

天然产物吉马酮致类过敏反应机制初步研究

高嘉盼, 车德路, 张 涛, 贺浪冲*

(西安交通大学医学部药学院, 陕西 西安 710061)

摘要: 含有倍半萜类天然产物制备而成的中药注射剂在临床使用的过程中可引起多种不良反应, 其中以皮肤过敏反应最为普遍。但造成这种过敏反应的原因是否与倍半萜类物质共同含有的3个异戊二烯单元相关尚不明确, 因此用药安全性评价具有重要指导意义。倍半萜类物质的相对分子质量小, 不是抗原或半抗原, 有可能通过直接作用于肥大细胞的方式引发过敏反应。近期研究证实, 肥大细胞上的一种7次跨膜的G蛋白偶联受体(Mas-related G protein-coupled receptor-X2, MRGPRX2)是介导多种小分子药物引发过敏反应的关键靶点, 不同于IgE介导的I型过敏反应, 这种反应与给药剂量和速度具有直接相关性, 首次接触致敏物即会出现过敏症状, 被称为类过敏反应。本文通过一系列体外实验研究发现并不是所有倍半萜类物质均引发类过敏反应。实验选取倍半萜类物质人参皂苷Re和Rb1及吉马酮等进行钙成像筛选分析。结果表明, 仅吉马酮可通过MRGPRX2激活钙动员, 引起肥大细胞内钙离子浓度的增加。进一步以吉马酮为研究对象, 通过 β -氨基己糖苷酶释放率测定和组胺释放量测定实验证实吉马酮能够直接引起肥大细胞脱颗粒反应。进一步利用siRNA敲低MRGPRX2受体表达和吉马酮与环丙沙星的竞争性结合实验证实了作用靶点为MRGPRX2。结果表明, 吉马酮可通过MRGPRX2受体直接激活肥大细胞, 引发类过敏反应, 这可能是含吉马酮成分中药注射剂引发皮肤过敏反应的原因。

关键词: 倍半萜类物质; 吉马酮; 肥大细胞; 类过敏; Mas相关的G蛋白偶联受体X2

中图分类号: R963 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2019)09-1667-06

Preliminary study on the mechanism of anaphylactoid reaction induced by natural product germacrone

GAO Jia-pan, CHE De-lu, ZHANG Tao, HE Lang-chong*

(School of Pharmacy, Health Science Center, Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710061, China)

Abstract: The Chinese medicine injections prepared by the natural products containing sesquiterpenoids caused various adverse reactions in clinical use, among which skin allergic reactions are the most common. However, whether the reason of allergic reaction was related to the three isoprene units contained in the sesquiterpenoids is not clear, so the evaluation of drug safety has important guiding significance. The sesquiterpenoids are small molecular substances, and they are not antigens or haptens. They may induce anaphylaxis reactions by acting mast cells directly. Current research confirmed that Mas-related G protein-coupled receptor-X2 (MRGPRX2) which is a 7-transmembrane G protein coupled receptor on mast cells was a key target mediated allergic reactions induced by many small molecular drugs. Unlike IgE-mediated allergic reactions, pseudo-allergic reaction is related to dosage and dosing rate, and occurs in the first exposure to the sensitizer. In this paper, a series of experiments *in vitro* found that not all sesquiterpenoids caused anaphylactoid reactions. Ginsenoside Re, ginsenoside Rb1 and germacrone were selected as representative of sesquiterpenoids for calcium imaging assay. The data confirmed that only germacrone activated calcium mobilization through MRGPRX2, causing an increase in intracellular calcium ion concentration in mast

收稿日期: 2019-04-23; 修回日期: 2019-05-21.

基金项目: 国家自然科学基金重点项目(81230079).

*通讯作者 Tel: 86-29-82656788, E-mail: helc@mail.xjtu.edu.cn

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2019-0323

cells. Furthermore, the release rate of β -hexosaminidase and the release amount of histamine analysis confirmed that germacrone induced mast cells degranulation directly. Knockdown of MRGPRX2 expression by siRNA and competitive binding experiments against ciprofloxacin were used to prove the target of germacrone was MRGPRX2. The results indicated that germacrone could activate mast cells directly to induce anaphylactoid reaction via MRGPRX2, which might be the reason of skin allergic reactions caused by injections containing germacrone.

