

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200510090635.6

[51] Int. Cl.

G01N 33/551 (2006.01)

G01N 21/17 (2006.01)

G01N 33/577 (2006.01)

[43] 公开日 2007年2月21日

[11] 公开号 CN 1916632A

[22] 申请日 2005.8.18

[21] 申请号 200510090635.6

[71] 申请人 中国科学院生物物理研究所

地址 100101 北京市朝阳区北沙滩大屯路15号

[72] 发明人 阎锡蕴 张佰茹 张莹 勒刚

[74] 专利代理机构 中科专利商标代理有限责任公司
代理人 程金山

权利要求书1页 说明书12页 附图6页

[54] 发明名称

CD146 分子的检测方法及其应用

[57] 摘要

本发明提供了一个新的自身免疫疾病相关靶分子 CD146，建立了新的自身免疫疾病临床诊断方法，包括(1)利用蛋白质芯片和光学偏光显微成像技术制备 CD146 抗体光学芯片来检测病人体液中的 CD146 含量是一种灵敏、快速的无标记检测方法；(2)流式细胞技术检测病人外周血白细胞膜上 CD146 的表达情况。上述发明可应用于系统性血管炎、系统性红斑狼疮、多发性硬化症以及格林巴利综合症等自身免疫性疾病的诊断、判断疾病进程以及预后评价。

1. 一种检测可溶性 CD146 分子的方法，其特征在于：将抗 CD146 抗体固定在硅芯片上，将待测样品流过 CD146 抗体芯片表面，样品中可溶性 CD146 分子与芯片上的特异抗体反应信号通过光学椭偏光显微成像检测系统，分析样品中 CD146 的含量。
2. 根据权利要求 1 所述的方法，其中所述样品是来自自身免疫疾病患者的血液、尿液、脑脊液或关节腔滑液。
3. 根据权利要求 2 所述的方法，其中所述自身免疫疾病包括系统性血管炎、系统性红斑狼疮、多发性硬化症以及格林巴利综合症。
4. 根据权利要求 1-3 中任何一项所述的方法，其中所述抗 CD146 抗体为小鼠抗人 CD146 单克隆抗体 AA98。
5. 一种检测 CD146 分子的方法，其特征在于：用流式细胞技术检测 CD146 在人受试者外周血白细胞膜上的动态表达。
6. 根据权利要求 5 的方法，其中所述流式细胞技术检测包括采用微量全血间标法用抗 CD146 抗体标记外周血白细胞，通过流式细胞仪区分外周血白细胞的三个细胞亚群即中性粒细胞、单核细胞和淋巴细胞，分别圈门分析 CD146 分子在三种细胞中表达情况。
7. 根据权利要求 5 或 6 的方法，其中所述受试者是自身免疫疾病患者。
8. 根据权利要求 7 的方法，其中所述自身免疫疾病患者包括系统性血管炎、系统性红斑狼疮、多发性硬化症以及格林巴利综合症患者。
9. CD146 分子在制备诊断自身免疫疾病的试剂盒中的应用。
10. 根据权利要求 9 的应用，其中所述自身免疫疾病包括系统性血管炎、系统性红斑狼疮、多发性硬化症以及格林巴利综合症。

CD146 分子的检测方法及其应用

技术领域

本发明涉及分子检测领域，更具体地，本发明涉及血管内皮粘附分子 CD146 的新的检测方法及其应用。

背景技术

血管内皮细胞是连续被覆在全身血管内膜的一层细胞群。它不仅是血液和组织的屏障，而且具有控制血管通透性，调节组织与血液的物质交换，抑制血管壁细胞游走等多种功能。血管内皮细胞结构与功能的变化或损伤引起多种重要疾病。血管内皮细胞也是在肿瘤、感染、自身免疫疾病、心血管疾病和移植免疫排斥反应中最早受到影响的靶细胞。血管内皮细胞的变化不仅增加血管通透性，而且改变白细胞、血小板以及肿瘤细胞的黏附和迁移。这些病理变化在炎症过程中起着重要作用。

炎症过程的一个重要特征就是血液中单核细胞黏附于血管内皮，随后渗出并迁移至炎症组织。在这一过程中，单核细胞与血管内皮细胞的粘附分子扮演着重要角色。

血管内皮细胞受体或黏附分子是一类表达于细胞膜表面的糖蛋白。它们大多数都是跨膜蛋白质，参与血管内皮细胞与循环细胞和血管壁基质以及平滑肌细胞的相互作用。这些粘附分子在血管内皮细胞上的动态表达（如缺失、增高、突变）不仅直接影响细胞迁移及细胞信号传导等重要生命活动，而且与疾病的发生和发展密切相关。因此，细胞黏附分子可作为一种标志分子用于疾病的诊断和治疗。

自身免疫疾病是指机体针对自身抗原而发生免疫反应致使组织损伤而引发的疾病。在自身免疫疾病的发病过程中，免疫反应处于一种失控状态，机体产生一些对内皮具有刺激甚至毒性的因子，破坏血管内皮细胞的整体平衡，改变血管内皮细胞与循环细胞的相互作用，导致血管损伤乃至病变。有报道表明黏附分子及其受体如选择素、整合素、ICAM、VCAM、

CD43、VMA 等参与这一系列病理过程。值得关注的是这些黏附分子不但以膜蛋白的形式存在，同时还以可溶性的形式存在于人体的体液中。在一些自身免疫疾病中，可溶性黏附分子如 ICAM-1、selectin、VCAM-1 等的含量明显高于正常人，其动态表达与疾病进程密切相关。尽管目前对于可溶性黏附分子表达水平升高的病理机制还不清楚，但通常认为这是血管损伤及功能障碍的标志，并在一定程度上反应了疾病进程。通过检测这些可溶性黏附分子的含量对于诊断伴有血管损伤的疾病尤其是自身免疫疾病具有重要的临床意义。

