

基于竞争 ELISA 法的铀促排螯合剂体外筛选模型的建立

王梦梦, 张旭霞, 尹俊, 任湘祎, 李欣悦, 陈红红*

(复旦大学上海医学院放射医学研究所, 上海 200032)

摘要: 血液中的铀 [U(VI)] 与去铁转铁蛋白 (apotransferrin, apo-Tf) 形成稳定的络合物在 U(VI) 进入细胞致细胞毒性中发挥重要作用。本研究通过探讨螯合剂与 apo-Tf 竞争结合 U(VI) 的作用, 建立了一种基于酶联免疫吸附实验 (enzyme linked immunosorbent assay, ELISA) 的 U(VI) 促排螯合剂体外筛选新模型, 通过方法学研究确定了该检测方法的最佳包被抗原 apo-Tf、Tf 抗体、二抗稀释比例和 U(VI) 处理的浓度, 验证了该方法的稳定性和重现性, 并采用该模型考察了 4 种螯合剂邻苯二酚-3,6 二甲撑亚氨基四乙酸 (CBMIDA)、Tiron、DTPA-CaNa₃、DTPA-ZnNa₃ 与 apo-Tf 竞争结合 U(VI) 的能力, 其强弱顺序为: CBMIDA ≈ Tiron > apo-Tf > DTPA-CaNa₃ ≈ DTPA-ZnNa₃; 采用动物实验观察以上螯合剂的排 U(VI) 效果发现, CBMIDA 和 Tiron 立即给药能显著提高 U(VI) 内污染小鼠 24 h 尿 U(VI) 排出、明显降低肾脏和股骨 U(VI) 蓄积; 而 DTPA-CaNa₃ 和 DTPA-ZnNa₃ 则无明显促排效果, 与竞争 ELISA 法的检测结果相一致。动物实验符合复旦大学药学院动物伦理委员会规程。以上结果表明, 该方法快速、简便、重现性好, 能够用于 U(VI) 促排螯合剂的快速筛选。

关键词: 铀; 螯合剂; 去铁转铁蛋白; 竞争酶联免疫吸附实验; 筛选方法

中图分类号: R943 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2020)02-0265-07

Establishment of an *in vitro* screening model for uranium decorporation chelators based on the competitive ELISA method

WANG Meng-meng, ZHANG Xu-xia, YIN Jun, REN Xiang-yi, LI Xin-yue, CHEN Hong-hong*

(Institute of Radiation Medicine, Shanghai Medical College, Fudan University, Shanghai 200032, China)

Abstract: Uranium [U(VI)] in the blood is known to form stable complexes with apotransferrin (apo-Tf), which plays an important role in mediating the cytotoxicity induced by U(VI) transported to cells. The present study aimed to establish a new *in vitro* screening model of U(VI) decorporation agents through exploring the capability of chelating agents competing with U(VI) binding to apo-transferrin based on enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The optimal concentrations of apo-Tf coated antigen, Tf antibody, secondary antibody and U(VI) treatment were achieved and the stability and reproducibility of this method were validated by methodology study. Using this model, the ability of four chelating agents to mobilize the U(VI) binding to apo-Tf was evaluated, and the rank of competitiveness was catechol-3,6-bis(methyleiminodiacetic acid) (CBMIDA) ≈ Tiron > apo-Tf > DTPA-CaNa₃ ≈ DTPA-ZnNa₃. The efficacy of these chelating agents in removal of U(VI) was tested by animal experiments. The results showed that immediate administration of CBMIDA or Tiron after injection of U(VI) in mice significantly promoted urinary U(VI) excretion and reduced U(VI) accumulation in kidneys and femurs, while DTPA-CaNa₃ and DTPA-ZnNa₃ have no obvious effects as compared to U(VI)-exposed mice alone, which was consistent with the results of competitive ELISA method. The animal experiments conform to the rules of the

收稿日期: 2019-08-27; 修回日期: 2019-09-30.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81972971).

*通讯作者 Tel / Fax: 86-21-64437130, E-mail: hhchen@shmu.edu.cn

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2019-0687

Animal Research Ethics Committee of School of Pharmacy of Fudan University. These results show that the new proposed method is rapid, simple and convenient with good reproducibility and has the potential to be used for *in vitro* screening of U(VI) decorporation agents.

Key words: uranium; chelating agent; apotransferrin; competitive enzyme linked immunosorbent assay; screening method

铀 (uranium, U) 是一种广泛存在于地壳中的天然放射性元素, 它作为核工业中重要的核燃料、核动力航母和核潜艇的燃料以及核武器的装料, 已在世界范围内生产和使用, 其副产物贫铀亦被广泛应用于军事领域^[1,2]。一旦发生核事故/核战争/核恐怖活动, 铀化合物可通过呼吸道、消化道和皮肤/伤口进入人体造成体内铀内污染^[3]。铀吸收入血后通常以稳定的、可溶性的六价铀酰离子 [UO_2^{2+} , U(VI)] 形式存在于血浆中^[4,5], 主要与转铁蛋白 (transferrin, Tf) 和碳酸盐结合形成络合物^[6,7], 经血液循环运输到肾脏、骨骼等主要蓄积靶器官, 通过 Tf 受体介导的细胞内吞作用而进入细胞产生毒性作用^[8-10], 甚至诱发癌症^[11]。采用螯合剂加速体内 U(VI) 排出是其主要的治疗措施, 但目前国内外临床上尚无有效的 U(VI) 促排药物, 因此探寻高效低毒的 U(VI) 促排螯合剂倍受世界各国所关注, 然而目前主要采用动物实验来筛选螯合剂对 U(VI) 的促排效果, 存在实验周期长、通量低、成本高等诸多局限, 亟待建立体外 U(VI) 促排药物的筛选模型, 以提高药物研发效率、降低研发成本。

