

稳心颗粒对心律失常大鼠凋亡、炎症及氧化应激的影响

钱舒乐¹, 于露¹, 李晓凤², 王润英¹, 宋博涵¹, 赵玉珂¹, 郭海珍¹, 杜武勋^{2*}

1. 天津中医药大学, 天津 301617

2. 天津中医药大学第二附属医院, 天津 300150

摘要: **目的** 探讨稳心颗粒对心律失常大鼠凋亡、炎症及氧化应激的影响。**方法** 60只雄性SD大鼠随机分为对照组、模型组及稳心颗粒低、中、高剂量(1.34、2.68、5.36 g/kg)组和胺碘酮(35.7 mg/kg)组。各组大鼠连续预防性给药21 d, 对照组和模型组ig纯水。末次给药后1 h将大鼠麻醉, 尾iv乌头碱以诱导心律失常。采用多道生理信号采集处理系统记录大鼠注射乌头碱前后的心电图变化; 采用苏木素-伊红(HE)、Masson染色观察心肌组织病理损伤情况; TUNEL染色观察心肌细胞凋亡情况; 采用试剂盒检测血清中超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)活性及丙二醛(malonaldehyde, MDA)、还原型谷胱甘肽(glutathione, GSH)、白细胞介素-18(interleukin-18, IL-18)、IL-1 β 、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)水平; 采用Western blotting检测心肌组织兰尼碱受体2(ryanodine receptor 2, RYR2)、NOD样受体热蛋白结构域相关蛋白3(NOD-like receptor thermal protein domain associated protein 3, NLRP3)、Toll样受体4(Toll-like receptor 4, TLR4)以及B淋巴细胞瘤-2(B-cell lymphoma-2, Bcl-2)、Bcl-2相关X蛋白(Bcl-2 associated X protein, Bax)表达。**结果** 与对照组比较, 模型组大鼠室早及室速频发, 心律失常评分增加($P<0.01$), 心肌组织病理损伤及细胞凋亡情况明显, 血清氧化应激指标(SOD、MDA)变化明显($P<0.01$); 血清炎症因子水平均显著升高($P<0.01$), 心肌组织RYR2、NLRP3、TLR4、Bax蛋白表达水平显著升高($P<0.01$), Bcl-2蛋白表达水平显著降低($P<0.01$)。与模型组比较, 胺碘酮组及稳心颗粒高剂量组大鼠心律失常持续时间缩短, 心律失常评分降低($P<0.05$ 、 0.01); 心肌组织病理损伤减轻, 心肌细胞凋亡指数降低; 氧化应激状态(SOD、MDA)改善($P<0.05$ 、 0.01); 血清炎症因子水平降低($P<0.05$ 、 0.01); 离子通道蛋白RYR2表达降低($P<0.01$), 炎症相关蛋白NLRP3、TLR4表达降低($P<0.01$), 凋亡蛋白Bax表达降低($P<0.01$), 抗凋亡蛋白Bcl-2表达升高($P<0.01$)。**结论** 稳心颗粒可以有效改善乌头碱所诱导的大鼠心律失常, 其作用机制可能与抑制氧化应激和炎症反应、降低凋亡水平从而减轻心肌细胞损伤有关。

关键词: 稳心颗粒; 凋亡; 氧化应激; 炎症反应; 心律失常

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2024)07-2292-11

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2024.07.016

Effect of Wenxin Granules on apoptosis, inflammation and oxidative stress in arrhythmic rats

QIAN Shule¹, YU Lu¹, LI Xiaofeng², WANG Runying¹, SONG Bohan¹, ZHAO Yuke¹, GUO Haizhen¹, DU Wuxun²

1. Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 301617, China

2. Second Affiliated Hospital of Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300150, China

Abstract: Objective To investigate the effect of Wenxin Granules (稳心颗粒) on apoptosis, inflammation and oxidative stress in arrhythmia rats. **Methods** A total of 60 male SD rats were randomly divided into control group, model group, Wenxin Granules low-, medium- and high-dose (1.34, 2.68, 5.36 g/kg) groups and amiodarone (35.7 mg/kg) group. Each group was given prophylactic

收稿日期: 2023-11-16

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(82004329); 天津市教委科研计划项目(2019SK025); 国家中医药管理局全国名老中医药专家传承工作室建设项目“杜武勋全国名老中医药专家传承工作室”; 天津市中医药管理局天津市名中医传承工作室建设项目“杜武勋天津市名中医传承工作室”

作者简介: 钱舒乐(1994—), 女, 博士研究生, 研究方向为心血管疾病中医临床研究。E-mail: qianshule0925@163.com

*通信作者: 杜武勋(1961—), 男, 教授, 主任医师, 博士生导师, 研究方向为心血管疾病的临床与基础、五运六气理论与临床。

E-mail: cnduwux@163.com

medication continuously for 21 d, while the control group and model group were given pure water. 1 h after the last administration, the rats were anesthetized, and aconitine was injected into the tail vein to induce arrhythmia. Multi-channel physiological signal acquisition and processing system was used to record the electrocardiogram changes of rats before and after injection of aconitine; Hematoxylin eosin (HE) and Masson staining were used to observe the pathological damage of myocardial tissue; TUNEL staining was used to observe the apoptosis of myocardial cells; Kits were used to detect the activity of superoxide dismutase (SOD) and levels of malondialdehyde (MDA), reduced glutathione (GSH), interleukin-18 (IL-18), IL-1 β and tumor necrosis factor- α (TNF- α) in serum; Western blotting was used to detect the expressions of ryanodine receptor 2 (RyR2), NOD like receptor thermal protein domain associated protein 3 (NLRP3), Toll-like receptor 4 (TLR4), B-cell lymphoma-2 (Bcl-2) and Bcl-2 associated X protein (Bax) in myocardial tissue. **Results** Compared with control group, ventricular premature and ventricular tachycardia occurred frequently in model group, and arrhythmia score was increased ($P < 0.01$). The pathological injury and apoptosis of myocardial tissue were obvious. The oxidative stress indexes (SOD and MDA) in serum were significantly changed ($P < 0.01$). The levels of inflammatory factors in serum were increased ($P < 0.01$). The expressions of RyR2, NLRP3, TLR4 and Bax in myocardial tissue were increased ($P < 0.01$), while the expression of Bcl-2 was decreased ($P < 0.01$). Compared with model group, the duration of arrhythmia in amiodarone group and Wenxin Granules high-dose group were shortened, and the arrhythmia score was decreased ($P < 0.05, 0.01$). The pathological injury of myocardium was alleviated, and the apoptosis index of myocardium was decreased. The state of oxidative stress (SOD, MDA) were improved ($P < 0.05, 0.01$). Levels of inflammatory cytokines in serum were decreased ($P < 0.05, 0.01$). The expressions of RyR2, NLRP3 and TLR4 were decreased ($P < 0.01$), the expression of apoptosis protein Bax was decreased ($P < 0.01$), and the expression of anti-apoptosis protein Bcl-2 was increased ($P < 0.01$). **Conclusion** Wenxin Granules can effectively ameliorate the arrhythmia induced by aconitine in rats, and its mechanism may be related to inhibiting oxidative stress and inflammation, reducing apoptosis level and thus alleviating myocardial cell damage.

