

张凯玉,王圆,胡燕燕,等. 斑马鱼缓慢性心律失常模型的构建[J]. 中国实验动物学报, 2022, 30(3): 358–369.

Zhang KY, Wang Y, Hu YY, et al. Establishment of a bradycardiac arrhythmia model in zebrafish [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2022, 30(3): 358–369.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2022.03.008

斑马鱼缓慢性心律失常模型的构建

张凯玉¹,王圆¹,胡燕燕¹,张静¹,施雯婷¹,赵外荣^{1,2},唐靖一^{1,2,3*},周忠焱^{1*}

(1. 上海中医药大学附属龙华医院心血管研究室,上海 200032;2. 上海中医药大学附属龙华医院中西医结合心脏康复中心,上海 200032;3. 上海中医药大学产业发展中心,上海 200032)

【摘要】 目的 建立一种简单易行、重复性好的斑马鱼缓慢性心律失常模型及其评价体系。**方法** 选用 24 hpf 的野生型和心脏标记绿色荧光蛋白的转基因斑马鱼,分别用不同浓度的维拉帕米、普罗帕酮、美托洛尔、胺碘酮、美西律干预 48 h,检测斑马鱼生存率、心率、心博量、心输出量、射血分数、心室舒张期和收缩期面积差值、静脉窦与动脉球(SV-BA)间距等心脏功能和心脏毒性评价指标。**结果** 药物毒性的评价中,半数致死浓度(IC₅₀)排序为普罗帕酮 < 美西律 < 胺碘酮 < 美托洛尔和维拉帕米。维拉帕米显著降低斑马鱼心率、心输出量、射血分数及心室舒张期和收缩期面积差值,增加 SV-BA 间距;普罗帕酮降低斑马鱼心率及心输出量;美托洛尔降低斑马鱼心率;胺碘酮降低斑马鱼心率,增加 SV-BA 间距;美西律增加 SV-BA 间距。**结论** 维拉帕米、普罗帕酮、美托洛尔、胺碘酮均可制备斑马鱼缓慢性心律失常模型,其中维拉帕米效果最佳。本研究提出运用维拉帕米等抗心律失常药物构建缓慢性心律失常斑马鱼模型,并建立了相应的评价指标,对缓慢性心律失常的研究及药物研发均具有重要的意义。

【关键词】 缓慢性心律失常;斑马鱼;维拉帕米;心脏毒性;抗心律失常药物

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2022)03-0358-12

Establishment of a bradycardiac arrhythmia model in zebrafish

ZHANG Kaiyu¹, WANG Yuan¹, HU Yanyan¹, ZHANG Jing¹, SHI Wenting¹, ZHAO Wairong^{1,2},
TANG Jingyi^{1,2,3*}, ZHOU Zhongyan^{1*}

(1. Cardiovascular Research Laboratory, Longhua Hospital, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200032, China. 2. Cardiac Rehabilitation Center of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, Longhua Hospital, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200032. 3. Industrial Development Center, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200032)

Corresponding author: TANG Jingyi. E-mail: dr_tang@163.com; ZHOU Zhongyan. E-mail: biozzy@126.com

【Abstract】 Objective To establish a simple and reproducible model and its evaluation system for bradycardiac arrhythmia in Zebrafish. **Methods** Wild-type and heart-labeled GFP transgenic zebrafish were employed in this study after 24 h of fertilization. Twenty-four hpf (hour post-fertilization) zebrafish embryos were treated with various concentrations of verapamil, propafenone, metoprolol, amiodarone, and mexiletine for 48 hours, then the cardiac function and cardiotoxicity, including survival rate, heart rate, stroke volume, cardiac output, ejection fraction, area difference between ventricular

【基金项目】上海中医药大学附属龙华医院育苗计划(KY202219),上海中医药大学医养结合示范工程项目(YYKC-2021-01-019),上海中医药大学预算内科科研项目(2021LK049),上海市公共卫生三年行动计划(GWIV-28,ZY-(2018-2020)-FWTX-8001)。

Funded by the Research Program of Longhua Hospital affiliated to Shanghai University of Traditional Chinese Medicine (KY202219), Shanghai University of Traditional Chinese Medicine Demonstration Project of Combination of Medical Care (YYKC-2021-01-019), Shanghai University of Traditional Chinese Medicine (2021LK049), Shanghai Public Health Three-Year Action Plan (GWIV-28,ZY-(2018-2020)-FWTX-8001)。

【作者简介】张凯玉(1995—),女,在读硕士研究生。Email: 690664521@qq.com

【通信作者】唐靖一(1973—),男,主任医师,博士,硕士生导师,研究方向:中西医结合治疗心血管疾病研究。Email: dr_tang@163.com;
周忠焱(1988—)男,副研究员,博士,硕士生导师,研究方向:模式生物斑马鱼在药学研究中的应用。Email: biozzy@126.com。

* 共同通信作者

diastole and systole and the distance between sinus venosus and bulbus arteriosus (SV-BA), were observed in each group.

Results To evaluate drug toxicity, the median lethal concentration (IC_{50}) was ranked as propafenone < mexiletine < amiodarone < metoprolol and verapamil. After treatment with verapamil, the heart rate, cardiac output, ejection fraction and difference between ventricular diastolic and systolic areas significantly decreased in Zebrafish, while the distance of SV-BA increased. Treatment of propafenone reduced the heart rate and cardiac output in Zebrafish. Treatment of metoprolol decreased the heart rate in Zebrafish. Treatment of amiodarone decreased the heart rate and increased the distance of SV-BA in Zebrafish. Treatment of metoprolol increased the distance of SV-BA in Zebrafish. **Conclusions** Verapamil, propafenone, metoprolol and amiodarone all could be used to construct zebrafish models of bradycardiac arrhythmia, among which verapamil had the best efficacy. This study proposes the use of anti-arrhythmic drugs, particularly verapamil, to establish the bradycardiac arrhythmia model using zebrafish as well as the corresponding evaluation indicators. This study is of great significance to the research of bradycardiac arrhythmia and its drug development.

【Keywords】 bradycardiac arrhythmia; zebrafish; verapamil; cardiotoxicity; antiarrhythmic drugs

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

缓慢性心律失常 (bradycardiac arrhythmia) 是以心脏起搏和 (或) 传导功能异常导致心率降低 (低于每分钟 60 次) 为特征的心律失常^[1], 其病因复杂, 受冠心病、心肌病、风湿性心脏病等疾病影响。特发性的传导系统退化、迷走神经兴奋、心脏外科手术和导管射频术造成的损伤, 甲状腺功能紊乱、电解质紊乱、营养不良, 以及一些药物 (如抗心律失常类药物、精神类药物等) 的影响^[2-4] 也可导致缓慢性心律失常的发生。而且缓慢性心律失常能诱发其他系统疾病, 重者可出现晕厥、猝死等危急情况, 严重危害生命健康。《心律失常的紧急处理专家共识》指出, 缓慢性心律失常的治疗以药物^[5] 和非药物治疗^[6-7] 为主。其中药物治疗多以阿托品、肾上腺素、氨茶碱等急救药物为主, 存在副作用大、不能长期应用等不足。非药物治疗主要是心脏起搏器、心脏神经消融术等, 其价格昂贵、普及性差。因此, 研发有效治疗缓慢性心律失常且副作用小、价格低的药物具有重要的意义。

目前特非那定^[8]、阿司咪唑^[9]、乌头碱^[10] 等药物常用于建立心律失常动物模型, 但缓慢性心律失常模型的构建仍缺乏公认的造模方法和全面的评价指标。现有的缓慢性心律失常模型主要以药物 (普萘洛尔、维拉帕米等) 诱导和手术建模为主^[11], 目前用于构建缓慢性心律失常模型动物有小鼠、大鼠、家兔、犬等^[12]。而常规的动物模型饲养周期长、造模时间长、成本高^[13-14], 难以实现大规模高通量药物筛选^[9]。斑马鱼模型实验周期短、成本低、观察方便可实现大规模高通量药物筛选^[15-17], 其与人虽属于不同物种, 蛋白表达存在差异, 但是基因组相似度高达 87%^[18-19]。斑马鱼心脏发育的基因级联与人类心脏发育的基因级联^[20]、心脏结构和功

能、心率和复极时间^[21] 等也存在相似性, 其在心脏疾病研究和新药药效评价方面发挥了重要的作用^[4]。因此, 斑马鱼能够完善现有的缓慢性心律失常动物模型的不足, 为缓慢性心律失常疾病模型的评价提供了一种新方法 (短时、高效、低廉)。研究表明^[2-4], 抗心律失常药物存在心率减慢、心脏毒性等副作用。是否可以应用此类药物在斑马鱼体内成功建立稳定的缓慢性心律失常模型, 本文做出了一定探索。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

