

基于RBL-2H3与P815细胞体外模型的聚山梨酯80、维生素K₁注射剂、注射用两性霉素B脂质体类过敏反应潜在风险评价

徐梦婕^{1,2}, 陈华英², 洪敏², 邱云良^{2*}

1. 中国医药工业研究总院, 上海 200040

2. 上海益诺思生物技术股份有限公司, 上海 200135

摘要: 目的 基于RBL-2H3及P815细胞系, 选择Compound 48/80 (C48/80) 为阳性药构建类过敏反应的体外评价模型, 初步评价聚山梨酯80、维生素K₁注射剂(VK₁I)、注射用两性霉素B脂质体(ABL)导致类过敏反应的潜在风险。方法 应用CCK-8法检测C48/80(10、30、60、100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)、聚山梨酯80(2.5、5.0、10.0、50.0 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$)、VK₁I(0.625、1.250、2.500、5.000、10.000 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$)、ABL(0.125、0.250、0.500、1.000、2.000 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$)对RBL-2H3、P815细胞活性的影响, 计算半数抑制浓度(IC₅₀), 阳性药及受试物均选择<IC₅₀浓度进行后续实验; 结合中性红染色形态学观察, 研究阳性药及受试物的细胞毒性; 流式细胞仪检测Annexin V阳性细胞率及Fluo-4AM标记率; ELISA法检测 β -氨基己糖苷酶(β -Hex)及组胺释放量。结果 中性红染色结果显示, 在C48/80作用下RBL-2H3、P815细胞部分皱缩或者偶有破损, 但大部分细胞仍维持完整细胞形态; 在聚山梨酯80、ABL、VK₁I高浓度的作用下, RBL-2H3、P815细胞大部分仍能保持正常形态。C48/80在<IC₅₀浓度时能够引起较强的细胞脱颗粒反应, 模型建立成功。聚山梨酯80、VK₁I在<IC₅₀浓度时均出现了浓度相关性细胞脱颗粒现象, 与对照组比较, 2种细胞聚山梨酯80 2.5、5.0 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 组及VK₁I 0.75、1.50、3.00 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 组Annexin V阳性率、Fluo-4AM标记率均显著升高($P<0.05$ 、 0.01); 聚山梨酯80 2.5、5.0 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 组及VK₁I 1.5、3.0 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 组的组胺、 β -Hex释放量显著升高($P<0.05$ 、 0.01)。ABL组Annexin V阳性率浓度相关性升高趋势不明显, 与对照组比较, 仅P815细胞ABL 2.00 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 组显著升高($P<0.05$), 且升高幅度不大; 与对照组比较, 2种细胞ABL 1.2 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 组的Fluo-4AM标记率和组胺、 β -Hex释放量显著升高($P<0.05$ 、 0.01)。结论 聚山梨酯80、VK₁I高浓度具有导致类过敏反应产生风险, ABL还需进一步研究。

关键词: 类过敏反应; RBL-2H3细胞; P815细胞; 细胞脱颗粒; 聚山梨酯80; 维生素K₁注射剂; 注射用两性霉素B脂质体; Annexin V; Fluo-4AM; β -氨基己糖苷酶; 组胺

中图分类号: R965.3 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376(2023)05-0952-10

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2023.05.004

Evaluation of tween 80, Vitamin K₁ Injection and Amphotericin B Liposomes pseudoallergy *in vitro* based on RBL-2H3 and P815 cell models

XU Mengjie^{1,2}, CHEN Huaying², HONG Min², QIU Yunliang²

1. China State Institute of Pharmaceutical Industry, Shanghai 200040, China

2. Shanghai Innostar Bio-Tech Co., Ltd., Shanghai 200135, China

Abstract: Objective To establish an *in vitro* pseudoallergy model based on RBL-2H3 and P815 cell lines and select Compound 48/80 as positive drug to evaluate potential of tween 80, Vitamin K₁ Injection (VK₁I) and Amphotericin B Liposomes (ABL) to induce pseudoallergy. **Methods** Applying CCK-8 method to detect the effects of C48/80 (10, 30, 60, 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), polysorbate 80 (2.5, 5.0, 10.0, 50.0 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$), VK₁I (0.625, 1.250, 2.500, 5.000, 10.000 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$), ABL (0.125, 0.250, 0.500, 1.000, 2.000 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) on the activity of RBL-2H3 and P815 cells, and the half inhibitory concentration (IC₅₀) were calculated. The positive drug and test substance were selected at concentrations < IC₅₀ for subsequent experiments. Combining neutral red staining with morphological observation to study the cytotoxicity of positive drugs and test substances. The percentage of Annexin V positive cells and the labeling rate of Fluo-4AM were detected by Flow cytometry staining, the release of β -hexosaminidase (β -Hex) and histamine were

收稿日期: 2022-12-28

基金项目: 上海市科委实验动物研究领域专项(19140901300)

第一作者: 徐梦婕, 女, 药理学硕士研究生, 研究方向为药理学与毒理学。E-mail: xumengjie2021@126.com

*通信作者: 邱云良, 男, 研究员, 主要从事新药临床前评价研究。E-mail: ylqiu@innostar.cn

detected by ELISA. **Results** The results of neutral red staining showed that under the action of C48/80, RBL-2H3 and P815 cells were partially shrunk or occasionally damaged, but most cells still maintained intact cell morphology. Under the action of high concentrations of polysorbate 80, ABL, and VK₁I, most RBL-2H3 and P815 cells can still maintain their normal morphology. C48/80 can induce strong cell degranulation reaction at concentrations below IC₅₀, and the model was successfully established. Both polysorbate 80 and VK₁I showed concentration dependent cell degranulation at concentrations below IC₅₀. Compared with the control group, the 2.5, 5.0 mg·mL⁻¹ group of polysorbate 80 and the 0.75, 1.50, and 3.00 mg·mL⁻¹ group of VK₁I showed a significant increase in the positive rate of Annexin V and the labeling rate of Fluor-4AM ($P < 0.05, 0.01$). The release of histamines and β -Hex in the groups of polysorbate 80 2.5, 5.0 mg·mL⁻¹ and VK₁I 1.5, 3.0 mg·mL⁻¹ significantly increased ($P < 0.05, 0.01$). The concentration correlation of Annexin V positive rate in the ABL group showed no significant increase. Compared with the control group, only P815 cells in the ABL 2.00 mg·mL⁻¹ group showed a significant increase ($P < 0.05$), and the increase was not significant. Compared with the control group, the labeling rate of Fluo-4AM and the release of histamine and β -Hex in the ABL 1 and 2 mg·mL⁻¹ groups increased significantly ($P < 0.05, 0.01$). **Conclusion** Some concentrations of Tween-80 and VK₁I have the risk of pseudoallergy, and ABL need further study.

