

红花注射液疑似致敏蛋白的初步研究^Δ

李建平*, 康永, 贺石麟, 杨国珍, 程玉钊[#](山西省中医药研究院, 太原 030012)

中图分类号 R285 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2015)07-0898-03
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2015.07.10

摘要 目的:研究红花注射液致敏反应相关蛋白。方法:收集有/无致敏性红花注射液各3批,经离子交换树脂梯度洗脱富集其中的总蛋白,利用十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)法分离蛋白并初步分析其差异。结果:40 kD和26 kD处,有致敏性红花注射液各有1个颜色较深、轮廓清晰的蛋白条带;10~17 kD处,无致敏性红花注射液有1个颜色较深、轮廓清晰的蛋白条带。结论:40 kD和26 kD处的蛋白可能是红花注射液致敏的原因之一,而17 kD处的蛋白可能不会引起过敏反应。致敏蛋白的分子结构及含量限度等仍需进一步研究。

关键词 红花注射液;致敏;蛋白;十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳

Preliminary Study on Suspected Hypersensitive Protein of *Carthamus tinctorius* Injection

LI Jian-ping, KANG Yong, HE Shi-lin, YANG Guo-zhen, CHENG Yu-chuan(Shanxi Academy of Traditional Chinese Medicine, Taiyuan 030012, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To study the hypersensitive reaction-related protein of *Carthamus tinctorius* injection. METHODS: Three batches of *C. tinctorius* injection with or without hypersensitive reaction were collected, and the proteins of *C. tinctorius* injection were separated and enriched by gradient elution of ion exchange resin; sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gelelectrophoresis (SDS-PAGE) was used to separate the proteins and preliminarily analyze the differences of them. RESULTS: The allergenic *C. tinctorius* injection had two deep-color, clear-cut bands, of which the protein molecular weight were 40 kD and 26 kD, respectively. Non-allergenic *C. tinctorius* injection have only one deep-color, clear-cut band, of which the protein molecular weight was 10-17 kD. CONCLUSIONS: The 40 kD and 26 kD protein are probably one of the reasons of *C. tinctorius* injection sensitization, but the 17 kD protein may not cause allergic reactions. The molecular structure and content limit of sensitization protein still needs further analysis.

KEYWORDS *C. tinctorius* injection; Allergic; Protein; Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gelelectrophoresis

红花注射液是中药红花经多步提取精制而成的无菌水溶液,具有活血化瘀、消肿止痛等功能,广泛应用于骨折^[1]、冠心病、心绞痛^[2]、急性脑梗死^[3]等疾病的治疗。随着其治疗范围的不断扩大,红花注射液的不良反应也日趋增多^[4-5],且有些过敏反应较严重,如哮喘^[6]、过敏性休克^[7]等。但针对其致敏物质开展的实验性研究很少。本课题组在前期研究^[8]中通过全身主动皮肤过敏反应和被动皮肤过敏反应证实红花注射液(批号:07123101)具有致敏性,在后续研究中发现批号为20070318、20070201的红花注射液在被动皮肤过敏反应实验中也出现阳性反应,但导致过敏的物质种类尚不明确。本研究针对红花注射液中的大分子蛋白类物质进行提取、纯化,并利用十二烷基硫酸钠(SDS)-聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE)法对混合蛋白进行初步分离,进而分析、比较有/无致敏性红花注射液中所含蛋白的异同。

1 材料

^Δ 基金项目:国家自然科学基金资助项目(No.81001691);山西省基础研究项目(No.2010021037-2);山西省中医药研究院院级课题(No.201001)

* 硕士研究生。研究方向:中药药理及其安全性评价。E-mail:lijianping905@163.com

[#] 通信作者:主管药师,硕士。研究方向:中药药剂学。E-mail:chengyuchuan2004@163.com

1.1 仪器

LGJ-18A型冷冻干燥机(北京四环科学仪器有限公司);HJ-3型恒温磁力加热搅拌器(天津红杉实验设备厂);1-14型小容量台式高速离心机(美国Sigma公司);KDC-2046型低速冷冻离心机(科大创新股份有限公司中佳分公司);JY-SCZ2型双垂直电泳槽、JY200C型电泳仪(北京君意东方电泳设备有限公司)。

1.2 药品与试剂

红花注射液(太原某药业有限公司,有致敏性产品,批号:07123101、20070318、20070201;无致敏性产品,批号:13072903、13060803、13040102);DEAE-52树脂(英国Whatman公司);透析袋(MW3 500)、超滤离心管(MW10 000)均购自美国Millipore公司;牛血清白蛋白(BSA,北京奥博星生物科技有限责任公司,批号:20100112);SDS、戊二醛均购自美国Sigma公司;丙烯酰胺、硫酸铵、Tris、甘油、过硫酸铵(Ap)、考马斯亮蓝G-250/R-250、四甲基乙二胺(TEMED)均购自美国Amresco公司。

