

双黄连注射液及其中间品对 RBL-2H3 细胞增殖的影响

李彦林, 周云丰, 李琳, 许扬*

(中国医学科学院 药用植物研究所, 北京 100193)

[摘要] **目的:**探讨双黄连注射液(SHLI)及其中间品(金银花连翘提取物、黄芩提取物)不同浓度对白血病细胞株 RBL-2H3 增殖和形态的影响,为类过敏细胞模型的建立及药品质量的监控提供实验依据。**方法:**将双黄连注射液以体积比 1:16 为初始浓度,按 2 倍梯度稀释至 1:4 096,中间品分别以体积比 1:8 为初始浓度,按 2 倍梯度稀释至 1:2 048,作为受试样品。以各受试样品分别孵育 RBL-2H3 细胞,观察细胞形态变化。应用噻唑蓝(MTT)比色法测定各组 RBL-2H3 细胞增殖活力,并计算细胞增殖的半数抑制浓度(IC₅₀)。根据 IC₅₀ 设置不同给药浓度,观察 SHLI 对 RBL-2H3 细胞凋亡的影响。**结果:**随着给药浓度的升高,SHLI 及其中间品对细胞增殖的抑制作用逐渐增强,细胞存活力明显降低。给药后随着药物浓度的升高,细胞损伤逐渐加重,形态发生明显变化。高浓度 SHLI 可引起 RBL-2H3 细胞凋亡。**结论:**SHLI 可抑制 RBL-2H3 细胞增殖活力,为 SHLI 类过敏细胞模型的建立,评价 SHLI 及中间品的安全性及药物质量控制提供依据。

[关键词] 双黄连注射液; 中间品; RBL-2H3; 细胞增殖

[中图分类号] **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2016)07-0116-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfx.2016070116

Effect of Shuanghuanglian Injection and Its Intermediates on Proliferation of RBL-2H3 Cells

LI Yan-lin, ZHOU Yun-feng, LI Lin, XU Yang*

(Institute of Medicinal Plant Development, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100193, China)

[Abstract] **Objective:** To observe the effect of different concentrations of Shuanghuanglian injection (SHLI) and its intermediates on proliferation of RBL-2H3 cells, and provide evidence for establishing anaphylactoid cell models and monitoring drug quality. **Method:** RBL-2H3 cells were treated with different concentrations of SHLI (2 times gradient dilution from volume ratio 1:16 to 1:4 096) and its intermediates (2 times gradient dilution from volume ratio 1:8 to 1:2 048). The cellular morphology was observed under inverted microscope. MTT colorimetric assay was used to determine the growth of RBL-2H3 cells in different concentration of SHLI and its intermediates, and the half inhibitory concentration (IC₅₀) was calculated. Dependent on the value of IC₅₀, RBL-2H3 cells were then treated with different concentrations of SHLI to observe the effect of SHLI on cells apoptosis. **Result:** As the concentration increases of SHLI and its intermediates, their inhibitory effect on proliferation of RBL-2H3 cells was gradually increased; the cells survival rate was decreased significantly; cells injury was gradually aggravated; and the cellular morphology was also changed. High dose of SHLI could induce apoptosis of RBL-2H3 cells. **Conclusion:** SHLI and its intermediates could reduce RBL-2H3 cells proliferation, we can provide certain experiment basis for establishing anaphylactoid cell models and monitoring drug quality and safety.

