

免疫亲和色谱特异性剔除中药方剂四逆散中的柚皮苷

陈 亮, 陈 婷, 徐 强

(南京大学生命科学学院 医药生物技术国家重点实验室, 江苏 南京 210093)

摘要: 为了获得剔除柚皮苷 (naringin) 的中药方剂四逆散样品以供其药理活性探讨时使用, 制备了抗柚皮苷抗体的免疫亲和色谱柱, 用于特异性地剔除四逆散中的柚皮苷。首先合成了柚皮苷的完全抗原——柚皮苷与牛血清白蛋白的结合物 naringin-BSA 并用 naringin-BSA 对新西兰兔进行免疫获得抗血清, 再将其纯化后与经 CNBr 活化的 Sepharose 4B 凝胶共价偶联制成免疫亲和色谱柱。将四逆散提取物样品溶液上样该色谱柱, 洗脱, 制得特异性剔除了柚皮苷的四逆散样品。由检测结果可知, naringin-BSA 被成功合成。将其用于免疫新西兰兔, 获得的抗血清的效价经酶联免疫吸附法 (ELISA) 测定达到 1:30 000 抗体 IgG 的纯度达 94% 交叉反应率低。在 IgG 与 Sepharose 4B 合成的 IgG-Sepharose 免疫亲和色谱柱中, IgG 的偶联率为 87%。用该免疫亲和色谱柱处理四逆散后, 其中所含的柚皮苷几乎完全被剔除。结果证明, 利用抗柚皮苷免疫亲和色谱, 能特异性地剔除四逆散或其他样品中的柚皮苷成分。

关键词: 免疫亲和色谱; 柚皮苷; 完全抗原; 特异性剔除; 四逆散

中图分类号: O658 文献标识码: A 文章编号: 1000-8713(2006)03-0243-04 栏目类别: 研究论文

Specific Depletion of Naringin from SiNiSan, a Traditional Chinese Prescription, by an Immunoaffinity Chromatography

CHEN Liang CHEN Ting XU Qiang

(State Key Laboratory of Pharmaceutical Biotechnology, School of Life Sciences

Nanjing University, Nanjing 210093, China)

Abstract To specifically deplete the compound naringin from SiNiSan, a traditional Chinese prescription, an immunoaffinity chromatography column was prepared. The naringin-bovine serum albumin (BSA) complex (naringin-BSA) was synthesized to make the complete antigen naringin-BSA. Polyclonal antibody was prepared from the serum of rabbit immunized with naringin-BSA. Then, an immunoaffinity column was made by covalently coupling the polyclonal antibody to CNBr-activated Sepharose 4B and used for depleting naringin from SiNiSan. The polyclonal antibody obtained from the rabbit serum was found through enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) to show the titer of 1:30 000, the purity of 94% and low cross reaction rate. The coupling rate of the polyclonal antibody to Sepharose 4B was 87%. By using this column, naringin in SiNiSan was selectively depleted from the whole extract. This immunoaffinity column of anti-naringin antibody could be used for specifically depleting naringin from SiNiSan and other samples.

Key words immunoaffinity chromatography; naringin; complete antigen; specific depletion; SiNiSan

四逆散方源自东汉张仲景所著《伤寒论》, 由柴胡、芍药、枳实、甘草各成分等份组成。此方在临床上被广泛应用于炎症性疾病的治疗, 其作用机理及其主要活性成分已部分阐明, 但各成分在此方中的作用尚不明了。我们的前期研究结果^[1]显示, 四逆散及其药对柴胡-芍药、芍药-甘草于诱导相给药时,

可显著减轻小鼠的耳肿胀, 其中以柴胡-芍药药对的作用为最强。作为四逆散的主要成分, 柴胡皂苷 a、芍药苷、柚皮苷 (naringin) 和甘草酸受到了关注, 其含量 (以质量分数计) 分别为四逆散提取物的 1.2%、1.4%、7.9% 和 2.1%。这些成分作为复方的主要有效成分, 其作用通常通过直接探讨它的药理

