

红花提取物对RBL-2H3细胞的免疫毒性及机制研究^Δ

吴思澜*,梅小利,罗金萍,张 莉,黄思行,黄崇刚[#](重庆市中药研究院中药药理毒理研究所/国家中医药管理局中药药理三级实验室,重庆 400065)

中图分类号 R285.5;R965.3 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2026)08-1003-06
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2026.08.06



摘要 **目的** 探究红花提取物直接诱导以及超剂量红花提取物致敏血清诱导对肥大细胞RBL-2H3的免疫毒性及潜在机制。**方法** 红花提取物直接诱导研究将RBL-2H3细胞分为正常对照组(不做任何处理)与红花提取物组(10 mg/mL);超剂量红花提取物致敏血清诱导研究将大鼠分为正常对照组(不做任何处理)、佐剂处理组(佐剂1 mL)、红花提取物诱导致敏组(2.04 g/mL)和卵清蛋白(OVA)诱导致敏组(50 mg/mL),隔日1次,共致敏3次。观察RBL-2H3细胞形态学变化,并计算脱颗粒率,检测组胺含量,计算 β -氨基己糖苷酶(β -Hex)释放率,检测白细胞介素6(IL-6)、肿瘤坏死因子 α (TNF- α)水平和细胞内 Ca^{2+} 浓度。**结果** 在红花提取物直接诱导下,与正常对照组比较,红花提取物组细胞体积明显缩小,细胞密度减少;细胞脱颗粒率、组胺含量、 β -Hex释放率、IL-6和TNF- α 水平,以及细胞内 Ca^{2+} 浓度均显著升高($P<0.01$)。在超剂量红花提取物致敏血清诱导下,与佐剂处理组比较,红花提取物诱导致敏组、OVA诱导致敏组上述指标结果,与直接诱导条件下红花提取物组变化一致($P<0.01$)。**结论** 红花提取物可能通过直接诱导以及超剂量使用致敏血清诱导这两种方式影响RBL-2H3细胞脱颗粒,促进 Ca^{2+} 内流,同时伴随促炎性细胞因子释放;其作用机制可能与多组分协同作用下钙信号通路的激活以及炎症通路的调控相关。**关键词** 红花提取物;肥大细胞;RBL-2H3;脱颗粒;免疫毒性

Study on the immunotoxicity and mechanism of *Carthamus tinctorius* extract on RBL-2H3 cells

WU Silan, MEI Xiaoli, LUO Jinping, ZHANG Li, HUANG Sixing, HUANG Chonggang (Institute of pharmacology and Toxicology of Traditional Chinese Medicine, Chongqing Academy of Chinese Materia Medica/Third Grade Laboratory of Pharmacology of Chinese Materia Medica, National Administration of Traditional Chinese Medicine, Chongqing 400065, China)

ABSTRACT **OBJECTIVE** To investigate the immunotoxicity and potential mechanism of *Carthamus tinctorius* extract on RBL-2H3 cells via direct induction and induction by sensitized serum prepared with an overdose of the extract. **METHODS** For direct induction by *C. tinctorius* extract, RBL-2H3 cells were divided into normal control group (no treatment) and *C. tinctorius* extract group (10 mg/mL). For induction by sensitized serum prepared with an overdose of *C. tinctorius* extract, rats were divided into normal control group (no treatment), adjuvant-treated group (1 mL adjuvant), *C. tinctorius* extract-induced sensitization group (2.04 g/mL), and ovalbumin (OVA)-induced sensitization group (50 mg/mL). Sensitization was performed once every other day for a total of 3 times. Morphological changes of RBL-2H3 cells were observed, the degranulated rate of cells was counted, and histamine content was determined; the release rate of β -hexosaminidase (β -Hex) was calculated, the levels of interleukin-6 (IL-6) and tumor necrosis factor- α (TNF- α) and intracellular Ca^{2+} concentration were detected. **RESULTS** Under direct induction by *C. tinctorius* extract, compared with the normal control group, the volume of cells in the *C. tinctorius* extract group was significantly reduced and cell density decreased; the degranulation rate of cells, histamine content, β -Hex release rate, IL-6 and TNF- α levels, as well as intracellular Ca^{2+} concentration were all significantly increased ($P<0.01$). Under induction by sensitized serum prepared with an overdose of *C. tinctorius* extract, compared with the adjuvant-treated group, the above indicators in the *C. tinctorius* extract-induced sensitization group and the OVA-induced sensitization group showed consistent changes with those in the *C. tinctorius* extract group under direct induction, all being significantly elevated ($P<0.01$). **CONCLUSIONS** *C. tinctorius* extract may affect degranulation of RBL-2H3 cells and promote Ca^{2+} influx accompanied by the release of pro-inflammatory cytokines through two approaches: direct induction and induction by sensitized serum prepared under overdose administration. Its mechanism may be related to the activation of the calcium signaling pathway and the regulation of inflammatory pathways under the synergistic effect of multiple components.

