

大鼠被动皮肤过敏试验影响因素的研究

王金华^{*}, 王瑞峰, 高志远
(北京振东光明药物研究院, 北京 100120)

[摘要] 目的: 探讨大鼠皮肤被动过敏试验(PCA)的影响因素, 为选择敏感试验条件和提高试验预测的准确性提供依据。方法: 采用卵白蛋白和牛血清白蛋白为 PCA 试验的抗原, 在不同条件下(加与不加佐剂、致敏的途径、大鼠的品系、制备抗血清的最佳取血时间、卵白蛋白与牛血清白蛋白在免疫原性上的差异等)进行 PCA 试验。结果: 加用佐剂能够显著增强 SD 和 Wistar 大鼠机体对免疫应答的敏感性。ip 致敏和背部皮下致敏均可获得良好的 PCA 反应, 但 ip 致敏加用佐剂后会诱发大鼠腹腔慢性炎症。SD 大鼠与 Wistar 大鼠在抗原免疫应答的敏感性方面基本相似, 但在同一试验中采用不同品系的大鼠进行 PCA 试验优于用单一品系的大鼠。大鼠在致敏后 16 d 抗体中 IgE 含量高于致敏后 14 d。卵白蛋白在 PCA 试验中的免疫原性优于牛血清白蛋白。

[关键词] 被动皮肤过敏试验; 弗氏完全佐剂; 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(2010)18-0160-03

Study on Experimental Factors of Passive Cutaneous Anaphylaxis in Rats

WANG Jin-hua^{*}, WANG Rui-feng, GAO Zhi-yuan
(Beijing Pharmaceutical Research Institute of Zhendong Guangming, Beijing 100120, China)

[Abstract] Objective: To investigate the factors of passive cutaneous anaphylaxis(PCA) in rats to select experimental conditions and improve the accuracy of forecasts for experiments. **Method:** Egg albumin and bovine serum albumin were selected as test antigens for the PCA. PCA experiments were carried out in different experimental conditions (with or without kasa agents, allergens means, rat strains, the optimal time for preparing antiserum of blood withdrawn, the difference in immunogenicity of egg albumin and bovine serum albumin, etc.). **Result:** Adjuvant could significantly enhance the sensitivity of immune response. in SD and Wistar tast. Intraperitoneally and subcutaneously injection sensitization both could get good response of PCA, but intraperitoneally injection with adjuvant could induce chronic inflammation of abdominal cavity. Sensitivity of immune response to antigen was similar in SD and Wistar rats. However, to use different strains of rats with PCA were better than to use single stain of experimental rats. Content of IgE in serum after 16 days sensitization was higher than that in 14 days sensitization. Egg albumin was superior to bovine serum albumin in immunogenicity of PCA test.

[Key words] passive cutaneous anaphylaxis (PCA); Freund's complete adjuvant; SD rat; Wistar rat

被动皮肤过敏试验 (passive cutaneous

anaphylaxis, PCA), 是一种敏感度较高、特异性较强的用于测定特异性抗体滴度的方法, 1952 年由 Overy 首创^[1]。目前已将 PCA 试验广泛的用于许多免疫学和变态反应的研究中, 用于评价药物的免疫原性和抗型变态反应药物的作用, 尤其是近年来用于评价注射剂的过敏性。在用此试验来考察药物的免疫原性时, 笔者发现影响本试验结果的因素较

[收稿日期] 2010-06-09

[基金项目] 国家“重大新药创制”科技重大专项
(2008ZX09202-009)

[通讯作者] * 王金华, 副研究员, 研究方向: 中药药理, Tel:
010-82012641, E-mail: wangjinhua1103@sina.com.

