

DOI:10.13288/j.11-2166/r.2023.07.014

桂枝甘草汤对豚鼠心室肌细胞IK_s及HEK293细胞IK_r的影响

邢作英¹, 王永霞²✉, 朱明军², 胡宇才², 陈召起³, 高原², 宋欢欢², 邱伯雍²

1. 河南中医药大学, 河南省郑州市金水区金水东路156号, 450000; 2. 河南中医药大学第一附属医院; 3. 河南省人民医院/郑州大学人民医院

[摘要] **目的** 探讨桂枝甘草汤治疗心律失常的可能作用机制及配伍意义。**方法** 30只SD大鼠随机分为桂枝组(桂枝单煎液120 mg/ml)、甘草组(甘草单煎液60 mg/ml)、桂枝甘草单煎液混合组(桂枝单煎液+甘草单煎液混合180 mg/ml)、桂枝甘草汤同煎液组(桂枝和甘草同煎液180 mg/ml)、对照组(生理盐水), 每组6只。各组每天灌胃相应药物1 ml/100 g, 3天后腔静脉取血制备含药血清。分离豚鼠心室肌细胞, 设桂枝血清组、甘草血清组、桂枝甘草单煎液混合血清组、桂枝甘草汤同煎液血清组、对照血清组, 每组5个复孔; 各组以体积比分别加入10%和15%浓度含药血清, 培养24 h后分别检测各组在0、20、30、40、50 mV条件下慢激活延迟整流钾电流(IK_s)电流密度。HEK293细胞分组及干预方法同心室肌细胞, 培养24 h后分别检测各组在0、20、30、40、50 mV条件下快激活延迟整流钾电流(IK_r)尾电流密度及IK_r尾电流动力学参数(包括激活半电压、斜率因子)。**结果** 在10%浓度药物干预下, 0、20、30、40、50 mV时各组IK_s电流密度比较差异均无统计学意义($P>0.05$), 20、30、40、50 mV时各组IK_r尾电流密度比较差异均无统计学意义($P>0.05$)。在15%浓度药物干预下, 与对照血清组比较, 甘草血清组和桂枝甘草单煎液混合血清组各电压IK_s电流密度均降低, 桂枝血清组30、40、50 mV时IK_s电流密度降低, 桂枝甘草汤同煎液血清组50 mV时IK_s电流密度降低($P<0.05$); 桂枝甘草汤同煎液血清组各电压IK_r尾电流密度均降低, 桂枝甘草单煎液混合血清组50 mV时IK_r尾电流密度降低, 甘草血清组0 mV时IK_r尾电流密度升高($P<0.05$)。在15%浓度药物干预下, 与甘草血清组比较, 桂枝甘草汤同煎液血清组30 mV时IK_s电流密度升高, 各电压IK_r尾电流密度均降低($P<0.05$); 与桂枝血清组比较, 桂枝甘草汤同煎液血清组30、40、50 mV时IK_r尾电流密度降低($P<0.05$)。与对照血清组比较, 在10%药物浓度干预下, 各组IK_r尾电流激活半电压均减小($P<0.05$); 在15%药物浓度干预下, 各组IK_r尾电流激活半电压均减小($P<0.05$), 甘草血清组、桂枝血清组斜率因子减小($P<0.05$)。**结论** 桂枝甘草汤可在一定程度上抑制心室肌细胞IK_s及HEK293细胞IK_r, 这可能是其治疗心律失常的作用机制之一, 且方中桂枝和甘草配伍具有协同增效的作用。

[关键词] 心律失常; 桂枝甘草汤; 心室肌细胞; HEK293细胞; 慢激活延迟整流钾电流; 快激活延迟整流钾电流

心肌细胞膜上的离子通道功能紊乱可引发心律失常, 严重者甚至导致心源性猝死^[1]。目前药物治疗法是心律失常不可缺少的重要手段, 但有研究发现使用阻断单一离子通道的抗心律失常药物, 在获得明确抗心律失常作用的同时会导致恶性心律失常发

生率和死亡率的增加^[2], 因此研发能够多通道协同作用的抗心律失常药物意义重大。心律失常属于中医学“心悸”“怔忡”范畴。中医理论认为, 心阳不足, 则推动血液运行作用减弱, 心脉失去濡养, 可导致心悸、头晕等症状的出现。因此, 温补心阳是治疗心律失常的基本治法之一。桂枝、甘草是张仲景辛温补阳治法的常用药物组合, 且桂枝甘草汤治疗心系系统疾病已被证实具有良好疗效^[3]。

基金项目: 国家自然科学基金(81803944, 81102698); 河南省科技创新团队(C20130050); 河南省高校科技创新团队(131RTSTHN012)

✉ 通讯作者: wyxchzhq@163.com

在人及大动物心脏复极过程中延迟整流钾离子通道电流 (IK) 发挥着重要作用, 由慢激活延迟整流钾电流 (IKs) 和快激活延迟整流钾电流 (IKr) 共同调节。研究^[4]显示, IK 异常会诱发 QT 间期综合征进而导致严重心律失常的发生。豚鼠心室肌细胞电活动存在长平台期, 类似于人心肌细胞电生理特性, 常用于研究药物对 IKs、IKr 的作用^[5]。因 IKr 电流激活快且在激活后迅速失活^[6], 故本实验观察桂枝甘草汤不同配伍含药血清对豚鼠心室肌细胞 IKs 的影响, 并选用稳定表达人类 ether- α -go-go 相关基因 (HERG) 的 HEK293 细胞记录 IKr 尾电流的情况, 以期对桂枝甘草汤不同配伍组方相关药理研究及研发提供基础研究证据。本研究经河南中医药大学第一附属医院伦理委员会批准 (伦理批准号: YFYDW2019005)。

