

研究论文

乌头碱对人诱导多能干细胞衍生 心肌细胞中钙信号的影响

阎美卉 于婷婷 李森*

(北京中医药大学生命科学院, 北京 102488)

摘要 该文旨在探究乌头碱对人诱导多能干细胞衍生心肌细胞(human induced pluripotent stem cells-derived cardiomyocytes, hiPSCs-CMs)中钙信号的影响。用CCK-8法测定乌头碱对hiPSCs-CMs细胞存活率的影响;通过共聚焦显微镜的明场模式记录不同加药时间和浓度条件下乌头碱对心肌细胞的搏动频率的影响;通过共聚焦显微镜荧光系统记录乌头碱对细胞自发及1、2、3 Hz电刺激条件下钙信号的影响;使用咖啡因诱导心肌细胞肌质网中的钙离子,令其全部被释放出来,以探究乌头碱对钙库的影响。乌头碱在加药浓度为9 $\mu\text{mol/L}$ 、加药时间为6 h时将产生毒性作用,可对hiPSCs-CMs细胞存活率造成显著影响;乌头碱能够明显加快hiPSCs-CMs搏动频率,最大搏动频率与加药时间和浓度相关;乌头碱能够明显降低hiPSCs-CMs自发及1、2、3 Hz电刺激条件下钙瞬变的振幅;经0.3 $\mu\text{mol/L}$ 乌头碱作用3 h的hiPSCs-CMs的钙库总钙量下降;且乌头碱对hiPSCs-CMs搏动频率及钙信号的影响具有洗脱作用。乌头碱能够加快hiPSCs-CMs搏动频率,降低钙瞬变振幅与钙库总钙量,并由此影响心肌功能。

关键词 钙信号;乌头碱;hiPSCs-CMs;中药注射剂;心脏毒性

Effect of Aconitine on Calcium Signal in Human Induced Pluripotent Stem Cells-Derived Cardiomyocytes

YAN Meihui, YU Tingting, LI Sen*

(School of Life Sciences, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 102488, China)

Abstract This study aims to investigate the effect of aconitine on calcium signal in hiPSCs-CMs (human induced pluripotent stem cells-derived cardiomyocytes). CCK-8 assay was used to determine the effect of aconitine on the survival rate of human cardiomyocytes. The effect of aconitine on the beating frequency of cardiomyocytes under different dosage time and concentration conditions was recorded by confocal microscope light field mode. The effect of aconitine on calcium signal was recorded by confocal microscope fluorescence system under spontaneous and 1, 2, 3 Hz electrical stimulation conditions. To investigate the effect of aconitine on calcium pool, caffeine was used to induce the release of calcium ions from the sarcoplasmic reticulum of cardiomyocytes. Aconitine had toxic effects when the addition dosage was 9 $\mu\text{mol/L}$ and the dosage time was 6 h, which significantly affected

收稿日期: 2022-09-22 接受日期: 2022-12-16

国家自然科学基金(批准号: 81973698)资助的课题

*通讯作者。Tel: 010-53912177, E-mail: senli@bucm.edu.cn

Received: September 22, 2022 Accepted: December 16, 2022

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.81973698)

*Corresponding author. Tel: +86-10-53912177, E-mail: senli@bucm.edu.cn

the survival rate of human cardiomyocytes. Aconitine could significantly accelerate the beat frequency of hiPSCs-CMs, which was related to the drug treatment time and concentration. Aconitine could significantly reduce the amplitude of spontaneous calcium transients and calcium transients under 1, 2, 3 Hz electrical stimulation in human cardiomyocytes. Sarcoplasmic reticulum calcium content of human cardiomyocytes treated with 0.3 $\mu\text{mol/L}$ aconitine for 3 h was decreased. Aconitine had elution effect on the pulsatile frequency and calcium signal of hiPSCs-CMs. Aconitine can accelerate the beat frequency of hiPSCs-CMs, reduce the amplitude of calcium transient and the sarcoplasmic reticulum calcium content, and thus affect the myocardial function.

Keywords calcium signal; aconitine; hiPSCs-CMs; traditional Chinese medicine injection; cardiac toxicity

乌头碱是一种双酯型二萜生物碱, 具有显著的抗炎、镇痛、强心作用, 但同时也兼具较强的心脏毒性和神经毒性, 其主要来源于附子, 而附子是我国最早有文字记录的含毒性的草药之一^[1]。乌头碱广泛存在于毛茛科乌头属植物中, 是毛茛科植物主要的药效成分及毒性成分。药理学研究表明, 低剂量的乌头碱兼具心脏保护作用, 但其临床用药安全窗口狭窄, 心律失常是乌头碱最常见的心脏毒性临床表现。因此在临床用药方面, 国家药典对药剂乌头碱含量有严格的管控要求($\leq 0.02\%$)^[2]。

