

生川乌醇提物致心、脑毒性的表现及其对血管内皮的影响

孙凤姣¹, 张泽丹¹, 吴锦^{1,2}, 张密霞¹, 庄朋伟^{1*}, 张艳军^{1*}

1. 天津中医药大学, 天津市中药药理重点实验室, 天津 300193

2. 天津市中医药研究院附属医院, 药学部, 天津 300120

摘要: **目的** 考察生川乌醇提物致心、脑毒性的表现和对血管内皮细胞的影响。**方法** 雄性 Wistar 大鼠随机分为对照组、生川乌醇提物低、中、高剂量 (2.5、5.0、7.5 g/kg) 组, 连续 ig 给药 15 d。观察大鼠毒性反应和死亡情况, 并于给药结束后检测心电图, 采集血液进行血常规和血生化分析。处死后取脑测定脏器系数并进行病理检查; 取左心室和海马区组织块做电镜观察。**结果** 给药结束时生川乌高剂量组大鼠全部死亡, 生川乌中剂量组死亡率显著升高, 血液中红细胞计数 (RBC)、血红蛋白 (HGB)、红细胞容积 (HCT)、丙氨酸转氨酶 (ALT)、尿素 (UREA)、葡萄糖 (GLU) 显著增高; 低、中剂量组均出现各种心律失常, 其中室性心律失常最为明显。生川乌中剂量组动物脑指数明显增加, 局灶性海马区神经元固缩明显增多。电镜观察结果表明, 生川乌中剂量组局部海马区神经元胞质溶解、核碎裂, 胶质细胞凝固性坏死; 左心室和海马区血管内皮细胞明显损伤、凋亡。**结论** 在所给剂量下, 生川乌醇提物能造成明显的心脏毒性和神经毒性, 并导致血管内皮细胞损伤、凋亡。

关键词: 生川乌; 血管内皮损伤; 神经毒性; 心律失常; 亚急性毒性实验; 血液学

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2017)06-1178-05

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2017.06.020

Cardiotoxicity and neurotoxicity features of *Aconiti Radix* ethanol extract and its impacts on vascular endothelial

SUN Feng-jiao¹, ZHANG Yi-dan¹, WU Jin^{1,2}, ZHANG Mi-xia¹, ZHUANG Peng-wei¹, ZHANG Yan-jun¹

1. Tianjin Key Laboratory of Pharmacology of Chinese Materia Medica, Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300193, China

2. Department of Pharmacy, Tianjin Academy of Traditional Chinese Medicine Affiliated Hospital, Tianjin 300120, China

Abstract: **Objective** To investigate the features of cardiotoxicity and neurotoxicity and the influence on vascular endothelial of ethanol extract of *Aconiti Radix* (AR). **Methods** Totally 45 Wistar rats were randomly divided into four groups, and ig given low-, middle-, and high-dose 70% ethanol extract of AR (in the raw drug dose of 2.5, 5.0, and 7.5 g/kg respectively) for 15 d. The toxic reaction and death condition were observed during administration. The electrocardiogram (ECG) change was tested after administration. Blood was collected for blood routine and blood biochemistry analysis. Brain was harvested for calculating viscera index and pathological examination. Left ventricular and hippocampus were extracted and stained with electron microscope (EM) methods. **Results** At the end of treatment, all rats were sacrificed in the high-dose AR group. The mortality and hematologic parameters including RBC, HGB, HCT, ALT, UREA, and GLU were significantly increased in the middle-dose AR groups compared with control group. Arrhythmia especially ventricular arrhythmia occurred in low- and middle-dose AR group. Brain index and number of pyknotic neurons in focal area of hippocampus were significantly increased in middle-dose AR group. EM examination indicated that dissolution of neuronal inclusions, nuclear fragmentation, and coagulation necrosis of glial cells were prominent in the hippocampus tissue in middle-dose AR group. In the middle-dose AR group, the vascular endothelial cells injury and apoptosis were obviously observed in left ventricular and hippocampus separately. **Conclusion** The ethanol extract of AR can lead to cardiotoxicity and neurotoxicity especially vascular endothelial injury in dose-dependent manner.

