

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 200410020174.0

[51] Int. Cl.

G01N 33/15 (2006.01)

G01N 33/50 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

[45] 授权公告日 2006 年 5 月 3 日

[11] 授权公告号 CN 1254682C

[22] 申请日 2004.7.28

[21] 申请号 200410020174.0

[71] 专利权人 南开大学

地址 300071 天津市卫津路 94 号

[72] 发明人 陈 强 陈可冀 李 静 殷惠军

吴宝艳 黄加栋 韩松岩 史海滨

审查员 石剑平

[74] 专利代理机构 天津市学苑有限责任专利代理事
务所

代理人 胡安朋

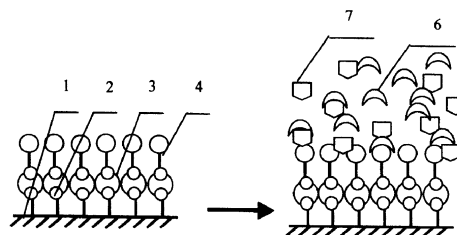
权利要求书 2 页 说明书 12 页 附图 7 页

[54] 发明名称

测定中药作用机理的方法

[57] 摘要

本发明的技术方案涉及应用生物传感分析技术来测定中药作用机理的方法，应用亲和型特异选择性生物传感器 IAsys plus 来检测中药有效成分与细胞因子的相互作用、与细胞因子受体的相互作用、以及对细胞因子与其受体间相互结合的影响情况，分析中药有效成分的作用靶点和作用机理，弄清中药的作用机理，并且可以由此进行中药的筛选及其配伍，本发明方法具有实时性、高效性、敏感性、特异性、简易性、客观性的优点。



1. 测定中药作用机理的方法, 应用亲和型特异选择性生物传感器 IAsys plus 来检测中药有效成分与细胞因子的相互作用、与细胞因子受体的相互作用、以及对细胞因子与其受体间相互结合的影响情况, 分析中药有效成分的作用靶点和作用机理, 具体的操作步骤是:

A. 细胞因子生物素衍生化: 将 4~100 μg 细胞因子加入 200~500 μL 浓度为 0.01mol/L pH=7.4 的磷酸盐缓冲液中; 将 1~2mg SULFO-NHS-LC-BIOTIN 活化生物素溶解于 120 μL 去离子水中, 取其 20~50 μL 加入上述细胞因子溶液中, 混匀, 室温下避光反应 4 小时后, 在 4℃ 温度下, 以 10000 转/分钟超滤离心 10 分钟, 截留物溶解于 200 μL 磷酸盐缓冲液中, 完成细胞因子生物素衍生化;

B. 细胞因子受体生物素衍生化: 将 4~100 μg 细胞因子受体加入 200~500 μL 0.01mol/L pH=7.4 磷酸盐缓冲液中; 1~2mg SULFO-NHS-LC-BIOTIN 活化生物素溶解于 120 μL 去离子水中, 取其 20~50 μL 加入上述细胞因子受体溶液中, 混匀, 室温避光反应 4 小时后, 在 4℃ 温度下, 以 10000 转/分钟超滤离心 10 分钟, 截留物溶解于 200 μL 磷酸盐缓冲液中, 完成细胞因子受体生物素衍生化;

C. 将生物素衍生化的细胞因子受体接合在样品池表面, 观察细胞因子与其受体相互作用:

(1) 将亲和型生物传感系统 IAsys plus 开机预热 1 小时, 参数设置: 采样间隔时间 1 秒, 搅拌 85 转/分, 温度 22℃, 亲和型生物传感系统 IAsys plus 是由 Thermo Life Sciences 公司提供, 其样品池表面已事先包被生物素;

(2) 将亲和素 Streptavidin 接合至样品池表面: IAsys 样品池用 40 μL PBST 洗 3 遍, 平衡 10 分钟, 采集基线, 加入 20 μL 2mg/mL 亲和素 Streptavidin, 反应 10~20 分钟, 用 40 μL PBST 洗 3 遍, 收集数据, PBST 为含 0.05% 吐温 20 (v/v) 的磷酸盐缓冲液;

(3) 生物素衍生化细胞因子受体包被样品池: 在样品池表面接合亲和素 Streptavidin 的 IAsys 样品池中加入上述 B 步中制取的 20 μL 生物素衍生化的细胞因子受体, 反应 3~25 分钟, 用 40 μL PBST 洗 3 遍, 采集数据;

(4) 细胞因子与其受体结合反应: 在经上述 (3) 步处理的 IAsys 样品池中加入浓度为 0.05~0.5mg/mL 的 20 μL 细胞因子溶液, 接合反应 5~25 分钟, 用 50 μL PBST 洗 3 遍, 采集数据;

D. 将生物素衍生化的细胞因子受体接合在样品池表面, 观察细胞因子受体与至少一种中药有效成分的相互作用:

(1) 同 C 步 (1);

(2) 同 C 步 (2);

(3) 同 C 步(3);

(4) 细胞因子受体与中药有效成分结合反应: 在经上述(3)步处理的 IAsys 样品池中加入浓度为 $10^{-5} \sim 10^{-1} \text{M}$ 的 $20 \mu\text{L}$ 至少含一种中药有效成分的溶液, 接合反应 5~25 分钟, 用 $50 \mu\text{L}$ PBST 洗 3 遍, 采集数据;

E. 将生物素衍生化的细胞因子接合在样品池表面, 观察细胞因子与至少一种中药有效成分的相互作用:

(1) 同 C 步(1);

(2) 同 C 步(2);

(3) 生物素衍生化细胞因子包被样品池: 在经过上述(2)处理的 IAsys 样品池中加入上述 A 步中制取的调节浓度为 $0.05 \sim 0.5 \text{mg/mL}$ 的 $20 \mu\text{L}$ 生物素衍生化的细胞因子, 反应 3~25 分钟, 用 $40 \mu\text{L}$ PBST 洗 3 遍, 采集数据;

(4) 细胞因子与中药有效成分结合反应: 在经上述(3)步处理的 IAsys 样品池中加入浓度为 $10^{-5} \sim 10^{-1} \text{M}$ 的 $20 \mu\text{L}$ 至少含一种中药有效成分的溶液, 接合反应 5~25 分钟, 用 $50 \mu\text{L}$ PBST 洗 3 遍, 采集数据;

F. 将生物素衍生化的细胞因子受体接合在样品池表面, 观察中药有效成分对细胞因子与其受体结合的影响:

(1) 同 C 步(1);

(2) 同 C 步(2);

(3) 同 C 步(3);

(4) 中药有效成分对细胞因子与其受体结合的影响: 在经上述(3)步处理的 IAsys 样品池中加入浓度为 $0.05 \sim 0.5 \text{mg/mL}$ 的 $20 \mu\text{L}$ 细胞因子与浓度为 $10^{-5} \sim 10^{-1} \text{M}$ 的 $20 \mu\text{L}$ 至少一种中药有效成分的混合液, 接合反应 5~25 分钟, 用 $50 \mu\text{L}$ PBST 洗 3 遍, 采集数据;

G. 实验结果: 对实验采集数据所形成的反应曲线和结合曲线进行分析, 可以确定中药有效成分对细胞因子与其受体相互结合的影响, 从而看出有些中药有效成分可增强某些细胞因子与其受体的结合, 有些中药有效成分可抑制某些细胞因子与其受体的结合, 有些中药有效成分则不影响某些细胞因子与其受体的结合, 由此, 可进一步推论和证实中药的作用机理: 影响细胞因子-受体体系的相互结合也是中药有效成分在体内的作用位点之一, 中药有效成分通过调节某些细胞因子与其受体的相互结合, 从而影响或改变细胞因子的功能与生理、病理作用, 进而发挥对疾病的疗效; 进而根据不同中药有效成分以及它们的不同配伍所进行的对比实验, 得出不同中药有效成分及其不同的配伍对细胞因子与其受体结合影响的强弱程度, 可进一步研究中药配伍机理及药物筛选和新药开发。

测定中药作用机理的方法

技术领域

本发明的技术方案涉及将生物传感技术应用于测试或分析材料，具体说是应用生物传感分析技术来测定中药作用机理的方法。

背景技术

在近半个世纪的中医药现代研究过程中，无论是对单味药还是复方的组合运用，中药的临床疗效和药理研究较多，而对于中药的作用机理，由于缺少适宜的研究方法和手段尚未深入研究，这成为中医药进一步研究和发展的瓶颈之一。近年来，随着仪器分析技术的发展，如 ESI/APCI-MS、NMR 以及多学科在中医药研究上相互交流的增进，在中药现代化研究领域中出现了一些新方法、新理论，如血清药理学、初级的中药效应成分动力学。这些成果对中医药的研究产生了新的推动，为中医药的研究增添了活力。日本富山医科药科大学在汉方药的研究中借鉴了西药药物的研究方法，主要从单成分-单靶点研究中药的有效成分，并对中药有效成分的药代动力学做了大量工作。近年来，基因芯片技术开始在中医药研究中得到应用，在中药的物质基础研究上取得进展，然而对细胞因子及其受体与中药有效成分之间结合的强弱和结合过程无法进行研究，对中药的作用机理仍解释不清（张发宝，李欣梅，周逸平，基因芯片技术在中医药研究中的应用，安徽中医学院学报 2002，21（3））。中药的作用机理说不清楚则会影响到中药的出口，不利于中药走向世界。

