

基于实时细胞分析系统的速效救心丸抗心律失常作用研究

王金磊^{1,2}, 马 静¹, 尹清晟¹, 范姗姗¹, 王 曼¹, 张艳军¹, 李英鹏^{1*}, 庄朋伟^{1*}

1. 天津市中药药理学重点实验室, 天津中医药大学, 天津 300193

2. 天津中新药业集团股份有限公司第六中药厂, 天津 300401

摘要:目的 利用实时细胞分析(RTCA) Cardio系统, 通过体外细胞实验及整体动物实验评价速效救心丸抗心律失常作用。方法 培养原代大鼠乳鼠心肌细胞, 接种于E-Plate Cardio 96, 分析3 600/孔、20 000/孔以及90 000/孔接种浓度心肌细胞的细胞指数(CI)和搏动图形; MTT法检测速效救心丸(10、20、40、80、160 $\mu\text{g/mL}$)对原代心肌细胞活力的影响; 考察速效救心丸(160 $\mu\text{g/mL}$)对乌头碱(8 $\mu\text{mol/L}$)诱发心律失常的心肌细胞搏动频率、搏动幅度的影响; 舌下iv乌头碱50 $\mu\text{g/kg}$ 制备大鼠心律失常模型, 利用八导生理记录仪观察速效救心丸(54、270 mg/kg)对II导联心电图的影响。结果 20 000/孔为最佳接种浓度, CI值在观察时间内成对数生长, 细胞形成同步搏动, 波形正常且持续时间长; 在10~160 $\mu\text{g/mL}$ 浓度范围内, 速效救心丸对心肌细胞活力均没有明显影响。RTCA Cardio系统检测结果显示, 与模型组比较, 速效救心丸能显著降低心肌细胞搏动速率($P<0.01$)、显著增加心肌细胞的搏动幅度($P<0.01$)。动物实验发现, 速效救心丸能有效对抗乌头碱诱导的心律失常、改善乌头碱对实验动物RR间期的抑制作用和对心率的促进作用、降低乌头碱诱导的室颤发生率($P<0.01$ 、 0.001)。结论 RTCA Cardio系统能实现对心肌细胞的实时监测, 可以检测心肌细胞的搏动情况; 速效救心丸能有效对抗乌头碱诱导的心律失常。

关键词: 实时细胞分析系统; 速效救心丸; 乌头碱; 心律失常; 心肌细胞

中图分类号: R965

文献标志码: A

文章编号: 1674-6376(2020)01-0027-05

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2020.01.005

in vitro evaluation of antiarrhythmia of SuXiao JiuXin Pill based on RTCA Cardio system

WANG Jinlei^{1,2}, MA Jing¹, YIN Qingsheng¹, FAN Shanshan¹, WANG Man¹, ZHANG Yanjun¹, LI Yingpeng¹, ZHUANG Pengwei¹

1. Tianjin State Key Laboratory of Modern Chinese Medicine, Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300193, China

2. The Sixth Chinese Medicine Factory, Tianjin Zhongxin Pharmaceutical Group Co., Ltd., Tianjin 300401, China

Abstract: **Objective** To evaluate the anti-arrhythmia effect of Suxiao Jiuxin Pill in vitro cell experimental and whole animal experiment by using the real-time cell analysis (RTCA) Cardio system, which provided experimental basis for the clinical application of Suxiao Jiuxin Pill. **Methods** The primary rat cardiac myocytes were cultured and inoculated in e-plate cardio 96. The cell index (CI) and pulsation pattern of cardiac myocytes at 3 600/well, 20 000/well and 90 000/well were analyzed. The effects of Suxiao Jiuxin Pill (10, 20, 40, 80, 160 $\mu\text{g/mL}$) on the viability of primary cardiac myocytes were detected by MTT method. The effects of Suxiao Jiuxin Pill (160 $\mu\text{g/mL}$) on aconitine (8 $\mu\text{mol/L}$) were investigated. The effects of tachycardia frequency and amplitude of cardiac myocytes on arrhythmia; the rat model of arrhythmia was made by sublingual aconitine 50 $\mu\text{g/kg}$, and the effects of Suxiao Jiuxin Pill (54, 270 mg/kg) on lead II ECG were observed by eight channel physiological recorder. **Results** In the concentration range of 10-160 $\mu\text{g/mL}$, Suxiao Jiuxin Pill had no significant effect on the viability of cardiomyocytes. The results of RTCA cardio system showed that compared with the model group, Suxiao Jiuxin Pill could significantly reduce the beating rate of cardiomyocytes ($P<0.01$), and significantly increase the beating range of cardiomyocytes ($P<0.01$). Animal experiments showed that Suxiao Jiuxin Pill can effectively resist aconitine induced arrhythmia, improve the inhibition of aconitine on RR interval and the promotion of heart

