

# 柴胡三参胶囊对缺血性心律失常大鼠心肌细胞 Cx43 的影响

刘建和<sup>1</sup>, 王建国<sup>2</sup>, 尹萍<sup>2</sup>, 杨成龙<sup>1</sup>, 唐银<sup>2</sup>, 周正<sup>2</sup>, 刘锦霞<sup>2</sup>

(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, 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细胞间缝隙连接蛋白 43(connexin 43, Cx43)表达和分布的影响, 为柴胡三参胶囊的临床应用提供实验依据。**方法** 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)、胺碘酮组、稳心颗粒组, 每组各 10 只。相应干预 10 d 后, 除空白组和对照组外, 其余各组采取大鼠左冠状动脉前降支高位结扎法制作心肌缺血性心律失常模型, 再用免疫组织化学 S-P 法检测 Cx43 蛋白在各组大鼠心肌中的表达水平及分布情况。**结果** 柴胡三参胶囊(青蒿组)与柴胡三参胶囊(常山组)Cx43 免疫组化灰度值比较差异无统计学意义 ( $P>0.05$ ); 与模型组比较, 柴胡三参胶囊心律失常评分降低 ( $P<0.05$ )、死亡率降低、Cx43 平均灰度值增高 ( $P<0.05$ ) 及分布紊乱得到改善。**结论** 柴胡三参胶囊(青蒿)与柴胡三参胶囊(常山)均能够改善心肌缺血时 Cx43 的表达及分布, 保护心肌, 从而减少缺血性心律失常的发生, 且柴胡三参胶囊(青蒿)临床安全性更高。

**[关键词]** 柴胡三参胶囊; 缺血性心律失常; 缝隙连接蛋白 43; 常山; 青蒿

**[中图分类号]** R285.5; R541.7

**[文献标识码]** A

**[文章编号]** doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2016.12.004

## Effect of Chaihu Sanshen Capsule on Cx43 in Myocardial Cells of Rats with Ischemic Arrhythmias

LIU Jianhe<sup>1</sup>, WANG Jianguo<sup>2</sup>, YIN Ping<sup>2</sup>, YANG Chenglong<sup>1</sup>, TANG Yin<sup>2</sup>, ZHOU Zheng<sup>2</sup>, LIU Jinxia<sup>2</sup>

(1. The First Affiliated Hospital of Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China;

2. Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China)

**[Abstract]** **Objective** To investigate the effect of Chaihu Sanshen capsule on the expression and distribution of connexin 43 (Cx43) of gap junction in myocardial cells of rats with ischemic arrhythmias, and provide experimental basis for clinical application of Chaihu Sanshen capsule. **Methods** The rats were randomly divided into blank group, sham operation group, model group, Chaihu Sanshen capsule (Qinghao group), Chaihu Sanshen capsule (Changshan group), amiodarone group and Wenxin granules group, 10 rats in each group. After intervention for 10 d, in addition to the blank group and the control group, the other rats were made myocardial ischemic arrhythmias model of left anterior descending coronary artery ligation. The expression and distribution of Cx43 protein in myocardial cells of rats was detected by immunohistochemical S-P method. **Results** The Cx43 gray scale of Chaihu Sanshen capsule (Qinghao group) and Chaihu Sanshen capsule (Changshan group) had no significant difference ( $P>0.05$ ). The arrhythmia score of Chaihu Sanshen capsule was lower ( $P<0.05$ ) and a decrease in mortality, Cx43 average gray value increased ( $P<0.05$ ) and distribution disorder to improve. **Conclusion** Chaihu Sanshen capsule (Qinghao) and Chaihu Sanshen capsule (Changshan) both can improve the expression and distribution of Cx43 in myocardial ischemia cell, protect cardiac muscle and to reduce the incidence of ischemic arrhythmias, and Chaihu Sanshen capsule (Qinghao) shows higher clinical safety.

