基于实时细胞分析技术评价注射用益气复脉（冻干）类过敏反应

范姗姗[1]，陈　瑞[1]，尹清晟[1]，韩　娟[1]，张艳军[1]，周大铮[2]，鞠爱春[2]，李德坤[2*]，庄朋伟[1*]

1. 天津中医药大学　天津市中药药理重点实验室，天津　300193
2. 天津天士力之骄药业有限公司，天津　300402

摘　要：目的　建立中药注射剂体外类过敏反应评价方法，快速评价不同批次注射用益气复脉（冻干）类过敏反应表现。**方法**　体外培养嗜碱性白血病细胞株 RBL-2H3 细胞，选择 Compound 48/80 为阳性药，采用实时细胞分析（real-time cell analysis，RTCA）系统检测药物干预后引起的细胞指数（CI）值变化，并利用甲苯胺蓝、鬼笔环肽染色观察细胞形态、骨架变化，以及检测组胺和 β-已糖苷酶释放量验证 RBL-2H3 细胞的脱颗粒情况。选择 20 个批次的注射用益气复脉（冻干，100 μg/mL）作用于 RBL-2H3 细胞，进行基于 RTCA 技术的类过敏反应评价。**结果**　阳性药 Compound 48/80（20 μg/mL）能够使 RBL-2H3 细胞的 CI 值在加药后 30 min 内呈先快速上升后下降趋势；形态学研究发现，Compound 48/80 使细胞形态和细胞骨架均发生明显改变，发生明显的脱颗粒现象；组胺和 β-已糖苷酶释放实验进一步证实 Compound 48/80 导致炎症介质的释放，引起了明显的脱颗粒现象；提示 RTCA 系统可以用于快速敏感的评价 RBL-2H3 细胞脱颗粒。不同批次的注射用益气复脉（冻干）对 RBL-2H3 细胞 CI 值无明显影响，提示所选批次为合格批次，无类过敏反应现象的发生。**结论**　建立了一套基于 RTCA 系统的类过敏反应体外快速评价技术，可用于注射用益气复脉（冻干）等中药注射剂类过敏反应的体外快速评价。

关键词：实时细胞分析（RTCA）；Compound 48/80；注射用益气复脉（冻干）；类过敏反应；RBL-2H3 细胞；脱颗粒

中图分类号：R962.2　　**文献标志码：**A　　**文章编号：**1674-6376 (2018) 03- 0411 - 06

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2018.03.010

Evaluation of anaphylactoid reaction of Yiqi Fumai Lyophilized Injection based on real-time cell analysis technique

FAN Shanshan[1], CHEN Rui[1], YIN Qingsheng[1], HAN Juan[1], ZHANG Yanjun[1], ZHOU Dazheng[2], JU Aichun[2], LI Dekun[2], ZHUANG Pengwei[1]

1. Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin State Key Laboratory of Modern Chinese Medicine, Tianjin 300193, China
2. Tianjin Tasly Pride Pharmaceutical Company Limited, Tianjin 300402, China

Abstract: Objective　To establish a new method for evaluating the anaphylactoid reaction of traditional Chinese medicine injection *in vitro*. Rapid evaluation of anaphylactoid reaction of Yiqi Fumai Lyophilized Injection (YQFM) from different batches was conducted. **Method**　The basophilic leukemia cell line RBL-2H3 cells were cultivated *in vitro*, and Compound 48/80 was selected as the positive drug. The effect of Compound 48/80 on cell index (CI) was monitored by using real-time cell analyzer (RTCA). Then the cell morphology and cytoskeleton changes were observed by using toluidine blue and phalloidin staining, histamine and beta hexose glucosidase release were used to verify the degranulation of RBL-2H3 cells. Finally, 20 batches of YQFM (100 μg/mL) were selected for the anaphylaxis evaluation. **Results**　Compound 48/80 could significantly increase the CI value of RBL-2H3 cells, further morphological study found that Compound 48/80 could make the cell morphology and cytoskeleton change obviously and show obvious degranulation at the same dose. Histamine and beta hexose glucosidase release experiments also confirmed that Compound 48/80 could lead to the release of inflammatory mediators and induce obvious degranulation at this dose. These results suggest that the RTCA system can be used to evaluate the degranulation of RBL-2H3 cells quickly and sensitively. RTCA monitoring

