

青霉噻唑蛋白致敏大鼠肥大细胞脱颗粒及组胺释放的变化

赵振军、马统勋 (河南医科大学药理教研室, 郑州 450052)

提要 青霉噻唑(BPO)蛋白致敏大鼠过敏休克发生率与死亡率分别为100和40%, 颅骨骨膜和腹腔肥大细胞脱粒率分别为 91 ± 5 和 $44 \pm 10\%$, 腹腔肥大细胞组胺释放率为 $13 \pm 2\%$, P 均 <0.01 。表明BPO-蛋白与青霉素过敏休克发生有密切关系。

关键词 青霉素G; 青霉噻唑蛋白; 免疫法; 肥大细胞; 组胺

青霉素在抗生素中毒性最小而过敏反应发生率却最高⁽¹⁾, 其中过敏休克更为严重, 仍为国内外十分重视而长期未获解决的问题。一般认为青霉素杂质及其降解产物是过敏反应的过敏原^(2,3), 其中青霉噻唑基(penicilloyl, BPO)为其主要抗原决定簇, 与蛋白结合后具有抗原性, 致敏豚鼠实验证明, BPO蛋白与过敏休克发生有重要关系⁽⁴⁾。为进一步探讨青霉素过敏

休克发生机理, 本文对BPO-蛋白致敏大鼠过敏休克的发生、肥大细胞脱颗粒、组胺释放等进行了研究。

Materials

青霉素G钾盐, 华北制药厂; 牛血清白蛋白(BSA), 美国Sigma公司; 人血清白蛋白(HSA), 北京生物制品研究所; 邻苯二甲醌(OPT), 瑞士产, GR; BPO-蛋白结合物, 参照青霉素抗原合成法^(5,6)由本室合成, 纯度为BPO₁₇-BSA, BPO₁₆-HSA; 荧光分光光度计, 日立MPF-4型; 冷冻干燥机, 英国Edwards。Wister大鼠、豚鼠为本校动物繁殖厂提供。

Methods and results

致敏大鼠及抗血清制备 采用多途径致敏

法⁽⁷⁾，取大鼠 40 只，体重 $210 \pm \text{SD } 37 \text{ g}$ ，♀♂兼用，分两次进行实验，均分为致敏组和对照组。致敏组 d1 每只分别 im 抗原混合液 (BPO-BSA 5 mg + Al(OH)₃ 5 mg/ml) 0.6 ml，4 脚掌各 sc 0.1 ml，同时 ip 56℃ 灭活百日咳疫苗 200 亿个；d5 im 上述等量抗原混合液，ip 0.4 ml，加强致敏；d13 取致敏和对照组大鼠各 10 只 iv BPO-HSA 2 mg/ml 进行攻击，其余大鼠颈动脉放血制备血清。

致敏大鼠过敏休克模型的观察 取上述致敏大鼠两次共 10 只，经 iv 抗原攻击后，均立即出现不安，继而静卧，四肢松弛，反应迟钝，呼吸缓慢，血压逐渐下降，其中 4 只分别在攻击后 20 min，2，3，5 h 死亡，血压即降为 0，未死者约在 30 min 降至最低点，血压平均为 $6.1 \pm 1.3 \text{ kPa}$ ($45 \pm 10 \text{ mm Hg}$)，较基础血压 $15.5 \pm 1.1 \text{ kPa}$ ($116 \pm 8 \text{ mm Hg}$) 下降 $10.0 \pm 1.7 \text{ kPa}$ ($75 \pm 13 \text{ mm Hg}$)，随后逐渐回升，约在 4 h 恢复。死后剖检。心脏停止于舒张期，肠系膜毛细血管扩张充血，组织学镜检可见心肌血管、肺血管和肝中央静脉扩张充血，肺泡壁明显充血水肿等休克的病理变化，休克率与死亡率分别为 100% (10/10) 和 40% (4/10)，对照组大鼠攻击后均无任何反应，血压在正常范围。

