

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.

G01N 33/15 (2006.01)

G01N 33/50 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)



[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 200410020175.5

[45] 授权公告日 2006 年 6 月 14 日

[11] 授权公告号 CN 1259568C

[22] 申请日 2004.7.28

[21] 申请号 200410020175.5

[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 吴宝艳 殷惠军

黄加栋 李 静 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

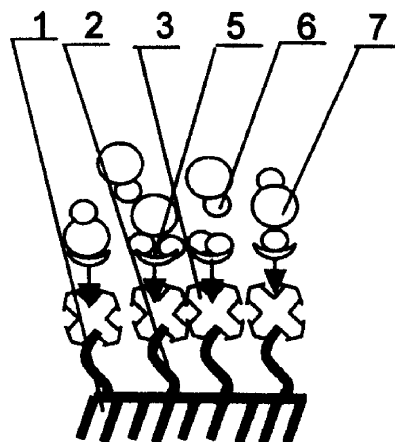
权利要求书 2 页 说明书 11 页 附图 3 页

[54] 发明名称

中药作用机理的测定方法

[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，应用压电石英晶体微天平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. 中药作用机理的测定方法, 其特征在于: 应用压电石英晶体微天平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:

第一步, 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 $1\sim 2\text{mg}$ $\text{SULFO-NHS-LC-BIOTIN}$ 活化生物素溶于 $120\ \mu\text{L}$ 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;

第二步, 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; 将 $1\sim 2\text{mg}$ $\text{SULFO-NHS-LC-BIOTIN}$ 活化生物素溶于 $120\ \mu\text{L}$ 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;

第三步, 将生物素衍生化的细胞因子受体接合在压电石英晶体微天平的金石英晶体基片表面, 观察细胞因子与其受体相互作用:

A. 将亲和素接合到压电石英晶体微天平的金石英晶体基片上: 先将压电石英晶体微天平的金石英晶体基片用去离子水清洗, 再用纯甲醇浸泡 1 小时, 然后用去离子水冲洗 3 遍, 再用超声波清洗 3 分钟, 晾干, 在基片表面加 $10\ \mu\text{L}$ 浓度为 10mmol/L 的 α -硫辛酸, 平衡 30 分钟后, 用去离子水冲洗, 依次加入活化剂 100mg/mL 盐酸 1—乙基—3—(3—二甲基氨基丙基)碳二亚胺和 100mg/mL N -羟琥珀酰亚胺各 $10\ \mu\text{L}$, 平衡 20 分钟, 用去离子水冲洗, 最后加入 $20\ \mu\text{L}$ 浓度为 2mg/mL 亲和素 Strepavidin, 平衡 1 小时, 收集数据;

B. 生物素衍生化细胞因子受体包被压电石英晶体微天平的金石英晶体基片: 在经过上述处理的压电石英晶体微天平的金石英晶体基片上加入上述第二步中制取的 $20\ \mu\text{L}$ 生物素衍生化的细胞因子受体, 反应 $30\sim 50$ 分钟, 用 $50\ \mu\text{L}$ PBS 冲洗, 采集数据, PBS 为由 0.01M 磷酸钠、 0.138M NaCl 和 0.027M KCl 配制成的、 $\text{pH}=7.4$ 的磷酸盐缓冲液;

C. 细胞因子与其受体结合反应: 在经过上述处理的压电石英晶体微天平的金石英晶体基片上加入浓度为 $0.05\sim 0.5\text{mg/mL}$ 的 $20\ \mu\text{L}$ 细胞因子, 结合反应 $30\sim 50$ 分钟, 用 $50\ \mu\text{L}$ PBS 冲洗, 采集数据;

第四步, 将生物素衍生化的细胞因子受体接合在压电石英晶体微天平的金石英晶体基片表面, 观察细胞因子受体与中药有效成分相互作用:

A. 同第三步的 A;

B. 同第三步的 B;

C. 细胞因子受体与中药有效成分结合反应: 在经上述处理的压电石英晶体微天平的金石英晶体基片上加入浓度为 $10^{-5}\sim 10^{-1}\text{M}$ 的 $20\ \mu\text{L}$ 至少含一种中药有效成分的溶液, 结合反

