论 著

异丙肾上腺素通过诱导心肌线粒体氧化应激在小鼠心律失常中的作用

刘 婷，罗 弦，刘 竹，许丹迪，刘蕾颖，谭晓秋，李 涛
1.西南医科大学 心血管医学研究所（泸州 646000）；2.西南医科大学 四川省心血管疾病防治协同创新中心（泸州 646000）

【摘 要】**目的** 探讨异丙肾上腺素（ISO）通过诱导心肌线粒体氧化应激诱发小鼠心律失常的机制。**方法** 小鼠腹腔注射异丙肾上腺素前后分别记录心电图。提取小鼠心肌组织，检测线粒体呼吸链复合物I、ATP、ROS的变化水平。光标测技术检测心脏动作电位的变化情况。**结果** 注射ISO后，小鼠的心率明显增加，起搏诱发心律失常的机率增加。ATP含量和线粒体呼吸链复合物I浓度降低，ROS含量增加。光标测结果显示心肌动作电位时程缩短。**结论** 异丙肾上腺素通过影响心肌线粒体氧化应激诱导心律失常的发生。

【关键词】异丙肾上腺素 心律失常 氧化应激 线粒体
【中图分类号】 R3 **文献标志码** A **DOI**：10.3969/j.issn.2096-3351.2021.06.007

Isoproterenol triggers arrhythmia by inducing oxidative stress of myocardial mitochondria in mice

LIU Ting, LUO Xian, LIU Zu, XU Dan-di, LIU Lei-ying, TAN Xiao-qiu, LI Tao
1.*Institute of Cardiovascular Research, Southwest Medical University, Luzhou 646000, China*; 2.*Collaborative Innovation Center for Prevention and Treatment of Cardiovascular Disease of Sichuan Province, Southwest Medical University, Luzhou 646000, China*

【**Abstract**】**Objective** To study the mechanism of isoproterenol triggering arrhythmia through myocardial mitochondrial oxidative stress in mice. **Methods** An electrocardiogram was recorded before and after intraperitoneal injection of isoproterenol. Myocardial tissues were extracted from the mice to measure the changes in the levels of mitochondrial respiratory chain complex I, adenosine triphosphate (ATP), and reactive oxygen species (ROS). The cardiac action potential was measured by optical mapping. **Results** After isoproterenol injection, the mice had a significantly increased heart rate, significantly more frequent arrhythmia triggered by pacing, significantly decreased levels of ATP and mitochondrial respiratory chain complex I, a significantly increased ROS level, and a significantly shortened cardiac action potential duration. **Conclusion** Isoproterenol induces oxidative stress in myocardial mitochondria to trigger arrhythmia.

【**Key words**】Isoproterenol Arrhythmia Oxidative stress Mitochondria

基金项目：国家自然科学基金（31900813）；四川省科技厅项目（2020JDJQ0047）；泸州市-西南医科大学联合项目（2020LZXNYDJ09）
第一作者简介：刘 婷，硕士。
通信作者：李 涛，副研究员。E-mail：leta49@163.com

心律失常是临床上常见且复杂的心血管疾病,并随年龄增加发病率增高。心律失常容易合并或继发心力衰竭、心肌肥大、心肌缺血等心血管疾病,最终导致患者晕厥、心脏骤停,甚至心源性猝死[1]。临床上按心律失常发作时心率的快慢分为快速性和缓慢性心律失常两大类,前者常见于过早搏动、心动过速、心房颤动和心室颤动等;后者常见于窦性缓慢性心律失常和各种传导阻滞等。目前心律失常的治疗仍然是临床上的一大难题,发生发展过程中存在复杂的电生理与结构重构改变,这是因为对心律失常疾病的发生发展机制认知还存在严重不足。研究证明,心肌细胞的氧化应激与心律失常的发生密切相关[2]。因此,探索心脏氧化应激的调控机制,有助于探讨心律失常的发生机制及寻找新的干预靶点,对于预防和治疗心律失常具有重要的理论基础和临床意义。

氧化应激是指机体内氧化与抗氧化作用失衡,产生大量氧化中间产物。氧化应激是自由基在体内堆积的一种负面反应,被认为是导致疾病的一个重要因素[3]。目前越来越多的证据显示,氧化应激参与多种心血管疾病的发生和发展过程。

