

• 药理与临床 •

基于钙信号转导的稳心颗粒抗心律失常机制研究

钱舒乐¹, 赵虎成², 于 露³, 李晓凤⁴, 郭海珍⁴, 赵玉珂⁴, 王润英⁴, 丛紫东⁴, 杜武勋^{4*}

1. 天津中医药大学中医学院 天津 301617
2. 清华大学航天航空学院工程力学系生物力学与医学工程研究所 北京 100084
3. 徐州医科大学附属医院 江苏 徐州 221132
4. 天津中医药大学第二附属医院 天津 300250

摘要: **目的** 基于钙信号转导探讨稳心颗粒抗心律失常的可能作用机制。**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 ig 给药 21 d, 对照组和模型组 ig 纯水, 末次给药 1 h 后麻醉大鼠, 尾 iv 乌头碱以诱导心律失常。采用 RM6240 多道生理信号采集处理系统记录大鼠心电图表现, 并进行心电图参数分析。采用蛋白质免疫印迹法 (Western blotting, WB) 检测心肌组织钙/钙调蛋白依赖性蛋白激酶 II (calcium/calmodulin-dependent protein kinase II, CaMKII)、兰尼碱受体 2 (ryanodine receptor 2, RyR2) 和 L-型钙通道 (L-type calcium channel, LTCC) 的蛋白表达。采用瞬时转染方法将编码 LTCC ($\alpha 1d\delta$ 、 $\alpha 2\delta$ 、 $\beta 2\alpha$) 和绿色荧光蛋白 (green fluorescent protein, GFP) 的质粒共转染至人胚胎肾细胞 HEK293 上, 予以稳心颗粒含药培养液干预, 用钙离子荧光探针 (Fluo-4 AM) 检测细胞内钙离子浓度的变化、膜片钳技术检测细胞膜上 LTCC 电流变化。**结果** 尾 iv 乌头碱后大鼠出现心律失常, 与对照组比较, 模型组大鼠心率显著加快 ($P < 0.05$), 心律失常评分显著升高 ($P < 0.01$), CaMKII 和 RyR2 蛋白表达增加 ($P < 0.01$), LTCC 蛋白表达减少 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 稳心颗粒高剂量组和胺碘酮组心率显著减慢 ($P < 0.05$), 心律失常评分降低 ($P < 0.01$), CaMKII 和 RyR2 蛋白表达减少 ($P < 0.05$ 、 0.01), LTCC 蛋白表达增加 ($P < 0.05$ 、 0.01)。稳心颗粒在 0.78~12.50 g/L 对细胞的促增殖作用最强 ($P < 0.05$ 、 0.01); 稳心颗粒能增加 LTCC 电流峰值和电流密度, 导致电压依赖性通道激活曲线发生负向偏移、电压依赖性通道失活曲线发生正向偏移。**结论** 稳心颗粒可能通过影响钙信号转导相关蛋白表达并改变 L-型钙通道的门控动力学发挥抗心律失常效应。

关键词: 钙信号转导; 心律失常; 膜片钳; 稳心颗粒; 离子通道; 三七皂苷 R₁; 人参皂苷 Rg₁; 人参皂苷 Rb₁

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2025)03-0855-12

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2025.03.012

Research on antiarrhythmic mechanism of Wenxin Granules based on calcium signal transduction

QIAN Shule¹, ZHAO Hucheng², YU Lu³, LI Xiaofeng⁴, GUO Haizhen⁴, ZHAO Yuke⁴, WANG Runying⁴, CONG Zidong⁴, DU Wuxun⁴

1. College of Traditional Chinese Medicine, Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 301617, China
2. Institute of Biomechanics and Medical Engineering, Department of Engineering Mechanics, School of Aerospace Engineering, Tsinghua University, Beijing 100084, China
3. Affiliated Hospital of Xuzhou Medical University, Xuzhou 221132, China
4. Second Affiliated Hospital of Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300250, China

收稿日期: 2024-09-13

基金项目: 国家自然科学基金项目 (82004329); 天津市教委科研计划项目 (2024KJ020); 天津中医药大学新教师科研启动项目“雏鹰计划”项目 (KG240215); 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”(国中医药人教函 [2022] 75 号); 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, 从事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, 从事心血管疾病的临床与基础、五运六气理论与临床相关研究。
E-mail: cnduwux@163.com

Abstract: Objective To investigate the possible mechanism of anti-arrhythmic action of Wenxin Granules (稳心颗粒) based on calcium signal transduction. **Methods** In animal experiment, 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. The rats in each group were given continuous prophylactic administration for 21 d, and the control group and model group were given pure water. The rats were anesthetized 1 h after the last administration and injected with aconitine through the tail vein to induce arrhythmia. The electrocardiograph (ECG) performance of rats was recorded by RM6240 physiological signal acquisition and processing system, and the ECG parameters were analyzed. Western blotting (WB) was used to detect calcium/calmodulin-dependent protein kinase II (CaMKII), ryanodine receptor 2 (RyR2) and L-type calcium channel (LTCC) protein expression in myocardial tissue. In the cell experiment, the plasmid encoding LTCC ($\alpha 1\delta$, $\alpha 2\delta$, $\beta 2\alpha$) and green fluorescent protein (GFP) was transfected into HEK293 cells by transient transfection method and interfered with Wenxin Granules, the change of intracellular calcium ion concentration was detected by calcium ion fluorescence probe (Fluo-4 AM) and the change of LTCC current on cell membrane was detected by patch clamp technique. **Results** Arrhythmia occurred in rats after being injected with aconitine through the tail vein. Compared with the control group, the heart rate of the model group was faster ($P < 0.05$), the arrhythmia score was higher ($P < 0.01$), the expression of CaMKII and RYR2 protein was increased ($P < 0.01$), and the expression of LTCC protein was decreased ($P < 0.01$). Compared with model group, the heart rate of Wenxin Granules high-dose group and amiodarone group significantly slowed down ($P < 0.05$), arrhythmia score was decreased ($P < 0.01$), protein expressions of CaMKII and RYR2 decreased ($P < 0.05, 0.01$), and protein expression of LTCC increased ($P < 0.05, 0.01$). At the concentration of 0.78—12.50 g/L, Wenxin Granules had the strongest effect on cell proliferation ($P < 0.05, 0.01$). Wenxin Granules could increase the current peak value and current density of LTCC, resulting in negative deviation of voltage-dependent channel activation curve and positive deviation of voltage-dependent channel inactivation curve. **Conclusion** Wenxin Granules may exert antiarrhythmic effects by influencing the expression of calcium signal transduction related proteins and changing the gating dynamics of LTCC.