野生型斑马鱼系 Tuebingen 和心脏标记绿色荧光蛋白的转基因斑马鱼系 Tg(cmlc2: GFP) 由上海中医药大学附属龙华医院斑马鱼实验室提供。参照第五版 The Zebrafish Book^[22], 斑马鱼的养殖在全封闭循环系统进行, 鱼房内光照/黑暗 (14 h 光照/10 h 黑暗交替循环)、室内温度、水温、pH 值、电导率以及各项水质指标均符合饲养要求, 每日定时两次喂食丰年虾。所有操作均在上海中医药大学附属龙华医院斑马鱼实验室进行, 该实验室具备标准化的斑马鱼养殖和实验技术, 并在国内外发表了多篇论文^[15-17]。

1.1.2 主要试剂与仪器

盐酸美西律片 (批号: 55191101)、盐酸普罗帕酮片 (批号: 144191001), 购自上海上药信谊药厂有限公司; 琥珀酸美托洛尔缓释片 (批号: SWNWA), 购自阿斯利康制药有限公司; 盐酸胺碘酮片 (批号: 9HG0436), 购自赛诺菲制药有限公司; 盐酸维拉帕米 (批号: 20201117), 购自国药集团试剂有限公司;

4%甲基纤维素(批号:M0512-100G),购自 Sigma 公司;0.9%生理盐水(批号:21032602),购自华裕有限公司。

斑马鱼养殖单元(北京爱生公司,中国);恒温培养箱(上海三腾仪器有限公司,PTC-300,中国);荧光倒置显微镜(尼康,Ti-U,日本;配置 Nikon DIGITAL SIGHT DS-Ri1 摄像头和 NIS Elements BR 软件);体视显微镜(尼康,SMZ18,日本;配置 Nikon DIGITAL SIGHT DS-Fi1C 摄像头和 NIS Elements F 软件);超纯水机(密理博,Milli-Q Direct 8,美国)。

1.2 方法

1.2.1 斑马鱼生存情况观察

选择发育良好的受精后 24 h(24 hpf)的野生型斑马鱼胚胎,用显微镊将其外层卵膜拆去,放入 24 孔板中,每孔 10 条,分别按照空白对照组、维拉帕米、美西律、普罗帕酮、美托洛尔、胺碘酮不同浓度组(1、3、10、30、100、1000 μmol/L)给药干预,连续观察 5 d,每天记录斑马鱼的生存情况。

1.2.2 斑马鱼给药处理

选择发育良好 24 hpf 的转基因斑马鱼 Tg(cmlc2:GFP),放入 24 孔板中,每孔 10 条,分别按照空白对照组、维拉帕米不同浓度组(20、40、50、80、100 μmol/L)、美西律不同浓度组(3、10、30 μmol/L)、普罗帕酮不同浓度组(3、10、30 μmol/L)、美托洛尔不同浓度组(10、30、100 μmol/L)、胺碘酮不同浓度组(10、30、100 μmol/L)给药干预 48 h。

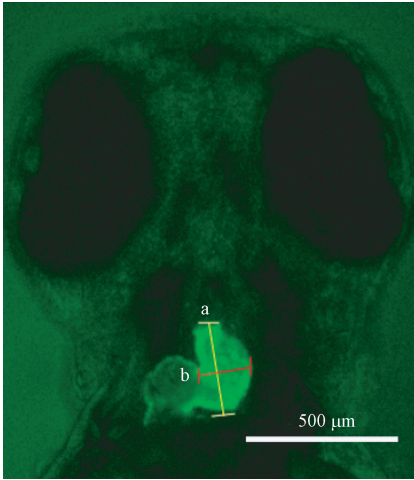
1.2.3 斑马鱼心脏形态观察

给药处理后,将斑马鱼放于载玻片上,用 4%的甲基纤维素进行固定,调整为侧卧位或俯卧位进行观察。侧卧位使两侧眼、体节重合,尾部和身体处于同一水平面。俯卧位使斑马鱼心室、心房充分暴露,在显微镜下进行观察拍照和视频记录。

1.2.4 斑马鱼心脏结构和功能的评价

给药处理后,按照文献的方法^[23-24]使斑马鱼处于俯卧位(图 1),在荧光倒置显微镜下视频记录 15 s,具体参数如下:曝光时间 25 ms;每秒帧数(Fps):> 50 fps;时长(Duration):15 s;分辨率(Resolution):1280 × 1024 像素(Pixel)。从视频文件中找到心室的舒张期末期和收缩期末期对应的图片,测量心室的长轴(a)和短轴(b)。用椭圆形的体积公式计算心室的体积: $V = \frac{4}{3}\pi \times (\frac{a}{2}) \times (\frac{b}{2})^2$;心搏量的计算:stroke volume = $V_{舒张期} - V_{收缩期}$;心输出量:cardiac output = stroke volume × heart rate;射血分数

(ejection fraction, EF) = (心室舒张末容积-心室收缩期容积)/心室舒张末容积×100%;心室舒张期和收缩期面积差值: $\Delta S_{心室} = S_{舒张期} - S_{收缩期}$ 。

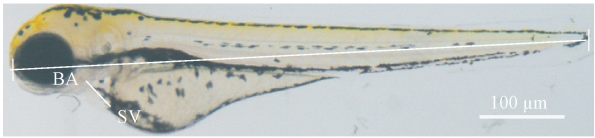


注:a:长轴;b:短轴。
图 1 斑马鱼心室长轴和短轴的测量方法
Note. a. Long axis. b. Short axis.

Figure 1 Measurement methods of the long axis and short axis of the ventricle in zebrafish

1.2.5 斑马鱼静脉窦与动脉球间距测量

给药处理后,参考文献^[25]使斑马鱼处于侧卧位(图 2),在体视显微镜下拍照观察斑马鱼心脏形态、静脉窦(sinus venosus, SV)、动脉球(bulbus arteriosus, BA),具体参数如下:分辨率(Resolution):1280 × 1024 像素(Pixel)。用 Image J 软件测量斑马鱼身长(height distance)、SV-BA 间的距离。以 SV-BA 间距/斑马鱼身长对不同的斑马鱼进行归一化比较。



注:SV:静脉窦;BA:动脉球。
图 2 斑马鱼身长、静脉窦-动脉球间距测量
Note. SV. Sinus venosus. BA. Bulbus arteriosus.

Figure 2 Measurement of the height distance and distance between SV and BA in zebrafish

1.3 统计学分析

多组间数据比较采用单因素方差分析(one-way ANOVA),两组比较采用 t 检验。 $P < 0.05$ 表示具有统计学意义。所有实验均独立重复 ≥ 3 次,数据均采用平均值 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,并使用 GraphPad Prism 软件作图。

2 结果

2.1 药物对斑马鱼生存率的影响

如图 3 所示,维拉帕米的半数致死浓度 (IC_{50}) 值为 $291.0\ \mu\text{mol/L}$, 95% 的置信区间为 $[286.2, 295.9]$; 普罗帕酮的 IC_{50} 值为 $47.08\ \mu\text{mol/L}$; 美托洛尔的 IC_{50} 值为 $291.0\ \mu\text{mol/L}$, 95% 的置信区间为 $[286.2, 295.9]$; 胺碘酮的

IC_{50} 值为 $140.6\ \mu\text{mol/L}$, 95% 置信区间为 $[58.63, 337.4]$; 美西律的 IC_{50} 值为 $104.7\ \mu\text{mol/L}$ 。因此,以上 IC_{50} 的排序为普罗帕酮 < 美西律 < 胺碘酮 < 美托洛尔和维拉帕米,说明美托洛尔和维拉帕米毒性较低。

