

•方法学研究•

[文章编号] 1007-3949(2003)11-05-0470-03

血小板膜糖蛋白 GP IIb/IIIa 受体复合物的分离和纯化杜琪¹, 薛红, 陈保生, 吴钢, 曾武威, 白玲, 张文成

(中国医学科学院医学分子生物学国家重点实验室, 北京市 100005;

1. 暨南大学附属第二医院, 深圳市人民医院, 广东省深圳市 518020)

[关键词] 生物化学; 血小板膜糖蛋白受体复合物的制备; 柱层析法; 血小板; 糖蛋白 GP IIb/IIIa 受体复合物; 凝胶电泳

[摘要] 从机采浓缩血小板中, 应用凝胶柱刀豆素 A-琼脂糖、肝素-琼脂糖亲和层析与分子筛层析法, 分离、纯化并得到血小板膜糖蛋白 GP IIb/IIIa 受体复合物。血小板膜糖蛋白 GP IIb/IIIa 受体复合物由 α 、 β 两个亚单位组成, 糖蛋白 GP IIb 可还原为糖蛋白 $\text{GP IIb}\alpha$ (分子量为 125 kDa) 和糖蛋白 $\text{GP IIb}\beta$ (分子量为 23 kDa), 而糖蛋白 GP IIIa 为一条多肽链, 分子量为 95 kDa, 还原后为 108 kDa。经不同凝胶亲和层析、凝胶电泳分析, 得到血小板膜糖蛋白 GP IIb/IIIa 受体复合物, 为进一步筛选单克隆抗体和进行药物研发打下了基础。

[中图分类号] Q513

[文献标识码] A

Isolation and Purification of the Human Platelet Glycoprotein GP IIb/IIIa Receptor ComplexDU Gong¹, XUE Hong, CHEN Bao-Sheng, WU Gang, ZENG Wu-Wei, BAI Ling, and ZHANG Wen-Cheng

(National Laboratory of Medical Molecular Biology, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100005; 1. Second Affiliated Hospital, Medical College of Jinan University, Shenzhen People's Hospital, Shenzhen, Guangdong 518020, China)

[KEY WORDS] Platelet; Glycoprotein Receptor GP IIb/IIIa Complex; Gel Electrophoresis; Affinity Chromatography; Column Chromatography

[ABSTRACT] **Aim** A method has been developed for the rapid isolation of platelet membrane glycoproteins (GP) GP IIb and GP IIIa . **Methods** The GP GP IIb/IIIa complex was purified with concanavalin A-sepharose, heparin-sepharose and sephacryl S-300HR chromatography. **Results** The GP GP IIb/IIIa complex, GP GP IIb is composed of two disulfide-linked chains, a heavy chain of 125 kDa, called GP $\text{GP IIb}\alpha$, and a light chain of 23 kDa, called GP $\text{GP IIb}\beta$, in reduced conditions. The GP GP IIIa is a single polypeptide of 108 kDa in reduced conditions, or 95 kDa in nonreduced conditions. **Conclusions** Concanavalin A affinity chromatography was used to purify a platelet glycoprotein fraction. The concanavalin A-retained glycoproteins were eluted and adsorbed with a heparin-sepharose column to remove a major contaminant, thrombospondin. Sephacryl S-300 gel filtration was used as the final purification step to remove most fibrinogen and low-molecular-weight contaminants. The GP GP IIb/IIIa complex can be used for the development of its biological products and further study.

血小板膜表面的糖蛋白受体, 分为整合素与非整合素两大类, 参与血小板的粘附与聚集。整合素类糖蛋白受体由 α 、 β 两个单位组成。糖蛋白 GP IIb/IIIa 受体异源二聚体的两个亚单位由 17 号染色体长臂上不同基因编码, 且糖蛋白 GP IIb 亚单位含有与钙调蛋白具有同源性的钙离子结合位点。由于血小板膜糖蛋白 GP IIb/IIIa 受体仅存在于血小板膜表面, 只有在血小板激活时才大量表达, 是形成血栓最后共同途径的特异受体, 使之成为治疗性药物阻断的有

利靶点^[1]。因此, 研究和开发能够阻断纤维蛋白原与糖蛋白 GP IIb/IIIa 结合的药物^[2], 从理论上来说, 就可能彻底阻止由血管损伤或动脉粥样硬化斑块破裂引起的血栓发生。血小板膜糖蛋白 GP IIb/IIIa 受体拮抗剂已在临床得到应用^[3]。如阿昔单抗于 1994 年经美国食品和药品管理局 (FDA) 批准, 在经皮冠状动脉腔内成形术高危患者应用; 阿昔单抗通过使糖蛋白 GP IIb/IIIa 受体空间阻碍或构型变化, 从而改变并抑制纤维蛋白原与该受体结合。同时试验显示, 糖蛋白 GP IIb/IIIa 受体阻断剂对治疗不稳定型心绞痛、急性心肌梗死和外周动脉栓塞^[4,5], 亦具有潜在的应用价值。