Key words: sesquiterpenoid; germacrone; mast cell; pseudo-allergic reaction; Mas-related G protein-coupled receptor-X2

近来,有报道发现 C48/80 (compound 48/80) 等小分子化合物能够通过小鼠肥大细胞上的 MrgprB2 受体,引发小鼠发生过敏样反应^[1]。不同于 IgE 介导的 I 型过敏反应和补体途径的过敏反应^[2],这种过敏反应与给药速度和剂量直接相关,并在首次用药后即可出现,被称为类过敏反应。药物作用于 MrgprB2 受体后,造成肥大细胞内钙离子浓度升高,引起肥大细胞颗粒物质的释放,促使类过敏反应的发生。同时还发现, MrgprB2 受体与人肥大细胞膜上的 MRGPRX2 受体具有同源性,是引发药物类过敏反应的关键受体,小分子药物通过作用于 MrgprB2 受体造成野生型小鼠出现类过敏反应,但当敲除 MrgprB2 受体后,这种类过敏反应症状也不再出现,并进一步证实了临床上经常发生过敏反应的四氢异喹啉类肌肉松弛药^[3]、氟喹诺酮类抗菌药^[4]等小分子药物就是通过 MrgprB2 活化肥大细胞而导致类过敏反应发生的,明确了人肥大细胞膜上的 G 蛋白偶联受体 MRGPRX2 就是药物引发类过敏反应的关键靶受体。

中药及其制剂是临床上广泛使用的有效药物。近年来,各类中药制剂尤其是中药注射剂引起过敏样反应的报道增多,但作用靶点与分子机制尚无相关研究^[4,5]。倍半萜类物质广泛存在于多种药物制剂中^[6],其引发的过敏样反应是否是由于共同的异戊二烯单元引起的并不明确。并且,此类物质致敏的分子机制尚无完整研究报道。因此,有必要对其引发的过敏反应机制进行研究。环丙沙星作为 MRGPRX2 受体的激动剂,能够导致肥大细胞释放 β -氨基己糖苷酶和组胺等过敏介质而引发类过敏反应。在此基础上,本研究探讨吉马酮是否通过 MRGPRX2 引发类过敏反应,明确导致类过敏机制,为药物安全性使用奠定实验基础。

材料与方法

仪器与设备 RPL-10ZD 装柱机 (大连日普利科技仪器有限公司,中国); HC-3018R 高速冷冻离心机 (科大创新股份有限公司中佳分公司,中国); 高效液相色谱/质谱联用仪 (HPLC/MS) (日本岛津公司,日本),包括: LC-20AD 高效液相色谱泵 3 个, SIL-20A 自动进

样器, CTO-20A 柱温箱, SPD-20A 紫外检测器, SPD-M20A 二极管阵列检测器, LCMS2010 质谱仪, LCMS-Solution 工作站; SW-CJ-1F 超净工作台 (苏州安泰空气技术有限公司,中国); MCO-15AC CO₂ 细胞培养箱 (日本三洋电机株式会社,日本); 尼康 Ti-S 倒置荧光显微镜 (尼康株式会社,日本); AUY-120 精密天平 (岛津公司,日本)。

试剂 人参皂苷 Re、人参皂苷 Rb1、吉马酮 (成都普非德,中国); C48/80 (Sigma 试剂公司,美国)青霉素、链霉素 (大连美罗制药厂,中国); 氯化钠和氯化钾 (天津市天力化学试剂有限公司,中国); 氢氧化钠 (天津市科密欧化学试剂有限公司,中国); 七水合硫酸镁 (成都化学试剂厂,中国); 十二水合磷酸氢二钠 (广东省化学试剂工程技术研究开发中心,中国); 超纯水实验室自制。

