

注射用促肝细胞生长素中组胺类物质检查和 降压物质检查的比较研究^{*}

吴贤生 黄甘泉 杨嘉俊 王凤姬 严家荣 钟志勇 邝少松

(广东省医学实验动物中心 佛山 528248)

摘要:目的 探讨注射用促肝细胞生长素安全性检查中,以组胺类物质检查法替代降压物质检查法的可能性。

方法 按照《中国药典》2015 年版中降压物质检查和组胺类物质检查方法的规定,分别对 3 批注射用促肝细胞生长素进行降压物质检查和组胺类物质检查,比较两种检查方法结果的异同。**结果** 1.根据药典相关判定标准,3 批注射用促肝细胞生长素降压物质检查和组胺类物质检查结果一致,均符合规定。2. 降压物质检查中 3 批注射用促肝细胞生长素均引起猫血压明显下降,结果呈阳性;3 批供试品均未引起豚鼠离体回肠收缩,结果呈阴性。**结论** 注射用促肝细胞生长素在组胺类物质含量符合要求时也可能引起动物血压明显下降,体外实验结果不能简单扩推至体内实验。

关键词:注射用促肝细胞生长素;降压物质检查;组胺类物质检查

中图分类号: R-33 **文献标识码:** A **文章编号:** 1006-6179(2019)02-0063-06

DOI: 10.3969/j.issn.1006-6179.2019.02.012

促肝细胞生长素 (hepatocyte growth-promoting factors, HPGF) 是从新鲜乳猪健康肝脏中提取的多肽和核苷酸制品,具有促进肝脏细胞分裂生长,加速损伤肝脏的修复的作用^[1-2]。HPGF 在临床上广泛用于治疗肝炎、肺纤维化和心、肾血管疾病^[3],同时相关不良反应报道也日益增多^[4-5]。低血糖是促肝细胞生长素的常见临床不良反应,并常伴随血压下降、出冷汗、恶心呕吐、心慌、意识改变、四肢冰冷和烦躁等症状^[5]。

组胺、缓激肽一类的物质因具有血管扩张作用,在注入机体后易引起血压快速下降。来自动、植物、微生物发酵提取物及生产过程中有可能混入组胺类或类组胺类物质的原料和注射剂(静脉)应建立降压物质检查项,如抗生素、中药注射剂、氨基酸和多肽类^[6]。近 3 版《中国药典》(2005 年版、2010 年版和 2015 年版)中降压物质检查方法均是通过比较药物和标准品引起动物血压变化的大小进行判定降压物质是否合格,所选用实验对象为猫。然而当前我国未建立实验猫的繁殖、培育和检验相关标准,用于降压物质检查的家猫均为非标准化实验动物,其个

体差异不可控制,健康状况无法保证,同时因这些家猫常常携带寄生虫和微生物,对实验结果以及实验人员的安全均产生威胁和影响^[7-9]。《中国药典》2015 年版正式将组胺类物质检查法(豚鼠离体回肠法)收录为通则之一,作为降压物质检查法的补充和替代方法^[10]。推广组胺类物质检查法替代现有的降压物质检查法,必将大量减少猫在降压物质检查中的应用。

现代药物生产工艺的改进以及对相关物质的控制,使得我们难以获得明显引起机体血压下降的药品,以阴性样品进行探讨检查方法,会增大假阳性的可能;采用加标方法进行检查,会增大假阴性的可能。我中心在进行药物安全性检查时,偶然发现 3 个批次引起动物血压明显下降但仍满足《中国药典》中关于降压物质检查要求的注射用促肝细胞生长素。注射用促肝细胞生长素的降压物质检查标准已经制定,而组胺类物质检查标准未见报道。本实验旨在通过比较这些批次的注射用促肝细胞生长素组胺类物质检查法和降压物质检查法结果的异同,探讨在注射用促肝细胞

收稿日期:2018-08-05

^{*} 基金项目:广东省医学自然科学基金青年项目 (No.B2018279)

作者简介:吴贤生 (1987—),男,硕士研究生,实验师,研究方向:药效学、药理学.E-mail:wuxs_87@163.com

生长素安全性检查中,以组胺类物质检查法替代降压物质检查法的可能性。

1 材料与方法

1.1 实验动物

普通级豚鼠,体质量 250~350 g,购于广东省医学实验动物中心,实验动物生产许可证号:SCXK(粤):2013-0002。家猫,购买于广东省佛山市南海区黄岐周边农村。

