

戊二醛聚合对猪、牛和人血红蛋白免疫学特性的影响^{*}

朱晓丽^{1**} 王童文²

(1 西北大学 陕西省生物材料与发酵工程技术研究中心 西安 710127)

(2 西北大学 国家微检测系统工程技术研究中心 西安 710127)

摘要 猪、牛、人血红蛋白或其相应的戊二醛聚合体分别经皮下或腹腔多次免疫小鼠,ELISA 检测抗血清 IgG 滴度;免疫印迹法分别检测小鼠抗猪、牛、人血红蛋白或其相应的戊二醛聚合体 IgG 与猪、牛、人血红蛋白或其相应的戊二醛聚合体之间的交叉反应,探讨戊二醛聚合对不同种类血红蛋白免疫学特性的影响。结果表明:猪、牛、人血红蛋白的免疫原性均很弱,其相应的戊二醛聚合体免疫原性明显增强;猪、牛、人血红蛋白具有明显的抗原性差异;戊二醛聚合对这三类血红蛋白免疫学性质的影响完全不同,戊二醛聚合猪血红蛋白没有产生新的抗原决定簇,戊二醛聚合牛血红蛋白某些抗原决定簇被封闭,戊二醛聚合人血红蛋白形成了某些新的抗原决定簇。

关键词 血红蛋白 戊二醛交联血红蛋白 免疫学特性 酶联免疫检测 免疫印迹

中图分类号 Q819

血红蛋白是生物体内具有携氧功能的一类生物大分子,多年来人们一直试图以血红蛋白为材料制备红细胞代用品,以解决红细胞寿命短、使用前需交叉配型和可能携带血液传播病毒的问题。但是天然血红蛋白脱离了红细胞以后,在体内会迅速解聚为 $\alpha\beta$ 二聚体,这些小分子易从血管内皮细胞间隙渗出而产生强烈的肾毒性^[1]。增加 Hb 的分子量是克服 Hb 致命缺点的重要手段,也是 HBOCs 分子设计的主要原则^[2-3]。Hb 分子量增加主要是用化学手段通过分子表面修饰,分子内交联或分子间聚合的方法实现的^[4]。分子内交联如双阿司匹林交联^[5]和氧开环的棉子糖交联^[6]、分子间交联如戊二醛交联^[7]及化学偶联活化的 PEG 修饰^[8]是三种常用的血红蛋白化学修饰方法,能够有效地增加血红蛋白的分子量,防止血红蛋白从肾脏的滤过,增加血红蛋白在血管内的半衰期,从而有效地减少或消除血红蛋白的毒性作用^[4]。

然而,蛋白质经化学修饰后可能会对抗原性产生影响,具有引入新抗原位点的风险^[9-10]。Hertzman

等^[11]报道聚合的人血红蛋白比天然人血红蛋白免疫原性明显增强。Chang 等^[12]认为引入新抗原位点的风险对于非人源 HBOCs 是一个特别关注的问题,因为如果接受治疗者易过敏,新抗原位点的引入可能导致严重的超敏反应如过敏性休克等。Schubert 等^[13],Estep 等^[14]和 Chang 等^[12]分别报道了双阿司匹林交联的人血红蛋白和 PEG 修饰的大鼠血红蛋白反复静脉注射后不会引起明显的体液免疫反应。但是,目前,为了避免引起免疫学相关的毒性作用,HBOCs 在临床实验中只能用于治疗从未接触过 HBOCs 的个体。我国关于血红蛋白类血液代用品评价与控制的指标与方法规定:抗原性实验应以 ELISA 检测无免疫原性^[15]。

综上所述,目前对化学修饰或聚合血红蛋白的免疫刺激性研究较多,但是关于修饰或聚合反应对血红蛋白免疫学性质的影响,如在修饰或聚合后抗原决定簇的改变、是否产生新的抗原决定簇却研究甚少。本文系统地比较了猪、牛、人血红蛋白与其相应戊二醛聚合体对小鼠免疫刺激性的异同,通过小鼠抗猪、牛或人血红蛋白或其相应戊二醛聚合体抗体分别与猪、牛、人血红蛋白及其相应戊二醛聚合体交叉反应的比较研究,初步探讨了戊二醛聚合对血红蛋白免疫学特性影