1 材料与方法

1.1 动物及细胞

普通级 Hartley 成年豚鼠 25 只, 雌雄各半, 3 月龄, 体质量 220 ~ 320 g, 购自北京金牧阳实验动物养殖有限责任公司, 实验动物合格证号: SCXK (京) 2018-0004, 以普通级豚鼠饲料、纯水和绿叶蔬菜喂养。清洁级雄性 SD 大鼠 30 只, 体质量 220 ~ 320 g, 3 月龄, 购自北京维通利华实验动物技术有限公司, 实验动物合格证号: SCXK (京) 2017-0001, 以清洁级大鼠维持饲料和纯水喂养。HEK293 细胞由北京爱思益普生物科技股份有限公司捐赠。

1.2 药物

桂枝 (批号: 20190315)、甘草 (批号: 20190221), 购自江阴天江药业有限公司; 尼莫地平片 (尼膜同, 拜耳公司, 30 mg/片, 国药准字: H2003010)。

1.3 主要试剂及仪器

戊巴比妥钠 (批号: 57-33-0, RUIBIO 公司); 氯化钾 (KCl, 批号: 7447-40-7)、氯化钠 (NaCl, 批号: 7647-14-5)、磷酸氢二钾 (K_2HPO_4 , 批号: 7758-11-4)、羟乙基哌嗪乙磺酸 (HEPES, 批号: 7365-45-9)、硫酸镁 ($MgSO_4$, 批号: 7487-88-9)、葡萄糖 (Glucose, 批号: 50-99-7)、氯化钙 ($CaCl_2$, 批号: 10035-04-8)、氢氧化钠 (NaOH, 批号: 215-185-5)、氯化镁 ($MgCl_2$, 批号: 7791-18-6)、乙二醇双 (2-氨基乙基醚) 四乙酸 (EGTA, 批号: 126824-24-6)、葡萄糖酸钾 (K-gluconate, 批号: 299-27-4)、天门冬氨酸钾 (K-Aspartic, 批号: 214-226-4)、牛磺酸 (Taurine, 批号: 1001675865)、肉碱 (Carnitine, 批号: 1001433553)、

肌酸 (Creatine, 批号: 1001306581)、三磷酸腺苷二钠 (Na_2 -ATP, 批号: 987-65-5), Sigma 公司; II 型胶原酶 (collagenase type II, 批号: 17101-015)、细胞培养基 (Media 199, 批号: 1221478)、胎牛血清 (批号: 2105263RP), Gibco 公司; N-甲基-D-葡萄糖胺 (N-methyl-D-glucamine, 批号: 6284-40-8)、肝素 (批号: 9041-08-1), Solarbio 公司; 青链霉素混合液 (批号: GC301011, Servicebio 公司); G418 (批号: 1776887, Thermofisher 公司); E-4031 (批号: 2A/110880, TOCRIS 公司)。

离心机 (YZB/GER 1806-2014 型, Thermo Fisher 公司); 膜片钳设备 (EPC-10 型, 德国 HEKA 公司); 倒置显微镜 (IX 71 型, 日本 Olympus 公司); 三维操纵仪 (MP-285 型)、玻璃微电极 (长 10 cm, 内径 0.86 mm, 批号: 154001-6), 美国 SUTTER 公司。

1.4 含药血清的制备

30 只 SD 大鼠采用随机数字表法分为桂枝组 (12 g 桂枝单煎液)、甘草组 (6 g 甘草单煎液)、桂枝甘草单煎液混合组 (12 g 桂枝单煎液+6 g 甘草单煎液混合)、桂枝甘草汤同煎液组 (12 g 桂枝和 6 g 甘草同煎液)、对照组 (生理盐水), 每组 6 只。各组药物分别加 100 ml 水浸泡 30 min 后煎煮 30 min, 过滤取液后加 100 ml 水再煮 30 min, 两次煎液混合, 再煎煮浓缩至 100 ml, 桂枝甘草单煎液混合组为两药煎液各浓缩为 50 ml 后混合为 100 ml。各组给药终浓度分别为: 桂枝组 120 mg/ml, 甘草组 60 mg/ml, 桂枝甘草单煎液混合组 180 mg/ml, 桂枝甘草汤同煎液组 180 mg/ml。

大鼠给药量以成人 (以 60 kg 体重换算) 给药量的 5 倍计算^[7], 约为每天 1 ml/100 g, 各组每日早 9:00、晚 5:00 分两次灌胃, 连续 3 天, 对照组灌服等量生理盐水。课题组预实验结果^[8]显示, 给药后 1 h 的血清样品中药物的血中移行成分最多而且浓度最高, 因此本实验选定最后一次灌胃 1 h 后为最佳采血时间。最后一次灌胃 1 h 后, 各组大鼠以戊巴比妥钠 40 mg/kg 麻醉, 腔静脉取血, 4 °C 冰箱冷藏静置 3 h 后, 用离心机 (离心半径 10 cm) 4 °C、3000 r/min 离心 15 min 收集血清, 经 56 °C 水浴灭活 30 min 后 -80 °C 冰箱存放备用。

