

梁娟,刘越,尹新华. 异丙肾上腺素所致心肌损伤动物模型的研究进展[J]. 中国实验动物学报, 2019, 27(1): 110-114.

Liang J, Liu Y, Yin XH. Research progress of animal models of myocardial injury induced by isoproterenol [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2019, 27(1): 110-114.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2019.01.018

异丙肾上腺素所致心肌损伤动物模型的研究进展

梁娟¹,刘越²,尹新华^{2*}

(1. 哈尔滨医科大学附属第一医院,哈尔滨 150001; 2. 哈尔滨医科大学附属第一医院心内科,哈尔滨 150001)

【摘要】 目前,心血管疾病(cardiovascular disease,CVD)是最常见的导致人类死亡原因,但其发病机制和防治仍需要进一步研究。异丙肾上腺素(isoproterenol,ISO)是一种 β -肾上腺素能受体激动剂,能够通过炎症反应、氧化应激、内质网应激、自噬和凋亡等直接和间接地作用于心肌组织,可以引起轻度心肌损伤、心肌梗死、心肌肥厚,甚至心力衰竭等。因此,本文从形态与功能学特征、发病机理等方面阐述ISO所致的动物心肌损伤模型的研究进展。

【关键词】 异丙肾上腺素;心肌损伤;发病机理

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2019) 01-0110-05

Research progress of animal models of myocardial injury induced by isoproterenol

LIANG Juan¹, LIU Yue², YIN Xinhua^{2*}

(1. First Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin 150001, China. 2. Department of Cardiology, First Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin 150001)

Corresponding author: YIN Xinhua. E-mail:yinxinhua5063@163.com

【Abstract】 Cardiovascular disease (CVD) is a leading cause of human death worldwide, but its pathogenesis and prevention still need further research. Isoproterenol (ISO) is a β -adrenergic receptor agonist that acts directly or indirectly on the myocardium through inflammatory responses, oxidative stress, endoplasmic reticulum stress, autophagy, and apoptosis, which can cause mild myocardial injury, myocardial infarction, cardiac hypertrophy, and even heart failure. This review mainly focuses on the research on animal models of myocardial injury caused by ISO and attempts to describe its morphological and functional characteristics, as well as its pathogenesis.

【Keywords】 isoproterenol; myocardial injury; pathogenesis

Conflict of interest statement: We declare that we have no conflict of interest statement.

美国流行病学数据表明心血管疾病(cardiovascular disease,CVD)是目前世界上最常见的导致人类死亡的原因,占全球总死亡人数的31.5%^[1]。在我国,最新流行病学证据也表明CVD患病率及死亡率仍处于上升阶段,而心血管死亡占城乡居民总死亡原因的首位,农村为45.01%,城市为42.61%^[2]。因此,CVD是世界公共卫生及健康事业所面临的严峻挑战,亟需进一步临床与基础研究。动物模型一直是心血管基础研究常被用到的方法,用于揭示疾病的发病机制和观察干预的效果。ISO是一种 β -肾上腺素能受体激动剂,通过加快心率、增强心肌耗氧量引发心肌损伤,其发病机

【基金项目】 国家自然科学基金(81200235,81200143)。
Funded by National Natural Science Foundation of China (81200235, 81200143)。

【作者简介】 梁娟(1993—),女,在读硕士,主要从事急性心肌损伤研究。Email: 2312306750@qq.com

【通信作者】 尹新华(1965—),女,主任医师,博士,主要从事高血压、冠心病研究。Email: yinxinhua5063@163.com

制主要与炎症反应、氧化应激、内质网应激、自噬和凋亡等机制有关,表现出许多与人类心脏病相似的代谢和形态学异常,模拟缺血性心肌损伤、药物性心肌损伤、2 型心肌梗死等疾病^[3]。因此,本文从形态与功能学特征、发病机理等方面阐述 ISO 所致的动物心肌损伤模型,从而有助于深入理解其在基础研究中应用的意义。

