鱼腥草注射液过敏及类过敏实验研究

张美玉, 李贻奎, 张嘉, 李连达* (中国中医科学院西苑医院实验研究中心, 北京 100091)

摘要: 目的 评价鱼腥草注射液及其辅料吐温 80(Tween-80)静脉给药的致敏性。方法 采用 Beagle 犬类过敏及过敏实验, 观察给药后动物行为变化和检测血浆中组胺、IgE、IgM、IgG 的含量。结果 含有 Tween-80 的鱼腥草注射液及 Tween-80 组动物给药后出现显著的行为异常, 血浆组胺升高, 而 IgE 变化不规律, IgG、IgM 则无明显改变。结论 鱼腥草注射液中导致犬严重类过敏反应与 Tween-80 有关。建议 Beagle 犬的过敏及类过敏试验, 应作为中药注射液致敏试验的必做实验, 行为异常及血浆中组胺为主要的判定指标, IgE 作为辅助判定指标。

关键词: 鱼腥草注射液; 吐温 80; 过敏及类过敏反应; Beagle 犬; 组胺; IgE

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1007-7693(2009)08-0610-05

Experimental Study on Anaphylactic and Anaphylactoid Reactions of Houttuynia Cordata Injections

ZHANG Meiyu, LI Yikui, ZHANG Jia, LI Lianda* (*R&D Center, Xiyuan Hospital, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100091, China*)

ABSTRACT: OBJECTIVE To evaluate the sensitizations by intravenous of Houttuynia Cordata injections and polysorbate 80 injection. **METHODS** Active systemic anaphylaxis(ASA) test was carried out, by intravenous of different injections to Beagle dogs to immunize, and inject double doses of injections to stimulate in the 9 days after the last sensitized. Observe the anaphylaxis situation of Beagle dogs and measure the concentrationns of histamine, IgE, IgM, IgG in plasma with ELISA. **RESULTS** Polysorbate 80 injection and Houttuynia Cordata injections which include polysorbate 80 are positive on Beagle dogs after by intravenous, it's obviously behavior disorder and histamine elevation, but IgE is irregularly changed , IgM and IgG are not obvious variation. **CONCLUSION** Polysorbate 80 is associated with ADRS of Houttuynia Cordata Injection which leded to severously allergic reactions. It is suggestion that anaphylactic reaction and anaphylactoid reaction tests of Beagle dogs should be carried out in the sensitization test of Chinese traditional medicine injections, behavior disorder and histamine in plasma are important assessment index, IgE is assisted one.

KEY WORDS: houttuynia cordata injection; polysorbate 80; anaphylactic and anaphylactoid reactions; beagle dogs; histamine; IgE

基金项目: 中药注射剂的安全性评价研究, 国家十一五科技支撑计划资助(2006BAI14B05)

作者简介: 张美玉, 女, 博士生 E-mail: meiyu96@126.com *通信作者: 李连达, 男, 院士, 博士生导师 Tel: (010) 628745610

当前, 中药注射剂的安全性已引起了广泛的关注, 其中中药注射剂的严重不良反应(ADR)之一为过敏性休克(约 3/4 属于类过敏反应)。鱼腥草注射液在临床应用中出现呼吸困难、高热、皮疹、过敏性休克、猝死等严重的 ADR^[1-2], 而引发 ADR 的主要原因尚需要进行深入的研究。本课题组前期进行的豚鼠全身主动致敏试验和豚鼠类过敏试验中均发现鱼腥草注射液所含增溶剂 Tween-80 具有致敏性^[3]。为进一步弄清鱼腥草注射液导致过敏反应的主要物质, 笔者进行了 Beagle 犬致敏试验研究, 以期进一步明确鱼腥草注射液不良反应的真正原因, 为确保安全用药提供依据。同时, 优选过敏试验模型和方法指标, 为中药注射剂安全性研究提出合理化建议。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验动物 Beagle 犬 42 只, 体重 10~12 kg, ♀ ♂ 兼用[军事医学科学院动物实验中心, 饲养于军事医学科学院动物试验中心, 实验动物许可证: SCXK(军)2007-0004]。实验环境室温度 20~24 °C, 相对湿度为 50%~60%。