Key words: Wenxin Granules; apoptosis; oxidative stress; inflammatory response; arrhythmias

心律失常是指心脏冲动的频率、节律、起源部位、传导速度或激动次序的异常^[1]。研究表明, 88%的心源性猝死是由心律失常引起的, 心律失常会导致心脏和其他器官疾病严重并发症的发生^[2]。心肌梗死缺血再灌注后, 室早、室速、室颤及房颤的发生率高达 80%^[3], 是增加心梗后手术难度及影响患者预后的主要因素, 也是心肌缺血再灌注损伤最主要、最严重的表现, 可占心血管死亡事件的 50%左右^[4]。心律失常还是心衰常见并发症之一, 为心衰患者死亡的重要原因。由此可知, 心律失常不仅是独立的心血管事件, 还会伴随许多基础心脏疾病出现并严重影响预后, 心律失常的防治对于心血管疾病的预后意义重大。

以稳心颗粒为代表的中药复方在抗心律失常方面疗效显著, 且安全性高, 临床未见致心律失常等不良反应的报道^[5-8]。许多研究表明, 稳心颗粒单独或联合化学药用于心律失常, 均有良好的疗效^[9-11]。炎症和氧化应激反应是心力衰竭、心律失常、心肌梗死等多种心血管系统疾病发生及病情进展的病理基础, 减轻炎症、抑制氧化应激可减少心肌细胞凋亡, 缓解心肌损伤, 改善心律失常症状^[12]。本研究旨在通过构建心律失常大鼠模型, 探讨稳心颗粒对其凋亡、炎症及氧化应激的影响, 为其抗心律失常

的机制研究开辟新的思路, 也为稳心颗粒的临床运用夯实理论基础。

1 材料

1.1 动物

SPF 级雄性 SD 大鼠 60 只, 体质量 180~220 g, 购自斯贝福(北京)生物技术有限公司, 许可证号 SCXK(京)2019-0010。所有实验大鼠均饲养于环境温度为(23 \pm 2) $^{\circ}$ C, 相对湿度为(35 \pm 5)%的中国医学科学院放射医学研究所实验动物中心 SPF 级动物实验室, 光照 12 h 明暗交替, 自由饮水、普通饮食, 适应性喂养 1 周后进行实验。动物实验经中国医学科学院放射医学研究所实验动物伦理委员会批准(批准号 IRM-DWLL-2023190)。

1.2 药品与试剂

稳心颗粒(无糖型, 5 g/袋, 国药准字 Z10950026, 批号 2205019)购自山东步长制药股份有限公司; 盐酸胺碘酮片(可达龙, 0.2 g/片, 国药准字 HJ20181050, 批号 EA2413)购自赛诺菲(杭州)制药有限公司; 乌头碱(批号 110799-201608)购自宝鸡市辰光生物科技有限公司; 乌拉坦(批号 Z11M12Y141466)购自上海源叶生物科技有限公司; 超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、丙二醛(malonaldehyde, MDA)、还原型谷胱甘肽

(glutathione, GSH)、白细胞介素-18 (interleukin-18, IL-18)、IL-1 β 、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) 试剂盒 (批号均为 20231010-20240409) 购自天津天景澄生物科技有限公司; NOD 样受体热蛋白结构域相关蛋白 3 (NOD-like receptor thermal protein domain associated protein 3, NLRP3) 抗体 (批号 8798121) 购自美国 Affinity Bioscience 公司; 兰尼碱受体 2 (ryanodine receptor 2, RYR2) 抗体 (批号 1016750-2)、Toll 样受体 4 (Toll-like receptor 4, TLR4) 抗体 (批号 1009562-8)、B 淋巴细胞瘤-2 (B-cell lymphoma-2, Bcl-2) 抗体 (批号 1003067-1)、Bcl-2 相关 X 蛋白 (Bcl-2 associated X protein, Bax) 抗体 (批号 1002634-1) 均购自英国 Abcam 公司; 苏木素 (批号 H9627) 购自美国 Sigma 公司; 伊红水溶液 (批号 71014544) 购自国药集团; Masson 染色试剂盒 (批号 BA4079) 购自珠海贝索生物技术有限公司; 细胞凋亡检测试剂盒 (批号 037E2220IA) 购自南京诺唯赞生物科技股份有限公司; RIPA 裂解液购自武汉赛维尔生物科技股份有限公司; BCA 蛋白浓度测定试剂盒购自广州捷倍斯生物科技股份有限公司; β -actin 抗体 (批号 F180047) 购自 Abways Technology 公司; HRP 标记的羊抗兔二抗 (批号 SA00001-2)、HRP 标记的羊抗小鼠二抗 (批号 SA00001-1) 购自武汉三鹰生物技术有限公司。

1.3 仪器

RM6240 型多道生理信号采集处理系统 (上海玉研科学仪器有限公司); DS-Fi3 型生物显微镜 (上海尼康精机有限公司); DYCZ-40 型电转仪 (北京六一仪器厂); MQX200 型酶标仪 (美国 Bio Tek 公司)。

2 方法

2.1 分组、造模与给药

60 只 SD 大鼠适应性饲养 1 周后, 随机分为对照组、模型组及稳心颗粒低、中、高剂量 (1.34、2.68、5.36 g/kg, 分别相当于临床等效剂量的 1、2、4 倍) 组和胺碘酮 (35.7 mg/kg) 组, 每组 10 只。稳心颗粒溶于纯净水中, 以超声振荡器制备成质量浓度分别为 0.134、0.268、0.536 g/mL 的药液。盐酸胺碘酮片用研钵捣成粉末状, 并用电子天平称取药粉溶于纯净水中, 以超声振荡器制成质量浓度为 3.57 mg/mL 的药液。各给药组 ig 相应药物 (10 mL/kg), 对照组和模型组 ig 等体积纯水, 1 次/d, 连续 21 d。

末次给药 1 h 后, 称定大鼠质量, ip 20% 乌拉坦 (5 mL/kg) 麻醉, 采用多道生理信号采集处理系统观察并采集标准 II 导联心电图数据。记录正常心电图 20 min 后, 基线调零。待心电图平稳后, 用 1 mL 注射器抽取 0.002% 的乌头碱溶液 (2 mL/kg), 根据文献及预实验研究^[13], 尾 iv 乌头碱 (40 μ g/kg) 构建心律失常模型, 当大鼠心电图出现室性期前收缩、室性心动过速等波形, 即视为造模成功, 记录心律失常出现及恢复的时间, 心律恢复正常后再记录 20 min 心电图。若造模期间出现大鼠死亡, 则停止记录。对照组大鼠尾 iv 生理盐水 (2 mL/kg)。

2.2 心电图观察及记录

采用多道生理信号采集处理系统连续记录尾 iv 乌头碱前后的大鼠心电图, 观察室性期前收缩 (premature ventricular contraction, PVC)、室性心动过速 (ventricular tachycardia, VT)、心室扑动 (ventricular flutter, VFI) 及心室颤动 (ventricular fibrillation, VF) 等异常心电发生情况。观察并记录大鼠心律失常的发生及持续时间, 当心电表现恢复正常时, 再记录 20 min 心电图, 若无异常则视为成功复律; 最长观测 2 h 心电图变化, 若仍为异常心电表现, 则视为未能复律; 同时根据心电表现进行心律失常评分。评分以 Lambeth 会议标准为参考, 具体如下: 0 分, 无心律失常或少于 5 次室早; 1 分, 不少于 5 次室早; 2 分, 室速持续时间少于 60 s; 3 分, 室速持续时间少于 60 s 或多阵室速累计时间少于 60 s; 4 分, 多阵室速且总持续时间不少于 60 s 或偶发室颤; 5 分, 持续性室颤或死亡^[12,14-15]。

