

基于钙超载研究滇乌碱诱导大鼠心律失常的毒性机制[△]

张祉思^{1*},程婉秋¹,江涛²,沈志滨¹,陈艳芬¹,陈聪¹,司徒莹¹,唐春萍^{1,3#}(1.广东药科大学中药学院,广州510006;2.广东药科大学实验动物中心,广州510006;3.广东省局部精准药物递药制剂工程技术研究中心,广州510006)

中图分类号 R285 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2021)23-2854-05
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2021.23.07



摘要 目的:研究滇乌碱诱导大鼠心律失常的毒性机制。方法:将32只大鼠按随机数字表法随机分为正常对照组、滇乌碱低、高剂量组(0.09、0.14 mg/kg)和乌头碱组(阳性对照,0.88 mg/kg),每组8只。各给药组大鼠每天灌胃相应药物1次,正常对照组大鼠灌胃等体积生理盐水,连续7 d。末次灌胃后,观察各组大鼠的心电图变化,测定大鼠心肌组织中腺苷三磷酸(ATP)含量、心肌细胞中Ca²⁺含量、心肌组织中Na⁺-K⁺-ATP酶和Ca²⁺-Mg²⁺-ATP酶活性以及雷诺定受体2(RyR2)、Ca²⁺-ATP酶(SERCA2)蛋白表达水平。结果:与正常对照组比较,滇乌碱低剂量组大鼠QRS波时限、校正后QT期间(QTc间期)均显著延长($P<0.01$),心肌细胞中Ca²⁺含量显著升高($P<0.05$),心肌组织中ATP含量、Ca²⁺-Mg²⁺-ATP酶活性、Na⁺-K⁺-ATP酶活性和SERCA2蛋白表达水平均显著降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$);滇乌碱高剂量组和乌头碱组大鼠心率均显著增快($P<0.05$ 或 $P<0.01$),QRS波时限、QTc间期均显著延长($P<0.01$),心肌细胞中Ca²⁺含量均显著升高($P<0.01$),心肌组织中ATP含量、Ca²⁺-Mg²⁺-ATP酶活性、Na⁺-K⁺-ATP酶活性和RyR2、SERCA2蛋白表达水平均显著降低($P<0.01$)。结论:滇乌碱可导致大鼠心律失常;其作用机制可能与降低心肌组织中Ca²⁺-Mg²⁺-ATP酶、Na⁺-K⁺-ATP酶活性,下调心肌组织中钙转运相关蛋白RyR2、SERCA2的表达,从而导致Ca²⁺超载有关。

关键词 滇乌碱;心律失常;钙超载;腺苷三磷酸;雷诺定受体2;Ca²⁺-ATP酶;毒性机制

Study on the Toxicity Mechanism of Yunaconitine-induced Arrhythmia in Rats Based on Calcium Overload
ZHANG Zhisi¹, CHENG Wanqiu¹, JIANG Tao², SHEN Zhibin¹, CHEN Yanfen¹, CHEN Cong¹, SITU Ying¹, TANG Chunping^{1, 3} (1.School of Traditional Chinese Medicine, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, China; 2. Laboratory Animal Center, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, China; 3. Guangdong Engineering Research Center for Local Precise Drug Delivery, Guangzhou 510006, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To study the toxicity mechanism of yunaconitine-induced arrhythmia in rats. METHODS: Totally 32 rats were randomly divided by random number table method into normal control group, yunaconitine low-dose and high-dose groups (0.09, 0.14 mg/kg), aconitine group (positive control, 0.88 mg/kg), with 8 rats in each group. Administration groups were given the corresponding drugs once a day, and normal control group was given the constant volume of normal saline, for consecutive 7 d. After last intragastric administration, the changes of electrocardiogram (ECG) were observed. The contents of adenosine triphosphate (ATP) in myocardial tissue and Ca²⁺ in myocardial cells, the activities of Na⁺-K⁺-ATPase and Ca²⁺-Mg²⁺-ATPase as well as the protein expression of ryanodine receptor 2 (RyR2) and Ca²⁺-ATPase (SERCA2) in myocardial tissue were determined. RESULTS: Compared with normal control group, time limit of QRS wave and QTc intervals of rats were prolonged significantly in yunaconitine low-dose group ($P<0.01$). The content of Ca²⁺ in myocardial cells, the ATP contents, the activities of Ca²⁺-Mg²⁺-ATPase and Na⁺-K⁺-ATPase as well as the protein expression of SERCA2 in myocardial tissue were reduced significantly ($P<0.05$ or $P<0.01$). The heart rate of rats in yunaconitine high-dose group and aconitine group were increased significantly ($P<0.05$ or $P<0.01$), and time limit of QRS wave and QTc intervals were significantly prolonged ($P<0.01$); the content of Ca²⁺ in myocardial cells was increased significantly ($P<0.01$); ATP content, the activities of Ca²⁺-Mg²⁺-ATPase and Na⁺-K⁺-ATPase, and protein expression of RyR2 and SERCA2 in myocardial tissue were decreased significantly ($P<0.01$). CONCLUSIONS: Yunaconitine can induce arrhythmia in rats, the mechanism of which may be associated with Ca²⁺ overload that resulted from reducing the activities of Na⁺-K⁺-ATPase and Ca²⁺-Mg²⁺-ATPase and down-regulating the expression of related calcium transporter

