

致敏 RBL-2H3 细胞在清开灵、痰热清中药注射剂过敏性评价中的应用

李黎明, 金若敏*, 谢家骏, 姚广涛, 符胜光, 徐婷婷

上海中医药大学 药物安全评价研究中心, 上海 201203

摘要: **目的** 探索采用血清抗体致敏的 RBL-2H3 细胞对清开灵、痰热清 2 种中药注射剂过敏性进行初步评价。**方法** 以阳性药卵白蛋白 (OVA)、清开灵注射液、痰热清注射液分别与 Al(OH)₃ 凝胶佐剂混合作为致敏源, Wistar 大鼠 sc 致敏源制备抗体血清, 采用放免法检测血清总 IgE 水平。取抗体血清致敏 RBL-2H3 细胞, 48 h 后再以药物激发致敏细胞, 检测细胞脱颗粒后上清液中 β -氨基己糖苷酶释放率。另取大鼠进行被动皮肤过敏 (PCA) 实验, 观察动物皮肤蓝斑阳性反应率。**结果** 与对照组相比, OVA、清开灵、痰热清组大鼠抗体血清总 IgE 水平显著升高 ($P < 0.05, 0.01$)。致敏细胞脱颗粒结果显示: 采用 OVA 和清开灵、痰热清注射液抗体血清致敏细胞, 再经药物激发后 RBL-2H3 细胞上清液中 β -氨基己糖苷酶释放率明显增加 ($P < 0.05, 0.01$), 与对照组比较, 最大的相对释放倍数分别为 3.7、1.53、1.98。大鼠 PCA 实验结果显示, 各给药组大鼠蓝斑阳性反应最高百分率分别为 100%、100%、86%。RBL-2H3 细胞实验与 PCA 实验结果具有较好的一致性。**结论** 血清抗体致敏 RBL-2H3 细胞模型可以用于对中药注射剂过敏性的初筛或评价。

关键词: 致敏 RBL-2H3 细胞; 清开灵注射液; 痰热清注射液; 过敏性; β -氨基己糖苷酶

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2015)01-0086-04

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2015.01.017

Application of RBL-2H3 cells on allergenicity assessment of Qing kailing and Tanreqing Injections

LI Li-ming, JIN Ruo-min, XIE Jia-jun, YAO Guang-tao, FU Sheng-guang, XU Ting-ting

Research Center for Drug Safety Evaluation of Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China

Abstract: Objective To explore the allergenicity of two kinds of Chinese materia medica (CMM) injections, Qingkailing (QKL) and Tanreqing (TRQ) Injections, with serum antibody sensitized RBL-2H3 cells. **Methods** The antiserum was prepared by sc injection of allergen composed of ovalbumin (OVA), QKL, or TRQ combined with aluminum hydroxide adjuvant respectively in Wistar rats. The total IgE level in serum antibody was determined by radioimmunoassay. The RBL-2H3 cells were sensitized with serum antibodies, then stimulated by OVA, QKL, or TRQ after 48 h. The release rate of β -hexosaminidase in the supernatant was determined after the degranulation of sensitized RBL-2H3 cells. Passive cutaneous anaphylaxis (PCA) test was performed with rats, and the positive reaction rate with blue plaque in animal skin was observed. **Results** Compared with the control group, the total IgE level in serum antibody was increased significantly in OVA, TRQ, and QKL groups ($P < 0.05$). The degranulation test revealed that the release rate of β -hexosaminidase was significantly increased in the supernatant when the cells were incubated with the antiserum and then stimulated with OVA, QKL, and TRQ. Compared with the control group, the largest relative times of release were 3.7, 1.53, and 1.98, respectively. The results of PCA test showed that the highest percentage rates of positive reaction of blue plaque were 100%, 100%, and 86% respectively. The results of RBL-2H3 cell test and PCA test have good consistency. **Conclusion** The serum antibody sensitized RBL-2H3 cell model can be used for screening or assessing allergenicity of CMM injection.

