

CN9200592

CNIC-00518

SMC-0063

中国核科技报告

血小板表面及血浆内活化标记蛋白
GMP-140 的放射免疫测定

RADIOIMMUNOASSAY FOR PLATELET ACTIVATION
SPECIFIC PROTEIN GMP-140 ON THE PLATELET
SURFACE AND IN PLASMA

(In Chinese)



原子能出版社

中国核情报中心

China Nuclear Information Centre

This report is subject to copyright. All rights are reserved. Submission of a report for publication implies the transfer of the exclusive publication right from the author(s) to the publisher. No part of this publication may be reproduced, stored in data banks or transmitted in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording or otherwise, without the prior written permission of the publisher, China Nuclear Information Centre, and/or Atomic Energy Press. Violations fall under the prosecution act of the Copyright Law of China.

The China Nuclear Information Centre and Atomic Energy Press do not accept any responsibility for loss or damage arising from the use of information contained in any of its reports or in any communication about its test or investigations.

CNIC-00518

SMC-0063

血小板表面及血浆内活化标记蛋白 GMP-140 的放射免疫测定^①

吴国新 李建勇 阮长耿

(苏州医学院)

摘 要

利用自制的抗人活化血小板 α -颗粒膜蛋白(Granule Membrane Protein-140, GMP-140)特异性单克隆抗体SZ-51,经放射免疫法直接定量测定血小板表面GMP-140的分子数及血浆内GMP-140的含量。对临床多种疾病(如急性心肌梗塞、脑血栓形成、糖尿病、支气管哮喘、流行性出血热等)体内血小板活化及其程度进行了评估,并与血浆内花生四烯酸代谢产物TXB₂及Von willebrand因子(vWF)含量比较,证实血小板表面GMP-140分子数的测定优于TXB₂及vWF等的测定。血小板表面GMP-140分子数能敏感地反映血小板的活化程度,是判断血小板活化特异的指标之一,这一方法的建立,将为血栓性疾病的诊断及其它疾病发病机理的进一步探讨提供依据。

① 该研究基金部分由国际原子能机构(OAEA)资助

**RADIOIMMUNOASSAY FOR PLATELET ACTIVATION
SPECIFIC PROTEIN GMP-140 ON THE PLATELET
SURFACE AND IN PLASMA**

(In Chinese)

Wu Guoxin Li Jianyong Ruan Changgeng
(SUZHOU MEDICAL COLLEGE)

ABSTRACT

Using monoclonal antibody (McAb) SZ-51 which is specific for an alpha-granule membrane protein (GMP-140) on the surface of human activated platelets, the platelet GMP-140 expression in fixed whole blood was measured by direct radioimmunoassay and GMP-140 microparticles in plasma was measured by sandwich method. The GMP-140 molecules per platelet or milliliter (mL) were calculated for the following subjects: acute myocardial infarction; cerebro thrombosis; diabetic mellitus; asthma attack; epidemic hemorrhagic fever etc. By comparing with the concentration of thromboxane B₂ (TXB₂) and von willebrand factor (vWF) in plasma, it is confirmed that the measurement of GMP-140 molecules is better than that of TXB₂ and vWF. It is a sensitive and specific method for evaluating the platelet activation degree in vivo. The establishment of this method will be useful to diagnosing the thrombotic disorders and studying the pathogenesis of some other diseases.

前 言

血小板在血栓形成及止血过程中起着关键的作用,血小板在活化过程中,不仅形态及生化代谢要发生改变,其膜糖蛋白的结构和组分也要发生变化,以发挥其粘附、聚集、释放等活化反应^[1],但在病理情况下,血小板膜糖蛋白的改变又是某些疾病的特征或伴随体征^[2]。测定血浆内花生四烯酸的代谢产物 TXB₂ 的改变及血小板 α-颗粒内容物释放产物等变化来评估体内血小板的活化程度,是间接的或是非特异的指标。本研究利用活化血小板特异性单克隆抗体(单抗)来直接定量测定体内血小板的活化程度,将为临床上特异性检测体内血小板的改变及某些疾病的诊断提供依据。

