

3 种中药注射液安全性评价

谢暎^{1*}, 王军成¹, 王爱武²

- (1. 山东省交通医院药剂科, 济南 250031;
2. 山东省省立医院药剂科, 济南 250021)

[摘要] **目的:**评价血栓通注射液、苦碟子注射液和喜炎平注射液的安全性。**方法:**采用主动全身过敏试验、被动皮肤过敏试验、血管刺激性试验和体外溶血试验考察以上 3 种中药注射液的安全性。**结果:**主动全身过敏试验中阳性对照过敏反应呈极强阳性,3 种注射液均未见过敏反应,各组豚鼠的体重变化未见明显差异;被动皮肤过敏试验中,阳性对照组各动物均出现蓝斑,且直径 > 5 mm,血清 IgE 含量明显增高 ($P < 0.01$),3 种注射液均未出现直径 > 5 mm 的蓝斑,血清 IgE 含量未见明显改变;血管刺激性试验中,各组动物的左耳和右耳给药局部血管肉眼观察均未见任何刺激反应症状,病理学结果显示给药结束及恢复期,实验动物双耳血管及周围组织均未见明显异常;体外溶血试验中,3 种注射液均未见溶血或凝集现象。**结论:**血栓通注射液、苦碟子注射液和喜炎平注射液在该实验条件下安全可靠。

[关键词] 中药注射液; 主动全身过敏; 被动皮肤过敏; 血管刺激性; 体外溶血

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)16-0263-05

[doi] 10.11653/syjf2013160263

Safety Evaluation of Three Traditional Chinese Medicine Injections

XIE Jian^{1*}, WANG Jun-cheng¹, WANG Ai-wu²

- (1. Pharmacy Department of Shandong Jiaotong Hospital, Ji'nan 250031, China;
2. Pharmacy Department of Shandong Provincial Hospital, Ji'an 250021, China)

[Abstract] **Objective:** Evaluate the safety of Xueshuantong Injection, Kudiezi Injection and Xiyanping Injection. **Method:** Active systemic anaphylaxis (ASA) test, passive cutaneous anaphylaxis (PCA) test, vascular irritation test and *In vitro* hemolysis test were used to evaluate the safety of three traditional Chinese medicine injections (TCMI). **Result:** In the ASA test, positive control group showed strong anaphylaxis effect, three TCMI

[收稿日期] 20130304(002)

[通讯作者] * 谢暎, 主管药师, 从事院内制剂研究与临床合理用药分析, Tel:0531-85953277-6579, E-mail: xiejian199008@163.com

- [11] Zhang W, Yang J, Chen J, et al. Immunomodulatory and antitumour effects of an exopolysaccharide fraction from cultivated *Cordyceps sinensis* (Chinese caterpillar fungus) on tumour-bearing mice [J]. *Biotechnol Appl Biochem*, 2005, 42(1):9.
- [12] Weng S C, Chou C J, Lin L C, et al. Immunomodulatory functions of extracts from the Chinese medicinal fungus *Cordyceps cicadae* [J]. *J Ethnopharmacol*, 2002, 83(1/2):79.
- [13] 黄文哲, 柳燕, 秦民坚, 等. 太子参提取物对小鼠免疫功能的影响 [J]. *现代中药研究与实践*, 2005, 19(6):35.
- [14] 刘循, 刘燕, 姚华, 等. 复方一枝蒿颗粒对小鼠抗炎和免疫功能的影响 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2012, 18(13):185.
- [15] 黄其春, 何玉琴, 李焰. 银杏叶提取物的免疫调节作用研究进展 [J]. *中国药理学通报*, 2010, 26(2):278.
- [16] Villasenor-Garcia M M, Lozoya X, Osuna-Torres L, et al. Effect of Ginkgo biloba extract EGb 761 on the nonspecific and humoral immune responses in a hypothalamic-pituitary-adrenal axis activation model [J]. *Int Immunopharmacol*, 2004, 4(9):1217.
- [17] 武红莉, 荆志伟, 王忠. 中药复方优化设计方法研究进展 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2010, 16(13):224.