细胞系 LAD2 人肥大细胞株 (NIH 赠与), 培养基 StemPro-34+10 mL·L⁻¹ StemPro nutrient supplement (Invitrogen 公司,美国), 2 mmol·L⁻¹ L-glutamine (R&D 公司,美国), 100 ng·mL⁻¹ 人干细胞生长因子 (human stem cell factor, SCF) (义翘神州科技有限公司,中国), 于 37 °C、5% 的 CO₂ 培养箱中培养。

细胞膜固定相制备 将细胞悬液于 4 °C 条件下 5 000 r·min⁻¹ 离心 10 min, 去除上清的培养液, 沉淀即为细胞, 加入生理盐水重新混悬后于上述条件离心, 生理盐水清洗过程重复 2 次。向得到的细胞中加入预冷的 Tris-HCl 溶液 5 mL, 置于超声仪内冰浴超声 30 min 破碎细胞, 以保证细胞膜的活性。同时称取 0.02 g 硅胶于具支试管中, 置于 105 °C 烘箱中活化 30 min。超声破碎细胞后, 用细胞破碎仪再次破碎, 程序为工作 3 s, 间歇 1 s, 6 次。离心 10 min (4 °C, 1 500 ×g), 吸取上清液于另外一只离心管中, 离心 10 min (4 °C, 12 000 ×g), 得到沉淀即为细胞膜, 沉淀用生理盐水重悬, 再离心 10 min (4 °C, 12 000 ×g), 将得到的细胞膜清洗一次。沉淀用 5 mL 的生理盐水混悬, 吸入 5 mL 注射器中, 于真空涡旋振荡条件下与已经活化的硅胶混匀, 置于磁力搅拌器上于 4 °C 条件搅拌 30 min, 静置过夜, 得到细胞膜固定相悬液。

CMC 柱的制备 将细胞膜固定相悬液涡旋混匀, 转移至 10 mL 离心管中, 4 °C 条件下 2 000 r·min⁻¹ 离心 10 min, 弃上清, 沉淀加入生理盐水约 5 mL 涡旋混匀, 重复上述操作 2 次, 去除多余的未包裹在硅胶上的细胞膜, 向沉淀中加入生理盐水约 5 mL 涡旋混匀, 倒入事先已经冲洗过的装柱机中, 流动相为水, 流速为 2.0 mL·min⁻¹, 装柱时的压力不超过 10 MPa, 装柱时间 5 min, 即可将细胞膜固定相装入柱芯中, 将装填好的细胞膜色谱柱装入液相色谱仪中使用。

色谱条件 细胞膜色谱条件 1: 超纯水为流动相, 流速 0.2 mL·min⁻¹, PDA 检测器检测。细胞膜色谱条件 2: 流动相: 50 mmol·L⁻¹ PBS 缓冲液; 流速: 0.2 mL·min⁻¹; 柱温箱: 37 °C; PDA 检测。

制备 LAD2/CMC 色谱柱用于细胞膜色谱法分析, 色谱柱在使用前预平衡 1 h。已知环丙沙星可以引起类过敏反应^[1], 所以使用其作为阳性对照应用于二维在线检测可引起类过敏的试剂。LAD2/CMC 细胞膜的重现性通过反复注射环丙沙星来检测。对于一根 LAD2/CMC 细胞膜色谱柱, 保留时间由 5 次重复注射致敏成分(5 μL, 0.1 mg·mL⁻¹) 来计算和确定。