1 材料与方 法

1.1 单克隆抗体的制备

SZ-51 为一株抗人活化血小板表面颗粒膜蛋白(GMP-140)的单抗^[3,4],经 Iodogen 法标记 Na¹²⁵I,蛋白定量后加入 50 μmol/L 牛血清白蛋白(BSA)及 3 mmol/L 叠氮钠,置 4℃ 保存。¹²⁵I-SZ-51 的放射比活性为 600~1000 ng⁻¹min⁻¹,99% 以上的放射性被 1.23 mmol/L 三氯醋酸沉淀。单抗 S₁₂^[5,6]由美国 Oklahoma 大学 McEver 博士赠送,亦作用于 GMP-140,但与 SZ-51 识别的决定簇不相关,S₁₂同位素标记同上,比活性为 1000 ng⁻¹min⁻¹。

1.2 标本制备

以塑料注射器抽外周血,1:9 EDTA-Na₂ 抗凝,取 0.5 mL 抗凝血与等量的固定剂(20 mmol/L 戊二醛-3 mmol/L 叠氮钠-PBS, pH 7.4)混合,室温作用 30 min,即为固定的全血,余血以 3000r/min 离心 30 min,上层血浆置-30℃ 保存。

1.3 活化及静止血小板的制备

上述 EDTA-Na₂ 抗凝血,800 r/min 离心 10 min,得上层富含血小板血浆(PRP),取 1 mL PRP 以等量的固定剂固定,作用 1 h,即为静止血小板,余 PRP 以 TEN(20 mmol/L Tris-HCl, 5 mmol/L EDTA Na₂, 0.15 mol/L NaCl, pH 7.4)洗涤 3 次,加入 1 U/mL 凝血酶(sigma),室温作用 3 min,按上法固定,即为活化血小板。

1.4 血小板表面 GMP-140 分子数测定

取含 2.5×10^6 血小板的固定全血,以 苔氏液(138 mmol/L NaCl, 29 mmol/L KCl, 12 mmol/L NaHCO₃, 0.36 mmol/L NaH₂PO₄, 5 mmol/L 葡萄糖, pH 7.4)洗涤 1 次,加入 ¹²⁵I-SZ-51 抗体(0.1 μg/管),终体积为 50 μL,混匀室温作用 30 min,以 50 μmol/L BSA-苔氏液洗涤 3 次,3000 r/min 离心 10 min,每次均不悬浮沉淀物,在 γ 计数仪上测定计数率,每个测定均为复管,非特异吸附以 100 倍未标记的单抗同时加入反应管,将特异结合的计数率换算成每个血小板上 GMP-140 表达的分子数。

1.5 血浆内 GMP-140 含量的测定

以 1 mg/L 的 SZ-51 抗体包板(100 μL/孔),次日以 0.05% Tween 20-PBS 洗 3 次,以 50 μmol/L BSA-PBS 37℃ 作用 2 h,依次加入血浆(100 μL/孔)和 ¹²⁵I-S₁₂(0.1 μg/孔),37℃ 作用 2

h. 各洗涤 6 次, 按上法计数并换算成单位体积血浆内 GMP-140 的含量, 抗原对照以 50 $\mu\text{mol/L}$ BSA 替代被检血浆。

1.6 血浆内 TXB₂ 和 vWF 的测定

将冻存的血浆 37℃ 解冻, 3000 r/min 离心 10 min, 按本院制备的 TXB₂ 放射免疫测定药盒^[2]及 vWF 的酶标药盒^[3]测定血浆内浓度。

1.7 研究对象

本研究的 50 例正常标本来自不同年龄的健康个体, 男女各半, 收集的 96 例病人均为住院确诊患者, 包括急性心肌梗塞 11 例, 脑血栓形成 5 例, 糖尿病 26 例, 甲状腺机能亢进 4 例, 支气管哮喘发作 14 例, 肾病综合症 5 例, 体外循环转流结束 13 例, 流行性出血热休克和少尿期 18 例。