Key words: pseudoallergy reaction; RBL-2H3 cell; P815 cell; cell degranulated; polysorbate 80; Vitamin K₁ Injection; Amphotericin B Liposomes for Injection; Annexin V; Fluo-4AM; β -hexosaminidase; histamine

药品应用过程中产生不良反应,是严重威胁公众健康的重要问题,过敏反应是不良反应中常见的种类,而研究发现一些药物容易引起类似过敏症状不良反应,不依赖特异性免疫机制,不需要二次或多次激发,反应发生迅速,首次用药后约30 min内即可发生,具有明显量效关系,国内外的学者称之为“类过敏反应”或“假过敏反应”^[1-2]。已经有文献报道过,某类药物作用可能会发生类过敏反应,例如阿片类药物、非甾体抗炎药、纳米脂质体类药物、中药注射剂、局麻药等^[3-7]。由于类过敏反应临床发生较快且难以预测,并且与多类药物可能相关,因此需要建立1种评价方法用于早期预测或者评估药物风险。

药物过敏类反应的临床前安全性评价属于免疫毒性的范畴。但国内外免疫相关指导原则中均未提及类过敏反应,未有权威性的技术指导原则,有待于建立能通用于检测类过敏反应的临床前安全性评价模型。一些研究应用体内动物模型包括大鼠、豚鼠、小鼠、猫、狗、猪和食蟹猴等^[8-10]研究类过敏反应,但不同的模型对各种化合物表现出不同的敏感性,且目前没有通用和可靠的动物模型来评估潜在过敏反应。一些体外模型,主要是基于细胞株建立的通过观察药物作用后细胞脱颗粒情况检测模型,已报道可用的细胞系包括原代腹腔肥大细胞、大鼠嗜碱性白血病细胞(RBL-2H3)、小鼠骨髓源性肥大细胞(BMMC)、小鼠肥大细胞瘤(P815)、人外周嗜碱性白血病细胞(Ku812)、人肥大细胞(LAD2及LMC-1)等,均能较好地模拟体内细胞脱颗粒反应^[11-12]。其中RBL-2H3是最常用的细胞

模型,已用于中药注射剂等的安全评价,是细胞脱颗粒检测较为成熟的细胞模型^[13];而P815、Ku812细胞模型也有研究证明能够快速早期地检测到细胞脱颗粒,P815细胞更具有潜在应用价值^[11]。

本研究拟用RBL-2H3与P815细胞,以C48/80作为阳性药,检测包括形态学、细胞脱颗粒释放介质、AnnexinV阳性率、钙离子浓度等的细胞脱颗粒指标,建立用于类过敏反应评价的体外细胞模型,并应用建立的模型初步评价聚山梨酯80、维生素K₁注射剂(VK₁I)、注射用两性霉素B脂质体(ABL)导致类过敏反应发生的潜在风险。

1 材料

1.1 细胞株及培养条件

RBL-2H3细胞(购自中国科学院上海细胞库),用含15% FBS、1%双抗、1%丙酮酸钠以及1% L-谷氨酰胺的MEM培养基培养;P815细胞(购自中国科学院上海细胞库),用含10% FBS、1%双抗以及1%丙酮酸钠的DMEM培养基培养,培养于37℃、5% CO₂的恒温培养箱中,每2~3天以1:3或1:4比例进行细胞传代,该传代周期可使细胞保持在对数生长期。

1.2 主要仪器

SpectraMax® i3 酶标仪(美国Molecular Innovations);CytoFLEX流式细胞仪(贝克曼库尔特有限公司);371二氧化碳培养箱(Thermo公司);ST16R离心机(Thermo公司);XP56DR天平(Mettler Toledo公司);BSC-1600IIA2生物安全柜(苏净集团苏州安泰空气技术有限公司);HYCD-205冷藏冷冻箱(海尔集团);IX71倒置显微

镜(OLYMPUS公司);DP-2SD电热恒温水浴锅(上海帝魄科学仪器有限公司)。

1.3 受试物及主要试剂

聚山梨酯80(国药集团化学试剂有限公司,批号20210401);VK₁I(成都倍特药业股份有限公司,批号210304);ABL(锋克松,按两性霉素B计1 000 U·mg⁻¹,上海上药新亚药业有限公司,批号H20020892);Compound 48/80(C48/80,批号0000116957),购于Sigma公司。

DMEM培养基(批号2307629)、MEM培养基(批号2187095)、胎牛血清(批号2128196)、丙酮酸钠(批号2193350)、L-谷氨酰胺(批号2192721)、双抗(批号129211)、胰蛋白酶(批号2318829),购于Gibco公司;1×磷酸盐(PBS)缓冲液(批号20210419)、改良台氏液(批号20210414)、D-Hanks缓冲液(批号20210510),购于Solarbio公司;Cell Counting Kit-8(CCK-8,批号BCCF4205)、细胞裂解液(Triton X-100,批号SLCG7494),购于Sigma公司;Annexin V结合缓冲液(批号B341944)、FITC Annexin V(批号B324953),购于BioLegend公司;组胺试剂盒(Elabscience公司,批号TRA95V5DE6);大鼠β-氨基己糖苷酶(β-Hex)试剂盒(批号093008002208470930)、小鼠β-Hex试剂盒(批号093008002202140930),上海江莱生物科技有限公司;钙离子荧光探针(Fluo-4 AM, Beyotime公司,批号041221210930)。

2 方法

2.1 CCK-8法观察受试物对细胞活性的影响

此步骤为类过敏反应评价的前期探索,旨在确定进一步脱颗粒指标检测的受试物作用浓度。

取对数生长期细胞,RBL-2H3细胞消化后收集细胞,P815细胞直接收集,20℃、1 000 r·min⁻¹离心5 min,离心后弃去废液,细胞计数后用培养基按照 $1.5 \times 10^5 \cdot \text{mL}^{-1}$ 的密度制成细胞悬液,准备若干96孔板,以每孔100 μL悬液接种,接种后培养24~72 h。加入C48/80(10、30、60、100 μg·mL⁻¹)、聚山梨酯80(2.5、5.0、10.0、50.0 mg·mL⁻¹)、VK₁I(0.625、1.250、2.500、5.000、10.000 mg·mL⁻¹)、ABL(0.125、0.250、0.500、1.000、2.000 mg·mL⁻¹),受试物均用改良台氏液配制,对照组给予改良台氏液,每组至少3个重复孔,并设置本底组(仅培养基)。放置培养箱培养约2 h后,CCK-8法检测细胞活力,用酶标仪在450 nm波长下检测吸光度(A)值,采用SPSS 21.0软件计算各受试物的半数抑制浓度(IC₅₀)。

