

基于RBL-2H3细胞和ICR小鼠过敏与类过敏叠加模型评价注射用血塞通(冻干)过敏与类过敏反应

刘方美¹, 张羽¹, 汤书婉¹, 符胜男¹, 冷雪娇¹, 李存玉^{1, 2, 3}, 郑云枫^{1, 2, 3}, 彭国平^{1, 2, 3*}

1. 南京中医药大学药学院, 江苏 南京 210023

2. 江苏省中药资源产业化过程协同创新中心, 江苏 南京 210023

3. 中药制药过程控制与智能制造技术全国重点实验室, 江苏 连云港 222047

摘要: 目的 建立过敏和类过敏叠加的RBL-2H3细胞和ICR小鼠动物模型, 对注射用血塞通(冻干)(XST)的过敏与类过敏反应进行评价研究。方法 体外以RBL-2H3细胞的 β -氨基己糖苷酶(β -Hex)和组胺释放率为评价指标, 确定抗二硝基苯单克隆抗体(DNP-IgE)、DNP-牛血清白蛋白(BSA)的剂量及与C48/80($30 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)作用的最佳时间, 筛选过敏和类过敏叠加模型的阳性条件, 随后考察XST($4, 8, 16 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$)对细胞活力及与DNP-IgE/BSA叠加后对细胞脱颗粒的影响。体内以ICR小鼠为实验对象, 以(类)过敏反应症状分值及血浆中免疫球蛋白E(IgE)、组胺、5-羟色胺、血管内皮生长因子A(VEGF-A)、末端补体复合物(SC5b-9)含量为评价指标, 筛选卵蛋白(OVA, $2.5, 5.0, 10.0 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)、C48/80($1, 2, 4 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)过敏-类过敏模型阳性条件, 最后对XST($60, 120, 240 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)的致敏性及是否会产生过敏、类过敏反应进行评价。结果 体外细胞实验最终确定 $400 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的DNP-IgE致敏后用 $50 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的DNP-BSA激发的同时与C48/80共同作用30 min作为过敏与类过敏叠加阳性组; $16 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的XST与DNP-IgE/BSA联合叠加时, 与单给DNP-IgE/BSA或XST组比较均促进组胺和 β -Hex的释放($P < 0.01$)。体内小鼠实验中5、10 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 的OVA均会使小鼠体内IgE显著升高, 依据过敏样反应分值和小鼠血浆内组胺、VEGF-A和SC5b-9含量最终确定 $5 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ OVA与 $1 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ C48/80建立叠加模型, 耳、肺及支气管组织中可见明显的水肿及炎性细胞浸润。单纯的XST不会对小鼠致敏, 但是与OVA介导的过敏反应叠加后, 与单给DNP-IgE/BSA或XST组比较, 会显著提高血浆中内组胺、VEGF-A和SC5b-9水平($P < 0.05, 0.01$), 与建立的过敏-类过敏叠加模型表现出较好地一致性。结论 体外体内实验均表明IgE介导的过敏反应和C48/80引起的类过敏反应会产生叠加作用, 加剧过敏介质的释放和免疫反应程度。同时此模型的建立也验证了XST存在过敏与类过敏叠加现象, 该模型可为中药注射剂的临床前安全性评价及合理用药提供参考。

关键词: 过敏反应; 类过敏反应; 叠加; RBL-2H3; ICR小鼠; 注射用血塞通(冻干)

中图分类号: R965.3 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376(2024)05-0982-12

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2024.05.008

An experimental study of combination of allergic and anaphylactoid reactions to Xuesaitong Injection (freeze-drying) based on RBL-2H3 cells and ICR mice model

LIU Fangmei¹, ZHANG Yu¹, TANG Shuwan¹, FU Shengnan¹, LENG Xuejiao¹, LI Cunyu^{1, 2, 3}, ZHENG Yunfeng^{1, 2, 3}, PENG Guoping^{1, 2, 3}

1. College of Pharmacy, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China

2. Jiangsu Collaborative Innovation Center of Chinese Medicinal Resources Industrialization, Nanjing 210023, China

3. National Key Laboratory on Technologies for Chinese Medicine Pharmaceutical Process Control and Intelligent Manufacture, Lianyungang 222047, China

Abstract: Objective To establish an allergic and anaphylactoid superimposed reaction RBL-2H3 cells and ICR mice model for the study of allergic and anaphylactoid reaction to Xuesaitong Injection (freeze-drying) (XST). **Methods** This study employed

收稿日期: 2024-01-05

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(82074006);江苏省自然科学基金面上项目(BK20211303)

第一作者: 刘方美(1999—), 硕士研究生。E-mail: liufangmei15@163.com

*通信作者: 彭国平, 博士, 教授, 主要从事中药化学与分析研究。E-mail: guopingpeng@sohu.com

the β -hexosidase and histamine release rate of RBL-2H3 cells as evaluation indices *in vitro* to determine the optimal dose of DNP-IgE, DNP-BSA, and the duration of interaction with C48/80. The study investigated the effects of various doses of XST on cell viability and degranulation after stacking. *In vivo*, ICR mice were used as experimental subjects, and the scores of (type) allergic reaction symptoms and the contents of immunoglobulin E (IgE), histamine, 5-hydroxytryptamine, vascular endothelial growth factor A (VEGF-A), and terminal complement complex (SC5b-9) in plasma were used as evaluation indicators to screen positive conditions for OVA (2.5, 5.0, 10.0 mg·kg⁻¹) and C48/80 (1, 2, 4 mg·kg⁻¹) allergy-like allergic models, and finally, the sensitization of XST (60, 120, 240 mg·kg⁻¹) and whether it would cause allergic or allergic-like reactions were evaluated. **Results** The positive group for anaphylactic-anaphylactoid superimposed reaction was determined to be 400 ng·mL⁻¹ DNP-IgE sensitised with 50 ng·mL⁻¹ DNP-BSA and co-administered with C48/80 for 30 min. Additionally, the release of His and β -Hex was promoted by 4, 8, and 16 mg·mL⁻¹ of XST in combination with IgE. In the *in vivo* mouse experiment, 5 and 10 mg·kg⁻¹ OVA significantly increased IgE levels in mice. Based on the allergy-like reaction score and the contents of histamine, VEGF-A, and SC5b-9 in the plasma, the 5 mg·kg⁻¹ OVA and 1 mg·kg⁻¹ C48/80 were used to establish a stacked model of allergy-like reaction. There was obvious edema and inflammatory cell infiltration in the ear, lung, and bronchial tissue. XST alone did not sensitize mice, but when combined with OVA-induced allergic reaction, it significantly increased the levels of intra-plasma histamine, VEGF-A, and SC5b-9 compared to the single administration of DNP-IgE/BSA or XST groups ($P < 0.05, 0.01$), showing good consistency with the established allergy-like-allergy stacked model. **Conclusion** *In vitro* and *in vivo* experiments have shown that IgE-mediated allergic reactions and C48/80-induced anaphylactoid reactions produce a superimposed effect, exacerbating the release of allergic mediators and the degree of immune response. The establishment of this model also verified the existence of allergic and anaphylactoid superposition phenomenon of XST. This model can provide a reference for the preclinical safety evaluation and rational use of Chinese medicine injection.

Key words: allergic reaction; anaphylactoid reaction; combination; RBL-2H3; ICR mice; Xuesaitong Injection (freeze-drying)

中药注射剂作为中药主要剂型之一,具有起效快、疗效好等优势,广泛用于肿瘤、心血管等疾病的治疗中。随着中药注射剂的广泛使用与品种的日益增多,其不良反应发生也愈加频繁。已报道的中药注射剂的不良反应主要为类过敏反应,多表现为皮疹、全身水肿、哮喘、呼吸急促、紫绀,严重者则出现休克甚至死亡等^[1]。目前对于这类不良反应现象的解释多为中药注射剂导致了机体过敏或类过敏的发生,但临床过敏性休克可发生在人体连续输液的第2天,这与过敏反应机制存在差异,又难以符合类过敏反应特征。本研究前期推测可能在首次使用中药注射剂之前机体就处于一个过敏反应应激阶段,即机体内免疫球蛋白E(IgE)水平较正常人处于一个较高水平,其体内的过敏介质如组胺、补体等水平异常,继而在使用中药注射剂后,中药注射剂的类过敏效应与机体本身的过敏效应产生叠加(协同)作用^[2],促使免疫细胞如肥大细胞或嗜碱性粒细胞等释放过敏介质过多,作用于血管、皮肤、呼吸系统等靶器官,加重过敏样反应,严重者则会出现过敏性休克甚至死亡。临床只在患者使用中药注射剂出现急性过敏样反应后才会采取常规体格检查如血压(BP)、脉率(P)和呼吸(R)等,以及血常规、肝肾功能检查等^[3-4],缺乏对中药注射剂临床前的过敏性叠加反应评价研究,致使临床上中药注射剂不良反应现象时有发生,严重制约了中药注射

