

• 基础研究 •

钠 - 钙交换体抑制剂 SN - 6 挽救钙矛盾处理造成的离体大鼠心功能障碍及细胞死亡

肖国胜, 张建英, 张 圆, 刘亚莉, 张淑苗, 殷 玥, 周京军

[摘要]:目的 评价钠 - 钙交换体选择性抑制剂 SN - 6 对钙矛盾处理造成离体灌注大鼠心脏功能障碍和心肌细胞死亡的影响。方法 离体心脏先后经历 3 min 无钙液、30 min 有钙液灌注即钙矛盾处理, 实验同步监测左室功能, 并检测复钙期冠脉流出液乳酸脱氢酶(LDH)含量与实验结束时存活心肌组织面积的大小。结果 钙矛盾处理使得左室功能丧失, 表现为左室舒张末压(LVEDP)显著抬高, 左心室发展压(LVDP)、心室压力变化最大速率($\pm dp/dt$)为 0; 心脏几乎不存在活性组织; 于无钙液灌注前 2 min、无钙液灌注期和复钙后前 5 min 给予 10 $\mu\text{mol/L}$ SN - 6 处理后, LVEDP 显著降低, LVDP 和 $\pm dp/dt$ 明显恢复, 心肌损伤面积缩小, LDH 释放减少; SN - 6 处理的对照心脏于灌流结束时左室功能没有显著改变。结论 SN - 6 具有减轻钙矛盾处理造成的心功能损害, 增加细胞存活的作用, 提示钠 - 钙交换体是钙矛盾损伤的关键分子。

[关键词]: 心脏; 钠钙交换体; 钙离子

[中图分类号]: R654.1 **[文献标识码]:** A **[文章编号]:** 1672 - 1403(2012)03 - 0167 - 04

Sodium/calcium exchanger inhibitor SN - 6 rescued heart dysfunction and cell death in calcium paradox

Xiao Guo - Sheng, Zhang Jian - ying, Zhang Yuan, Liu Ya - li, Zhang Shu - miao, Yin Yue, Zhou Jing - jun
Xiamen Heart Centre, Cardiology of Zhongshan Hospital, Xiamen University, Xiamen 361004, China;
Department of Physiology, The Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, China
Corresponding author: Xiao Guo - Sheng, Email: xgs71@163.com
Zhou Jing - Jun, Email: jjzhou71@yahoo.com

[Abstract]: Objective The present study was to observe the effect of sodium/calcium exchanger inhibitor SN - 6 on heart dysfunction and cell death induced by calcium paradox. **Methods** Calcium paradox in isolated heart was elicited by 3 - min calcium depletion followed by 30 - min calcium repletion in the absence or presence of 10 $\mu\text{mol/L}$ SN - 6, an inhibitor of sodium/calcium exchanger. Cardiac function was monitored, and lactate dehydrogenase (LDH) release during calcium repletion and infarct size was measured. **Results** Upon calcium repletion, the heart deteriorated, exhibiting a marked depression in cardiac function, an enlarged infarct size and an increase in LDH release. These changes were significantly attenuated by SN - 6. SN - 6 had no effect on cardiac performance at the end of perfusion under control conditions. **Conclusion** The results demonstrate that SN - 6 rescues heart dysfunction and cell death in calcium paradox. It also indicates that sodium/calcium exchanger is a key molecule in the injury.

[Key words]: Heart; Sodium/calcium exchanger; Calcium

离体心脏给予短暂无钙液灌注, 随即恢复为有钙液灌注会导致心功能障碍, 大量心肌细胞死亡,

Zimmerman 将其命名为钙矛盾心肌损伤^[1], 它是探讨缺血 - 再灌注等不同条件下因 Ca^{2+} 稳态失衡所致心肌损伤的重要模型^[2]。但是钙稳态失衡、心功能障碍与心肌细胞死亡的分子机制并不十分清楚。

基金项目: 国家自然科学基金(30971196)

