



BN大鼠用于评价中药注射液速发型过敏反应模型的建立及适用性评价

郭姗姗¹, 王意忠², 金亚宏¹, 张毅¹, 高英杰¹, 时宇静¹, 崔晓兰^{1*}

(1. 中国中医科学院 中药研究所, 北京 100700;

2. 北京大学 航天临床医学院, 北京 100049)

[摘要] 以清开灵注射液、双黄连注射液、黄芩苷、绿原酸为受试样本,以豚鼠为对照,通过观察BN大鼠(brown norway rats)过敏反应的特异性来建立中药注射液速发型过敏反应的动物模型,并对两者在评价中药注射液过敏反应中的适用性进行比较。本研究以中药注射液为致敏原,直接对BN大鼠进行致敏和攻击后,通过观察过敏症状、过敏反应率、过敏反应程度、组胺释放量、靶器官病变率和病变程度的变化,来评价BN大鼠过敏反应动物模型。结果显示中药注射剂致敏后,BN大鼠出现明显的过敏症状、血清和组织中组胺含量明显增加,肺组织和气管出现明显的病理改变,同时以青霉素和天花粉蛋白为阳性对照,也出现速发型过敏反应的表现;BN大鼠的过敏反应发生率、过敏反应程度、靶器官病变率和病变程度均显著高于豚鼠。试验结果说明BN大鼠为评价中药注射液过敏反应的适宜动物模型,且其敏感性高于豚鼠。

[关键词] BN大鼠;速发型过敏反应;动物模型;中药注射液

中药注射剂是我国独创的新剂型,具有生物利用度高,作用迅速等特点,能较好的发挥中药治疗急病重症的特点^[1]。但由于中药注射剂本身存在的一系列问题——化学成分复杂、制备工艺落后、质量标准欠缺等,造成近年来中药注射剂不良反应逐年增加。中药注射液严重不良反应中尤以过敏反应的比例为最高,且反应类型多为速发型变态反应,使其在临床上的应用受到了很大的限制。但目前国内外均未建立中药致敏原的标准动物模型,导致中药注射液过敏反应的评价受到了很大限制,缺乏敏感的动物模型成为中药注射液过敏反应研究中的瓶颈问题。

本课题组前期采用BN大鼠(brown norway rats)作为实验动物,分别对清开灵注射液和双黄连注射液的过敏反应进行了探索性研究,发现BN大鼠可能为适合评价中药注射液过敏反应的适宜模型^[2-3]。本研究以清开灵注射液、双黄连注射液及其相应的药物成分黄芩苷、绿原酸作为致敏原,同时以青霉素和天花粉蛋白为阳性对照,通过对过敏反应发生率、过敏反应程度、组胺释放、靶器官病变率、靶器官病变程度等

指标的观察,对BN大鼠和豚鼠在评价中药注射液过敏反应中的适用性进行比较,并以此为依据建立适合评价中药注射液过敏反应的动物模型。本项目将为建立一套适合评价中药注射剂的动物模型和研究方法提供实验依据,为寻找评价中药注射剂致敏成分提供客观、准确的研究手段,同时为探讨中药注射液过敏反应机制提供新思路。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 动物 雄性BN大鼠,SPF级,体重180~200g,由北京维通利华实验动物有限公司提供,许可证号SCKX(京)2002-0003;雄性豚鼠,SPF级,体重250~350g,由北京市海淀区兴旺动物养殖场提供,许可证号SCKX(京)2006-0006。

1.1.2 药物 清开灵注射液,北京中医药大学药厂生产,批号612509A;双黄连注射液(冻干),哈药集团中药二厂生产,批准文号:国药准字Z10960058;黄芩苷,购自中国药品生物制品检定所,纯度>98%,批号110715;绿原酸购自中国药品生物制品检定所,纯度>98%,批号110753。阳性对照:注射用青霉素钠,华北制药股份有限公司生产,批号S0903311;天花粉蛋白注射液,购自上海金山制药有限公司,天花粉蛋白为105.6%,批号050601。

