

中药注射剂的类过敏实验动物模型 和实验方法研究*

□梁爱华** 李春英 刘 婷 曹春雨 郝 然
易 艳 郭 静 杨 华 易 红

(中国中医科学院中药研究所 北京 100700)

王 治 马珠凤 (正大青春宝药业有限公司 杭州 310023)

张伯礼 (天津中医药大学 天津 300193)

摘 要:目的:探讨中药注射剂类过敏实验动物模型和实验方法,以用于中药注射剂类过敏反应的临床前评价。方法:(1)Beagle 犬随机分成:0.5% T-80 组、鱼腥草蒸馏液组、含 0.5%吐温的鱼腥草注射液组、0.5% HS15 组、含 0.5% HS15 的鱼腥草注射液组。上述各组分别静脉注射给予各自受试药 3mL·kg⁻¹。给药后观察动物的反应,给药前和给药后 10、30min 分别测定血压、呼吸、心率。(2)小鼠或豚鼠分别一次性静脉注射给予不同浓度 T-80 溶液、含不同浓度 T-80 的鱼腥草蒸馏液、不含 T-80 的鱼腥草蒸馏液,Compound 48/80 溶液;以上受试物中均含有 0.4%伊文思蓝。记录给药后各组动物耳廓血管通透性增高反应的阳性率,按照耳廓蓝染程度评分,并采用分光光度计定量测定耳廓伊文思蓝渗出量。结果:含 T-80 的受试物(0.5% T-80 组单独或含 0.5% T-80 的鱼腥草注射液)给 Beagle 犬一次性静脉注射后,犬迅速出现类过敏反应,包括面部、口唇、眼结膜和耳部皮肤黏膜红肿、瘙痒,流涎、流泪,步态不稳或跌倒,精神萎靡或嗜睡,呼吸急促,血压下降等。在小鼠和豚鼠上,不同浓度的 T-80 或含不同浓度 T-80 的鱼腥草注射液可剂量依赖性地导致耳廓血管通透性增高。而其它不含 T-80 的受试物给 Beagle 犬静脉注射后未见类过敏反应,给小鼠和豚鼠注射后未见耳廓血管通透性增高反应。结论:鱼腥草注射液可导致类过敏反应,T-80 是其主要的致类过敏反应物质。Beagle 犬、小鼠和豚鼠均可作为中药注射剂类过敏实验的动物模型。Beagle 犬的类过敏反应与临床高度一致,模型敏感性高、重复性好。小鼠和豚鼠的类过敏反应特征主要表现为耳廓血管通透性增高,该血管反应符合类过敏反应发生机制。

关键词:类过敏反应 中药注射剂 不良反应 动物模型

doi: 10.3969/j.issn.1674-3849.2010.06.032

收稿日期: 2010-11-25

修回日期: 2010-12-10

* 科学技术部国家“十一五”科技支撑计划(2006BAI14B05):中药注射剂的安全性评价研究,负责人:梁爱华;科学技术部国家科技重大专项(2009ZX09301-005-008):综合性中药新药研究开发技术大平台之子课题-中药安全性评价平台,负责人:李连达,梁爱华;科学技术部国家科技重大专项(2009ZX09502-001):中药注射剂致敏性检测关键技术的研究,负责人:刘兆平;国家自然科学基金重大研究计划(90709043):中医药学几个关键科学问题的现代研究——中药注射剂细菌内毒素检测方法的研究,负责人:刘婷。

** 通讯作者:梁爱华,研究员,博士生导师,主要研究方向:中药药理学、毒理学和中药安全评价研究,Tel:010-64288601,E-mail:liangaihua@sina.com。

类过敏反应的症状与速发型过敏反应的症状相似,严重者可致休克、甚至死亡。有些药物如麻醉剂^[1-2]、造影剂^[3-4]、抗癌药^[5]等均曾有类过敏反应的报道。过敏反应与类过敏反应最大的不同在于其发病过程和机制不同。过敏反应的致病过程包括抗原(或半抗原)进入机体使机体致敏和机体再次接触同一种抗原后激发反应两个阶段,属于抗原抗体反应。而类过敏反应则在机体首次接触某种物质即发生反应,缺乏致敏产生抗体的过程,不属于抗原抗体反应。近年来有关中药注射剂“过敏反应”的报道屡见不鲜,然而,有不少患者的“过敏反应”是在首次用药后发生,缺乏免疫介导过敏反应的证据,很多病例可能不是真正的过敏反应,而是类过敏反应。我国 SFDA《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》^[6](以下简称指导原则)中所推荐的主动全身过敏试验和被动皮肤过敏试验不能检测出类过敏反应;而目前关于中药注射剂类过敏反应的临床前评价尚没有可靠的动物模型和实验方法,因而中药注射剂不少品种存在着临床前致敏性评价为阴性而临床使用中时有“过敏反应”发生的矛盾现象。本研究以鱼腥草注射液为代表,研究其对 Beagle 犬、小鼠和豚鼠的类过敏反应,建立了一套可用于中药注射剂临床前类过敏评价的动物模型和实验方法。