作者单位: 361004 厦门, 厦门市心脏中心, 厦门大学附属中山医院心内科(肖国胜); 710032 西安, 第四军医大学基础医学院生理学教研室(张建英、张圆、刘亚莉、张淑苗、殷玥、周京军)

钠 - 钙交换体(sodium/calcium exchanger, NCX)是心肌重要的钙稳态调节蛋白。Chatamra^[3]观察到, 复钙早期给予 Mn^{2+} 降低胞浆 Ca^{2+} (Ca^{2+} i) 或用 Ni^{2+} 等非选择性抑制 NCX 活性可减少心肌肌球蛋白丢失; 继合成 NCX 选择性抑制剂 SN - 6 等化合物后, Takahashi 和 Kojima 先后发现, 抑制 NCX

通讯作者: 肖国胜, xgs71@163.com

周京军, Email: jjzhou71@yahoo.com

活性能拮抗急性分离细胞钙矛盾处理引起的细胞死亡与长度缩短^[4-5]。但是,关于 NCX 在钙矛盾处理引起心功能障碍中的作用尚未评价。因此,本研究以心功能和心肌细胞死亡/损伤面积作为检测指标,评价 NCX 抑制剂 SN-6 对离体心脏钙矛盾的影响。

1 材料和方法

1.1 实验动物与试剂 清洁级 SD 雄性大鼠,体重 250~350 g,由第四军医大学实验动物中心提供。NCX 抑制剂 SN-6 购于 Tocris 公司,氯化三苯基四氮唑(TTC)购于 Sigma 公司,乳酸脱氢酶(LDH)检测试剂盒购自 R & D 公司。

1.2 离体心脏灌注与心功能监测 SD 雄性大鼠在腹腔注射肝素(500 U/kg) 20 min 后脱颈处死,迅速开胸剪取心脏,将主动脉根部固定于 Langendorff 灌注装置(Radnoti Glass Technology Inc., Monrovia, CA, USA)灌注压保持在 80 mm Hg;灌注液为正常 Krebs-Henseleit 液,KH 液的配方为(mmol/L): NaCl 140, KCl 4.7, MgSO₄ 1.2, KH₂PO₄ 1.2, CaCl₂ 1.25, NaHCO₃ 25, Glucose 11, 灌注前 40 min 用 95% O₂ 和 5% CO₂ 混合气体(v/v)向 KH 液中持续通气直至实验结束;待心脏复跳后,于左心耳下方剪一小口,将带有乳胶气囊的测压管经二尖瓣插入左心室,测压管的另一端经换能器(MP100, BIOPAC Systems, Inc.)与计算机相连,调节气囊使左心室舒张末压(left ventricular end diastolic pressure, LVEDP)维持在 5~10 mm Hg; KH 液灌注 10 min,待心功能平稳后施行实验。

实验中采用 AcqKnowledge 3.8.1 软件全程记录 LVEDP 和左室收缩峰压(left ventricular peak systolic pressure, LVPSP)的变化,以 LVEDP、左室发展压(left ventricular developed pressure, LVDP,为 LVPSP 与 LVEDP 的差值)、心室压力变化的最大速率(+dp/dt)和最小速率(-dp/dt)评价心功能。实验以无钙液灌注末/复钙开始记为 0 min,分别于平衡末(-10 min)、无钙液灌注开始(-3 min)、无钙液灌注末(0 min)、有钙液灌注 5 min、实验结束(30 min)测量冠脉流量。

1.3 实验分组 随机分为 4 组(n=6)。组 1(单纯对照组):正常 KH 液持续灌注 45 min;组 2(SN-6 对照组):依次用正常 KH 平衡灌注 10 min,含 10 μmol/L SN-6 的 KH 液灌注 10 min,正常 KH 液灌注 25 min;组 3(钙矛盾组):依次用正常 KH 液灌注 12 min,无钙 KH 液(在正常 KH 液成分的基础上去除 CaCl₂,添加 0.2 mmol/L Na₂EDTA 配制而成)灌