收稿日期:2010-11-23 修回日期:2011-01-19

^{*} 国家“863”计划资助项目(2004AA205030)

^{**} 电子信箱:zhuxiaoli1369@163.com

响,为戊二醛交联血红蛋白作为血液代用品最终应用于临床提供重要的安全性依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试剂 猪血红蛋白(porcine hemoglobin, pHb)、牛血红蛋白(bovine hemoglobin, bHb)、人血红蛋白(human hemoglobin, hHb)及其相应的戊二醛聚合体即戊二醛交联猪血红蛋白(porcine glutaraldehyde polymerized hemoglobin, pPolyHb)、戊二醛交联牛血红蛋白(bovine glutaraldehyde polymerized hemoglobin, bPolyHb)、戊二醛交联人血红蛋白(human glutaraldehyde polymerized hemoglobin, hPolyHb), pPolyHb、bPolyHb 和 hPolyHb 聚合方法相同,分子量分布、平均分子量大小、高铁血红蛋白含量均大致相同,均由本室制备。小鼠抗 pHb, bHb, hHb 或其相应的戊二醛聚合体抗体由本室制备。羊抗小鼠、大鼠、兔子辣根过氧化物酶(HRP)标二抗盐酸 TMB(四甲基联苯胺盐酸盐)、弗氏完全佐剂、弗氏不完全佐剂均购自鼎国公司。DAB(3,3-二甲基苯联胺)购自华美公司。标准分子量蛋白购自 NEB 公司,蛋白转印膜(PVDF)购自 Millipore 公司。SDS、Tris base、丙烯酰胺、甲叉丙烯酰胺均购自 Sigma 公司,其它所需试剂均为国产分析纯。酶标板购自 Corning 公司。

1.1.2 动物 BALB/C 小鼠,6~8 周龄,体重 18 ± 2 g, 购自西安交通大学医学院;健康大耳白兔,体重: 2.0 ± 0.2 kg, 购自第四军医大学。

1.1.3 仪器 全自动酶标仪(Elx800uv)为 Bio-Tek Instruments 产品,涡旋振荡器(G-560E)购自美国 Scientific Industries 公司,转移电泳仪(DYY-7B 型)为北京六一仪器厂产品。

1.2 实验方法

1.2.1 小鼠免疫及抗血清的收集保存 Balb/c 小鼠随机分为 12 组,每组 6 只,雌雄各半。未免疫前,经每只小鼠尾静脉采血,收集血清作为阴性对照。分别皮下或腹腔免疫猪、牛、人血红蛋白或其相应的戊二醛聚合体。之后,每隔 3 周加强免疫一次,每次加强免疫第 12 天后经尾静脉采血、收集血清。间接 ELISA 法检测血清中 IgG。

1.2.2 血清抗体(IgG)滴度的测定 用间接 ELISA (enzyme-linked immuno assay)法检测小鼠抗猪、牛、人血红蛋白或其相应的戊二醛聚合体抗血清 IgG^[16]。

1.2.3 SDS-PAGE/Western blotting 法测定抗原抗体结合反应 采用免疫印迹法结合 ECL 化学发光检测小鼠抗猪、牛、人血红蛋白或其相应的戊二醛聚合抗体与猪、牛、人血红蛋白及其相应的戊二醛聚合体之间的交叉反应^[16]。

