

Hz, H-5), 6.40 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, H-6), 6.20 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, H-8), 5.38 (1H, d, $J = 7.5$ Hz, H-1'); ^{13}C -NMR (75 MHz, DMSO- d_6) δ : 177.6 (C-4), 164.2 (C-7), 161.3 (C-5), 156.3 (C-2), 156.3 (C-9), 148.5 (C-4), 144.9 (C-3), 133.5 (C-3), 122.1 (C-6), 121.2 (C-1), 116.0 (C-5), 115.3 (C-2), 104.0 (C-10), 101.8 (C-1), 98.7 (C-6), 93.6 (C-8), 75.9 (C-5), 73.3 (C-3), 71.3 (C-2), 68.0 (C-4), 60.2 (C-6)。以上数据与相关文献报道^[9]一致,从而确定该化合物为槲皮素-3- O - β -D-吡喃半乳糖苷。

参考文献:

- [1] 国家中医药管理局《中华本草》编委会. 中华本草 [M]. 第2册. 第4卷. 上海: 上海科学技术出版社, 1998.
- [2] 张健, 何晓伟, 高竟春, 等. 滑叶山姜的化学成分研究

- [J]. 中国药理学杂志, 2003, 38(7): 502-503.
- [3] Wollenweber B, Peter R, David S S, et al. Diterpenes of *Cheilanthes argentea*, a fern from Asia [J]. *Z Naturforsch*, C: Biosci, 1982, 37(11-12): 1283-1285.
- [4] 赵爱华, 赵勤实, 李蓉涛, 等. 肾茶的化学成分 [J]. 云南植物学报, 2004, 26(5): 563-568.
- [5] Tokunaru H, Masao T, Yasuhiko K, et al. 3, 5-Dihydroxy-7, 8-dimethoxyflavones and revised structures for some natural flavones [J]. *Phytochemistry*, 1988, 27(5): 1491-1495.
- [6] Tokunaru H, Yoshizumi O, Kenichi S, et al. ^{13}C -NMR spectral assignment of the A-ring of polyoxygenated flavones [J]. *Phytochemistry*, 1998, 47(5): 865-874.
- [7] 邹建华, 杨俊山. 短瓣金莲花的化学成分研究 [J]. 中国药理学杂志, 2005, 40(10): 733-736.
- [8] Zhang Y Y, Guo Y Z, Hiroyuki A, et al. Studies on the constituents of aerial parts of *Scutellaria planipes* [J]. *J Chin Pharm Sci*, 1998, 7(2): 100-102.
- [9] 向燕, 王皓, 温远影. 鹿角蕨化学成分的研究 [J]. 热带亚热带植物学报, 2002, 10(1): 69-73.

紫杉醇完全抗原的合成鉴定及免疫原性分析

马丽玲¹, 晁志^{2*}, 田中宏幸³

(1. 广州医学院护理学院, 广东 广州 510450; 2. 南方医科大学中医药学院, 广东 广州 510515;

3. 九州大学大学院药学院, 日本 福岡 812-8582)

摘要:目的 制备红豆杉属植物中抗癌成分紫杉醇(paclitaxel, TAX)的人工抗原及抗血清,为获取分泌抗紫杉醇抗体的单克隆细胞系及分离单链抗体基因,进而以之提高植物中紫杉醇的量,及建立快速检测 TAX 的酶联免疫吸附测定(ELISA)法提供技术基础。方法 将7-木糖基紫杉醇(7-xylo-taxol, 7-xyt-TAX)经 NaIO_4 氧化打开糖环,与载体蛋白牛血清白蛋白(BSA)反应偶联,制得半抗原-载体蛋白复合物后,用基质辅助激光解吸飞行时间质谱测定其中结合的半抗原数目;以此抗原免疫BALB/c小鼠,制备抗血清,并通过ELISA法检测其抗体效价和特异性。结果 合成的人工抗原 TAX-BSA 中 TAX 与 BSA 的结合比约为4~5:1;免疫小鼠到特异针对 TAX 的抗血清, TAX 抗体的效价为1:3200。结论 成功地合成了 TAX 的人工抗原,且该抗原有良好的免疫原性。

