

· 基础研究 ·

黄芪党参对心肌梗死后心衰小鼠心肌
复极时间的干预研究李思耐^{1,2} 林 谦¹ 高 群¹ 武 乾³ 崔海峰³ 刘 静¹ 石晓路³

摘要 目的 研究益气药黄芪、党参对心肌梗死(myocardial infarction, MI)后心衰小鼠心肌细胞复极时间的干预作用。**方法** 通过冠脉结扎术复制 MI 后心衰小鼠模型,采用随机数字表分为假手术组(生理盐水)、模型组(生理盐水)、益气组[黄芪 1.2 g/(kg·d) + 党参 0.9 g/(kg·d) 配方颗粒溶液]、西药组[美托洛尔溶液 8 mg/(kg·d)]。术后灌胃干预 4 周。检测小鼠超声心动及心电图,分离心肌细胞,使用全细胞膜片钳技术记录分析心肌细胞动作电位。**结果** 黄芪、党参可改善 MI 后心衰小鼠左室射血分数($P < 0.05$),缩短 MI 后心衰小鼠 QT 间期($P < 0.01$)及校正 QT 间期($P < 0.05$),减少室性心律失常发生率,缩短 MI 后心衰小鼠心肌细胞复极时间($P < 0.05$),并且缩短心肌细胞复极时间效果优于美托洛尔($P < 0.05$)。**结论** 益气药黄芪、党参可提高 MI 后心衰模型心肌复极速度,减少室性心律失常发生率,改善心功能和远期预后。

关键词 心律失常;心力衰竭;心肌梗死;黄芪;党参

Effect of *Astragalus membranaceus* and *Codonopsis pilosula* on Myocardial Repolarization in Post-infarction Heart Failure Mice LI Si-nai^{1,2}, LIN Qian¹, GAO Qun¹, WU Qian³, CUI Hai-feng³, LIU Jing¹, and SHI Xiao-lu³ 1 Cardiology Department, Dongfang Hospital, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing (100078); 2 Beijing Hospital of Traditional Chinese Medicine, Capital Medical University, Beijing Institute of Traditional Chinese Medicine, Beijing (100010); 3 Experimental Research Center, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing (100700)

ABSTRACT Objective To explore the effect of qi-promoting drugs (*Astragalus membranaceus* and *Codonopsis pilosula*) on myocardial repolarization in post-infarction heart failure mice. **Methods** The post-infarction heart failure animal models were established by the ligation of left anterior descending coronary in mice. The mice were divided into the sham group (administered with normal saline by gastrogavage), control group (administered with normal saline by gastrogavage), qi-promoting group [administered with *Astragalus membranaceus* (1.2 g·kg⁻¹·d⁻¹) and *Codonopsis pilosula* (0.9 g·kg⁻¹·d⁻¹) granular solution by gastrogavage] and Metoprolol group (administered with Metoprolol 8 mg·kg⁻¹·d⁻¹ by gastrogavage) by random digit table. After 4 weeks of intervention, echocardiography and electrocardiogram were examined. Then the cardiomyocytes of mice were isolated and the action potentials of cardiomyocytes were recorded by patch clamp. **Results** The left ventricular ejection fractions of post-infarction heart failure mice were improved by qi-promoting drugs ($P < 0.05$). After treatment with qi-promoting drugs, the QT intervals ($P < 0.01$) and the corrected QT intervals ($P < 0.05$) were shortened and the risk of ventricular arrhythmia was reduced, the repolarization time of cardiomyocytes were shortened ($P < 0.05$), and the effect of shortening cardiomyocytes repolarization time was better than Metoprolol ($P < 0.05$). **Conclusion** These findings revealed that treatment with qi-promoting drugs *Astragalus membranaceus* and *Codonopsis pilosula* accelerated the myocardial repolarization, reduced the risk of ventricular arrhythmia and improved cardiac function and prognosis in post-infarction heart failure.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(No. 81173176, No. 81373779)

作者单位: 1. 北京中医药大学东方医院心血管内科(北京 100078); 2. 首都医科大学附属北京中医医院 北京市中医研究所(北京 100010); 3. 中国中医科学院医学实验中心(北京 100700)