[Key words] Shuanghuanglian injection; intermediate products; RBL-2H3; cell proliferation

[收稿日期] 20151204(014)

[基金项目] 国家“重大新药创制”科技重大专项(2014ZX09201022-006);药植所创新团队发展计划项目(IT1305)

[第一作者] 李彦林, 硕士, 从事中药药理学及创新中药研究, Tel:010-57833234, E-mail: yanlinli2013_yz@126.com

[通讯作者] * 许扬, 研究员, 从事中药药理学及创新中药研究, Tel:010-57833234, E-mail: vascular888@126.com

双黄连注射液 (SHLI) 由金银花、黄芩、连翘 3 味中药的提取物精制而成, 具有清热解毒功效和抗菌抗病毒药理作用, 临床上广泛用于治疗上呼吸道感染等炎症性疾病。近年来由于使用量的增加, 双黄连注射剂的不良反应病例数逐渐增多^[1]。国家药品不良反应监测中心发布的《药品不良反应信息通报》中对双黄连注射剂的严重不良反应提出警示^[2]。双黄连注射液不良反应多发生在首次用药过程中或用药后不久, 多以类过敏反应的形式表现, 并且给药方式多为静脉滴注^[3-4], 这与类过敏反应首次接触药物即可发生过敏症状的特征相符^[5]。目前对于中药注射剂的过敏类型的判定仍存在一定争议, 并且对类过敏的相关情况认识不够充分, 中药注射剂类过敏的相关检测方案仍属空白^[6]。因此, 建立恰当的研究模型对中药注射剂的类过敏情况进行研究十分必要。目前中药注射剂体外研究较多用大鼠嗜碱性白血病细胞株 RBL-2H3^[7-9], 该细胞可反映肥大细胞过敏反应过程中的病理生理变化。

本实验选用双黄连注射液及直接来源于产品生产线上中间品金银花连翘提取物、黄芩提取物, 观察 RBL-2H3 细胞对细胞形态学及增殖的影响。

1 材料与方法

1.1 试剂 注射用双黄连注射液 (黑龙江多多药业有限责任公司, 批号 13093013); 金银花的连翘提取物浸膏 (金银花-连翘 1:1)、黄芩提取物粉末均为黑龙江多多药业有限责任公司生产线上的中间品。MEM 培养基、胎牛血清、0.25% 胰酶、磷酸盐缓冲液 (PBS, Gibco 公司, 批号分别为 41500034, 16000-044, 25200-056, P1020-500); *N*-甲基-对甲氧基苯乙胺和甲醛聚合物 (Compound48/80), 噻唑蓝 (MTT, Sigma 公司, 批号分别为 040M4047, T0973-1G)。Annexin V-FITC/碘化丙啶 (PI) 凋亡双染检测试剂盒 (BD 公司, 批号 556547)。

1.2 仪器 CKX41-A32PH 型倒置显微镜 (日本 Olympus 公司), AME3300 型荧光倒置显微镜 (美国 Life Evos 公司), 3427 型 CO₂ 培养箱 (美国 Thermo 公司), ELX800 型酶标仪 (美国 Bio-Tek 公司)。

1.3 细胞株 RBL-2H3 细胞购自中国科学院上海生命科学研究院细胞资源中心。

1.4 受试样品的配制 取 SHLI 及其各中间品 (金银花连翘提取物、黄芩提取物), 用 MEM 培养基以体积比进行稀释。SHLI 以 1:16 为初始浓度, 依次 2 倍稀释至 1:32, 1:64, 1:128, 1:256, 1:512, 1:1 024, 1:2 048, 1:4 096, 共 9 个浓度梯度; 黄芩提取物、金

银花连翘提取物以 1:8 为初始浓度, 依次 2 倍稀释至 1:16, 1:32, 1:64, 1:128, 1:256, 1:512, 1:1 024, 1:2 048, 共 9 个浓度梯度, 对应药物质量浓度分别为 0.24, 0.49, 0.98, 1.95, 3.91, 7.81, 15.63, 31.25, 62.50 g·L⁻¹。配好后用 0.22 μm 微孔滤器过滤除菌, 4℃ 保存。

