

李恩灿,范潇予,林琳,等. 5-羟甲基糠醛及其二聚体 OMBF 引发 I 型超敏反应毒性评价与机制初探 [J]. 中国比较医学杂志, 2020, 30(2): 1-8.

Li EC, Fan XY, Lin L, et al. Toxicity evaluation and mechanism of type I hypersensitivity induced by 5-hydroxymethylfurfural and its dimer OMBF [J]. Chin J Comp Med, 2020, 30(2): 1-8.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2020.02.001

5-羟甲基糠醛及其二聚体 OMBF 引发 I 型超敏反应 毒性评价与机制初探

李恩灿¹, 范潇予¹, 林琳¹, 郝瑞瑞¹, 林生², 贺玖明², 靳洪涛^{1,3*}

(1. 中国医学科学院, 北京协和医学院药物研究所, 新药安全评价研究中心, 北京 100050;

2. 中国医学科学院, 北京协和医学院药物研究所, 天然药物活性物质与功能国家重点实验室, 北京 100050;

3. 北京协和建昊医药技术开发有限责任公司, 北京 100176)

【摘要】 目的 对 5-羟甲基糠醛及其二聚体 OMBF 是否引发 I 型超敏反应进行评价, 并初步探索其作用机制。方法 分为体内实验和体外实验。体内实验选取雄性 BN 大鼠, 随机分为 7 组: 生理盐水对照组 (NS), 佐剂对照组 (Adj.), 模型组, 5-HMF 低、高剂量组, OMBF 低、高剂量组。各组大鼠分别给予生理盐水、佐剂或相应浓度的药物佐剂混悬液, 30 min 后腹主动脉采血, 测定血清中 IgE、IgG 和 IL-4 含量。体外实验采用 RBL-2H3 细胞系, 分组同体内实验。采用甲苯胺蓝染色观察给药前后细胞脱颗粒情况; 测定药物作用后细胞上清中 β -HEX、His 的释放率。通过 Western blot 技术初步探索 5-HMF 及其二聚体 OMBF 诱导 I 型超敏反应的作用机制。结果 体内实验显示, 血清中各指标除 5-HMF 低剂量作用下 IgG 未见明显差异外, 其余均显著性升高。体外实验研究表明, 低、高剂量组均出现了细胞脱颗粒现象, 测定的 β -HEX 和 His 释放量均出现了不同程度的升高。结论 5-HMF 及其二聚体 OMBF 作为小分子过敏原可诱导 I 型超敏反应的发生, 且发挥免疫毒性可能与 MAPK 家族磷酸化蛋白的上调水平有关。

【关键词】 I 型超敏反应; 5-HMF; OMBF; BN 大鼠; RBL-2H3 细胞

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2020) 02-0001-08

Toxicity evaluation and mechanism of type I hypersensitivity induced by 5-hydroxymethylfurfural and its dimer OMBF

LI Encan¹, FAN Xiaoyu¹, LIN Lin¹, HAO Ruirui¹, LIN Sheng², HE Jiuming², JIN Hongtao^{1,3*}

(1. New Drug Safety Evaluation Center, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100050, China.

2. State Key Laboratory of Bioactive Substance and Function of Natural Medicines, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical, Beijing 100050. 3. Beijing Union-Genius Pharmaceutical Technology Co., Ltd, Beijing 100176)

【Abstract】 **Objective** We aimed to evaluate the immunotoxicity of type I hypersensitivity reaction of 5-hydroxymethylfurfural (5-HMF, $C_5H_6O_3$) and its dimer 5,5'-dimethyl oxide (2-furfural) (OMBF, $C_{12}H_{10}O_5$) *in vivo* and *in vitro* and to explore the mechanisms of action. **Methods** The *in vivo* experiments were performed on male Brown Norway (BN) rats, which were randomly divided into seven groups before a week of environmental adaptation. The groups were

【基金项目】 国家自然科学基金资助项目 (81773996); 北京协和医学院“协和青年科研基金”资助项目 (3332015135); 重大新药创制基金 (2018ZX09201-017-005; 2018ZX09711-001-002-001)。

【作者简介】 李恩灿 (1993—), 女, 在读硕士研究生, 研究方向: 药物毒理作用机制。E-mail: liencan@imm.ac.cn

【通信作者】 靳洪涛 (1976—), 男, 研究员, 硕士生导师, 研究方向: 药物毒性机制与毒害干预研究。E-mail: jinhongtao@imm.ac.cn

saline control (NS), adjuvant control (Adj.), model group (Model), low dose of 5-HMF (5-HMF-L) and high dose of 5-HMF (5-HMF-H), low dose of OMBF (OMBF-L) and high dose of OMBF (OMBF-H). BN rats in each group were given saline, adjuvant or adjuvant suspension of the corresponding concentration of drug, respectively. After 30 minutes reaction, blood was collected from the abdominal aorta, and the concentrations of IgE, IgG and IL-4 in the serum were determined by enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). Rat basophil leukemia (RBL)-2H3 cells were used for the *in vitro* experiments. Cells were randomly divided into seven groups, as per the animal experiments. The degranulation of cells was observed by toluidine blue staining before and after administration of different concentrations of drug. The release rates of β -hexosaminidase (β -HEX) and histamine (His) in the supernatant of the cells were determined by chemiluminescence after drug administration. The mechanism of 5-HMF and its dimer OMBF-induced type I hypersensitivity was explored by Western blot analysis. **Results** Type I hypersensitivity can be induced by 5-HMF and its dimer OMBF at both low and high doses. The *in vivo* experiments demonstrated that there existed significant differences between the NS and all other groups in IgE, IgG and IL-4 in the serum, except IgG in the low dose 5-HMF group. *In vitro* experimental studies indicated that both the low and high dose groups showed cell degranulation, and the indicators measured showed different degrees of increase. The toluidine blue staining result showed that the degranulation of RBL-2H3 cells under the high dose of OMBF was more severe. The result of the β -HEX assay showed that the release rate of β -HEX from the supernatant of the high-dose OMBF group was higher than that of 5-HMF. The release rate of His was significantly increased when compared with the blank groups, but showed no major differences among the drug-administered groups. From the result of mitogen-activated protein kinase (MAPK) family phosphorylation levels, OMBF can promote the phosphorylation of MAPK more dramatically when compared with 5-HMF, especially in the expression of p-p38. These findings indicated that the immunotoxicity of OMBF was higher than that of 5-HMF. **Conclusions** Through *in vitro* and *in vivo* experimental models, we found that both 5-HMF and OMBF can induce type I hypersensitivity reactions as small molecule allergens. The levels of phosphorylated MAPKs were up-regulated, indicating that the immunotoxicity of 5-HMF and OMBF might be related to MAPK family proteins.

