

射干抗病毒注射液致类过敏反应初步研究

张瑞瑞¹ 刘艳萍⁴ 聂西周¹ 杨东花² 刘 峰^{2,3}

(1 陕西中医药大学, 咸阳, 712046; 2 陕西步长制药有限公司, 西安, 710075; 3 陕西国际商贸学院, 咸阳, 712046; 4 西安交通大学, 西安, 710061)

摘要 目的:探究射干抗病毒注射液的致类过敏反应及其可能的作用机制。方法:通过体外动物类过敏试验,探究射干抗病毒注射液对小鼠耳廓血管通透性的影响;细胞水平上,采用 MTT 比色法筛选出射干抗病毒注射液对 RBL-2H3 细胞的安全作用浓度,并在安全浓度之下,以不同浓度,用中性红染色观察其脱颗粒状态,检测射干抗病毒注射液对细胞内颗粒物 β -氨基己糖苷酶释放量的影响,Fluo-3 荧光标记细胞内 Ca^{2+} 检测细胞内钙离子变化,综合考察射干抗病毒注射液的体外致类过敏性。结果:射干抗病毒注射液可引起小鼠耳廓通透性增强,引发类过敏反应;并可诱导 RBL-2H3 细胞发生脱颗粒反应,使胞内钙离子浓度升高,且均具有剂量依赖性。结论:射干抗病毒注射液具有引发类过敏反应的风险,其机制可能与引起胞内 Ca^{2+} 浓度增加有关。

关键词 射干抗病毒注射液;类过敏反应;RBL-2H3 细胞

Preliminary Study on the Pseudoallergic Reaction of Shegan Kangbingdu Injection

Zhang Ruirui¹, Liu Yanping⁴, Nie Xizhou¹, Yang Donghua², Liu Feng^{2,3}

(1 Shaanxi University of Chinese Medicine, Xianyang 712046, China; 2 Shaanxi Buchang Pharmaceutical Co. Ltd., Xianyang 712000, China; 3 Shaanxi Institute of International Trade&Commerce, Xianyang 712046, China; 4 Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710061, China)

Abstract Objective: To explore the effect of Shegan Kangbingdu injection (SG) on inducing pseudo-allergic reaction. **Methods:** Animal allergy experiment was taken to explore the allergic effects on mice. MTT was used to confirm the concentration on RBL-2H3 cells. Cell degranulation effect was verified by neutral red staining experiment, and β -hexosaminidase release rate test. Fluo-3 was used to detect intracellular Ca^{2+} changes. The allergic reactions of SG were thus detected comprehensively. **Results:** SG enhanced mice auricle permeability and thus induced mice allergy; different concentrations of SG induced RBL-2H3 cell degranulation, the intracellular calcium concentration has obviously increased due to dose-dependence **Conclusion:** SG can induce mice allergy, and this might related to intracellular Ca^{2+} increase.

Key Words SG; Pseudo-allergic reaction; RBL-2H3 cell

中图分类号:R285.5 文献标识码:A doi:10.3969/j.issn.1673-7202.2016.04.031

射干抗病毒注射液由射干、金银花、佩兰、板蓝根、大青叶、茵陈、柴胡、蒲公英组成的中药制剂,在临床治疗上呼吸道感染、肺炎、疱疹和秋季腹泻等疾病方面有显著疗效,对治疗小儿手足口病、口腔咽喉部溃疡、病毒性角膜炎方面有一定的疗效^[1]。临床应用中发现其有过敏性皮疹^[2],红色斑丘疹及水疱^[3],双眼刺痒、球结膜、睑结膜充血水肿、右眼下睑出现直径约 2 cm 的水泡^[4],浑身发麻、打颤、胸闷、恶心、干呕、双腿无力^[5],多汗、胃肠道不适^[6]等不良反应发生,且大多在首次用药发生,推测其可能为类过敏反应。类过敏反应是首次用药即可发生,无免疫系统的参与,无需 IgE^[7-8]介导,然而引发类过敏反应的主要病理基础之一就是血管通透性增强^[9],因

