

附子中乌头碱对大鼠心功能效-毒剂量关系测定

张硕峰, 吴金英, 贾占红, 孙建宁*
(北京中医药大学, 北京 100102)

[摘要] **目的:** 动态观察乌头碱的心脏毒性与强心作用。并计算其毒理学参数与药效学参数, 评价其使用的安全性, 为其临床应用提供实验依据。**方法:** 以大鼠 II 导联心电图变化为指标, 经大鼠股静脉缓慢恒速推注乌头碱, 连续观察大鼠心电图变化, 动态观察乌头碱对心脏毒性的量-毒关系; 选用钙离子拮抗剂尼莫地平复制大鼠心衰模型, 经大鼠股静脉缓慢恒速推注乌头碱, 以心率、左心室内压最大上升速率 ($+ dp/dt_{max}$) 和反映心脏做功的指标率压积 (RPP) 为指标, 动态观察乌头碱的强心作用。**结果:** 以 RPP, $+ dp/dt_{max}$ 为指标计算乌头碱的 50% 最大效应量 (ED_{50}), 以室性早搏 (PVC), 停搏 (CA) 为指标计算乌头碱的半数中毒量 (TD_{50})、半数致死量 (LD_{50}), 则乌头碱的治疗指数 (TI, 按 RPP 计算) 分别为 1.84, 17.22, TI (按 $+ dp/dt_{max}$ 计算) 分别为 1.23, 11.54。**结论:** 乌头碱具有强心作用, 但也具有心脏毒性, 安全范围狭窄。

[关键词] 乌头碱; 左心室内压最大上升速率; 率压积; 半数中毒量; 半数致死量; 50% 最大效应量; 治疗指数

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)19-0222-04

Dose-toxicity Relationship Study for Cardiotoxic Effect of Aconitine

ZHANG Shuo-feng, WU Jin-ying, JIA Zhan-hong, SUN Jian-ning*
(Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100102, China)

[Abstract] **Objective:** To analyze the relationship between toxicity and cardiotoxic effect of aconitine, calculating the therapeutic index (TI) of aconitine. **Method:** Regarding rat's electrocardiogram (ECG) change as the index, the toxicity to heart induced by aconitine was studied. Nimodipine, one of Ca^{2+} antagonist, was used to make heart failure model in rats. The aconitine was injected through femoral vein continuously. The effect on heart rate, $+ dp/dt_{max}$, LVDP-rate pressure product (RPP) was observed. **Result:** Regarding RPP or $+ dp/dt_{max}$ as the index of ED_{50} and regarding PVC or CA as the index of TD_{50} or LD_{50} , LD_{50}/ED_{50} or TD_{50}/ED_{50} was used to calculate the therapeutic index (TI) of aconitine, TI (RPP) were 1.84, 17.22 and TI ($+ dp/dt_{max}$) were 1.23, 11.54 respectively. **Conclusion:** Aconitine has cardiotoxic effect but has toxicity to heart. TI is small.

[Key words] aconitine; $+ dp/dt_{max}$; rate pressure product; TD_{50} ; LD_{50} ; ED_{50} , therapeutic index

附子性辛、甘, 大热, 有毒, 具回阳救逆, 补火助阳, 散寒止痛之功效, 为温里之要药, 用于亡阳虚脱及阳虚诸证。现代药理学研究证明, 附子具有强心作用、抗心律失常作用^[1]。附子等含双酯型生物碱的药材中毒, 症状多见心慌气短, 心律失常; 心电图呈现心律紊乱、结性心率迟缓、多源性频发室性期前

收缩及心室纤颤、心室扑动、心尖扭转性心律失常, 甚至停搏。乌头碱是附子类药材的主要的毒性成分, 但也是这类药材回阳救逆、温中止痛的主要活性成分^[1-2]。本研究以大鼠 II 导联心电图变化为指标, 经大鼠股静脉缓慢恒速推注乌头碱, 连续观察大鼠心电图变化, 动态观察乌头碱对心脏毒性的量-毒关系; 选用钙离子拮抗剂尼莫地平复制大鼠心衰模型, 经大鼠股静脉缓慢恒速推注乌头碱, 以心率、左心室内压最大上升速率 ($+ dp/dt_{max}$) 和反映心脏做功的指标率压积 (RPP) 为指标, 动态观察乌头碱的强心作用。并计算其毒理学参数与药效学参数, 评价其使用的安全性, 为其临床应用提供实验依据。