2.2 中性红染色后形态观察

细胞接种操作同“2.1”项,接种后培养24~72 h。加入C48/80(RBL-2H3细胞30 μg·mL⁻¹、P815细胞15 μg·mL⁻¹)、聚山梨酯80(0.625、1.250、2.500、5.000 mg·mL⁻¹)、VK₁I(0.375、0.750、1.500、3.000 mg·mL⁻¹)、ABL(0.25、0.50、1.00、2.00 mg·mL⁻¹),受试物均用改良台氏液配制,对照组给予改良台氏液。各个孔板加药30 min后移液枪吸去上清,用PBS缓冲液冲洗1~2次后分2部分观察:①每组取3个孔加入100 μL PBS缓冲液后直接于倒置显微镜400×观察并拍摄照片;②每组取3个孔弃去废液后每孔加入100 μL 0.1%中性红染色液,反应约10 min后吸去染液,用PBS缓冲液冲洗2次后再每孔加入100 μL PBS缓冲液,后于倒置显微镜400×观察并拍摄照片。

2.3 Annexin V阳性细胞率

细胞膜磷脂酰丝氨酸与蛋白Annexin V有很强的亲和力,Annexin V蛋白能参与细胞脱颗粒胞吐转运颗粒,在FITC通道应用流式细胞仪检测Annexin V阳性率,检测受试物作用后胞吐脱颗粒情况。

取对数期的RBL-2H3、P815细胞,按照 $1 \times 10^6 \cdot \text{mL}^{-1}$ 的密度制成细胞悬液,向每只1.5 mL离心管中加入500 μL细胞悬液后放入培养箱(37℃、5% CO₂)培养1~3 h。培养结束后,向离心管中加入不同浓度受试物,组别设置同“2.2”项,每组设置3个重复。受试物作用30 min后,将离心管放入碎冰中冰浴10 min终止反应,后取出离心管4℃、3 000 r·min⁻¹离心5 min,弃去上清液,用冷PBS清洗细胞,去除残留的受试物。再次4℃、3 000 r·min⁻¹离心5 min,弃去上清液。本实验设置阴性对照,细胞接种及给药操作同对照组,向阴性对照离心管中加入100 μL Annexin V Binding Buffer,向其他组离心管中加入100 μL Annexin V溶液,避光反应15 min。反应结束后将离心管放入高速冷冻离心机中3 000 r·min⁻¹离心5 min(4℃),弃去上清液,再向每支离心管中加入500 μL Annexin V Binding Buffer混悬细胞,将所得细胞悬液用流式细胞仪在FITC通道检测阳性率。

2.4 细胞钙离子浓度变化

钙离子浓度变化是促进胞吐作用、导致细胞脱颗粒原因之一,Fluo-4AM是最常用的钙离子探针之一,本实验应用流式细胞仪检测Fluo-4AM标记率,检测细胞钙离子浓度变化情况。

细胞处理过程及分组同“2.3”项,各组分别加药后,继续在培养箱(37 °C、5% CO₂)孵育 30 min, 4 °C、3 000 r·min⁻¹离心 5 min 去上清。用无钙的 D-Hanks 缓冲液洗 2 遍,加入 100 μL 的 Fluo-4AM(终浓度为 5 μmol·L⁻¹)避光孵育 30 min 后, 4 °C、3 000 r·min⁻¹离心 5 min 去上清,用无钙的 D-Hanks 缓冲液洗 2 遍,去除残留的 Fluo-4AM,加入 500 μL 无钙的 D-Hanks 缓冲液继续孵育 30 min,确保 Fluo-4AM 在细胞内完全酯化后,在流式细胞仪 FITC 通道检测 Fluo-4AM 标记率。

2.5 细胞上清炎症介质释放

细胞接种及分组给药操作同“2.2”项,另增设裂解液(1%的 Triton X-100)组,加药后 30 min,每孔取 50 μL 细胞上清液,试剂盒法测定组胺及 β-Hex 含量。进一步计算相对释放率:定义裂解液组为“总酶组”(细胞裂解后释放量总数)。

相对释放率=受试物组相对浓度/总酶组相对浓度

2.6 统计学分析

数据均用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 21.0 软件进行统计学分析,单因素方差分析/独立样本 *t* 检验。

3 结果

3.1 CCK-8法检测受试物 IC₅₀

如表 1 所示,阳性药 C48/80 的 2 个细胞株的 IC₅₀ 有一定差异,而其他受试物 2 个细胞株的 IC₅₀ 差异不大,后续受试物选择 <IC₅₀ 的作用浓度,此时细胞毒性较低。

表 1 受试物与阳性药对 RBL-2H3、P815 细胞的 IC₅₀

Table 1 IC₅₀ of test substance and positive drug on RBL-2H3 and P815 cells

组别	IC ₅₀ /(mg·mL ⁻¹)	
	RBL-2H3 细胞	P815 细胞
C48/80	0.061 17	0.019 81
聚山梨酯 80	34.19	10.36
ABL	3.50	2.29
VK ₁ I	3.602	3.87

3.2 药物作用后形态学观察

由图 1(聚山梨酯 80、ABL、VK₁I 仅出示最高作用浓度)可知,RBL-2H3 细胞为贴壁细胞,在 400 倍显微镜下观察,正常细胞形状为较为饱满的梭形,边缘光滑透光率较好,P815 细胞为悬浮细胞,正常细胞为饱满球形,边缘光滑透光率较好。在阳性药 C48/80 作用下细胞部分皱缩或者偶有破损,但大部分细胞仍维持完整细胞形态。在聚山梨酯 80、