Key words: sensitized RBL-2H3 cells; Qingkailing Injection; Tanreqing Injection; anaphylactic reaction; β -hexosaminidase

过敏反应是中药注射剂的主要不良反应之一, 也是限制中药注射剂临床应用的最主要因素之一^[1]。

近年来, 人们除了采用整体实验对中药注射剂过敏性进行研究外, 还探索采用 RBL-2H3 细胞构建过敏

收稿日期: 2014-03-10

基金项目: 国家“重大新药创制”科技专项项目 (2009ZX0902-002); 国家“重大新药创制”科技专项项目 (2011ZX09301-009)

作者简介: 李黎明, 硕士研究生, 主要研究方向为中药药理毒理学。Tel: 13916303295 E-mail: goodday20120214@126.com

*通信作者 金若敏, 博士生导师, 主要研究方向为中药药理毒理学。Tel: (021)51322401 E-mail: rmj801@126.com

反应的体外细胞模型,以检测细胞上清液中 β -氨基己糖苷酶释放率等指标,来初步评价药物的致敏性^[2]。然而,目前多采用注射剂直接刺激 RBL-2H3 细胞的实验方法,但此方法难以严格区分最后引起的反应是类过敏还是过敏反应。本实验根据过敏反应的原理,采用大鼠抗体血清先致敏 RBL-2H3 细胞,48 h 后再以药物激发,考察致敏细胞激发后上清液 β -氨基己糖苷酶释放率,并与大鼠致敏后血清总 IgE 水平及大鼠被动皮肤过敏实验(PCA)结果进行比较,旨在进一步探索 RBL-2H3 细胞模型用于中药注射剂过敏反应评价时的可行性。

1 材料

1.1 动物及细胞

清洁级 Wistar 大鼠(160~200 g),购于上海西普尔-必凯实验动物有限公司,大鼠实验期间在上海中医药大学动物实验中心饲养。

RBL-2H3 细胞购于中国科学院细胞库,以含 15%胎牛血清的高糖 DMEM 培养基培养于 37 °C、95% CO₂ 饱和湿度的细胞培养箱中,每 3 天以 1:3 比例稀释传代培养 1 次。

1.2 主要试剂与药物

卵白蛋白(OVA,鼎国生物技术有限公司)、Al(OH)₃凝胶佐剂(Sigma 公司);清开灵注射液(规格 10 mL/支,批号 09070463,河北神威药业有限公司);痰热清注射液(规格 10 mL/支,批号 100908,上海凯宝药业股份有限公司);伊文思蓝(国药集团化学试剂有限公司)。

2 方法

2.1 溶液配制

2.1.1 致敏液的配制 OVA 组致敏液:称取 40 mg OVA,加入 2 mL 生理盐水混匀为混悬液,与 Al(OH)₃凝胶佐剂等体积混合,即得 10 mg/mL 致敏液。清开灵组致敏液:清开灵注射液 1 支(10 mL)与 Al(OH)₃凝胶佐剂等体积混合,即得。痰热清组致敏液:痰热清注射液 1 支(10 mL)与 Al(OH)₃凝胶佐剂等体积混合,即得。

2.1.2 RBL-2H3 细胞激发液的配制 首先将不同浓度的药物直接与 RBL-2H3 细胞共孵育,采用 MTT 法测定其 IC₅₀,计算出药物的 IC₁₀,选择近 IC₁₀ 的浓度作为 RBL-2H3 细胞激发液的浓度,以尽可能消除药物对细胞的直接作用。由此确定具体的药物激发浓度分别为清开灵 1:1 000、痰热清 1:300、OVA 激发液 25 μ g/mL,对照组直接给予台氏缓冲液。

其中台氏缓冲液配制:NaCl 137 mmol/L、KCl 2.7 mmol/L、葡萄糖 5.6 mmol/L、CaCl₂ 1.8 mmol/L、MgCl₂ 1 mmol/L、4-羟乙基哌嗪乙磺酸(HEPES) 20 mmol/L、BSA 1 mg/mL,充分混匀后,调 pH 至 7.2~7.4,0.2 μ m 微孔滤膜滤过除菌,4 °C 保存备用。

2.1.3 大鼠 PCA 实验激发液的配制 称取 1 g 伊文思蓝加入生理盐水溶解至 50 mL,即得 2%伊文思蓝溶液。清开灵、痰热清各 1 支(10 mL),与 2%伊文思蓝溶液等体积混匀,现配现用,即为 0.5 mL/mL 的激发液。称取 100 mg OVA,加入 5 mL 生理盐水混匀为混悬液,并与 2%伊文思蓝溶液等体积混匀,即得 10 mg/mL OVA 阳性对照溶液。2 mL 生理盐水与 2%伊文思蓝溶液等体积混匀,即得生理盐水对照。

2.2 大鼠抗体血清制备及总 IgE 检测

取 Wistar 大鼠随机分为 4 组,OVA 及对照组各 3 只,雌雄不拘;清开灵、痰热清组每组 6 只,雌雄各半;各组分别 sc 给予致敏液,剂量分别为中药注射剂致敏液 2.5 mL/kg(约 0.5 mL/只),OVA 5 mg/只,对照组给予生理盐水 0.5 mL/只;间隔 1 d 致敏 1 次,共 3 次。于末次致敏后第 13 天,大鼠以 25%乌拉坦麻醉后,腹主动脉取血,3 000 r/min 离心 10 min,分离上清液,得抗体血清^[3]。采用放免法检测血清中总 IgE 水平^[4]。另一部分血清-80 °C 条件下保存作为 PCA 试验中抗体血清用于被动致敏;剩余部分经 2 μ m 无菌滤器滤过,在-20 °C 条件下保存,用于检测细胞脱颗粒。