Tf 是人体内参与铁代谢的一种 β -球蛋白, 是血液中最主要的、非血红素结合铁的铁转运蛋白, 它大部分以去铁转铁蛋白 (apotransferrin, apo-Tf) 的形式存在于血浆中。研究发现, apo-Tf 除与 Fe^{3+} 络合外, 还可作为内源性配体与内污染人体的铜系和镉系金属离子络合, 促进其在机体内的转运^[7], 包括与血浆中以 UO_2^{2+} 形式存在的 U(VI) 形成稳定的 $(\text{UO}_2^{2+})_2\text{Tf}$ 络合物, 该络合物通过内吞作用被细胞摄取^[6,7,12], 从而对细胞产生毒性作用。螯合剂若能竞争结合 $(\text{UO}_2^{2+})_2\text{Tf}$ 络合物中 UO_2^{2+} , 则能阻断 UO_2^{2+} 被细胞摄取, 从而降低 U(VI) 的细胞毒性, 并加速其排出体外。由此可见, 螯合剂与 apo-Tf 竞争结合 U(VI) 的能力是影响螯合剂解毒和排 U(VI) 效果的关键因素之一。故本研究拟建立竞争 ELISA 法以检测螯合剂与 apo-Tf 竞争结合 U(VI) 的能力, 并采用动物实验验证螯合剂促排 U(VI) 的效果, 以评价该方法用于体外筛选 U(VI) 促排螯合剂的可行性, 为 U(VI) 促排新药的研发提供简便、快速、经济和高通量的筛选模型。

材料与方法

药品及试剂 去铁转铁蛋白、转铁蛋白抗体 (美国 Santa Cruz 公司); 辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的山羊抗小鼠 IgG (江苏碧云天生物技术有限公司); 邻苯二胺 (OPD, 国药集团化学试剂有限公司); 醋酸铀酰 [$(\text{UO}_2(\text{CH}_3\text{COO})_2) \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 美国 Chem-Impex 公司]; 邻苯二酚-3,6 二甲撑亚氨基四乙酸 (CBMIDA, 复旦大学化学系合成); Tiron (美国 Sigma-aldrich 公司); DTPA- CaNa_3 和 DTPA- ZnNa_3 水溶液 (复旦大学放射医学研究所配制)。

动物 SPF 级 ICR 小鼠, 雄性, 体重 18~20 g, 购自上海杰思捷实验动物有限公司, 动物许可证号: SCXK (沪) 2018-0004。动物实验在复旦大学药学院实验动物中心进行, 遵守复旦大学药学院伦理委员会规程。

仪器 Infinite M200 pro 多功能酶标仪 (瑞士 TECAN 公司); 石墨消解仪 (广州基创仪器有限公司); X-7 电感耦合等离子体质谱仪 (ICP-MS, 美国 Thermo 公司)。

ELISA 测定 采用包被缓冲液 ($0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 碳酸盐缓冲液, pH 9.6) 将 $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 apo-Tf 抗原水溶液稀释成一定的质量浓度, 加入 96 孔酶标板中, 每孔 $100 \mu\text{L}$, 同时设置空白对照孔, $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 包被过夜, 使 apo-Tf 附着于孔板上。用含 0.05% Tween 20 的磷酸盐缓冲液 (phosphate buffered solution containing Tween 20, PBST) 清洗 3 次, 5 min/次, 洗去未附着的 apo-Tf。用含 1% 牛血清白蛋白 (albumin from bovine serum, BSA) 的磷酸盐缓冲液 (phosphate buffered solution, PBS) 作为封闭液, 每孔加 $200 \mu\text{L}$, $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 封闭过夜。封闭结束后, 弃液, 于吸水纸上拍干, 每孔加入 Tf 抗体 $100 \mu\text{L}$, $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 孵育 3 h, 使 Tf 抗体与附着于孔底的 apo-Tf 进行特异结合。一抗孵育结束后, PBST 清洗 3 次, 5 min/次, 洗去未结合的一抗。然后每孔加入 $100 \mu\text{L}$ 一定稀释比例的 HRP 标记的山羊抗小鼠 IgG 作为二抗, $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 孵育 1 h。二抗孵育结束后, 用 PBST 清洗 3 次, 5 min/次, 洗去未结合的二抗。之后每孔加入新鲜配制的 OPD 底物显色液 $100 \mu\text{L}$, 室温避光显色 15 min 后, 每孔加入 $2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ H_2SO_4 溶液 $50 \mu\text{L}$ 终止反应。于酶标仪 490 nm 波长处检测吸光度 (A) 值。

Apo-Tf 抗原最佳包被浓度的确定 采用不同质

量浓度 (0.2、0.4、0.6、0.8、1、2、4 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) 的 apo-Tf 抗原包被 96 孔酶标板, 与 4 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ Tf 抗体特异结合, 与 1:250 稀释的二抗进行免疫反应, OPD 显色后测定各孔 A 值, 以确定本 ELISA 检测体系包被抗原 apo-Tf 的最佳工作浓度。

