

马钱苷人工抗原的合成、鉴定及免疫原性的初步研究

迪更妮^{1,4}, 张维库², 李 壮^{1,4}, 乔灏祎^{1,4}, 屈会化^{3,4}, 赵 琰^{1,4}, 王庆国^{1,4}, 续洁琨^{1,4*}

1. 北京中医药大学基础医学院, 北京 100029

2. 中日友好医院临床医学研究所 药物药理室, 北京 100029

3. 北京中医药大学 科研中心, 北京 100029

4. 北京中医药大学“经典方剂的应用基础研究”创新团队, 北京 100029

摘要: 目的 首次合成并鉴定马钱苷(loganin)人工抗原,为进一步制备马钱苷单克隆抗体,建立相关免疫分析方法奠定基础。方法 采用高碘酸钠氧化法合成马钱苷免疫原(loganin-BSA)和包被原(loganin-OVA);应用基质辅助激光解析电离-飞行时间质谱(MALDI-TOF-MS)法鉴定马钱苷人工抗原是否偶联成功;通过酶联免疫吸附试验(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)方法检测免疫小鼠血清中抗马钱苷抗体效价及其特异性。结果 经MALDI-TOF-MS检测,马钱苷与BSA偶联成功。竞争抑制曲线表明,血清中的抗体可与马钱苷产生特异性结合,血清抗体效价在1:40 000。结论 成功合成了马钱苷人工抗原,为马钱苷单克隆抗体的制备及其在中药质量评价和动物体内药动学方面的应用奠定了基础。

关键词: 马钱苷; 人工抗原; 单克隆抗体; 免疫分析法; 高碘酸钠法; 免疫原; 包被原; 基质辅助激光解析电离-飞行时间质谱法; 酶联免疫吸附试验; 抗体效价

中图分类号: R283.6 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2015)19-2870-04

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2015.19.009

Synthesis and identification of artificial antigen of loganin and preliminary study on its immunogenicity

Degeniee^{1,4}, ZHANG Wei-ku², LI Zhuang^{1,4}, QIAO Hao-yi^{1,4}, QU Hui-hua^{3,4}, ZHAO Yan^{1,4}, WANG Qing-guo^{1,4}, XU Jie-kun^{1,4}

1. School of Basic Medical Sciences, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China

2. Department of Pharmacology, Institute of Clinical Medical Sciences, China-Japan Friendship Hospital, Beijing 100029, China

3. Center of Scientific Research, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China

4. Beijing University of Chinese Medicine 'Classical Prescription Application Foundation Research' Innovation Team, Beijing 100029, China

Abstract: Objective To synthesize and identify the artificial antigen of loganin for the first time, and provide a foundation for the preparation of specific monoclonal antibody and establishment of immunoassay method. **Methods** Sodium periodate oxidation method was used to synthesize immunogenic antigen (loganin-BSA) and coating antigen (loganin-OVA) of loganin. Whether loganin was conjugated with BSA and OVA or not was confirmed by matrix-assisted laser desorption ionization/time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF-MS). The titer and specificity of the antibody in serum of immunised mice were detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). **Results** The results of MALDI-TOF-MS indicated that loganin was conjugated to BSA. The antibody against loganin obtained from immunised-mice could bind to loganin and the titer was up to 1:40 000. **Conclusion** The artificial antigen of loganin was synthesized, which can be used further in the preparation of monoclonal antibody, application in quality control of Chinese materia medica and the pharmacokinetic study of loganin in laboratory animals.

收稿日期: 2015-05-06

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81473590, 81473119, 81274115); 教育部新世纪优秀人才项目(NCET-11-0606); 北京市优秀人才培养资助项目(2013D 0099990000001)

作者简介: 迪更妮(1990—), 女, 蒙古族, 在读硕士研究生, 研究方向为中药小分子单克隆抗体的制备与应用。

Tel: (010)84205662 E-mail: digengni@163.com

*通信作者 续洁琨(1979—), 女, 博士, 副教授, 硕士生导师, 主要研究方向为中药活性成分作用机制和新药研发。

Tel: (010)84205662 E-mail: xjkbucm@163.com

Key words: loganin; artificial antigen; monoclonal antibody; immunoassay method; sodium periodate oxidation method; immunogenic antigen; coating antigen; MALDI-TOF-MS; ELISA; antibody titer

