

聚山梨酯 80 刺激肥大细胞 RBL-2H3 脱颗粒作用的评价

李 佳¹, 金 晶¹, 关翠雯¹, 李 萍¹, 涂家生², 孙会敏³, 黄芝瑛^{1*}

1 中山大学药学院, 广东 广州 510006;

2 中国药科大学药剂学教研室, 江苏 南京 210009;

3 中国药品生物制品检定所, 北京 100050

摘 要 **目的:** 研究不同类别及厂家的聚山梨酯 80 直接刺激肥大细胞 RBL-2H3 脱颗粒的作用, 为建立完善的注射用辅料引发类过敏反应的筛选评价体系提供依据。**方法:** 以不同剂量的聚山梨酯 80 处理 RBL-2H3 细胞, 测定 β -氨基己糖苷酶释放量, 并通过 MTT 法进一步研究有脱颗粒作用的受试物对 RBL-2H3 细胞的毒性作用。**结果:** 8 种聚山梨酯 80 样品具有不同程度的直接刺激 RBL-2H3 细胞脱颗粒的作用, 且呈浓度依赖性, 其中上海试剂采购供应站提供的受试物作用极强, 威尔制药口服级受试物作用较强, 威尔制药 A、威尔制药 B、威尔制药注射级、威尔制药 4 个受试物作用相近, 2 个进口品种的作用略弱。在产生直接刺激 RBL-2H3 细胞脱颗粒作用的浓度下, 上海试剂采购供应站的聚山梨酯 80 有明显的细胞毒性, 并呈浓度依赖性。**结论:** 聚山梨酯 80 能够直接刺激 RBL-2H3 细胞脱颗粒, 其作用强度不同反映了产品的质量差异; 上海试剂采购供应站提供的聚山梨酯 80 直接刺激 RBL-2H3 细胞脱颗粒的作用可能由其细胞毒性引起。

关键词 聚山梨酯 80; 类过敏反应; 肥大细胞; β -氨基己糖苷酶; MTT

中图分类号: R965.3 **TQ460.4** **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-6376(2010)05-0379-05

Study of degranulation in mast cell RBL-2H3 induced by Tween 80

LI Jia¹, JIN Jing¹, GUAN Cui-wen¹, LI Ping¹, TU Jia-sheng², SUN Hui-min³, HUANG Zhi-ying¹

1 School of Pharmaceutical Science, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510006, China;

2 Department of Pharmaceutics, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China;

3 National Institute for the Control of Pharmaceutical and Biological Products, Beijing 100050, China.

Abstract **Objective:** To study directive effects of multiple kinds of injective excipients on the degranulation in rat mast cell line RBL-2H3 and to provide some indications for establishing a screening and evaluating method for pseudoallergy induced by different Tween 80. **Methods:** RBL-2H3 cells were cultured and treated with varying dose of Tween 80, and then the amount of releasing β -hexosaminidase was detected. MTT assay was demonstrated to determine the cytotoxicity of injective excipients which causing RBL-2H3 cells degranulation. **Results:** All of eight different Tween 80 products directly induced RBL-2H3 cells degranulation in a concentration-dependent manner while the degree of this effect was varying (Shanghai > Weier (oral) > Weier (A) = Weier (B) = Weier (injective) = Weier > Nof = Croda). Tween 80 (Shanghai) showed cytotoxicity effect in a concentration-dependent manner. **Conclusion:** Tween 80 can induce RBL-2H3 cells degranulation directly, and the degree of effect is related to the different quality among these products. Cell degranulation induced by Tween 80 (Shanghai) dues to its cytotoxicity.