KEYWORDS *Carthamus tinctorius* extract; mast cells; RBL-2H3; degranulation; immunotoxicity

^Δ **基金项目** 国家重点研发计划课题(No.2022YFC3501603);重庆市中医药重点学科建设项目[No.委办(2022-66)]

* **第一作者** 工程师。研究方向:中药药理毒理机制。E-mail: 253151262@qq.com

[#] **通信作者** 研究员。研究方向:中药药理毒理机制。E-mail: hcg2091@163.com

随着中医药在国内外的广泛应用,中药相关安全性问题时有报道,尤其是一些被认为“无毒”的传统中药,在临床使用过程中也出现了明显的不良反应,这使得中药的安全性问题受到越来越多的关注^[1-3]。然而,现有

常规毒理学研究方法存在明显的局限性,难以全面揭示中药临床应用过程中的潜在安全风险^[4-6]。这一现状,已成为中药安全性评价领域亟待解决的关键问题。因此,中药风险评估需突破传统认知范畴,结合药性特征、临床用药经验及不良反应数据,开展更具针对性的毒理学研究。

红花作为一种传统中药材,含有醌类查尔酮类、黄酮类、生物碱等多种活性成分,具有抗炎、抗氧化、免疫调节等药理作用^[7-8]。鉴于其成分的多样性与药理作用的广泛性,红花单味制剂及相关配伍复方制剂在临床中的应用日趋广泛,有关其不良反应的报道亦随之增多^[9]。但目前关于红花毒性的研究仍存在明显不足:绝大多数研究聚焦于注射剂(如红花注射液、注射用红花黄色素、羟基红花黄色素A等)所引发的类过敏反应^[10-12],而对于非注射剂型的花红单用及复方制剂(如红花口服液、桃红四物汤等),尚缺乏系统的不良反应监测与安全性评价研究,尤其是超剂量使用场景下的免疫毒性研究,更是匮乏。

肥大细胞作为人体固有免疫细胞,在受到特定刺激后会发生脱颗粒反应,进而引发一系列的生理或病理效应;这一脱颗粒过程,本质上是分泌介质与细胞因子的过程,在过敏性疾病、类过敏反应及神经性炎症等病理进程中均起着关键作用^[13-14]。大鼠嗜碱性白血病细胞株RBL-2H3,由于具备与肥大细胞相似的细胞结构和脱颗粒途径,成为模拟肥大细胞脱颗粒病理过程、探究其作用机制的理想替代模型^[15-16],为红花免疫毒性的机制研究提供了可靠的实验载体。基于此,本文以RBL-2H3细胞为研究对象,探究红花提取物直接诱导以及超剂量红花提取物致敏血清诱导,对RBL-2H3细胞免疫毒性的影响及潜在机制,旨在为红花临床合理用药及相关风险防控提供科学依据,同时也为中药的潜在风险探究提供一种可行的研究范式。

1 材料

1.1 主要仪器

YXQ-LS-100A型电热压力蒸汽消毒器、GZX-9140MBE型电热恒温鼓风干燥箱、BSC-1300ⅡA2型生物安全柜、SW-CJ-2F型超净工作台均购自上海博迅实业有限公司,Elix3型纯水仪购自美国Millipore公司,MCO-15AC型CO₂培养箱购自日本Sanyo公司,HW.SY-P型智能恒温水浴锅购自北京东方精瑞科技发展有限公司,ECLIPSE Ti-s型倒置荧光显微镜购自日本Nikon公司,TDL-50B型台式低速离心机购自上海安亭科学仪器厂,DW-HL328型超低温冷冻储存箱购自中科美菱低温科技股份有限公司,Varioskan™ LUX型多功能酶标仪购自美国Thermo Fisher Scientific公司,CytoFLEX型流式细胞仪购自美国Beckman Coulter公司。

1.2 主要药物与试剂

红花药材购自浙江永宁药业股份有限公司,经北京大学药学院屠鹏飞教授鉴定为菊科植物红花*Carthamus*

tinctorius L.的干燥花。MEM培养基、胎牛血清、非必需氨基酸溶液(批号分别为3237291、2233790P、3209589)均购自美国Gibco公司;胰蛋白酶、青霉素-链霉素溶液(100×)(批号分别为A068240916、A143803405)均购自上海碧云天生物技术有限公司;对硝基苯-*N*-乙酰-β-D-氨基葡萄糖苷(4-nitrophenyl-*N*-acetyl-β-D-glucopyranoside,PNP-NAG)、弗氏完全佐剂、弗氏不完全佐剂、卵清蛋白(ovalbumin,OVA)、二甲基亚砜(批号分别为0000491065、0000440881、0000406764、0000289190、BNBK6092)均购自美国Sigma公司;甲苯胺蓝染色液(细胞专用)、组胺检测试剂盒、Fluo-3 AM Ca²⁺浓度检测试剂盒(批号分别为YP24008001、2412008、2410016)均购自北京索莱宝科技有限公司;碳酸氢钠、碳酸钠、柠檬酸、柠檬酸钠(批号分别为G2422303、F2413210、A2418239、F2411443)均购自北京化学工业集团有限责任公司;白细胞介素6(interleukin-6,IL-6)、肿瘤坏死因子α(tumor necrosis factor-α,TNF-α)酶联免疫吸附测定(ELISA)试剂盒(批号分别为202501、202501)均购自北京晶美生物工程有限公司;水合氯醛(批号I2214469)购自阿拉丁试剂(上海)有限公司。