CD146 是一个新的血管内皮黏附分子，又名 MUC18、Mel-CAM，属于免疫球蛋白基因超家族成员。除了在少数正常组织和某些恶性肿瘤细胞上有表达外，CD146 主要表达于血管内皮细胞，尤其是在增生活跃的肿瘤血管上高表达。由于 CD146 分子在血管上的这种动态表达特性，使它在血管内皮病变的研究中倍受关注。目前，CD146 已经被认为是血管内皮细胞和循环内皮细胞的标志分子(Blann, Woywodt et al. 2005)，因而在伴有内皮损伤、脱落现象的某些疾病中可作为疾病进程的参考指标。另有研究表明 CD146 分子还表达于单核细胞，有报道在激活的 T 淋巴细胞上也有高表达。像其它很多黏附分子一样，体内 CD146 分子以细胞膜和可溶形式(soluble CD146, sCD146)存在。(Neidhart, Wehrli et al. 1999; Bardin, Moal et al. 2003)分别报道 sCD146 在风湿性关节炎滑液以及慢性肾衰竭患者的血清中的表达水平明显高于正常人。

目前用于检测 sCD146 的方法为双抗夹心 ELISA。虽然用这种方法能够检测到 sCD146 的存在，但在应用时存在较多的局限性。例如，该方法繁琐，灵敏度较低，最低检测量为 10ng/ml，仅限于血液检测，不能用于脑脊髓液等样品的检测。因此，发展新的检测技术，是研究和应用 sCD146 分子作为自身免疫疾病标志分子的关键。

发明内容

针对上述研究背景，本发明的一个目的是提供一种检测 CD146 分子的方法，其特征在于：将抗 CD146 抗体固定在硅芯片上，将待测样品流过 CD146 抗体芯片表面，样品中可溶性 CD146 分子与芯片上的特异抗体

反应信号通过光学椭偏光显微成像检测系统,分析样品中 CD146 的含量。

在一个实施方案中,所述样品是来自自身免疫疾病患者的血液、尿液、脑脊液或关节腔滑液。所述自身免疫疾病包括系统性血管炎、系统性红斑狼疮、多发性硬化症以及格林巴利综合症。优选所述抗 CD146 抗体为小鼠抗人 CD146 单克隆抗体 AA98。

本发明还有一个目的是提供一种检测 CD146 分子的方法,其特征在于:用流式细胞技术检测 CD146 在人受试者外周血白细胞膜上的动态表达。更具体地,所述流式细胞技术检测包括采用微量全血间标法用抗 CD146 抗体标记外周血白细胞,通过流式细胞仪区分外周血白细胞的三个细胞亚群即中性粒细胞、单核细胞和淋巴细胞,分别圈门分析 CD146 分子在三种细胞中表达情况。在一个实施方案中,所述人受试者是自身免疫疾病患者。所述自身免疫疾病患者包括系统性血管炎、系统性红斑狼疮、多发性硬化症以及格林巴利综合症患者。

本发明另一方面涉及 CD146 分子在制备诊断自身免疫疾病的试剂盒中的应用。所述自身免疫疾病包括系统性血管炎、系统性红斑狼疮、多发性硬化症以及格林巴利综合症。

以下详细描述本发明。

1. 蛋白质光学芯片检测 sCD146 的临床应用

本发明主要是克服现有方法的局限性,提高 sCD146 检测系统的灵敏度和方便性,缩短检测时间而发展的无标记检测体液 sCD146 的新技术。这一检测系统是基于先进的光学椭偏光显微成像技术的蛋白质光学芯片,解决了 sCD146 检测灵敏度的问题。光学椭偏光成像技术是近年来发展起来的一种基于单分子膜层的无标记检测技术,它将传统的光学椭偏技术、CCD 摄像、计算机采集和图像处理技术理想的结合在一起。通过分析蛋白芯片上样品椭偏图像的灰度值来确定其浓度。本发明将这一灵敏的技术应用到 sCD146 的检测,从而弥补目前商用试剂盒的不足。建立一种敏感适用、易于操作针对自身免疫性疾病的新的诊断方法。

本发明与传统的 ELISA 方法相比较,其优越性在于:(1)灵敏度高,本方法直接检测结合在抗体上的目标蛋白,没有任何中间步骤,分析软件可以分析到痕量样品的灰度值,使得检测的灵敏度很高。并且可以排除非

特异性干扰,重复性好。由于该检测方法是基于样品的物理学特性来检测,检测结果主要与相互作用的两个分子的结合动力学常数有关,所以可以排除其他干扰,使得结果重复性更好;(2)样品用量少,样品用量仅在10微升以上即可满足检测;(3)样品无需任何标记物,因此不存在二抗交差的问题更不会因为显色过程所带来的问题而对结果的判断产生影响;(4)检测速度快,包被抗体后只需一步反应(抗原与抗体反应)就可以观察结果。由于检测薄膜厚度所以会受待检测分子分子量的限制,如分子量很小或者过大就不适合应用本方法。本发明中所涉及的sCD146分子量在100KDa左右,正是适合光学椭偏显微成像技术检测的范围。

2. 流式细胞技术检测 CD146 的临床应用

本发明首次发现自身免疫疾病患者外周血白细胞膜表面 CD146 分子的动态表达与疾病活动期和缓解期相关。因此,检测 CD146 分子的表达情况,能够为自身免疫疾病的诊断及预后评价提供新的信息和指标。本发明采用微量全血间标法检测外周血白细胞 CD146 表达。流式细胞技术是一种自动分析细胞并具有分选功能的高新技术,具有高速度、高灵敏度、高精度及高分辨率、分选纯度高和收获率高及多参数同时分析等特点,已经被广泛地应用于临床诊断中。本发明采用的微量全血间标法,充分利用了流式细胞仪的优点,同时样品用量少(仅需抗凝的全血 200 μ l 左右),在进行其他检测的血液中取一点即可,避免了患者检查中的多次抽血。

