

2 种品系大鼠被动皮肤过敏反应的差异性比较

李秀芳, 金若敏*, 符胜光, 姚广涛, 谭梦晖
(上海中医药大学药物安全性评价研究中心, 上海 201203)

[摘要] 目的: 比较 SD, Wistar 2 种品系大鼠对卵蛋白(OVA)、天花粉蛋白(TCS)诱导的被动皮肤过敏(passive cutaneous anaphylaxis, PCA)反应的差异性。方法: 选用 SD, Wistar 2 种品系大鼠, 以 OVA, TCS 为致敏原, PCA 反应时出现蓝斑的直径及阳性反应率作为判别标准, 进行大鼠同种或小鼠异种 PCA 试验, 并考查佐剂的应用与否对试验结果产生影响。结果: 大鼠同种 PCA 加或不加佐剂的 TCS 反应均为阳性, 蓝斑直径大小 SD 大鼠 > Wistar 大鼠; 加入氢氧化铝凝胶佐剂可提高两品系大鼠对 OVA 的过敏反应阳性率, 且 Wistar 大鼠的敏感性高于 SD 大鼠; 小鼠异种 PCA 试验显示: 耳廓皮内分别注射两种品系大鼠不加佐剂致敏的 OVA 抗血清时均呈阴性反应, 注射 SD 大鼠天花粉蛋白抗血清后, 呈阳性反应; 分别注射加入佐剂致敏的 OVA, TCS 抗血清, 则小鼠异种 PCA 反应均呈阳性。结论: 2 种品系大鼠对 OVA, TCS 的敏感性存在较大差异, SD 大鼠对 TCS 较敏感, 而 Wistar 大鼠对 OVA 的敏感性较强; 加入佐剂可提高两种品系大鼠对 OVA 的过敏反应阳性率。

[关键词] 大鼠; 品系; 卵蛋白; 天花粉蛋白; 被动皮肤过敏; 差异

[中图分类号] R285.5 [文献标识码] B [文章编号] 1005-9903(2010)10-0102-04

Difference of Passive Cutaneous Anaphylaxis between SD and Wistar Rats

LI Xiu-fang, JIN Ruo-min*, FU Sheng-guang, YAO Guang-tao, TAN Meng-hui
(Research Center for Drug Safety Evaluation of Shang Hai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China)

[Abstract] Objective: To compare the different sensitivity passive cutaneous anaphylaxis(PCA) caused by OVA and TCS between Sprague Dawley(SD) and Wistar rats. **Method:** PCA was performed by using SD and Wistar rats, and xenogenic PCA by using KM mice. OVA and TCS were taken as allergens. The diameter of dermal evan's blue spot and the positive reaction rate were measured to discriminate severity of PCA. **Result:** Homologous PCA revealed that after injecting with 0.9 mg/rat TCS with or without adjuvant, two rat strains showed positive reaction. According to the diameter evan's blue spots, the degree of response was as follows: SD rat > Wistar rat. The allergic positive reaction rate of two rat strains would be improved by adding aluminium hydroxide into OVA(5 mg/rat), and the sensitivity of OVA of Wistar rat was more than SD rat. Xenogeneic PCA showed that after auricular intradermally injecting with OVA antiserum without aluminium hydroxide of two different rat strains, the mice demonstrated negative reaction. But the positive reaction was showed by injecting with TCS antiserum without adjuvant of SD rat. The mice showed positive reaction after auricular intradermally injecting with OVA or TCS with adjuvant of two rat strains. **Conclusion:** There are differences in sensitivity of OVA and TCS between SD and Wistar rat strains, and SD rat is the more sensitive of TCS than Wistar rat. Otherwise, Wistar rat is more sensitive of OVA. The allergic positive reaction rate will be improved by adding aluminium hydroxide into OVA.

