

DOI: 10.3724/SP.J.1096.2010.01206

中药致肾毒性成分马兜铃酸 A 单抗制备及酶联免疫分析方法的建立

南铁贵¹ 何素平¹ 谭桂玉¹ 李刚² 王保民^{* 1} 黄璐琦^{* 3}

¹(中国农业大学农学与生物技术学院, 北京 100193)

²(吉林省农业科学院 农业环境与资源研究中心, 长春 130033)

³(中国中医科学院中药研究所, 北京 100700)

摘 要 采用活化酯法, 将马兜铃酸 A 分别与牛血清蛋白 (BSA) 和卵清蛋白 (OVA) 偶联, 得到免疫抗原马兜铃酸 A-BSA 和包被抗原马兜铃酸 A-OVA。利用马兜铃酸 A-BSA 免疫 Balb/c 小鼠, 制得鼠单克隆抗体 1A11, 单抗效价为 2×10^4 ; 单抗为 IgG1 类, 轻链为 κ 型; 与其结构类似物马兜铃酸 B、C 和 D 的交叉反应率分别为 2.8%、3.5% 和 31.2%。基于抗马兜铃酸 A 单克隆抗体的间接竞争酶联免疫分析方法 (iELISA) 的 IC_{50} 为 $1.9 \mu\text{g/L}$, 检测范围为 $0.5 \sim 7.5 \mu\text{g/L}$ 。iELISA 添加回收率为 86% ~ 97%, 相对标准偏差在 5.2% ~ 11.1% 之间。利用所建立的 iELISA 测定了 6 个中药材和 5 个中成药中马兜铃酸 A 的含量, 并用高效液相色谱法 (HPLC) 进行了验证, 其中关木通、广防己、天仙藤、马兜铃和青木香中均检测出马兜铃酸 A, 而川木通和 5 个中成药中未检测到马兜铃酸 A。结果表明: 本方法可用于中药中马兜铃酸 A 的快速检测。

关键词 马兜铃酸 A; 单克隆抗体; 中药; 酶联免疫分析法

1 引 言

马兜铃酸类化合物是马兜铃科马兜铃属植物特有的一类硝基菲类化合物, 包括马兜铃酸 A、B、C 和 D 等^[1]。近年来, 马兜铃酸的肾毒性已引起广泛关注, 各国纷纷对含马兜铃酸的中药采取管制及限制措施^[2~5]。研究表明, 马兜铃酸类化合物的毒性主要由马兜铃酸 A 或其代谢物马兜铃内酰胺所致^[6,7]。因此, 在检测马兜铃酸时, 常选择马兜铃酸 A 为指标性成分。马兜铃科药用植物在我国广泛使用。由于马兜铃科植物许多名称混淆, 为确保临床用药的安全有效, 对于疑含有马兜铃酸类物质的药用植物及制剂必须进行严格检测, 制订限量用药标准。目前, 检测马兜铃酸的方法主要有薄层色谱法^[8]、紫外分光光度法^[9]、高效液相色谱法^[10]及酶联免疫分析法^[11]等。薄层色谱法和紫外分光光度法灵敏度较低; 高效液相色谱法 (HPLC) 灵敏度较高、测定准确, 是目前测定马兜铃酸最常用的方法, 但仪器设备昂贵, 对实验人员专业技能要求高。酶联免疫分析法具有灵敏、准确、前处理简单、适合大通量筛选等优点, 在医学诊断、食品安全检测、环境污染物监测等领域已得到广泛应用^[12,13]。Yu 等^[11]利用 EDC/NHS 将马兜铃混合酸 (A/B) 与 OVA 偶联, 制备了抗马兜铃酸兔多克隆抗体, 但该抗体的灵敏度较差; Tian 等^[14]将马兜铃酸 B 与 BSA 偶联, 制备得到抗马兜铃酸 B 的单克隆抗体, 该抗体具有较好的特异性, 但灵敏度较差。本研究制备了马兜铃酸 A 的单克隆抗体, 建立了马兜铃酸 A 的酶免疫分析技术。

