浓度为 2.0%(质量体积比)的乳胶微球悬液储存于 4℃ 备用.

1.2 对照和修饰微球表面的血浆吸附与洗脱

用 EDTA 抗凝管采集健康志愿者(签署知情同意书)全血, 经 $1000\times g$ (22℃, 5 min)离心制备血浆. 采用未标记和荧光标记的血浆进行蛋白吸附实验.

结果均以 $\bar{x} \pm SE$ 表示, 所有实验至少重复 3 次, 统计分析采用 SPSS V. 16.0 软件(Statistical Products and Services Solutions, SPSS Inc., Chicago, IL, USA). 组间均值的多重比较采用单因素方差分析(ANOVA), 组间均值的配对比较采用 Tukey post-hoc 检验, 以 $P < 0.05$ 示有显著性差异.

1.3 血浆蛋白标记、吸附与洗脱

未标记的血浆蛋白吸附实验在 50%血浆-乳胶微球悬液中(乳胶微球总表面积为 500 cm^2)进行. 荧光标记的血浆蛋白吸附则采用表面积为 83.3 cm^2 的乳胶微球和 83.3%(以未标记的血浆稀释)Alexa 488 (Molecular Probes, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)标记的血浆. 未修饰或修饰微球与血浆(未标记或荧光标记)持续混匀, 室温孵育 60 min, 随后用 0.02 mol/L 磷酸盐缓冲液(含 3 mmol/L NaN_3 , pH 7.4)洗涤样品 5 次, 去除未结合的蛋白.

应用显微分析技术和流式细胞术(BD FACSCalibur, BD Biosciences, San Jose, CA, USA)对乳胶微球样品表面吸附的荧光标记蛋白进行定性和定量分析. 数据分析使用 CellQuest Pro 软件(BD Biosciences, San Jose, CA, USA). 激发光波长和发射光波长分别为 488 和 530 nm. 每个样品至少采集 20000 个微球.

在样品中加入增溶缓冲液(2%十二烷基硫酸钠(SDS)和 80 mmol/L 二硫苏糖醇(DTT)溶于水), 95℃ 水浴 5 min, 使结合于未修饰或差异修饰微球表面的蛋白洗脱. 然后将微球样品离心 5 min($16000\times g$), 采用比色法, SDS-PAGE 和质谱分析技术对含有洗脱未标记蛋白的上清液进行检测.

荧光标记蛋白洗脱后, 应用流式细胞术测定残留于乳胶微球表面的蛋白质荧光表达率.

1.4 蛋白质定量检测

用 70 μL 增溶缓冲液将未标记蛋白从表面积为 500 cm^2 的乳胶微球上洗脱, 然后进行比色法蛋白含量检测(RC DC protein assay, Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA), 操作步骤按照说明书进行, 所有样品均留取 2 份, 每份 25 μL . 采用牛血清白蛋白(BSA)标准溶液(2.0 mg/mL, Thermo Fisher Scientific, Inc., Rockford, IL, USA)建立标准曲线.

1.5 SDS-PAGE 分析

采用 SDS-PAGE 分析对照和 PEG 修饰微球表面洗脱的未标记蛋白, 操作过程按照 Laemmli^[7]的方法进行. 将等量的蛋白洗脱液与对照溶液依次加入 7%聚丙烯酰胺凝胶上样孔中, 室温电泳 60 min(电流: 25 mA). 每一凝胶均依次加入如下样品: 上样缓冲液对照, 蛋白标准品(Kaleidoscope precision plus protein standards; Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA), 经上样缓冲液 100 倍稀释的人血浆. 电泳完毕后, 用 Pierce Imperial™ 蛋白染色剂进行凝胶染色(Thermo Fisher Scientific, Inc., Rockford, IL, USA).

1.6 iTRAQ 与质谱分析

根据蛋白定量数据, 使用 200 μL 洗脱液可将约 200 μg 非荧光标记蛋白从微球表面洗脱, 留取含洗脱蛋白的上清液, 送维多利亚大学蛋白质组学中心进行 iTRAQ 和质谱分析. 简言之, 4 份从空白对照和差异修饰乳胶微球表面洗脱的蛋白样品(0.5, 2.0 和 5.0 mmol/L), 经胰蛋白酶酶解并用 iTRAQ™ 试剂标记(Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). 采用由 Famos 自动进样器, Switchos II 交换泵和 UltiMate 微型泵(LC Packings a Dionex Company, Sunnyvale, CA, USA)组成的液相色谱-串联质谱仪(LC-MS/MS)进行不同浓度标记肽检测. 此系统配有串联四极杆-飞行时间(TOF)LC-MS/MS 质谱仪(QStar, Mary Esther, FL, USA)、纳米-电喷雾离子源(Proxeon, Odense, Denmark)和 10 μm 熔融石英发射器(New Objective, Inc., Woburn, MA, USA). 应用 Protein Pilot 软件(v.2.0, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)进行数据处理. 结果分析中依据的 3 个严格标准为: 肽鉴定的置信度 $\geq 99.0\%$, $P < 0.01$ 示肽量的差异有统计学意义, 每个蛋白必须依据至少 3 个不同的肽段进行鉴定.

