

附子含药血清对大鼠心室肌细胞 L 型钙通道的影响

郭雄¹, 李妙龄², 刘兴隆¹, 贾波^{1*}, 石含秀², 沈涛¹, 彭腾¹, 姜岑¹

(1. 成都中医药大学 基础医学院, 成都 610075;
2. 泸州医学院 心肌电生理学研究室, 四川 泸州 646000)

[摘要] **目的:**研究附子含药血清对大鼠心室肌细胞 L 型钙通道的影响,探讨附子抗缓慢型心律失常的作用机制。**方法:**附子水煎后水浴浓缩成 1:1,给予大鼠灌胃,每次 15.6 g·kg⁻¹,7 d 后制备含药血清;细胞密度 20 个/mL,药物血清体积分数为 10%。作用时间:从加药物血清 20 min 后开始记录,到 1 h 逐渐结束,各组样本数均为 8;采用急性酶解法获得大鼠的心室肌细胞,用全细胞膜片钳技术记录 L 型钙通道电流,观察附子含药血清对单个心室肌细胞 L 型钙通道电流(*I_{Ca-L}*)幅度及动力学特性的影响。**结果:**10% 空白血清组和 10% 附子含药血清组给药后的平均峰电流密度和平均激活率分别为:(-3.59±1.06) pA/pF(单位细胞膜面积的电流大小),12.87% (*n*=8, *P*<0.05)和(-4.01±0.88) pA/pF,51.17% (*n*=8, *P*<0.01);附子含药血清激活曲线用药前和用药后的 *V*_{1/2}和 *K*(稳态半数激活电压和斜率因子)分别为(-12.66±0.44) mV 和(5.70±0.35),(-14.71±0.88) mV 和(5.68±0.72),(*P*<0.05, *n*=8);附子含药血清失活曲线用药前和用药后的 *V*_{1/2}和 *K*分别为(-28.10±0.20) mV 和(6.31±0.18),(-37.55±0.11) mV 和(5.94±0.09),(*P*<0.05, *n*=8);附子含药血清恢复曲线用药前和用药后的 *τ*为(171.01±11.13) ms 和(160.15±4.97) ms(*n*=8),差异无统计学意义;附子含药血清可增加 L 型钙通道电流密度、激活曲线左移,失活曲线右移,对恢复曲线没有影响。**结论:**附子含药血清能增加心室肌细胞钙通道电流。

[关键词] 附子; 含药血清; 钙通道; 心肌细胞
[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2015)11-0111-05
[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2015110111

Effect of Aconite containing Serum on L-type Calcium Channel in Rat Ventricular Myocytes GUO Xiong¹, LI Miao-ling², LIU Xing-long¹, JIA Bo^{1*}, SHI Han-xiu², SHEN Tao¹, PENG Teng¹, JIANG Cen¹
(1. College of Basic Medicine, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 610075, China;
2. Institute of Myocardial Electrophysiology, Luzhou Medical College, Luzhou 646000, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effect of aconite containing serum on L-type calcium channel in isolated rat ventricular myocytes. **Method:** Aconite decoction 15.6 g·kg⁻¹ was were *ig* given rats 7 d to prepare containing serum; The concentration of containing drug serum was 10% to obtain rat ventricular myocyte, enzymatic dissociation was used, whole cell patch clamp technique was used to record the L-type calcium channel current, L-type calcium channel current amplitude and kinetics characteristics were observed. **Result:** In the blank serum group and drug serum group the average peak current density and average activation after administration were respectively (-3.59±1.06) pA/pF, 12.87% (*n*=8, *P*<0.05) and (-4.01±0.88) pA/pF, 51.17% (*n*=8, *P*<0.01). In aconite containing serum before and after the treatment *V*_{1/2} and *K* of activation curve were respectively (-12.66±0.44) mV and (5.70±0.35); (-14.71±0.88) mV and (5.68±0.72) (*P*<0.05, *n*=8). In aconite containing serum before and after the treatment *V*_{1/2} and *K* of inactivation curve were respectively (-28.10±0.20) mV, and (6.31±0.18) mV; (-37.55±0.11) mV and (5.94±0.09) (*P*<0.05, *n*=8). Aconite containing serum recovery curves before and after medication for the *τ*: (171.01±11.13) ms and (160.15±4.97) ms (*n*=8). **Conclusion:** Aconite containing serum has activate function to the myocardial cells of L-type calcium channel currents.

