

注射用姜黄素脂质体过敏现象的初步研究

修 宪¹, 冯彩霞^{2*}, 唐晓娇³, 王雪姣¹, 李 超¹, 朱 颖¹, 王雅鹃^{3*}

1. 石家庄市第二医院, 河北 石家庄 050051

2. 石家庄市第五医院, 河北 石家庄 050024

3. 石药集团中奇制药技术(石家庄)有限公司, 河北 石家庄 050035

摘要: **目的** 比较3种不同粒径注射用姜黄素脂质体(CLI)引起的过敏反应,并判断可能的过敏反应类型。**方法** 将平均粒径约为70、100、130 nm的CLI(剂量为20 mg/kg,以姜黄素计)分别尾iv给予大鼠,分别于注射前,注射后10 min、7 d,眼眶采血,分离血清,ELISA法检测注射前后血清中过敏相关因子——补体C3a、C3b和C5a,组胺和抗体IgE、IgG、IgM的含量变化。将平均粒径约为100 nm的CLI和抗过敏药地塞米松(预处理2 h,2 mg/kg)联用给予大鼠,观察血清中补体C3a、C5a和组胺的含量变化。**结果** 给予3种粒径的CLI,血清中补体C3a、C3b、C5a和组胺含量均明显升高,与给药前比较差异具有统计学意义($P < 0.01$);血清中抗体IgE、IgG、IgM的含量均无明显变化。预先给予地塞米松,在注射CLI前后C3a和C5a的含量无明显变化,组胺含量极低。**结论** 3种不同粒径CLI在体内引起的过敏反应一致,且可能是补体激活相关的假性过敏反应。

关键词: 姜黄素; 脂质体; 过敏反应; 补体; 抗体; 组胺

中图分类号: R994 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-6376(2018)02-0234-05

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2018.02.011

Preliminary study of allergy phenomenon of curcumin liposomes injection

XIU Xian¹, FENG Caixia², TANG Xiaojiao³, WANG Xuejiao¹, LI Chao¹, ZHU Ying¹, WANG Yajuan³

1. The Second Hospital of Shijiazhuang, Shijiazhuang 050051, China

2. The Fifth Hospital of Shijiazhuang, Shijiazhuang 050024, China

3. CSPC ZhongQi Pharmaceutical Technology Co., Ltd., Shijiazhuang 050035, China

Abstract: **Objective** To compare the allergic reactions caused by curcumin liposomes injection (CLI) with different sizes, and analysis the possible type of the allergic reaction caused by those. **Methods** Curcumin liposomes injection with an average diameter of about 70, 100, and 130 nm were iv administered to rats in tail, and then the concentration of allergy-related factors including complement C3a, C3b and C5a, histamine and antibody IgE, IgG, IgM in serum originated from orbital blood were detected by ELISA before injection and 10 min and 7 d after the injection. Rats were treated with CLI with an average particle size of 100 nm and an anti-allergy drug dexamethasone (pretreated for 2 h, 2 mg/kg). The contents of complement C3a, C5a and histamine in serum were observed. **Results** Three sizes of CPI could cause the obvious increase of complement factor activation and histamine release, the difference was statistically significant compared with that before administration ($P < 0.01$). However, there was no significant change in the contents of IgE, IgG and IgM in serum. Pretreated with dexamethasone, the content C3a and C5a had no obvious change before and after the injection of CLI, the content of histamine was very low. **Conclusion** The allergic reactions caused by the three sizes of CPI is consistent with each other, which may be the complement activated related pseudo allergic reactions.

