

CNIC-01179

SMC-0136

蛋白 C 系统的放射免疫分析

金 坚 阮长耿

(苏州医学院血栓与止血研究室, 苏州)

张满达

(核医学国家重点实验室, 无锡)

摘 要

蛋白 C 系统是机体重要的凝血反应调节系统, 该文组合生化和免疫化学技术分别从人尿中提纯了血栓调节素和从利凡诺去白蛋白人血浆中纯化了蛋白 C、蛋白 S 和蛋白 C 抑制物。免疫家兔产生抗血清。用氯胺 T 法制备了¹²⁵I-蛋白 C 和¹²⁵I-蛋白 S, Iodogen 法制备了¹²⁵I-蛋白 C 抑制物, Bolton-Hunter 法制备了¹²⁵I-血栓调节素。采用平衡法分别建立了上述四种化合物的放射免疫分析。蛋白 C、蛋白 S、蛋白 C 抑制物和血栓调节素的分析灵敏度分别为 3.94 μg/L、9.87 μg/L、2.58 μg/L 和 6.16 μg/L; 批内和批间 CV 为 4.40% 和 9.68%、4.99% 和 13.14%、2.73% 和 8.62%、5.10% 和 10.94%; 平均回收率为 104.28%、94.30%、101.89% 和 105.22%; 工作范围为 6.25~1024 μg/L、21~700 μg/L、4.8~1024 μg/L 和 8.1~560 μg/L。四种方法与其检测的相似化合物均无交叉。初步应用效果满意, 该方法可为血栓栓塞性疾病的诊疗提供有效手段。

Radioimmunoassay of Protein C System

(In Chinese)

JIN Jian RUAN Changgeng

(Thrombosis and Hemostasis Research Unit, Suzhou Medical College, Suzhou)

ZHANG Manda

(State Key Laboratory of Nuclear Medicine, Wuxi)

ABSTRACT

Protein C system is an anticoagulation pathway which consists of protein C (PC), protein S (PS), thrombomodulin (TM) and protein C inhibitor (PCI). Using the McAb SZ-57, we have established SZ-57-sepharose CL-6B affinity chromatography to purify human urinary TM. A procedure for isolation and purification of PC, PS and PCI from albumin-free human plasma by rivanol precipitation was also established. The isolation steps include adsorption onto and elution from harium, PEG precipitation, ion-exchange chromatography and preparative isoelectric focusing and so on. The molecular weight, isoelectric points, amino acid contents and the functional activity of these proteins were consistent with other previous reports. Four radioimmunoassays (RIAs) of PC, PS, TM and PCI were established using the equilibrium method. ^{125}I -PC and ^{125}I -PS were prepared using the chloramine-T method. ^{125}I -PCI was prepared by iodogen method and ^{125}I -TM by Bolton-Hunter method. Their sensitivities were 3.94 $\mu\text{g/L}$, 9.87 $\mu\text{g/L}$, 6.16 $\mu\text{g/L}$ and 2.58 $\mu\text{g/L}$, respectively. The recovery rates were 104.28%, 94.30%, 105.22% and 101.89%. Some antiserum provided a linear reponse from 6.25 to 1024 $\mu\text{g/L}$ for PC, 21 to 700 $\mu\text{g/L}$ for PS, 8.1 to 560 $\mu\text{g/L}$ for TM and 4.8 to 1024 $\mu\text{g/L}$ for PCI. The intra- and inter-assay CV were 4.4% and 9.68% for PC RIA, respectively, 4.99% and 13.14% for PS RIA, 5.10% and 10.94% for TM RIA, 2.73% and 8.62% for PCI RIA. The cross reactivity with factor II, thrombin, and antithrombin III was negligible. These methods can be used as effective tools especially for diagnosis of thrombosis and basic or clinical studies of protein C system.

前 言

蛋白 C 系统是由蛋白 C (Protein C, PC)、蛋白 S (Protein S, PS)、血栓调节素 (Thrombomodulin, TM) 和蛋白 C 抑制物 (Protein C Inhibitor, PCI) 所组成。自 1976 年 Stenflo 以纯化的 PC 证明了 Mammen 60 年代推测的凝血酶具有抗凝活性以来, 先后阐明了 PS, TM 和 PCI 在系统中的作用, 建立了 PC 系统的抗凝血反应体系, 使之成为血凝调节三大系统之一^[1]。

PC 由重链 (41 KD) 和轻链 (21 KD) 组成, 二条多肽链之间由单二硫键连接。PC 必须转变成具有丝氨酸蛋白酶活性的形式, 即活化的 PC (Activated Protein C, APC), 才能发挥抗凝活性。凝血酶是 PC 唯一的生理性活化剂, 它与 TM 结构中第 5, 6 个 EGF 重复区域可逆结合成 1:1 的复合物, 引起凝血酶的分子构象和反应特异性改变, 阻碍了凝血酶自身催化的凝血反应, 将别是对纤维蛋白形成, 因子 V 活化和血小板活化可因复合物形成而受到抑制。这种复合物可与 PC 结合, 并加速 PC 重链 NH₂ 端 Arg12-Leu13 位裂解, 释放 12 肽残基, 转化成 APC。后者与凝血酶-TM 复合物的亲和性小于 PC, 推测 APC 在膜磷脂表面的自由度较大, 主要通过对磷脂高亲和的 PS 来稳定结构, 并且发挥生理功能。有报道发现 APC 含多个 Arg 和 Lys 残基组成的亲水超分子基团, 位于 TM 和 PS 相互反应的活性裂隙附近, 说明 PS 和 TM 均有 APC 作用的辅因子功能。最近的研究认为, 因子 V 与 PS 有互为增强 APC 功能表达的作用^[2]。APC 可顺序切割灭活因子 V_A 和因子 VIII_A, 阻止凝血酶原酶集中, 并促进体内纤维蛋白溶解而发挥抗凝作用。由肝脏合成和分泌的 PC 和 PS 作为维生素 K 依赖性蛋白的功能表达要求带阴性电荷的磷脂存在, 这些磷脂既是 PC 活化所需的, 又是凝血蛋白反应的场所。APC 至少可被 6 种结构 P₁ 区域含 Arg 的 Serpins 成员所抑制, PCI 抑制 APC 的二级速度常数达 $1.3 \times 10^4 \text{ m}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$, 是体内主要的 APC 抑制物^[3]。PCI 反应环由 Phe353-Arg354-Ser355 组成, 与 APC 形成复合物, 而肝素样物质可结合于 PCI H 螺旋部位, 组成三元复合物, 促进 PCI 灭活 APC 的作用。

