

基于免疫指纹图谱法筛查双黄连注射剂的致敏成分

文雯^{1,2}, 贺福元^{1,3}, 刘文龙^{1,3}, 周逸群^{1,3*}, 刘红宇^{2*}

(1. 湖南中医药大学 药学院, 湖南 长沙 410208;

2. 湖南中医药大学 第一附属医院, 湖南 长沙 410007;

3. 中药成药性与制剂制备湖南省重点实验室, 湖南 长沙 410208)

[摘要] 该文采用免疫指纹图谱法,以酶联免疫吸附法(ELISA)结合HPLC/MS法筛查双黄连注射剂(SHLI)的致敏性成分,制备SHLI的鼠抗兔血清免疫球蛋白E抗体(抗IgE抗体)通过ELISA包埋抗IgE抗体可成功吸附SHLI及其不同给药途径的含药血浆样品中的致敏原,提示SHLI可引起大鼠产生I型超敏反应。建立抗IgE抗体吸附前后各样品的HPLC指纹图谱和质谱图,由HPLC指纹图谱的相似度和MS图谱归纳结果可知,不同给药方式可改变SHLI的致敏性,SHLI及其含药血浆中可被特异性抗IgE抗体吸附的成分有22种,多为酸类、酯类及含氮化合物。基于超分子理论推断这些酸类、酯类及含氮化合物来源于SHLI或机体,可能形成超分子半抗原,致使其口服不过敏而作为注射剂使用时具有免疫毒性引发过敏反应。比较传统的中药注射剂致敏原筛查方法,免疫指纹图谱法不仅限于单成分致敏原筛查,该方法纳入成分更全面,灵敏度高,操作方便,可为今后中药注射剂过敏反应的研究方法提供参考。

[关键词] 双黄连注射剂; 免疫指纹图谱; 超分子; 过敏反应; 抗IgE抗体

Screening of Shuanghuanglian Injection allergenic ingredients based on immune fingerprint

WEN Wen^{1,2}, HE Fu-yuan^{1,3}, LIU Wen-long^{1,3}, ZHOU Yi-qun^{1,3*}, LIU Hong-yu^{2*}

(1. Department of Pharmaceutics, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410208, China;

2. First Affiliated Hospital of Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410007, China; 3. Hunan Provincial Key

Laboratory of Druggability and Preparation Modification of Traditional Chinese Medicine, Changsha 410208, China)

[Abstract] In this paper, immune fingerprint was used to screen the allergenic components of Shuanghuanglian Injection (SHLI) by enzyme-linked immuno sorbent assay (ELISA) combined with HPLC/MS method. ELISA-embedded anti-IgE antibody could successfully adsorb allergens in SHLI and its plasma samples containing drugs through different routes of administration, suggesting that SHLI can induce type I hypersensitivity in rats. HPLC fingerprints and MS map of SHLI and drug-containing plasma samples from different routes of administration before and after anti-IgE antibody adsorption were established. According to the similarity evaluation of HPLC fingerprints and analysis results MS map, the sensitization of traditional Chinese medicine injections can be changed by different administration methods. There were 22 kinds of components that can be adsorbed by specific anti-IgE antibodies in Shuanghuanglian Injection and its drug-containing plasma, most of them were acids and nitrogen compounds. Based on supramolecular theory, it was inferred that these compounds came from SHLI or body, and may form supramolecular hapten, which results in immunotoxicity and allergic reaction when being used as injection instead of oral liquid. Immune fingerprint is not only used to screen out single component allergen, but also more comprehensive, sensitive and easy to operate. It can provide reference for the future research methods of allergic reaction of traditional Chinese medicine injections.

[Key words] Shuanghuanglian Injection; immune fingerprint; supramolecular; anaphylactoid; anti-IgE antibody

doi: 10.19540/j.cnki.cjmm.20190325.301

[收稿日期] 2018-11-23

[基金项目] 国家自然科学基金青年项目(81803729); 湖南省自然科学基金项目(2016JJ2097)

[通信作者] * 刘红宇 教授 硕士生导师, E-mail: lhy9544@163.com; * 周逸群, E-mail: zhoyiqun123@sina.com

[作者简介] 文雯 硕士研究生, E-mail: 793691251@qq.com

中药注射剂的不良反应主要是(类)过敏反应^[1],其中过敏反应需预先致敏产生血清免疫球蛋白E抗体(IgE抗体),再由IgE抗体介导产生^[2]。目前的致敏原检验方法主要包括特异性抗体检测、免疫印迹分析、放射性过敏原吸附试验(RAST)、RAST阻断分析试验、酶联免疫吸附试验、基因组学分析技术、蛋白质组学分析技术、表面等离子共振生物传感分析技术等^[3],上述技术较适宜单成分引起的致敏反应,而中药注射剂为多成分复杂物质,需从众多的中药成分群中筛查出致敏成分群,还需研究与致敏成分群结合的载体蛋白。前期本课题组在经典的酶联免疫吸附法的基础上,改二抗显色为直接采用GC-MS、HPLC-MS指纹图谱测定抗原,建立了免疫指纹图谱法^[4],用特异性抗体对半抗原药物成分的选择性吸附原理,通过比对中药注射剂与抗IgE抗体吸附前后指纹图谱的差异来确定可能的致敏原^[5]。双黄连注射剂^[6](SHLI)是临床上常用的抗病毒、抗菌药。然而2016年国家食品药品监督管理总局通报的中药不良反应(ADR)报告中,中药注射剂占比53.7%^[7],其中以(类)过敏为主。已有研究证明,黄连注射液的致敏反应发生率为64.5%,主要因素可能与小分子成分的(类)过敏原性有关^[8-9]。SHLI成分复杂,其致敏原可能为单分子、代谢产物及其组合而成的超分子^[10]。

