

强心甙类固醇作用于 Na-K-ATP 酶引起细胞内钙离子浓度改变的分子机制进展

曾 一¹ 李 娟² 欧阳建^{2*}

(¹东南大学医学院, 南京 210009; ²南京市鼓楼医院血液科, 南京 210008)

摘要 Na-K-ATP 酶(或称为钠泵)是一种广泛存在于真核细胞膜上的跨膜蛋白, 近年来许多研究发现其不但有调节细胞内钠、钾离子浓度的功能, 也可通过与不同蛋白相互作用发挥细胞信号传导作用。强心甙类固醇类药物(CTS)长久以来被用来治疗心脏疾病, 近年来发现其与钠泵结合后可以激活细胞内一系列信号通路, 其中很重要一点即是通过改变细胞内钙离子浓度从而调节细胞增殖、凋亡等。本文就 CTS/ 钠泵通过与 IP3R、Src、Na/Ca 复合体相互作用影响细胞内钙离子浓度的改变作简要综述。

关键词 Na-K-ATP 酶(钠泵); 强心甙类固醇(CTS); 钙信号微结构域; 肌醇三磷酸受体(IP3Rs); 钠钙交换体(NCX); 钠泵 /Src 复合物

Na-K-ATP 酶的基本作用是维持细胞内外 Na⁺/K⁺ 电化学梯度的平衡。强心甙类固醇(如哇巴因等)是 Na-K-ATP 酶的特异性配体, 一定浓度的强心甙类固醇可抑制 Na-K-ATP 酶离子泵的功能, 有研究表明低浓度的哇巴因在不抑制离子泵的条件下可通过 Na-K-ATP 酶启动细胞内的信号传导通路, 从而调节细胞的功能。强心甙类固醇结合钠泵后可以产生多种效应, 其中重要的一点是通过与 IP3R、Src、Na/Ca 交换体相互作用改变细胞内钙离子浓度, 进而调节细胞分化、增殖、凋亡等。本文就 CTS/ 钠泵通过与 IP3R、Src、Na/Ca 复合体相互作用影响细胞内钙离子浓度的改变作简要综述。

1 Na-K-ATP 酶

Na-K-ATP 酶是一个细胞膜蛋白, 存在于所有真核细胞膜上, 它利用一分子 ATP 水解产生的能量逆电荷梯度及化学梯度泵出三个钠离子到细胞外, 同时泵入两个钾离子到细胞内, 从而维持细胞内外电化学梯度的平衡, 以维持细胞的基本生理功能。它于 1957 年首次由 Skou^[1] 发现, 属 P 型 ATP 酶膜结合蛋白超家族成员之一。Na 泵包含了 α 和 β 两个亚单位。一些特殊组织的细胞表达 FXYP 蛋白, 该蛋白含 7 个保守的氨基酸序列, 被认为是钠泵第三个亚单位(即 γ 亚基), 它与 $\alpha\beta$ 的二聚体结合起调节作用。 α 催化亚单位(约 112 kDa)含有 ATP 及其他配体结合的位点,

强心甙类固醇(如地高辛、哇巴因)可以和该亚基 NH₂ 端位于胞外的位点结合^[2]。不同的组织表达不同亚型的亚单位。 $\alpha 1$ 亚型在所有细胞中表达, $\alpha 2$ 、 $\alpha 3$ 亚型在骨骼肌、神经组织和心肌细胞表达, $\alpha 4$ 亚型在睾丸中表达, 调节精子的运动^[3]。

2 强心甙类固醇(CTS)及其调节细胞生长

强心甙类固醇是一类与 Na-K-ATP 酶特异性结合的化学物质, 包括植物来源的洋地黄类, 如地高辛(digoxin)和哇巴因; 动物来源的蟾毒灵(又称布法林 bufalin, 提取自蟾蜍毒素)和海蟾毒(marinobufagenin)等。洋地黄类用于治疗充血性心力衰竭和心房纤颤已有 200 多年的历史, 布法林和海蟾毒具有强心、利尿、镇痛作用。近年来研究发现哇巴因和海蟾毒均为内源性强心甙类固醇, 其产生和分泌受多种激素的调节, 包括促肾上腺皮质激素和血管紧张素 II 等。已有研究者从人体血浆、肾上腺、下丘脑提取出哇巴因等 CTS 衍生物^[4]。1991 年 Hamlyn 等^[2]通过核磁共振氢谱(¹H-NMR)与液相色谱-电喷雾电离质谱分析验证人体内源性 CTS 与植物来源的 CTS 具