收稿日期: 2019-05-29

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81703710);天津市留学回国人员科技活动启动项目(2018018)

第一作者: 王金磊(1982—),女,硕士研究生,研究方向为中药学。Tel:13821228492 E-mail:wjl6zy@163.com

*通信作者: 庄朋伟(1982—),男,博士,副教授,研究方向为中药药理。E-mail:zhuangpengwei@163.com

李英鹏(1987—),男,博士,讲师,研究方向为药物制剂。E-mail:li-ying-peng@126.com

rate, and reduce the incidence of ventricular fibrillation induced by aconitine ($P < 0.01, 0.001$). **Conclusion** RTCA cardio system can realize real-time monitoring of myocardial cells, Suxiao Jiuxin Pill can effectively treat arrhythmias induced by Aco.

Key words: RTCA Cardio; Suxiao Jiuxin Pill; aconitine; arrhythmia; cardiac myocytes

心律失常是心脏衰竭和心肌缺血常见的并发症,尤以快速型心律失常最为严重,会严重影响患者的生活质量和活动能力,甚至会引起猝死,因此抗心律失常药物的研发很重要。传统抗心律失常评价手段多存在技术要求高、检测过程繁琐且工作量大等不足,亟待建立一种新型、准确的体外心律失常检测手段。实时细胞分析(Real-time cell analysis, RTCA) Cardio系统能实现对心肌细胞的实时监测,可以检测心肌细胞的搏动情况^[1-2],实现对心肌细胞生理特性无损伤、实时、快速的监测。

速效救心丸具有抗心肌缺血作用,临床上常用于治疗冠心病、心绞痛,对各种心律失常也有很好的临床治疗作用^[3-6],但关于其抗心律失常作用相关的基础研究较为薄弱。本研究分别通过体外细胞实验及整体动物实验考察速效救心丸对乌头碱诱导的心肌细胞心律失常的影响,为速效救心丸的临床应用提供实验依据,同时也为抗心律失常药物的研发提供方法学参考。

1 材料

1.1 实验动物

雄性SD大鼠,体质量(200 ± 20)g,由北京华康实验动物中心提供,实验动物生产许可证号为SCXK(京)2014-0004,饲养于天津中医药大学实验动物中心;1~2天SD大鼠乳鼠来自中国人民解放军军事医学科学院卫生学环境医学研究所实验动物中心,实验动物生产许可证号SCXK(军)2014-003。

1.2 药物及主要试剂

速效救心丸(由天津中新药业第六中药厂提供,批号612286);乌头碱(成都曼思特生物科技有限公司,生产批号MUST-13012802);胎牛血清(Gibco公司,批号1227693);DMEM高糖培养基(Hyclone公司,批号NYL1023);胰蛋白酶(Gibco公司,批号1371058);二型胶原酶(Gibco公司,批号1102392);DMSO(北京索莱宝科技有限公司,批号8023271)。

1.3 实验仪器

八导生理记录仪(MP-100,美国BIOPAC);电动呼吸机(DHX-500,成都仪器厂);酶标仪(Multiskan Ascent, Thermo LabSystems, 美国);5% CO₂恒温培养箱(美国Thermo Scientific Cytoperm公司);倒置相差显微镜(XD-101 98010,

