

·不良反应与合理用药·

中药注射剂类过敏反应应急检验方法探讨

陈素珍, 李瑾翡, 黎 旻(广东省食品药品检验所, 广东 广州 510180)

摘要: **目的** 探索适用于中药注射剂类过敏反应的应急检验方法。**方法** 考察豚鼠一次性静脉注射注射用丹参和清开灵注射液后类过敏反应的发生情况, 并观察清开灵注射液对 RBL-2H3 细胞中 β -氨基己糖酶释放率的影响。**结果** 豚鼠一次性静脉注射中药注射液后, 部分批次的中药注射液可观察到类过敏反应; 清开灵注射液体外可诱导 RBL-2H3 细胞发生非免疫性脱颗粒, 刺激 β -氨基己糖酶释放, 且呈浓度依赖性。**结论** 豚鼠体内类过敏反应检查法和 RBL-2H3 细胞 β -氨基己糖酶释放率检查法结合, 可作为中药注射剂类过敏反应应急检验方法, 用于药品质量控制。

关键词: 中药注射剂; 类过敏反应; 应急检验方法

中图分类号: R284.1 文献标志码: A 文章编号: 1003-9783(2014)04-0512-04

doi: 10.3969/j.issn.1003-9783.2014.04.030

Study of Emergency Monitoring Methods for Anaphylactoid Reaction Caused by Traditional Chinese Medicine Injection

CHEN Suzhen, LI Jinfei, LI Yang (Guangdong Institute for Food and Drug Control, Guangzhou 510180 Guangdong, China)

Abstract: **Objective** To study the emergency monitoring methods for anaphylactoid reaction caused by traditional Chinese medicine injection(TCMI). **Methods** The anaphylactoid reaction was monitored in guinea pigs after injection of one-dose TCMI. In-vitro RBL-2H3 cells were cultured and treated with TCMI, and then the amount of releasing β -hexosaminidase was detected. **Results** After injection of one-dose TCMI in the guinea pigs, some batches of TCMI resulted into anaphylactoid reaction. *Qingkailing* injection induced non-immune degranulation in RBL-2H3 cells, and stimulated the releasing of β -hexosaminidase in a concentration-dependent manner. **Conclusion** Both in-vivo test of Guinea pigs anaphylactoid reaction and in-vitro test of β -hexosaminidase release in RBL-2H3 cells can be applied as the emergency monitoring methods for anaphylactoid reaction caused by TCMI, and can be used for the quality control of TCMI.

Keywords: Traditional Chinese medicine injection; Anaphylactoid reaction; Emergency monitoring methods

类过敏反应是指无免疫系统参与的, 由药物直接刺激肥大细胞和嗜碱性粒细胞释放大量组胺, 首次用药即表现出与过敏反应相似症状的临床反应^[1]。目前, 中药注射剂不良反应多为首次用药就出现过敏症状, 没有致敏过程, 且与每次使用剂量、浓度明显相关, 与经典的过敏反应机制有明显的不同^[2-3]。

随着中药注射剂广泛应用, 所引发的类过敏反应十分常见, 建立类过敏反应应急检验方法是应对临床出现该类不良反应的关键。

本研究以临床常用的中药注射剂注射用丹参和清开灵注射液为范例, 利用不良反应率高的样品开展类过敏反应检验方法研究, 以期中药注射剂应

收稿日期: 2013-12-22

作者简介: 陈素珍, 女, 主管药师, 研究方向: 药品检验。Email: 40586313@qq.com。通讯作者: 李瑾翡, 主任药师, 研究方向: 药品检验。Email: 841697256@qq.com。

基金项目: 广东省科技厅科技计划项目(2010B060500022)。

急检验、质量控制提供新的检验方法。

1 材料

1.1 药品 注射用丹参 4 批(批号: 070411, 060718, 070413, 070402), 规格: 每瓶 0.4 g; 清开灵注射液 40 批, 规格: 每支 10 mL。样品来源于 7 家制药企业。

1.2 动物及细胞 豚鼠, SPF 级, 体质量 250~350 g, 南方医科大学, 合格证号: 2006A053; 小鼠, SPF 级, 体质量 18~20 g, 广东省医学实验动物中心, 许可证号: SCXK (粤)2004-0003; 大鼠嗜碱粒细胞白血病细胞株(RBL-2H3 细胞), 中国科学院上海细胞库。

