

- [12] Murányi A, Gergely P, Fekete M I, et al. Protein phosphatase 2A plays a role in the suckling-induced changes in the responsiveness of pituitary mammotropes [J]. *Endocrinology*, 1998, 139(11): 4590-4597.
- [13] Diamond S E, Chiono M, Gutierrez-Hartmann A. Reconstitution of the protein kinase A response of the rat prolactin promoter; differential effects of distinct Pit-1 isoforms and functional interaction with Oct-1 [J]. *Mol Endocrinol*, 1999, 13(2): 228-238.
- [14] Brooks C L. Molecular mechanisms of prolactin and its receptor [J]. *Endocr Rev*, 2012, 33(4): 504-525.
- [15] Fitzgerald P, Dinan T G. Prolactin and dopamine; what is the connection? [J]. *J Psychopharmacol*, 2008, 22(2S): 12-19.
- [16] Huan C, Cui G, Ren Z. The characteristics of acromegalic patients with hyperprolactinemia and the differences with hyperprolactinemia patients [J]. *Pak J Pharm Sci*, 2015, 28(2 Suppl): 713-718.

## T7 噬菌体展示人肺癌 cDNA 文库筛选丹参-人参组分复方靶点研究

李变英, 陈飞燕, 陈建平, 毕蕾, 高静, 陈卫平\*  
(南京中医药大学基础医学院, 江苏南京 210023)

**摘要:** 目的 通过噬菌体展示技术筛选丹参-人参组分复方(丹参总酚酸、人参总皂苷、人参多糖)的作用靶点。方法 经过 T7 噬菌体展示人肺癌 cDNA 文库的 4 轮淘选, 获得阳性噬菌体克隆, 随机挑选 10 个克隆进行 DNA 提取和测序。基因序列用 ExPASy 网站的 Translate tool 查找开放阅读框(ORF)。选取代表性多肽用生物膜干涉技术检测亲和力。结果 4 轮淘选后阳性噬菌体克隆得到高度富集, 10 个样品中 7 个有相同的 DNA 序列, 长度为 471 bp(序列 1), 另外 3 个完全一致, 长度为 58 bp(序列 2)。序列 1 得到 4 个 ORFs, 序列 2 未进行分析。丹参-人参组分复方和多肽 His-MNTGRFGKTTSPALTLGNFQKPL 亲和力最高,  $K_D = 4.57 \times 10^{-8}$  mol/L, 人参多糖、丹参总酚酸和多肽亲和力分别为  $K_D = 7.23 \times 10^{-8}$  mol/L、 $K_D = 7.66 \times 10^{-8}$  mol/L, 人参总皂苷与多肽没有典型的结合和解离效应。结论 本研究获得了与丹参-人参组分复方高亲和力多肽, 为丹参-人参组分复方肺癌靶向治疗研究提供依据。

**关键词:** T7 噬菌体展示人肺癌 cDNA 文库; 丹参-人参组分复方; 靶点; 多肽; 生物膜干涉技术; 亲和力

**中图分类号:** R285.5

**文献标志码:** A

**文章编号:** 1001-1528(2016)04-0745-06

**doi:**10.3969/j.issn.1001-1528.2016.04.006

## Screening of targets binding to compound prescription of *Salviae Miltiorrhizae Radix et Rhizoma* and *Ginseng Radix et Rhizoma* with T7 select human lung tumor cDNA library

LI Bian-ying, CHEN Fei-yan, CHEN Jan-ping, BI Lei, GAO Jing, CHEN Wei-ping\*

(Department of Preclinical Medicine, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China)

**ABSTRACT:** **AIM** To use phage display technique to screen targets for compound prescription of *Salviae Miltiorrhizae Radix et Rhizoma* and *Ginseng Radix et Rhizoma* (total salvianolic acid, total ginsenoside, ginseng polysaccharides). **METHODS** The positive phage clones were obtained with T7 select human lung tumor cDNA library after biopanning four times. Ten phage clones were randomly picked for DNA sequence analyses. Gene sequences were found open reading frames (ORFs) with ExPASy website Translate tool. The representative polypeptide was

