



[DOI]10.3969/j.issn.1001-9057.2022.04.013

<http://www.lenkzz.com/CN/10.3969/j.issn.1001-9057.2022.04.013>

· 临床研究 ·

# 沙库巴曲/缬沙坦对应激性心肌病大鼠室性心律失常的影响及其机制

孙亚洲 刘韬 石少波 刘欣 冉倩 杨波

**【摘要】** **目的** 探讨沙库巴曲(SAC)/缬沙坦(SAC)对应激性心肌病(TTS)大鼠室性心律失常的影响及其机制。**方法** 将 60 只野生型雄性 SD 大鼠分为对照组(CTL 组)、TTS 组、SAC/VAL 组、VAL 组,每组各 15 只。CTL 组大鼠给予无菌生理盐水 1 ml/kg 腹腔注射,其余 3 组大鼠给予异丙肾上腺素(ISO)50 mg/kg 腹腔注射。药物注射后 24 h 开始干预,CTL 组和 TTS 组大鼠给予生理盐水灌胃连续 7 d,SAC/VAL 组和 VAL 组大鼠分别给予 SAC/VAL 68 mg/kg、VAL 31 mg/kg 灌胃。在生理盐水或 ISO 注射后 8 d 对各组大鼠进行离体电生理、Masson 染色及蛋白质免疫印迹法(Western blot)检测。**结果** CTL 组、TTS 组、SAC/VAL 组、VAL 组大鼠室性心律失常发生率分别为 0(0/10)、80%(8/10)、20%(2/10)、50%(5/10),其中 TTS 组高于 CTL 组,SAC/VAL 组低于 TTS 组( $P < 0.05$ )。4 组间大鼠左室心尖部纤维化面积分数比较差异有统计学意义,其中 TTS 组高于 CTL 组,SAC/VAL 组低于 TTS 组( $P < 0.05$ )。4 组大鼠转化生长因子(TGF)- $\beta_1$ 、Smad3、Collagen I、磷酸化的 RyR2(p-RyR2)及磷酸化的钙调蛋白依赖性蛋白激酶 II(p-CaMK II)蛋白表达水平比较差异均有统计学意义( $P < 0.05$ ),其中 TTS 组上述指标均高于 CTL 组,SAC/VAL 组均低于 TTS 组( $P < 0.05$ )。**结论** SAC/VAL 对 TTS 大鼠具有抗室性心律失常作用。

**【关键词】** 应激性心肌病; 沙库巴曲/缬沙坦; 室性心律失常;  $Ca^{2+}$  泄漏**【中图分类号】** R542.2 **【文献标识码】** A

## Effect of sacubitril/valsartan on ventricular arrhythmia in rats with stress cardiomyopathy and its mechanism

Sun Yazhou, Liu Tao, Shi Shaobo, Liu Xin, Ran Qian, Yang Bo. Department of Cardiology, Renmin Hospital of Wuhan University, Wuhan 430060, China

**【Abstract】** **Objective** To explore the effect of sacubitril(SAC)/valsartan(SAC) on ventricular arrhythmias in rats with stress cardiomyopathy(TTS) and its mechanism. **Methods** Sixty wild-type male SD rats were divided into control group(CTL group), TTS group, SAC/VAL group and VAL group, with 15 rats in each group. Rats in CTL group were given sterile saline 1ml/kg intraperitoneally, and rats in other 3 groups were given isoprenaline(ISO) 50 mg/kg intraperitoneally. The intervention was started 24 h after drug injection, rats in CTL group and TTS group were given saline for 7 d consecutively, and rats in SAC/VAL group and VAL group were given SAC/VAL 68 mg/kg and VAL 31 mg/kg respectively. In vitro electrophysiology, Masson staining and Western blotting detection were performed in rats of each group 8 d after saline or ISO injection. **Results** Incidence of ventricular arrhythmias in rats of CTL group, TTS group, SAC/VAL group and VAL group were 0(0/10), 80%(8/10), 20%(2/10) and 50%(5/10) respectively, and that in TTS group was higher than CTL group, SAC/VAL group was lower than TTS group( $P < 0.05$ ). There was statistically significant difference in fraction of fibrotic area in left ventricular apex of rats among 4 groups, and that in TTS group was higher than CTL group, SAC/VAL group was lower than TTS group( $P < 0.05$ ). Differences in expression levels of transforming growth factor(TGF)- $\beta_1$ , Smad3, Collagen I, phosphorylated RyR2(p-RyR2) and phosphorylated calmodulin-dependent protein kinase II(p-CaMK II) protein among 4 groups were statistically significant( $P < 0.05$ ), and above indexes in TTS group were higher than those in CTL group, above indexes in SAC/VAL group were lower than those in TTS group( $P < 0.05$ ). **Conclusion** SAC/VAL exerts antiarrhythmic effects on rats with TTS.