此本文将采用小鼠尾静脉注射射干抗病毒注射液,通过小鼠耳廓通透性实验予以验证;并在细胞水平上,利用 RBL-2H3 细胞脱颗粒模型,探讨其可能的作用机制。

1 材料与方法

1.1 受试药物及主要试剂 Dulbecco's Modified Eagle (DMEM) 培养基 (批号:071M8305, Sigma 公司);胎牛血清 (批号:NYB0814, 易科赛生物科技有限公司);溴化四唑嗪蓝 (美国 Sigma 公司);二甲基亚砜 (DMSO) (批号:20110621, 天津市巴斯夫化工有限公司);C48/80 (批号:014M4062V, Sigma 公司);Fluo-3 AM、Pluronic F127 (北京泛博科技有限责任公司); β -氨基己糖 (批号:SLBL1919V, 美国 Gibco

基金项目:陕西省重点科技创新团队计划项目 (编号:2015KCT-19)

作者简介:张瑞瑞 (1988.07—),女,硕士,在读硕士,研究方向:中药新药研究与开发, E-mail: rui09117@163.com

通信作者:刘峰 (1968.09—),男,在读博士研究生,主任药师,硕士研究生导师,研究方向:中药新药研究与开发, E-mail: liufeng1720@163.com

公司); Triton X-100 裂解液(批号:W10K06KH,科昊生物工程有限责任公司);中性红试剂(批号:580328,北京市化学试剂厂);射干抗病毒注射液(批号:120501,某药业有限公司)。

1.2 主要仪器 倒置显微镜 XDS-1B,重庆光电仪器有限公司;CO₂ 恒温培养箱 MCO-15AC,日本 SANYO;酶联免疫检测仪,美国伯乐公司;VictorTM X5 多功能分析仪,美国 Perkin Elmer 公司;低温离心机,德国 Eppendorf 公司。

1.3 动物 SPF 级 balb/c 小鼠,雄性,体重 18~22 g,由西安交通大学实验动物中心提供,实验动物许可证:XTJU(陕)2011-0045。

1.4 小鼠全身类过敏实验 小鼠按体重随机分组,分别为阳性组(C48/80 45 mg/kg)、射干抗病毒注射液组(10 mL/kg)、阴性组(生理盐水 NS 组),每组 8 只,可自由饮水、进食。各组受试物均用含有 0.4% 伊文思蓝的 NS 配制。标记各组小鼠,按照 20 mL/kg 的剂量进行尾静脉注射,30 min 后,观察并记录每组出现耳廓蓝染的动物数,蓝染总耳数,计算耳蓝染率。然后脱颈处死小鼠,剪下双耳,置于 1 mL 丙酮-生理盐水(7:3)中并剪碎,60 ℃ 水浴 12 h,3 000 r/min,4 ℃ 离心 15 min,吸取上清液 150 μL,610 nm 下检测吸光度值(A)。根据伊文思蓝标准曲线,计算伊文思蓝染料渗出量(μg)。

耳蓝染率 = 蓝染耳数/组内动物总耳数 × 100%

1.5 射干抗病毒注射液对 RBL-2H3 细胞脱颗粒的研究

1.5.1 细胞株的培养 RBL-2H3 细胞 购自中国科学院上海生命科学研究院细胞资源中心,由本实验室保存。用含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基(含 100 U/mL 的青霉素和链霉素),于细胞孵育箱中培养(37 ℃、饱和湿度、5% CO₂)。当细胞生长融合至 80% 时,对细胞进行传代。

1.5.2 射干抗病毒注射液对 RBL-2H3 细胞活力的影响 取对数生长期的 RBL-2H3 细胞,重悬后 1×10^5 个/mL,按每孔 180 μL 接种于 96 孔板,37 ℃ 培养 24 h,依次加入 20 μL 不同浓度的射干抗病毒注射液(按原液用无血清 DMEM 培养基等比例稀释)和等体积的无血清培养基,每个浓度设 5 个复孔,共稀释 6 个浓度,放入培养箱中培养 48 h 后,吸弃上清,各孔分别加入 180 μL 无血清 DMEM 培养基及 20 μL MTT 溶液(5 mg/mL),37 ℃ 孵育 4 h,吸弃孔内培养液,各孔加入 150 μL DMSO,摇床振摇 15 min,490 nm 下检测各孔的 OD 值(A)。按照以下公