2.3 大鼠心肌组织病理观察

大鼠脱颈处死后, 开胸取出心脏, 以生理盐水冲洗干净, 取适量心肌组织于 4% 多聚甲醛溶液中固定 24 h, 以梯度乙醇对组织进行脱水处理, 常规进行组织透明、浸蜡、包埋、切片和烤片、脱蜡等步骤后, 进行苏木素-伊红 (hematoxylin-eosin, HE) 染色观察心肌组织的形态结构变化, Masson 染色以观察心肌组织的纤维化改变。

2.4 大鼠血清中氧化应激和炎症因子相关指标的检测

大鼠于麻醉状态下行腹主动脉采血, 3 000 r/min 离心 15 min, 取血清, 按照试剂盒说明书检测 SOD 活性及 MDA、GSH、IL-18、IL-1 β 、TNF- α 水平。

2.5 大鼠心肌细胞凋亡情况的检测

取各组大鼠心肌组织, 固定、包埋及切片后,

按照试剂盒说明书进行 TUNEL、DPAI 双染色，于荧光显微镜下观察细胞凋亡情况，组织切片上凋亡的细胞呈红色荧光，细胞核呈蓝色荧光。

细胞凋亡率 = 凋亡细胞数 / 总细胞数

2.6 心肌组织 RYR2、NLRP3、TLR4、Bcl-2 和 Bax 蛋白表达的检测

取各组大鼠心肌组织置于 RIPA 裂解液中研磨，直至看不见明显块状，12 000 r/min 离心 5 min，将上清转移到新的离心管中，采用 BCA 试剂盒测定蛋白浓度，加入蛋白上样缓冲液进行沸水浴使蛋白变性。蛋白样品经十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳，转至 PVDF 膜，加入一抗，4 ℃ 孵育过夜，TBST 洗涤 5 次，5 min/次；加入二抗，室温摇床孵育 2 h，TBST 洗涤 5 次，显色曝光并拍照，用 ipip 软件分析胶片灰度值。

2.7 统计学分析

用 SPSS 25.0 软件对数据进行统计分析，对组间各样本量参数进行正态性检验，若符合正态分布，

则数据以 $\bar{x} \pm s$ 进行描述统计，采用 Lev-enes Test 判断方差齐性，若符合方差齐性则采用单因素方差分析 (ANOVA) 进行多组间比较，事后比较采用 LSD 检验；若方差不齐时，采用 Tamhane's T^2 法进行两两比较。若不符合正态分布，则数据用中位数和四分位数 [M (P₂₅, P₇₅)] 进行描述统计，组间比较采用独立样本 Kruskal-Wallis 检验。

3 结果

3.1 稳心颗粒对心律失常大鼠心电图的影响

3.1.1 各组大鼠心律失常出现及持续时间 对照组大鼠在监测过程中未发现明显电异常表现，模型组大鼠在尾 iv 乌头碱后，心电图可见明显的 PVC、VT 等心律失常表现，提示心律失常大鼠模型复制成功。各给药组大鼠在尾 iv 乌头碱后亦出现 PVC、VT 等心律失常表现，其中胺碘酮组和稳心颗粒中、高剂量组均能有效缩短大鼠心律失常持续时间 ($P < 0.05$ 、 0.01 ，表 1)；各组大鼠在尾 iv 乌头碱后，心律失常开始出现的时间差别无统计学意义。

表 1 各组大鼠心律失常出现及持续时间

Table 1 Occurrence and duration of arrhythmia of rats in each group

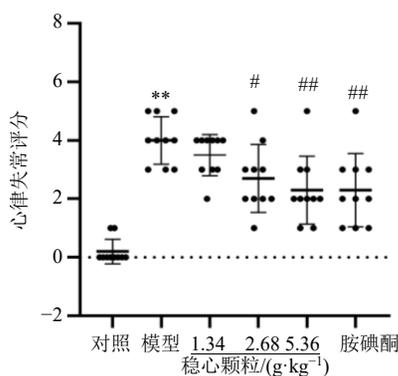
组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	n/只	心律失常出现时间/s	心律失常持续时间/s
模型	—	7	145.50 (60.00, 212.00)	4 145.71 ± 879.90
稳心颗粒	1.34	10	205.50 (50.00, 465.00)	3 438.33 ± 790.91
	2.68	9	186.50 (83.50, 312.75)	2 863.33 ± 1 202.90 [#]
	5.36	9	289.50 (168.75, 323.00)	2 871.67 ± 571.46 [#]
胺碘酮	0.035 7	9	498.00 (346.50, 670.50)	2 459.33 ± 1 052.71 ^{##}

死亡大鼠未计入在内，心律失常出现时间指心电图由正常表现首次出现异常心电图的时间，心律失常持续时间为各类心律失常时间的总和；与模型组比较：[#] $P < 0.05$ ^{##} $P < 0.01$ 。

Dead rats were not included, the time of occurrence of arrhythmia refers to the time when abnormal ECG appeared for the first time from normal ECG manifestations, and the duration of arrhythmia is the sum of all arrhythmia time. [#] $P < 0.05$ ^{##} $P < 0.01$ vs model group.

3.1.2 各组大鼠心律失常评分 如图 1 所示，与对照组比较，模型组大鼠出现持续性室速、室颤等异常心电图情况明显增多，心律失常评分大幅增加 ($P < 0.01$)，进一步提示模型复制成功；与模型组比较，胺碘酮组和稳心颗粒中、高剂量组大鼠心律失常评分明显降低 ($P < 0.05$ 、 0.01)，稳心颗粒低剂量组心律失常评分无显著变化，提示稳心颗粒具有明确的抗心律失常作用，且其作用呈现一定的剂量相关性。

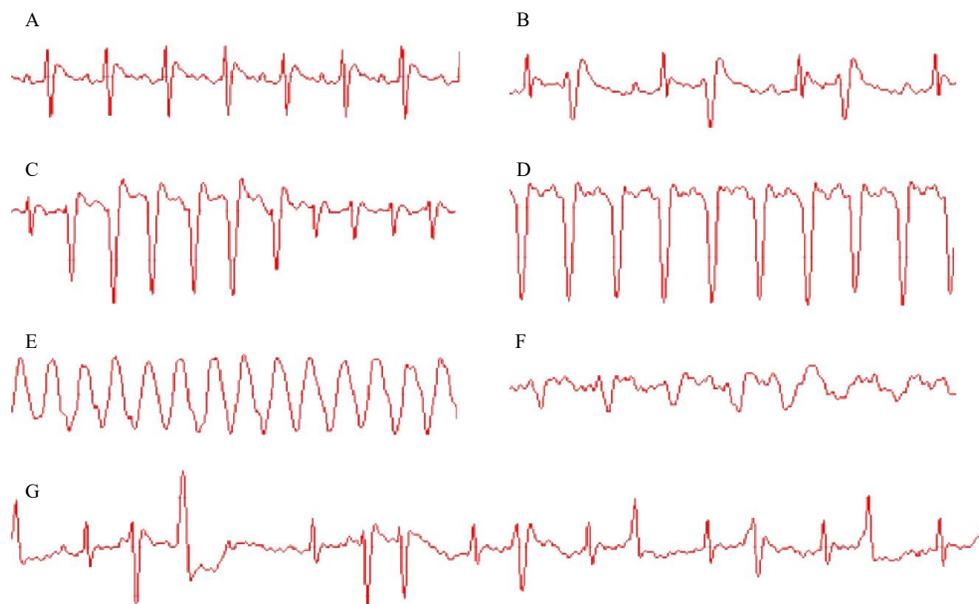
3.1.3 典型心电图表现 各组大鼠在尾 iv 乌头碱之前，心电图均无明显异常；在尾 iv 乌头碱后，均不同程度出现各种类型的心律失常，图 2 所示的心电表现各组均有出现，其中最常见的是各类室性期前收缩，包括单发室早、多源性室早、二联律等；其次为室性心动过速，包括短阵室速和持续性室速；此外，室扑与室颤也有出现，大部分出现持续性室



