Tween 遮蔽 RBC 表面抗原制备通用血型的初步研究

陈洪宇[1],韩 威[2],姜 恒[2],尹晓琳[1],李 辉[1],李玉麒[1],伍成淑[1] (1. 成都医学院检验医学院医学检验输血方向本科班,四川 成都 610500;2. 成都医学院检验医学院临床输血教研室,四川 成都 610500)

[摘 要] **目的** 探讨 Tween 对红细胞表面抗原(主要是 ABO 和 D 抗原)的遮蔽效果以及红细胞的稳定性。**方法** 采用不同浓度的 Tween 孵育不同血型红细胞,并对其孵育前后抗原效价进行比较,以及采用形态观察,渗透脆性、自身溶血率、氧饱和度(SO_2)、RBC 平均指数检测和上清液游离血红蛋白测定判断孵育后红细胞的基本功能变化,以证实其稳定情况。**结果** Tween-20 对 D 抗原的孵育效果较好且稳定,减弱程度保持在"+"以上,B 抗原遮蔽略差且并不稳定,A 抗原的遮蔽效果较弱,优势浓度在 0.004% 附近。Tween-80 对 D、B 遮蔽效果差异并不明显,在 0.74%、0.80% 附近遮蔽效果较好,保持在"+"以上。**结论** Tween-20, Tween-80 可以遮蔽 RBC 表面抗原,并使其减弱程度保持在"+"以上,RBC 形态及功能没有发生变化。

[关键词] 红细胞表面抗原;Tween-20;Tween-80;化学修饰;通用血型

[中图分类号] R331.141;R457.1 [文献标识码] A [文章编号] 1672-5042(2015)01-0060-03

Preliminary study on preparation of universal blood type through masking RBC's surface antigen with Tween

CHEN Hong-yu[1], HAN Wei[2], JIANG Heng[2], YIN Xiao-lin[1], LI Hui[1], LI Yu-qi[1], WU Cheng-shu[1] (1. Undergraduate Classes of Medical Transfusion Direction, Chengdu Medical College, Chengdu Sichuan 610500, China; 2. Teaching and Research Section of Blood Transfusion, Chengdu Medical College, Chengdu Sichuan 610500, China)

Abstract: Objective To explore the shielding effect that Tween has made on the erythrocyte's surface antigen (ABO and D antigen mainly) and the stability of the RBC. **Methods** Various types red blood cells' surface antigens were incubated with different concentrations of Tween, then the titers of RBC's surface antigen before and after incubation were compared. The erythrocyte's function alterations and stability through the morphological obersavation, the osmotic fragility, RBC's own hemolysis rate, oxygen saturation (SO_2), routine test of blood as well as the supernatant of free hemoglobin determination were confirmed. **Results** The masking effect of the Tween-20 on D antigen with the weaken titer keeping above "+" was better and more stable than that on A, B antigen. The impact on B antigen was a little worse, and A was the worst. The advantaged concentration is about 0.004%. Besides, the influence of Tween-80's on B and D antigen was not apparent enough. Among all of the concentration, 0.74% and 0.80% did a relatively better job, which also could keep the weaken titer above "+". **Conclulsion** The shielding effect that Tween has made on the erythrocyte's surface antigen (ABO and D antigen mainly) is stable, which keeps above "+". The morphology and function of the RBC does not change.

Keywords: surface antigens on red blood cells; Tween-20; Tween-80; chemical modification; universal blood type

doi:10.11659/jjssx.06E014388

[基金项目] 成都医学院大学生创新性实验项目(CX201112)

[收稿日期] 2014-08-29 [修回日期] 2014-09-17

[6] 曹 辉,田力平,王新异. 浆细胞性乳腺炎诊治分析[J]. 中国血液流变学杂志,2013,9(1):116-118.

[7] 李东生. 浆细胞性乳腺炎与肉芽肿性小叶性乳腺炎[J]. 国际外科学杂志,2012,39(3):203-205.

[8] 袁修学,袁静萍,杨月红,等. 肉芽肿性小叶性乳腺炎 1 例[J]. 中华内分泌外科杂志,2012,6(4):285-286.

[9] Omranipour R, Mohammadi SF, Samimi P. Idiopathic granulomatous lobular mastitis-report of 43 cases from iran; introducing a preliminary clinical practice guideline[J]. Breast Care (Basel), 2013, 8(6): 439-443.

[10] 蔡国英. 中西医结合治疗 39 例非哺乳期乳腺炎的疗效观察[J]. 贵阳中医学院学报,2013,4(1):45-46.