**[Keywords]** Chaihu Sanshen capsule; ischemic arrhythmias; Connexin 43; Changshan; Qinghao

**[收稿日期]** 2016-05-06

**[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(2014XNFZ03); 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, 医学博士, 教授, 主任医师, 博士研究生导师, 主要从事中医药防治心血管疾病, E-mail:ljh+cm1@163.com。

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。早期人们对抗心律失常药物的研究主要集中在膜离子通道上,而其药物本身又存在致心律失常的风险,且不能有效降低死亡率,致使临床应用受到限制。而近些年来研究发现缝隙连接(gap junction, GJ)的电脱耦联与缺血性心律失常密切相关,构成GJ的缝隙连接蛋白43(Cx43)表达和分布的异常是引发缺血后及再灌注后心律失常的重要机制。Cx43表达越弱,心律失常的发生率则越高<sup>[1]</sup>。本研究以目前临床常用抗缺血性心律失常药物稳心颗粒和胺碘酮为阳性对照,旨在观察柴胡三参胶囊对缺血性心律失常大鼠心肌细胞Cx43表达和分布的影响,进一步探讨柴胡三参胶囊抗心律失常的作用机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 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 药物与试剂

柴胡三参胶囊(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<sup>[2-3]</sup>,柴胡三参胶囊原配方中含常山,后根据普通高等教育“十一五”国家级规划教材《中药学》第二版,常山有毒,故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),由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);稳心颗粒(山东步长制药股份有限公司,规格:9g/袋);胺碘酮[赛诺菲(杭州)制药,规格:0.2g/粒];兔抗Cx43多克隆抗体,北京博奥森生物技术有限公司提供(批号:K142714C);抗Gi蛋白抗体,北京中杉金桥生物技术有限公司提供(批号:K142714C)。

### 1.3 仪器

RWD407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 分组与给药

将大鼠随机分为7组:空白组、假手术组、模型组、柴胡三参胶囊(青蒿组)(简称:柴三青蒿组)、柴胡三参胶囊(常山组)(简称:柴三常山组)、稳心颗粒组、胺碘酮组,每组10只。空白组、假手术组、模

型组、柴三青蒿、柴三常山组、稳心颗粒组、胺碘酮组,分别予以生理盐水(同等容量1mL)、生理盐水(同等容量1mL)、生理盐水(同等容量1mL)、柴胡三参胶囊(青蒿)内容物溶液[以70kg成人剂量4.8g/(kg·d)换算,大鼠剂量0.014g/(kg·d)]、柴胡三参胶囊(常山)内容物溶液[以70kg成人剂量4.8g/(kg·d)换算,大鼠剂量0.014g/(kg·d)]、稳心颗粒溶液[以70kg成人剂量27g/(kg·d)换算,大鼠剂量0.077/(kg·d)]、胺碘酮溶液[以70kg成人剂量0.6g/(kg·d)换算,大鼠剂量0.002g/(kg·d)]灌胃。各组均在结扎冠状动脉左前降支前10d预先给药,连续灌胃10d。

### 1.5 动物模型制备

根据文献[4-6]的Wistar大鼠冠心病气虚痰瘀模型造模方法稍作改进。末次给药30min后,用10%水合氯醛(0.35mL/100g)腹腔注射麻醉老鼠,生物信号采集器全程记录II导联心电图,切开气管,连接呼吸机。在胸骨左缘纵行切开皮肤,依次分离组织,暴露心脏,分离心包膜,从左心耳下缘处进针,肺动脉旁出针,结扎冠状动脉左前降支。以II导联ST段明显抬高或T波高耸,结扎线以下心脏表面区域颜色变暗为造模成功的标准。结扎30min后再灌注40min。(空白组只麻醉不开胸不结扎,假手术组只开胸不结扎。)

### 1.6 Cx43免疫组化染色与分析

灌注结束后直接摘取心脏(空白组直接开胸摘取心脏,假手术组则直接摘取心脏,经PBS缓冲液冲洗),选取部分左心室心肌组织,用多聚甲醛溶液固定,采取免疫组化染色SP法对取材的左心室组织进行染色(严格按照试剂盒说明书操作),在光学显微镜下观察Cx43的表达及分布情况。每张切片随机选5个高倍视野,以心肌胞浆中棕黄色颗粒状及位于心肌细胞之间闰盘连接处为Cx43阳性表达,细胞核为淡蓝色。最后采用Image-Pro Plus6.0图像分析软件对上述切片在显微镜下的视野进行阳性染色的平均灰度值测定,进而对心肌Cx43的表达进行半定量分析。灰度值越大,Cx43表达越弱,灰度值越小,Cx43表达越强。

