

• 基础实验研究 •

CD55 和 CD59 对聚乙二醇衍生物修饰红细胞保存性能的影响*

张 家¹, 李 璐², 陈军浩¹, 顾光煜¹, 戴宇东³, 张 葵¹(1. 南京大学医学院附属鼓楼医院检验科 210008; 2. 江苏省连云港市第一人民医院输血科 222002;
3. 南京市红十字血液中心 210003)

摘要:目的 观察经甲氧基聚乙二醇-琥珀酰亚胺丙酸酯(mPEG-SPA)修饰后红细胞(RBC)CD55 和 CD59 的表达情况, 评估其对修饰后红细胞保存性能的影响。方法 以 mPEG-SPA 体外修饰健康者 RBC; 观察修饰前后 RBC 的变形性、渗透脆性、自身溶血率、CD55 和 CD59, 判断修饰后对 RBC 保存性能的影响。结果 mPEG-SPA 修饰后红细胞的变形性、渗透脆性和自身溶血率虽属正常范围, 但 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 CD55 表达基本不变, CD59 的表达严重下降, 其表达率接近于零。结论 mPEG-SPA 修饰后红细胞 CD59 的表达严重降低, 可能影响红细胞的保存性能, 甚至影响修饰后红细胞输血后的体内存活率。

关键词: 聚乙二醇类; 红细胞; 化学修饰; CD55; CD59

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2011.18.015

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2011)18-2077-02

Influence of CD55 and CD59 on the preservation of RBC modified by mPEG-SPA*Zhang Jia¹, Li Lu², Chen Junhao¹, Gu Guangyu¹, Dai Yudong³, Zhang Kui¹

(1. Clinical Laboratory, The Drum Tower Hospital of Nanjing University Medical School, Nanjing 210008, China;

2. Department of Blood Transfusion, Lianyungang First People's Hospital, Lianyungang, Jiangsu 222002, China;

3. Nanjing Red Cross Blood Center, Nanjing 210003, China)

Abstract: Objective To observe the effect of grafted methoxy polyethylene glycol(mPEG)-succinimid propionate(mPEG-SPA) on shielding the antigens of CD55 and CD59 on red blood cell(RBC), and to evaluate the influence of the two antigens' expression on the preservation of RBC, modified by mPEG-SPA. **Methods** RBC from healthy persons were modified by mPEG-SPA, and the deformability, osmotic fragility, autohemolysis, rate and the expression of CD55 and CD59 were detected and compared before and after modification to evaluate the influence of modification on the preservation of RBC. **Results** Compared with the detected results before modification, the deformability of RBC decreased, while the osmotic fragility and autohemolysis rate increased, but were still in the normal range. The positive rate of CD55 expression had little significant change after modification, but CD59 expression sharply decreased and almost disappeared. **Conclusion** The CD59 expression on RBC could be seriously decreased by modification with mPEG-SPA, which might exert an influence on the preservation of RBC, even on its survival in vivo.

Key words: polyethylene glycols; erythrocytes; chemical modification; CD55; CD59

聚乙二醇(polyethylene glycol, PEG)衍生物修饰的红细胞不仅具有正常红细胞的结构与功能, 而且可以遮蔽多种血型抗原, 减少受血者体内相应抗体对 A、B 特别是非 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的配血困难^[1]。近年来, 利用修饰技术的动物血人源化改造也取得了一定的进展, 但是由于修饰过程的机械损伤以及修饰本身可能造成的影响, 修饰后红细胞的保存性能有所降低。本组采用甲氧基聚乙二醇(mPEG)衍生物——mPEG-琥珀酰亚胺丙酸酯(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、变形性以及红细胞表面 C3 转化酶衰变加速因子(C3 convertase decaying accelerating factor, DAF, CD55)和膜攻击复合物抑制因子或称膜反应溶解抑制物(membrane inhibitor reactive lysis, MIRL, CD59), 进行修饰后红细胞的保存效果研究。

1 资料与方法**1.1 仪器与试剂** 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。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); 荧光素异硫氰酸酯(FITC)标记 CD55 单抗和藻红蛋白(PE)标记 CD59 单抗, 均为美国 BD 公司产品。