Key words: *Aconiti Radix*; vascular endothelial injury; neurotoxicity; arrhythmia; subacute toxicity test; hematology

收稿日期: 2016-09-20

基金项目: 国家重点基础研究发展计划 (“973” 计划) 项目 (2011CB505300, 2011CB505302)

作者简介: 孙凤姣 (1988—), 女, 博士研究生, 研究方向为中药药理学。E-mail: sunfengjiao.ya@163.com

*通信作者 张艳军, 博士生导师, 主要从事中药药理学研究。E-mail: zyjsunye@163.com

庄朋伟, 硕士生导师, 主要从事中药药理学研究。E-mail: zhuangpengwei@163.com

生川乌的毒性靶器官主要是心血管系统和神经系统^[1]。其毒性成分乌头碱能抑制 Na^+ 通道的失活作用,促使 Na^+ 内流增加,导致细胞膜去极化,异位起搏点的自律性增加,缩短不应期而导致多源性心律失常; Na^+ 通道持续激活同时导致神经元持久的去极化而发生毒性反应^[2-5]。有研究报道了乌头类生药的体外神经毒性并对小鼠神经行为造成不良影响,却在大鼠体内研究未见神经毒性作用^[6-7]。鉴于乌头类生药的药性特征并未完全暴露出乌头碱的毒性作用,本研究开展了生川乌醇提物对大鼠的亚急性毒性试验,研究了生川乌致心、脑毒性的表现及对血管内皮细胞的影响,为其临床应用提供依据。

1 材料

1.1 药材

生川乌(四川江油)购自中国药材总公司,经天津中医药大学中药鉴定教研室李天祥教授鉴定为毛茛科植物乌头 *Aconitum carmichaeli* Debx. 的干燥母根。

1.2 动物

SPF 级 Wistar 大鼠 45 只,雄性,体质量(200±10) g,均购自北京华阜康生物科技股份有限公司,许可证号 SCXK(京)2014-0004。

1.3 仪器

ML870 Powerlab 八导电生理记录仪(澳大利亚 AD Instruments 公司);H-600 型透射电镜(日本日立公司);DM4000B LED 荧光显微镜(德国 Leica 公司)。

2 方法

2.1 生川乌醇提物的制备

将生川乌粉碎为粗颗粒,精密称量,加生药量 10 倍体积 70%乙醇水溶液浸泡 30 min 后,煮沸回流提取 1 h,滤过,残渣加 8 倍体积 70%乙醇水溶液煮沸回流提取 1 h,滤过,合并滤液,50 ℃减压浓缩至质量浓度为生药 1 g/mL,于-20 ℃冷冻保存,备用。实验时用蒸馏水稀释至所需浓度。采用 RPLC/Q-TOF-MS 系统对浓缩液进行测定,鉴定出 50 多种化学成分,主要成分均为生物碱类,其中含乌头碱 1.45%。

2.2 分组给药

将大鼠随机分为对照组和生川乌醇提物低、中、高剂量(2.5、5.0、7.5 g/kg,分别相当于成年人用量每天 28、56、84 g,《中国药典》2015 年版

规定生川乌一般炮制后用,且制川乌的最大用量仅为 3 g/d)组,共 4 组,各组连续 ig 给药 15 d,对照组给予等量生理盐水。定期观察动物的毒性反应,如精神状况,活动状态,腺体分泌等,并记录死亡情况。生川乌醇提物高剂量组在给药结束时动物全部死亡,故未检测如下指标。

2.3 心电图检测

末次给药后,大鼠 ip 10%水合氯醛 300 mg/kg 麻醉,背位固定,连接电极用 Powerlab 八导电生理记录仪采集 II 导联心电图。

2.4 血液学检查和脏器系数

大鼠麻醉后经腹主动脉采血进行血液常规指标和生化指标检查,然后迅速脱臼处死,并立即取脑称质量,计算脑指数(脑指数=脑质量/体质量)。

2.5 病理检查

脑组织用 4%中性多聚甲醛固定,在视交叉后 1 mm 和 6 mm 处冠状面切开,取组织块进行常规石蜡包埋,切片(5 μm),苏木素-伊红染色。

2.6 电镜观察

大鼠处死后,快速取左心室和海马区组织约 1 mm×1 mm×1 mm 大小放入 2.5%戊二醛固定液中固定,经 1%的四氧化锇二次固定,常规 Epon812 包埋,切 60 nm 超薄切片,铀-铅双染色,透射电镜观察。

