

## • 药理与临床 •

## 人参皂苷 Re 对异丙肾上腺素诱导离体灌流大鼠心脏心律失常的调节作用

曹瑀莹<sup>1</sup>, 杜丙秀<sup>1</sup>, 李劲恒<sup>1</sup>, 袁 硕<sup>1,2</sup>, 陶雅军<sup>1</sup>, 刘丽萍<sup>1\*</sup>, 陈颖卿<sup>1\*</sup>

1. 大连大学 慢性病研究中心大连市重点实验室, 辽宁 大连 116622

2. 延边大学, 吉林 延吉 133022

**摘要:** 目的 探究人参皂苷 Re 对异丙肾上腺素 (isoprenaline, ISO) 诱导离体大鼠心脏心律失常的调节作用。方法 提取原代乳鼠心肌细胞, 通过 CCK-8 法检测人参皂苷 Re 对乳鼠心肌细胞存活率的影响。将雄性 Wistar 大鼠随机分为对照组、ISO 组、人参皂苷 Re+ISO 组和人参皂苷 Re 组, 通过 Langendorff 灌流系统对离体大鼠心脏进行给药, 利用多电极阵列映射系统分析大鼠心肌电活动变化; 通过苏木素-伊红 (HE) 染色观测离体大鼠心肌损伤情况; 利用荧光共振能量转移成像系统实时监测心肌细胞内环磷酸腺苷 (cyclic adenosine monophosphate, cAMP) 和蛋白激酶 A (protein kinase A, PKA) 的含量变化; 通过 ELISA 法检测各组离体心脏组织上清液中炎症因子水平。结果 人参皂苷 Re (1~50  $\mu\text{mol/L}$ ) 均对原代乳鼠心肌细胞的存活率无明显影响; 与对照组相比, ISO 组心室肌传导速度明显加快, 传导方向变化显著, 心率显著增高 ( $P < 0.05$ ), 心肌细胞脂肪变性严重程度增加, cAMP 和 PKA 含量增加, 趋化因子 1 (C-X-C motif chemokine 1, CXCL1)、CXCL2、CXCL3、肿瘤坏死因子- $\alpha$  (tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ ) 和白细胞介素-6 (interleukin-6, IL-6) 水平均明显升高 ( $P < 0.05$ ); 与 ISO 组相比, 人参皂苷 Re+ISO 组心率明显下降 ( $P < 0.05$ ), 心肌细胞脂肪变性严重程度减轻, cAMP 和 PKA 含量降低, CXCL1、CXCL2、CXCL3、TNF- $\alpha$  和 IL-6 水平均显著降低 ( $P < 0.05$ )。结论 人参皂苷 Re 可通过调节 cAMP/PKA 通路并抑制炎症反应干预快速型心律失常的发生。

**关键词:** 人参皂苷 Re; 心律失常; 环磷酸腺苷; 蛋白激酶 A; 炎症因子

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2021)20-6234-11

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2021.20.013

## Effect of ginsenoside Re on isoproterenol-induced cardiac arrhythmia in isolated perfused rat heart

CAO Yu-ying<sup>1</sup>, DU Bing-xiu<sup>1</sup>, LI Shao-heng<sup>1</sup>, YUAN Shuo<sup>1,2</sup>, TAO Ya-jun<sup>1</sup>, LIU Li-ping<sup>1</sup>, CHEN Ying-qing<sup>1</sup>

1. Dalian Key Laboratory of Chronic Disease Research Center, Dalian University, Dalian 116622, China

2. Yanbian University, Yanji 133022, China

**Abstract: Objective** To investigate the suppressive effect of ginsenoside Re on isoproterenol (ISO)-induced cardiac arrhythmia in isolated rat hearts. **Methods** CCK-8 assay was performed to assess the effect of ginsenoside Re on survival rate of primary neonatal ventricular myocytes isolated from rats. Male Wistar rats were randomly divided into control group, ISO group, ginsenoside Re + ISO group and ginsenoside Re group. Langendorff-perfused hearts were challenged with different drugs in turn, and the myocardial electrical activity was checked by multi-electrode array in isolated rat hearts. Myocardial injury in isolated rat hearts were detected by hematoxylin-eosin (HE) staining. Cyclic adenosine monophosphate (cAMP) and protein kinase A (PKA) contents were measured by targeted fluorescence resonance energy transfer probes in primary neonatal rat ventricular myocytes. Levels of inflammatory

收稿日期: 2021-04-26

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (82000074); 辽宁省自然科学基金指导计划项目 (20180550388); 辽宁省教育厅科学研究经费项目 (jyt-dldxc202005)

作者简介: 曹瑀莹 (1996—), 女, 硕士研究生, 研究方向为心血管疾病靶向治疗及药物筛选。E-mail: 1152650355@qq.com

\*通信作者: 陈颖卿 (1986—), 男, 朝鲜族, 硕士生导师, 讲师, 从事心血管疾病靶向治疗及药物筛选研究。

Tel: (0411)87402916 E-mail: chenyc1211@163.com

刘丽萍 (1974—), 女, 硕士生导师, 副教授, 从事心血管疾病靶向治疗及药物筛选研究。

Tel: (0411)87402103 E-mail: liuliping@dlu.edu.cn

factors in isolated rat hearts were analyzed by ELISA. **Results** Ginsenoside Re (1—50  $\mu\text{mol/L}$ ) showed no significant effect on survival rate of primary neonatal rat ventricular myocytes. Compared with control group, ISO significantly changed the direction of conduction, increased the left ventricular conduction velocity and heart rate ( $P < 0.05$ ); The severity of steatosis in heart tissues were significantly increased, cAMP and PKA contents were increased, C-X-C motif chemokine 1 (CXCL1), CXCL2, CXCL3, tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) and interleukin-6 (IL-6) levels were significantly increased ( $P < 0.05$ ). Compared with ISO group, ginsenoside Re + ISO group showed a significant decrease in heart rate, as well as in the severity of heart injury. cAMP and PKA contents were decreased, CXCL1, CXCL2, CXCL3, TNF- $\alpha$  and IL-6 levels were significantly decreased ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** Ginsenoside Re can ameliorate ISO-induced arrhythmia in isolated perfused rat hearts through regulating cAMP/PKA signaling pathway and inhibiting inflammatory factors expressions.

**Key words:** ginsenoside Re; arrhythmia; cAMP; PKA; inflammatory factor

心律失常指心律起源部位、心搏频率与节律以及冲动传导等任一项异常，是心血管疾病中的常见病和多发病。目前我国心血管病患者人数达 2.9 亿，而心律失常患者约有 2000 万人。因此，防治心律失常十分重要。临床上心律失常按照心率的快慢可分为快速型和缓慢型心律失常，其中快速型心律失常的发病率、严重性、治疗难度远大于缓慢型心律失常。人参是百草之王，用于治疗心血管疾病已有 2000 多年的历史。人参皂苷是人参中主要的活性成分，其中人参皂苷 Re 是最关键的生物活性成分<sup>[1]</sup>。人参皂苷 Re 对心血管系统具有较好的保护作用，如改善心肌重构和纤维化<sup>[2-4]</sup>、缓解心肌缺血再灌注损伤<sup>[5-6]</sup>、减轻心肌损伤<sup>[7]</sup>、抗心律失常<sup>[8-12]</sup>、促进血管再生<sup>[13]</sup>。

G 蛋白偶联的信号传递通路是细胞信号传导中的重要途径，G 蛋白偶联受体 (G protein-coupled receptor, GPCR) 是人体内最大的膜蛋白受体家族，目前 72.9% 心血管疾病药物以 GPCR 为靶点<sup>[14-15]</sup>。 $\beta$ -肾上腺素能受体 ( $\beta$ -adrenergic receptor,  $\beta$ -AR) 属于细胞膜上 GPCR 超家族，在心脏生理活动中起着重要的作用。当异丙肾上腺素 (isoprenaline, ISO) 刺激  $\beta$ -AR 时，可以上调 GPCR，进而激活细胞内腺苷酸环化酶 (adenylyl cyclase, AC)，使细胞内环磷酸腺苷 (cyclic adenosine monophosphate, cAMP) 升高，进一步激活蛋白激酶 A (protein kinase A, PKA)，引起钙通道蛋白的磷酸化，使细胞内  $\text{Ca}^{2+}$  超载，从而引起心律失常<sup>[11]</sup>。