**【Key words】** Stress cardiomyopathy; Sacubitril/valsartan; Ventricular arrhythmia;  $Ca^{2+}$  leak

基金项目:国家自然科学基金资助项目(81800337、82170316)

作者单位:430060 武汉,武汉大学人民医院心内科 武汉大学心血管病研究所 心血管病湖北省重点实验室

通讯作者:杨波, E-mail:yybb112@whu.edu.cn

应激性心肌病又称 Takotsubo 综合征 (TTS), 是一种急性、通常可逆的心力衰竭 (简称心衰) 综合征。既往认为 TTS 是一种良性疾病, 但最近的研究发现, TTS 急性期的死亡率与急性冠脉综合征相当<sup>[1]</sup>。TTS 可并发心衰、心源性休克、左室流出道梗阻、系统性血栓栓塞和心律失常<sup>[2-3]</sup>。其中, 1/4 以上 TTS 患者急性期出现多种心律失常<sup>[4]</sup>。TTS 主要发生于绝经后女性<sup>[2]</sup>, 而室性心律失常更常见于男性 TTS 患者<sup>[4]</sup>。此外, 男性 TTS 患者更容易出现室性心动过速、心脏骤停等危及生命的心律失常, 故更需关注男性 TTS 患者的心律失常事件<sup>[4]</sup>。沙库巴曲 (SAC)/缬沙坦 (VAL) 是由内啡肽酶抑制剂沙库巴曲和血管紧张素受体阻滞剂缬沙坦组成的复方药物。临床研究表明, SAC/VAL 在急性失代偿性心衰中具有较好的心脏保护作用<sup>[5]</sup>。基础研究也验证了 SAC/VAL 在心衰、心肌梗死、心肌肥厚甚至肺动脉高压和右心衰等多种病理情况下均可改善心室功能<sup>[6-7]</sup>。此外, 在兔心房颤动模型中, SAC/VAL 可恢复 Cav1.2 表达, 延长心房有效不应期, 减轻心房结构重塑<sup>[8]</sup>; 同样, SAC/VAL 可上调钾通道蛋白的表达, 降低心肌梗死诱导的心衰大鼠模型室性心律失常易感性<sup>[9]</sup>。以上研究结果均表明 SAC/VAL 具有抗心律失常潜质, 但 SAC/VAL 对 TTS 室性心律失常的作用尚不清楚。本研究采用单次大剂量注射异丙肾肾上腺素 (ISO) 构建 TTS 大鼠模型, 短期给予 SAC/VAL 和 VAL, 探究 SAC/VAL 和 VAL 对 TTS 室性心律失常的作用。

## 材料与方法

1. 材料: 60 只野生型雄性 SD 大鼠 (体重 200 ~ 220 g) 购自三峡大学动物实验中心, 饲养于武汉市第三医院实验动物中心。所有实验流程已通过武汉市第三医院实验动物伦理审定委员会批准 (SY2020-002)。

### 2. 方法

(1) 模型制作: 将雄性 SD 大鼠随机分为 4 组: 对照组 (CTL 组)、TTS 组、SAC/VAL 组、VAL 组, 每组各 15 只。CTL 组大鼠予无菌生理盐水 (1 ml/kg) 腹腔注射 (IP), 其余 3 组大鼠均予 ISO (50 mg · ml<sup>-1</sup> · kg<sup>-1</sup>) IP, 24 h 后行灌胃处理。CTL 组和 TTS 组大鼠给予生理盐水灌胃, SAC/VAL 组大鼠给予 SAC/VAL 68 mg/kg 灌胃, VAL 组大鼠给予 VAL 31 mg/kg 灌胃。

(2) 超声心动图检查: 所有大鼠在生理盐水或 ISO 注射后 2 d 和 7 d 进行经胸超声心动图检查。大鼠麻醉后, 平卧于自制的恒温发热垫上。使用 vivo 成像系统 (VINNO 6 VET 超声系统) 和 18 MHz 探头进行经胸超声心动图检查, 胸骨旁左心室长轴切面运动减弱或

无运动区域 > 左心室内膜周长的 10% 表明 TTS 模型建立成功。在胸骨旁左心室短轴测定左心室心尖部和左心室心底部的短轴缩短率 (FS),  $FS = [\text{舒张期左心室内径}(\text{mm}) - \text{收缩期左心室内径}(\text{mm})] / \text{舒张期左心室内径}(\text{mm})$ <sup>[10]</sup>。