1.3 试剂 Compound 48/80, 美国 Sigma 公司, 批号: 040M4047; β -氨基己糖苷, 美国 Sigma 公司, 批号: SLBB4917V; DMEM 培养基, 美国 Gibco 公司, 批号: 8111223; 胎牛血清, 美国 Invitrogen 公司, 批号: 8090485; 25 %胰酶-EDTA 液, 广州英伟创津生物科技有限公司, 批号: 951538; Triton X-100, 美国 Amresco 公司, 批号: 0964。

2 方法与结果

2.1 体内类过敏反应应急检验方法研究 鉴于类过敏反应和过敏反应产生的症状相似, 区别仅在于产生的过敏样反应是在首次给药后发生还是在激发时发生, 因此, 参考《中国药典》附录过敏反应检查法^[4], 观察首次给予供试品后实验动物在 30 min 内出现过敏样反应的程度, 作为体内类过敏反应的判断指标。即实验动物一次性静脉注射供试品溶液 30 min 内, 如在同一只动物上出现竖毛、发抖、干呕、连续喷嚏 3 声、连续咳嗽 3 声、紫癜和呼吸困难等现象中的 2 种或 2 种以上, 或出现二便失禁、步态不稳或倒地、抽搐、休克、死亡现象之一者, 判断供试品类过敏反应为阳性。

2.1.1 实验动物种类的考察 选择小鼠、豚鼠作为受试动物, 每组 5 只, 取注射用丹参 4 批, 用氯化钠注射液配成 80 mg·mL⁻¹ 溶液作为供试液, 豚鼠注射剂量为 266.7 mg·kg⁻¹, 小鼠为 800 mg·kg⁻¹, 观察给药后 30 min 内豚鼠、小鼠反应, 根据上述标准进行判断, 结果见表 1。注射后有 2 批次的豚鼠在出现竖毛、抓鼻、舔足、搔痒、步态不稳等类过敏反应的现象, 其余 2 批次豚鼠未出现类似症状; 4 批次的小鼠均未出现异常, 表明对类过敏反应较灵敏的实验动物为豚鼠, 豚鼠反应可区分样品的差异, 应优先

表 1 不同种类实验动物发生类过敏反应考察结果

Table 1 The result of allergic reaction caused by traditional Chinese medicine injection in mice and guinea pigs

受试动物	剂量 / mg·kg ⁻¹	批次	类过敏反应观察结果	结论
豚鼠	266.7	2	出现明显的类过敏反应, 超过 3/5 的豚鼠在首次注射后就出现竖毛、抓鼻、舔足、搔痒、站立不稳	阳性
		2	未出现类过敏反应症状	阴性
小鼠	800	4	未出现类过敏反应症状	阴性

选择豚鼠作为类过敏反应的受试动物。

2.1.2 方法对品种的适用性研究 对所收集的 2 个中药注射剂品种(注射用丹参、清开灵注射液), 按照上述拟定方法进行试验, 取注射用丹参 4 批各 1 瓶, 每瓶加入氯化钠注射液 5 mL, 配成 80 mg·mL⁻¹ 溶液作为供试液, 豚鼠静脉给予注射用丹参溶液 266.7 mg·kg⁻¹, 每批 6 只豚鼠; 取不同厂家清开灵注射液共 40 批, 静脉注射各批次供试液 1.7 mL·kg⁻¹, 每批 6 只豚鼠; 同时设氯化钠注射液阴性对照组。观察给药后 30 min 内豚鼠出现类过敏反应症状, 根据上述标准进行判断, 结果见表 2。结果表明, 注射用丹参 4 批供试样品中, 有 2 批静脉注射供试液后出现明显的类过敏反应, 豚鼠在首次注射后就出现竖毛、抓鼻、舔足、搔痒、步态不稳等类过敏反应的现象, 具有速发反应的特点; 其余 2 豚鼠给药后未出现类过敏反应症状。出现类过敏反应的 2 批样品与临床出现不良反应药品为同批次产品。

表 2 中药注射剂体内类过敏反应试验结果(n=6)