本发明涉及上述两种检测 CD146 的新方法,其意义在于:(1)首次发现 sCD146 在自身免疫疾病临床诊断和预后中的意义。例如系统性血管炎患者在治疗前后体液中 sCD146 的表达水平有明显的变化;(2)利用了先进的无标记蛋白质光学芯片检测 sCD146,检测的灵敏度达到 0.1ng/ml 水平,比现有检测手段提高 100 倍,可以检测到用现有方法无法检测的样本如脑脊液,扩大了 sCD146 的检测范围。另外,本方法是无标记检测技术简便易行,在临床诊断中有很大的应用潜力。(3)本发明首次发现了 CD146 分子在系统性血管炎患者的外周血白细胞膜表面的表达。该研究结果首次在国际上发现 CD146 在系统性血管炎等自身免疫性疾病患者外周血白细胞中激活,并且与活动期相关,随治疗过程表达下调,而血浆中 sCD146 的水平升高,可作为临床诊断的新指标,并为进一步研究

风湿性疾病发病机制提供了新的方向。

附图说明

下面结合附图对理解本发明作进一步的详细描述,但并非对本发明作限定。

图 1. 24 通道 CD146 蛋白质光学芯片, 图中箭头所指为 sCD146 浓度 (ng/ml), 横向 (从左至右) 相邻两通道为同一浓度两次重复, 其中包括两个未包被抗体、未加样品的空白通道 (图中黑色的通道);

图 2. sCD146 标准曲线, A. sCD146 浓度范围: 0.13~83.2 ng/ml; B. sCD146 浓度范围: 0.13~7.0 ng/ml;

图 3. 流式细胞仪分析病人外周血白细胞细胞群, 通过前向散射光 (FSC-Height) 和侧向散射光 (Side Scatter) 把病人外周血白细胞分为 3 个细胞群体, 其中 R1 为中性粒细胞; R2 为单核细胞; R3 为淋巴细胞;

图 4. CD146 在患者白细胞上动态表达, 不同血管炎患者中性粒细胞以及淋巴细胞表达 CD146;

图 5. 比较分析病人活动期和延缓期外周血白细胞 CD146 的表达。A. 中性粒细胞活动期及缓解期 CD146 的表达; B. 淋巴细胞在活动期及缓解期 CD146 的表达。横坐标 1: 活动期; 2: 缓解期;

图 6. 标准曲线。标准品倍比稀释, 分别为 800、400、200、100ng/ml, 以样品稀释液取标准品作为 0ng/ml。经计算 $R^2=0.9987$, 线性回归非常好;

图 7. 系统性血管炎患者血清中 sCD146 水平。与健康对照相比仅 MPA 具有显著性差异 ($P<0.01$);

图 8. 治疗前后 sCD146 水平变化。与治疗前相比, 12 例患者中的 10 例在治疗后 sCD146 水平明显升高了。通过配对 t 检验统计分析, 治疗前后 sCD146 含量在 0.05 水平上有显著性差异。

具体实施方式

下面结合附图对理解本发明作进一步的详细描述, 但并非对本发明作限定。

本发明所用的主要试剂及仪器如表 1 所示。

表 1. 主要试剂及仪器:

仪器/试剂	产地
酶标仪	美国 Bio-rad 公司
CD146 检测试剂盒	CY-QUANT ELISA 法国 Biocytex 公司
生物芯片制作和芯片上生物分子固定及检测一体的系统	中国科学院生物物理研究所靳刚研究组制造 中国专利号 200420064457.0
光学椭偏光成像系统	中国科学院生物物理研究所靳刚研究组制造 中国专利号 200420064457.0
流式细胞仪 FCSCaliber	美国 BD 公司
牛血清白蛋白 (BSA)	Sigma 公司
FITC-羊抗鼠 IgG	美国 BD 公司
10×红细胞裂解液	美国 PharMingen 公司
鼠抗人 AA98 单克隆抗体	由本实验室制备

实施例 1

无标记检测技术光学椭偏光成像系统检测 sCD146

鉴于商用试剂盒检测 sCD146 最低值为 10ng/ml, 不能用于如脑脊髓液、关节炎滑液等样品中 sCD146 的检测。因此, 我们采用蛋白质光学芯片来解决这个问题。其特征在于, 将纯化的抗 CD146 单克隆抗体 AA98 (见中国发明专利申请“高效广谱抑制肿瘤生长和转移的新型抗体”, 专利号 99107586.2; 及参考文献(Yan, Lin et al. *Blood*, 2003)) 固定在活化的硅芯片上 (24 通道), 将待测样品流过固定有抗体的芯片表面, 使抗原抗体充分反应, 抗原抗体的特异性反应信号通过椭偏光系统检测, 利用软件分析拍摄图片的灰度, 并与标准样品对比确定待测样品中 sCD146 的含量。

1. 样品来源及临床资料: 被检测样品来自安贞医院神经内科, 已经明确诊断为多发硬化、格林巴利综合症患者的脑脊髓液。

2.具体步骤:

1) 硅片活化处理: 硅片(约 $7 \times 34\text{mm}$ 大小), 先用弱碱混合液 ($\text{H}_2\text{O}: 30\% \text{H}_2\text{O}_2: 25\% \text{NH}_4\text{OH} = 5: 1: 1(\text{V}/\text{V})$) 在 80°C 下清洗 5 分钟, 除去表面有机污染物以及离子型污染物, 同时提高表面硅醇基量, 使硅片表面亲水, 得到亲水性基底。再用硅烷溶液二氯二甲基硅烷: $\text{C}_2\text{HCl}_3 = 1: 4$ 在室温下浸泡 5 分钟后, 无水乙醇和三氯乙烯清洗硅片 2~3 次。最后通过二氯二甲基硅烷与表面的硅醇基反应, 将 $-\text{Si}(\text{CH}_3)_2$ 基团共价结合到二氧化硅膜上, 甲基末端暴露在外并形成紧密的一层, 从而使硅片表面呈强疏水性。

2) 包被抗体: 纯化的抗体 AA98 以 $250\mu\text{g}/\text{ml}$ 浓度, 每个通道 $50\mu\text{l}$ 包被活化的硅芯片, 室温孵育 45 分钟, 在硅芯片表面形成一层单分子膜层。每个芯片 24 通道。

