



不同来源生脉注射液体外细胞毒性的比较及原因分析

刘倩, 秦媛媛, 张媛, 汪祺, 郑笑为, 陈晨, 贺庆, 高华*

(中国食品药品检定研究院, 北京 100050)

[摘要] 目的:比较不同来源生脉注射液体外细胞毒性的差别,寻找造成差别的主要原因。方法:将不同来源生脉注射液原液以及不同浓度的稀释液分别与 L929 细胞接触培养,通过倒置相差显微镜观察其形态,采用四甲基偶氮唑盐比色法(MTT法)量化细胞毒性,计算相对增殖率,并进行细胞毒性评价。结果:8个厂家生产的生脉注射液原液的细胞毒性分级均为4级,为重度毒性。样品A的 EC_{50} 最高,说明其细胞毒性较其他样品高。在生脉注射液所添加的辅料中,当聚氧乙烯脱水山梨醇单油酸酯(吐温80)浓度为处方量的0.5%时,其细胞毒性分级为3~4级。将吐温80稀释至0.0625%时,其细胞毒性分级为1级,基本无细胞毒性。8个厂家生产的生脉注射液原液中吐温80的含量不一致,有些厂家的含量大于0.5%。结论:不同厂家生产的生脉注射液由于原料产地、生产条件不同等原因,其细胞毒性存在较大的差别。吐温80作为中药注射剂的辅料,在高于0.0625%的浓度下存在细胞毒性。生脉注射液中吐温80的含量与细胞毒性可能呈一定的正相关性。

[关键词] 生脉注射液;细胞毒性;MTT比色法

生脉注射液的处方源自古方“生脉散”,由红参、麦冬、五味子3味药组成,制剂生药含量为 $0.568\text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。现行生脉注射液质量标准收载于《卫生部部颁标准中药成方制剂》第15册(中药保护品种分册)(WS3-B-2865-98)。生脉注射液在近期临床使用广泛且用量较大,具有扩张血管、增加冠状动脉流量、强心、升高血压、抗休克、对化疗药物有增效及减毒等作用,广泛应用于心血管、内分泌等系统疾病^[1-2]。全国共有8家企业生产,分别为上海和黄药业有限公司、四川大华西药业股份有限公司、常熟雷允上制药有限公司、雅安三九药业有限公司、江苏苏中药业集团股份有限公司、山西太行药业股份有限公司、四川省宜宾五粮液集团宜宾制药有限公司、吉林省集安益盛药业股份有限公司。目前,常用中药材受产地和环境的影响,造成中药材的质量不够稳定。此外,不同来源的生脉注射液中添加的辅料主要为吐温80,辅料也可能导致不同产品之间的安全性存在差异。

细胞毒性试验是利用体外细胞培养方法来评价

药品成分中潜在的细胞毒性^[3]。细胞毒性试验是生物安全评价体系中中药的检测指标之一。为评价生脉注射液的产品质量状况,本研究参照国家标准,对不同来源的生脉注射液的体外细胞毒性进行比较研究,为遴选优质药品、保障用药安全提供科学的证据。同时对影响生脉注射液细胞毒性的因素进行了深入探讨。

1 材料

1.1 仪器 CO_2 培养箱(MCO-15AC, SANYO);倒置显微镜(CX41-32C02, OLYMPUS);酶标仪(PLUS386, MD公司);Waters 2695高液相色谱仪;ALLtech ELSD 2000检测器;Mettler XS105电子天平。

1.2 供试药物 生脉注射液,淡黄色或淡红棕色的澄明液体,共8个厂家,22批样品(表1)。L929细胞购自美国模式培养寄存库。改良型RPMI-1640培养基(批号NVL0340)和胎牛血清(批号11257L46)购自Hyclone公司,二甲基亚砜(DMSO,批号D2650)和0.25%胰酶-EDTA(批号T4049)购自Sigma公司,MTT(批号0793)购自Amresco公司。聚氧乙烯脱水山梨醇单油酸酯(吐温80)由厂家A, B, D分别各提供1批。吐温80对照品(南京威尔化工有限公司,纯度76.9%);色谱纯乙腈(德国默克公司);Millie-Q超纯水,分析纯乙酸铵。