收稿日期：2018-01-04

第一作者：范姗姗，硕士，研究方向为方剂学。E-mail: fanshanshan420@163.com

***通信作者：**庄朋伟，副教授，中药学药理研究。E-mail: zhuangpengwei@163.com

李德坤，工程师, 中药注射剂工艺及安全性研究。E-mail: lidekun@tasly.com

results showed that different batches of YQFM had no significant effect on the CI value of RBL-2H3 cells, suggesting that the selected batches of YQFM were eligible batches without anaphylactoid reaction. **Conclusion**　An *in vitro* rapid evaluation method for anaphylactoid reaction has been established based on RTCA system, which can be used for rapid evaluating the anaphylactoid reaction of YQFM and other traditional Chinese medicine injections *in vitro*.

Key words: real-time cell analysis (RTCA); Compound 48/80; Yiqi Fumai Lyophilized Injection; anaphylactoid reaction; RBL-2H3 cells; degranulation

中药注射剂不良反应临床多表现为类过敏反应、发热反应等，目前尚无快速敏感的检测方法。大量研究表明[1]，药物作用于肥大细胞或嗜碱性粒细胞引起脱颗粒、释放组胺等，是导致临床不良反应发生的关键环节。RBL-2H3 细胞是 Wistar 大鼠嗜碱性白血病细胞株，胞浆内含有大量颗粒，当受到抗原或者非抗原物质刺激时，活化后发生脱颗粒反应，可释放含有组胺、β-氨基己糖苷酶等物，从而产生一系列的生物学效应，被认为是体外检测脱颗粒反应的最佳模型[2]。实时细胞分析（real-time cell analysis，RTCA）可实时检测电极板中细胞形态及结构的变化，且以细胞指数（cell index，CI）的形式反应[3]，是一种新兴、基于电子阻抗技术监测活细胞状态的检测方法[4]。因此，本实验建立实时、无标记、快速敏感的体外细胞脱颗粒检测系统，首次评价不同批次的注射用益气复脉（冻干）对 RBL-2H3 细胞脱颗粒的影响，从而为进一步保障益气复脉（冻干）临床使用的安全性提供一定方法学参考。

1　材料

1.1　细胞

RBL-2H3 细胞，来源于美国模式培养物集存库（Ameriean tpye culture colleetion，ATCC），购自中国科学院上海细胞研究所。

1.2　药物及主要试剂

注射用益气复脉（冻干），共 20 个批次，批号分别为 20140601、20140602、20140901、20140902、20141001、20141002、20141003、20141004、20141102、20141103，天津天士力之骄药业有限公司生产；Compound48/80，批号 1002340712，购自美国 Sigma 公司。

DMEM 培养基（美国 GIBCO，批号 8112118）；胎牛血清（天津市中奥天原生物制品有限公司）；0.25%胰酶（吉诺生物医药有限公司，批号 07121103）；甲苯胺蓝（批号 1002341392）、鬼笔环肽，均购自美国 Sigma 公司；KCl、NaCl、$Na_2HPO_4\cdot 12H_2O$、KH_2PO_4、$NaHCO_3$、$CaCl_2$、$MgSO_4$、$Co(NO_3)_2\cdot 6H_2O$、（NH_4）SH 等无机试剂均为分析纯（天津化学试剂厂）；青、链霉素（分别含青霉素 100 μg/mL 和链霉素 100 μg/mL，Sigma，华美生物工程公司北京分公司提供）；组胺和 β-己糖苷酶试剂盒（南京建成生物工程研究所）。

1.3　主要仪器

5% CO_2 恒温培养箱（美国 Thermo Scientific Cytoperm 公司）；倒置相差显微镜（德国 XD-101 98010）；Flexstation 3 多功能酶标仪工作站（Molecular Devices）；RTCA 系统、16 孔电极板（美国罗氏公司）；生物洁净工作台（JB-CJ-2FC 型，苏州佳宝净化工程设备有限公司）；LDZ5-2 医用离心机（北京医用离心机厂）；DK-98-IIA 水浴锅（天津泰斯特仪器有限公司）；超纯水装置（美国 Cascada）；高压灭菌器（日本 SANYO）；－80 ℃低温冰箱（日本 SanY 公司产品，MDF-U4086 型）。

