

人源细胞激活试验法应用于中药注射剂过敏反应检查的研究

桑晶, 陈舒怀, 蒙宏, 谢珍, 匡荣* (浙江省食品药品检验研究院, 杭州 310004)

摘要: 目的 研究体外人源细胞激活试验法(human cell line activation test, h-CLAT)用于中药注射剂过敏反应检查的可行性, 探讨中药注射剂的IV型变态反应体外检测的可行性。方法 参考 OECD 指导原则 442E 的 h-CLAT 法, 应用流式细胞仪在类树突样的人源白血病细胞系 THP-1 上对 4 种中药注射剂进行体外过敏反应检查, 根据 THP-1 细胞表面抗原 CD86 和 CD54 的相对荧光强度评价 4 种中药注射剂体外过敏反应; 同时采用体内过敏反应对 4 种注射剂进行评价。结果 体外皮肤过敏试验表明, 树突状细胞表面特异抗原 CD86 相对荧光强度值<150, CD54 的相对荧光强度值<200, 根据判定标准结果为阴性, 与体内法结果一致。结论 h-CLAT 法具有检验周期短、测试方法简便、评价客观等优点, 是一种较好的检查中药注射剂过敏反应的替代方法。

关键词: 人源细胞激活试验; 皮肤变态反应; 替代方法

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1007-7693(2018)07-0975-05

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2018.07.006

引用本文: 桑晶, 陈舒怀, 蒙宏, 等. 人源细胞激活试验法应用于中药注射剂过敏反应检查的研究[J]. 中国现代应用药学, 2018, 35(7): 975-979.

Study on the Application of *in Vitro* Human Cell Line Activation Test with Chinese Medicine Injection

SANG Jing, CHEN Shuhuai, MENG Hong, XIE Zhen, KUANG Rong* (Zhejiang Institute for Food and Drug Control, Hangzhou 310004, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To evaluate the possibility of allergic response test for Chinese medicine injections using human cell line activation test *in vitro*, and to explore the feasibility of *in vitro* test of type IV allergy reaction for traditional Chinese medicine injection. **METHODS** In terms of OECD Guideline 442E, 4 different Chinese medicine injections were tested both in human cell line activation test with human leukemia THP-1 cells *in vitro* and allergic response *in vivo* at the same time. **RESULTS** From the result of *in vitro* skin sensitization test, relative fluorescence intensity of specific surface antigen of dendritic cells CD86 was below 150 and CD54 below 200, which was negative according to the criteria. The results was the same as *in vivo* test. **CONCLUSION** *In vitro* test has its advantages of short cycle, relatively simple and objective, and is a good alternative method for allergic response test for Chinese medicine injections.

KEY WORDS: human cell line activation test(h-CLAT); skin sensitization; alternative methods

中药注射剂是我国特有的剂型, 随着中药注射剂在临床中的广泛应用, 临床过敏和类过敏反应报道逐年增加, 中药注射剂的安全性受到越来越多的关注。目前, 中国药典2015年版对中药注射剂的过敏反应试验以及药物临床前安全性评价仍以传统的豚鼠主动全身过敏法和/或PCA反应法为主。但这2种方法都存在动物使用量大、试验周期长、动物与人反应差异大、结果判定主观等缺点, 同时这2种方法也很难实现临床前的高通量快速筛选^[1-2]。近年来随着3R理念的深入, 越来越多的研究致力于开发新的体外过敏反应检查方法^[3-4]。

体外人源细胞激活试验 2016 年被收录到

OECD 指南中, 作为一种对化学品的潜在致敏性评价的体外测试方法, 其主要原理是通过检测 DC 样细胞系接触化学物后的激活状态, 以致敏过程中树突状细胞特异性表达的分子 CD86、CD54 的表达增强作为判断标准^[2,4-5]。本研究评价体外人源细胞激活试验法用于评价中药注射剂过敏反应检查的可行性, 以推动中药注射剂的过敏反应检查体外方法的开发。

1 仪器与材料

1.1 仪器

HERAcell150i 型号二氧化碳培养箱 (Thermo Scientific 公司); DMI3000B 型显微镜(美国 Leica

基金项目: 浙江省药品接触材料质量控制研究重点实验室(2014E10006)

