

3种品系大鼠对灯盏花素所致 被动皮肤过敏差异性研究

谭梦晖¹, 李秀芳^{1,2}, 金若敏^{1*}, 姚广涛¹, 符胜光¹, 谭森文¹

(1. 上海中医药大学, 上海 201203; 2. 云南中医学院, 昆明 650500)

[摘要] 目的: 比较 F344, SD, Wistar 3 种品系大鼠对灯盏花素诱导的被动皮肤过敏 (passive cutaneous anaphylaxis, PCA) 反应的差异性。方法: 取 3 种品系大鼠随机分为阴性对照组、天花粉组、灯盏花素组。采用 sc 给药方式, 分别给予各组动物不同的药物, 进行大鼠同种或大鼠-小鼠异种 PCA 试验, 检测给予灯盏花素后动物皮肤蓝斑吸光度 (A), 比较药物对 F344, SD, Wistar 3 种品系大鼠的 A 变化率。结果: 大鼠同种 PCA 试验显示: 3 种品系大鼠注射灯盏花素 25 mg·kg⁻¹ 致敏后, F344 大鼠皮肤蓝斑 A 为 0.064 ± 0.005 7, 明显升高 (P < 0.05), SD, Wistar 大鼠 PCA 反应均为阴性。大鼠-小鼠异种 PCA 试验显示: 注射 F344 大鼠抗血清后, 小鼠异种 PCA 反应为阳性, A 为 0.10 ± 0.01 (P < 0.05), 注射 SD, Wistar 大鼠抗血清后, 反应均为阴性。结论: 2 种试验方法结果均显示, 3 种品系大鼠对灯盏花素的敏感性存在差异, 其中以 F344 大鼠最为敏感。

[关键词] 灯盏花素; 被动皮肤过敏; F344 大鼠; SD 大鼠; Wistar 大鼠

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2011)09-0169-04

Differences in Sensitivity of Passive Cutaneous Anaphylaxis Induced by Breviscapine Among Three Rat Strains

TAN Meng-hui¹, LI Xiu-fang^{1,2}, JIN Ruo-min^{1*}, YAO Guang-tao¹, FU Sheng-guang¹, TAN Sen-wen¹

(1. Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China;

2. Yunnan University of Traditional Chinese Medicine, Kunming 650500, China)

[Abstract] **Objective:** To compare the differences in sensitivity of passive cutaneous anaphylaxis (PCA) caused by breviscapine among Sprague Dawley (SD), Wistar, and Fischer344 (F344) rats. **Method:** The rats in the 3 strains were randomly divided into negative control group, trichosanthin group and breviscapine group. The homologous PCA experiment was performed by using three different strains of rat and xenogenic PCA by using rats and mice. Breviscapine was given as allergen. The absorbance was measured to discriminate the severity of PCA. **Result:** The rat homologous PCA revealed that after injection with 25 mg·kg⁻¹ breviscapine, F344 rat showed positive reaction, the absorbance was 0.064 ± 0.005 7 and increased significantly (P < 0.05), but SD rat and Wistar rat showed negative reaction. Xenogenic PCA showed that the mice injected breviscapine antiserum of F344 rat, demonstrated a positive reaction (P < 0.05), the absorbance was 0.10 ± 0.01, the others received breviscapine antiserum of SD or Wistar rats showed negative reactions. **Conclusion:** There are differences in sensitivity to breviscapine among three rat strains, and F344 rat is the most sensitive one.

