

- Microb Technol*, 2003, 32: 688-705.
- [12] Manosroi J, Abe M, Manosroi A. Biotransformation of steroidal drugs using microorganisms screened from various sites in Chiang Mai, Thailand [J]. *Bioresource Technol*, 1999, 69: 67-73.
- [13] Chen Y G, Yu B Y. Optimization studies of fermentation condition for bioconverting artemisinin to 9 $\alpha$ -hydroxyartemisinin [J]. *Pharm Biotechnol* (药物生物技术), 2001, 8(2): 90-93.
- [14] Zhan J X, Guo H Z, Han J, et al. Biotransformation of artemisinolide by fermentation of *Rhizopus chinensis* and *Cunninghamella elegans* [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2002, 33(10): 869-872.
- [15] Li L X, Su Y F, Liu X F, et al. Biotransformation of artemisinin by hairy cultures of *Rheum palmatum* L. [J]. *J Chin Pharm Sci*, 2002, 11(4): 122-124.
- [16] Han J, Dai J G, Cui Y J, et al. Biotransformation of artemisinin by *Catharanthus roseus* and *Ginkgo biloba* cell suspension cultures [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2003, 34(2): 166-168.
- [17] Hamada H, Miyamoto Y, Nakajima N, et al. Highly selective transformation by plant catalase [J]. *J Mol Catal B: Enzyme*, 1998, 5: 187-189.
- [18] Giri A, Dhingra V, Giri C, et al. Biotransformation using plant cell, organ cultures and enzyme system: current trend and future prospects [J]. *Biotechnol Adv*, 2001, 19: 175-199.
- [19] Zhao M Q, Ding J Y, Liu J, et al. Studies on the arbutin biosynthesis by hairy root of *Panax ginseng* C. A Mayer [J]. *China J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 2001, 26(12): 819-822.
- [20] Xu J F, Su Z G, Feng P S. Activity of tyrosol glucosyltransferase and improved salidroside production through transformation of tyrosol in *Rhodiola sachalinensis* cell cultures [J]. *J Biotechnol*, 1998, 61: 69-73.
- [21] Kawaguchi K, Koike S, Hirofumi M, et al. Biotransformation of digitoxigenin by cultured strophanthus hybrid cell [J]. *Phytochemistry*, 1998, 47(7): 1261-1265.
- [22] Hirata T, Shimoda K, Fujino T, et al. Biotransformation of hydroxycoumarins by the cultured cells of *Nicotiana tabacum* [J]. *J Mol Catal B: Enzyme*, 2000, 10: 477-481.
- [23] Shimoda K, Yamane S, Hirakawa H, et al. Biotransformation of phenolic compounds by the cultured cells of *Catharanthus roseus* [J]. *J Mol Catal B: Enzyme*, 2002, 16: 275-281.
- [24] Ye M, Dai J G, Guo H Z, et al. Glucosylation of cinobufagin by cultured suspension cells of *Catharanthus roseus* [J]. *Tetrahedron Lett*, 2002, 43: 8535-8538.

## 单克隆抗体在中草药研究中的应用前景

朱学泰<sup>1</sup>, 马瑞君<sup>1\*</sup>, 谢 臻<sup>2</sup>

(1. 西北师范大学 生命科学学院, 甘肃 兰州 730070; 2. 兰州生物制品研究所, 甘肃 兰州 730046)

**摘要:**单克隆抗体技术作为一项成熟的生物学技术,在医学和生物学领域应用普遍,但在中草药研究领域中的应用国内鲜有报道。对单克隆抗体应用于中草药研究的可行性进行分析认为,中草药中的许多有效成分都可以通过杂交瘤技术得到其单克隆抗体。利用免疫学技术,单克隆抗体以其灵敏、精确、迅速和简便等特点,可用于药物原材料的分析、中草药有效成分的纯化以及药物分析方法的建立等诸多方面,可望在中药研究和加速中药现代化的进程中起重要的作用。

