文章编号:1000-5404(2010)15-1649-03

论著

缺血性脑卒中患者血小板糖蛋白Ⅵ、CD62P 的检测及其意义

龚道元[1],林发全[2],陈家强[3],伏红霞[1],彭 艳[1],王晓娟[1] (528000 广东 佛山,佛山科学技术学院医学院检验系[1];530021 南宁,广西医科大学附属第一医院检验科[2];528041 广东 佛山,佛山市第三人民医院检验科[3])

【摘要】 目的 探讨缺血性脑卒中患者血小板活化标记物血小板糖蛋白Ⅵ(glycoprotein, GPⅥ)、P-选择素(CD62P)的表达水平及葛根素治疗对其的影响。方法 收集 2009 年 1-6 月佛山市第三人民医院首发的缺血性脑卒中住院患者 50 例和同期体检的正常对照 50 例作为研究对象;采用流式细胞仪(FCM)检测两组 GPⅥ和 CD62P 的表达水平并观察患者葛根素治疗前后 GPⅥ和 CD62P 的表达变化;应用双抗体夹心 ELISA 法检测两组血浆中可溶性 GPⅥ水平;应用直线相关分析统计血小板膜 GPⅥ与 CD62P、血小板膜 GPⅥ与可溶性 GPⅥ之间的相关性。结果 缺血性脑卒中患者(病例组)血小板膜 GPⅥ和 CD62P 表达增加,并且明显高于正常对照组($P<0.01$);葛根素治疗后血小板膜 GPⅥ、CD62P 表达有明显下降($P<0.05$),但仍高于正常对照组($P<0.05$);缺血性脑卒中患者血小板膜 GPⅥ与 CD62P 之间呈显著直线正相关($r=0.784$,$P<0.01$);病例组可溶性 GPⅥ水平明显低于正常对照组($P<0.01$);血小板膜 GPⅥ与血浆可溶性 GPⅥ之间呈直线负相关($r=-0.828$,$P<0.01$)。结论 GPⅥ和 CD62P 均可作为缺血性脑卒中血小板活化的标志物,而且二者具有同样的敏感性;GPⅥ、CD62P 检测对于指导用药有临床价值;血浆可溶性 GPⅥ亦可作为血小板活化的评估指标。

【关键词】 缺血性脑卒中;血小板糖蛋白Ⅵ;CD62P
【中图法分类号】 R743.33;R446.112 【文献标志码】 A

Detection of platelet glycoprotein Ⅵ and CD62P in patients with ischemic cerebral stroke and its clinical significance

Gong Daoyuan[1], Lin Faquan[2], Chen Jiaqiang[3], Fu Hongxia[1], Peng Yan[1], Wang Xiaojuan[1] ([1]Department of Clinical Laboratory, Medical College of Foshan University of Science and Technology, Foshan, Guangdong Province, 528000; [2]Department of Clinical Laboratory, First Affiliated Hospital, Guangxi Medical University, Nanning, Guangxi Zhuang Autonomous Region, 530021; [3]Department of Clinical Laboratory, Foshan Third People's Hospital, Foshan, Guangdong Province, 528041, China)

【Abstract】 Objective To study the effect of puerarin treatment on expression of platelet activation biomarkers, glycoprotein Ⅵ (GPⅥ) and CD62P, in patients with ischemic cerebral stroke. Methods Expression of GPⅥ and CD62P was detected by flow cytometry (FCM) before and after puerarin treatment in 50 ischemic cerebral stroke patients from Jan. to Jun. 2009 in Foshan Third People's Hospital. Another 50 health individuals served as normal control. Soluble GPⅥ (sGPⅥ) in plasma of patients with ischemic cerebral stroke was assayed with double antibody sandwich ELISA. Correlation between expressions of platelet GPⅥ and CD62P, and between expressions of platelet and sGPⅥ was observed by linear correlation analysis. Results The expression level of platelet GPⅥ and CD62P was significantly higher in patients with ischemic cerebral stroke than in normal control group ($P<0.01$) and was significantly lower after than before treatment with puerarin ($P<0.05$), but still higher than in normal control group ($P<0.05$). A significant positive linear correlation was observed between expressions of platelet GPⅥ and CD62P ($r=0.784$, $P<0.01$). The sGPⅥ level was significantly lower in patients with ischemic cerebral stroke than in normal control group ($P<0.01$). A significant negative linear correlation was found between expressions of platelet GPⅥ and sGPⅥ ($r=-0.828$, $P<0.01$). Conclusion Both GPⅥ and CD62P can be used as biomarkers of platelet activation in patients with ischemic cerebral stroke with a similar sensitivity. Detection of GPⅥ and CD62P helps rational use of drugs in clinical practice. Plasma sGPⅥ can also be used as a parameter for the assessment of activated platelets.