德国);生物洁净工作台(JB-CJ-2FC型,苏州佳宝净化工程设备有限公司);实时无标记心肌细胞分析系统(RTCA Cardio,美国罗氏公司);Flexstation 3多功能酶标仪工作站(Molecular Devices);96孔电极板(E-Plate Cardio 96,美国罗氏公司产品);AE200型电子分析天平(梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司);YXJ-II型高速离心机(常州金城教学仪器厂);BCD-256KF B型-20℃冰箱(青岛海尔股份有限公司)。

2 方法

2.1 大鼠乳鼠心肌细胞原代培养

取新生1~2 d的大鼠乳鼠,无菌操作取出心脏心尖部,在预冷的DMEM去除心房和血管等组织并漂洗3次,将心尖转移到D-Hanks中,用眼科剪剪成约1 mm³的小块,加入消化酶溶液(含0.07% Trypsin和0.05% Collagenase Type II),37℃消化10 min,至心肌组织块松软,过200目细胞筛。收集细胞悬液,800 r/min离心5 min,用含有10% FBS的DMEM培养基重悬细胞,将细胞悬液收集到培养瓶中进行差速贴壁2次,每次60 min,以去除成纤维细胞等杂细胞,将差速贴壁后的心肌细胞悬液接种于0.1%明胶溶液包被的E-Plate Cardio 96板中培养。

2.2 基于RTCA Cardio系统E-Plate Cardio 96筛选合适的细胞接种密度

RTCA Cardio系统可用来实时监测细胞的增殖和搏动情况,并可以检测到不同密度接种的原代心肌细胞有不同的生长曲线,同时对应不同的细胞指数(Cell index, CI值)。RTCA Cardio系统监测得到的细胞搏动图形与细胞接种密度、细胞状态有关,若接种密度偏小,CI值过小,则不能形成细胞搏动同步化,检测不到细胞的搏动图形;若接种密度过大,CI值以先缓慢增长随后很快下降的趋势,搏动起跳时间推迟,搏动图形呈倒峰,且搏动持续时间不够长;只有接种密度适当,才能形成搏动稳定、波峰正常、持续时间足够长的搏动图形。实验过程中将RTCA检测工作台放在CO₂细胞培养箱中,调整心肌细胞细胞密度分别为3 600/孔、20 000/孔以及90 000/孔,实时记录72 h,脱机分析不同浓度心肌细胞的CI值和搏动图形,选择合适的接种密度。

2.3 MTT法检测药物对原代心肌细胞活力的影响

原代大鼠乳鼠心肌细胞接种于普通96孔板,每

孔 2.0×10^4 个细胞,每天换液,待细胞贴壁 48 h 后,弃去培养基,换液,24 h 后加药,对照组加入 100 μL 完全培养液,加药组分别加入 100 μL 不同浓度速效救心丸(10、20、40、80、160 $\mu\text{g}/\text{mL}$),每组 6 个复孔,24 h 后,每孔加入 0.5% MTT 液 100 μL ,孵育 4 h 后吸弃液体,加入 DMSO 溶液 100 μL ,置于酶标仪上采用 490 nm 波长测定各孔的吸光度(A)值,观察速效救心丸对原代心肌细胞活力的影响。

2.4 基于 RTCA Cardio 系统评价速效救心丸抗心律失常作用

原代心肌细胞提取分离步骤同“2.1”项,计数,按 2.0×10^4 /孔的细胞数接种。培养 24 h 后,加入不同药物,分别为对照组、模型(加入 8 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 乌头碱)组以及速效救心丸(加入 160 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 速效救心丸和 8 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 乌头碱)组,每组 6 个复孔,继续监测。监测结束后,脱机使用 RTCA Cardio 系统自带数据分析模块,分析细胞搏动情况、搏动速率及搏动幅度,体外观察速效救心丸对乌头碱诱发心律失常的作用。