Key words Tween 80; pseudoallergy; mast cells; β -hexosaminidase; MTT

中药注射剂的安全性问题越来越受关注, 其不良反应中出现较多、危害较大的是过敏反应, 从轻度的皮疹到致命的过敏性休克。在中药注射剂引起

的过敏性休克中, 约 3 / 4 属于类过敏反应^[1]。中药注射剂引发类过敏反应的重要原因之一是其注射用辅料^[2], 目前的研究显示, 能引发类过敏反应的注

收稿日期: 2010-07-23

基金项目: 科技部“十一五”国家科技支撑计划重点项目——药用新辅料临床前安全性评价及药品与包装材料的相容性安全研究 (2008BAI55B03)

作者简介: 李 佳 (1985—), 女, 硕博连读研究生, 研究方向: 药物毒理学。Tel: 13430271250 E-mail: jia1225-@126.com

* 通讯作者 黄芝瑛, 研究员, 博士生导师, 研究方向: 药物毒理学。E-mail: huangzhiying@21cn.com

射用辅料主要有以下几种: 聚氧乙烯蓖麻油^[3]、泊洛沙姆 188^[4]、聚山梨酯 80^[5,6]、高分子量聚乙二醇^[7]、脂质体^[8]、甲氧基聚乙二醇修饰的聚苯乙烯微球^[9]。其中聚山梨酯 80 作为常用的增溶剂、乳化剂和稳定剂, 不仅在中药注射剂中应用广泛, 很多难溶性的化学药物如多西紫杉醇注射剂等也采用其为增溶剂。而不同的厂家和制备工艺对聚山梨酯 80 产品质量亦有影响。

目前研究注射用辅料类过敏反应的体外方法主要是直接刺激肥大细胞脱颗粒试验。组胺是经典的过敏介质, 以往主要用来标记肥大细胞脱颗粒的程度, 但有研究显示组胺在肥大细胞体外的释放不稳定, 重复性较差; 而类胰蛋白酶和 β -氨基己糖苷酶的释放则相似度较高, 稳定性较好^[10]。类胰蛋白酶多作为临床诊断的指标^[11], 而 β -氨基己糖苷酶释放试验方法成熟、简便经济、应用广泛, 近年来更有研究者在努力将其改良为高通量筛选方法^[12]。

RBL-2H3 细胞分离自嗜碱性白血病 Wistar 大鼠的血液, 具有肥大细胞的许多生物学特性, 能够分泌组胺等炎症介质, 其表面表达的多种受体和黏附分子与体内成熟的肥大细胞十分相似, 具有高亲和力 IgE 受体, 活化后可以发生脱颗粒反应, 因而被作为肥大细胞模型用于研究高亲和力 IgE 受体的研究, 以及相关分泌与胞吐机制、过敏反应的研究等^[13]。本研究通过 β -氨基己糖苷酶释放试验, 考察不同厂家和级别的聚山梨酯 80 对肥大细胞 RBL-2H3 的直接刺激作用, 并初步探讨可能引发该作用的机制, 尝试和探索建立完善的注射用辅料引发类过敏反应的筛选评价体系。

1 材料与方法

1.1 试剂

MEM 培养基 (Gibco 公司, 批号 431726); 胎牛血清 (杭州四季青生物工程材料有限公司, 批号 090502); HEPES (美国 Mbchem 公司, 批号 7365-45-9); TritonX-100 (Amresco 公司, 批号 0458); *p*-Nitrophenyl-2-acetamido-2-deoxy-beta-*D*-glucopyranoside (美国 Sigma 公司, 货号 N9376, 批号 078 K5003); Compound 48 / 80 (C48 / 80) (美国 Sigma 公司, 货号 C2313, 批号 028 K4073)。聚山梨酯 80 (上海化学试剂采购供应站, 批号 200905; 南京威尔化工有限公司 A, 批号 200905; 南京威尔化工有限公司 B, 批号 200905; 南京威尔化工有限

公司 (口服级), 批号 20090701; 南京威尔化工有限公司 (注射用), 批号 091019; 南京威尔化工有限公司, 批号 0920 C)。

1.2 细胞培养

RBL-2H3 细胞购于中国科学院上海生命科学研究院细胞资源中心, 细胞培养于 37 °C, 饱和湿度, 5% CO₂ 培养箱中。当细胞生长约满 80% 培养瓶底面积时可进行传代, 传代比例为 1 : 3, 2 d 传代 1 次。

