

· 基础实验研究 ·

聚乙二醇衍生物修饰红细胞的保存性能研究*

顾光煜¹, 李璐², 陈军浩¹, 张葵¹

(1. 南京大学医学院附属鼓楼医院检验科, 南京 210008; 2. 江苏省连云港市第一人民医院输血科 222002)

摘要:目的 评估经甲氧基聚乙二醇-琥珀酰亚胺丙酸酯(mPEG-SPA)修饰后红细胞(RBC)的保存性能。方法 以 mPEG-SPA 体外修饰健康人 RBC, 观察修饰前后 RBC 的变形性、渗透脆性、自身溶血率、磷脂酰丝氨酸和 CD59, 评估修饰对 RBC 保存性能的影响。结果 mPEG-SPA 修饰后 RBC 的变形性略有下降, 渗透脆性和自身溶血率有所增加; 修饰后红细胞磷脂酰丝氨酸表达明显增加; 红细胞 CD59 的表达严重下降, 其表达率几近于零。结论 mPEG-SPA 修饰后红细胞的保存性能下降, 可能影响修饰后红细胞的寿命和输入体内的存活率。

关键词: 聚乙二醇类; 红细胞; 血液保存

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2012.03.030

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2012)03-0322-02

Evaluate the preservation of RBC modified by polyethylene glycol derivatives*

Gu Guangyu¹, Li Lu², Chen Junhao¹, Zhang Kui¹

(1. Clinical Laboratory, Nanjing Drum Tower Hospital Affiliated to Nanjing University Medical School, Nanjing 210008, China; 2. Department of Blood Transfusion, Lianyungang First People's Hospital, Lianyungang Jiangsu 222002, China)

Abstract: Objective To evaluate the preservation properties of grafted of red blood cell(RBC) by methoxy polyethylene glycol-succinimid propionate(mPEG-SPA). **Methods** RBC from normal individuals was modified by mPEG-SPA. The characteristics of RBC, such as deformability, osmotic fragility, autohemolysis rate, the positive rate of phosphatidylserine and CD59 expression, were compared before and after the mPEG-SPA treatment. **Results** The deformability of RBC had slightly decreased than normal, the osmotic fragility and autohemolysis rate increased a little at the same time. But the positive rate of phosphatidylserine expression had obviously increased, and the expression of CD59 had sharply decreased even undetected on the RBC surface. **Conclusion** The preservation properties of RBC modified by mPEG-SPA could be dropped, and that might affect the life and the survival rate after transfusion of modified RBC.

Key words: glycols, polyethylene; red blood cells; blood preservations

研究表明, 聚乙二醇(polyethylene glycol, PEG)衍生物修饰的红细胞具有正常红细胞的结构与功能, 可以遮蔽多种血型抗原, 减少受血者体内相应抗体对 A、B 特别非 AB 血型抗原的反应性, 有效地解决了不规则抗体和自身抗体所致配血困难^[1-2]。由于修饰过程中的反复洗涤可能造成机械损伤以及修饰本身可能的影响, 修饰后红细胞的保存性能有所降低, 笔者用甲氧基聚乙二醇(polyethylene glycol, mPEG)衍生物 mPEG-琥珀酰亚胺丙酸酯(methoxy polyethylene glycol-succinimidyl propionate, mPEG-SPA)修饰红细胞、遮蔽红细胞表面血型抗原, 检测修饰前后的红细胞自身溶血率、渗透脆性、变形性、磷脂酰丝氨酸(phosphatidylserine, PS)和 CD59, 进行修饰后红细胞的保存性能研究。

1 材料与与方法

1.1 材料

1.1.1 仪器 北京普利生公司 LBY-BX 型红细胞变形仪; 美国 BD 公司 FACSCanto 流式细胞仪。

1.1.2 试剂 mPEG(相对分子质量 5×10^3 , 德国 Fluka 公司); mPEG-SPA(相对分子质量 20×10^3 , 北京凯正公司); CPD 保养液(南京市红十字血液中心); 细胞凋亡试剂 Annexin V-EGFP-FITC(南京凯基生物公司); 藻红蛋白(PE)标记 CD59 单抗为美国 BD 公司产品。

