

聚山梨酯80对多源肥大细胞脱颗粒的影响研究

杨慧萍¹, 王蕴华³, 侯健⁵, 李智^{3, 4}, 万梅绪^{3, 4}, 李德坤^{3, 4}, 徐亮^{1, 2*}, 鞠爱春^{3, 4*}

1. 天津医科大学药学院, 天津 300070

2. 天津市临床药物关键技术重点实验室, 天津 300070

3. 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评价企业重点实验室, 天津 300410

5. 天士力控股集团有限公司, 天津 300410

摘要:目的 通过比较不同浓度聚山梨酯80溶液对RBL-2H3、P815、Ku812细胞脱颗粒的影响, 探究聚山梨酯80的量与过敏反应的关系, 进而筛选出一套灵敏、稳定的体外肥大细胞脱颗粒模型。方法 体外培养RBL-2H3、P815和Ku812细胞, 测定3株细胞的生长曲线, 在细胞生长对数期, 以不同浓度(0.04、0.20、1.00、5.00、10.00、20.00、40.00、80.00 mg/mL)聚山梨酯80分别刺激3株细胞, 采用中性红染色法显微镜下观察不同浓度聚山梨酯80溶液对3株细胞脱颗粒的影响, 并计算脱颗粒百分率, 同时以化学发光法分别检测组胺和 β -氨基己糖苷酶释放率, 以酶联免疫吸附法测定类胰蛋白酶的释放量; 并进一步检测聚山梨酯80对人的肥大细胞IgE释放的影响。结果 3株肥大细胞脱颗粒模型中, 各细胞的脱颗粒指标均随聚山梨酯80浓度的升高而升高。相同浓度聚山梨酯80对来源、大鼠、小鼠肥大细胞的类胰蛋白酶释放量无较大统计学差异; 与RBL-2H3细胞系比较, P815细胞和组胺释放率显著降低($P < 0.05$ 、 0.01), Ku812细胞组胺释放率和 β -氨基己糖苷酶释放率显著升高($P < 0.05$ 、 0.01), Ku812细胞脱颗粒最灵敏。但在实验过程中发现Ku812细胞模型稳定性、可重复性较差, 而RBL-2H3细胞稳定性、可重复性均优于Ku812和P815细胞。0.04~80.00 mg/mL的聚山梨酯80溶液作用于Ku812细胞产生的IgE均低于检测限。结论 聚山梨酯80诱导的过敏反应可能是不经过IgE介导的类过敏反应, 随着聚山梨酯80浓度的增大, 3个细胞模型脱颗粒现象显著, 相比于Ku812和P815细胞, RBL-2H3细胞更适合作为体外肥大细胞脱颗粒检测模型。

关键词: 聚山梨酯80; 肥大细胞脱颗粒; 组胺; 类胰蛋白酶; β -氨基己糖苷酶; IgE

中图分类号: R994.2

文献标志码: A

文章编号: 1674-6376(2019)03-0472-07

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2019.03.016

Effect of Tween 80 on degranulation of mast cells

YANG Huiping¹, WANG Yunhua³, HOU Jian⁵, LI Zhi^{3, 4}, WAN Meixu^{3, 4}, LI Dekun^{3, 4}, XU Liang^{1, 2}, JU Aichun^{3, 4}

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

2. Tianjin Clinical Drug Key Technology Laboratory, Tianjin 300070, China

3. Tianjin Tasly Pride Pharmaceutical Company Limited, Tianjin 300410, China

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

5. Tasly holding group company, Co., Ltd., Tianjin 300410, China

Abstract: Objective To investigate the relationship between the quantity of Tween 80 and allergic reaction and select a sensitive and stable model of mast cell degranulation *in vitro* by comparing the effects of different concentrations of Tween 80 solution on the degranulation of RBL-2H3, P815 and Ku812 cells. **Methods** The RBL-2H3, P815, and Ku812 cells were cultured *in vitro*, and the growth curves of three cell lines were determined. Stimulated cells which were in the logarithmic phase with different concentrations of Tween 80 solution (0.04, 0.2, 1, 5, 10, 20, 40, 80 mg/mL), were observed under microscope to study the effect of different concentrations of Tween 80 solution on degranulation of three cell lines by neutral red staining method, and calculated the

