

• 综 述 •

中药注射剂大分子杂质与类过敏反应:线索与原理*

段为钢¹, 张陆勇^{2,3}

(1.云南中医药大学云南省中医药学分子生物学重点实验室, 云南 昆明 650500;

2.中国药科大学新药筛选中心, 江苏 南京 210038; 3. 广东药科大学, 广东 广州 510006)

摘要:从技术上寻找中药注射剂安全性问题的解决方案一直是中医药界的热点问题。本文基于口服药物吸收规律较系统地分析了不能直接吸收的大分子杂质是导致其安全性问题的重要因素,可能通过病原相关分子模式(PAMP)和损伤相关分子模式(DAMP)激发机体的固有免疫反应而引发(类)过敏反应,最后提出去除大分子杂质是提高中药注射剂安全性的重要策略。

关键词:中药注射剂;大分子杂质;类过敏反应;病原相关分子模式;损伤相关分子模式

中图分类号: R286

文献标志码: A

文章编号: 1000-2723(2020)01-0093-05

DOI: 10.19288/j.cnki.issn.1000-2723.2020.01.0016

The Relationship between Macromolecular Impurities in Traditional Chinese Medicine Injection and Anaphylactoid Reaction: the Clues and Principles

DUAN Weigang¹, ZHANG Luyong^{2,3}

(1.Yunnan Provincial Key Laboratory of Molecular Biology for Sinomedicine,
Yunnan University of Chinese Medicine, Kunming 650500, China;

2.Jiangsu Center for Drug Screening,China Pharmaceutical University, Nanjing 210038, China;

3.Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, China)

ABSTRACT: It has been a hot issue in the field of tradition Chinese medicine(TCM) to find a technical solution to the safety of traditional Chinese medicine injections (TCMIs). Based on oral drug absorption law, the present article will put forward that the macromolecular impurity that cannot directly absorbed is one of the important factors leading to its safety problems, which mechanisms may be associated with pathogen associated molecular patterns (PAMP) and damage associated molecular patterns (DAMP) that can directly stimulate the body's natural immune response, then cause anaphylactoid reactions. Finally, the article suggests that macromolecular impurity removal is a feasible strategy to improve the safety of TCMIs.

KEY WORDS: traditional Chinese medicine injection; macromolecular impurities; anaphylactoid reactions; pathogen associated molecular pattern; damage associated molecular pattern

中药注射剂是最具科技含量的制剂,是中药现代化的骄傲,但也是行业之痛。面对中药注射剂的类过敏反应等安全性问题,国家启动了安全性再评价以提升中药注射剂的质量。然而面对错综复杂的中药注射剂安全性问题,提高其安全性既是一个管理问题,更是一个技术问题。以大分子物质为切入点,笔者前期

曾提出了相应的技术观点^[1-5],本文则进一步进行了完善,以理顺中药注射剂大分子杂质与类过敏反应的关系。

1 中药注射剂的安全性主要表现为类过敏反应

根据叶祖光教授^[6]的总结,中药注射剂安全性监测现状及不良事件特点主要有:1)(类)过敏反应是中

收稿日期: 2020-01-08

* 基金项目: 国家自然科学基金项目(81560645),云南省中医药联合专项重点项目(2018FF001-002)

第一作者简介: 段为钢(1974-),男,博士,教授,从事分子药理学和中药药理学研究。E-mail: deardwg@126.com

药注射剂不良事件的共性问题,临床主要表现为皮肤黏膜、呼吸系统损害或全身过敏样反应。2)不良反应临床表现的多样性。3)不良反应的不可预知性,(类)过敏反应诱因及表现不一致,故致敏原筛选困难,通过预实验或皮试很难预测并预防不良反应的发生。4)用药途径为静脉滴注的不良反应明显高于肌肉注射。5)与中成药其他剂型相比,中药注射剂相关突发或群体事件明显多于其他剂型。

也有学者^[7]将中药注射剂的不良反应特点总结为“没有特点”的特点,即不良反应的多发性和普遍性;不良反应临床表现的多样性;不良反应的不可预知性;不良反应种类的不确定性;批与批之间不良反应的差异性。

因此,可大致认为,目前中药不良反应 3/4 发生在中药注射剂,中药注射剂 3/4 的不良反应可归结为类过敏反应,中药注射剂的严重不良反应 3/4 以上发生在静脉注射剂,3/4 以上发生在复方和单方总提取物制剂,24 h 内的反应占 3/4 以上。这实际上被后续的数据所证实^[8]。

