

柴胡三参胶囊对缺血性心律失常大鼠模型心肌细胞 HERG K⁺通道蛋白的研究

刘建和^{1,2}, 杨成龙^{1,2}, 苏联军³, 周正³, 刘锦霞³, 唐银³, 胡志希², 王建国²

(1.湖南中医药大学第一附属医院, 湖南长沙 410007; 2.湖南中医药大学中医诊断学湖南省重点实验室, 湖南长沙 410007;
3.湖南中医药大学, 湖南长沙 410208)

[摘要] **目的** 探讨柴胡三参胶囊对缺血性心律失常大鼠心肌中 HERG K⁺通道蛋白表达的影响, 为柴胡三参胶囊的临床应用提供实验依据, 为缺血性心律失常的中医药治疗提供更多的治疗途径。**方法** 将大鼠随机分为空白组、假手术组、模型组、柴胡三参胶囊(青蒿)组、柴胡三参胶囊(常山)组、稳心颗粒组、胺碘酮组, 每组各 10 只, 药物组在结扎左冠状动脉前降支前 10 d 开始预先给药, 连续 10 d, 观察大鼠结扎左冠状动脉前降支后心电图改变及心肌中 HERG K⁺通道蛋白表达。**结果** 柴胡三参胶囊能够降低缺血性心律失常的发生率($P<0.05$)、显著性的降低大鼠心肌细胞 HERG K⁺通道蛋白的失活($P<0.01$)。**结论** 柴胡三参胶囊抗缺血性心律失常的效果明显, 心肌细胞 HERG K⁺通道蛋白是其作用靶点。

[关键词] 柴胡三参胶囊; 缺血性心律失常; HERG K⁺

[中图分类号] R256.21 **[文献标识码]** A **[文章编号]** doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2016.06.005

Effect of Chaihu Sanshen Capsule on Myocardial Cell HERG K⁺ Channel Protein in Ischemic Arrhythmia Rat Models

LIU Jianhe^{1,2}, YANG Chenglong^{1,2}, SU Lianjun³, ZHOU Zheng³, LIU Jinxia³, TANG Yin³, HU Zhixi², WANG Jianguo²

(1. The First Affiliated Hospital of Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410007, China;
2. Hunan Provincial Key Laboratory of TCM Diagnostics, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410007
China; 3. Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China)

[Abstract] **Objective** To investigate Chaihu Sanshen capsule on myocardial ischemic arrhythmia mice HERG K⁺ channel protein expression in ischemic arrhythmia rat models, and provide more experimental basis for clinical use of Chaihu Sanshen capsule. **Methods** The rats were randomly divided into blank group, sham-operation group, model group, Chaihu Sanshen (Qinghao) group, Chaihu Sanshen (Changshan) group, Wenxin granule group, amiodarone group, 10 rats in each group. The drug group was given pretreatment for 10 days before 10 days of left anterior descending coronary artery. The change of electrocardiogram and myocardial HERG K⁺ channel protein expression in left anterior descending coronary artery was observed. **Results** Chaihu Sanshen capsule can reduce the incidence of ischemic arrhythmias ($P<0.05$), and significantly reduce the HERG K⁺ channel protein inactivation ($P<0.01$). **Conclusion** The antiarrhythmic effect of Chaihu Sanshen capsules is obvious, and its targets are HERG K⁺ channel proteins.

[Keywords] Chaihu Sanshen capsule; ischemic arrhythmias; HERG K⁺

缺血性心律失常(Ischemic arrhythmias)是冠心病的常见并发症, 是临床上缺血性心脏病常见的病理生理过程, 发病率高, 是发生心源性猝死的主要原因, 严重威胁着人类健康。研究发现心脏 HERG K⁺通道属于电压依赖性钾通道, 其介导的快速激活延