钙成像 LAD2 细胞以 5 000 个细胞每孔接种于 96 孔板中, 在 37 °C 饱和湿度的细胞培养箱中培养过夜, 离心, 弃上清, 加入 5 ng·mL⁻¹ Fluo-3-AM 的钙成像缓冲液 (CIB: NaCl 125 mmol·L⁻¹, KCl 3 mmol·L⁻¹, CaCl₂ 2.5 mmol·L⁻¹, MgCl₂ 0.6 mmol·L⁻¹, HEPES 10 mmol·L⁻¹, 葡萄糖 20 mmol·L⁻¹, NaHCO₃ 1.2 mmol·L⁻¹, 蔗糖 20 mmol·L⁻¹, pH 7.4), 37 °C 培养箱孵育 30 min。弃孵育液, 加入 CIB 清洗一遍后弃上清, 再次加入 CIB, 每孔 100 μL, 于荧光显微镜的蓝光下, 以 C48/80 为阳性对照, CIB 为阴性对照, 给药组每孔依次加入 400 μmol·L⁻¹, 加药体积为 100 μL 的人参皂苷 Re、人参皂苷 Rb1 和吉马酮后采集荧光变化突变, 曝光时间为 200 ms, 每秒拍一张, 拍照时间为 2 min。

β-氨基己糖苷酶释放率的测定 将 LAD2 细胞稀释为终浓度为每毫升 1×10⁵ 个细胞, 每孔 100 μL 接种于 96 孔板, 并设置 4 个复孔。在 37 °C 饱和湿度的细胞培养箱中培养过夜。次日, 对于给药组细胞, 1 500 r·min⁻¹ 室温离心 5 min 后, 弃上清, 以台式液配制浓度为 100、200、400 μmol·L⁻¹ 的吉马酮, 并依次加入孔板中, 30 μg·mL⁻¹ 的 C48/80 为阳性对照, 单独的台式液为阴性对照, 37 °C 下培养 30 min 后, 1 500 r·min⁻¹ 室温离心 5 min, 得到给药组细胞培养基上清; 再用 0.1% Triton X-100 裂解空白组细胞 5 min, 将裂解液吹打均匀, 在 1 500 r·min⁻¹ 室温离心 5 min, 得到细胞裂解液。将给药组细胞培养基上清及细胞裂解液各 50 μL 分别加入

空白 96 孔板, 每孔加入底物 1 mmol·L⁻¹ 的 β-氨基己糖 50 μL, 置于 37 °C 培养箱内孵育 90 min, 孵育完成后, 每孔加入 0.1 μmol·L⁻¹ Na₂CO₃/NaHCO₃ 终止液 150 μL 终止反应。将 96 孔板置于室温摇床上摇晃混匀 2 min, 在酶标仪上 405 nm 下检测吸光度值 (OD)。β-氨基己糖苷酶释放率的计算方法: β-氨基己糖苷酶释放率 (%) = [上清液吸光度/(上清液吸光度+细胞裂解液吸光度)]×100%。

组胺释放量的测定 将 LAD2 细胞稀释为终浓度为每毫升 1×10⁶ 个细胞, 每孔 100 μL 接种于 96 孔板, 在 37 °C 饱和湿度的细胞培养箱中培养过夜。次日, 1 500 r·min⁻¹ 室温离心 5 min 后, 弃上清, 加入台式液配制的浓度为 100, 400 μmol·L⁻¹ 吉马酮溶液, 30 μg·mL⁻¹ 的 C48/80 为阳性对照, 阴性对照组加入台式液 100 μL, 37 °C 下培养 30 min 后, 1 500 r·min⁻¹ 室温离心 5 min, 取上清 50 μL, 加入含 100 μL 内标 (氘代组胺, 美国 Sigma 公司) 的新 1.5 mL EP 管中, 振荡 10 s。10 000 r·min⁻¹, 4 °C 离心 10 min。离心后吸取上清 50 μL 于进样瓶中, 质谱检测。

siRNA 干扰 *MrgprX2* siRNA 片段为 forward: 5'-GUACAACAGUGAAUGGAAATT-3', reverse: 5'-UUUCCAUUCACUGUUGUACTT-3'; 无序的 siRNA 片段作为阴性对照 forward: 5'-UUCUCCGAACGUGUCACGUTT-3', reverse: 5'-ACGUGACACGUUCGGAGAATT-3'。分别稀释 75 pmol *MrgprX2* siRNA 和 Lipofectamine 2000 稀释液 7.5 μL 至 100 μL Opti-MEM 培养基中, 静置 2 min 后, 将 *MrgprX2* siRNA 加入到 Lipofectamine 2000 稀释液中, 轻柔混匀, 室温静置 15 min。将 LAD2 细胞以每孔 (0.25~1)×10⁶ 个细胞接种于 6 孔板中, 加入 *MrgprX2* siRNA 和 Lipofectamine 2000 的混合液, 轻柔混匀。转染 48 h 后用于后续实验。

