

注射用双黄连与生脉注射液对 Hartley 豚鼠与 BN 大鼠主动全身过敏反应的影响

谭梦晖, 金若敏*, 崔金刚, 朱灿伶, 朱睿
(上海中医药大学, 上海 201203)

[摘要] **目的:**研究注射用双黄连、生脉注射液对 Hartley 豚鼠与棕色挪威(BN)大鼠的主动全身过敏反应(active systemic anaphylaxis, ASA)及其相关指标,为完善中药注射剂过敏性评价提供实验依据。**方法:**取 Hartley 豚鼠或 BN 大鼠随机分为卵蛋白(OVA)组、注射用双黄连(双黄连)组、生脉注射液(生脉)组、正常组。2 种动物分别隔日 *ih* 受试药物致敏液 3 次,于致敏后第 14 天静脉注射相应的激发液,观察激发后 30 min 动物的全身过敏反应症状,苏木素-伊红(HE)染色观察肺组织病理改变。放射免疫法检测 BN 大鼠在致敏前及激发后血清总免疫球蛋白 E(IgE)水平的变化、致敏激发后血清类胰蛋白酶变化。**结果:**对 Hartley 豚鼠或 BN 大鼠,OVA 组、双黄连组动物均呈现过敏反应症状,肺组织病理切片显示均有明显淋巴细胞浸润等炎症病理表现,但双黄连组较轻。生脉组则未见过敏反应症状以及肺组织病理异常。与正常组比较,OVA 组、双黄连组、生脉组大鼠激发后血清总 IgE 水平显著升高($P < 0.05$, $P < 0.01$)。与致敏前同组动物血清总 IgE 水平比较,激发后 OVA 组、双黄连组血清总 IgE 水平显著升高($P < 0.05$, $P < 0.01$)。与正常组比较,OVA 组、双黄连组大鼠激发后血清类胰蛋白酶水平显著升高($P < 0.01$, $P < 0.05$),生脉组有升高趋势,但是无显著差异。**结论:**采用不同品种实验动物及增加相关检测的指标,能更全面评价注射用双黄连、生脉注射液潜在的致敏性。

[关键词] 双黄连注射液; 生脉注射液; 主动全身过敏反应; Hartley 豚鼠; BN 大鼠; 免疫球蛋白 E; 类胰蛋白酶

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2016)14-0116-05

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2016140116

Active Systemic Anaphylaxis to Shuanghuanglian and Shengmai Injection in Hartley Guinea Pigs and BN Rats

TAN Meng-hui, JIN Ruo-min*, CUI Jin-gang, ZHU Can-ling, ZHU Rui
(Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China)

[Abstract] **Objective:** To study the active systemic anaphylaxis (ASA) and relevant indicators induced by Shuanghuanglian and Shengmai injection in Hartley guinea pigs and Brown Norway (BN) rats. **Method:** Hartley guinea pigs or BN rats were randomly divided into ovum albumin (OVA) group, Shuanghuanglian injection group, Shengmai injection group and normal group. Animals were injected with test sensitization drug liquid 3 times every other day. On day 14 of sensitization, corresponding arousal liquid was intravenously injected. The usual systemic symptoms of ASA test were observed within 30 min after the last injection. The lung tissue pathological examination was performed with hematoxylin-eosin (HE) staining. Changes of serum immunoglobulin E (IgE) levels before sensitization and after arousal, and changes of serum tryptase after sensitization and arousal were determined using radioimmunoassay in BN rats. **Result:** Hartley guinea pigs or BN rats in OVA group and Shuanghuanglian injection group showed systemic allergy symptoms. The pathological changes of the lung tissue with perivascular lymphocyte infiltration were observed, but the symptoms in Shuanghuanglian group were less

[收稿日期] 20150610(007)

[基金项目] 国家“重大新药创制”科技重大专项(2009ZX0902-002)

