

香丹注射液中致类过敏反应成分筛选及机制初探

庞 菲¹, 王弯弯², 郝瑞瑞¹, 周甜雨³, 陈世忠^{2*}, 靳洪涛^{1,4,5*}

1. 中国医学科学院, 北京协和医学院药物研究所, 新药安全评价研究中心, 北京 100050

2. 北京大学药学院, 北京 100191

3. 陕西中医药大学, 陕西 咸阳 712046

4. NMPA 创新药物安全性研究与评价重点实验室, 北京 102206

5. 北京协和建昊医药技术开发有限责任公司, 北京 100176

摘要: **目的** 筛选香丹注射液中可能存在的致类过敏成分并探讨其作用机制。 **方法** 使用 Auto Dock Tools Vina 软件, 以人类 Mas 相关 G 蛋白偶联受体 X2 (Mas-related G protein-coupled receptor X2, MRGPRX2) 和小鼠 MRGPRb2 为目标蛋白, 对香丹注射液中的水溶性酚酸类物质进行分子对接, 并将香丹注射液及与 MRGPRX2 和 MRGPRb2 有较高结合 (≤ -25.10 kJ/mol) 的组成成分丹酚酸 A、丹酚酸 B、丹酚酸 C、迷迭香酸、紫草酸与小鼠肥大细胞瘤 P815 细胞孵育 1 h, 检测组胺 (histamine, His) 和 β -氨基己糖苷酶 (β -hexosaminidase, β -Hex) 释放率, 筛选出致类过敏成分, 进一步观察丹酚酸 B 及紫草酸刺激 P815 细胞胞内 Ca^{2+} 动员及细胞脱颗粒情况, 最后进行小鼠后爪外渗实验验证。 **结果** P815 细胞分别给予香丹注射液 (1:25、1:250) 及丹酚酸 B (100 $\mu\text{g/mL}$) 和紫草酸 (100 $\mu\text{g/mL}$) 刺激后, His、 β -Hex 释放均显著升高 ($P < 0.01$)。P815 细胞分别给予丹酚酸 B (100 $\mu\text{g/mL}$) 和紫草酸 (100 $\mu\text{g/mL}$) 刺激后, 胞内 Ca^{2+} 浓度均显著升高 ($P < 0.05$), 并有脱颗粒现象。丹酚酸 B (43.5、21.7 $\mu\text{g/kg}$) 和紫草酸 (43.5 $\mu\text{g/kg}$) 均能显著提高小鼠后爪伊文思蓝渗出程度 ($P < 0.05$ 、0.01)。 **结论** 香丹注射液诱导的类过敏反应可能与丹酚酸 B 和紫草酸有关, 且丹酚酸 B 和紫草酸诱导的类过敏反应可能与动员 Ca^{2+} 内流相关。

关键词: 香丹注射液; 类过敏反应; 分子对接; 丹酚酸 B; 紫草酸; P815 细胞

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2022)20-6500-09

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2022.20.022

Screening and preliminary mechanism of inducer of anaphylactic reaction in Xiangdan Injection

PANG Fei¹, WANG Wan-wan², HAO Rui-rui¹, ZHOU Tian-yu³, CHEN Shi-zhong², JING Hong-tao^{1,4,5}

1. New Drug Safety Evaluation Center, Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Beijing 100050, China

2. School of Pharmaceutical Sciences, Peking University, Beijing 100191, China

3. Shaanxi University of Chinese Medicine, Xianyang 712046, China

4. NMPA Key Laboratory for Safety Research and Evaluation of Innovative Drug, Beijing 102206, China

5. Beijing Union-Genius Pharmaceutical Technology Development Co., Ltd., Beijing 100176, China

Abstract: Objective To screen the components induced the anaphylactic reaction in Xiangdan Injection (香丹注射液) and explore the mechanism. **Methods** With human Mas-related G protein-coupled receptor X2 (MRGPRX2) and mouse MRGPRb2 as target proteins, water-soluble phenolic acids in Xiangdan Injection were docked with target protein by Auto Dock Tools Vina. P815 cells were incubated with Xiangdan Injection and its constituents of salvianolic acid A, salvianolic acid B, salvianolic acid C, rosmarinic acid and lithospermic acid for 1 h, which had high binding energy (≤ -25.10 kJ/mol) to MRGPRX2 and MRGPRb2. According to

收稿日期: 2022-06-30

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81773996); 中国毒理学会临床毒理专项资助课题 (CST2021CT101)

作者简介: 庞 菲, 硕士研究生, 研究方向为药物免疫毒理学。E-mail: pangfei@imm.ac.cn

*通信作者: 靳洪涛, 博士生导师, 从事药物毒理学研究。E-mail: jinhongtao@imm.ac.cn

陈世忠, 博士生导师, 主要从事天然药物化学研究。E-mail: chenshizhong66@163.com

histamine (His) and β -hexosaminidase (β -Hex) release rate, possible components that may induce the anaphylactic reaction were screened out. The intracellular Ca^{2+} mobilization and cell degranulation stimulated by salvianolic acid B and lithospermic acid were further observed. Finally, the mouse hind paw extravasation experiment was observed for verification. **Results** After P815 cells were stimulated with Xiangdan Injection (1 : 25, 1 : 250), salvianolic acid B (100 $\mu\text{g/mL}$) and lithospermic acid (100 $\mu\text{g/mL}$), the release of His and β -Hex were significantly increased ($P < 0.01$). After P815 cells were stimulated with salvianolic acid B (100 $\mu\text{g/mL}$) and lithospermic acid (100 $\mu\text{g/mL}$), the intracellular Ca^{2+} concentration was significantly increased ($P < 0.05$), and degranulation was observed. Salvianolic acid B (43.5, 21.7 $\mu\text{g/kg}$) and lithospermic acid (43.5 $\mu\text{g/kg}$) could significantly increase the degree of Evans blue exudation in hind paw of mice ($P < 0.05, 0.01$). **Conclusion** The anaphylactoid reaction induced by Xiangdan Injection may be related to salvianolic acid B and lithospermic acid, and the anaphylactoid reaction induced by salvianolic acid B and shikonic acid may be related to the mobilization of Ca^{2+} influx.