本实验采用免疫指纹图谱法,先制备抗IgE抗体,分离包埋鼠抗兔的IgE抗体,吸附经SHLI致敏的鼠IgE抗体,对比和分析抗IgE抗体捕获前后注射液及其含药血浆的指纹图谱和质谱,根据特征峰的增减或缺失来确定致敏性成分,并期望从超分子作用层面来探讨SHLI与过敏反应之间的关系。

1 材料

双黄连粉针剂(哈药集团中药二厂,批号1206222,600 mg/瓶);弗氏完全佐剂(Sigma公司,F5881);弗氏不完全佐剂(Sigma公司,F5506);卵清蛋白(OVA,北京鼎国生物技术有限责任公司,DH015-1);黄芩苷(化学对照品,中国食品药品检定研究院,110715-200413);绿原酸(化学对照品,中国食品药品检定研究院,110753-200413);生理盐水(武汉滨湖双鹤药业有限责任公司,批号080904406);DEAE-52(上海蓝季科技发展有限公司);Sephadex G-200(北京索莱宝有限公司);丙烯酰胺(Acry),甲叉双丙烯酰胺(Bis),三羟甲基氨基

甲烷(Tris),四甲基乙二胺(TEMED,Ultra Pure Grade,Solarbio); β -巯基乙醇(Ultra Pure Grade,Sigma);甘氨酸(Biotechnology Grade,Solarbio)。

Agilent 1290 高效液相色谱仪、Agilent 6530 Q-TOF-MS(美国Agilent公司);800型电动离心机(江苏金坛市金城国胜实验仪器厂);透析袋(MD 34 Solarbio公司);Immulon96孔微量滴定板(长沙丽欣生物科技有限公司);VE-180电泳槽、EPS-300电泳仪(上海天能科技有限公司);TY-80A脱色摇床(江苏省金坛市莱华仪器制造有限公司);肝素钠抗凝采血管(湖南省浏阳市医用仪器厂)。

新西兰白兔,SPF级,雄性,体质量2 kg左右,由长沙市天勤生物技术有限公司提供,合格证号SCXK(湘)2009-0012。SPF级Wistar大鼠,雄性,购于湖南斯莱克景达实验动物有限公司,许可证号为SCXK(湘)2009-0012。

2 方法

2.1 SHLI抗IgE抗体的制备

2.1.1 一抗的制备

2.1.1.1 弗氏佐剂-抗原乳剂和试液的配制 取双黄连粉针剂,注入生理盐水,充分混匀配制成 $300\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的双黄连注射液,取1 mL黄连注射液加入1 mL弗氏佐剂混合使其乳化完全,即得弗氏佐剂-抗原乳剂。取 NaH_2PO_4 0.041 4 g, Na_2HPO_4 1.695 9 g于1 000 mL量瓶中,加超纯水溶解并定容至刻度,即得pH 8.0的 $0.005\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ PB缓冲液。取 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 80 g,加超纯水100 mL,边搅拌边加热使之完全溶解(温度不能超过 $100\text{ }^\circ\text{C}$),冷却,用28%氨水调pH至7.0,即得 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 饱和溶液。取 NaH_2PO_4 0.207 0 g, Na_2HPO_4 0.847 9 g于1 000 mL量瓶中,加超纯水溶解并定容至刻度,即得pH 8.0的 $0.025\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ PB缓冲液。取 NaH_2PO_4 0.296 8 g, Na_2HPO_4 2.900 0 g, NaCl 9.0 g于1 000 mL量瓶中,加超纯水溶解并定容至刻度,即得pH 7.4的 $0.01\text{ mol}\cdot\text{mL}^{-1}$ PBS缓冲液。取磺基水杨酸4 g,加20 mL超纯水溶解,即得20%磺基水杨酸溶液。取丙烯酰胺29.2 g、甲叉双丙烯酰胺0.8 g于100 mL量瓶中,加超纯水溶解并定容至刻度,即得分离胶储备液(30% Acry/Bis溶液)。取三羟甲基氨基甲烷18.06 g于100 mL量瓶中,加40 mL超纯水溶解,用 $1\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ HCl溶液调节pH至8.8,再加超纯水定容至刻度,即得分离胶缓冲液(pH 8.8, $1.5\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$