被动致敏大鼠颅骨骨膜肥大细胞脱颗粒试验 大鼠 10 只，♂，体重 $200 \pm 35 \text{ g}$ ，均分为致敏组和对照组，分别头部 sc 致敏和正常大鼠血清原液 0.1 ml，24 h 后 iv 溶于 0.5% Evans 蓝的 BPO-HSA 2 mg/ml 进行攻击，30 min 后断头处死大鼠，制片镜检可见对照大鼠颅骨骨膜肥大细胞大部分完整，颗粒分布均匀，脱粒率为 $11 \pm 5\%$ ，而致敏组肥大细胞多数体积增大，胞膜边缘不完整，颗粒脱出胞外，脱粒率为 $91 \pm 5\%$ (Fig 1, Plate 2, Tab 1)。两组结果有极显著差异 ($P < 0.01$)。同时也观察到致敏组大鼠头部皮下均由蓝斑覆盖，而对照组则无蓝斑覆盖，结果表明，BPO-HSA 可诱发致敏大鼠颅骨骨膜肥大细胞

Tab 1. Degranulation and histamine release from passively sensitized rat peritoneal and cranial periosteous mast cells. n=5 expts, $\bar{x} \pm \text{SD}$. * $P < 0.01$**

	Control	Sensitized
Peritoneal		
Degranulation	6 ± 2	$44 \pm 10^{***}$
Histamine release	3.0 ± 0.4	$13 \pm 2^{***}$
Cranial periosteous		
Degranulation	11 ± 5	$91 \pm 5^{***}$

脱颗粒。

被动致敏大鼠腹腔肥大细胞脱颗粒及组胺释放的测定 参照腹腔肥大细胞脱颗粒和组胺荧光测定法^(8,9)，并略加改进。取大鼠 12 只，体重 $215 \pm 30 \text{ g}$ ，收集腹腔肥大细胞液，分别加致敏和正常大鼠血清原液作为致敏组和对照组，经 37℃ 孵育、离心后，各加 BPO-HSA 抗原攻击，孵育后取一滴染色并镜检肥大细胞，其余离心，留上清液，另于肥大细胞收集液中加三蒸水煮沸，留上清液，分别取两组上清液不经正丁醇提取，直接测定荧光读数，并计算组胺释放%。共进行 6 次实验，实验证明，对照组肥大细胞经抗原攻击后大多数胞膜仍完好无损，脱粒率为 $6 \pm 2\%$ ，致敏组肥大细胞经抗原攻击后部分胞膜缺损，颗粒脱出胞外，脱粒率为 $44 \pm 10\%$ (Tab 1)。两组结果有极显著差异 ($P < 0.01$)，致敏组和对照组肥大细胞经抗原攻击后组胺释放率分别为 13 ± 2 和 $3.0 \pm 0.4\%$ ，有极显著差异 ($P < 0.01$, Tab 1)。结果表明，BPO-HSA 抗原可诱发大鼠腹腔肥大细胞脱颗粒及组胺释放，两者有很好的相关性，脱粒率越高，过敏介质释放越多。

致敏大鼠血清抗体滴度测定 用被动致敏皮肤过敏反应 (PCA) 进行测定⁽⁴⁾。取大鼠 18 只，体重 $240 \pm 38 \text{ g}$ ，每次 3 只，重复进行 6 次。抗原攻击后 30 min 击毙大鼠，剪下背部皮肤，测皮下蓝斑直径。实验证明，致敏大鼠血清抗体滴度在 16-32 之间，正常大鼠血清抗体滴度为 0。致敏大鼠血清经 56℃ 灭活 1 h，并用正常大鼠血清作对照做同种动物 PCA 实

验6次,血清抗体滴度均为0。用异种动物豚鼠做6次PCA实验,证明致敏大鼠血清抗体滴度均为0,结果表明,致敏大鼠血清中有抗BPO抗体,经抗原攻击后可诱发同种动物PCA反应,此抗体具有不耐热特性,属IgE抗体,并有种属特异性,对异种动物豚鼠均呈阴性反应。