剂的发展。

注射用血塞通(冻干)(以下简称XST)的主要成分为三七总皂苷,具有活血祛瘀、通脉活络的功效,用于卒中偏瘫、瘀血阻络及脑血管疾病后遗症、胸痹心痛、视网膜中央静脉阻塞属瘀血阻滞证者。临床中XST所导致的皮肤及附件、全身性疾病等不良反应发生率较高,且存在超说明书和超剂量用药情况^[5]。现已有研究表明XST会引起类过敏反应^[6-7],故本实验将其作为代表性中药注射剂进行过敏与类过敏研究。

当前检测类过敏反应的方法多为体外细胞实验和体内动物实验。大鼠嗜碱性白血病细胞RBL-2H3细胞具有原代腹腔肥大细胞及粒细胞的部分特征,该细胞表面表达IgE高亲和力受体,受刺激后能分泌组胺、 β -氨基己糖苷酶(β -Hex)等过敏性介质,可用于由IgE介导的过敏性反应及非IgE介导的类过敏反应研究^[8-10]。动物模型中ICR小鼠主要用于全身类过敏试验方法(MASR),通过观察不同剂量类过敏药物所致动物全身过敏样反应症状进行打分,同时以血液中的过敏性介质含量为指标,结合受试动物全身症状特点对其进行综合评判^[11-12]。

组胺是引起过敏和类过敏反应的主要活性介质,肥大细胞(MC)提前合成组胺、 β -Hex,并将其贮存在胞内,当受到免疫刺激后,便会释放这些免疫介质^[13],所以体外细胞实验常将组胺和 β -Hex作为

评价药物类过敏反应程度的指标^[14-16]。IgE是区分过敏和类过敏的特征性指标^[17-18],5-羟色胺(5-HT)同样作为过敏介质,汪芳等^[19]发现在过敏反应过程中,IgE和5-HT均有不同程度的升高趋势,可用来表征过敏反应发生程度。可溶性末端补体复合物(SC5b-9)作为末端补体复合物,是经典、旁路或甘露糖结合凝集素(MBL)途径激活补体系统而得到的殊途同归的结果,其含量变化在预测免疫反应缓解和复发环节具有重要意义^[20]。Wang等^[21-22]通过过敏和类过敏豚鼠体内实验,发现只有过敏反应能够引起IgE的升高,而类过敏反应中SC5b-9则明显升高,并将2种指标作为区分2类免疫反应的特征指标。过敏和类过敏反应的主要表现之一为水肿、血管通透性增加,血管内皮生长因子-A(VEGF-A)是血管通透因子,可通过细胞小囊泡器迅速使血管通透性增加^[23-24],上述指标均可作为评价过敏样反应程度的指标。

本研究将体外RBL-2H3细胞模型与ICR小鼠体内模型相结合,通过检测体外细胞经IgE与C48/80叠加不同时间后 β -Hex和组胺的释放率、体内小鼠比较(类)过敏症状评分以及血浆内细胞因子含量,筛选出适于评价小鼠发生过敏和类过敏反应的阳性模型剂量与代表性指标,建立过敏与类过敏叠加反应的细胞模型和动物模型,随后对代表性中药注射剂XST的致敏性进行研究,在确保该注射剂不会致过敏的前提下,再对前期建立的阳性模型进行适用性考察,验证该模型的可行性,为后期中药注射剂临床前的过敏与类过敏反应评价提供参考。

1 材料

1.1 细胞

大鼠嗜碱性白血病细胞RBL-2H3细胞,购自中国科学院上海生命科学院研究院细胞资源中心。用DMEM高糖完全培养基(含1%双抗和10%胎牛血清)培养于37℃、5%CO₂的细胞培养箱中,2~3d传代1次。

1.2 动物

SPF级健康雄性ICR小鼠,体质量18~22g,购自上海斯莱克实验动物有限责任公司,实验动物生产许可证号SCXK(沪)2022-0004。动物实验经南京中医药大学动物伦理委员会审批通过,伦理编号202305A011、202307A062。于南京中医药大学动物中心适应性饲养3d,温度20~23℃,相对湿度40%~70%,12h昼夜交替循环,动物自由进食饮水。

1.3 药品与主要试剂

DMEM高糖培养基(批号20220908)、胰蛋白酶-EDTA消化液(批号21030702)均购自凯基生物技术股份有限公司;胎牛血清(批号21030702)购自浙江天杭生物科技股份有限公司;PBS(批号N15HR13969A)、对硝基苯基-N-乙酰基- β -D-葡萄糖酰胺(批号O11HS197293)、鸡蛋清白蛋白(批号J08GS153986)均购自上海源叶生物科技有限公司;改良台氏液(批号WH1022X131)购自武汉普诺赛生命科技有限公司;Compound48/80(批号0000197118)、小鼠抗二硝基苯单克隆抗体(DNP-IgE,批号0000119780)均购自美国Sigma公司;DNP-牛血清白蛋白(BSA)(批号165849-03)购自美国Biosearch公司;XST(批号21AB218)购自昆药集团股份有限公司;邻苯二甲醛(批号RH272582)购自上海易恩化学技术有限公司;Triton X-100(批号T8200)购自北京索莱宝科技有限公司;小鼠IgE ELISA试剂盒(批号YJ037602)、小鼠组胺ELISA试剂盒(批号YJ001877)、小鼠5-HT ELISA试剂盒(批号YJ001891)均购自上海酶联生物公司;小鼠可溶性末端补体复合物(sC5b-9,批号E-EL-M1129c)、小鼠VEGF-A ELISA试剂盒(批号E-EL-M1292c)均购自Elabscience公司。

1.4 仪器

VS-1300L-U型苏净安泰洁净工作台(苏州安泰空气技术有限公司);Heracell 150i型CO₂培养箱(美国Thermo Fisher Scientific公司);Synergy H1型多功能微孔板检测仪(Biotek Instruments公司)。

2 方法

2.1 细胞实验

2.1.1 抗DNP-IgE单抗刺激RBL-2H3细胞脱颗粒的浓度筛选 取对数生长期的RBL-2H3细胞,接种于96孔板中,每孔 2×10^4 个,设置空白组(无细胞)、对照组、裂解(0.1% TritonX-100)组、IgE(终质量浓度分别为50、100、200、400、800、1 000 ng·mL⁻¹)组,其中接种后IgE组加入各浓度抗体,其余组加入相同体积的改良台氏液,各组于37℃、5%CO₂培养24h后,吸弃旧液,用改良台氏液冲洗3次,空白组和对照组加入200 μ L的改良台氏液,IgE组加入用改良台氏液稀释好的终质量浓度为500 ng·mL⁻¹的DNP-BSA溶液,于培养箱中培养1h后取出,冰浴10 min中止反应,其中裂解组加入200 μ L用改良台氏液稀释成终浓度为0.1% TritonX-100的裂解液于培养箱中作用30 min后,吸取上清液于EP管中,于

4 °C、10 000 r·min⁻¹离心15 min。吸取上清液50 μL于新的96孔板中,加入50 μL的1 mmol·L⁻¹ 4-硝基苯-N-乙酰-β-D-氨基糖苷酶显色液,于37 °C孵育1.5 h后取出,加入150 μL的0.1 mol·L⁻¹ Na₂CO₃/NaHCO₃终止液,于酶标仪405 nm波长下检测吸光度(A)值,计算β-Hex的释放率。

$$\beta\text{-Hex释放率} = (A_{\text{实验}} - A_{\text{空白}}) / (A_{\text{裂解}} - A_{\text{空白}})$$

2.1.2 DNP-BSA激发RBL-2H3细胞脱颗粒的浓度筛选 取对数生长期的RBL-2H3细胞,接种于96孔板中,每孔2×10⁴个,设置空白组(无细胞)、对照组、裂解(0.1% TritonX-100)组、IgE(终质量浓度为400 ng·mL⁻¹)组,于37 °C、5% CO₂培养24 h后,吸弃旧液,用改良台氏液冲洗3次后对照组加入改良台氏液200 μL, IgE组加入用改良台氏液稀释好的终质量浓度分别为10、25、50、100、250、500、1 000 ng·mL⁻¹的DNP-BSA溶液,细胞上清提取检测方法按“2.1.1”进行。计算各组β-Hex释放率。

2.1.3 DNP-IgE/BSA与C48/80刺激RBL-2H3细胞过敏和类过敏叠加反应时效考察 取对数生长期的RBL-2H3细胞,接种于96孔板中,每孔2×10⁴个,设置空白组(无细胞)、对照组、C48/80(30 μg·mL⁻¹)组、DNP-IgE(400 ng·mL⁻¹)/BSA(50 ng·mL⁻¹)组、DNP-IgE(400 ng·mL⁻¹)/BSA(50 ng·mL⁻¹)与C48/80(30 μg·mL⁻¹)叠加组、裂解(0.1% TritonX-100)组,接种后DNP-IgE/BSA组加入抗体,各组细胞于37 °C、5% CO₂培养24 h后,吸弃旧液,用改良台氏液冲洗3次。对照组加入改良台氏液200 μL; C48/80组加入终质量浓度为30 μg·mL⁻¹的C48/80溶液作用30 min; IgE组加入用改良台氏液稀释好的终质量浓度为50 ng·mL⁻¹的DNP-BSA溶液; IgE与C48/80叠加不同时间组加入50 ng·mL⁻¹的DNP-BSA溶液后,分别于培养箱中培养0、0.5、1.0、2.0、4.0 h(在最后30 min时加入终浓度为30 μg·mL⁻¹的C48/80)后取出;裂解组细胞在相同最后30 min时加入200 μL TritonX-100的裂解液。分别吸取各组细胞上清液,处理细胞上清进行检测并计算各组β-Hex释放率。