收稿日期: 2010-04-23 接受日期: 2010-09-28

国家自然科学基金(No.30971511)资助项目

* 通讯作者。Tel: 025-83105211, Fax: 025-83105211, E-mail: oy626@sina.com

有相同的结构,但其循环浓度为皮摩尔至纳摩尔数量级。内源性 CTS 在调节血压、维持水电解质平衡、收缩血管和心肌等方面同样具有重要作用。CTS(例如哇巴因)与钠泵结合后能磷酸化或非磷酸化该酶影响 A 结构域的位置,进而抑制 Na 泵的离子泵功能。

CTS 对细胞生长的调节也起着重要作用。早在上个世纪 70 年代就发现哇巴因可以影响淋巴母细胞基因表达和丝裂原诱导的分化及增殖^[5]。它能激活多条细胞生长通路,使不同类型细胞发生肥大/增生性生长/凋亡/分化。已发现哇巴因可以影响淋巴母细胞基因表达和丝裂原诱导的分化及增殖^[5]。Huang 等^[6]在原代培养的心肌细胞中加入哇巴因,检测到肥大基因转录增加,这种作用依赖钠泵的信号功能,有几种信号途径交叉起作用。Xiao 等^[9]用哇巴因作用于皮层神经元,检测到“DNA 梯带”和天冬氨酸半胱氨酸蛋白酶(caspase)活化等凋亡特征。电镜显示存在单个细胞呈核皱缩,染色质凝集的形态学变化,并伴有坏死特征。纳摩尔或低于纳摩尔浓度的 CTS 即可调节细胞生长,该数量级浓度不会抑制 Na-K-ATP 酶的泵功能。Xie 等^[9]首次在犬平滑肌细胞上发现低于纳摩尔浓度的哇巴因能影响细胞生长。哇巴因调节细胞生长具有一定细胞特异性,并具有病理、生理上的重要意义。Blanco 等^[7]发现,肾基底膜低于纳摩尔浓度的哇巴因可通过 ERK 途径刺激 ADPKD 细胞的增殖。该研究说明内源性 CTS 在常染色体显性多囊肾的发病机制中起重要作用。体外试验证实,CTS 也参与尿毒症引起的心肌病中心肌肥大和纤维化过程^[8]。

3 强心甙类固醇作用于钠泵调节细胞内游离 Ca²⁺ 浓度

3.1 钙信号微结构域

强心甙类固醇作用于钠泵发挥信号转导存在几种机制,重要一点即是引起细胞内 Ca²⁺ 浓度改变,激活多条信号转导通路。钙离子为细胞内的第二信使,它对调节肌肉收缩、细胞分泌、受精、增殖和凋亡等有着重要作用。上述作用的精密调控主要在胞膜窖(caveolae)上的钙信号微结构域完成^[9]。例如在心肌细胞, T 管和肌浆网可以形成二聚连接体,该二聚体可以刺激大量钙离子从肌浆网上释放导致肌肉收缩^[4]。胞膜窖是一种特殊形式的脂质筏结构,当窖蛋白(caveolin)和脂筏中的胆固醇作用而整合到脂筏中,脂筏就会弯曲内陷形成囊状的胞膜窖。与信号

转导有关的受体、激酶及衔接蛋白等在胞膜窖区域中高度富集。胞膜窖上富含钠泵, Wang 等^[9]用共焦显微镜观察到钠泵在胞膜窖中积聚,并介导信号传导。多种 G 蛋白偶联受体和受体型酪氨酸激酶也位于胞膜窖上。钙离子信号微结构域能使 IP3Rs 更接近质膜受体, Xiao 等^[10]发现神经元细胞中配体激活受体后,缓激肽受体 B2 和 IP3Rs 之间的偶联作用可以产生钙离子信号。

哇巴因等强心甙类固醇能抑制钠泵活性,导致细胞内 K⁺ 下降,胞内 Na⁺ 积聚,引起膜去极化,胞膜电压调控 Ca²⁺ 通道激活, Na⁺-Ca²⁺ 交换体启动,使胞内游离 Ca²⁺ 升高;其次,钠泵通过蛋白质-蛋白质相互作用介导信号途径如 MAPK 激活 L 型 Ca²⁺ 通道蛋白磷酸化,导致 Ca²⁺ 内流。哇巴因等强心甙类固醇还可激活 L 型钙离子通道,从而刺激钙离子从肌浆网和内质上释放。

