

· 综述 ·

中药注射剂过敏反应非临床评价方法

张玉生¹, 史艳秋², 王建华², 刘兆平^{2*}

(1. 山东大学药学院, 山东 济南 250012; 2. 山东大学新药评价中心, 山东 济南 250012)

摘要: 中药注射剂不良反应问题日益严峻, 以发生率最高的过敏反应最为突出, 已经成为临床医生担忧的重点和药监部门重点监管的对象。然而, 由于目前中药注射剂过敏反应评价方法尚不完善和存在诸多缺陷, 尚不能有效地预测中药注射剂临床过敏反应的发生。对现有的非临床过敏反应实验方法、评价指标及其意义进行综述, 为建立适合中药注射剂的过敏反应非临床评价方法提供参考。

关键词: 中药注射剂; 过敏反应; 非临床评价

中图分类号: R283; R285

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2009)02-0313-03

Non-clinical evaluation on hypersensitivity induced by Chinese materia medica injections

ZHANG Yu-sheng¹, SHI Yan-qiu², WANG Jian-hua², LIU Zhao-ping²

(1. School of Pharmaceutical Sciences, Shandong University, Jinan 250012, China; 2. Center for New Drugs

Evaluation, Shandong University, Jinan 250012, China)

Key words: Chinese materia medica injections; hypersensitivity; non-clinical evaluation

中药注射剂是指以中医药理论为指导, 采用现代科学技术和方法, 从中药或天然药物的单方或复方中提取有效物质而制成的无菌溶液、混悬液或临用前配成溶液的灭菌粉末供注入体内的制剂^[1,2]。中药注射剂作为我国独创的新剂型, 具有生物利用度高、作用迅速等特点, 已广泛应用于危重病急救及感染性疾病、心脑血管疾病、恶性肿瘤等疾病的治疗^[3]。然而, 近年来, 随着中药注射剂在临床上的广泛应用, 不良反应病例报道逐渐增多, 安全性问题越来越突出, 给用药者的健康和生命带来了严重的危害。

中药注射剂在临床应用中会出现不可预见的不良反应, 其不良反应发生率和严重程度都高于其他中药剂型。在诸多的中药注射剂不良反应临床症状中, 过敏反应发生频率最高^[3], 也是当前首先需要解决的关键问题。因此, 分析中药注射剂不良反应发生的原因, 探寻过敏原, 建立高效、灵敏的致敏检测方法, 提高准确率, 保证临床合理用药, 是摆在中药注射剂安全性评价研究和药物毒理学面前的重大而急迫的课题。本文就现有的非临床过敏反应检测方法进行综述, 为寻找有效的中药注射剂过敏反应非临床评价方法提供思路。

1 过敏反应与类过敏反应

药物引起的过敏反应主要包括经典过敏反应和类过敏反应。经典过敏反应分为由 IgE 介导的速发型过敏反应、由抗体介导细胞毒型的过敏反应、由 IgG 介导的免疫复合物型的过敏反应和 T 淋巴细胞介导的过敏反应。

还有一些过敏反应尚不能用上述分类方法进行界定, 可能有多种机制参与。类过敏反应临床症状与过敏反应相似, 但其与抗原特异性免疫反应无关, 可能由炎症反应的激活引起, 其机制尚未明确, 有待进一步研究。中药注射剂由于成分复杂, 引起的过敏反应可能为上述过敏反应中的任意一种或几种。目前尚无用于预测型和型过敏反应标准的非临床评价方法, 而且, 中药注射剂过敏反应中未见型过敏反应的相关报道, 因此本文主要介绍型过敏反应和类过敏反应非临床评价方法。