1 ISO 诱导心肌损伤动物模型的形态与功能学特征

ISO 所致心肌损伤的动物模型包括轻度心肌损伤、心肌梗死、心肌肥厚甚至心力衰竭等。根据 ISO 给药的剂量和持续时间分为三种情况:低剂量 ISO 所致心肌损伤模型,例如心肌肥厚,多用 5 mg/(kg·bw),时间至少 1 周,多至 4 周;中等剂量 ISO 所致心肌梗死模型,通常用 ISO 10 ~ 120 mg/(kg·bw) 连续两次或多次皮下注射方式;高剂量 ISO 所致心肌梗死模型,ISO 150 ~ 400 mg/(kg·bw) 以单次剂量或连续两次施用。高等剂量 ISO 所致心肌梗死模型的成模率高于中等剂量 ISO,但同时伴随着更高的实验动物死亡率。

1.1 低剂量 ISO 所致心肌损伤模型

低剂量 ISO 5 mg/(kg·bw) 作用 7 d 或 14 d 可诱导以心肌纤维化和坏死为特征的心肌肥厚模型。在 ISO 5 mg/(kg·bw) 皮下注射 7 d 后 24 h,雄性 Wistar 大鼠(2 ~ 3 月龄, $n=7$, 来自斯洛伐克共和国的 Dobrá Voda 育种站)体内心脏和离体心脏模型的心电图检查发现体内心脏的 QRS 时间和 QT 间期分别延长了 8% 和 53%, I 导联可见 R 波振幅增加,部分出现 ST-T 改变,而离体心脏 R 波振幅较体内心脏更高,QT 间期延长了 55%。一般认为,QT 间期延长为复极异常的表现,与室性心律失常风险增加有关。ISO 组大鼠的离体心脏中,室性早搏数量较正常组离体心脏明显增多^[4]。同时,ISO 5 mg/(kg·bw) 腹腔注射 7 d 后雄性 SD 大鼠(140 ~ 160 g, 来自西安交通大学实验动物中心)心脏重量显著增加,血清 BNP 及其在心脏中的 mRNA 表达水平升高^[5]。而且,ISO 5 mg/(kg·bw) 腹腔注射 7 d 的雄性 Wistar 大鼠(180 ~ 200 g, $n=6$, 来自沙特国王沙特大学药剂学院实验动物中心)的血浆 cTnI 和 CK-MB 水平显著升高,进一步的心肌组织 HE 染色发现左心室局灶性心内膜下退化,伴有许多单核细胞浸润灶;而 Masson 染色可见左心室心肌细胞特别是在内皮下区域的肌内膜中有较多的纤维组织沉积^[6]。与之

一致,在 5 mg/(kg·bw) 皮下注射 14 d 诱导的雄性 SD 大鼠(200 ~ 250 g, $n=10$, 来自印度海得拉巴的蒂娜实验室)中,在实验第 13 天的心电图上呈现心率加快、QT 间期延长和 R 波振幅增加。同时 ISO 组大鼠心肌组织中 ANP、 β -MHC 及胶原 mRNA 的表达量较盐水对照组显著增加^[7]。上述现象表明肾上腺素能过度激活导致心肌损伤坏死、纤维化进而发生心肌肥厚,同时伴随着心脏功能下降。