收稿日期: 2018-08-29

基金项目: 天津市中药注射剂关键技术校企协同创新实验室建设项目(17PTSYJC00090)

第一作者: 杨慧萍(1993—)女, 硕士生, 研究方向为药学。Tel: 13920165517 E-mail: 1208975181@qq.com

*通信作者: 徐亮(1982—)男, 副教授。研究方向为生物色谱及体外诊断试剂研发。Tel: 13602106627 E-mail: xuliang@tmu.edu.cn

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

percentage of degranulation. Meanwhile, the release rate of histamine and β -hexosaminidase was detected by chemiluminescence assay, and the release amount of trypsin was detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Furthermore, the IgE release of human mast cells was also examined. **Results** In the three mast cell degranulation models, the degranulation index of each cell increased with the increase of Tween 80 concentration. There was no significant difference in tryptase release from human, rat and mouse mast cells at the same concentration of Tween 80. Compared with RBL-2H3 cell line, the degranulation rate and histamine release rate of P815 cells were significantly decreased ($P < 0.05, 0.01$), and the histamine release rate and β -hexosaminidase release rate of Ku812 cells were significantly increased ($P < 0.05, 0.01$). The degranulation effect of Ku812 cells was the most sensitive, but the stability and repeatability of Ku812 cells model were poor. However, the sensitivity of RBL-2H3 cells was inferior to Ku812 cells, and its stability and reproducibility were superior to Ku812 and P815 cells. In addition, the IgE produced by 0.04—80.00 mg/mL Tween 80 solution acting on Ku812 cells cannot be detected. **Conclusion** The anaphylaxis induced by Tween 80 may be the anaphylactoid reaction without mediated by IgE. With the increase of Tween 80 concentration, three models were all degranulated significantly. Compared with Ku812 and P815 cells, RBL-2H3 cells were more suitable for degranulation detection model of mast cells *in vitro*.

Key words: Tween80; mast cell degranulation; histamine; trypsin; β -aminohexosaminidase; IgE

近年来,随着中药注射剂的广泛应用,临床不良反应的相关报道数量也呈上升趋势,其安全性问题成为备受关注的焦点^[1-4]。有研究表明,中药注射剂危及生命的严重不良反应主要是以肥大细胞脱颗粒释放组胺为主的过敏及类过敏反应,约占不良反应发生的80%^[5-7]。

聚山梨酯80属于亲水型非离子表面活性剂,对亲脂性药物具有较好的增溶作用,为中药注射剂的常用辅料之一^[8],但聚山梨酯80能够引发过敏反应已被文献研究证实^[9],目前仍有很多含有聚山梨酯80的中药注射剂应用于临床,聚山梨酯80的浓度与过敏反应发生之间的关系有待进一步研究。

在中药注射剂过敏及类过敏反应评价方面,体内一般选择BN大鼠^[10]、Wistar大鼠^[10-11]、豚鼠^[12]和Beagle犬^[12-13]等易发生过敏性的动物进行评定,体外则通常选择嗜碱性粒细胞或肥大细胞进行评价,体外细胞类过敏模型因相对于动物致敏模型成本较低、灵敏度、重复性较高,而广泛应用于过敏及类过敏反应的初步评价^[14-15]。然而,不同来源的肥大细胞模型致敏后脱颗粒检测指标存在差异性^[16],细胞模型的选择对过敏及类过敏反应评价的灵敏度、准确性有较大影响。

以往研究^[17-18]表明,大鼠嗜碱性粒细胞白血病细胞(RBL-2H3)、小鼠肥大细胞瘤细胞(P815)是最常用于体外评估药物过敏及类过敏反应的模型,近年来随着日本科学家^[19]对人外周血嗜碱性粒细胞(Ku812)的研究,它也逐渐被人们熟知,并应用到药物过敏及类过敏反应的评价体系中。RBL-2H3和Ku812细胞虽源于嗜碱性白血病细胞株,但具有肥大细胞相似的生物学特性,在致敏源刺激时

都能释放组胺、 β -氨基己糖苷酶等生物活性物质^[20-21]。但是,现仍缺乏有关3种细胞在相同刺激条件下脱颗粒程度对比的相关数据研究。因此本研究以RBL-2H3、P815和Ku812细胞为模型,以不同浓度聚山梨酯80溶液为刺激物,通过比较肥大细胞IgE的释放量,以及脱颗粒指标的差异性,探究聚山梨酯80的量与过敏反应的关系,并筛选出一套灵敏、稳定的体外肥大细胞脱颗粒模型。