2 非临床评价方法

2.1 动物模型: 在各种药物不良反应中, 过敏反应最难预测, 主要原因之一是缺乏相应敏感的动物模型^[4,5]。与临床上其他药物过敏反应一样, 中药注射剂过敏反应存在发生率的问题, 在动物体内难以复制。目前已有多种动物用于研究药物过敏反应, 如小鼠、大鼠、豚鼠和犬, 但对药物过敏反应敏感的动物模型极少^[5]。例如氨苯磺胺致大型犬过敏与人体过敏反应相似, 但其发生率仅为 0.25%; 另外 2 个较为有效的动物模型为青霉素致 Brown Norway (BN) 大鼠自身免疫病和奈韦拉平致大鼠皮疹, 模型中出现的毒性反应均为免疫反应。其他动物模型, 如氨酚喹致大鼠粒性白细胞缺乏/肝毒性、氟烷致大鼠和豚鼠肝毒性均为免疫反应, 但临床上这两种药物均不出现此毒性反应。药物敏感的实验动物是进行中药注射剂过敏反应临床前评价的前提。王红星^[6]认

* 收稿日期: 2008-08-22

基金项目: 国家科技部支撑计划项目 (2006BAI14B00)

作者简介: 张玉生 (1969—), 男, 山东济南人, 副研究员, 硕士研究生, 研究方向为药物毒理学。

Tel: 13306407299 E-mail: zhangysh2000@sdu.edu.cn

* 通讯作者 刘兆平 Tel: (0531) 88380319 E-mail: liuzhaoping@sdu.edu.cn

为犬(家犬、Beagle 犬)比豚鼠对中药注射剂过敏物质更敏感,且易观察;1997—2002 年的 6 年间对 15 个具有不同药用功效的中药注射剂进行 Beagle 犬(其中 2 个为家犬试验)静脉滴注长期毒性试验,其中有 14 个供试品在预试时出现过敏反应。这些制剂(注射剂、粉针和大输液)的稀释液或原液通过犬前肢静脉血管滴注,5~30 min 内均表现出不同程度的皮肤与消化系统症状:头面部、额部、眼、口腔、嘴唇、耳朵、胸部、腹部、腋窝和足趾等部位皮肤增厚(水肿),红斑和眼口黏膜充血,并有烦躁不安、流涎、呼吸及心率加快,甚至腹泻、站立不稳、厌食等明显的皮肤和消化系统过敏反应;而这些供试品的豚鼠过敏反应试验则为阴性。现有的中药注射剂致犬过敏的研究尚不全面,尤其是发生机制方面的研究,有待于在其他品种的动物中寻找敏感的动物模型。

2.2 经典过敏反应非临床评价方法

2.2.1 主动皮肤过敏试验、主动全身过敏试验和被动皮肤过敏试验:目前只对皮肤接触性药物过敏有比较行之有效的预测方法,如豚鼠最大化试验(guinea pig maximization test, GPMT)、Buehler 试验(Buehler assay, BA)和啮齿类动物局部淋巴结试验(LLNA)^[4],而对全身过敏反应尚未有较为稳定、可靠的预测方法,但可尝试以下方法进行研究。

型过敏反应通常采用主动皮肤过敏试验(active cutaneous anaphylaxis, ACA)、主动全身过敏试验(active systemic anaphylaxis, ASA)和被动皮肤过敏试验(passive cutaneous anaphylaxis, PCA)检测。国家食品药品监督管理局发布的《中药、天然药物免疫毒性(过敏性、光变态反应)研究技术指导原则》中规定了局部给药发挥全身作用的药物需考察型过敏反应,如注射剂需进行 ASA 和 PCA 试验。一些研究者对临床上出现过过敏反应的中药注射剂进行了 PCA 试验。刘建芳等^[7]对清开灵注射液进行 PCA 试验,发现该注射液高剂量组大鼠均表现过敏反应,低剂量组中以 1/2 抗血清致敏出现过敏反应,以 1/8 抗血清致敏未出现过敏反应。鲍玉琳等^[8]对参麦注射液、穿琥宁注射液和黄芪注射液进行 PCA 和 ASA 试验,结果显示 PCA 试验中参麦注射液和穿琥宁注射液高、低剂量组均有过敏反应,黄芪注射液高剂量组出现过敏反应,低剂量组未出现过敏反应。ASA 试验中只有穿琥宁注射液高剂量组的两只动物显示弱阳性,其他未见过过敏反应。对于小分子药物,PCA 和 ACA 易出现假阴性反应,尤其是当药物可能为半抗原,需经过生物转化才能引起机体致敏。与 PCA 和 ACA 一样,ASA 对于检测大分子蛋白的过敏性有效,对于检测小分子药物可能并不适合^[3,6]。而中药注射剂成分复杂,许多成分未知,大分子蛋白和小分子物质种类和量均不清楚。另外,虽然在以上 PCA 试验中出现了临床反应相似的阳性结果,但其他中药注射剂 PCA 试验是否能产生同样反应尚未可知,因此 PCA 对于中药注射剂过敏反应预测的适用性还需确定。

