

团 体 标 准

T/TPPA 0007-2024

基于血小板活化生物标志物 CD62p 检测的 中药注射剂活血化瘀活性评价方法操作 规程

Operating procedure for evaluating the potent of traditional Chinese medicine injection for promoting blood circulation and removing blood stasis based on activated platelet biomarker test

2024-05-31 发布

2024-05-31 实施

天津市医药行业协会 发布

目 次

前 言	I
1 范围	1
2 规范性引用文件	1
3 术语和定义	1
4 检测原理	1
5 材料与设备	2
5.1 材料	2
5.2 设备	2
6 实验方法	2
6.1 溶液配制	2
6.2 实验步骤	2
7 数据处理及判定	4

前 言

本文件按照 GB/T1.1-2020《标准化工作导则第1部分：标准化文件的结构和起草规则》的规定起草。

请注意本文件的某些内容可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别这些专利的责任。

本文件由天津市药品检验研究院提出。

本文件由天津市医药行业协会归口。

本文件起草单位：天津市药品检验研究院、天津天士力之骄药业有限公司、现代中药创制全国重点实验室、天津药物研究院有限公司、天津红日药业股份有限公司、津药达仁堂集团有限公司中药研究院、天津宏仁堂药业有限公司、津药达仁堂集团股份有限公司乐仁堂制药厂。

本文件主要起草人：王冲、税凤春、徐琳、岳洪水、张铁军、田成旺、周学海、宋纹、张培元、华晓东、杨天骄、贾文婷、刘萍、许浚、延阔、侯钰卓、张营、张慧、刘丽、聂晓洁、张俊华、何毅。

基于血小板活化生物标志物 CD62p 检测的中药注射剂活血化瘀活性评价方法操作规程

1 范围

本文件规定了以体外血小板活化生物标志物P-选择素（CD62p）评价中药注射剂活血化瘀活性的实验方法。

本文件适用于以活化血小板为靶点的活血化瘀类中药注射剂的活性评价，对于作用于其他靶点如改善血液流变学等的活血化瘀类中药注射剂不适用。

2 规范性引用文件

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成本文件必不可少的条款。其中注日期的引用文件，仅该日期对应的版本适用于本文件；不注日期的引用文件，其最新版本（包括所有的修改单）适用于本文件。

- GB 14925 实验动物 环境及设施
- GB 19489 实验室 生物安全通用要求
- GB/T 24001 环境管理体系 要求及使用指南
- GB/T 45001 职业健康安全管理体系要求及使用指南

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

生物标志物 biomarker

又称生物学标记或生物标志，指反映生物体系与外源化学物、物理和生物因素之间相互作用的任何可测定的指标，包括化学、生化、生理、行为或其他的改变。

3.2

流式细胞术 flow cytometry

系以流式细胞仪为工具，通过多种单克隆的抗体以及荧光染料，测定一个细胞的一种或多种参数，用于判断细胞的属性和分化程度。

4 检测原理

对血小板功能的影响是活血化瘀类中药临床功效的主要评价指标之一，《实用流式细胞术-血液病篇》及大量临床研究实践表明，血小板膜糖蛋白P-选择素（CD62p）是临床上判定血小板活化程度及血栓形成的特异性生物标志物，因此用CD62p作为生物标志物可以准确可靠的评价活血化瘀类中药注射剂的活血化瘀作用。血小板活化后，CD62p表达上调，程度与血小板活化有很强的相关性。二磷酸腺苷（ADP）为一种较为温和的血小板活化诱导剂，可适度活化血小板，引发后续血小板凝集、血栓等反应。具有活血化瘀功能的药物应能拮抗ADP作用，下调血小板CD62p表达，发挥活血化瘀作用。

本法系将一定量的供试品与大鼠抗凝血混合，作用一定时间后，以流式细胞术检测生物标志物的方法测定经ADP激活的血小板活化率，并与供试品作用前进行比较，判定该供试品是否具有活血化瘀作用。