(3) 离体电生理检测: 在生理盐水或 ISO 注射后 8 d, 按照既往流程<sup>[11]</sup> 进行离体电生理检测。大鼠麻醉后, 快速取出心脏, 将心脏连接到 Langerdorff 灌流系统 (AD Instruments), 系统中含有正常的 Tyrode 溶液, 包括氯化钠 135 mmol/L、氯化钾 5.4 mmol/L、氯化镁 1.0 mmol/L、氯化钙 1.8 mmol/L、磷酸氢二钠 0.3 mmol/L、羟乙基哌嗪乙硫磺酸 10 mmol/L、葡萄糖 10 mmol/L, 用氢氧化钠将 pH 值调至 7.35 ~ 7.45。用 2 个定制的 Ag-AgCl 电极在左心室基底部和左心室心尖部记录心室单相动作电位。使用 PowerLab 系统 (AD Instruments) 对所有信号进行测量, 并使用 Chart 8.0 软件记录所有信号。采用 S1S2 方案测量心室有效不应期 (ERP), 由 8 个连续的基本刺激 (S1) [起搏周期长度 (PCL) 为 200 ms] 和一个提前的刺激 (S2) 组成, S2 的 PCL 由 100 ms 逐步降低至 1 ms, ERP 定义为 S2 未能捕获心脏的最长 S1S2 间隔。S1S1 方案由 10 个连续刺激 (S1) 组成, 记录 PCL 为 200 ms 时心室动作电位持续时间 (APD), 计算 90% 复极时间 (APD<sub>90</sub>)。采用 Burst 起搏法测定室性心律失常易感性, 室性心律失常的诱发刺激电极发放 Burst 刺激 (50 Hz), 每次刺激持续 2 s, 如未诱发出室性心律失常则间隔 2 s 再次发放, 共发放 20 次, 如诱发出持续时间超过 2 s 的不规则电活动则记为室性心律失常可诱发, 计算每组大鼠室性心律失常诱发率。

(4) Masson 染色: 大鼠麻醉后, 迅速取出心脏, 采用 5% 福尔马林固定。取左心室心底部和左心室心尖部组织固定, 按 Masson 染色标准方法进行染色, 采用 Image J 软件测量心肌纤维面积分数。

(5) 蛋白质免疫印迹法 (Western blot): 大鼠在深度麻醉状态下处死, 迅速取出心脏左心室心尖组织, 液氮冷冻。采用 Western blot 检测 RyR2、磷酸化的 RyR (p-RyR2) [RyR2-S2814, RyR2 有两个磷酸化位点, 分别为 S2808 和 S2814。S2808 为蛋白激酶 A (PKA) 的磷酸化位点, 而 S2814 为 Ca<sup>2+</sup>/钙调蛋白依赖性蛋白激酶 II (CaMK II) 的磷酸化位点。PKA 介导的 RyR2 磷酸化不影响心肌细胞对 β 受体的反应性, RyR2-S2808 突变也不改变慢性应激所致的心肌重构<sup>[12]</sup>。而 CaMK II 介导的 RyR2-S2814 参与心律失常的发生<sup>[13]</sup>。故本研究中只检测 RyR2-S2814 的水平。]、Smad3、Collagen I、转化生长因子 (TGF)-β<sub>1</sub>、CaMK II、

磷酸化的 CaMK II (p-CaMK II) 蛋白水平, GAPDH 作为内参。采用 Image J 软件对 Western blot 图像进行扫描和分析。

3. 统计学处理:应用 SPSS 23.0 和 GraphPad Prism 8 软件进行统计分析和作图。计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示,多组间的差异比较采用单因素方差分析,两两比较采用 SNK-*q* 检验。以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

### 结 果

1. 4 组大鼠超声心动图检查结果比较:生理盐水或 ISO 注射后 2 d, TTS 组、SAC/VAL 组、VAL 组心尖部 FS 均明显低于 CTL 组 ( $P < 0.001$ ), 而 4 组大鼠心底部 FS 比较差异均无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。生理盐水或 ISO 注射后 7 d, 4 组大鼠心底部、心底部 FS 比较差异均无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。见表 1。

表 1 4 组大鼠超声心动图检查结果比较 (% ,  $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 5$ )