还有一些研究者从半抗原角度进行药物过敏反应研究,假设小分子药物进入机体后首先与血浆蛋白结合形成抗原,然后引起过敏反应,据此设计实验,即首先在体外将药物与

血浆蛋白结合,然后以药物-血浆蛋白复合物为受试物进行 PCA 试验。木糖醇的过敏反应罕见,为研究其发生机制, Sreenath 等^[9]将 D-木糖醇体外结合牛血清白蛋白,以此结合物为受试物对 BALB/c 小鼠进行 PCA 试验。结果表明,该结合物可引起与阳性对照物类似且发生程度远高于牛血清白蛋白的阳性反应,并得出 D-木糖醇是半抗原的结论。中药注射剂成分复杂,不排除其中含有半抗原的可能,因而可考虑利用该方法进行中药注射剂过敏反应研究。

2.2.2 检测淋巴细胞因子和血清 IgE:研究表明,过敏反应与淋巴细胞应答和 IgE 生成有关,如型过敏反应由 IgE 介导。淋巴细胞因子和血清 IgE 检测已成为过敏反应研究的常用方法。一项关于吸入性过敏原的研究显示,吸入性过敏原偏苯三苷、二异氰酸甲苯酯、己二异氰酸酯和六氢邻苯二甲酸均可诱导 BN 大鼠产生过敏反应(淋巴结中出现细胞构成改变和细胞增殖),但只有偏苯三苷诱导的小鼠血清 IgE 浓度显著升高,而其他过敏原只引起短暂的或微弱的血清 IgE 浓度升高,表明仅检测 IgE 水平不足以预测过敏反应。该研究还同时对上述 4 种过敏原诱导的 BALB/c 小鼠引流淋巴结进行检测,发现 Th-2 型淋巴细胞的细胞因子分泌均显著增加,认为细胞因子更有可能成为评价吸入性过敏原的有效指标^[10]。虽然血清 IgE 浓度变化作为过敏反应评价指标存在缺陷,如与给药途径有关,但美国 FDA 发布的《医药企业在研药物免疫毒性评价指导原则》仍认为可以从 IgE 检测角度考虑通过动物实验预测全身性过敏反应和吸入性过敏反应^[11]。目前尚未报道在中药注射剂过敏反应研究中进行淋巴细胞细胞因子和血清 IgE 的检测试验。

2.2.3 腮腺淋巴结试验:药物过敏反应机制多种多样,可能与生成新抗原和佐剂样作用有关,从而产生引起细胞和组织损伤的危险信号。药物过敏反应必须经历免疫系统的激活和 T 淋巴细胞兴奋过程,据此设计了腮腺淋巴结试验(PLNA)。其方法是向啮齿类动物(大鼠或小鼠)后脚趾部注射受试物,6~8 d 后检测腮腺淋巴结大小、质量和细胞构成以确定抗体反应。PLNA 被认为是一种较有前景的预测小分子药物过敏反应的系统方法,但该方法还存在许多局限性。一种改良的 PLNA 法,即报告抗原 PLNA 法,是将报告抗原三硝基苯-聚蔗糖(TNF-Ficoll)结合物或报告抗原三硝基苯-卵白蛋白(TNF-ovalbumin)结合物与药物同时 sc 动物后脚趾,通过检测腮腺淋巴结大小、质量和细胞构成确定抗体反应。TNF-Ficoll 为非 T 淋巴细胞依赖性抗原,因此认为药物形成的新抗原是引起针对该报告抗原的抗体反应增强的原因;而 TNF-ovalbumin 试验中抗体反应增强是由于药物本身促进了该报告抗原的抗体反应^[12]。中药注射剂尚未见进行腮腺淋巴结试验的报告,在未来的研究中有望利用该方法探寻中药注射剂过敏反应机制。

