

mPEG修饰淋巴细胞 HLA-A₂ 抗原的研究

张印则¹袁伟²袁周华友¹袁小燕²袁兰炯采¹袁扬培³袁张志新² 第一军医大学南方医院输血科袁广东 广州 510515 北京红十字血液中心袁北京 100088 军事医学科学院野战输血研究所袁北京 100850 宛

摘要目的 用甲氧基-聚乙二醇mPEG修饰淋巴细胞表面 HLA-A₂ 抗原阻断它与相应抗体的特异性结合方法 在不同温度不同 pH 的磷酸缓冲液 PBS 中分别使用终浓度为 12mmol/L 不同种类的 mPEG 对淋巴细胞表面 HLA-A₂ 抗原进行修饰结果 4 益及室温对淋巴细胞表面 HLA-A₂ 抗原修饰效果无明显影响 0 益及 37 益条件下不利于修饰 高浓度 mPEG 在碱性环境中对 HLA-A₂ 抗原的修饰效果较好且不同 mPEG 对修饰效果亦有影响 结论 室温下在 pH7.4 的 PBS 介质中 mPEG-BTC 对淋巴细胞表面 HLA-A₂ 抗原的修饰效果最好其次为 mPEG-丙酸-琥珀酰亚胺 mPEG-马来酰亚胺无修饰能力

关键词淋巴细胞 甲氧基-聚乙二醇 化学修饰 HLA-A₂ 抗原

中图分类号 R392.11 文献标识码 B 文章编号 000-2588(2003)06-0557-04

Methoxypolyethylene glycol-modified HLA-A₂ antigen on lymphocytes

ZHANGYin-ze¹, LIWei², ZHOUHua-you¹, SHANXiao-yan², LANJiong-cai¹, ZHANGYang-pei³, ZHANGZi-xin²

¹Department of Blood Transfusion, First Military Medical University, Guangzhou 510515, China; ² Beijing Red-Cross Blood Center, Beijing 100088, China; ³ Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100850, China

Abstract: Objective To modify the HLA-A₂ antigen on the lymphocytes with methoxypolyethyleneglycol (mPEG) so as to block the specific binding site for antibody. Method Different types of mPEG (all with final concentration of 12mmol/L) were used at different temperatures in PBS with varied pH values for the modification of the HLA-A₂ antigen. Result The modification of the antigen was not obviously affected when it was carried out at 4益 or room temperature, but high temperatures of 30 and 37 益 significantly hampered the modification. Better antigen modification was observed with high-concentration mPEG in basic PBS, depending also on the type of mPEGs used for this purpose. Conclusion The specific HLA-A₂ binding on the lymphocytes is completely blocked by benzotriazolecarbonate-mPEG (mPEG-BTC), which is superior to N-hydroxysuccinimidylester of mPEG (mPEG-SPA). Maleimide-mPEG (mPEG-MAL) is incapable of blocking the HLA-A₂ ligand-binding site with antibody.

Key words: lymphocyte; methoxypolyethyleneglycol; camouflage; HLA-A₂ antigen

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 HLA-玉类抗原属移植抗原影响造血干细胞的存活 采用甲氧基-聚乙二醇 mPEG 对淋巴细胞表面的 HLA-玉类抗原进行化学修饰可以阻断其与相应 HLA-玉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 5000 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 均购于美国 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 BD 生物技术公司提供 提取淋巴细胞 用 HEPES/RPMI1640 含 1% 的人白蛋白 洗涤 3 次 调细胞浓度至 2伊0⁵/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 和 mPEG-SPA 和 mPEG-MAL 并分别在不同 pH 的 PBS 中 pH=7.4 和 8.0 和 9.0 不同温度 4 益 22 益 35 益 37 益 条件下用终浓度为 12mmol/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/RPMI1640 含 1% 的人白蛋白 洗 2 次 调细胞浓度到 2伊0⁵/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

收稿日期 003-02-19

基金项目 国家高技术研究发展计划 863 项目 001AA261161 宛

Supported by National "863" Program for High-tech Development 001AA261161 宛

作者简介 张印则 男 袁北张家口人 袁 000 年毕业于河北医科大学 袁在读博士 袁主管检验师 袁电话 00-61365698 袁 e-mail: zyz200157@sohu.com