Key words: Xiangdan Injection; anaphylactic reaction; molecular docking; salvianolic acid B; lithospermic acid; P815 cells

中药注射剂 (traditional Chinese medicine injections, TCMIs) 是由中医药理论指导, 采用现代科学技术与方法, 从中草药、天然药物中提取有效成分制成可供注入体内 (包括肌内、穴位、皮内、皮下、静脉以及其他组织或器官) 的无菌溶液以及供临床前配制溶液的无菌粉末或浓缩液^[1]。近年来, 中药制剂种类越来越多, 且在病毒感染性疾病、心脑血管疾病等疾病中疗效显著, 随其应用范围逐渐扩大, 其用药安全性也备受重视。中药是在药物过敏反应中常见的触发因素, TCMIs 复方复杂多样, 几乎所有 (95.7%) 与中药有关的过敏性病例均来自 TCMIs^[2]。在 2014—2019 年湖北省基于自发报告系统的 TCMIs 安全性研究中发现类过敏反应 (14.39%) 是最常见的不良反应^[3], 对 TCMIs 中的潜在致类过敏反应物质进行筛选, 对提高临床应用的安全性至关重要。

香丹注射液属于活血化瘀类药物, 在临床中广泛应用于心脑血管疾病的治疗, 脂溶性的二萜醌类及水溶性的酚酸类物质是该制剂的主要活性物质^[4], 丹参和降香是香丹注射液的主要组成, Cao 等^[5]和陈影等^[6]测定出香丹注射液中水溶性酚酸类成分包括丹参素、原儿茶酸、原儿茶醛、咖啡酸、丹酚酸 A、丹酚酸 B、丹酚酸 C、紫草酸和迷迭香酸等生物活性成分。香丹注射液疗效显著确切, 随着临床对其应用的认知加深, 其不良反应也受到广泛重视。药品不良反应信息通报 (第 45 期) 指出要警惕香丹注射液的严重不良反应^[7], 理血剂中活血化瘀药 (24.5%) 在 2021 年药品不良反应/事件报告涉及的中药中排第 1 位^[8], 在 2013 年 TCMIs 严重不良反应/事件报告中香丹注射液排第 5 位^[9]。香丹注射液的不良反应累及皮肤、呼吸等多个组织器官, 主要体现在超敏反应上, 且集中于给药后 30 min 内,

临床表现复杂多样, 严重时出现休克死亡^[10]。患有心血管疾病、有过敏史及过敏体质患者更易发生不良反应, 当香丹注射液与其他药物联用时, 会加重不良反应, 增加严重不良反应的发生率^[11-12]。对香丹注射液进行致类过敏物质筛选, 有利于提高制剂的安全性。本研究利用已建立的成熟致敏物质筛选平台^[13-14], 寻找香丹注射液引起类过敏反应发生的原因, 为提高其临床应用的安全性并为制剂进行质量控制以及工艺优化提供参考。

1 材料

1.1 细胞

小鼠肥大细胞瘤 P815 细胞购自中国科学院上海生命科学研究院细胞资源中心。

1.2 动物

SPF 级雄性 ICR 小鼠, 4~5 周龄, 体质量 18~22 g, 购自北京维通利华实验动物技术有限公司, 动物合格证号 SCXK (京) 2016-0006。动物于中国医学科学院药物研究所实验动物中心适应性饲养 7 d, 温度 20~23 $^{\circ}\text{C}$, 相对湿度 40%~70%, 12 h 昼夜交替循环, 动物自由进食饮水。动物实验经中国医学科学院动物福利与伦理委员会批准 (批准号 0000262)。

1.3 药品与试剂

香丹注射液 (批号 110401) 购自河南同源制药有限公司; 对照品丹酚酸 A (批号 DST201109-008)、丹酚酸 B (批号 DSTDD000901)、丹酚酸 C (批号 DST200302-010)、迷迭香酸 (批号 DSTDM002701)、紫草酸 (批号 DST201209-028) 购自成都德斯特生物技术有限公司, 质量分数均 $\geq 98\%$; C48/80 (批号 088M4120V)、对硝基苯基-N-乙酰基- β -D-葡萄糖酰胺 (批号 1002575112) 购自美国 Sigma 公司; Triton X-100 (批号 EZ1609D315) 购自 BioFroxx 公司; CCK-8 (批号 PN558) 购自日本株式会社同仁化学研究

所; RPMI 1640 培养基 (批号 AF29546226)、胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS, 批号 DD19099560) 购自 Hyclone 公司; 胰酶 (批号 2114092)、盐酸 (批号 20140703) 购自北京利维宁生物科技有限公司; PBS (批号 2126176) 购自 BI 公司; 改良台式液 (批号 20211019)、0.1 mol/L 柠檬酸钠缓冲液 (批号 20200728) 购自北京索莱宝科技有限公司; Na_2CO_3 (批号 20160616)、 NaHCO_3 (批号 20170216) 均购自北京化工厂; NaOH (批号 20200701) 购自天津市大茂化学试剂厂; 邻苯二甲醛 (批号 K2024111) 购自上海阿拉丁生化科技有限公司; 甲醇 (批号 100296) 购自 Honeywell 公司; Fluo-8 AM 新型钙离子荧光探针检测试剂盒 (批号 2021A0JC0012) 购自北京普利莱基因技术有限公司。

1.4 仪器

LB942S 型多功能微孔板检测系统 (Berthold 公司); SW-CJ-2D 型细胞操作超净台 (苏州净化设备有限公司); 3111 型 CO_2 培养箱 (美国 Thermo Fisher Scientific 公司); DHP-9052 型电热 37 °C 恒温培养箱 [中仪国科 (北京) 科技有限公司]; XMTD-6000 型三用电热恒温水箱 (北京长风仪器仪表公司); 3K18 型小型台式冷冻离心机 (美国 Sigma 公司); ASV-3023 型灭菌蒸气高压锅 (Sakura 公司); Scepter 型手持细胞计数仪、Scepter™ Sensors-60 μm 细胞计数芯片 (美国 Millipore 公司); Axio Vert AI 型半自动倒置研究级显微镜 (CARL ZEISS 公司)。

2 方法

2.1 分子对接

在 Uniport 数据库中 (<https://www.uniprot.org/>) 下载蛋白质 PDB 结构。利用 ChemDraw 20.0 和 Chem3D 20.0 软件绘制化合物结构并将结构扭转得到化合物 mol2 结构。利用 Auto Dock 软件对分子进行去水、加氢后进行分子对接, 通过 Auto Dock Tools Vina 进行分子对接评价靶蛋白和化合物之间的相互作用, 并利用 Ligplot 进行可视化处理。