类过敏反应和过敏反应的临床表现是高度相似的,均涉及到肥大细胞脱颗粒、炎症因子和细胞因子释放,根据临床表现很难区别。但前者属于固有免疫反应,后者属于适应性免疫反应,而中药注射剂的类过敏反应则是主要的^[9]。理由是中药注射剂具有婴幼儿首次用药可以引发^[10],静脉给药反应严重而口服几乎无反应等特点,非常符合表 1 中类过敏反应的特

征。但其发生机理与过敏反应的区别还是明显的,过敏反应属于适应性免疫,有 IgE 参与,但类过敏反应无此特点。

2 中药注射剂的类过敏反应与大分子杂质相关

通过分析已公开的中药注射剂不良反应资料,发现其类过敏反应主要与大分子杂质有关。理由是:对比同处方或相似处方的注射剂和口服剂,安全性问题几乎都发生在注射剂,说明消化系统能“过滤”引发注射剂安全性问题的物质。

消化系统的“过滤”作用分为两种:一种是机械性过滤,一种是化学性过滤。机械性过滤的主要作用是阻止高极性和大分子物质进入机体,发生部位主要在消化道粘膜。化学性过滤主要是将进入门静脉的物质进行代谢,增加其极性继而阻止这些物质跨膜转运进入组织细胞,加快肾脏排泄;发生的部位主要在肝脏。显然,机械性过滤是第一道屏障,化学过滤是第二道屏障。由于大多数注射剂的研发就假定了中药提取物能直接起作用(如果承认胃肠和肝脏的代谢产物是中药作用的主要物质形式,那说明开发成注射剂则是不合理的),因此只能考虑被消化道粘膜机械屏障阻止的物质是安全性问题的主要物质基础。根据吸收的一般规律,分子量越大,吸收的可能性就越小,一般认为分子量大于 3 000 是不吸收的。到现在为止,在药理学意义上也一直没有大分子物质完整吸收的证据;极性大、分子量小的物质生物利用度较低,但还是会存在药理学意义上的吸收。

从生物学的角度看,生物体组织细胞内的大分子物质是高度有序的^[11]。正常情况下,外源性的大分子是不能进入的,甚至细胞内外的大分子物质也是严格区分的。如果外源性大分子入侵,或内源性大分子物质在细胞、组织或体内发生异位,则会导致病理状态。根据现在免疫学的观点,外源性大分子物质入侵后,机体会通过病原相关分子模式(PAMP,pathogen-associated molecular pattern)进行识别,内源性大分子异位则通过损伤相关分子模式(DAMP,damage-associated molecular pattern)进行识别。

类过敏反应的物质基础绝非小分子物质^[9]。如果小分子作为半抗原诱发机体过敏反应,那么相同或相似处方的口服药和注射剂都应有相似的不良反应且

表 1 过敏反应和类过敏的区别 *

序号	内容	过敏反应	类过敏反应
1	免疫类型	适应性免疫	固有免疫
2	IgE	必须	不需
3	剂量依赖性	不明显	明显
4	首次使用	无反应	有反应
5	给药方式敏感性	局部>静脉	局部<静脉
6	防御反应归类	适应性免疫	固有免疫
7	病原分子	抗原	PAMP、DAMP
8	病原分子的特异性	特异性高	特异性差
9	识别方式	抗原抗体结合	模式识别

注:* 根据已有认识总结

符合过敏表现,如青霉素注射剂过敏;如果小分子作为诱发机体类过敏反应的物质,那么相同或相似处方的口服药的反应应该更为严重,因为口服进入机体的小分子可能会更多。然而,类过敏反应严重注射剂的药材如鱼腥草均在民间广泛食用,辅料如聚山梨酯80(吐温80)在食品中也有较多添加,但均罕见类过敏反应。如此可以推定,类过敏反应的物质基础绝非小分子物质,更应该是大分子物质。

事实证明,中药注射剂去除大分子杂质后,物质基础和主要功效无明显影响^[12-13],其多种安全性明显改善^[12],而富含大分子的注射剂则安全性问题更为突出^[14]。

