

中药注射剂类过敏反应的实验方法研究进展

邓国艳¹, 周鑫¹, 刘红宇¹, 欧阳林旗^{1, 2*}

1. 湖南中医药大学第一附属医院 药学部, 湖南 长沙 410007

2. 湖南中医药大学 药学院, 湖南 长沙 410208

摘要: 中药注射剂(TCMIs)起效快、疗效确切、临床应用广泛,但其类过敏反应(ARs)等不良事件已成为中药安全性研究的热点和难点。近年来,为加快推进TCMIs安全性再评价,深入了解TCMIs相关ARs的症状特点、致敏成分、作用机制等,研究者采用体内实验(ARs症状观察法、伊文思蓝染色法、组织病理学检查法)、体外实验(甲基四氮唑与细胞计数试剂盒-8法、染色法、膜黏连蛋白V结合法等)方法对ARs进行了评估,可为建立可靠的评价方法提供依据,为临床TCMIs相关ARs的早期识别、风险防控提供新思路。

关键词: 中药注射剂; 类过敏反应; 实验方法; 安全性评价; 组织病理学检查法; 染色法

中图分类号: R969.3; R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-6376(2023)08-1787-07

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2023.08.023

Advances in experimental methods of anaphylactoid reactions related to traditional Chinese medicine injections

DENG Guoyan¹, ZHOU Xin¹, LIU Hongyu¹, OUYANG Linqi^{1, 2}

1. Department of Pharmacy, The First Hospital of Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410007, China

2. School of Pharmacy, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410208, China

Abstract: Traditional Chinese medicine injections (TCMIs) have been widely used in clinical because of their rapid onset of action and precise efficacy, while their anaphylactoid reactions (ARs) and other adverse events have become a hot spot and a difficult area for safety research on traditional Chinese medicine. In recent years, in order to accelerate the safety re-evaluation of TCMIs and to gain a deeper understanding of the symptom characteristics, allergenic components and mechanisms of TCMIs-related ARs. The researchers evaluated ARs using *in vivo* experiments (ARs symptom observation method, Evans blue staining method, histopathological examination method) and *in vitro* experiments (methyl tetrazolium and cell counting kit-8 method, staining method, membrane adhesion protein V binding method). It can provide a basis for establishing scientific and reliable evaluation methods, and provide new ideas for early identification, risk prevention and control of clinical TCMIs-related ARs.

Key words: traditional Chinese medicine injection; anaphylactoid reactions; experimental method; safety evaluation; histopathological examination method; staining method

中药注射剂(TCMIs)疗效确切,可避开首关效应,直接进入机体并分布到组织、器官,生物利用度高、起效快,解决了中医临床没有急症用药的问题;但TCMIs成分复杂,含多种辅料,极易引入致敏原而导致不良反应,其中大部分是类过敏反应(ARs),约占急性过敏反应77%^[1]。ARs多由炎症或与抗

原-特异性免疫无关的反应引起,与I型过敏反应不同的是无需免疫球蛋白E(IgE)介导,首次接触药物即可出现。虽然两者发病机制不同,但都主要作用于肥大细胞或嗜碱性细胞,致其脱颗粒并释放致敏活性介质,从而引起相似的临床症状,进一步加大了ARs的临床诊断难度。相较于过敏反应,ARs的

收稿日期: 2023-03-03

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(82174069); 湖南省教育厅科学研究项目(21B0375); 湖南省卫健委科研计划课题(C202313057956)

第一作者: 邓国艳(1999—),女,硕士研究生,研究方向为临床中药学。E-mail: 2798271082@qq.com

*通信作者: 欧阳林旗(1985—),男,硕士,副主任药师,研究方向为临床中药学。E-mail: oylqzyfy03@hnuucm.edu.cn

发生呈剂量相关性,具体机制尚不明确。此外,致敏成分不清楚、中西药不合理配伍等,加大了TCMIs致ARs的安全风险,也制约了相关产业的发展。

自2009年启动TCMIs安全性再评价工作以来,部分企业和科研院所开展了大量研究,主要集中在TCMIs相关ARs模型建立,致敏成分筛查,ARs作用机制以及安全性评价、风险防控的探讨等方面^[2-4],同时通过体内外实验进行了ARs评价,建立了相关研究方法,一定程度上健全了ARs评价标准。然而,由于TCMIs致ARs的物质基础不明确、研究模型差异大等原因,现有研究方法对于预测和防控ARs仍存在不同程度的局限;各国关于新药临床前致敏性评价的要求尚未完全统一,至今仍缺少公认的TCMIs相关ARs的非临床安全性评价方法。现有TCMIs相关ARs的文献综述主要针对ARs临床前评价模型、物质基础、反应机制及检测指标等进行讨论,缺乏实验方法的概括总结,因此本文从TCMIs相关ARs实验方法的原理、适用范围、优缺点等进行综述,以期建立可靠的评价方法提供理论依据,为临床TCMIs相关ARs的早期识别、风险调控提供依据。