2 结果

2.1 蛋白质吸附与洗脱

将吸附于不同浓度修饰乳胶微球表面的蛋白质(0~2 mmol/L, 2, 5 和 20 kD SC-mPEG)洗脱, 留取上清液, 采用比色法定量检测总蛋白含量. 如图 2A 所示, 乳胶微球表面血浆总蛋白吸附水平随着 mPEG 修饰浓度的升高而下降. SC-mPEG 修饰的乳胶微球(2 mmol/L, 2 kD SC-mPEG)表面蛋白吸附量明显低于空白对照微球, 分别为(15.2±2.0)和(159.9±6.4) ng/cm². 而且, 与高分子量聚合物比较, 低分子量聚合物能更有效地阻止蛋白质吸附. 例如, 在 0.1~2.0 mmol/L 浓度范围内, 2 kD 聚合物修饰效果明显强于 20 kD($P<0.04$). 在浓度相同(0.5 mmol/L)的条件下, 2 kD mPEG 修饰的微球表面蛋白吸附量为(24.3±3.6) ng/cm², 明显低于 20 kD mPEG 修饰微球((70.4±9.6) ng/cm²). 因此, 只有表面结合 mPEG 才具备掩盖并阻止蛋白吸附性能. 可溶性、未活化的 mPEG 共孵育的乳胶微球表面蛋白吸附水平与空白对照微球相似.

流式细胞术分析表明, 蛋白质吸附水平下降与修饰聚合物浓度以及链长度相关(图 2B). 将差异修饰乳胶微球与荧光标记的血浆共孵育, 在蛋白质洗脱前后进行流式细胞分析. 乳胶微球荧光表达以平均荧光百分率表示, 吸附荧光蛋白的对照非修饰乳胶微球荧光表达设定为 100%. 本研究同时发现, 洗脱过程可去除大部分蛋白质, 但仍有少量残留(图

2B). 与蛋白洗脱前比较, 洗脱后的微球荧光表达率明显下降. 例如, 对照微球蛋白洗脱前后的荧光表达率分别为 100%和(12.0±2.1)%, 而 0.5 mmol/L, 5 kD SC-mPEG 修饰微球洗脱前后分别为(29.9±3.8)%和(4.7±1.6)%. 但空白对照或经洗脱的修饰微球的荧光表达率均未达到阴性对照水平(0%), 表明洗脱过程并不完全.

为进一步研究 PEG 表面修饰对蛋白质吸附的抑制效果, 对不同浓度修饰乳胶微球(0~2 mmol/L, 5 kD SC-mPEG)表面洗脱的蛋白进行了 SDS-PAGE 电泳分析(图 3). 结果发现, PEG 修饰微球样品的蛋白吸附水平随修饰浓度的增高而显著下降. 乳胶微球与可溶性、未活化的 5 kD mPEG(2.0 mmol/L)共孵育不能抑制蛋白吸附, 与以上研究结果一致. 使用对照和 PEG 修饰的 8 μm 乳胶微球与 Alexa Fluor 488 标记的人血浆共孵育, 通过荧光显微镜观察进一步确认了二者之间的相互作用. 如图 4 所示, 聚合物修饰微球的蛋白质吸附水平较对照微球明显减少($P<0.0001$).

2.2 iTRAQ 分析

如图 2 和 3 所示, 吸附于 PEG 修饰微球的总蛋白水平显著下降. 然而, 如图 3 所示, PEG 修饰表面吸附的蛋白质下降程度不同. 特定蛋白条带的强度不稳定、不均匀减弱也证实了这一点. 目测法同样表明, 在 PEG 修饰微球和空白微球表面, 吸附层蛋白质的构成具有差异性. 因此, 为研究蛋白吸附层特定蛋

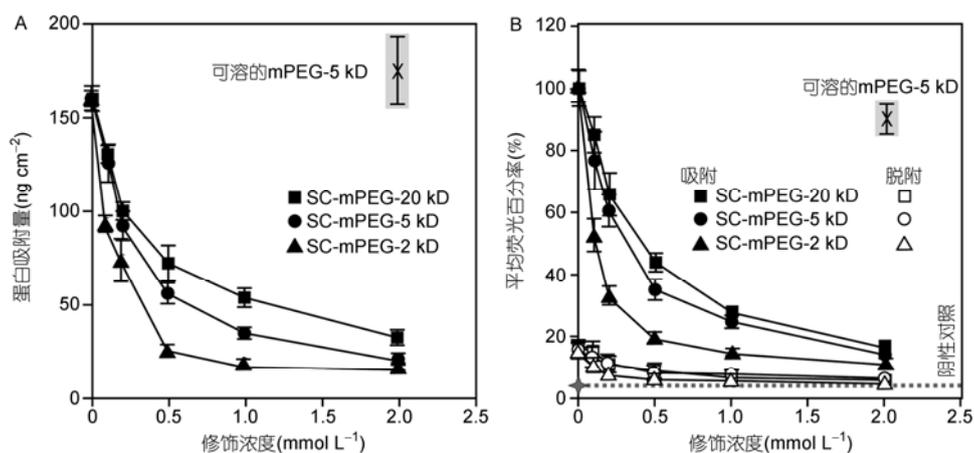


图 2 直径为 1.2 μm 乳胶微球经 SC-mPEG 修饰后, 其表面的血浆蛋白吸附总量明显降低

比色法(A)和流式细胞术(B)蛋白定量分析表明, mPEG 修饰以剂量依赖方式显著抑制了血浆蛋白-界面间的相互作用. 与长链聚合物(20 kD)相比, 短链聚合物(2 kD)表面修饰效应更强, 尤其以较低浓度修饰时效应更明显. 蛋白洗脱可去除大部分蛋白