1.2 方法

1.2.1 mPEG-SPA 修饰红细胞 选取 15 例健康成年人 CPD 保养液抗凝血液 5 mL, 200 g 离心 3 min, 去除血浆, 生理盐水洗涤 3 次待用。实验组: CPD 中加入 mPEG-SPA, 使终浓度为 2.0 mmol/L, 各加入洗净的红细胞配制约为 12% 的红细胞悬浮液, 颠倒混匀, 25 °C 孵育 1 h, 其间每十分钟混匀一次, 反应结束后经离心半径 8 cm, 200 r/min 离心 5 min, 生理盐水洗涤 3 次。对照组用 2.0 mmol/L mPEG 代替 mPEG-SPA 进行修饰反应。

1.2.2 修饰前后红细胞自身溶血率和渗透脆性测定 15 例健康献血者血液用自身血浆配制成红细胞压积约 45% 的悬液 2 mL, 37 °C 孵育 48 h 后, 取上清液 540 nm 波长处检测吸光度值, 计算自身溶血率。

$$\text{测定管溶血率}(\%) = \frac{\text{测定管 A} \times (1 - \text{红细胞压积})}{\text{溶血对照管 A} \times 4}$$

按《全国临床检验操作规程(第 3 版)》^[3]进行红细胞渗透脆性试验。

1.2.3 修饰前后红细胞变形性测定 将待测红细胞加入 MAP 红细胞保存液, 配制 RBC: MAP 为 2:1 的悬浮红细胞, 再加入 15% 聚乙烯吡咯烷酮至红细胞终压积 15% 左右, 于 LBY-BX 红细胞变形仪激光衍射法切变率(SHR)为 800 条件下测定红细胞变形性。

* 基金项目: 南京市医学重点科技发展项目(ZKX07014)。

1.2.4 红细胞表面磷脂酰丝氨酸(PS)测定 将修饰前后的红细胞加入红细胞保存液(MAP)(红细胞:MAP=2:1),4℃保存,在修饰后当天第2天、第3天分别将2μL的Annexin V-EGFP-FITC抗体与1μL的红细胞混合在400μL缓冲液中孵育15min,BD FACSCanto流式细胞仪测定红细胞表面PS的表达情况。

1.2.5 红细胞表面CD59的检测 以mPEG(2.0mmol/L)孵育红细胞为对照,测定mPEG-SPA(2.0mmol/L)修饰的15例健康人血液CD59。将血液稀释200倍。对照组用20μL稀释的mPEG孵育全血加10μL CD59-PE单抗;实验组用20μL稀释的mPEG-SPA修饰后全血,加10μL CD59-PE单抗。混匀,室温25℃避光孵育15min后加PBS 1mL,BD FACSCanto流式细胞仪检测红细胞表面CD59。每份样品收集100000个细胞,以阳性细胞占细胞总数的百分比来表示。连续测定修饰当天(0天)、第2天和第3天的CD59表达情况。

1.2.6 统计学处理 连续性变量以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用配对样本t检验和秩和检验的方法, $P < 0.05$ 为具有统计学意义,使用SPSS和EXCEL软件作结果分析。

2 结果

2.1 修饰后红细胞自身溶血率增加,变形性略有降低,渗透脆性也略有增加,但仍属正常范围,结果见表1。

表1 mPEG-SPA修饰后红细胞自身溶血率、变形性和渗透脆性(n=15)

项目	未修饰	修饰	参考范围
自身溶血率(%)	2.16±0.27	3.60±0.35	<4
变形性(%)	58.62±3.93	55.89±3.74	>56
渗透脆性(g/L)	4.21±0.16	4.54±0.14	开始溶血(3.8~4.6)
渗透脆性(g/L)	2.97±0.15	3.20±0.13	完全溶血(2.8~2)

2.2 与未经修饰的红细胞相比,修饰后的红细胞表面PS表达增加,保存3天后差别更为显著,差异有统计学意义(P<0.05)。见表2、图1。

表2 mPEG-SPA修饰前后红细胞表面PS表达情况(n=15)