1.5 豚鼠心室肌细胞急性分离

参照文献 [9] 分离豚鼠心室肌细胞。豚鼠以 0.1 g/kg 戊巴比妥钠合 1 ml 肝素麻醉, 备皮后开胸暴露心脏, 从主动脉根部取下, 连接于自制的 Langendorff 灌流装置, 流速为 4 ~ 5 ml/min, 水浴锅

维持灌流装置温度在 37 ~ 37.5 °C。自制台式液 (NaCl 118 mmol/L, KCl 4.8 mmol/L, $K_2HPO_4 \cdot 2H_2O$ 0.33 mmol/L, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 1.0 mmol/L, Glucose 1.1 mmol/L, HEPES 25 mmol/L, $CaCl_2$ 1.5 mmol/L, NaOH 调 pH 值至 7.3 ~ 7.4) 灌洗 5 min, 继以 0.5 g/L 的 II 型胶原酶无钙台式液灌流, 灌流器单向排液 5 min 后改为循环灌流, 灌流时间为 10 ~ 15 min, 终点时间以心脏消化透亮、组织易撕拉为准。酶解完成后用弯镊从心尖部位开始将心脏组织依次夹取至盛有自制 KB 液 (KOH 80 mmol/L, KCl 30 mmol/L, L-Glutamic Acid 50 mmol/L, $MgCl_2$ 1 mmol/L, HEPES 10 mmol/L, Glucose 10 mmol/L, KH_2PO_4 20 mmol/L, Taurine 20 mmol/L, EGTA 0.5 mmol/L, KOH 调 pH 值至 7.3 ~ 7.4) 的 50 ml 烧杯中, 2 ml 一次性吸管轻柔吹吸细胞液, 使细胞从心肌组织上脱落, 用 200 目细滤网过滤获得心肌细胞液。

1.6 细胞分组及干预方法

心室肌细胞液经复钙处理并分离提纯后以细胞培养基 (Media 199: Taurine 5 mmol/L, Carnitine 5 mmol/L, Creatine 5 mmol/L, Antibiotic/Antimycotic 0.5% 体积) 重悬, 在细胞培养皿中事先铺设直径 1 cm 的细胞爬片, 因复钙后存留细胞数量有差异, 所以铺设细胞浓度以显微镜 200 倍视野下细胞数 10 个左右为宜。参考文献 [10-11] 及预实验结果^[8], 以体积比分别加入 10% 和 15% 浓度含药血清。10% 浓度含药血清实验以 1.8 ml 细胞悬液加入 200 μ l 相应药物血清, 充分混匀后铺设于细胞培养皿中, 分为桂枝血清组、甘草血清组、桂枝甘草单煎液混合血清组、桂枝甘草汤同煎液血清组、对照血清组, 每组 5 个复孔; 15% 浓度含药血清实验以 1.7 ml 细胞悬液加入 300 μ l 相应药物血清, 充分混匀后铺设于细胞培养皿中, 分组及复孔设置同上。后置于 37 °C、5% CO_2 的细胞孵育箱中, 24 h 后取出附着有细胞的爬片用于观察各组 IK_s 水平。

HEK293 细胞系置于细胞培养基中, 分别加入 10% 和 15% 含药血清及 10% 胎牛血清、G418 (1.2 mg/ml)。24 孔板中事先铺设细胞爬片, 分组同上, 每组以 3×10^3 浓度铺设细胞, 每组 5 个复孔。在 37 °C、5% CO_2 的湿化培养箱中培养, 24 h 后观察各组 IK_r 水平。

1.7 细胞电流记录

在 23 ~ 25 °C 室温下利用全细胞膜片钳装置, 参考文献 [9] 方法观察药物对 IK_s 的影响。细胞外液组成: $MgCl_2$ 5 mmol/L, N-methyl-D-glucamine

149 mmol/L, $CaCl_2$ 0.9 mmol/L, $CdCl_2$ 0.1 mmol/L, HEPES 5 mmol/L, E-4031 0.1 mmol/L, HCl 调 pH 值至 7.3 ~ 7.4; 电极内液组成: K-gluconate 140 mmol/L, NaCl 5 mmol/L, HEPES 10 mmol/L, EGTA 1 mmol/L, $MgCl_2$ 1 mmol/L, $CaCl_2$ 0.1 mmol/L, Mg-ATP 2 mmol/L, KOH 调 pH 值至 7.2 ~ 7.25。细胞外液中以 1 μ mol/L 尼莫地平阻断 $ICa-L$ 电流, 并以 2 μ mol/L 的 E-4031 阻断 IK_r 。选择电压钳模式, 去极化电压范围为 -60 mV 至 50 mV, 阶跃电压为 10 mV, 持续时间为 4000 ms; 然后保持 -40 mV 电压 4000 ms 引出 IK_s 尾电流, 膜电位维持在 -40 mV 时, 钠离子和 T 型钙离子通道电流失活。分别在 0、20、30、40、50 mV 电压条件下, 观察药物对 IK_s 电流密度的影响, 电流结果用 PatchMaster (EPC-10) 软件系统记录分析。