1.1.3 试剂盒与仪器 血清和组织中组胺 Hista-

[稿件编号] 20110310002

[基金项目] 国家自然科学基金重大研究计划(90709042)

[通信作者] * 崔晓兰,研究员,博士生导师, Tel: (010) 84015200, E-mail: cuixl2812@sina.com

[作者简介] 郭姗姗, E-mail: ruochushan@sina.com



mine ELISA 试剂盒(美国 Rapidbio lab 产品,生产批号:豚鼠组织 12270511,豚鼠血清 12270514,大鼠组织 12280405,大鼠血清 12280408);Multiskan 3 酶标仪(芬兰 Thermo 公司);5415R 高速离心机(德国 Eppendorf 公司);Lambdal P40 紫外-可见分光光度计(美国 PE 公司);切片机(德国 Leitz);RSH-100 自动染色机(日本 Sakura 公司);DMLK-HC 自动照相生物显微镜(德国 Leica 公司)。

1.2 方法

1.2.1 动物分组 BN 大鼠和豚鼠分别按体重平均分为腹腔注射(*ip*)低剂量组、静脉注射(*iv*)低剂量组和静脉注射高剂量组,清开灵注射液和双黄连注射液每组 6 只,黄芩苷和绿原酸每组 4 只,同时设正常对照组。

1.2.2 致敏试验 将各受试样本按临床等倍剂量(黄芩苷和绿原酸分别按照药典中规定的清开灵注射液和双黄连注射液中成分的含量折合成临床等倍剂量)注射给予 BN 大鼠和豚鼠,2.5 mL · kg⁻¹,隔日注射 1 次,连续 3 次。致敏途径腹腔组为腹腔注射,静脉组 BN 大鼠为尾静脉注射、豚鼠为足静脉注射。注射容积按体重换算,隔日 1 次,连续 3 次,对照组注射无菌生理盐水。

1.2.3 攻击试验 各组攻击量均采用致敏剂量,注射容积为致敏时的 2 倍,途径均为静脉快速推注。每组均于末次致敏后第 14 天攻击 1 次,攻击后观察过敏症状反应结果,并根据全身致敏性评价标准分级^[4]。“-”,过敏反应阴性:正常;“+”,过敏反应弱阳性:躁动、竖毛、颤抖、搔鼻;“++”,过敏反应阳性:喷嚏、咳嗽、呼吸急促、排尿、排粪、流泪;“+++”,过敏反应强阳性:呼吸困难、哮喘音、紫癜、步态不稳、跳跃、喘息、痉挛、旋转、潮式呼吸;“++++”,过敏反应极强阳性:死亡。

1.2.4 血清和组织中组胺含量的测定 各组动物均于攻击观察过敏反应症状 30 min 后采血,BN 大鼠眼眶采血,豚鼠心脏取血,采血后将动物处死,取出肺脏和气管。将动物全血于 4 °C 3 000 r · min⁻¹离心 15 min 后,取血清用于检测组胺含量。分别取大鼠、豚鼠的肺、支气管组织 100 mg,加入 1 mL 匀浆液,液氮中反复冻融 3 次,每次 10 min,然后在冰浴中超声 3 × 4 s,4 °C 12 000 r · min⁻¹离心 30 min。取上清,蛋白定量后,ELISA 测组胺含量,采用试剂盒提供的方法进行测定。

1.2.5 肺脏和气管的病理学检查 肺和气管固定于 10% 甲醛溶液中,取材后流水冲洗,梯度乙醇脱水,二甲苯透明,浸蜡包埋,切片,HE 染色,光学树脂封片,光镜下观察并显微照相。气管、肺组织病理改变评价标准:“-”,气管和肺组织未见明显病变;“+”,气管和肺间质有少量炎症细胞,气管黏膜下腺体轻度扩张;“++”,气管间质有较多的炎症细胞浸润,部分气管黏膜上皮脱落,固有层腺体中度扩张,肺间质有较多的炎症细胞浸润;“+++”,气管纤毛柱状上皮增生,间质有大量炎症细胞浸润,固有层腺体增生、扩张。肺间质有大量炎症细胞浸润,部分肺泡融合,部分肺泡代偿性扩张。