Tris-HCl 溶液)。取三羟甲基氨基甲烷 6.01 g 于 100 mL 量瓶中,加 40 mL 超纯水溶解,用 1 mol·L⁻¹ HCl 溶液调节 pH 至 6.8,再加超纯水定容至刻度,即得浓缩胶缓冲液(pH 6.8, 0.5 mol·L⁻¹ Tris-HCl 溶液)。取三羟甲基氨基甲烷 3.03 g、甘氨酸 14.4 g、十二烷基硫酸钠 1.0 g 于 1 000 mL 量瓶中,加超纯水溶解并定容至刻度,即得电极缓冲液(pH 8.3)。取分离胶缓冲液 1.0 mL, 50% 甘油溶液 0.8 mL, 10% SDS 溶液 1.6 mL, β-巯基乙醇 0.4 mL, 0.05% 溴酚蓝溶液 0.2 mL, 超纯水 4.0 mL, 混合均匀,即得样品缓冲液(6X)。取过硫酸铵 1.0 g 于 10 mL 量瓶中,加超纯水溶解并定容至刻度,即得 10% 过硫酸铵溶液(10% APS)。取冰醋酸 10 mL, 甲醇 40 mL, 超纯水 50 mL, 混合均匀,即得固定液。取戊二醛 50% 溶液 30 mL, 超纯水 30 mL, 混合均匀,即得增敏液。取 20% AgNO₃ 400 μL, 氨水 400 μL, 4% NaOH 溶液 2 mL, 20% 乙醇溶液 37.2 mL, 按顺序加,即得染色液,配制过程应避光。取 20% 乙醇溶液 40 mL, 甲醛溶液 40 μL, 饱和柠檬酸溶液 10 μL, 混合均匀,即得显影液。取冰醋酸 5 mL, 加入超纯水 95 mL, 混合均匀,即得终止液。

2.1.1.2 动物处理及血样采集 取 1 mL 弗氏佐剂-抗原乳化剂免疫新西兰兔,背部多点注射,首次免疫使用弗氏完全佐剂,根据国家食品药品监督管理局《中药、天然药物免疫毒性(过敏性、光变态反应)研究技术指导原则》^[11]中有关全身主动过敏试验的症状观察和全身过敏评价标准判断兔子被成功致敏后,10 d 后改用弗氏不完全佐剂。每隔 1 周免疫 1 次,共免疫 4 次,末次免疫后 7 d 于兔耳中央动脉和边缘静脉采血,于 4 °C 冰箱中静置过夜,3 000 r·min⁻¹ 离心 15 min,取上清液,每只兔获得约 50 mL 血清,-20 °C 冻存。

2.1.1.3 免疫球蛋白的粗提 采用分步洗涤^[12]的方法,取血清 20 mL,加生理盐水 20 mL, (NH₄)₂SO₄ 饱和溶液 40 mL,使成 50% 饱和硫酸铵混合液,于 4 °C 冰箱中静置 60 min,3 000 r·min⁻¹ 离心 15 min,弃上清液。沉淀物溶于 20 mL 生理盐水中,加 (NH₄)₂SO₄ 饱和溶液 10 mL,使成 33% 饱和硫酸铵混合液,于 4 °C 冰箱中静置 60 min,3 000 r·min⁻¹ 离心 15 min,弃上清液。得沉淀物后同上再操作一次。再得沉淀物用 10 mL 生理盐水溶解,装入透析袋,在超纯水中 4 °C 透析除盐过夜,再用 pH 8.0 的 0.005

mol·L⁻¹ PB 缓冲液透析 72 h,中间换液数次。以 1% BaCl₂ 检查透析液直至无 SO₄²⁻ 出现,取上清液即为粗提免疫球蛋白。

2.1.1.4 IgE 的分离和纯化 将免疫球蛋白粗提液加入到预处理过的 DEAE-52 色谱柱中,依次用 pH 8.0 的 0.005 mol·L⁻¹ PB 缓冲液,pH 8.0 的 0.025 mol·L⁻¹ PB 缓冲液洗脱,弃去洗脱液,用 20% 磺基水杨酸检测蛋白质呈阳性时,开始收集洗脱液至检验呈阴性,用 PEG-2000 浓缩洗脱液,得初步纯化的免疫球蛋白。将所得的免疫球蛋白(含免疫球蛋白 IgE) 加入到预处理过的 Sephadex G-200 凝胶色谱柱中,用 pH 7.4 的 0.01 mol·L⁻¹ PBS 缓冲液洗脱,20% 磺基水杨酸检测蛋白质,呈阳性时,开始收集洗脱液至检验呈阴性,用 PEG-2000 进行浓缩即得 IgE 提取物,-20 °C 冻存。

