

基于小鼠全身主动过敏实验和被动皮肤过敏实验评价注射用丹参多酚酸安全性

倪秀一¹, 张旭¹, 华文浩², 万梅绪^{3,4}, 李智^{3,4}, 张燕欣^{3,4}, 原景^{3,4}, 李德坤^{3,4}, 刘颖^{5*}, 鞠爱春^{3,4*}

1. 河北中医药大学, 河北 石家庄 050200
2. 北京大学人民医院 检验科, 北京 101109
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重点实验室, 天津 300410
5. 天津市药品医疗器械化妆品不良反应监测中心, 天津 300191

摘要: **目的** 通过小鼠全身主动过敏实验 (ASA) 和被动皮肤过敏实验 (PCA) 评价注射用丹参多酚酸 (SAFI) 的致敏性。**方法** ASA 和 PCA 分别设阴性对照 (0.9%氯化钠注射液) 组、卵清白蛋白 (OVA, 阳性药, 10 mg·kg⁻¹) 组和 SAFI (228、114、23、5、2 mg·kg⁻¹) 组, 致敏均采用 ip 给药方式, 隔天致敏 1 次, 共致敏 5 次。末次致敏 14 d 后, ASA 先取每组 10 只小鼠 iv 2 倍致敏剂量药液激发, 30 min 后眼内眦取血离心, ELISA 法检测血清中肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、组氨酸 (His)、白细胞介素 (IL)-10、血管内皮生长因子 (VEGF) 和 β -氨基己糖苷酶 (β -Hex) 含量, 肺组织苏木精-伊红 (HE) 染色后进行病理观察; 另外每组 10 只 iv 2 倍致敏剂量药液混合 0.4%伊文思蓝 (EB) 激发, 30 min 后记录各组耳廓蓝染和伊文思蓝渗出情况。PCA 致敏后首先取血检测血清免疫球蛋白 E (IgE) 含量, 剩余各组血清混匀后另取每组 6 只进行被动致敏测定背部蓝斑大小。**结果** ASA 结果显示, 与阴性对照组相比, OVA 组有明显过敏反应, SAFI 114、228 mg·kg⁻¹ 剂量 (临床等效剂量的 10、20 倍) 诱发耳廓蓝染过敏反应, 其他剂量组均无明显过敏反应症状; 肺部 HE 结果显示, 与阴性对照组相比, OVA 组肺泡壁凝固性坏死, 肺间质有大量炎症因子浸润, 激发后小鼠血清中 His、VEGF、TNF- α 、 β -Hex 释放量显著升高 ($P < 0.001$), IL-10 释放量显著降低 ($P < 0.001$), SAFI 228 mg·kg⁻¹ 组 His 含量显著升高 ($P < 0.001$), 其他生化指标均无显著性差异。PCA 结果显示, 仅 OVA 组小鼠背部可见明显蓝斑; 仅 OVA 组致敏小鼠血清中 IgE 含量明显升高 ($P < 0.001$)。**结论** SAFI 未产生由特异性抗体 IgE 介导的 I 型过敏反应, 高剂量时可能会导致血管通透性增加。建议临床严格参照说明书, 在安全剂量范围内使用, 以降低不良反应发生率。

关键词: 注射用丹参多酚酸; ICR 小鼠; 过敏反应; 耳廓蓝染; 炎症

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376(2025)02-0354-08

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2025.02.009

Evaluation of safety of Salvianolic Acid for Injection based on mouse whole body active allergy experiment and passive skin allergy experiment

NI Xiuyi¹, ZHANG Xu¹, HUA Wenhao², WAN Meixu^{3,4}, LI Zhi^{3,4}, ZHANG Yanxin^{3,4}, YUAN Jing^{3,4}, LI Dekun^{3,4}, LIU Ying⁵, JU Aichun^{3,4}

1. Hebei University of Chinese Medicine, Shijiazhuang 050200, China
2. Peking University Peoples Hospital, Beijing 101109, China
3. Tianjin Tasly Pride Pharmaceutical Co., Ltd., Tianjin 300410, China
4. Tianjin Key Laboratory of Safety Evaluation Enterprise of TCM Injections, Tianjin 300410, China
5. Tianjin Adverse Reaction Monitoring Center for Drugs, Medical Devices and Cosmetics, Tianjin 300191, China

收稿日期: 2024-06-27

基金项目: 天津市制造业高质量发展专项资金-天津天士力之骄药业有限公司技术中心创新能力建设 (ZZY20232088)