1.2 药品与试剂

注射用促肝细胞生长素,批号:16010101、16010301、16010501;磷酸组织胺,中国药品生物制品检定所;戊巴比妥钠,德国默克公司;肝素钠,广东晶欣生物科技有限公司;盐酸赛拉嗪注射液,吉林省方正动物药业科技有限责任公司;氯化钠、氯化钾、磷酸氢二钠,广州市中南化学试剂有限公司;碳酸氢钠,天津市大茂化学试剂厂;氯化钙,广州化学试剂二厂;氯化镁(含 6 个结晶水)、葡萄糖(含 1 个结晶水),天津市福晨化学试剂厂;硫酸阿托品注射液,吉林省华牧动物保健有限公司;灭菌注射用水,四川科伦药业股份有限公司;0.9%氯化钠注射液,贵州天地药业有限公司;去离子水,由广东省医学实验动物中心生产;氧气和二氧化碳混合气体($O_2:CO_2=95:5$),广州珠江气体有限公司产品。

1.3 仪器

BL-420F/S 生理机能仪,成都泰盟科技有限公司;恒温 HW-400E 恒温平滑肌槽,成都泰盟科技有限公司。

1.4 方法

1.4.1 降压物质检查法:参照《中国药典》2015 年版. 四部. 通则 1145 降压物质检查法进行。动物对降压物质灵敏度检查符合要求后,取对照品溶液(d_s)按 0.10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 体质量剂量,供试品溶液(d_T)按 2 mg/kg 体质量剂量注射,照下列次序注射一组 4 个剂量: d_{s1} 、 d_{T1} 、 d_{T2} 、 d_{s2} ,然后以 d_{s1} 与 d_{T2} 、 d_{T1} 与 d_{s2} 剂量所致的反应分别比较,依照《中国药典》2015 年版中判定标准对受试样品降压物质检查结果进行判定。

1.4.2 组胺类物质检查:参照《中国药典》2015 年版. 四部. 通则 1146 组胺类物质检查法进行。

(1)组胺类物质检查中对照品高低浓度确定:

按照对照品浴槽终浓度从小到大的次序,将对照品依次加入浴槽(浴槽体积为 20 mL),注射量均为 0.2 mL。根据豚鼠离体回肠的收缩反应,选择其中能引起豚鼠离体回肠收缩的 2 个剂量设定为高、低剂量,低剂量能引起豚鼠离体回肠明显收缩,高剂量不致使回肠收缩达到极限,且高低剂量所致回肠的收缩有明显差别,高低剂量比为 1:0.5 左右,高、低剂量分别标示为 d_{s2} 和 d_{s1} 。

(2)组胺类物质检查理论限值确定:根据中国药典委员会发布《注射剂安全性检查法应用指导原则》,组胺类物质检查原则上与降压物质检查限值一致。根据国家药品标准 WS1-10001-(HD-0828)-2002 规定^[11],注射用促肝细胞生长素降压物质检查注射剂量为 2 mg/kg,对应组胺标准品剂量为 0.10 $\mu\text{g}/\text{kg}$,则 $d_T=20\,000\,d_s$ 。

(3)组胺类物质检查和判定:照下列次序准确注入浴槽 6 个剂量: d_{s2} 、 d_{s1} 、 d_T 、 d_T 、 d_{s1} 、 d_{s2} ,如 d_{s2} 所致的反应值大于 d_{s1} 所致的反应值并且可重复时判定试验有效。

(4)干扰实验:按照限值剂量在注射用促肝细胞生长素溶液中加入组胺对照品高、低剂量,并按下列次序准确注入 d_{s2} 、 d_{s1+T} 、 d_{s2+T} 、 d_{s1} ,重复一次,研究注射用促肝细胞生长素对回肠收缩的干扰。

(5)注射用促肝细胞生长素组胺类物质检查灵敏度实验:分别将 0.2、0.5、1、2、5、10 mg/mL 的注射用促肝细胞生长素溶液注入浴槽,注射体积均为 0.2 mL,研究不同浓度剂量下豚鼠离体回肠的收缩情况。