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得分 0~2 分为完全阻断 4 分为部分阻断 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观察不同 mPEG 对淋巴细胞的修饰能力

1.4 统计学处理

采用 字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 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 mPEG-MAL 对 HLA-A₂ 抗原与 HLA-A₂ 单价抗血清无阻断作用结果见表 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

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
Blockpartly	0	0	0	10	2
Noblock	0	53	0	0	51

mPEG: Methoxypolyethyleneglycol;EB:Blockeffect;NC: Negativecontrol;PC:Positivecontrol

2.2 不同 pH 对 mPEG 化学修饰的影响

T=22 益时不同 pH 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 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 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 时对 HLA-A₂ 抗原的修饰能力无影响结果见表 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

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
Blockpartly	0	0	0	0	0	0	11	2	0	6	2
Noblock	0	53	0	53	53	0	0	51	0	1	51

BTC:mPEG-BTC(benzotriazolecarbonate);SPA:mPEG-SPA(N-hydroxysuccinimidylester);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 益至 25 益对 mPEG 的化学修饰能力基本无影响当温度升到 30 益时

会降低 mPEG 对淋巴细胞的修饰能力当温度升到 37 益时 mPEG 基本失去了对淋巴细胞表面 HLA-A₂ 抗原的修饰能力结果见表 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

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 益			T=22 益			T=25 益			T=30 益			T=37 益		
			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
Blockpartly	0	0	0	0	0	0	10	2	0	6	2	21	6	0	11	0	0
Noblock	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 0 mg/ml 的 mPEG-BTC 或 mPEG-SPA 可以阻断淋巴细胞表面 HAL-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 pH7.4 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(图 1)

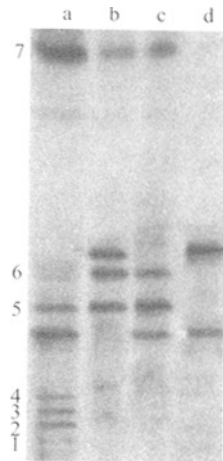


图 1 SDS-PAGE 结果

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

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,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 已成功用于修饰红细胞,阻断 ABO 抗原与 ABO 抗血清的特异性结合。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,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。我们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 pH7.4~9.0 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 pH7.4 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,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。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,这说明两者有较为相似的化学修饰能力。这与表 1 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,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。

参考文献

1. Kupfer A, Singer SJ. Cell biology of cytotoxic and helper T-cell functions. *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. *Clin Oncol*, 2002, 20(24): 4655-64.
3. 赵桐茂. HLA 分析原理和应用. 上海科学技术出版社, 1984. 279-80.
4. 瑞斯伯, RE 金森顿, J 塞德曼, 等. 颜子颖译. 精编分子生物学实验指南. 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. *高分子通报*, 2002, 12(1): 34-40.
6. Jiang ZY, Xu SW, Gao R. Synthesis and application of polyethylene glycol derivatives for the chemical modification of biomolecules. *Polymer Bull*, 2002, 12(1): 34-40.
7. 章扬培, 杨军, 季守平, 等. 血型转变. *现代科学仪器*, 2000, 10(1): 8-11.
8. Zhang YP, Yang J, Ji SP, et al. Blood conversion. *Mod Sci Instr*, 2000, 10(1): 8-11.
9. Murad KL, Mahany KL, Brugnara C, et al. Structural and functional consequences of antigenic modulation of red blood cell with methoxypoly(ethyleneglycol). *Blood*, 1999, 93(6): 2121-7.
10. 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. *Electrophoresis*, 2000, 21(2): 301-6.
11. Leach JK, Hinman A, O'Rear EA. Investigation of deformability, viscosity, and aggregation of mPEG-modified erythrocytes. *Biomed Sci Instrum*, 2002, 38(3): 333-8.

咱0暂MuradKL,GosselinEJ,EatonJW, et al.Stealthcells:preventionof majorhistocompatibilitycomplexclassII-mediatedT-cellactivation bycellsurfacemodification咱暂Blood1999,94(6):2135-41.

咱1暂ScottMD, Murad KL. Cellular camouflage: foolingtheimmune systemwithpolymers咱暂CurrPharmDes,1998,4(6):423-38.

