

· 毒理 ·

检测原代肥大细胞组胺释放分析中药注射剂致类过敏性

邓向亮, 朱远洪, 王青, 董燕*, 周联, 王培训
(广州中医药大学, 广州 510006)

[摘要] **目的:**通过检测组胺释放考察 19 种临床常用中药注射剂致大鼠腹腔原代肥大细胞脱颗粒情况,为评价中药注射剂致类过敏性提供参考。**方法:**应用荧光法检测组胺,并进行条件优化以适用于中药注射剂所致肥大细胞释放组胺的检测。分离大鼠腹腔肥大细胞,分别将 19 种中药注射剂、阳性药 C48/80 和肥大细胞混合孵育 1h,采用优化的荧光法检测组胺,再计算组胺释放率并进行统计学分析。**结果:**荧光法检测组胺最佳缩合反应时间为 3 min,终止反应后 7.5~30 min 缩合物稳定性好;采用间接检测组胺释放率与直接检测组胺释放率两方法结果间无显著差异。痰热清、清开灵、参麦、丹参、血塞通、参附、双黄连、生脉、香丹、热毒宁、复方当归等 11 种中药注射剂致肥大细胞释放组胺作用明显。脉络宁、黄芪、艾迪、醒脑静、黄芪多糖、红花、盐酸川芎嗪、参芪等 8 种注射剂未见明显致肥大细胞释放组胺作用。**结论:**中药注射剂引发的过敏样反应可能大多为类过敏,检测组胺释放分析原代肥大细胞脱颗粒试验可以为评价中药注射剂的致类过敏性提供参考。

[关键词] 中药注射剂;肥大细胞;脱颗粒;类过敏反应

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)21-0271-05

[doi] 10.11653/syfy2013210271

Analysis of Anaphylactoid Reactions Caused by TCMIs via Detection of Histamine Release in Primary Mast Cells

DENG Xiang-liang, ZHU Yuan-hong, WANG Qing, DONG Yan*, ZHOU Lian, WANG Pei-xun
(Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510006, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the stimulation effect of 19 traditional Chinese medicine injections (TCMIs) on rat peritoneal mast cell degranulation *in vitro*. **Method:** The optimal reaction factors were found to detect histamine of release caused by TCMIs. And rat peritoneal mast cells were isolated and purified as reference described. The cells were then incubated in Tyrode's containing 100 mL · L⁻¹ TCMI or 4 mg · L⁻¹ C48/80 for 1 h. After washing, degranulation was assessed by measuring histamine in cell lysates as previously described, and percentage of degranulated peritoneal mast cell were calculated in a modified method. **Result:** The optimal reaction time of histamine and O-phthaldialdehyde (OPT) to form a fluorophore is 3 min. The fluorophore is stability during 7.5-30 min after the reaction was terminated. Percentages of histamine release in two calculation methods showed no difference. The mast cells, stimulated by Tan-re-qing, Qing-kai-ling, Shen-mai, Dan-shen, Xue-sai-tong, Shen-fu Shuang-huang-lian, Sheng-mai, Xiang-dan, Re-du-ning, Fu-fang-dang-gui, had higher percentages in histamine release than that in control. But, those stimulated by Mai-luo-ning, Huang-qi, Ai-di, Xing-nao-jing, Huang-qi-duo-tang, Hong-hua, Yan-suan-chuang-xiong-qin, Shen-qi had no difference with the

[收稿日期] 20130518(008)

[基金项目] 广东省 211 工程 3 期重点学科建设项目(粤发改社[2009]972 号);广东省中医管理局科研课题(2009225);广东高校优秀青年创新人才培育项目(LYN09049)

[第一作者] 邓向亮,在读博士生,从事中药免疫研究,Tel: 020-39358221, E-mail: gzy622@163.com

[通讯作者] *董燕,博士,研究员,从事中药免疫药理研究,Tel:020-36585479, E-mail: dondy001@gzhtcm.edu.cn

control in degranulation. **Conclusion:** Most hypersusceptibility caused by TCMI may be anaphylactoid reactions. It suggests that rat peritoneal mast cell degranulation test by detecting histamine release can be used to evaluate anaphylactoid reactions caused by TCMI.