1.2 中等剂量 ISO 所致心肌损伤模型

通常以连续两次或多次剂量给予中等 ISO 建立啮齿类动物的急性心肌梗死(acute myocardial infarction, AMI)模型。在中等剂量的 ISO 85 mg/(kg·bw) 皮下注射 2 d 干预的成年雄性 Wistar 大鼠(170 ~ 200 g, $n=10$, 来自印度新德里医学科学研究院中心畜舍设施)中,血清 CK-MB 和 LDH 水平显著增加;组织病理学检查显示心肌明显水肿,伴炎症改变及坏死;超微结构检查示心肌细胞线粒体肿胀和嵴的空泡化破坏^[8]。值得一提的是,有文章报道采用 ISO 剂量梯度递减法并延长给药时间方式诱导的心肌梗死模型较 ISO 85 mg/(kg·bw) 短期给药方式更稳定,而且实验动物生存率更高^[9]。研究发现即使 ISO 代谢清除后损伤的心肌仍会继续发生重塑,导致心肌肥厚、心室扩张和心脏功能障碍,这些改变与 ISO 给药剂量成正比^[10],甚至可能在 ISO 给药后 9 周仍有心电图变化、纤维化进展和 TNF 水平升高^[11]。与之相反,Shao 等^[10]报道中等剂量 ISO 50 ~ 100 mg/(kg·bw) 所致的心肌损伤是一个可逆过程,但仍有待进一步研究。

1.3 高剂量 ISO 所致心肌损伤模型

高剂量的 ISO 150 ~ 340 mg/(kg·bw) 诱导弥漫性心肌坏死,甚至诱发恶性心律失常。有研究报道单剂量 ISO 200 mg/(kg·bw) 皮下注射给药后 24 h 血清 CK-MB 和 cTnI 水平分别升高为对照组的 2 ~ 3 倍和 15 ~ 20 倍^[12]。有意思的是,Markus 等^[13]给予野生型 C57BL/6 小鼠(10 ~ 12 周龄,来自美国缅因州巴尔港杰克逊实验室)单剂量 ISO 200 ($n=5$)、300 ($n=1$)、400 ($n=4$)、500 ($n=1$)、600 ($n=1$)、700 ($n=1$)、800 ($n=1$) 和 1000 ($n=5$) mg/(kg·bw),并对给予 200、300、400、1000 mg/(kg·bw) 的小鼠行心电图检查以探索各剂量 ISO 对小鼠心脏的影响。结果发现 400、1000 mg/kg ISO 给药的小鼠心电图最初表现为心率略增加,随后几分钟出现窦性停搏、心室传导阻滞、室性逸搏心律,而终止于室性心动

过速或心脏停搏,因此推测啮齿类动物可耐受的 ISO 最高非致死剂量为 300 mg/kg,故选取 200 及 300 mg/(kg·bw) 剂量用于后续实验研究。进一步发现单剂量 ISO 200 mg/(kg·bw) 或 300 mg/(kg·bw) 皮下注射后 1 d,小鼠心脏收缩功能瞬时增加,舒张功能无变化,血清 cTnI 水平升高。通过伊文思蓝染料 (EBD) 摄取评估表明 ISO 可以改变心肌细胞的膜通透性而并不导致坏死。EBD + 心肌细胞存在于整个心室内,而不仅局限于左心室内膜或心尖区域。然而,另一研究给予 16 周龄野生型 C57BL/6 小鼠从 50 mg/(kg·bw) 起始逐渐递增的单剂量 ISO,直至在单剂量 ISO 400 mg/(kg·bw) 后 2 h 小鼠中检测到明显的节段性心脏功能障碍,但并不导致小鼠直接死亡^[14]。因此,300 mg/kg ISO 是否为啮齿类动物可耐受的最低非致死剂量仍有待进一步研究。