[稿件编号] 20111109003

[通信作者] *高华, Tel: (010) 67095231, E-mail: huag55@163.com

[作者简介] 刘倩, Tel: (010) 67095381, E-mail: qian_liu82128@hotmail.com



表1 不同来源生脉注射液

Table 1 Different Shengmai Injections produced by different factories

产地	规格/mL/支	批号
A	5	11031805, 11010909
	10	10081003
B	10	100522, 101214, 101207
C	10	10081901, 10102004, 10081901
D	10	101207, 110108, 110206, 10090636
E	10	10080311, 10082412, 100914
F	10	100606, 100614
	20	1010211
G	20	1010221, 100601
	50	1101301
H	5	11031805

2 方法

2.1 MTT 比色法^[3] L929 细胞消化后调整细胞浓度为 1×10^4 个/mL, 均匀接种到 96 孔板内, 每孔 100 μ L。24 h 后, 吸弃培养液, 加入各组浸提液 100 μ L, 继续培养 72 h。倒置显微镜下观察细胞形态。细胞形态正常, 贴壁生长良好, 细胞胞浆内有离散颗粒, 无细胞溶解, 为无毒性。至多 20% 的细胞呈圆形, 疏松贴壁, 无胞浆内颗粒; 偶见细胞溶解, 为极轻毒性; 至多 20% 的细胞呈圆形, 无胞浆内颗粒; 明显可见细胞溶解和细胞间空区, 为轻微毒性; 至多 20% 细胞呈圆形或溶解, 为中度毒性; 细胞层几乎完全破坏, 为重度毒性。然后每孔加入 $5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 MTT 20 μ L, 继续培养 4 h 后弃去孔内液体, 加入 DMSO 150 μ L, 置振荡器振荡 10 min, 酶标仪 570, 630 nm 波长下测定吸光度(A)。

2.2 样品稀释及培养 将各样品液按原液, 1:1, 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32 稀释, 空白对照为细胞培养液。吐温 80 等辅料按其在处方中的比例用细胞培养液配制。将上述样品液及对照液加入细胞密度为 1×10^4 个/mL 的 96 孔板内, 每孔 100 μ L。然后按 2.1 MTT 方法进行, 测定 A。计算细胞相对增殖率并对细胞毒性进行评价。

2.3 细胞相对增殖率 (relative growth rate, RGR) 计算及细胞毒性评价 $RGR = A_{\text{试验组}} / A_{\text{空白对照组}} \times 100\%$ 。细胞毒性评价标准参考 GB/T14233. 2-2005 细胞毒性试验^[4]。依据 RGR 将细胞毒性反应分级如下: 0 级为 $RGR \geq 100\%$; 1 级为 $80\% \sim 99\%$, 极轻度毒性; 2 级为 $50\% \sim 79\%$, 轻微毒性; 3 级为

$30\% \sim 49\%$, 中度毒性; 4 级为 $0\% \sim 29\%$, 重度毒性。使用 SAS 统计软件中的 probit 模型, 根据各药物浓度对应的 RGR, 求出生脉注射液对 L-929 细胞的半数抑制浓度 EC_{50} 。

2.4 吐温 80 含量测定 色谱条件如下, 色谱柱 TSK_{ge}L G2000SWXL (7.8 mm \times 30 cm, 5 μ m); 流动相 $0.02 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 乙酸铵-乙腈 90:10, 流速 $0.6 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$; 柱温 $30 \text{ }^\circ\text{C}$, ELSD 检测条件为漂移管温度 $110 \text{ }^\circ\text{C}$, 氮气流速 $2.3 \text{ L} \cdot \text{min}^{-1}$ 。吐温 80 对照品溶液的制备: 精密称取吐温 80 对照品 1.012 g, 置 50 mL 量瓶中, 加水溶解并定容至刻度, 作为对照品溶液。取生脉注射液为供试品溶液。测定法: 取供试品溶液 2 μ L、对照品溶液 2, 4, 6, 8, 10 μ L, 分别进样, 以进样量对数值为横坐标, 峰面积对数值为纵坐标, 绘制校正曲线和线性方程, 求得含量。

2.5 统计处理 试验中所有结果用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 通过 SAS 软件进行统计学处理。

3 结果

3.1 不同来源生脉注射液对细胞相对增殖率的影响 不同来源生脉注射液原液的体外细胞相对增殖率结果见图 1。8 个厂家生产的生脉注射液原液的细胞毒性分级均为 4 级。但其中来自厂家 C 的 3 批样品的细胞相对增殖率较其他样品低, 而来自厂家 B, F, H 的样品其细胞相对增殖率较其他样品高。说明不同厂家生产的生脉注射液由于生产条件不同、处方不同等原因, 这些产品的细胞毒性存在有一定的差别, 但之间无显著性差异。