2 结果与分析

2.1 猪、牛、人血红蛋白及其戊二醛聚合体对小鼠 IgG 生成反应的刺激作用

猪、牛、人血红蛋白及其戊二醛聚合体对小鼠 IgG 生成反应的刺激作用见图 1。图中 A、B 和 C 分别为接受 pHb, bHb 或 hHb 腹腔免疫注射刺激的 3 组动物, D、E 和 F 分别为接受 pHb, bHb 或 hHb 皮下免疫注射刺激的 3 组动物,图中横坐标分别代表 1~6 号小鼠,测量血清稀释度均为 1:50。从图中可以看出, pHb、bHb 腹腔或皮下加强免疫 3 次, ELISA 检测小鼠抗血清 P/N 值均 <2 , 说明 pHb 或 bHb 均不能刺激小鼠产生抗 pHb 的特异性 IgG。反复腹腔免疫注射 hHb 也不能使小鼠产生特异性抗 hHb 抗体(IgG),而多次皮下免疫小鼠可使个别小鼠产生极少量的特异性抗 hHb 抗体(IgG),但是,抗体滴度很低,即使在第三次加强免疫注射后,抗体最高稀释度仅在 1:100 以下。因此, pHb、bHb 和 hHb 对小鼠免疫刺激性均很弱。

2.2 戊二醛聚合猪、牛、人血红蛋白对小鼠 IgG 生成反应的刺激作用

戊二醛聚合猪、牛、人血红蛋白对小鼠 IgG 生成反应的刺激作用结果如表 1 所示,从表中可以看出戊二醛交联能够增强血红蛋白的免疫原性,而且皮下给药与腹腔给药途径相比对小鼠刺激强度大,抗体产生快,产生的抗体(IgG)滴度更高。

2.3 小鼠抗猪、牛、人血红蛋白或其相应的戊二醛聚合抗体与猪、牛、人血红蛋白及其相应的戊二醛聚合体之间的交叉反应

猪、牛、人血红蛋白及其相应的戊二醛聚合体 SDS-PAGE 电泳分析如图 2 所示,图中第 1~7 泳道分别为标准蛋白 Marker、PHb、pPolyHb、bHb、bPolyHb、hHb 和 hPolyHb。从图中可以看出,经纯化的 PHb、bHb 和 hHb SDS-PAGE 电泳银染后未见任何杂带, pPolyHb、bPolyHb 和 hPolyHb 分子量分布相同。所有样品中最小蛋白条带的分子量均为 16kDa,所有蛋白条带均为 16kDa 的整数倍,这是由于在 SDS 变性条件下,聚合体 Hb 分子中非共价键形式结合的亚基相互解离,进而产生以 16kDa 为最小单位的不同大小的分子。

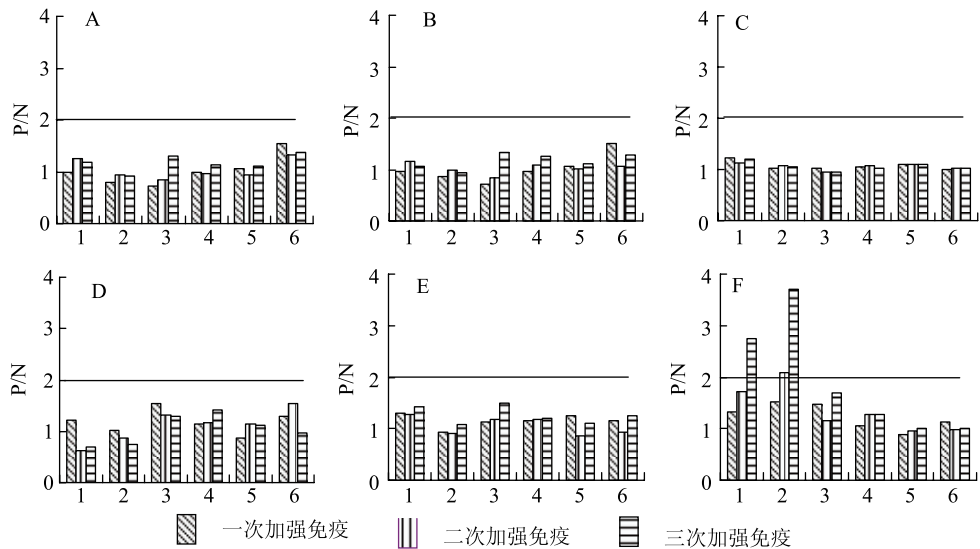


图 1 猪、牛或人血红蛋白腹腔或皮下注射刺激小鼠 IgG 生成反应作用的比较
Fig. 1 IgG stimulation of pHb,bHb and hHb in mice through s. c. or i. p. route

