

· 研究论文 ·

用离体兔气管平滑肌建立抗鼻病毒药物的药效学评价模型

颜 慧, 刘 茵, 路新强, 官泽辉*

(军事医学科学院毒物药物研究所, 北京 100850)

摘要: 人鼻病毒 (human rhinovirus, HRV) 是引起病毒性呼吸道感染的最常见病原体, 目前尚无有效治疗药物。由于 HRVs 绝大多数血清型仅对灵长类动物易感, 对常用实验动物不感染, 目前多在细胞水平对抗 HRVs 药物进行筛选与评价, 这对抗 HRVs 药物的有效性研究明显不足。本文根据 HRVs 对呼吸道感染的特点, 以离体气管平滑肌 (ASM) 收缩反应变化为评价指标, 建立了可模拟呼吸症状的筛选模型, 在此模型上接种鼻病毒后 ASM 对于激动剂引发的收缩反应显著增强 150%, 舒张反应明显减弱至 63%, 而预先加入已经过细胞初筛有效的化合物后, 可显著改善鼻病毒引发的收缩反应异常, 表明所建立的评价模型可用于抗鼻病毒药物的进一步筛选。

关键词: 人鼻病毒; 气管平滑肌; 呼吸道感染; 抗病毒药物筛选

中图分类号: R965.1

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870 (2010) 04-0436-06

Establishment of isolated rabbit airway smooth muscles responsiveness model for the pharmacodynamic study of anti-rhinoviruses drugs

YAN Hui, LIU Yin, LU Xin-qiang, GONG Ze-hui*

(Institute of Pharmacology and Toxicology, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100850, China)

Abstract: Human rhinoviruses (HRVs) are the causative pathogens in more than half of viral upper respiratory tract infections. Currently, no antiviral agents that are active against HRVs are available for clinical use. Because only higher primates are susceptible to HRVs, the screening of new drug is most commonly based on the cell line model. In this study, isolated rabbit airway smooth muscles (ASM) tissue model has been established, and the airway responsiveness with different treatment has been examined. Relative to control tissues, the maximal constrictor (T_{max}) response to ACh increased significantly 150% in ASM inoculated with HRV, and relaxation to isoproterenol has been attenuated to 63%. And the abnormal responsiveness can be inhibited in presence of pretreatment with several new compounds which have been exhibited effective anti-HRV activity on cell lines. The results demonstrate that the established ASM model will be applied to screening the anti-HRVs drugs.

Key words: human rhinovirus; airway smooth muscle; respiratory tract infection; anti-viral drug screening

HRVs 属小核糖核酸病毒, 是引起普通感冒的主要病原体, 自 1956 年用组织培养的方法分离出第 1 株 HRV 后, 至今鉴定 HRVs 已超过 120 个血清型, 是人类病毒中血清型最多的病毒。40%~60% 的普通感冒由 HRVs 引起, 感染 HRVs 后大多数患者为急性起

病, 表现为鼻塞、咽部不适、咳嗽等上呼吸道症状, 可伴有头痛、全身无力、寒战及低热。HRVs 还能导致急、慢性支气管炎以及其他呼吸道感染疾病, 并引发并发症, 如鼻窦炎、中耳炎等。HRVs 的感染还可能加重慢性阻塞性气管疾病、哮喘以及肺纤维化^[1, 2]。

目前尚没有能有效阻止和治疗 HRVs 感染的药物, 因此筛选抗鼻病毒感染药物来有效地预防和治疗鼻病毒感染是非常必要的, 然而, 由于鼻病毒绝大多数亚型只能感染高等灵长类动物, 且症状指标很

收稿日期: 2009-11-02.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30600782).

*通讯作者 Tel: 86-10-66931620, Fax: 86-10-68211656,

E-mail: gongzeh@yahoo.com.cn

难量化, 初期的抗鼻病毒药物多采用细胞水平, 但对于咳嗽、哮喘等呼吸症状的改善情况很难在细胞模型上体现。有资料表明^[3], 离体的气管平滑肌 (ASM) 暴露于致炎细胞因子, 所表现出的组织反应性变化非常接近特征性的“哮喘前”ASM 表型, 对于激动剂引发的收缩反应显著增强而舒张反应明显减弱, 这些证据为建立模拟呼吸症状的筛选平台提供了启示。

