

参麦注射液对人诱导多能干细胞衍生心肌细胞钙信号的影响

张 章, 于婷婷, 李 森*

北京中医药大学 生命科学学院, 北京 102401

摘要: 目的 研究参麦注射液对人诱导多能干细胞衍生心肌细胞 (HiPSC-CM) 钙信号的影响。方法 通过CCK-8法测定参麦注射液 (培养基中终体积分数为0.25%、0.50%、1.00%、2.00%) 培养24 h对HiPSC-CM细胞存活率的影响; 采用钙离子探针Fluo-4研究参麦注射液 (2%, 处理3 min) 对HiPSC-CM自发钙瞬变频率的影响, 并在不同电刺激频率 (0.2、1.0、2.0 Hz) 下研究参麦注射液对HiPSC-CM钙瞬变振幅、上升及下降时间和半峰全宽 (FWHM) 的影响。结果 CCK-8结果显示, 参麦注射液对HiPSC-CM无毒性, 且在体积分数2%时细胞存活率显著高于对照组 ($P < 0.05$)。与加药前比较, 对照组加药后自发钙瞬变频率没有明显变化, 2%的参麦注射液组自发钙瞬变频率显著降低 ($P < 0.001$)。与加药前比较, 在0.2、1.0 Hz电刺激频率下, 参麦注射液显著降低HiPSC-CM的钙瞬变振幅、上升及下降时间和FWHM ($P < 0.01$); 在2.0 Hz电刺激频率下, 参麦注射液显著降低HiPSC-CM的上升、下降时间和FWHM ($P < 0.01$)。结论 参麦注射液能够降低HiPSC-CM自发钙瞬变的频率, 且在不同频率的电刺激下能降低HiPSC-CM的钙瞬变振幅, 表明钙信号调控可能是参麦注射液心肌保护作用的潜在机制之一。

关键词: 参麦注射液; 人诱导多能干细胞衍生心肌细胞; 钙信号; 钙瞬变; 频率; 振幅

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-6376 (2022) 12-2458-06

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2022.12.008

Effects of Shenmai Injection on calcium signaling in HiPSC-CM

ZHANG Zhang, YU Tingting, LI Sen

School of Life Sciences, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 102401, China

Abstract: **Objective** To study the effect of Shenmai Injection (SMI) on calcium signaling of human induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocyte (HiPSC-CM). **Methods** The effect of SMI (final volume fractions in medium were 0.25%, 0.50%, 1.00% and 2.00%) on the cell viability of HiPSC-CM was determined by CCK-8 assay. Calcium ion probe Fluo-4 was used to study the effect of SMI (2%, 3 min) on spontaneous calcium transient frequency in HiPSC-CM. The effect of SMI on amplitude, rise and decay time and half-peak full width (FWHM) of electrical stimulation-induced calcium transient in HiPSC-CM was investigated at different electrical stimulation frequencies (0.2, 1.0 and 2.0 Hz). **Results** The results of CCK-8 showed that SMI was not toxic to HiPSC-CM, and cell viability was significantly higher than that of control group at 2% ($P < 0.05$). Compared with before treatment, the spontaneous calcium transient frequency in control group did not change significantly after treatment, and the spontaneous calcium transient frequency in 2% SMI group was significantly decreased ($P < 0.001$). Compared with before treatment, SMI significantly decreased the calcium transient amplitude, rise and fall time and FWHM of HiPSC-CM at 0.2 and 1.0 Hz electrical stimulation frequency ($P < 0.01$). At the frequency of 2.0 Hz electrical stimulation, SMI significantly reduced the rise and fall time and FWHM of HiPSC-CM ($P < 0.01$). **Conclusions** SMI can decrease the frequency of spontaneous calcium transients in HiPSC-CM. Under the electrical stimulation at different frequency, SMI can reduce the amplitude of calcium transient in HiPSC-CM. It was indicated that SMI achieve its cardioprotective effect by regulating the calcium signal of cardiomyocytes.