[收稿日期] 20100402(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] 李秀芳, 讲师, 博士, 从事中药药理与毒理研究, Tel: 021-51323053, 15921740121, E-mail: itislxf@163.com

[通讯作者] * 金若敏, Tel: 021-51322649, E-mail: rmj801@126.com

[Key words] rat; strain; ovalbumin; trichosanthin; passive cutaneous anaphylaxis; difference

PCA 试验是我国注射剂研发过程中免疫毒性研究要求进行的基本试验项目之一,在抗过敏药物研究中亦为常规实验。《药物研究技术指导原则(2005年)》^[1](以下简称“指导原则”)中指出,“PCA 反应常用的动物是大鼠,亦用小鼠,有时根据试验需要用豚鼠”。大量研究表明,不同品系的动物对特定药物的易感性有所不同^[2-3],而这种易感性差异产生的原因与动物的遗传背景密切相关,具有 Th2 极化遗传背景的动物对实验性过敏性疾病呈现易感体质。SD 和 Wistar 大鼠是国内常见而易得的试验用大鼠,大部分学者认为,从遗传学的角度来看,这 2 种封闭群动物并无明显的 Th2 偏向性,那么,在 PCA 试验中,这 2 种动物的反应是否存在差异? 本文对此进行了相关研究。

1 材料

1.1 药物 卵蛋白(ovalbumin, OVA): Sigma 公司产品,购于北京鼎国生物技术有限责任公司,批号 DHO15-4。天花粉蛋白注射液(TCS),上海金山制药有限公司,批号 080601。

1.2 试剂 无水 $Al(Cl)_3$, 批号 T20080829, NaOH, 批号 T20030408, KOH, 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。

1.3 动物 SD, Wistar 大鼠, 清洁级, 雌雄各半, 体重 160 ~180 g, 购于上海西普尔-必凯实验动物有限公司提供, 合格证号 Scxk(沪) 2008-0016; 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) 2007-2005。所有动物均饲养于上海中医药大学实验动物中心, 清洁级环境。

1.4 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。

2 方法

2.1 大鼠抗血清的制备

2.1.1 无佐剂大鼠抗血清制备 取 SD, Wistar 2 种品系大鼠各 15 只, 每品系均随机分 3 组, 即 OVA 无佐剂组、TCS 无佐剂组、阴性无佐剂组, 每组 5 只。致敏: OVA 组给予生理盐水配制的 $10 g \cdot L^{-1}$ 质量

浓度 OVA 溶液; TCS 组给予 $0.6 g \cdot L^{-1}$ 生理盐水稀释的 TCS 溶液; 阴性对照组给予生理盐水, 给药方式均为 sc $0.5 mL/只$, 隔天 1 次, 共注射 3 次, 末次致敏后第 14 天, 以 25% 乌拉坦 $1 g \cdot kg^{-1}$ ip 麻醉, 腹主动脉采血, $3\ 000 r \cdot min^{-1}$, 离心 10 min, 分离血清, 分装于 EP 管中, $-20^\circ C$ 保存备用, 用于大鼠同种 PCA 试验或小鼠异种 PCA 试验。

2.1.2 加佐剂大鼠抗血清制备 取 SD, Wistar 2 种品系大鼠各 15 只, 每品系均随机分 3 组, 即 OVA 佐剂组、TCS 佐剂组、阴性佐剂组, 每组 5 只。致敏: OVA 组给予 $20 g \cdot L^{-1}$ 的 OVA 溶液与氢氧化铝凝胶的 1:1 混合乳液(终浓度 $10 g \cdot L^{-1}$); TCS 组给予 $1.2 g \cdot L^{-1}$ TCS 与氢氧化铝凝胶的 1:1 混合乳液(终浓度 $0.6 g \cdot L^{-1}$), 阴性对照组给予生理盐水与氢氧化铝凝胶的 1:1 混合乳液。给药及血清制备同 2.1.1。