作者简介: 桑晶, 女, 博士, 主管药师 Tel: (0571)86457970 E-mail: oliver169@163.com *通信作者: 匡荣, 男, 主任药师 Tel: 13989899796 E-mail: kuangrong@zjy.org.cn

公司); FACSVerse™ System 型流式细胞仪(美国 BD); Sorvall ST8 型水平式离心机(Thermo 公司); ACS-20-TE 型号的电子天平(Mettler Toledo 公司)。

1.2 受试物

4 种中药注射剂样品见表 1。

表 1 市售 4 种中药注射剂

Tab. 1 Four Chinese medicine injections in drug store

名称	厂家	批号
丹参注射液	正大青春宝药业有限公司	1603221
香丹注射剂	正大青春宝药业有限公司	1603181
参麦注射剂	正大青春宝药业有限公司	1607054
黄芪注射剂	正大青春宝药业有限公司	1610282

1.3 材料

人源白血病细胞系 THP-1 (上海中科院细胞资源中心); RPMI-1640 培养液 (GIBCO 公司, 批号: 1864173); 胎牛血清(浙江天杭生物科技有限公司, 批号 141013); 磷酸盐缓冲液(DPBS, 含钙镁离子, 批号: 1740576); 流式上样缓冲液临用时用水配成 2%溶液; CD86 同型对照 FITC 标记小鼠源 IgG1 抗体(BD 公司, 批号: 7313762); FITC 标记鼠源单克隆抗人 CD54 抗体(DAKO 公司, 批号: 20038138); FITC 标记鼠单克隆抗人 CD86 抗体 (BD 公司, 批号: 6036848); CD54 同型对照 FITC 标记小鼠源 IgG1(DAKO 公司, 批号: 20027873); 阳性对照: 2,4-二硝基氯苯(2,4-dinitrochlorobenzene, SIGMA 公司, 规格: 10 g·mL⁻¹); 阴性对照: 乳酸(SIGMA 公司, 批号: WXBC2377V, 规格: 每瓶 500 g)。

1.4 动物

健康豚鼠, 每批 6 只, 共计 30 只。动物来源: 余姚市泗门镇建飞实验兔养殖场, 生产许可证号: SCXK(浙)2017-0002。

2 方法

2.1 人源细胞激活试验法

2.1.1 样品浓度的确定 用 RPMI-1640 作为溶剂, 从原液起依次向下稀释 8 个剂量: 原液、原液 1/2 体积、原液 1/4 体积、原液 1/8 体积、原液 1/16 体积、原液 1/32 体积、原液 1/64 体积、原液 1/128 体积。再用 RPMI-1640 作为溶剂, 将每个剂量进行 1:50 倍稀释, 制成工作液。采用流式细胞仪检测 PI 染色阴性的活细胞数计算细胞成活率, 计算公式如下: 细胞成活率=活细胞数/

总收获的细胞数×100%。

根据细胞成活率的计算结果得到剂量毒性 log 曲线, 确定每种中药注射剂的 CV75 的值。CV75 值即剂量毒性 log 曲线中相对细胞成活率为 75% 时选用的样品剂量。根据 CV75 值确定正式试验的 8 个剂量为: $1.2 \times CV75$, $1 \times CV75$, $1/1.2 \times CV75$, $1/1.2^2 \times CV75$, $1/1.2^3 \times CV75$, $1/1.2^4 \times CV75$, $1/1.2^5 \times CV75$, $1/1.2^6 \times CV75$ 。

2.1.2 试验步骤 将 THP-1 细胞以 $0.1 \times 10^6 \sim 0.2 \times 10^6 \cdot \text{mL}^{-1}$ 铺于培养瓶, 预培养 48~72 h 后, 以 $1 \times 10^6 \cdot \text{mL}^{-1}$ 的密度铺于 24 孔板, 加入样品接触 24 h。收集上述细胞, PBS(含 0.1%BSA)清洗, 4 °C 封闭培养 15 min。将细胞平均分成 3 份, 加入 FITC 标记的抗 CD86、抗 CD54 以及同型对照的单克隆抗体, 4 °C 孵育 30 min。流式细胞仪分析 CD86 和 CD54 的平均几何荧光强度(mean fluorescence intensity, MFI)。