Table 2 The results of allergic reaction caused by traditional Chinese medicine injection in vivo

供试样品	批次	类过敏反应观察结果	结论	
阴性对照	4	未出现类过敏反应症状	阴性	
注射用丹参	2	出现明显的类似过敏反应，超过 2/3 的豚鼠在首次注射后就出现竖毛、抓鼻、舔足、搔痒、站立不稳	阳性	
清开灵注射液	企业 A	2	未出现类过敏反应症状	阴性
		4	出现明显的类过敏反应	阳性
		5	未出现类过敏反应症状	阴性
	企业 B	1	出现明显的类过敏反应	阳性
		5	未出现类过敏反应症状	阴性
		企业 C	2	出现明显的类过敏反应
	3		未出现类过敏反应症状	阴性
	企业 D	2	出现明显的类过敏反应	阳性
		4	未出现类过敏反应症状	阴性
	企业 E	3	出现明显的类过敏反应	阳性
		4	未出现类过敏反应症状	阴性
	企业 F	1	出现明显的类过敏反应	阳性
6		未出现类过敏反应症状	阴性	

不同药企的清开灵注射液各批样品在等剂量下,均有一些批次出现不同程度的类过敏反应,其中企业 A、C、E 生产的清开灵注射液发生类过敏反应发生率(分别为 44 %、40 %、43 %)明显高于企业 B、F (17 %、14 %)。经查询泛珠三角不良反应网络管理平台 (<http://www.fzadr.cn>),出现类过敏反应的清开灵注射液各批次样品,在临床上也有不良反应的报告,其发生频次互相吻合。

上述结果表明该方法对注射用丹参、清开灵注射液类过敏反应有一定适用性,可以区分不同批次的同品种样品,而且与临床不良反应有一致性。

2.2 体外类过敏反应检验方法研究 采用 RBL-2H3 细胞 β -氨基己糖酶释放率测定法^[9],考察清开灵注射液体外类过敏反应。

2.2.1 阳性对照品(Compound 48/80)试验浓度的选择 Compound 48/80 是 N-甲基-对甲氧基苯乙胺和甲醛缩合产生的聚合物,具有诱导肥大细胞脱颗粒和促进组胺释放的作用。

RBL-2H3 细胞用含 10 %胎牛血清、100 U·mL⁻¹青链霉素的 DMEM 培养液,于 37 ℃、5 %CO₂ 培养箱中传代培养。

取对数生长期的 RBL-2H3 细胞按每孔 1×10⁵ 接种于 6 孔板,37 ℃,CO₂ 培养箱中培养过夜使贴壁。次日吸去培养基,用孵育缓冲液(NaCl 137 mmol·L⁻¹、KCl 2.7 mmol·L⁻¹、glucose 5.6 mmol·L⁻¹、CaCl₂ 1.8 mmol·L⁻¹、MgCl₂ 1 mmol·L⁻¹、HEPES 20 mmol·L⁻¹、BSA 1 mg·mL⁻¹,pH7.4)清洗 3 遍,每孔加入 0.5 mL 孵育缓冲液 37 ℃预孵育 10 min。设空白孔、5 个阳性对照(Compound 48/80)不同浓度孔(6.25, 1.25, 0.25, 0.05, 0.01 mg·mL⁻¹),分别加入不同浓度的 Compound 48/80 溶液 0.5 mL 和等量的阴性对照(孵育缓冲液),在 37 ℃,CO₂ 培养箱中孵育 1 h。冰浴 10 min 终止反应,取各孔上清液 50 μ L 转入 96 孔板,同时加入 50 μ L 含 2 mmol·L⁻¹ 底物的柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液(0.1 mol·L⁻¹ 柠檬酸、0.1 mol·L⁻¹ 柠檬酸钠,pH4.5),37 ℃孵育 60 min,最后加入 150 μ L 终止液(0.1mol·L⁻¹ Na₂CO₃、0.1 mol·L⁻¹ NaHCO₃ 缓冲液,pH10.7)终止反应,在波长 405 nm 下测定各孔反应吸光度。

移去 6 孔板中剩余上清液,每孔加入 1 mL 1 % Triton X-100 裂解细胞,裂解液 3000 r·min⁻¹ 离心 1 min,取上清 50 μ L 转入 96 孔板,同时加入 50 μ L 柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液,37 ℃孵育 60 min,最后加入 150 μ L 终止液(Na₂CO₃/NaHCO₃ 溶液)终止反

应,在波长 405 nm 下测定各孔反应吸光度。不同浓度 Compound 48/80 对 RBL-2H3 细胞 β -氨基己糖酶释放率的影响见表 3。

表 3 不同浓度 Compound 48/80 致 β -氨基己糖酶释放率测定结果

Table 3 Effect of different concentrations Compound 48/80 on the releasing rate of β -hexosaminidase in RBL-2H3 cells.