Tf 抗体最佳质量浓度的确定 采用 0.2 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ apo-Tf 抗原包被 96 孔酶标板, 与不同质量浓度 (0.1、0.2、0.5、1.0、2.0、3.0、4.0、6.0、8.0 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) 的 Tf 抗体特异结合, 与 1:250 稀释的二抗进行免疫反应, OPD 显色后测定各孔 A 值, 以确定本 ELISA 检测体系 Tf 抗体的最佳工作浓度。

二抗最佳稀释比例的确定 采用 0.2 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ apo-Tf 抗原包被, 2 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ Tf 抗体特异结合和不同稀释比例 (1:2 000、1:1 000、1:750、1:500、1:300、1:200、1:150) 的二抗进行免疫反应, OPD 显色后测定各孔 A 值, 以确定本 ELISA 检测体系 HRP 标记的山羊抗小鼠 IgG 二抗的最佳稀释比例。

U(VI) 与 Tf 抗体对 apo-Tf 的结合反应 采用上述实验确定的包被抗原 apo-Tf、Tf 抗体和 HRP 标记的山羊抗小鼠 IgG 二抗的最佳工作浓度。根据上述 ELISA 的实验步骤, 于封闭结束后加入 0、10、75、150、300、600 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 U(VI)-碳酸盐溶液 [U(VI) 与碳酸钠的摩尔比为 1:10, 以 1 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 氢氧化钠调节 pH 值为约 7.4], 每孔 100 μL , 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 3 h。U(VI) 处理结束后, 按上述 ELISA 方法的后续步骤进行, 以确定本实验体系中 U(VI) 溶液的最佳工作浓度。

螯合剂与 apo-Tf 竞争结合 U(VI) 的 ELISA 方法
日内和日间精密度测定 采用 0.2 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ apo-Tf 抗原包被、1% BSA 封闭、300 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ U(VI) 孵育后, 分别加入 125、250 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的螯合剂 CBMIDA 和 Tiron, 250、500 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 DTPA-CaNa₃ 和 DTPA-ZnNa₃ 各 50 μL , 以上各孔同时加入 4 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ Tf 抗体 50 μL , 经二抗免疫结合后进行 OPD 显色, 测定各孔 A 值。每个样品设置 6 个平行孔 ($n=6$), 计算相对标准偏差 (relative standard deviation, RSD) 以评估方法的稳定性 (即

日内精密度)。日间精密度测定方法与日内精密度操作相同, 每个样品设置 3 个平行孔 ($n=3$), 连续测定 5 天, 以评估方法的重现性。

螯合剂与 apo-Tf 竞争结合 U(VI) 能力的检测 采用 0.2 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ apo-Tf 抗原包被、1% BSA 封闭、300 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 U(VI) 孵育后, 分别加入 125 和 250 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 CBMIDA 和 Tiron, 250 和 500 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 DTPA-CaNa₃ 和 DTPA-ZnNa₃ 各 50 μL , 以上各孔同时加入 4 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ Tf 抗体 50 μL , 按上述 ELISA 方法的后续步骤进行。

小鼠 U(VI) 促排实验 将小鼠随机分为 6 组: 空白对照组、单纯染 U(VI) 组、U(VI)+CBMIDA 组、U(VI)+Tiron 组、U(VI)+DTPA-CaNa₃ 组和 U(VI)+DTPA-ZnNa₃ 组, 每组小鼠 6 只。每只小鼠腹腔注射 (intraperitoneal injection, ip) 0.2 μg U(VI) 后, 立即肌肉注射 (intramuscular injection, im) 25 $\mu\text{mol}\cdot\text{kg}^{-1}$ 各种螯合剂; 单纯染 U(VI) 组小鼠 ip U(VI) 后立即 im 生理盐水; 空白对照组 ip 生理盐水后立即 im 生理盐水。将小鼠置于代谢笼中, 收集 24 h 尿液, 于 U(VI) 染毒后 24 h 麻醉处死小鼠, 解剖取双侧肾脏和股骨, 经硝酸/高氯酸于石墨消解仪 120 $^{\circ}\text{C}$ 消解后, 采用 ICP-MS 检测尿、肾脏和股骨 U(VI) 含量, 再乘以稀释倍数, 除以 U(VI) 注入量, 计算尿 U(VI) 排出量、肾脏和股骨 U(VI) 蓄积量占注入量的百分数。

统计学分析 实验数据以均值 \pm 标准差表示, 各项 ELISA 实验至少重复 3 次。采用 SPSS 11.5 统计软件进行单因素方差分析。P<0.05 为差异有统计学意义。

结果

1 ELISA 间接法检测系统条件的确定

为保证实验结果的有效性和可重复性, 首先需要确定最佳的 apo-Tf 抗原包被浓度、Tf 抗体浓度和二抗稀释比例。在一定的 Tf 抗体浓度、二抗稀释比例条件下, 随着 apo-Tf 抗原包被浓度的增加, A 值明显增加, 在 0.2~4 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 内 A 值达平台期 (图 1A), 故采用 A 值基本达峰值的 0.2 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 作为本实验的 apo-Tf 抗原包

