

实验研究

振元复脉颗粒对慢性心律失常模型大鼠的疗效
及其部分机制研究

黄 玮 张 琪 朱月琴 曹 琰 刘产明

(常州市中医医院,常州,213003)

摘要 目的:探讨振元复脉颗粒治疗慢性心律失常模型大鼠的可能机制。方法:将 60 只 SD 大鼠随机分为空白组(10 只)及造模组(50 只),造模组大鼠接受尾静脉注射氯化钡溶液制备心律失常模型,将 46 只成模大鼠数字随机分为模型组及干预组,每组 23 只。其中干预组大鼠利用振元复脉颗粒灌胃,模型组大鼠接受等体积生理盐水灌胃,均干预 4 周。比较各组大鼠心电图指标,外周血 SOD、MDA、心脏组织 Na⁺-K⁺-ATP、心脏组织 PI3K、AKT、p-AKT 浓度变化。结果:与模型组比较,振元复脉颗粒可明显缩短模型鼠心律失常持续时间($P < 0.05$);下降外周血 MDA、Bax 水平;上调 SOD、PI3K、p-Akt、Bcl-2 水平及 Na⁺-K⁺-ATP 酶活性,差异有统计学意义($P < 0.05$)。结论:振元复脉颗粒可明显对抗心率失常,具有保护心肌组织的作用,其作用机制可能与抗氧自由基、抑制心肌细胞凋亡有关。

关键词 心律失常;振元复脉颗粒;SOD;MDA;Na⁺-K⁺-ATP 酶;PI3K-AKT 通路;心肌凋亡

Study on Efficacy and Part of the Mechanism of Zhenyuan Fumai Granules in Chronic Arrhythmia Model Rats

HUANG Wei, ZHANG Qi, ZHU Yueqin, CAO Yan, LIU Chanming

(Changzhou Traditional Chinese Medicine Hospital, Changzhou 213003, China)

Abstract Objective: To explore the possible mechanism of Zhenyuan Fumai Granules in the treatment of chronic arrhythmia model rats. **Methods:** A total of 60 SD rats were randomly divided into blank group ($n = 10$) and modeling group ($n = 50$). The modeling group was injected with barium chloride solution through tail vein to establish arrhythmia model. A total of 46 model rats were randomly divided into model group ($n = 23$) and intervention group ($n = 23$). Among them, the rats in the intervention group were given intragastric administration of Zhenyuan Fumai Granules for 4 weeks, and the rats in the model group were given intragastric administration of the same volume of normal saline for 4 weeks. ECG indexes, SOD and MDA in peripheral blood, Na⁺-K⁺-ATP in heart tissue, as well as concentration changes of PI3K, AKT and p-AKT in heart tissue were compared in each group. **Results:** 1) Compared with the model group, Zhenyuan Fumai Granules could significantly shorten the duration of arrhythmia ($P < 0.05$), decrease the levels of MDA and Bax in peripheral blood, and increase the levels of SOD, PI3K, p-Akt and Bcl-2 as well as Na⁺-K⁺-ATP activity. The differences were statistically significant ($P < 0.05$). **Conclusion:** Zhenyuan Fumai Granules can obviously antagonize arrhythmia and protect myocardial tissue, and its mechanism may be related to anti-oxygen free radicals and inhibition of cardiomyocyte apoptosis.

Keywords Arrhythmia; Zhenyuan Fumai Granules; SOD; MDA; Na⁺-K⁺-ATPase; PI3K-AKT pathway; Myocardial apoptosis

中图分类号:R285.5 文献标识码:A doi:10.3969/j.issn.1673-7202.2020.02.020

诸多心脏疾病均可以心律失常为临床表现,是导致死亡的主要原因。目前抗心律失常西药的有效率为 30%~60%^[1],且常具有诱发新的心律失常或原有心律失常病情加剧的风险^[2-3]。故探索新的抗心律失常方法迫在眉睫。中医药疗法以其安全性高、疗效显著,被诸多临床工作者所重视。临床文献显示心肾阳虚、痰瘀痹阻是心律失常的主要病机,基于此有助阳散寒、活血化瘀通络的作用振元复脉颗