人诱导多能干细胞衍生心肌细胞(human induced pluripotent stem cells-derived cardiomyocytes, hiPSCs-CMs)由多能干细胞定向分化而来, 体外培养时, 多能干细胞在一定条件下具有无限增殖的特性, 可以被诱导并分化成多种细胞和组织, 从而解决由于供体有限造成人体心肌细胞难以获得的问题。hiPSCs-CMs在结构与机制等方面具有与成年心肌细胞相似的特性, 如紧密连接的细胞排布、肌节Z盘以及成熟的钙触发钙释放机制等^[3-4]。hiPSCs-CMs在心肌离子通道(I_{Na} 、 I_{CaL} 、 I_{f} 、 I_{to} 、 I_{K1} 、 I_{Kr} 和 I_{Ks})等特性方面的生理反应与现有的人类心肌细胞相一致^[5]。与动物模型存在种属间差异、实验周期长、费用高等缺陷相比, hiPSCs-CMs具有人源属性、来源稳定、药物反应敏感、离子通道成熟等优势。因此, 可再生的人多能干细胞衍生心肌细胞, 是可以用于高通量药物筛选, 并用于构建心脏毒性模型的理想材料, 已在国际上广泛应用于心脏安全的药理学评价, 其中包括多种化合物致心律失常风险的评价^[6-7]。

乌头碱可显著诱导心律失常, 作为诱发心律失常的重要模型药物, 近年来被广泛应用于抗心律失常药物的筛选^[8]。现代药理学研究表明, 乌头碱诱导心律失常的作用可能与其影响 K^+ 、 Na^+ 通道^[9], 抑制呼吸酶活性^[10], 诱导Cx43蛋白在特定位点脱磷酸

化^[11]等机制有关。 Ca^{2+} 参与心肌细胞兴奋-收缩耦联, 与心肌功能直接相关。虽然ZHANG等^[12]采用实时细胞分析心脏系统探索了乌头碱对hiPSCs-CMs的致心律失常作用, 发现其机制可能与半胱天冬酶依赖性凋亡途径有关, 但仍缺乏乌头碱在人心肌细胞模型上影响钙信号的有效评估。因此, 本研究将基于hiPSCs-CMs, 探索乌头碱对心肌细胞 Ca^{2+} 的影响。

1 材料与方法

1.1 药品与试剂

乌头碱(产品编号: DW0006)购自成都乐美天医药科技有限公司; 钙离子探针Fluo-4购自美国Thermo Fisher Scientific公司; 咖啡因购自德国Merck公司; 细胞增殖及毒性检测试剂盒(CCK-8)增强型购自大连美仑生物技术有限公司; DMSO购自艾万拓威达优尔国际贸易(上海)有限公司; 人源心肌细胞培养基(产品编号: HELP3001)购自艾尔普再生医学科技有限公司。

1.2 仪器

HERAcell vios 160i CO_2 培养箱和Multiskan FC酶标仪均购自美国Thermo Fisher Scientific公司; 共聚焦显微镜(FV3000)购自日本Olympus公司; 活细胞工作站(INUF-IX3W)购自日本TOKAI HIT公司; 信号发生器(DG2A)和电刺激器(DS2A-Mk.II)均购自英国Digitimer公司。

1.3 方法

1.3.1 细胞培养 将人多能干细胞衍生心肌细胞(hiPSCs-CMs)(购于南京艾尔普再生医学科技有限公司, 纯度为94.29%^[13])复苏后以 1×10^4 个/mL的密度分别接种于96孔板与共聚焦培养皿中, 再将其放入 37°C 、5% CO_2 的细胞培养箱中培养, 自第二天心肌细胞出现小幅搏动后每48 h更换一次培养基, 在第六天左右当细胞直径达到15~25 μm 、搏动频率为

40~60次/min时,即可判断细胞培养稳定。

1.3.2 CCK-8法测定乌头碱对hiPSCs-CMs细胞存活率的影响 将hiPSCs-CMs按照 1×10^4 个/mL的密度接种于96孔板中,培养至状态稳定。将提前配制好的含有0 $\mu\text{mol/L}$ 、0.3 $\mu\text{mol/L}$ 、1 $\mu\text{mol/L}$ 、3 $\mu\text{mol/L}$ 和9 $\mu\text{mol/L}$ 乌头碱(溶于DMSO溶液)的培养基添加到96孔板中,每个浓度设置5个复孔,分别培养3 h、6 h后每孔添加10 μL 的CCK-8液体,在37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 的培养箱中孵育30 min后,使用酶标仪读取450 nm波长处的吸光度(D)值并计算细胞存活率。计算公式为:细胞存活率 $=[(D_{\text{实验孔}}-D_{\text{空白孔}})/(D_{\text{对照孔}}-D_{\text{空白孔}})] \times 100\%$ 。