[**Key words**] traditional Chinese medicine injection; mast cells; degranulation; anaphylactoid reaction

药物过敏样不良反应包括了过敏反应和类过敏反应,现有研究认为中药注射剂(TCMI)引发的严重不良反应大部分是类过敏反应^[1]。类过敏反应的机制之一是药物直接作用于肥大细胞表面受体引起细胞脱颗粒,所以可以利用体外肥大细胞模型研究药物类过敏。现有的肥大细胞模型主要有 RBL-2H3 细胞、P815 和 Ku812^[2],但是这 3 种细胞均来自于嗜碱性粒细胞或肥大细胞的肿瘤细胞株,将其作为肥大细胞模型一直存在争议^[3],因此人们致力于寻找敏感性更好,生理活性更接近肥大细胞的细胞模型。国内虽然也有研究报道利用大鼠腹腔肥大细胞脱颗粒形态改变评价中药注射剂类过敏^[4],但是受限于肥大细胞纯度不高,计数方法主观性强,缺乏客观指标。本课题组前期的系列研究不仅获得了活性和纯度满足实验需求的大鼠腹腔肥大细胞,而且发现该细胞对药物的敏感性高于 RBL-2H3 细胞^[5-6]。在此基础上,本研究选取 19 种临床常用中药注射剂直接与肥大细胞孵育,考察细胞释放组胺情况,并对组胺检测方法进行优化,以期对中药注射剂类过敏反应的评价提供方法和参考信息。

1 材料

1.1 动物 SD 大鼠 20 只,SPF 级,平均体质量(250±50)g,雌性,由广东省医学实验动物中心提供,动物许可证号 SCXK(粤)2008-0002。

1.2 药物及试剂 注射液包括参脉(批号 1201153),红花(批号 111003),复方当归(批号 120213),参芪(批号 1107434),醒脑静(批号 120322),黄芪多糖(批号 91001),艾迪(批号 20110506),鸦胆子油乳(批号 110508),热毒宁(批号 110812),参附(批号 111203),痰热清(批号 1106106),双黄连粉针(批号 1011022,生理盐水稀释成 12 mL),盐酸川芎嗪(批号 10110512),脉络宁(批号 20110361),丹参(批号 11092614),香丹(批号 1105243),生脉(批号 110934),清开灵(批号 120306),血塞通(批号 20110604)。含 Ca²⁺ Tyrode 液(Tyrode's)和无 Ca²⁺ 的 Tyrode 液按文献[3]方法配制;Percoll 液(美国 GE 公司);Compound 48/80(美国 Sigma 公司产品,批号 039k4023);邻苯二甲醛(OPT),组胺二盐酸盐(均购自美国 Sigma 公司);

Triton X-100(美国 Amresco 公司),RPMI 1640 培养基,胎牛血清(均为美国 Hyclone 公司)。

1.3 仪器 MC0175 型 CO₂ 培养箱(日本 Sanyo 公司);IMT-2 倒置显微镜(日本 Olympus 公司);Genios 多功能酶标仪(瑞士 Tecan);Centrifuge 5810R 台式高速冷冻离心机(美国 Eppendorf 公司)。

2 方法

2.1 分离、纯化大鼠腹腔原代肥大细胞 按本课题组前期报道的方法^[5]分离、纯化大鼠腹腔原代肥大细胞。主要过程如下:大鼠麻醉后颈动脉放血处死,ip 12 mL 无 Ca²⁺ Tyrode's,按摩腹部 3 min。取腹腔冲洗液在 300×g,4℃,10 min 条件下离心。弃上清液,用 0.75 mL 含 Ca²⁺ Tyrode's 液重悬细胞,并将细胞悬液与 3.5 mL 质量浓度为 1.110 g·mL⁻¹ 的 Percoll 液混合,往液面铺 0.5 mL 含 Ca²⁺ Tyrode's。在 130×g,4℃,15 min,弃上清。用含 Ca²⁺ Tyrode's 洗细胞 3 次,离心条件为 4℃,200×g,4 min。加入含 Ca²⁺ Tyrode's 混悬,细胞计数后,用台盼蓝拒染法计算细胞活性;光学显微镜下或甲苯胺蓝染色后镜下观察细胞形态。

2.2 荧光法检测组胺的条件优化

2.2.1 组胺与 OPT 最佳缩合反应时间 参考文献[3]方法,取组胺二盐酸盐稀释液,加入 0.4 mol·L⁻¹ NaOH 溶液和 0.05% 的 OPT 甲醇溶液,混匀后室温(25~28℃)放置。于缩合反应开始后 2~10 min,每分钟取 3 份样品加入 0.5 mol·L⁻¹ HCl 溶液混合以终止反应。在激发波长 360 nm,发射波长 460 nm 条件下检测荧光信号。以荧光值最高的反应时间为组胺与 OPT 最佳缩合反应时间。