通讯作者: 林 谦, Tel: 010-67689611, E-mail: lingqian62@126.com

DOI: 10.7661/j.cjim.20171212.327

KEYWORDS arrhythmia; heart failure; myocardial infarction; *Astragalus membranaceus*; *Codonopsis pilosula*

心源性猝死(sudden cardiac death, SCD)已成为全球患者的主要死亡原因之一,在中国每年约 100 万人死于 SCD。心肌梗死(myocardial infarction, MI)相关心律失常是 SCD 发生的主要原因,据报道约 75% SCD 的发生与陈旧性心肌梗死相关^[1]。心肌细胞复极障碍是 MI 后心力衰竭(heart failure, HF)患者发生 SCD 的主要病理机制之一^[2]。研究表明, HF 时蛋白激酶激活、钙转运障碍、离子通道重构等因素均可引起心肌细胞复极障碍,诱发异常触发活动,最终导致恶性心律失常^[3]。中医学认为心悸是心气虚的外在表现之一,心气虚是 HF 心律失常发生的基本病机,益气法是治疗心衰心悸的基本治法^[4]。临床应用益气药治疗 HF 心律失常效果明显,且不良反应小,可能成为抗心律失常药物治疗的突破口,但相关机制有待研究。本研究通过复制 MI 小鼠模型,利用小鼠清醒状态下动态心电图、全细胞膜片钳等技术,观察益气药黄芪、党参对 MI 后 HF 小鼠心肌细胞复极时间的干预作用,探讨益气药防治心律失常的作用机制。

材料与方法

1 实验动物 清洁级健康雄性 6~8 周龄 C57BL/6N 小鼠,体重(22 ± 2)g,购自北京维通利华实验动物技术有限公司,许可证号:SCXK(京)2012-0001,饲养于中国中医科学院中药研究所 SPF 级动物房,环境温度(22 ± 2)℃,相对湿度(40 ± 5)%,小鼠专用无菌饲料,专人喂养。本实验通过北京中医药大学实验动物伦理委员会审查。

2 药物及试剂 中药黄芪、党参配方颗粒购自北京康仁堂药业有限公司;β 受体阻滞剂美托洛尔购自英国阿斯利康制药有限公司;注射用青霉素钠购自华北制药公司;水合氯醛为国产分析纯试剂;无钙台氏液(Ca^{2+} -free Tyrode solution, mmol/L): NaCl 140.0、KCl 5.4、 MgCl_2 1.0、HEPES 10.0、D-Glucose 10.0、NaOH 调至 pH 7.4;KB 液(Kraft-Bruehe solution, mmol/L): KOH 80.0、KCl 40.0、 KH_2PO_4 25.0、 MgSO_4 3.0、L-Glutamic 50.0、Taurine 20.0、HEPES 10.0、EGTA 1.0、D-Glucose 10.0、KOH 调至 pH 7.2;动作电位电极内液(mmol/L): NaCl 120.0、KCl 120.0、 MgCl_2 5.0、HEPES 20.0、EGTA 5.0、 Na_2ATP 3.0、KOH 调至 pH 7.2。

3 主要仪器 ECG TUNNEL 心电检测平台

(EMKA Technologies, France); Vevo 770 高分辨率小动物超声心动检测系统(Visual Sonics Inc, Canada);膜片钳检测系统(HEKA Electronics, Germany)。

4 模型制备及分组方法 适应性喂养 1 周后,小鼠行左前降支冠脉结扎术:称重,腹腔注射 4% 水合氯醛($0.1 \text{ mL}/10 \text{ g}$)麻醉后,不使用机械通气,在左胸心尖搏动位置开一纵行 12 mm 皮肤切口,对切口穿线做荷包暂不缝合,钝性分离胸大肌和胸小肌,在心尖区第 4 肋间用蚊式血管钳直接撑开胸壁,轻轻将心脏挤出,在距左冠状动脉分出后约 3 mm 处使用 6 号缝针和丝线将冠脉连同该处心肌一起结扎,可观察到左室前壁发白,将心脏归位,挤出胸腔残气同时收紧荷包缝线,关胸^[5]。冠脉结扎术前心电图对比如图 1 所示,术后小鼠心电图 ST 段明显上抬表明手术成功,否则认定为手术失败,不予分组。假手术组同法手术但不结扎冠状动脉。将手术成功并存活的小鼠编号按随机数字表法随机分为 4 组,模型组、益气组、西药组、假手术组,每组 10 只。