参考文献 [12] 方法观察药物对 IK_r 的影响。细胞外液组成: KCl 3.5 mmol/L, NaCl 140 mmol/L, $CaCl_2$ 2 mmol/L, HEPES 10 mmol/L, $MgCl_2$ 1 mmol/L, NaH_2PO_4 1.25 mmol/L, Glucose 10 mmol/L, NaOH 调 pH 值至 7.3 ~ 7.4; 电极内液组成: KCl 20 mmol/L, K-Aspartic 110 mmol/L, HEPES 10 mmol/L, $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ 1 mmol/L, EGTA 5 mmol/L, Na_2 -ATP 2 mmol/L, KOH 调 pH 值至 7.2 ~ 7.25。选择电压钳模式, 去极化电压范围为 -60 mV 至 60 mV, 阶跃电压为 10 mV, 持续时间为 5000 ms; 然后保持 -40 mV 电压 2500 ms 引出 IK_r 尾电流。分别在 0、20、30、40、50 mV 电压条件下, 观察药物对 IK_r 尾电流电流密度的影响。用记录 IK_r 稳态激活的 I-V 方案, 测量不同电压 V_t 条件下 IK_r 尾电流峰值, 以 G/G_{max} 对电压 V_t 作图, 得到 IK_r 的稳定激活曲线, 以 Boltzman 方程拟合曲线, 求得 IK_r 尾电流动力学参数 (包括激活半电压、斜率因子)。原始电流数据采用 EPC-10 (Germany HEKA) 膜片钳设备进行采集和分析, 使用 Origin7.5 (USA Origin Lab) 进行图像处理。

1.8 统计学方法

采用 SPSS 22.0 软件进行统计分析。计量资料符合正态分布以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 使用单因素方差分析, 方差齐者组间比较采用 LSD 法, 方差不齐者组间比较采用 Dunnett's T^* 法。使用 Graphpad Pad 9 软件对实验数据作图。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组细胞不同浓度药物干预下 IK_s 电流密度比较表 1 示, 在 10% 浓度药物干预下, 不同电压各

组间 I_{Ks} 电流密度比较差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。表 2 示, 在 15% 浓度药物干预下, 与对照血清组比较, 甘草血清组和桂枝甘草单煎液混合血清组各电压 I_{Ks} 电流密度均降低, 桂枝血清组在 30、40、50 mV 时 I_{Ks} 电流密度降低, 桂枝甘草汤同煎液血清组仅在 50 mV 时 I_{Ks} 电流密度降低 ($P < 0.05$)。各用药组间比较, 桂枝甘草汤同煎液血清组在 30 mV 时 I_{Ks} 电流密度高于甘草血清组 ($P < 0.05$), 在 0 mV、30 mV 时 I_{Ks} 电流密度高于桂枝甘草单煎液混合血清组 ($P < 0.05$)。各组心室肌细胞不同浓度药物干预下 I_{Ks} 电流-电压关系曲线见图 1。

2.2 各组细胞不同浓度药物干预下 I_{Kr} 尾电流密度比较

表 3 示, 在 10% 浓度药物干预下, 0 mV 时各

组 I_{Kr} 尾电流密度与对照血清组比较均升高 ($P < 0.05$), 20、30、40、50 mV 时各组 I_{Kr} 尾电流密度比较差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。表 4 示, 在 15% 浓度药物干预下, 与对照血清组比较, 桂枝甘草汤同煎液血清组各电压 I_{Kr} 尾电流密度均降低, 桂枝甘草单煎液混合血清组 50 mV 时 I_{Kr} 尾电流密度降低, 而甘草血清组 0 mV 时 I_{Kr} 尾电流密度升高 ($P < 0.05$); 与甘草血清组比较, 桂枝甘草汤同煎液血清组各电压 I_{Kr} 尾电流密度均降低, 桂枝血清组、桂枝甘草单煎液混合血清组 0 mV 时 I_{Kr} 尾电流密度降低 ($P < 0.05$); 与桂枝血清组比较, 桂枝甘草汤同煎液血清组 30、40、50 mV 时 I_{Kr} 尾电流密度降低 ($P < 0.05$)。各组 HEK293 细胞不同浓度药物干预下 I_{Kr} 尾电流-电压关系曲线见图 2。

表 1 各组细胞 10% 浓度药物干预下不同电压 I_{Ks} 电流密度比较

Table 1 Comparison of I_{Ks} current density at different voltages under 10% concentration of drug intervention in each group (pA/pF, $\bar{x} \pm s$)

组别	样本数	0 mV	20 mV	30 mV	40 mV	50 mV
对照血清组	5	1.60±0.85	3.32±0.99	4.26±1.35	5.18±1.63	6.13±2.53
甘草血清组	5	1.78±0.85	3.55±0.88	4.78±1.67	5.35±1.37	6.23±1.02
桂枝血清组	5	1.10±0.30	2.44±0.52	3.15±0.77	3.97±0.94	4.88±1.88
桂枝甘草单煎液混合血清组	5	0.94±0.79	2.41±0.79	3.34±1.14	4.31±1.67	4.73±2.69
桂枝甘草汤同煎液血清组	5	0.95±0.57	2.48±1.07	3.38±1.19	4.28±1.33	4.93±1.42