Key words: calcium signal transduction; arrhythmia; patch clamp; Wenxin Granules; ion channel; notoginsenoside R₁; ginsenoside Rg₁; ginsenoside Rb₁

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]。心肌细胞的正常工作有赖于各种跨膜离子流的协调运转,多种跨膜离子流的综合作用形成了心肌细胞的动作电位和静息电位。跨膜离子流异常,是导致心律失常最重要的因素。离子流的大小不仅取决于相应离子通道的数量,更与该离子通道的开放程度密切相关。钙离子(Ca²⁺)是心肌细胞内重要的信号分子,通过调节心脏正常节律和兴奋-收缩耦联,以维持心脏的正常机械收缩功能和心电生理稳定。稳心颗粒是获得国家批准的抗心律失常中成药,课题组前期研究发现其具有恢复心肌细胞Ca²⁺稳态的作用^[2],而钙信号转导又与心律失常密切相关。据此,本研究通过考察稳心颗粒对钙信号转导相关蛋白及离子通道门控动力学的影响,以探索稳心颗粒基于钙信号转导发挥抗心律失常作用的机制。

1 材料

1.1 动物与细胞株

SPF 级健康雄性 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。所有实验动物均饲养于环境温度(23±2)℃,湿度(35±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。本课题经过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)。

人胚肾 293 细胞(HEK293)由清华大学航天航空学院工程力学系生物力学与医学工程研究所赵虎成研究员馈赠。

1.2 药品与试剂

稳心颗粒(无糖型,5 g/袋,国药准字 Z10950026,批号 2307014,其中三七皂苷 R₁质量分数为 0.43 mg/g,人参皂苷 Rg₁质量分数为 1.14 mg/g,人参皂苷 Rb₁质量分数为 1.08 mg/g)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,质量分数 98%)购自宝鸡市辰光生物科技有限公司;乌拉坦(批号 Z11M12Y141466,质量分数 98%)购自上海源叶生物科技有限公司;兔抗钙/钙调蛋白依赖性蛋白激酶 II(calcium/calmodulin-dependent protein kinase II, CaMKII,批号 GR3290535-6)、兔单抗兰尼碱受体 2(ryanodine receptor 2, RyR2,批号 1016750-2)均购自英国 Abcam 公司;兔多抗钙电压门控通道亚基 $\alpha 1C$ (voltage-gated calcium channel subunit alpha1C, CACNA1C,批号 59v9215)购自

Affinity 公司; β -肌动蛋白 (β -actin, 批号 5402802) 购自北京艾博唯科技有限公司; HEK293 专用培养基 (批号 WH3723D213) 购自武汉普诺赛生命科技有限公司; 胰蛋白酶-EDTA 消化液 (含酚红, 批号 2311009)、 $1\times$ PBS 缓冲液 (批号 2312023) 均购自北京索莱宝科技有限公司; 细胞增殖-毒性检测试剂盒 (cell counting kit-8, CCK-8, 批号 23243457)、二甲基亚砜 (dimethyl sulfoxide, DMSO, 批号 23178714) 均购自北京兰杰柯科技有限公司; Opti-MEM 培养基 (批号 2537154) 购自美国 Gibco 公司; Lipofectamine-3000 转染试剂 (批号 2696953)、钙离子荧光探针 Fluo-4 AM (批号 2761148) 均购自美国 Invitrogen 公司; 嵌段式聚醚 F-127 (批号 1622774) 购自美国 Life Technologies 公司; DMEM 培养基 (批号 31222002)、Hank's 平衡盐溶液 (Hank's balanced salt solution, HBSS, 无钙镁, 批号 22519016) 均购自美国 CORNING 公司。4-羟乙基哌嗪乙磺酸 [4-(2-hydroxyethyl) piperazine-1-ethanesulfonic acid, HEPES, 批号 678389] 购自美国 MCE 公司; BaCl_2 (批号 20240806)、NaOH (批号 20230824)、CsOH (批号 20211105)、葡萄糖 (批号 231027) 均购自国药集团化学试剂有限公司; 四乙基氯化铵 (批号 2023-01-04)、四乙基氢氧化铵 (tetraethylammonium-OH, TEOH, 批号 2022-10-21) 均购自上海麦克林生化科技有限公司; NaCl (批号 OK20230805W)、KCl (批号 OK20230608H)、 CaCl_2 (批号 OK20240401E)、 MgCl_2 (批号 OK20240317U)、CsCl (批号 OK20231208Q)、乙二醇双 (2-氨基乙基醚) 四乙酸 (ethylene glycol bis (2-aminoethylether)- N,N,N',N' -tetraacetic acid, EGTA, 批号 OK20240328R) 均购自北京沃凯生物科技有限公司。MgATP (批号 A9187)、 Na_2GTP (批号 51120) 均购自美国 sigma-aldrich 公司。 N -[亚氨基(膦氨基)甲基]- N -甲基甘氨酸 (批号 P333235) 购自湖北汉达飞生物科技有限公司; 磷酸肌酸激酶 (creatine phosphokinase, CPK, 批号 E0048) 购自南京都莱生物技术有限公司; L-型钙通道质粒 ($\alpha 1\delta$ 、 $\alpha 2\delta$ 、 $\beta 2\alpha$) 及标记质粒绿色荧光蛋白 (green Fluorescence Protein, GFP) 由北京航空航天大学刘晓冬教授馈赠, 测序结果与目的基因一致。

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); MultiClamp 700B 型膜片

钳信号放大器、Digidata 1550B 型数模转换器 (美国 Axon 公司); MP-225 型电动显微操作仪、P-2000 型微电极拉制仪 (美国 SUTTER 公司); 倒置荧光显微镜 (日本 Olympus Corporation 公司); pClamp 10 软件 (美国 Molecular Devices 公司); 80-2 型台式低速离心机 (上海医疗器械公司医疗设备厂); SW-CJ-1FD 型超净工作台 (苏州净化设备有限公司); XD-101 型 CO_2 培养箱 (日本 SANYO 公司); Dragon 微量移液器 (德国 Sartorius 公司); AS220.X2 型分析天平 (波兰 Radwag 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 动物分组、造模与给药

60 只 SD 大鼠适应性饲养 1 周后, 随机均分为对照组、模型组及稳心颗粒低、中、高剂量 (1.34、2.68、5.36 g/kg) 组和胺碘酮组 (35.7 mg/kg), 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, 称定大鼠体质量, 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), 根据文献方法^[3]及预实验, 尾 iv 乌头碱 (40 $\mu\text{g/kg}$) 构建大鼠心律失常模型, 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。对照组大鼠尾 iv 生理盐水 (2 mL/kg)。

2.2 溶液配制

2.2.1 记录钙通道的细胞外液 (含 Ba^{2+}) 10 mmol/L BaCl_2 、140 mmol/L 四乙基氯化铵、10 mmol/L HEPES 和 20 mmol/L 葡萄糖, 用 TEOH 调节 pH 为 7.3, 渗透压为 310 mOsm/L。

2.2.2 台氏液 (Tyrode's solution) 130 mmol/L NaCl、2 mmol/L KCl、2 mmol/L CaCl_2 、2 mmol/L MgCl_2 、25 mmol/L HEPES 和 30 mmol/L 葡萄糖, 用 NaOH 调节 pH 为 7.3, 渗透压为 310 mOsm/L。

2.2.3 记录钙通道的电极内液 110 mmol/L CsCl、10 mmol/L EGTA、4 mmol/L MgATP、0.3 mmol/L

Na₂GTP、25 mmol/L HEPES、10 mmol/L *N*-(亚氨基[膦氨基] 甲基)-*N*-甲基甘氨酸和 20 U/mL CPK，用 CsOH 调节 pH 为 7.3，渗透压为 290 mOsm/L。

2.2.4 高钾溶液 37 mmol/L NaCl、90 mmol/L KCl、2 mmol/L CaCl₂、2 mmol/L MgCl₂、30 mmol/L 葡萄糖、25 mmol/L HEPES，用 NaOH 调节 pH 为 7.3，渗透压为 310 mOsm/L。

2.3 冻存细胞复苏

超净工作台紫外线照射 30 min，细胞间水浴锅提前预热至 37 ℃；液氮中取出装有 HEK293 细胞的冻存管，迅速放入水浴锅轻轻振荡至冻存液融化；用酒精棉球擦拭冻存管外部后，将细胞悬液转移至 15 mL 离心管中，1 000 r/min 离心 5 min 后弃上清；用新鲜培养基重悬细胞，接种至新的无菌培养器皿中，“十”字摇晃混匀后将培养皿转移至培养箱。