1 材料

1.1 药品和试剂

聚山梨酯80(批号MKBW8434)、中性红染料(批号MKCKu81224V)、邻苯二甲醛(批号P0657)、Triton 100裂解液(批号SLBR8497V)、 β -氨基己糖苷酶检测试剂盒(批号126M4176V),均购自美国Sigma公司;PBS溶液(批号1897215)、DMEM培养基(批号1929918)、RPMI-1640培养基(批号1810626)、胰酶(批号1742078),均购自美国Gibco公司;胎牛血清(美国Hyclone公司,批号DB10194785);青-链双抗(上海碧云天公司,批号C0222);Cell Counting Kit-8(日本同仁公司,批号LF678);甲醇(天津市康科德科技有限公司);盐酸(天津威晨化学试剂科贸有限公司);氢氧化钠(天津市风船化学试剂科技有限公司);类胰蛋白酶ELISA检测试剂盒(美国Cloud-Clone公司,批号1180531302);IgE检测试剂盒(英国Abcam,批号ab195216)。

1.2 仪器

细胞培养箱,美国Thermo公司;多功能酶标仪,瑞士TECAN公司;倒置显微镜,德国Leica公司;细胞计数仪,美国Millipore公司;高速离心机,美国

Thermo公司;电子分析天平,瑞士Mettler公司。

1.3 细胞

RBL-2H3、P815、Ku812细胞,均购自ATCC公司。

2 方法

2.1 细胞培养及生长规律监测

RBL-2H3细胞用含10%的胎牛血清、 1×10^5 U/L青-链双抗的DMEM培养液,于37℃、5% CO₂、饱和湿度的培养箱中传代培养,取对数生长期细胞进行实验;P815和Ku812细胞,用含10%的胎牛血清、 1×10^5 U/L青-链双抗的RPMI-1640培养液,于37℃、5% CO₂、饱和湿度的培养箱中传代培养,取对数生长期细胞进行实验。

取生长状况良好的细胞,调整细胞浓度依次为: 2.5×10^4 、 5×10^4 、 7.5×10^4 、 1.0×10^5 、 1.5×10^5 /mL,均匀接种于96孔板中,每孔200 μL,每个浓度组设6个复孔,于37℃、5% CO₂、饱和湿度的培养箱中培养24、48、72、96、120、144、168 h。培养终止时,每孔加入20 μL CCK-8溶液,继续培养0.5 h,用酶标仪于450 nm处检测各孔的吸光度(A)值,并以未接种细胞只加培养基孔的A值为空白对照调零。

实验数据使用SPSS 17.0软件进行处理,并用Origin Pro 9.1软件绘制细胞生长曲线。

2.2 聚山梨酯80对肥大细胞脱颗粒的影响及模型筛选

2.2.1 细胞脱颗粒前后形态观察及脱颗粒百分率测定 收集对数生长期的3株细胞,调整细胞浓度,RBL-2H3细胞为 7.5×10^4 /mL、P815细胞为 5×10^4 /mL、Ku812细胞为 1×10^5 /mL,均匀接种于24孔板中,每孔1 mL,于37℃、5% CO₂、饱和湿度的培养箱中培养,RBL-2H3细胞培养36 h,P815细胞和Ku812细胞培养60 h,至细胞单层铺满孔底,弃去培养基,加药。实验设置聚山梨酯80、试剂对照和空白对照组。聚山梨酯80组各孔分别加入质量浓度为0.04、0.20、1.00、5.00、10.00、20.00、40.00、80.00 mg/mL的聚山梨酯80溶液(PBS溶解)1 mL;试剂对照组(即调零孔,不铺细胞,只加各种试剂)每孔加入1 mL PBS溶液;空白对照组(铺细胞),每孔加入1 mL PBS溶液。然后于37℃、5% CO₂、饱和湿度的培养箱中孵育30 min,取出细胞上清并吸干,每孔加入1%中性红染液1 mL,混匀,于37℃培养箱中染色30 min,弃去染液,PBS缓冲液清洗2~3次,倒置显微镜下观察细胞脱颗粒情况,并计算细胞脱颗粒百分率($P_{\text{脱颗粒}}$)。