关键词:紫杉醇;半抗原-载体蛋白复合物;免疫原性;基质辅助激光解吸飞行时间质谱

中图分类号:R284.1

文献标识码:A

文章编号:0253-2670(2009)08-1045-04

紫杉醇(paclitaxel, Taxol[®],以下简称 TAX)是一种结构复杂的二萜生物碱,1971年从短叶红豆杉 *Taxus brevifolia* Nutt. 的树皮中提取而得^[1],可以通过独特的微管聚合促进作用而抑制癌细胞的生长^[2],相继被证明对卵巢癌、子宫癌、乳腺癌等10余种癌症具有很好的疗效,1992年经美国FDA批准上市,是目前治疗乳腺癌、卵巢癌、非小细胞肺癌的临床一线用药,需要量逐年递增^[3,4]。

紫杉醇主要来源于红豆杉属植物,但其量甚微,即使是含量最高的树皮部位,亦仅为0.01%左右。据计算,处理一个卵巢癌患者需要6棵树龄60~

100年的红豆杉,每年200 kg紫杉醇的消耗量意味着要砍伐红豆杉100万株。而红豆杉属植物资源稀少,生长缓慢,自然更新困难,单纯依靠自然资源必然造成物种的濒危甚至灭绝。因而,紫杉醇的生产远不能满足临床需求,售价高居不下^[5]。如何解决日益尖锐的紫杉醇来源问题,自其上市之日起,即成为世界范围内药学、植物学等领域研究者面临的重大课题。研究发现,往植物中转入针对其生物活性成分的单链抗体(scFv)基因,可以诱导其产生更多的该成分。据此,笔者提出了向红豆杉植物细胞中转入抗紫杉醇单链抗体基因,提高红豆杉植物中紫

* 收稿日期:2009-01-15

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30500652);教育部留学回国人员科研基金资助项目;广东省中医药局科研计划项目(1060131)

作者简介:马丽玲,女,高级讲师。

*通讯作者 晁志 Tel:(020)61648256 E-mail:chaozhi1971@yahoo.com.cn

杉醇的含量的设想^[6]。

欲获得单链抗体基因,首先要对动物进行免疫,制备能够分泌针对紫杉醇的抗体的单克隆细胞系。但 TAX 相对分子质量(M_r)较小,为不能直接引发免疫反应的半抗原,必须和大分子的载体蛋白如牛血清白蛋白(bovine serum albumin, BSA)、钥孔戚血蓝蛋白(keyhole limpet hemocyanin, KLH)等偶联之后构成完全人工抗原,才能应用于免疫操作。本实验以 BSA 为载体合成半抗原 TAX-载体蛋白复合物,经基质辅助激光解吸飞行时间质谱(matrix-assisted laser absorption ionization time-of-flight mass spectrometry, MALDI-TOF-MS)鉴定其中结合半抗原分子数目后免疫小鼠,用 ELISA 法分析血清中抗体的滴度和特异性,对其免疫原性进行了考察。

1 材料与方法

1.1 实验材料:7-木糖基紫杉醇(7-xylotaxol, ChromaDex, Inc, 美国); TAX (质量分数为 98%, HPLC 归一法)由上海同田生物有限公司提供。牛血清白蛋白(BSA)、人血清白蛋白(HSA)、弗氏完全佐剂(FCA)、弗氏不完全佐剂(FICA)为 Sigma 公司产品; HRP 酶标羊抗鼠 IgG、2,2'-氨基-双(3-乙基-苯并噻唑啉-6-磺酸)铵盐(ABTS)显色剂为美国 Pierce 公司产品。甲醇、 NaIO_4 、三氟乙酸(TFA)、芥子酸(sinapinic acid)、乙腈均为分析纯。JMS-ELITE 基质辅助激光解吸飞行时间质谱仪为日本 JEOL 公司产品。6 周龄 SPF 级雌性 BALB/c 小鼠,体质量 16~18 g,由南方医科大学动物中心提供。