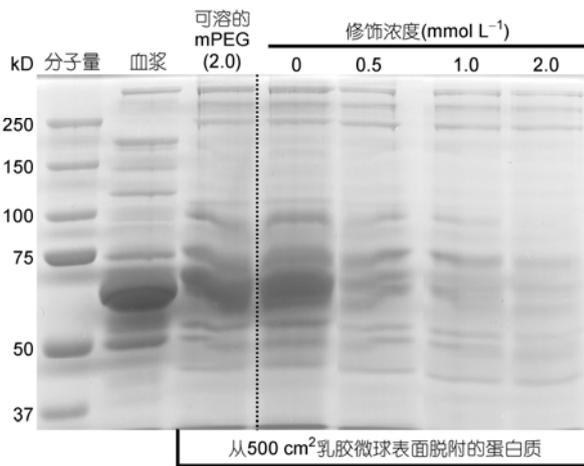


图3 PEG 修饰的 1.2 μm 微球表面不仅吸附的总蛋白量减少, 蛋白吸附层的组成也具有差异

对修饰微球(0, 0.5, 2, 5 mmol/L 5 kD SC-mPEG)进行 SDS-PAGE 分析表明, 蛋白条带亮度不均匀减弱. M.W.-Kaleidoscope 彩色分子量标准品; PI-100 倍稀释的人血浆; Sol. 2.0-从微球洗脱的蛋白质与可溶性无共价结合功能的 2.0 mmol/L, 5 kD mPEG 共孵育. 蛋白洗脱过程参见材料与方法部分, SDS-PAGE 技术蛋白分析的分辨率低于 iTRAQ 技术(表 1~4)

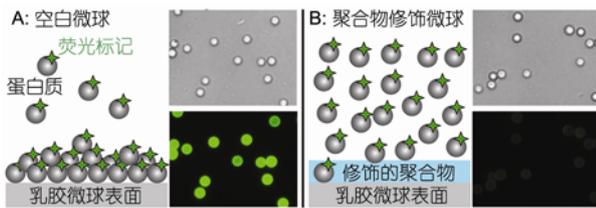


图4 聚合物修饰使微球表面 Alexa Fluor 488-标记的人血浆蛋白吸附水平明显降低($P < 0.001$)

荧光标记血浆蛋白与直径 8 μm 的对照(A)或 PEG 修饰乳胶微球(B)表面相互作用. 显微镜照片: 上图为光学显微镜照片, 下图为荧光显微镜照片

白的组成与相对丰度, 采用 iTRAQ 联合质谱技术对洗脱蛋白质样品进行检测^[8]. 在解析分析中, iTRAQ/MS 方案要求标记的所有样品中总蛋白含量(100 μg)相等, 以使样品标准化, 避免产生差异. 由于 PEG 修饰微球表面的总蛋白吸附量明显下降, 为使洗脱蛋白量达到 100 μg, iTRAQ 分析要求从浓度分别为 0.5, 2.0 和 5.0 mmol/L 修饰微球(1.2 μm, 5 kD SC-mPEG)获得的蛋白洗脱液的量要分别达到非修饰对照微球的 3, 9 和 15 倍.

质谱分析鉴定出 95 种吸附于非修饰微球样品表面的蛋白(表 1), 由于制备的人血浆内含有少量来源

于组织、残留白细胞、血小板和红细胞的蛋白质, 因此也鉴定出由 47 种蛋白质组成的血浆蛋白亚类. 另外, 从补体、凝血蛋白以及少数其他蛋白组成的功能已明确的群体中进一步鉴定出另一个含有 32 种蛋白的免疫调节血浆蛋白亚类. 从空白和 PEG 修饰微球洗脱的血浆总蛋白及其亚类的相对丰度均存在差异. 研究表明, 从 PEG 修饰微球(与空白对照微球相比)表面洗脱的 47 种血浆蛋白中, 有 32 种吸附量下降, 5 种蛋白相对丰度增加, 而其余 10 种不变(表 1). 而且, 大部分免疫调节血浆蛋白亚类(共 32 种)的相对丰度明显降低(表 1 和图 5).

如表 2 所示, 68% 的血浆蛋白在 PEG 修饰微球表面的相对吸附量显著减少, 62% 的免疫调节蛋白丰度下降(图 5). 而这些蛋白质参与了主要的“自我”和“非自我”识别以及免疫系统活化. 因此, 通过免疫修饰赋予界面“抗吸附”或“隐形”特性, 从而下调异源物质表面活化蛋白前体的相对吸附量具有极为重要的

表 1 iTRAQ/MS 分析^{a)}

	总蛋白	血浆蛋白	免疫蛋白亚类
鉴定蛋白质	95	47	32
PEG 修饰表面蛋白质丰度下降	43	32	20
PEG 修饰表面蛋白质丰度增高	15	5	6
PEG 修饰表面蛋白质丰度无变化	37	10	6

a) 与未修饰乳胶微球比较, PEG 修饰微球表面的蛋白质吸附层中相对丰度下降、增高与无变化的蛋白数量和种类

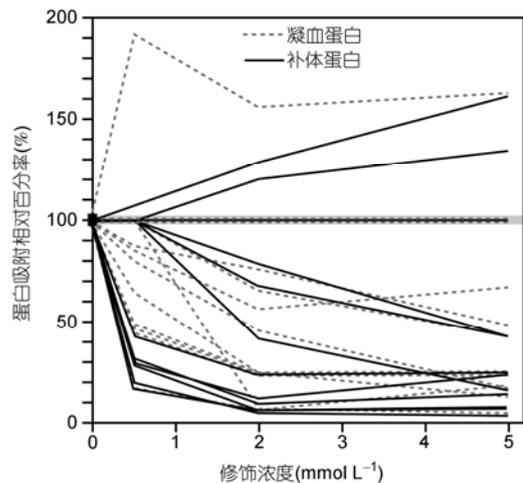


图5 补体和凝血相关蛋白的吸附水平呈明显下降趋势与未修饰微球表面吸附蛋白比较的相对百分率变化

意义. 如凝血酶原、纤维蛋白原、凝血因子 V 和纤溶酶原激活物抑制因子均为凝血途径重要的调控因子. C4b, 脂多糖(LPS)结合蛋白, C1s, C1r, C3, C9 和 MASP-3 均为有效的补体激活因子. 另外, 本实验发现, 在免疫活化过程中发挥抑制功能的蛋白质, 于 PEG 修饰微球表面的吸附水平也有所下降, 如纤溶酶原、C4b 结合蛋白、维生素 K-依赖蛋白 S 和肝素辅因子 II 等.

