

绿原酸和双黄连粉针剂致敏性比较评价*

□张瑞霞 汤纳平 林海霞 马 璟**

(国家上海新药安全评价研究中心 上海 201203)

谢 岑 陈笑艳 (中国科学院上海药物研究所 上海 201203)

摘 要:目的:比较评价绿原酸和双黄连粉针剂的潜在致敏性,并初步探索可疑致敏原绿原酸的致敏机制。方法:绿原酸与含等剂量绿原酸的双黄连粉针剂同时进行 BN 大鼠全身主动致敏实验(ASA),激发前取血测定抗体(IgE、IgG、IgA、IgM)、补体(C3、C4)、淋巴细胞免疫表型(CD3/4/8),记录激发后症状;单次静脉给予绿原酸与含等剂量绿原酸的双黄连粉针剂,测定给药前,给药后 5、10、30、60、120、240min 血浆中绿原酸浓度。结果:比较 ASA 激发后过敏反应发生率和发生程度,可知绿原酸过敏反应程度低于含等剂量绿原酸的双黄连粉针剂;绿原酸组和双黄连组抗体(IgE、IgG、IgA、IgM)、补体(C3、C4)各有不同程度升高,淋巴细胞免疫表型也有一定变化;单次静脉给药测定绿原酸血药浓度,给药后 5、10、30、60min 时,绿原酸组血浆中绿原酸浓度显著低于双黄连粉针剂组。结论:绿原酸对 BN 大鼠致敏性低于含等剂量绿原酸的双黄连粉针剂,原因可能是单体和复方绿原酸的代谢差异,也可能是因为绿原酸并非唯一致敏原。

关键词:绿原酸 双黄连粉针剂 ASA BN 大鼠 抗体 补体 免疫表型

doi: 10.3969/j.issn.1674-3849.2010.06.033

双黄连注射剂是金银花、黄芩和连翘 3 味中药材制成的提取物制剂,主要成分为黄芩苷、绿原酸、连翘苷,具有清热解毒、消肿止痛、轻宣透邪的作用。临床上广泛应用于病毒性和细菌性的急性上呼吸道感染、急性支气管炎、肺炎、扁桃体炎、咽炎、泌尿系统感染等疾病的治疗,且疗效确切。但是,随着临床应用的日益广泛,其不良反应发生的情况日渐增多,其中以过敏反应(如皮疹、药热、过敏性休克等)发生率最高。

作为其有效成分和质量指标之一的绿原酸

(Chlorogenic acid, CA),又名咖啡鞣酸,是由咖啡酸与奎尼酸生成的缩酚酸,是植物细胞在有氧呼吸过程中经莽草酸途径的中间产物合成的一种苯丙素类物质^[1],广泛存在于杜仲科、忍冬科忍冬属、菊科蒿属植物中,在使用频率较高的金银花、忍冬藤、鱼腥草、茵陈、栀子、蒲公英等药材中含量较高^[2]。关于绿原酸致敏的报道,起于 20 世纪 60 年代, Freedman 发现咖啡工人对绿咖啡有皮肤过敏现象^[3],并认为咖啡中的酚类物质绿原酸是致敏原。

本试验对双黄连粉针剂和绿原酸的致敏性研究和代谢进行比较,从而确定绿原酸是否是导致临床使用双黄连粉针剂发生过敏反应的原因。

收稿日期: 2010-11-25

修回日期: 2010-12-10

* 科学技术部“重大新药创制”科技重大专项(2008ZX09305);创新药物研究开发技术平台建设,负责人:马璟。

** 通讯作者:马璟,研究员,博士生导师,主要研究方向:毒理学和新药安全性评价, Tel: 021-50800333-106, E-mail: jma@ncdser.com。

一、仪器与材料

SPECTRAMAX 340PC 酶标仪, HITACHI (7060) 全自动生化分析仪, BD (FACSCAL IBUR) 流式细胞仪。Agilent 1100 液相色谱系统(包括 G1311A 型二元输液泵, G1313A 型自动进样器, G1316A 型柱温箱, G1379A 型脱气机和 G1314A 紫外检测器), 德国 Agilent 公司。