收稿日期: 2005-11-30

第一作者: 陈 亮, 男, 硕士研究生。

通讯联系人: 陈 婷, Tel: (025) 83686786 E-mail: chenting_nju@163.com

基金项目: 国家自然科学基金重大研究计划资助项目 (No. 90209040)。

活性来实现,但其在复方整体中的作用还往往无法认定。为了探讨这些成分在四逆散中的作用,我们^[2]曾建立了成分特异性剔除的方法,成功地将甘草酸从复方中剔除,并通过实验证明了四逆散对淋巴细胞黏附能力和基质金属蛋白酶活性的抑制作用因剔除甘草酸而减弱,提示这种特异性剔除特定成分的新方法可用于研究该成分在复方中的作用。本研究为了进一步探究四逆散中柚皮苷的作用,合成了柚皮苷与牛血清白蛋白的结合物,并以其作为完全抗原制备了抗柚皮苷的多克隆抗体,通过抗柚皮苷的免疫亲和色谱,以获得特异性地剔除柚皮苷而不影响其他成分的四逆散样品。

1 实验部分

1.1 仪器及试剂

Waters 600 高效液相色谱仪; Waters 600 泵, Waters 2487 监测器, Empower 工作站; 分析柱: Symmetry 5 μ m-C18 3.9 mm i.d. \times 150 mm (Waters USA); YMC-Pack Diol120 (YMC USA)。

柚皮苷对照品(中国药品生物制品检定所); 牛血清白蛋白(BSA, Sigma); 卵清蛋白(OVA, Sigma); 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimide (EDC, Sigma); 经 CNBr 活化的 Sepharose 4B 凝胶(Amersham Biosciences 瑞士); 邻苯二胺(中国医药集团上海化学试剂公司); 甲醇(色谱纯, 江苏汉邦科技有限公司); 柴胡、白芍、枳实、甘草均购自南京市药材公司。

1.2 完全抗原 naringin-BSA、naringin-OVA 的合成及鉴定

1.2.1 EDC 法制备 naringin-BSA^[3]

参照文献[4]的方法制备柚皮苷琥珀酰半酯。

将 25 mg BSA 和 10 mg EDC 溶于 10 mL 0.01 mol/L 磷酸盐缓冲液(PBS)(pH 7.4)中,置于磁力搅拌器上缓慢搅拌,并逐滴加入 50 g/L 柚皮苷琥珀酰半酯的二甲基甲酰胺溶液,30 min 后再加入 5 mg EDC,室温下搅拌过夜(24 h)。反应液经透析后冷冻干燥,得到粉红色粉末(即 naringin-BSA)29 mg。

1.2.2 偏碘酸钠法制备 naringin-OVA^[5]

将 55 mg OVA 溶于 14 mL 0.05 mol/L 碳酸盐缓冲液(pH 9.6)中,置于磁力搅拌器上缓慢搅拌,并逐滴加入 12.5 g/L 的柚皮苷甲醇溶液 4 mL,随后用 1 mol/L 的碳酸钠水溶液调整 pH 到 10.0 室温下继续搅拌 6 h。该反应液经透析后冷冻干燥,得到白色粉末(即 naringin-OVA)68 mg。

1.2.3 完全抗原的检测

采用凝胶-高效液相色谱法(GEL-HPLC)对

“1.2.1”和“1.2.2”节中获得的完全抗原进行检测。HPLC 条件: YMC-Pack Diol120 凝胶柱; 流动相为 0.01 mol/L 的 PBS 流速 1 mL/min 检测波长 280 nm; 柱温 25 $^{\circ}$ C。

1.3 抗柚皮苷抗体的制备

1.3.1 抗血清的制备^[6]