2.7 统计学方法

采用 SPSS 17.0 统计软件包,对计数资料进行 χ^2 检验,计量资料进行方差分析。

3 结果

3.1 生存率

表 1 结果显示,生川乌中剂量组与对照组比较大鼠死亡率明显增加($P<0.01$),呈剂量效应关系。生川乌中剂量组动物给药后出现不同程度上的拱背、蜷曲、少动、被毛湿润、呼吸急促、流涎、抽搐等,部分大鼠出现角弓反张后死亡。低剂量组动物未出现明显症状。

表 1 生川乌醇提物对大鼠生存率的影响
Table 1 Effect of AR on survival rate of rats

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	n	存活数/只	存活率/%
对照	—	15	15	100.00
生川乌	2.5	15	15	100.00
	5.0	15	10	66.67**

与对照组比较: ** $P<0.01$

** $P<0.01$ vs control group

3.2 血液常规指标

给药 15 d 后, 生川乌中剂量组的红细胞计数 (RBC)、血红蛋白 (HGB)、红细胞容积 (HCT) 高于对照组 ($P<0.05$); 生川乌低、中剂量组平均红细胞血红蛋白 (MCH) 低于对照组 ($P<0.05$), 呈剂量效应关系。其他血液学指标包括平均红细胞血红蛋白浓度 (MCHC)、平均红细胞容积 (MCV)、血小板计数 (PLT)、白细胞计数 (WBC)、淋巴细胞绝对值 ($LYM^{\#}$), 生川乌醇提物组与对照组比较差异均不显著 ($P>0.05$)。见表 2。

3.3 血液生化指标

由表 3 可知, 给药 15 d 后, 生川乌低、中剂量组

的丙氨酸转氨酶 (ALT) 均高于对照组 ($P<0.01$), 呈剂量效应关系。生川乌中剂量组尿素 (UREA)、血糖 (GLU) 均高于对照组 ($P<0.05$ 、 0.01)。生川乌醇提物组其余指标包括天冬氨酸转氨酶 (AST)、总胆红素 (TBIL)、碱性磷酸酶 (ALP)、肌酐 (Scr) 与对照组比较均无统计学意义 ($P>0.05$)。

3.4 心电图表现

图 1 结果显示, 随着生川乌醇提物剂量的加大, 心脏毒性表现为多种心律失常, 尤其是室性心律失常。低剂量组动物心律失常发生率为 73.33%, 表现为 T 波倒置、插入性室性早搏、室性心动过速、窦性室性竞争心律等。中剂量组动物全部表现出心律

表 2 生川乌醇提物对大鼠血液常规指标的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Effect of AR on blood routine parameters in rats ($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量/ (g·kg ⁻¹)	<i>n</i>	RBC/ ($\times 10^{12} \cdot L^{-1}$)	HGB/ (g·L ⁻¹)	HCT	MCV/fL	MCH/pg	MCHC/ (g·L ⁻¹)	PLT/ ($\times 10^9 \cdot L^{-1}$)	WBC/ ($\times 10^9 \cdot L^{-1}$)	$LYM^{\#}/$ ($\times 10^9 \cdot L^{-1}$)
对照	—	15	6.71±1.53	138.15±30.04	0.43±0.10	63.59±1.86	20.68±0.93	325.59±21.46	1 005.95±207.85	3.18±0.95	2.88±1.05
生川乌	2.5	15	7.41±2.18	150.31±34.90	0.47±0.14	62.85±2.13	19.91±0.53*	314.44± 3.54	1 112.34±339.51	3.16±1.22	3.31±1.43
	5.0	10	8.23±0.72*	163.04±10.21*	0.51±0.04*	62.18±1.72	19.85±0.66*	319.31± 5.70	1 005.64±187.28	3.51±1.22	3.19±1.02