炎症因子作为炎症反应中活化细胞产生的具有高活性、多功能的可溶性肽，可通过多种机制调控心血管功能。趋化因子是一组具有特定吸引功能的细胞因子，迄今发现的 52 个趋化因子中，19 个趋化因子与动脉粥样硬化、高血压、心肌肥大、心衰、冠状动脉疾病等心脏疾病相关<sup>[16]</sup>。趋化因子也参与

损伤反应的早晚期，并与心律失常和心脏移植的慢性排斥反应密切相关<sup>[17]</sup>。在心肌细胞中，炎症因子释放引起的炎症反应会造成心肌细胞损伤，当产生心肌损伤后，往往会导致心律失常的发生。此外，炎症反应也可以导致心肌传导的不均一性，易引起心室重构和室性心律失常的发生<sup>[18]</sup>。

本研究通过构建 ISO 诱导的大鼠快速型心律失常模型，观察人参皂苷 Re 的抗心律失常作用，并探讨人参皂苷 Re 缓解快速型心律失常的潜在作用机制，为临床开发低毒高效的抗心律失常药物提供依据。

## 1 材料

### 1.1 动物

SPF 级雄性 Wistar 大鼠 (10~12 周龄，体质量 280~320 g) 以及 Wistar 新生乳鼠 ( $\leq 3$  d) 均购自大连医科大学动物中心。Wistar 大鼠适应性饲养 1 周，自由进食饮水，温度 ( $23 \pm 1$ )  $^{\circ}\text{C}$ ，相对湿度 50%~70%，光/暗周期 12 h，环境噪声低于 50 分贝。动物实验经大连大学附属中山医院实验动物福利与伦理委员会批准 (批准号 202004038)

### 1.2 药品与试剂

人参皂苷 Re (质量分数为 98%，批号 wkq16081605) 购自四川省维克齐生物科技有限公司；盐酸 ISO (批号 BCBL3022V)、NaCl (批号 BCBV3784V)、KCl (批号 BCBQ0895V)、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (批号 BCBJ7824V)、 $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  (批号 BCBM7996V)、 $\text{NaHCO}_3$  (批号 SLBZ5815)、HEPES (批号 SLBL5403V)、 $\text{CaCl}_2$  (批号 I1020)、 $\text{MgCl}_2$  (批号 H0950)、葡萄糖 (批号 071M0145V)、胰酶 (批号 SLBM4075V) 和谷氨酰胺 (批号 RNBD5611V) 购自美国 Sigma 公司；盐酸普萘洛尔 (批号 26496) 购自美国 MedChemExpress 公司；胶原酶 A (批号 33278522) 购自瑞士 Roche 公司；

水合氯醛(批号 20190801)购自天津市大茂化学试剂厂; DMEM 培养基(批号 811723)、双抗(批号 2029632)购自美国 Gibco 公司; 胎牛血清(批号 1719426)购自以色列 BI 公司; 肿瘤坏死因子- $\alpha$  (tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ ) ELISA 试剂盒(批号 06/2019)、白细胞介素-6 (interleukin-6, IL-6) ELISA 试剂盒(批号 08/2019)购自上海语纯生物技术有限公司; 趋化因子 1 (C-X-C motif chemokine 1, CXCL1) ELISA 试剂盒(批号 J21032177)、CXCL2 ELISA 试剂盒(批号 I11031020)、CXCL3 ELISA 试剂盒(批号 K1802176)购自武汉华美生物工程有限公司。

### 1.3 仪器

EMS64-USB-1002 型多电极阵列映射系统(英国 MappingLab 公司); NIUSB-6001 型荧光共振能量转移系统(英国 CAIRN 公司); SpectraMax Plus 384 型多功能酶标仪(美国 MD 公司)。

## 2 方法

### 2.1 原代乳鼠心肌细胞的分离与培养

新生 Wistar 乳鼠处死后立即取出心脏, 放置于预冷的台式液(135 mmol/L NaCl、4.5 mmol/L KCl、20 mmol/L HEPES、11 mmol/L 葡萄糖、1 mmol/L MgCl<sub>2</sub>、2 mmol/L CaCl<sub>2</sub>)中洗去血液, 将心室肌剪成 1 mm<sup>3</sup> 小块, 移至含 5 mL 胶原酶 A(0.45 mg/mL)的台式液中, 于 37 °C 轻轻搅拌消化 15 min, 弃上清, 重复 2 次。加入含 5 mL 胰酶(1.25 mg/mL)的台式液, 于 37 °C 轻轻搅拌消化 5 min, 收集上清于 1 mL 胎牛血清中, 800 r/min 离心 5 min, 弃上清; 胰酶重复消化 4~5 次, 直至所有组织消化, 收集全部细胞液, 800 r/min 离心 5 min, 用原代心肌细胞

培养液(84.5% DMEM 培养基、15%胎牛血清、1%谷氨酰胺、0.1%双抗)重悬细胞, 于培养箱中贴壁培养 2 h 后收集上清, 离心后进行细胞培养。

### 2.2 CCK-8 检测人参皂苷 Re 对原代乳鼠心肌细胞存活率的影响

取分离好的原代乳鼠心肌细胞, 以  $1 \times 10^6$ /mL 接种于 96 孔板中, 100  $\mu$ L/孔, 于培养箱中培养 24 h。设置对照组和人参皂苷 Re (1.0、2.5、5.0、10.0、25.0、50.0  $\mu$ mol/L) 组, 各给药组加入相应药物, 对照组加入不含药物的培养基, 培养 24 h。每孔加入 10  $\mu$ L CCK-8, 于 37 °C 孵育 3 h, 采用多功能酶标仪测定 450 nm 处的吸光度(A)值, 计算细胞存活率。

$$\text{细胞存活率} = A_{\text{给药}} / A_{\text{对照}}$$

### 2.3 离体心脏 Langendorff 灌流

根据课题组前期研究结果<sup>[3]</sup>, 将人参皂苷 Re 浓度定为 5  $\mu$ mol/L。Wistar 大鼠 ip 10%水合氯醛(3 mL/kg)麻醉, 进行开胸手术, 取出心脏立即放入含肝素(10 mg/L)和饱和气体(95% O<sub>2</sub>、5% CO<sub>2</sub>)的冰冷 Krebs-Henseleit 缓冲液(120.3 mmol/L NaCl、4 mmol/L KCl、1.3 mmol/L MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O、1.2 mmol/L NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、1.2 mmol/L CaCl<sub>2</sub>、25.2 mmol/L NaHCO<sub>3</sub>、11 mmol/L 葡萄糖)中, 快速摘除结缔组织和肺组织, 留下 3~4 mm 主动脉, 将主动脉插管并连接到 Langendorff 灌流系统上, 以 7 mL/min 速度主动脉逆行灌流正常缓冲液或工具药。灌流液全程 37 °C 恒温、持续供氧。实验方案见图 1。

对照组灌流 4 个循环缓冲液; ISO 组经过 3 个对照循环, 灌流 1 个循环 ISO (0.5  $\mu$ mol/L); 人参皂苷 Re+ISO 组经过 2 个对照循环, 预灌流 1 个循

