



注射用双黄连类过敏反应与特异性免疫细胞之间关系的探讨

易艳¹, 梁爱华^{1*}, 李春英¹, 赵雍¹, 王云庭^{1,2}, 李桂琴¹

(1. 中国中医科学院 中药研究所, 北京 100700; 2. 首都医科大学 中医药学院, 北京 100069)

[摘要] 目的:将 ICR 小鼠、SCID 小鼠和 BALB/C 裸鼠用于注射用双黄连(SHLI)类过敏反应研究,以探讨 SHLI 类过敏反应的发生与特异性免疫细胞之间的关系。方法:ICR 小鼠、SCID 小鼠和 BALB/C 裸鼠耳廓血管通透性分析:小鼠随机分成不同实验组,不同组的小鼠分别一次性静脉注射含有 0.4% 伊文思蓝的不同浓度的 Compound 48/80 溶液、注射用双黄连(SHLI)、生理盐水,给药后 30 min 记录各组动物耳廓血管通透性增高反应的阳性率,进行耳廓蓝染程度评分,并定量测定耳廓伊文思蓝渗出量。结果:SHLI 300,600 mg·kg⁻¹(分别相当于临床剂量的等效剂量和 2 倍剂量)静脉注射均可引起 ICR 小鼠耳廓血管通透性增高,耳廓明显蓝染。以上剂量的 SHLI 均未引起 SCID 小鼠和 BALB/C 裸鼠小鼠耳廓蓝染。结论:SHLI 在临床等效剂量和 2 倍临床剂量下有明显增高血管通透性的作用,提示有致 ICR 小鼠类过敏作用;相同剂量的 SHLI 对于免疫缺陷小鼠没有致类过敏作用,提示特异性免疫细胞可能参与了 SHLI 的致类过敏反应。

[关键词] 类过敏反应;注射用双黄连;反应机制;血管通透性;免疫细胞

注射用双黄连(SHLI)具有清热解毒,清宣风热的功效,其疗效肯定而广泛应用于病毒及细菌感染引起的呼吸道疾病。但是近年来由于 SHLI 导致的药物不良反应事件越来越受到人们的关注,对于 SHLI 的安全性再评价也成为亟待解决的问题。文献报道,SHLI 导致的不良反应类型以急性过敏样反应为主,主要发生在第一次接触药物时^[1],符合类过敏反应的临床特点,因此认为 SHLI 发生的药物不良反应主要为类过敏反应,这一点本实验室前期研究中也得到了证实^[2]。已知类过敏反应与 I 型过敏反应的症状类似,但类过敏反应是机体首次接触药物即发生反应,其具体机制与 I 型过敏反应的抗原抗体反应不同,目前并不十分明确^[3-4]。本实验室结合前期工作,运用于 SCID 小鼠和 BALB/C 裸鼠,对 SHLI 发生类过敏反应与特异性免疫细胞之间的关系进行探讨,以了解其发生类过敏反应的可能机制,从而为评价 SHLI 的安全性提供依据。

1 材料

1.1 动物 成年健康 ICR 小鼠, SCID 小鼠和 BALB/C 裸鼠,雄性,SPF 级,体重 22~25 g,由北京维通利华实验动物技术有限公司提供,动物合格证号 SCXK(京)2006-0009,0233621。动物饲养于 SPF 动物房内,温度控制在 20~25℃,相对湿度(55±15)%,每小时通风 10 次,人工控制照明,昼夜交替时间为 12 h。

1.2 药物和仪器 注射用双黄连(哈药集团制药二厂,批号 1009106);Compound 48/80(Sigma 公司,批号 40M4047);伊文思蓝(国药集团化学试剂有限公司,批号 WC20070607);甲酰胺(国药集团化学试剂有限公司,批号 F20110915);BHM36Humalyzer 3000 半自动生化分析仪(德国)。

2 方法

将 ICR 小鼠、SCID 小鼠和 BALB/C 裸鼠分别按体重随机分组,每组 10 只动物。各组小鼠分别 *iv* 给予含 0.4% 伊文思蓝不同受试物 20 mL·kg⁻¹,观察给药后 30 min 内动物的行为学变化及耳廓蓝染情况。根据每组出现耳廓蓝染的动物数计算反应率 = 出现耳廓蓝染的动物数/组内动物数 × 100%;根据蓝染耳数计算耳蓝染率;耳廓蓝染面积(S)按照以下标准进行分级:0 分,双耳无蓝染;1 分,0 < S ≤ 1/8(蓝染面积占耳廓面积的 1/8,以下相同);2 分,

[稿件编号] 20120208002

[基金项目] 国家“重大新药创制”科技重大专项(2009ZX09301-005, 2009ZX09502-001);中国中医科学院自选课题研究项目(2009 年度)