表 1 pPolyHb、bPolyHb 和 hPolyHb 通过腹腔或皮下免疫途径刺激小鼠 IgG 生成反应作用的比较
Table 1 IgG stimulation of pPolyHb、bPolyHb and hPolyHb in mice through s. c. or i. p. route

Serum dilution	pPolyHb				bPolyHb				hPolyHb			
	i. p.		s. c.		i. p.		s. c.		i. p.		s. c.	
	Boost ₁	Boost ₂	Boost ₁	Boost ₂	Boost ₁	Boost ₂	Boost ₁	Boost ₂	Boost ₁	Boost ₂	Boost ₁	Boost ₂
10 ⁻²	1 *	5 *	5 *	6 *	1 *	6 *	6 *	6 *	2 *	6 *	6 *	6 *
10 ⁻³	0 *	0 *	2 *	5 *	0 *	2 *	5 *	6 *	1 *	3 *	6 *	6 *
10 ⁻⁴	nd	nd	1 *	5 *	nd	nd	1 *	5 *	nd	nd	4 *	5 *
2 × 10 ⁻⁴	nd	nd	0 *	3 *	nd	nd	0 *	5 *	nd	nd	0 *	5 *

* Indicates the number of mouse that p/n ratio value larger than 2 that the result of an ELISA test using the corresponding serum with the indicated fold of dilution yielded, nd indicates not detect

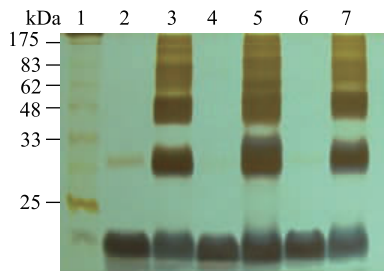


图 2 猪、牛或人血红蛋白及其相应的戊二醛聚合物 SDS-PAGE 银染分析
Fig. 2 Silver stained SDS-PAGE analysis of porcine, bovine,human hemoglobin and their related polymerized hemoglobin

小鼠抗猪、牛、人血红蛋白或其相应的戊二醛聚合抗体与猪、牛、人血红蛋白及其相应的戊二醛聚合物之间的交叉反应结果如图 3、4 所示。图中 1~6 泳道分别为 PHb、pPolyHb、bHb、bPolyHb、hHb 和 hPolyHb。

从图 3、4 可以看出,小鼠抗猪血红蛋白抗体与牛和人血红蛋白及其相应的戊二醛聚合物均不能发生抗原抗体交叉反应,小鼠抗聚合猪血红蛋白抗体与牛和人血红蛋白及其相应的戊二醛聚合物也不能发生抗原抗体结合反应,这提示猪血红蛋白上具有与人、牛血红蛋白不同的抗原决定簇,戊二醛聚合猪血红蛋白没有形成新的抗原决定簇。小鼠抗牛血红蛋白抗体能够与猪或人血红蛋白及其相应的戊二醛聚合物发生交叉反应,而小鼠抗戊二醛聚合牛血红蛋白抗体不能与猪或人血红蛋白及其相应的戊二醛聚合物发生明显的抗原抗体结合反应,这提示:(1)牛血红蛋白与人、猪血红蛋白具有部分相似的抗原决定簇;(2)戊二醛聚合或修饰可能造成牛血红蛋白某些抗原决定簇的封闭,进而减弱了有关抗原决定簇的刺激性;(3)戊二醛聚合或修饰使牛血红蛋白相应抗原决定簇局部的蛋白水解特性发生改变,造成在抗原提呈细胞内与抗原决定簇有关的血

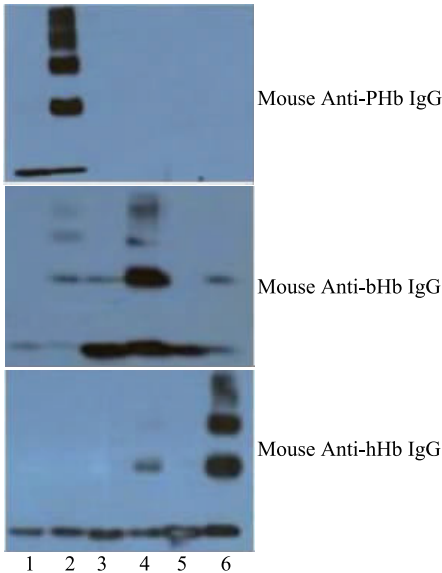


图3 小鼠抗猪、牛或人血红蛋白抗体与猪、牛、人血红蛋白及其相应的戊二醛聚合体的交叉反应

Fig. 3 Cross-binding reactions of anti-pHb, bHb or hHb IgG with pPb, bPb, hPb and their related polymerized Hb