选 8 月龄体重在 2~3 kg 的健康雄性新西兰大白兔 2 只,于免疫前一周在兔耳缘静脉采血留作阴性对照。参照文献[6]的方法用 naringin-BSA 进行常规免疫。经 5 次免疫后,从兔耳缘静脉取血测抗体效价,当效价符合要求时经颈动脉采全血。将全血于 37 $^{\circ}$ C 下放置 1 h 于 4 $^{\circ}$ C 下静置过夜,以 3 000 r/min 离心 5 min 取血清分装,于 -20 $^{\circ}$ C 下保存。

1.3.2 非竞争性酶联免疫吸附法(ELISA)测定抗血清效价

用溶于 50 mmol/L 碳酸钠缓冲液的包被抗原 naringin-OVA(500 mg/L)包被酶标板,每孔 100 μ L。洗涤,其他步骤参照文献[7]。

1.3.3 抗体 IgG 的纯化^[2]

用硫酸铵沉淀法从抗血清中分离得到粗 IgG 蛋白,用 Sephadex G-25 柱脱盐,除去硫酸铵,再用 Cellulose DE-32 离子交换柱提纯。以核酸蛋白检测仪监测蛋白出峰情况,将吸光值(OD)高的各管洗脱液合并,置于重蒸水中透析 3 次,冷冻干燥,得 IgG 纯品,于 -70 $^{\circ}$ C 下保存。用 HPLC 检测其纯度。

1.3.4 竞争性 ELISA 法测定抗体交叉反应率

参照文献[7],用 naringin-OVA 包被酶标板,每孔 50 μ g。洗涤,封闭,竞争性反应: 50 μ L 各浓度的柚皮苷和其他样品的 10% 甲醇溶液分别与 50 μ L IgG 溶液混合均匀,然后在酶标板上每孔加入 100 μ L 孵育 1 h 制得二抗。加入邻苯二胺-H₂O₂ 底物溶液,每孔 100 μ L 避光反应 20 min 再于每孔中加入 50 μ L 的 2 mol/L H₂SO₄ 溶液终止反应,进行吸光值测定。按文献[8]的方法计算交叉反应率。

1.4 免疫亲和色谱柱的制备^[9]

称取抗体 IgG 蛋白 14 mg 溶解于 pH 8.3 的 0.1 mol/L NaHCO₃(含 0.5 mol/L NaCl)溶液,定容至 5 mL。另称取 0.5 g 经 CNBr 活化的 Sepharose 4B 凝胶到一干净的烧杯中,用 40 mL 的 1 mmol/L HCl 溶液悬浮并转移至玻璃滤器中,再用 1 mmol/L HCl 溶液约 200 mL 分 4 次冲洗,去除保护基团。将抗体溶液加入到凝胶中并转移至一玻璃管中,封口,在 20 $^{\circ}$ C 中振荡孵育 3 h。再将该抗体溶液转移至 0.5 mm i.d. \times 20 mm 的色谱柱内,用核酸蛋白检测仪检测、收集流出液,并以 pH 8.3 的 0.1 mol/L NaHCO₃(含 0.5 mol/L NaCl)溶液冲洗到 OD 值为

0. 合并流出液。用 HPLC 法检测流出液中 IgG 蛋白的峰面积, 以 IgG 蛋白的对照溶液为对照, 计算未偶联 IgG 蛋白的质量, 从而计算得出 IgG 蛋白的偶联率。剩余的活性基团以 2 倍体积的终止液 (0.1 mol/L Tris Cl 溶液, pH 8.0) 封闭。再以不少于 5 倍柱体积的 0.1 mol/L NaAc-HAc 缓冲液 (pH 4.0) 冲洗该柱, 接着以同体积的 0.1 mol/L Tris Cl (pH 8.0 含 0.05 mol/L NaCl) 溶液冲洗。循环冲洗 3 次。将该柱以 0.01 mol/L PBS (含 0.02% NaN₃) 平衡, 在 4 °C 条件下保存。