1.2.6 统计分析 实验所得数据采用 SPSS 12.0 软件包进行统计学处理,各受试样本的 3 组分别进行综合统计,组胺含量采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用单因素方差分析;过敏反应发生率和肺、气管病理率比较采用卡方检验;过敏反应发生程度和肺、气管病理改变程度比较采用秩和检验。

2 结果

2.1 BN 大鼠过敏反应动物模型的特异性

采用本实验中的方法建立 BN 大鼠的动物模型,产生如下的特异性速发型过敏反应的变化。

2.1.1 BN 大鼠的过敏反应症状 BN 大鼠出现搔鼻、喷嚏、呼吸急促等过敏症状,多在攻击后 10 min 内出现,10 ~ 15 min 后缓解;其中静脉注射高剂量组部分动物出现静卧、肌张力下降、体表温度下降、抽搐、晕厥等过敏性休克的症状,甚至死亡。

2.1.2 BN 大鼠的血清和组织中的组胺释放 以清开灵注射液、双黄连注射液、黄芩苷和绿原酸为样本,BN 大鼠过敏反应模型的血清、肺组织和气管中的组胺含量均明显升高,与对照组比较均具有显著性差异(表 1)。

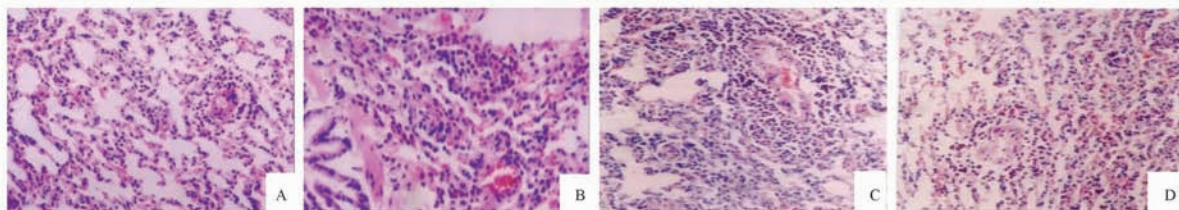
表 1 中药注射液对 BN 大鼠血清和组织中组胺含量的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	血清 /μg · L ⁻¹	肺组织 /μg · g ⁻¹	气管 /μg · g ⁻¹
对照	13.31 ± 0.80	17.48 ± 2.03	20.25 ± 2.09
清开灵	24.37 ± 5.72 ¹⁾	32.44 ± 5.36 ¹⁾	35.97 ± 5.43 ¹⁾
双黄连	24.84 ± 5.29 ¹⁾	31.23 ± 2.03 ¹⁾	33.02 ± 6.13 ¹⁾
黄芩苷	21.13 ± 3.68 ¹⁾	25.82 ± 6.01 ¹⁾	28.84 ± 6.35 ¹⁾
绿原酸	19.73 ± 4.85 ¹⁾	28.28 ± 4.18 ¹⁾	29.82 ± 5.37 ¹⁾

注:与对照组相比¹⁾P < 0.01。

2.1.3 BN大鼠靶器官的病理改变 4种样本作用后,各组BN大鼠的肺间质均有不同程度的炎症细胞浸润,以淋巴细胞为主,偶见中性粒细胞浸润;气管间

质均有不同程度的炎症细胞浸润,部分标本可见气管黏膜轻度增生、上皮细胞脱落、黏膜下腺体增生,腺上皮细胞增生多层,间质增厚(图1,2)。



A. 清开灵注射液组; B. 双黄连注射液组; C. 黄芩苷组; D. 绿原酸组(图2同)。

图1 各组BN大鼠肺组织的病理改变(HE)