[第一作者] 谭梦晖,副教授,博士,从事中药药理学与毒理研究, Tel:021-51322212, E-mail:mimidiandian1@126.com

[通讯作者] *金若敏,教授,博士生导师,从事中药药理学与毒理研究, Tel:021-51322401, E-mail:rmj801@126.com

serious. Shengmai group had no anaphylaxis or pathological abnormality of lung tissues. Compared with the normal group, the levels of serum IgE were significantly increased in OVA group, Shuanghuanglian group and Shengmai group after arousal ($P < 0.05$, $P < 0.01$). Compared with the animals of the same group before arousal, the total serum IgE levels after arousal were significantly increased both in OVA group and Shuanghuanglian group ($P < 0.05$, $P < 0.01$). Compared with the normal group, the serum tryptase levels in OVA group and Shuanghuanglian group were significantly increased after arousal ($P < 0.01$, $P < 0.05$), and Shengmai group had an increase trend but with no significant difference. **Conclusion:** Application of different animal species and increasing relevant detection indicators are useful to more comprehensively evaluate the potential ASA induced by Shuanghuanglian and Shengmai injection.

[**Key words**] Shuanghuanglian injection; Shengmai injection; active systemic anaphylaxis; Hartley guinea pig; BN rat; total immunoglobulin E; tryptase

近年来对中药注射剂在临床使用中出现过敏或类过敏反应的报道不少,中药注射剂上市之前均进行过临床前安全性评价,但是在使用之中却出现过敏反应,因此对已经上市的中药注射剂进行安全性再评价工作非常重要^[1-3]。目前对中药注射剂过敏反应评价的经典方法是采用豚鼠主动全身过敏反应(active systemic anaphylaxis, ASA)实验^[4]。鉴于不同遗传背景的动物对不同成分物质的过敏反应不同^[5],国内外亦有文献报道棕色挪威(BN)大鼠较容易诱导 I 型过敏反应,可作为研究速发型过敏反应的动物模型^[6-7]。本研究选用 Hartley 豚鼠与 BN 大鼠对注射用双黄连粉针剂(以下简称双黄连)、生脉注射液(以下简称生脉)进行主动全身过敏反应的比较研究。近年来上述 2 种注射剂在临床上均出现不良反应文献报道,其中双黄连的过敏反应发生率比生脉高,但未见同时使用 2 种动物模型进行此 2 种中药注射剂安全性评价的报道^[8]。本研究在进行 ASA 实验的同时还增加了不同检测指标,以全面反应中药注射剂的过敏反应特点,为多层次综合评价中药注射剂的潜在致敏性提供实验依据。

1 材料

1.1 动物 Hartley 豚鼠,SPF 级,雌雄各半,200 ~ 220 g,由北京维通利华实验动物有限公司提供,合格证号 SCXK(京)2006-2009。BN 大鼠,清洁级,雄性体重 160 ~ 180 g,购于上海斯莱克实验动物有限公司,合格证号 SCXK(沪)2003-0002。动物饲养于上海中医药大学实验动物中心,清洁级环境。

1.2 药物及试剂 卵蛋白(美国 Sigma 公司,批号 DH015-4),注射用双黄连[冻干](哈尔滨制药集团中药二厂,批号 0906006),生脉注射液(上海和黄药业有限公司,批号 080316),Al(OH)₃ 凝胶佐剂(美国 Sigma 公司,批号 MDBH714),N α -苯甲酰-DL-精

氨酸-P-硝基苯胺盐酸盐(BAPNA,美国 Sigma 公司,批号 BCBC5353),胰蛋白酶(Trypsin,美国 Amresco 公司,批号 0458)。卵蛋白(OVA)致敏液:称取卵蛋白 40 mg 加 0.9% 氯化钠注射液 2 mL 溶解后再与 Al(OH)₃ 凝胶佐剂 2 mL 充分混合配成 10 g·L⁻¹。激发液:称取卵蛋白 60 mg 加 0.9% 氯化钠注射液 3 mL 溶解配成 20 g·L⁻¹。双黄连豚鼠致敏液:取粉针 1 800 mg,加 0.9% 氯化钠注射液 2.25 mL 以及 Al(OH)₃ 凝胶佐剂 2.25 mL 配成 400 g·L⁻¹;激发液:取粉针 3 600 mg,加 0.9% 氯化钠注射液 4.5 mL 配成 800 g·L⁻¹。双黄连大鼠致敏液:取粉针 1 200 mg,加 0.9% 氯化钠注射液 2 mL 以及 Al(OH)₃ 凝胶佐剂 2 mL 配成 300 g·L⁻¹;激发液:取粉针 1 800 mg,加 0.9% 氯化钠注射液 3 mL 配成 600 g·L⁻¹。生脉豚鼠与大鼠致敏液:取生脉原液 2 mL,加 Al(OH)₃ 凝胶佐剂 2 mL 充分混合;激发液:取生脉原液。大鼠 IgE 对照品,抗大鼠 IgE 抗血清,¹²⁵I-IgE(大鼠)标记物,RIA 分析缓冲液均由复旦大学放射医学研究所制备与提供^[5]。