材料与方法

动物 成年 New Zealand White 兔购自北京市海淀区兴旺动物养殖场, 合格证号: SCXK (京) 2006-0006。动物饲养于 SPF 级动物房中, 12 h 黑/白交替, 自由摄取食物和水, 在用于试验前确定无呼吸疾病的症状。

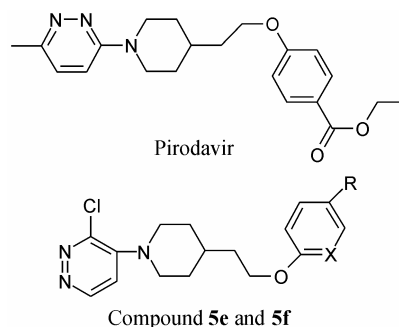
病毒与细胞株 病毒: 人鼻病毒 3 型 (HRV3, ATCC No.: VR-1113), 购自 ATCC (American Type Culture Collection) 病毒库。宿主细胞: HeLa 细胞, 由本所王莉莉教授惠赠。增殖条件: 病毒与细胞于 25 °C 吸附 30 min, 而后细胞 33 °C、5% CO₂ 培养, 每隔 12 h 观察生长状态。收获与悬液制备: 细胞脱落率 > 75% 时收获细胞, 重悬于匀浆缓冲液中。将细胞经过冻融循环 2 次 (-70 °C 与 37 °C), 离心后上清液为病毒悬浮液, 经 3 次传代梯度纯化后, 得到试验用贮液。

试剂与仪器 温育缓冲液为改良的 Krebs-Ringer 溶液 (mmol·L⁻¹): NaCl 125, NaHCO₃ 14, KCl 4, CaCl₂·H₂O 2.25, MgSO₄·H₂O 1.46, NaH₂PO₄·H₂O 1.2, glucose 11, pH 7.35~7.40; 细胞培养液: DME 培养液 (Gibco), 补充以 10% 热灭活胎牛血清 (FBS, Gibco), 2 mmol·L⁻¹ L-谷氨酰胺 (Sigma), 青霉素 1×10⁵ u·mL⁻¹ (华北制药), 及 100 μg·mL⁻¹ 硫酸链霉素 (华北制药); 细胞维持液: 含 2% FBS 的 DMEM 培养液; 乙酰胆碱 (ACh) 和异丙肾上腺素购自 Sigma 公司, 在每次实验前新鲜配制, 溶于生理盐水配制成 0.1 mol·L⁻¹ 母液, 而后以生理盐水逐级稀释。

受试化合物 **5e** 和 **5f** 为白色固体, 纯度 > 95%, 以 DMSO 为溶剂配制成 10 mg·mL⁻¹ 的母液, 试验时以细胞维持液稀释。

张力换能器、离体温育装置、MedLab 8 通道生物信号采集处理系统 (南京美易科技有限公司)。

50% 组织培养感染剂量法 (TCID₅₀) 测定病毒滴度 以维持液配制细胞 (细胞数 1×10⁵/mL), 总体积 20 mL, 96 孔板每孔加 100 μL; 病毒梯度稀释成 1×10⁻¹~1×10⁻¹⁰, 从最高稀释倍数加起, 每孔 100



μL。空白对照液为细胞维持液。33 °C 孵育 72 h, 观察细胞病变率 (CPE)。计算每一稀释度出现病变阳性率 (细胞病变的孔数/总孔数)。如果空白对照中无任何 CPE 且细胞生长良好, 最低稀释度 100% 阳性而最高稀释度 100% 阴性, 则本测试即为有效。对于 100 μL 病毒稀释液, 滴度计算公式为: 滴度 TCID₅₀ = 10^{1+(s-0.5)}} 其中, s 为阳性比率之和。本实验所用病毒贮液 TCID₅₀ 约为 1×10⁶。

气管环的制备 兔子经静脉注射过量戊巴比妥钠 (130 mg·kg⁻¹) 处死, 而后自甲状软骨下至气管分叉处剪下全部气管, 放入盛有温育缓冲液的平皿中, 剥去与其相连的组织 and 上皮细胞, 在气管软骨面纵行剪开气管, 再以 2 个软骨环的间隔将气管横切分成 6~8 mm 宽的条, 每段气管条在其纵切口处用针引线缝上, 成为气管环, 取气管的中部, 每条气管可制成 4~6 个环, 制备过程中持续向缓冲液中通混合气 (95% O₂/5% CO₂)。