与对照组比较: * $P<0.05$

* $P<0.05$ vs control group

表 3 生川乌对大鼠血液生化指标的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Table 3 Effect of AR on serum biochemical parameters in rats ($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	<i>n</i>	AST/(U·L ⁻¹)	ALT/(U·L ⁻¹)	TBIL/(μ mol·L ⁻¹)	ALP/(U·L ⁻¹)	Scr/(μ mol·L ⁻¹)	UREA/(mmol·L ⁻¹)	GLU/(mmol·L ⁻¹)
对照	—	15	156.51±50.78	48.06± 8.80	0.76±0.15	314.64±62.32	30.35±5.28	7.06±1.06	7.10±1.41
生川乌	2.5	15	130.98±38.53	71.80±10.34**	0.71±0.24	349.92±75.45	28.14±2.87	7.04±1.29	7.63±1.47
	5.0	10	141.22±51.11	80.85±26.68**	0.86±0.20	317.71±76.06	26.99±4.01	9.60±2.87*	13.45±4.06**

与对照组比较: * $P<0.05$ ** $P<0.01$

* $P<0.05$ ** $P<0.01$ vs control group

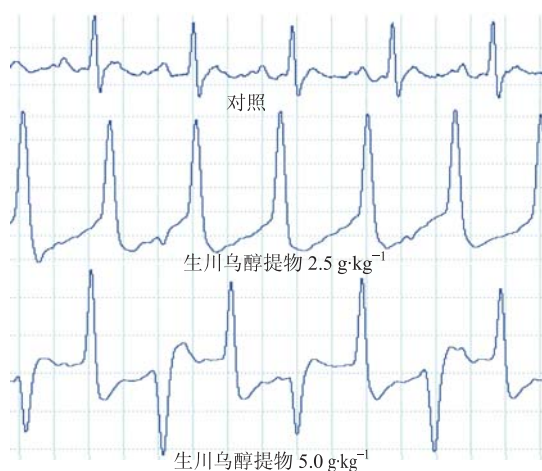


图 1 生川乌醇提物对大鼠心电图的影响

Fig. 1 Effect of AR on ECG in rats

失常, 包括竞争心律、室早二联律、房室分离-加速性室性心动过速等。

3.5 脑指数及组织学检查

表 4 结果显示, 生川乌醇提物中剂量组大鼠体质量明显减轻, 脑指数显著高于对照组 ($P<0.01$), 提示生川乌毒性表现存在脑水肿。脑组织病理观察结果 (图 2) 表明: 对照组动物脑组织外层皮质及深层髓质结构清晰, 海马区散在圆滑, 无明显病变。低剂量组海马区神经元个别固缩, 中剂量组局部海马区神经元较多固缩。超微结构观察结果显示: 对照组神经元结构基本正常。低剂量组无髓神经纤维轻度水肿, 线粒体肿大。中剂量组神经细胞局灶性溶解、坏死、轻度出血、胶质细胞凝固性坏死。

表 4 生川乌醇提物对大鼠脑指数的影响 ($\bar{x} \pm s$)
Table 4 Effect of AR on brain organ index in rats ($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	n	体质量/g	脑质量/g	脑指数/(mg·g ⁻¹)
对照	—	15	257.17±15.31	1.45±0.15	5.65±0.56
生川乌	2.5	15	247.64±14.52	1.48±0.15	5.97±0.64
	5.0	10	219.10±21.07**	1.45±0.16	6.63±0.72**