[收稿日期] 20120511(338)

[基金项目] 国家科技攻关计划项目(2004BA7211)1; 北京中医药大学科研创新团队项目(2011-CXTD-12)

[第一作者] 张硕峰, 副教授, 博士, 药效毒理研究, Tel: 84738627, E-mail: shuofengzhang@sina.com

[通讯作者] * 孙建宁, 教授, E-mail: jn_sun@sina.com

1 材料

1.1 药品与试剂 乌头碱:北京中医药大学张宏桂教授提供,纯度 95.95%。加 1% 盐酸溶解,加生理盐水,用 $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaOH 调 pH 至 7,制成 0.000 5% 溶液;尼莫地平注射液,山东方明药业股份有限公司产品,批号 0509004;西地兰注射液(去乙酰毛花苷注射液),上海旭东海普药业有限公司产品,批号 060301。

1.2 动物 SD 大鼠,雄性,体重 210 ~ 220 g,北京维通利华实验动物技术有限公司提供,许可证号 SCXK(京)2002-2003。

1.3 仪器 MedLab-U 生物信号采集系统,南京美易科技有限公司产品。WZ-50C2 型微量注射泵,浙江大学医学机械有限公司产品。

2 方法

2.1 附子中乌头碱的心脏毒性 大鼠 10% 水合氯醛 $350 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ip 麻醉,背位固定,连接电极用 MedLab-U 生物信号采集系统测定二导联心电图。描记正常心电图,然后用微量注射泵分别缓慢注射乌头碱 $1 \text{ mL} \cdot \text{h}^{-1}$ 至动物死亡。参照正常心电图找出大鼠第一次出现室性早搏(PVC),室性心动过速(VT),心室纤颤(VF),心室扑动(VFL)以及停搏(CA)时间,根据给药速度计算动物出现 PVC,VT, VF, VFL 以及 CA 时的累计给药量。计算各组动物出现 PVC,VT, VF, VFL 以及 CA 时累计的给药量。

2.2 乌头碱对尼莫地平致心衰大鼠左心功能的影响

2.2.1 分组给药 大鼠随机分为 4 组,即对照组、模型组、乌头碱组、西地兰组。造模后各组经股静脉缓慢恒速推注相应药物 $0.2 \text{ mL} \cdot \text{h}^{-1}$,对照组、模型组注射给予等量生理盐水 $0.2 \text{ mL} \cdot \text{h}^{-1}$ 。

2.2.2 造模方法 大鼠 10% 水合氯醛 $350 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ip 麻醉,背位固定,经大鼠右侧颈总动脉插管至左心室,连接 MedLab-U 生物信号采集系统测定大鼠心功能^[4],然后用微量注射泵缓慢注射尼莫地平注射液 $0.6 \text{ mL} \cdot \text{h}^{-1}$,给药约 15 min,复制大鼠心衰模型。

2.2.3 指标计算 记录各组动物造模前、造模后即刻,10,20,30,40,50,60 min 左心室心功能各项指标,以造模前的左心室心功能各项指标为基础值,计算各组给药后的各项指标变化率;以造模后的左心室心功能各项指标为基础值,计算各组给药后各时间点的各项指标变化率,用 SPSS 11.5 软件包进行统计分析。

2.3 附子中乌头碱安全范围的计算 将实验 2.1

结果的原始数据,计算在不同剂量时出现毒性反应(PVC,VT, VF, VFL, CA)的阳性率,用 BLISS 法计算相应毒性反应的半数中毒量(TD_{50}),半数致死量(LD_{50})。

将实验 2.2 结果的原始数据,分别计算各例动物的 RPP, $+ dp/dt_{\text{max}}$ 造模前后各时间点的变化率,选择最大值作为最大效应量,用 DAS 软件计算 50% 最大效应量(ED_{50})。

以 $\text{LD}_{50}/\text{ED}_{50}$ 或 $\text{TD}_{50}/\text{ED}_{50}$ 计算 TI。

3 结果

3.1 乌头碱的心脏毒性 结果可见乌头碱具有明显的心脏毒性,持续缓慢 iv 后,随着药物在体内的蓄积,均依次出现 PVC [$(17.5 \pm 15.3) \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$], VT [$(42.8 \pm 15.8) \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$], VF [$(80.8 \pm 26.6) \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$], VFL [$(84.5 \pm 31.5) \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$] 直至 CA [$(106.7 \pm 27.6) \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$],动物死亡。用 Bliss 法计算相应毒性反应的 TD_{50} 分别为 10.446, 36.877, 70.700, 72.994, 97.981 $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$,其中产生 CA 的 TD_{50} 即为半数致死量 LD_{50} 。