迟整流钾电流(IK_r)是人类心肌细胞动作电位 3 期快速复极的主要电流, 是心脏电活动的基础, 心肌缺血主要影响 HERG K⁺通道的失活过程, 导致动作电位时程缩短, 诱发缺血性心律失常, 因此成为致死性心律失常的重要生物靶标^[1]。本课题从 HERG K⁺通

[收稿日期] 2015-12-26

[基金项目] 湖南省科技厅科研项目(2013SK3103); 湖南省中医药管理局重点课题(201303); 湖南省重点实验室开放基金计划项目(2014XN-FZ03); 湖南省科技创新项目投资计划([2014]658); 2015 年湖南省学位与研究生教育教改研究课题(JG2015B071)。

[作者简介] 刘建和, 男, 博士, 主任医师, 博士研究生导师, 研究方向: 心血管疾病的中医药防治。

道进行研究,进一步探讨柴胡三参胶囊作用机制,为缺血性心律失常的中医药治疗提供更多的治疗途径。

1 材料与方法

1.1 实验动物

清洁级 Wistar 大鼠 70 只,雌雄各半,体质量(200±20) g,由北京维通利华实验动物技术有限公司提供[许可证编号:SCXK(湘)2012-0001,动物合格证号(11400700061625,11400700070275)]。

1.2 实验药物与试剂

柴胡三参胶囊(SHSS)(青蒿与常山均是传统的抗疟疾中药,都具有传统的抗心律失常作用^[1-2],根据普通高等教育“十一五”国家级规划教材中药学第二版,常山有毒,在原有配方不变的情况下,更改常山为青蒿,特在此实验中分为两组对比观察),湖南中医药大学第一附属医院制剂室生产提供柴胡三参胶囊(青蒿)(批号:140403)、柴胡三参胶囊(常山)(批号:140820);HERG K⁺通道反应蛋白一抗,北京博奥森生物技术有限公司提供(生产日期:2014-04-18);二抗,北京中杉金桥生物技术有限公司提供(批号:K142714C)。

1.3 实验仪器

WD407 型小动物呼吸机,深圳市瑞沃德生命科技有限公司;RM6280 型多道生理信号采集处理系统以及图像识别分析系统,成都仪器厂;光学显微镜,上海沪星光学仪器有限公司。

1.4 实验分组与给药

将大鼠随机分为 7 组:空白组、假手术组、模型组、柴胡三参(青蒿)组、柴胡三参(常山)组、胺碘酮组、稳心颗粒组,各组 10 只,各组在结扎左冠状动脉左前降支前 10 d 开始预先给药,连续 10 d,分别予以生理盐水、相应药物灌胃。给药量按成人 70 kg、大鼠 200 g 体表面积换算(公式为 $D_2=D_1 \times R_2/R_1$),并按重量调整剂量。

1.5 动物模型制备

根据朱丽红^[3]、张页^[4]及徐叔云的《药理实验方法学》^[5]的造 Wistar 大鼠冠心病气虚痰瘀模型方法稍作改进。末次给药 30 min 后大鼠腹腔注射 10% 水合氯醛(0.35 mL/100 g)进行麻醉,用生物信号采集器全程记录 II 导联心电图,气管切开、插管、接呼

吸机。打开胸腔,分离心包膜,轻掀左心耳,从左心耳下缘处进针,在肺动脉旁出针,结扎左冠状动脉前降支,以 II 导联 ST 段明显抬高或 T 波高耸,肉眼观察结扎线以下心脏表面区域颜色变暗为结扎成功标志,结扎 30 min 后再灌注 40 min。空白组腹腔只麻醉不开胸不结扎,假手术组只开胸不结扎。

1.6 大鼠死亡率及心律失常评分

在实验过程期间,因意外原因死亡大鼠剔除最后数据统计,因恶性心律失常而死大鼠则进入心电图室性心律失常评分统计,但不进入其他指标检测项目之中。采用 Curtis 和 Walker(1988)心律失常评分法对心律失常严重程度进行定量分析。