1.3 实验动物与细胞

SPF级雄性SD大鼠4只,体重250~300 g,由江苏华创信诺医药科技有限公司提供,生产许可证号:SCXK(苏)2020-0009。本实验在遵循优良实验室规范的实验室中开展,饲养环境:12 h光暗交替,温度控制在23~25℃,湿度约55%。本实验经重庆市中药研究院实验动物福利伦理审查委员会批准(伦理号:YLS2022-58)。

大鼠嗜碱性白血病细胞株RBL-2H3购自中国科学院上海细胞库。

2 方法

2.1 红花提取物的制备

根据本课题组前期建立的方法,将红花药材用10倍量水煎煮2次(1.5 h/次),滤过,合并提取液,喷雾干燥,待用。红花提取物的生药含量为4.486 g,高效液相色谱法测定其含量约为0.9%(以羟基红花黄色素A计)。

2.2 细胞培养

将RBL-2H3细胞置于含15%优质胎牛血清、1%青霉素-链霉素双抗以及1%非必需氨基酸溶液的MEM培养基中培养,每2~3 d更换1次培养液。当细胞融合度达80%时,按照1:3的比例进行传代,置于37℃饱和湿度的培养箱中培养,取处于对数生长期的细胞进行传代及后续实验。

2.3 红花提取物直接诱导对RBL-2H3细胞免疫毒性的影响

2.3.1 细胞形态学观察及脱颗粒计数

取处于对数生长期的RBL-2H3细胞,经消化液消化处理后,使用完全培养基对细胞进行重悬,并将细胞密度调整至2×10⁴ mL⁻¹。于无菌12孔板中铺设细胞圆片,取500 μL细胞悬液接种于圆片之上。待细胞贴壁

30 min后,在培养皿中补加500 μL 完全培养液,于37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱中培养过夜。将经过上述处理的细胞分为正常对照组和红花提取物组,每组设3个复孔(后同)。正常对照组不做任何处理,红花提取物组加入10 μL 终浓度为10 mg/mL的红花提取物[该浓度依据本课题组前期预实验筛选出的半数抑制浓度(half maximal inhibitory concentration, IC_{50})设定]。继续培养24 h后,用磷酸盐缓冲液漂洗3次,每次5 min;采用4%多聚甲醛溶液在室温下处理20 min;再用双蒸水清洗3次,每次2 min;每孔加入适量的细胞专用甲苯胺蓝染色液染色5 min,随后加入等量蒸馏水,混匀后静置15 min;最后用蒸馏水清洗2次,每次30 s,加入足量蒸馏水以完全浸没样本。采用倒置显微镜观察细胞形态变化并拍照。计数每200个细胞中染色的细胞数量,并计算细胞的脱颗粒率:脱颗粒率(%)=染色细胞数/200个细胞数 $\times$ 100%。

2.3.2 组胺含量检测

取处于对数生长期的RBL-2H3细胞,接种于12孔板中,接种密度为 $2\times 10^4\text{ mL}^{-1}$,每孔接种体积为1 mL,随后将其置于培养箱中培养过夜。将经过上述处理后的细胞分为正常对照组和红花提取物组。正常对照组加入1 mL完全培养基,红花提取物组加入1 mL含有10 mg/mL红花提取物的完全培养基。然后,将其置于37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱中继续培养24 h,收集各组上清液。按照ELISA试剂盒说明书操作,检测上清液中的组胺含量。

2.3.3 β -氨基己糖苷酶释放率计算

取处于对数生长期的RBL-2H3细胞,接种于96孔板中,接种密度为 $1\times 10^5\text{ mL}^{-1}$,每孔接种体积为100 μL ,随后将其置于培养箱中培养过夜。将经过上述处理后的细胞分为正常对照组和红花提取物组。正常对照组加入100 μL 完全培养基,红花提取物组加入100 μL 含10 mg/mL红花提取物的完全培养基。然后,将其置于37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱继续培养24 h,收集各组上清液。然后,在正常对照组原孔中加入50 μL 细胞裂解液,于37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育30 min。分别取各孔上清液以及正常对照组细胞裂解液50 μL ,转移至新的96孔板中,随后加入100 μL 显色底物,于37 $^{\circ}\text{C}$ 下孵育45 min。最后,加入200 μL 终止液终止反应,于405 nm波长处测定吸光度(optical density, OD)值,并计算 β -氨基己糖苷酶(β -hexosaminidase, β -Hex)释放率: β -Hex释放率(%)=各组受检孔上清OD值/(正常对照组上清OD值+正常对照组胞内OD值) $\times$ 100%。

