

## 蒙古黄芪中 2 种具有免疫活性的可溶性粗蛋白提取工艺优选

陈秀红, 魏砚明, 任晋宏, 薛慧清\*, 武福云, 高丽, 岳晓华, 李敏, 刘瑞, 白承之, 梁锐, 刘必旺  
山西中医学院 实验中心, 山西 晋中 030619

**摘要:** 目的 优选蒙古黄芪 *Astragalus membranaceus mongholicus* 中 2 种免疫活性蛋白 AmPR10-16kDa 和 HQGP-2 的最佳提取工艺。方法 以蒙古黄芪中所含可溶性蛋白 AmPR10-16kDa 和 HQGP-2 二级结构的圆二色性对提取温度和提取溶剂种类进行考察; 对该 2 种蛋白提取条件进行单因素考察, 并采用  $L_9(3^4)$  正交试验设计法, 采用 Image 凝胶图形分析软件以 AmPR10-16kDa 和 HQGP-2 在 SDS-PAGE 凝胶图中的蛋白条带灰度值(峰面积)为指标, 考察提取温度、料液比、提取时间、提取溶剂(pH 值)、药材粒度、提取次数对 AmPR10-16kDa 和 HQGP-2 蛋白条带灰度值的影响, 从而确定 AmPR10-16kDa 和 HQGP-2 的最佳提取工艺, 辅以其免疫抑制率(CCK-8 法)和可溶性蛋白定量测定(BCA 法)作为佐证。结果 建立了蒙古黄芪中 AmPR10-16kDa 和 HQGP-2 的最佳提取工艺: 向药材粉末(过 4 号筛) 5.0 g 中加入 16 倍量 Tris-HCl, 在温度 40 °C 条件下恒温提取 60 min, 以 100 r/min 搅拌。蒙古黄芪蛋白质提取率为 65 mg/g, 且质量浓度为 90  $\mu\text{g/mL}$  粗蛋白的免疫抑制率为 90.90%。结论 优化的提取工艺能正确反映 AmPR10-16kDa 和 HQGP-2 收率的最高相对量, 为 AmPR10-16kDa 和 HQGP-2 的进一步研究提供了稳定、合理、可行的提取工艺。

**关键词:** 蒙古黄芪; 蛋白质; 蛋白质二级结构; SDS-PAGE; 正交试验; CCK-8 法

中图分类号: R284.2 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2016)15-2641-09

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2016.15.010

## Optimization of extraction technology of two immune active proteins from *Astragalus membranaceus* var. *mongholicus*

CHEN Xiu-hong, REN Jin-hong, WEI Yan-ming, XUE Hui-qing, WU Fu-yun, GAO Li, YUE Xiao-hua, LI Min, LIU Rui, BAI Cheng-zhi, LIANG Rui, LIU Bi-wang

Experiment Management Center, Shanxi University of Traditional Chinese Medicine, Jinzhong 030619, China

**Abstract: Objective** To optimize the extraction technology of immune active glycoproteins AmPR10-16kD and HQGP-2 from *Astragalus membranaceus* var. *mongholicus* (AMM). **Methods** The optimized extraction temperature conditions were investigated by circular dichroism of water-soluble protein involving in AmPR10-16kD and HQGP-2 with secondary structure from AMM. The optimized extraction technology was investigated using single factor test and orthogonal test with gray value of water-soluble protein AmPR10-16kD and HQGP-2 as the index which was determined by Image of gel graphical analysis software. In this study, the effects of temperature, solid-liquid ratio, time, solvent, granularity, and times on gray value were investigated, for which the inhibitory effect of water-soluble protein was determined as an evidence by CCK-8 method, and the content of water-soluble protein is determined as an evidence by BCA method. **Results** The optimized extraction technique for proteins AmPR10-16kD and HQGP-2 in AMM was established, that was 5.0 g powder of AMM over the No.4 sieve, solvent Tris-HCl, solid-liquid ratio 1:16 and 60 min for extraction at the temperature of 40 °C and being mixed under 100 r/min. The water-soluble protein extract rate in the orthogonal test analysis was 65 mg/g, of which inhibitory effect was 90.90% at a concentration of 90  $\mu\text{g/mL}$ . **Conclusion** The optimal extraction conditions could accurately reflect the relative amounts of AmPR10-16kD and HQGP-2 maximum extraction rate, providing a stable, reasonable, and feasible extraction process for further study of the bioactive substance of AMM.

**Key words:** *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bge. var. *mongholicus* (Bge.) Hsiao; protein; secondary structure of protein; SDS-PAGE; orthogonal test; CCK-8 method

收稿日期: 2016-03-31

基金项目: 国家国际合作专项项目(2013DFA30700); 山西省科技攻关项目(20130321031-01); 山西省自然科学基金资助项目(2013011052-4)

作者简介: 陈秀红, 在读硕士研究生, 主要从事中药提取分离纯化及活性成分研究。Tel: (0351)3179766 E-mail: chenxh@126.com

\*通信作者 薛慧清, 博士, 教授, 硕士生导师, 从事中药及天然药物的提取分离及活性研究。Tel: (0351)3179766 E-mail: xuehuiqing@sina.com

