基于小鼠腘窝淋巴结模型对脑苷肌肽注射液过敏检查方法的探讨

沈薇，梁一博，谢楠*（甘肃省药品检验研究院，甘肃 兰州 730070）

摘要：目的 利用小鼠直接腘窝淋巴结（D-PLNA）和报告抗原腘窝淋巴结（RA-PLNA）模型对脑苷肌肽注射液的过敏检查方法进行改进，以寻求新的针对该品种更敏感、更准确的检查方法。**方法** D-PLNA模型中设脑苷肌肽注射液组，生理盐水对照组和阳性药物盐酸D-青霉胺对照组；RA-PLNA模型中上述各组分别加入报告抗原TNP-Ficoll和TNP-OVA，于左足趾部给药50 μL。第7天处死小鼠分离腘窝淋巴结，研磨制备淋巴单细胞悬液并进行细胞计数，计算细胞指数；将细胞悬液培养于96孔板中，加入刺激剂共孵育后，利用ELISA技术测定细胞上清液中IgE和MCP-1的含量。**结果** 与生理盐水对照组比较，小鼠RA-PLNA模型中，加入TNP-OVA组的给药侧腘窝淋巴结细胞数增加（$P<0.05$），IgE与MCP-1含量均升高（$P<0.05$）。**结论** 脑苷肌肽注射液仅在加入报告抗原TNP-OVA后引起小鼠淋巴结阳性反应，说明脑苷肌肽注射液中可能存在小分子物质与TNP-OVA协同诱发过敏反应。

关键词：脑苷肌肽注射液；小鼠腘窝淋巴结模型；过敏检查

中图分类号：R965　　**文献标志码：**A　　**文章编号：**1674-229X（2026）03-0171-04

Doi：10.12048/j.issn.1674-229X.2026.03.002

Exploration of Allergy Testing Method for Cattle Encephalon Glycoside and Ignotin Injection Based on Mouse Popliteal Lymph Node Model

SHEN Wei，LIANG Yibo，XIE Nan*（*Gansu Institute of Drug Control*，*Lanzhou*，*Gansu* 730070，*China*）

ABSTRACT: OBJECTIVE To improve the allergic reaction test method of Cattle Encephalon Glycoside and Ignotin Injection by using the direct popliteal lymph node（D-PLNA）and reporter antigen popliteal lymph node（RA-PLNA）models in mice. **METHODS** In the D-PLNA model，the Cattle Encephalon Glycoside and Ignotin Injection group，normal saline control group and positive drug D-penicillamine hydrochloride control group were set up. In the RA-PLNA model，the above groups were respectively added with reporter antigens TNP-Ficoll and TNP-OVA，and 50 μL of the drug was administered to the left toe pad. On the 7th day，the mice were sacrificed，and the popliteal lymph nodes were isolated，ground to prepare lymphocyte single-cell suspensions and counted to calculate the cell index. The cell suspension was cultured in 96-well plates，and after co-incubation with stimulators，the contents of IgE and MCP-1 in the cell supernatant were determined by ELISA. **RESULTS** Compared with the normal saline control group，in the RA-PLNA model of mice，the number of cells in the popliteal lymph nodes on the drug administration side increased in the group added with TNP-OVA（$P<0.05$），and the contents of IgE and MCP-1 both increased（$P<0.05$）. **CONCLUSION** Cattle encephalon glycoside and ignotin injection only caused a positive lymph node reaction in mice when TNP-OVA was added，indicating that there may be small molecule substances in Cattle Encephalon Glycoside and Ignotin Injection that cooperate with TNP-OVA to induce allergic reactions.

KEYWORDS: cattle encephalon glycoside and ignotin injection；mouse popliteal lymph node model；allergic reaction test

脑苷肌肽注射液系由健康家兔肌肉提取物和牛脑神经节苷脂提取物混合制成的灭菌水溶液，主要组分为多肽、单唾液酸四己糖神经节苷脂、游离氨基酸、次黄嘌呤等。作为静脉注射用制剂，脑苷肌肽注射液药物经静脉给药直接入血，能在短时间内发挥药效的同时引起速发不良反应[1]，其不良反应的危害远超于口服制剂。

本研究通过查询国家不良反应监测系统，发现该品种在临床使用中的不良反应也确实集中在过敏或类过敏反应。但此前笔者在对脑苷肌肽注射液国家药品评价项目中，对近60批次的样品进行检查，并未出现过敏检查项不合格的样品[2]。基于实