组胺测定:吸取各组上清液20 μL于全黑96孔板中,分别加入20 μL 1 mol·L⁻¹ NaOH溶液和20 μL的1% 邻苯二甲醛溶液,37 °C孵育15 min后取出,加入20 μL 1 mol·L⁻¹ HCl溶液中止反应,立即采用酶标仪于E_m/E_x=350 nm/460 nm测定各组A值,并计算组胺释放率。

$$\text{组胺释放率} = (A_{\text{实验}} - A_{\text{空白}}) / (A_{\text{裂解}} - A_{\text{空白}})$$

2.1.4 XST对DNP-IgE/BSA诱导RBL-2H3细胞脱颗粒模型活力的影响 取对数生长期的RBL-2H3细胞,接种于96孔板中,每孔2×10⁴个,分别设置有和无DNP-IgE(400 ng·mL⁻¹)/BSA(50 ng·mL⁻¹)刺激的空白组(无细胞)、对照组、C48/80(30 μg·mL⁻¹)组、XST(4、8、16 mg·mL⁻¹)组,有DNP-IgE/BSA刺激组加入400 ng·mL⁻¹的DNP-IgE,其余组加入同体积的改良台氏液,于37 °C、5% CO₂培养24 h后,吸弃旧液,用改良台氏液冲洗3次。按分组加入稀释好的各药液,有DNP-IgE/BSA刺激组加入终浓度为50 ng·mL⁻¹的DNP-BSA。37 °C孵育30 min后吸弃上清,加入20 μL 5 mg·mL⁻¹的MTT溶液和180 μL的改良台氏液,37 °C孵育4 h,取出,吸弃上清液,加入150 μL的DMSO溶液,避光震荡10 min,于酶标仪490 nm波长下检测A值。计算存活率。

$$\text{存活率} = (A_{\text{实验}} - A_{\text{空白}}) / (A_{\text{对照}} - A_{\text{空白}})$$

2.1.5 XST对DNP-IgE/BSA诱导RBL-2H3细胞脱颗粒影响 在“2.1.4”项基础上增加裂解组,除裂解组外,各组操作与“2.1.4”项相同,裂解组于细胞培养最后30 min加入200 μL TritonX-100的裂解液,培养箱中培养30 min后取出,取各组上清液进行β-Hex和组胺的测定。

2.2 动物实验

2.2.1 卵蛋白(OVA)介导的过敏反应与C48/80引发的类过敏反应叠加小鼠实验 OVA造模方法借鉴易艳等^[23]方案,根据体质量将ICR小鼠随机分为OVA 0、2.5、5.0、10.0 mg·kg⁻¹组。分别于第1、3、5天ip给药,0 mg·kg⁻¹组给予0.9%氯化钠水溶液。在末次致敏的第14天,内眦静脉丛取血,EDTA-2K抗凝,于4 °C、3 000 r·min⁻¹离心10 min分离血清,进行后续IgE的ELISA检测(同时设置仅尾iv C48/80 1、2、4 mg·kg⁻¹组,给药后30 min检测)。随后尾iv注射4倍剂量的OVA进行激发,30 min内观察小鼠行为,并按表1评价过敏反应症状分值^[25-26]。随后各组小鼠均又分为C48/80 0、1、2、4 mg·kg⁻¹亚组,尾iv C48/80并观察30 min内小鼠症状表现,评价过敏反应症状分值,以OVA 0 mg·kg⁻¹+C48/80 0 mg·kg⁻¹组为对照组。随后摘眼球取血,EDTA-2K抗凝,于4 °C、3 000 r·min⁻¹离心10 min分离血清,吸取上清液进行组胺、5-HT、SC5b-9和VEGF-A的ELISA检测。小鼠脱颈椎处死后,取出耳朵和肺,置于组织固定液中,常规脱水、浸蜡、包埋、切片,进行HE染色,光学显微镜下观察其病理形态学变化。

2.2.2 XST的过敏研究 将ICR小鼠分为9组,分

表1 小鼠(类)过敏反应症状等级评分

Table 1 Mouse (anaphylactic) allergic reaction symptom rating scale

症状表现	分值
正常活动	0
不安、频繁搔鼻或搔耳	1
活动减少或不动、呼吸急促、排尿排粪、口鼻(足背)肿胀	2
呼吸困难、喘息、口周发绀	3
意识丧失、震颤、抽搐、步态不稳	4
死亡	5

别为对照组、OVA (5.0 mg·kg⁻¹) 平行 5 组(此仅验证过敏反应, 后续各组进行不同操作)、XST(60、120、240 mg·kg⁻¹, 临床等效剂量的 1、2、4 倍) 组, 每组 8 只, XST、OVA 致敏方式同“2.2.1”激发前 OVA 的给药方式, 于末次致敏的第 14 天, 内眦静脉丛取血, EDTA-2K 抗凝, 于 4 °C, 3 000 r·min⁻¹ 离心 10 min 分离上清, 进行后续 IgE 的 ELISA 检测。

2.2.3 XST 的类过敏与过敏叠加研究 取“2.2.1”项的对照组和 OVA (5.0 mg·kg⁻¹) 平行 5 组, 将 OVA (5.0 mg·kg⁻¹) 平行 5 组分为 OVA 组、OVA + C48/80 组、OVA + XST(60、120、240 mg·kg⁻¹) 组, 另设置 C48/80(1 mg·kg⁻¹) 组、XST(60、120、240 mg·kg⁻¹) 组, 致敏第 14 天取血后, OVA 组、OVA + C48/80 组、OVA + XST(60、120、240 mg·kg⁻¹) 组尾 iv 20 mg·kg⁻¹ 的 OVA 激发, 其余组给予相同剂量的 0.9% 氯化钠水溶液, 观察 30 min 行为, 随后尾 iv 相应剂量的 C48/80 或 XST, 继续观察 30 min 后, 摘眼球取血, EDTA-2K 抗凝, 于 4 °C、3 000 r·min⁻¹ 离心 10 min 分离, 吸取上清液进行组胺、SC5b-9 和 VEGF-A ELISA 检测。

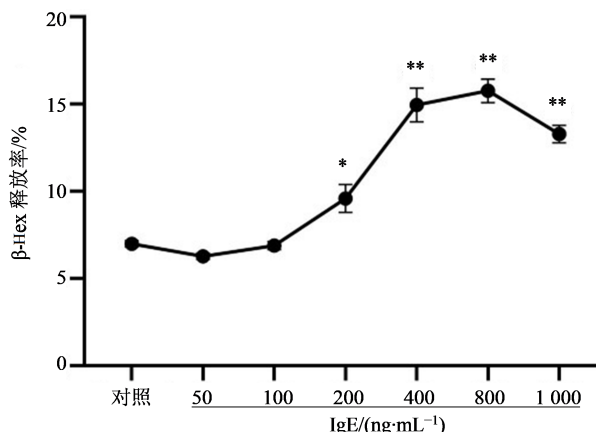
2.3 统计学分析

采用 GraphPad Prism 9.3.1 软件进行分析, 数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 体外细胞 β -Hex 和组胺释放率、细胞活力及小鼠体内 IgE 分析采用 One-way ANOVA 比较, 小鼠行为学评分、组胺、5-HT、SC5b-9 和 VEGF-A 分析 Two-way ANOVA 比较。

3 结果

3.1 细胞实验

3.1.1 不同浓度抗 DNP-IgE 单抗刺激 RBL-2H3 细胞过敏脱颗粒的 β -Hex 释放率 如图 1 所示, 在 IgE 为 50~800 ng·mL⁻¹ 时, β -Hex 释放率随着 IgE 的含量的增加而增加; 400~800 ng·mL⁻¹ 上升趋势变缓, 随后呈现下降趋势。故选择 400 ng·mL⁻¹ 的 IgE 作为后续致敏浓度。



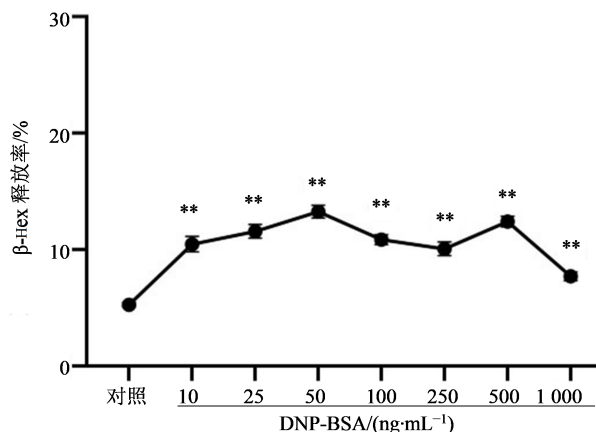
与对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ 。