2　方法

2.1　RTCA 检测 RBL-2H3 细胞脱颗粒方法的建立

2.1.1　大鼠嗜碱性粒细胞 RBL-2H3 的培养　RBL-2H3 细胞培养于含 15%胎牛血清的 DMEM 培养基中，放置于 37 ℃、饱和湿度、5% CO_2 培养箱中。RBL-2H3 细胞为贴壁生长，当细胞生长铺满约培养瓶 90%底面积时，可进行传代。传代时将培养瓶从 CO_2 培养箱中取出，打开瓶盖，弃培养液，加入 0.25%胰酶消化，当镜下观察细胞间有明显的间隙，细胞明显变圆时，迅速加入含 10%胎牛血清的培养液终止消化，用吸管吹打将细胞收集于离心管中，常温下，1 000 r/min 离心 5 min，再加入新鲜完全培养液重悬传代。传代比例为 1∶3，每 4 天传代 1 次。

2.1.2　实时监测 RBL-2H3 细胞的增殖情况　为考察细胞的合适接种密度，首先利用 RTCA 系统进行筛查。实验过程中将 RTCA 检测工作台放在 CO_2 细胞培养箱中，调整 RBL-2H3 细胞密度分别为 4×10^5、2×10^5、1×10^5、5×10^4、2.5×10^4、1.25×

10^4/mL，将 150 μL 细胞悬液接种于 16 孔电极板中，使细胞贴附于电子传感器表面，另设对照组，只添加培养基，不接种细胞。接种细胞后将电极板置于 RTCA 检测工作台上，设置监测间隔为 15 min，记录 CI 值。

2.1.3 RTCA 检测 Compound 48/80 对 RBL-2H3 细胞脱颗粒的作用 RBL-2H3 细胞以 1×10^5/mL 的细胞浓度接种于 16 孔电极板，每孔 100 μL，监测 24 h，待细胞增殖稳定后，分为对照组和 Compound 48/80（20 μg/mL）组，于 RTCA 检测工作台上，与分析仪和 RTCA 系统控制台接通，设置监测间隔为 2 min，监测 24 h。通过 RTCA 系统实时监测细胞状态的变化，并绘制出 RBL-2H3 细胞的实时特征 CI 值曲线。

2.2 RTCA 检测 RBL-2H3 细胞脱颗粒方法的验证

2.2.1 甲苯胺蓝染色考察 Compound 48/80 对 RBL-2H3 细胞的影响 RBL-2H3 细胞以 1.5×10^4/mL 的密度接种培养于 12 孔板培养，待 24 h 细胞贴壁后，分为对照组和 Compound 48/80（20 μg/mL）组，每孔设 5 个复孔，分别在药物作用 5、20、60 min 后，每孔加入 0.5%的甲苯胺蓝染液 20 μL，染色 3 min 后，吸弃培养液，倒置显微镜下观察细胞脱颗粒形态的变化。

2.2.2 鬼笔环肽染色考察 Compound 48/80 对 RBL-2H3 细胞骨架的影响 RBL-2H3 细胞以 1.5×10^4/mL 的密度接种培养于 12 孔板培养，待 24 h 细胞贴壁后，设对照组和 Compound 48/80（20 μg/mL）组，每孔设 5 个复孔，37 ℃孵育 5、20、60 min，1 h 吸弃培养液，用多聚甲醛固定细胞，鬼笔环肽-ph 荧光染色。

2.2.3 Compound 48/80 对 RBL-2H3 细胞 β-氨基已糖苷酶、组胺释放量的影响 RBL-2H3 细胞以 1.5×10^4/mL 的密度接种于 96 孔培养板中培养，细胞贴壁 24 h，吸弃培养液，设对照组和 Compound 48/80（20 μg/mL）组，于 37 ℃孵育 30、60、90 min，取细胞裂解上清液，Elisa 试剂盒测定细胞总组胺和 β-已糖苷酶的释放量。数据均用 $\bar{x}\pm s$ 表示，采用 SPSS 17.0 统计软件进行数据处理，结果均采用单因素方法分析进行显著性检验。