3 中药注射剂存在大分子杂质

对于基于口服药疗效开发的中药注射剂而言,活性成分只可能是可以直接吸收的物质,因此中药注射剂的活性成分只能属于小分子组分。现在也的确存在以大分子物质为活性成分中药注射剂,但其合理性是值得进一步研究的,或者已经不属于传统意义上的中药注射剂。在小分子组分中,生物共性的小分子物质不应该是活性成分,典型的是常见无机离子、单糖、氨基酸、核苷(酸)、维生素等。

中药注射剂具有生物提取物的特征,多采用煎煮法,对细胞结构的破坏比较彻底,好处是活性成分提取比较完整,但不可避免地会提取到药材的蛋白质、多糖、核酸、缩合鞣质、树脂等大分子物质。

我国目前没有实施注射剂专用药材饮片制度,这些饮片在储存和使用过程中也不执行无菌操作。药材饮片本身很容易吸附环境中的微生物,有些药材植物还含有内生菌。因此,中药注射剂可能含有来自药材饮片微生物的生物大分子如菌体蛋白、脂多糖、核酸等。

对某些以挥发油为活性成分的中药注射剂而言,为了改善制剂性质,往往加入聚山梨酯80等辅料^[15-16]。由于大分子物质不具备挥发性,因此这些中药注射剂大分子杂质更多地来自该辅料^[17],如鱼腥草注射液。

从工艺来看,目前中药注射剂生产涉及到药材饮片煎煮、乙醇沉淀、大孔树脂吸附、活性炭吸附、微孔

滤膜过滤等工艺。其中有些工艺有利于去除一些大分子杂质,但去除能力有限,很难去除完全。比如,蛋白质在80%乙醇中的溶解度可达20 μ g/mL以上。

目前药典对蛋白质类、缩合鞣质类和树脂等大分子物质均进行检查。前两者的检查限量分别是40 μ g/mL(蛋白质,磺基水杨酸法)和6mg/mL(缩合鞣质,蛋白吸附法)^[4]。因此,限量是偏高的。

因此,从药材、辅料、工艺和质量标准的角度看,中药注射剂都是存在大分子杂质的。根据所含物质的复杂程度,从高到低依次是复方制剂、单方制剂、活性部位制剂和准单体制剂,对相同给药方式的注射剂而言,类过敏反应的发生频率大体也是这个顺序。

4 大分子杂质导致类过敏反应的可能机理

类过敏反应主要属于一种固有免疫反应,而固有免疫反应主要以两种方式识别PAMP和DAMP^[18],识别后会激发机体的固有免疫反应和炎症反应,一方面具有清除大分子的作用,一方面会诱发机体损伤。中药注射剂中的大分子杂质更符合PAMP,因为中药注射剂中的大分子物质是外源性的。可能的信号通路有:1)Toll样受体(TLR)信号通路;可以激活多种固有免疫应答,包括多种细胞吞噬、补体作用和溶酶体释放等。2)甘露糖受体信号通路^[19];主要激活单核-巨噬细胞,介导单核-巨噬细胞的吞噬作用。3)清道夫受体信号通路^[20];主要激活单核-巨噬细胞,清除相应的受损细胞。

损伤的主要方式有^[21]:1)激活单核-巨噬细胞、NK细胞等吞噬细胞;2)激活补体系统,主要通过旁路途径和MBL(甘露聚糖结合凝集素)途径激活补体系统;3)促进肥大细胞和嗜碱性粒细胞脱颗粒;4)溶酶体释放。这些损伤方式能基本甚至完全解释类过敏反应的临床表现。

特别地,人的TLRs有10种(表2)之多,是PAMP和DAMP识别的最主要的方式^[18]。TLRs的配体特异性较低,各受体间还存在一定的交叉反应。这些受体激活后会启动固有免疫反应和炎症反应,导致血液白细胞和/或淋巴比例增多,细胞因子和炎症因子分泌增加,在清除大分子物质的同时导致机体损伤而表现出类过敏反应。如,中药注射剂导致类过敏反