【Keywords】 type I hypersensitivity; 5-HMF; OMBF; BN rats; RBL-2H3 cells

I 型超敏反应又称速发型超敏反应(immediate hypersensitivity),主要由特异性 IgE 抗体介导,高亲和力的 IgE 受体(Fc ϵ RI)是反应发生的重要膜分子,其中肥大细胞和嗜碱性粒细胞表面含有大量的 Fc ϵ RI^[1]。I 型超敏反应通常包含两个阶段,即致敏阶段和激发阶段。当抗原初次进入机体后,初次应答产生的 IgE 抗体与细胞膜表面 Fc ϵ RI 高亲和力的结合,使细胞处于致敏阶段。当相同的抗原再次入侵时,与细胞膜上的 IgE 抗体结合,致使相邻的 Fc ϵ RI 发生桥连,从而触发细胞内一系列的生物化学反应^[1]。

5-羟甲基糠醛(5-HMF, C₃H₆O₃)是由一个呋喃环组成的小分子化合物,六碳糖在高温的条件下发生美拉德反应可生成 5-HMF^[2-3]。5-HMF 通常被认为是高温灭菌过程中产生的副产物^[4],存在于各种含糖类的食品和药物制剂中。此外,5-HMF 在高温下易通过聚合反应生成其二聚体产物,即双(5-甲酰基糠醛)醚(OMBF)。本实验室前期通过报告抗原胸腺淋巴结合试验(RA-PLNA)证实,5-HMF 和 OMBF 可诱导小鼠发生免疫反应^[5]。基于先前关于 5-HMF 和 OMBF 的研究,本研究将进一步对 5-HMF

及 OMBF 的免疫毒性进行评价并初步探讨其可能的作用机制。

1 材料和方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验动物

无特定病原体(SPF)级的 6 周龄雄性 Brown Norway(BN)大鼠 21 只,(170 ± 20)g,购自维通利华生物技术公司[SCXK(京)2016-0006]。将其随机分为不同的给药组及对照组。在实验之前,使大鼠在含有玉米芯的聚碳酸酯笼中适应环境一周,并且可以自由获取通过反渗透系统净化的水和实验室动物饲料,环境温度为(23 ± 2)℃,相对湿度为(50 ± 5)%,12 h 光照/黑暗循环。动物饲养于北京协和建昊医药技术开发有限责任公司动物中心[SYXK(京)2015-0021],该设施已经通过 AAALAC 认证。动物处理程序经北京协和建昊医药技术开发有限责任公司实验动物伦理委员会批准,伦理委员会批准文号:2018-002(研)。实验期间按实验动物使用的 3R 原则给予人道主义关怀。

1.1.2 细胞系

大鼠嗜碱性白血病细胞系 (RBL-2H3) 购自中国科学院上海生命科学研究院细胞资源中心

1.2 主要试剂与仪器

卵清白蛋白、弗氏不完全佐剂、弗氏完全佐剂、5-HMF (CAS:67-47-0; 纯度:99%)、4-硝基苯-N-乙酰基- β -D-氨基糖苷酶、1,2-苯二甲醇 (CAS:612-14-6; 纯度:97%)、Anti-DNP-IgE、DNP-HSA、二甲基亚砜 (DMSO, 细胞培养级) 均购自 Sigma-Aldrich 公司 (美国); MEM/DMEM 培养基、谷氨酰胺、非必须氨基酸、丙酮酸钠、胰酶溶液 0.25%、胎牛血清、PBS 均购自 Thermo Fisher 公司 (美国); 甲醇、二甲苯、乙醇、盐酸 (36%~38%)、氢氧化钠 ($\geq 99.8\%$)、碳酸氢钠 ($\geq 99.8\%$)、碳酸钠 ($\geq 99.8\%$)、柠檬酸 ($\geq 99.8\%$)、柠檬酸钠 ($\geq 99.8\%$) 均购自北京化工厂 (中国); ELISA 试剂盒包括大鼠 IgE、IgG、白细胞介素-4 (IL-4)、C5b-9、谷胱甘肽过氧化物酶-1 (Gpx-1) 等指标均购自深圳达科为有限公司 (深圳); Western blot 所用抗体购自 Cell Signaling Technology (美国); PierceTM BCA 蛋白检测试剂盒等其他 Western blot 相关试剂均来源于 Thermo Fisher 公司 (美国)。

1.3 实验方法

1.3.1 细胞培养

大鼠嗜碱性白血病细胞系 (RBL-2H3) 培养在 10% 胎牛血清的 MEM 培养基中, 加入 100 U/mL 青霉素, 100 U/mL 链霉素。将细胞在 37°C, 5% CO₂ 的条件下在培养箱中培养。