[Key words] aconite; medicated serum; calcium channel; myocardial cells

[收稿日期] 20140821(010)
[基金项目] 高等学校博士学科点专项科研基金(20105132110002)
[第一作者] 郭雄, 硕士, 从事方剂配伍规律的理论及应用研究, Tel:13980615442, E-mail:liuxinglongedutcm@126.com
[通讯作者] * 贾波, 教授, 博士生导师, 从事方剂配伍规律的理论及应用研究, Tel:18030518562, E-mail:jiabocdutcm@126.com

附子具有回阳救逆,补火助阳,散寒止痛之功效,主治亡阳虚脱、心阳不足、风寒湿痹等证^[1]。入药首载于《神农本草经》,作为“回阳救逆”之要药,是附子的强心作用之故。许多学者用其不同的制剂在不同的动物模型上均证明附子具有强心作用^[2-3]。据现代药理分析^[4],附子的化学成分主要为乌头碱、次乌头碱、中乌头碱以及消旋去甲乌药碱等。现代药理研究表明:附子具有强心、抗休克、升高血压、增强心率和对抗缓慢心型心律失常^[5]等多种药理作用。

缓慢型心律失常是心肌肥厚、心肌缺血、心肌梗死及心力衰竭等患者的最终死因之一。而附子具有显著的抗缓慢性心律失常的作用,其有效成分为去甲乌药碱,该成分可增强心肌收缩,对 β 受体有部分激动作用^[6],但是,附子抗缓慢型心律失常的作用机制并不清楚。钙(Ca^{2+})离子通道结构和功能紊乱是心律失常发生的主要机制之一。目前,从 L 型 Ca^{2+} 离子通道角度探讨附子对缓慢型心律失常的干预机制尚未涉及。

本实验采用全细胞膜片钳技术,结合血清药理学方法研究附子对大鼠心肌细胞膜 L 型钙电流 $I_{\text{ca-L}}$ 及其动力学过程的影响,为深入研究中药治疗缓慢型心律失常的作用机制提供相关的实验基础。

1 材料

1.1 动物 SD 大鼠,SPF 级别,体重 200 ~ 250 g,雌雄不限,由四川省医科学院动物实验中心和泸州医学院实验动物中心提供,合格证号 SCXK(川)2013-0017。

1.2 药物 附子 *Aconitum carmichaeli* 1 kg,购于成都同仁堂药店,经成都中医药大学药学院李敏教授鉴定为正品。

1.3 仪器 AXOPATCH 200B 型膜片钳放大器(Axon,美国),P-97 型微电极拉制器(Sutter,美国),Axiovert 135 型倒置相差显微镜(Zeiss,德国),MP-285 型三维操纵器(Sutter,美国),Sartorius BP211D 型电子天平(Sutter,美国),Digidata-1200 型 A/D-D/A 转换器(Axon,美国)。

1.4 试剂 Mg-ATP(批号 48K5154),EGTA(批号 058K5426)和 HEPES(批号 0511),均购于美国 Sigma 公司,胶原酶 II(批号 C6885, Worthington 公司),其他购于国产分析纯。无钙台式液($\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$): NaCl 137, HEPES 10, KCl 5.4, MgCl_2 1.2, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 1.2。KB 液($\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$): KOH 80, KCl 40, KH_2PO_4 25, MgSO_4 3, L-Glutamac 50, Taurine

20, HEPES 10, EGTA 1, Glucose 10; 细胞外液($\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$): TEA-Cl 140, $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 2, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 1.5, Glucose 10, HEPES 10; 电极液($\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$): Mg-ATP 3, CsCl 140, HEPES 10, EGTA 10。