1.3 β -氨基己糖苷酶释放试验^[14,15]

取浓度为 $(2 \sim 3) \times 10^5 \text{ mL}^{-1}$ 的 RBL-2H3 细胞悬液接种于 96 孔板, 200 μL / 孔, 37 °C、5% CO₂ 饱和湿度的培养箱中培养, 待细胞单层长满孔底后, 弃去培养基, 改良 Tyrode 液 (NaCl 137 mmol / L, KCl 2.7 mmol / L, glucose 5.6 mmol / L, CaCl₂ 1.8 mmol / L, MgCl₂ 1 mmol / L, HEPES 20 mmol / L, BSA 1 mg / mL, pH 7.4) 洗 2 遍, 加入各种受试液: ①阴性对照组加改良 Tyrode 液; ②阳性对照组加 2 mg / mL Compound 48 / 80 溶液; ③裂解组加改良 Tyrode 液; ④试验组加各组受试液 (溶解于改良 Tyrode 液) (0.1、0.3、1、3 mg / mL 的 8 种不同的聚山梨酯 80), 200 μL / 孔, 每组平行 3 孔, 37 °C 孵育 1 h 后, 置于冰上 10 min 终止反应。在裂解组相应的复孔中加入 40 μL 1.2% TritonX-100, 冰上裂解 5 min, 以获得细胞裂解液 (代表 β -氨基己糖苷酶总量)。4 °C、1 500 r/min 离心 5 min。分别取 50 μL 细胞上清或 60 μL 细胞裂解液, 转移至一新的 96 孔板, 在各组细胞上清液及调零孔 (50 μL 改良 Tyrode 液) 中加入 10 μL 1.2% TritonX-100 补齐体积至 60 μL 。各孔加入 60 μL 底物 (5 mmol / mL *p*-Nitrophenyl-2-acetamido-2-deoxy-beta-*D*-glucopyranoside + 0.1 mol / mL 柠檬酸钠缓冲液 pH 4.5), 37 °C 孵育 1 h 后, 每孔加入 150 μL 终止液 (100 mmol / L NaCO₃、100 mmol / L NaHCO₃ 缓冲液 pH 10.7) 终止反应, 于酶标仪 405 nm 处测定各孔反应液吸光度 (*A*) 值, 计算 β -氨基己糖苷酶释放率。 β -氨基己糖苷酶释放率 (%) = (上清样品酶活力 *A* 值 - 空白 *A* 值) / (裂解组总酶活力 *A* 值 - 空白 *A* 值) $\times 100\%$ 。

1.4 MTT 法测定细胞活力

取浓度为 $5 \times 10^4 \text{ mL}^{-1}$ 的 RBL-2H3 细胞悬液接种于 96 孔板, 200 μL / 孔, 37 °C、5% CO₂ 饱

和湿度的培养箱中过夜培养,换无血清 MEM 培养基, 37℃、5% CO₂ 饱和湿度培养箱中培养 12 h, 弃去培养基, 加入各种受试液: ①试验组加入 0.1、0.3、1、3 mg/mL 的聚山梨酯 80 (上海试剂采购供应站); ②阴性对照组加入无血清 MEM 培养基; ③空白调零组不加细胞悬液, 只加无血清 MEM 培养基, 200 μL/孔, 每组平行 3 孔, 37℃、5% CO₂ 饱和湿度培养箱中培养 1 h, 小心吸去上清液, 每孔加 180 μL 无血清 MEM 培养基, 20 μL MTT (5 mg/mL) 工作液, 继续 37℃培养 4 h, 终止培养, 小心吸去培养液, 加入 150 μL DMSO 溶液, 振荡混匀 5 min, 使甲臞充分溶解, 于酶标仪 570 nm 处测定各孔反应液吸光度 (*A*) 值, 计算细胞活性。细胞活性 (%) = (待测组 *A* 值-空白 *A* 值) / (阴性组 *A* 值-空白组 *A* 值) × 100%。