2.3 RTCA 检测不同批次注射用益气复脉（冻干）对 RBL-2H3 细胞的影响

抽取 20 个批次益气复脉进行实时检测，RBL-2H3 细胞以 1×10^5/mL 的细胞浓度接种于 16 孔细胞电极板，每孔 100 μL，监测 24 h，待细胞增殖稳定后，加入不同批次注射用益气复脉（冻干），使终浓度为 100 μg/mL（前期实验通过 MTT 法测定细胞活力摸索出来的最佳给药浓度，此给药浓度，对细胞活力无明显影响，最接近于对照组），每组设 5 个复孔，监测间隔为 5 min，实时监测 24 h，通过 RTCA 系统实时监测细胞状态的变化，并绘制出 RBL-2H3 细胞的实时特征 CI 值曲线。

3 结果

3.1 实时监测 RBL-2H3 细胞的增殖情况

RTCA 实时检测细胞增殖情况 48 h 后，如图 1 所示，可观察到不同密度的细胞均有不同的生长曲线，并且有不同的 CI 值。CI 值依赖于接种浓度，不同浓度细胞的 CI 值从 0.1 到 2.2 不等。RBL-2H3 细胞接种浓度低于 1875/孔时，CI 值在观察时间内未发生明显变化，说明细胞并未增殖；而 RBL-2H3 细胞接种浓度高于 1875/孔时，CI 值在 48 h 内持续增高，说明细胞增殖较活跃；当接种浓度为 7 500/孔或者 15 000/孔时，CI 值在 32 h 内持续增长，且成对数生长趋势，32 h 后进入平台期，细胞增殖活跃。RBL-2H3 细胞接种浓度达到 30 000/孔时，CI 值在 24 h 内持续上升，直到 24 h 达到顶峰，直至 32 h 开始下降。本实验后续研究选取 15 000/孔作为最适的细胞接种浓度。

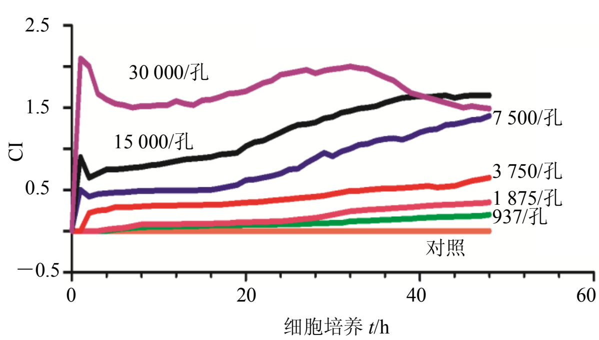


图 1 不同接种密度的 RBL-2H3 细胞 CI 值的变化

Fig. 1 Changes of CI value of RBL-2H3 cells with different inoculation density

3.2 RTCA 监测 Compound 48/80 诱导的 RBL-2H3 细胞脱颗粒

如图 2 所示，与对照组比较，阳性药 Compound 48/80（20 μg/mL）可明显改变 RBL-2H3 细胞正常的增长规律，CI 值在加药后 30 min 内呈先快速上升后下降，30～60 min 略微上升，60 min 后有下降的趋势。结果提示，阳性药 Compound

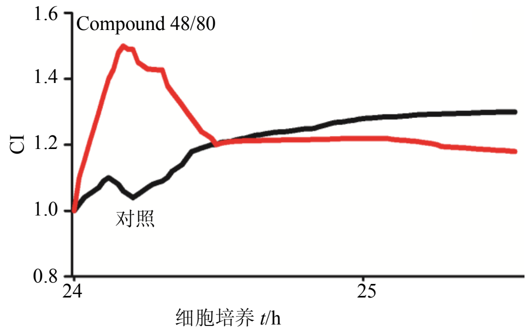


图 2　RTCA 监测 Compound 48/80 诱导的 RBL-2H3 细胞脱颗粒

Fig. 2　RTCA monitoring of Compound 48/80 induced degranulation of RBL-2H3 cells

48/80（20 μg/mL）可诱导 RBL-2H3 细胞脱颗粒、结构变形，在 RTCA 实时监测过程中表现出了特异性变化。

3.3　RTCA 评价 RBL-2H3 细胞脱颗粒方法的验证

3.3.1　甲苯胺蓝染色考察 Compound 48/80 对 RBL-2H3 细胞的影响　RBL-2H3 细胞与 Compound 48/80 分别作用不同时间后，用甲苯胺蓝染色，结果如图 3 所示，对照组细胞生长良好，呈梭形，细胞核清晰可见，细胞质饱满，染成深蓝色；加 Compound 48/80（20 μg/mL）后细胞梭形逐渐变圆甚至多边形，出现明显的脱颗粒现象。