Key words: Shenmai Injection; human induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocyte; calcium signaling; calcium transient; frequency; amplitude

收稿日期: 2022-05-15

基金项目: 国家自然科学基金项目 (81973698、81703942); 中华中医药学会青年人才托举工程项目 (2019-QNRC2-B08)

第一作者: 张 章, 研究方向为心肌细胞钙信号。E-mail: chris@bucm.edu.cn

*通信作者: 李 森, 副研究员, 研究方向为基于人诱导多能干细胞衍生心肌细胞的中药安全性和有效性评价。E-mail: senli@bucm.edu.cn

参麦注射液源自于中国传统配方——参麦散,主要由红参和麦冬组成^[1],是以中医理论为根据,应用现代工艺生产的中成药。参麦注射液的用药方式为静脉滴注,相对于口服,在一定程度上加快了药物在患者体内的起效速度^[2]。已有大量临床试验证明了参麦注射液对心力衰竭(心衰)、冠心病和慢性肺心病等疾病均有疗效^[3]。此外,参麦注射液联合其他药物具有增强药效和降低毒性的作用^[4]。目前关于参麦注射液的已有研究主要聚焦在两方面:在动物模型中研究射血功能、心脏收缩^[5-6];在体外细胞实验中测量活性氧、线粒体功能等^[7]。然而这些研究未能阐明其对可代表心肌细胞功能的钙信号的影响。

钙离子作为心肌细胞中重要的第二信使,在兴奋收缩偶联中起到重要的作用^[8],与心脏收缩功能息息相关。动作电位诱发钙离子内流,进一步促进心肌细胞中肌浆网钙库的钙离子释放到细胞质中,与细丝上的肌钙蛋白钙离子结合位点结合引起心脏收缩^[9]。细胞质中钙离子浓度的突然升高被称为钙瞬变^[10],研究钙瞬变能从一定角度上描述心肌功能^[11]。然而由于供体有限,人体心肌细胞难以获得,且受到道德伦理限制,直接在人体心肌细胞上开展研究难度较大^[12]。因此,多能干细胞分化的心肌细胞逐渐成为了体外细胞研究的重要角色。人诱导多能干细胞衍生心肌细胞(HiPSC-CM)是一种由胚胎干细胞分化而来衍生的心肌细胞^[13],与人心肌细胞相似,也具有成熟的钙触发钙释放(CICR)机制,因此HiPSC-CM被广泛用来进行药物筛选^[14]。但现在基于HiPSC-CM层面的药理学研究仍然以化学药为主,以中药为主的研究较少,且尚未有研究应用HiPSC-CM考察药物对钙信号的影响。本研究通过钙成像技术研究参麦注射液对HiPSC-CM钙信号的作用,揭示其改善心肌功能的机制。

1 材料

1.1 细胞

HiPSC-CM及培养基、复苏液、铺板液,从南京爱尔普再生医学有限公司获得。

1.2 药物及主要试剂

参麦注射液购自杭州正大青春宝药业有限公司(批号2011263,规格:每支2 mL);钙离子荧光探针Fluo-4、咖啡因购自美国Thermo Fisher Scientific公司;台氏液购自北京索莱宝科技有限公司;CCK-8试剂盒购自大连美仑生物技术有限公司。

1.3 主要仪器

SpectraMax i3X酶标仪购自美国Molecular Devices仪器公司;FV3000共聚焦显微镜购自日本Olympus公司;电刺激器购自英国Digitimer公司。

2 方法

2.1 细胞培养

从液氮中取出细胞冻存管后,立即将其没入37℃水浴锅中融化,随后立刻转移至超净台吸出至15 mL离心管进行复苏,由慢变快滴加复苏液,同时旋转离心管以混匀细胞悬液和复苏液。300×g离心5 min,弃去上清,将细胞置于37℃和5% CO₂培养箱中培养,24 h后更换为心肌细胞培养基,隔天换液。