2.1.1.5 IgE 的 SDS-PAGE 电泳鉴定 将成套的 2 块玻璃板用超纯水洗净,喷 75% 乙醇清洗,烘干,凹槽面向内安装于支架上。按顺序向洁净烧杯中加入超纯水 2.77 mL、分离胶储备液 4.00 mL、分离胶缓冲液 2.50 mL、10% SDS 溶液 0.07 mL、50% 甘油溶液 0.60 mL、10% APS 溶液 0.07 mL、TEMED 0.007 mL。混合均匀得到分离胶,用 1 mL 微量移液器将其注入玻璃板之间,加胶距玻璃板顶端约 2 cm 停止,立即用无水乙醇封满,垂直静置 60 min 使聚合完全。按顺序向洁净烧杯中加入超纯水 1.525 mL、分离胶储备液 0.325 mL、浓缩胶缓冲液 0.625 mL,10% SDS 溶液 0.025 mL,10% APS 溶液 0.025 mL,TEMED 0.002 5 mL,混合均匀得到浓缩胶。倾去分离胶表面液,用超纯水清洗干净,用 1 mL 微量移液器将浓缩胶加在分离胶表面,加满玻璃板之间空隙,均匀地用力插入梳子,垂直静置 5 min 使聚合完全。均匀向上拔出梳子,将聚合完全后的凝胶板与电泳槽连接安装,并与电泳仪连接好,在电泳槽中加入电极缓冲液,没过加样孔。取蛋白质样品溶液与样品缓冲液按 5:1 混合加入 EP 管中,封好口,于漂浮板上沸水浴 5 min,使蛋白质变性。蛋白质点样量为 50 μg,每孔点样体积为 30 μL,Marker 每孔点样 10 μL。打开电泳仪,设置电压 100 V 预电泳,待指示带下移至分离胶时(约 30 min),再设置电压 150 V,电泳 60 min。指示带下沿距底部约 0.5 cm 时,停止电泳。取出玻璃板,切去凝胶上层的浓缩胶,分离胶放入摇床上的培养皿内,用超纯水漂洗 3 次。弃去

超纯水,固定液固定 10 min,再用超纯水漂洗 5 min。弃去超纯水,增敏液增敏 7 min,再用超纯水漂洗 3 次,每次 3 min。弃去超纯水,染色液染色 10 min,再用 20%乙醇溶液漂洗 3 次,每次 3 min。染色过程避光操作,成像过程均在摇床上的培养皿内进行。弃去乙醇液,显影液显色至满意,立刻加终止液终止显色。

2.1.2 二抗的制备

参考一抗的制备。弗氏佐剂-抗原乳剂的配制中抗原为双黄连注射液 IgE 提取液 1 mL。动物处理及血样采集中实验动物为 Wistar 大鼠,取血方式为后颈动脉取血,离心,取上清液,每只大鼠获得约 3 mL 血清。

2.2 ELISA 免疫吸附注射液及血浆样品中的致敏成分

2.2.1 试液的配制

取双黄连粉针剂 1 瓶,注入生理盐水 8 mL,充分混匀,即得 $75 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的双黄连注射液。取 NaH_2PO_4 0.296 4 g, Na_2HPO_4 2.901 1 g, NaCl 9 g 加适量超纯水溶解于 1 000 mL 量瓶中,稀释至刻度,即得 PBS 缓冲液。加 0.5 mL 聚氧乙烯脱水山梨醇单月桂酸酯(吐温-20, Tween-20)于 1 000 mL 量瓶中,加 PBS 缓冲液溶解并稀释至刻度,摇匀,即得洗涤液 PBST。取 Na_2CO_3 1.59 g, NaHCO_3 2.93 g 于 1 000 mL 量瓶中,加超纯水定容至刻度,即得包被液(pH 9.6 的碳酸盐缓冲液)。取 0.5 g 卵清蛋白 OVA 于 50 mL 量瓶中,加适量 PBST 液溶解,定容至刻度,溶解,静置,取上清液即得封闭液。取明胶 0.1 g 于 100 mL 量瓶中,加 1 μL Tween-20,用 PBST 溶解并稀释至刻度,即得稀释液。

2.2.2 ELISA 包被抗 IgE 抗体

用包被液稀释抗 IgE 抗体至 $5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$,以每孔 100 μL 加至酶标板中,设立空白孔作为对照,4 $^\circ\text{C}$ 包被过夜。取出包被板,甩干孔中液体,用洗涤液 PBST 洗 4 次,每次 3 min,吸水纸拍干。封闭:加入封闭液每孔 150 μL ,用封口膜封好,置 37 $^\circ\text{C}$ 孵育 1 h。洗涤。

2.2.3 含药血浆的制备

取 SPF 级健康雄性 Wistar 大鼠 12 只,体质量 230~270 g,称重,利用 Excel 和随机数字表将其随机分为 2 组,每组 6 只:双黄连注射液尾静脉注射给

药(SHLI 注射)组和生理盐水尾静脉注射给药(空白)组。适应性饲养 7 d,2 组分别按 $4 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ 双黄连注射液 $75 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 和生理盐水给药,每天 1 次,共给药 4 次,末次给药后 10 min 在颈动脉取得血浆。

2.2.4 抗 IgE 抗体吸附各样品中的致敏成分

分别加入双黄连注射液、SHLI 注射组血浆和空白组大鼠血浆,每孔 50 μL ,每组 6 孔。温育:将酶标板用封口膜封好,置 37 $^\circ\text{C}$ 温育箱孵育 1 h。取样:取出酶标板,用移液枪吸出孔中液体,置于 EP 管中,即得抗 IgE 抗体吸附后注射液和血浆样品。

2.3 免疫指纹图谱的建立

2.3.1 供试品溶液的制备^[13-14]

