

• 基础实验研究论著 •

应用生物传感器技术筛选拮抗革兰阴性菌主要病原分子的中药*

龙宇鹏^{1,2}, 郑江^{1△}

(1. 第三军医大学西南医院综合实验研究中心, 重庆 400038;

2. 中国人民解放军第三二四医院检验科, 重庆 400020)

摘要: 目的 建立以 CpG DNA 和脂质 A 为靶点的生物传感器筛选平台, 从传统抗炎中药中筛选同时具有拮抗细菌基因组 DNA 及脂质 A 活性的中药并按其活性物质的含量进行排序。方法 将 CpG DNA 和脂质 A 分别包被于生物传感器的生物素样品池和非衍生板以建立靶点, 测定 114 种中药提取液去鞣质后与 CpG DNA 的亲和力; 选择亲和力较高的 35 种药物与定量 CpG DNA(16.5 μg/mL) 37 °C 混合孵育 30 min, 再测定其与 CpG DNA 的亲和力, 以评价中药提取液中活性物质的含量。选择亲和力较高的中药与脂质 A 反应进行再次筛选。结果 114 种中药中, 侧柏叶、薄荷、半枝莲等 35 种中药与 CpG DNA 具有较高亲和力(>100 RU); 地骨皮、侧柏叶等 14 种中药中, 与 CpG DNA 特异性结合的活性物质, 测得含量均较高。经另一检测靶点脂质 A 再次筛选后得到 8 种特异性亲和力较高的备选中药。结论 应用生物传感器跟踪检测技术筛选具有结合革兰阴性菌主要致病分子作用的中药具有可行性。

关键词: CpG DNA; 脂质 A; 生物传感器技术; 脓毒症**DOI:** 10.3969/j.issn.1673-4130.2013.22.004**文献标识码:**A**文章编号:** 1673-4130(2013)22-2951-03

Application of biosensor technology to screen anti-inflammatory traditional Chinese medicine against CpG DNA and lipid A*

Long Yupeng^{1,2}, Zheng Jiang^{1△}

(1. Medical Research Center, Southwestern Hospital, the Third Military Medical University, Chongqing 400038, China; 2. The 324th Hospital of PLA, Chongqing 400020, China)

Abstract: Objective To apply the biosensor technology to screen anti-inflammatory traditional Chinese medicine(TCM) by target of CpG DNA and lipid A. Then TCM were sorted in accordance with the content of anti-inflammatory efficient materials. **Methods** CpG DNA and lipid A were immobilized onto the surface of biotin and non-derivatized cuvettes respectively for establishing target. 114 anti-inflammatory TCMs were sifted by biosensor through targets of two pathogenic molecules. The quantitative CpG DNA were incubated at 37 °C with watery extractive from the TCM having high affinity about 30 min, after that the affinity biosensor were used to detect binding force. Lipid A was used for secondary screening. **Results** Thirty-five TCMs had higher combining competence with CpG DNA, and fourteen species owned more specific binding-CpG DNA compositions. Eight species of TCMs contained the active substance with specific affinity to CpG DNA and lipid A. **Conclusion** It is feasible to screen TCMs by biosensor technology.

Key words: CpG DNA; lipid A; biosensor technology; sepsis

所谓脓毒症, 临幊上主要是指在感染因素介导下, 人机体发生的全身性炎症综合征(SIRS), 其发病率和病死率均很高^[1]。临幊上革兰阴性菌介导的细菌脓毒症约占 57%, 其主要病原分子分为 2 种, 一是细菌基因组 DNA(CpG DNA), 二是内毒素(LPS), 但过去对脓毒症的治疗研究主要以单一的病原分子 LPS 为靶点, 至今医学界仍未提出行之有效的治疗方案^[2]。所以探索有效的治疗措施, 研究出同时可以拮抗多个核心病原分子的天然无不良反应的药物已成为脓毒症防治未来发展的主要趋势。本研究以在传感器样品池表面包被的 CpG DNA 作为待测靶点, 根据抗炎中药与其亲和力的高低进行初步筛选, 随后以脂质 A 作为待测靶点进行二次筛选, 同时与 2 种病原分子分别孵育进行消耗实验, 以便对中药水提液中所含