2.5 速效救心丸对乌头碱诱发大鼠心律失常的影响

随机选取 24 只雄性 SD 大鼠,体质量(200 ± 20)g,随

机分为 3 组,每组 8 只,即模型(生理盐水)组、速效救心丸低、高剂量(54、270 mg/kg)组,各组每天按 15 mL/kg ig 给药,连续 3 d;末次给药 1 h 后,20% 乌拉坦 0.06 mL/kg 麻醉,仰位固定,针形电极插入四肢皮下,连续记录标准肢体 II 导联心电图(ECG)。待 ECG 稳定 5 min 后,快速(10 s 内)舌下 iv 乌头碱 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$,记录 1 h ECG,统计各组室颤率、心率及 RR 间期,观察速效救心丸对乌头碱诱发心律失常的影响。

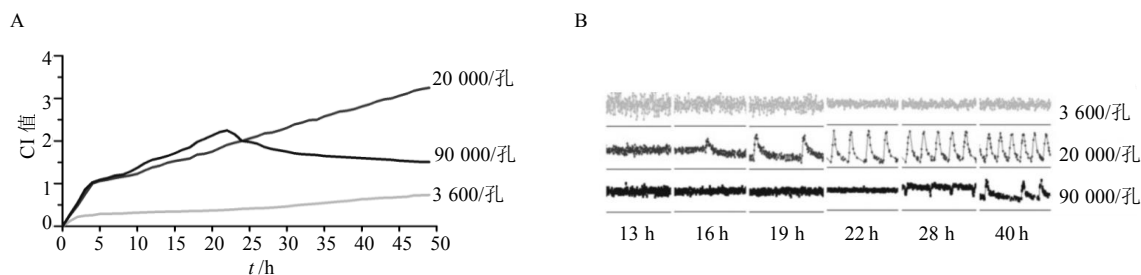
2.6 统计学分析

数据均用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 17.0 统计软件进行单因素方法分析(One-way ANOVA),先执行方差齐性检验和方差分析,若方差齐,组间两两比较用 LSD 法,若方差不齐,组间两两比较采用 Dunnett's T3,各组室颤率进行 χ^2 检验。

3 结果

3.1 RTCA Cardio 系统 E-Plate Cardio 96 细胞接种密度的筛选

RTCA Cardio 实时监测细胞增殖情况 72 h 后,如图 1 所示,可观察到不同密度的细胞有不同的生



A-不同密度原代心肌细胞的 CI 值曲线;B-不同密度原代心肌细胞的搏动图形

A-CI value curve of different density primary cardiac myocytes; B-Pulsation patterns of different density primary cardiac myocytes

图1 RTCA Cardio 系统筛选合适的细胞接种密度

Fig. 1 Screening suitable cell inoculation density by RTCA Cardio system

长曲线,并且有不同的 CI 值和搏动状态。当接种密度为 3 600/孔时,CI 值在观察时间内未发生明显变化,未形成细胞搏动同步化;当接种密度为 90 000/孔时,CI 值在 24 h 内持续增长,24 h 后开始降低,且细胞搏动起跳时间推迟,搏动图形呈倒峰,且搏动持续时间不够长;而当接种密度为 20 000/孔时,CI 值在观察时间内成对数生长,细胞形成同步搏动,波形正常且持续时间长。后续实验确定以 20 000/孔为最佳接种密度。

3.2 MTT 法检测药物对原代心肌细胞活力的影响

将酶标仪测得的 A 值进行数据分析,如表 1 所示,速效救心丸作用于原代心肌细胞 24 h 后,不同

浓度速效救心丸 A 值较对照组降低,但均没有显著性差异,提示该浓度范围内,速效救心丸对心肌细胞活力均没有明显影响。

表1 不同浓度速效救心丸对心肌细胞活力的影响($\bar{x} \pm s, n=6$)

Table 1 Effect of different concentrations of Suxiao Jiuxin Pill on viability of cardiac myocytes ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	浓度/ $(\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1})$	A 值
对照	—	0.76 ± 0.08
速效救心丸	10	0.65 ± 0.10
	20	0.56 ± 0.05
	40	0.55 ± 0.08
	80	0.54 ± 0.08
	160	0.56 ± 0.08