**关键词:**单克隆抗体;中草药;免疫技术

**中图分类号:**R282.1

**文献标识码:**A

**文章编号:**0253-2670(2005)06-0945-03

### Application prospect of monoclonal antibody in Chinese herbal medicine study

ZHU Xue-tai<sup>1</sup>, MA Rui-jun<sup>1</sup>, XIE Zhen<sup>2</sup>

(1. College of Life Science, Northwest Normal University, Lanzhou 730070, China;

2. Lanzhou Institute of Biological Products, Lanzhou 730046, China)

**Key words:** monoclonal antibody; Chinese herbal medicine; immunotechnology

#### 1 单克隆抗体的特点及其研究进展

单克隆抗体是指由一个B淋巴细胞克隆产生的抗体。每一个B细胞表面的抗原受体只特异性的识别一种抗原决定簇,因此,一个B细胞克隆产生的抗体是同一克隆的。但由于B淋巴细胞在体外很难培养,单克隆抗体便无法大量获得。1975年,Kohler和Milstein发现将小鼠骨髓瘤细胞和经绵羊红细胞免疫的小鼠的脾细胞进行融合,形成杂交细胞,然后对杂交细胞进行细致的筛选,得到既可产生相应抗体又可

无限增殖的杂交瘤细胞克隆,从而创立了杂交瘤技术。应用杂交瘤技术,单克隆抗体的大量获得成为可能,这一技术此后在生物学和医学研究及临床上得到了普遍的应用,并发挥了重要的作用。单克隆抗体因为是由同一个B细胞克隆产生的,因此具有纯度高、特异性强、利于试验标准化及可大量生产供应等优点。建立在单克隆抗体基础之上的免疫定性、分离、分析检测技术,如免疫沉淀技术、免疫荧光技术及胶体金技术等,在实验、临床及生物制品生产过程中都发挥着重要

收稿日期:2004-10-28

作者简介:朱学泰(1979—),男,甘肃金昌人,助教,硕士,主要从事免疫学研究。 E-mail:zhuxutai@163.com

\* 通讯作者 马瑞君 Tel:(0931)7971530

的作用<sup>[1]</sup>。

近年来,随着分子生物学技术的发展,出现了由转基因小鼠、噬菌体展示技术、核糖体展示技术及共价展示技术所产生的单克隆抗体<sup>[2]</sup>。这些技术有效解决了单克隆抗体的鼠源性等问题,大大降低了单克隆抗体的生产成本,缩短了单克隆抗体的研制周期并且产生的人源性单克隆抗体可直接用于人体治疗,使单克隆抗体具有了更广阔的应用空间。

## 2 中草药研究的现状

中草药在我国人民的健康事业中起着非常重要的作用。现在中草药研发工作正迎来一个巨大的机遇,一方面随着中医药的对外传播,世界对中医药了解逐渐加深,受到采用天然药物潮流的影响,欧洲国家对中医、中药的谨慎态度正在变得宽松;另一方面由于老龄化社会的到来,对中药保健品的社会需求将会不断高涨,中草药因其独特的调理滋补作用,在保健品领域中的影响将与日俱增<sup>[3]</sup>。我国拥有世界上最丰富的中草药资源,中医药有数千年的悠久历史,在长期的实践中形成了独特的理论体系并积累了丰富的临床经验,利用中草药开发研制新药是我国的优势,应抓住机遇,发挥优势,研发具有自己特色的新型药物。

但目前我国的中草药产品在国际市场上所占份额很小,且国内市场已受到洋中药的强烈冲击,这与我国作为中草药的发祥地和主要原料产地的地位不符。因此运用现代生物技术推动我国中草药的现代化发展,具有非常重要的意义。目前中药的现代化研究大多集中在单味中药有效成分的研究上,重点是大环结构的抗癌物质、多糖、皂苷、黄酮及香豆精类等化合物。有学者指出注重单个成分的分析会使中草药丧失其独特的疗效而走上西药研制的老路,研究思路方法未脱离化学合成药物的框架,这种担心不无道理。但对中药复方作用机制的研究必须建立在对其中药效成分的了解之上。因此若想中医药实现现代化,打开国际市场,就必须在中药研究中应用现代生物工程技术对中药活性成分进行深入的研究。在研制开发新中药的过程中,对活性成分的分离纯化,活性成分结构的测定,构效关系的研究,有效活性部位的修饰,定向诱导有效活性成分的生成,新剂型、新工艺的研究等都需要应用生物工程技术。另外,中药的不良反应、农药残留物、重金属含量超标等问题也是非常难以解决的问题。单克隆抗体作为一种成熟的生物工程技术,可望在解决这些问题方面发挥作用。