$$P_{\text{脱颗粒}} = n_{\text{脱颗粒细胞}} / (n_{\text{脱颗粒细胞}} + n_{\text{未脱颗粒细胞}})$$

2.2.2 组胺释放率测定 收集对数生长期的3株细胞,调整细胞浓度,RBL-2H3细胞为 7.5×10^4 /mL、P815细胞为 5×10^4 /mL、Ku812细胞为 1×10^5 /mL,均匀接种于96孔板中,每孔200 μL细胞悬液,于37℃、5% CO₂、饱和湿度的培养箱中培养,RBL-2H3细胞培养36 h,P815细胞和Ku812细胞培养60 h,至细胞单层铺满孔底,弃去培养基,加药,实验设置聚山梨酯80、试剂对照和空白对照组。聚山梨酯80组各孔分别加入质量浓度为0.04、0.20、1.00、5.00、10.00、20.00、40.00、80.00 mg/mL的聚山梨酯80溶液(PBS溶解)200 μL;试剂对照组每孔加入200 μL PBS溶液;空白对照组每孔加入200 μL PBS溶液,37℃孵育30 min。孵育终止后,取出细胞上清100 μL置于测试荧光板中(多余的上清于-20℃冰箱中冻存,备用),测试板各孔加入50 μL、0.4 mol/L NaOH后,立即加入0.1%邻苯二甲醛-甲醇溶液10 μL,混匀,室温放置10 min,加入50 μL、0.5 mol/L HCl终止反应,立即用酶标仪检测A值(入射波长360 nm,发射波长450 nm)。

96孔板中剩余的细胞用0.5%的Triton100-PBS溶液裂解,37℃孵育30 min后,取细胞裂解液100 μL置于测试荧光板中(多余的裂解液于-20℃冰箱中冻存,备用),测试板各孔加入50 μL、0.4 mol/L NaOH后,立即加入0.1%邻苯二甲醛-甲醇溶液10 μL,混匀,室温放置10 min,加入50 μL、0.5 mol/L HCl终止反应,混合均匀后立即用酶标仪检测A值(入射波长360 nm,发射波长450 nm),计算组胺释放率($P_{\text{组胺}}$)。

$$P_{\text{组胺}} = (A_{\text{上清}} - A_{\text{本底}}) / (A_{\text{上清+裂解}} - A_{\text{本底}})$$

2.2.3 β-氨基己糖苷酶释放率测定 待测样品为“2.22”项中冻存的上清和裂解液,平衡至室温,在96孔板中进行实验,设置实验组和空白组。实验组每孔均匀加入待测上清10 μL,立即加入90 μL基底溶液(用10 mL的0.09 mol/L的柠檬酸盐溶液溶解的4-硝基苯-N-乙酰基-酰基酸盐葡萄糖胺,质量浓度为1 mg/mL);空白组每孔加入100 μL基底溶液,37℃孵育30 min。然后每孔加入200 μL终止液(5 g的碳酸钠溶于118 mL的超纯水中,质量浓度为42.37 mg/mL)终止反应,混合均匀后立即在酶标仪405 nm处检测A值。上清和裂解液需分开测定,实验步骤相同,计算β-氨基己糖苷酶释放率($P_{\beta\text{-氨基己糖苷酶}}$)。

$$P_{\beta\text{-氨基己糖苷酶}} = (A_{\text{上清}} - A_{\text{本底}}) / (A_{\text{上清+裂解}} - A_{\text{本底}})$$

2.2.4 类胰蛋白酶释放量测定 待测样品为“2.22”项中冻存的上清,平衡至室温,在检测试剂盒自带

的96孔板中进行实验,分别设置标准品组和实验组。标准品组设置8个浓度梯度(最小浓度为0),每孔加入100 μL 稀释后的标准品;实验组各孔加待测样品100 μL ,酶标板加上覆膜,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育1 h。弃去液体,甩干,每孔加检测溶液A工作液(临用前配制)100 μL ,酶标板覆膜,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育1 h。弃去孔内液体,每孔用300 μL 的洗涤液洗涤,浸泡1 min,弃去孔内液体,重复洗板3次,最后一次洗涤后,用吸水纸将孔内液体吸干。然后每孔加检测溶液B工作液(临用前配制)100 μL ,酶标板覆膜,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育30 min。弃去孔内液体,甩干,洗板5次。接下来每孔加入TMB底物溶液90 μL ,酶标板覆膜,37 $^{\circ}\text{C}$ 避光反应20 min,最后每孔加入50 μL 终止液,终止反应,混合均匀后立即用酶标仪在450 nm波长处检测A值。类胰蛋白酶释放量的计算:以标准品的浓度为横坐标,A值为纵坐标,绘制标准曲线,然后根据样品的A值,由标准曲线查出相应样品的浓度。