蛋白 C 系统各成员的搭配非常精细, 稍不平衡就会导致疾病的发生。目前, 对 PC 系统的研究非常活跃, 但因缺少 PC 系统纯品供应, 国内尚难开展这方面的工作。本文建立了从国内血站废弃血浆中纯化 PC 系统成分, 并进行定量分析的方法。

1 材料与方 法

1.1 主要试剂及材料

利凡诺 (Rivanol) 去白蛋白人血浆由苏州市中心血站提供。浓缩 200 倍的人尿由珠海丽珠公司上海分公司提供。正常人和重症肝病伴发凝血障碍患者血浆, 由苏州医学院第一医院、无锡市传染病医院和江苏省江原医院提供。

苯甲脒, 东京化成产品。十二烷基硫酸钠 (SDS), Serve 产品。大豆胰蛋白酶抑制剂 (STI)、苯甲烷磺酰氟化物 (PMSF) 和氯胺-T, Merck 产品。1, 3, 4, 6-四氧-3 α , 6 α -二苯甘脲 (Iodogen), Aldrich 产品。水蛭素、3-(4-羟苯基) 丙酸-N-琥珀酰亚胺 (HPNS)、因子 I、牛血清白蛋白第 V 部分 (BSA-V)、Aprotinin、福氏完全和不完全佐剂, Sigma 产品。 β -巯基乙醇和考马斯亮蓝 R250, Fluka 产品。DE₃, Sephadex G-25, Sephadex G-50, Sephadex G-100, QAE-Sephadex A-50, DEAE-Sephadex CL-6B, 蛋白 A-Sepharose CL-6B,

肝素-Sepharose CL-6B, Blue-Sepharose CL-6B, Sepharose CL-6B, Ampholine, TEMED, 过硫酸铵, 丙烯酰胺, 甲叉双丙烯酰胺, 转移电泳用硝酸纤维素膜和电泳标准等电点蛋白均为 Pharmacia 产品。色谱标准分子量蛋白, Bio-Rad 产品。抗 BALB/c 小鼠 IgG 酶标抗体, Immunotech 产品。抗兔 IgG 酶标抗体, 上海华美生物公司产品。抗 IgG 亚型血清, 卫生部上海生物制品所产品。BSA、S2366 和电泳标准分子量蛋白, 中科院上海东风试剂厂产品。白陶土部分凝血活酶时间测定 (APTT) 试剂盒, 上海通用医用仪器公司产品。SZ-57 单克隆抗体和红细胞生成素、凝血酶和抗凝血酶-Ⅲ 为本室制备^{11,15}。Na¹²⁵I, 中国原子能研究院产品。其余试剂均为国产分析纯。

1.2 钡盐吸附

20 L 利凡诺去白蛋白人血浆加入终浓度分别为 5×10^4 u/L STI, 0.1 mmol/L PMSF 和 5 mmol/L 苯甲脒等蛋白酶抑制剂, 冷却至 4 °C, 边搅拌边滴加 1 mol/L BaCl₂ 溶液至终浓度为 74 mmol/L。6 000 g 连续角转头离心 2 h, 分别取上清和沉淀 (JCFZ, J₂-HS, Backman)。

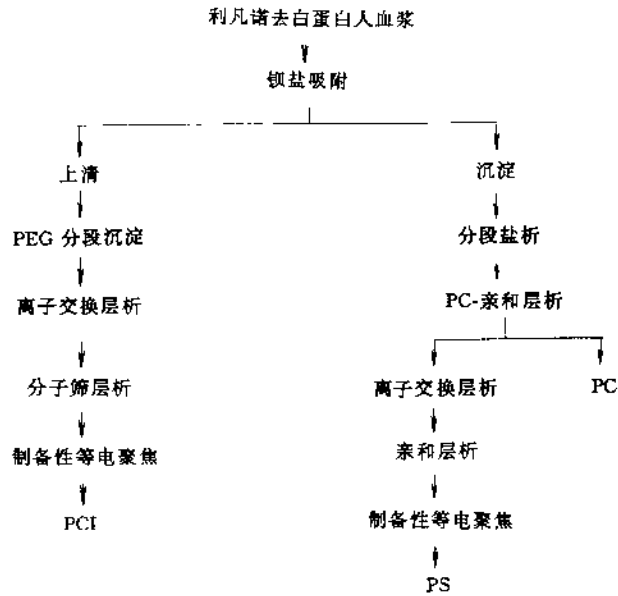


图1 PC、PS和PCI联合纯化工艺设计示意图

1.3 PC的纯化

(1) PC IgG 亲和层析柱制备: 采用从新鲜人血浆中经钡盐吸附沉淀、(NH₄)₂SO₄ 分步盐析、DEAE-Sephadex A-50 层析、制备性 PAGE 和肝素-Sepharose CL-6B 亲和层析分离的 PC, 免疫家兔产生抗血清, 蛋白 A-Sepharose CL-6B 分离 IgG。用 CNBr 活化法制备活化的 Sepharose CL-6B, 与 PC IgG 偶联, 装柱, 封闭残留连接点并平衡。