2.2 维拉帕米对斑马鱼心脏结构和功能的影响

2.2.1 维拉帕米对斑马鱼心脏功能的影响
如图 4 所示,与空白对照组相比,维拉帕米 40、

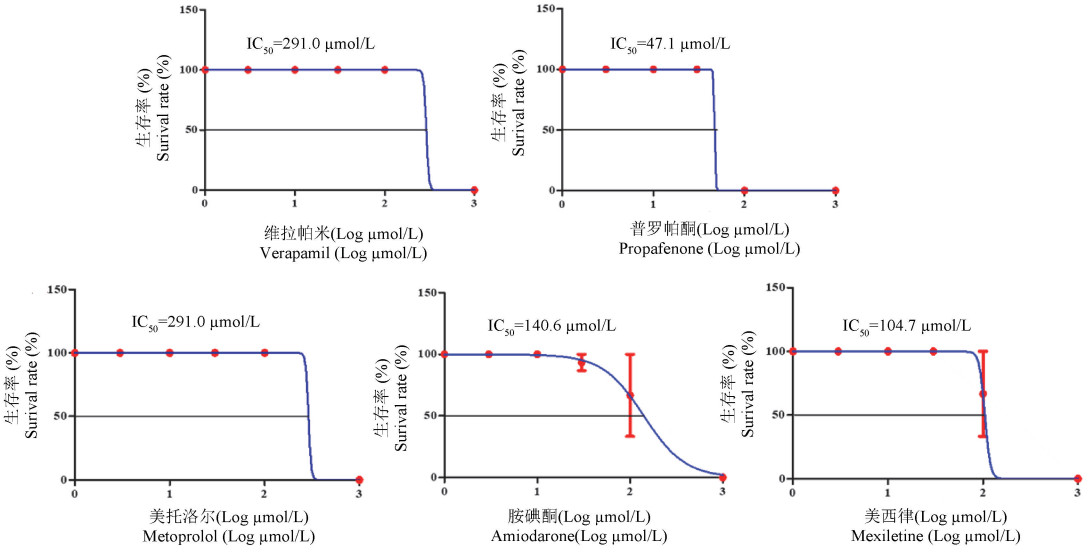
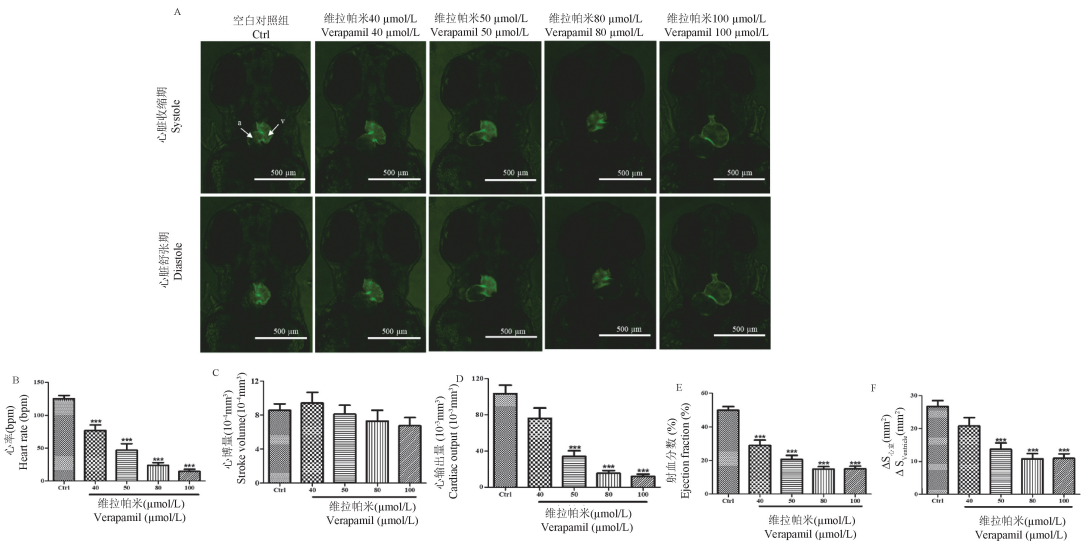


图 3 药物对斑马鱼生存率的影响
Figure 3 Effects of drugs on the survival rate in zebrafish



注: A: 斑马鱼心脏收缩和舒张形态图, a: 心房, v: 心室; B: 心率; C: 心搏量; D: 心输出量; E: 射血分数; F: 斑马鱼的心室舒张期和收缩期面积差值 $\Delta S_{\text{心室}}$; 与 Ctrl 组相比, *** $P < 0.001$; 放大倍数: 10X。(下图同)

图 4 维拉帕米对斑马鱼心脏功能的影响

Note. A. Cardiac systolic and diastolic morphology of zebrafish. a. Atrium. v. Ventricle. B. Heart rate. C. Stroke volume. D. Cardiac output. E. Ejection fraction. F. Area difference between diastole and systole in zebrafish $\Delta S_{\text{ventricle}}$. Compared with Ctrl group, *** $P < 0.001$. Magnification. 10X. (The same in the following figures)

Figure 4 Effects of verapamil on the cardiac functions in zebrafish

50、80、100 $\mu\text{mol/L}$ 处理组斑马鱼的心率 (heart rate) 均明显降低 ($P < 0.001$)。同时维拉帕米干预后,与空白对照组相比,斑马鱼的心输出量 (cardiac output) 分别降低了约 26%、67%、85%、88%;射血分数 (ejection fraction) 分别降低了约 42%、59%、70%、70%;斑马鱼的心室舒张期和收缩期面积差值 ($\Delta S_{\text{心室}}$) 分别降低了约 22.1%、48.7%、59.6%、59%,差异均具有显著性 ($P < 0.001$),且具有一定的量效关系。但与空白对照组相比,维拉帕米干预后斑马鱼的心博量 (stroke volume) 无显著性差异 ($P > 0.05$)。

2.2.2 维拉帕米对斑马鱼 SV-BA 间距的影响

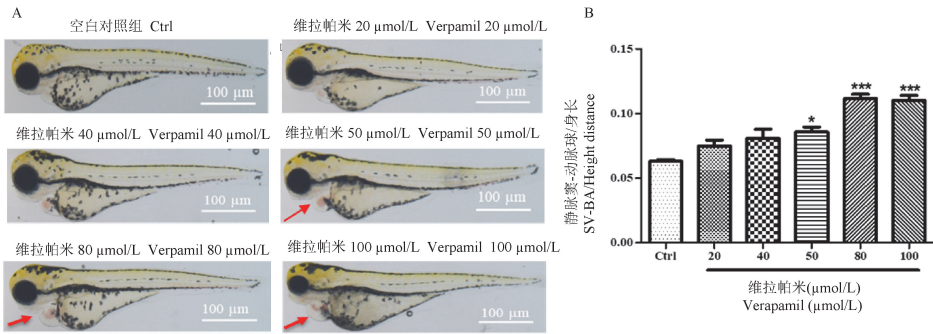
如图 5 所示,与空白对照组相比,维拉帕米 50、

80、100 $\mu\text{mol/L}$ 处理组静脉窦-动脉球/身长 (SV-BA/Height distance) 均明显增加 ($P < 0.05$),提示高浓度维拉帕米有一定的心脏毒性,且具有一定的剂量依赖性。

2.3 普罗帕酮对斑马鱼心脏结构和功能的影响

2.3.1 普罗帕酮对斑马鱼心脏功能的影响

如图 6 所示,与空白对照组相比,普罗帕酮 10、30 $\mu\text{mol/L}$ 处理组斑马鱼的心率显著降低 ($P < 0.001$),且具有一定的量效关系;普罗帕酮 30 $\mu\text{mol/L}$ 处理组斑马鱼的心输出量降低了约 56% ($P < 0.05$);斑马鱼的心博量、射血分数、心室舒张期和收缩期面积差值 ($\Delta S_{\text{心室}}$) 无显著性差异 ($P > 0.05$)。

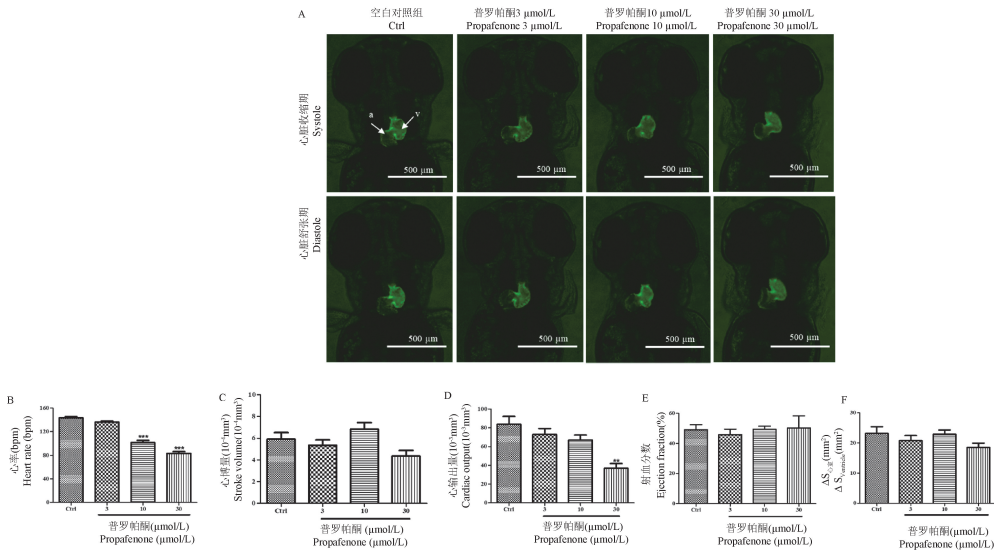


注:A:斑马鱼侧面心脏形态;B:静脉窦-动脉球距离与斑马鱼身长的比例;与 Ctrl 组相比,*** $P < 0.001$,* $P < 0.05$;放大倍数:2X。(下同)