1.2 方法

1.2.1 mPEG-SPA(20×10^3)修饰红细胞 选取 15 例健康献血者 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 10 分钟混匀 1 次, 反应结束后 200 g 离心 5 min, 生理盐水洗涤 3 次。对照组: 用 2.0 mmol/L mPEG(5×10^3)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检测 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

* 基金项目: 南京市医学重点科技发展项目(ZKX07014)。

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。测定管溶血率 = [测定管 A × (1 - 红细胞压积)] / 溶血对照管 A × 4, 按《全国临床检验操作规程》进行红细胞渗透脆性试验^[2]。

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, 用 LBY-BX 红细胞变形仪激光衍射法切变率 (SHR) = 800, 测定红细胞变形性。

1.2.4 红细胞表面 CD55 和 CD59 的检测 以 mPEG (5 × 10³, 2.0 mM) 孵育红细胞为对照, 测定 mPEG-SPA (2.0 mmol/L, 20 × 10³) 修饰的 15 例健康者血液 CD55 和 CD59。将血液稀释 200 倍。对照组用 20 μL 稀释的 mPEG 孵育全血加 10 μL CD55-FITC 和 10 μL CD59-PE 单抗; 实验组用 20 μL 稀释的 mPEG-SPA 修饰后全血, 加 10 μL CD55-FITC 和 10 μL CD59-PE 单抗。混匀, 室温 25 °C 避光孵育 15 min 后加 PBS 1 mL, BD FACSCanto 流式细胞仪检测红细胞 CD55 和 CD59。每份样品收集 100 × 10³ 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 d)、修饰后 1 d 和修饰后 3 d 的 CD55 和 CD59 表达情况。

1.3 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, 以 *P* < 0.05 为差异有统计学意义, 使用 SPSS 和 EXCEL 软件作结果分析。

2 结 果

2.1 修饰后的自身溶血率增加、变形能力略有降低, 红细胞渗透脆性也略有增加, 但仍属正常范围。见表 1。

表 1 mPEG-SPA 修饰后红细胞自身溶血率、变形性和渗透脆性结果 (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 (SHR = 800, %)	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 ~ 3.2)

2.2 红细胞修饰后当天 (0 d) 到修饰后 3 d 的 CD55 和 CD59 抗原的表达情况, 结果显示修饰前后 CD55 差异不显著, 但修饰后 CD59 表达率严重下降, 其表达率几乎为零。见表 2 和表 3。

表 2 mPEG-SPA 修饰后当天至第 3 天红细胞表面 CD55 抗原表达情况 (n = 15, %)

项目	0 d	1 d	3 d
修饰前	99.94 ± 0.08	99.88 ± 0.08	99.89 ± 0.09
修饰后	99.99 ± 0.03	99.91 ± 0.14	99.73 ± 0.58

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, %)

项目	0 d	1 d	3 d
修饰前	99.89 ± 0.07	99.44 ± 0.43	99.61 ± 0.40
修饰后	1.25 ± 1.32	1.01 ± 0.55	2.04 ± 1.42

3 讨 论

Scott 等^[3] 1997 年首先报道了用氰脲酰氯活化的 mPEG 修饰红细胞, 修饰后红细胞血型抗原与相应抗体的反应减弱, 即抗原性减弱, 而红细胞的形态、结构及功能未发生明显变化。国内这方面的研究也取得了一定的进展^[4]。

红细胞的变形性与红细胞的寿命密切相关, 红细胞具有的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。红细胞的变形性是机体清除异常红细胞的一个重要手段。红细胞保存期越长, 变形性降低越明显, 表明变形性下降是老化红细胞破坏的一个重要因素。修饰后红细胞的变形性能略有降低, 可能影响红细胞的保存能力。修饰后红细胞的自身溶血率和渗透脆性虽属正常范围, 但自身溶血率和渗透脆性均有所增加, 这表明修饰可能对红细胞的保存性能有一定的影响, 修饰过程中的反复洗涤也可能造成红细胞的损伤并可能导致修饰红细胞的保存性能下降。