2.2 细胞毒性实验

P815 细胞用含 1% 青霉素-链霉素、10% FBS 的 RPMI 1640 培养基, 于 37 °C、5% CO_2 的培养箱中进行培养。取处于对数生长期的细胞, 以 4×10^4 个/孔接种到 96 孔板中, 于培养箱中孵育过夜, 另设调零组不接种细胞。香丹注射液临床使用需将原液稀释 25 倍, 以该质量浓度为最高质量浓度, 将最高质量浓度以 10 倍梯度稀释, 共稀释 8 个质量浓度; 各给

药组分别加入 200 μL 8 个稀释倍数的香丹注射液以及 100、50、12.5、3.125、0.781 25 $\mu\text{g/mL}$ 的丹酚酸 A、丹酚酸 B、丹酚酸 C、迷迭香酸、紫草酸, 对照组加入 200 μL 含 1% 青霉素-链霉素、10% FBS 的 RPMI 1640 培养基, 孵育 1 h。孵育结束后, 弃去药物, 每孔加入 110 μL CCK-8 试剂, 37 °C 孵育 2 h, 采用酶标仪测定 490 nm 处的吸光度 (A) 值, 并计算抑制率。

$$\text{抑制率} = 1 - (A_{\text{给药}} - A_{\text{调零}}) / (A_{\text{对照}} - A_{\text{调零}})$$

2.3 组胺 (histamine, His) 释放试验

取处于对数生长期的细胞, 以 4×10^4 个/孔接种到黑色不透光 96 孔板中, 孵育过夜, 另设调零组不接种细胞。设置对照组、C48/80 组和各给药组, 调零组和对照组每孔加入 200 μL 改良台式液, C48/80 组加入 200 μL C48/80 (30 $\mu\text{g/mL}$), 各给药组分别加入 200 μL 高、低剂量 (1:25、1:250) 的香丹注射液稀释液及高、低剂量 (50、5 $\mu\text{g/mL}$) 的丹酚酸 A 和高、低剂量 (100、10 $\mu\text{g/mL}$) 的丹酚酸 B、丹酚酸 C、迷迭香酸、紫草酸, 孵育 1 h。裂解组加入 200 μL 1% Triton X-100, 每孔取 100 μL 放入黑色不透光 96 孔板中, 每孔加入 20 μL 1 mol/L NaOH, 再加入 20 μL 1% 邻苯二甲醛底物, 37 °C 孵育 15 min, 加入 20 μL 1 mol/L 盐酸终止反应, 立即采用酶标仪 $E_m/E_x = 350/460$ 测定各组 A 值, 并计算 His 释放率。

$$\text{His 释放率} = (A_{\text{样品上清}} - A_{\text{调零}}) / (A_{\text{裂解}} - A_{\text{调零}})$$

2.4 β -氨基己糖苷酶 (β -hexosaminidase, β -Hex) 释放试验

按“2.3”项下方法进行分组和给药, 孵育 1 h, 裂解组加入 200 μL 1% Triton X-100, 取上清液 50 μL 加到 1 个新的 96 孔板, 每孔加入 50 μL 对硝基苯基- N -乙酰基- β -D-葡萄糖酰胺显色底物试剂 (1.70 mg/mL), 37 °C 孵育 1.5 h, 每孔加入 150 μL $\text{Na}_2\text{CO}_3/\text{NaHCO}_3$ 终止液, 采用酶标仪测定 405 nm 处的各组 A 值, 并计算 β -Hex 释放率。

$$\beta\text{-Hex 释放率} = (A_{\text{样品上清}} - A_{\text{调零}}) / (A_{\text{裂解}} - A_{\text{调零}})$$

2.5 小鼠后爪外渗实验验证

丹酚酸 B 及紫草酸高质量浓度下均可显著刺激 P815 细胞释放 His 和 β -Hex, 因此进行小鼠局部过敏反应进行验证。雄性 ICR 小鼠 56 只随机分为 C48/80 (13.0 $\mu\text{g/kg}$) 组及丹酚酸 B 高、中、低剂量 (43.5、21.7、10.9 $\mu\text{g/kg}$) 组和紫草酸高、中、低剂量 (43.5、21.7、10.9 $\mu\text{g/kg}$) 组, 每组 8 只。小鼠

iv 0.4%伊文思蓝盐水 (10 mL/kg), 5 min 后将 10 μ L 生理盐水注射到左爪中作为对照, 将 10 μ L 含各质量浓度待测药物的生理盐水注射到右爪中。15 min 后, 收集爪组织, 37 $^{\circ}$ C 干燥 24 h 后称定质量, 剪碎, 置于 800 μ L 丙酮-生理盐水 (7:3) 溶液中。65 $^{\circ}$ C 孵育 12 h, 5000 r/min 离心取上清液, 取 200 μ L 移至 96 孔板中, 于 620 nm 处测定 A 值。

2.6 甲苯胺蓝染色观察细胞形态变化

将细胞爬片放入 6 孔板中, P815 细胞以 1.8×10^6 个/孔接种到爬片上, 孵育过夜。对照组每孔加入 600 μ L 改良台式液, C48/80 组加入 30 μ g/mL C48/80, 丹酚酸 B 高、中、低剂量 (100、50、10 μ g/mL) 组和紫草酸高、中、低剂量 (100、50、10 μ g/mL) 组每孔加入 200 μ L 待测药物, 孵育 1 h。取出爬片, 于 4%多聚甲醛溶液中固定, 滴加甲苯胺蓝进行染色, 于显微镜下观察并拍照。

2.7 细胞内 Ca^{2+} 动员实验

取处于对数生长期的细胞, 以 4×10^4 个/孔接种到黑色不透光 96 孔板中, 孵育过夜, 另设调零组不接种细胞。设置对照组、C48/80 组和各给药组, 调零组和对照组每孔加入 200 μ L 钙离子荧光探针试剂盒内稀释缓冲液, C48/80 组加入 200 μ L C48/80 (30 μ g/mL), 各给药组分别加入 200 μ L 高、中、低剂量 (100、25、6.25 μ g/mL) 的丹酚酸 B、紫草酸, 孵育 1 h。弃去上清液, 每孔加入 100 μ L Fluo-8 AM 工作液, 37 $^{\circ}$ C 孵育 40 min, 用稀释缓冲液洗涤细胞 2 次, 每孔加入 200 μ L 稀释缓冲液, 立即采用酶标仪 $E_m/E_x=490/514$ 测定各组 A 值。