应 20~30 分钟, 用 50 μ L PBS 洗 3 遍, 采集数据;

第五步, 将生物素衍生化的细胞因子接合在压电石英晶体微天平的金石英晶体基片表面, 观察细胞因子与中药有效成分相互作用:

A. 同第三步的 A;

B. 生物素衍生化细胞因子包被压电石英晶体微天平的金石英晶体基片: 在经过上述处理的压电石英晶体微天平的金石英晶体基片上加入上述第一步中制取的 20 μ L 生物素衍生化的细胞因子, 反应 30 分钟, 用 50 μ L PBS 冲洗, 采集数据, PBS 为由 0.01M 磷酸钠、0.138M NaCl 和 0.027M KCl 配制成的, pH=7.4 的磷酸盐缓冲液;

C. 细胞因子与中药有效成分结合反应: 在经过上述处理的压电石英晶体微天平的金石英晶体基片上加入浓度为 10^{-5} ~ 10^{-1} M 的 20 μ L 至少含一种中药有效成分的溶液, 结合反应 20~30 分钟, 用 50 μ L PBS 洗 3 遍, 采集数据;

第六步, 将生物素衍生化的细胞因子受体接合在压电石英晶体微天平的金石英晶体基片表面, 观察中药有效成分对细胞因子与受体结合的影响:

A. 同第三步的 A;

B. 同第三步的 B;

C. 中药有效成分对细胞因子与其受体结合的影响: 在经上述处理的压电石英晶体微天平的金石英晶体基片上加入浓度为 0.05~0.5mg/mL 的 20 μ L 细胞因子与浓度为 10^{-5} ~ 10^{-1} M 的 20 μ L 至少一种中药有效成分的混合液, 结合反应 20~30 分钟, 用 50 μ L PBS 洗 3 遍, 采集数据;

第七步, 实验结果: 对实验采集的晶体震荡频率发生变化的数据所形成的反应曲线进行分析, 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。

中药作用机理的测定方法

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进行中药作用机理测定的方法。

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技术进行中药作用机理测定的方法，该发明方法能够测定中药有效成分对于细胞因子和受体间相互作用的影响情况，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：应用压电石英晶体微天平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：

第一步，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；

第二步，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 pH7.4 磷酸盐缓冲液中；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；

第三步，将生物素衍生化的细胞因子受体接合在压电石英晶体微天平的金石英晶体基片表面，观察细胞因子与其受体相互作用：

A. 将亲和素接合到压电石英晶体微天平的金石英晶体基片上：先将压电石英晶体微天平的金石英晶体基片用去离子水清洗，再用纯甲醇浸泡 1 小时，然后用去离子水冲洗 3 遍，再用超声波清洗 3 分钟，晾干，在基片表面加 10 μL 浓度为 10mmol/L 的 α -硫辛酸，平衡 30 分钟后，用去离子水冲洗，依次加入活化剂 100mg/mL 盐酸 1-乙基-3-(3-二甲基氨基丙基)碳二亚胺和 100mg/mL N-羟琥珀酰亚胺各 10 μL ，平衡 20 分钟，用去离子水冲洗，最后加入 20 μL 浓度为 2mg/mL 亲和素 Streptavidin，平衡 1 小时，收集数据；

B. 生物素衍生化细胞因子受体包被压电石英晶体微天平的金石英晶体基片：在经过上述处理的压电石英晶体微天平的金石英晶体基片上加入上述第二步中制取的 20 μL 生物素衍生化的细胞因子受体，反应 30~50 分钟，用 50 μL PBS 冲洗，采集数据，PBS 为由 0.01M 磷酸钠、0.138M NaCl 和 0.027M KCl 配制成的、pH=7.4 的磷酸盐缓冲液；