2 方法

2.1 附子的制备工艺和质控指标 《中国药典》2005 年版只用加工品,临床主要有黑顺片、白附片等,其品种间药性、药效上并无明确区分,本试验用黑顺片。取泥附子.按大小分别洗净,浸入食用胆巴的水溶液中数日,连同浸液煮至透心,捞出,水漂,纵切成厚约 0.5 cm 的片,再用水浸漂,用调色液使附片染成浓茶色,取出,蒸至出现油面、光泽后,烘至半干,再晒干或继续烘干,习称“黑顺片”。不同煎煮时间对附子毒效组分与毒性成分有显著影响,共同的最佳煎煮时间是 1 h 内^[7]。

2.2 附子煎液的制备 附子加水浸泡 30 min,煎煮 2 次,第 1 次 60 min,第 2 次 40 min,合并煎液,双层纱布过滤,60 ℃ 恒温水浴浓缩至 $1 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 4 ℃ 冷藏备用。

2.3 药物血清的制备 SD 大鼠 2 组,体重 200 ~ 250 g,雌雄各半,共 20 只,随机分为空白组(生理盐水组)和附子含药血清组。灌胃给药,每天 1 次, $15.6 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$,连续 7 d,附子组给药剂量参照《中药药理实验方法学》,根据《中国药典》(2010 年版)记载的附子成人每日最大用量 15 g,换算成大鼠用药量后,再给予 10 倍给予动物,即 $15.6 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$;空白对照组给予相应体积生理盐水。末次给药前禁食不禁水 12 h,药后 0.5 h 股动脉取血自然静置分离血清,56 ℃ 灭活 30 min,0.22 μm 一次性滤器过滤除菌,分装, -80 ℃ 保存备用。

2.4 心室肌细胞的急性分离 大鼠用 10% 水合氯醛 ip 麻醉后,迅速开胸取出心脏,立即置于冰冷和氧饱和的无钙台式液中进行修剪,暴露主动脉,迅速将主动脉固定于 Langendorff 心脏灌流装置上, [灌流液为 100% 氧饱和液,灌流液温度保持在 $(37 \pm 0.5) \text{ }^\circ\text{C}$,流速 $6 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$],先以无钙台式液灌流 5 min,待心脏停止跳动并去除冠脉内残血后,再换用酶液灌流约 20 min 之后(当心脏变软和膨松变大、呈海绵状、色泽较浅,心脏鲜红稍带黄,心肌呈粉红色半透明,表示可以终止酶消化),剪下左心室部分,在 KB 液中剪碎,将取下的心室肌组织置于装有 KB 液的试管中,用吸管轻轻吹打 3 ~ 5 min,使细胞团分散,然后用 200 目尼龙网过滤后,即收集到心室肌细胞悬液,将其存储于 KB 液中,静置 0.5 ~ 1 h 后

复钙, 然后进行实验。

2.5 全细胞膜片钳试验 将复钙的细胞悬液置于倒置相差显微镜工作台上的浴液中, 选择外形完整, 边缘清楚, 表面光滑, 透光度好, 横纹清晰, 具有较强立体感, 无收缩的细胞进行试验。电极在电极拉制器上拉制, 将电极置于放大器探头上, 通过三维操纵仪驱动电极, 给予 1 cm 的正压, 然后驱动电极进入浴液, 并轻压细胞表面, 轻抽负压使电极与细胞表面形成高阻封接, 进行电极电容补偿, 然后继续负压吸破细胞膜, 给予膜电容及串联电阻补偿, 即形成全细胞膜片钳模式, 恒流蠕动泵 $2\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ 药液灌流, 可调节负压吸引装置将废液从灌流槽吸除, 5 min 后记录动作电位, 药液持续充 100% 氧气。

2.6 空白血清对 $I_{\text{Ca-L}}$ 峰值电流的影响 全细胞模式形成后, 将细胞保持电位 (V_h) 到 -50 mV , 步阶测试电压 (V_t) 从 -40 mV 开始, 以 10 mV 阶跃刺激至 $+50\text{ mV}$, 时程 300 ms , 刺激频率 1 Hz , 采样频率 5 kHz , 即可记录到不同电压下的 $I_{\text{Ca-L}}$ 电流。每 $100\text{ }\mu\text{L}$ 灌流液中含 $10\text{ }\mu\text{L}$ 空白血清 ($n=8$)。