2.4 细胞传代培养

超净工作台进行使用前准备后，从培养箱取出细胞，弃去旧培养液，加入 1~2 mL PBS 洗涤；随后用预热至 37 ℃的胰蛋白酶-EDTA 消化液进行消化，当显微镜下观察可见胞质回缩、细胞间隙变大时，加入与胰酶等量的含血清培养基终止消化；用枪头反复吹打，使细胞从皿底脱离形成细胞悬液；收集细胞悬液，转移至 15 mL 离心管，1 000 r/min，5 min 离心后弃上清；加入新的培养基重悬，按照 1:3 传代，细胞“十”字摇晃混匀后于培养箱中培养。

2.5 L-型钙通道基因的转染

本研究采用瞬时转染的方法将重组 DNA 导入 HEK293 细胞，使目的基因获得短暂的高水平表达，使用 Lipofectamine-3000 将编码 L-型钙通道($\alpha 1\delta$ 、 $\alpha 2\delta$ 、 $\beta 2\alpha$) 和 GFP 的质粒共转染至 HEK293 细胞上。根据文献方法^[4]，加入目的基因表达质粒的量远高于表达 GFP 质粒的量，以保证表达 GFP 基因的细胞能够表达目的基因。转染后 24~72 h 内，进行 L-型钙通道电流检测，用于钙成像的细胞不转染 GFP。在转染前 1 d 下午进行细胞铺板，以第 2 天进行转染时细胞密度约 80%为宜。转染前，提前预热 HEK293 培养基和 Opti-MEM，并将质粒从 -20 ℃解冻、轻轻混匀。在 Opti-MEMTM Medium 中稀释 LipofectamineTM 3000 试剂，混匀得到混合物 ①：125 μ L Opti-MEMTM Medium + 3.75 μ L LipofectamineTM 3000 Reagent；在 Opti-MEMTM 培

养基中稀释 DNA，制备 DNA 的主混合物，然后加入 P3000TM试剂，轻轻吹打混匀后得到混合物②：125 μ L Opti-MEMTM Medium + 3.2 μ g DNA 质粒($\alpha 1\delta$ 质粒 2 μ g + $\alpha 2\delta$ 质粒 0.4 μ g + $\beta 2\alpha$ 质粒 0.4 μ g + GFP 质粒 0.4 μ g) + 6.4 μ L P3000TM Reagent (用于钙成像的细胞不转染 GFP，其他操作相同；质粒质量与 P3000TM Reagent 的体积为固定比值 1:2)。随后，将稀释后的 DNA 加入稀释后的脂质体试剂，即混合物②加入混合物①中，轻轻吹打混匀后得到混合物③，并在室温下孵育 10~15 min。孵育结束后，从培养箱取出细胞，用 Opti-MEMTM清洗 1 次，再加入 1~1.5 mL 新的 Opti-MEMTM。沿着培养皿侧壁向细胞中逐滴轻柔添加 DNA-脂质复合物(即混合物③)，轻轻混匀并放回培养箱。在 37 ℃下孵育细胞 24 h 后，按照细胞传代步骤进行分皿，尽可能使细胞成单个分散分布。所得到的细胞于转染后 72 h 内用于相关分析。

2.6 心电观察记录及参数分析

RM6240 多道生理信号采集处理系统连续记录乌头碱尾 iv 前后的大鼠心电图，观察室性期前收缩(premature ventricular beat, PVB)、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。设定尾 iv 乌头碱即刻开始每 5 min 为 1 段观察期，每 1 min 视为 1 次心电图记录，每个观察期内随机选取 2 次心电图记录的相应参数取平均值，每只大鼠随机选取 10 个观察期进行心电相关参数分析，其中心律失常评分取其心电表现最严重的一个观察期内对应的分数。心律失常评分以 Lambeth 会议标准为参考，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：室速持续时间不少于 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^[5-6]。

2.7 心肌组织 CaMKII、RyR2 和 CACNA1C 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 后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;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 ip 软件分析胶片灰度值。

2.8 细胞增殖与细胞毒性检测

取处于对数生长期的细胞,按照细胞传代的方法将其消化,离心后用完全培养基重悬并稀释成 2×10^4 个/mL 的细胞悬液,将细胞接种至 96 孔板,每孔细胞悬液 150 μ L,待细胞贴壁后,分别采用不同质量浓度 (0.39、0.78、1.56、3.13、6.25、12.5、25、50、100 g/L) 的稳心颗粒作用于细胞,每组 6 个复孔,对照组使用等量的完全培养基,药物干预 12 h 后,每孔加入 10 μ L CCK-8 溶液,孵育 45 min 后,使用酶标仪测定 450 nm 下吸光度 (A) 值,计算细胞存活率。

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

2.9 全细胞膜片钳记录

运用膜片钳技术记录细胞膜上 L-型钙通道的电流在稳心颗粒干预前后的变化情况,电流信号经膜片钳信号放大器、数模转换器和 pClamp 10 软件采集、保存及分析,调节参数至合适的数值,使玻璃电极灌注电极液后入水电阻为 3~4 M Ω 。通过倒置显微镜观察,用电动显微操作仪驱动微电极,电极入水前在电极腔内施加正压,当微电极尖端刚与细胞膜接触时放掉正压,稍加负压形成高阻密封。封接电阻达到 1 000 M Ω 时,便认为高阻封接形成。然后进行电极电容补偿,并用负压或高电压脉冲破膜。随后进行钙电流记录,使用信号放大器和 pClamp 10 软件进行全细胞膜片钳记录,整个记录过程中对电池电容和串联电阻 (<20 M Ω) 进行监测。信号以 2 kHz 进行滤波,采样频率为 10 kHz。电流-电压关系曲线的 L 型钙电流通过施加 -80~-100 mV 的测试脉冲来激发电流,持续时间为 40 ms,间隔 10 s 阶跃 5 mV。记录用药前后的钙电流变化情况。研究电压依赖性通道激活和失活,电流-电压曲线通过玻尔兹曼方程拟合。

$$I/I_{\max} = 1/[1 + \exp(V - V_{1/2})/k]$$

$I_{\max}$ 代表最大电流, $V_{1/2}$ 代表达到最大电流一半时的钳制电压 (半激活电压或半失活电压), k 代表曲线的斜率,即对膜电位的敏感程度

在 Clampfit 11.0.3 软件中将记录到的原始钙电流信号进行分析,使用 Excel、SPSS 27.0、Origin、GraphPad Prism8 等软件对数据进行统计分析 & 拟合绘图。全细胞膜片钳实验结果以通道电流密度数

值表示,电流密度为电流强度与膜电容的比值 (pA/pF),其中电流强度为实验所测量电流峰值,膜电容为实验中记录到的单个细胞电容值。

2.10 钙离子荧光探针记录 Ca^{2+} 浓度

通过钙离子荧光探针来记录细胞在稳心颗粒干预前后细胞内 Ca^{2+} 浓度的变化。进行 Fluo-4 储液的配制,即 Fluo-4 AM (50 μ g) + DMSO (9 μ L) + F-127 (9 μ L)。将储液稀释 1 000 倍作为 Fluo-4 工作液使用。从培养箱中取出细胞,将培养皿中原培养基弃去,加入 500~1 000 μ L Fluo-4 工作液,37 $^{\circ}$ C 孵育 20~30 min 后,将 Fluo-4 工作液弃去,用不含有钙、镁离子的 HBSS 溶液清洗 3 遍,每次 2~3 min,然后加入含钙的台式液作为记录溶液。最后将细胞转移至普通荧光显微镜下进行钙成像拍摄,激发光波长为 488 nm;用移液枪缓慢向培养皿内滴加稳心颗粒药液,使溶液中稳心颗粒终浓度达到指定浓度,拍摄记录下稳心颗粒干预前后细胞内 Ca^{2+} 荧光强度的变化过程。

2.11 统计学分析

用 SPSS 27.0 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-ones 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 T2 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