式计算射干抗病毒注射液对 RBL-2H3 细胞抑制率,求出 IC₅₀ 值。

抑制率 = (阴性 OD 值 - 给药 OD 值) / (阴性 OD 值 - 空白 OD 值) × 100%

1.5.3 RBL-2H3 细胞脱颗粒测定 1) 射干抗病毒注射液对 RBL-2H3 细胞形态学影响:取对数生长期的 RBL-2H3 细胞按 1×10^5 个/孔接种于 96 孔板,37 ℃ 培养 24 h 后,吸弃培养液,依次加入不同浓度的射干抗病毒注射液(使其终浓度为 12.5 μL/mL、25 μL/mL、50 μL/mL)、C48/80(终浓度 30 μg/mL)及等体积无血清培养基,37 ℃ 孵育 0.5 h,吸弃培养液,加入 0.5% 的中性红染液,37 ℃ 染色 5 min,分别对同视野中上、下、左、右及中间部分细胞分别计数 100 个细胞,重复 3 个视野。统计脱颗粒细胞个数和总细胞量,按以下公式计算脱颗粒百分率。

脱颗粒百分率 = 脱颗粒的细胞数 / (脱颗粒的细胞数 + 未脱颗粒的细胞数) × 100%。

2) 射干抗病毒注射液对 RBL-2H3 细胞 β-氨基己糖苷酶释放的影响:取对数期生长的 RBL-2H3 细胞,按 1×10^5 个/孔接种于 96 孔板,设空白对照孔、阳性对照孔和实验孔和总酶孔,每组设 3 个复孔。37 ℃ 培养 24 h 后,吸弃上清液,用 PBS 洗细胞 2 遍,空白孔加入 100 μL TMT 缓冲液,实验孔分别加入等体积的大、中、小剂量的射干抗病毒注射液,阳性对照孔加入等体积的 C48/80 溶液,总酶孔加入 100 μL 的 0.1% 的 Triton X-100 裂解细胞。药物与细胞作用 30 min 后,冰上终止 10 min,吸取上清于 1.5 mL EP 管中,3 000 r/min 离心 5 min,取上清。加入底物 1 mmol/L β-氨基己糖 50 μL(β-氨基己糖溶于 0.1 mol/L 的柠檬酸/柠檬酸钠缓冲液)于 96 孔板中,再加入细胞上清 50 μL,轻轻摇晃混匀,37 ℃ 孵育 1.5 h,加入 150 μL 0.1 mol/L 的 NaCO₃/NaHCO₃ 缓冲液终止反应。450 nm 下检测吸光度值,按以下公式计算其释放率。

β-氨基己糖苷酶释放率 = 实验孔吸光度值 / (空白孔吸光度值 + 总酶孔吸光度值) × 100%。

1.6 射干抗病毒注射液对 RBL-2H3 细胞内钙离子浓度的影响 培养 RBL-2H3 细胞于 6 cm 培养皿中,待细胞生长融合至 70%~80% 时,弃培养基,加入含 4 μmol Fluo-3 AM 的 HBSS 溶液,37 ℃ 孵育 20 min,加入 5 倍体积含 1% 胎牛血清的 HBSS 缓冲液,37 ℃ 孵育 40 min,弃上清,加入 HBSS 缓冲溶液清洗细胞 3 次,0.25% 胰蛋白酶消化,1 000 r/min 离心 5 min,弃上清,用 5 mL 的 HEPES 缓冲盐溶液重悬细

胞后接种于白色 96 孔酶标板中(5×10^4 个/孔,每孔 100 μL),分别加入 100 μL 大、中、小剂量的射干抗病毒注射液、C48/80 和等体积 HEPES 溶液,室温振荡混匀,置于微板型荧光计内,在激发波长为 488 nm,发射波长为 527 nm 的条件下,检测给药后 12 min 内的细胞荧光强度。

