

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl<sup>7</sup>

G01N 33/53

G01N 33/48

A61K 39/00

A61P 37/00



# [12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 200510004203.9

[43] 公开日 2005 年 7 月 27 日

[11] 公开号 CN 1645143A

[22] 申请日 2005. 1. 14

[21] 申请号 200510004203.9

[30] 优先权

[32] 2004. 1. 14 [33] US [31] 10/756,768

[71] 申请人 香港理工大学

地址 中国香港

[72] 发明人 卢俊立 黄文秀 王渊渊

[74] 专利代理机构 中原信达知识产权代理有限责任  
公司

代理人 杨 青 樊卫民

权利要求书 1 页 说明书 13 页 附图 5 页

[54] 发明名称 检测免疫反应的方法

[57] 摘要

传统上,转化的永生免疫细胞系一直用作药物筛选的效应物。这种方案可能忽视重要的原则:广谱免疫调节反应的开始要求巨噬细胞,B细胞和T细胞的间接相互作用。本发明利用有生存能力的脾细胞提供检测物质的免疫反应的方法。

I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

1. 一种检测物质对生物体的工作机理的方法，包括将该化合物与有生存能力的脾细胞温育的步骤。

5

2. 权利要求 1 的方法，其中有生存能力的脾细胞抽提自大鼠。

3. 权利要求 1 的方法，其中该物质与脾细胞在缓冲液里约 20-40℃下温育。

10

4. 权利要求 3 的方法，其中该物质与脾细胞在缓冲液里约 37℃下温育。

15

5. 权利要求 1 的方法，其进一步包括通过两维聚丙烯酰胺凝胶电泳分析与有生存能力的脾细胞温育的物质的步骤。

20

6. 权利要求 5 的方法，其进一步包括检测至少一种下列蛋白和/或其前体和/或其分解产物产量的步骤：TNF- $\alpha$ ，IFN- $\gamma$  和 iNOS，hoemotic 蛋白 LH-2，细胞色素 C 氧化酶多肽 IV 前体，DNA 聚合酶  $\beta$ ，鸟嘌呤核苷酸-结合蛋白 G，T-细胞表面糖蛋白 CD5 前体以及  $\alpha$ -甘露糖苷酶 II。

25

7. 权利要求 1 的方法，其中该物质与脾细胞在缓冲液中 pH 约 5-9 下温育。

8. 权利要求 7 的方法，其中该物质与脾细胞在缓冲液中 pH 约 7 下温育。

30

9. 权利要求 1 的方法，其中工作机理为免疫反应。

## 检测免疫反应的方法

## 5 发明领域

本发明涉及检测化合物的免疫反应的方法，尤其是在筛选用于治疗疾病的化合物中。

## 发明背景

10 传统上，转化的永生免疫细胞系一直用作药物筛选的效应物。例如，巨噬细胞系（RAW 264.7）在免疫调节和抗癌药物筛选领域中是一种最常用的细胞系。然而，这种方案可能忽视重要的原则：广谱免疫调节反应的开始要求巨噬细胞，B 细胞和 T 细胞的间接相互作用。结果，具有潜力担当免疫调节药的化学物和/或药物在这些“传统的”  
15 筛选体系中会轻易地得出不能诱导癌细胞系的凋亡和/或抗癌细胞因子（例如，TNF- $\alpha$ ）的分泌，因为它们的活化途径中缺乏一些必要组分。因此，它们不能显示出作为免疫调节药物的真正潜力。

## 发明目的

20 本发明的目的是解决现有技术所述的至少一种或多种问题。最低程度，本发明的目的是给公众提供一种有用的选择。

## 发明概述

25 本发明提供检测物质的免疫反应的方法，包括将所述化合物与有生存能力的脾细胞温育的步骤。

优选地，有生存能力的脾细胞抽提自大鼠。

30 优选地，所述物质与脾细胞在缓冲液中于约 20-40℃，更优选约 37℃下温育。

另外，与有生存能力的脾细胞温育的物质通过两维聚丙烯酰胺凝胶电泳（2DE）进行分析，优选以检测至少一种下列蛋白的产量：TNF- $\alpha$ ，IFN- $\gamma$ 和 iNOS，hoemotic 蛋白 LH-2，细胞色素 C 氧化酶多肽 IV 前体，DNA 聚合酶  $\beta$ ，鸟嘌呤核苷酸-结合蛋白 G，T-细胞表面糖蛋白 CD5 前体以及  $\alpha$ -甘露糖苷酶 II。

优选地，所述物质与脾细胞在缓冲液中于 pH 约 5-9，更优选于 pH 约 7 下温育。

#### 附图简述

本发明优选的实施方案通过实施例方式并参照附图现将加以解释，在附图中：

图 1 利用 Wright-Giemsa 染色（X 1000）示出分离的脾细胞；

图 2 示出 Rg1 对 TNF- $\alpha$ ，IFN- $\gamma$  分泌和 iNOS 合成的影响，图 2A，2B 和 2C 分别示出 Rg1 处理后 TNF- $\alpha$ ，IFN- $\gamma$  分泌和 iNOS 合成的免疫印迹；

图 3 示出采用和没采用 Rg1（5  $\mu$ g/ml）处理后从脾细胞中分泌 TNF- $\alpha$  和 IFN- $\gamma$  的时程；

图 4 示出通过“二位一体（Two-in-One）凝胶”比较，在 Rg1 存在或缺乏下，脾细胞中的差异蛋白表达。Rg1 处理样品示于左边，而对照样品示于右边。4A 示出 pH 4-5.5 的样品，而 4B 示出 pH 5.5-7 的样品；

图 5 示出通过总结 Rg1 对脾细胞蛋白表达的影响，Rg1 对脾细胞中蛋白表达的影响，以及涉及 Rg1 对脾细胞的免疫调节活性的可能的调节机理。

#### 优选实施方案的详述

本发明参照附图通过实施例方式在以下段落中加以描述。

本发明的目的，特征和方面在下文中公开，或者从下文中显而易见。本领域普通技术人员应理解，下文仅是对示例性实施方案的描述，并非旨在限制本发明的范围，更宽的范围体现在代表性解释中。

5           在本发明中，与传统利用细胞系的方法相反，脾细胞原始培养物用于药物筛选中。这种脾细胞培养物含有全部 3 种对起始广谱免疫反应所必需的免疫细胞（约 30% B 淋巴细胞，60% CD3<sup>+</sup> T 淋巴细胞和 5% 巨噬细胞）。这类脾细胞可抽提自任何适于药物筛选的哺乳动物，例如大鼠，狗，猫，小鼠，豚鼠，牛，鹿，猴子等。