粒是有效治疗心律失常的手段,临床不乏相关报道,但其作用机制目前尚未知。本研究通过心电图检测、Elisa 法、Western Blot 法对心律失常模型鼠进行检测,旨在探讨振元复脉颗粒的可能作用机制,具体报道如下。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 动物 将 60 只雄性 SPF 级的 SD 大鼠纳入

基金项目:常州市科技计划指导性项目(2017333);常州市孟河医派百人传承培养工程项目

作者简介:黄玮(1984.03—),女,硕士,副主任中药师,研究方向为中药临床药学,E-mail:450048497@qq.com

通信作者:刘产明(1961.05—),男,本科,主任中药师,研究方向为中药临床药学,E-mail:cz_lcm@139.com

研究,体质量 220 ~ 260 g,平均体质量(221 ± 9.47) g,均购自上海斯莱克实验动物有限公司,合格证号:2007000509960,许可证号:SC-SCXK(沪)2007-0005,饲养于本院动物实验中心,补充具体的饲养条件:12 h/12 h 昼夜交替,温度(25 ± 2)℃,湿度(50 ± 1)%。本研究经过本院医学伦理委员会审批同意(伦理审批号:2738273292)。

1.1.2 试剂与仪器 超微量 Na⁺-K⁺-ATP 酶测试盒(上海百蕊生物科技有限公司,批号 2932)、SOD 试剂盒(上海西唐生物科技有限公司,批号 X632)、MDA 试剂盒(上海西唐生物科技有限公司,批号 2231)、SDS-PAGE 电泳凝胶试剂盒(碧云天生物公司,批号 P0012A)、PI3K 单克隆一抗抗体(美国 CST 公司,货号:17366S)、Akt 单克隆一抗抗体(美国 CST 公司,货号:4685S)、p-Akt 单克隆一抗抗体(美国 CST 公司,货号:4060T)及 β -actin 抗体(美国 CST 公司,货号:3700T)、4% 氯化钡(Alfa Aesar 公司,货号:10361-37-2)。

1.2 方法

1.2.1 分组与模型制备 1) 分组:将 60 只 SD 大鼠随机分为空白组(10 只)及造模组(50 只),造模组大鼠接受尾静脉注射氯化钡溶液制备心律失常模型,将 46 只成模大鼠数字随机分为模型组及干预组,每组 23 只。2) 模型制备:对造模组大鼠进行称重,按照 3 mL/kg 比例对大鼠进行腹腔注射 10% 水合氯醛,待大鼠充分麻醉后将大鼠俯卧位固定于手术板上,充分固定后对大鼠四肢内侧皮下插入针状电极,连接心电图仪器,描记 II 导联心电图,基线调零,待描述出正常平稳心电图后将大鼠尾部充分消毒,按照 4 mg/kg 对大鼠尾静脉快速推注 0.4% 氯化钡溶液,5 s 内完成,并开始记录心电图,共记录 30 min。空白组大鼠进行相同麻醉、固定操作,尾静脉注射等体积比例的 0.9% 氯化钠溶液。

1.2.2 干预方法 干预组大鼠接受振元复脉颗粒水溶液灌胃给药,剂量按照按人/鼠 kg 体质量的等效剂量计算,1 次/d,连续干预 4 周。模型组及空白与等体积生理盐水灌胃。

1.2.3 检测指标及方法

1.2.3.1 ELISA 法检测各组外周血 SOD、MDA 水平变化 干预结束后各组大鼠随机选取 3 只,按照 3 mL/kg 比例对大鼠进行腹腔注射 10% 水合氯醛,大鼠充分麻醉后去腹主动脉血,将标本置于 4℃ 环境下 5 000 r/min 离心 15 min,取出上清液,标准品的稀释与加样,在酶标包被板上待测样品孔中先加

样品稀释液 40 μ L,然后再加待测样品 10 μ L(样品最终稀释度为 5 倍);用封板膜封板后置 37℃ 温育 30 min,在进行配液、加酶(空白孔不加酶),再进行温育、洗涤,最后将孔板至于酶标仪上进行检测,读取各组样本的 OD 值。