C. 细胞因子与其受体结合反应：在经过上述处理的压电石英晶体微天平的金石英晶体基片上加入浓度为 0.05~0.5mg/mL 的 20 μL 细胞因子，结合反应 30~50 分钟，用 50 μL PBS 冲洗，采集数据；

第四步，将生物素衍生化的细胞因子受体接合在压电石英晶体微天平的金石英晶体基片表面，观察细胞因子受体与中药有效成分相互作用：

A. 同第三步的 A;

B. 同第三步的 B;

C. 细胞因子受体与中药有效成分结合反应: 在经上述处理的压电石英晶体微天平的金石英晶体基片上加入浓度为 $10^{-5} \sim 10^{-1} \text{M}$ 的 $20 \mu\text{L}$ 至少含一种中药有效成分的溶液, 结合反应 $20 \sim 30$ 分钟, 用 $50 \mu\text{L}$ PBS 洗 3 遍, 采集数据;

第五步, 将生物素衍生化的细胞因子接合在压电石英晶体微天平的金石英晶体基片表面, 观察细胞因子与中药有效成分相互作用:

A. 同第三步的 A;

B. 生物素衍生化细胞因子包被压电石英晶体微天平的金石英晶体基片: 在经过上述处理的压电石英晶体微天平的金石英晶体基片上加入上述第一步中制取的 $20 \mu\text{L}$ 生物素衍生化的细胞因子, 反应 30 分钟, 用 $50 \mu\text{L}$ PBS 冲洗, 采集数据, PBS 为由 0.01M 磷酸钠、 0.138M NaCl 和 0.027M KCl 配制成的, $\text{pH}=7.4$ 的磷酸盐缓冲液;

C. 细胞因子与中药有效成分结合反应: 在经过上述处理的压电石英晶体微天平的金石英晶体基片上加入浓度为 $10^{-5} \sim 10^{-1} \text{M}$ 的 $20 \mu\text{L}$ 至少含一种中药有效成分的溶液, 结合反应 $20 \sim 30$ 分钟, 用 $50 \mu\text{L}$ PBS 洗 3 遍, 采集数据;

第六步, 将生物素衍生化的细胞因子受体接合在压电石英晶体微天平的金石英晶体基片表面, 观察中药有效成分对细胞因子与受体结合的影响:

A. 同第三步的 A;

B. 同第三步的 B;

C. 中药有效成分对细胞因子与其受体结合的影响: 在经上述处理的压电石英晶体微天平的金石英晶体基片上加入浓度为 $0.05 \sim 0.5 \text{mg/mL}$ 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, 结合反应 $20 \sim 30$ 分钟, 用 $50 \mu\text{L}$ PBS 洗 3 遍, 采集数据;

第七步, 实验结果: 对实验采集的晶体震荡频率发生变化的数据所形成的反应曲线进行分析, 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。

压电石英晶体微天平 (Quartz Crystal Microbalance, 简称 QCM, 又称为厚度剪切模式声波传感器、或压电石英晶体生物传感器) 的工作原理是基于 AT 切割的石英晶体震荡片及其上面的逆压电效应。当有物质在石英晶片上吸附或沉淀时，晶体震荡频率发生变化 (ΔF)，它与晶片上沉积物的质量变化 (ΔM) 间有简单的线性关系。压电石英晶体微天平的金石英晶体基片共振频率的变化 ΔF 与吸附物质量 m 的关系如下：

$$\Delta F = -2F_0^2 (\rho_q \mu_q) - 1/2m/A$$

其中： F_0 为石英基本振动频率， ρ_q 为石英的密度 $= 2.65 \times 10^3 \text{ kg/m}^3$ ， μ_q 为剪切模

量 $=2.95 \times 10^{10} \text{Pa}$ ，A为基片表面积。

本发明中使用的是At-cut基片，石英基本振动频率 $F_0=9\text{MHz}$ ，基片表面积 $A=0.19 \pm 0.01 \times 10^{-4} \text{m}^2$ ，因此可以得到：

$$\Delta F = -1.83 \times 10^8 \text{m/A}$$

压电石英晶体微天平是一种高灵敏度的质量检测器，理论上检测灵敏度可达到ng级，因此本发明方法所有的高特异性、高灵敏度、高检测精度的优点更为突出。

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。本发明方法中采用压电石英晶体微天平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，是对以往中药作用机理研究方法的新突破。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 亲和素与压电石英晶体微天平的金石英晶体基片接合过程示意图。