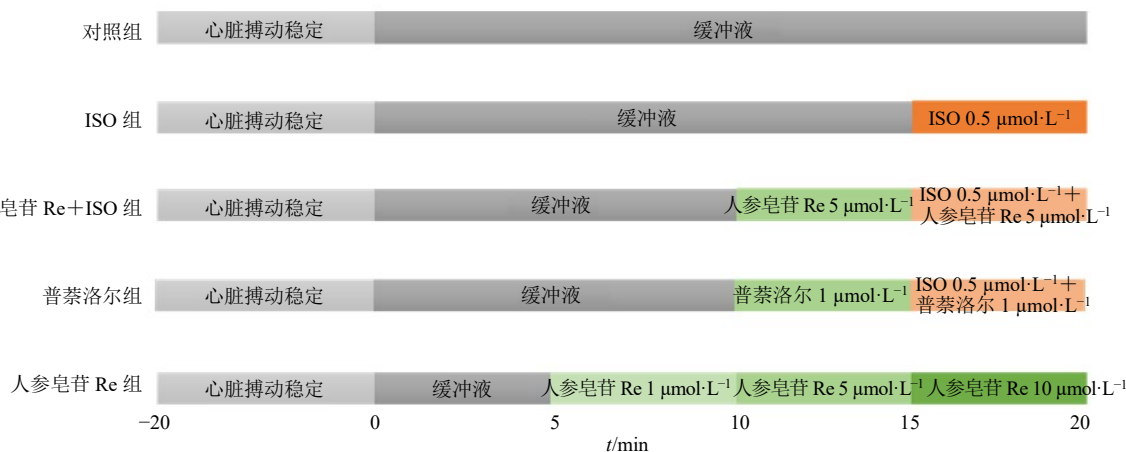


图 1 离体心脏灌流实验方案

Fig. 1 Experimental protocol of isolated heart perfusion

环人参皂苷 Re (5 μmol/L), 然后在人参皂苷 Re 存在下, 灌注 1 个循环 ISO (0.5 μmol/L); 非选择性 β-AR 抑制剂普萘洛尔组经过 2 个对照循环, 预灌注普萘洛尔 (1 μmol/L) 1 个循环, 然后在普萘洛尔存在下, 灌注 1 个循环 ISO (0.5 μmol/L); 人参皂苷 Re 组经过 1 个对照循环, 分别灌注人参皂苷 Re (1、5、10 μmol/L) 各 1 个循环。

## 2.4 多电极阵列映射系统检测人参皂苷 Re 对 ISO 所致心律失常大鼠左右心室肌心外膜电生理指标的影响

离体心脏固定到 Langendorff 灌注装置上, 2 个多通道电极分别贴附右心室和左心室游离壁, 并连至多电极阵列映射系统上, 对心脏电位进行多点同步标测。每 5 分钟设为 1 个实验循环, 待各组大鼠心脏搏动稳定 20 min 后, 开始记录心率、动作电位传导速度和传导方向等指标。每个多电极阵列 (MEA PA03206060203) 由 32 个直径为 0.1 mm 的电极组成, 在 6×6 网格 (尺寸为 6 mm×6 mm) 中, 电极间距为 1.2 mm。64 个记录电极连接到 64 通道放大器和数据采集系统。每个通道的采样频率设置为 10 kHz, 场电位记录与放置在心脏灌注金属套管上的参比电极的场电位记录相对应, MEA 使用 EMapScope 软件提供了细胞外场电位的无创同步 64 通道记录。EMapScope 软件允许实时监测所有 64 个通道的场电位, 以此为基础计算心率; 根据记录阵列中第 1 个检测到的波形的相对延迟计算每个通道的激活时间。为了生成心外膜传播图, 在显示原始记录阵列布局的 6×6 网格中, 用色标表示每个通道的激活时间, 生成心外膜传播图, 以便更清晰地查看传导模式和传导方向。

## 2.5 苏木素-伊红 (HE) 染色检测心肌组织损伤

ISO 组、ISO+人参皂苷 Re 组以及普萘洛尔+ISO 组离体心脏的灌注持续时间延长至 2 个循环, 以便明显观测其心肌组织损伤程度。取 Langendorff 灌注大鼠心脏放入 4%多聚甲醛固定液中, 进行常规石蜡包埋, 切片后进行脱蜡水化, 通过苏木素染色、分化液分化、伊红染色后, 脱水、透明、封片, 根据脂肪变性程度评价人参皂苷 Re 对 ISO 诱导的离体大鼠心肌组织病理变化的保护程度。

## 2.6 人参皂苷 Re 对 ISO 诱导原代乳鼠心肌细胞 cAMP 和 PKA 含量的影响

将原代乳鼠心肌细胞以  $3 \times 10^5$ /孔接种于 6 孔板内的载玻片上, 转染 cAMP 或 PKA 荧光探针

(Epac-SH187 或 AKAR4), 12 h 后, 将载玻片移入荧光共振能量转移成像系统 (fluorescence resonance energy transfer, FRET)。采用 FRET 动态观察 cAMP 和 PKA 含量变化。通过激发青色荧光蛋白 (cyan fluorescent protein, CFP) 480 nm 后, 计算 CFP 与黄色荧光蛋白 (yellow fluorescent protein, YFP) 荧光发射强度比值 (480 nm/535 nm) 的变化实时观察 cAMP 含量; 通过计算 YFP 与 CFP 荧光发射强度比值 (535 nm/480 nm) 的变化实时观察 PKA 含量。实验方案见图 2。

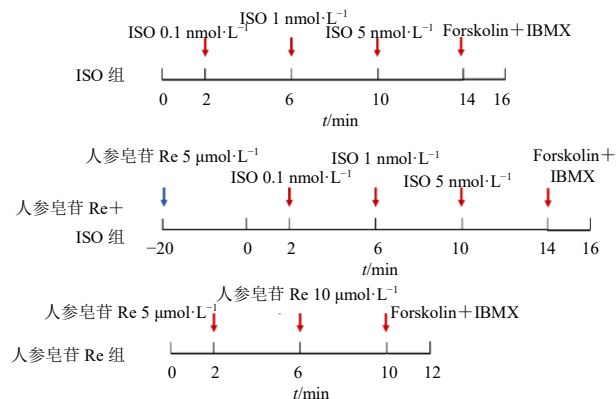


图 2 原代乳鼠心肌细胞实验方案

Fig. 2 Experimental protocol of primary neonatal rat cardiomyocytes

**2.6.1 ISO 不同浓度组** 基线平稳后, 记录 2 min 细胞正常状态后, 每 4 分钟分别给予 ISO (0.1、1.0、5.0 nmol/L)、25 μmol/L 腺苷酸环化酶激活剂 (Forskolin) 和 100 μmol/L 磷酸二酯酶抑制剂 (IBMX)。Forskolin 激活腺苷酸环化酶, 进而激活 cAMP, IBMX 抑制 cAMP 降解, 二者共同作用使心肌细胞 cAMP 含量达到饱和。

**2.6.2 人参皂苷 Re+ISO 组** 细胞预先孵育人参皂苷 Re 20 min 后, 再给予不同浓度 ISO 和 Forskolin (25 μmol/L)+IBMX (100 μmol/L)。

**2.6.3 人参皂苷 Re 组** 基线平稳后, 记录 2 min 细胞正常状态后, 每 4 分钟分别给予人参皂苷 Re (5、10 μmol/L)、Forskolin (25 μmol/L) 和 IBMX (100 μmol/L)。

实时检测细胞内 cAMP/PKA 含量变化, 明确 ISO 所致心律失常传导通路及人参皂苷 Re 的干预作用。

## 2.7 高通量基因测序与生物信息分析

Langendorff 灌注结束后立即取下心脏, 剪取心

尖部位放置 RNA 保护液中, 寄至上海华大基因科技有限公司, 将对照组和 ISO 组大鼠心室肌进行高通量基因测序和生物信息分析, 以检测心律失常模型组的可能致病基因。

## 2.8 ELISA 法检测心肌组织炎症因子水平

取 Langendorff 灌流后的离体心脏, 于冰上剪碎、匀浆, 取上清液, 按照 ELISA 试剂盒说明书检测各组离体心脏组织上清液 CXCL1、CXCL2、CXCL3、TNF- $\alpha$  和 IL-6 水平。

## 2.9 统计学分析

应用 Prism (6.0 版) 统计软件进行统计学分析, 数据以  $\bar{x} \pm s$  表示, 组间比较采用单因素方差分析并进行两两比较。

## 3 结果

### 3.1 人参皂苷 Re 对原代乳鼠心肌细胞存活率的影响

如图 3 所示, 人参皂苷 Re (1~50  $\mu\text{mol/L}$ ) 对原代乳鼠心肌细胞的存活率无影响。

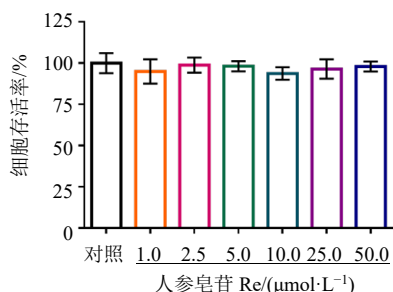


图 3 人参皂苷 Re 对原代乳鼠心肌细胞存活率的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )

Fig. 3 Effect of ginsenoside Re on survival rate of primary neonatal rat cardiomyocytes ( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )

### 3.2 人参皂苷 Re 对 ISO 所致心律失常大鼠心室肌传导方向、传导速度及心率的影响

多电极阵列映射系统笔式电极分别贴附左右心室心外膜表面 (图 4-A), 2 个 32 通道电极在左右心室上对应位置, 在 1 次心跳中, 每个通道都会得到 1 个激活时间。根据各个通道在 1 次心跳的激活时间顺序进行色彩分级, 箭头所指方向可见深红色代表最早激活, 深蓝色代表最晚激活, 将比例图转换成等时图, 更加凸显传导模式和方向以及传导过程中的任何心律失常情况 (图 4-B)。

如图 4-C 所示, 与对照组比较, ISO 组大鼠心率显著增加 ( $P < 0.05$ ); 与 ISO 组比较, 人参皂苷 Re+ISO 组大鼠心率明显降低 ( $P < 0.05$ )。如图 4-D 所示, 与对照组比较, ISO 组左心室传导速度明显

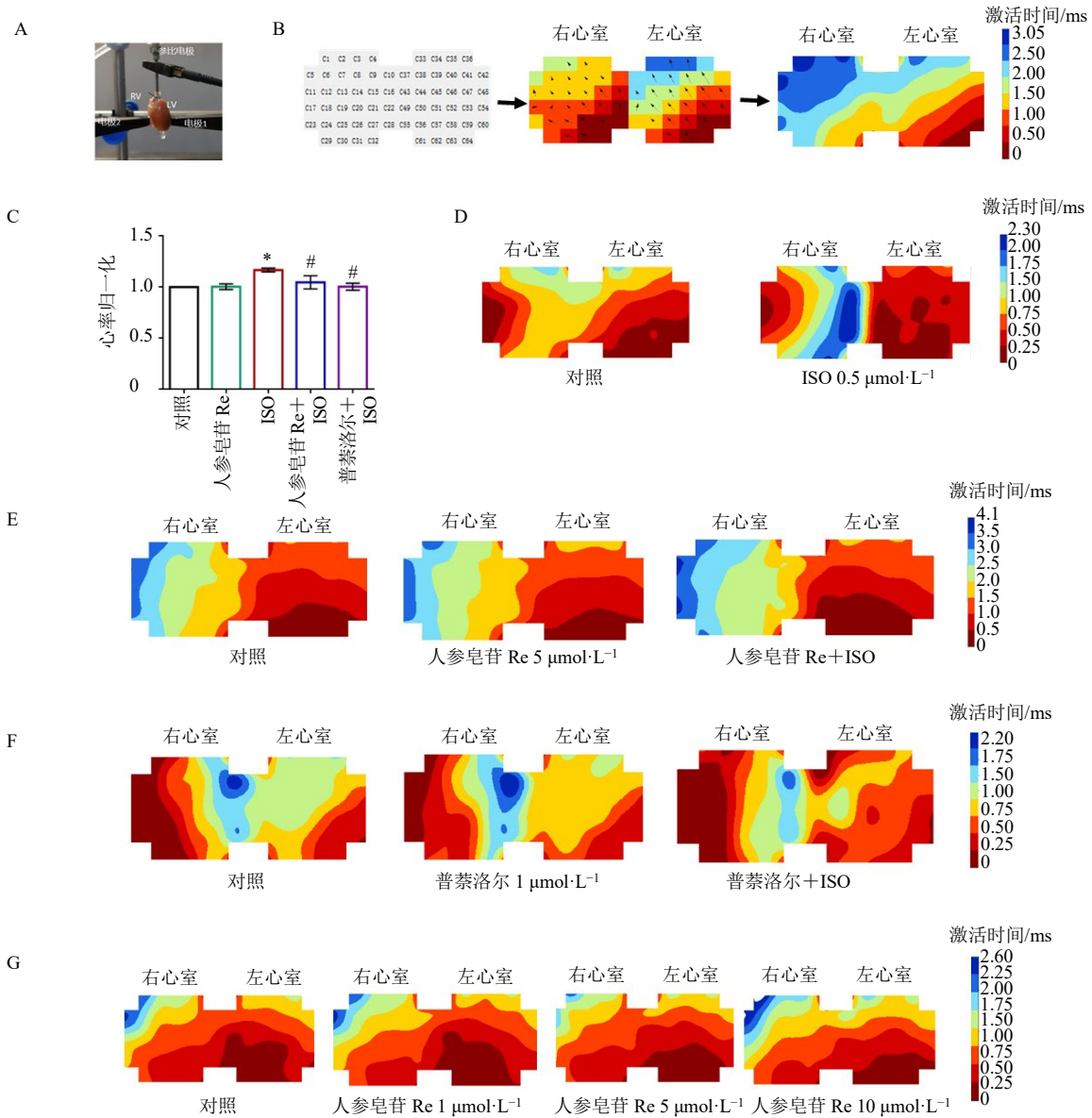
增加, 传导方向紊乱。如图 4-E 所示, 与对照组比较, 人参皂苷 Re (5  $\mu\text{mol/L}$ ) 预处理 5 min, 左右心室传导方向没有改变, 左心室传导速度略微减慢, 但不明显; 在人参皂苷 Re 存在下, 灌流 ISO 5 min, 传导方向和传导速度均未见明显变化。如图 4-F 所示, 与对照组比较, 普萘洛尔 (1  $\mu\text{mol/L}$ ) 预处理 5 min, 左右心室传导方向没有改变, 左心室传导速度略微增加; 在普萘洛尔存在下, 灌流 ISO 5 min, 传导方向未见明显改变, 左心室传导速度略有加快。如图 4-G 所示, 灌流不同浓度的人参皂苷 Re (1、5、10  $\mu\text{mol/L}$ ) 后, 左右心室的传导速度和传导方向均未见明显变化。以上结果表明, 人参皂苷 Re 显著下调 ISO 所致的心率增加, 明显抑制 ISO 所致心律失常大鼠心室肌传导方向、传导速度的改变。人参皂苷 Re 对 ISO 所致离体大鼠心室肌快速型心律失常具有明显的抑制作用。

### 3.3 人参皂苷 Re 对 ISO 所致心律失常离体大鼠心肌损伤的影响

如图 5 所示, 与对照组比较, ISO 组大鼠心肌细胞脂肪变性严重程度增加; 人参皂苷 Re (5  $\mu\text{mol/L}$ ) 预处理 5 min 后, 再给予 ISO+人参皂苷 Re 处理 10 min 时, 心肌细胞脂肪变性严重程度降低; 普萘洛尔 (1  $\mu\text{mol/L}$ ) 预处理 5 min 再给予 ISO+普萘洛尔处理 10 min 时, 心肌损伤也得到了缓解。表明人参皂苷 Re 能够明显减轻 ISO 诱导的离体灌流大鼠心肌损伤。

### 3.4 人参皂苷 Re 对 ISO 诱导原代乳鼠心肌细胞 cAMP/PKA 通路及其细胞形态学的影响

3.4.1 人参皂苷 Re 对 ISO 所致原代乳鼠心肌细胞 cAMP 和 PKA 含量变化的影响 不同浓度 ISO (0.1、1.0、5.0、10.0 nmol/L) 对 FRET cAMP 荧光团标记物 YFP 和 CFP 荧光强度变化见图 6-A, cAMP 含量用 CFP 与 YFP 比值 (480 nm/535 nm) 表示, 心肌细胞颜色变化代表不同时间段细胞内 cAMP 含量变化 (图 6-B)。待心肌细胞稳定后, 分别孵育人参皂苷 Re (5、10  $\mu\text{mol/L}$ ) 各 4 min, 随后加入 Forskolin、IBMX 孵育 2 min, 使心肌细胞 cAMP 含量达到饱和。如图 6-C 所示, 不同浓度人参皂苷 Re 对乳鼠心肌细胞内 cAMP 含量无影响。以人参皂苷 Re (5  $\mu\text{mol/L}$ ) 预处理心肌细胞 20 min, 再以不同浓度的 ISO (0.1、1.0、5.0 nmol/L) 各处理 4 min, 如图 6-D~G 所示, 与单独给予不同浓度 ISO 处理比较, 人参皂苷 Re 显著降低不同浓度 ISO 所致乳鼠心肌细胞 cAMP 和