一、材 料

1. 动 物

Beagle 犬,雄性,4~6 月龄,体重 6~8kg,来源于北京科宇动物养殖中心,许可证编号:SCXK(京)2007-0003。适应性饲养 1 周后开始试验。ICR 小鼠,雄性,22~25g,北京维通利华试验动物技术有限公司提供。豚鼠,雄性,体重 210~260g,北京沙河通力实验动物养殖场提供。动物房温度为 19~24℃,相对湿度为 60%~70%,通风 10 次/h。

2. 药 物

药用吐温-80(下文简称 T),批号:20050125,上海申宁医药有限公司提供。用生理盐水配制含 0.5%的 T-80,用 0.22 μ m 无菌滤膜过滤后备用。鱼腥草注射液(下文简称 TY),按照中药部颁标准 WS3-B-3264-98 制备,含鱼腥草二次蒸馏液和 0.5% T-80,由正大青春宝药业有限公司提供,批号:0809091。去 T-80 的鱼腥草注射液(即鱼腥草蒸

馏液,下文简称 Y),除了不含 T-80 外,其他制法均与 TY 相同。

3. 仪 器

BP98E 动物血压测定仪,日本产,购自北京吉安得尔科技有限公司。AVE-845 型半自动生化分析仪。

二、实验方法

1. 犬类过敏实验

进行动物分组给药前一天,用 BP98E 动物血压测定仪对所有犬在清醒状态下进行血压基础值测定,包括收缩压、舒张压、平均动脉压。每只犬测定 3 次,取平均值作为每只犬的血压基础值。然后根据血压基础值将犬分成 5 组:0.5% T-80 组(T 组)、鱼腥草蒸馏液组(Y 组)、含 0.5%吐温的鱼腥草注射液组(TY 组)、0.5% HS15 组(H 组)、含 0.5% HS15 的鱼腥草注射液组(HY 组),每组 4 只犬。于实验当日给药前,先测定动物血压、心率和呼吸。然后分别经静脉给予不同的受试药,鱼腥草注射液静脉用的临床用量为 20~100mL,按照最高量 100mL 计,以人与犬体表面积折算后相当于犬剂量为 3.0mL·kg⁻¹,静脉缓慢推注,2min 推完,所有受试物给药体积均相同。给药后立即观察动物在 30min 内的类过敏反应症状。于给药后 10、30min,用 BP98E 动物血压测定仪测定动物血压、心率,人工计数呼吸次数。于给药 1 个月,再次采用上述同样的给药方法进行试验。

2. 小鼠类过敏实验

将小鼠按体重随机分为以下 9 组,每组 10 只,分别为:对照组;Compound 48/80 组;鱼腥草蒸馏液(不含 T-80);0.5%、2.5%、5.0% T-80 溶液组;含 0.5%、2.5%、5.0% T-80 的鱼腥草蒸馏液组。以上受试物中均含有 0.4%伊文思蓝。各组小鼠分别 i.v 给予以上不同受试物 20mL·kg⁻¹,观察给药后 30min 内动物的行为学变化及耳廓蓝染情况。记录每组出现耳廓蓝染的动物数、蓝染总耳数、耳廓蓝染面积。耳廓蓝染面积(S)按照分级评估,0 分:双耳无蓝染;1 分:0<S≤1/8(蓝染面积占耳廓面积的 1/8,以下相同);2 分:1/8<S≤1/4;3 分:1/4<S≤1/2;4 分:1/2<S≤3/4;5 分:3/4<S≤1。于注射后 30min 将动物处死,取双耳,剪碎,用 2mL 丙酮-生理盐水液(7:3)混合浸泡,4℃冰箱中过夜,3000rpm 离心 15min,取上清液于 610nm 处测吸光度(A)。根据伊文思蓝标准曲线,计

算伊文思蓝染料渗出量(μg)。

3. 豚鼠类过敏实验

将豚鼠按体重随机分为 9 组, 每组 6 只, 分别为: 对照组; 去吐温鱼腥草蒸馏液组; 0.25%、0.5%、1.0% T-80 溶液组; 含 0.25%、0.5%、1.0% T-80 的鱼腥草注射液组。以上受试物中均含有 0.4% 伊文思蓝。各组豚鼠分别 i.v 给予以上不同受试物 $3.0\text{mL}\cdot\text{kg}^{-1}$, 观察给药后 30min 内动物的行为学变化及耳廓蓝染情况。记录每组出现耳廓蓝染的动物数、蓝染总耳数、耳廓蓝染面积(分级方法与小鼠相同)。