2 ISO 诱导心肌损伤模型的发病机理

2.1 炎症反应

炎症免疫反应在 ISO 所致心肌损伤中发挥重要作用。既往研究发现,ISO 可以诱导包括 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 在内的多种心肌炎性因子的表达^[15-16]。另外,雄性 C57BL/6 小鼠模型细胞因子阵列分析 ISO 对心肌的作用,发现趋化因子在心脏内特异性上调的初始细胞因子中起主导作用,促进了早期巨噬细胞的浸润,增强细胞炎症免疫反应,间接导致心肌损伤增加的趋化因子包括单核细胞趋化蛋白 (MCP)-1、MCP-5、巨噬细胞炎性蛋白-1 α (MIP-1 α) 和 C-X-C 趋化因子 10 (CXCL-10),均在 ISO 处理后 12 h 达到最高表达水平。相比之下,升高的促炎性细胞因子 (如 IL-6 和 TNF- α) 直到 24 h 才被检测到,并持续到 ISO 给药后 72 h。相反,在此过程中未检测到 T 细胞, B 细胞和中性粒细胞。进一步的研究发现,IL-18 (而非 IL-1 β) 的快速炎症体依赖性激活是由 ISO 诱导的 β 1-AR-ROS 信号介导的,是心肌中上调趋化因子表达的关键上游调控因子。IL-18 或上游炎性小体成分 NLRP3 的基因缺失使异源性趋化因子的表达和炎细胞因子、粘附分子、巨噬细胞的浸润明显下降,从而有效减轻心脏炎症和纤维化。但是,炎症反应在 ISO 所致的心肌损伤的发病中作用仍有待进一步阐明^[17]。

2.2 氧化应激及脂质过氧化

研究表明 ISO 处理的成年雄性 Wistar 大鼠

(170 ~ 200 g, $n=10$, 来自印度新德里医学科学研究中心中心畜舍设施) 抗氧化酶水平显著降低,如超氧化物歧化酶、过氧化氢酶和谷胱甘肽等;而丙二醛水平升高^[8]。ISO 还能够引起电压敏感 Ca^{2+} 通道打开和过度的 Ca^{2+} 内流,使心肌收缩增强,进而增加氧需求,导致 ATP 消耗和呼吸链中的电子泄漏。这些释放的自由电子与分子氧反应形成活性氧基团 (reactive oxygen species, ROS), 进一步氧化蛋白质、DNA 和膜脂质等细胞组分,直接损伤心肌。此外,ROS 引发 TNF- α 和 IL-6 等炎性细胞因子的释放会导致肌质网中 Ca^{2+} 泵的持续抑制,间接对心肌细胞产生负面影响^[18]。此外,ROS 导致脂质膜破坏使 LDH 和 CK-MB 等胞质酶释放入血液中,因此通过检测 ISO 组大鼠血清中的这些胞质酶可判断是否存在心肌损伤^[19]。

同时,ISO 使心脏组织中脂质积聚并发生脂质过氧化从而导致心脏功能障碍。研究显示 ISO 85 mg/(kg·bw) 2 d 导致雄性白化 Wistar 大鼠 (120 g, $n=8$) 血清总胆固醇、三酰甘油、低密度脂蛋白胆固醇、极低密度脂蛋白胆固醇和脂质过氧化的浓度显著增加,而高密度脂蛋白胆固醇浓度显著降低。重要的是,ISO 处理后卵磷脂胆固醇酰基转移酶、对氧磷酶和脂蛋白脂肪酶的活性显著降低,而 3-羟基-3-甲基戊二酰辅酶 A 还原酶 (HMG-CoA) 的活性显著增加^[20]。这些表明脂毒性与儿茶酚胺引起的心肌功能障碍密切相关。

2.3 内质网应激 (Endoplasmic reticulum stress, ERS)

ERS 能够调节蛋白质折叠和运输以及细胞内钙浓度等不同细胞过程,参与高血压、心肌缺血和扩张型心肌病等多种导致心力衰竭的心脏疾病^[21]。ISO 5 mg/(kg·bw) 作用 7 d 诱导的雄性 C57BL/6 小鼠 (6 ~ 8 周, 20 ~ 25 g, 来自美国缅因州巴尔港杰克逊实验室) 心力衰竭模型中,ISO 能够显著上调心肌组织中 GRP78 蛋白表达,进一步激活其下游的 PERK、IRE1 和 eIF2 α 来启动 ERS^[22]。在 ISO 所致的雄性 Wistar 大鼠 (200 ~ 250 g, $n=20$, 来自哈尔滨医科大学实验动物中心) 心肌损伤模型中,ISO 能够使心肌中 ER 伴侣蛋白和相关凋亡蛋白明显增加;应用钙受体 (calcium receptor, CaR) 激活剂 calindol 后 ER 伴侣蛋白的表达和凋亡率有所增加,而应用 CaR 阻断剂 calhex231 后上述蛋白的表达降低。ISO 处理 48 h 后, CaR 活化使肌浆网内 Ca^{2+} 浓度降低、