3.3 基于RTCA Cardio系统体外评价速效救心丸抗心律失常作用

RTCA Cardio系统监测结果如图2所示,与对照组比较,模型组心肌细胞搏动速率、搏动幅度显著增加($P<0.01$);与模型组比较,速效救心丸能显著降低心肌细胞搏动速率($P<0.01$)、显著增加心肌细胞的搏动幅度($P<0.01$),改善心肌细胞搏动异常。结果提示,速效救心丸能有效对抗乌头碱对心肌细胞搏动频率的增强作用,减轻乌头碱对心肌细胞收缩舒张幅度的抑制作用,提示速效救心丸对乌头碱诱导的心律失常有改善作用。

3.4 速效救心丸对乌头碱诱发在体动物心律失常的影响

各组实验动物在造模前ECG均为正常窦性心律,舌下iv乌头碱1 min后,仅模型组发生明显的室性心律失常,速效救心丸54、270 mg/kg组均未发生

心律失常。注射乌头碱后5 min各组相继出现不同类型心律失常,尤其以模型组出现较严重的非持续性室性心动过速,速效救心丸54 mg/kg组出现室性齐射,270 mg/kg组出现室性二联律。待注射乌头碱后8 min时,模型组大多出现持续性室速,有的甚至发生室颤;速效救心丸54 mg/kg组出现非持续性心动过速,270 mg/kg组出现室性二联律伴窦性心律。结果见图3。

在注射乌头碱之前,各组RR间期和心率无明显差异。注射乌头碱5、25 min后,与注射前一段时间比较,模型组RR间期显著缩短,心率显著增加($P<0.01$);与模型组比较,速效救心丸54 mg/kg能显著改善注射乌头碱5、25 min对大鼠RR间期的抑制作用和对心率的促进作用($P<0.01$ 、 0.001),270 mg/kg能够显著改善注射乌头碱25 min对大鼠RR间期的抑制作用和对心率的促进作用($P<0.01$ 、 0.001)。结果见表2、3。

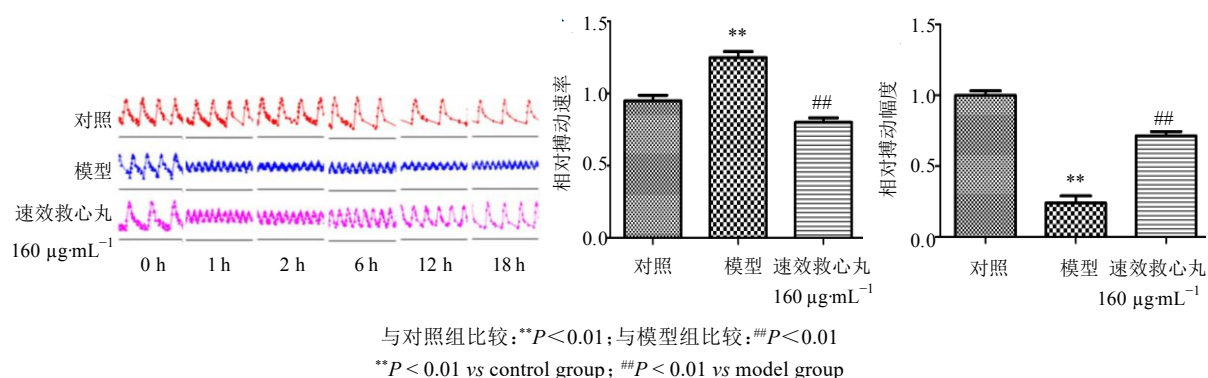


图2 基于RTCA Cardio系统分析速效救心丸对乌头碱诱发心律失常的影响($\bar{x}\pm s, n=6$)

Fig. 2 Analysis of effect of Suxiao Jiuxin Pill on Aco induced arrhythmia based on RTCA Cardio system($\bar{x}\pm s, n=6$)