ASM 反应测定方法 基本操作参考文献^[4, 5] 进行。气管环纵向悬于支架上, 在信号采集温育槽中 37 °C 水浴。支架上方通过金属线与张力传感器相连, 将张力持续地反映在多通道记录仪上。测定过程中维持曝气, 期间换液 3~4 次, 然后以累积法加入收缩剂与舒张剂, 记录平滑肌收缩松弛曲线。以最大收缩力 T_{max} 为 100%, 绘制收缩比率 (T/T_{max})-浓度曲线, 得到 T_{1/2max} 时所对应的 ACh 浓度的对数值 pD₅₀ (即为 logED₅₀)。彻底冲洗后, 气管在温育槽中平衡 45 min, 而后置于引发 T_{1/2max} 的 ACh 浓度下, 达到平台期后加入舒张剂, 使其累积最终温育浓度达 1×10⁻⁸~1×10⁻³ mol·L⁻¹, 绘制收缩比率 (T/T_{1/2max})-浓度曲线, 得到最大舒张率 R_{max}。

病毒接种及药物保护试验 气管环在含有病毒 (TCID₅₀ 为 1×10⁵/mL) 的细胞维持液中 33 °C 温育 90 min (空白对照为细胞维持液)。之后组织在室温下温育 24 h。组织在整个温育过程中持续通混合气 (95% O₂/5% CO₂)。药物保护试验中, 病毒接种前 1 h 经 100 μg·mL⁻¹ 的药物预处理 (设不加药物的对照组)。此后

比较组织对特定 ASM 收缩剂与舒张激动剂的反应。

统计学处理 实验数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示。组间比较采用 repeated one-way ANOVA 进行分析, Newman-Keuls test 进行后检验。利用 GraphPad Prism 4 软件绘制收缩比率-浓度曲线, 并进行非线性回归。

结果

1 离体气管平滑肌收缩-舒张反应模型的建立

1.1 离体 ASM 反应测试条件的确定 为了能客观量化地体现鼻病毒侵染后气管平滑肌收缩反应的变化, 在操作中对于经典离体 ASM 反应试验进行了改动。

在加入收缩剂前, 气管平滑肌预先被动拉伸达到 8 g 张力。具体操作如图 1 所示, 组织先在水浴中平衡 15 min, 之后使每一气管平滑肌的被动静止张力在组织被动拉伸达到 8 g 张力。而后, 再次调节使张力设置为 2 g, 并归零; 最后再将组织暴露在 $1 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ACh 1 min, 彻底冲洗, 直至张力回复到接近零点左右后归零。这样做的目的是使离体 ASM 组织获取最佳的静止长度, 但需要注意的是, 预先拉伸不能过度, 否则会破坏肌肉细胞。

曝气条件的确定: 在实验的整个过程中都要保持曝气, 使得离体组织有足够的氧气, 但通气量及速度要精确调节, 在实验中使用 5 号注射针头, 速度控制在每秒 3~4 个小气泡, 曝气不足会影响组织活性, 但通过快或气泡过大都会对支架产生冲击, 影响数据稳定性。

气管取材的要求: 在预实验中发现不同气管部位对于激动剂的收缩反应显著不同, 由甲状软骨以下, 每 2 个软骨制成 1 个气管环, 设 1~2 气管环为上部, 3~6 气管环为中部, 7~8 气管环为下部, 给予 $1 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ACh 刺激, 上、中、下部气管环的最大收缩力分别为 (0.65 ± 0.30) 、 (1.38 ± 0.14) 和 $(2.25 \pm 0.98) \text{ g}$ ($n = 4 \sim 6$), 其中上部和下部气管环的收缩力相差显著, 且同一部位气管环间的误差也很大, 不利于实验的平行性与评价指标量化, 因此在后续模型

构建中, 采用的是甲状软骨下第 5~15 软骨间的气管制备离体 ASM。

1.2 离体气管平滑肌收缩性-剂量关系的确定 离体组织获取最适静止长度后, 加入 ACh, 浓度由低至高, 使其最终累积温育浓度达到 $1 \times 10^{-7} \sim 1 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 每一浓度浸浴约 15 min 至张力稳定后才能加入下一浓度。离体 ASM 加入 ACh 后张力变化如图 2A 所示。图中表明在累积加入 ACh 浓度范围在 $1 \times 10^{-7} \sim 1 \times 10^{-5.7} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, ASM 的等距收缩力变化不明显, 累积加入 ACh 最大浓度为 $1 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 此时的 ASM 等距收缩力为最大收缩力。