收稿日期: 2015-11-17

**基金项目:** 国家自然科学基金项目(81273638, 81503486); 江苏省高校优势学科建设工程项目(PAPD); 江苏省中医药局科技重点项目(ZD201502)

**作者简介:** 李变英(1989—), 女, 硕士生, 从事中药抗肿瘤作用靶点研究。Tel: 18351890710, E-mail: 18351890710@163.com

\* **通信作者:** 陈卫平(1959—), 女, 博士, 教授, 博士生导师, 从事中药抗肿瘤研究。Tel: (025) 85811923, E-mail: 13951033609@163.com

selected for the test of binding affinity by biolayer interferometry technology. **RESULTS** The positive phage clones were gradually enriched after biopanning; seven out of ten phage clones had the same DNA sequence with 471 bp in length, whereas other three phage clones were identical with 58 bp in length. Four ORFs came from Sequence 1. Sequence 2 was not analyzed. There was high affinity between compound prescription and the polypeptide His-MNT GRFGKTTSSPALTLGNFQKPL,  $K_D = 4.57 \times 10^{-8}$  mol/L.  $K_D$  values of affinity of ginseng polysaccharides and total salivianolic acid were  $7.23 \times 10^{-8}$  mol/L and  $K_D = 7.66 \times 10^{-8}$  mol/L, respectively. However, there were not typical association and dissociation between total ginsenoside and the polypeptide. **CONCLUSION**

The high affinity polypeptide obtained in this study combined compound prescription of *Salviae Miltiorrhizae Radix et Rhizoma* and *Ginseng Radix et Rhizoma* can be used in targeted therapy for lung cancer.

**KEY WORDS:** T7 select human lung tumor cDNA library; compound prescription of *Salviae Miltiorrhizae Radix et Rhizoma* and *Ginseng Radix et Rhizoma*; target; polypeptide; biolayer interferometry technology (BLI); affinity

丹参-人参组分复方, 是课题组前期通过正交设计优选的对肺癌有选择性抑制作用的有效组分配伍, 由丹参总酚酸、人参总皂苷、人参多糖组成, 对肺癌细胞 A549 具有显著增殖抑制作用, 能诱导细胞凋亡和降低细胞骨架面积, 而对正常细胞低毒安全<sup>[1]</sup>。但是其作用靶点和作用途径的相关信息尚不明确, 为了明确其抗肺癌作用分子机制和靶点, 本研究应用 T7 噬菌体展示人肺癌 cDNA 文库, 对丹参-人参组分复方的分子靶点进行筛选研究。

## 1 实验材料

1.1 药物 丹参-人参组分复方: 丹参总酚酸(80%, 批号 ZL20130112)、人参总皂苷(80%, 批号 ZL20130211) 和人参多糖(60%, 批号 ZL20130203) 均购于南京泽朗医药科技有限公司。

1.2 文库与试剂 T7 噬菌体展示人肺癌 cDNA 文库(美国 Novagen 公司, 批号 D00130452); 大肠杆菌 *E. coli* BLT5615 (美国 Novagen 公司, 批号 D00121319); 紫胶(上海典品工贸有限公司, 纯度大于 99%); 羧苄青霉素(Carb)(美国 Sigma 公司, 批号 XP0605B2013J); 胰蛋白胨(英国 Oxoid 公司, 批号 969801); 酵母提取物(英国 Oxoid 公司, 批号 1155226); 异丙基- $\beta$ -D-硫代半乳糖苷(IPTG)(上海捷瑞生物工程有限公司, 批号 R11758-IPTG-5G); DNA 提取试剂盒 Takara MiniBEST Viral DNA Extraction Kit (大连 Takara 公司, 批号 AK1501)。

1.3 仪器 Octet 分子间相互作用仪 (Octet Red96, 美国 Fortebio 公司); 超净工作台 (SW-CJ-1FD, 苏州净化设备有限公司); 细菌培养箱 (SPX-150B-Z, 上海博讯实业有限公司); 台式空气浴摇床 (TS-100B, 上海天呈实验仪器制造有限