[11] 杨丽芸. 按摩联合通乳散结汤治疗哺乳期急性乳腺炎 60 例疗效观察[J]. 河北中医,2013,9(2):203-204.

[12] 汪 飞,鲍克志,朱 娟,等. MRMBI-RADS3-5 类肿块性病变的 DCE-MRI 及 DWI 联合应用价值探讨[J]. 中国临床医学影像杂志,2013,24(9):617-621.

[13] 朱 惠,钱军明. 肉芽肿性小叶性乳腺炎的治疗[J]. 实用临床医药杂志,2014,18(9):166-167.

[14] 邹家群,王 春,张晓华,等. 应用维斯第负压引流装置治疗乳腺脓肿的护理体会[J]. 局解手术学杂志,2011,20(5):482.

[15] 杜 琳,程 涓,汤 玲,等. 药源性肉芽肿性小叶性乳腺炎 8 例诊治报告[J]. 中华中医药杂志,2014,29(3):953-955.

[16] 李雅勋,顾立学,陶 维,等. 肉芽肿性小叶性乳腺炎的诊断和治疗[J]. 中国妇幼保健,2012,27(28):4491-4492.

(编辑:周小林)

输血治疗的原则是供受者血型相同或相容。在当今社会,器官移植已逐渐成为一种常见的治疗方式,而输注红细胞是其中最常见也是耐受性最好的一种移植手段。血型系统尤其是 ABO 和 Rh 血型系统在输血中具有重要的作用,ABO 血型不合引起输血反应的概率是 100%,而 RhD 不合也有 50% 的可能。一般情况下,要求输入相同型血,但在紧急情况下,例如稀有血型、重大自然灾害、战争等,由于不能保证同型血的及时供应,一般要求以交叉配血相容为前提的异型输血,一般以 O 型血作为供血者。对此,希望能通过生物技术将 A、B 和 AB 型红细胞转化成通用的 O 型红细胞,使用大分子化学材料对细胞抗原进行遮蔽,避免机体免疫系统的攻击,使供体组织器官能更好地在受者体内生存是一种比较简单可行的方法。

美国研究员 Scott 利用化学材料:甲氧基聚乙二醇(methoxy polyethylene glycol, mPEG)修饰红细胞发现以共价键结合在 RBC 膜上的 mPEG 可以阻断抗-A、抗-B对 A、B 抗原的凝集反应。但是,后又有试验证明 mPEG 并不能完全遮蔽抗原,并不能达到临床输血前配血标准,并有考虑到 PEG 抗体存在的可能性[1-4]。本实验室期望能找到另一种化学材料能够起到更好的抗原遮蔽作用。聚山梨醇酯(Tween, Polysorbate,吐温),与 PEG 有类似理化性质,是一种非离子型表面活性剂,为淡黄色至橙黄色的黏稠液体,其结构中既有亲水基团,又有亲油基团。现将 A、B、O 3 种红细胞采用 Tween-20、Tween-80 进行化学修饰,并观察其修饰红细胞 A、B 和 D 抗原的遮蔽效果,作出初步研究。

1 材料与方法

1.1 研究对象

收集合格的健康献血者 A、B、O 三种血型红细胞(枸橼酸盐抗凝)。

1.2 主要试剂和仪器

Tween-20(购自美国 Sigma 公司,批号 P1379,规格 25 mL);Tween-80(购自美国 Sigma 公司,批号 P1754,规格 25 mL);抗-A、抗-B 血型定型试剂(单克隆试剂;购自上海血液生物医药有限责任公司,批号 20110820);RhD(IgM)血型定型试剂(单克隆抗体;购自上海生物医药有限责任公司,批号 20110218);0.9% 氯化钠注射液(购自四川科伦药业股份有限公司,生产批号 M11072715);自配 pH 7.0 ~ 7.5 等渗磷酸盐缓冲液[4]。血型血清学专用离心机(KUBOTA HA-2200,日本);721 分光光度计(T6 新世纪,北京谱析仪器有限责任公司);电子天平(MP2002,上海舜宇横平科学仪器有限公司);优普纯水机(购自成都超纯科技有限公司)。