Compound 48/80/mg·mL ⁻¹	0	0.01	0.05	0.25	1.25	6.25
β -氨基己糖酶释放率/%	9.31	17.69	30.87	43.37	45.00	52.62

β -氨基己糖酶释放率(%)=[上清液吸光度/(上清液吸光度+细胞裂解液吸光度)]×100 %。

当 Compound 48/80 浓度大于 0.05 mg·mL⁻¹ 时, β -氨基己糖酶释放率>30 %,选择 Compound 48/80 浓度 0.1 mg·mL⁻¹ 作为正式试验时阳性对照浓度。

2.2.2 清开灵注射液对 RBL-2H3 细胞中 β -氨基己糖酶释放率的影响 取对数生长期的 RBL-2H3 细胞按 1×10⁵ mL⁻¹ 接种于 6 孔板,37 ℃,CO₂ 培养箱中培养过夜使贴壁。次日吸去培养基,孵育缓冲液清洗 3 遍,每孔加入 0.5 mL 孵育缓冲液 37 ℃预孵育 10 min。设空白孔、阳性对照 Compound 48/80(0.1 mg·mL⁻¹)和清开灵注射液不同浓度孔(清开灵注射液用孵育缓冲液稀释至 2.5 %、5 %)。分别加入孵育缓冲液、Compound 48/80 和不同浓度的清开灵,每孔 0.5 mL,在 37℃,CO₂ 培养箱中孵育 1 h。同 2.2.1 项下操作,同法计算 β -氨基己糖酶释放率,结果见表 4。

表 4 清开灵注射液对 RBL-2H3 细胞中 β -氨基己糖酶释放率的影响

Table 4 Effect of Qing Kailing Injection on the releasing rate of β -hexosaminidase in RBL-2H3 cells

组别	样品来源	批号	浓度 /%	β -氨基己糖酶释放率 /%
阴性对照组			0	2.20
Compound 48/80 组		040M4047	0.1 mg·mL ⁻¹	35.93
清开灵注射液组	企业 A	081107	2.5	2.25
			5.0	39.99
		080625	2.5	3.13
			5.0	34.04
	企业 C	811402A	2.5	1.83
			5.0	32.63
	企业 D	08090163	2.5	2.01
			5.0	33.31
	企业 E	090316 6	2.5	1.36
			5.0	21.86
	企业 F	09020802	2.5	4.81
			5.0	48.65

由表 4 可见,不同浓度的清开灵注射液与 RBL-2H3 细胞共孵育可明显提高后者 β -氨基己糖苷酶释放率,且有明显的浓度依赖性,提示清开灵注射液体外可诱导 RBL-2H3 细胞发生非免疫性脱颗粒,同时可以看出,不同来源的样品在 5% 浓度下致 β -氨基己糖苷酶释放率差异较大(21.86%~48.65%)。

3 讨论

类过敏反应和过敏反应的不同点在于过敏样反应是在首次给药后发生还是在激发时发生。若动物首次接触药物即出现过敏症状,推测该过敏反应属于药物直接作用所致,应属于类过敏反应范畴^[6]。根据泛珠三角不良反应网络管理平台和《中国期刊网》检索,清开灵注射液的不良反应多数报道为首次用药即发生过敏,没有致敏过程,且与每次使用剂量、浓度显著相关。传统过敏反应检查法采用的“致敏-激发”检查方法不适用于此类注射剂可能引起的类过敏反应的质量控制。