[责任编辑 李玉洁]

didn't produce allergic reaction and body weight of all groups showed no significant differences. In the PCA test, all rats of positive control group caused blue spots of which the diameters were all greater than 5 mm and the IgE were significantly increased. However, three TCMI didn't produce blue spots of which the diameters were greater than 5 mm and the IgE levels showed no significant differences compared with negative control group. In the vascular irritation test, local blood vessels by near the administration site of both left and right ears of the animals did not observe irritative reaction symptoms, pathology results showed that after administration and recovery phase, blood vessels and surrounding tissues of auresunitas of the animals didn't appear apparent abnormality. *In vitro* hemolysis test showed that no haemolysis or agglutination phenomenon were induced by any of the three TCMI. **Conclusion:** Xueshuantong Injection, Kudiezi Injection and Xiyanping Injection were safety under these experimental conditions.

[**Key words**] traditional chinese medicine injections; active systemic anaphylaxis; passive cutaneous anaphylaxis; vascular irritation; *In vitro* hemolysis

中药注射液 (Traditional Chinese Medicine Injections, TCMI) 是我国传统医药中的瑰宝, 为我国医疗卫生事业的发展做出了巨大贡献。但随着 TCMI 临床应用日益广泛, 不良反应报道也逐渐增多, 为全面提高 TCMI 的安全性、有效性和质量可控性, 2009 年国家食品药品监督管理局下发了《关于开展中药注射剂安全性再评价工作的通知》(国食药监办[2009]28 号) 并组织制定了《中药注射剂安全性再评价基本技术要求》, 2010 年进一步公布了《中药注射剂安全性再评价非临床研究评价技术原则》等 7 个指导原则, 对已上市的 TCMI 再评价中的非临床安全性再评价做了详细规定。血栓通注射液、苦碟子注射液和喜炎平注射液是我院常用的 3 种 TCMI, 临床应用中都有不良反应的报道^[1-3], 本课题旨在通过非临床试验考察其安全性, 为临床合理用药提供参考。

1 材料

血栓通注射液 [丽珠集团利民制药厂, 规格 5 mL, 175 mg (三七总皂苷), 批号 1208045]; 苦碟子注射液 (沈阳双鼎制药有限公司, 规格 20 mL, 批号 12061201); 喜炎平注射液 (江西青峰药业有限公司, 规格 2 mL, 50 mg, 批号 20120821), 0.9% 氯化钠注射液 (山东齐都药业有限公司, 规格 100 mL, 0.9 g, 批号 2011070303), 卵白蛋白 (上海蓝季科技发展有限公司, 规格 1 g, 批号 110104)。伊文斯兰 (北京利科生化科贸有限公司), IgE 测定试剂盒 (美国 Bethyl 公司)。

豚鼠, 雌雄各半, 体重 300 ~ 400 g (普通级), SD 大鼠, 雌雄各半, 体重 250 ~ 300 g (SPF 级), 新西兰大耳白家兔, 体重 2.0 ~ 3.0 kg (普通级) 均购自山东大学实验动物中心, 动物生产许可证号 SCXK

(鲁) 20090001, 动物使用许可证 SYXK (鲁) 20090013; 动物分笼饲养, 对每只动物进行编号和称重, 检疫观察 3 d 后进行实验。对实验动物进行外观体征、行为活动、摄食量和体重观察。饲养环境, 室温 19 ~ 26 °C, 日温差 ≤ 4 °C, 相对湿度 40% ~ 70%, 昼夜明暗交替时间 12 h/12 h。饲料由北京科澳协力饲料有限公司生产, 批号 11120105, 动物饮用水为城市管道自来水经过煮沸冷却后饮用。

