

综述

乌头碱致中枢神经毒性机制的研究进展[▲]

汤春红 肖雪 段海真 喻安永

(遵义医学院附属医院急诊科,贵州省遵义市 563003,电子邮箱:2505329359@qq.com)

【提要】 乌头类中药是一类重要的中药材,在全世界得到了广泛的应用。然而由于其中毒剂量与治疗剂量相当接近,中毒事件时有发生。过去十几年间,全世界大约共报告了5 000例乌头碱中毒事件,中毒者常出现中枢神经系统的症状。尽管相关研究阐述了乌头碱致中枢神经毒性的机制,但迄今为止仍不明确。本文从乌头碱影响神经细胞离子通道、影响神经递质、干扰神经细胞能量代谢、诱导神经细胞凋亡等方面对乌头碱致中枢神经毒性机制进行综述。

【关键词】 乌头碱;中枢神经毒性;机制;综述

【中图分类号】 R 595.4 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 0253-4304(2018)20-2448-04

DOI:10.11675/j.issn.0253-4304.2018.20.20

乌头属植物,为毛茛科中药,包括草乌、附子、川乌等。根据现代药理学理论,乌头类中药具有止痛、抗炎、麻醉、调节免疫、抗癌、抑制血管通透性以及降低血压等作用^[1-2],现被用于治疗多种疾病,如晕厥、风湿热、关节痛、胃肠炎、腹泻病、水肿、支气管哮喘、各种肿瘤以及某些内分泌紊乱^[3]。由于人们不合理的应用,比如食用未炮制的乌头属药材、饮用自制的含乌头属药材药酒、过量使用或者不遵医嘱使用等,乌头碱中毒的事件屡有发生,重者可导致死亡。不同类别乌头属中药的有毒成分及剂量不完全相同,但乌头碱是它们共同且主要的有毒成分^[4-5]。据估计,2~3 mg 乌头碱是人体的致死剂量^[3]。由此可见乌头碱治疗窗窄,毒性强。虽然相关研究表明,经处理的硼砂溶液可作为急性和亚急性乌头碱中毒以及乌头碱诱导的心脏和神经肌肉毒性的有效保护剂^[6],但现代医学对乌头碱中毒尚无特效药^[7-8]。因此,急性乌头碱中毒是一个重大的医学及社会问题。

乌头碱的毒性作用主要影响中枢神经系统和心脏^[9]。但据报道,乌头碱在肝脏和肾脏中含量较高,而在中毒个体的心脏和大脑中含量较低^[10]。另外,乌头碱中毒患者尸检报告表明,显微镜下检测肝脏、肺、脾、胰腺和胃肠黏膜组织可见嗜酸性粒细胞,而心脏和大脑中未检测到嗜酸性粒细胞,但相关机制尚不明确^[11]。明确乌头碱的毒性机制有助于安全应用乌头类中药及解毒药物的研发。目前关于乌头碱引起的心脏毒性机制的研究表明,乌头碱可影响心肌细胞 Na^+ 、 K^+ 等通道,从而导致心律失常^[12-13],而关于乌头碱导致中枢神经毒性的研究相对较少。本文就乌头碱引起中枢神经毒性的机制进行综述,旨在为临床应用乌头碱的安全性及开

发其神经毒性拮抗药提供更好的理论依据。

1 中枢神经系统表现

据文献报道,急性乌头碱中毒患者可出现头晕、眼花、呼吸困难、全身麻木、感觉不适、烦躁不安、意识模糊、反应迟钝、阵发性抽搐、无法控制的震颤和运动亢进等中枢神经系统症状^[14-15]。相关实验提示,经乌头碱灌胃的小鼠可出现身体僵硬、抽搐、步态不稳、呼吸异常、流涎等异常表现^[16]。此外,Li等^[17]采用大鼠鞘内注射乌头碱的方法,也观察到一系列与运动阻滞有关的异常行为,包括发绀、哮喘、呼吸困难、运动困难,尤其是弛缓性麻痹,并且中毒行为在注射乌头碱2~3 min后即出现。脑活性肽-100 β (calcium-binding protein, S-100 β)和神经元特异性烯醇化酶(neuro-specific enolase, NSE)是脑损伤相关的生化指标,血浆中这两种生物标志物的循环水平对监测脑功能障碍和预测死亡具有重要意义^[18-19]。Zhu等^[16]的实验结果显示,乌头碱中毒组小鼠血浆 S100- β 和 NSE 均显著高于对照组。

