

清开灵注射液引发 Beagle 犬类过敏反应的实验研究

王志国¹ 王丹巧¹ 吴兆恩¹ 李连达¹ 魏 峰²

(1. 中国中医科学院医学实验中心, 北京市东直门内南小街 16 号, 100700; 2. 河北神威药业有限公司)

[摘要] 目的 研究 5 个不同厂家生产的清开灵注射液及清开灵注射液各组分和辅料静脉注射的致敏性。方法 一次性给予 Beagle 犬静脉恒速注射 5 种厂家生产的清开灵注射液及其各组成成分和辅料, 观察给药后 Beagle 犬的行为学变化, 检测血中组胺、IgE、IgG、IgM、嗜酸粒细胞阳离子蛋白(ECP)和白细胞介素-4(IL-4)的含量变化。结果 根据行为异常评分和组胺、IgE、IgG、IgM、ECP 和 IL-4 等含量变化, 有 3 个药厂生产的清开灵注射液及栀子提取物和胆酸综合判断为类过敏反应阳性。结论 3 个药厂生产的清开灵注射液可引起类过敏反应, 而栀子提取物和胆酸可能是引起类过敏反应的有关物质。

[关键词] 清开灵注射液; 类过敏反应; Beagle 犬

Experimental Study on the Anaphylactoid Reaction induced by Qingkailing Injections on the Beagle Dogs

WANG Zhiguo¹, WANG Danqiao¹, WU Zhaoen¹, LI Lianda¹, WEI Feng²

(1. Experimental Research Center, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700; 2. Hebei Shineway Pharmaceutical Co. Ltd)

ABSTRACT **Objective** To study the sensitization of Qingkailing Injections produced in five pharmaceutical factories and the sensitization of each composition and adminicle of Qingkailing Injections on the Beagle dogs by intravenous injection. **Methods** By intravenous injection with Qingkailing Injections produced by the five pharmaceutical factories and all the compositions and adminicles into the Beagle dogs, the behavior changes of the dogs were observed and the content of serum histamine, IgE, IgG, IgM, ECP and IL-4 were detected. **Results** The result was determined according to the indices of both behavior changes and the serum histamine, IgE, IgG, IgM, ECP and IL-4. Qingkailing Injections produced in three pharmaceutical factories and the compositions, extract of gardenia and cholic acid were positive in inducing the anaphylactoid reaction. **Conclusion** The Qingkailing Injections produced in three pharmaceutical factories can induce anaphylactoid reaction. The extract of gardenia and cholic acid may be the relevant substance of anaphylactoid reaction.

Key Words Qingkailing Injection; Anaphylactic reaction; Beagle dogs

中药注射剂具有生物利用度高、起效快、作用强等特点, 但随着中药注射剂迅速发展及广泛应用, 有关其不良反应的报告亦相继增多, 引发了人们对中药注射剂安全性问题的疑虑和关注。中药注射剂不良反应占中药不良反应的 70% 以上, 而类过敏反应是中药注射剂主要不良反应之一^[1], 其起病急, 可在注射 5min 内出现, 来势凶猛, 有的患者来不及抢救即已死亡, 具有病情危急的特点^[2]。本研究以类过敏反应实验方法研究清开灵注射液不良反应的物质基础, 以期为提高其质量及安全性提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 实验药物及试剂

清开灵注射液分别由 A、B、C、D、E 药厂提供, 批号依次为: 812001A, 0806024, 08092211, 080717, 080704。板蓝根提取液(批号: 08123151; 总氮含量:

0.2mg/ml), 栀子提取液(批号: 09010153; 栀子苷含量: 0.34mg/ml), 金银花提取液(批号: 08123153; 金银花提取物: 5mg/ml), 水牛角、珍珠母混合提取液(批号: 09010152; 含氮量: 2.1mg/ml), 黄芩苷提取液(批号: 08123152; 黄芩苷含量: 3.7mg/ml), 胆酸提取液(批号: 08123151; 胆酸含量: 1.95mg/ml), 猪去氧胆酸提取液(批号: 08123153; 猪去氧胆酸含量: 1.84mg/ml), 辅料甘油(含量: 9.41mg/ml)、硫代硫酸钠含量: 0.65mg/ml、EDTA-2Na 混合液含量: 0.65mg/ml(批号: 08102354), 均由 C 药厂提供。吐温-80: 药用级, 批号: OE61206A, 德国 Welding 公司生产, 使用时配成 1% 浓度。犬组胺 ELISA 试剂盒 96T(批号: 12120811), 犬 IgE ELISA 试剂盒 96T(批号: 21040921), 犬 IgG ELISA 试剂盒 96T(批号: 18090811), 犬 IgM ELISA 试剂盒 96T(批号: 10020904), 犬嗜酸粒细胞阳离子蛋白(ECP)ELISA 试剂盒 96T(批号: 14030902), 犬白细胞介素-4(IL-4) ELISA 试剂盒 96T(批号: 10020903), 均由美国 Rapid Bio Lab. Calabasas 公司生产。