本研究显示, 5 种血浆蛋白在修饰微球表面的 (10.6%)的吸附水平增高(表 3). 其中参与免疫调节的 4 种蛋白分别为: C1q(α -与 β 链)、免疫球蛋白 IgG 链恒定区片段、凝血酶敏感蛋白 1 和 β -2 糖蛋白. 仅有 10 种(21.3%)血浆蛋白(表 4)在 PEG 修饰微球和空白微球表面的吸附水平相同. 这些蛋白质大部分具有调节体内平衡的功能, 包括血清白蛋白、多聚素 1、载脂蛋白 A-V, C-II 和 C-III 等结合转运蛋白, 其中绝

表 2 吸附水平相对降低的血浆蛋白^{a)}

登录号	M.W. kD	pI	蛋白名称	0.5 mmol/L	2 mmol/L	5 mmol/L
凝血相关蛋白						
IPI: IPI00019568.1	65.3	5.2	凝血酶原前体蛋白	20.2	55.4**	81.9*
IPI: IPI00021885.1	75.5	5.1	纤维蛋白原 α / α -E 链前体	56.4**	77.4*	77.7*
IPI: IPI00298497.3	50.8	8.0	纤维蛋白原 β 链前体	51.3**	74.9*	75.3*
IPI: IPI00019580.1	88.4	7.1	纤溶酶原前体	34.7***	74.4**	87.0*
IPI: IPI00219713.1	48.5	5.2	纤维蛋白原 γ 链前体	53.7**	75.5*	75.5*
IPI: IPI00294004.1	70.6	5.2	维生素 K-依赖蛋白 S 前体	0.0****	93.6*	95.5*
IPI: IPI00478809.3	248.7	5.7	凝血因子 V 前体	14.0****	42.8***	33.4***
IPI: IPI00292950.3	55.0	6.3	肝素辅因子 II 前体	82.2*	94.6*	82.3*
IPI: IPI00007118.1	42.8	7.0	纤溶酶原激活物抑制剂-1 前体	13.5****	23.1***	51.5**
IPI: IPI00216065.1	40.4	5.3	维生素 K-依赖蛋白 Z 前体	0.0****	36.0***	58.0**
补体相关蛋白						
IPI: IPI00453459.1	192.8	6.9	补体 4B 前原蛋白	83.4*	94.6*	94.5*
IPI: IPI00021727.1	61.7	6.2	C4b-结合蛋白 α 链前体	71.4**	93.3*	93.6*
IPI: IPI00400826.1	50.1	5.9	簇蛋白	0.0****	21.2***	58.6**
IPI: IPI00025862.1	26.4	5.0	C4b-结合蛋白 β 链前体	80.4*	96.7*	97.6*
IPI: IPI00017696.1	74.9	4.9	补体 C1s 子成分前体	0.0****	31.3***	57.9**
IPI: IPI00164623.3	185.0	6.0	补体 C3 前体	58.1**	75.5*	75.9*
IPI: IPI00022395.1	61.0	5.4	补体 C9 前体	71.0**	89.4*	78.5*
IPI: IPI00290283.5	81.9	5.0	补体因子 MASP-3	0.0****	59.5**	86.7*
IPI: IPI00296165.5	78.3	5.8	补体 C1r 子成分前体	69.9**	90.7*	86.8*
其他蛋白						
IPI: IPI00022229.1	512.8	6.6	载脂蛋白 B-100 前体	31.3***	82.2*	53.7**
IPI: IPI00021841.1	28.1	5.3	载脂蛋白 A-I 前体	19.4****	51.2**	63.6**
IPI: IPI00304273.1	43.4	5.2	载脂蛋白 A-IV 前体	29.8***	51.2**	34.4***
IPI: IPI00218192.1	101.2	6.2	间- α -胰蛋白酶抑制因子 H4 前体	50.1**	64.1**	57.1**
IPI: IPI00514475.3	41.1	5.7	OTTHUMP00000028705	41.5**	62.3**	70.9**
IPI: IPI00021842.1	34.2	5.5	载脂蛋白 E 前体	23.7***	43.6***	57.3**
IPI: IPI00028413.3	69.4	5.0	间- α -胰蛋白酶抑制因子 H3 前体	0.0****	81.9*	78.1*
IPI: IPI00292530.1	71.4	6.3	间- α -胰蛋白酶抑制因子 H1 前体	78.2*	94.2*	84.2*
IPI: IPI00305461.2	72.4	5.8	间- α -胰蛋白酶抑制因子 H2 前体	73.4**	88.1*	79.6*
IPI: IPI00554598.1	23.8	4.8	假定蛋白 DKFZp686N1868	0.0****	42.1***	77.9*
IPI: IPI00298971.1	52.3	5.5	玻璃黏连蛋白前体	3.6****	43.4***	71.3**
IPI: IPI00218732.2	39.6	5.1	血清对氧磷酶/芳基酯酶 1	0.0****	24.8***	54.1**
IPI: IPI00032311.3	50.9	6.3	脂多糖-结合蛋白前体	70.9**	85.1*	54.3**

a) 表中数值表示 100 μ g 洗脱总蛋白的相对丰度下降百分率(PEG 修饰微球比空白对照微球). 丰度下降百分率标志: *: >75%; **: 50%~74.9%; ***: 20%~49.9%; ****: <20%. 黑体示免疫相关蛋白; IPI 示国际蛋白质索引

大部分为白蛋白. 10种蛋白仅有4种是参与免疫调节的蛋白, 分别是C1q(C-链), vWF, 血小板碱性蛋白和血小板因子4.