2.2.5 统计学方法 使用统计软件SPSS 17.0进行数据处理,结果均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析。

2.3 聚山梨酯80刺激Ku812细胞IgE释放的测定

收集对数生长期的Ku812细胞,调整细胞浓度为 $1 \times 10^5/\text{mL}$,均匀接种于96孔板中,每孔200 μL 细胞悬液,于37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 、饱和湿度的培养箱中培养72 h,至细胞单层铺满孔底,弃去培养基,各孔分别加入质量浓度为0.04、0.20、1.00、5.00、10.00、20.00、40.00、80.00 mg/mL的聚山梨酯80溶液(PBS溶解)200 μL ,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育30 min。孵育终止后,各孔均取出细胞上清50 μL 于IgE检测试剂盒自带的96孔板相应的孔中,为实验组;此外实验设置标准品组,标准品组设置8个浓度梯度(最小浓度为0),50 $\mu\text{L}/\text{孔}$ 加入96孔板相应孔中。然后每孔加入50 μL 的Antibody Cocktail溶液,室温孵育板子1 h,弃去

孔内液体,每孔用300 μL 的洗涤液洗涤,重复洗板3次,吸干。每孔加入100 μL TMB溶液,避光,孵育10 min,加入100 $\mu\text{L}/\text{孔}$ 的终止液,酶标仪在450 nm处检测A值。

数据处理,以标准品的浓度为横坐标,A值为纵坐标,绘制标准曲线,然后根据样品的A值,由标准曲线查出相应样品的浓度。

3 结果

3.1 细胞生长曲线测定结果

由图1-A可知,RBL-2H3细胞接种密度为 $7.5 \times 10^4 \sim 1.0 \times 10^5/\text{mL}$,周期性明显,铺板24~48 h,细胞呈对数生长期,适宜用于实验;由图1-B可知,P815细胞接种密度为 $5.0 \times 10^4 \sim 1.0 \times 10^5/\text{mL}$,周期性明显,铺板48~72 h,细胞呈对数生长,适宜用于实验;由图1-C可知,Ku812细胞接种密度为 1.0×10^5 个/mL,周期性明显,铺板48~72 h,细胞呈对数生长,适宜用于实验。

3.2 聚山梨酯80对肥大细胞脱颗粒的影响及模型筛选的结果

3.2.1 显微镜下细胞脱颗粒前后形态变化 经中性红染色后,显微镜下正常的RBL-2H3呈长梭形,着色较浅,细胞膜完整,结构致密;正常的P815和Ku812细胞呈通透的圆形,染色后颜色较浅。脱颗粒后的RBL-2H3细胞着色较深,变为圆形,体积变大,边缘不完整;脱颗粒的P815和Ku812细胞,染色后颜色较深,细胞变大,边缘破碎,形态不完整,脱颗粒严重者,细胞膜几乎完全破碎。结果见图2。

3.2.2 脱颗粒百分率、组胺释放率、 β -氨基己糖苷酶释放率和类胰蛋白酶释放量测定及模型筛选的结果 不同浓度聚山梨酯80溶液引起各细胞系细胞脱颗粒百分率、组胺释放率、 β -氨基己糖苷酶释放率、类胰蛋白酶释放量各不相同,具体情况详见表1。