2 毒性机制

2.1 影响神经细胞离子通道 细胞内外的无机盐离子主要包括 Na^+ 、 K^+ 、 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Cl^- 等,对维持细胞的生理活动起着至关重要的作用,而这些无机盐离子对于神经细胞同样有举足轻重的作用,其主要与神经细胞之间的电信号传导相关。离子通道异常会破坏内环境稳态,从而导致细胞功能受损^[20]。电压敏感的 Na^+ 通道由三个亚单元组成,即 α 、 β_1 和 β_2 亚单元^[21-22]。 Na^+ 通道有三个独立的神经毒素受体位点,通道功能的调节可通过

▲基金项目:国家自然科学基金(81560217);遵义医学院急诊医学研究生工作站(GZZ2017006)

作者简介:汤春红(1991~),女,本科,住院医师,研究方向:急危重症。

通信作者:肖雪(1969~),女,硕士,主任医师,研究方向:急危重症,电子邮箱:969993055@qq.com。

神经毒素位点的作用实现^[23-24]。以往研究发现乌头碱可与神经毒素位点2相互作用,使 Na^+ 通道电流的激活向超极化电位转移,并通过阻断去极化通道失活而诱发持续激活^[25-26]。Ameri等^[27]通过研究乌头碱在大鼠海马脑片中的电生理作用,也发现乌头碱可结合 Na^+ 通道第2神经毒素受位点位点并使其失活。有研究表明,乌头碱可以结合 Na^+ 通道的 α 亚单位并使 α 亚单位失活,但不会影响 β 亚单位的功能^[28],因此Rao等^[28]认为 Na^+ 通道的 α 亚单位可能是乌头碱的神经毒性结合位点。近年来我国学者发现,当乌头碱作用于神经细胞30 s时,乌头碱组细胞的 Na^+ - K^+ -三磷酸腺苷(adenosine triphosphate, ATP)酶活性较正常对照组有下降的趋势;而在1 min、20 min时乌头碱组细胞 Na^+ - K^+ -ATP酶活性较正常对照组下降,并且随着作用时间延长,其活性下降越明显;2%乌头碱作用于神经细胞30 s时,细胞内 Na^+ 、 Ca^{2+} 水平明显高于正常对照组,而 K^+ 、 Mg^{2+} 水平明显低于正常对照组;因此认为乌头碱通过抑制 Na^+ - K^+ -ATP酶活性而引起神经细胞内 Na^+ 浓度升高、 K^+ 浓度降低, Na^+ - Ca^{2+} 交换增多。可导致神经细胞内 Ca^{2+} 浓度增高甚至超载,进而引发细胞膜衰竭、自由基大量产生、细胞骨架被破坏等一系列病理生理改变^[29]。此外,相关研究还发现, Ca^{2+} 通道转运ATP酶被破坏与乌头碱的中枢神经毒性有关^[30]。

2.2 影响神经递质 神经递质可以与相应的受体结合并引发一系列反应,因此,神经递质浓度的变化必然导致相应生理功能的改变。Ameri等^[31]的研究表明,乌头碱可通过抑制去甲肾上腺素的摄取而提高大鼠海马锥体细胞的兴奋性。Sheikh-Zade等^[32]发现乌头碱可能通过减少乙酰胆碱量子式释放、阻断神经动作电位而导致神经肌肉传导阻滞。Zhao等^[33]首次发现乌头碱能引起多巴胺释放,而多巴胺的迅速释放是乌头碱中毒最早的事件,多巴胺过多将引起多巴胺能神经元的氧化应激和功能障碍,最终导致神经元死亡。但乌头碱导致多巴胺过量释放的机制有待进一步阐明。谷氨酸和 γ -氨基丁酸均属氨基酸类神经递质,分别是大脑内主要的兴奋性递质及抑制性递质,在中枢神经系统内具有重要的作用。近年来,王磊等^[34]通过建立乌头碱中毒模型研究乌头碱对神经元的兴奋性递质谷氨酸及抑制性递质 γ -氨基丁酸含量变化的影响,发现与正常对照组比较,染毒组细胞培养液中的兴奋性递质与抑制性递质的释放量增加,因此认为兴奋性神经递质和抑制性神经递质含量的变化可能是乌头碱致神经毒性机制之一。强啡肽A是一种内源性阿片类神经递质,可在大脑的许多不同部位产生,包括下丘脑、纹状体、海马和脊髓,由神经元、星