组别	注射后 2 d		注射后 7 d	
	心底部 FS	心尖部 FS	心底部 FS	心尖部 FS
CTL 组	52.36 ± 1.81	53.13 ± 2.39	53.67 ± 3.68	51.33 ± 1.77
TTS 组	52.14 ± 3.57	39.51 ± 3.69 <sup>a</sup>	53.13 ± 1.89	53.16 ± 2.15
SAC/VAL 组	48.41 ± 2.93	38.46 ± 2.88 <sup>a</sup>	54.69 ± 1.94	53.38 ± 1.67
VAL 组	50.17 ± 4.79	33.88 ± 6.38 <sup>a</sup>	56.28 ± 2.40	53.46 ± 3.13
<i>F</i> 值	1.445	20.110	1.440	1.005
<i>P</i> 值	0.267	<0.001	0.268	0.416

注:与 CTL 组比较, <sup>a</sup> $P < 0.001$

2. 4 组大鼠心尖部 ERP、APD<sub>90</sub> 及室性心律失常发生情况比较:4 组大鼠心尖部 ERP、APD<sub>90</sub> 比较差异均无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。见表 2。CTL 组、TTS 组、SAC/VAL 组、VAL 组大鼠室性心律失常发生率分别为 0(0/10)、80%(8/10)、20%(2/10)、50%(5/10), 其中 TTS 组高于 CTL 组, SAC/VAL 组低于 TTS 组 ( $P < 0.05$ ), 而 TTS 组和 VAL 组比较差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。

表 2 4 组大鼠心尖部 ERP 和 APD<sub>90</sub> 比较 (ms,  $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 10$ )

组别	心尖部		心底部	
	ERP	APD <sub>90</sub>	ERP	APD <sub>90</sub>
CTL 组	52.00 ± 10.75	68.72 ± 30.69	55.60 ± 9.56	64.40 ± 20.69
TTS 组	55.80 ± 12.12	69.28 ± 14.13	55.00 ± 9.10	65.64 ± 11.38
SAC/VAL 组	52.40 ± 7.04	68.68 ± 12.72	56.20 ± 11.01	66.28 ± 12.40
VAL 组	56.20 ± 8.56	68.36 ± 7.73	56.80 ± 10.42	68.44 ± 7.67
<i>F</i> 值	0.505	0.004	0.059	0.148
<i>P</i> 值	0.681	0.999	0.981	0.930

3. 4 组大鼠左心室心尖部和心底部纤维化面积分数比较:4 组间大鼠左心室心尖部纤维化面积分数比较差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), 其中 TTS 组高于 CTL 组, SAC/VAL 组低于 TTS 组 ( $P < 0.05$ ), SAC/VAL 组和 VAL 组比较差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ), 而 4 组间大鼠左心室心底部纤维化面积分数比较差异

无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。见图 1 和表 3。

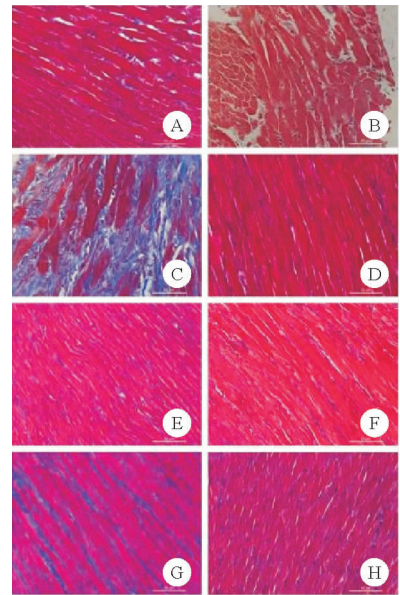


图 1 4 组大鼠左心室心尖部和心底部组织 Masson 染色结果 (A、B 分别为 CTL 组心尖部、心底部; C、D 分别为 TTS 组心尖部、心底部; E、F 分别为 SAC/VAL 组心尖部、心底部; G、H 分别为 VAL 组心尖部、心底部,  $\times 400$ )

表 3 4 组大鼠左心室心尖部和心底部纤维化面积分数比较 (% ,  $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 3$ )

组别	心尖部	心底部
CTL 组	3.16 ± 0.77	3.39 ± 0.98
TTS 组	8.15 ± 2.57 <sup>a</sup>	2.95 ± 0.98
SAC/VAL 组	4.17 ± 0.55 <sup>b</sup>	3.09 ± 0.59
VAL 组	5.62 ± 0.58	3.63 ± 1.02
<i>F</i> 值	7.195	0.346
<i>P</i> 值	0.012	0.794