山茱萸是山茱萸科 (Cornaceae) 植物山茱萸 *Cornus officinalis* Sieb. et Zucc. 的干燥成熟果肉, 具有补益肝肾、涩精固脱等功效^[1], 临床应用非常广泛。其主要药效成分马钱苷 (loganin) 属于环烯醚萜类化合物, 是《中国药典》2010年版中山茱萸的质量控制指标^[1]。近年来越来越多的研究表明, 马钱苷具有降血糖、抗氧化、抗炎等功效^[2-3], 可用以改善肝脏等器官的代谢紊乱, 有助于抑制代谢性疾病 (如高血糖、高血脂), 氧化应激和炎症的形成^[4-5]。

目前检测马钱苷的方法主要有 HPLC^[6]、近红外光谱成像法^[7]、胶束电动毛细管色谱-二极管阵列检测法 (MEKC-DAD)^[8]等, 这些方法皆存在检测样品用量大、样品前处理复杂、分析时间长和灵敏度不高等局限性。因此, 需要寻找和建立新的分析方法来提升样品的检测效率与灵敏度。基于中药活性小分子化合物单克隆抗体技术的中药免疫分析法具有特异性强、灵敏度高、检测样品用量少、样品前处理简单和高通量同时检测等优点^[9]。在中药质量评价、药动学研究等方面都发挥着重要的作用^[10]。此外, 利用中药活性小分子化合物单克隆抗体制备的免疫亲和色谱柱, 可对相应中药小分子化合物进行特异性敲除, 为中药药效分析提供了新途径^[11-12]。人工抗原的合成是成功制备单克隆抗体的重要前提^[13], 为制备出马钱苷的单克隆抗体, 建立马钱苷的免疫学分析方法, 本实验对马钱苷人工抗原进行了合成及鉴定。

1 仪器与材料

Tecan Safire2 全波长多功能酶标仪, 瑞士 Tecan 公司; 84-1A 磁力搅拌器, 上海司乐仪器有限公司; MALDI-TOF-MS, Shimadzu Axima-CFR Plus。

SPF 级雄性 BALB/c 小鼠 5 只, 6 周龄, 北京维通利华实验动物中心提供, 动物许可证 SCXK-(京) 2012-0001, 实验动物质量合格证号 No. 11400700043339。

马钱苷, 批号 1398/13847, 购自上海诗丹德生物技术有限公司, 质量分数 $\geq 95\%$ (HPLC); 牛血清白蛋白 (BSA), 批号 29180102100, 美国 Roche 公司; 卵白蛋白 (OVA), 批号 115K0730, 购自北京欣经科生物技术有限公司; 弗氏完全佐剂 (F5881, 批号 SL11432)、弗氏不完全佐剂 (F5506,

批号 SL12282), Sigma 公司; 酶标二抗 (HRP-标记羊抗鼠 IgG), 批号 RPN4201, Gene-Script 公司; NaIO₄、Na₂CO₃ 等常用试剂为国产分析纯。

2 方法与结果

2.1 马钱苷人工抗原的合成方法

采用 NaIO₄ 法^[14], 将马钱苷分别与 BSA 偶联制备人工抗原, 与 OVA 偶联制备包被抗原。具体方法: 准确称取马钱苷 5.0 mg, 加入 1.0 mL 蒸馏水中充分溶解, 准确称取 3.0 mg NaIO₄, 加入 150 μ L 蒸馏水中充分溶解, 密封避光, 室温下搅拌反应 2 h, 得到马钱苷氧化反应液, 用 0.05 mol/L 碳酸盐缓冲液 (CBS) 调整 pH 值至 9.0 以上, 称为 A 液。准确称取 BSA/OVA 10 mg 充分溶于 1.0 mL CBS 中, 称为 B 液。然后将 A 液逐滴加入 B 液中, 密封避光, 在室温下搅拌过夜。待上述反应完成后, 将反应液转移至采用去离子水预处理的透析袋中, 搅拌下用去离子水透析 72 h, 中间多次换液。将透析后的交联产物分装, 于 4 $^{\circ}$ C 保存待测。