2.2.4 其他试验方法:通过对过敏反应症状的观察可以判断过敏反应是否发生。聚山梨酯 80 作为中药注射剂的常用助溶剂,被许多研究者认为是引起中药注射剂过敏反应的主要因素之一。何永亮等^[13]以热可宁注射剂为研究对象,发

现清醒状态下,给犬含聚山梨酯 80 的热可宁注射液和 0.3% 聚山梨酯 80 注射液,5~25 min 内,动物均出现 3 级以上过敏反应,并伴有体温下降和心率加快的症状,以上过敏反应在停药后 100~300 min 内消失;给不含聚山梨酯 80 的热可宁注射液和 0.9% 氯化钠注射液,各组动物均无上述反应。动物停药后第 2 天继续按原方案给药,结果与前一天一致;交叉给药结果显示含聚山梨酯 80 的热可宁注射液引起犬过敏反应,认为热可宁注射液引起犬速发过敏反应为助溶剂聚山梨酯 80 所致。易勇等^[14]亦发现青银注射液可致犬产生过敏反应症状,而不含聚山梨酯 80 的青银注射液不引起犬过敏反应,但含聚山梨酯 80 的青银注射液对麻醉猴的血压和心电图无明显影响,推测猴对聚山梨酯 80 引起的过敏反应可能不敏感。该方法主观性强,对实验操作者的要求较高,需经验丰富、能准确辨认过敏反应,一旦症状出现即可确诊为过敏反应,较上述其他方法更为直观,但不能明确过敏反应机制。

2.3 类过敏反应非临床评价方法:类过敏反应与过敏反应具有相似的症状,单凭症状难以将二者区分开来。类过敏反应发生机制多种多样^[15],常可引起组胺的释放和补体的激活,但又不局限与此。我国规定静脉给药应注意给药剂量和给药速度以排除类过敏反应^[16]。类过敏反应可能具有剂量依赖性,而中药注射剂一般给药剂量大,因此在中药注射剂过敏反应研究中排除类过敏反应意义重大。中药注射剂类过敏反应的非临床研究方法尚未建立,可参考以下在化学药物类过敏反应研究中常用的两种方法。

2.3.1 体外肥大细胞释放组胺试验:通常选择动物或人体肥大细胞为实验系统,将药物与肥大细胞共孵育后检测组胺释放量和释放率,若二者升高提示该药物可能导致类过敏反应发生^[11]。万古霉素和某些杀菌剂可能引起类过敏反应,Toyoguchi 等^[17]利用大鼠腹腔肥大细胞释放组胺试验检测万古霉素、咪康唑和氟康唑,发现万古霉素和咪康唑刺激肥大细胞释放组胺呈剂量依赖性,而氟康唑在所检测的剂量范围内未发现刺激肥大细胞释放组胺作用。目前,正在尝试通过直接刺激肥大细胞释放组胺的方法评价中药注射剂是否产生类过敏反应。

2.3.2 检测类过敏反应的一些生物标记物:类过敏反应与血清中的组胺、纤维蛋白溶酶和过敏反应相关补体的量变化有关,因而可通过检测以上这些生物标记物对药物类过敏反应进行研究^[11]。目前对这些生物标记物的检测多局限于临床对类过敏反应的诊断,如 Tanahashi 等^[18]发现对麻醉药物过敏的病人术后血清纤维蛋白溶酶和组胺水平升高,而 IgE 和补体水平保持正常,认为据此可诊断为类过敏反应。目前