图 5 维拉帕米对斑马鱼身长、SV-BA 间距的影响

Note. A. The lateral heart shape of zebrafish. B. Ratio of the distance between SV and BA to the height distance of zebrafish. Compared with group Ctrl, *** $P < 0.001$, * $P < 0.05$. Magnification. 2X. (The same in the following figures)

Figure 5 Effect of verapamil on the height distance and distance between SV and BA in zebrafish



注:A:斑马鱼心脏收缩和舒张形态图,a:心房,v:心室;B:心率;C:心博量;D:心输出量;E:射血分数;F:心室舒张期和收缩期面积差值 $\Delta S_{\text{心室}}$ 。

图 6 普罗帕酮对斑马鱼心脏功能的影响

Note. A. Cardiac systolic and diastolic morphology of zebrafish. a. Atrium. v. Ventricle. B. Heart rate. C. Stroke volume. D. Cardiac output. E. Ejection fraction. F. Area difference between diastole and systole in zebrafish $\Delta S_{\text{ventricle}}$.

Figure 6 Effects of propafenone on the cardiac functions in zebrafish

2.3.2 普罗帕酮对斑马鱼 SV-BA 间距的影响

如图 7 所示,与空白对照组相比,普罗帕酮 3、10、30 $\mu\text{mol/L}$ 干预组斑马鱼静脉窦-动脉球/身长(SV-BA/Height distance)的比值无显著性差异($P > 0.05$)。

2.4 美托洛尔对斑马鱼心脏结构和功能的影响

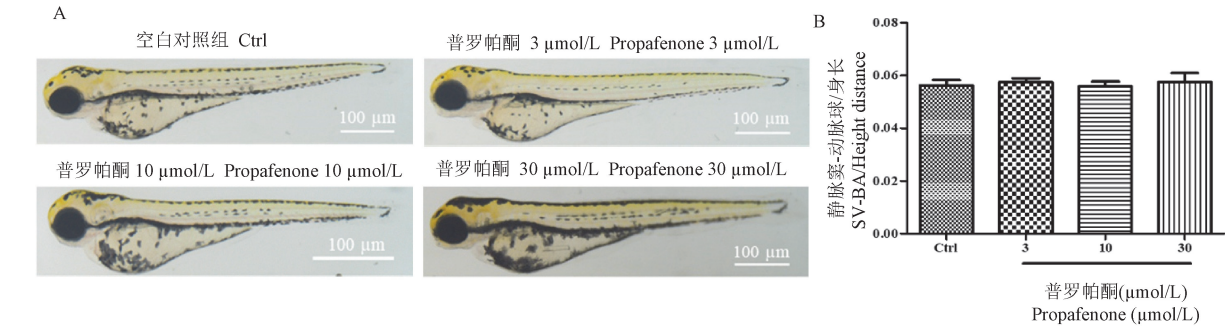
2.4.1 美托洛尔对斑马鱼心脏功能的影响

如图 8 所示,与空白对照组相比,美托洛尔 100 $\mu\text{mol/L}$ 处理组斑马鱼的心率降低了约 23%,且差异

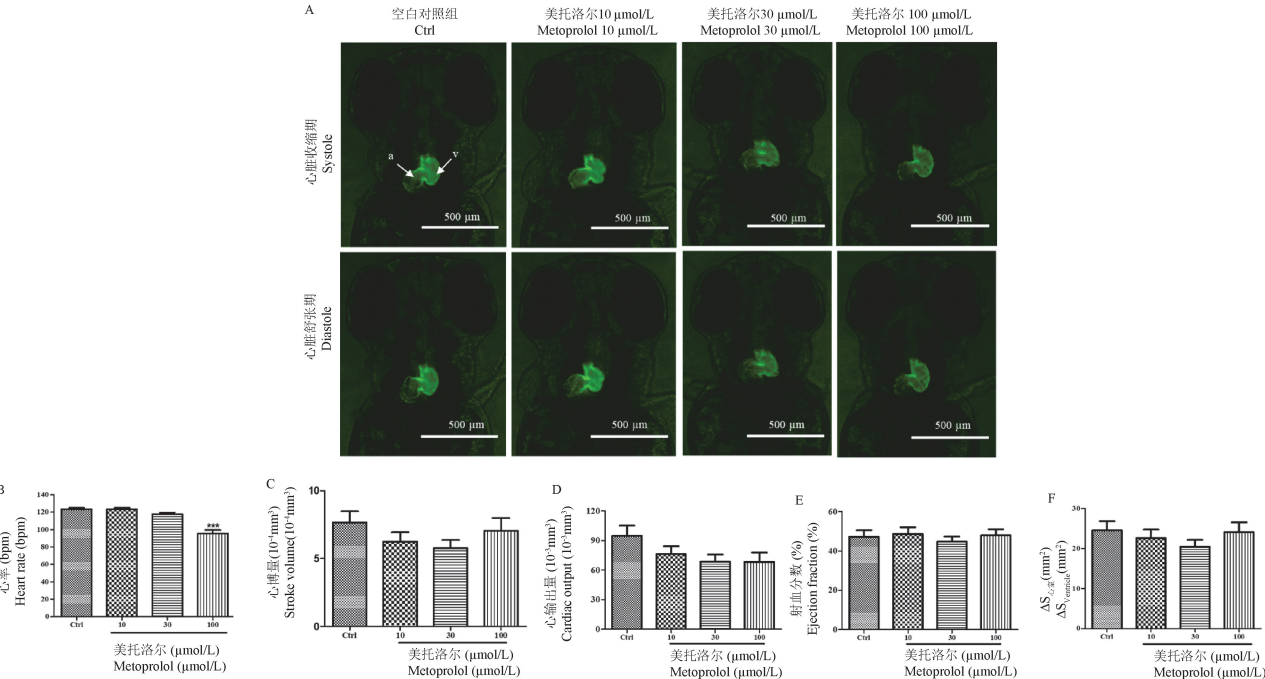
具有显著性($P < 0.001$);美托洛尔 10、30、100 $\mu\text{mol/L}$ 处理组斑马鱼的心输出量、心博量、射血分数、心室舒张期和收缩期面积差值($\Delta S_{\text{心室}}$)无显著性差异($P > 0.05$)。

2.4.2 美托洛尔对斑马鱼 SV-BA 间距的影响

如图 9 所示,与空白对照组相比,美托洛尔 10、30、100 $\mu\text{mol/L}$ 处理组斑马鱼静脉窦-动脉球/身长(SV-BA/Height distance)的比值无显著性差异($P > 0.05$)。



注:A:斑马鱼侧面心脏形态;B:静脉窦-动脉球距离与斑马鱼身长的比例。
图 7 普罗帕酮对斑马鱼身长、SV-BA 间距的影响
Note. A. The lateral heart shape of zebrafish. B. Ratio of the distance between SV and BA to the height distance of zebrafish.
Figure 7 Effect of propafenone on the height distance and distance between SV and BA in zebrafish



注:A:斑马鱼心脏收缩和舒张形态图,a:心房,v:心室;B:心率;C:心博量;D:心输出量;E:射血分数;F:心室舒张期和收缩期面积差值 $\Delta S_{\text{心室}}$ 。
图 8 美托洛尔对斑马鱼心脏功能的影响
Note. A. Cardiac systolic and diastolic morphology of zebrafish. a. Atrium. v. Ventricle. B. Heart rate. C. Stroke volume. D. Cardiac output. E. Ejection fraction. F. Area difference between diastole and systole in zebrafish $\Delta S_{\text{Ventricle}}$.