3) PBST(PBS 加 0.05% Tween20)洗三次

4) 封闭非特异结合位点: 加入 $50\mu\text{l} 1\% \text{BSA}/\text{PBS}$ 封闭非特异性结合位点, 室温孵育 45 分钟。

5) 样品孵育: 将已知 sCD146 浓度的血清样品梯度稀释用来绘制标准曲线, 稀释后的浓度分别为 0.13 、 0.64 、 1.3 、 2.6 、 5.2 、 10.4 、 20.8 、 41.6 、 $83.2\text{ng}/\text{ml}$ 。待测脑脊液稀释 20 倍, 上样量 $50\mu\text{l}$, PBS 取代样品作为阴性对照。每个样品设两次重复。

6) PBST 洗去非特异性结合, 三次重复。蒸馏水冲洗后用氮气吹干以备观察。

7) 椭偏光学显微镜成像系统观察。

8) 软件统计结果: 软件分析灰度值, 根据稀释标准血清中 sCD146 浓度绘制标准曲线。

9) 根据标准曲线计算出待测样品的浓度。

3. 结果分析:

1) 利用蛋白质光学芯片可以检测 sCD146, 结合图像如图 1 所示。从图上可以看出不同浓度 sCD146 通道的灰度差异肉眼可见。

2) 利用已知 sCD146 浓度的血清制作标准曲线。稀释后 sCD146 的浓度 $0.13 \sim 83.2\text{ng}/\text{ml}$, 绘制标准曲线如图 2.A.所示。经计算得出该方法检测范围在 $0.1 \sim 2.5\text{ng}/\text{ml}$ 内符合线性, $2.5\text{ng}/\text{ml}$ 接近饱和。取 sCD146 浓度范

围 0.13~7.0ng/ml 作图所得到的标准曲线 ($R^2=0.9965$), 如图 2.B.所示。

3) 分析格林巴利综合症、多发硬化症患者脑脊髓液中 sCD146 含量。处于活动期患者脑脊髓液中 sCD146 含量在十几纳克左右, 在多发硬化患者中最高达到 24ng/m,。处于缓解期患者仅 0.2ng/ml, 详细数据如表 2 所示

表 2. 患者脑脊髓液 sCD146 含量

诊断	年龄	CSF-sCD146 ng/ml
GBS	55	12
GBS	55	0.2
GBS	60	12
MS	48	0.2
MS	37	24
MS	44	12
MS	37	13
MS	52	14

注: GBS: 格林巴利综合症; MS: 多发硬化症; CSF: 脑脊髓液

实施例 2

检测病人外周血白细胞膜 CD146 表达的临床意义

1. 样品来源及临床资料: 所有患者均为临床资料完整的 2004 年 4 月至 2005 年 4 月北京协和医院内科住院患者。其中系统性血管炎共 58 例, 男性 31 例, 女性 27 例; 系统性红斑狼疮(SLE)患者 15 例。大动脉炎(TA)11 例, 韦格纳肉芽肿(WG)16 例, 显微镜下多血管炎 (MPA) 19 例, 变应性肉芽肿性血管(CSS)炎 6 例。TA、PAN、WG、MPA、CSS 患者均符合 1990 年美国风湿病学会 (ACR) 系统性血管炎的分类标准; 系统性红斑狼疮符合 1982 年 ACR 的分类标准。所有患者在明确诊断或入院时采血样, 活动期的患者在治疗 2—4 周后再次采血。18 例患者(SLE4 例, BD2

例, TA2 例, WG5 例, PAN2 例, MPA6 例, CSS 2 例)在明确诊断且为活动期时及治疗好转后两个时间点分别进行了检测。同时 20 名健康志愿者采血作为对照。

2. 具体实施步骤

外周血白细胞 CD146 的表达采用微量全血间标法, 样本的处理步骤如下:

1) 取肝素抗凝全血 200ul, 加入 AA98 mAb(杂交瘤培养上清), 阴性对照组加入鼠 IgG 无关抗体, 置冰浴 40min。

2) 以含 0.5%BSA 的 PBS 2ml 洗涤 3 次, 1500rpm 离心 3min, 弃上清

3) 加入羊抗鼠二抗-FITC (PBS 1: 500 稀释), 置冰上孵育 30min, 避光

4) 加入 2 ml 红细胞裂解液, 温和振摇 2min, 避光 5min, 离心 5min(1000rpm/min)

5) 以含 0.5%BSA 的 PBS 洗 2 次, 1500rpm 离心 5min, 弃上清

6) 每管加 0.5ml 不含 BSA 的 PBS 或 1%多聚甲醛重悬细胞, 置 4℃ 冰箱避光待测

7) 上机前用 >100 目的尼龙网过滤

8) 上机检测。每个样本收集 10^4 个细胞, 采用前向角(Forward Scatter, FSC)和侧向角 (Side Scatter, SSc) 对细胞群的大小、颗粒等物理形态进行选择分析。正常人的外周血白细胞大致分为中性粒细胞 (PMN)、单核细胞(Mono)和淋巴细胞(LYM)共 3 群细胞。然后分别以三群细胞设门, 根据侧向角检测 FITC 的荧光强度。以阳性细胞的百分率作为检测结果。

3. 结果分析:

通过流式细胞以将外周血白细胞清晰地分为三个群体, 中性粒细胞、单核细胞和淋巴细胞, 如图 3 所示。本研究主要对中性粒细胞和淋巴细胞进行分析, 单核细胞 CD146 的变化趋势与中性粒细胞和淋巴细胞一致。

分析患者活动期和缓解期白细胞表面 CD146 动态表达。不同类型的血管炎患者, 同一个患者所处不同的疾病期, 其外周血白细胞表面 CD146 的表达量都有很大的差异。图 4 所示为选取其中三个患者, 分析 CD146