1.1.2 药品与试剂 鱼腥草注射液 A(含 5% Tween-80, 生产批号: K080501); 鱼腥草注射液 B(含 2% Tween-80, 生产批号: K080502); 鱼腥草双蒸馏液(生产批号: K080102, 均由某制药集团提供); 鱼腥草注射液 C(不含 Tween-80, 生产批号: C20080811, 西苑医院制备); 卵清蛋白(干粉)(sigma 公司, 批号: 026K5448); Tween-80(英国 Croda 公司, 注射级, 生产批号: 20060906)。

犬组胺 ELISA 试剂盒(48T 批号: 08090403, 96T 批号: 25080314); 犬 IgE ELISA 试剂盒(48T 批号: 08090418, 96T 批号: 25080323); 犬 IgG ELISA 试剂盒(48T 批号: 08090412, 96T 批号: 25080309); 犬 IgM 试剂盒(48T 批号: 08090424); 96T 批号: 25080317。购自 SUNBIO 公司, 美国 RB(Rapidbio) 分装。

1.1.3 实验器材 电脑微量注射泵 AJ-5803 型, 上海安洁电子有限公司; IEC CL31R 离心机, 美国 Thermo Fisher Scientific 公司; 全自动酶标仪, THERMO MULTISKAN MK3, 美国热电公司。

1.2 实验方法

将 Beagle 犬按体重随机分为 7 组(每组 6 只), 分别为: 生理盐水组、0.05% 卵白蛋白组、1% Tween-80 组、鱼腥草双蒸馏液组、鱼腥草注射

液 A 组、鱼腥草注射液 B 组、鱼腥草注射液 C 组。

1.2.1 给药剂量 实验第 1, 3, 5, 14 天分别给予各组犬相应药液, 前 3 次为致敏阶段, 给药体积均为 5.0 mL·kg⁻¹(鱼腥草注射液 A、B、C 用量相当于临床成人用药量的 3.5 倍), 第 4 次激发给药, 给药体积为 10.0 mL·kg⁻¹(鱼腥草注射液 A、B、C 用量相当于临床成人用药量的 7 倍)。

1.2.2 试验方法^[4]

1.2.2.1 类过敏试验 首次给药前, 观察各组犬眼睑、嘴、颈及腹部皮肤等情况。动物固定于控制架上, 前肢静脉恒速(5 mL·min⁻¹)注射给药。连续观察给药前、后各 15 min 内每组犬的行为学变化(有无烦躁不安、搔鼻、皮肤潮红、眼内巩膜充血、痉挛、抽搐、大小便失禁、精神萎靡不振、休克, 甚至死亡等过敏反应症状), 并记录症状出现时间, 消失时间, 根据症状的轻重评分。给药前、后 15 min 抽取静脉血检测组胺、总 IgE、IgG、IgM 水平。(若实验过程中出现动物死亡, 则立即进行解剖, 肉眼观察各主要脏器有无明显异常, 并对心、肝、脾、肺、肾、胸腺等重要器官进行病理学检查。)

1.2.2.2 过敏试验 分别于实验第 1, 3, 5 d 静脉恒速给予受试药液致敏, 第 14 天各组犬激发给药。观测指标同类过敏试验, 并对实验结果进行评价。

1.2.3 观测指标

1.2.3.1 行为学变化 犬行为异常判断标准按表 1、2 要求, 记录动物异常反应症状及强度评级; 类过敏和过敏反应判定标准: 按表 3 要求判定结果。

1.2.3.2 含量测定方法 采用双抗夹心 ELISA 法, 参照试剂盒说明书测定血浆中组胺、IgM、IgG、IgE 的含量。

表 1 犬行为异常评级标准

Tab 1 The evaluation criterion of behavior disorders in the anaphylaxis situation of Beagle dogs