1.2 TAX-BSA 人工抗原的合成:7-木糖基紫杉醇 5 mg 溶于 0.4 mL 甲醇,逐滴加入 10 mg/mL NaIO_4 溶液 0.4 mL,室温避光搅拌 1 h。将上述反应混合物 0.4 mL 逐滴加入含 5 mg/mL BSA 的 50 mmol/L 碳酸盐缓冲液(pH 9.6) 0.4 mL 中,用 1 mol/L Na_2CO_3 溶液调节 pH 值至 9 左右,避光搅拌 8 h 后对水透析,冷冻干燥,即得复合物 TAX-BSA。

1.3 MALDI-TOF-MS 测定 TAX-BSA 中半抗原 TAX 结合数目^[7]

1.3.1 供试品处理:称取 TAX-BSA 0.6 mg,溶于 8 mol/L 的尿素 30 μL 中,再稀释成适当的浓度。称取 BSA 1 mg 溶于 50 μL 水中。

1.3.2 基质辅助溶液的配制:将体积分数为 0.15%的 TFA 35 μL 加到乙腈 15 μL ,再加入适量的芥子酸使溶液达到过饱和状态,超声 15 min, 1 000 r/min 离心 3 min,备用。

1.3.3 MALDI-TOF-MS 测定:各取供试品和基质辅助溶液 1 μL ,充分混匀,吸取混合液 1 μL 滴加在金属点样板上,室温干燥,置 MALDI-TOF-MS 中测定。测定时加速电压为 20 kV,栅极电压 17 kV,线性模式下操作;飞行时间通过电脑中 500 MHz 瞬态数字转换器测定,所得数据用 GRAMS/386 软件(Galactic Industries Corp., Salem, NH, 美国)分析。

1.4 TAX-BSA 人工抗原的免疫原性鉴定

1.4.1 抗血清的制备:将 TAX-BSA 溶于含 8 mol/L 尿素的 Tris-HCl 溶液,质量浓度为 20 mg/mL,以磷酸盐缓冲液(PBS)稀释到 200 $\mu\text{g/mL}$ 。取 1 mL 上述稀释溶液,加入 1 mL 弗氏完全佐剂,制成混悬液,以 0.5 mL ip 给予小鼠,免疫 BALB/c 小鼠,共 2 只。两周后进行第一次加强免疫,方法同上,仅将弗氏完全佐剂改为弗氏不完全佐剂。以后每隔两周进行一次加强免疫,但不使用佐剂,直接使用 200 $\mu\text{g/mL}$ TAX-BSA 的 PBS 稀释液。第 3 次加强免疫 4 d 后眼球内眦采血,将所采得的血液置于硅烷化 Eppendorf 离心管中,于 10 000 r/min 离心 5 min,分离血清,进行抗体效价测定和抗体特异性检测。

1.4.2 抗体效价测定:用 pH 9.6 碳酸盐缓冲液将 TAX-HSA(合成方法同 TAX-BSA)配制为质量浓度为 1 $\mu\text{g/mL}$ 的溶液,以 100 μL /孔包被 96 孔免疫反应板,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h;用含 5%脱脂奶粉的 PBS 溶液于 37 $^{\circ}\text{C}$ 封闭 2 h;加入从 1:100 开始顺次 2 倍稀释的抗血清(PBS 稀释)100 μL /孔,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h;加入羊抗鼠酶标抗体(1:1 000 稀释)100 μL /孔,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h,显色液用 ABTS,100 μL /孔,于 37 $^{\circ}\text{C}$ 反应 15 min,用酶标仪读出各孔在波长 405 nm 处的吸光度值($A_{405\text{ nm}}$)。阴性对照用未免疫过的小鼠血清,空白对照为 PBS。每一稀释比的供试品设置 3 个平行孔。血清供试品的 $A_{405\text{ nm}}$ 值(P)与阴性对照的 $A_{405\text{ nm}}$ 值(N)之比(P/N)大于 2 即为阳性,反之则为阴性,以 P/N 大于 2 的血清最高稀释倍数作为抗体的效价。