公司); 加热板 (Cimarec, 美国 Barnstead Thermolyne 公司)。

## 2 实验方法

2.1 菌株的培养 向无菌 M9TB 液体培养基中加入 Carb (50  $\mu$ g/mL), 摇匀后接种大肠杆菌 BLT5615, 于 37  $^{\circ}$ C, 200 r/min 摇床培养, 约 1.5 ~ 2 h 后, 以空白培养基为对照测量菌液 600 nm 波长下的吸光度 ( $D$ ) 值, 直到  $D_{600}$  值达到 0.5, 加入 IPTG (终浓度 1 mol/L), 37  $^{\circ}$ C 继续摇床培养 30 min, 得宿主菌悬液 (最终  $D_{600}$  为 0.6 ~ 1)。

2.2 噬菌体的扩增 向培养好的宿主菌悬液中加入 T7 噬菌体原液, 37  $^{\circ}$ C, 200 r/min 摇床培养, 使宿主细胞裂解。用不加 T7 噬菌体原液的宿主菌液做空白对照, 约 2 ~ 2.5 h 溶液彻底澄清, 裂解完毕。

2.3 药物的包被 称取一定量的紫胶, 置于 50 mm  $\times$  10 mm 玻璃平皿中, 加热板 170  $^{\circ}$ C 加热熔化, 在紫胶凝固前于胶表面迅速加入丹参-人参组分复方 0.5 g, 丹参总酚酸: 人参总皂苷: 人参多糖为 1:2:1。

2.4 阳性噬菌体克隆筛选 将扩增好的噬菌体文库加入已包被好药物的紫胶平皿中, 室温放置 2 h, 使噬菌体与药物充分结合。TBST (TBS, 10 mmol/L Tris-HCl, pH 8.0, 150 mmol/L NaCl, 含 0.1% Tween-20) 洗涤, 除去未与药物结合的噬菌体。洗脱缓冲液 (TBS, 含 1% SDS) 室温孵育 10 min, 洗脱已与药物结合的噬菌体。按照“2.2”项方法对洗脱噬菌体进行扩增 (感染复数 MOI 约为 0.001), 重复以上结合 $\rightarrow$ 洗涤 (非特异性噬菌体) $\rightarrow$ 洗脱 (特异性结合噬菌体) $\rightarrow$ 扩增循环 4 次, 获得高度富集的噬菌体。每轮筛选前后均测定噬菌

体的滴度。

**2.5 噬菌体的滴度测定** 按照“2.1”项方法培养菌液 BLT5615, 在 M9TB 培养基中准备 10 倍系列稀释的噬菌体溶液。微波炉融化固体培养基 LB、半固体培养基 Top agarose, 将处于融化状态的 Top agarose 溶液置于 50 °C 水浴箱中保温备用, 将适量 LB 趁热倒入培养皿中, 待凝固, 放入 37 °C 细菌培养箱。取 10 mL 无菌试管, 每管加入 5 mL 准备的处于融化状态的 Top agarose, 每管加入所准备的 200 μL 的 BLT5615、100 μL 不同稀释度的噬菌体溶液, 混合均匀, 然后迅速倒入平皿中, 快速旋转铺匀后, 室温放置至凝固, 然后倒置于 37 °C 细菌培养箱中培养 2~3 h。当噬菌斑长至 1~2 mm 时, 计数培养板上 100 个以内的噬菌斑数。然后用此数目乘以稀释倍数即得到每 100 μL 噬菌体的空斑形成单位 (plaque forming unit, pfu) 滴度。

**2.6 噬菌体 DNA 提取和序列测定** 用无菌黄色枪头从第 4 轮洗脱噬菌体滴度测定平板上随机挑取 10 个单个噬菌斑, 转入 5 mL 培养好的菌液 BLT5615 中并加以标记, 37 °C 培养直到彻底澄清。按照 TaKaRa MiniBEST Viral DNA Extraction Kit 的步骤提取 DNA, 金斯瑞公司用 Applied Biosystems 3730XL 测序仪和基因分析系统 SOLiD™ System 进行测序。测序引物 T7Select UP Primer 5'-GGAGCT-GTCCGTATTCCAGTC-3', T7Select DOWN Primer 5'-AACCCTCAAGACCCGTTTA-3'。