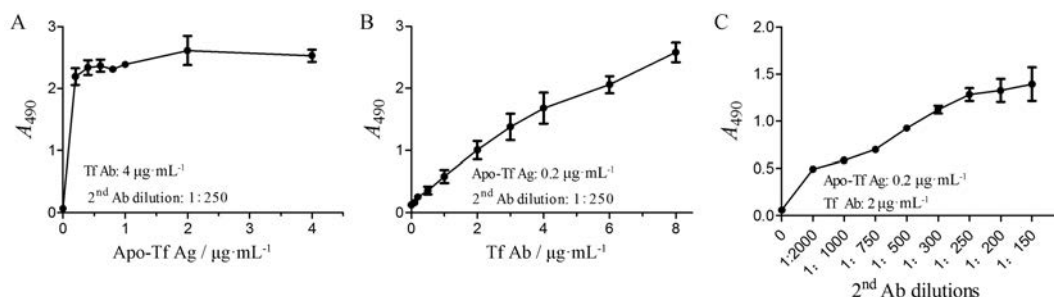


Figure 1 Determination of optimal concentration of the coated apo-Tf Ag (A), Tf Ab (B) and the dilution ratio of 2nd Ab (C) for the indirect ELISA assay. A: Absorbance; Apo-Tf Ag: Apo-Tf antigen; Tf Ab: Tf antibody; 2nd Ab: Secondary antibody. $n=3$, $\bar{x}\pm s$

被浓度。在一定的 apo-Tf 抗原包被浓度、二抗稀释比例的条件下,随着 Tf 抗体浓度的增加, A 值呈线性增加(图 1B),由于 Tf 抗体浓度在 $4 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时所得 A 值在 2.0 左右,处于酶标仪最佳响应范围,故选择 $4 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 为本检测体系的 Tf 抗体浓度。在一定 apo-Tf 抗原包被浓度、Tf 抗体浓度的条件下,随着 HRP 标记的羊抗鼠 IgG 二抗浓度的增加, A 值逐渐增加,当二抗稀释比例在 1:250~1:150 时, A 值增加放缓,几乎达到平台期(图 1C),故选择 A 值基本达峰值的 1:250 为本检测体系的二抗稀释比例。

2 U(VI) 对 Tf 抗体与 apo-Tf 结合的影响

U(VI) 与 apo-Tf 结合是否会影响 apo-Tf 抗原与 Tf 抗体免疫复合物的形成是竞争 ELISA 建立的基础。由图 2 可见,在碳酸盐存在的条件下,随着 U(VI) 浓度的增加,该反应体系的 A 值明显降低,表明 U(VI) 与 apo-Tf 形成了稳定的络合物,使 Tf 发生构象改变,阻碍了 Tf 抗体与其免疫位点的结合,以致反应体系的 A 值下降。随着 U(VI) 浓度的增加,与 U(VI) 结合的 apo-Tf 越多, A 值下降的幅度就越大;当 U(VI) 浓度增加至 $300\sim 600 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, U(VI) 与 apo-Tf 结合基本达到饱和,反应体系的 A 值显著降低了约 55%,故选取 $300 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 作为本实验体系的 U(VI) 浓度。

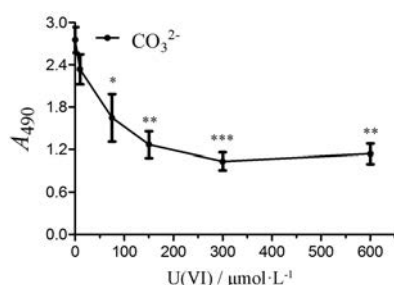


Figure 2 Effect of U(VI) on Tf Ab and apo-Tf Ag combination. $n = 3, \bar{x} \pm s$. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs $0 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ U(VI)

3 螯合剂与 apo-Tf 竞争结合 U(VI) 的 ELISA 方法稳定性和重现性验证

本实验选择了文献报道的 2 个阳性 U(VI) 促排螯合剂 CBMIDA 和 Tiron, 以及 2 个阴性 U(VI) 促排螯合剂 DTPA-CaNa₃ 和 DTPA-ZnNa₃, 通过测定空白对照组、单纯 U(VI) 处理组、U(VI)+螯合剂组的日内精密度和日间精密度,考察了方法的稳定性和重现性。由表 1 可见,各组样品 6 个平行孔所得 A 值的 RSD 均小于 10%,连续测定 5 天的 RSD 均小于 20%,表明该方法的稳定性和重现性较好,能够满足生物学检测试验的要求。

4 螯合剂与 apo-Tf 竞争结合 U(VI) 能力的比较

本实验检测了 2 个阳性 U(VI) 促排螯合剂 CBMIDA

Table 1 The intra- and inter-day precision of the competitive ELISA method for chelating agents competing with U(VI) binding to apo-transferrin. ^aThe working concentration was $125 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$; ^b $n = 6$; ^c $n = 15$. CBMIDA: Catechol-3,6-bis(methyleiminodiacetic acid)

Group	Precision (RSD/%)	
	Intra-day ^b	Inter-day ^c
Control	8.36	9.34
U(VI)	7.26	19.94
U(VI) + CBMIDA ^a	9.93	16.56
U(VI) + Tiron ^a	9.21	12.10
U(VI) + DTPA-CaNa ₃ ^a	9.33	17.46
U(VI) + DTPA-ZnNa ₃ ^a	8.42	17.69