1.2.3.2 ELISA 法检测各组心脏组织 Na⁺-K⁺-ATP 酶水平变化 待 1.2.3.1 步骤大鼠取完腹主动脉血后于冰快速取出各组大鼠的心脏组织,称取约 0.1 g 组织,加入 RIPA 裂解液和 10 μ L PMSF 进行冰浴匀浆,置于 4℃ 环境下 5 000 r/min 离心 15 min,取上清,余下步骤同 1.2.3.1。

1.2.3.3 Western blotting 检测各组 PI3K、Akt、p-Akt、Bcl-2、Bax 的水平变化 干预结束后从各组大鼠中随机选取 3 只大鼠,麻醉处死后在冰浴上将大鼠心脏组织迅速取出,加入 1 mL RIPA 裂解液和 10 μ L PMSF 进行冰浴匀浆,充分反应后将样本置于 4℃,5 000 r/min 分离 15 min,吸取上清液后加入 4X 蛋白上样缓冲液,在金属浴中进行蛋白变性 7 min,将样品加入至事先配制好的 SDS-PAGE 电泳凝胶内,总蛋白量 30 μ g,电泳结束后将目标蛋白转移至 PVDF 膜,转膜后用脱脂奶粉封闭 2 h,用 0.01 mol/L PBS 溶液冲洗干净后分别加入 PI3K、Akt、p-Akt、Bcl-2、Bax 以及 β -actin 一抗抗体,4℃ 下孵育 24 h,次日取出 PVDF 膜后用 TBST 清洗 3 次,10 min/次,加入辣根过氧化物酶标记的二抗(1:1 000)室温下孵育 1 h,加入 ECL 溶液,反应 1 min 后进行曝光扫描,用 Image J 软件扫描条带灰度值。

1.3 统计学方法 采用 SPSS 22.0 统计软件进行数据分析,计数资料用($\bar{x} \pm s$)表达,组间统计均采用方差分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠心电图结果比较 50 只造模组大鼠中 46 只成模,出现心律失常,造模成功率 92%。见图 1。模型组比较,振元复脉颗粒可明显缩短模型鼠心律失常持续时间($P < 0.05$)。见表 1。

表 1 各组大鼠心律失常持续时间($\bar{x} \pm s, s$)

组别	心律失常持续时间
空白组($n=10$)	—
模型组($n=23$)	483.28 ± 89.19
干预组($n=23$)	258.38 ± 18.28
F 值	192.38
P 值	< 0.05

2.2 各组 MDA、SOD 以及 Na⁺-K⁺-ATP 酶水平的

变化 造模组大鼠外周血 MDA 水平明显高于空白组,SOD 低于空白组,差异有统计学意义($P < 0.05$),其中干预组 MDA 水平低于模型组,SOD 高于模型组差异有统计学意义($P < 0.05$);与空白组比较,造模组大鼠心脏组织 Na⁺-K⁺-ATP 酶值明显降低($P < 0.05$),与模型组比较,干预组 Na⁺-K⁺-ATP 酶明显升高($P < 0.05$);具体见表 2。