2.8 统计学分析

数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两组间数据使用 t 检验。小鼠后爪外渗试验中, 左右两爪数据使用配对 t 检验。

3 结果

3.1 分子对接

配体与受体结合能量越低, 配体与受体结合构象越稳定, 结合活性越强。当结合能 < -29.29 kJ/mol 可推测其有强烈的结合活性^[15-16]。迷迭香酸与人类 Mas 相关 G 蛋白偶联受体 X2 (Mas-related G protein-coupled receptor X2, MRGPRX2) 结合能接近该标准, 且与小鼠 MRGPRb2 结合能 < -29.29 kJ/mol, 本研究以 -25.10 kJ/mol 为后续实验筛选标准^[17]。如表 1 所示, 丹酚酸 A、丹酚酸 B、丹酚酸 C、紫草酸和迷迭香酸与 MRGPRX2 和 MRGPRb2 结合位点的结合能均 ≤ -25.10 kJ/mol。丹酚酸 B、紫草酸与 MRGPRX2/MRGPRb2 分子对接见图 1、2。

3.2 细胞毒性实验

如图 3 所示, 丹酚酸 A 在 100 μ g/mL 对 P815

表 1 核心成分与 MRGPRX2/MRGPRb2 的分子对接

Table 1 Molecular docking of core components with MRGPRX2/MRGPRb2

蛋白	化合物	结合能/(kJ·mol ⁻¹)
MRGPRX2	丹酚酸 B	-35.98
	紫草酸	-35.12
	丹酚酸 C	-32.64
	丹酚酸 A	-29.71
	迷迭香酸	-28.03
	原儿茶醛	-23.85
	丹参素	-22.59
	咖啡酸	-20.92
	原儿茶酸	-20.08
	丹酚酸 C	-35.15
MRGPRb2	紫草酸	-32.64
	丹酚酸 B	-31.80
	丹酚酸 A	-30.54
	迷迭香酸	-30.12
	丹参素	-24.27
	咖啡酸	-23.01
	原儿茶酸	-20.50
	原儿茶醛	-20.08

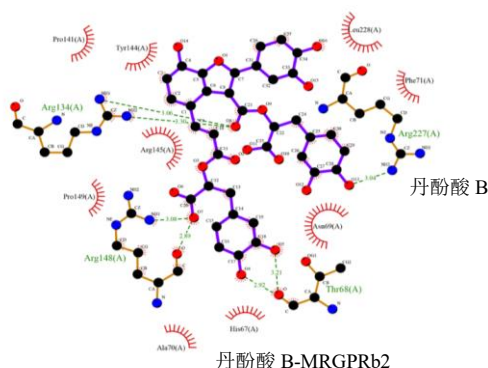
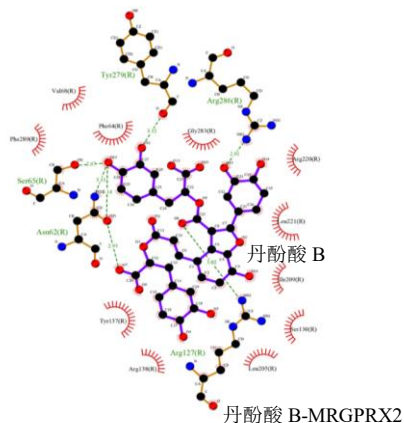


图 1 丹酚酸 B 与 MRGPRX2/MRGPRb2 分子对接可视化

Fig. 1 Visualization of molecular docking results of salvianolic acid B and MRGPRX2/MRGPRb2

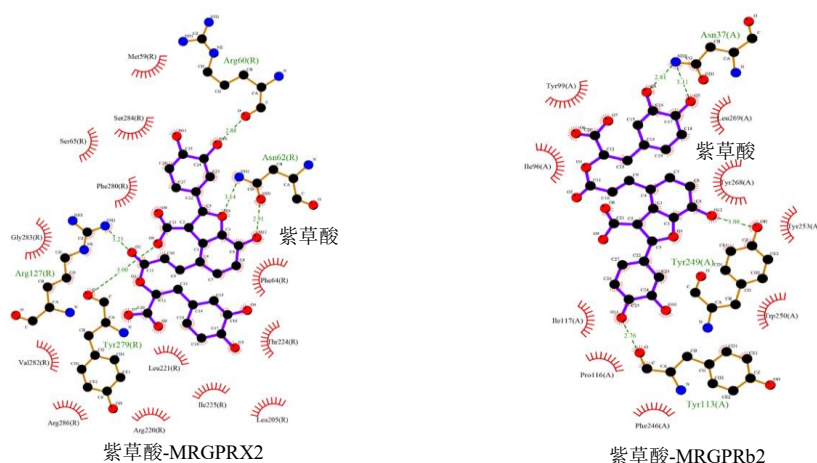


图 2 紫草酸与 MRGPRX2/MRGPRb2 分子对接可视化

Fig. 2 Visualization of molecular docking results of lithospermic acid and MRGPRX2/MRGPRb2