和 Tiron 以及 2 个阴性 U(VI) 促排螯合剂 DTPA-CaNa₃ 和 DTPA-ZnNa₃ 在该体系中与 apo-Tf 竞争结合 U(VI) 的能力。由图 3 可见,该体系经 $300 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ U(VI) 作用后 A 值明显降低。在 U(VI) 处理后反应体系中含有 $62.5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ CBMIDA 和 Tiron 的 A 值与 U(VI) 单独处理组相比无明显差异;当 CBMIDA 和 Tiron 的浓度增加至 $125 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,可使反应体系的 A 值较 U(VI) 单独处理组分别明显增加 52% 和 54%,而与空白对照组相比无显著差异。反应体系中含有 125 和 $250 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 DTPA-CaNa₃ 和 DTPA-ZnNa₃ 的 A 值与 U(VI) 单独处理组相比均未见明显变化。以上结果表明, CBMIDA 和 Tiron 能竞争结合与 apo-Tf 结合的 U(VI),而 DTPA-CaNa₃ 和 DTPA-ZnNa₃ 结合 U(VI) 的能力小于 apo-Tf。

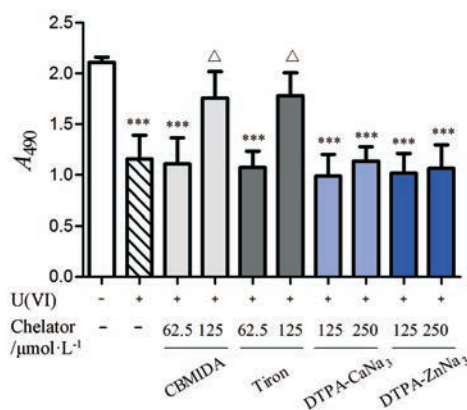


Figure 3 Ability of competitive combination of chelating agent and apo-Tf with U(VI). $n = 3, \bar{x} \pm s$. *** $P < 0.001$ vs blank control; $\Delta P < 0.05$ vs U(VI)-treated group alone

5 螯合剂对染 U(VI) 小鼠的促排作用

本实验进一步观察了以上 4 种螯合剂对 U(VI) 内污染小鼠的促排效果。 $25 \mu\text{mol}\cdot\text{kg}^{-1}$ CBMIDA 和 Tiron 立即给药能显著提高 U(VI) 内污染小鼠 24 h 的尿 U(VI) 排出,分别较单纯 U(VI) 染毒组提高了 148% 和 63%;而 DTPA-CaNa₃ 和 DTPA-ZnNa₃ 立即给药组小鼠

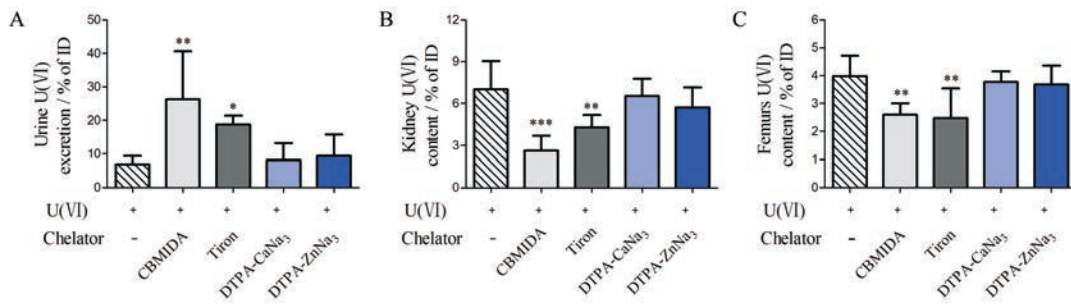


Figure 4 Effect of chelating agents on urine U(VI) excretion (A), kidneys U(VI) accumulation (B) and femurs U(VI) accumulation (C) in U(VI)-exposed mice. $n = 6$, $\bar{x} \pm s$. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs U(VI)-exposed mice alone. ID: Injected dose

的尿 U(VI) 排出与单纯 U(VI) 染毒组相比无明显差异 (图 4A)。25 $\mu\text{mol} \cdot \text{kg}^{-1}$ CBMIDA 和 Tiron 立即给药能显著降低 U(VI) 内污染小鼠 24 h 的肾脏和股骨 U(VI) 蓄积, 分别较单纯 U(VI) 染毒组降低了 62% 和 37% 以及 35% 和 40%; 而 DTPA-CaNa₃ 和 DTPA-ZnNa₃ 立即给药组小鼠的肾脏和股骨 U(VI) 蓄积与单纯 U(VI) 染毒组相比无显著差异 (图 4B、C)。

讨论

Tf 在血浆中含量丰富, 亦存在于胆汁等体液和细胞外液中, 它不仅是血浆中转运 U(VI) 的主要蛋白, 而且是介导细胞摄取 U(VI) 导致细胞毒性的关键蛋白^[6,7]。许多动物实验表明, 小鼠/大鼠急性 U(VI) 染毒后给予某种螯合剂, 可显著降低肾和骨 U(VI) 蓄积, 促进 U(VI) 自体内排出, 减轻 U(VI) 致肾毒性^[13-15], 表明螯合剂能竞争螯合 apo-Tf 结合的 U(VI), 加速其从体内排出。本研究基于螯合剂与 apo-Tf 竞争结合 U(VI) 的作用建立 U(VI) 促排螯合剂的体外筛选模型 (图 5), 设计思路是以竞争 ELISA 法为基础, U(VI) 通过与包被于 96 孔酶标板中的 apo-Tf 结合形成络合物引起 apo-Tf 的构象改