1.5 柚皮苷特异性剔除四逆散样品的制备

称取上述单味药材各 25 g 以等比配成四逆散全方, 用 8 倍量的 70% 乙醇回流提取, 回收乙醇, 干燥得提取物粉末, 收率为 23.3%。

在四逆散提取物中加入适量 0.01 mol/L PBS 溶液, 溶解。将质量浓度为 180 mg/L 四逆散提取物的 PBS 溶液 1 mL 加至免疫亲和色谱柱上, 以 5 倍量的 0.01 mol/L PBS 溶液洗脱, 流速 4 mL/h。合并流出液 (作为流出液 1), 得到剔除柚皮苷后的四逆散样品。再以同样流速的 0.1 mol/L PBS 溶液洗脱, 收集流出液 (作为流出液 2), 得到剔除下来的柚皮苷成分。

1.6 剔除效率的检测

用 HPLC 的方法对剔除前后的四逆散样品进行检测。HPLC 条件: Symmetry 5 μ m-C18 分析柱; 检测波长 283 nm (柚皮苷的特征吸收波长); 流动相梯度洗脱, 0 ~ 25 min 由 20% 甲醇水溶液变化到 80% 甲醇水溶液。采用竞争性 ELISA 法测定剔除柚皮苷的四逆散样品中残留的柚皮苷含量 (线性检测范围为 10 ~ 2000 μ g/L)。

2 结果与分析

2.1 完全抗原的检测

完全抗原 naringin-BSA 合成前后的 HPLC 图谱见图 1。从图 1 中可见, 完全抗原合成后, 其保留时间明显前移。同样, naringin-OVA 的出峰时间为 6.3 min 而 OVA 的出峰时间为 7.8 min (图略)。这是因为合成抗原较载体蛋白的相对分子质量有所增加, 其出峰时间也有所提前。

2.2 抗血清的效价与抗体 IgG 的纯度测定

新西兰兔经人工完全抗原 naringin-BSA 常规免疫 5 次后获得兔抗血清。在以非竞争性 ELISA 方法测定该兔抗血清的效价时, 将其稀释到 30 000 倍, 发现 OD₄₉₂ 曲线趋向水平, 即稀释更大的倍数时 OD₄₉₂ 趋向不变, 此稀释度 (1:30 000) 即为该兔抗血清的效价 (见图 2)。

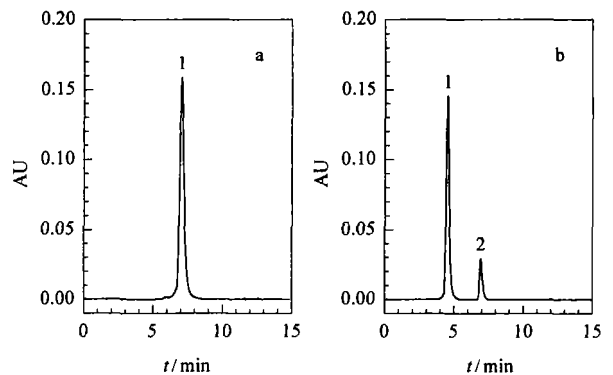


图 1 (a) BSA 和 (b) naringin-BSA 的 HPLC 图谱
Fig 1 Chromatograms of (a) BSA and (b) naringin-BSA
1. BSA; 2 naringin-BSA

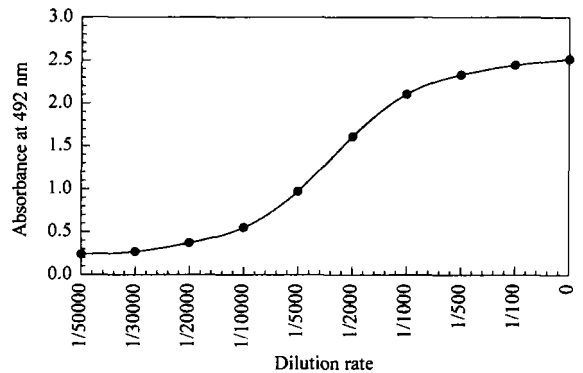


图 2 抗柚皮苷抗血清效价的测定

Fig 2 Titer of the anti serum against naringin
This chart indicates that the titer of the serum is not less than 1:30 000