2.3.1.1 抗 IgE 抗体吸附前/后血浆样品溶液的制备 取抗 IgE 抗体吸附前/后的 SHLI 各给药组大鼠血浆及空白组大鼠血浆各 200 μL ,分别置于尖底塑料刻度离心管中,加甲醇溶液 800 μL ,涡旋混合 5 min,4 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min。取上层清液常温下氮气流吹干,残渣用甲醇 200 μL 溶解,经 0.45 μm 的微孔滤膜过滤后待用。

2.3.1.2 抗 IgE 抗体吸附前/后双黄连注射液样品溶液的制备 精密称取双黄连粉针剂 0.100 6 g 于 100 mL 量瓶中,用超纯水溶解并定容至刻度,摇匀,得 $1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的双黄连注射液。取 200 μL 双黄连注射液和抗 IgE 抗体吸附后的双黄连注射液分别置于尖底塑料刻度离心管中,加甲醇溶液 800 μL ,涡旋混合 5 min,4 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min。取上层清液常温下氮气流吹干,残渣用甲醇 200 μL 溶解,经 0.45 μm 的微孔滤膜过滤后待用。

2.3.2 对照品溶液的制备

精密称取绿原酸对照品 0.011 2 g、黄芩苷对照品 0.013 0 g 分别置于 10 mL 量瓶中,用超纯水溶解并定容至刻度,摇匀,经 0.45 μm 微孔滤膜过滤,备用。

2.3.3 色谱条件

液相色谱-质谱联用测定条件。UltimateXB-C₁₈ 色谱柱(4.6 mm×250 mm,5 μm);流动相 0.25%醋酸溶液(A)-乙腈(B),梯度洗脱,0~2 min,5%~10% B,2~25 min,10%~35% B,25~33 min,35%~42% B,33~45 min,42%~65% B,45~47 min,65%~80% B,47~54 min,80%~95% B,54~55 min,95%~5% B;柱温 40 $^\circ\text{C}$;流速 1 $\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$;进样量 5 μL 。

离子源电喷雾离子源(ESI);毛细管电压 4 kV;

离子源温度 300 ℃; 喷嘴电压 500 V; 正离子模式; 气流量 10 L·min⁻¹; 雾化气压力 45 psi (1 psi ≈ 6.895 kPa); 检测方式飞行时间串联质谱仪(Q-TOF); 质量范围 100~1 000(*m/z*)。

2.3.4 方法学考察

2.3.4.1 精密度试验 同一批号(1206222)双黄连注射剂(干粉)样品在2.3.3项色谱条件和测定方法下,每次进样 10 μL,连续进样 6 次,测得绿原酸、黄芩苷峰面积和保留时间的 RSD 均在 3.0% 以内,相似度均在 0.95 以上,结果表明精密度较好。

2.3.4.2 稳定性试验 制备双黄连注射剂(干粉)样品原液 1 份,分别在制备后 0、2、4、8、16、24 h 进样,每次进样 10 μL,按 2.3.3 项下色谱条件和方法测定,测得绿原酸、黄芩苷峰面积和保留时间的 RSD 均在 3.0% 以内,相似度均在 0.90 以上,表明样品在 12 h 内基本稳定。

2.3.4.3 重复性试验 将同一批号(1206222)双黄连注射剂(干粉)样品,平行制备供试品 6 份,按 2.3.3 项下色谱条件和方法测定,结果表明,各色谱峰相对峰面积的 RSD 在 3.0% 左右,相似度均在 0.90 以上。

3 结果

3.1 IgE 抗体鉴定

2.1.1.5 项 SDS-PAGE 电泳鉴定结果 见图 1,对比 Marker 对照物在 70 kDa 条带最为明显,血清 IgE 在 70 kDa 条带和 25 kDa 条带明显,其电泳结果显示条带清晰,杂质较少,说明免疫球蛋白 IgE 分离成功,且较纯。

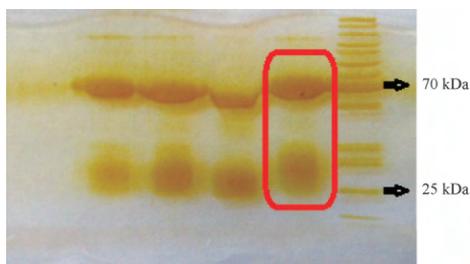


图 1 血清 IgE(圆框标记)的 SDS-PAGE 电泳照片
Fig.1 SDS-PAGE electrophoresis photograph of serum IgE (marked by circle)

3.2 抗 IgE 抗体鉴定

2.1.2 项 SDS-PAGE 电泳鉴定结果 见图 2,对比

Marker 对照物在 70 kDa 条带最为明显,血清 IgE 在 70 kDa 条带和 25 kDa 条带明显,其电泳结果显示条带清晰,杂质较少,说明免疫球蛋白 IgE 分离成功,且较纯。