变, 从而阻碍了 apo-Tf 的免疫位点与 Tf 抗体的结合, 使反应体系的 A 值明显降低。若螯合剂能竞争结合 apo-Tf 络合的 U(VI), 则可使 apo-Tf 构象恢复并与 Tf 抗体结合形成免疫复合物, 使反应体系的 A 值显著回升, 亦即为螯合剂竞争结合 U(VI) 的能力越强, 反应体系的 A 值回升越明显; 反之, 当螯合剂竞争结合 U(VI) 的能力低于 apo-Tf 时, 反应体系的 A 值则无明显改变。该实验原理与作者前期报道^[16]的螯合剂与金属硫蛋白 (metallothionein, MT) 竞争结合 U(VI) 的竞争 ELISA 法的实验原理相一致; 不同的是, 两者与 U(VI) 形成的络合物的生理功能不同, Tf 是介导 U(VI) 进入细胞发挥毒性作用的重要蛋白配体^[12], 而 MT 是人体自身存在的可促进 U(VI) 自体内排出的 U(VI) 解毒剂^[17]。因此, 本实验建立的与 apo-Tf 竞争结合 U(VI) 的 U(VI) 促排螯合剂体外筛选模型可进一步阐明螯合剂抑制细胞摄取 U(VI) 的解毒作用机制。由于本方法是以使 U(VI) 处理体系的 A 值显著回升为指标来判断螯合剂对 U(VI) 的螯合能力, 具有简便、快速、易于判断的优点; 不足之处在于该方法仅能定性检测螯合剂对 U(VI) 的螯合能力。目前国内外尚未见其他 U(VI) 促

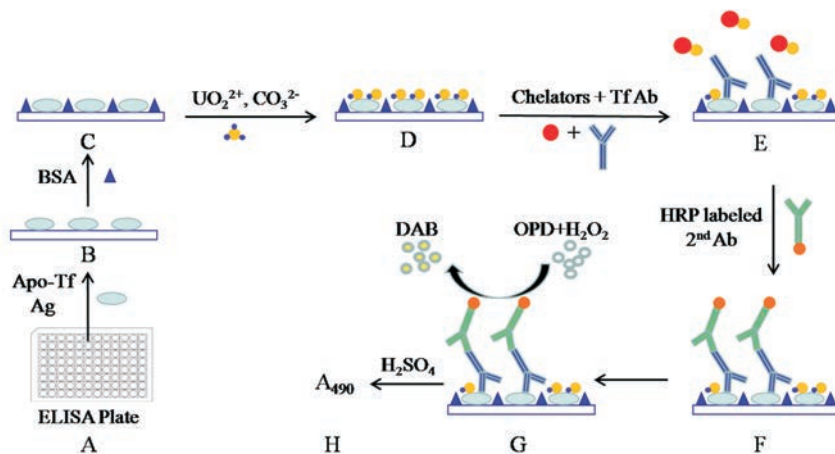


Figure 5 Schematic illustration of competitive ELISA. A: Prepare a microtiter plate; B: Coating apo-Tf Ag; C: Blocking with BSA; D: Incubating with UO_2^{2+} ; E: Incubating with chelators and Tf Ab; F: Incubating with HRP labeled 2nd Ab; G: Color-developing with *O*-phenylenediamine (OPD); H: Detecting A_{490}

排整合剂体外筛选模型报道。

研究已证实, apo-Tf 由 C 端和 N 端两个高度同源的结构域组成, 每个结构域各包含 1 个金属离子结合位点^[18], 能可逆地结合 Fe^{3+} , 形成 Fe_2Tf 络合物^[6,7], 许多其他金属离子包括 U(VI) 亦结合到这个位点, 以 UO_2^{2+} 形式与 apo-Tf 结合形成 $(\text{UO}_2^{2+})_2\text{Tf}$ 络合物^[6,7]。值得注意的是, 无论是 Fe^{3+} 还是 U(VI), 与 apo-Tf 的金属位点结合时, 均需要碳酸根作为协同阴离子参与, 其中碳酸根阴离子的 2 个氧原子参与 UO_2^{2+} 配位, U(VI) 才能与 apo-Tf 形成稳定的 $(\text{UO}_2^{2+})_2\text{Tf}$ 络合物^[19,20]; 研究还发现, 在生理 pH 7.4 的条件下, apo-Tf 可结合 1 个或 2 个 Fe^{3+} ; 而在细胞胞内体 pH 5~6 的酸性环境中, 则可诱导 Tf 构象改变, 并伴随 Fe^{3+} 的释放^[21], 提示 pH 值也可能对 apo-Tf 与 U(VI) 的亲合力产生重要影响。本实验亦观察到, 用 10~600 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ U(VI) 溶液与包被抗原 apo-Tf 孵育后, 随 U(VI) 浓度的增加, A 值非但未见下降, 反而显著高于空白对照孔 (数据未显示), 可能与 U(VI) 溶液的酸度随 U(VI) 浓度增加而增加 (pH 值由 6 下降至 5), 使 apo-Tf 构象改变从而降低与 U(VI) 的亲合力有关。有研究表明, 血浆中的 U(VI) 除了与 apo-Tf 结合外, 还主要与碳酸盐形成络合物^[22,23]。在采用细胞实验研究 U(VI) 的细胞毒性和细胞内沉积时, 发现 U(VI) 在含重碳酸盐的培养液中实际主要与碳酸根形成稳定的 $\text{UO}_2(\text{CO}_3)_3^{4-}$ 络合物^[10,24]; 当 U(VI) 与重碳酸盐摩尔比为 1:10 时, 培养液中 U(VI) 是可溶性的, 且对细胞的毒性随 U(VI) 浓度的增加而增加; 透射电镜则观察到 U(VI) 沉淀于细胞质中^[25], 表明碳酸根作为 U(VI) 的配体在 U(VI) 进入细胞致细胞毒性中发挥重要作用。故在本实验体系中, 在 pH 7.4 和碳酸根存在 [碳酸钠与 U(VI) 的摩尔比为 10:1] 的条件下, 观察到 U(VI) 能与 apo-Tf 稳定结合, 显著降低本体系 A 值, 这为采用竞争 ELISA 法检测整合剂与 apo-Tf 竞争结合 U(VI) 的能力奠定了重要的基础。而且, 本文对该竞争 ELISA 法进行方法学研究进一步验证了其具有较好的稳定性和重现性。