## 3 单克隆抗体在中草药研究中应用的可行性分析

目前大量的单克隆抗体主要是抗动物(包括人)体内生物物质的抗体,用于临床诊断和治疗、实验室研究。一般来说,在现代生物制品研究中,若要对某一生物物质进行研究,首先应得到它的抗体,建立可靠的检测平台,以便于每一步纯化或修饰后,对其进行检测。但单克隆抗体在植物有效成分研究过程中的应用并不多见。20世纪70年代,西方植物学家开始将以抗体为基础的分析方法应用到植物学领域,利用放射免疫分析的方法对植物组织中的植物激素含量进行检测<sup>[4]</sup>,我国也曾有学者将单克隆技术应用于植物科学的研

究<sup>[5]</sup>,但总的说来,单克隆抗体在植物学,尤其是中草药研究领域的应用发展缓慢。20世纪90年代有日本学者开始针对中药有效成分,专门进行单克隆抗体的制备<sup>[6,7]</sup>,并将其应用于中药的鉴定及质量控制方面。

中草药中的一些有效成分如蛋白质、多肽等,既能刺激机体引起免疫反应,产生相应的抗体,又能与抗体发生特异结合,称为完全抗原。而像一些小分子物质如植物激素、植物单糖、寡糖及多糖等,能与免疫反应产物发生特异性结合,但不能刺激机体产生免疫反应,即只具有反应原性而不具有免疫原性,属于半抗原。为使之获得免疫原性,可通过化学方法,如过碘酸法、戊二醛法、氰基硼氢化物法或碳化二亚胺法等,将它们与载体,如牛血清蛋白或麻仁球蛋白等偶联形成复合物,再注入动物体内,便能够引起免疫反应,产生相应的抗体。所以从理论上说,中草药中的许多有效成分都可以通过杂交瘤技术得到其单克隆抗体。

## 4 单克隆抗体在中草药研究中的应用

开发制备针对各种中药有效成分的单克隆抗体,然后应用免疫学技术,可以在中草药研究中发挥以下作用。

4.1 利用单克隆抗体对药物原材料进行检测分析:目前我国中药原药材来源混乱情况仍未得到根本解决,同名异物、同物异名、替代用品现象仍然存在。不同种植物或同种植物不同组织中有效成分的含量差别很大,而且栽培药材农药残留量很高,这些都影响了中药制剂的疗效和安全性。如果得到某种中草药有效成分的单克隆抗体,就可以应用放射免疫法或酶联免疫分析法对待测的不同植物或植物的不同组织的粗提物中的有效成分进行检测分析,判断待测物中该有效成分的有无及其含量<sup>[8]</sup>。早在1977年Pengelly等就用放射免疫法测定植物髓组织分泌液及冠瘿组织中植物生长素IAA的含量,可以检测出每克组织鲜重中小于0.5 mg IAA的量<sup>[5]</sup>。正山征洋等制备抗人参皂苷的单克隆抗体,并用其对人参属植物的根部粗提物中的人参皂苷进行了质和量的检测分析。还有关于利用单克隆抗体及免疫检测法对中草药中小檗碱含量进行定量分析的报道<sup>[10]</sup>。此外亦有大量文献报道关于利用免疫学技术对除草剂、杀虫剂、杀菌剂等药物进行定量分析。由此相信,免疫学技术可以为解决中草药原材料的质量监控问题提供一种选择。