多, 极易造成试验结果的不稳定。但究竟哪些因素是影响本试验的关键所在? 针对这些问题, 笔者对 PCA 试验中影响的如下因素进行了实验研究。

1 材料与方

1.1 试剂 卵白蛋白(OVA)、牛血清白蛋白(BSA)、弗氏完全佐剂均为 Sigma 公司产品, 由科海军舟试剂公司提供; 伊文思蓝, Fluka 进口分装。

1.2 动物 SD 大鼠, 雄性, 体重(200 ± 10) g; Wistar 大鼠, 雄性, (275 ± 25) g。北京维通利华实验动物技术有限公司, 合格证号 SCXK(京) 2008-0006。

1.3 方法 常规 PCA 试验方法参照文献^[2-3]: 取 SD, Wistar 大鼠, 每组 4 只, 根据致敏蛋白种类、致敏途径、加用佐剂与否等不同实验条件, 采用 OVA 和 BSA[抗原的致敏剂量设定依据《中药、天然药物免疫毒性(过敏性、光过敏反应)研究的技术指导原则》]生理盐水溶液单用以及 OVA, BSA 加用弗氏完全佐剂分别致敏 SD, Wistar 大鼠。佐剂致敏的体积为 0.5 mL·只⁻¹, 与等量的 OVA, BSA 生理盐水溶液在无菌条件下分别制成均匀的水包油乳剂, 致敏途径分为 ip 和背部多点 sc, 致敏总体积均为 1 mL/只, 隔日 1 次, 共 3 次。分别于首次致敏后 14 d, 16 d 眶后静脉取血, 取血后 20 min 内 2 000 r·min⁻¹ 离心分离血清。

另取相等数量的 SD, Wistar 大鼠, 每组 4 只, 被动致敏的前 1 d 背部脱毛 3 cm × 4 cm, 同时配制各组抗血清的生理盐水稀释液(原血清, 1 2, 1 4, 1 8), 将各不同浓度的稀释血清于脱毛区内、脊柱两侧进行 sc 被动致敏大鼠, 0.1 mL/点, 48 h 后分别 iv 各自的致敏抗原加等量的 5% 依文氏蓝生理盐水混合液 1 mL/只激发, 30 min 后, 处死大鼠, 剪取背部皮肤, 测定蓝斑直径, 直径在 5 mm 以上者判定为阳性, 比较各组阳性反应率。

2 结果

2.1 加用佐剂与否对大鼠 PCA 的影响 结果表明, OVA 和 BSA 在不加佐剂的条件下致敏大鼠进行 PCA 试验, 结果全部为阴性。但在加用弗氏完全佐剂的情况下, 结果全部为阳性(表 1 ~2)。

2.2 不同抗原对大鼠 PCA 的影响 用 OVA, BSA 分别加用佐剂, 采用 ip 和背部 sc 两种途径致敏大鼠。结果表明, OVA 和 BSA 组 ip 和背部多点 sc 致敏, 均可得到阳性结果, 但 OVA 组的蓝斑面积比

表 1 不加佐剂抗原对大鼠 PCA 试验的影响(n = 4)

| 抗原种类 | 主动致敏大鼠品种 | 致敏途径 | 被动致敏大鼠品系 | 阳性反应动物数/n | 蓝斑面积/mm ² | | |
|------|----------|------|----------|-----------|----------------------|-----|-----|
| | | | | | 抗血清原液 | 1 2 | 1 4 |
| OVA | SD | ip | Wistar | 0 | 0 | 0 | 0 |
| BSA | SD | ip | Wistar | 0 | 0 | 0 | 0 |
| OVA | SD | sc | Wistar | 0 | 0 | 0 | 0 |
| BSA | SD | sc | Wistar | 0 | 0 | 0 | 0 |

