

基于BN大鼠动物模型的注射用丹参多酚酸致敏性研究

张瀛化¹, 张家丰², 万梅绪^{3, 4}, 李智^{3, 4}, 张燕欣^{3, 4}, 李德坤^{3, 4}, 杨晓英^{1*}, 鞠爱春^{3, 4*}

1. 天津医科大学 药学院, 天津 300070

2. 鼎泰(南京)临床医学研究有限公司, 江苏 南京 210000

3. 天津天士力之骄药业有限公司, 天津 300410

4. 天津市中药注射剂安全性评价企业重点实验室, 天津 300410

摘要:目的 通过BN大鼠全身主动过敏实验考察注射用丹参多酚酸的过敏反应症状, 检测致敏后BN大鼠血清中的IgE、组胺及 β -氨基己糖苷酶含量, 考察注射用丹参多酚酸是否产生速发型过敏反应。方法 以卵白蛋白为阳性药物、生理盐水为对照, 注射用丹参多酚酸分为低、中、高(13.43、26.86、134.30 mg/kg) 3个剂量组分别直接对BN大鼠进行致敏和激发, 观察过敏反应症状; 酶联免疫吸附法(ELISA)法检测致敏后动物血清中的IgE、 β -氨基己糖苷酶及组胺的含量变化; 激发后的BN大鼠立即处死, 取肺组织进行HE染色。结果 BN大鼠全身主动过敏实验中仅卵白蛋白组有明显过敏反应; 与对照组比较, BN大鼠致敏血清IgE水平仅卵白蛋白组显著升高($P<0.05$), 组胺检测各组间均无显著性差异, 注射用丹参多酚酸中、高剂量组 β -氨基己糖苷酶释放量显著降低($P<0.05$); BN大鼠激发后, 肺部组织病理结果仅阳性药组肺泡壁凝固性坏死, 肺间质有大量炎症因子浸润。结论 注射用丹参多酚酸未产生由IgE介导的I型过敏反应。

关键词: 注射用丹参多酚酸; 全身主动过敏; BN大鼠; IgE; 组胺; β -氨基己糖苷

中图分类号: R965.3 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376(2020)08-1565-05

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2020.08.016

Sensitization research of Salvianolic Acids for Injection on BN rat model

ZHANG Yinghua¹, ZHANG Jiafeng², WAN Meixu^{3, 4}, LI Zhi^{3, 4}, ZHANG Yanxin^{3, 4}, LI Dekun^{3, 4}, YANG Xiaoying¹, JU Aichun^{3, 4}

1. School of Pharmacy, Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China

2. Tripod(Nanjing) Clinical Research Co.,Ltd. Nanjing 210000, China

3. Tianjin Tasly Pride Pharmaceutical Co., Ltd., Tianjin 300410, China

4. Tianjin Key Laboratory of Safety Evaluation Enterprise of Traditional Chinese Medicine Injections, Tianjin 300410, China

Abstract: **Objective** Investigating the allergic reaction of Salvianolic Acids for Injection (SAFI) by active systemic anaphylaxis in BN rats. detecting the content of IgE, histamine and β -hexosaminidase in the serum of BN rats after sensitization for investigating whether the allergic reaction is immediate hypersensitivity. **Methods** ovalbumin (OVA) was used as positive drug group, stroke-physiological saline solution was used as negative control group, and injection dose of SAFI was divided into low, medium and high (13.43, 26.86, 134.30 mg/kg) groups to sensitize and stimulate BN rats directly, then observing the symptoms of allergic reaction. Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) was used to detect the content of IgE, β -hexosaminidase and histamine in serum of sensitized animals. After stimulation, BN rats were immediately sacrificed to obtain lung tissue for pathological study. **Results** BN rats had no significant difference between drug groups and negative control group in allergic reaction except positive group. In the sensitized serum of BN rats, The result of Enzyme linked immunosorbent assay show that IgE content of positive has significant difference from the rest of the groups. And there was no significant difference among all test groups in detecting the content of histamine. The release content of β -hexosaminidase test in the medium dose group and the high dose group was significantly

收稿日期: 2019-10-15

基金项目: 天津市科技重大专项与工程(18ZXXYSY00120)

