

BN 大鼠与 Wistar 大鼠 I 型超敏反应敏感性的比较

李中港, 秦慧迪, 汪怀山, 史艳秋, 刘兆平

(山东大学新药评价中心, 山东 济南 250012)

摘要: **目的** 比较 BN 大鼠和 Wistar 大鼠在 I 型超敏反应中的敏感性, 建立一种灵敏可靠的 I 型超敏反应检测体系。 **方法** BN 大鼠和 Wistar 大鼠分别隔天 sc 不同剂量的卵白蛋白($10, 20$ 和 $40 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$), 共 5 次, 正常对照组 sc 给予生理盐水。首次注射后第 21 天取血清, 用 ELISA 法测定血清总免疫球蛋白 E(IgE) 水平, 通过被动皮肤过敏反应实验检测其特异性 IgE 水平; 第 22 天检测激发后大鼠血压、血清中组胺和类胰蛋白酶浓度的变化。 **结果** 与正常对照组比较, BN 大鼠在卵白蛋白 $10, 20$ 和 $40 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 下血清总 IgE 和特异性 IgE 显著增加, 血压下降, 血清组胺和类胰蛋白酶浓度增加; Wistar 大鼠仅在卵白蛋白 $40 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 组出现上述变化。 **结论** 与 Wistar 大鼠相比, BN 大鼠用于 I 型超敏反应的检测更为灵敏。血压和血清总 IgE、特异性 IgE、组胺及类胰蛋白酶浓度等可作为 I 型超敏反应重要的检测指标。

关键词: 超敏反应, 速发型; 模型, 动物; 免疫球蛋白 E; 组胺; 类胰蛋白酶类

中图分类号: R965 **文献标志码:** A **文章编号:** 1000-3002(2010)01-0030-05

DOI: 10.3867/j.issn.1000-3002.2010.01.006

随着中药注射剂不良反应报道的日益增多以及公众用药安全标准的提高, 国家食品药品监督管理局正陆续开展多种中药注射剂的安全性再评价工作。中药注射剂的不良反应主要是 I 型超敏反应, 其中的植物蛋白可能为一类主要的致敏原^[1]。因此, 对中药注射剂中异种蛋白质成分致敏性的评价成为其安全性再评价的一项重要内容。评价蛋白质成分致敏性较好的方法, 是建立 I 型超敏反应的检测体系, 并由已知致敏蛋白验证其适用性和有效性^[2]。以卵白蛋白(ovalbumin, OVA)为致敏原, 比较 BN 大鼠和 Wistar 大鼠在 I 型超敏反应中的敏感性, 并通过检测血清总免疫球蛋白 E(immunoglobulin E, IgE)、特异性 IgE、激发后血压、血清中组胺和类胰蛋白酶浓度等指标建立一种灵敏可靠的 I 型超敏反应检测体系, 为中药注射剂安全性再评价提供平台。

1 材料与方法

1.1 实验动物

BN 大鼠, 雄性, 6 周龄, 购自北京维通利华实验

动物技术有限公司, 动物许可证号: SCXK(京)2007-0001; Wistar 大鼠, 雄性, 6 周龄, 购自山东大学实验动物中心, 动物许可证号: SCXK(鲁)2009-0001。

1.2 仪器和试剂

MP150 生理记录仪(Biopac 公司, 美国); Model 680 酶标仪(Bio-Rad 公司, 美国); TU-1810PC 紫外可见分光光度计(北京普析通用仪器有限公司)。OVA、 α -N-苯甲酰-dl-精氨酸-p-硝基苯胺(α -N-benzoyl-dl-arginine-2-naphthylamide, BAPNA)购自美国 Sigma 公司; 胰蛋白酶购自北京 Solarbio 公司; 大鼠血清总 IgE 试剂盒和大鼠血清组胺测定试剂盒购自美国 RapidBio Lab 公司。

1.3 动物致敏

BN 大鼠和 Wistar 大鼠分别按体重随机分为 4 组, 每组 5 只。正常对照组 sc 给予生理盐水。实验组分别隔日 sc OVA 溶液 $10, 20$ 和 $40 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 致敏, 共 5 次, 致敏第 21 天取血, $800 \times g$ 离心制备血清。