活性物质的量进行评估。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂 生物传感器 IASYS Auto, 生物素样品池 Cuv992200 及非衍生板均购自美国 Thermo 公司。5'端由生物素标记的 CpG DNA 107(5'-TGG CGC GGG GCG-3')由北京赛百盛公司合成; 114 种中药材均购自重庆市西部医药商城; 60Co 辐照 EP 管为本室提供; 亲和素(批号 123k4827), 大肠埃希菌脂质 A(批号 103K4125), 多粘菌素 B(PMB, 批号 052K25025), n-辛基-β-D-吡喃葡萄糖昔(OG, 批号 122K5305)和 LPS(O111:B4)均购自美国 Sigma 公司。

1.2 方法

1.2.1 中药水提液的制备 查阅资料选择购买 114 种具有清

* 基金项目: 国家重点基础研究发展计划(973 计划)资助项目(2005CB522600)。作者简介: 龙宇鹏, 女, 主管技师, 主要从事感染、炎症的发病机制及防治措施研究。△ 通讯作者, E-mail: zhengj@mail.tmmu.com.cn。

热消炎作用的中药,将其粉碎后与蒸馏水 100 ℃ 水浴 90 min, 5 000 r/min 离心 20 min, 取上清液冷冻抽干称量后用蒸馏水重悬,使中药终浓度为 0.1 g/mL。

1.2.2 生物素样品池及非衍生板的包被检测 将 5'端生物素标记的 CpG DNA 配制为 33 μg/mL 的溶液,按照 Thermo 公司生物素样品池包被说明书操作。将脂质 A 配制为 2 mg/mL 的 OG/PBS 溶液进行包被,按照 Thermo 公司非衍生板包被说明书操作,将 PMB 分别配置为 6 个浓度(512、256、128、64、32、16 nmol/L)的标准溶液,与脂质 A 进行结合反应测定,然后用传感器自带软件 FASTfit 及 FASTplot 程序计算 PMB 与脂质 A 的平衡解离常数(KD)。

1.2.3 与 CpG DNA 结合力的测定 分别取 5 μL 中药水提液上样,具体测定步骤:(1)平衡基线,pH7.4 的 PBST 50 μL 冲洗样品池 5 次,基线平稳后采集数据 3 min;(2)结合,取 5 μL 药液加入 PBST 中,充分混匀;(3)解离,50 μL PBST 洗脱 3 次(非特异性);(4)再生,0.01 mol/L 50 μL HCl 洗脱 1 次(特异性);(5)进入下一循环,PBST 冲洗平衡基线。

1.2.4 CpG DNA 的定量消耗实验 用⁶⁰Co 辐照的 EP 管分装筛选出的高亲和力中药水提液[反应单位(RU)>100],每管 50 μL,分为 2 组。第 1 组为对照组,补足等体积生理盐水,第 2 组为消耗实验组,加入 16.5 μg/mL 的等体积 CpG DNA,充分混匀 2 组样品,37 ℃ 水浴 30 min,再次测定与 CpG DNA 的结合力。

1.2.5 中药水提液与脂质 A 结合力的测定 将与 1.2.4 中测定结果较高的 14 种中药水提液样品上样测定与脂质 A 的结合活性,选择结合力较高的中药,其结合力测定过程同 1.2.3。

1.2.6 与定量 LPS 的消耗实验 测定方法同 1.2.4,消耗组加入等体积 5 ng/mL 的 LPS 用以消耗样品中的部分活性物质,然后测定与脂质 A 的结合活性。