2.3.4 IL-6、TNF- α 水平检测

取处于对数生长期的RBL-2H3细胞,接种于96孔板中,接种密度为 $1\times 10^5\text{ mL}^{-1}$,每孔接种体积为100 μL ,随后将其置于培养箱中过夜培养。将经过上述处理后的细胞分为正常对照组和红花提取物组。正常对照组加入100 μL 完全培养基,红花提取物组加入100 μL 含10 mg/mL红花提取物的完全培养基。然后,将其置于37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱中继续培养24 h,收集各组上清液,按照

ELISA试剂盒说明书操作,检测上清液中IL-6、TNF- α 水平。

2.3.5 Ca^{2+} 浓度检测

取处于对数生长期的RBL-2H3细胞制备成密度为 $2\times 10^5\text{ mL}^{-1}$ 的细胞悬液,取2 mL该细胞悬液接种于6孔板中,置于37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱中培养过夜。将经过上述处理后的细胞分为正常对照组和红花提取物组。正常对照组加入2 mL完全培养基,红花提取物组加入2 mL含10 mg/mL红花提取物的完全培养基。然后,将其置于37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱中继续培养24 h。用胰蛋白酶消化细胞后,用Hank's平衡盐溶液洗涤3次,将细胞转移到2 mL EP管中,每管加入100 μL 的Fluo-3 AM工作液,于37 $^{\circ}\text{C}$ 下培养20 min,以此进行荧光探针装载。随后加入500 μL 含1%胎牛血清的Hank's平衡盐溶液,继续培养40 min。再用磷酸盐缓冲液洗涤3次,重悬细胞,制成密度为 $1\times 10^5\text{ mL}^{-1}$ 的细胞悬液,按每管200 μL 分装后,于37 $^{\circ}\text{C}$ 培养10 min。最后采用流式细胞仪检测平均荧光强度,以此反映 Ca^{2+} 浓度,平均荧光强度越大,表明 Ca^{2+} 浓度越高。

2.4 超剂量红花提取物致敏血清对RBL-2H3细胞免疫毒性的考察

2.4.1 超剂量红花提取物致敏给药剂量的设定

为系统评价红花在不同应用场景中的免疫毒性,本研究采用超剂量致敏给药方案,分析超剂量红花提取物致敏血清诱导RBL-2H3细胞的免疫毒性。依据本课题组前期研究结果,红花提取物配制后的最大使用浓度为2.04 g/mL,因此以此浓度作为超剂量致敏给药剂量。

2.4.2 致敏血清的制备

大鼠适应性喂养1周后,将大鼠分为正常对照组、佐剂处理组、红花提取物诱导致敏组和OVA诱导致敏组。正常对照组大鼠不做任何处理。佐剂处理组大鼠于背部皮下注射佐剂,每次1 mL,隔日1次,共3次(首次注射采用弗氏完全佐剂,第2、3次采用弗氏不完全佐剂)。红花提取物诱导致敏组及OVA诱导致敏组大鼠,通过背部皮下分别注射红花提取物或OVA与佐剂等体积混合的乳剂来致敏,每次1 mL,隔日1次,共3次[首次致敏时,分别将0.5 mL红花提取物(2.04 g/mL)或0.5 mL OVA(50 mg/mL)与等体积的弗氏完全佐剂混合制成乳剂后进行注射;第2、3次致敏时,分别将上述浓度的红花提取物和OVA溶液各0.5 mL,与等体积的弗氏不完全佐剂混合制成乳剂后进行注射]。在末次致敏后的第13天,将大鼠用7%水合氯醛麻醉,经腹主动脉取血,将血液置于37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴15 min,以3 000 r/min离心15 min,取上清液,即为致敏血清。将致敏血清分装后,于-20 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

2.4.3 细胞形态学观察及脱颗粒计数

取处于对数生长期的RBL-2H3细胞,经胰蛋白酶消化处理后,采用完全培养基进行重悬,并将细胞密度调整至 $2\times 10^4\text{ mL}^{-1}$ 。于无菌12孔板中铺设细胞圆片,取

500 μL 细胞悬液接种至圆片上。待细胞贴壁 30 min 后,在培养皿中补充完全培养液 500 μL ,随后置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱中培养过夜。将经过上述处理后的细胞分为正常对照组、佐剂处理组、红花提取物诱导致敏组、OVA 诱导致敏组。正常对照组加入 1 mL 含 15% 正常大鼠血清的完全培养液,佐剂处理组加入 1 mL 含 15% 佐剂处理的大鼠血清的完全培养液,红花提取物诱导致敏组加入 1 mL 含 15% 红花提取物诱导致敏的大鼠血清的完全培养液,OVA 诱导致敏组加入 1 mL 含 15% OVA 诱导致敏的大鼠血清的完全培养液。后续步骤同“2.3.1”项。

2.4.4 组胺含量检测

取处于对数生长期的 RBL-2H3 细胞,接种于 96 孔板中,接种密度为 $1 \times 10^5 \text{ mL}^{-1}$,每孔接种体积为 100 μL ,随后将其置于培养箱中培养过夜。按“2.4.3”项下方法进行分组并加入 1 mL 相应大鼠血清;后续步骤同“2.3.2”项。