基金项目: 中国博士后科学基金资助项目(20080440503); 中国中医

科学院基本科研业务费自主选题资助项目(ZZ2007010)

通讯作者: 李连达, liyikui2002@sina.com, (010)62874069

1.2 实验动物及仪器

Beagle 犬, 体重(14 ± 0.5)kg, 雄雌兼用, 由军事医学科学院动物实验中心提供, 动物许可证: SCXK(军) 2007-0004。实验环境室温 $20 \sim 24^{\circ}\text{C}$, 相对湿度为 $48\% \sim 58\%$ 。主要仪器: 电脑微量注射泵, 型号: ANGELAJ-5803, 上海安洁电子有限公司生产。全自动酶标仪, 型号: BIO-RAD Model 550, 美国伯乐公司生产。

1.3 动物分组

第 1 批实验: 将 Beagle 犬按体重随机分为 7 组: 吐温-80 组、生理盐水组、清开灵注射液 A 组、B 组、C 组、D 组和 E 组; 第 2 批实验: 将 Beagle 犬按体重随机分为 10 组: 吐温-80 组、生理盐水组、黄芩苷组、金银花提取物组、板蓝根提取物组、栀子提取物组、水解液(珍珠母和水牛角)组、胆酸组、猪去氧胆酸组和辅料组。每组 3 只犬。

1.4 实验过程

各组 Beagle 犬前肢静脉以 $5\text{ml}/\text{min}$ 的速度恒速注射相应药液, 给药体积均为 $6.67\text{ml}/\text{kg}$ (相当于临床成人用药的等效剂量), 前肢静脉注射。连续观察给药前后各组犬的行为学变化, 并根据自拟的症状评分标准评分。评分标准: 0 分: 无异常反应; 1 分: 烦躁不安, 皮肤潮红, 喷嚏、搔鼻, 部分动物单次出现或 3min 内消失; 2 分: 全部动物出现上述症状 3 次以上, 烦躁不安持续时间超过 3min ; 3 分: 部分或全部动物出现皮肤潮红、红斑、眼内巩膜充血; 4 分: 部分或全部动物出现流涎、恶心、呕吐、唇耳眼水肿、动物极度不安; 5 分: 部分或全部动物出现痉挛、抽搐、大小便失禁、精神萎靡不振、无力、休克、死亡。

给药前及给药后 10mins 抽取静脉血 4ml , $3000\text{r}/\text{min}$, 10min , 离心血浆以检测组胺、IgE、IgG、IgM、ECP 和 IL-4 水平。根据异常行为评分及组胺升高判定致敏性(见表 1)。

1.5 统计学方法

采用 SPSS 16.0 统计软件处理数据。计量数据用($\bar{x} \pm s$)表示, 各组间的比较采用单因素方差分析。

表 1 类过敏反应判定标准

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

2 结果

2.1 5 个药厂生产的清开灵注射液类过敏反应比较

给药后, 吐温-80 组的犬均出现严重行为异常。根据表 1 类过敏反应判定标准, 吐温-80 组和清开灵注射液 D 组、E 组达到类过敏反应强阳性或阳性, 其他各组可疑阳性。根据组胺含量变化判定标准, 吐温-80 组和清开灵注射液 C 组为阳性; 各组的 IgE、IgG、IL-4、ECP 无规律性变化, 结果见表 2。

2.2 清开灵注射液各组成成分类过敏反应比较

给药后, 吐温-80 组的犬出现明显行为异常, 栀子提取物组及胆酸组有可疑行为变化。其他各组无明显行为学异常。根据表 1 行为异常判定标准, 吐温-80 组和栀子提取物组达到类过敏反应强阳性及阳性, 胆酸组为可疑阳性。根据表 2 各项指标的判定标准, 只有吐温-80 组的组胺含量变化判定为阳性; 各组的 IgE、IgG、IL-4、IgM、ECP 含量无规律性变化, 结果见表 3。