2.2.2 组胺-OPT 缩合物的稳定性 取组胺稀释液按 2.2.1 项下优化的缩合反应时间进行缩合反应,分别于终止反应后的 0,7.5,15,22.5,30,60 min 检测荧光信号。

2.2.3 计算肥大细胞组胺释放率的方法改良 由于大部分中药注射液的理化性质对检测组胺荧光信号产生干扰,本研究对肥大细胞组胺释放率的计算方法进行改良:用总组胺减去药物作用后的胞内组胺再除以总组胺计算肥大细胞组胺释放率。设计以下实验验证此方法的可行性:设空白组、C48/80 组

($4 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)、盐酸川芎嗪注射液组($10 \text{ mL} \cdot \text{L}^{-1}$) (两种药物已验证对组胺荧光信号无明显影响);比较直接检测胞外组胺和间接推算方法得到的组胺释放率是否一致。两种方法计算组胺释放率的公式如下所示。

(1)直接计算:组胺释放率 = (胞外荧光值/总荧光值) $\times 100\%$

(2)间接计算:组胺释放率 = (总荧光值 - 胞内荧光值)/总荧光值 $\times 100\%$

2.3 原代肥大细胞脱颗粒试验

2.3.1 细胞分组 肥大细胞用 Tyrode's 混悬液按每孔 0.5×10^5 个接种于 96 孔板。细胞分为空白组, C48/80 组(阳性组), 注射剂组, 总组胺组, 每组 3 个复孔。

2.3.2 加药刺激 阳性药组加 C48/80 ($4 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$);各注射剂组加注射液(注射液:总体积 1:10), 空白组加 Tyrode's, 以上均为终浓度。摇匀后, 细胞置 $37 \text{ }^\circ\text{C}$, CO_2 体积比 5% 的饱和湿度培养箱孵育 1 h。离心后:各组弃上清, 用冷 PBS 洗细胞 3 次后加入含 TritonX-100 的 PBS 使 Triton X-100 终浓度为 0.1% 以裂解细胞, 检测组胺。总组胺组吸弃上清 $20 \mu\text{L}$ 后加入 $20 \mu\text{L}$ 含 TritonX-100 的 PBS, 使 TritonX-100 终浓度为 0.1%, 以裂解细胞, 检测总组胺。收集细胞裂解液待测组胺。

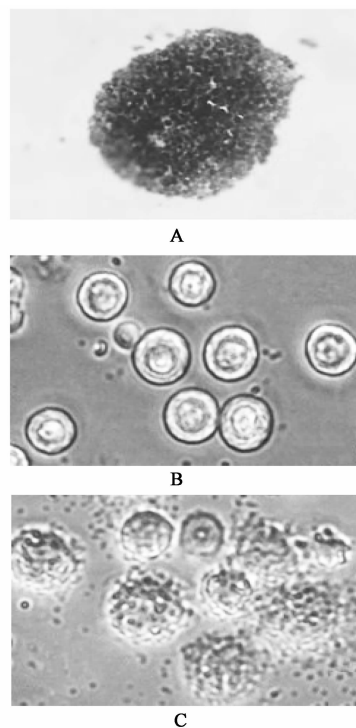
2.3.3 检测组胺并计算组胺释放率 采用 2.2 项下优化的荧光法检测组胺荧光信号, 并计算组胺释放率。

2.4 统计方法 采用 SPSS 17.0 统计软件按以下方法进行数据处理:两组之间比较采用独立样本 t 检验;3 组以上之间或多组与同一空白组之间的比较采用单因素方差分析, 结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示。 $P < 0.05$ 为有统计学意义。

3 结果

3.1 大鼠腹腔肥大细胞 经分离纯化后, 获得大鼠腹腔肥大细胞的数量约为每只 1.0×10^6 个;经台盼蓝染色分析细胞活性大于 99%, 经甲苯胺蓝染色后肥大细胞胞内可见明显的嗜碱性颗粒(图 1A), 纯度 85% ~ 90%。光学显微镜下观察正常的肥大细胞呈圆形或椭圆形, 表面光滑, 轮廓清晰, 折光性好(图 1B);经 C48/80 刺激后细胞表面粗糙, 细胞周围出现大量颗粒(图 1C)。