2.2 大鼠同种 PCA 试验 另取 SD, Wistar 2 种品系大鼠, 雌雄各半, 分为 OVA 无佐剂组、OVA 佐剂组、TCS 无佐剂组、TCS 佐剂组、阴性无佐剂组、阴性佐剂组, 6 ~10 只/组。戊巴比妥钠 $42 mg \cdot kg^{-1}$ 麻醉, 背部剃毛, 面积 $3 cm \times 4 cm$, 分别于剃毛处皮内注射同品系大鼠各对应组的抗血清 $0.1 mL$, 进行被动致敏, 48 h 后, 两组大鼠分别尾 iv 生理盐水或 TCS 的 0.5% 伊文思蓝混合溶液, $0.5 mL/只$, 进行激发, 30 min 后, 以 25% 乌拉坦 $1 g \cdot kg^{-1}$ ip 麻醉动物, 直尺测量抗血清注射部位皮肤的蓝色斑点直径, 直径大于 5 mm 者判为阳性。

2.3 小鼠异种 PCA^[3] 试验 每一品系大鼠抗血清的注射均按如下操作: 取昆明种小鼠 60 只, 随机分 6 组, 即 OVA 佐剂抗血清组、OVA 无佐剂抗血清组、TCS 佐剂抗血清组、TCS 无佐剂抗血清组、阴性佐剂抗血清组、阴性无佐剂抗血清组。每组 10 只, 雌雄各半, 戊巴比妥钠 $75 mg \cdot kg^{-1}$ 麻醉, 各组动物 2 只耳廓分别皮内注射某一品系大鼠相应组别抗血清 $20 \mu L$, 进行被动致敏, 48 h 后, 各组小鼠分别尾 iv 生理盐水或 OVA 或 TCS 的 0.5% 伊文思蓝混合溶液, $0.3 mL/只$, 进行激发, 30 min 后, 脱颈处死小鼠, 剪下双耳, 浸泡于 $0.75 mL$ 的 $0.5 mol \cdot L^{-1}$ KOH 溶液中, $37^\circ C$ 水浴恒温过夜消化, 次日加 $0.3 mol \cdot L^{-1}$ 磷酸丙酮(5:13)混合液 $3.5 mL$, 振摇, $3\ 500 r \cdot min^{-1}$

min^{-1} , 离心 15 min, 上清液在 610 nm 波长处测定其吸光度(A)。

2.4 统计学方法 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, $P < 0.01$ 为差异有非常显著性意义。

3 结果

3.1 无佐剂大鼠同种 PCA 试验 不加佐剂时, SD, Wistar 大鼠对 OVA 均为阴性反应; 对 TCS, 2 种品系动物均呈阳性反应, 且 SD 大鼠较 Wistar 大鼠敏感。见表 1。

表 1 2 种品系大鼠蓝斑直径及阳性反应率比较
(无佐剂, $\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	SD		Wistar	
	直径/mm	阳性反应数	直径/mm	阳性反应数
阴性	0.0 ± 0.0	0	0.0 ± 0.0	0
OVA	0.0 ± 0.0	0	3.8 ± 6.3	2
TCS	33.2 ± 12.0 ^{2,4)}	6 ^{2,4)}	10.3 ± 5.3 ^{2,3,5)}	4 ¹⁾

注: 与阴性无佐剂组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$; OVA 组与 TCS 组比较³⁾ $P < 0.05$, ⁴⁾ $P < 0.01$; SD 与 Wistar 大鼠比较⁵⁾ $P < 0.05$, ⁶⁾ $P < 0.01$ 。(表 2 ~ 4 同)

3.2 加佐剂大鼠同种 PCA 试验 加入 $\text{Al}(\text{OH})_3$ 佐剂后, 可显著提高 2 种品系动物对 OVA 和 TCS 的过敏反应阳性率, SD 大鼠对 TCS 的敏感性高于 Wistar 大鼠, 而 Wistar 大鼠对 OVA 的敏感性则高于 SD 大鼠。见表 2。

表 2 2 种品系大鼠蓝斑直径及阳性反应率比较
(有佐剂, $\bar{x} \pm s$)