1.3 仪器 5415R 型 4 ℃ 离心机(德国 Eppendorf 公司),ELX800 型酶联免疫检测仪(美国 BioTek 公司),SN-695 型放射免疫 γ 测量仪(上海核所日环电仪器有限公司),DDL-5 型低速冷冻多管离心机(上海安亭科学仪器厂),IX71 型倒置相差显微镜(日本 Olympus 公司)。

2 方法

2.1 分组及处理

2.1.1 双黄连、生脉对豚鼠的 ASA 实验 豚鼠随机分为正常、OVA、双黄连、生脉组。给药组于第 1, 3, 5 天分别皮下注射 OVA, 双黄连, 生脉致敏液 0.5 mL/只,共致敏 3 次。末次致敏后第 14 天,各组动物分别静脉注射相应激发剂量的药物 0.5 mL/只进

行激发。正常组同时点同法给予等容量生理盐水。激发后立即至 30 min 内观察动物的过敏反应情况及进行评价,然后取 10% 甲醛溶液将动物右肺组织固定,浸蜡包埋,切片,苏木素-伊红(HE)染色,光镜下观察并拍照^[5]。

2.1.2 双黄连、生脉对大鼠的 ASA 实验 动物分组、给药方法及肺组织病理评价标准均同 2.1.1 项,大鼠过敏症状评价方法见参考文献[9]。在大鼠进行 ASA 实验的同时,分别于致敏 0 天眼眶取血,第 14 天激发后 30 min,以 25% 乌拉坦 1 g·kg⁻¹ ip 麻醉,腹主动脉取血。动物取血后,立即进行 3 000 r·min⁻¹离心 15 min,分离血清,-80 ℃保存备用。

2.2 观察指标 血清总 IgE 水平,血清类胰蛋白酶水平,豚鼠、大鼠过敏症状表现及过敏反应发生率,豚鼠、大鼠肺组织病理形态改变。

2.3 标本采集与制备

2.3.1 豚鼠、大鼠过敏症状表现及过敏反应发生率 末次致敏后第 14 天,各组动物分别静脉注射相应激发剂量的药物 0.5 mL/只进行激发。正常组同时点同法给予等容量生理盐水。激发后立即至 30 min 内观察动物的过敏反应情况并按参考文献[10]进行评价。

2.3.2 豚鼠、大鼠肺组织病理形态改变 激发后 30 min,以 25% 乌拉坦 1 g·kg⁻¹ ip 麻醉,腹主动脉取血。取 10% 甲醛溶液将动物右肺组织固定,浸蜡包埋,切片,HE 染色,光镜下观察并拍照。

2.3.3 大鼠血清总 IgE 测定 大鼠激发后 30 min,

以 25% 乌拉坦 1 g·kg⁻¹ ip 麻醉,腹主动脉取血。具体检测方法见参考文献[9]。

2.3.4 大鼠血清类胰蛋白酶测定 精确称取胰蛋白酶 10 mg,置 50 mL 量瓶中,用磷酸盐缓冲液溶解并定容,得质量浓度为 200 mg·L⁻¹ 的原液;依次稀释,分别配制成 3.125 mg·L⁻¹至 200 mg·L⁻¹ 的系列质量浓度梯度对照品溶液。分别吸取上述的对照品溶液各 500 μL,在 405 nm 处测吸光度 A。以胰蛋白酶浓度为纵坐标 Y,以吸光度为横坐标,绘制标准曲线。以 20 mg BAPNA 溶于 1 mL 二甲基亚砜中,取 20 μL 加入血清 100 μL,反应缓冲液(Tris-HCl, pH 7.4) 0.65 mL。30 ℃避光反应 30 min 后,加入 30% 乙酸 0.25 mL 终止反应并测 A。以反应缓冲液为参比调零。根据曲线计算血清类胰蛋白酶浓度。