3 讨论

外源材料和细胞的免疫识别依赖于细胞表面与可溶性因子(如抗体)的相互作用, 以及免疫系统的细胞识别(如抗原递呈细胞和淋巴细胞). 先前研究表明, 易于变性(“柔性”)的蛋白质具有解折叠功能, 可通过与暴露的内部疏水性残基多点接触而结合于疏水表面, 并通过氢键、疏水相互作用、静电吸引和范德华力而进一步增强黏附^[9,10]. 采用聚合物免疫修饰的生物材料、移植组织或细胞, 可以明显减弱炎症和异体识别的起始阶段, 因此其临床适用范围非常广泛.

本研究以乳胶微球为模型, 分析了血浆蛋白在PEG修饰微球表面的吸附水平. 使用mPEG共价修饰乳胶微球表面能够显著减弱界面-大分子间的相互

作用(图2~5). 同时, 总血浆蛋白吸附量下降这一结果也表明了对微球进行全面免疫修饰的有效性. 与以往生物学研究相比, 生物物理学的乳胶微球模型联合以质谱为基础的蛋白质组学应用, 可定性定量评估PEG修饰对总蛋白和特定蛋白与界面间相互作用的抑制效果, 有助于进一步阐述PEG修饰界面的生物学反应.

mPEG是一种具有高度柔性和亲水性的聚合物, 具有较大的三维空间结构, 即分子排阻体积较大, 能够显著改变所修饰材料的表面特性(图6). 由于mPEG高度的亲水性及其与水分子较强的结合能力, 通过PEG修饰可增强乳胶微球表面的亲水性^[11]. 以往研究表明, 亲水性界面不但可抑制蛋白质吸附, 而且具有更好的生物相容性^[12]. 因此, mPEG修饰不仅能产生空间位阻效应, 同时还以生物物理方式掩盖了表面电荷, 从而降低了植入生物材料、异源红细胞、淋巴细胞和病毒的免疫识别能力^[3~5,13~22](图6B~D). 本研究应用比色法和流式细胞术蛋白定量检测技术(图2A和

表3 吸附水平相对增高的血浆蛋白^{a)}

登录号	M.W. kD	pI	蛋白名称	吸附增高百分率(%)			分类
				0.5 mmol/L	2 mmol/L	5 mmol/L	
IPI: IPI00296099.3	127.5	4.7	凝血酶敏感蛋白1前体	5.2****	18.3****	26.3*	细胞外基质
IPI: IPI00549769.1	36.1	8.5	免疫球蛋白γ-1链C区	20.0****	0.0****	89.9**	免疫相关蛋白
IPI: IPI00022392.1	23.7	9.3	补体C1q, 链前体	0.0****	20.2****	34.4*	补体蛋白
IPI: IPI00477992.1	23.7	8.9	补体1, q子成分, β多肽	0.0****	28.1*	60.4***	补体蛋白
IPI: IPI00298828.1	36.3	8.4	β-2-糖蛋白I前体	94.9**	55.2***	64.7***	凝血相关蛋白

a) 表中数值表示100 μg洗脱总蛋白的相对丰度增高百分率(PEG修饰微球比空白对照微球). 丰度下降百分率标志: *: >75%; **: 50%~74.9%; ***: 20%~49.9%; ****: <20%. 黑体示免疫相关蛋白; IPI示国际蛋白质索引

表4 吸附水平相对无变化的血浆蛋白

登录号	M.W.kD	pI	蛋白名称	分类
IPI: IPI00022434.1	66.5	5.7	血清白蛋白前体	转运蛋白
IPI: IPI00303283.1	84.4	5.0	整合素β3	受体
IPI: IPI00418392.1	136.1	7.9	多聚素1	转运蛋白
IPI: IPI00022394.2	22.8	8.3	补体C1q子成分, C链前体	补体蛋白
IPI: IPI00023014.1	225.7	5.4	血管性血友病因子前体	凝血相关蛋白
IPI: IPI00465378.1	38.9	6.0	载脂蛋白A-V前体	转运蛋白
IPI: IPI00021857.1	8.8	4.7	载脂蛋白C-III前体	转运蛋白
IPI: IPI00022445.1	10.3	9.0	血小板碱性蛋白前体	免疫相关蛋白
IPI: IPI00022446.1	7.8	8.8	血小板因子4前体	凝血相关蛋白
IPI: IPI00021856.3	8.9	4.7	载脂蛋白C-II前体	转运蛋白

a) 以上所列蛋白质虽然在对照和修饰微球洗脱总蛋白溶液(100 μg)中的相对丰度无差异, 但与对照微球相比, PEG修饰微球表面总蛋白的吸附量显著降低, 例如, 修饰微球为(18.3±4.1) ng/cm²(2 mmol/L, 5 kD SC-mPEG), 明显低于(159.9±6.4) ng/cm²(空白对照). 黑体示免疫相关蛋白; IPI示国际蛋白质索引