黄芪 *Astragali Radix* 为常用大宗药材, 始载于《神农本草经》, 有补气固表、利尿消肿、托毒生肌之功效, 被广泛应用于临床各科, 素有“十药八芪”之称<sup>[1]</sup>, 现代药理学研究证明黄芪具有保肝、利尿、抗肿瘤、抗衰老、抗应激、抗溃疡、调节血糖和血压、抑制病毒、抗菌等多种作用, 不仅能增强机体的免疫功能, 还具有双向调节作用<sup>[2-8]</sup>。《中国药典》2015 年版<sup>[9]</sup> 收录的黄芪为豆科黄芪属植物蒙古黄芪 *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bge. var. *mongholicus* (Bge.) Hsiao 或膜荚黄芪 *A. membranaceus* (Fisch.) Bge. 的干燥根。本课题组从黄芪中已分离得到具有明显免疫抑制作用的糖蛋白类化合物 HQGP<sup>[10-11]</sup>、AmGP-2<sup>[12]</sup>、AmGP-3<sup>[13]</sup>、AmPR10-16kDa ( $1.60 \times 10^4$ ) 及 HQGP-2 ( $3.10 \times 10^4$ ), 药理学研究表明黄芪蛋白质对小鼠脾淋巴细胞有抑制作用<sup>[14-16]</sup>; 对佐剂性关节炎 (adjuvant arthritis, AA) 模型大鼠和实验性自身免疫性脑脊髓炎 (experimental autoimmune encephalomyelitis, EAE) 模型小鼠有治疗作用<sup>[17-20]</sup>。同时淋巴细胞体外增殖试验显示, 黄芪蛋白抑制作用不同于雷公藤甲素、雷帕霉素、氢化可的松, 推测其具有独特的作用机制<sup>[21]</sup>。本研究以 AmPR10-16kDa 及 HQGP-2 的提取工艺优化为研究对象, 采用圆二色谱 (CD) 法<sup>[22-23]</sup> 考察提取温度与提取溶剂对目标蛋白结构的影响, 应用 Image 凝胶图形分析软件以 AmPR10-16kDa 及 HQGP-2 在 SDS-PAGE 胶图中的蛋白条带灰度值 (峰面积) 为定量指标, 采用单因素方差分析筛选显著性单因素, 采用正交试验设计筛选出优化的提取工艺, 采用 CCK-8 法测定正交试验设计下各样品的免疫活性, 并采用 BCA 法测定可溶性蛋白质量来证明所筛选提取工艺的合理性, 为 AmPR10-16kDa 及 HQGP-2 的进一步研究提供稳定、合理、可行的提取工艺。

## 1 仪器与材料

MOS-500 型圆二色光谱仪, 法国 Bio-Logic 公司; BIO-RAD3000 型电泳系统, 美国 Bio-Rad 公司; SpectraMax 190 型酶标仪, 美国 MD 公司; PHS-3C 型 pH 计, 上海精科公司; M150 型低温粉碎机, 昆山强威粉体设备有限公司; A-1000S 型水流抽气机, 上海爱朗仪器有限公司; AVC-3A1 型超净工作台, 新加坡艺思高科技有限公司; 倒置显微镜, 日本 Olympus 公司; HH.CP-160 二氧化碳细胞培养箱, 上海姚氏仪器设备厂; BioSpectrum 凝胶成像系统,

美国 UVP 公司。

SPF 级雌性 ICR 小鼠, 体质量 15~18 g; SPF 级雌性 SD 大鼠, 体质量 150~180 g, 购自北京维通利华实验动物技术有限公司, 动物合格证号 SCXK (京) (2012) 0001。

刀豆蛋白 A (ConA), Sigma 公司; 细胞增殖-毒性检测试剂盒 (Cell Counting Kit-8, CCK-8), 日本同仁化学研究所; 磷酸盐缓冲液 (PBS)、牛血清白蛋白 (BSA) 对照品 (批号 2015011), 武汉博士德生物公司; 非预染中、低相对分子质量 ( $1.44 \times 10^4$ 、 $1.84 \times 10^4$ ) 标准蛋白 Marker, 美国 Thermo 公司; RPMI 1640 培养基 (Hyclone 改良型), 赛默飞世尔生物化学制品 (北京) 有限公司; 胎牛血清、青霉素-链霉素混合液 (100×)、三羟甲基氨基甲烷 (Tris) 均购自北京索莱宝科技有限公司; 醋酸格拉替雷 (GA), Sigma 公司; 2-(N-吗啉代)乙烷磺酸 (MES)、4-羟乙基哌嗪乙磺酸 (HEPES)、十二烷基硫酸钠 (SDS) 和二喹啉甲酸 (BCA) 蛋白质定量试剂盒, 均购自武汉博士德生物公司; 水为双蒸水, 试剂均为分析纯。

蒙古黄芪购自山西浑原黄芪种植基地, 经山西中医学院刘计权副教授鉴定为 4~5 年生豆科植物蒙古黄芪 *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bge. var. *mongholicus* (Bge.) Hsiao 的干燥根。

## 2 方法与结果

### 2.1 可溶性蛋白的圆二色性考察 (定性研究)

**2.1.1 原料预处理** 将黄芪洗净, 50 °C 烘干, 低温粉碎, 过筛, 留 1、2、3、4、5、6 号筛粉待用。

**2.1.2 测定条件** 室温 18~25 °C, 相对湿度 45%~75%。CD 值测试要求: 供试品为 1~100 mg/L, 液池厚度 1 mm, 起始波长 190 nm, 终止波长 250 nm, 步长 1 nm, 重复 1 次, 采集时间 1 s, CD 参数 ± (100~300) mD, CD 单位为椭圆率, 狭缝宽度 2.0 nm。

**2.1.3 不同提取温度的考察** 称定药材粉末 (3 号筛) 共 7 份, 每份 5.0 g, 用溶剂润湿后装纱布袋, 各加入用 PBS (pH 7.4) 50 mL, 称定, 分别在 4、25、40、55、70、85、100 °C 时水浴提取 60 min, 4 °C 于冰箱中浸提 60 min, 时时搅拌, 冷至室温, 称定, 加 PBS 补足质量, 将提取混悬液置于布氏漏斗抽滤装置中抽滤, 滤液过 0.45 μm 滤膜, 所得滤液作为待测溶液, 分别吸取 250 μL 待测溶液置于 1 mm 石英比色池中, 测定其 CD 值, 可得到 7 个谱

(图 1), 100 °C 有明显的二级结构 CD 谱; 其他温度的蛋白质的 CD 谱图为一趋向于 X 轴的曲线。说明随着温度的升高, 可溶性蛋白在 205~245 nm 范围内部分蛋白的二级结构在发生明显折叠变化, 4 °C 时样品的蛋白质二级结构为  $\alpha$ -螺旋 (222 nm), 100 °C 时为  $\beta$ -转角 (212 nm), 其他温度 CD 谱也随温度变化 CD 值呈逐渐上升趋势, 55 °C 时样品的蛋白质二级结构居中。