**2.7 限制性酶切位点分析及查找开放阅读框** 载体为 T7Select10-3b, 根据多克隆酶切位点 *EcoR* I 和 *Hind* III, 软件 Primer 5.0 将测定的 DNA 序列剔除载体及引物序列后找到插入的肺癌序列, 利用 ExPASy 网站的 Translate tool (<http://web.expasy.org/translate/>) 查找开放阅读框 (ORF)。

**2.8 多肽的合成** 鉴于目前多肽合成技术的局限, 选取多肽 MNTGRFGKTTSSPALTILGNFQKPL 作为代表, 由金斯瑞公司通过 FlexPeptide™ 技术合成, 且带有 His-tag, 分子量为 3 389.78, 纯度为 98.3%。

**2.9 生物膜干涉技术 (BLI) 检测多肽 His-MNT-GRFGKTTSSPALTILGNFQKPL 和丹参-人参组分复方的直接相互作用和亲和力** BLI 技术是基于光的干涉原理检测物质相互作用。将多肽或蛋白固定于传感器表面, 与药物溶液进行反应, 若发生结合则引起表面光干涉的改变, 通过分析光干涉的改变可以得到分子间相互作用的信息<sup>[2]</sup>。Octet 分子间相互

作用仪可以实时监测整个分析过程。(1) 传感器预湿: 将新的 Ni-NTA 传感器放入 PBST 中预湿 10 min。(2) 仪器平衡: 将传感器在 PBST 中进行平衡。(3) 固化: 将多肽 His-MNTGRFGKTTSSPALTILGNFQKPL 固化到传感器上。(4) 平衡: 固化的传感器在 PBST 中进行平衡。(5) 结合: 带有 His-tag 的传感器浸入药物溶液中, 进行结合步骤。(6) 解离: 将结合到靶蛋白上的药物解离下来。(7) 数据采集和分析: 利用 ForteBio Data Acquisition 软件实时收集分子相互作用和结合动力学数据。

### 3 实验结果

**3.1 阳性噬菌体克隆的筛选** 每轮筛选前后均测定噬菌体的滴度 (表 1)。

表 1 噬菌体的滴度测定结果

轮数	投入量/ pfu	回收量/ pfu	回收率	TBST 洗涤次数/次
1st	$6.0 \times 10^{10}$	$3.0 \times 10^5$	$5.0 \times 10^{-6}$	6
2nd	$7.0 \times 10^{10}$	$2.4 \times 10^5$	$3.4 \times 10^{-6}$	10
3rd	$1.0 \times 10^{11}$	$4.2 \times 10^5$	$4.2 \times 10^{-6}$	10
4th	$6.6 \times 10^{10}$	$1.4 \times 10^6$	$2.1 \times 10^{-5}$	12

为了增加筛选的特异性, 在筛选的过程中不断增加非特异性结合噬菌体的洗涤次数, 从而保证被筛选到的靶蛋白有较强的亲和力。第 1 轮洗涤次数相对较少, 可能部分非特异性结合的噬菌体未洗掉, 回收率较第 2 轮和第 3 轮高。为了使结合的噬菌体更充分洗脱下来, 在洗脱缓冲液中加入少量菌液 BLT5615。经过逐轮淘选, 得到与丹参-人参组分复方高度结合的噬菌体克隆。回收率 (回收量/投入量) 代表了富集程度。经 4 轮筛选后, 噬菌体得到了有效的富集 (图 1)。