2 实验部分

2.1 仪器、试剂与材料

Wellwash 4 MK 自动洗板机, Multiskan MK3 酶标仪 (芬兰 Thermo 公司); 高效液相色谱仪 (美国 Waters 公司), 包括 Waters 600E 溶剂传输系统和 Waters 2487 吸收检测器; Centrifuge 5810 R 离心机 (德国 Eppendorf 公司); 96 孔酶标板 (美国 Costar 公司)。

马兜铃酸 A、B (中国药品生物制品检定所); 马兜铃酸 C、D (美国 ChromaDex 公司); 辣根过氧化物

2009-11-10 收稿; 2010-02-07 接受

* E-mail: wbaomir@263.net

酶标记羊抗鼠 IgG (IgG-HRP)、牛血清蛋白 (BSA)、卵清蛋白 (OVA)、*N,N'*-二环己基碳化二亚胺 (DCC)、*N* 羟基丁二酰亚胺 (NHS)、弗氏完全佐剂、弗氏不完全佐剂、邻苯二胺 (OPD)、二甲基亚砷 (DMSO) 和三氟乙酸 (TFA) 均购自美国 Sigma 公司; 甲醇、乙腈 (色谱纯, 美国 Fisher Scientific 公司); 鼠抗体亚型 ELISA 鉴定试剂盒 (美国 Pierce 公司), 其它化学试剂均为分析纯 (北京化学试剂公司)。

包被缓冲液: 0.05 mol/L 碳酸盐缓冲液 (pH 9.6); PBS 含 0.9% NaCl 的 0.1 mol/L 磷酸盐缓冲液 (pH 7.5); PBST 含有 0.1% (V/V) 吐温-20 的 PBS; PBSTG: 含有 0.5% (w/V) 明胶的 PBST; 柠檬酸盐-磷酸盐缓冲液: 含 0.01 mol/L 柠檬酸三钠和 0.03 mol/L Na_2HPO_4 (pH 5.5); 底物缓冲液: 在 10 mL 含 2 g/L OPD 的柠檬酸盐-磷酸盐缓冲液中加入 4 μL 30% H_2O_2 ; 终止液: 2 mol/L H_2SO_4 。

Balb/c 雌性小鼠 (6~7 周龄, 军事医学科学院); SP 2/0 骨髓瘤细胞 (中国兽药监察所)。

2.2 实验方法

2.2.1 马兜铃酸 A 免疫抗原和包被抗原的制备 称取 2.0 mg 马兜铃酸 A, 溶于 0.4 mL DMSO, 分别加入 100 μL DCC (2.1 mg DCC 溶解于 100 μL DMSO) 和 50 μL NHS (1.0 mg NHS 溶解于 50 μL DMSO), 室温下搅拌反应 1.5 h, 以 4000 r/min 离心 5 min, 取上清液。将上清液逐滴加入到蛋白溶液 (20 mg BSA 或 OVA 溶解于 2.0 mL 0.13 mol/L NaHCO_3 溶液) 中, 室温下反应 2 h。反应产物用 0.01 mol/L PBS 透析 3 d, 冷冻干燥, -20 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

2.2.2 Balb/c 雌性小鼠免疫 以 0.01 mol/L PBS 将马兜铃酸 A 免疫抗原稀释成 1.0 g/L, 初次免疫用完全弗氏佐剂与等体积的免疫原混合, 充分乳化, 免疫 5 只小鼠, 每只小鼠免疫剂量为 200 μL 。加强免疫用不完全弗氏佐剂乳化。免疫部位为腹腔或背部皮下。经过 5 次免疫后, 对小鼠血清进行检测。

2.2.3 血清效价测定 小鼠经过第 5 次免疫后第 6 d 用毛细玻璃管从眼眶取少量血液, 室温静置 1 h, 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜, 4000 r/min 离心 10 min, 收集血清, 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。血清效价的测定采用 iELISA 方法^[15]。效价定义为吸光值 (A) 为 1.0 时的抗血清最大稀释倍数。