2 方法^[9-11]

2.1 考马斯亮蓝法测定蛋白质质量浓度

在电泳分离前,首先测定样品中的蛋白质质量浓度,初步了解其中蛋白的质量浓度,并使同一块凝胶中各泳道的蛋白上样量一致。

2.1.1 酸性染色液的制备 取考马斯亮蓝 G-250 0.1 g,精密称定,加入 95%乙醇 50 ml 和磷酸 100 ml,蒸馏水定容至 1 000 ml,混匀,滤过,备用。

2.1.2 标准曲线的绘制 制备 BSA 标准溶液 1.0 mg/ml,分别移取该溶液 0.01、0.02、0.04、0.06、0.08、0.10 ml 置于具塞试管中,加蒸馏水补足至 0.1 ml,再分别加入酸性染色液 5.0 ml,立即混匀,于 595 nm 波长处测定吸光度。以蛋白质质量浓度为横坐标,吸光度为纵坐标,绘制标准曲线。

2.1.3 蛋白质质量浓度的测定 取待测样品 0.1 ml,平行 3 份,分别加入酸性染色液 5.0 ml,立即混匀,于 595 nm 波长处测定吸光度。根据标准曲线,计算蛋白质质量浓度。

2.2 SDS-PAGE 电泳

2.2.1 电泳凝胶与其他溶液的配制 分离胶质量分数为 15%,浓缩胶质量分数为 5%。固定液:0.5%戊二醛、30%乙醇;染色液:50%甲醇、10%乙醇、0.2%考马斯亮蓝 R-250;脱色液:10%甲醇、10%乙酸。电泳凝胶配方见表 1。

表 1 电泳凝胶配方

Tab 1 Electrophoresis gel formula

配方	分离胶	浓缩胶
31%丙烯酰胺,ml	4.704	0.48
凝胶缓冲液(pH 8.6),ml	3	0.93
去离子水,ml	0.344	2.34
甘油,ml	0.95	
10%Ap, μ l	30	22.5
TEMED, μ l	6	4.5

2.2.2 电泳 恒流电压为 20 mA,电泳结束后固定 30 min,染色 30 min,脱色过夜至背景清晰。

2.3 红花注射液中残留蛋白类物质的制备与电泳分离

2.3.1 残留蛋白的制备 取各批红花注射液,分别用硫酸铵沉淀使其饱和度达 90%,4 °C 静置 2 h 后,以离心半径为 14 cm、3 500 r/min 离心 15 min,弃上清液,沉淀用去离子水溶解,滤过,透析,冷冻干燥,冻干,即得。

2.3.2 残留蛋白的电泳分离 分别取批号为 07123101、13040102 的红花注射液所得蛋白冻干粉末适量,加去离子水溶解,按“2.1.3”项下方法测定蛋白质质量浓度并计算其含量,同时取 5 μ g 蛋白上样,按“2.2”项下方法进行电泳分离。

2.4 红花注射液中残留蛋白的纯化及电泳分离

将 DEAE-52 树脂预处理后装柱(3 cm \times 30 cm),用 Tris-HCl(0.02 mol/L,pH 7.5)溶液充分平衡,精密称取各批红花注射液蛋白冻干粉末 0.5 g,加 1 ml Tris-HCl(0.02 mol/L,pH 7.5)溶液溶解后上样,依次用 Tris-HCl(0.02 mol/L,pH 7.5)溶液、含 NaCl 浓度为 0.01、0.02、0.03、0.04、0.05 mol/L 的 Tris-HCl 溶液梯度洗脱,调节流速为 0.5 ml/min,同时在 280 nm 波长处检测吸光度。收集各梯度洗脱液,混合,减压低温浓缩后,透析,超滤离心,取 5 μ g 蛋白上样,按“2.3.2”项下方法进行电泳分离。

3 结果

3.1 蛋白质质量浓度的测定结果

采用考马斯亮蓝法测定蛋白质质量浓度,得标准曲线方程为 $A=44.844c+0.0204$ ($r=1.0000$),标准曲线见图 1。红花注射液中蛋白质质量浓度见表 2。