2.2 细胞活力检测

在“2.1”项的复苏过程前,预先使用铺板液包被96孔板,铺板液能够帮助HiPSC-CM贴壁。将HiPSC-CM以每孔 1×10^4 个均匀接种在孔内,状态良好后,用参麦注射液(培养基中终体积分数为0.25%、0.50%、1.00%、2.00%)处理细胞,每个体积分数设立3个复孔,对照组加入不含药物的培养基。培养24 h后,吸尽培养基,将含有10% CCK-8的培养基加入到每个孔内,等待2 h。在酶标仪的450 nm波长处读取吸光度(A)值,计算细胞存活率。

细胞存活率=参麦注射液组A值/对照组A值

2.3 钙成像

在“2.1”项的复苏过程前,预先使用铺板液包被共聚焦小皿。将HiPSC-CM以每皿 1×10^4 个的细胞密度接种在共聚焦小皿中间圆孔。培养1周,待细胞状态良好后,吸尽培养基,使用台氏液冲洗细胞1遍。使用台氏液配制Fluo-4工作液($4 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$),在37℃、5% CO₂下孵育细胞30 min。使用台氏液冲洗细胞3遍,加入1 mL台氏液。随后,将共聚焦小皿置于FV3000共聚焦显微镜下并打开温控系统,使温度稳定在37℃。细胞搏动频率在1 Hz左右即可加药,使用参麦注射液(2%)处理HiPSC-CM 3 min、咖啡因(阳性对照, $25 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)即时处理后,记录给药前后分别对自发钙瞬变频率的影响,另设置对照组,即不含药物的培养基,操作与参麦注射液组相同。

2.4 电刺激

体外实验中,一定频率的电刺激可以使得心肌细胞跟随刺激频率同步化跳动,有助于分析药物对同一频率下的细胞钙瞬变振幅、半峰全宽(FWHM)等参数的影响,这些参数描述了一定的生理功能。

将细胞按“2.2”项流程接种在共聚焦小皿中,以同样的培养条件和方法处理细胞,电刺激器一端连有不具有细胞毒性的电极,另一端连接电源和参数面板,使用不同电刺激频率(0.2、1.0、2.0 Hz)刺激HiPSC-CM,记录1 min,温度恒定且细胞搏动频率稳定后,加入2%的参麦注射液处理3 min,使用共聚焦显微镜记录HiPSC-CM的钙荧光变化并导出原始文件,原始文件经过基于Image J的Olympus viewer插件读取,并经过分析后导出生成Excel文件,再导入Matlab的Peakcaller插件分析钙瞬变振幅、上升及下降时间和FWHM。

2.5 统计学处理

数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,对于两两比较采用配对 t 检验、双尾 t 检验,对于多于3组的数据的比较采用单因素方差分析。统计软件为SPSS 22.0。

3 结果

3.1 参麦注射液对HiPSC-CM细胞存活率的影响

如图1所示,与对照组比较,参麦注射液组HiPSC-CM细胞存活率呈增加趋势,体积分数为2%时差异显著($P < 0.05$),均对细胞无明显毒性,后续实验体积分数选择2%。

3.2 参麦注射液降低HiPSC-CM自发钙瞬变的频率

Fluo-4是一种钙离子探针,能够结合钙离子并在共聚焦显微镜激发光488 nm波长处产生较强的荧光。如图2所示,咖啡因能够促进HiPSC-CM收缩,能够介导钙库的钙离子全部释放,因此呈现出来的一次较强的荧光变化,这称为咖啡因介导的胞质钙浓度升高,在本实验中被用作阳性对照,与加药前比较,咖啡因处理后的钙荧光强度显著升高,钙瞬变的振幅显著增加($P < 0.001$),证明实验系统可靠。与加药前比较,对照组加药后钙瞬变的频率没有明显变化;2%参麦注射液组钙瞬变频率

