

应用压电石英晶体生物传感器研究赤芍 801 与 ET-1 间的相互作用

李 静¹ 吴宝艳¹ 蒋跃绒² 殷惠军² 黄加栋¹ 陈可冀² 陈 强¹

摘要 **目的** 采用体外实验的方法,直接检测活血化瘀中药赤芍有效成分赤芍 801 与细胞因子内皮素-1(ET-1)间的相互作用,探讨其作用的可能的靶点和分子机理。**方法** 应用压电石英晶体生物传感器——石英晶体微天平(QCM)检测赤芍 801 与 ET-1 之间的特异性结合。在 QCM 金基片表面经活化后接合上亲和素,继而将生物素衍生化的 ET-1 固定于基片表面,加入赤芍 801,检测赤芍 801 与 ET-1 之间的相互作用。每一步结合反应后,均用磷酸盐缓冲液(PBS)冲洗以去除非特异性吸附。**结果** 赤芍 801 与 ET-1 发生特异性结合。**结论** ET-1 可能是赤芍 801 体内作用靶点之一,即赤芍 801 通过与 ET-1 结合,阻碍 ET-1 与其受体的结合,从而拮抗 ET-1 的作用,扩张血管,抑制血小板聚集。

关键词 赤芍 801;内皮素-1;石英晶体微天平

Study on Interaction of Radix Paeoniae 801 and endothelin-1 by Using a Piezoelectric Quartz Crystal Biosensor
LI Jing, WU Bao-yan, JIANG Yue-rong, et al *Life-Science College, Nankai University, Tianjin (300071)*

Objective To explore the possible target and molecular mechanism of Radix Paeoniae 801 (RP801), an effective ingredient extracted from Radix Paeoniae, the Chinese herbal medicine for activating blood circulation to remove blood stasis, using experimental in vitro method by directly detecting the interaction between RP801 and endothelin-1 (ET-1). **Methods** Piezoelectric quartz crystal biosensor, namely, the quartz crystal microbalance (QCM) was used to detect the specific combining between RP801 and ET-1 by binding avidin to the pre-activated Au surface of electrode of QCM, followed by immobilizing biotinylated ET-1 to it, and adding RP801, then the binding curve was recorded. PBS washing was applied at the end of every steps of combining reaction for dissociate the non-specific absorption. **Results** Specific combining of RP801 and ET-1 was found. **Conclusion** ET-1 could possibly be one of the acting targets of RP801 in the body, that is, RP801 could combine with ET-1 to impede the binding of ET-1 with its receptor, so as to counteract the action of ET-1, dilate blood vessels and inhibit platelet aggregation.

Key words Radix Paeoniae 801; endothelin-1; quartz crystal microbalance

赤芍 801 又名通脉酯,是由中药赤芍(Paeonia lactiflora Pall)原成分经化学结构改造而成的单体药物——没食子酸丙酯(propyl gallate, PrG),配成水溶液经冷冻干燥制成的灭菌制剂^[1]。该药有很强的抑制血小板血栓素 A₂ (TXA₂)形成的作用,同时又促进动脉内前列腺素(PGI₂)样物生成^[2],抑制血栓的形成,有对抗血小板凝集、疏通栓塞、保护心肌缺血

损伤等作用^[3]。主要用于治疗脑血栓疾病、冠心病、心绞痛等疾病^[4,5]。尽管目前对赤芍 801 的化学结构、生物学效应、临床功效等都有了较深入的研究,但其作用的体内靶点和分子机理仍不清楚。针对目前的这种研究状况,依据现代中医学“中药的作用机理可能是调节细胞因子网络的功能态平衡”的观点^[6],本研究应用压电石英晶体生物传感器检测赤芍 801 与 ET-1 的特异结合,就赤芍 801 的作用靶点和作用机理及其与受体的相互作用作了初步的研究,为赤芍 801 乃至中药作用机理的研究提供了一种新的思路和方法。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(No. 90209054)

作者单位:1. 南开大学生命科学院(天津 300071);2. 中国中医研究院西苑医院

通讯作者:陈 强, Tel: 022-23506182, E-mail: qiangchen@nankai.

edu.cn

材料与方法

1 材料

1.1 药品 注射用倍丙酯(注射用赤芍 801)为福建省闽东力捷迅药业有限公司产品,批号:021201,加入生理盐水溶解,浓度为 1mg/ml。

1.2 试剂 avidin、biotin-N-hydroxysuccinimide ester (BNHS)、a-硫辛酸(a-TA,10mmol/L)购自 Sigma 公司;rhendothelin-1 购自 Alexis 公司;盐酸 1-乙-3-(3-二甲基氨基丙基)碳二亚胺(EDC)和 N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)为上海化学试剂有限公司生产;甲醇(100%)、KCl、NaCl、NaH₂PO₄、Na₂HPO₄ 均为天津市大茂化学试剂厂生产;磷酸盐缓冲液(PBS,0.01mol/L 磷酸钠,0.138mol/L NaCl,0.027mol/L KCl, pH7.4)。以上试剂均为分析纯。