竞争性结合实验 竞争性结合实验是通过使用 6×10⁻⁸~9.6×10⁻⁷ mol·L⁻¹ 不同浓度的吉马酮作为 LAD2/CMC 细胞膜色谱柱的流动相, 检测不同浓度环丙沙星的保留时间。再根据已知竞争性位移分析法考察药物的作用位点。

统计学方法 所有实验数据采用平均值±标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 用 SPSS 18.0 统计软件进行 student's t-test 分析, $P < 0.05$ 为具有统计学差异, $P < 0.01$ 为统计学差异较显著, $P < 0.001$ 为统计学差异极显著。

结果

1 吉马酮可引起 LAD2 细胞内钙离子浓度升高

具有致敏作用的药物可激活肥大细胞钙动员, 引起肥大细胞内 Ca²⁺ 浓度的升高, 胞内游离的 Ca²⁺ 与荧

光探针结合发出荧光, 可通过荧光强度表征胞内 Ca^{2+} 的含量。在 $400 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 吉马酮、人参皂苷 Re 或人参皂苷 Rb1 的作用下, 仅吉马酮可使人肥大细胞 LAD2 细胞内 Ca^{2+} 浓度升高, 其他两种作用甚微 (图 1)。

2 吉马酮激活 LAD2 细胞引发脱颗粒反应

肥大细胞激活后会发生脱颗粒反应释放颗粒物质, β -氨基己糖苷酶和组胺包含于肥大细胞释放的颗粒物质中, 可作为评价肥大细胞脱颗粒反应程度的标志物。吉马酮能够剂量依赖性的激活 LAD2 细胞, 释放 β -氨基己糖苷酶和组胺。100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 不引起 LAD2 细胞激活, 而在 200 和 400 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 吉马酮的作用下, 可以引起人肥大细胞 LAD2 β -氨基己糖苷酶的释放率分别为 $29.8\% \pm 1.9\%$ 和 $37.5\% \pm 0.7\%$ (图 2A)。组胺是肥大细胞释放的重要致敏介质, 在 200 和 400 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 吉马酮的作用下, 组胺的释放量分别为

(174.4 ± 8.9) 和 (231.8 ± 17.6) $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ (图 2B)。与对照组相比, 具有统计学差异 ($P < 0.05$)。

3 吉马酮激动敲低后的 LAD2 细胞作用降低

为了考察吉马酮致过敏反应与 MRGPRX2 受体的关系, 采用 siRNA 干扰的方法敲低 LAD2 细胞中的 MRGPRX2 的表达。通过 Control-siRNA 与 *MrgprX2*-siRNA 干扰后, 吉马酮刺激 LAD2 细胞脱颗粒释放 β -氨基己糖苷酶的作用明显降低 (图 3A)。同时还发现与对照组相比, 使胞内钙离子浓度升高的作用也明显降低 (图 3B)。

4 与环丙沙星的竞争性结合实验计算吉马酮的解离平衡常数

分别采用 $6 \times 10^{-8} \sim 9.6 \times 10^{-7} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 不同浓度的吉马酮作为流动相, 色谱柱进样注射环丙沙星, 记录环丙沙星在不同流动相下的保留时间^[7]。环丙沙星作为明