3.2 乌头碱对尼莫地平致心衰大鼠左心功能的影响 乌头碱给药时间与累计给药量的关系,见表 1。

表 1 乌头碱给药时间与累计给药量关系 μg

组别	药物质量浓度 $/\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	给药速度 $/\text{mL} \cdot \text{h}^{-1}$	给药时间/min					
			10	20	30	40	50	60
乌头碱	50	0.2	1.67	3.33	5.00	6.67	8.33	10.00
西地兰	200	0.2	6.67	13.33	20.00	26.67	33.33	40.00

造模后模型组动物心率明显减慢(与对照组比较, $P < 0.01$)。阳性对照药西地兰可明显抑制模型动物心率的减慢,并随着给药量的增加,作用逐渐增强(与模型组比较, $P < 0.05$, $P < 0.01$)。乌头碱随给药剂量的增加,可明显提高模型动物的心率水平(最高分别增加 24%, 35%, 与模型组比较, $P < 0.05$, $P < 0.01$),峰值出现在给药后 40 ~ 50 min 之间。见表 2。

模型组动物反映心肌收缩功能的指标 $+ dp/dt_{\text{max}}$ 在造模后明显降低(与对照组比较, $P < 0.01$)。阳性对照药西地兰可明显改善模型动物的心肌收缩功能,使 $+ dp/dt_{\text{max}}$ 明显增加,并随给药量的增加,作用逐渐增强(与模型组比较, $P < 0.05$, $P < 0.01$)。乌头碱随给药剂量的增加,模型动物的 $+ dp/dt_{\text{max}}$ 明显升高,尤以给药 20 min 后作用明显(与模型组比较 $P < 0.01$),峰值出现在给药后 30 ~ 50 min,最高增加 32%。见表 3。

表 2 乌头碱对心衰大鼠心率变化率的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	n	造模后	给药后/min					
			10	20	30	40	50	60
对照	10	-1.72 ± 5.69 ²⁾	2.32 ± 5.65	2.53 ± 8.03	2.29 ± 8.75	-0.02 ± 8.91	-3.78 ± 13.79	-2.47 ± 12.67
模型	9	-17.60 ± 7.91	-2.98 ± 9.70	1.86 ± 8.57	-4.92 ± 9.10	-5.17 ± 11.36	-9.28 ± 6.80	-10.36 ± 12.14
乌头碱	11	-13.45 ± 14.99	6.79 ± 6.46 ¹⁾	19.08 ± 10.07 ²⁾	20.00 ± 15.07 ²⁾	20.46 ± 16.41 ²⁾	20.48 ± 13.86 ²⁾	24.11 ± 16.00 ²⁾
西地兰	9	-11.71 ± 6.04	4.17 ± 2.35	2.53 ± 5.14	2.66 ± 3.70 ¹⁾	1.71 ± 3.44	1.35 ± 4.84 ²⁾	0.59 ± 5.43 ¹⁾

注:与模型组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$ (表 3~4 同)。

表 3 乌头碱对心衰大鼠左心 + dp/dt_{max} 变化率的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	n	造模后	给药后/min					
			10	20	30	40	50	60
对照	10	-0.69 ± 4.99 ²⁾	2.40 ± 6.76	5.47 ± 9.59 ¹⁾	6.64 ± 13.52 ²⁾	3.67 ± 10.66 ²⁾	5.91 ± 17.39 ¹⁾	7.08 ± 13.84
模型	9	-21.91 ± 7.80	-11.87 ± 24.08	-14.50 ± 21.76	-19.69 ± 21.08	-18.46 ± 16.21	-16.00 ± 20.21	-13.20 ± 29.31
乌头碱	11	-20.30 ± 7.33	3.78 ± 12.43	25.94 ± 28.60 ²⁾	31.09 ± 32.25 ²⁾	26.64 ± 34.43 ²⁾	31.84 ± 40.41 ²⁾	25.50 ± 39.91 ¹⁾
西地兰	9	-19.98 ± 8.49	8.65 ± 9.71 ¹⁾	8.91 ± 8.16 ¹⁾	10.66 ± 14.01 ²⁾	11.17 ± 13.78 ²⁾	13.25 ± 15.16 ²⁾	15.46 ± 14.80 ¹⁾