1.4.3 抗体特异性检测:选取效价较高的 BALB/c 小鼠血清进行测定。以上项测得的 $A_{405\text{ nm}}$ 在 1.0 左右的血清稀释度作为工作浓度。用 10%甲醇将 TAX 稀释为 100、50、25、12.5、6.25 $\mu\text{g/mL}$ 的系列浓度。免疫反应板经 1 $\mu\text{g/mL}$ TAX-HSA 包被,5%SPBS 封闭后,加入不同浓度的 TAX 溶液及抗血清各 50 μL ,混匀后于 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h。其余步骤同 1.4.2。空白对照为 10%甲醇 50 μL 加 PBS 50

μL 。依据 $A_{405\text{ nm}}$ 的变化判断是否发生竞争反应。

2 结果

2.1 TAX-BSA 人工抗原的合成产率:冻干后的 TAX-BSA 复合物质量为 2.8 mg,产物和反应物的质量比约为 62%。这一结果与人工抗原的通常合成产率基本类似^[8]。

2.2 TAX-BSA 人工抗原的 MALDI-TOF-MS 鉴定:图 1 为 TAX-BSA 的质谱图,可见 TAX-BSA 的相对分子质量分别为 70 940。BSA 的相对分子质量为 66 430,因而连接上的 7-木糖基紫杉醇总量为 4 500。7-木糖基紫杉醇的相对分子质量是 986,因而, TAX-BSA 复合物中,每个载体蛋白 BSA 分子上偶联约 4~5 个 7-木糖基紫杉醇分子 ($4\,500/986 \approx 4.5$)。以此人工抗原免疫小鼠,成功取得了针对 TAX 的抗血清。

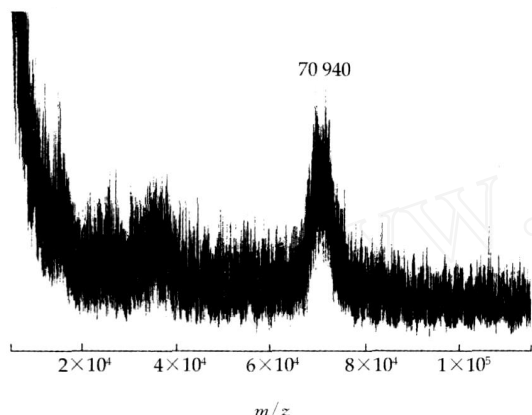


图 1 TAX-BSA 的基质辅助激光解吸飞行时间质谱图

Fig 1 Mass spectra of TAX-BSA determined by MALDI-TOF mass spectrometry

2.3 抗血清的效价及特异性分析:两份抗血清由于小鼠的个体差异,效价各不相同。图 2 显示了用 ELISA 法测定 2 号小鼠的抗体效价的结果。空白对照的 $A_{405\text{ nm}}$ 值为 0.108; $P/N > 2$ (即结果为阳性)的血清最大稀释倍率为 3 200。由此可知,抗血清效价为 1 3 200。

血清稀释 800 倍时,间接 ELISA 测得的 $A_{405\text{ nm}}$ 为 0.850,以此稀释度的血清作为竞争 ELISA 的工作浓度。TAX 对 TAX-HSA 与抗血清结合的竞争结果如图 3 所示。竞争 ELISA 结果显示 $A_{405\text{ nm}}$ 随着 TAX 竞争质量浓度的增加而减少,说明小鼠的抗血清具有 TAX 特异性。

由间接及竞争 ELISA 法结果可知抗血清的抗体水平较高,特异性较好,从而说明了本实验合成的人工抗原 TAX-BSA 具有良好的免疫原性,可作为免疫原应用于单克隆抗体制备。

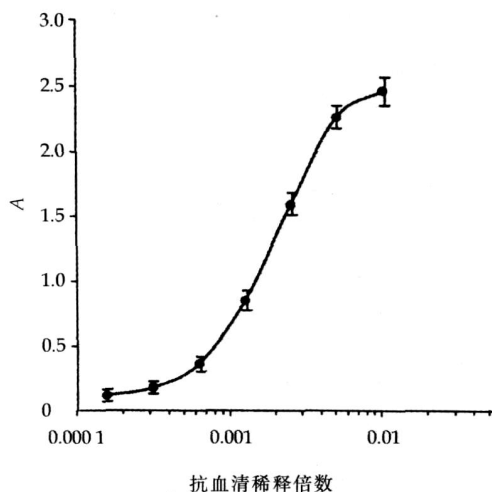


图 2 末次免疫后不同稀释倍数抗血清的吸光度值

Fig. 2 Absorbance at 405 nm of antiserum with different dilution ratios obtained after final immunization