1.3 仪器 石英晶体微天平(Quartz Crystal Microbalance, QCM): SEIKO QCA 917 型,Winchem 软件;AT-cut 金石英晶体基片:表面积(0.19±0.01)×10⁻⁴m²,厚度 0.3mm,F₀=9MHz,均购自 EG&G 公司;超声波清洗器(KQ218 型,昆山市超声仪器有限公司)等。

QCM 又称压电石英晶体生物传感器,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。其工作原理是基于 AT 切割的石英晶体振荡片及其上的逆压电效应。当有物质在石英晶片上吸附或沉淀时,晶体振荡频率发生变化(ΔF),它与晶片上沉积物的质量变化(ΔM)间有一简单的线性关系^[7]。QCM 基片共振频率的变化 ΔF 与吸附物质量 m 的关系如下:ΔF = -2F₀²(ρ_qμ_q)^{-1/2}m/A。其中 F₀:石英基本振动频率;ρ_q:石英的密度,2.65×10³kg/m³;μ_q:剪切模量,2.95×10¹⁰Pa;A:基片表面积。

本实验中使用的是 AT-cut 基片,石英基本振动频率 F₀=9MHz,基片表面积为(0.19±0.01)×10⁻⁴m²,因此可以得到:ΔF = -1.83×10⁸Δm/A

2 实验方法

2.1 ET-1 生物素衍生化 4μg 重组人 ET-1 加入 200μl 0.01mol/L pH7.4 PBS,与 20μl 10mg/ml N-羟基琥珀酰亚胺活化生物素室温避光反应 4h,10⁴r/min 超速离心 10min,将产物即生物素衍生化的 ET-1 溶于 200μl PBS。

2.2 QCM 基片活化后,将 avidin 接合到 QCM 基片上,见图 1。先将 QCM 金基片用去离子水清洗,再用纯甲醇浸泡 1h,然后用去离子水冲洗 3 遍,用超声波清洗 3min,晾干。在金基片上加上 10μl 10mmol/

L 的 a-TA,平衡 30min 后,用去离子水冲洗。依次加入 100mg/ml EDC 和 100mg/ml NHS 各 10μl,平衡 20min 用去离子水冲洗。加入 avidin 平衡 1h。

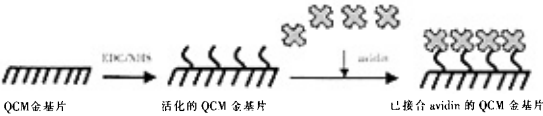


图 1 QCM 基片活化并接合 avidin 示意图
(a-TA avidin)

2.3 生物素衍生化的 ET-1 与 QCM 基片表面上的 avidin 接合固定于基片表面,见图 2。将生物素衍生化的 ET-1 加到 avidin 修饰的 QCM 基片上,结合反应 50min,用 PBS 冲洗。

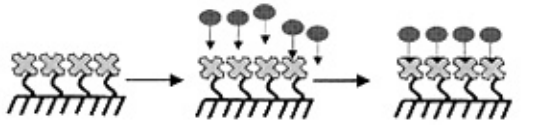


图 2 ET-1 在基片表面的固定:利用 biotin-avidin 的特异亲和作用,将生物素衍生化的 ET-1 固定于 QCM 金基片表面。
(生物素衍生化的 ET-1)

2.4 赤芍 801 与生物素衍生化的 ET-1 接合,见图 3。在 2.3 的基础上,加入赤芍 801,结合反应 30min,用 PBS 冲洗。

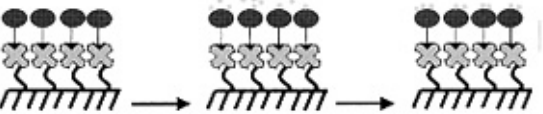


图 3 赤芍 801 与生物素衍生化的 ET-1 结合(赤芍 801)

结 果

1 生物素衍生化的 ET-1 在 QCM 基片表面的固定 见图 4。生物素衍生化的 ET-1 到达结合有 avidin 的 QCM 金基片表面,由于生物素-亲和素间的特异性亲和作用,生物素衍生化的 ET-1 结合到基片表面,晶体振荡频率发生了变化,曲线下降。用 PBS 冲洗以去除非特性异性吸附至基片表面的物质,曲线略有所回升。

2 赤芍 801 与 ET-1 的相互作用 见图 5。在固定有 ET-1 的基片表面加入赤芍 801 后,由于赤芍 801 与 ET-1 的结合,晶体振荡频率减小,曲线下降。充分反应后用 PBS 清洗以去除非特性异性吸附,曲线有所回升。上述实验结果表明:赤芍 801 能与 ET-1 在体外发生特异性结合。