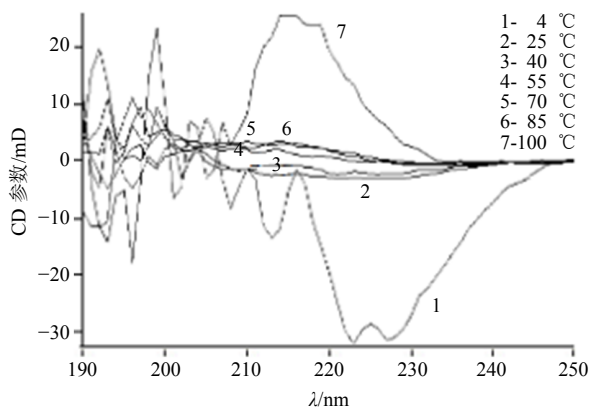


图 1 不同提取温度下可溶性蛋白的 CD 谱

Fig. 1 CD spectra of soluble protein at different extraction temperatures

**2.1.4 不同提取溶剂的考察** 称定药材粉末 (3 号筛) 共 5 份, 分别加入都含有 10 mmol/L NaCl 的 0.02 mol/L 醋酸-醋酸铵缓冲液 (pH 5.0), 25 mmol/L MES 缓冲液 (pH 6.0), 25 mmol/L HEPES 缓冲液 (HEPES, pH 7.0), PBS 缓冲液 (pH 7.4), 25 mmol/L Tris-HCl 缓冲液 (pH 8.0) 各 50 mL, 提取温度 55 °C, 其他条件同“2.1.3”项, 吸取待测溶液 250  $\mu$ L 置于 1 mm 石英比色池中, 测定 CD 值。结果如图 2 所示: 5 条 CD 谱带均为趋向于 X 轴的曲线, 不过随着 pH

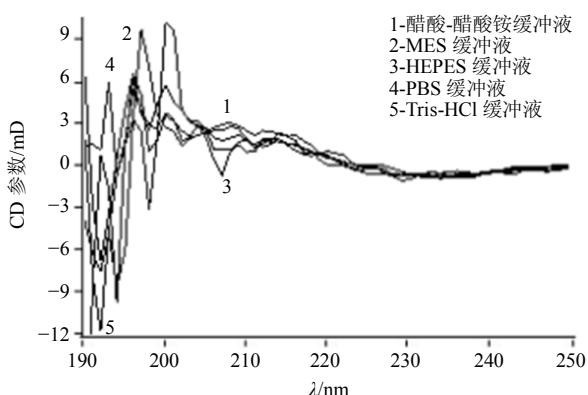


图 2 不同提取溶剂的可溶性蛋白 CD 谱

Fig. 2 CD spectra of soluble protein using different extraction solvents

值的升高, 每条谱带的 CD 值呈逐渐下降趋势。在 205~240 nm, 醋酸-醋酸铵缓冲液所提取可溶性蛋白 CD 值最大, 依次为 MES、PBS、Tris-HCl 缓冲液, HEPES 所得可溶性蛋白 CD 值最小。

其他因素 (料液比、提取时间、药材粒度、提取次数) 对可溶性蛋白的 CD 值影响很小, 故文中不再列出具体考察结果。

## 2.2 AmPR10-16kDa 和 HQGP-2 蛋白质提取单因素考察

**2.2.1 精密度试验** 按仪器标准操作方法测定 Marker  $1.44 \times 10^4$ 、 $1.84 \times 10^4$  标准蛋白 (非预染中低分子量标准蛋白 Marker) 的灰度值, 其 RSD 分别为 2.2%、2.0%, 表明仪器精密度良好。

**2.2.2 稳定性试验** 分别计算正交试验  $Z_3$  组蛋白中 AmPR10-16kDa 和 HQGP-2 蛋白提取样品在 5、10、15、20、25、30、35、40、45 min 的灰度值, 计算得其 RSD 分别为 2.0%、2.2%, 表明 45 min 内样品稳定性良好。

**2.2.3 重复性试验** 取 6 份供试蛋白样品 (正交试验  $Z_3$  组蛋白), 对其中 AmPR10-16kDa 和 HQGP-2 蛋白进行灰度值测定, 结果其 RSD 分别为 1.6% 和 2.1%, 证明该方法重复性良好。

**2.2.4 提取温度对 AmPR10-16kDa 和 HQGP-2 蛋白收率的影响** 称量蒙古黄芪药材粉末 (3 号筛) 共 7 份, 每份 5.0 g, 溶剂润湿后装入纱布袋, 各加入用 PBS (pH 7.4) 50 mL, 称定, 分别在 4、25、40、55、70、85、100 °C 时水浴提取 60 min, 4 °C 于冰箱中浸提 60 min, 时时搅拌, 冷至室温, 称定, 加 PBS 补足质量, 将提取混悬液置于布氏漏斗抽滤装置中抽滤, 滤液过 0.45  $\mu$ m 滤膜, 所得滤液作为待测溶液。配制 15% 分离胶、5% 浓缩胶, 加样 10  $\mu$ L、Marker 7.0  $\mu$ L, 电泳条件为 80~120 V 电压, 采用 Image 软件与 SPSS 17.0 统计学软件 (实验中所有结果用  $\bar{x} \pm s$  表示, 两组间均数比较采用  $t$  检验, 各组分间的差异比较用 One-way 检验) 对 AmPR10-16kDa 和 HQGP-2 蛋白条带进行分析, 与对照组  $1.44 \times 10^4$  蛋白 (非预染中低分子量标准蛋白 Marker) 条带灰度值比较,  $P < 0.05$  为显著性差异,  $P < 0.01$  为极显著性差异 ( $n=3$ )。

如图 3 所示, 随着温度的升高, AmPR10-16kDa 和 HQGP-2 蛋白质色带依次变浅, 蛋白质杂色带依次也变浅; 如表 1 所示, AmPR10-16kDa 和 HQGP-2 蛋白质条带的灰度值由高依次降低, 依据表 1 灰度

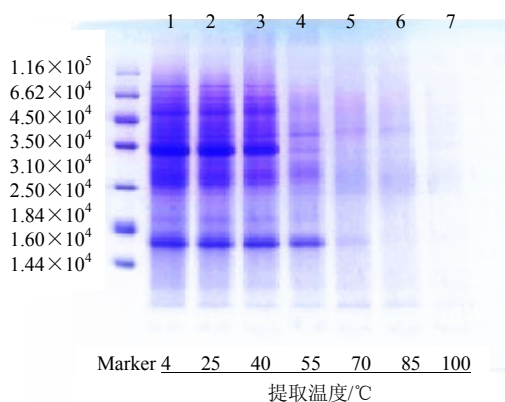


图 3 不同提取温度下提取的 AmPR10-16kDa 和 HQGP-2 SDS-PAGE 电泳图

Fig. 3 SDS-PAGE Electrophoresis of AmPR10-16kDa and HQGP-2 at different extraction temperatures