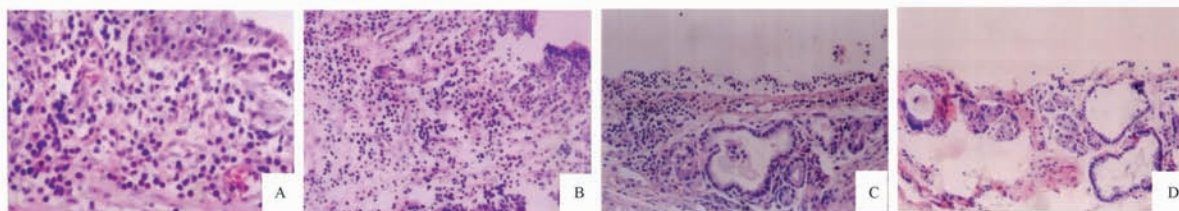
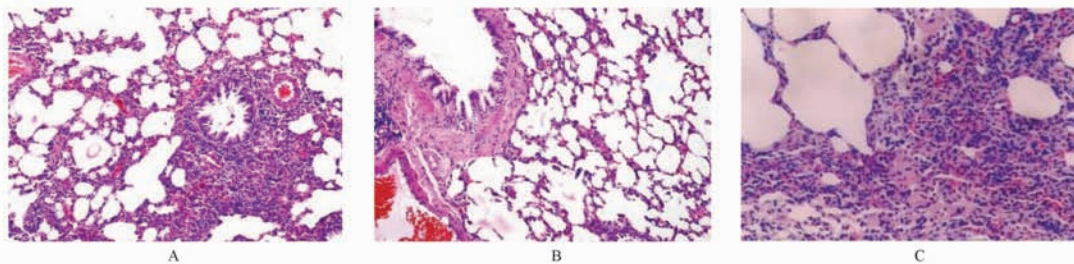


图2 各组BN大鼠气管的病理改变(HE)

2.1.4 阳性对照药的验证 阳性对照药青霉素和天花粉蛋白组BN大鼠均出现明显的速发型过敏反应症状,如骚鼻、喷嚏、旋转、晕厥等,甚至死亡,过敏反应发生率分别为83.33%,66.67%,与生理盐水对照组比较具有显著性差异($P < 0.01$)。靶器官肺

和气管均出现明显的病理改变,青霉素组肺和气管的病变率分别为45.45%,72.73%,天花粉蛋白组肺和气管的病变率分别为100%,83.33%,均与生理盐水对照组比较具有显著性差异($P < 0.01$,图3)。



A. 生理盐水组; B. 青霉素组; C. 天花粉蛋白组。

图3 对照组BN大鼠肺组织和气管的病理改变

2.2 BN大鼠对中药注射液过敏反应的敏感性

2.2.1 BN大鼠和豚鼠对中药注射液过敏反应率的比较 以清开灵注射液、双黄连注射液、黄芩苷和绿原酸为受试样本,BN大鼠各组的过敏率分别为52.78%,62.86%,79.17%,83.33% ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),而豚鼠对各样本的过敏率分别为

16.67%,36.11%,8.33%,26.92%,BN大鼠对4种受试的中药注射液及药物成分的过敏率均显著高于豚鼠。

2.2.2 BN大鼠和豚鼠对中药注射液过敏反应程度的比较 4种受试样本致BN大鼠的过敏程度均比豚鼠严重,其中清开灵注射液组、黄芩苷组和绿原酸



组的致BN大鼠的过敏反应程度与豚鼠比较具有显著性差异(表2)。

表2 BN大鼠和豚鼠各组的过敏反应程度

组别	动物	过敏反应/只				
		-	+	++	+++	++++
清开灵	BN大鼠 ²⁾	8	9	1	0	0
	豚鼠	15	1	1	1	0
双黄连	BN大鼠	6	7	2	2	1
	豚鼠	12	0	0	6	0
黄芩苷	BN大鼠 ¹⁾	2	6	4	0	0
	豚鼠	11	1	0	0	0
绿原酸	BN大鼠 ²⁾	1	9	2	0	0
	豚鼠	9	1	2	0	0