2 结 果

2.1 包被板的质量评估 CpG DNA 包被生物素板的反应曲线,见图 1a(见《国际检验医学杂志》网站主页“论文附件”),A、B 两点对应的纵坐标数值间的差值即为包被值,通过计算,包被值约为 196 弧秒,换算成包被量约为 0.33 ng/mm²(600 弧秒换算成包被量约等于 1 ng/mm²),可见共振峰尖锐对称,表明样品池内的 CpG DNA 分布均匀,包被质量均达到 Thermo 公司的检测标准。脂质 A 包被非衍生板反应值约为 716 弧秒,换算为包被量约 1.19 ng/mm²,共振峰尖锐对称,表明样品池内的脂质 A 同样分布均匀;梯度浓度 PMB 与脂质 A 的结合曲线,见图 1b(见《国际检验医学杂志》网站主页“论文附件”),通过软件 FASTfit 及 FASTplot 作图、计算出 KD 值为 4.14×10^{-8} mol/L,包被结果及 PMB 标准品 KD 值均达到实验标准。

2.2 中药水提液与 CpG DNA 的结合力检测 不同中药与 CpG DNA 结合的反应值有较大差异,其水提液与 CpG DNA 的结合值大于 100 RU 的有侧柏叶、薄荷、半枝莲等 35 种中药,提示这些中药可能含有能够高亲和力结合 CpG DNA 的抗炎活性物质,可进一步进行消耗实验检测其物质含量,见图 2(见《国际检验医学杂志》网站主页“论文附件”。

2.3 CpG DNA 的定量消耗实验 相较于对照组,消耗组的结合值都发生了一定程度的降低,提示定量 CpG DNA 消耗了 35 种中药中的部分活性物质。经消耗实验后,薄荷、草果、桂枝等中药结合值下降明显,表明其剩余的抗炎活性成分少;侧柏叶、大黄、地骨皮等 14 种中药仍保持较高结合值,表明其剩余的活性成分较多,提示其所含活性物质的量较高,见表 1。

表 1 35 种中药消耗实验后与 CpG DNA 亲和力的排序

中药	消耗组 RU	对照组 RU	中药	消耗组 RU	对照组 RU
侧柏叶	276.58	346.79	黄药子	94.91	127.30
石榴皮	253.61	301.36	山楂	94.77	113.86
知母	219.09	268.27	槐花	93.22	122.25
地骨皮	209.72	240.60	夏枯草	83.99	104.24
牡丹皮	201.47	275.46	草果	77.40	108.55
大黄	192.98	252.13	半枝莲	71.08	107.45
山茱萸	164.03	247.31	马齿苋	70.31	85.57
黄芩	154.70	203.45	藏青果	67.01	80.95
陈艾	142.07	197.13	商陆	66.21	92.35
肉桂	131.12	196.32	雷公藤	66.04	91.15
毛冬青	115.71	134.58	黄连	61.17	89.64
牛耳大黄	115.09	176.92	金荞麦	60.17	82.36
地耳草	113.89	156.33	连翘	56.53	80.23
赤芍	113.53	151.32	大青叶	53.36	72.35
西青果	98.34	146.36	薄荷	52.86	80.59
槐角	98.26	132.66	桂枝	51.91	78.56
桃仁	96.50	136.56	秦艽	48.47	72.45
柴胡	95.55	135.55			

2.4 与脂质 A 结合活性的测定 本研究所采用的 14 种中药水提液,其与脂质 A 的结合活性均较高,RU>100,而其中侧柏叶等 5 种中药水提液,其与脂质 A 的结合值甚至高于 300,提示这些中药均含有能够与脂质 A 高亲和力结合的活性成分,见图 3(见《国际检验医学杂志》网站主页“论文附件”。

