

【 安全性评价 】

黄芪甲苷注射液动物过敏性研究

荆宝琴¹, 张金晓¹, 康 玮¹, 王 磊¹, 熊思敏², 申秀萍^{1*}

1. 天津药物研究院新药评价有限公司, 天津 300301

2. 安徽医科大学药学院, 安徽 合肥 230032

摘要: **目的** 采用主动全身过敏试验(ASA)和被动皮肤过敏试验(PCA)以及血清样本效价测定, 综合评价黄芪甲苷注射液对动物的致敏作用, 为临床拟用的安全性提供参考。**方法** ASA: 选用豚鼠作为实验动物, 0.4、1.6 mg/kg 黄芪甲苷注射液间日致敏5次, 末次致敏后11 d, 3倍剂量进行激发, 观察30 min内动物过敏症状; PCA: 选用大鼠作为实验动物, 0.5、2.0 mg/kg 黄芪甲苷注射液间日致敏5次, 制备抗血清; 将致敏血清稀释后sc给予另一批大鼠进行被动致敏, 约48 h后激发, 30 min后麻醉处死, 观察皮肤过敏反应; 间接酶联免疫吸附测定法(ELISA)检测制备的抗血清中的抗体效价。**结果** ASA: 黄芪甲苷注射液在0.4、1.6 mg/kg剂量下各只豚鼠均未出现任何过敏反应, 即过敏反应阴性; PCA: 黄芪甲苷注射液0.5、2.0 mg/kg剂量下大鼠被动过敏反应均为阴性, 血清样本中不存在针对黄芪甲苷的特异性抗体。**结论** 黄芪甲苷注射液体内ASA和PCA试验均无过敏反应, 动物血清中不存在针对黄芪甲苷药物的特异性抗体, 提示临床使用出现过敏反应的可能性较小。

关键词: 黄芪甲苷注射液; 主动全身过敏试验(ASA); 被动皮肤过敏试验(PCA)

中图分类号: R994.2

文献标志码: A

文章编号: 1674-6376(2017)08-1086-05

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2017.08.009

Study on allergy of Astragaloside injection

JING Bao-qin¹, ZHANG Jin-xiao¹, KANG Wei¹, WANG Lei¹, XIONG Si-min², SHEN Xiu-ping¹

1. Center for Drug Evaluation and Research in Tianjin Institute of Pharmaceutical Research, Tianjin 300301, China

2. Anhui Medical University, Hefei 230032, China

Abstract: Objective To evaluate the hypersusceptibility of Astragaloside injection on animal, and provide reference for clinical use with active systemic anaphylaxis (ASA), passive cutaneous anaphylaxis (PCA) and determination of serum sample titer.

Methods ASA: Guinea pigs was ip with 0.4, 1.6 mg/kg Astragaloside injection five times every other day. On the eleventh day after the last administration, the test substance was quickly injected to fore limb vein, and animal allergy symptoms were observed within 30 min. PCA: Astragaloside injection was ip injected to rats five times every other day and antiserum was collected. The antiserum was appropriately diluted, and sc injected to another group rats for passive sensitization. About 48 hours later, Astragaloside was quickly iv to rats, and the skin allergy was observed. Meanwhile, the antibody titer of the antiserum was determined. **Results** ASA: Astragaloside injection of 0.4, 1.6 mg/kg in guinea pigs did not show any allergic reaction, that is, ASA was negative; PCA: Astragaloside injection of 0.5, 2.0 mg/kg in rats did not show any allergic reaction, and Astragaloside specific antibodies were not determined in serum samples. That is, PCA was negative. **Conclusion** The results of ASA and PCA were negative in the experimental dose, and there was no specific antibody against Astragaloside in the serum prepared by PCA, which indicated that the possibility of hypersensitivity reaction was weak in clinical use.

Key words: Astragaloside injection; active systemic anaphylaxis (ASA); passive cutaneous anaphylaxis (PCA)

黄芪甲苷是黄芪的药理活性成分之一^[1], 随着中药注射剂的广泛使用, 不良反应报道率愈发上升, 其中过敏反应发生率最高^[2-4], 多为I型过敏反应。过敏试验是药物临床前安全性研究中的一

收稿日期: 2016-12-27

作者简介: 荆宝琴(1983-), 女, 助理研究员, 主要从事药理毒理学研究

*通信作者 申秀萍, 研究员。Tel: (022)84845260 Email: shenxp@tjipr.com

项重要内容,目前过敏反应临床前评价方法多为整体动物实验法[包括被动皮肤过敏试验(PCA)、主动皮肤过敏试验和主动全身过敏试验(ASA)等]^[5-8]。针对中药注射剂引起过敏反应的过程,也有免疫学测定法等体外实验方法的应用^[9-10]。为了分析黄芪甲苷注射液的过敏性,本实验采用主动全身过敏试验(ASA)和被动皮肤过敏试验(PCA)进行评价,同时对PCA制备的血清样本进行抗体效价测定,进一步确证PCA结果。