1.7 统计学分析 运用 SPSS 18.0 统计软件进行数据处理,计量资料采用($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 有统计学意义。

2 结果

2.1 射干抗病毒注射液导致小鼠类过敏反应 小鼠尾静脉注射 0.4% EB 的 NS 后,小鼠耳廓无明显蓝染,小鼠尾静脉注射 0.4% EB 的 C48/80 (45 mg/kg)、射干抗病毒注射液 (10 mL/kg),小鼠均出现明显蓝染,且蓝染率和伊文思蓝渗出量与 NS 组相比有统计学意义($P < 0.05$)。结果表明,射干抗病毒注射液可导致小鼠血管通透性增高,发生类过敏反应,结果见图 1、表 1。

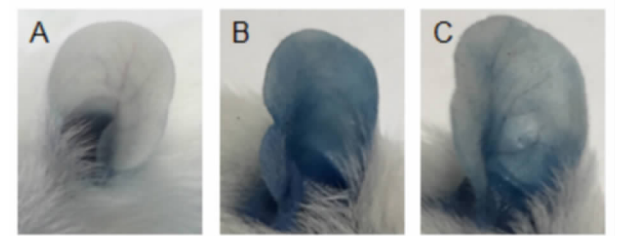


图 1 射干抗病毒注射液对 Balb/c 小鼠耳廓蓝染的结果
注:A. NS 组耳廓蓝染,B. C48/80 组耳廓蓝染,C. 射干抗病毒注射液组耳廓蓝染。

表 1 射干抗病毒注射液致小鼠类过敏反应($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量	蓝染率($n = 16$)/%	EB 渗出量/ μg
NS	-	0	0.32 ± 0.22
C48/80	45 mg/kg	100	$3.17 \pm 1.10^*$
射干注射液	10 mL/kg	87.5	$2.81 \pm 1.17^*$

注:与 NS 组相比 * $P < 0.05$ 。

2.2 射干抗病毒注射液对 RBL-2H3 细胞脱颗粒的研究

2.2.1 射干抗病毒注射液对 RBL-2H3 细胞活力的影响 当射干抗病毒注射液浓度达到 100 $\mu\text{L/mL}$ 时,80% 以上的细胞死亡,由 MTT 结果计算射干抗病毒注射液对 RBL-2H3 细胞的 IC₅₀ 值为 57 $\mu\text{L/mL}$,故本实验选取 12.5 $\mu\text{L/mL}$ 、25 $\mu\text{L/mL}$ 、50 $\mu\text{L/mL}$ 为后续实验浓度,结果见图 2。

2.2.2 射干抗病毒注射液对 RBL-2H3 细胞脱颗粒影响 1)射干抗病毒注射液对 RBL-2H3 细胞形态学影响:药物与 RBL-2H3 细胞作用 30 min 后,中性

红染色后,正常细胞呈长梭形,着色较浅,细胞膜完整,结构致密;C48/80 作用后的细胞着色较深,呈圆形,体积变大边缘不整,内有空泡产生,可见颗粒状物质。不同浓度的射干抗病毒注射液组也出现细胞着色深,变圆偶见颗粒物质,结果见图 3。对细胞进行计数后统计脱颗粒率,射干抗病毒注射液组以及 C48/80 组与阴性组相比脱颗粒率有统计学意义($P < 0.05$),结果见表 2。

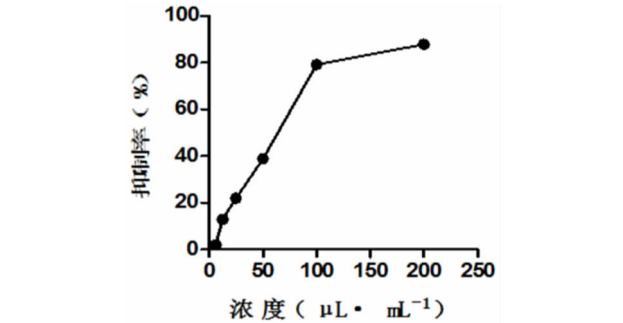


图 2 射干抗病毒注射液对 RBL-2H3 细胞的抑制率

2)射干抗病毒注射液对 RBL-2H3 细胞 β -氨基己糖苷酶释放的影响:C48/80 组 β -氨基己糖苷酶释放率显著升高,不同浓度的射干抗病毒注射液均可促进 β -氨基己糖苷酶释放增加,且具有剂量依赖性,与阴性组相比有统计学意义($P < 0.05$),表明射干抗病毒注射液可引起 RBL-2H3 细胞内颗粒物质释放,结果见表 2。