3 讨论

中药注射剂引起的严重不良反应包括 I 型超敏反应及类过敏反应, 后者约占 77% ^[3-4]。类过敏反应与肥大细胞脱颗粒释放组胺有关, 无需 IgE 介导, 首次接触药物即可出现潮红、头痛、水肿、低血压以及休克等过敏样反应症状; I 型超敏反应须 IgE 介导, 首次接触抗原时产生抗原特异性 IgE 并使机体致敏, 当机体再次接触同一抗原时, 激活肥大细胞引发生物活性介质释放, 产生过敏反应^[5]。

中药注射剂发生类过敏反应, 一是通过非免疫机

表 2 各组犬行为学评分和血浆中组胺、IgE、IgG、IgM、ECP 及 IL-4 含量变化比较($\bar{x} \pm s$)

组别	犬数	行为学评分(分)	组胺	IgE	IgG	IgM	ECP	IL-4	判定结果
吐温-80 组	3	$4.00 \pm 1.41^*$	$89.1 \pm 28.28^*$	59.7 ± 34.58	$132.6 \pm 44.39^*$	10.2 ± 26.22	24.07 ± 48.21	$224.4 \pm 109.43^{**}$	阳性
生理盐水组	3	0	10.4 ± 17.69	9.1 ± 13.70	19.1 ± 20.62	0.8 ± 19.46	36.64 ± 30.95	11.1 ± 27.37	阴性
清开灵注射液 A 组	3	1.00 ± 0.82	12.6 ± 84.20	2.7 ± 22.20	12.6 ± 25.67	-6.8 ± 23.45	-28.15 ± 16.79	-16.5 ± 25.83	阴性
清开灵注射液 B 组	3	1.00 ± 0.82	6.2 ± 81.45	-10.5 ± 32.34	-4.0 ± 11.06	-8.9 ± 3.24	32.14 ± 65.66	-1.1 ± 10.25	阴性
清开灵注射液 C 组	3	1.00 ± 0.82	$97.1 \pm 145.15^*$	17.9 ± 45.37	23.1 ± 11.26	44.1 ± 36.76	34.75 ± 29.14	50.6 ± 51.89	阳性
清开灵注射液 D 组	3	$2.00 \pm 1.63^*$	2.1 ± 18.48	29.5 ± 25.89	12.9 ± 23.28	-37.9 ± 36.54	16.72 ± 26.59	30.5 ± 79.06	阳性
清开灵注射液 E 组	3	1.67 ± 1.70	-11.0 ± 22.46	15.2 ± 19.54	3.60 ± 2.06	9.50 ± 63.74	62.38 ± 56.98	35.9 ± 22.06	阳性

注: 与生理盐水组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

表3 各组犬行为学评分和血浆中组胺、IgE、IgG、IgM、ECP 及 IL-4 含量变化比较($\bar{x} \pm s$)

组别	犬数	行为学评分 (分)	升高百分率(%)						判定 结果
			组胺	IgE	IgG	IgM	ECP	IL-4	
吐温-80组	3	4.33±0.47*	62.40±47.83	25.80±8.13	66.60±31.99	32.20±50.72	41.00±12.78	54.90±29.31	阳性
生理盐水组	3	0	-18.00±28.55	-13.90±17.99	-3.60±27.61	11.90±14.73	16.00±39.25	19.50±57.99	阴性
栀子提取物组	3	2.67±0.94*	-27.90±34.04	-24.70±24.60	-14.70±32.76	13.80±21.85	-4.90±12.85	-12.50±19.81	阳性
双花提取物组	3	0.33±0.47	3.30±47.51	-4.50±25.38	-23.20±25.41	12.80±7.91	-17.90±22.85	-19.10±26.18	阴性
板蓝根提取物组	3	0	-7.20±6.32	-5.80±3.29	25.50±59.90	0.90±15.64	-4.40±11.49	0.80±8.61	阴性
黄芩苷组	3	0.67±0.94	-27.50±6.09	-23.00±7.57	-9.90±6.08	10.40±14.11	12.30±79.46	13.10±90.34	阴性
水解液组	3	0.67±0.94	-13.20±30.49	-5.10±21.31	-24.80±8.26	-1.00±1.02	-36.820±8.97	-36.40±25.34	阴性
胆酸组	3	1.33±0.94	13.10±78.73	3.90±69.98	-10.00±13.89	4.50±19.55	-20.40±11.42	-26.40±8.92	可疑
猪去氧胆酸组	3	0	-22.40±26.67	-19.90±26.32	29.30±103.52	19.24±202.13	-20.50±24.83	-18.30±28.43	阴性
辅料组	3	0	-20.30±21.27	-19.60±21.53	-7.10±30.24	1.40±12.12	-20.40±21.39	-27.30±21.13	阴性