2.2.4 单克隆抗体的制备与抗体纯化 取效价和特异性都较好的一只小鼠进行加强免疫, 免疫原溶于 0.01 mol/L PBS 进行腹腔免疫, 4 d 后取脾细胞与 SP 2/0 骨髓瘤细胞进行细胞融合, 经过筛选、克隆得到能稳定分泌抗体的杂交瘤细胞株, 并制备腹水。腹水室温静置 1 h, 4 $^{\circ}\text{C}$ 静置过夜, 以 3000 r/min 离心 10 min, 弃脂肪层和细胞层, 收集中间澄清层采用饱和硫酸铵法^[16] 对抗体进行纯化, 蒸馏水透析后冻干, -40 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存。

2.2.5 马兜铃酸提取^[17] 川木通、广防己、天仙藤、青木香、关木通和马兜铃磨成细粉, 过 60 目筛 (0.30 mm 孔径), 各称 0.5 g 中成药双香排石颗粒、龙胆泻肝丸等各称 1.0 g 于试管中; 以 5 mL 甲醇浸提, 超声 15 min, 以 4000 r/min 离心 10 min, 取上清液; 甲醇重复提取一次, 合并两次所得溶液, 氮气吹干; 以 2.0 mL 无水甲醇 (HPLC 分析) 或 0.01 mol/L PBS (ELISA 分析) 溶解残余物, 即得马兜铃酸提取液。测定前经 0.45 μm 滤膜过滤。

2.2.6 iELISA 法^[15] 测定马兜铃酸含量 (1) 包被 包被缓冲液将包被抗原稀释成 0.5 mg/L, 加入到酶标板中, 每孔 200 μL , 37 $^{\circ}\text{C}$ 温育 3 h, PBST 洗板 4 次; (2) 封闭 每孔加入 200 μL 封闭液, 37 $^{\circ}\text{C}$ 温育 30 min, 用洗板机洗板 4 次; (3) 竞争 将标准样品和待测样品用 PBSTG 稀释成不同浓度, 加入到酶标板中, 每孔 100 μL , 同时每孔加入 100 μL PBSTG 稀释的抗体, 37 $^{\circ}\text{C}$ 温育 30 min, 用洗板机洗板 4 次; (4) 加酶标二抗 用 PBSTG 稀释羊抗鼠 IgG-HRP, 每孔加入 200 μL , 温育 30 min, 用洗板机洗板 4 次; (5) 显色 每孔加入 200 μL 底物溶液显色; (6) 终止反应 一定时间后每孔加入 100 μL 终止液终止反应, 在 492 nm 下测定吸光值。

2.2.7 HPLC 法^[18] 测定马兜铃酸含量 HPLC 测定条件: C_{18} 反相柱 (250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μm); 柱温为 25 $^{\circ}\text{C}$; 流动相: 水-乙腈 (40:60 V/V), 含 0.1% (V/V) 三氟乙酸; 流速 1 mL/min; 上样体积为 20 μL ; 检测波长为 390 nm。

3 结果与讨论

3.1 单克隆抗体的制备

融合前 4 d 对小鼠血清进行效价与抑制率检测。选取效价高 (>8000)、抑制好的小鼠进行加强免

疫。取加强免疫后的小鼠脾细胞与 SP 2/0 骨髓瘤细胞进行融合,融合率约为 86%。iELISA 法检测细胞上清液,选择吸光值大于 1.0 的阳性孔再进行抗马兜铃酸 A 抗体特异性检测,选择抑制率高的孔用有限稀释法进行多次克隆,筛选到一株效价与特异性均较好的单克隆细胞株,命名为 1A11。将该细胞株扩大培养,制备腹水并用饱和硫酸铵法纯化抗体。

3 2 单克隆抗体的性质鉴定

3 2 1 单克隆抗体效价检测 iELISA 法检测抗马兜铃酸 A 单克隆抗体 1A11 的效价,以未免疫的小鼠血清作为阴性对照,如图 1 抗马兜铃酸 A 单克隆抗体 1A11 的效价约为 2×10^4 。

3 2 2 单克隆抗体特异性检测 iELISA 法检测抗马兜铃酸 A 单克隆抗体 1A11 的特异性,抗马兜铃酸 A 单克隆抗体 1A11 与马兜铃酸类物马兜铃酸 B、C 和 D (图 2) 反应,交叉反应率分别为 2.8%、3.5% 和 31.2%。