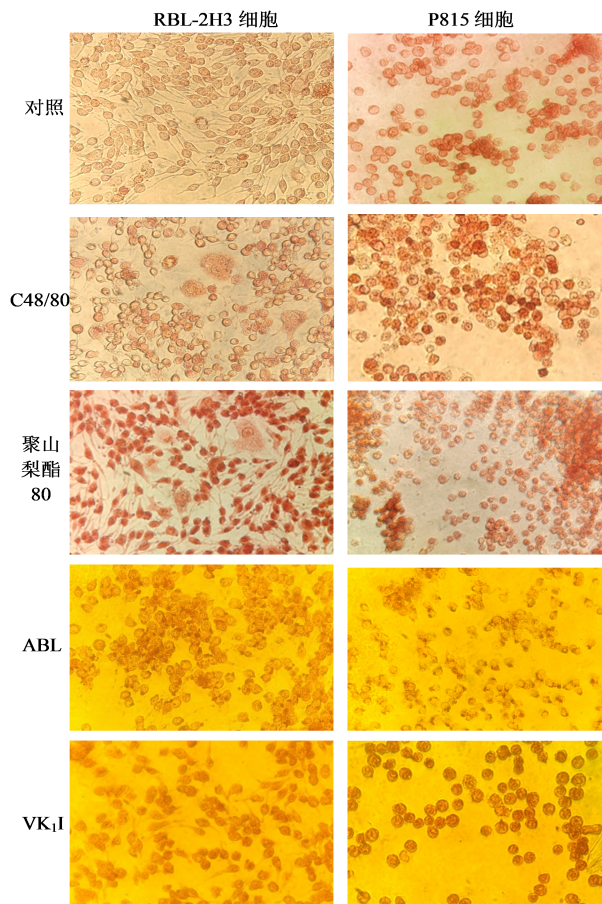


图 1 RBL-2H3、P815 细胞中性红染色结果

Fig. 1 Neutral red staining results of RBL-2H3 and P815 cell

ABL、VK₁I 高浓度的作用下,RBL-2H3、P815 细胞大部分仍能保持正常形态。结果初步证明细胞脱颗粒不是由细胞破损导致的,可以初步将细胞脱颗粒的检测情况判定为类过敏反应而非细胞毒性。

3.3 C48/80 作用后细胞脱颗粒检测结果

3.3.1 Annexin V 阳性率测定 如图 2、表 2 所示,与对照组比较,C48/80 组 Annexin V 阳性率显著升高($P < 0.01$)。

3.3.2 Fluo-4AM 标记率测定 如图 3、表 3 所示,与对照组比较,C48/80 组 Fluo-4AM 标记率显著升高($P < 0.01$)。Fluo-4AM 作为钙离子的特异性荧光标记物,其标记率变化代表了活细胞内钙离子水平的改变,因此可初步推断阳性药作用后细胞内钙离子水平升高。

3.3.3 组胺、β-Hex 释放量测定 如表 4 所示,与对照组相比,C48/80 组 RBL-2H3 与 P815 细胞组胺、β-Hex 释放量与相对释放率均显著升高($P < 0.01$)。

3.4 受试物作用后各指标的检测结果

3.4.1 Annexin V 阳性率测定 经流式细胞仪检测后,Annexin V 阳性率数值见表 5,聚山梨酯 80、VK₁I

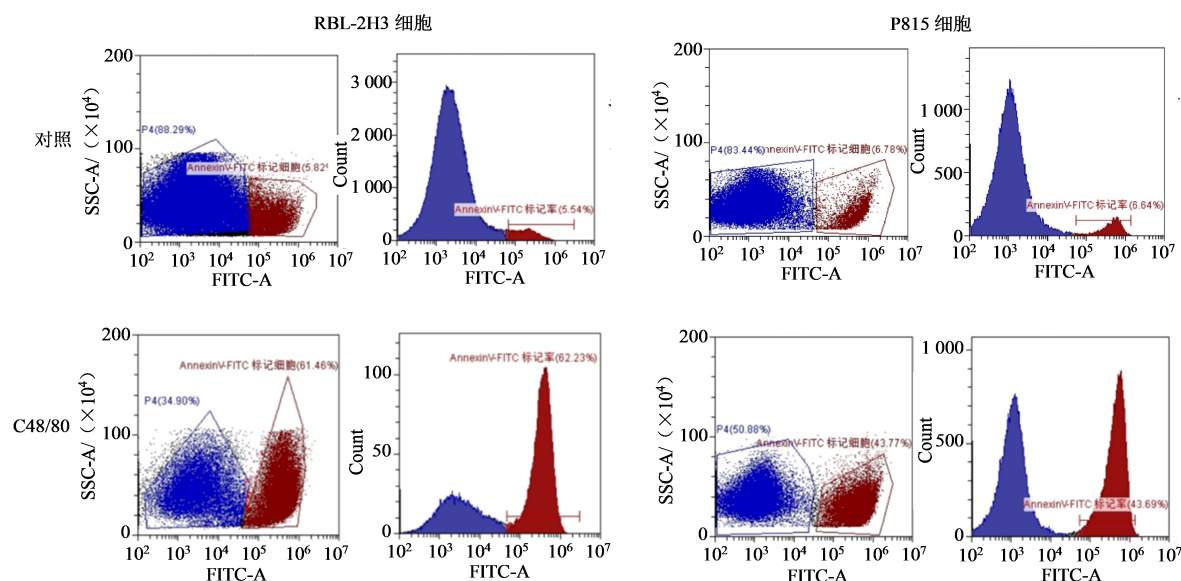


图2 C48/80作用后细胞的Annexin V标记流式图

Fig. 2 Annexin V labeling flow cytometry of cells after C48/80 treatment

表2 C48/80作用后细胞的Annexin V阳性率($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 2 Annexin V positive rate of cells after C48/80 action ($\bar{x} \pm s, n=3$)

细胞	组别	质量浓度/ ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	Annexin V 阳性率/%
RBL-2H3	对照	—	7.78 $\pm$ 0.84
	C48/80	30	45.23 $\pm$ 1.24**
P815	对照	—	7.84 $\pm$ 0.84
	C48/80	15	40.98 $\pm$ 2.69**

与对照组比较:** $P < 0.01$

** $P < 0.01$ vs control group

组 Annexin V 阳性率随药物浓度的升高而逐步增大,具有较为明显的浓度相关性。与对照组比较,部分浓度,即聚山梨酯 80 2.5、5.0 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 组及 VK₁ 0.75、1.50、3.00 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 组 Annexin V 阳性率均显著升高($P < 0.05$ 、0.01)。ABL 组 Annexin V 阳性率剂量相关性升高趋势不明显,与对照组比较,仅P815细胞ABL 2.00 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 组显著升高($P < 0.05$),且升高幅度不大。