[△] 基金项目:国家中医药行业科研专项(No.201507004)

* 硕士研究生。研究方向:中药药效评价与临床应用。E-mail: 2737911514@qq.com

通信作者:教授,硕士生导师。研究方向:中药药效评价与临床应用。E-mail: tchp66@163.com

RyR2 and SERCA2.

KEYWORDS Yunaconitine; Arrhythmia; Calcium overload; Adenosine triphosphate; Ryanodine receptor 2; Ca²⁺ ATPase; Toxicity mechanism

黄草乌 *Aconitum vilmorinianum* Kom. 为毛茛科乌头属多年生草本植物的干燥块根^[1], 具有祛风散寒、活血止痛的功效, 临床用于治疗风寒湿痹、跌打损伤和风湿关节疼痛等^[2], 被收载于 2005 年版《云南省中药材标准》^[3]。本课题组前期研究发现, 黄草乌及其炮制品都有明显的镇痛作用, 但其毒性剂量和疗效剂量接近, 限制了其在临床的广泛使用^[4]。滇乌碱是从黄草乌中提取、分离得到的主要药效成分, 但也是毒性成分^[5]。温玉莹等^[6]的研究结果显示, 黄草乌经十二指肠给药后, 小鼠心律失常的发生率为 100%。黎虽宇等^[7]研究发现, 黄草乌生品能使大鼠出现室性早搏等心律失常现象; 而黄草乌经炮制后, 生物碱含量减少, 且对大鼠心电图的各项指标也无明显影响, 提示黄草乌炮制前后诱导大鼠心律失常的毒性差异可能与滇乌碱含量变化有关。然而, 关于滇乌碱诱导心律失常的毒性机制仍未明确。

心律失常是最常见的心血管疾病, 是由于心脏冲动起源部位、兴奋秩序以及传导速度异常而引起的心脏搏动频率与节律障碍。心律失常不仅会加重原有心脏疾病的进展(如加速心力衰竭), 而且也是导致患者发生猝死的重要原因之一^[8]。 Ca^{2+} 不仅是维持心脏电活动的关键因素, 也是引发心肌收缩的直接激活剂, 因此任何引起 Ca^{2+} 含量波动的因素都会影响心肌兴奋-收缩偶联(ECC)过程, 最终导致心律失常^[9]。基于此, 本研究拟从整体动物水平观察滇乌碱对大鼠心电图的影响, 并探究其对腺苷三磷酸(ATP)含量及 Ca^{2+} - Mg^{2+} -ATP 酶活性、 Na^{+} - K^{+} -ATP 酶活性、心肌细胞中 Ca^{2+} 含量、钙转运相关蛋白表达水平的影响, 进一步揭示滇乌碱诱导心律失常的毒性机制, 为黄草乌的临床安全使用提供实验依据。

1 材料

1.1 主要仪器

本研究所用主要仪器有 BL-420F 型生物信号采集处理系统(成都泰盟软件有限公司), Infinite 200 PRO 型多功能荧光酶标仪(奥地利 Tecan Austria GmbH 公司), HZT-A1000 型电子天平(福州华志科学仪器有限公司), 3100 型 CO_2 培养箱(广州市源起生物科技有限公司), Mini 型蛋白电泳系统(美国 Bio-Rad 公司), LG2000 型数码凝胶图像分析系统(杭州朗基科学仪器有限公司)。