1.5 MTT 检测细胞活力 取生长良好的 RBL-2H3 细胞, 用 0.25% 胰酶消化后, 以 15% 胎牛血清将细胞稀释至 1 × 10⁵ 个/mL, 取上述细胞混悬液接种于 96 孔培养板中, 100 μL/孔。每个剂量组均设置板底孔, 每孔加入 100 μL 不含细胞的培养基。将培养板置于 37℃ 5% CO₂ 饱和湿度培养箱中培养过夜。24 h 后各组加入受试液 100 μL/孔, 药液组加入先前配制的不同稀释浓度的供试样品溶液, 对照组加入 MEM 培养基, 板底组加入相应浓度的药液, 每组设 3 个复孔。培养 24 h 后, 弃药液, 换入无血清的 MEM 培养基 100 μL/孔和 MTT 溶液 (5 g·L⁻¹) 10 μL/孔, 空白组及板底组各孔做相同处理。孵育 4 h 后, 终止培养, 弃去培养液, 加入二甲基亚砜 (DMSO) 100 μL/孔, 振摇 15 min 使甲瓚结晶完全溶解, 酶标仪 570 nm 波长下检测各孔吸光度 *A*。

$$\text{存活率} = (A_{\text{药液}} - A_{\text{药液板底}}) / (A_{\text{空白}} - A_{\text{空白板底}}) \times 100\%$$

1.6 细胞形态学观察 显微镜下对不同剂量药物给药后 RBL-2H3 细胞的生长状况进行观察, 并拍照记录图像数据, 分析其生长情况和形态变化。

1.7 Annexin V/PI 双染检测细胞凋亡 RBL-2H3 细胞按照上述方法进行培养和传代。根据实验中测定的 SHLI 的半数抑制浓度 (IC₅₀), 设定 4 个不同质量浓度 (10, 20, 40, 80 g·L⁻¹) 培养 RBL-2H3 细胞, 孵育 30 min。随即加入预冷的 PBS 清洗, 再加入 PBS 100 μL 和 Annexin V 5 μL 及 PI 5 μL, 避光染色 15 min, 在暗室环境中使用荧光显微镜观察并拍照, 记录细胞凋亡情况。

1.8 统计学分析 采用 SPSS 17.0 统计软件, 计量数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 各浓度组与空白组比较采用 One-way ANOVA 方法分析, 各浓度组间比较用 *t* 检验, *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 SHLI 及其中间品对 RBL-2H3 细胞增殖的影响 与空白组比较, 随着给药浓度的增加, 0.24 ~ 15.63 g·L⁻¹ SHLI 对 RBL-2H3 细胞增殖抑制作用增强 (*P* < 0.01), 但无梯度增强的趋势; 31.25, 62.50 g·L⁻¹ SHLI 对细胞增殖的抑制作用逐渐增强, 细胞存活率显著降低 (*P* < 0.01)。与空白组比

较, 0.24 ~ 7.81 g·L⁻¹ 金银花连翘提取物对 RBL-2H3 细胞增殖的抑制作用较为明显 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), 但未超过半数; 随着金银花连翘提取物 (5.63 ~ 62.5 g·L⁻¹) 给药质量浓度的提升, 细胞的存活率呈下降趋势 ($P < 0.01$)。黄芩提取物随着给药质量浓度的升高, 对细胞增殖的抑制作用梯度增强, 1.95 ~ 31.25 g·L⁻¹ 黄芩提取物对细胞增殖的抑制作用显著增强 ($P < 0.01$)。见表 1。

表 1 双黄连注射液及其中间品对 RBL-2H3 细胞增殖 (存活率) 的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Table 1 Effect of SHLI and intermediates on proliferation of RBL-2H3 cells ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$) %