线粒体内 Ca^{2+} 浓度升高,从而降低线粒体膜电位,使 ER 应激伴侣蛋白及相关凋亡蛋白的表达增强,表明钙感受受体通过内质网应激在 ISO 所致心肌损伤发挥着重要的作用^[23]。同时,另一研究表明 ISO 抑制 AMPK 活化并增强 ERS,随后导致心肌细胞凋亡^[24]。

2.4 自噬

自噬是依赖溶酶体途径对胞质蛋白和细胞器进行降解的一种过程,参与细胞更新和稳态的维持。自噬在许多疾病的发病过程中发挥重要作用,如癌症、神经退行性疾病、炎症反应和其他心脏病^[25]。自噬依赖性心肌细胞死亡已在心肌梗塞动物模型中得到证实,然而却很少有研究报道自噬是否可以影响心脏成纤维细胞活化。因此, Dong 等^[26]假设自噬可以促进成纤维细胞在增殖和分化中的激活,使用 Toll 样受体 4 敲除 (TLR4 KO) 小鼠作为自噬不足的阴性对照。结果表明 TLR4 KO 减轻 ISO 诱导的心脏纤维化,该效应可能与抑制自噬有关。因此,推测适度抑制自噬活性可能是治疗心脏纤维化的新策略。相反, Lu 等^[27]却发现 ISO 诱导原代新生大鼠心肌细胞 (NRCMs) 发生肥大反应并抑制该细胞自噬活性,而 SIRT6 诱导的自噬可能通过抑制 Akt 信号传导来减轻 ISO 诱导的心脏肥大,并推测促进自噬可能成为治疗心脏肥大的有效方法。自噬在心肌损伤中的作用犹如一把双刃剑,被生物体微妙地调控着。

2.5 凋亡

Fas 配体 (FasL) 及其受体 Fas (CD95/APO-1) 均参与细胞死亡调控,被认为是心肌梗死、缺血再灌注 (I-R) 损伤和慢性心力衰竭等多种心脏病理的重要因素^[28]。有证据表明细胞外基质蛋白 CCN1/Cyr61 能够促进 FasL 和 TNF 家族细胞因子的细胞毒性。在 ISO 诱导的心肌损伤模型中,CCN1 通过增加 ROS 和细胞表面 Fas 的表达提高细胞对 fas 所诱导细胞凋亡的敏感性,使心肌细胞更容易受到应激性心脏的死亡刺激,提示阻断 CCN1 可能减轻小鼠心肌损伤^[29]。

ISO 通过炎症反应、氧化应激、内质网应激、自噬和凋亡等机制直接和间接地诱导形成心肌损伤动物模型。这些机制并不是独立存在的,而是通过各种方式相互联系、相互影响的。关于 ISO 建立实验性心肌损伤模型的机制仍存在许多未知,有待进一步研究。

3 展望

ISO 通过炎症反应、氧化应激、内质网应激、自噬和凋亡等机制直接和间接地引起心肌损伤。这些机制并不是独立存在的,而是通过各种方式相互联系、相互影响的。ISO 建立的实验动物模型,包括病理性心肌损伤、心肌梗死、心肌肥厚和心力衰竭等,有助于我们深入理解 β -肾上腺素能受体刺激下发生的病理变化和病理机制并找到治疗交感神经过度活化的最佳途径。在大鼠心脏中由单次、两次或多次过量 ISO 引起的急性心肌梗塞症状与人类相似,因此使用 ISO 模型作为合并 HF 的非侵入性 AMI 模型尤为适用。同时,对该动物模型的体外和体内观察为 β -肾上腺素能受体过度刺激引起左室重塑和心力衰竭患者的治疗提供了合理机制。最近有研究表明 ISO 所致心肌损伤可能还与 E2/ER β 受体等有关^[30]。由此可见,ISO 诱导实验性心肌损伤模型仍有待进一步研究,其在心血管疾病诊疗方面具有重要意义和广阔前景。