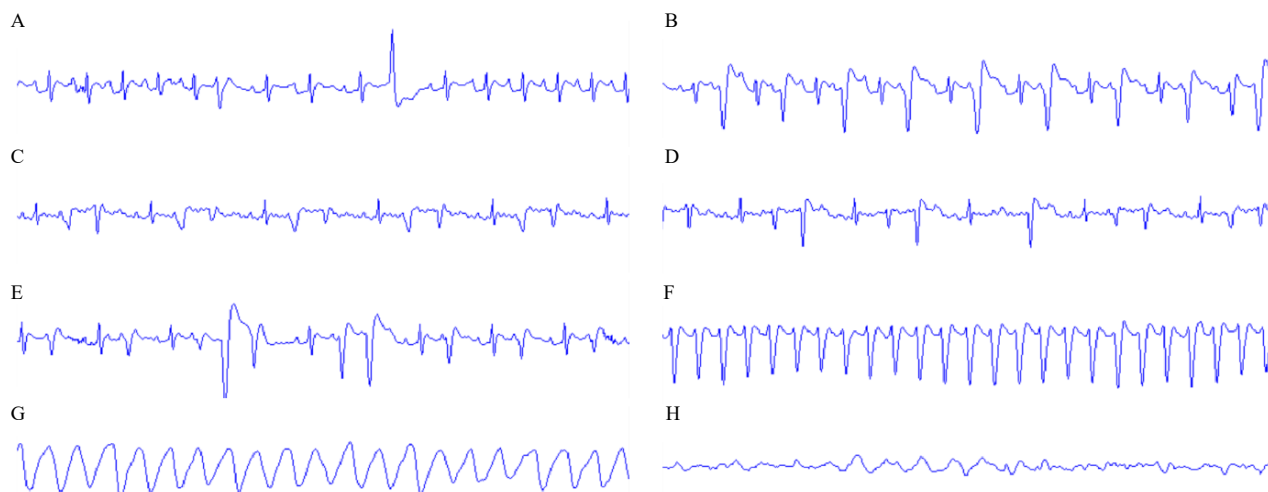
3.1 大鼠心电图表现及参数分析

各组大鼠在尾 iv 乌头碱前,心电图均无明显异常,心电图典型表现见图 1。在尾 iv 乌头碱后,各组大鼠均不同程度出现各种类型的心律失常 (图 2),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。尾 iv 乌头碱后,模型组和给药组均出现不同程度及频次的心律失常。对整体平均心率进行评估,如图 3 所示,模型组大鼠心率明显增快,提示室早、室速、室颤等心律失常的情况可能持续更久;稳心颗粒高剂量组和胺碘酮组大鼠的心率与之相比明显减慢 ($P < 0.05$),趋于对照组的心率;此外,对尾 iv 乌头碱后的心律失常首发时间和持续时间



图 1 大鼠尾 iv 乌头碱前典型心电图

Fig. 1 Typical electrocardiogram of rats before tail iv aconitine

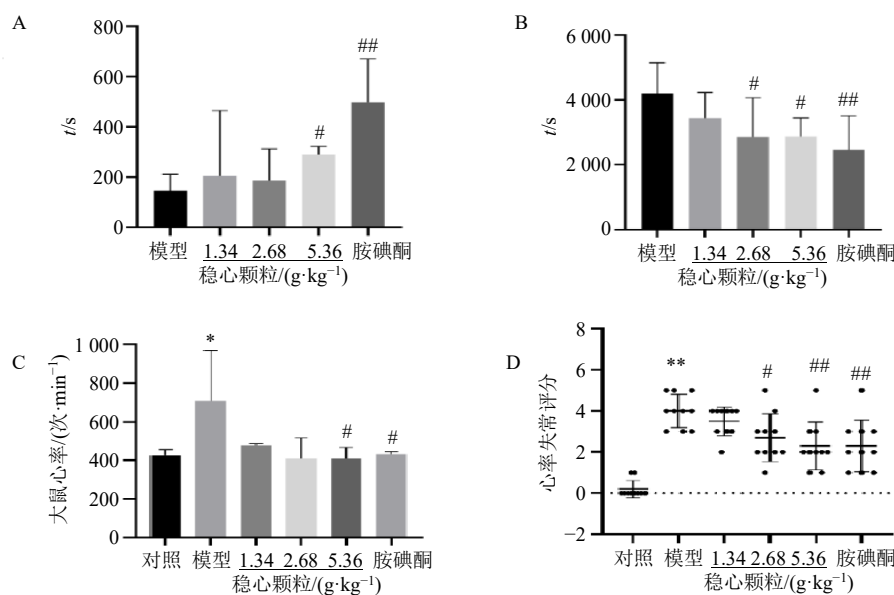


A-单发室早; B-室早二联律; C-成对的室早; D-多源性室早; E-短阵室速; F-持续性室速; G-室扑; H-室颤。

A-single premature ventricular contraction; B-ventricular premature beat duplex; C-paired ventricular premature beats; D-multifocal premature ventricular beats; E-paroxysmal ventricular tachycardia; F-persistent ventricular tachycardia; G-ventricular flutter; H-ventricular fibrillation.

图 2 大鼠尾 iv 乌头碱后典型心电图

Fig. 2 Typical electrocardiogram after tail iv aconitine in rats



A-心律失常出现时间 M (P25, P75); B-心律失常持续时间; C-各组大鼠心率情况 M (P25, P75); D-各组大鼠心律失常评分; 与对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$; 与模型组比较: # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$, 下图同。

A-time of first arrhythmia M (P25, P75); B-duration of arrhythmia; C-heart rate of rats in each group M (P25, P75); D-arrhythmia score of rats in each group; * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs control group; # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ vs model group, same as below figures.

图 3 各组大鼠心电图参数分析 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)Fig. 3 Analysis of ECG parameters in each group ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

进行分析发现,与模型组比较,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); 各组大鼠在尾 iv 乌头碱后,心律失常首次出现的时间差别无统计学意义,但稳心颗粒各剂量组和胺碘酮组心律失常出现的时间较模型组均呈现一定程度的延迟趋势;进一步对各组大鼠进行心律失常评分,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改变无统计学意义,提示稳心颗粒具有明确的抗心律失常作用,且其作用呈现剂量相关性^[7]。

3.2 对心律失常大鼠心肌组织 CaMKII、RyR2 和 CACNA1C 蛋白表达的影响

对 RyR2、L-型钙通道和影响多个离子通道的关键生物标志物 CaMKII 进行蛋白相对定量,如图 4 所示,与对照组比较,模型组和稳心颗粒低剂量组 RyR2 和 CaMKII 蛋白相对表达量显著增加 ($P<0.01$),CACNA1C 相对表达显著减少 ($P<0.01$);与模型组比较,稳心颗粒高剂量组和胺碘酮组可显著减少 CaMKII 蛋白的相对表达量 ($P<0.05$ 、 0.01),显著增加 CACNA1C 的相对表达量 ($P<0.05$ 、 0.01);胺碘酮组和稳心颗粒各剂量组均能不

同程度下调 RyR2 蛋白相对表达 ($P<0.05$ 、 0.01),其中胺碘酮组和稳心颗粒高剂量组蛋白相对表达水平更趋近于对照组。

3.3 对细胞增殖的影响

采用 CCK-8 细胞增殖实验观察稳心颗粒对细胞增殖的影响,如图 5-A 所示,稳心颗粒在 $0.39\sim 25\text{ g/L}$ 对细胞增殖均有一定的促进作用趋势,且在 $0.78\sim 12.5\text{ g/L}$ 其促增殖作用最强 ($P<0.05$ 、 0.01)。根据细胞的增殖情况绘制浓度-响应曲线(图 5-B),结果显示,稳心颗粒的半数抑制浓度(half maximal inhibitory concentration, IC_{50})为 39.18 g/L ,提示稳心颗粒诱导凋亡的能力较弱,即药物安全性较好,结合标准曲线可知,稳心颗粒质量浓度大约为 5 g/L 时,其对细胞的促增殖作用较强,即细胞保护效应较强,故后续的细胞实验均采用 5 g/L 。