质量浓度 /g·L ⁻¹	双黄连注射液	金银花连翘提取物	黄芩提取物
空白	100.00 ± 4.93	100.00 ± 6.25	100.00 ± 6.00
0.24	87.67 ± 1.16 ²⁾	87.33 ± 1.53 ¹⁾	106.67 ± 1.53 ⁴⁾
0.49	89.00 ± 4.00 ²⁾	82.00 ± 4.58 ²⁾	96.50 ± 2.12
0.98	89.00 ± 1.00 ²⁾	80.67 ± 2.52 ²⁾	90.33 ± 6.51
1.95	86.67 ± 0.58 ²⁾	78.00 ± 3.00 ^{2,3)}	66.67 ± 5.51 ^{2,4)}
3.91	87.67 ± 1.53 ²⁾	68.33 ± 6.11 ^{2,4)}	59.00 ± 6.00 ^{2,4)}
7.81	87.67 ± 1.16 ²⁾	57.67 ± 8.39 ^{2,4)}	55.00 ± 5.57 ^{2,4)}
15.63	82.33 ± 2.89 ²⁾	32.00 ± 2.00 ^{2,4)}	58.50 ± 2.12 ^{2,4)}
31.25	71.00 ± 4.00 ²⁾	7.00 ± 4.00 ^{2,4)}	57.00 ± 2.00 ^{2,4)}
62.50	13.67 ± 3.79 ²⁾	7.67 ± 3.40 ²⁾	19.04 ± 3.30 ²⁾

注: 与空白组比较, ¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$; 与 SHLI 组比较, ³⁾ $P < 0.05$, ⁴⁾ $P < 0.01$ 。

与 0.24 g·L⁻¹ SHLI 组相比, 同质量浓度黄芩提取物组细胞存活率显著提高 ($P < 0.01$)。1.95 ~ 31.25 g·L⁻¹ 时, 黄芩和金银花连翘提取物组细胞存活率较 SHLI 组均显著降低 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。62.5 g·L⁻¹ 时 3 组药物对 RBL-2H3 细胞均显示出较强的抑制作用。15.63 g·L⁻¹ 金银花连翘提取物对细胞增殖抑制作用提升最快。黄芩提取物 (1.95 ~ 31.25 g·L⁻¹) 对细胞增殖的抑制作用均较为平缓。见表 1。

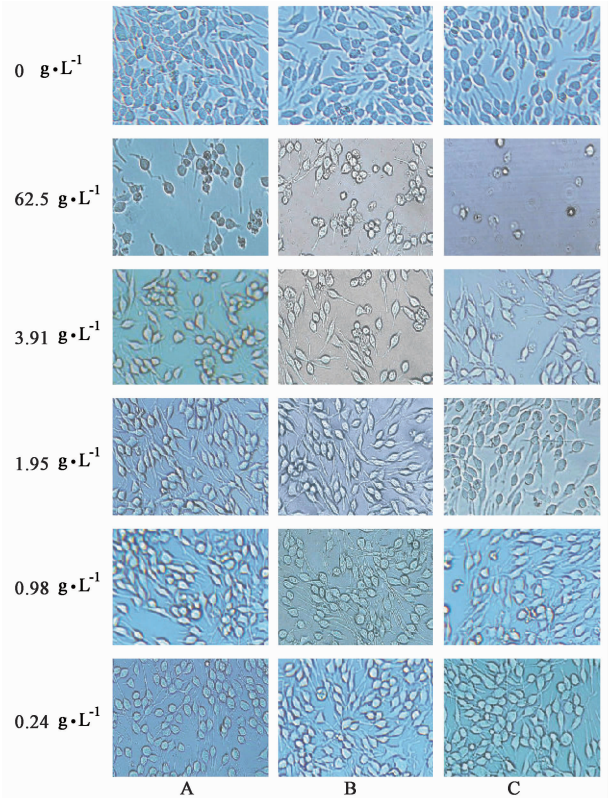
2.2 SHLI 及其中间品对 RBL-2H3 细胞 IC₅₀ 的影响

按照文献 [10] 计算 SHLI 对于 RBL-2H3 细胞 IC₅₀ 为 38.73 g·L⁻¹, 黄芩提取物 IC₅₀ 为 29.93 g·L⁻¹, 金银花连翘提取物 IC₅₀ 为 13.64 g·L⁻¹。IC₅₀ 值均相当于生药量。