注 3 min,正常 KH 液灌注 30 min;组 4(SN-6 处理组):在钙矛盾处理过程(同钙矛盾组)中,于无钙液灌注前 2 min、无钙液灌注期和复钙后前 5 min 给予 10 μmol/L SN-6 的处理。

1.4 心肌损伤面积测定 灌流心脏于实验结束后,置于 -20℃ 冻存 30 min;剔除心房组织,沿长轴由心尖向心底方向,连续切成六片厚度约为 1 mm 的环行切片;于 37℃ 1% 2,3,5-氯化三苯基四氮唑溶液(TTC 溶液)中避光孵育 15 min;4% 多聚甲醛固定过夜;正常心肌组织被染为红色,白色区为坏死组织,在数码相机采集图像后,用 OPTIMAS v 5.2 软件双盲法分析心肌损伤面积百分比(%),其数值=(坏死区面积/总面积)×100%。

1.5 LDH 检测 收集复钙开始后 30 min 冠脉流出液,依照 R & D 公司提供的 ELISA 试剂盒使用说明检测心脏释放 LDH 的总活性单位,实验结果用 LDH 活性单位/心脏重量(IU/g)表示。

1.6 统计分析 应用 GraphPad Prism 4.0 统计软件进行分析,数据用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,多组间差异显著性检验采用单因素方差分析(ANOVA),两组间比较用 Tukey 检验,以 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 SN-6 对各组冠脉流量的影响 实验开始前各组间冠脉流量无统计学差异。实验结束时,与单纯对照组相比,钙矛盾组的冠脉流量显著减少;SN-6 不影响对照心脏冠脉流量,但显著增加钙矛盾处理心脏的冠脉流量。各组实验前后的冠脉流量统计结果详见表 1。

2.2 SN-6 对钙矛盾处理引起心功能障碍的影响

与单纯对照组相比,无钙灌注、30 min 含 1.25 mmol/L Ca²⁺ 的 KH 液先后灌注使得心脏出现机械功能障碍,表现为 LVEDP 显著增加, LVDP、+dp/dt、-dp/dt 为 0。10 μmol/L SN-6 可显著减轻钙矛盾处理造成的心功能障碍, LVEDP 显著降低, LVDP、+dp/dt、-dp/dt 部分恢复。10 μmol/L SN-6 虽减慢正常灌注心脏的心率,增加 LVDP,但在药物洗脱后这一作用随即消失。见图 1A,图 1B。

2.3 SN-6 对钙矛盾处理造成心肌细胞死亡和 LDH 释放的影响 与单纯对照组相比钙矛盾组使得心脏几乎没有存活组织;10 μmol/L SN-6 不影响正常 KH 液灌注心肌组织的存活,但显著缩小钙矛盾处理造成的心肌细胞死亡面积,见图 2。与心肌细胞死亡结果相似,钙矛盾处理显著增加 LDH

表 1 各组离体大鼠心脏冠脉流量比较 (ml/min n=6 $\bar{x} \pm s$)

组别	-10 min	-3 min	0 min	5 min	15 min	30 min
单纯对照组	11.4 ± 0.5	12.2 ± 0.3	12.4 ± 0.6	12.5 ± 0.2	12.4 ± 0.1	12.1 ± 0.8
SN-6 对照组	10.8 ± 0.3	9.4 ± 0.7	11.3 ± 0.4	11.2 ± 0.9	12.2 ± 0.2	12.0 ± 0.6
钙矛盾组	11.3 ± 0.2	11.0 ± 0.4	7.4 ± 0.9	6.8 ± 0.5	5.9 ± 0.1	5.5 ± 0.4 ^{##}
SN-6 处理组	12.2 ± 0.5	12.1 ± 1.3	7.6 ± 0.8	7.3 ± 0.5	7.5 ± 0.6	7.5 ± 0.7 [*]