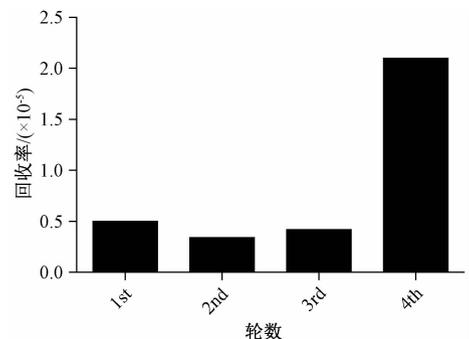


图 1 T7 噬菌体在每一轮筛选的富集程度

Fig. 1 Relative enrichment of T7 phage particles in each round of selection

**3.2 测序及分析结果** 10 个样品中 7 个有相同的 DNA 序列, 另外 3 个序列完全一致 (表 2)。

表 2 阳性噬菌体克隆的测序结果

Tab. 2 Sequencing results of positive phage clones

序列	基因序列	长度/bp	频率
1	AATTCAAGCAGAAACGCCTAGTTTATACTGCTTGGAGATGCTCCTCGGAGACCATTCTTGCTA TGACAAGGCTGGGAGTTGTCGCCGTACCGCAGTCTCGTCTCAGCGCTCCAAAGCC CTCCTTC ATCTTCGGAACAAGGAGTTCAAGAGTGTGTAG AGTGCTTCAACGCTCGGTTAAGATTAATCCC ATGCAGCTCGGGTGTGGTTTTCTCTCGGTTGTGCCTATTTGGCCCTGGAAGACTATCAAGGTTCA GCAAAGGCATTTACAGCGCTGTGACTCTAGAACCCGATAATGCTGAAGCTTGAACAATTTGTCA ACTTCTATATCCGATTAACAAAAAGTAAAAGCTTTTAGAAGCTTTACAAGAAGCTCTCAAGTGT AACTATGAACACTGGCAGATTTGGGAAA ACTACATCTCACCAGCACTGACGTTGGGGAATTTTC AGAAGCCATTAA	471	7/10
2	AATTCGATGAAAGAAACCGCTGCTGCTAAATTCGAACGCCAGCACATGGACAGCCCAA	58	3/10

3.3 寻找开放阅读框 (ORF) ORF 是一段位于的编码区。序列 1 (5'→3') 的 ORFs 如表 3, 由于起始密码子和终止密码子之间的核酸序列, 是潜在序列 2 基因长度的局限, 未进行分析。

表 3 序列 1 的开放阅读框 (ORFs)

Tab. 3 Open reading frames of the sequense 1

编号	起始位点/bp	终止位点/bp	ORF 长度/aa	氨基酸序列
1	303	344	14	MLKLGTICQLPISD
2	399	470	24	MNTGRFGKTTSSPALTLGNFQKPL
3	42	161	40	MSSETILAMTRPGSCPGTAVLVLSAPKPSFIFGTRSFKSV
4	197	469	91	MQLGVWVSLGCAYLALEDYQGSAKAFQRCVTLEPDNAEAWNLLSTSYIRLKQKVKA FRTLQEQALKCNYEHWQIWENYILTSTDVGEFSEAI

3.4 多肽 His-MNTGRFGKTTSSPALTLGNFQKPL 和丹参-人参组分复方、人参多糖、丹参总酚酸、人参总皂苷的直接相互作用 多肽与药物溶液质量浓度均为 10 μg/mL, 结果如图 2, 组分复方响应值最高, 为 0.091 1, 人参多糖、丹参总酚酸、人参总皂苷响应值分别为 0.060 3、0.024 9、0.022 5。

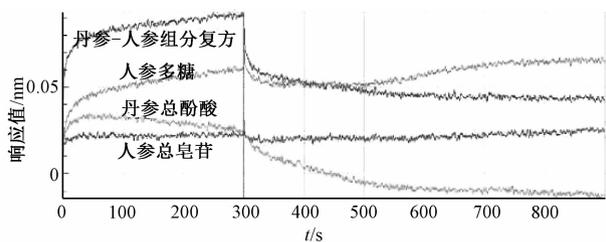


图 2 多肽 His-MNTGRFGKTTSSPALTLGNFQKPL 和组分复方、人参多糖、丹参总酚酸、人参总皂苷直接相互作用

Fig. 2 Binding responses between the peptide His-MNTGRFGKTTSSPALTLGNFQKPL and compound prescription, ginseng polysaccharides, total salvi-anolic acid, total ginsenoside

3.5 多肽 His-MNTGRFGKTTSSPALTLGNFQKPL 和丹参-人参组分复方、人参多糖、丹参总酚酸、人参总皂苷的动力学结合 Octet 分子间相互作用仪