表 2 加用佐剂后抗原对大鼠 PCA 实验的影响(均 ± s, n = 4)

| 抗原种类 | 致敏途径 | 阳性反应动物数/n | 蓝斑面积/mm ² | | | |
|--------|------|-----------|----------------------|----------------|----------------|----------------|
| | | | 抗血清原液 | 1 2 | 1 4 | 1 8 |
| OVA+佐剂 | ip | 4 | 288.5 ± 30.40 | 181.50 ± 25.19 | 172.50 ± 27.30 | 101.25 ± 32.10 |
| OVA+佐剂 | sc | 4 | 236.00 ± 27.80 | 172.50 ± 33.60 | 159.50 ± 33.70 | 109.50 ± 38.23 |
| BSA+佐剂 | ip | 4 | 111.25 ± 28.64 | 85.00 ± 22.20 | 58.00 ± 25.65 | 29.75 ± 12.01 |
| BSA+佐剂 | sc | 4 | 108.25 ± 37.07 | 95.00 ± 15.20 | 54.00 ± 14.27 | 31.53 ± 15.01 |

BSA 组相对要大, 表明 OVA 对大鼠的免疫原性优于 BSA(表 3)。

表 3 不同抗原对大鼠 PCA 的影响(均 ± s, n = 4)

| 抗原种类 | 致敏途径 | 阳性反应鼠数/n | 蓝斑面积/mm ² | | | |
|---------|------|----------|----------------------|----------------|---------------|--------------|
| | | | 抗血清原液 | 1 2 | 1 4 | 1 8 |
| OVA白+佐剂 | sc | 4 | 236.00 ± 27.80 | 128.5 ± 19.00 | 71.75 ± 17.20 | 35.00 ± 7.00 |
| BSA+佐剂 | sc | 4 | 198.25 ± 28.89 | 105.50 ± 13.60 | 53.5 ± 6.31 | 25.00 ± 9.50 |

2.3 不同致敏途径对大鼠 PCA 的影响 采用 OVA 一种抗原, 选择 sc, ip 不同致敏途径, 结果可见两种途径致敏大鼠的 PCA 结果基本相同, 表明两种途径致敏均可获得良好的致敏效果, 但 ip 致敏组的大鼠由于佐剂的慢性刺激, 大鼠腹腔内肠黏膜出现明显的炎性粘连, 个别的大鼠睾丸也出现不同程度的红肿, 体重也有所下降, 故建议尽量不采用 ip 致敏途径(表 4)。

表 4 不同致敏途径对大鼠 PCA 的影响(均 ± s, n = 4)

| 抗原种类 | 致敏途径 | 阳性反应鼠数/n | 蓝斑面积/mm ² | | | |
|-------|------|----------|----------------------|----------------|---------------|---------------|
| | | | 抗血清原液 | 1 2 | 1 4 | 1 8 |
| OA+佐剂 | sc | 4 | 228.00 ± 38.40 | 133.01 ± 29.90 | 79.50 ± 23.70 | 35.00 ± 5.00 |
| OA+佐剂 | ip | 4 | 221.25 ± 48.64 | 133.00 ± 25.20 | 69.75 ± 22.01 | 38.50 ± 16.00 |

2.4 致敏后不同时间制备抗血清对大鼠 PCA 的影响 OVA 加用弗氏完全佐剂, sc 进行主动致敏, 抗血清制备时间分别为致敏后 14 d 和 16 d 取血。结果表明, OVA 致敏后 16 d 的抗血清的效价在一定程度上高于致敏后 14 d(表 5)。

表 5 致敏后不同时间的抗血清对 PCA 的影响
(背部 sc 致敏, $\bar{x} \pm s, n = 4$)

| 抗原种类 | 致敏途径 | 致敏天数 | 蓝斑面积/mm ² | | | |
|--------|------|------|----------------------|----------------|----------------|---------------|
| | | | 抗血清原液 | 1 2 | 1 4 | 1 8 |
| OVA+佐剂 | sc | 14 | 169.75 ± 37.2 | 189.5 ± 29.0 | 96.75 ± 17.2 | 35.0 ± 7.0 |
| | | 16 | 218.25 ± 28.89 | 217.25 ± 18.89 | 118.25 ± 18.89 | 48.25 ± 18.89 |