目前理论上较为普遍的观点认为，中药的作用机理可能是中药能够调节细胞因子网络的功能态平衡（申维玺 刘玉梅，细胞因子网络与中药的作用机理，世界科学技术—中药现代化，2000，2（6）：24—27），这只是一个观点，还没有得到实验测定数据的证明。中药对细胞因子网络的调节作用是通过中药对细胞因子与其受体之间的特异性亲和作用的影响来实现的，如果能够测定中药有效成分对于细胞因子和受体间相互结合的影响情况，也就弄清了中药的作用机理，并且可以由此进行中药的筛选及其配伍。目前，虽然已有研究者应用分子生物学方法检测相关细胞因子表达的变化（陈执中，生物特异相互作用分析及其应用进展，中国新药杂志，2001，10（11）：829；李红，周谋，中药对粘附分子表达调节的研究，中医药学报，2002，30（1）：27—29），但仍未见有测定中药有效成分对于细胞因子与其受体间相互结合的影响情况的研究报道。

经专利文献检索，目前尚未发现有有关测定中药作用机理的专利文献报道。United States Patent Application 20020098590 “Method and device for diagnosing disease patterns in Traditional Chinese Medicine”、United States Patent Application 20030207280 “Determination of physiological conditions defined in traditional chinese medicine” 和 United States Patent 6,673,624 “Method and device for diagnosing disease patterns in Traditional Chinese Medicine” 虽然属于 IPC 分类 G01N33/00—利用特殊的方法来测试或分析材料的技术领域，但与本发明的技术主题毫不

相关。

发明内容

本发明所要解决的技术问题是：提供一种应用生物传感分析技术来测定中药作用机理的方法，该发明方法通过测定中药有效成分对细胞因子与其受体间相互结合的影响情况，弄清中药的作用机理，并且可以由此进行中药的筛选及其配伍。

本发明解决该技术问题所采用的技术方案是：应用亲和型特异选择性生物传感器 IAsys plus 来检测中药有效成分与细胞因子的相互作用、与细胞因子受体的相互作用、以及对细胞因子与其受体间相互结合的影响情况，分析中药有效成分的作用靶点和作用机理，具体的操作步骤是：

A. 细胞因子生物素衍生化：将 $4\sim 100\ \mu\text{g}$ 细胞因子加入 $200\sim 500\ \mu\text{L}$ 浓度为 0.01mol/L $\text{pH}=7.4$ 的磷酸盐缓冲液中；将 $1\sim 2\text{mg}$ SULFO-NHS-LC-BIOTIN 活化生物素溶解于 $120\ \mu\text{L}$ 去离子水中，取其 $20\sim 50\ \mu\text{L}$ 加入上述细胞因子溶液中，混匀，室温下避光反应 4 小时后，在 4°C 温度下，以 10000 转/分钟超滤离心 10 分钟，截留物溶解于 $200\ \mu\text{L}$ 磷酸盐缓冲液中，完成细胞因子生物素衍生化；

B. 细胞因子受体生物素衍生化：将 $4\sim 100\ \mu\text{g}$ 细胞因子受体加入 $200\sim 500\ \mu\text{L}$ 0.01mol/L $\text{pH}=7.4$ 磷酸盐缓冲液中； $1\sim 2\text{mg}$ SULFO-NHS-LC-BIOTIN 活化生物素溶解于 $120\ \mu\text{L}$ 去离子水中，取其 $20\sim 50\ \mu\text{L}$ 加入上述细胞因子受体溶液中，混匀，室温避光反应 4 小时后，在 4°C 温度下，以 10000 转/分钟超滤离心 10 分钟，截留物溶解于 $200\ \mu\text{L}$ 磷酸盐缓冲液中，完成细胞因子受体生物素衍生化；

C. 将生物素衍生化的细胞因子受体接合在样品池表面，观察细胞因子与其受体相互作用：

(1) 将亲和型生物传感系统 IAsys plus 开机预热 1 小时，参数设置：采样间隔时间 1 秒，搅拌 85 转/分，温度 22°C ，亲和型生物传感系统 IAsys plus 是由 Thermo Life Sciences 公司提供，其样品池表面已事先包被生物素；

(2) 将亲和素 Streptavidin 接合至样品池表面：IAsys 样品池用 $40\ \mu\text{L}$ PBST 洗 3 遍，平衡 10 分钟，采集基线，加入 $20\ \mu\text{L}$ 2mg/mL 亲和素 Streptavidin，反应 10~20 分钟，用 $40\ \mu\text{L}$ PBST 洗 3 遍，收集数据，PBST 为含 0.05% 吐温 20 (v/v) 的磷酸盐缓冲液；

(3) 生物素衍生化细胞因子受体包被样品池：在样品池表面接合亲和素 Streptavidin 的 IAsys 样品池中加入上述 B 步中制取的 $20\ \mu\text{L}$ 生物素衍生化的细胞因子受体，反应 3~25 分钟，用 $40\ \mu\text{L}$ PBST 洗 3 遍，采集数据；

(4) 细胞因子与其受体结合反应：在经上述 (3) 步处理的 IAsys 样品池中加入浓度为 $0.05\sim 0.5\text{mg/mL}$ 的 $20\ \mu\text{L}$ 细胞因子溶液，接合反应 5~25 分钟，用 $50\ \mu\text{L}$ PBST 洗 3 遍，采集数据；

D. 将生物素衍生化的细胞因子受体接合在样品池表面，观察细胞因子受体与至少一种中药有效成分的相互作用：

(1) 同 C 步 (1)；

(2)同C步(2);

(3)同C步(3);

(4)细胞因子受体与中药有效成分结合反应:在经上述(3)步处理的 IAsys 样品池中加入浓度为 $10^{-5} \sim 10^{-1} \text{M}$ 的 $20 \mu\text{L}$ 至少含一种中药有效成分的溶液,接合反应 $5 \sim 25$ 分钟,用 $50 \mu\text{L}$ PBST 洗 3 遍,采集数据;

E. 将生物素衍生化的细胞因子接合在样品池表面,观察细胞因子与至少一种中药有效成分的相互作用:

(1)同C步(1);

(2)同C步(2);

(3)生物素衍生化细胞因子包被样品池:在经过上述(2)处理的 IAsys 样品池中加入上述 A 步中制取的调节浓度为 $0.05 \sim 0.5 \text{mg/mL}$ 的 $20 \mu\text{L}$ 生物素衍生化的细胞因子,反应 $3 \sim 25$ 分钟,用 $40 \mu\text{L}$ PBST 洗 3 遍,采集数据;

(4)细胞因子与中药有效成分结合反应:在经上述(3)步处理的 IAsys 样品池中加入浓度为 $10^{-5} \sim 10^{-1} \text{M}$ 的 $20 \mu\text{L}$ 至少含一种中药有效成分的溶液,接合反应 $5 \sim 25$ 分钟,用 $50 \mu\text{L}$ PBST 洗 3 遍,采集数据;

F. 将生物素衍生化的细胞因子受体接合在样品池表面,观察中药有效成分对细胞因子与其受体结合的影响:

(1)同C步(1);

(2)同C步(2);

(3)同C步(3);

(4)中药有效成分对细胞因子与其受体结合的影响:在经上述(3)步处理的 IAsys 样品池中加入浓度为 $0.05 \sim 0.5 \text{mg/mL}$ 的 $20 \mu\text{L}$ 细胞因子与浓度为 $10^{-5} \sim 10^{-1} \text{M}$ 的 $20 \mu\text{L}$ 至少一种中药有效成分的混合液,接合反应 $5 \sim 25$ 分钟,用 $50 \mu\text{L}$ PBST 洗 3 遍,采集数据;

G. 实验结果:对实验采集数据所形成的反应曲线和结合曲线进行分析,可以确定中药有效成分对细胞因子与其受体相互结合的影响,从而看出有些中药有效成分可增强某些细胞因子与其受体的结合,有些中药有效成分可抑制某些细胞因子与其受体的结合,有些中药有效成分则不影响某些细胞因子与其受体的结合,由此,可进一步推论和证实中药的作用机理:影响细胞因子-受体体系的相互结合也是中药有效成分在体内的作用位点之一,中药有效成分通过调节某些细胞因子与其受体的相互结合,从而影响或改变细胞因子的功能与生理、病理作用,进而发挥对疾病的疗效;进而根据不同中药有效成分以及它们的不同配伍所进行的对比实验,得出不同中药有效成分及其不同的配伍对细胞因子与其受体结合影响的强弱程度,可进一步研究中药配伍机理及药物筛选和新药开发。

本发明方法所选用的中药有:解表类药麻黄或其配伍、杏仁或其配伍;清热类药黄连或其配伍、黄芩或其配伍;泻下类药大黄或其配伍、甘草或其配伍;利水渗湿类药白术或其配伍、陈皮或其配伍;化湿药及祛风湿类药藿香或其配伍、半夏或其配伍;湿里类药附子或其配伍、大黄或其配伍;止血药及消食类药三七或其配伍、大黄或其配伍;活血化瘀