[通信作者] * 梁爱华, Tel: (010) 84252805, E-mail: liangaihua@sina.com

[作者简介] 易艳, 实习研究员, Tel: 13520324152, E-mail: yiyanyan800109@yahoo.com.cn



分, $1/8 < S \leq 1/4$; 3 分, $1/4 < S \leq 1/2$; 4 分, $1/2 < S \leq 3/4$; 5 分, $3/4 < S \leq 1$ 。于注射受试物后 30 min 将动物脱颈椎处死。沿耳根剪下双耳, 剪碎, 用 2 mL 甲酰胺于 37 °C 浸泡过夜, 萃取耳廓内渗出的染料。3 000 r · min⁻¹ 离心 15 min, 取上清液于 630 nm 处测吸光度 A。根据伊文思蓝标准曲线, 计算伊文思蓝染料渗出量。各组的伊文思蓝渗出数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 One-Way ANOVA 进行分析。率的统计采用 Fisher 精确概率法检验; 耳廓蓝染面积采用非参数检验。

3 结果

在 ICR 小鼠, 阳性药 Compound 48/80 25 mg ·

kg⁻¹ 组所有动物均出现双耳不同程度蓝染, 反应率和耳蓝染率均达 100%; 注射用双黄连 300, 600 mg · kg⁻¹ 组的反应率分别为 80%, 100%, 耳蓝染率分别达到 80%, 95%, 与对照组相比均有明显差异 ($P < 0.01$)。对耳廓渗出的伊文思蓝进行定量分析, 结果显示, 阳性药 Compound 48/80 25 mg · kg⁻¹ 组, 注射用双黄连 300, 600 mg · kg⁻¹ 组与对照组比较, 耳廓伊文思蓝渗出量均明显增高 ($P < 0.01$)。

而在 SCID 小鼠和 BALB/C 裸鼠上述药物均没有造成小鼠双耳明显蓝染, 耳廓伊文思蓝渗出量与对照组相比没有显著差异, 见表 1。

表 1 注射用双黄连致 ICR, SCID 小鼠, BALB/C 裸鼠耳廓蓝染面积评分及血管通透性增高情况 ($n = 10$)

Table 1 The score of ear's blued area and vasopermeability of ICR, SCID mice and BALB/C athymic mouse induced by SHLI ($n = 10$)

动物	组别	剂量 /mg · kg ⁻¹	有蓝染耳 动物数	反应率 /%	耳蓝染率 /%	耳蓝染 平均分	伊文思蓝渗出量 /μg	升高率 /%
ICR 小鼠	对照	-	0	0	0	0	0.62 ± 0.16	-
	Compound 48/80	25	10	100	100	3.85 ± 1.04 ²⁾	4.26 ± 1.62 ²⁾	587.10
	SHLI	300	8	80	80	1.9 ± 1.62 ¹⁾	4.21 ± 3.45 ²⁾	579.03
	SHLI	600	10	100	95	3.15 ± 1.12 ²⁾	6.02 ± 2.26 ²⁾	870.97
SCID 小鼠	对照	-	0	0	0	0	1.51 ± 0.23	-
	Compound 48/80	25	0	0	0	0	1.55 ± 0.31	2.65
	SHLI	300	0	0	0	0	1.68 ± 0.19	11.26
	SHLI	600	0	0	0	0	1.55 ± 0.17	2.65
BALB/C 裸鼠	对照	-	0	0	0	0	1.58 ± 0.09	-
	Compound 48/80	25	0	0	0	0	1.82 ± 0.21	17.42
	SHLI	300	0	0	0	0	2.10 ± 0.87	32.91
	SHLI	600	0	0	0	0	1.72 ± 0.1	8.86

注: 与对照组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$ 。

4 讨论

血管通透性增高是类过敏反应的主要病理机制之一^[5]: 由于通透性增高, 血浆渗出到组织间隙, 可引起组织水肿, 显现出皮肤、黏膜红肿、瘙痒等; 肺组织血管通透性增高及其炎性渗出, 可导致咳嗽、喘息、呼吸困难等; 严重类过敏反应时, 由于大量血浆渗出, 血容量下降, 同时炎性因子导致毛细血管扩张, 可引起血压下降乃至休克等。本实验室曾以血管通透性增高为指征建立了注射剂小鼠类过敏反应模型, 可通过耳廓蓝染发生率和耳廓蓝染面积分级, 判断血管通透性增高的程度^[2, 6-7]。

类过敏反应的机制并不十分清楚, 目前认为类过敏反应主要是由直接刺激肥大细胞和嗜碱性粒细胞释放组胺和类胰蛋白酶等及激活补体

从而释放上述生物活性物质这 2 条主要途径造成, 而不是由经典的免疫途径介导^[8-9]。为了解 SHLI 类过敏反应与体内主要的免疫细胞及特异性免疫之间的关系, 本研究借助 SCID 小鼠和 BALB/C 裸鼠以进一步研究 SHLI 发生类过敏反应的机制。SCID 小鼠即重症联合免疫缺陷综合征型小鼠, 其所有 T 和 B 淋巴细胞功能测试均为阴性, 对外源性抗原无细胞免疫及体液免疫应答。BALB/C 裸鼠由于无胸腺或仅有胸腺残迹, 导致缺乏成熟的 T 淋巴细胞, 因而细胞免疫功能低下, 虽然 B 淋巴细胞正常, 但其免疫功能欠佳。