形胶质细胞和小胶质细胞分泌。有学者发现,乌头碱通过激活神经元 κ -阿片受体诱导强啡肽A发挥作用,其由于对强啡肽的刺激能力不同而产生抗过敏作用或神经毒性,因此乌头碱的神经毒性可能与强啡肽A不同程度的表达有关^[17]。

2.3 干扰神经细胞能量代谢 糖原是由葡萄糖合成的多糖,在一定条件下可分解为葡萄糖,为细胞和组织代谢提供能量。糖原对机体的意义主要在于当机体需要能量时它可以迅速分解以供急需,而神经细胞的各项生理变化均需消耗能量。因此,通过测定糖原含量的变化可以观察神经细胞的能量代谢情况。Peng等^[35]首次利用细胞培养技术研究乌头碱的神经毒性作用及其机制,发现神经细胞受到2%乌头碱的作用后,其细胞内糖原含量较正常对照组明显下降,并且随着时间的推移,糖原浓度发生了显著变化;故Peng等^[35]认为,一方面,由于细胞内钙超载形成,呼吸链中断,能量消耗增加,加速线粒体的无氧代谢,糖原被大量分解,因此细胞中糖原含量减少,最终导致细胞能量代谢障碍;另一方面,钙超载直接抑制 α -酮戊二酸脱氢酶和丙酮酸脱氢酶及线粒体的 H^+ -ATP酶活性,导致线粒体功能下降等。曾有研究显示,附子可通过上调葡萄糖-6-磷酸酶的催化亚基、葡萄糖激酶、胰岛素样生长因子结合蛋白1等表达,下调肝糖原合酶基因表达,从而影响糖代谢过程,起到温热作用^[36]。亦有报道称,乌头碱可使柠檬酸合酶的基因表达降低,从而抑制三羧酸循环,导致能量代谢紊乱、细胞功能障碍^[30]。但目前仍缺乏在乌头碱中毒的情况下有关乌头碱干扰神经细胞能量代谢的基因研究。因此,还需进一步探索乌头碱如何从基因水平上影响神经细胞能量代谢而导致神经毒性。

2.4 诱导神经细胞凋亡 细胞形态在维持细胞功能方面起着非常重要的作用。细胞凋亡后,组织的相应功能不可避免地会受到影响,最终导致机体功能紊乱。PC12细胞是1976年由Greene和Tischler成功建立的具备神经特性的细胞,属神经脊源性,来自大鼠的肾上腺嗜铬细胞瘤,因其生长条件稳定且可传代培养,现被广泛用于神经系统相关病变等的体外研究^[37]。我国学者利用PC12细胞观察乌头碱对神经细胞的损伤,发现当25 $\mu\text{mol/L}$ 乌头碱作用于PC12细胞时,PC12细胞活性明显降低,且乌头碱浓度与PC12细胞活性呈负相关^[38]。相关研究也发现,经乌头碱处理的PC12细胞凋亡比例明显高于未经乌头碱处理的细胞,并且早期凋亡的PC12细胞比例高达45.46%^[34]。研究表明,光镜下可见乌头碱中毒大鼠神经元排列结构紊乱,胞体高度肿胀,含量明显减少或消失,12 h时病理损伤最为显著,