模型组动物反映心肌做功的指标 RPP 在造模后明显降低 (与对照组比较 $P < 0.01$)。阳性对照药西地兰可明显改善模型动物的心肌收缩功能,使 RPP 明显增加,并随着给药量的增加,作用逐渐增强 (与模型比较 $P < 0.05$, $P < 0.01$)。乌头碱随给药

剂量的增加,可使模型动物的 RPP 明显增加 (与模型组比较 $P < 0.05$, $P < 0.01$),表示动物心肌做功明显增加,峰值在给药 20 min,即累计给药量为 3.33 μg 时,可使 RPP 升高约 34%。见表 4。

表 4 乌头碱对心衰大鼠 RPP 变化率的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	n	造模后	给药后/min					
			10	20	30	40	50	60
对照	10	0.69 ± 11.24 ²⁾	3.52 ± 13.89	5.21 ± 15.13	3.28 ± 17.45	2.06 ± 15.92	-3.57 ± 18.13	-0.10 ± 17.89
模型	9	-27.80 ± 11.00	-6.59 ± 25.14	-2.33 ± 19.63	-8.37 ± 18.81	-2.55 ± 13.69	-5.82 ± 9.89	-5.91 ± 26.12
乌头碱	11	-24.38 ± 17.44	14.30 ± 13.11 ¹⁾	34.31 ± 20.53 ²⁾	32.87 ± 28.69 ²⁾	27.34 ± 28.90 ¹⁾	24.40 ± 25.43 ²⁾	17.97 ± 17.89 ¹⁾
西地兰	9	-24.41 ± 10.60	13.50 ± 5.66 ¹⁾	11.67 ± 10.76	13.77 ± 8.54 ²⁾	12.92 ± 8.09 ¹⁾	18.88 ± 12.34 ²⁾	20.27 ± 12.60 ¹⁾

综上所述,乌头碱可增加衰竭心脏心率,改善心肌收缩功能,增加心肌做功。

3.3 乌头碱安全范围的计算 以 RPP, + dt/dt_{max} 为指标计算乌头碱的 ED₅₀ 分别为 (5.69 ± 2.70), (8.49 ± 2.70) $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$,以 PVC, CA 为指标计算乌头碱的 TD₅₀, LD₅₀ 分别为 10.446, 97.981 $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$,如以出现室性早搏为毒性表现,分别以 RPP, + dp/dt_{max} 药效评价指标,则乌头碱的 TI (RPP) 分别为 1.84, TI (+ dp/dt_{max}) 分别为 1.23;如以乌头碱引起的死亡为毒性表现,分别以 RPP, + dp/dt_{max} 药效评价指标,则乌头碱的 TI (RPP) 分别为 17.22, TI (+ dp/dt_{max}) 分别为 11.54。

4 讨论

双酯二萜类生物碱乌头碱是附子、乌头中剧毒

成分^[2]。其毒性与 C₁₄ 位的苯甲酰酯的存在有关,此外 C₈ 位的乙酰基, C₁₃ 位的羟基, C₁, C₆, C₁₆, C₁₈ 位甲氧基也与其毒性有关^[3]。本实验结果可见乌头碱的致死量分为 106.7 $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$, LD₅₀ 为 97.98 $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。双酯二萜类生物碱乌头碱对神经和心血管系统的毒性最为严重,对心脏的毒性最为明显,其中毒机制研究颇多,一般认为乌头碱一是兴奋迷走神经,表现为心率减缓、传导阻滞,如切断实验动物的迷走神经,则使这种作用消失。二是直接对心脏的毒性作用,引起严重的心律失常,其心律失常的特点是多样易变,以频发室早最常见,且为多源性,并易形成二联律及阵发性室速、扭转型室速,甚至发展为室颤,导致猝死^[5-7]。本实验结果可见随给药剂量的增多大鼠依次出现 PVC, VT, VF, VFL 直至 CA,其

中,乌头碱出现上述毒性的 TD_{50} 分别为 10.446, 36.877, 70.700, 72.994, 97.981 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 。