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, 对红细胞而言即造成溶血。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。CD55 可同 C2 竞争结合 C4b, 从而抑制 C3 转化酶的形成并促进其加速分解和衰变, CD55 可下调 C3 转化酶的活性, 阻止补体活化过程的继续和放大。红细胞表面 CD55 的表达明显降低或缺失可能造成溶血。CD59 可阻碍 C7、C8 与 C5b6 的结合, 从而抑制 C9 的聚合和膜攻击复合物 (MAC) 的形成, 最终抑制补体对膜的攻击, 使红细胞免受损伤。目前认为 CD55 和 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的作用, CD55 和 CD59 的缺失是溶血或溶血发作的重要原因。其中 CD59 的重要性可能比 CD55 更大, 因为用抗体抑制正常红细胞的 CD55 或先天缺乏 CD55 者, 并不改变红细胞对补体的敏感性, 也不引起溶血; 而用抗体抑制 CD59, 则增加细胞对补体的敏感性, 先天缺乏 CD59 者可有严重的溶血^[5-7]。CD55 和 CD59 在特发性血小板减少性紫癜的发病中起重要的作用^[8]。本研究修饰前后红细胞 CD55 基本不变而 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。

修饰后红细胞的自身溶血率、渗透脆性和变形性虽属正常范围但红细胞自身溶血率和渗透脆性有所增高, 红细胞变形性略有下降, 红细胞 CD59 的表达明显降低, 这可能是修饰过程中反复洗涤对红细胞的机械损伤所致, 红细胞 CD59 的降低也可能是 mPEG-SPA 对 CD59 的修饰、遮蔽作用所致, 这些因素都将影响红细胞的保存性能, 甚至影响修饰后红细胞输血后的体内存活率。

应用 mPEG-SPA 修饰后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有所下降, 如何提高修饰后红细胞的保存性能并保证输入体内的存活率, 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] 叶应妩, 王毓三, 申子瑜, 等. 全国临床检验操作 (下转第 2081 页)

表 4 人附红细胞体感染成年家兔血浆游离血红蛋白测定结果($\bar{x} \pm s$, mg/L)

组别	例数(n)	接种前	窗口期	高峰期	消失期
观察 1 组	30	34.10±2.45	61.33±10.41 ^{①*}	145.00±13.26 ^{②△}	36.51±5.40
观察 2 组	30	34.30±2.59	67.53±11.49 ^{①*}	174.00±12.70 ^{②△}	39.48±4.39 ^{①*}
观察 3 组	30	33.87±2.89	81.53±10.38 ^{①*}	224.00±16.30 ^{②△}	48.54±5.66 ^{①*}
阴性对照组	30	33.70±2.69	32.30±3.31	34.18±4.06	33.65±3.17
盐水对照组	30	33.90±2.70	33.43±2.42	35.24±3.63	32.71±3.06

①、②:与接种前比较, $P < 0.05$, $P < 0.01$; *、△与对照组比较, $P < 0.05$, $P < 0.01$ 。

3 讨 论

人附红细胞体在人群中感染虽然较高,但发病率较低。多数学者认为,人附红细胞体的毒力较低,致病力较弱,多呈潜伏状态,只有当机体处于应激状态下才可能发病^[6-8]。人附红细胞体感染机体后引起人附红细胞体病的发病机制,目前还不十分清楚,有学者认为人附红细胞体病的发病主要是自身免疫和吞噬细胞的作用所致^[9-10]。选用红细胞渗透脆性实验和血浆游离血红蛋白作为红细胞损伤指标,观察高原人附红细胞体感染高原适应 1 个月的成年家兔红细胞损伤状况,以探讨高原环境条件下人附红细胞体病的发病机制。

3.1 接种剂量与各期出现时间 本实验结果显示,在高原低氧、低气压、强幅射、低湿度的特殊自然环境条件下,高原人附红细胞体感染成年家兔后,相同的接种方式,不同的接种剂量窗口期出现时间为 4~6 d,高峰期出现时间为 15~16 d,消失期出现的时间为 27~29 d。接种量多者窗口期出现时间早,高峰期出现时间早,而消失期出现时间晚,接种量少者则与之相反。这一现象对人附红细胞体病病情的判断与评估具有重要的临床意义。