1 体内实验研究方法

TCMIs相关ARs的体内实验是通过动物给药后对其行为变化、病理组织及生化指标的观察与测定综合评价是否发生ARs。目前国内外用于TCMIs相关ARs评价的动物主要包括Beagle犬、大鼠(SD、BN、Wistar)、豚鼠、小鼠(ICR、昆明、C57BL/6、Balb/C)等,不同种属或品系动物模型在易感性、症状表现及选用的实验方法和检测指标均有不同。

1.1 ARs症状观察法

TCMIs相关ARs属固有免疫范畴,可能由病原相关分子模式(PAMP)所激发^[5],并通过致敏原的直接刺激或补体途径产生的过敏毒素C3a、C5a,以及凝血系统和激肽系统激活后释放的凝血酶、缓激肽作用于肥大细胞或嗜碱性粒细胞表面受体,诱导其脱颗粒并释放活性介质进入细胞外液,引起血管通透性增加、平滑肌收缩、黏液腺分泌增强以及皮肤黏膜水肿等。致敏后的动物出现皮肤潮红、红斑、眼内巩膜充血、唇眼水肿、烦躁不安、抓耳搔鼻、流涎、恶心、呕吐、痉挛、抽搐、发抖、大小便失禁、精神萎靡不振、四肢瘫软及血压下降等症状,甚至休克或死亡^[1],可通过对这些行为学变化及生理指标的观察来评价ARs,并对其症状严重程度进行等级

区分。

梁爱华团队^[6-8]在Beagle犬、小鼠及豚鼠等动物模型中首次静脉注射鱼腥草注射液,观察到Beagle犬迅速出现眼睛发红、眼结膜水肿,后续出现搔头挠耳、甩头、添舌、蹭痒、血压下降等典型的ARs症状,而小鼠及豚鼠的症状相对较弱,提示ARs症状观察法更适用于Beagle犬类非啮齿动物。血压下降可作为ARs的1项客观且容易检测的生理指标,一定程度上弥补了行为学变化及精神状态观察的主观性。

李莎莎等^[9]发现给予醒脑注射液后Beagle犬出现组胺过敏症状并伴随心率加快、血压下降、呼吸急促等生理变化,与临床症状有很好的 consistency,提示临床使用TCMIs应密切监测ARs症状及心率、血压、呼吸频率等指标,以早期发现并防止严重ARs的发生。由于非啮齿动物体型和个体差异大、不可控因素多,且实验费用高,无法进行大规模的TCMIs致ARs筛查,近年来类过敏症状观察法主要采用啮齿类动物,因此需同时结合动物血浆中的组胺含量进行ARs的综合评价。

1.2 伊文思蓝(EB)蓝染法

血管通透性增加是ARs的机制之一,其定性、定量检测可作为在体实验的观察指标。蓝染法是一种以EB为指示剂检测动物血管通透性变化的评价方法。EB是常用的偶氮染色剂,无明显毒性,血浆蛋白亲和力高,易形成结合物。当血管通透性增高时,蛋白结合物会渗漏到血管外的组织间隙中,造成组织明显蓝染^[10],可通过分析大鼠背部皮肤、小鼠耳廓和爪子蓝染情况及EB渗出量,评价ARs的严重程度。易艳^[11]为选择适宜的血管通透性增加动物模型,分别给予Beagle犬、Wistar大鼠、ICR小鼠双黄连注射剂致敏后进行耳廓蓝染,发现小鼠对血管通透性的检测更为灵敏,且小鼠相较于大鼠、犬类等有价格便宜、操作简便、快速出结果的特点及免疫学、分子学反应多样性的优点,是目前药物致敏模型常用的实验动物。