2.1.3 结果分析 首先通过 PI 染色去除死细胞, 收集约 10 000 个活细胞, 分析细胞表面 CD86 和 CD54 的 MFI。然后, 采用以下公式计算相对荧光强度(relative fluorescence intensity, RFI), 以表示细胞表面 CD86 和 CD54 的表达量: $\text{RFI} = (\text{样品处理细胞组 MFI} - \text{样品处理细胞同型对照 IgG 的 MFI}) / (\text{空白对照细胞组 MFI} - \text{空白对照细胞同型对照 IgG 的 MFI})$ 。

2.1.4 判断标准 在细胞成活率>50%的情况下, 每个化合物的至少 2 次独立试验任一个剂量的 CD86 的 RFI 等≥150, 或者至少 2 次独立试验任一剂量的 CD54 的 RFI≥200, 则该化合物可判断为受试物阳性。

2.1.5 致敏阳性的剂量计算 致敏作用都与剂量相关, 因此受试物致敏为阳性时, 要进一步利用 RFI 通过公式计算有效作用浓度 (effective concentration, EC), FITC-CD86 用 EC150 表示, PE-CD54 用 EC200 表示。

当受试物致敏阳性时, 从最低浓度开始计算, 满足阳性标准的第 1 个浓度设置为 B 浓度, 选择 B 浓度的上一个浓度为 A 浓度: A 浓度的 RFI 比第一个浓度的 RFI 值至少要高 10%, 否则要向上再取一个浓度的 RFI 值, 直到符合>10%的标准。

若 A 浓度的 RFI>150 或 200, B 浓度的 RFI<150 或 200, 则: $\text{EC150} = \text{B 剂量} + \{[(150 - \text{BRFI}) /$

$[(ARFI-BRFI)(A \text{ 剂量}-B \text{ 剂量})]$ }; $EC200=B \text{ 剂量}+\{(200-BRFI)/[(ARFI-BRFI)(A \text{ 剂量}-B \text{ 剂量})]\}$ 。

若 A 浓度和 B 浓度的 RFI 均>150 或 200, 则:
 $EC150=2^{\{\log_2(B \text{ 剂量})+(150-BRFI)/(ARFI-BRFI) \times [\log_2(A \text{ 剂量})-\log_2(B \text{ 剂量})]\}}$;
 $EC200=2^{\{\log_2(B \text{ 剂量})+(200-BRFI)/(ARFI-BRFI) \times [\log_2(A \text{ 剂量})-\log_2(B \text{ 剂量})]\}}$ 。

2.2 体内过敏反应试验

参照中国药典 2015 年版所示方法, 取豚鼠 6 只, 隔日每只每次腹腔注射供试品溶液 0.5 mL, 共 3 次, 致敏。每日观察每只动物的行为和体征, 首次致敏和激发前称量并记录每只动物的体质量。然后将其均分为 2 组, 每组 3 只, 分别在首次注射后第 14 天和第 21 天, 静脉注射供试品溶液 1 mL 进行激发。观察激发后 30 min 内动物有无过敏反应症状。

静脉注射供试品溶液 30 min 内, 不得出现过敏反应。如在同一只动物上出现竖毛、发抖、干咳、连续喷嚏 3 声、连续咳嗽 3 声、紫癜和呼吸困难等现象中的 2 种或 2 种以上, 或出现二便失

禁、步态不稳或倒地、抽搐、休克、死亡现象之一者, 判定供试品不符合规定。

3 结果

3.1 人源细胞激活试验法

首先对 4 种不同中药注射剂进行毒性试验, 利用 PI 染色得到的活细胞进行流式分析, 得到毒性剂量曲线, 根据毒性剂量曲线计算得到每种中药注射剂的 CV75, 见表 2。结果表明, 除参麦注射液的 CV75 值为 0.5 体积比, 其余丹参注射液、香丹注射液和黄芪注射液体积比均为 0.03 体积比。

根据预试验得到 4 种中药注射剂的 CV75 值, 进行 8 个剂量的正式试验。用流式细胞仪分析每种中药注射剂的平 MFI。根据 RFI 计算公式得到 4 种中药注射剂的 CD86RFI 和 CD54RFI 值。4 种中药注射剂的 CD86RFI 都<150 而 CD54RFI 都<200, 见图 1。因此按判定标准结果为阴性。