1.2 主要药品与试剂

滇乌碱对照品(批号 MUST17102101, 纯度 $\geq 98\%$)、乌头碱对照品(批号 MUST17110910, 纯度 $\geq 98\%$)均购自成都曼斯特生物科技有限公司; ATP 含量测定试剂盒(批号 20200712)、ATP 酶活性测定试剂盒(批号 20200628)和二喹啉甲酸(BCA)蛋白浓度测定试剂盒(批号 20200723)均购自南京建成生物工程研究所; Fluo-3/AM Ca^{2+} 荧光探针(批号 75400150)购自北京鼎国昌盛生物技术有限公司; 兔源雷诺定受体 2(RyR2)单克隆抗体(批号 GR3200692-1)购自美国 Proteintech 公司; 兔源

Ca^{2+} -ATP 酶(SERCA2)单克隆抗体(批号 GR3182873-9)、兔源 3-磷酸甘油醛脱氢酶(GAPDH)单克隆抗体(批号 GR3250452-7)均购自英国 Abcam 公司; 山羊抗兔辣根过氧化物酶(HRP)标记的免疫球蛋白 G(IgG)抗体(批号 GR3321256-8)购自美国 Bioworld 公司; 超敏 ECL 化学发光即用型底物(批号 B347825E)购自美国 Boster 公司; 其余试剂均为分析纯, 水为双蒸水。

1.3 动物

本研究所用动物为 SPF 级 SD 大鼠, 共 32 只, 雌雄各半, 体质量为 240~260 g, 由广东省医学实验动物中心提供, 实验动物生产许可证号为 SCXK(粤)2018-0002、质量合格证号为 44007200078479。大鼠购入后饲养于广东药科大学实验动物中心 SPF 级动物房中[实验动物使用许可证号为 SYXK(粤)2017-0125]。实验室环境温度为 20~25 $^{\circ}\text{C}$, 相对湿度为 40%~70%, 12 h 照明/12 h 黑暗循环。本实验动物方案已获得广东药科大学实验动物伦理委员会批准。

2 方法

2.1 分组与给药

采用随机数字表法将 32 只大鼠随机分为正常对照组, 滇乌碱低、高剂量组(0.09、0.14 mg/kg)和乌头碱组(阳性对照, 0.88 mg/kg), 每组 8 只。各给药组大鼠的给药剂量是参考文献[10-11]及前期预实验结果设置, 其中滇乌碱低、高剂量分别为大鼠的 1/6、1/4 半数致死量(LD_{50}), 乌头碱的剂量为大鼠的 1/10 LD_{50} 。各给药组大鼠灌胃相应药物(均以生理盐水为溶剂溶解), 正常对照组大鼠灌胃等体积的生理盐水; 灌胃体积均为 10 mL/kg, 每天 1 次, 连续 7 d。

2.2 心电图观察

末次灌胃 1 h 后, 腹腔注射 3% 水合氯醛(10 mL/kg)将大鼠麻醉, 然后将大鼠按仰卧位固定, 并将正向电极插入其右上肢, 负向电极插入其左下肢, 底线插入其右下肢, 然后使用生物信号采集系统采集大鼠 60 min 内的 II 导联心电图, 记录并分析其心率、QRS 波、PR 间期以及校正后 QT 间期(QTc 间期)的变化。其中, QTc 间期是根据公式 $\text{QTc} = \text{QT}/\text{RR}^{1/2}$ 计算得到(RR 为标准化的心率值, 根据 60 除以心率得到)^[6]。

2.3 标本采集与处理

记录大鼠的心电图后, 将大鼠处死, 打开其胸腔, 在无菌条件下迅速剥离其心脏。心脏用生理盐水冲洗, 并用滤纸吸干, 置于 -80 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中保存, 备用。

2.4 心肌组织中 ATP 含量测定

称取心肌组织样本 0.1 g, 以水制成 100 g/L 的匀浆液后, 置于沸水浴中煮 10 min; 取出, 涡旋混匀 1 min, 然后以 3 500 r/min 离心 10 min, 取上清液。根据 ATP 含量测定试剂盒说明书方法操作, 通过酶标仪测定各组大鼠心肌组织中 ATP 的含量。