(2) BaCl₂ 处理过的血浆沉淀物, 用生理盐水洗涤两次, 溶解于含 0.1 mmol/L PMSF 和 0.1 mol/L EDTA Na₂ 的 25% 饱和度 (NH₄)₂SO₄ 中, 搅拌 20 min, 静置 1 h, 10 000 g 离心 1 h (20 PR-50D, HITACHI)。上清加入 (NH₄)₂SO₄ 至饱和度 65%, 静置 3 h, 10 000 g 离心 1 h。沉淀溶于含 5×10^4 u/L STI, 0.1 mmol/L PMSF 的 50 mmol/L PBS pH=7.0,

并对相同缓冲液透析平衡。上样于 PC IgG-Sepharose CL-6B 亲和层析柱, 进行含 25 mmol/L CaCl_2 的平衡溶液洗脱 (Econo, Bio-Rad)。合并经 SDS-PAGE 和 APTT 证实含 PC 的组分, 对平衡缓冲液透析后, 冷冻干燥, $-30\text{ }^\circ\text{C}$ 保存 (Labconco, Fisher)。

1.4 PS 的纯化

收集不吸附的 PC IgG-Sepharose CL-6B 亲和层析柱的流过液, 上阴离子交换 Q2 柱 (751-0001 Q2, Bio-Rad), 进行 $0\sim 0.8\text{ mol/L}$ NaCl 线性洗脱 (Bio-Scale, Bio-Rad)。收集 SDS-PAGE 证实含 82~84 KD 组分, 对含 0.1 mol/L NaCl, 0.5 mmol/L EDTANa_2 , 0.1 mmol/L PMSF 的 50 mmol/L Tris-HCl ($\text{pH}=7.5$) 透析平衡, 上 Blue-Sepharose CL-6B 柱, 收集穿过峰, 对含 0.1 mmol/L PMSF 溶液透析平衡。进行制备性液体滚动式等电聚焦, Ampholine $\text{pH}=4.0\sim 6.0$, 恒功率 12 W 电泳 5 h (Rotofor™, Bio-Rad)。回收 pI 为 $5.0\sim 5.5$ 组分, 对含 0.1 mmol/L PMSF, 0.15 mol/L NaCl 的 50 mmol/L Tris-HCl ($\text{pH}=7.0$) 透析平衡, 冷冻干燥, $-30\text{ }^\circ\text{C}$ 保存。

1.5 PCI 的纯化

10 L BaCl_2 处理过的血浆上清, 加入 60 g/L PEG 6 000, 搅拌 1 h , 连续角转头 10 000 g 离心 2 h 。上清再添加 60 g/L PEG 6 000, 10 000 g 离心 1 h , 收集沉淀 (JA-10, J_2 -HS, Backman)。沉淀用含 $3\times 10^5\text{ u/L}$ STI, 10^5 u/L Aprotinin 和 0.1 mmol/L PMSF 的 50 mmol/L Tris-HCl ($\text{pH}=7.5$) 溶解, 上经相同缓冲液平衡过的 DEAE-Sepharose CL-6B 柱, 收集不吸附组分。进行 75% 饱和 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 盐析, 沉淀复溶于含上述蛋白水解酶抑制剂的水溶液, 上 Sephadex G-100 分子筛层析, 收集经 SDS-PAGE 证实含 PCI 的组分。进行制备性液体滚动式等电聚焦, Ampholine $\text{pH}=6.5\sim 9.0$, 收集 pI 为 $7.9\sim 8.1$ 组分。对含 10^4 u/L Aprotinin, 0.1 mol/L PMSF 的 50 mmol/L Tris-HCl ($\text{pH}=7.0$) 进行透析平衡后, $-30\text{ }^\circ\text{C}$ 保存。

1.6 TM 的纯化

(1) 30 ml 去纤维蛋白原 SZ-57 BABL/c 小鼠腹水, 经 35% 饱和 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 盐析及脱盐透析平衡后, 进行制备性液体滚动式等电聚焦, Ampholine $\text{pH}=3.50\sim 10.00$ 。收集经 IgG 亚型血清免疫双扩散和 SDS-PAGE 证实含免疫球蛋白部分, 对含 0.15 mol/L NaCl 的 0.1 mol/L NaHCO_3 ($\text{pH}=8.5$) 进行透析平衡, 与 CNBr 活化的 Sepharose CL-6B 偶联制备亲和层析柱。