参 考 文 献 (References)

- [1] Benjamin EJ, Blaha MJ, Chiuve SE, et al. Heart disease and stroke statistics – 2017 update: a report from the American Heart Association [J]. *Circulation*, 2017, 135(10): e146-e603.
- [2] 陈伟伟,高润霖,刘力生,等.中国心血管病报告 2017 概要 [J]. *中国循环杂志*, 2018, 33: 1-8.
Chen WW, Gao RL, Liu LS, et al. China cardiovascular disease report 2017 summary [J]. *Chin Circul J*, 2018, 33: 1-8.
- [3] Nichtova Z, Novotova M, Kralova E, et al. Morphological and functional characteristics of models of experimental myocardial injury induced by isoproterenol [J]. *Gen Physiol Biophys*, 2012, 31(2): 141-151.
- [4] Mikusová A, Králová E, Tylková L, et al. Myocardial remodelling induced by repeated low doses of isoproterenol. *Can J Physiol Pharmacol* [J]. *Can J Physiol Pharmacol*, 2009, 87(8): 641-651.
- [5] Zhuo XZ, Wu Y, Ni YJ, et al. Isoproterenol instigates cardiomyocyte apoptosis and heart failure via AMPK inactivation-mediated endoplasmic reticulum stress [J]. *Apoptosis*, 2013, 18(7): 800-810.
- [6] Al-Rasheed NM, Al-Oteibi MM, Al-Manee RZ, et al. Simvastatin prevents isoproterenol-induced cardiac hypertrophy through modulation of the JAK/STAT pathway [J]. *Drug Des Devel Ther*, 2015, 9: 3217-3229.
- [7] Katare PB, Bagul PK, Dinda AK, et al. Toll-Like receptor 4 inhibition improves oxidative stress and mitochondrial health in isoproterenol-induced cardiac hypertrophy in rats [J]. *Front Immunol*, 2017, 22(8): 719.
- [8] Suchal K, Malik S, Gamad N, et al. Kampeferol protects against