异丙肾上腺素(isoprenaline,ISO)是合成的儿茶酚胺,属于非选择性的β受体激动剂,在心血管功能的调控中发挥重要作用[4]。但是,ISO对心肌组织氧化应激的研究不全面。本研究通过观察ISO对线粒体相关指标的影响,评估ISO在线粒体通路中影响氧化应激的调控,进一步探讨ISO对小鼠心肌氧化应激的作用机制,为临床应用提供一定的实验依据。

1 材料和方法

1.1 动物

C57雄鼠由西南医科大学动物中心提供,20~22 g,所有的动物操作符合西南医科大学动物实验伦理要求(201903-259)。小鼠腹腔注射ISO,剂量为10 mg/kg。

1.2 心电图记录

将小鼠放进气体麻醉盒里,异氟烷麻醉后,小鼠仰卧位固定。将电极一端插入小鼠四肢末端的皮下,另一端与心电换能器相连接;右上肢为I导联、左上肢为Ⅱ导联、右下肢为III导联、左下肢为AVF导联;AcqKnowledge 4.4软件采集小鼠心电数据,记录注射ISO前后的心电图。接下来对小鼠进行程序性电刺激pacing起搏,对小鼠行气管插管,并接上小动物呼吸机。开胸后暴露心脏,并在小鼠左心室位置安放刺激电极,调整电子刺激器(Nihon Kohden Corporation),开始Pacing并使用AcqKnowledge 4.4软件采集数据和记录Pacing起搏后的心电图及诱发的室性心律失常(ventricular tachycardia,VT)情况[5]。

1.3 光标测

将小鼠颈椎脱臼法处死后,取出心脏,将主动脉固定在Langendorff灌流系统。先用PSS心脏灌流10 min后,再用10 μM的停搏剂Blebbistatin灌流大约10 min,观察到离体心脏停止舒缩活动。取1 μM的RH237电压敏感染料循环灌注染色10 min后,继续循环灌注停搏剂。

使用Spik2软件编辑所需刺激方案,电刺激调整至5 V。刺激波宽2 ms,刺激频率为10 Hz。使用Meta Morph软件设置信号采集参数曝光时间为0.9 ms,像素面积为32×32 μm。调整激发波长为525 nm的LED灯,使其聚焦于心脏上。心尖部进行电刺激,同时打开激发光源,开始信号采集。信号记录采集结束后,给予1 μM ISO灌流1 min后,重复上述的刺激方案和记录信号[6-7]。

1.4 取材

小鼠随机分为未注射组(CON组)和腹腔注射组(ISO组),快速解剖取心脏,用预冷的PBS液清洗残留血液,滤纸拭干称重,将心肌组织剪碎,转移到玻璃研磨器,按1∶10比例加入预冷的PBS液,用玻璃研磨器进行匀浆。将匀浆后组织分成三份进行线粒体指标的检测。

1.5 活性氧(reactive oxygen species, ROS)检测

按照试剂盒说明书(英潍捷基,C10444),将100 μL的匀浆液4 ℃,5 000 rmp离心5 min,弃上清。沉淀中加入240 μL PBS重悬混匀,再加入60 μL ROS荧光染料,混匀,37 ℃避光孵育30 min。4 ℃,5 000 rmp离心5 min后,弃上清。用PBS洗涤三次,去除多余的荧光染料。最终重悬于300 μL的PBS中,将悬液加入96孔板中,每孔100 μL,立即用酶标仪检测荧光强度。

1.6 ATP(ade nosine triphosphate,ATP)检测

按照试剂盒说明书(英潍捷基,A22066),将200 μL的悬液超声波破碎2 min,4 ℃,5 000 rmp离心5 min,取上清进行ATP检测,在96孔板中加入90 μL ATP检测工作液,10 μL匀浆离心后的上清液,用酶标仪检测化学发光值。

1.7 线粒体呼吸链复合物I检测

按照试剂盒说明书(南京建成,A089-1-1),在

96孔板中加入156 μL反应液A，20 μL反应液B，4 μL反应液D，37 ℃孵育3 min后加入20 μL匀浆离心后的上清液。用酶标仪检测OD340处的吸光值，分别检测基础值和反应1 min后的值，根据说明书公式换算复合物的活性单位。