1.3.2 OMBF 的制备

使用 Larousse 概述的程序^[6]制备 OMBF, 纯度大于 98%, 采用高效液相色谱法进行检测。OMBF: m.p. 110°C~112°C; ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ : 9.66 (2 H, s, 2CH=O), 7.26 (2H, d, $J=3.5$ Hz), 6.61 (2 H, d, $J=3.5$ Hz), 4.65 (4 H, s, -CH₂OCH₂-); ESIMS m/z 235 [M+H]⁺。OMBF 的制备与鉴定由中国医学科学院药物研究所林生研究员课题组完成。

1.3.3 剂量选择

根据中国药典, 5% 葡萄糖注射液中 5-HMF 含量不应超过 11.8 $\mu\text{g/mL}$ ^[7]。根据每天最大输注量为 2000 mL, 5% 葡萄糖注射液中 5-HMF 的限量为每人每天 23.6 mg。使用体表面积系数公式将人体数据转换为大鼠, 大鼠的等效剂量为 2.5 mg/kg。在前期实验的基础上, 本研究选择 5 mg/kg 为低剂量, 25

mg/kg 为高剂量进行动物实验。

细胞实验根据 MTT 实验结果 (数据未展示), 本研究选择 0.0502 mM、0.502 mM 为 5-HMF 的低、高剂量, 表示为 5-HMF-L、5-HMF-H; 0.0338 mM、0.338 mM 为 OMBF 的低、高剂量, 表示为 OMBF-L、OMBF-H。选择作用时长为 1 h, 在该时间范围内, 细胞存活率与正常未加药组无显著性差异。

1.3.4 I 型超敏反应体内实验设计

将 21 只 SPF 雄性 BN 大鼠随机按体重分为 7 组, 分别为生理盐水对照组 (NS), 佐剂对照组 (Adj.), 卵清白蛋白组 (Model), 5-HMF-L, 5-HMF-H, OMBF-L 和 OMBF-H。在适应环境一周后, 于第 1 天、第 3 天和第 5 天, 给药组每天一次尾静脉注射药物, 使动物致敏。于第 19 天, 腹主动脉采血, 离心取血清, 测定各项指标。对照组给予 0.9% 生理盐水, 使用弗氏完全佐剂 (FCA) 对给药组 BN 大鼠进行第一次致敏和刺激, 使用弗氏不完全佐剂 (FICA) 进行第二次和第三次致敏。阳性药组大鼠给予 5% 卵清白蛋白溶液 (致敏浓度 2.5 mL/kg) 致敏。给药组将相应浓度的 5-HMF 和 OMBF 溶液与等体积的佐剂混合并尾静脉给药, 激发剂量是致敏剂量的两倍。

给药 30 min 后用 1% 戊巴比妥钠溶液麻醉大鼠, 腹主动脉采血并收集到含有凝血剂的冷冻管中。2500 r/min, 4°C 离心 10 min, 分离血清, -20°C 保存, 一个月内进行 ELISA 检测。

1.3.5 I 型超敏反应体外实验设计

大鼠含药血清的制备与 I 型超敏反应体内实验前期步骤相同, 但是没有经过激发直接腹主动脉采集血清, 并用 ELISA 试剂盒检测 IgE 浓度。

取 RBL-2H3 对数生长期的细胞, 每毫升 1×10^5 个, 接种到 24 孔板内。5% CO₂, 37°C 孵化后, 随机分为空白对照组, 佐剂对照组, 裂解组, 模型组 (Anti-IgE-DNP 为抗体, 以 DNP-BSA 为抗原), 5-HMF 组 (低、高), OMBF 组 (低、高)。待细胞贴壁后, 吸弃各组培养基, 用相应的培养基稀释 4 倍的致敏血清刺激细胞 24 h, 使细胞处于致敏状态, 模型组用 750 ng/mL 的 Anti-DNP-IgE 致敏。24 h 后用改良台式液清洗两遍, 加入改良台式液配置的不同浓度的药物, 模型组加入 1 $\mu\text{g/mL}$ 的 DNP-BSA 200 μL , 正常组加入 200 μL 改良台式液, 裂解组加入 200 μL 浓度为 1% 的 Tritonx-100。在 37°C, 5% CO₂ 条件下刺激 1 h, 取细胞上清。将细胞上清液和裂解液储存在 -20°C 下以用于后期实验指标的

测定。

1.3.6 甲苯胺蓝染色

取对数生长期 RBL-2H3 细胞,调整细胞密度至每毫升 1×10^5 个,均匀铺在含有细胞爬片的 6 孔板内。待细胞贴壁后,将培养基配置的 750 ng/mL 的 Anti-DNP-IgE 孵育模型组细胞,佐剂对照组及各给药组分别加入培养基稀释 4 倍的血清孵育。24 h 后用 1 mL 改良台式液洗涤两遍以清除残存培养基。后分别加入改良台式液配置的含有相应浓度药物的溶液 200 μ L,对照组用相同量的改良台式液替换,模型组加入 200 μ L DNP-BSA (1 μ g/mL),刺激 1 h 后,冰浴使反应停止后,取出细胞爬片,立即置于 95%乙醇中,细胞固定后取出细胞爬片滴入甲苯胺蓝染色溶液进行染色。在显微镜下观察细胞脱颗粒形态并拍照。