与对照组比较：^{**} $P < 0.01$ ；与模型组比较：[#] $P < 0.05$ ^{##} $P < 0.01$ ，下同。

^{**} $P < 0.01$ vs control group; [#] $P < 0.05$ ^{##} $P < 0.01$ vs model group, same as below figures.

图 1 各组大鼠心律失常评分 ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)
Fig. 1 Arrhythmia score of rats in each group ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)



A-正常心电图; B-室性早搏二联律; C-阵发性室速; D-持续性室速; E-室扑; F-室颤; G-多源性室早。
 A-normal electrocardiogram; B-ventricular premature beat duplex; C-paroxysmal ventricular tachycardia; D-persistent ventricular tachycardia;
 E-ventricular flutter; F-ventricular fibrillation; G-multifocal premature ventricular beats.

图 2 各种类型心电表现

Fig. 2 Various types of ECG manifestations

颤的大鼠最后均死亡（模型组死亡 3 只，胺碘酮组和稳心颗粒中、高剂量组各死亡 1 只）。

3.2 稳心颗粒对心律失常大鼠心肌组织病理形态学的影响

HE 染色结果如图 3 所示，采用高倍光镜观察各组大鼠心肌组织 HE 染色后所示的病理情况，细胞核呈蓝色，细胞质、肌纤维呈红色。其中，对照组心肌组织形态结构完整，心肌细胞排列紧密、层次清晰，胞核与胞质边缘分明，心肌细胞胞质、核

染色均匀，未见明显心肌细胞坏死及炎症细胞浸润。模型组心肌组织结构破坏，心肌细胞层次及轮廓模糊，心肌纤维排列紊乱伴肿胀和断裂，可见较多炎症细胞浸润及散在小灶性及条索状变性、坏死。胺碘酮和稳心颗粒中、高剂量干预后，可减轻炎症细胞浸润，染色结果显示心肌组织形态结构较为完整，但稳心颗粒低剂量组心肌组织形态结构欠佳，心肌纤维排列紊乱伴断裂，可见散在炎症细胞浸润。

Masson 染色结果如图 4 所示，对照组心肌组织

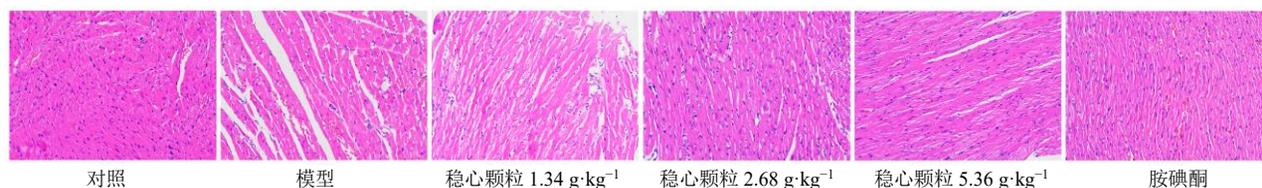


图 3 各组大鼠心肌组织 HE 染色 (×200)

Fig. 3 HE staining of myocardial tissue in each group of rats (× 200)

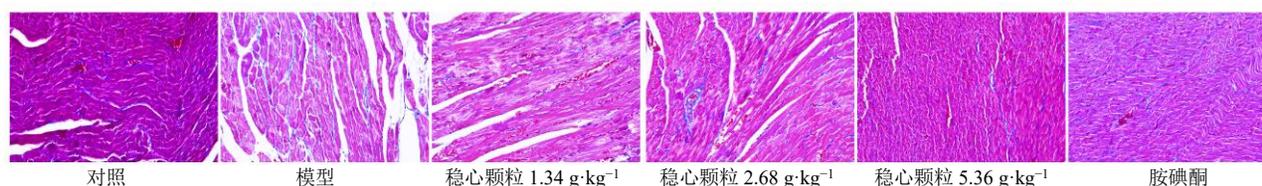


图 4 各组大鼠心肌组织 Masson 染色 (×200)

Fig. 4 Masson staining of myocardial tissue in each group of rats (× 200)

染色均匀，心肌肌束排列均匀。模型组心肌组织着色较浅而不均，心肌组织排列紊乱，心肌肌束可见一定程度的增宽，细胞间质可见较多的蓝色胶原纤维沉积。各给药组心肌组织形态结构均有不同程度的改善，胶原纤维沉积有一定减少，其中以胺碘酮组和稳心颗粒高剂量组效果最为明显。

3.3 稳心颗粒对心律失常大鼠离子通道蛋白 RYR2 表达的影响

如图 5 所示，与对照组比较，模型组大鼠心肌组织 RYR2 蛋白表达水平显著升高 ($P < 0.01$)；与模型组比较，各给药组 RYR2 蛋白表达水平均显著降低 ($P < 0.01$)，其中胺碘酮组和稳心颗粒高剂量组 RYR2 蛋白表达水平更趋向于对照组。根据大鼠心电和离子通道蛋白 RYR2 的表达改变，并结合心肌组织病理情况，提示心律失常模型复制成功，且

药物干预确有疗效。

3.4 稳心颗粒对心律失常大鼠氧化应激水平的影响

如表 2 所示，与对照组比较，模型组大鼠血清中 SOD 活性显著降低 ($P < 0.01$)，MDA 水平显著升高 ($P < 0.01$)；与模型组比较，胺碘酮组和稳心颗粒高剂量组大鼠血清中 SOD 活性明显升高 ($P < 0.01$)，MDA 水平显著降低 ($P < 0.05$)；稳心颗粒中剂量组有升高 SOD、降低 MDA 含量的趋势，但无统计学意义。血清中 GSH 水平结果显示，模型组较对照组减少，且经过胺碘酮或稳心颗粒干预后有升高趋势，但各组间含量变化无统计学差异。