2.4.5 β -Hex 释放率计算

取处于对数生长期的 RBL-2H3 细胞,接种于 96 孔板中,接种密度为 $1 \times 10^5 \text{ mL}^{-1}$,每孔接种体积为 100 μL ,随后将其置于培养箱中过夜培养。按“2.4.3”项下方法进行分组并加入 100 μL 相应大鼠血清;后续步骤同“2.3.3”项。

2.4.6 IL-6、TNF- α 水平检测

取处于对数生长期的 RBL-2H3 细胞,接种于 96 孔板,接种密度为 $1 \times 10^5 \text{ mL}^{-1}$,每孔接种体积为 100 μL ,随后将其置于培养箱中培养过夜。按“2.4.3”项下方法进行分组并加入 100 μL 相应大鼠血清;后续步骤同“2.3.4”项。

2.4.7 Ca^{2+} 浓度检测

取处于对数生长期的 RBL-2H3 细胞,取密度为 $2 \times 10^5 \text{ mL}^{-1}$ 的细胞悬液 2 mL,接种于 6 孔板中,置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱中培养过夜。按“2.4.3”项下方法进行分组并加入 2 mL 相应大鼠血清;后续步骤同“2.3.5”项。

2.5 统计学方法

采用 GraphPad 8.0 软件对数据进行统计分析。计量资料满足正态分布以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用方差分析,进一步两两比较采用 LSD- t 检验。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

3 结果

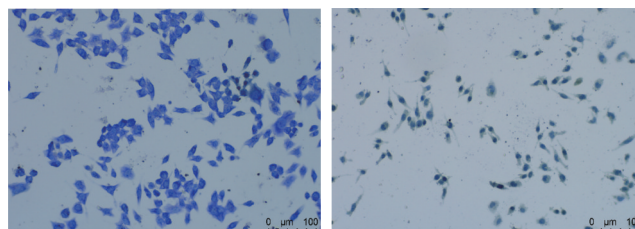
3.1 红花提取物直接诱导对 RBL-2H3 细胞的免疫毒性

3.1.1 对细胞形态学及脱颗粒的影响

甲苯胺蓝染色结果显示,正常对照组 RBL-2H3 细胞呈成纤维细胞样,细胞体积较大;红花提取物组 RBL-2H3 细胞体积明显缩小,细胞密度减少(图 1)。与正常对照组[(0.82 $\pm$ 0.67)%]比较,红花提取物组 RBL-2H3 细胞脱颗粒率[(8.85 $\pm$ 2.07)%]显著升高($P<0.01$)。

3.1.2 对组胺含量、 β -Hex 释放率的影响

正常对照组和红花提取物组 RBL-2H3 细胞中组胺含量分别为(0.116 $\pm$ 0.010)、(0.233 $\pm$ 0.023) $\mu\text{mol/mL}$,



A. 正常对照组

B. 红花提取物组

图 1 红花提取物直接诱导后 RBL-2H3 细胞染色显微图

β -Hex 释放率分别为(13.4 $\pm$ 1.4)%、(21.3 $\pm$ 1.4)%;与正常对照组比较,红花提取物组 RBL-2H3 细胞中组胺含量、 β -Hex 释放率均显著升高($P<0.01$)。

3.1.3 对 IL-6、TNF- α 水平的影响

正常对照组和红花提取物组 RBL-2H3 细胞中 IL-6 水平分别为(12.9 $\pm$ 0.3)、(16.3 $\pm$ 0.5) pg/mL , TNF- α 水平分别为(46.1 $\pm$ 1.5)、(57.7 $\pm$ 3.7) ng/L ;与正常对照组比较,红花提取物组 RBL-2H3 细胞中 IL-6、TNF- α 水平均显著升高($P<0.01$)。

3.1.4 对 Ca^{2+} 浓度的影响

正常对照组和红花提取物组 RBL-2H3 细胞中 Ca^{2+} 平均荧光强度分别为(3.6 $\pm$ 0.0) $\times 10^4$ 、(10.9 $\pm$ 0.8) $\times 10^4$ 。与正常对照组比较,红花提取物组 RBL-2H3 细胞中 Ca^{2+} 平均荧光强度显著增加($P<0.01$)。结果见图 2。

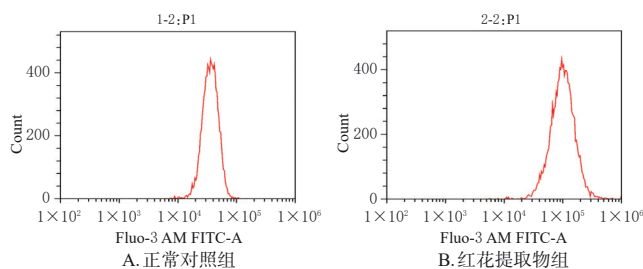


图 2 红花提取物直接诱导后细胞中 Ca^{2+} 光谱图

3.2 超剂量红花提取物致敏血清对 RBL-2H3 细胞的免疫毒性

3.2.1 对细胞形态学及脱颗粒的影响

正常对照组、佐剂处理组、红花提取物诱导致敏组、OVA 诱导致敏组的细胞形态无明显差异(图 3),上述各组 RBL-2H3 细胞的脱颗粒率分别为(5.7 $\pm$ 1.0)%、(7.3 $\pm$ 1.8)%、(10.8 $\pm$ 2.3)%、(11.5 $\pm$ 3.5)%。与正常对照组比较,佐剂处理组 RBL-2H3 细胞脱颗粒率升高,但差异无统计学意义($P>0.05$);与佐剂处理组比较,红花提取物诱导致敏组、OVA 诱导致敏组 RBL-2H3 细胞脱颗粒率均显著升高($P<0.01$)。