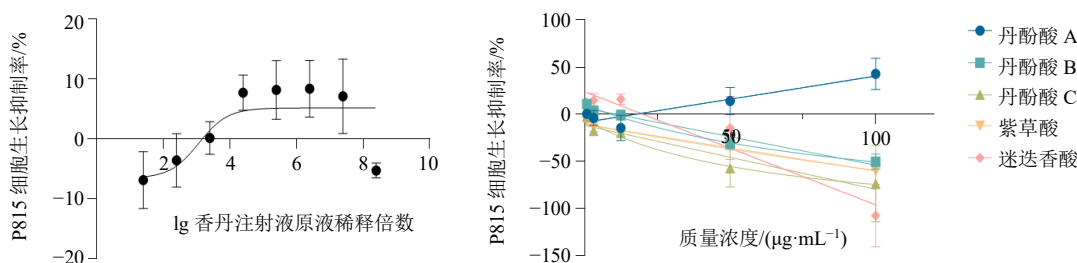


图 3 香丹注射液及其各组分对 P815 细胞毒性测定

Fig. 3 Cytotoxicity of Xiangdan Injection and its components to P815 cells

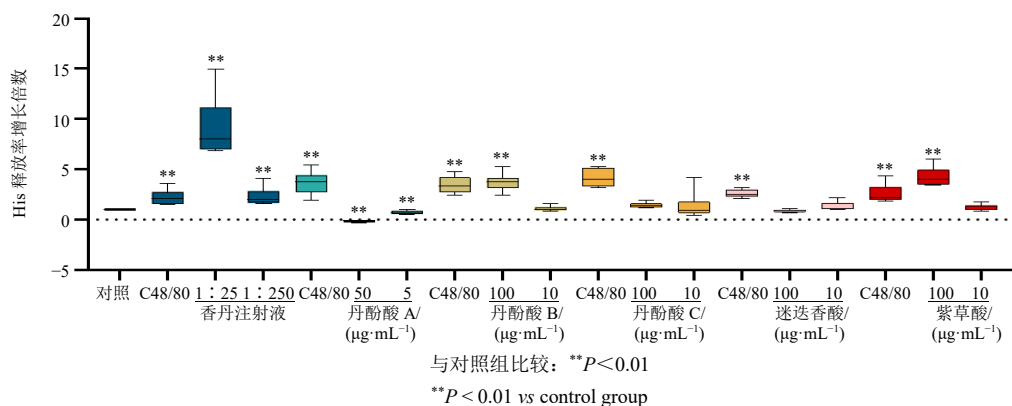
细胞生长抑制率为 42.99%，其余药物及组分对 P815 细胞无明显毒性作用。为确保筛选实验的准确性，减少细胞毒性作用对后续实验的影响，药物对 P815 细胞的生长抑制率 $\leq 20\%$ ，故以香丹注射液原液稀释 25 倍为最高质量浓度 (1:25)，丹酚酸 A 以 50 $\mu\text{g/mL}$ 为最高质量浓度，丹酚酸 B、丹酚酸 C、紫草酸、迷迭香酸以 100 $\mu\text{g/mL}$ 为最高质量浓度。

3.3 His 及 β -Hex 释放实验

如图 4 所示，香丹注射液高、低剂量组及丹酚

酸 B 高剂量组和紫草酸高剂量组均能显著刺激 P815 细胞释放 His ($P < 0.01$)，且呈剂量相关性；而丹酚酸 A 高、低剂量组能够显著抑制 P815 细胞释放 His ($P < 0.01$)。

如图 5 所示，香丹注射液、丹酚酸 B、紫草酸、迷迭香酸的高、低剂量组和丹酚酸 C 高剂量组均能显著刺激 P815 细胞释放 β -Hex ($P < 0.05, 0.01$)，且呈剂量相关性；丹酚酸 A 高剂量组显著刺激 P815 细胞释放 β -Hex ($P < 0.01$)，而丹酚酸 A 低

图 4 香丹注射液及其各组分 His 释放测定 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)Fig. 4 His release rate of Xiangdan Injection and its components ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

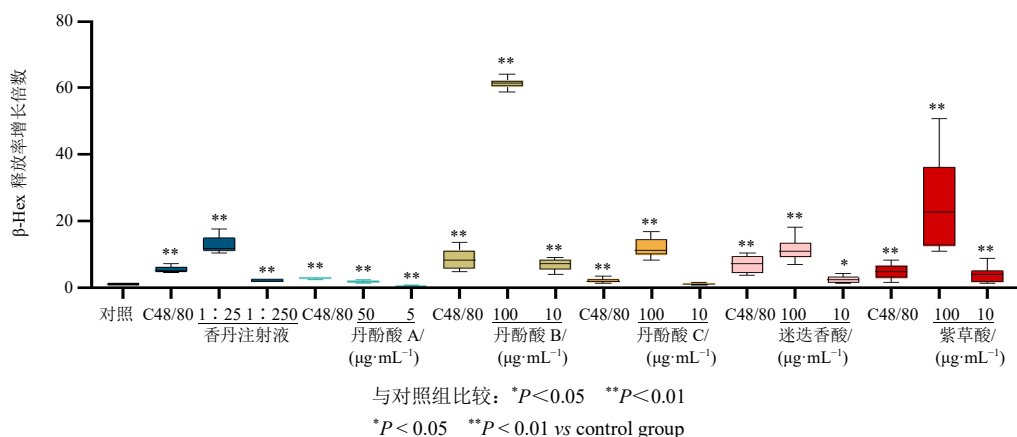


图 5 香丹注射液及其各组分 β -Hex 释放测定结果 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Fig. 5 β -Hex release rate of Xiangdan Injection and its components ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

剂量组抑制 P815 细胞释放 β -Hex ($P < 0.01$)。根据 His 释放率及 β -Hex 释放率增加倍数对其致敏可疑程度进行排序 (表 2), 丹酚酸 B 及紫草酸可能是香丹注射液中潜在的致类过敏组分。

3.4 小鼠后爪外渗试验验证及细胞形态变化

如图 6 所示, 观察小鼠后右爪注射 C48/80 以诱导局部类过敏反应, 伊文思蓝渗出增加, 右爪相较仅注射生理盐水的左爪蓝色更深, 丹酚酸 B 高、中剂量组和紫草酸高剂量组均能显著提高小鼠后爪伊文思蓝渗出程度 ($P < 0.05$ 、 0.01)。

如图 7 所示, 对照组细胞完整, 边缘光滑, 结构致密; C48/80 组细胞边缘不整, 背景中出现大量

的蓝色颗粒样物质; 丹酚酸 B 组和紫草酸组诱导 P815 细胞脱颗粒呈剂量相关性减弱, 表明丹酚酸 B 和紫草酸可能是致类过敏物质。

3.5 细胞内 Ca^{2+} 动员试验结果

如图 8 所示, 丹酚酸 B 高剂量组和紫草酸高剂量组刺激 P815 细胞后胞内 Ca^{2+} 浓度显著升高 ($P < 0.05$), 表明丹酚酸 B 和紫草酸诱导的类过敏反应可能与动员 Ca^{2+} 内流相关。