1.4 血清总免疫球蛋白 E 测定

采用大鼠血清总 IgE 试剂盒检测, 按试剂盒说明书操作。

1.5 被动皮肤过敏反应(passive cutaneous anaphylaxis, PCA)实验

另取未致敏的 BN 大鼠和 Wistar 大鼠, 分别按体重随机分为 4 组, 每组 5 只。背部剃毛, 分别皮内注射上述致敏第 21 天的 BN 和 Wistar 大鼠血清各 $100 \mu\text{l}$ (用生理盐水稀释成 1:2, 1:8 和 1:32)。被动

基金项目: 十一五国家科技支撑计划资助项目(2006BAI14B05)

作者简介: 李中港(1984-), 男, 山东省淄博人, 硕士研究生, 研究方向为药物毒理学; 刘兆平(1958-), 男, 山东省济宁人, 教授, 硕士研究生导师, 研究方向为药物毒理学。

通讯作者: 刘兆平, E-mail: liuzhaoping@sdu.edu.cn, Tel: (0531)88382124

转移血清 24 h 后, iv 给予 OVA 溶液 $20 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 1 ml 与 2% 伊文思蓝溶液 1 ml 进行激发。30 min 后处死大鼠, 剪取背部皮肤, 测量蓝斑直径, 直径大于 5 mm 者判定为阳性。得到阳性结果的最大稀释度即为特异性 IgE 抗体滴度。

1.6 血压记录

致敏第 22 天, 将致敏大鼠麻醉后手术暴露左侧颈总动脉, 采用 MP150 生理记录仪记录动物血压变化。从右侧颈静脉给予 2 ml OVA 溶液 ($20 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$) 进行激发, 并记录激发后大鼠血压的变化, 每 30 s 记录 1 次, 记录 10 min。激发后 15 min 取血, 处死。

1.7 血清组胺浓度测定

将激发后所取大鼠血清用大鼠血清组胺测定试剂盒检测血清组胺浓度, 按试剂盒说明书操作。

1.8 血清类胰蛋白酶浓度检测

采用特异性底物 BAPNA 测定激发后血清中类胰蛋白酶的浓度^[3]。取 80 μl BAPNA $20 \text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 加入 80 μl 待测血清中。30 $^{\circ}\text{C}$ 反应 30 min 后, 加入 30% (V/V) 乙酸 0.5 ml 终止反应, 在波长 405 nm 测定吸光度(A)值。以胰蛋白酶标准溶液建立标准曲线, 计算血清类胰蛋白酶浓度。

1.9 统计学分析

实验结果数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。采用 SPSS 10.0 软件, 首先进行方差分析, 两组间比较用两独立样本 *t* 检验。

2 结果

2.1 卵白蛋白致敏大鼠血清总 IgE 水平的变化

如表 1 所示, BN 大鼠 OVA 10, 20 和 $40 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 致敏第 21 天血清中总 IgE 水平与对照组相比均显著升高 ($P < 0.05$, $P < 0.01$); OVA 10 和 $20 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 致敏 Wistar 大鼠血清总 IgE 无明显变化, OVA $40 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 致敏 Wistar 大鼠血清总 IgE 升高。此外, BN 大鼠血清总 IgE 水平与 OVA 致敏剂量呈现一定的剂量依赖关系 ($r = 0.938$, $P = 0.062$)。

2.2 卵白蛋白致敏大鼠血清致 PCA 的变化

如表 2 所示, OVA 10, 20 和 $40 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 组 BN 大鼠均出现 PCA 阳性, 且最大抗体滴度为 1/32 (表 2, 图 1); Wistar 大鼠仅 OVA $40 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 组 PCA 呈现阳性, 其最大抗体滴度也为 1/32, OVA 10 和 $20 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 组 PCA 均为阴性 (表 2, 图 2)。由此可见, BN 大鼠在 OVA 10, 20 和 $40 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 的刺激下均可诱导产生特异性 IgE 表达, Wistar 大鼠仅 OVA $40 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 诱导产生特异性 IgE 表达。

表 1 卵白蛋白(OVA)致敏大鼠 21 d 血清总免疫球蛋白 E (IgE) 水平的变化

Tab. 1 Changes in total immunoglobulin E (IgE) levels in serum of ovalbumin (OVA)-sensitized rats for 21 d

OVA/ $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$	总 IgE/ $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	
	BN 大鼠	Wistar 大鼠
0	1.17 \pm 0.35	0.93 \pm 0.37
10	1.79 \pm 0.56 *	1.09 \pm 0.24
20	2.10 \pm 0.56 **	1.05 \pm 0.28
40	2.39 \pm 0.42 **	1.62 \pm 0.42 **