Key word: curcumin; liposome; allergic reaction; complement; antibody; histamin

收稿日期: 2017-08-31

基金项目: 石家庄市科技支撑计划(171461293)

第一作者: 修 宪, 男, 主管药师, 硕士, 研究方向为新型药物传递系统。Tel: (0311)87023965 E-mail: lnxixian@126.com

*通信作者: 冯彩霞, 女, 硕士, 高级工程师, 研究方向为新药开发。Tel: (0311)85925636 E-mail: fern_yange@163.com

王雅鹃, 女, 博士, 高级工程师, 研究方向为新型药物传递系统。Tel: (0311)67808853 E-mail: wangyajuan@mail.ecspc.com

姜黄素 (curcumin), 又名二阿魏酰基甲烷, 属于天然酚类色素, 是从姜黄、莪术、郁金根茎中分离出的活性物质之一^[1]。许多研究表明, 姜黄素的药理作用广泛^[2], 在抗氧化^[3]、抗炎 (神经变性疾病、糖尿病、过敏、哮喘、支气管炎、肠炎、风湿病和牛皮癣)^[4]、抗动脉粥样硬化^[5]、抗肿瘤^[6]方面均发挥显著作用^[7], 也具有抗增生、抗人类免疫缺陷、抗病毒、免疫调节、保护肝脏和肾脏等功效。姜黄素在水中溶解度低, 本课题组将其制备成脂质体制剂, 提高溶解度, 使该药物能够以静脉注射的方式给药。由于姜黄素脂质体为纳米粒子, 在使用过程中可能会出现过敏反应, 本文对姜黄素脂质体过敏现象进行初步研究。

过敏反应 (hypersensitivity reactions, HSRs) 传统上被分为 4 类, 分别是 I~IV 型。该分类标准的制订者 Coombs 和 Gell 将 I 型过敏反应定义为 IgE 介导的急性反应, 其它几类分别是由 IgG、免疫复合物或者是淋巴细胞引发或介导的亚急性或慢性免疫变化^[6]。通常情况下, 药物引发的快速过敏反应大多属于 I 型过敏反应, 这类由过敏原激活补体引起的过敏反应被称为补体激活相关的假性过敏反应 (C activation-related pseudoallergy, CARPA)。由于 CARPA 的普遍性, 美国 FDA 建议在药物免疫毒性检测中增加体外或/和体内的补体活性检测, 以便更好地预测药物在临床上发生假性过敏反应的风险。本课题组在前期研究中发现, 大鼠注射姜黄素脂质体后, 血清中组胺含量明显增高, 推测存在 CARPA 反应。本研究将不同粒径注射用姜黄素脂质体 (curcumin liposomes injection, CLI) 分别给予大鼠, 通过检测注射前后血清样品中各种过敏相关因子的含量变化, 分析是否能够引起过敏反应, 以及引起过敏反应的类型。

1 材料

1.1 仪器

多功能酶标仪 (Thermo, Varioskan Flash)。

1.2 药品及主要试剂

CLI (自制, 批号 160503、160504、160505); 姜黄素 (石药集团中奇制药技术有限公司, 批号 150701A, 质量分数 93.77%); 卵磷脂 (Lipoid 公司, 批号 EP031533B6); 胆固醇 (默克公司, 批号 201509001); 地塞米松磷酸钠注射液 (石家庄欧意药业有限公司, 批号 071120628); 大鼠补体 C3a、C3b、C5a ELISA 试剂盒 (批号分别为 30226233、

36288214、34272202, Mybiosource,); 大鼠组胺检测试剂盒 (批号 38298138, Mybiosource); 大鼠 IgG、IgM、IgE 定量试剂盒 (批号分别为 E110-128-28、E110-100-26、AK0015MAR 17030, Bethyl)。

1.3 实验动物

体质量 200~250 g 的雄性 SD 大鼠, 北京维通利华实验动物科技有限公司, 实验动物许可证号 SCXK (京) 2012-0001。

2 方法

2.1 CLI 的制备

将姜黄素、卵磷脂和胆固醇溶解于无水乙醇后置于茄型瓶内, 使用旋转蒸发仪缓慢减压蒸发成膜, 加入海藻糖水溶液水化, 使用微射流均质机整粒至目标粒径, 使用 0.2 μm 的尼龙膜将药液过滤到无菌容器中, 分装到冻干容器中进行冻干, 得到 CLI。本研究共制备了 3 种粒径姜黄素脂质体, 平均粒径分别为 68.6 nm [聚合物分散性指数 (PDI) 0.059]、101.3 nm (PDI 0.084)、128.2 nm (PDI 0.094)。