万梅绪等^[12]通过对动物种属、饲养时间、EB放置处理方式、耳部取材部位、组织保存时间、蓝染面积与评分标准界定、标准曲线等进行耳廓蓝染方法考察,并以注射用益气复脉所致ARs进行方法验证,优化实验条件,建立了重复性更好的耳廓蓝染法。目前对于小鼠血管通透性增加的检测不仅局限于耳廓蓝染观察,也可对鼠爪进行染色评价。

Gao等^[13]采用EB蓝染法观察清开灵注射剂类

过敏实验中 Balb/C 小鼠左右爪的蓝染情况及 EB 含量,结果表明小鼠爪子也可作为 EB 蓝染法的检测部位。EB 蓝染法利用 EB 的蛋白结合特性,具有较好的准确性、经济性、安全性,且能同时测定多个组织的血浆外渗,但仍存在一定局限性,如该方法主要以皮肤和血管的病理生理改变为基础,活血化癥或强刺激性的药物可能会出现假阳性。此外,尾静脉注射技术具有挑战性,容易导致 EB 蓝染结果不一致,降低检测灵敏度,因此可对 EB 蓝染的组织进行荧光显微镜检查,以便在更明显的位置观察血管通透性变化。

1.3 组织病理学检查法

组织病理学检查法是通过显微镜观察病变组织切片来对病理学表现进行评价的实验研究方法。染色对组织病理学检查至关重要,根据不同的染色原理可以分为苏木精-伊红(HE)染色法和免疫组化(IHC)染色法。ARs 会致使相关细胞脱颗粒而发生形态变化,可通过 HE 染色对致敏前后的组织、细胞结构进行观察,评价 TCMI 相关 ARs 程度。韩佳寅^[14]对双黄连注射剂致 ARs 后 ICR 小鼠的耳、肠、肺组织进行 HE 染色后观察病理变化,结果显示小鼠耳组织内结构较稀疏,并存在少量炎性细胞浸润和肥大细胞脱颗粒;肺泡间隔增厚,泡内中性粒细胞、肥大细胞浸润,呈现炎症反应;小肠绒毛加粗,组织内可见水肿,与 ARs 临床表现高度一致。

HE 染色法技术要求严格,操作不当易引起染色效果不佳,染色时间难以控制,切片易造成不清晰、雾化、斑点、黑色物质及气泡等问题,只能粗略地辨认不同细胞形态学改变,因此可考虑 IHC 对 TCMI 相关 ARs 进一步评价。病理组织中含有大量嗜碱性粒细胞,在其受到刺激后会表达多种蛋白标志物(如 CD63、CD203c 等),可利用 IHC 对其变化进行检测^[15-16]。目前以 CD63 和 CD203c 来确定嗜碱粒细胞活化是诊断过敏性疾病的一种安全、有效的检测方法,可作为过敏反应体内实验的补充,具有较好的临床应用价值,为 ARs 的临床前评价提供了新的选择。

2 体外实验研究方法

根据 ARs 的发生机制,致敏成分可直接作用于肥大细胞和嗜碱性粒细胞,相较于整体动物模型,体外实验具有高通量、灵敏、快速、稳定传代培养、可用于复杂成分筛选等优点,且细胞模型更简便、经济,能够弥补整体动物模型的不足,通过体外细胞模型进行筛查、评价 TCMI 相关 ARs 是可行的。

目前常用的离体实验方法有甲基四氮唑(MTT)法、细胞计数试剂盒-8(CCK-8)法、甲苯胺蓝染色法、中性红染色法、膜黏连蛋白(Annexin)V 结合法等。

2.1 MTT 与 CCK-8 法

ARs 的体外实验常用细胞模型有 RBL-2H3、P815、Ku812 等,利用 CCK-8/MTT 法检测其活性及增殖情况,筛选细胞培养的实验条件,对后续体外 ARs 评价的开展至关重要。CCK-8/MTT 法利用细胞中酶的作用将相应试剂转化成不同颜色的甲臞染料^[17-18],通过实验前后产物颜色对比及检测生长曲线来反映细胞活性情况,并结合体外实验的其他检测方法对 TCMI 相关 ARs 进行评价。杨艺帆^[19]采用 MTT 法绘制了 RBL-2H3 细胞生长曲线,寻找到最佳培养条件,并通过酶联免疫吸附测定(ELISA)法检测血塞通注射液对 RBL-2H3 细胞致敏前后的生化指标变化,提示血塞通具有诱发 ARs 的潜力。MTT 法费用低,对其他颜色造成实验结果影响较小,但其操作复杂,试剂具有致癌性,常用 CCK-8 法来代替。