1.3.3 乌头碱对hiPSCs-CMs搏动频率的影响 设置对照组与乌头碱给药组。因hiPSCs-CMs对细胞外环境变化较为敏感,换液、长期在空气中暴露等均可能导致心肌细胞停止跳动,需将其放回37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 的培养箱中静置0.5~1.0 h使其恢复稳定。因此将处理后的心肌细胞置于倒置显微镜载物台上的活细胞工作站内,可保证在记录期间细胞外环境保持37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 的平衡,甚至在镜下完成对细胞的长时间培养与观察。使用Olympus显微镜内置软件CellSens,在明场模式下通过时间序列模块完成对细胞的连续拍照记录,结合ImageJ软件分析乌头碱在不同加药时间和浓度处理下对心肌细胞搏动频率的影响,每组实验重复3次。

1.3.4 乌头碱对hiPSCs-CMs钙信号的影响 设置对照组(Control)和0.3 $\mu\text{mol/L}$ 乌头碱、3 $\mu\text{mol/L}$ 乌头碱给药组,使用不同浓度乌头碱分别处理hiPSCs-CMs后,将培养皿在37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 的培养箱中静置3 h。细胞状态稳定后,吸去培养基,加入以台式液配制的4 $\mu\text{mol/L}$ Fluo-4细胞染液,将细胞放入37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 的培养箱中孵育30 min,之后吸去细胞染液,加入1 mL台式液。

将共聚焦培养皿置于倒置显微镜载物台上的活细胞工作站内,观察乌头碱对hiPSCs-CMs自发钙瞬变的影响。将Digitimer电刺激器探头一端深入共聚焦小皿内台式液液面以下,另一端与信号发生器相连,在信号发生器上调整电信号的输出模式与输出频率,分别为心肌细胞提供1、2、3 Hz电刺激,记录电刺激条件下乌头碱对hiPSCs-CMs钙瞬变的影响,设置相机曝光时长为100 ms,在streaming模式下连续拍摄200张照片,将其储存为vsi格式。

向1 mL台式液中加入0.334 μL 由DMSO配制成的10 mmol/L尼非地平,令细胞在工作站内静置3 min,可抑制细胞自发钙瞬变。以台式液配制高浓度咖啡因(25 mmol/L)诱导心肌细胞肌质网中的钙离子全部被释放出来,由此得到的相对荧光强度峰值代表hiPSCs-CMs钙库的总钙量,探究乌头碱对钙库的影响,设置相机曝光时长为100 ms,在streaming模式下连续拍摄600张照片,将其储存为vsi格式。

使用ImageJ进行数据转换,计算细胞荧光强度与背景荧光强度之差,得到钙信号相对荧光强度,使用Matlab软件的PeakCaller插件^[4]分析得到钙信号平均峰值高度,并使用SPSS对数据做统计学检验。以上每组实验均重复3次。

1.3.5 乌头碱的洗脱作用 向心肌细胞内加入乌头碱(3 $\mu\text{mol/L}$)并在37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 的培养箱中孵育3 h,弃去含乌头碱的培养基,使用PBS清洗培养皿2次,向培养皿内加入正常心肌细胞培养基,并将细胞送至37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中静置3 h,等待细胞状态恢复。在此期间分别记录初始时、给药后3 h与乌头碱替换为培养基3 h后这三个阶段的心肌细胞搏动频率、自发钙瞬变强度以及在1、2、3 Hz电刺激下的钙瞬变强度,前后对照,判断乌头碱对心肌细胞的影响作用是否可以通过替换培养基恢复。

1.3.6 统计学分析 用SPSS 22.0进行统计学分析,本研究数据用均值 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。多样本资料间采用单因素方差分析,对同一因变量进行重复测量,两组间比较采用重复测量数据的方差分析,两组间比较,方差齐,则采用 t 检验,方差不齐,则采用近似 t 检验。以 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

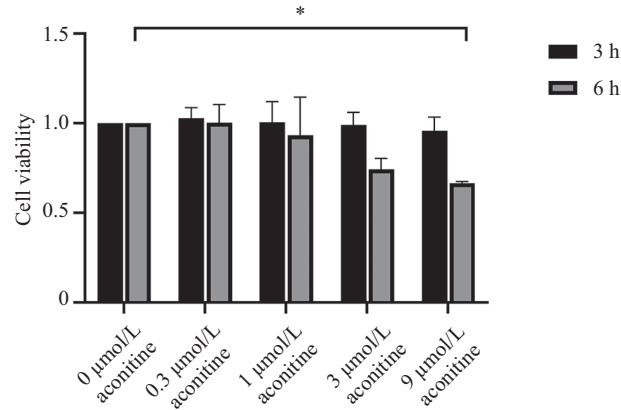
2 结果

2.1 乌头碱对hiPSCs-CMs细胞存活率的影响

通过CCK-8法探究不同浓度乌头碱在不同处理时长下对hiPSCs-CMs存活率的影响。结果如图1所示,与对照组相比,当乌头碱加药浓度为9 $\mu\text{mol/L}$ 、加药时间为6 h时,其将产生毒性作用,使hiPSCs-CMs存活率显著降低($P < 0.05$)。