24 h 时病理损伤有所减轻,但尼氏体脱颗粒仍存在,排列的结构层次紊乱;大鼠脑皮质电镜显示,乌头碱中毒大鼠神经元核仁消失,核膜部分溶解、模糊不清,线粒体溶解、肿胀,胞浆里出现空泡,给药后 12 h 时病理损伤最严重^[39]。另有研究表明,当乌头碱的浓度升高时,中脑多巴胺神经细胞树突的数量和长度减少,并且细胞的形态会产生变化,表现为收缩、变形、纤维缩短等^[40]。在心肌细胞中, Ca^{2+} 、环磷酸腺苷和 Ca^{2+} 载体浓度的增加可诱导细胞凋亡^[41],而乌头碱诱导神经细胞凋亡的详细机制还需进一步探究。

2.5 其他 P 糖蛋白是人体内主要的转运蛋白之一,由 *mdr1* 基因所编码,其与药物的吸收及排泄等过程密切相关^[42]。体外研究表明,*mdr1* 基因表达的 P 糖蛋白在乌头碱的排出过程中起着至关重要的作用^[43]。Zhu 等^[16]研究了 P 糖蛋白在调节乌头碱的有效性及毒性方面的作用及其在体内的作用机制,发现 P 糖蛋白缺乏不仅增强了乌头碱的镇痛作用,而且加重了乌头碱所致的中枢神经毒性。因此可以推测,乌头碱导致中枢神经毒性可能与干扰 *mdr1* 基因、影响 P 糖蛋白表达等因素有关。

3 展 望

近年来,国内外对乌头碱致中枢神经毒性的机制研究较少,且现有研究多局限在神经细胞的离子通道、神经递质、能量代谢、细胞损伤上,而缺乏与乌头碱致中枢神经毒性相关的基因调控研究及血脑屏障方面的研究。因此,随着分子生物学和蛋白质组学等研究方法的不断改进,可进一步探讨乌头碱对神经系统基因表达调控的影响、乌头碱在大脑中的标记方法及其通过血脑屏障的通道,以便更系统与深入地理解乌头碱的神经毒理机制,为临床安全应用乌头碱及开发乌头碱中毒的神经毒性拮抗药提供更好的理论依据。

参 考 文 献

- [1] Verma S, Ojha S, Raish M. Anti-inflammatory activity of *Aconitum heterophyllum* on cotton pellet-induced granuloma in rats[J]. *J Med Plants Res*, 2010, 4(15): 1 566 - 1 569.
- [2] Lai MC, Liu IM, Liou SS, et al. Radix *Aconiti kusnezoffii* exhibits an antinociceptive activity involvement at central and peripheral nervous system[J]. *J Food Drug Anal*, 2012, 20(2): 501 - 509, 557.
- [3] Singhuber J, Zhu M, Prinz S, et al. *Aconitum* in traditional Chinese medicine: a valuable drug or an unpredictable risk? [J]. *J Ethnopharmacol*, 2009, 126(1): 18 - 30.
- [4] Chan TY. *Aconitum* alkaloid content and the high toxicity of aconite tincture[J]. *Forensic Sci Int*, 2012, 222(1/3): 1 - 3.
- [5] Zhang ZT, Jian XX, Ding JY, et al. Further Studies on Structure-Cardiac Activity Relationships of Diterpenoid Alkaloids [J]. *Nat Prod Commun*, 2015, 10(12): 2 075 - 2 084.
- [6] Sarkar PK, Prajapati PK, Shukla VJ, et al. Evaluation of processed borax as antidote for aconite poisoning[J]. *J Ethnopharmacol*, 2017, 205: 138 - 146.
- [7] So YT, Fung HT, Chung KL, et al. A case of Chuanwu and Fuzi poisoning[J]. *Hong Kong J Emerg Med*, 2000, 7(4): 230 - 233.
- [8] Paudel R, Palaian S, Ravi-Shankar P, et al. Aconite poisoning: a clinical review of the first four cases from Nepal[J]. *J Clin Diagn Res*, 2008, 2(1): 651 - 655.
- [9] 卢中秋, 胡国新. 乌头碱急性中毒及诊治研究现状[J]. *中国中西医结合急救杂志*, 2005, 12(2): 119 - 121.
- [10] Niitsu H, Fujita Y, Fujita S, et al. Distribution of Aconitum alkaloids in autopsy cases of aconite poisoning[J]. *Forensic Sci Int*, 2013, 227(1/3): 111 - 117.
- [11] Li H, Liu L, Zhu S, et al. Case reports of aconite poisoning in mainland China from 2004 to 2015: A retrospective analysis[J]. *J Forensic Leg Med*, 2016, 42: 68 - 73.
- [12] Ono T, Hayashida M, Tezuka A, et al. Antagonistic effects of tetrodotoxin on aconitine-induced cardiac toxicity[J]. *J Nippon Med Sch*, 2013, 80(5): 350 - 361.
- [13] Li Y, Tu D, Xiao H, et al. Aconitine blocks HERG and Kv1.5 potassium channels[J]. *J Ethnopharmacol*, 2010, 131(1): 187 - 195.
- [14] Sheth S, Tan EC, Tan HH, et al. Herb-induced cardiotoxicity from accidental aconitine overdose [J]. *Singapore Med J*, 2015, 56(7): e116 - e119.
- [15] Chen X, Wu R, Jin H, et al. Successful Rescue of a Patient with Acute Aconitine Poisoning Complicated by Polycystic Renal Hemorrhage[J]. *J Nippon Med Sch*, 2015, 82(5): 257 - 261.
- [16] Zhu L, Wu J, Zhao M, et al. *Mdr1a* plays a crucial role in regulating the analgesic effect and toxicity of aconitine by altering its pharmacokinetic characteristics[J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2017, 320: 32 - 39.
- [17] Li TF, Gong N, Wang YX. Ester Hydrolysis Differentially Reduces Aconitine-Induced Anti-hypersensitivity and Acute Neurotoxicity: Involvement of Spinal Microglial Dynorphin Expression and Implications for *Aconitum* Processing [J]. *Front Pharmacol*, 2016, 7: 367.
- [18] Stammet P, Wagner DR, Gilson G, et al. Modeling serum level of s100 β and bispectral index to predict outcome after cardiac arrest[J]. *J Am Coll Cardiol*, 2013, 62(9): 851 - 858.
- [19] Zenaide PV, Gusmao-Flores D. Biomarkers in septic encephalopathy: a systematic review of clinical studies [J]. *Rev Bras Ter Intensiva*, 2013, 25(1): 56 - 62.