3.3.2　鬼笔环肽染色考察 Compound 48/80 对 RBL-2H3 细胞骨架的影响　RBL-2H3 细胞与 Compound 48/80 分别作用不同时间后，多聚甲醛固定细胞，用鬼笔环肽染色，在荧光显微镜下观察细胞骨架的变化。如图 4 所示，对照组 RBL-2H3 细胞骨架变化不明显，Compound 48/80 组细胞边缘出现折光性，骨架发生明显变化。

3.3.3　Compound 48/80 对 β-己糖苷酶、组胺释放量的影响　如图 5 所示，与对照组比较，Compound 48/80 能显著增加 β-己糖苷酶、组胺释放量（$P<0.01$），提示 Compound 48/80 能诱导 RBL-2H3 细胞脱颗粒。

3.4　RTCA 分析不同批次注射用益气复脉（冻干）对 RBL-2H3 细胞脱颗粒的影响

RTCA 实时监测结果显示，加入不同批次益气复脉（100 μg/mL）对 RBL-2H3 细胞 CI 值均没有明显影响，提示不同批次益气复脉（冻干）不引起 RBL-2H3 细胞脱颗粒，无类过敏反应发生。见图 6。

4　讨论

中药注射剂目前在我国临床上广泛用于各类疾病的治疗，且表现出良好的疗效，为人类医疗健康做出了巨大贡献[5-6]。但随着其应用范围的不断扩大，同时也表现出一系列的不良反应。大量临床研究发现，类过敏反应是中药注射剂的主要不良反应[7-9]。本研究利用 RTCA 系统建立了类过敏反应体外快速评价技术，20 批次注射用益气复脉（冻干）对 RBL-2H3 细胞脱颗粒无明显影响，提示所检测批次的益气复脉均不能引起过敏样反应。

类过敏是由于非 IgE 介导的肥大细胞和嗜碱性粒细胞（RBL-2H3）脱颗粒，释放炎症介质所致。研究者多将 RBL-2H3 细胞作为筛选和评价类过敏反应的可靠体外模型[2, 10]。RBL-2H3 细胞在类过敏反应过程中发生脱颗粒，释放多种生物介质（组胺、β-己糖苷酶等），同时细胞的形态及骨架也会发生明显变化。传统上常用的评价类过敏反应方法为体外检测 RBL-2H3 细胞活性物质的释放[11-12]（如组胺、β-己糖苷酶）以及电镜或扫描观察细胞脱颗粒的形态和骨架变化[13-14]。但这些检测方法都必须对肥大细胞进行化学固定及显色处理，不但失去了活体状态下脱颗粒的生物信息，而且检测过程比较繁琐，敏感性较低。就化学染色法而言，只能监测到某一时项细胞脱颗粒的变化，不能进行连续动态的检测。因此，建立简便易行并可对肥大细胞脱颗粒进行直观实时动态观测的方法十分必要。

RTCA 是一种新兴的、基于电子阻抗技术监测活细胞状态的检测方法，可实时连续检测电极板中细胞形态及结构的变化，且以 CI 的形式反映。本实验中，我们选择 Compound 48/80[15]作为阳性药，运用 RTCA 实时监测 Compound 48/80 对 RBL-2H3 细胞脱颗粒的影响，结果发现，与对照组比较，加入 Compound 48/80 后 CI 值发生明显改变，提示 Compound 48/80 能明显诱导 RBL-2H3 细胞脱颗粒，此结果和本课题组前期研究相一致[16]。接着我们选择甲苯胺蓝和鬼笔环肽染色验证 RBL-2H3 细胞脱颗粒过程中细胞形态和骨架的变化，结果发现，Compound 48/80 作用后可明显引起 RBL-2H3 细胞形态和骨架的变化，与 CI 值的变化相一致。同时我们检测了组胺和 β-己糖苷酶的释放，进一步对其进行验证，结果发现，Compound 48/80 可明显引起组胺和 β-己糖苷酶释放的增加。结果提示，RTCA 系