2 方法与结果

2.1 主动全身过敏试验 取豚鼠 48 只, 随机分为 8 组: 阳性对照组 (卵白蛋白 3 mg/只)、阴性对照组 (0.9% 氯化钠注射液)、血栓通注射液 1.5 mL·kg⁻¹ 组、血栓通注射液 0.75 mL·kg⁻¹ 组、苦碟子注射液 6 mL·kg⁻¹ 组、苦碟子注射液 3 mL·kg⁻¹ 组、喜炎平注射液 75 mg·kg⁻¹ 组、喜炎平注射液 37.5 mg·kg⁻¹ 组, 每组 6 只。腹腔注射给药致敏, 隔日 1 次, 共 5 次。末次致敏后第 14 天豚鼠后肢小隐静脉注射给药激发, 激发剂量为致敏剂量的 2 倍。致敏期间每日观察动物症状, 初次、末次致敏和激发当日测定动物体重。激发后详细观察 30 min 内每只动物的反应、症状出现及消失时间, 如果给药组动物出现过过敏反应症状则需延长观察时间至 3 h。按表 1^[4] 观察、记录过敏反应发生程度并计算过敏反应发生率。根据过敏反应发生率和发生程度进行综合判断。药物组若出现过过敏反应, 取健康未致敏豚鼠 2 只, 静脉注射致敏剂量的药物, 观察有无类过敏反应症状。

结果发现, 给药组动物活动及进食等一般状况未见明显异常, 各组豚鼠的体重变化未见明显差异 (表 2)。

静脉给药激发后, 阳性对照组的所有 6 只豚鼠多数出现搔鼻、咳嗽、排尿、痉挛、横转后在 1 ~ 5 min

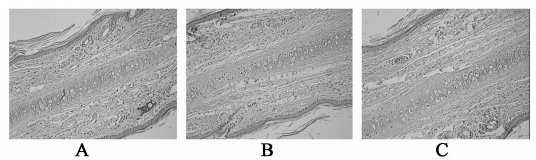
碟子注射液 $2 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ 组、喜炎平注射液 $25 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 组。家兔耳缘静脉左耳滴注上述药物,右耳滴注等剂量 0.9% 氯化钠注射液,每天给药 1 次,连续 5 d,每天给药前以及末次给药后 48 h 对动物和注射部位进行肉眼观察,按表 2^[6] 观察记录注射部位有无红肿、充血等刺激现象。末次给药后 48 h 每组处死半数动物,以耳缘静脉注射点至向心方向(避开注射部位)2 cm,连续取 3 段血管连同周围组织,每段 1 cm,用 10% 甲醛溶液固定,做病理组织学检查,观察静脉血管组织有无炎症反应,甚至变性、坏死等显著性刺激反应。剩余动物继续观察 14 d 后再进行组织病理学检查,以了解刺激性反应的可逆性。

表 4 血管刺激反应肉眼观察分级标准

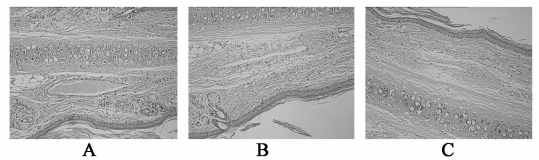
刺激反应	分级
无变化	0
轻度充血和/出血	1
中度充血、肿胀	2
明显充血、肿胀、耳下垂	3
明显充血、肿胀、耳下垂,且有轻、中度坏死,紫绀,血管轻度阻塞	4
明显充血、肿胀、耳下垂,且有重度坏死,紫绀,血管严重阻塞	5

实验期间,实验动物的左耳和右耳给药局部血管均未见任何刺激反应症状,刺激反应评分为 0 分。病理学检查结果显示给药结束及恢复期结束时,实验动物 0.9% 氯化钠注射液对照侧和血栓通注射液、苦碟子注射液、喜炎平注射液给药侧注射血管及周围组织均未见明显异常,典型病理图片见图 1。本次试验条件下,家兔静脉注射给予血栓通注射液、苦碟子注射液、喜炎平注射液,对注射部位无刺激性。