2.2 血清样品收集

2.2.1 对过敏相关因子的影响 选取体质量 200~250 g 的雄性 SD 大鼠, 按照 3 只/组随机分为 4 组: 对照组及 CLI 70、100、130 nm 组, 分别尾 iv 注射: 生理盐水及平均粒径约为 70、100、130 nm 的 CLI (剂量为 20 mg/kg, 以姜黄素计^[9])。在注射前通过眼眶采集空白血, 注射后 10 min、7 d, 再次眼眶采血, 使用无内毒的离心管收集血样。采集到的全血置于 4 $^{\circ}\text{C}$, 静置过夜后, 3 000 r/min 离心 10 min, 取血清用于后续检测。

2.2.2 联用抗过敏药对过敏相关因子的影响 6 只 SD 大鼠, 随机分为 2 组: 地塞米松+CLI 组、CLI 组, 每组 3 只。地塞米松+CLI 组首先给予 2 mg/kg 地塞米松 (尾 iv 给药), CLI 组给予生理盐水; 2 h 后两组均给予平均粒径约为 100 nm 的 CLI (20 mg/kg)。按照上述“2.2.1”项方法收集血样用于检测。

2.3 过敏相关因子的 ELISA 检测

补体 C3a、C3b 和 C5a, 以及组胺和 IgE 的检测按照各自 ELISA 试剂盒说明书进行, 即将血清加入到预先包被抗体的酶标板中, 反应一段时间, 去掉血清, 洗涤液去除残留血清; 加入抗体, 反应一段时间, 去掉抗体, 洗涤液去除残留抗体; 最后加入显色液显色, 酶标仪检测吸光度 (A) 值。抗体 IgG 和 IgM 检测也按照说明书进行, 但由于血清中

IgM 和 IgG 含量较高, 故将血清用生理盐水稀释 50 倍再进行检测。

2.4 统计学分析

数据均采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 SPSS 19.0 软件进行 t 检验, 对各组给药前后数据进行统计学分析。

3 结果

3.1 血清中补体因子的含量变化

药物进入体内后, 需要通过补体的逐级活化产

生过敏素(如补体 C3a 和 C5a), 才能引起过敏反应。因此, 首先对收集的血清中的补体因子 C3a、C3b 和 C5a 进行 ELISA 检测。给予不同粒径的 CLI 10 min 后血清中的补体因子 C3a、C3b 和 C5a 均活化, 含量显著高于注射前($P < 0.05$)。CLI 3 种粒径比较, 注射前后血清中补体水平均相似。对照组的补体因子在注射前后无明显变化, 与 CLI 组的给药前水平相似(图 1)。