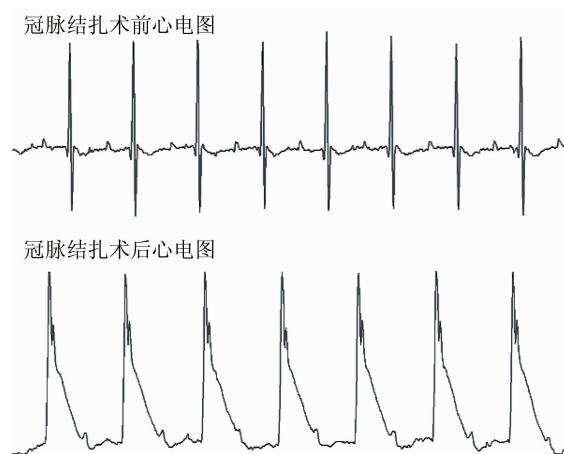


图 1 冠脉结扎术前心电图对比

5 干预方法 术后 3 天开始灌胃给药干预。模型组和假手术组给予生理盐水灌胃,益气组给予黄芪配方颗粒 $[1.2 \text{ g}/(\text{kg} \cdot \text{d})]$,1 g 黄芪配方颗粒相当于黄芪生药量 5 g + 党参配方颗粒 $[0.9 \text{ g}/(\text{kg} \cdot \text{d})]$,1 g 党参配方颗粒相当于党参生药量 3.3 g 溶于生理盐水灌胃,西药组给予美托洛尔 $8 \text{ mg}/(\text{kg} \cdot \text{d})$ 研磨后溶于生理盐水灌胃。用药剂量由 60 kg 成人每日常规剂量换算(黄芪生药 30 g,党参生药 15 g,美托洛尔 40 mg),小鼠剂量 = (小鼠体重/人体重) × 人用药剂量 × 12,每只小鼠每日灌胃总体积 0.5 mL 保持一致,给药 4 周。

6 检测指标及方法

6.1 超声心动检测 利用小动物超声心动检测系统,检测药物干预后 4 周小鼠心功能。小鼠脱毛后在 1.5% 异氟烷气体麻醉下检测,取左室乳头肌水平短轴位 M 型超声,测量收缩末期左室内径(left ventricle internal dimensions at systole, LVIDS),舒张末期左室内径(left ventricle internal dimensions at diastole, LVIDD),计算射血分数(ejection fraction, EF)和短轴缩短率(fractional shortening, FS)。

6.2 清醒状态心电图检测 药物干预后 4 周将清醒的小鼠放入 ECG TUNNEL 心电检测平台上束缚固定,记录小鼠清醒状态 6 导联体表心电图,每只小鼠记录 20 min,使用 ECG Auto 软件进行分析,包括心率,PR 间期,QRS 时间,QT 间期以及校正 QT 间期[QTc, $QTc = QT / (RR/100)^{1/2}$][6],记录各组小鼠频发室性心律失常(>5 beats/min)的发生率。

6.3 心肌细胞动作电位检测 药物干预后 4 周检测心功能及心电图后,腹腔注射 2 000 IU 肝素,20 min 后腹腔注射 4% 水合氯醛溶液(0.1 mL/10 g)麻醉,开胸,将心脏连同部分主动脉一同取出,常规 Langendorff 法灌流,以 3 mL/min 的速度逆行灌流无钙台式液 5 min 后,灌注消化液 10 min 至心室松软。随后将左室心肌剪下,在 KB 液中将心肌剪碎,轻柔吹打至分散成单个细胞,经 100 μ m 尼龙网过滤,随后将分离的心肌细胞保存在 KB 液中。获得的心肌细胞在 4~6 h 内使用。只选用耐受复钙、静止、棒状并清晰显示横纹的心肌进行检测。使用 EPC10 放大器(HEKA Electronics, German)的电流钳模式进行心肌细胞动作电位检测[7]。玻璃电极电阻为 2~3 M Ω ,填充电极内液,灌流液为 1.8 mmol/L 有钙台氏液,膜片钳实验在室温下(22~26 $^{\circ}$ C)进行。形成高阻封接(>2.0 G Ω)后,负压抽吸吸破细胞膜,静息电位(-80 mV)补偿全细胞膜电容,串联电阻(<9 M Ω)未补偿,使用电流钳模式,给予 1.5 倍阈上刺激的电流(时间 3~5 ms)以诱发动作电位,记录动作电位复极 50% 时间(action potential duration at 50% repolarization, APD50),动作电位复极 90% 时间(action potential duration at 90% repolarization, APD90),静息电位(resting potential, RP)以及动作电位幅值(action potential amplitude, APA)。