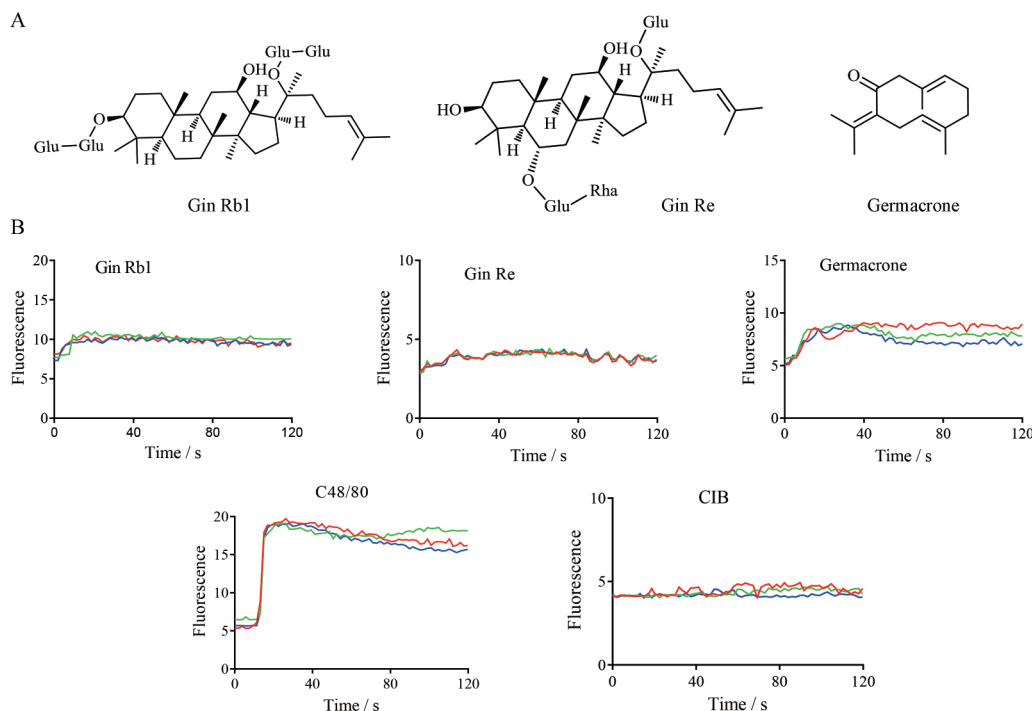


Figure 1 Germacrone increased Ca^{2+} concentration in LAD2 cells. A: Chemical structure of ginsenoside Rb1, ginsenoside Re and germacrone; B: Calcium image of ginsenoside Rb1, ginsenoside Re and germacrone ($400 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) on LAD2 cells. C48/80: Compound 48/80. Experiments are repeated thrice, and each color line represents an individual cell

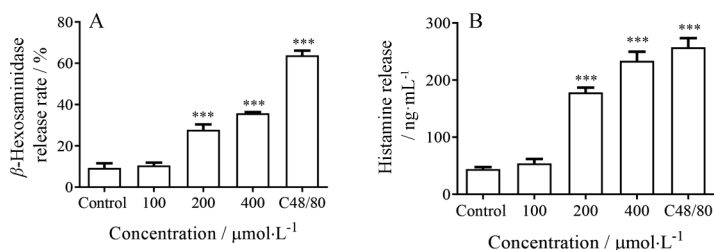


Figure 2 Germacrone induced LAD2 cells degranulation reaction. A: The release rate of β -hexosaminidase by germacrone on LAD2; B: The histamine release by germacrone on LAD2. $n = 6, \bar{x} \pm s$. *** $P < 0.001$ vs Control

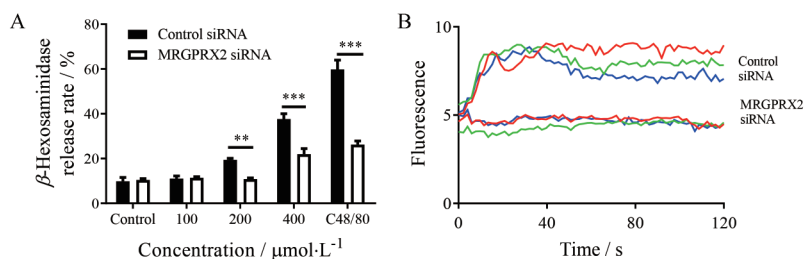


Figure 3 The allergic effect of germacrone on *MrgprX2*-knockdown LAD2 cells. A: The β -hexosaminidase release of germacrone on *MrgprX2*-knockdown LAD2 cells; B: Representative Fluo-3 fluorescence incubated of *MrgprX2*-knockdown LAD2 cells showing changes in Ca^{2+} induced by $400 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Germacrone. Experiments are repeated thrice. $n = 6$, $\bar{x} \pm s$. and analyzed using two-tailed unpaired Student's *t*-test. ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$. Each color line represents an individual cell