2.5 心肌组织中Ca²⁺-Mg²⁺-ATP酶、Na⁺-K⁺-ATP酶活性测定

称取心肌组织样本0.1 g,以水制成100 g/L的匀浆液,按照ATP酶活性测定试剂盒说明书方法操作,测定大鼠心肌组织中Ca²⁺-Mg²⁺-ATP酶、Na⁺-K⁺-ATP酶活性。采用BCA法测定各组大鼠心肌组织匀浆液的蛋白浓度,ATP酶的活力单位以每小时每毫克蛋白分解ATP产生无机磷的量($\mu\text{mol Pi/mg prot/h}$)表示。

2.6 心肌细胞中Ca²⁺含量测定

称取心肌组织样本约50 mg,加入水充分研磨,于300目尼龙网上过滤得到细胞悬液;以1 000 r/min离心5 min,收集细胞沉淀。以磷酸盐缓冲液(PBS)冲洗细胞2遍,随后加入含有5 $\mu\text{mol/L}$ Fluo-3/AM Ca²⁺荧光探针的无血清DMEM培养基5 mL,再加入1 μL 25% Pluronic F127,置于37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO₂培养箱中培养1 h;取出,以1 000 r/min离心5 min,以PBS洗涤3次,洗脱未负载的Fluo-3/AM Ca²⁺荧光探针;然后使用酶标仪在激发波长488 nm、发射波长530 nm处检测大鼠心肌细胞中Ca²⁺的荧光强度(荧光强度越高代表Ca²⁺的含量越高)。

2.7 心肌组织中RyR2、SERCA2蛋白表达测定

每组随机选取3只大鼠的心肌组织样本,采用Western blot法进行测定。称取心肌组织样本约100 mg,加入裂解液提取总蛋白;以BCA法进行蛋白定量分析,然后将蛋白高温变性。取变性后的蛋白进行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)分离(分离胶电压为100~200 V,浓缩胶电压为60~100 V,电泳时间为60 min),随后湿法转至聚偏二氟乙烯膜(转膜电流均为300 mA,RyR2蛋白的转膜时间为130 min,SERCA2蛋白的转膜时间为90 min);以5%脱脂奶粉封闭1 h后,加入RyR2一抗(稀释比例为1:2 000)、SERCA2一抗(稀释比例为1:3 000)、GAPDH一抗(稀释比例为1:10 000),于4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜;以TBST漂洗6次、每次5 min,加入HRP标记的IgG二抗(稀释比例为1:40 000),于室温孵育1 h;以TBST漂洗6次、每次5 min,加入ECL显色,于化学发光成像仪中成像。采用Image J v1.8.0软件测定各蛋白条带的灰度值,以各目的蛋白条带与内参GAPDH蛋白条带的灰度比值表示目的蛋白的表达水平。

2.8 统计学方法

采用SPSS 21.0软件进行统计分析。实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用LSD-*t*检验。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

3 结果

3.1 滇乌碱对大鼠心电图的影响

正常对照组大鼠保持窦性心律。与正常对照组比较,滇乌碱低剂量组大鼠QRS波时限和QTc间期均显著

延长($P<0.01$),以产生室性期前收缩的心电图变化为主;滇乌碱高剂量组大鼠心率显著增快($P<0.05$),QRS波时限和QTc间期均显著延长($P<0.01$),主要表现为双向性室性心动过速;乌头碱组大鼠的心率显著增快($P<0.01$),QRS波时限和QTc间期均显著延长($P<0.01$),主要表现为单形性室性心动过速等心电异常。与乌头碱组比较,滇乌碱低、高剂量组大鼠心电图各参数的差异均无统计学意义($P>0.05$)。各组大鼠的心电图见图1,心电图各参数测定结果见表1。