7 统计学方法 使用 SPSS 13.0 统计软件,使用 Prism 6.0 软件绘制图表,所测数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间数据比较采用 ANOVA 单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1 各组小鼠一般状况及死亡率比较 除假手术组小鼠外,其余各组术后均出现不同程度的 HF 表现,如乏力、喘促、下肢水肿、消瘦等症状;4 周死亡率模型组为 40%,益气组为 10%,西药组为 10%,假手术组无死亡,死亡原因均为心源性死亡。

2 各组小鼠心功能比较(图 2) 与假手术组比较,模型组小鼠心脏 EF 和 FS 明显下降($P < 0.01$),LVIDS 和 LVIDD 均明显增加($P < 0.01$)。与模型组比较,益气组小鼠心脏 EF 升高($P < 0.05$),LVIDS 有下降趋势但差异无统计学意义($P = 0.32$);与模型组比较,西药组 EF、FS、LVIDS、LVIDD 差异均无统计学意义($P > 0.05$)。

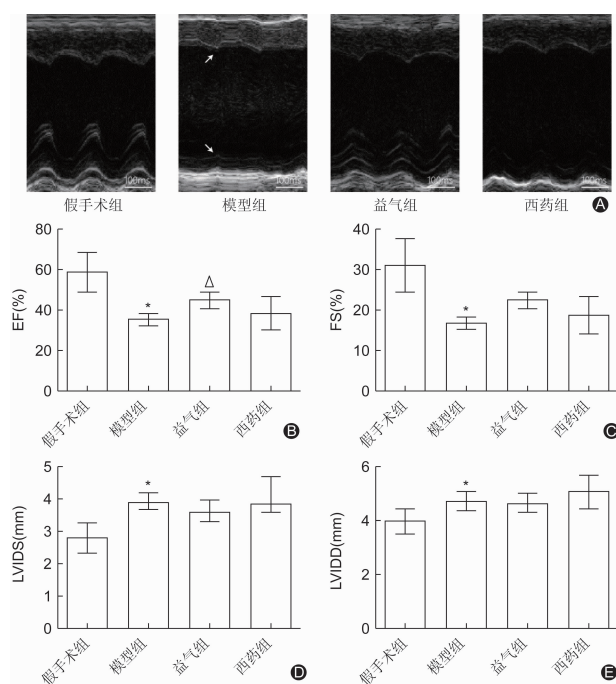
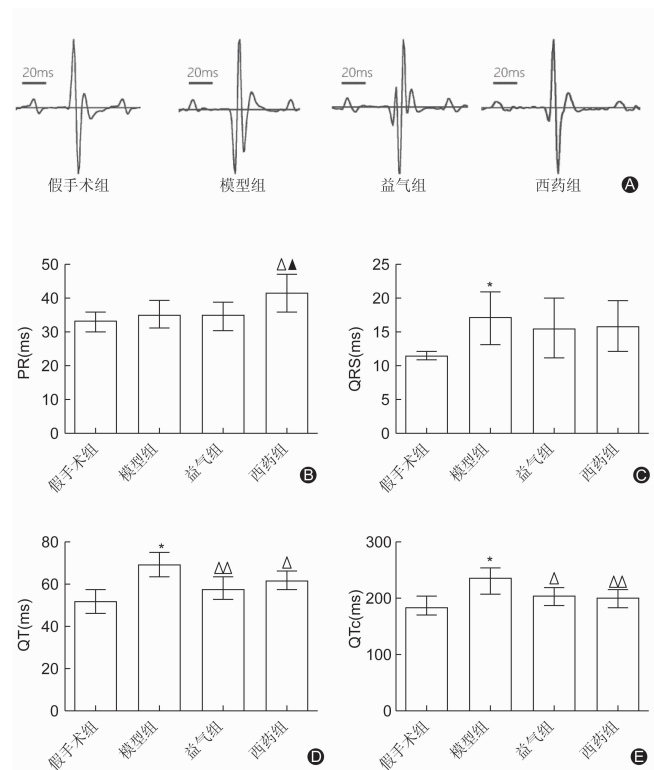