分子在中性粒细胞及淋巴细胞上的动态表达。从中可以看出不同类型的患者 CD146 表达差异很大，大血管炎 TA 患者表达量与健康对照相比没有显著性差异低于 10%；较之健康人小血管炎差异显著 (WG: $P < 0.00$; MPA: $P < 0.05$; CSS: $P < 0.05$; SLE: $P < 0.01$)，表达量均在 20% 以上。分析总结见表 3。活动期与缓解期的淋巴细胞 CD146 的阳性率为 $16.7 \pm 3.6\%$ ，治疗后为 $3.0 \pm 0.7\%$ ($P = 0.003$)；二者的比较见图 5。

从这些结果不难看出 CD146 在外周血白细胞上的表达与疾病所处的阶段有很好的相关性，随着治疗的作用，病人的状况也得到缓解，CD146 的表达也随之下降。

表 3. 流式细胞术检测系统性血管炎外周血白细胞 CD146 的动态表达

分组 (n)	中性粒细胞 CD146 表达 (%)			淋巴细胞 CD146 表达 (%)		
	活动期 (n)	缓解期 (n)	P	活动期 (n)	缓解期 (n)	P
正 常 (20)	3.20 ± 1.83			2.37 ± 2.36		
TA (11)	8.2 ± 4.1 (7)	4.5 ± 2.4 (4)	0.109	5.4 ± 3.8	3.3 ± 1.4	0.22
WG (16)	28.6 ± 18.8 (6)	3.4 ± 2.3 (10)	0.001*	13.9 ± 8.8	4.3 ± 3.1	0.044*
MPA (19)	20.5 ± 25.0 (13)	2.6 ± 2.0 (6)	0.025*	7.3 ± 8.4	3.3 ± 1.3	0.275
CSS (6)	30.9 ± 29.9 (3)	4.8 ± 3.9 (3)	0.033*	15.4 ± 14.0	3.0 ± 1.6	0.13
SLE (19)	37.5 ± 27.5 (9)	9.4 ± 4.3 (10)	0.008*	25.0 ± 13.0	7.3 ± 2.7	0.001*

注：TA:大动脉炎；WG:韦格纳肉芽肿；MPA:显微镜下多血管炎；CSS:变应性肉芽肿性血管炎；SLE:系统性红斑狼疮。与正常对照相比，活动期 CD146 的表达有显著性差异，而治疗后处于缓解期这种显著性差异消失了。

实施例 3

ELISA 检测 sCD146 在自身免疫疾病患者血清中的含量

1. 样品来源及临床资料：所有患者共计 67 例均为临床资料完整的 2004 年 4 月至 2005 年 4 月北京协和医院内科住院患者。患者诊断均符合 1990 年美国风湿病学会（ACR）系统性血管炎的分类标准。系统性红斑狼疮（SLE）患者符合 1982 年 ACR 的分类标准。患者具体情况见表 3。12 其中包括 2 例 BD，4 例 CSS，4 例 MPA，1 例 SLE，1 例 WG。例患者在明确诊断且为活动期时及治疗好转后两个时间点分别进行了检测。

2. 具体实施步骤：

1) 血清的采集：早晨空腹抽取血液 2ml,凝集 30 分钟左右后离心，2000rpm×5 分钟后收取血清，分装后冻存于-70℃冰箱备用。

2) sCD146 的检测：采用夹心 ELISA 方法分别检测血浆 sCD146 水平，操作步骤按照试剂盒说明书要求实施。检测的敏感性分别是 10ng/ml。数据于全自动酶标仪上测量吸光值（单波长，492nm）。每份样品做复孔。

3) 根据标准品梯度制作出标准曲线，并根据计算公式计算出每个样品中 sCD146 的含量。

表 4. 系统性血管炎患者的一般情况

诊断	年龄	性别 (M/F)	n
BD	34±13	7/7	14
WG	35±12	14/7	21
MPA	56±14	9/7	16
SLE	32±13	3/13	16
健康 Y	33±9	9/7	16
健康 O	59±11	9/9	18

注：健康 Y：平均年龄在 33±9 的正常人；健康 O：平均年龄在 59±11 的正常人。M：女性；F：男性。

3. 结果分析：

1) 标准曲线 $R^2=0.9987$ 具有很好的线性回归。

2) 相对于正常人仅 MPA 患者 sCD146 水平有显著性差异($P<0.01$)，

与 MPA 中性粒细胞上 CD146 表达趋势相吻合。

3) 另外在 12 例治疗组中 10 名患者 sCD146 水平再经过治疗后水平都上升了, 经配对 t 检验统计分析显示在 0.05 水平上, 相对于治疗前具有显著性差异。这与实施例二中治疗后外周血白细胞上的表达下降恰好相反。

参考文献

Bardin, N., V. Moal, et al. (2003). "Soluble CD146, a novel endothelial marker, is increased in physiopathological settings linked to endothelial junctional alteration." Thromb Haemost **90**(5): 915-20.

Blann, A. D., A. Woywodt, et al. (2005). "Circulating endothelial cells. Biomarker of vascular disease." Thromb Haemost **93**(2): 228-35.

Neidhart, M., R. Wehrli, et al. (1999). "Synovial fluid CD146 (MUC18), a marker for synovial membrane angiogenesis in rheumatoid arthritis." Arthritis Rheum **42**(4): 622-30.

Yan, X., Y. Lin, et al. (2003). "A novel anti-CD146 monoclonal antibody, AA98, inhibits angiogenesis and tumor growth." Blood **102**(1): 184-91.