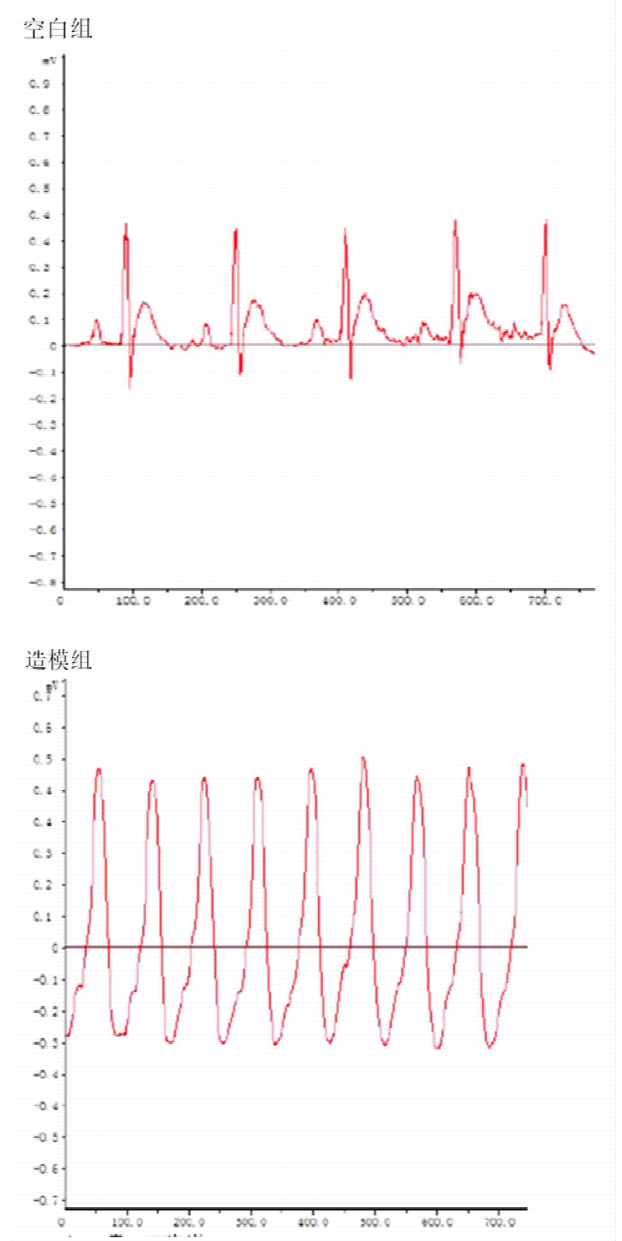


图 1 正常大鼠和心律失常大鼠心电图表现

2.3 各组大鼠心脏组织 PI3K、Akt、p-Akt、Bcl-2、Bax 的水平变化 与空白组比较,造模组大鼠心脏组织 PI3K、p-Akt、Bcl-2 水平明显降低($P < 0.05$),Bax 水平增加,与模型组比较,干预组 PI3K、p-Akt、Bcl-2 值明显升高,Bax 水平明显下调($P < 0.05$),各组 AKT 浓度相仿($P > 0.05$)。见图 2、图 3,表 4。

表 2 各组大鼠 MDA、SOD 以及 Na⁺-K⁺-ATP 酶水平的变化($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	MDA (nmol/L)	SOD (U/mL)	Na ⁺ -K ⁺ -ATP 酶 (U/mgprot)
空白组	4.17 ± 0.46	149.38 ± 11.28	1.49 ± 0.12
模型组	8.54 ± 0.77	92.18 ± 7.28	1.01 ± 0.07
干预组	6.07 ± 0.51	118.28 ± 9.27	1.22 ± 0.09
F 值	17.98	12.38	9.28
P 值	<0.05	<0.05	<0.05

表 4 各组 PI3K-Akt 信号通路标志性蛋白的表达水平($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	PI3K/β-actin	Akt/β-actin	p-Akt/β-actin
空白组	3.14 ± 1.12	2.27 ± 0.46	3.11 ± 0.88
模型组	1.17 ± 0.47	2.31 ± 0.43	1.02 ± 0.38
干预组	1.97 ± 0.95	2.29 ± 0.44	2.37 ± 0.57
F 值	12.182	18.28	12.38
P 值	<0.05	<0.05	<0.05