图 2 各组小鼠心功能比较

3 各组小鼠心电图结果比较(图 3) 模型组出现频发室性心律失常的概率为 50.0% (3/6), 益气组概率为 11.1% (1/9), 西药组概率为 11.1% (1/9), 假手术组概率为 0。药物干预后 4 周模型组小鼠心电图与假手术组比较, q 波出现, ST-T 改变, QT 间期延长。与假手术组比较, 模型组小鼠 QRS 时间、QT 间期及 QTc 间期延长($P < 0.01$)。与模型组比较, 益气组 QT 间期及 QTc 缩短($P < 0.01$, $P < 0.05$); 西药组 PR 间期延长($P < 0.05$), QT 间期及 QTc 缩短($P < 0.01$, $P < 0.05$)。



注:A 为各组典型心电图;B 为 PR 间期对比;C 为 QRS 时间对比;D 为 QT 间期对比;E 为 QTc 间期对比;与假手术组比较,* $P < 0.01$;与模型组比较, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$;与益气组比较, $\blacktriangle P < 0.05$

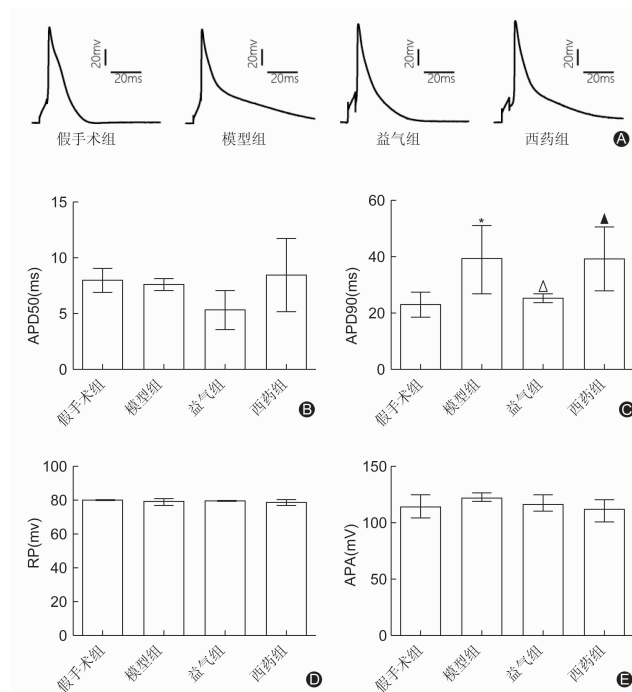
图 3 各组心电图结果比较

4 各组小鼠心肌细胞动作电位结果比较(图 4)与假手术比较,模型组小鼠心肌细胞 APD90 时间延长($P < 0.05$),RP 及 APA 差异无统计学意义($P > 0.05$);与模型组比较,益气组小鼠心肌细胞 APD90 时间缩短($P < 0.05$);与益气组比较,西药组小鼠心肌细胞 APD90 时间延长($P < 0.05$);各组 RP 及 APA 差异无统计学意义($P > 0.05$)。

讨 论

本研究结果表明:(1)益气药黄芪、党参可改善 MI 后 HF 小鼠心功能并降低死亡率,美托洛尔虽然对心功能无明显改善作用,但仍能降低 MI 后小鼠死亡率;(2)益气药黄芪、党参可降低 HF 室性心律失常的发生风险,缩短 HF 小鼠 QT 间期,加快心室复极速度,美托洛尔同样具有抗 HF 室性心律失常的作用,并可缩短 QT 间期,但同时延长 PR 间期,可能增加房室传导阻滞的发生风险;(3)益气药黄芪、党参可缩短 HF 细胞复极时间,改善 HF 细胞复极障碍,并且效果优于美托洛尔。

