

硝酰基 (HNO), 新一代心力衰竭治疗正性肌力药物

Ye Tian¹, Nazareno Paolucci², Wei Dong Gao^{3*}

1 引言

心力衰竭(HF)不仅对临床医生来说是一个巨大挑战,对当今社会来说也是一项沉重的经济负担。目前对严重心肌收缩力下降的临床治疗不是依赖器械支持,就是依赖传统的正性肌力药物,即通过提高细胞内Ca²⁺浓度来增强肌肉收缩力。然而,这些治疗方法会导致HF的预后较差。基因操作(如基因转移)或干细胞的使用为心力衰竭治疗提供了另一种可能性。到目前为止,基因治疗尚未成功^{**}。细胞再生技术还处于试验阶段,并伴随着风险和限制。同时,有关肌丝力生成调控的新知识彻底改变了我们探寻提高心肌收缩力新方法的思路。显然,肌丝蛋白的翻译后修饰(PTM)是心肌发展的重要调控机制。钙增敏剂是一类可提高一定量的Ca²⁺在生成肌力时的有效性的药物,目前已经成为研究的焦点[1]。从机制上讲,大部分钙增敏剂都通过让其自身进入调控蛋白的分子结构内来产生PTM,从而提高蛋白质对Ca²⁺的亲合性。但有些令人失望的是,这种PTM会提高心脏舒张期压力,因此会恶化HF中的舒张期功能障碍或导致心律失常。硝酰基(HNO)可以通过与收缩性蛋白质中重要的半胱氨酸残基作用改变蛋白质的氧化还原状态,并产生特定的PTM以提高心肌收缩力。HNO作为新型影响肌肉收缩的药物正在不断引起人们的兴趣。最近的研究表明,新型血管内的HNO供体CXL-1020可以显著提高患有心衰的狗的心肌收缩功能[2, 3],并且CXL-1020目前已经进入了I/II期临床试验^{**}。

2 HNO 是什么?

硝酰基或亚硝酰氢(HNO)是一氧化氮(NO[•])的单电子还原产物,有着与NO[•]截然不同的化学性质[4]。由于HNO的半衰期相对较短(< 2.7 min, 基于现有的生物缓冲系统中的HNO供体),目前还没有确定的方法可以在生物系统中明确检测出HNO的“足迹”。但有大量证据证明HNO在体外研究中生成,其中大部分生成途径是一氧化氮合酶(NOS)依赖性途径[5]。目前,HNO(通路)的内源生成机制仍不清楚;但是最近的一些证据表明,内源分子可以作为HNO生成的基质,使得其内源性生物合成更具可行性[5]。

3 HNO 发挥了怎样的强心作用?

Fukuto等[6]首次报告了HNO对心血管的作用,提出以Angeli盐(AS, Na₂N₂O₃)为供体的HNO可以通过sGC依赖性机制使兔子的主动脉和牛的肺内动脉舒张。在过去的几年中,笔者和其他同事一起研究了HNO的生物效应。Paolucci博士等[7]表明,在外周血管扩张时,HNO的应用会引起左心室收缩力的增强并伴随前负荷的降低。重要的是,HNO的正性肌力作用可以通过N-乙酰-L-半胱氨酸等硫醇供体化合物得到抑制[7],同时HNO在体内也显示出完全的cGMP受体和β受体的独立性[8]。

¹ Department of Pathophysiology, Harbin Medical University, Harbin 150086, China; ² Division of Cardiology, Department of Medicine, Johns Hopkins University School of Medicine, Baltimore, MD 21205, USA; ³ Department of Anesthesiology and Critical Care Medicine, Johns Hopkins University School of Medicine, Baltimore, MD 21205, USA

* Correspondence author. E-mail: wgao3@jhmi.edu

** <http://www.medscape.com/viewarticle/843901>

** <http://www.cardioxyl.com>

© The Author(s) 2015. Published by Engineering Sciences Press. This is an open access article under the CC BY license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>)

英文原文: Engineering 2015, 1(4): 401-404

引用本文: Ye Tian, Nazareno Paolucci, Wei Dong Gao. Nitroxyl, a New Generation of Positive Inotropic Agent for Heart Failure. *Engineering*, DOI 10.15302/J-ENG-2015118

3.1 HNO 在正常心脏兴奋收缩 (EC) 耦联中的作用

心肌收缩和心力生成是由膜动作电位的形成引发的, 可允许少量 Ca^{2+} 通过肌膜的电压依赖性 Ca^{2+} 通道(L型 Ca^{2+} 通道)进入肌细胞。这种进入过程会引发肌质网(SR)大量 Ca^{2+} 脉冲通过特定的 Ca^{2+} 门控通道(如兰尼碱受体(RyR2))释放。这种现象被称为 Ca^{2+} 引发的 Ca^{2+} 释放[9]。释放的 Ca^{2+} 会结合到肌钙蛋白C(TnC)上。 Ca^{2+} 结合在TnC的 NH_2 区单一位点, 从而引发该区域与COOH末端和肌钙蛋白I(TnI)中心区更强的结合[10]。这两种肌钙蛋白亚基之间的结合改变了它们的分子结构[11, 12], 并导致: TnI的抑制区(残基136~147)从其与F-肌动蛋白-原肌球蛋白(Tm)的相互作用位点上被释放, 减弱了TnI的C末端区与Tm的相互作用。因此, Tm离开肌动蛋白表面, 使得肌动蛋白上的肌球蛋白头部结合位点暴露出来, 进而导致肌肉收缩。