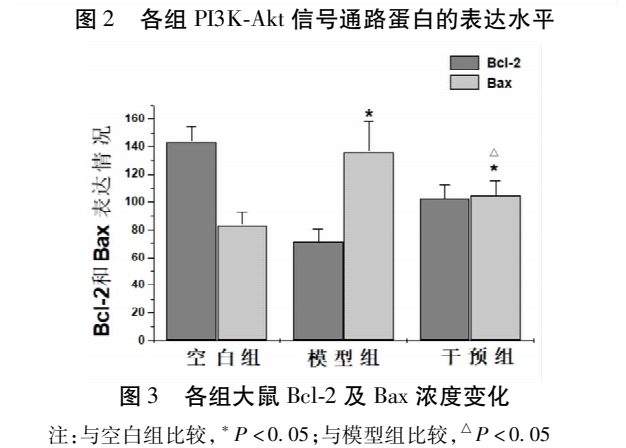
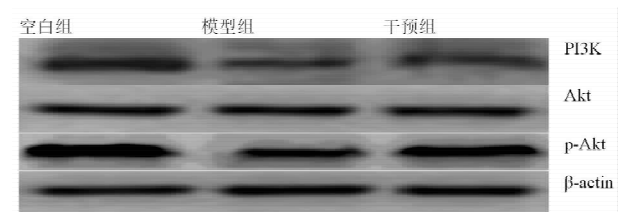


图 3 各组大鼠 Bcl-2 及 Bax 浓度变化

注:与空白组比较,* $P < 0.05$;与模型组比较,Δ $P < 0.05$

3 讨论

 心肾阳虚是本病的主要病机,阳虚血脉无以温煦,气血运行不畅而出现瘀血、痰浊等病理产物^[4-5],因虚致实,虚实夹杂,互为因果,瘀血/痰浊痹阻心脉,故温肾助阳、活血化瘀通络是治疗心律失常的主要原则^[6-8],因此国内有学者提出“温通剔络”的观点^[9]。所谓的“温通”即温阳通脉,“剔络”即搜剔脉络,由此创立了振元复脉颗粒对心律失常进行治疗,并获得了理想的效果。方中附子有回阳救逆、补火助阳,散寒止痛功效,是“回阳救逆第一品”。附子可温通上中下三焦,温心阳以通心脉,助脾阳以散中寒,补肾阳以益火,温通周身之阳。麻黄归肺/膀胱

二经,可发汗解表、宣肺平喘,可通过破散之功以驱除寒邪、调节血脉^[10-11]。麻黄和附子合用,一表一里,一收一散,二者共为君药,即可助底部之火上扬,又可宣散顶部之寒,最终以增强发越阳气之功。红参有大补元气、复脉固脱、益气摄血的功效,促使机体扶正以驱邪外出。丹参具有活血祛瘀,通经止痛之功效,一方面可实现瘀除而新生,另一方面可助红参益气养心,复脉定悸。白芥子有温肺豁痰利气散结通络止痛的作用,逐寒痰而通血脉^[12]。白僵蚕具有息风止痉,祛风止痛,化痰散结之功效,与白芥子共为佐药。熟地黄归肝肾二经,是滋阴补血之要药,即可生化阳气又可润燥,此外,肾主水藏精,熟地黄可生津润燥,有助肾阳生精化水,以实现“阴阳和合”^[13]。整方共奏温肾助阳、活血化瘀通络、安神定悸之功。在研究中我们利用氯化钡溶液制备心律失常大鼠模型,结果显示使用振元复脉颗粒干预的大鼠心律失常持续时间明显较模型组缩短,这提示振元复脉颗粒可明显改善心律失常症状。

自由基可导致机体组织细胞产生脂质过氧化,随后产生一系列有害物质对组织/细胞产生不良反应,其中丙二醛(MDA)是被公认的可诱导心肌细胞损伤的脂质过氧化物,有研究^[14-15]显示随着MDA浓度的升高,大鼠罹患致命性心律失常的风险增加,给予抗氧自由基对心肌细胞可产生高度保护效应。SOD是机体质量要的氧自由基清除酶,可促使机体的氧自由基产生氧化效应,SOD的水平代表机体对氧自由基清除能力的高低,MDA的表达变化间接体现氧自由基对组织/细胞的损伤程度,故检测MDA与SOD水平的变化可提现干预手段的抗心律失常能力。研究中我们发现造模组大鼠外周血MDA水平明显高于空白组,SOD低于空白组,经过振元复脉颗粒干预后大鼠MDA水平降低,SOD上调,提示意味着振元复脉颗粒增强了机体的抗氧自由基能力,与此同时我们通过检测发现振元复脉颗粒可明显上调模型鼠Na⁺-K⁺-ATP酶,而Na⁺-K⁺-ATP酶是心肌能量释放的直观体现,这说明振元复脉颗粒上调了心肌的能量供应,改善心肌供血。

