

参麦注射液致 RBL-2H3 细胞脱颗粒的研究

熊克朝^{1,2}, 李泽君^{1,2}, 李志刚⁴, 张志伟⁴, 张 纲⁵, 吴纯启², 唐春萍¹, 丁日高^{2,3}, 李振江^{4*}, 王全军^{2,3*}

1. 广东药学院中药学院, 广东 广州 510006
2. 军事医学科医学院毒物药物研究所, 国家北京药物安全评价研究中心, 北京 100850
3. 抗毒药物与毒理学国家重点实验室(军事医学科学院), 北京 100850
4. 河北神威药业有限公司, 河北 三河 065201
5. 河北省中药注射剂工程技术研究中心, 河北 石家庄 051430

摘要: 目的 探讨参麦注射液(SMI)对 RBL-2H3 细胞脱颗粒的影响及其原因。方法 以 C48/80 为工具药建立 RBL-2H3 细胞脱颗粒模型, 检测不同浓度 C48/80 与 RBL-2H3 细胞作用不同时间后细胞 β -己糖苷酶、类胰蛋白酶和组胺的释放率以及细胞活力, 在细胞活力大于 80% 情况下, 选择释放程度较高的指标和条件为优选考察指标和条件。将 SMI 和其溶剂(Tween-80)原液等比稀释成不同浓度后与 RBL-2H3 细胞共同培养, 通过中性红染色法观察细胞脱颗粒的形态学变化, 分别用显色法和间接荧光法检测细胞上清的 β -己糖苷酶和组胺释放率, 采用细胞计数法(CCK-8)检测细胞的活力。结果 RBL-2H3 细胞脱颗粒模型的最佳作用时间为 30 min, 最佳指标为 β -己糖苷酶和组胺释放率。与空白组相比, SMI 质量浓度低于 13.3 g 生药/L (3 倍临床浓度) 时, 细胞中性红染色未见脱颗粒现象, 组胺和 β -己糖苷酶释放率亦无差异; 而在 Tween-80 质量浓度为 1.00 g/L 时, SMI 40 g 生药/L (9 倍临床浓度) 组和溶剂 1.00 g/L 组细胞中性红染色均可见脱颗粒现象, 细胞上清组胺和 β -己糖苷酶释放率亦明显增加。此外, CCK-8 结果显示, 与空白组相比, 各浓度的 SMI 对细胞活力均无影响。结论 SMI 低于 3 倍临床浓度无明显 RBL-2H3 细胞脱颗粒作用; 而在 9 倍临床浓度能刺激细胞脱颗粒, 这种脱颗粒作用可能与所含溶剂(Tween-80)有关, 与其对 RBL-2H3 的细胞毒性作用无关。提示 SMI 在低于 3 倍临床浓度相对安全, 在 9 倍临床浓度时有致类过敏反应的风险。

关键词: 参麦注射液; RBL-2H3 细胞; 类过敏反应

中图分类号: R965.3 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376(2015)02-0140-07

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2015.02.005

Study on degranulation of RBL-2H3 cells induced by Shenmai Injection

XIONG Ke-zhao^{1,2}, LI Ze-jun^{1,2}, LI Zhi-gang⁴, ZHANG Zhi-wei⁴, ZHANG Gang⁵, WU Chun-qi², TANG Chun-ping¹, DING Ri-gao^{2,3}, LI Zhen-jiang⁴, WANG Quan-jun^{2,3}

1. College of Traditional Chinese Medicine, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, China
2. National Beijing Center for Drug Safety Evaluation and Research, Institute of Pharmacology and Toxicology, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100850, China
3. State key Laboratory of Toxicology and Medical Countermeasures, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100850, China
4. Shineway Pharmaceutical Group Limited, Sanhe 065201, China
5. Hebei Engineering Technology Research Center of Chinese Materia Medica Injection, Shijiazhuang 051430, China

Abstract: Objective To explore the effect on degranulation of RBL-2H3 cells and its reasons induced by Shenmai Injection (SMI).