CCK-8 法是测定细胞活力灵敏可靠的比色法,其试剂采用的是即用型单瓶溶液,不需要进行重新溶解,且溶液稳定,几乎无细胞毒性,相较于其他四唑盐(如二甲氧喹啉)有更好的敏感性;与其他检测方法相比,还具有良好的可重复性、检测速度快和稳定性高。孙岩等^[20]采用 CCK-8 法筛选 RBL-2H3 细胞合适的接种密度和接种时间及祖师麻注射液的给药浓度,建立了实时细胞分析系统结合模式识别的 ARs 体外实验检测方法,可用于 TCMI 相关 ARs 的快速评价。相较于 MTT 法,CCK-8 法检测含金属的药物容易对本身显色影响较大,因此,两种方法可根据需要酌情选择。

2.2 染色法

正常肥大细胞呈圆形或卵圆形,细胞核小、位于细胞中央,细胞内含有致密的小颗粒;当类过敏原刺激肥大细胞脱颗粒后,细胞浆稀疏,出现大量空泡样结构,可通过染色剂对其进行染色,在光电显微镜下可观察到细胞脱颗粒过程中细胞表面或内部结构变化。根据染色剂的种类常分为中性红、甲苯胺蓝、阿利新蓝、台盼蓝染色法等。

国内外相关文献表明,TCMI 相关 ARs 体外实验常用中性红或甲苯胺蓝染色法对细胞脱颗粒进行检测^[21-24]。中性红试剂是种弱碱性染色剂,而肥大细胞内核酸、溶酶体、特殊颗粒等呈酸性,可被中性红染成红色,较早用于肥大细胞脱颗粒相关的研

究。张瑞瑞等^[22]通过中性红染色法观察射干抗病毒注射液致RBL-2H3细胞脱颗粒后的细胞形态,并计算脱颗粒百分率,结果显示给药组的细胞着色较深,变圆且偶见颗粒物质,提示射干抗病毒注射液会导致细胞脱颗粒产生ARs。中性红染色是针对活细胞进行染色,当细胞活性较差时,容易导致其不着色。

甲苯胺蓝染法的染色剂含有发色团及助色团,能促使染料电离成盐类与被染物质结合,使细胞上色。肥大细胞胞质中含有嗜碱性颗粒,颗粒中肝素、组胺和5-羟色胺具有异染性,可被甲苯胺蓝染成紫红色。庞菲等^[24]通过甲苯胺蓝染色法观察P815细胞在给予香丹注射液后的脱颗粒情况,发现其主要成分丹酚酸B和紫草酸可能是致类过敏物质。该法选择能力较强,但染色能力较弱,染色时间长,可通过结合酸碱性溶液调整甲苯胺蓝的染色能力与选择能力,如甲苯胺蓝硫酸混合染色法、甲苯胺蓝硼酸盐染色法、甲苯胺蓝饱和碳酸锂染色法等。

2.3 膜黏连蛋白V结合法

肥大细胞脱颗粒是通过胞吐的方式将颗粒释放到胞外,膜黏连蛋白V是参与这种跨膜转运的蛋白之一。膜黏连蛋白V是钙离子依赖型磷脂结合蛋白,能与外侧暴露的磷脂酰丝氨酸特异性结合,可通过荧光显微镜或流式细胞仪检测荧光判断膜黏连蛋白V阳性细胞,即为脱颗粒细胞^[24-25]。1999年Demo^[26]首次用膜黏连蛋白V标记脱颗粒的RBL-2H3细胞,结果显示膜黏连蛋白V能特异性地与细胞表面的分泌颗粒结合,结合程度与 β -氨基己糖苷酶释放成正比。

郭薇等^[27]通过荧光标记膜黏连蛋白V抗体并利用流式细胞仪检测过敏性休克的豚鼠腹腔肥大细胞的体内外脱颗粒程度,并同组胺的释放量进行比较,证实该方法不但能定量反映体外培养的肥大细胞受抗原刺激脱颗粒的程度,也能定量标记动物模型体内脱颗粒的肥大细胞,为类过敏的临床前评价提供了客观、定量检测的新方法。