组别	SD		Wistar	
	直径/mm	n/N	直径/mm	n/N
阴性	0.0 ± 0.0	0/6	0.0 ± 0.0	0/6
OVA	5.7 ± 4.8 ¹⁾	6/10 ¹⁾	17.9 ± 3.8 ^{2,6)}	10/10 ²⁾
TCS	14.3 ± 2.4 ^{2,4)}	6/6 ²⁾	6.3 ± 3.5 ^{1,4,5)}	3/6 ⁵⁾

注: n 表示阳性反应动物数, N 表示动物总数

3.3 无佐剂大鼠抗血清致小鼠异种 PCA 试验 KM 种小鼠耳廓注射 SD 大鼠的不加佐剂 TCS 抗血清后激发, 过敏反应呈阳性, 而注射 Wistar 大鼠抗血清则呈阴性反应, 注射两种品系大鼠的 OVA 抗血清激发后, 过敏反应均呈阴性。见表 3。

3.4 加佐剂大鼠抗血清致小鼠异种 PCA 试验 加入佐剂后, 2 种品系大鼠的 OVA 抗血清和 TCS 抗血

清均可引起 KM 种小鼠异种 PCA 反应阳性。见表 4。

表 3 无佐剂大鼠抗血清致小鼠异种 PCA 耳廓
蓝染 A ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	SD 大鼠抗血清	Wistar 大鼠抗血清
阴性	0.062 ± 0.018	0.073 ± 0.016
OVA	0.068 ± 0.012	0.063 ± 0.008
TCS	0.130 ± 0.036 ²⁾	0.071 ± 0.010 ⁴⁾

表 4 加佐剂大鼠抗血清致小鼠异种 PCA 耳廓
蓝染 A ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	SD 大鼠抗血清	Wistar 大鼠抗血清
阴性	0.083 ± 0.008	0.091 ± 0.003
OVA	0.330 ± 0.150 ²⁾	0.330 ± 0.170 ²⁾
TCS	0.130 ± 0.030 ²⁾	0.130 ± 0.012 ²⁾

4 讨论

关于 PCA 试验中阳性对照药的选择, 指导原则中建议“给予 1 ~ 5 mg/只牛血清白蛋白或卵蛋白或已知致敏阳性物质”, 在中文科技期刊数据库中对 1979 年至 2009 年的相关文献的检索中发现, 国内的研究阳性药物大约有 64.7% 选择了卵蛋白^[4-5], 30.6% 选择了天花粉蛋白^[6-7], 4.7% 选择了牛血清白蛋白^[8]。而对于动物品系的选择, 采用 SD, Wistar 大鼠进行相关研究较多, 检索共得到 112 篇相关论著性文献, 有明确报道实验所使用大鼠品系的文章有 85 篇, 其中使用 SD 大鼠的有 45 篇^[9-10], 占文章总数的 52.9%, 使用 Wistar 大鼠的有 39 篇^[11-12], 占文章总数的 45.9%。本研究显示, SD 大鼠和 Wistar 大鼠对于 OVA 和 TCS 的敏感性存在差异, 且加或不加佐剂对 PCA 试验的结果将产生较大的影响, 对于 TCS, 加或不加 $\text{Al}(\text{OH})_3$ 佐剂均可引起两品系动物 PCA 反应阳性, 且 SD 大鼠的敏感性明显高于 Wistar 大鼠, 而对于 OVA, 加入佐剂后可大大提高两品系大鼠的过敏反应阳性率, Wistar 大鼠对 OVA 的敏感性高于 SD 大鼠。

有研究认为^[13], 小鼠异种耳廓 PCA 试验具有较高的敏感性和重现性, 因此本试验还以 2 种品系大鼠的抗血清致敏昆明种小鼠, 以验证其与大鼠同种 PCA 试验的一致性, 结果显示, 2 种试验方法在反映不同品系动物的敏感性时尚存在一定的差异。

综上所述, 在进行 PCA 试验时, 选择 2 种以上品系的动物或两种方法进行考查, 可能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] 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.

[2] 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.

[3] Gillespie K M, Saudi 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.