收稿日期: 2014-12-23

基金项目: 重大新药创制科技重大专项(2013ZX09302303); 重大新药创制科技重大专项(2012ZX09301003-001-008); 国家自然科学基金(81001254); 河北省科技计划项目(13272503D); 北京市科委项目基金(Z131100006513010)

作者简介: 熊克朝, 男, 硕士研究生, 主要从事药物毒理学研究。Tel: (010)66930631 E-mail: xiongkezhao@163.com

*通信作者 李振江 E-mail: sun@shineway.com

王全军 E-mail: wangquanjunbeijing@163.com

网络出版时间: 2015-03-09 15:19 网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/12.1409.R.20150309.1519.002.html>

Methods Compound 48/80 (C48/80) was used to establish RBL-2H3 cells degranulation model, the release rates of β -hexosaminidase, Tryptase, and histamine and the cell viability of RBL-2H3 cells were detected after treated by different times at the different concentration of C48/80; The indicators and conditions which had a higher degree of release were selected as the preferred study indicators and conditions in the case of that the cell viability was more than 80 percents. RBL-2H3 cells were cultured with the geometric dilution at different concentrations of the stock solution of SMI and its solvent (Tween-80), the morphology of degranulation was observed by neutral red staining. In addition, the releasing rates of β -hexosaminidase and histamine in cell supernatants were detected by chromogenic assay and indirect fluorescence analysis, respectively; The viability of RBL-2H3 cells was tested by cell counting kits. **Results** The optimal condition of C48/80-induced RBL-2H3 cells degranulation test was 30 min and the best indicators were the release rates of β -hexosaminidase and histamine. When compared with the control group, the release rates of histamine and β -hexosaminidase were no difference and the degranulation by neutral red staining did not appear in SMI groups with the concentrations less than 13.3 g crude drug/L (3 times as much as the clinical concentration) while the release rates of histamine and β -hexosaminidase were significantly increased and the degranulation by neutral red staining appeared in SMI 40 g crude drug/L (9 times as the clinical concentration) group and SMI solvent group that both of them included 1.00 g/L Tween-80. In addition, the results of CCK-8 showed that there was no significant effect in different SMI doses groups on cell viability compared with the control group. **Conclusion** SMI at the concentration below 3 times as much as the clinical concentration has no significant degranulation of RBL-2H3 cells while at the concentration of 9 times as much as the clinical concentration shows the certain effect on inducing the degranulation of cells which may be related to its solvent that contains Tween-80 and shows no relationship with its toxic effects on the cells. It suggests that SMI is relatively safe at the concentration below 3 times as much as the clinical concentration while it has the risk of allergic reactions at the concentration of 9 times as much as the clinical concentration.

Key words: Shenmai Injection; RBL-2H3 cells; anaphylactoid reactions

中药注射剂是采用现代工艺将中药单方或复方加工精炼而成的一种新剂型,具有见效快、效果稳定、使用方便的特点,在临床急、重症方面应用广泛,但药物不良反应(adverse drug reaction, ADR)报道亦逐渐增多,以过敏反应较为常见^[1-2]。然而,研究表明,类过敏反应和过敏反应的症状极为相似,最大的区别是类过敏反应首次用药即可发生,无免疫系统参与,无需 IgE 介导^[3-4],分析临床报道可知,很多中药注射剂归类为过敏反应的 ADR 应属于类过敏反应的范畴。因此,有必要加强中药注射剂致机体的类过敏反应的评价。

中药注射剂产生类过敏反应的机制有多种,但最主要的机制是药物直接刺激嗜碱性细胞或肥大细胞脱颗粒并释放过敏性介质而引起类过敏反应^[5]。在中药注射剂类过敏反应评价方面,体内一般选择 Wistar 大鼠、豚鼠和 Beagle 犬等易发生过敏性反应的动物来进行评定,体外通常选取肥大细胞或嗜碱性细胞的原代细胞或细胞系进行评价,但是体内法因成本高、重复性差而导致其应用受到局限,体外法则相对来说成本较低、重复性较高而广泛应用于类过敏反应的初步评价。目前,常用作中药注射剂类过敏性反应的体外评价的细胞系为 RBL-2H3 细胞,它源于大鼠嗜碱性白血病细胞株,具有肥大细胞相似的生物学特性,已在生脉注射液^[6]、清开灵注

射液^[7]、血塞通注射液^[8]等多种中药注射剂中得到应用,评价的结果与 ADR 监测的结果基本一致。

参麦注射液(Shenmai Injection, SMI)作为一种广泛适用于治疗充血性心力衰竭、冠心病、心绞痛、肿瘤化疗辅助的中药注射剂,临床 ADR 的报道也以过敏反应居多^[9-10],但这些过敏反应报道中是否存在类过敏反应尚不明确。因此,本研究首先选择化合物 48/80 (Compound 48/80, C48/80) 为工具药,建立 RBL-2H3 细胞脱颗粒模型,通过分析不同浓度的 SMI 及其溶剂与 RBL-2H3 细胞直接作用后的脱颗粒形态学变化和活性物质的释放程度来初步评价 SMI 的类过敏反应,为 SMI 的临床使用提供参考。