注:与 CTL 组比较, <sup>a</sup> $P < 0.05$ ; 与 TTS 组比较, <sup>b</sup> $P < 0.05$

4. 4 组大鼠 TGF- $\beta_1$ 、Smad3、Collagen I、RyR2、p-RyR2、CaMK II、p-CaMK II 蛋白表达水平比较:4 组大鼠 TGF- $\beta_1$ 、Smad3、Collagen I、p-RyR2 及 p-CaMK II 蛋白表达水平比较差异均有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), 其中 TTS 组上述指标均高于 CTL 组, SAC/VAL 组均低于 TTS 组 ( $P < 0.05$ ), VAL 组与 TTS 组比较差异均无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。而 4 组间 CaMK II 和 RyR2 蛋白表达水平比较差异均无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。见表 4。

### 讨 论

近年来的研究发现, TTS 并非良性疾病<sup>[1,3]</sup>, 心律失常是 TTS 急性期的常见并发症<sup>[2,4]</sup>, 但尚缺乏对 TTS 相关心律失常的探讨。SAC/VAL 可缓解多种病因所致的心功能不全和心律失常<sup>[5-7]</sup>。本研究结果显示: (1) SAC/VAL 可降低 TTS 的室性心律失常易感性; (2) SAC/VAL 可减弱 TTS 心尖部纤维化; (3) SAC/VAL

表 4 4 组大鼠 TGF- $\beta_1$ 、Smad3、Collagen I、RyR2、p-RyR2、CaMK II、p-CaMK II 蛋白表达水平比较( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

组别	TGF- $\beta_1$	Smad3	Collagen I	RyR2	p-RyR2	CaMK II	p-CaMK II
CTL 组	0.19 ± 0.03	0.24 ± 0.11	0.11 ± 0.06	0.56 ± 0.14	0.14 ± 0.05	0.87 ± 0.04	0.17 ± 0.08
TTS 组	0.65 ± 0.03 <sup>a</sup>	0.76 ± 0.11 <sup>a</sup>	0.58 ± 0.07 <sup>a</sup>	0.59 ± 0.15	0.68 ± 0.04 <sup>a</sup>	0.88 ± 0.01	0.69 ± 0.14 <sup>a</sup>
SAC/VAL 组	0.36 ± 0.03 <sup>b</sup>	0.46 ± 0.11 <sup>b</sup>	0.21 ± 0.07 <sup>b</sup>	0.50 ± 0.11	0.33 ± 0.06 <sup>b</sup>	0.87 ± 0.03	0.28 ± 0.09 <sup>b</sup>
VAL 组	0.55 ± 0.08	0.65 ± 0.04	0.44 ± 0.08	0.55 ± 0.11	0.55 ± 0.08	0.84 ± 0.02	0.54 ± 0.04
F 值	40.130	16.950	31.640	0.267	47.380	1.064	18.920
P 值	<0.001	<0.001	<0.001	0.847	<0.001	0.417	<0.001

注:与 CTL 组比较,<sup>a</sup> $P < 0.05$ ;与 TTS 组比较,<sup>b</sup> $P < 0.05$

对心室肌细胞的 ERP 或 APD 无明显影响,但可能降低致心律失常的肌浆网  $Ca^{2+}$  泄漏。

ISO 可用于多种动物模型的制备,包括急性心肌梗死、心肌肥厚/纤维化、ISO 所致的心肌损伤、心衰及本研究中的 TTS。虽不同的动物模型采用的药物相同,但药物剂量和给药方式有所差异。ISO 用于诱导大鼠急性心肌梗死时,常采用大剂量给药,一般为连续两次皮下或 IP 75 ~ 150 mg/kg ISO,注射间隔时间为 24 h<sup>[14]</sup>。心肌肥厚、纤维化、心衰等常采用小剂量给药方式<sup>[15-16]</sup>。而本研究中的 TTS,最早来源 Sachdeva 等<sup>[10]</sup>报道的模型研究,采用单次大剂量注射 ISO,剂量为 50 mg/kg 或 100 mg/kg,模型构建成功率与 ISO 剂量无明显相关性。所以本研究选择 50 mg/kg ISO 诱导 TTS<sup>[10,17]</sup>。

临床上,典型的 TTS 主要累及左心室心尖部和心室中部,少有累及左心室基底部分,其超声表现为心尖部、心室中部收缩功能减弱或消失,心室基底部分收缩增强或正常<sup>[18]</sup>。在本研究制作的模型中,注射 ISO 后 2 d,大鼠心尖部收缩功能下降而心底部收缩功能正常。故可模拟临床 TTS 的心脏表型,而 7 d 后行心脏超声检查,心尖部收缩功能亦恢复正常,这与临床 TTS 患者的收缩功能迅速恢复类似<sup>[18]</sup>。