1.3.7 β -氨基糖苷酶(β -HEX)释放率的测定

在普通 96 孔板中,取 50 μ L 各组别细胞上清,每组 3 个复孔,每孔加入 100 μ L 酶底物,37 $^{\circ}$ C 恒温孵育箱中孵育 45 min,后加入终止液($\text{NaHCO}_3/\text{Na}_2\text{CO}_3$)200 μ L 中止反应。使用酶标仪(DIALAB GmbH, Vienna, Austria)在 405 nm 的波长下测量光密度(OD)。 β -氨基糖苷酶释放率(%)=(给药组 OD-空白对照组 OD)/(裂解组 OD-空白对照组 OD) $\times 100\%$ 。

1.3.8 组胺(His)释放率测定

在全黑 96 孔板中,取 100 μ L 各组别细胞上清,每组 3 个复孔,每孔加入 20 μ L NaOH 溶液,20 μ L 组胺底物,37 $^{\circ}$ C 恒温孵育箱中孵育 15 min,加入终止液 3% HCl 溶液 20 μ L 中止反应。使用酶标仪(DIALAB GmbH, Vienna, Austria)在 Ex/Em = 460/350 nm 的波长下测量荧光强度。组胺释放率(%)=(给药组荧光强度-空白对照组荧光强度)/(裂解组荧光强度-空白对照组荧光强度) $\times 100\%$ 。

1.3.9 Western blot

选取对数生长期的 RBL-2H3,调整细胞密度至每毫升 1×10^5 个,均匀铺在 6 孔板内。待细胞贴壁后,将培养基配置的 750 ng/mL 的 Anti-DNP-IgE 孵育模型组细胞,佐剂对照组及各给药组分别加入培养基稀释 4 倍的血清,正常组选择培养基继续培养。孵育 24 h 后用 1 mL 改良台式液洗涤两遍以清除残存培养基。模型组及各给药组分别加入改良台式液配置的 1 μ g/mL DNP-BSA 及各浓度药物 200 μ L,对照组加入 200 μ L 改良台式液。孵育 1 h 后用冷

的 PBS 清洗细胞两遍,用细胞刮刮下各组细胞放入不同的 1.5 mL E_p 管中,离心后弃上清加入 100 μ L 细胞裂解液在冰浴中裂解 30 min,12 000 r/min 离心取上清。取少量含蛋白的裂解液稀释 10 倍后使用 BCA 蛋白测定试剂盒进行蛋白定量。应用 Western blot 法检测在 I 型超敏反应期间 p-JNK, JNK, p-ERK, ERK, p-p38, p-38 蛋白表达情况的改变。按照 Kim 描述的方法进行操作,并重复实验 3 次^[8]。使用 Image-Pro Plus 分析软件(Media Cybernetics, Inc., MD, USA)进行进一步的图形分析。

1.4 统计学方法

采用统计软件 SPSS 22.0 进行统计分析。实验数据以平均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,多组间数据比较采用单因素方差分析(one-way ANOVA),进行统计学分析, $P < 0.05$ 表示组间差异显著。所有柱形图均使用 GraphPad Prism 5 绘制。

2 结果

2.1 5-HMF 和 OMBF 诱导的体内 I 型超敏反应

采用酶联免疫吸附试验(ELISA)测定血清中 IgE、IgG 以及 IL-4 的变化(见图 1)。图 1A 显示 5-HMF 组和 OMBF 组的 IgE 含量与对照组相比均有显著增长。佐剂组与生理盐水对照组相比无明显变化。图 1B 显示, IgG 水平的改变主要体现在 5-HMF 高剂量组以及 OMBF 剂量组。在图 1C 中,除佐剂组外,所有组均较生理盐水对照组有明显的增长。实验结果表明 5-HMF 及其二聚体 OMBF 在低、高剂量下均可诱导 I 型超敏反应的发生。

2.2 5-HMF 和 OMBF 诱导的体外 I 型超敏反应

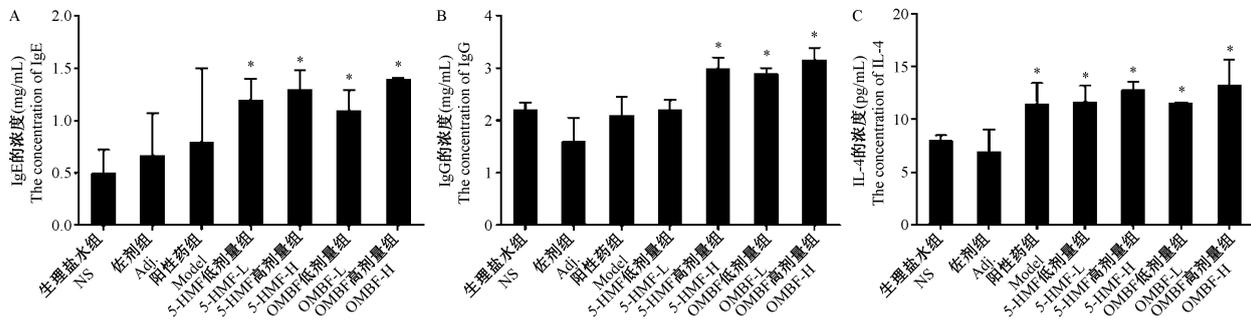
2.2.1 BN 大鼠血清中 IgE 的测定结果

ELISA 测定含药血清中 IgE 的含量(见图 2),结果显示,除佐剂组,其余各组与生理盐水组的 IgE 含量相比均显著性增高,可用于后续实验对细胞的致敏刺激。

2.2.2 TB 染色结果

甲苯胺蓝(Toluidine Blue O)是一种常用的人工合成染料,可以与肥大细胞的细胞质内肝素、组织胺等物质发生特异性染色^[9]。

染色结果显示,佐剂组 RBL-2H3 细胞呈长梭形,边缘完整,结构致密,未见脱颗粒。而脱颗粒的细胞体积增大,边缘不整,出现大量的空泡或颗粒样结构。RBL-2H3 细胞脱颗粒形态观察(见图 3),