1 材料与方法

1.1 受试药物及主要试剂配制方法

SMI 原液,含 0.2 kg/L 的生药(红参和麦冬)和 5 g/L 的 Tween-80,神威药业有限公司生产,批号 1310133; SMI 溶剂原液,仅含 5 g/L 的 Tween-80,神威药业有限公司生产,批号 12101539,使用前用台氏液稀释。台氏液^[11](20 mmol/L HEPES, 135 mmol/L NaCl, 5 mmol/L KCl, 1.8 mmol/L CaCl₂, 1 mmol/L MgCl₂, 5.6 mmol/L glucose, 0.05% BSA, pH 7.4); DMEM 培养基、胎牛血清购自 Gibco 公司。C 48/80 购自 Sigma 公司,批号 014M4062V,

以台氏液配成 250 mg/L 的储存液; Triton X-100 购自 Sigma 公司, 批号 WXBB2203V, 取原液用 9% NaCl 配制体积分数为 1%。中性红试剂, 国药集团化学试剂有限公司生产, 批号 20120806; β -己糖苷酶底物 (4-nitroPheny 1-*N*-acety- β -D-glucosaminide) 购自 Sigma 公司, 批号 SLBF1695V, 用 0.05 mol/L 柠檬酸盐缓冲液 (pH=4.5) 配成 1 mmol/L 溶液; *N*-苯甲酰-DL-精氨酸对硝基苯酰胺盐酸盐 (*N*-benzoyl-DL-arginine *p*-nitrophenyl amide hydrochloride, BAPNA) 购自 Sigma 公司, 批号 BCBM1688V, 用 DMSO 配成 20 g/L 的溶液; 组胺二盐酸盐、邻苯二甲醛购自 Sigma 公司; 细胞计数试剂盒 (Cell Counting kit-8), 日本同仁化学研究所, 批号 FQ659。

1.2 主要仪器

Victor 1420 多功能酶标仪, 美国 Perkin Elmer 公司; CKX41 显微镜, 日本 Olympus 公司; 3000T 二氧化碳培养箱, 美国 Revco 公司; 3-18k 离心机, 德国 Sigma 公司。

1.3 细胞培养

RBL-2H3 细胞是大鼠嗜碱性白血病细胞株的一个亚系, 购自中国科学院上海生命科学研究院细胞资源中心, 本实验室保存。细胞采用含有 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液于 37 °C, 饱和湿度, 5% 的 CO₂ 培养箱中进行培养。当细胞生长铺满约 80% 培养皿底面时, 进行传代, 传代比例为 1:2~1:3, 每 2 天传代 1 次。

1.4 RBL-2H3 细胞脱颗粒模型的最佳的药物作用条件和考察指标选择

分别用台氏液配制质量浓度为 5、10、20、50 和 100 mg/L 的 C48/80 溶液, 每个质量浓度按作用的时间分为 15、30、45、60 min 4 个亚组, 每亚组 4 个复孔。取对数生长期细胞, 重悬后以 2×10^5 /mL, 200 μ L 种板, 37 °C 培养 24 h, 吸掉旧培养基, 用 PBS 清洗 3 遍, 每孔加入 200 μ L 上述配制好的 C48/80 溶液, 分别作用对应时间后取上清于 0.2 mL EP 管中, 3 000 r/min 离心 10 min, 取上清测定 β -己糖苷酶、类胰蛋白酶; 此外用间接荧光法检测组胺, 用 CCK-8 法测定细胞的活力。

1.5 SMI 致 RBL-2H3 细胞脱颗粒作用研究

1.5.1 药物浓度的选择^[12] SMI 的临床标注量为 100 mL/次, 相当于 20 g 生药/次, 其溶剂 Tween-80 的量为 0.5%。本试验模拟临床体内细胞接触药物的

血药浓度, 以正常人血液量 4.5 L 计, 临床体内药物浓度 (简称临床浓度) 相当于标注量/血容量。考虑到个体差异和量效关系, 分别将 SMI 和溶剂用台氏液等比稀释成 5 个浓度, 等级比为 3 倍 (表 1)。

表 1 实验药物剂量设置
Table 1 Setting of drug dose in experiment

受试药物	受试药物质量浓度/(g·L ⁻¹)				
	1 (9)	2 (3)	3 (1)	4 (0.33)	5 (0.11)
SMI	40	13.33	4.44	1.48	0.49
SMI 溶剂	1	0.33	0.11	0.037	0.012

