

复脉 I 号抗应激豚鼠在体心脏触发活动的实验研究

李文宏, 周青罡, 廖 群, 陈 奇
(江西中医学院药理学系, 江西 南昌 330006)

摘要:目的: 研究复脉 I 号对应激性心律失常、心肌损伤的保护作用及机制。方法: 用电刺激方法制备慢性应激模型, 异丙肾上腺素激发, 同步观察 ECG 及在体心脏心外膜单相动作电位(MAP), 并测定心肌组织中乳酸脱氢酶(LDH)、肌酸激酶(CK)、一氧化氮合酶(NOS)的活性和一氧化氮(NO)的含量。结果: 复脉 I 号能降低应激豚鼠在体心脏触发活动及心律失常的发生率, 并能降低心肌组织中 LDH、NOS 的活性, 减少 NO 的含量, 减少心肌 CK 的释放。结论: 复脉 I 号对应激性心律失常和心肌损伤有明显的保护作用。

关键词: 复脉 I 号; 电应激; 心律失常; 单相动作电位; 心肌损伤

中图分类号: R285.5 文献标识码: B 文章编号: 1005-9903(2004)03-0033-04

Experimental Studies of Fumai I on Thiggered Activity Induced by Stress in Guinea Pig in Vivo

LI Wen-hong, ZHOU Qing-gan, LIAO Qun, CHEN Qi
(Jiangxi College of TCM, Nanchang 330006, China)

Abstract: Objectives: To observe the protective effects and mechanism of Fumai I on arrhythmias and myocardial injury induced by stress. Methods: Chronic stress guinea pig model was established by footshock during a long period, arrhythmias was induced by Isoprenaline, epicardial Monophasic action potential (MAP) and ECG were detected synchronously, the activities of LDH, CK, NOS and the content of NO in myocarditis were measured. Results: Fumai I can reduce the incidences of arrhythmias and triggered activity, the activity of LDH, NOS and the content of NO, increased the activity of CK in myocardium. Conclusion: Fumai I has a protective effect on arrhythmias and myocardial injury induced by stress.

Key words: Fumai I; stress; Arrhythmia; MAP; Myocardial Injury

目前, 心律失常是临床上最多见的病症之一, 其发生率和病死率较高。应激是诱发心律失常的一个重要原因, 有人通过对 200 例心律失常患者发病原因的统计, 总结出有 95% 心律失常的发生与应激有直接关系。现代研究表明应激诱发心律失常与机体的神经内分泌功能紊乱有关。为了探讨复脉 I 号对应激动物模型心律失常的作用及作用机理, 我们观察了该方对电应激模型动物在体单相动作电位及心肌损伤的影响。

1 材料与方

1.1 药物及试剂 复脉 I 号是由复脉汤(西洋参、甘草、麦冬等五味药组成的古方, 简称 FM I) 经提取纯化而得到的总皂苷有效部位(含量 54%), 自

制, 换算成 1g 生药/ml; 复方炙甘草颗粒, 内蒙古依利科技实业公司, 批号: 020306, 配成 1g 生药/ml; 盐酸普萘洛尔片, 常州四药制药有限公司, 批号: 200208312, 配成 6mg/ml 溶液; 盐酸异丙肾上腺素(ISO)注射液, 上海禾丰制药有限公司, 批号: 980501; 乌拉坦(C.P)(上海化学试剂采购供应站经销, 批号 880328), 配成 20% 溶液; LDH 检测试剂盒, 批号: 20030820; CK 检测试剂盒, 批号: 20030806; NOS 检测试剂盒, 批号: 20030729; NO 检测试剂盒, 批号: 20030722, 上述试剂盒均购自南京建成生物工程研究所。

1.2 仪器 生理药理实验多用仪(河南开封仪器厂), 江湾 I 型微型人工呼吸器(第二军医大学), 723 分光光度计(上海第三分析仪器厂), Pclab 生物信号采集处理系统(北京微信斯达科技发展有限责任公司), 接触电极(自制)。

1.3 动物 英国短毛种豚鼠 42 只, 雌雄各半, 体重

收稿日期: 2003-09-10

基金项目: 江西省自然科学基金课题(0140010); 江西省教育厅课题(赣教批字 2001 年 387 号文)