3.2.2 对组胺含量、 β -Hex 释放率的影响

与正常对照组比较,佐剂处理组 RBL-2H3 细胞中组胺含量及 β -Hex 释放率升高,但差异无统计学意义($P>0.05$);与佐剂处理组比较,红花提取物诱导致敏组、OVA 诱导致敏组 RBL-2H3 细胞中组胺含量及 β -Hex 释放率均显著升高($P<0.01$)。结果见表 1。

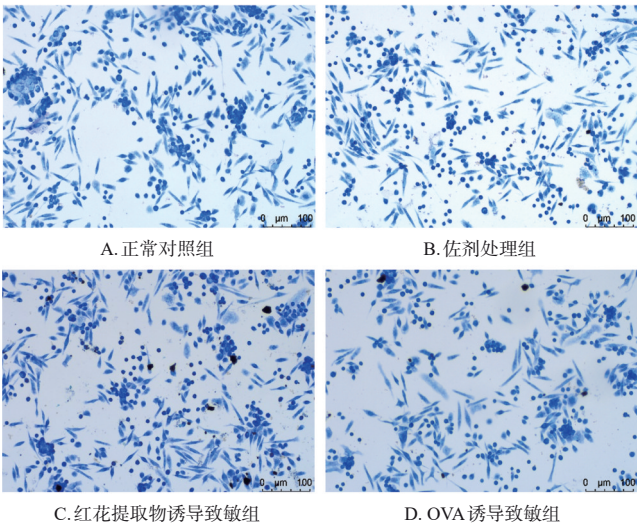


图3 超剂量红花提取物致敏血清诱导后RBL-2H3细胞染色显微图

表1 超剂量红花提取物致敏血清诱导对组胺含量、 β -Hex 释放率和 IL-6、TNF- α 水平的影响($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

组别	组胺/($\mu\text{mol/L}$)	β -Hex 释放率/%	IL-6/(pg/mL)	TNF- α /(ng/L)
正常对照组	0.171 ± 0.037	11.1 ± 0.4	13.7 ± 0.7	54.1 ± 2.4
佐剂处理组	0.198 ± 0.034	11.7 ± 0.3	14.5 ± 0.7	57.1 ± 3.9
红花提取物诱导致敏组	0.325 ± 0.031^a	21.1 ± 2.2^a	16.6 ± 0.9^a	64.9 ± 2.7^a
OVA 诱导致敏组	0.359 ± 0.021^a	23.3 ± 0.7^a	18.9 ± 1.9^a	71.0 ± 5.1^a

a: 与佐剂处理组比较, $P < 0.01$ 。

3.2.3 对 IL-6、TNF- α 水平的影响

与正常对照组比较, 佐剂处理组 RBL-2H3 细胞中 IL-6、TNF- α 水平均升高, 但差异无统计学意义 ($P > 0.05$); 与佐剂处理组比较, 红花提取物诱导致敏组、OVA 诱导致敏组 RBL-2H3 细胞中 IL-6、TNF- α 水平均显著升高 ($P < 0.01$)。结果见表 1。

3.2.4 对 Ca^{2+} 浓度的影响

正常对照组、佐剂处理组、红花提取物诱导致敏组、OVA 诱导致敏组 RBL-2H3 细胞中 Ca^{2+} 平均荧光强度分别为 $(9.6 \pm 0.1) \times 10^4$ 、 $(10.2 \pm 0.7) \times 10^4$ 、 $(15.7 \pm 0.1) \times 10^4$ 、 $(19.2 \pm 0.1) \times 10^4$ 。与正常对照组比较, 佐剂处理组 RBL-2H3 细胞中 Ca^{2+} 平均荧光强度升高, 但差异无统计学意义 ($P > 0.05$); 与佐剂处理组比较, 红花提取物诱导致敏组、OVA 诱导致敏组 RBL-2H3 细胞中 Ca^{2+} 平均荧光强度均显著增加 ($P < 0.01$)。结果见图 4。

4 讨论

红花在临床上属于常用的传统中药材, 已有研究证实, 其脂溶性活性成分具有较强的致敏性, 且这种致敏性与类过敏反应机制密切相关^[13], 这表明在临床应用中, 红花存在一定的致敏风险和促炎反应的安全隐患。因此, 系统考察红花的免疫毒性特征, 并阐释其潜在的免疫炎症相关作用机制, 对于明确红花临床安全用药范畴意义重大。考虑到类肥大细胞 RBL-2H3 是目前研究肥大细胞脱颗粒机制理想的替代模型, 故本研究选择其