10           为了实施药物筛选功能，脾细胞必须是有生存能力的。术语“有生存能力”在此表示脾细胞仍是活的，对此现有技术能够操作。这种有生存能力的细胞在细胞和 0.4% w/v 台盼蓝溶液 1:1 的混合物中不会被台盼蓝染色。有生存能力的脾细胞可采用已知方法从动物中去除，  
15           合适的实施例将在下文中进行描述。非生存能力的细胞在筛选平台上不可用作效应物，因为它们不能被药物候选物刺激，和/或彼此有效相互作用。有生存能力的脾细胞通常可在动物细胞培养工作所常用的大多数培养基中令人满意地加以培育。然而，脾细胞不可经受极端温度范围（即低于 20℃和高于 40℃）。有生存能力的脾细胞的最适温度为  
20           37℃。此外，如果培养基处于极端 pH（即高于 pH 9 和低于 pH 5）下，脾细胞的生存力也将下降。

25           待检测的化合物一般以溶液的形式存在，然后通过多种方法将其施用给有生存能力的脾细胞。例如，化合物（没有内毒素污染）可被直接添加到有生存能力的脾细胞上。这当然会随待检测化合物的不同而不同，但是将化合物添加给脾细胞不是本发明的主题。

30           在检测人参 Rg1 的免疫反应中采用有生存能力的脾细胞将在下文详细描述。

## 实施例

高度纯化的 Rg1 为人参中一种主要的皂角苷，已经显示可抑制癌细胞的生长。其刺激 DNA，蛋白和脂类在动物组织中的生化合成。Rg1 还显示担当免疫调节剂，使得内皮细胞中一氧化氮产量在 Rg1 诱导后增加，T 辅助细胞活性，细胞因子 IL-1 以及自然杀伤细胞的产量增加。其他属性包括选择性增强淋巴细胞的增殖和 IL-2 的产生。假设人参苷（ginsenoside）抗致癌效应可能与或通过胱冬肽酶（caspase）3 和/或由活性氧起始的凋亡效应相关。尽管对人参效应的研究历史悠久，但其作用的分子机理大部分仍知之甚少。

## 材料和方法

### 动物

周龄 8-10、体重 200 g 的雄性 Sprague Dawley 大鼠由香港理工大学应用生物和化学技术系动物中心（the animal holding center of the Department of Applied Biology and Chemical Technology, The Hong Kong Polytechnic University）提供。所有研究都是根据最新公布的对实验室动物护理和使用的 NIH 指南（the NIH Guide for the Care and Use of Laboratory Animals）中所述的原理和程序进行的。动物伦理学批文已从香港理工大学动物伦理学分委员会获得。

### 制备大鼠脾细胞

将大鼠在醚深度麻醉下放置，并经腹部大动脉放血。通过无菌技术移出脾脏，接着在 10 ml 含有 1000 U/ml 青霉素-链霉素（PS）（Gibco, USA）的 RPMI-1640（Gibco, USA）培养基中洗涤两次。把脾脏切成小块后，在塑料注射器中用柱塞上下抽吸。制备单个细胞悬浮液，并放置在含有 1000 U/ml PS 和 5%柠檬酸葡萄糖的同样培养基中。然后通过梯度离心将单细胞悬浮液分层到 Ficoll-Paque Plus 梯度（Amersham Bioscience, H.K. Ltd.）上而分离脾细胞，室温下以 400 g 离心 35 分钟。收集含脾细胞的组分。室温下加入 4 倍体积的冰冷氯化铵溶液（pH 7.4）而裂解红细胞 5 分钟，将脾细胞在普通培养基中

洗涤两次。淋巴细胞用 Wright-Giemsa 着色剂染色后，再在光学显微镜下检查。台盼蓝染色后，经光学显微镜检查细胞生存力和数目。将脾细胞 ( $1 \times 10^6$ ) 培养在含有 1000 U/ml PS、补充有 2 g/L 碳酸钠的完全 RPMI-1640 培养基上。24 小时温育后，使细胞重悬浮在含有 10%FCS (Gibco, USA) 的同样培养基上，并进行多种处理。

#### 用 Rg1 刺激脾细胞

将 Rg1 (常用剂量 5  $\mu$ g/ml) 加入到位于 37°C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱内 6 孔平底板 (Nunc Maxisorp, USA) 上脾细胞的 PBS 缓冲液中。在不同时间点 (12-72 小时) 从温育混合物中采集条件培养基的样品。这些样品储存在 -80°C 备用。样品保存不超过两个月。此外，在 Rg1 处理的脾细胞的样品 (间隔 12 和 24 小时) 中使用 2-DE 分析也进行全蛋白的表达。与 PBS 温育 24 小时的细胞用作对照。

#### Western 印迹和免疫检测

在不同时间点采集与 Rg1 温育和没有与 Rg1 温育的脾细胞培养物的上清液，并且用于检测 TNF- $\alpha$  和 IFN- $\gamma$ 。同样，脾细胞裂解液用于检测 iNOS 的表达。上清液/裂解液中的蛋白含量通过 Bradford 方法 (Bio-Rad Laboratory, USA) 确定。对于各个分析，通过 12.5% 还原性 SDS-PAGE 胶在恒压 (150 V) 下电泳 1 小时，分析 350  $\mu$ g 蛋白。蛋白转移至硝酸纤维素膜 (Millipore, USA) 上。洗涤和封闭后，以 1:500 的稀释度，对这些膜用下列探针进行检查：兔抗大鼠 iNOS (Transduction Laboratories, USA)，兔抗大鼠 TNF- $\alpha$  (PropTech, USA) 或兔抗大鼠 IFN- $\gamma$  (PropTech, USA)。室温温育 2 小时后，洗涤这些膜，然后与 1:20,000 稀释的结合有 IgG (Sigma, USA) 的山羊抗兔辣根过氧化物酶 (HRP) 温育。使用 SuperSignal West Pico Chemiluminescent 试剂盒 (Pierce, USA) 检测阳性结合，而使用分子动力学密度仪 (Molecular Dynamics Densitometer) (Bio-Rad Laboratories, USA) 扫描曝光的 X 线胶片 (Kodak)。