1.5 统计学方法

实验数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组比较采用单因素方差分析, 两组间比较采用 *t* 检验, 使用 SPSS16.0 统计软件进行分析。

2 结果

2.1 β-氨基己糖苷酶释放率测定

不同厂家和级别的聚山梨酯 80 刺激肥大细胞 RBL-2H3 释放 β-氨基己糖苷酶的结果如图 1~3 所示。可见各种不同来源的聚山梨酯 80 样品刺激肥大细胞脱颗粒释放 β-氨基己糖苷酶的作用强弱存在差异。聚山梨酯 80 (上海化学试剂采购供应站、威尔制药 A、威尔制药 B、英国 Croda、日本 NOF) 高剂量组 (3.0 mg/mL) 的 β 氨基己糖苷酶释放率明显高于阴性对照组 ($P < 0.05$), 其中聚山梨酯 80 (上海化学试剂采购供应站) 的作用最强, 0.3、1.0 mg/mL 剂量组与阴性对照组相比亦具有统计学差异 ($P < 0.05$)。其余各组 β-氨基己糖苷酶释放率与阴性对照组比较无统计性差异 ($P > 0.05$), 但除批号为 0920 C 的威尔制药组样品外, 其余各样品均具有明显的浓度依赖关系。

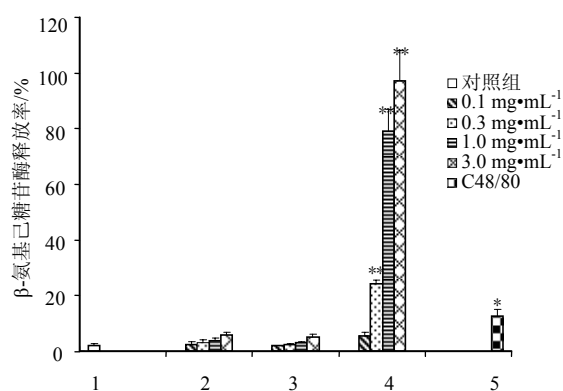
2.2 MTT 法测定细胞活力

为进一步探究聚山梨酯 80 刺激肥大细胞 RBL-2H3 脱颗粒释放 β-氨基己糖苷酶的作用机制, 选取其中作用最强的聚山梨酯 80 (上海试剂采购供应站) 样品, 利用 MTT 法测定其对 RBL-2H3 细胞活力的影响。结果如图 4 所示, 在 0.1 mg/mL 聚山梨酯 80 (上海试剂采购供应站) 作用后, RBL-2H3

细胞的活力与对照组相比没有显著性差异 ($P > 0.05$), 而在 0.3、1.0、3.0 mg/mL 浓度作用下均产生明显的细胞毒性 ($P < 0.05$), 且该细胞毒性在 0.1~3.0 mg/mL 呈明显的浓度依赖关系。

3 讨论

聚山梨酯 80 属于亲水型非离子表面活性剂, 作为常用的增溶剂、乳化剂和稳定剂, 不仅在中药注射剂中应用广泛, 很多难溶性的化学药物如多西紫杉醇注射剂等也采用其为增溶剂。临床上聚山梨酯

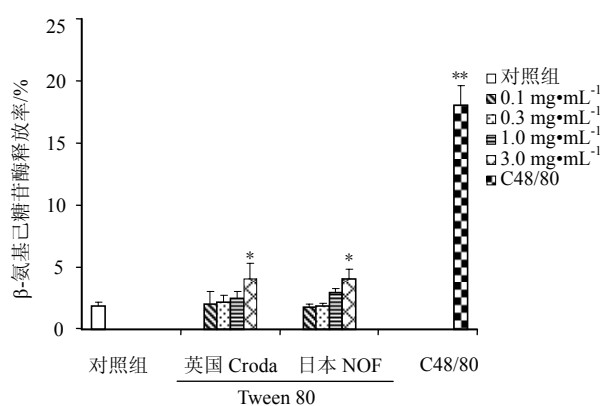


1-对照组; 2-Tween80(威尔制药 A); 3-Tween80(威尔制药 B); 4-Tween80(上海试剂采购供应站); 5-C48/80
与阴性对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs control group