[收稿日期] 2002-08-08

[修回日期] 2003-05-06

[基金项目] 国家攀登计划项目 (G20000056569)、国家自然科学基金 (39770168) 资助

[作者简介] 杜琪, 女, 1968 年出生, 北京市人, 主管药师, 主要从事基因工程药物的研究; 电话: 0755-25533018-2599, E-mail: duhong68@yahoo.com.cn。薛红, 女, 1952 年出生, 山西侯马市人, 生物化学专业。陈保生, 男, 教授, 博士研究生导师, 为本文通讯作者; 电话: 010-65296413, E-mail: capogene@163bj.com。

1 材料和方法

机采浓缩血小板 400 mL, 5.1 kg 离心力离心 15 min, 沉淀在 4℃用 Tris 缓冲盐溶液 (TBS: 20 mmol/L

Tris. HCl, 150 mmol/L NaCl, pH 7.4, 其中含 1 mmol/L 乙二胺四乙酸) 洗 3 次。用约 100 mL 裂解液(含 TBS 5~10 倍体积)[TBS: 10% Triton(曲通) X-100, 1 mmol/L CaCl₂ 和 10 μmol/L 亮抑酶肽], 在 4℃ 裂解血小板后, 30 kg 离心力在 4℃ 离心 15 min, 除去细胞碎片, 上清液保存在 -20℃ 备用。

1.1 柱层析

1.1.1 刀豆素 A—琼脂糖凝胶柱亲和层析 将凝胶置于室温, 充分膨胀, 进行浮选后, 装柱 25 mL。用缓冲液 A^[6] (20 mmol/L Tris. HCl, 100 mmol/L NaCl, 0.1% Triton X-100, 1 mmol/L CaCl₂, pH 7.4) 平衡。将裂解的血小板液在室温下上样, 用缓冲液 A 洗涤, 流速为 0.3 mL/min。用洗脱缓冲液(缓冲液 A 中加入 100 mmol/L α-甲基-D-甘露糖苷) 洗涤, 0.5 mL/min, 每 2 mL 收集洗脱液。合并洗脱液为 A 液。

1.1.2 肝素—琼脂糖凝胶柱亲和层析 将凝胶置于室温, 充分膨胀, 进行浮选后, 装柱 25 mL。用缓冲液 A 平衡。将洗脱液 A 液在室温下上样, 用缓冲液 A 洗脱, 流速为 1 mL/min, 收集于样品管中, 2 mL/管, 紫外检测, 收集流出液为 B 液。用聚乙二醇 20 000 浓缩流出液 B 液。

1.1.3 Sephacryl S-300HR 凝胶层析 将凝胶放置室温, 充分膨胀, 进行浮选后, 装柱 650 mL。用缓冲液 B^[6] (20 mmol/L Tris·HCl, 150 mmol/L NaCl, 0.1% Triton X-100, 1 mmol/L CaCl₂, pH 7.4) 平衡。将浓缩后的流出液 B 液, 室温上样, 用缓冲液 B 洗脱, 流速为 0.8 mL/min, 紫外检测, 每 2 mL 收集流出液。

1.2 电泳条件

用 5%~20% 十二烷基磺酸钠—聚丙烯酰胺梯度凝胶电泳检测柱层析流出组分, 样品加入等体积上样缓冲液, 100℃ 煮沸 5 min。同时做不还原及 5% 2-巯基乙醇还原凝胶电泳, 考马斯亮蓝法染色。分别合并含糖蛋白 α 和 β 流分, 再上样进行纯化。

2 结果

400 mL 浓缩血小板经含曲通 X-100 的裂解液处理, 包含有约 2 g 的蛋白质; 离心, 去除不溶物质后, 上清经过刀豆素 A—琼脂糖凝胶亲和柱吸附, 用 10 倍柱体积缓冲液 A 洗脱, 除去不结合的杂质(图 1, Figure 1); 用含有 α-甲基-D-甘露糖苷的洗脱液, 洗脱与刀豆素 A 结合的糖蛋白(图 1, Figure 1); 测定蛋白含量, 约占血小板裂解液蛋白量的 8.7%。各步分离纯化后的产物, 用 BCA 法检测蛋白含量, 结果见表 1(Table 1)。