### 1.7 统计方法

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;计数资料采用 $\chi^2$ 检验。

## 2 结果

### 2.1 各组大鼠死亡情况

在喂养及手术期间,因意外原因死亡(麻醉意外、多次结扎致大出血等)大鼠剔除心电图统计分

析及最后数据统计;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,因室颤死亡的缺血再灌注模型组 4 只,死亡率 40%;柴三青蒿组 2 只,死亡率 20%;柴三常山组 2 只,死亡率 20%;稳心颗粒组 1 只,死亡率 10%;胺碘酮组 4 只,死亡率 40%。

## 2.2 每组大鼠室性心律失常评分

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。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,模型组及柴三青蒿组、柴三常山组均有发生多种室性心律失常。与模型组比较,柴三青蒿组、柴三常山组 VP、VF 发生次数及心律失常评分明显降低( $P<0.01$ )(详见表 1)。

表 1 缺血再灌注期间各组大鼠心律失常情况及评分 ( $\bar{x}\pm s$ )

组别	n	VP(次)	VF(次)	VT(次)	评分(分)
模型组	6	29.20±5.25	14.5±3.03	4	5.40±0.52
柴三青蒿组	8	4.00±1.69 <sup>###*</sup>	2.63±1.60 <sup>###*</sup>	1	1.13±0.03 <sup>###*</sup>
柴三常山组	8	3.11±2.03 <sup>###*</sup>	2.00±1.66 <sup>###*</sup>	2	1.67±0.50 <sup>###*</sup>
稳心颗粒组	9	2.56±2.13 <sup>##</sup>	1.22±0.97 <sup>##</sup>	1	1.00±0.93 <sup>##</sup>
胺碘酮组	6	15.60±3.69 <sup>##</sup>	6.80±1.93 <sup>##</sup>	4	3.60±2.17 <sup>##</sup>
F 值		4.206	3.257		0.786
P 值		<0.01	<0.01		0.638

注:与模型组比较,## $P<0.01$ ;与胺碘酮组比较:\* $P<0.05$ 。

## 2.3 Cx43 免疫组化染色结果及平均灰度值半定量统计分析

从心肌细胞的纵切面上看,空白对照组和假手术组心肌细胞排列整齐,心肌 Cx43 表达强阳性,着色均匀,呈明显的棕黄色颗粒状,大小一致,条带状分布,密集、规律,主要位于闰盘内,界限清晰成线状排列,大多数位于心肌细胞长轴垂直的端-端连接处,少数位于与长轴平行的侧-侧相接处以及胞浆内。

在模型组中心肌缺血后心肌细胞呈区域性变性坏死,分布紊乱,心肌细胞肿胀断裂,心肌纤维断裂,结构破坏,Cx43 表达明显减弱甚至消失,数量减少,残存的 Cx43 界限不清,成点状或弥散成片,排列散乱,着色斑点大小不一,分布无规律,大部分散乱分布于心肌细胞的胞浆和心肌侧面,呈端-端连接处向侧-侧连接处转移趋势。

柴三青蒿组、柴三常山组、稳心颗粒组在心肌缺血后心肌纤维较为整齐,结构破坏较少,Cx43 的表达及分布改善,大部分染色颗粒明显,界限清晰,闰盘处表达多,心肌细胞侧-侧连接处表达少,分布较为规律。