基金项目：甘肃省科技计划项目（23JRRA1367）；甘肃省药品科研项目（2022GSMPA0028）

作者简介：沈薇，主管药师，研究方向：药理学　　*通信作者：谢楠，正高级工程师，研究方向：生物工程，E-mail：373634899@qq.com

验室检测结果与临床使用中高不良反应率的不一致，分析原因可能有以下两点。一是中国药典采用的过敏检查方法为全身主动过敏反应[3]，反应机制与类过敏反应机制存在不同；且该方法选用的动物，也会因被测药品的种类不同，其敏感性有所不同[4]，这可能会导致在进行该品种检验时出现假阴性的情况；二是脑苷肌肽注射液作为生化药，含有很多结构复杂且成分不明确的生物活性物质，并以分子量为2 000 Da以下的多肽为主，常规的过敏检查方法对该分子量多肽的检查可能灵敏度较低[5]。因此，寻找新的方法用于该品种的过敏检查，提高检测的灵敏度，可为类似该品种的小分子多肽及生物活性物质的药品检验提供新思路。

本研究选择小鼠腘窝淋巴结模型作为该品种的过敏检查方法进行评价。小鼠腘窝淋巴结模型是指在足趾部位注射药物等物质时，这些物质会随淋巴液优先进入腘窝淋巴结，引发该淋巴结的致敏反应，再通过检测淋巴结的病理、免疫或分子变化，反推目标物质的作用机制或生物学效应。该模型的原理是模拟免疫介导的致敏过程，更贴近临床药物免疫介导的过敏反应。

三硝基苯基聚蔗糖（TNP-Ficoll）和三硝基苯基卵蛋白（TNP-OVA）是免疫研究中常用的半抗原-载体型报告抗原。二者均以三硝基苯基（TNP）为“报告标签”（半抗原），但载体分子不同（分别为聚蔗糖Ficoll和卵清蛋白OVA），这导致其诱导的免疫应答类型、机制及应用场景存在显著差异，尤其在报告抗原小鼠腘窝淋巴结模型中可精准模拟不同类型的免疫激活过程。

1 材料

1.1 样品与试剂

脑苷肌肽注射液A（批号：202305032）；脑苷肌肽注射液B（批号：202211014）。PBS缓冲液，1640培养液购自Gibco公司；D-青霉胺（批号RH518962）；报告抗原三硝基苯基聚蔗糖（2，4，6-trinitrophenyl-Ficoll，TNP-Ficoll，批号：192031-02）和三硝基苯基卵蛋白（TNP-ovalbumin，TNP-OVA，批号：207265-02），规格均为每瓶10 mg，均购自美国Bio Search公司；脂多糖；免疫球蛋白IgE及单核细胞趋化蛋白-1（monocyte chemotactic protein-1，MCP-1）试剂盒均购自欣博盛。

1.2 实验动物

6~8周龄的雄性BALB/c小鼠（SPF级），购于兰州生物制品研究所有限责任公司，实验小鼠每笼4只，实验开始前适应性喂养7 d。

2 实验方法

2.1 分组设计

小鼠按体质量随机分为13组，其中直接腘窝淋巴结（D-PLNA）模型为4组，即生理盐水对照组，脑苷肌肽注射液注射液A和B各1组，阳性药物青霉胺对照组；报告基因腘窝淋巴结（RA-PLNA）模型为9组，即上述4组分别联合报告抗原TNP-Ficoll和TNP-OVA作用组，另设生理盐水对照组，每组8只。报告抗原的剂量为每只10 μg，给药体积均为50 μL，阳性药物给药剂量为每只2 mg。

2.2 给药及样本收集

D-PLNA模型中，BALB/c小鼠后足趾部75%酒精消毒，用1 mL注射器针头于左侧足趾部皮下注射50 μL样品，注意避免出现漏液。RA-PLNA模型中，将两个批号的脑苷肌肽注射液、阳性药物和生理盐水分别与10 μg TNP-OVA或TNP-Ficoll粉末混合后，注射于小鼠足趾部，给药方式与D-PLNA模型的给药方式一致。于给药7 d后，取出淋巴结备用。将各组淋巴结置于200目不锈钢筛网上，用研磨器轻轻研碎，同时以1%FBS-1640冲洗淋巴细胞液于培养皿中，吹匀并收集细胞悬液，4 ℃、1 500 r·min^{-1}离心10 min后，重悬并进行细胞计数。按下面公式计算细胞指数（cellularity index，CI）：CI=处理侧淋巴结细胞数/未处理侧淋巴结细胞数。

2.3 ELISA法测定免疫相关因子浓度

将淋巴结细胞悬液培养于96孔板，加入浓度为5 μg·mL^{-1}的刺激剂脂多糖（lipopolysaccharide，LPS），每孔100μL，培养箱孵育18~20 h，收集细胞上清液。参照ELISA试剂盒说明书分别测定上清液中IgE及MCP-1的浓度。