4 讨论

类过敏反应与 I 型超敏反应临床表症相似, 但不会引起抗原特异性免疫反应。类过敏反应可以通过直接刺激或激活补体系统间接刺激肥大细胞和嗜碱性粒细胞释放活性介质而被诱导, 还可通过激活 Ca^{2+} 相关信号通路释放活性介质而被诱导^[18-19]。MRGPRX2/MRGPRb2 是一种在肥大细胞上表达的 A 类 G 蛋白偶联受体, 可以活化非 IgE 介导的肥大细胞, 研究已证明罗库溴铵等几种 FDA 批准的阳离子药物的类过敏反应与其相关, MRGPRX2/MRGPRb2 是类过敏反应的关键靶标, 并可在体外通过 MRGPRX2 对体内假过敏反应的发生进行预测^[20-23]。将酚酸类物质与 MRGPRX2/MRGPRb2 进行分子对接评估, 发现丹酚酸 A、丹酚酸 B、丹酚酸 C、紫草酸和迷迭香酸与 MRGPRX2/MRGPRb2 结合位点的结合力较高, 其中丹酚酸 B、紫草酸和丹酚酸 C 的结合排于前 3, 故选择丹酚酸 A、丹酚酸 B、丹酚酸 C、紫草酸和迷迭香酸这 5 个单体进行类过敏反应物质筛选。

本研究使用 P815 细胞, 因其表面没有高亲和性的 IgE Fc 段受体, 更适合作为类过敏反应肥大细胞脱颗粒检测模型^[24]。C48/80 是常用的诱导细胞脱

表 2 致类过敏可疑程度

Table 2 Suspicious degree of induction of anaphylactic reaction

组别	剂量	刺激 His 释放	刺激 β -Hex 释放
香丹注射液	1 : 25	++	+
	1 : 250	+	—
丹酚酸 A	50 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	—	—
	5 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	—	—
丹酚酸 B	100 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	+	+++
	10 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	—	+
丹酚酸 C	100 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	—	+
	10 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	—	—
紫草酸	100 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	+	+++
	10 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	—	—
迷迭香酸	100 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	—	—
	10 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	—	—

—: 与对照组比较, His 释放率增长倍数 (X) ≤ 2 , β -Hex 释放率增长倍数 (Y) ≤ 5 ; +: $2 < X \leq 5$, $5 < Y \leq 20$; ++: $X > 5$, $Y > 20$

—: His release rate increased multiple (X) ≤ 2 vs control group, β -Hex release rate increased multiple (Y) ≤ 5 vs control group; +: $2 < X \leq 5$, $5 < Y \leq 20$; ++: $X > 5$, $Y > 20$

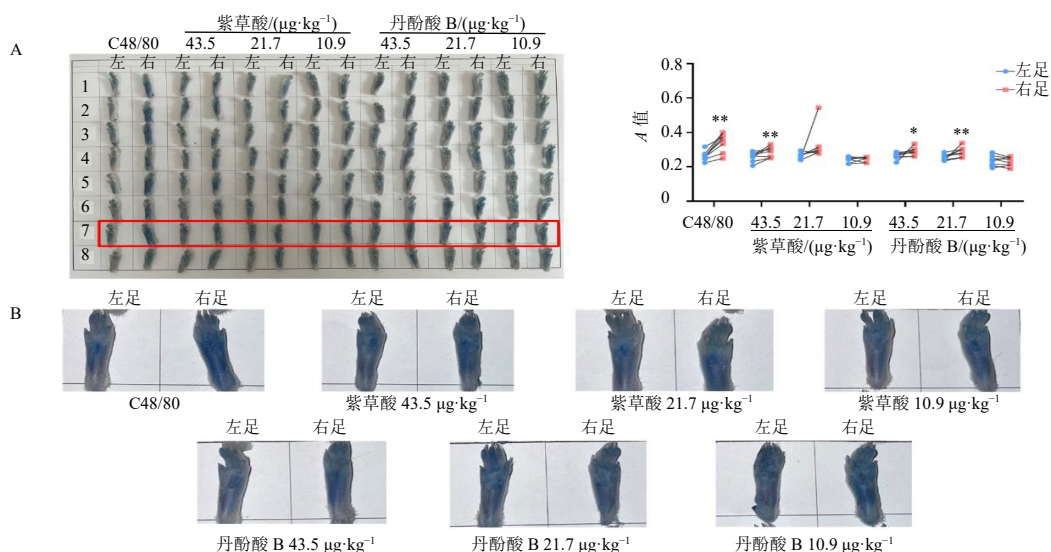


图 B 为图 A 红色框内各组局部放大图, 与左足比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$
Figure B is an enlarged view of each group in the red box of figure A, * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ right foot vs left foot control group

图 6 丹酚酸 B 及紫草酸对小鼠后爪通透性的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Fig. 6 Effect of salvianolic acid B and lithospermic acid on permeability of hind paw in mice ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

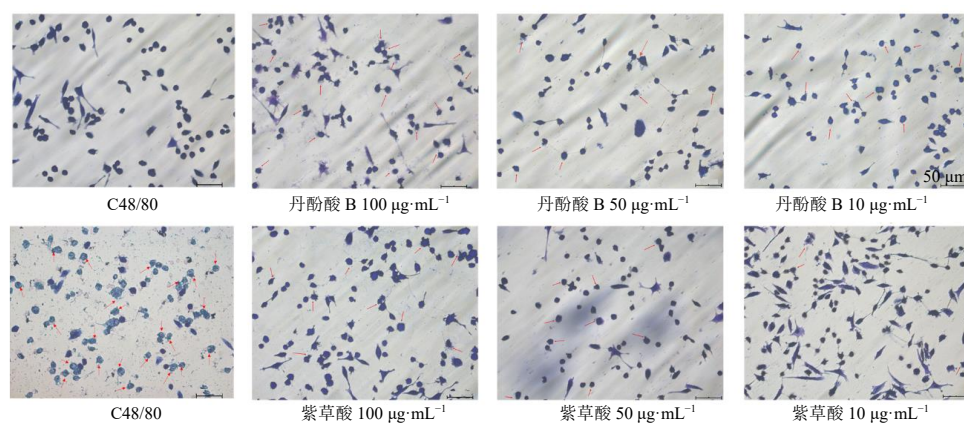


图 7 丹酚酸 B 及紫草酸刺激 P815 细胞脱颗粒变化

Fig. 7 Degranulation of P815 cells stimulated by salvianolic acid B and lithospermic acid

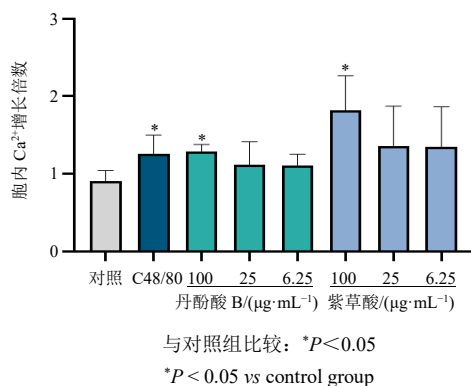


图 8 丹酚酸 B 及紫草酸刺激 P815 细胞胞内 Ca^{2+} 水平变化结果 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 8 Changes in intracellular Ca^{2+} level of P815 cells stimulated by salvianolic acid B and lithospermic acid ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