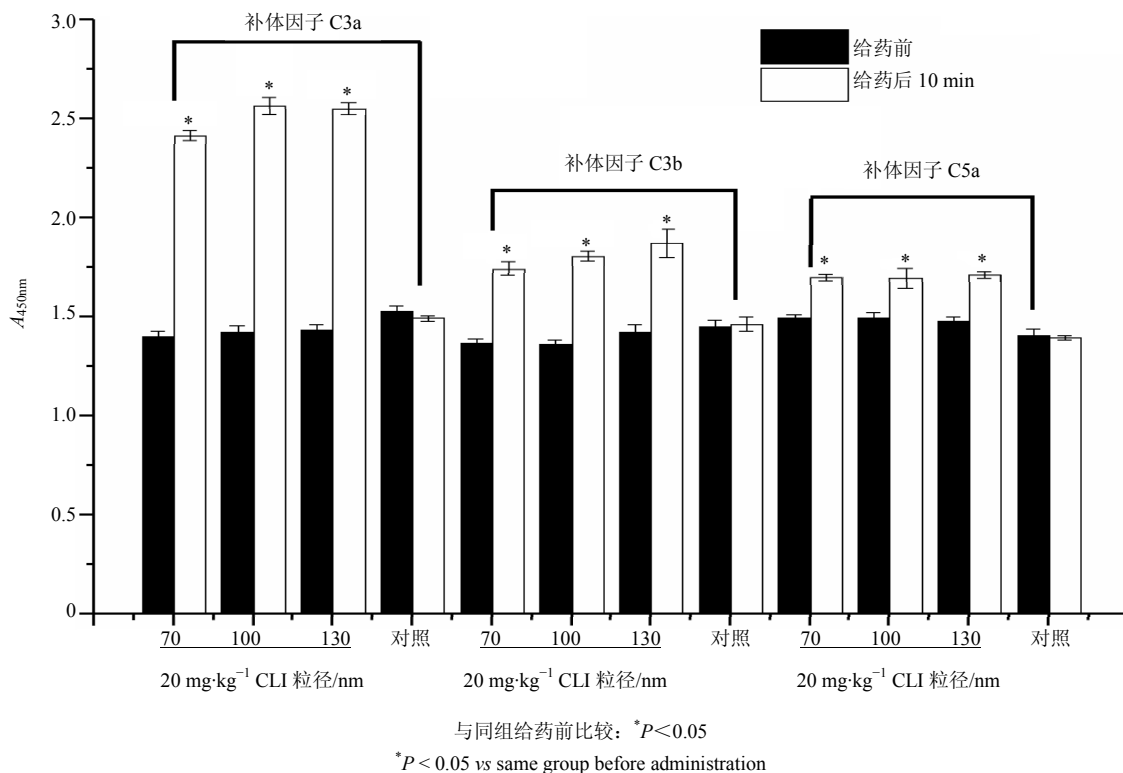


图 1 给药前后血清 C3a、C5a 和 C3b 含量的变化 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 1 Content changes of complement C3a, C5a and C3b in serum collected before and after injection ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

3.2 血清中免疫球蛋白的含量变化

一些过敏反应是通过抗体(免疫球蛋白)介导或诱发体内免疫反应而产生的, 因此, 对采集到的血清样品中与过敏相关的 3 种抗体 IgE、IgM 和 IgG 进行检测。与 IgE 不同, IgM 和 IgG 通常是经抗原刺激后由 B 淋巴细胞产生的特异性抗体, 产生时间较长。因此, 选择检测注射 7 d 后的血清中的 IgM 和 IgG 的含量, 检测注射 10 min 后 IgE 含量。结果表明, 各组在注射前后血清中的 IgM 和 IgG 的含量相差不大, 而所有血清中的 IgE 含量极低, 且给药前后没有变化(图 2)。

3.3 血清中组胺的含量变化

组胺是自体活性物质之一, 在体内由组氨酸脱

羧基而成。当机体受到某些刺激时, 可引起肥大细胞或嗜碱性粒细胞脱颗粒, 导致组胺释放。释放出的组胺与其受体结合产生过敏、炎症等生物效应。通过检测注射前后血清中组胺的变化情况, 预测 CLI 是否存在过敏的可能。结果表明, 注射姜黄素脂质体之后, 血清中组胺的含量均显著高于注射之前, 并且不同粒径组别之间的差异不大; 对照组在注射前后组胺的含量无明显变化(图 3)。

3.4 抗过敏药物对过敏因子产生的影响

CLI 给药后, 大鼠体内的补体 C3a、C5a 和组胺的含量都相应升高。因此, 需考察在注射抗过敏药物之后, 这些因子在血清中的变化情况。结果表明, 预先给予地塞米松, 在注射 CLI 前后 C3a 和