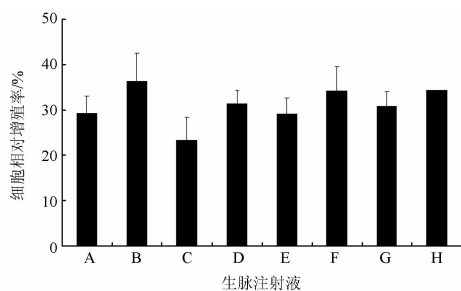


图1 不同来源生脉注射液对细胞相对增殖率的影响

Fig. 1 The effect of different Shengmai injections on cytotoxicity *in vitro*

3.2 不同来源生脉注射液的体外细胞毒性反应 以细胞相对增殖率 (RGR) 超过 80% (1 级反应) 作为无细胞毒性指标, 各样品无细胞毒性的反应浓度



和样品稀释倍数见表2。生脉注射液A的样品稀释倍数较其他样品高, EC_{50} 生药量为 $0.103 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 显示其有较强的细胞毒性, 与其他厂家有显著性差异; 而生脉注射液G的样品稀释倍数较其他样品低, EC_{50} 为 $0.405 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 说明其细胞毒性较其他样品低。

表2 不同来源生脉注射液的毒性反应

Table 2 *In vitro* cytotoxicity of different Shengmai injections produced by different factories

生脉注射液	样品稀释倍数	$EC_{50}/\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$
A	26.7	0.103
B	16.0	0.145
C	8.0	0.244
D	16.0	0.159
E	8.0	0.201
F	10.7	0.296
G	4.0	0.405
H	16.0	0.282

3.3 生脉注射液中辅料对细胞相对增殖率的影响

吐温80是一个亲水性的表面活性剂, 具有很强的破裂细胞膜的作用而引起刺激性、溶血性和致敏性。因此考察了吐温80的细胞毒性。按照处方, 吐温80在生脉注射液中的浓度应为0.5%。将来自3个厂家的不同产地的吐温80用细胞培养基配制成0.5%的浓度, 灭菌处理后, 用细胞培养基分别进行1:1, 1:2, 1:4倍稀释, 所得吐温80浓度分别为0.25%, 0.125%, 0.0625%。观察不同浓度的吐温80对细胞相对增殖率的影响。吐温80的浓度为0.5%时, 厂家A的细胞毒性分级为4级(28.2%), 厂家B和D的细胞毒性均为3级(31.1%和30.1%), 细胞毒性都很大, 见图2。将吐温80稀释8倍时, 即吐温80浓度为0.0625%时, 3个厂家的细胞毒性分级均为1级, 基本无细胞毒性。上述结果表明, 吐温80作为增溶剂, 在大于0.0625%的浓度下其细胞毒性较大。将其作为辅料可能会增加制剂的细胞毒性。

3.4 生脉注射液中吐温80的含量 研究检测了来自这8个不同厂家19批的生脉注射液中吐温80的含量, 从图3中可见, 生脉注射液A的样品中吐温80的含量较其他样品高, 平均值为0.56%, 超过了中药注射液中规定的0.5%的限值。生脉注射液E, G的样品中吐温80的含量较其他样品低, 分别为

0.14%, 0.16%。

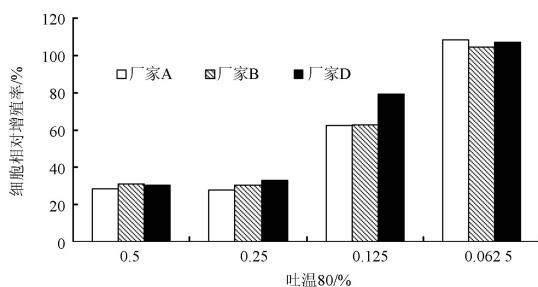


图2 吐温80对细胞相对增殖率的影响

Fig. 2 Effect of tween 80 on cytotoxicity *in vitro*

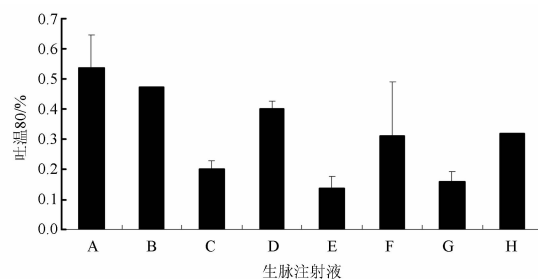


图3 不同厂家生脉注射液中吐温80的含量

Fig. 3 Content of tween 80 in different Shengmai injections produced by different factories