2.5 LPS 的定量消耗实验 在被 LPS 定量消耗后,14 种中药亲和力都发生了不同程度的降低,其中地耳草、陈艾等被定量 LPS 消耗后,结合力降低明显,表明剩余的有效成分较少;而仍有侧柏叶、石榴皮、地骨皮等 8 种中药结合力超过 200 弧秒,表明剩余的有效成分较多,提示这 8 种中药即使在与定量脂质 A 结合后,其游离活性成分含量依然较高。14 种中药消耗实验后与脂质 A 亲和力从高到低排序为侧柏叶、石榴皮、地骨皮、牡丹皮、山茱萸、知母、黄芩、大黄、肉桂、牛耳大黄、赤芍、毛冬青、地耳草、陈艾,消耗组 RU 值分别为 321.56、316.55、286.52、267.35、252.63、228.65、209.88、203.45、156.58、133.66、123.55、115.68、101.43、96.52,对照组 RU 值分别为 396.22、378.43、335.52、318.86、309.56、276.55、252.67、243.24、192.35、181.32、180.69、182.36、165.55、168.36。

3 讨 论

脓毒症的主要病原分子就是革兰阴性菌外膜的 LPS^[3],其中脂质 A 是 LPS 分子的生物学活性中心。细菌 DNA 既是所

有细菌共有的遗传物质,又是介导脓毒症的主要病原分子。所以,对于脓毒症的预防乃至治疗,寻找出既可以拮抗 CpG DNA 又可以拮抗病原分子脂质 A 的天然无副作用药物具有重大的理论与现实意义。

PMB 对革兰阴性细菌具有广谱抗菌活性,是得到国际公认的脂质 A 的特异性配体。因此本实验以不同浓度 PMB 标准溶液与脂质 A 进行结合反应测定作为参照,通过软件计算出的两者结合的 KD 值,该值不仅符合 Thermo 公司提供的参考标准,而且与文献报道的 10~100 nmol/L 水平基本相符,表明建立的生物传感器筛选平台在脓毒症病原分子的配体筛选方面具有快捷和可靠的优势。

生物传感技术最大的特点在于光学共振镜的应用,即按照折光系数的动态变化数值,实时对传感器表面受体与其配体分子间的相互作用及亲和力予以反映^[4]。本课题组在前期的研究工作中,围绕脂质 A 为中央靶点,在赤芍的组分离中,成功提取出拮抗内毒素的单体 1,2,3,4,6-O-五没食子酰-β-D-葡萄糖(PGG)^[5]。实验研究得出,有大量的带负电荷磷酸基团存在于脂质 A 双糖骨架上,诸如 PMB 这类具有拮抗 LPS 作用的天然生物分子,都是借助与 LPS 的活性中心脂质 A 的阴离子基团结合,实现拮抗作用^[6]。实验中脂质 A 疏水端经表面活性剂 OG 连接到非衍生板上,在样品池表面形成脂质 A 活性中心充分暴露的带负电荷的单分子层。而研究发现带负电荷的磷酸基团同时也存在于 CpG DNA 中,所以笔者推测,相较于脂质 A 分子,CpG DNA 在部分属性上与其类似,即其与中药活性物质的结合是通过电荷作用来实现的,这为 CpG DNA 建立靶点筛选抗炎中药提供了实验基础和理论依据。

本实验选用了碱基经硫化修饰的免疫刺激作用增强型 CpG DNA 107 序列,其 5' 端被生物素标记后,CpG DNA 再经亲和素-生物素效应放大系统与样品池表面稳固连接,从而建立了可靠的靶点。在应用生物传感器技术检测过程中,由于药液(配体)浓度不发生改变,当样品池表面受体与配体进行结合后,其结合反映值的变化就是两者结合作用是否具有特异性及其亲和力值的实时反映,其能直观、准确地提示与病原分子 CpG DNA 及脂质 A 结合的抗炎活性物质是否存在与中药中。基于此,本课题组设计了进一步对中药活性成分含量评估的定