三、统计分析

类过敏反应症状采用随机区组设计的多个样本比较的 Friedman 检验, 若整体分布水平有差异, 则用 Wilcoxon Signed Ranks Test 检验进行组间两两比较; Beagle 犬血压、呼吸、心率数据均计算各组平均值和标准差, 采用 student's T test 进行本各组给药前后比较; 小鼠伊文思蓝渗出数据采用方差分析; 耳廓血管反应阳性率、耳蓝染率采用卡方检验进行组间比较。

四、结果

1. Beagle 犬类过敏实验结果

(1) 类过敏反应症状和评价标准。

先进行了犬静脉注射含 T-80 鱼腥草注射液的类过敏实验预试, 观察所表现的各种类过敏反应症状。可见犬类过敏症状主要表现为: 皮肤粘膜症状(如眼结膜、耳廓或口唇、鼻皮肤粘膜红、肿或紫绀); 皮肤搔痒相关的行为学症状(如挠耳、鼻和头, 甩头, 舔舌, 蹭痒); 神经精神系统症状(精神萎靡或嗜睡; 无力、静卧懒动); 消化系统症状(流涎、流泪、恶心、呕吐, 多次排便等)等。根据症状轻重程度, 拟定了 Beagle 犬类过敏反应的症观察和类过敏反应分级评价标准。0 分: 无异常。1 分: 不安, 挠耳或挠头、搔鼻(3min 内消失), 喷嚏, 单处皮肤粘膜(如耳廓或口鼻或眼)潮红, 立毛。2 分: 烦躁, 用力甩头、挠耳、鼻、头(3min 后未消失), 多处皮肤粘膜潮红(口唇、耳廓、眼、鼻等), 咳嗽; 30min 内排便或排尿 1~2 次。3 分: 狂躁, 步态不稳, 2 处或以上皮肤或粘膜出现水肿, 皮肤粘膜出现紫绀, 30min 内排便或排尿 >2 次或腹泻、流涎, 流泪, 恶心, 呕吐。4 分: 走路跌倒; 精神萎靡或嗜睡, 无力、静卧懒动, 痉挛, 抽搐, 呼吸困难或喘息; 5 分: 大小便失禁, 休克、死亡。其中 0 分为阴性; 1 分

为弱阳性; 2 分为阳性; 3 分为强阳性; 4 分以上为极强阳性。

(2) T-80 及含 T-80 鱼腥草注射液的类过敏反应症状。

给药前 T、H、Y、TY、HY 组的所有犬均未见异常。首次静脉注射给药后, TY 组和 T 组的所有犬给药后即刻就出现耳部发红, 有的动物眼睛发红, 眼结膜水肿, 口唇红或红肿; 于给药后约 1min 开始出现烦躁、甩头, 前肢挠头、挠耳、蹭鼻、添舌等症状; 多数犬步态不稳, 静卧, 部分犬精神萎靡、嗜睡, 有的出现多次排尿、排便, 甚至有恶心、呕吐等症状; 多数动物呼吸急促或喘息, 四肢湿冷; 部分犬呈现颤抖症状。TY 组和 T 组反应阳性率达 100%, 反应级数均达到 3 级以上, 反应评价为强阳性至极强阳性。1 个月后再次给药后的症状与单次给药相似, 未见明显增强或减弱。H、Y、HY 组动物无论是首次静脉注射还是再次静脉注射给药后, 均未见明显的异常反应。结果见表 1。

(3) 犬给药后的血压改变。

首次给药后, T 组和 TY 组动物出现显著的血压降低(分别 $P<0.01$), 给药后 10min 和 30min 血压降低幅度均达到 30% 以上, 甚至降低近 50%, 有的动物血压降低至 80/50mmHg。1 个月后再次给药, Y 组和 TY 组的血压降低情况与首次给药类似, 10min 降低显著, 但在给药 30min 后有所恢复。H、Y、HY 组所有犬于首次给药和再次给药均未见血压下降, 给药后 10min、30min 的收缩压、舒张压、平均动脉压均与给药前无显著差异。结果见图 1。

(4) 犬给药后呼吸、心率的影响。

表 1 Beagle 犬的类过敏反应($n=4, \bar{x}\pm\text{SD}$)