组别	当天	第2天	第3天
未修饰	0.21±0.12	0.20±0.16	0.46±0.32
修饰	0.34±0.12	0.90±0.27	0.95±0.55

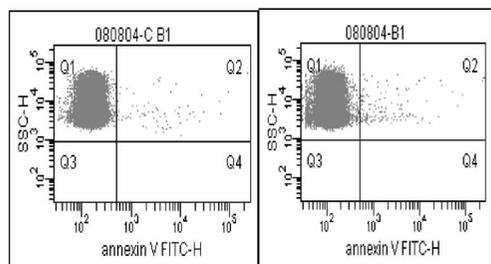


图1 未修饰(CB1)和修饰后(B1)当天红细胞表面PS表达情况

2.3 红细胞修饰后当天到修饰后第3天的CD59抗原的表达情况结果显示修饰后CD59表达率严重下降,其表达率几乎为零。结果见表3、图2。

表3 mPEG-SPA修饰后当天至第3天红细胞表面CD59抗原表达情况(n=15)

组别	当天	第2天	第3天
未修饰	99.89±0.07	99.44±0.43	99.61±0.40
修饰	1.25±1.32	1.01±0.55	2.04±1.42

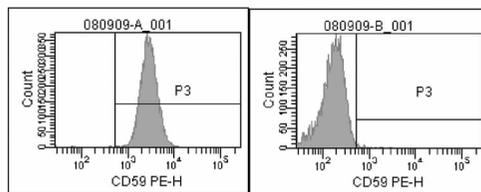


图2 mPEG-SPA修饰前(A)、后(B)红细胞表面CD59检测结果

3 讨论

聚乙二醇衍生物修饰红细胞减弱了红细胞血型抗原与相应抗体的反应性、有效地解决了不规则抗体和自身抗体所致的配血困难,而红细胞的形态与结构未发生明显变化^[2,4]。然而,修饰本身以及修饰过程反复洗涤的机械损伤可能影响修饰后红细胞的保存性能,甚至影响修饰红细胞输血后的体内存活率。因此,有必要研究并改善修饰红细胞的保存性能,为修饰红细胞的临床应用奠定基础。

修饰后红细胞的自身溶血率和渗透脆性虽属正常范围但有所增高。红细胞的变形性与红细胞的寿命密切相关,红细胞具有变形性有利于通过比其自身直径小得多的微血管;如变形性差,红细胞将无法通过微循环。红细胞保存期越长,变形性降低愈明显,表明变形性下降是衰老红细胞被破坏的一个重要因素。修饰后红细胞的变形性能降低、自身溶血率和渗透脆性增加都可能影响修饰红细胞的保存性能。

PS约占人红细胞磷脂的14%,主要分布于红细胞膜脂质双层的内层。当细胞发生程序性死亡即凋亡的时候,膜脂上磷脂的不对称分布发生变化,正常时位于胞质层的PS快速转移至胞膜外层,俗称PS外翻。巨噬细胞表面存在PS受体,PS外翻暴露于细胞表面可作为一种信号,促进巨噬细胞对衰老红细胞的识别、吞噬和降解^[5]。膜脂的不对称分布是维持红细胞形态的基础,如果膜脂的双层结构发生变化,会使红细胞形态发生变化,转变成棘状、口形等。临床观察发现,镰状细胞性贫血患者发生迟发性溶血性输血反应时,体内PS增高,标志着伴随PS的增高,体内红细胞被过度破坏^[6]。PS是凝血酶原的激活剂,PS外翻还可以促进血液凝固和血栓的形成^[7-8]。本研究表明,修饰后红细胞表面PS的表达增加,保存2天后的修饰红细胞的PS表达增加更加明显,与对照组比较差异具有统计学意义。

补体的调控作用直接影响红细胞的保存性能,补体被激活并形成补体复合物,可使细胞破溶,对红细胞来说即造成溶血。在一系列的补体反应中,有激活、也有抑制补体活化的分子参与并起调控作用,任何异常都会引起疾病。红细胞表面有膜攻击复合物抑制因子(membrane inhibitor reactive lysis, MIRL, CD59),CD59是红细胞膜上重要的免疫分子,在体内发挥着保护自身细胞免受补体的活化和攻击的作用^[9],CD59的缺失是溶血或溶血发作的重要原因。用抗体抑制正常红细胞的CD59,可增加细胞对补体的敏感性,先天缺乏(下转第326页)