为了检测该体系测定整合剂与 apo-Tf 竞争结合 U(VI) 能力的可行性, 本实验观察了 2 个阳性 U(VI) 促排整合剂 CBMIDA 和 Tiron 以及 2 个阴性 U(VI) 促排整合剂 DTPA- CaNa_3 和 DTPA- ZnNa_3 的体外竞争结合 U(VI) 的能力。Lan 等^[26]报道, CBMIDA 以人常用剂量的犬等效剂量 12.5 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 肌肉注射犬后, 其血药浓度 C_{\max} 为 14.18 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (即 35.45 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)。本实验采用高于此浓度 1.8 倍 (62.5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)、3.5 倍 (125 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 和 7.1 倍 (250 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 的整合剂进行检测, 发现高于此浓度 3.5 倍的 125 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ CBMIDA 和 Tiron 均可使

U(VI) 处理体系 A 值明显回升, 而高于此浓度 7.1 倍的 250 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ DTPA- CaNa_3 和 DTPA- ZnNa_3 却仍未能引起 U(VI) 处理体系 A 值的增加, 表明 CBMIDA 和 Tiron 能与 apo-Tf 竞争结合 U(VI), 其整合 U(VI) 的能力明显大于 apo-Tf, 而 DTPA- CaNa_3 和 DTPA- ZnNa_3 则未显示对 apo-Tf 结合 U(VI) 的竞争作用。由此可见, 这 4 种整合剂与 apo-Tf 竞争结合 U(VI) 能力的强弱顺序为: CBMIDA \approx Tiron>apo-Tf>DTPA- $\text{CaNa}_3\approx$ DTPA- ZnNa_3 。

本研究进一步采用动物实验以验证这 4 种整合剂的排 U(VI) 效果。实验观察到, CBMIDA 和 Tiron 立即给药能显著降低急性 U(VI) 染毒小鼠肾脏和股骨 U(VI) 蓄积、促进尿 U(VI) 排出; 而 DTPA- CaNa_3 和 DTPA- ZnNa_3 立即给药组小鼠的肾脏和股骨 U(VI) 蓄积、尿 U(VI) 排出与单纯 U(VI) 染毒组相比无显著差异。Fukuda 等^[14,15]报道, CBMIDA 能够促进急性 U(VI) 中毒大鼠尿 U(VI) 排出, 降低肾脏、股骨和肝脏等组织的 U(VI) 蓄积, 该文献报道与本动物实验结果相吻合。本课题组前期细胞实验^[27]研究表明, CBMIDA 能够降低肾近曲小管上皮 HK-2 细胞对 U(VI) 的摄取, 促进细胞内 U(VI) 的释放, 减轻 U(VI) 诱导的 DNA 损伤和细胞损伤, 进一步从细胞水平阐明了 CBMIDA 促进细胞内 U(VI) 排出和降低 U(VI) 致细胞毒性的作用。Domingo 等^[13]报道, Tiron 立即给药或 U 染毒后延迟 1 h 内给药均能有效促进急性 U(VI) 中毒小鼠的尿 U(VI) 排出, 降低肾脏和股骨 U(VI) 蓄积; 而 DTPA- CaNa_3 则无明显的促排作用, 该文献报道亦与本动物实验结果相一致。因此, 本动物实验进一步证实这 4 种整合剂排 U(VI) 效果的强弱顺序为: CBMIDA \approx Tiron>DTPA- $\text{CaNa}_3\approx$ DTPA- ZnNa_3 , 与本研究建立的竞争 ELISA 方法检测整合剂与 apo-Tf 竞争结合 U(VI) 能力的强弱顺序相吻合。

综上所述, 本研究建立的基于 apo-Tf 的竞争 ELISA 法能有效预测整合剂络合 U(VI) 的能力, 可作为初步筛选 U(VI) 促排整合剂的体外模型; 该方法的建立亦为其他放射性核素和重金属促排整合剂的筛选与发现提供了新思路。

References

- [1] Faa A, Gerosa C, Fanni D, et al. Depleted uranium and human health [J]. *Curr Med Chem*, 2018, 25: 49-64.
- [2] Craft E, Abu-Qare A, Flaherty M, et al. Depleted and natural uranium: chemistry and toxicological effects [J]. *J Toxicol Environ Health Part B*, 2004, 7: 297-317.
- [3] Bleise A, Danesi PR, Burkart W. Properties, use and health effects of depleted uranium (DU): a general overview [J]. *J*