## ELISA 测定

使用 OptEIA™ 大鼠 IFN- $\gamma$  和 TNF- $\alpha$  试剂盒 (Pharmigen, USA) 进行 IFN- $\gamma$  以及 TNF- $\alpha$  ELISA 测定。对使用或没用 Rg1 刺激的脾细胞进行检测。在这些试剂盒中, 单克隆抗大鼠 IFN- $\gamma$  或 TNF- $\alpha$  抗体用作一级抗体, 而生物素酰化的单克隆抗大鼠 IFN- $\gamma$  或 TNF- $\alpha$  抗体用作二级抗体。加入亲和素-HRP 结合物后, 再加入 2,2-Azin-bis-3-thylbenzthiazoline-6-sulfonic acid 显色, 并且采用微滴定板读数仪 (Bio-Rad Laboratories, USA) 在吸光度 405 nm 处监测颜色变化。与标准相比, 计算 IFN- $\gamma$  和 TNF- $\alpha$  的量。

## 2-DE 分析脾细胞裂解液

### 样品制备

在与或不与 Rg1 温育后, 将培养皿上的脾细胞以 RPMI-1640 冲洗一遍。随后, 加入含有 0.2 g/L EDTA 的 0.5 g/L 胰蛋白酶, 温育 3 分钟。以 1000 g 离心 5 分钟收集细胞, 并用 PBS (pH 7.2) 洗涤两次。然后将脾细胞用最低量的含有 4% Triton X-100, 9 M 尿素和 1 mM PMSF 的裂解缓冲液 (通常 200  $\mu$ l) 在冰上裂解 10 分钟。以 3000 g 离心 10 分钟收集上清液, 采用 Bio-Rad Laboratories, USA 的蛋白分析试剂盒通过改进的 Bradford 法测量蛋白含量。经同样处理的不同动物的细胞裂解液以 1:1 的蛋白比率合并在一起, 并用作 2-DE 分析。120  $\mu$ l 的脾细胞裂解液[在含有 9 M 尿素, 2% w/v Triton X-100, 0.5% w/v DDT (Sigma, USA), 0.4% v/v IPG 缓冲液 4-7 (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden) 和痕量溴酚兰的缓冲液中至终体积 300  $\mu$ l 中]用于胶内样品再水合。

## 2-DE

把样品上样到 IPG 胶条 pH 4-7 (3  $\times$  170 mm, Bio-Rad Laboratories, USA)。使用 Protean IEF 仪 (Bio-Rad Laboratories, USA) 或 IPGphor (Amersham Biosciences, USA) 进行再水合和随后的等电聚焦。室温下在覆盖有低粘度石蜡油的 IPG 胶条固定器上以 50 V 进

行再水合 16 小时。然后依序使用 500 V (1 小时), 1000 V (1 小时), 4000 V (2 小时) 和 8000 V (2 小时) 进行等电聚焦。胶条平衡在 pH 6.8, 含有 1% (w/v) DTT (Sigma, USA)、9 M 尿素、30% v/v 甘油、2% w/v SDS 和痕量溴酚兰的 50 mM Tris-HCl 平衡缓冲液中 10 分钟。平衡后, 5 IPG 胶条转移至 12.5% SDS-PAGE 凝胶 (1600×1600×1 mm), 用于在 Protean VI 电泳槽中室温下以恒电流 30 mA/凝胶电泳进行第二维分离。随后, 使用与 MALDI-TOF 分析相容的方法对胶银染。银染的胶以分子动力学密度仪 (Bio-Rad Laboratories, USA) 扫描。所得 2-DE 形式采用软件 Melanie III (Bio-Rad Laboratories, USA) 加以分析。10 在银染蛋白点中以体积百分比变化的基础上, 对相对量的变化进行评价。目的点变化在多凝胶上测试用于重现性。

#### 银染使蛋白显现

按本发明人使用 MALDI-TOF 质谱仪的制造商 Bruker Deltonics (USA) 所建议的质谱仪相容的方案进行银染。简而言之, 首先将凝胶在含有 50% v/v 甲醇, 12% v/v 乙酸, 0.0375% v/v 甲醛的固定溶液中固定 2 小时。随后用 50% 甲醇另洗涤凝胶 20 分钟。洗涤步骤重复两次。凝胶在含有 0.05% 硫代硫酸二钠的溶液中氧化 1 分钟, 接着用 milli-Q 水洗涤 (三次, 每次 20 分钟)。把凝胶在含有 0.0375% 甲醛的 20 0.2% 硝酸银中温育 20 分钟。再次用 milli-Q 水洗涤凝胶三次, 每次 20 分钟。然后在含有 0.0375% 甲醛和 0.004% 硫代硫酸二钠的 15% 碳酸钠溶液中使凝胶显色, 直到凝胶达到所需量的染色。该过程不应长于 10 分钟。最后, 用含有 12% 乙酸的 25% 甲醇终止反应。

#### 25 蛋白鉴定

或通过软件 Melanie III (Bio-Rad, USA) 进行图像分析, 或直接利用如前所述的“二位一体”胶法 (Wang, A.Y.Y., Cheung, B.Y., Wong, M.S., Lo, S.C.L. 两维电泳后“二位一体”凝胶用于点匹配, Proteomics 2003, 3, 580-583) 加以比较, 而将不同处理后差异表达的蛋白定位于 30 2-DE 凝胶上。使用 MALDI-TOF-MS (Autoflex, Bruker Daltonics,

Germany) 通过肽质量指纹识别选择和鉴定若干种差异表达的蛋白点。含有差异表达的蛋白点的胶塞从 2-DE 凝胶上切去, 并用胰蛋白酶消化 (采用由 Bruker Daltonics, Germany 建议的方案, 该方案是如先前由 Shevchenko 等 (Shevchenko A, Wilm M, Vorm O, Mann M. 质谱测序蛋白银染的聚丙烯酰胺凝胶. *Anal. Chem.* 68:850-8, 1996) 所述方法的改进)。简而言之, 胶塞被切成小块, 用 milli-Q 水洗涤两次, 接着用 25 mM 碳酸氢铵的 50% 乙腈洗涤。样品中的半胱氨酸残基用 10 mM DTT 还原, 并用 55 mM 碘代乙酰胺处理而衍生化。乙腈再水合和干燥后, 样品用胰蛋白酶 (5 ng/ $\mu$ l 胰蛋白酶的 25 mM 碳酸氢铵) 37°C 下消化过夜。消化样品用 50% 乙腈/1% 三氟乙酸通过超声抽提。收集含有消化的肽的上清液。消化的肽 (0.5  $\mu$ l-1.5  $\mu$ l) 与 1-2  $\mu$ l 的  $\alpha$ -氰基-4-羟基肉桂酸 (10 mg/ml 的 50% 乙腈, 0.1% 三氟乙酸) 基质和 100 fM 促肾上腺皮质激素 (ATCH) 片段 18-39 混合作为内标。仪器以阳离子反射方式在 20 kV 加速压下操作。所得肽质量指纹使用矩阵科学 (Matrix Science) 的 MSCOT 搜索引擎对 Swiss-Prot 进行检索。所有检索都使用 1-100 kDa 的质量窗以质量公差  $\pm$ 100 ppm 进行。每个样品允许有一个失误切割, 而半胱氨酸假定是氨基甲酰胺基甲基化的, 以及甲硫氨酸为氧化形式。