5 材料与设备

5.1 材料

5.1.1 实验动物

大鼠，SD或Wistar，8只，体重250g~350g，雌雄各半，雌鼠应无孕。实验动物应从取得实验动物生产许可证资质的单位购进。在实验期间应按国家对实验动物饲养条件要求进行饲养。动物饲养符合GB14925和GB/T24001的要求，动物实验符合GB19489和GB/T 45001的要求。

5.1.2 试剂试药

- a) anti-mouse/rat CD62p PE-Cy7、Anti-Mouse/Rat CD61 PE、Rat IgG2a PE-Cy7、Rat IgG1 PE。
- b) ADP、3.8%枸橼酸钠、4%多聚甲醛（固定液）、缓冲液、补偿微球、PBS（pH 7.2~7.4）。

5.2 设备

流式细胞仪。

6 实验方法

6.1 溶液配制

除另有规定外，按各品种项下规定的浓度配制成所需浓度的供试品溶液备用。

6.1.1 20 μM ADP溶液的配制

精密称定ADP适量，加入0.9%氯化钠注射液配成浓度为20 μM的溶液备用。配制后可分装，-20℃冻存，7天内使用。不可反复冻融。

6.1.2 3.8%枸橼酸钠溶液的配制

称定枸橼酸钠适量，用纯化水配成3.8%的枸橼酸钠溶液备用，如无浑浊等异常可在3个月内使用。

6.2 实验步骤

6.2.1 抗凝血的采集

大鼠 8 只，雌雄各半，乙醚轻麻醉后，采用玻璃毛细管眼眶取血 500 μL ~1000 μL ，分别置于采血管中(按 9:1 的比例预加入 3.8%枸橼酸钠抗凝)，轻轻混匀，备用。采血前动物应禁食 16 h~24h。

6.2.2 抗凝血的分组

将每只动物采集的抗凝血分成 3 份，每份 50 μL ，一份为空白血样，一份为基础血样，一份为加药血样。

6.2.3 血样的制备

空白血样的制备：取抗凝血 50 μL ，加入 0.9%氯化钠注射液 50 μL ，轻轻摇匀，37 $^{\circ}\text{C}$ \pm 1 $^{\circ}\text{C}$ 作用 5min，作为空白血样备用。

基础血样的制备：另取抗凝血 50 μL ，加入 0.9%氯化钠注射液 50 μL ，轻轻摇匀，37 $^{\circ}\text{C}$ \pm 1 $^{\circ}\text{C}$ 作用 5min，作为基础血样备用。

加药血样的制备：另取抗凝血 50 μL ，加入适宜浓度供试品溶液 50 μL ，轻轻摇匀，37 $^{\circ}\text{C}$ \pm 1 $^{\circ}\text{C}$ 作用适宜时间，作为加药血样备用。

ADP 激活血样的制备：分别取上述基础血样和加药血样，各加入 100 μL 浓度为 20 μM 的 ADP 激活，使得 ADP 的终浓度为 10 μM ，涡旋混匀 1s，反应 2min。

6.2.4 抗体标记

a) 血小板的标记取上述各组血样，分别加入抗体 CD62p PE-Cy7 和 CD61 PE 各 1.0 μL ~2.0 μL 双标，以 CD61 标记所有血小板，以 CD62p 标记活化血小板。

b) 同型对照为证明上述抗体的结合具有特异性，应设置同型对照管。另取抗凝血 50 μL ，同体积 20 μM 的 ADP 激活，再加入 IgG2a PE-Cy7 和 IgG1 PE 各 1.0 μL ~2.0 μL 标记，作为同型对照管。

c) CD61 PE 单标另取任意空白血样一份，同体积 ADP 激活后，只加入抗体 CD61 PE 各 1.0 μL ~2.0 μL 标记。

6.2.5 孵育

上述各血样加入不同抗体后，4 $^{\circ}\text{C}$ \pm 1 $^{\circ}\text{C}$ 避光孵育 20min。

6.2.6 固定

各管孵育结束后加入固定液 0.5mL，固定 10min~20min，4 $^{\circ}\text{C}$ \pm 1 $^{\circ}\text{C}$ ，避光。

