

豚鼠不同致敏和激发途径主动全身过敏试验方法的探讨

张娟, 称春雷, 曲见松, 赵岩, 祝清芬*

山东省食品药品检验研究院, 山东 济南 250101

摘要:目的 相同剂量卵白蛋白和相同激发时间的条件下, 比较豚鼠主动全身过敏反应症状的严重程度与致敏途径和激发途径的关系。方法 取300~400 g豚鼠78只, 雌雄各半, 随机分为13组, 每组6只。以0.4%卵白蛋白溶液为受试物, 氯化钠注射液为阴性对照, 每组动物均隔日致敏1次, 连续致敏3次, 致敏剂量为0.5 mL (2 mg/只), 末次致敏后第14天各组分别进行激发, 激发剂量为1.0 mL (4 mg/只)。研究不同致敏途径和激发途径条件下, 豚鼠主动全身过敏的发生情况。结果 在相同致敏剂量、激发剂量和激发时间的条件下, 均以ip致敏的条件下, 豚鼠主动全身过敏反应的症状严重程度为iv激发>im激发>ip激发>sc激发; 均以im致敏的条件下, 症状严重程度为iv激发>ip激发>im激发>sc激发; 均以sc致敏的条件下, 症状严重程度为iv激发>im激发>ip激发>sc激发; 均以iv激发的条件下, 症状严重程度为ip致敏>im致敏>sc致敏。结论 新药主动全身过敏试验临床前安全性评价研究应注意致敏途径和激发途径。

关键词: 主动全身过敏试验; 豚鼠; 致敏途径; 激发途径

中图分类号: R965.2 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376 (2019) 07-1330-04

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2019.07.013

Exploration on different sensitization and excitation ways in active systemic anaphylaxis test of guinea pigs

ZHANG Juan, CHENG Chunlei, QU Jiansong, ZHAO Yan, ZHU Qingfen

Shandong Institute for Food and Drug Control, Jinan 250101, China

Abstract: **Objective** The relationship between the severity of active systemic anaphylaxis and the sensitization and activation pathways in guinea pigs was compared under the same dose of ovalbumin and the same excitation time. **Methods** A total of 78 Guinea pigs weighted 300 to 400 grams were randomly divided into 13 groups, each group of six guinea pigs. The 0.4% ovalbumin were used as experimental materials, and sodium chloride injection as negative control, sensitizing once every other day for 3 d, with sensitizing dose of 0.5 ml (2 mg/animal). The excitation was carried out at the fourteenth day after the end sensitization, with challenge dose of 1.0 ml (4 mg/animal). Guinea pigs had active systemic allergic reaction in the study of different sensitizing and challenge way. **Results** In the conditions of the same sensitizing dose, challenge dose and challenge interval, under the condition of ip sensitization, the severity of guinea pigs' active systemic anaphylaxis was iv excitation > im excitation > ip excitation > sc excitation; Under the condition of im sensitization, the severity of symptoms was iv excitation > ip excitation > im excitation > sc excitation; Under the condition of sc sensitization, the severity of symptoms was iv excitation > im excitation > ip excitation > sc excitation. Under iv stimulation, the severity of symptoms was ip sensitization > im sensitization > sc sensitization. **Conclusion** Preclinical safety evaluation of the new drug active systemic anaphylaxis should pay attention to the route of sensitization and challenge.

Key words: active systemic anaphylaxis; guinea pigs; sensitizing way; excitation way

在药物安全性评价中,主动全身过敏试验是给致敏成立的动物iv抗原,观察抗原与IgE抗体结合后导致肥大细胞、嗜碱性细胞脱颗粒、释放活性介质而致的全身性过敏反应^[1]。药物可能作为过敏原

引发机体产生过敏反应,药源性过敏反应对人体危害性大,且发病率高。常见的过敏症状包括皮疹、恶心、呕吐、支气管哮喘、变应性鼻炎,严重时可发生过敏性休克、心功能衰竭等,危及生命^[2]。国家食

收稿日期: 2018-10-13

第一作者:张娟,研究方向为卫生毒理学。E-mail: zhangjuan1357@163.com

*通信作者: 祝清芬 E-mail: zhuqingfen73@163.com

品药品监督管理局颁发的指导原则中规定,局部给药发挥全身作用的药物(如注射剂和透皮吸收剂等)需考察I型过敏反应,考察I型过敏反应最常见的方法为豚鼠主动全身过敏试验^[3]。主动全身过敏试验能够直接观察到相应的临床症状表现,所以在临床前安全性评价中具有其重要作用^[4]。

有研究推荐,豚鼠主动全身过敏反应中阳性物质选择卵白蛋白,剂量推荐2 mg/只,在此剂量下能观察到全面的阳性反应症状,末次致敏后第14、21天激发时出现的阳性反应率与反应强度并无明显区别^[5-6]。本研究采用0.4%卵白蛋白溶液,致敏剂量为2 mg/只,激发剂量为4 mg/只,激发时间选择末次致敏后14 d,研究不同致敏和激发途径对豚鼠主动全身过敏试验评价的影响。