Figure 8 Effects of metoprolol on the cardiac functions in zebrafish

2.5 胺碘酮对斑马鱼心脏结构和功能的影响

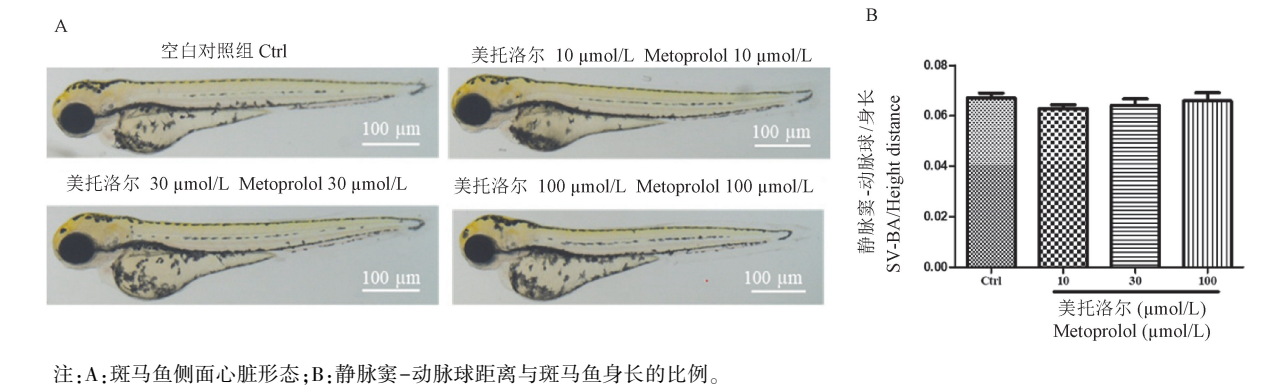
2.5.1 胺碘酮对斑马鱼心脏功能的影响

如图 10 所示,与空白对照组相比,胺碘酮 10、30、100 $\mu\text{mol/L}$ 处理组斑马鱼的心率分别降低了约 23%、24%、48%,具有统计学意义 ($P < 0.001$);胺碘酮各剂量处理组斑马鱼的心输出量、心博量、射血分数、心室舒张期和收缩期面积差值 ($\Delta S_{\text{心室}}$) 无

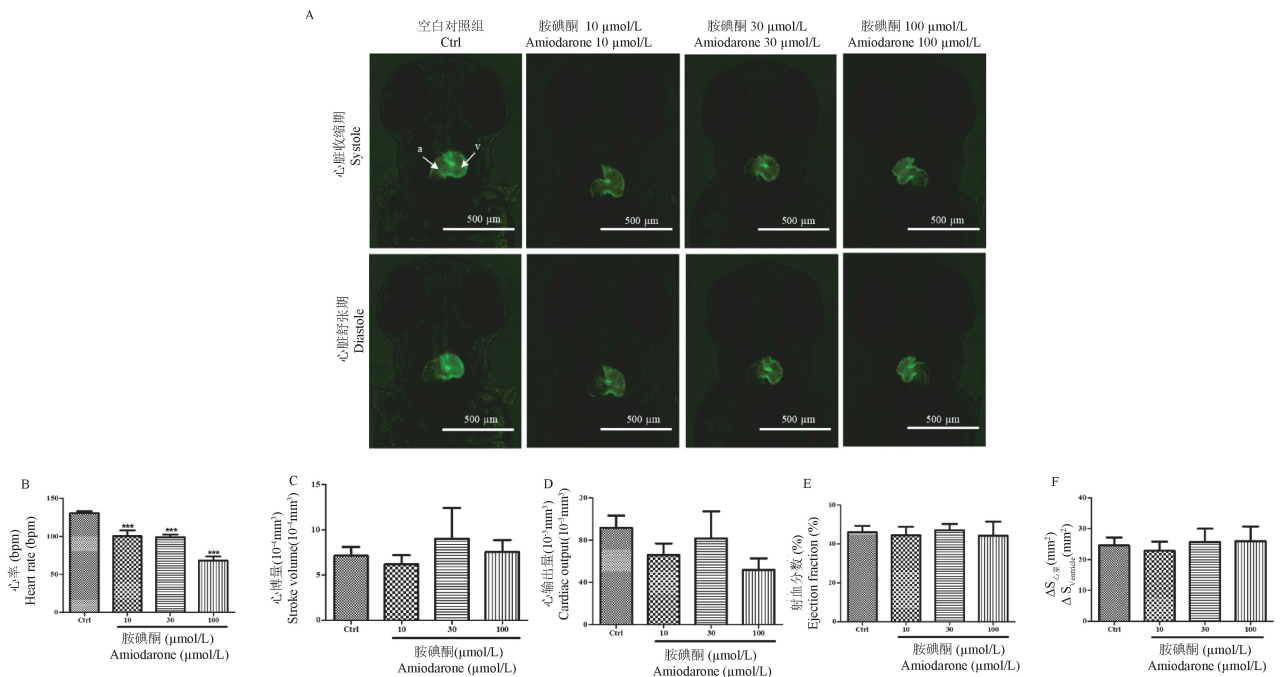
显著性差异 ($P > 0.05$)。

2.5.2 胺碘酮对斑马鱼 SV-BA 间距的影响

如图 11 所示,与空白对照组相比,胺碘酮 30、100 $\mu\text{mol/L}$ 处理组静脉窦-动脉球/身长 (SV-BA/Height distance),具有显著性差异 ($P < 0.05$),提示胺碘酮有一定的心脏毒性,且具有一定的剂量依赖性。



注:A:斑马鱼侧面心脏形态;B:静脉窦-动脉球距离与斑马鱼身长的比例。
图 9 美托洛尔对斑马鱼身长、SV-BA 间距的影响
Note. A. The lateral heart shape of zebrafish. B. Ratio of the distance between SV and BA to the height distance of zebrafish.
Figure 9 Effect of metoprolol on the height distance and distance between SV and BA in zebrafish



注:A:斑马鱼心脏收缩和舒张形态图,a:心房,v:心室;B:心率;C:心博量;D:心输出量;E:射血分数;F:心室舒张期和收缩期面积差值 $\Delta S_{\text{心室}}$ 。
图 10 胺碘酮对斑马鱼心脏功能的影响
Note. A. Cardiac systolic and diastolic morphology of zebrafish. a. Atrium. v. Ventricle. B. Heart rate. C. Stroke volume. D. Cardiac output. E. Ejection fraction. F. Area difference between diastole and systole in zebrafish $\Delta S_{\text{Ventricle}}$.

Figure 10 Effects of amiodarone on the cardiac functions in zebrafish

2.6 美西律对斑马鱼心脏结构和功能的影响

2.6.1 美西律对斑马鱼心脏功能的影响

如图 12 所示,与空白对照组相比,美西律 10、30、100 $\mu\text{mol/L}$ 处理组斑马鱼的心率、心输出量、心搏量、射血分数、心室舒张期和收缩期面积差值($\Delta S_{\text{心室}}$)均无显著性差异($P > 0.05$)。

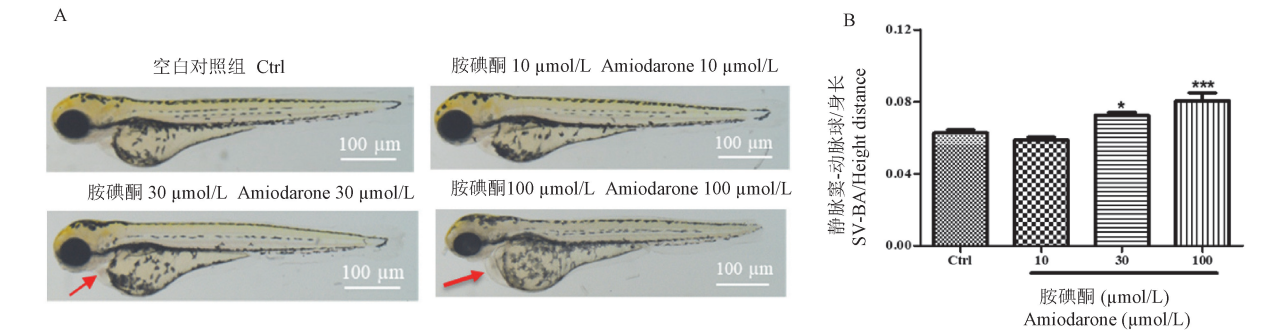
2.6.2 美西律对斑马鱼 SV-BA 间距的影响

如图 13 所示,与空白对照组相比,美西律 30 $\mu\text{mol/L}$ 处理组斑马鱼静脉窦-动脉球/身长(SV-BA/Height distance)明显增加,具有显著性差异(P