2.2 乌头碱对hiPSCs-CMs搏动频率的影响

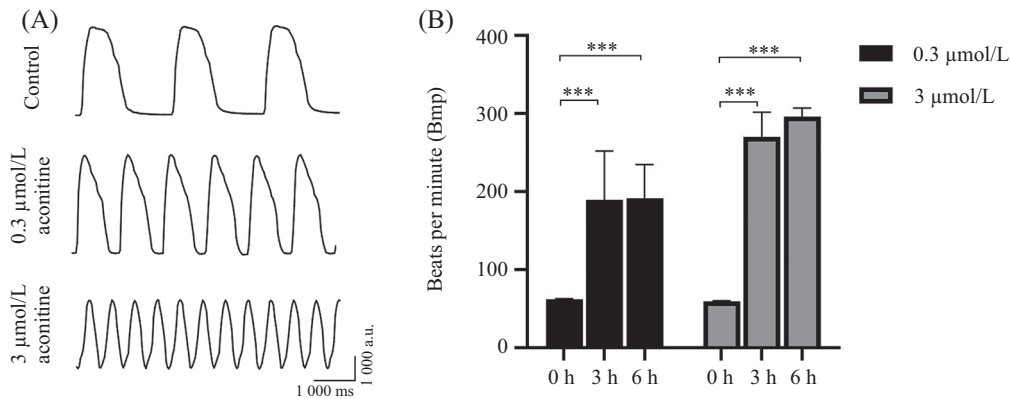
分别使用0.3 $\mu\text{mol/L}$ 、3 $\mu\text{mol/L}$ 乌头碱处理hiPSCs-CMs 0 h、3 h、6 h,观察细胞搏动频率的变化情况。实验过程中发现,部分经3 $\mu\text{mol/L}$ 乌头



* $P < 0.05$.

图1 CCK-8法测定乌头碱作用3 h与6 h对hiPSCs-CMs存活率的影响

Fig.1 CCK-8 assay was used to determine the effect of aconitine on the survival rate of hiPSCs-CMs after 3 h and 6 h treatment



A: 给药前(Control)和0.3 μmol/L乌头碱、3 μmol/L乌头碱分别给药处理后hiPSCs-CMs自发收缩的代表性曲线; B: 不同浓度与时间条件下乌头碱对搏动频率的影响。*** $P < 0.001$ 。

A: representative curves of hiPSCs-CMs spontaneous contraction before administration (Control) and after 0.3 μmol/L aconitine and 3 μmol/L aconitine administration, respectively; B: effect of aconitine on pulsatile frequency under different concentration and time conditions. *** $P < 0.001$.

图2 乌头碱对hiPSCs-CMs搏动频率的影响

Fig.2 Effect of aconitine on the beating frequency of hiPSCs-CMs

碱加药处理3 h或6 h的细胞,即使在活细胞工作站37 °C、5% CO₂的平衡环境下稳定一段时间,仍会出现间歇性停跳(arrest)现象;其余经过乌头碱处理的细胞出现明显的搏动频率加快的现象。使用ImageJ插件MUSCLEMOTION^[15]进行定量分析,获得搏动频率及收缩力相关参数,绘制收缩力变化曲线以反映搏动频率变化情况(图2A)。如图2B所示,SPSS重复测量的多因素方差分析验证结果显示,经乌头碱处理3 h、6 h的hiPSCs-CMs搏动频率与未加药时的差异有统计学意义($P < 0.001$)。

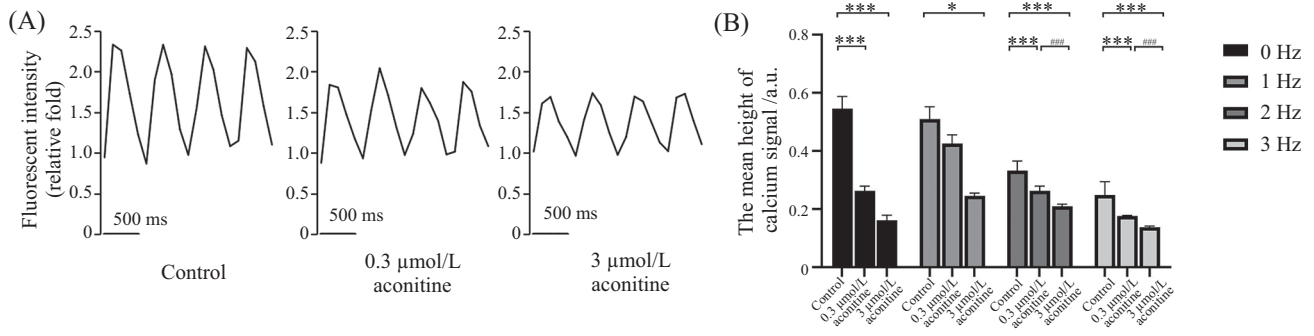
2.3 乌头碱对hiPSCs-CMs钙信号的影响

如图3所示,与对照组相比,0.3 μmol/L乌头碱作用3 h已能够明显降低hiPSCs-CMs自发钙瞬变的振幅($P < 0.001$);在1 Hz电刺激下,仅3 μmol/L乌