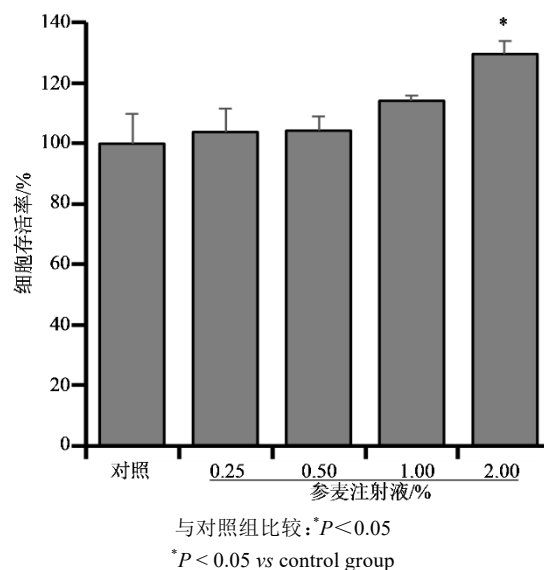


图1 不同浓度参麦注射液对HiPSC-CM细胞存活率的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 1 Effect of SMI on cell viability of HiPSC-CM at different concentrations ($\bar{x} \pm s, n=3$)

显著降低($P < 0.001$)。

3.3 不同电刺激频率下参麦注射液降低HiPSC-CM钙瞬变振幅

使用0.2、1.0和2.0 Hz的频率对HiPSC-CM进行电刺激,观察参麦注射液对其钙瞬变振幅的影响。结果如图3所示,与加药前比较,在0.2、1.0 Hz电刺激频率下,参麦注射液显著降低HiPSC-CM的钙瞬变振幅、上升及下降时间和FWHM($P < 0.01$);在2.0 Hz电刺激频率下,参麦注射液显著降低HiPSC-CM的上升、下降时间和FWHM($P < 0.01$)。

4 讨论

临床上,参麦注射液被用来治疗或者辅助其他药物治疗心血管疾病或其他疾病。根据研究,参麦注射液的组分——红参和麦冬均有增强免疫、抗肿瘤、增加心血管活性等药理作用^[15]。Han等^[16]总结

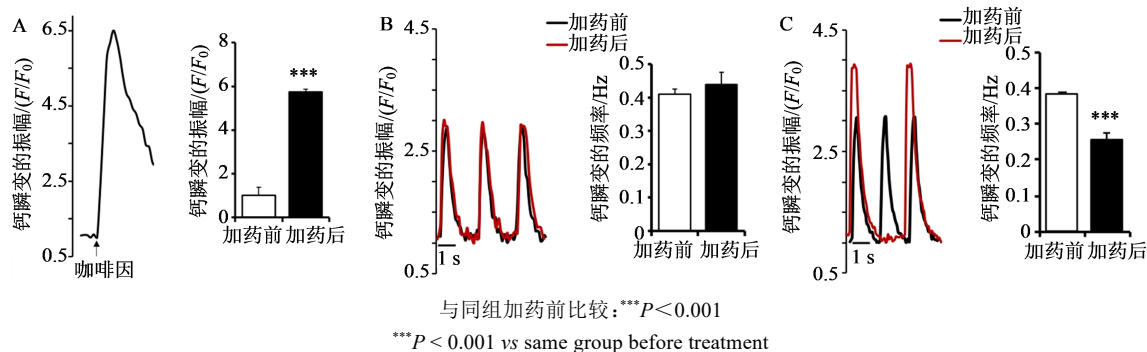


图2 咖啡因(A)、对照(B)、2%参麦注射液(C)组HiPSC-CM后钙信号的改变情况($n=3$)

Fig. 2 Changes of Ca^{2+} signaling in HiPSC-CM of caffeine (A), control (B) and 2% SMI (C) group ($n=3$)