用 HPLC 法对抗体 IgG 的纯度进行检测。取质量浓度为 2 g/L 的抗体 IgG 溶液 20 μ L 进样, 检测波长为 280 nm。用峰面积归一法测得抗体 IgG 的纯度为 94%。

用竞争性 ELISA 法测定纯化的抗体 IgG 与四逆散中其他主要成分的交叉反应。结果表明, 该抗体与白芍中的成分芍药苷、柴胡中的成分柴胡皂苷 a、甘草中的成分甘草酸的交叉反应率均低于 1%; 同为枳实中的成分橙皮苷与柚皮苷化学结构相似, 但它们的交叉反应率仅为 2%, 故可认为所纯化的抗体 IgG 具备了较高的特异性。

2.3 抗体 IgG 与 Sepharose 4B 的偶联率测定

将纯化的多克隆抗体与用 CNBr 活化的 Sepharose 4B 凝胶进行偶联反应, 得到亲和凝胶约 2.5 mL。装柱并平衡, 用 HPLC 测定未偶联的 IgG 量, 计算出蛋白偶联率为 87%。

2.4 特异性剔除柚皮苷前后样品的检测

剔除柚皮苷前后样品的 HPLC 图谱见图 3。由图 3 中可以看出, 柚皮苷的吸收峰在剔除后的样品中几乎消失, 而其他的吸收峰没有明显的变化。HPLC 测定流出液 2 中的柚皮苷含量为原上样四逆

散溶液中柚皮苷含量的 96%。以竞争性 ELISA 测定流出液 1 和流出液 2 中的柚皮苷含量, 结果分别为原上样四逆散溶液中柚皮苷含量的 2% 和 96.5%。因此可认为原上样四逆散溶液中约 98% 的柚皮苷已经被剔除。

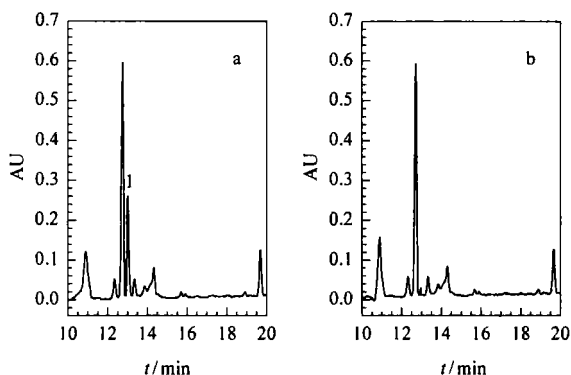


图 3 经抗柚皮苷抗体免疫亲和色谱柱 (a) 处理前和 (b) 处理后的四逆散样品的色谱图

Fig 3 Chromatograms of SiNiSan samples (a) before and (b) after passed through an immunoadfinity column with the antibody against naringin

Concentrations of the SiNiSan samples are 180 mg/L
Peak 1 naringin

3 讨论

本研究在人工抗原合成过程中, 为避免引入相同的交联副产物而干扰效价检测, 免疫抗原和包被抗原采用了不同的合成路线。为了考察完全抗原是否偶联成功, 我们选用 GEL-HPLC 方法, 从吸收峰的保留时间和峰面积的变化就能直观地从质和量两个角度证明偶联的成功, 并通过非竞争性 ELISA 方法测得抗体的效价达到 1:30 000。该抗血清经过硫酸铵沉淀除去杂蛋白, Sephadex G-25 柱脱去硫酸铵和小分子, 以及 Cellulose DE-32 离子交换柱以等电点的差异除去 IgM、IgA 等蛋白后进一步精制得到抗体 IgG。经检测得知抗体效价没有降低, 纯度达到 94%。实验中还测得该抗体与四逆散中其他主要成分交叉反应率很低, 基本避免了多克隆抗体较单克隆抗体的效价低、纯度低、交叉反应率高等缺陷, 达到了制备免疫亲和色谱柱的要求。