3.2 钠泵和肌醇三磷酸受体之间相互作用引起慢钙震荡

IP3Rs 是一种 IP3 调控的钙离子通道。它可以调节细胞增殖、分化、凋亡、行为和记忆等功能。刺激 G 蛋白偶联受体或者受体型酪氨酸激酶,可在胞膜募集并激活磷脂酶 C-β 或磷脂酶 C-γ。激活的 PLC 可催化 PIP2 转化为第二信使 IP3,进而打开 IP3Rs。IP3R 含有 COOH 端和具有的调节作用的 NH₂ 端。其 NH₂ 端可以与离子通道、蛋白激酶、磷酸酶和结构蛋白等相互作用,不仅可通过蛋白激酶级联反应调节受体功能,也调节这些相互作用蛋白的功能。例如,IP3R 可以和肌醇-1,4,5-三磷酸受体结合蛋白(IRBIT)相结合,IP3R 可以使后者处于失活状态。IP3 与 IP3R 结合后可以改变后者构型,从而使 IRBIT 脱离 IP3R,进而激活 Na/HCO₃ 共转运体。

Aperia 等^[11]用 GST-pull down、免疫共沉淀的方法发现肾小管上皮细胞钙离子震荡时钠泵 α 亚单位 NH₂ 末端和 IP3R 的 N 端 1~604 位氨基酸存在相互作用。哇巴因能诱导肾外髓细胞、海马星状细胞等发生钙离子震荡^[12],此时钠泵和内质网上 IP3Rs 共纯化,而不同程度敲除钠泵 α1 亚单位可使哇巴因诱导的钙离子释放减少,重新转入 α1 亚单位能逆转上述改变^[10],说明钠泵和 IP3R 的相互作用对于哇巴因诱导细胞钙存库释放 Ca²⁺ 产生慢钙震荡具有关键作用^[13]。IP3Rs 的 N 端含抑制结构域(1~225 位氨基酸)和 IP3 结合结构域(226~579 位氨基酸)两个功能单位,其 IP3R1~343 位氨基酸能与钠泵 α 亚基 A 结构域 N 端

富含赖氨酸的 LKK 模体结合。尽管不同亚型钠泵 α 亚基的 N 端富于变化, 但 LKK 模体序列在不同种类的细胞高度保守, 其对于钠泵结合到 IP3R 十分重要^[14]。胞膜窖内钠泵和 IP3Rs 之间的相互作用使 IP3Rs 和其它胞膜受体在空间上接近形成微结构域, 哇巴因与钠泵结合后改变后者 A 结构域构象, 进而改变 IP3R 构象导致 IP3R 的门控特性改变, 即在不依赖 IP3 经典途径下影响钙离子浓度。研究表明抑制磷脂酶 C 或减少 IP3 不影响哇巴因诱导肾上皮细胞产生钙离子震荡^[13]。

Aperia 等^[11]还发现哇巴因诱导产生的低频率钙离子震荡在 4 分钟(COS-7 细胞)~5 分钟(RPT 细胞)后可以激活 NF- κ B 途径, 从而使肾小管上皮细胞避免发生“营养不良”诱导的凋亡。当 ER 储存库上钙离子耗竭, 或者加入 NF- κ B 抑制剂, 哇巴因就不能保护细胞避免发生凋亡^[15]。

3.3 钠泵和钠钙交换体之间的作用

钠泵调节钙离子浓度另一重要机制是通过位于钙离子信号微结构域的 Na/Ca 交换体(NCX)发挥作用的。NCX 可以和钠泵偶联, 将细胞外钠离子泵入细胞内, 同时将细胞内钙离子泵出^[11,16]。NCX 的活性由局部的 Na^+ 和 Ca^{2+} 浓度调节。哇巴因与钠泵结合, 可间接抑制 NCX 影响 Ca^{2+} 浓度^[17]。Blaustein 等认为, 哇巴因与钠泵结合可以抑制钠离子泵出, 使钙离子信号微结构域附近 Na^+ 浓度升高, 抑制位于该结构域的 NCX, 继发引起钙离子泵出减少或者泵入增加, 从而增加胞内钙离子。Edwards 和 Pallone^[2]最近设计了一种数学模型来模拟钙离子信号转导证实了该设想。这一结论也在心肌细胞上得到了证明。抑制钠泵功能可以增加细胞(特别是高表达 Na/Ca 交换体的心肌细胞)内 Ca^{2+} 离子浓度。Fredrik 等^[18]发现慢性心衰时, 抑制心肌细胞钠泵的 $\alpha 2$ 亚基可以减弱 Na/Ca 交换体的活性, 进而增加心肌细胞内 Ca^{2+} 离子浓度, 敲除心肌细胞 Na/Ca 交换体可减弱哇巴因诱导的心肌收缩增强。不同类型细胞的 NCX 可以和钠泵不同亚型相互作用形成钙离子信号微结构域, 例如平滑肌细胞和星状细胞的 NCX 与钠泵的 $\alpha 2$ 和 $\alpha 3$ 亚基相互作用形成信号结构域, 心肌细胞 $\alpha 1$ 亚基和 NCX 相结合调节钙离子信号。