OVA 隔日 sc 1 次, 共 5 次。第 21 天取血检测。 $\bar{x} \pm s$, $n = 5$ 。

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, 与对照组 OVA $0 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 比较。

表 2 卵白蛋白致敏 21 d 的大鼠血清导致被动皮肤过敏反应的变化

Tab. 2 Changes in passive cutaneous anaphylaxis induced by serum from OVA-sensitized rats for 21 d

OVA/ $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$	IgE 最大滴度	
	BN 大鼠	Wistar 大鼠
0	ND	ND
10	1/32	ND
20	1/32	ND
40	1/32	1/32

皮内注射按表 1 方法致敏 21 d 大鼠血清 100 μl , 24 h 后, iv 给予 OVA 和 2% 伊文思蓝各 1 ml 激发。ND: 未检出。

2.3 卵白蛋白致敏大鼠激发后血压的变化

如图 3 和图 4 所示, 与正常对照组相比, OVA 10, 20 和 $40 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 组 BN 大鼠在 OVA 激发后血压均明显下降 ($P < 0.01$), 900 s 时血压下降至正常血压的 1/3。Wistar 大鼠仅 OVA $40 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 组在 OVA 激发后血压明显下降, 900 s 时血压下降至正常血压的 1/3, OVA 10 和 $20 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 组在激发后血压未见明显变化。

2.4 卵白蛋白致敏大鼠激发后血清组胺和类胰蛋白酶浓度的变化

如表 3 所示, 在 OVA 10, 20 和 $40 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 组, OVA 激发后 BN 大鼠血清组胺和类胰蛋白酶浓度明显升高 ($P < 0.01$), 均达正常对照组的 2 倍以上, 但无明显剂量依赖关系。Wistar 大鼠 OVA 10 和 $20 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 组血清组胺和类胰蛋白酶浓度无明显变化, OVA $40 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 组血清组胺和类胰蛋白酶浓度均明显升高 ($P < 0.01$)。此变化与血压的变化相似, 提示组胺和类胰蛋白酶等过敏介质的释放可能是血压下降的原因。

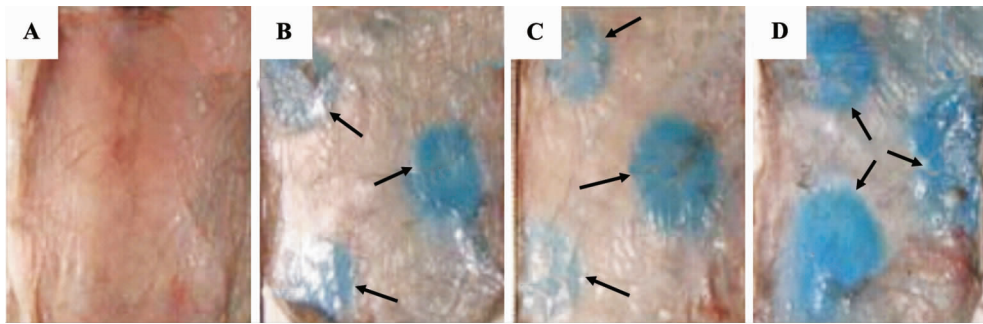


图 1 卵白蛋白致敏 21 d 的 BN 大鼠血清导致的被动皮肤过敏反应。大鼠给药和处理见表 2。A: 正常对照; B: OVA 10 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$; C: OVA 20 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$; D: OVA 40 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 。箭头示皮肤蓝色病变。

Fig. 1 Passive cutaneous anaphylaxis induced by serum from OVA-sensitized BN rats for 21 d.