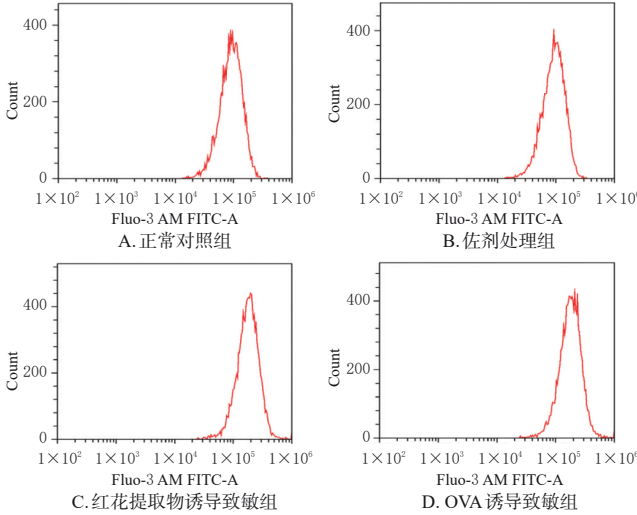


图4 超剂量红花提取物致敏血清诱导后细胞中 Ca^{2+} 光谱图

作为体外模型, 观察红花提取物直接诱导以及超剂量红花提取物致敏血清诱导这两种方式, 对 RBL-2H3 细胞免疫毒性的影响。本课题组前期预实验结果显示, 红花提取物作用于 RBL-2H3 细胞 24 h 的 IC_{50} 为 12.63 mg/mL, 因此本研究选择红花提取物 10 mg/mL 作为红花提取物直接诱导的细胞干预浓度。该浓度与 IC_{50} 较为接近, 一方面能够维持细胞的基本活性, 另一方面也足以诱导出显著的脱颗粒效应, 能够较好地模拟红花提取物在接近有效浓度区间内的生物活性与毒性作用, 同时还避免了因浓度过高导致的细胞损伤、干扰功能学实验结果等问题。此外, 为模拟临床超剂量使用情景下机体可能产生的免疫应答, 本研究采用红花提取物的最大可配制浓度 (2.04 g/mL) 对大鼠进行多次致敏, 取致敏后血清干预 RBL-2H3 细胞。该剂量远高于红花临床常用给药剂量 (通常为每日 3~10 g 生药), 属于严格意义上的超剂量暴露条件。

本研究结果显示, 在 10 mg/mL 干预浓度下, 红花提取物直接诱导后的 RBL-2H3 细胞中组胺含量和 β -Hex 释放率、细胞内 Ca^{2+} 浓度均显著升高。组胺释放、 β -Hex 分泌及 Ca^{2+} 浓度升高是肥大细胞活化脱颗粒的核心特征指标, 该结果直接证实红花提取物在接近 IC_{50} 剂量时可有效触发肥大细胞活化。超剂量红花提取物致敏血清诱导结果与红花提取物直接诱导结果高度一致。这提示, 红花提取物可能通过两条途径激活肥大细胞: 一是直接结合细胞表面非免疫球蛋白 E (immunoglobulin E, IgE) 受体 (如 Toll 样受体), 激活下游信号通路^[17-18]; 二是通过致敏血清中的 IgE 与细胞表面高亲和力 IgE 受体交联, 激活钙信号通路促进 Ca^{2+} 内流^[19-21]。虽然路径不同, 但最终都介导了肥大细胞的脱颗粒。

本研究还发现, 红花提取物能同步上调辅助性 T 细胞 2 (helper T cell 2, Th2) 型细胞因子 IL-6 和 Th1 型细胞因子 TNF- α 的表达, 打破机体正常 Th1/Th2 免疫平衡, 且红花提取物直接诱导与超剂量红花提取物致敏血清

诱导的细胞因子表达趋势基本一致。这也印证了红花提取物可能通过多途径调控免疫反应:促炎性细胞因子释放形成正向反馈环路,局部炎症反应会持续放大,这一效应与肥大细胞在过敏及炎症进程中的双重调控作用相契合。

结合已有研究中关于红花脂溶性成分致敏性与类过敏反应的相关结论^[13],本研究发现,红花提取物既能通过直接诱导,也能通过致敏血清介导的途径,诱导RBL-2H3细胞脱颗粒,同时伴随促炎性细胞因子大量释放。其作用机制可能涉及多种组分协同调控钙信号通路激活,以及炎症相关通路的表达。这一结果一方面为红花的免疫调节和抗炎作用提供了新的研究视角,另一方面也提示红花在特定浓度下可能借助膜损伤或受体激活这两种机制触发肥大细胞活化。相较于体外直接诱导,致敏血清诱导更接近体内真实病理生理过程,反映了超剂量暴露后免疫系统被“预激活”的状态。基于以上发现,笔者建议,临床应用红花时,既要考虑其免疫调节价值,也要留意其潜在的致敏风险,尤其是超剂量使用诱发的免疫毒性风险;特别是用于过敏相关疾病治疗时,更需审慎评估。