A-多电极阵列映射系统笔式电极分别贴附左右心室外膜表面示意图 B-各通道激活时间、色彩分级比例图和等时图 C-各组大鼠心率 D~G-各组大鼠左右心室传导方向及传导速度 与对照组比较: \* $P < 0.05$ ; 与 ISO 组比较: # $P < 0.05$

A-multi-electrode array mapping system written test electrodes attached to epicardial surface of left and right ventricles respectively B-activation time of each channel, color grading ratio diagram and isochronous diagram C-heart rate of rats in each group D—G-left and right of ventricular conduction direction and conduction velocity of rats in each group \* $P < 0.05$  vs control group; # $P < 0.05$  vs ISO group

图4 人参皂苷 Re 改善快速型心律失常的心肌电活动

Fig. 4 Ginsenoside Re improves myocardial electrical activity in tachyarrhythmia

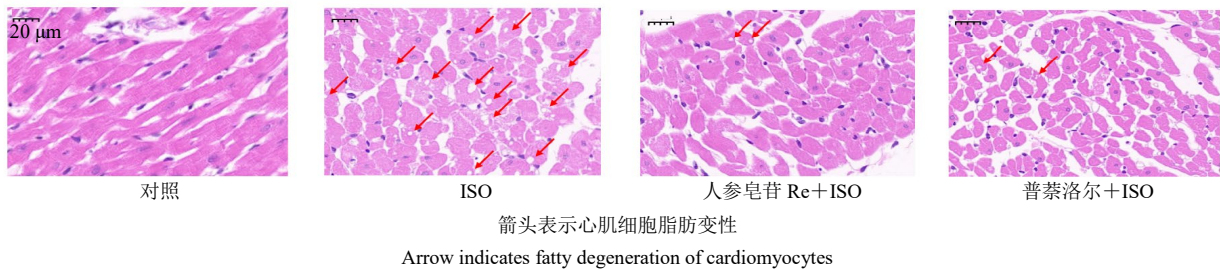
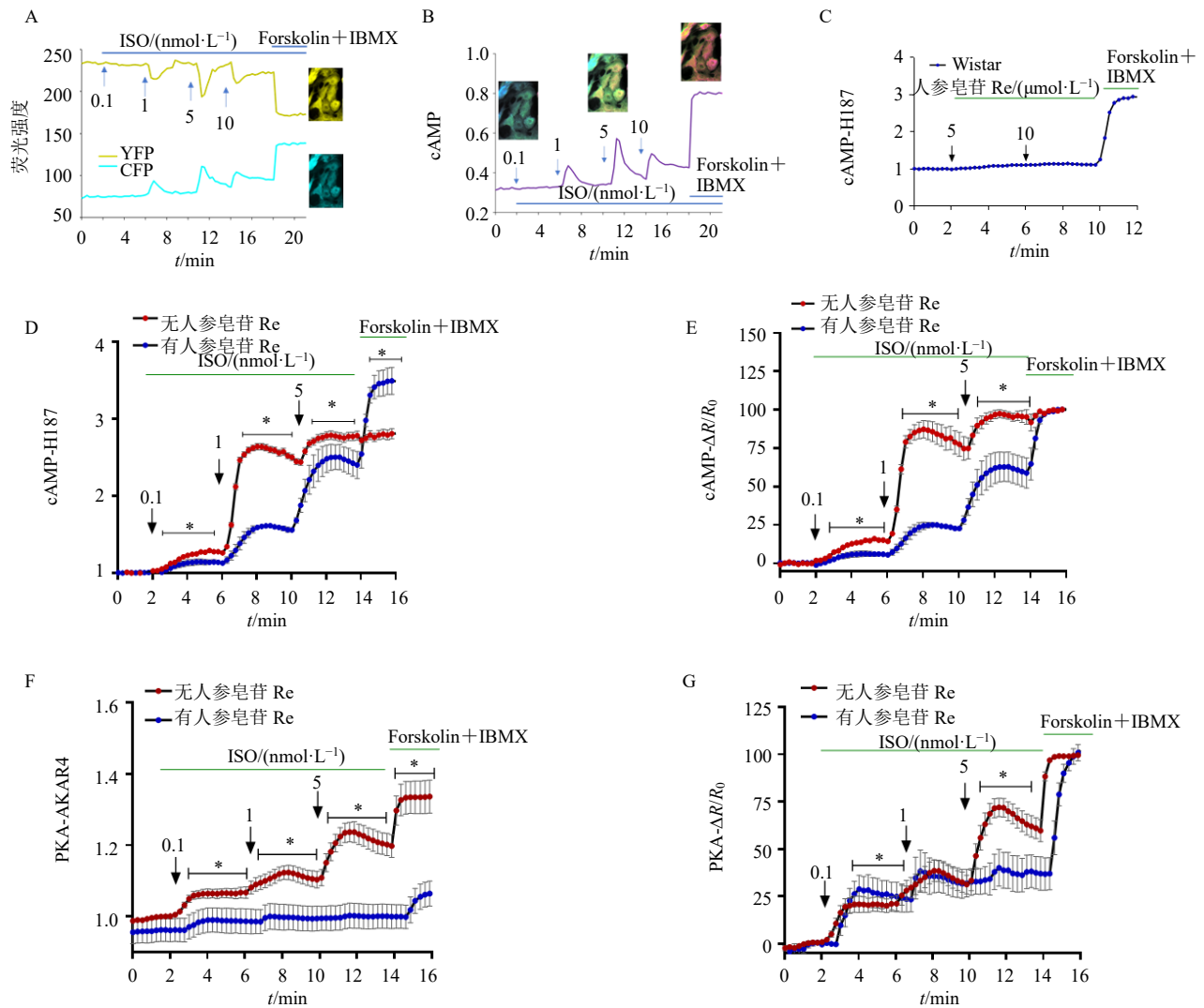


图5 人参皂苷 Re 对 ISO 所致心律失常离体大鼠心肌损伤的影响 (HE,  $\times 400$ )

Fig. 5 Effect of ginsenoside Re on myocardial injury in isolated cardiomyocytes of rats with arrhythmia induced by ISO (HE,  $\times 400$ )



A-不同浓度 ISO 对 YFP 和 CFP 荧光强度的变化 B-不同时间段心肌细胞内 cAMP 含量变化 C-不同浓度人参皂苷 Re 对乳鼠心肌细胞内 cAMP 含量的影响 D~G-各组乳鼠心肌细胞内 cAMP 和 PKA 含量 与无人参皂苷 Re 组比较: \* $P < 0.05$

A-changes of YFP and CFP fluorescence intensity by different concentrations of ISO B-changes of cAMP content in cardiomyocytes at different time periods C-effect of different concentrations of ginsenoside Re on cAMP content in neonatal rat cardiomyocytes D-G-cAMP and PKA contents of neonatal rat cardiomyocytes in each group \* $P < 0.05$  vs without ginsenoside Re group

图 6 人参皂苷 Re 对 ISO 所致原代乳鼠心肌细胞 cAMP 和 PKA 含量变化的影响

Fig. 6 Effect of ginsenoside Re on content change of cAMP and PKA in primary neonatal rat cardiomyocytes induced by ISO

PKA 含量。表明人参皂苷 Re 能够通过抑制 cAMP/PKA 通路缓解 ISO 所致快速型心律失常的发生。

**3.4.2 原代乳鼠心肌细胞内 cAMP 和 PKA 含量改变时的荧光及细胞形态变化** 心肌细胞颜色变化代表不同时间段细胞内 cAMP 含量变化, 细胞颜色越绿表示 cAMP 含量越高, 颜色越蓝表示 PKA 含量越高。如图 7-A 所示, 不同浓度的人参皂苷 Re 对原代乳鼠心肌细胞内 cAMP 的荧光强度没有明显改变。如图 7-B 所示, 当给予不同浓度 ISO 时, 随着 ISO 浓度的增加, 原代乳鼠心肌细胞颜色越绿, 表