(2) 10 kg 浓缩尿加入终浓度分别为 5 mmol/L 苯甲脒、 1 mmol/L PMSF 和 0.025% 石炭酸等蛋白酶和细菌抑制剂, 用 4 mol/L NaOH 调 pH 值至 7.40 , 加 100 g 经含 0.15 mol/L NaCl, 0.5% Triton X-100 的 20 mmol/L Tris-HCl ($\text{pH}=7.4$) 处理过的 QAE-Sephadex A-50, $4\text{ }^\circ\text{C}$, 搅拌过夜, 置于内衬绸布的布氏漏斗中过滤。凝胶经含 5 mmol/L 苯甲脒、 1 mmol/L PMSF 的上述缓冲液洗涤数次后, 用含 1 mol/L NaCl 的缓冲液洗脱。收集洗脱液, 以截留分子量 20 KD 的膜超滤浓缩 20 倍后 (Amico I, Hangton), 加热至 $70\text{ }^\circ\text{C}$, 保持 10 min , 10 000 g 离心 1 h 。上清对含上述蛋白酶抑制剂和 0.5% Triton X-100 的 50 mmol/L PB ($\text{pH}=7.0$) 透析平衡, 上经该缓冲液平衡的 SZ-57 IgG₁-Sepharose CL-6B 柱, 洗脱液为 0.1 mol/L 甘氨酸 ($\text{pH}=3.0$)。收集蛋白峰, 对含 0.1% Triton X-100 的 50 mmol/L PBS $\text{pH}=7.4$ 透析后, 分装, 冷冻干燥, $-30\text{ }^\circ\text{C}$ 保存。

1.7 PC 系统抗血清制备与鉴定

(1) 每只新西兰雄性家兔 (约 2.5 kg), 每次注射 100 μg 抗原 (PC 或 PS 或 PCI 或 TM), 间隔两周。基础免疫加福氏完全佐剂, 背部皮肉多点, 肩胛部和臀部肌肉注射; 加强免疫 5~7 次, 加不完全佐剂。7 d 后颈动脉放血, 分离血清, 冷冻干燥, $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存。

(2) 抗血清滴度用免疫双扩散测定。Scatchard 作图法计算亲和常数。特异性鉴定采用标准曲线抑制比较法。抗血清工作浓度分析采用抗血清稀释曲线法。

1.8 示踪化合物的制备

(1) ^{125}I -PC, ^{125}I -PS 采用氯胺-T 法制备。 ^{125}I -PCI 用 Iodogen 法制备。采用 Bolton-Hunter 法制备 ^{125}I -TM [6]。将溶解于苯和无水吡啶混合液的 0.2 μg HPNS 涂布尖底玻璃试管, 氮气吹干。依次快速加入 37 MBq Na ^{125}I , 5 μg 氯胺-T 反应 10 s, 用 120 μg $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ 中止反应, KI 示踪反应进程。以含 2 μl DMF 的 250 μl 苯萃取 ^{125}I -HPNS, 重复一次, 用氮气吹干。加入溶于 0.1 mol/L 硼酸-硼砂 (pH=8.5) 的 5 μg TM, $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ 搅拌反应 15 min 后, 加 3 mg Gly 与未反应完全的 ^{125}I -HPNS 作用 5 min。

(2) ^{125}I -PC, ^{125}I -PS 和 ^{125}I -PCI 经 Sephadex G-50 分离, ^{125}I -TM 经 Sephadex G-25 分离, 第一洗脱峰各管用给定稀释比例的兔抗相应抗原抗血清测定免疫活性, 选择结合率高, 非特异结合低的洗脱峰管用于 RIA。 ^{125}I -HPNS 的碘化产率由两相放射性强度比例而得, 放化纯用硅胶薄层层析分析, 展开剂为乙酸乙酯与甲苯的体积比为 1:1。

1.9 RIA

(1) PC 和 PCI 的反应缓冲液为含 0.2% BSA 的 10 mmol/L PBS pH=7.4; PS 为含 0.2% Tween-20 的上述缓冲液; TM 为含 2.5 mmol/L CaCl_2 , 0.15 mol/L NaCl 和 0.2% BSA 的 50 mmol/L Tris-HCL pH=7.4。

(2) PC 和 PCI 的血浆分别用反应缓冲液稀释成 1:50, 1:100 后用于 RIA。PS 血浆样品与 7.5% PEG6000 等体积混匀, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保持 30 min, 10 000 g 离心 15 min, 上清和沉淀分别用反应缓冲液稀释成 1:50 为游离 PS (FPS) 和结合 PS (BPS) 样品用于 RIA。

(3) 在 RIA 反应试管中, 依次加入 100 μl 参考标准 (或稀释的血浆样品)、100 μl 工作浓度抗血清, 100 μl (约 240 Bq) 示踪化合物, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保温 24 h, 再加入 500 μl 1:50 稀释的正常兔血清和 100 μl 1:50 稀释的羊抗兔第二抗体, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保温 2 h。抗体结合的示踪化合物用 γ 计数器测量 (C5002, Parkard)。

1.10 PC 系统的理化鉴定

蛋白纯度鉴定用毛细管区带电泳法, 其中 TM 分析电极液为 0.1 mol/L PB, pH=6.0, 电泳走向 $\rightarrow +$ (Bio-Focus 3000, Bio-Rad) [7]; 分子量测定采用 SDS-PAGE 和分子筛 HPLC 法, 电泳标准蛋白分子量范围为 17.5~96 KD (Mini Protein I, Bio-Rad), 色谱分子参考标准范围 1.35~670 KD (125-0477 Bio-SilSEC-400, Bio-Rad) [8]; pI 测定用薄层等电聚焦法, 标准蛋白 pI 为 2.40~5.65, 3.0~9.5 (Electrophor 2117- I, Pharmacia); 蛋白含量分析用 Lowry 法, 以 BSA-V 作标准 (Lambda 2S, Perkin Elmer)。氨基酸组分分析采用酸消化后 HPLC 分析法 (HPLC 8350, HITACHI) [9]。

1.11 PC 系统的生物学鉴定

PC 系统的抗凝血活性分析采用 APTT 试验法, 按产品说明书操作; 免疫学分析用转移电泳法和 ELISA 法; 采用 Jakubowski 的 PC 辅因子活性抗凝试验分析 TM 的活性, 取 10 μl TM 液与 0.2 u 凝血酶、10 μg PC 混合, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存 30 min, 以 100 u 水蛭素终止反应, 再

