

体外嗜碱性粒细胞激活试验法的建立

桑晶¹, 康桦¹, 王佳炜², 陈舒怀¹, 徐玲燕¹, 王木兰², 洪利娅^{1*} (1.浙江省食品药品检验研究院, 国家药品监督管理局化妆品动物替代试验技术重点实验室, 杭州 310004; 2.正大青春宝药业有限公司, 杭州 310004)

摘要: 目的 建立基于流式细胞仪检测的体外嗜碱性粒细胞激活试验(human basophil activation test, h-BAT)方法, 并探索该方法用于 I 型变态反应检查的可行性。方法 利用人源白血病嗜碱性粒细胞 KU812 在 I 型变态反应过程中经阳性剂激活后, 细胞特异性表面抗原 CD63 和 CD203 表达特异性增强的原理建立体外 I 型变态反应模型, 并同步用组胺酶联免疫法进行验证。结果 确定以终浓度为 $2 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的 N-乙酰甲硫氨酸-亮氨酸-苯丙氨酸为阳性剂, 孵育 2 h 作为流式方法检测嗜碱性粒细胞激活的阳性成立条件, 细胞相对组胺释放百分比增高结果进一步确认了阳性成立条件。结论 h-BAT 法有测试简便、评价客观等优点, 是一种较好的过敏反应细胞模型, 可以用于豚鼠试验的替代。

关键词: 嗜碱性粒细胞激活试验; 过敏反应模型; 替代方法

中图分类号: R965.2 文献标志码: A 文章编号: 1007-7693(2020)08-0949-04

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2020.08.010

引用本文: 桑晶, 康桦, 王佳炜, 等. 体外嗜碱性粒细胞激活试验法的建立[J]. 中国现代应用药学, 2020, 37(8): 949-952.

Establishment of Human Basophil Activation Method *in Vitro*

SANG Jing¹, KANG Hua¹, WANG Jiawei², CHEN Shuhuai¹, XU Lingyan¹, WANG Mulan², HONG Liya^{1*}
(1. Zhejiang Institute for Food and Drug Control, NMPA Key Laboratory for Animal Alternative Testing Technology of Cosmetics, Hangzhou 310004, China; 2. Chiatai Qingchunbao Pharmaceutical Co., Ltd., Hangzhou 310004, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To establish human basophil activation test *in vitro* by flow cytometry, and to explore its feasibility of assessment of type I allergy reaction. **METHODS** By the theory of the specific expression of CD63 and CD203 in human basophil KU812 could be enhanced by positive agents, established *in vitro* model of type I allergy, which was verified by the result of human histamine enzyme-linked immunosorbent assay. **RESULTS** Human basophil activation test by flow cytometry was set up with positive agent of $2 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ fMLP for 2 h of incubation. The results of increase of cell histamine release percentage confirmed the positive establishment condition at the same time. **CONCLUSION** Human basophil activation test *in vitro* is a good cell model of anaphylaxis with the advantages of relatively simple and objective. It is a good animal alternative test for sensitization test with guinea pigs.

KEYWORDS: human basophil activation test; allergic model; alternative method

由于环境污染日益加剧, 临床上各种过敏和类过敏反应报道逐年增加, 引起过敏反应的各种过敏源也越来越多。根据引起的过敏反应机制不同, 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 4 种^[1]。目前引起过敏的临床表现以 I 型变态反应居多^[2-4], 因此找到一种有效的针对 I 型变态反应设计的体外过敏试验尤为必要。目前已有致敏的体外方法如肥大细胞脱粒试验和体外补体激活试验, 然而脱颗粒试验不太适用于悬浮的人源嗜碱性粒细胞, 而补体激活检测主要是针对类过敏反应, 且激活补体途径很多, 难以解释清楚^[5-7]。研究^[8]显

示, I 型变态反应中嗜碱粒细胞表面特异性的表面标志物 CD63 和 CD203c 的变化能反映出机体对致敏原刺激的反应性。本研究就是利用这一原理建立流式细胞仪检测的人源嗜碱性粒细胞激活试验法, 并评价该方法对于 I 型过敏反应检查的可行性。

1 仪器和材料

1.1 仪器

BD FACSVerserTM 流式细胞仪(美国 BD 公司); Sorvall ST8 型水平式离心机(可设置 2~4 °C、离心力 300~400 ×g)、HERAcell150i 二氧化碳培养箱(Thermo 公司); CJ-2F 双人净化工作台(苏州市冯

基金项目: 浙江省药品监管系统科技计划项目(2020010); 浙江省食品药品监管系统科技计划项目(BH201701)