1 材料

1.1 药物与试剂

黄芪甲苷注射液(批号091222,无色澄明溶液,规格5 mg/mL)、溶媒对照:25%乙醇+25%丙二醇(批号090317-1,无色澄明液体,每支20 mL),均为天津药物研究院制剂中心制备;0.9%氯化钠注射液(天津市津兰药业有限公司,批号08101101,无色澄明液体,每瓶100 mL);卵清白蛋白(OVA, sigma进口分装,批号2010-09VS,规格5 g/瓶);吸附无细胞百白破联合疫苗(北京天坛生物制品股份有限公司,批号2009060201,规格0.5 mL/支);伊文思兰(Serva进口分装,批号871225);牛血清白蛋白(BSA, sigma进口分装);酶标记二抗(美国KPL公司);BSA偶联抗原、OVA偶联抗原,均由北京望尔生物技术有限公司提供。

1.2 主要仪器

BT224S天平, Sartorius公司; G&G T2000天平, 美国双杰兄弟(集团)有限公司; LXJ-IIB 低速台式离心机, 上海安亭科学仪器有限公司; 酶标仪, 热电 MK3; 酶标板, 热电 NUNC。

1.3 实验动物

豚鼠,普通级,体质量300~360 g,北京科宇动物养殖中心提供,实验动物许可证号SCXK(京)2016-0011。SD大鼠,SPF级,体质量140~180 g,北京维通利华实验动物技术有限公司提供,生产单位许可证号SCXK(京)2016-0011。动物使用许可证号SYXK(津)2016-0009。

2 方法

2.1 ASA

30只豚鼠,随机均分为5组:阴性对照(生理盐水)组、OVA(阳性对照,10 mg/kg)组、溶媒对照(8%乙醇+8%丙二醇)组和黄芪甲苷注射液低(0.4 mg/kg,略高于临床使用等效剂量)、高剂量(1.6 mg/kg,约为临床使用等效剂量的4.5倍)组。豚鼠

连续间日ip相应受试药物进行致敏,共5次,末次致敏后第11天,于前肢静脉一次快速给予受试药物进行激发(激发剂量为致敏剂量的3倍)。观察豚鼠在激发注射后30 min内出现的症状,记录每只豚鼠症状出现及消失时间,症状判断标准为:0,正常;1,不安宁;2,立毛;3,发抖;4,搔鼻;5,喷嚏;6,咳嗽;7,呼吸急促;8,排尿;9,排粪;10,流泪;11,呼吸困难;12,啰音;13,紫癜;14,步态不稳;15,跳跃;16,喘息;17,痉挛;18,横转;19,潮式呼吸;20,死亡。根据表1判断反应级数确定受试物的过敏反应强弱。

表1 豚鼠全身致敏性评价标准

Table 1 Evaluation criteria of ASA on guinea pigs

症状	过敏级别	结果判定
0	—	阴性
1~4	+	弱阳性
5~10	++	阳性
11~19	+++	强阳性
20	++++	极强阳性

2.2 PCA

25只大鼠,随机均分为5组:阴性对照(生理盐水)组、OVA(阳性对照,100 mg/kg)组、溶媒对照(8%乙醇+8%丙二醇)组和黄芪甲苷注射液低(0.5 mg/kg,略高于临床使用等效剂量)、高剂量(2.0 mg/kg,约为临床使用等效剂量的4.4倍)组。大鼠连续间日ip相应受试药物,同时ip佐剂百白破联合疫苗0.25 mL/只,共5次,末次给药后12 d,采血制备抗血清。

另取大鼠30只,随机均分为5组,组别同上,剃毛,麻醉。将上述各组分离所得部分血清(部分血清留作抗体检测用)用生理盐水稀释为1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 分别在鼠背部脱毛的不同区域sc各对应组血清0.1 mL进行被动致敏。被动致敏约48 h后,各组动物iv与致敏剂量相同的抗原加等量的1%伊文思兰染料共1 mL进行激发。激发30 min后,麻醉处死,测量皮肤蓝斑直径,判定过敏反应结果。无蓝斑(-)或蓝斑直径<5 mm(±),过敏反应阴性;蓝斑直径≥5 mm(+)或弥漫(+),过敏反应阳性。