1.8 统计学方法

采用SPSS 19.0软件进行分析，计量资料以均数 ± 标准差（$\bar{x} \pm s$）表示，自身对照采用配对t检验，组间比较采用独立样本t检验，以$P < 0.05$为有统计学差异。

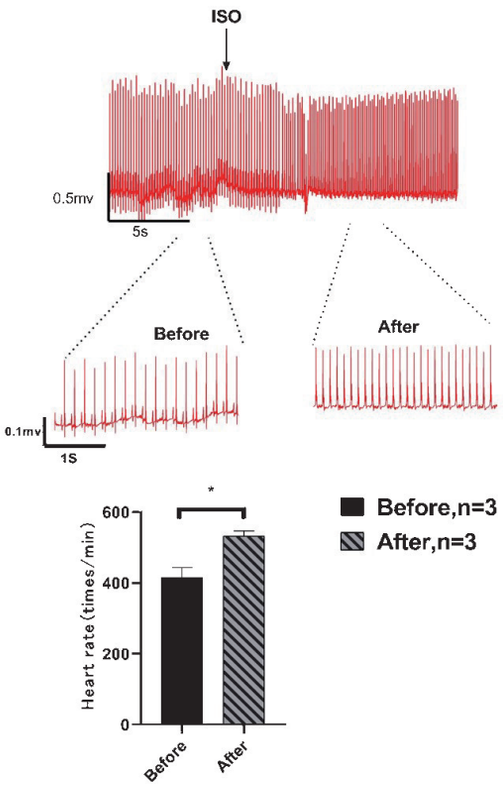
2 结果

2.1 ISO处理后小鼠的心率增快及VT发生率增加

C57小鼠腹腔注射ISO前后相比，注射ISO后的C57小鼠的心率在短时间内明显增快，小鼠心率由415.1 ± 28.54 次/min升高到532.8 ± 14.33 次/min，$P < 0.05$，有统计学差异，见图1。在程序性电刺激下，注射ISO后的C57小鼠，室性快速性心律失常的发生率明显增高，未注射组的VT发生率为3/22，注射ISO后小鼠的VT增加为7/22，$P < 0.05$，有统计学差异，见图2。因此，注射ISO后C57小鼠的心室电稳定性减弱。

2.2 ISO通过线粒体途径影响心肌的氧化应激

与对照组相比，ISO组ROS的荧光强度由2 509 ± 148.2（$N = 3$）升高到3 514 ± 40.88（$N = 3$），$P < 0.01$，有统计学差异，表明ISO组心脏氧化应激程度加重，见图3A。与对照组相比，ISO组ATP化学发光值由65.67 ± 7.688（$N = 3$）降低至22.67 ± 2.728（$N = 3$），$P < 0.01$，有统计学差异，表明ISO组心肌组织ATP产量降低，见图3B。与对照组相比，ISO组线粒体复合物I的活性由0.09333 ± 0.005364（$N = 3$）降低至0.06367 ± 0.004256（$N = 3$），$P < 0.05$，有统计学差异，表明线粒体呼吸链受到抑制，见图3C。



注：*表示$P < 0.05$

图1 小鼠腹腔注射ISO后的心率变化

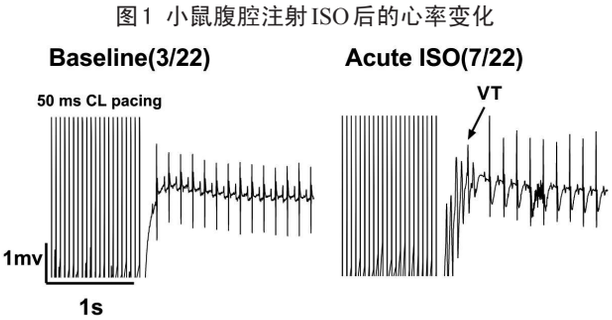
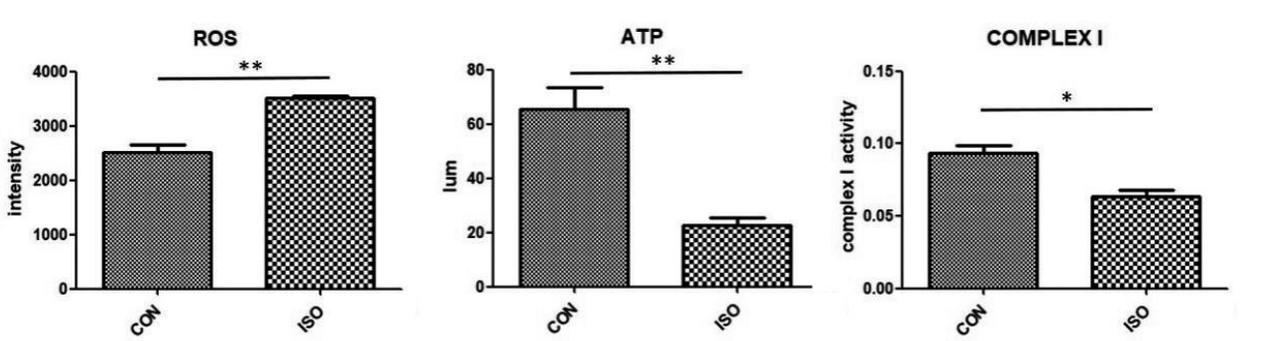