2.3 致敏 RBL-2H3 细胞 β -氨基己糖苷酶释放率的测定

RBL-2H3 细胞传代培养后,取对数生长期细胞,以 1×10^5 /mL 细胞浓度接种至 96 孔板中,100 μ L/孔,过夜培养。设给药上清组和给药总酶组及对照上清组和对照总酶组,共 4 组,给药上清组及其总酶组取“2.2”项中制备所得的大鼠抗体血清,以 DMEM 完全培养液稀释至不同倍数,加入各稀释倍数的抗体血清 100 μ L/孔,对照上清组及其总酶组给予等体积台氏缓冲液,每个稀释倍数设 4 个复孔,培养 24 h 致敏细胞后;弃培养液,以 PBS 清洗,去除残余血清,加入新鲜完全培养液 100 μ L/孔,重新培养 24 h。给药上清组及对照上清组弃培养液后以台氏缓冲液清洗细胞,每孔再次分别加入 100 μ L OVA、清开灵、痰热清的激发液或等体积缓冲液;给药总酶组及对照总酶组弃培养液后以台氏缓冲液清洗细胞,每孔加入 100 μ L 含 0.1% TritonX-100

的台氏缓冲液以溶解细胞；以上 4 组均置 CO₂ 培养箱中 37 °C 继续培养 2 h。取上清液，4 °C、1 500 r/min 离心 5 min 分离上清液。取 50 μL 上清液加入 50 μL 1 mmol/L β-氨基己糖苷的柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液 (pH 4.5)，37 °C 孵育 60 min，加入 200 μL 终止液 (0.1 mmol/L Na₂CO₃/NaHCO₃，pH 10.0) 终止反应，用酶标仪在波长 405 nm 处测吸光度 (A) 值^[5]。按公式计算各药物上清组的 β-氨基己糖苷酶释放率，并换算相对释放倍数。

$$\text{释放率} = \frac{\text{上清组 } A \text{ 值}}{\text{总酶组 } A \text{ 值}}$$

$$\text{相对释放倍数} = \frac{\text{给药组释放率}}{\text{对照组释放率}}$$

2.4 大鼠 PCA 实验^[3]

另取一批 Wistar 大鼠，按体质量随机分组，雌雄各半，分为对照、OVA、清开灵、痰热清组，其中对照组 6 只，OVA 组 8 只，清开灵组 8 只，痰热清组 7 只。动物背部剃毛，皮内注射“2.2”项制备的相应抗体血清，各给药组分为抗体血清原液及血清稀释液 (血清原液+3 倍生理盐水)，给药体积为 0.1 mL/只，进行被动致敏大鼠。48 h 后，各组动物尾 iv 相应激发液：对照给予生理盐水 0.5 mL/只；OVA 组给予 OVA 0.5 mL/只；清开灵、痰热清组给予药物 2.5 mL/kg。激发后 30 min 用 25% 乌拉坦麻醉后，观察皮肤蓝斑，以背部皮肤蓝斑直径大于 5 mm 为阳性，计算阳性率。

2.5 数据统计

使用 SPSS 19.0 软件进行统计处理，数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示，多组间比较采用单因素方差分析法，两组间比较采用 *t* 检验，计数资料采用 χ^2 检验。

3 结果

3.1 致敏大鼠血清总 IgE 水平比较

结果显示，与对照组比较，OVA、清开灵、痰热清组大鼠抗体血清总 IgE 水平明显升高 ($P < 0.05$ 、 0.01)。见表 1。

表 1 大鼠抗体血清总 IgE 水平 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 1 Levels of total IgE in antiserum of rats ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	血清总 IgE/(ng·mL ⁻¹)
对照	33.06 ± 13.76
OVA	126.38 ± 27.72**
清开灵	94.31 ± 41.73*
痰热清	160.83 ± 31.25**

与对照组比较：* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ ，下同

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs control group, same as below