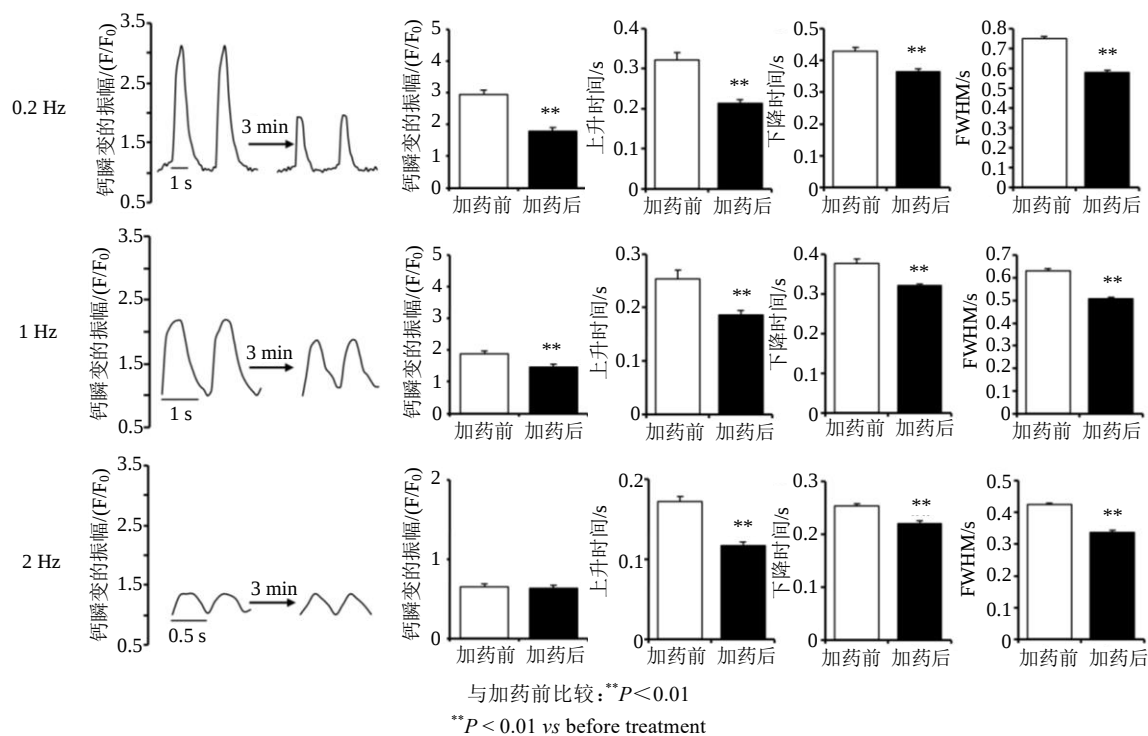


图3 0.2、1.0、2.0 Hz电刺激下2%参麦注射液处理HiPSC-CM前后钙瞬变振幅及相关参数的变化($n=3$)

Fig. 3 Amplitude and related parameters of calcium transient in HiPSC-CM before and after treated with 2% SMI under electrical stimulation at 0.2, 1.0 and 2.0 Hz ($n=3$)

发现,参类提取物包括红参,能够起到调节免疫应答、抗过敏反应的作用,麦冬也被报道具有免疫调节的功能^[17];Hwang等^[18]发现红参提取物Rg₃可以通过活性氧(ROS)促进肺癌细胞凋亡以及线粒体自噬,此外,麦冬也在最近被发现能在肺癌中减轻患者症状,提高营养吸收等^[19];Hossain等^[20]也通过小鼠模型阐明了红参对心血管功能低下的逆转和保护作用,最新的1项基于网络药理学分析研究发现麦冬潜在的治疗心血管疾病的作用^[21]。这一系列研究证实了红参和麦冬的有益作用相得益彰,表明参麦注射液的功效和这些成分具有相似之处。已有文献报道了参麦注射液多种药理作用,如参麦注射液能够发挥提高免疫功能,抵抗新型冠状病毒肺炎(COVID-19)感染^[22],以及可能通过抑制细胞因子风暴、维持心脏动能稳态等机制实现对COVID-19合并冠心病的同时干预^[23];Cheng等^[24]通过随机对照试验,确定了参麦注射液能够重塑促血管生成因子和抗血管生成因子的稳态,促进肿瘤血管正常化,从而增强药物递送和抗肿瘤作用。此外,参麦注射液还被报道能够降低多柔比星诱导的心脏毒性^[25],改善临床化疗后患者的生活质量以及副作用^[26]。然而目前关于中药在体外调控心肌细胞钙信号的研究较少,且尚未有人研究基于钙信号阐明参麦注