第一作者: 张瀛化(1994—), 硕士生, 研究方向为药学。Tel: 18920678132 E-mail: 1523144090@qq.com

*通信作者: 杨晓英(1971—), 教授, 研究方向为高分子材料。Tel: 13001324708 E-mail: lyangxiaoying@tmu.edu.cn

鞠爱春(1973—), 高级工程师, 研究方向为中药注射剂工艺及质量控制。Tel: (022)86342096 E-mail: juach@tasly.com

different with other groups. And the concentration of SAFI was negatively correlated with the release content of β -hexosaminidase. The results of Hematoxylin-Eosin show that the positive group had coagulation necrosis of alveolar wall and extensive inflammatory factor infiltration in the lung stroma, while all the other groups were normal. **Conclusion** The results indicated the SAFI may not cause anaphylaxis reaction in BN rats model, long-term administration of the drug will not cause increasing (IgE, histamine and β -hexosaminidase) indexes *in vivo*.

Key words: Salivianolic Acids for Injection (SAFI); active systemic anaphylaxis; BN rats; IgE; histamine; β -hexosaminidase

中药注射剂是指从药材中提取有效物质而制成的,可通过im、iv或滴注等方式进入人体内的制剂。相对于传统中药剂型,中药注射剂具有起效快、生物利用度高和给药方便等优势,然而随着中药注射剂在临床上的广泛应用,其药品不良反应(adverse drug reaction, ADR)报道也屡见不鲜^[1-2],而目前中药注射剂在临床中的ADR主要是过敏反应。过敏反应分为4种类型,其中由特异性抗体(IgE)介导的变态反应称为I型过敏反应,也叫速发型超敏反应,该反应会激活细胞释放活性介质(组胺、 β -氨基己糖苷酶和5-羟色胺等)^[3-5],这些活性介质引发呼吸道过敏反应、消化道过敏反应、皮肤过敏反应或全身性过敏反应。常见的I型超敏反应有过敏性休克,药物引起的药疹,其临床表现包括皮肤、黏膜红疹、轻微黄斑或皮疹等,严重者出现呼吸困难、血压下降、休克甚至死亡等^[6-8]。注射用丹参多酚酸具有良好的活血、化瘀、通脉等功效,临床主要用于卒中病中经络(轻中度脑梗死)恢复期治疗,临床使用安全,偶有患者发生皮疹、头晕、头昏、头胀痛等不良反应^[6]。

已有研究表明,BN大鼠血清中IgE表达水平较高,更容易模拟临床过敏患者的生理状态,是国内外研究速发型过敏反应的适宜动物模型^[9-12]。鉴于以上理论和研究结果的支持,本研究采用BN大鼠建立速发型超敏反应模型,通过酶联免疫吸附法(ELISA)检测致敏动物体内血清中IgE、组胺及 β -氨基己糖苷酶等活性介质的含量来考察注射用丹参多酚酸是否会发生速发型超敏反应。

1 材料

1.1 药品和主要试剂

注射用丹参多酚酸,批号20180901,天津天士力之骄药业有限公司; β -氨基己糖苷酶检测试剂盒(批号m1063085)、大鼠组胺ELISA检测试剂盒(批号m1003022)、RAT(IgE)ELISA检测试剂盒(批号m1037602),均购于上海酶联生物科技有限公司。卵白蛋白,货号A5253-500G,批号SLBL739 2V, sigma 公司;0.9%注射用氯化钠,批号

1612193402,石家庄四药有限公司。

1.2 主要仪器

多功能酶标仪,瑞士TECAN公司;高速离心机,美国Thermo公司;电子分析天平,瑞士Mettler公司。

1.3 动物

SPF级BN大鼠,雄性,200~220 g,8~10周龄,购于北京维通利华实验动物技术有限公司,许可证号SCXK(京)2016-0006。

2 方法

2.1 动物分组

适应期结束后,随机分成5组:对照组、卵白蛋白(阳性对照)组和注射用丹参多酚酸低、中、高剂量组,每组12只,致敏结束后随机每组取6只用于取血清(血清中IgE、组胺及 β -氨基己糖苷酶检测),另外每组6只用于全身主动过敏实验的激发。