1.7 HERG K⁺通道蛋白的表达检测

应用免疫组织化学检测法检测缺血区心肌组织中 HERG K⁺通道蛋白的表达水平。

1.8 统计学分析处理

所有数据均用 SPSS 22.0 统计软件分析,所有数据均采用“ $\bar{x} \pm s$ ”表示。计量资料采用 *t* 检验,方差不齐者换用校正 *t* 检验;非正态分布采用 Wilcoxon 秩和检验;所有计数资料均采用 χ^2 检验;所有等级资料均采用 Wilcoxon 秩和检验或 Ridit 分析。

2 结果

2.1 各组大鼠死亡情况

在喂养及手术期间,因不明原因突然死亡,或麻醉意外,或多次结扎致大出血等死亡的剔除于心电图统计分析及最后数据统计,但因恶性心律失常而死亡的大鼠进入心电图统计分析,但不进入最后的数据统计。在实验过程中,因室颤死亡的模型组 4 只,死亡率 44.4%;柴胡三参青蒿组 2 只,死亡率 12.5%;柴胡三参常山组 2 只,死亡率 22.2%;稳心颗粒组 1 只死亡率 11.1%;胺碘酮组 4 只,死亡率 40%。

2.2 各组大鼠室性心律失常评分

实验缺血再灌注期间,除假手术组因机械性心肌损伤出现短暂室速外,模型组及 SHSS 组均有发生多种室性心律失常,与假手术组比较,模型组心室扑动(VP)、心室颤动(VF)发生次数增多($P < 0.01$),心律失常评分升高。与模型组比较,SHSS 组 VP、VF 发生次数及心律失常评分明显降低。见表 1。

2.3 HERG K⁺免疫组化染色结果

空白组:心肌细胞排列规则,核呈杆状,可见横

表1 各组大鼠心律失常情况及评分

组别	n	VP(次)	VF(次)	VT(次)	($\bar{x}\pm s$) 评分(分)
模型组	10	29.20±5.25	14.5±03.03	4	5.40±0.52
柴胡三参(青蒿)组	8	4.00±1.69 ^{▲▲▲}	2.63±1.60 ^{▲▲▲}	1	1.13±0.03 ^{▲▲▲}
柴胡三参(常山)组	9	3.11±2.03 ^{▲▲▲}	2.00±1.66 ^{▲▲▲}	2	1.67±0.50 ^{▲▲▲}
稳心颗粒组	9	2.56±2.13 ^{▲▲}	1.22±0.97 ^{▲▲}	1	1.00±0.93 ^{▲▲}
胺碘酮组	10	15.60±3.69 ^{▲▲▲▲}	6.80±1.93 ^{▲▲▲▲}	4	3.60±2.17 ^{▲▲▲}

注:与模型组比较:▲▲ $P<0.01$,▲ $P<0.05$;与稳心颗粒组比较:★★ $P<0.01$,★ $P<0.05$ 。

纹,细胞间质分布均匀,毛细血管丰富,未见炎性细胞浸润;假手术组:心肌细胞排列欠规则,核呈杆状,细胞间质分布较为均匀,未见炎性细胞浸润;模型组:心肌细胞排列紊乱,大量细胞肥大水肿变性,横纹溶解消失,有大量炎性细胞浸润;柴胡三参胶囊(青蒿)组:心肌细胞排列较紊乱,部分细胞水肿变性,横纹溶解消失,间质少量炎性细胞浸润;柴胡三参胶囊(常山)组:心肌细胞排列紊乱,大量细胞水肿变性,横纹溶解消失,间质大量炎性细胞浸润;稳心颗粒组:心肌细胞排列较紊乱,部分细胞水肿变性,纤维断裂,间质增宽,较多炎性细胞浸润;胺碘酮组:心肌细胞排列紊乱,大量细胞肥大水肿变性,横纹溶解消失,有大量炎性细胞浸润。