1 材料

1.1 动物

Hartley种系豚鼠,体质量为300~400 g,济南金丰实验动物有限公司,实验动物生产许可证号SCXK(鲁)2014-0006,实验动物使用许可证号SYXK(鲁)2013-0012,饲养房间温度20.0~25.0℃,日温差≤3℃,湿度40%~70%,动物饲料使用豚鼠生长繁殖饲料,由北京科澳协力饲料有限公司提供。

1.2 主要试剂

卵白蛋白(美国Sigma Aldrich公司,批号

SLBB5992V,规格5 g);氯化钠注射液(河北天成药业股份有限公司,批号1161104101,规格10 mL:90 mg)。

2 方法

2.1 试验分组

取健康豚鼠78只,雌雄各半,检疫7 d后,采用随机区组的方法分为13组,雌雄各半,每组6只。分别为阴性对照组、ip致敏iv激发组、ip致敏ip激发组、ip致敏im激发组、ip致敏sc激发组、im致敏iv激发组、im致敏ip激发组、im致敏im激发组、im致敏sc激发组、sc致敏iv激发组、sc致敏ip激发组、sc致敏im激发组、sc致敏sc激发组。

2.2 致敏

各组致敏阶段均给予0.4%的卵白蛋白溶液,致敏剂量为2 mg/只,阴性对照组给予氯化钠注射液,0.5 mL/只,致敏阶段隔日给药,连续3次。

2.3 激发

末次致敏后第14天各组分别进行激发,激发时均给予0.4%的卵白蛋白溶液,激发剂量为4 mg/只,阴性对照组给予氯化钠注射液,1.0 mL/只。

2.4 过敏反应检查及判断^[3]

激发即刻至激发后,连续观察3 h;按表1所述症状详细观察动物反应及出现、消失时间^[6]。并按表1全身致敏性评价标准进行各组过敏反应评判。

表1 全身致敏性评价标准

Table 1 Evaluation criteria on symptoms of systemic allergic reaction

症状	分级	过敏反应强度
0. 正常	—	阴性
1. 不安宁;2. 竖毛;3. 发抖;4. 搔鼻	+	弱阳性
5. 喷嚏;6. 咳嗽;7. 呼吸急促;8. 排尿;9. 排粪;10. 流泪	++	阳性
11. 呼吸困难;12. 哮鸣音;13. 紫癜;14. 步态不稳;15. 跳跃;16. 喘息;17. 痉挛;18. 旋转;19. 潮式呼吸	+++	强阳性
20. 死亡	++++	过极强阳性

3 结果

3.1 ip致敏途径不同激发途径对豚鼠主动全身过敏反应的影响

阴性对照组6只豚鼠均未出现明显的过敏症状;ip致敏途径iv激发组均采用后肢小隐iv的方式,6只豚鼠均出现过敏反应极强阳性且极强阳性反应率为100%;ip激发组1只豚鼠出现过敏反应强阳性,4只豚鼠出现过敏反应弱阳性,1只豚鼠出现过敏反应阴性,过敏反应阳性反应率为83.3%;im激发组6只豚鼠均出现过敏反应强阳性且阳性反应率

为100%;sc激发组4只豚鼠出现过敏反应弱阳性,2只豚鼠出现过敏反应阴性,过敏反应阳性反应率为66.7%。结果见表2。

3.2 im致敏途径不同激发途径对豚鼠主动全身过敏反应的影响

阴性对照组6只豚鼠均未出现明显的过敏症状;im致敏途径iv激发组5只豚鼠出现过敏反应极强阳性,1只豚鼠出现过敏反应强阳性,极强阳性反应率为83.3%且阳性反应率为100%;ip激发组4只豚鼠出现过敏反应强阳性,2只豚鼠出现过敏反应

表2 各组豚鼠主动全身过敏反应症状等级评价情况($n=6$)Table 2 Levels on symptoms of active systemic anaphylaxis of guinea pig in various groups ($n=6$)

组别	过敏反应症状					阳性反应率	极强阳性反应率
	—	+	++	+++	++++		
阴性对照	6	0	0	0	0	0%	0%
ip致敏iv激发	0	0	0	0	6	100.0%	100%
ip致敏ip激发	1	4	0	1	0	83.3%	0%
ip致敏im激发	0	0	0	6	0	100.0%	0%
ip致敏sc激发	2	4	0	0	0	66.7%	0%
im致敏iv激发	0	0	0	1	5	100.0%	83.3%
im致敏ip激发	0	2	0	4	0	100.0%	0%
im致敏im激发	0	3	0	3	0	100.0%	0%
im致敏sc激发	2	4	0	0	0	66.7%	0%
sc致敏iv激发	0	1	0	5	0	100.0%	0%
sc致敏ip激发	1	2	3	0	0	83.3%	0%
sc致敏im激发	0	1	1	4	0	100.0%	0%
sc致敏sc激发	3	3	0	0	0	50.0%	0%

弱阳性,过敏反应阳性反应率为100%;im激发组3只豚鼠出现过敏反应强阳性,3只豚鼠出现过敏反应弱阳性,阳性反应率为100%;sc激发组4只豚鼠出现过敏反应弱阳性,2只豚鼠出现过敏反应阴性,过敏反应阳性反应率为66.7%。结果见表2。