类药川芎或其配伍、赤芍或其配伍；理气类药枳实或其配伍、厚朴或其配伍；化痰、止咳平喘类药半夏或其配伍；开窍类药牛黄或其配伍、朱砂或其配伍；补益类药人参或其配伍、三七或其配伍；安神类药龙骨或其配伍、牡蛎或其配伍；平肝熄风类药天麻或其配伍、川芎或其配伍。

本发明方法所选用的细胞因子有：人重组细胞因子内皮素-1 (ET-1)、肿瘤坏死因子 α 、血小板膜糖蛋白 IIb-IIIa、血栓素 B_2 、血小板源性生长因子、成纤维细胞生长因子、胰岛素样生长因子-1、内皮细胞生长因子、白细胞介素-1、白细胞介素-6、白细胞介素-8、转化生长因子、血管紧张素 II、内皮细胞舒张因子、氧化低密度脂蛋白、或去甲肾上腺素。

本发明方法所选用的细胞因子受体有：人重组细胞因子内皮素-1 受体 (ET-1 受体)、肿瘤坏死因子 α 受体、血小板膜糖蛋白 IIb-IIIa 受体、血栓素 B_2 受体、血小板源性生长因子受体、成纤维细胞生长因子受体、胰岛素样生长因子-1 受体、内皮细胞生长因子受体、白细胞介素-1 受体、白细胞介素-6 受体、白细胞介素-8 受体、转化生长因子受体、血管紧张素 II 受体、内皮细胞舒张因子受体、氧化低密度脂蛋白受体、或去甲肾上腺素受体- α 。

本发明的有益效果是：应用分子生物学方法可以检测相关细胞因子表达的变化，但仍不能测定中药对于细胞因子与受体间相互结合的影响。基于表面等离子体共振现象发展起来的新型生物传感分析技术，也称为生物相互作用分析技术，与其他常规技术相比较具有以下优点：①实时性，可以对生物大分子相互作用过程中每时每刻的变化进行跟踪监测分析；②高效性，完成一个基本过程仅需 5—15 分钟的时间，在短时间内可以测定大量样本；③敏感性，可以检测到 10^{-12} mol/L 浓度的反应过程；④特异性，样品中其它非特异性分子对共振角无影响，可以在样品浓度不高的情况下完成测试；⑤简易性，对相互作用的大分子无需标记；⑥客观性，实验观测结果均由仪器记录和分析，避免了主观因素的影响，并保证有较好的重复性。由于生物传感分析技术具有常规技术不可替代的优点，目前已广泛应用于生物分子间的相互作用分析，如蛋白与蛋白、药物与受体、抗原与抗体、DNA / RNA 与结合蛋白、DNA 与 DNA 及细胞与蛋白间的相互作用分析，并将在信号传导、免疫调节、蛋白工程、抗体定性、核酸研究及药物的研制和开发方面的研究中发挥重大作用。随着电子测量技术、生物电子学、免疫学、分子生物学和仿生学的快速发展和相互渗透，特别是新材料科学的迅猛发展，近来又出现了许多新型换能器件的生物传感器，使生物传感分析技术的应用范围和应用水平进一步提高。

Thermo Life Sciences 公司的 IAsys plus 生物传感器采用波导模式和 RM (resonant mirror) 技术，并以绝缘体作为传感基片材料，其能量的损耗较低，敏感度大大提高，更易测量传感基片表面吸附物质的厚度以及适于长时间的监测分子间的相互作用过程，可进行分子水平上的分子之间相互作用分析，包括定量分析、动力学分析、分子结合位间的拓扑关系分析，因此本发明方法所具有的上述优点更加突出。

从化学分析的角度来看，所有中药，无论单方或复方，之所以对疾病产生疗效，必含有有效的化学成分存在。中药的有效成分分属于多种类型的化合物，药理活性范围十分广

泛。一方面,即便是一味中药,也往往含有结构、性质不尽相同的多种成分,加之煎煮过程中相互反应以及与机体相互作用有可能产生的新成分,因此成分很复杂;另一方面,中药多是通过多个靶点、多个环节、多个层次发挥疗效,这给中药有效成分及其作用机制的测定带来了很大难度。但是本发明方法首次将生物传感分析技术应用于中药作用机理的测定,运用现代医学理论阐明中药有效成分在体内的作用靶点和分子机理,终于克服上述诸多难点,在中药作用机理的测定中取得新的突破。本发明方法中采用亲和型特异选择性生物传感器 IAsys plus 来检测细胞因子与其受体之间的特异性亲和作用,进而检测中药有效成分对细胞因子和其受体间相互结合的影响情况,对分子间相互作用进行直接、实时、原位监测其动态过程,具有高灵敏度和高稳定性。另外,本发明方法作为一种新的研究思路 and 手段,可与基因芯片技术在中药的物质基础研究上互补。

附图说明

图 1-1 表面已事先包被生物素的亲和型生物传感系统 IAsys plus 的样品池的示意图。

图 1-2 在图 1-1 所示样品池中加入亲和素后的示意图。

图 1-3 生物素与亲和素结合的反应曲线。

图 2-1 已接合亲和素的样品池的示意图,同图 1-2。

图 2-2 在图 2-1 所示样品池中加入细胞因子受体后的示意图。

图 2-3 亲和素与细胞因子受体结合的反应曲线。

图 3-1 已接合亲和素的样品池的示意图,同图 1-2。

图 3-2 在图 2-1 所示样品池中加入生物素衍生化细胞因子后的示意图。

图 3-3 亲和素与细胞因子结合的反应曲线。

图 3-4 细胞因子与生物素衍生化细胞因子受体结合示意图。

图 4-1 生物素衍生化细胞因子受体包被的样品池的示意图,同图 2-2。

图 4-2 在图 4-1 所示样品池中加入中药有效成分的示意图。

图 4-3 中药有效成分与细胞因子受体结合的反应曲线图。

图 5-1 生物素衍生化细胞因子包被的样品池的示意图,同图 3-2。

图 5-2 在图 5-1 所示样品池中加入中药有效成分的示意图。

图 5-3 中药有效成分与细胞因子结合的反应曲线图。

图 6-1 生物素衍生化细胞因子受体包被的样品池的示意图,同图 2-2。

图 6-2 在图 6-1 所示样品池中加入细胞因子与中药有效成分混合液的示意图。

图 7 细胞因子受体与细胞因子的结合曲线图。

图 8 细胞因子受体与中药有效成分的结合曲线图。

图 9 细胞因子与中药有效成分结合曲线图。

图 10 中药有效成分与细胞因子的混合液与细胞因子受体的结合曲线图。

图 11-1 中药有效成分为川芎嗪、阿魏酸分别和细胞因子 ET-1 的混合液与细胞因子 ET-1 受体结合的反应曲线图。

图 11-2 中药有效成分为赤芍 801 和细胞因子 ET-1 的混合液与细胞因子 ET-1 受体结

合的反应曲线图。

图中, 1. IAsys plus 的样品池、2. 事先包被样品池表面的生物素、3. 亲和素、4. 生物素衍生化细胞因子受体、5. 生物素衍生化细胞因子、6. 细胞因子、7. 中药有效成分。

下面结合附图和实施例对本发明进一步说明, 但权利要求保护的范围并不限于此。

具体实施方式

图 1-1 表示亲和型生物传感系统 IAsys plus 样品池(1)表面已事先包被生物素(2);

图 1-2、图 2-1 和图 3-1 均表示在表面已事先包被生物素(2)的 IAsys plus 样品池(1)中加入亲和素(3)后, 亲和素(3)与生物素(2)结合;

图 1-3 表示 IAsys plus 记录的结合反应曲线表明生物素与亲和素之间具有很高的亲和力, 加入亲和素后, 与生物素迅速结合, 曲线几乎在瞬时直线上升;

图 2-2、图 4-1 和图 6-1 表示在图 2-1 所示样品池中加入生物素衍生化细胞因子受体(4)后, 生物素衍生化细胞因子受体(4)与亲和素(3)紧密结合;

图 2-3 表示, IAsys plus 记录的亲和素与细胞因子受体结合的反应曲线表明, 加入生物素衍生化细胞因子受体(4)与结合在样品池表面的亲和素(3)发生结合反应, 由此, 利用生物素和亲和素的特异性相互结合作用将生物素衍生化细胞因子受体固定在 IAsys 样品池表面, 这里所用的生物素衍生化细胞因子受体是生物素化 ET-1 受体;

图 3-2 和图 5-1 表示在图 3-1 所示样品池中加入生物素衍生化细胞因子(5)后, 生物素衍生化细胞因子(5)与亲和素(3)紧密结合;

图 3-3 表示, IAsys plus 记录的亲和素与细胞因子结合的反应曲线表明, 加入生物素衍生化细胞因子(5)与结合在样品池表面的亲和素(3)发生结合反应, 由此, 利用生物素和亲和素的特异性相互结合作用将生物素衍生化细胞因子固定在 IAsys 样品池表面, 这里所用的生物素衍生化细胞因子是生物素化 ET-1;

图 3-4 表示在图 2-2 所示样品池中加入细胞因子(6)后, 细胞因子(6)与生物素衍生化细胞因子受体(4)紧密结合;