射液调控心肌功能的相关机制。

CCK-8结果显示,2%的参麦注射液促进HiPSC-CM活性,无明显毒性,与文献报道的实验浓度相当^[5,27]。结合临床报道来看,使用常规治疗手段联合参麦注射液治疗如心衰^[28]、卒中^[29]等心血管疾病时,并没有增加不良反应事件发生率,且能降低一些术后不适症状^[28]。这表明参麦注射液安全性良好,但个体差异大,且体外与临床研究仍然存在差异,因此还需要进一步研究。本研究中用到的HiPSC-CM已被证明是优良的体外模型对象,可在体外几乎无限获得。多项研究表明,HiPSC-CM可被用来临床前心脏毒性药物测试。da Rocha^[30]建立了基于HiPSC-CM的心律失常药物评价的体外模型;Hortigon-Vinagre^[31]基于HiPSC-CM评估了硝苯地平、雷诺嗪和E4031对细胞的药效反应,表明应用HiPSC-CM可以准确和定量地检测药物安全性和药效。综合现有研究来看,虽然基于HiPSC-CM评估中药研究较少,但仍然具有较好的前景。

心肌细胞钙信号一定程度上代表了心肌功能。本结果表明,参麦注射液显著降低了钙瞬变的频率。钙瞬变的频率能够反映心率的变化,HiPSC-CM的自发跳动频率已经被广泛用来检查药物的变时效应。现有研究表明,心率升高可能导致心血管

疾病,且已被证明是预测人群心血管疾病发病的危险因素。研究发现,心率和 β 受体活性有关,使用 β 受体抑制剂可以导致心率降低。临床中应用降低心率的药物来降低心衰患者的死亡率,例如使用伊伐布雷定可以通过降低心率来减轻心衰的症状。

心率过快或早搏与钙瞬变的动态变化有关,它们两者的关系可以通过记录不同电刺激下的钙瞬变的变化来研究^[32]。研究证实,钙信号代表的收缩功能对频率变化的反应是心肌衰竭的诊断标志^[33]。HiPSC-CM存在负向力频关系,而在不同电刺激频率下,参麦注射液处理降低了钙瞬变振幅。Watanabe等^[34]研究发现,评估钙瞬变的波形变化(包括振幅)是评估药物对心脏收缩力影响的有效方法。例如,许多其他药物如钙通道阻滞剂能够降低钙瞬变的振幅。有研究表明具有这种作用的药物也可用来降低心绞痛下的心脏负荷^[35],降低充血性心力衰竭的发病率和死亡率^[36]。本研究还发现在不同频率下,参麦注射液可以降低钙瞬变的上升时间、下降时间。据报道,许多致心律失常药物会增大钙瞬变的波形中峰值下降时间与峰值上升时间的比值(D/R比)^[34],在后续研究,或许可以从这个角度出发,研究参麦注射液是否存在致心律失常的可能性。然而,本研究尚为体外研究,后续可能需要结合体内实验进一步说明参麦注射液的药理作用。