1.3 方法

1.3.1 Tween 孵育红细胞 用生理盐水洗涤红细胞 3 次(2 500 r/min,1 min 离心,弃上清)。将制备好的新鲜红细胞压积加至自制 PBS 配制的孵育液,使终浓度为 Tween-20:0.40‰,0.44‰,0.52‰;Tween-80:0.74‰,0.80‰,0.82‰。加入后轻轻混匀,A、B 型置于 4 ℃,O 型室温孵育 2 h,期间每 0.5 h 混匀 1 次,以加强反应。

1.3.2 Tween 孵育后红细胞表面抗原效价测定 2 h 后取出,弃上层清液,用生理盐水洗涤 3 次,方法同上。后配成 2% ~5% 红细胞悬液,与相应抗血清 1∶1 反应,测定抗原效价。

1.3.3 Tween 孵育前后红细胞形态观察,渗透脆性、自身溶血率和氧饱和度(SO_2)检测 取被 Tween 孵育后和对照组 RBC 做推片,经瑞士染色,在光学显微镜下观察其细胞形态的变化;取 Tween 孵育后与对照组的 RBC 悬液(50%)10 μl 加入 1.25 mL按《全国临床检验操作规程》第 2 版配制的 41.0 ~ 116.3 mmol/L 的 NaCl 梯度溶液,判断 RBC 的渗透脆性变化;取 Tween 组与实验组的 RBC 置 37 ℃ 48 h,离心3 min(1 000 r/min)取上层清液,以 PBS 等渗液为空白对照,检测上清液在 540 nm 处的光吸收值,计算 RBC 自身溶血率,以溶血者对照管测定值作为阳性对照(正常 RBC),以 PBS 等渗液测定值作为阴性对照;SO_2 用血气检测试剂(由德国罗氏诊断有限公司提供)测定。

1.3.4 Tween 孵育前后红细胞形态观察,渗透脆性、自身溶血率和氧饱和度(SO_2)检测 查看血细胞分析仪 MCV、MCH、MCHC、RDW-SD、RDW-CV 及 Tween 孵育液是否是红细胞产生肉眼不可见溶血,使用邻家联苯胺法[5]测定上清中游离血红蛋白量。

2 结果

2.1 不同浓度遮蔽红细胞上 A、B 和 D 抗原的情况

通过试管法在抗血清 1∶4 ~ 1∶32 的浓度下分别进行凝集反应,发现 Tween-20 对 D 抗原的孵育效果较好且稳定,减弱程度保持在“+”以上,B 抗原遮蔽略差且并不稳定,A 抗原的遮蔽效果较弱,优势浓度在 0.4‰附近。Tween-80 对 D、B 遮蔽差异并不明显,在 0.74%、0.80% 附近遮蔽效果较好,保持“+”以上(表 1)。

表 1 不同浓度遮蔽红细胞上 A、B 和 D 抗原的情况

组别		红细胞血型抗原(盐水介质)		
		A	B	D
Tween-20	0.40‰	4+^{w}→2+	4+→2+^{w}	2+→+
	0.44‰	4+^{w}→2+	4+→2+	2+→+^{w}
	0.52‰	4+^{w}→3+	4+→2+	2+→+
Tween-80	0.74%	/	4+^{w}→2+	4+^{w}→2+
	0.80%	/	4+^{w}→3+	4+^{w}→3+
	0.82%	/	4+^{w}→3+	4+^{w}→2+

+ ~4+:凝集程度逐渐增强;w:表示偏弱红细胞功能改变情况

2.2 红细胞功能改变情况

红细胞孵育前后形态涂片检查无异常,红细胞仍为正常大小的双凹圆盘状;渗透脆性较空白正常或略减弱,但都在 $P<0.05$;自身溶血率较空白略高,$P<0.05$,其中 Tween-80

0.74%、0.82%与空白相比,差异具有统计学意义,见表 2;SO_2 都高于 97%(参考值:95% ~99%)。

2.3 红细胞形态变化

HCT、MCV、MCH、MCHC、RDW-SD、RDW-CV 都处于正常范围内(表 3);孵育液(孵育后留取上清)血红蛋白量趋于 0,见表 2、表 3。

3 讨论

Tween-20 及 Tween-80 分子中有较多的亲水性基团—聚氧乙烯基,故亲水性强,为一种非离子型去污剂,二者区别在于 Tween 的编号依聚合山梨醇所结合的脂肪酸种类不同而定,Tween 系列产品常作为乳化剂广泛用在食品,化妆品和其他行业中。Tween-80 已经在大量的经口途径或非消化道途径的药物制剂中应用,对其安全性进行了较为深入的研究。Tween-20、Tween-80 对红细胞均有溶血作用,以 Tween-80 作用最弱。二者与 PEG 具有相似的理化性质,国内最近几年