图 4-2 表示在图 4-1 所示样品池中加入中药有效成分(7), 中药有效成分(7)与生物素衍生化细胞因子受体(4)结合;

图 4-3 表示, IAsys plus 记录的中药有效成分与细胞因子受体结合的反应曲线表明, 加入中药有效成分后, 这里用的是赤芍 801, 曲线上升, PBST 冲洗后曲线未降至基线水平, 说明中药有效成分与细胞因子之间发生特异性结合反应;

图 5-2 表示在图 5-1 所示样品池中加入中药有效成分(7), 中药有效成分(7)与生物素衍生化细胞因子(5)结合;

图 5-3 表示, IAsys plus 记录的中药有效成分与细胞因子结合的反应曲线表明, 加入中药有效成分后, 这里用的是赤芍 801, 曲线上升, PBST 冲洗后曲线未降至基线水平, 说明中药有效成分与细胞因子之间发生特异性结合反应;

图 6-2 表示在图 6-1 所示样品池中加入细胞因子与中药有效成分混合液; 中药有效成分(7)与细胞因子(6)和生物素衍生化细胞因子受体(4)分别结合, 影响细胞因子与

受体的结合；

图 7 细胞因子受体与细胞因子的结合曲线表明，在生物素衍生化表面的样品池中加入亲和素时（7-1），由于生物素与亲和素的特异性相互作用，曲线迅速上升，反应达平衡后，用 PBST 冲洗，去除非特异性吸附时（7-2），曲线略下降，向样品池中加入生物素衍生化的细胞因子受体时（7-3），利用生物素-亲和素体系即可将细胞因子受体接合在样品池表面，再向样品池中加入细胞因子时（7-4），曲线上升，冲洗后有所下降，但仍高于基线，说明在该实验条件下细胞因子与其受体发生特异性结合；

图 8 细胞因子受体与中药有效成分的结合曲线表明，在生物素衍生化表面的样品池中加入亲和素时（8-1），由于生物素与亲和素的特异性相互作用，曲线迅速上升，反应达平衡后，用 PBST 冲洗，去除非特异性吸附时（8-2），曲线略下降，向样品池中加入生物素衍生化的细胞因子受体时（8-3），亲和素具有四个与生物素结合的位点，所以应用生物素-亲和素体系即可将细胞因子受体接合在样品池表面，再向样品池中加入中药有效成分时（8-4），曲线上升，冲洗后有所下降，但仍高于基线，说明中药有效成分可与细胞因子受体发生特异性结合；

图 9 细胞因子与中药有效成分结合曲线表明，在生物素衍生化表面的样品池中加入亲和素时（9-1），由于生物素与亲和素的特异性相互作用，曲线迅速上升，反应达平衡后，用 PBST 冲洗，去除非特异性吸附时（9-2），曲线略下降，向样品池中加入生物素衍生化的细胞因子时（9-3），亲和素具有四个与生物素结合的位点，所以应用生物素-亲和素体系即可将细胞因子接合在样品池表面，再向样品池中加入中药有效成分时（9-4），曲线上升，冲洗后有所下降，但仍高于基线，说明中药有效成分可与细胞因子发生特异性结合；

图 10 中药有效成分与细胞因子的混合液与细胞因子受体的结合曲线表明在生物素表面的样品池中加入亲和素时（10-1），由于生物素与亲和素的特异性相互作用，曲线迅速上升，反应达平衡后，用 PBST 冲洗，去除非特异性吸附时（10-2），曲线略下降，向样品池中加入生物素衍生化的细胞因子受体时（10-3），利用生物素-亲和素体系即可将细胞因子受体接合在样品池表面，再向样品池中加入细胞因子与中药有效成分的混合液时（10-4），曲线上升，冲洗后下降，由于曲线升高的幅度较小，说明加入的中药有效成分可抑制该对细胞因子与受体间发生的特异性结合；

图 11-1 中药有效成分为川芎嗪、阿魏酸分别和细胞因子 ET-1 的混合液与细胞因子 ET-1 受体结合的反应曲线图和图 11-2 中药有效成分为赤芍 801 和细胞因子 ET-1 的混合液与细胞因子 ET-1 受体结合的反应曲线图表明，三种不同中药有效成分抑制该对细胞因子与受体间发生特异性结合的强弱不同。

实施例 1

所选中药为活血化瘀类药赤芍，其有效成分为赤芍 801；所选细胞因子及其受体为人重组细胞因子内皮素-1（ET-1）及人重组细胞因子内皮素-1 受体（ET-1 受体）；所选活化生物素为 SULFO-NHS-LC-BIOTIN；所选亲和素为 Streptavidin；所选亲和型生物传感系统是由 Thermo Life Sciences 公司提供的 IAsys plus，其样品池表面已事先包被生物素。

A. 将 4~100 μg 人重组细胞因子内皮素-1 加入浓度为 0.01mol/L、pH=7.4 的 200~500 μL 磷酸盐缓冲液中, 又将 1~2mg SULFO-NHS-LC-BIOTIN 活化生物素溶于 120 μL 去离子水中, 取其 20~50 μL 加入上述人重组细胞因子内皮素-1 溶液中, 混匀, 室温避光反应 4 小时后, 在 4℃ 温度下, 以 10000 转/分钟超滤离心 10 分钟, 截留物溶解于 200 μL 磷酸盐缓冲液中, 完成人重组细胞因子内皮素-1 生物素衍生化;

B. 将 4~100 μg 人重组细胞因子内皮素-1 受体加入浓度为 0.01mol/L、pH=7.4 的 200~500 μL 磷酸盐缓冲液中, 又将 1~2mg SULFO-NHS-LC-BIOTIN 活化生物素溶于 120 μL 去离子水中, 取其 20~50 μL 加入上述人重组细胞因子内皮素-1 受体溶液中, 混匀, 室温避光反应 4 小时后, 在 4℃ 温度下, 以 10000 转/分钟超滤离心 10 分钟, 截留物溶解于 200 μL 磷酸盐缓冲液中, 完成人重组细胞因子内皮素-1 受体生物素衍生化;

C. (1) 将亲和型生物传感系统 IAsys plus 开机预热 1 小时, 参数设置: 采样间隔时间 1 秒, 搅拌 85 转/分, 温度 22℃, 亲和型生物传感系统 IAsys plus 是由 Thermo Life Sciences 公司提供, 其样品池表面已事先包被生物素;

(2) IAsys 样品池用 40 μL PBST 洗 3 遍, 平衡 10 分钟, 采集基线, 加入 20 μL 浓度为 2mg/mL 的亲和素 Streptavidin, 反应 10~20 分钟, 用 40 μL PBST 洗 3 遍, 收集数据, 结果处理如图 1-3 所示, PBST 为含 0.05% 吐温 20 (v/v) 的磷酸盐缓冲液;

(3) 再在样品池中加入上述 B 步中制取的 20 μL 生物素衍生化的人重组细胞因子内皮素-1 受体, 反应 3~25 分钟, 用 40 μL PBST 洗 3 遍, 采集数据, 结果如图 2-3 所示;

(4) 在经上述(3)步处理的 IAsys 样品池中再加入浓度为 0.05~0.5mg/mL 的 20 μL 人重组细胞因子内皮素-1, 接合反应 5~25 分钟, 形成结果如图 3-4 所示, 用 50 μL PBST 洗 3 遍, 由采集数据, 结果如图 7 所示, 表明人重组细胞因子内皮素-1 与人重组细胞因子内皮素-1 受体结合, 在人体内, 人重组细胞因子内皮素-1 与人重组细胞因子内皮素-1 受体的结合会引起血管收缩, 血小板聚集;

D. (1) 同 C 步(1);

(2) 同 C 步(2);

(3) 同 C 步(3);

(4) 在经上述步处理的 IAsys 样品池中加入 20 μL 浓度为 10^{-5} ~ 10^{-1}M 的中药有效成分为赤芍 801 的溶液, 接合反应 5~25 分钟, 用 50 μL PBST 洗 3 遍, 采集数据, 结果如图 4-3 和图 8 所示, 表明人重组细胞因子内皮素-1 受体与赤芍 801 能发生特异性结合;

E. (1) 同 C 步(1);

(2) 同 C 步(2);

(3) 再在样品池中加入上述 A 步中制取的 20 μL 生物素衍生化的人重组细胞因子内皮素-1, 反应 3~25 分钟, 用 40 μL PBST 洗 3 遍, 采集数据, 结果如图 3-3 所示;

(4) 在经上述(3)步处理的 IAsys 样品池中加入 20 μL 浓度为 10^{-5} ~ 10^{-1}M 的中药有效成分为赤芍 801 的溶液, 接合反应 5~25 分钟, 用 50 μL PBST 洗 3 遍, 采集数据, 结果如图 5-3 和图 9 所示, 表明人重组细胞因子内皮素-1 与赤芍 801 能发生特异性结合;

F. (1)同C步(1);

(2)同C步(2);

(3)同C步(3);