注:与豚鼠组相比¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$ (表3,4同)。

2.2.3 BN大鼠和豚鼠对中药注射液靶器官病变率的比较 以清开灵注射液、双黄连注射液、黄芩苷和绿原酸为受试样本, BN大鼠各组肺组织的病变率分别为61.11%, 72.22%, 66.67%, 50%, 而豚鼠对各样本的过敏率分别为50%, 50%, 16.67%, 16.67%, BN大鼠对4种受试中药注射液及药物成分的过敏率均显著高于豚鼠, 其中黄芩苷组致BN大鼠肺组织病变率与豚鼠比较具有显著性差异($P < 0.01$)。

以清开灵注射液、双黄连注射液、黄芩苷和绿原酸为受试样本, BN大鼠各组的气管病变率(44.44%, 50%, 33.33%, 8.33%)与豚鼠各组(50%, 33.33%, 25%, 16.67%)比较没有显著性差异。

2.2.4 BN大鼠和豚鼠对中药注射液靶器官病变程度的比较 4种受试样本致BN大鼠肺组织的病理改变程度均比豚鼠严重, 其中黄芩苷组和绿原酸组致BN大鼠肺组织病变程度与豚鼠比较具有显著性差异(表3)。4种受试样本致BN大鼠气管的病理改变程度与豚鼠比较均没有显著性差异(表4)。

3 讨论

长期以来, 由于对中药注射液的不良反应重视不够, 造成该方面的研究基础极为薄弱。尤其是目前对中药注射液不良反应的临床前研究存在相当难度, 主要原因是缺乏一套客观、准确的评价方法, 尤其是敏感的动物模型。因此迅速开展中药注射液不良反应的评价方法研究, 并建立相应的标准动物模型已成为中药安全性工作的重中之重^[5-6]。BN大

表3 BN大鼠和豚鼠各组肺组织的病变程度

组别	动物	肺组织病变/只			
		-	+	++	+++
清开灵	BN大鼠	7	9	2	0
	豚鼠	9	8	1	0
双黄连	BN大鼠	5	13	0	0
	豚鼠	9	8	1	0
黄芩苷	BN大鼠 ²⁾	4	4	4	0
	豚鼠	10	2	0	0
绿原酸	BN大鼠 ²⁾	6	5	1	0
	豚鼠	12	0	0	0

表4 BN大鼠和豚鼠各组气管的病变程度

组别	动物	气管病变/只			
		-	+	++	+++
清开灵	BN大鼠	10	2	3	3
	豚鼠	9	7	2	0
双黄连	BN大鼠	9	5	3	1
	豚鼠	11	7	0	0
黄芩苷	BN大鼠	8	1	3	0
	豚鼠	9	3	0	0
绿原酸	BN大鼠	11	1	0	0
	豚鼠	10	2	0	0

鼠能产生较为理想的I型过敏反应, 更重要的是BN大鼠对不同食物致敏原产生的过敏反应的强度与人体相似, 对常见食物致敏原(如花生)产生过敏反应的强度 > 不常见食物致敏原(如牛奶) > 无致敏史食物(如菠菜叶), 因此, 目前国内外均把BN大鼠作为常规食物过敏动物模型优选鼠系来进行进一步的免疫学研究。

本实验结果显示, 以清开灵注射液及其药物成分黄芩苷、双黄连注射液及其药物成分绿原酸为致敏原, BN大鼠出现明显的速发型过敏反应, 包括过敏症状与速发型过敏反应的症状相吻合; BN大鼠血清、肺组织和气管中均出现大量的组胺释放, 与正常对照组比较具有显著性差异, 说明BN大鼠出现速发型过敏反应的标志性过敏介质的显著释放; 肺组织和气管出现不同程度的炎性病理改变, 说明BN大鼠的过敏反应具有特异性的病理改变, 其靶器官为肺和气管; 经西药阳性对照青霉素和中药阳性对照天花粉蛋白验证, BN大鼠均出现明显的速发型过敏反应的表现; 而阴性对照生理盐水组则没有出现任何过敏反应的表现。以上结果说明, BN大鼠对中药注射液的过敏反应具有特异性, BN大鼠为评价中