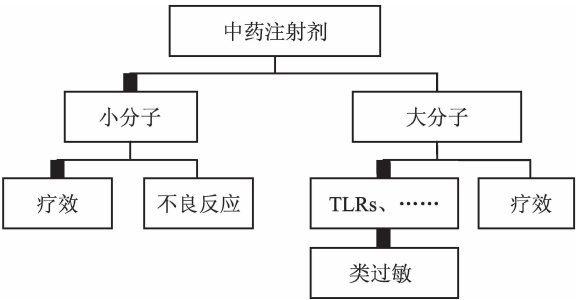
应后会导致白细胞减少^[22-23];用富含大分子杂质的注射剂处理家兔,会导致家兔血液中性粒细胞增多^[14];某些注射剂会使组胺^[24-25]、细胞因子 IL-1、IL-2、IL-4、IL-6、TNF-α 等^[26-28]也增多。由于某些 TLRs 编码在 X 染色体(表 2),提示女性可能对中药注射剂大分子杂质更敏感^[29]。

表 2 人的模式识别受体和配体^[30]

受体	别名	染色体	配体(来源)	表达部位
TLR1	CD281	4	脂肽(细菌)、肽聚糖(G+)	肠上皮、巨噬细胞、中性粒细胞
TLR2	CD282、TIL4	4	肽聚糖(G+)、三酰基脂蛋白(细菌)、二酰基脂蛋白(支原体)、酵母聚糖(酵母)、磷壁酸(G+)、糖基磷脂酰肌醇锚定蛋白(克氏锥虫)、外膜蛋白 A(肺炎克雷伯菌)、磷脂酰肌醇二甘露糖苷(分支杆菌)、糖脂-脂基阿拉伯甘露聚糖(分支杆菌)、19k 脂蛋白(分支杆菌)、酚溶性调控蛋白(表皮葡萄球菌)、钩端螺旋体 LPS(问号螺旋体)、Poryphyromonas gingivitis LPS(poryphyromonas gingivitis)、凝血素(麻疹、风疹)	小胶质细胞、雪旺细胞、单核细胞、巨噬细胞、树突状细胞、多形核白细胞、B 细胞(B1、MZ B、B2)、T 细胞、气道上皮、肺泡上皮、肾小管上皮、肾小球上皮、消化道上皮、皮肤上皮
TLR3	CD283、IIAE2	4	多聚 I:C(dsRNA)(dsRNA 病毒)	淋巴细胞、白细胞、巨噬细胞
TLR4	ARMD10、CD284	9	LPS(G-)、热敏感细胞相关因子(分支杆菌)、RSV F 蛋白(病毒)、Hsp 60(人)、纤连蛋白外结构域 A(人)	淋巴细胞、白细胞、巨噬细胞
TLR5	MELIOS、SLE1、SLEB1、TIL3	1	鞭毛蛋白(细菌)	消化道、(软)骨组织
TLR6	CD286	4	二酰基脂蛋白(支原体)、酚溶性调控蛋白(表皮葡萄球菌)	多同 TLR2
TLR7		X	Poly G(病毒)、ssRNA(病毒)	巨噬细胞、树突状细胞
TLR8	CD288	X	ssRNA(病毒)	淋巴细胞、白细胞、巨噬细胞
TLR9	CD289	3	非甲基化 CpG DNA(细菌、病毒)	脾、淋巴结、骨髓、外周血白细胞
TLR10	CD290	4	抑制样蛋白(弓形虫)	B 细胞、单核细胞、中性粒细胞

5 小结

至此,现有的线索提示中药注射剂所含的大分子杂质是导致类过敏反应的重要原因,其主要原理可参见图 1。对于反复使用同一种中药注射剂的情形,也可能涉及到过敏反应。但不管如何,大分子杂质是以前忽视的一大类杂质,监控、去除大分子杂质是提高中药注射剂安全性的重要技术策略。



注:加粗表示占主要地位

图 1 中药注射剂的小分子成分和大分子成分对疗效和不良反应的贡献

参考文献:

[1] 段为钢. 用“活性成分谱”思路破解中药的安全性和有效性[J]. 医学与哲学(人文社会医学版),2009,30(9):60-61.

[2] 段为钢. 中药注射剂安全性的技术思考[J]. 云南中医学院学报,2009,32(6):12-13.

[3] 段为钢,李奇峰,柯瑾. 中药注射剂有效性及“毒性”的物质基础分析[J]. 医学与哲学(临床决策论坛版),2011,32(8):56-57.

[4] 段为钢,张陆勇. 提高中药注射剂安全性的技术策略[J]. 中成药,2012,34(11):2201-2205.

[5] 殷华,柯瑾,段为钢. 中药注射剂大分子物质是活性成分还是杂质[J]. 医学争鸣,2018,9(2):26-30.