3 2 3 单克隆抗体类型检测 利用 Pierce 公司的单抗类型检测试剂盒对抗马兜铃酸 A 单克隆抗体 1A11 类型进行检测(表 1)。结果表明:1A11 与 IgG1 类和 κ 的吸光值分别是 1.210 和 1.023,其它类型的 IgG, IgA, IgM 和 λ 几乎没有反应。因此,抗马兜铃酸 A 单克隆抗体 1A11 为 IgG1 类,轻链为 κ 型。

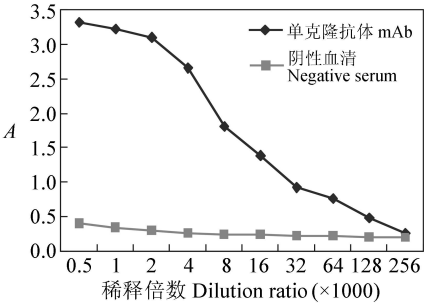


图 1 抗马兜铃酸 A 单抗 1A11 效价检测
Fig 1 Titer of monoclonal antibody (mAb) 1A11 against aristolochic acid A determined in ELISA

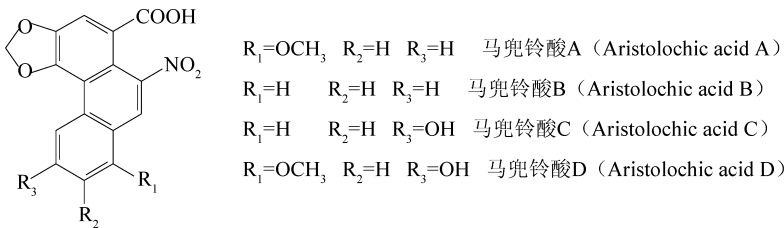


图 2 马兜铃酸 A 及其类似物结构式
Fig 2 Structures of aristolochic acid A and its analogs

表 1 马兜铃酸 A 单抗 1A11 类型检测
Table 1 Isotype of mAb 1A11 against aristolochic acid A

	抗体类型 Isotype of mAb						轻链类型 Isotype of Light chain	
	IgG1	IgG2a	IgG2b	IgG3	IgA	IgM	κ	λ
吸光值 Absorbance	1.210	0.090	0.0745	0.092	0.073	0.117	1.023	0.108

3 3 ELISA 工作曲线

棋盘格实验筛选最佳包被抗原、抗体的工作浓度。确定马兜铃酸 A 的 iELISA 法工作条件为:包被抗原浓度 0.5 mg/L, 抗体浓度 0.5 mg/L, 羊抗鼠 IgG-HRP 1.0 mg/L。建立标准曲线如图 3 (B_0 和 B 分别为空白孔和抑制孔的吸光值), iELISA 的 IC_{50} 为 1.9 μ g/L, 检测范围为 0.5~7.5 μ g/L (抑制率 20%~80%)。

3 4 添加回收实验

川木通不含马兜铃酸类物质,向其中加入马兜铃酸 A,测定方法的添加回收率。添加浓度依次为 10.5、0.25、1.0、0.5 和 0.25 μ g/g 以不添加马兜铃酸 A 的川木通样品为阴性对照,结果如表 2。添加回收率为 86%~97%;相对标准偏差在 5.2%~11.1% 之间。

表 2 马兜铃酸 A 的添加回收率
Table 2 Recovery of aristolochic acid A spiked to caulis clematidis and ii samples by iELISA

添加浓度 Added (μ g/g)	回收率 Recovery (% , n= 3)	RSD (% , n= 3)
0.25	90	11.1
0.5	89	9.0
1.0	91	5.5
2.5	86	7.0
5.0	97	5.2
10.0	95	7.4

