

mPEG修饰淋巴细胞HLA-A₂抗原的研究

淋巴细胞表面表达有丰富的HLA抗原, 在免疫应答中起着重要作用[1]。HLA- I 类抗原属移植抗原, 影响造血干细胞的存活[2]。采用甲氧基-聚乙二醇(mPEG)对淋巴细胞表面的HLA- I 类抗原进行化学修饰可以阻断其与相应HLA- I 类抗体的反应, 有助于干细胞的移植成功。

1 材料与方法

1.1 试剂

相对分子质量为5 000的甲氧基-聚乙二醇-苯丙三唑碳酸盐(mPEG-BTC)、甲氧基-聚乙二醇-丙酸-琥珀酰亚胺(mPEG-SPA)、甲氧基-聚乙二醇-马来酰亚胺(mPEG-MAL), 购于美国Shearwater公司。

1.2 血清

HLA-A₂单价抗血清(由北京红十字血液中心HLA实验室提供)经标准细胞鉴定。

1.3 方法

1.3.1 HLA-A₂淋巴细胞悬液的制备 随机选取104例无偿献血者, 筛选出HLA-A₂阳性供者53例。采其静脉血10ml, 用淋巴细胞分离液(TBD生物技术公司提供)提取淋巴细胞。用HEPES/RPMI 1640(含1%的人白蛋白)洗涤3次, 调细胞浓度至 2×10^5 /ml左右, 备用。

1.3.2 HLA-A₂抗原的化学修饰工艺 分别使用mPEG-BTC、mPEG-SPA、mPEG-MAL并分别在不同pH的PBS中(pH=7.4、8.0、9.0)、不同温度(T=4 °C、22 °C、25 °C、30 °C、37 °C)条件下用终浓度为12 mmol/L的mPEG对淋巴细胞表面HLA-A₂抗原进行修饰。修饰后的淋巴细胞用HEPES/RPMI 1640(含1%的人白蛋白)洗2次, 调细胞浓度到 2×10^5 /ml左右, 备用。

1.3.3 微量混合淋巴细胞毒试验 使用HLA-A₂单价抗血清对经mPEG处理后的HLA-A₂抗原阳性淋巴细胞进行微量混合淋巴细胞毒试验, 同时设阴性、阳性对照。在倒置相差显微镜下观察结果。采用积分制观察mPEG对抗原抗体反应的阻断能力[3]。得0~2分为完全阻断, 得4分为部分阻断, 得6~8分为无阻断。

1.3.4 SDS-PAGE电泳 对处理前后的淋巴细胞进行SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳[4], 观察不同mPEG对淋巴细胞的修饰能力[5]。

1.4 统计学处理

采用 χ^2 检验对数据进行分析。

2 结果

2.1 不同mPEG对淋巴细胞的化学修饰

在pH=8.0、T=22 °C条件下, 不同mPEG对淋巴细胞的化学修饰能力不同。mPEG-BTC的化学修饰能力最强, 可以完全阻断HLA-A₂抗原与HLA-A₂单价抗血清的特异性结合(P<0.001); 其次为mPEG-SPA, 基本可以阻断HLA-A₂抗原与HLA-A₂单价抗血清的结合(P<0.001); mPEG-MAL对HLA-A₂抗原与HLA-A₂单价抗血清无阻断作用(P>0.05)。结果见表1。

表 1 不同 mPEG 修饰淋巴细胞后对 HLA-A₂ 抗原和 HLA-A₂

抗体反应的阻断效果(n=53)

Tab.1 Block effect on the specific binding of HLA-A₂ antigen modified with different mPEGs to HLA-A₂ antibody(n=53)

EB	NC	PC	mPEG-BTC	mPEG-SPA	mPEG-MAL
Block	53	0	53	43	0
Block partly	0	0	0	10	2
No block	0	53	0	0	51

mPEG: Methoxypolyethylene glycol; EB: Block effect; NC: Negative control; PC: Positive control

2.2 不同pH对mPEG化学修饰的影响

T=22 °C时, 不同pH(pH=7.4、8.0、9.0)对mPEG-BTC修饰淋巴细胞的能力无影响, mPEG-BTC可阻断抗原与抗体的特异性结合(P<0.001)。mPEG-MAL在这三种不同pH条件下没有阻断抗原与抗体结合的能力(P<0.001)。pH的变化对mPEG-SPA影响较大, 在pH=7.4时, mPEG-SPA失去对HLA-A₂抗原的修饰能力, 但在pH=8.0、9.0时对HLA-A₂抗原的修饰能力无影响(P<0.001)。结果见表2。

