

# 钠钙交换体与心肌缺血再灌注

刘 秀 华

(中国人民解放军总医院病理生理学研究室, 北京市 100853)

[关键词] 病理学与病理生理学; 钠钙交换体调节机制; 综述; 钙稳态; 缺血再灌注损伤

[摘要] 钠钙交换体是一种存在于细胞膜上的  $\text{Na}^+ - \text{Ca}^{2+}$  转运蛋白, 通过调节细胞钙稳态影响心肌结构、电生理与收缩功能, 心肌缺血再灌注时, 钠钙交换体反向转运导致细胞钙超载, 是缺血再灌注造成细胞结构损伤、心律失常和收缩功能障碍的重要机制, 抑制钠钙交换体活性已经成为缺血再灌注防治的新药物靶点。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

钠钙交换体(sodium calcium exchanger, NCX)是一种存在于细胞膜上的  $\text{Na}^+ - \text{Ca}^{2+}$  转运蛋白, 为非耗能的低亲和力高容量双向转运系统, 其转运方向取决于细胞内外  $\text{Ca}^{2+}$  和  $\text{Na}^+$  的电化学梯度。生理状态下  $\text{Na}^+$  顺电化学梯度进入, 而  $\text{Ca}^{2+}$  则逆电化学梯度移出细胞(即正向转运)是胞浆内  $\text{Ca}^{2+}$  转运至细胞外的最主要途径<sup>[1]</sup>。在某些情况下可以反向转运模式介导钙内流, 有助于肌浆网形成一定的钙负荷, 并触发肌浆网钙释放。因此, NCX 对心肌细胞钙稳态以及细胞结构与功能的维持具有重要作用。心肌缺血再灌注(ischemia/reperfusion, I/R)时, 继发于细胞内酸中毒的胞浆  $\text{Na}^+$  升高, 激活 NCX 反向转运使  $\text{Ca}^{2+}$  内流增加, 导致细胞钙超载, 是缺血再灌注造成细胞结构损伤、心律失常和收缩功能障碍的重要机制; 抑制 NCX 活性已经成为缺血再灌注防治新的药物治疗靶点。本文综述心肌 NCX 的功能、调节及其在缺血再灌注中的病理生理学意义。

## 1 心肌钠钙交换体及其调节

1968 年 Reuter 等首次在心肌细胞上发现了 NCX, 1990 年 Nicoll 等成功克隆出 NCX1, 其基因定位于人类染色体 2p21-p23。犬的 NCX1 由 938 个氨基酸组成, 有 11 个疏水片段(H1-H11)形成跨膜  $\alpha$  螺旋, 其中在 H5 和 H6 之间形成一个由 520 个氨基酸构成的巨大的胞浆内结构域, 其中 Glu-199 是  $\text{Ca}^{2+}$  结合的关键位点, 被 Gln 或 Asp 替换时 NCX 便失活。目前发现的哺乳类动物 NCX 有心脏型和视杆细胞型 2 大类, 心脏型主要包括 NCX1、NCX2、NCX3, 三者哺乳类动物分子结构相似, 全序列中有 70% 的氨基酸相同, 其中在心脏表达的主要是 NCX1, 目前在蛋白水平尚未检测到其他类型的 NCX。心脏型 NCX 通常是 3 个  $\text{Na}^+$  交换 1 个  $\text{Ca}^{2+}$ , 但有报道 4 个  $\text{Na}^+$  交换 1 个  $\text{Ca}^{2+}$ 。免疫细胞化学显示 NCX1 主要存在于心肌

细胞膜的周边和 T 管处, Western blot 分析时常出现 170、120 和 70 kDa 三个条带, 多为 120 kDa 或(120+70) kDa 两种情况。NCX1 的基因表达出现于胚胎小鼠心脏发育的早期, 于出生前表达达到高峰, 出生后逐渐下降, 至成年时呈低表达。NCX 纯合子缺陷的小鼠心室壁变薄、心肌细胞数量减少并出现凋亡的形态学变化。不同种属心肌细胞膜上 NCX 在  $\text{Ca}^{2+}$  外向转运中所占比例不同, 在豚鼠、兔和人类心脏, 细胞浆钙离子中有 28% 是由 NCX 转运出细胞的, 而大鼠和小鼠心肌细胞 NCX 的作用仅为 7%<sup>[1]</sup>。