3.2 红花注射液中残留蛋白的电泳分离结果

两批红花注射液中残留蛋白经 SDS-PAGE 电泳后,均无清

晰可辨的蛋白条带,仅可见模糊的背景颜色。红花注射液中残留蛋白的 SDS-PAGE 电泳结果见图 2。

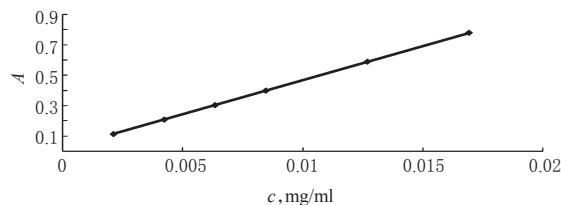


图 1 BSA 质量浓度-吸光度标准曲线

Fig 1 Bovine serum albumin concentration-absorbance standard curve

表 2 红花注射液中蛋白质质量浓度测定结果

Tab 2 Results of determination of protein concentration in the *C. tinctorius* injection

批号	粗蛋白,mg/ml	纯化蛋白,mg/ml
07123101	0.174 6	0.958 0
20070318	0.143 3	0.807 9
20070201	0.167 8	0.655 4
13072903	0.145 9	0.775 0
13060803	0.182 3	0.601 1
13040102	0.164 4	0.874 7

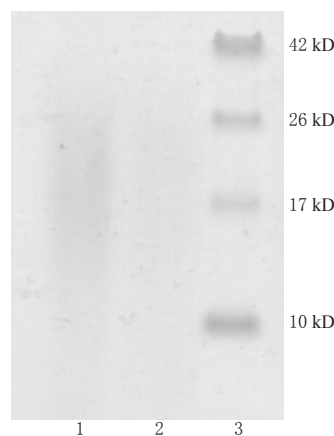


图 2 红花注射液中残留蛋白的 SDS-PAGE 电泳结果

1. 有致敏性红花注射液(批号:07123101); 2. 无致敏性红花注射液(批号:13040102); 3. 蛋白分子质量标准

Fig 2 SDS-PAGE electrophoresis results of protein residues in *C. tinctorius* injection

1. *C. tinctorius* injection with sensitization response (batch number: 07123101); 2. *C. tinctorius* injection without sensitization response (batch number: 13040102); 3. Marker

3.3 纯化后的红花注射液残留蛋白的电泳分离

经 DEAE-52 除杂后,两种混合蛋白的 SDS-PAGE 图均无背景颜色。观察条带位置可知,大于 42 kD 处均无蛋白条带;40 kD 处均有 1 个蛋白条带,有致敏性红花注射液的颜色较深且轮廓清晰,无致敏性红花注射液颜色较浅且模糊;30 kD 处均有 1 个颜色较浅且模糊的条带;26 kD 处有致敏性红花注射液有且只有 1 个蛋白条带,较为清晰,无致敏性红花注射液无蛋白条带;10~17 kD 区间各批红花注射液均有 1 个蛋白条带,无致敏性红花注射液较致敏样品的颜色深且清晰。红花注射液中纯化蛋白的 SDS-PAGE 电泳结果见图 3。

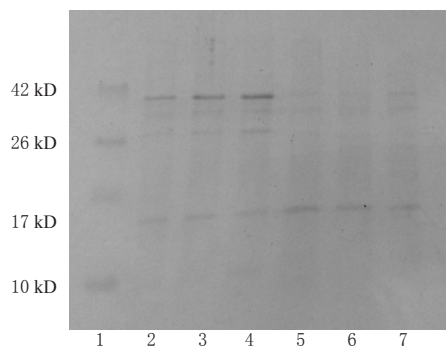


图3 红花注射液纯化蛋白的SDS-PAGE分离结果

1. 蛋白分子质量标准;2~4. 有致敏性红花注射液(批号:07123101、20070318、20070201);5~7. 无致敏性红花注射液(批号:13072903、13060803、13040102)

Fig 3 SDS-PAGE electrophoresis results of protein purifying in *C. tinctorius* injection

1. Marker; 2-4. *C. tinctorius* injection with sensitization response (batch number: 07123101, 20070318, 20070201); 5-7. *C. tinctorius* injection without sensitization response (batch number: 13072903, 13060803, 13040102)

4 讨论

红花注射液残留蛋白不经纯化直接进行SDS-PAGE电泳,未能获得清晰可辨的蛋白条带,仅有成片的背景颜色,其原因可能是红花注射液本身含有少量多糖、色素、鞣质等较复杂的其他成分干扰所致。通过采用DEAE-52树脂柱层析除杂后,其电泳图谱的条带清晰可见,重现性好。