3.5 稳心颗粒对心律失常大鼠血清炎症因子水平的影响

如表 3 所示，与对照组比较，模型组大鼠血清

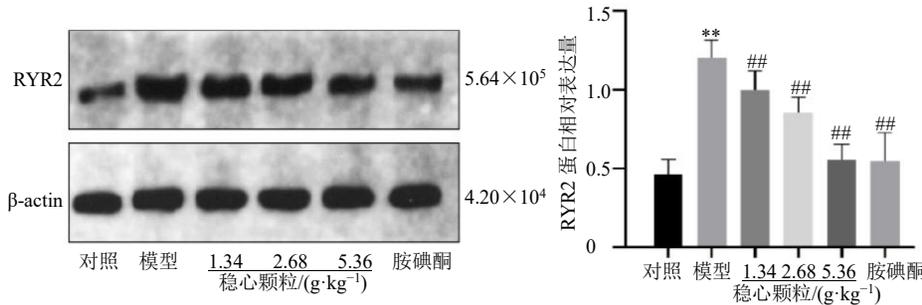


图 5 各组大鼠心肌组织 RYR2 蛋白表达 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Fig. 5 RYR2 protein expression in myocardial tissue of rats in each group ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

表 2 各组大鼠血清中 SOD 活性及 MDA、GSH 水平 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 2 SOD activity and MDA, GSH levels in serum of rats in each group ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	SOD/(ng·mL ⁻¹)	MDA/(nmol·L ⁻¹)	GSH/(ng·L ⁻¹)
对照	—	132.85 ± 10.46	2.16 ± 0.38	317.57 ± 22.89
模型	—	116.70 ± 8.43**	2.65 ± 0.38**	296.57 ± 60.92
稳心颗粒	1.34	119.29 ± 12.10	2.68 ± 0.26	302.85 ± 29.77
	2.68	123.98 ± 5.83	2.55 ± 0.28	305.85 ± 24.38
	5.36	129.95 ± 7.57##	2.27 ± 0.29#	310.22 ± 26.28
胺碘酮	0.035 7	128.57 ± 7.88##	2.31 ± 0.23#	306.95 ± 20.18

与对照组比较：** $P < 0.01$ ；与模型组比较：# $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ ，表 3 同。

** $P < 0.01$ vs control group; # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ vs model group, same as below Table 3.

表 3 各组大鼠血清中炎症因子水平 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 3 Levels of inflammatory factors in serum of rats in each group ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	IL-18/(ng·L ⁻¹)	IL-1β/(ng·L ⁻¹)	TNF-α/(ng·L ⁻¹)
对照	—	88.42 ± 5.03	52.15 ± 3.02	152.63 ± 13.28
模型	—	100.96 ± 6.48**	59.95 ± 3.85**	206.20 ± 10.10**
稳心颗粒	1.34	96.29 ± 9.33	56.17 ± 3.30	198.18 ± 19.24
	2.68	94.93 ± 3.94	56.22 ± 3.48	189.25 ± 28.26
	5.36	94.02 ± 5.64#	54.00 ± 3.81##	173.02 ± 19.97#
胺碘酮	0.035 7	93.35 ± 7.94#	52.79 ± 5.98##	173.54 ± 31.04#

中 IL-18、IL-1 β 、TNF- α 水平明显升高 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 胺碘酮组和稳心颗粒高剂量组大鼠血清中 IL-18、IL-1 β 、TNF- α 水平均明显降低 ($P < 0.05$ 、 0.01); 稳心颗粒低、中剂量组有一定的降低血清中 IL-18、IL-1 β 、TNF- α 水平的趋势, 但其含量变化无统计学意义。

3.6 稳心颗粒对心律失常大鼠心肌组织 NLRP3、TLR4 蛋白表达的影响

如图 6 所示, 与对照组比较, 模型组大鼠心肌组织 NLRP3、TLR4 蛋白表达水平均显著升高 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 胺碘酮组和稳心颗粒中、高

剂量组大鼠心肌组织 NLRP3、TLR4 蛋白表达水平明显降低 ($P < 0.01$), 稳心颗粒低剂量组 TLR4 蛋白表达水平明显降低 ($P < 0.05$)。

3.7 稳心颗粒对心律失常大鼠心肌细胞凋亡的影响

如图 7 所示, 与对照组比较, 模型组大鼠心肌细胞凋亡率显著升高 ($P < 0.01$); 经过药物干预后, 大鼠心肌细胞凋亡率均有不同程度的降低, 且稳心颗粒各组表现出剂量相关性疗效, 其中胺碘酮组、稳心颗粒高剂量组与模型组之间的差异有统计学意义 ($P < 0.05$ 、 0.01)。

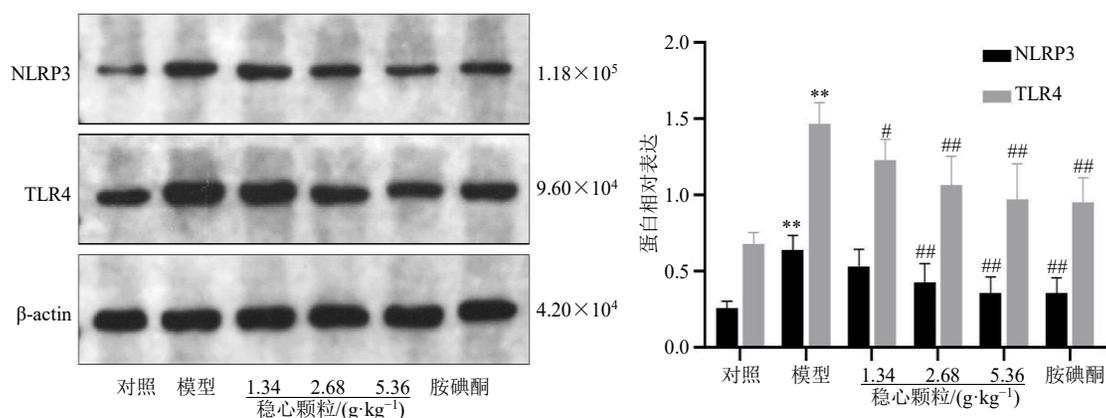
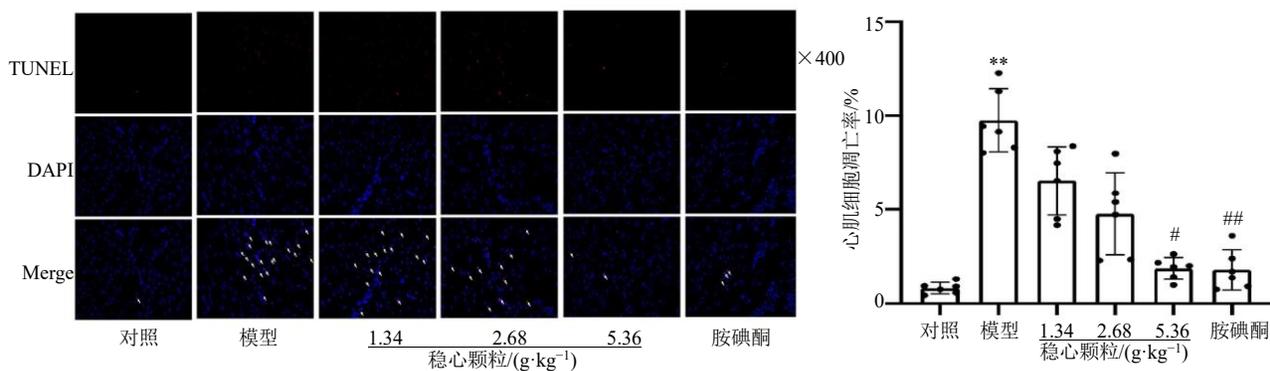


图 6 各组大鼠心肌组织 NLRP3、TLR4 蛋白表达 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Fig. 6 NLRP3 and TLR4 protein expressions in myocardial tissue of rats in each group ($\bar{x} \pm s, n = 6$)



白色箭头为凋亡阳性细胞。

White arrow represents apoptosis positive cells.