双黄连粉针剂, 哈尔滨集团中药二厂, 批号: 0809002 (每支 600mg, HPLC 测定每支含绿原酸 9.2mg)。绿原酸, SIGMA, 119k1340。卵白蛋白, SIGMA, A5378。大鼠 CD3-APC、CD8-PE、CD4-FITC (BD Pharmingen, 批号分别是 55153、61207、39722)。生理盐水, 青州尧王制药有限公司, 09021011。大鼠 IgE ELISA 试剂盒, RB 公司, 100301。

二、方法

1. 动物

SPF 级 BN 大鼠, 42 只, 雌雄各半, 购入体重 160~180g, 购于上海西普尔-必凯实验动物有限公司(合格证号: 2008001602476)。动物实验环境条件: SPF 动物房, $22\pm 2^{\circ}\text{C}$, 相对湿度 60%~80%, 12/12h 黑白交替照明。

2. ASA 实验

设置阴性对照组(生理盐水 $5\text{mL}\cdot\text{kg}^{-1}$)、阳性对照组(卵白蛋白 $5\text{mg}/\text{只}$)、双黄连低剂量组($360\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, 此剂量为临床剂量换算所得)、双黄连高剂量组($720\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, 此剂量为临床剂量二倍剂量)和绿原酸组($11\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, 与双黄连高剂量组所含绿原酸等量)。每组 6 只大鼠, 雌雄各半。按上述剂量静脉给药致敏, 隔天 1 次, 共 3 次, 末次给药后第 13d 各组动物眼眶取血, 3000rpm 离心 10min, 取血清, 待测。

末次给药后第 14d 以二倍剂量静脉给药激发, 攻击后均按过敏症状反应观察结果, 并根据全身致敏性评价标准分级。全身致敏性评价标准为“-”: 过敏反应阴性(正常); “+”: 过敏反应弱阳性(躁动、竖毛、颤抖、搔鼻); “++”: 过敏反应阳性(喷嚏、咳嗽、呼吸急促、排尿、排粪、流泪); “+++”: 过敏反应强阳性(呼吸困难、哮喘音、紫癜、步态不稳、跳跃、喘息、痉挛、旋转、潮式呼吸); “++++”: 过敏反应极强阳性(死亡)。

3. 绿原酸代谢实验

设置双黄连组($720\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)和绿原酸组($11\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$),

每组 6 只, 雌雄各半。

静脉给药, 在给药前、给药后 5、10、30、60、120、240min, 眼眶取血 1mL, 离心取血浆, 待测。

测定血浆中绿原酸的色谱条件: 色谱柱为 Phenomenex Luna- C_{18} ($150\text{mm}\times 4.6\text{mm}$, $5\mu\text{m}$) 粒径, 美国 Phenomenex 公司; 预柱为 C_{18} 保护柱, $4\times 3.0\text{mm}$ I.D., 美国 Phenomenex 公司; 柱温为 30°C ; 流速为 $0.8\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$; 流动相为甲醇: 水: 甲酸 ($27:73:0.1$, v/v/v), 紫外检测波长为 313 nm, 进样量为 $30\mu\text{L}$ 。

4. 免疫学指标检测

用大鼠 IgE ELISA 试剂盒测定血清中 IgE 浓度(按试剂盒说明书操作进行), 用四参数法作标准曲线, 根据样品 450nm 处吸光度计算 IgE 浓度。

HITACHI (7060) 全自动生化分析仪上样测定血清中 IgG、IgA、IgM、C3、C4 浓度。

用流式细胞仪测定免疫细胞表型 CD3/4/8: 取血用红细胞裂解液裂解后, 2500rpm 离心 5min, 弃上清, 加入 Mouse Anti-Rat CD8-FITC、Mouse Anti-Rat CD3-APC、Mouse Anti-Rat CD4-PE 标记, 流式细胞仪检测。