3.3 sc致敏途径不同激发途径对豚鼠主动全身过敏反应的影响

阴性对照组6只豚鼠均未出现明显的过敏症状;sc致敏iv激发组5只豚鼠出现过敏反应强阳性,1只豚鼠出现过敏反应弱阳性,阳性反应率为100%;ip激发组3只豚鼠出现过敏反应阳性,2只豚鼠出现过敏反应弱阳性,1只豚鼠出现过敏反应阴性,过敏反应阳性反应率为83.3%;im激发组4只豚鼠出现过敏反应强阳性,1只豚鼠出现过敏反应阳性,1只豚鼠过敏反应弱阳性,阳性反应率为100%;sc激发组3只豚鼠出现过敏反应弱阳性,3只豚鼠出现过敏反应阴性,过敏反应阳性反应率为50%。结果见表2。

4 讨论

随着上市新药的增多,尤其是注射途径药物的广泛应用,药物过敏反应的发生率大大提高,因此,临床前过敏反应评价已成为新药研发中安全性评价的重要内容^[7]。指导原则中指出,阳性对照组给予牛血清白蛋白或卵白蛋白或已知致敏阳性物质^[3]。通过比较发现,以卵白蛋白、人血白蛋白、牛血清白蛋白3种蛋白作为阳性对照时,在一定范围内,均能得到较好的阳性效果,但是从经济因素考

虑,3种蛋白相同规格的市场报价为人血白蛋白>牛血清白蛋白>卵白蛋白,从症状发生过程考虑,卵白蛋白使用剂量为2 mg/只时,便能观察到全面的阳性反应症状^[5]。实验结果证明,在主动全身过敏试验评价中使用卵白蛋白阳性对照药,各品系大鼠的过敏强度均不及豚鼠^[8]。豚鼠主动全身过敏反应与致敏剂量、激发剂量、激发时间等都有较大关系^[9-10]。

本研究采用相同剂量卵白蛋白和相同激发时间的条件下,比较豚鼠主动全身过敏反应症状的严重程度与致敏途径和激发途径的关系,研究发现,在本实验室条件下,均以ip致敏的条件下,豚鼠主动全身过敏反应的症状严重程度为iv激发>im激发>ip激发>sc激发;均以im致敏的条件下,豚鼠主动全身过敏反应的症状严重程度为iv激发>ip激发>im激发>sc激发;均以sc致敏的条件下,豚鼠主动全身过敏反应的症状严重程度为iv激发>im激发>ip激发>sc激发;均以iv激发的条件下,豚鼠主动全身过敏反应的症状出现时间和严重程度为ip致敏>im致敏>sc致敏。

根据试验结果,在进行新药豚鼠主动全身过敏临床前安全性评价时,在严格遵照药物非临床研究质量管理规范和药物刺激性、过敏性和溶血性研究技术指导原则的同时,根据药物临床使用方法进行剂量设计,iv的药物首选ip致敏,iv激发,其他注射途径的药物需要选择合适的致敏途径和激发途径,从而有效全面的进行全身致敏性评价。

参考文献

- [1] 袁伯俊, 廖明阳, 李 波. 药物毒理学实验方法与技术 [M]. 北京: 化学工业出版社, 2007: 247- 249.
- [2] 霍 艳, 李 波. 药物免疫毒性评价技术要求的国内外进展 [J]. 中国药理学杂志, 2006: 41(20): 1525-1529.
- [3] 国家食品药品监督管理局. 药物刺激性、过敏性和溶血性研究技术指导原则 [S]. 2014.
- [4] 罗轶凡, 任利翔, 姜明燕. 青霉素类和头孢菌素类药物的全身主动过敏试验方法探讨 [J]. 山东医药, 2014, 54(20): 28-30.
- [5] 高 梅, 曹 冲, 马 会, 等. 豚鼠主动全身过敏试验两种阳性物质选择的探讨 [J]. 中国比较医学杂志, 2015, 25(9): 51-55.
- [6] 翁谢川, 樊 星, 王青秀, 等. 药物安全性评价中豚鼠全身过敏试验方法的研究 [J]. 中国比较医学杂志, 2012, 22(5): 51-55.
- [7] 毛宏梅, 韩 超, 崔 璐, 等. 4 种不同类型药物的豚鼠全身主动过敏试验研究 [J]. 军事医学, 2016, 40(5): 405-407.
- [8] 陈华英, 李秀芳, 金若敏, 等. 大鼠主动全身过敏试验方法的探讨 [J]. 中成药, 2012, 34(7): 1209-1215.
- [9] 郑智勇, 李 莉, 赵 晋, 等. 不同致敏和激发剂量对豚鼠主动全身过敏试验结果的影响 [J]. 中国药理学与毒理学, 2013, 27(3): 540.
- [10] 张德波, 杨幼琪, 冯 诚, 等. 过敏反应与致敏剂量和致敏时间的关系研究 [J]. 中国药品标准, 2007, 8(3): 18-20.