与对照组比较: ** $P<0.01$
** $P<0.01$ vs control group

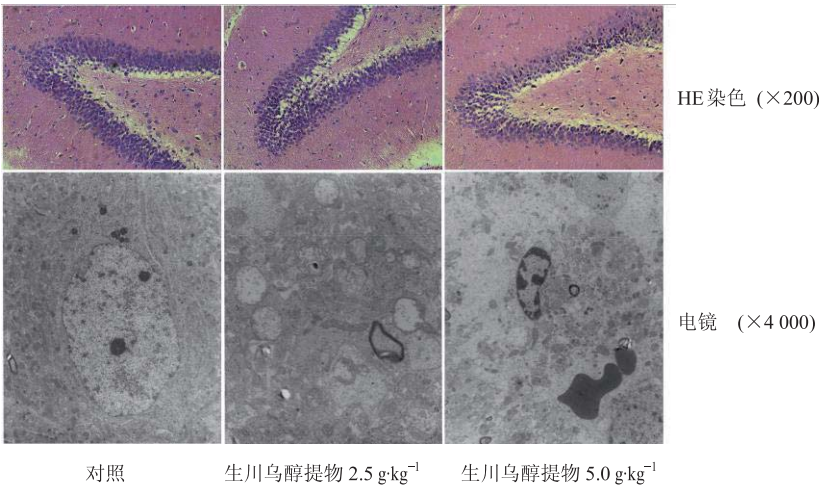


图 2 各组大鼠脑组织海马区形态学观察

Fig. 2 Morphological observation of hippocampus in brain of rats in each group

3.6 血管内皮损伤超微结构观察

左心室电镜观察结果显示: 对照组毛细血管结构正常; 生川乌醇提物低剂量组毛细血管通畅, 偶见毛细血管扩张, 内皮结构正常; 中剂量组大部分毛细血管扩张, 血管内皮细胞损伤、凋亡。海马区电镜观察结果表明: 对照组毛细血管结构正常; 低剂量组结构基本正常, 未见明显损伤; 中剂量组血管内皮细胞损伤。见图 3。

4 讨论

生川乌的毒性靶器官主要是心血管系统和神经系统^[1]。目前认为乌头碱抑制 Na⁺通道的失活作用是生川乌诱导心、脑毒性的机制之一。具体表现为乌头碱直接作用于心肌细胞, 使 Na⁺通道的开放时间延长, 促使 Na⁺内流增加, 导致细胞膜去极化, 异位起搏点的自律性增加, 缩短不应期而导致多源性心律失常; Na⁺通道持续激活同时导致神经元持久的去极化, 过度的突触前去极化导致神经动作电位和终板电位阻滞, 阻断了神经-肌肉接头的传导功能而发生毒性反应^[2-5]。

川乌的心血管中毒症状表现为多种类型心律失常, 尤其是严重的室性心律失常是致死的主要原因

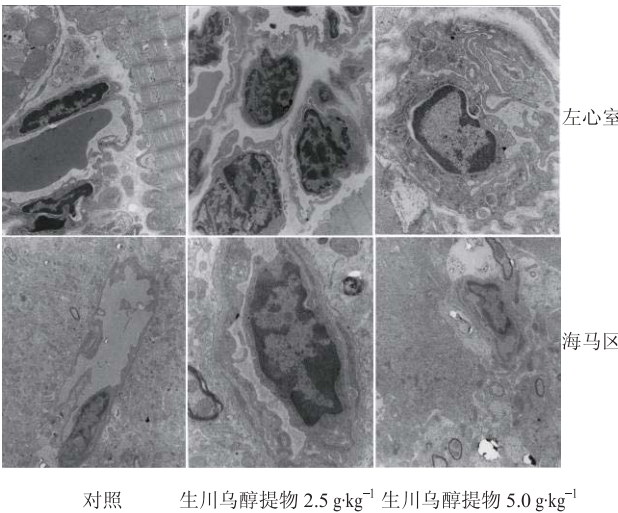


图 3 各组大鼠左心室和海马区血管内皮细胞超微结构观察
Fig. 3 Ultrastructural observation of vascular endothelial in left ventricular and hippocampus of rats in each group

因之一^[1]。

本研究结果显示生川乌醇提物低、中剂量组出现不同程度的心律失常, 包括早搏、二联律、室速等; 且随着药物剂量的增加, 大鼠死亡率明显增加, 与生川乌所致心律失常严重程度一致。