进一步考察, 获得结合解离曲线 (图 3) 和速率常数、亲和力常数等结合动力学常数 (表 4)。存在特异性结合时结合曲线 Association 呈现缓缓上升最终趋于平衡, 解离曲线 Dissociation 呈现缓慢下降趋于平衡, 并且存在剂量依赖性。丹参-人参组分复方、人参多糖、丹参总酚酸都获得典型的结合解离时相曲线, 人参总皂苷无正常的结合解离时相曲线, 与多肽没有典型的结合和解离效应。

#### 4 讨论

21 世纪肿瘤学研究方向的热门为分子靶向治疗<sup>[3]</sup>, 药物与肿瘤发生发展过程中的关键分子特异性结合, 控制其基因表达以及改变生物学行为, 阻断肿瘤细胞的信号传导, 抑制肿瘤细胞的生长和繁殖, 改变肿瘤生长微环境, 从而发挥抗肿瘤作用。因此, 新的抗肺癌药物靶点的寻找以及新的肺癌治疗药物的探索成为治疗肺癌的关键<sup>[4]</sup>。

中药组分复方抗肿瘤研究为治疗恶性肿瘤提供了新的契机。近年来, 随着中药抗肿瘤的深入研究, 部分中药及其活性成分改变肿瘤细胞的生物学行为从而抑制其生长发展, 并保护机体的正常功能, 使患者可以带瘤生存, 延长寿命, 减轻痛苦, 保持良好生活质量<sup>[5]</sup>。但是中药药效物质成分众多复杂, 分子结构和药效基因很难明确, 医药研究者提出了中药有效组分配伍组方的研究思路<sup>[6]</sup>。

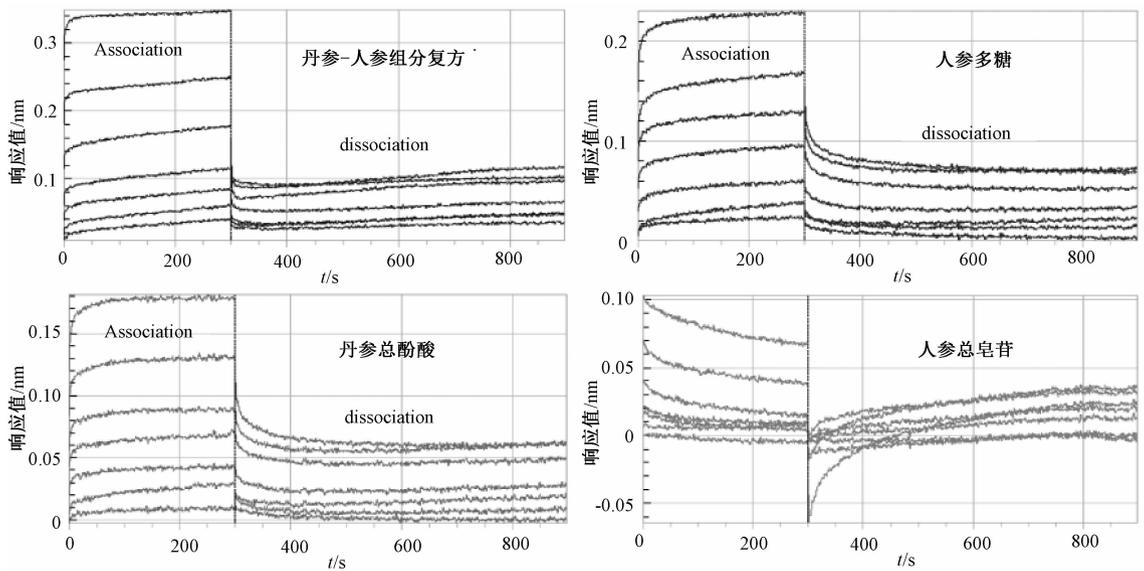


图3 多肽 His-MNTGRFGKTTSSPALTGLGNFQKPL 和不同浓度的组分复方、人参多糖、丹参总酚酸、人参总皂苷 (上→下 160、80、40、20、10、5、2.5 μg/mL) 之间的结合解离曲线

Fig. 3 Curves of association and dissociation of between the peptide His-MNTGRFGKTTSSPALTGLGNFQKPL and compound prescription, ginseng polysaccharides, total salvianolic acid, total ginsenoside at various concentrations (from top to bottom: 160, 80, 40, 20, 10, 5, 2.5 μg/mL)