注:与单纯对照组相比^{##} $P < 0.01$;与钙矛盾组相比^{*} $P < 0.05$ 。

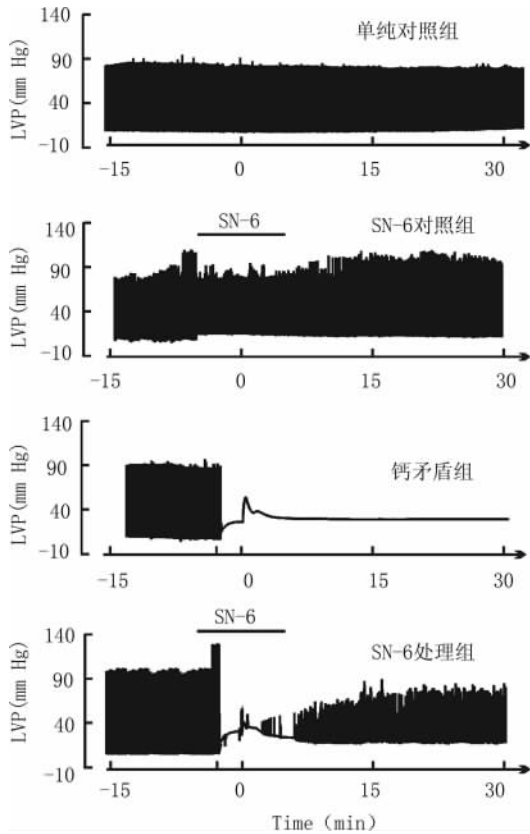


图 1(A)

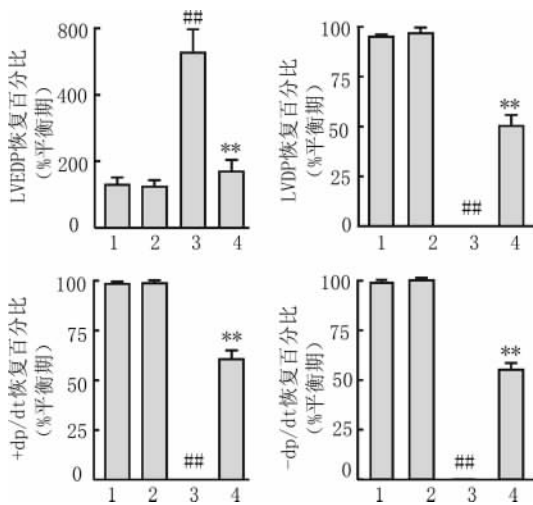
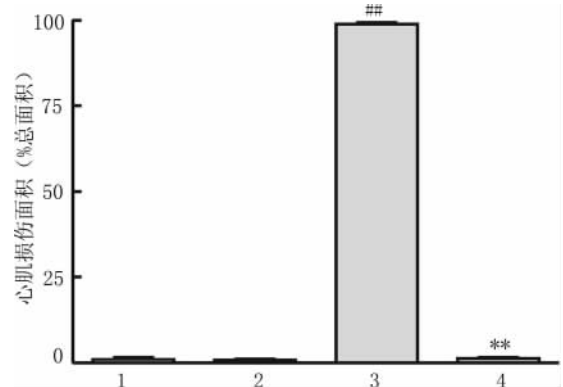


图 1(B)

注:与单纯对照组相比^{##} $P < 0.01$;
与钙矛盾组相比^{**} $P < 0.05$

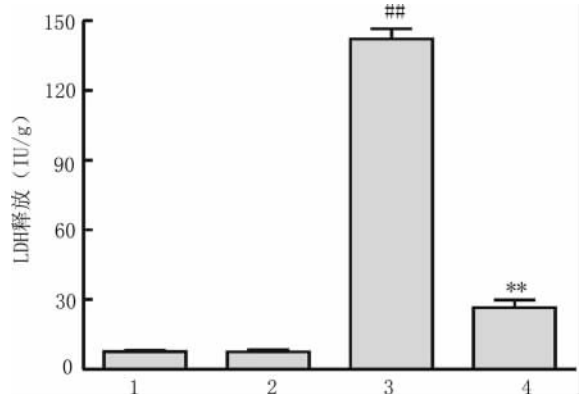
图 1 SN-6 对钙矛盾处理造成的心功能障碍



注:与单纯对照组相比^{##} $P < 0.01$;