Discussion

本文证明BPO-蛋白有较强的致敏性,为青霉素过敏休克的重要抗原之一,可致敏大鼠并可诱发典型过敏休克反应。致敏大鼠血清中有抗BPO抗体,属IgE抗体。大鼠颅骨骨膜和腹腔肥大细胞被动致敏经抗原攻击后脱粒率及组胺释放量均明显增加,这可能与过敏休克发生有关。本文结果还表明,大鼠青霉素过敏休克症状与豚鼠不同,豚鼠发生迅速,死亡较快⁽⁴⁾,大鼠发生发展缓慢,与文献(10)报道一致。

组胺为速发型过敏休克反应中一种重要介质,组胺的荧光测定仍为目前较先进的方法,一般均需正丁醇提取纯化⁽¹¹⁾,本文根据荧光测定法⁽⁹⁾略去了正丁醇提取过程,发现用与不用该过程结果一致,略去该过程可简化操作步骤,比国内近年来采用的方法⁽¹²⁾具有优点。

肥大细胞脱颗粒方法应用较广泛,本文采用腹腔和颅骨骨膜两种肥大细胞进行实验,结果表明颅骨骨膜肥大细胞脱颗粒法具有明显优点,细胞局限在局部,颗粒脱出在细胞周围,易于辨认,灵敏度高,可测皮下蓝斑,标本还可长期保存,还需指出,本文腹腔肥大细胞脱粒率较本室过去报道⁽⁴⁾为低,这可能与室温条件有关。本文是在10℃左右进行,而过去是在25℃左右,对结果可能产生一定影响,应引起注意。

References

1 Idsore O, Guthe T, Willoox RR, de Weck

- AL. Nature and extent of penicillin side-reactions, with particular reference to fatalities from anaphylactic shock. *Bull WHO* 1968; 38 : 159
- 2 Batchelor FR, Dewdney JM, Feinbery JG, Weston RD. A penicilloylated protein impurity as a source of allergy to benzyl penicillin and 6-aminopenicillanic acid. *Lancet* 1967; 1 : 1175
- 3 赵建西、汪开敏、孙学兰. 青霉素过敏反应的研究 I. 青霉素中高分子杂质的分离和本质的研究. *药物分析杂志* 1981; 1 : 1
- 4 段民江、马统勋、张启堂、鲍梦周、岳景丽. 青霉素过敏休克机制的初步研究. *药学通报* 1981; 16 : 7
- 5 Batchelor FR, Dewdney JM, Weston RD, Wheeler AW. The immunogenicity of cephalosporin derivatives and their cross-reaction with penicillin. *Immunology* 1966; 10 : 21
- 6 de Weck AL, Schneider CH. Immune and non-immune responses to monovalent low molecular weight penicilloyl-polylysines and penicilloyl-bacitracin in rabbits and guinea pigs. *Ibid* 1968; 14 : 457
- 7 Shiho O, Tsuchiya K. IgE antibodies for penicillins and cephalosporins in rats. I. Characteristics of the IgE antibodies for penicillins and cephalosporins in rats. *J Antibiot* 1981; 34 : 72
- 8 Chand N, Pillar J, Diamantis W, Sofia RD. Inhibition of IgE-mediated allergic histamine release from rat peritoneal mast cells by azelastine and selected antiallergic drugs. *Agents Actions* 1985; 16 : 318
- 9 Rönnerberg AL, Håkanson R. A simplified procedure for the fluorometric determination of histamine in rat stomach. *Ibid* 1984; 14 : 195
- 10 尤家驛、罗涵. 休克动物实验模型复制. 见: 潘世成、罗正曜, 主编. 休克. 第1版. 北京: 人民卫生出版社, 1982 : 491-513
- 11 Yamatodani A, Watanabe T, Wada H. Methods for determination of histamine in biological materials. In: Parvez S, ed. *Methods in biogenic amine research*; vol 28. Amsterdam: Elsevier, 1983 : 664-87
- 12 杜敏琼、戴静芝、张君伟、卢艳萍、潘咸新. 过敏反应中肥大细胞的脱颗粒和微量组胺释放的测试. *医药工业* 1985; 16 : 361