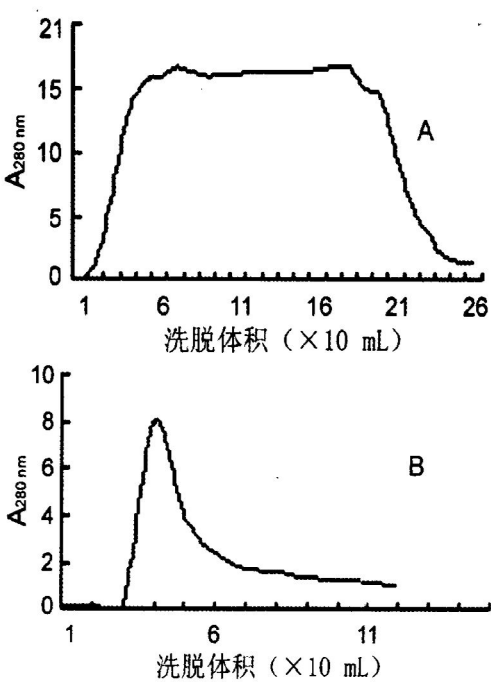


图 1. 刀豆素 A—琼脂糖凝胶柱层析 A: 上样曲线; B: 洗脱曲线。

Figure 1. Concanavalin A-sepharose chromatography

表 1. 糖蛋白 α 和 β 受体复合物纯化步骤

纯化步骤	总蛋白 (mg)	糖蛋白 α 和 β 受体复合物		
		(mg)	占总蛋白 比例(%) ^a	产率 (%)
裂解液	2160			
刀豆素 A 洗脱液	189	59	31	(100)
肝素一流出液	100	40	40	68
Sephacryl S-300 组分	36	25	70	63

a: 利用聚丙烯酰胺梯度凝胶电泳进行扫描。

由于血小板膜糖蛋白 α 和 β 受体复合物不被肝素吸附, 因此, 将洗脱液 A 液反复上样肝素—琼脂糖凝胶柱, 收集流出液, 浓缩后上样 Sephacryl S-300HR 凝胶柱, 进行最后的分离纯化, 得到纯化的血小板膜糖蛋白 α 和 β 受体复合物(图 2, Figure 2)。

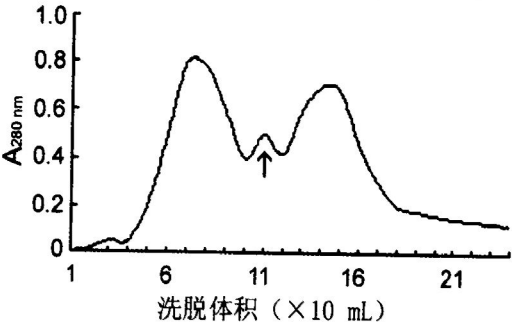


图 2. Sephacryl S-300 HR 凝胶层析

Figure 2. Sephacryl S-300 HR chromatography

将血小板膜糖蛋白 GPIIb/IIIa 受体复合物分离纯化各步的产物, 进行 5% ~ 20% 十二烷基磺酸钠一聚丙烯酰胺梯度凝胶电泳分析(图 3, Figure 3)。从中可以看出, 血小板膜糖蛋白 GPIIb/IIIa 复合物是一个异源性二聚体, 由两个亚单位组成, 糖蛋白 GPIIb 分

子量约 140 kDa, 经 5% 2-巯基乙醇还原后, 产生两个单链, 糖蛋白 $\text{GPIIb}\alpha$ 分子量约 125 kDa, 糖蛋白 $\text{GPIIb}\beta$ 分子量约 23 kDa; 而糖蛋白 GPIIIa 分子量约 95 kDa, 经 5% 2-巯基乙醇还原后, 糖蛋白 GPIIIa 分子量约 108 kDa。