作者简介: 倪秀一, 女, 硕士研究生, 研究方向为中药生产与质量控制。E-mail: 1165937171@qq.com

*通信作者: 刘颖, 女, 副主任药师, 主要从事药物警戒。E-mail: tjydluoying@163.com

鞠爱春, 男, 正高级工程师, 主要从事中药注射剂工艺及质量控制。E-mail: juach@tasly.com

Abstract: Objective The sensitization of Salvianolic Acids for Injection (SAFI) was evaluated by active systemic anaphylaxis (ASA) and passive cutaneous anaphylaxis (PCA) in mice. **Methods** Negative control (0.9% sodium chloride injection), ovalbumin (OVA, positive drug, 10 mg·kg⁻¹), and SAFI (228, 114, 23, 5, and 2 mg·kg⁻¹) were set up for ASA and PCA, respectively. Sensitization was performed by ip administration, every other day, for a total of five times. Fourteen days after the last sensitization, ASA first took 10 mice/group to be sensitized with *iv* two-fold sensitizing dose, and then centrifuged the blood from the inner canthus of the eyes after 30 min, and then detected the levels of tumor necrosis factor- α (TNF- α), histidine (His), interleukin-10 (IL-10), vascular endothelial growth factor (VEGF), and β -glucosidase (β -Hex) in the serum by ELISA, and the lung tissue was observed by HE; and 10 mice/group were also sensitized with *iv* 2-fold sensitizing dose of the drug mixed with 0.4% Evans' Blue (EB), after 30 min, the auricular blue staining and EB exudation of each group were recorded. PCA firstly, blood was taken to detect serum IgE content, and the remaining sera of each group were mixed well and then another 6 mice were taken to determine the size of the blue spot on the back by passive sensitization. **Results** ASA results showed that compared with the negative control group, the OVA group had a significant allergic reaction, and the SAFI (114, 228 mg·kg⁻¹) group had induced an allergic reaction with blue staining of the auricle, while all other dose groups had no significant symptoms of allergic reaction; HE results of the lungs showed coagulative necrosis of the alveolar wall and a large amount of inflammatory factor infiltration of the interstitium of the lungs in the OVA group, and the serum of the mice after excitation, when compared with the negative control group. There were significant differences in the levels of TNF- α , IL-10, VEGF and β -Hex in the serum of mice after excitation ($P < 0.001$), and the level of His was significantly increased in the SAFI group at the highest dose of 228 mg·kg⁻¹, while other biochemical indexes did not show any significant differences. The results of PCA showed that only in the back of the mice in the OVA group, a clear blue spot could be seen; and the serum level of IgE was significantly elevated ($P < 0.001$) only in the OVA group of the sensitized mice. IgE content in the serum of sensitized mice in the OVA group only was significantly elevated ($P < 0.001$). **Conclusion** SAFI did not produce a type I allergic reaction mediated by the specific antibody IgE, and that the high dose may lead to an increase in vascular permeability. It is recommended that clinical use should be strictly referred to the instructions to reduce clinical adverse reactions.

Key words: Salvianolic Acid for Injection; ICR mice; allergic reaction; auricular blue staining; inflammation

中药注射剂是由中医药理论指导,由中药材或天然药物单方或复方提取、纯化、精制有效成分后制成的无菌制剂,属于传统医药理论与现代工艺相结合的产物,对心脑血管等疾病具有良好的治疗效果^[1]。近年来,中药注射剂品种日益增多,应用范围逐步扩大,但是其引起的不良事件也不断增加,质量安全问题引起了广泛关注^[2]。中药注射剂的主要不良反应是过敏类不良反应,临床上药物过敏反应多为由特异性抗体免疫球蛋白 E (IgE) 介导的 I 型过敏反应^[3-4]。I 型过敏反应又称速发型过敏反应,其机制主要是抗原刺激 B 细胞后产生特异性 IgE 抗体,此抗体具有亲细胞性,容易结合在肥大细胞或嗜碱性粒细胞的表面,即机体被致敏,倘若抗原再次刺激机体,随后就会与特异性 IgE 抗体结合,并发生桥联反应。此时会引发肥大细胞或嗜碱性粒细胞脱颗粒,释放组胺等活性介质,可能会引起毛细血管扩张及通透性增加等,而活性介质作用的靶细胞各有不同,可能引发呼吸道过敏反应、消化道过敏反应、皮肤过敏反应甚至是过敏性休克^[5]。

注射用丹参多酚酸 (SAFI) 是由天津天士力之骄药业公司生产的冻干粉针剂,临床使用中偶见有

荨麻疹、瘙痒等过敏类不良反应^[6-7]。ICR 小鼠价格比较低廉、操作相对简便,具有实用价值高^[4],也被用于多种致敏性评价^[8-9]。本研究采用 ICR 小鼠建立 I 型过敏反应模型,通过全身主动过敏实验 (ASA)、被动皮肤过敏实验 (PCA),以及对肺部组织苏木精-伊红 (HE) 染色,并通过酶联免疫吸附 (ELISA) 法检测致敏后血清 IgE 水平和激发后小鼠血清肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、组氨酸 (His)、白细胞介素 (IL)-10、血管内皮生长因子 (VEGF) 和 β -氨基己糖苷酶 (β -Hex) 水平,以此综合性考察 SAFI 的安全性。