6.2.7 稀释

上述各血样加入不同抗体后，4 $^{\circ}\text{C}$ \pm 1 $^{\circ}\text{C}$ 避光孵育 20min。分别取固定后的各组血样 50 μL ，加入 1mL 稀释液稀释（稀释约 250 倍），可根据情况适当调整稀释倍数，防止浓度过大，分离不佳。加入稀释液后静置 1min~2min，溶液澄清后准备上机分析。

6.2.8 上机分析及参数设定

a) 检测通道的选择根据配备的激光器和抗体所采用的荧光染料，选择相应的检测通道。（本实验中采用PE和PE-Cy7两种染料，因此选择BL2、BL4检测通道）。

b) 补偿：由于本实验中采用的是PE和PE-Cy7两个染料（BL2、BL4检测通道），荧光激发波长分别为574nm和780nm，干扰较小可以不用调补偿；但如采用其他染料或对试验结果不满意时，可取补偿微球，分别加入适量CD62p和CD61抗体标记后上机检测，通过补偿去除二者间相互干扰。

c) 上样速度控制细胞获取速度在每秒200个~400个细胞，一般可选择25 μ L/min。

6.2.9 R1门和十字门的划分

为区分所有的血小板以及活化的血小板，需首先划定R1门和十字门。一般采用上述CD61 PE单标的血样，孵育、固定、稀释后上机检测，用于R1门和十字门的划分。

a) R1门的划定确定靶细胞群（单一的血小板），同时去除细胞碎片和细胞聚集体对试验的干扰。采用氩离子激光（BLUE 488nm），在以CD61-PE-H/SSC-H为坐标的图中，荧光强度较强，细胞较小的细胞团为单一的血小板。将血小板圈定为R1门，门内收集5000个~10000个血小板。

b) 十字门的划定在已确定的血小板细胞群中，划分活化的和未活化的血小板。以CD61-PE-H为横坐标，CD62-PE-CY7-H为纵坐标的坐标系中划分十字门，十字门右上方为CD61、CD62p双阳性（即为活化血小板），右下方为CD61单阳性。

以CD61 PE单标血样为标准绘制十字门，确定十字门横纵线的坐标，在十字门右上方和左下方应无任何细胞或仅有极少量细胞，十字门的横线和纵线应以尽可能满足该条件为前提确定坐标位置。

6.2.10 血小板活化率检测

a) 同型对照管的检测采用IgG2a PE-Cy7和IgG1 PE标记的同型对照血样，在上述十字门的各相限中均应无或仅有极少量细胞，表明CD62p PE-Cy7和CD61 PE与不同状态血小板结合均有其特异性。

b) 空白血样血小板活化率检测分别取空白血样，固定、稀释后，以上述划定的R1门和十字门为标准上机分析，记录空白血样的血小板活化率。空白血样血小板活化率均应小于1.5%，否则该动物血样不得用于检测和结果判定。

c) 基础血样的血小板活化率检测取ADP激活的基础血样，固定、稀释后，以上述划定的R1门和十字门为标准上机分析，记录其ADP激活血样的血小板活化率。

d) 加药血样的血小板活化率检测取ADP激活的加药血样，固定、稀释后，以上述划定的R1门和十字门为标准上机分析，记录其ADP激活血样的血小板活化率。

7 数据处理及判定

空白血样的血小板活化率均小于1.5%时，各组的血小板活化率检测结果才可用于结果判定。

采用配对资料t检验进行统计，与基础血样比较，加药血样的血小板活化率降低有显著性差异，则判定供试品有活血化瘀作用。反之则判定供试品无活血化瘀作用。

全国团体标准信息平台