[Key words] breviscapine; passive cutaneous anaphylaxis; F344 rat; SD rat; Wistar rat

[收稿日期] 20101118(001)

[基金项目] 国家“十一五”科技支撑计划项目(2006BAI06A03-02); 国家“重大新药创制”科技重大专项项目(2009ZX0902-002)

[第一作者] 谭梦晖, 讲师, 博士, 主要从事中药药理与毒理研究, Tel: 021-51323053, E-mail: mimidiandian@yahoo.com.cn

[通讯作者] * 金若敏, Tel: 021-51322402, E-mail: rmj801@126.com

灯盏花素(brevicapsine)是从菊科植物短葶飞蓬中分离得到的黄酮类有效成分,具有增加脑血流量、改善脑微循环、抗血小板聚集等作用,在临床上主要用于脑血栓、冠心病等疾病的治疗。灯盏花素的不良反应报道其临床表现以过敏反应为主,严重的可出现过敏性休克^[1]。本研究采用大鼠和大鼠-小鼠进行 PCA 试验,以探讨不同品系大鼠或 2 种试验方法在评价灯盏花素潜在致敏性时的灵敏度差异。

1 材料

1.1 药物 注射用灯盏花素,昆明龙津药业有限公司,批号 20080905;天花粉蛋白注射液,上海金山制药有限公司,批号 080601。

1.2 动物 SD, Wistar, F344 大鼠,清洁级,雌雄各半,体重 160 ~ 180 g,昆明种小鼠,雌雄各半,体重 18 ~ 20 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。

1.3 仪器 MK3 酶标仪,热电上海仪器有限公司,DK-8A 电热恒温水槽,上海精宏实验设备有限公司。

1.4 试剂与配制 无水三氯化铝,批号 T20080829,氢氧化钠,批号 T20030408,氢氧化钾,批号 T20081015,丙酮,批号 T20090312,磷酸,批号 T20080530,试验所用试剂均为分析纯,购于国药集团化学试剂有限公司;伊文思蓝,购自国药集团化学试剂有限公司,批号 WC20080125;生理盐水,上海长征富民金山制药有限公司,批号 08120505。

1.4.1 氢氧化铝凝胶佐剂的配制 称取无水三氯化铝 1.7 g 缓慢加入 25 mL 蒸馏水中,不断搅拌使其溶解,在不断搅拌下缓慢滴加 10 mol·L⁻¹ 氢氧化钠,调节 pH 至 8 ~ 9,得终质量浓度 4% 的氢氧化铝凝胶^[2]。

1.4.2 1% 伊文思蓝染液的配制 取 1 g 伊文思蓝加生理盐水 100 mL 即得。

1.5 致敏、激发药液的配制

1.5.1 天花粉蛋白致敏液、激发液的配制 致敏液:取天花粉蛋白注射液(1.2 g·L⁻¹)与氢氧化铝凝胶按体积 1:1 混合均匀,即得 0.6 g·L⁻¹ 混合致敏液;激发液:取天花粉蛋白注射液(1.2 g·L⁻¹)与 1% 伊文思蓝染液按体积 1:1 混合均匀,即得含 0.5% 伊文思蓝的 0.6 g·L⁻¹ 激发液。

1.5.2 灯盏花素致敏液、激发液的配制 致敏液:取注射用灯盏花素加生理盐水配成 20 g·L⁻¹ 质量浓

度溶液后,与氢氧化铝凝胶佐剂按体积 1:1 混合均匀,即得 10 g·L⁻¹ 混合致敏液;激发液:取注射用灯盏花素加生理盐水配成 20 g·L⁻¹ 溶液后,与 1% 伊文思蓝染液按体积 1:1 混合均匀,即得含 0.5% 伊文思蓝的 10 g·L⁻¹ 激发液。

1.6 大鼠抗血清的制备 取 SD 大鼠 15 只,随机分为 3 组,即阴性对照组、天花粉组、灯盏花素组。每次致敏时阴性对照组 sc 生理盐水与氢氧化铝凝胶的 1:1 混合液;天花粉组 sc 0.6 g·L⁻¹ 天花粉蛋白混合致敏液,给药剂量为 1.5 mg·kg⁻¹ (相当于临床人用量的 38 倍);灯盏花素组 sc 10 g·L⁻¹ 灯盏花素混合致敏液,给药剂量为 25 mg·kg⁻¹ (相当于临床人用量的 30 倍),各组给药体积均为 2.5 mL·kg⁻¹。隔天 1 次,共注射 3 次,末次致敏后第 14 d,以 25% 乌拉坦 1 g·kg⁻¹ ip 麻醉,腹主动脉采血,3 000 r·min⁻¹,离心 10 min,分离血清,分装于 EP 管中,-20 °C 保存备用,用于大鼠同种 PCA 试验或大鼠-小鼠异种 PCA 试验。