图2 小鼠心脏刺激后，诱发VT的情况



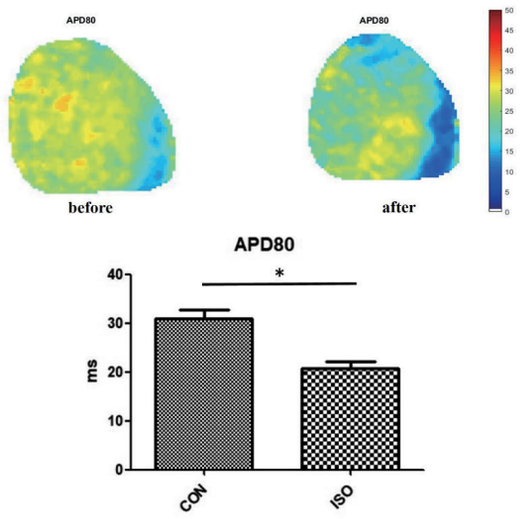
A B C

注：*表示$P < 0.05$，**$P < 0.01$

图3 CON组与ISO组线粒体ROS浓度、ATP含量及呼吸链复合物I的变化

2.3 ISO引起心脏的动作时程缩短

光标测检测结果显示ISO灌流之后，APD80时程由30.85 ± 1.880 ms（$N = 3$）缩短至20.65 ± 1.512 ms（$N = 3$），$P < 0.05$，有统计学差异，如图4所示。



注:*$P < 0.05$

图4 心脏在10Hz刺激下,ISO处理后心电活动的变化

3 讨论

异丙肾上腺素是合成的儿茶酚胺,结构上类似于内源性肾上腺素和去甲肾上腺素,具有强烈的非选择性激动β受体。激动心脏β1受体,可以使心肌收缩力增强、心率加快,收缩期和舒张期缩短。激动β2受体使骨骼肌血管舒张,也有舒张冠状血管和增加组织血流量的作用。除了激动心脏的β2受体,还可舒张支气管平滑肌,并具有抑制组胺等过敏性物质释放的作用,增加肝糖原、肌糖原分解,增加组织耗氧量。异丙肾上腺素还可以升高血中游离脂肪酸,作用机制与肾上腺素相似,而升高血糖作用较弱。总之,异丙肾上腺素在心血管功能的调控中发挥关键作用[8-9]。本研究发现异丙肾上腺素处理之后,不仅小鼠心率增加,还会导致小鼠快速起搏之后,VT的发生率明显增加,这也说明小鼠注射异丙肾上腺素后,小鼠的心室电稳定性减低。

急性异丙肾上腺素注射可以引起心肌细胞耗氧量增加,产生大量的自由基,导致氧化应激增加。氧化应激反应不仅可以直接损伤心肌细胞,也能影响线粒体代谢功能,进一步加重心肌损伤[10-11]。线粒体是真核生物重要的细胞器,其主要的功能是参与心肌细胞能量代谢、氧化应激以及程序性细胞死亡过程,其功能障碍与心肌肥厚、心力衰竭的发生和发展密切相关。因此,线粒体对保障心肌细胞的生存和维持心脏正常功能具有重要意义[12-13]。