反应强度	反应症状
0	无异常反应
1	烦躁不安, 皮肤潮红, 喷嚏、搔鼻(单次出现或 3 min 内消失)
2	上述症状 3 次以上, 烦躁不安持续时间超过 3 min
3	皮肤潮红、红斑、眼内巩膜充血
4	流涎、恶心、呕吐、唇耳眼水肿、动物极度不安
5	痉挛、抽搐、大小便失禁、精神萎靡不振、无力、休克、死亡

1.3 统计学方法

数据均采用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示, SPSS

13.0 for windows 统计软件处理组间差异。采用 One-Way ANOVA(单因素方差分析)方法,方差齐性用 Student-Newman-Keuls 检验,方差不齐用 Tamhane's T2 检验。 $P < 0.05$ 为有统计学意义。

表 2 根据异常行为指数及组胺升高判定致敏性的标准

Tab 2 The evaluation criterion of sensitization on the basis of index of behavior disorders

异常行为分值	组胺升高/%	判定结果
1 以下	0~30	阴性
1~2	31~50	可疑
2~3	51~100	阳性
>3	>100	强阳性

表 3 类过敏反应和过敏反应判定标准

Tab 3 The evaluation criterion of anaphylactic and anaphylactoid reactions

	行为表现	组胺升高/%	IgE 升高/%	判定结果
类过敏反应 (首次给药前后对比)	>1	>30		可疑
	>2	>50	-	阳性
	>3	>100	-	强阳性
过敏反应 (首次给药前与激发给药后对比)	>1	>30	>30	可疑
	>2	>50	>50	阳性
	>3	>100	>100	强阳性

2 结果

2.1 鱼腥草注射液类过敏实验结果

Tween-80 及含有 Tween-80 鱼腥草注射液 A、B

表 4 各组 Beagle 犬类过敏试验行为变化和血浆中组胺、IgE、IgM、IgG 含量比较($n=6$)

Tab 4 The comparison of behavior changes and the concentrations of histamine, IgE, IgM, IgG in plasma of Beagle dogs from 7 groups in anaphylactoid reaction test ($n=6$)

组别	过敏反应发生情况/只					行为学评分	升高百分率/%				判定结果	
	0	1	2	3	4		5	组胺	IgE	IgG		IgM
生理盐水对照组	6	0	0	0	0	0	0.00	50.55±70.21	25.50±44.26	12.21±6.38	23.03±29.31	阴性
卵白蛋白对照组	0	2	4	0	0	0	1.67	58.38±56.91	31.64±19.40	16.44±7.63	12.71±62.02	可疑
Tween-80 组	0	0	0	0	2	4	4.67	127.23±81.40	80.68±47.04	7.18±8.83	32.13±48.31	强阳性
鱼腥草双蒸馏液组	2	4	0	0	0	0	0.67	47.27±12.75	34.16±18.78	13.21±5.06	8.49±39.33	可疑
鱼腥草注射液 A 组	0	0	1	1	3	1	3.67	112.75±105.05	50.03±78.47	27.33±21.77	49.84±120.24	强阳性
鱼腥草注射液 B 组	0	0	1	2	2	1	3.50	64.82±55.79	38.20±44.39	-2.44±16.73	16.02±52.50	阳性
鱼腥草注射液 C 组	0	5	1	0	0	0	1.17	38.11±44.72	39.98±38.44	26.27±45.70	26.67±50.97	可疑

给药后均能引起 Beagle 犬出现烦躁不安、搔抓、唇红、眼红肿、腹皮潮红,严重者见有流涎、恶心、呕吐、大小便失禁、精神萎靡不振、无力、过敏性休克等症状,表现为强阳性反应。静脉给予不含有 Tween-80 的鱼腥草注射液 C 组和鱼腥草双蒸馏液组部分动物出现疑似症状。

比较各组给药前、后血浆中组胺、IgM、IgG、IgE 的水平,发现 Tween-80 组,鱼腥草注射液 A、B 组犬血中组胺升高,而 IgE 变化不规律,IgG、IgM 则无明显改变。而鱼腥草注射液 C 组和鱼腥草双蒸馏液组的组胺、IgE 无明显升高,IgG、IgM 也无明显改变。见表 4。