## 20 结果

### 脾细胞分离

如上文方法所述制备脾细胞, 并在 Wright-Giemsa 染色后检查细胞。采用 Leica Q500MC 成像处理和分析系统 (Leica, Germany), 分离的脾细胞 (大和小淋巴细胞) 图像示于图 1 中。未见红细胞污染。台盼蓝染色证实 95% 以上的分离细胞是有生存能力的。由于大和小淋巴细胞皆存在, 该制备物可用作研究 Rg1 的免疫调节活性的效应物。

根据 IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  和 iNOS 产量测定 Rg1 对脾细胞的影响

在成功制备有生存能力的脾细胞之后, 加入 Rg1 作为刺激物以研究这些脾细胞可能的反应。Western 印迹检测 IFN- $\gamma$  和 TNF- $\alpha$  在培养

基中的分泌。iNOS 的表达也在脾细胞裂解液中加以测试。大多数药理学研究 Rg1 所用的浓度为 5-20  $\mu$ g/ml。一方面,预备研究利用 5  $\mu$ g/ml 的 Rg1, 导致在 IFN- $\gamma$  和 TNF- $\alpha$  试验中的阳性结果。因此, 5  $\mu$ g/ml 的 Rg1 用于本发明人试验中。IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  和 iNOS 在不同时间间隔处 Rg1 诱导时 Western 印迹的结果示于图 2 (2A 为 TNF- $\alpha$ , 2B 为 IFN- $\gamma$ , 而 2C 为 iNOS) 中。没有 Rg1 处理的脾细胞用作比较用对照。结果显示, 对照组在 72 小时的温育过程中, 细胞培养基或脾细胞裂解液均未检测到 IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  和 iNOS。另一方面, 当用 5  $\mu$ g/ml Rg1 刺激时, 可检测到两个细胞因子和 iNOS。TNF- $\alpha$  在间隔 24 小时和 48 小时皆被检测到, 而 IFN- $\gamma$  在 24 小时被检测到。诱导的 NOS 在用 Rg1 温育后 12 小时和 24 小时被检测到。随后, 利用 ELISA 对培养基的系列样品进行这些抗癌细胞因子 (IFN- $\gamma$  和 TNF- $\alpha$ ) 的定量记录。各个条件重复测定三次, 结果示于图 3 中。两个细胞因子的分泌方式诱导后很相似。这些细胞因子的数量在 Rg1 诱导后增加 1000 倍以上, 而其水平在温育 24 小时时达到最高。24 小时后, 两个细胞因子分泌水平随着温育时间延长开始下降。该结果也与 Western 印迹的结果一致, 在 Western 印迹中, 最高的 IFN- $\gamma$  和 TNF- $\alpha$  分泌出现在 Rg1 诱导后 24 小时处。

#### Rg1 对蛋白表达的影响

由于 Rg1 发现在温育 24 小时后诱导 IFN- $\gamma$  和 TNF- $\alpha$  生产, 因此在温育 24 小时后还研究了 Rg1 对脾细胞蛋白质组 (proteome) 的影响。同样处理的样品以 1:1 的蛋白比率合并, 并用于如材料和方法中所述的 2-DE 分析。无论在 PBS 还是在含有 Rg1 的 PBS 中, 全部样品皆在温育 24 小时后采集。与 PBS 温育的样品用作比较用对照。为了便于鉴定差异表达的蛋白, 如前所述 (Wang 等, 2003) 进行“二位一体”凝胶方法。简而言之, 样品第一维 IEF (使用或没用 Rg1 温育) 分开在不同 Protean IEF 细胞中但同时进行。IEF 完成后, 将 IEF 胶条切成等半。半份 IEF 胶条对应于同样的 pH 范围, 但以不同样品 (有或无 Rg1 温育) 电泳, 并排放到 Protean VI 电泳装置中制备的第二维

5

SDS-PAGE 的顶部。所得对照样品的凝胶和 Rg1 处理样品的凝胶在银染后利用 Melanin III 加以比较。图 4 表明蛋白表达在正常样品和 Rg1 处理样品中的差异。在用正常样品电泳的一半凝胶中约有 102 个蛋白点被检测，而在用 Rg1 处理的样品电泳的另一半凝胶中有 122 个蛋白点被检测。

蛋白鉴定

10

在凝胶内胰蛋白酶消化后，MALDI-TOF-MS 用于鉴定差异表达的蛋白。7 个差异表达的蛋白点通过 MASCOT 搜索引擎得以成功鉴定。6 个蛋白被上调，包括细胞色素 C 氧化酶，homeotic 蛋白 LH-2，T 细胞表面糖蛋白 CD5，DNA 聚合酶  $\beta$ ， $\alpha$ -甘露糖苷酶 II 以及鸟嘌呤核苷酸结合蛋白 G。其他蛋白发现是下调的，并且被鉴定为假设的抗增殖因子。7 个鉴定的蛋白的详情汇总在表 1 中。

| 点号 | 蛋白名称                   | 登录号               | 理论<br>Mr(kDa)/pI | 序列覆盖范围% | 调节 |
|----|------------------------|-------------------|------------------|---------|----|
| 1  | Homeotic 蛋白 LH-2       | A47179            | 47.38/8.94       | 14%     | 上调 |
| 2  | 细胞色素 C 氧化酶<br>多肽 IV 前体 | NP_058898         | 19.50/9.45       | 26%     | 上调 |
| 3  | DNA 聚合酶 $\beta$        | AAA41900          | 38.17/8.69       | 20%     | 上调 |
| 4  | 鸟嘌呤核苷酸结合<br>蛋白 G       | P82471            | 41.45/5.58       | 15%     | 上调 |
| 5  | T 细胞表面糖蛋白<br>CD5 前体    | P51882;<br>Q63098 | 53.40/8.86       | 14%     | 上调 |
| 6  | $\alpha$ -甘露糖苷酶 II     | P28494            | 56.70/6.20       | 11%     | 上调 |
| 7  | 假设的抗增殖因子               | I53276            | 17.74/8.39       | 33%     | 下调 |