绘制 $T/T_{\max} - \log[\text{浓度}]$ 曲线, 如图 2B 所示。测定计算得到离体的健康兔气管平滑肌 $T_{\max} = (2.66 \pm 0.25) \text{ g}$, 对曲线进行非线性回归, 求得 $T_{1/2\max}$ 所对应的 ACh $\text{pD}_{50} = (-4.68 \pm 0.07) \log[\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}]$, 取近似值 $1 \times 10^{-4.7} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 作为舒张性测试引发 ASM 收缩 $T_{1/2\max}$ 时加入 ACh 的浓度。

气管经彻底冲洗并充分平衡后, 加入浓度为 $1 \times 10^{-4.7} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 ACh, 达到平台期后加入舒张剂异丙肾上腺素, 使其累积最终温育浓度达 $1 \times 10^{-8} \sim 1 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 绘制 $(T/T_{1/2\max}) - \text{浓度}$ 曲线, 如图 3 所示。

累积加入异丙肾上腺素最大浓度为 $1 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 此时 ASM 表现出最大舒张性 $R_{\max} = (43.9 \pm 16.1) \%$, 对曲线进行非线性回归, 求得 50% $R_{\max}$ 时对应的 $\text{pD}_{50}' = (-8.61 \pm 0.58) \log[\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}]$ 。

经过对多只健康兔离体 ASM 收缩反应性进行测试, 得到了代表性的离体 ASM 收缩及舒张性反应曲线, 表明该模型已初步建立, 可用于进一步的鼻病毒致敏及药物保护试验。

2 离体气管平滑肌模型在抗鼻病毒药物筛选中的应用

筛选评价的受试化合物 5e 及 5f 为本所合成, 是以作用于鼻病毒衣壳蛋白的抑制剂 pirodavir 为先导化合物合成的系列新化合物, 已在细胞模型上经过多轮筛选^[6], 图 4 可见细胞在接种病毒 60 h 后出现大