图1 国产聚山梨酯 80 刺激 RBL-2H3 细胞释放 β-氨基己糖苷酶的作用 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig.1 Effect of domestic Tween 80 on β-hexosaminidase releasing of RBL-2H3 cell ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

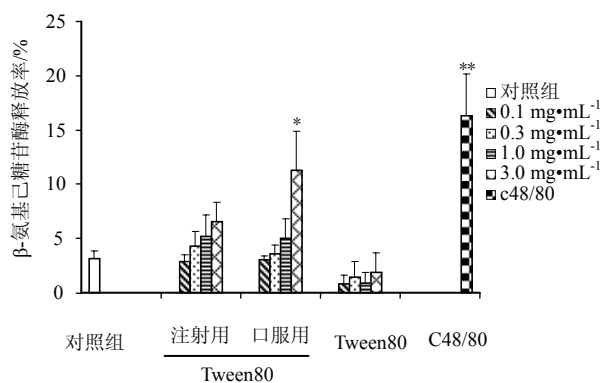


与阴性对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs control group

图2 进口聚山梨酯 80 刺激 RBL-2H3 细胞释放 β-氨基己糖苷酶的作用 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig.2 Effect of imported Tween 80 on β-hexosaminidase releasing of RBL-2H3 cell ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

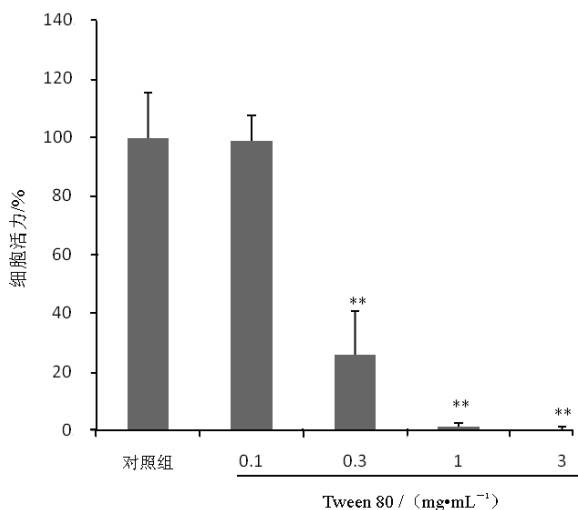


与阴性对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs control group

图3 威尔制药不同级别的聚山梨酯80刺激RBL-2H3细胞释放 β -氨基己糖苷酶的作用($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig.3 Effect of various Tween 80 from Weier pharmaceutical on β -hexosaminidase releasing of RBL-2H3 cell ($\bar{x} \pm s, n = 3$)



与阴性对照组比较: ** $P < 0.01$

** $P < 0.01$ vs control group

图4 聚山梨酯80(上海试剂采购供应站)对肥大细胞RBL-2H3活力的影响($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig.4 Effect of Tween 80 (Shanghai) on cell viability of mass cell RBL-2H3 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

80的应用浓度较高,在用于静脉给药的注射剂中可达10%,血药浓度亦可达到0.17 mg/mL(多西紫杉醇注射液静脉给药1 h后)^[16]。从实验结果可知,各种聚山梨酯80样品具有不同程度的直接刺激RBL-2H3肥大细胞脱颗粒的作用,这与临床使用及临床前安全性评价研究中观察到的类过敏现象一致^[17,18],说明聚山梨酯80引发类过敏反应的机制可能是直接刺激肥大细胞和/或嗜碱性粒细胞脱颗粒释放过敏介质^[19-21]。可进一步比较不同品种聚山梨