图 7 各组大鼠心肌组织 TUNEL 染色 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Fig. 7 TUNEL staining of myocardial tissue of rats in each group ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

如图 8 所示, 与对照组比较, 模型组大鼠心肌组织 Bax 蛋白表达水平显著升高 ($P < 0.01$), Bcl-2 蛋白表达水平显著降低 ($P < 0.01$), Bax/Bcl-2 值显著升高 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 胺碘酮组和稳心颗粒中、高剂量组大鼠心肌组织 Bax 蛋白表达

水平显著降低 ($P < 0.01$), Bcl-2 蛋白表达水平显著升高 ($P < 0.01$), 各给药组大鼠心肌组织 Bax/Bcl-2 值显著降低 ($P < 0.01$)。表明稳心颗粒可抑制心律失常大鼠心肌细胞凋亡, 与 TUNEL 染色结果一致。

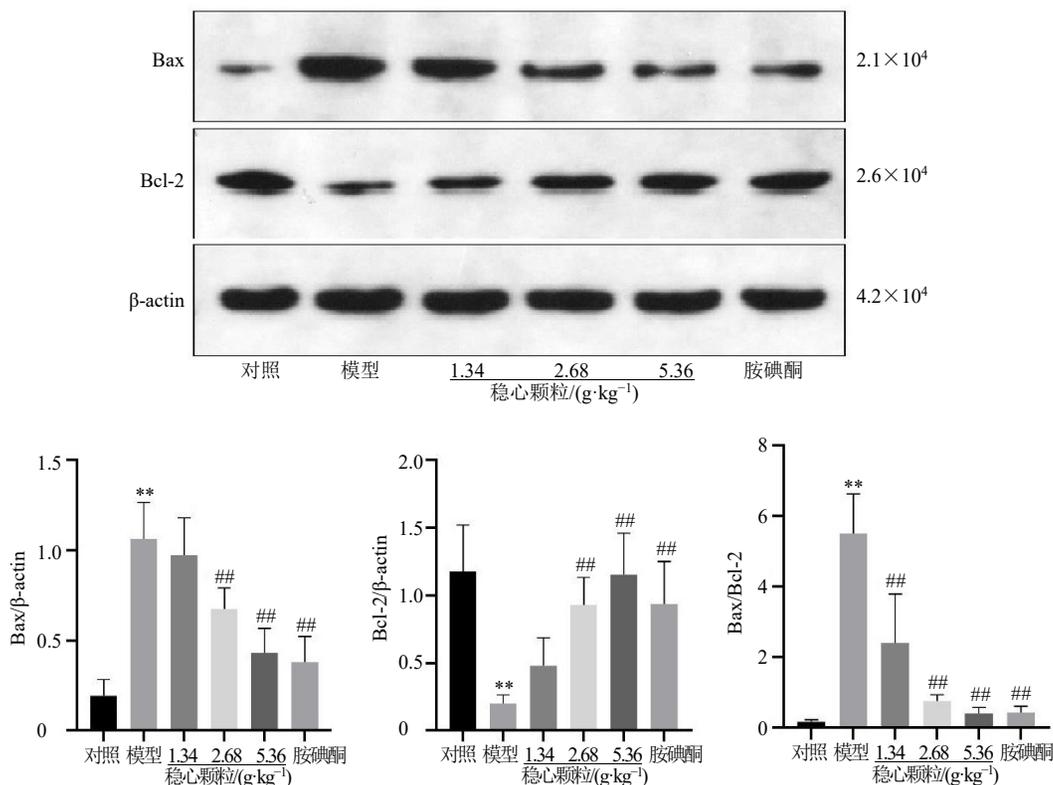


图 8 各组大鼠心肌组织 Bax、Bcl-2 蛋白表达 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)
 Fig. 8 Bax and Bcl-2 protein expressions in myocardium of rats in each group ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

4 讨论

4.1 稳心颗粒防治心律失常效果显著

稳心颗粒收载于《中国药典》2020 年版、《国家基本药物目录》《国家基本医疗保险、工伤保险和生育保险药品目录》，传承了炙甘草汤补益气阴、阴阳兼顾的组方原则，由现代医学及药理学等技术与临床经验方相结合研制而成。其由党参、黄精、三七、琥珀、甘松 5 味中药组成，党参、黄精性甘平，补脾气而润心肺，相佐以益气生血；三七、琥珀活血化瘀而安神定痛；再以甘松之甘温，开郁散滞，气血得以兼行。全方君臣佐使相得益彰，益气活血、补而不滞，共奏益气养阴、定悸复脉、活血化瘀之功，气血畅行而心悸自止。

稳心颗粒可以增加冠状动脉血流量，减少心肌耗氧量，增强心肌顺应性，改善心肌耐缺氧能力，减轻心脏前后负荷，减少心律失常的发生^[16]。尤其是在防治心律失常方面，稳心颗粒发挥着重要作用。研究表明，稳心颗粒可以减少心室颤动的发生率和室性心动过速发作的次数，改善心律失常的严重程度^[17]。在离体豚鼠心脏模型中，奎尼丁快速灌注可改变心率并延长 Q-T 间期，而稳心颗粒预处理可显

著缩短 QRS 和 Q-T 间期以改善心电图表现^[18-19]。此外，稳心颗粒还通过降低炎症因子及下调炎症相关基因的表达而表现出抗炎特性^[20]。如党参多糖可有效抑制巨噬细胞中丝裂原活化蛋白激酶（mitogen-activated protein kinase, MAPK）和核因子- κ B（nuclear factor- κ B, NF- κ B）炎症信号通路的激活，并可显著下调炎性细胞因子 TNF- α 和 IL-1 β 的分泌^[21]；党参弱极性部分中三萜及甾醇类化合物在抗炎中起到重要作用^[22]；人参皂苷 Rg₁ 通过抑制过氧化体增殖物激活型受体 γ （peroxisome proliferator-activated receptor γ , PPAR γ ）介导的炎症反应来改善大鼠心肌缺血再灌注后心律失常^[23]；人参皂苷 Rg₁ 及三七总皂苷能抑制多种炎症因子的分泌，减轻心肌缺血再灌注损伤^[24]；三七皂苷 R₁ 有助于减轻氧化应激反应，降低缺血/再灌注损伤引起的心律失常^[25]；三七多糖可以降低炎症因子水平^[26]；黄精多糖可通过调控 RAW264.7 细胞 TNF- α /IL-6/诱导型一氧化氮合酶（inducible nitric oxide synthase, iNOS）信号通路的表达，发挥免疫调节作用^[27]。本研究结果显示，稳心颗粒可以有效缩短大鼠心律失常持续时间、降低心律失常评分，显著改善心电图表现，

具有明确的抗心律失常作用，基于现有研究所显示稳心颗粒的抗炎特性，从凋亡、炎症及氧化应激的角度探索其抗心律失常机制，对于稳心颗粒的临床运用及心律失常的防治均具有重要意义。

4.2 抑制凋亡、炎症及氧化应激可能是稳心颗粒抗心律失常的重要机制

胺碘酮抗心律失常谱广，临床运用广泛，且许多研究显示其在抑制凋亡^[28-29]、抗氧化应激^[28,30-31]及减轻机体炎症反应^[30,32]方面具有一定的作用，故以此作为本研究的阳性对照药。