2.4 统计学分析 采用 SPSS 11.5 统计软件,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间比较采用 *t* 检验,多组间比较采用单因素方差分析,过敏反应发生率采用卡方检验;过敏反应程度以及组织病理改变程度比较采用秩和检验,以 *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 对豚鼠、大鼠过敏症状的影响 豚鼠或大鼠正常组均无异常表现。OVA 组豚鼠表现出呼吸急促、步态不稳等症状;大鼠出现活动减少、步态不稳、爪甲紫疔等症状。双黄连组豚鼠出现躁动、挠鼻等症状;大鼠出现活动减少症状。生脉组豚鼠或大鼠均无异常表现。根据过敏症状表现进行反应强度的评价及统计过敏反应发生率。见表 1。

表 1 双黄连与生脉注射液对 Hartley 豚鼠与 BN 大鼠过敏反应症状、强度及发生率的影响(*n* = 6)

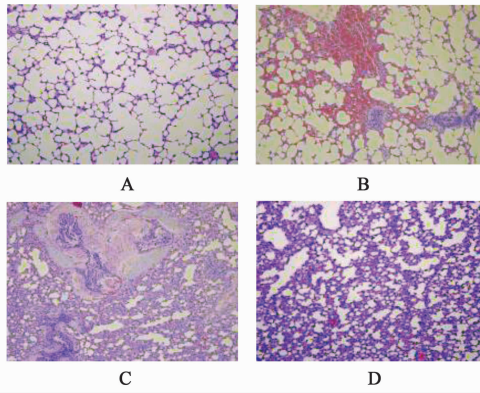
Table 1 Effects of Shuanghuanglian and Shengmai injection on allergy symptoms, intensity and incidence of Hartley guinea pigs and BN rats (*n* = 6)

组别	Hartley 豚鼠			BN 大鼠		
	反应症状	反应强度	反应发生率/%	反应症状	反应强度	反应发生率/%
正常	无异常	-	0	无异常	-	0
OVA	呼吸急促,步态不稳,痉挛,口唇紫疔,四肢软瘫,潮式呼吸,死亡	卅	100 ²⁾	活动减少,步态不稳,爪甲紫疔,四肢软瘫	卅	100 ²⁾
双黄连	躁动,挠鼻	+	100 ²⁾	活动减少	+	100 ²⁾
生脉	无异常	-	0	无异常	-	0

注:与正常组比较¹⁾ *P* < 0.05, ²⁾ *P* < 0.01。

3.2 对豚鼠、大鼠肺组织病理形态学的影响 豚鼠或大鼠正常组肺组织均无异常病理改变。OVA 组豚鼠肺泡腔内充满渗出液,肺间质水肿,黏膜下有大量淋巴细胞浸润,肺泡壁毛细血管扩张瘀血明显;大鼠肺泡腔内充满渗出液,肺间质水肿,黏膜下有大量

嗜酸性粒细胞、淋巴细胞浸润,肺泡壁毛细血管扩张瘀血。双黄连组豚鼠肺间质有大量淋巴细胞浸润;大鼠肺泡腔内充满渗出液,肺黏膜下有大量淋巴细胞浸润。生脉组肺间质有少量淋巴细胞浸润;大鼠未见异常。见图 1,2。



A. 正常组; B. BOVA 组; C. 双黄连组; D. 生脉组 (图 2 同)
图 1 双黄连与生脉注射液对 Hartley 豚鼠肺组织病理学的影响 (HE, ×100)

Fig. 1 Effects of Shuanghuanglian and Shengmai injection on pulmonary histopathology of Hartley guinea pigs (HE, ×100)

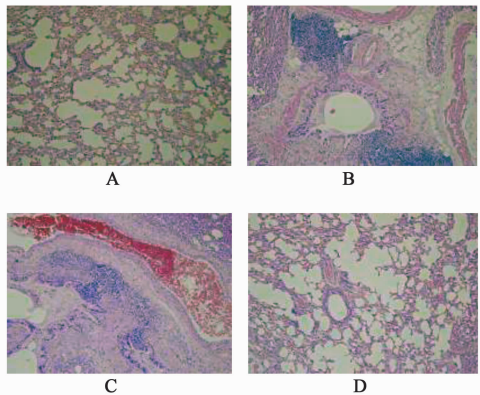


图 2 双黄连与生脉注射液对 BN 大鼠肺组织病理学的影响 (HE, ×100)