- Environ Radioact, 2003, 64: 93-112.
- [4] Wang XM, Ji GX, Shi C, et al. Structural and thermodynamic stability of uranyl-deferiprone complexes and the removal efficacy of U(VI) at the cellular level [J]. Dalton Trans, 2018, 47: 8764-8770.
- [5] Averseng O, Hagège A, Taran F, et al. Surface plasmon resonance for rapid screening of uranyl affine proteins [J]. Anal Chem, 2010, 82: 9797-9802.
- [6] El Hage Chahine J, Hémadi M, Ha-Duong N. Uptake and release of metal ions by transferrin and interaction with receptor 1 [J]. Biochim Biophys Acta, 2012, 1820: 334-347.
- [7] Deblonde GJ, Sturzbecher-Hoehne M, Mason AB, et al. Receptor recognition of transferrin bound to lanthanides and actinides: a discriminating step in cellular acquisition of f-block metals [J]. Metallomics, 2013, 5: 619-626.
- [8] Malard V, Gaillard J, Bérenguer F, et al. Urine proteomic profiling of uranium nephrotoxicity [J]. Biochim Biophys Acta, 2009, 1794: 882-891.
- [9] Shaki F, Hosseini M, Ghazi-Khansari M, et al. Toxicity of depleted uranium on isolated rat kidney mitochondria [J]. Biochim Biophys Acta, 2012, 1820: 1940-1950.
- [10] Pierrefite-Carle V, Santucci-Darmanin S, Breuil V, et al. Effect of natural uranium on the UMR-106 osteoblastic cell line: impairment of the autophagic process as an underlying mechanism of uranium toxicity [J]. Arch Toxicol, 2017, 91: 1903-1914.
- [11] Wagner SE, Burch JB, Bottai M, et al. Ground water uranium and cancer incidence in South Carolina [J]. Cancer Cause Control, 2011, 22: 41-50.
- [12] Hemadi M, Ha-Duong N, El Hage Chahine J. Can uranium be transported by the iron-acquisition pathway? Ur uptake by transferrin [J]. J Phys Chem B, 2011, 115: 4206-4215.
- [13] Domingo JL, Ortega A, Llobet JM, et al. Effectiveness of chelation therapy with time after acute uranium intoxication [J]. Fundam Appl Toxicol, 1990, 14: 88-95.
- [14] Fukuda S, Ikeda M, Nakamura M, et al. Efficacy of oral and intraperitoneal administration of CBMIDA for removing uranium in rats after parenteral injections of depleted uranium [J]. Radiat Prot Dosim, 2009, 133: 12-19.
- [15] Fukuda S, Ikeda M, Nakamura M, et al. Effects of pH on DU intake and removal by CBMIDA and EHBP [J]. Health Phys, 2007, 92: 10-14.
- [16] Zhang XX, Bao YZ, Wang MM, et al. Competitive combination with uranium (VI) between chelating agent and metallothionein [J]. Chin J Radiol Health (中国辐射卫生), 2019, 28: 12-16.
- [17] Hao YH, Huang JW, Liu C, et al. Differential protein expression in metallothionein protection from depleted uranium-induced nephrotoxicity [J]. Sci Rep, 2016, 6: 38942.
- [18] Guo M, Lu XW, Ran XY, et al. Molecular transport mechanism of pefloxacin mesylate binding with transferrin [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2012, 47: 1503-1510.
- [19] Wang M, Ding WJ, Wang DQ. Binding mechanism of uranyl to transferrin implicated by density functional theory study [J]. RSC Adv, 2017, 7: 3667-3675.
- [20] Benavides-Garcia MG, Balasubramanian K. Structural insights into the binding of uranyl with human serum protein apotransferrin structure and spectra of protein-uranyl interactions [J]. Chem Res Toxicol, 2009, 22: 1613-1621.
- [21] Gkouvatso K, Papanikolaou G, Pantopoulos K. Regulation of iron transport and the role of transferrin [J]. Biochim Biophys Acta, 2012, 1820: 188-202.
- [22] Montavon G, Apostolidis C, Bruchertseifer F, et al. Spectroscopic study of the interaction of U(VI) with transferrin and albumin for speciation of U(VI) under blood serum conditions [J]. J Inorg Biochem, 2009, 103: 1609-1616.
- [23] Sutton M, Burastero SR. Uranium(VI) solubility and speciation in simulated elemental human biological fluids [J]. Chem Res Toxicol, 2004, 17: 1468-1480.
- [24] Carrière M, Thiebault C, Milgram S, et al. Citrate does not change uranium chemical speciation in cell culture medium but increases its toxicity and accumulation in NRK-52E cells [J]. Chem Res Toxicol, 2006, 19: 1637-1642.
- [25] Mirto H, Barrouillet MP, Henge-Napoli MH, et al. Influence of uranium(VI) speciation for the evaluation of *in vitro* uranium cytotoxicity on LLC-PK1 cells [J]. Hum Exp Toxicol, 1999, 18: 180-187.
- [26] Lan LA, Wu SY, Yu SD, et al. Fast and direct determination of catechol-3,6-bis(methyleiminodiacetic acid) prototype in beagle dog plasma using liquid chromatography tandem mass spectrometry: a simplified and high throughput *in-vivo* method for the metal chelator [J]. J Chromatogr A, 2019, 1596: 84-95.
- [27] Bao YZ, Wang D, Hu YX, et al. Efficacy of chelator CBMIDA-CaNa₂ for the removal of uranium and protection against uranium-induced cell damage in human renal proximal tubular cells [J]. Health Phys, 2013, 105: 31-38.