聚山梨酯80是TCMIs常用助溶剂,李钦等^[28]将聚山梨酯80与RBL-2H3细胞共同培养,并采用荧光显微镜观察细胞膜磷脂酰丝氨酸与膜黏连蛋白V结合变化,发现给药组膜黏连蛋白V阳性细胞率高于对照组,且呈浓度相关关系。因此,膜黏连蛋白V结合法可作为检测细胞脱颗粒的补充研究

方法,弥补了染色法观察细胞脱颗粒的主观性,减少假性结果的发生。

3 体内外实验研究方法

ARs体内外均会刺激肥大细胞或嗜碱性粒细胞脱颗粒,释放组胺、 β -氨基己糖苷酶、类胰蛋白酶、生化因子等活性介质,可采用ELISA法检测致敏前后活性介质变化评价TCMIs相关ARs。ELISA常分为间接法、竞争法、双抗夹心法等,兼具灵敏和特异

的优点,能弥补比色法的主观性,检测结果更可靠。间接ELISA法需要将抗原包被在固相载体表面,最常用的载体材料为聚苯乙烯,它通过疏水作用吸附蛋白质,因此适用于TCMIs中蛋白类完全抗原的检测。胡昌勤等^[29-30]研究发现TCMIs提取过程中易残留蛋白等大分子物质,可能引起过敏反应,可采用间接ELISA法筛选TCMIs(如刺五加注射液)中的致敏物质,为明确ARs致敏成分提供新思路。

双抗体夹心ELISA测定的抗原种类广泛,方法简便、灵活性高,不仅能检测抗原,也能检测抗体。王志飞等^[31]运用双抗体夹心亲和素-生物素复合酶联免疫吸附测定法(ABC-ELISA)检测过敏患者血清中补体C3、C4,免疫球蛋白E、G,类胰蛋白酶 β ,并根据结果分析其过敏反应类型,为临床鉴别ARs提供了新的检测方法。当抗原中杂质难以去除或抗原结合特异性不稳定时,可采用竞争ELISA法测定^[32]。

组胺是全身过敏反应发展的关键介质,性质极不稳定,温度及孵育时间的变化均可影响组胺含量,血浆半衰期短,因此可采用竞争ELISA法测定。王欢等^[33]通过ELISA法检测RBL-2H3细胞给予清开灵注射液后的组胺含量,用于评价TCMIs相关ARs。当前市场上ELISA试剂盒种类繁多,ARs相关活性介质体内水平低,因此在选择ELISA试剂盒时需注意灵敏度和检测限是否符合要求。

4 结语与展望

ARs是TCMI最常见的不良反应,对TCMIs相关ARs进行评价、筛选潜在致类过敏反应物质,对提高临床应用的安全性至关重要。国家药品监督管理局发布的《药物刺激性、过敏性和溶血性研究技术指导原则》中推荐的全身主动过敏试验和被动皮肤过敏试验,不能有效检测出ARs,美国食品药品监督管理局(FDA)、国际组织人用药品注册技术协调会(ICH)的相关研究指南等至今仍然没有可靠的ARs动物模型和评价方法^[5,34]。目前,由于TCMIs

成分复杂、致敏原的筛查技术不足、ARs 机制不明确、缺乏在体试验与离体试验间相关性及一致性的系统性研究、检测方法自身及指标具有局限性,TCMIs 相关 ARs 的体内外实验研究方法都有各自的缺陷,二者需要结合起来进行综合评价。因此,为获得稳定、敏感、可靠的 ARs 评价方法,须对各种模型进行方法学验证和敏感性分析,并寻求最佳实验方法和最优组合,以提高评价的准确性。