3.4 细胞转染效率评价

共转染时,当加入目的基因质粒的量远 GFP 质粒的量,即可认为表达 GFP 基因的细胞能够表达目的基因。因此,研究通过考察细胞内 GFP 表达的情况来判断 L-型钙通道基因的表达,即 L-型钙通道基因转染效率可以通过观察转染到细胞内 GFP 的数量来评价。如图 6 所示,低倍镜视野下,有大量细胞成功转染了 GFP,表明质粒的转染效率较高,细胞可用于后续对 L-型钙通道门控动力学的考察。

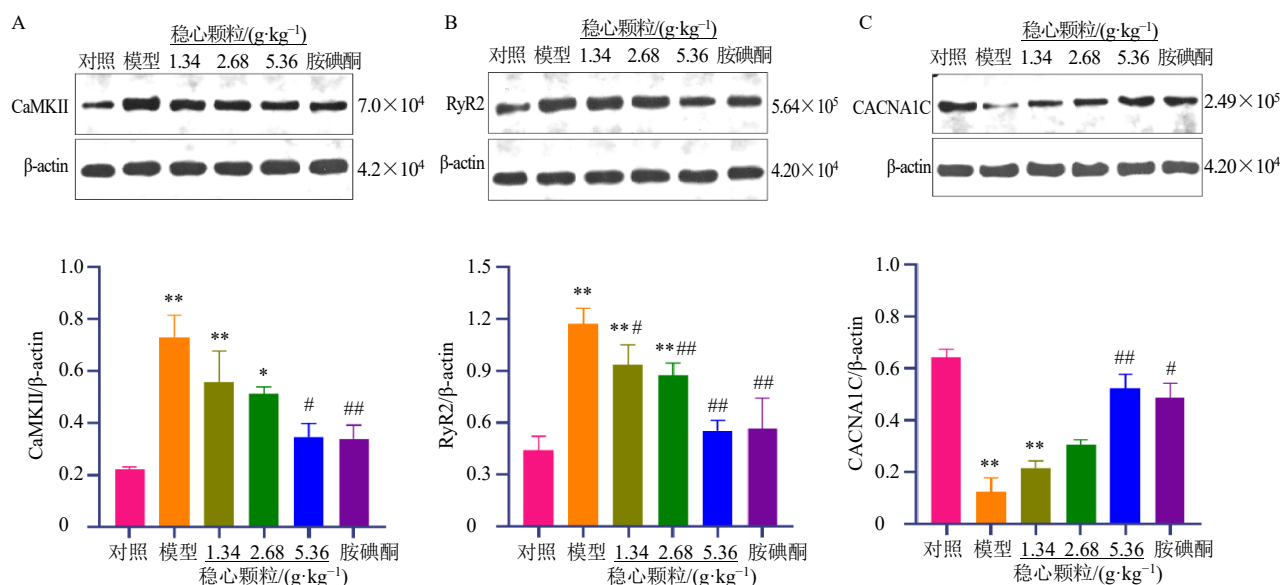
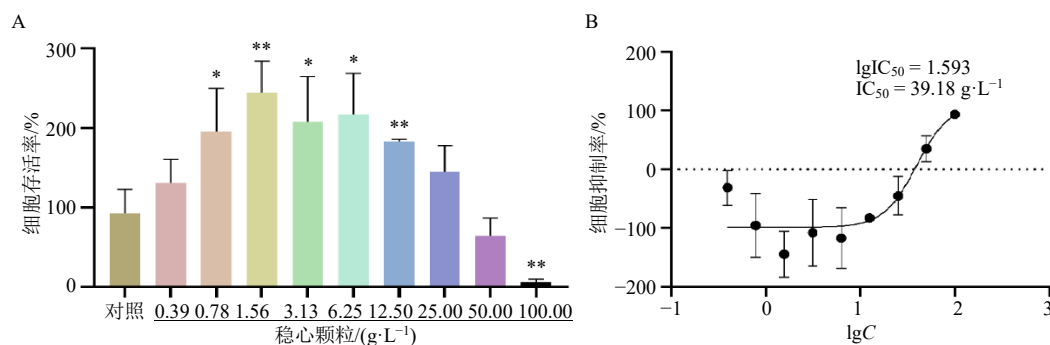


图 4 心肌组织 CaMKII、RyR2、CACNA1C 蛋白表达 ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

Fig. 4 Protein expressions of CaMKII, RyR2 and CACNA1C in myocardial tissue ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

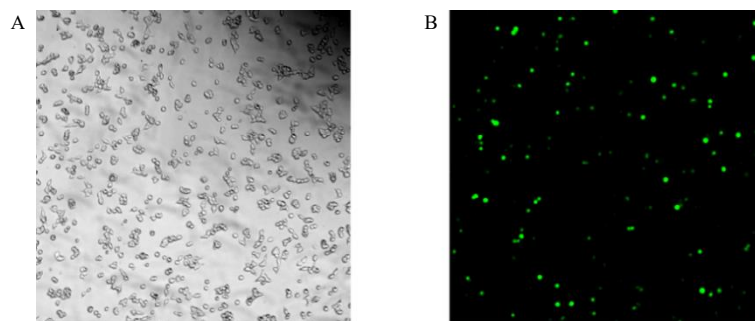


A-不同质量浓度稳心颗粒对细胞活性的影响; B-根据不同质量浓度稳心颗粒对细胞增殖效应而绘制的标准曲线。

A-effects of different concentrations of Wenxin Granules on cell activity; B-standard curves drawn according to effects of different concentrations of Wenxin Granules on cell proliferation.

图 5 不同质量浓度稳心颗粒对细胞增殖的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Fig. 5 Effect of different concentration of Wenxin Granules on cell proliferation ($\bar{x} \pm s, n = 6$)



A-低倍视野下转染后的 HEK293 细胞 (明场); B-低倍视野下转染后的 HEK293 细胞 (荧光)。

A-transfected HEK293 cells at low power field of view (bright field); B-transfected HEK293 cells at low power field of view (fluorescence).

图 6 HEK293 细胞转染 GFP 的情况 ($\times 400$)

Fig. 6 Transfection of HEK293 cells with GFP ($\times 400$)

3.5 稳心颗粒对 L-型钙通道电流的作用

图 7-A 为对照组细胞在相应的电刺激后 L-型钙通道电流的情况,图 7-B 为稳心颗粒干预后电流、电压关系曲线的刺激方波,结果显示,当向细胞外液中加入稳心颗粒药液后,L-型钙通道电流峰值显著增强。图 7-C 为电流密度曲线,结果提示,对照组和稳心颗粒干预组的细胞,均在约-40 mV 时开始出现内向电流,在电压大致为 0 mV 时达到最大,并在约 60 mV 时电流出现反转,提示稳心颗粒基本不改变激活电位、峰电位、反转电位和曲线的形状。与药物干预前相比,稳心颗粒干预后细胞上的电流密度显著增加 ($P < 0.05$),在每一指令电压水平上都不同程度增加 L-型钙通道电流的电流密度,其峰值电流密度由药物干预前的 (33.82 ± 15.01) pA/pF 增加至 (54.15 ± 14.14) pA/pF,表现为电流-电压曲线整体下移。如图 7-D 所示,稳心颗粒组细胞的 $V_{1/2}$ 为-6.08 mV,明显低于对照组的