2.7 附子含药血清对 $I_{\text{Ca-L}}$ 峰值电流的影响 全细胞模式形成后, 将细胞保持电位 (V_h) 到 -50 mV , 步阶测试电压 (V_t) 从 -40 mV 开始, 以 10 mV 阶跃刺激至 $+50\text{ mV}$, 时程 300 ms , 刺激频率 1 Hz , 采样频率 5 kHz , 即可记录到不同电压下的 $I_{\text{Ca-L}}$ 电流, 药物剂量: 每 $100\text{ }\mu\text{L}$ 含 $10\text{ }\mu\text{L}$ 附子含药血清 ($n=8$)。

2.8 统计学分析 试验所得的数据采用 pClamp 10.0 进行分析处理, 观察含药血清给药前后电流指标变化, 并计算出给药前后 $I-V$ 曲线、激活曲线、失活曲线和恢复曲线的变化, 曲线拟合用 Origin 8.0。数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示。采用 SPSS 19.0 软件对数据进行处理和配对 t 检验, $P<0.05$ 具有统计学意义。

3 结果

3.1 急性分离细胞的形态学 在倒置显微镜下心肌细胞呈杆状, 表面光滑, 横纹清晰, 透光度好, 具有较强立体感。复钙后部分心肌细胞短时间内呈自发性收缩、挛缩、变圆, 最终成为死亡细胞, 而大部分呈静止状态可供试验使用。获得 60% 以上耐钙活细胞, 可成活 8 h 以上。

3.2 对 $I_{\text{Ca-L}}$ 峰值电流的影响

3.2.1 空白血清对 $I_{\text{Ca-L}}$ 峰值电流的影响 全细胞模式形成后, 将细胞保持电位 (V_h) 到 -50 mV , 步阶测试电压 (V_t) 从 -40 mV 开始, 以 10 mV 阶跃刺激至 $+50\text{ mV}$, 时程 300 ms , 刺激频率 1 Hz , 采样频率 5 kHz , 即可记录到不同电压下的 $I_{\text{Ca-L}}$ 电流, 以测试

电压为 0 mV 引出的峰值电流作为统计指标, 用药前平均峰值电流密度为 $(-3.18\pm1.05)\text{ pA/pF}$, 给予空白血清作用后的平均峰值电流密度分别为 $(-3.59\pm1.06)\text{ pA/pF}$, 平均激活率为 12.87% ($n=8, P<0.05$)。结果显示空白血清能激活 $I_{\text{Ca-L}}$, 差异具有统计学意义。见图 1。

3.2.2 附子含药血清对 $I_{\text{Ca-L}}$ 峰值电流的影响 以测试电压为 0 mV 引出的峰值电流作为统计指标, 用药前平均峰值电流密度为 $(-2.65\pm0.71)\text{ pA/pF}$, 附子含药血清作用后的平均峰值电流密度为 $(-4.01\pm0.88)\text{ pA/pF}$, 平均激活率为 51.17% ($n=8, P<0.01$)。结果显示附子含药血清显著地激活 $I_{\text{Ca-L}}$ 峰值, 将给药后最大峰值电流与给药前进行比较, 差异具有显著性。见图 1。