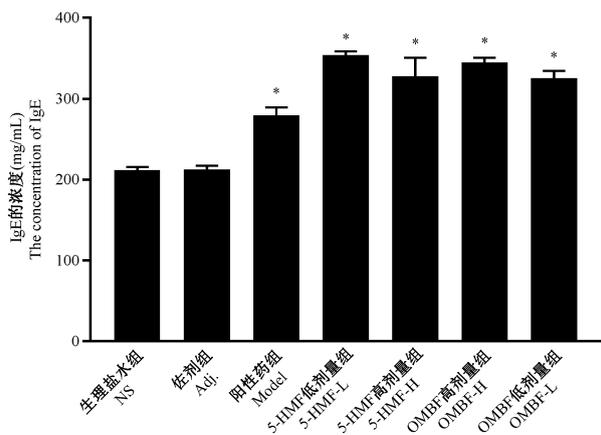


注: BN 大鼠血清中 IgE (A)、IgG (B)、IL-4 (C) 的含量测定;与 NS 组相比, * $P < 0.05$ 。

图 1 BN 大鼠血清中 I 型超敏反应相关指标的测定

Note. The determination of IgE (A), IgG (B), and IL-4 (C) in the serum of BN rats. Compared with the NS group, * $P < 0.05$.

Figure 1 The determination of related indexes of type I hypersensitivity in serum of BN rats



注:与 NS 组相比, * $P < 0.05$ 。

图 2 含药血清中 IgE 含量测定

Note. Compared with the NS group, * $P < 0.05$.

Figure 2 The determination of IgE in drug-containing serum

模型组脱颗粒明显,可见大部分细胞膜破裂,有颗粒样物质渗出。5-HMF 及 OMBF 低剂量组部分细胞结构保持完整,仍可见大量脱颗粒细胞。5-HMF 及 OMBF 高剂量组大部分细胞均出现了脱颗粒的现象,细胞边缘不整,细胞密度减低,出现颗粒样尾状结构。由上述结果可知,RBL-2H3 细胞在 OMBF 高剂量作用下脱颗粒较为严重,即 OMBF 的免疫毒性高于单体 5-HMF。

2.2.3 β -氨基糖苷酶释放情况

β -氨基糖苷酶 (β -HEX) 被认为是间接反映细胞脱颗粒情况的重要指标^[10-11]。通过测定细胞上清中 β -HEX 的含量,计算各给药组释放率来判断各给药组产生的免疫毒性的强弱。实验结果显示(见图 4),各给药组除佐剂组外均出现了显著性差异,且 OMBF 高剂量组诱导细胞上清中的 β -HEX 的释放量高于 5-HMF。

2.2.4 组胺的释放情况

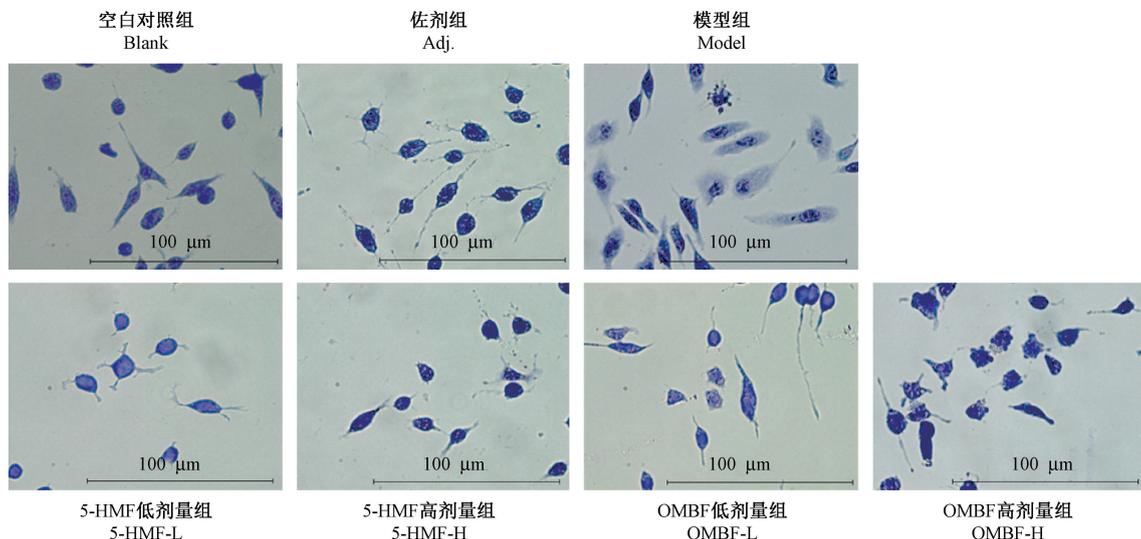
组胺 (Histamine) 在人体中分布广泛,主要存在于肥大细胞以及嗜碱性细胞中,由组氨酸经组氨酸脱羧酶 (HDC) 脱羧而产生,是反映细胞脱颗粒严重程度的重要指标^[10,12]。实验结果显示(见图 5),给药组刺激 RBL-2H3 细胞,高剂量组和模型组出现了显著性差异。提示较高剂量的 5-HMF 及其二聚体均能诱导细胞脱颗粒产生免疫毒性。