注:与生理盐水组比较,* $P<0.05$

制的直接刺激肥大细胞或嗜碱性粒细胞释放生物活性介质,二是通过免疫机制激活补体系统或其他通路引起该细胞生物活性介质释放发生^[6]。非免疫机制可能与肥大细胞表面的在细胞内信号传导通路中起信号转换器作用的 GTP 结合蛋白(G 蛋白)有关。产生类过敏反应的药物与 G 蛋白直接作用后,可激活与 G 蛋白相连的磷脂酶 C,后者通过一系列的信号转导通路使细胞内钙离子浓度升高,最终刺激肥大细胞脱颗粒^[5]。ECP 是嗜酸粒细胞(EOS)在炎症过程中活化后脱颗粒而释放的一种毒性蛋白质,ECP 能反映机体被致敏后 EOS 在炎症过程中活化程度和脱颗粒而释放组织胺等炎症介质的能力^[7]。

本研究结果显示,吐温-80对 Beagle 犬可以引起典型的类过敏反应,即行为异常及组胺升高,但 IgE、IgG、IgM、ECP 和 IL-4等指标无明显的规律性变化,说明类过敏反应以组胺释放为主,而不是由 IgE、IgG、IgM、ECP 和 IL-4等诱导所致,这与其他报道一致^[8]。IgE 作为中药注射剂类过敏反应辅助判定指标,有一定参考作用,而 IgG、IgM、ECP 和 IL-4等在类过敏试验中变化均不够规律。本课题组曾通过小鼠、BN 大鼠、豚鼠及 Beagle 犬实验研究,证实类过敏反应以 Beagle 犬为敏感实验动物,以行为异常和组胺含量升高为主要判定指标,IgE 可作为辅助指标,其他指标变化缺乏一致性,不宜作为判定标准。D、E 两个药厂生产的清开灵注射液行为异常达到阳性标准,C、D、E 3 个药厂生产的清开灵注射液行为异常未达到阳性指标,说明不同药厂生产的清开灵注射液质量不同,其类过敏反应也不相同。清开灵注射液各组分中仅发现黄芩苷、胆酸能引起犬明显的行为异常,但组胺升高不明显,IgE、IgG、IgM、ECP 和 IL-4等其他免疫物质未出现明显变化,因而栀子提取物、胆酸所引起的类过敏反应还需进一步研究。由于条件所限,本实验样本量偏少,

致使数据较为离散,今后将通过增加样本量来减少实验偏差。

清开灵注射液产生 ADR 的主要原因一方面是不合理用药:过敏体质、剂量过大、滴速过快、混合用药及超适应症用药,特别是清开灵注射液与其他药物混合注射。另一方面是药物本身的问题:国内有多家制药企业生产清开灵注射液,有的企业产品质量较好,未发生 ADR;有的企业的产品质量差,可引起 ADR,Beagle 犬类过敏反应试验显示为阳性或疑似阳性,说明各药厂生产的清开灵注射液致敏性不尽相同,应进一步研究,提高清开灵注射液的安全性、质量标准。

参考文献

- [1]梁进权,邹亢平,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):574-577.
- [2]杨华,赵艳娇,耿凤英.838例中药注射液不良反应分析[J].实用药物与临床,2007,10(4):228-229.
- [3]程芳,刘兆平.中药注射剂安全性评价与关键技术的研究[J].中国中药杂志,2009,34(8):1052-1054.
- [4]Szebeni J. Complement activation-related pseudoallergy: a new class of drug-induced acute immune toxicity[J]. Toxicology,2005,216(2-3):106-121.
- [5]Mistovich JJ, Limmer D, Krost WS.. Anaphylactic and anaphylactoid reactions[J]. Emery Med Serv, 2004,33(6):48-49,142.
- [6]Simons FE, Frew AJ, Ansotegui IJ, et al. Practical allergy (PRACTALL) report: risk assessment in anaphylaxis[J]. Allergy,2008,63(1):35-37.
- [7]郭盛华,蒋英,张春梅.43例急性荨麻疹患者血清 ECP 和 TIgE 的水平及相关性分析[J].中国麻风皮肤病杂志,2006,22(11):11917-11918.
- [8]张美玉,李贻奎,张嘉,等.鱼腥草注射液过敏及类过敏实验研究[J].中国现代应用药学杂志,2009,26(8):610-614.

(收稿日期:2009-11-10;修回日期:2009-12-29)

[编辑:行 之]