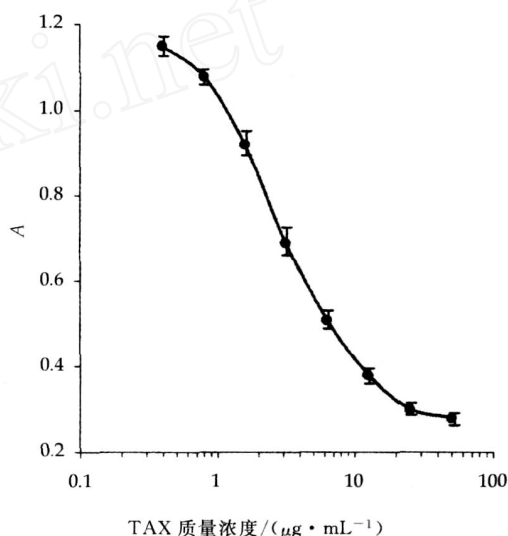


图 3 竞争性 ELISA 测定血清 TAX 抗体的特异性结合

Fig. 3 Specificity of TAX antibody in serum determined by competitive ELISA

3 讨论

TAX 相对分子质量 (M_r) 较小,为不能直接引发免疫反应的半抗原,必须和大分子的载体蛋白如 BSA、KLH 等偶联之后构成完全人工抗原,才能应用于免疫操作。TAX 分子结构中,不存在可与蛋白载体结合的基团,通常必须先合适位置联接适当的架桥剂,通过架桥剂,才能与载体蛋白偶联。架桥剂一般是含酸基或氨基,具有适当碳链长度的化合物。文献曾报道,在 TAX 分子 7-位连接琥珀酰基,用碳化二亚胺 (EDC) 法合成了完全抗原^[9]。此方法首先需合成 2'-叔丁基二甲氨基硅烷基紫杉醇 [2'-O-(tert-butyl dimethylsilyl) taxol], 然后将其溶

解于 *N,N*-二甲氧基甲酰胺中,再加入琥珀酸酐及二甲氨基吡啶反应,经过一系列处理、纯化等过程,才能得到 7-琥珀酰基紫杉醇,操作相当繁琐而费时。在本实验中,选用了 7-木糖基紫杉醇,这是一种天然存在的紫杉醇衍生物,市场有商品供应,可直接利用高碘酸氧化法,将其与载体蛋白联接。此方法较前述文献方法省略了衍生物合成步骤,更加简便易行,且具有较高的合成效率(在每个 BSA 分子上可成功联接约 4~5 个 7-木糖基 TAX 分子)。

制备单克隆抗体使用的实验动物可为家兔或小鼠。日本九州大学正山和田中实验室获得了近 40 种针对生药中生理活性成分的单克隆抗体,建立了酶联免疫吸附反应检测法,几乎全部是使用 BALB/c 小鼠作为免疫对象^[7,10]。本实验使用两只小鼠,均产生了明显的免疫反应;但由于动物个体差异,抗血清效价也有所不同。测得效价较高的小鼠抗血清效价为 1:3 200,竞争 ELISA 结果显示抗血清能够特异性识别游离 TAX,证明了合成的人工抗原 TAX-BSA 有较好的免疫原性,可为 TAX 的单克隆抗体的制备及后续应用提供技术基础(抗体的交叉反应性一般于单克隆抗体制备过程中检测)。

本实验使用 MALDI-TOF-MS 法测定了 TAX-BSA 中结合的半抗原 TAX 分子数目。与传统的鉴定方法(紫外光谱扫描法、标记抗原示踪法和凝胶电泳等)相比,该技术具有高灵敏度,供试品用量少,结

