

利用碱性磷酸酶抗碱性磷酸酶法检测凝血酶受体

孙成文 王汉斌 史寅奎 刘龙斌^① 王海涛^② 陈万荣^②

(军事医学科学院附属医院心血管病研究室, 北京 100039)

Detection of Thrombin Receptor by Alkaline Phosphatase Antialkaline Phosphatase Method

SUN Cheng-Wen, WANG Han-Bin, SHI Yin-Kui, LIU Long-Bin, WANG Hai-Tao and CHEN Wan-Rong

(Cardiovascular Diseases Research Lab, Affiliated Hospital of Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100039, China)

ABSTRACT

Aim To establish an immunocytochemistry method of detection to thrombin receptor (TR).

Methods TR activated by thrombin can release a peptide that contains 41 amino acids (TR1-41) from N-terminal of TR. The TR1-41 was synthesized according to the amino acids sequence of TR, then mice were immunized utilizing the TR1-41. 4 cell strains producing TR-McAb were gotten. Preparations of atherosclerotic human left ventricular myocardium of four died patients were cut out. The preparations were made into paraffin sections.

Results An immunocytochemistry method—alkaline phosphatase antialkaline phosphatase (APAAP) to detect the thrombin receptor was established and the TR of myocardium were detected successfully.

Conclusion The method established can detect TR expression of tissue and organ.

KEY WORDS Thrombin; Thrombin receptor; Monoclonal antibody

摘要 凝血酶受体被凝血酶激活时,凝血酶受体结

合于细胞膜处氨基末端精氨酸 41/丝氨酸 42 被裂解, 释放出一个包含有 41 个氨基酸残基的多肽 (TR1-41)。根据 TR1-41 的氨基酸序列, 对其进行合成, 并对小鼠进行免疫, 筛选得到了 4 个产生抗 TR1-41 单克隆抗体的细胞株。利用抗 TR1-41 单克隆抗体建立了一种检测凝血酶受体的免疫酶组织化学方法—碱性磷酸酶抗碱性磷酸酶法, 并成功地检测了心肌细胞凝血酶受体, 该方法可以用于组织器官凝血酶受体的检测。

关键词 凝血酶; 凝血酶受体; 单克隆抗体

凝血酶受体 (thrombin receptor, TR) 被凝血酶 (thrombin) 激活引起机体凝血瀑布反应, 形成凝血块是引发以动脉粥样硬化为病理基础的人类心脑血管疾病的重要原因^[1,2]。当 TR 被激活时, TR 氨基末端第 41 位精氨酸和第 42 位丝氨酸间被裂解, 释放出一个含有 41 个氨基酸残基的多肽 (TR1-41)。本文利用此多肽制备了抗 TR1-41 单克隆抗体, 建立了一种检测 TR 的免疫酶组织化学方法—碱性磷酸酶抗碱性磷酸酶 (alkaline phosphatase antialkaline phosphatase, APAAP) 法。

1 材料和方法

1.1 试剂

TR1-41 多肽于美国麻省大学医学院心血管生物学实验室利用 PE 公司 ABI433A 多肽合成仪合成, 常规法裂解及纯化, 分子量 5 000 kDa^[3,4]。APAAP 试剂盒购自北京中山生物技术有限公司, 包括羊抗鼠 IgG、APAAP 复合物、底物液及坚固红等。

1.2 TR1-41 单克隆抗体

将 TR1-41 多肽和血蓝蛋白偶联, 免疫动物。当效价达到 1:5 000~1:10 000 以上时, 按常规法进行脾细胞和 Sp2/0 骨髓瘤细胞融合。结果获得 4 株分泌 TR1-41-McAb 的细胞株。经鉴定, TR1-41-McAb 均属

^①麻省大学医学院血管生物学实验室, 美国 MA01655

^②军事医学科学院微生物流行病学研究所, 北京 100085

IgG1,K链。与凝血酶IIa、凝血酶原II和HMCV多肽进行特异性鉴定,均未出现交叉反应^[4]。

1.3 组织标本

4例尸检病人标本来源于本院病理科,其中,男性3例,年龄分别为43岁、67岁、74岁,均死于冠状动脉粥样硬化性心脏病和急性心肌梗死;女性1例,75岁,死于右肺癌并发左心室前壁心肌梗死。取尸检病人左心室肌,做正常石蜡组织切片。编号为心肌1~4。

1.4 实验方法

采用APAAP法:①切片脱蜡至水;②微波修复,将切片放于0.1 mol/L枸橼酸缓冲液,置于微波炉上,高火5 min,使温度达到98℃,再低火维持5 min;③10%山羊血清封闭10 min;④弃去血清,加TR1-41-McAb,37℃ 30 min,0.01 mol/L PBS洗三次;⑤加生物素标记的二抗,37℃ 40 min,PBS洗三次;⑥APAAP复合物,37℃ 30 min,PBS洗三次;⑦坚固红显色(镜下观察控制),苏木素复染,脱水、透明、封片、镜检。

尽管试剂盒中的试剂已进行了严格地特异性、敏感性等质量鉴定,但为了实验结果准确可靠,除了实验组外在实验中还设计了一抗、二抗、APAAP复合物、显色液等对照。另外,还设计了HBsAg-McAb无关对照及TR1-41阻断实验对照。

