

滇黄芩总黄酮急性毒性及抗实验性心律失常作用的研究

何晓山^{1*}, 代蓉¹, 陈秀红², 侯安国, 陈小明

(1. 云南中医学院, 昆明 650500; 2. 昆明市盘龙区人民医院, 昆明 650021)

[摘要] 目的: 观察滇总黄芩黄酮提取物的小鼠急性毒性及对乌头碱诱发大鼠实验性心律失常的影响。方法: 以 Bliss 法测定滇黄芩总黄酮提取物的急性毒性; 通过测定大鼠心电图研究滇黄芩总黄酮的抗心律失常作用。结果: 滇黄芩总黄酮提取物对小鼠有一定急性毒性, 但半数致死量 (LD_{50} , $4.4388 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 体重) 与抗心律失常实验所采用的中剂量 ($20 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 体重) 的剂量距离较远; 滇黄芩总黄酮提取物能明显增加乌头碱诱发大鼠室早 (VP)、室颤 (VF) 和室性停搏 (CA) 所需的阈剂量; 可剂量依赖性地缩短肾上腺素致麻醉豚鼠心律失常的持续时间。结论: 滇黄芩总黄酮提取物对小鼠毒性小, 但有明显的抗实验性心律失常作用。

[关键词] 滇黄芩总黄酮; 急性毒性; 实验性心律失常

[中图分类号] R285.5 [文献标识码] B [文章编号] 1005-9903(2010)10-0150-03

Acute Toxicity of Total Flavonoid from *Scutellaria amoena* and its Effect on Experimental Arrhythmia

HE Xiao-shan^{*}, DAI Rong, CHEN Xiu-hong, HOU An-guo, CHEN Xiao-ming

(1. Yunnan University of Traditional Chinese Medicine, Kunming 650500, China;

2. Kunming Panlong District People's Hospital, Kunming 650021, China)

[Abstract] Objective: To study the acute toxicity of total flavonoid from *Scutellaria amoena* in mice and its effect on experimental arrhythmia induced by aconitine in rats. **Method:** The acute toxicity of the flavonoid was investigated by Bliss's method. The anti-arrhythmia effect of the flavonoid was determined by ECG of rats and of guinea pigs. **Result:** The flavonoid showed some toxicity on mice, but its median lethal dose (LD_{50} , $4.4388 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$) keeps away from effective median dose ($20 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) of anti-arrhythmia activity experiment. It could obviously increase the threshold dose of ventricular premature beats (VP), ventricular fibrillation (VF) and cardiac ventricular arrest (CA) induced by aconitine in rats and shorten the duration of ventricular arrhythmia induced by adrenaline in guinea pigs with dose-dependent manner. **Conclusion:** The flavonoid from *S. amoena* has very little toxicity in mice, but obvious protective effect on arrhythmia models in animals.

[Key words] total flavonoid from *Scutellaria amoena*; acute toxicity; experimental arrhythmia

心血管疾病引起的死亡率约占我国总死亡率的20%, 其中因心脏病诱发恶性心律失常, 导致室颤引起猝死属于主要的死因之一。合理使用抗心律失常药可预防和治疗室颤, 降低心血管疾病死亡率, 因此

研究开发低毒、高效的抗心律失常药物具有重要的现实意义。

滇黄芩 *Scutellaria amoena* C. H. Wright 为云南道地中药材, 以黄芩之名始载于《滇南本草》, 具有“苦寒泻实火, 除湿热, 止血, 安胎”等功效。滇黄芩传统功能主治方面的记载未见与抗心律失常作用相关的, 现代药理研究也未见抗心律失常等活性的报道, 但我们在前期的初筛研究中发现, 其具有一定的抗实验性心律失常活性, 因此我们对滇黄芩进行了

[收稿日期] 20100311(006)

[基金项目] 云南省教育厅自然科学研究重点资助项目 (06Z333C)

[通讯作者] * 何晓山, 硕士, 副教授, 研究主向: 中药药理学, Tel: 0871-5918142, E-mail: hexshjyh74@sina.com