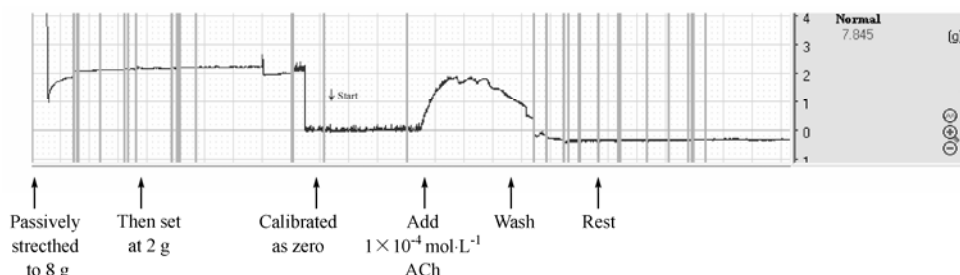


Figure 1 Determination of optimal resting length for each segment

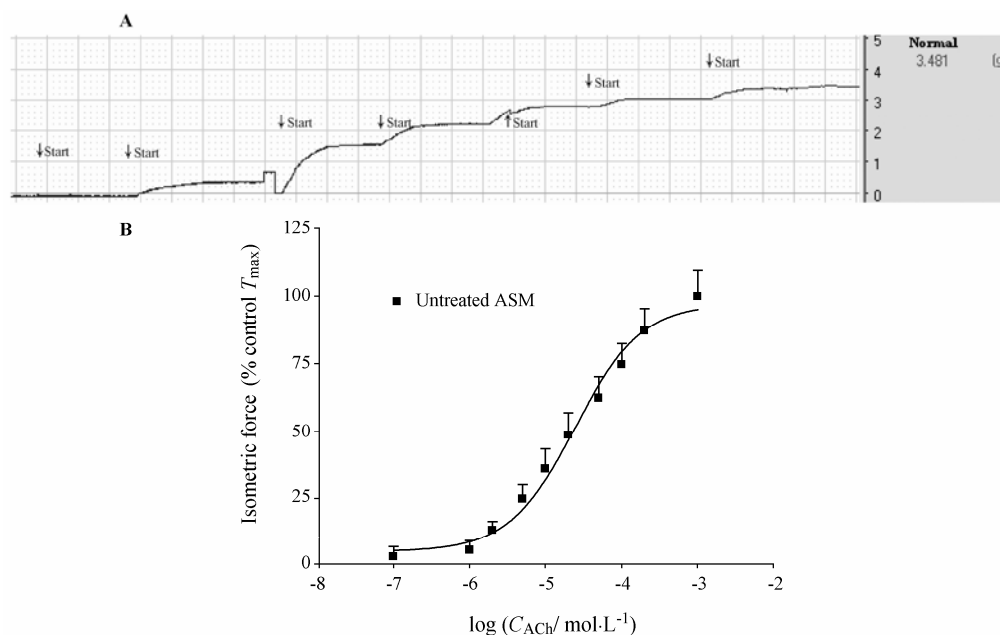


Figure 2 Establishment of isolated ASM constrictor responsiveness model. A: Real-time dose-isometric force curve recorded by MedLab. B: Constrictor dose-response relationships to ACh in untreated rabbit ASM. Data are expressed as $\bar{x} \pm s$ from 9 separate experiments

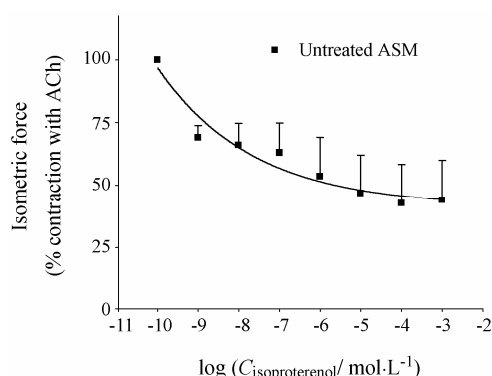


Figure 3 Establishment of isolated ASM relaxation responsiveness model. Relaxation dose-response relationships to isoproterenol in untreated rabbit ASM were determined. Data are expressed as $\bar{x} \pm s$ from 6 separate experiments

面积脱落、膜破裂等细胞病变效应 (CPE), 而化合物在 $100 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 浓度下对细胞有很好的保护作用。

在经过细胞模型药效学筛选的基础上, 利用已建立的离体 ASM 模型, 对这些化合物的抗病毒药效进行进一步评价。在预试验中, 选择相同部位的气管环进行了化合物对气管环收缩力影响测试 (给予 $1 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ACh 刺激), 单独加入浓度为 $100 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 **5e**、**5f** 及 pirodavis, 其 ASM 最大收缩力 ($T_{\max}$) 分别为 (2.4 ± 0.7) 、 (2.2 ± 0.4) 和 $(2.4 \pm 0.4) \text{ g}$ 与空白对照 $(2.6 \pm 0.3) \text{ g}$ 相比无显著差异, 与 HRV3 预处理组 $(4.4 \pm 0.8) \text{ g}$ 相比有显著差异 ($P < 0.01$, $\bar{x} \pm s$, $n = 2 \sim 3$)。

在此基础上, 利用已建立的离体 ASM 模型, 进行病毒接种及药物预保护试验, 结果见图 5 和图 6。在 ACh 最大浓度为 $1 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 暴露于 HRV3 的 ASM 收缩性显著增强, 其最大收缩力 $T_{\max}$ 为 $(3.41 \pm 0.35) \text{ g}$, pD_{50} 为 $(-5.22 \pm 0.13) \log [\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}]$, 而 **5e** 保护组可以显著抑制这种病毒引发的收缩性上升, 其 $T_{\max}$ 及 pD_{50} 分别为 $(2.11 \pm 0.19) \text{ g}$ 和 $(-4.62 \pm 0.17) \log [\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}]$, 与 HRV3 致敏组相比有非常显著的差异 ($P < 0.001$)。阳性对照药 pirodavis 预保护组的 $T_{\max}$ 及 pD_{50} 分别为 $(2.69 \pm 0.41) \text{ g}$ 和 $(-5.07 \pm 0.16) \log [\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}]$, **5f** 保护组的 $T_{\max}$ 及 pD_{50} 分别为 $(2.50 \pm 0.25) \text{ g}$ 和 $(-4.97 \pm 0.21) \log [\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}]$, 与 HRV3 致敏组相比有显著差异 ($P < 0.05$)。