各细胞系细胞的脱颗粒指标均随聚山梨酯80

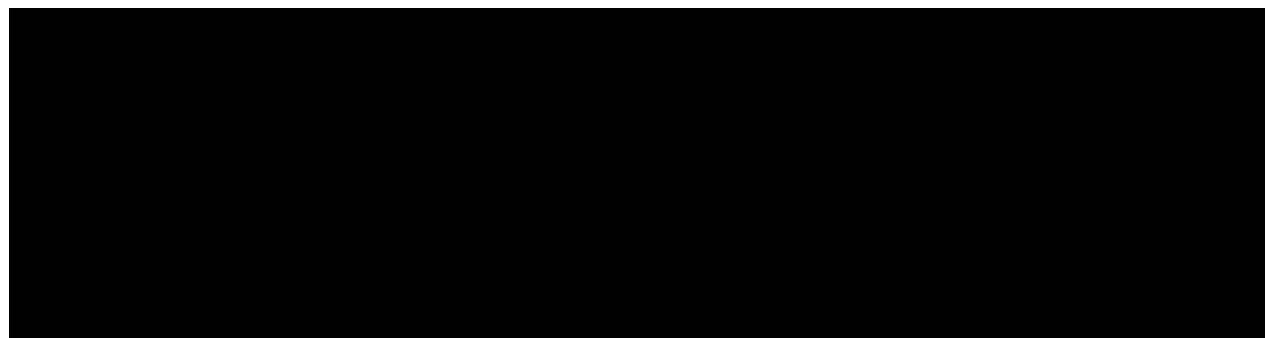


图1 RBL-2H3 (A)、P815 (B)、Ku812 (C)细胞的生长曲线(CCK8法)

Fig. 1 Growth curve of RBL-2H3 (A), P815 (B), and Ku812 (C) cell lines (method of CCK8)

图2 各细胞系细胞脱颗粒前后的形态学观察(中性红染色法, ×100)

Fig. 2 Morphological observation of cell lines before and after degranulation (neutral red staining, ×100)

表1 各细胞系细胞脱颗粒指标(脱颗粒百分率、组胺释放率、 β -氨基己糖苷酶释放率、类胰蛋白酶释放量)测定结果($\bar{x} \pm s$, $n = 4$)Table 1 Results of degranulation index (percentage of degranulation, release of histamine, β -hexosaminidase and trypsin) of each cell line ($\bar{x} \pm s$, $n = 4$)

细胞	聚山梨酯 80/(mg·mL ⁻¹)	$P_{\text{脱颗粒}}/\%$	$P_{\text{组胺}}/\%$	$P_{\beta\text{-氨基己糖苷酶}}/\%$	类胰蛋白酶释放量/(pg·mL ⁻¹)
RBL-2H3	0.04	4.05±0.77	2.42±1.69	2.00±0.71	-25.02±2.16
RBL-2H3	0.20	17.70±1.43	4.41±1.59	3.89±0.89	-18.18±2.15
RBL-2H3	1.00	23.93±1.82	5.92±2.10	4.54±0.94	-15.01±3.14
RBL-2H3	5.00	25.38±1.01	11.45±1.34	6.22±0.86	-5.23±0.93
RBL-2H3	10.00	37.61±0.18	19.67±3.71	7.72±0.61	-1.71±2.90
RBL-2H3	20.00	45.72±1.36	28.85±0.86	14.13±1.27	3.58±0.61
RBL-2H3	40.00	65.79±1.41	41.96±1.91	15.49±1.23	14.65±1.27
RBL-2H3	80.00	78.89±0.67	51.36±2.38	18.17±0.98	23.63±0.09
P815	0.04	4.64±1.11	9.54±0.71**	2.16±0.38	-11.21±0.35*
P815	0.20	12.53±1.07*	10.16±2.10*	3.39±2.16	-10.01±1.86*
P815	1.00	14.51±0.89**	13.435±1.69**	5.87±1.39	-9.46±2.81
P815	5.00	15.59±0.58**	14.93±1.21**	6.72±0.50	-3.74±2.07
P815	10.00	19.96±0.89**	15.94±2.42	10.07±0.75	1.25±2.28
P815	20.00	31.38±1.11**	27.36±1.94	12.92±1.23	3.25±0.59
P815	40.00	36.77±0.81**	31.60±2.10**	16.69±1.58	15.75±0.75
P815	80.00	45.33±1.37**	39.53±1.33**	20.43±0.24*	29.94±0.56**
Ku812	0.04	10.70±3.30*	18.05±1.82**	9.81±1.07**	-11.25±0.19*
Ku812	0.20	14.70±2.00	19.23±2.59**	11.55±1.10**	-8.22±0.09
Ku812	1.00	19.48±1.75*	20.87±1.98**	14.78±0.80**	-7.50±2.50
Ku812	5.00	23.25±2.72	24.83±1.22**	15.44±1.10**	-6.53±1.40
Ku812	10.00	30.49±3.47*	26.98±1.62*	16.90±1.29**	1.85±0.75
Ku812	20.00	53.08±3.66*	34.46±1.78**	16.95±0.58	5.35±1.71
Ku812	40.00	68.39±0.74	38.02±2.00	17.48±0.77	13.43±1.29
Ku812	80.00	71.87±1.36**	41.18±2.15**	22.77±0.74**	23.52±0.81