系列研究。

1 材料

1.1 动物 昆明种小鼠, 清洁级, 雌雄各半, 体重 18 ~22 g; SD 大鼠, 清洁级, 雌雄各半, 体重 250 ~280 g 均由四川省医学科学院实验动物研究所提供, 合格证号: SCX(川) 2004-16; 豚鼠由本院动物室提供。

1.2 药物 滇黄芩总黄酮提取物, 课题组自制, 本工艺提取得率为 0.96%, 总黄酮含量 56.7%, 1 g 总黄酮提取物相当于滇黄芩原药材 104.167 g, 临用时以蒸馏水配成所需各浓度, 给药前摇匀; 乌头碱为美国 Sigma 公司产品, 用生理盐水配成质量浓度 10 mg/L; 水合氯醛, 上海市国药集团化学试剂有限公司生产, 批号 20050609, 用蒸馏水配成 10%; 硫酸奎尼丁, 北京制药厂出品, 批号 20061016; 维拉帕米注射液, 批号 070218, 福建省泉州制药厂生产; 普萘洛尔, 批号 070610, 江苏林海药业有限公司制造分公司。

1.3 仪器 BL-420E 生物机能实验系统, 成都泰盟科技有限公司; XS 型分析天平, Precisa Instruments Ltd., Switzerland; BP310S 电子天平, 德国 Sartorius 生产; 1810B 型自动双重纯水蒸馏器, 上海申立玻璃仪器有限公司。

2 方法与结果

2.1 滇黄芩总黄酮提取物对小鼠的急性毒性试验^[1-2] 经预试, 找出滇黄芩总黄酮提取物 ig 小鼠最大致死量为 6.58 g · kg⁻¹, 最小致死量为 2.695 g · kg⁻¹, 在该 2 个剂量之间, 按 1:0.8 的比例设 6 个剂量组。

取 60 只健康昆明种小鼠, 按体重与性别随机分成 6 组, 每组 10 只, 雌雄各半, 试验前禁食不禁水 12 h。6 组小鼠分别按 6.580, 5.264, 4.211, 3.369, 2.695, 2.136 g · kg⁻¹, 1 次 ig 给予滇黄芩总黄酮提取部位, ig 给药体积为 30 mL · kg⁻¹, 详细观察给药后 8 h 内动物的反应情况, 以后每天上午、下午各观察 1 次, 连续观察 14 d, 观察各组小鼠的外观、行为和毒性反应, 并记录各组小鼠的死亡数, 用 Bliss 法计算小鼠的半数致死量。结果见表 1。

回归方程 $Y(\text{Probit}) = -1.2217 + 9.6124 \log(D)$

半数致死量 $LD_{50} = 4.4388 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$

LD_{50} (Feiller 校正) 95% 的可信限 = 3.9493 ~5.0227 g · kg⁻¹

$LD_5 = 2.9932 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$

$LD_{95} = 6.5824 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$

MTD(最大耐受量) = 2.695 g · kg⁻¹

表 1 用 Bliss 法计算滇黄芩总黄酮提取物 ig 小鼠的 LD₅₀ (n=10)

剂量 / g · kg ⁻¹	对数剂量	死亡数 / 只	死亡率 / %	机率单位	回归机率单位
6.580	0.81823	9	90	6.2817	6.6434
5.264	0.72132	8	80	5.8415	5.7118
4.211	0.62439	5	50	5.0000	4.7801
3.369	0.52750	1	10	3.7183	3.8488
2.695	0.43056	0	0	-	2.9170
2.136	0.32960	0	0	-	1.9465

小鼠的中毒表现主要为自发活动减少, 而后俯卧不动。死亡时间集中在给药后 8 h 内。死亡小鼠解剖肉眼观察主要脏器未见明显异常改变。滇黄芩总黄酮提取物 ig 给药, 对小鼠有一定的急性毒性, 但用量已远大于临床剂量: 总黄酮 LD₅₀ = 4.4388 g · kg⁻¹, 相当于滇黄芩原生药 462.376 g · kg⁻¹, 为临床人用量的 2768.7 倍。(附: 滇黄芩药材临床成人用量为 3 ~ 10 g, 按 60 kg 体重计, 为 0.050 ~0.167g · kg⁻¹)。