(4)在经上述(3)步处理的 IAsys 样品池中加入浓度为 0.05~0.5mg/mL 的 20 μ L 人重组细胞因子内皮素-1 与浓度为 10^{-5} ~ 10^{-1} M 的 20 μ L 赤芍 801 的混合液, 接合反应 5~25 分钟, 用 50 μ L PBST 洗 3 遍, 采集数据, 结果如图 10 所示, 由于图 10 中的(10-4)升高的幅度小于图 7 中的(7-4), 说明加入中药有效成分赤芍 801 抑制了人重组细胞因子内皮素-1 与其受体间发生的特异性结合, 起到拮抗内皮素的作用、扩张血管和抑制血小板聚集;

G. 结果分析: 内皮素是迄今发现最强的收缩血管物质之一, 也是较强的血小板致聚剂, 因此是诸多活血化瘀中药扩血管、抗血小板聚集的主要作用靶点, 本实验的检测结果表明: 赤芍 801 可与人重组细胞因子内皮素-1 及其受体发生特异性结合, 提示赤芍 801 在体内的作用靶点除已有报道的血栓素 A2 外, 还有人重组细胞因子内皮素-1 及其受体途径, 即赤芍 801 通过与人重组细胞因子内皮素-1 及其受体的结合, 抑制人重组细胞因子内皮素-1 与人重组细胞因子内皮素-1 受体的结合, 从而起到拮抗内皮素的作用、扩张血管和抑制血小板聚集。

实施例 2

除将所用中药赤芍 801 替换为中药川芎有效成分川芎嗪之外, 其余与实施例 1 相同, 本实验的检测结果表明: 川芎嗪可与人重组细胞因子内皮素-1 及其受体发生特异性结合, 提示川芎嗪在体内的作用靶点除已有报道的血栓素 A2 外, 还有人重组细胞因子内皮素-1 及其受体途径, 即川芎嗪通过与人重组细胞因子内皮素-1 及其受体的结合, 抑制人重组细胞因子内皮素-1 与人重组细胞因子内皮素-1 受体的结合, 从而起到拮抗内皮素的作用、扩张血管和抑制血小板聚集。

实施例 3

除将所用中药赤芍 801 替换为中药当归有效成分阿魏酸之外, 其余与实施例 1 相同, 本实验的检测结果表明: 阿魏酸可与人重组细胞因子内皮素-1 及其受体发生特异性结合, 提示阿魏酸在体内的作用靶点除已有报道的血栓素 A2 外, 还有人重组细胞因子内皮素-1 及其受体途径, 即阿魏酸通过与人重组细胞因子内皮素-1 及其受体的结合, 抑制人重组细胞因子内皮素-1 与人重组细胞因子内皮素-1 受体的结合, 从而起到拮抗内皮素的作用、扩张血管和抑制血小板聚集。

实施例 4

比较实施例 1、2 和 3 中三种不同中药对人重组细胞因子内皮素-1 与人重组细胞因子内皮素-1 受体结合抑制的强弱: 比较图 11-1 和图 11-2 中的三条反应曲线可以得出, 赤芍 801 和细胞因子 ET-1 的混合液使细胞因子 ET-1 与细胞因子 ET 受体的结合最小, 川芎嗪和和细胞因子 ET-1 混合液使细胞因子 ET-1 与细胞因子 ET 受体的结合次之, 阿魏酸和和细胞因子 ET-1 混合液使细胞因子 ET-1 与细胞因子 ET 受体结合的最大。这说明赤芍 801 抑制细胞因子 ET-1 及其受体的能力最强、川芎嗪次之、阿魏酸最弱, 即在拮抗内皮素的

作用、扩张血管和抑制血小板聚集方面，赤芍 801 药效最强、川芎嗪次之、阿魏酸最弱。

实施例 5

除将所用中药赤芍 801 替换为赤芍 801 与川芎嗪之间的配伍之外，其余与实施例 1 相同，本实验的检测结果表明：赤芍 801 与川芎嗪之间的配伍可与人重组细胞因子内皮素-1 及其受体发生特异性结合，提示赤芍 801 与川芎嗪之间的配伍在体内的作用靶点除已有报道的血栓素 A2 外，还有人重组细胞因子内皮素-1 及其受体途径，即赤芍 801 与川芎嗪之间的配伍通过与人重组细胞因子内皮素-1 及其受体的结合，抑制人重组细胞因子内皮素-1 与人重组细胞因子内皮素-1 受体的结合，从而起到拮抗内皮素的作用、扩张血管和抑制血小板聚集。

实施例 6

除将所用中药赤芍 801 替换为赤芍 801 与阿魏酸之间的配伍之外，其余与实施例 1 相同，本实验的检测结果表明：赤芍 801 与阿魏酸之间的配伍可与人重组细胞因子内皮素-1 及其受体发生特异性结合，提示赤芍 801 与阿魏酸之间的配伍在体内的作用靶点除已有报道的血栓素 A2 外，还有人重组细胞因子内皮素-1 及其受体途径，即赤芍 801 与阿魏酸之间的配伍通过与人重组细胞因子内皮素-1 及其受体的结合，抑制人重组细胞因子内皮素-1 与人重组细胞因子内皮素-1 受体的结合，从而起到拮抗内皮素的作用、扩张血管和抑制血小板聚集。

实施例 7

除将所用中药赤芍 801 替换为川芎嗪和阿魏酸之间的配伍之外，其余与实施例 1 相同，本实验的检测结果表明：川芎嗪和阿魏酸之间的配伍可与人重组细胞因子内皮素-1 及其受体发生特异性结合，提示川芎嗪和阿魏酸之间的配伍在体内的作用靶点除已有报道的血栓素 A2 外，还有人重组细胞因子内皮素-1 及其受体途径，即川芎嗪和阿魏酸之间的配伍通过与人重组细胞因子内皮素-1 及其受体的结合，抑制人重组细胞因子内皮素-1 与人重组细胞因子内皮素-1 受体的结合，从而起到拮抗内皮素的作用、扩张血管和抑制血小板聚集。

实施例 8

除将所用中药赤芍 801 替换为赤芍 801、川芎嗪和阿魏酸它们之间的配伍之外，其余与实施例 1 相同，本实验的检测结果表明：赤芍 801、川芎嗪和阿魏酸它们之间的配伍可与人重组细胞因子内皮素-1 及其受体发生特异性结合，提示赤芍 801、川芎嗪和阿魏酸它们之间的配伍在体内的作用靶点除已有报道的血栓素 A2 外，还有人重组细胞因子内皮素-1 及其受体途径，即赤芍 801、川芎嗪和阿魏酸它们之间的配伍通过与人重组细胞因子内皮素-1 及其受体的结合，抑制人重组细胞因子内皮素-1 与人重组细胞因子内皮素-1 受体的结合，从而起到拮抗内皮素的作用、扩张血管和抑制血小板聚集。

实施例 9

将所用中药赤芍 801 替换为川芎嗪，细胞因子及其受体由人重组细胞因子内皮素-1 与人重组细胞因子内皮素-1 受体替换为肿瘤坏死因子 $\text{TNF-}\alpha$ 及其可溶性受体 sTNFR-1 ，操作步骤与实施例 1 相同，实验的检测结果表明：川芎嗪可以促进肿瘤坏死因子 $\text{TNF-}\alpha$ 与其

受可溶性受体 sTNFR-1 结合, 从而抑制 TNF- α 的生物学活性。肿瘤坏死因子 TNF- α 是一种重要的调节机体免疫功能和代谢过程的多功能细胞因子, 具有抗肿瘤的有益的生物学作用, 但当 TNF- α 产生过量时, 则会对机体造成严重损害。因此可溶性受体 sTNFR-1 可与原细胞膜上的受体竞争, 先与 TNF- α 结合, 减少直接发挥有害人体作用的 TNF- α 数量, 对某些疾病, 如脓毒性休克、自身免疫性疾病和移植排斥反应起到治疗作用。

实施例 10

将所用中药赤芍 801 替换为阿魏酸, 细胞因子及其受体由人重组细胞因子内皮素-1 与人重组细胞因子内皮素-1 受体替换为为肿瘤坏死因子 TNF- α 及其可溶性受体 sTNFR-1, 操作步骤与实施例 1 相同, 实验的检测结果表明: 阿魏酸可以促进肿瘤坏死因子 TNF- α 与其受可溶性受体 sTNFR-1 结合, 从而抑制 TNF- α 的生物学活性。

实施例 11

仍然用中药赤芍 801, 将细胞因子及其受体由人重组细胞因子内皮素-1 与人重组细胞因子内皮素-1 受体替换为为肿瘤坏死因子 TNF- α 及其可溶性受体 sTNFR-1, 操作步骤与实施例 1 相同, 实验的检测结果表明: 赤芍 801 也可以促进肿瘤坏死因子 TNF- α 与其可溶性受体 sTNFR-1 结合, 从而抑制 TNF- α 生物学活性。

实施例 12

将所用中药赤芍 801 替换为川芎嗪和阿魏酸之间的配伍, 细胞因子及其受体由人重组细胞因子内皮素-1 与人重组细胞因子内皮素-1 受体替换为肿瘤坏死因子 TNF- α 及其可溶性受体 sTNFR-1, 操作步骤与实施例 1 相同, 实验的检测结果表明: 川芎嗪和阿魏酸之间的配伍可以促进肿瘤坏死因子 TNF- α 与其可溶性受体 sTNFR-1 结合, 从而抑制 TNF- α 生物学活性。