2.3 PCA血清抗体效价测定

制备黄芪甲苷偶联抗原:采用琥珀酸酐法制备黄芪甲苷半抗原,分别采用碳二亚胺(EDC)法和

混合酸酐法将改造后的半抗原与载体蛋白 BSA 和 OVA 偶联^[11-13]。取黄芪甲苷偶联抗原用包被液(pH 值为 9.6 的碳酸盐缓冲液)稀释 1 000 倍后,取 100 μL 加入酶标板孔,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 2 h,甩干,洗板,每孔加入封闭液(含有 1% BSA 的 PBS)溶液 150 μL ,置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 2 h,甩干备用。“2.2”项制备的 PCA 血清样本用 0.02 mol/L PBS (pH 7.2) 稀释 50 倍后,各取 50 μL 加入准备好的酶标板孔中,37 $^{\circ}\text{C}$ 反应 30 min,洗板;加入用 PBS-T 稀释 5 000 倍的辣根过氧化物酶标记的羊抗大鼠酶标二抗 100 μL ,37 $^{\circ}\text{C}$ 反应 30 min,洗板 4~5 次;加入新鲜配制的显色底物 A 液和 B 液各 50 μL ,37 $^{\circ}\text{C}$ 反应 15 min,以 2 mol/L 硫酸中止反应;用酶标仪置于 450 nm 波长(630 nm 作为对照)测定板孔吸光度(A)值,以 A 值大于 0.2 为阳性。

3 结果

3.1 ASA 结果

致敏期间,各组动物均未出现任何异常反应。激发给药后,阳性对照组 6 只动物在药后立即出现搔鼻、喷嚏、呼吸困难、步态不稳、痉挛等一系列过敏反应,药后 3 min 内全部死亡,即过敏反应呈

极强阳性;其它各组动物均未观察到任何过敏症状,即过敏反应阴性。见表 2。

3.2 PCA 结果

阳性对照组 6 只动物被动过敏反应均为阳性;阴性对照组、溶媒对照组和黄芪甲苷注射液 0.5、2.0 mg/kg 剂量组所有动物被动过敏反应均为阴性,结果见表 3。

3.3 PCA 血清抗体效价测定

阴性对照、溶媒对照和黄芪甲苷注射液低、高剂量组所有动物血清样本 A 值均在 0.2 以下;阳性对照组绝大部分样本 A 值接近 0.2 或大于 0.2,见表 4。

表 2 黄芪甲苷注射液对豚鼠主动过敏实验结果($n=6$)
Table 2 Results of ASA on guinea pigs at Astragaloside injection ($n=6$)

组别	剂量/ ($\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)	过敏级别	结果判定
阴性对照	—	—	阴性
溶媒对照	—	—	阴性
OVA	10	++++	极强阳性
黄芪甲苷注射液	0.4	—	阴性
	1.6	—	阴性

表 3 黄芪甲苷注射液对大鼠被动皮肤过敏实验结果($n=6$)
Table 3 Results of PCA on rats at Astragaloside injection ($n=6$)

组别	剂量/ ($\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)	出现过敏症状动物数			判定结果
		—	±	+	
阴性对照	—	5	1	0	过敏反应阴性
溶媒对照	—	3	3	0	过敏反应阴性
OVA	100	0	0	6	过敏反应阳性
黄芪甲苷注射液	0.5	6	0	0	过敏反应阴性
	2.0	4	2	0	过敏反应阴性

表 4 血清样本测定结果
Table 4 Determination of serum sample

组别	剂量/ ($\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)	各组 5 个样本 A 值				
阴性对照	—	0.002	0.040	0.050	0.037	0.056
溶剂对照	—	0.047	0.061	0.043	0.108	0.047
OVA	100	0.106	0.219	0.287	0.187	0.219
黄芪甲苷注射液	0.5	0.112	0.084	0.072	0.100	0.117
	2.0	0.072	0.066	0.103	0.098	0.049

为了验证阳性对照组 A 值高于其他样本是否由于对包被的偶联抗原中的 OVA 产生交叉反应,将酶标板以 100 μL 质量浓度为 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ OVA 进行包被,测定阳性对照组样本对 OVA 的交叉反应。结

果显示,阳性对照组 5 个样本对 OVA 显色的 A 值分别为: 0.131、0.353、0.386、0.263、0.242,均偏高,表明其对 OVA 存在交叉反应,由此可以证明表 4 中的阳性对照组样本的显色是针对 OVA,而非