1 材料

1.1 药品和主要试剂

SAFI (每瓶 130 mg, 批号 20210304), 天津天士力之骄药业有限公司; 卵清白蛋白 (OVA, 批号 XV230209), 合肥博美生物科技有限责任公司; 小鼠 IgE (批号 N913313Y)、VEGF (批号 N469933W)、TNF- α (批号 N680089Y)、IL-10 (批号 N469934G)、 β -Hex (批号 N468879G)、His (批号 N024424G) ELISA 试剂盒, 均购于上海酶联生物科技有限公司; 0.9%氯化钠注射液 (批号 230501D05), 黑龙江

佳益康生物科技有限公司；伊文思蓝（EB，批号 20150729）。

1.2 主要实验仪器

ST16R 高速离心机，美国 Thermo 公司；Infinite M200 多功能酶标仪，瑞士 TECAN 公司；XS105 Dual 电子分析天平，瑞士 Mettler 公司；ASP300S 全自动脱水机、EG1150H 包埋机、EG1150C 冷冻台、RM2235 轮转式切片机、HI1220 烘片机、HI1210 恒温展片机，德国 Leica 公司。

1.3 实验动物

SPF 级 ICR 小鼠，雄性，体质量 20~25 g，购于北京维通利华实验动物技术有限公司，实验动物生产许可证号 SCXK（京）2021-0006，分笼饲养于天士力控股集团有限公司动物设施屏障系统内，动物使用许可证 SYXK（津）2022-0005。动物实验严格按照天津天士力集团动物伦理委员会标准执行，实验动物伦理号为 TSL-IACUC-2023-62，实验动物质量合格证号为 110011231110894723、110011231112129851，小鼠于实验前适应性饲养 3 d，温度 20~25 °C，相对湿度为 40%~70%，12 h 明暗周期照明，自由饮用纯净水，饲喂小鼠颗粒饲料。

2 方法

2.1 剂量设计及动物分组

SAFI 临床用量为 130 mg·d⁻¹，按照人体质量平均 70 kg 计算，相当于 1.857 mg·kg⁻¹。按照 FDA 推荐的人与小鼠剂量换算系数（12.3）^[10]，计算得出小鼠的临床等效剂量为 23 mg·kg⁻¹，SAFI 的 5 个剂量分别设置为 228、114、23、5、2 mg·kg⁻¹，为临床等效剂量的 10.0、5.0、1.0、0.2、0.1 倍。

适应期结束后，ICR 小鼠随机分成 7 组：阴性对照组、OVA（阳性对照，10 mg·kg⁻¹）组和 SAFI 228、114、23、5、2 mg·kg⁻¹ 组。

2.2 ASA 实验

2.2.1 致敏 小鼠按 20 mL·kg⁻¹ 体积 ip 给药，隔天 1 次，共 5 次，阴性对照组 ip 0.9%氯化钠注射液，OVA 组 ip 10 mg·kg⁻¹ OVA 溶液（0.9%氯化钠注射液配制），SAFI 组分别 ip SAFI 228、114、23、5、2 mg·kg⁻¹ SAFI（0.9%氯化钠注射液配制），每组致敏 20 只小鼠。

2.2.2 激发 小鼠末次致敏后第 14 天，按 20 mL·kg⁻¹ 体积 iv 给药。取每组 10 只致敏小鼠，阴性、阳性对照组和 SAFI 的 5 个剂量组分别 iv 2 倍致敏剂量的 0.9%氯化钠注射液、OVA 溶液和 5 个剂量组的

SAFI 溶液。

2.2.3 血清指标检查 30 min 后摘眼球取血，1 000 r·min⁻¹ 离心 20 min 分离血清，参照说明书，ELISA 法检测 VEGF、TNF-α、IL-10、β-Hex 和 His 水平。

2.2.4 病理学观察 小鼠脱颈椎处死后，取肺组织，置于 10%甲醛溶液中固定至少 14 d 后，经组织脱水、浸蜡包埋，5 μm 切片后进行 HE 染色，光学显微镜下观察其病理形态学变化。

2.2.5 耳廓蓝染情况 另取每组 10 只致敏小鼠，iv 含 0.4% EB 的 0.9%氯化钠注射液配制的各组药液（2 倍致敏剂量），给药后 30 min 后观察耳廓蓝染情况，并记录每组出现耳廓蓝染的动物数。耳廓蓝染面积按照表 1 标准进行评分。评分结束后，剪下双耳，剪碎，并浸泡 2 mL 甲酸胺 48 h，取 200 μL 上清液于 96 孔板中，用酶标仪于 620 nm 处测吸光度（A）值。根据 EB 标准曲线，计算 EB 的渗出量。阳性结果判断标准：给药组出现耳廓蓝染面积评分 ≥ 2 的动物数占动物总数的百分率大于 10%，且 EB 渗出量与对照组比较差异有统计学意义。