实施例 13

将所用中药赤芍 801 替换为川芎嗪和赤芍 801 之间的配伍, 细胞因子及其受体由人重组细胞因子内皮素-1 与人重组细胞因子内皮素-1 受体替换为肿瘤坏死因子 TNF- α 及其可溶性受体 sTNFR-1, 操作步骤与实施例 1 相同, 实验的检测结果表明: 川芎嗪和赤芍 801 之间的配伍可以促进肿瘤坏死因子 TNF- α 与其可溶性受体 sTNFR-1 结合, 从而抑制 TNF- α 生物学活性。

实施例 14。

将所用中药赤芍 801 替换为阿魏酸和赤芍 801 之间的配伍, 细胞因子及其受体由人重组细胞因子内皮素-1 与人重组细胞因子内皮素-1 受体替换为肿瘤坏死因子 TNF- α 及其可溶性受体 sTNFR-1, 操作步骤与实施例 1 相同, 实验的检测结果表明: 阿魏酸和赤芍 801 之间的配伍可以促进肿瘤坏死因子 TNF- α 与其可溶性受体 sTNFR-1 结合, 从而抑制 TNF- α 生物学活性。

实施例 15

将所用中药赤芍 801 替换为川芎嗪、阿魏酸和赤芍 801 它们之间的配伍, 细胞因子及其受体由人重组细胞因子内皮素-1 与人重组细胞因子内皮素-1 受体替换为肿瘤坏死因子

TNF- α 及其可溶性受体 sTNFR-1, 操作步骤与实施例 1 相同, 实验的检测结果表明: 川芎嗪、阿魏酸和赤芍 801 它们之间的配伍可以促进肿瘤坏死因子 TNF- α 与其可溶性受体 sTNFR-1 结合, 从而抑制 TNF- α 生物学活性。

由于中药的种类繁多, 与人体健康相关的细胞因子及其受体也不胜枚举, 本发明方法中不可能将其全部列出, 但是采用本发明的应用生物传感分析技术来测定中药作用机理的方法, 均可以实现弄清其作用机理和筛选药物的目的。

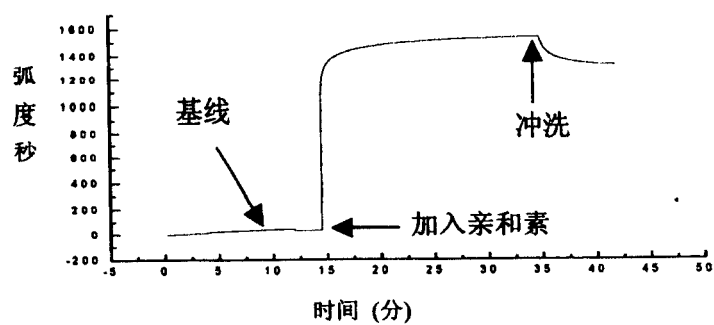
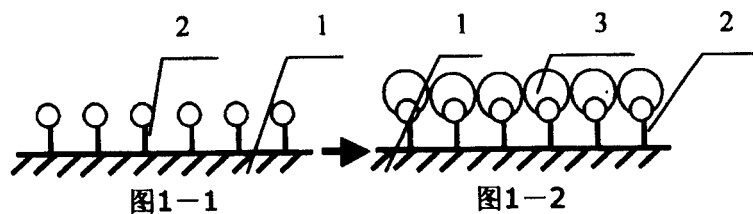


图 1-3

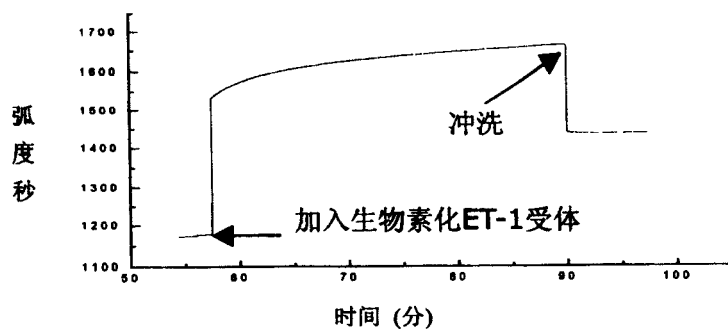
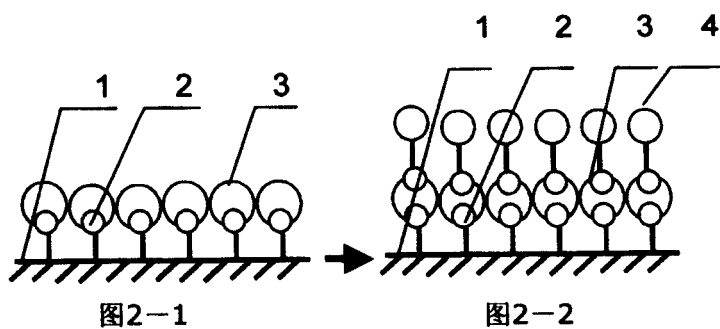