2.2 剂量设计

注射用丹参多酚酸使用说明书临床用量为130 mg/d,按照人体质量平均60 kg计算,相当于2.17 mg/kg。按照FDA推荐的人与大鼠剂量换算系数(6.2)^[13],计算得出13.43 mg/kg为大鼠的临床等效剂量,设置低、中、高剂量为13.43、26.86、134.30 mg/kg。致敏阶段:BN大鼠按体质量5 mL/kg体积ip给药,1 mL/次,每只大鼠平均体质量200 g,因此配制药物浓度分别为2.686、5.372、26.86 mg/mL。激发阶段:BN大鼠尾iv给药,2倍给药剂量,低、中、高剂量分别为26.86、53.72、268.60 mg/kg。

2.3 BN大鼠全身主动过敏实验

2.3.1 致敏阶段 BN大鼠称质量记录,对照组ip 1 mL生理盐水,卵白蛋白组ip 20 mg/mL卵白蛋白溶液(生理盐水配制),注射用丹参多酚酸药液低、中和高剂量组均ip对应的药液,隔日注射,共致敏5次。

2.3.2 激发阶段 于第5次致敏后14 d时,BN大鼠尾iv 2倍致敏剂量的相应各组药物后,30 min内观察大鼠全身过敏反应症状。

2.3.3 全身过敏反应症状及评价标准 依照国家

食品药品监督管理局《中药、天然药物一般药理研究学研究技术指导原则》(2005版)中关于《药物刺激性、过敏性和溶血性研究技术指导原则》里对过敏性实验方法项下的全身主动过敏试验的判断标准(0 正常、1 不安宁、2 竖毛、3 发抖、4 搔鼻、5 喷嚏、6 咳嗽、7 呼吸急促、8 排尿、9 排粪、10 流泪、11 呼吸困难、12 哮喘音、13 紫癜、14 步态不稳、15 跳跃、16 喘息、17 痉挛、18 旋转、19 潮式呼吸、20 死亡)及评价标准^[4](表1),对大鼠激发后30 min,观察BN大鼠的全身过敏反应症状评分并记录。

表1 全身致敏性评价标准

Table 1 Evaluation criteria of systemic sensitization

症状	评价标准	过敏反应判断
0	—	阴性
1~4 症状	+	弱阳性
5~10 症状	++	阳性
11~19 症状	+++	强阳性
20	++++	极强阳性

2.3.4 BN大鼠肺部病理学检查 激发后的BN大鼠观察(30 min)后,立即处死,解剖,摘取完整肺部,固定于4%多聚甲醛溶液中,在-4℃冰箱中储存3~4 d,待组织固定后进行组织脱水、包埋并切片,进行HE染色和显微镜观察。

2.4 血清中IgE、组胺及β-氨基己糖苷酶指标检测

2.4.1 致敏血清制备 取末次致敏后14 d的BN大鼠用10%水合氯醛麻醉后,快速腹主动脉取血于10 mL的EP管中,冰浴中静置2~3 h后,3 000 r/min离心20 min,取上层血清,-20℃保存。2周内用于IgE、组胺及β-氨基己糖苷酶的测定。

2.4.2 组胺释放量测定 按照说明书进行操作,标准品加样:设置标准孔,每孔加不同浓度的标准品50 μL;加样:分别设空白孔(不加样品及酶标试剂)、待测样品孔。在酶标包被板上加“2.4.1”项BN大鼠血清50 μL(样品最终稀释度为5倍)。轻轻晃动混

匀;加酶:每孔加入酶标试剂100 μL,空白孔除外,封板膜封板,37℃孵育60 min。洗涤:小心揭掉封板膜,弃去液体,每孔加满洗涤液,静置30 s后弃去,如此反复5次,拍干。显色:每孔加入显色剂A 50 μL,再加入显色剂B 50 μL,轻轻震荡混匀,避光37℃孵育15 min。终止:每孔加入终止液50 μL,终止反应。测定:以空白孔调零,450 nm波长依序测量各孔的吸光度(A)值。

2.4.3 IgE释放量测定 按照说明书进行操作,基本同“2.4.2”项。

2.4.4 β-氨基己糖苷酶释放量测定 按照说明书进行操作,基本同“2.4.2”项。

以上各实验计算均以标准物的浓度为横坐标,A值为纵坐标,绘制标准曲线,计算标准曲线直线回归方程,根据样品A值由标曲算出相对应的浓度,再乘以稀释倍数,即为样品实际浓度。各组实验数据使用SPSS 17.0软件进行处理,使用GraphPad Prism 7软件进行绘图。