注: I_{Ks} , 慢激活延迟整流钾电流。

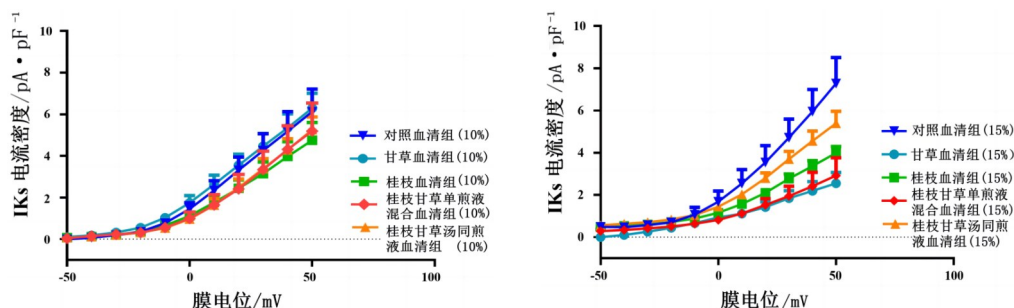
表 2 各组细胞 15% 浓度药物干预下不同电压 I_{Ks} 电流密度比较

Table 2 Comparison of I_{Ks} current density at different voltages under 15% concentration of drug intervention in each group (pA/pF, $\bar{x} \pm s$)

组别	样本数	0 mV	20 mV	30 mV	40 mV	50 mV
对照血清组	5	1.67±0.45	3.54±0.52	4.68±0.62	6.00±0.94	7.69±1.19
甘草血清组	5	0.94±0.14 ^{a)}	1.42±0.58 ^{a)}	1.84±0.81 ^{a)}	2.20±0.98 ^{a)}	2.55±1.16 ^{a)}
桂枝血清组	5	1.19±0.28	2.07±0.61	2.83±0.72 ^{a)}	3.40±0.79 ^{a)}	4.19±0.91 ^{a)}
桂枝甘草单煎液混合血清组	5	0.82±0.16 ^{a)}	1.52±0.68 ^{a)}	1.95±0.50 ^{a)}	2.41±0.97 ^{a)}	2.92±1.88 ^{a)}
桂枝甘草汤同煎液血清组	5	1.45±0.21 ^{c)}	2.78±0.61	3.67±0.90 ^{b) c)}	4.42±1.26	4.86±0.92 ^{a)}

注: I_{Ks} , 慢激活延迟整流钾电流。

a) 与对照血清组比较, $P < 0.05$; b) 与甘草血清组比较, $P < 0.05$; c) 与桂枝甘草单煎液混合血清组比较, $P < 0.05$ 。



注: I_{Ks} , 慢激活延迟整流钾电流。

图 1 各组心室肌细胞不同浓度药物干预下 I_{Ks} 电流-电压关系曲线图

Figure 1 I_{Ks} current-voltage relationship of ventricular myocytes in each group under different concentrations of drug intervention

表 3 各组细胞 10% 浓度药物干预下不同电压 IKr 尾电流密度比较

Table 3 Comparison of IKr tail current density at different voltages under 10% concentration of drug intervention in each group (pA/pF, $\bar{x}\pm s$)

组别	样本数	0 mV	20 mV	30 mV	40 mV	50 mV
对照血清组	5	6.51±0.27	34.08±1.46	42.48±1.80	44.48±1.85	45.34±2.04
甘草血清组	5	19.53±7.32 ^{a)}	39.52±14.39	41.42±14.61	41.82±14.82	41.42±14.61
桂枝血清组	5	23.81±9.85 ^{a)}	43.06±13.78	44.49±14.09	44.26±13.87	44.06±12.30
桂枝甘草单煎液混合血清组	5	21.23±1.93 ^{a)}	30.34±7.20	31.55±7.34	31.03±7.17	31.54±9.51
桂枝甘草汤同煎液血清组	5	26.05±5.76 ^{a)}	43.80±11.93	45.18±12.40	44.60±12.72	41.92±12.98

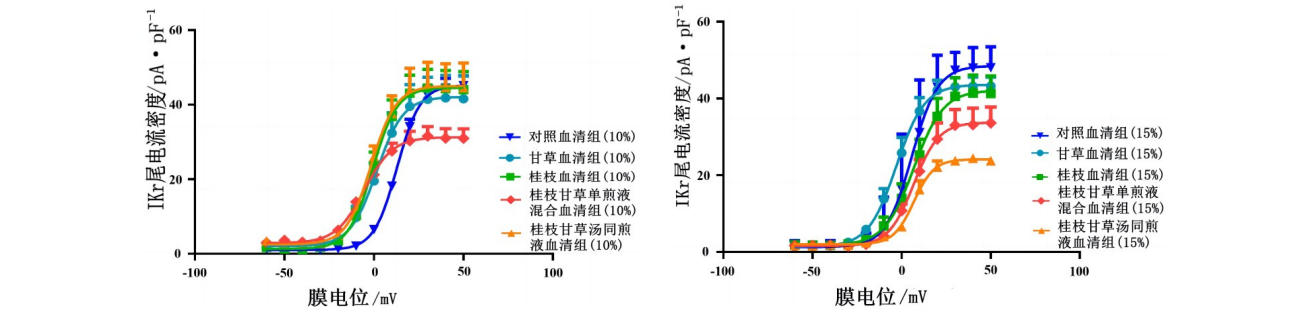
注: IKr, 快激活延迟整流钾电流。
a) 与对照血清组比较, $P<0.05$ 。