道的 7.1% 稍微偏低^[5],可能与不同地区用药情况有关。

表 2 MIC 法检测 318 株病原菌对 4 种药物的耐药率

耐药率(%)	CPZ	CPZ/TZB (8:1)	CPZ/SBT (1:1)	CPZ/SBT (2:1)
大肠埃希菌(不产 ESBLs)	9.7	3.2	3.2	3.2
大肠埃希菌(产 ESBLs)	96.6	6.8	8.5	13.6
肺炎克雷伯菌(不产 ESBLs)	11.5	7.7	7.7	7.7
肺炎克雷伯菌(产 ESBLs)	94.1	8.8	14.7	17.6
阴沟肠杆菌	41.2	17.6	17.6	17.6
铜绿假单胞菌	45.9	18.8	23.5	23.5
鲍曼不动杆菌	63.6	57.6	6.1	24.2

3 讨 论

β -内酰胺酶的产生是革兰阴性杆菌对 β -内酰胺类抗菌药物产生耐药的最主要机制,由于近年来超广谱抗生素的广泛使用,产 ESBLs、多重耐药菌及泛耐药菌呈逐年上升趋势^[6], β -内酰胺酶抑制剂(TZB、SBT 及克拉维酸)可以阻断超广谱酶的活性,使产生超广谱酶的细菌对一些 β -内酰胺酶抑制剂与 β -内酰胺类抗生素联合制剂敏感。本研究以豫东地区临床分离的常见革兰阴性杆菌为检测对象,以了解目前 CPZ、CPZ/SBT(8:1)、CPZ/SBT(1:1 和 2:1)体外抗菌活性。数据显示,CPZ 对大肠埃希菌、产 ESBLs 大肠埃希菌,肺炎克雷伯菌、产 ESBLs 肺炎克雷伯菌,阴沟肠杆菌、铜绿假单胞菌、鲍曼不动杆菌的 MIC₅₀/MIC₉₀ 为 32/64、64/128、32/64、64/128、32/128、16/128、128/>128 μ g/mL,表明 CPZ 对临床常见菌株存在不同程度的耐药。

研究发现,对于肠杆菌科的产 ESBLs 大肠埃希菌、产 ESBLs 肺炎克雷伯菌、阴沟肠杆菌、复方制剂比单方 CPZMIC₅₀/MIC₉₀ 分别降低 8~16 和 2~4 倍,其中 CPZ/SBT(8:1)的抗菌活性优于 CPZ/SBT(1:1 和 2:1),可能与近年来 CPZ/ SBT 长期使用和 TZB 的特点有关,TZB 是 SBT 的衍生物,是一种竞争性不可逆 β -内酰胺酶抑制剂,其结构是在 SB 的基础

上增加一个三氮唑环,提高了抑酶活性。在 CPZ/ SBT(1:1 和 2:1)两者间比较,对产 ESBLs 菌株 CPZ/ SBT(1:1)抗菌活性更高,其 MIC₅₀/MIC₉₀ 基本降低 2 倍。

CPZ/ SBT(8:1)、CPZ/ SBT(1:1 和 2:1) 对非发酵菌铜绿假单胞菌均有一定程度的耐药,其 MIC₅₀/MIC₉₀ 为 8/64、16/64、16/64 μ g/mL,而鲍曼不动杆菌的 MIC₅₀/MIC₉₀ 为 64/128、16/32、16/64 μ g/mL,其中 CPZ/ SBT(1:1) 抗菌活性最高。现有情况下,多重耐药与泛耐药菌的迅速增加^[1,7],已经给临床治疗感染带来了极大困难,由于非发酵菌耐药机制极为复杂,细菌大多数携带多种 β -内酰胺酶,除分子分类中 A 组、B 组、D 组碳青霉烯酶外,还可带有 ESBLs、AmpC、aac(6')-Ib-cr 以及细菌外膜蛋白缺乏和外排泵机制等。鲍曼不动杆菌对 CPZ/ SBT(1:1 和 2:1) 和 CPZ/ SBT(8:1) 的耐药率为 6.1%、24.2%、57.6%,这与 SBT 具有直接抑菌和抑酶双重功效有关^[4],这与本研究结果是一致的。