图2 生物素衍生化细胞因子与被亲和素修饰的压电石英晶体微天平的金石英晶体基片接合过程示意图。

图3 中药有效成分与细胞因子结合过程示意图。

图4 生物素衍生化细胞因子受体与被亲和素修饰的压电石英晶体微天平的金石英晶体基片接合过程示意图。

图5 中药有效成分与细胞因子受体结合过程示意图。

图6 在被亲和素修饰的压电石英晶体微天平的金石英晶体基片上生物素衍生化细胞因子受体与细胞因子结合示意图。

图7 中药有效成分对在被亲和素修饰的压电石英晶体微天平的金石英晶体基片上生物素衍生化细胞因子受体与细胞因子结合影响示意图。

图8 亲和素与细胞因子结合的反应曲线。

图9 中药有效成分与细胞因子结合的反应曲线。

图中，1. 压电石英晶体微天平的金石英晶体基片、2. 活化剂、3. 亲和素、4. 生物素衍生化细胞因子、5. 生物素衍生化细胞因子受体、6. 中药有效成分、7. 细胞因子。

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表示亲和素与压电石英晶体微天平的金石英晶体基片的接合过程,先将压电石英晶体微天平的金石英晶体基片(1)用去离子水清洗和纯甲醇处理,然后在基片表面加入活化剂(2),最后加入亲和素(3),平衡后压电石英晶体微天平的金石英晶体基片(1)与亲和素(3)紧密接合。

图2表示生物素衍生化细胞因子与被亲和素修饰的压电石英晶体微天平的金石英晶体基片的接合过程,将生物素衍生化细胞因子(4)加到被亲和素(3)修饰的压电石英晶体微天平的金石英晶体基片(1)上,生物素衍生化细胞因子(4)借助亲和素(3)与被亲和素修饰的压电石英晶体微天平的金石英晶体基片(1)紧密接合。

图3表示将中药有效成分(6)加到接合了生物素衍生化细胞因子(4)的被亲和素(3)修饰的压电石英晶体微天平的金石英晶体基片(1)上,中药有效成分(6)与细胞因子(4)结合。

图4表示生物素衍生化细胞因子受体与被亲和素修饰的压电石英晶体微天平的金石英晶体基片的接合过程,将生物素衍生化细胞因子受体(5)加到被亲和素(3)修饰的压电石英晶体微天平的金石英晶体基片(1)上,生物素衍生化细胞因子受体(5)借助亲和素(3)与被亲和素修饰的压电石英晶体微天平的金石英晶体基片(1)紧密接合。

图5表示将中药有效成分(6)加到接合了生物素衍生化细胞因子受体(5)的被亲和素(3)修饰的压电石英晶体微天平的金石英晶体基片(1)上,中药有效成分(6)与细胞因子受体(5)结合。

图6表示将细胞因子(7)加到接合了生物素衍生化细胞因子受体(5)的被亲和素(3)修饰的压电石英晶体微天平的金石英晶体基片(1)上,生物素衍生化细胞因子受体(5)与细胞因子(7)紧密结合。

图7表示将细胞因子(7)与中药有效成分(6)的混合液加到接合了生物素衍生化细胞因子受体(5)的被亲和素(3)修饰的压电石英晶体微天平的金石英晶体基片(1)上,中药有效成分(6)影响了生物素衍生化细胞因子受体(5)与细胞因子(7)的接合。

图8表明表面接合有亲和素的压电石英晶体微天平的金石英晶体基片达到平衡后,加入细胞因子或细胞因子受体后,曲线下降。原因是由于细胞因子或细胞因子受体与亲和素特异性结合,晶体震荡频率发生了变化,导致曲线下降,平衡约50分钟后,用磷酸盐缓冲液清洗,洗掉非特异性吸附及结合性弱的物质,重新达到平衡。