表 2 不同 pH 条件下经不同 mPEG 修饰的淋巴细胞对 HLA-A₂ 抗原和 HLA-A₂ 抗体反应的阻断效果(n=53)**Tab.2 Block effect on the binding of HLA-A₂ antigen to the antibody in PBS with different pH values (n=53)**

EB	NC	PC	pH=7.4			pH=8.0			pH=9.0		
			BTC	SPA	MAL	BTC	SPA	MAL	BTC	SPA	MAL
Block	53	0	53	0	0	53	42	0	53	46	0
Block partly	0	0	0	0	0	0	11	2	0	6	2
No block	0	53	0	53	53	0	0	51	0	1	51

BTC: mPEG-BTC(benzotriazole carbonate); SPA: mPEG-SPA(N-hydroxysuccinimidyl ester); MAL: mPEG-MAL(maleimide)

2.3 不同温度对mPEG化学修饰的影响

pH=8.0时, 温度从4 °C至25 °C对mPEG的化学修饰能力基本无影响(P>0.05)。当温度升到30 °C时, 会降低mPEG对淋巴细胞的修饰能力。当温度升到37 °C时mPEG基本失去了对淋巴细胞表面HLA-A₂抗原的修饰能力(P<0.001)。结果见表3。

表 3 不同温度条件下经不同 mPEG 修饰的淋巴细胞对 HLA-A₂ 抗原和 HLA-A₂ 抗体反应的阻断效果(n=53)**Tab.3 Block effect on the binding of HLA-A₂ antigen modified with different mPEGs to HLA-A₂ antibody under different temperatures(n=53)**

EB	NC	PC	T=4 °C			T=22 °C			T=25 °C			T=30 °C			T=37 °C		
			BTC	SPA	MAL	BTC	SPA	MAL	BTC	SPA	MAL	BTC	SPA	MAL	BTC	SPA	MAL
Block	53	0	53	0	0	53	43	0	53	46	0	14	0	0	0	0	0
Block partly	0	0	0	0	0	0	10	2	0	6	2	21	6	0	11	0	0
No block	0	53	0	53	53	0	0	51	0	1	51	18	47	53	42	53	53

BTC: mPEG-BTC; SPA: mPEG-SPA; MAL: mPEG-MAL

2.4 不同浓度对mPEG化学修饰的影响

12 mmol/L (60 mg/ml)的mPEG-BTC或mPEG-SPA可以阻断淋巴细胞表面HLA-A₂抗原与其抗体的反应, 低于此浓度则无阻断效果。mPEG-MAL在此浓度下无阻断能力。

2.5 最佳修饰条件

综合以上多种影响因素, 采用正交试验选择最佳修饰条件。室温下, 在pH 7.4的PBS介质中使用12 mmol/L的mPEG-BTC对淋巴细胞表面HLA-A₂抗原化学修饰效果最好。

2.5 SDS-PAGE结果

三种不同的mPEG对淋巴细胞均有较强的修饰能力，见图1。

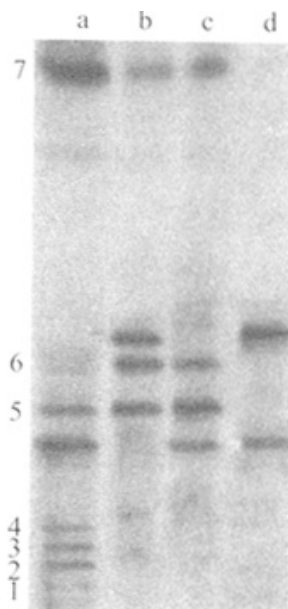


图 1 SDS-PAGE 结果

Fig.1 Result of SDS-PAGE

Lane a: HLA-A₂ on lymphocytes modified by mPEG-MAL;
Lane b: HLA-A₂ on lymphocytes modified by mPEG-SPA;
Lane c: HLA-A₂ on lymphocytes modified by mPEG-BTC;
Lane d: Control (lymphocytes); Bands 1-7 were generated by
the modification of the lymphocytes with different mPEGs

图1 SDS-PAGE结果

Fig.1 Result of SDS-PAGE

Lane a: HLA-A₂ on lymphocytes modified by mPEG-MAL;
Lane b: HLA-A₂ on lymphocytes modified by mPEG-SPA;
Lane c: HLA-A₂ on lymphocytes modified by mPEG-BTC;
Lane d: Control (lymphocytes); Bands 1-7 were generated by the modification of the lymphocytes with different mPEGs