[4] 高丽, 王鹿, 田树革. “鼻炎清胶囊”对变应性鼻炎大鼠药效实验观察[J]. *新疆医科大学学报*, 2002, 25(3): 249.

[5] 胡东良. 刺芍冲剂抗变态反应作用的实验研究[J]. *湖南中医杂志*, 2008, 24(5): 95.

[6] 张少卿, 张君. 柴草汤治疗过敏性紫癜疗效机制的实验研究[J]. *中医儿科杂志*, 2008(3): 7.

[7] 余彦, 杜俊蓉, 况国成, 等. 辛芩片剂治疗过敏性鼻炎

的主要药效学研究[J]. *中成药*, 2004, 26(5): 401.

[8] 梁新丽, 廖正根, 高秀蛟, 等. 注射用盐酸槐定碱对血管刺激性、溶血、过敏性试验研究[J]. *时珍国医国药*, 2007, 18(8): 1890.

[9] 周福松, 王帅, 关素珍, 等. 中药复方肤灵浸膏对 PCA 大鼠血 TXB₂, 6-keto-PGF1a 的影响[J]. *浙江中西医结合杂志*, 2009, 19(3): 150.

[10] 李旭波, 李娜, 侯颖, 等. 玉屏风散加味治疗慢性荨麻疹的作用及机制[J]. *第四军医大学学报*, 2009, 30(5): 462.

[11] 李欣, 苏云明, 李俊清, 等. 敏康胶囊对过敏大鼠骨髓肥大细胞脱颗粒及皮肤蓝斑的影响[J]. *齐齐哈尔医学院学报*, 2005, 26(3): 257.

[12] 刘昌孝, 王瑞芝, 刘宁, 等. 诺司咪唑抗过敏作用的实验研究[J]. *中国临床药理学与治疗学*, 2004, 9(1): 56.

[13] 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.

[责任编辑 邹晓翠]

(上接第 101 页)

本实验结果显示, HK-2 细胞以 3×10^4 个/mL 密度接种后, 在 1 ~3 d 细胞生长处在潜伏期, 3 ~6 d 细胞进入大量分裂的指数生长期, 第 6 d 达到饱和密度(100%) 后, 细胞生长则进入衰退期。因为一般在指数生长期的 1/3 ~1/2 处加药, 所以, 如果按照本实验方法, 应该在 4 ~5 d 对细胞进行药物处理, 本研究在后续的实验中将选择培养 4 d(细胞密度为 60%) 加药。由于细胞计数存在一定的误差, 所以 1 d 处的细胞计数 (2.20×10^4 个/mL) 比细胞接种密度 (3×10^4 个/mL) 略低, 但实验自始至终由一人完成, 并且计数多次取平均值, 在一定程度上降低了误差, 具有一定的科学性, 可为后续研究以及他人类似研究作为参考。

[参考文献]

[1] 杨丽霞, 任彬, 李彘, 等. 姜黄素对 TGF- β_1 诱导人肾小

管上皮细胞增殖的影响[J]. *北京中医药大学学报*, 2008, 31(10): 682.

[2] 杨丽霞, 李彘, 王谦, 等. 姜黄素对 TGF- β_1 诱导人肾小管上皮细胞转分化及分泌细胞外基质成分的影响[J]. *中国中西医结合肾病杂志*, 2008, 9(12): 1040.

[3] 林敏魁, 闫福华, 赵欣, 等. 狗牙周膜成纤维细胞的体外培养及其生物学活性[J]. *中国临床康复*, 2004, 8(8): 1456.

[4] ZUO Shi, TANG Cong, XU Li-ning, et al. Effects of recombinant DNMT1 eukaryotic expression plasmids on mRNA expression level of DNMT1 gene and growth curve of cells in human cholangiocarcinoma cell line[J]. *Chin J Hepatobiliary Surg*, 2006, 12(3): 191.

[5] WU Nan, CUI Heng, WEN Kai-hui, et al. The XTT colorimetric assay measuring the cell growth curve[J]. *Med J Nat Def Force North China*, 2007, 19(4): 7.

[责任编辑 邹晓翠]