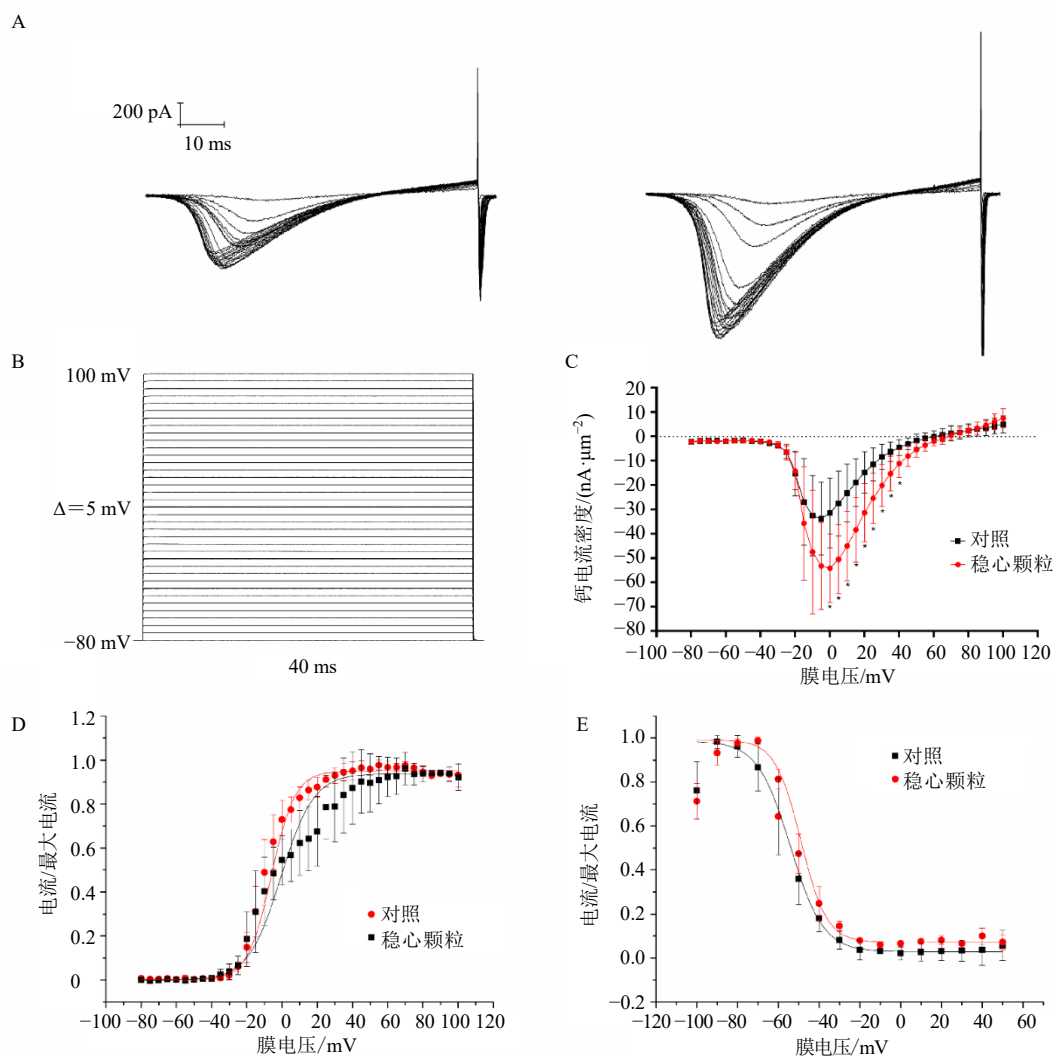
$V_{1/2}$, 激活曲线斜率也从 9.26 变为 6.75。如图 7-E 所示,稳心颗粒导致电压依赖性通道失活曲线发生正向偏移, $V_{1/2}$ 从-54.10 mV 变成-48.91 mV,失活曲线斜率从 8.05 变成 6.32,可减缓 L-型钙通道的失活。上述结果表明,稳心颗粒可能通过调节通道激活和失活来影响 L-型钙通道的电流。

3.6 稳心颗粒对细胞内游离钙离子浓度的影响

通过钙离子荧光探针观察稳心颗粒对细胞内 Ca^{2+} 浓度的影响,如图 8 所示,给药前 2 组细胞内 Ca^{2+} 水平均较低且较为平稳,给予稳心颗粒药液后,细胞内 Ca^{2+} 迅速升高后又快速回落;给予高钾溶液后,细胞内 Ca^{2+} 迅速上升并保持高水平状态。稳心颗粒组细胞内 Ca^{2+} 上升幅度比高钾溶液组细胞内 Ca^{2+} 上升幅度大,且有统计学意义 ($P < 0.01$)。

4 讨论

本课题组前期研究发现,心律失常伴随着钙超载的表现,而稳心颗粒显示出一定的抑制钙超载的



A-对照组及稳心颗粒组的代表性 L-型钙通道电流曲线; B-电流、电压关系曲线的刺激方波; C-L-型钙通道电流-电压关系曲线; D-对照组和稳心颗粒组的稳态激活曲线; E-对照组和稳心颗粒组的稳态失活曲线。
A-representative LTCC curves of control group and Wenxin Granules group; B-stimulated square wave of current and voltage relationship curve; C- LTCC current-voltage relationship curve; D-steady-state activation curves of control group and Wenxin Granules group; E-steady-state inactivation curves of control group and Wenxin Granules group.

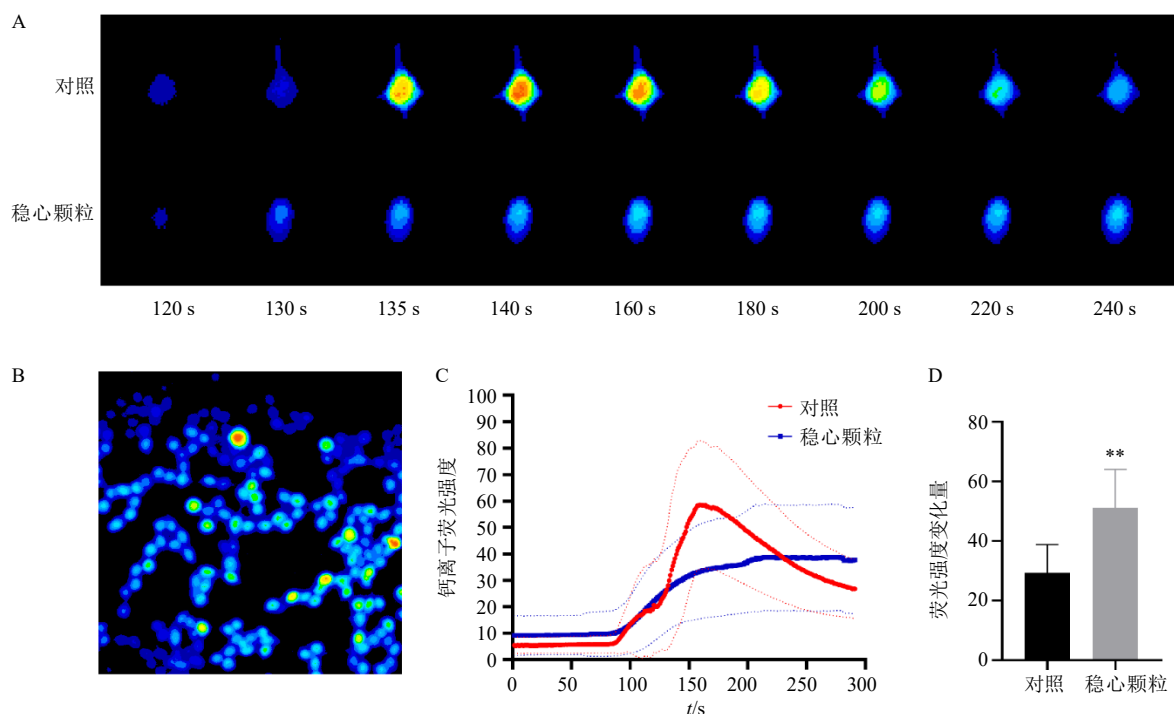
图 7 稳心颗粒对 L-型钙通道电流的作用 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Fig. 7 Effect of Wenxin Granules on L-type calcium channel current ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