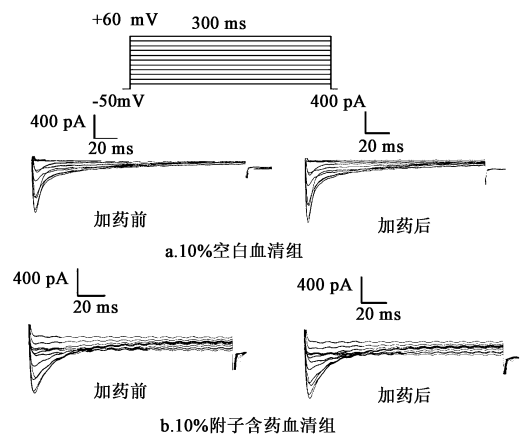


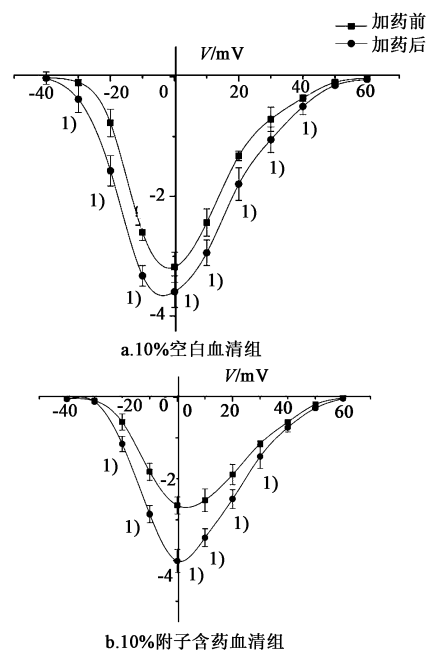
图 1 a. 空白血清组和 b. 附子含药血清组心肌细胞 $I_{\text{Ca-L}}$ 原始电流 ($\bar{x}\pm s, n=8$)

Fig.1 Myocardial cell $I_{\text{Ca-L}}$ original current a. 10% blank serum group, b. 10% aconite drug containing serum group ($\bar{x}\pm s, n=8$)

3.3 对 $I_{\text{Ca-L}}$ 电流-电压 ($I-V$) 关系曲线的影响 $I-V$ 曲线反应药物对通道的整流性和离子选择性的影响。本试验观察了空白血清和附子含药血清对 $I_{\text{Ca-L}}$ 的影响, 以电压 mV 为 x 轴, 电流 I 为 y 轴统计大鼠心室肌细胞给药前后的 $I-V$ 曲线变化, 如图 2 所示。空白血清和附子含药血清均能使 $I-V$ 曲线下移, 而附子含药血清使 $I-V$ 曲线下移更明显, 说明附子含药血清对 L 型钙通道电流的激活作用更明显, 表明附子可通过增强 L 型钙通道电流发挥抗心律失常作用 (图 2)。

3.4 对 $I_{\text{Ca-L}}$ 通道动力学特性的影响

3.4.1 附子含药血清对 $I_{\text{Ca-L}}$ 稳态激活曲线的影响 $I_{\text{Ca-L}}$ 稳态激活曲线由 $I-V$ 曲线的数据转化成电导值后, 经 Boltzmann 方程 $G/G_{\text{max}} = 1/[1 + \exp(V_m - V_{1/2})/K]$ 拟合可得到 $I_{\text{Ca-L}}$ 激活曲线, 求得稳态半数激



与加药前比较¹⁾ $P < 0.05$ (图 3 ~ 4 同)

图 2 附子含药血清对心肌细胞 I_{Ca-L} $I-V$ 曲线的作用 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Fig. 2 Effects of aconite contained serum on myocardial cell I_{Ca-L} $I-V$ curve ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

活电压($V_{1/2}$)和斜率因子(K)。用药前 $V_{1/2}$ 和 K 分别为(-12.66 ± 0.44) mV 和 5.70 ± 0.35 ; 附子含药血清作用后 $V_{1/2}$ 和 K 分别为(-14.71 ± 0.88) mV 和 5.68 ± 0.72 ($P < 0.05, n = 8$), 可见随着附子含药血清的加入, 其稳态激活曲线左移, 对钙通道的开放具有促进作用。见图 3。

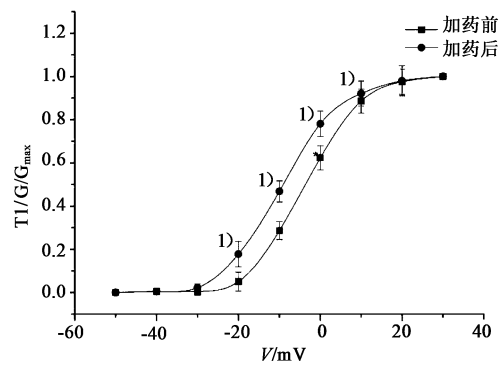


图 3 10% 附子含药血清对大鼠心肌细胞 I_{Ca-L} 稳态激活曲线的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Fig. 3 Effects of 10% Radix Aconiti Lateralis Preparata medicated serum on myocardial cell activation curve of I_{Ca-L} homeostasis ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