表 1 耳廓蓝染面积评分标准

Table 1 Auricular blue-stained area scoring scale

分值	蓝染面积占耳廓面积比例
0	双耳无蓝染
1	0 < 比例 ≤ 1/8
2	1/8 < 比例 ≤ 1/4
3	1/4 < 比例 ≤ 1/2
4	1/2 < 比例 ≤ 3/4
5	3/4 < 比例 ≤ 1

2.3 PCA 实验

2.3.1 致敏及致敏血清制备 致敏方法同“2.2.1”项，末次致敏后 14 d，对致敏小鼠摘眼球取血，1 000 r·min⁻¹ 离心 20 min 得致敏血清。

2.3.2 IgE 含量测定 将“2.3.1”项中致敏血清，参照说明书进行 ELISA 法检测 IgE，各组剩余血清混匀后于同一 EP 管中 -80 °C 保存。

2.3.3 激发 各组致敏血清用 0.9%氯化钠注射液按照 1 : 2、1 : 4、1 : 8 稀释^[11]。在动物背部预先脱毛处皮内注射原液及 3 个稀释组的血清 0.05 mL，每只小鼠背上脊柱两侧注射，共注射 4 个点。24 h 后，各组 iv 与致敏剂量相同的激发药液加等量的 0.4% EB，给药体积 20 mL·kg⁻¹。

2.3.4 蓝斑面积测定 iv 后 30 min，处死各组动物，剪取背部皮肤蓝斑，进行蓝斑面积测定。

2.4 统计学分析

数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,用 GraphPadPrism 8.0.1 软件进行统计学分析与作图,多组间比较采用单因素方差分析 (One-way ANOVA)。

3 结果

3.1 ASA 实验结果

3.1.1 血清指标检测结果 如表 2 所示,与阴性对照组比较,OVA 组 His 释放量显著升高 ($P < 0.001$)、炎症因子 VEGF、TNF- α 、 β -Hex 释放量显著升高 ($P < 0.001$),IL-10 释放量显著降低 ($P <$

0.001),SAFI 的 5 个剂量组 IL-10、VEGF、TNF- α 、 β -Hex 释放量无明显差异,仅 228 mg·kg⁻¹ 组 (即 10 倍临床等效剂量组) His 释放量显著升高 ($P < 0.001$)。

3.1.2 病理学结果 如图 1 所示,ICR 小鼠激发后,与对照组相比,OVA 组气管壁结构破损严重,肺泡出现凝固性坏死,含有大量炎症细胞,出现炎细胞浸润,堵塞气道管腔出现明显狭窄;而其他各组肺泡完整且呈空泡状薄壁结构。说明 SAFI 未引起小鼠肺部组织发生病变。

表 2 ICR 小鼠血清 IL-10、VEGF、His、TNF- α 、 β -Hex 水平测定 ($\bar{x} \pm s, n=10$)

Table 2 Determination of serum IL-10、VEGF、His、TNF- α and β -Hex levels in ICR mice ($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	剂量/ (mg·kg ⁻¹)	IL-10/ (pg·mL ⁻¹)	VEGF/ (pg·mL ⁻¹)	His/ (ng·mL ⁻¹)	TNF- α / (pg·mL ⁻¹)	β -Hex/ (ng·mL ⁻¹)
对照	—	326.6±15.5	125.4±7.5	6.2±0.4	342.5±17.0	6.7±0.5
OVA	10	205.5±11.9 ^{###}	218.1±9.5 ^{###}	10.8±0.6 ^{###}	509.8±22.8 ^{###}	12.7±0.4 ^{###}
SAFI	228	284.3±11.1	130.2±7.7	7.2±0.6 ^{###}	404.4±21.5	7.4±0.5
	114	285.6±10.1	139.3±11.0	6.6±0.4	394.7±10.5	7.7±0.4
	23	285.3±10.2	133.7±11.7	6.6±0.4	396.3±17.4	8.1±0.3
	5	286.3±12.0	130.6±8.6	6.5±0.4	407.5±19.5	8.0±0.3
	2	284.8±10.8	140.1±9.0	6.7±0.4	387.5±21.2	8.2±0.4

与阴性对照组比较: ^{###} $P < 0.001$ 。

^{###} $P < 0.001$ vs negative control group.