表 4 各组细胞 15% 浓度药物干预下不同电压 IKr 尾电流密度比较

Table 4 Comparison of IKr tail current density at different voltages under 15% concentration of drug intervention in each group (pA/pF, $\bar{x}\pm s$)

组别	样本数	0 mV	20 mV	30 mV	40 mV	50 mV
对照血清组	5	16.34±4.65	43.15±6.95	47.36±5.49	47.86±5.67	48.89±4.73
甘草血清组	5	25.86±5.44 ^{a)}	41.50±7.04	42.54±6.47	42.72±6.53	42.82±6.30
桂枝血清组	5	11.67±2.88 ^{b)}	35.54±9.93	40.84±11.83	41.64±12.21	41.20±12.62
桂枝甘草单煎液混合血清组	5	10.79±4.42 ^{b)}	29.34±7.32	32.52±11.08	33.18±11.03	32.62±11.00 ^{a)}
桂枝甘草汤同煎液血清组	5	6.57±0.71 ^{a) b)}	22.16±2.77 ^{a) b)}	23.75±2.03 ^{a) b) c)}	24.45±1.48 ^{a) b) c)}	23.17±2.21 ^{a) b) c)}

注: IKr, 快激活延迟整流钾电流。
a) 与对照血清组比较, $P<0.05$; b) 与甘草血清组比较, $P<0.05$; c) 与桂枝血清组比较, $P<0.05$ 。



注: IKr, 快激活延迟整流钾电流。

图 2 各组 HEK293 细胞不同浓度药物干预下 IKr 尾电流-电压关系曲线图

Figure 2 IKs current-voltage relationship of HEK293 cells in each group under different concentrations of drug intervention

2.3 各组细胞不同浓度药物干预下 IKr 尾电流动力学参数比较

表 5 示, 在 10% 药物浓度干预下, 与对照血清组比较, 各组 IKr 尾电流激活半电压均减小 ($P<$

0.05), 斜率因子差异均无统计学意义 ($P>0.05$); 各药物干预组激活半电压、斜率因子比较差异无统计学意义 ($P>0.05$)。在 15% 药物浓度干预下, 与对照血清组比较, 各组 IKr 尾电流激活半电压均

表 5 各组细胞不同浓度药物干预下 IKr 尾电流动力学参数比较

Table 5 Comparison of kinetic properties of IKr tail current under different concentrations of drug intervention in each group ($\bar{x}\pm s$)

组别	样本数	10%		15%	
		激活半电压/mV	斜率因子	激活半电压/mV	斜率因子
对照血清组	5	9.81±0.48	7.13±0.43	15.53±0.62	8.13±0.55
甘草血清组	5	1.24±1.40 ^{a)}	7.71±1.25	3.41±0.31 ^{a)}	4.11±0.25 ^{a)}
桂枝血清组	5	-0.21±0.46 ^{a)}	6.88±0.40	3.01±0.43 ^{a)}	4.84±0.37 ^{a)}
桂枝甘草单煎液混合血清组	5	-6.23±0.69 ^{a)}	8.03±0.62	-4.26±0.60 ^{a)}	6.44±0.52
桂枝甘草汤同煎液血清组	5	0.26±0.88 ^{a)}	7.38±0.78	-2.36±0.54 ^{a)}	6.06±0.48

注: IKr, 快激活延迟整流钾电流。
a) 与对照血清组比较, $P<0.05$ 。

减小 ($P < 0.05$), 甘草血清组、桂枝血清组斜率因子减小 ($P < 0.05$); 各药物干预组激活半电压、斜率因子比较差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。

3 讨论

《伤寒杂病论·辨太阳病脉证并治》提出“心下悸，欲得按者，桂枝甘草汤主之”，这是桂枝甘草汤治疗心律失常最早的相关记载。桂枝甘草汤方中君药桂枝辛热，具有温通心阳及血脉之效；臣药甘草甘平，具有补中益气作用。二者配伍辛甘化阳，或称辛甘助阳、辛甘扶阳，治疗心血管系统疾病心阳虚证确有良效^[13]。现代研究^[14]显示，IK参与心脏窦房结起搏细胞的起搏活动和所有心肌细胞的复极过程，同时影响浦肯野纤维的最大复极电位、慢反应细胞的动作电位复极。IK包括IKs和IKr两个成分，IKs是心肌细胞复极化过程起重要作用的钾离子电流，构成心脏复极功能储备^[4]；IKr是心脏复极3期易敏感电流，影响细胞复极，其异常与房颤的发生和维持密切相关^[15]。IKs缺失或被抑制时，IKr不能正常发挥复极储备功能，复极变缓，动作电位时程延长，这可能与IKs激活缓慢，相邻心动周期期间IKs作用累加，形成较强的外向电流来纠正QT间期延长有关^[16]。前期研究^[17]发现，桂枝甘草汤可以降低离体豚鼠心室肌细胞除极幅度，使动作电位和有效不应期延长。另有研究证实，桂枝甘草汤及其提取物组分具有复杂的抗心律失常及抗心肌缺血再灌注损伤作用^[18]；甘草提取物甘草次酸可显著抑制钾电流，且呈剂量依赖性和电压依赖性^[19]，提示甘草次酸可通过抑制IK和HERG K⁺通道而发挥抗心律失常作用。