加入 200 μg S2366, 37 $^{\circ}\text{C}$ 保存 30 min, 测 A410 nm (DU-650, Beckman) ^[10]。

1.12 数据处理

PC 系统 RIA 采用四参数 Logistic 数据处理程序进行处理。

2 结果

2.1 PC 系统的理化和生物学鉴定

(1) PC IgG-Sepharose CL-6B 柱参数偶联率为 59.93%, 亲和层析得 21.52 mg PC (见图 2), 纯化倍数为 277 倍, APTT 证实可延长凝血时间, 有关生化参数见表 1 ^[11]。

(2) 制备 PS 的主要污染物是 PC, C_{1b}P 和因子 I。Q₂ 阴离子交换层析可将 PS 与 C_{1b}P 分开; 回收 pH=5.0~5.5 片段, 可有效地剔除因子 I。所得 PS 20.15 mg, 纯化倍数为 537 倍, 有关生化参数与文献报道相符 ^[12]。

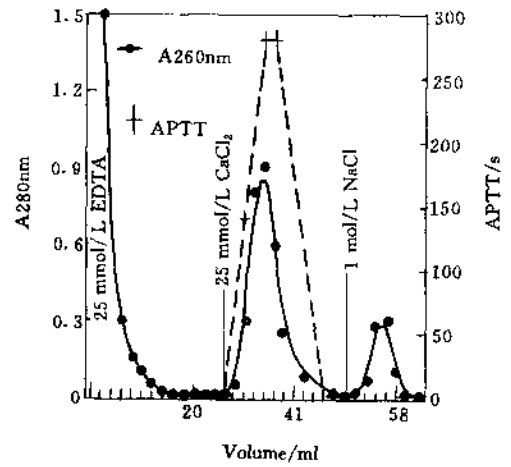


Fig. 2 Immunopurification of protein C from the human plasma absorbed by barium salt (Econo, Bio-Rad) (The activity of protein C was measured by APTT.)

表 1 PC, PS, PCI 和 TM 生化参数分析

种类	分子量 KD	等电点	高含量 氨基酸	制备产率 %
PC	62	4.69	Glu, Asp, Leu	28.3
PS	83	5.20	Asp, Glu, Leu	12.6
PCI	56	8.03	Glu, Leu, Asp	10.5
TM	60	3.70	Glu, Ala, Gly	25

(3) 经钡盐处理过的废血浆含纤维蛋白原、蛋白水解酶和可灭活 PCI 的激肽释放酶等, 添加 PMSF, STI 和 Aprotinin 于每个步骤可有效抑制之, 并能提高产率。DEAE-Sepharose CL-6B 可去除大排阻半径自由卷曲结构的 PEG6000、因子 V 和痕量 PC 的污染。Sephadex G-100 层析既有一定的纯化作用, 又为后续的制备性 IEF 创造条件。所得 PCI 4.2 mg, 纯化倍数为 2 589 倍, 有关生化参数与文献报道相符 (见图 3) ^[13]。

(4) 尿中 TM 含量低, 浓缩尿为起始原料是必要的。TM 富含二硫键, 对胃蛋白酶和巯基乙醇敏感, 添加蛋白酶抑制剂和抑菌剂是有益的。选用 QAE-Sephadex A-50, 并添加适量 Triton X-100 防止 TM 聚合体产生, 效果较为满意。SZ-57 IgG₁-Sepharose CL 6B 柱参数偶联率

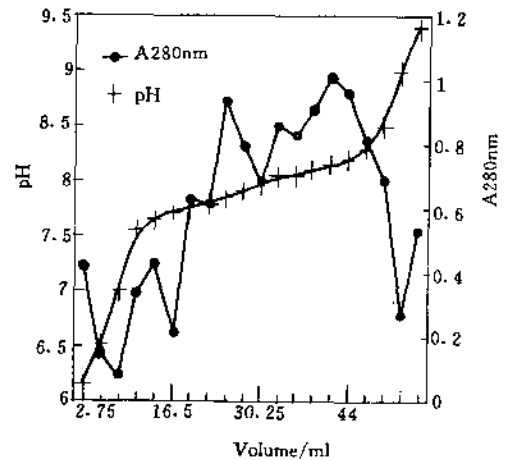


Fig. 3 Preparative electrofocusing of protein C inhibitor (RotoforTM, Bio-Rad) from Sephadex G-100

为 66.02%，亲和层析得 9.924 mg TM，纯化倍数为 104 485 倍（见图 4）。因考马斯亮蓝等蛋白染料对 TM 不敏感，故分子量用 Western-blot 测量。活性分析证明 TM 可辅助激活 PC，有关生化参数与文献报道相符^[4]。所有 PC 系统成员在毛细管区带电泳呈单一色谱峰，说明所得产品高度均一。

2.2 兔抗 PC 系统血清的鉴定

交叉反应分析 PC 选用 PS、因子 I、凝血酶和抗凝血酶 III 为交叉反应物；PS 选用 PC、因子 I、凝血酶和抗凝血酶 III；PCI 选用抗凝血酶 III、 α -胰蛋白酶、凝血酶和 PC；TM 选用凝血酶，PC，PS，PCI，抗凝血酶 III 和红细胞生成素。有关参数见表 2。