探索 ARs 发生机制,寻找更加可靠的生物学诊断指标,加强新技术在研究方法中的应用,建立 ARs 公认的检测方法及模型,是下一步的研究重点。《中药注射剂安全性再评价非临床研究评价技术原则》也鼓励运用新技术、新方法评价 TCMIs 安全性。近年来通过蛋白质组学和代谢组学分析 TCMIs 致敏的潜在生物标记物探讨 ARs 的机制,并建立了基于荧光标记和高含量筛选(HCS)系统的 ARs 体外检测新方法,具有灵敏度高、药物颜色干扰少等优势,可为临床应用提供参考^[35]。另外,肥大细胞受体 Mas 相关 G 蛋白偶联受体 X2(MRGPRX2)被确定为 ARs 发生的重要机制,基于该靶点建立高表达 MRGPRX2 或细胞膜色谱法(CMC)模型及有效的临床前药物安全评价方法,用于 TCMIs 潜在致敏成分筛选和程度评价是未来研究的重要方向^[24],有望为临床 TCMIs 相关 ARs 的早期识别、风险防控提供新思路。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Li H, Deng J, Deng L, et al. Safety profile of traditional Chinese herbal injection: An analysis of a spontaneous reporting system in China [J]. *Pharmacoevidemiol Drug Saf*, 2019, 28(7): 1002-1013.
- [2] Li X, Thai S, Lu W, et al. Traditional Chinese medicine and drug-induced anaphylaxis: Data from the Beijing pharmacovigilance database [J]. *Int J Clin Pharm*, 2018, 40(4): 921-927.
- [3] 冯祝婷, 龚安慧, 吕凌丽, 等. 中药注射剂过敏反应防治对策 [J]. *山东化工*, 2020, 49(18): 60-61, 64.
Feng Z T, Gong A H, Lv L L, et al. Prevention and treatment of allergic reactions caused by traditional Chinese medicine injection [J]. *Shandong Chem Ind*, 2020, 49(18): 60-61, 64.
- [4] 梁爱华, 易艳. 中药注射剂超敏反应评价和风险控制相关问题的思考 [J]. *药学进展*, 2020, 44(10): 752-758.
Liang A H, Yi Y. Thoughts on the related issues of hypersensitivity evaluation and risk control of traditional Chinese medicine injection [J]. *Prog Pharm Sci*, 2020, 44(10): 752-758.
- [5] 韩依伦, 夏恒, 段金连, 等. 双黄连注射液导致类过敏的物质基础及作用机理 [J]. *云南中医学院学报*, 2020, 43(5): 90-97.
Han Y L, Xia H, Duan J L, et al. Material basis and mechanism of anaphylactoid induced by Shuanghuanglian Injection [J]. *J Yunnan Univ Chin Med*, 2020, 43(5): 90-97.
- [6] 梁爱华, 李春英, 郝然, 等. 用清醒 Beagle 犬进行中药注射液的类过敏试验方法研究 [J]. *中国中药杂志*, 2010, 35(17): 2328-2333.
Liang A H, Li C Y, He R, et al. Pseudoanaphylactoid reaction analysis of Chinese herbal injections in Beagle dogs [J]. *China J Chin Mater Med*, 2010, 35(17): 2328-2333.
- [7] 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.
- [8] 李春英, 梁爱华, 高双荣, 等. 啮齿类动物类过敏试验模型的建立 [J]. *中国中药杂志*, 2011, 36(4): 488-491.
Li C Y, Liang A H, Gao S R, et al. Development of animal model for anaphylactoid test of rodent [J]. *China J Chin Mater Med*, 2011, 36(4): 488-491.
- [9] 李莎莎, 王虎斌, 丁亚军, 等. 醒脑静注射液对 Beagle 犬心血管和呼吸系统功能的影响 [J]. *药物评价研究*, 2020, 43(12): 2422-2428.
Li S S, Wang H B, Ding Y J, et al. Effects of Xingnaojing Injection on cardiovascular and respiratory functions in Beagle dogs [J]. *Drug Eval Res*, 2020, 43(12): 2422-2428.
- [10] 张帆, 王璐, 戚进, 等. 中药注射剂致类过敏反应评价模型研究进展 [J]. *海峡药学*, 2019, 31(9): 10-13.
Zhang F, Wang L, Qi J, et al. Research progress of the evaluation model of pseudoallergic reactions induced by traditional Chinese medicine injection [J]. *Strait Pharm J*, 2019, 31(9): 10-13.
- [11] 易艳. 双黄连注射液类过敏反应及其炎症机制研究 [D]. 北京: 中国中医科学院, 2014.
Yi Y. Study on allergic reaction and its inflammatory mechanism of Shuanghuanglian Injection class [D]. Beijing: Chinese Academy of Traditional Chinese Medicine, 2014.
- [12] 万梅绪, 宋美珍, 李智, 等. 小鼠耳廓蓝染类过敏检测方法用于注射益气复脉(冻干)的质控研究 [J]. *药物评价*