磁共振研究显示,TTS 患者细胞外体积分数明显增加<sup>[19]</sup>,提示细胞外纤维增多;Sachdeva 等<sup>[10]</sup>发现 ISO 注射 8 d 后心肌细胞间出现明显的胶原沉积。同样,本研究制作的 TTS 模型中,左心室心尖部出现明显纤维化,但心室心底部未见明显胶原沉积,这可能与 TTS 累及的病变范围有关<sup>[18]</sup>。TTS 的结构重塑进一步说明 TTS 并不是一种预后良好的临床疾病<sup>[1-3]</sup>。既往的研究结果显示,TGF- $\beta_1$ /Smad-3 信号通路在心脏重塑过程中被激活<sup>[20]</sup>。本研究中,ISO 注射后 8 d 大鼠 TGF- $\beta_1$ 和下游信号分子 Smad3 蛋白表达增加,表明 TGF- $\beta_1$ /Smad3 通路的过度激活参与了急性 ISO 诱导的心肌病的纤维化过程。与心肌梗死、心衰等多种疾病模型类似,SAC/VAL 可降低 TTS 左心室心尖部纤维化<sup>[6]</sup>。SAC 可抑制脑钠肽的降解,脑钠肽主要通过激活环磷酸鸟苷(cGMP)/环磷酸鸟苷依赖的蛋白激酶

(PKG) 信号通路发挥作用。本研究结果显示,SAC/VAL 的使用可降低 TGF- $\beta_1$ /Smad3 的表达,而单独使用 VAL 对上述通路无明显影响。故通过 cGMP/PKG/TGF- $\beta_1$ /Smad3 通路下调 Collagen I 的表达,可能是 SAC/VAL 发挥抗纤维化作用的主要机制<sup>[20]</sup>。

大部分 TTS 患者急性期 QT 间期延长,提示 TTS 急性期患者心室肌细胞 APD 延长<sup>[5]</sup>,但大多数 TTS 患者 QT 间期在数天内可迅速恢复正常<sup>[21]</sup>。既往研究表明,大剂量短期使用 ISO 可延长大鼠 QT 间期<sup>[22]</sup>,ISO 还可延长心肌细胞的 APD<sup>[23]</sup>。结合本研究结果,ISO 诱导的 TTS 大鼠第 8 d 的 APD 和 ERP 均恢复正常,表明采用大剂量 ISO 诱导的动物模型符合 TTS 患者的临床特征。同时,SAC/VAL 在心房颤动、心肌梗死等 ERP 改变时可调节 Cav1.2 或钾通道蛋白的表达,部分恢复 ERP,降低心律失常的发生,但在本研究中,TTS 组大鼠 ERP 和 APD 均无明显变化,提示 Cav1.2 和钾通道蛋白等影响动作电位的离子通道无明显改变,使用 SAC/VAL 后 ERP 和 APD 亦保持正常,表明 SAC/VAL 不影响正常的 Cav1.2 和钾通道蛋白表达<sup>[8-9]</sup>。舒张期肌浆网  $Ca^{2+}$  泄漏增加可激活内向  $Na^+$ / $Ca^{2+}$  交换电流,引起延迟后去极化,可触发心律失常<sup>[24]</sup>。一项对 TTS 大鼠的钙成像研究发现,在 ISO 注射后 15 d 内,肌浆网  $Ca^{2+}$  泄漏频率显著增加。故肌浆网  $Ca^{2+}$  泄漏介导的延迟后去极化可能是 TTS 急性期心律失常的潜在机制<sup>[17]</sup>。RyR2 是肌浆网  $Ca^{2+}$  泄漏的主要通道,虽然注射 ISO 后 RyR2 不变,但作为 RyR2 的活性形式,p-RyR2 蛋白表达水平升高,间接证明了肌浆网  $Ca^{2+}$  泄漏增多。RyR2 可被 PKA 或 CaMK II 磷酸化,而后者在心律失常中的比例更大,p-CaMK II 蛋白表达水平升高,表明 RyR2 活性增加主要由 CaMK II 介导。Eiringhaus 等<sup>[25]</sup>发现 SAC/VAL 可降低终末期心衰患者的心室肌细胞  $Ca^{2+}$  泄漏,还可降低自发  $Ca^{2+}$  火花的频率。本研究结果显示,短期应用 SAC/VAL 可降低 RyR2 的磷酸化水平,进一步验证了 SAC/VAL 的抗心律失常作用。TTS 发生后向血浆释放大量的儿茶酚胺。过量的去甲肾上腺素和肾上腺素激活  $\beta$  肾上腺素能受体,通过  $\beta$  受体-Gs 途径引起 RyR2 过度磷酸