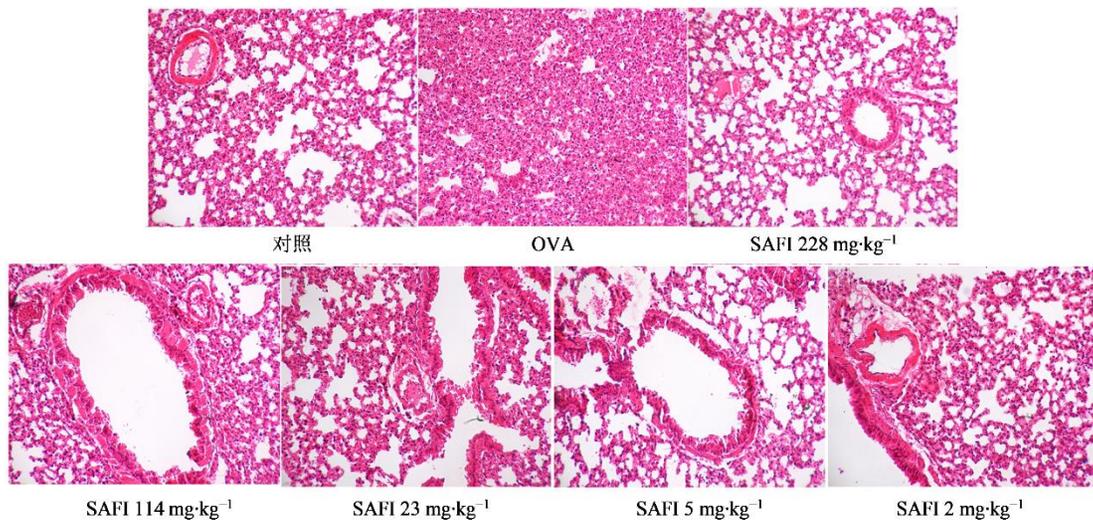


图 1 ICR 小鼠肺组织病理变化 (HE 染色, ×200)

Fig. 1 Histopathological changes of lung in ICR mice (HE staining, ×200)

3.1.3 耳廓蓝染情况结果 如表 3 所示,与阴性对照组相比,OVA 组在激发后,小鼠耳廓出现明显蓝染,即血管通透性增高,100%小鼠耳廓蓝染评分 ≥ 2 分,并且 EB 渗出量显著高于对照组 ($P < 0.001$),判断为过敏反应阳性。SAFI 组小鼠过敏反应在 114、228 mg·kg⁻¹ (激发剂量为 228

和 456 mg·kg⁻¹,为临床等效剂量的 10 倍和 20 倍) 出现耳廓蓝染评分升高,分别有 70%、80% 的小鼠耳廓蓝染评分 ≥ 2 分,EB 渗出量显著高于对照组 ($P < 0.001$)。说明高剂量下 SAFI 会导致小鼠血管通透性增加,EB 血管外渗透升高,出现类似过敏样耳廓蓝染现象。

表 3 SAFI 致小鼠过敏反应耳廓蓝染 ($\bar{x} \pm s, n=10$)

Table 3 Blue staining of ears in mice with allergic reaction induced by SAFI ($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	致敏剂量/ (mg·kg ⁻¹)	不同耳蓝染分值动物只数						耳蓝染平均分	EB渗出量/ μ g
		0分	1分	2分	3分	4分	5分		
对照	—	10	—	—	—	—	—	0	2.4±0.5
OVA	10	—	—	—	—	—	10	5.0 ^{###}	10.8±1.1 ^{###}
SAFI	228	1	1	7	1	—	—	1.8±0.8 ^{###}	6.2±0.8 ^{###}
	114	1	2	5	2	—	—	1.8±0.9 ^{###}	5.5±0.7 ^{###}
	23	10	—	—	—	—	—	0	3.0±1.0
	5	10	—	—	—	—	—	0	3.0±1.0
	2	10	—	—	—	—	—	0	2.8±0.7

与阴性对照组比较: ^{###} $P < 0.001$ 。

^{###} $P < 0.001$ vs negative control group.

3.2 PCA 实验结果

3.2.1 IgE 含量测定结果 如表 4 所示, 与对照组相比, OVA 组 IgE 含量显著升高 ($P < 0.001$), 各 SAFI 组小鼠体内的 IgE 含量未见显著性升高。结果表明 SAFI 未引起致敏后小鼠产生特异性抗 SAFI 的 IgE 抗体。

3.2.2 蓝斑面积测定结果 如图 2 所示, 将致敏小鼠血清稀释至不同浓度进行 PCA 实验, 阴性对照组小鼠背部注射局部未见明显的蓝斑, OVA 组可观察到小鼠背部注射局部出现了明显的蓝斑, SAFI 各剂量组小鼠背部注射局部未见明显的蓝斑。表明 SAFI 未引起小鼠背部注射局部皮内抗原抗体反应。

表 4 SAFI 致敏后小鼠血液内 IgE 含量 ($\bar{x} \pm s, n=10$)

Table 4 Levels of IgE in blood of mice after SAFI sensitization ($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	IgE/(μ g·mL ⁻¹)
对照	—	7.4±1.2
OVA	10	10.1±1.6 ^{###}
SAFI	228	8.7±1.2
	114	8.7±1.4
	23	8.6±1.5
	5	8.3±1.2
	2	8.8±1.0

与阴性对照组比较: ^{###} $P < 0.001$ 。

^{###} $P < 0.001$ vs negative control group.