胺碘酮组心肌缺血后心肌细胞呈大量细胞肥大

水肿变性,心肌纤维排列紊乱,Cx43 表达较模型组增多,闰盘处可见少量棕黄色颗粒,排列紊乱,分布不规律,心肌纤维的侧-侧连接处及细胞浆内增多。见图 1。

通过 Image-Pro Plus6.0 图像分析软件测定阳性染色的平均灰度值进行半定量统计分析可知(如表 2):与空白组及假手术组比较,模型组、柴三青蒿组、柴三常山组、稳心颗粒组、胺碘酮组灰度值增高明显,差异有统计学意义( $P<0.01$ ),表明 Cx43 蛋白在急性心肌缺血心律失常大鼠心肌中表达减弱。与模型组比较,柴三青蒿组、柴三常山组、稳心颗粒组、胺碘酮组灰度值减少,差异有统计学意义( $P<0.01$ ),表明药物干预可以使 Cx43 蛋白表达增强,从而减少心律失常的发生。柴三青蒿组、柴三常山组与胺碘酮组比较,其柴胡三参胶囊两组心肌 Cx43 免疫组化灰度值减少,有统计学意义( $P<0.05$ ),表明在此实验中,柴胡三参胶囊(青蒿)、柴胡三参胶囊(常山)较胺碘酮能更好的保护心肌缺血/再灌注大鼠心肌 Cx43 的表达和分布。柴三青蒿组、柴三常山组与稳心颗粒组比较,其三组的心肌 Cx43 免疫组化灰度值比较,差异无统计学意义( $P>0.05$ )。柴三青蒿组与柴三常山组比较,两组的心肌 Cx43 免疫组化灰度值比较,差异无统计学意义( $P>0.05$ )。

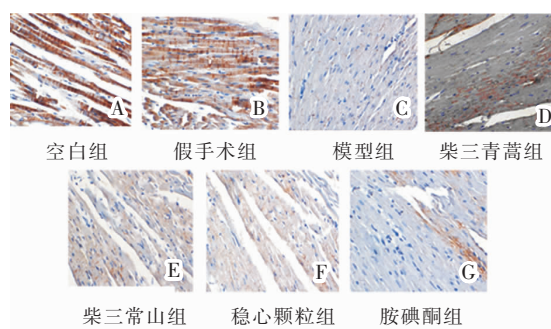


图 1 大鼠缺血区组织形态学变化显微图(HE×400)

表 2 各组大鼠心肌 Cx43 灰度值比较 ( $\bar{x}\pm s$ )

组别	n	心肌 Cx43 灰度值
空白组	10	65.33±2.79
假手术组	10	68.10±3.43
模型组	6	135.06±2.97 <sup>△△</sup>
柴三青蒿组	8	90.76±3.76 <sup>△△▲▲*</sup>
柴三常山组	8	90.67±3.46 <sup>△△▲▲*</sup>
稳心颗粒组	9	93.63±2.78 <sup>△△▲▲</sup>
胺碘酮组	6	115.25±2.65 <sup>△△▲▲</sup>
F 值		14.379
P 值		<0.01

注:与空白组及假手术组比较,△ $P<0.01$ ;与模型组比较,▲ $P<0.01$ ;与胺碘酮组比较:☆ $P<0.05$ 。



### 3 讨论

缺血性心律失常在临床中多见,在中医学属于“心悸”、“怔忡”范畴。柴胡三参胶囊是本院根据少阳不和且有宿根(宿痰)的中医病机所制的治疗缺血性心律失常的有效验方,原方主要由柴胡、法夏、党参、丹参、苦参、黄芩、常山、甘草等药物组成,其中柴胡为君,调畅气机、和解少阳之邪,党参、丹参、黄芩、半夏为臣,以补气活血以辅正,化痰、活血、清热、燥湿以驱邪,常山截邪、定悸,甘草补脾益气、调和诸药,共为佐使,共奏和解定悸、益气活血、清热化痰之效。但常山有毒性,具有强烈的致吐作用,并可致肝、肾的病理损害,临床用药具有不安全性。因青蒿<sup>[7]</sup>和常山具有截疟定悸的作用,无毒性,临床用药安全性大,故特意将常山更改为青蒿,且通过此实验表明,青蒿与常山在抗心律失常作用上效果无明显差异,更利于临床应用。

前期实验研究<sup>[8-11]</sup>提示,柴胡三参胶囊(青蒿)可增强缺血性心律失常大鼠心肌细胞 SERCA2a 活性、减少钙超载,抗缺血性心律失常;作用于多种离子通道使氯仿、乌头碱和氯化钡诱发的心律失常得到抑制;在心肌缺血再损伤模型中能降低乳酸脱氢酶(LDH)、肌酸激酶(CK)以及血清丙二醛(MDA)的含量,升高超氧化物歧化酶(SOD)的含量,提高自由基(OFR)清除剂的活力、增强心肌抗氧化能力、抑制心肌脂质过氧化,从而保护缺血再灌注损伤心肌,有效减少心律失常的发生。