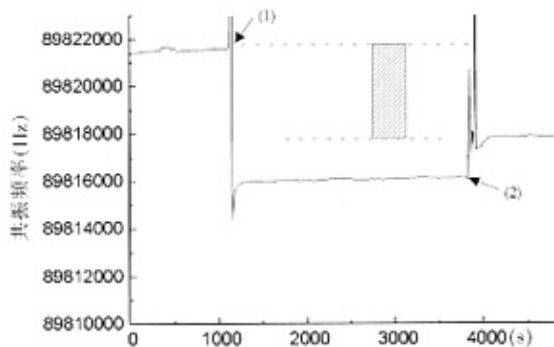


图4 加入生物素衍生化的 ET-1 后的 QCM 振频频率变化曲线
注:(1)加入生物素衍生化的 ET-1;(2)PBS 冲洗; 代表结合至 QCM 基片表面的 ET-1 的量

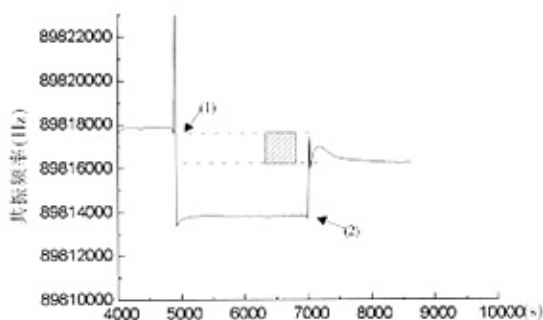


图5 加入赤芍 801 后的 QCM 振频频率变化曲线
注:(1)加入赤芍 801;(2)PBS 冲洗; 代表与 QCM 基片表面的 ET-1 结合的赤芍 801 的量

讨 论

本研究揭示了赤芍 801 可与 ET-1 发生特异性结合,因此除已有报道的血栓素 A_2 外,赤芍 801 在体内的作用靶点还有 ET-1 途径。ET-1 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,因而成为诸多活血化瘀中药扩血管、抗血小板聚集的主要作用途径^[8,9]。赤芍 801 通过与 ET-1 结合,阻碍 ET-1 与 ET-1 受体的结合,从而拮抗内皮素的作用,扩张血管,抑制血小板聚集。

压电石英晶体生物传感器具有高特异性、高灵敏度、高检测精度等优点,经查此前尚未见到压电石英晶体生物传感器应用于中药有效成分作用机理研究的报道,本研究为中药作用机理的研究提供了一种新的思路和方法。

参 考 文 献

1 刘秀丽,唐蕊,张风华.注射用赤芍 801 治疗缺血性脑血管

病的临床观察及护理.黑龙江医学 2000;7:55.

Liu XL, Tang R, Zhang FH. Clinical observation and nursing of Paeoniae Radix 801 parenteral solution on treatment for ischemic cardio-cerebral vascular disease. Heilongjiang Med J 2000;7:55.

2 刘铮,张广生.赤芍 801 治疗血栓性深静脉炎的疗效观察.中国农村医学 1994;22(4):50.

Liu Z, Zhang GS. Observation on curative effect of Paeoniae Radix 801 in treating thrombotic deep phlebitis. Chin Country Med J 1994;22(4):50.

3 陈菲.注射用赤芍 801 与 4 种输液配伍的稳定性考察.中国医师 2002;5(2):89.

Chen F. Observation of compatibility of Paeoniae Radix 801 with 4 transfusions. Chin Pharmacist 2002;5(2):89.

4 王亚光,陈颖利,王淑芬,等.赤芍 801 治疗血栓性深静脉炎的疗效观察.人参研究 2001;13(3):45.

Wang YG, Chen YL, Wang SF, et al. Observation on curative effect of Paeoniae Radix 801 in treating thrombus deep phlebitis. Study on Ginseng 2001;13(3):45.

5 左晓莉,庄华彦.赤芍 801 治疗冠心病心绞痛的临床观察.齐齐哈尔医学院学报 2002;23(1):37.

Zuo XL, Zhuang HY. Clinical observation of propyl gallate in treating angina pectoris of coronary heart disease. J Qiqihaer Med Coll 2002;23(1):37.

6 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.

Shen WX, Liu YM. Cytokine network and action mechanism of traditional Chinese medicine. World Sci Technol/Modernization Tradit Chin Med 2000;2(6):24—27.

7 汪尔康.21 世纪的分析化学.北京:科学出版社,2001:41.

Wang EK. Analytical chemistry in the 21st century. Beijing: Science Publishing House,2001:41.

8 何海菊,付娟,付津,等.逐瘀法对血瘀证血清内皮素影响的实验研究.天津中医学院学报 2000;19(1):42—45.

He HJ, Fu J, Fu J, et al. Experimental study of effect of removing stasis on the level of endothelin in blood stasis syndrome. J Tianjin Coll Tradit Chin Med 2000;19(1):42—45.

9 袁林,苗葵葵,赵萍,等.葛根素对高血压缺血性脑卒中血 ET-1, SOD, MDA 的影响.现代中西医结合杂志 2000;9(22):2197—2199.

Yuan L, Miao ZZ, Zhao P, et al. Effect of puerarin on blood ET-1, SOD, MDA in the patients with stroke or hypertension. Modern J Integr Tradit West Med 2000;9(22):2197—2199.

(收稿:2004-04-30 修回:2004-05-28)