碱对钙信号的影响有统计学差异($P < 0.05$);然而在2、3 Hz电刺激下,对照组、0.3 μmol/L乌头碱组与3 μmol/L乌头碱组间钙信号相对振幅均有明显差异($P < 0.001$)。在咖啡因诱导下,细胞内钙库钙离子全部被释放,相对荧光强度变化曲线及钙瞬变基线与峰值荧光示意图如图4所示,与对照组相比,经0.3 μmol/L乌头碱作用3 h的hiPSCs-CMs钙库的总钙量下降($P < 0.05$)。

2.4 乌头碱的洗脱作用

3 μmol/L乌头碱给药3 h后hiPSCs-CMs搏动频率显著上升,并出现加药后间歇性停跳现象,表明此条件下心肌细胞已出现明显心脏毒性反应。实验发现,此时使用PBS洗去含乌头碱的培养基,并添加正常培养基,在37 °C、5% CO₂的培养箱中静置3 h后

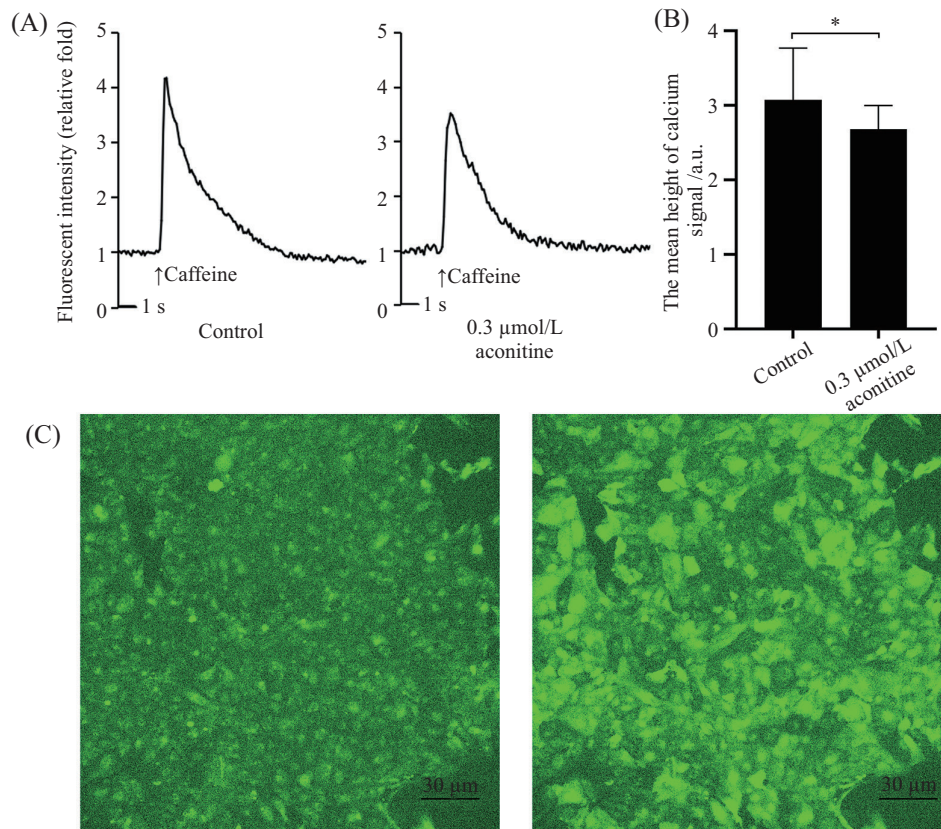


A: 对照组(Control)和0.3 μmol/L乌头碱、3 μmol/L乌头碱分别处理3 h后hiPSCs-CMs在2 Hz电刺激下钙信号振幅强度变化的代表性曲线; B: 乌头碱改变细胞钙瞬变的振幅。* $P<0.05$, *** $P<0.001$, #### $P<0.001$ 。

A: representative curves of calcium signal amplitude intensity of hiPSCs-CMs treated with Control, 0.3 μmol/L aconitine and 3 μmol/L aconitine for 3 h under 2 Hz electrical stimulation; B: aconitine alters the amplitude of cellular calcium transients. * $P<0.05$, *** $P<0.001$, #### $P<0.001$.