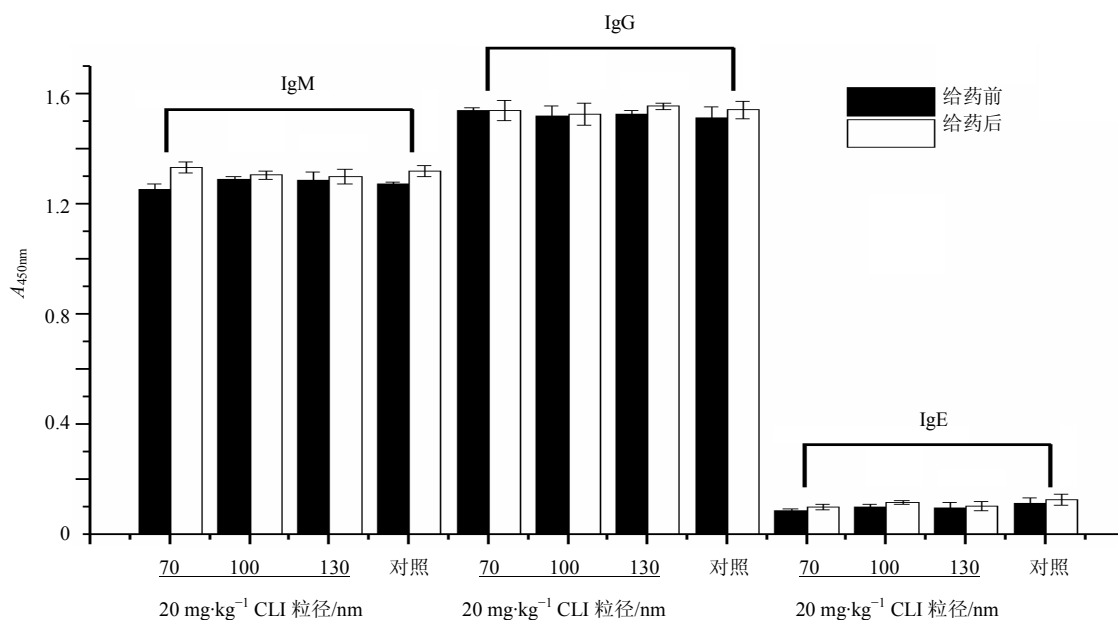
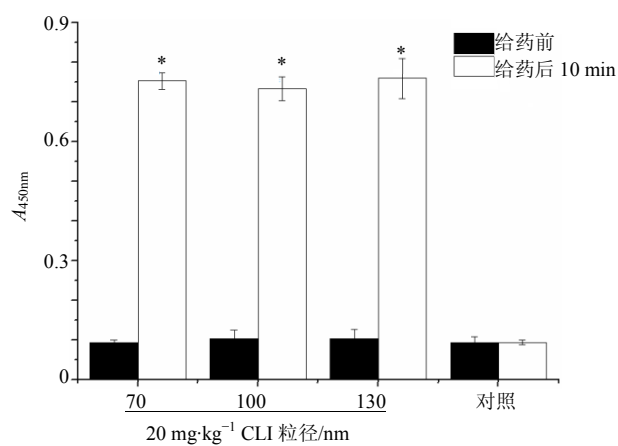


图 2 给药前后 IgE、IgM 和 IgG 的含量变化 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 2 Content changes of immunoglobulin IgE, IgM and IgG in serum collected before and after injection ($\bar{x} \pm s, n = 3$)



与同组给药前比较: * $P < 0.05$

* $P < 0.05$ vs same group before administration

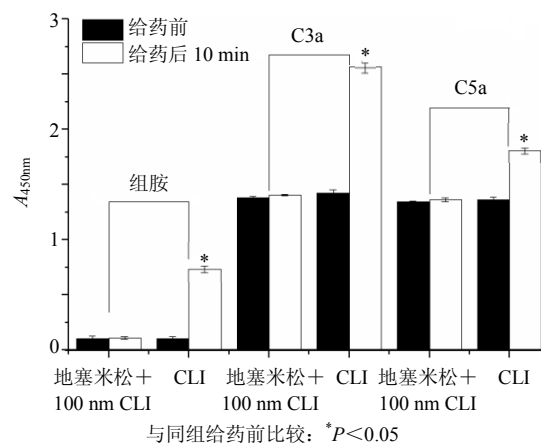
图 3 给药前后血清中组胺含量变化 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 3 Content changes of histamine in serum collected before and after injection ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

C5a 的含量无明显变化, 组胺含量极低; 单独注射 CLI 后, 血清中的 C3a、C5a 和组胺的含量均显著升高。结果见图 4。

4 讨论

从结果可以看出, 不同粒径 CLI 在静脉注射后都会引起补体活化和组胺释放, 但是并不导致抗体 IgE、IgM 和 IgG 的升高。并且, 活化产生的补体 C3a、C5a 和 C3b 的量、以及释放出的组胺的量相