[6] 叶祖光,张广平,刘新义. 刍议中药注射剂不良反应的原因及防治[J]. 世界科学技术(中医药现代化),2010,12(6):985-989.

[7] 李玉萍. 中药注射剂不良反应的特点及成因[J]. 中国实用

- 医药,2009,4(25):166-167.
- [8] 朱峰,郭代红,袁凤仪,等. 3695例中药注射剂不良反应分析[J]. 药物流行病学杂志,2015,24(3):158-160.
- [9] 高建波. 类过敏反应的研究进展 [J]. 中国药物警戒,2014,11(6):344-346.
- [10] 汪咪珍. 中药注射剂过敏反应 16 例分析[J]. 儿科药理学杂志,2005,11(1):59.
- [11] 云宇,王蕾,段为钢. 从机体处理物质的方式认识代谢和免疫的一致性[J]. 医学争鸣,2017,8(1):24-27.
- [12] 柯瑾,张陆勇,殷华,等. 大分子物质对中药注射剂的安全性影响[J]. 中成药,2014,36(4):855-859.
- [13] 殷华,王俊杰,司季青,等. 4 种去大分子中药注射液与原液的主要疗效对比实验研究[J]. 中医药导报,2017,23(3):62-65.
- [14] 殷华,李月,司季青,等. 4 种中药注射剂大分子富集液的重复给药毒性实验研究 [J]. 云南中医学院学报,2017,40(4):14-20.
- [15] 邱玲,段为钢. 注射用聚山梨酯 80 的安全性分析[J]. 云南中医学院学报,2018,41(6):90-95.
- [16] 张祎,殷华,李月,等. 中药注射剂中增溶性辅料聚山梨酯 80 的安全性问题分析 [J]. 中国实验方剂学杂志,2019,25(20):160-165.
- [17] 李月,张路梅,段金连,等. 注射用聚山梨酯 80 的杂质、安全性问题与可能的出路 [J]. 云南中医学院学报,2018,41(4):93-97.
- [18] KAY E, SCOTLAND R S, WHITEFORD J R. Toll-like receptors: Role in inflammation and therapeutic potential [J]. Biofactors, 2014, 40(3): 284-294.
- [19] SHIMIZU K, FUJII S. An adjuvant role of in situ dendritic cells(DCs) in linking innate and adaptive immunity [J]. Front Biosci, 2008, 13: 6193-6201.
- [20] KOMAI K, SHICHITA T, ITO M, et al. Role of scavenger receptors as damage-associated molecular pattern receptors in Toll-like receptor activation [J]. Int Immunol, 2017, 29(2): 59-70.
- [21] 陈梦,李伟,王雪,等. 药物类过敏反应发生机制及临床前评价方法研究进展 [J]. 中国新药杂志,2017,26(1): 51-59.
- [22] 舒军,文书奎,周国民. 87 例中药制剂的不良反应报告分析[J]. 中国药业,2012,21(13):64-66.
- [23] 殷秀兰. 中药制剂不良反应报告分析及对策 [J]. 世界最新医学信息文摘,2016,16(84):216.
- [24] 李伟,武璐璐,姜华,等. 中药注射剂过敏及类过敏反应体外评价方法的初步建立 [J]. 世界中西医结合杂志,2016,11(3):416-419.
- [25] 易艳,李春英,张宇实,等. 3 种中药注射剂类过敏反应评价及其机制探讨 [J]. 中国中药杂志,2015,40(14): 2711-2716.
- [26] 赵玉斌,肖颖,谢雁鸣. 清开灵注射液过敏患者血清免疫球蛋白及细胞因子变化规律的临床研究[J]. 中国中药杂志,2011,36(10):1382-1385.
- [27] 胡永良,朱建华,竞花兰. 中药致过敏性休克死亡血清 TNF- α 的检测价值 [J]. 中华全科医学,2009,7(10): 1118-1119.
- [28] CHE D, CAO J, LIU R, et al. Harpagoside-induced anaphylactic reaction in an IgE-independent manner both in vitro and in vivo [J]. Immunopharmacol Immunotoxicol, 2018, 40(2): 173-178.
- [29] 陈玉琼,龚节合,李川海. 等. 妇女儿童中药过敏及类过敏反应问题分析[J]. 中国药业,2014,23(7):54-55.
- [30] BEUTLER B, WAGNER H. Toll-like receptor family members and their ligands[M]. Springer, 2002.