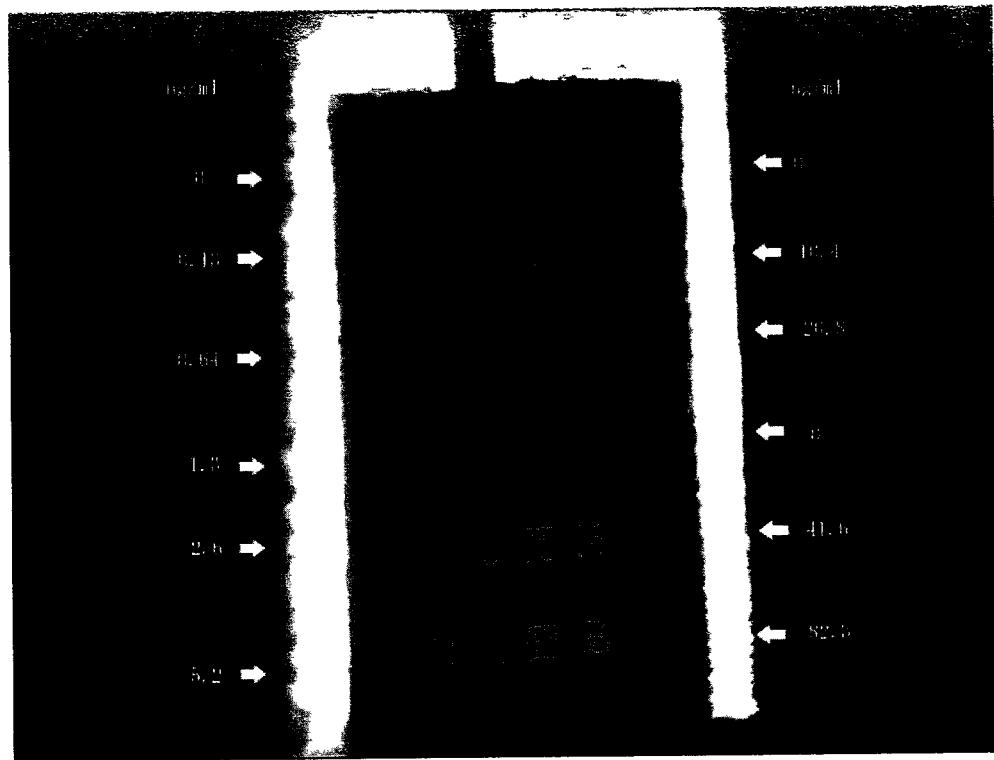


图 1

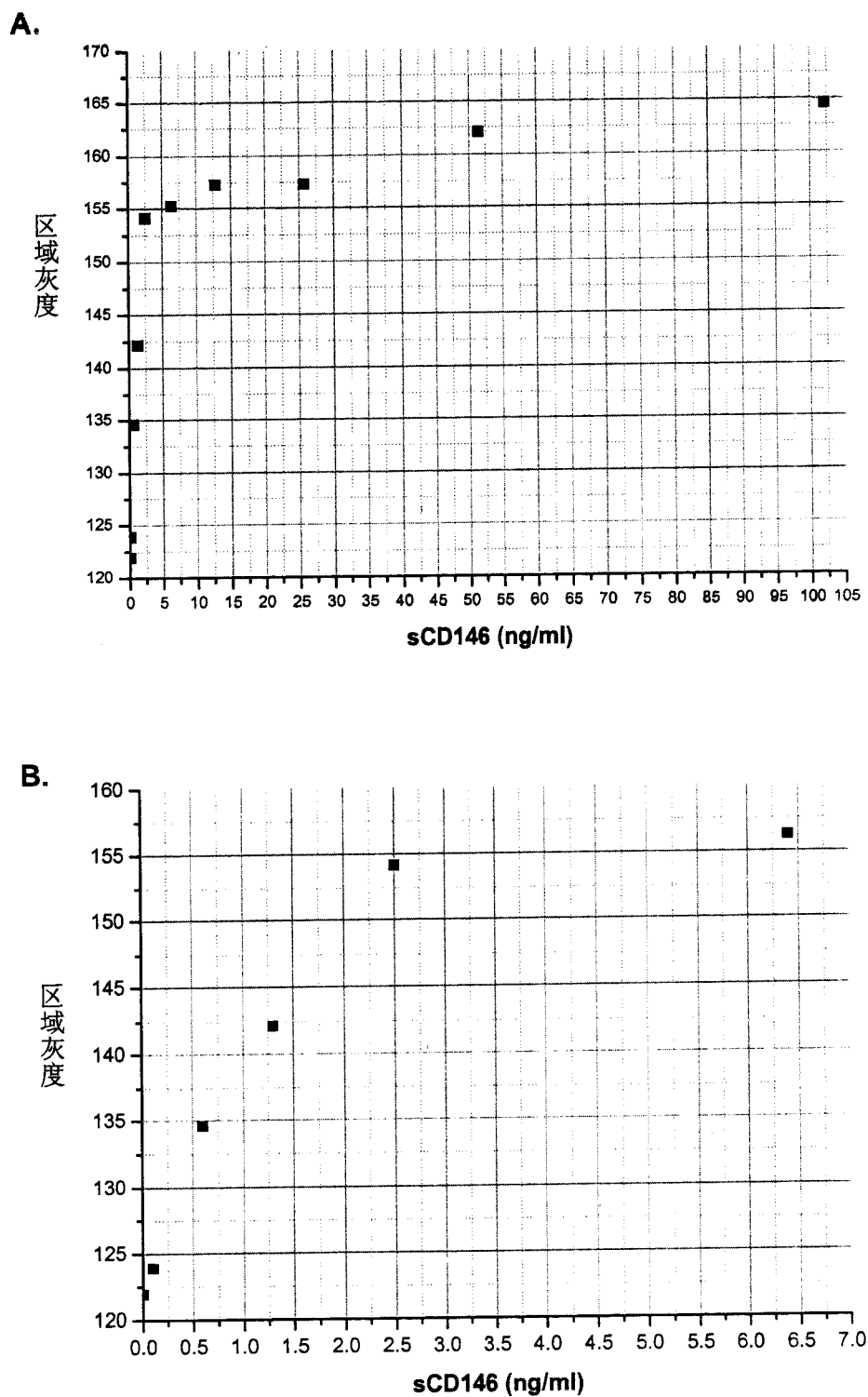


图 2

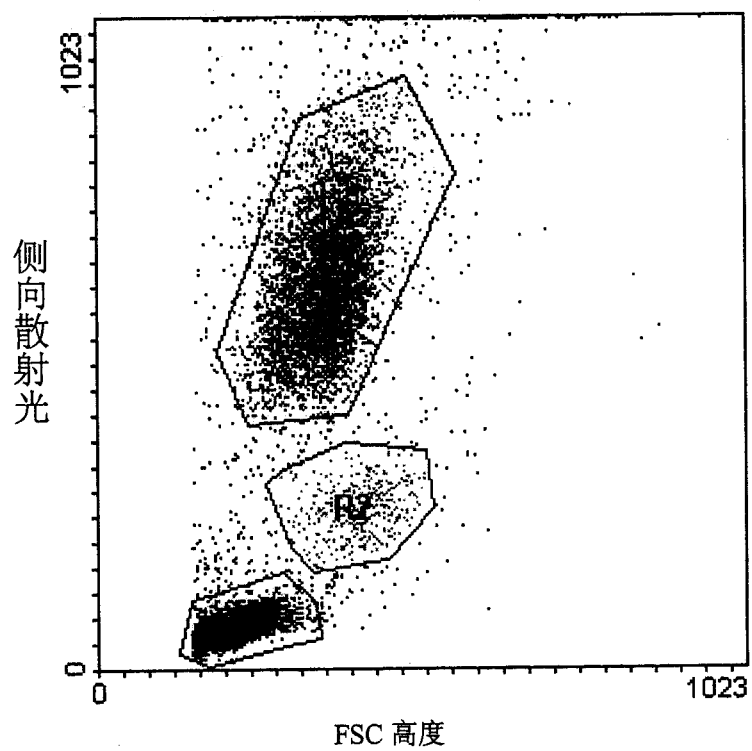