在本次试验中, SHLI 可以造成免疫功能正常的小鼠血管通透性增高, 但对于上述 2 种免疫缺陷小鼠却没有出现耳廓蓝染, 说明 SHLI 可以造成免疫



功能正常的小鼠发生类过敏反应,而对于体内缺乏 T 和 B 淋巴细胞的免疫缺陷小鼠却没有造成类过敏反应,这也提示 T 和 B 细胞 2 种体内主要的特异性免疫细胞可能与 SHLI 引发的类过敏反应有关。已知组胺、5-羟色胺、P 物质、血小板活化因子(PAF)、白三烯 B₄(LTB₄)、缓激肽、肿瘤坏死因子(TNF)等均可导致血管通透性增高,而细胞间裂隙和穿细胞通道的查明、咬合蛋白、钙粘蛋白、整合蛋白等连接蛋白的发现、细胞骨架重构和应力纤维的形成、骨架蛋白磷酸化和相应信号转导等研究则为血管通透性增高的机制从细胞和分子水平作了深入一步的阐明^[10-11]。由于 SHLI 引发的类过敏反应主要在机体第一次接触药物时,且多在用药前 30 min,即缺乏致敏过程,因此 SHLI 与 T、B 细胞之间的相互作用可能并不是通过传统的体液免疫或细胞免疫途径,另外,由于 SCID 小鼠和 BALB/C 裸鼠体内的肥大细胞和粒细胞等功能基本正常,推测可能是 SHLI 直接刺激 T 或 B 淋巴细胞从而产生了除组胺以外的其他细胞因子或是发生了某种细胞间连接或细胞骨架结构的改变而直接或间接导致血管通透性增高,从而发生了类过敏反应,其具体的细胞和分子机制还有待更加深入的试验研究来进行进一步阐明。

[参考文献]

- [1] 成岚,王莉,袁强,等. 双黄连注射剂不良反应文献评价[J]. 中国循证医学杂志, 2010, 10(2):140.
- [2] 易艳,梁爱华,赵雍,等. 注射用双黄连类过敏反应物质及作用机制研究[J]. 中国中药杂志,2011,36(14):1865.
- [3] 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.
- [4] Robinson S, Sivanandan I. Anaphylactic and anaphylactoid reactions[J]. Anaesth Intensive Care Med, 2004, 5(9): 298.
- [5] Janice A. Vascular permeability, vascular hyperpermeability and angiogenesis [J]. Angiogenesis, 2008, 11: 109.
- [6] 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.
- [7] 李春英,梁爱华,高双荣,等. 啮齿类动物类过敏实验模型的建立[J]. 中国中药杂志,2011,36(4):488.
- [8] Simons F E. Practical allergy report: risk assessment in anaphylaxis [J]. J Allergy Clin Immunol, 2008, 121(2):402.
- [9] Szebeni J, Muggia F, Gabizon A. Activation of complement by therapeutic liposomes and other lipid excipient based therapeutic products: prediction and prevention[J]. Adv Drug Deliv Rev, 2011, 63(12):1020.
- [10] 赵克森,黄巧冰. 血管通透性增高的基本机制[J]. 中国病理生理杂志,2003,19(4): 549.
- [11] Shirinski V P. Molecular physiology of the endothelium and mechanisms of vascular permeability[J]. Usp Fiziol Nauk,2011, 42(1):18.

Relationship between specific immunocyte and pseudoanaphylactoid reactions induced by Shuanghuanglian injection

YI Yan¹, LIANG Aihua^{1*}, LI Chunying¹, ZHAO Yong¹, WANG Yunting^{1,2}, LI Guiqin¹

(1. Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China;

2. Capital Medical University, School of Traditional Chinese Medicine, Beijing 100069, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the relationship between specific immunocyte and pseudoanaphylactoid reactions (PR) induced by Shuanghuanglian injection (SHLI). **Method:** ICR mice, SCID mice and BALB/C athymic mouse were divided into different test groups, the mice were intravenously injected with solutions of different concentration of SHLI, positive control Compound 48/80 and normal sodium. All test substances were mixed with 0.4% Evans blue. The reaction and vascular permeability of the ears were observed and measured 30 min after SHLI injected. **Result:** SHLI of 300, 600 mg · kg⁻¹ caused obvious vascular hyperpermeability in ICR mice, but the same dose of SHLI didn't cause vascular hyperpermeability in SCID mice and BALB/C athymic mouse. **Conclusion:** SHLI in equivalent and 2 times the clinical dose can cause PR in ICR mice, but the same dose of SHLI can't cause PR in SCID mice and BALB/C athymic mouse, so specific immunocyte maybe take part in the SHLI-induced PR.

[Key words] pseudoanaphylactoid reactions; Shuanghuanglian injection; reaction mechanism; vasopermeability; specific immunocyte