4.2 可利用单克隆抗体制成免疫亲和柱,用于实验室中提取高纯度的有效成分:在药材的提取过程中,除个别品种可以采用有机溶媒提取,大多数品种都必须经色谱柱分离,所用柱类型需根据植物化学的原理来实验确定。免疫亲和色谱柱<sup>[11]</sup>是将抗体通过连接臂结合在固相的介质上,这种固相化的抗体将只和与其有生物特异亲和性的抗原分子相结合,其他的生物分子因不被吸附而流出色谱柱,然后改变流动相的条件将吸附的抗原洗脱下来,从而达到分离纯化的目的。免疫亲和色谱利用的是生物学特异性,而不是依赖于物理化学性质,因此将非常适用于分离低浓度的有效成分。而且亲和色谱选择性强、纯化效率高,常常可以一步就获得满意的纯化效果。应用免疫亲和柱可在短时间内得到实验室所需要

的高纯度的药物成分,便于进一步的研究。国外曾有报道<sup>[9,12]</sup>用抗人参皂苷抗体制作免疫亲和色谱柱,提取得到高纯度的人参皂苷。随着材料科学的发展,如果出现更为廉价、耐用的柱介质,那么直接将免疫亲和柱用于生产将成为可能,会大幅缩减工艺流程,降低生产成本。

4.3 可建立药物分析方法,用于实验室及药厂生产中质量的控制:中药的炮制过程中有效成分是否减少或变性,将会直接影响到药品的疗效。在得到抗有效成分的单克隆抗体的基础上,建立免疫分析方法,如酶联免疫检测法,可以对药品生产过程中的每一步进行监测,以保证产品中有效成分的质和量均达到要求。通常的生物检测法或物理化学检测法往往需要几克甚至几十克的材料,经过反复提取、分离和纯化处理后方可得到供检测样品,且要有价格昂贵的仪器如高效液相色谱、气相色谱以及核磁共振等,配合分析才能完成,而免疫分析技术可直接测定略经纯化的微量样品的某一种或某几种物质,它具有灵敏、精确、迅速和简便等优点。国外有报道<sup>[13]</sup>将番泻苷的单克隆抗体用胶体金技术处理后,用免疫色谱检测技术仅一步就可以检测到浓度达125 ng/mL的番泻苷。因此建立在单克隆抗体基础之上的免疫检测技术有望在中草药制剂生产质量控制中发挥巨大作用。

4.4 中药有效成分抗体用于中药真伪的鉴定:从中药用于人们防病治病开始,中药的真伪问题便随之而产生,中药鉴别的方法、技术和理论也随之经历了一个形成、发展、不断完善和不断提高的过程。尤其是在当前中药正面临走向世界和实现中药现代化的新形势下,加强中药的鉴别研究是确保中药原药材和制剂质量可靠,确保其他各项研究工作顺利进行的首要环节。随着物理、化学、生物学和计算机技术的不断发展,紫外、红外、气相、高效液相、核磁共振、扫描电子显微镜、计算机图像分析、各种电泳、同功酶分析法、免疫学技术等均被吸收到中药鉴别的方法中,大大丰富了中药鉴别的内容,形成了一套适应中药现代化并有利于中药走向世界的更为科学、完善、先进的中药鉴别体系。而在其中,以单克隆抗体为基础的免疫分析技术有其独特的优势,如果将药物有效成分的单克隆抗体试剂盒化,即使是普通的消费者,运用相应的单抗试剂盒,凭借简单的显色反应,在不需要配备特殊仪器的情况下,也可以对药物的真假做出基本的判断。国外已有用免疫色谱条带检测技术检测人参皂苷的报道<sup>[14]</sup>。此方法简单易行,尤其在对名贵药材选购时的鉴定中,相信会有很大的潜力。

4.5 单克隆抗体可被开发成治疗药物:一些中草药中含有毒性成分,盲目服用或服用过量会对人体造成危害,如果有针对该成分的单克隆抗体,利用抗原抗体的特异性反应,可在病人体内将该毒性成分中和,使其不能发挥生物活性,从而保证病人不受损害。长期以来,人们利用抗血清来中和外