与钙矛盾组相比^{**} $P < 0.05$

图 2 SN-6 对钙矛盾处理引起的心肌损伤



注:与单纯对照组相比^{##} $P < 0.01$;

与钙矛盾组相比^{**} $P < 0.05$

图 3 SN-6 对钙矛盾处理引发心机的 LDH 释放

释放, 10 $\mu\text{mol/L}$ SN-6 拮抗这一作用, 见图 3。SN-6 对正常 KH 液灌注心脏的 LDH 释放没有显著影响。结果表明: NCX 抑制剂 SN-6 可显著减轻钙矛盾处理引起的心功能障碍和心肌细胞死亡。

3 讨论

已有研究发现抑制 NCX 活性可减少钙矛盾处理造成的心肌肌球蛋白丢失^[3] 增加细胞存活率^[5], 拮抗细胞长度缩短^[4]。本实验观察到, NCX 抑制剂 SN-6 可减轻钙矛盾处理造成的心功能损害, 缩小

心肌损伤面积。该结果表明 SN-6 具有减轻钙矛盾心肌损伤的作用,并进一步提示 NCX 活性增强是钙矛盾心肌损伤的关键环节。

NCX 可实现对 Ca^{2+} 的内向或外向跨膜转运,即存在正向和反向两种交换模式,转运方向取决于跨膜 Na^+ 、 Ca^{2+} 的浓度梯度与膜电位的差值^[6]。研究发现, Na^+ 负载心脏在短暂无钙液灌注后的复钙期 Ca^{2+} 内流显著增加,提示存在 NCX 反向交换模式的激活^[7]。SN-6、KB-R7943、SEA0400 是苯甲氧基苯基衍生物,是目前研究 NCX 功能的常用抑制剂^[8]。Kojima 在离体细胞发现 KB-R7943 可延缓无钙灌注期末肌浆网钙库含量的减少^[4],提示无钙期 NCX 正向交换模式也参与钙矛盾处理造成的心肌损害。我们在离体灌注心脏发现,SN-6 减轻钙矛盾处理造成的心功能损害、缩小心肌损伤面积,减少 LDH 释放,表明 NCX 是钙矛盾处理造成心肌损害的关键分子,因此,我们有必要在离体灌注心脏模型中探讨两种交换模式在钙矛盾处理中的角色与分子机制。

实验发现,钙矛盾处理显著减少冠脉流量,SN-6 能减弱这一作用。我们认为,该变化可能与 LVEDP 水平密切相关,即钙矛盾处理后,LVEDP 升高,冠脉流量减少;SN-6 下降 LVEDP 水平,冠脉流量增加。

有研究发现,L-型钙通道阻断剂硝苯地平(nifedipine)可减少钙矛盾处理造成的 Ca^{2+} 内流增加和心肌肌球蛋白的释放,然而 nifedipine 不能拮抗 1 min 无钙液、10 min 有钙液接替灌注造成的心功能障碍^[7]。我们的结果发现 NCX 抑制剂 SN-6 能显著保护左室功能。这些结果提示,NCX 活性增加是

钙矛盾造成心功能损害的重要原因。

总之,本研究发现 NCX 抑制剂 SN-6 具有减轻钙矛盾处理造成的心功能损害,保护心肌存活的作用,其作用机制将是下一步的重要研究内容。

参考文献:

- [1] Zimmerman AN, Hulsmann WC. Paradoxical influence of calcium ions on the permeability of the cell membranes of the isolated rat heart [J]. *Nature*, 1966, 211(5049): 646-647.
- [2] Piper HM. The calcium paradox revisited: an artefact of great heuristic value [J]. *Cardiovasc Res* 2000, 45(1): 123-127.
- [3] Chatamra KR, Chapman RA. The effects of sodium-calcium exchange inhibitors on protein loss associated with the calcium paradox of the isolated Langendorff perfused guinea-pig heart [J]. *Exp Physiol*, 1996, 81(2): 203-210.
- [4] Kojima A, Kitagawa H, Omatu-Kanbe M, et al. Ca^{2+} paradox injury mediated through TRPC channels in mouse ventricular myocytes [J]. *Br J Pharmacol*, 2010, 161(8): 1734-1750.
- [5] Takahashi K, Takahashi T, Suzuki T, et al. Protective effects of SEA0400, a novel and selective inhibitor of the $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger, on myocardial ischemia-reperfusion injuries [J]. *Eur J Pharmacol*, 2003, 458(1-2): 155-162.
- [6] Shigekawa M, Iwamoto T. Cardiac $\text{Na}^+ - \text{Ca}^{2+}$ exchange: molecular and pharmacological aspects [J]. *Circ Res*, 2001, 88(9): 864-876.
- [7] Nayler WG, Perry SE, Elz JS, et al. Calcium, sodium, and the calcium paradox [J]. *Circ Res*, 1984, 55(2): 227-237.
- [8] Iwamoto T. Forefront of $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger studies: molecular pharmacology of $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchange inhibitors [J]. *J Pharmacol Sci*, 2004, 96(1): 27-32.

(收稿日期: 2012-06-03)

(修订日期: 2012-07-10)

(上接第 188 页)

- [50] Jia JH, Chen KP, Chen SX, et al. Breviscapine, a traditional Chinese medicine, alleviates myocardial ischaemia reperfusion injury in diabetic rats [J]. *Acta Cardiol*, 2008, 63(6): 757-762.
- [51] Matsumoto S, Cho S, Tosaka S, et al. Pharmacological preconditioning in type 2 diabetic rat hearts: the roles of mitochondrial ATP-sensitive potassium channels and the phosphatidylinositol 3-kinase-Akt pathway [J]. *Cardiovasc Drugs Ther*, 2009, 23(4): 263-270.
- [52] Wu Y, Xia ZY, Meng QT, et al. Shen-Fu injection preconditioning inhibits myocardial ischemia-reperfusion injury in diabetic rats: activation of eNOS via the PI3K/Akt pathway [J]. *J Biomed Biotechnol*, 2011, 2011: 384627.
- [53] Balakumar P, Rose M, Ganti SS, et al. PPAR dual agonists: are they opening Pandora's Box [J]? *Pharmacol Res*, 2007, 56(2): 91-98.
- [54] Balakumar P, Arora MK, Singh M. Emerging role of PPAR ligands in the management of diabetic nephropathy [J]. *Pharmacol Res*, 2009, 60(3): 170-173.
- [55] Kaur J, Reddy K, Balakumar P. The novel role of fenofibrate in preventing nicotine- and sodium arsenite-induced vascular endothelial dysfunction in the rat [J]. *Cardiovasc Toxicol*, 2010, 10(3): 227-238.
- [56] Balakumar P, Jagadeesh G. Multifarious molecular signaling cascades of cardiac hypertrophy: can the muddy waters be cleared [J]? *Pharmacol Res*, 2010, 62(5): 365-383.
- [57] Balakumar P, Rohilla A, Mahadevan N. Pleiotropic actions of fenofibrate on the heart [J]. *Pharmacol Res*, 2011, 63(1): 8-12.
- [58] Bulhak AA, Jung C, Ostenson CG, et al. PPAR-alpha activation protects the type 2 diabetic myocardium against ischemia-reperfusion injury: involvement of the PI3-Kinase/Akt and NO pathway [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2009, 296(3): H719-727.

(收稿日期: 2012-06-04)

(修订日期: 2012-07-09)