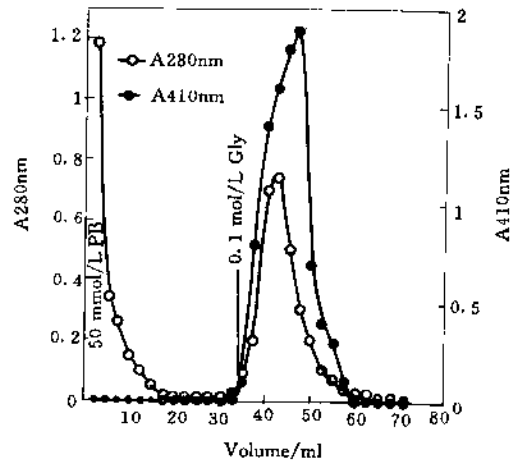


Fig. 4 Immunopurification of human urine thrombomodulin with SZ-57-Sepharose CL-6B

表 2 抗血清质量参数评价

抗血清	滴度	特异反应物	亲和常数 (K_d) L/mol	工作浓度	交叉反应率
PC	1:32	PC	4.35×10^5	$1:2 \times 10^4$	因子 I 0.42%
PS	1:32	PS	3.20×10^5	$1:2.5 \times 10^4$	因子 I 0.11%
PCI	1:32	PCI	1.44×10^6	$1:4 \times 10^5$	AT-III 0.93%
TM	1:16	TM	6.68×10^8	$1:3 \times 10^4$	—

2.3 标记化合物的理化和免疫学分析

所有¹²⁵I 标记化合物经标准曲线比较和稀释曲线比较，免疫反应性基本无损失。放置 3~4 周后，最高结合管和非特异结合管无明显改变，说明这些化合物稳定性好。有关理化参数见表 3。

表 3 标记化合物的质量参数评价

¹²⁵ I 化合物	¹²⁵ I 利用率/%	标记率/%	放化纯/%	比放射性/mCi·mg ⁻¹
PC	20.16	59.59	96.26	72
PS	17.46	55.97	92.20	70
PCI	29.20	81.11	99.86	41
TM	16.48	29.43	77.40	46

2.4 RIA 方法学考核

经四参数 Logistic 数据处理程序处理后的 PC 系统 RIA 标准曲线示于图 5~8。曲线拟合方程为 $Y = \frac{a-d}{1 + (\frac{X}{c})^b} + d$ ，标准曲线拟合参数见表 4，效点参数见表 5，方法学质量参数

见表 6。

表 4 PC 系统 RIA 拟合参数评价

RIA	<i>a</i>	<i>b</i>	<i>c</i>	<i>d</i>	<i>R</i>
PC	34.93	0.57	724.5	4763.5	0.9982
PS	132.63	1.24	317.5	4846.75	0.9962
TM	1.74	0.69	689	17795	0.9990
PCI	14.27	0.82	760	9731.5	0.9954

表 5 PC 系统 RIA 效点评价/ $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$

RIA	ED_{25}	ED_{50}	ED_{75}
PC	538.09	79.72	17.48
PS	297.08	120.68	45.68
TM	45.75	12.58	5.72
PCI	73.8	19.34	6.03

表 6 方法学质量参数评价

RIA	工作范围 $\mu\text{g}/\text{L}$	灵敏度 $\mu\text{g}/\text{L}$	CV%		回收率 %
			批内	批间	
PC	6.25~1024	3.94	4.40	9.68	104.28
PS	21~700	9.87	4.99	13.14	94.30
PCT	4.8~1024	2.58	2.73	8.62	101.89
TM	8.1~560	6.16	5.10	10.94	105.22