用药次数	组别	平均级数	阳性率(%)
首次用药	T	$3.5\pm0.581^{(1)}$	100 ⁽²⁾
	H	0	0
	Y	0	0
	TY	$4.0\pm0.0^{(2)}$	100 ⁽²⁾
	HY	0	0
再次用药	T	$4.0\pm0.0^{(2)}$	100 ⁽²⁾
	H	0	0
	Y	0	0
	TY	$3.7\pm0.5^{(2)}$	100 ⁽²⁾
	HY	0	0

注: 与给药前比较 1) $P<0.05$, 2) $P<0.01$ 。

T、TY 组给药后 10min、30min 时呼吸明显增快，再次给药后与首次给药后的情况类似，呼吸频率增快幅度达 28%~40%。T、TY 组于首次给药后 30min 心率分别较给药前增快 11% 和 18.5%，而再次给药后 30min 心率分别较给药前增快 25.4% 和 35.1%。H、Y、HY 组于首次给药和再次给药后的呼吸频率、心率均较给药前无显著差异。结果见表 2。

2. 小鼠类过敏实验结果

小鼠一次性静脉注射不同浓度的 T-80、含不同浓度 T-80+鱼腥草蒸馏液、鱼腥草蒸馏液后，均未见明显的全身异常反应。

不同浓度 T-80(0.5%~5%) 静脉注射后均可造成小鼠耳廓血管明显的渗出反应，反应率和蓝染程度和面积均呈剂量依赖性增高。当 T-80 浓度达 5% 时反应率达 100%。含 0.5%~5% T-80 的鱼腥草蒸馏液也可造成明显的血管反应，其反应程度与同浓度 T-80 相似。静脉注射鱼腥草蒸馏液则未见小鼠耳廓血管渗出反应，耳廓未见明显蓝染。阳性药 Compound48/80 $2.5\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 组所有动物均出现双耳不同程度蓝染，反应率达 100%。结果见表 3。

通过定量测定耳廓伊文思蓝渗出量来评价小鼠耳廓血管渗出反应的程度。结果显示，鱼腥草蒸馏液组的耳廓伊文思蓝渗出量未见增高(与对照组比较 $P>0.05$)。T-80 在 0.5%~10% 范围内随剂量增高伊文思蓝渗出增加，其中 2.5% 和 5% 浓度组与对照组比较有显著差异(分别为 $P<0.05$, $P<0.001$)。含 0.5%~5% T-80 的鱼腥草蒸馏液各组随所含的 T-80 浓度增高其伊文思蓝渗出显著增加(与对照组比较均 $P<0.01$)。与同浓度 T-80 组相比，含 0.5% 和 2.5% 吐温的鱼腥草蒸馏液组的伊文思蓝渗出量更高。阳性对照 Compound48/80 组的耳廓伊文思蓝渗出量显著增高

($P<0.01$)。结果见表 4。

3. 豚鼠类过敏实验结果

豚鼠一次性静脉注射不同受试物后均未见明显的全身异常反应。

与小鼠给药后所显示的耳廓血管渗出反应相

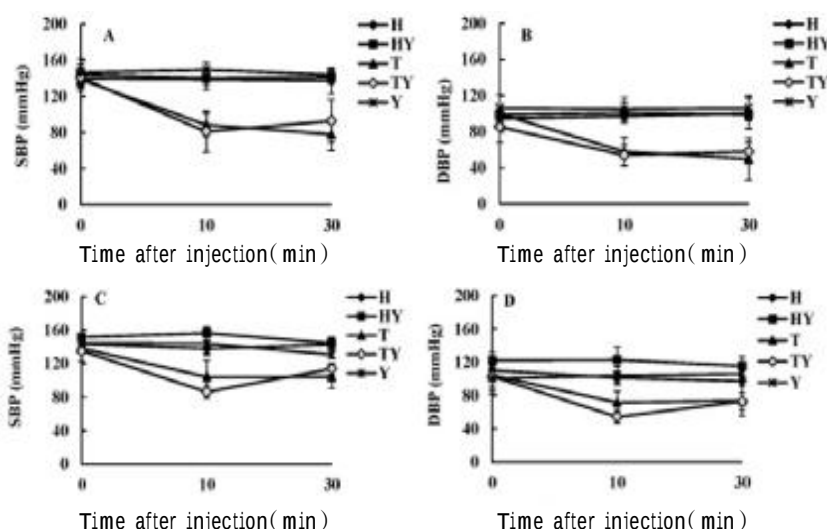


图 1 含吐温和不含吐温鱼腥草注射液首次和再次静脉注射前后血压的变化 (A、B: 首次静脉注射; C、D: 再次静脉注射)