2.3 Western blot 结果

蛋白免疫印迹法检测用于研究在 I 型超敏反应期间 p-JNK, JNK, p-ERK, ERK, p-p38, p38 在 RBL-2H3 细胞中的表达,结果以磷酸化蛋白和总蛋白的表达量比值呈现(见图 6)。与空白对照组相比,ERK, JNK 和 p38 的磷酸化水平表达均上调。在 5-HMF 和 OMBF 的作用下,蛋白表达上调的水平未表现出明显的剂量差异性,但从 JNK 和 p38 的磷酸化蛋白表达结果分析,OMBF 比 5-HMF 更能促进磷酸化蛋白的表达,表现出了更强的免疫毒性。

3 讨论

先前的研究发现 5-HMF 具有抗氧化、抗组织缺氧等生理药理作用^[13-15]。然而,研究表明该物质具有毒理学特性,5-HMF 具有皮肤、粘膜和呼吸道刺激性^[16]。此外,关于 5-HMF 的致突变性和致癌性尚且存在争议^[17-20]。基于上述原因,中国药典和美国药典将葡萄糖注射液在加热和贮存过程中产生的 5-HMF 视为有害杂质。同样,在一定条件下,5-HMF 会发生聚合生成其二聚体产物 OMBF,已经发现部分中药注射剂中同时含有 5-HMF 和 OMBF^[21]。然而,到目前为止,关于 OMBF 的潜在毒性的研究很少,值得确认和探索可能的毒性与机制。

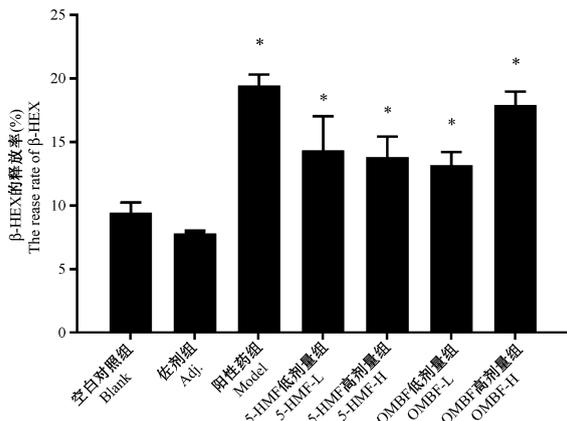


注:上行显示的是 RBL-2H3 细胞的正常形态及佐剂和阳性药作用后的细胞形态,下行显示的是 RBL-2H3 细胞经不同剂量的 5-HMF 及 OMBF 刺激后的细胞形态。

图 3 RBL-2H3 细胞脱颗粒形态观察

Note. The upper line shows the normal morphology of RBL-2H3 cells and the morphology of the cells stimulated by adjuvant and positive drugs. The next line shows the morphology of RBL-2H3 cells stimulated by different doses of 5-HMF and OMBF.

Figure 3 The observation of RBL-2H3 cells



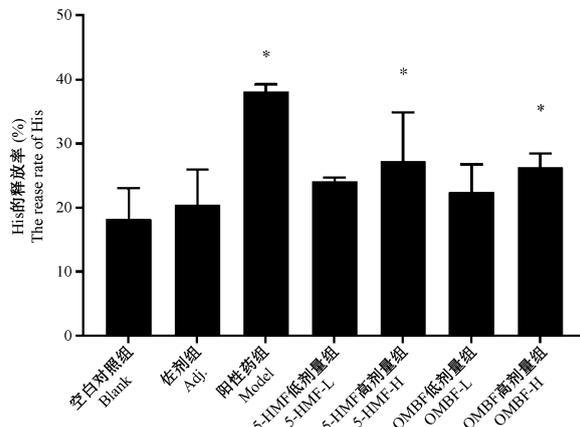
注:与 Blank 组相比, * $P < 0.05$ 。

图 4 RBL-2H3 细胞上清中 β -HEX 释放率的测定

Note. Compared with the Blank group, * $P < 0.05$.

Figure 4 Determination of β -HEX release rate in supernatant of RBL-2H3 cells

我们采用体内实验与体外实验相结合的方式,在体内实验中,采用免疫系统发达的 Brown Norway (BN) 大鼠作为研究对象,通过测定给药前后血清中 IgG、IgE 和炎症因子的含量变化探究药物的免疫毒性。除了 IgG 之外,还可以更精准的测定 IgG₁ 的含量,在今后的相关实验中我们将加以考虑。体外实验采用大鼠嗜碱性粒细胞 (RBL-2H3) 系, RBL-2H3 细胞表面 Fc 受体大量表达,是用于研究 I 型超敏反