多种因素可以调节 NCX 的表达和活性, 其中细胞浆  $\text{Na}^+$  和  $\text{Ca}^{2+}$  浓度与细胞膜电位是最重要的因素, 成年与新生心肌细胞长期处于细胞外高钙和钠内流增加的状态可以造成细胞内  $\text{Ca}^{2+}$  和  $\text{Na}^+$  浓度升高, 从而引起明显的心肌细胞 NCX1 mRNA 表达升高。另外  $\text{Ni}^{2+}$ 、 $\text{Cd}^{2+}$ 、 $\text{Mn}^{2+}$  和  $\text{Mg}^{2+}$  均抑制 NCX, 而  $\text{K}^+$ 、 $\text{Li}^+$  激活 NCX<sup>[3]</sup>。目前证实影响 NCX 的细胞外信号分子包括转化生长因子  $\beta$ 、白细胞介素  $1\beta$ 、forskolin、苯肾上腺素、内皮素、血管紧张素  $\text{I}\alpha$  等, 其中 forskolin、苯肾上腺素、内皮素、血管紧张素  $\text{I}\alpha$  和转化生长因子  $\beta$  促进 NCX 的表达, 而白细胞介素  $1\beta$  抑制 NCX 的表达。NCX1 蛋白质具有特定的丝氨酸磷酸化位点, 磷脂酶 C、蛋白激酶 C (protein kinase C, PKC)、蛋白激酶 A (protein kinase A, PKA) 和 IP3 等均参与 NCX1 活性的调节<sup>[2]</sup>。苯肾上腺素、内皮素、血管紧张素  $\text{I}\alpha$  和一些生长因子通过活化磷脂酶 C 而激活成年和新生大鼠心肌细胞 NCX1, 这种作用可以被 PKC 激动剂佛波酯或蛋白磷酸酶抑制剂 Okadaic acid 所模拟, 并被选择性 PKC 抑制剂所阻断, 提示细胞外信号可以通过 PKC 磷酸化 NCX1, 使之激活。PKC 抑制剂还明显降低基础和转化生长因子  $\beta$  刺激的 NCX1 mRNA 表达。蛋白磷酸酶抑制剂 Calyculin A 可以引起表达 NCX1 的细胞内钠依赖性钙内流的抑制, PKC 抑制剂和去除 NCX1 的中央亲水性环并不消除上述抑制, 认为 PKC 以外的其他蛋白激酶的蛋白磷酸化可能参与了 NCX1 的调节。在某些细胞, forskolin 刺激的 PKA 活化可以激活 NCX1。肾上腺素  $\alpha$  受体与  $\text{cAMP}$  的激活可以明显上调 NCX1 基因的表达。体外研究结果表明, 成年心肌细胞接受牵张或  $\alpha$  肾上腺素受体刺激后 NCX 表达上调。但是在蛙心  $\beta$  受体或  $\text{cAMP}$

[收稿日期] 2004-02-20

[修回日期] 2004-08-21

[基金项目] 国家自然科学基金(30270550)和北京市自然科学基金(7032044)资助

[作者简介] 刘秀华, 医学博士, 研究员, 从事冠心病缺血心肌保护机制研究, E-mail 为 liuxiuhua@167.net.cn。

依赖性刺激则导致 NCX 活性的抑制,其作用机制不详。

## 2 钠钙交换体在心肌缺血再灌注中的作用

缺血再灌注现象存在于心、脑、肾等多种组织器官,是临床上缺血性心、脑及外周血管疾病的防治和器官移植领域亟待解决的问题。心肌缺血时 ATP 合成减少,细胞膜及肌质网膜钙泵功能障碍,不能及时摄取细胞浆  $\text{Ca}^{2+}$ ,致使细胞浆  $\text{Ca}^{2+}$  增加;另外,缺血(或缺氧)致细胞内酸中毒,激活细胞膜上的  $\text{Na}^+-\text{H}^+$  交换体,使细胞内  $\text{Na}^+$  增高,活化 NCX 反向转运模式,在外向转运  $\text{Na}^+$  的同时造成细胞外  $\text{Ca}^{2+}$  大量内流,出现钙超载,损伤细胞结构与功能。