15

表 I. 脾细胞的差异表达的蛋白点的身份。

讨论

大鼠脾细胞由巨噬细胞, T 细胞和 B 细胞组成。这群细胞用作效应物对 Rg1 是否存在免疫调节活性进行测试。利用 Western 印迹和 ELISA, 发现 Rg1 刺激了脾细胞的 IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  和 iNOS 的产生。Rg1 诱导后, IFN- $\gamma$  和 TNF- $\alpha$  的产量在 24 小时达到峰值。本发明人的结果与 Gao 等 (Gao H., Wang, F., Lien, E.J., Trousdale M.D. *Pharmaceutical Research* 1996,13,1196-200) 的报道相似, 其中在用三七 (Panax notoginseng) 的粗制品对分离自小鼠脾脏的淋巴细胞诱导后 24 小时和 48 小时检测到最高量的 IFN- $\gamma$  和 TNF- $\alpha$ 。在本发明人的试验中, 对 IFN- $\gamma$  和 TNF- $\alpha$  的产生达到其峰值的时间较短。这可能是由于下列事实: 纯化的 Rg1 而非粗制品用于本发明人的研究中。

另一方面, Rg1 对分子水平的作用方式可能已被揭示出来, 这在其他研究中尚未发现。脾细胞中的差异蛋白表达通过 Rg1 诱导加以研究。基于直接比较“二位一体”凝胶的蛋白表达, 发现了蛋白表达在正常样品和 Rg1 处理样品之间的显著变化。有 87 个蛋白发现是上调的, 而另有 38 个蛋白发现是下调的。还有 38 个点没有任何显著的变化。

胰蛋白酶消化后, 利用 MALDI-TOF-MS 对差异表达蛋白进行了选择和鉴定。有 7 个蛋白成功地得以鉴定, 其中 6 个是上调蛋白。它们是细胞色素 C 氧化酶, homeotic 蛋白 LH-2, T 细胞表面糖蛋白 CD5, DNA 聚合酶  $\beta$ ,  $\alpha$ -甘露糖苷酶 II 以及鸟嘌呤核苷酸结合蛋白 G。剩余蛋白点 (假设的抗增殖因子) 发现是下调的。从文献中可知, DNA 聚合酶  $\beta$  相关于 DNA 合成。其上调表明 Rg1 刺激 DNA 合成。该刺激是否通过类固醇激素依赖的或不依赖的途径介导现在还未知。Rg1 对 DNA 合成的刺激效果也在大鼠和小鼠骨髓细胞中被观察到。另一方面, 还有两个上调蛋白: homeotic 蛋白 LH-2 和 T 细胞表面糖蛋白 CD5 已知参与 B 细胞和 T 细胞增殖。据报道, homeotic 蛋白 LH-2 是 B 淋巴细胞分化的早期标记, 也参与控制 B 细胞分化 (Xu, Y., Baldassare, M., Fisher, P., Rathbun, G., Oltz, E.M., Yancopoulos, G.D., Jessell, T.M., Alt, F.W.

Proc Natl Acad Sci USA.,1993,90,227-31)。T 细胞表面糖蛋白 CD5 为一跨膜蛋白，已知在调节 T 细胞增殖中担当受体 (Vermeer,L.A., de Boer,N.K., Bucci,C., Bos,N.A., Kroese,F.G., Alberti,S. Eur. J. Immunol. 1994,24,585-92)。另两个鉴定的上调蛋白细胞色素 C 氧化酶和  $\alpha$ -甘露糖苷酶 II 可能参与细胞代谢过程。细胞色素 C 氧化酶是一种参与呼吸链的氧化性磷酸化作用的线粒体膜酶 (Kadenbach, B. Biochim. Biophys. Acta 2003,1604,77-94)。由于 ATP 是呼吸过程的终产物之一，当细胞色素 C 增加时 ATP 的合成也很可能增加。已知细胞内高的 ATP 含量归功于细胞生长和增殖用的能量供应。细胞色素 C 氧化酶还参与 cAMP 生成的跨膜信号传导途径 (Frizzell,R.A. Am J Respir Crit Care Med. 1995,151,S54-8)。 $\alpha$ -甘露糖苷酶 II 为高尔基膜蛋白，控制甘露糖转化为复合的 N-glycon。其可能参与溶酶体合成，因为注定为溶酶体的蛋白在高尔基体内通过加入 6-磷酸甘露糖被共价修饰。然而，其真正的功能还不清楚。

鸟嘌呤核苷酸结合蛋白 G 是另一上调蛋白，为膜相关蛋白，其将许多类型的膜受体连接到多种第二信使系统上 (Gilman,A.G. Ann.Rev.Biochem.1987,56,615-49)。 $\beta$  和  $\gamma$  亚基为把  $\alpha$  亚基 (一种外周蛋白) 固定至质膜上的疏水整合膜蛋白。已知 G 蛋白的一个组分  $G_s \cdot GTP$  能够结合到腺苷酰基环化酶，这刺激 cAMP 的产生 (Lania,A., Mantovani,G., Spada,A. Eur.J.Endocrin. 2001,145,543-559)。据报道，Rg1 可增加老年动物中胞内 cAMP 和 cGMP，导致白介素 2 (IL-2) 的表达以及脾细胞增殖 (Liu M., Zhang J.T. Yao Xue Xue Bao,1996,31,95-100)。因此，鸟嘌呤核苷酸结合蛋白 G 的上调可能暗示 cAMP 水平相应的增加，而这又诱导 IL-2 表达和脾细胞增殖的相应增加。假设的抗增殖因子，尽管其真正的功能还未确立，但据信抑制细胞增殖。因此，这种蛋白在 Rg1 处理后的下调表明细胞增殖的机会增加。