3.2 组胺和荧光染料最佳缩合反应条件 组胺荧光信号随缩合时间表现为先增加后减少的趋势, 其中缩合反应时间在 3 min 时荧光值较高, 随后逐渐



A. 甲苯胺蓝染色 ($\times 1000$);
B. 未脱颗粒的肥大细胞 ($\times 200$);
C. C48/80 刺激脱颗粒的肥大细胞 ($\times 200$)

图 1 大鼠腹腔肥大细胞形态

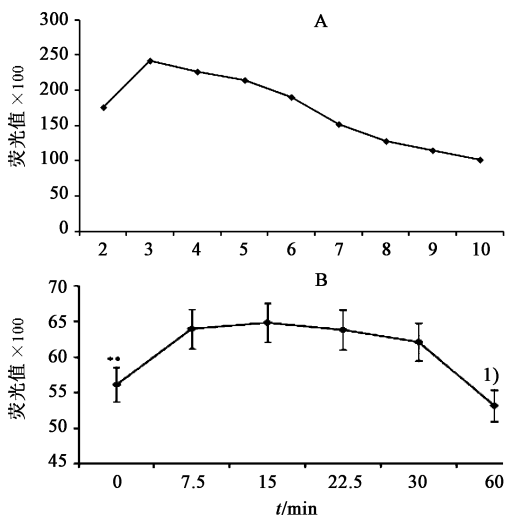
减少。组胺-OPT 缩合物在终止反应后 15 min 时组胺荧光值最高, 与 0, 60 min 的荧光值比较有统计学意义 ($P < 0.01$)。但是 7.5, 15, 22.5, 30 min 荧光值, 两两比较无统计学意义, 提示终止反应后 7.5 ~ 30 min 内缩合物荧光值较高而稳定(图 2)。

3.3 间接计算组胺释放率的可行性 间接计算释放率与传统计算方法得出释放率无显著性差异, 空白组 ($20.6 \pm 2.4\%$), ($22.4 \pm 0.8\%$)。川芎嗪组 ($22.2 \pm 6\%$), ($21.3 \pm 1.9\%$); C48/80 组 ($68.1 \pm 2\%$), ($65.5 \pm 0.3\%$)。

3.4 中药注射剂致肥大细胞释放组胺情况 研究结果显示痰热清、清开灵、参麦、丹参、血塞通、双黄连、生脉、香丹、参附、复方当归、热毒宁等 11 种中药注射剂可直接致大鼠腹腔原代肥大细胞明显释放组胺, 组胺释放率与空白组比较均具有统计学意义 ($P < 0.01$); 脉络宁、参芪、醒脑静、盐酸川芎嗪和红花等 8 种注射液未见明显致肥大细胞释放组胺, 结果见表 1。

4 讨论

肥大细胞内含有多种炎性因子, 释放细胞外的炎性因子参与多种生理病理反应^[8]。其中组胺是肥大细胞内含量丰富的介导过敏样反应的主要炎性



A. 缩合反应时间对缩合物荧光的影响;
B. 终止反应后, 缩合物的稳定性;
与 15 min 荧光值比较¹⁾ P < 0.01

图 2 组胺-OPT 缩合物荧光随时间变化情况 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

表 1 100 mL·L⁻¹ 中药注射剂致原代肥大细胞释放组胺情况 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

| 编号 | 注射剂名称 | 组胺释放率/% |
|----|--------|--------------------------|
| 1 | 空白 | 20.8 ± 3.4 |
| 2 | C48/80 | 70.7 ± 5.9 ¹⁾ |
| 3 | 痰热清 | 99.3 ± 0.7 ¹⁾ |
| 4 | 清开灵 | 66.7 ± 7.6 ¹⁾ |
| 5 | 生脉 | 55.3 ± 3.9 ¹⁾ |
| 6 | 香丹 | 55.3 ± 2.9 ¹⁾ |
| 7 | 血塞通 | 61.1 ± 5.7 ¹⁾ |
| 8 | 参附 | 64.7 ± 1.9 ¹⁾ |
| 9 | 参麦 | 59.4 ± 9.1 ¹⁾ |
| 10 | 丹参 | 46.3 ± 3.2 ¹⁾ |
| 11 | 复方当归 | 33.7 ± 1.9 ¹⁾ |
| 12 | 双黄连 | 47.3 ± 3.3 ¹⁾ |
| 13 | 热毒宁 | 30.6 ± 3.5 ¹⁾ |
| 14 | 脉络宁 | 23.8 ± 1.7 |
| 15 | 黄芪 | 18.4 ± 4.8 |
| 16 | 艾迪 | 20.7 ± 0.2 |
| 17 | 醒脑静 | 21.5 ± 1.2 |
| 18 | 参芪 | 22.1 ± 1.7 |
| 19 | 盐酸川芎嗪 | 22.0 ± 1.3 |
| 20 | 黄芪多糖 | 18.6 ± 0.9 |
| 21 | 红花 | 22.3 ± 3.6 |