3.4.2 Fluo-4AM 标记率 测定经流式细胞仪检测后,Fluo-AM 标记率见表6。聚山梨酯 80、VK₁ 及

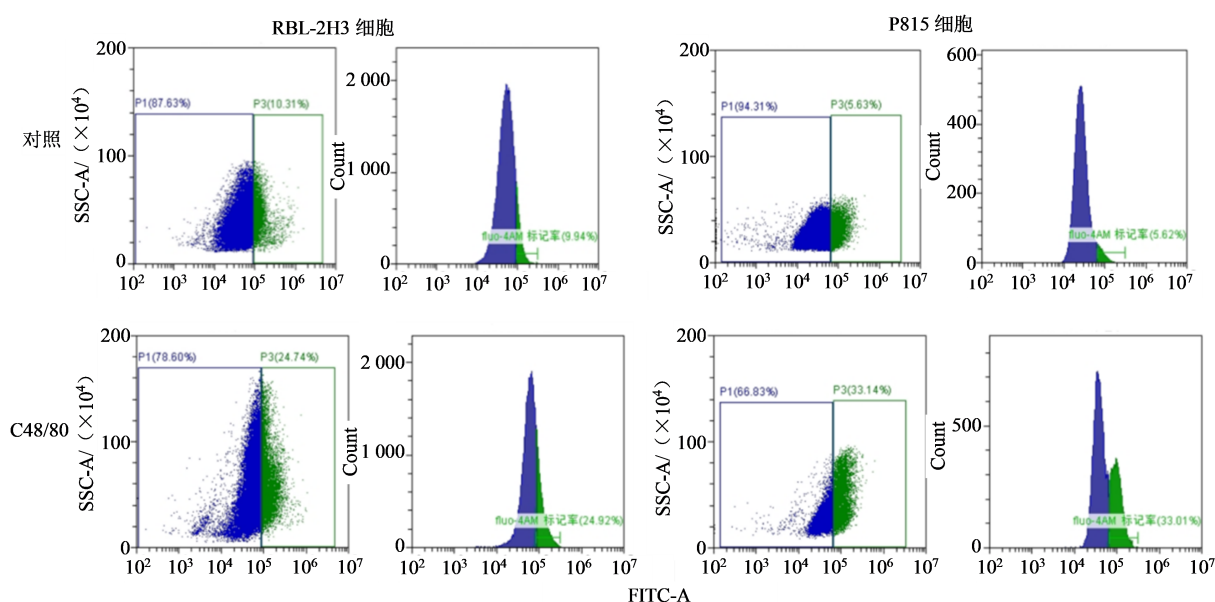


图3 C48/80作用后Fluo-4AM标记流式图

Fig. 3 Fluo-4AM label flow diagram after C48/80 action

表3 C48/80作用后细胞的Fluo-4AM标记率($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 3 Fluo-4AM marking rate cells after C48/80 action

($\bar{x}\pm s, n=3$)			
细胞	组别	质量浓度/ ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	Fluo-4AM 标记率/%
RBL-2H3	对照	—	9.62±2.30
	C48/80	30	26.18±3.10**
P815	对照	—	7.53±0.5
	C48/80	15	32.44±2.52**

与对照组比较: ** $P<0.01$ ** $P<0.01$ vs control group

ABL组Fluo-AM标记率均随药物浓度的升高而逐步增大,具有较为明显的浓度相关性。与对照组比较,部分浓度即聚山梨酯80 2.5、5.0 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 组, ABL 1、2 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 组及VK_I 0.75、1.50、3.00 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 组细胞钙离子升高水平有显著性差异($P<0.05$ 、0.01)。

3.4.3 组胺释放量测定 如表7所示,聚山梨酯80、VK_I及ABL组组胺释放量及相对释放率均随药物浓度的升高而逐步增大,具有较为明显的剂量相关

表4 C48/80作用后组胺、 β -Hex释放量($\bar{x}\pm s, n=3$)Table 4 Histamine and β -Hex release after C48/80 action ($\bar{x}\pm s, n=3$)

细胞	组别	质量浓度/ ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	组胺释放量/ ($\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$)	组胺相对释放 率/%	β -Hex 释放量/ ($\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$)	β -Hex 相对释放 率/%
RBL-2H3	对照	—	0.59±0.22	15.93±0.22	0.40±0.05	8.65±0.05
	C48/80	30	2.47±0.21**	28.55±0.21**	0.88±0.20**	38.77±0.20**
P815	对照	—	0.53±0.15	15.93±0.15	0.20±0.06	8.81±0.06
	C48/80	15	2.33±0.21**	46.19±0.21**	0.38±0.01**	54.19±0.01**

与对照组比较: ** $P<0.01$ ** $P<0.01$ vs control group表5 受试物作用后P815细胞的Annexin V阳性率($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 5 Annexin V positive rate of P815 cells after test

substance action ($\bar{x}\pm s, n=3$)			
细胞	组别	质量浓度/ ($\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$)	Annexin V 阳性率/%
RBL-2H3	对照	—	7.78±0.84
		0.625	4.41±0.06
		1.250	10.09±0.86
		2.500	15.24±1.27**
		5.000	28.18±0.37**
	ABL	0.25	2.18±0.04
		0.50	6.65±0.36
		1.00	7.16±0.13
		2.00	7.72±0.89
		3.000	20.07±0.91**
	VK _I	0.375	10.85±1.54
		0.750	16.52±0.24**
		1.500	18.71±0.80**
		3.000	20.07±0.91**
P815	对照	—	7.84±0.84
		0.625	8.59±0.33
		1.250	17.41±0.52
		2.500	25.73±1.07**
		5.000	36.21±0.22**
	ABL	0.25	4.98±1.40
		0.50	4.66±0.43
		1.00	7.86±0.56
		2.00	13.52±0.69*
		3.000	24.18±0.02**
	VK _I	0.375	8.27±0.75
		0.750	13.92±1.92*
		1.500	20.29±0.01**
		3.000	24.18±0.02**

与对照组比较: * $P<0.05$ ** $P<0.01$ * $P<0.05$ ** $P<0.01$ vs control group表6 受试物作用后细胞的Fluo-4AM标记率($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 6 Fluo-4AM marking rate cells after drug action

($\bar{x}\pm s, n=3$)			
细胞	组别	质量浓度/ ($\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$)	Fluo-4AM 标记 率/%
RBL-2H3	对照	—	9.62±2.30
		0.625	10.61±0.38
		1.250	12.28±0.33
		2.500	22.05±0.85**
		5.000	31.52±0.09**
	ABL	0.25	11.10±0.64
		0.50	13.65±1.11
		1.00	17.06±0.29*
		2.00	21.14±0.67**
		3.000	26.95±1.03**
	VK _I	0.375	9.21±0.70
		0.750	15.24±0.78*
		1.500	18.84±0.36**
		3.000	26.95±1.03**
P815	对照	—	7.53±0.5
		0.625	3.94±0.76
		1.250	9.13±0.80
		2.500	20.37±1.25**
		5.000	24.12±0.22**
	ABL	0.25	11.10±0.64
		0.50	13.65±1.11
		1.00	17.06±0.29*
		2.00	21.14±0.67**
		3.000	26.95±1.03**
	VK _I	0.375	8.99±0.31
		0.750	10.85±1.54*
		1.500	13.92±1.79**
		3.000	17.53±1.31**

与对照组比较: * $P<0.05$ ** $P<0.01$ * $P<0.05$ ** $P<0.01$ vs control group

性。与对照组比较,部分浓度即聚山梨酯 80 2.5、5.0 mg·mL⁻¹ 组, ABL 0.5、1、2 mg·mL⁻¹ 组及 VK_I 1.5、3.0 mg·mL⁻¹ 组的组胺释放变化水平有显著性差异($P<0.05, 0.01$)。