2 结果

4例被检测的心肌组织中,阳性结果呈玫瑰红色,显色鲜明,背景清晰,见图(Figure)。在各组对照中,除HBsAg-McAb对照组中的心肌-2个体有较弱的阳性染色外,其余染色均为阴性,见表(Table)。

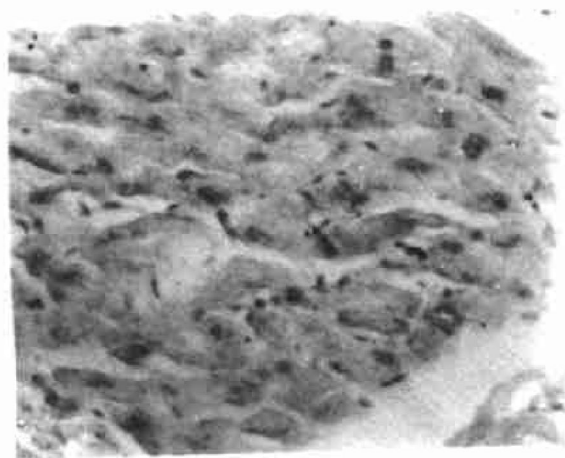


Figure. Myocardium TR positive (×200).

Table. Results of detection TR on myocardium by APAAP method.

Groups	Myoc-1	Myoc-2	Myoc-3	Myoc-4
A	+	+	+	+
B	-	-	-	-
C	-	-	-	-
D	-	-	-	-
E	-	-	-	-
F	-	+	-	-
G	-	-	-	-

A, test group; B, TR-McAb; C, goat against mouse IgG; D, APAAP; E, developing fluid; F, HBsAg-McAb; G, TR1-41 block; Myoc: Myocardium; +, Positive; -, Negative.

3 讨论

凝血酶受体在体内血小板激活及动脉血栓形成中的明显作用,提示它与以心肌梗死和缺血性脑中风为代表的严重危害人类健康的心脑血管疾病有着密切的关系^[6,7]。研究TR诱导血小板激活及其在心血管疾病的发病过程中的作用是临床研究的重大课题。任何可以影响心脑血管疾病的预防、检测及治疗的新方法、新手段都将产生巨大的社会效益和经济效益。90年初,凝血研究领域的重大发现是TR的成功克隆。由于TR的发现,人们对凝血酶IIa如何激活TR的分子机理有了进一步了解,同时也打开了更多的研究心血管疾病的途径。已有研究发现动脉粥样硬化斑块处的TR表达量较正常血管部位高的多^[8]。本文用TR1-41多肽免疫小鼠,制备了抗TR1-41单克隆抗体,建立了检测TR的APAAP法,并成功地对心肌组织的TR进行了检测。在检测的4例心肌组织中,阳性结果显色鲜明,背景清晰。在实验中设计各种对照,保证了结果的准确可靠。本方法能有效地避免心肌细胞中的内源性过氧化物酶的影响,消除了背景的非特异染色,保证了实验结果的准确可靠。由于TR的活化与动脉粥样硬化的发生存在着密切的关系,已有人将TR拮抗剂用于动脉粥样硬化等疾病的治疗。检测外周血细胞TR的含量或血清中TR1-41水平的变化

对这些疾病的预防和治疗效果的评价将起到非常重要的作用。本方法的建立为进一步检测机体各器官的 TR 表达及在某些病理状态下 TR 的含量变化打下基础。

另外,在 HBsAg 对照组中,心肌-2 号个体染色阳性。原因尚不清楚,是否与此个体为 HBsAg 阳性有关,有待进一步确定。

参考文献

- 1 Baykal D, Schmedtje JF Jr, Runge MS. Role of the thrombin receptor in restenosis and atherosclerosis. *Am J Cardiol*, 1995, **75**: 6.
- 2 Maruyama I, Shigeta K, Miyahara H, et al. Thrombin activates NF-kappa B through thrombin receptor and results in proliferation of vascular smooth muscle cells; role of thrombin in atherosclerosis and restenosis. *Ann NY Acad Sci*, 1997, **811**: 429.
- 3 Vu TK, Hung D, Wheaton V, et al. Molecular cloning of a functional thrombin receptor reveals a novel proteolytic mechanism of receptor activation. *Cell*, 1991, **64**: 1 057.
- 4 Vu TK, Wheaton V, Hung D, et al. Domains specifying thrombin-receptor interaction. *Nature*, 1991, **353**: 674.
- 5 陈万荣, 徐 静, 刘树玲, 等. 抗凝血酶受体单克隆抗体的制备与鉴定. *细胞与分子免疫学杂志*, 1997, **13**: 33.
- 6 Seiler SM. Thrombin receptor antagonists. *Semin Thromb Hemost*, 1996, **22**: 3 223.
- 7 Wilcox JN, Rodriguez J, Subramanian R, et al. Characterization of thrombin receptor expression during vascular lesion formation. *Circ Res*, 1994, **75**: 6 102.
- 8 Nelken N, Soifer S, O'Keefe J, et al. Thrombin receptor expression in normal and atherosclerotic human arteries. *J Clin Invest*, 1992, **90**: 1 614.

(此文 1998-06-23 收到, 1998-10-07 修回)

(此文编辑: 文玉珊)