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: 洪利娅, 女, 硕士, 主任药师 Tel: (0571)86454617 E-mail: hongliya@zjyj.org.cn

氏实验动物设备有限公司); DMI3000B 型显微镜 (Leica 公司); Spectra Max190 酶标仪(MD 公司); 高速台式冷冻离心机(Beckman Coulter 公司)。

1.2 细胞株

人外周血嗜碱性白血病细胞株 KU812 购自上海中科院细胞资源中心, 代数 p3。

1.3 实验试剂

IMDM 培养液(批号: 1897157)、DPBS 缓冲液(批号: 1848822)均购自 GIBCO 公司; PE-Cy7 标记的鼠单克隆抗人 CD63 抗体(批号: 7172969)、PE-Cy7 标记的鼠 IgG1 κ 抗体(批号: 7174918)、BB700 标记的鼠单克隆抗人 CD203 抗体(批号: 7331832)、BB700 标记的鼠 IgG1 κ 抗体(批号: 6327763)均购自 BD 公司; 人组胺试剂盒(上海酶联生物科技有限公司, 批号: Nov.2017, July.2018); PI 染液(批号: MKBV0241V)、羊抗人 IgE 抗体(批号: 16284-1MG)、*N*-甲酰甲硫氨酸-亮氨酸-苯丙氨酸(fMLP, 批号: MKCC5355)、C48-80(批号: 097M4042V)均购自 Sigma 公司。

2 方法

2.1 体外模型的建立

细胞的制备与接种: 选择生长状态良好的 KU812 细胞, 37 °C 悬浮培养 24 h。将生长状态良好的细胞悬液在 250 $\times$ g, 4 °C 离心 5 min。用新鲜培养基重悬为终浓度 $2 \times 10^6 \cdot \text{mL}^{-1}$, 接种 24 孔板每孔 0.5 mL, 即细胞数量为每孔 1×10^6 。

细胞接触受试物: 加 500 μL 的工作液到 24 孔板中, 即终体积为 1 mL, 逐滴加入, 并在放入培养箱之前手动混匀。按试验给定时间培养数小时。

细胞的收集: 24 孔板接触受试物后的细胞分别收集到样品管中, 250 $\times$ g, 4 °C 离心 5 min。弃上清并将其余细胞重悬于 600 μL 的 FACS 缓冲液中, 离心后, 加封闭液 600 μL 重悬并 4 °C 封闭 15 min。封闭完成后, 每组细胞分成 3 管, 每管 180 μL 。用标记的 CD-203, CD-63 以及小鼠 IgG 4 °C 暗处孵育 30 min。孵育结束后重悬在 400 μL FACS 缓冲液的上样管中, 待上样前加入 PI 染色。

流式上样: 用流式细胞仪测定细胞表面抗原标记物。细胞活性需要用 PI 染色设门来测定, 死细胞用 PI 染色设门进行排除。每管收集总的活细胞数 10 000 个。PE 通道(FL-1)需要优化到能够检测出 PE-Cy7 信号; 而 BB700 通道(FL-3)需要优化到能够检测出 BB700 染色的荧光信号。

流式分析: 活细胞的荧光强度的几何均值 (MFI)以及每份样品的成活率数据最终用于分析。

2.2 组胺相对释放量测定

将生长状态良好的细胞悬液在 250 $\times$ g, 4 °C 离心 5 min。新鲜培养基重悬细胞终浓度为 $2 \times 10^6 \cdot \text{mL}^{-1}$ 的密度, 接种 24 孔板每孔 0.5 mL, 即细胞数量为每孔 1×10^6 。每孔加 500 μL 的样品后培养按给定时间孵育。孵育后离心收集上清作为胞外释放的组胺测定。同时加缓冲液重悬细胞沉淀, 液氮反复冻融, 破碎细胞膜, 离心后上清用来测定胞内释放的组胺。准备好待测样品后, 每孔加入待测样本 50 μL ; 空白孔不加。除空白孔外, 标准品孔和样品孔中每孔加入辣根过氧化物酶 (horseradish peroxidase, HRP) 标记的检测抗体 100 μL , 用封板膜封住反应孔, 37 °C 恒温箱温育 60 min。弃去液体, 吸水纸上拍干, 每孔加满洗涤液 350 μL , 静置 1 min, 甩去洗涤液, 吸水纸上拍干, 如此重复洗板 5 次。每孔加入底物 A、B 各 50 μL , 37 °C 避光孵育 15 min。每孔加入终止液 50 μL , 15 min 内, 在 450 nm 处测定各孔的 OD 值。得到的 OD 值用来计算组胺相对释放量, 即相对组胺释放百分比 = 胞外组胺释放 OD 值 / (胞内组胺释放 OD 值 + 胞外组胺释放 OD 值) $\times 100\%$, 根据相对组胺释放百分比的变化确定阳性剂的具体的反应条件。