在健康状态下,机体的生命活动所需的能量都以ATP的形式来提供,因此ATP是机体直接的能量供体。线粒体作为心肌细胞内部的能量工厂,是产生和释放ATP的场所。活性氧包括超氧自由基、过氧化氢及其下游产物过氧化物和羟化物等,参与细胞生长增殖、发育分化、衰老和凋亡以及许多生理和病理过程。线粒体的能量供应依赖于呼吸链复合酶产生的,它们利用电子传输过程中释放的自由能将质子从线粒体基质转移到间隙,可以促进能量的产生及传递[14]。

线粒体氧化应激不仅参与多种生理和病理过程,包括衰老、基因突变、炎症、糖尿病和神经退行性疾病等,还参与了心脏发育和心脏疾病的发生[15-16]。心脏是终末分化的器官,心肌细胞几乎没有复制和再生的潜力。因此,细胞稳态的精确调节和充足的氧供对于心肌细胞的存活和功能至关重要。由于心肌细胞具有较差的再生能力和对氧供的依赖,因此特别容易受到线粒体氧化应激反应的影响。心脏压力超负荷或心肌缺血会导致心肌细胞氧化应激、能量缺乏、钙超载和炎症反应,这些都会破坏线粒体功能并诱发线粒体氧化应激反应。严重的线粒体氧化应激反应会导致心脏疾病的发生,动脉粥样硬化、高血压、缺血性心肌病、糖尿病性心脏病、心率失常及心力衰竭等心脏疾病的发生发展都与线粒体氧化应激反应密切相关[17-18]。因此,在一定程度上,通过对线粒体氧化应激反应相关通路的干预可以产生对心肌细胞的保护作用[19-22]。

心律失常的发生与氧化应激ROS产物表达增加有关,降低ROS产物表达的水平可降低心律失常的发生率。其中心房颤动是最常见的快速型的心律失常,有研究发现与正常窦性心律的相比,心房颤动患者心房组织中ROS相关蛋白的表达上调[23-24]。本研究也证实线粒体氧化应激与心律不齐有关,ROS表达增加可能加速快速心律失常的发展。

本实验室特聘教授、牛津大学雷鸣博士等最近在《*Circulation*》上提出,将抗心律失常药物在原来分类的基础上进行了补充和完善,未来离子通道上游信号调控是心律失常治疗的重要策略之一[25]。本课题关注线粒体功能障碍,从氧化应激反应角度研究其心律失常中的作用,为快速性心律失常的发病机制寻找治疗靶点提供新观点和新思路。

本研究发现,在ISO诱导的氧化应激下,线粒体膜通透性增加,从而导致ATP产生过程受到影响,线粒体呼吸链复合物I活性降低,ROS含量增加,这与既往的研究结论是相符的。在本研究中,我们还观察了ISO对心脏电活动的影响,发现ISO可以增加心率,动作电位时程缩短,心脏快速起搏之后,VT的发

生率明显增加。

4 结论

ISO是通过线粒体途径影响心肌的氧化应激反应，进而增加室性快速性心律失常的发生率，其中具体的分子机制还需要更深入的研究，为临床预防和治疗心血管疾病提供理论依据。

参 考 文 献

[1] Fu DG. Cardiac arrhythmias: diagnosis, symptoms, and treatments[J]. Cell Biochem Biophys, 2015, 73(2): 291-296.

[2] Zhang J, Youn JY, Kim AY, *et al*. NOX4-Dependent hydrogen peroxide overproduction in human atrial fibrillation and HL-1 atrial cells: relationship to hypertension[J]. Front Physiol, 2012, 3: 140.

[3] Dey S, DeMazumder D, Sidor A, *et al*. Mitochondrial ROS drive sudden cardiac death and chronic proteome remodeling in heart failure[J]. Circ Res, 2018, 123(3): 356-371.

[4] Krestinina O, Baburina Y, Krestinin R, *et al*. Astaxanthin prevents mitochondrial impairment induced by isoproterenol in isolated rat heart mitochondria[J]. Antioxidants (Basel), 2020, 9(3): 262.

[5] 陈唐葶, 李涛, 李妙龄, 等. 心房快速起搏致豚鼠房颤模型建立及心房肌动作电位的改变[J]. 泸州医学院学报, 2012, 35(6): 551-553.

[6] Dong RR, Mu-U-Min R, Reith AJM, *et al*. A protocol for dual calcium-voltage optical mapping in murine sinoatrial preparation with optogenetic pacing[J]. Front Physiol, 2019, 10: 954.