在异丙肾上腺素最大浓度为 $1 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 暴露于 HRV3 的 ASM 最大舒张率 $R_{\max}$ 为 $(62.8 \pm 14.6) \%$, pD_{50}' 为 $(-6.78 \pm 0.74) \log [\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}]$, 与空白对照组相比, 其舒张性显著减弱 ($P < 0.01$); 而预先给予化合物保护的各组, 其中 **5e** 和 **5f** 可以显著抑制这种病毒引发的反应性下降, **5e** 预保护组的 $R_{\max}$ 及 pD_{50}' 分别为 $(40.4 \pm 12.8) \%$ 和 $(-8.75 \pm 0.52) \log [\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}]$, **5f** 预保护组的 $R_{\max}$ 及 pD_{50}' 分别为 $(15.6 \pm 8.0) \%$ 和 $(-7.72 \pm 0.74) \log [\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}]$, 与 HRV3 处理组相比均有显著差异 ($P < 0.01$); 而 pirodavis 预保护组的结果显示 pirodavis 对病毒引发的舒张反应下降无明显改善作用, 其 $R_{\max}$ 及 pD_{50}' 分别为 $(66.4 \pm 10.1) \%$

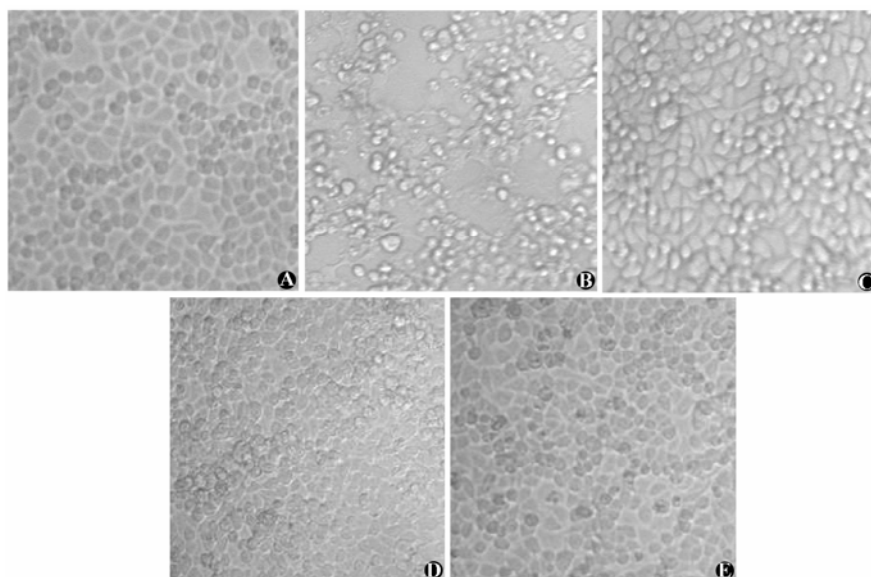


Figure 4 Cytoprotective effects of several compounds on infected-host cell. HeLa cells were infected with HRV3 (TCID₅₀ 100 per cell) in the absence or presence of different compounds (100 ng·mL⁻¹). Cells were examined by light microscopy (40×) after infection for 60 h. The figure showed that pretreated with compounds inhibited HRV3-induced cytopathic effect (CPE). A: Blank; B: HRV3-TCID₅₀ 100; C: Pirodavis+HRV3; D: 5e + HRV3; E: 5f + HRV3

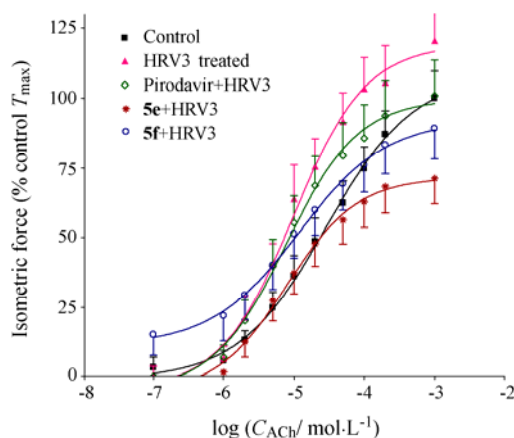


Figure 5 Constrictor dose-response relationships to ACh comparison of constrictor dose-response relationships to ACh in control and HRV3-treated ASM in the absence or presence of compound. Data are $\bar{x} \pm s$ from 7–9 separate experiments. Both the maximal constrictor and pD₅₀ values to ACh are significantly enhanced ($P < 0.001$ vs control) in tissues exposed to HRV3, and these effects of HRV are inhibited in the presence of compounds ($P < 0.001$ vs 5e, $P < 0.05$ vs pirodavis and 5f)

和 $(-7.07 \pm 0.48) \log [\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}]$, 与 HRV3 处理组相比无显著差异。