括号内表示药物相对临床浓度的倍数

Parenthesis indicates multiple of clinical drug concentration

1.5.2 加药处理和指标测定 取对数成长期的 RBL-2H3 细胞按 2×10^5 /mL 的密度接种于 96 孔板, 每孔 200 μ L, 培养 24 h 贴壁后, 弃去培养液, 用台氏液洗 3 次, 设置空白组 (台氏液)、阳性组 (40 mg/L 的 C48/80)、总酶组 (1% Triton X100) 和给药组 (用台氏液稀释的各质量浓度的 SMI 和溶剂)。各组均于 37 °C 与细胞作用 30 min 后, 吸取细胞上清液, 3 000 r/min 离心 10 min, 收集离心上清液用来检测 β -己糖苷酶释放率, 用间接荧光法检测组胺释放率, 用 CCK-8 法检测细胞存活率。取过上清后细胞用台氏液清洗 3 次, 加入 0.5% 的中性红染液染色 3 min, 在光学显微镜下观察细胞脱颗粒的形态变化。

1.6 β -己糖苷酶释放率测定 (显色法)

各组取 50 μ L 上清液加入 96 孔板中, 每份待测液 5 孔, 同时添加 5 孔本底液, 向各孔加入 50 μ L 基质液 (将底物 β -己糖苷酶溶于 0.1 mol/L 的 pH=4.5 的柠檬酸-柠檬酸钠缓冲盐中, 使其终浓度为 1 mmol/L) 在 37 °C 孵育 1 h, 加入 150 μ L 的 0.1 mol/L NaHCO₃-Na₂CO₃ 缓冲液终止反应, 5 min 内测定 405 nm 处的吸光度 (*A*) 值。

$$\beta\text{-己糖苷酶释放率} = (A_{\text{上清}} - A_{\text{本底}}) / (A_{\text{总酶}} - A_{\text{空白}})$$

1.7 类胰蛋白酶释放率测定 (专一性底物法)

各组依次加入上清液 100、200 μ L BAPNA 底物 (溶于 DMSO, 终质量浓度为 20 g/L) 和 30 μ L Tri-HCl (0.1 mol/L, pH=7.4), 每组 5 孔, 同时添加本底对照。37 °C 反应 30 min 后, 每孔加 50 μ L 30% 的乙酸, 在 405 nm 波长处检测其 *A* 值。

$$\text{类胰蛋白酶释放率} = (A_{\text{上清}} - A_{\text{本底}}) / (A_{\text{总酶}} - A_{\text{空白}})$$

1.8 组胺释放率测定 (间接荧光法^[13])

各组加药处理后, 除总组胺组外, 加药组和空白组弃去上清, 用 PBS 洗 3 遍, 加入 200 μ L 1% 的

TritonX-100, 37 °C处理 30 min 后, 吸取上清, 3 000 r/min 离心 10 min, 收集离心上清液待测组胺。待测样品每组设置 5 个复孔, 同时添加组胺对照品 (用 0.1 mol/L HCl 稀释, 质量浓度为 2 000、1 000、500、250、100、50、20、10、0 $\mu\text{g/L}$) 对照, 各孔分别加 100 μL 上清液、50 μL 0.4 mol/L 的 NaOH 和 10 μL 的 1 g/L 的 OPT 甲醇溶液, 反应 10 min 后加入 50 μL 0.5 mol/L 的 HCl 终止反应, 在激发波长 355 nm, 发射波长 460 nm 条件下检测荧光值。

组胺释放率 = (细胞总荧光值 - 胞内荧光值) / 细胞总荧光值

1.9 RBL-2H3 细胞活力测定 (CCK-8 法)

各组加药处理后, 弃去上清, 用 PBS 洗 3 次, 每孔依次加 100 μL DMEM 培养液和 10 μL 的 CCK-8 试剂, 同时添加本底和 DMEM 组作为对照, 继续在培养箱中培养 3 h, 在 450 nm 波长检测 A 值, 并计算细胞活力。

$$\text{细胞活力} = (A_{\text{加药}} - A_{\text{本底}}) / (A_{\text{DMEM}} - A_{\text{本底}})$$