化,介导肌浆网  $\text{Ca}^{2+}$  泄漏,进而激活  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  交换体,导致触发活动,使心律失常易感性增加<sup>[26-27]</sup>。同时,过量的  $\beta$  受体激活可引起心脏结构重塑,因  $\beta$  受体分布差异,过量的肾上腺素介导的纤维化在左心室心尖部最严重,而在左心室基底部较少见<sup>[26]</sup>。纤维化的空间分布异质性可进一步促进心律失常的发生<sup>[28]</sup>。短期使用 SAC/VAL 可减少由 CaMK II 上调的 RyR2 磷酸化水平,而 RyR2 磷酸化的降低使其介导的致心律失常肌浆网  $\text{Ca}^{2+}$  泄漏减少;此外,SAC/VAL 阻断胶原纤维的沉积,显著减少纤维化和整个心室的电不均一性,从而降低心律失常的发生,故本研究中 SAC/VAL 组的实验结果为药物干预所致,而非心脏自动恢复。

综上,短期使用 SAC/VAL 对 TTS 具有抗心律失常作用,但其对 TTS 患者的使用价值尚需临床试验进行验证。

### 参 考 文 献

- [1] Auger N, Paradis G, Healy-Peoffitos J, et al. Outcomes of Takotsubo Syndrome at 15 Years: A Matched Cohort Study[J]. *Am J Med*, 2020, 133(5):627-634, e4.
- [2] Medina de chazal H, Del buono MG, Keyser marcus L, et al. Stress Cardiomyopathy Diagnosis and Treatment: JACC State-of-the-Art Review[J]. *J Am Coll Cardiol*, 2018, 72(16):1955-1971.
- [3] Brinjikji W, El-Sayed AM, Salka S. In-hospital mortality among patients with takotsubo cardiomyopathy: a study of the National Inpatient Sample 2008 to 2009[J]. *Am Heart J*, 2012, 164(2):215-221.
- [4] Pant S, Deshmukh A, Mehta K, et al. Burden of arrhythmias in patients with Takotsubo cardiomyopathy (apical ballooning syndrome) [J]. *Int J Cardiol*, 2013, 170(1):64-68.
- [5] Morrow DA, Velazquez EJ, Devore AD, et al. Clinical Outcomes in Patients With Acute Decompensated Heart Failure Randomly Assigned to Sacubitril/Valsartan or Enalapril in the PIONEER-HF Trial [J]. *Circulation*, 2019, 139(19):2285-2288.
- [6] Burke RM, Lighthouse JK, Mickelsen DM, et al. Sacubitril/Valsartan Decreases Cardiac Fibrosis in Left Ventricle Pressure Overload by Restoring PKG Signaling in Cardiac Fibroblasts [J]. *Circ Heart Fail*, 2019, 12(4):e005565.
- [7] Chaumais MC, Djessas MRA, Thuillet R, et al. Additive Protective Effects of Sacubitril/Valsartan and Bosentan on Vascular Remodeling in Experimental Pulmonary Hypertension [J]. *Cardiovasc Res*, 2021, 117(5):1391-1401.
- [8] Li LY, Lou Q, Liu GZ, et al. Sacubitril/valsartan attenuates atrial electrical and structural remodelling in a rabbit model of atrial fibrillation [J]. *Eur J Pharmacol*, 2020, 881:173120.
- [9] Chang PC, Lin SF, Chu Y, et al. LCZ696 Therapy Reduces Ventricular Tachyarrhythmia Inducibility in a Myocardial Infarction-Induced Heart Failure Rat Model [J]. *Cardiovasc Ther*, 2019, 2019:6032631.
- [10] Sachdeva J, Dai W, Kloner RA. Functional and histological assessment of an experimental model of Takotsubo's cardiomyopathy [J]. *J Am Heart Assoc*, 2014, 3(3):e000921.
- [11] Ye T, Liu X, Qu C, et al. Chronic inhibition of the sigma-1 receptor exacerbates atrial fibrillation susceptibility in rats by promoting atrial remodeling [J]. *Life Sci*, 2019, 235:116837.
- [12] Benkuskay NA, Weber CS, Scherman JA, et al. Intact beta-adrenergic response and unmodified progression toward heart failure in mice with genetic ablation of a major protein kinase A phosphorylation site in the cardiac ryanodine receptor [J]. *Circ Res*, 2007, 101(8):819-829.
- [13] Purohit A, Rokita AG, Guan X, et al. Oxidized  $\text{Ca}^{2+}$ /calmodulin-dependent protein kinase II triggers atrial fibrillation [J]. *Circulation*, 2013, 128(16):1748-1757.
- [14] Vázquez-Martínez O, Díaz-Muñoz M, López-Barrera F, et al. Mitochondrial Oxidation of the Cytoplasmic Reducing Equivalents at the Onset of Oxidant Stress in the Isoproterenol-Induced Rat Myocardial Infarction [J]. *Antioxidants (Basel)*, 2021, 10(9):1444.