本研究结果显示，桂枝甘草汤不同配伍组方在各电压条件下可不同程度地抑制IKs，但不改变IKs的电流-电压曲线形状；其中15%浓度甘草血清组和桂枝甘草单煎液混合血清组与对照血清组比较抑制作用更显著。同时桂枝甘草汤不同配伍组方在各电压条件下可不同程度地抑制IKr尾电流，但不改变IKr尾电流的电流-电压曲线形状；其中15%浓度桂枝甘草汤同煎液血清组与对照血清组比较抑制作用更显著。根据Boltzman方程拟合曲线发现，各药物血清组均可使IKr尾电流激活半电压减小，说明各药物通过改变IKr的激活半电压进而影响IKr通道动力学参数。此外，本研究还发现，桂枝、甘草药物同煎液和单煎混合液的药理作用强弱程度有一定差异，分析原因可能是药物同煎过程中有新物质产生，但其具体原因还需要药物的化学物质基础

研究支持。

综上所述，桂枝甘草汤在15%浓度时对心室肌细胞IKs和HEK293细胞系IKr尾电流有抑制作用，其可能通过阻断IKs和HERG通道发挥抗心律失常作用；同时桂枝甘草汤配伍具有协同增效的作用，再一次证明中药配伍的重要性。本研究仅从细胞层面观察桂枝甘草汤不同配伍对IKs和IKr离子通道电流的影响，未来将开展动物实验对药物作用和机制进一步探讨，并从离子通道蛋白的表达等分子层面开展深入研究。

参考文献

- [1] NAMIT G, YORAM R, LIVIA H. Contributions of ion channel currents to ventricular action potential changes and induction of early afterdepolarizations during acute hypoxia[J]. Circresaha, 2009, 105(12): 1196-1203.
- [2] CECILIA A, JOHANNA M, ELISABET E, et al. Drug-induced torsades de pointes: a review of the Swedish pharmacovigilance database[J]. Pharmacoepidemiol Drug Saf, 2008, 17(6): 587-592.
- [3] 吕茜倩, 宋俊生. 《伤寒杂病论》方治疗心律失常方剂谱文献研究[J]. 中医杂志, 2017, 58(10): 878-880, 883.
- [4] CHENG JH, KODAMA I. Two components of delayed rectifier K⁺ current in heart: molecular basis, functional diversity, and contribution to repolarization [J]. Acta Pharmacol Sin, 2004, 25(2): 137-145.
- [5] MAYUMI Y, AKIKO K, XINYA M, et al. Characterization and functional role of rapid- and slow-activating delayed rectifier K⁺ currents in atrioventricular node cells of guinea pigs[J]. Pflugers Arch, 2021, 473(12): 1885-1898.
- [6] HEATH B, TERRAR D. The deactivation kinetics of the delayed rectifier components IKr and IKs in guinea-pig isolated ventricular myocytes [J]. Exp Physiol, 1996, 81(4): 605-621.
- [7] 赵伟, 孙国志. 不同种实验动物间用药量换算[J]. 畜牧兽医科技信息, 2010(5): 52-53.
- [8] 原双兴. 桂枝甘草汤指纹图谱及血清药物化学研究[D]. 郑州: 河南中医学院, 2014.
- [9] LIN ZH, XING WL, GAO CY, et al. Inhibitory effect of vascular endothelial growth factor on the slowly activating delayed rectifier potassium current in guinea pig ventricular myocytes [J]. J Am Heart Assoc, 2018, 7(3): e007730. doi: 10.1161/JAHA.117.007730.
- [10] 邢作英, 王永霞, 曹英杰, 等. 血清药理学研究概要[J]. 世界科学技术-中医药现代化, 2015, 17(1): 219-222.
- [11] CAO Y, XIA QH, MENG H, et al. Pharmacological effects of serum containing Chinese medicine Bushen Huayu Jiedu compound recipe in lung cancer drug-resistance cells[J]. Chin J Integr Med, 2008, 14(1): 46-50.