酯80引发类过敏反应能力的强弱,与样品的质量分析结合在一起,建立可靠易行的质控指标。本研究为了使各个品种聚山梨酯80的结果具有可比性,统一采用0.1~3.0 mg/mL的质量浓度,涵盖了血药浓度和临床应用浓度,但并未超过临床应用浓度,若增大浓度则刺激肥大细胞脱颗粒的效果会更加明显。从实验结果可以看出,上海试剂采购供应站提供的聚山梨酯80样品直接刺激肥大细胞脱颗粒的作用极强,威尔制药口服级聚山梨酯80样品较强,其余的样品差别不大,其中威尔制药A、威尔制药B、威尔制药注射级、威尔制药4个样品直接刺激肥大细胞脱颗粒作用相近,而2个进口品种的刺激作用则略弱于上述样品。各种样品比较的情况可见图5(其中未包括上海试剂采购供应站提供的样品)。实验结果表明:(1)不同来源的聚山梨酯80均可直接刺激RBL-2H3细胞脱颗粒,释放 β -氨基己糖苷酶;(2)不同来源的聚山梨酯80致RBL-2H3细胞释放 β -氨基己糖苷酶的量有一定差异,可能由其制备工艺不同、产品质量差异引起。

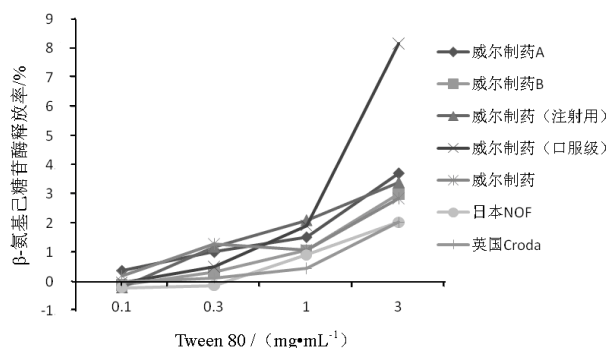


图5 不同品种聚山梨酯-80刺激RBL-2H3细胞脱颗粒作用的比较

Fig.5 Comparison of various Tween 80 on cell degranulation of RBL-2H3

本研究所关注的注射用辅料直接刺激肥大细胞脱颗粒的作用仅仅是引发类过敏反应的机制之一,仍不能排除其他几种作用机制同时存在的可能。本课题组正在进一步研究能够反映其他类过敏作用机制的特异性指标,以建立更加全面、完善的筛选体系。而直接刺激肥大细胞脱颗粒释放组胺是类过敏反应最常见的作用机制之一,且检测方法简便、稳定,目前相关的研究也较为成熟,因此本研究筛选注射用辅料直接刺激肥大细胞脱颗粒作用,依然具

有十分重要的意义。

上海试剂采购供应站提供的聚山梨酯 80 有明显的直接刺激肥大细胞脱颗粒作用, 本研究采用 MTT 法研究其对肥大细胞 RBL-2H3 的直接细胞毒性, 初步探究其引发脱颗粒作用的机制。 β -氨基己糖苷酶释放试验中给药时间为 1 h, 为了平行比较, MTT 法测定细胞活力中给药时间也定为 1 h。本实验结果表明聚山梨酯 80 (上海试剂采购供应站) 在 0.3~3.0 mg / mL 对 RBL-2H3 细胞有明显的细胞毒性, 而且呈明显的浓度依赖性; 而在 β -氨基己糖苷酶释放试验中, 聚山梨酯 80 (上海试剂采购供应站) 在 0.3~3.0 mg / mL 有明显的直接刺激肥大细胞脱颗粒的作用, 而且也呈明显的浓度依赖关系。曾有研究报道药物的直接刺激肥大细胞脱颗粒作用是由其细胞毒性引起的, 结合聚山梨酯 80 (上海试剂采购供应站) 的 2 个实验结果, 表明该辅料的直接刺激肥大细胞脱颗粒作用可能是由其细胞毒性引起的。