2.2 滇黄芩总黄酮提取物对乌头碱诱发大鼠心律失常的影响

2.2.1 对乌头碱诱发大鼠室性心律失常的影响

^[3-5]

健康 SD 大鼠 60 只, 随机分为如表 2 所示 6 组, 每组 10 只, 禁食 12 h, ip 水合氯醛 2.5 mL · kg⁻¹ 麻醉, 按表 2 剂量 ig 给药, 药后 40 min 时由一侧颈外静脉恒速输入新鲜配制的乌头碱溶液 2 μg · min⁻¹。以 BL-420E 生物信号采集系统描记标准肢体导联心电图(注意电极银针插入皮下, 不能插入肌内), 监测心电图变化, 注意观察室早(VP)、室速(VT)、室颤(VF)和心脏停跳(CA)时的心电图。计算大鼠出现 VP, VF, CA 时乌头碱的用量。

结果表明, 总黄酮和奎尼丁能明显增加乌头碱诱发 VP, VF, CA 所需的阈剂量, 与生理盐水对照组比较差异具有显著性意义, 见表 2。

表 2 滇黄芩总黄酮对乌头碱诱发大鼠心律失常的影响(珞±s, n=10)

组别	剂量 / mg · kg ⁻¹	乌头碱剂量 / μg · kg ⁻¹		
		VP	VF	CA
生理盐水	-	50.7 ±7.2	83.4 ±14.7	128.2 ±21.3
奎尼丁	20	88.0 ±10.7 ²⁾	177.8 ±15.3 ²⁾	237.3 ±27.9 ²⁾
维拉帕米	1	53.6 ±8.7	86.4 ±11.6	135.8 ±24.8
滇黄芩总黄酮	10	58.1 ±12.5	102.3 ±13.9 ¹⁾	169.6 ±29.2 ¹⁾
	20	73.1 ±12.0 ¹⁾	147.2 ±26.4 ²⁾	220.5 ±21.4 ²⁾
	40	83.7 ±12.2 ²⁾	156.0 ±18.2 ²⁾	234.2 ±21.6 ²⁾

注: 与生理盐水组比较¹⁾ P < 0.05, ²⁾ P < 0.01。

2.2.2 对肾上腺素诱发豚鼠心律失常的影响

^[6]

豚鼠 40 只, 雌雄各半, 体重(376 ±52) g, 按表 3 随机分组, 每组 8 只。ip 水合氯醛 3.0 mL · kg⁻¹ 麻

醉, 以 BL-420E 生物信号采集系统描记标准肢体导联心电图, 监测心电图变化, 由一侧颈外静脉快速注射肾上腺素 $40 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$, 记录由肾上腺素引起的心律失常(室早、室速)持续时间作为对照的基础值; 按表 3 剂量 ig 给药, 药后 40, 90, 120 min 时分别以同样速度静脉注射同剂量肾上腺素(如在 120 min 时无心律失常发生, 则肾上腺素的剂量加倍)观察心

律失常持续时间。

结果表明, 与生理盐水组相比, 滇黄芩总黄酮可剂量依赖性地缩短肾上腺素致麻醉豚鼠心律失常的持续时间, 抗心律失常作用维持时间较长, 药后 120 min 仍有作用 ($P < 0.05$)。滇黄芩总黄酮 $40 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 在给药后 120 min 仍可完全阻滞加倍剂量 ($80 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$) 肾上腺素引起的心律失常, 见表 3。

表 3 滇黄芩总黄酮对肾上腺素诱发心律失常的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量 / $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$	心律失常持续时间 / min			
		0 min	40 min	90 min	120 min
生理盐水	-	1.65 ± 0.16	1.82 ± 0.15	1.93 ± 0.35	1.9 ± 0.3
普奈洛尔	1	1.32 ± 0.20	0.30 ± 0.24 ^{2, 3)}	0.73 ± 0.31 ^{1, 3)}	1.37 ± 0.37 ³⁾
滇黄芩总黄酮	10	1.31 ± 0.20	0.48 ± 0.35 ^{2, 3)}	1.45 ± 0.41	1.52 ± 0.40 ¹⁾
	20	1.41 ± 0.25	0.00 ^{2, 3)}	0.18 ± 0.14 ^{2, 3)}	0.45 ± 0.38 ^{2, 3)}
	40	1.35 ± 0.20	0.00 ^{2, 3)}	0.00 ^{2, 3)}	0.00 ^{2, 3)}