3.4 钠泵 /Src 复合物

Xie 等^[19]发现钠泵和 Src 共同存在于肾上皮细胞的胞膜窖(caveolae)上, 该钠泵/Src 复合物在钠泵信号转导中起着重要作用。哇巴因与钠泵结合后可以通

过激活 Src 激酶引起 IP3Rs 酪氨酸磷酸化, 进而增加细胞内 Ca^{2+} 浓度, 并激活下游 Ras/Raf/MEK/ERK 蛋白级联反应^[5]。抑制 Src 可以减弱哇巴因诱导的钙离子震荡。PLC- γ 能和钠泵 /Src 复合物能免疫共沉淀, GST pull-down 方法发现钠泵 $\alpha 1$ 亚单位的中心环可直接和 PLC- γ 相作用, 而钠泵 NH_2 端和 IP3Rs 相结合, 表明钠泵能发挥支架作用将 IP3Rs 和 PLC- γ 联系起来形成钙离子调节微结构域, 促进哇巴因诱导激活钠泵 /Src 受体复合物后钙离子的释放。

4 小结与展望

近年来研究发现, 哇巴因强心甙类固醇等药物可以通过与普遍存在于细胞膜表面的钠泵相互作用调节细胞分化、增殖、凋亡, 从而为临床研究提出了一个新药靶点的思路^[16]。通过以上的综述发现, 哇巴因等药物可以在不影响钠泵泵功能、低于强心苷强心毒性作用的低浓度下改变钙离子浓度发挥信号转导的作用, 并对不同的细胞产生不同的效应: 对正常生理状态的细胞无影响, 在“营养不良”等病理情况下发挥抗凋亡作用, 而对肿瘤细胞产生促进凋亡的作用。最近通过用免疫荧光等方法表明^[7]细胞表面钠泵表达分布改变可能是哇巴因产生不同细胞效应的原因之一。有研究表明, 根据钙流震荡的频率和时间, 细胞会精细调节产生不同的效应, 所以钙离子震荡所产生的细胞信号具有多样性, 例如促凋亡蛋白细胞色素 C 可以通过和 IP3R 的 C 端相作用, 产生持续时间比哇巴因 - 钠泵作用后更长的钙离子震荡, 从而诱导细胞凋亡^[8]。以上试验结果多为体外实验, 体内多条信号通路相互情况下又是如何相互联系起来? 如何确定体内用药最佳浓度? 解答以上这些问题需要进行更深入的研究。

参考文献(References)

- 1 Morth JP, Pedersen BP, Toustrup-Jensen MS, Sorensen TL, Petersen J, Andersen JP, et al. Crystal structure of the sodium-potassium pump. *Nature* 2007; 450 (7172): 1043-9.
- 2 Edwards A, Pallone TL. Ouabain modulation of cellular calcium stores and signaling. *Am J Physiol Renal Physiol* 2007; 293 (5): F1518-32.
- 3 Sanchez G, Nguyen AN, Timmerberg B, Tash JS, Blanco G. The Na,K-ATPase alpha4 isoform from humans has distinct enzymatic properties and is important for sperm motility. *Mol Hum Reprod* 2006; 12 (9): 565-76.
- 4 Schoner W, Scheiner-Bobis G. Endogenous and exogenous cardiac glycosides: their roles in hypertension, salt metabolism, and cell growth. *Am J Physiol Cell Physiol* 2007; 293 (2): C509-36.