2.3 SHLI 及其中间品对 RBL-2H3 细胞形态的影响

在最高质量浓度 (62.50 g·L⁻¹) 时细胞皱缩变圆, 细胞数目显著减少, 大部分细胞破裂, 排列紊乱。随着药物浓度降低, 细胞形态逐渐恢复, 细胞恢复成

“蝌蚪”状形态, 表明对细胞的损伤逐渐减轻。1.95 g·L⁻¹ 时, 细胞形态与空白组接近, 呈长梭形, 贴壁生长良好。细胞形态的变化与 MTT 检测结果一致。见图 1。



A. SHLI 组; B. 黄芩提取物组; C. 金银花连翘提取物组

图 1 双黄连注射液及其中间品对 RBL-2H3 细胞形态的影响 (倒置显微镜, ×200)

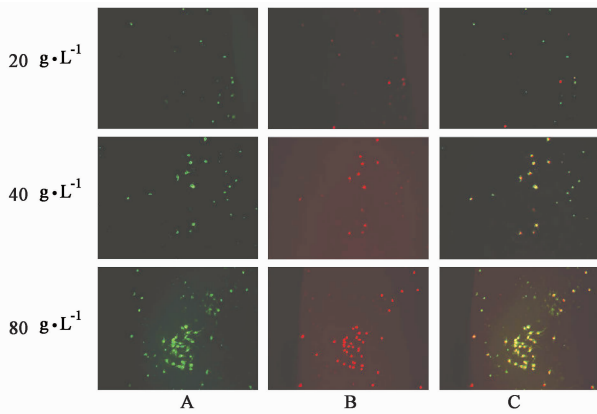
Fig. 1 Effect of SHLI and intermediates on cellular morphology of RBL-2H3 cells (inverted microscope, ×200)

2.4 SHLI 对 RBL-2H3 细胞凋亡的影响

与空白组比较, 10 g·L⁻¹ SHLI 组未见明显凋亡细胞, 20 g·L⁻¹ SHLI 组仅有少量凋亡细胞, 40 g·L⁻¹ SHLI 组可见明显凋亡细胞。80 g·L⁻¹ SHLI 引起大量细胞凋亡。见图 2。

3 讨论

近年来中药注射剂的临床应用不断增多, 其的不良反应发生率相对较高^[11], 其中速发型过敏反应对患者的身心危害最为严重, 并且已有报道显示中药注射剂的速发型过敏反应偏向于类过敏的反应类型^[3,12]。研究发现与双黄连注射液相关的过敏患者伴有心慌胸闷、口唇发绀、四肢无力、皮肤红肿和呼吸困难等症状^[13]。为了研究这些不良反应的发生机制, 需要合适的细胞和动物模型进行研究。在动物体内的过敏反应中, 肥大细胞扮演着重要的角色。但体外研究中尚没有合适的肥大细胞株。RBL-2H3



0, 10 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 组未见明显凋亡细胞, 不展示图片。A. 异硫氰酸荧光素染色; B. 碘化丙啶染色; C. A + B

图 2 SHLI 对 RBL-2H3 细胞凋亡的影响 (Annexin V/PI, $\times 200$)

Fig. 2 Effect of SHLI on the apoptosis of RBL-2H3 cells (Annexin V/PI, $\times 200$)

细胞具有肥大细胞的许多生物学特性, 能模拟肥大细胞的各种功能, 是体外研究与肥大细胞有关的各种生理病理、药物作用机制等的重要模型^[8, 14]。RBL-2H3 细胞在某些药物的刺激下能够发生与肥大细胞相类似的脱颗粒反应, 同时释放组胺、 β -氨基己糖苷酶等多种生物活性物质。

本研究采用不同浓度 SHLI 及其中间品对 RBL-2H3 细胞增殖的抑制作用明显不同, 随着给药浓度的增高, 细胞存活率逐渐降低, 高浓度药物对细胞增殖的抑制作用最强。MTT 比色法为快速地检测活细胞数量的有效手段, 是检测细胞增殖和生长是比较理想的方法^[15]。本实验采用 MTT 法, 测算 SHLI 及其中间品黄芩提取物、金银花连翘提取物 IC_{50} , 根据 SHLI 的 IC_{50} , 设定 SHLI 4 个不同浓度, 随着给药剂量的增加, 引起 RBL-2H3 细胞凋亡的数量不断增多, 表明 SHLI 对 RBL-2H3 细胞增殖的抑制作用是通过引起细胞凋亡的途径而实现。为进一步的研究过程中建立合适的细胞模型以及 SHLI 致敏机制的深入研究提供科学的依据。