自律性改变、异常触发活动、折返是心律失常发生的主要病理生理机制。研究表明 MI 动物模型 50% 以上



注:A 为各组典型动作电位曲线;B 为 APD50 比较;C 为 APD90 比较;D 为 RP 比较;E 为 APA 比较;与假手术组比较,* $P < 0.05$;与模型组比较, $\Delta P < 0.05$;与益气组比较, $\blacktriangle P < 0.05$

图 4 各组心肌细胞动作电位结果比较

室性心律失常均由异常触发活动所导致^[2],可见异常触发活动是 MI 后室性心律失常发生的重要机制。目前大多数学者认为,异常触发活动与动作电位复极时间延长关系密切,动作电位复极时间延长会诱发后除极,导致心肌细胞膜电位在复极期出现电位震荡,引起异常触发活动^[3]。动作电位复极时间与内向电流(钠电流、钙电流、钠钙交换体电流)与外向电流(钾电流)的相对大小有关。MI 发生后,蛋白激酶 A (Protein kinase A, PKA)、钙调蛋白依赖的蛋白激酶 II (Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase II, CaMK II)等蛋白激酶持续激活,可磷酸化多种离子转运蛋白引起功能改变,导致内向电流相对增大:(1) L 型钙通道蛋白持续磷酸化导致 L 型钙电流发生重构(峰电流增大、失活减慢、激活-失活曲线上移)^[8];(2)肌浆网钙转运蛋白磷酸化导致心肌细胞钙转运障碍,复极期胞内钙离子浓度升高,钠钙交换体电流增大^[9];(3)晚钠通道磷酸化导致复极 3 期晚钠电流增大^[10]。此外,有研究表明慢性 HF 模型钾通道蛋白表达下降,密度降低,导致外向电流减小^[11]。这些改变均可能引起心肌细胞动作电位复极时间延长,诱发异常触发活动。

中医学认为心气虚是 HF 的基本病机,贯穿于 HF 发生发展始终,而心气虚证的表征中即有心悸一项,是

“心气不足——心动悸”这一病机的外在表现,因此益气法是 HF 心悸的基本治法之一。黄芪、党参是临床常用的益气药。笔者前期研究表明,黄芪能够改善 HF 心肌细胞钙转运能力,并且改善钙转运相关蛋白的表达,其机制可能与抑制钙调蛋白激酶途径中 CaMK II 的表达改善收缩功能有关^[12, 13]。龚奥娣等^[14]研究发现,黄芪甲苷可降低缺血后心肌细胞内游离 Ca^{2+} 浓度,从而减少心律失常的发生。陆文娟等^[15]也发现黄芪甲苷、人参总皂苷对小鼠心律失常有一定保护作用。Dai H 等^[16]研究发现,异丙肾上腺素能使心肌细胞肥大,细胞内游离 Ca^{2+} 浓度升高, CaMK II 表达及激活量增加,黄芪多糖能够浓度依赖性地降低肥大细胞游离 Ca^{2+} 浓度,下调 CaMK II 表达并减少激活。本研究表明,益气药黄芪、党参可提高 MI 后 HF 小鼠心肌复极速度,减少 MI 后室性心律失常发生率,改善 MI 后 HF 小鼠心功能和远期预后,并且缩短心肌细胞复极时间效果优于美托洛尔。以上结果提示,益气药黄芪、党参可能通过抑制过度激活的 CaMK II、PKA 等蛋白激酶,阻止 HF 导致的 L 型钙电流、钠钙交换体电流、晚钠电流等内向电流重构,缩短动作电位时程,抑制异常触发活动的发生,其机制有待进一步研究验证。

利益冲突:本文作者与药品企业不存在任何以合同约定或兼职等方式获取报酬的利益关系;不会利用各类资料、数据或讨论、结论及其他有关信息以获取利益或帮助他人获取利益;本文作者之间不存在学术或财务利益冲突。