与同组给药前比较: * $P < 0.05$

* $P < 0.05$ vs same group before administration

图 4 抗过敏药物对血清组胺、C3a 和 C5a 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 4 Effect of anti-allergy drug on histamine, C3a, and C5a in serum ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

似, 表明 3 种不同粒径 CLI 在动物体内均会引起过敏因子的变化, 且引起的变化一致。

通常情况下, 药物引起的过敏反应大多是 I 型过敏反应, 即 IgE 引发或介导的急性过敏反应。然而, 近年来在急性过敏反应中出现了一部分新的内容, 符合 Coombs 和 Gell I 型过敏反应的标准, 但是不需要 IgE 引发或介导。这一类非 IgE 介导的急性过敏反应被称为假性过敏反应, 约占所有过敏反

应的 77%^[8], 每年会导致成千上万例过敏事件, 并导致数百起的死亡事件^[10]。造影剂、胶束溶剂等都能够引起假性过敏反应, 引起的过敏反应有一个共同的诱发机制——补体激活, 因此, 被称为 CARPA^[11]。在本研究中, CLI 能够诱发补体活化, 但是 IgE 的含量并不随之增加, 因此, CLI 引起的过敏反应可能是 CARPA 反应。

大多数情况下 CAPRA 反应是温和的、暂时的, 但是补体激活后的一个主要表现是出现心肺压迫, 因此, CARPA 反应可能会成为心脏病患者的安全隐患。本研究通过预先注射抗过敏药物地塞米松, 抑制了注射 CLI 后补体因子 C3a 和 C5a 的活化以及组胺的释放。因此, 今后开发姜黄素脂质体时, 对于心脏病患者, 选择 CLI 应谨慎, 必要情况下应通过适当方式预防可能的过敏反应。

参考文献

- [1] Goel A, Kunnumakkara A B, Aggarwal B B. Curcumin as “Curecumin”: from kitchen to clinic [J]. *Biochem pharmacol*, 2008, 75(4): 787-809.
- [2] 罗廷顺, 李洪文, 刘正文, 等. 姜黄素的提取分离与药理作用研究进展 [J]. *现代药物与临床*, 2011, 26(2): 102-107.
- [3] 李 军, 熊 琨, 龚 元, 等. 基于信号转导通路的姜黄素抗氧化机制研究进展 [J]. *中草药*, 2016, 47(13): 2373-2380.
- [4] Aggarwal B B, Harikumar K B. Potential therapeutic effects of curcumin, the anti-inflammatory agent, against neurodegenerative, cardiovascular, pulmonary, metabolic, autoimmune and neoplastic diseases [J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2009, 41(1): 40-59.
- [5] Shin S K, Ha T Y, McGregor R A, et al. Long - term curcumin administration protects against atherosclerosis via hepatic regulation of lipoprotein cholesterol metabolism [J]. *Mol Nutr Food Res*, 2011, 55(12): 1829-1840.
- [6] 常明向, 吴梅梅, 李瀚旻. 姜黄素与甘草次酸联用对肝癌 HepG-2 细胞增殖的抑制作用 [J]. *药物评价研究*, 2017, 40(1): 42-47.
- [7] Chattopadhyay I, Biswas K, Bandyopadhyay U, et al. Turmeric and curcumin: biological actions and medicinal applications [J]. *Curr Sci*, 2004, 87(1): 44-53.
- [8] Szebeni J. Complement activation-related pseudoallergy: A new class of drug-induced acute immune toxicity [J]. *Toxicology*, 2005, 216(2/3): 106-121.
- [9] L 赫尔森 S 邱. 用于治疗神经退行性和应激性障碍的静脉姜黄素及衍生物 [P]. 中国专利: CN 103037841A, 2013-04-10.
- [10] Demoly P, Lebel B, Messaad D, et al. Predictive capacity of histaminerelease for the diagnosis of drug allergy [J]. *Allergy*, 1999, 54: 500-506.
- [11] Szebeni J. Complement activation-related pseudoallergy caused by liposomes, micellar carriers of intravenous drugs and radiocontrast agents [J]. *Crit Rev Ther Drug Carr Syst*, 2001, 18: 567-606.