能力^[8]。Ca²⁺是心肌细胞内重要的信号分子,通过调节心脏正常节律和兴奋-收缩耦联,以维持心脏的正常机械收缩功能和心电生理稳定。钙信号转导与心律失常密切相关,因此本研究关注了稳心颗粒对钙信号转导相关蛋白及电信号的影响。

CaMKII 是受钙调控的 1 类蛋白激酶,与心血管系统关系密切,可以通过调节 Ca²⁺的细胞内浓度参与心脏的兴奋-收缩耦联。在肌细胞中, CaMKII 是 1 种丰富的丝氨酸-苏氨酸激酶,能磷酸化下游许多靶酶的磷酸化位点并使其活化,被认为是钙信号转导通路中最为重要的蛋白分子^[9],如通过磷酸化多种钙调

节蛋白(肌浆网钙泵、兰尼碱受体、受磷蛋白等)引起心肌兴奋-收缩耦联,并促进肌浆网(sarcoplasmic reticulum, SR)渗漏而诱发心律失常^[10-11]。CaMKII 是一个高度证实的共同分子机制,介导着上游促心律失常危险因素与下游各种效应,包括离子通道的过度激活、细胞内钙稳态破坏以及纤维化等,进而促进心律失常的发生发展^[12]。本研究中,模型组的 CaMKII 蛋白相对表达显著增多,而稳心颗粒可有效抑制其过度表达,与现有研究所述的抑制 CaMKII 具有心肌细胞保护作用结果一致^[13],提示钙信号转导通路中的 CaMKII 可能是稳心颗粒防治



A-对照组和稳心颗粒组代表性细胞在不同时间点的荧光强度; B-细胞内 Ca^{2+} 荧光的代表性图像; C- Ca^{2+} 荧光强度随时间变化的趋势; D- Ca^{2+} 荧光强度的最大变化范围。

A-fluorescence intensity of representative cells in control group and Wenxin Granules group at different time points; B-representative images of intracellular Ca^{2+} fluorescence; C-trend of fluorescence intensity of Ca^{2+} with time; D-maximum variation range of fluorescence intensity of Ca^{2+} .

图 8 钙成像结果

Fig. 8 Results of calcium imaging

心律失常的一个有效靶点。与心律失常最相关的 CaMKII 下游效应便是对多种离子通道的影响。RyR2 功能的改变是乌头碱作用于心肌细胞的一个重要结果, RyR2 基因的持续性激活与乌头碱诱导的心律失常有直接关系^[14]。因此, 本研究观察了稳心颗粒对 RyR2 蛋白相对表达的影响, 结果提示模型组 RyR2 蛋白相对表达显著增加, 与现有研究结果一致, 侧面反映了以乌头碱构建心律失常模型的可靠性。乌头碱通过影响心肌细胞兴奋-收缩偶联系统的钙调控蛋白的表达而打乱心肌细胞内 Ca^{2+} 的体内平衡^[15]。CaMKII 在氧化应激的条件下被过度激活, 从而导致下游离子通道的过度激活 (如 RyR2) 与各种效应。CaMKII 对 RyR2 的作用是增强 Ca^{2+} 诱导的 Ca^{2+} 释放。RyR2 是已知最大的离子通道, 当细胞内的少量 Ca^{2+} 结合并激活 RyR2 后, RyR2 通道将打开并从肌浆网释放大量的 Ca^{2+} , Ca^{2+} 激活 RyR2 通道的过程便是 Ca^{2+} 诱导的 Ca^{2+} 释放^[16], 这个过程将导致胞内钙超载而诱发心律失常。RyR2 是调节 Ca^{2+} 出入的一个重要通道, 稳心颗粒可以有

效减少 RyR2 蛋白的表达, 提示其可能是通过减少细胞内 Ca^{2+} 的释放, 抑制胞内钙超载而发挥防治心律失常的作用。同时, 本研究关注了心肌细胞 L-型钙通道蛋白的表达情况, 结果显示稳心颗粒可以增加 L-型钙通道蛋白的相对表达水平。研究表明, 乌头碱会破坏细胞内 Ca^{2+} 稳态^[17-18], 抑制 L-型钙通道电流^[17], 这可能是稳心颗粒为抵抗乌头碱所致的 L-型钙电流减小而促进 L-型钙通道蛋白表达增加的原因。另有研究提到, 肌浆网钙释放通道蛋白和 L-型钙通道蛋白间存在一种负反馈的联系, 当用乌头碱干预导致 RyR2 活性增强时, L-型钙通道电流会被抑制; 而在 RyR2 沉默的心肌细胞中, L-型钙通道电流较正常心肌细胞有所增加^[14]。这种“负反馈联系”可能是稳心颗粒抑制心肌细胞 RyR2 蛋白表达并伴随 L-型钙通道蛋白表达增加的原因。

Ca^{2+} 的转导除了需要离子通道本身作为媒介, 还与离子通道的门控动力学密切相关。L-型钙通道的启闭对动作电位平台期的形成、细胞内 Ca^{2+} 浓度改变及心肌细胞的电生理特性等起重要作用。因

此,在观察稳心颗粒对钙信号转导相关蛋白表达影响的基础上,本研究通过膜片钳等技术观察稳心颗粒对 L-型钙通道门控动力学的影响。首先,低于 50 g/L 的药物浓度对 HEK293 细胞均有不同程度的促增殖作用趋势,提示稳心颗粒具有一定的细胞保护作用,同时由标准曲线确定后续实验的稳心颗粒药液质量浓度为 5 g/L (此浓度的促增殖作用最强)。通过全细胞膜片钳记录发现,稳心颗粒有助于 L-型钙通道的激活及开放,可以促进 Ca^{2+} 的内向转运,增加钙电流峰值。L-型钙通道电流是动作电位平台期除极的主要电流,L-型钙通道参与心脏活动的很多过程,包括动作电位的形成、兴奋-收缩偶联以及 Ca^{2+} 信号转导通路等。L-型钙通道电流增加可延长平台期开放时间和心肌细胞动作电位时程,并易触发细胞内 Ca^{2+} 超载,可导致静息膜电位波动。由 L-型钙通道的开放及 Ca^{2+} 内流而产生的 L-型钙通道电流决定动作电位平台期时程,在心肌细胞动作电位复极和兴奋-收缩偶联过程中起重要作用^[19]。大量研究表明,许多病理条件会导致 Ca^{2+} 负荷过重,最终导致心律失常。如此看来,稳心颗粒对 L-型钙通道的“激活”作用,似乎会加重钙超载的影响。为了进一步探究稳心颗粒影响 Ca^{2+} 转导的具体情况,本研究继续通过钙离子荧光探针的方法观察细胞内 Ca^{2+} 浓度,以便更直观地观察 Ca^{2+} 随时间的变化趋势。结果显示,当稳心颗粒药液作用于细胞后,细胞荧光强度首先是显著增强,即胞内 Ca^{2+} 浓度增加,随后荧光强度又急剧降低,即胞内 Ca^{2+} 浓度又迅速减少。与之形成鲜明对比的是,用高钾溶液刺激细胞后,胞内 Ca^{2+} 浓度也显著上升,但在 300 s 的观察期内,胞内 Ca^{2+} 浓度始终处于较高水平而无明显降低趋势。这说明稳心颗粒在干预细胞的初期确实会在一定程度上激活 L-型钙通道,但随后能迅速地进一步调节离子通道,使胞内钙浓度下降并趋于稳定。心肌素 Myocardin 能激活电压门控钙离子通道 L-型电压门控钙离子通道 (L-type voltage-gated calcium channel, Cav1.2) 而增加心肌细胞膜 Ca^{2+} 电流,并激活 Cav1.2 基因的转录和表达^[20]。神经介素 B 对成年大鼠心室肌细胞 L-型钙通道电流具有剂量依赖性的增强作用^[21]。心肌素与心脏发育密切相关,神经介素 B 在中枢及外周发挥着不同的生理调节功能,二者都能激活 Cav1.2 而增加钙电流。本研究中稳心颗粒对 L-型钙通道的激活效应,可能是类似于此而发挥的生理自稳调节效应,且中药复方本