2.3 数据分析

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间数据的比较采用 *t* 检验, $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 通过组胺释放量选择阳性剂

分别选文献^[6-8]报道的 3 种致敏阳性剂 C48/80, 羊抗人 IgE 抗体, fMLP 进行 KU812 细胞模型阳性成立条件的摸索。C48/80 存储液浓度为 10 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, 羊抗人 IgE 抗体存储液浓度为 1 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, fMLP 存储液浓度为 1 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。按照 1 : 500 的比例加入得到 C48/80 终浓度为 20 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 羊抗人 IgE 抗体终浓度为 2 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, fMLP 终浓度为 2 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。分别用 3 种阳性剂处理 0.5, 1, 2 h, 比较 3 种阳性剂孵育后对组胺相对表达量变化的影响。在 3 种阳性剂孵育后 0.5 h 后组胺释放无明显的增加。从 1 h 起, 2 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ fMLP 促进组胺释放的百分比增强有显著性差异, 孵育 2 h 时, 2 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 羊抗人 IgE 抗体和 2 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ fMLP 均对细胞组胺的释

放有明显的增强作用。而 $20\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ C48/80 孵育 0.5, 1, 2 h 对细胞组胺释放百分比无显著性增加。因此选择 $2\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ fMLP 孵育时间 2 h 作为模型的阳性成立的反应条件。结果见图 1。

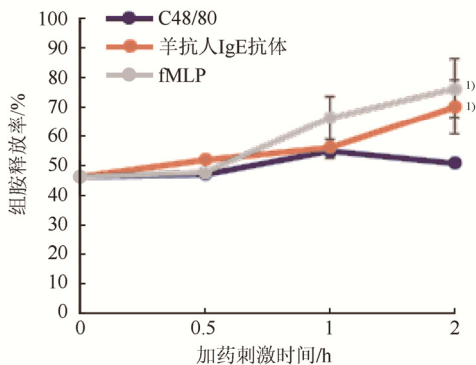


图 1 3 种致敏剂分别在不同时间点的组胺释放百分比 ($\bar{x} \pm s, n=3$) 与刺激前相比, $^{1)}P<0.05$ 。

Fig. 1 Percentages of histamine release with three sensitizers for different incubation time ($\bar{x} \pm s, n=3$) Compared with pre stimulation, $^{1)}P<0.05$.

3.2 确定细胞模型的特异表面标志物

采用流式细胞仪检测的方法对 $20\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ C48/80, $2\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 羊抗人 IgE 抗体, $2\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的 fMLP 孵育 2 h 后的嗜碱性粒细胞 KU812 表面特异性抗原的增强用 PE-Cy7 标记的 CD63 抗体和 BB700 标记的 CD203 抗体进行测定。结果显示, 阳性剂处理 2 h 后, 与对照组相比, C48/80 处理的 CD63 和 CD203 的相对荧光强度均无显著增加; $2\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 羊抗人 IgE 抗体处理的细胞表面标志物 CD63 的相对荧光强度增加, 而 CD203 相对荧光强度不变; 而 $2\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的 fMLP 孵育的细胞表面特异性标志物 CD63 的增强有显著性差异 ($P<0.05$), CD203 表达不变。该结果与组胺相对释放百分比一致, 结果见表 1。因此认为在本系统条件下, CD203 对阳性化合物的激活并不敏感, 不能作为 KU812 细胞体外模型的标志物, 而 CD63 在 fMLP 和羊抗人 IgE 刺激下表达增强, 且与对照组相比有显著性差异, 结果也和组胺释放试验结果一致, 认为 CD63 是很好的可以用来进行过敏试验的细胞模型标志物, 而 fMLP 可作为该系统下的阳性对照。

3.3 确定 KU812 细胞模型 fMLP 阳性剂的孵育时间和孵育浓度

选用 fMLP 刺激下嗜碱粒细胞表面抗原 CD63 作为体外细胞模型的特异标志物, 测定体系最佳的孵育时间以及阳性剂的有效浓度。在 $2\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$

fMLP 剂量下采用 1~5 h 的不同细胞给药时间, CD63 相对荧光强度在 2 h 达到峰值。再以 1, 2, 4, 8, 10 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的不同 fMLP 给药浓度孵育 2 h, 得到表面标志物 CD63 的相对荧光强度在 $2\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 达到峰值, 当浓度 $\geq 4\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时, 无法检测到 CD63 的相对荧光强度的增加。因此, 体外细胞系统采用阳性剂 fMLP 终浓度 $2\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 处理 2 h, 采用 CD63 的相对荧光强度的增加作为试验建立条件。结果见图 2。