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

图1 不同浓度 IgE 致敏的 β -Hex 释放率 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Fig. 1 Sensitization β -Hex release rate at different concentration of IgE ($\bar{x} \pm s, n=6$)

3.1.2 不同浓度 DNP-BSA 激发 RBL-2H3 细胞过敏脱颗粒的 β -Hex 释放率 如图 2 所示, β -Hex 的释放随着 DNP-BSA 浓度的增加呈现先上升后下降再上升、下降的趋势, 故选择 50 ng·mL⁻¹ 的 DNP-BSA 作为后续激发剂量。



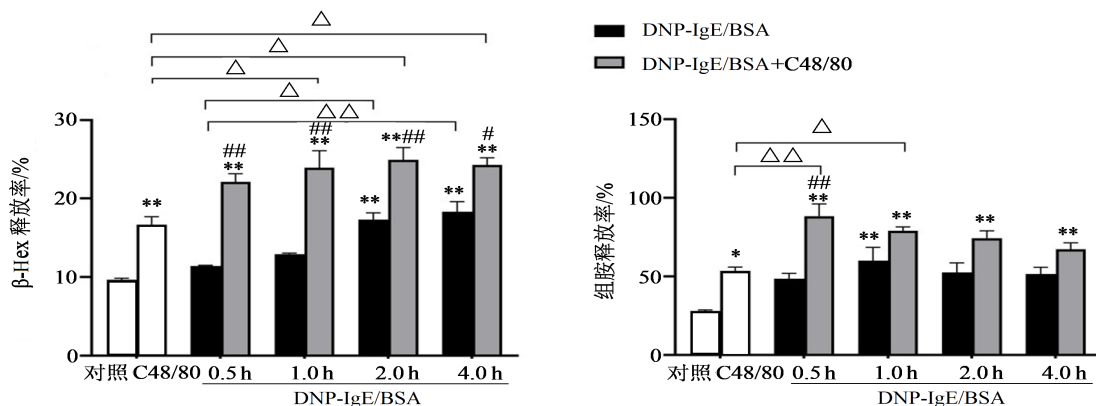
与对照组比较: ** $P < 0.01$ 。

** $P < 0.01$ vs control group.

图2 不同浓度 DNP-BSA 激发的 β -Hex 释放率 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Fig. 2 Different doses of DNP-BSA excite β -Hex release rate ($\bar{x} \pm s, n=6$)

3.1.3 DNP-IgE/BSA 与 C48/80 刺激 RBL-2H3 细胞过敏和类过敏叠加时效考察 如图 3 所示, 与对照组相比, 单一的 C48/80 引起 β -Hex 和组胺的释放率显著升高 ($P < 0.05, 0.01$); 单一的 DNP-IgE/BSA 作用 2.0、4.0 h 引起 β -Hex 释放率显著升高, 作用 1.0 h 引起组胺的释放率显著升高 ($P < 0.01$); 各叠加组均引起 β -Hex 和组胺的释放率显著升高 ($P < 0.01$)。叠加组的 1.0、2.0、4.0 h 与单一 C48/80 组比较 β -Hex 释放率显著增加 ($P < 0.05, 0.01$), 叠加组的 0.5 h 与



与对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$; 与同时时间点 DNP-IgE/BSA 组比较: # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$; 与 C48/80 组或 0.5 h DNP-IgE/BSA 组比较: $\Delta P < 0.05$ $\Delta\Delta P < 0.01$ 。
* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs control group; # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ vs DNP-IgE/BSA group at same time point; $\Delta P < 0.05$ $\Delta\Delta P < 0.01$ vs C48/80 group or 0.5 h DNP-IgE/BSA group.

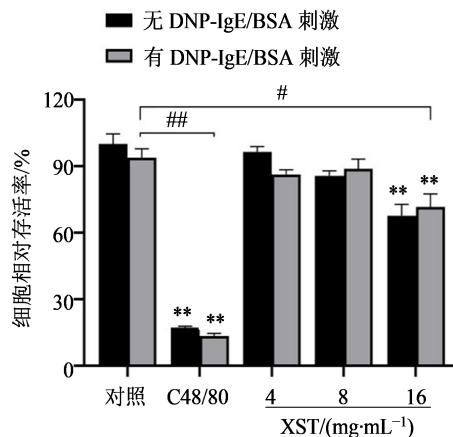
图3 IgE与C48/80叠加致细胞 β -Hex、组胺释放率($\bar{x} \pm s, n=5$)
Fig. 3 Superposition of IgE and C48/80 causes release rate of His and β -Hex ($\bar{x} \pm s, n=5$)

单一 C48/80 组比较组胺释放率显著增加 ($P < 0.01$)。

结果均表明在由 DNP-IgE/BSA 介导的过敏和 C48/80 介导的类过敏反应共同作用下, 会加剧 RBL-2H3 细胞的脱颗粒现象, 表现为 β -Hex 和组胺的释放率增加, 进一步加重过敏样反应程度。选择 DNP-BSA 与 C48/80 共同作用 30 min (即 DNP-BSA 作用 0 h 加入 C48/80) 作为后续细胞实验的过敏与类过敏叠加阳性组。

3.1.4 XST 对 DNP-IgE/BSA 诱导脱颗粒模型细胞活力的影响 如图 4 所示, 与对照组相比, 有无 DNP-IgE/BSA 刺激下, 4、8 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 XST 均未明显降低细胞活力, 16 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 XST 均显著降低细胞活力 ($P < 0.01$)。而 30 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 C48/80 则产生了较大的细胞毒性, 推测是与 C48/80 可直接刺激 RBL-2H3 细胞, 诱导细胞膜破裂, 使胞内的过敏性成分直接流出有关。

3.1.5 XST 对 DNP-IgE/BSA 诱导 RBL-2H3 细胞脱颗粒影响 由图 5 可知, C48/80、不同剂量的 XST 组在 DNP-IgE/BSA 刺激 RBL-2H3 细胞的条件下, 其 β -Hex 和组胺的释放率较对照组和同组无 DNP-IgE/BSA 刺激条件下均显著性升高 ($P < 0.05, 0.01$); 且与单一 DNP-IgE/BSA 组比较, XST 16 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 和 C48/80 叠加 DNP-IgE/BSA 组的 β -Hex 释放率显著增加 ($P < 0.01$), 各叠加组的组胺释放率显著增加 ($P < 0.01$)。体外细胞实验表明, XST 介导的类过敏反应可以与 IgE 介导的过敏反应产生叠加作用, 加剧过敏性介质的释放。



与对照组比较: ** $P < 0.01$; 与单给 DNP-IgE/BSA 组比较: # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ 。
** $P < 0.01$ vs control group; # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ vs single DNP-IgE/BSA group.

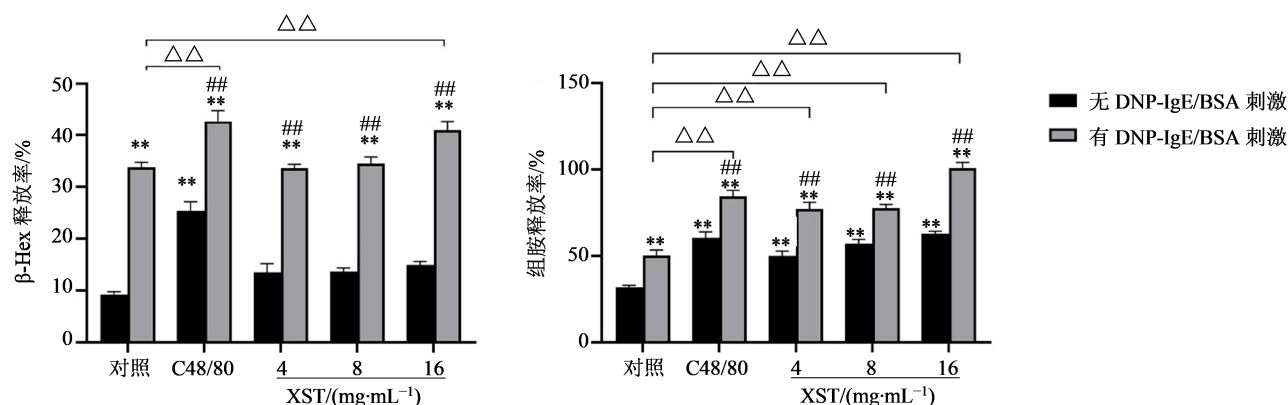
图4 XST对DNP-IgE/BSA诱导脱颗粒模型细胞活力的影响($\bar{x} \pm s, n=6$)

Fig. 4 Effect of XST on viability of DNP-IgE/BSA-induced degranulation model cells ($\bar{x} \pm s, n=6$)