300±50g, 购于江西博雅生物制品有限公司。随机分为正常组, 模型对照组, 阳性西药组普萘洛尔 6mg/kg, 阳性中药组炙甘草汤 10g 生药/kg, FM I (小、中、大剂量) 分别为 2g 生药/kg、4g 生药/kg、8g 生药/kg, 每组 6 只。

1.4 实验方法^[1,2] 各组动物分别用刺激仪进行足底电刺激, 其中电激参数为: 电压 60~120V, 每次电激 30s, 每隔 30s 电激一次, 共循环 30 次, 每天电激 30min。对照组不电激, 电激前 1h 分别灌胃各种药物(其中对照组与模型组灌服生理盐水), 连续 30 天。实验前再给药、电激一次, 20% 乌拉坦(7.5ml/kg) ip 后, 固定于鼠台上, 连接肢体 II 导联, 记录一段正常的心电图之后, 作气管插管行人工呼吸, 开胸作心包床, 接触电极置左心室的心尖部, 并给予一定的压力, 调整压力直至引出稳定的 MAP 图形, 固定接触电极, 无关电极埋入胸壁肌内, 引导单相动作电

位, ECG 与 MAP 信号同步输至 Pclab 信号采集处理系统。稳定 15min 后股静脉恒速注射 ISO 3mg/kg, 观察激发前后 MAP 和 ECG 的变化, 持续 15min 后, 立即取出心脏, 置于预冷生理盐水中洗净残血, 液氮保存, 测定前按要求制成 1% 或 2% 匀浆, 按各试剂盒说明书测定心肌组织中 LDH、CK、NOS、NO 的含量。

1.5 统计方法 数据以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 组间差异采用方差分析, 以 q 检验进行两两比较; 与激发前比较用配对 T 检验, 所有数据采用 SPSS10.0 统计软件包处理。

2 结果

2.1 复脉 I 号对应激豚鼠单相动作电位 MAPA 的影响 ISO 激发前, 各组动物的 MAPA 无显著性差异; 激发后各组动物的 MAPA 虽有一定升高的趋势, 但各组间无显著性差异, 各组内激发前后也无显著性差异, 结果见表 1。

表 1 复脉 I 号对单相动作电位 MAPA 的影响($\bar{x} \pm s; n=6$)

组别	剂量 (g 生药/kg)	MAPA(mv)				
		激发前	1min	5min	10min	15min
对照组		38.5±7.2	39.4±8.3	45.3±7.0	47.6±9.4	45.2±8.5
模型组		40.8±10.7	43.7±6.5	42.8±17.6	51.9±10.5	53.2±9.8
普萘洛尔组	6mg	47.5±13.1	40.6±9.6	33.3±13.5	41.8±10.0	39.5±11.4
炙甘草汤组	10	39.5±10.8	46.5±7.4	49.1±7.8	42.3±6.8	40.6±6.6
小剂量组	2	38.8±10.6	38.1±12.1	28.8±8.1	27.2±12.0	22.3±5.4
中剂量组	4	39.5±4.1	38.8±5.5	43.4±2.0	32.8±10.7	33.5±8.1
大剂量组	8	43.3±12.4	44.9±15.2	49.5±14.7	57.4±18.0	53.8±19.8

注: 与模型组相比* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与激发前相比# $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ (下同)。

2.2 复脉 I 号对应激豚鼠单相动作电位 MAPD₅₀、MAPD₉₀ 的影响 激发前各组动物间的 MAPD₅₀ 及 MAPD₉₀ 均无显著性差异; 激发后对照组及复脉 I 号小剂量组与激发前比较, MAPD₅₀ 明显缩短 ($P <$

0.05); 应激组的 MAPD₅₀、MAPD₉₀ 虽有延长的趋势, 但与激发前相比无显著性差异; 其它各组的 MAPD₅₀、MAPD₉₀ 与激发前相比虽有一定的缩短, 但无显著性。结果见表 2、3。

表 2 复脉 I 号对单相动作电位 MAPD₅₀ 的影响($\bar{x} \pm s; n=6$)