表 1 蒙古黄芪中 AmPR10-16kDa 和 HQGP-2 蛋白质提取条件单因素灰度值分析 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Table 1 Single factor test analysis of gray value of extraction conditions of AmPR10-16kDa and HQGP-2 in AMM ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

组别	试验号	灰度值					
		提取温度	料液比	提取时间	提取溶剂	粒度	提取次数
对照	—	113 197 ± 350	143 146 ± 550	129 160 ± 380	111 899 ± 280	74 362 ± 138	123 255 ± 490
AmPR10-16 kDa	1	14 543 ± 250**	15 228 ± 210**	11 436 ± 138**	691 ± 129**	7 669 ± 128**	11 234 ± 328**
	2	13 149 ± 255**	18 228 ± 222**	11 141 ± 142**	3 538 ± 109**	9 139 ± 107**	2 302 ± 289**
	3	12 594 ± 259**	23 474 ± 189**	12 771 ± 145**	4 556 ± 119**	11 663 ± 122**	1 180 ± 207**
	4	9 864 ± 205**	24 402 ± 138**	9 705 ± 151**	4 796 ± 121**	17 781 ± 129**	—
	5	4 657 ± 268**	27 675 ± 144**	9 270 ± 180**	4 978 ± 149**	13 414 ± 157**	—
	6	2 609 ± 147**	23 747 ± 167**	6 800 ± 155**	—	13 060 ± 161**	—
	7	949 ± 159**	—	5 894 ± 127**	—	—	—
HQGP-2	1	15 075 ± 138**	16 019 ± 201**	10 464 ± 211**	4 595 ± 186**	7 392 ± 129**	9 669 ± 211**
	2	12 753 ± 146**	15 686 ± 189**	9 922 ± 171**	7 661 ± 125**	7 738 ± 157**	1 485 ± 189**
	3	11 202 ± 199**	15 646 ± 177**	10 956 ± 209**	10 026 ± 172**	8 080 ± 182**	752 ± 189**
	4	8 383 ± 172**	17 924 ± 187**	8 034 ± 210**	12 672 ± 159**	15 026 ± 201**	—
	5	5 701 ± 155**	19 572 ± 197**	8 319 ± 169**	9 472 ± 107**	10 804 ± 209**	—
	6	4 809 ± 167**	19 982 ± 156**	4 467 ± 152**	—	11 157 ± 189**	—
	7	1 668 ± 177**	—	3 997 ± 111**	—	—	—

与对照组比较: \*\* $P < 0.01$

\*\* $P < 0.01$  vs control group

药材粉末(3号筛)共7份,每份5.0g,各加入PBS 50 mL,于55 °C水浴提取30、40、50、60、70、80、90 min,其他条件同“2.2.4”项,以AmPR10-16kDa和HQGP-2在SDS-PAGE胶图中的蛋白条带灰度值(峰面积)为定量指标,研究料液比对目标蛋白得率的影响。如图5和表1所示,随着提取时间的延长,AmPR10-16kDa和HQGP-2蛋白质色带先深后浅,灰度值先升高后降低,依据显著性所示,

值的显著性与图1中CD值考察结果,故提取温度的选择水平定为40、55、70 °C。

**2.2.5 料液比对目标黄芪蛋白得率的影响** 称定药材粉末(3号筛)共6份,每份5.0g,分别加入PBS 30、40、50、60、70、80 mL,称定,于55 °C时水浴提取,其他条件同“2.2.4”项,以AmPR10-16kDa和HQGP-2在SDS-PAGE胶图中的蛋白条带灰度值(峰面积)为定量指标,经体积换算后,研究料液比对目标蛋白得率的影响。如图4和表1所示,随着料液比的逐渐增大,AmPR10-16kDa蛋白质条带的灰度值依次升高后降低, HQGP-2蛋白质条带的灰度值依次降低后升高,依据显著性所示,故料液比水平选择1:12、1:14、1:16。

**2.2.6 提取时间对目标黄芪蛋白得率的影响** 称定

故提取时间水平选择40、50、60 min。

**2.2.7 溶剂种类对目标黄芪蛋白得率的影响** 称定药材粉末(过3号筛)5份,每份5.0g,分别加入都含有10 mmol/L NaCl的0.02 mol/L醋酸-醋酸铵缓冲液(pH 5.0),25 mmol/L MES缓冲液(pH 6.0),25 mmol/L HEPES缓冲液(pH 7.0),PBS缓冲液(pH 7.4),25 mmol/L Tris-HCl缓冲液(pH 8.0)各50 mL,提取温度55 °C,其他条件同“2.2.4”项,测定

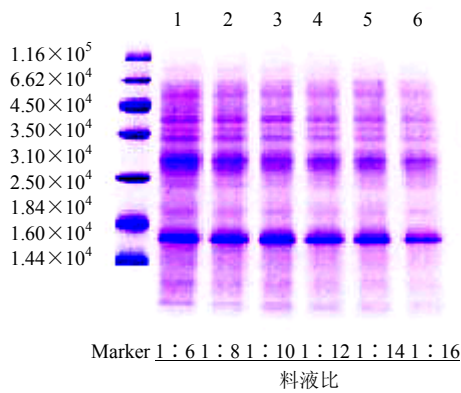


图 4 不同料液比下提取的 AmPR10-16kDa 和 HQGP-2 的 SDS-PAGE 电泳图  
 Fig. 4 SDS-PAGE Electrophoresis of AmPR10-16kDa and HQGP-2 at different solid-liquid ratios

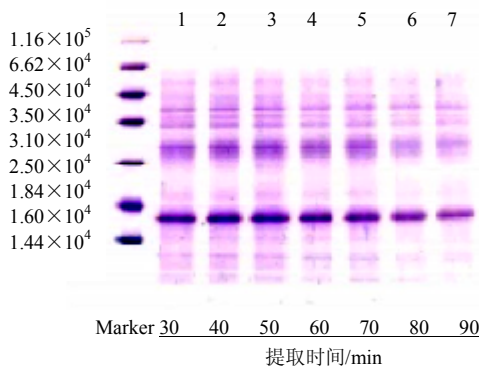


图 5 不同提取时间下提取的 AmPR10-16kDa 和 HQGP-2 的 SDS-PAGE 电泳图  
 Fig. 5 SDS-PAGE Electrophoresis of AmPR10-16kDa and HQGP-2 at different extraction time