明其 cAMP 含量不断增加, 在 ISO 浓度为 1 nmol/L 时 cAMP 含量基本达到饱和。如图 7-D 所示, 随着 ISO 浓度的增加心肌细胞颜色愈发变蓝, 表明其 PKA 含量不断增加。如图 7-C、E 所示, 当给予人参皂苷 Re (5 μmol/L) 预处理后, 心肌细胞的颜色变化明显减小。由于药物处理时间较短, 细胞未见明显形态学变化。

**3.5 人参皂苷 Re 对 ISO 所致离体灌流大鼠心室肌炎性因子水平的影响**

为了找到对照组和模型组的差异基因, 从而锁

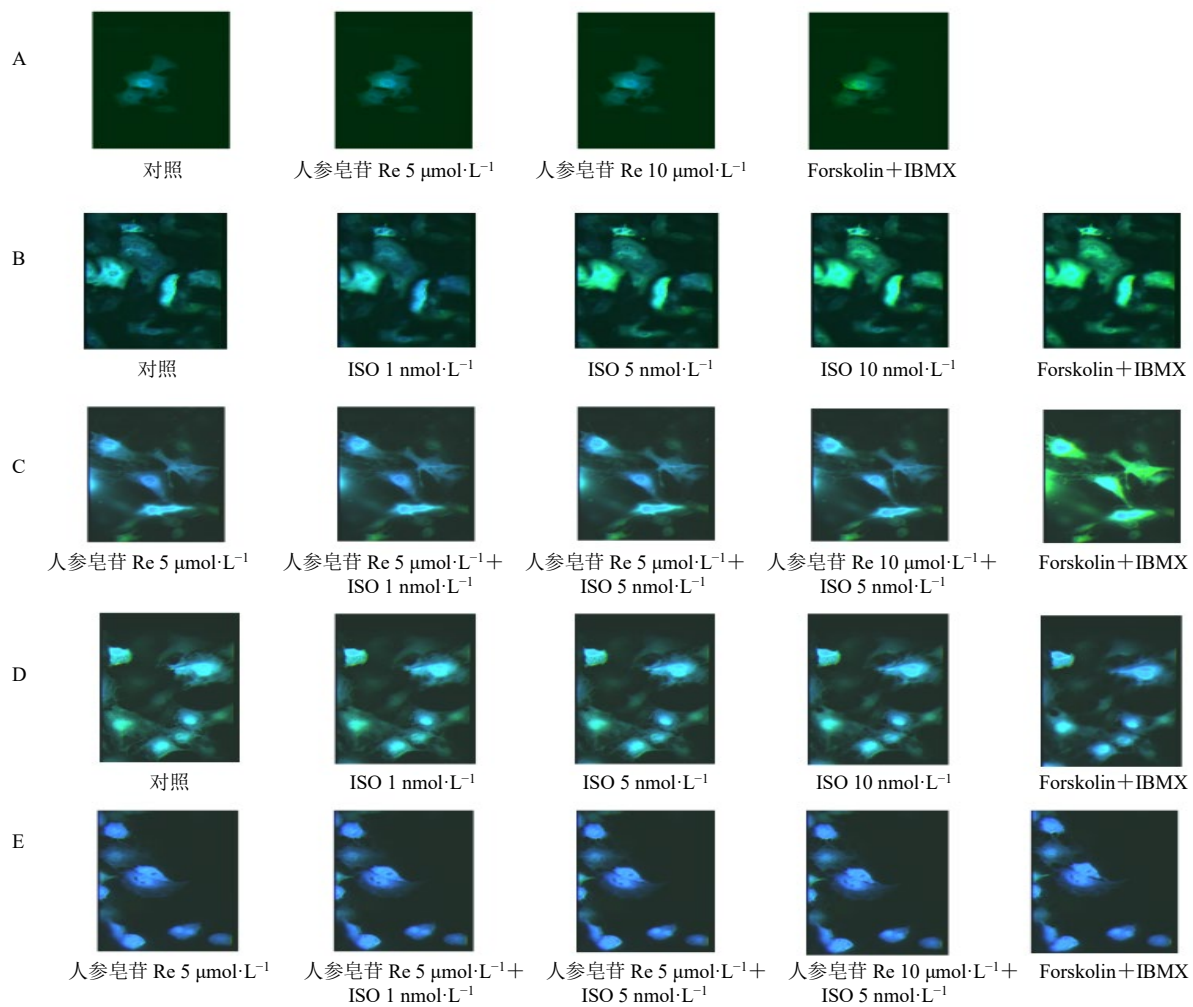


图7 人参皂苷 Re 抑制 ISO 所致的原代乳鼠心肌细胞中 cAMP (A、B、C) 和 PKA (D、E) 含量增加时的细胞变化 (×1000)  
 Fig. 7 Cellular changes with increase of cAMP (A, B, C) and PKA (D, E) content in ISO-induced primary neonatal rat cardiomyocytes inhibited by ginsenoside Re (× 1000)

定药物治疗靶标,本研究对对照组和 ISO 组大鼠心室肌进行高通量基因测序及生物信息分析,发现与炎症反应相关 35 个基因、趋化因子介导的信号通路 12 个基因、细胞因子 24 个基因、趋化因子 11 个基因在 ISO 组中高表达(图 8-A)。随后对差异基因进行筛选,如图 8-B 所示,与对照组比较,ISO 组大鼠心室肌 CXCL1、CXCL2、CXCL3、TNF- $\alpha$  和 IL-6 水平均显著增加 ( $P < 0.05$ );与 ISO 组比较,人参皂苷 Re+ISO 组大鼠心室肌 CXCL1、CXCL2、CXCL3、TNF- $\alpha$  和 IL-6 水平均显著降低 ( $P < 0.05$ )。表明人参皂苷 Re 能够通过降低 ISO 所致部分趋化因子和细胞因子的上调抑制心律失常。

#### 4 讨论

心律失常是心血管系统最常见病症之一,可突发发作而致猝死,亦可持续累及心脏而致其衰竭。

近年来,抗心律失常化学药在临床应用的安全性不断受到质疑,很多药物本身存在局限性及不良反应,且有致心律失常作用<sup>[19]</sup>,因此,从药用植物中寻找高效低毒的化合物用于心律失常的防治受到各国学者的高度重视<sup>[20]</sup>。

既往研究表明,人参皂苷 Re 对心律失常起着重要的调节作用<sup>[21]</sup>。陈彩霞等<sup>[10-11]</sup>在 ISO 诱导的兔心律失常模型中发现,人参皂苷 Re 治疗后血流动力学各指标与模型组同时段相比,均有显著性下降,人参皂苷 Re 能够使 ISO 所致的家兔室性心律失常转为窦性心律,且人参皂苷 Re 的剂量越大,维持窦性节律的时间越长。该研究认为,人参皂苷 Re 可能通过多个靶点共同作用,而且各机制之间相互促进、相互关联:①人参皂苷 Re 是钙离子拮抗剂,  $Ca^{2+}$  内流增多会引发心律失常;②人参皂苷 Re 对