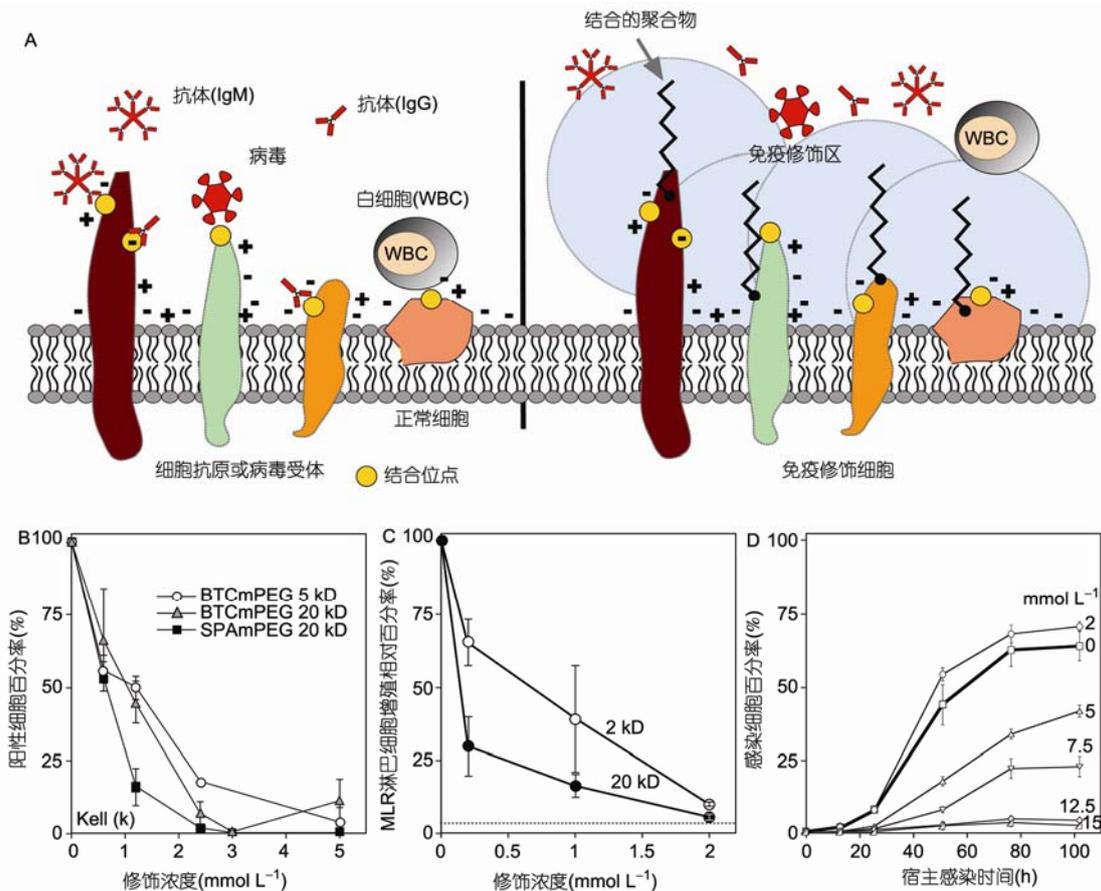


图 6 血浆蛋白与乳胶微球的相互作用受抑预示了免疫修饰的生物效应

聚合物修饰不仅阻止了血浆蛋白对生物材料的不良吸附(如血管支架), 而且抑制或下调了负面的生物学反应. A: 通过聚合物(如 mPEG 或 HPG)共价结合产生的空间位阻和电荷遮蔽效应实现了表面蛋白(如细胞受体、抗原位点和病毒结合位点)的生物物理修饰. 随后形成生物物理屏障; B: 红细胞抗体与血型抗原结合减少; C: 混合淋巴细胞反应(MLR)中淋巴细胞增殖降低表明, MHC 不相合淋巴细胞失去免疫识别功能; D: 对定位于宿主细胞膜表面的病毒受体进行免疫修饰可抑制病毒入侵、增殖及疾病进程

B)及 SDS-PAGE, 荧光显微镜技术和 iTRAQ-MS 分析(图 3~5)表明, 随着 mPEG 修饰浓度和分子量的增加, 乳胶微球表面蛋白质吸附水平受到显著抑制.

血浆蛋白于乳胶微球表面的吸附抑制效果受微球-血浆界面的热动力学改变影响. 这一变化是由电荷掩盖, 特别是由修饰 PEG 聚合物的空间位阻效应所介导. 当聚合物以高密度修饰时, 尤其是能以高密度结合的短链聚合物, 其空间效应被增强(如 2 kD)(图 2A 和 B). 与低分子量聚合物比较, 高密度长链聚合物修饰微球时, 由于其最初在微球表面形成的修饰聚合物群产生的空间自我排斥效应而使其受到抑制.

生物物理学的空间位阻效应是由修饰 mPEG 聚合物构象自由度的降低而引起聚合物熵值下降产生

的. 当高分子与 mPEG 修饰表面发生相互作用时, 高分子接触并压缩聚合物链进一步引起熵值下降. 通过聚合物接触点的分子排斥作用, 来减弱这种极其不利的热动力学状态, 从而阻止蛋白质吸附, 并增加聚合物链的熵值和构象自由度^[23-25]. 对于更高密度的表面聚合物(图 2 和 3), 其链的构象自由度受到更大程度的限制, 因此增强了血浆蛋白与生物材料(微球)表面间的排斥作用.

iTRAQ/MS 研究证实(表 1~4), 68%的被鉴定血浆蛋白与 PEG 修饰表面的结合水平下降, 其蛋白下调水平取决于 mPEG 的修饰浓度. 如表 2 所示, 与空白对照微球比较, 0.5, 2 和 5 mmol/L 的修饰浓度分别可使 12.5%, 50%和 56%的被鉴定蛋白质丰度下降 $\geq 75\%$.

如表 2 所示, 参与异物识别、凝血和补体活化(如纤溶酶原、C4b 结合蛋白、玻璃黏连蛋白、维生素 K 依赖蛋白 S 和肝素辅因子 II)等过程的多免疫蛋白的吸附量均有所降低. 与吸附部分变性蛋白质和/或疏水性表面相比, 聚合物修饰表面不仅蛋白吸附量降低, 而且其亲水性增加, 这些特点均有利于减少血栓的形成. 事实上, 疏水性表面血栓形成倾向部分来自于吸附的变性血浆蛋白的亲合力增加.