图9表明表面接合有亲和素的压电石英晶体微天平的金石英晶体基片达到平衡,加入细胞因子或细胞因子受体,再加入中药有效成分后,曲线下降。原因是由于中药有效成分与细胞因子或细胞因子受体特异性结合,晶体震荡频率发生了变化,导致曲线下降,平衡约30分钟,用磷酸盐缓冲液清洗,洗掉非特异性吸附及结合性弱的物质,再次达到平衡。实验证明中药有效成分能与细胞因子及其受体发生特异性结合。

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；所选生物传感系统是 EG&G 公司的 SEIKO QCA917 型，有 Winchem 软件和表面积为 $0.19 \pm 0.01 \times 10^{-4} \text{m}^2$ 、厚度 0.3 mm、 $F_0=9\text{MHzAT-cut}$ 金石英晶体基片的压电石英晶体微天平。

第一步，将 $4 \sim 100 \mu\text{g}$ 人重组细胞因子内皮素-1 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 活化生物素溶于 $120 \mu\text{L}$ 去离子水中，取其 $20 \sim 50 \mu\text{L}$ 加入上述人重组细胞因子内皮素-1 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，完成人重组细胞因子内皮素-1 生物素衍生化；

第二步，将 $4 \sim 100 \mu\text{g}$ 人重组细胞因子内皮素-1 受体加入 $200 \sim 500 \mu\text{L}$ 0.01mol/L 、 $\text{pH}=7.4$ 磷酸盐缓冲液中；将 $1 \sim 2\text{mg}$ SULFO-NHS-LC-BIOTIN 活化生物素溶于 $120 \mu\text{L}$ 去离子水中，取其 $20 \sim 50 \mu\text{L}$ 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°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，完成人重组细胞因子内皮素-1 受体生物素衍生化；

第三步，A. 先将所选用压电石英晶体微天平的金石英晶体基片用去离子水清洗，再用纯甲醇浸泡 1 小时，然后用去离子水冲洗 3 遍，再用超声波清洗 3 分钟，晾干，在基片表面加 $10\mu\text{L}$ 浓度为 10mmol/L 的 α -硫辛酸，平衡 30 分钟后，用去离子水冲洗，依次加入活化剂 100mg/mL 盐酸 1-乙基-3-(3-二甲基氨基丙基)碳二亚胺和 100mg/mL N-羟琥珀酰亚胺各 $10\mu\text{L}$ ，平衡 20 分钟，用去离子水冲洗，最后加入亲和素 Streptavidin 平衡 1 小时，收集数据，证明所选用压电石英晶体微天平的金石英晶体基片与亲和素 Streptavidin 紧密接合。

B. 在经过上述处理的压电石英晶体微天平的金石英晶体基片上加入上述第二步中制取的 $20 \mu\text{L}$ 生物素衍生化的人重组细胞因子内皮素-1 受体，反应 30~50 分钟，用 $50 \mu\text{L}$ PBS 冲洗，采集数据，绘制成如图 8 所示的曲线，它说明人重组细胞因子内皮素-1 受体与亲和素 Streptavidin 发生特异性结合，PBS 为由 0.01M 磷酸钠、 0.138M NaCl 和 0.027M KCl 配制成的、 $\text{pH}=7.4$ 的磷酸盐缓冲液；

C. 在经过上述 B 步处理的压电石英晶体微天平的金石英晶体基片上加入浓度 $0.05 \sim 0.5\text{mg/mL}$ 的 $20 \mu\text{L}$ 人重组细胞因子内皮素-1，结合反应 30~50 分钟，用 $50 \mu\text{L}$ PBS 冲洗，采集数据，结果如图 6 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；

第四步，A. 同第三步的 A；

B. 同第三步的 B；

C. 在经过上述 B 步处理的压电石英晶体微天平的金石英晶体基片上加入浓度

为 $10^{-5} \sim 10^{-1} \text{M}$ 的 $20 \mu\text{L}$ 赤芍 801 的溶液, 结合反应 $20 \sim 30$ 分钟, 用 $50 \mu\text{L}$ PBS 洗 3 遍, 采集数据, 绘制成如图 9 所示的曲线, 它说明赤芍 801 与人重组细胞因子内皮素-1 受体发生特异性结合;

第五步, A. 同第三步的 A;