与同浓度给药后的RBL-2H3细胞组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs RBL-2H3 cells group with same concentration after administration

浓度的升高而升高。其中,相同浓度聚山梨酯 80 对人源、大鼠、小鼠肥大细胞的类胰蛋白酶释放量无统计学差异;与 RBL-2H3 细胞系比较,P815 细胞 $P_{\text{脱颗粒}}$ 和 $P_{\text{组胺}}$ 显著降低 ($P < 0.05, 0.01$), Ku812 细胞 $P_{\text{组胺}}$ 和 $P_{\beta\text{-氨基己糖苷酶}}$ 显著升高 ($P < 0.05, 0.01$), Ku812 细胞较 P815 和 RBL-2H3 细胞脱颗粒指标变化更灵敏。

3.3 聚山梨酯 80 刺激 Ku812 细胞 IgE 释放的测定结果

不同浓度的聚山梨酯 80 刺激 Ku812 细胞产生的 IgE 释放量如表 2 所示,本实验所用的 IgE 检测试剂盒最低检测限为 0.02 ng/mL,表 2 中 IgE 释放量均低于 0.02 ng/mL,由此可认为聚山梨酯 80 作用于肥大细胞,不产生 IgE,说明聚山梨酯 80 引起的致敏反应可能是不经过 IgE 介导的类过敏反应。

表 2 不同浓度聚山梨酯 80 使 Ku812 细胞释放 IgE 情况 ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

Table 2 Release of IgE from Ku812 cells with different concentrations of Tween 80 ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

聚山梨酯 80/(mg·mL ⁻¹)	IgE 释放量/(ng·mL ⁻¹)
0.04	0.006±0.005
0.20	0.001±0.006
1.00	-0.004±0.002
5.00	0.002±0.006
10.00	0.007±0.002
20.00	0.012±0.016
40.00	0.011±0.007
80.00	0.016±0.003

4 讨论

美国 FDA 很早就批准聚山梨酯 80 可以作为注射用途,对于静脉注射的给药途径而言,注射液中聚山梨酯 80 最大允许浓度为 10%,冻干粉末中聚山梨酯 80 可以加到制剂总质量的 12%^[22]。通过实验数据(表 1)发现,聚山梨酯 80 浓度较低(<0.2 mg/mL)时,细胞脱颗粒指标并不明显,浓度较高时引起细胞脱颗粒指标差异性明显。因此,合理控制中药注射剂中聚山梨酯 80 的量至关重要。在本实验中以 0.04~80.00 mg/mL 的聚山梨酯 80 溶液刺激 Ku812 细胞,其 IgE 的释放量均低于检测限,一定程度上可以说明聚山梨酯 80 产生的过敏反应是不经过 IgE 介导的类过敏反应。但是聚山梨酯 80 的致敏机制还需进一步研究确认。

在本实验选取的检测指标中,以化学发光法分

别检测组胺和 β -氨基己糖苷酶的释放率,操作简便、价格适中且稳定性较好。以酶联免疫吸附法(ELISA)检测类胰蛋白酶的释放量,灵敏度高、重复性好。以中性红染色法观察细胞形态,计算细胞 $P_{\text{脱颗粒}}$,RBL-2H3 细胞为贴壁生长,P815 为半贴壁半悬浮生长,比较容易染色,但是细胞数量较多,不易观察脱颗粒现象;而 Ku812 细胞,为悬浮生长,且细胞数量较小,不易进行染色实验,染色后也难以清洗,导致显微镜下观察到的细胞形态背景与其他两组细胞不同(图 1),但是脱颗粒现象比较明显。以不同浓度聚山梨酯 80 溶液刺激 3 株肥大细胞,通过脱颗粒指标的比较,发现 Ku812 细胞最灵敏,但是实验中发现这株细胞脱颗粒指标稳定性、重复性不好,可能与其生长特性与细胞大小有一定关系。RBL-2H3 细胞的灵敏性仅次于 Ku812 细胞,但是实验过程中发现其稳定性和重复性均优于 Ku812 和 P815 细胞,因此认为 RBL-2H3 细胞更适合作为体外肥大细胞脱颗粒检测模型。