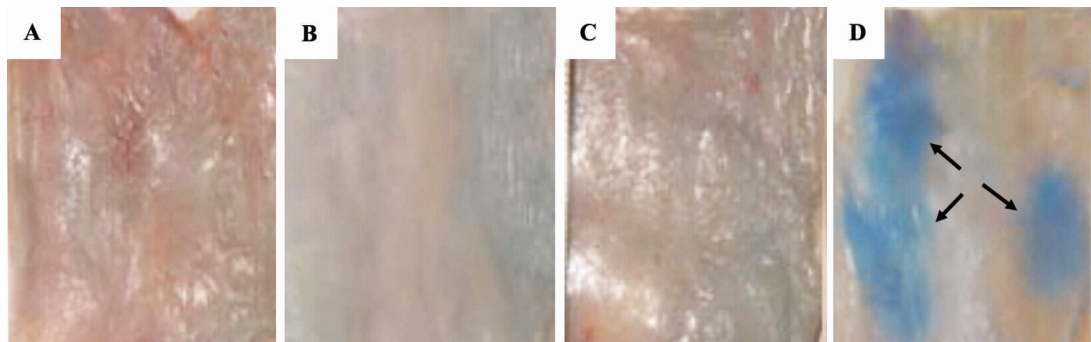


图 2 卵白蛋白致敏 21 d 的 Wistar 大鼠血清导致的被动皮肤过敏反应。大鼠给药和处理见表 2。A: 正常对照; B: OVA 10 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$; C: OVA 20 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$; D: OVA 40 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 。箭头示皮肤蓝色病变。

Fig. 2 Passive cutaneous anaphylaxis induced by serum from OVA-sensitized Wistar rats for 21 d.

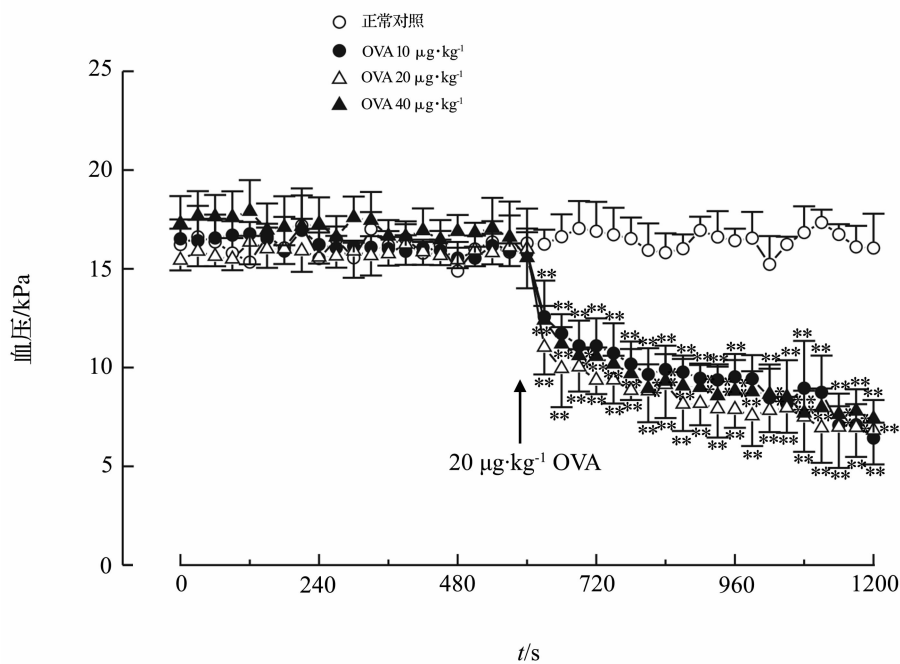


图 3 卵白蛋白致敏 BN 大鼠激发后血压的变化。致敏后第 22 天, 大鼠右侧静脉给 OVA 2 ml 激发。 $\bar{x} \pm s, n=5$ 。 ** $P < 0.01$, 与正常对照组比较。

Fig. 3 Changes in blood pressure in OVA-sensitized BN rats after challenge.