图3 乌头碱对hiPSCs-CMs钙信号的影响

Fig.3 Effect of aconitine on calcium signal in hiPSCs-CMs



A: 对照组与0.3 μmol/L乌头碱组咖啡因诱导的荧光相对强度变化曲线,箭头处为咖啡因加药操作时间点; B: 乌头碱改变咖啡因诱导的胞内钙浓度升高的振幅; C: 钙瞬变基线(左)与峰值(右)荧光示意图。* $P<0.05$ 。

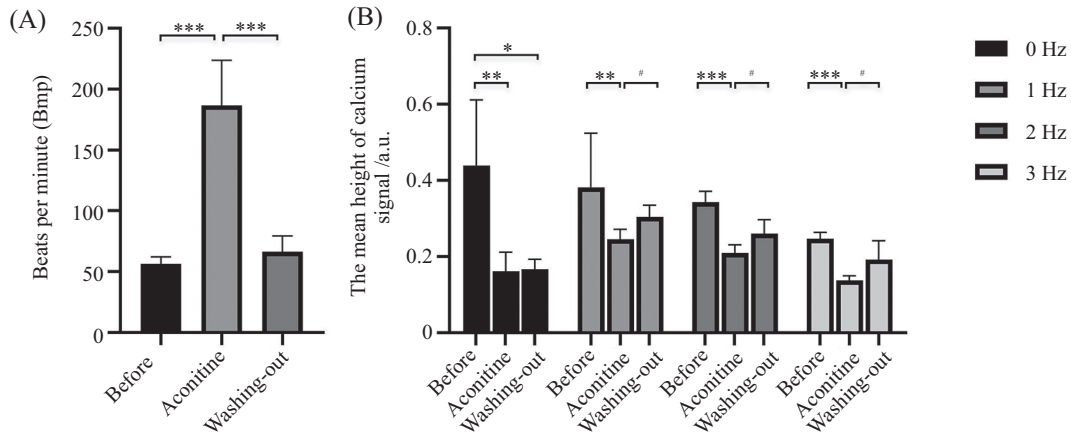
A: change curve of relative fluorescence intensity induced by caffeine in control group and 0.3 μmol/L aconitine group, the arrow is the time point of caffeine dosing operation; B: aconitine alters the amplitude of caffeine-induced increase in intracellular calcium concentration; C: fluorescence images of baseline (left) and peak (right) calcium transients. * $P<0.05$.

图4 乌头碱对hiPSCs-CMs钙库含量的影响

Fig.4 Effect of aconitine on calcium store content in hiPSCs-CMs

细胞搏动频率能够恢复至加药前水平(图5A)。在钙信号方面,如图5B所示,洗去乌头碱后,心肌细胞自发钙瞬变振幅没有恢复,但1、2、3 Hz电刺激下钙

信号强度均能恢复至加药前水平。因此可以说明,乌头碱对心肌细胞的毒性作用在某种程度而言是可逆的。



A: 乌头碱在搏动频率方面的洗脱作用; B: 乌头碱在钙信号方面的洗脱作用。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, # $P < 0.05$ 。

A: washing-out of aconitine in terms of pulsatile frequency; B: washing-out of aconitine in calcium signal. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, # $P < 0.05$ 。

图5 乌头碱的洗脱作用

Fig.5 Washing-out of aconitine

3 讨论

乌头碱的正向肌力作用^[16]使其在中医临床治疗心力衰竭、心源性休克时被誉为“回阳就逆第一品”。然而其心脏毒性同样显著,稍微超过治疗浓度即会诱发心律失常,甚至心源性猝死等严重毒副反应^[17]。刘泓等^[2]使用微电极阵列(microelectrode array, MEA)研究发现100 nmol/L乌头碱持续给药可导致hiPSCs-CMs搏动周期缩短,场电位和胞外局部动作电位时程均明显缩短,传导速度增快,收缩力降低,兴奋传导延迟。FU等^[18]发现,细胞内Ca²⁺稳态的破坏是SD大鼠附子中毒的关键机制。ZHANG等^[19]研究发现,乌头碱不仅能够介导乳鼠心肌细胞间隙蛋白Cx43和蛋白激酶PKC α 的去磷酸化,还能改变细胞内Ca²⁺的振动模式。然而以hiPSCs-CMs作为药物检测模型探究乌头碱对Ca²⁺影响的研究仍然欠缺。

本研究发现,低剂量(0.3 $\mu\text{mol/L}$)乌头碱已具有诱发hiPSCs-CMs心律失常的潜力,可使心肌细胞搏动频率大幅上升,舒张期时间显著缩短;且乌头碱对心肌细胞的作用受浓度与时间双重因素的影响。因此,即使在小剂量应用浓度下,长期使用乌头碱同样存在心脏慢性损伤的风险。