与表2不同来源生脉注射液的毒性反应相联系, 发现吐温80含量较高的厂家(如A)其产生I级细胞毒性反应的最小稀释倍数也大, 显示出较强的细胞毒性。而吐温80含量较低的厂家(如G)其产生I级细胞毒性反应的最小稀释倍数也小, 显示出较弱的细胞毒性由图4可见, 生脉注射液中吐温80的含量与细胞毒性可能呈一定的正相关性。

4 讨论

生脉注射液在临床上广泛使用且用量较大, 国内有多家生产单位。生脉注射液主要是由红参、麦冬、五味子组成的中成药。其中红参为人参的一种, 有效成分为人参皂苷, 具有强心、调整血压、改善循环、促进代谢和蛋白质合成等功效。麦冬有效成分为麦冬皂苷, 具有改善心肌收缩力及心脏泵功能、保护心肌、抗心律失常、耐缺氧、降血糖和抗菌等功效。五味子有效成分为五味子素, 具有增强肝脏解毒功能、促进肝脏蛋白质和糖原的生物合成等功效。生脉注射液的功效正是由这3种药物相互作用、相互协调而共同体现出来的, 而它产生的不良反应也是

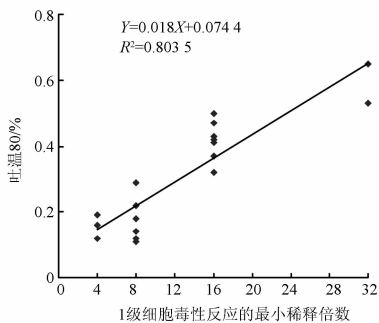


图4 不同厂家生脉注射液中吐温80含量与I级细胞毒性反应的最小稀释倍数的相关性

Fig. 4 The correlation of the content of tween 80 and the minimum dilution of class I cytotoxicity in different Shengmai injections produced by different factories

多方面因素的综合体现。生脉注射液已被临床广泛应用,并取得一定的疗效,但在临床应用中引起的不良反应也较多,如过敏性皮疹、丘疹、呼吸困难、上呼吸道感染、发热、发绀等^[5],过敏体质者慎用。因生脉注射液由多种中药成分组成,存在中药类注射液常见的缺点,如何在临床安全应用需要进行更深入的研究。

通过对不同厂家的生脉注射液的体外细胞毒性进行研究,结果表明不同厂家生产的生脉注射液由于原料产地不同、生产条件不同等原因,这些产品的细胞毒性存在较大的差别。8个厂家的样品原液的细胞相对增殖率均较低,细胞毒性分级均为4级。但样品A的无细胞毒性反应的稀释倍数最高,且 EC_{50} 也相对较高,说明其无细胞毒性反应的浓度最低,表明样品A的细胞毒性最大。

影响中药注射剂安全性的因素很多,考察来自8个厂家的生脉注射液的渗透压、pH、热原反应、溶血、异常毒性等安全性指标,均符合其质量标准,未发现与生脉注射液的细胞毒性之间有相关性。吐温

80是一个亲水性的表面活性剂,为提高注射剂的澄清度和稳定性,防止储存或使用中出现浑浊,常使用吐温80作为增溶剂。但近年来临床上含吐温80的注射液多有不良反应发生,如依托泊苷注射液、多西紫杉醇注射液和鱼腥草注射液等事件,许多研究指出吐温80是引起不良反应的主要原因之一^[5]。同时文献报道,吐温80也具有强烈的破裂细胞膜的作用而引起刺激性、溶血性和致敏性,在静脉使用时用降压和轻微的溶血作用。故而对来自3个厂家的吐温80也进行了细胞毒性的考察,发现来自厂家A的吐温80其细胞毒性大于其他厂家,提示这可能是厂家A的生脉注射液细胞毒性大于其他厂家的原因之一^[6-7]。发现吐温80含量较高的厂家(如A)其产生I级细胞毒性反应的最小稀释倍数也大,显示出较强的细胞毒性。而吐温80含量较低的厂家(如G)其产生I级细胞毒性反应的最小稀释倍数也小,显示出较弱的细胞毒性,生脉注射液中吐温80的含量与细胞毒性可能呈一定的正相关性。