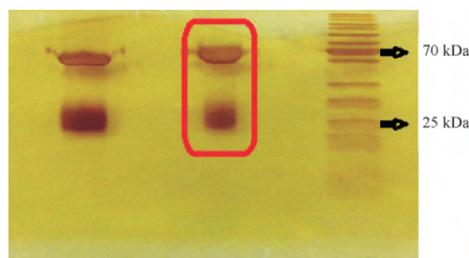


图 2 抗体 IgE(圆框标记)的 SDS-PAGE 电泳照片
Fig.2 SDS-PAGE electrophoresis photograph of serum anti-IgE (marked by circle)

3.3 标准对照品 HPLC 指纹图谱的建立

取 2.3.2 项配制的绿原酸、黄芩苷对照品在 2.3.3 项色谱条件下进样,结果见图 3。

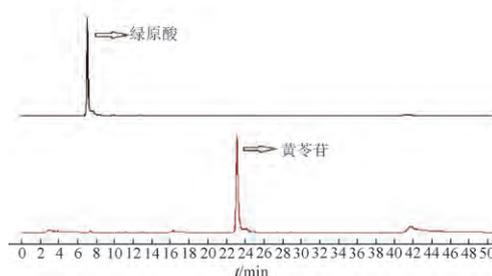


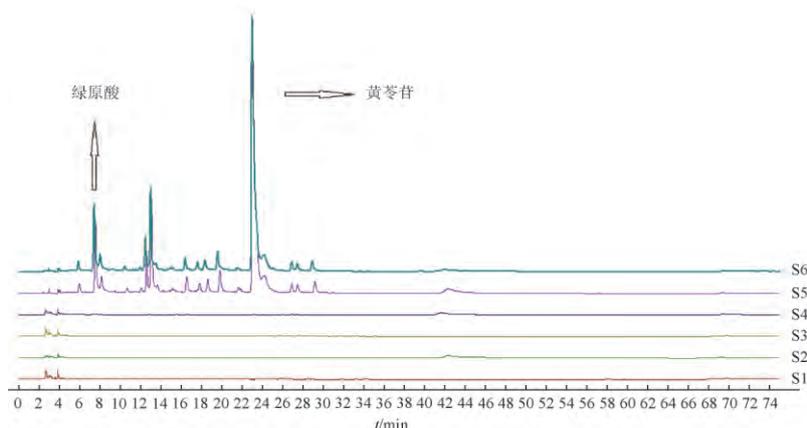
图 3 绿原酸、黄芩苷对照品 HPLC 指纹图谱
Fig.3 HPLC fingerprint of chlorogenic acid and baicalin reference substances

3.4 供试品 HPLC 指纹图谱的建立

取 2.3.1.1 项和 2.3.1.2 项配制的各组供试品按 2.3.3 项条件和方法进行测定,得到各样品的 HPLC 图见图 4,把各样品图谱的峰面积和保留时间数据导入总量统计矩相似度计算处理系统计算相似度,结果见表 1。S1~S6 相似度为 0~0.958,整体相似度较差;其中 S2(空白组吸附后血浆样品)与 S5(SHLI 吸附前样品)的指纹图谱相似度为 0,成分差异最大;S1(空白组吸附前血浆样品)与 S4(注射组吸附后血浆样品)的指纹图谱相似度为 0.958,成分差异程度最小;其他样品液的指纹图谱,各组吸附后相似度普遍小于吸附前。由以上结果可知,本实验

通过特异性抗 IgE 抗体吸附,成功捕获到致敏性物质提示 SHLI 对大鼠有致敏性。各组含药血浆样

品液所含成分及比例不同,即提示不同给药方式可改变中药注射剂的致敏性。



S1.空白组吸附前血浆样品; S2.空白组吸附后血浆样品; S3.SHLI 注射组吸附前血浆样品; S4.SHLI 注射组吸附后血浆样品; S5.SHLI 吸附前样品; S6.SHLI 吸附后样品。

图 4 免疫吸附前后不同样品溶液的 HPLC 指纹图谱

Fig.4 HPLC fingerprints of different sample solutions before and after immunoadsorption

表 1 免疫吸附前后双黄连不同样品溶液的指纹图谱相似度评价

Table 1 Fingerprint similarity evaluation of different Shuanghuanglian sample solutions before and after immunoadsorption

项目	S1	S2	S3	S4	S5	S6	对照指纹图谱
S1	1	0.227	0.477	0.958	0.002	0.008	0.092
S2	0.227	1	0.231	0.127	0	0.002	0.043
S3	0.477	0.231	1	0.489	0.009	0.006	0.099
S4	0.958	0.127	0.489	1	0.001	0.024	0.072
S5	0.002	0	0.009	0.001	1	0.027	0.826
S6	0.008	0.002	0.006	0.024	0.027	1	0.577
对照指纹图谱	0.092	0.043	0.099	0.072	0.826	0.577	1