【Key words】 ischemic stroke; GPⅥ; CD62P

Corresponding author: Wang Xiaojuan, Tel: 86-757-82814016, E-mail: doctorwxj@yahoo.com.cn

【通信作者】 王晓娟,电话:(0757)82814016,E-mail:doctorwxj@yahoo.com.cn

血小板活化状态在缺血性脑卒中的作用日益得到关注。活化的血小板与静止的血小板相比,其膜糖蛋白分子的种类、数量、分布和构型等均出现显著变化[1]。P-选择素(CD62P)是目前已知的反映血小板活化的经典标志物,但由于其特异性差而限制了进一步的临床应用。血小板糖蛋白Ⅵ(glycoprotein,GPⅥ)是新近发现的一种胶原受体,能介导血小板黏附于内皮基质并参与血栓形成。本研究通过检测缺血性脑卒中患者血小板膜GPⅥ和血浆可溶性血小板糖蛋白Ⅵ(soluble GPⅥ,sGPⅥ)的水平变化及治疗对血小板膜GPⅥ的影响,并与CD62P表达水平相比较,探讨血小板膜GPⅥ和血浆sGPⅥ与缺血性脑卒中血小板活化之间的关系,为指导临床用药和疾病早期诊断提供方便、可行的依据。

1 材料与方法

1.1 一般资料

病例组:选择2009年1-6月佛山市第三人民医院神经科被诊断为首次发病的缺血性脑卒中住院患者50例,男性27例,女性23例,年龄57~85(65.76±7.46)岁。诊断标准:诊断符合1995年第四届全国脑血管病学术会议修订的诊断标准,全部病例经头颅CT或磁共振成像(MRI)扫描证实。排除标准:①出现症状至确诊超过24 h;②本次发病前有脑血管病病史;③发病前2周内有感染性疾病;④患有严重心脏、肝脏、肾脏疾病;⑤患有免疫性疾病及恶性肿瘤。正常对照组:选择同期体格检查健康志愿老年人50例作为对照者,男性29例,女性21例,年龄60~84(67.00±6.24)岁,均无神经系统疾病和重大遗传病史,近2周无感染性疾病,无严重心脏、肝脏、肾脏疾病,不伴免疫性疾病及恶性肿瘤。2组患者临床资料差异无统计学意义($P>0.05$)。

1.2 样本采集及制备

患者及正常对照血液标本的采集均用枸橼酸钠抗凝,采集静脉血。入院时每人采血4 ml,其中2 ml用于ELISA测定,2 ml用于血小板膜糖蛋白(GPⅥ和CD62P)检测。病例组患者在入院期间予以葛根素500 mg/d静脉滴注,同时口服脑复康、维生素类药物。1个疗程(10 d)后,症状有所缓解再取血进行相关指标测定。

1.3 血小板GPⅥ和CD62P测定

免疫荧光标记:取2只试管,1只加入5 μl全血,再加入血小板阴性对照IgG1-FITC、IgM-PE和CD61 PerCP各10 μl;另1只试管加入5 μl全血及GPⅥ-FITC、CD62P-PE和CD61 PerCP单克隆抗体各10 μl,混匀后室温避光孵育30 min,加入0.5 ml PBS缓冲液,立即上机检测。FCM检测:样品测试前,用标准荧光微球调整荧光检测*CV*值在2%以下,并设定血小板光散射的最佳阈值,消除其他细胞和噪声干扰,荧光检测经对数放大,收集30 000个血小板,测试完毕数据存盘后用CellQuest分析软件分析结果。根据所测定的荧光强度(fluorescence intensity,FI)即可知相应GPⅥ和CD62P的表达水平。

1.4 血浆sGPⅥ测定

采用双抗体夹心ELISA法检测,具体操作如下:用纯化的羊抗人GPⅥ(N-20)抗体(10 μg/ml)包被微孔板,1% BSA封闭。加入血小板裂解液50 μl,37 ℃反应1 h,PBST洗3次,加入兔抗人GPⅥ(LS-C83910)抗体(1∶200)100 μl,37 ℃反应45 min,PBST洗3次,加入HRP标记的羊抗兔IgG,37 ℃反应1 h,PBST洗3次,加入邻苯二胺底物显色10 min,最后加入2 mol/L H_2SO_4终止反应。测波长490 nm光密度值[*D*(490)]。同时以无关抗体(兔抗鼠IgG-HRP)为阴性对照。事先以不同浓度的重组人GPⅥ(rhGPⅥ)(0.025、0.05、0.1、0.25、0.5 μg)作为标准品,绘制标准曲线,根据*D*(490)值,即可得出样本中sGPⅥ水平。