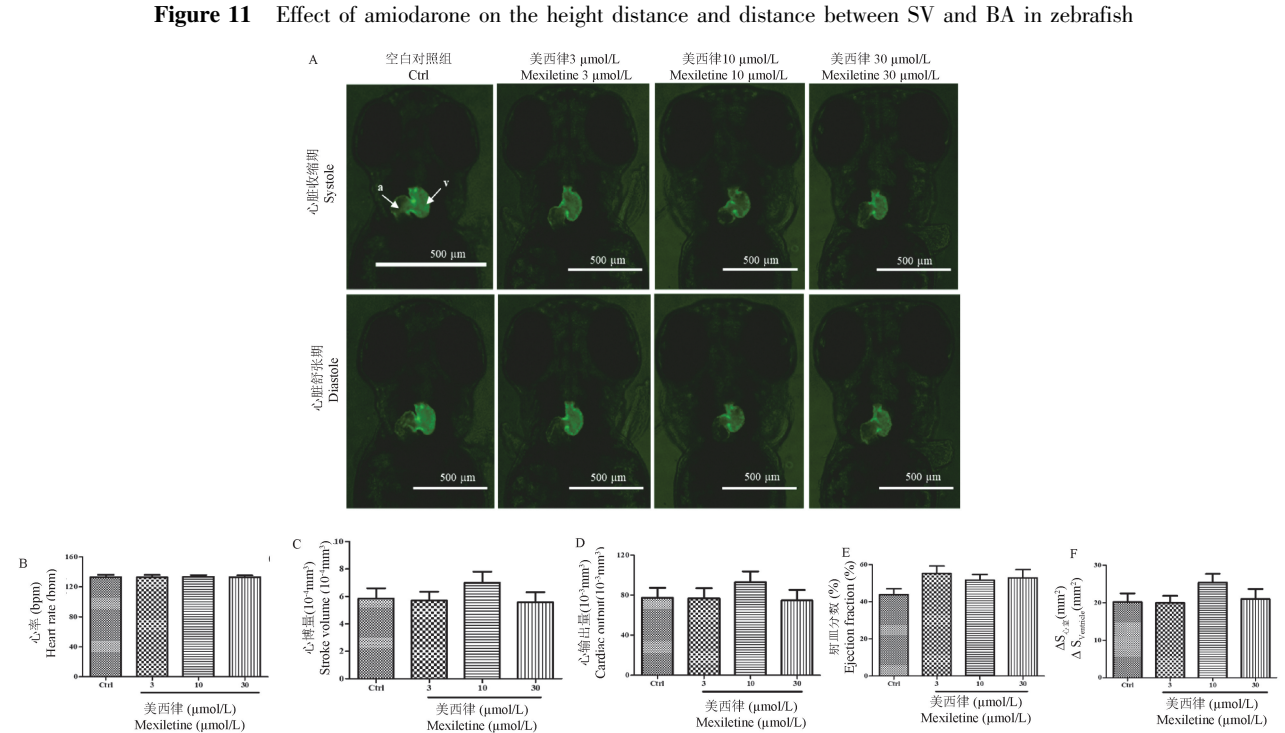
< 0.05),提示高浓度美西律有一定的心脏毒性。

2.7 缓慢性心律失常斑马鱼模型构建的综合评价

维拉帕米、普罗帕酮、美托洛尔、胺碘酮均可显著降低斑马鱼心率,用于制备斑马鱼的缓慢性心律失常模型。然而,基于心搏量、心输出量、射血分数、SV-BA 间距等斑马鱼心脏功能和毒性的评价指标,维拉帕米诱导的斑马鱼缓慢性心律失常模型,心功能变化更为明显(表 1),并且呈现剂量依赖性。因此,维拉帕米诱导的斑马鱼缓慢性心律失常模型更加适合应用于抗缓慢性心律失常药物的研发。

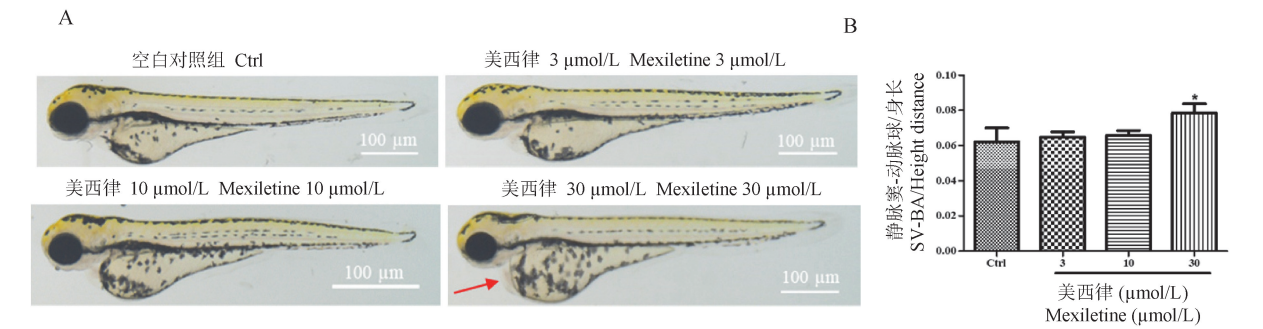


注:A:斑马鱼侧面心脏形态;B:静脉窦-动脉球距离与斑马鱼身长的比例。
Figure 11 胺碘酮对斑马鱼身长、SV-BA 间距的影响
Note. A. The lateral heart shape of zebrafish. B. Ratio of the distance between SV and BA to the height distance of zebrafish.



注:A:斑马鱼心脏收缩和舒张形态图,a:心房,v:心室;B:心率;C:心搏量;D:心输出量;E:射血分数;F:心室舒张期和收缩期面积差值 $\Delta S_{\text{心室}}$ 。
Figure 12 美西律对斑马鱼心脏功能的影响
Note. A. Cardiac systolic and diastolic morphology of zebrafish. a. Atrium. v. Ventricle. B. Heart rate. C. Stroke volume. D. Cardiac output. E. Ejection fraction. F. Area difference between diastole and systole in zebrafish $\Delta S_{\text{ventricle}}$.

Figure 12 Effects of mexiletine on the cardiac functions of zebrafish



注:A:斑马鱼侧面心脏形态;B:静脉窦-动脉球距离与斑马鱼身长的比例。

图 13 美西律对斑马鱼身长、SV-BA 间距的影响

Note. A. The lateral heart shape of zebrafish. B. Ratio of the distance between SV and BA to the height distance of zebrafish.

Figure 13 Effect of mexiletine on the height distance and distance between SV and BA in zebrafish

表 1 缓慢性心律失常斑马鱼模型疗效评价表

Table 1 Efficacy evaluation table of the zebrafish model with bradycardiac arrhythmia

心脏结构功能评价指标 Evaluation index of cardiac structure and function	维拉帕米 Verapamil	普罗帕酮 Propafenone	美托洛尔 Metoprolol	胺碘酮 Amiodarone	美西律 Mexiletine
心率 Heart rate	++	++	+	++	-
心搏量 Stroke volume	-	-	-	-	-
心输出量 Cardiac output	++	+	-	-	-
射血分数 Ejection fraction	++	-	-	-	-
$\Delta S_{\text{心室}}$ $\Delta S_{\text{ventricle}}$	++	-	-	-	-
静脉窦-动脉球 Sinus venosus-bulbus arteriosus	++	-	-	++	+

注:+:有效;+:有效且具有剂量依赖性;-:无效。
Note. +. Effective. ++. Effective and dose-dependent. -. Ineffective.

3 讨论

缓慢性心律失常是由心脏窦房结、房室结或传导束支功能障碍导致的疾病^[26],以心率减慢为特征,严重时可出现阿斯综合征甚至猝死,严重影响患者的生活质量和生命安全。缓慢性心律失常的病因多种多样,抗心律失常药物是诱发缓慢性心律失常的一个重要原因^[2]。常用于构建缓慢性心律失常模型的药物有普萘洛尔、维拉帕米、特非那定、阿司咪唑等^[8-9]。然而目前尚缺乏与临床病症一致、操作简单、重复性好,并可系统全面评价缓慢性心律失常的动物模型^[27],同时现有缓慢性心律失常动物模型存在实验周期长、成本高,不利于高通量药物筛选等缺点,迫切需要利用新技术和新方法,为缓慢性心律失常研究和药物筛选开发新的动物模型和快速检测方法。

本研究运用斑马鱼模型评价抗心律失常药物对斑马鱼幼鱼心脏功能的影响。斑马鱼卵黄囊以及心脏发育过程中出现的畸形可能和低氧环境^[28]有关,本实验分组中设立了空白对照组排除斑马鱼

本身发育畸形等情况,造模前期进行药物毒性实验排除药物本身毒性作用。基于抗心律失常药物对斑马鱼的 IC₅₀ 值,发现本研究所选抗心律失常药物毒性的排序为普罗帕酮 < 美西律 < 胺碘酮 < 美托洛尔和维拉帕米。同时,实验中也观察发现维拉帕米、胺碘酮、美西律干预后斑马鱼出现不同程度的身体短小、心包水肿、心房和心室狭长、卵黄囊出血等毒性表现。