黄芪甲苷药物本身。

为了更进一步确定待测样本中是否有黄芪甲苷的抗体,排除包被的偶联抗原中的 OVA 的干扰,采用 BSA 偶联抗原进行包板,对所有血清样本进行检

测,结果显示所有血清样本 A 值均在 0.05 以下,进一步证明血清样本中无黄芪甲苷的特异性抗体。见表 5。

从血清测定实验结果来看,所测定的血清样本中不存在针对黄芪甲苷药物的特异性抗体。

表 5 血清样本与 BSA 偶联抗原的测定结果

Table 5 Determination of positive serum samples and BSA conjugated antigen

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	各组 5 个样本 A 值				
阴性对照	—	0.010	0.009	0.028	0.008	0.009
溶媒对照	—	0.010	0.013	0.005	0.008	0.032
OVA	100	0.027	0.025	0.038	0.023	0.012
黄芪甲苷注射液	0.5	0.033	0.035	0.029	0.030	0.038
	2.0	0.020	0.015	0.044	0.043	0.033

4 讨论

随着中药现代化的发展,中药制剂在临床上的应用日益广泛,其过敏性不良反应的报道也急剧增多,其引发的过敏反应表现形式多样,可发生于任何系统和器官,过敏反应轻者为荨麻疹及药疹,中度反应表现为呼吸困难,重者表现为过敏性休克^[14-15]。中药注射剂引起的过敏反应主要是 I 型过敏反应和类过敏反应,引起过敏反应的原因及成分复杂,既有中药多成分的复杂性,也有注射剂内的辅料临床使用不当^[16];目前发布的《药物刺激性、过敏性和溶血性研究技术指导原则》^[5]对静脉注射剂型过敏反应推荐使用 ASA 和 PCA 来预测中药注射剂是否会产生过敏反应。

ASA 发生机制是:初次进入体内的药物,可刺激机体产生相对应的抗体,当药物再次进入体内时,可与抗体结合形成抗原抗体复合物,从而导致肥大细胞释放过敏介质(如组胺等),引起过敏反应。PCA 发生机制是:由药物诱导动物产生 Ig E 抗体,动物的抗血清皮内注射于正常动物后, Ig E 抗体与肥大细胞受体结合,使正常动物被动致敏。当被动致敏的正常动物再次接触相同药物时,结合半抗原的载体蛋白可以与 Ig E 结合,导致肥大细胞脱颗粒,局部释放过敏介质,导致局部血管通透性增大,而产生过敏反应。抗体效价一般采用生物学方法检测,包括病毒中和试验法、免疫标记技术、血凝抑制试验、双向免疫扩散技术等,其原理均基于抗原抗体间的结合反应。除与其特异性抗体发生反应外,抗原还与非特异抗体发生交叉反应^[17]。目前我国过敏反应临床前评价方法多为整体动物实验法,这些方法对于药物致敏性的检测很不敏感,动物实验还存

在检测指标主观性强、重现性差等缺点。而体外血清抗体效价方法具有检测直观,结果易于量化,客观准确等优点,体内动物实验结合体外效价测定使得过敏反应结果更加可信,二者结合,可以互相验证,能够完善过敏反应临床前评价方法。

黄芪甲苷,药理作用显著,有望成为疾病治疗和康复用药物,具有广阔的市场发展空间^[18-19],但口服生物利用度仅为 2.2%,且该化合物在油中、水中均不易溶,因此本制剂中心用 25%乙醇+25%丙二醇作为溶媒,研制出黄芪甲苷注射液,为评价该中药注射剂临床使用是否会引起过敏反应,进行体内 ASA 和 PCA 实验,同时利用间接酶联免疫吸附测定法(ELISA)对制备的血清进行抗体效价测定,对体内 PCA 实验结果进行验证。黄芪甲苷注射液体内 ASA 和 PCA 实验结果均为阴性,血清抗体测定结果表明 PCA 实验制备的抗血清中不存在针对黄芪甲苷药物的特异性抗体,这提示临床使用出现过敏反应的可能性较小。

参考文献

- [1] 曹玉冰. 黄芪甲苷的药理作用及其机制的研究进展[J]. 现代药物与临床, 2017, 32(5): 954-960.
- [2] 杨亚南, 高卫真, 柳钢, 等. 生脉注射剂不良反应分析及原因探索[J]. 中草药, 2014, 45(9): 1349-1352.
- [3] 徐煜彬, 窦德强. 中药注射剂类过敏研究进展[J]. 中国中药杂志, 2015, 40(14): 2765-2773.
- [4] 李黎明, 金若敏, 符胜光, 等. 清开灵、血塞通注射液类过敏反应研究[J]. 中国中医药信息杂志, 2014, 21(9): 53-57.
- [5] 国家食品药品监督管理总局. 药物刺激性、过敏性和溶血性研究技术指导原则[EB/OL]. (2014-05-13). <http://www.sda.gov.cn/WS01/CL1616/101018.html>.