2.2 鱼腥草注射液过敏实验结果

第 4 次给药(激发给药)后,Tween-80 组及含有 Tween-80 鱼腥草注射液 A、B 组均引起动物强阳性反应,鱼腥草注射液 C 部分动物见疑似症状。鱼腥草双蒸馏液组部分动物出现阳性症状。卵白蛋白组动物全部出现强阳性反应(如:恶心、呕吐、呼吸困难、精神萎靡不振、大小便失禁,休克等)。

经检测 Tween-80 组,鱼腥草注射液 A、B 组犬血浆中组胺及 IgE、IgG 升高,而 IgM 变化不明显。鱼腥草注射液 C 组组胺、IgE 及 IgG 轻度升高,IgM 无明显改变。鱼腥草双蒸馏液组的组胺明显升高,IgG 轻度升高,IgE、IgM 无明显变化。卵白蛋白组血浆中组胺、IgE 升高明显,IgG、IgM 无明显变化。见表 5。

表 5 各组 Beagle 犬过敏试验的行为变化和血中组胺、IgE、IgM、IgG 含量比较(n=6)

Tab 5 The comparison of behavior changes and the concentrations of histamine, IgE, IgM, IgG in plasma of Beagle dogs from 7 groups in anaphylactic reaction test (n=6)

组别	过敏反应发生情况/只						行为学评分	升高百分/%				判定结果
	0	1	2	3	4	5		组胺	IgE	IgG	IgM	
生理盐水对照组	6	0	0	0	0	0	0.00	-29.24±35.01	-5.53±41.87	-14.64±30.66	-26.88±34.23	阴性
卵白蛋白对照组	0	0	0	1	3	2	4.17	103.59±107.00	57.18±41.73	13.98±9.69	-49.40±15.18	强阳性
Tween-80 组	0	0	0	1	2	3	4.33	138.36±92.07	84.66±52.63	49.19±67.63	-1.98±35.73	强阳性
鱼腥草双蒸馏液组	1	1	2	2	0	0	1.83	14.43±27.49	33.87±28.64	3.48±64.55	-4.20±38.91	可疑
鱼腥草注射液 A 组	0	0	0	2	3	1	3.83	100.41±27.34	75.72±46.69	46.89±111.93	44.35±79.50	强阳性
鱼腥草注射液 B 组	0	0	0	3	3	0	3.50	73.06±44.76	60.01±61.30	13.08±68.26	2.17±71.30	阳性
鱼腥草注射液 C 组	0	3	3	0	0	0	1.50	74.75±92.86	42.34±19.42	21.90±39.83	22.19±64.94	可疑

3 讨论

本研究结果表明, Tween-80 及含有 Tween-80 的鱼腥草注射液 A、B, 均出现明显的类过敏反应, 主要表现是在首次静脉给药后即出现严重的行为异常及血浆组织胺升高, 而 IgE 变化不规律, IgG、IgM 则无明显改变。说明 Tween-80 是诱发类过敏反应的主要物质, 在中药注射液应该禁用。鱼腥草双蒸馏液及无 Tween-80 的鱼腥草注射液 C 组, 则出现轻微的行为异常及血浆组织胺升高, 有可疑的类过敏反应。说明在鱼腥草双蒸馏液中可能存在微量有害物质, 可诱发轻微的疑似类过敏反应。如能进一步纯化, 彻底除去有害物质, 则可进一步提高其安全性。