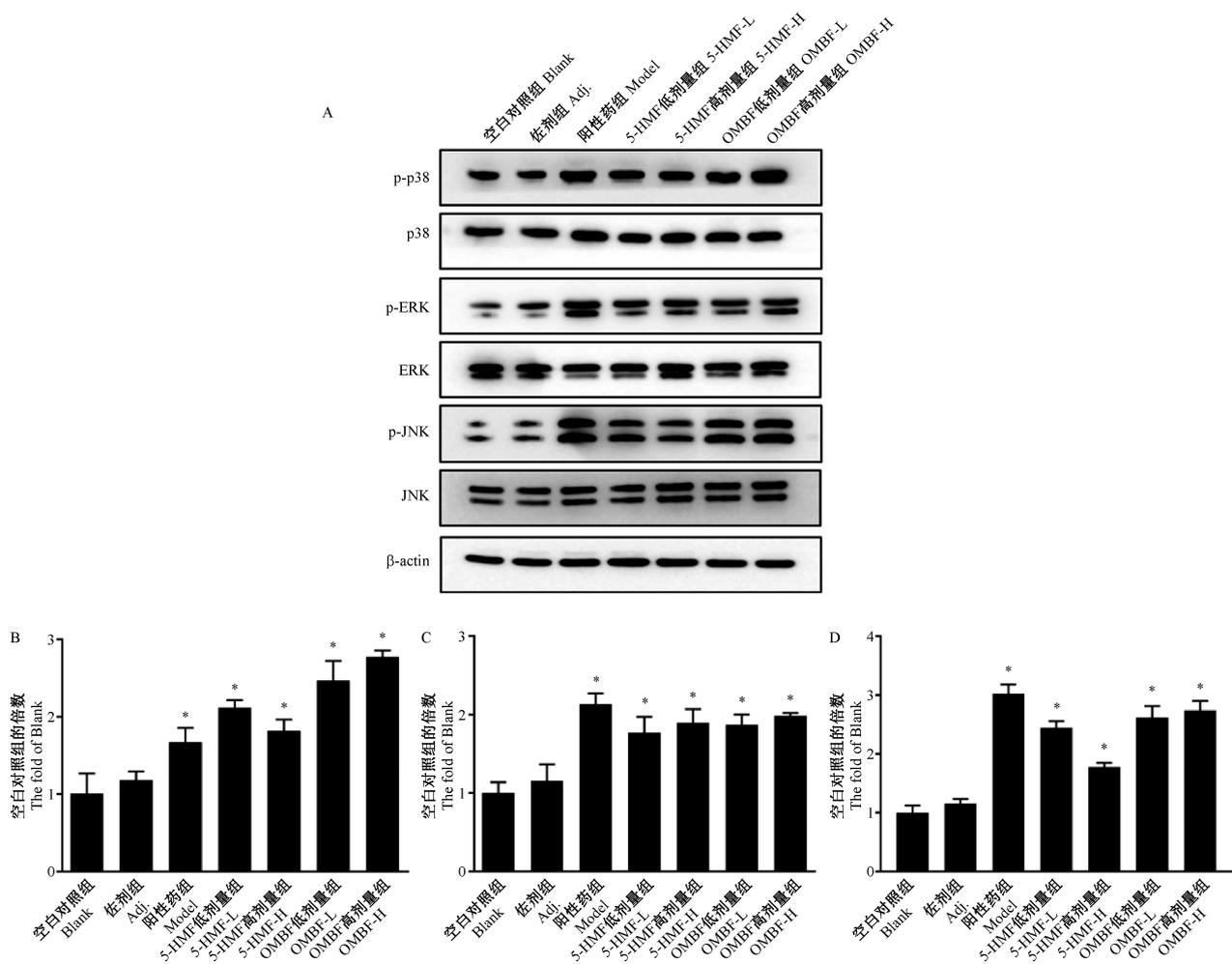
注:与 Blank 组相比, * $P < 0.05$ 。

图 5 RBL-2H3 细胞上清液中 His 释放率的测定

Note. Compared with the Blank group, * $P < 0.05$.

Figure 5 Determination of His release rate in supernatant of RBL-2H3 cell

应的常用细胞系。众所周知, I 型超敏反应需要致敏和激发两个阶段,我们通过获取大鼠含药血清,孵育细胞 24 h 使细胞致敏,后加入相应浓度药物,模拟机体 I 型超敏反应的全过程。通过甲苯胺蓝染色观察细胞脱颗粒形态,直接反映药物免疫毒性的强弱。通过测定细胞上清中典型指标 β -氨基糖苷酶及组胺的释放量,通过比较给药组与空白对照组释放率的差异来判断药物免疫毒性的强弱。MAPK



注:Western blot 技术测定结果(A)、p-p38 的表达变化(B)、p-ERK 的表达变化(C)、p-JNK 的表达变化(D)。与 Blank 组相比, * $P < 0.05$ 。

图 6 RBL-2H3 细胞经 5-HMF 和 OMBF 刺激前后 p-p38、p-ERK、p-JNK 蛋白表达变化

Note. Protein level was assessed by Western blot(A). Expression changes of p-p38(B), p-ERK(C), and p-JNK(D). Compared with the Blank group, * $P < 0.05$.

Figure 6 Effects of 5-HMF and OMBF on p-p38, p-ERK, p-JNK expression and production from antigen-stimulated RBL-2H3 cells

信号通路的激活在 I 型超敏反应中起重要作用,是抗过敏药物的靶点,其特征在于活化后,磷酸化蛋白表达增多。MAPK 信号通路与炎性介质的释放息息相关,而过敏反应中 IL-4 等炎性介质显著升高。因此,本研究在免疫毒性评价的基础上,对 5-HMF 及其二聚体 OMBF 引起的 MAPK 通路中 p-JNK, p-ERK 和 p-p38 这三种蛋白表达量的变化进行了研究,以此确定 5-HMF 及其二聚体 OMBF 产生免疫毒性可能的作用通路。

通过体外和体内实验模型,本研究发现 5-HMF 和 OMBF 作为小分子过敏原均可诱导 I 型超敏反应的发生。5-HMF 及 OMBF 组内低、高剂量之间并未表现出显著的差异性,这可能与引发免疫反应的物质质量效关系不明显有关,在今后我们的相关研究中

会对其进一步观察和验证。从甲苯胺蓝染色的结果来看,OMBF 诱导细胞脱颗粒的严重程度明显高于 5-HMF,表现出了更强的免疫毒性。从 Western blot 的结果也可以看出,OMBF 诱导 RBL-2H3 细胞 p-p38 以及 p-JNK 的表达量高于 5-HMF 组的表达量,从蛋白表达上进一步证实了 5-HMF 聚合生成 OMBF 后毒性增加,且二者产生的免疫毒性与 MAPK 家族蛋白磷酸化表达上调有关。结合本课题组前期研究结果,表明 5-HMF 和 OMBF 可同时导致过敏反应以及类过敏反应的发生,且产生相似的症状^[22],于是我们提出了新的假设,认为过敏反应与类过敏反应在作用通路上存在相同的地方,我们将会进一步完善二者的机制通路,因此二者在机制上的区别和联系将会成为下一步研究的重点。