3.4.4 β -Hex 释放量测定 如表 7 所示,聚山梨酯 80、VK_I 及 ABL 组 β -Hex 释放量及相对释放率均随药物浓度的升高而逐步增大,具有较为明显的剂量相关性。与对照组比较,部分浓度即聚山梨酯 80 的 1.25、2.5、5.0 mg·mL⁻¹ 组, ABL 的 1、2 mg·mL⁻¹ 组及 VK_I 的 1.5、3.0 mg·mL⁻¹ 组 β -Hex 释放变化水平有显著性差异($P<0.05, 0.01$)。

4 讨论

体外评价类过敏反应相比体内有快速灵敏、适合大规模筛选药物等特点。目前已发展了许多可

用的细胞模型,包括原代腹腔肥大细胞、RBL-2H3、BMMC、P815、Ku812、LAD2 及 LMC-1 等。其中 RBL-2H3 因其操作简单、生长迅速、嗜碱性颗粒适宜观察等特点,在研究超敏反应及类过敏反应方面被广泛应用。但 RBL-2H3 细胞作为嗜碱性粒细胞可能不能完全代替人的致敏靶细胞, Falcone 等^[14]总结一些新产生的人源化的 RBL 细胞系,将荧光素酶或荧光素酶报告基因导入 RBL 细胞产生新的检测工具 RS-ATL8、NFAT-DSRED 和 NPY-MRFP,或可增加现有检测手段的灵敏性,使过敏及类过敏反应的诊断标准化、快速化。除了单独使用 RBL-2H3 细胞进行评价,还可以应用上述其他种细胞或联合应用于评价类过敏反应。对比各细胞系的特点, LAD2 细胞因其细胞中含有大量的胞浆内颗粒,近

表 7 受试物作用后组胺、 β -Hex 释放量($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 7 Histamine and β -Hex release after test substance action ($\bar{x}\pm s, n=3$)

细胞	组别	质量浓度/ (mg·mL ⁻¹)	组胺释放量/ (ng·mL ⁻¹)	组胺释相对释放 率/%	β -Hex 释放量/ (ng·mL ⁻¹)	β -Hex 相对释放 率/%
RBL-2H3	对照	—	0.53±0.15	15.93±0.15	0.40±0.05	8.65±0.05
	聚山梨酯 80	0.625	0.72±0.29	12.62±0.29	0.44±0.02	9.52±0.02
		1.250	1.10±0.30	15.68±0.30	0.49±0.13*	10.57±0.13*
		2.500	1.16±0.22*	29.53±0.22*	0.54±0.02**	11.66±0.02**
		5.000	2.40±0.23**	30.15±0.23**	0.66±0.03**	12.27±0.03**
	VK _I K	0.375	0.85±0.17	15.96±0.17	0.39±0.04	8.50±0.04
		0.750	0.88±0.08	16.43±0.08	0.48±0.03	10.48±0.03
		1.500	1.22±0.31*	22.68±0.31*	0.56±0.04*	12.20±0.04*
		3.00	1.48±0.22**	27.51±0.22**	0.58±0.07**	12.63±0.07**
	ABL	0.25	0.85±0.24	15.94±0.24	0.15±0.04	6.61±0.04
		0.50	1.25±0.08*	23.38±0.08*	0.28±0.02	12.33±0.02
		1.00	1.40±0.06**	26.10±0.06**	0.47±0.02*	20.70±0.02*
		2.00	2.14±0.28**	39.71±0.28**	0.67±0.02**	29.57±0.02**
P815	对照	—	0.53±0.15	15.93±0.15	0.19±0.10	5.48±0.10
	聚山梨酯 80	0.625	1.03±0.28	12.62±0.28	0.07±0.01	10.60±0.01
		1.250	1.28±0.33	15.68±0.33	0.17±0.01*	24.95±0.01*
		2.500	2.41±0.22*	29.53±0.22*	0.21±0.16**	29.62±0.16**
		5.000	2.46±0.54**	30.15±0.54**	0.27±0.10**	39.45±0.10**
	VK _I K	0.375	0.43±0.05	12.48±0.05	0.15±0.01	4.32±0.01
		0.750	0.67±0.09	19.11±0.09	0.33±0.02	9.51±0.02
		1.500	0.78±0.03	22.59±0.03	0.43±0.07*	12.39±0.07*
		3.000	1.07±0.27**	30.81±0.27**	0.58±0.05**	16.71±0.05**
	ABL	0.25	0.72±0.11	20.75±0.11	0.07±0.01	4.20±0.01
		0.50	0.97±0.10*	27.95±0.10*	0.11±0.00	6.91±0.00
		1.00	1.02±0.03**	29.40±0.03**	0.25±0.01**	15.94±0.01**
		2.00	1.23±0.17**	35.45±0.17**	0.45±0.00**	29.26±0.00**

与对照组比较: * $P<0.05$ ** $P<0.01$

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

年来受到研究者的关注,例如McNeil等^[15]应用其研究肥大细胞脱颗粒机制。但LAD2细胞分裂较慢且生长依赖于重组人干细胞因子,不适用于快速短期试验,更适用于长期的机制研究^[16];而对于P815细胞,Peng等^[17]研究证明其脱颗粒过程速度相较于其他细胞快。P815细胞可以用作类过敏反应检测早期、快速和敏感的体外模型。本实验在总结各个细胞特点后,选用的细胞模型为RBL-2H3、P815细胞,经过阳性药物验证后,2个细胞模型检测结果良好,适用于建立体外类过敏评价模型。

药物对细胞直接作用产生脱颗粒可能有多种原因,可以通过观察细胞脱颗粒的变化来判定,但某些高浓度药物作用下,细胞破裂释放胞内介质可能不是由于类过敏反应而可能是细胞毒作用导致的。因此判断药物是由于细胞毒作用还是类过敏反应造成的脱颗粒是建立体外类过敏细胞模型成功的前提。目前对于两者区分多是通过3种方法:一是直接或染色后观察细胞形态,例如Han等^[18]将中性红染色后颗粒变化作为类过敏程度的监测指标;二是通过扫描或透射电镜等观察脱颗粒过程的胞吐情况^[19],三是通过MTT/CCK-8等方法检测细胞活性变化。近些年研究中也发现一些新的观察手段,胡剑江等^[20]构建CD63-GFP质粒并稳定导入RBL-2H3细胞中,用共聚焦激光扫描显微镜(CLSM)和全内反射荧光显微镜(TIRFM)研究了CD63-GFP在C48/80刺激后细胞颗粒膜和质膜上的运动,建立了1种观察细胞脱颗粒过程观测的方法。本实验采用CCK-8法检测药物作用后IC₅₀以确定类过敏评价试验所采用的浓度范围,并结合细胞染色观察细胞形态学变化,直观判断细胞是否完整,以确保实验结论的准确可用性。