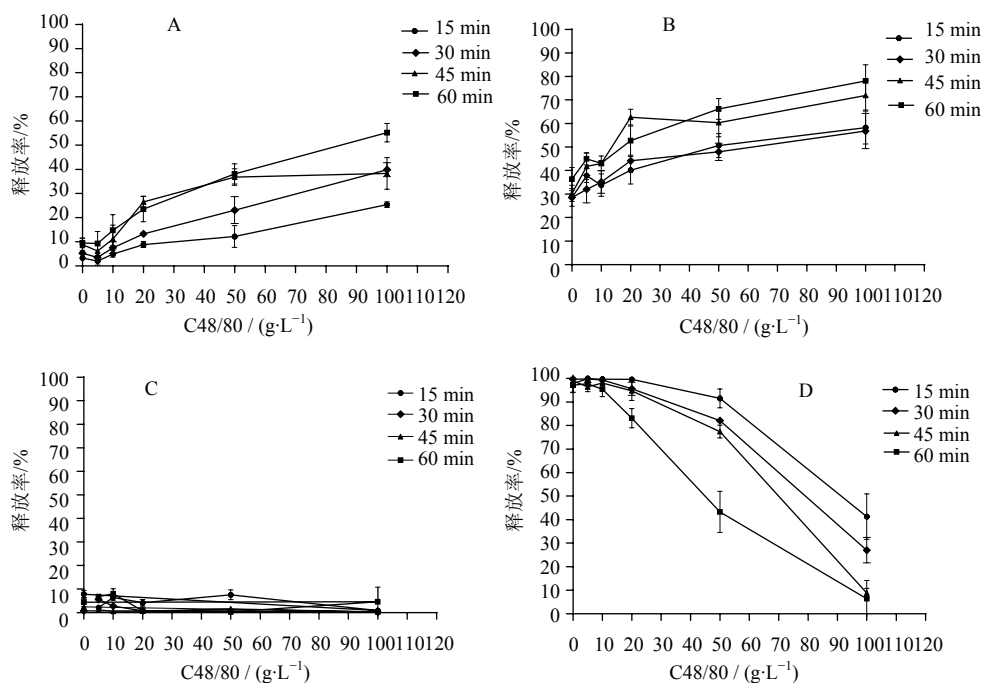
1.10 统计学处理

应用 SPSS19.0 软件进行数据处理, 结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示。采用独立样本 t 检验比较组间的差异性。

2 结果

2.1 RBL-2H3 细胞脱颗粒模型的最佳药物作用条件和考察指标选择

不同浓度的 C48/80 与 RBL-2H3 细胞作用后, 结果显示, 各组细胞上清液类胰蛋白酶几乎没有释放; 组胺和 β -己糖苷酶释放程度较高并且具有良好的量 - 时 - 效关系: 在相同作用时间下, 其释放率均随浓度增加而增高; 同一浓度释放率也均随作用时间延长而提高 (图 1)。但是, CCK-8 结果显示, 当 C48/80 质量浓度超过 50 mg/L , 作用时间超过 45 min 后, 细胞的活力低于 80%, 大于 20% 细胞死亡, 易造成评价结果的假阳性。因此, 选择考察的指标以组胺和 β -己糖苷酶释放率为佳, C48/80 浓度不应超过 50 mg/L , 最佳作用时间为 30 min。



A- β -己糖苷酶; B-组胺; C-类胰蛋白酶; D-细胞活力

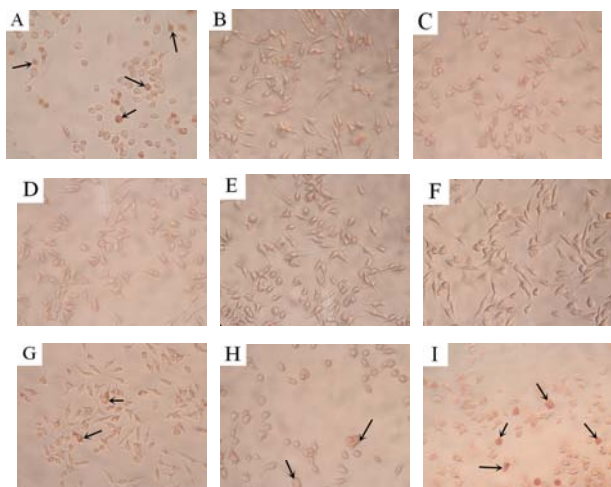
A- β -hexosaminidase; B-histamine; C- trypase; D- cell activity

图 1 C48/80 对 RBL-2H3 细胞过敏活性物质释放和活力的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 1 Effect of C48/80 to RBL-2H3 cells on release of active substances of allergies and viability ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

2.2 SMI 对 RBL-2H3 细胞脱颗粒形态学上的影响

RBL-2H3 细胞与药物作用 30 min 后, 用中性红染色, 在光学显微镜下观察可知, 空白组细胞生长状态良好, 呈长梭形, 着色较浅, 折光性较好; 阳性组细胞呈圆形或椭圆形, 着色较深, 细胞内可见颗粒状物质。与阴性组相比, SMI 溶剂组 Tween-80 质量浓度大于 0.33 g/L 后会出现较明显的脱颗粒作用; 而 SMI 40 g 生药/L 组细胞有轻微脱颗粒作用外, 其他浓度组均未见脱颗粒现象 (图 2)。