仅有少部分蛋白质与 PEG 修饰微球表面的吸附或相互作用相对增加, 其中包括胶原、类纤维蛋白或参与类胶原蛋白黏附与结合的蛋白质. 虽然此类蛋白数量有限, 却是免疫系统的活性成分. 本研究表明, 这些蛋白的吸附水平随 mPEG 浓度的增大而增高. 其中, 包括具有启动补体活化途径功能的 C1q 复合物成分(α 与 β 链). C1q(α 与 β 链)蛋白与 IgG 链恒定区相互作用, 通过 C1q 的类胶原结构, 使二者结合于 PEG 修饰表面^[26-28]. 然而, 先前研究表明, 经 mPEG 修饰的人红细胞并未直接启动补体活化或补体消耗途径^[15]. 凝血酶敏感蛋白-1 相对丰度增高是由于其复杂的多结构域结构, 使其与细胞黏附受体, 糖蛋白包括纤维连接蛋白和胶原发生相互作用所致^[29]. 但并非所有吸附的蛋白质都会产生负面影响, β -2-糖蛋白 I 前体和凝血酶敏感蛋白的结合对细胞和组织移植有利. β -2-糖蛋白与带负电荷的磷脂结合, 可抑制凝血连锁反应, 而凝血酶敏感蛋白-1 是 T 细胞和树突状细胞活化的有效抑制剂^[30-33].

丰度未发生相应变化的 10 种蛋白(表 4)大部分具有调节体内平衡的功能(如结合转运蛋白). 该亚类中仅有 4 种蛋白发挥免疫作用, 分别为 C1q(C-链), vWF, 血小板碱性蛋白和血小板因子 4. C1 复合物是通过 C1q C-链连接而成, 而 vWF 作为凝血因子 VIII 的载体而保护其活性; 因此除作为免疫相关蛋白执行功能外, 二者均属于结合转运蛋白亚类. 血小板因子 4 和血小板碱性蛋白属于趋化因子家族, 具有下调免疫应答的功能. 血小板因子 4 抑制淋巴细胞增殖和 T 细胞释放细胞因子^[34]. 血小板碱性蛋白可抑制嗜中性粒细胞在前炎症反应中的趋化性和功能^[35]. 另外, 由于趋化因子是信号蛋白, 如果未与其受体结合, 则基本不会产生任何生物效应. 因此, 这些蛋白在免疫系统活化中不发挥作用, 其吸附也不会引起不良免疫反应.

蛋白质组学的研究结果具有前瞻性, 同时有生

物学实验数据的确认. 如图 6 所示, 细胞表面的聚合物修饰阻断或减弱了不良的免疫性生物学反应. 图 6A 表明, 聚合物(mPEG 或 HPG)与细胞共价结合掩盖了表面蛋白(如细胞受体、抗原位点和病毒结合位点等), 随后形成生物物理屏障, 产生以下效应: (i) 人红细胞与血型抗原(如 Kell k)的抗体结合能力减弱; (ii) 混合淋巴细胞反应(MLR)中淋巴细胞增殖受抑制表明, HLA 不相合淋巴细胞同种异物识别功能降低; (iii) 对定位于宿主细胞膜表面的病毒受体进行免疫修饰可抑制病毒入侵、增殖及疾病进程. 总之, 生物物理学、蛋白质组学和生物学研究均为生物材料和细胞/组织免疫修饰在临床医学中的潜在应用提供了可靠的依据.

综上所述, mPEG 共价结合实现了乳胶微球表面全方位的免疫修饰, 通过定性和定量蛋白分析证实, 微球表面血浆蛋白吸附水平明显下降(图 7). 修饰聚合物的热动力学空间位阻效应和电荷掩盖效应阻止了血浆的吸附. 而且, 蛋白质组学研究表明, 乳胶微球修饰显著抑制了参与生物材料以及异物细胞和组织免疫识别的血浆蛋白与界面之间的相互作用. 以生物学方式下调界面-大分子间不良的相互作用, 理论上可抑制免疫识别信号(如变性蛋白质或免疫球蛋白结合)的产生, 从而提高生物相容性. 事实上, 乳胶微球生物相容性研究为本实验室先前报道^[14]的生物学观

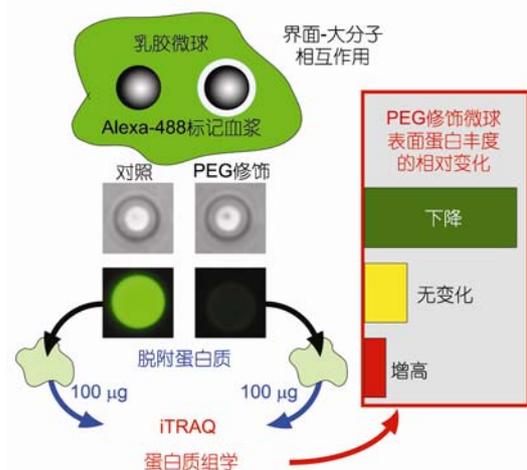


图 7 血浆-界面相互作用的定性定量分析

免疫修饰有效地抑制蛋白吸附. iTRAQ 检测结果进一步证实血浆蛋白吸附下降与异物细胞/组织以及生物材料的免疫识别具有相关性

察结果提供了依据, 并为后续研究奠定了基础(图 5)。蛋白质组学研究将有助于评价经 PEG 修饰(或其他聚合物)的生物材料、异体细胞和组织的物理化学参数, 以便精确控制流体面(如血浆-植入材料)、细胞-细胞