2007 年 6 月在我省部分医院出现注射用丹参不良反应,病人表现为寒战、高热等症状,采用豚鼠体内类过敏反应方法,对临床上出现不良反应的注射用丹参与同厂家不同批号产品进行了安全性研究^[7],结果显示,引起不良反应的批次样品可使豚鼠出现明显的类过敏样反应的症状,而作为对照用的其他批次注射用丹参未出现该反应。在此基础上,以清开灵注射液为受试药,对不同厂家生产的清开灵注射液进行试验,进一步验证豚鼠体内一次性静脉注射法在中药注射剂类过敏反应检测方法的可行性。结果表明,不同批次样品的实验结果有一定区分度,临床有不良反应报告的批次,其发生类过敏反应程度也较高,按拟订的标准判断,属于不符合规定范围。表明该体内方法可迅速、较好地地区分引起类过敏反应的样品。

本研究的切入点是应急检验,临床上发生不良反应的应急检验对时效要求高,一旦出现不良反应,需要快速响应,第一时间提供用于判断不良反应原因的线索,以满足药品监管的需求。该方法可以迅速提供不良反应发生的线索,指导下一步应急检验的方向。下一步还将扩大批次应用,并对该方法进行灵敏度和特异度、方法稳定性研究(实验室间方法稳定性)等方法学验证,同时与泛珠三角不良反应网络管理平台信息相佐证,以进一步证明新方法

的实用性。

体外肥大细胞或嗜碱性粒细胞脱颗粒是研究类过敏反应的关键环节,RBL-2H3 细胞为大鼠嗜碱性粒细胞肿瘤株,表面有高亲和力的 IgE 受体,活化后可以发生脱颗粒反应。由于其具有永生特性,培养方法简单,生长迅速,避免了从血液中梯度分离嗜碱性粒细胞时操作繁琐或细胞纯度、数量不足等弊端,是建立类过敏反应体外检测系统的最佳选择^[8]。 β -氨基己糖苷酶是存在于肥大细胞颗粒内的一种酶,随脱颗粒而释放到细胞外,研究表明其释放率与组胺释放率平行,可采用该指标来反映 RBL-2H3 细胞的脱颗粒程度^[9]。本研究采用该方法观察清开灵注射液对 RBL-2H3 细胞脱颗粒的直接诱导作用,结果显示清开灵注射液可明显提高 RBL-2H3 细胞 β -氨基己糖苷酶释放率,且具有明显的浓度依赖性,提示清开灵注射液体外可诱导 RBL-2H3 细胞发生非免疫性脱颗粒,推测这是清开灵静脉给药易发生类过敏反应的原因之一。

体内豚鼠一次性静脉注射法可直观、有效的观察到中药注射剂的过敏反应症状,而体外 RBL-2H3 细胞 β -氨基己糖苷酶释放率测定法能较灵敏捕捉样品致脱颗粒反应程度,体内、体外两种考察类过敏反应的检查方法可互为佐证,为类过敏反应应急检验提供方法学支撑,可望为药厂产品批批检验提供新的控制方法。

参考文献:

- [1] 丁玉峰. 中药注射剂引起的变态反应及其影响因素[J]. 中华中医学杂志, 2007, 31(4): 244-246.
- [2] 梁进权, 邹元平, 王宁生, 等. 中药不良反应特点与发生规律的文献研究[J]. 广州中医药大学学报, 2009, 26(6): 574-576.
- [3] 刘静, 黄洋, 王玉荣. 542 例 TCMI 不良反应分析[J]. 中国医院用药评价与分析, 2005, 5(5): 307-309.
- [4] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(1 部) [M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2010: 附录 92.
- [5] 罗霞, 王青, 周联, 等. 几种常见中药注射剂对 RBL-2H3 细胞脱颗粒的影响[J]. 中药新药与临床药理, 2009, 20(6): 506-510.
- [6] 田玉科. 麻醉期间的过敏反应及类过敏样反应[J]. 实用医学进修杂志, 2004, 32(3): 1293.
- [7] 李瑾翡, 谭舜, 赖宇红, 等. 注射用丹参不良反应原因筛查的实验研究[J]. 中药新药与临床药理, 2009, 20(5): 285-287.
- [8] 孙立, 刘晓萌, 王欣, 等. 吐温 80 引起动物类过敏反应的原因初步探索[J]. 毒理学杂志, 2007, 21(4): 322.

(编辑: 梁进权)