图 2 SAFI 致小鼠过敏反应被动皮肤过敏蓝斑 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Fig. 2 SAFI-induced allergic reactions in mice passive skin sensitization blue spots ($\bar{x} \pm s, n=6$)

4 讨论

中药注射剂的不良反应以过敏反应居多, 主要有 I 型过敏反应和类过敏反应, 在临床症状上相似, 难区分易混淆, 表现为药物类过敏反应多在首次用药后短时间内发生^[12], I 型过敏反应则需要特异性 IgE 抗体介导。不同品种的动物对同一种中药注射剂的过敏反应存在一定的差异, 因此在评价中药注射剂的过敏性方面, 需要将不同种属动物的实验结果综合分析^[13]。本研究采用 ICR 小鼠, 综合考察

SAFI 能否会诱发 IgE 介导的 I 型过敏反应, 以评价其安全性。

I 型过敏反应发生过程通常为 3 个阶段即致敏、激发和效应, 当抗原诱发机体特异性 B 细胞产生相应的抗体后, 抗体和肥大细胞或嗜碱性粒细胞的表面受体结合, 机体就会处于致敏状态, 如相同抗原再次刺激机体, 并与抗体产生特异性结合, 则会刺激肥大细胞或嗜碱性粒细胞释放生物活性介质, 作用于效应的组织或者器官引起局部或者全身过敏

反应^[14]。中药注射剂临床上过敏和类过敏反应症状相似，引发的全身各系统病理症状表现多为血管通透性增高^[4]。

ICR 小鼠是国际通用的封闭群小鼠，是进行免疫药物筛选、复制病理模型较常用的实验动物。本实验通过 5 次 ip 药物致敏，14 d 后 iv 激发，用于评价 SAFI 是否会引起 ICR 小鼠发生 IgE 依赖的 I 型过敏反应。本实验选用 EB 作为常用的血管通透性指示剂，考察药物刺激小鼠的血管通透性变化^[15]。阳性药选用 OVA，其为经典的致敏蛋白质，致敏性强，比较容易获取^[16]。查阅相关文献，现有的用于过敏反应的预测方法（包括 ASA 和 PCA）考察对象为大分子物质，无法考察小分子药物的致敏性，说明现有的过敏实验方法仍需改进^[17]。《中国药典》和药物指导原则中推荐的 ASA 方法中一般建议豚鼠，但豚鼠与人对药物的反应症状存在较大差异，易艳等^[4]认为与常规豚鼠 ASA 模型相比，小鼠实验操作更加简便、准确，成本也更低。

本实验增加了致敏后小鼠体内 IgE 的含量检测，以及激发后小鼠体内血管通透性的检测，更好的补充实验。OVA ip 致敏小鼠 5 次后，体内 IgE 含量检测和 PCA 都说明 OVA 致敏诱发小鼠体内产生了 IgE，小鼠 iv 激发 OVA 后，体内血管通透性升高，导致 EB 渗出，发生明显耳廓蓝染，因此本实验模型可以检测由 IgE 介导的 I 型过敏反应。ICR 小鼠 OVA 组肺组织病理显示出现了炎症细胞浸润，即从病理上表明了有炎症特征，SAFI 组未出现明显的病理变化。进行后续 ELISA 检测相关炎症因子，激发后小鼠血清中，最高剂量 SAFI 组 His 含量出现了偏高现象，可能与激发时剂量过高有关，最高剂量为 20 倍临床等效剂量。ASA 及 PCA 中，未发现致敏后的小鼠在 iv SAFI 激发后出现类似过敏症状，如临床上 SAFI 出现过敏类不良反应，推测引发的可能是类过敏反应，而非固有免疫。这也与前期文献^[18]报道“BN 大鼠多次给予 SAFI 后均未产生 I 型过敏反应”结果一致。

由 IgE 依赖的 I 型过敏反应 T 细胞发挥重要作用^[19]，当抗原刺激时，CD4⁺代表的 T 辅助细胞(Th) 会促进细胞因子的分泌，根据其细胞因子的差异分为 Th1 和 Th2 细胞。Th1 细胞主要负责细胞介导的免疫反应，分泌 TNF- α 等，Th2 细胞主要与速发型超敏反应有关，主要分泌 IL-10 等^[4]，本研究中，与对照组相比，激发后，OVA 组 IL-10、TNF- α 有显