表4 多肽 His-MNTGRFGKTTSSPALTGLGNFQKPL 和组分复方、人参多糖、丹参总酚酸、人参总皂苷的亲合力参数  
Tab. 4 Affinity parameters between compound prescription, ginseng polysaccharides, total salvianolic acid and the peptide His-MNTGRFGKTTSSPALTGLGNFQKPL

编号	样品名称	样品质量浓度/ (μg·mL <sup>-1</sup> )	响应值/nm	结合速率常数/ [L·(mol·s) <sup>-1</sup> ]	解离速率常 数/s <sup>-1</sup>	亲和力 K <sub>D</sub> / (mol·L <sup>-1</sup> )
1	丹参-人参组分复方	160	0.346 5	1.87 × 10 <sup>4</sup>	8.53 × 10 <sup>-4</sup>	4.57 × 10 <sup>-8</sup>
		80	0.247 7			
		40	0.176 7			
		20	0.113 6			
		10	0.083 7			
		5	0.059 5			
		2.5	0.039 1			
2	人参多糖	160	0.228 3	2.97 × 10 <sup>4</sup>	2.15 × 10 <sup>-3</sup>	7.23 × 10 <sup>-8</sup>
		80	0.167			
		40	0.127 9			
		20	0.094 7			
		10	0.058 7			
		5	0.037 1			
		2.5	0.022 9			
3	丹参总酚酸	160	0.178 6	3.43 × 10 <sup>4</sup>	2.63 × 10 <sup>-3</sup>	7.66 × 10 <sup>-8</sup>
		80	0.130 4			
		40	0.088			
		20	0.069 6			
		10	0.042 6			
		5	0.028 2			
		2.5	0.009			

噬菌体表面展示技术可构建含有大量的具有不同结构和组成信息的噬菌体呈现表位文库, 最大优势是表达蛋白(表达型)与DNA序列(基因型)建立直接联系<sup>[7]</sup>, 使外源多肽或蛋白与噬菌体外

壳蛋白融合表达, 保持相对独立和正确的空间构象确保蛋白质的生物学活性, 有利于药物或生物分子的特异性识别和结合。噬菌体展示技术可以从广泛的作用靶点筛选到特异性结合位点, 是一种有效的

药物靶点筛选工具,与传统的药物靶点筛选模式相比,噬菌体展示技术筛选模式更高效,耗成本更低,选择性更强<sup>[8]</sup>。噬菌体展示技术已经在中药方剂及中药活性成分的靶点筛选中发挥了重要作用,如 Takakusagi 等<sup>[9]</sup>利用 T7 噬菌体展示 cDNA 库,筛选得到了喜树碱的结合肽序列 NSSQSARR。潘超等<sup>[10]</sup>利用噬菌体随机十二肽库淘选出与三水白虎汤作用的类风湿关节炎滑膜成纤维细胞特异性结合的多肽。龙军等<sup>[11]</sup>利用噬菌体展示十二肽库,筛选出隐丹参酮高亲和性结合肽。

本研究利用噬菌体展示人肺癌文库筛选丹参-人参组分复方的作用靶点,不仅具有物质基础及作用机理相对清楚的特点,且保存了方剂多环节、多靶点、整体调节的优势<sup>[12]</sup>。经过4轮淘选后,阳性噬菌体克隆得到有效富集。随机挑选10个克隆进行测序和分析,7个样品有相同的DNA序列,另外3个完全一致,更说明筛选出了丹参-人参组分复方高度特异性结合的噬菌体。通过将基因序列查找开放阅读框,序列1得到4个ORFs,序列2较短,未进行分析。