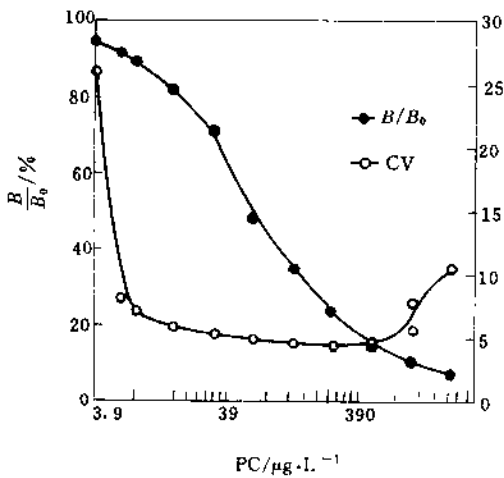


Fig. 5 The standard curve and PDP of protein C

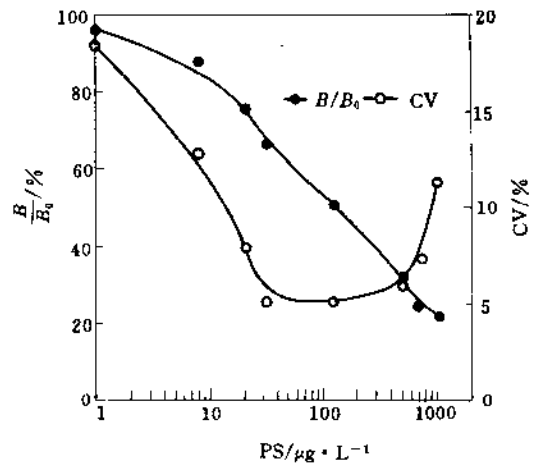


Fig. 6 The standard curve and PDP of protein S

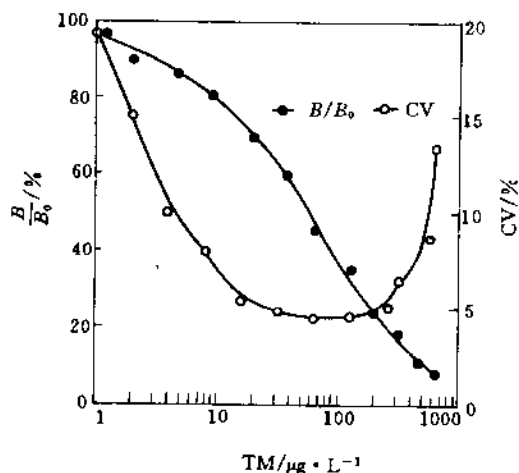


Fig. 7 The standard curve and PDP of thrombomodulin

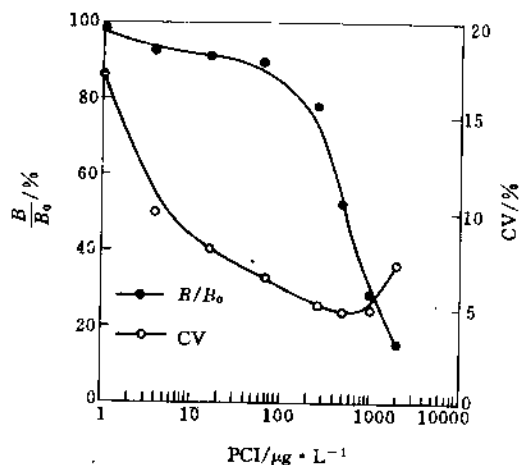


Fig. 8 The standard curve and PDP of protein C inhibitor

2.5 PC 系统 RIA 的初步应用

(1) PC RIA: 测定 36 例正常人 (男性 20 例、女性 16 例) 血浆 PC 含量为 3.84 ± 0.34 mg/L ($\bar{X} \pm 2s$), 与文献报道相似^[15]。16 例重症肝病伴发凝血障碍患者血浆 PC 含量为 1.03 ± 0.41 mg/L ($\bar{X} \pm 2s$)。

(2) PS RIA: 测定 40 例正常人血浆 FPS 含量为 9.19 ± 3.62 mg/L ($\bar{X} \pm 2s$), BPS 为 11.74 ± 5.98 mg/L ($\bar{X} \pm 2s$)。已知 $C_{4b}P$ 结合 PS 的平衡常数为 0.9×10^{-8} mol/L, 每分子 $C_{4b}P$ 可结合 1.7 ± 0.3 分子 PS, 则血浆总 PS (TPS) 为 29.15 mg/L ($FPS + 1.7 \times BPS$), 范围为 $15.36 \sim 40.93$ mg/L, 与文献报道相近^[16]。

(3) PCI RIA: 测定 40 例正常人血浆 PCI 含量为 4.69 ± 1.8 mg/L ($\bar{X} \pm 2s$), 与文献报道相近^[17]。

(4) TM RIA: 测定 40 例正常人血浆 TM 含量为 58.3 ± 10.4 mg/L ($\bar{X} \pm 2s$), 与文献报道相近^[18]。

3 讨论

本文所建的 PC 系统 RIA 适用于测量血浆相应成分的含量, 其中 TM RIA 还可用于尿中 TM 的检测。在所有的方法学考核中, 我们曾将血浆样品经多次稀释后用于方法学测定, 换算后的结果非常接近。用这些系列稀释血浆代替相应的参考标准作标准曲线, 经 Logit 转换成线性, 其斜率与各自的标准曲线斜率基本一致, 表明本文方法有良好的健全性, 血浆基质对方法学没有明显影响。所有方法测量 12 管, 重复 6 组参考标准点的平均批变异系数均小于 6.0, 批内和批间重复性研究亦证明本文方法学是可靠的。

制备维生素 K 依赖蛋白和 PCI 的最佳材料是新鲜人血浆。国外均是选取乙醇沉淀法第 I, II 和 III 部分上清, 我们发现这种方法只适于维生素 K 依赖蛋白。因 PCI 含有与硫化的

功能团相对应的结构区域,纯化步骤不宜激烈,尤其不宜采用化学去污剂及变性试剂。乙醇冷沉淀原料中,PCI的肝素辅因子活性损失,蛋白降解产物污染严重。国内血站普遍采用利凡诺沉淀法制备白蛋白,本文以利凡诺去白蛋白人血浆为原料成分相应复杂。利用维生素K依赖蛋白均含高比例 γ -羧基Glu并可结合二价阳离子的特性,以钡盐吸附物和上清作为制备PC,PS和PCI的前体是可行的。在PC纯化中,采用特异、高亲和力的免疫亲和层析技术,得率高,产品纯度好,简便,并可进一步避免纯化中 β -PC的产生^[11]。因基本上无PC的干扰,后续的PS纯化设计可着重于产率提高。

PCI不含 γ -羧基Glu,大量采用低吸热试剂PEG的优点是适于工艺建立。许多作者选用肝素或硫酸葡聚糖亲和层析为制备PCI的终末步骤,优点是浓缩倍数高,稳定性好,但常受抗凝血酶Ⅲ的污染,液体制备性IEF可解决该难题。PCI在冷冻干燥保存时,因有大量二聚体形成,可明显降低活性和溶解度,中性条件及液体 -30°C 保存稳定性好^[13]。