2.4 体外溶血试验 取健康新西兰家兔血 30 mL 置于烧杯内玻璃棒搅动 10 min 除去纤维蛋白原。加入 0.9% 氯化钠溶液 300 mL,摇匀, $1\ 500 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 15 min,除去上清液,沉淀的红细胞再用 0.9% 氯化钠溶液按上述方法洗涤 3 次,至上清液不显红色为止。将所得红细胞用 0.9% 氯化钠溶液配成 2% 的混悬液备用。分为血栓通注射液、苦碟子注射液、喜炎平注射液 3 组,每组取洁净试管 7 只,进行编号,1~5 号管为供试品管,6 号管为阴性对照管,7 号管为阳性对照管。按表 5^[6-7] 所示依次加入 2% 红细胞悬液、0.9% 氯化钠溶液或蒸馏水、受试物,混匀



动物编号:1 动物编号:2 动物编号:3
组别:0.9% 组别:0.9% 组别:0.9%
氯化钠注射液 氯化钠注射液 氯化钠注射液
器官:耳缘静脉 1 段 器官:耳缘静脉 2 段 器官:耳缘静脉 3 段
病变:未见明显异常 病变:未见明显异常 病变:未见明显异常



动物编号:1 动物编号:2 动物编号:3
组别:血栓通注射液 组别:苦碟子注射液 组别:喜炎平注射液
器官:耳缘静脉 1 段 器官:耳缘静脉 2 段 器官:耳缘静脉 3 段
病变:未见明显异常 病变:未见明显异常 病变:未见明显异常

图 1 血管刺激试验典型图例(HE 染色,10 ×)

后,立即置 $37 \pm 0.5 \text{ }^\circ\text{C}$ 的恒温箱中进行温育,开始每隔 15 min 观察 1 次,1 h 后,每隔 1 h 观察 1 次,观察 3 h。血栓通注射液、苦碟子注射液、喜炎平注射液均加入原液进行试验。溶液呈澄明红色,管底无细胞残留或有少量红细胞残留,表明有溶血发生;红细胞全部下沉,上清液体无色澄明,表明无溶血发生。溶液中有棕红色或红棕色絮状沉淀,振摇后不分散,表明有红细胞凝聚发生。如有红细胞凝聚的现象,可将凝聚物置于载玻片上,在盖玻片边缘滴加 2 滴 0.9% 氯化钠溶液,显微镜下观察,凝聚红细胞能被冲散者为假凝聚,不被冲散者为真凝聚。

在 3 h 内除第 7 管(蒸馏水)溶液呈现澄明红色,溶血结果为阳性,其余 6 管均未见澄明红色,且红细胞全部下沉,上层液体无色澄明,经振摇后红细胞能均匀分散,溶血结果为阴性。表明血栓通注射液、苦碟子注射液及喜炎平注射液无溶血及无凝集作用。

表 5 体外溶血试验加样方法

试管编号	2% 红细胞悬液	生理盐水	蒸馏水	受试物	mL
1	2.5	2.0			0.5
2	2.5	2.1			0.4
3	2.5	2.2			0.3
4	2.5	2.3			0.2
5	2.5	2.4			0.1
6	2.5	2.2			
7	2.5		2.5		

2.5 统计分析 采用 SPSS 17.0 软件进行数据分析,计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用单因素方法分析, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 讨论

近年 TCMI 不良反应频发,根据国家食品药品监督管理局通知,对已上市的中药注射剂尤其是临床出现不良反应的,应进行安全性再评价。血栓通注射液、苦碟子注射液和喜炎平注射液均有临床不良反应的报道,但其临床前安全性评价及上市后再评价均未见报道,因此,本文参照指导原则要求对其进行了免疫毒性试验及溶血、刺激试验研究。结果表明,3种 TCMI 均未引起豚鼠主动全身反应和大鼠皮肤被动过敏反应,亦未见血管刺激性和体外溶血及聚集。因此,在该试验条件下该3种 TCMI 是安全有效的。