表 2 含吐温和不含吐温鱼腥草注射液对呼吸频率和心率的影响 ($n=4$, $\bar{x}\pm\text{SD}$)

项目	组别	0 min value	10min		30min		
			value	变化(%)	value	变化(%)	
首次	呼吸 次/min	H	30.5±3.4	31.0±7.4	1.6	30.5±3.0	0.0
		HY	35.0±4.8	35.5±4.4	1.4	37.0±6.6	5.7
		T	33.5±4.4	45.0±5.0 ¹⁾	34.3	43.0±6.2 ¹⁾	28.4
		TY	33.0±2.6	46.4±6.8 ²⁾	40.6	46.5±1.9 ²⁾	40.9
		Y	33.0±5.8	36.5±8.1	10.6	29.0±6.6	-12.1
给药	HR 次/min	H	158.5±26.2	132.3±35.7	-16.6	130.4±14.8	-17.7
		HY	126.5±13.2	128.5±14.2	1.5	131.2±9.1	3.7
		T	119.1±32.1	105.4±37.7	-11.5	132.3±39.3	11.0
		TY	109.3±21.2	104.3±26.8	-4.5	129.5±46.1	18.5
		Y	131.2±40.2	124.2±30.1	-5.3	119.5±31.1	-8.9
再次	呼吸 次/min	H	33.5±8.5	37.5±4.4	11.9	38.0±12.8	13.4
		HY	33.5±5.7	35.0±7.4	4.5	36.0±8.2	7.5
		T	32.5±4.1	43.0±7.3 ¹⁾	32.3	46.0±12.1	41.5
		TY	29.3±5.8	42.0±6.0	43.2	43.3±7.0	47.7
		Y	35.5±8.7	34.0±5.4	-4.2	34.0±6.3	-4.2
给药	HR 次/min	H	136.7±20.6	127.5±18.5	-6.7	129.2±25.9	-5.5
		HY	157.6±22.6	134.4±19.1	-14.8	149.4±17.0	-5.2
		T	138.7±49.3	153.8±54.3	10.8	174.0±46.7	25.4
		TY	139.9±41.4	140.2±33.0	0.2	189.0±35.7	35.1
		Y	124.6±2.7	131.0±13.1	5.1	121.9±13.1	-2.2

注:与本组给药前比较 1) $P<0.05$, 2) $P<0.01$ 。

似,豚鼠在静脉注射 0.5%、1.0% T-80 后均可见耳廓血管通透性显著增高,伊文思蓝渗出至耳廓皮下而使耳廓蓝染;血管反应率和蓝染程度以及蓝染面积均呈剂量依赖性增高,1.0% T-80 与对照组比较有显著性差异($P<0.001$)。含 0.5%~1.0% T-80 的鱼腥草蒸馏液也可造成明显的血管反应,与对照组比较有显著差异(分别为 $P<0.05$, $P<0.001$)。静脉注射鱼腥草蒸馏液则未见明显的血管渗出反应和耳廓蓝染,与静脉注射生理盐水组无明显差异。结果见表 5。

五、小结和讨论

1. 鱼腥草注射液引起类过敏反应而不引起过敏反应

根据临床上有些药物的“过敏反应”报道来看,有部分是首次用药发生,缺乏免疫介导过程,不属于真正的过敏反应,而可能是类过敏反应^[7-8]。本研究采用 Beagle 犬证明,鱼腥草注射液首次静脉给药即发生类似的“过敏反应”。在另外的试验中(豚鼠和 BN 大鼠全身主动过敏试验和被动皮肤过敏试验),鱼腥草注射液均未引起阳性反应(结果将另文报道)。可见鱼腥草注射液的反应不需要抗体介导,因此其引起的是类过敏反应,而不引起过敏反应。

2. 不同动物静脉给药后的类过敏反应特征

在临床上类过敏反应症状与过敏反应症状类似,轻者表现为皮肤黏膜红、肿、起疹、瘙痒等,重者可出现胸闷、心悸、呼吸困难、头昏、出冷汗、血压下降等。本研究分别采用非啮齿类动物(Beagle 犬)和啮齿类动物(小鼠、豚鼠)进行了类过敏试验。结果显示,Beagle 犬在首次静脉注射给予 0.5% T-80 或含 0.5% T-80 的鱼腥草注射液(给予的 T-80 剂量为 $15\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)以后均迅速(给药后 2min 之内)出现与临床“过敏反应”相似的症状,症状较重,并且给药后迅速出现较大幅度的血压下降和呼吸频率增快。而啮齿类动物小鼠在静脉