著差异，小鼠的肺组织有炎症和渗出变化，即在组织脏器发生了过敏相关的效应变化，SAFI 组小鼠无相关过敏反应变化。

VEGF 可通过细胞小囊泡器迅速使血管通透性增加。VEGF^[20]能促进抗原致敏以及 Th2 型免疫反应的炎症，导致树突细胞数量增加并活化，使得固有免疫和适应性 Th2 型免疫反应相互联系，最终加重组织炎症变化，本研究中，与对照组相比，激发后，OVA 组 VEGF 显著升高，即阳性药组从病理上模拟了临床药物发生过敏反应。SAFI 组小鼠无相关过敏反应变化。

机体发生 I 型过敏反应时，肥大细胞或嗜碱性粒细胞中 β -Hex 和 His 被释放，被作为肥大细胞和嗜碱性粒细胞脱颗粒的标志物之一^[21]。过敏反应可能会导致多种化学介质的释放，但是现有的研究已证实多种介质的释放都与组胺或 β -Hex 的释放量呈正相关，组胺与组氨酸密切相关，组氨酸通过脱羧基反应可以转化为组胺，因此一般采用检测 His 和 β -Hex 的释放量来评价过敏反应的严重程度。本研究中，与对照组相比，激发后，OVA 组 β -Hex 和 His 显著升高，SAFI 仅 228 mg·kg⁻¹ 组（即 10 倍临床等效剂量组）His 释放量显著升高。激发后 VEGF、 β -Hex、His、TNF- α 、IL-10 释放量反映不同样品致敏性的程度，作为 ICR 小鼠模型的标志物，在发生过敏反应时血清中炎症因子的浓度才会有显著差异。

本研究主要为补充小鼠模型评价 SAFI 的安全性，力求结合前期研究^[22-23]通过多种方法考察 SAFI 的安全性，在保证中药注射剂有效性的前提下，加强安全性研究及风险评估，从而达到降低 SAFI 安全风险的目的。本实验结果表明，SAFI 在安全剂量范围内使用时，安全性良好；过量使用药物会引起过敏样不良反应。表明 SAFI 在临床用药时应针对患者的具体病情，在安全剂量内合理用药，减少不良反应的发生。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 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.
Wang K X, Gao L, Qin X M, et al. Research progress on chromatic aberration and safety of Chinese materia medica injection [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2019, 50(9): 2219-2223.
- [2] 寿晓媛, 郝宇, 胡斌, 等. 2013—2018 年西安市 18 家

- “三甲”医院中药注射剂不良反应/事件分析 [J]. 中国药房, 2019, 30(19): 2696-2701.
- Shou X A, Hao Y, Hu B, et al. Analysis of adverse drug reactions/events of TCM injections in 18 third grade class A hospitals from Xi'an during 2013-2018 [J]. China Pharm, 2019, 30(19): 2696-2701.
- [3] Pichler W J. Immune pathomechanism and classification of drug hypersensitivity [J]. Allergy, 2019, 74(8): 1457-1471.
- [4] 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.
- [5] 蒋宝平, 田磊, 方泰惠, 等. 几种临床引发I型过敏反应的中药注射剂致敏性再评价 [J]. 安徽医药, 2014, 18(1): 20-23.
- Jiang B P, Tian L, Fang T H, et al. Allergenicity reevaluation of several traditional Chinese medicine injections which can cause the type I hyper sensitivity in clinical practice [J]. Anhui Med Pharm J, 2014, 18(1): 20-23.
- [6] 张雯琪, 李东娜, 马萌萌, 等. 注射用丹参多酚酸通过调节 Akt/mTOR 通路介导的自噬对氧糖剥夺/再灌注 Neuro-2a 细胞凋亡的影响 [J]. 中草药, 2022, 53(9): 2706-2714.
- ZHANG W Q, LI D N, MA M M. et al. Salvianolate Lyophilized Injection induced autophagy against neuronal apoptosis through Akt/mTOR pathway in Neuro-2a cells [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2022, 53(9): 2706-2714.
- [7] 于倩, 王华, 谢程. 基于真实世界的注射用丹参多酚酸临床用药合理性分析 [J]. 药物评价研究, 2019, 42(11): 2238-2242.
- Yu Q, Wang H, Xie C. Based on real world: Rational analysis of clinical use of Salvianolic Acid for Injection [J]. Drug Eval Res, 2019, 42(11): 2238-2242.
- [8] 刘方美, 张羽, 汤书婉, 等. 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 [J]. 药物评价研究, 2024, 47(5): 982-993.
- Liu F M, Zhang Y, Tang S W, et al. An experimental study of combination of allergic and anaphylactoid reactions to Xuesaitong Injection(freeze-drying) based on RBL-2H3 cells and ICR mice model [J]. Drug Eval Res, 2024, 47(5): 982-993.
- [9] 梁爱华, 李春英, 易艳, 等. 药物类过敏反应的临床前评价方法研究(I): 小鼠类过敏反应评价方法的建立和验证 [J]. 中国中药杂志, 2012, 37(13): 1865-1870.
- Liang A H, Li C Y, Yi Y, et al. Methodology for preclinical assay of pseudoallergy of injectable drugs(I): Mouse model for assay of pseudoallergy induced by injections [J]. China J Chin Mater Med, 2012, 37(13): 1865-1870.
- [10] Contrera J F, Matthews E J, Kruhlik 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.
- [11] 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://www.cde.org.cn/zdyz/domesticinfo page?zdyzIdCODE=01abfd0ec839e7ef72e91ca4a9cfec26>.
- China Food and Drug Administration. Technical guidelines for the study of irritation, sensitization and hemolysis of chemical substances[EB/OL]. (2005-03-18) [2009-04-27]. <https://www.cde.org.cn/zdyz/domesticinfo page?zdyzIdCODE=01abfd0ec839e7ef72e91ca4a9cfec26>.
- [12] 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]. Chin Tradit Herb Drugs, 2024, 55(3): 907-918.
- [13] 孙悦, 范巾杰, 闫佩娟, 等. 中药注射剂的非临床安全性再评价研究进展 [J]. 药物评价研究, 2024, 47(6): 1400-1412.
- Sun Y, Fan J J, Yan P J, et al. Progress of non-clinic safety re-evaluation for traditional Chinese medicine injection [J]. Drug Eval Res, 2024, 47(6): 1400-1412.
- [14] 曾静. 瑞香素对 IgE 介导的 I 型过敏反应的影响及其机制研究 [D]. 广州: 暨南大学, 2014.
- Zeng J. Effect of daphnetin on IgE-mediated type I allergic reaction and its mechanism [D]. Guangzhou: Jinan University, 2014.
- [15] Wu M C, Hsu J L, Lai T W. Evans blue dye as an indicator of albumin permeability across a brain endothelial cell monolayer *in vitro* [J]. Neuroreport, 2021, 32(11): 957-964.
- [16] 宁亚维, 刘茁, 范素芳, 等. 超高效液相色谱-串联质谱法检测食品中鸡蛋过敏原卵白蛋白 [J]. 食品科学, 2018, 39(20): 332-336.
- Ning Y W, Liu Z, Fan S F, et al. Detection of egg allergen ovalbumin in food by ultra-high performance liquid