2 结果

2.1 降压物质检查结果

以 2 mg/kg 的注射剂量将促肝细胞生长素注入猫体内后,均引起了猫血压的下降,下降幅度约为对照品的 50%。3 个批次药品的降压物质检查结果如表 1 所列,并选择其中 1 个批次药品降压物质检查过程中猫血压的变化情况进行绘图,见图 1。3 批注射用促肝细胞生长素在降压物质检查中,药品引起的猫血压下降值均小于相应对照品引起的血压下降值,根据《中国药典》2015 年版相关标准,可判定 3 批注射用促肝细胞生长素降压物质检查均合格。

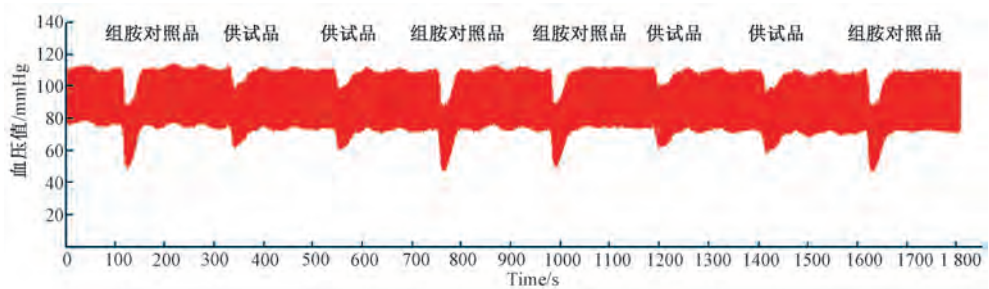


图 1 注射用促肝细胞生长素(批号:16010101)组胺类物质检查试验结果

Fig.1 Result of depressor substance test of hepatocyte growth-promoting factors for injection (Lot No. 16010101)

表 1 3 批注射用促肝细胞生长素降压物质检查结果

Table 1 Result of depressor substance test of hepatocyte growth-promoting factors for injection.

药品批号	轮次	组胺			注射用促肝细胞生长素		
		剂量	d_{s1}	d_{s2}	剂量	d_{T1}	d_{T2}
		$/(\mu\text{g}/\text{kg})$	$/\text{kPa}$	$/\text{kPa}$	$/(\text{mg}/\text{kg})$	$/\text{kPa}$	$/\text{kPa}$
16010101	第 1 轮	0.1	3.26	3.07	2	1.53	1.72
	第 2 轮	0.1	3.18	2.90	2	1.60	1.95
16010301	第 1 轮	0.1	4.41	5.08	2	2.00	2.84
	第 2 轮	0.1	5.31	4.24	2	2.34	1.68
16010501	第 1 轮	0.1	3.60	4.63	2	2.48	3.10
	第 2 轮	0.1	4.43	5.70	2	2.68	3.26

2.2 组胺类物质检查结果

(1)不同浓度组胺对回肠收缩的影响:往离体浴槽中分别依次加入不同剂量的组胺溶液,观察并记录豚鼠离体回肠收缩情况。不同剂量组胺引起豚鼠回肠张力变化结果如表 2,并将这一过程豚鼠离体回肠张力变化情况进行绘图见图 2。随后选择浴槽组胺终浓度 0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 为低剂量对照(d_{s1}),0.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 为高剂量对照(d_{s2}),进行 2 轮注射验证,高低剂量差别明显且重复性好(表 2、图 2),故在后期组胺类物质检查中选择这两个剂量作为高、低剂量。

表 2 不同浓度组胺对豚鼠离体回肠收缩张力影响

Table 2 Contractility of isolated ileum that caused by histamine of different concentration

组胺浓度 $/(\mu\text{g}/\text{mL})$	注射体积 $/(\text{mL})$	组胺终浓度 $/(\mu\text{g}/\text{mL})$	回肠收缩力 $/\text{g}$
0.5	0.2	0.005	3.25
1.0	0.2	0.01	4.12
2.0	0.2	0.02	6.54
3.0	0.2	0.03	8.43
4.0	0.2	0.04	8.89
5.0	0.2	0.05	9.20
1.0	0.2	0.01	3.98
2.0	0.2	0.02	6.72
1.0	0.2	0.01	4.17
2.0	0.2	0.02	6.68