药注射液过敏反应的适宜模型。

对BN大鼠和豚鼠在评价中药注射液过敏反应的敏感性进行比较,对于各受试样本,BN大鼠的过敏反应发生率均显著高于豚鼠;BN大鼠的过敏反应程度明显高于豚鼠,清开灵注射液组、黄芩苷组和绿原酸组与豚鼠比较具有显著性差异;BN大鼠的肺组织病变率明显高于豚鼠,其中黄芩苷组与豚鼠比较具有显著性差异;BN大鼠的肺组织病变程度明显高于豚鼠,其中黄芩苷组和绿原酸组与豚鼠比较具有显著性差异;而BN大鼠和豚鼠对气管的病变率和病变程度比较没有显著性差异。以上结果说明,BN大鼠对中药注射液过敏反应的敏感性高于豚鼠。

本研究证明,BN大鼠为评价中药注射液过敏反应的适宜动物模型,该模型对评价中药注射液过敏反应具有特异性,且其敏感性明显高于豚鼠。下一

步将对如何规范建立动物模型的条件,探讨中药注射液的过敏反应机制和寻找中药注射液中的致敏物质进行深入研究。

[参考文献]

- [1] 王景红,张彦丽. 1998—2008年中药注射剂不良反应文献分析[J]. 中国医院用药评价与分析,2009,9(12):951.
- [2] 郭姗姗,王意忠,张毅,等. BN大鼠和豚鼠对清开灵注射液致速发型过敏反应的比较[J]. 药学报,2009,44(8):852.
- [3] 郭姗姗,王意忠,张毅,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.
- [4] 国家食品药品监督管理局. 化学药物刺激性、过敏性和溶血性研究技术指导原则[S]. GPT 4-1. 2005.
- [5] Utrecht J. Role of animal models in the study of drug induced hypersensitivity reactions[J]. AAPS J,2006,7(4):914.
- [6] 章海风,翟成凯,郑艳泽. 中药注射剂致过敏反应的研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志,2010,16(10):204.

Establishment and applicability evaluation of animal model which was suitable to evaluate immediate hypersensitivity induced by injections of traditional Chinese medicine in BN rats

GUO Shanshan¹, WANG Yizhong², JIN Yahong¹, ZHANG Yi¹, GAO Yingjie¹, SHI Yujing¹, CUI Xiaolan^{1*}
(1. Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China;
2. Aerospace Center Hospital, Beijing University, Beijing 100049, China)

[Abstract] Qingkailing injection, Shuanghuanglian injection, baicalin, chlorogenic acid as sample, guinea pig as control, to observe the specificity of allergic response to traditional Chinese medicine (TCM) injection in BN rats and establish a suitable animal model to evaluate applicability of allergic response in BN rats and guinea pigs induced by TCM. BN rats were sensitized by TCM injection, the symptoms, the rate and degree of allergic response were observed, the level of histamine in serum and tissues were determined by ELISA assay, the rate and degree of pathological changes in target organs were observed by HE staining under light microscope. There were significant symptoms of allergic response can be in BN rats, the level of histamine in serum, lung and trachea tissues increased significantly and there were significant pathological changes in lungs and tracheas. Meanwhile, the similar symptoms of allergic response can be induced by penicillin and trichosanthin. The rate and degree of allergic response, the rate and degree of pathological changes was higher in BN rats than in guinea pigs. Compared with guinea pig, BN rat is probably more suitable animal model in evaluating allergic response to injection of TCM.

[Key words] BN rats; allergic response; animal model; traditional Chinese medicine injection

doi:10.4268/cjcm20111402

[责任编辑 张宁宁]