Fig. 2 Effects of Shuanghuanglian and Shengmai injection on pulmonary histopathology of BN rats (HE, ×100)

3.3 对大鼠血清总 IgE 水平的影响 与正常组比较, OVA, 双黄连, 生脉组大鼠激发后 30 min 血清总 IgE 水平均明显升高 ($P < 0.01, P < 0.05$)。与致敏当天比较, OVA, 双黄连血清总 IgE 水平明显升高 ($P < 0.01, P < 0.05$), 生脉组有升高趋势, 但无显著性差异。见表 2。

3.4 对大鼠血清类胰蛋白酶水平的影响 胰蛋白酶进样量在 $3.125 \sim 200 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 与峰面积线性关系良好, 标准曲线 $Y = 60.128X - 5.8371, r = 0.999$ 。与正常组比较, OVA, 双黄连组大鼠激发后 30 min 血清中类胰蛋白酶水平有明显升高 ($P < 0.01, P < 0.05$), 生脉组大鼠血清中类胰蛋白酶水平有升高趋势, 但无显著差异。见表 3。

4 讨论

双黄连由金银花、黄芩、连翘的提取物制成, 生

表 2 双黄连与生脉注射液对 BN 大鼠血清总 IgE 水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 2 Effects of Shuanghuanglian and Shengmai injection on total IgE level of BN rats ($\bar{x} \pm s, n = 6$) $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$

组别	激发剂量	致敏当天	激发后 30 min
正常	-	186.87 ± 24.25	195.90 ± 18.73
OVA	10 mg	188.63 ± 9.50	307.42 ± 45.74 ^{2,4)}
双黄连	300 mg	199.85 ± 41.56	266.25 ± 39.15 ^{2,3)}
生脉	0.5 mL	198.02 ± 27.01	231.16 ± 41.52 ¹⁾

注: 与正常组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$; 与致敏当天比较³⁾ $P < 0.05$, ⁴⁾ $P < 0.01$ (表 3 同)。

表 3 双黄连与生脉注射液对 BN 大鼠血清类胰蛋白酶水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 3 Effects of Shuanghuanglian and Shengmai injection on trypsin concentration of BN rats after ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

分组	激发剂量	类胰蛋白酶/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$
正常	-	5.30 ± 3.05
OVA	10 mg	12.63 ± 0.89 ²⁾
双黄连	300 mg	8.44 ± 2.37 ¹⁾
生脉	0.5 mL	7.35 ± 1.26

脉的主要成分为红参、麦冬、五味子。近年来上述 2 种注射剂在临床上均出现不良反应文献报道, 其中双黄连的过敏反应发生率比生脉高^[11], 本研究选用豚鼠和大鼠 2 种实验动物模型对 2 种中药注射剂进行 ASA 比较研究, 在观察过敏反应的症状同时还增加了对动物肺组织的病理检查。结果显示对阳性药物 2 种实验动物均表现出极其明显的过敏反应症状, 双黄连组 2 种实验动物均表现出弱过敏反应症状, 与肺的组织病理改变相吻合。生脉组在豚鼠与大鼠的整体实验中均未出现过敏反应, 但豚鼠肺组织病理出现 50% 阳性病变率, 程度较轻, 而大鼠肺组织未见异常。这个结果既表明用不同品种动物模型较一种动物模型评价更为全面, 也反映肺组织病理改变程度较整体过敏反应症状表现敏感, 可作为过敏反应评价的补充指标。

IgE, 组胺和类胰蛋白酶被认为是反应过敏反应的敏感指标, 血清总 IgE 是介导 I 型变态反应的抗体, 一般在过敏反应中水平会明显升高^[12-13]; 类胰蛋白酶在血中的半衰期时间远远大于组胺, 比组胺检测更稳定。因此近几年来文献报道类胰蛋白酶水平的检测被看成是肥大细胞及其脱颗粒的程度的判定标准^[14-16]。本研究发现 OVA, 双黄连组大鼠激发后血清总 IgE 水平与类胰蛋白酶水平有明显提高,