AmPR1016kDa 和 HQGP-2 在 SDS-PAGE 胶图中的蛋白条带灰度值 (峰面积), 并采用 BCA 法测定正交试验及其显著性单因素的可溶性蛋白的量, 研究溶剂对目标蛋白得率的影响。如图 6 和表 1 所示, AmPR10-16kDa 的蛋白质条带的灰度值依次升高, 蛋白质色带依次加深, 灰度值依次增大, HQGP-2 的先升高后降低, 依据表 1 灰度值的显著性与图 2 中 CD 值考察结果, 故提取溶剂选择 HEPES、PBS、Tris-HCl。

**2.2.8 药材粒度对目标黄芪蛋白得率的影响** 称定 1~6 号筛药材粉末各 5.0 g, 各加入 PBS 50 mL, 提取温度 55 °C, 其他条件同“2.2.4”项, 以 AmPR10-16kDa 和 HQGP-2 在 SDS-PAGE 胶图中的蛋白条带灰度值 (峰面积) 为定量指标, 研究药粉粒度对目标蛋白得率的影响。如图 7 和表 1 所示, 随着粉末

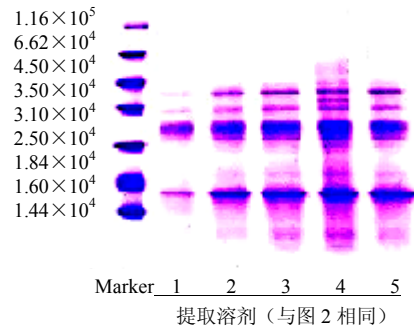


图 6 不同溶剂种类提取的 AmPR10-16kDa 和 HQGP-2 的 SDS-PAGE 电泳图  
 Fig. 6 SDS-PAGE Electrophoresis of AmPR10-16kDa and HQGP-2 using different extraction solvents

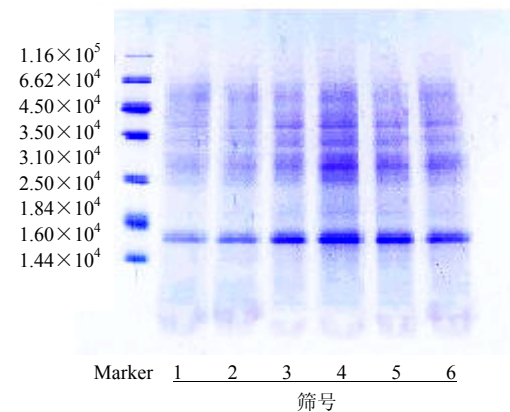


图 7 不同药材粒度提取的 AmPR10-16kDa 和 HQGP-2 的 SDS-PAGE 电泳图  
 Fig. 7 SDS-PAGE Electrophoresis of AmPR10-16kDa and HQGP-2 by different powder particle sizes

粒度的减小, AmPR10-16kDa 和 HQGP-2 蛋白质色带先深后浅, 灰度值先增大后减小, 4 号筛粉末的灰度值最大, 故选用 4 号筛粉末。

**2.2.9 提取次数** 称定药材粉末 (过 4 号筛) 5.0 g, 提取温度 55 °C, 其他条件同“2.2.4”项, 提取 3 次, 每次滤液单独放, 以 AmPR10-16kDa 和 HQGP-2 在 SDS-PAGE 胶图中的蛋白条带灰度值 (峰面积) 为定量指标, 研究提取次数对目标蛋白得率的影响。如图 8 和表 1 所示, 随着提取次数的增多, AmPR10-16kDa 和 HQGP-2 蛋白质色带由深至浅, 灰度值由大变小, 提取 1 次即可将大部分蛋白浸提出来, 故在规模生产中, 提取 2 次即可。

**2.3 蒙古黄芪粗蛋白提取工艺的优化**

**2.3.1 正交试验设计** 在上述单因素试验的基础上, 以具有显著性的提取温度 (A)、料液比 (B)、浸提时间 (C) 和提取溶剂 (D) 为考察因素, 设计



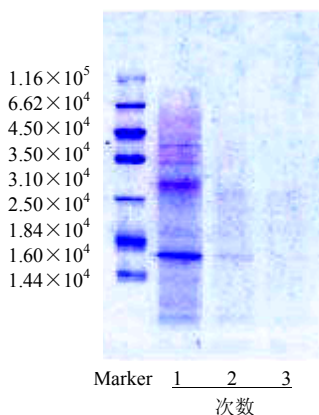


图 8 不同提取次数时 AmPR10-16kDa 和 HQGP-2 的 SDS-PAGE 电泳图

Fig. 8 SDS-PAGE Electrophoresis of AmPR10-16kDa and HQGP-2 for different extraction times

4 因素 3 水平的正交试验, 以 AmPR10-16kDa 和 HQGP-2 在 SDS-PAGE 电泳图中的蛋白条带灰度值 (峰面积) 为定量指标, 从 AmPR10-16kDa 和 HQGP-2 蛋白得率及纯度角度出发, 对黄芪粗蛋白提取工艺进行优化。

**2.3.2 供试品溶液的制备** 称定药材粉末 (过 4 号筛) 9 份, 各 5.0 g, 分别向粉末中各加入提取溶剂

为 D 的 B 倍量缓冲液, 称定, 在温度 A 的条件时水浴提取 C min, 每 10 min 搅拌 1 次, 静置片刻, 冷至室温, 称定, 补足减失的质量。取以上提取液, 同“2.2.4”项方法抽滤, 所得滤液作为待测溶液。

**2.3.3 加样** 加样 14.0 μL, 同时加入 Marker 7.0 μL。

**2.3.4 蒙古黄芪中 AmPR10-16kDa 和 HQGP-2 最佳提取工艺确定** 正交试验设计及结果见表 2 和图 9, 方差分析见表 3。

由表 2 可知 9 组试验组合中 AmPR10-16kDa 和 HQGP-2 各因素的最佳搭配为实验最佳水平组合为 A<sub>1</sub>B<sub>3</sub>C<sub>3</sub>D<sub>3</sub>; 直观分析得出: 各因素对 AmPR10-16kDa 和 HQGP-2 提取影响的程度均依次为 A>D>B>C; AmPR10-16kDa 的 A 因素中 K<sub>1</sub>>K<sub>2</sub>>K<sub>3</sub>, D 因素中 K<sub>3</sub>>K<sub>2</sub>>K<sub>1</sub>, B 因素中 K<sub>3</sub>>K<sub>2</sub>>K<sub>1</sub>, C 因素中 K<sub>3</sub>>K<sub>1</sub>>K<sub>2</sub>; HQGP-2 的 A 因素中 K<sub>1</sub>>K<sub>2</sub>>K<sub>3</sub>, D 因素中 K<sub>3</sub>>K<sub>1</sub>>K<sub>2</sub>, B 因素中 K<sub>3</sub>>K<sub>2</sub>>K<sub>1</sub>, C 因素中 K<sub>1</sub>>K<sub>2</sub>>K<sub>3</sub>; 因此得出最佳水平组合为 A<sub>1</sub>B<sub>3</sub>C<sub>3</sub>D<sub>3</sub>。