综上所述,参麦注射液能在体外降低HiPSC-CM的自发钙瞬变频率,且在不同频率的电刺激下,降低钙瞬变的振幅,表明钙信号调控可能是参麦注射液心肌保护作用的潜在机制之一。后续将针对发挥作用的主要成分、具体调控靶点及信号通路等进行进一步研究。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Yang L, Zhang C D, Chen J T, et al. Shenmai injection suppresses multidrug resistance in MCF-7/ADR cells through the MAPK/NF- κ B signalling pathway [J]. *Pharm Biol*, 2020, 58(1): 276-285.
- [2] Jean K, Orlando D J. Medication routes of administration [EB/OL]. (2022-02-17) [2022-04-15]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK568677/>.
- [3] Chen C Y, Lu L Y, Chen P, et al. Shengmai injection, a traditional Chinese patent medicine, for intradialytic hypotension: A systematic review and meta-analysis [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2013, 2013: 703815.
- [4] Ye L F, Zheng Y R, Wang L H. Effects of Shenmai injection and its bioactive components following ischemia/reperfusion in cardiomyocytes [J]. *Exp Ther Med*, 2015, 10(4): 1348-1354.
- [5] Li L, Yang D L, Li J H, et al. Investigation of cardiovascular protective effect of Shenmai injection by network pharmacology and pharmacological evaluation [J]. *BMC Complement Med Ther*, 2020, 20(1): 112.
- [6] 郑晓俊, 胡志强. 参麦注射液对猪冠状动脉环的舒张作用及机制研究 [J]. *中国中药杂志*, 2011, 36(21): 3023-3025.
- [7] Zheng X J, Hu Z Q. Effect and mechanisms of Shenmai injection on contractions of porcine coronary artery [J]. *China J Chin Mater Med*, 2011, 36(21): 3023-3025.
- [8] Li L, Sha Z M, Wang Y Y, et al. Pre-treatment with a combination of Shenmai and Danshen injection protects cardiomyocytes against hypoxia/reoxygenation-and H₂O₂-induced injury by inhibiting mitochondrial permeability transition pore opening [J]. *Exp Ther Med*, 2019, 17: 4643-4652.
- [9] Tyser R C V, Srinivas S. The first heartbeat-origin of cardiac contractile activity [J]. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2020, 12(7): a037135.
- [10] Gross P, Johnson J, Romero C M, et al. Interaction of the joining region in junctophilin-2 with the L-type Ca²⁺ channel is pivotal for cardiac dyad assembly and intracellular Ca²⁺ dynamics [J]. *Circ Res*, 2021, 128(1): 92-114.
- [11] Berridge M J, Bootman M D, Roderick H L. Calcium signalling: Dynamics, homeostasis and remodelling [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2003, 4(7): 517-529.
- [12] Eisner D A, Caldwell J L, Kistamas K, et al. Calcium and excitation-contraction coupling in the heart [J]. *Circ Res*, 2017, 121(2): 181-195.
- [13] Chen G P, Li S, Karakikes I, et al. Phospholamban as a crucial determinant of the inotropic response of human pluripotent stem cell-derived ventricular cardiomyocytes and engineered 3-dimensional tissue constructs [J]. *Circ Arrhythm Electrophysiol*, 2015, 8(1): 193-202.
- [14] de Korte T, Katili P A, Mohd Yusof N A N, et al. Unlocking personalized biomedicine and drug discovery with human induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes: Fit for purpose or forever elusive? [J]. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 2020, 60: 529-551.
- [15] Goldfracht I, Efraim Y, Shinnawi R, et al. Engineered heart tissue models from hiPSC-derived cardiomyocytes and cardiac ECM for disease modeling and drug testing applications [J]. *Acta Biomater*, 2019, 92: 145-159.
- [16] Kim J H. Pharmacological and medical applications of