注射 0.5%~5% T-80 或含 0.5%~5% T-80 的鱼腥草注射液 $20\text{mL}\cdot\text{kg}^{-1}$ 和豚鼠在静脉注射给予最高含 0.25%~1% T-80 或含 0.25%~1% T-80 的鱼腥草注射液 $3.0\text{mL}\cdot\text{kg}^{-1}$ 均未出现明显的皮肤黏膜红肿、瘙痒、呼吸困难等典型的“过敏反应”症状;然而在受试物中加入伊文思蓝作为指示剂的条件下,可见给予

表 3 T-80 及含 T-80 鱼腥草注射液致小鼠血管通透性增高作用

组别	剂量 ($\text{mL}\cdot\text{kg}^{-1}$)	n	反应率 (%)	耳蓝染率 (%)	耳蓝染 平均分
对照组	-	10	0	0	0
compound48/80	$2.5\text{mL}\cdot\text{kg}^{-1}$	10	100 ²⁾	100 ²⁾	$2.45\pm0.94^{2)}$
鱼腥草蒸馏液	20	10	0	0	0
0.5% T-80	20	10	30	20	0.40 ± 0.94
2.5% T-80	20	10	60 ¹⁾	45	$0.95\pm1.28^{2)}$
5.0% T-80	20	9	100 ²⁾	100 ²⁾	$3.30\pm1.13^{2)}$
含 0.5% T-80 鱼腥草蒸馏液	20	10	40	20	0.20 ± 0.41
含 2.5% T-80 鱼腥草蒸馏液	20	10	40	40	$0.40\pm0.50^{1)}$
含 5% T-80 鱼腥草蒸馏液	20	10	90 ²⁾	90 ²⁾	$2.35\pm1.35^{2)}$

注:tw:为 T-80;与对照组比较 1) $P<0.05$;2) $P<0.01$ 。

表 4 T-80 及含 T-80 鱼腥草注射液致小鼠耳廓伊文思蓝渗出作用($\bar{x}\pm\text{SD}$)

组别	剂量 ($\text{mL}\cdot\text{kg}^{-1}$)	n	伊文思蓝渗出量 ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	升高率 (%)
对照组	-	10	0.314 ± 0.179	-
compound48/80	$2.5\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$	10	$1.019\pm0.287^{2)}$	224.52
鱼腥草蒸馏液	20	10	0.244 ± 0.179	-22.29
0.5% T-80	20	10	0.389 ± 0.227	23.89
2.5% T-80	20	10	$0.547\pm0.367^{1)}$	74.20
5.0% T-80	20	9	$5.367\pm2.509^{3)}$	1609.24
含 0.5% T-80 鱼腥草蒸馏液	20	10	$0.758\pm0.175^{3)}$	141.40
含 2.5% T-80 鱼腥草蒸馏液	20	10	$0.766\pm0.333^{3)}$	143.95
含 5% T-80 鱼腥草蒸馏液	20	10	$3.200\pm1.882^{3)}$	919.11

注:tw:为 T-80;与对照组比较 1) $P<0.05$;2) $P<0.01$;3) $P<0.001$ 。

表 5 T-80 及含 T-80 鱼腥草注射液致豚鼠血管通透性增高作用

组别	剂量 ($\text{mL}\cdot\text{kg}^{-1}$)	n	反应率 (%)	耳蓝染率 (%)	耳蓝染 平均分
对照组	0	6	0	0	0
鱼腥草蒸馏液	3.0	6	0	0	0
0.5% T-80	3.0	6	0	0	0
2.5% T-80	3.0	4	50	50	0.25 ± 0.62
5.0% T-80	3.0	6	83 ²⁾	83 ²⁾	$1.33\pm1.07^{2)}$
含 0.5% T-80 鱼腥草蒸馏液	3.0	6	0	0	0.00 ± 0.00
含 2.5% T-80 鱼腥草蒸馏液	3.0	6	33	33	$0.33\pm0.49^{1)}$
含 5% T-80 鱼腥草蒸馏液	3.0	6	100 ²⁾	100 ²⁾	$2.83\pm1.40^{2)}$

注:0.5%吐温 80 组 6 只动物中有 2 只因注射渗漏弃去。

上述中药注射剂的小鼠和豚鼠均出现耳廓血管通透性显著增高,从而使得耳廓蓝染,并且这种血管通透性增高反应与剂量呈正比例关系。从类过敏发生机制来看,受试物导致血管通透性增高可引起血浆渗出、水肿及伴发相关炎症,是发生类过敏反应症状如皮肤、粘膜红肿、瘙痒、咳嗽、喘息、呼吸困难、血压下降等的主要机制之一。因此,在小鼠和豚鼠模型上,血管通透性增高可认为是类过敏反应特征。但采用大鼠静脉注射给予中药注射剂时,这种血管通透性增高的表现不明显,说明大鼠的类过敏反应比较不敏感。本研究结果表明,非啮齿类动物 Beagle 犬模型的类过敏反应特征与临床“过敏反应”高度一致;而小鼠和豚鼠的类过敏反应特征则主要为血管通透性增高。