2 结果

2.1 血小板表面及血浆内 GMP-140 的分子数

¹²⁵I-SZ-51 抗体与洗涤固定的全血作用 30 min 后, 测得 50 例正常血标本血小板上有 780 ± 490 个 GMP-140 分子, 以 1 U/mL 凝血酶活化的血小板表面有 10000~13000 个分子, 且其结合不受 Ca²⁺ 或 EDTA-Na₂ 浓度的影响, 正常血浆内 GMP-140 的浓度为 $(1.61 \pm 0.72) \times 10^{10}$ 分子/mL, 而全血经凝血酶作用后离心分离血清, GMP-140 的含量为 $(22.3 \pm 3.5) \times 10^{10}$ 分子/mL。

2.2 血小板表面 GMP-140 测定的敏感性

取 10⁷ 的活化及静止血小板, 以不同的比例混合, 致活化血小板所占的百分比为 100%, 50%, 25%, 12.5%, 6.2%, 3.1%, 1.5%, 0。GMP-140 分子测定结果见图 1, 由图可见, 在血小板悬液中, 活化血小板仅占 1.5% 时, GMP-140 的分子数较静止血小板显著增高, 因此, 血小板表面 GMP-140 分子数的测定能敏感地反映血小板的活化程度。

2.3 全血固定剂及放置时间的影响

固定剂: EDTA-Na₂ 抗凝全血分别以等量的 0.67 mol/L 甲醛, 1.3 mol/L 多聚甲醛, 20 mmol/L 戊二醛固定, 三次实验结果显示以 20 mmol/L 戊二醛固定为最佳, GMP-140 分子数为 1264 ± 54 血小板⁻¹, 而以 0.67 mol/L 甲醛或 1.3 mol/L 多聚甲醛处理后, 红细胞经离心后均有不同程度的裂解, 且不易形成团块, 与戊二醛比较, 血小板上 GMP-140 分子数偏高 (1440 ± 210 血小板⁻¹), 因此, 本实验选择戊二醛为固定剂。

放置时间: 全血经 20 mmol/L 戊二醛固定后放置的时间在 24 h 内测定较稳定, 血小板表面 GMP-140 分子数与抽血后即刻测定差别无显著性, 以后随放置时间的延长, GMP-140 表达随之增加, 至固定后 48 h, GMP-140 分子数为 1580 ± 150 血小板⁻¹ ($n=3$), 可见, 尽管标本已固定, 放置的时间对结果有较大的影响, 因此, 本实验标本测定的时间均在取血后当天 (<24 h) 完成。

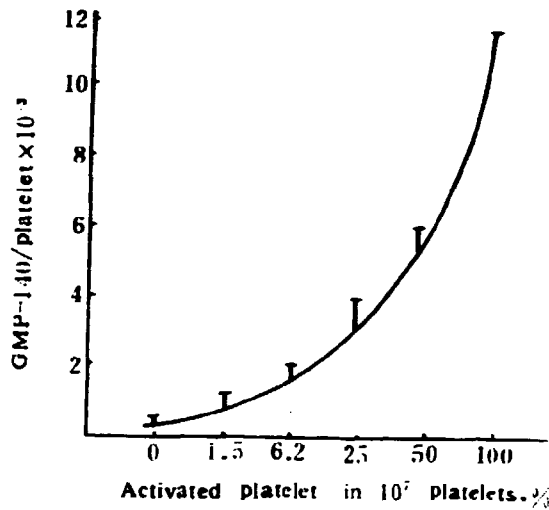


图1 不同比例混合的活化及静止血小板，GMP-140测定的敏感性白线($n=3$)