3 5 含马兜铃酸中药样品测定

利用所建立的测定马兜铃酸 A 的 icELISA 方法, 测定 6 种中药材 (表 3) 和 5 种中成药中马兜铃酸 A 的含量。结果表明, 川木通不含马兜铃酸 A; 双香排石颗粒、龙胆泻肝丸、跌打丸、连翘败毒丸和止嗽青果丸等 5 种中成药均未检测到马兜铃酸 A; 关木通、广防己中含量很低; 天仙藤、马兜铃和青木香中含量较高, 但是 ELISA 测得的马兜铃酸 A 的含量大于 HPLC, 这与抗马兜铃酸 A 单克隆抗体 1A11 与马兜铃酸 B、C 和 D 的交叉反应有关, 其他研究者也得到类似的结果^[11]。由于其它马兜铃酸类化合物同样具有毒性, 本测定结果对药品安全监督具有现实意义。

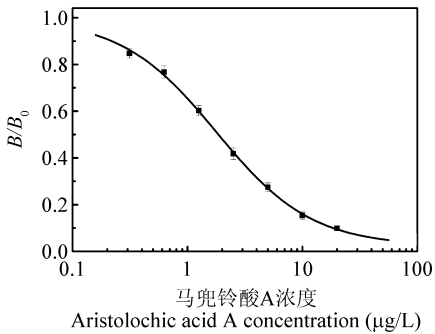


图 3 马兜铃酸 A 的 icELISA 标准曲线
Fig. 3 Standard inhibition curve of aristobchic acid A in icELISA format

表 3 icELISA 和 HPLC 测定中药材和中成药马兜铃酸 A 含量
Table 3 icELISA and HPLC analysis of aristobchic acid A in herbal medicines

		样品 Sample	icELISA (µg/g)	HPLC (µg/g)
中药材 Chinese Herb medicine		川木通 Caulis Clematidis Amurii	未检出 No detection	未检出 No detection
		关木通 Manchurian Dutchman's pipe Stem	3.5 ± 0.3	2.9 ± 0.1
		天仙藤 Herba Aristolochiae	109 ± 4	67 ± 2
		马兜铃 Fructus Aristolochiae	740 ± 32	482 ± 7
		广防己 Aristolochia Fangchi	4.9 ± 0.2	3.1 ± 0.1
		青木香 Dutchman's pipe Root	1880 ± 55	1284 ± 19

References

1 ZHU De-Qiu(祝德秋), SHEN Jir-Fang(沈金芳). *China Pharmacy*(中国药房), **2005**, 16(2): 149~150

2 Vanheerweghem JL, Tielemans C, Abramowicz D, Depierreux M, Vanhaeleir-Fastre R, Vanhaelen M, Dratwa M, Richard C, Vandervelde D, Verbeelen D, Jadou IM. *Lancet*, **1993**, 341(8842): 387~391

3 Reginster F, Jadou IM, van Ypersele de Strihou C. *Nephrol Dial Transplant*, **1997**, 12(1): 81~86

4 Ono T, Eri M, Honda G, Kuwahara T. *Lancet*, **1998**, 351(9107): 991~992

5 Cosyns J P, Jadou IM, Squifflet J P, Wese F X, van Ypersele de Strihou C. *Am. J. Kidney Dis*, **1999**, 33(6): 1011~1017

6 RAO Xing-Rong(饶向荣), LI Shen(李深), LI Xi-Ying(李秀英), YAO Nai-Li(姚乃礼). *Chinese Journal of Information on Traditional Chinese Medicine*(中国中医药信息杂志), **2001**, 8(2): 82~86

7 LI Ying(李瑛). *Chinese Journal of Nephrology, Dialysis & Transplantation*(肾脏病与透析肾移植杂志), **2003**, 12(6): 558~563

8 CHANG Chao-Xia(常朝霞), NEI Gu-Hua(聂贵华), CHEN Hui-Qiang(陈汇强), ZHAO Xi-Ying(赵新英), MEI Hong-Yong(梅洪勇), SUN Bao-Ming(孙保明). *Chinese Traditional Patent Medicine*(中成药), **2000**, 22(3): 229~230

9 SHANG Ming-Ying(尚明英), LI Jun(李军), HU Bo(胡波), YANG Shan(杨珊), LI Chang-Ling(李长龄), ZHENG Jun-Hua(郑俊华). *Chinese Traditional And Herbal Drugs*(中草药), **2000**, 31(12): 899~900

10 Zhang C, Wang X, Shang M, Yu J, Xu Y, Li Z, Lei L, Li X, Cai S, Namba T. *Biomol. Chromatogr*, **2006**, 20(4): 309~318