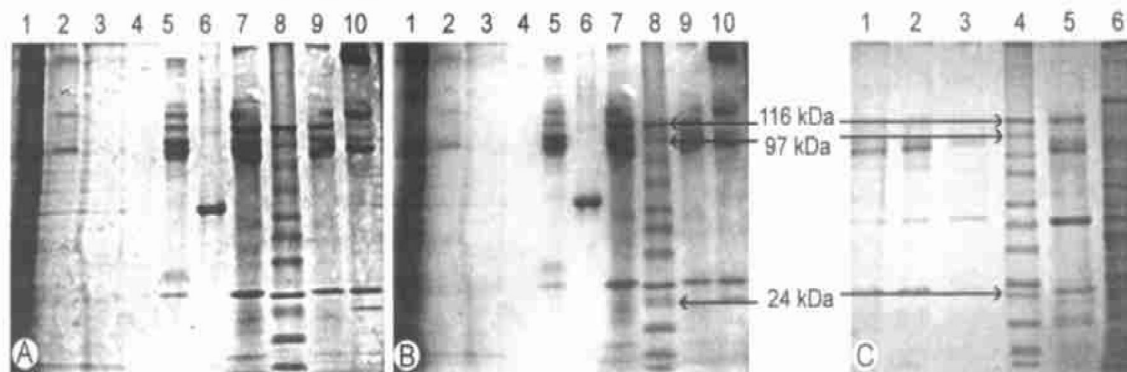


图 3. 5% ~ 20% 十二烷基磺酸钠一聚丙烯酰胺梯度凝胶电泳

A 图示: 1: 裂解液; 2: 糖蛋白 GPIIb/IIIa 复合物; 3, 4: 麦胚亲和柱洗脱液; 5, 7: Sephacryl S-300HR 上样液; 6: 标准牛血清白蛋白; 8: 标准分子量; 9: 肝素柱流出液; 10: 刀豆素 A-琼脂糖凝胶洗脱液。B 图示无 5% 2-巯基乙醇还原凝胶电泳: 1: 裂解液; 2: 糖蛋白 GPIIb/IIIa 复合物; 3, 4: 麦胚亲和柱洗脱液; 5, 7: Sephacryl S-300HR 上样液; 6: 标准牛血清白蛋白; 8: 标准分子量; 9: 肝素柱流出液; 10: 刀豆素 A-琼脂糖凝胶洗脱液。C 图示 5% 2-巯基乙醇还原凝胶电泳: 1: Sephacryl S-300HR 上样液; 2: 肝素柱流出液; 3: 糖蛋白 GPIIb/IIIa 复合物; 4: 标准分子量; 5: 刀豆素 A-琼脂糖凝胶; 6: 裂解液。

Figure 3. 5% ~ 20% SDS-PAGE gel electrophoresis

3 讨论

血小板膜糖蛋白 GPIIb/IIIa 受体拮抗剂, 能抑制血小板聚集, 是强力、高效、特异的抗血小板药物, 已广泛用于临床。分离提取高纯度的血小板膜糖蛋白 GPIIb/IIIa 受体复合物, 对药物和检测试剂的研制、开发具有重要意义。

在实验中, 我们应用的刀豆素 A-琼脂糖凝胶和肝素-琼脂糖凝胶均属亲和层析柱。刀豆素 A 是一种植物凝集素, 能识别细胞膜中的糖蛋白和糖肽, 特异性结合糖基 α -D-吡喃糖基甘露糖, 常用于亲和层析, 纯化糖蛋白、糖脂、多糖等。含有血小板膜糖蛋白 GPIIb/IIIa 受体复合物的裂解液, 在流经含刀豆素 A 的琼脂糖凝胶时被吸附, 用含 α -甲基-D-甘露糖苷的洗脱液解离后的溶液, 已除去大部分杂质。肝素-琼脂糖凝胶亲和柱常用于分离纯化凝血因子、激素、干扰素等, 而血小板膜糖蛋白 GPIIb/IIIa 受体复合物不会被肝素吸附。为提高分离效果, 将流出液多次上样, 可尽量除去与肝素结合的杂质组分。在进行 Sephacryl S-300HR 凝胶层析时, 要注意控制

流速, 以除去纤维蛋白原和小分子杂质。

由聚丙烯酰胺梯度凝胶电泳可以看出, 进行 3 次层析分离后, 仍有极微量的小分子杂质。我们认为若进行多克隆抗体的免疫, 极微量小分子杂质的影响可忽略; 若要进行单克隆抗体的免疫, 仍需进一步纯化。但继续采用麦胚亲和层析的方法回收率极低, 故推荐应用制备凝胶的方法。

[参考文献]

- [1] 陈志勇, 翁进, 李副刚, 汪钟. 764-3 对人血小板功能及血管内皮细胞抗凝作用的影响. 中国动脉硬化杂志, 1994, 2 (4): 137-139
- [2] Collet JP, Montalescot G, Lesty C, Weisel JW. A structural and dynamic investigation of the facilitating effect of glycoprotein GPIIb/IIIa inhibitors in dissolving platelet-rich clots. Circ Res, 2002, 90 (4): 428-434
- [3] 杨威, 夏斌赞. 血小板膜糖蛋白 GPIIb/IIIa 拮抗剂——新型的抗血小板药. 中国动脉硬化杂志, 1996, 4 (3): 234-236
- [4] Rocher-Singh KJ, Trokey J. Combined glycoprotein GPIIb/IIIa receptor inhibition and low-dose fibrinolysis for peripheral arterial thrombosis. Catheter Cardiovasc Interv, 2002, 55 (4): 457-460
- [5] 许俊堂, 胡大一. 血小板膜糖蛋白受体拮抗剂研究及临床应用的新进展. 中华心血管病杂志, 1999, 27 (2): 155-158
- [6] Teresa Royo, Matilde Vidal, Lina Badimon. Purification of the porcine platelet GP GPIIb/IIIa complex and the propeptide of von willebrand factor. Thromb Haemost, 1998, 80 (2): 302-309

(此文编辑 曾学清)