目前对于 SHLI 过敏原的研究中, 有学者提出黄芩苷和绿原酸可能是导致其过敏的物质^[16], 这些物质通过按照 SHLI 的比例配合后, 是否还具有同样的致敏特性还有待深入的研究。同时提示在以后的 SHLI 致敏机制的研究中, 应该以 SHLI 整体为研究对象, 不能单独着眼于其中某一成分, 应该将这些成分可能产生的相互作用也纳入研究范畴之中。

[参考文献]

[1] 黄路芬, 董燕, 王青, 等. 探讨几种中药注射剂对膈窝

淋巴结免疫细胞表面分子的影响及其致敏性[J]. 中国药理学通报, 2012, 28(6): 877-881.

[2] 杨燕妮, 冯雪梅, 何海明, 等. 144 例双黄连注射剂不良反应/事件报告分析[J]. 广东药学院学报, 2014, 30(2): 210-213.

[3] 程芳. 注射用双黄连类过敏反应及其机制研究[D]. 济南: 山东大学, 2009.

[4] 吴嘉瑞, 张冰. 双黄连注射剂致过敏性休克流行病学特点[J]. 中成药, 2007, 29(5): 638-641.

[5] Ring J, Behrendt H. Anaphylaxis and anaphylactoid reactions[J]. Clin Rev Allergy Immunol, 1999, 17(4): 387-399.

[6] 国家食品药品监督管理总局. 化学药物刺激性、过敏性和溶血性研究技术指导原则[S]. 2005: [H] GPT4-1.

[7] Rashid A, Sadroddiny E, Ye H T, et al. Review: Diagnostic and therapeutic applications of rat basophilic leukemia cells[J]. Mol Immunol, 2012, 52(3/4): 224-228.

[8] Silwal P, Shin K, Choi S, et al. Adenine suppresses IgE-mediated mast cell activation[J]. Mol Immunol, 2015, 65(2): 242-249.

[9] 周琴, 付贤树, 王为民. RBL-2H3 细胞在药理学研究上的应用[J]. 中国药学杂志, 2011, 46(17): 1305-1308.

[10] 周一平. 用 SPSS 软件计算新药的 LD_{50} [J]. 药学进展, 2003, 27(5): 314-316.

[11] 马宏图, 睢凤英. 中药注射剂安全性与类过敏反应[J]. 中国医院药学杂志, 2009, 29(10): 838-840.

[12] 梁爱华, 李春英, 刘婷, 等. 中药注射剂的类过敏实验动物模型和实验方法研究[J]. 世界科学技术—中医药现代化, 2010, 12(6): 998-1004.

[13] 吴嘉瑞, 张冰. 基于病案对照分析的中药注射剂致过敏性休克流行病学特点研究[J]. 中药新药与临床药理, 2008, 19(5): 404-407.

[14] Ede J D, Ortega V A, Boyle D, et al. Rosette nanotubes alter IgE-mediated degranulation in the Rat Basophilic Leukemia(RBL)-2H3 cell line[J]. Toxicol Sci, 2015, 148(1): 108-120.

[15] 李上标, 裴淑艳, 蒋超, 等. MTT 比色法研究应用进展[J]. 西北民族大学学报: 自然科学版, 2013, 34(9): 68-74.

[16] Han S, Zhang T, Huang J, et al. New method of screening allergenic components from Shuanghuanglian injection; with RBL-2H3/CMC model online HPLC/MS system[J]. J Pharm Biomed Anal, 2014, 88C: 602-608.