A-阳性组 (40 mg·L⁻¹ C48/80); B-空白组 (台氏液); C~G-分别为 SMI 0.49、1.48、4.44、13.33 和 40 g·L⁻¹ 组; H~I-分别为 SMI 溶剂 0.33 和 1.00 g·L⁻¹ 组

图 2 RBL-2H3 细胞中性红染色结果

Fig. 2 Result of neutral red staining of RBL-2H3 cells

2.3 SMI 对 RBL-2H3 细胞 β -己糖苷酶释放率的影响

实验结果表明: 与空白组相比, 阳性组细胞上清 β -己糖苷酶释放明显, 与预期结果相符; SMI 溶剂组 Tween-80 质量浓度大于 0.33 g/L 后, 细胞 β -己糖苷酶的释放率明显增高 ($P < 0.05$); SMI 浓度在 13.33 g 生药/L (3 倍临床浓度) 以下时, β -己糖苷酶释放无差异; 而在 Tween-80 质量浓度为 1.00 g/L 时, SMI 40 g/L (9 倍临床浓度) 组和溶剂 1.00 g/L 组细胞 β -己糖苷酶释放率均明显增加 ($P < 0.05$) (表 2)。提示质量浓度为 40 g 生药/L 的 SMI 能致 RBL-2H3 细胞脱颗粒, 且这种脱颗粒作用可能与溶剂 Tween-80 有关。

2.4 SMI 对 RBL-2H3 细胞组胺释放率的影响

2.4.1 组胺对照品质浓度-荧光值工作曲线 以组胺对照品质浓度为横坐标, 荧光值为纵坐标作图,

得标准曲线为 $y = 0.374 3x + 11.214$ ($R^2 = 0.994 7$), 可知组胺-OPT 缩合物的荧光值与底物组胺对照品的浓度之间存在明显的线性关系, 说明用此方法检测待测样品中的组胺可行。

2.4.2 药物刺激 RBL-2H3 细胞的组胺释放率 实验结果显示, 与空白组相比, 阳性组细胞上清组胺释放显著, 与预期相符; SMI 溶剂组 Tween-80 质量浓度在 0.11~1.00 g/L 组胺释放显著; SMI 质量浓度在 0.49~4.44 g 生药/L 组胺释放不明显; 而在 Tween-80 的质量浓度分别为 0.33~1.00 g/L 时, SMI 质量浓度在 13.33~40.00 g 生药/L, SMI 和溶剂组细胞组胺释放率均明显升高 ($P < 0.05$) (表 2)。以上结果说明, SMI 在高于 13.33 g 生药/L (3 倍临床浓度) 后能刺激 RBL-2H3 细胞脱颗粒, 且脱颗粒程度与其所含 Tween-80 的量呈正相关。

表 2 SMI 对 RBL-2H3 细胞 β -己糖苷酶和组胺释放率的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=5$)

Table 2 Effect of SMI on release rates of β -hexosaminidase and histamine of RBL-2H3 cells ($\bar{x} \pm s$, $n=5$)

组别	质量浓度/ (g·L ⁻¹)	过敏性介质释放率/%	
		β -己糖苷酶	组胺
空白	—	7.75 ± 1.97	28.57 ± 3.32
阳性	0.04	21.87 ± 2.43**	67.11 ± 11.77**
SMI	0.49	7.14 ± 1.42	32.58 ± 9.79
	1.48	7.80 ± 1.50	34.60 ± 7.18
	4.44	8.91 ± 1.85	31.66 ± 6.84
	13.33	9.17 ± 2.74	37.92 ± 7.10*
	40.00	11.24 ± 1.52*	40.61 ± 8.26**
SMI 溶剂	0.012	11.71 ± 2.65	33.01 ± 13.21
	0.037	10.77 ± 3.19	35.40 ± 8.41
	0.11	10.46 ± 2.90	40.90 ± 9.77*
	0.33	13.91 ± 2.90*	49.04 ± 7.50**
	1.00	19.94 ± 2.74**	56.52 ± 1.70**

与空白组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs blank group

2.5 SMI 对 RBL-2H3 细胞活力的影响

结果显示, 与空白组相比, SMI 溶剂 1.00 g/L 组细胞活力明显降低 ($P < 0.05$), 而 SMI 各浓度组细胞活力均无统计学差异, 提示各浓度的 SMI 对 RBL-2H3 细胞的毒性作用不明显 (表 3)。

3 讨论

近年来, 具有操作简便、成本低、重复性高的特点的 RBL-2H3 细胞脱颗粒模型, 已成为评价中药注射剂类过敏反应的一种常见的模型^[14], 其评价结果的准确性也逐步提高。就评价的指标而言, 组胺^[15]、类胰蛋白酶、白三烯和 β -己糖苷酶^[16]等