源性毒素,如蜂毒、蛇毒等都取得了非常好的效果。相信单克隆抗体在中和植物毒素方面用于临床治疗也会有广阔的应用前景。

此外将已知特性的抗体通过阵列点样机或阵列复制器准确、快速、定量和有序的点加在硅片等载体上,经洗涤和封闭后制成抗体芯片<sup>[15]</sup>,可用于有效药物的检测。虽然目前由于各种条件的限制,抗体芯片技术尚难推广,但相信随着工程抗体技术以及仪器自动化等学科的发展,此项新技术有望在有效药物筛选方面取得巨大突破。

## 5 结语

单克隆抗体技术作为一种成熟的生物学技术,以其灵敏、精确、迅速和简便等特点,可以在中药研究和加速中药现代化的进程中,在药物有效成分提取、鉴定和分析方面起重要的作用,为中药的研究方法提供更多的选择。

## References:

- [1] Matzku S, Stahel A. *Antibodies in Diagnosis and Therapy* [M]. Amsterdam: Harwood Academic Publishers, 1999.
- [2] Amstutz P, Forrer P, Zahnd C, et al. *In vitro* display technologies: novel developments and application [J]. *Curr Opin Biotechnol*, 2001, 98: 75-80.
- [3] Xiao P G, Liu Y. Several strategic consideration for the modernization of Chinese materia medica [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2003, 38(7): 485-486.
- [4] Pengelly W A. Specific radioimmunoassay for nanogram quantities of the auxin, indole-3-acetic acid [J]. *Planta*, 1997, 136: 173-180.
- [5] Chen J X, Chen M Y, Zhao H J. *Applications of Immunological Techniques in Botany (免疫技术在植物学中的应用)* [M]. Beijing: China Agricultural University Publishing House, 1997.
- [6] Xuan L J, Tanaka H, Xu Y M, et al. Preparation of monoclonal antibody against crocin and its characterization [J]. *Cytotechnology*, 1999, 29(1): 65-70.
- [7] Ishiyama M, Shoyama Y, Murakami H, et al. Production of monoclonal antibodies and development of an ELISA for solamargine [J]. *Cytotechnology*, 1995, 18(3): 153-158.
- [8] Yanagihara H, Sakata R, Shoyama Y, et al. Rapid analysis of small samples containing forskolin using monoclonal antibodies [J]. *Planta Med*, 1996, 62(2): 169-172.
- [9] Fukuda N, Tanaka H, Shoyama Y. Applications of ELISA, Western blotting, and immunoaffinity concentration for survey of ginsenosides in crude drugs of *Panax* species and traditional Chinese herbal medicines [J]. *Analyst*, 2000, 125(8): 1425-1429.
- [10] Kim J S, Tanaka H, Shoyama Y. Immuno quantitative analysis for berberine and its related compounds using monoclonal antibodies in herbal medicines [J]. *Analyst*, 2004, 129(1): 87-91.
- [11] Jack G W. Immunoaffinity Chromatography [J]. *Meth Mol Biol*, 1992, 11: 273-275.
- [12] Putalun W, Fukuda N, Tanaka H, et al. Immunoaffinity column for isolation of bioactive compounds using monoclonal antibodies [J]. *J Liquid Chromatog Related Technol*, 2002, 25(13-15): 2387-2398.
- [13] Putalun W, Morinaga O, Tanaka H, et al. Development of a one-step immunochromatographic strip test for the detection of sennosides A and B [J]. *Phytochem Anal*, 2004, 15(2): 112-116.
- [14] Putalun W, Fukuda N, Tanaka H, et al. A one-step immunochromatographic assay for detecting ginsenosides Rb<sub>1</sub> and Rg<sub>1</sub> [J]. *Anal Bioanal Chem*, 2004, 378(5): 1338-1341.
- [15] Borrebaeck C. Antibodies in diagnostics—from immunoassays to protein chip [J]. *Immunol Today*, 2001, 21(8): 379-382.