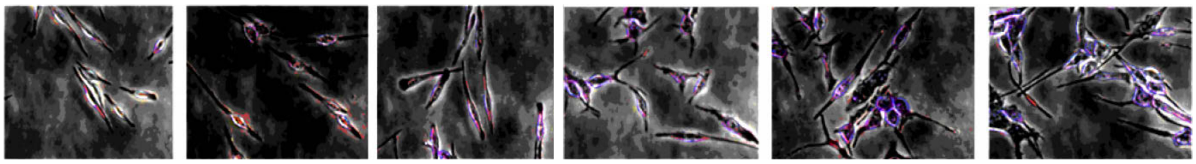


图 3　甲苯胺蓝染色验证 Compound 48/80 对 RBL-2H3 细胞形态的影响

Fig. 3　Toluidine blue staining to verify effect of Compound 48/80 on RBL-2H3 cells morphology

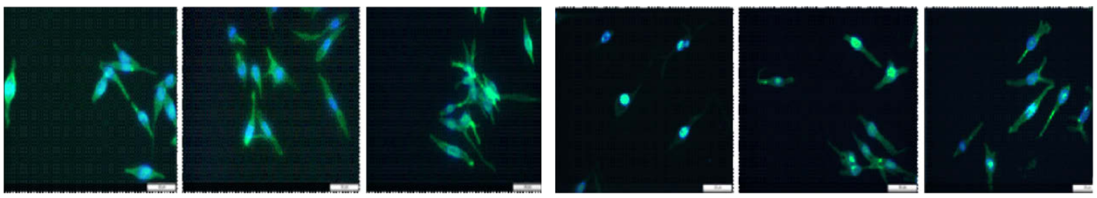
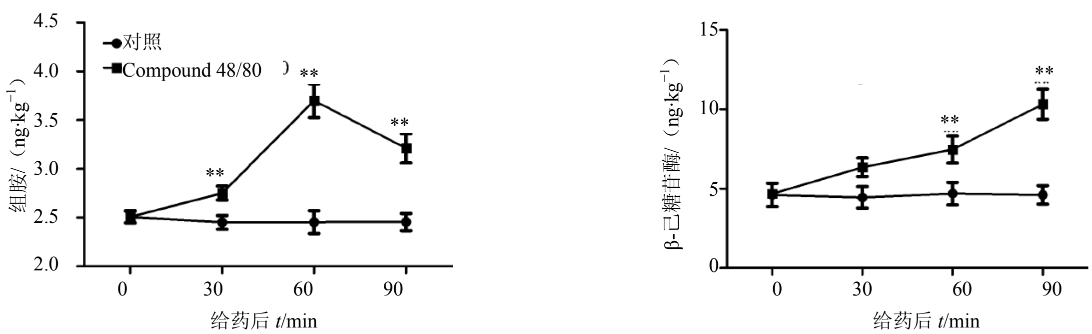


图 4　鬼笔环肽染色验证 Compound 48/80 对 RBL-2H3 细胞骨架的影响

Fig. 4　Phalloidin staining to verify effect of Compound 48/80 on RBL-2H3 Cytoskeleton



与对照组比较：$^{**}P<0.01$

$^{**}P<0.01$ *vs* control group

图 5　Compound 48/80 对 RBL-2H3 细胞 β-己糖苷酶、组胺释放量的影响（$\bar{x}\pm s$, $n=5$）

Fig. 5　Effect of Compound 48/80 on release of beta hexose glucosidase and histamine in RBL-2H3 cells ($\bar{x}\pm s$, $n=5$)

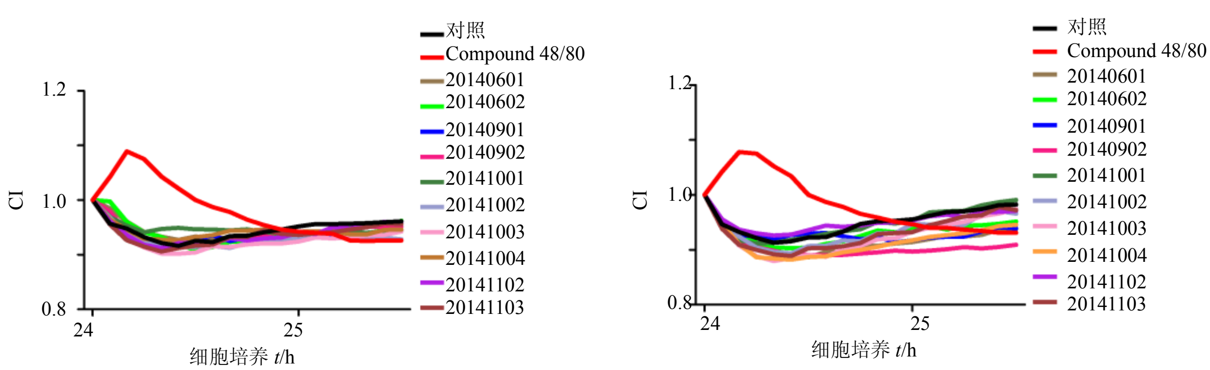


图 6　RTCA 监测不同批次注射用益气复脉（冻干）对 RBL-2H3 细胞脱颗粒的影响

Fig. 6　RTCA monitoring effect of different batches YQFM on degranulation of RBL-2H3 cells