讨论

越来越多的临床证据表明病毒性上呼吸道感染可导致哮喘加剧, 超过 50% 的原发性呼吸道感染是由鼻病毒引起的, 另外非哮喘患者感染鼻病毒也会出现一过性气管超敏。HRV 诱发的气管超敏推断其

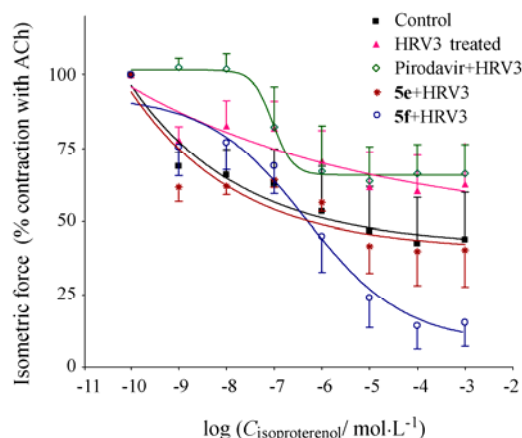


Figure 6 Relaxation response curves to isoproterenol. Comparison of relaxation response curves to isoproterenol in control and HRV3-treated ASM in the absence and presence of compound. Data are $\bar{x} \pm s$ from 6–7 separate experiments. Both the maximal constrictor and pD₅₀ values to isoproterenol are significantly attenuated in HRV3-exposed ASM ($P < 0.01$ vs control), and these effects of HRV are largely inhibited in the presence of compounds ($P < 0.01$ vs HRV-treated group)

可能是通过产生促炎性因子而引发的, 但这一过程是如何导致气管高反应性以及气管堵塞的, 其确切机制尚不明确。在药物筛选过程中, 利用细胞模型无法对呼吸症状进行针对性评价, 而多数鼻病毒血清亚型对啮齿类、兔、狗等常规模型动物不具感染性, 利用高级动物造模成本较高, 且多为定性评价, 因此在细胞评价模型基础上, 利用气管平滑肌的收缩舒张功能变化, 开发离体器官水平上可模拟呼吸功能

的药效评价模型, 对抗鼻病毒药物筛选具有重要应用意义^[7, 8]。

本研究建立了兔离体气管平滑肌收缩反应模型, 利用中部气管制备气管环, 建模并对剂量对数值-等距收缩力关系进行非线性回归, 拟合度良好。利用自建模型进行了鼻病毒接种, 与空白对照组相比, 接种病毒组的 ASM 对于 ACh 收缩反应性显著增强, 其中平均最大收缩力为空白对照组的 150%, 对于舒张剂的舒张反应性显著降低, 平均最大舒张率仅在 63% 左右, 这些结果表明在病毒悬液中温育后的 ASM 所表现出的特征与病毒性呼吸道感染十分相似, 进一步确定该模型可作为抗鼻病毒药物筛选模型。

药物保护评价试验中的化合物为靶向性设计, 是针对鼻病毒衣壳蛋白合成的抑制剂, 通过抑制病毒的脱壳和病毒黏附来阻断病毒的感染, 通过阻止病毒继续与宿主细胞结合, 从而达到治疗作用, 这一机制已经多轮细胞模型筛选得以验证。离体模型上的测试结果表明, 预先加入化合物可以不同程度地抑制鼻病毒接种引发的 ASM 收缩反应性异常, 其中化合物 **5e** 的表现尤其突出, 可以显著抑制鼻病毒侵染导致的 ASM 收缩反应增强而舒张反应减弱, 这些结果不仅是对细胞筛选模型的重要补充与有效验证, 也实现了对化合物预防鼻病毒引发的呼吸症状的定量评价, 表明该评价模型在抗鼻病毒药物筛选中具有很好的应用前景, 并为化合物作用机制研究提供良好的技术平台。