- chromatography-tandem mass spectrometry [J]. Food Sci, 2018, 39(20): 332-336.
- [17] FDA. Guidance for industry-immunotoxicology evaluation of investigational new drugs [S]. 2005.
- [18] 张瀛化, 张家丰, 万梅绪, 等. 基于 BN 大鼠动物模型的注射用丹参多酚酸致敏性研究 [J]. 药物评价研究, 2020, 43(8): 1565-1569.
- Zhang Y H, Zhang J F, Wan M X, et al. Sensitization research of Salvianolic Acids for Injection on BN rat model [J]. Drug Eval Res, 2020, 43(8): 1565-1569.
- [19] 郑全玲. 牛乳 β -乳球蛋白过敏中 Th17/Treg 细胞失衡的作用研究 [D]. 哈尔滨: 东北农业大学, 2014.
- Zheng Q L. Study on the role of Th17/Treg cell imbalance in cow's milk β -lactoglobulin allergy [D]. Harbin: Northeast Agricultural University, 2014.
- [20] Lee C G, Link H, Baluk P, et al. Vascular endothelial growth factor (VEGF) induces remodeling and enhances TH2-mediated sensitization and inflammation in the lung [J]. Nat Med, 2004, 10(10): 1095-1103.
- [21] 曹雪涛. 医学免疫学 [M]. 第 7 版. 北京: 人民卫生出版社, 2018.
- Cao X T. *Medical Immunology* [M]. 7th Ed. Beijing: People's Medical Press, 2018.
- [22] 周大铮, 肖辉, 万梅绪, 等. RBL-2H3 细胞脱颗粒模型评价注射用丹参多酚酸的安全性 [J]. 药物评价研究, 2021, 44(11): 2403-2407.
- Zhou D Z, Xiao H, Wan M X, et al. Evaluate safety of Salvianolic Acid for Injection with RBL-2H3 cell degranulation model [J]. Drug Eval Res, 2021, 44(11): 2403-2407.
- [23] 张瀛化, 张家丰, 万梅绪, 等. 基于 BN 大鼠动物模型的注射用丹参多酚酸致敏性研究 [J]. 药物评价研究, 2020, 43(8): 1565-1569.
- Zhang Y H, Zhang J F, Wan M X, et al. Sensitization research of Salvianolic Acids for Injection on BN rat model [J]. Drug Eval Res, 2020, 43(8): 1565-1569.

[责任编辑 兰新新]