表3 SMI对RBL-2H3细胞活力的影响 ($\bar{x} \pm s, n=5$)

Table 3 Effect of SMI on viability of RBL-2H3 cells

($\bar{x} \pm s, n=5$)

组别	质量浓度/(g·L ⁻¹)	细胞存活率/%
空白	—	90.08±2.91
阳性	0.04	81.32±8.31
SMI	0.49	91.83±6.87
	1.48	90.05±8.18
	4.44	88.33±5.44
	13.33	92.37±7.79
	40.00	88.65±6.84
SMI 溶剂	0.012	92.76±4.61
	0.037	93.95±2.71
	0.11	93.89±5.99
	0.33	83.21±8.58
	1.00	64.46±3.16**

与空白组比较: ** $P<0.01$ ** $P<0.01$ vs blank group

RBL-2H3 细胞释放的活性物质是检测类过敏反应常见的指标^[14],但不同指标的释放程度和敏感性也不一,因而需要筛选敏感性较好的指标。而 C48/80 作为一种非免疫型刺激剂,极小剂量就能明显刺激 RBL-2H3 脱颗粒,是建立 RBL-2H3 细胞脱颗粒模型常用的阳性药,通过检测细胞的各种活性物质的释放程度可进行检测指标的优化^[17]。本研究选择 C48/80 为工具药,来筛选 RBL-2H3 细胞脱颗粒模型最佳的检测指标,结果表明 β -己糖苷酶和组胺的释放程度较高且均有量-效关系,而类胰蛋白酶几乎没有释放。因此,评价 SMI 的脱颗粒时最佳的指标为 β -己糖苷酶和组胺释放率。此外,考虑到 SMI 为黄色的澄明液体,药物本身颜色会干扰需经比色法原理的指标的检测,因而检测 β -己糖苷酶时添加本底对照,检测组胺时采用灵敏度较高的间接荧光法。

就 RBL-2H3 细胞脱颗粒模型的最佳条件选择来说,本研究采用正交实验法,设置浓度和作用时间两个因子,在细胞活力大于 80% 情况下选择细胞活性物质释放程度较高的条件作为最优条件,结果表明, C48/80 质量浓度不应超过 50 mg/L,最佳作用时间为 30 min。而临床中所见的类过敏反应具有速发性的特点,一般在初次给药 30 min 之内发生^[14],故选择 SMI 处理 RBL-2H3 细胞的时间为 30 min。

中药注射剂产生类过敏反应的原因有多种,主要是由药物本身成分或添加剂所致。研究表明,作为中药注射剂常用辅料的 Tween-80 可通过激活补体途径或者直接诱导肥大细胞脱颗粒而导致类过敏

性反应的发生^[18-20]。故此,本研究在评价 SMI 的类过敏反应时,将 SMI 和其溶剂(Tween-80)原液进行等比稀释分别作用于 RBL-2H3 细胞,来探究 SMI 致细胞脱颗粒作用程度以及与溶剂的关系。本研究结果显示,药物与 RBL-2H3 细胞作用 30 min 后,与空白组相比,SMI 溶剂 Tween-80 质量浓度在大于 0.11 g/L(临床浓度)后确能刺激 RBL-2H3 细胞脱颗粒,与预期相符;SMI 质量浓度低于 13.3 g 生药/L(3 倍临床浓度)时,细胞中性红染色未见脱颗粒现象,组胺和 β -己糖苷酶释放率亦无差异;而在所含 Tween-80 质量浓度同为 1.00 g/L 时,SMI 40 g/L 组和溶剂 1.00 g/L 组细胞中性红染色亦可见脱颗粒现象 β -己糖苷酶和组胺释放均明显增加,提示,SMI 在质量浓度为 40 g 生药/L 时能诱导 RBL-2H3 细胞脱颗粒,且这种脱颗粒作用可能与所含溶剂 Tween-80 有关。

与此同时,有文献报道,药物引起的细胞的凋亡或坏死也可以直接刺激细胞释放大量的炎症介质^[21],干扰对实验结果的评定。因此,本研究用 CCK-8 法检测了药物对 RBL-2H3 细胞的活力的影响,结果发现,药物与 RBL-2H3 细胞作用 30 min 后,与空白组相比,SMI 各剂量组无差异,说明 SMI 对 RBL-2H3 细胞无药源性毒性。

综上所述,在本试验的条件下,SMI 在质量浓度低于 13.33 g 生药/L(3 倍临床浓度)对 RBL-2H3 细胞无明显的脱颗粒作用;而在质量浓度为 40 g 生药/L(9 倍临床浓度)下能明显刺激 RBL-2H3 细胞脱颗粒,且这种脱颗粒作用与溶剂 Tween-80 的质量浓度有关,与其对细胞的毒性无关。提示 SMI 在低于 3 倍临床浓度下相对安全,在 9 倍临床浓度时具有潜在致类过敏反应的风险。