参 考 文 献

- [1] Xing Y, Chen J, Wang J, et al. The effects of al-litridi and amiodarone on the conduction system and reverse use-dependence in the isolated hearts of rats with myocardial infarction [J]. *J Ethnopharmacol*, 2012, 141(2): 674–684.
- [2] Sanchez-Alonso JL, Bhargava A, O'Hara T, et al. Microdomain-specific modulation of L-type calcium channels leads to triggered ventricular arrhythmia in heart failure [J]. *Circ Res*, 2016, 119(8): 944–955.
- [3] Belardinelli L, Giles WR, Rajamani S, et al. Cardiac late Na^+ current: proarrhythmic effects, roles in long QT syndromes, and pathological relationship to CaMK II and oxidative stress [J]. *Heart Rhythm*, 2015, 12(2): 440–448.
- [4] 梁晋普, 王亚红, 帅东亚, 郭维琴教授辨治心律失常经验 [J]. *现代中医临床*, 2016, 23(5): 5–10.
- [5] Gao E, Lei YH, Shang X, et al. A novel and efficient model of coronary artery ligation and myocardial infarction in the mouse [J]. *Circ Res*, 2010, 107(12): 1445–1453.
- [6] Royer A, van Veen TA, Le Bouter S, et al. Mouse model of SCN5A-linked hereditary Lenègre's disease: age-related conduction slowing and myocardial fibrosis [J]. *Circulation*, 2005, 111(14): 1738–1746.
- [7] Rivard K, Trépanier-Boulay V, Rindt H, et al. Electrical remodeling in a transgenic mouse model of alpha1B-adrenergic receptor overexpression [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2009, 296(3): H704–H718.
- [8] Tzimas C, Terrovitis J, Lehnart SE, et al. Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II (CaMK II) inhibition ameliorates arrhythmias elicited by junctin ablation under stress conditions [J]. *Heart Rhythm*, 2015, 12(7): 1599–1610.
- [9] Foteinou PT, Greenstein JL, Winslow RL. Mechanistic investigation of the arrhythmogenic role of oxidized CaMK II in the heart [J]. *Biophys J*, 2015, 109(4): 838–849.
- [10] Mishra S, Reznikov V, Maltsev VA, et al. Contribution of sodium channel neuronal isoform Nav1.1 to late sodium current in ventricular myocytes from failing hearts [J]. *J Physiol*, 2015, 593(6): 1409–1427.
- [11] Shi CX, Dong F, Chang YC, et al. Role of calcineurin in down-regulation of left ventricular transmural voltage-dependent K^+ currents in mice with heart failure [J]. *Acta Physiologica Sinica*, 2015, 67(4): 401–408.
- [12] 孙娅楠, 农一兵, 崔晓云, 等. 黄芪对乳鼠肥大心肌细胞钙瞬变及钙调蛋白激酶 II 的影响 [J]. *中国中医基础医学杂志*, 2013, 19(1): 44–46, 49.
- [13] 孙娅楠, 李思耐, 马淑骅, 等. 黄芪、丹参注射液对乳鼠肥大心肌细胞钙瞬变的影响 [J]. *中华中医药杂志*, 2013, 28(5): 1356–1360.
- [14] 龚奥娣, 孙敬和. 黄芪甲苷对心肌缺血心律失常大鼠模型 Ca^{2+} 浓度影响初步研究 [J]. *亚太传统医药*, 2013, 9(8): 11–12.
- [15] 陆文娟, 周婧, 马宏跃, 等. 黄芪甲苷、人参总皂苷和西洋参总皂苷对蟾酥致小鼠心律失常的影响 [J]. *南京中医药大学学报*, 2012, 28(1): 61–64.
- [16] Dai H, Jia G, Liu X, et al. Astragalus polysaccharide inhibits isoprenaline-induced cardiac hypertrophy via suppressing Ca^{2+} -mediated calcineurin/NFATc3 and CaMK II signaling cascades [J]. *Environ Toxicol Pharmacol*, 2014, 38(1): 263–271.

(收稿: 2017-03-31 在线: 2017-12-30)

责任编辑: 赵芳芳