细胞质钙离子作为第二信使,其浓度与分布对心肌细胞收缩功能、节律变化、生长发育具有不可或缺的调控作用^[20]。钙离子浓度变化在一定程度上可以反映心肌细胞收缩功能^[21],由钙致钙释放引发的肌质网(sarcoplasmic reticulum, SR)内钙离子通过ryanodine受体(ryanodine receptor, RyR)释放导致的瞬时性钙增高被称为钙瞬变(Ca²⁺ transients),心肌细

胞每一次兴奋-收缩耦联时,都会出现钙瞬时性增高,通过细胞染色可观察钙瞬变的荧光强度。乌头碱在0.3 $\mu\text{mol/L}$ 和3 $\mu\text{mol/L}$ 两种浓度梯度下均会影响心肌细胞钙瞬变,导致心肌细胞自发钙瞬变的振幅下降,即减弱心肌的收缩和舒张能力,与此同时,心肌细胞的搏动频率也加快,这可能是细胞出现心力衰竭的现象令细胞搏动频率代偿性提升的结果,可能与心肌肌质网Ca²⁺-ATP酶(sarco/endoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase, SERCA)活性降低^[22]导致的钙瞬变振幅降低和细胞收缩功能障碍有关。

在搏动频率恒定的情况下,心肌收缩力越弱,则心肌功能越差,即收缩强度越弱,收缩速度越慢,则心肌功能越差。在2 Hz、3 Hz外在电刺激加持下,不同组细胞搏动频率相差不大,但经乌头碱孵育后的细胞钙离子相对荧光强度明显下降,且高浓度(3 $\mu\text{mol/L}$)组比低浓度(0.3 $\mu\text{mol/L}$)组下降更明显,说明乌头碱在长时间(3 h)加药条件下确实可降低心肌细胞收缩力,进而影响心肌功能。

与对照组相比,咖啡因诱导的乌头碱孵育后的hiPSCs-CMs,其胞内钙信号荧光强度的峰值明显下降,即钙库的总钙量下降,这与自发钙瞬变振幅的降低结果相对应,即钙瞬变振幅的降低可能源自降低的钙库总钙量。研究表明,心力衰竭期间,通常可以观察到肌质网RyR活性增强导致钙泄漏的现象^[23],这可能是钙库,即肌质网向细胞质释放的钙离子的总量下降的机制之一。

此外,本研究首次发现,由乌头碱诱导的心律失常心肌细胞模型在搏动频率与钙信号方面具有洗脱效应,这意味着乌头碱在诱导心脏毒性的潜在靶

点处的作用强度与浓度即时相关,乌头碱可能与体内其他协助平衡搏动频率与钙离子稳态的小分子竞争性结合靶标。然而,乌头碱能够被洗脱的具体机制需要进一步的实验验证。

人类成年心肌细胞供体有限、来源珍贵。本文观察到的现象是基于hiPSCs-CMs的,而人类成年心肌细胞与hiPSCs-CMs有区别,两者可能对乌头碱的潜在心脏毒性有不同反应。

综上所述,本研究发现乌头碱对hiPSCs-CMs的作用受浓度与时间双重因素的影响,其在大幅加快搏动频率的同时降低心肌收缩力和钙库含钙总量,进而影响心肌功能。在该过程中,我们发现了乌头碱作用的可逆性,这为后续中药研究提供了新的见解和方法。

参考文献 (References)