组别	剂量 (g 生药/kg)	MAPD ₅₀ (ms)				
		激发前	1min	5min	10min	15min
对照组		105.3±40.2	83.3±23.9 [#]	92.0±28.3	78.0±48.1	110.5±24.5
模型组		130.2±41.8	164.8±15.9	158.5±48.7	168.5±35.5	177.0±41.3
普萘洛尔组	6mg	118.6±35.2	112.0±45.9	114.8±35.3	142.6±27.3	148.2±42.2
炙甘草汤组	10	135.3±44.0	145.0±50.0	131.6±33.1	115.7±49.5	121.5±53.4
小剂量组	2	114.5±40.9	82.7±26.1 [#]	101.0±34.2	84.3±41.9	82.7±31.4
中剂量组	4	117.0±16.1	129.3±39.7	89.0±24.9	98.7±41.4	83.0±27.2
大剂量组	8	136.2±44.1	104.8±54.8	115.0±42.6	127.8±37.3	140.0±39.3

表 3 复脉 I 号对单相动作电位 MAPD₉₀ 的影响($\bar{x} \pm s; n=6$)

组别	剂量 (g 生药/kg)	MAPD ₉₀ (ms)				
		激发前	1min	5min	10min	15min
对照组		102.0 ± 14.1	91.5 ± 38.9	107.0 ± 32.5	93.7 ± 39.8	126.0 ± 41.4
模型组		152.3 ± 34.9	174.5 ± 5.2	171.5 ± 52.9	178.5 ± 39.8	185.5 ± 44.9
普萘洛尔组	6mg	130.0 ± 32.8	126.6 ± 40.5	127.6 ± 33.5	155.0 ± 26.4	159.4 ± 37.5
炙甘草汤组	10	146.5 ± 40.4	146.8 ± 47.0	142.2 ± 29.6	129.5 ± 45.5	134.3 ± 49.8
小剂量组	2	125.5 ± 33.8	95.3 ± 20.5	123.3 ± 25.5	99.0 ± 43.7	103.0 ± 35.6
中剂量组	4	125.0 ± 14.7	143.3 ± 36.6	102.7 ± 27.8	109.3 ± 46.7	91.3 ± 28.7
大剂量组	8	156.5 ± 46.8	137.0 ± 63.5	131.0 ± 46.3	140.8 ± 41.8	149.3 ± 41.4

2.3 复脉 I 号对应激豚鼠单相动作电位 V_{max} 的影响 与对照组相比, 激发前应激组的 0 相最大上升速率 (V_{max}) 明显减小 ($P < 0.05$), 给药组除复脉 I 号小剂量组外, 其余各组与应激组相比明显增大; 激发后, 对照组的 V_{max} 于激发后 5min 增至最大, 与激发

前相比有显著性差异, 复脉 I 号小剂量组的 V_{max} 于激发后 1min 增至最大, 与激发前相比有显著性差异; 其余各组的 V_{max} 均有增大的趋势, 但与激发前相比无显著性差异, 结果见表 4。

表 4 复脉 I 号对单相动作电位 V_{max} 的影响($\bar{x} \pm s; n=6$)

组别	剂量 (g 生药/kg)	V_{max} (v/s)				
		激发前	1min	5min	10min	15min
对照组		1.56 ± 0.22*	1.86 ± 0.12	2.09 ± 0.17#	1.77 ± 0.19	1.73 ± 0.24
模型组		0.94 ± 0.35	1.09 ± 0.50	1.29 ± 0.73	1.15 ± 0.36	1.91 ± 0.91
普萘洛尔组	6mg	1.83 ± 0.12*	1.71 ± 0.24	1.85 ± 0.26	1.89 ± 0.22	1.90 ± 0.23
炙甘草汤组	10	1.97 ± 0.57*	1.76 ± 0.38	2.58 ± 0.71	1.89 ± 1.00	1.97 ± 1.11
小剂量组	2	1.23 ± 0.25	2.16 ± 0.13#	2.11 ± 0.11	1.72 ± 0.41	2.19 ± 0.36
中剂量组	4	1.88 ± 0.38*	1.97 ± 0.62	2.15 ± 0.60	1.84 ± 0.60	1.82 ± 0.19
大剂量组	8	1.88 ± 0.59*	1.80 ± 0.84	2.23 ± 1.22	2.16 ± 1.25	2.30 ± 1.17