2.2 马钱苷人工抗原的 MALDI-TOF-MS 鉴定

2.2.1 仪器工作条件 质谱仪在线性模式下进行分析, 正离子模式, 激光能量 0.125 J, 检测范围 m/z : 20 000~90 000。

2.2.2 操作步骤 精确吸取乙腈 333 μ L 到 0.15% 三氟醋酸 666 μ L 中, 加入 10 mg 芥子酸, 混合液超声 15 min 后溶解, 制得基质辅助溶液备用^[15]。取人工抗原适量溶解在 8.0 mol/L 的尿素溶液中, 然后将溶液稀释至浓度为 1.0~10.0 pmol/L; 另制备 5.0 mg/mL 的 BSA 水溶液。各取人工抗原、BSA 和基质辅助溶液 1.0 μ L, 充分混匀, 吸取混合溶液 1.0 μ L 滴加在镀金样品板上, 室温下风干后, 送入质谱仪分析。

2.2.3 MALDI-TOF-MS 鉴定马钱苷人工抗原 根据 MALDI-TOF-MS 检测图谱 (图 1), 可知马钱苷人工抗原的相对分子质量为 68 533.2, BSA 的相对分子质量为 66 447.3, 证明马钱苷人工抗原偶联成功, 根据偶联比的计算公式: 偶联比=(马钱苷人工抗原相对分子质量-BSA 相对分子质量)/马钱苷相对分子质量, 偶联比数值经四舍五入为 5 个。

2.3 动物免疫实验

2.3.1 免疫实验操作方法 以马钱苷-BSA 为免疫

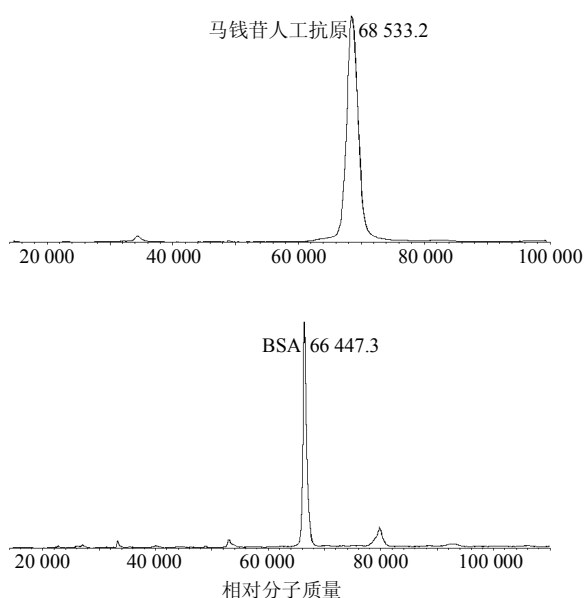


图1 马钱苷人工抗原和BSA的MALDI-TOF-MS图谱
Fig. 1 MALDI-TOF-MS Spectra of loganin artificial antigen and BSA

原对5只雄性BALB/c小鼠进行免疫,基础免疫剂量为50 μg/只,采用背部皮下多点注射免疫的方法。初次免疫时用与免疫原等量的弗氏完全佐剂充分乳化混匀,以后每隔14 d左右进行1次加强免疫,改用等量弗氏不完全佐剂乳化免疫原,免疫剂量不变。第3次加强免疫后1周左右,断尾法采血适量,5 000 r/min离心10 min分离血清,采用间接ELISA法测小鼠血清抗体效价。

2.3.2 间接ELISA方法检测血清中的马钱苷抗体效价 以马钱苷-OVA作为包被原,用CBS缓冲液稀释10 000倍,在96孔板上每孔加100 μL,37℃孵育2 h。以PBST洗板,每次5 min,共4次。以10 mg/mL明胶为封闭液,每孔加200 μL,37℃孵育2 h,洗板。血清稀释倍数分别为10 000、20 000、40 000,以空白小鼠的血清作为阴性对照,37℃孵育1 h,洗板。每孔加入100 μL酶标二抗(1:10 000),37℃孵育1 h,洗板。每孔加入TMB工作液100 μL,37℃孵育显色15 min后,每孔加2 mmol/L硫酸50 μL终止反应,测定450 nm处吸光度(A_{450})值。以免疫血清(P)与阴性血清(N) A_{450} 值的比值大于2.1时定义为阳性^[16],抗血清的效价以抗血清为阳性的最大稀释倍数的倒数表示。间接ELISA法检测结果见表1。以 $P/N \geq 2.1$ 判定为阳性,可见第2、3、5号小鼠的血清抗马钱苷抗体效价达到1:40 000,表明已产生良好的免疫效果,