本研究亦存在一些局限性:未设置梯度给药剂量与阳性对照,剂量-效应关系和干预特异性尚不明晰;未开展红花提取物脂溶性成分的平行实验,毒性作用的物质基础仍不明确。后续计划结合多组学技术与体内实验,围绕致敏活性成分的鉴定、体内安全性系统评价以及分子机制网络解析等方面进行深入研究。

综上所述,红花提取物可能通过直接诱导,以及超剂量使用致敏血清诱导两种方式影响RBL-2H3细胞脱颗粒,促进Ca²⁺内流,同时伴随促炎性细胞因子释放;其作用机制可能与多组分协同作用下钙信号通路的激活以及炎症通路的调控相关。

参考文献

[1] 王停,涂灿,张林,等. 中药潜在毒性研究及其科学监管探讨[J]. 中国实验方剂学杂志,2026,32(3):1-9.

[2] 柏兆方,高源,王伽伯,等. 中药特异质肝损伤评价及风险防控对策研究[J]. 药学进展,2020,44(10):724-729.

[3] WU J W, ZHU Y, DU X K, et al. Review on traditional Chinese medicine-induced liver injury[J]. J Ethnopharmacol, 2026, 358:120949.

[4] 杨忠奇,唐雅琴,汤慧敏,等. 基于人用经验的中药新药安全性评价[J]. 中国中药杂志,2025,50(3):812-816.

[5] XUE J H, GAO S W, YOU Z B, et al. *In vitro* technology and ADMET research in traditional Chinese medicine[J]. Front Pharmacol, 2025, 16:1605330.

[6] LI X Y, LIN L S, PANG L, et al. Application and development trends of network toxicology in the safety assessment of traditional Chinese medicine[J]. J Ethnopharmacol, 2025, 343:119480.

[7] 王佐梅,肖洪彬,李雪莹,等. 中药红花的药理作用及临床应用研究进展[J]. 中华中医药杂志,2021,36(11):6608-6611.

[8] 白启荣,郭姣洁,吴娇. 红花的化学成分及药理作用研究进展[J]. 新乡医学院学报,2024,41(1):88-94,100.

[9] 孙骏. 2017年药品不良反应监测重要事件回顾与启示[J]. 药学与临床研究,2018,26(1):3-6.

[10] 陈勇灵,蔡霖,张巍,等. 注射用红花黄色素基于细胞脱颗粒和急性类过敏模型的研究[J]. 中国中药杂志,2019,44(17):3792-3797.

[11] 黄丰,李满萍,吴赛春,等. 羟基红花黄色素A对抗原诱导RBL-2H3细胞活化脱颗粒的影响[J]. 中国药房,2013,24(19):1738-1741.

[12] 伏晓,代大顺,吴桂月,等. 红花注射液致敏成分的RBL-2H3细胞模型筛选[J]. 时珍国医国药,2015,26(9):2291-2293.

[13] GALLI S J, TSAI M. IgE and mast cells in allergic disease[J]. Nat Med, 2012, 18(5):693-704.

[14] WAGNER A, ALAM S B, KULKA M. The effects of age, origin, and biological sex on rodent mast cell (BMMC and MC/9) and basophil (RBL-2H3) phenotype and function[J]. Cell Immunol, 2023, 391:104751.

[15] YANO H, NAKANISHI S, KIMURA K, et al. Inhibition of histamine secretion by wortmannin through the blockade of phosphatidylinositol 3-kinase in RBL-2H3 cells[J]. J Biol Chem, 1993, 268(34):25846-25856.

[16] ZHOU Z W, ZHU X Y, LI S Y, et al. Formononetin inhibits mast cell degranulation to ameliorate compound 48/80-induced pseudoallergic reactions[J]. Molecules, 2023, 28(13):5271.

[17] VON BEEK C, FAHLGREN A, GEISER P, et al. A two-step activation mechanism enables mast cells to differentiate their response between extracellular and invasive enterobacterial infection[J]. Nat Commun, 2024, 15:904.

[18] SIRAGANIAN R P. Mast cell signal transduction from the high-affinity IgE receptor[J]. Curr Opin Immunol, 2003, 15(6):639-646.

[19] NAGAO K, YOSHIKAWA S, URAKAMI H, et al. Ligand-independent function of β_2 -adrenergic receptor affects IgE-mediated Ca²⁺ influx in mast cells[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2024, 733:150595.

[20] BLANK U, HUANG H, KAWAKAMI T. The high affinity IgE receptor: a signaling update[J]. Curr Opin Immunol, 2021, 72:51-58.

[21] HOLOWKA D, WILKES M, STEFAN C, et al. Roles for Ca²⁺ mobilization and its regulation in mast cell functions: recent progress[J]. Biochem Soc Trans, 2016, 44(2):505-509.

(收稿日期:2026-01-09 修回日期:2026-03-12)

(编辑:舒安琴)