鲜有检测这些生物标记物预测类过敏反应的动物实验,但美国 FDA 发布的《医药企业在研药物免疫毒性评价指导原则》认为可以从生物标记物检测角度进行药物类过敏反应非临床探索性研究^[11]。

3 展望

建立可靠的中药注射剂过敏反应非临床评价体系是目前解决其过敏反应发生率高的首要任务,而改进现有的药物过敏反应非临床评价方法,将其合理地应用于中药注射剂中,将会成为完成这一艰巨任务的有效途径之一。

参考文献:

- [1] 中国药典 [S]. 一部, 2005.
- [2] 朱永宏, 李认书. 心脑血管类中药注射剂品种分析 [J]. 中草药, 2007, 38(10): 附 7-附 8.
- [3] 郑彦云, 陆平平, 吴志红, 等. 84 例中药注射液不良反应及相关因素分析 [J]. 广东药学, 2003, 13(4): 53-55.
- [4] Hastings K L. Pre-clinical methods for detecting the hypersensitivity potential of pharmaceuticals: regulatory considerations [J]. *Toxicology*, 2001, 158(1-2): 85-89.
- [5] Uetrecht J. Role of animal models in the study of drug-induced hypersensitivity reactions [J]. *AA PS J*, 2006, 7(4): E914-E921.
- [6] 王红星. 用 Beagle 犬观察中药注射剂过敏反应的体会 [J]. 中药药理与临床, 2002, 18(2): 9.
- [7] 刘建芳, 陈艳华. 清开灵注射液的过敏性研究 [J]. 中国现代中药, 2006, 8(8): 16-17.
- [8] 鲍玉琳, 刘卫东. 几种中药注射液的过敏性研究 [J]. 中国药师, 2006, 9(7): 618-620.
- [9] Sreenath K, Venkatesh Y P. Reductively aminated D-xylose-Albumin conjugate as the immunogen for generation of IgG and IgE antibodies specific to D-xylose, a haptenic allergen [J]. *Bioconjugate Chem*, 2007, 18: 1995-2003.
- [10] Dearman R J, Skinner R A, Humphreys N E, et al. Methods for the identification of chemical respiratory allergens in rodents: comparisons of cytokine profiling with induced changes in serum IgE [J]. *J Appl Toxicol*, 2003, 23(4): 199-207.
- [11] FDA: *Guidance for Industry Immunotoxicology Evaluation of Investigational New Drugs* [S]. 2002.
- [12] Kimber I. The local lymph node assays and potential application to the identification of drug allergens [J]. *Toxicology*, 2001, 158: 59-64.
- [13] 何永亮, 易勇, 王红星, 等. 含吐温-80 中药注射液对犬致过敏的研究清开灵注射液的过敏性研究 [J]. 中药药理与临床, 2005, 21(1): 55-56.
- [14] 易勇, 何永亮, 王红星. 含吐温-80 的中药注射剂对 2 例猴血压、心电图影响的初步观察 [J]. 中国药理与临床, 2005, 21(3): 64-65.
- [15] Robinson S, Siyanandan I. Anaphylactic and anaphylactoid reactions [J]. *Anaesth Intensive Care Med*, 2004, 5(9): 298-300.
- [16] 国家食品药品监督管理局: 中药、天然药物免疫毒性(过敏性、光过敏反应)研究的技术指导原则 [S]. 2005.
- [17] Toyoguchi T, Ebihara M, Ojima F, et al. Histamine release induced by antimicrobial agents and effects of antimicrobial agents on vancomycin-induced histamine release from rat peritoneal mast cells [J]. *J Pharm Pharmacol*, 2000, 52(3): 327-331.
- [18] Tanahashi S, Lida H, Shjui D. An anaphylactoid reaction after administration of fluorescein sodium during neurosurgery [J]. *Int Anaesth Res Soc*, 2006, 103(2): 503.