参考文献

- [1] 马红英. 中药注射剂安全性问题的相关探讨 [J]. 基层医学论坛, 2017, 21(26): 3596-3597.
- [2] 胡曼曼, 孙丽蓉, 林 中. 中药注射剂安全性问题分析与建议 [J]. 中医药管理杂志, 2017, 25(1): 85-86.
- [3] 冯宇飞, 吕邵娃, 王艳宏, 等. 中药注射剂安全性问题分析及对策 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(9): 278-281.
- [4] 袁 强, 王 莉, 成 岚, 等. 国家基本药物目录 (2004 年版) 33 种中药注射剂不良反应/不良事件文献分析 [J]. 中国循证医学杂志, 2010, 10(2): 132-139.
- [5] 易 艳, 李春英, 张宇实, 等. 3 种中药注射剂类过敏反应评价及其机制探讨 [J]. 中国中药杂志, 2015, 40(14): 2711-2716.
- [6] 梁爱华, 易 艳, 张宇实, 等. 中药注射剂的类过敏反应及其风险防控 [J]. 中国药理学杂志, 2015, 50(15): 1301-1308.
- [7] Szebeni J. Complement activation-related pseudoallergy: a new class of drug-induced acute immune toxicity [J]. Toxicology, 2005, 216(2/3): 106-121.
- [8] 谭 瑾, 宋民宪, 傅超美, 等. 中药注射剂标准中辅料的使用及含量测定指标的统计 [J]. 华西药理学杂志, 2008, 23(3): 376-377.
- [9] Coors E A, Seybold H, Merk H F, et al. Polysorbate 80 in medical products and nonimmunologic anaphylactoid reactions [J]. Ann Allergy Asthma Immunol, 2005, 95(6): 593-599.
- [10] Sun N, Zhou C, Pu Q K, et al. Allergic reactions

- compared between BN and Wistar rats after oral exposure to ovalbumin [J]. *J Immunotoxicol*, 2013, 10(1): 67-74.
- [11] 汪怀山. 类过敏反应检测模型的建立及在中药注射剂类过敏反应检测中的应用 [D]. 济南: 山东大学, 2011.
- [12] 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.
- [13] 闫位娟, 李连达, 张美玉, 等. 7 种中药注射剂对 Beagle 犬类过敏反应研究 [J]. *中国新药杂志*, 2010, 19(20): 1895-1898, 1910.
- [14] 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.
- [15] Xu Y B, Liu C Y, Dou D Q, et al. Evaluation of anaphylactoid constituents *in vitro* and *in vivo* [J]. *Int Immunopharmacol*, 2017, 43: 79-84.
- [16] Antunes M A, Abreu S C, Damaceno-Rodrigues N R, et al. Different strains of mice present distinct lung tissue mechanics and extracellular matrix composition in a model of chronic allergic asthma [J]. *Respir Physiol Neurobiol*, 2009, 165(2/3): 202-207.
- [17] Passante E, Ehrhardt C, Sheridan H, et al. RBL-2H3 cells are an imprecise model for mast cell mediator release [J]. *Inflamm Res*, 2009, 58(9): 611-618.
- [18] Chan C L. Effects of Taiwan medicinal plants on asthmatic mediators releasing in mouse mastocytoma cell line P815 [D]. Tainan: National Cheng Kung University, 2008.
- [19] Karasuyama H, Mukai K R, Tsujimura Y, et al. Newly discovered roles for basophils: a neglected minority gains new respect [J]. *Nat Rev Immunol*, 2009, 9(1): 9-13.
- [20] 熊克朝, 李泽君, 李志刚, 等. 参麦注射液致 RBL-2H3 细胞脱颗粒的研究 [J]. *药物评价研究*, 2015, 38(2): 140-146.
- [21] 李 伟, 陈 梦, 黄芝瑛, 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.
- [22] 孙会敏, 杨 锐, 栾 琳, 等. 聚山梨酯 80 质量分析与致敏原探究 [J]. *药物分析杂志*, 2011, 31(10): 1850-1855.