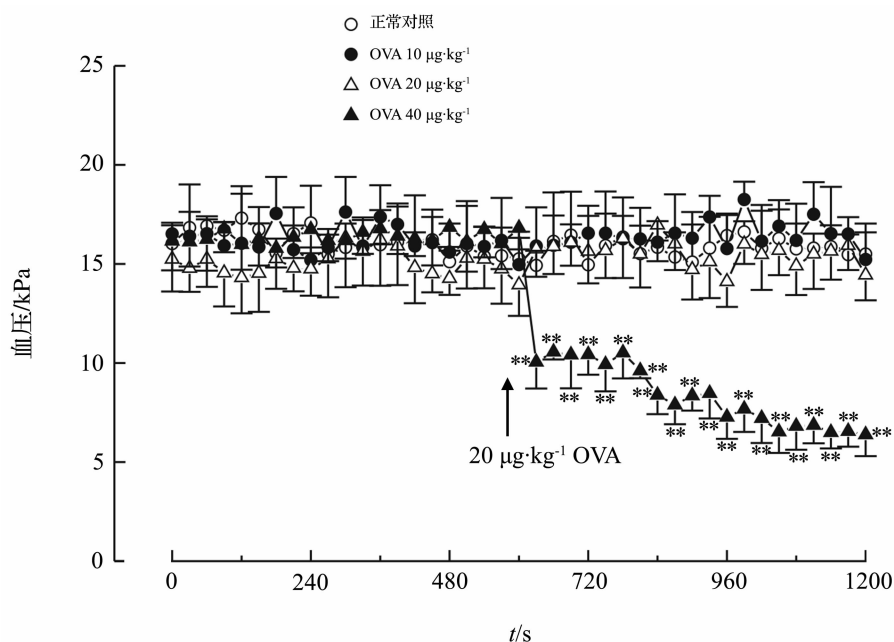


图 4 卵白蛋白致敏 Wistar 大鼠激发后血压的变化. 大鼠给药和处理见图 3. $\bar{x} \pm s$, $n = 5$. ** $P < 0.01$, 与正常对照组比较.
Fig. 4 Blood pressure changes in OVA-sensitized Wistar rats after challenge.

表 3 卵白蛋白致敏 BN 和 Wistar 大鼠激发后血清组胺和类胰蛋白酶水平的变化

Tab. 3 Histamine and trypsin levels in serum of OVA-sensitized BN and Wistar rats after challenge

OVA/ $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$	组胺/ $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$		类胰蛋白酶/ $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	
	BN 大鼠	Wistar 大鼠	BN 大鼠	Wistar 大鼠
0	8.1 ± 1.2	8.7 ± 1.1	140 ± 17	156 ± 36
10	19.7 ± 1.8**	9.9 ± 2.4	571 ± 88**	146 ± 15
20	21.2 ± 3.3**	9.6 ± 1.2	491 ± 98**	180 ± 16
40	20.5 ± 3.1**	16.8 ± 2.6**	604 ± 52**	585 ± 96**

大鼠给药和处理见图 3. $\bar{x} \pm s$, $n = 5$. ** $P < 0.01$, 与对照组 OVA 0 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 比较.

3 讨论

大鼠是毒理学评价中最常用的实验动物,比较适合用于 I 型超敏反应研究^[4]. BN 大鼠血清 IgE 表达水平较高,更容易模拟临床过敏患者的生理状态,在 I 型超敏反应研究中应用较多^[5-6]. 本研究结果表明,与 Wistar 大鼠致敏剂量 40 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 比较, BN 大鼠 OVA 的致敏剂量较低,为 10 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$,且致敏反应明显. 因此, BN 大鼠更适宜作为 I 型超敏反应检测体系的实验动物.

IgE 的生成是 I 型超敏反应发生的关键环节,也是 I 型超敏反应检测的重要指标. 据报道,动物体内的总 IgE 水平与其致敏敏感性相关^[7]. 本研究结果亦表明,血清总 IgE 水平的升高与 OVA 致敏剂量呈现一定的剂量依赖性,血清总 IgE 水平可灵敏地反映大鼠的致敏状态. 特异性 IgE 的水平与 I 型超敏反应的发生关系更为密切. PCA 作为检测特

异性 IgE 的经典方法,其特异性和灵敏度已有研究报道^[8]. 本研究进一步确证了其用于特异性 IgE 检测的可行性. 因此,可将血清总 IgE 测定和 PCA 作为 I 型超敏反应检测体系的 2 项重要指标.

致敏动物再次接触致敏原后被激发,可引起相应过敏介质(如组胺和类胰蛋白酶等)的大量释放,继而引发动物血压下降,该过程与临床过敏症状有很好的相似性,是判定动物致敏的直接指标. 本研究结果表明, OVA 10, 20 和 40 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 组, OVA 激发后 BN 大鼠血压均明显下降, 900 s 时血压下降至正常血压的 1/3; 血清组胺和类胰蛋白酶浓度明显升高,均达对照组的 2 倍以上. 因此认为,检测大鼠激发后血压、血清组胺和类胰蛋白酶浓度的变化,可以有效地、定量判断致敏大鼠 I 型超敏反应的发生. 因此,组胺、类胰蛋白酶及血压可作为 I 型超敏反应检测体系的指标^[9].