References

- [1] Leigh R, Oyelusi W, Wiehler S, et al. Human rhinovirus infection enhances airway epithelial cell production of growth factors involved in airway [J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2008, 112: 1238–1245.
- [2] Friedlander SL, Busse WW. The role of rhinovirus in asthma exacerbations [J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2005, 116: 267–273.
- [3] Howarth PH, Knox AJ, Amrani Y, et al. Synthetic responses in airway smooth muscle [J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2004, 114: S32–50.
- [4] Hakonarson H, Carter C, Maskeri N, et al. Rhinovirus-mediated changes in airway smooth muscle responsiveness: induced autocrine role of interleukin-1 β [J]. *Am J Physiol*, 1999, 277: L13–L21.
- [5] Tanaka DT, Grunstein MM. Maturation of neuromodulatory effect of substance P in rabbit airways [J]. *J Clin Invest*, 1990, 85: 345–350.
- [6] Fan SY, Zheng ZB, Mi CL, et al. Synthesis and evaluation of novel chloropyridazine derivatives as potent human rhinovirus (HRV) capsid-binding inhibitors [J]. *Bioorg Med Chem*, 2009, 17: 621–624.
- [7] Anzueto A, Niederman MS. Diagnosis and treatment of rhinovirus respiratory infections [J]. *Chest*, 2003, 123: 1664–1672.
- [8] Sarah S, Long MD. Respiratory pathogens in children with and without respiratory symptoms [J]. *J Pediatr*, 2009, 154: 396–400.

Preparation of anti-salbutamol antibody based on a new designed immunogen and development of a heterologous indirect ELISA for detection of salbutamol residue

MENG Meng¹, ZHANG Yu-lan², LU Sheng-xin², LIU Jin-ting², ZHAN Jin-hua², XI Ri-mo^{1*}

(1. The College of Pharmacy, Nankai University, Tianjin 300071, China;

2. The School of Chemistry and Chemical Engineering, Shandong University, Jinan 250100, China)

Abstract: To synthesize salbutamol immunogen and develop an enzyme immunoassay (ELISA), a new salbutamol immunogen was synthesized using 4-aminobenzoic acid as a linker to connect hapten with carrier protein. An enzyme immunoassay based on the antibody prepared was developed and applied to detect salbutamol residue spiked in swine liver. An unusual coating antigen, clenbuterol-ovalbumin (OVA) conjugate instead of salbutamol-OVA conjugate, was used in the immunoassay and the results were discussed based on the structures of related compounds. The antibodies showed high sensitivity in the heterologous assay when using clenbuterol-OVA as a coating antigen, with an IC_{50} value of $8.97 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ toward salbutamol. The antibodies prepared showed high cross-reactivity with clenbuterol (107%) and were promising for the simultaneous determination of salbutamol and clenbuterol residues in food and food products. Recovery rates from the salbutamol-spiked swine liver samples were in the range of 70%–99%, while the intra-assay and inter-assay coefficients of variation were <13.3% and <14.3%, respectively. In summary, the antibodies of salbutamol have been successfully prepared. Sensitive and stable analysis for the detection of salbutamol residues in swine liver was obtained based on the competitive ELISA methods developed in this study.

Key words: immunoassay; drug residue; salbutamol; ELISA; β -agonist

CLC number: R967

Document code: A

Article ID: 0513-4870 (2010) 04-0442-09

以新型沙丁胺醇抗原为基础建立 ELISA 法测定沙丁胺醇残留量

孟 萌¹, 张玉兰², 卢圣欣², 刘金庭², 占金华², 郝日沫^{1*}

(1. 南开大学药学院, 天津 300071; 2. 山东大学化学与化工学院, 山东 济南 250100)

摘要: 合成了一种新型沙丁胺醇抗原, 并以此建立酶联免疫分析法 (ELISA)。利用 4-氨基苯甲酸作为偶联剂使沙丁胺醇与载体蛋白连接得到免疫抗原, 免疫家兔得到沙丁胺醇多克隆抗体。以克伦特罗-卵蛋白代替包被抗原所建立的 ELISA 法对沙丁胺醇的半数抑制浓度 (IC_{50}) 为 $8.97 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$, 该抗体检测克伦特罗时有较强的交叉反应 (107%), 有望同时测定食物中的克伦特罗和沙丁胺醇残留。用该法测定猪肝中的沙丁胺醇加标量, 回收率在 70%~99%, 批内差<13.3%, 批间差<14.3%。利用该法可快速、灵敏地检测沙丁胺醇的药残量, 为最终开发商品化的酶联免疫试剂盒打下良好的基础。

关键词: 免疫分析; 药物残留; 沙丁胺醇; ELISA; β -激动剂

Received 2009-11-05.

Project supported by National Natural Science Foundation of China (No. 20675048); National High-Tech Research and Development Program of China (863 Program, No. 07AA10Z435, No. 2007AA06A407); National Basic Research Program of China (973 Program, No. 2007CB936602).

*Corresponding author Tel: 86-22-23499986, Fax: 86-24-23507760, E-mail: xirimo2000@yahoo.com