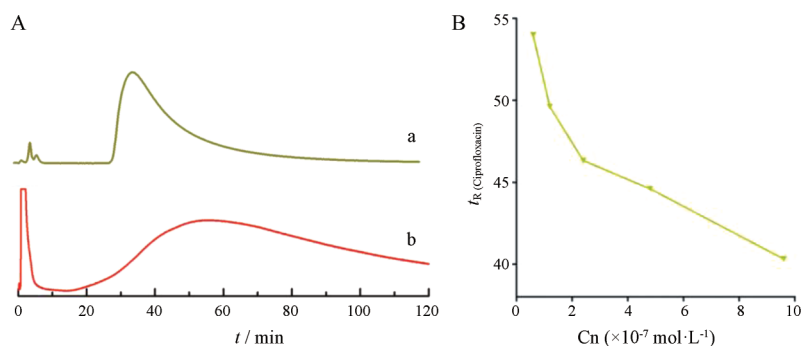


Figure 4 Germacrone and ciprofloxacin could competitive bind MRGPRX2. A: The LAD2/CMC chromatograms of germacrone and ciprofloxacin; B: Germacrone decreased reserve time of ciprofloxacin in a dose-manner

确的 MRGPRX2 受体的激动剂, 其与吉马酮一样, 均在 LAD2 细胞膜色谱柱上具有保留作用 (图 4A)。根据竞争剂环丙沙星的保留时间, 发现环丙沙星的保留时间随着流动相中吉马酮浓度的增加而降低 (图 4B)。结果表明吉马酮与环丙沙星在 LAD2/CMC 细胞膜色谱柱上具有相同的结合位点。

讨论

小分子药物引发的类过敏反应可能是源于药物直接刺激肥大细胞或嗜碱性粒细胞, 导致肥大细胞脱颗粒释放组胺类活性递质而引发的^[8]。药物类过敏反应在患者首次用药时即可能发生^[9]。近年来, 临床观察发现中药注射剂可以引发类过敏反应^[10,11]。但由于中药组分众多, 相互作用复杂, 引发机制也不清楚。一般情况下, 过敏反应的发生机制分为 3 类: ① 以不依赖 IgE 介导方式直接刺激肥大细胞, 通过 G 蛋白偶联受体造成肥大细胞内钙离子浓度升高^[12]; ② 通过补体受体激活肥大细胞^[13]; ③ 抑制 COX-1 活性造成生物胺类成分合成及释放^[14]。目前药物导致类过敏反应的作用机制报道较少^[15]。

钙成像实验证实倍半萜类化合物吉马酮^[9]、人参皂苷 Re 及人参皂苷 Rb1^[16]中只有吉马酮可激活 LAD2

细胞, 造成细胞内钙离子浓度升高 (图 1)。与此同时, 由于胞内钙离子浓度升高, 激活肥大细胞脱颗粒^[17]。因此, 吉马酮能剂量依赖性地引发 β -氨基己糖苷酶及组胺 (图 2) 等颗粒物质的释放。但是, 吉马酮在 MRGPRX2 敲低的 LAD2 细胞的细胞内钙离子浓度及脱颗粒作用降低 (图 3), 表明吉马酮导致肥大细胞脱颗粒通过 MRGPRX2, 所以, 吉马酮引发的类过敏反应与 MRGPRX2 相关。进一步, 与环丙沙星的竞争性结合实验结果表明, 吉马酮是 MRGPRX2 的外源性小分子配体 (图 4)。但是, 这种对 MRGPRX2 受体的激活作用, 可能和倍半萜类物质共有的 3 个异戊二烯单元并不相关。

本实验通过一系列体外实验发现, $200 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 以上的吉马酮具有致类过敏作用, 这种类过敏反应具有剂量依赖性。同时对吉马酮与 MRGPRX2 相互作用特性进行了分析, 对其致敏机制进行研究, 为中药制剂的安全性奠定了实验基础。

Reference

- [1] McNeil BD, Pundir P, Meeker S, et al. Identification of a mast-cell-specific receptor crucial for pseudo-allergic drug reactions [J]. *Nature*, 2015, 519: 237-241.