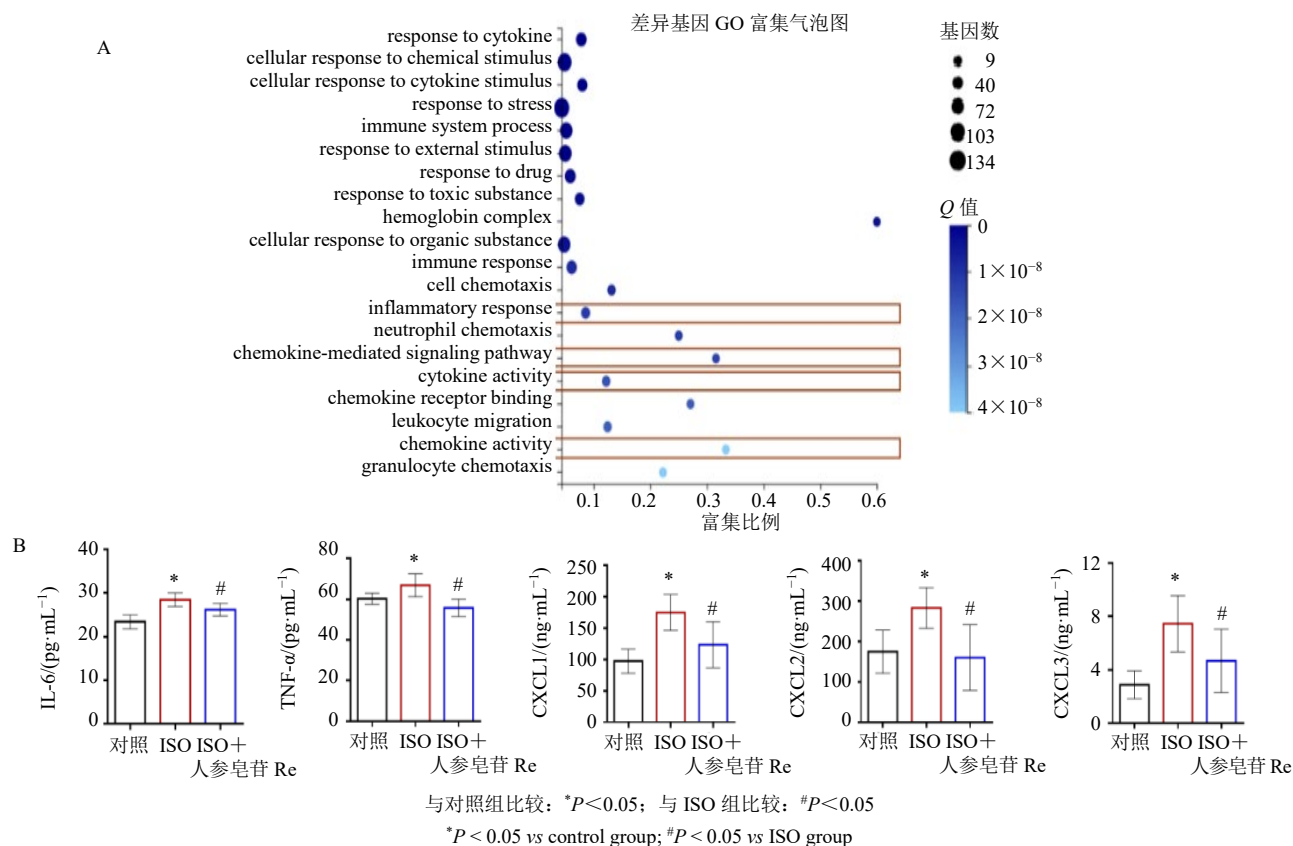


图 8 基因差异生物信息学分析 (A) 以及人参皂苷 Re 抑制 ISO 所致离体灌流大鼠心室肌炎性因子水平 (B)  
**Fig. 8 Genetic difference bioinformatics analysis (A) and ginsenoside Re inhibits levels of inflammatory factors in isolated rat ventricular muscles induced by ISO (B)**

KATP 通道的开放具有调节作用；③人参皂苷 Re 具有清除氧自由基、增加一氧化氮的产生以及膜稳定剂等作用。另有研究发现，人参皂苷 Re 能够抑制心室肌细胞电压依赖性的钠通道、瞬时外向钾通道、内向整流钾通道电流和 L 型钙通道电流，从而发挥抗心律失常的作用<sup>[22-23]</sup>。以上对人参皂苷 Re 抑制心律失常的机制研究主要集中在离子通道方面，对其信号转导通路的研究甚少，cAMP/PKA 信号通路和炎症反应在人参皂苷 Re 调节心律失常的研究中未见具体报道。本研究采用多电极阵列映射系统和 FRET 技术，实时观察人参皂苷 Re 对 ISO 诱导离体灌流大鼠快速型心律失常的影响并探讨其作用机制。以往研究认为人参皂苷 Re 抑制心律失常可能是通过多个离子通道共同作用，本研究发现人参皂苷 Re 抑制心律失常具有多靶点作用，人参皂苷 Re 通过调节 cAMP/PKA 通路和抑制炎症反应干预快速型心律失常的发生。

ISO 是非选择性  $\beta_1$ 、 $\beta_2$  受体激动剂，若  $\beta$  受体过度激活，可通过上调 GPCR 激活下游 AC/cAMP/

PKA 通路，PKA 生成过多，最终导致细胞质内  $Ca^{2+}$  浓度瞬间升高。当胞内游离钙瞬间增多，可直接延长复极，最终导致快速型心律失常的发生<sup>[24]</sup>。本研究通过多电极阵列映射系统观察离体 Langendorff 灌流心脏发现，人参皂苷 Re 抑制 ISO 所致大鼠心室肌传导速度、传导方向及心率的改变，抑制 ISO 诱导乳鼠心肌细胞内 cAMP 和 PKA 含量的增加。表明人参皂苷 Re 通过阻断 ISO 与心肌细胞膜上的 GPCR 的结合，抑制其下游 cAMP/PKA 信号传导通路缓解心律失常 (图 9)。

炎症反应与室性心律失常密切相关<sup>[25]</sup>，炎症反应可以导致心肌传导的不均一性，促进心室重构和室性心律失常的发生<sup>[18]</sup>。心律失常患者血清中炎症因子 TNF- $\alpha$  和 IL-6 水平显著增高，经人参配伍方剂参麦注射液治疗后炎症因子水平明显降低<sup>[26]</sup>，炎症因子表达较高的患者发生室性心律失常的风险也更高<sup>[27-28]</sup>。在缺血性心力衰竭的模型中，丝裂原激活的蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinase, MAPK) 的激活可以诱导 CXCL1、TNF- $\alpha$  和 IL-6 的

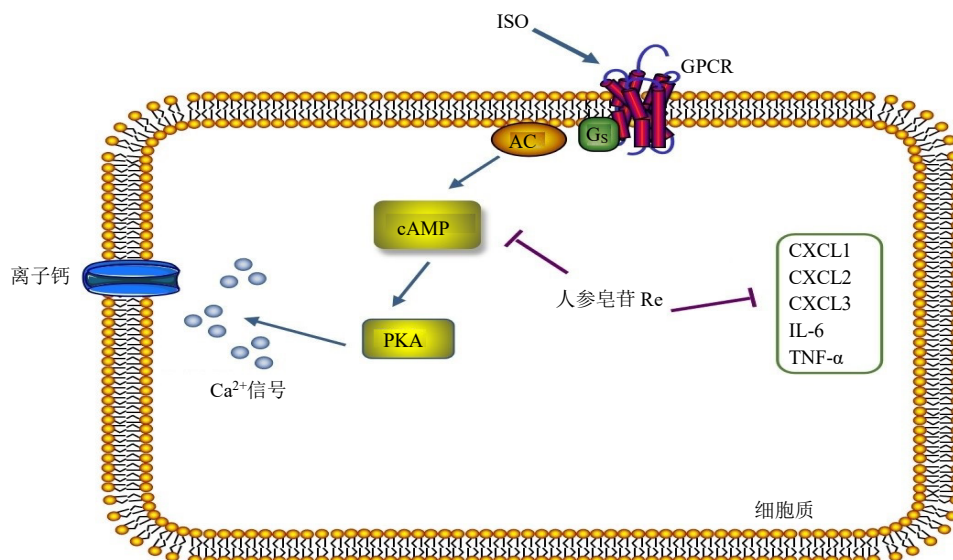


图9 人参皂苷 Re 通过抑制 cAMP/PKA 信号通路及炎症因子表达干预快速型心律失常

Fig. 9 Ginsenoside Re interferes with tachyarrhythmia by inhibiting cAMP/PKA signaling pathway and expressions of inflammatory factors

产生，促进细胞凋亡、纤维化，最终导致心室重构和室性心律失常的发生<sup>[29-30]</sup>。在心肌纤维化的研究中发现，CXCL2 和 CXCL3 表达均明显上调<sup>[31]</sup>。cAMP/PKA 及其下游 cAMP 反应元件（cAMP responsive element binding protein, CREB）的激活是 CXCL1 基因转录的主要途径，而 IL-1 $\beta$  也可通过 CREB 途径诱导趋化因子的基因表达<sup>[32]</sup>。由此可以推断，cAMP/PKA 通路可能参与调节炎症因子的表达，进而引起心肌损伤和心肌纤维化，最终导致心律失常。本研究结果显示，人参皂苷 Re 可以通过抑制心脏组织中的 CXCL1、CXCL2、CXCL3、TNF- $\alpha$  和 IL-6 水平，发挥抗心律失常作用（图 9）。

综上，人参皂苷 Re 通过阻断 ISO 与心肌细胞膜上的 GPCR 结合，抑制其下游 cAMP/PKA 信号传导通路和炎症因子水平缓解心律失常。本研究仅在离体组织和心肌细胞水平对人参皂苷 Re 的抗心律失常进行分析，体内实验正进一步展开，炎症因子抗心律失常的具体机制有待深入探讨。本研究旨在为开发高效低毒的抗快速型心律失常药物提供科学依据和物质基础。

**利益冲突** 所有作者均声明不存在利益冲突

**参考文献**

[1] 王伯昊, 李洪英, 李德坤, 等. UPLC-UV 法测定注射用益气复脉(冻干)中人参皂苷 Rg<sub>1</sub>、Re、Rb<sub>1</sub> [J]. 药物评价研究, 2020, 43(8): 1587-1591.