3.4.2 附子含药血清对 I_{Ca-L} 稳态失活曲线的影响 记录 L -型钙通道的稳态失活曲线的刺激方案为: 采用双脉冲刺激法, 保持电位(V_h)为 -50 mV,

条件脉冲从 -70 mV 开始, 10 mV 阶跃去极化至 $+30$ mV, 持续时间 $1\ 000$ ms, 在每一个条件脉冲下紧跟一固定脉冲(0 mV), 持续时间 300 ms, 最后回到 V_h (-50 mV), 可记录到通道的失活过程。以电流标准化值(Y)对条件脉冲电压(X)做图, 经 Boltzmann 方程 $I/I_{max} = 1 / \{ 1 + \exp [- (V_m - V_{1/2}) / K] \}$ 对曲线进行拟合, 可获得稳态半数失活电压 ($V_{1/2}$)和斜率因子(K)。用药前 $V_{1/2}$ 和 K 值分别为 (-28.10 ± 0.20) mV, 6.31 ± 0.18 , 附子含药血清作用后 $V_{1/2}$ 和 K 值分别为 (-37.55 ± 0.11) mV 和 5.94 ± 0.09 , ($P < 0.05, n = 8$)。可见随着附子含药血清的加入, 其稳态失活曲线左移, 说明同样电压脉冲下通道开放的数目变少了, 且能促进钙通道失活。见图 4。

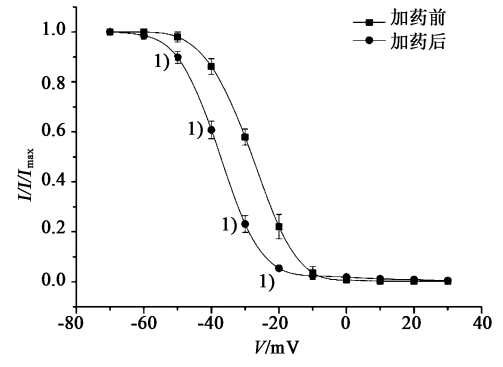


图 4 10% 附子含药血清对大鼠心肌细胞 I_{Ca-L} 稳态失活曲线的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Fig. 4 Effects of Radix Aconiti Lateralis Preparata medicated serum on myocardial cell inactivation curve of I_{Ca-L} homeostasis ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

3.4.3 附子含药血清对 I_{Ca-L} 稳态失活后恢复曲线的影响 记录 L -型钙通道的稳态失活后恢复曲线采用双脉冲刺激: V_h 保持在 -50 mV, 给予的 2 个不同刺激 P1 (0 mV, $1\ 000$ ms) 和 P2 (0 mV, 300 ms), 2 个刺激间隔时间从 50 ms 每次递增 50 ms, 直至 $1\ 000$ ms。2 个刺激间隔保持 V_h 在 -50 mV, 记录 P2 对应的 I_{Ca-L} 进行标准化处理 (I/I_{max}), 以 I/I_{max} 对 Δt 做图, 并对所得数据用单指数方程 $I/I_{max} = 1 - \exp (-t/\tau)$ 进行拟合, 得到 L -型钙通道电流复活时间曲线, 求得 τ 值。用药前 τ 为 (171.01 ± 11.13) ms, 附子含药血清作用后为 (160.15 ± 4.97) ms ($n = 8$), 表明附子含药血清对稳态失活后恢复曲线影响不大。