- oxidative stress and apoptotic damage in experimental model of isoproterenol-induced cardiac toxicity in rats [J]. *Phytomedicine*, 2016, 23(12): 1401–1408.
- [9] Zhu XQ, Hong HS, Lin XH, et al. Changes in cardiac aldosterone and its synthase in rats with chronic heart failure: an intervention study of long-term treatment with recombinant human brain natriuretic peptide [J]. *Braz J Med Biol Res*, 2014, 47(8): 646–654.
- [10] Shao Y, Redfors B, Scharin TM, et al. Novel rat model reveals important roles of beta-adrenoreceptors in stress-induced cardiomyopathy [J]. *Int J Cardiol*, 2013, 168(3): 1943–1950.
- [11] Zaitone SA, Abo-Gresha NM. Rosuvastatin promotes angiogenesis and reverses isoproterenol-induced acute myocardial infarction in rats: role of iNOS and VEGF [J]. *Eur J Pharmacol*, 2012, 691(1–3): 134–142.
- [12] Kuloglu T, Aydin S, Eren MN, et al. Irisin: A potentially candidate marker for myocardial infarction [J]. *Peptides*, 2014, 55: 85–91.
- [13] Wallner M, Duran JM, Mohsin S, et al. Acute catecholamine exposure causes reversible myocyte injury without cardiac regeneration [J]. *Circ Res*, 2016, 119(7): 865–879.
- [14] Shao Y, Redfors B, Ståhlman M, et al. A mouse model reveals an important role for catecholamine-induced lipotoxicity in the pathogenesis of stress-induced cardiomyopathy [J]. *Eur J Heart Fail*, 2013, 15(1): 9–22.
- [15] Shukla SK, Sharma SB, Singh UR. β -Adrenoreceptor agonist isoproterenol alters oxidative status, inflammatory signaling, injury markers and apoptotic cell death in myocardium of rats [J]. *Ind J Clin Biochem*, 2015, 30(1): 27–34.
- [16] Ojha S, Azimullah S, Mohanraj R, et al. Thymoquinone protects against myocardial ischemic injury by mitigating oxidative stress and inflammation [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2015, 2015: 143629.
- [17] Xiao H, Li H, Wang JJ, et al. IL-18 cleavage triggers cardiac inflammation and fibrosis upon β -adrenergic insult [J]. *Eur Heart J*, 2018, 39(1): 60–69.
- [18] Reddy NM, Mahajan UB, Patil CR, et al. Eplerenone attenuates cardiac dysfunction and oxidative stress in β -receptor stimulated myocardial infarcted rats [J]. *Am J Transl Res*, 2015, 7(9): 1602–1611.
- [19] Derbali A, Mnafigui K, Affes M, et al. Cardioprotective effect of linseed oil against isoproterenol-induced myocardial infarction in Wistar rats: a biochemical and electrocardiographic study [J]. *J Physiol Biochem*, 2015, 71(2): 281–288.
- [20] Shaik AH, Shaik NR, Mohammed AK, et al. Terminalia pallida fruit ethanolic extract ameliorates lipids, lipoproteins, lipid metabolism marker enzymes and paraoxonase in isoproterenol-induced myocardial infarcted rats [J]. *Saudi J Biol Sci*, 2018, 25(3): 431–436.
- [21] Ni L, Zhou CQ, Duan QL, et al. β -AR blockers suppresses ER stress in cardiac hypertrophy and heart failure [J]. *PLoS One*, 2011, 6: 27294.
- [22] Yang J, Wang Z, Chen DL. Shikonin ameliorates isoproterenol (ISO)-induced myocardial damage through suppressing fibrosis, inflammation, apoptosis and ER stress [J]. *Biomed Pharmacother*, 2017, 93: 1343–1357.
- [23] Lu FH, Fu SB, Leng X, et al. Role of the calcium-sensing receptor in cardiomyocyte apoptosis via the sarcoplasmic reticulum and mitochondrial death pathway in cardiac hypertrophy and heart failure [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2013, 31(4–5): 728–743.
- [24] Zhuo XZ, Wu Y, Ni YJ, et al. Isoproterenol instigates cardiomyocyte apoptosis and heart failure via AMPK inactivation-mediated endoplasmic reticulum stress [J]. *Apoptosis*, 2013, 18(7): 800–810.
- [25] Mizushima N. Methods for monitoring autophagy [J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2004, 36: 2491–2502.
- [26] Dong RQ, Wang ZF, Zhao C, et al. Toll-like receptor 4 knockout protects against isoproterenol-induced cardiac fibrosis: the role of autophagy [J]. *J Cardiovasc Pharmacol Ther*, 2015, 20(1): 84–92.
- [27] Lu J, Sun D, Liu Z, et al. SIRT6 suppresses isoproterenol-induced cardiac hypertrophy through activation of autophagy [J]. *Transl Res*, 2016, 172: 96–112.e6.
- [28] Bhuiyan MS, Fukunaga K. Inhibition of HtrA2/Omi ameliorates heart dysfunction following ischemia/reperfusion injury in rat heart in vivo [J]. *Eur J Pharmacol*, 2007, 557(2–3): 168–177.
- [29] Hsu PL, Su BC, Kuok QY, et al. Extracellular matrix protein CCN1 regulates cardiomyocyte apoptosis in mice with stress-induced cardiac injury [J]. *Cardiovasc Res*, 2013, 98(1): 64–72.
- [30] Lin KH, Kuo WW, Shibu MA, et al. E2/ER β enhances calcineurin protein degradatoin and PI3K/Akt/MDM2 signal transduction to inhibit ISO-induced myocardial cell apoptosis [J]. *Int J Mol Sci*, 2017, 18(4).