通过检测斑马鱼心率,我们发现抗心律失常药物 Ca²⁺通道阻滞剂维拉帕米、Ic 类普罗帕酮、β 肾上腺素能受体阻滞剂美托洛尔、K⁺通道阻滞剂胺碘酮均能显著降低斑马鱼心率。心搏量、心输出量、射血分数是用于评价循环系统效率高低、心脏收缩能力等心脏功能的重要指标^[29]。同样,在斑马鱼的心脏功能评估上,我们发现维拉帕米、普罗帕酮、美托洛尔、胺碘酮干预后,损伤斑马鱼的心脏功能,表现为心搏量、心输出量、射血分数的不同程度降低。同时,实验中观察发现斑马鱼心脏传导异常,出现心脏传导阻滞、心跳缓慢甚至停跳现象,血流缓慢等现象。

斑马鱼只存在一个体循环系统,心脏由一心房、一心室、一个房室瓣膜和一个流出瓣膜组成,血液从动脉球流出心室流至全身,最后通过静脉窦流回心房^[30]。通过测量静脉窦-动脉球的距离改变,可以用于判断药物对斑马鱼心脏发育程度和心脏毒性的影响^[31-32]。维拉帕米、胺碘酮、美西律干预后,斑马鱼心脏心房和心室位置发生变化,静脉窦-动脉球的距离增大,且随着药物浓度增大,静脉窦-动脉球与身长的比例逐渐增大。说明在斑马鱼模型上,维拉帕米、胺碘酮、美西律随着浓度的增加,表现出不同程度的心脏毒性,这与临床上抗心律失常药物可能存在一定的心脏毒性相一致。

抗心律失常药物导致的心动过缓可能与药物诱发的长 QT 综合征密切相关。而药物导致的心脏 QT 间期延长是 hERG 钾通道阻断的结果^[33-36]。与 hERG 基因相关的抗心律失常药物主要包括 I a 类和 III 类心律失常, I b 类药物未引起 QT 间期变化或轻微下降^[3]。研究表明 I c 类代表药物普罗帕酮对 hERG 电流具有抑制作用,是一种开放通道的钾通道阻滞剂^[4]。普罗帕酮一方面可以导致药物诱发的长 QT 综合征,另一方面可通过延长难治期起到抗心律失常的效果。II 类抗心律失常药物为 β 肾上腺素能受体阻滞剂(普萘洛尔)被证明可预防先天性长 QT 综合征。III 类抗心律失常药物索他洛尔主要电生理效应是通过延长复极时间,延长动作电位间期和有效不应期^[2]。胺碘酮用于治疗室性、室上性快速心律失常,被证实有明显的 QT 间期延长。第 IV 类抗心律失常药物为钙离子通道阻滞剂,通过阻断慢钙通道的开放,来减低传导速度及延长有效不应期。硝苯地平、维拉帕米、地尔硫卓不会导致 QT 间期延长,也未被确定为尖端扭转,其导致心脏功能损伤的机制仍需进一步研究^[36]。以上研究为维拉帕米、普罗帕酮、美托洛尔、胺碘酮、美西律等抗心律失常药物诱发心律失常的机制提供了参考。

目前的缓慢性心律失常模型主要有化学药物(胺碘酮、普萘洛尔^[37]、维拉帕米^[11])诱发动物模型、冠状动脉结扎动物模型^[38]、化学消融动物模型^[39]等,造模后分别检测大、小鼠心脏收缩压、心率、心输出量、左室射血分数、呼吸、肛温水平等指标。虽然大小鼠模型与人类心脏结构和功能更相似,但模型制备过程中死亡率高,操作复杂,并且实验周期长。因此,现有的缓慢性心律失常动物模型均存在优势与不足^[11]。本研究充分发挥斑马鱼模

型实验周期短、成本低、观察方便等优势,通过检测心率、心博量、心输出量、射血分数等指标,评价斑马鱼心脏功能,建立缓慢性心律失常模型。在抗缓慢性心律失常药物研发过程中,可以利用斑马鱼模型做前期的药物筛选,发现有潜在活性的药物后,再进入大小鼠动物实验进一步评价药效。本研究制备的斑马鱼缓慢性心律失常模型,可以为抗缓慢性心律失常前期的潜在活性药物发现提供便利。

因此,维拉帕米、普罗帕酮、美托洛尔、胺碘酮均可以作为制备斑马鱼的缓慢性心律失常模型。然而,基于心博量、心输出量、射血分数、SV-BA 间距等斑马鱼心脏功能和毒性的评价指标,维拉帕米诱导的斑马鱼缓慢性心律失常模型,其心功能变化更为明显,并且呈现剂量依赖性。维拉帕米诱导的斑马鱼缓慢性心律失常模型可能更适合应用于抗缓慢性心律失常药物的发现。

然而,本研究具有一定的局限性,主要包括:(1)没有对维拉帕米等抗心律失常药物引起的缓慢性心律失常的机制做深入的研究;(2)与传统动物相比,斑马鱼体型小,解剖器官需要更专业的技术和精密仪器^[40],没有对心脏组织病理进行观察和研究;(3)心电图是心脏功能的重要检测方法,而斑马鱼胚胎目前很难进行心电测量,基于成像的模拟心电图也没有在本研究中体现。

综上所述,本研究建立了维拉帕米等缓慢性心律失常斑马鱼模型及心功能评价指标,对于缓慢性心律失常模型的构建和抗缓慢性心律失常药物的研发均具有重要意义。

参 考 文 献(References)

- [1] The Task Force on cardiac pacing and resynchronization therapy of the European Society of Cardiology (ESC), Developed in collaboration with the European Heart Rhythm Association (EHRA), Brignole M, et al. 2013 ESC Guidelines on cardiac pacing and cardiac resynchronization therapy [J]. Rev Esp Cardiol (Engl Ed), 2014, 67(1): 58.
- [2] Stratmann HG, Kennedy HL. Torsades de pointes associated with drugs and toxins: Recognition and management [J]. Am Heart J, 1987, 113(6): 1470-1482.
- [3] Krikler DM, Curry PV. Torsade De Pointes, an atypical ventricular tachycardia [J]. Br Heart J, 1976, 38(2): 117-120.
- [4] Mergenthaler J, Haverkamp W, Hüttenhofer A, et al. Blocking effects of the antiarrhythmic drug propafenone on the HERG potassium channel [J]. Naunyn Schmiedeberg Arch Pharmacol, 2001, 363(4): 472-480.
- [5] 杨艳敏,朱俊. 心律失常的紧急处理——《心律失常紧急处