量消耗实验,按照上述技术的特点实验选择了亲和力值均高于 100 RU 的中药。因部分中药中的有效物质被定量的脂质 A 及 CpG DNA 所消耗,因而在定量消耗实验过程中,很多中药由于活性成分含量较低,在消耗后与病原分子结合能力明显降低,有的甚至丧失结合能力,如薄荷、草果等;但有的中药活性物质含量较高,即使在消耗后仍具有较高的结合能力。实验结果表明,侧柏叶等 8 种中药拮抗脂质 A 及 CpG DNA 的活性成分含量较高,拥有巨大的开发潜力。

本实验的检测靶点主要来源于革兰阴性菌的 2 种病原分子,在构建应用生物传感筛选技术平台的基础上进行交叉二次筛选,最终从 114 种抗炎中药中筛选出 8 种备选抗炎中药,为后续选择分离纯化的药物提供了实验依据。

参考文献

- [1] Targowski T. Possibilities of therapeutic intervention in severe infections[J]. Pol Merkur Lekarski, 2012, 33(197):245-247.
- [2] Harjai M, Bogra J, Kohli M, et al. Is suppression of apoptosis a new therapeutic target in sepsis? [J]. Anaesth Intensive Care, 2013, 41(2):175-183.
- [3] Brandenburg K, Schromm AB, Gutsmann T. Endotoxins: relationship between structure, function, and activity[J]. Subcell Biochem, 2010, 53:53-67.
- [4] Concepcion J, Witte K, Wartchow C, et al. Label-free detection of biomolecular interactions using BioLayer interferometry for kinetic characterization[J]. Comb Chem High Throughput Screen, 2009, 12(8):791-800.
- [5] Genfa L, Jiang Z, Hong Z, et al. The screening and isolation of an effective anti-endotoxin monomer from Radix Paeoniae Rubra using affinity biosensor technology [J]. Int Immunopharmacol, 2005, 5(6): 1007-1017.
- [6] Okazaki T, Mihara T, Fujita Y, et al. Polymyxin B neutralizes bacteria-released endotoxin and improves the quality of boar sperm during liquid storage and cryopreservation[J]. Theriogenology, 2010, 74(9):1691-1700.

(收稿日期:2013-05-08)

(上接第 2950 页)

- [J]. Lung Cancer, 2009, 64(3):263-270.
- [4] Allan AL, George R, Vantyghem SA, et al. Role of the integrin-binding protein osteopontin in lymphatic metastasis of breast cancer[J]. Am J Pathol, 2006, 169(1):233-246.
- [5] Kita Y, Natsugoe S, Okumura H, et al. Expression of osteopontin in oesophageal squamous cell carcinoma[J]. Br J Cancer, 2006, 95(5):634-638.
- [6] Davidson B, Holth A, Moripen L, et al. Osteopontin expression in ovarian carcinoma effusions is related to improved clinical outcome[J]. Hum Pathol, 2011, 42(7):991-997.
- [7] Lu JG, Li Y, Li L, et al. Overexpression of osteopontin and integrin αv in laryngeal and hypopharyngeal carcinomas associated with differentiation and metastasis[J]. J Cancer Res Clin Oncol, 2011, 137(11):1613-1618.

- [8] He ML, Luo MX, Lin MC, et al. MicroRNAs: potential diagnostic markers and therapeutic targets for EBV-associated nasopharyngeal carcinoma[J]. Biochim Biophys Acta, 2012, 1825(1):1-10.
- [9] Wai PY, Kuo PC. Osteopontin: regulation in tumor metastasis[J]. Cancer Metastasis Rev, 2008, 27(1):103-118.
- [10] Bachmann IM, Ladstein RG, Straume O, et al. Tumor necrosis is associated with increased alpha v beta 3 integrin expression and poor prognosis in nodular cutaneous melanomas[J]. BMC Cancer, 2008, 8(1):362.
- [11] Rangaswami H, Bulbule A, Kundu GC. Osteopontin: role in cell signaling and cancer progression[J]. Trends Cell Biol, 2006, 16(2):79-87.

(收稿日期:2013-05-08)