表 2 不同浓度射干抗病毒注射液诱导 RBL-2H3 细胞脱颗粒率结果($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	鼠数	剂量	脱颗粒率 (%)	β -氨基己糖苷酶释放率
空白	3	0	9.67 ± 1.53	8.19 ± 0.84
C48/80	3	30 $\mu\text{g/mL}$	$39.67 \pm 2.52^*$	$18.44 \pm 3.23^*$
小剂量	3	12.5 mL/L	14.56 ± 2.08	$25.19 \pm 1.69^*$
中剂量	3	25 mL/L	$23.00 \pm 3.00^*$	$41.89 \pm 2.03^*$
大剂量	3	50 mL/L	$30.48 \pm 2.06^*$	$50.75 \pm 6.09^*$

注:与空白组相比 * $P < 0.05$ 。

2.3 射干抗病毒注射液对 RBL-2H3 细胞质内游离 Ca^{2+} 浓度的影响 随着射干抗病毒注射液给药浓度的增加,RBL-2H3 细胞荧光强度显著增加,表明细胞内游离 Ca^{2+} 浓度升高,并呈剂量依赖性,与阴性相比有统计学意义,结果见图 4。

3 讨论

中药注射剂相较于中药传统制剂具有起效快、剂量准确等优点,然而由于其成分复杂,所以在临床使用过程中不良反应时有发生,且以过敏反应报道居多,多是类过敏反应^[10-11]。因此,在中药注射剂的进一步研究中,研究其类过敏反应的发生机制,减少类过敏反应发生,提高其安全性是首要任务。

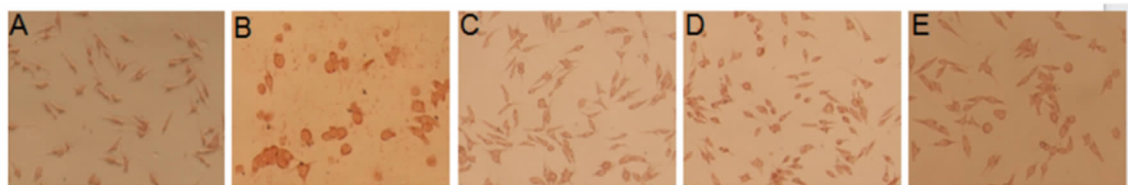


图3 RBL-2H3 细胞中性红染色结果

注:A. 空白组;B. C48/80;C-E 分别为射干抗病毒注射液 12.5、25、50 $\mu\text{L}/\text{mL}$ 组。

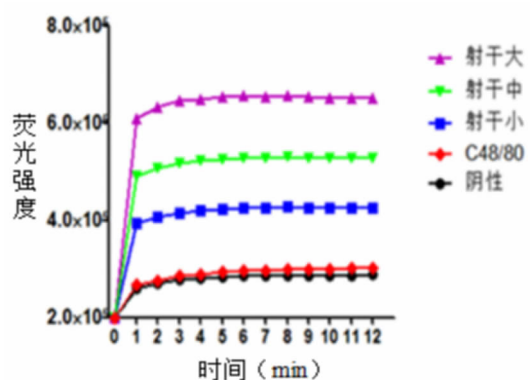


图4 不同浓度射干抗病毒注射液对 RBL-2H3 细胞质内游离 Ca^{2+} 的影响

类过敏反应是指无免疫系统参与的,药物直接刺激肥大细胞或嗜碱性粒细胞使其发生脱颗粒反应,释放大炎症递质,即首次用药就表现出与过敏反应相似症状的临床反应^[12]。近年来,由于 RBL-2H3 细胞具有永生特性,体外培养方法简单且生长速度较快的特点,因此,RBL-2H3 细胞脱颗粒模型已成为评价中药注射剂类过敏反应的一种常见的模型^[13],而且其评价结果的准确性也在不断的提高。 β -氨基己糖苷酶活性是检测 RBL-2H3 细胞脱颗粒的一个较好指标,该方法简便、稳定,可重复性好^[14],因此本实验选取 β -氨基己糖苷酶作为脱颗粒物质释放的一个指标。