- [20] Sterea AM, Almasi S, El Hiani Y. The hidden potential of lysosomal ion channels: A new era of oncogenes [J]. Cell Calcium, 2018, 72: 91 - 103.
- [21] Kayano T, Noda M, Flockerzi V, et al. Primary structure of rat brain sodium channel III deduced from the cDNA sequence [J]. FEBS Lett, 1988, 228(1): 187 - 194.
- [22] Noda M, Ikeda T, Kayano T, et al. Existence of distinct Sodium Channel messenger RNAs in rat brain [J]. Nature, 1986, 320(6 058): 188 - 192.
- [23] Catterall WA. Neurotoxins that act on voltage-sensitive sodium channels in excitable membranes [J]. Annu Rev Pharmacol Toxicol, 1980, 20: 15 - 43.
- [24] Catterall WA. Cellular and molecular biology of voltage-gated sodium channels [J]. Physiol Rev, 1992, 72(4 Suppl): S15 - S48.
- [25] Mozhayeva GN, Naumov AP, Negulyaev YA, et al. The permeability of aconitine-modified sodium channels to univalent cations in myelinated nerve [J]. Biochim Biophys Acta, 1977, 466(3): 461 - 473.
- [26] Schmidt H, Schmitt O. Effect of aconitine on the Sodium permeability of the node of Ranvier [J]. Pflugers Arch, 1974, 349(2): 133 - 148.
- [27] Ameri A, Shi Q, Aschoff J, et al. Electrophysiological effects of aconitine in rat hippocampal slices [J]. Neuropharmacology, 1996, 35(1): 13 - 22.
- [28] Rao S, Sikdar SK. Modification of alpha subunit of RIIA sodium channels by aconitine [J]. Pflugers Arch, 2000, 439(3): 349 - 355.
- [29] 杨帆. 乌头碱对神经细胞毒作用机制的研究 [D]. 成都: 成都中医药大学, 2008.
- [30] 张仲林, 彭成. 乌头类有毒中药的毒性基因研究 [J]. 中国药理通讯, 2009, 26(2): 81.
- [31] Ameri A, Seitz U. Effects of mesaconitine on [3H] noradrenaline uptake and neuronal excitability in rat hippocampus [J]. Exp Brain Res, 1998, 121(4): 451 - 456.
- [32] Sheikh-Zade YR, Cherednik IL, Galenko-Yaroshevskii PA. Peculiarities of cardiotropic effect of aconitine [J]. Bull Exp Biol Med, 2000, 129(4): 365 - 366.
- [33] Zhao Y, Bu Q, Zhou Y, et al. Mechanism study of Aconitum-induced neurotoxicity in PC12 cells: involvement of dopamine release and oxidative damage [J]. Neurotoxicology, 2010, 31(6): 752 - 757.
- [34] 王磊. 乌头碱中枢神经毒性及双黄连干预 [D]. 温州: 温州医科大学, 2014.
- [35] Peng C, Zheng T, Yang F, et al. Study of neurotoxic effects and underlying mechanisms of aconitine on cerebral cortex neuron cells [J]. Arch Pharm Res, 2009, 32(11): 1 533 - 1 543.
- [36] 于华芸, 季旭明, 吴智春, 等. 附子对大鼠能量代谢及相关基因表达的影响 [J]. 中国中药杂志, 2011, 36(18): 2 535 - 2 538.
- [37] Greene LA, Tischler AS. Establishment of a noradrenergic clonal line of rat adrenal pheochromocytoma cells which respond to nerve growth factor [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1976, 73(7): 2 424 - 2 428.
- [38] 王磊, 赵光举, 洪广亮, 等. 双黄连对乌头碱所致 PC12 细胞损伤的干预作用 [J]. 中国中西医结合急救杂志, 2014, 21(6): 408 - 411.
- [39] 王磊, 赵光举, 李萌芳, 等. 急性乌头碱中毒脑损伤机制及黄芩苷的干预作用 [J]. 中国中西医结合急救杂志, 2014, 21(4): 289 - 293.
- [40] 严妍, 杨茂, Rausch WD, 等. 乌头碱对胎鼠中脑多巴胺能神经元细胞的神经毒性作用 [J]. 江苏大学学报(医学版), 2013, 23(3): 212 - 215.
- [41] Orrenius S, McConkey DJ, Bellomo G, et al. Role of Ca²⁺ in toxic cell killing [J]. Trends Pharmacol Sci, 1989, 10(7): 281 - 285.
- [42] Picchianti-Diamanti A, Rosado MM, Scarsella M, et al. P-glycoprotein and drug resistance in systemic autoimmune diseases [J]. Int J Mol Sci, 2014, 15(3): 4 965 - 4 976.
- [43] Li N, Tsao R, Sui Z, et al. Intestinal transport of pure diester-type alkaloids from an aconite extract across the Caco-2 cell monolayer model [J]. Planta Med, 2012, 78(7): 692 - 697.