细胞脱颗粒过程影响因素很多,观测指标的設置可以从几个部分考虑:一是在细胞脱颗粒上游的影响因素,主要是一些通路蛋白或特异性受体或者钙离子等浓度变化,例如Wang等^[21]应用Fluo-3标记P815细胞后检测荧光强度变化,初步判定细胞内钙离子变化情况;二是检测胞吐过程或程度,例如细胞膜磷脂酰丝氨酸外翻检测(AnnexinV阳性细胞率);三是检测脱颗粒释放的炎性介质,肥大细胞与嗜碱性细胞脱颗粒释放介质中有些相同,例如组胺、 β -Hex、前列腺素D₂(PGD₂)、TNF- α 等,例如Zhang等^[22]通过测量 β -Hex和组胺释放,评估RBL-2H3和小鼠骨髓源性肥大细胞(BMMC)受芍药苷刺激后细胞脱颗粒情况;四是通过标记嗜碱性细胞

或者肥大细胞表面特异性标志物,以反映细胞脱颗粒时的激活状态,人嗜碱性细胞表达的主要表面标志物是CD63、CD69和CD203c,其中CD203c和CD63被认为是最有用的嗜碱性粒细胞活化和分化的标志^[23]。综合比较上述细胞脱颗粒指标后,本实验选用钙离子浓度检测作为脱颗粒影响因素指标,AnnexinV阳性率检测作为脱颗粒过程胞吐情况检测指标,组胺及 β -Hex的释放为细胞脱颗粒后介质释放的检测指标,并结合中性红染色观察,从多个方面分析药物是否发生细胞脱颗粒,并判断药物导致类过敏反应的潜力。

指标检测结果显示,钙离子探针标记率及AnnexinV阳性率的检测结果较好,应用流式细胞仪检测的指标比较适合建立进一步的评价模型,但一些本身不易冲洗容易产生沉淀影响观察的药物如脂质体药物可能不适用此指标的检测方法;形态学方面RBL-2H3细胞由于是贴壁细胞更容易观察,P815细胞本身为球形的半悬浮细胞,冲洗过程中容易流失且产生重叠,较不容易观察单个细胞的细节;而对于释放介质组胺及 β -Hex来说,结果显示两细胞上清中释放的介质含量均较低,可能本身细胞上清中能捕捉到的含量就较低,因此本研究对数据进一步处理,结合裂解液释放介质的总量计算释放比率能够更直观地观察变化趋势,或者寻求更稳定或者含量更高的释放介质用于检测。

本实验选用的阳性药C48/80,为苯乙胺与甲醛交联的缩合产物,能强烈激活细胞胞吐脱颗粒释放介质。各项指标检测结果显示其在安全浓度即能检测到较强的脱颗粒现象,组胺浓度、阳性率及标记率与对照组对比均具有统计学差异,且形态学没有较大改变,提示其能直接作用于2个细胞导致脱颗粒,并且是由于钙离子浓度变化引起的,因此适合作为脱颗粒反应的阳性对照药物。本实验选用的受试物之一为聚山梨酯80,是常用的药物辅料,可作为增溶剂添加至一些注射液;受试物之二是VK₁I,注射剂由于本身含有的物质有多种,比较复杂,容易因为注射剂含有的多种物质如上述的辅料聚山梨酯80、聚氧乙烯蓖麻油等产生致敏风险。本研究结果表明,根据细胞脱颗粒各项指标检测结果能初步检测到聚山梨酯80、VK₁I高浓度作用于细胞模型后均能产生浓度相关性的细胞脱颗粒,部分高浓度细胞脱颗粒较强,具有数据统计学差异,提示存在类过敏风险。有研究应用比格犬模型结合RBL-2H3细胞模型探索聚山梨酯80及VK₁I应用后

产生的类似过敏情况^[24],结果显示,VK₁I能够导致类过敏反应的产生且具有一定浓度的浓度相关性,聚山梨酯80的结果也类似,这与本研究结果相符合。受试物之三是ABL,两性霉素本身是多烯类抗真菌药物,脂质体制剂是包裹两性霉素B的双层脂质体,脂质体包裹药物的方式本身可以减少药物直接进入机体产生的毒性,但是一些脂质体制作过程中加入的辅材也可能会增加致敏风险。ABL药物由于本身特点配制给药制剂后为浅黄混悬液,与细胞悬液等反应后难以冲洗区分开,所以不适合直接细胞观察的指标例如形态学染色、流式细胞仪观察等,且此类药物的引发机制很有可能是由于补体系统激活,而在细胞模型中很难观测到相关补体因子的变化,需要结合动物实验进行佐证。但目前ABL导致类过敏反应的动物模型报道中,没有统一的结果,例如Jackman^[25]应用猪的动物模型研究脂质体类药物导致类过敏发生的情况,其中就包括ABL,能够在猪的模型中有较为明显的阳性结果,但Őrfi^[26]及Dézsi^[27]等应用大鼠及小鼠模型的研究中ABL导致类过敏的一些指标检测结果并不明显,可能是种属及剂量影响了实验结果,这也表明了ABL导致类过敏的发生条件暂时还未明确,这也与本研究的推论类似,需要进一步大量研究。