### 2.1 钠钙交换体与缺血再灌注后心肌坏死

细胞内钙超载是缺血再灌注致细胞损伤的重要机制,过度表达 NCX 的杂合子转基因小鼠心肌细胞质膜小泡上 NCX 活性高 148%,NCX 内向峰交换电流约高 3 倍,提示钙内流增加。大鼠冠状动脉左旋枝结扎 6 周后 NCX 电流升高,反向转运模式 NCX 活化触发肌浆网钙释放,加重钙超载。Sugishita 等<sup>[3]</sup>报道,与野生型小鼠比较,过度表达 NCX1 的雄性转基因小鼠心肌细胞膜上 NCX 活性高 2.5 倍,模拟心肌缺血 30 min 的氰化钠代谢抑制导致细胞内  $\text{Ca}^{2+}$  水平较野生型小鼠高 188%,NCX1 反向转运抑制剂 KB-R7943 明显抑制细胞钙超载,表明 NCX 上调介导的反向  $\text{Ca}^{2+}$  内流是引起细胞钙超载的主要原因;但雌性转基因小鼠心肌细胞内  $\text{Ca}^{2+}$  水平升高程度和 KB-R7943 抑制钙超载的作用均明显低于雄性动物,提示 NCX 对于细胞钙稳态的调节有性别差异。反义寡核苷酸抑制豚鼠心肌细胞 NCX1 的表达明显减轻缺氧复氧(hypoxia/reoxygenation, H/R)诱导的钙超载。KB-R7943 消除离体灌注大鼠心脏缺血再灌注所造成的乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH)漏出。Inserte 等<sup>[4]</sup>在以氰化钠抑制代谢模拟心肌细胞缺血模型上发现,15 mmol/L 的 KB-R7943 减轻细胞内钙超载;在离体灌注大鼠心脏缺血再灌注模型上,KB-R7943 的保护作用与剂量和应用时间有关,再灌注 5 min 内 0.3~3.0 mmol/L 的 KB-R7943 呈剂量依赖性抑制缺血再灌注引起的 LDH 漏出,10 min 内 5 mmol/L 的 KB-R7943 可以改善再灌注后心肌收缩功能障碍、LDH 漏出和心肌收缩带坏死;此时经冠状动脉内给予 5 mmol/L 的 KB-R7943,可以使猪缺血 48 min 所致心肌梗死面积下降 34%。但是再灌注 6 h 后给予 KB-R7943 则上述作用消失,认为再灌注早期 NCX 反向转运模式激活造成钙超载是细胞损伤的关键,此期应用 NCX 反向转运抑制剂是有益的。Takahashi 等<sup>[5]</sup>发现选择性 NCX 抑制剂 SEA0400(1~3 mmol/L)减轻犬心肌细胞钙反常诱导的心肌细胞死亡。成人心肌细胞较幼年心肌细胞的 NCX 更易于被缺氧损伤,造成 NCX 外向转运  $\text{Ca}^{2+}$  减少,诱发钙超载。Magee 等<sup>[6]</sup>在兔心脏缺血再灌注模型上观察到缺血前后给予 SEA0400 和 KB-R7943 均可缩小缺血再灌注造成的心肌梗死面积,前者不仅限制心肌梗死的作用显著,还具有改善心功能的作用。但是急性 NCX 高表达时则有相反的报道,如腺病毒携带 NCX 基因转染成年兔心肌细胞造成急性 NCX 高表达,48 h NCX 蛋白水平升高 2 倍,肌浆网钙泵没有变化,但是

却出现细胞浆内钙的净移出增加。

### 2.2 钠钙交换体与缺血再灌注后心肌收缩功能和心律失常

通常有 25% 的缺血性和 75% 的再灌注性心律失常由非折返机制(如延迟后除极)引起,缺血再灌注激活的 NCX 反向转运模式可以引发一种致心律失常的瞬间内向电流,通过延迟后除极引发室性心律失常。NCX1 基因转染的雄性小鼠心肌细胞在缺血再灌注后收缩功能下降。60 min 缺氧、10 min 复氧造成 Wistar 大鼠心肌细胞内  $\text{Ca}^{2+}$  浓度明显升高和心肌细胞过度收缩,而复氧时给予无钙灌注液或 NCX 反向转运抑制剂 KB-R7943 完全抑制钙超载和心肌细胞挛缩,在离体灌注大鼠心脏的缺血再灌注模型上,KB-R7943 可改善缺血再灌注后左心室功能。Inserte 等<sup>[4]</sup>在氰化钠抑制心肌细胞代谢的模拟缺血模型上发现,15 mmol/L 的 KB-R7943 减轻细胞内钙超载和心肌细胞过度收缩。Yamamura 等<sup>[7]</sup>分别在成年(12 周)和老年(78 周)Fische 344 和成年(12 周)SD 大鼠离体灌注心脏缺血再灌注模型上发现,KB-R7943 可以抑制 NCX 反向转运模式引起的细胞  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  摄取,并减轻 25 min 缺血、30 min 再灌注所造成的左心室收缩功能障碍、高能磷酸化合物消耗、肌酸激酶释放和再灌注心律失常。Maczewski 等<sup>[8]</sup>在离体灌注的大鼠心脏缺血再灌注模型上发现,再灌注流出液中一氧化氮和羟自由基出现一过性升高,使用  $\text{Na}^+-\text{H}^+$  交换体抑制剂或 NCX 反向转运模式抑制剂 KB-R7943 均可以减少一氧化氮和羟自由基的产生,并减轻缺血再灌注造成的心肌过度收缩,改善再灌注后心脏功能。Tadros 等<sup>[9]</sup>发现,成年大鼠心肌细胞以腺病毒转染 NCX1 反义寡核苷酸后 3 天,心肌细胞 NCX1 下降 30%,6 天时下降 66%,在细胞外钙浓度为 0.6 mmol/L 时,该心肌细胞收缩、细胞内钙瞬变幅度和肌浆网  $\text{Ca}^{2+}$  含量明显高于对照组,上述变化与大鼠心肌梗死后心肌细胞的表现一致。提示 NCX1 下调可以导致收缩期钙内流与外流的减少,与心肌梗死后收缩功能障碍有关。