3 结果

3.1 BN大鼠主动全身过敏实验结果

仅卵白蛋白组6只BN大鼠有明显过敏反应如竖毛、呼吸急促、排粪、静卧、步态不稳等,对照组和注射用丹参多酚酸低、中、高3个剂量组均未出现明显过敏反应现象。见表2。

3.2 BN大鼠肺部病理实验结果

如图1所示,BN大鼠致敏后,卵白蛋白组肺泡壁凝固性坏死、炎细胞浸润;而其他各组肺泡完整且呈空泡状薄壁结构。

3.3 IgE、组胺及β-氨基己糖苷酶释放量测定结果

如表3所示,与对照组比较,注射用丹参多酚酸组IgE释放量无明显差异,卵白蛋白组显IgE释放量显著升高($P < 0.05$);组胺释放量各组间均无显著性差异;与对照组比较,注射用丹参多酚酸中、高剂量组β-氨基己糖苷酶释放量显著降低($P < 0.05$),且呈剂量相关。

表2 BN大鼠主动过敏评分判定结果

Table 2 Results of active allergy score of BN rats

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	n/只	出现过敏症状动物数					判定结果
			—	+	++	+++	++++	
对照	—	6	6	0	0	0	0	阴性
卵白蛋白	20	6	0	0	4	2	0	阳性
注射用丹参多酚酸	13.43	6	6	0	0	0	0	阴性
	26.86	6	6	0	0	0	0	阴性
	134.30	6	6	0	0	0	0	阴性

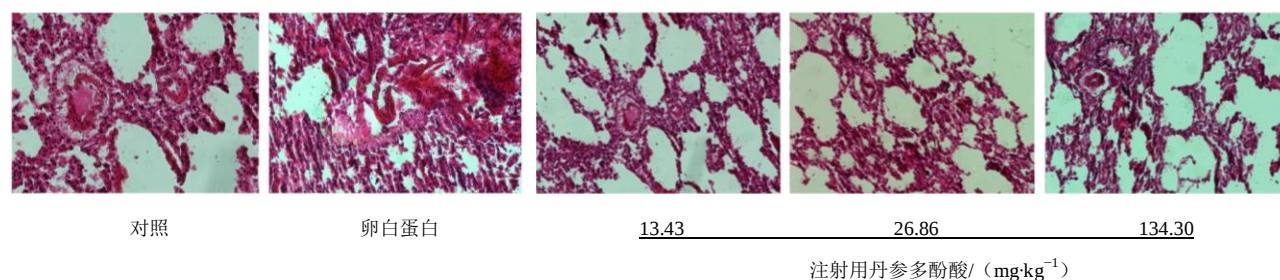


图1 BN大鼠肺部切片HE染色(200×)

Fig. 1 HE staining section of lung in BN rats (200×)

表3 BN大鼠血清IgE、组胺、β-氨基己糖苷酶水平测定($\bar{x} \pm s, n=6$)Table 3 Determination of serum IgE, histamine and β-aminohexosidase levels in BN rats($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	IgE/(μg·mL ⁻¹)	组胺/(ng·mL ⁻¹)	β-氨基己糖苷酶/(ng·mL ⁻¹)
对照	—	13.47±1.23	12.67±0.67	8.65±0.39
卵白蛋白	20	17.44±0.72*	13.22±0.37	8.18±0.28
注射用丹参多酚酸	13.43	12.76±0.85	13.04±0.46	8.00±0.90
	26.86	11.44±0.94	12.66±0.91	7.22±0.56*
	134.30	11.74±0.88	12.89±1.27	6.56±0.93*

与对照组比较: * $P < 0.05$ * $P < 0.05$ vs control group

4 讨论

近年来中药注射液在临床使用过程中出现的不良反应日益引起大家的广泛关注^[15],尤其是过敏反应占总不良反应的比例最高^[1]。前期预实验采用BN大鼠和Wistar大鼠2种动物模型进行主动全身过敏实验,同等剂量的阳性药在Wistar大鼠身上仅出现搔鼻、发抖等轻微一过性的过敏反应症状,而BN大鼠除了搔鼻、竖毛等现象外,还能出现较为明显的步态不稳、排粪、呼吸急促等明显过敏反应症状,因此正式研究采用BN大鼠作为本次实验的I型过敏反应的动物模型,这也与文献报道“BN大鼠较Wistar大鼠可能更适宜作为I型过敏反应的动物模型”一致^[16]。