- [2] Feng CX, Xiu X, Tian W, et al. Establishment of *in-vitro* model of complement activation and its application [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2017, 52: 722-728.
- [3] Blanca-Lopez N, Ariza A, Doña I, et al. Hypersensitivity reactions to fluoroquinolones: analysis of the factors involved [J]. Clin Exp Allergy, 2013, 43: 560-567.
- [4] Xu YB, Dou DQ. Advance and prospect in studies on anaphylactoid reaction of traditional Chinese medicine injections [J]. China J Chin Mater Med (中国中药杂志), 2015, 40: 2765-2773.
- [5] Wang J, Wang T, Li Y S, et al. Allergic constitution theory of Chinese medicine and its assessment criterion and related studies [J]. Chin J Integr Med, 2015, 21: 716-720.
- [6] Hu CQ, Xu MZ, Ma Y, et al. Determination of the allergic impurities in the parenteral injection of Chinese traditional medicines containing *Salvia miltiorrhiza* [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2008, 43: 518-522.
- [7] Jiang X, Lv B, Li P, et al. Bioactivity-integrated UPLC/Q-TOF-MS of Danhong injection to identify NF- κ B inhibitors and anti-inflammatory targets based on endothelial cell culture and network pharmacology [J]. J Ethnopharmacol, 2015, 174: 270-276.
- [8] Moon P D, Choi I S, Go J H, et al. Inhibitory effects of BiRyuChe-bang on mast cell-mediated allergic reactions and inflammatory cytokines production [J]. Am J Chin Med, 2013, 41: 1267-1282.
- [9] Deng C, Ji J, Li N, et al. Fast determination of curcumin, curdione and germacrone in three species of *Curcuma* rhizomes by microwave-assisted extraction followed by headspace solid-phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry [J]. J Chromatogr A, 2006, 1117: 115-120.
- [10] Han S, Zhang T, Huang J, et al. New method of screening allergenic components from Shuanghuanglian injection: with RBL-2H3/CMC model online HPLC/MS system [J]. J Pharm Biomed Anal, 2014, 88: 602-608.
- [11] Braakman RB, Bezstarosti K, Sieuwerts AM, et al. Integrative analysis of genomics and proteomics data on clinical breast cancer tissue specimens extracted with acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform [J]. J Proteome Res, 2015, 14: 1627-1636.
- [12] Ashmole I, Bradding P. Ion channels regulating mast cell biology [J]. Clin Exp Allergy, 2013, 43: 491-502.
- [13] Szebeni J. Complement activation-related pseudoallergy: a stress reaction in blood triggered by nanomedicines and biologicals [J]. Mol Immunol, 2014, 61: 163-173.
- [14] Berkes EA. Anaphylactic and anaphylactoid reactions to aspirin and other NSAIDs [J]. Clin Rev Allergy Immunol, 2003, 24: 137-148.
- [15] Farnam K, Chang C, Teuber S, et al. Nonallergic drug hypersensitivity reactions [J]. Int Arch Allergy Immunol, 2012, 159: 327-345.
- [16] Qi LW, Wang CZ, Yuan CS. American ginseng: potential structure-function relationship in cancer chemoprevention [J]. Biochem Pharmacol, 2010, 80: 947-954.
- [17] Sibilano R, Frossi B, Pucillo CE. Mast cell activation: a complex interplay of positive and negative signaling pathways [J]. Eur J Immunol, 2014, 44: 2558-2566.