三、结果与分析

1. ASA 激发后症状观察

激发后, 本实验 BN 大鼠过敏反应症状主要有搔鼻、排尿、步态不稳等, 其中阳性对照组有 2 只动物死亡, 阴性对照组未见任何过敏反应, 双黄连低剂量组有 1 只动物发生弱阳性反应, 双黄连高剂量组 1 只强阳性 1 只阳性, 其余都发生了弱阳性反应, 绿原酸组有 5 只动物发生弱阳性反应。可知, 过敏反应的程度和发生率顺序如下: 双黄连低剂量组<绿原酸组<双黄连高剂量组。可见, 绿原酸与含等剂量绿原酸的双黄连粉针剂对 BN 大鼠的致敏性是不同的, 绿原酸致敏性低于复方的双黄连粉针剂。

2. 绿原酸代谢

将血药浓度值取平均值后, 作药时曲线, 见图 1 在 5、10、30min 时, 双黄连组动物的血浆绿原酸浓度显著高于绿原酸组动物血浆绿原酸浓度, 显示绿原酸在单独给药和复方给药时代谢有差异。竞争性的血浆蛋白结合或其他原因可能造成双黄连粉针剂中的绿原酸的清除率减小, 半衰期延长, 血药浓度增大, 从而使粉针剂中绿原酸致敏性高于单体绿原酸。

3. 免疫指标检测

(1) IgE、IgG、IgA、IgM 测定。

IgE 是 I 型过敏反应发生的主要介导者和反应指标, IgG、IgA 和 IgM 在 II、III 型过敏反应中也发挥着重要作用^[4]。由表 2 中可知, 阳性组的 IgE 水平显著高于阴性对照组, 给药组 IgE 水平也升高趋势; 与阴性对照组比较, 阳性对照组和双黄连高剂量组的 IgG、IgA 和 IgM 值, 都极显著升高, 双黄连低剂量组显著升高, 绿原酸组三者水平也有升高, 但只有 IgA 的升高有显著差异。且绿原酸组 4 种抗体浓度都低于双黄连高剂量组, 双黄连低剂量组 (除 IgE 外), 其余 3 种抗体浓度亦低于双黄连高剂量组, 这与 ASA 实验中过敏反应发生率和严重程度基本一致。

(2) C3、C4 测定。

补体是天然免疫系统的重要组成部分, 激活的补体不仅自身可直接对组织造成损伤, 还可导致多种免疫细胞如中性粒细胞、内皮细胞、血小板、单核巨噬细胞等的继发性激活^[5]。C3 是补体系统的中枢^[6], 3 条补体活化途径即经典途径、旁路途径和凝集素途径都需通过激活 C3 才能得以实现, C4 是 C3 的底物^[7], 是血清中含量仅低于 C3 的补体成分, 二者亚型 C3a、C4a 亦称过敏毒素, 可与肥大细胞、嗜碱性粒细胞表面上相应受体结合, 促使其脱颗粒。

本实验动物血清补体水平见表 3, 双黄连高剂量组和阳性对照组的 C3 水平都有极显著升高, 与绿原酸组相比, 也有极显著差异。至于 C4, 阴性对照组和绿原酸组血清在检测限以下, 而双黄连高剂量组尤其是阳性组大幅升高, 这与 ASA 实验中过敏反应发生率和严重程度基本一致, 也与抗体浓度变化趋势基本一致。

(3) 免疫表型 CD3/4/8 分析。

CD3 是外周血 T 细胞的特异性标志, T 细胞根据其他表面标志和免疫功能又可分为若干亚群, 其中 CD4+T 代表辅助性 T 细胞, 是免疫应答的重要反应细胞, CD8+T 主要是细胞毒 T 细胞和抑制性 T 细胞。而 CD4+/CD8+ 比例的稳定是机体免疫系统稳

定的一个表现。由表 4 可知, 与阴性对照组相比, CD3+CD4+T 和 CD3+CD8+T 表达率都有所降低, 其中绿原酸组降低的比双黄连高剂量组要多。CD3+CD4+/CD3+CD8+ 的比值给药组有升高趋势, 阳性组