生脉组血清总 IgE 有明显提高,类胰蛋白酶水平仅有升高趋势,此变化与动物的整体表现、肺组织的病理变化基本是一致的。表明血清中总 IgE 水平与类胰蛋白酶水平的检测对中药注射剂过敏性或潜在过敏性评价具有一定的实用价值。增加大鼠模型进行药物安全性评价是非常必要的。

生脉组动物整体表现虽无异常,但对豚鼠肺组织病理有轻微的改变、对大鼠激发后血清敏感指标的变化趋势均提示了其可能具有的弱致敏性。通过本研究结果可以初步认为豚鼠在 ASA 实验中的整体表现和肺组织病理改变为比较敏感指标;BN 大鼠则是整体表现、肺组织病理改变以及血清中与过敏反应相关的指标检测较敏感。全面地评价多成分中药注射剂潜在的过敏性,可选用不同动物及对不同的过敏反应敏感指标进行综合研究,如动物的敏感器官肺的病理学检查、增加血清中相关指标 IgE,类胰蛋白酶的检测,这些均为提高检测效能的方法。

[参考文献]

[1] 李硕,李敏,卫营芳,等. 中药安全性评价的研究进展[J]. 中国现代中药,2014,16(2):172-176.
[2] 袁强,王莉,成岚,等. 国家基本药物目录(2004年版)33种中药注射剂不良反应/不良事件文献分析[J]. 中国循证医学杂志,2010,10(2):132-139.
[3] 周超凡. 关于中药注射剂安全性及再评价的探讨[J]. 药物不良反应杂志,2009,11(2):103-105.
[4] 国家食品药品监督管理总局. 中药、天然药物免疫毒性研究的技术指导原则[M]. 2005.
[5] Hylkema M N, Hoekstra M O, Luinge M, et al. The strength of the OVA-induced airway inflammation in rats is strain dependent[J]. Clin Exp Immunol, 2002, 129(3):390-396.
[6] Antunes M A, Abreu S C, Damaceno-Rodrigues N R, et

al. Different strains of mice present distinct lung tissue mechanics and extracellular matrix composition in a model of chronic allergic asthma [J]. Respiratory Physiol Neurobiol, 2009, 165(2/3):202-207.
[7] Gillespie K M, Saoudi A, Kuhn J, et al. Th1/Th2 cytokine gene expression after mercuric chloride in susceptible and resistant rat strains[J]. Eur J Immunol, 1996, 26(10):2388-2392.
[8] 吴嘉瑞,张冰. 双黄连注射剂不良反应文献的数据挖掘研究[J]. 药物警戒,2008,5(3):139-143.
[9] 谭梦晖,金若敏,姚广涛,等. 注射用灯盏花素主动全身过敏反应评价指标的探索[J]. 中国中医药信息杂志,2012,19(3):30-32.
[10] 陈华英,李秀芳,金若敏,等. 大鼠主动全身过敏试验方法的探讨[J]. 中成药,2012,34(7):1209-1215.
[11] 程民,蒋春海,黄萍. 1012例生脉注射液不良反应/事件分析[J]. 安徽医药,2011,15(2):250-253.
[12] 陈谱. 变态反应性疾病中肥大细胞的特异性激活标志物[J]. 实用儿科临床杂志,2004,19(2):141-143.
[13] Clark J M, Moore W R, Fishman C E, et al. A novel tryptase inhibitor, APC 366, inhibits allergen-induced airway and inflammatory responses in allergic sheep[J]. Am J Respir Crit Care Med, 1995, 152(6):2076-2083.
[14] Walls A F, Jones D B, Williams J H, et al. Immunohistochemical identification of mast cells in formaldehyde2 fixed tissue using monoclonal antibodies specific for tryptase [J]. J Pathol, 1990, 28(162):119-126.
[15] 沈忆文,陆超,赵子琴,等. 类胰蛋白酶与过敏性休克死亡的法医学鉴定[J]. 法医学杂志,2002,8(18):132-136.
[16] 郭永超,李振兴,林洪,等. 组胺、类胰蛋白酶、 β -己糖胺酶在肥大细胞体外释放过程中的相互关系[J]. 细胞与分子免疫学杂志,2009,25(12):1073-1075.

[责任编辑 周冰冰]