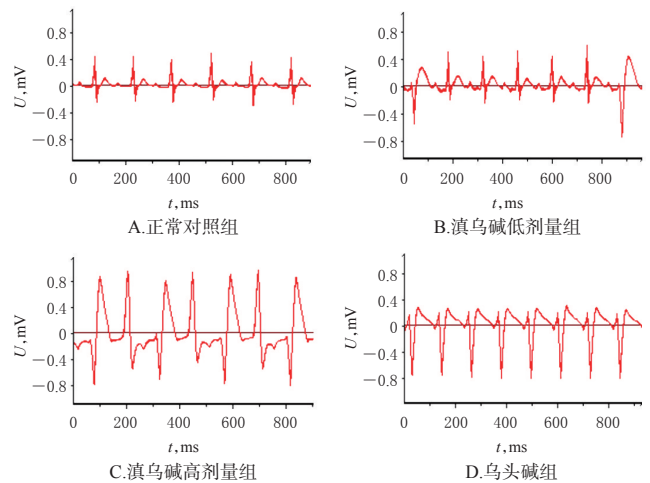


图1 各组大鼠的心电图

Fig 1 Electrocardiograms of rats in each group

表1 各组大鼠心电图各参数测定结果($\bar{x} \pm s, n=8$)

Tab 1 Results of the parameters of the electrocardiogram of rats in each group($\bar{x} \pm s, n=8$)

组别	心率,次/min	QRS波,ms	PR间期,ms	QTc间期,ms
正常对照组	425.73 \pm 16.83	28.46 \pm 1.41	49.14 \pm 2.02	187.37 \pm 10.54
滇乌碱低剂量组	440.13 \pm 29.87	35.49 \pm 2.26**	51.71 \pm 3.75	219.60 \pm 10.58**
滇乌碱高剂量组	460.77 \pm 26.83*	39.43 \pm 2.27**	51.20 \pm 2.39	237.14 \pm 17.75**
乌头碱组	528.13 \pm 35.23**	39.97 \pm 3.78**	50.23 \pm 1.46	248.45 \pm 26.49**

注:与正常对照组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$

Note: vs. normal control group,* $P<0.05$,** $P<0.01$

3.2 滇乌碱对大鼠心肌组织中ATP含量的影响

与正常对照组比较,滇乌碱低、高剂量组和乌头碱组大鼠心肌组织中ATP含量均显著降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。与乌头碱组比较,滇乌碱低、高剂量组大鼠心肌组织中ATP含量差异均无统计学意义($P>0.05$)。各组大鼠心肌组织中ATP含量测定结果见表2。

3.3 滇乌碱对大鼠心肌组织中ATP酶活性的影响

与正常对照组比较,滇乌碱低、高剂量组和乌头碱组大鼠心肌组织中Ca²⁺-Mg²⁺-ATP酶、Na⁺-K⁺-ATP酶活性均显著降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。与乌头碱组比较,滇乌碱低、高剂量组大鼠心肌组织中上述ATP酶活性差异均无统计学意义($P>0.05$)。各组大鼠心肌组织中ATP酶活性测定结果见表2。

表2 各组大鼠心肌组织中ATP含量、ATP酶活性和细胞中Ca²⁺含量测定结果($\bar{x} \pm s, n=8$)

Tab 2 ATP content and ATPase activity in myocardial tissue and the content of Ca²⁺ in myocardial cells of rats in each group($\bar{x} \pm s, n=8$)

组别	ATP含量, $\mu\text{mol/g prot}$	Ca ²⁺ -Mg ²⁺ -ATP酶, $\mu\text{mol Pi/mg prot/h}$	Na ⁺ -K ⁺ -ATP酶, $\mu\text{mol Pi/mg prot/h}$	Ca ²⁺ 荧光强度
正常对照组	0.26±0.09	2.57±1.00	1.60±0.52	450.79±45.34
滇乌碱低剂量组	0.19±0.05*	1.68±0.62*	0.80±0.24**	523.15±71.78*
滇乌碱高剂量组	0.17±0.05**	1.44±0.65**	0.77±0.31**	570.60±47.61**
乌头碱组	0.16±0.05**	1.48±0.73**	0.78±1.09**	538.50±63.11**

注:与正常对照组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$

Note: vs. normal control group,* $P<0.05$,** $P<0.01$

3.4 滇乌碱对大鼠心肌细胞中Ca²⁺含量的影响

与正常对照组比较,滇乌碱低、高剂量组和乌头碱组大鼠心肌细胞中Ca²⁺含量均显著升高($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。与乌头碱组比较,滇乌碱低、高剂量组大鼠心肌细胞中Ca²⁺含量差异均无统计学意义($P>0.05$)。各组大鼠心肌细胞中Ca²⁺含量测定结果见表2。