表2 速效救心丸对乌头碱诱发心律失常RR间期的影响($\bar{x}\pm s, n=8$)

Table 2 Effect of Suxiao Jiuxin Pill on RR interval induced by aconitine ($\bar{x}\pm s, n=8$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	RR 间期/s					
		0 min	5 min	10 min	15 min	20 min	25 min
模型	—	0.17±0.01	0.15±0.01**	0.16±0.014	0.16±0.021	0.16±0.008	0.12±0.004***
速效救心丸	54	0.17±0.01	0.17±0.007##	0.16±0.01	0.19±0.016	0.18±0.01###	0.16±0.01###
	270	0.17±0.005	0.16±0.005	0.18±0.006##	0.15±0.008	0.14±0.003###	0.16±0.012###

与模型组前一时间段比较: ** $P<0.01$ *** $P<0.001$; 与模型组同时间段比较: ## $P<0.01$ ### $P<0.001$

** $P<0.01$ *** $P<0.001$ vs the previous period of model group; ## $P<0.01$ ### $P<0.001$ vs same period of model group

表3 速效救心丸对乌头碱诱发心律失常心率的影响($\bar{x}\pm s, n=8$)

Table 3 Effect of Suxiao Jiuxin Pill on heart rate induced by aconitine ($\bar{x}\pm s, n=8$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	心率/(次·min ⁻¹)					
		0 min	5 min	10 min	15 min	20 min	25 min
模型	—	366±10	410±18***	368±14***	314±17***	351±13***	403±16***
速效救心丸	54	371±9	365±7###	354±8	325±14	313±15###	362±14###
	270	376±11	415±15	357±8	371±9###	376±9###	367±8###

与模型组前一时间段比较: ** $P<0.01$ *** $P<0.001$; 与模型组同时间段比较: ## $P<0.01$ ### $P<0.001$

** $P<0.01$ *** $P<0.001$ vs the previous period of model group; ## $P<0.01$ ### $P<0.001$ vs same period of model group

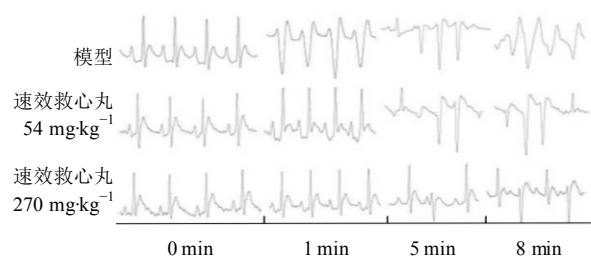


图3 速效救心丸对乌头碱诱发心律失常的影响。

Fig. 3 Effect of SX on arrhythmia induced by Aconitine

iv 乌头碱 25 min 后, 模型组室颤率 62.5%, 速效救心丸 54 mg/kg 组室颤率 37.5%, 270 mg/kg 组未发生室颤。结果提示, 速效救心丸可以降低乌头碱诱导的严重室速导致的室颤发生率。结果见表 4。

表 4 速效救心丸对乌头碱诱发室颤的发生率的影响($n=8$)

Table 4 Effect of SX on incidence of ventricular fibrillation induced by Aco ($n=8$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	室颤动物数	室颤发生率/%
模型	—	5	62.5
速效救心丸	54	3	37.5
	270	0	0**

与模型组比较: ** $P<0.01$

** $P<0.01$ vs model group

4 讨论

心律失常是指心脏搏动的频率、节律、起源部位、传导速度等异常, 是临床上心肌缺血和心力衰竭常见的并发症, 常可引发猝死^[7], 因此有效的控制心律失常是治疗心血管系统疾病的重要手段。基于心律失常发生的复杂性^[8-10], 抗心律失常药物的研发也存在一定的技术难度。

现在研究者多利用体外培养心肌细胞诱导心律失常作为动物模型的替代, 但其传统的监测手段却利弊均分, 如膜片钳技术可以被用来研究离子通道动力学和瞬时电流^[11-13], 可以得到高质量的结果, 但膜片钳技术是劳动密集型技术, 要求技术高, 操作难度较大。本实验利用可以瞬时或者长时间监测并记录心肌细胞的搏动变化状态的 RTCA Cardio 系统, 来反映药物对心肌细胞搏动的影响, 弥补了传统检测手段的不足。