注:与空白组比较¹⁾ P < 0.01。

因子,因此释放组胺是肥大细胞脱颗粒的标志之一。通过检测中药注射剂直接致肥大细胞释放组胺情况,可以对其致类过敏潜能进行分析。荧光是检测组胺的经典方法,具有简单、经济、重复性好等优点。然而荧光法检测组胺时最佳缩合反应时间在在

不同文献报道中有差异,且终止反应后最佳上机检测时间也未见报道;此外在研究中还发现由于大部分中药注射液成分复杂,其理化性质对荧光检测产生了干扰。因此本研究首先对荧光法检测组胺的条件进行了优化,结果提示在室温 25 ~ 28 °C 时组胺与 OPT 的最佳缩合反应时间为 3 min,终止反应后最佳检测时间为 7.5 ~ 30 min;并建立了间接计算组胺释放率的方法以避免注射液理化性质对荧光信号的影响。

近年来中药注射剂不良反应的报道引起了人们的关注,虽然临床前评价要求进行全身主动过敏试验和被动皮肤过敏试验,但仍不能全面和准确地反映和预测临床上中药注射剂的过敏反应的发生,因此注射剂上市后再评价研究成为研究热点之一。本研究考察的 19 种中药注射剂临床上都有不同程度的不良反应报告,其中清开灵、参麦、双黄连、生脉、丹参、香丹、黄芪、脉络宁和血塞通等 9 种注射剂临床不良反应报道较多,是 2012 年中成药严重不良反应排名的前 10 位^[9]。目前对注射剂过敏样反应评价的研究较多的是类过敏反应,其中动物试验以 Beagle 犬试验最敏感,体外研究以肥大细胞脱颗粒模型为主。Beagle 犬试验显示双黄连、清开灵、复方丹参、脉络宁类过敏反应为阳性,黄芪注射液为可疑^[7]。本课题组前期研究发现部分中药注射剂可直接刺激 RBL-2H3 细胞脱颗粒^[10]。李咏梅等^[4]利用甲苯胺蓝染色计数大鼠腹腔肥大细胞脱颗粒,发现参麦、痰热清、清开灵、生脉明显致肥大细胞脱颗粒。本研究在前期研究基础上采用纯化的大鼠腹腔原代肥大细胞,考察 19 种中药注射剂致其释放组胺情况。研究结果显示临床严重不良反应较多的清开灵、参麦、丹参、血塞通、双黄连、生脉和香丹注射液及痰热清、参附、热毒宁明显致肥大释放组胺。其中双黄连、清开灵、复方丹参、脉络宁、痰热清、生脉等致肥大细胞释放组胺统计结果与 Beagle 犬试验^[7]或肥大细胞脱颗粒计数试验^[4]出现阳性结果一致。而在肥大细胞计数试验中结果阴性的香丹、丹参注射液在本研究中却检测到明显致肥大细胞释放组胺,提示检测组胺释放较之计数法计算细胞脱颗粒结果更客观和精确。前期研究发现血塞通和清开灵能刺激 RBL-2H3 释放组胺,香丹和双黄连未见致 RBL-2H3 细胞释放组胺^[10],然而上述 4 种注射剂在本研究均致肥大细胞明显释放组胺,提示原代肥大细胞对药物敏感性高于 RBL-2H3 细胞。上述结果提示严重不良反应较多的中药注射剂大部分可

致肥大细胞释放组胺,其所引发的过敏样不良反应可能主要为类过敏。

此外,脉络宁、盐酸川芎嗪、黄芪等临床也有过敏样不良发应的报道在本研究中未见明显致肥大细胞脱颗粒,推测这8种中药注射剂引发的过敏样不良反应可能并非直接致肥大细胞脱颗粒引起,需要结合其他过敏性评价实验进行综合评价。事实上,过敏样反应包括过敏反应和类过敏反应;前者属于免疫反应,一般有明显的致敏环节;后者又包括3种:一是直接作用于肥大细胞或嗜碱性粒细胞引起细胞脱颗粒^[10];二是通过激活补体产生C5a和C3a等,进而引起肥大细胞脱颗粒^[11-12];三是药物引起的细胞坏死和凋亡也可以直接致细胞释放大炎症介质^[14-15]。本研究考察的是第一种情况的类过敏反应。目前研究发现注射剂常用辅料聚氧乙烯山梨糖醇单油酸酯(吐温80)既可以直接致RBL-2H3细胞脱颗粒,也可以活化补体系统^[16-17]。文献报道清开灵不能引起补体活化,但可以直接刺激肥大细胞脱颗粒^[18]。黄芪注射液在Beagle犬试验中结果为可疑,在本研究也未见致肥大细胞释放组胺,提示该注射剂引起的过敏样反应可能不是类过敏。