表1 间接ELISA法测定抗马钱苷抗体的效价

Table 1 Titer of anti-loganin antibodies by ELISA

血清稀释倍数	抗体效价(P/N)				
	小鼠1	小鼠2	小鼠3	小鼠4	小鼠5
10 000	4.31	6.86	12.80	5.66	8.40
20 000	2.79	4.50	6.87	2.98	4.91
40 000	1.86	2.16	2.79	1.39	2.11

其中3号小鼠效价最高,说明相较于其他小鼠,3号小鼠对合成的人工抗原产生的免疫反应更强,因此本实验选取3号小鼠的血清进行特异性检测。

2.3.3 间接竞争ELISA法检测血清抗马钱苷抗体特异性 以马钱苷-OVA作为包被原,用CBS缓冲液稀释10 000倍,以10 mg/mL明胶为封闭液,血清稀释倍数为40 000,马钱苷水溶液质量浓度由10 μg/mL二倍稀释至0.039 μg/mL,其余方法与间接ELISA基本一致,测定 A_{450} 值。间接竞争ELISA法检测3号小鼠血清抗体特异性结果见图2,以马钱苷对照品质量浓度的对数值为 X ,检测结果 A_{450} 值为 Y ,绘制竞争抑制曲线,得到方程 $Y = -0.1771X + 0.8981$, $R^2 = 0.9943$ 。可见,当马钱苷对照品的质量浓度为1.5 μg/mL时,小鼠的血清抑制率可达到50%,表明本实验成功制备了具有免疫原性的马钱苷人工抗原。

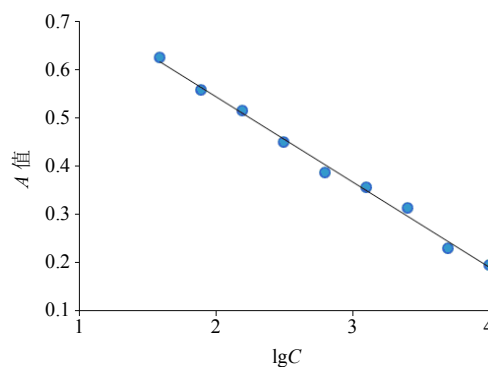


图2 马钱苷的抑制线性曲线

Fig. 2 Corrected linear curve of inhibitory rate for loganin

3 讨论

本实验首次成功合成了马钱苷人工抗原,并对其特异性进行了鉴定。马钱苷为天然产物小分子化合物,要制备其人工抗原,首先需要选择合适的合成方法,因为抗原的性质、构象及聚集状态直接关系到产生抗体的效价和灵敏度。马钱苷分子结构中含有葡萄糖基团,采用 NaIO_4 法,可将其糖基侧链中的邻羟基氧化为双醛基,在碱性条件下与蛋白质

形成 Schiff 氏碱^[15],继而与大分子载体蛋白相偶联。这种合成方法只需在常温条件下进行温和的结构改造,操作十分简便,且最大程度地保留了马钱苷的特征性基团,提高了人工抗原的免疫原性,为高效价抗体的制备提供了保障。

MALDI-TOF-MS 具有待测品用量少且灵敏度高等特点^[17],相较于 TLC 法、紫外扫描法等方法, MALDI-TOF-MS 的检测结果更加精准可靠。本实验选用 MALDI-TOF-MS 法测定马钱苷人工抗原的相对分子质量为 68 533.2 (BSA 的相对分子质量为 66 447.3),证实人工抗原合成成功。研究证实,当载体蛋白上偶联 5 到 20 个半抗原分子时,其免疫原性较好^[18]。本研究合成的马钱苷-BSA 中马钱苷与 BSA 的偶联比约为 5:1,表明合成的人工抗原具备动物免疫的条件及产生抗体的可能。

人工抗原能否产生高效价的特异性抗体是评价人工抗原是否合成成功的关键性证据。马钱苷人工抗原经过数次对实验动物的免疫,所产生抗体的血清检测范围在 0.039~10.0 $\mu\text{g/mL}$,血清效价达到 1:40 000,直接说明成功合成的马钱苷人工抗原有效激活了小鼠的免疫应答,产生了高特异性抗体。