以往从胎盘和肺组织中制备TM均采用匀浆抽提法,其中中性盐的选择颇为讲究, Na^+ 或 K^+ 过量效果欠佳。血浆和尿中TM含亲水的 NH_2 端区域,保持着与凝血酶结合和辅助激活PC的活性,提示它们有作为TM原料的价值^[14]。采用离子交换技术作为分离TM的前道工序已为许多学者所接受。因尿中成分复杂,这种技术的应用需慎重选择。有作者选用DEAE-Sepharose,据我们的经验,难以达到满意的产率。可能的原因是填料对环境离子强度要求高所致。许多工作注重TM与凝血酶的亲和关系,进一步研究发现TM与 β 和 γ -凝血酶亲和力很低,与 α -凝血酶和DFP修饰的 α -凝血酶的结合解离常数分别为0.48 nm和0.56 nm。我们的研究结果提示,由后者建立的亲和层析分离TM产率均在20%以内,且产品纯度低。原因可能有两点:(1)商品化凝血酶是其同工酶的混合物, α -凝血酶所占比例是柱载容量的限制性因素;(2)凝血酶的Try,Arg和Tyr残基是与TM可逆性结合必需的,建立亲和固相相比的CNBr活化联接过程需含末缩 NH_2 的氨基酸残基参与,导致凝血酶中大量Arg残基化学修饰而降低与TM的亲和力。本文采用SZ-57 IgG₁-Sepharose CL-6B系统避免了上述问题,产率高。

在标记化合物的研究中,因尿TM是内皮细胞表面TM经血浆弹性蛋白酶水解的片段,缺少跨膜区域羧基端29个氨基酸,常用的氧化标记方法难以得到完整保留免疫反应性的TM,且产率极低。选用间接联接标记法,效果较为满意。PS有结合和解离两种形式,与 C_{66}P 结合部分是没有辅助APC抗凝活性的,以往的分析方法只能对两种形式之一进行单一定量。PS- C_{66}P 复合物的形成可遮掩一些抗体识别位点干扰测量。有学者建议用低浓度PEG6000溶液高倍稀释样品可使PS从 C_{66}P 上游离出来。我们认为这种方法可明显升高非特异结合,增加分析的不精密性和降低高限测量范围。本文建立的PS RIA在样品处理上采用低浓度PEG6000剔除BPS,并经有限稀释降低PEG6000对非特异结合的干扰。许多学者在计算TPS时,采用FPS加BPS或将FPS乘以一个操作误差因子后加PBS的方法,我们认为这些方法不太合理。 C_{66}P 与PS和 C_{66} 结合部位不同,无竞争结合关系。根据质量作用定律的平衡常数方程,参考 C_{66}P 可结合PS的摩尔数计算TPS。

遗传性PC/PS缺乏症表现为无明显诱因反复出现血栓形成,口服抗凝剂治疗更易出现皮肤坏死,故其诊疗非常慎重。纯合子型遗传性PC/PS缺乏症临床表现更为严重,一般在婴儿时就有内脏静脉广泛性出血倾向,多在早期死亡。PC/PS置换法是目前较为肯定的治疗方法,血浆PC/PS定量是确定治疗方式的基础。先天性PCI缺乏的病人可出现严重出血。

TM不但参与活化PC系统,又可直接灭活凝血酶,它在微循环中的高浓度表现被认为是灭活凝血酶的主要成分。因它具有成为新一代抗凝血药物的价值,建立适于应用的定量方法是很有意义的。本文测定的重症肝病伴发凝血障碍患者血浆PC含量较正常人明显降低,证实了肝脏疾病可导致体内PC缺乏。

正常人血浆PC,PS,TM和PCI的含量,由于报道的方法各异,故范围较宽^[19,20]。与其它凝血因子不同,上述成分的稍微缺乏便会伴随临床上血栓形成或严重出血,因此,临床检验对它们测定的精密度要求较高,方法学较大的分析变异可能会影响临床诊断。本文建立的方法中PS和TMRIA的批间CV略高,因此,我们还需努力降低方法的分析变异。

参考文献

- 1 Suzuki K. *Nippon Naika Gakkai Zasshi*, 1994, 83: 646
- 2 马西. 凝血系统的现代概念. 阮长耿主编《血栓与止血——现代理论和临床实践》. 江苏: 江苏科学技术出版社, 1994. 95
- 3 Suzuki K. *Protein C Inhibitor. Methods Enzymol*, 1993, 222: 385
- 4 周泉生. 苏州医学院博士研究生毕业论文, 1991
- 5 金坚. 苏州医学院博士研究生毕业论文, 1996
- 6 Bolton A E, Hunter W M. *Biochem J*, 1973, 133: 529
- 7 金坚, 王博诚, 张满达. *中华核医学杂志*, 1995, 15 (增刊): 36
- 8 王博诚, 金坚, 张满达. *生物化学杂志*, 1994, 10: 687
- 9 金坚, 张满达, 王博诚等. *中华核医学杂志*, 1993, 13: 167
- 10 Jakubowski H V. *J Biol Chem*, 1986, 261: 3876
- 11 王博诚, 李金泉, 金坚等. *生物化学杂志*, 1993, 9: 204
- 12 Gullin M C, Bezeaud A. *Ann Biol Clin Paris*, 1987, 45: 184
- 13 Meijers J C M, Kanter B H A J, Vloeswijk R A A, et al. *Biochemistry*, 1988, 27: 4231
- 14 Yamamoto S, Mizoguchi T, Tamaki T, et al. *J Biolchem*, 1993, 113: 433
- 15 Howard P R, Bovill E G, Mann K G, et al. *Clin Chem*, 1988, 34: 324
- 16 Fernandez J A, Estelles A, Gilabert J, et al. *Thromb Haemostas*, 1989, 61: 474
- 17 Heeb M J, Espana F, Geiger M, et al. *J Biol Chem*, 1987, 262: 15813
- 18 Ishii H. *Thromb Haemost*, 1990, 63: 157
- 19 Bell H, Odgaard O R, Andersson T, et al. *J Hepatol*, 1992, 14: 163
- 20 Takagi M, Wada H, Mukai K, et al. *Blood Coagul Fibrinolysis*, 1994, 5: 713