上述结果还显示，Rg1 处理后 12 小时和 24 小时检测到 iNOS。诱导的 NOS 已知产生一氧化氮，其在诸如血管舒张、抑制血小板聚

集和神经传递的不同生理过程中起重要作用。一氧化氮也已知担当细胞毒介导剂，并且归功于巨噬细胞的杀菌和杀肿瘤活性[36]。因此，iNOS 的上调可用于评价细胞的杀菌活性。这种酶的产生可能受到细胞因子（IFN- $\gamma$  和 TNF- $\alpha$ ）的调节。Karupiah 等报道了病毒复制受到 IFN- $\gamma$  诱导的 NOS 的抑制（Karupiah,G., Xie,Q.W., Buller,R.M., Nathan,C., Duarte,C., MacMicking,J.D. Science 1993,261,1445-48）。这些研究人员提出了诱导 NOS 对于 IFN- $\gamma$  的实际抗病毒效果是必需和足够的。文献中还清楚记载了 IFN- $\gamma$  可与 TNF- $\alpha$  协同作用，促进 iNOS 的基因表达。此外，细胞色素 C 氧化酶和 ATP 在 Rg1 处理后的增加可能还增加 iNOS 的生成。蛋白激酶 C（PKC）活性对于 iNOS 表达是必要的，其中 PKC 在结合到膜受体的过程中需要 ATP。还已知 PKC-介导的信号传导刺激 G 蛋白的活性。因此，iNOS 的增加也会导致 IL-2，IFN- $\gamma$  和 TNF- $\alpha$  的量的增加。7 种鉴定的蛋白以及 IL-2，IFN- $\gamma$ ，TNF- $\alpha$  和 iNOS 可能的相互作用所显现出的免疫调节效果汇总在图 5 中。

总之，免疫调节是一复杂的活动，涉及多种蛋白和细胞组分之间的相互作用。使用脾细胞对 Rg1 免疫调节活性进行筛选已证明在了解涉及 Rg1 免疫调节的机理方面是成功的。本发明可提供大规模筛选免疫调节用 TCM 以及癌症治疗新药物的构思。

尽管本发明的优选实施方案已通过实施例详细描述，但是显而易见，本领域技术人员会对此进行修饰和改进。另外，本发明的实施方案不应解释为仅受到实施例或附图的限制。然而，特别值得注意的是，这些修饰和改进也落入本发明的范围内，正如权利要求书所述。例如，作为一个实施方案的部分所述的特征可用于另一实施方案中从而产生其他实施方案。因此，本发明旨在覆盖如同在权利要求的范围内的这些修饰和变化及其等同物。

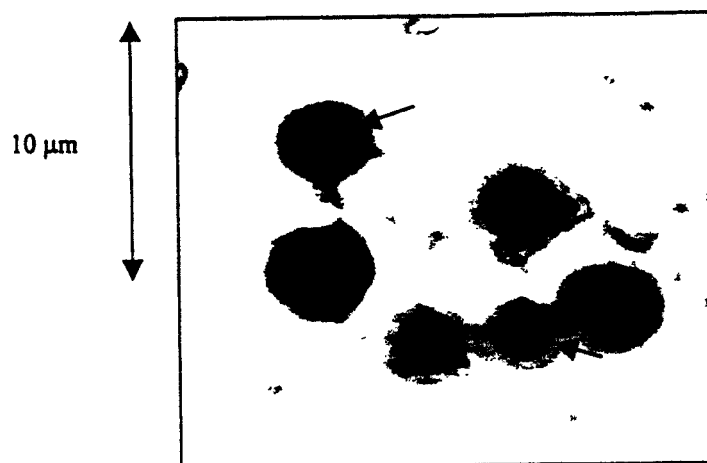


图1

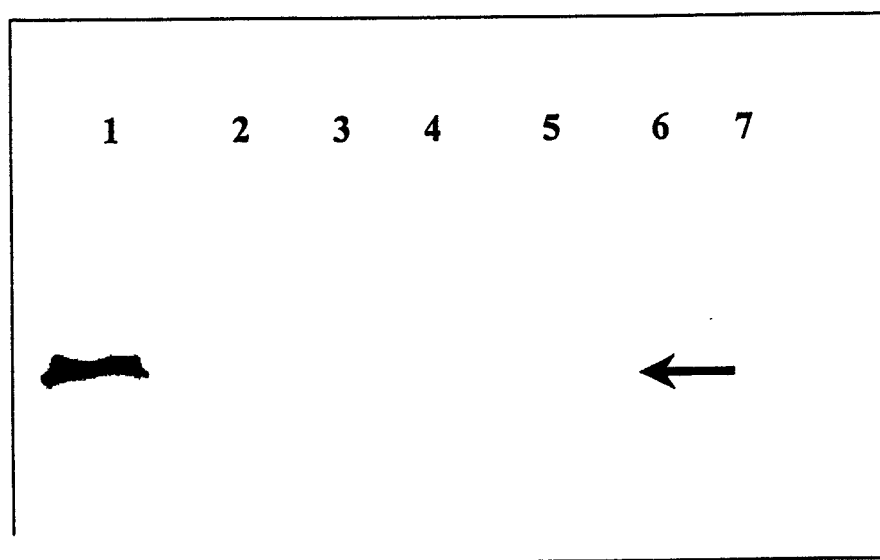
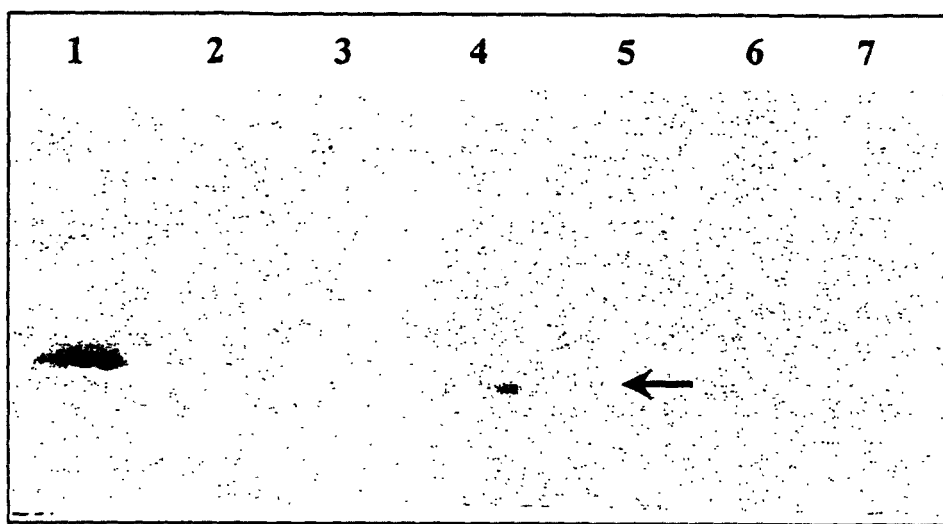
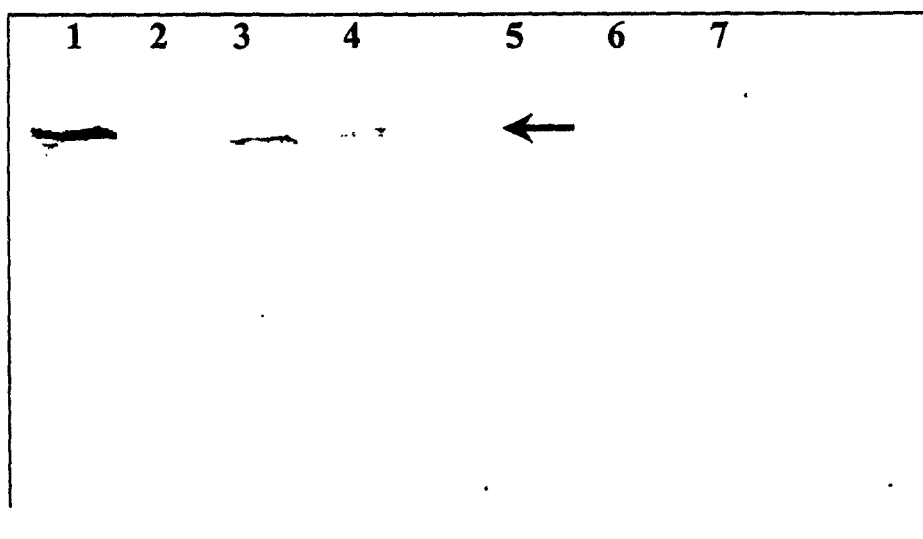