B. 在经过上述处理的压电石英晶体微天平的金石英晶体基片上加入上述第一步中制取的 $20 \mu\text{L}$ 生物素衍生化的人重组细胞因子内皮素-1, 反应 $30 \sim 50$ 分钟, 用 $50 \mu\text{L}$ PBS 冲洗, 采集数据, 绘制成如图 8 所示的曲线, 它说明人重组细胞因子内皮素-1 与亲和素 Streptavidin 发生特异性结合;

C. 在经过上述 B 步处理的压电石英晶体微天平的金石英晶体基片上加入浓度为 $10^{-5} \sim 10^{-1} \text{M}$ 的 $20 \mu\text{L}$ 赤芍 801 的溶液, 结合反应 $20 \sim 30$ 分钟, 用 $50 \mu\text{L}$ PBS 洗 3 遍, 采集数据, 绘制成如图 9 所示的曲线, 它说明赤芍 801 与人重组细胞因子内皮素-1 发生特异性结合;

第六步, A. 同第三步的 A;

B. 同第三步的 B;

C. 在经过上述步处理的压电石英晶体微天平的金石英晶体基片上加入浓度为 $0.05 \sim 0.5 \text{mg/mL}$ 的 $20 \mu\text{L}$ 人重组细胞因子内皮素-1 和浓度为 $10^{-5} \sim 10^{-1} \text{M}$ 的 $20 \mu\text{L}$ 赤芍 801 的混合液, 结合反应 $20 \sim 30$ 分钟, 用 $50 \mu\text{L}$ PBS 洗 3 遍, 采集数据, 结果如图 7 所示, 赤芍 801 抑制了生物素衍生化人重组细胞因子内皮素-1 受体与人重组细胞因子内皮素-1 的接合, 起到拮抗内皮素作用、扩张血管和抑制血小板聚集;

第七步, 结果分析: 内皮素是迄今发现最强的缩血管物质之一, 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途径。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, 从而拮抗内皮素作用, 扩张血管, 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作用、扩张血管和抑制血小板聚集。

实施例 4

通过比较实施例 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, 证明赤芍 801 抑制人重组细胞因子内皮素-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 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。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 $\text{TNF-}\alpha$ 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：阿魏酸和赤芍 801 之间的配伍可以促进肿瘤坏死因子 $\text{TNF-}\alpha$ 与其可溶性受体 sTNFR-1 结合，从而抑制 $\text{TNF-}\alpha$ 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 $\text{TNF-}\alpha$ 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、阿魏酸和赤芍 801 它们之间的配伍可以促进肿瘤坏死因子 $\text{TNF-}\alpha$ 与其可溶性受体 sTNFR-1 结合，从而抑制 $\text{TNF-}\alpha$ 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。