双酯二萜类生物碱不仅是附子、乌头的毒性成分,也是本类药物的有效成分。附子性辛、甘,大热,有毒,具回阳救逆,补火助阳,散寒止痛之功效,为温里之要药,用于亡阳虚脱及阳虚诸证,被誉为“回阳救逆第一品药”,现代药理学研究证明,附子具有强心作用。在现代临床中,附子常用于救治急性心肌梗死所致休克、低血压、冠心病及风心病等。本实验用尼莫地平复制大鼠心衰模型观察乌头碱的回阳救逆作用。

尼莫地平是常用的钙离子通道拮抗剂,可扩张外周血管,抑制心脏,本试验选用尼莫地平经股静脉缓慢恒速推注 15 min(速度约为 $480 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ 约为人用量 $7.5 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ 的 60 倍)。使用后模型动物的心功能各项指标有了明显的改变,表现为 $+dp/dt_{\max}$ 明显降低,心率明显减慢,提示大鼠心功能受到明显抑制。使用乌头碱后其各项指标发生了明显的变化。

首先是心率的改变,造模后模型动物的心率明显降低。使用乌头碱后心率明显加快,且模型动物反应敏感作用出现较早,并贯穿整个用药周期。

左室内压最大上升速率($+dp/dt_{\max}$)反映心室壁张力的变化速率,常用来评价心肌的收缩性能,作为等容收缩期心肌的收缩性的指标,其对心肌的各种变力性干预十分敏感,在一定程度上与心率、前后负荷呈正相关,除心肌收缩性能增强可引起其升高外,心率的增加,心肌前后负荷的增加也可引起其升高。使用尼莫地平后,模型动物 $+dp/dt_{\max}$ 明显降低。此作用与尼莫地平抑制心脏收缩,减慢心率,扩张外周血管降低后负荷有关。使用乌头碱后 $+dp/dt_{\max}$ 明显升高,可能与其增加心肌收缩力,加快心率,外周阻力增加有关。

率压积(RPP)使左心室收缩末压与心率的乘积可反映心脏做功情况。造模后,模型动物 RPP 明显降低,表明心功能明显被抑制。使用乌头碱后心脏做功明显增加,RPP 明显升高。

分别以 RPP, $+dp/dt_{\max}$ 造模前后各时间点的变

化率为指标,计算的 ED_{50} 分别为 5.69, 8.49 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 。

综合毒性试验结果,以 RPP、 $+dp/dt_{\max}$ 为指标计算乌头碱的 ED_{50} ,以 PVC,CA 为指标计算乌头碱的 TD_{50} 、 LD_{50} ,则乌头碱的 TI(RPP) 分别为 1.84, 17.22, TI($+dp/dt_{\max}$) 分别为 1.23, 11.54。

综上所述,乌头碱具有强心作用,同时也存在心脏毒性;使用不同药效学指标计算得出的治疗指数数值接近,但使用不同毒性指标计算得出的治疗指数差异较大。如以 LD_{50} 作为评价其毒性的指标,其 TI(RPP)、TI($+dp/dt_{\max}$) 值较大,不能准确反映其安全范围。而以乌头碱最易引起的 PVC 的 TD_{50} 作为评价其毒性的指标,其 TI(RPP)、TI($+dp/dt_{\max}$) 值较小,较能真实反映乌头碱安全范围小的实际情况。故 TI 虽为评价药物安全范围的经典指标,但其数值的大小与选用的毒性指标与药效指标有密切关系,需综合予以考虑。

[参考文献]

- [1] 沈映君. 中药药理学[M]. 2 版. 北京:人民卫生出版社, 2011:435.
- [2] 边宝林, 司南, 王宏洁, 等. 附子单煎以及与浙贝母合煎后乌头碱、次乌头碱、新乌头碱等有毒成分的含量变化研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2006, 12(4):9.
- [3] 洪波, 仇永清. 附子中双酯型乌头碱类成分水解减毒机理的密度泛函理论研究[J]. 分子科学学报, 2008, 24(3):216.
- [4] 马晓斌, 王杨慧, 刘建勋, 等. 参芪益心颗粒对慢性心力衰竭大鼠血流动力学的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2007, 13(11):27.
- [5] 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[J]. 中国法医学杂志, 2009, 24(6):398.
- [6] 李宗浩. 现代急救医学[M]. 杭州:浙江科学出版社, 1993:408.
- [7] 杨小欣. 浅谈附子的毒性反应及防范措施[J]. 辽宁中医学院学报, 2003, 5(2):162.

[责任编辑 何伟]