表 1 BN 大鼠全身主动致敏实验激发症状统计表 (n=6)

组别	剂量	过敏反应程度				
		-	+	++	+++	++++
阴性对照组	生理盐水 10mL·kg ⁻¹	6	0	0	0	0
双黄连低剂量组	360mg·kg ⁻¹	5	1	0	0	0
双黄连高剂量组	720mg·kg ⁻¹	0	4	1	1	0
绿原酸组	11mg·kg ⁻¹	1	5	0	0	0
阳性对照组	OVA 5mg/只	0	0	0	2	4

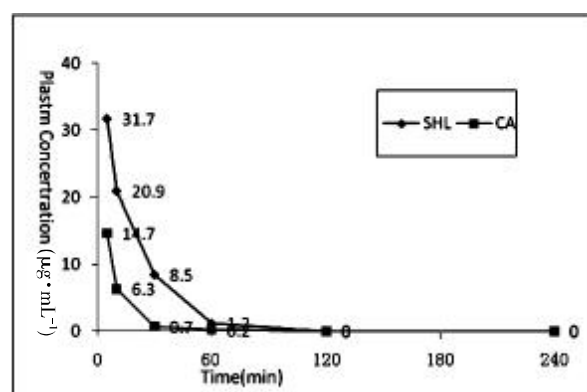


图 1 双黄连组 (SHL) 和绿原酸组 (CA) 动物血浆中绿原酸平均浓度——时间曲线

表 2 IgE、IgG、IgA、IgM 测定 (n=6)

组别	剂量	IgE (ug·mL ⁻¹)	IgG (mg·mL ⁻¹)	IgA (mg·mL ⁻¹)	IgM (mg·mL ⁻¹)
阴性对照组	生理盐水 10mL·kg ⁻¹	24.952±1.5714	0.0376±0.0085	0.0074±0.0064	0.0588±0.0098
双黄连低剂量组	360mg·kg ⁻¹	48.4180±20.8742	0.0618±0.0081*	0.0282±0.0061*	0.0700±0.0700*
双黄连高剂量组	720mg·kg ⁻¹	46.3315±20.0233	0.1185±0.0204**	0.0793±0.0200**	0.1170±0.1170**
绿原酸组	11mg·kg ⁻¹	41.4442±18.0057	0.0502±0.0063	0.0133±0.0041*	0.0562±0.0562
阳性对照组	OVA 5mg/只	48.8638±35.6094*	0.4658±0.3734**	0.3558±0.3168**	0.3558±0.3558**

注: 与阴性对照组相比, *P<0.05, 显著性差异; **P<0.01, 极显著性差异。

表 3 补体 C3、C4 测定 (n=6)

组别	剂量	C3 (ug·mL ⁻¹)	C4 (ug·mL ⁻¹)
阴性对照组	生理盐水 10mL·kg ⁻¹	55.3333±13.9236	-
双黄连低剂量组	360mg·kg ⁻¹	55.1667±17.1746	0.8333±0.2000
双黄连高剂量组	720mg·kg ⁻¹	81.8333±9.9883**	14.6667±5.5377
绿原酸组	11mg·kg ⁻¹	56.3333±16.7650	-
阳性对照组	OVA 5mg/只	114.3333±90.0130**	100.7500±93.4750

注: **P<0.01, 极显著性差异。

表4 CD3/4/8 免疫表型分析(n=6)

组别	剂量	CD3+CD4+/CD3+CD8+
阴性对照组	生理盐水 10mL·kg ⁻¹	22.64±6.87
双黄连低剂量组	360mg·kg ⁻¹	27.42±13.4
双黄连高剂量组	720mg·kg ⁻¹	26.28±41.78
绿原酸组	11mg·kg ⁻¹	30.27±50.19
阳性对照组	OVA 5mg/只	39.03±56.70*

注: *P<0.05, 显著性差异。

升高有显著性差异。

四、结 论

近年来, 中药注射剂的安全性问题引起广泛关注, 不良反应中过敏反应占了很大比重, 寻找引起不良反应的原因是亟待解决的问题。绿原酸在众多的中药注射剂中都有存在, 有着广泛的药理作用, 但它又是一种可疑的致敏物质, 且对其致敏性的研究至今没有定论。