(2)注射用肝细胞生长素组胺类物质检查限值计算:降压物质检查中,组胺对照品注射剂量为 0.1 $\mu\text{g}/\text{kg}$,对应促肝细胞生长素注射剂量为 2 mg/kg 。组胺类物质检查原则上与降压物质检查限值一致,则组胺类物质限值 $d_T=20\,000\,d_s$,选定 d_{s1} 浴槽终浓度为 0.01 $\mu\text{g}/\text{mL}$,则 $d_T=0.2\,\text{mg}/\text{mL}$,注射用肝细胞生长素溶液浓度为 20 mg/mL 。

(3)组胺类物质检查:组胺类物质检查中, d_{s2} 引起回肠收缩明显大于 d_{s1} ,且可重复,结果成立。3 个批次药品的组胺列物质检查结果如表 3 所列,选择其中 1 个批次的检查结果绘制豚鼠离体回肠张力变化图,见图 3。注射注射用促肝细胞生长素溶液后,豚鼠回肠未见收缩,需按照限值剂量在供试品溶液中加入组胺对照品高、低剂量进行干扰实验。

表 3 注射用促肝细胞生长素组胺类物质检查结果

Table 3 Result of histamine-like substance test of hepatocyte growth-promoting factors for injection

药品批号	离体回肠收缩力/ g					
	d_{s2}	d_{s1}	d_T	d_T	d_{s1}	d_{s2}
16010101	3.87	2.45	0	0	2.36	4.02
16010301	4.12	2.65	0	0	2.54	4.07
16010501	4.20	2.41	0	0	2.66	3.97

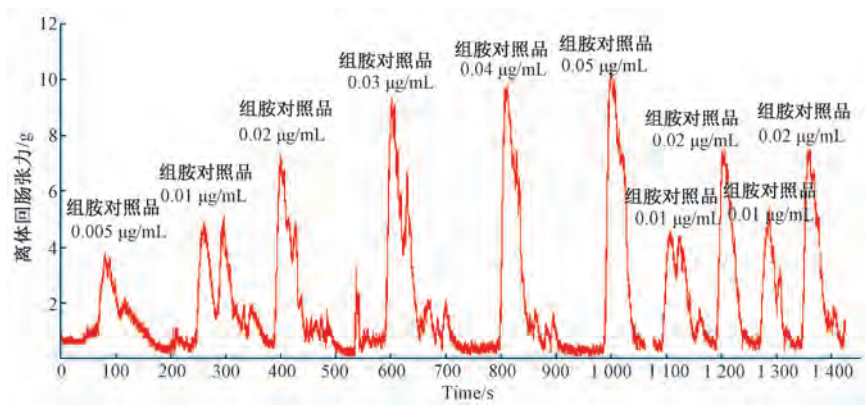


图 2 不同浓度的组胺对照品对豚鼠离体回肠收缩张力的影响

Fig.2 Contractility of isolated ileum that caused by histamine of different concentration

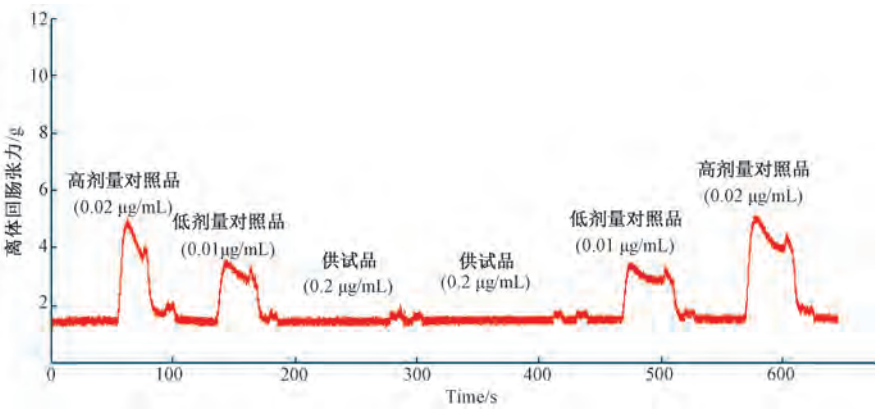


图 3 注射用促肝细胞生长素(批号:16030101)组胺类物质检查结果

Fig.3 Result of histamine-like substance test of hepatocyte growth-promoting factors for injection (Lot No. 16010101)