3.2 OVA 介导的过敏反应与 C48/80 介导的类过敏反应叠加小鼠实验

3.2.1 OVA、单给 C48/80 对小鼠血清 IgE 抗体含量的影响 如图 6 所示, 与对照组相比, 致敏剂量为 2.5、5.0、10.0 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 的 OVA 都可使小鼠体内 IgE 含量不同程度地升高, 其中 5、10 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 组差异显著 ($P < 0.05$)。与对照组相比, 单给 C48/80 不会致使小鼠体内 IgE 水平升高。

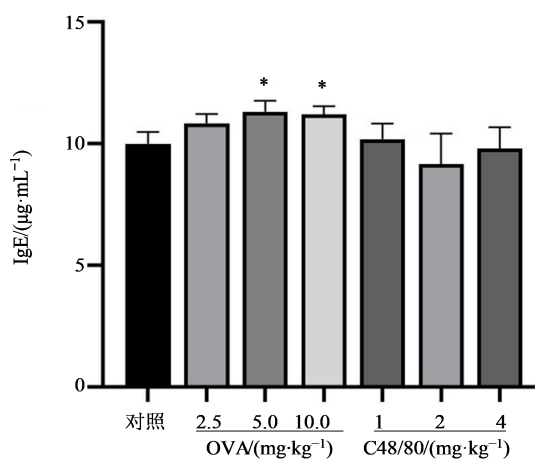
3.2.2 小鼠全身致敏后(类)过敏反应症状评价 如图 7 所示, 对照组与 C48/80 组在给予 C48/80 前不存在过敏样行为; 给予 C48/80 后, 与对照组及给



与对照组比较: ** $P < 0.01$; 与单给 DNP-IgE/BSA 组比较: $\Delta\Delta P < 0.01$; 与无 DNP-IgE/BSA 刺激的同组比较: $\#\# P < 0.01$ 。
 $**P < 0.01$ vs control group; $\Delta\Delta P < 0.01$ vs single DNP-IgE/BSA group; $\#\# P < 0.01$ vs same group without DNP-IgE/BSA stimulation.

图5 IgE与不同剂量的XST叠加致细胞β-Hex、组胺释放($\bar{x} \pm s, n=5$)

Fig. 5 IgE superimposed with different doses of XST resulted in release of β-Hex and histamine ($\bar{x} \pm s, n=5$)



与对照组比较: * $P < 0.05$ 。

* $P < 0.05$ vs control group.

图6 OVA、单给C48/80对小鼠血清IgE抗体含量的影响($\bar{x} \pm s, n=6$)

Fig. 6 Effects of OVA and C48/80 on serum IgE antibody content in mice ($\bar{x} \pm s, n=6$)

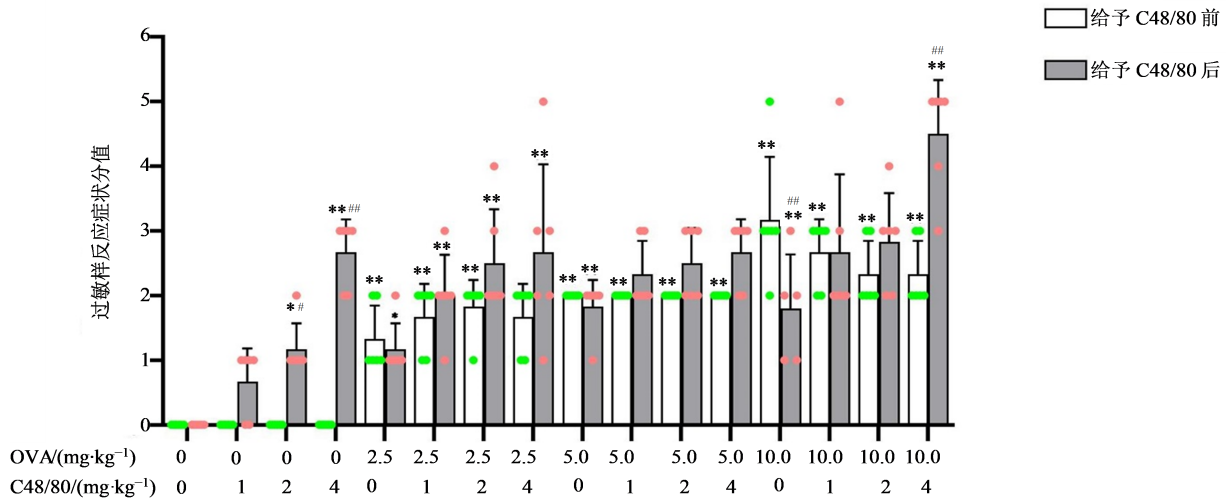
C48/80前比较,C48/80从1 mg·kg⁻¹开始表现出较轻的过敏样反应,2、4 mg·kg⁻¹则呈现强阳性($P < 0.05$ 、0.01)。与对照组比较,给予OVA组过敏反应症状分值均显著增加($P < 0.05$ 、0.01),2.5 mg·kg⁻¹的OVA组小鼠多为频繁搔耳,活动减少;5 mg·kg⁻¹ OVA组小鼠多表现为足背肿胀,而10 mg·kg⁻¹的OVA组小鼠开始出现呼吸困难、喘息等现象。在同一剂量的OVA下,0 mg·kg⁻¹ C48/80组小鼠的过敏样症状逐渐缓解,多表现为活动恢复或水肿消失,但小鼠的过敏样症状随C48/80剂量增加而加剧,如在2.5、10 mg·kg⁻¹的OVA下注射4 mg·kg⁻¹的C48/80后小鼠出现死亡,且在使用4倍剂量的高剂量OVA时,已有小鼠出现死亡。上述现象表明4 mg·kg⁻¹的C48/80与10 mg·kg⁻¹的OVA不宜作为类过敏阳性和过敏

叠加阳性剂量组。同时这与临床中患者出现过敏症状再就施以中药注射液治疗,结果出现过敏性休克甚至死亡的现象相符,表明2种免疫反应存在协同作用,进一步加重不良反应发生的频率与程度。

3.2.3 过敏与类过敏模型小鼠血浆中细胞因子水平 由图8所示,与对照组相比,除10 mg·kg⁻¹的OVA与2 mg·kg⁻¹ C48/80叠加组的5-HT呈明显降低($P < 0.01$)外,其余各组小鼠体内的5-HT均无明显变化;C48/80组小鼠体内血浆中组胺、SC5b-9和VEGF-A含量与C48/80剂量呈正相关,4 mg·kg⁻¹组的组胺和2、4 mg·kg⁻¹组的SC5b-9含量显著升高($P < 0.05$ 、0.01);5 mg·kg⁻¹的OVA与1 mg·kg⁻¹的C48/80叠加后较对照组及2单给药组相比,组胺、SC5b-9和VEGF-A均具有增加趋势,并且与单给1 mg·kg⁻¹的C48/80相比具有明显差异($P < 0.01$)。

3.2.4 小鼠耳、肺、气管病理组织切片图 如图9所示,与对照组小鼠耳组织相比,其他各组耳组织均出现皮下组织疏松水肿,其中OVA与C48/80叠加组尤其明显,并伴有炎性细胞浸润。对照组小鼠的肺部形态正常,气管黏膜上皮细胞排列整齐;C48/80组和OVA组小鼠肺部多呈肺泡间隔增厚,支气管黏膜上皮细胞损伤,其中OVA组小鼠肺部还有炎性细胞浸润;OVA与C48/80叠加组小鼠的肺部水肿明显、肺泡间隔增宽,呈大面积的炎性细胞和红细胞浸润,支气管较C48/80、OVA组也呈增厚状态。