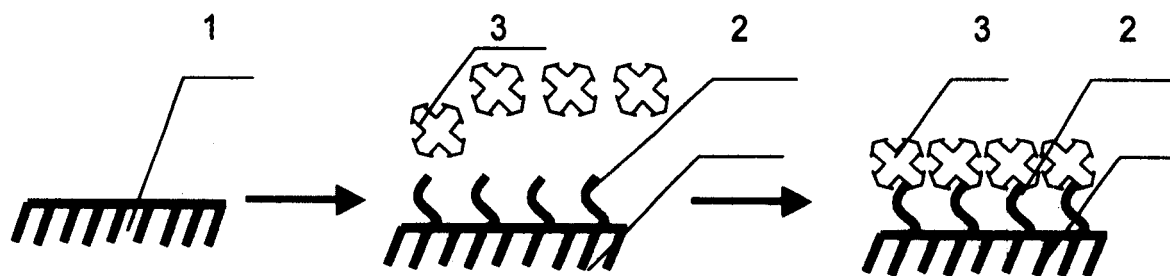


图 1

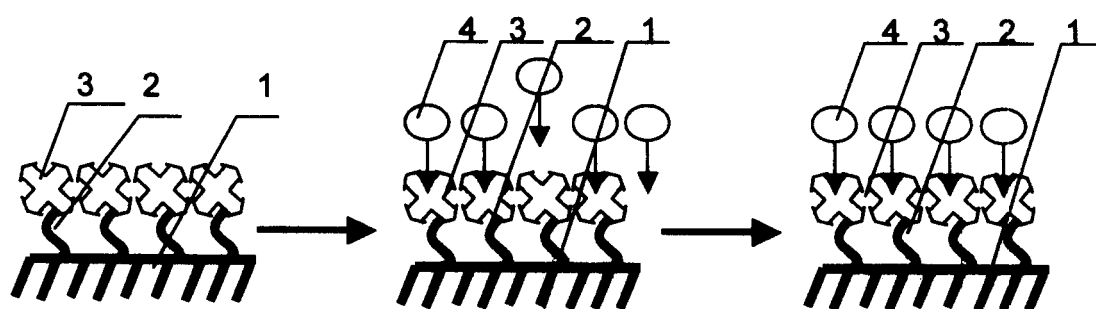


图 2

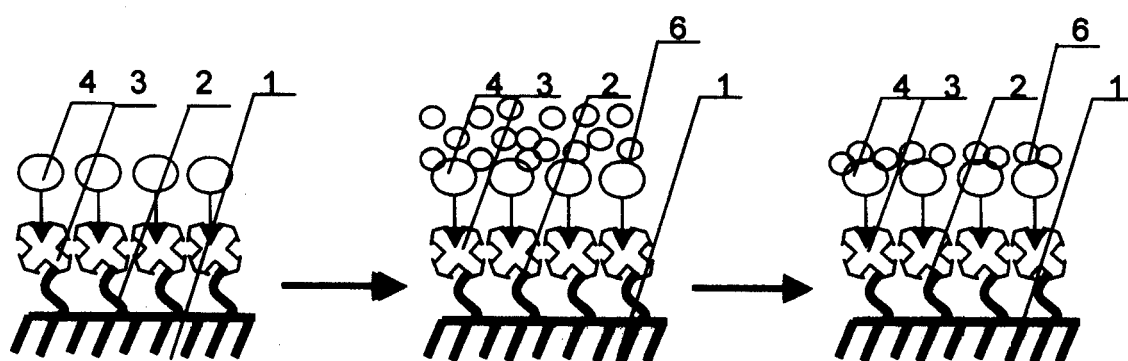


图 3

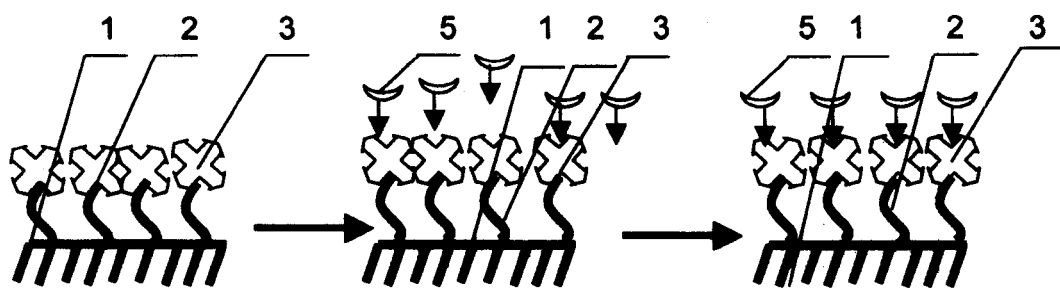


图 4

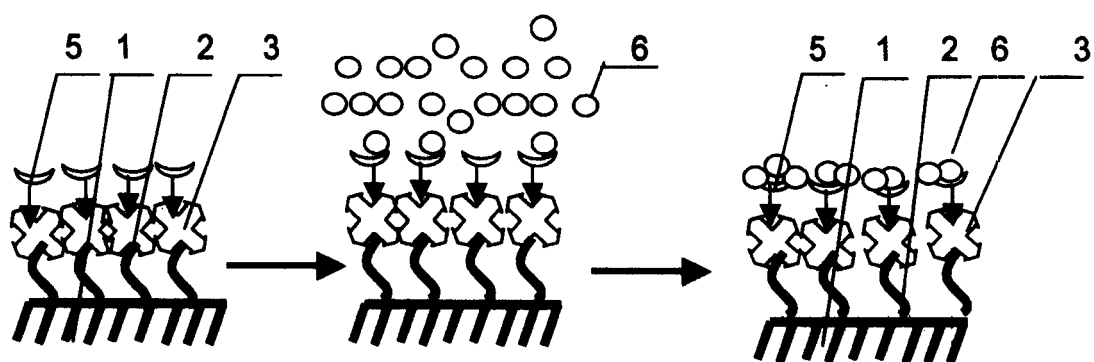


图 5

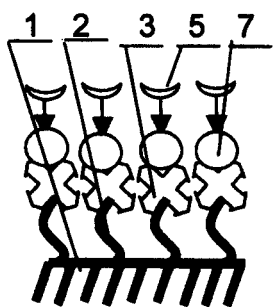


图 6

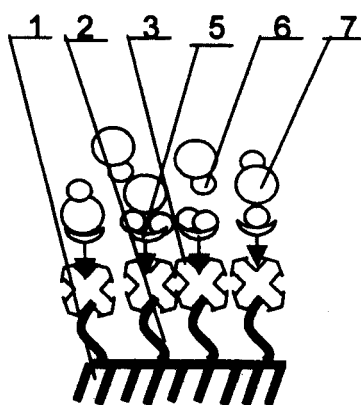


图 7

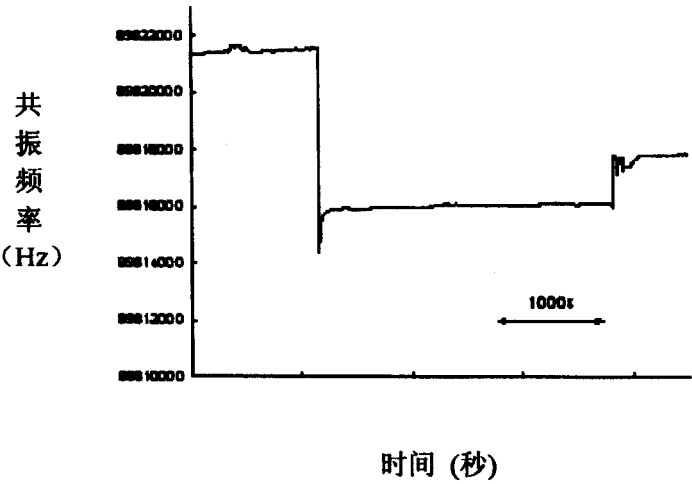


图 8