3.2 体内过敏反应试验

在过敏反应试验中, 4 种中药注射剂和阴性对照组豚鼠在第 14 天和第 21 天激发后均未观察到过敏反应症状, 因此判定为阴性。

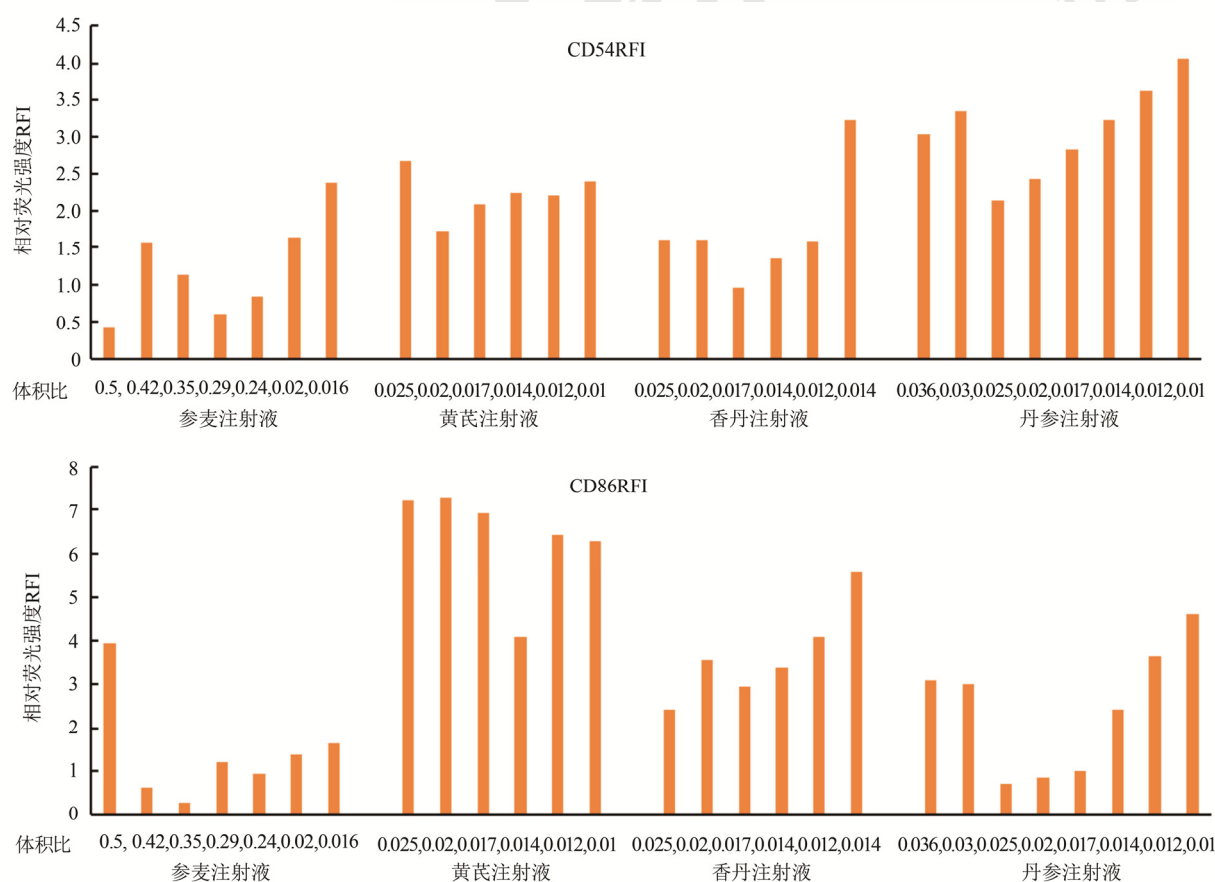


图 1 4 种中药注射剂 CD54 和 CD86 的 RFI 比较

Fig. 1 Comparison of the relative fluorescence intensity of CD54 and CD86 for 4 Chinese medicine injection

表 2 4 种中药注射剂体外过敏反应和体内过敏反应结果的比较($n=3$, $\bar{x} \pm s$)

Tab. 2 Comparison of the results for 4 Chinese medicine injection in sensitization tests *in vitro* and *in vivo*($n=3$, $\bar{x} \pm s$)

样品名称	人细胞激活试验			结果	过敏反应试验结果
	CV ₇₅ /μg·mL ⁻¹	EC150	EC200		
阴性对照	3 500	<150	<200	阴性	阴性
丹参注射液	0.03	<150	<200	阴性	阴性
香丹注射液	0.03	<150	<200	阴性	阴性
参麦注射液	0.5	<150	<200	阴性	阴性
黄芪注射液	0.03	<150	<200	阴性	阴性
阳性对照	6	3.9	3.8	阳性	阳性