表 1 3 种潜在的致敏剂作用在 KU812 细胞模型上的 CD63 和 CD203 2 种表面标志物相对荧光强度 ($n=3$)

Tab. 1 Relative fluorescence intensity(RFI) of two surface markers CD63 and CD203 on KU812 cell model stimulated by three potential sensitizers ($n=3$)

受试物种类	CD63MFI	CD203MFI	CD63RFI	P 值	CD203 RFI	P 值
对照	159.6	138.8	1	—	1	—
C48/80	144.3	131.7	0.93	0.165	0.90	0.236
羊抗人 IgE 抗体	181.8	125.2	1.13	0.141	0.76	0.053
fMLP	207.4	131.6	1.28	0.003	0.82	0.084

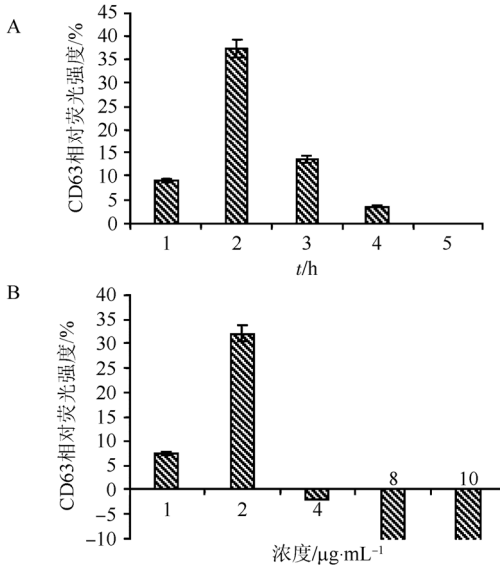


图 2 fMLP 阳性剂处理细胞模型不同时间点及不同剂量下的 CD63 相对荧光强度 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

A—采用不同的给药时间点 fMLP 孵育检测嗜碱性粒细胞模型表面标志物相对荧光强度; B—采用不同的 fMLP 的给药浓度孵育 2 h 检测细胞模型表面标志物的相对荧光强度。

Fig. 2 Relative fluorescence intensity of CD63 on KU812 cell model stimulated treated with fMLP by different time point and different dose ($\bar{x} \pm s, n=3$)

A—relative fluorescence intensity of surface markers of KU812 cell model by incubation with fMLP was detected at different time points; B—relative fluorescence intensity of surface markers of cell model by incubation with fMLP was detected at different concentration for 2 h.

3.4 嗜碱性粒细胞激活试验流程

根据“3.1”至“3.3”项下的试验结果, 选择 KU812 人源嗜碱性粒细胞模型进行试验, 首先通

过组胺胞外释放的测定筛选文献报道的 3 种 I 型变态反应的阳性剂 C48/80, 羊抗人 IgE 抗体, fMLP 中有效的阳性物质, 最终确定 fMLP 作为体系的阳性对照。再通过流式细胞仪检测筛选有效的表面特异标志物 CD63 和 CD203, 根据试验结果确定 CD63 为体系有效的表面特异标志物。通过在流式细胞仪体系上对 fMLP 孵育不同时间梯度和浓度梯度的比较, 找到以 $2 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ fMLP 作用靶细胞 2 h 为体系的最佳反应条件。结果见图 3。

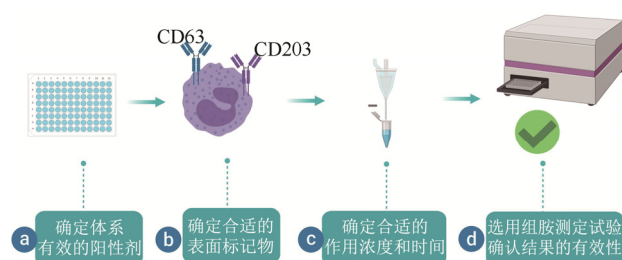


图 3 嗜碱性粒细胞激活试验建立的操作流程

Fig. 3 Procedure of establishment of human basophil activation test

4 讨论

当前国内过敏试验的评价仍以传统的动物试验来进行。如豚鼠最大值方法具有使用动物多, 每批至少需要 10 只豚鼠、周期长(一般至少需要 35 d)、评价主观(以动物咳嗽、呼吸急促等等症状作为指标观察)、灵敏度低等缺点, 假阴性反应时有发生。而目前国际倡导 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^[9-13], 本研究利用 I 型变态反应的原理, 以人源嗜碱性粒细胞为靶细胞, 建立体外过敏反应细胞模型。