咱2暂OshimaM,AtassiMZ.TcellsofmicetreatedwithmPEG-myasthenogenicpeptideconjugateareinvolvedinprotectionagainstEAMG bystimulatinglowerpathogenicantibodyresponses咱暂Autoimmu-

nity,2000,32(1):45-5.

咱3暂MuradKL.Camoufalgingendothelialcells:doseitprolonggraftsurvival咱暂BiochemBiophysActa1999,1428:177-90.

咱4暂赵桐贺.人类血型遗传学咱暂北京:科学出版社1987.139.

咱5暂ScottMD,MuradKL,KoumpourasF, et al.Chemicalcamouflageof antigenicdeterminants:stealtherythrocytes咱暂 ProcNatlAcadSci USA,1997,94(14):7566-71.

瀑任编辑 隰锦雅 冤

表面麻醉下月形隧道刀行小梁切除术治疗青光眼渊1 例报道冤

王克华 袁春华 袁光洁 瀑解放军第 106 医院眼科袁山东 济南 250022 冤

摘要 目的 探讨改良青光眼小梁切除术遥方法 应用表面麻醉联合月形隧道刀制作巩膜瓣袁对 41 例 48 眼青光眼患者施行小梁切除术遥 结果 麻醉成功率 100%遥每眼术程平均 17min袁较既往常规手术缩短 37%遥术后眼压控制均获满意效果袁术中袁术后并发症遥 结论 表面麻醉下应用月形隧道刀可以安全袁快速袁有效地完成小梁切除术

关键词 青光眼 小梁切除术 隧道刀 表面麻醉

中图分类号 瀑775;R614.1 文献标识码 隰 文章编号 院000-2588(2003)06-0560-02

Trabeculectomy with crescent tunnel knife under surface anesthesia for glaucoma: report of 41 cases

WANGKe-hua,ZHANGChun-hua,WANGGuang-jie

Department of Ophthalmology, 106 Hospital of PLA, Jinan 250022, China

Abstract: This study aims to modify the surgical procedure of conventional trabeculectomy for glaucoma by incorporating scleral flap preparation with crescent tunnel knife under surface anesthesia. A total of 41 patients (48 eyes) received this modified surgical procedure, with the anesthesia being successfully implemented in all the cases. The time consumption by the operation on each eye averaged 17 min, shortened by 37% compared with the conventional procedure. The postoperative intraocular pressure was well under control without any complications arising either during or after the operation, showing the safety, rapidness and efficacy of this surgical approach in the treatment of glaucoma.

Key words: glaucoma; trabeculectomy; tunnel knife; surface anesthesia

小梁切除术是目前临床上治疗青光眼的首选术式袁但传统手术步骤繁杂袁术程较长袁球周麻醉具有一定的并发症咱暂咱我们借鉴表面麻醉下作小切口白内障手术的经验咱暂咱自 2000 年以来对 41 例 48 眼青光眼应用表面麻醉下月形隧道刀制作巩膜瓣施行小梁切除术袁效果满意袁现报告如下遥

1 临床资料

1.1 一般资料

本组共 41 例 48 眼袁年龄 21~69 岁袁平均 49.23 岁 术前眼压 25.81~63.96mmHg 袁平均 38.26mmHg 术前视力 0~1.2 曰病例构成见表 1 遥

表 1 青光眼病例诊断构成

Tab.1 General data of the glaucoma cases enrolled in this study

Case classification	Number of cases	Eyes	Gender	
			Male	Female
Primary glaucoma				
Acute glaucoma	20	20	8	12
Chronic angle glaucoma	9	10	3	6
Open-angle glaucoma	8	11	4	3
Congenital glaucoma				
Juvenile glaucoma	3	5	3	0
Secondary glaucoma				
Corticosteroid glaucoma	1	2	1	0

1.2 药品及器械

表面麻醉采用日本参天制药株式会社生产的 0.4% 倍诺喜滴眼液 瀑酸奥布卡因滴眼液冤 YZ7A 眼压计为苏州医疗器械总厂生产 手术刀为爱尔康 瀑国 隰科产品有限公司生产的月形刀 瀑.3mm 冤和角

收稿日期 院003-03-14

作者简介 隰克华 瀑962- 隰男 隰苏海安人 袁994 年第二军医大学硕士研究生课程班结业 袁主治医师 袁电话 隰531-2176845 袁-mail: wkh.kk@163.com