总结而言,本实验以RBL-2H3及P815细胞为检测模型,建立了能通用于检测各类药物类过敏潜力的体外评价方法,并应用该方法评价了3种受试物导致类过敏反应发生的潜力,结果发现2种受试物具有导致类过敏反应发生的风险。下一步研究可将本实验建立的体外检测模型应用于检测更多可能导致类过敏反应产生的药物,实现药物不良反应的提前预测以及筛选药物的安全性。此外,对于已经确定能够导致类过敏反应产生的药物,应对其产生机制进行更深层次的研究,以便于了解产生过程,更好的预防其发生。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- Pichler W J, Hausmann O. Classification of drug hypersensitivity into allergic, p-i, and pseudo-allergic forms [J]. *Int Arch Allergy Immunol*, 2016, 171(3/4): 166-179.
- Zhang B, Li Q, Shi C Y, et al. Drug-induced pseudoallergy: A review of the causes and mechanisms [J]. *Pharmacology*, 2018, 101(1/2): 104-110.
- Szebeni J. Complement activation-related pseudoallergy: A stress reaction in blood triggered by nanomedicines and biologicals [J]. *Mol Immunol*, 2014, 61(2): 163-173.
- Grimes J, Desai S, Charter N W, et al. MrgX2 is a promiscuous receptor for basic peptides causing mast cell pseudo-allergic and anaphylactoid reactions [J]. *Pharmacol Res Perspect*, 2019, 7(6): e00547.
- Subramanian H, Gupta K, Ali H. Roles of Mas-related G protein-coupled receptor X2 on mast cell-mediated host defense, pseudoallergic drug reactions, and chronic inflammatory diseases [J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2016, 138(3): 700-710.
- Che D L, Wang J, Ding Y Y, et al. Mivacurium induce mast cell activation and pseudo-allergic reactions via MAS-related G protein coupled receptor-X2 [J]. *Cell Immunol*, 2018, 332: 121-128.
- Szebeni J, Storm G. Complement activation as a bioequivalence issue relevant to the development of generic liposomes and other nanoparticulate drugs [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2015, 468(3): 490-497.
- 张宇实, 易艳, 李春英, 等. 中药注射剂类过敏反应临床前评价: 动物品系和性别差异研究 [J]. *中国中药杂志*, 2015, 40(14): 2717-2722.
- Zhang Y S, Yi Y, Li C Y, et al. Preclinical evaluation of pseudoallergic reactions on Chinese herbal injections: Study on animal strain and gender difference [J]. *China J Chin Mater Med*, 2015, 40(14): 2717-2722.
- 纪凤兰, 温富春, 丁涛, 等. 不同种动物用于中药注射剂致敏性评价的比较 [J]. *中国中医药科技*, 2017, 24(5): 591-593.
- Ji F L, Wen F C, Ding T, et al. Comparison of different animals used in sensitization evaluation of traditional Chinese medicine injection [J]. *Chin J Tradit Med Sci Technol*, 2017, 24(5): 591-593.
- 梁爱华, 李春英, 刘婷, 等. 中药注射剂的类过敏实验动物模型和实验方法研究 [J]. *世界科学技术: 中医药现代化*, 2010, 12(6): 998-1004.
- Liang A H, Li C Y, Liu T, et al. Animal models and methodologies for evaluation of Chinese herbal injection-induced pseudoanaphylactoid reactions [J]. *Mod Tradit Chin Med Mater Med World Sci Technol*, 2010, 12(6): 998-1004.
- 高婕, 罗佳波, 雷林生, 等. 3种细胞用于建立体外肥大细胞脱颗粒模型的比较研究及应用 [J]. *广州中医药大学学报*, 2012, 29(3): 295-299, 304.
- Gao J, Luo J B, Lei L S, et al. Establishment of *in-vitro* model of mast cell degranulation with three kinds of cell lines and its application [J]. *China Ind Econ*, 2012, 29(3): 295-299, 304.
- 杨永强, 陈晓红, 李怡然, 等. 肥大细胞系LAD2的培养

- 及肥大细胞脱颗粒模型的建立 [J]. 中国皮肤性病杂志, 2014, 28(1): 26-29.
- Yang Y Q, Chen X H, Li Y R, et al. The cultivation of mast cell line LAD2 and establishment of mast cell degranulation model [J]. Chin J Dermatovenereology, 2014, 28(1): 26-29.
- [13] 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.
- Zhao Y, Li Q, Zhang X Y. Study progress of type I anaphylaxis reaction and anaphylactoid reaction on the basis of RBL-2H3 cell models [J]. Chin J Clin Pharmacol Ther, 2010, 15(11): 1310-1315.
- [14] Falcone F H, Alcocer M J, Okamoto-Uchida Y, et al. Use of humanized rat basophilic leukemia reporter cell lines as a diagnostic tool for detection of allergen-specific IgE in allergic patients: Time for a reappraisal ? [J]. Curr Allergy Asthma Rep, 2015, 15(11): 67.
- [15] McNeil B D, Pundir P, Meeker S, et al. Identification of a mast-cell-specific receptor crucial for pseudo-allergic drug reactions [J]. Nature, 2015, 519(7542): 237-241.
- [16] Guhl S, Babina M, Neou A, et al. Mast cell lines HMC-1 and LAD2 in comparison with mature human skin mast cells: Drastically reduced levels of tryptase and chymase in mast cell lines [J]. Exp Dermatol, 2010, 19(9): 845-847.
- [17] Peng B, He R, Xu Q H, et al. Comparison of RBL-2H3 and P815 cell lines for establishing *in vitro* model of mast cell degranulation [J]. Chin J Nat Med, 2011, 9: 227-231.
- [18] Han S L, Zhang T, Huang J, et al. New method of screening allergenic components from Shuanghuanglian injection: With RBL-2H3/CMC model online HPLC/MS system [J]. J Pharm Biomed Anal, 2014, 88: 602-608.
- [19] Huang F, Tong X Y, Zhang R H, et al. Effect of achyranthes bidentata polysaccharides on antigen-induced activation of mast cells [J]. Chin Pharmacol Bull, 2008.
- [20] 胡剑江, 侯燕鸣, 张倩, 等. 肥大细胞类过敏反应脱颗粒的实时动态检测方法 [J]. 中国中药杂志, 2011, 36(14): 1860-1864.
- Hu J J, Hou Y M, Zhang Q, et al. Real-time detection of mast cell degranulation in anaphylactoid reaction [J]. China J Chin Mater Med, 2011, 36(14): 1860-1864.
- [21] Wang N, Liu R, Liu Y, et al. Sinomenine potentiates P815 cell degranulation via upregulation of Ca^{2+} mobilization through the Lyn/PLC γ /IP3R pathway [J]. Int J Immunopharm, 2015: 0394632015621768.
- [22] Zhang L N, Ji K, Sun Y T, et al. Aurora kinase inhibitor tozasertib suppresses mast cell activation *in vitro* and *in vivo* [J]. Brit J Pharm, 2020, 177(12): 2848-2859.
- [23] Kabashima K, Nakashima C, Nonomura Y, et al. Biomarkers for evaluation of mast cell and basophil activation [J]. Immunol Rev, 2018, 282(1): 114-120.
- [24] Mi Y N, Ping N N, Xiao X, et al. The severe adverse reaction to vitamin K₁ injection is anaphylactoid reaction but not anaphylaxis [J]. PLoS One, 2014, 9(3): e90199.
- [25] Jackman J A, Mészáros T, Fülöp T, et al. Comparison of complement activation-related pseudoallergy in miniature and domestic pigs: Foundation of a validatable immune toxicity model [J]. Nanomed-Nanotechnol Biol Med, 2016, 12(4): 933-943.
- [26] Örfi E, Mészáros T, Hennies M, et al. Acute physiological changes caused by complement activators and amphotericin B-containing liposomes in mice [J]. Int J Nanomed, 2019, 14: 1563-1573.
- [27] Dézsi L, Fülöp T, Mészáros T, et al. Features of complement activation-related pseudoallergy to liposomes with different surface charge and PEGylation: Comparison of the porcine and rat responses [J]. J Control Release, 2014, 195: 2-10.

[责任编辑 兰新新]