动物体重的变化是毒性评价中的一个重要指标,以往的 TCMI 免疫毒性文献报道中往往忽略,本研究表明,在 ASA 试验中各组豚鼠的体重在评价的各个阶段未见明显差异,提示体重可能不适合作为 TCMI 免疫毒性评价的主要指标之一。IgE 是一种重要的免疫球蛋白,过敏原进入机体后刺激免疫系统产生相应的 IgE 抗体,IgE 抗体附着在肥大细胞及嗜碱性细胞上使之致敏,当同一抗原再次进入机体后,即与肥大细胞及嗜碱性细胞表面的 IgE 抗体发生抗原抗体反应,导致肥大细胞及嗜碱性细胞脱颗粒并释放生物活性介质,作用于不同的组织和器官,产生不同的病理生理反应。以往的 TCMI 免疫毒性研究中关于 IgE 水平测定的报道较少,本研究 PCA 试验结果表明已知致敏物质卵白蛋白可引起血清 IgE 显著升高,提示血清 IgE 水平检测可以作为过敏反应研究辅助指标^[5],值得在指导原则中做进一步强调。

由于 TCMI 临床不良反应中 75% 是过敏反应^[8],因此免疫毒性是评价其非临床安全性评价的一个重要指标。尽管指导原则中要求必须进行 ASA 试验和 PCA 试验,但就国内数据库检索得到的 127 篇文献分析,同时进行 ASA 和 PCA 试验的仅占 38%。这一方面可能是由于试验操作的不规范,操作者缺乏相应的专业技能及论文写作水平;另一方面,可能是由于进行评价时参考的标准不统一造成的。大量研究表明,PCA 试验对多种 TCMI(如参麦、穿琥宁、黄芪、莲必治、双黄连、清开灵等)过敏

反应检出敏感度高于 ASA 试验^[9-11],因此进行 PCA 试验是十分必要的。另外,由于指导原则仅是一个技术性指导文件,为充分暴露受试物的各种毒性,仅按指导原则要求进行相关研究远远不够,本研究证实仅按照指导原则要求进行的 3 种 TCMI 临床前安全性评价结果与临床不良反应报道不相符,因此,尚需进一步选择其他实验方法,如对其主要成分及附加剂的抗原性研究,建立致敏动物模型,充分利用免疫化学和免疫芯片技术等^[12]现在分子生物学技术手段进行研究,以期充分暴露其毒性并揭示作用机制,为临床安全合理用药提供确切参考。

[参考文献]

- [1] 朱丽萍,蔡庆顺.血栓通注射液不良反应分析及防治[J].中成药,2009,31(12):1922.
- [2] 陈新悦,张金梅.苦碟子临床应用中的不良反应[J].中国药业,2008,17(24):62.
- [3] 王燕萍,焦凯,何忠芳.喜炎平注射剂不良反应文献的系统评价[J].中国实验方剂学杂志,2011,17(24):236.
- [4] 国家食品药品监督管理局.中药,天然药物免疫毒性(过敏性、光变态反应)研究技术指导原则[M].北京:中国医药科技出版社,2005:3.
- [5] 高天红,朴晋华,王婷婷.鱼金注射液被动皮肤过敏试验及对血清 IgE 的影响[J].山西医科大学学报,2011,42(6):477.
- [6] 国家食品药品监督管理局.中药,天然药物局部刺激性和溶血性研究技术指导原则[M].北京:中国医药科技出版社,2005:3.
- [7] 何晓静,黄琳仪,刘玉兰.注射用银杏达莫的安全性评价[J].中国实验方剂学杂志,2006,12(8):52.
- [8] Horikawa T. Diagnosis and management of drug-induced anaphylaxis[J]. Arerugi, 2007, 56(7):655.
- [9] 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.
- [10] 胡中慧,李磊宁,吴纯启.莲必治注射液的过敏性研究[J].中国药师,2011,14(10):1433.
- [11] 王增仙,武敏霞,高萧枫.三种常用中药注射液的过敏性研究[J].山东中医学院学报,2011,12(4):5.
- [12] 章海风,翟成凯,郑艳泽.中药注射剂致敏反应的研究进展[J].中国实验方剂学杂志,2010,16(10):204.

[责任编辑 顾雪竹]