(4) 干扰实验结果:依次注入 d_{S2} 、 d_{S1+T} 、 d_{S2+T} 、 d_{S1} ,重复一次,各批次检查结果如表 4 所列,选择其中 1 个批次的检查结果绘制豚鼠离体回肠张力变化图,见图 4。注射用促肝细胞生长素-组胺溶液产生的收缩与对应组胺对照品高、低剂量的收缩基本一致,可排除注射用促肝细胞生长素-组胺溶液对离体回肠的干扰。根据《中国药典》2015 年版相关判定标准,可认为注射用促肝细胞生长素组胺类物质检查合格。

表 4 注射用促肝细胞生长素组胺类物质检查干扰实验结果
Table 4 Result of interference experiment for histamine-like substance test of hepatocyte growth-promoting factors for injection

药品批号	离体回肠收缩力/g							
	d_{S2}	d_{S1+T}	d_{S2+T}	d_{S1}	d_{S2}	d_{S1+T}	d_{S2+T}	d_{S1}
16010101	5.21	3.54	5.12	3.61	5.27	3.88	5.42	3.73
16010301	4.89	3.46	4.93	3.58	4.76	3.42	4.85	3.37
16010501	4.27	3.05	4.35	2.99	4.30	2.96	4.28	2.99

2.3 注射用促肝细胞生长素降压物质检查与组胺类物质检查结果比较

依照《中国药典》2015 年版中的检查方法和判定标准,3 批注射用促肝细胞生长素降压物质检查和组胺类物质检查结果均为符合规定。但从实验过程中我们发现,在降压物质检查中供试品引起了猫血压的明显下降。以供试品引起猫血压下降的均值/对照品引起猫血压下降均值,计算二者引起猫血压变化的比例,则 3 批供试品所致猫血压下降分别是对照品的 54.8%、46.5% 和 62.7%。而在组胺类物质检查过程中,供试品并未引起豚鼠离体回肠的收缩,也未对回肠对组胺的灵敏度产生干扰,根据检查法中判定标准虽可判定组胺类物质检查合格,但与降压物质检查结果相比较,组胺类物质检查结果未能较好地反应出供试品对动物血压带来的影响。

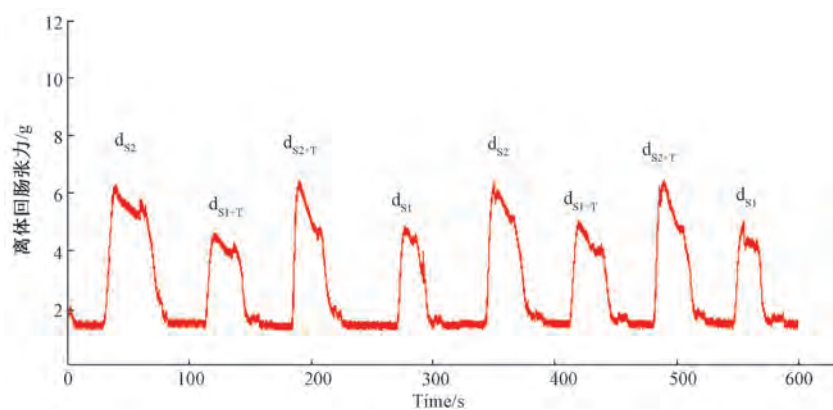


图 4 注射用促肝细胞生长素(批号:16010101)组胺类物质检查干扰实验结果

注: d_{S2} 浓度:0.02 $\mu\text{g/mL}$; d_{S1} 浓度:0.01 $\mu\text{g/mL}$; d_T 浓度:0.2 mg/mL (浴槽浓度)

Fig.4 Result of interference experiment for histamine-like substance test of hepatocyte growth-promoting factors for injection (Lot No. 16010101)

Note: d_{S2} : 0.02 $\mu\text{g/mL}$; d_{S1} : 0.01 $\mu\text{g/mL}$ and d_T : 0.2 mg/mL (final concentration)

3 讨论

组胺类物质检查法作为降压物质检查法的补充和替代,被《中国药典》2015 年版正式收录。推广组胺类物质检查法将有利于规范和减少非标准化猫的使用,符合动物伦理和 3R 原则,同时也可使实验质量得到保障。但目前已经建立起组胺类物质检查方法的药品品种甚少,组胺类物质检查标准的建立,尤其是限值剂量的设定仍需大量工作推进。