2.4 复脉 I 号对应激动物触发活动、心律失常的影响 激发后, 应激组早后除极 (EAD)、迟后除极 (DAD) 及 VP、VT、VF 的发生率均很高, 且对照组相比 DAD 的发生率显著升高; 复脉 I 号小剂量组与应

激组相比无统计意义, 其余各给药组上述指标的发生率均有降低, 且复脉 I 号作用强度呈浓度依赖性增强, 结果见表 5。

表 5 复脉 I 号对触发活动、心律失常的影响($\bar{x} \pm s; n=6$)

组别	剂量 (g 生药/kg)	发生率 (%)				
		EAD	DAD	VP	VT	VF
对照组		17	17*	33	17	0
模型组		83	100	100	83	50
普萘洛尔组	6mg	17	17*	33	17	0
炙甘草汤组	10	33	33	33	17	17
小剂量组	2	83	67	50	33	33
中剂量组	4	33	17*	33	17	0
大剂量组	8	17	17*	33	17	0

表 6 复脉 I 号对心肌 LDH、CK、NOS 活性及 NO 含量的影响($\bar{x} \pm s; n=6$)

组别	剂量(g 生药/kg)	活性及含量			
		LDH(U/g prot)	CK(U/mg prot)	NOS(U/ml)	NO(μmol/g prot)
对照组		3894.2 ± 236.6**	85.76 ± 7.36**	0.55 ± 0.14**	0.99 ± 0.18**
模型组		5776.5 ± 635.8	33.77 ± 11.81	1.18 ± 0.16	2.44 ± 0.46
普萘洛尔组	6mg	3788.7 ± 465.4**	80.56 ± 6.50**	0.70 ± 0.24**	1.76 ± 0.29*
炙甘草汤组	10	3849.1 ± 703.5**	80.43 ± 8.45**	0.59 ± 0.21**	1.58 ± 0.44*
小剂量组	2	4651.8 ± 832.4*	88.64 ± 11.16**	0.87 ± 0.17*	2.09 ± 0.33
中剂量组	4	3667.8 ± 611.3**	91.53 ± 19.71**	0.74 ± 0.17**	1.62 ± 0.29*
大剂量组	8	3779.3 ± 921.7**	100.11 ± 18.15**	0.60 ± 0.14**	1.37 ± 0.24**

2.5 复脉 I 号对应激动物心肌组织中 LDH、CK、NOS、NO 含量的影响 模型组豚鼠心肌组织中 LDH、NOS、NO 含量较对照组增高,均有显著性差异 ($P < 0.01$),而 CK 含量则显著下降 ($P < 0.01$)。普萘洛尔及炙甘草汤均可显著降低应激豚鼠心肌组织中 LDH、NOS 的含量,明显降低 NO 的含量,显著增高 CK 含量;复脉 I 号可抑制 LDH、NOS 活性,降低 NO 含量,升高 CK 活性,作用强度呈浓度依赖性增强,结果见表 6。

3 讨论

应激诱发心律失常是由于机体在应激状态下产生一系列的生理心理反应,使神经内分泌系统活动增强,交感-肾上腺髓质系统活动增强,体内 Adr、NE 释放增多,使心脏兴奋性增强,心肌异位节律点兴奋性增强,自动节律增加而产生心律失常,期前收缩甚至室颤。重复应激诱发心律失常则与应激造成心肌损伤有关,应激可造成心肌细胞膜脂质紊乱,基质膜的 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$ 酶和肌浆网的 $\text{Ca}^{2+} - \text{ATP}$ 酶失常,并出现心肌供能紊乱。这些变化可造成形态学可见的小灶性损伤,甚至“应激后僵化”(post-stress rigidity)。此外,心肌电稳定性也发生改变,如室颤阈下降,异位搏动频发等。

触发活动也被称为后除极,分为早后除极(EAD)和迟后除极(DAD)两种,EAD 发生在完全复极之前的 2 或 3 相中,一般认为是由于复极电流/除极电流比值减小,即内向电流增加或外向电流减小所致^[3];DAD 发生在完全复极之后的 4 相中,其机理可能是 Ca^{2+} 内流过多,肌浆网上钙泵($\text{Ca}^{2+} - \text{ATPase}$)不能摄 Ca^{2+} ,导致细胞浆 Ca^{2+} 超载, $\text{Na}^+ - \text{Ca}^{2+}$ 交换体激活进行 $\text{Na}^+ / \text{Ca}^{2+}$ 交换^[4]。