本实验中, 绿原酸代谢血浆浓度, 单体给药时显

著低于粉针剂, 尽管二者绿原酸含量相同, 而全身主动致敏实验中, 绿原酸致敏性低于含等剂量绿原酸的粉针剂。在测定的各项免疫指标中, 前者 IgA、IgG、IgM 抗体水平和 C3、C4 补体水平都不同程度的低于后者, 由此可知, 绿原酸确是双黄连粉针剂的致敏原, 但是否是唯一致敏原, 尚需进一步实验研究。

参考文献

- 1 邓良, 袁华, 喻宗沅. 绿原酸的研究进展. 化学与生物工程, 2005, 7: 004~006.
- 2 黄芳华. 绿原酸及其中药注射剂的安全性问题状况分析. 中国中药杂志, 2008, 33(22): 2716~2719.
- 3 Freedman SO, Krupey J, Sehon AH, et al. Chlorogenic acid: an allergen in green coffee bean. Nature, 1961: 192~241.
- 4 陈兴保. 病原生物学和免疫学. 北京: 人民卫生出版社, 2004: 14~22.
- 5 Butler J. Inflammatory response to cardiopulmonary bypass. Ann Thorac Surg, 1993, 55: 552~555.
- 6 裘毅刚, 陈月, 张丽芸, 等. C3 在迟发型超敏反应中的作用. 第一军医大学学报, 2005, 25(11): 1413~1417.
- 7 李郝, 江华, 唐玉萍. 体外循环手术患者血浆 C3 和 C4 的检测及临床意义. 检验医学与临床, 2006, 3(9): 427~428.

Allergenicity Assessment and Comparison between Chlorogenic Acid and Shuanghuanglian Fenzhenji

Zhang Ruixia¹, Tang Naping¹, Lin Haixia¹, Ma Jing¹, Xie Cen², Chen Xiaoyan²

(1. National Shanghai Center for Drug Safety Evaluation and Research, Shanghai 201203, China;

2. Shanghai Institute of Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Shanghai 201203, China)

Abstract: This study aimed to evaluate and compare potential allergenicity of chlorogenic acid (CA) and Shuanghuanglian (SHL) Fenzhenji, and investigate mechanism of hypersensitivity reactions. **Methods:** Active systemic anaphylaxis (ASA) was used to determine the potential allergenicity of CA and SHL in BN rats. Symptoms of allergic response were observed. The level of immunoglobulins (Ig E, Ig G, Ig A and Ig M) and complements (C3 and C4) in the serum were detected. Ig E is detected by ELISA assay and other indexes are determined by Automatic Biochemical Analyzer. The surface expression of CD3/CD4/CD8 was also measured by flow cytometry. Then, BN rats were administered intravenously with CA and SHL, which contains equal amount of CA, respectively. The concentration of CA in plasma, which were taken before and 5, 10, 30, 60, 120, and 240 min after the injection, was determined by HPLC. **Results:** CA and SHL containing equal amount of CA, induce allergic response in BN rats. Responses of the latter were higher in the total incidence. For rats administrated with CA and SHL, the concentrations of immunoglobulins (Ig E, IgG, IgA and Ig M) and complements (C3 and C4) in serum increased on different levels compared with the control group. Besides, the surface expressions of CD3/CD4/CD8 were also varied. As concentrations of CA in plasma, the concentration of CA group was significantly lower than the SHL group. **Conclusions:** CA is less allergenic than SHL containing equal amount of CA. The reason may be related to different metabolism between CA and CA in SHL. It may also because that CA is not the only allergen in SHL. Further studies should be done to draw the final conclusion.

Keywords: Chlorogenic acid, Shuanghuanglian Fenzhenji, ASA, BN rats, Immunoglobulin, Complement, Immune phenotype

(责任编辑: 张志华 李沙沙, 责任译审: 王 晶)