- 研究, 2018, 41(3): 405-410, 428.
- Wang M X, Song M Z, Li Z, et al. Quality control study on Yiqi Fumai Lyophilized Injection for mouse ear blue staining pseudo-allergic reactions [J]. Drug Eval Res, 2018, 41(3): 405-410, 428.
- [13] Gao Y, Qi R, Zhang X, et al. Qingkailing Injection induces immediate hypersensitivity reaction via the activation of anaphylatoxin C3 [J]. Front Pharmacol, 2020, doi:10.3389/fphar.2019.01524.
- [14] 韩佳寅. RhoA/ROCK 信号通路在青霉素和双黄连注射液类过敏反应中的作用研究 [D]. 北京: 中国中医科学院, 2017.
- Han J Y. Study on the role of RhoA/ROCK signaling pathway in allergic reactions to penicillin and diflucan injection classes [D]. Beijing: Chinese Academy of Traditional Chinese Medicine, 2017.
- [15] 李伟, 陈梦, 黄芝琰, 等. 类过敏反应体外评价模型的建立及其指标的筛选 [J]. 中国新药杂志, 2017, 26(14): 1649-1660.
- Li W, Chen M, Huang Z Y, et al. Establishment of in vitro evaluation model of pseudoallergy and screening of its indexes [J]. Chin J New Drugs, 2017, 26(14): 1649-1660.
- [16] 张楚楠, 于浩, 王晓龙, 等. 过敏性休克死亡豚鼠肺组织中 CD63 的表达 [J]. 法医学杂志, 2019, 35(4): 396-401.
- Zhang C N, Yu H, Wang X L, et al. Expression of CD63 in lung tissue of guinea pigs dying of anaphylactic shock [J]. J Foren Med, 2019, 35(4): 396-401.
- [17] Kumar P, Nagarajan A, Uchil P D. Analysis of cell viability by the MTT assay [J]. Cold Spring Harb Protoc, 2018, 2018(6): 10.
- [18] James N, Kini S, Pai S, et al. Comparative evaluation of corneal storage medias used as tooth avulsion medias in maintaining the viability of periodontal ligament cells using the cell counting kit-8 assay [J]. Clin Cosmet Investig Dent, 2022, 14: 87-94.
- [19] 杨艺帆. 注射用血塞通(冻干)过敏性评价及其类过敏反应分筛查和反应机制研究 [D]. 上海: 上海中医药大学, 2019.
- Yang Y F. Evaluation of allergenicity of Hemosiderin (lyophilized) for Injection, screening of its allergy-like components and study of reaction mechanism [D]. Shanghai: Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, 2019.
- [20] 孙岩, 吴晨光, 韩群, 等. 实时细胞分析技术结合模式识别评价祖师麻注射液类过敏反应 [J]. 中国中药杂志, 2020, 45(12): 2865-2871.
- Sun Y, Wu C G, Han Q, et al. Real-time cell analysis combined with pattern recognition to evaluate anaphylaxis of Zushima Injection [J]. China J Chin Mater Med, 2020, 45(12): 2865-2871.
- [21] 翟晓峰, 施文, 李国兴, 等. 中性红、吖啶橙及 PE 标记的 LAMP-2 抗体在 B16F10 细胞溶酶体检测中的应用与比较 [J]. 免疫学杂志, 2012, 28(12): 1069-1072.
- Zai X F, Shi W, Li G X, et al. Application and comparison of neutral red, acridine orange, or PE labeled LAMP-2 antibodies in the detection of lysosomes in B16F10 cells [J]. Immunol J, 2012, 28(12): 1069-1072.
- [22] 张瑞瑞, 刘艳萍, 聂西周, 等. 射干抗病毒注射液致类过敏反应初步研究 [J]. 世界中医药, 2016, 11(4): 682-685.
- Zhang R R, Liu Y P, Lie X Z, et al. Preliminary study on the pseudoallergic reaction of Shagan Kangbingdu Injection [J]. World Chin Med, 2016, 11(4): 682-685.
- [23] 王玉文, 宋宗义, 赵云龙, 等. 肥大细胞甲苯胺蓝饱和碳酸锂染色法 [J]. 临床与实验病理学杂志, 2022, 38(11): 1393-1395.
- Wang Y W, Song Z Y, Zhao Y L, et al. Mast cell toluidine blue saturated lithium carbonate staining [J]. Chin J Clin Exp Pathol, 2022, 38(11): 1393-1395.
- [24] 庞菲, 王弯弯, 郝瑞瑞, 等. 香丹注射液中致类过敏反应成分筛选及机制初探 [J]. 中草药, 2022, 53(20): 6500-6508.
- Pang F, Wang W W, Hao R R, et al. Screening and preliminary mechanism of inducer of anaphylactic reaction in Xiangdan Injection [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2022, 53(20): 6500-6508.
- [25] 郑晓亮, 李钦, 赵吟, 等. 清开灵注射液诱导嗜碱性粒细胞脱颗粒致类过敏反应作用研究 [J]. 中国中药杂志, 2010, 35(21): 2904-2907.
- Zheng X L, Li Q, Zhao Y, et al. Anaphylactoid reaction induced by Qingkailing Injection via basophils cells degranulation [J]. China J Chin Mater Med, 2010, 35(21): 2904-2907.
- [26] Demo S D, Masuda E, Rossi A B, et al. Quantitative measurement of mast cell degranulation using a novel flow cytometric annexin-V binding assay [J]. Cytometry, 1999, 36(4): 340-348.
- [27] 郭薇, 陈玉川, 刘水平, 等. RBL-2H3 细胞诊断过敏性休克的可行性初探 [J]. 中国免疫学杂志, 2002, 18(9): 611-613.
- Guo W, Chen Y C, Liu S P, et al. Study of diagnose guinea pigs anaphylaxis shock with RBL-2H3 cells [J]. Chin J Immunol, 2002, 18(9): 611-613.
- [28] 李钦, 赵吟, 郑晓亮, 等. 药用注射辅料聚山梨酯 80 诱发类过敏反应的细胞研究 [J]. 中国临床药理学与治疗学, 2011, 16(5): 501-505.
- Li Q, Zhao Y, Zheng X L, et al. Cell research on anaphylactoid reaction induced by pharmaceutical excipients polysorbate 80 [J]. Chin J Clin Pharmacol