本实验首先体外评价了速效救心丸对乌头碱诱导心律失常的影响, 结果发现, 速效救心丸能有效对抗乌头碱诱导的心律失常。在此基础之上, 利用八导生理记录仪, 在整体动物水平验证速效救心丸对乌头碱诱导心律失常的作用, 结果显示, 速效救心丸可以改善乌头碱诱发的心律失常, 与 RTCA Cardio 系统体外检测结果相一致。乌头碱可以通过

心肌细胞 Na⁺通道的激活, 减少心肌细胞 Na⁺内流, 减慢起搏点自律, 增加心肌不应期等导致心律失常^[14]的发生, 实验分别利用离体心肌细胞与整体动物实验证实了速效救心丸可以抑制乌头碱所致的心律失常, 其具体机制有待进一步深入研究。本研究以乌头碱为工具药, 评价速效救心丸抗心律失常作用, 不仅可为速效救心丸的临床应用提供一定实验依据, 而且还可为抗心律失常药物的研发提供方法学参考。

参考文献

- [1] Jonsson M K, Wang Q D, Becker B. Impedance-based detection of beating rhythm and proarrhythmic effects of compounds on stem cell-derived cardiomyocytes [J]. Assay Drug Dev Technol, 2011, 9(6): 589-599.
- [2] 王淑颜, 汪溪洁, 靳康, 等. 运用实时细胞分析系统监测原代小鼠心肌细胞的生长及搏动评价抗心律失常药物 [J]. 中国药理学与毒理学杂志, 2014, 28(6): 837-843.
- [3] 张鸿升, 万晓莹, 宋丽艳. 速效救心丸治疗心律失常的临床应用 [J]. 中西医结合实用临床急救, 1997, 4(5): 42-43.
- [4] 刘清安, 赵克. 速效救心丸的临床新用途 [J]. 淮海医药, 2007, 25(4): 382-384.
- [5] 罗助荣, 郑冰. 速效救心丸抗心律失常的临床研究 [J]. 中国社区医师, 2012, 28(12): 16.
- [6] 严军亮, 贺中式. 速效救心丸治疗心律失常的临床观察 [J]. 实用临床医学, 2004, 5(4): 43-44.
- [7] 赵薇, 王树, 李方江. 大黄酚对小鼠脑缺血再灌注脑组织抗氧化应激和 AQP4 的影响 [J]. 中国药理学通报, 2015, 31(10): 1477-1478.
- [8] 岳慧杰, 王友群. 药物致心律失常及其评价模型研究进展 [J]. 中国现代应用药学, 2007, 24(4): 285-288.
- [9] 杨宝峰, 蔡本志. 心律失常发病机制研究进展 [J]. 国际药学研究杂志, 2010, 37(2): 81-88.
- [10] 张莹茜, 冯志强. 缺血性心律失常发生机制的研究进展 [J]. 医学综述, 2011, 17(21): 3210-3213.
- [11] Moretti A, Bellin M, Welling A, et al. Patient-specific induced pluripotent stem-cell models for long-QT syndrome [J]. N Engl J Med, 2010, 363(15): 1397-1409.
- [12] Itzhaki I, Maizels L, Huber I, et al. Modelling the long QT syndrome with induced pluripotent stem cells [J]. Nature, 2011, 471(7337): 225-229.
- [13] Sartiani L, Bettiol E, Stillitano F, et al. Developmental changes in cardiomyocytes differentiated from human embryonic stem cells: a molecular and electrophysiological approach [J]. Stem Cells, 2007, 25(5): 1136-1144.
- [14] 肖勇, 马增春, 王宇光, 等. 参附注射液配伍对乌头碱诱发心律失常的减毒研究 [J]. 中药药理与临床, 2013, 29(3): 12-15.