颗粒的药物, 能够通过 MRGPRX2 诱导肥大细胞活化。MRGPRX2 可以通过激活磷脂酶 C 信号通路诱导 Ca^{2+} 动员, 激活 G 蛋白, 促使肥大细胞胞吐, 合成磷脂酰肌醇 3-激酶, 并形成花生四烯酸代谢物, 激活 Ca^{2+} 通道和蛋白激酶 C, 胞内 Ca^{2+} 水平升高, 发生脱颗粒现象并释放介质, 此外补体系统激活产生 C3a 和 C5a, C3a 和 C5a 在动员 Ca^{2+} 方面具有高活性^[25]。本研究结果显示, 香丹注射液在一定剂量下可以诱导 P815 细胞释放 His、 β -Hex 介质, 且在香丹注射液中筛选出其单体成分丹酚酸 B 及紫草酸可以诱导 P815 细胞脱颗粒, 并释放 His、 β -Hex 介质。本研究中丹酚酸 A 低剂量组可显著抑制 P815 细胞释放 His 和 β -Hex, Jeon 等^[26]发现丹酚酸 A 可以降低二硝基氯苯诱导的 BALB/c 小鼠血清中 IgE

水平,可能具有抗过敏作用,本研究结果与文献报道较一致。在小鼠后爪外渗验证实验中,当小鼠发生类过敏反应时,其皮肤血管壁通透性升高,伊文思蓝可与血浆蛋白结合,渗出血管外,表现出组织蓝染,丹酚酸 B 高、中剂量组和紫草酸高剂量组均可导致小鼠后爪血管通透性增加,类过敏反应发生,这一结果与分子对接结果相互对应。 Ca^{2+} 内流对 His 释放和肥大细胞脱颗粒有显著影响^[27],丹酚酸 B 和紫草酸高剂量组刺激 P815 细胞后,胞内 Ca^{2+} 浓度显著升高,香丹注射液诱导的类过敏反应可能与丹酚酸 B 和紫草酸有关。

紫草酸是一种具有神经保护、肝保护、心脏保护等多种生物活性的天然产物^[28]。丹酚酸 B 是丹参中丹酚酸类里含量最丰富、最具生物活性的成分之一,富含丹酚酸 B 的相关药物广泛用于各种心血管疾病的临床治疗,丹酚酸 B 还可通过抑制过敏诱导的气道黏蛋白 MUC5AC 过表达来改善气道高反应性^[29-30]。在丹参水提液中,丹参酚酸类成分不稳定,易发生降解和相互转化。丹酚酸 B 是水溶性酚酸中含量最高的成分,在不同温度(80~210℃)下,其呋喃环相连酯键发生水解反应,生成紫草酸和丹参素,且随温度升高水解反应程度增加^[31]。在高温高压处理丹酚酸 B 水溶液时,紫草酸含量会先升高再降低,可能与丹酚酸 B 和紫草酸之间存在可逆反应有关,且紫草酸也会发生降解反应,形成丹参素、丹酚酸 A、原儿茶醛^[31-32]。目前尚无有关丹酚酸 B 和紫草酸单体致超敏反应的报道,其具体机制仍需进一步研究,同时本研究发现丹酚酸 A 具有一定的抗类过敏作用,当丹酚酸 B、紫草酸与丹酚酸 A 同时存在的致敏作用或者抗过敏作用也值得进一步深入探索。

随着香丹注射液广泛应用,其不良反应备受临床重视。香丹注射液致敏反应受多种因素影响^[33-34]:①鞣质是结构复杂的多元酚类化合物,含有大量的酚羟基或羧基,因其结构与香丹注射液中活性成分相似,不易完全分离,生产过程中产生的鞣质可作为半抗原在体内与大分子蛋白结合形成复合物引起过敏反应,或者通过共激活激肽释放酶-激肽系统、凝血、补体途径诱导类过敏反应;②辅料聚山梨酯 80 可诱导类过敏反应;③选择生理盐水作为溶媒可能会产生不溶性颗粒;④联合用药可诱导超敏反应发生率增加;⑤其活性成分可能作为半抗原诱导过敏反应或直接诱导类过敏反应。在卫生部颁药品标

准中药成方制剂(WS3-B-3289-98)中仅要求对香丹注射液中原儿茶醛含量进行定量分析^[35]。丹酚酸 B 和紫草酸诱导的 P815 细胞脱颗粒释放介质具有剂量相关性,为提高香丹注射液临床使用的安全性,在确保制剂有效性的前提下有必要对其潜在的致敏物质进行限量标准研究,重视各酚酸类的相互转化,改善制剂工艺,以进一步提高香丹注射液的安全性。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 文雯,梁慧慧,余格,等.中药注射剂类过敏反应研究进展[J].湖南中医药大学学报,2020,40(1):117-122.
- [2] Zhao Y, Sun S S, Li X T, et al. Drug-induced anaphylaxis in China: A 10 year retrospective analysis of the Beijing Pharmacovigilance Database [J]. *Int J Clin Pharm*, 2018, 40(5): 1349-1358.
- [3] Huang R, Cai Y X, Yang L H, et al. Safety of traditional Chinese medicine injection based on spontaneous reporting system from 2014 to 2019 in Hubei Province, China [J]. *Sci Rep*, 2021, 11(1): 8875.
- [4] 徐曼,刘爱华,崔亚君,等.不同厂家生产的香丹注射液中丹参色谱指纹图谱的比对研究[J].中国天然药物,2007,5(2):120-126.
- [5] Cao J, Wei Y J, Qi L W, et al. Determination of fifteen bioactive components in *Radix et Rhizoma Salviae Miltiorrhizae* by high-performance liquid chromatography with ultraviolet and mass spectrometric detection [J]. *Biomed Chromatogr*, 2008, 22(2): 164-172.
- [6] 陈影,吴婷,姜超,等.一测多评法同时测定 4 种中药注射液中 9 种丹参酚酸[J].中成药,2021,43(3):590-595.
- [7] 国家药品监督管理局.药品不良反应信息通报(第 45 期)警惕香丹注射液的严重不良反应[EB/OL]. [2012-03-23]. <https://www.nmpa.gov.cn/xxgk/yjjsh/ypblfytb/20120323162201191.html>.
- [8] 国家药品监督管理局.国家药品不良反应监测年度报告(2021 年)[EB/OL]. [2022-03-30]. <https://www.nmpa.gov.cn/xxgk/yjjsh/ypblfytb/20220329161925106.html>.
- [9] 国家药品监督管理局.国家药品不良反应监测年度报告(2013 年)[EB/OL]. [2014-05-14]. <https://www.nmpa.gov.cn/directory/web/nmpa/xxgk/yjjsh/ypblfytb/20140514161301843.html>.
- [10] 徐春丽,丁丽萍,郑志昌,等.复方丹参注射液致不良反应 119 例文献分析[J].中国医院药学杂志,2005,25(9):896-897.
- [11] 柴丽娟,蔺新英.静脉滴注香丹注射液致严重过敏反应 4 例临床分析[J].齐鲁护理杂志,2015,21(21):122-124.