表 2 红细胞功能改变情况

	对照组	Tween-20			Tween-80			正常参考值范围
		0.40‰	0.44‰	0.52‰	0.74%	0.80%	0.82%	
氧饱和度(SO_2)	98.8	97.5	98.0	98.7	97.0	97.2	97.9	95 ~99
自身溶血率	0.576 ±0.050	/	/	/	0.600 ±0.010 *	0.636 ±0.009	0.645 ±0.090 *	

*:与对照组比较,$P<0.05$

表 3 不同浓度 Tween 及对照组的红细胞形态变化

项目	对照组	Tween-20			Tween-80			正常参考值范围
		0.4‰	0.44‰	0.52‰	0.74%	0.80%	0.82%	
MCV(fL)	88.5	88.3	87.7	87.6	84.2	86.7	83.9	80 ~100
MCH(pg)	30.2	29.6	30.0	29.6	30.2	30.1	29.7	27 ~32
MCHC(g/L)	341.0	335.0	342.0	338.0	359.0	348.0	355.0	310 ~360
RDW-SD(fL)	37.9	39.6	42.3	38.1	36.2	38.1	36.0	37.0 ~54.0
RDW-CV(%)	12.1	12.7	13.6	12.2	12.4	13.0	12.4	11.5 ~14.5

许多人士对 PEG 对红细胞表面抗原遮蔽效果进行研究,研究结果表明 PEG 对红细胞表面抗原有遮蔽的作用,为制备通用血型奠定了基础[5-11]。本实验证明了不同浓度 Tween-20、Tween-80 对红细胞的遮蔽效果有明显差异,Tween-20 对 D 抗原的孵育效果较好且稳定,减弱程度保持在"+"以上,B 抗原遮蔽略差且并不稳定,A 抗原的遮蔽效果较弱,优势浓度在 0.40‰附近。Tween-80 对 D、B 遮蔽差异并不明显,在 0.74%、0.80%附近遮蔽效果较好,保持"+"以上,说明 Tween-20、Tween-80 也具有和 PEG 类似的抗原屏蔽作用,但是目前的研究机制尚未清楚,有待进一步研究。尽管化学物质遮蔽红细胞的抗原的研究还存在一些问题,但它为制备通用型血的研究提供了很多线索,具有很大的研究价值和应用前景。未来,人们可望达到既完全遮蔽红细胞的血型抗原,又不影响其形态、结构、功能和寿命的目的,最终实现制备通用型血液的目标。

[参考文献]

[1] 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.

[2] Armstrong JK, Meiselman HJ, Fisher TC. Covalent binding of poly(ethylene glycol) (PEG) to the surface of red blood cells inhibits aggregation and reduces low shear blood viscosity[J]. Am J Hematol, 1997, 56(1): 26 - 28.

[3] Garratty G, Telen MJ, Petz LD. Red cell antigens as functional molecules and obstacles to transfusion[J]. Hematology Am Soc Hematol Educ Program, 2002: 445 - 462.

[4] Başkurt OK, Bor-Küçükatay M, Yalçin O, et al. Standard aggregating media to test the "aggregability" of rat red blood cells[J]. Clin Hemorheol Microcirc, 2000, 22(2): 161 - 166.

[5] Garratty G. Progress in modulating the RBC membrane to produce transfusable universal/stealth donor RBCs[J]. Transfus Med Rev, 2004, 18(4): 245 - 256.

[6] 中华人民共和国医政司. 全国临床检验操作规程[M]. 第 3 版. 南京:东南大学出版社, 2006: 164 - 165, 253 - 266.

[7] 檀英霞, 王捷熙, 章扬培. 体外化学修饰红细胞 —— 通用型血?[J]. 生命科学, 2004, 16(1): 35 - 38.

[8] 郁成雨. 人红细胞 A→O 血型改造的研究[D]. 中国人民解放军军事医学科学院, 2008.

[9] 邱 艳, 檀英霞, 李立立, 等. mPEG 修饰红细胞的动物实验[J]. 中国实验血液学杂志, 2006, 14(4): 816 - 821.

[10] 王庆利, 彭 健. 吐温 80 的安全性研究进展[J]. 毒理学杂志, 2006, 20(4): 262 - 264.

[11] 张印则. 红细胞抗原化学修饰的研究进展[J]. 中国输血杂志, 2003, 16(6): 435 - 437.

(编辑:杨 颖)