3.5 滇乌碱对大鼠心肌组织中RyR2、SERCA2蛋白表达的影响

与正常对照组比较,滇乌碱低剂量组大鼠心肌组织中SERCA2蛋白表达水平显著降低($P<0.01$),但RyR2蛋白表达水平差异无统计学意义($P>0.05$);滇乌碱高剂量组和乌头碱组大鼠心肌组织中RyR2、SERCA2蛋白表达水平均显著降低($P<0.01$)。与乌头碱组比较,滇乌碱低剂量组大鼠心肌组织中SERCA2蛋白表达水平差异无统计学意义($P>0.05$),RyR2蛋白表达水平显著升高($P<0.05$);滇乌碱高剂量组大鼠心肌组织中RyR2蛋白表达水平差异无统计学意义($P>0.05$),SERCA2蛋白表达水平显著升高($P<0.05$)。各组大鼠心肌组织中RyR2、SERCA2蛋白表达的电泳图见图2,蛋白表达水平测定结果见表3。

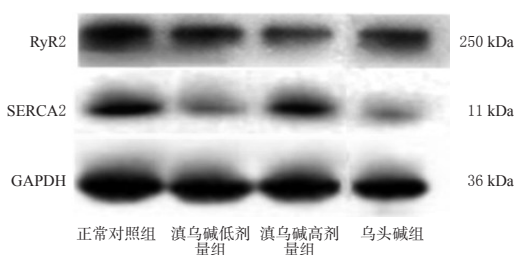


图2 各组大鼠心肌组织中RyR2、SERCA2蛋白表达的电泳图

Fig 2 Electrophoretic maps of protein expression of RyR2 and SERCA2 in myocardial tissue of rats in each group

表3 各组大鼠心肌组织中RyR2、SERCA2蛋白的表达水平测定结果($\bar{x} \pm s, n=3$)

Tab 3 Protein expression of RyR2 and SERCA2 in myocardial tissue of rats in each group($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	RyR2/GAPDH	SERCA2/GAPDH
正常对照组	0.23±0.01	0.60±0.13
滇乌碱低剂量组	0.22±0.05*	0.17±0.04**
滇乌碱高剂量组	0.15±0.01**	0.24±0.04**
乌头碱组	0.14±0.01**	0.06±0.04**

注:与正常对照组比较,** $P<0.01$;与乌头碱组比较,* $P<0.05$

Note: vs. normal control group,** $P<0.01$; vs. aconitine group,* $P<0.05$

4 讨论

心电图记录了心脏兴奋的产生、传导、恢复过程中的生物电变化,在临床中反映了患者的心脏功能,是监测、诊断心血管疾病的重要指标之一^[12]。QRS波是心室除极波,QRS波群时限延长可能与室性异位激动产生的心室除极有关^[13]。PR间期代表由窦房结产生的兴奋经由心房、房室交界和房室束到达心室并引起心室开始兴奋所需要的时间,若PR间期异常,则提示兴奋传导异常;QTc间期延长可导致室性心律失常的发生,在诊断某些心律失常和判断心肌梗死患者预后等方面有着重要的临床意义^[14]。由于乌头碱是乌头属植物最主要的心脏毒性物质,能引起多种心律失常,故可作为乌头属植物毒性成分的典型代表^[15]。因此,本研究以乌头碱为阳性对照药物来考察滇乌碱致大鼠心律失常的毒性作用。心电图观察结果显示,给予不同剂量的滇乌碱后,大鼠的心率不同程度地加快,QRS波时限和QTc间期不同程度地延长,并且出现了室性早搏、室性心动过速等心律失常现象。