氧化应激是指当身体在代谢过程中产生的氧化物，包括 ROS 和活性氮（reactive nitrogen species, RNS）超过身体细胞的内源或外源抗氧化物的结果。炎症和氧化应激是互相影响的，且越来越多的研究表明炎症和氧化应激与心血管疾病是因果关系^[33-34]。MDA 是脂质过氧化产物，常用来反映脂质过氧化水平，是氧化应激的标志物。SOD 是一种重要的抗氧化酶，能使氧自由基产生歧化反应，生成氧分子和过氧化氢分子。本研究结果显示，稳心颗粒干预后能有效升高 SOD 活性、降低 MDA 含量，提示其具有一定的抗氧化应激作用。SOD 减少将导致氧化应激升高，使线粒体中 ROS 生成和抗氧化能力失衡，最终导致线粒体氧化损伤。当线粒体功能受损后，线粒体中 ROS 水平会增加，对细胞凋亡的敏感性也会增强，从而导致炎症出现及凋亡异常，同时 NLRP3 炎症小体也会由此而被激活。NLRP3 炎症小体是目前研究最充分的炎症小体之一，并已被证明可以促进促炎细胞因子的产生。本研究中，与模型组比较，稳心颗粒中、高剂量组能显著降低心肌组织 NLRP3 蛋白表达水平，说明稳心颗粒可以有效降低氧化应激水平、减轻炎症反应。当 NLRP3 炎症小体启动后，又会促使致炎症细胞因子 IL-1 β 和 IL-18 的大量分泌。IL-1 β 在介导免疫反应以及刺激巨噬细胞增加炎症细胞因子的表达方面发挥作用；IL-18 能调节炎症级联反应；TNF- α 可诱导炎症和各种细胞因子的释放。本研究中，胺碘酮组和稳心颗粒高剂量组均能有效降低血清中 IL-18、IL-1 β 和 TNF- α 水平，与 Western blotting 结果所示的 NLRP3 表达降低相印证。TLR4 是 TLR 家族的成员，该家族在病原体识别和先天免疫激活中起着基本作用，同时 TLR4 的激活也会进一步促进 NLRP3 的表达。研究表明，TLR4 可与髓样分化蛋白 88 结合，激活胞内转导通路，促进 NF- κ B、JNK 等多种转导通路

表达参与细胞凋亡、炎症反应等生理过程^[35]。本研究结果显示，稳心颗粒各剂量组均可不同程度地降低 TLR4 表达水平，在炎症及凋亡的上游水平发挥了其抑制作用。

凋亡又称为程序性细胞死亡，在此过程中机体能清除衰老及异常细胞，并在维持很多细胞功能方面有重要作用，但是因各种原因导致的凋亡异常则会导致细胞大量死亡并可能引发炎症级联反应。促凋亡和抑制凋亡 2 类最典型的蛋白分别是 Bax 和 Bcl-2，Bax/Bcl-2 的比值被认为是细胞凋亡的可靠指标。本研究中模型组 Bax/Bcl-2 值显著升高；胺碘酮组和稳心颗粒高剂量组 Bax/Bcl-2 值低，趋向于对照组的表达情况，提示凋亡情况降低。TUNEL 染色显示模型组凋亡水平升高，胺碘酮组和稳心颗粒高剂量组能明显降低凋亡水平，接近于对照组，与 Western blotting 结果一致。异常的心肌细胞凋亡也会在一定程度上促进心肌纤维化的发生发展。心脏纤维化是心脏对多种损伤的常见反应，在心脏纤维化过程中，过多的胶原沉积和细胞外基质的堆积导致心肌顺应性下降，电传导也受到影响，进一步导致心律失常^[36]，并且纤维化发生会诱导更多的炎症因子释放，会进一步加重纤维化的过程^[37]。在本研究中，包括模型组在内的各组大鼠 Masson 染色所示的心肌纤维化程度总体而言不高，这可能与心律失常大鼠的急性造模方式有关，心肌组织无法在短时间内出现大量纤维化病变。但相对而言，模型组心肌排列紊乱，纤维化范围增多；胺碘酮组和稳心颗粒高剂量组能在一定程度上减轻心肌纤维化程度。

现有的许多关于稳心颗粒作用机制的研究，亦关注了凋亡、炎症及氧化应激等方面^[38]，但多为侧重某一方面，本研究不仅关注了这 3 方面的病理变化，更是将三者进行了病理串话。氧化应激可诱导细胞凋亡，激发机体防御性炎症反应，产生更多炎症因子；炎症因子又促进氧自由基的大量产生^[39-40]。氧化应激与凋亡、炎症反应等不是简单的先后发生关系，而是互相影响进而形成恶性循环，逐渐加剧心肌细胞损伤，导致心肌组织结构损坏及电信号传导异常。而稳心颗粒可抑制心肌细胞凋亡、减轻炎症反应和氧化应激，打破三者所串扰的连锁反应，缓解心肌细胞和组织的病理损伤，以发挥其抗心律失常作用。稳心颗粒现不仅用于心律失常，还用于冠心病、心力衰竭等多种心血管疾病。凋亡、炎症及氧化应激是包括心血管疾病在内的多种疾病的基本

病理改变,对稳心颗粒该方面的机制探索,乃是追本溯源之举,亦符合中医“异病同治”的理念。本研究中,稳心颗粒的作用也呈现一定的剂量相关性,高剂量组疗效最好,中剂量组对部分指标也有一定的改善作用,未来还需对稳心颗粒使用的最佳剂量进一步研究。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

[1] 葛均波,徐永健.内科学[M].第8版.北京:人民卫生出版社,2013:177-203.

[2] Nattel S, Harada M. Atrial remodeling and atrial fibrillation: Recent advances and translational perspectives [J]. *J Am Coll Cardiol*, 2014, 63(22): 2335-2345.

[3] Kumar S, Sivagangabalan G, Thiagalingam A, et al. Effect of reperfusion time on inducible ventricular tachycardia early and spontaneous ventricular arrhythmias late after ST elevation myocardial infarction treated with primary percutaneous coronary intervention [J]. *Heart Rhythm*, 2011, 8(4): 493-499.

[4] 于立鹏,杨志明.急性心肌梗死后缺血再灌注性心律失常发病机制及预防的研究进展 [J]. *实用医学杂志*, 2016, 32(9): 1536-1537.

[5] 唐正香.稳心颗粒联合美托洛尔治疗冠心病合并室性心律失常的系统评价 [J]. *中西医结合心血管病电子杂志*, 2019, 7(3): 146-147.

[6] 姜威锋,宋俊钢,张韦琳.稳心颗粒联合决奈达隆治疗老年阵发性房颤的疗效观察 [J]. *现代药物与临床*, 2020, 35(10): 2023-2027.

[7] 何颖,刘莹,邹爱英.稳心颗粒治疗心律失常的 Meta 分析 [J]. *中草药*, 2014, 45(15): 2277-2282.

[8] 胡影,冯玲,李平,等.稳心颗粒治疗功能性早搏随机对照试验的系统评价与 Meta 分析 [J]. *海南医学院学报*, 2021, 27(1): 36-45.

[9] 岳修宇.稳心颗粒联合胺碘酮治疗冠心病心律失常疗效观察 [J]. *实用中西医结合临床*, 2018, 18(10): 65-66.