Takahashi 等<sup>[5]</sup>观察 SEA0400 对于犬心肌细胞钠依赖性钙摄取的影响,发现 SEA0400(1~3 mmol/L)减轻钙反常诱导的离体灌注大鼠心脏缺血再灌注后心功能障碍,并减少大鼠在体心脏缺血再灌注后室颤和死亡发生率。犬心脏缺血前 5 min 静脉注射 KB-R7943(5 mg/kg)可以减少缺血期心律失常的次数,但对于缺血再灌注后死亡率无影响。另外,在心肌缺血时,NCX 蛋白质与活性水平并不总是一致的,兔心肌梗死后 8~9 周左心室组织中 NCX 蛋白表达较假手术组明显升高,但是 NCX 活性下降,NCX 电流及其所介导的钙外流均明显低于假手术组,认为这种 NCX 蛋白质与活性水平不一致可能与 NCX 变构调节的钙敏感性不同有关。

### 2.3 钠钙交换体对肥大和衰竭心脏缺血再灌注损伤的影响

在缺血再灌注引起的细胞损伤中,NCX 介导的钙超载起重要作用。而在心肌肥大和心力衰竭的发生与发展过程中,NCX 的表达和/或活性也发生动态变化,并与心律失常和心肌收缩功能障碍的发生密切相关。肥大和衰竭心肌 NCX 上调具有双重作用:一方面使 NCX 外向  $\text{Ca}^{2+}$  转运增多,致肌浆网钙负荷不足,引起心肌收缩功能障碍;另一方面,内向  $\text{Ca}^{2+}$  转运可以激活瞬间内向电流,参与延迟后除极和室性心律失常

常的发生。在这类病变心脏上 NCX 的上调是否会影响心肌细胞对缺血再灌注的易感性, 该问题直接影响到 NCX 抑制剂临床应用的可行性, 是近年来研究的热点。大鼠左心室心肌梗死后 16 周出现明显的心力衰竭症状, 其细胞质膜小泡 NCX 活性明显升高。Bers 等<sup>[10]</sup>在兔心力衰竭模型上证实 NCX 的 mRNA、蛋白质表达和活性均升高, 肌浆网  $\text{Ca}^{2+}$  含量和收缩期钙瞬变下降, 心肌收缩功能下降 38%, 钾内向矫正电流下降 49%, NCX 的上调和内向矫正电流下降明显增加了延迟后除极触发致心律失常的危险性。Sjaastad 等<sup>[11]</sup>予雄性 Wistar 大鼠左冠状动脉结扎致心肌梗死, 于心肌梗死后 110 天检测非梗死区心肌组织中 NCX 的 mRNA 和蛋白质表达, 发现其水平分别高 24% 和 76%, 细胞钙摄取高 3 倍, 表明心肌梗死后存活心肌细胞更容易出现钙超载, 因而更容易受缺血再灌注损伤。但是兔心肌细胞转染 NCX 后致 NCX 蛋白表达上调, 心肌收缩功能却明显下降, 提示细胞内  $\text{Ca}^{2+}$  含量不足。Matsumoto 等<sup>[12]</sup>的研究结果表明, 兔在体心脏冠状动脉左旋枝结扎致心肌梗死后 2 周出现中度心肌梗死, 此时非梗死区心肌组织 NCX 蛋白表达水平较假手术组高 60%, 在上述肥大上心脏以 5 轮 5 min 短暂缺血再灌注诱导心肌顿抑, 或以 30 min 缺血、2 h 再灌注再次造成急性心肌梗死, NCX 抑制剂 KB-R7943 (0.3 mmol/L) 并无减轻心肌顿抑或限制心肌梗死面积的作用, 提示 NCX 上调对兔肥大心肌的急性心肌缺血再灌注并未无保护作用, 亦未增加心肌对缺血再灌注损伤的危险性, 可能与动物种属 NCX 作用的差异有关, 但是亦不能完全排除缺血后存活心肌对 NCX 抑制剂反应性下降的因素。