图2A

**图2B****图2C**

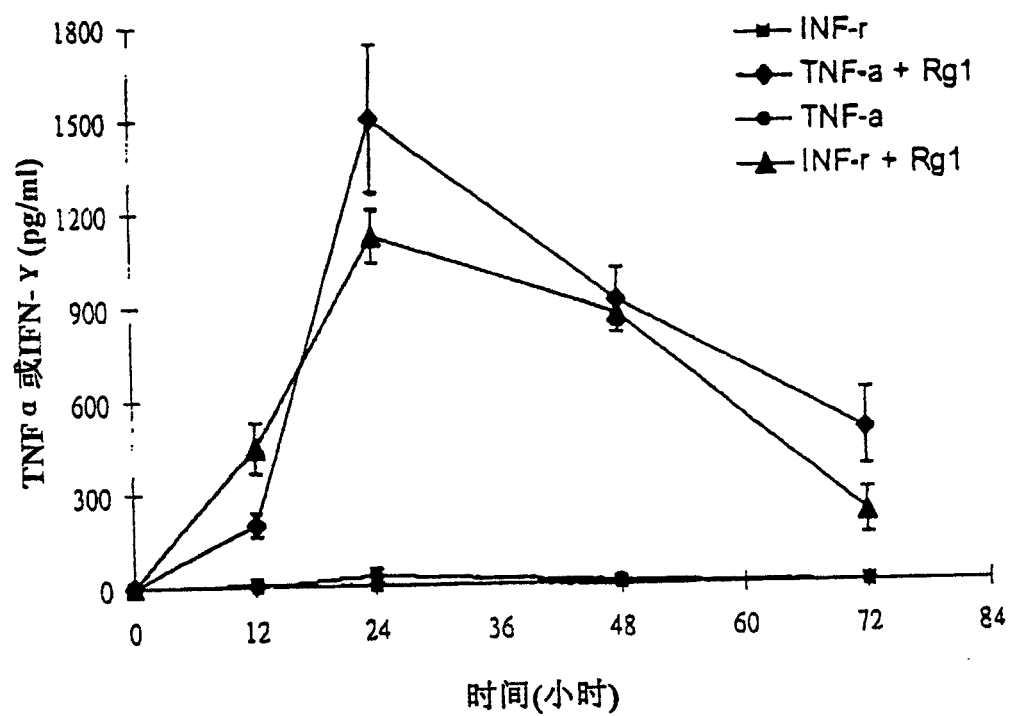
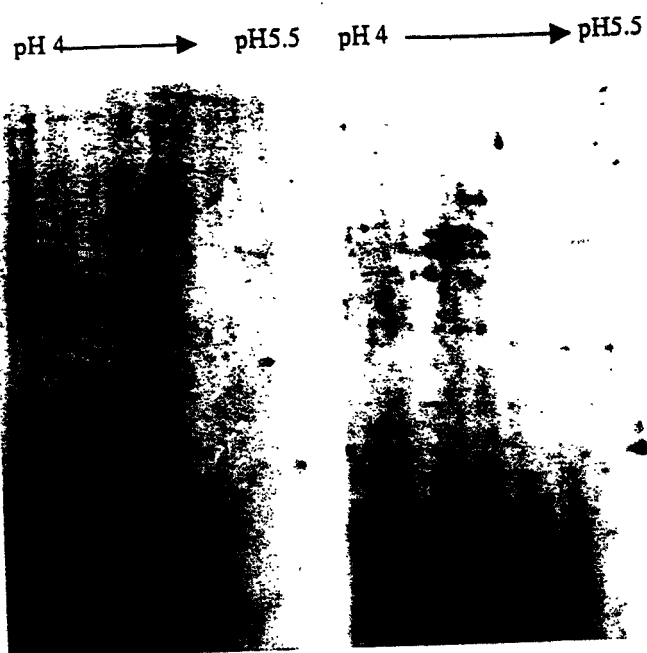