图 2-3

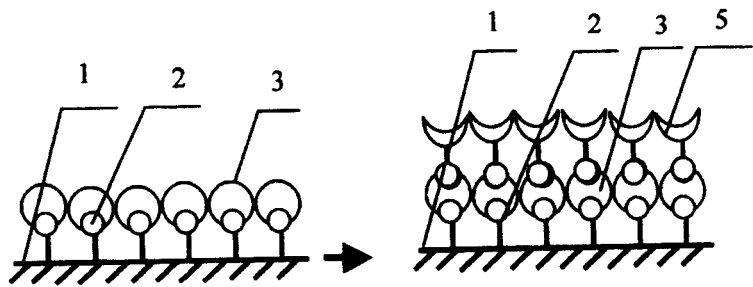


图 3-1

图 3-2

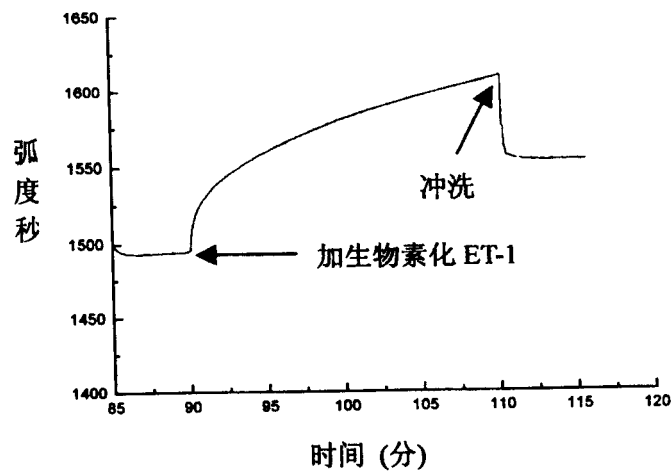


图 3-3

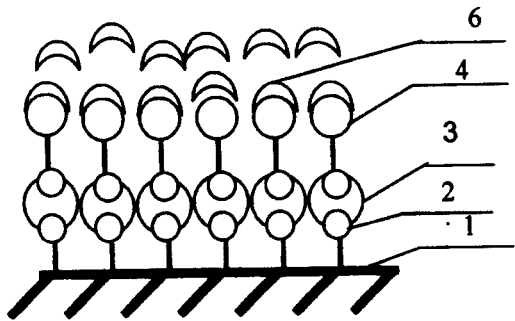


图 3-4

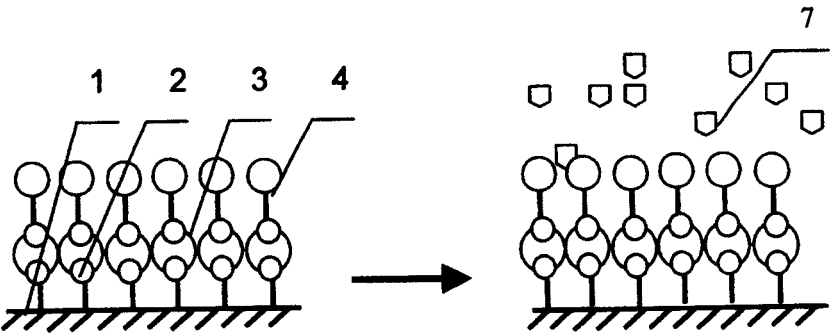


图4-1

图4-2

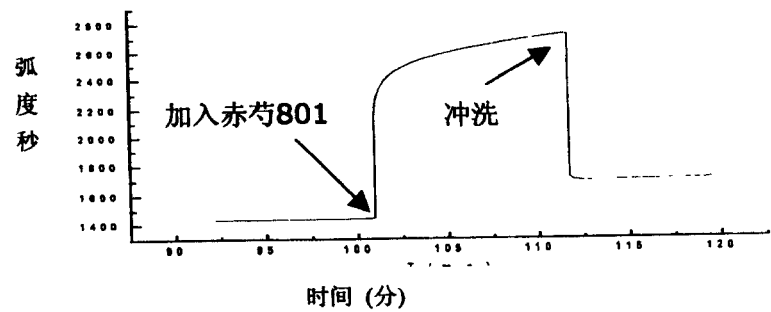


图4-3

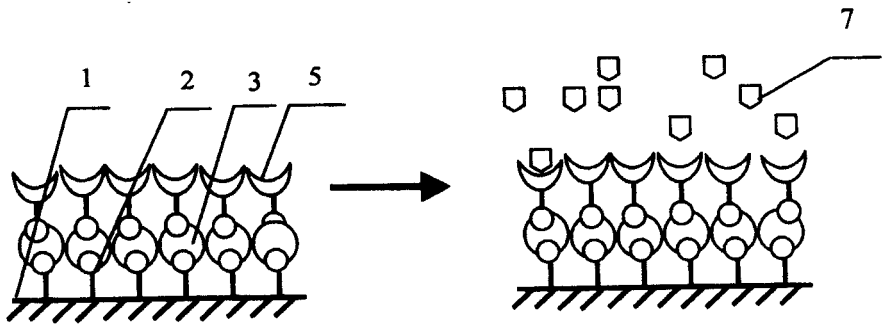


图 5-1

图 5-2

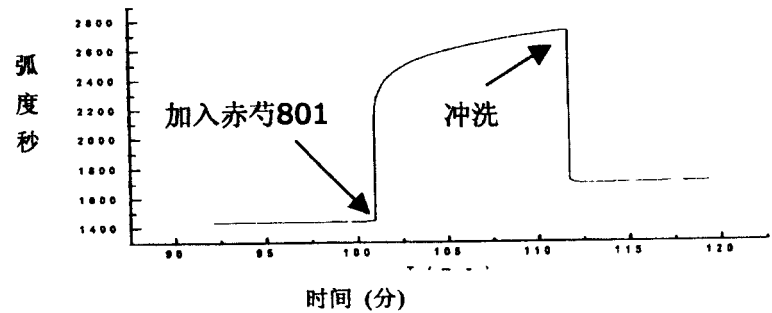


图 5-3

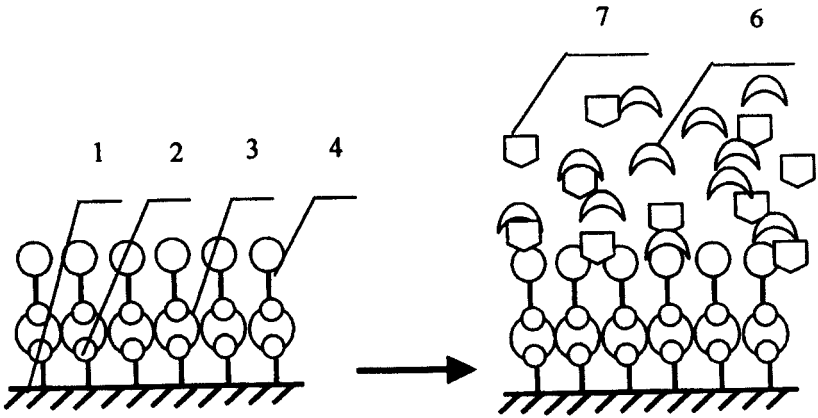


图 6-1

图 6-2

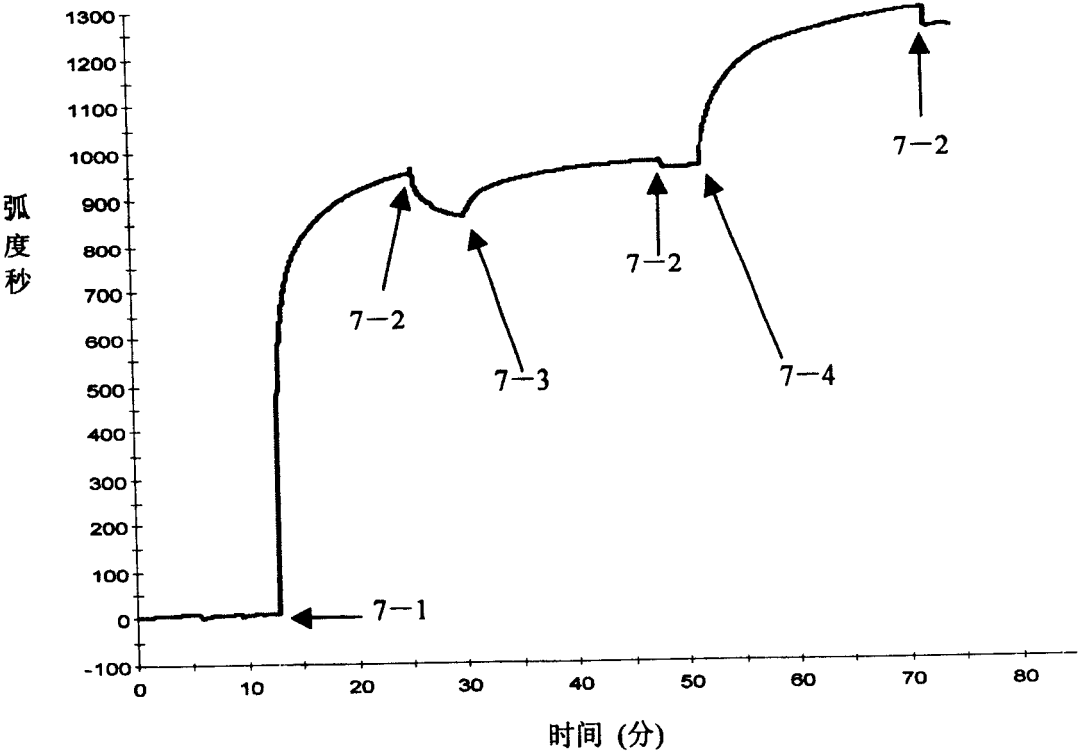


图 7

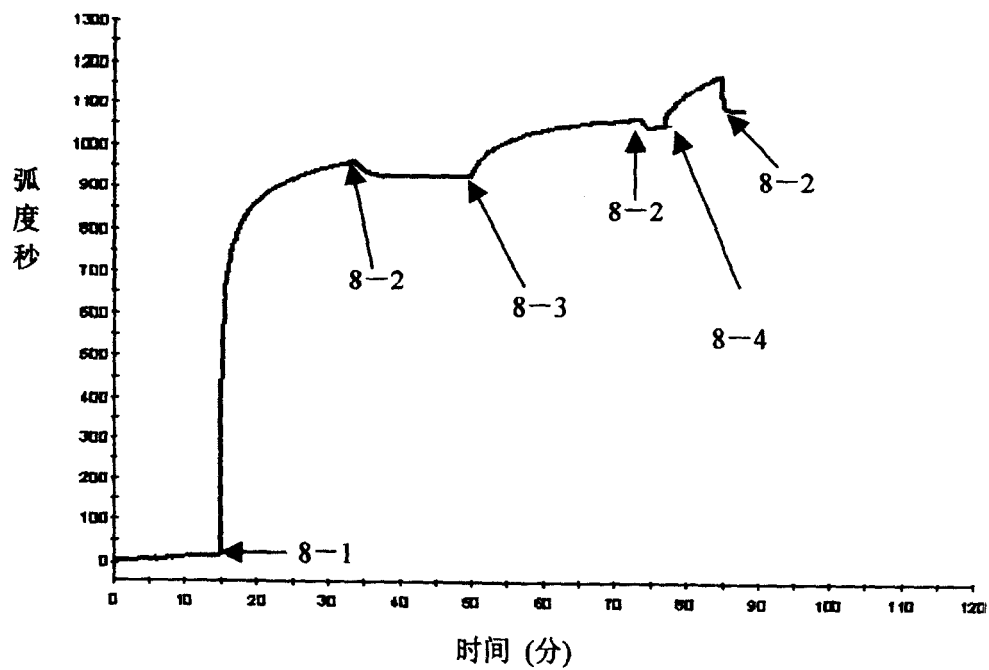


图 8

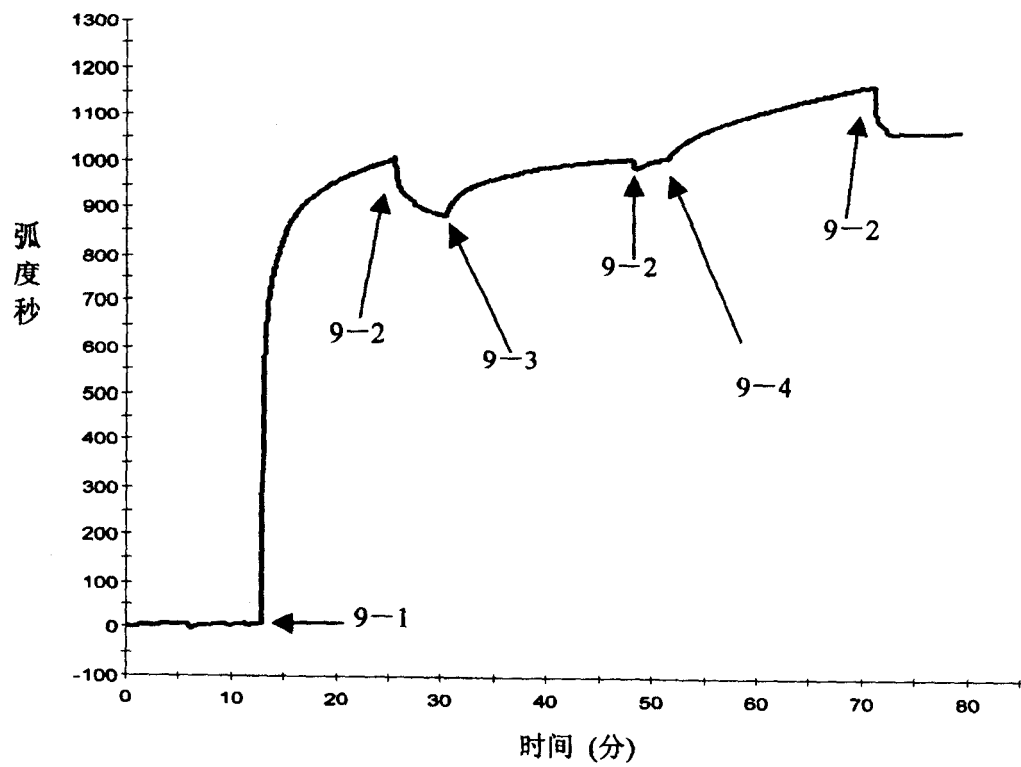


图 9

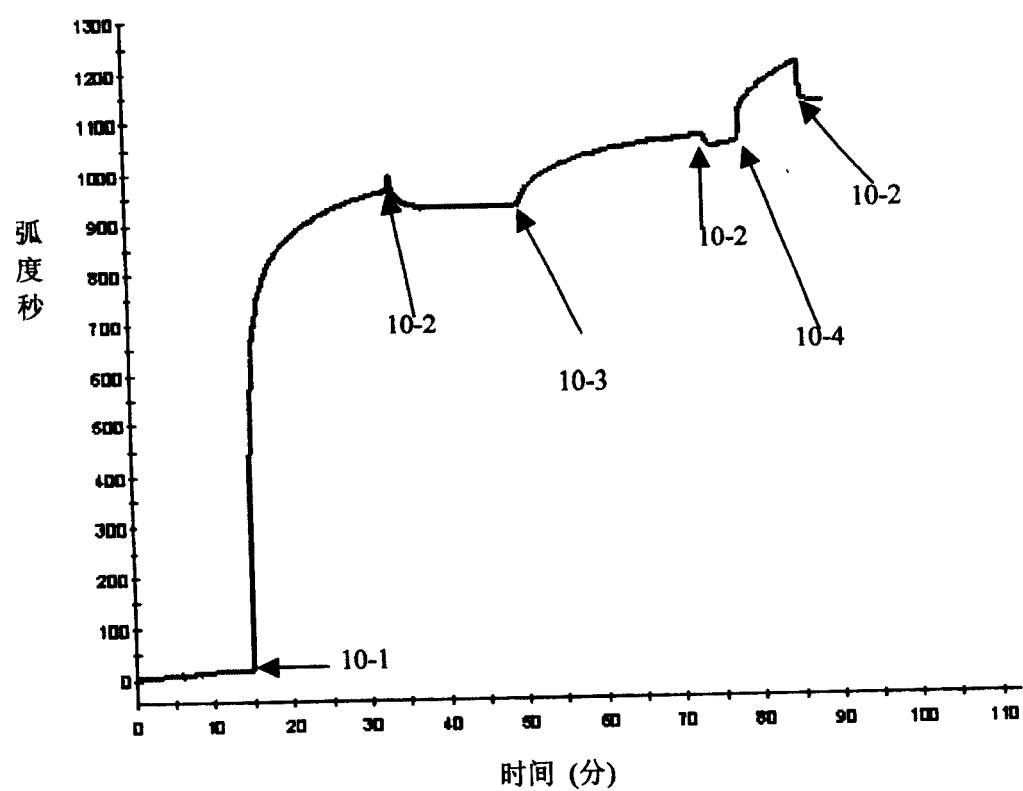


图 10