[10] 李玉芬,金燕,孙海燕.步长稳心颗粒治疗室性期前收缩 100 例 [J]. *临床心血管病杂志*, 2003, 19(12): 751.

[11] Wu X Q, Liu Z M, Yu X Y, et al. Autophagy and cardiac diseases: Therapeutic potential of natural products [J]. *Med Res Rev*, 2021, 41(1): 314-341.

[12] 曹瑀莹,李劭恒,袁硕,等.人参抗心律失常作用机制的研究进展 [J]. *中草药*, 2021, 52(10): 3157-3166.

[13] 樊博雅,李晓凤,邓芳隽,等.基于 cAMP 与钙信号通路探讨交泰丸干预快速性心律失常作用机制 [J]. *辽宁中医药大学学报*, 2023, 25(10): 10-15.

[14] 何阳,李福森,陆俊鸿,等.红景天苷对大鼠缺血再灌注心律失常及心肌Cx43的影响 [J/OL]. *沈阳药科大学*

学报, (2023-02-22) [2023-11-16]. <https://doi.org/10.14066/j.cnki.cn21-1349/r.2022.1056>.

[15] Walker M J, Curtis M J, Hearse D J, et al. The Lambeth Conventions: Guidelines for the study of arrhythmias in ischaemia infarction, and reperfusion [J]. *Cardiovasc Res*, 1988, 22(7): 447-455.

[16] Chen Y, Nie S P, Gao H, et al. The effects of Wenxin Keli on P-wave dispersion and maintenance of sinus rhythm in patients with paroxysmal atrial fibrillation: A meta-analysis of randomized controlled trials [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2013, 2013: 245958.

[17] Minoura Y, Panama B K, Nesterenko V V, et al. Effect of Wenxin Keli and quinidine to suppress arrhythmogenesis in an experimental model of Brugada syndrome [J]. *Heart Rhythm*, 2013, 10(7): 1054-1062.

[18] Xue X L, Guo D L, Sun H M, et al. Wenxin Keli suppresses ventricular triggered arrhythmias via selective inhibition of late sodium current [J]. *Pacing Clin Electrophysiol*, 2013, 36(6): 732-740.

[19] Wang T Y, Lu M, Du Q Q, et al. An integrated anti-arrhythmic target network of compound Chinese medicine Wenxin Keli revealed by combined machine learning and molecular pathway analysis [corrected] [J]. *Mol Biosyst*, 2017, 13(5): 1018-1030.

[20] Tian G H, Sun Y, Liu S, et al. Therapeutic effects of Wenxin Keli in cardiovascular diseases: An experimental and mechanism overview [J]. *Front Pharmacol*, 2018, 9: 1005.

[21] 巩志国,赵佳敏,顾柏臣,等.基于网络药理学分析党参减轻大肠杆菌感染小鼠急性肺损伤的作用机制 [J]. *畜牧兽医学报*, 2023, 54(8): 3571-3581.

[22] 徐旭.党参弱极性成分分析及其抗炎谱效关系研究 [D]. 兰州:兰州大学,2023.

[23] 韩志龙,王静,王连友,等.基于 PPAR- γ 探讨人参皂苷 Rg₁ 对大鼠心肌缺血再灌注后心律失常的调节作用 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2019, 27(7): 587-592.

[24] 成万华,杨晓雪,李付强.三七的活性成分抗心律失常作用机制的研究进展 [J]. *环球中医药*, 2023, 16(4): 796-801.

[25] Yu Y, Sun G, Luo Y, et al. Cardioprotective effects of notoginsenoside R₁ against ischemia/reperfusion injuries by regulating oxidative stress-and endoplasmic reticulum stress-related signaling pathways [J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 21730.

[26] 郑子淳,吕碧君,管琦,等.探究三七多糖对 COPD 大鼠肺部巨噬细胞极化及炎症的影响 [J]. *辽宁中医药大学学报*, 2023, 25(11): 46-51.

[27] 杜青,陈林,贺炜,等.黄精多糖对 RAW264.7 细胞活

- 性及炎症因子 TNF- α 、IL-6、iNOS 表达的影响 [J]. 中成药, 2022, 44(8): 2676-2679.
- [28] 刘晓瑜, 顾民华, 徐煜凌, 等. 定心方 I 号方通过调控 GSK3 β /Nrf2/HO-1 通路防治大鼠心肌缺血再灌注损伤的机制研究 [J]. 中药新药与临床药理, 2020, 31(11): 1265-1270.
- [29] 程何祥, 王海昌, 张荣庆, 等. 胺碘酮对外源性羟自由基诱导心肌细胞凋亡的影响 [J]. 中国老年学杂志, 2003, 23(11): 782-784.
- [30] Polat B, Cadirci E, Halici Z, *et al.* The protective effect of amiodarone in lung tissue of cecal ligation and puncture-induced septic rats: A perspective from inflammatory cytokine release and oxidative stress [J]. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 2013, 386(7): 635-643.
- [31] Ide T, Tsutsui H, Kinugawa S, *et al.* Amiodarone protects cardiac myocytes against oxidative injury by its free radical scavenging action [J]. *Circulation*, 1999, 100(7): 690-692.
- [32] 刘斌, 王霞, 唐兵梅, 等. 胺碘酮联合阿替普酶溶栓治疗老年急性心肌梗死的临床观察 [J]. 中国老年学杂志, 2020, 40(2): 240-243.
- [33] 刘济玮, 周立君. NLRP3 炎症小体在心血管疾病中的作用的研究进展 [J]. 心血管康复医学杂志, 2023, 32(5): 545-548.
- [34] 张慧, 董晋, 唐璐, 等. 依洛尤单抗联合阿托伐他汀早期干预对急性冠脉综合征病人血脂、炎症介质和氧化应激的影响 [J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2023, 21(18): 3414-3417.
- [35] 樊帅帅, 宋磊军, 蔺聪. 异氟醚通过 TLR4/JNK 信号通路干预心肌梗死大鼠室性心律失常的作用机制研究 [J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2023, 21(11): 1989-1996.
- [36] Donekal S, Venkatesh B A, Liu Y C, *et al.* Interstitial fibrosis, left ventricular remodeling, and myocardial mechanical behavior in a population-based multiethnic cohort: The multi-ethnic study of atherosclerosis (MESA) study [J]. *Circ Cardiovasc Imaging*, 2014, 7(2): 292-302.
- [37] Hinderer S, Schenke-Layland K. Cardiac fibrosis—A short review of causes and therapeutic strategies [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2019, 146: 77-82.
- [38] 齐贵彬, 高健步. 稳心颗粒对病毒性心肌炎的疗效及对抗氧化指标的影响 [J]. 中药材, 2018, 41(6): 1489-1491.
- [39] Wang C, Sun H R, Song Y, *et al.* Pterostilbene attenuates inflammation in rat heart subjected to ischemia-reperfusion: Role of TLR4/NF- κ B signaling pathway [J]. *Int J Clin Exp Med*, 2015, 8(8): 14565.
- [40] 张晓凤, 代杰, 祁文祎. SNHG14 调控 miR-181b 对 H₂O₂ 诱导的人脑微血管内皮细胞氧化应激和凋亡的影响 [J]. 中国老年学杂志, 2023, 43(20): 5048-5053.

[责任编辑 李亚楠]