3 讨论

PEG及其衍生物是高分子化学材料，有许多优良的化学特性。无免疫原性，毒性低[6]，并且可以将许多优良性质赋予修饰后的生物分子。FDA已批准PEG作为化学辅料用于人体。mPEG已成功地用于修饰红细胞，阻断ABO抗原与ABO抗血清的特异性结合[7][8][9]。mPEG修饰T淋巴细胞也取得一定效果，可以不同程度地降低CD分子的表达[10][11][12][13]。但尚未见阻断HLA抗原与其相应抗体间特异性免疫反应的报道。本研究选择HLA-A₂抗原作为观察指标(HLA-A₂抗原是A座位最常见的抗原，在汉族人中的基因频率为0.30[14])，发现采用适当的修饰工艺可以完全阻断淋巴细胞的免疫应答。

从以上数据可以看出：室温条件下，mPEG-BTC在pH 7.4~9.0范围内对淋巴细胞表面HLA-A₂抗原均有理想的修饰效果，而mPEG-SPA在pH 7.4的环境下无修饰淋巴细胞表面HLA-A₂抗原的能力，但在pH8.0~9.0范围内mPEG-SPA可以对淋巴细胞表面HLA-A₂抗原进行充分修饰。mPEG-MAL无论在那种条件下，均不具有对淋巴细胞表面HLA-A₂抗原修饰的能力。对淋巴细胞进行化学修饰的体外环境应尽量接近人体正常的内环境，故选择pH7.4作为对淋巴细胞进行体外修饰的条件。

从图1中可以看出，三种mPEG对淋巴细胞均有较强的化学修饰能力。mPEG对蛋白质的化学修饰能力可以通过SDS-PAGE电泳条带来判断，电泳条带越多颜色越深则表明mPEG的化学修饰能力越强[4][15]。mPEG-BTC与mPEG-SPA的电泳条带结构相同，均比对照组多出同样的3条带(带5, 6, 7)，说明两者有较为相似的化学修饰能力，这与表1、2、3中的结果相吻合。从电泳结果看，mPEG-MAL对淋巴细胞的化学修饰能力最强，比对照组多出6条带(带1, 2, 3, 4, 5, 7)可是却无法阻断HLA-A₂抗原与HLA-A₂抗体间的特异性免疫反应。这一结果的出现是由于不同mPEG与蛋白质上的不同氨基酸结合而引起的。mPEG-BTC可高效修饰多肽和蛋白质上的不同氨基酸，形成稳定的胺酯键；mPEG-SPA修饰的氨基酸是多肽链上的赖氨酸，并能与之形成稳定的氨基化合物；mPEG-

MAL则与前两者不同,它具有高度特异性,只与含硫氨基酸即只与HS-R反应,它的结合部位是半胱氨酸。由此可以看出,针对不同氨基酸的修饰效果要比修饰某一个具体氨基酸的效果好。

(责任编辑:吴锦雅)

参考文献:

- [1] Kupfer A, Singer SJ. Cell biology of cytotoxic and helper T-cell functions[J]. Annu Rev Immunol, 1993, 7: 309.
- [2] Ringden O, Lobbopin M, Bacigalupo A, et al. Transplantation of peripheral blood stem cells as compared with bone marrow from HLA-I identical siblings in adult patients with acute myeloid leukemia and acute lymphoblastic leukemia[J]. J Clin Oncol, 2002, 20(24): 4655-64.
- [3] 赵桐茂. HLA分析原理和应用[M]. 上海科学技术出版社, 1984. 279- 80.
- [4] F·奥斯伯, RE·金斯顿, JG·塞德曼, 等. 颜子颖译. 精编分子生物学实验指南[M]. 北京: 科学出版社, 1998. 334-8.
- [5] 姜忠义, 许松伟, 高蓉. 生物分子化学修饰用聚乙二醇衍生物的合成及应用[J]. 高分子通报, 2002, 12(1): 34-40. Jiang ZY, Xu SW, Gao R. Synthesis and application of polyethylene glycol derivatives for the chemical modification of biomolecules[J]. Polymer Bull, 2002, 12(1): 34-40.
- [6] 章扬培, 杨军, 季守平, 等. 血型转变[J]. 现代科学仪器, 2000, 10(1): 8-11. Zhang YP, Yang J, Ji SP, et al. Blood conversion[J]. Mod Sci Instr, 2000, 10(1): 8-11.
- [7] Murad KL, Mahany KL, Brugnara C, et al. Structural and functional consequences of antigenic modulation of red blood cell with methoxypoly(ethylene glycol)[J]. Blood, 1999, 93(6): 2121-7.
- [8] Sabolovic D, Sestier C, Perrotin P, et al. Covalent binding of polyethylene glycol to the surface of red blood cells as detected and followed up by cell electrophoresis and rheological methods[J]. Electrophoresis, 2000, 21(2): 301-6.
- [9] Leach JK, Hinman A, O'Rear EA. Investigation of deformability, viscosity, and aggregation of mPEG-modified erythrocytes[J]. Biomed Sci Instrum, 2002, 38(3): 333-8.
- [10] Murad KL, Gosselin EJ, Eaton JW, et al. Stealth cells: prevention of major histocompatibility complex class II-mediated T-cell activation by cell surface modification[J]. Blood 1999, 94(6): 2135-41.
- [11] Scott MD, Murad KL. Cellular camouflage: fooling the immune system with polymers[J]. Curr Pharm Des, 1998, 4(6): 423-38.
- [12] Oshima M, Atassi MZ. T cells of mice treated with mPEG-myasthenogenic peptide conjugate are involved in protection against EAMG by stimulating lower pathogenic antibody responses[J]. Autoimmunity, 2000, 32(1): 45-5.
- [13] Murad KL. Camouflaging endothelial cells: does it prolong graft survival[J]? Biochem Biophys Acta 1999, 1428: 177-90.
- [14] 赵桐茂. 人类血型遗传学[M]. 北京: 科学出版社, 1987. 139.
- [15] Scott MD, Murad KL, Koumpouras F, et al. Chemical camouflage of antigenic determinants: stealth erythrocytes[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1997, 94(14): 7566-71.