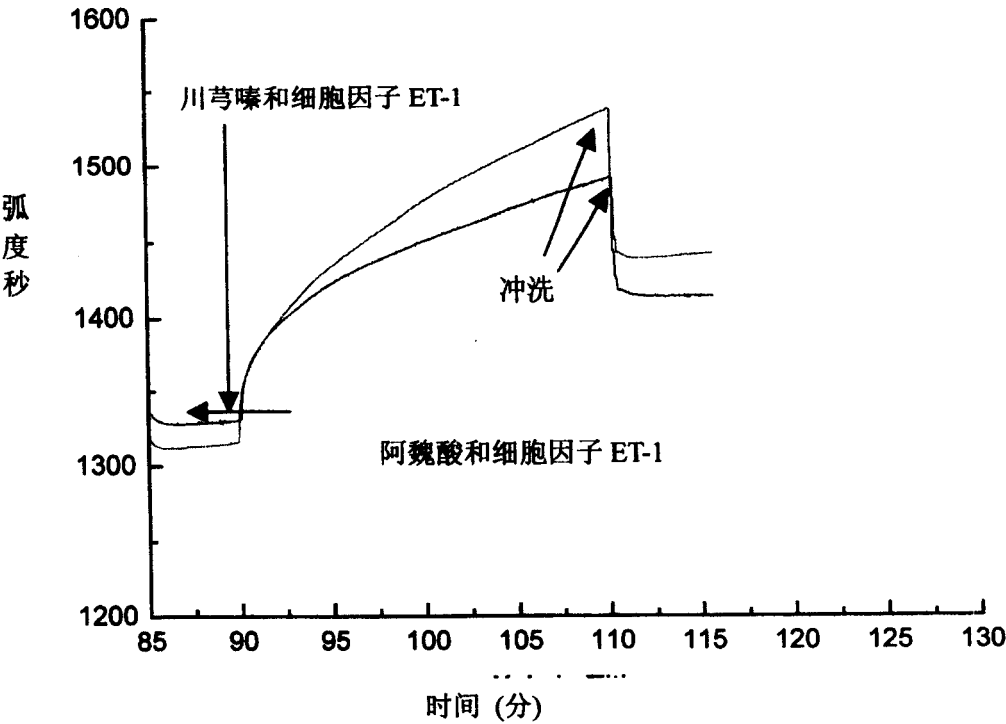


图 11-1

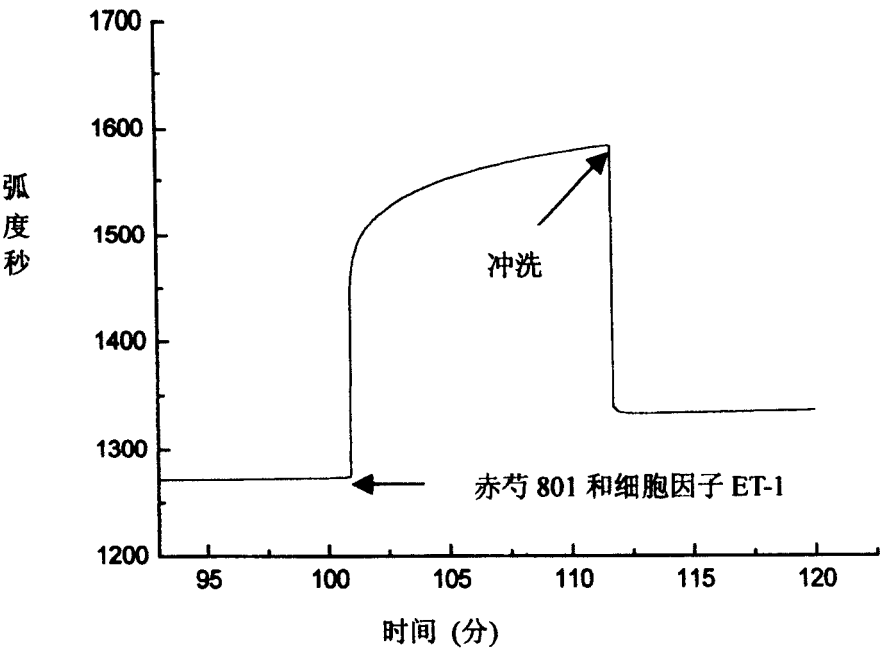


图 11-2

专利名称(译)	测定中药作用机理的方法		
公开(公告)号	CN1254682C	公开(公告)日	2006-05-03
申请号	CN200410020174.0	申请日	2004-07-28
[标]申请(专利权)人(译)	南开大学		
申请(专利权)人(译)	南开大学		
当前申请(专利权)人(译)	南开大学		
[标]发明人	陈强 陈可冀 李静 殷惠军 吴宝艳 黄加栋 韩松岩 史海滨		
发明人	陈强 陈可冀 李静 殷惠军 吴宝艳 黄加栋 韩松岩 史海滨		
IPC分类号	G01N33/15 G01N33/50 G01N33/53 C12Q1/00		
其他公开文献	CN1598576A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明的技术方案涉及应用生物传感分析技术来测定中药作用机理的方法，应用亲和型特异选择性生物传感器IAsys plus来检测中药有效成分与细胞因子的相互作用、与细胞因子受体的相互作用、以及对细胞因子与其受体间相互结合的影响情况，分析中药有效成分的作用靶点和作用机理，弄清中药的作用机理，并且可以由此进行中药的筛选及其配伍，本发明方法具有实时性、高效性、敏感性、特异性、简易性、客观性的优点。