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<sup>[12-13]</sup>。Cx43 是构成心肌细胞间通道和缝隙连接的最基本的蛋白质之一,能促进心脏的正常发育,是心肌细胞电耦联及化学耦联的基础,其数量改变可影响心肌的电传导速度,其分布改变影响心肌的传导各向异性<sup>[14]</sup>,其构成的离子通道在细胞通讯、心肌缺血再灌注损伤及闰盘重构过程中起着非常重要的作用<sup>[15-16]</sup>,高表达的Cx43 不仅能促进缝隙连接的形成<sup>[17]</sup>,还能有效地降低心律失常的发生率<sup>[18]</sup>。

在本实验研究中,结果表明心肌缺血后 Cx43 发生了重构,其数量减少、表达减弱,分布紊乱、侧边化,室性心律失常评分、大鼠死亡率也相应的增加,中药柴胡三参胶囊(青蒿组)与柴胡三参胶囊(常山组)中 Cx43 表达均较模型组明显增强,大部分染色颗粒明显,界限较为清晰,多散在分布于闰盘处,分布紊乱情况得到改善,心律失常评分及大鼠死亡率均较模型组降低。提示柴胡三参胶囊(青蒿组与常山组)均能通过调节 Cx43 的表达,减少其降解,有效改善 Cx43 的分布,稳定细胞间的电耦联,从而维持

心肌细胞间正常电活动(即正常的传导速度及各向异性),减少缺血性心律失常的发生,降低大鼠的死亡率,且柴胡三参胶囊(青蒿组)与柴胡三参胶囊(常山组)对 Cx43 的表达无明显差异,在临床应用柴胡三参胶囊(青蒿组)安全性更高。

### 参考文献:

- [1] 陈向来,唐燕华,杨岷圣.心肌 Cx43 在缺血预处理抗心律失常中的作用[J].实用临床医学,2011,12(8):12-13.16.
- [2] 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.
- [3] 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):1613-1614.
- [4] 朱丽红,汪克明,王宗殿,等.冠心病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.
- [5] 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,2006,10(12):50-52.
- [6] 徐叔云,卞如濂,陈 修.药理实验方法学[M].3 版.北京:人民卫生出版社,2001:1052-1053.
- [7] 黎润红.“523 任务”与青蒿抗疟作用的再发现[J].中国科技史杂志,2011,32(4):488-500.
- [8] 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.
- [9] 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.
- [10] 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 Ca<sup>2+</sup>及 SERCA2a mRNA 表达的影响[J].中华中医药杂志,2010,25(10):35-37.
- [11] 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.
- [12] 黄小平,王 蓓,邱咏园,等.黄芪甲苷、人参皂苷 Rg1、Rb1 和三七皂苷 R1 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.
- [13] 陈 聪,廖 菁,李 鑫,等.加味丹参饮抑制 p38MAPK 表达保护缺氧/复氧乳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.
- [14] Yu LL, He WB, Huang B, et al. Abstract 18522: Atrial Ganglionated Plexus Stimulation Prevents Myocardial Ischemia Reperfusion Arrhythmias by Preserving Connexin43 Protein [J]. Circulation, 2012, 126(21): A18522.
- [15] Michael P, Palatinus, Joseph A, et al. A Peptide Mimetic of the Connexin43 Carboxyl Terminus Reduces Gap Junction Remodeling and Induced Arrhythmia Following[J]. Circulation Research, 2011, 108(6): 704-715.
- [16] John A Jansen, Maartje Noorman, Mèra Stein, et al. Reduced Heterogeneous Expression Of Cx43 Combined with Decreased Nav1.5 Expression Account for Arrhythmia Vulnerability in Conditional Cx43 Knockout Mice[J]. Circulation, 2011, 124(21): A10183.
- [17] Abraham MR, Hen rikson CA, Tung L. An tiarrhythm ic engineering of skeletal myoblasts for cardiac transplantation [J]. Circ Res, 2005, 97(2): 159.
- [18] Fontes MS1, van Veen TA, de Bakker JM, et al. Functional consequences of abnormal Cx43 expression in the heart[J]. Biochimica et Biophysica Acta Biomembranes, 2012, 1818(8): 2020-2029.