### 3 结语

钠钙交换体(NCX)是维持心肌细胞钙稳态的重要成分之一, 在心肌结构、电生理与收缩功能的维持与调节中均具有作用。心肌缺血再灌注时, NCX 反向转运使  $\text{Ca}^{2+}$  内流增加, 导致细胞钙超载, 是缺血再灌注造成细胞结构损伤、心律失常和收缩功能障碍的重要机制, 抑制 NCX 活性已经成为

缺血再灌注防治的新药物靶点。随着 NCX 在缺血再灌注中作用的阐明和特异性 NCX 抑制剂的发展, NCX 在缺血再灌注防治中的作用将进一步明确。

### [参考文献]

- [1] Pogwizd SM. Clinical potential of sodium-calcium exchanger inhibitors as antiarrhythmic agents. *Drugs*, 2003, **63**: 439-452
- [2] Shigekawa M, Iwamoto T. Cardiac  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  Exchange: Molecular and Pharmacological Aspects. *Circ Res*, 2001, **88**: 864-876
- [3] Sugishita K, Su Z, Li F, Barry WH. Gender Influences  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  During Metabolic Inhibition in Myocytes Overexpressing the  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  Exchanger. *Circulation*, 2001, **104**: 2101-106
- [4] Insarte J, Garcia-Dorado D, Ruiz-Meana M, Padilla F, Barrabes JA, Pina P, et al. Effect of inhibition of  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  exchanger at the time of myocardial reperfusion on hypercontracture and cell death. *Cardiovasc Res*, 2002, **55**: 739-748
- [5] Takahashi K, Takahashi T, Suzuki T, Onishi M, Tanaka Y, Hamano-Takahashi A, et al. Protective effects of SEA0400, a novel and selective inhibitor of the  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  exchanger, on myocardial ischemia-reperfusion injuries. *Eur J Pharmacol*, 2003, **458**: 155-162
- [6] Magee WP, Deshmukh G, Deninno MP, Sutt JC, Tracey WR. Differing cardioprotective efficacy of the  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  exchanger inhibitors SEA0400 and KB-R7943. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2003, **284**: H903-H910
- [7] Yamamura K, Tani M, Hasegawa H, Gen W. Very low dose of the  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  exchange inhibitor, KB-R7943, protects ischemic reperfused aged Fischer 344 rat hearts: considerable strain difference in the sensitivity to KB-R7943. *Cardiovasc Res*, 2001, **52**: 397-406
- [8] Maczewski M, Beresewicz A. Role of nitric oxide and free radicals in cardioprotection by blocking  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  and  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  exchange in rat heart. *Eur J Pharmacol*, 2003, **461**: 139-147
- [9] Tadros GM, Zhang XQ, Song J, Carl LL, Rothblum LI, Tian Q, et al. Effects of  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  exchanger downregulation on contractility and  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  transients in adult rat myocytes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2002, **283**: H1616-H1626
- [10] Bers DM, Pogwizd SM, Schlotthauer K. Upregulated  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  exchange is involved in both contractile dysfunction and arrhythmogenesis in heart failure. *Basic Res Cardiol*, 2002, **97** (Suppl 1): 136-142
- [11] Sjaastad I, Bentzen JG, Semb SO, Ilebekk A, Sejersted OM. Reduced calcium tolerance in rat cardiomyocytes after myocardial infarction. *Acta Physiol Scand*, 2002, **175**: 261-269
- [12] Matsumoto T, Miura T, Miki T, Nishino Y, Nakamura Y, Shimamoto K. Dose enhanced expression of the  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  exchanger increase myocardial vulnerability to ischemia/reperfusion injury in rabbit hearts? *Mol Cell Biochem*, 2003, **248**: 141-147

(此文编辑 文玉珊)

## 《中国科技论文统计源期刊(中国科技核心期刊)》 (生物医药类)一览表(2003 年度)

中国修复重建外科杂志  
中国学校卫生  
中国血液流变学杂志  
中国循环杂志  
中国循证医学杂志  
中国药房  
中国药科大学学报  
中国药理学报

中国药理学通报  
中国药理学与毒理学杂志  
中国药师  
中国药事  
中国药物化学杂志  
中国药物依赖性杂志  
中国药理学杂志  
中国医刊