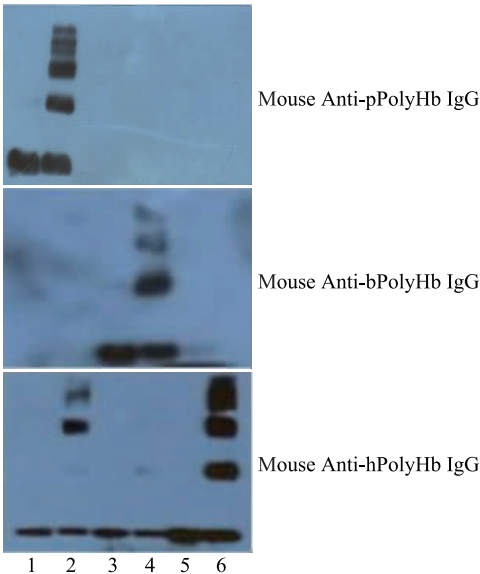


图4 小鼠抗戊二醛聚合猪、牛或人血红蛋白抗体与猪、牛、人或血红蛋白及其相应的戊二醛聚合体的交叉反应

Fig. 4 Cross-binding reactions of anti-pPolyHb, bPolyHb or hPolyHb IgG with pPb, bPb, hPb and their related polymerized Hb

红蛋白片段完全水解,致使相应抗原多肽不能正常地呈现在抗原提呈细胞表面,造成相应免疫原性的丧失。小鼠抗人血红蛋白抗体与牛、猪血红蛋白能够发生交

叉反应,与戊二醛聚合血红蛋白无交叉反应,而小鼠抗戊二醛聚合人血红蛋白抗体与猪血红蛋白或戊二醛聚合猪血红蛋白均有明显的交叉反应。这提示人血红蛋白与牛、猪血红蛋白具有部分相似的决定簇,戊二醛聚合人血红蛋白形成了某些新的抗原决定簇。

3 讨论

目前,已有数种血液代用品进入临床研究,但是许多产品由于安全性问题而被提前终止^[17]。本文通过血红蛋白与其相应的戊二醛聚合体免疫学特性的比较研究发现,猪、牛、人血红蛋白对小鼠的免疫刺激性都很弱,但其相应的戊二醛聚合体免疫原性都增强。此外,实验结果还表明:皮下给药与腹腔给药途径相比对小鼠刺激强度大,抗体产生快,产生的IgG滴度更高。原因是腹腔给药通过腹膜吸收,吸收面积大,直接吸收入血,所以抗原降解速度快,而皮下注射通过皮下微血管吸收抗原,吸收速度较慢,从而使抗原刺激时间延长,因此,皮下注射较之腹腔注射对小鼠的免疫刺激性更强。

天然血红蛋白是自然界中进化相对保守的蛋白之一,不同来源的Hb具有极其相似的氨基酸序列和空间结构^[18],猪、牛、人和小鼠血红蛋白的氨基酸序列的相同性见表2。

表2 猪、牛、人和小鼠血红蛋白氨基酸序列的相同性分析

Table 2 The analysis of amino acid sequence identity score among pPb, bPb, hPb and mouse Hb

Proteins	α subunit			β subunit		
	pPb	bPb	hPb	pPb	bPb	hPb
pPb	100	86	84	100	81	85
bPb	86	100	88	81	100	84
hPb	84	88	100	85	84	100
Mouse Hb	82	86	85	78	73	80