- 5 Li Z, Xie Z. The Na/K-ATPase/Src complex and cardiotonic steroid-activated protein kinase cascades. *Pflugers Arch* 2009; 457 (3): 635-44.
- 6 Xiao AY, Wei L, Xia S, Rothman S, Yu SP. Ionic mechanism of ouabain-induced concurrent apoptosis and necrosis in individual cultured cortical neurons. *J Neurosci* 2002; 22 (4): 1350-62.
- 7 Tian J, Li X, Liang M, Liu L, Xie JX, Ye Q, *et al.* Changes in sodium pump expression dictate the effects of ouabain on cell growth. *J Biol Chem* 2009; 284 (22): 14921-9.
- 8 Elkareh J, Kennedy DJ, Yashaswi B, Vetteth S, Shidyak A, Kim EG, *et al.* Marinobufagenin stimulates fibroblast collagen production and causes fibrosis in experimental uremic cardiomyopathy. *Hypertension* 2007; 49 (1): 215-24.
- 9 Wang H, Haas M, Liang M, Cai T, Tian J, Li S, *et al.* Ouabain assembles signaling cascades through the caveolar Na⁺/K⁺-ATPase. *J Biol Chem* 2004; 279 (17): 17250-9.
- 10 Tian J, Xie ZJ. The Na-K-ATPase and calcium-signaling microdomains. *Physiology (Bethesda)* 2008; 23: 205-11.
- 11 Aizman O, Uhlen P, Lal M, Brismar H, Aperia A. Ouabain, a steroid hormone that signals with slow calcium oscillations. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98 (23): 13420-4.
- 12 Liu XL, Miyakawa A, Aperia A, Krieger P. Na,K-ATPase generates calcium oscillations in hippocampal astrocytes. *Neuroreport* 2007; 18 (6): 597-600.
- 13 Miyakawa-Naito A, Uhlen P, Lal M, Aizman O, Mikoshiba K, Brismar H, *et al.* Cell signaling microdomain with Na, K-ATPase and inositol 1,4,5-trisphosphate receptor generates calcium oscillations. *J Biol Chem* 2003; 278 (50): 50355-61.
- 14 Zhang S, Malmersjo S, Li J, Ando H, Aizman O, Uhlen P, *et al.* Distinct role of the N-terminal tail of the Na,K-ATPase catalytic subunit as a signal transducer. *J Biol Chem* 2006; 281 (31): 21954-62.
- 15 Li J, Zelenin S, Aperia A, Aizman O. Low doses of ouabain protect from serum deprivation-triggered apoptosis and stimulate kidney cell proliferation via activation of NF-kappaB. *J Am Soc Nephrol* 2006; 17 (7): 1848-57.
- 16 Aperia A. New roles for an old enzyme: Na,K-ATPase emerges as an interesting drug target. *J Intern Med* 2007; 261 (1): 44-52.
- 17 Lytton J. Na⁺/Ca²⁺ exchangers: three mammalian gene families control Ca²⁺ transport. *Biochem J* 2007; 406 (3): 365-82.
- 18 Swift F, Birkeland JA, Tovsrud N, Enger UH, Aronsen JM, Louch WE, *et al.* Altered Na⁺/Ca²⁺-exchanger activity due to downregulation of Na⁺/K⁺-ATPase alpha2-isoform in heart failure. *Cardiovasc Res* 2008; 78 (1): 71-8.
- 19 Tian J, Cai T, Yuan Z, Wang H, Liu L, Haas M, *et al.* Binding of Src to Na⁺/K⁺-ATPase forms a functional signaling complex. *Mol Biol Cell* 2006; 17 (1): 317-26.

The Mechanism of Cardiac Glycosides Binding to Na-K-ATPase Influences the Intracellular Calcium: Research Advances

Yi Zeng¹, Juan Li², Jian Ouyang^{2*}

¹School of Medicine, Southeast University, Nanjing 210009, China; ²Department of Hematology, the Affiliated Drum Tower Hospital of Nanjing University Medical School, Nanjing 210008, China)

Abstract The Na-K-ATPase, or sodium pump, is an ubiquitous membrane protein expresses on the eukaryote cells. Studies over the past years have given us insights about its versatile physiological functions. In addition to regulate intracellular sodium and potassium concentration, it is also an important signal transducer that interacts with proteins. The cardiac glycosides(CTS) have been used to treat heart disease for many years. Recent studies have revealed that this old group drugs which bind to the Na-K-ATPase, can activate multiple intracellular signal transduction pathways. One of the significant results of these activations is to change the concentration of intracellular calcium, which plays an important role for the regulation of cell proliferation and apoptosis in diverse cells. This minireview tries to illustrate the mechanism of how CTS/Na-K-ATPase complex influences intracellular calcium concentration through the interaction with IP3R, Src and Na⁺/Ca⁺ exchange.

Key words Na-K-ATPase; cardiac glycosides (CTS); Calcium-Signaling Microdomains; inositol 1,4,5-trisphosphate (IP3) receptors (IP3Rs); Na⁺-Ca²⁺ exchanger(NCX); Na-K-ATPase / Src complex

Received: April 23, 2010 Accepted: September 28, 2010

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (No.30971511)

*Corresponding author. Tel: 86-25-83105211, Fax:86-25-83105211, E-mail: oy626@sina.com