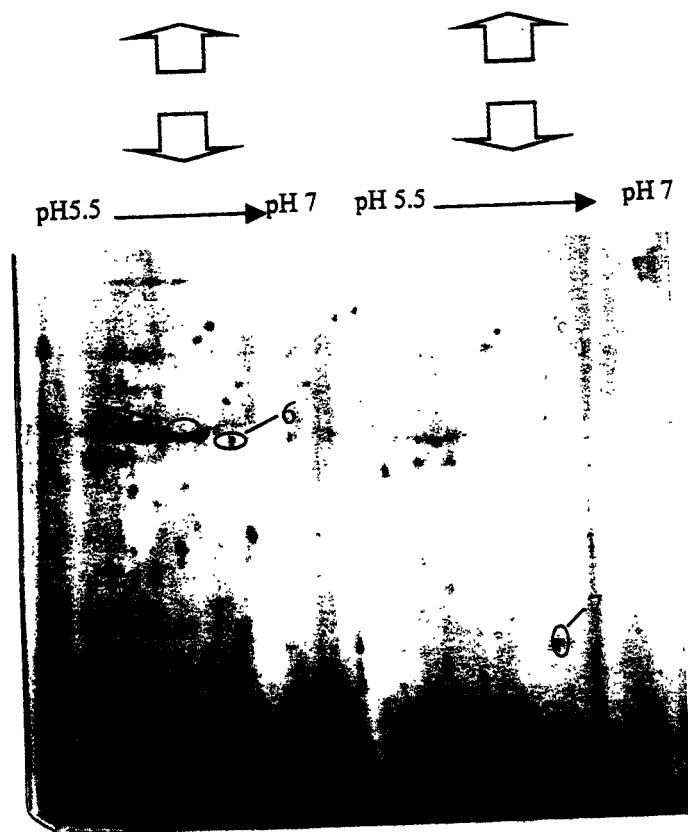
图3

图4

A



B



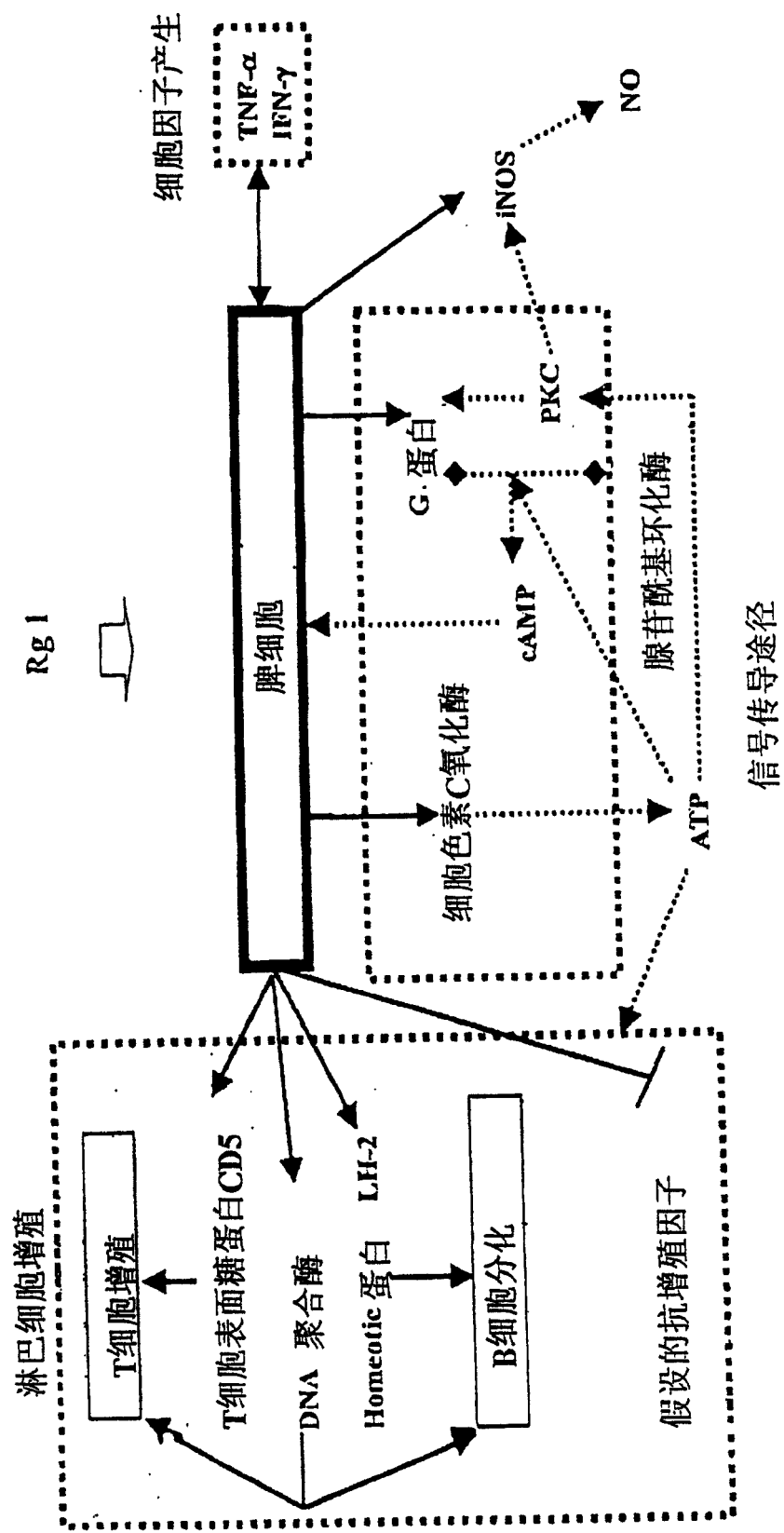


图5

|                |                                                                        |         |            |
|----------------|------------------------------------------------------------------------|---------|------------|
| 专利名称(译)        | 检测免疫反应的方法                                                              |         |            |
| 公开(公告)号        | <a href="#">CN1645143A</a>                                             | 公开(公告)日 | 2005-07-27 |
| 申请号            | CN200510004203.9                                                       | 申请日     | 2005-01-14 |
| [标]申请(专利权)人(译) | 香港理工大学                                                                 |         |            |
| 申请(专利权)人(译)    | 香港理工大学                                                                 |         |            |
| 当前申请(专利权)人(译)  | 香港理工大学                                                                 |         |            |
| [标]发明人         | 卢俊立<br>黄文秀<br>王渊渊                                                      |         |            |
| 发明人            | 卢俊立<br>黄文秀<br>王渊渊                                                      |         |            |
| IPC分类号         | A61K39/00 A61P37/00 C12N5/071 G01N33/48 G01N33/50 G01N33/53 G01N33/567 |         |            |
| CPC分类号         | C12N2503/02 C12N5/0648 G01N33/5047                                     |         |            |
| 代理人(译)         | 杨青                                                                     |         |            |
| 优先权            | 10/756768 2004-01-14 US                                                |         |            |
| 外部链接           | <a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>                         |         |            |

#### 摘要(译)

传统上，转化的永生免疫细胞系一直用作药物筛选的效应物。这种方案可能忽视重要的原则：广谱免疫调节反应的开始要求巨噬细胞，B细胞和T细胞的间接相互作用。本发明利用有生存能力的脾细胞提供检测物质的免疫反应的方法。