表1 疾病状态下血小板表面GMP-140分子数及血浆内GMP-140, TXB₂和vWF的浓度($\bar{X} \pm S$)

| | 表面GMP-140 (分子数/血小板) | 血浆GMP-140 (分子数 $\text{mL} \times 10^{-10}$) | TXB ₂ (pg mL^{-1}) | vWF (%) |
|------------------|------------------------|---|---|----------------|
| 急性心肌梗塞($n=11$) | $3470 \pm 1300^{**}$ | $4.68 \pm 1.64^*$ | $370 \pm 220^{**}$ | 127 ± 32 |
| 脑血栓形成($n=5$) | 1619 ± 915 | $4.88 \pm 1.34^*$ | $280 \pm 75^*$ | 110 ± 15 |
| 糖尿病($n=26$) | 1219 ± 716 | $4.76 \pm 2.55^*$ | $170 \pm 165^{**}$ | 120 ± 36 |
| 甲亢($n=4$) | 1240 ± 220 | 4.13 ± 2.41 | $540 \pm 80^{**}$ | 150 ± 56 |
| 哮喘发作($n=14$) | $3261 \pm 1231^{**}$ | $4.86 \pm 1.72^{**}$ | $282 \pm 78^*$ | $173 \pm 61^*$ |
| 肾病综合症($n=5$) | 2773 ± 907 | $4.66 \pm 0.46^{**}$ | $560 \pm 240^*$ | 100 ± 36 |
| 体外循环($n=13$) | $2084 \pm 748^*$ | $3.71 \pm 0.92^*$ | $840 \pm 370^{**}$ | 122 ± 41 |
| 流行性出血热($n=18$) | $2490 \pm 350^{**}$ | $3.41 \pm 0.98^*$ | $355 \pm 130^*$ | 131 ± 28 |

* $p < 0.01$, ** $p < 0.001$

2.4 疾病状态下GMP-140分子数的改变

由表1可见,急性心肌梗塞、支气管哮喘发作、肾病综合症、体外循环及流行性出血热等病人,体内血小板表面GMP-140分子数及血浆内的含量均显著升高,提示体内有较高度度的血小板活化;脑血栓形成、糖尿病等血小板表面GMP-140改变不显著,但血浆内GMP-140含量显著升高,这可能与体内血小板破坏增加有关,至于脑血栓形成患者外周血中血小板活

化不明显,可能与脑血栓比较局限,在外周血中表现不出来,或测定的例数较小有关。

2.5 血小板活化特异指标 GMP-140 与血浆内 TXB₂ 及 vWF 含量的比较

由表 1 可见,血浆内 TXB₂ 含量在各类疾病中均有升高,而 vWF 的含量改变无显著性(除支气管哮喘),急性心肌梗塞患者,血小板表面 GMP-140 及血浆 TXB₂ 的含量已显著增高,但血浆 vWF 的含量改变不明显,至于 AMI 的 GMP-140 分子数变异较大,可能与 AMI 不同的病期有关。甲亢患者 GMP-140 含量改变不显著,血浆 TXB₂ 的升高可能由于其它血细胞或组织细胞代谢旺盛引起。因此,在反映体内血小板活化程度上,表面 GMP-140 分子数的测定有其特异性和敏感性。

3 讨论

本研究利用自制的抗人活化血小板 GMP-140 单抗来测定血小板表面活化标记蛋白 GMP-140 的分子数,鉴于单抗 SZ-51 不与静止的血小板、红细胞、白细胞及血浆蛋白等反应,它是活化血小板特异的,因此,用单抗 SZ-51 来直接测定血小板的活化程度是可靠的,至于在静止血小板上存在少量的结合分子,可能与抽血等操作导致部分血小板的体外激活有关,或由于血小板的异质性,在正常血循环中有部分血小板已经活化有关^[9]。

一般认为,血小板从静止状态转变为具有功能的活化血小板时,其形态、生化代谢要发生改变,随颗粒内容物的释放,颗粒膜蛋白与开放管道系统膜融合而整合至活化血小板质膜内,因此,正常人血浆内 GMP-140 含量是极少的,当血小板活化伪足形成时,一方面伪足可断裂而进入血浆,另一方面血小板活化其变形能力下降,通过微血管时极易破裂,因此,血浆内 GMP-140 含量的改变在一定程度上也反映了血小板在体内的破坏程度。本实验用 GMP-140 的二株单抗 SZ-51 和 S₁₂,通过夹心法来定量测定血浆内 GMP-140 的含量也是可行的。