[7] He S, Wen Q, O'Shea C, *et al*. A protocol for transverse cardiac slicing and optical mapping in murine heart[J]. Front Physiol, 2019, 10: 755.

[8] Krestinin R, Baburina Y, Odinokova I, *et al*. Isoproterenol-induced permeability transition pore-related dysfunction of heart mitochondria is attenuated by astaxanthin[J]. Biomedicines, 2020, 8(10): 437.

[9] Stanely Mainzen Prince P, Dey P, Roy SJ. Sinapic acid safeguards cardiac mitochondria from damage in isoproterenol-induced myocardial infarcted rats[J]. J Biochem Mol Toxicol, 2020, 34(10): e22556.

[10] Kumar V, Santhosh Kumar TR, Kartha CC. Mitochondrial membrane transporters and metabolic switch in heart failure[J]. Heart Fail Rev, 2019, 24(2): 255-267.

[11] Zhou B, Tian R. Mitochondrial dysfunction in pathophysiology of heart failure[J]. J Clin Invest, 2018, 128(9): 3716-3726.

[12] Li YL, Chen BY, Yang XY, *et al*. S100a8/a9 signaling causes mitochondrial dysfunction and cardiomyocyte death in response to ischemic/reperfusion injury[J]. Circulation, 2019, 140(9): 751-764.

[13] Kim SY, Zhang X, Schiattarella GG, *et al*. Epigenetic reader BRD4 (bromodomain-containing protein 4) governs nucleus-encoded mitochondrial transcriptome to regulate cardiac function[J]. Circulation, 2020, 142(24): 2356-2370.

[14] Cadenas S. mitochondrial uncoupling, ROS generation and cardio protection[J]. Biophys Biophys Acta Bioenerg, 2018;1859(9):940-950.

[15] Li H, Li Q, Zhang YX, *et al*. Novel treatment of hypertension by specifically targeting E2F for restoration of endothelial dihydrofolate reductase and eNOS function under oxidative stress[J]. Hypertension, 2019, 73(1): 179-189.

[16] Li Q, Youn JY, Siu KL, *et al*. Knockout of dihydrofolate reductase in mice induces hypertension and abdominal aortic aneurysm via mitochondrial dysfunction[J]. Redox Biol, 2019, 24: 101185.

[17] Senoner T, Dichtl W. Oxidative stress in cardiovascular diseases: still a therapeutic target?[J]. Nutrients, 2019, 11(9): 2090.

[18] Pignatelli P, Menichelli D, Pastori D, *et al*. Oxidative stress and cardiovascular disease: new insights[J]. Kardiol Pol, 2018, 76(4): 713-722.

[19] Li T, Chen LL, Yu YY, *et al*. Resveratrol alleviates hypoxia/reoxygenation injury-induced mitochondrial oxidative stress in cardiomyocytes[J]. Mol Med Rep, 2019, 19(4): 2774-2780.

[20] Ge LQ, Li CZ, Wang ZR, *et al*. Suppression of oxidative stress and apoptosis in electrically stimulated neonatal rat cardiomyocytes by resveratrol and underlying mechanisms[J]. J Cardiovasc Pharmacol, 2017, 70(6): 396-404.

[21] Hasan R, Lasker S, Hasan A, *et al*. Canagliflozin attenuates isoprenaline-induced cardiac oxidative stress by stimulating multiple antioxidant and anti-inflammatory signaling pathways[J]. Sci Rep, 2020, 10(1): 14459.

[22] Viswanadha VP, Dhivya V, Somasundaram B, *et al*. The role of mitochondria in piperine mediated cardioprotection in isoproterenol induced myocardial ischemia[J]. Curr Pharm Des, 2021, 27(26): 2975-2989.

[23] García N, Zazueta C, Aguilera-Aguirre L. Oxidative stress and inflammation in cardiovascular disease[J]. Oxid Med Cell Longev, 2017, 2017: 5853238.

[24] Schirone L, Forte M, Palmerio S, *et al*. A review of the molecular mechanisms underlying the development and progression of cardiac remodeling[J]. Oxid Med Cell Longev, 2017, 2017: 3920195.

[25] Lei M, Wu L, Terrar DA, *et al*. Modernized classification of cardiac antiarrhythmic drugs[J]. Circulation, 2018, 138(17): 1879-1896.

(2021-07-01 收稿)