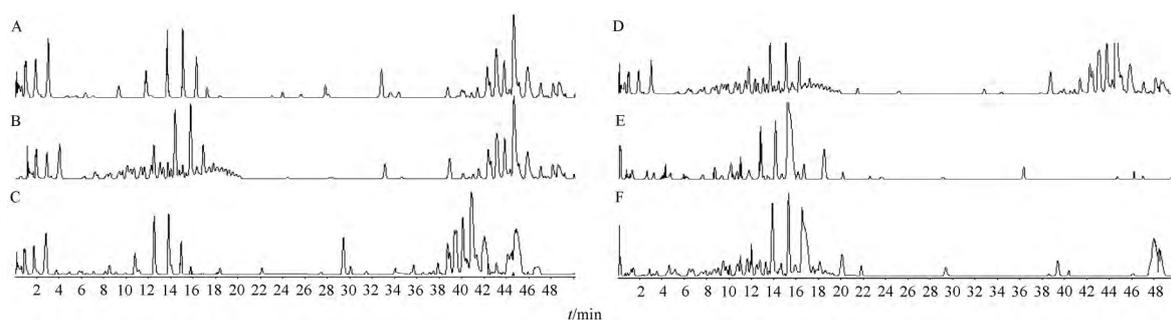
3.5 供试品 MS 指纹图谱的建立

按 2.3 项的条件和方法进行测定,各样品在吸附前后的质谱总离子流图见图 5。根据峰的保留时间及质谱信息进行分析,空白组血浆吸附前样品分离出 128 种化学成分,吸附后样品分离出 159 种化学成分; SHLI 注射组血浆吸附前样品分离出 196 种化学成分,吸附后样品分离出 179 种化学成分; SHLI 吸附前分离出 150 种化学成分,吸附后样品分离出 185 种化学成分。仅 SHLI 注射组血浆样品吸附后比吸附前化合物数量减少,其余各组样品吸附后的化合物数量均比吸附前减增多。将各组样品吸附前后有变化的特征峰进行归纳,结果见表 2。SHLI 及其含药血浆中可被特异性 IgE 抗体吸附的成分有 22 种,相对分子质量为 114 ~

908,多为酸类、酯类及含氮化合物,均为引起 I 型超敏反应的致敏原。

4 结论与讨论

本实验通过抗 IgE 抗体的特异性吸附,成功捕获到致敏原,提示 SHLI 可导致大鼠产生 I 型超敏反应,且不同的给药方式可改变中药注射剂的致敏性。从 MS 图谱归纳出具有致敏性的酸类、酯类及含氮化合物等可能来自于 SHLI 中的某些成分、制剂辅料以及体内代谢产物^[15],这些化合物可能是单成分与载体蛋白作用产生全抗原,也可能是多个成分相互作用形成超分子直接与载体蛋白产生全抗原而致敏。中药注射剂的有效成分群通常为小分子物质而不具有免疫原性,但可能发生相互络合、复合、螯合、包含、中和、自组装、化学反应等形成超分



A.空白组吸附前血浆样品; B.空白组吸附后血浆样品; C.SHLI 注射组吸附前血浆样品; D.SHLI 注射组吸附后血浆样品; E.SHLI 吸附前样品; F.SHLI 吸附后样品。

图5 双黄连样品吸附前后的质谱总离子流图

Fig.5 Mass spectrometric total ion current charts of Shuanghuanglian samples before and after immunosorption

表2 双黄连各组样品吸附前后有变化的特征峰归纳

Table 2 Fingerprint similarity evaluation of different Shuanghuanglian sample solutions before and after immunoadsorption

No.	质子数/电子数	离子模式	名称	分子式	匹配评分
1	362.095 3	(M+H) ⁺	cys his cys	C ₁₂ H ₂₀ N ₅ O ₄ S ₂	81.81
2	140.07	(M+H) ⁺	isoamyl nitrite	C ₅ H ₁₁ NNaO ₂	86.26
3	162.112 6	(M+H) ⁺	3-butyl propionic acid	C ₇ H ₁₆ NO ₃	99.77
4	118.086 5	(M+H) ⁺	4-amino-pentanoic acid	C ₅ H ₁₂ NO ₂	85.82
5	132.101 9	(M+H) ⁺	isoleucine	C ₆ H ₁₄ NO ₂	98.55
6	268.996 1	(M+H) ⁺	dimethylallyl pyrophosphate	C ₅ H ₁₂ NaO ₇ P ₂	93.6
7	132.101 8	(M+H) ⁺	leucine	C ₆ H ₁₄ NO ₂	44.42
8	120.080 4	(M+H) ⁺	-	-	-
9	166.086	(M+H) ⁺	2-amino-4'-hydroxy-propiofenone	C ₉ H ₁₂ NO ₂	99.22
10	205.097 1	(M+NH ₄) ⁺	indoleacrylic acid	C ₁₁ H ₁₃ N ₂ O ₂	99.76
11	188.063 2	(M+H) ⁺	-	-	-
12	114.091 6	(M+H) ⁺	epsilon-caprolactam	C ₆ H ₁₂ NO	85.95
13	194.081 3	(M+H) ⁺	2-methylhippuric acid	C ₁₀ H ₁₂ NO ₃	99.23
14	190.084 6	(M+H) ⁺	methyl dopamine	C ₉ H ₁₃ NNaO ₂	95.72
15	569.312 6	(M+H) ⁺	protoporphyrinogen IX	C ₃₄ H ₄₁ N ₄ O ₄	83.45
16	394.221 9	(M+NH ₄) ⁺	18-oxocortisol	C ₂₁ H ₃₂ NO ₆	98.87
17	209.116 4	(M+H) ⁺	phosphonic acid, p-(2-phenylethynyl)-, diethyl ester	C ₁₂ H ₁₇ O ₃	96.28
18	426.320 1	(M+H) ⁺	-	C ₂₄ H ₄₄ NO ₅	95.2
19	279.158 4	(M+H) ⁺	-	C ₁₆ H ₂₃ O ₄	92.72
20	908.649 3	(M+H) ⁺	-	C ₄₈ H ₉₄ NO ₁₂ S	93.13
21	864.623 8	(M+H) ⁺	-	C ₄₆ H ₉₀ NO ₁₁ S	92.57
22	556.440 4	(M+H) ⁺	-	C ₃₁ H ₅₅ D ₅ KO ₅	80.52