3. 不同动物的类过敏反应症状观察和评价标准

我国 SFDA《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》^[5]中的有关全身主动过敏试验的症状观察和全身过敏评价标准主要是针对豚鼠全身主动过敏反应试验而定的。而关于类过敏试验的评价标准,在我国的指导原则中没有规定。

虽然类过敏反应发病过程和发病机理与过敏反应不同,但是其 Beagle 犬试验中的类过敏反应症状与临床过敏反应类似。本研究拟定 Beagle 犬类过敏试验的观察症状时,仍然以指导原则所列举的症状为基础,结合类过敏反应症状特点,对观察指标加以修订。在本试验中发现,发生类过敏反应的 Beagle 犬未见明显的喷嚏、咳嗽症状,故在结果评价指标中未将喷嚏、咳嗽纳入。Beagle 犬类过敏症状普遍呈现皮肤黏膜症状面部、口唇、耳等处皮肤粘膜潮红或水肿以及严重的瘙痒症状;重者出现皮肤湿冷、步态不稳、跌倒、精神萎靡或静卧、嗜睡、流涎、流泪、呼吸急促或喘息、紫绀等。有的动物有排便、排尿反应,但由于排便、排尿也属于正常动物的生理反应,故本研究确定,只有当动物在给药后排便、排尿次数增多(30 min 内超过 2 次或腹泻)者,才认为与类过敏反应有关。根据本研究结果,拟定了 Beagle 类过敏试验的症状观察及评分标准。

小鼠和豚鼠均不出现明显的皮肤、黏膜红肿、瘙痒和呼吸急促等症状,也不出现与 Beagle 犬类过敏反应相似的行为学表现。因此,所拟定的用于 Beagle 犬类过敏试验的观察指标和评价标准不适用于小鼠

和豚鼠类过敏试验。然而,小鼠和豚鼠类过敏试验中均可见耳廓血管通透性明显增高,而血管通透性增高是导致各种类过敏症状的机制之一,故血管通透性增高的定性和定量测定可作为小鼠和豚鼠类过敏试验评价指标。评价指标包括血管反应阳性率(出现耳廓蓝染的动物百分率)、耳蓝染率(耳蓝染百分率)、耳廓蓝染面积等。定量指标可采用耳廓组织中依文思蓝渗出量测定。以用药组与对照组比较有统计学显著性差异作为阳性标准。

4. 血压下降是 Beagle 犬类过敏反应的敏感指标

根据临床中药注射剂的“过敏反应”报道来看,严重者均可见血压下降。本研究证明,Beagle 犬首次和再次缓慢静脉注射 0.5%T-80 或含 0.5% T-80 的鱼腥草注射液后,均可出现血压迅速下降,降低幅度可达到 30%~50%,动物呈现精神萎靡、嗜睡、皮肤湿冷、呼吸急促等休克表现。根据本研究结果认为,临床前类过敏评价采用 Beagle 犬比较敏感,血压下降是类过敏反应尤其是严重类过敏反应的一项较为客观而容易检测的指标。在本研究中进行清醒状态下进行犬血压测定可较好地反映动物给予中药注射剂后血压的实际变化,经过重复实验证明测量清醒动物的血压是可行和可靠的。建议在临床上使用中药注射剂时,除了密切注意输液后的一些主观症状以外,还应注意监测血压,尤其是对输液后有不适症状的病人要注意测量血压,以早期发现并预防严重类过敏反应的发生。

5. T-80 是一种致类过敏反应物质

T-80 是一种常用的助溶剂,有些中药注射剂由于溶解度或澄明度不理想而使用 T-80。本研究结果显示,含 T-80 的溶液(T-80 单独或含 T-80 的鱼腥草注射液)给 Beagle 犬、小鼠或豚鼠静脉注射后,动物才出现相应的类过敏反应;而不含 T-80 的鱼腥草蒸馏液、含 HS15 的鱼腥草注射液以及 HS15 单独用则不引起类过敏反应。结果提示,T-80 可能为鱼腥草注射液中的主要致类过敏反应物质之一。其它有些含 T-80 的西药如抗心律失常药胺碘达隆(Aminodaron)、抗癌药多西紫杉醇(Taxotere)在临床上有很高比例的血压下降不良反应报道。有人比较了人静脉注射含 T-80 和不含 T-80 的胺碘达隆,结果发现,含 T-80 的胺碘达隆可造成明显的血压下降,而不含 T-80 的胺碘达隆却不引起明显的血压下降^[9]。以上证据也说明 T-80 是导致临床病人血压下降的主要物