综上所述,与 Wistar 大鼠相比, BN 大鼠更适宜

用于 I 型超敏反应研究, 通过其血清总 IgE 水平、PCA、激发后血压、血清组胺及类胰蛋白酶浓度变化等指标, 可以有效地、定量检测微量异种蛋白的致敏性。本研究建立的 BN 大鼠 I 型超敏反应检测体系是否可用于中药注射剂的安全性再评价尚待进一步探讨。

参考文献:

- [1] 梁进权, 邹元平, 邓响潮. 中药注射剂不良反应的文献调查与分析[J]. 中国医院药学杂志, 2003, **23**(8): 486-488.
- [2] 向钱, 贾旭东, 王伟, 李宁. BN 大鼠致敏动物模型研究[J]. 中国食品卫生杂志, 2008, **20**(5): 393-396.
- [3] Bonadonna P, Perbellini O, Passalacqua G, Caruso B, Colarossi S, Dal Fior D, *et al.* Clonal mast cell disorders in patients with systemic reactions to Hymenoptera stings and increased serum tryptase levels[J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2009, **123**(3):680-686.
- [4] Kuper CF, Stierum RH, Boorsma A, Schijf MA, Prinsen M, Bruijntjes JP, *et al.* The contact allergen dinitrochlorobenzene (DNCB) and respiratory allergy in the Th2-prone Brown Norway rat [J]. *Toxicology*, 2008, **246**(2-3):213-221.
- [5] Knippels LM, Penninks AH. Assessment of the allergic potential of food protein extracts and proteins on oral application using the brown Norway rat model[J]. *Environ Health Perspect*, 2003, **111**(2):233-238.
- [6] 郭姗姗, 王意忠, 张毅, 李德凤, 宗桂珍, 高英杰, 等. BN 大鼠和豚鼠评价双黄连注射液的过敏反应[J]. 中国药理学与毒理学杂志, 2009, **23**(2):128-133.
- [7] Lewkowich IP, Rempel JD, HayGlass KT. *In vivo* IgE levels in exogenous antigen stimulated responses: measurement of total IgE as a valid, simple surrogate for Ag-specific IgE[J]. *J Immunol Methods*, 2004, **286**(1-2):123-132.
- [8] Albrecht M, Kühne Y, Ballmer-Weber BK, Becker WM, Holzhauser T, Lauer I, *et al.* Relevance of IgE binding to short peptides for the allergenic activity of food allergens[J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2009, **124**(2):328-336.
- [9] 程芳, 刘兆平. 中药注射剂安全性评价与关键技术的研究[J]. 中国中药杂志, 2009, **34**(8):1052-1054.

Sensitivity in type I hypersensitivity compared between BN rats and Wistar rats

LI Zhong-gang, QIN Hui-di, WANG Huai-shan, SHI Yan-qiu, LIU Zhao-ping
(Center for New Drug Evaluation, Shandong University, Jinan 250012, China)

Abstract: OBJECTIVE To compare sensitivity in type I hypersensitivity between BN and Wistar rats, and to establish a sensitive and reliable determination system for type I hypersensitivity. **METHODS** BN and Wistar rats were sc given ovalbumin (OVA) 10, 20 and 40 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ every other day for 5 times and normal control group with sc normal saline. The total immunoglobulin E (IgE) levels in serum were determined with ELISA and the specific IgE levels in serum were determined by passive cutaneous anaphylaxis on the 21st day from the 1st injection. The blood pressure, serum histamine and tryptase levels were determined after challenge on the 22nd day. **RESULTS** Total IgE, specific IgE, histamine and tryptase levels in serum significantly increased and blood pressure decreased in OVA 10, 20 and 40 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ BN rat groups compared with normal control group, while in Wistar rats these symptoms only appeared in OVA 40 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ group. **CONCLUSION** BN rats are more sensitive than Wistar rats in type I hypersensitivity. The blood pressure, serum total IgE, specific IgE, histamine and tryptase levels can be used as the important indicators in type I hypersensitivity.

Key words: hypersensitivity, immediate; models, animal; immunoglobulin E; histamine; tryptases

Foundation item: The project supported by the Eleventh Five-year National Science and Technology Support Program of China (2006BAI14B05)

Corresponding author: LIU Zhao-ping, E-mail: liuzhaoping@sdu.edu.cn, Tel: (0531)88382124

(收稿日期: 2009-06-16 接受日期: 2009-10-09)

(本文编辑: 齐春会)