fMLP 是一个 N-甲酰基-L-甲硫氨酸-L-亮氨酸-L-苯丙氨酸构成的三肽, 有文献报道它可以引起嗜碱性粒细胞的活化^[14-15], 本研究选用低浓度 ($2 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) 的 fMLP 暴露 2 h。结果发现, 该浓度下可以有效地在流式细胞仪上检测到嗜碱性粒细胞表面特异性标志物 CD63 相对荧光强度的增加, 而 CD203 虽然有报道也可以作为嗜碱性粒细胞的表面标志物, 但有报道 CD203 对部分阳性剂是无效的, 在本系统里通过验证用 $2 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的 fMLP 刺激也是不灵敏的, 因此没有选用 CD203 作为系统的特异性表面标志物。

综上, fMLP 诱导的人源嗜碱性粒细胞 KU812

细胞可以作为一种有效的过敏性细胞模型, 且组胺胞外释放的测定进一步验证了模型的有效性。CD63 的相对荧光强度的变化指标可以用于流式细胞仪检测受试物潜在的致敏性。

REFERENCES

- [1] NOAH W P, RACHEL K R, RUSLAN M. Allergic host defenses [J]. *Nature*, 2012, 484(7395): 465-472.
- [2] CHANDRA R K. Food hypersensitivity and allergic diseases [J]. *Eur J Clin Nutr*, 2002, 56(S3): S54-S56.
- [3] HOFFMANN H J, SANTOS A F, MAYORGA C, et al. The clinical utility of basophil activation testing in diagnosis and monitoring of allergic disease [J]. *Allergy*, 2015, 70(11): 1393-1405.
- [4] SANTOS A F, SHREFFLER W G. Road map for the clinical application of the basophil activation test in food allergy [J]. *Clin Exp Allergy*, 2017, 47(9): 1115-1124.
- [5] SANTOS A F, COUTO-FRANCISCO N, BÉCARES N, et al. A novel human mast cell activation test for peanut allergy [J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2018, 142(2): 689-691.
- [6] EBO D G, HAGENDORENS M M, BRIDTS C H, et al. Flow cytometric analysis of *in vitro* activated basophils, specific IgE and skin tests in the diagnosis of pollen-associated food allergy [J]. *Cytometry B Clin Cytom*, 2005, 64(1): 28-33.
- [7] SANTOS A F, BROUGH H A. Making the most of *in vitro* tests to diagnose food allergy [J]. *J Allergy Clin Immunol Pract*, 2017, 5(2): 237-248.
- [8] CHIRUMBOLO S, VELLA A, ORTOLANI R, et al. Differential response of human basophil activation markers: a multi-parameter flow cytometry approach [J]. *Clin Mol Allergy*, 2008, 6: 12. Doi: 10.1186/1476-7961-6-12.
- [9] ZHAO H C, DAN M, LIU L, et al. Evaluation method of photosensitivity and the research progress on *in vitro* alternative methods [J]. *Chin J New Drugs(中国新药杂志)*, 2017, 26(21): 2510-2515.
- [10] SANG J, CHEN S H, MENG H, et al. Study on the application of *in vitro* human cell line activation test with Chinese medicine injection [J]. *Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学)*, 2018, 35(7): 975-979.
- [11] HOFFMANN H J, BØGEBJERG M, NIELSEN L P, et al. Lysis with Saponin improves detection of the response through CD203c and CD63 in the basophil activation test after crosslinking of the high affinity IgE receptor FcεRI [J]. *Clin Mol Allergy*, 2005, 3: 10. Doi: 10.1186/1476-7961-3-10.
- [12] HAUSMANN O V, GENTINETTA T, BRIDTS C H, et al. The basophil activation test in immediate-type drug allergy [J]. *Immunol Allergy Clin North Am*, 2009, 29(3): 555-566.
- [13] SANTOS A F, JAMES L K, BAHNSON H T, et al. IgG4 inhibits peanut-induced basophil and mast cell activation in peanut-tolerant children sensitized to peanut major allergens [J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2015, 135(5): 1249-1256.
- [14] ALEXANDRA F S, NATÁLIA C F, NATÁLIA B, et al. A novel human mast cell activation test for peanut allergy [J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2018, 142(2): 689-691.
- [15] THYAGARAJAN A, JONES S M, CALATRONI A, et al. Evidence of pathway-specific basophil anergy induced by peanut oral immunotherapy in peanut-allergic children [J]. *Clin Exp Allergy*, 2012, 42(8): 1197-1205.

收稿日期: 2019-05-07

(本文责编: 李艳芳)