- [15] Meshram S, Verma VK, Mutneja E, et al. Evidence based mechanistic role of Chrysin towards protection of cardiac hypertrophy & fibrosis in rats [J]. *The British journal of nutrition*, 2022. [Epub ahead of print]
- [16] Liao M, Xie Q, Zhao Y, et al. Main active components of Si-Miao-Yong-An decoction (SMYAD) attenuate autophagy and apoptosis via the PDE5A-AKT and TLR4-NOX4 pathways in isoproterenol (ISO)-induced heart failure models [J]. *Pharmacol Res*, 2022, 176:106077.
- [17] Perez-Trevino P, Sepulveda-Leal J, Altamirano J. Simultaneous assessment of calcium handling and contractility dynamics in isolated ventricular myocytes of a rat model of post-acute isoproterenol-induced cardiomyopathy [J]. *Cell Calcium*, 2020, 86:102138.
- [18] Ghadri JR, Wittstein IS, Prasad A, et al. International Expert Consensus Document on Takotsubo Syndrome (Part I): Clinical Characteristics, Diagnostic Criteria, and Pathophysiology [J]. *Eur Heart J*, 2018, 39(22):2032-2046.
- [19] Schwarz K, Ahearn T, Srinivasan J, et al. Alterations in Cardiac Deformation, Timing of Contraction and Relaxation, and Early Myocardial Fibrosis Accompany the Apparent Recovery of Acute Stress-Induced (Takotsubo) Cardiomyopathy: An End to the Concept of Transience [J]. *J Am Soc Echocardiogr*, 2017, 30(8):745-755.
- [20] Calvieri C, Rubattu S, Volpe M. Molecular mechanisms underlying cardiac antihypertrophic and antifibrotic effects of natriuretic peptides [J]. *J Mol Med (Berl)*, 2012, 90(1):5-13.
- [21] Santoro F, Brunetti ND, Tarantino N, et al. Dynamic changes of QTc interval and prognostic significance in takotsubo (stress) cardiomyopathy [J]. *Clin Cardiol*, 2017, 40(11):1116-1122.
- [22] Elasarou SE, Rhana P, De Oliveira Barreto T, et al. Andrographolide protects against isoproterenol-induced myocardial infarction in rats through inhibition of L-type  $\text{Ca}^{2+}$  and increase of cardiac transient outward  $\text{K}^{+}$  currents [J]. *Eur J Pharmacol*, 2021, 906:174194.
- [23] El-Battrawy I, Zhao Z, Lan H, et al. Estradiol protection against toxic effects of catecholamine on electrical properties in human-induced pluripotent stem cell derived cardiomyocytes [J]. *Int J Cardiol*, 2018, 254:195-202.
- [24] Curran J, Brown KH, Santiago DJ, et al. Spontaneous  $\text{Ca}^{2+}$  waves in ventricular myocytes from failing hearts depend on  $\text{Ca}^{2+}$ -calmodulin-dependent protein kinase II [J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2010, 49(1):25-32.
- [25] Eiringhaus J, Wunsche CM, Tirilomis P, et al. Sacubitrilat reduces pro-arrhythmic sarcoplasmic reticulum  $\text{Ca}^{2+}$  leak in human ventricular cardiomyocytes of patients with end-stage heart failure [J]. *ESC Heart Fail*, 2020, 7(5):2992-3002.
- [26] Heubach JF, Ravens U, Kaumann AJ. Epinephrine activates both Gs and Gi pathways, but norepinephrine activates only the Gs pathway through human beta2-adrenoceptors overexpressed in mouse heart [J]. *Mol Pharmacol*, 2004, 65(5):1313-1322.
- [27] Ellison GM, Torella D, Karakikes I, et al. Acute beta-adrenergic overload produces myocyte damage through calcium leakage from the ryanodine receptor 2 but spares cardiac stem cells [J]. *J Biol Chem*, 2007, 282(15):11397-11409.
- [28] Tanaka K, Zlochiver S, Vikstrom KL, et al. Spatial distribution of fibrosis governs fibrillation wave dynamics in the posterior left atrium during heart failure [J]. *Circ Res*, 2007, 101(8):839-847.

(收稿日期:2022-01-17)

(本文编辑:周三凤)