但是,由于人体内的类过敏反应是药物与机体多种靶细胞的综合作用,RBL-2H3 细胞脱颗粒与类过敏反应的相关性还有待进一步探究,要想客观评价 SMI 的类过敏反应,还需结合其他细胞或整体动物模型^[4],通过各种模型评价结果的综合分析来确定 SMI 所致类过敏反应的剂量和程度,从而指导临床用药。

参考文献

- [1] 张惠霞,陈建玉,宋成. 3 414 例中药注射剂不良反应分析[J]. 药物警戒,2006,2(3): 232-235.
- [2] 张 頔,屈 哲,霍桂桃,等. 中药注射剂诱发过敏性

- 反应的临床前安全性评价 [J]. 药物评价研究, 2013, 36(4): 241-244.
- [3] 李黎明, 金若敏, 李小月. 中药注射剂类过敏反应实验研究进展 [J]. 中药药理与临床, 2012, 28(1): 187-190.
- [4] 马宏图, 睢凤英. 中药注射剂安全性与类过敏反应 [J]. 中国医院药学杂志, 2009, 29(10): 838-840.
- [5] Szebeni J. Complement activation-related pseudoallergy: a new class of drug-induced acute immune toxicity [J]. *Toxicology*, 2005, 216(2-3): 106-121.
- [6] 朱远洪, 王 青, 董 燕, 等. 生脉注射剂致 RBL-2H3 细胞与小鼠腹腔肥大细胞脱颗粒研究 [J]. 广州中医药大学学报, 2014, 31(3): 410-413.
- [7] 刘 炯, 汤家铭, 吴文斌. 中药注射剂致 RBL-2H3 细胞脱颗粒的研究 [J]. 上海中医药大学学报, 2012, 26(5): 85-90.
- [8] 罗 霞, 王 青, 周 联, 等. 几种常见中药注射剂对 RBL-2H3 细胞脱颗粒的影响 [J]. 中药新药与临床药理, 2009, 20(6): 506-510.
- [9] 陈萌霞. 参麦注射液不良反应52例分析 [J]. 湖南中医药大学学报, 2013, 33(11): 63-67.
- [10] 万凯化, 高 菁, 付辉政, 等. 参麦注射液致 349 例不良反应病例报告分析 [J]. 中国药物滥用防治杂志, 2014, 20(2): 71-73.
- [11] Momoko Ishida a, Kosuke Nishi a, Hisashi Watanabe, *et al.* Inhibitory effect of aqueous spinach extract on degranulation of RBL-2H3 cells [J]. *Food Chem*, 2013, 136(2): 322-327.
- [12] 易娟娟, 谢家骏, 张立波, 等. RBL-2H3 细胞体外试验评价药物类过敏的方法学研究和适用性考察 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2014, 20(13): 180-184.
- [13] 向军俭, 陈华粹. 组胺的荧光测定法的研究 [J]. 中国医学科学院学报, 1981, 3(3): 183-187.
- [14] 赵 吟, 李 钦, 张信岳. 基于 RBL-2H3 细胞模型的 I 型过敏反应和类过敏反应研究 [J]. 中国临床药理学与治疗学, 2010, 15(11): 1310-1314.
- [15] 邓向亮, 朱远洪, 王 青, 等. 检测原代肥大细胞组胺释放分析中药注射剂致类过敏性 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(21): 271-275.
- [16] Hepbaldikler S T, Sandhoff R, Kolzer M, *et al.* Physiological Substrates for human lysosomal β -Hexosaminidase [J]. *J Boil Chem*, 2002, 277(4): 2562-2572.
- [17] Jun Ho Lee, Jin Young Seo, Na Young Ko, *et al.* Inhibitory activity of *Chrysanthemi sibirici* herbaextract on RBL-2H3 mast cells and compound 48/80-induced anaphylaxis [J]. *J Ethnopharmacol*, 2004, 95(2-3): 425-430.
- [18] Coor 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.
- [19] 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): 457-459.
- [20] 李 佳, 金 晶, 关翠雯, 等. 聚山梨酯 80 刺激肥大细胞 RBL-2H3 脱颗粒作用的评价 [J]. 药物评价研究, 2010, 33(5): 379-382.
- [21] 林 静, 李大主. 细胞焦亡: 一种新的细胞死亡方式 [J]. 国际免疫学杂志, 2011, 34(3): 213-216.