4 讨论

心肌细胞中主要存在 L 型和 T 型钙离子通道。试验保持电位 -50 mV, 可排除 T 型钙离子通道的

干扰和钠电流的影响,灌注液中用 Cs⁺代替 K⁺,可阻断钾电流的产生。因此,试验记录到的心肌细胞 L 型钙通道电流基本是较纯净的。

附子具有强心、升高血压、增强心率和对抗缓慢心型心律失常作用^[8]等多种药理作用。附子对缓慢性心律失常有显著的对抗作用,其有效成分是去甲乌药碱有加强心肌收缩力作用,属 β -受体部分激动剂,是一种慢通道激动剂,现代药理学研究认为附子主要作用于慢通道而发挥其抗心动过缓性心律失常的作用^[6]。附子的主要活性成分是乌头类生物碱,它们既是附子的药效成分,也是主要的毒性成分^[9-10]。附子的毒性主要是对神经与心脏的损害^[11]。中毒机制是附子生物碱刺激神经系统,先兴奋后抑制^[12]。本课题组的整体试验研究证实,附子灌胃给药能改善缓慢型心律失常,但其机制不清楚^[13]。L 型钙通道是心肌细胞主要的内向电流,钙离子通道的结构和功能紊乱是引起心律失常的主要原因。本试验从缓慢型心律失常的发病机制入手,发现附子含药血清可以明显增强大鼠心室肌 L 型钙电流的电流密度,使 $I-V$ 曲线下移,这种增强作用与附子含药血清对 L 型钙通道的动力学特性改变相关。附子含药血清使大鼠心室肌 L 型钙通道的激活曲线左移,失活曲线右移,对 L 型钙通道电流的恢复曲线无明显影响。结果表明附子含药血清增强 L 型钙电流电流作用可能是其具有抗缓慢型心律失常的可能机制。

缓慢型心律失常是临床难治的心律失常,目前的主要治疗方法是安装临时和永久性起搏器,病人的经济实力、远期疗效等多种原因限制了起搏器在临床治疗中的应用,因此药物治疗依然是治疗缓慢型心律失常的主要手段,从传统中药中筛选有效的抗心律失常药物,将可能改善目前治疗缓慢型心律失常的现状,具有较为广阔的临床开发前景。

综上所述,本文首次证实附子对心室肌 L 型钙

电流有明显增强作用,附子含药血清对心肌细胞的 I_{Ca-L} 激活作用是治疗缓慢型心律失常的可能离子机制之一。

[参考文献]

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[S]. 北京:中国医药科技出版社,2010:177-178.

[2] 顾科民. 附子“回阳救逆”作用的初步药理学探讨[J]. 上海中医药杂志,1962,6(8):10-19.

[3] 饶曼人. 关于“乌头、附子”强心作用的研究[J]. 药学报,1966,13(3):195-203.

[4] 张思佳,刘敏卓,刘静涵,等. 附子的化学成分研究[J]. 药学与临床研究,2010,18(3):262-264.

[5] 王胜林,董耀荣. 附子水煎液对心梗后心力衰竭大鼠血流动力学的影响[J]. 陕西中医,2007,28(6):745-748.

[6] 徐敬海,赵洪峰,徐雅娟,等. 四川江油生附子强心成分的研究[J]. 中草药,2004,35(9):964-966.

[7] 余葱葱,郭力,彭成. 不同煎煮时间的附子毒效组分与毒性成分质量控制研究[J]. 中草药,2006,37(3):409-412.

[8] 王胜林,董耀荣. 附子水煎液对心梗后心力衰竭大鼠血流动力学的影响[J]. 陕西中医,2007,28(6):745-748.

[9] Ma M, Yu J. Existence of multiple positive periodic solution for nonlinear functional difference equations [J]. J Math Am,2005,305(1):483-487.

[10] Liu Y. Periodic solutions of nonlinear functional difference equations at nonTesonance ease[J]. J Math Appl,2007,327(4):801-804.

[11] 陈荣昌,孙桂波,张强,等. 附子毒性研究会进展[J]. 中国中药杂志,2013,38(8):1126-1129.

[12] 康永. 中药药理学[M]. 北京:科学出版社,2001:90-93.

[13] 陈明,高卫平. 麻黄细辛附子汤抗缓慢性心律失常的实验研究[J]. 中华中医药杂志,2009,24(5):906-910.

[责任编辑 聂淑琴]