3.2 致敏 RBL-2H3 细胞 β-氨基己糖苷酶的释放率

结果显示，与对照组比较，OVA 组血清稀释 4~128 倍致敏细胞，再以药物激发，β-氨基己糖苷酶释放率显著增加 ($P < 0.05$ 、 0.01)，见表 2。OVA 组血清稀释 4~128 倍，其相对释放倍数分别为 2.5、3.7、2.9、2.3、1.6、1.4，最大达到 3.7 倍；清开灵、痰热清组血清稀释 4~32 倍致敏细胞，β-氨基己糖苷酶相对释放倍数也显著增加 ($P < 0.01$)，清开灵组血清稀释 4~128 倍，对应的相对稀释倍数分别为 1.53、1.31、1.12、1.14、1.11、1.00，痰热清组血清稀释 4~128 倍，对应的相对稀释倍数分别为 1.98、1.82、1.57、1.29、1.11、0.89；而且随着血清浓度的增加，β-氨基己糖苷酶的相对最大释放倍数分别为 1.53、1.98 倍。

表 2 RBL-2H3 细胞上清液中 β-氨基己糖苷酶释放率 ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

Table 2 Release rates of β-hexosaminidase in supernatant of RBL-2H3 cells ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

组别	血清不同稀释倍数下的 β-氨基己糖苷酶释放率/%						
	对照	稀释 4 倍	稀释 8 倍	稀释 16 倍	稀释 32 倍	稀释 64 倍	稀释 128 倍
OVA	12.77 ± 0.54	32.34 ± 3.37**	47.81 ± 1.77**	36.78 ± 4.07**	29.64 ± 3.56**	20.08 ± 4.94*	18.36 ± 2.66**
清开灵	7.95 ± 0.19	12.17 ± 0.71**	10.40 ± 0.52**	8.89 ± 0.45**	9.04 ± 0.46**	8.81 ± 0.46	7.96 ± 0.37
痰热清	7.75 ± 1.70	15.33 ± 1.96**	14.14 ± 1.25**	12.28 ± 1.56**	10.08 ± 1.97**	8.64 ± 1.32	6.87 ± 0.83

3.3 大鼠 PCA 实验结果

皮肤被动致敏结果显示，对照组大鼠皮肤未见蓝斑。阳性 OVA 组大鼠皮肤能观察到边界清晰的蓝斑，6 只大鼠均为阳性反应，蓝斑阳性反应率均为 100%。清开灵组大鼠皮肤能观察到明显的边界不清晰的蓝染，8 只大鼠均为阳性反应，蓝染阳性反应率均为 100%。痰热清血清原液组及血清稀释液

组蓝斑清晰，原液组有 6 只大鼠为阳性反应，血清稀释组有 1 只大鼠为阳性反应，其阳性反应率分别为 86%、14%，与对照组相比，OVA 与清开灵血清原液和血清稀释组阳性反应率均显著提高 ($P < 0.01$)，痰热清血清原液组阳性反应率有升高趋势 ($P < 0.05$)。

4 讨论

目前评价药物的过敏反应主要是采用整体动物

实验。近年来,根据肥大细胞表面有大量 IgE 受体 FcεR I 的表达,对体内 IgE 抗体具有高亲和力,当过敏原进入体内后与 IgE 结合,并使 IgE-FcεR I 复合物相互连接,触发细胞内一系列的反应如细胞脱颗粒的原理^[6],采用离体细胞实验方法来评价药物的致敏性,取得了一定的效果。RBL-2H3 细胞是一株嗜碱性白血病细胞,其表面也有大量 IgE 受体 FcεR I 的表达,具是与肥大细胞脱颗粒功能相似的一种模型,由于其具有培养方法简单,快速便捷等优点,已广泛应用于药物致敏性的评价,国内多采用此模型对中药注射剂进行致敏性的评价。Dearman 等^[7]研究显示 RBL-2H3 细胞可作为体外模型用于替代 PCA 检测特异性 IgE,并具有一定的敏感性和特异性。然而,国内现有评价中药注射剂致敏性方法均采用药物直接刺激 RBL-2H3 细胞,检测其 β-氨基己糖苷酶等的量^[8],根据类过敏反应的原理,即过敏原致敏直接激发细胞脱颗粒,因此该实验方法所得的结果多为反映了中药注射剂的类过敏反应的情况^[9]。

本实验从抗原-抗体结合致敏反应原理出发,首先用药物 sc 致敏大鼠,取血清,从而获得了药物鼠源性 IgE 免疫球蛋白的血清。将血清与 RBL-2H3 细胞体外共同孵育,血清中 IgE 可使细胞膜表面的 IgE 受体活化,使细胞致敏。再用不引起细胞直接脱颗粒的剂量激发致敏细胞,致使细胞脱颗粒而释放 β-氨基己糖苷酶,通过测定 β-氨基己糖苷酶的释放率来评价药物的过敏反应性,以区别于药物单次直接刺激 RBL-2H3 细胞的类过敏评价方法。