本研究采用中药注射剂直接刺激大鼠原代肥大细胞,通过组胺释放率的比较反映其脱颗粒情况,分析其致类过敏性。结果提示中药注射剂引发的过敏样反应可能大多为类过敏,所检测的19种中药注射剂中11种有显著的刺激肥大细胞脱颗粒释放组胺的活性,研究结果可为中药注射剂安全性预警提供参考。

[参考文献]

[1] 张美玉,李怡奎,张嘉,等. 鱼腥草注射液过敏及类过敏实验研究[J]. 中国现代应用药学杂志,2009,26(8):610.

[2] 高捷,罗佳波,雷林生,等. 3种细胞用于建立体外肥大细胞脱颗粒模型比较及应用[J]. 广州中医药大学学报,2012,29(3):295.

[3] Egle Passante, Neil Frankish. The RBL-2H3 cell line: its provenance and suitability as model for the mast cell [J]. *Inflamm Res*,2009,58:737.

[4] 李咏梅,刘炯,赵源,等. 大鼠腹腔肥大细胞与RBL-2H3细胞脱颗粒方法的建立及其在中药注射剂安全性评价上的应用[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(22):152.

[5] 幸晓燕,王青,周联,等. 一种大鼠腹腔肥大细胞分离方法[J]. 免疫学杂志,2011,28(7):615.

[6] 邓向亮,王丽虹,周联,等. 鼻塞通致RBL-2H3细胞与原代肥大细胞脱颗粒特性的比较[J]. 广州中医药大学学报,2012,29(3):150.

[7] 闫位娟,李连达,张美玉,等. 7种中药注射剂对Beagle犬类过敏反应研究[J]. 中国新药杂志,2010,19(20):1895.

[8] 阮从潇,李玉洁,杨庆,等. 参莲提取物对大鼠腹腔肥大细胞释放活性物质的干预作用[J]. 中国实验方剂学杂志,2013,19(6):196.

[9] 国家食品药品监督管理总局. 国家食品药品监督管理局发布2012年药品不良反应监测年度报告[EB/OL] (2013-03-14. <http://www.sda.gov.cn/WS01/CL0051/79058.html>).

[10] 罗霞,王青,周联,等. 几种常用中药注射剂对RBL-2H3细胞脱颗粒的影响[J]. 中药新药与临床药理,2009,20(6):506.

[11] Ahmed Chahdi, Paul F, Fraundorfer, Michael A Beaven. Compound 48/80 activates mast cell phospholipase D via Heterotrimeric GTP-Binding Proteins [J]. *J Pharmacol Exp Ther*,2000,292(1):122.

[12] Janos Szebeni. Complement activation-related pseudoallergy: A new class of drug-induced acute immune toxicity [J]. *Toxicology*,2005,216(2/3):106.

[13] Szebeni J, Muggia F, Gabizon A. et al. Activation of complement by therapeutic liposomes and other lipid excipient-based therapeutic products: prediction and prevention [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2011, 63(12):1020.

[14] 林静,李大主. 细胞凋亡:一种新的细胞死亡方式[J]. 国际免疫学杂志,2011,34(3):213.

[15] Pranati Samadder, Robert Bittman, Hoe-Sup Byun, et al. A glycosylated antitumor ether lipid kills cells via paraptosis-like cell death [J]. *Biochem Cell Biol*, 2009,87(2):401.

[16] 张嘉,李澎,李贻奎,等. 吐温80诱导RBL-2H3细胞脱颗粒作用研究[J]. 现代免疫学,2009,29(3):240.

[17] 张嘉,李贻奎,李连达,等. 补体系统激活在吐温80导致类过敏反应中的作用[J]. 毒理学杂志,2009,23(6):457.

[18] 陈莉婧,廖国平,汪艳,等. 清开灵注射液对血清补体和RBL-2H3细胞影响的体外研究[J]. 中国中药杂志,2011,36(14):1884.

[责任编辑 聂淑琴]