[参考文献]

- [1] 徐淑华,刘生友. 生脉注射液的药理作用研究进展[J]. 中国药事, 2010, 24(4): 405.
- [2] 王利华,张遥. 生脉注射液临床应用进展[J]. 华北国防医药, 2010, 22(3): 233.
- [3] 王蓉蓉,李文莉,田洪,等. 不同来源灯盏花素注射液体外细胞毒性比较研究[J]. 药物分析杂志, 2010, 30(11): 2173.
- [4] 季永乔. 50例生脉注射液不良反应分析[J]. 现代中西医结合杂志, 2007, 16(27): 4025.
- [5] 刘婷,赵雍,曹春雨,等. 鱼腥草注射液致类过敏反应的物质及其作用机制研究[J]. 中国中药杂志, 2010, 35(12): 1603.
- [6] 冯文字,肖顺汉,刘明华,等. 含吐温80中药注射剂对不同动物的过敏反应[J]. 泸州医学院学报, 2007, 30(2): 92.
- [7] 邹静,张青,唐冰,等. 紫外分光光度法测定吐温80对人红细胞和兔红细胞的溶血度[J]. 西南国防医药, 2004, 14(3): 255.



Comparison and analysis of *in vitro* cytotoxicity of different shengmai injections

LIU Qian, QIN Yuanyuan, ZHANG Yuan, WANG Qi, ZHENG Xiaowei, CHEN Chen, HE Qing, GAO Hua*
(National Institutes for Food and Drug Control, Beijing 100050, China)

[Abstract] **Objective:** To compare the cytotoxic response with respect to different Shengmai injections manufactured by different manufacturers and to find the main reasons that cause the differences. **Method:** L929 cells were cultured with various Shengmai injections which were incubated into serum-supplemented minimum essential medium at different doses. The cellular morphology was observed by phase contrast inverted microscopy and proliferation of the cells was examined using mitochondrial function methyl thiazolyl tetrazolium (MTT) assay. Relative growth rate (RGR) was calculated. Moreover, cytotoxicity was evaluated. **Result:** For Shengmai injections manufactured by 8 manufacturers, cytotoxicity was high, Class 4. The EC value of sample A was high than other samples. This result indicated that sample A is much more toxic than other samples. For the excipients of Shengmai injections, when the concentration of tween 80 is 0.5% of composition of drug products, cytotoxicity was classified as 3-4; while the concentration of tween 80 is 0.0625% of composition of drug products, the cellular toxicity was classified as 1 (no cellular toxic response). The content of tween 80 of shengmai injection is different during different factories; some of it is higher than 0.5%. **Conclusion:** Cytotoxic results of these various injections were significantly different because of different manufacturers of drug substance and manufacturing process. As an excipient of injection, it showed cytotoxicity when the concentration is higher than 0.0625%. The content of tween-80 and the degree of cytotoxicity in different Shengmai injections may have a positive correlation.

[Key words] Shengmai injection; Cytotoxic; methyl thiazolyl tetrazolium (MTT) assay

doi:10.4268/cjmm20120521

[责任编辑 陈玲]

《中国珍稀濒危药用植物资源调查》书讯

由黄璐琦、肖培根、王永炎主编的《中国珍稀濒危药用植物资源调查》近日由上海科学技术出版社出版发行。本书汇集了著者历经多年辛勤调查的第一手珍贵资料。其中总论主要介绍了中国药用植物资源现状及存在的问题,药用植物资源调查的相关内容和方法,药用植物保护现状、方法及存在的问题,受威胁及优先保护评价体系等方面的相关知识。各论根据对濒危药材、与维护生态平衡紧密相关的药材、资源急剧减少的紧缺药材、具有较大开发价值的原料药材等药用资源的调查实践,结合资源调查先进技术和方法,精选了55种代表性的珍稀濒危药用植物,对其资源进行翔实且有深度的总结和分析,提供了权威的资源信息、市场供求信息及相关统计数据,同时找出了存在的问题,并提供了相应的对策和建议。本书原创性强,数据翔实、可靠、珍贵,具有权威性,对从事中药研究的学者和研究人员,从事中药资源保护、可持续性利用的生产实践第一线技术人员,中药资源管理的政府官员,以及相关中药行业市场人士,可以提供重要信息和学术参考。