图 3

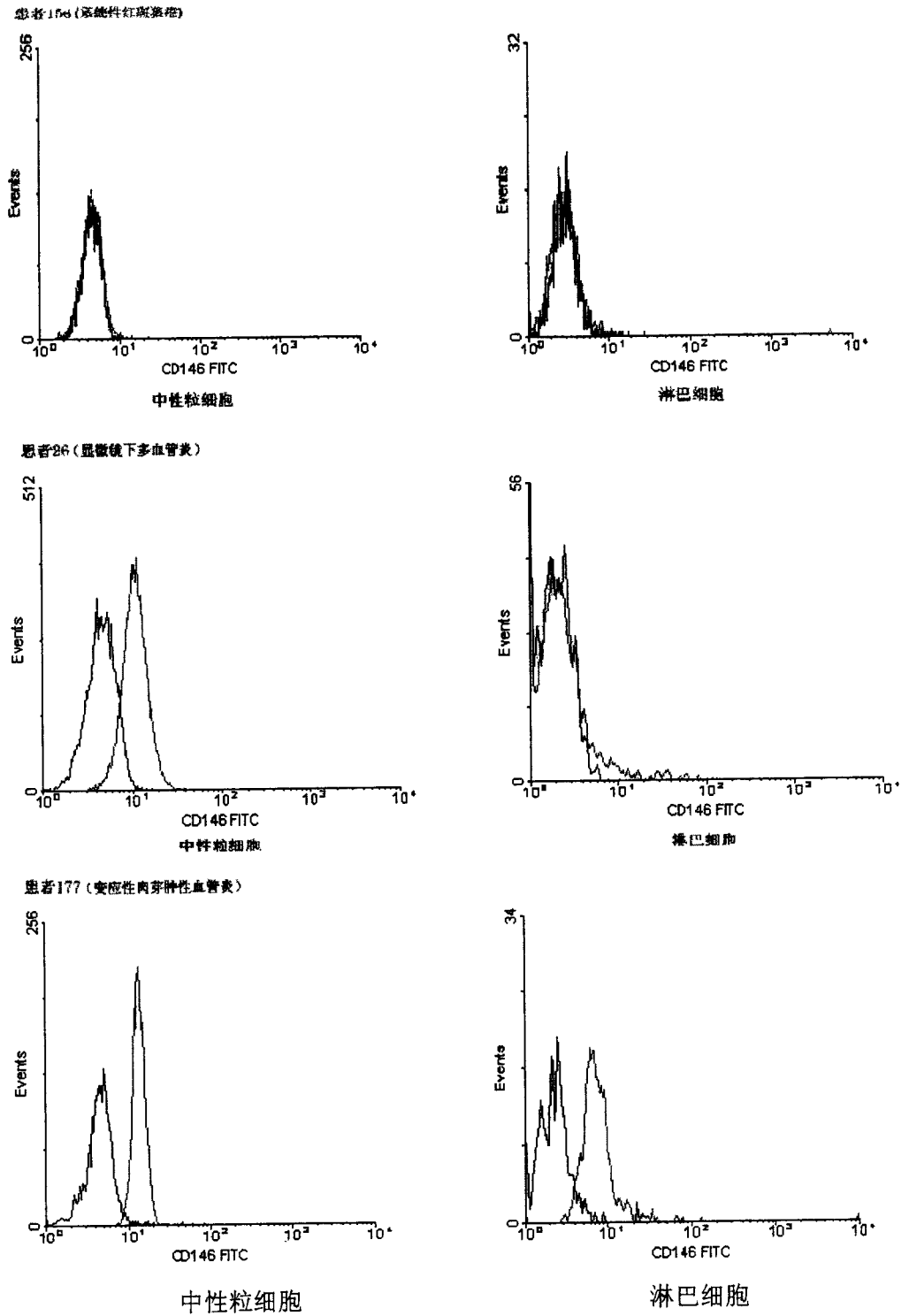


图 4

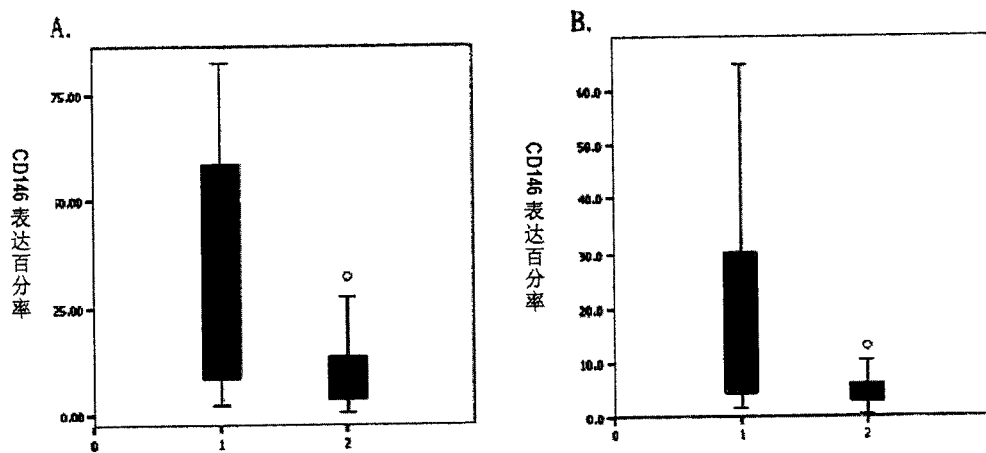


图 5