- [12] 徐春丽, 孙怡, 丁丽萍, 等. 复方丹参与低分子右旋糖酐混合静脉滴注致严重 ADR 分析 [J]. 中国药物滥用防治杂志, 2008, 14(6): 361-365.
- [13] Li E C, Lin N, Hao R R, *et al.* 5-HMF induces anaphylactoid reactions *in vivo* and *in vitro* [J]. *Toxicol Rep*, 2020, 7: 1402-1411.
- [14] 李恩灿, 范潇予, 林琳, 等. 5-羟甲基糠醛及其二聚体 OMBF 引发 I 型超敏反应毒性评价与机制初探 [J]. 中国比较医学杂志, 2020, 30(2): 1-8.
- [15] Trott O, Olson A J. AutoDock Vina: Improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading [J]. *J Comput Chem*, 2010, 31(2): 455-461.
- [16] 李洵珣, 金晨, 陈康, 等. 基于网络药理学和分子对接分析丰城鸡血藤治疗乳腺癌的分子靶点和机制 [J]. 中国药理学通报, 2022, 38(5): 767-775.
- [17] 元伟钰, 李鑫, 满荣勇, 等. 基于网络药理学及分子对接技术分析薏苡汤加减治疗类风湿关节炎的作用机制 [J]. 中医药导报, 2022, 28(4): 105-111.
- [18] Zhang B, Li Q, Shi C Y, *et al.* Drug-induced pseudoallergy: A review of the causes and mechanisms [J]. *Pharmacology*, 2018, 101(1/2): 104-110.
- [19] Meng F J, Jiao S M, Yu B. Picroside II protects cardiomyocytes from hypoxia/reoxygenation-induced apoptosis by activating the PI3K/Akt and CREB pathways [J]. *Int J Mol Med*, 2012, 30(2): 263-270.
- [20] Kumar M, Duraisamy K, Chow B K. Unlocking the non-IgE-mediated pseudo-allergic reaction puzzle with mas-related G-protein coupled receptor member X2 (MRGPRX2) [J]. *Cells*, 2021, 10(5): 1033.
- [21] Occhiuto C J, Kammala A K, Yang C C, *et al.* Store-operated calcium entry via STIM1 contributes to MRGPRX2 induced mast cell functions [J]. *Front Immunol*, 2020, 10: 3143.
- [22] John L M, Dalsgaard C M, Jeppesen C B, *et al.* *In vitro* prediction of *in vivo* pseudo-allergenic response via MRGPRX2 [J]. *J Immunotoxicol*, 2021, 18(1): 30-36.
- [23] McNeil B D. MRGPRX2 and adverse drug reactions [J]. *Front Immunol*, 2021, 12: 676354.
- [24] Miller L, Alber G, Varin-Blank N, *et al.* Transmembrane signaling in P815 mastocytoma cells by transfected IgE receptors [J]. *J Biol Chem*, 1990, 265(21): 12444-12453.
- [25] Ding Y Y, Che D L, Li C M, *et al.* Quercetin inhibits Mrgprx2-induced pseudo-allergic reaction via PLC γ -IP3R related Ca²⁺ fluctuations [J]. *Int Immunopharmacol*, 2019, 66: 185-197.
- [26] Jeon W J, Lee J H, Lee J E, *et al.* Salvianolic acid A suppresses DNCB-induced atopic dermatitis-like symptoms in BALB/c mice [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2021, 2021: 7902592.
- [27] Che D L, Wang J, Ding Y Y, *et al.* Mivacurium induce mast cell activation and pseudo-allergic reactions via MAS-related G protein coupled receptor-X2 [J]. *Cell Immunol*, 2018, 332: 121-128.
- [28] Zhang M, Wei L, Xie S Y, *et al.* Activation of Nrf2 by lithospermic acid ameliorates myocardial ischemia and reperfusion injury by promoting phosphorylation of AMP-activated protein kinase α (AMPK α) [J]. *Front Pharmacol*, 2021, 12: 794982.
- [29] Cao W, Guo X W, Zheng H Z, *et al.* Current progress of research on pharmacologic actions of salvianolic acid B [J]. *Chin J Integr Med*, 2012, 18(4): 316-320.
- [30] Guan Y, Zhu J P, Shen J, *et al.* Salvianolic acid B improves airway hyperresponsiveness by inhibiting MUC5AC overproduction associated with Erk1/2/P38 signaling [J]. *Eur J Pharmacol*, 2018, 824: 30-39.
- [31] 李思谦, 章顺楠, 周立红, 等. 丹参中酚酸类成分及在水溶液中降解转化研究进展 [J]. 辽宁中医药大学学报, 2020, 22(4): 109-117.
- [32] Pan J Y, Gong X C, Qu H B. Quantitative ¹H NMR method for hydrolytic kinetic investigation of salvianolic acid B [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2013, 85: 28-32.
- [33] 潘恩. 香丹注射液的安全性评价与临床合理使用 [J]. 中西医结合心血管病电子杂志, 2020, 8(17): 165-166.
- [34] 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.
- [35] 穆象山, 张强, 房信胜, 等. HPLC-DAD 同时测定香丹注射液中 7 种丹参酚酸类成分 [J]. 中国中医药信息杂志, 2012, 19(12): 56-58.

[责任编辑 李亚楠]