Note: From the SWISS-PROT database accessed via the website of NCBI

从表2可以看出:猪、牛、人血红蛋白α亚基和β亚基氨基酸序列相同性均很高,在81%~88%之间,这提示3种血红蛋白可能具有相似的抗原性,同种化学修饰方法对猪、牛、人血红蛋白免疫学性质的影响也可能相似。但是,本文通过猪、牛、人血红蛋白及其相应的戊二醛聚合体抗原抗体交叉反应的研究发现:猪、牛、人血红蛋白具有明显的抗原性差异,戊二醛聚合对这三类血红蛋白免疫学性质的影响完全不同。

首先,猪、牛、人血红蛋白注入小鼠体内都能够产

生抗体,说明猪、牛、人血红蛋白具有与小鼠血红蛋白不同的抗原决定簇;其次,在小鼠免疫背景下,小鼠抗猪、牛或人血红蛋白抗体与猪、牛和人血红蛋白之间的交叉反应有显著的差异,因此,虽然不同种的血红蛋白的氨基酸序列具有很高的相似性,但其抗原性存在明显的差异。

戊二醛聚合反应造成猪、牛、人血红蛋白免疫学性质发生不同改变的事实说明,虽然不同种的血红蛋白的氨基酸序列具有很高的相同性,但聚合反应所产生的免疫学特性的影响可能完全不同,这与聚合反应所修饰的氨基酸位点及其相邻空间结构的特点相关。

总之,戊二醛聚合能够增强猪、牛、人血红蛋白的免疫刺激性,改变人和牛血红蛋白的抗原性和免疫原性,戊二醛聚合人血红蛋白产生了新的抗原决定簇,戊二醛聚合牛血红蛋白某些抗原决定簇被覆盖,但此现象未在戊二醛聚合猪血红蛋白中发现。而戊二醛聚合人血红蛋白产生的新的抗原决定簇是否会对人体产生免疫学影响在临床研究中应给予充分的重视。人、牛、猪血红蛋白免疫原性及其特点共性和异性的认识,对 HBOCs 的生物学及其临床医学研究具有重要的作用。此外,在临床前研究中应分别研究不同 HBOCs 产品的免疫学特性,不能仅根据某一种 HBOC 产品的免疫学特性推断用相同制备方法获得的不同来源血红蛋白产品的免疫学性质。