- 理专家共识》解读 [J]. 中华心脏与心律电子杂志, 2013, 1(1): 17-19.
- Yang YM, Zhu J. Emergency management of arrhythmia-interpretation of expert consensus on emergency management of arrhythmia [J]. Chin J Heart Heart Rhythm (Electronic Edition), 2013, 1(1): 17-19.
- [6] 黄大革. 心脏起搏器植入术治疗老年人缓慢性心律失常的研究 [J]. 中西医结合心血管病电子杂志, 2020, 8(1): 78, 93.
- Huang DP. Study on cardiac pacemaker implantation in elderly patients with bradyarrhythmia [J]. Cardiovasc Dis J Integr Tradit Chin Western Med, 2020, 8(1): 78, 93.
- [7] 胡锋, 郑黎晖, 刘尚雨, 等. 心脏神经消融术对神经反射性缓慢性心律失常的治疗价值 [J]. 中华心律失常学杂志, 2021, 25(4): 306-310.
- Hu F, Zheng LH, Liu SY, et al. Therapeutic value of cardiac nerve ablation in patients with reflexbradyarrhythmia [J]. Chin J Cardiac Arrhyth, 2021, 25(4): 306-310.
- [8] 王明亮, 丁永芳, 印鑫, 等. 斑马鱼在毒理学中的应用研究进展 [J]. 中国实验动物学报, 2020, 28(3): 390-396.
- Wang ML, Ding YF, Yin X, et al. Research progress regarding the application of zebrafish in toxicology [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2020, 28(3): 390-396.
- [9] 薛迪. 斑马鱼血管抑制和心脏损伤模型的构建及研究 [D]. 太原: 山西医科大学; 2016.
- Xue D. Construction and study of model of vascular inhibition and heart injury in zebrafish [D]. Taiyuan: Shanxi Medical University; 2016.
- [10] 石亚楠, 王佑华, 李强, 等. 黄芪甲苷对乌头碱诱导的斑马鱼心脏损伤保护作用的研究 [J]. 中医药导报, 2019, 25(7): 26-28.
- Shi YN, Wang YH, Li Q, et al. Study on the protective effect of astragaloside IV on aconitine-Induced zebrafish heart injury [J]. Guid J Tradit Chin Med Pharm, 2019, 25(7): 26-28.
- [11] 王哲, 刘艳飞, 王娅, 等. 缓慢性心律失常动物模型的研究进展 [J]. 实用心电图学杂志, 2019, 28(6): 447-450.
- Wang Z, Liu YF, Wang Y, et al. Research progress of animal model of bradyarrhythmia [J]. J Prac Electrocardiol JS, 2019, 28(6): 447-450.
- [12] 吴晶晶. $I_{Na,L}$ 导致 SAN 功能紊乱和心内传导障碍——病理生理机制及治疗方向 [D]. 武汉: 华中科技大学; 2009.
- Wu JJ. $I_{Na,L}$ Lead to SAN dysfunction and intracardiac conduction disorder: pathophysiological mechanism and treatment direction [D]. Wuhan: Huazhong University of Science and Technology; 2009.
- [13] Mcgrath P, Li CQ. Zebrafish: a predictive model for assessing drug-induced toxicity [J]. Drug Discovery Today, 2008, 13(9-10): 394-401.
- [14] Sukardi H, Chng HT, Chan EC, et al. Zebrafish for drug toxicity screening: bridging the *in vitro* cell-based models and *in vivo* mammalian models [J]. Expert Opin Drug Metab Toxicol, 2011, 7(5): 579-589.
- [15] Zhou ZY, Huan LY, Zhao WR, et al. Spatholobi Caulis extracts promote angiogenesis in HUVECs *in vitro* and in zebrafish embryos *in vivo* via up-regulation of VEGFRs [J]. J Ethnopharmacol, 2017, 200: 74-83.
- [16] Zhou ZY, Huang B, Li S, et al. Sodium tanshinone IIA sulfonate promotes endothelial integrity via regulating VE-cadherin dynamics and RhoA/ROCK-mediated cellular contractility and prevents atorvastatin-induced intracerebral hemorrhage in zebrafish [J]. Toxicol Appl Pharmacol, 2018, 350: 32-42.
- [17] Huang B, Zhou ZY, Li S, et al. Tanshinone I prevents atorvastatin-induced cerebral hemorrhage in zebrafish and stabilizes endothelial cell-cell adhesion by inhibiting VE-cadherin internalization and actin-myosin contractility [J]. Pharmacol Res, 2017, 128: 389-398.
- [18] Barbazuk WB, Korf I, Kadavi C, et al. The syntenic relationship of the zebrafish and human genomes [J]. Genome Res, 2000, 10(9): 1351-1358.
- [19] Santos-Ledo A, Jenny A, Marlow FL. Comparative gene expression analysis of the fmnl family of formins during zebrafish development and implications for tissue specific functions [J]. Gene Expr Patterns, 2013, 13(1-2): 30-37.
- [20] Kitambi SS, Nilsson ES, Sekyrova P, et al. Small molecule screening platform for assessment of cardiovascular toxicity on adult zebrafish heart [J]. BMC Physiol, 2012, 12: 3.
- [21] Milan DJ, Peterson TA, Ruskin JN, et al. Drugs that induce repolarization abnormalities cause bradycardia in zebrafish [J]. Circulation, 2003, 107(10): 1355-1358.
- [22] Westerfield M. The zebrafish book, 5th Edition; A guide for the laboratory use of zebrafish (*Danio rerio*) [M]. Eugene: University of Oregon Press; 2007.
- [23] Zhang YY, Wang CG, Huang LX, et al. Low-level pyrene exposure causes cardiac toxicity in zebrafish (*Danio rerio*) embryos [J]. Aquat Toxicol, 2012, 114-115: 119-124.
- [24] Chen ZY, Huang W, Dahme T, et al. Depletion of zebrafish essential and regulatory myosin light chains reduces cardiac function through distinct mechanisms [J]. Cardiovasc Res, 2008, 79(1): 97-108.
- [25] 张利军. 斑马鱼心脏毒性评价模型的建立及美托洛尔心脏毒性作用机制研究 [D]. 北京: 中国人民解放军军事医学科学院; 2012.
- Zhang LJ. Development of the zebrafish as an animal model for cardiotoxicity screening and cardiac risk assessment of Metoprolol [D]. Beijing: Academy of Military Medical Sciences; 2012.
- [26] 许姝雯, 王振涛. 王振涛教授从“虚”“滞”论治缓慢性心律失常病机分析 [J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2020, 18(11): 1835-1838.
- Xu SW, Wang ZT. Professor Wang Zhentao from "deficiency" and "stagnation" on the treatment of chronic arrhythmia pathogenesis analysis [J]. Chin J Integr Med Cardio -/Cerebrovascuar Dis, 2020, 18(11): 1835-1838.
- [27] 陈瑞哈, 方永煌, 曹静桦, 等. 不同心律失常模型应用的探

- 讨 [J]. 医学理论与实践, 2016, 29(1): 20–22.
- Chen RH, Fang YH, Cao JH, et al. Research on the application of different arrhythmia models [J]. J Med Theory Practice, 2016, 29(1): 20–22.
- [28] 楚璐萌, 田子颖, 崔蕊, 等. 低氧对斑马鱼胚胎发育和红细胞生成的抑制作用 [J]. 中国实验动物学报, 2021, 29(1): 1–8.
- Chu LM, Tian ZY, Cui R, et al. Inhibition effects of hypoxia on embryonic development and erythropoiesis in rebrfish [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2021, 29(1): 1–8.
- [29] Wang L, Zhang XJ, Chan JY, et al. A novel danshensu derivative prevents cardiac dysfunction and improves the chemotherapeutic efficacy of doxorubicin in breast cancer cells [J]. J Cell Biochem, 2016, 117(1): 94–105.
- [30] Salman HE, Yalcin HC. Advanced blood flow assessment in zebrafish via experimental digital particle image velocimetry and computational fluid dynamics modeling [J]. Micron, 2020, 130: 102801.
- [31] Antkiewicz DS, Burns CG, Carney SA, et al. Heart malformation is an early response to TCDD in embryonic zebrafish [J]. Toxicol Sci, 2005, 84(2): 368–377.
- [32] Lin CC, Hui MN, Cheng SH. Toxicity and cardiac effects of carbaryl in early developing zebrafish (*Danio rerio*) embryos [J]. Toxicol Appl Pharmacol, 2007, 222(2): 159–168.
- [33] Curran ME, Splawski I, Timothy KW, et al. A molecular basis for cardiac arrhythmia: HERG mutations cause long QT syndrome [J]. Cell, 1995, 80(5): 795–803.
- [34] 冉凯凯, 郑瑞芳, 夏青, 等. 模式生物斑马鱼在心功能评价中的应用 [J]. 药物评价研究, 2021, 44(8): 1581–1587.
- Ran KK, Zheng RF, Xia Q, et al. Application of model organism-zebrafish in cardiac function evaluation [J]. Drug Eval Res, 2021, 44(8): 1581–1587.
- [35] Taglialatela M, Castaldo P, Pannaccione A, et al. Human ether-a-gogo related gene (HERG) K⁺ channels as pharmacological targets: present and future implications [J]. Biochem Pharmacol, 1998, 55(11): 1741–1746.
- [36] Langheinrich U, Vacun G, Wagner T. Zebrafish embryos express an orthologue of HERG and are sensitive toward a range of QT-prolonging drugs inducing severe arrhythmia [J]. Toxicol Appl Pharmacol, 2003, 193(3): 370–382.
- [37] Lei H, Zhu JJ, Zhang XX, et al. Therapeutical effect of Radix Aconiti and Astragalus extracts on models of experimental bradycardia animal [J]. Pak J Pharm Sci, 2014, 27(3): 439–444.
- [38] Zhang WT, Zhu BC, Ren JX, et al. Two methods for modeling of sick sinus syndrome in rats: Ischemia reperfusion and sodium hydroxide induced injury [J]. Biomed Pharmacother, 2019, 111: 778–784.
- [39] 张志辉. 兔缓慢性心律失常模型建立与 MSCs 同种异体心脏移植后细胞整合及功能研究 [D]. 重庆: 第三军医大学; 2012.
- Zhang ZH. Study on cell integration and function after rabbit bradyarrhythmia model and MSCs allograft heart transplantation [D]. Chongqing: Third Military Medical University; 2012.
- [40] Benchoula K, Khatib A, Jaffar A, et al. The promise of zebrafish as a model of metabolic syndrome [J]. Exp Anim, 2019, 68(4): 407–416.

[收稿日期] 2022-01-11