- Ther, 2011, 16(5): 501-505.
- [29] 胡昌勤, 许明哲, 马越, 等. 含丹参的中药注射液中过敏性杂质的检测 [J]. 药学学报, 2008, 43(5): 518-522.
- Hu C Q, Xu M Z, Ma Y, et al. Determination of the allergic impurities in the parenteral injection of Chinese traditional medicines containing *Salvia miltiorrhiza* [J]. Acta Pharm Sin, 2008, 43(5): 518-522.
- [30] 范能全. 刺五加注射液致敏物质检测及去除方法 [J]. 重庆师范大学学报: 自然科学版, 2011, 28(1): 68-70.
- Fan Q N. Methods of the test and the elimination of bacterial endotoxin in Ciwujia Injection [J]. J Chongqing Norm Univ Nat Sci Ed, 2011, 28(1): 68-70.
- [31] 王志飞, 艾青华, 黎元元, 等. 基于血清免疫毒理学的中药注射剂过敏反应类型分析 [J]. 中国中药杂志, 2015, 40(24): 4762-4765.
- Wang Z F, Ai Q H, Ni Y Y, et al. Analysis of the allergic reaction types of Chinese medicine injection based on immunotoxicity [J]. China J Chin Mater Med, 2015, 40(24): 4762-4765.
- [32] 王钧, 陈天焱, 邵文, 等. 浅析中药注射液体外类过敏检测方法 [J]. 免疫学杂志, 2011, 27(12): 1083-1085.
- Wang J, Chen T Y, Shao W, et al. Analysis of in vitro class allergy detection methods for Chinese medicine injection [J]. Immunol J, 2011, 27(12): 1083-1085.
- [33] 王欢, 王庆甫, 王庆国. 清开灵注射液及其中间品类过敏反应的实验研究 [J]. 辽宁中医杂志, 2015, 42(10): 1947-1949, 2.
- Wang H, Wang Q P, Wang Q G. Experimental studies in anaphylactoid reactions of Qingkailing Injection [J]. Liaoning J Tradit Chin Med, 2015, 42(10): 1947-1949, 2.
- [34] 刘素彦, 易艳, 于辉, 等. 中药注射剂的有效性、安全性及风险控制 [J]. 中国食品药品监管, 2020, 200(9): 16-29.
- Liu S Y, Yi Y, Yu H, et al. Efficacy, safety and risk control of Chinese medicine injections [J]. China Food Drug Adm Mag, 2020, 200(9): 16-29.
- [35] Xu Y, Dou D, Ran X, et al. Integrative analysis of proteomics and metabolomics of anaphylactoid reaction induced by Xuesaitong Injection [J]. J Chromatogr A, 2015, 1416: 103-111.

[责任编辑 李红珠]