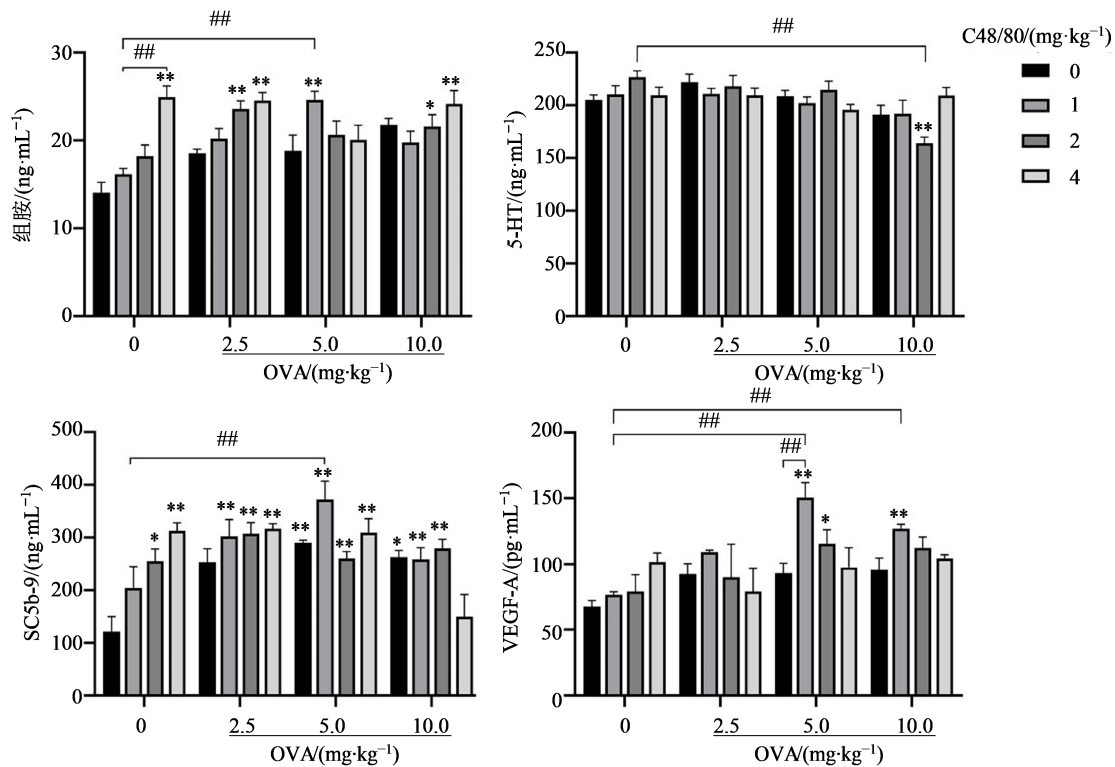
综合小鼠(类)过敏反应症状评分和血浆内细胞因子水平结果,选取5 mg·kg⁻¹的OVA与1 mg·kg⁻¹的C48/80作为小鼠过敏和类过敏叠加反应的阳性剂量组。



与 OVA 0 mg·kg⁻¹+C48/80 0 mg·kg⁻¹ 组比较: *P<0.05 **P<0.01; 与给予 C48/80 前同组比较: #P<0.05 ##P<0.01。
*P<0.05 **P<0.01 vs OVA 0 mg·kg⁻¹+C48/80 0 mg·kg⁻¹ group; #P<0.05 ##P<0.01 vs same group before iv C48/80.

图7 不同剂量的 OVA 和 C48/80 组小鼠的过敏样反应症状分值 ($\bar{x}\pm s, n=6$)

Fig. 7 Anaphylactoid symptom scores in mice at different doses of OVA and C48/80 ($\bar{x}\pm s, n=6$)



与 OVA 0 mg·kg⁻¹+C48/80 0 mg·kg⁻¹ 组比较: *P<0.05 **P<0.01; 与单给 C48/80 或 OVA 组比较: ##P<0.01。
*P<0.05 **P<0.01 vs OVA 0 mg·kg⁻¹+C48/80 0 mg·kg⁻¹ group; ##P<0.01 vs C48/80 or OVA group.

图8 OVA 及 C48/80 各剂量叠加后小鼠体内组胺、5-HT、SC5b-9 和 VEGF-A 测定 ($\bar{x}\pm s, n=6$)

Fig. 8 Determination of histamine, 5-HT, SC5b-9, and VEGF-A contents of each index in mice after superposition of OVA and C48/80 ($\bar{x}\pm s, n=6$)

3.3 XST 对于过敏与类过敏反应适用性评价

3.3.1 XST 的过敏 IgE 检测 图 10 中 OVA 致敏组小鼠较对照组小鼠体内 IgE 水平呈明显升高趋势 ($P<0.05, 0.01$); 而 3 种剂量的 XST 致敏则会降低小鼠体内的 IgE 水平, 但无显著性差异。结果表

明单一的 XST 并不会使小鼠体内 IgE 抗体升高, 不存在过敏反应的发生情况。

3.3.2 XST 的全身过敏反应症状评分 单纯 iv XST、1 mg·kg⁻¹ C48/80 的小鼠也会出现一些过敏样反应; 单纯 OVA 组在第 2 次注射 0.9% 氯化钠溶液后

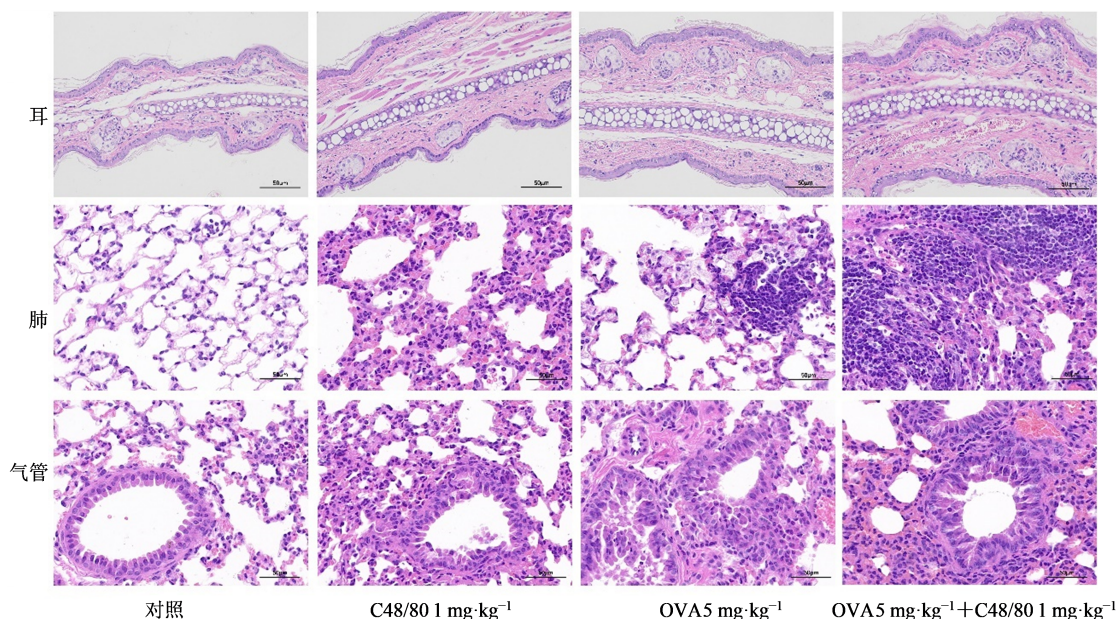


图 9 过敏和类过敏小鼠耳、肺、气管组织病理变化(HE 染色, ×200)

Fig. 9 Histopathological changes of ear, lung and trachea in allergic and anaphylactic mice (HE staining, ×200)

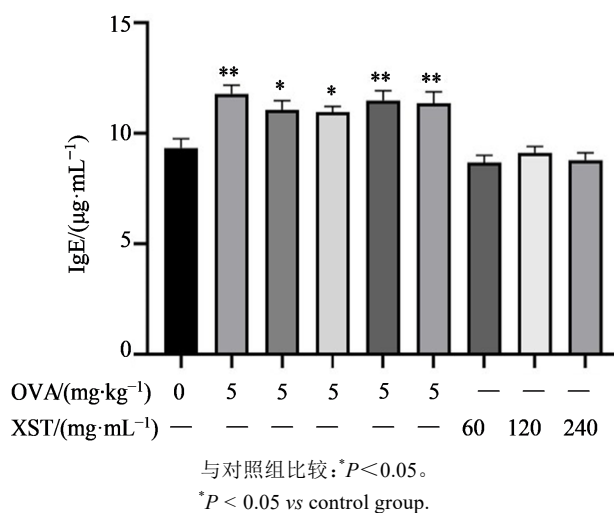


图 10 OVA 及 XST 致敏小鼠体内 IgE 水平 ($\bar{x} \pm s, n=8 \sim 10$)
Fig. 10 IgE in OVA and XST sensitized mice ($\bar{x} \pm s, n=8 \sim 10$)

部分出现足部消肿,活动较为正常,较刚激发时,症状评分显著下降 ($P < 0.01$); OVA 与 C48/80 或 XST (120、240 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) 联合后其过敏样反应加重,症状评分与单 OVA 组比较显著增加 ($P < 0.01$), XST 叠加组与单给 XST 组症状评分也明显升高,高剂量的 XST 叠加组则出现 1 例死亡。评分见图 11。

3.3.3 XST 的类过敏与过敏叠加小鼠血浆内细胞因子检测 与对照组相比, C48/80 组、XST 各剂量组及叠加组小鼠血浆中组胺、SC5b-9、VEGF-A 均有升高趋势。C48/80 叠加组和 OVA+XST 240 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 组小鼠血浆中 3 指标浓度与对照组相比均显著性升