由电泳结果可知,红花注射液致敏与否,其内含残存蛋白有明显差异。本研究中,发现共有3个分子质量的蛋白条带存在差异。在40 kD和26 kD处,有致敏性红花注射液均有1个颜色较深的蛋白条带;而在10~17 kD处,无致敏性红花注射液蛋白条带较深。由以上结果可初步推断,致敏性红花注射液中40 kD和26 kD两个较大分子质量的蛋白含量较高,可能

是红花注射液致敏的原因之一;同时,可推测较小分子质量的蛋白可能不会导致过敏。至于致敏蛋白物质的结构及含量限度,还有待进一步研究。

参考文献

- [1] 刘聚良,苗琳,王海军,等.红花注射液与接骨板结合术治疗多发肋骨骨折疗效观察[J].陕西中医,2014,35(4):450.
- [2] 陈文斌,薛梅苓,单升高.红花注射液治疗冠心病心绞痛的临床疗效分析[J].中国卫生产业,2013,17(68):68.
- [3] 张伟英.红花注射液治疗急性脑梗死50例疗效观察[J].现代诊断与治疗,2013,24(17):3874.
- [4] 魏琴.红花注射液不良反应55例分析[J].北方药学,2013,10(3):136.
- [5] 曾聪彦,梅全喜.34例红花注射液不良反应文献分析[J].中国药房,2006,17(20):1574.
- [6] 梁艳霞,王玉英.红花注射液致哮喘发作1例[J].北方药学,2013,10(10):194.
- [7] 葛红星,刘艳红,雷招宝.红花注射液致过敏性休克16例文献分析[J].中成药,2012,34(9):1836.
- [8] 张潞,岳永花,程玉钊,等.红花注射液致I型过敏反应试验[J].中国医院药学杂志,2012,32(17):1319.
- [9] 张善玉,葛娜.中药材中蛋白质含量测定方法的研究[J].中国实用医药,2009,4(21):246.
- [10] 吴兴达,陈伟,黄海波,等.中华绒螯蟹组织蛋白中变应原组分的分析与提取[J].中国生物制品学杂志,2009,22(11):1084.
- [11] 张华,陈伟,张晓峰,等.刀额新对虾组织蛋白中变应原组分的分析与纯化[J].中国生物制品学杂志,2008,21(10):873.

(收稿日期:2014-04-19 修回日期:2014-06-22)

(编辑:张静)

国家卫生和计划生育委员会副主任王培安主持召开部分医改重点联系省份工作座谈会

本刊讯 2015年1月30日,国家卫生和计划生育委员会副主任王培安在福建省三明市主持召开江西省、山东省、重庆市、新疆维吾尔自治区和新疆生产建设兵团等部分医改重点联系省份推进医改工作专题座谈会。王培安一行实地考察了三明市沙县医院、三明市医保基金管理中心和三明市第一医院,听取了福建省、三明市医改工作情况介绍和江西省、山东省、重庆市、新疆维吾尔自治区以及新疆生产建设兵团医改工作的下一步安排情况。座谈会上,有关省份充分交流了地方医改工作经验,并就目前医改工作中的一些难点和热点问题进行了讨论。

王培安强调,2015年是落实医改“十二五”规划的收官之年,时间紧、任务重,为推动改革进程,国家卫生和计划生育委员会党组专门研究建立了委领导联系地方省份医改工作制度。这次组织召开座谈会,主要目的就是落实国家卫生和计划生育委员会《委领导2015年医改重点联系省份分工方案》要求,了解重点联系地区推动落实医改工作总体部署情况,掌握公立医院改革试点工作动态、面临的主要困难和突出问题,研

究落实李斌主任在2015年全国卫生计生工作会议上的讲话精神,做好下一步医改联系工作。

王培安充分肯定了福建省和三明市取得的成绩。他指出,福建省和三明市党委、政府以及卫生计生等有关部门对深化医改工作高度重视,认真落实各项医改任务,特别是在推动公立医院改革、破除“以药补医”机制方面有创举、有亮点,取得了积极进展,探索出了很多好的做法和经验,值得各地总结和借鉴。

王培安指出,要从经济新常态对社会领域改革要求的高度,充分认识卫生计生事业改革发展和深化医改的紧迫性。地方要突出重点、真抓实干,落实投入责任,推进医疗服务价格改革,下大力气坚决破除“以药补医”机制,推进人事薪酬制度改革、建立分级诊疗制度、探索现代医院管理制度等配套改革,推动医改取得突破性进展。他特别要求强化思想政治工作,破除思想桎梏,提升医务人员思想境界,调动改革积极性,为深化医改夯实思想基础,营造良好的社会风气和行业作风。