测定血浆内花生四烯酸的代谢产物 TXB₂ 和 6-酮-PGF_{1α} 的含量改变,可间接判断体内血小板的活化程度^[7],但由于多种组织细胞均有花生四烯酸的代谢,因此,其临床意义就显得含糊。血浆内血小板 α-颗粒内容物 β-TG、PF₁ 含量的测定,能反映体内血小板的活化程度^[10],它们与 GMP-140 表达的关系还有待进一步研究,但其含量一方面与血小板活化释放及体内破坏有关,另一方面受机体代谢与排泄的影响。检测血小板膜糖蛋白组分的改变是一项特异的指标,过去通过分离并洗涤血小板后测定,由于体外操作的人为活化,从而掩盖了体内血小板某些亚群的微小改变。本实验用固定的全血来测定血小板表面 GMP-140 的分子数克服了上述的不足,但受固定全血放置时间的影响,需在固定后 24 h 内完成。利用同位素的敏感性,经放射免疫的手段来直接测定全血中血小板表面 GMP-140 表达的分子数,此法简单,特异性高,有利于基层和科研单位推广应用。

参 考 文 献

- [1] 吴国新,阮长耿. 血小板活化过程中膜蛋白质的变化. 国外医学输血与血液学分册, 1991, 14: 20.
- [2] George JN, et al. Platelet surface glycoproteins. Studies on resting and activated platelets and platelet membrane microparticles in normal subjects, and observations in patients during adult respiratory distress syndrome and cardiac surgery. J Clin Invest. 1986, 78: 340.

- [3] 吴国新等. SZ-51: 抗人活活化小板的单克隆抗体. 中华血液学杂志. 1991. 12: 67-69.
- [4] Wu GX et al. Preparation of a monoclonal antibody .SZ. 51. that recognizes an α -granule membrane protein (GMP-140) on the surface of activated human platelets. *New Rev Fr Hematol.* 1990. 32: 231.
- [5] McEver RP and Martin MN. A monoclonal antibody to a membrane glycoprotein binds only to activated platelets. *J Biol Chem.* 1984. 259: 9799.
- [6] Stenberg PE et al. A platelet α -granule membrane protein(GMP-140) is expressed on the plasma membrane after activation. *J Cell Biol.* 1985. 101: 880.
- [7] 王菊敏等. 125 I-血栓烷 β_2 放射免疫测定. 苏州医学院学报. 1986. 5: 13.
- [8] 莫晓东等. 抗血管性假血友病因子单克隆抗体 ELISA 的建立及其临床应用. 中华医学检验杂志. 1988. 11: 272.
- [9] Nieuwenhuis HK et al. Studies with a monoclonal antibody against activated platelets: Evidence that a secreted 53 000-molecule weight lysosome-like granule protein is exposed on the surface of activated platelet in the circulation. *Blood.* 1987. 70: 838.
- [10] 张启良等. 酶联免疫吸附法测定血浆 V-TG 和 PF 在临床的应用. 中华血液学杂志. 1990. 11: 172.

血小板表面及血浆内活化标记
蛋白 GMP-140 的放射免疫测定

原子能出版社出版

(北京 2108 信箱)

原子能出版社激光照排中心排版

北京市海淀区三环快速印刷厂印刷

新华书店总店科技发行所发行·新华书店经售

☆

开本 787×1092 1/16·印张 1·字数 7千字

1991年8月北京第一版·1991年8月北京第一次印刷

ISBN 7-5022-0526-8

II·245

CHINA NUCLEAR SCIENCE & TECHNOLOGY REPORT

ISBN 7 5022 0526 8
TL • 289

P.O.Box 2103
Beijing, China

China Nuclear Information Centre