Gilfillan AM 等研究发现^[15]肥大细胞表面 IgE 高亲和力受体 $\text{Fc}\epsilon\text{RI}$ 在抗原的刺激下发生交联,招募下游的蛋白酪氨酸激酶 Lyn 将其磷酸化,致使 $\text{Fc}\epsilon\text{RI}$ 免疫受体酪氨酸激活基序 (Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif, ITAM) 磷酸化, Lyn 激酶也将信号传递给蛋白酪氨酸激酶 Syk, Syk 激酶进一步活化下游的磷脂酶 C (PLC),而活化的 PLC 水解细胞膜上的 PIP₂ 为 DAG 和 IP₃,游离的 IP₃ 进入胞浆,与内质网上的 IP₃R 结合释放胞内的钙库,引起胞内钙离子浓度增大,游离的钙离子可以直接引发肥大细胞脱颗粒,进而释放胞内的颗粒物质。

本研究结果表明,射干抗病毒注射液可引起类

过敏反应。射干抗病毒注射液作用于 RBL-2H3 细胞后可以使细胞发生不同程度的脱颗粒现象,同时还可使胞内钙离子浓度明显升高,且具有剂量依赖性。由此我们推测射干抗病毒注射液引发的类过敏反应的机制可能与胞内钙离子浓度升高相关,该结果将为后续进一步研究射干抗病毒注射液过敏反应机制提供参考。

参考文献

- [1] 石磊,姬志强,等.射干抗病毒注射液的临床应用[J].中国药房,2012,23(35):3359-3360.
- [2] 王喜平,曹俊丽.射干抗病毒注射液致过敏性皮疹 1 例[J].新医学,2010,41(4):277.
- [3] 高继兰,陈述.射干抗病毒注射液引起皮肤过敏 1 例[J].齐鲁药事,2006,25(8):508.
- [4] 李颖,明霞.射干抗病毒注射液致过敏反应 1 例[J].中南药学,2005,3(4):237.
- [5] 伏醒,熊少妹.射干抗病毒注射液致过敏反应 1 例[J].农垦医学,2006,28(2):159.
- [6] 汪刚,刘效筠.射干抗病毒注射液治疗小儿上呼吸道感染疗效观察[J].时珍国医国药,2006,17(8):1540.
- [7] 李黎明,金若敏,李小明.中药注射剂类过敏反应实验研究进展[J].中药药理与临床,2012,28(1):187-190.
- [8] 马宏图,睢凤英.中药注射剂安全性与类过敏反应[J].中国医院药学杂志,2009,29(10):838-840.
- [9] 崔宏玉,易艳,李春英,等.清开灵注射液类过敏反应的实验研究[J].中国中药杂志,2014,35(2):511-514.
- [10] 刘兆平,汪怀山.中药注射剂安全现状与挑战[J].临床药物治疗杂志,2009,7(2):18-23.
- [11] 郭海平,刘军艳,杨本明,等.10 种中药注射剂不良反应文献分析[J].中国药物应用与监测,2007,4(2):57-59.
- [12] 陈玉琼,张萃.中药类过敏反应研究进展[J].广东药学院学报,2013,29(4):465-468.
- [13] 周琴,付贤树,王为民. RBL-2H3 细胞在药理学研究上的应用[J].中国药理学杂志,2011,46(17):1305-1308.
- [14] 刘炯,汤家铭,吴文斌.中药注射剂致 RBL-2H3 细胞脱颗粒的研究[J].上海中医药大学学报,2012,26(5):85-91.
- [15] Gilfillan AM, Rivera J. The tyrosine kinase network regulating mast cell activation[J]. Immunological Reviews, 2009, 228(1):149-169.