- [12]HUANG N, LIAN JF, HUO JH, et al. The EGFP/hERG fusion protein alter the electrophysiological properties of hERG channels in HEK293 cells [J]. Cell Biol Int, 2011,35(3):193-199.
- [13]王永霞,原双兴. 桂枝甘草汤治疗心律失常现状探讨[J]. 中华中医药杂志,2013,28(2):457-459.
- [14]GINNEKEN AC, VELDKAMP MW. Implications of inhomogeneous distribution of IKS and IKr channels in ventricle with respect to effects of class III agents and beta-agonists[J]. Cardiovasc Res, 1999,43(1):20-22.
- [15]IV JAMIE, MATTHEW DP, MARK JP, et al. hERG K(+) channels: structure, function, and clinical significance[J]. Physiol Rev, 2012,92(3):1393-1478.
- [16]BOHNEN MS, PENG G, ROBEY SH, et al. Molecular pathophysiology of congenital long QT syndrome [J]. Physiol Rev, 2017,97(1):89-134.
- [17]陈召起,邢作英,王永霞,等. 桂枝甘草汤含药血清对离体豚鼠心室肌细胞膜电位的影响[J]. 中医学报, 2019,34(5):971-975.
- [18]赵伟国. 桂枝甘草汤及其提取物组分对实验性心律失常的影响[D]. 哈尔滨:黑龙江中医药大学,2006.
- [19]WU DL, JIANG LQ, WU HJ, et al. Inhibitory effects of glycyrrhetic acid on the delayed rectifier potassium current in guinea pig ventricular myocytes and HERG channel [J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2013, 2013:481830. doi: 10.1155/2013/481830.

Effect of *Guizhi Gancao* Decoction (桂枝甘草汤) on IKs in Guinea Pig Ventricular Myocytes and IKr in HEK293 Cells

XING Zuoying¹, WANG Yongxia², ZHU Mingjun², HU Yucui², CHEN Zhaoqi³, GAO Yuan², SONG Huanhuan², QIU Boyong²

1. Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou, Henan 450046; 2. The First Affiliated Hospital of Henan University of Chinese Medicine; 3. Henan Provincial People's Hospital/Zhengzhou University People's Hospital

ABSTRACT Objective To observe the possible mechanism in treating arrhythmia and the compatibility significance of *Guizhi Gancao Decoction* (GGD). **Methods** A total of 30 SD rats were randomly divided into *Guizhi* (*Ramulus Cinnamomi*) group (*Guizhi Decoction* 120 mg/ml), *Gancao* (*Radix et Rhizoma Glycyrrhizae*) group (*Gancao Decoction* 60 mg/ml), *Guizhi* and *Gancao Decoction* mixed group (*Guizhi Decoction* + *Gancao Decoction* mixed 180 mg/ml), GGD (*Guizhi* and *Gancao* co boiling *Decoction* 180 mg/ml), and the control group (saline solution), with each group of 6 rats. The rats were intragastrically given 1 ml/100 g corresponding decoction per day. After 3 days, the medicinal serum was prepared by taking the cavity venous blood. Guinea pigs' ventricular myocytes were separated in each of the five groups, with 5 duplicated wells for each group. Each group was added with 10% and 15% concentrations of medicinal serum respectively, and the current density of the slow activation delayed rectifier potassium current (IKs) of each group was detected under the conditions of 0, 20, 30, 40, and 50 mV after culturing 24 h, respectively. HEK293 cell grouping and intervention methods were the same with ventricular muscle cells. Tail current density and the rapid activation delayed rectifier potassium current (IKr), tail current including activating semi-voltage and slope factor of IKr were detected under the conditions of 0, 20, 30, 40, and 50 mV conditions. **Results** Under the intervention of 10% concentration of decoction, there was no statistical significance for all groups of both IKs and IKs current density and at 0, 20, 30, 40, and 50 mV ($P > 0.05$). Under the intervention of 15% concentration of decoction, compared with the control group, the IKs voltage density of the *Gancao* serum group and *Guizhi Gancao Decoction* mixed group was reduced, and the IKs current density was reduced in the *Guizhi* serum group under 30, 40, and 50 mV. The IKs current density at 50 mV of the GGD co boiling group was decreased ($P < 0.05$). The voltage IKr tail current density of the GGD co boiling group was reduced. The IKr tail current density of *Guizhi* and *Gancao Decoction* mixed group at 50 mV decreased, and the IKr tail current density increased in the *Gancao* serum group under 0 mV ($P < 0.05$). Under the 15% concentration of decoction, compared with the *Gancao* serum group, the current density of IKs of the GGD co boiling group at 30 mV increased, and under every each voltage IKr tail current density decreased ($P < 0.05$). Compared with *Guizhi* serum soup, the current density of the IKr tail of the *Guizhi* and *Gancao* co boiling serum group was decreased at 30, 40, and 50 mV ($P < 0.05$). Compared with the control serum group, under the intervention of 10% decoction, the semi-voltage activation of IKr tail currents in all groups was reduced ($P < 0.05$). Under the intervention of 15% concentration of decoction, the semi-voltage activation of IKr tail currents in all groups was reduced. ($P < 0.05$), and the slope factors of the *Gancao* serum group and the *Guizhi* serum group were decreased ($P < 0.05$). **Conclusions** GGD can inhibit IKS in the ventricular muscle cell and IKr in HEK293 cells to a certain extent. This may be one of the mechanisms of the decoction in treatment of arrhythmia, and the combination of *Guizhi* and *Gancao* in the formula has a synergistic effect.

Keywords arrhythmia; *Guizhi Gancao Decoction* (桂枝甘草汤); ventricular myocytes; HEK293 cells; slow activation delayed rectifier potassium current; rapid activation delayed rectifier potassium current

(收稿日期: 2022-09-29; 修回日期: 2022-12-26)

[编辑: 邓媛]