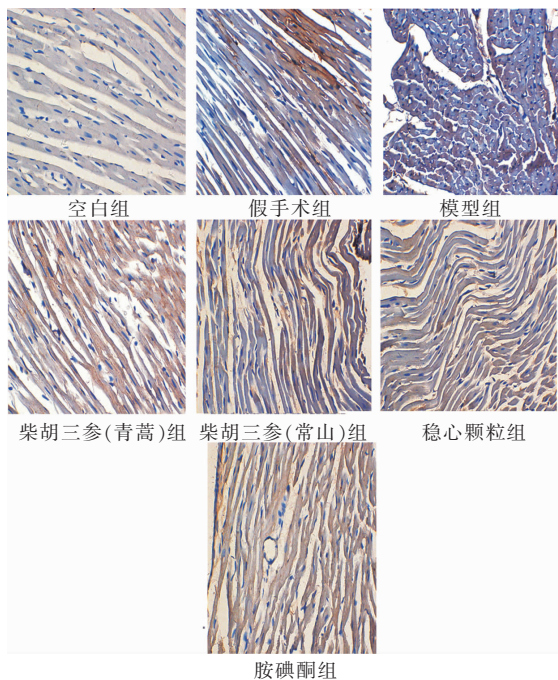


图1 大鼠缺血区组织形态学光镜图(HE染色,×400)

2.4 各组间 HERG K⁺通道的蛋白表达水平

将空白组、假手术组、模型组、各药物组 HERG K⁺通道蛋白平均灰度相比较,结果符合方差齐性及正态分布,采用 *t* 检验。柴胡三参胶囊能够显著性的

降低 HERG K⁺通道蛋白的失活 ($P<0.01$),且柴三(青蒿组)与柴三(常山组)无差异性。见表2。

表2 HERG K⁺通道蛋白平均灰度组间比较

组别	n	平均灰度
空白组	9	69.944±11.737 [■]
假手术组	9	137.08±14.846 [■]
模型组	6	178.11±21.097 ^{▲▲}
柴胡三参青蒿组	7	110.54±19.115 ^{▲▲■}
柴胡三参常山组	7	111.21±7.952 ^{▲▲■}
稳心颗粒组	8	113.35±13.375 ^{▲▲■}
胺碘酮组	6	121.10±10.016 ^{▲▲■}
统计值	-	36.869
<i>P</i>	-	0.0001

注:与空白组比较:▲ $P<0.01$;与假手术组比较:★ $P<0.05$;与模型组比较:■ $P<0.01$ 。

3 讨论

抗心律失常西药存在致心律失常及安全性等诸多问题,近年来多项临床研究证实,中药可通过多靶点、多途径、多离子通道阻滞和非离子通道调节的整合机制,发挥调节心律失常作用^[6-8]。从此共识出发,中医中药在心律失常的防治上大有可挖掘之处。柴胡三参胶囊是在认为心悸的基本病机少阳不和,治法为“和解定悸”的指导思路下由小柴胡汤加减而来的。方中以柴胡为君,达肝入少阳,疏泄肝郁、升发肝气、和解少阳之邪;配伍黄芩,清泄少阳湿热之邪,柴胡配伍黄芩为经典和法配伍;臣以法半夏下气化痰,丹参活血清心,苦参通利清火,青蒿截邪并配合柴胡和解少阳之邪;党参、甘草缓急益气,调和诸药共为佐使。全方合用标本兼治,邪去而正安,又扶正兼祛邪,以达和解稳律之目的。柴胡三参胶囊前期临床及实验研究也已表明其抗心律失常疗效确切^[9-12]。

HERG 基因编码的 K⁺通道称为 HERG K⁺通道,HERG K⁺通道与室性心律失常密切相关,心脏 HERG K⁺通道属于电压依赖性钾通道,其介导的快

速激活延迟整流钾电流(IK_r)是人类心肌细胞动作电位3期快速复极的主要电流,是心脏电活动的基础^[13]。在本实验中,结合心电图统计分析,心律失常发生率低的柴胡三参胶囊组中HERG K⁺通道蛋白的表达较心律失常发生率高的模型组明显降低且存在显著性差异。从而证实HERG K⁺是柴胡三参胶囊抗心律失常的作用靶点之一。