参考文献

- [1] 汪复,朱德妹,胡付品,等. 2009 年中国 CHINET 细菌耐药性检测[J]. 中国感染与化疗杂志,2010,10(5):325-334.
- [2] Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing, eighteenth informational supplement, M100-S18[S]. Wayne, PA: CLSI, 2008.
- [3] 陈东科,孙长贵. 实用临床微生物学检验与图谱[M]. 北京:人民卫生出版社,2011:775-777.
- [4] 胡继红,张楠,高振详,等. 头孢哌酮-舒巴坦药敏纸片中舒巴坦量对药敏结果的影响[J]. 中华检验医学杂志,2010,33(3):231-235.
- [5] 金红,曹银光. 神经外科病房鲍曼不动杆菌耐药性分析[J]. 国际检验医学杂志,2010,31(10):1159-1160.
- [6] 田新村,吴文哲,张静,等. 老年人下呼吸道感染常见病原菌与 G⁻ 杆菌耐药性分析[J]. 国际检验医学杂志,2011,32(6):696-697.
- [7] 刘强,张蕾蕾,张红梅,等. 鲍氏不动杆菌产 AmpC 酶的检测与耐药性分析[J]. 中华医院感染学杂志,2010,20(23):3776-3777.

(收稿日期:2011-10-09)

(上接第 323)

CD59 者可有严重的溶血^[7,10]。本研究修饰前后红细胞 CD59 的差异显著,修饰后 CD59 的表达严重下降,其表达率几乎为零,修饰后红细胞 CD59 的缺失可能提高红细胞对补体的敏感性并进一步影响红细胞的保存性能。

应用 mPEG-SPA 修饰红细胞有效地解决了不规则抗体和自身抗体所致的配血困难,但修饰后红细胞的保存性能下降,这表明修饰过程中的反复洗涤可能造成红细胞的损伤并可能进一步导致修饰红细胞的保存性能下降,红细胞 CD59 的降低也可能是 mPEG-SPA 对 CD59 的修饰、遮蔽作用所致。如何提高修饰后红细胞的保存性能并保证输入体内红细胞的存活率,有待进一步研究。

参考文献

- [1] 李璐,顾光煜. 聚乙二醇及其衍生物在检验医学中的应用[J]. 临床检验杂志,2008,26(6):469-471.
- [2] Scott MD, Murad KL, Koumpouras F, Talbot M, Eaton JW. Chemical camouflage of antigenic determinants; "Stealth" erythrocytes[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1997, 94(14):7566-7571.

- [3] 叶应妩,王毓三,申子瑜. 全国临床检验操作规程[M]. 3 版. 南京:东南大学出版社,2006:168-171.
- [4] 李璐,李平,顾光煜,等. 甲氧基聚乙二醇修饰红细胞解决自身免疫性疾病所致配血困难研究[J]. 临床检验杂志,2009,27(2):94-96.
- [5] 鲍国强,俎爱忠. 红细胞衰亡信号通路研究进展[J]. 中国实验血液学杂志,2009,17(4):1097-1100.
- [6] 周柏发,吴炜书. 镰状细胞性贫血患者的输血[J]. 北京医学,2010,32(10):841-842.
- [7] 张之南,李蓉. 红细胞疾病基础与临床[M]. 北京:科学技术出版社,2000:16-22,47-50,143-174.
- [8] Solá E, Vayá A, Martínez M, et al. Erythrocyte membrane phosphatidylserine exposure in obesity[J]. Obesity, 2009, 17(2):318-322.
- [9] 和迎春,宋建新,张群智. CD55、CD59 在特发性血小板减少性紫癜发病中的研究[J]. 国际检验医学杂志,2010,31(3):238-239.
- [10] 袁育康. 医学免疫学[M]. 北京:科学出版社,2010:281-283.

(收稿日期:2011-10-09)