和细胞-大分子间相互作用的程度和特异性。免疫修饰技术的临床应用对于提高植入生物材料的安全性, 以及增强输血和移植医学领域的安全性、稳定性和持续性具有重要意义。

致谢 感谢 Peter Schubert 博士(Canadian Blood Services and University of British Columbia, Vancouver, BC, Canada)和 Jurgen Kast 博士(University of British Columbia, Biomedical Research Centre, Vancouver, BC, Canada)对本文的指导、 Derek Smith(University of Victoria, Genome BC Proteomics Centre, Victoria, BC, Canada)的专业技术支持、 Geraldine Walsh 博士(CBS 科技作家)对论文撰写的帮助及陈炜博士(Cornell University)对文章的帮助。

参考文献

- 1 Gallagher W M, Lynch I, Allen L T, et al. Molecular basis of cell-biomaterial interaction: insights gained from transcriptomic and proteomic studies. *Biomaterials*, 2006, 27: 5871–5882
- 2 Ratner B D, Bryant S J. Biomaterials: where we have been and where we are going. *Annu Rev Biomed Eng*, 2004, 6: 41–75
- 3 Chen A M, Scott M D. Current and future applications of immunological attenuation via pegylation of cells and tissue. *Bio Drugs*, 2001, 15: 833–847
- 4 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
- 5 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
- 6 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
- 7 Laemmli U K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 1970, 227: 680–685
- 8 Ross P L, Huang Y N, Marchese J N, et al. Multiplexed protein quantitation in *Saccharomyces cerevisiae* using amine-reactive isobaric tagging reagents. *Mol Cell Proteomics*, 2004, 3: 1154–1169
- 9 Vroman L. Effect of adsorbed proteins on the wettability of hydrophilic and hydrophobic solids. *Nature*, 1962, 196: 476–477
- 10 Horbett T A. Mass action effects on competitive adsorption of fibrinogen from hemoglobin solutions and from plasma. *Thromb Haemost*, 1984, 51: 174–181
- 11 Harris J M. Introduction to bioethical and biomedical applications of poly(ethylene glycol). In: Harris M J, ed. *Topics in Applied Chemistry*. New York: Plenum Press, 1992. 1–14
- 12 Andrade J D. Interfacial phenomena and biomaterials. *Med Instrum*, 1973, 7: 110–119
- 13 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
- 14 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
- 15 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
- 16 Scott M D, Chen A M. Beyond the red cell: pegylation of other blood cells and tissues. *Transfus Clin Biol*, 2004, 11: 40–46
- 17 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
- 18 Bradley A J, Scott M D. Immune complex binding by immunocamouflaged [poly(ethylene glycol)-grafted] erythrocytes. *Am J Hematol*, 2007, 82: 970–975
- 19 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
- 20 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
- 21 Scott M D, Murad K L. Cellular camouflage: fooling the immune system with polymers. *Curr Pharm Des*, 1998, 4: 423–438
- 22 McCoy L L, Scott M D. Broad-spectrum antiviral prophylaxis: inhibition of viral infection by polymer grafting with methoxypoly(ethylene glycol). In: Torrence P F, ed. *Antiviral Drug Discovery for Emerging Diseases and Bioterrorism Threats*. New York: John Wiley & Sons, Inc, 2005. 379–395
- 23 Szleifer I. Protein adsorption on surfaces with grafted polymers: a theoretical approach. *Biophys J*, 1997, 72: 595–612
- 24 Hermans J. Excluded-volume theory of polymer-protein interactions based on polymer chain statistics. *J Chem Phys*, 1982, 77: 2193–2203
- 25 Brooks D E, Haynes C A, Hritcu D, et al. Size exclusion chromatography does not require pores. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 97: 7064–7067
- 26 Yasmeen D, Ellerson J R, Dorrington K J, et al. The structure and function of immunoglobulin domains. IV. The distribution of some effector functions among the Cgamma2 and Cgamma3 homology regions of human immunoglobulin G1. *J Immunol*, 1976, 116: 518–526
- 27 Colomb M, Porter R R. Characterization of a plasmin-digest fragment of rabbit immunoglobulin gamma that binds antigen and complement. *Biochem J*, 1975, 145: 177–183
- 28 Reid K B. Complete amino acid sequences of the three collagen-like regions present in subcomponent C1q of the first component of human complement. *Biochem J*, 1979, 179: 367–371
- 29 Lawler J, Duquette M, Urry L, et al. The evolution of the thrombospondin gene family. *J Mol Evol*, 1993, 36: 509–516
- 30 Miyakis S, Giannakopoulos B, Krilis S A. Beta 2 glycoprotein I-function in health and disease. *Thromb Res*, 2004, 114: 335–346
- 31 Brighton T A, Hogg P J, Dai Y P, et al. Beta 2-glycoprotein I in thrombosis: evidence for a role as a natural anticoagulant. *Br J Haematol*, 1996, 93: 185–194
- 32 Doyen V, Rubio M, Braun D, et al. Thrombospondin 1 is an autocrine negative regulator of human dendritic cell activation. *J Exp Med*, 2003, 198: 1277–1283
- 33 Li Z, He L, Wilson K, et al. Thrombospondin-1 inhibits TCR-mediated T lymphocyte early activation. *J Immunol*, 2001, 166: 2427–2436
- 34 Fleischer J, Grage-Griebenow E, Kasper B, et al. Platelet factor 4 inhibits proliferation and cytokine release of activated human T cells. *J Immunol*, 2002, 169: 770–777
- 35 Ehlert J E, Ludwig A, Grimm T A, et al. Down-regulation of neutrophil functions by the ELR(+) CXC chemokine platelet basic protein. *Blood*, 2000, 96: 2965–2972