质。本研究结果与上述其他含 T-80 西药的研究报道一致。

参考文献

- 1 严伟丽,邹玉梅,王欣,等.麻醉药类过敏反应临床分析.黑龙江医学,1999,23(5):52.
- 2 王凤学,郑斯聚.麻醉与类过敏反应.国外医学.麻醉学与复苏分册,1988,9(4):201.
- 3 徐红玉.碘造影剂的速发过敏样反应.世界临床药物,2009,29(1):29~33.
- 4 Sachiko T. Cochran. Anaphylactoid reactions to radiocontrast media, Current Allergy and Asthma Reports, 2005, 5(1):1529~7322.
- 5 南家林.40例紫杉醇注射液过敏反应分析.中国药物警戒,2009,6(6):346~350.
- 6 《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》课题研究组.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. [Z]GPT5-1,2005.
- 7 马宏图,睢凤英.中药注射剂安全性与类过敏反应.中国医院药学杂志,2009,29(10):838~840.
- 8 丁玉峰.中药注射剂引起的变态反应及其影响因素.中华医学杂志,2007,31(4):244~246.
- 9 A. Munoz, P. Karila, P. Gallay, et al. A randomized hemodynamic comparison of intravenous amiodarone with and without Tween 80. European Heart Journal, 1988, 9(2):142~148.

Animal Models and Methodologies for Evaluation of Chinese Herbal Injection-induced Pseudoanaphylactoid Reactions

Liang Aihua¹, Li Chunying¹, Liu Ting¹, Cao Chunyu¹, Hao Ran¹, Yi Yan¹, Guo Jing¹,
Yang Hua¹, Yi Hong¹, Wang Zhi², Ma Zhufeng²

(1. Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China;

2. Chiatai Qingchunbao Pharmaceutical Co., Ltd., Hangzhou 310023, China)

Abstract: This study aimed at development of animal models and methodologies for preclinical evaluation of pseudoanaphylactoid reactions induced by Chinese herbal injections. Beagle dogs were divided into the group of 0.5% Tween 80, distilled Yuxingcao solution, Yuxingcao injection containing 0.5% Tween 80, 0.5% HS 15, Yuxincao injection containing 0.5% HS 15. Different groups of Beagle dogs were given 3ml/kg of the intravenous injection respectively. Anaphylactoid reactions were observed. The blood pressure, respiratory rate and heart rate were tested before the injection, 10 min and 30 min after the injection. Mice or guinea pigs were intravenously injected solutions with different concentrations of Tween 80, Yuxingcao injection containing different concentrations of Tween 80, distilled Yuxingcao solution, or positive control compound 48/80. All test substances were mixed with 0.4% Evans blue. Reactions and vascular permeability of the ear was observed and measured 30 min after injection. The results showed that a variety of anaphylactoid reactions, such as cutaneous and mucosa signs of the lip, conjunctiva, ear and circumoral skin, bronchospasm, cardiovascular collapse, somnolence, lethargy, breathless or dyspnea, severe hypotension, were observed immediately after the injection of Tween 80 and Yuxingcao injection containing 0.5% Tween 80 among Beagle dogs. Those reactions occurred at both first injection or repeated injections at intervals of 2 weeks or 4 weeks, manifesting that it was pseudoanaphylactoid reaction mediated by non-immune mechanisms. In mice and guinea pigs, single dose of intravenous injection of solutions with various concentrations of Tween 80 or Yuxingcao injection containing different concentrations of Tween 80 caused vascular hyperpermeability in the ear. Yuxingcao injection causes pseudoanaphylactoid reactions and its solubilizer Tween 80 is the principal contributor for pseudoanaphylactoid reactions. Beagle dogs, mice and guinea pigs can be used as animal model for preclinical evaluation of pseudoanaphylactoid reactions for Chinese herbal injections. Pseudoanaphylactoid reactions in Beagle dogs are of high clinic consistency, sensitivity, reproducibility, and maneuverability. Vascular hyperpermeability which represents the basic mechanism of pseudoanaphylactoid reactions is the main characteristic reactions in mice and guinea pigs.

Keywords: Pseudoanaphylactoid reactions, Chinese herbal injections, Adverse reactions, Animal models

(责任编辑:张志华 李沙沙,责任译审:王 晶)