Changes in degranulation and histamine release from mast cells in rats sensitized by penicilloyl-protein

ZHAO Zhen-Jun, MA Tong-Xun

(Department of Pharmacology, Henan Medical University, Zhengzhou 450052)

ABSTRACT In this paper, the mechanism of the penicillin G anaphylactic reaction was studied. Rats were sensitized to penicilloyl (BPO)-protein. The incidences of anaphylactic reaction and death were 100 and 40%, respectively. After being challenged, the degranulation rates of rat cranial periosteous and peritoneal mast cells were 91 ± 5 and $44 \pm 10\%$, respectively. In the control group, they were 11 ± 5 and

$7 \pm 2\%$, respectively. The histamine release rates from sensitized and control rat peritoneal mast cells were 13 ± 2 and $3.0 \pm 0.4\%$, respectively. The passive cutaneous anaphylaxis (PCA) test demonstrated that the antibody titers in sensitized serum were 16-32.

KEY WORDS penicillin G; penicilloyl-protein; immunization; mast cells; histamine

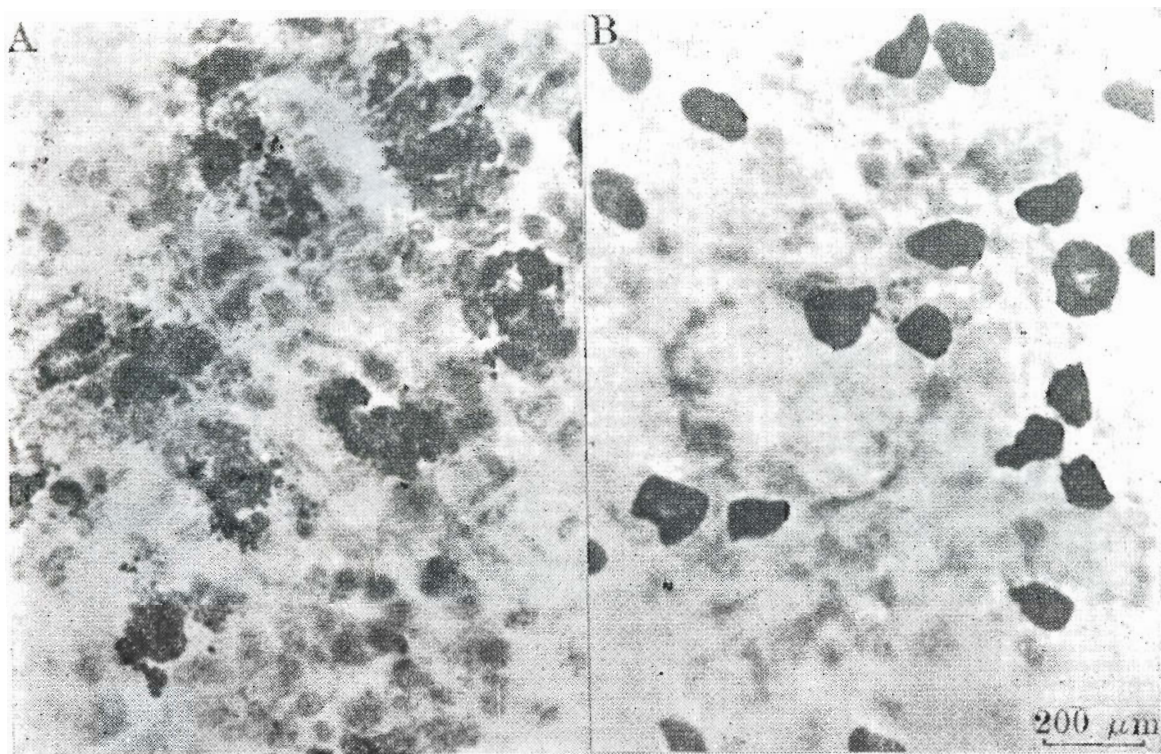


Fig 1. Rat cranial periosteal mast cells in sensitized (A) and control groups (B) ($\times 400$)

(See p 79)