细胞内Ca²⁺作为第二信使,可以介导以膜电位变化为特征的兴奋过程和以肌丝滑行为基础的收缩过程,即ECC过程;若细胞内Ca²⁺浓度异常,可导致心脏传导速度减慢、心室收缩功能减弱,从而影响心脏功能的正常发挥^[16]。Na⁺-K⁺-ATP酶又称钠泵,是广泛存在于心肌及其他组织细胞膜上的一种糖蛋白,也是一种能催化ATP水解的酶,这种泵每消耗1分子ATP所释放的能量就可逆浓度将3个Na⁺泵出细胞外,同时将2个K⁺泵入细胞内;一旦Na⁺-K⁺-ATP酶活性降低,就会造成细胞内Na⁺浓度过高,间接促进Na⁺-Ca²⁺交换,从而引起细胞内Ca²⁺超载,导致心肌的兴奋-收缩功能紊乱^[17]。Ca²⁺-Mg²⁺-ATP酶又称钙泵,能够利用水解ATP释放的能量驱动细胞内Ca²⁺泵出细胞,以维持细胞内低浓度的游离Ca²⁺;当Ca²⁺-Mg²⁺-ATP酶活性受到抑制时,容易导致心肌游离Ca²⁺浓度过高,而Ca²⁺超载程度与心肌损伤程度呈正相关^[18]。心肌细胞中过多的Ca²⁺以磷酸盐的形式沉积,引

起线粒体氧化磷酸化的电子传递功能障碍,造成ATP合成受阻,导致能量无法转化成ATP为心肌所用,进一步抑制ATP酶活力,形成“ATP合成障碍-Ca²⁺超载”的恶性循环,从而诱导心律失常发生^[19]。本研究结果显示,给予不同剂量滇乌碱后,大鼠心肌组织中ATP含量不同程度地减少,心肌细胞中Ca²⁺含量不同程度地增加,心肌组织中Na⁺-K⁺-ATP酶、Ca²⁺-Mg²⁺-ATP酶活性不同程度地降低。这提示Ca²⁺超载可能是滇乌碱致大鼠心律失常的毒性机制之一。

在ECC过程中,相关钙转运蛋白的调控紊乱会导致胞浆Ca²⁺负载和肌浆网中Ca²⁺释放失调,这也是引起Ca²⁺依赖型心律失常的关键因素^[20]。RyRs又称兰尼碱受体,是位于肌浆网中的一种选择性阳离子通道。据文献报道,RyRs有3种亚型,其中RyR2是主要的Ca²⁺释放通道,主要分布于心肌,对细胞质内游离Ca²⁺的浓度影响尤为显著:正常情况下,当兴奋冲动传导至心肌细胞时,L型Ca²⁺通道开放,然后细胞外少量的Ca²⁺内流,而短时间内迅速升高的游离Ca²⁺浓度会增加RyR2对Ca²⁺的敏感性,使RyR2被激活并同步释放大量的Ca²⁺,引起心肌收缩^[21]。但游离Ca²⁺在胞浆内对RyR通道具有双向调节作用:当Ca²⁺处于低浓度(0.01~1 mmol/L)时,可以刺激并激活RyR2通道;当细胞内的Ca²⁺浓度达到1 mmol/L时,RyR2通道的开放程度达到最大;此时若Ca²⁺浓度继续升高(>1 mmol/L),心肌组织为避免过长或过强的收缩,则会抑制RyR2通道开放^[22]。在ECC过程中,待心肌细胞处于舒张期后,广泛表达于真核细胞肌浆网中的SERCA2则可以利用ATP供能,驱动胞浆内Ca²⁺重新泵入钙库中,从而降低胞浆中Ca²⁺浓度,以维持细胞内外Ca²⁺的动态平衡,同时为心肌细胞的下一次收缩储存足够的Ca²⁺量^[23]。本研究结果显示,给予不同剂量滇乌碱后,大鼠心肌组织中RyR2、SERCA2蛋白表达均不同程度地下调,表明滇乌碱可造成肌浆网对Ca²⁺的再摄取功能障碍,从而导致Ca²⁺超载,使心肌细胞丧失自律性、兴奋性、传导性等生理功能,最终引起病理状态下心肌收缩、舒张功能的障碍。

综上所述,滇乌碱可导致大鼠心律失常;其毒理学机制可能与降低心肌组织中Ca²⁺-Mg²⁺-ATP酶、Na⁺-K⁺-ATP酶活性,下调心肌组织中钙转运相关蛋白RyR2、SERCA2的表达,从而导致Ca²⁺超载有关。