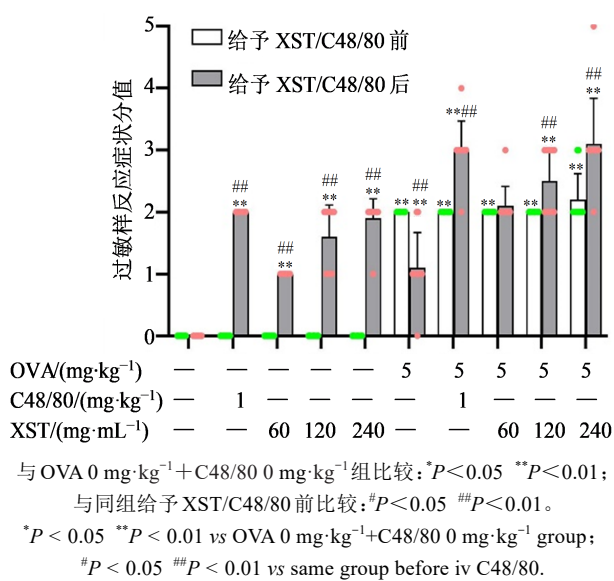


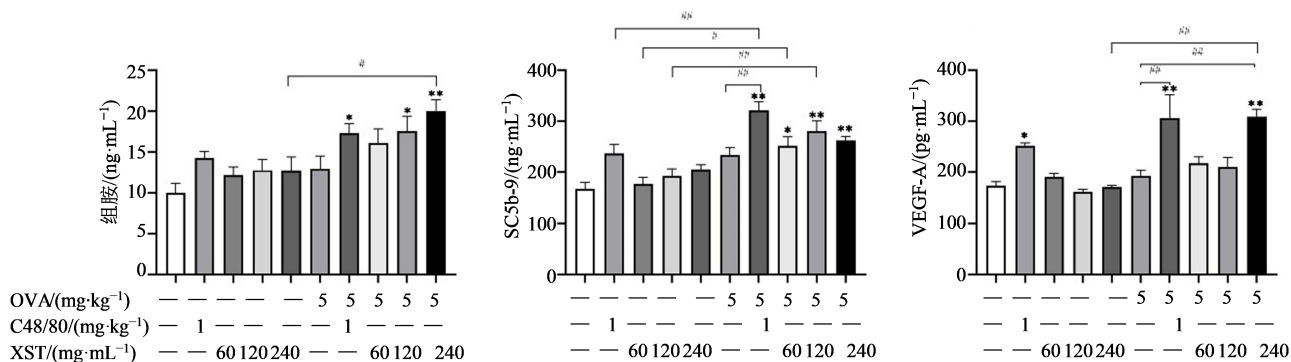
图 11 XST 组小鼠(类)过敏反应症状评分图 ($\bar{x} \pm s, n=8 \sim 10$)

Fig. 11 Symptom score of allergic (anaphylactoid) reaction in mice of XST group ($\bar{x} \pm s, n=8 \sim 10$)

高 ($P < 0.01$), 其中 OVA+XST 240 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 组的组胺和 VEGF-A 均较单一高剂量组的 XST 组呈显著性升高 ($P < 0.05, 0.01$)。结果见图 12。

4 讨论

当前用于评价类过敏反应的体外细胞模型主要包括 RBL-2H3 细胞、P815 细胞、LAD2 细胞及 Ku812 细胞等^[27]。由于 P815 细胞表面不会表达 FcεRI 受体(与过敏反应相关), 故不适用于 IgE 介导的过敏研究。LAD2 细胞来源于人肥大细胞, 几乎



与 OVA 0 mg·kg⁻¹+C48/80 0 mg·kg⁻¹ 组比较: *P<0.05 **P<0.01; 与单给 XST 或 OVA 组比较: #P<0.05 ##P<0.01。

*P<0.05 **P<0.01 vs OVA 0 mg·kg⁻¹+C48/80 0 mg·kg⁻¹ group; #P<0.05 ##P<0.01 vs single C48/80/OVA group。

图 12 叠加后小鼠体内组胺、SC5b-9、VEGF-A 含量测定 ($\bar{x}\pm s, n=10$)

Fig. 12 Determination of contents of histamine, SC5b-9, and VEGF-A in mice after superposition ($\bar{x}\pm s, n=10$)

包含完整的人原代肥大细胞的生物学特征,但是目前国内的 LAD2 存在污染现象,致使其研究受限。Ku812 细胞来源于人体、且能够体外稳定培养的免疫细胞,但其悬浮细胞的特性使得其脱颗粒观察较难。综上,将 RBL-2H3 细胞作为评价药物过敏和类过敏反应的体外细胞模型,具有简便、灵敏等优点,且在本研究中不同剂量的 DNP-IgE 与 DNP-BSA 组合会使得 RBL-2H3 细胞的脱颗粒率发生变化。

过敏反应及类过敏反应都会产生组胺,但组胺半衰期短,可能在 1 h 内代谢,会对实验结果造成误差。 β -Hex 是肥大细胞(MC)颗粒中所包含的物质,其释放程度与 MC 脱颗粒程度一致,且与组胺的释放量呈正相关,且半衰期长,较为稳定,故本实验前期将 RBL-2H3 细胞的 β -Hex 释放率作为标准,确定 DNP-IgE 致敏剂量和 DNP-BSA 的激发剂量,随后以组胺和 β -Hex 释放率作为参考指标,比较 IgE 与 C48/80 叠加作用不同时间,最后确定 IgE 与 C48/80 共同作用 30 min 作为过敏与类过敏叠加细胞模型。

由于细胞提前合成组胺、 β -Hex 并将其贮存在胞内,故为排除过敏模型与类过敏叠加模型致促使细胞破裂而导致过敏性介质释放增多的影响,本实验考察了 DNP-IgE/BSA 和 C48/80 或不同剂量的 XST 叠加对 RBL-2H3 细胞活力的影响。结果显示 C48/80 或 XST 与 IgE 叠加组较单给 DNP-IgE/BSA 组其细胞活力并未明显下降,但是其组胺和 β -Hex 的释放率都明显升高。这表明叠加组并不是直接破坏细胞膜,而是存在其他刺激方式加速细胞的过敏性介质释放。

现今关于药物类过敏反应的检测尚无一个成熟且可靠的动物模型及试验方法。现行国家食品药品监督管理局《指导原则》中,对静脉注射剂 I 型

过敏反应推荐使用主动全身过敏试验(ASA)和被动皮肤过敏试验(PCA),但未提供类过敏反应方法^[28]。故本实验通过观察小鼠尾 iv 给药后过敏反应症状并给予评分,模拟临床中病人静脉给药后症状表现。本实验前期研究不同致敏剂量的 OVA 对小鼠体内 IgE 含量的影响,建立一个体内 IgE 异常升高的过敏性应激状态。随后考察不同剂量的 C48/80 对小鼠过敏样反应症状评分及体内细胞因子含量的影响。从症状评分和小鼠存活率看,在 5 mg·kg⁻¹ 的 OVA 与 1 mg·kg⁻¹ 的 C48/80 较好的呈现临床严重不良反应症状表现,且该剂量下的小鼠血浆内组胺、SC5b-9 和 VEGF-A 与对照组及单一 C48/80 组比较均显著上升,耳及肺组织的病理切片中也可看出明显的水肿及红细胞浸润。故可将 5 mg·kg⁻¹ 的 OVA 与 1 mg·kg⁻¹ 的 C48/80 作为 ICR 雄性小鼠发生过敏和类过敏叠加反应的模型剂量。

本实验中使用的 XST 主要成分为三七皂苷 R₁、人参皂苷 R_{g₁}、R_b 和 R_d 等大分子物质,这些大分子进入人体血液可能会使机体产生变态反应^[29],同时成分也具有溶血或抗溶血作用,当 XST 剂量过高时,其中的三七总皂苷具有溶血活性^[30],可能会导致红细胞破裂。当机体处于免疫异常状态时,XST 成分可能会加重过敏样反应发生程度。

本研究体外考察 DNP-IgE 的致敏与 DNP-BSA 的激发条件以及与 C48/80 的作用时间对 RBL-2H3 细胞脱颗粒的影响,体内采用 ICR 小鼠分析不同剂量 OVA 与 C48/80 对小鼠(类)过敏反应强度以及血浆内细胞因子如 IgE、组胺、5-HT、SC5b-9 和 VEGF-A 的含量,并使用代表性中药注射剂 XST 进行验证,综合确立了一种过敏和类过敏反应叠加的体内体外评价模型,可为今后中药注射剂是否发生过敏