统曲线 CI 值的变化与 RBL-2H3 细胞脱颗粒密切相关，CI 值变化可反映 RBL-2H3 细胞的脱颗粒现象。

基于 RTCA 方法我们选择 20 个不同批次注射用益气复脉（冻干）进行类过敏反应评价，结果发现，益气复脉对 RBL-2H3 细胞 CI 值无影响，无类

过敏现象的发生，与临床反应数据一致均为合格样品。

本研究建立了通过 CI 值变化评价肥大细胞脱颗粒反应的新方法，该方法快速、灵敏、可靠，可实时连续检测肥大细胞的脱颗粒反应，为中药注射剂的临床安全性评价提供了可靠的监测手段，具有广泛的应用价值。

参考文献

[1] 王　钧, 陈天焱, 邵　文. 浅析中药注射液体外类过敏检测方法 [J]. 免疫学杂志, 2011, 12(27): 1083-1085.

[2] 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): 1310-1315.

[3] 刘　炯, 唐家铭, 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): 86-87.

[4] Garcia S N, Gutierrez L, Mcnulty A. Real-time cellular analysis as a novel approach for *in vitro* cytotoxicity testing of medical device extracts [J]. J Biomed Mater Res A, 2013, 101(7): 2097-2106.

[5] 程　芳. 注射用双黄连类过敏反应及其机制研究 [D]. 济南: 山东大学, 2009.

[6] 中华人民共和国国务院新闻办公室.《中国的药品安全监管状况》白皮书 [EB/OL]. (2008-07-18) [2017-12-04]. http://www.sda.gov.cn/WS01/CL0051/31372.html

[7] 张嘉等. 鱼腥草蒸馏液与 3 种增溶剂配伍后对 Beagle 犬的致敏性 [J]. 中国新药杂志, 2008, 17(17): 1494-1498.

[8] 李　静, 郑新元, 唐元泰. 关于中药注射剂安全性问题的探讨 [J]. 中草药, 2010, 41(9): 78-79.

[9] 孙伟伟, 李贻奎, 张金艳, 等. 吐温及其配制的鱼腥草注射液致豚鼠过敏反应的实验研究 [J]. 中药新药与临床药理, 2011, 22 (1): 47-51.

[10] 罗　霞, 王　青, 周　联, 等. 几种常用对细胞脱颗粒的影响 [J]. 中药新药与临床药理, 2009, 20(6): 506.

[11] 黄　丰, 童晓云, 张荣华, 等. 牛膝多糖对抗原诱导的肥大细胞活化的影响 [J]. 中国药理学通报, 2008, 24(10): 1302.

[12] 谢　华, 何韶衡, 程明华, 等. 类糜蛋白酶抑制剂对人结肠肥大细胞组胺释放的影响 [J]. 中国药理学通报, 2004, 20(10): 1135.

[13] 陈振华, 王高华, 罗和生, 等. 抑郁模型大鼠胃窦部变态反应及超微结构改变 [J]. 中国病理生理杂志, 2009, 25(1): 148.

[14] 罗刚健, 甘小亮, 黑子清, 等. 黄芪对失血性休克再灌注肠黏膜肥大细胞活性及肠黏膜炎症反应的影响 [J]. 中国中药杂志, 2007, 32(14): 1436.

[15] 周国茂, 周小勇, 高　进. 丹皮酚对 RBL-2H3 肥大细胞活化脱颗粒的影响 [J]. 中国皮肤性病杂志, 2006, 20(10): 589-591.

[16] 王　曼, 庄朋伟, 周会芳, 等. 基于实时细胞分析的化合物 48 /80 诱导肥大细胞脱颗粒评价研究 [J]. 中国药理学通报, 2014, 30(3): 441-442.