(下转第 1097 页)

- [14] Mortaz E, Masjedi M R, Abedini A, et al. Common features of tuberculosis and sarcoidosis [J]. *Int J Mycobacteriol*, 2016, 5 Suppl 1: S240-S241.
- [15] Hamilton C A, Mahan S, Entrican G, et al. Interactions between natural killer cells and dendritic cells favour T helper1-type responses to BCG in calves [J]. *Vet Res*, 2016, 47(1): 85.
- [16] Thada S, Ponnana M, Sivangala R, et al. Polymorphisms of IFN-gamma (+874A/T) and IL-12 (+1188A/C) in tuberculosis patients and their household contacts in Hyderabad, India [J]. *Hum Immunol*, 2016, 77(7): 559-565.
- [17] Anuradha R, Munisankar S, Bhootra Y, et al. High body mass index is associated with heightened systemic and mycobacterial antigen-specific pro-inflammatory cytokines in latent tuberculosis [J]. *Tuberculosis (Edinb)*, 2016, 101: 56-61.
- [18] Kreins A Y, Ciancanelli M J, Okada S, et al. Human TYK2 deficiency: Mycobacterial and viral infections without hyper-IgE syndrome [J]. *J Exp Med*, 2015, 212(10): 1641-1662.
- [19] 张万江, 刘云霞. 结核分枝杆菌与巨噬细胞相互作用的研究进展 [J]. *中国细胞生物学学报*, 2012, 34(6): 617-622.
- [20] 杨廷桐, 毛泽善, 范雪辉, 等. 异烟肼对小鼠非特异性免疫功能的影响 [J]. *陕西医学杂志*, 2004, 33(04): 306-307.

(上接第 1089 页)

- [6] 周莉, 王永, 杨春雷, 等. 注射用灯盏花素豚鼠全身主动过敏性试验评价方法的比较 [J]. *中国药理学与毒理学杂志*, 2015, 29(2): 265-270.
- [7] 荆宝琴, 张金晓, 王磊, 等. 大鼠被动皮肤过敏性实验中最佳佐剂的选择研究 [J]. *中国临床药理学杂志*, 2014, 30(12): 1114-1116.
- [8] 李逢春. 盐酸氨溴索注射液安全性评价研究 [J]. *中国实用医药*, 2014, 9(19): 258-259.
- [9] 鲁素雅, 黄青, 史清水. 中药注射剂过敏反应非临床评价方法研究进展 [J]. *药学与临床研究*, 2013, 21(5): 547-550.
- [10] 刘丽鹤, 尹利辉, 金少鸿. 中药注射剂过敏反应体外评价方法研究进展 [J]. *药物分析杂志*, 2013, 33(8): 1439.
- [11] 刘珍, 张改平, 职爱民. 苏丹红IV和柠檬黄人工抗原的制备与鉴定 [J]. *中国免疫学杂志*, 2013, 29(5): 538-541.
- [12] 余伟, 王小红, 周有祥. 苏丹红 I 人工抗原的合成 [J]. *卫生研究*, 2008, 37(3): 362-376.
- [13] 吴昊, 戴彩霞, 刘佳. 盐酸西布曲明人工抗原的合成与鉴定 [J]. *食品科学*, 2012, 33(3): 140-145.
- [14] 李亚萍, 张明昊. 中药注射液不良反应现状分析与防治措施探讨 [J]. *光明中医*, 2016, 31(5): 739-741.
- [15] 李福兵. 174 例中药注射液不良反应的临床分析 [J]. *数理医药学杂志*, 2015, 28(11): 1656-1657.
- [16] 高英杰. 中药注射液常用辅料的作用与安全性分析 [J]. *中国医院用药评价与分析*, 2014, 14(7): 640-642.
- [17] 张佩, 吴恩应, 陈玉琴, 等. 特异性抗体效价检测技术概述 [J]. *现代生物医学进展*, 2011, 11(17): 3377-3381.
- [18] 尉希清, 刘帅, 牛珩, 等. 黄芪甲苷对大鼠平滑肌细胞及颈动脉内膜增生的影响及机制研究 [J]. *中草药*, 2016, 47(19): 3432-3440.
- [19] 孙豪栋, 庞晓斌, 李继扬. 黄芪甲苷生物活性研究进展 [J]. *中国药房*, 2011, 22(7): 657-660.