参考文献:

- [1] Kupfer A, Singer SJ. Cell biology of cytotoxic and helper T-cell functions[J]. Annu Rev Immunol, 1993, 7: 309.
- [2] Ringden O, Lobbopin M, Bacigalupo A, et al. Transplantation of peripheral blood stem cells as compared with bone marrow from HLA-I identical siblings in adult patients with acute myeloid leukemia and acute lymphoblastic leukemia[J]. J Clin Oncol, 2002, 20(24): 4655-64.
- [3] 赵桐茂. HLA分析原理和应用[M]. 上海科学技术出版社, 1984. 279- 80.
- [4] F·奥斯伯, RE·金斯顿, JG·塞德曼, 等. 颜子颖译. 精编分子生物学实验指南[M]. 北京: 科学出版社, 1998. 334-8.
- [5] 姜忠义, 许松伟, 高蓉. 生物分子化学修饰用聚乙二醇衍生物的合成及应用[J]. 高分子通报, 2002, 12(1): 34-40. Jiang ZY, Xu SW, Gao R. Synthesis and application of polyethylene glycol derivatives for the chemical modification of biomolecules[J]. Polymer Bull, 2002, 12(1): 34-40.
- [6] 章扬培, 杨军, 季守平, 等. 血型转变[J]. 现代科学仪器, 2000, 10(1): 8-11. Zhang YP, Yang J, Ji SP, et al. Blood conversion[J]. Mod Sci Instr, 2000, 10(1): 8-11.
- [7] Murad KL, Mahany KL, Brugnara C, et al. Structural and functional consequences of antigenic modulation of red blood cell with methoxypoly(ethylene glycol)[J]. Blood, 1999, 93(6): 2121-7.

- [8] Sabolovic D, Sestier C, Perrotin P, et al. Covalent binding of polyethylene glycol to the surface of red blood cells as detected and followed up by cell electrophoresis and rheological methods[J]. *Electrophoresis*, 2000, 21(2): 301-6.
- [9] Leach JK, Hinman A, O'Rear EA. Investigation of deformability, viscosity, and aggregation of mPEG-modified erythrocytes[J]. *Biomed Sci Instrum*, 2002, 38(3): 333-8.
- [10] Murad KL, Gosselin EJ, Eaton JW, et al. Stealth cells: prevention of major histocompatibility complex class II-mediated T-cell activation by cell surface modification[J]. *Blood* 1999, 94(6): 2135-41.
- [11] Scott MD, Murad KL. Cellular camouflage: fooling the immune system with polymers[J]. *Curr Pharm Des*, 1998, 4(6): 423-38.
- [12] Oshima M, Atassi MZ. T cells of mice treated with mPEG-myasthenogenic peptide conjugate are involved in protection against EAMG by stimulating lower pathogenic antibody responses[J]. *Autoimmunity*, 2000, 32(1): 45-5.
- [13] Murad KL. Camouflaging endothelial cells: does it prolong graft survival[J]? *Biochem Biophys Acta* 1999, 1428: 177-90.
- [14] 赵桐贺. 人类血型遗传学[M]. 北京: 科学出版社, 1987. 139.
- [15] Scott MD, Murad KL, Koumpouras F, et al. Chemical camouflage of antigenic determinants: stealth erythrocytes[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, 94(14): 7566-71.

[回结果列表](#)