由表 3 可知, 以极差最小的因素 C 为误差项进行方差分析, 结果发现因素 A、D 具有显著性差异, 因素 B、C 则无显著性影响, 按方差分析法的观点,

表 2 蒙古黄芪中 AmPR10-16kDa 和 HQGP-2 蛋白质提取条件正交试验分析  
Table 2 Orthogonal test analysis of extraction conditions of AmPR10-16kDa and HQGP-2 in AMM

试验号	A/℃	B	C/min	D	灰度值		可溶性粗蛋白 提取率/(mg·g <sup>-1</sup> )
					AmPR10-16kDa	HQGP-2	
1	40 (1)	1 : 12 (1)	40 (1)	HEPES 缓冲液 (1)	429 464.724	106 617.560	56±1
2	40 (1)	1 : 14 (2)	50 (2)	PBS 缓冲液 (2)	468 670.529	105 919.183	61±1
3	40 (1)	1 : 16 (3)	60 (3)	Tris-HCl 缓冲液 (3)	776 509.848	154 194.798	63±1
4	55 (2)	1 : 12 (1)	50 (2)	Tris-HCl 缓冲液 (3)	574 881.345	85 017.140	56±1
5	55 (2)	1 : 14 (2)	60 (3)	HEPES 缓冲液 (1)	346 246.395	37 987.883	53±2
6	55 (2)	1 : 16 (3)	40 (1)	PBS 缓冲液 (2)	368 923.721	70 215.441	53±1
7	70 (3)	1 : 12 (1)	60 (3)	PBS 缓冲液 (2)	113 741.295	16 749.084	47±1
8	70 (3)	1 : 14 (2)	40 (1)	Tris-HCl 缓冲液 (3)	436 618.203	75 190.819	50±1
9	70 (3)	1 : 16 (3)	50 (2)	HEPES 缓冲液 (1)	110 531.627	48 364.498	48±1
K <sub>1</sub>	558 215.034	372 695.788	411 668.883	295 414.249	—	—	—
	122 243.847	69 461.261	84 007.940	64 323.314	—	—	—
K <sub>2</sub>	430 017.154	417 178.376	384 694.500	317 111.848	—	—	—
	64 406.821	73 032.628	79 766.940	64 294.569	—	—	—
K <sub>3</sub>	220 297.042	418 655.065	412 165.846	596 003.132	—	—	—
	46 768.134	90 924.912	69 643.922	104 800.919	—	—	—
R	337 917.992	45 959.277	27 471.346	300 588.883	—	—	—
	75 475.713	21 463.651	14 364.018	40 506.350	—	—	—

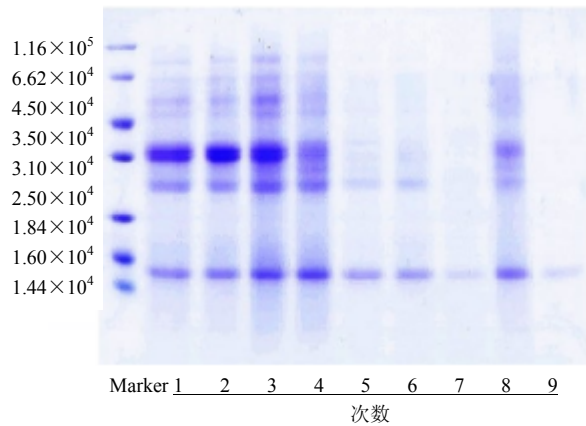


图 9 正交试验中各样品的 SDS-PAGE 电泳图

Fig. 9 SDS-PAGE Electrophoresis of each sample in orthogonal test

表 3 AmPR10-16kDa 和 HQGP-2 蛋白质提取条件方差分析  
Table 3 ANOVA on extraction conditions of AmPR10-16kDa and HQGP-2

方差来源	偏差平方和	自由度	F 值	显著性
A	$1.75 \times 10^{11}$	2	117.78	$P < 0.01$
	$9.35 \times 10^9$	2	28.62	$P < 0.05$
B	$4.09 \times 10^9$	2	2.76	
	$7.94 \times 10^8$	2	2.43	
C (误差)	$1.48 \times 10^9$	2	1.00	
	$3.27 \times 10^8$	2	1.00	
D	$1.69 \times 10^{11}$	2	113.73	$P < 0.01$
	$3.28 \times 10^9$	2	10.04	

$F_{0.05}(2, 2) = 19.00$   $F_{0.01}(2, 2) = 99.00$

只需对有显著影响的因素选择最佳水平，而其他对试验结果影响较小的因素，则可按实际需要选择适当的水平，选择最佳提取工艺条件为  $A_1B_3C_3D_3$ ，即向药材粉末（过 4 号筛）中加入 pH 值为 8.00 的 Tris-HCl 缓冲液 16 倍，在温度 40 °C 条件下常压水浴提取 60 min，时时搅拌（100 r/min）。

**2.3.5 验证试验** 分别取 3 份药材粉末 Y1、Y2、Y3（过 4 号筛）各 5.0 g，各加入 16 倍量 Tris-HCl，在温度 40 °C 条件下恒温提取 60 min，时时搅拌（100 r/min）。取以上提取液，同“2.2.4”项方法抽滤，所得滤液作为待测溶液。对所得 3 份黄芪粗蛋白样品分别制作 SDS-PAGE 胶图，加样同“2.3.3”项方法，并测定可溶性蛋白提取率。结果见表 4，结果证明该提取工艺稳定性良好。