另取 Wistar 和 F344 品系大鼠各 15 只,按上述 SD 大鼠抗血清制备法制备抗血清。

2 方法

2.1 大鼠同种 PCA 试验^[3] 取 SD 大鼠 18 只,雌雄各半,分为阴性对照组、天花粉组和灯盏花素组,以戊巴比妥钠 42 mg·kg⁻¹ 麻醉,背部剃毛,面积(3 × 4) cm²,分别于剃毛处皮内注射 1.6 项制备的同品系大鼠的对应抗血清 0.1 mL 进行被动致敏。48 h 后,大鼠分别尾 iv 注射生理盐水、天花粉蛋白或灯盏花素的 0.5% 伊文思蓝激发液 0.5 mL/只进行激发。30 min 后,ip 乌拉坦 2 g·kg⁻¹ 麻醉处死动物,将抗血清注射部位皮肤的蓝色斑块剪下,剪碎后加入丙酮-生理盐水(7:3)混合液 3 mL,浸泡,次日以丙酮-生理盐水(7:3)混合液调零,在 610 nm 波长处测定其吸光度(A)。

另取 Wistar 和 F344 品系大鼠各 18 只,分别采用皮内注射同品系大鼠的对应抗血清,药物激发后将抗血清注射部位皮肤的蓝色斑块剪下处理,测定皮肤蓝斑 A。

2.2 大鼠-小鼠异种 PCA 试验^[4-5] 取昆明种小鼠 30 只,随机分 3 组,即阴性对照组、天花粉组和灯盏花素组,10 只/组,雌雄各半。ip 戊巴比妥钠 75 mg·kg⁻¹ 进行麻醉,分别于两耳廓皮内注射 SD 大鼠抗血清 20 μL,进行被动致敏,48 h 后各小鼠分别尾 iv 注

射生理盐水、天花粉蛋白或灯盏花素的 0.5% 伊文思蓝激发液 0.3 mL/只进行激发,30 min 后,脱颈处死小鼠,剪下双耳,浸泡于 0.75 mL 的 1 mol·L⁻¹ 氢氧化钾溶液中,37 °C 水浴恒温过夜消化,次日加 0.6 mol·L⁻¹ 磷酸丙酮(5:13)混合液 3.5 mL,振荡,3 500 r·min⁻¹,离心 15 min,上清液在 610 nm 波长处测定 A。

另取 60 只小鼠分别采用小鼠两耳廓皮内注射 Wistar 或 F344 大鼠抗血清,药物激发后剪下小鼠双耳处理,测定小鼠耳廓蓝染 A。

2.3 计算及统计方法 按下式计算 A 变化率:

$$A \text{ 变化率} = \frac{\text{给药组 } A - \text{阴性对照组 } A}{\text{阴性对照组 } A} \times 100\%$$

计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间比较采用 t 检验法,多组间比较采用单因素方差分析法。P < 0.05 为差异有显著性意义。

3 结果

3.1 大鼠同种 PCA 试验 结果显示对于阳性对照天花粉蛋白,3 种品系的大鼠皮肤注射部位均出现明显蓝斑,A 显著升高(P < 0.01);对于灯盏花素,F344 大鼠皮肤注射部位出现蓝斑,A 明显升高(P < 0.05);而 SD,Wistar 大鼠均未出现蓝斑。见表 1。

表 2 灯盏花素 3 种品系大鼠抗血清致小鼠异种 PCA 试验 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