- [1] 刘艳,章诗伟,周兰,等.乌头类生物碱对心肌的毒性作用及分子毒理学研究进展[J].中国法医学杂志(LIU Y, ZHANG S W, ZHOU L, et al. Effects of aconitum alkaloids on myocardial toxicity and molecular toxicology research progress [J]. Chinese Journal of Forensic Medicine), 2009, 24(6): 398-401.
- [2] 刘泓,岳兰昕,邱丽珍,等.低剂量乌头碱持续给药重塑hiPSCs-CM线粒体能量代谢模式[J].中国药理学通报(LIU H, YUE L X, QIU L Z, et al. Remodeling mitochondrial energy metabolism pattern of hiPSCs-CM by continuous administration of low dose aconitine [J]. Chinese Pharmacological Bulletin), 2021, 37(5): 617-23.
- [3] LI S, CHEN G, LI R A. Calcium signalling of human pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes [J]. J Physiol, 2013, 591(21): 5279-90.
- [4] LI S, CHENG H, TOMASELLI G F, et al. Mechanistic basis of excitation-contraction coupling in human pluripotent stem cell-derived ventricular cardiomyocytes revealed by Ca²⁺ spark characteristics: direct evidence of functional Ca²⁺-induced Ca²⁺ release [J]. Heart Rhythm, 2014, 11(1): 133-40.
- [5] MA J, GUO L, FIENE S J, et al. High purity human-induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes: electrophysiological properties of action potentials and ionic currents [J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2011, 301(5): H2006-17.
- [6] LIANG P, LAN F, LEE A S, et al. Drug screening using a library of human induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes reveals disease-specific patterns of cardiotoxicity [J]. Circulation, 2013, 127(16): 1677-91.
- [7] MCKEITHAN W L, SAVCHENKO A, YU M S, et al. An automated platform for assessment of congenital and drug-induced arrhythmia with hiPSC-derived cardiomyocytes [J]. Front Physiol, 2017, 8: 766.
- [8] 杨宝峰,单宏丽,周宇宏,等.一种筛选抗心律失常药物新模型的建立[J].中国药理学通报(YANG B F, SHAN H L, ZHOU Y H, et al. A new model for screening antiarrhythmic drugs [J]. Chinese Pharmacological Bulletin), 2003(2): 217-21.
- [9] WANG X C, JIA Q Z, YU Y L, et al. Inhibition of the I_{NaK} and the activation of peak I_{Na} contribute to the arrhythmogenic effects of aconitine and mesaconitine in guinea pigs [J]. Acta Pharmacol Sin, 2021, 42(2): 218-29.
- [10] 李宏,陈念祖,刘明俊.大鼠乌头碱中毒心肌酶的细胞化学研究(II)——线粒体细胞色素C氧化酶(CCO)的定位[J].中国法医学杂志(LI H, CHEN N Z, LIU M J. Cytochemical study of myocardial enzymes in rats with aconitine poisoning (II): localization of mitochondrial cytochrome C oxidase (CCO) [J]. Chinese Journal of Forensic Medicine), 1988(4): 202-5,65.
- [11] 章诗伟,任杰林,张黎,等.乌头碱对培养新生大鼠心室肌细胞Connexin43蛋白磷酸化的影响[J].中国法医学杂志(ZHANG S W, REN J L, ZHANG L, et al. Effect of aconitine on phosphorylation of Connexin43 protein in cultured neonatal rat ventricular myocytes [J]. Chinese Journal of Forensic Medicine), 2008(2): 92-5,146.
- [12] ZHANG F, CAI L, ZHANG J, et al. Aconitine-induced cardiac arrhythmia in human induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes [J]. Exp Ther Med, 2018, 16(4): 3497-503.
- [13] LI Y, ZHANG Z, HAO X, et al. Qiliqiangxin capsule modulates calcium transients and calcium sparks in human induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes [J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2022, 2022: 9361077.
- [14] ARTIMOVICH E, JACKSON R K, KILANDER M B C, et al. PeakCaller: an automated graphical interface for the quantification of intracellular calcium obtained by high-content screening [J]. BMC Neurosci, 2017, 18(1): 72.
- [15] SALA L, VAN MEER B J, TERTOOLEN L G J, et al. MUS-CLEMOTION: a versatile open software tool to quantify cardiomyocyte and cardiac muscle contraction *in vitro* and *in vivo* [J]. Circ Res, 2018, 122(3): e5-e16.
- [16] 张世忠,吴博威.乌头碱与钾离子通道激动剂合用对离体大鼠心脏的正性肌力作用研究[J].中国药理学通报(ZHANG S Z, WU B W. Effect of aconitine combined with potassium channel agonist on positive muscle strength of isolated rat heart [J]. Chinese Pharmacological Bulletin), 2001(5): 570-2.
- [17] 谢晓芳.附子心脏毒作用机制研究[D].成都:成都中医药大学, 2012.
- [18] FU M, WU M, WANG J F, et al. Disruption of the intracellular Ca²⁺ homeostasis in the cardiac excitation-contraction coupling is a crucial mechanism of arrhythmic toxicity in aconitine-induced cardiomyocytes [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2007, 354(4): 929-36.
- [19] ZHANG S W, LIU Y, HUANG G Z, et al. Aconitine alters connexin43 phosphorylation status and [Ca²⁺] oscillation patterns in cultured ventricular myocytes of neonatal rats [J]. Toxicol In Vitro, 2007, 21(8): 1476-85.
- [20] 孙祝美.心肌细胞与钙离子调控[J].广州医药(SUN Z M. Cardiomyocyte and calcium ion regulation [J]. Guangzhou Medicine), 2008(3): 1-3.
- [21] EISNER D. Calcium in the heart: from physiology to disease [J]. Exp Physiol, 2014, 99(10): 1273-82.
- [22] SANKARANARAYANAN R, LI Y, GREENSMITH D J, et al. Biphasic decay of the Ca transient results from increased sarcoplasmic reticulum Ca leak [J]. J Physiol, 2016, 594(3): 611-23.
- [23] KALYANASUNDARAM A, LACOMBE V A, BELEVYCH A E, et al. Up-regulation of sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ uptake leads to cardiac hypertrophy, contractile dysfunction and early mortality in mice deficient in CASQ2 [J]. Cardiovasc Res, 2013, 98(2): 297-306.