**2.4 蒙古黄芪粗蛋白的体外免疫抑制活性测定**

**2.4.1 样品处理** 黄芪粗蛋白样品在 4 °C 下透析

表 4 验证试验

Table 4 Validation test

样品	灰度值		可溶性粗蛋白 提取率/(mg·g <sup>-1</sup> )
	AmPR10-16kDa	HQGP-2	
Y1	796 666.006	166 204.456	66
Y2	789 236.556	159 227.331	65
Y3	771 220.079	156 224.007	64
RSD/%	1.67	3.19	1.54

（透析袋截留相对分子质量  $3.5 \times 10^3$ ）过夜，蛋白得率 90%~95%，经 SDS-PAGE 跑胶得蛋白条带数量未有改变，纯化倍数（以小鼠为基准）是 0.94。

**2.4.2 免疫抑制活性测定** 采用 CCK-8 法测定正交试验中 9 组黄芪粗蛋白的体外免疫抑制活性，正交试验中的 9 组取终质量浓度为 10 μg/mL 蛋白样品，最优组合为 10、30、50、70、90 μg/mL 5 个终质量浓度梯度。常规制备小鼠用脾淋巴细胞<sup>[24]</sup>，调节细胞悬液密度为  $3 \times 10^9/L$ ，并用台盼蓝染色检测细胞活力 >99%。于 96 孔细胞培养板中每孔加入制备好的细胞悬液 100 μL 及 ConA 5 μL（终质量浓度 5 μg/mL），将培养板在培养箱中预培养 24 h（37 °C，5% CO<sub>2</sub>），用完全培养基稀释样品成不同质量浓度，每孔加入 8 μL 上述质量浓度的含样品培养基至终质量浓度，空白组加入不含细胞的培养基，阴性对照加入含有细胞的培养基，阳性对照组加入醋酸格拉替雷（GA）至终质量浓度为 30 μg/mL，每个组 6 个重复孔，将细胞培养板置于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱孵育 48 h。将细胞培养板取出后，向每孔加入 10 μL CCK-8 溶液，将其置于培养箱内孵育 4 h，用酶标仪测定在 450 nm 处的吸光度（A）值。

细胞形态观察：采用倒置显微镜观察样品抑制率最高的脾细胞形态变化。结果如表 5 所示，由正交试验的 9 组实验数据可知，正交试验 3 的抑制率最高，其次为正交试验 4 组，样品对 SD 大鼠和 ICR 小鼠脾淋巴细胞的抑制作用差距不大，正交试验 3 组样品对脾淋巴细胞的抑制率随着浓度的增加而增加，呈现出明显的量效关系，在最高质量浓度 90 μg/mL 时抑制率为 90.90%，与阳性对照醋酸格拉替雷的抑制率相接近。

在上述实验中，样品对 ICR 小鼠脾淋巴细胞的抑制率最高，故选择对黄芪粗蛋白较敏感的 ICR 小鼠脾淋巴细胞进行形态学观察，黄芪粗蛋白在不同质量浓度（10、30、50、70、90 μg/mL）条件下对

表 5 蒙古黄芪粗蛋白对 SD 大鼠与 ICR 小鼠脾淋巴细胞的抑制作用 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Table 5 Inhibitory effect of crude protein from AMM on lymphocyte in spleen of SD rats and ICR mice ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

组别	质量浓度/ ( $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ )	脾淋巴细胞抑制率/%		
		SD 大鼠	ICR 小鼠	
阴性对照组	0	—	—	
阳性对照组 (醋酸格拉替雷)	30	93.96 $\pm$ 1.03	96.23 $\pm$ 1.38	
正交试验	1	10	35.71 $\pm$ 0.79	37.79 $\pm$ 1.67
	2	10	48.09 $\pm$ 1.09	51.70 $\pm$ 1.60
	3	10	59.35 $\pm$ 2.76	64.10 $\pm$ 2.94
	4	10	57.27 $\pm$ 1.89	62.62 $\pm$ 0.12
	5	10	35.98 $\pm$ 2.23	39.90 $\pm$ 1.08
	6	10	46.88 $\pm$ 1.07	49.50 $\pm$ 1.47
	7	10	39.01 $\pm$ 0.99	40.73 $\pm$ 0.14
	8	10	34.89 $\pm$ 1.78	37.24 $\pm$ 2.02
	9	10	32.11 $\pm$ 2.01	34.05 $\pm$ 1.69
正交试验 3 (抑制率最高组合)	90	88.71 $\pm$ 2.77*	90.90 $\pm$ 4.84*	
	70	78.78 $\pm$ 2.61*	82.04 $\pm$ 1.22*	
	50	70.56 $\pm$ 2.65*	75.32 $\pm$ 1.77*	
	30	65.22 $\pm$ 3.61**	70.18 $\pm$ 3.41*	
正交试验 3(未透析)	10	57.22 $\pm$ 3.01**	62.07 $\pm$ 2.52**	
	10	60.33 $\pm$ 3.41**	66.03 $\pm$ 2.07**	

与对照组比较: \* $P < 0.05$  \*\* $P < 0.01$

\* $P < 0.05$  \*\* $P < 0.01$  vs control group

小鼠脾淋巴细胞均有影响, 阴性对照组的脾淋巴细胞的形态完整、数量众多, 阳性对照组(醋酸格拉替雷)和 90  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的脾淋巴细胞急剧减少、细胞的完整性受到损坏、出现明显的细胞碎片和细胞集聚现象, 细胞的受损程度与浓度有相关性。

### 3 讨论

在自身免疫性疾病和器官移植抗排斥反应的治疗中, 免疫抑制剂的使用量较大, 只是化学药类免疫抑制剂毒副作用大, 中药历来以药效广泛、毒副作用小为优点, 可弥补化学药的不足, 尤其对于长期用药的慢性排异、自身免疫性疾病。目前, 国内研究成熟的中药免疫抑制剂只有雷公藤多苷<sup>[25]</sup>, 国外有日本研发的冬虫夏草提取物修饰产品 FTY 720<sup>[26]</sup>, 显示出中药免疫抑制剂的开发意义非常大。

本实验在以往黄芪可溶性蛋白提取及纯化的基础上<sup>[10-13, 27-29]</sup>, 进一步提出以提高目标蛋白 AmPR10-16kDa 和 HQGP-2 的提取率及降低其纯化