本实验尚处于血清抗体检测阶段,虽为多克隆抗体,但血清 ELISA 检测灵敏度已明显高于马钱苷的 HPLC、MEKC-DAD 等检测方法^[6,8]。制备得到单一抗原决定簇的单克隆抗体后,应该可以进一步提升马钱苷抗体的效价及灵敏度,这为山茱萸药材质量的评价,马钱苷在动物体内吸收(如血药浓度测定)、分布(肝肾等组织)等药动学研究和马钱苷药效作用的解析等方面奠定了基础。

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2010.
- [2] Park C H, Tanaka T, Kim J H, *et al.* Hepato-protective effects of loganin, iridoid glycoside from *Corni Fructus*, against hyperglycemia-activated signaling pathway in liver of type 2 diabetic db/db mice [J]. *Toxicology*, 2011, 290(1): 14-21.
- [3] 曹 岗,邵玉蓝,张 云,等. 山茱萸中马钱子苷的研究进展 [J]. *现代药物与临床*, 2009, 24(5): 272-275.
- [4] Yokozawa T, Kang K S, Park C H, *et al.* Bioactive constituents of *Corni Fructus*: The therapeutic use of morroniside, loganin, and 7-O-galloyl-D-sedoheptulose as renoprotective agents in type 2 diabetes [J]. *Drug Discov Ther*, 2010, 4(4): 223-234.
- [5] Khan M, Garg A, Srivastava S K, *et al.* A cytotoxic agent from *Strychnos nux-vomica* and biological evaluation of its modified analogues [J]. *Med Chem Res*, 2012, 21(10): 2975-2980.
- [6] 柴 军,汪佳萍,沈坚萍. HPLC 法同时测定参麦地黄丸中丹皮酚芍药苷和马钱苷的含量 [J]. *中华中医药学刊*, 2010(3): 641-643.
- [7] Xie C X, Gong H Y, Liu J Y, *et al.* Determination of loganin in Qiju Dihuang Pills by near-infrared spectroscopy technique [J]. *Adv Mater Res*, 2013, 807/809: 1978-1983.
- [8] 李俊松,刘训红,张月婵,等. MEKC-DAD 测定山茱萸饮片中獐牙菜苷和马钱苷含量 [J]. *中成药*, 2010, 32(6): 970-973.
- [9] 屈会化,赵 琰,王庆国. 基于中药活性小分子单克隆抗体的复方配伍机理研究新思路 [J]. *中国中西医结合杂志*, 2012, 32(10): 1416-1419.
- [10] Qu H H, Sun Y, Wu T T, *et al.* Pharmacokinetics of geniposide by monoclonal antibody-based icELISA in mice after oral administration of Huanglian-Jiedu-Tang [J]. *Biol Pharm Bull*, 2014, 37(9): 1525-1533.
- [11] 赵 琰,屈会化,王庆国. 利用单克隆抗体特异性敲除技术解析中药药效物质基础的新方法 [J]. *中国中药杂志*, 2013, 38(17): 2906-2910.
- [12] Xu J S, Tanaka H, Shoyama Y. One-step immunochromatographic separation and ELISA quantification of glycyrrhizin from traditional Chinese medicines [J]. *J Chromatogr B*, 2007, 850(1/2): 53-58.
- [13] 赵 妍,屈会化,张 越,等. 猪去氧胆酸人工抗原的合成及鉴定 [J]. *中草药*, 2014, 45(23): 3387-3391.
- [14] 屈会化,赵 琰,李翼飞,等. 中药活性小分子人工抗原合成的技术要点 [J]. *中草药*, 2012, 43(10): 1880-1885.
- [15] Sakamoto S, Putalun W, Tsuchihashi R, *et al.* Development of an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) using highly-specific monoclonal antibodies against plumbagin [J]. *Anal Chim Acta*, 2008, 607(1): 100-105.
- [16] 刘 洋,屈会化,任 燕,等. 人参皂苷 Rg₁ 人工抗原的合成及免疫原性鉴定 [J]. *中草药*, 2013, 44(13): 1738-1742.
- [17] Relloso M S, Nievas J, Fares Taie S, *et al.* Evaluation of mass spectrometry: MALDI-TOF MS for fast and reliable yeast identification [J]. *Rev Argent Microbiol*, 2015, 47(2): 103-107.
- [18] 杨利国,魏平华,郭爱珍,等. 酶免疫测定技术 [M]. 南京: 南京大学出版社, 1998.