参考文献:

- [1] 曹雪涛, 何维. 医学免疫学 [M]. 北京: 人民卫生出版社; 2013.
- [2] Mes ías-García M, Guerra-Hernández E, García-Villanova B. Determination of furan precursors and some thermal damage markers in baby foods; ascorbic acid, dehydroascorbic acid, hydroxymethylfurfural and furfural [J]. *J Agric Food Chem*, 2010, 58(10): 6027-6032.
- [3] Zirbes L, Nguyen BK, De Graaf DC, et al. Hydroxymethylfurfural: a possible emergent cause of honey bee mortality [J]. *J Agric Food Chem*, 2013, 61(49): 11865-11870.
- [4] 李恩灿, 贺玖明, 靳洪涛, 等. 5-羟甲基糠醛的药理和毒理研究进展 [J]. *中国药物警戒*, 2018, 15(4): 210-215.
- [5] Lin N, Liu T, Lin L, et al. Comparison of in vivo immunomodulatory effects of 5-hydroxymethylfurfural and 5, 5'-oxydimethylenebis (2-furfural) [J]. *Regul Toxicol Pharmacol*, 2016, 81: 500-511.
- [6] Larousse C, Rigal L, Gaset A. Synthesis of 5, 5'-oxydimethylenebis (2-furfural) by thermal dehydration of 5-hydroxymethyl-2-furfural in the presence of dimethylsulfoxide [J]. *J Chem Technol Biotechnol*, 2007, 53(1): 111-116.
- [7] National Pharmacopoeia Commission. Pharmacopoeia of the People's Republic of China [M]. Part II. Glucose Injection; Limit of 5-Hydroxymethylfurfural. Beijing: China Medical Science Press, 2015.
- [8] Kim Y, Kim K, Lee H, et al. Celastrol binds to ERK and inhibits FcεRI signaling to exert an anti-allergic effect [J]. *Eur J Pharmacol*, 2009, 612(1-3): 131-142.
- [9] Wernersson S, Pejler G. Mast cell secretory granules: armed for battle [J]. *Nat Rev Immunol*, 2014, 14(7): 478-494.
- [10] Chong YJ, Musa NF, Ng CH, et al. Barrier protective effects of 2, 4, 6-trihydroxy-3-geranyl acetophenone on lipopolysaccharides-stimulated inflammatory responses in human umbilical vein endothelial cells [J]. *J Ethnopharmacol*, 2016, 192: 248-255.
- [11] Wang W, Zhou Q, Liu L, et al. Anti-allergic activity of emodin on IgE-mediated activation in RBL-2H3 cells [J]. *Pharmacol Rep*, 2012, 64(5): 1216-1222.
- [12] Thurmond RL, Gelfand EW, Dunford PJ. The role of histamine H1 and H4 receptors in allergic inflammation; the search for new antihistamines [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2008, 7(1): 41-53.
- [13] Wang MY, Zhao FM, Peng HY, et al. Investigation on the morphological protective effect of 5-hydroxymethylfurfural extracted from wine-processed Fructus corni on human L02 hepatocytes [J]. *J Ethnopharmacol*, 2010, 130(2): 424-428.
- [14] Zhao L, Chen J, SU J, et al. In vitro antioxidant and antiproliferative activities of 5-hydroxymethylfurfural [J]. *J Agric Food Chem*, 2013, 61(44): 10604-10611.
- [15] Yalcin O, Cabrales P. Increased hemoglobin O₂ affinity protects during acute hypoxia [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2012, 303(3): H271-H281.
- [16] Uubricht RJ, Northup SJ, Thomas JA. A review of 5-hydroxymethylfurfural (HMF) in parenteral solutions [J]. *Fundam Appl Toxicol*, 1984, 4(5): 843-853.
- [17] Bauer-marinovic M, Taugner F, Florian S, et al. Toxicity studies with 5-hydroxymethylfurfural and its metabolite 5-sulphooxymethylfurfural in wild-type mice and transgenic mice expressing human sulphotransferases 1A1 and 1A2 [J]. *Arch Toxicol*, 2012, 86(5): 701-711.
- [18] Florian S, Bauer-marinovic M, Taugner F, et al. Study of 5-hydroxymethylfurfural and its metabolite 5-sulfooxymethylfurfural on induction of colonic aberrant crypt foci in wild-type mice and Transgenic mice expressing human sulfotransferases 1A1 and 1A2 [J]. *Mol Nutr Food Res*, 2012, 56(4): 593-600.
- [19] Svendsen C, Husøy T, Glatt H, et al. 5-Hydroxymethylfurfural and 5-sulfooxymethylfurfural increase adenoma and flat ACF number in the intestine of Min/+ mice [J]. *Anticancer Res*, 2009, 29(6): 1921-1926.
- [20] Surh YJ, Tannenbaum SR. Activation of the Maillard reaction product 5-(hydroxymethyl)furfural to strong mutagens via allylic sulfonation and chlorination [J]. *Chem Res Toxicol*, 1994, 7(3): 313-318.
- [21] 臧清策, 靳洪涛, 再帕尔·阿不力孜, 等. 注射剂中致敏成分分析方法研究进展 [J]. *中国药物警戒*, 2018, 15(4): 216-220, 225.
- [22] 林琳. RBL-2H3 细胞评价 5-HMF 及其二聚体 OMBF 的体外免疫毒性以及 PLNA 评价 3 种中药注射液的免疫原性 [D]. 北京: 北京协和医学院, 2018.

[收稿日期] 2019-09-16