参考文献

- [1] 张美玉, 李贻奎, 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, 29 (8): 610-614.
- [2] 李 佳, 黄芝瑛. 注射用辅料类过敏反应的非临床评价方法[J]. 药物评价研究, 2010, 33 (1): 9-12.
- [3] Szebeni J, Muggia F M, Alving C R. Complement activation by Cremophor EL as a possible contributor to hypersensitivity to paclitaxel: an *in vitro* study [J]. *J Natl Cancer Inst*, 1998, 90 (4): 300-306.
- [4] Moghimi S M, Hunter A C, Dadswell C M, *et al*. Causative factors behind poloxamer 188 (Pluronic F68, Flocor) -induced complement activation in human sera. A protective role against poloxamer-mediated complement activation by elevated serum lipoprotein levels [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2004, 1689 (2): 103-113.
- [5] Coors E A, Seybold H, Merk H F, *et al*. Polysorbate 80 in medical products and nonimmunologic anaphylactoid reactions [J]. *Ann Allergy Asthma Immunol*, 2005, 95 (6): 593-599.
- [6] Limaye S, Steele R H, Quin J, *et al*. An allergic reaction to erythropoietin secondary to polysorbate hypersensitivity [J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2002, 110 (3): 530.
- [7] Hamad I, Hunter A C, Szebeni J, *et al*. Poly (ethylene glycol) s generate complement activation products in human serum through increased alternative pathway turnover and a MASP-2-dependent process [J]. *Mol Immunol*, 2008, 46 (2): 225-232.
- [8] Szebeni J. Complement activation-related pseudoallergy caused by liposomes, micellar carriers of intravenous drugs, and radiocontrast agents [J]. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst*, 2001, 18: 567-606.
- [9] Gbadamosi J K, Hunter A C, Moghimi S M. PEGylation of microspheres generates a heterogeneous population of particles with differential surface characteristics and biological performance [J]. *FEBS Lett*, 2002, 532 (3): 338-344.
- [10] Hohman R J, Dreskin S C. Measuring degranulation of mast cells [J]. *Curr prot immunol*, 2001, 7 (26): 1-7.
- [11] Fiorucci L, Ascoli F. Mast cell tryptase, a still enigmatic enzyme [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2007, 61: 1278-1295.
- [12] Naal R M, Tabb J, Holowka D, Baird B. *In situ* measurement of degranulation as a biosensor based on RBL-2H3 mast cells [J]. *Biosens Bioelectron*, 2004, 20 (4): 791-796.
- [13] Naal R M, Tabb J, Holowka D, *et al*. *In situ* measurement of degranulation as a biosensor based on RBL-2H3 mast cells [J]. *Biosens Bioelectron*, 2004, 20 (4): 791-796.
- [14] Dastych J, Walczak-Drzewiecka A, Wyczolkowska J, *et al*. Murine mast cells exposed to mercuric chloride release granule-associated N-acetyl-beta-D-hexosaminidase and secrete IL-4 and TNF-alpha [J]. *J Allergy Clin Immunol*, 1999, 103: 1108-1114.
- [15] Goromaru T. Evidence for involvement of mast cell degranulation and subsequent stimulation of histamine H1 and H2 receptors in radiographic contrast media-increased vascular permeability in rats [J]. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 2002, 366: 605-612.
- [16] 吴 毅, 金少鸿. 药用辅料吐温 80 的药理、药动学及分析方法研究进展[J]. 中国药事, 2008, 22 (8): 717-720.
- [17] 何永亮, 易 勇, 王红星, 等. 含吐温-80 中药注射液对犬致过敏的研究[J]. 中药药理与临床, 2005, 21 (1): 55-56.
- [18] Van Zuylen L, Verweij J, Sparreboom A. Role of formulation vehicles in taxane pharmacology [J]. *Invest New Drugs*, 2001, 19: 125-141.
- [19] 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): 240-245.
- [20] 郭 玉, 杨清敏, 王晶翼, 等. 聚山梨酯-80 致 RBL-2H3 肥大细胞脱颗粒的研究[J]. 中国医院药学杂志, 2008, 28 (19): 1676-1679.
- [21] 孙 立, 刘晓萌, 王 欣, 等. 吐温 80 引起动物类过敏反应的原因初步探索[J]. 毒理学杂志, 2007, 21 (4): 322.