在本次实验中,对降压物质检查和组胺类物质检查结果进行比较后我们发现在降压物质检查中呈阳性结果(引起猫血压明显下降)的 3 批注射用促肝细胞生长素组胺类物质检查结果均呈阴性。此结果提示 3 批供试品中所含组胺的量均低于限值,则在整体水平上的降压物质检查过程中,是什么物质导致了猫血压的下降?同样的情况在中药注射剂检查中也有出现^[12]。我们推测可能是药物注入猫体内后,引起了内源性的组胺类物质释放,从而导致猫血压下降。而内源性组胺类物质如何定位和检测,仍需进一步研究。

本实验中,降压物质检查和组胺类物质检查结果的差异提示组胺类物质检查合格时,仍可能会有降压物质检查不满足规定的情况出现,所以体外实验的结果不能简单地推广到体内实验。同时反推回来,在组胺类物质检查方法学研究过程中,应用降压物质检查结果阴性的供试品进行组胺类物质检查的

方法学研究,可能会增大假阳性结论的可能性。在未能充分验证注射剂组胺类物质检查结果的有效性以及和降压物质检查结果的一致性时,不能简单地以组胺类物质检查来代表降压物质检查结果。

参考文献

- [1] Wang N, Tong G, Yang J, *et al.* Effect of hepatocyte growth-promoting factors on myocardial ischemia during exercise in patients with severe coronary artery disease [J]. *Int Heart J*, 2009, **50**(3): 291-299.
- [2] 朱雪荣. 促肝细胞生长素研究进展与临床应用[J]. *中国医院用药评价与分析*, 2007, **7**(6): 415-417.
- [3] Yuan Q Y, Zhu Z W, Wang Z, *et al.* A novel method of augmenting gene expression and angiogenesis in the normal and ischemic canine myocardium[J]. *Heart Vessels*, 2012, **27**(3): 316-326.
- [4] 雷招宝. 促肝细胞生长素的不良反应与合理用药[J]. *药物流行病学杂志*, 2010, **19**(2): 104-106.
- [5] 邢渊, 宋成功. 促肝细胞生长素不良反应回归性分析[J]. *中国药物应用与监测*, 2013, **10**(5): 276-277.
- [6] 国家药典委员会. 国家药品标准工作手册[M]. 第四版. 北京:中国科技出版社, 2013.
- [7] 周立, 吕茂利, 吕文涛. 饲养犬、猫导致人兽共患寄生虫病的防治[J]. *中国伤残医学*, 2012, **209**(7): 144, 147.
- [8] 范卫, 潘世友, 张忠海, 等. 浦东地区犬猫体表寄生虫病流行病学调查[J]. *上海畜牧兽医通讯*, 2016, (1): 56-57.
- [9] Ringler D H. 不同来源狗和猫的呼吸道传染病[J]. *实验动物科学*, 1987, **4**(1): 14-16.
- [10] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典[M]. 四部. 北京:中国医药科技出版社, 2015: 158-159.

[11] WS1-10001-(HD-0828)-2002, 注射用促肝细胞生长素[S].

与类过敏反应的相关性研究[J]. 药物分析杂志, 2015, 35

[12] 潘卫松, 刘肃, 符路娣, 等. 中药注射剂降压物质检查结果

(8): 1346-1353.

Comparison of Test Method for Histamine-like Substance and Depressor Substance in Hepatocyte Growth-promoting Factors for Injection

WU Xiansheng, HUANG Ganquan, YANG Jiajun, WANG Fengji, YAN Jiarong,
ZHONG Zhiyong, KUANG Shaosong

(Guangdong Medical Laboratory Animal Center, Foshan 528248, China)

Abstract: Objective To study the feasibility of histamine-like substance test in hepatocyte growth-promoting factors for injection safety. **Method** Histamine-like substance and depressor substance in three batches of hepatocyte growth-promoting factors was test according to the test method in the appendix of Chinese Pharmacopoeia (edition 2015) and the result of the tests were compared. **Result** The test result of histamine-like substance test in all three batches of hepatocyte growth-promoting factors were consistent with the test result of depressor substance test and met the requirement of Chinese Pharmacopoeia. While positive result were observed in depressor substance test, but negative result observed in histamine-like substance test. **Conclusion** Hepatocyte growth-promoting factors for injection may cause drop of blood pressure without histamine-like substance, and *in vivo* experiments cannot be extrapolate simply by the result of *in vitro* experiments.

Key words: Hepatocyte growth-promoting factors for injection; depressor substance test; histamine-like substance test