2.4 统计学处理方法

采用SPSS Statistics 28.0软件进行统计分析。结果均以均值±标准差（$\bar{x}\pm s$）表示，使用Dunnett's t检验进行统计分析。

3 结果

3.1 细胞浓度

在D-PLNA模型中，不同批号的脑苷肌肽注射

液对处理侧与对照侧的细胞浓度差异无统计学意义，CI指数与阴性对照组比较差异无统计学意义，具体见表1。在RA-PLNA模型中，加入报告抗原TNP-OVA后，脑苷肌肽注射液A与B的处理侧细胞浓度比对照侧明显升高，CI指数与阴性对照组比较差异有统计学意义。加入TNP-Ficoll的各组，处理侧细胞有上升趋势，但差异无统计学意义，具体见表2。

表1 D-PLNA模型中，脑苷肌肽注射液A和B对淋巴结细胞浓度的影响（$\bar{x}\pm s$，$n=8$）

组别	细胞浓度/$\times10^6\cdot mL^{-1}$		CI指数
	左（处理侧）	右（对照侧）	
生理盐水	0.81±0.22	0.83±0.25	0.98±0.45
脑苷肌肽注射液A	0.95±0.31	0.90±0.28	1.06±0.72
脑苷肌肽注射液B	1.11±0.25	0.99±0.23	1.12±0.43
阳性对照组	4.33±0.42	0.93±0.30	4.66±0.84

3.2 IgE及MCP-1浓度的变化

在D-PLNA模型中，IgE及MCP-1在处理侧与对照侧无显著差异，与阴性对照组差异无统计学意义，见表3。

在RA-PLNA模型中，加入TNP-OVA的脑苷肌肽注射液A和B，处理侧浓度均高于对照测，并与阴性对照组比较差异有统计学意义，见表4。

表2 RA-PLNA模型中，脑苷肌肽注射液A和B对淋巴结细胞浓度的影响（$\bar{x}\pm s$，$n=8$）

组别	细胞浓度/$\times10^6\cdot mL^{-1}$		CI指数
	左（处理侧）	右（对照侧）	
生理盐水	0.81±0.22	0.83±0.25	0.98±0.45
Ova+脑苷肌肽注射液A	3.12±0.49*#	1.09±0.37	2.86±0.53*#
脑苷肌肽注射液B	2.44±0.51*#	0.94±0.41	2.60±0.72*#
阳性对照组	4.33±0.42*#	0.93±0.30	4.66±0.63*#
生理盐水	1.09±0.34	0.89±0.27	1.22±0.54
Ficoll+脑苷肌肽注射液A	1.11±0.28	1.01±0.32	1.10±0.49
脑苷肌肽注射液B	1.26±0.24	1.05±0.38	1.21±0.58
阳性对照组	5.79±0.46	1.18±0.35	4.91±0.81
生理盐水	1.37±0.28	1.24±0.36	1.10±0.63

注：与未处理侧比较，*$P<0.05$；与生理盐水组比较，#$P<0.05$。

4 结论

目前，针对小分子物质或药物致敏潜能的检测方法中，腘窝淋巴结实验是被认可且相对常用的筛选评价技术[6]，是检测小分子化合物致敏的常用实验方法[7]。因此本研究选择该模型及其改良方法用于脑苷肌肽注射液的过敏检查，以期寻找更适应于该品种的检测方法，保障其用药安全。

通过以上实验结果表明，脑苷肌肽注射液在D-PLNA模型中，并未出现相关的免疫应答反应。

表3 D-PLNA模型中，脑苷肌肽注射液A和B对IgE和MCP-1浓度的影响（$\bar{x}\pm s$，$n=8$）

组别	IgE浓度/ng·mL^{-1}		MCP-1浓度/pg·mL^{-1}	
	左（处理侧）	右（对照侧）	左（处理侧）	右（对照侧）
生理盐水	0.43±0.19	0.40±0.22	63.74±3.88	65.57±4.34
脑苷肌肽注射液A	0.48±0.12	0.46±0.23	68.61±4.73	70.15±3.86
脑苷肌肽注射液B	0.45±0.20	0.44±0.11	74.28±4.92	71.61±4.77
阳性对照组	1.43±0.34	0.51±0.13	98.47±5.33	65.79±4.12