本实验观察到应激性心律失常表现特征为:① ISO 激发后既有 EAD 又有 DAD 的出现;② ISO 激发后,应激组 MAPD_{50} 、 MAPD_{90} 均延长;③与对照组相比,激发前应激组的 0 相最大上升速率(V_{\max})明显较小。长期反复应激导致体内儿茶酚胺类递质释放持续升高,兴奋心脏 β_1 受体,产生三磷酸肌醇(IP_3), IP_3 能调节肌浆网上 Ca^{2+} 代谢,从而调节心肌钙离子浓度,导致心肌细胞 Ca^{2+} 大量内流,引起 Ca^{2+} 超载^[5],ISO 激发后通过兴奋心脏 β_1 受体, Ca^{2+} 内流而引发 DAD;同时 MAPD_{50} 和 MAPD_{90} 延长,表明复极时相的内向电流增加而外向钾电流相对减小,可能是引发 EAD 的原因。有文献报道^[6],热休克预处理可阻滞心肌快钠通道,使单相动作电位 V_{\max} 降低,我们

的实验中观察到应激可降低单相动作电位 V_{\max} ,与文献报道是一致的,表明不论是急性还是慢性应激都可能通过抑制心肌快钠通道,引起单相动作电位 V_{\max} 的降低。

LDH 是一种广泛存在于细胞浆内的氧化还原酶,参与机体能量代谢,正常情况下释放很少,当细胞受损时,细胞内无氧代谢加强,诱导 LDH 产生增加,大量释放,故 LDH 释放的多少可反映细胞受损的程度。CK 也是反映心脏损伤的一个重要指标,当心肌受损出现变性、坏死时,细胞膜功能受损,细胞内 CK 外逸,致心肌 CK 活性显著下降。NO 是内源性活性物质,参与多种生理功能,同时过量的 NO 对机体组织将产生损伤作用,很多病理过程中都有 NO 的毒性作用参与介导,如心血管系统中的内毒素休克、动脉粥样硬化等。应激时可能由于体内儿茶酚胺类递质的大量释放,而产生严重的缺血状态,机体通过自身调节作用,诱导细胞内 NOS 酶活性升高,从而引起 NO 持续、大量地释放,导致心肌损伤的发生。

复脉 I 号对应激豚鼠的心脏具有保护作用,可抑制触发活动及触发性心律失常的发生;并对应激所致的豚鼠心肌损伤有保护作用,可能与降低心肌 LDH、NOS 的活性,抑制心肌细胞内 CK 外逸等有关。

参考文献:

- [1] Tajagi S, Miyazaki T, Moritani K, et al. Gadolinium suppresses stretch-induced increases in the differences in epicardial and endocardial monophasic action potential durations and ventricular arrhythmias in dogs[J]. Jpn Circ J, 1999, 63(4): 296.
- [2] 李兴高,陈奇,黄梦雨,等.炙甘草汤有效成分及其配伍对缺血再灌离体大鼠心脏触发活动及心及损伤的影响[J].中药新药与临床药理,2003,14(1):6.
- [3] Mest HJ, Ponicke K, Heinroth-Hoffmann I, et al. Relevance of mediators to cardiac parameters of isolated anaphylactic guinea pig heart[J]. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acid, 1995, 53(1): 21.
- [4] Nuery CT, Riddle JM. Early afterdepolarization: mechanism of induction and block. A role for L-type Ca^{2+} current[J]. Circ Res, 1989, 64: 977.
- [5] Corbier A, Robineau P. Evidence for a direct noncholinergic effect of an organophosphorous compound on guinea pig papillary muscles: are ventricular arrhythmias related to a $\text{Na}^+ / \text{K}^+ \text{ATPase}$ inhibition? [J]. Arch Int Pharmacodyn Ther, 1989, 300: 218.
- [6] 谢子安,黄元伟,胡申江,等.热休克预处理对大鼠心肌动作电位的影响[J].临床心血管病杂志,2002,18(3):125.