在本研究中我们发现振元复脉颗粒可介导心肌组织PI3K-Akt信号通路的标志性蛋白产生变化。PI3K-Akt信号通路是经典的与细胞凋亡相关的分子生物学信号通路,PI3K是脂质激酶,其发生磷酸化激活后诱导下游Akt的构象产生变化,随即发生一系列级联反应,对下游的因子表达产生影响,其中与

凋亡密切相关的当属Bcl-2及Bax^[16-17]。本研究我们发现造模组大鼠心脏组织PI3K、p-Akt、Bcl-2水平明显降低,Bax水平增加,经过振元复脉颗粒干预后PI3K、p-Akt、Bcl-2值明显升高,Bax水平明显下调。这意味着振元复脉颗粒抗心律失常与PI3K-Akt信号通路密切相关。

总之,振元复脉颗粒可明显对抗心率失常,具有保护心肌组织的作用,其作用机制可能与抗氧自由基、抑制心肌细胞凋亡有关。

参考文献

- [1]胡大一. 抗心律失常药物的使用原则[J]. 中国医刊,2001,36(6):7-8.
- [2]成应文. 温阳益气活血法治疗心动过缓的体会[J]. 陕西中医,2004,25(2):178.
- [3]卞海,黄顺,王雅娟,等. 心律失常发病机制相关细胞因子的研究进展[J]. 河南中医,2014,34(7):1264-1266.
- [4]诚,陈铁龙. 中医辨证治疗缓慢性心律失常研究进展[J]. 新中医,2019,51(2):18-21.
- [5]闫一群,张培影. 中西医结合治疗缓慢性心律失常研究进展[J]. 中西医结合心血管病杂志(连续型电子期刊),2019,7(1):40-41.
- [6]解微微,高佳明,石凌茹,等. 从心律失常与心衰并发症的最新临床进展解析中医治疗“脉结代,心动悸”的科学内涵[J]. 中草药,2018,49(22):5448-5455.
- [7]周燕. 定悸复脉汤对室性心律失常大鼠心电图及心肌Cx43的影响[D]. 泸州:西南医科大学,2018.
- [8]段立萍. 养心定悸胶囊治疗室性心律失常的临床观察及实验研究[D]. 石家庄:河北医科大学,2018.
- [9]袁玲. 振元复脉颗粒治疗心肾阳虚、痰瘀痹阻型结脉证(房室传导阻滞)的临床疗效观察[D]. 南京:南京中医药大学,2018.
- [10]孙天才. 麻黄附子细辛汤对缓慢性心律失常患者心率指标及血液流变学的影响[J]. 中国民间疗法,2019,27(5):38-39.
- [11]郭雷,高建凯. 麻黄附子细辛汤治疗缓慢性心律失常阳虚血瘀证临床观察[J]. 实用中医药杂志,2019,35(2):153-154.
- [12]成应文. 温阳益气活血法治疗心动过缓的体会[J]. 陕西中医,2004,25(2):178.
- [13]鲁月凤,薛一涛. 当归六黄汤治疗心悸举隅[J]. 山东中医杂志,2014,33(2):151-152.
- [14]张宾,刘刚,郑明奇,等. 氧化应激致心律失常机制新进展[J]. 中国循证心血管医学杂志,2017,9(9):1141-1142.
- [15]吴利平. 氧化应激与心血管疾病关系的研究进展[J]. 中国处方药,2017,15(7):9-10.
- [16]卢青. 枸橼酸预处理对缺血再灌注大鼠心肌细胞凋亡和再灌注心律失常的影响及其分子机制研究[D]. 广州:南方医科大学,2016.
- [17]褚淑蕾. PI3k-Akt信号通路在2型糖尿病大鼠易发心房颤动中的介导作用[D]. 福州:福建医科大学,2015.

(2019-06-15 收稿 责任编辑:王明)