和类过敏叠加反应提供了一种可行的评价方法。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 邓国艳, 米惠, 刘红宇, 等. 基于VOSviewer和CiteSpace对中药注射剂类过敏反应研究热点和趋势的可视化分析[J]. 中草药, 2024, 55(3): 907-918.
Deng G Y, Mi H, Liu H Y, et al. Visualization analysis of hot spots and trends in research on anaphylactoid reactions of traditional Chinese medicine injection based on VOSviewer and CiteSpace [J]. China J Chin Mater Med, 2021, 46(7): 1711-1716.
- [2] 彭国平, 李存玉. 中药注射剂安全性的分析与思考[J]. 南京中医药大学学报, 2019, 35(6): 744-751.
Peng G P, Li C Y. Thinking and analysis on the safety of traditional Chinese medicine injection [J]. J Nanjing Univ Tradit Chin Med, 2019, 35(6): 744-751.
- [3] 黄瑛, 潘红梅. 舒血宁注射液所致严重不良反应4例分析[J]. 药物流行病学杂志, 2014, 23(8): 519-520.
Huang Y, Pan H M. Analysis of 4 cases of serious adverse reactions caused by shuxuening injection [J]. Chin J Pharmacoepidemiol, 2014, 23(8): 519-520.
- [4] 郭明鑫, 薛莉丽, 胡志强, 等. 注射用红花黄色素致过敏性休克1例报道[J]. 临床合理用药, 2023, 16(15): 155-157.
Guo M X, Xue L L, Hu Z Q, et al. Anaphylactic shock caused by safflower yellow for injection: A case report [J]. Chin J Clin Ration Drug Use, 2023, 16(15): 155-157.
- [5] 金鑫瑶, 王可仪, 翟静波, 等. 30097例注射用血塞通(冻干)真实世界应用分析[J]. 中国中药杂志, 2020, 45(20): 5024-5028.
Jin X Y, Wang K Y, Zhai J B, et al. Analysis of Injection of Xuesaitong (lyophilized) in 30097 cases in real world [J]. China J Chin Mater Med, 2020, 45(20): 5024-5028.
- [6] 杨艺帆. 注射用血塞通(冻干)过敏性评价及其类过敏成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 allergy of Xuesaitong for Injection (Freeze-dried) and study on screening of allergic components and reaction mechanism [D]. Shanghai: Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, 2019.
- [7] Xiang Z, Qiao T, Xiao H, et al. The anaphylactoid constituents in Xue-Sai-Tong injection [J]. Planta Med, 2013, 79(12): 1043-1050.
- [8] 刘艳, 谷福蝶, 陈慧莹, 等. 基于RBL-2H3模型分析过敏反应效应细胞激活的差异基因[J]. 食品科学, 2022, 43(22): 105-112.
Liu Y, Gu F D, Chen H Y, et al. Rat basophilic leukemia-2H3 cells to analyze the differential genes involved in the activation of effector cells of anaphylaxis [J]. Food Sci, 2022, 43(22): 105-112.
- [9] Altenbernd F, Schwarz L, Lipowicz B, et al. Myrrh and chamomile flower extract inhibit mediator release from IgE-stimulated mast-cell-like RBL-2H3 cells [J]. Plants, 2022, 11(24): 3422.
- [10] 朱昱, 张军霞, 周继春, 等. BN大鼠和RBL-2H3细胞作为茵栀黄注射液过敏反应模型的可行性研究[J]. 中国药理学通报, 2022, 38(12): 1908-1914.
Zhu Y, Zhang J X, Zhou J C, et al. Feasibility study on BN rats and RBL-2H3 cells as models of allergic reaction to Yin Zhihuang injection [J]. Chin Pharmacol Bull, 2022, 38(12): 1908-1914.
- [11] 杨炳治, 杨旭娟, 黄茜, 等. 注射用曲札苾昔类过敏反应检测体系的应用[J]. 中南药学, 2021, 19(12): 2525-2530.
Yang B Z, Yang X J, Huang X, et al. Allergic reaction evaluation system of piceatannol-3'-O- β -D-glucopyranoside for injection [J]. Cent South Pharm, 2021, 19(12): 2525-2530.
- [12] 李瓊峪, 文雯, 刘红宇, 等. 双黄连注射剂及参麦注射液类过敏反应的剂量相关性研究[J]. 湖南中医药大学学报, 2022, 42(11): 1843-1848.
Li Y Y, Wen W, Liu H Y, et al. Dose correlation study of anaphylactoid reaction induced by Shuanghuanglian Injection and Shenmai Injection [J]. J Hunan Univ Chin Med, 2022, 42(11): 1843-1848.
- [13] 杨艺帆, 谢家骏, 陈锰, 等. 中药注射剂类过敏反应机制的研究进展[J]. 中成药, 2019, 41(8): 1935-1940.
Yang Y F, Xie J J, Chen M, et al. Research progress on allergic reaction mechanism of traditional Chinese medicine injections [J]. Chin Tradit Pat Med, 2019, 41(8): 1935-1940.
- [14] 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.
- [15] Sun X Y, Lv W L, Wang Y L, et al. Mrgprb2 gene plays a role in the anaphylactoid reactions induced by Houittuyinia cordata injection [J]. J Ethnopharmacol, 2022, 289: 115053.
- [16] 申茜, 李珍, 王玉, 等. 绿原酸致RBL-2H3细胞脱颗粒反应及机制研究[J]. 药物评价研究, 2023, 46(2): 305-310.
Shen Q, Li Z, Wang Y, et al. Degranulation response and

- mechanism of chlorogenic acid on RBL-2H3 cells [J]. *Drug Eval Res*, 2023, 46(2): 305-310.
- [17] Adhikari N, Shim W S. Caffeic acid phenethyl ester inhibits pseudo-allergic reactions via inhibition of MRGPRX2/MrgprB2-dependent mast cell degranulation [J]. *Arch Pharm Res*, 2022, 45(9): 644-657.
- [18] Wang J, Zhang Y J, Hu S L, et al. Resveratrol inhibits MRGPRX2-mediated mast cell activation via Nrf2 pathway [J]. *Int Immunopharmacol*, 2021, 93: 107426.
- [19] 汪芳, 萧伟, 王振中, 等. 5-羟色胺监控中药注射剂过敏反应的可行性研究 [J]. *中成药*, 2015, 37(2): 457-459.
Wang F, Xiao W, Wang Z Z, et al. Feasibility study on monitoring allergic reaction of traditional Chinese medicine injection with 5- hydroxytryptamine [J]. *Chin Tradit Pat Med*, 2015, 37(2): 457-459.
- [20] Khalili M, Bonnefoy A, Genest D S, et al. Clinical use of complement, inflammation, and fibrosis biomarkers in autoimmune glomerulonephritis [J]. *Kidney Int Rep*, 2020, 5(10): 1690-1699.
- [21] Wang F, Weng Z B, Li C Y, et al. A reliable method for the evaluation of the anaphylactoid reaction caused by injectable drugs [J]. *Molecules*, 2016, 21(10): 1352.
- [22] 汪芳. 中药注射液类过敏反应特征的研究[D]. 南京:南京中医药大学, 2017.
Wang F. Study on characteristics of anaphylactoid reaction caused by Chinese medicine injection [D]. Nanjing: Nanjing University of Traditional Chinese Medicine, 2017.
- [23] 易艳, 李春英, 赵雍, 等. 一种新的小鼠过敏试验模型的建立及其在中药注射剂致敏性评价中的应用 [J]. *中国中药杂志*, 2022, 47(13): 3581-3588.
Yi Y, Li C Y, Zhao Y, et al. A novel mouse allergy tested model and its application for traditional Chinese medicine injections's allergy evaluation [J]. *China J Chin Mater Med*, 2022, 47(13): 3581-3588.
- [24] Nguyen S M T, Rupprecht C P, Haque A, et al. Mechanisms governing anaphylaxis: Inflammatory cells, mediators, endothelial gap junctions and beyond [J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(15): 7785.
- [25] Angelina A, Jiménez-Saiz R, Pérez-Diego M, et al. Cannabinoid WIN55212-2 impairs peanut-allergic sensitization and promotes the generation of allergen-specific regulatory T cells [J]. *Clin Exp Allergy*, 2022, 52(4): 540-549.
- [26] Han S W, Sun L, He F, et al. Anti-allergic activity of glycyrrhizic acid on IgE-mediated allergic reaction by regulation of allergy-related immune cells [J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 7222.
- [27] 王璐, 龚光明, 苏华. 中药诱导的类过敏反应发生机制及体内外评价模型研究现状 [J]. *药物评价研究*, 2019, 42(12): 2471-2477.
Wang L, Gong G M, Su H. Research on mechanisms and evaluation models of traditional Chinese medicine-induced pseudo-allergy [J]. *Drug Eval Res*, 2019, 42(12): 2471-2477.
- [28] 谢家骏, 张立波, 易娟娟, 等. 小鼠全身类过敏试验方法及其评价标准的研究 [J]. *中国中药杂志*, 2019, 44(17): 3763-3772.
Xie J J, Zhang L B, Yi J J, et al. Establishment of new evaluation standards for systemic anaphylactoid reactions using mouse model [J]. *China J Chin Mater Med*, 2019, 44(17): 3763-3772.
- [29] 易晓霞. 中药注射剂不良反应分析 [J]. *实用中医药杂志*, 2021, 37(3): 504-506.
Yi X X. Analysis of adverse reactions of traditional Chinese medicine injection [J]. *J Pract Tradit Chin Med*, 2021, 37(3): 504-506.
- [30] 韩淑娴, 游云. 三七总皂苷心脑血管药理作用及其溶血反应 [J]. *中国中药杂志*, 2016, 41(5): 818-822.
Han S X, You Y. Balance between cardiovascular pharmacological and hemolytic effects of saponins of *Panax notogenseng* [J]. *China J Chin Mater Med*, 2016, 41(5): 818-822.

[责任编辑 兰新新]