3.3 体内过敏反应法与体外过敏反应法的优劣比较

对体外人源细胞激活试验法和体内过敏反应试验法的优缺点进行比较,见表3。体外体内2种方法对中药注射剂的过敏反应结果的比较表明,中国药典2015年版以豚鼠为受试动物的体内方法,存在使用动物多(每组至少6只豚鼠);试验周期时间较长(至少需要21 d)、与人的过敏反应差异大(豚鼠和人过过敏原的反应有差异,可能造成假阳性和假阴性的结果),最终评价主观(结果由主观打分来进行判定)等问题。而体外过敏反应试验周期短(正式试验2~3 d),没有动物损耗,评价结果客观(根据流式细胞测定的相对荧光强度RFI来确定,不受主观因素的影响),灵敏性高。体外试验对操作人员技术要求高,由于灵敏度高,可能存在假阳性的可能。由于体外方法只能部分反映过敏的过程,因此需要结合其他体外方法进行最终判定。

表 3 体外试验和体内试验优缺点的比较

Tab. 3 Comparison of advantages and disadvantages between sensitization test *in vitro* and *in vivo*

优缺点	体外过敏反应法	体内过敏反应法
正式试验周期	3 d	21 d
材料价格	低	低
动物消耗	无	有
评价方式	客观	主观
操作是否简便	对操作人员要求高	是
反应过敏过程	部分	整体
灵敏性	高	低

4 讨论

中国药典2015年版仍以传统的体内试验评价对中药注射剂的过敏反应。该方法使用动物多,周期长,且评价主观,灵敏度低,假阳性反应时有发生。而在国际倡导3R原则的大背景下,越来

越多的体外方法以周期短,评价灵敏客观,操作简便,材料易获取等优点受到重视。根据中药注射剂引起的变态反应机制不同,主要分为I型(速发型)、II型(细胞毒型)、III型(免疫复合物型)和IV(迟发型)变态反应。由于中药注射剂引起的IV型迟发过敏反应发病速度缓慢,出现症状不明显,目前药物的体外致敏检测方法多根据I型和类过敏反应设计,如肥大细胞脱粒试验,体外补体激活试验^[4-6]。而对IV型药物迟发变态反应检测方法的研究还处在空白阶段,因此找到一种针对IV型药物迟发变态反应设计的体外过敏试验是尤为必要的。

人源细胞激活试验作为2016年收录到OECD指南中的一种国际上公认的过敏体外测试方法正是针对IV型药物变态反应机制设计的。有研究表明,当IV型药物变态反应发生时,机体的非成熟型树突状细胞(imature dendritic cells, iDCs),也就是朗格汉斯细胞(Langerhans cells, LCs),能够将致敏物质识别,经过加工处理,并呈递给T淋巴细胞,启动特异性的免疫应答。在此过程中,iDCs分化为成熟的树突状细胞,并上调一系列细胞表面分子的表达,包括共刺激分子如CD80, CD86以及CD40,黏附分子如CD2, CD54, CD58等。人细胞激活试验就是利用检测DC样细胞系接触化学物后的激活状态,以树突状细胞表面分子CD86和CD56的表达变化作为判断致敏性的标准。目前该方法主要用于化妆品的体外测试中^[7-9]。

本研究将人细胞激活试验法应用在中药注射剂IV型药物过敏反应的体外的研究上。通过对4种中药注射剂的体外过敏反应的测定,丹参注射液、香丹注射液、参麦注射液和黄芪注射液的相对荧光强度CD86RFI都<150而CD54RFI都<200,因此根据判定标准结果均为阴性,与体内豚鼠过敏反应结果一致。此外,针对中药注射剂特有成分复杂等特点,体外人源细胞激活试验法可通过CD54, CD86等一系列表面蛋白的表达进一步区分不同中药注射剂进行致敏潜在风险的比较。在流式细胞仪检测CD54和CD86的特异性表达峰,可见不同的中药注射剂CD86和CD54相对于同型对照的表达峰也有明显差异,见图2。丹参注射剂CD86和CD54的表达峰与同型对照基本重合,说明1#受试物在该体系中无致敏潜力,而黄芪注射剂的CD86和CD54的表达峰明显高于同型对照峰,说明该2#中