子化合物^[10],或者与辅料以及体内的活性代谢产物(糖类、蛋白质等)结合而形成超分子化合物,直接或通过药物代谢酶分解后与蛋白类载体连接而形成载体复合物——超分子半抗原,进而通过抗原的处理、提呈及免疫细胞的识别、增殖和反应等一系列机制诱发免疫应答的发生^[16],由此推断,SHLI及其含药血浆中所含酸类、酯类及含氮化合物等可能形成超分子半抗原,致使其口服不过敏而作为注射剂使用时具有免疫毒性引发过敏反应。

免疫指纹图谱法较传统的致敏原筛查方法而言,该法选择特异性抗IgE抗体与中药注射剂中的成分或血液中的代谢产物反应,灵敏度高;不需制备抗体(抗原)芯片板,操作简便;采用HPLC-MS指纹图谱分析,在线可确定致敏原的结构;且不受纳入成分的限制,可用于多成分致敏原的筛查^[17],是一种更全面、更高效的中药注射剂致敏原筛查方法,可为中药注射剂过敏反应的研究提供参考。同时超分子理论的引进可为分析和解决中药注射剂引起的过敏

反应的相关难题提供新的突破口,对有针对性地改进技术,提高可预知因素比例,对中药注射剂的研制开发将具有积极影响。

[参考文献]

- [1] 张冰,吴嘉瑞,陈易新,等.穿琥宁注射剂致过敏性休克文献分析[J].中药新药与临床理,2006,17(1):65.
- [2] 杨帅才.中药注射剂过敏反应的原因分析[J].中医中药健康必读杂志,2011(2):153.
- [3] 鞠艳芳,刘蓉,杨金菊,等.氨甲酰磷酸合成酶单克隆抗体的制备、鉴定及应用[J].细胞与分子免疫学杂志,2008,24(5):479.
- [4] 曾姣丽,贺福元,唐昱,等.双黄连注射剂中黄芩苷致敏原性的研究[J].中国实验方剂学杂志,2012,18(1):102.
- [5] 陈锋,贺福元,罗杰英,等.鱼腥草注射液和新鱼腥草素钠注射液小鼠免疫毒性的评价[C].运城:全国中药创新与研究论坛,2009.
- [6] 卫生部.药品标准(中药成方制剂第11册)[S].2010.
- [7] 张彦昭,文占权,刘传绪,等.2013—2016年国家药品不良反应监测年度报告统计分析[J].药物流行病学杂志,2017,26(11):763.
- [8] 翁维良,林洪生.4种中药注射剂皮肤过敏试验方法与意义的探讨[J].中国中药杂志,2007,32(24):2649.
- [9] 陈伟,李存玉,彭国平,等.超滤工艺对双黄连注射剂致敏性的影响[J].医药导报,2012(3):292.
- [10] 贺福元,邓凯文,周逸群,等.中药注射剂(类)致敏反应的超分子作用分析与研究方法探讨[J].湖南中医药大学学报,2013,33(9):3.
- [11] 中药、天然药物免疫毒住(过敏性、光过敏反应)研究的技术指导原则课题研究组.中药、天然药物免疫毒性(过敏性、光变态反应)研究技术指导原则[S].2005.
- [12] Lin K H, Cheng S Y. An efficient method to purify active eukaryotic proteins from the inclusion bodies in *Escherichia coli* [J]. *Biotechniques*, 1991, 11(6):149.
- [13] Chanan-Khan A, Szebeni J, Savay S, et al. Complement activation following first exposure to pegylated liposomal doxorubicin (Doxil): possible role in hypersensitivity reactions [J]. *Ann Oncol*, 2003, 14: 1430.
- [14] Bodo M, Szebeni J, Baranyi J, et al. Cerebrovascular involvement in liposome induced cardiopulmonary distress in pigs [J]. *J Liposome Res*, 2005, 15: 3.
- [15] 乔海灵,赵永星,马统勋.青霉素类抗生素致敏反应机制及诊断的新近研究进展[J].国外医药·抗生素分册,2002,23(5):197.
- [16] Sueki H. Drug allergy [J]. *Nippon Rinsho*, 2009, 67(11):2139.
- [17] 贺福元,邓凯文,曾姣丽,等.中药注射剂致敏成分群筛查方法研究的现状与免疫综合法[J].中国中药杂志,2012,37(19):2836.

[责任编辑 曹阳阳]