神经系统也是生川乌醇提物的重要毒性靶器官。一般状态观察到大鼠汗腺分泌、流涎、抽搐、角弓反张,并造成死亡一系列神经系统功能改变症状。且随着药物剂量的增加,脑组织形态学病变越明显。大体解剖观察到脑水肿,HE染色观察到局灶性海马区神经元固缩增多,超微结构观察显示神经元胞质溶解、核碎裂,胶质细胞凝固性坏死等病理改变。但是韩岫等^[6]研究乌头类中药的神经毒性时发现,乌头类中药对体外培养神经元细胞具有直接细胞毒性,但在大鼠整体动物实验中未见神经毒性作用,这可能与血脑屏障及体内代谢有关。

血管内皮细胞是药物吸收入血后随血液循环进入各个靶器官分布的天然屏障,其重要生理功能就是调节血液与组织间的物质交换,维持内环境稳定。内皮细胞损伤时,血管通透性大大增加,对溶质分子的选择性丧失,有害物质(大分子物质等)主要经细胞旁扩散侵入,造成邻近或远端的组织器官水肿和功能障碍^[8-10]。本实验生川乌醇提物低剂量组左室内皮结构正常,偶见毛细血管扩张,大部分动物出现轻度心律失常;海马区血管内皮未见明显损伤,神经功能和组织形态未见明显改变。但是随着药物剂量的增加,心和脑的血管内皮细胞明显损伤、凋亡,动物出现严重的心律失常和神经毒性,且伴随死亡率明显增加。这与临床报道乌头碱制剂中毒患者表现出多种心律失常并伴随血浆中NO和NOS水平升高,内皮功能损伤的结果一致^[1]。由此可见,生川乌醇提物造成血管内皮损伤同时又可加重其本身的心、脑毒性。血管内皮细胞损伤时,血脑屏障的选择功能受到破坏,因此乌头碱等毒性成分进入心、脑组织增多,导致直接细胞毒性。

此外,大剂量给予生川乌醇提物可导致大鼠的RBC、HGB、HCT、ALT、UREA、GLU增多,即

血液学毒性变化。

总之,生川乌存在潜在心脏毒性和神经毒性,血管内皮损伤可进一步加重其毒性作用。提示生川乌临床应用于血管内皮细胞损伤性疾病,或者与促血脑屏障开放和增加血管通透性药物配伍应用时,可能加重生川乌毒性,应减量或避免使用。

参考文献

- [1] 戴江平,袁 逊,张家龙. 乌头碱中毒致心律失常的表现及其对内皮功能的影响 [J]. 实用心脑血管病杂志, 2007, 15(5): 346-348.
- [2] 刘 艳,章诗伟,周 兰,等. 乌头类生物碱对心肌的毒性作用及分子毒理学研究进展 [J]. 中国法医学杂志, 2009, 24(6): 398-401.
- [3] Ameri A, Shi Q, Aschoff J, *et al.* Electrophysiological effects of aconitine in rat hippocampal slices [J]. *Neuropharmacology*, 1996, 35(1): 13-22.
- [4] Ameri A, Simmet T. Interaction of the structurally related Aconitum alkaloids, aconitine and 6-benzylolheteratisine, in the rat hippocampus [J]. *Europ J Pharmacol*, 1999, 386(2): 187-194.
- [5] Onur R, Bozdagi O, Ayata C. Effects of aconitine on neurotransmitter release in the rat neuromuscular junction [J]. *Neuropharmacology*, 1995, 34(9): 1139-1145.
- [6] 韩 岫,吕 雷,王汉蓉,等. 3种乌头类中药在大鼠体内的神经毒性 [J]. 华西药理学杂志, 2007, 22(3): 286-288.
- [7] 严光焰,何晓娟,王 冲,等. 生川乌对小鼠神经行为的影响 [J]. 现代预防医学, 2008, 35(11): 2026-2027.
- [8] 肖贞良,孙耕耘. 血管内皮屏障功能调节的研究进展 [J]. 生理科学进展, 1998, 29(3): 215-220.
- [9] 谭晓燕. 血管内皮的通透性与心血管疾病 [J]. 首都医药, 2000, 7(1): 47-48.
- [10] 金露薇,魏元锋,高 缘. 中药化学成分透血脑屏障机制及促透方法研究进展 [J]. 中草药, 2013, 44(15): 2183-2188.