表4 RA-PLNA模型中，脑苷肌肽注射液A和B对IgE和MCP-1浓度的影响（$\bar{x}\pm s$，$n=8$）

组别	IgE浓度/ng·mL^{-1}		MCP-1浓度/pg·mL^{-1}	
	左（处理侧）	右（对照侧）	左（处理侧）	右（对照侧）
生理盐水	0.43±0.19	0.40±0.22	63.74±3.88	65.57±4.34
Ova+脑苷肌肽注射液A	0.58±0.08*	0.45±0.16	78.82±2.94*#	61.23±4.02
脑苷肌肽注射液B	0.82±0.19*#	0.48±0.11	69.42±3.39*#	58.85±3.28
阳性对照组	1.29±0.28*#	0.57±0.10	75.24±4.13*#	54.75±4.12
生理盐水	0.54±0.20	0.52±0.14	65.81±3.17	63.63±4.25
Ficoll+脑苷肌肽注射液A	0.52±0.27	0.53±0.12	57.33±4.52	55.94±4.19
脑苷肌肽注射液B	0.49±0.13	0.51±0.26	60.73±2.95	58.68±3.82
阳性对照组	1.13±0.49*#	0.52±0.23	67.22±3.84*#	61.69±3.65
生理盐水	0.48±0.09	0.51±0.12	60.61±4.21	58.57±3.18

注：与未处理侧比较，*$P<0.05$；与生理盐水组比较，#$P<0.05$。

但RA-PLNA模型中，加入TNP-Ficoll的样品组与空白组各项指标比较差异无统计学意义，加入TNP-OVA的样品组与空白组比较差异有统计学意义。这2种报告基因，Ficoll为多糖，OVA为蛋白质，当给予极低剂量时，自身不会诱发免疫反应，需要辅助性共刺激信号存在时才能诱导免疫应答产生抗体[8]，二者分别诱导T细胞非依赖性（TI）免疫应答和T细胞依赖性（TD）免疫应答。脑苷肌肽注射液在加入TNP-OVA，致使其腘窝细胞数量增加，腘窝细胞经刺激剂刺激后使分泌的IgE及MCP-1等与过敏相关的免疫因子升高。因此，脑苷肌肽注射液可能与TNP-OVA协同诱发T细胞依赖性免疫反应。

此外，有文献指出[9]，脑苷肌肽注射液与其他药物的联合使用，会导致该品种在临床使用中过敏反应等不良反应发生率的升高。本次实验结果也表明该品种与报告抗原会协同激发免疫反应，这也与之前的研究相一致。提示该品种与其他药物的联合使用，尤其是与含有蛋白类物质的药品联合使用，有可能会增加不良反应发生的风险。

综上所述，小鼠腘窝淋巴结模型在研究多肽类药物的过敏检查中，有一定的应用前景，但也有局限性。一是脑苷肌肽注射液样品虽涉及2个厂家，但样品批次较少，不能全面反应出该过敏反应是否存在批次差异，因此需要在今后的研究中扩大样品批数，并寻找合适的反应阈值。二是设置不同的药物剂量及报告抗原的剂量，观察过敏反应与剂量的依赖性，以期为该模型在多肽类药物的过敏检查中的应用提供可靠的实验基础，也为评估该类药物的临床使用风险提供有力的实验依据。

参考文献

[1] 杨奇涛，吴畅，林新丽，等.药物类过敏反应及其机制的研究进展[J].药学与临床研究，2023，31(2)：159-163.

[2] 沈薇，吕栋，王奕匀，等.基于国家药品评价性抽验的全国脑苷肌肽注射液质量情况分析与研究[J].中国药事，2021，35(3)：281-288.

[3] Wilkerson R G. Drug hypersensitivity reactions[J]. Immunol Allergy Clin N Am，2023，43(3)：473-489.

[4] 陈华英，李秀芳，金若敏，等.大鼠主动全身过敏试验方法的探讨[J].中成药，2012，34(7)：1209-1215.

[5] 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.

[6] Løvik M，Alberg T，Nygaard U C，*et al*.Popliteal lymph node (PLN) assay to study adjuvant effects on respiratory allergy[J].Methods，2007，41(1)：72-79.

[7] 黄路芬，董燕，王青，等.腘窝淋巴结免疫细胞多种表面分子在PLNA评价致敏性中的综合分析[J].中国药理学通报，2011，27(11)：1510-1514.

[8] 林琳，范潇予，李恩灿，等.小鼠腘窝淋巴结模型评价3种中药注射液的潜在免疫毒性[J].癌变·畸变·突变，2018，30(4)：275-278.

[9] 陈晓艳，唐源，李宇华，等.脑苷肌肽注射液的合理用药评价[J].海峡药学，2021，33(4)：125-127.

（收稿日期：2025-07-15；在线出版日期：2026-02-09）