同时,目前研究得比较清楚的是肾上腺素能对HERG K⁺通道的调控^[14-15],β₁-AR通过Gs蛋白激活腺苷酸环化酶(AC),使细胞内环磷酸腺苷(cAMP)水平升高,cAMP激活蛋白激酶A(PKA)、蛋白激酶C(PKC),引起HERG K⁺通道蛋白直接发生磷酸化,刺激加速HERG K⁺电流外流,减弱HERG K⁺电流内流导致快速型室性心律失常。本实验的前期研究了柴胡三参胶囊对缺血性心律失常的大鼠模型缺血心肌中的PKA、PKC表达影响研究,结果亦证实在心律失常发生率低的柴胡三参胶囊组PKA、PKC的表达亦降低。

参考文献:

- [1] 史海霞.中药青蒿的药理学研究进展[J].武警后勤学院学报(医学版),2015,24(1):77-80.
- [2] 丁书文,焦华琛,解砚英,等.青蒿常山对冠脉结扎所诱发犬急性心肌缺血所致心律失常的保护作用[J].中华中医药学刊,2008,26(8): 1 613-1 614.
- [3] 朱丽红,汪克明,王宗殿,等.冠心病痰瘀互结证动物模型复制方法的研究[J].广州中医药大学学报,2006,23(4):346-349.
- [4] 张 页,杨学娟,沈绍功.冠心病心绞痛气虚痰浊证动物模型研究[J].中国中医基础医学杂志,2000,6(12):50-52.
- [5] 徐叔云,卞如濂,陈 修.药理实验方法学[M].第3版.北京:人民卫生出版社,2001:1 052-1 053.
- [6] 毕颖斐,毛静远,王贤良,等.中医药防治冠心病临床优势及有关疗效评价的思考[J].中医杂志,2015,56(5):437-440.
- [7] 黄小平,王 蓓,邱咏园,等.黄芪甲苷、人参皂苷 Rg1、Rb1 和三七皂苷抗小鼠脑缺血再灌注氧化应激损伤和促进能量代谢的配伍研究[J].湖南中医药大学学报,2014,34(7):5-11.
- [8] 陈 聪,廖 菁,李 鑫,等.加味丹参饮抑制 p38MAPK 表达保护缺氧/复氧小鼠心肌细胞损伤的实验研究[J].湖南中医药大学学报,2016,36(2):35-39.
- [9] 刘建和,易刚强,程丑夫.柴胡三参汤治疗冠心病室性期前收缩临床研究[J].中国中医药信息杂志,2005,12(11):13-15.
- [10] 刘建和,李 群,何少平,等.柴胡三参胶囊对大鼠心肌缺血再灌注损伤的影响[J].中国中医药信息杂志,2012,11(17):29-30.
- [11] 刘建和,何少平,胡熙苒,等.柴胡三参胶囊对心肌缺血心律失常模型大鼠心肌细胞 Ca²⁺及 SERCA2a 表达的影响[J].中华中医药杂志,2010,25(10):35-37.
- [12] 刘建和,胡熙苒,何少平,等.柴胡三参胶囊对实验性心律失常保护作用的研究[J].中西医结合心脑血管病杂志,2010,8(10):35-38.
- [13] 汪艳丽,刘如秀,刘金凤.窦房结细胞钾离子通道结构及电生理研究进展[J].中国循证心血管医学杂志,2014,6(5):635-637.
- [14] Bian J, Cui J, McDonald TV. Adrenergic Receptors; Investigators at College of Medicine, Department of Medicine publish new data on adrenergic receptors[J]. Obesity, Fitness & Wellness Week, 2010:860.
- [15] Bian JS, Kagan A, McDonald TV. Molecular analysis of PIP2 regulation of HERG and IK_r [J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2004,287(5):2 154-2 163.

(本文编辑 李 杰)