目前中药药理的研究主要限于细胞和活体水平,少有分子水平的直接证据。生物膜干涉技术(BLI)有检测速度快、通量高的特点,较其它检测方法更适用于成分复杂的中药样品检测,可以在分子水平验证中药药效及相应机理,为传统研究方法提供了有力的补充。本研究中选择多肽 MNT-GRFGKTTSSPALTGLGNFQKPL 为代表,与药物进行分子间相互作用分析。丹参-人参组分复方和多肽亲和力最高,  $K_D = 4.57 \times 10^{-8}$  mol/L,说明二者具有较强的结合力和较高的亲和力。人参多糖和丹参总酚酸次之,人参总皂苷与多肽没有典型的结合和解离效应。表明,丹参-人参组分复方与多肽的结合可能主要是人参多糖和丹参总酚酸的贡献。丹参<sup>[13]</sup>、人参<sup>[14]</sup>在抗肿瘤治疗时应用广泛,对治疗有着积极的意义,但是作用机制以及靶点研究大多以单味药或单体为主,对于二者组分配伍后共同的信号通路、作用靶点,则报道较少,而配伍后在调节免疫、诱导肿瘤细胞凋亡等方面是否起到协同增效作用还需要进一步深入研究。

通过此研究,筛选出丹参-人参组分复方特异性结合多肽,其可能是通过与高亲和性多肽发生结合,进而影响多肽所归属的蛋白质的功能。但是此多肽是否就是丹参-人参组分复方的靶标,复

方中与多肽亲和力强的成分是否就是有效的活性成分,将在后续的研究中进行验证和分析。随着对丹参、人参抗肿瘤作用靶点和作用机制的不断深入研究,将为临床肿瘤的靶向治疗提供更详实的理论依据。此研究同时表明噬菌体展示技术不仅可以筛选单体的作用靶点<sup>[15]</sup>,也为中药组分复方的靶点研究提供了强有力的支持。

#### 参考文献:

- [1] 颜晓静,杨焯,毕蕾,等.丹参-人参组分配伍对肺癌 A549 增殖、凋亡和骨架的影响[J].中国中药杂志,2014,39(22):4436-4441.
- [2] Frenzel D, Willbold D. Kinetic titration series with biolayer interferometry[J]. *PLoS One*, 2014, 9(9): e106882.
- [3] Forde P M, Ettinger D S. Targeted therapy for non-small-cell lung cancer: past, present and future[J]. *Expert Rev Anti-cancer Ther*, 2013, 13(6): 745-758.
- [4] She J, Yang P, Hong Q, et al. Lung cancer in China: challenges and interventions[J]. *Chest*, 2013, 143(4): 1117-1126.
- [5] 姜怡,刘苓霜,李春杰,等.中医综合方案维持治疗晚期非小细胞肺癌对疾病进展时间和生活质量的影响[J].中国中西医结合杂志,2011,31(10):1311-1316.
- [6] 王阶,王永炎,郭丽丽.基于病证结合的中药组方模式研究[J].中国中药杂志,2009,34(1):2-5.
- [7] Bratkovic T. Progress in phage display evolution of the technique and its application[J]. *Cell Mol Life Sci*, 2010, 67(5): 749-767.
- [8] Wang J, Wang B. Phage display technology and its application in drug screening[J]. *Foreign Med Sci Pharm*, 2003, 30(5): 257-261.
- [9] Takakusagi Y, Ohta K, Kuramochi K, et al. Synthesis of a biotinylated camptothecin derivative and determination of the binding sequence by T7 phage display technology[J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2005, 15(21): 4846-4849.
- [10] 潘超,肖长虹,高燕,等.噬菌体随机十二肽库淘选三水白虎汤作用于类风湿关节炎滑膜细胞的靶点研究[J].中国免疫学杂志,2014,4(30):446-453.
- [11] 龙军,袁冬平,陆茵,等.噬菌体肽库筛选隐丹参酮高亲和性结合肽[J].中国药科大学学报,2013,44(5):465-469.
- [12] 王阶,郭丽丽,王永炎.中药方剂有效成(组)分配伍研究[J].中国中药杂志,2006,31(1):5-7.
- [13] 焦鹏,夏作理,常起,等.泰山白花丹参对实验肿瘤细胞体内外生长的抑制作用[J].中成药,2009,31(10):1622-1623.
- [14] 任莉莉,魏影非,杜惠兰.人参抗肿瘤作用研究进展[J].中成药,2005,27(8):947-950.
- [15] Dorst B V, Mehta J, Rouah-Martin E, et al. Phage display as a method for discovering cellular targets of small molecules[J]. *Methods*, 2012, 58(1): 56-61.