果直观、准确^[11],是比较理想的抗原复合物中半抗原数目的测定方法。

参考文献:

- [1] Wani M C, Taylor H L, Wall M E, et al. Plant antitumor agents. The isolation and structure of taxol, a novel antileukemic and antitumor agent from *Taxus brevifolia* [J]. *J Am Chem Soc*, 1971, 93(9): 2325-2327.
- [2] Schiff P B, Fant J, Horwitz S B. Promotion of microtubule assembly *in vitro* by taxol [J]. *Nature*, 1979, 277(5698): 665-667.
- [3] Nightingale S L. From the food and drug administration [J]. *JAMA*, 1992, 268(11): 1390.
- [4] Anonymous. FDA approves treatment IND protocol for taxol [J]. *Clin Pharm*, 1992, 11(11): 912.
- [5] 刘 涤,章国瑛,王 晓,等. 红豆杉资源与紫杉醇生产概况 [J]. 植物资源与环境, 1997, 6(1): 48-53.
- [6] 马丽玲,晁 志,田中宏幸. 单链抗体技术及其在药用植物研究中的应用 [J]. 中草药, 2006, 37(7): 附 4-附 6.
- [7] Zhu S, Shimokawa S, Shoyama Y, et al. A novel analytical ELISA-based methodology for pharmacologically active saikosaponins [J]. *Fitoterapia*, 2006, 77(2): 100-108.
- [8] 蔡碧双,邵幼岩,林纪昀,等. 甘草酸人工抗原的合成鉴定及免疫原性分析 [J]. 中国生化药物杂志, 2008, 29(1): 19-22.
- [9] Paul G, Raybould T J G, Gary S B, et al. An enzyme immunoassay for the determination of taxol and taxanes in *Taxus* sp. tissues and human plasma [J]. *J Immunol Meth*, 1993, 158(1): 5-15.
- [10] Tian M, Tanaka H, Shang M Y, et al. Production, characterization of a monoclonal antibody against aristolochic acid and development of its assay system [J]. *Am J Chin Med*, 2008, 36(2): 425-436.
- [11] 刘益华,徐俊福. 基质辅助激光解吸飞行时间质谱在生物大分子中的应用 [J]. 中国生化药物杂志, 2004, 25(3): 192-193.

三种海龙中甾醇类成分的 GC-MS 分析

陶 莉¹,王有为^{2*}

(1. 浙江海洋学院食品与药学院、医学院,浙江 舟山 316004; 2. 武汉大学药学院,湖北 武汉 430072)

海龙为我国常用名贵中药材,其性温,味甘,归肝肾经,具温肾壮阳、散结消肿之功效。用于阳痿遗精,瘰癧痰核,跌扑损伤等症^[1]。《本草纲目拾遗》记载,海龙功同海马而力倍之^[2]。《中国药典》历版均收载海龙,并确定来源为海龙科动物刁海龙 *Solenognathus hardwickii* (Gray)、拟海龙 *Syngnathoides biaculeatus* (Bloch) 和尖海龙 *Syngnathus acus* Linnaeus 的干燥体。现代研究表明,海龙含有大量甾醇类^[3]、脂肪酸^[4]、蛋白质^[5]等成

分,具有抗肿瘤^[6]、激素样^[7]等药理作用。本实验通过对 3 种海龙中甾醇类成分的 GC-MS 测定,比较分析了 3 种海龙的甾醇类成分。

1 仪器和材料

1.1 实验材料:3 种海龙均购自河北安国药材市场,经浙江海洋学院赵盛龙教授分别鉴定为刁海龙 *Solenognathus hardwickii* (Gray)、拟海龙 *Syngnathoides biaculeatus* (Bloch)、尖海龙 *Syngnathus acus* Linnaeus。药材晾晒干燥后粉碎,过

* 收稿日期:2008-12-02

基金项目:浙江省卫生厅中医药青年基金项目研究计划(2005 Y011)

作者简介:陶 莉(1980—),女,湖北襄樊人,讲师,研究方向为天然药物化学。