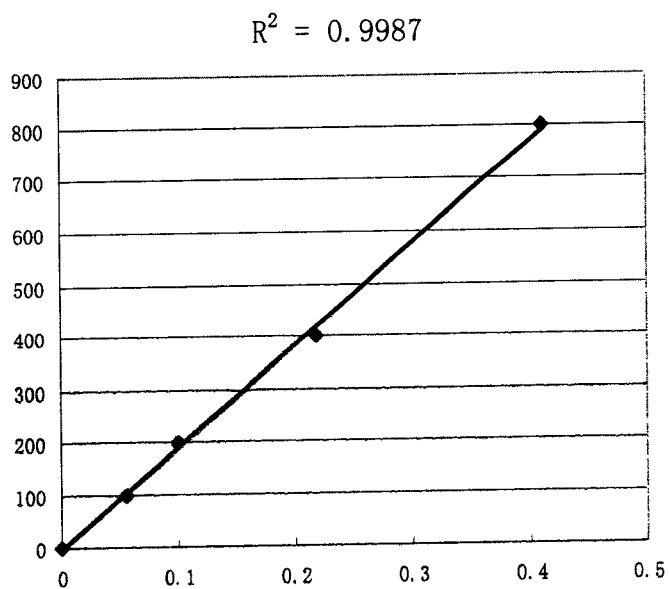


图 6

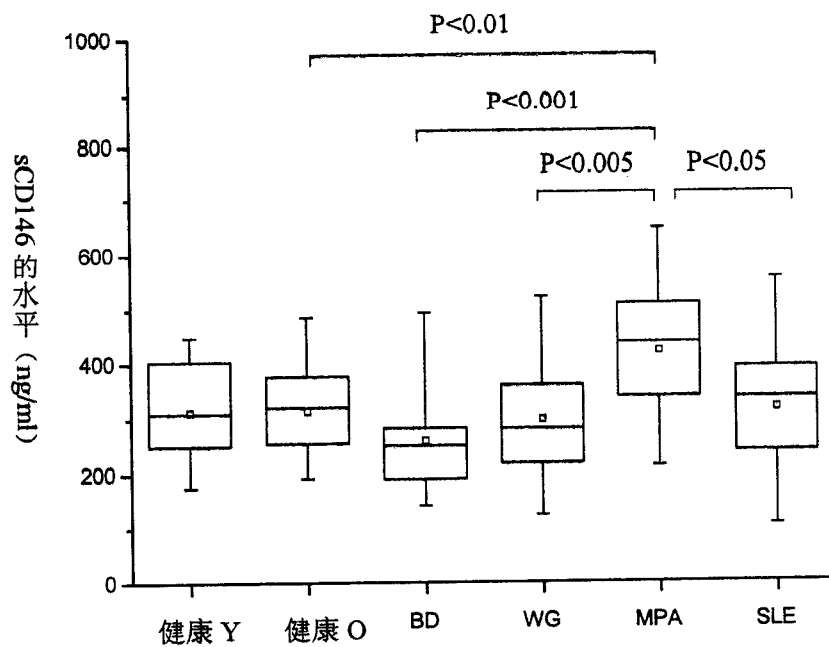


图 7

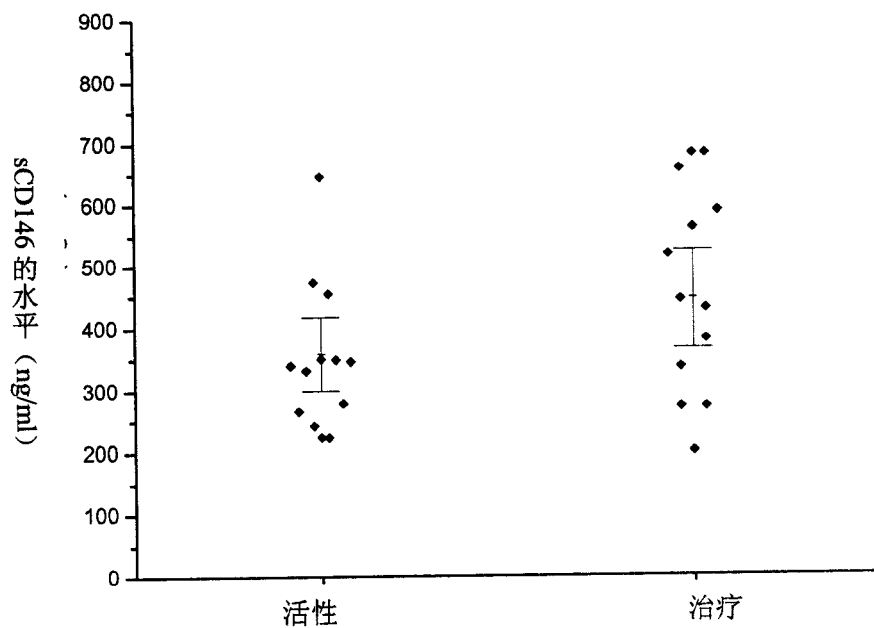


图 8