(收稿日期: 2018-05-19 修回日期: 2018-08-20)

● 本刊对统计学符号及统计学方法的要求

按 GB 3358-82《统计学名词及符号》的有关规定书写, 常用如下: (1) 样本的算术平均数用英文小写 \bar{x} (中位数仍用 M); (2) 标准差用英文小写 s ; (3) 标准误用英文小写 s_x ; (4) t 检验用英文小写 t ; (5) F 检验用英文大写 F ; (6) 卡方检验用希腊文小写 χ^2 ; (7) 相关系数用英文小写 r ; (8) 自由度用希腊文小写 ν ; (9) 概率用英文大写 P (P 值前应给出具体检验值, 如 $\chi^2 = 10.306$, $P = 0.001$; $t = 4.713$, $P = 0.000$)。以上符号均用斜体。

关于资料的统计学分析: 对于定量资料, 应根据实验或调查设计类型和资料的条件选用合适的统计学分析方法, 不能盲目套用 t 检验和单因素方差分析; 对于定性资料, 应根据实验或调查设计类型、列表中性变量的性质和分析目的选用合适的统计学分析方法, 不能盲目套用 χ^2 检验; 对于回归分析, 应结合专业知识和散布图选用合适的回归类型, 不能盲目套用简单直线回归分析。