试验模型及方法指标的优选: 笔者经过小鼠、BN 大鼠、豚鼠及 Beagle 犬的研究^[5], 证实 Beagle 犬的过敏试验及类过敏试验以行为异常, 组胺及 IgE 测定, 结果最为准确可靠, 且在同一批实验中可完成两项试验, 即首次静脉给药前及后的观测结果可确定有无“类过敏反应”。而首次给药前与第 4 次给药(激发给药)后比较, 可确定有无“过敏反应”。而豚鼠及 BN 大鼠试验, 有时行为改变不够典型明显, 易致误判, 出现假阳性或假阴性结果。小鼠试验, 行为表现更不典型, 血液指标的检测, 误差较大, 实验结果仅供参考, 不能作出准确判断。因此, 作为中药注射液的致敏试验, 特别是药品出厂前的最后把关, 建议: ①豚鼠过敏试验; ②Beagle 犬的过敏试验及类过敏试验, 应作为必做实验; ③行为异常及血液组胺为主要的判定指标, IgE 作为辅助判定指标。

试验阳性对照药的选择: 类过敏反应主要是药

物诱发组胺大量释放的结果^[6], 因而首次给药即可发生严重类过敏反应, 据分析中药注射液引起的过敏性休克约 3/4 属于类过敏反应, 而 Tween-80 是诱发典型类过敏反应的代表性物质, 可以作为类过敏试验的阳性对照药。而过敏反应则是由药物含有抗原(或半抗原)引起的抗原-抗体反应, 因而过敏反应常发生在多次给药以后, 其阳性对照药以血清白蛋白为佳, 在首次给药后, 常无严重不良反应, 而在多次给药后才出现典型的过敏反应, 可区别于类过敏反应, 故作为过敏试验的阳性对照药较为理想。

其他试验方法及观测指标, 还应进行更广泛, 更深入的研究, 有些可满足学术性研究、机制研究的要求。但作为常规检测方法, 则要求简便、快速、准确、敏感、特异, 易于推广应用, 可以作为中药注射剂出厂前的把关试验。

中药注射剂的进一步研究, 首要重点是提高安全性, 特别是最大限度的降低过敏性休克及急性致死性反应的发生率。建议工作重点应该放在以下 3 方面: ①原料药的精制、纯化, 消除一切致敏原及有毒有害物质; ②优选安全、有效、合法的注射级药用辅料, 取代 Tween-80, 今后应逐步限制、禁止在中药注射剂中使用 Tween-80; ③防止一切内源性和外源性的污染, 在原料药生产、加工、贮存、运输、提取、纯化、制剂、灌封及内外包装等方面, 以及农药、重金属及细菌、毒素生物源物质等一切外源性、有毒有害及致敏物质的污染, 提高药品质量及质控标准(包括有效成分标准及有害物质的限量标准), 加强药品出厂前的安全性检测, 确保进入市场的中药注射剂的安全性及有效性。

REFERENCES

- [1] ZHANG C S, YANG B, WU R C, et al. Bibliometrical analysis of Chinese medical literature-194 cases of drug-induced allergic shocks[J]. Chin J Pharmacoepidemiol(药物流行病学杂志), 1999, 8(1):9-13.
- [2] LIU W Q, GUO W. Analysis on cause of adverse drug reaction(ARDS) of injection of Herba Houத்துyniae[J]. Chin J Pharm Anal(药物分析杂志), 2007, 27(6): 943-946.
- [3] ZHANG J, LI Y K, LI L D, et al. Acute toxicity of Tween-80, Poloxamer 188 and other two solubilizers in mice [J]. Chin J New Drugs (中国新药杂志), 2008, 17(17): 1491-1493.
- [4] Technical Guidelines on studies for the Immune Toxicities (Allergic, Light Allergic Reaction) of Chinese Medicine and Natural Medicine(Second Draft)[中药、天然药物免疫毒性(过敏性、光变态反应)研究的技术指导原则][M]. 2004: 19-21
- [5] ZHANG J, LI Y K, LI L D, et al. Sensitization of beagle dogs to houttuynia cordata distillation mixed with three solubilizers[J]. Chin J New Drugs (中国新药杂志), 2008,17(17): 1494-1498.
- [6] HE S H, XIE H, ZHANG X J, et al. Inhibition of histamine release from human mast cells by natural chymase inhibitors[J]. Acta Pharmacol Sin(中国药理学报), 2004, 25(6): 822-826.

收稿日期: 2008-10-21