注: 与给药前(0min)比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$; 与生理盐水组比较³⁾ $P < 0.05$ 。

3 讨论

抗心律失常药通常根据 Vaughan Williams 分类法包括钠通道阻滞剂、受体拮抗剂、延长动作电位时程药和钙通道阻滞剂, 这 4 类药物目前都存在总有效率不高(一般仅为 30% ~ 60%)、本身有引起药源性心律失常的副作用、对患者生存率改善作用不明显等缺点^[7]。针对这种现状, 笔者的研究尝试从祖国传统的中药里寻找低毒高效的抗心律失常新药, 提取分离制备了滇黄芩总黄酮, 得率 0.96%, 总黄酮含量 56.7%。为初步评价滇黄芩总黄酮提取物的安全性, 进行小鼠急性毒性试验, 结果表明, ig 给药其 LD_{50} 为 $4.4388 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$, LD_5 为 $2.9932 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$, MTD 为 $2.695 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$, 与后续进行的主要药效学试验所用总黄酮中剂量 ($20 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) 相比, 剂量距离均较远, ig 给予滇黄芩总黄酮安全性很高。

乌头碱诱发的心律失常与其直接兴奋心肌, 开放钠通道促进钠内流, 提高心脏异位起搏点的自律性, 从而引起室性及室上性异位节律, 出现室性心动过速等多种心律失常。滇黄芩总黄酮提取物能明显增加乌头碱诱发 VP, VF 和 CA 所需的阈剂量, 与生理盐水对照组比较差异具有显著性意义。肾上腺素可激活 β_1 受体, 使交感神经冲动发放增加, 促进内源性儿茶酚胺的释放, 引起细胞膜上的钙通道开放, 钙内流增加, 大剂量肾上腺素可提高心肌自律性, 导致心律失常。与生理盐水组相比, 滇黄芩总黄酮可剂量依赖性地缩短肾上腺素致麻醉豚鼠心律失常的持续时间, 抗心律失常作用维持时间较长, 给药后 120

min 仍有作用 ($P < 0.05$)。滇黄芩总黄酮 $40 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 在给药后 120 min 仍可完全阻滞加倍剂量 ($80 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$) 肾上腺素引起的心律失常。

综上所述, 滇黄芩总黄酮对小鼠毒性低, 对乌头碱致大鼠心律失常模型及肾上腺素诱导的豚鼠心律失常模型均有抗心律失常作用, 其抗心律失常的机制与可逆性钠通道阻滞作用等有关。

[参考文献]

- [1] 国家食品药品监督管理局中药、天然药物急性毒性研究技术指导原则[Z] GPT2-1, 2005: 3.
- [2] 王北婴, 李仪奎. 中药新药研制开发技术与方法[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 2001: 790.
- [3] 宋昆, 肖桂林, 石燕. 双黄连粉针剂抗乌头碱诱发大鼠心律失常的实验研究[J]. 实用中西医结合临床, 2007, 7(6): 88.
- [4] 闫桂珍, 郭景生. 苦参碱滴丸抗心律失常作用的实验研究[J]. 河北医科大学学报, 2004, 25(3): 142.
- [5] Tan C, Zhu W Y, Lu Y. Aloin, cinnamic acid and sophorcarpidine are potent inhibitors of tyrosinase[J]. Chinese Med J, 2002, 115(12): 1859.
- [6] 黄贤华, 胡晓, 潘火英, 等. 迎春花提取物抗心律失常作用[J]. 中药药理与临床, 2006, 22(6): 47.
- [7] Sanguinetti M C, Bennett P B. Anti-arrhythmic drug target choices and screening[J]. Circ Res, 2003, 93(6): 491.

[责任编辑 聂淑琴]