- Panax ginseng* and ginsenosides: A review for use in cardiovascular diseases [J]. *J Ginseng Res*, 2018, 42(3): 264-269.
- [16] Han M J, Kim D H. Effects of red and fermented ginseng and ginsenosides on allergic disorders [J]. *Biomolecules*, 2020, 10(4): 634.
- [17] Liu H J, Wang Y, Wang T Z, et al. De novo assembly and annotation of the Zhe-Maidong (*Ophiopogon japonicus* (L.f.) Ker-Gawl) transcriptome in different growth stages [J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 3616.
- [18] Hwang S K, Jeong Y J, Cho H J, et al. Rg₃-enriched red ginseng extract promotes lung cancer cell apoptosis and mitophagy by ROS production [J]. *J Ginseng Res*, 2022, 46(1): 138-146.
- [19] He M Y, Luo Y, Chen L J, et al. Shashen Maidong Decoction: The effect of TNF- α and IL-6 on lung cancer Cachexia based on cancer toxicity theory [J]. *Am J Transl Res*, 2021, 13(6): 6752-6758.
- [20] Hossain M A, Lee D B, Kim B, et al. Korean Red Ginseng attenuates type 2 diabetic cardiovascular dysfunction in Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty rats [J]. *J Ginseng Res*, 2020, 44(2): 308-311.
- [21] Yuan S, Xu Y Y, Yi T, et al. The anti-tumor effect of OP-B on ovarian cancer *in vitro* and *in vivo*, and its mechanism: An investigation using network pharmacology-based analysis [J]. *J Ethnopharmacol*, 2022, 283: 114706.
- [22] Zhu X B, Guo M, Zhang Z H, et al. Chinese herbal injections for coronavirus disease 2019 (COVID-19): A narrative review [J]. *Integr Med Res*, 2021, 10(4): 100778.
- [23] 韩利文, 张友刚, 李昊楠, 等. 参麦注射液治疗新型冠状病毒肺炎(COVID-19)合并冠心病的网络药理分子机制探析 [J]. *中草药*, 2020, 51(9): 2334-2344.
- Han L W, Zhang Y G, Li H N, et al. Network pharmacologic molecular mechanism of Shenmai Injection in treatment of COVID-19 combined with coronary heart disease [J]. *Chin Tradit Herb Drugs*, 2020, 51(9): 2334-2344.
- [24] Cheng L G, Liu W Y, Zhong C J, et al. Remodeling the homeostasis of pro- and anti-angiogenic factors by Shenmai injection to normalize tumor vasculature for enhanced cancer chemotherapy [J]. *J Ethnopharmacol*, 2021, 270: 113770.
- [25] Zhang X N, Lv S C, Zhang W Q, et al. Shenmai injection improves doxorubicin cardiotoxicity via miR-30a/Beclin 1 [J]. *Biomed Pharmacother*, 2021, 139: 111582.
- [26] Duan B Q, Xie J S, Rui Q L, et al. Effects of Shengmai injection add-on therapy to chemotherapy in patients with non-small cell lung cancer: A Meta-analysis [J]. *Support Care Cancer*, 2018, 26(7): 2103-2111.
- [27] Zhao M, Chen Q F, Wang H, et al. Comparison of protective effects of Shenmai injections produced by medicinal materials from different origins on cardiomyocytes [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2022, 2022: 7205476.
- [28] Chen H D, Xie Y M, Wang L X, et al. Systematic review of efficacy and safety of Shenmai injection for chronic heart failure [J]. *China J Chin Mater Med*, 2014, 39(18): 3650-3661.
- [29] Li X L, Shen Y, He F, et al. Effectiveness and safety of Shenmai injection in treatment of shock: A Meta-analysis [J]. *Chung I Tsa Chih Ying Wen Pan*, 2018, 38(2): 155-166.
- [30] da Rocha A M, Campbell K, Mironov S, et al. hiPSC-CM monolayer maturation state determines drug responsiveness in high throughput pro-arrhythmia screen [J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 13834.
- [31] Hortigon-Vinagre M P, Zamora V, Burton F L, et al. The use of ratiometric fluorescence measurements of the voltage sensitive dye di-4-ANEPPS to examine action potential characteristics and drug effects on human induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes [J]. *Toxicol Sci*, 2016, 154(2): 320-331.
- [32] Pan W, Yang Z Q, Cheng J, et al. Contractile heterogeneity in ventricular myocardium [J]. *J Cell Physiol*, 2018, 233(8): 6273-6279.
- [33] Haizlip K M, Milani-Nejad N, Brunello L, et al. Dissociation of calcium transients and force development following a change in stimulation frequency in isolated rabbit myocardium [J]. *Biomed Res Int*, 2015, 2015: 468548.
- [34] Watanabe H, Honda Y, Deguchi J, et al. Usefulness of cardiotoxicity assessment using calcium transient in human induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes [J]. *J Toxicol Sci*, 2017, 42(4): 519-527.
- [35] Müller-Werdan U, Stöckl G, Ebelt H, et al. Ivabradine in combination with beta-blocker reduces symptoms and improves quality of life in elderly patients with stable angina pectoris: Age-related results from the additions study [J]. *Exp Gerontol*, 2014, 59: 34-41.
- [36] Chavey W E. The importance of beta blockers in the treatment of heart failure [J]. *Am Fam Phy*, 2000, 62(11): 2453-2462.