2.5 大鼠品系对 PCA 的影响 以 SD 大鼠作为抗

表 6 大鼠的品系对 PCA 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

| 抗原种类 | 主动致敏大鼠品系 | 致敏途径 | 被动致敏大鼠品系 | 阳性反应鼠数/n | 蓝斑直径/mm | | | |
|----------|----------|------|----------|----------|----------------|---------------|---------------|---------------|
| | | | | | 抗血清原液 | 1 2 | 1 4 | 1 8 |
| OVA + 佐剂 | SD | sc | Wistar | 4 | 218.5 ± 11.29 | 156.5 ± 10.05 | 79.75 ± 17.2 | 39.75 ± 13.15 |
| OVA + 佐剂 | Wistar | sc | SD | 4 | 226.00 ± 18.90 | 143.0 ± 11.60 | 63.5 ± 16.31 | 31.65 ± 15.00 |
| OVA + 佐剂 | SD | sc | SD | 4 | 186.00 ± 28.50 | 125.0 ± 19.30 | 53.5 ± 16.51 | 25.60 ± 15.00 |
| OVA + 佐剂 | Wistar | sc | Wistar | 4 | 176.00 ± 18.40 | 120.0 ± 15.90 | 43.55 ± 16.31 | 22.70 ± 9.80 |

本实验中所选用的两种品系 (SD, Wistar) 大鼠均为常用的实验大鼠品种, 动物的免疫原性较强。

佐剂的主要作用是增加抗原的免疫原性, 佐剂与抗原混合能延长抗原在局部组织中的存留时间, 降低抗原的分解速度, 使抗原缓慢释放至淋巴系统, 持续刺激机体产生高滴度的抗体; 佐剂也可以直接或间接的激活免疫活性细胞并使之增生, 从而增强了抗原的免疫原性。因佐剂本身基本无毒性作用, 因此在进行动物的致敏时宜加用佐剂, 可获得良好的免疫效果。

抗原的摄入途径可诱导参与免疫应答的器官和细胞类型。一般来说, 通过 sc 或 ip 免疫, 均能获得良好的致敏效果, 因为表皮内有很多的朗罕细胞, 它们能够有效的摄取和呈递抗原。

综上所述, 影响 PCA 试验敏感性的因素主要包括是否加用佐剂、动物致敏的途径等, 提示我们在采用此项试验来评价 I 型变态反应时, 要考虑到影响试验的主要因素, 尽可能的优化试验条件, 以达到提

原的主动致敏鼠, 以 Wistar 大鼠作为被动致敏鼠, 或者反之, 蓝斑面积大致相等; 但同品系大鼠的蓝斑面积均低于异品系大鼠 (表 6)。

3 讨论

本实验的目的是研究在 PCA 试验中影响免疫应答的因素, 以便在预测受试物的免疫原性时, 能够采用更为敏感的试验条件。

高试验预测准确性的目的。在评价药物的 I 型变态反应时, 一般均采用主动全身过敏试验 (ASA) 和皮肤被动过敏试验 (PCA) 两种方法共同综合评价, 以提高试验预测的准确性。本实验只是研究探讨了影响 PCA 试验的敏感因素, 但并未对临床上出现不良反应的已知药物进行 I 型变态反应评价, 需要通过有针对性的评价研究, 才能使 I 型变态反应的评价的方法更加准确、更加稳定、更加可靠。

[参考文献]

- [1] 潘绍武, 陈世祺. 豚鼠被动皮肤过敏反应影响因素的研究 [J]. 中国实验临床免疫学杂志, 1991, 3(3) 8.
- [2] 徐叔云, 卞如谦, 陈修, 等. 药理实验方法学 [M]. 3 版. 北京: 人民卫生出版社, 2002: 1407.
- [3] 国家食品药品监督管理局. 中药、天然药物免疫毒性 (过敏性、光过敏反应) 研究的技术指导原则 [S]. 2005: 25.

[责任编辑 何伟]