参考文献

- [1] Paul M N, Melissa M C. Oxygen therapeutics pursuit of an alternative to the donor red blood cell. *Arch Pathol Lab Med*, 2007, 131:734-741.
- [2] Moore E E, Moore F A, Fabian T C, et al. Human polymerized hemoglobin for the treatment of hemorrhagic shock when blood is unavailable: the USA multi-center trial. *J Am Coll Surg*, 2009, 208:1-13.
- [3] Chen J Y, Michelle S, George K. A review of blood substitutes: examining the history, clinical trial results and ethics of hemoglobin-based oxygen carriers. *Clinics*, 2009, 64 (8): 803-813.
- [4] Chang T M. Hemoglobin-based red blood cell substitutes. *Artificial Organs*, 2004, 28 (9):789-794.
- [5] Nelson D, Azari M, Brown R, et al. Preparation and characterization of diaspirin cross-linked hemoglobin solutions for preclinical studies. *Biomater Artif Cell Im*, 1992, 20: 423-427.
- [6] Hsia J C. O-raffinose polymerized hemoglobin as a red cell substitute. *Biomater Artif Cell Im*, 1991, 19:401.
- [7] Sehgal L R, Gould S A, Rosen A L, et al. Polymerized pyridoxalated hemoglobin: a red cell substitute with normal oxygen capacity. *Surgery*, 1984, 95: 433-438.
- [8] Vandegriff K D, Malavalli A, Wooldrige J, et al. MP4, a new nonvasoactive PEG-Hb conjugate. *Transfusion*, 2003, 43: 509-516.
- [9] Bleeker W K, Zappeij L M, den Boer P J. Evaluation of the immunogenicity of polymerized hemoglobin solutions in a rabbit model. *Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol*, 1995, 23 (4):461-468.
- [10] Mehul J P, Edwin J W, Tina E S, et al. Absence of immunogenicity of Diaspirin cross-linked hemoglobin in humans. *Blood*, 1998, 91:710-716.
- [11] Hertzman C M, Keipert P E, Chang T M. Serum antibody titers in rats receiving repeated small subcutaneous injections of hemoglobin or polyhemoglobin: a preliminary report. *Int J Artif Organs*, 1986, 9(3):179-182.
- [12] Chang T M, Lister C, Nishiya V R, et al. Immunological effects of hemoglobin, encapsulated hemoglobin, polyhemoglobin and conjugated hemoglobin using different immunization schedules. *Biomater Artif Cells Immobilization Biotechnol*, 1992, 20 (2 - 4):611-618.
- [13] Schubert A, Przybelski R J, Eidt J F, et al. Diaspirin cross-linked hemoglobin reduces blood transfusion in noncardiac surgery: a multicenter, randomized, controlled, double-blinded trial. *Anesth Analg*, 2003, 97:323-332.
- [14] Estep T N, Gonder J, Bornstein I, et al. Immunogenicity of diaspirin cross-linked human hemoglobin solutions. *Biomater Artif Cells Immobilization Biotechnol*, 1992, 20 (2 - 4): 603-609.
- [15] 王军志. 生物技术药物研究开发和质量控制. 北京:科学出版社, 2002. 721.
Wang J Z. Research Development and Quality Control of Biotechnological Pharmaceuticals. Science Press, 2002, 721.
- [16] 朱晓丽. 戊二醛聚合猪血红蛋白氧载体免疫学特性及其作用机理的研究. 西安:西北大学, 化工学院, 2007.
Zhu X L. The study of imunological properties and mechanisms of glutaraldehyde polymerized/modified porcine hemoglobin oxygen carrier. Xi'an: Northwest University, School of Chemical Engineering, 2007.
- [17] Natanson C, Kern S J, Lurie P, et al. Cell free Hemoglobin-based blood substitutes and risk of myocardial infarction and death: a meta-analysis. *JAMA*, 2008, 299:2304-2312.
- [18] Darin S K, Steven P W, Huang W, et al. Structure determination of aquomet porcine hemoglobin at 2.8 Å resolution. *J Mol Biol*, 1994, 244: 541-553.

The Influence of Glutaraldehyde Polymerization on Immunological Properties of Porcine Hemoglobin, Bovine Hemoglobin and Human Hemoglobin

ZHU Xiao-li¹ WANG Tong-wen²

(1 Northwest University Shaanxi R&D Center of Biomaterials and Fermentation Engineering, Xi'an 710127, China)

(2 Northwest University National Engineering Research Center for Miniaturized Detection System, Xi'an 710127, China)

Abstract To reveal the effects of glutaraldehyde polymerization on the immunological properties of porcine hemoglobin, bovine hemoglobin and human hemoglobin, repeated ip. or sc. administration of an immunizing dose of pHb, bHb, hHb or their glutaraldehyde cross-linked derivatives were given to mice to stimulate IgG responses, which was measured by indirect ELISA. Western blotting analysis of the antibody-antigen cross-binding reactions between pHb, bHb, hHb or its related glutaraldehyde polymerized hemoglobin derivatives and anti-hemoglobin or anti-glutaraldehyde polymerized hemoglobin antibodies raised in mice were used in order to investigate the effects of glutaraldehyde polymerization on the immunological properties of the proteins concerned. The results indicated that hHb, bHb and pHb are all weakly immunogenic, while polymerization significantly increases the immunogenicity of all their glutaraldehyde-cross-linked derivatives. There exist clear species-specific antigen-determinants in hHb, bHb and pHb. The effects of glutaraldehyde polymerization on immunological properties of porcine hemoglobin, bovine hemoglobin and human hemoglobin are significantly different, there were no neo-antigens formed in pPolyHb, some of the determinants of bHb were covered because of glutaraldehyde polymerization, however, neo-antigens produced in hPolyHb. Therefore, it is necessary to study the immunological characteristics of different HBOCs products separately and should not infer the characteristics of the products from different kinds of Hb even when they were made by the same method.

Key words Hemoglobin Glutaraldehyde polymerized hemoglobin Immunological properties Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) Western blotting