身具有双向调节的作用,其发挥药效的方式并非单一的“促进”或“抑制”所能概括。但可以肯定的是,稳心颗粒对 L-型钙通道具有确切的调节作用,在 HEK293 细胞中所体现的钙通道激活、钙内流现象,可能是一种细胞的自稳调节机制表现。本研究重点考察稳心颗粒对 L-型钙通道的门控动力学影响,故选用了具有高转染效率的 HEK293 细胞。HEK293 是一种广泛应用于研究转染后离子通道的细胞异体表达系统^[22],是研究药物对 L-型钙通道包括门控动力在内诸多影响的一个良好载体^[23-24]。当然,HEK293 整体细胞功能可能与心律失常大鼠心肌细胞上各离子通道的协同作用存在一定的差异,今后的研究可能需要更加关注稳心颗粒在心律失常模型大鼠心肌细胞的整体效应。疾病和中药复方都是一个整体,单独的通道反应无法完全代表药物对整个疾病的调节作用,这也可能是“钙内流”现象的原因。

Ca^{2+} 是心肌细胞内重要信号分子,通过调节心脏正常节律和兴奋-收缩偶联,以维持心脏的正常机械收缩功能和心电生理稳定。本研究通过考察稳心颗粒对离子通道的表达与门控动力学改变来综合评价其对钙信号转导的调控形式。CaMKII 在心律失常中扮演着重要的角色,接受上游多种促心律失常信号并影响下游多个离子通道,通过直接或间接的形式诱发心律失常。CaMKII 是钙信号转导过程中的重要一环,而稳心颗粒可以有效抑制 CaMKII 的表达,影响多个离子通道的功能(包括抑制 RyR2 蛋白表达、促进 L-型钙通道蛋白表达),并通过调控 L-型钙通道的门控动力学影响细胞内 Ca^{2+} 浓度来综合发挥其钙信号转导的调控能力以防治心律失常。

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] 于露,钱舒乐,郭海珍,等.基于 CMC/UPLC-Q-TOF/MS 探讨稳心颗粒效应成分及抗心律失常作用机制[J].中国实验方剂学杂志,2024,30(19):124-132.
- [3] 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.
- [4] Zhao H C, Yu Y, Wu X A, et al. A role of BK channel in regulation of Ca^{2+} channel in ventricular myocytes by substrate stiffness[J]. *Biophys J*, 2017, 112(7): 1406-1416.

- [5] 周露, 李冰艳, 顾霞飞, 等. 丹参酮 II_A 通过 PKC/Cx43 通路减轻大鼠心肌缺血再灌注致心律失常 [J]. 药物评价研究, 2023, 46(12): 2617-2623.
- [6] 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.
- [7] 钱舒乐, 于露, 李晓凤, 等. 稳心颗粒对心律失常大鼠凋亡、炎症及氧化应激的影响 [J]. 中草药, 2024, 55(7): 2292-2302.
- [8] 李晓凤. 稳心颗粒治疗心律失常的药效物质基础和作用机制研究 [D]. 天津: 天津中医药大学, 2019.
- [9] 赵灿, 吴永全. 心肌细胞钙信号与心血管疾病研究进展 [J]. 实用医学杂志, 2017, 33(3): 492-495.
- [10] Ramos-Mondragón R, Lozhkin A, Vendrov A E, *et al.* NADPH oxidases and oxidative stress in the pathogenesis of atrial fibrillation [J]. *Antioxidants*, 2023, 12(10): 1833.
- [11] Purohit A, Rokita A G, Guan X Q, *et al.* Oxidized Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II triggers atrial fibrillation [J]. *Circulation*, 2013, 128(16): 1748-1757.
- [12] 钟鹏. CaMKII 在肥胖诱导的心肌重构以及心律失常中的作用及机制研究 [D]. 武汉: 武汉大学, 2018.
- [13] Swaminathan P D, Purohit A, Soni S, *et al.* Oxidized CaMKII causes cardiac sinus node dysfunction in mice [J]. *J Clin Invest*, 2011, 121(8): 3277-3288.
- [14] 付敏. 乌头碱致心律失常的细胞分子机制的实验研究 [D]. 北京: 北京中医药大学, 2007.
- [15] Robinson P, Liu X, Sparrow A, *et al.* Hypertrophic cardiomyopathy mutations increase myofilament Ca²⁺ buffering, alter intracellular Ca²⁺ handling, and stimulate Ca²⁺-dependent signaling [J]. *J Biol Chem*, 2018, 293(27): 10487-10499.
- [16] Dridi H, Kushnir A, Zalk R, *et al.* Intracellular calcium leak in heart failure and atrial fibrillation: A unifying mechanism and therapeutic target [J]. *Nat Rev Cardiol*, 2020, 17(11): 732-747.
- [17] Wu J J, Wang X C, Chung Y Y, *et al.* L-type calcium channel inhibition contributes to the proarrhythmic effects of aconitine in human cardiomyocytes [J]. *PLoS One*, 2017, 12(1): e0168435.
- [18] Sun G B, Sun H, Meng X B, *et al.* Aconitine-induced Ca²⁺ overload causes arrhythmia and triggers apoptosis through p38 MAPK signaling pathway in rats [J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2014, 279(1): 8-22.
- [19] 连亚军, 王治平, 胡耀东, 等. 参松养心胶囊对心律失常大鼠抗室性心律失常作用及其机制 [J]. 中国老年学杂志, 2016, 36(6): 1289-1291.
- [20] 代玉环, 徐尧, 罗颖, 等. Myocardin 调控心肌 H9C2 细胞 Ca²⁺ 通道机制研究 [J]. 中国生物工程杂志, 2016, 36(11): 1-6.
- [21] 应娇茜, 张园, 孙玉芳, 等. 神经介素 B 对大鼠心室肌细胞 L 型钙离子通道调节及机制研究 [J]. 中国心血管杂志, 2016, 21(3): 241-245.
- [22] Amarouch M Y, Syam N, Abriel H. Biochemical, single-channel, whole-cell patch clamp, and pharmacological analyses of endogenous TRPM4 channels in HEK293 cells [J]. *Neurosci Lett*, 2013, 541: 105-110.
- [23] Guo K, Wang Y P, Zhou Z W, *et al.* Impact of phosphomimetic and non-phosphorylatable mutations of phospholemman on L-type calcium channels gating in HEK 293T cells [J]. *J Cell Mol Med*, 2015, 19(3): 642-650.
- [24] Li K, Pi M S, Li X T. The inhibitory effects of levo-tetrahydropalmatine on rat Kv1.5 channels expressed in HEK293 cells [J]. *Eur J Pharmacol*, 2017, 809: 105-110.

[责任编辑 罗 曦]