11 Yu F Y, Lin Y H, Su C C. *J. Agric. Food Chem.*, **2006**, 54(7): 2496~2501

12 HAN Dan(韩丹), YU Meng(于梦), WU Mei(吴梅), DENG An-Ping(邓安平). *Chinese J. Anal. Chem.*(分析化学), **2007**, 35(8): 1168~1170

13 LI Bo(李波), SHI Hai-Yan(施海燕), WANG Ming-Hua(王鸣华). *Chinese J. Anal. Chem.*(分析化学), **2008**, 36(1): 34~38

- 14 Tian M, Tanaka H, Shang M Y, Karashina S, Chao Z, Wang X, Cai S Q, Shoyama Y. *Am. J. Chin. Med.*, **2003**, 31(2): 163~169
- 15 Zhao J Li G, Wang B M, Liu W, Nan T G, Zhai Z X, Li Z H, Li Q X. *Anal. Bioanal. Chem.*, **2006**, 386(6): 1735~1740
- 16 ZHU LiPing(朱立平), CHEN XueQing(陈学清). *Immunological Laboratory Methods*(免疫学常用实验方法). Beijing (北京): People's Military Medical Press(人民军医出版社), **2000**: 52~55
- 17 Yuan J Nie L, Zeng D, Luo X B, Tang F, Ding L, Liu Q, Guo M L, Yao S Z. *Talanta*, **2007**, 73(4): 644~650
- 18 Flurer R A, Jones M B, Vekic N, Ciolino L A, Woznick K A. *Determination of Aristolochic Acid in Traditional Chinese Medicines and Dietary Supplements* marked DRAFT, No. 4212. U. S. Food and Drug Administration, Forensic Chemistry Center, Cincinnati, OH.

Development of Sensitive Monoclonal Antibody-based Enzyme-linked Immunosorbent Assay for Renal Toxicity Ingredient Aristolochic acid A in Chinese Herb Medicine

NAN Tie-Gui¹, HE Su-Ping¹, TAN Gui-Yu¹, LI Gang²,

WANG Bao-Min¹, HUANG Lu-Qi³

¹(College of Agronomy and Biotechnology, China Agricultural University, Beijing 100193)

²(Agricultural Environment and Resources Research Center, Jilin Academy of Agricultural Sciences, Changchun 130033)

³(Institute of Chinese Medicine, Academy of Traditional Chinese Medicine, Beijing 100700)

Abstract Aristolochic acid A-bovine serum albumin (BSA) conjugate and aristolochic acid A-ovalbumin (OVA) conjugate were produced as the immunogen and coating antigen, respectively. A monoclonal antibody (mAb), designated as 1A11, was produced with aristolochic acid A-BSA. The titer was 2×10^4 . The mAb was IgG1 isotype with κ light chains. A sensitive monoclonal antibody-based indirect enzyme-linked immunosorbent assay (iELISA) was established with the mAb. The cross-reactivity (CR) of mAb 1A11 with aristolochic acid B, C and D, an analog of aristolochic acid A, was 2.8%, 3.5% and 31.2%, respectively. IC_{50} and the working range of the iELISA for aristolochic acid A were 1.9 and 0.5~7.5 $\mu\text{g/L}$, respectively. The average recoveries of aristolochic acid A fortified in *caulis clematidis amandii* were 86%~97% with RSD of 5.2%~11.1%. Analysis of aristolochic acid A in Chinese herb medicines and Chinese proprietary medicines with iELISA showed that the examined samples of *manshurian dutchman's pipe stem*, *herba aristolochiae*, *fructus aristolochiae*, *aristolochia fangchi* and *dutchman's pipe root* were positive; the *caulis clematidis amandii* and the other Chinese proprietary medicines examined samples were negative and the results were confirmed by HPLC analysis. This ELISA is suitable for the rapid detection of aristolochic acid A in Chinese Herb medicine.

Keywords Aristolochic acid A; Monoclonal antibody; Chinese Herb medicine; Enzyme-linked immunosorbent assay

(Received 10 November 2009; accepted 7 February 2010)