1.5 统计学分析

数据以$\bar{x}\pm s$表示,采用SPSS 13.0统计软件行*t*检验,计量资料之间可能存在的相关性分析先描散点图,符合直线相关关系后行Pearson相关分析。

2 结果

2.1 2组血小板GPⅥ与CD62P含量的变化

缺血性脑卒中病例组血小板膜GPⅥ(20.52±3.50)和CD62P(47.82±7.52)的荧光强度均明显高于正常对照组[GPⅥ(6.18±1.12)、CD62P(8.43±2.16),$P<0.01$]。

2.2 葛根素治疗前后血小板GPⅥ与CD62P含量变化

病例组葛根素治疗后较治疗前相比,血小板膜GPⅥ、CD62P含量有明显下降($P<0.05$),但仍高于正常对照($P<0.05$,表1)。

表1 葛根素治疗前后血小板膜GPⅥ、CD62P的含量变化
(FI, $n=50$, $\bar{x}\pm s$)

组别		GPⅥ	CD62P
病例组	治疗前	20.52±3.50[a]	47.82±7.52[a]
	治疗后	15.85±4.37	28.18±8.27
正常对照组		6.18±1.12[a]	8.43±2.16[a]

a:$P<0.05$,与病例组治疗后比较

2.3 血小板GPⅥ与CD62P的相关性分析

缺血性脑卒中患者血小板GPⅥ与CD62P呈直线正相关,经Pearson相关分析,结果显示有高度相关性($r=0.784$,$P<0.01$)。

2.4 病例组与正常对照组血浆sGPⅥ表达的比较

双抗体夹心ELISA法检测缺血性脑卒中病例组与正常对照组血浆sGPⅥ表达水平,病例组[(2.3±0.6)ng/ml]明显低于正常对照组[(18.6±2.1)ng/ml,$P<0.01$]。

2.5 血小板膜GPⅥ与血浆sGPⅥ的相关性分析

血小板膜GPⅥ与血浆sGPⅥ之间呈直线负相关,经Pearson相关分析,结果显示有高度相关性($r=-0.828$,$P<0.01$)。

3 讨论

在血栓形成诸多环节中,血小板的活化、黏附和聚集起着重要作用。活化的血小板是缺血性脑卒中的一个重要的危险因素,血小板活化作为脑血管内血栓形成和梗死的早期因素[1,2],准确测定其活化标志物对

血栓性脑血管疾病发生的诊断、预防、治疗效果监测都有着重要意义。在血小板的黏附、聚集、释放过程中，血小板膜糖蛋白的表达起了重要作用，并且可以作为观察血小板活化的指标，目前研究较多的是 CD62P[3-5]。CD62P 又称为 α 颗粒膜蛋白（α-granule membrane protein，GMP），亦称为 P-选择素（P-selectin），主要参与活化血小板与白细胞的黏附，除存在于血小板 α 颗粒外，也存在于巨核细胞和血管内皮细胞内的 Weibel-Palade 小体[6]。静止与活化血小板的 CD62P 表达差别很大，是目前所知的反映血小板活化与释放最特异性的标志物，曾被认为是反映血小板活化的“金标准”[7]。但 CD62P 在处理过程容易出现假阳性，与临床结果不一致。另外，虽然可溶性 CD62P 可以通过 ELISA 方法检测到，但是由于血浆中 CD62P 可同时来源于血小板和血管内皮细胞，故很难判断它的真正来源，极大限制了 CD62P 的临床应用。所以，急需找到一种新的评价血小板活化的标志物及其检测方法，用以诊断血小板活化/血管内皮损伤性疾病（血栓）、选择有效药物、预测疾病预后等方面研究。有关 GPⅥ研究为这一设想的实施提供了实验依据[8]。

血小板 GPⅥ是新发现的胶原受体之一，在胶原介导的血小板信号转导、聚集、促凝活性表达过程中起到重要作用。GPⅥ在体内分布有高度选择性，即仅分布于巨核细胞和血小板，因此，将 GPⅥ作为血小板活化标志物比 CD62P 更特异。Bigalke 等[9,10] 报道，在急性冠脉综合征（acute coronary syndrome，ACS）中，GPⅥ介导的血小板黏附于内皮基质和血栓形成起着重要作用，血小板膜 GPⅥ及其脱落形成的血浆 sGPⅥ可作为早期诊断的依据。