另外有文献报道,机体内的IgE、组胺和β-氨基己糖苷酶的含量一般与过敏反应发生程度呈直接正相关^[7-8],因此本研究检测致敏14 d后BN大鼠体内血清IgE、组胺和β-氨基己糖苷酶含量,结果发现,IgE的含量仅阳性药组与其余组有显著性差异,给药组与对照组均无显著性差异;组胺释放量各组间均无显著性差异;与对照组比较,注射用丹参多酚酸中、高剂量组β-氨基己糖苷酶释放量显著降低,且呈剂量相关性,说明β-氨基己糖苷酶释放量与注射用丹参多酚酸呈负相关,与过敏反应无关。

全身主动过敏实验、肺部病理切片检查和血清中IgE的检测结果均为阴性,注射用丹参多酚酸对

BN大鼠多次给药后未产生I型过敏反应,推测临床上偶有发生的皮疹等轻微不良反应可能不是由于I型过敏反应导致,课题组后续将对注射用丹参多酚酸从非临床角度进一步考察其是否发生类过敏反应。

参考文献

- [1] 王茜. 中药注射液不良反应213例分析[J]. 临床合理用药杂志, 2019, 12(19): 13-14.
- [2] 武晓红. 中药注射剂不良反应与安全性评价研究[J]. 山西中医学院学报, 2019, 20(1): 76-77, 79.
- [3] Marshall J S, Bell E B. Induction of an auto-anti-IgE response in rats I. Effects on serum IgE concentrations [J]. Eur Immunol, 1985, 15(3): 272-277.
- [4] van Toorenenbergen A W, van Swieten P, Aalberse R C. Measurement of IgE on rat mast cells: relation to serum IgE and allergen-induced histamine release [J]. Scand Immunol, 1983, 17(1): 13-18.
- [5] 吴长有. 卵白过敏反应—抗原特异性IgE免疫复合物的检测[J]. 国外医学: 免疫学分册, 1987(6): 332.
- [6] 唐浩伦, 刘悦, 解生旭, 等. 中药注射剂过敏及类过敏反应机制及评价方法概述[J]. 中国中西医结合杂志, 2018, 38(4): 508-512.
- [7] Stone S F, Phillips E J, Wiese M D, et al. Immediate-type hypersensitivity drug reactions [J]. Clin Pharmacol, 2014, 78(1): 1-13.
- [8] Waheed A, Hill T, Dhawan N. Drug Allergy [J]. Prim Care, 2016, 43(3): 393-400.

- [9] Sun N, Zhou C, Pu Q, et al. Allergic reactions compared between BN and Wistar rats after oral exposure to ovalbumin [J]. J Immunotoxicol, 2013, 10(1): 67-74.
- [10] 陈如程, 李娜, 樊柏林, 等. BN大鼠致敏动物模型研究[J]. 中国食品卫生杂志, 2014, 26(1): 14-17.
- [11] 孙拿拿, 梁春来, 张倩男, 等. BN大鼠致敏动物模型研究[J]. 卫生研究, 2012, 41(3): 459-461.
- [12] 易艳, 李春英, 赵雍, 等. 动物类中药注射剂的安全性研究进展[J]. 中国中药杂志, 2018, 43(22): 4391-4396.
- [13] Contrera J F, Matthews E J, Kruhlak N L, et al. Estimating the safe starting dose in phase I clinical trials and no observed effect level based on QSAR modeling of the human maximum recommended daily dose [J]. Regul Toxicol Pharmacol, 2004, 40(3): 185-206.
- [14] 国家食品药品监督管理总局. 化学药物刺激性、过敏性和溶血性研究技术指导原则 [EB/OL]. (2005-03-18) [2009-04-27]. <https://wenku.baidu.com/view/3988401ac0c708a1284ac850ad02de80d5d806ea.html>
- [15] 王珂欣, 高丽, 秦雪梅, 等. 中药注射剂色差与安全性研究进展[J]. 中草药, 2019, 50(9): 2219-2223.
- [16] 李中港. BN大鼠与Wistar大鼠I型超敏反应敏感性的比较 [A]. 中国药学会 (Chinese Pharmaceutical Association)、天津市人民政府. 2010年中国药学会大会暨第十届中国药师周论文集 [C]. 天津, 2010.