动物品系	组别	剂量 /mg·kg ⁻¹	A	A 变化率/%
SD 大鼠-小鼠	阴性抗血清	-	0.08 ± 0.02	-
	天花粉抗血清	1.5	0.18 ± 0.06 ²⁾	114.76 ± 70.00
	灯盏花素抗血清	25	0.10 ± 0.03	23.74 ± 41.79
Wistar 大鼠-小鼠	阴性抗血清	-	0.09 ± 0.00	-
	天花粉抗血清	1.5	0.13 ± 0.01 ²⁾	45.60 ± 13.47
	灯盏花素抗血清	25	0.10 ± 0.03	13.52 ± 33.60
F344 大鼠-小鼠	阴性抗血清	-	0.08 ± 0.03	-
	天花粉抗血清	1.5	0.13 ± 0.03 ²⁾	59.40 ± 11.83
	灯盏花素抗血清	25	0.10 ± 0.01 ¹⁾	30.53 ± 17.02

4 讨论

药物诱导过敏反应的研究中,来自于动物品系的因素常常能够影响实验结果。研究表明,不同品系的动物有可能对相同药物的易感性不同^[6-7],被动皮肤过敏反应(PCA)试验是注射剂研发技术中要求进行的基本试验项目之一,而天花粉蛋白常常作为(PCA)试验的阳性药使用^[8-10]。在我们的前期研究中也发现,SD,Wistar,F344 3 种品系大鼠对阳性药天花粉蛋白的敏感性具有明显的差异^[10]。因此我

表 1 灯盏花素致 3 种品系大鼠同种 PCA 试验 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

大鼠品系	组别	剂量 /mg·kg ⁻¹	A	A 变化率 /%
SD	阴性对照	-	0.083 ± 0.0033	-
	天花粉	1.5	0.27 ± 0.085 ²⁾	232.12 ± 102.93
	灯盏花素	25	0.064 ± 0.0072	-22.91 ± 8.76
Wistar	阴性对照	-	0.081 ± 0.0036	-
	天花粉	1.5	0.14 ± 0.030 ²⁾	67.77 ± 37.24
	灯盏花素	25	0.055 ± 0.0062	-32.31 ± 7.69
F344	阴性对照	-	0.056 ± 0.0075	-
	天花粉	1.5	0.12 ± 0.040 ²⁾	139.29 ± 61.11
	灯盏花素	25	0.064 ± 0.0057 ¹⁾	21.34 ± 10.93

注:与相应品系阴性对照组相比¹⁾P < 0.05,²⁾P < 0.01(表 2 同)。

3.2 大鼠-小鼠异种 PCA 试验 结果显示:注射 3 种品系大鼠的天花粉蛋白组抗血清后,小鼠耳廓注射部位均呈明显蓝染现象,A 显著升高(P < 0.01);注射 3 种品系大鼠的灯盏花素抗血清后,F344 大鼠-小鼠组,小鼠耳廓呈明显蓝染,A 明显升高(P < 0.05);SD,Wistar 大鼠-小鼠组,小鼠耳廓无明显蓝染,A 值仅有升高趋势,而无统计学意义。见表 2。

们设想由于中药注射剂内的成分不同,不同品系的动物对中药注射剂的敏感性是否也可能有所不同,这或许能够部分解释中药注射剂临床前过敏反应评价高阴性率而进入临床后却引起较多过敏反应的原因。为此,本研究选择注射用灯盏花素作为研究对象,选用 SD,Wistar,F344 3 种品系大鼠进行了 PCA 试验,旨在研究动物品系差异在中药注射剂潜在过敏反应预测中的表现。结果显示,不同品系的大鼠在灯盏花素诱导的被动皮肤过敏反应中确实存在敏