药注射剂有一定的潜在的致敏风险。CD86和CD54的表达峰差异为不同中药注射剂的过敏反应进一步进行区分提供了可能。

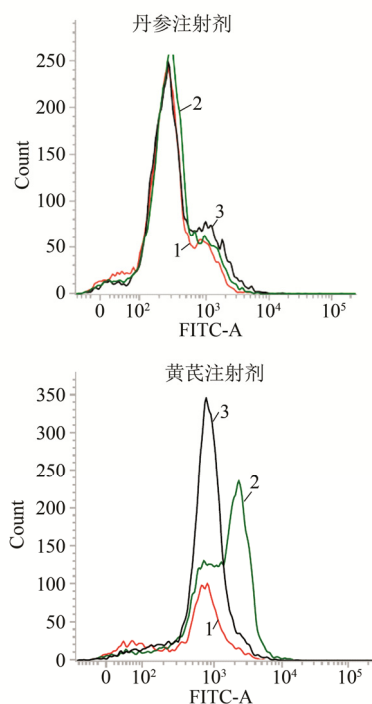


图 2 2 种不同成分的中药注射剂几何荧光强度值比较
曲线 1 为 FITC 标记的 IgG 同型对照, 曲线 2 和 3 分别为 FITC 标记的 CD86 和 CD54 的标记的 FITC 几何荧光强度。

Fig. 2 Comparison of the geometric fluorescence intensity of CD54 and CD86 for 4 Chinese medicine injections
curve 1 is geometric fluorescence intensity of IgG-FITC, curve 2 is the geometric fluorescence intensity of CD86-FITC, curve 3 is geometric fluorescence intensity of CD54-FITC.

总之, 通过体外人源细胞激活试验法对 4 种中药注射剂过敏反应检查的评价, 发现针对 IV 型药物变态反应的人细胞激活试验应用到中药注射

剂的致敏性的评价是可行的, 这为中药注射剂初步快速检测提供了依据, 同时为研究方法处在空白阶段的药品 IV 型药物变态反应检测的研究提供了一种新的思路。

REFERENCES

- [1] 中国药典. 四部[S]. 2015: 1148
- [2] In Vitro Skin Sensitisation, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4 Health Effects No. 442E [S]. 2016.
- [3] ZHANG J S, SANG J, SUN Y D, The Application of Direct Peptide Reactivity Assay for Sensitization Prediction of Chinese Medicine Injection [J]. Drug Standards of China, 2016, 17(4): 268-271.
- [4] KANG R X, YOU R L, WANG R, et al. *In vitro* experiment of allergic reactions induced by traditional Chinese medicine injections [J]. China J Chin Mater Med(中国中药杂志), 2015, 40(13): 2503-2507.
- [5] AZAM P, PEIFFER J L, CHAMOUSSET D, et al. The cytokine-dependent MUTZ-3 cell line as an *in vitro* model for the screening of contact sensitizers [J]. Toxicol Appl Pharmacol, 2006, 212(1): 14-23.
- [6] ZHAO Y, LI Q, ZHANG X Y Study progress of type I anaphylaxis reaction and anaphylactoid reaction on the basis of RBL-2H3 cell models [J]. Chin J Clin Pharmacol Ther(中国临床药理学与治疗学), 2010, 15(11): 1310-1315.
- [7] ASHIKAGA T. Development of an *in vitro* skin sensitization test (human Cell Line Activation Test; h-CLAT) using THP-1 cell (human monocytic leukemia cell line) [J]. Alternatives to Animal Testing & Experimentation Aatex, 2006, 11.
- [8] SAKAGUCHI H, ASHIKAGA T, MIYAZAWA M, et. al Development of an *in vitro* skin sensitization test using human cell lines; human Cell Line Activation Test (h-CLAT) [J]. Toxicol in Vitro, 2006, 20(5):774-784
- [9] SAKAGUCHI H, ASHIKAGA T, MIYAZAWA M, et al. The relationship between CD86/CD54 expression and THP-1 cell viability in an *in vitro* skin sensitization test-human cell line activation test (h-CLAT) [J]. Cell Biol Toxicol, 2009, 25(2): 109-126.

收稿日期: 2017-11-29

(本文责编: 曹粤锋)