难度为目标, 对提取温度、料液比、提取时间、提取溶剂、药粉粒度、提取次数 6 因素进行考察, 以显著性单因素做正交试验。其中, 提取温度的筛选, 采用 CD 法进行考察, 与所得纯品 AmPR10-16kDa 和 HQGP-2 (质量分数 > 95%) 的蛋白质二级结构进行比照, 如果纯品 AmPR10-16kDa 和 HQGP-2 的蛋白质二级结构拟合于  $\alpha$ -螺旋, 则提取温度  $\leq 40$   $^{\circ}\text{C}$  更合理, 反之则  $> 40$   $^{\circ}\text{C}$  更合理; 以各因素 SDS-PAGE 电泳图的蛋白条带灰度值为指标选出显著性单因素; 分析正交试验所得的蛋白条带灰度值和可溶性蛋白对脾淋巴细胞的免疫抑制活性结果, 说明以目标蛋白的收率为指标所优化的提取条件更科学合理。

### 参考文献

- [1] 秦雪梅, 李震宇, 孙海峰, 等. 我国黄芪药材资源现状与分析 [J]. 中国中药杂志, 2013, 38(19): 3234-3238.
- [2] 韩榕徽, 王洪新, 唐富天, 等. 黄芪多糖对异丙肾上腺素诱导的心肌肥厚大鼠内皮功能的影响 [J]. 中草药, 2015, 46(24): 3722-3726.
- [3] 周 然. 北黄芪研究 [M]. 北京: 科学出版社, 2015.
- [4] 郑召鹏, 杨卫兵, 李 宁, 等. 注射用黄芪多糖预防非小细胞肺癌化疗后骨髓抑制的疗效观察 [J]. 中草药, 2013, 44(2): 208-209.
- [5] 刘 阳, 刘 畅, 罗英花, 等. 黄芪中有效成分对人食道癌 HCE-4 细胞凋亡的影响 [J]. 药物评价研究, 2016, 39(3): 377-381.
- [6] 张金英. 黄芪对机体的双向调节作用 [J]. 天津中医学院学报, 2002, 21(3): 62-63.
- [7] 刘小花, 梁 瑾, 梁建娣, 等. 黄芪抗胃溃疡作用的谱效关系研究 [J]. 中草药, 2012, 43(12): 2448-2452.
- [8] 奚友耿, 易宁育. 黄芪对免疫功能的双向调节作用-北芪对腺苷酸环化酶活力的影响 [J]. 上海免疫学杂志, 1985, 5(3): 138-139.
- [9] 中国药典 [S]. 一部. 2015.
- [10] 冯前进, 薛慧清, 杨向竹, 等. 一种黄芪糖蛋白及其制备方法 and 用途: 中国, 101962402A [P]. 2012-04-11.
- [11] 周 然, 冯前进, 薛慧清, 等. 一种黄芪糖蛋白及其制备方法 and 用途: 中国, CN103450354A [P]. 2013-12-18.
- [12] 李 敏, 高 丽, 岳晓华, 等. 黄芪糖蛋白的分离纯化及其理化性质、组成成分分析 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2014, 20(13): 48-51.
- [13] 张俊英, 薛慧清, 冯前进, 等. 正北芪中一种活性糖蛋白的分离纯化及理化性质研究 [A] // 中国生物化学与分子生物学会. 中医药生物化学与分子生物学会学术年会 [C]. 北京: 中国科学技术出版社, 2013.



- [14] 杨向竹, 薛慧清, 冯前进, 等. 黄芪糖蛋白对 T 淋巴细胞增殖活性的影响 [J]. 上海中医药大学学报, 2009, 23(5): 66-68.
- [15] 杨向竹, 薛慧清, 冯前进, 等. HQ0805 对小鼠淋巴细胞体外活化的抑制作用 [J]. 山西中医, 2009, 25(8): 45-46.
- [16] 赵俊云, 杨向竹, 牛欣, 等. 黄芪糖蛋白对 T 细胞增殖与活化的影响 [J]. 中华中医药学刊, 2015, 33(1): 49-50.
- [17] 章培军, 郭敏芳, 张丽红, 等. 黄芪糖蛋白小鼠 EAE 的作用研究 [J]. 山西大同大学学报: 自然科学版, 2012, 28(5): 42-44.
- [18] 章培军, 郭敏芳, 邢雁霞, 等. 黄芪糖蛋白对实验性自身免疫性脑脊髓炎小鼠的免疫调节作用 [J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2016, 32(1): 54-58.
- [19] 赵俊云, 刘亚明, 冯前进, 等. 黄芪糖蛋白对佐剂性关节炎大鼠外周血细胞因子及关节滑膜组织形态学的影响 [J]. 上海中医药杂志, 2010, 44(5): 78-80.
- [20] 赵俊云, 杨向竹, 季新燕, 等. 黄芪糖蛋白诱导佐剂性关节炎大鼠体内细胞凋亡的研究 [J]. 中华中医药杂志, 2011, 26(5): 1204-1207.
- [21] 杨向竹, 赵俊云, 崔向青, 等. 黄芪糖蛋白、雷公藤甲素、雷帕霉素和氢化考的松体外免疫抑制作用的比较研究 [J]. 中华中医药杂志, 2011, 26(10): 2411-2414.
- [22] 盛家镛, 许箬, 刘敏, 等. 大腹园蛛丝腺蛋白二级结构的圆二色性研究 [J]. 科学技术与工程, 2002, 2(6): 27-30.
- [23] 沈星灿, 梁宏, 何锡文, 等. 圆二色光谱分析蛋白质构象的方法及研究进展 [J]. 分析化学, 2004, 32(3): 388-394.
- [24] 徐叔云, 卞如濂, 陈修. 药理实验方法学 [M]. 第 2 版. 北京: 人民卫生出版社, 2002.
- [25] 向明, 张程亮, 雷公藤免疫抑制作用研究进展 [J]. 中草药, 2005, 36(3): 458-460.
- [26] Tanaka T, Takahara S, Hatorin M, *et al.* A novel immunosuppressive drug FTY720, prevents the cancer progression induced by cyclosporine [J]. *Cancer*, 2002, 181(2): 165-172.
- [27] 闫巧娟. 蒙古黄芪中多糖、皂甙及活性蛋白的提取分离 [D]. 北京: 中国农业大学, 2005.
- [28] 齐笑玮. 蒙古黄芪中两种生物活性蛋白的研究 [D]. 北京: 中国农业大学, 2006.
- [29] 包华音, 刘杨. 单因素考察和正交试验结合优选黄芪药材蛋白质提取工艺 [J]. 辽宁中医杂志, 2014, 41(10): 2190-2193.