参考文献

[1] 关克俭.中国植物志:第27卷[M].北京:科学出版社,1979:245.
[2] MING L I, JUN H E, JIANG L L, et al. The anti-arthritic effects of Aconitum vilmorinianum, a folk herbal medicine in South Western China[J]. J Ethnopharmacol, 2013, 147(1):122-127.
[3] 云南省食品药品监督管理局.云南省中药材标准:第七册[S].2005年版.昆明:云南省科技出版社,2013:69-70.
[4] 王丽苹,陈强威,沈志滨,等.黄草乌及其炮制品的毒性和

镇痛作用研究[J].中药材,2018,41(8):1864-1868.
[5] 黎虽宇.黄草乌炮制前后生物碱含量变化及亚急性毒性研究[D].广州:广东药科大学,2019.
[6] 温玉莹,王丽苹,沈志滨,等.黄草乌及其炮制品对心脏毒性的作用和机制研究[J].中药材,2019,42(6):1277-1282.
[7] 黎虽宇,刘小赞,唐春萍,等.黄草乌炮制前后生物碱含量及心脏毒性差异研究[J].中草药,2018,49(23):5588-5593.
[8] 储睿,朱刚艳. RyR2在心律失常中的研究进展[J].临床误诊误治,2017,30(10):113-116.
[9] 李志勇.附子成分次乌头碱心脏毒性及中毒机制研究[D].北京:北京中医药大学,2008.
[10] 林志共,蔡文,唐希灿.滇乌碱的抗炎和镇痛作用[J].中国药理学与毒理学杂志,1987,1(2):93-99.
[11] 张舒涵,李晋奇.乌头碱心脏毒性作用机制的研究进展[J].中西医结合心脑血管病杂志,2018,16(10):1366-1370.
[12] 冯群,李晓宇,栾永福,等.附子水提物单次给药对小鼠心脏“量-时-毒”关系研究[J].中国中药杂志,2015,40(5):927-932.
[13] 唐恬,赵婷,赵晖,等.附子及其炮制品对大鼠心脏毒性的影响[J].中国中医急症,2016,25(12):2286-2289,2315.
[14] 杨蕾,王宇航,刘晓宇,等.缺血性QTc间期改变临床意义[J].中华实用诊断与治疗杂志,2010,24(2):154-156.
[15] 潘美辰,周小伟,刘艳,等.乙醇-乌头碱致心律失常的毒理分子机制研究进展[J].法医学杂志,2020,36(1):115-119.
[16] 陈芸,章茜. Ryanodine受体通道的分子调控与心脏疾病[J].医学研究与教育,2010,27(2):74-77,101.
[17] 徐炜棉,郭金莲,王燕琴,等.苦参碱对阿霉素所致H9c2心肌细胞损伤的保护作用及与线粒体Na⁺-K⁺-ATP酶、Ca²⁺-ATP酶关系的研究[J].中国医院药学杂志,2019,39(9):941-944.
[18] 苑春元,周华,戎靖枫,等.补心方对慢性心衰大鼠心肌Na⁺-K⁺-ATP酶、Ca²⁺-Mg²⁺-ATP酶及琥珀酸脱氢酶的作用研究[J].时珍国医国药,2013,24(6):1374-1376.
[19] 俞飞虎,邓媛,陈振云,等.大蒜素预处理对急性心肌缺血再灌注损伤的保护作用[J].心脑血管病防治,2020,20(5):451-455.
[20] 彭微,易明晶,王俊俊,等.次乌头碱与甘草苷合用对大鼠心肌兴奋-收缩偶联相关基因mRNA表达的影响[J].中华中医药杂志,2013,28(1):117-120.
[21] 王世红,陈安宝,李芳.乌头碱中毒心脏毒性的分子机制研究进展[J].西北药学杂志,2020,35(6):972-975.
[22] 韩红梅,尹长城. Ca²⁺对骨骼肌钙释放通道的调节[J].生理科学进展,2006,37(2):132-135.
[23] MARK D, MCCAUL E Y, XANDER H T. Targeting ryanodine receptors for anti-arrhythmic therapy[J]. Acta Pharmacol Sin, 2011, 32(6):749-757.

(收稿日期:2021-07-20 修回日期:2021-10-20)

(编辑:林 静)