感性差异,其中以 F344 大鼠较为敏感。F344 大鼠是毒理学研究中常用的近交系大鼠品系,从遗传背景来看,具有 Th2 极化型遗传背景的动物是最理想的药物致敏性研究的模型动物^[11-12],F344 大鼠无明显的 Th1 或 Th2 极化现象,但 Jia 等的研究指出,与 LEW 大鼠(Th1 极化型大鼠)相比,F344 大鼠具有更强的气道高反应性,因此,在典型的 Th2 细胞介导的过敏性哮喘研究中,F344 是较好的模型动物^[13],Skripuletz 等的研究也证实了这一观点^[14]。从化学结构上来看,灯盏花素是以灯盏乙素(含量 > 90%)为主的黄酮类成分,作为小分子物质,其本身并不具备抗原性,可能进入机体后与某种蛋白结合增强了抗原性,而 3 种品系大鼠对灯盏花素敏感性差异的产生可能与其进入不同品系动物体内后的代谢过程不同有关,也可能是某些动物品系对一些特定的化学成分较为敏感,具体机制值得进一步深入研究。国内在 PCA 试验研究中,最常用的是 SD 或 Wistar 大鼠,在本试验中这 2 种品系的大鼠对灯盏花素的被动皮肤过敏反应并不明显。

另外,本研究还从试验方法学的角度,考察了大鼠同种 PCA 试验、以及大鼠-小鼠异种 PCA 试验在对灯盏花素潜在过敏反应预测方面的灵敏性差异。结果显示,大鼠-小鼠异种 PCA 试验结果与大鼠同种 PCA 试验结果基本吻合。从 A 变化率来看,大鼠-小鼠异种 PCA 试验的 A 变化率均较大鼠同种 PCA 试验要大,提示大鼠-小鼠异种 PCA 试验灵敏性略高于大鼠同种 PCA 试验,这一结果对于预测其他药物的致敏性是否亦是如此,还值得进一步研究。

综上所述,对于中药注射剂这样含有多种成分的复杂体系进行致敏性安全评价时,选择不同品系的动物或至少 2 种以上方法进行考查,将会大大提高检测方法的灵敏度及结果的可靠性。

[参考文献]

[1] 谢冬梅,马玲.灯盏花素注射液的不良反应文献分析[J].中国实用医药,2009,4(15):65.
[2] 徐小洁.针对 IgE 介导性疾病治疗性疫苗的研究[D].第四军医大学学位论文,2007:53.

[3] 国家食品药品监督管理局.药物研究技术指导原则[S].北京:中国医药科技出版社,2006:252.
[4] Kim S Y, Kim S H, Shin H Y, et al. Effects of *Prunella vulgaris* on mast cell-mediated allergic reaction and inflammatory cytokine production [J]. *Exp Biol Med (Maywood)*, 2007, 232(7):921.
[5] 谢强敏,卞如濂.小鼠耳异种 PCA 及其药理特性[J].浙江医科大学学报,1987,16(2):60.
[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 Physiology Neurobiology*, 2009, 165(2/3):202.
[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.
[8] 陈震霖,张景明.肺气虚对 SD 大鼠被动皮肤过敏反应的影响[J].陕西中医学院学报,2006,29(6):47.
[9] 徐涛,于庆海.北豆根总碱的抗变态反应作用[J].中药药理与临床,1996(4):27.
[10] 李秀芳,金若敏,符胜光,等.不同品系大鼠对天花蛋白诱导被动皮肤过敏差异性比较研究[J].中药新药与临床药理,2010,21(4):52.
[11] Akiyama H, Teshima R, Sakushima J I, et al. Examination of oral sensitization with ovalbumin in Brown Norway rats and three strains of mice [J]. *Immunology Lett*, 2001, 78(1):1.
[12] Sakamoto S, Fukushima A, Ozaki A, et al. Mechanism for maintenance of dominant T helper 1 immune responses in lewis rats[J]. *Microbiol Immunol*, 2001, 45(5):373.
[13] Jia Y, Xu L, Heisler S, et al. Airways of a hyperresponsive rat strain show decreased relaxant responses to sodium nitroprusside [J]. *Am J Physiol*, 1995, 269(1 Pt 1):L85.
[14] Skripuletz T, Schmiedl A, Schade J, et al. Dose-dependent recruitment of CD25⁺ and CD26⁺ T cells in a novel F344 rat model of asthma [J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2007, 292(6):L1564.

[责任编辑 聂淑琴]