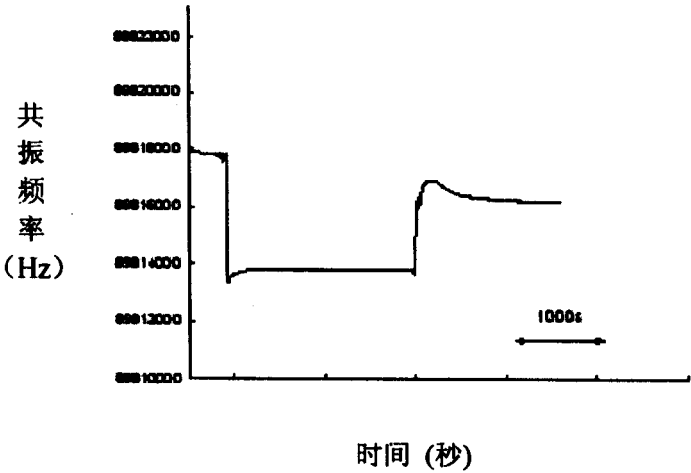


图 9

专利名称(译)	中药作用机理的测定方法		
公开(公告)号	CN1259568C	公开(公告)日	2006-06-14
申请号	CN200410020175.5	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 吴宝艳 殷惠军 黄加栋 李静 史海滨		
发明人	陈强 陈可冀 吴宝艳 殷惠军 黄加栋 李静 史海滨		
IPC分类号	G01N33/15 G01N33/50 G01N33/53 C12Q1/00		
其他公开文献	CN1598577A		
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，应用压电石英晶体微天平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。