在制备免疫亲和色谱柱的过程中, 我们曾用 14 mg 抗体 IgG 与 0.5 g 经 CNBr 活化的 Sepharose 4B 凝胶 (干粉, 溶胀后体积约为 1 mL) 以 98% 的偶联率合成了免疫亲和色谱柱, 发现其对柚皮苷的亲和能力很弱, 几乎不能吸附柚皮苷成分。有文献^[10-11]报道, 抗体 IgG 和 Sepharose 4B 凝胶的偶

联率过高会影响免疫亲和色谱柱的亲合效率。抗体 IgG 与 Sepharose 4B 凝胶颗粒过度交联会使抗体的活性下降, 或偶联发生在抗体的抗原结合片段, 从而使得抗体 IgG 的抗原结合位点被封闭, 导致免疫亲和色谱柱的亲合能力大大降低。通常 1 mL 溶胀的 Sepharose 4B 偶联 10 mg 抗体 IgG 较为合适^[11]。经过改进, 制备的免疫亲和色谱柱的偶联率为 87%。对于柚皮苷的剔除效果达到 98%。

从图 3 可知, 在成功地剔除柚皮苷后的四逆散样品中未观察到其他峰的明显变化, 因此可以认为免疫亲和柱对柚皮苷的剔除是特异性的, 对柚皮苷以外的其他成分基本无影响。

基于抗原-抗体反应特异性的原理, 免疫亲和色谱技术已在分离纯化方面得到了广泛应用, 一些研究机构已经开始制备中药成分的多克隆或单克隆抗体, 用竞争性 ELISA 法精确地测定中药中微量成分的含量。将中药成分的特异性抗体用于剔除中药或方剂中的特定成分, 从而从反向探讨该成分的作用, 本课题组已有报道^[2], 本研究进一步用该法成功地从四逆散中剔除了柚皮苷, 为从新的角度进一步考察该成分在四逆散中的作用打下了基础。同时, 这种通过免疫亲和色谱特异性地剔除中药中特定成分的方法, 对于其他中药或复方的物质基础和作用机理的探讨亦具有指导意义。

参考文献:

- [1] Sun Y, Chen T, Xu Q. J Pharm Pharmacol 2003; 55: 839
- [2] Zhang L, Sun Y, Chen T, Xu Q. Int Immunopharmacol 2005; 5(7-8): 1193
- [3] Goodfriend T L, Levine L, Fasman G D. Science 1964; 144: 1344
- [4] Akbarzadeh A, Mehraby M, Zorbakhsh M, Farzaneh H. Biotechnol Appl Biochem 1999; 30(2): 139
- [5] Lu Z H, Morinaga O, Tanaka H, Shoyama Y. Biol Pharm Bull 2003; 26(6): 862
- [6] Gilbert S, Halliwell R E W. Veterinary Immunol Immunopathol 1998; 63: 223
- [7] Putahn W, Tanaka H, Shoyama Y. Phytochem Anal 2005; 16(5): 370
- [8] Weiler E W, Zenk M H. Phytochem 1976; 15: 1537
- [9] Zhao M P, Liu Y, Li Y Z, Zhang X X, Chang W B. J Chromatogr B 2003; 783(2): 401
- [10] Muronetz V I, Korpeka T. J Chromatogr B 2003; 790: 53
- [11] Wu Xiongwen, Lang Zhihui. Applied Laboratory Technology of Immunology. Wuhan: Hubei Science and Technology Press (吴雄文, 梁智辉. 实用免疫学实验技术. 武汉: 湖北科学技术出版社), 2002: 36