3.2 接种剂量与红细胞脆性 红细胞渗透脆性是红细胞损伤破坏的重要指标,以开始溶血和完全溶血表示。相同的接种方式,随着接种剂量加大,人附红细胞体感染成年家兔后,窗口期时红细胞渗透脆性实验开始溶血与完全溶血的值均有不同程度的增加,并随接种人附红细胞体感染剂量的增加而升高;高峰期各观察组红细胞渗透脆性实验开始溶血与完全溶血的值均增加;消失期随接种人附红细胞体感染剂量的增加开始溶血与完全溶血的值也有不同程度的增加。说明人附红细胞体感染机体、黏附红细胞后影响红细胞的变型性,红细胞脆性增加致红细胞损伤,破坏溶血。

3.3 接种剂量与血浆游离血红蛋白 血浆中游离血红蛋白系血管内溶血的血红蛋白超过触珠所能结合的量时出现,常因机体内红细胞破坏增加、增速、超过造血补偿能力范围所致。本实验结果显示,相同的接种方式,不同的接种剂量,人附红细胞

体感染成年家兔后,各观察组在窗口期和高峰期血浆中游离血红蛋白均明显增加,与接种前和对照组比较差异有统计学意义($P < 0.05$ 和 $P < 0.01$);消失期观察 1 组血浆中游离血红蛋白接近接种前水平($P > 0.05$),观察 2 组、观察 3 组血浆中游离血红蛋白仍高于接种前和对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。表明人附红细胞体虽已在体内消失,红细胞未能继续损伤破坏,红细胞脆性未能再增加,但血浆中游离血红蛋白仍在分解代谢,提示机体仍处于恢复期。

参考文献

- [1] 尚德秋. 附红细胞体病研究进展[J]. 中华流行病学杂志, 1994, 15(4): 234-236.
- [2] 尚德秋, 李兰玉, 栾景辉, 等. 附红细胞体感染人畜的流行病学调查[J]. 中华流行病学杂志, 1995, 16(3): 143-146.
- [3] 陶小润, 王显军, 孙桐, 等. 山东省附红细胞体的流行病学调查[J]. 中华流行病学杂志, 2001, 22(5): 359-361.
- [4] 石泉贵, 陈洪章, 卢永周, 等. 西藏附红细胞体感染人畜的流行病学调查[J]. 中华医药卫生杂志, 2004, 2(4): 7-9.
- [5] 石泉贵, 李素芝, 陈洪章, 等. 高原附红细胞体的临床特点[J]. 中华临床医学研究杂志, 2004, 10(89): 987-989.
- [6] 侯安祖. 猪病诊断与防治[M]. 北京: 中国农业出版社, 2000: 332-335.
- [7] 张伟清, 徐丽华. 猪犬人坠附红细胞体对小鼠的感染试验[J]. 中国兽医科技, 2003, 33(6): 50-53.
- [8] 李芬, 刘毅, 晏霞. 反刍兽源附红细胞体感染小鼠的研究[J]. 中国实验动物学报, 2004, 12(3): 166-168.
- [9] 华修国, 李宏全. 附红细胞体患者病理组织学血液学变化的研究[J]. 上海农学院学报, 1998, 16(2): 116-119.
- [10] 杨玉芝. 附红细胞体病研究进展[J]. 安徽医药, 1999, 20(4): 67-69.

(收稿日期: 2011-06-19)

(上接第 2078 页)

程[M]. 3 版. 南京: 东南大学出版社, 2006: 168-171.

- [3] Scott MD, Murad KL, Koumpouras F, et al. Chemical camouflage of antigenic determinants: "Stealth" erythrocytes[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1997, 94(14): 7566-7571.
- [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] 张之南, 李蓉生. 红细胞疾病基础与临床[M]. 北京: 科学技术出

版社, 2000: 16-22.

- [6] 欧阳红梅, 张芹, 甸自金, 等. CD55 和 CD59 在健康者红细胞及中性粒细胞上表达的研究[J]. 国际检验医学杂志, 2010, 31(2): 109-110.
- [7] 袁育康. 医学免疫学[M]. 北京: 科学技术出版社, 2010: 281-283.
- [8] 和迎春, 宋建新, 张群智. CD55 和 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.

(收稿日期: 2011-04-18)