[2] Wang Q W, Yu X F, Xu H L, *et al.* Ginsenoside Re improves isoproterenol-induced myocardial fibrosis and heart failure in rats [J]. *Evid Based Compl Alternat Med*, 2019, 2019: 3714508.

[3] Zhang B, Cui X, Jin H H, *et al.* Ginsenoside Re prevents angiotensin II-induced gap-junction remodeling by activation of PPAR $\gamma$  in isolated beating rat atria [J]. *Life Sci*, 2017, 190: 36-45.

[4] Yu Y, Sun J, Liu J, *et al.* Ginsenoside Re preserves cardiac function and ameliorates left ventricular remodeling in a rat model of myocardial infarction [J]. *J Cardiovasc Pharmacol*, 2020, 75(1): 91-97.

[5] Lim K H, Lim D J, Kim J H. Ginsenoside-Re ameliorates ischemia and reperfusion injury in the heart: A hemodynamics approach [J]. *J Ginseng Res*, 2013, 37(3): 283-292.

[6] Furukawa T, Bai C X, Kaihara A, *et al.* Ginsenoside Re, a main phytosterol of *Panax ginseng*, activates cardiac potassium channels via a nongenomic pathway of sex hormones [J]. *Mol Pharmacol*, 2006, 70(6): 1916-1924.

[7] Wang Q W, Yu X F, Xu H L, *et al.* Ginsenoside Re attenuates isoproterenol-induced myocardial injury in rats [J]. *Evid Based Compl Alternat Med*, 2018, 2018: 8637134.

[8] Wang Y G, Zima A V, Ji X, *et al.* Ginsenoside Re suppresses electromechanical alternans in cat and human cardiomyocytes [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2008, 295(2): H851-H859.

- [9] 孟红旭, 姚明江, 刘建勋. 人参皂苷 Re 对大鼠心肌细胞钠、钾离子通道的影响 [J]. 世界中医药, 2013, 8(10): 1147-1149.
- [10] 陈彩霞, 张宏艳. 人参皂甙 Re 对家兔触发性室性心律失常血流动力学的影响 [J]. 实用医学杂志, 2009, 25(14): 2237-2240.
- [11] 陈彩霞, 张宏艳. 人参皂甙 Re 对异丙肾上腺素致家兔室性心律失常的保护作用 [J]. 中国当代儿科杂志, 2009, 11(5): 384-388.
- [12] Bai C X, Sunami A, Namiki T, *et al.* Electrophysiological effects of ginseng and ginsenoside Re in guinea pig ventricular myocytes [J]. *Eur J Pharmacol*, 2003, 476(1/2): 35-44.
- [13] Huang Y C, Chen C T, Chen S C, *et al.* A natural compound (ginsenoside Re) isolated from *Panax ginseng* as a novel angiogenic agent for tissue regeneration [J]. *Pharm Res*, 2005, 22(4): 636-646.
- [14] Hauser A S, Chavali S, Masuho I, *et al.* Pharmacogenomics of GPCR drug targets [J]. *Cell*, 2018, 172(1/2): 41-54.
- [15] Wang J, Gareri C, Rockman H A. G-protein-coupled receptors in heart disease [J]. *Circ Res*, 2018, 123(6): 716-735.
- [16] Altara R, Manca M, Brandão R D, *et al.* Emerging importance of chemokine receptor CXCR3 and its ligands in cardiovascular diseases [J]. *Clin Sci (Lond)*, 2016, 130(7): 463-478.
- [17] Xuan W, Liao Y, Chen B, *et al.* Detrimental effect of fractalkine on myocardial ischaemia and heart failure [J]. *Cardiovasc Res*, 2011, 92(3): 385-393.
- [18] Francis Stuart S D, de Jesus N M, Lindsey M L, *et al.* The crossroads of inflammation, fibrosis, and arrhythmia following myocardial infarction [J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2016, 91: 114-122.
- [19] Correa A, Rochlani Y, Aronow W S. Current pharmacotherapeutic strategies for cardiac arrhythmias in heart failure [J]. *Expert Opin Pharmacother*, 2020, 21(3): 339-352.
- [20] Sun Y Y, Liu Y, Chen K J. Roles and mechanisms of ginsenoside in cardiovascular diseases: Progress and perspectives [J]. *Sci China Life Sci*, 2016, 59(3): 292-298.
- [21] Peng L, Sun S, Xie L H, *et al.* Ginsenoside Re: Pharmacological effects on cardiovascular system [J]. *Cardiovasc Ther*, 2012, 30(4): e183-e188.
- [22] 杨勇, 任长虹, 孟红旭, 等. 参附汤有效组分配伍对离体大鼠心肌细胞 L 型钙通道的影响 [J]. 中草药, 2014, 45(24): 3594-3598.
- [23] 刘岩, 赵世萍, 董晞, 等. 甘草苷及人参皂苷对乌头碱导致心肌细胞离子通道 mRNA 表达变化的影响 [J]. 中国中医基础医学杂志, 2008, 14(5): 359-361.
- [24] Souza D S, Menezes-Filho J E R, Santos-Miranda A, *et al.* Calcium overload-induced arrhythmia is suppressed by farnesol in rat heart [J]. *Eur J Pharmacol*, 2019, 859: 172488.
- [25] de Jesus N M, Wang L G, Herren A W, *et al.* Atherosclerosis exacerbates arrhythmia following myocardial infarction: Role of myocardial inflammation [J]. *Heart Rhythm*, 2015, 12(1): 169-178.
- [26] 杨晓明, 黄伟剑. 参麦注射液辅助胺碘酮对阵发性室性心律失常患者血清 IL-6、TNF- $\alpha$  及 hs-CRP 的影响 [J]. 中国生化药物杂志, 2016, 36(3): 127-129.
- [27] Blangy H, Sadoul N, Dousset B, *et al.* Serum BNP, hs-C-reactive protein, procollagen to assess the risk of ventricular tachycardia in ICD recipients after myocardial infarction [J]. *Europace*, 2007, 9(9): 724-729.
- [28] Lewek J, Kaczmarek K, Cygankiewicz I, *et al.* Inflammation and arrhythmias: Potential mechanisms and clinical implications [J]. *Expert Rev Cardiovasc Ther*, 2014, 12(9): 1077-1085.
- [29] Chang S L, Hsiao Y W, Tsai Y N, *et al.* Interleukin-17 enhances cardiac ventricular remodeling via activating MAPK pathway in ischemic heart failure [J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2018, 122: 69-79.
- [30] Hsiao Y W, Tsai Y N, Huang Y T, *et al.* *Rhodiola crenulata* reduces ventricular arrhythmia through mitigating the activation of IL-17 and inhibiting the MAPK signaling pathway [J]. *Cardiovasc Drugs Ther*, 2020: 35(5): 889-900.
- [31] Clancy R M, Markham A J, Jackson T, *et al.* Cardiac fibroblast transcriptome analyses support a role for interferogenic, profibrotic, and inflammatory genes in anti-SSA/Ro-associated congenital heart block [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2017, 313(3): H631-H640.
- [32] Tsai Y J, Hao S P, Chen C L, *et al.* Thromboxane A2 regulates CXCL1 and CXCL8 chemokine expression in the nasal mucosa-derived fibroblasts of chronic rhinosinusitis patients [J]. *PLoS One*, 2016, 11(6): e0158438.

[责任编辑 李亚楠]