实验选用已有文献报道引起临床不良反应发生的清开灵、痰热清注射液作为受试药物。清开灵注射液变态反应发生率占其总不良反应的 85%^[10];痰热清注射液的临床不良反应发生率为 2.54%,其中变态反应占总不良反应的 93.65%^[11-12]。清开灵、痰热清注射液临床推荐的剂量均为 2~4 支/d (10 mL/支)。本实验选用药物致敏及激发剂量均为临床推荐使用中间剂量 (3 支/d)。阳性药物组给予 5 mg/只 OVA^[13]。实验结果显示阳性药 OVA 致敏大鼠,可使血清总 IgE 水平显著升高;以不引起细胞直接脱颗粒的剂量致敏细胞后进行激发,β-氨基己糖苷酶释放率明显增加;大鼠 PCA 反应中蓝斑阳性反应率达 100%;3 个实验结果具有较好的一致性,血清 IgE 的升高与蓝斑阳性率验证了致敏 RBL-2H3 细胞实验进行过敏反应评价的可行性。同样清开灵、痰热清注射液选用不直接引起 RBL-2H3 细胞脱颗粒的剂

量作为激发剂量,在药物稀释倍数 4~32 倍均能引起致敏 RBL-2H3 细胞显著释放 β-氨基己糖苷酶,与血清总 IgE 水平的作用趋势是一致的。皮肤被动致敏结果显示,与对照组相比,清开灵组及痰热清原液组,皮肤蓝斑阳性反应率分别为 100%和 86%,均具有统计学差异。由于受试药物成分复杂,PCA 试验更可能受到受试药物中某些成分对毛细血管扩张作用的影响,但尽管如此,RBL-2H3 细胞的 3 个实验结果与 PCA 试验还是具有很好的一致性。3 个实验结果亦具有较好的一致性,表明该离体实验方法与大鼠 PCA 结果有较好的相关性。本研究为中药注射剂过敏性评价提供了有益的参考和探索。

参考文献

- [1] 张 岷, 屈 哲, 霍桂桃, 等. 中药注射剂诱发过敏性反应的临床前安全性评价 [J]. 药物评价研究, 2013, 36(4): 241-244.
- [2] Yamanishi R, Tsuji H, Bando N, et al. Micro-assay method for evaluating the allergenicity of the major soybean allergen, Gly m Bd 30K, with mouse antiserum and RBL-2H3 cells [J]. *Biosci Biotechnol Biochem*, 1997, 61(1): 19-23.
- [3] 药物研究技术指导原则 [S]. 2006.
- [4] 张 彤, 钟高仁, 林 敏, 等. 用于测量大鼠血清总 IgE 的放射免疫分析试剂盒及其检测方法: 中国, 201010172353.1 [P]. 2010-05-20.
- [5] 李 佳, 金 晶, 关翠雯, 等. 聚山梨酯 80 刺激肥大细胞 RBL-2H3 脱颗粒作用的评价 [J]. 药物评价研究, 2010, 33(5): 379-383.
- [6] Stone K D, Prussin C, Metcalfe D D. IgE, mast cells, basophils, and eosinophils [J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2010, 125(Suppl 2): 73-80.
- [7] Dearman R J, Skinner R A, Deakin N, et al. Evaluation of an *in vitro* method for the measurement of specific IgE antibody responses: the rat basophilic leukemia (RBL) cell assay [J]. *Toxicology*, 2005, 206(2): 195-205.
- [8] 黄文恒, 罗 霞, 周 联, 等. 清开灵注射液对 RBL-2H3 肥大细胞脱颗粒的影响 [J]. 贵阳中医学院学报, 2010, 32(4): 80-82.
- [9] 赵 吟, 李 钦, 张信岳. 基于 RBL-2H3 细胞模型的 I 型过敏反应和类过敏反应研究 [J]. 中国临床药理学与治疗学, 2010, 15(11): 1310-1315.
- [10] 袁晓勇. 清开灵注射液不良反应研究 [J]. 中国社区医师: 医学专业, 2011, 13(277): 23-24.
- [11] 靳颖华, 张卫东, 齐 平. 痰热清注射液不良反应的 Meta 分析 [J]. 首都医药, 2009(4): 28-29.
- [12] 李鲜淑. 我院 58 例痰热清注射液致不良反应报告分析 [J]. 中国社区医师, 2010, 12(260): 139.
- [13] 王志国, 王丹巧, 于友华, 等. 组胺致 Beagle 犬类过敏反应实验模型研究 [J]. 中国中药杂志, 2011, 36(14): 1842-1844.