本研究运用 FCM 测定了缺血性脑卒中患者血小板活化标志物 GPⅥ和 CD62P 表达水平，结果显示，病例组血小板 GPⅥ和 CD62P 的荧光强度均明显高于正常对照组，而且 GPⅥ与 CD62P 之间呈直线正相关，表明 GPⅥ作为缺血性脑卒中患者血小板活化的标志物，能够达到和 CD62P 同样的敏感性，又可大大提高其特异性，为进一步应用血小板膜 GPⅥ监测血小板活化程度和预测缺血性脑卒中病情提供了可能。目前，研究证实抗血小板药物抵抗的问题越来越严重，许多患者急性期应用抗血小板药物不能有效抑制病情进展，也不能有效地进行一级和二级预防[11]。因此，在临床上有效地检测血小板活化功能对判定药物治疗效果也是非常重要的。本研究表明，经葛根素治疗 1 个疗程后随着临床症状的缓解，血小板活化水平与治疗前相比也明显降低，但仍高于正常对照，说明检测缺血性脑卒中患者 GPⅥ和 CD62P 水平，有助于判断使用抗血小板治疗的有效性。本研究采用 ELISA 法测定了缺血性脑卒中患者血浆 sGPⅥ水平，并与正常对照组进行比较，同时分析了病例组血浆 sGPⅥ和血小板膜 GPⅥ的相关性，评估其作为一种血栓标志物的可能性，结果显示，病例组血浆 sGPⅥ表达水平明显低于正常对照组，而且血小板膜 GPⅥ与血浆 sGPⅥ之间呈直线负相关，表明血浆 sGPⅥ可作为血小板活化的评估指标，但是其具体临床应用还需进一步研究证实。与 FCM 等血小板活化的检测方法相比，ELISA 方法具有操作简单、价格便宜、易于普及、敏感性高等优点[12]，如能证实血浆 sGPⅥ在血小板活化中的临床意义，将会对缺血性脑卒中及其他血栓性疾病的诊断、预防、治疗、预后评价等方面研究产生深远的影响。

参考文献：

[1] Smout J, Dyker A, Cleanthis M, *et al*. Platelet function following acute cerebral ischemia[J]. Angiology, 2009, 60(3): 362-369.

[2] Marquardt L, Ruf A, Mansmann U, *et al*. Course of platelet activation markers after ischemic stroke[J]. Stroke, 2002, 33(11): 2570-2574.

[3] Li X, Cong H. Platelet-derived microparticles and the potential of glycoprotein Ⅱb/Ⅲa antagonists in treating acute coronary syndrome[J]. Tex Heart Inst J, 2009, 36(2): 134-139.

[4] Surin W R, Barthwal M K, Dikshit M. Platelet collagen receptors, signaling and antagonism: emerging approaches for the prevention of intravascular thrombosis[J]. Thromb Res, 2008, 122(6): 786-803.

[5] Polek A, Sobiczewski W, Matowicka-Karna J. P-selectin and its role in some diseases[J]. Postepy Hig Med Dosw (Online), 2009, 63: 465-470.

[6] McEver R P, Beckstead J H, Moore K L, *et al*. GMP-140, a platelet *al*pha-granule membrane protein, is also synthesized by vascular endothelial cells and is localized in Weibel-Palade bodies[J]. J Clin Invest, 1989, 84(1): 92-99.

[7] Reiner A P, Kumar P M, Schwartz S M, *et al*. Genetic variants of platelet glycoprotein receptors and risk of stroke in young women[J]. Stroke, 2000, 31(7): 1628-1633.

[8] Jung S M, Moroi M. Platelet glycoprotein Ⅵ[J]. Adv Exp Med Biol, 2008, 640: 53-63.

[9] Bigalke B, Geisler T, Stellos K, *et al*. Platelet collagen receptor glycoprotein Ⅵ as a possible novel indicator for the acute coronary syndrome[J]. Am Heart J, 2008, 156(1): 193-200.

[10] Bigalke B, Stellos K, Stakos D, *et al*. Influence of platelet count on the expression of platelet collagen receptor glycoprotein Ⅵ (GPⅥ) in patients with acute coronary syndrome[J]. Thromb Haemost, 2009, 101(5): 911-915.

[11] Vinik R, Wanner N, Pendleton R C. Periprocedural antithrombotic management: a review of the literature and practical approach for the hospitalist physician[J]. J Hosp Med, 2009, 4(9): 551-559.

[12] Al-Tamimi M, Mu F T, Moroi M, *et al*. Measuring soluble platelet glycoprotein Ⅵ in human plasma by ELISA[J]. Platelets, 2009, 20(3): 143-149.

（收稿 2009-11-22 修回 2009-12-22）

（编辑 龙 亮）