近期研究表明, HNO通过刺激 RyR2 增强心脏 Ca^{2+} 循环来提高SR的 Ca^{2+} 释放率, 而不是利用L型 Ca^{2+} 通道召回细胞外的 Ca^{2+} [13, 14]。有趣的是, 若要保持所引发的收缩力则需要激活SR的 Ca^{2+} -ATP酶2a(SERCA2a)活性。这是因为HNO通过受磷蛋白(PLN)中半胱氨酸的选择性修饰激活SERCA2a, 该激活方式与PLN作用的肾上腺素/蛋白激酶A依赖性抑制的移除类似[15]。笔者还证明, HNO在心肌中增强与 Ca^{2+} 有关的肌力是肌丝对 Ca^{2+} 应答增强的结果[16, 17]。相较于细胞内 Ca^{2+} 瞬变, 在固定的外部 Ca^{2+} 浓度下, HNO可以增加更多的肌力。因此, HNO是 Ca^{2+} 增敏剂。HNO对增加细胞内 Ca^{2+} 瞬变和肌丝 Ca^{2+} 应答的作用是协同的, 正如笔者近期在缺乏PLN的老鼠上进行的实验所示(实验结果尚未发表)。在分子水平上, HNO能够诱导半胱氨酸之间二硫键的形成。

这种正性肌力作用还可以被二硫苏糖醇(DTT)阻断或反转, 这进一步证明了HNO对氧化还原反应条件的敏感性。因此, HNO特异性修饰了收缩性蛋白质的氧化还原状态, 由此产生了正性肌力作用。这种作用与活性氧(ROS)对氧化还原状态的“调控”形成对照, 后者会导致心肌收缩力明显减弱[18~20]。HNO作用的另一个重要方面是它不会消耗谷胱甘肽[21]。

3.2 HNO 在衰竭心脏兴奋收缩耦联中的作用

心肌衰竭的一个显著特征是氧化应激升高[22, 23]。氧化应激升高(或“氧化还原状态失衡”)可导致决定充血性心力衰竭(CHF)发病和病情进展或与之相关的关键事件。这些事件包括兴奋收缩(EC)耦联改变、心肌细胞适应不良性肥大、细胞外基质重塑、组织能量异常、存

活心肌缺失、血管和毛细血管病变以及炎症。所有这些事情最终都会导致以心腔扩张和收缩力减弱为标志的心脏结构显著重构。值得注意的是衰竭心肌有两个明显变化: 在CHF中, β 肾上腺素系统(调节心肌力量以达到工作要求)由于受信号分子的 β 受体脱敏和解耦联作用的影响而下调[24]; 肌丝蛋白发生氧化, 并在HF的肌力下降中发生作用[20, 25~27]。这些蛋白质包括肌动蛋白、Tm和肌球蛋白轻链1(MLC1)。肌丝蛋白的氧化可导致羰基和蛋白质-蛋白质交联的形成[28]。由于心肌收缩力的减弱是可逆的且依赖于氧化还原反应, 受Tm-Tm和肌动蛋白-肌动蛋白二聚体形成的支持, 半胱氨酸残基成为HNO的主要靶点。

如上所述, HNO也作用于半胱氨酸, 并且具有类似的氧化还原依赖性和可逆性, 但却增加了心肌收缩力。那么HNO是否能够增强含有已氧化半胱氨酸残基的衰竭心肌的肌力呢? 答案是肯定的。在起搏诱导HF犬中, Paolucci等[8]成功证明了HNO可以将心肌收缩力和舒张力增强到与对照组相同的程度。此外, 当HNO与 β 受体激动剂(如多巴酚丁胺)同时服用时, 它们额外增加心肌收缩, 这与消弱多巴酚丁胺诱导功能增强的NO/亚硝酸盐相反。新型血管内HNO供体CXL-1020可以显著改善HF犬和HF患者的心肌收缩功能[29]。在HF小鼠模型分离的心肌中, HNO也可以直接提高肌力(相关数据尚未发表)。但是, HNO在氧化应激增强(或改变的氧化还原信号)引起的衰竭心肌中增强肌力的确切机制还需要进一步的探索。

4 作为独特的正性肌力药物, HNO 的未来研究方向

氧化还原状态的失衡已逐渐被认为是HF中心肌收缩力下降的主要作用机制。氧化的肌丝蛋白也在HF实验中被发现, 并且与心脏功能的下降有关。HNO在氧化应激状态下仍可增强收缩力, 这表明HNO具有特殊的作用机制, 并且受这些变化的影响很小。例如, 横桥动力学是否受氧化还原信号的调控是未知的。由于HNO通过氧化还原依赖性方式增强肌力, 揭示HNO影响横桥循环动力的机制十分重要。这类研究不仅能揭示心脏中HNO作用的分子机制, 还可以增进人们对肌动蛋白激活的肌球蛋白化学机械循环中PTM介导的调控的理解, 并且有助于产生肌力以及为肌力减弱、氧化应激升高和对其他传统强心药物治疗反应效果有限的所有HF患者设计治疗方案。

HNO研究的另一个领域是其对心脏舒张功能的影响。到目前为止,还没有研究关注过这个问题。但是,笔者实验室之前的研究已经指出,HNO不会改变舒张松弛和ATP酶活性。舒张功能受三个主要因素控制:细胞内Ca²⁺减少速率、细肌丝失活和横桥循环率。通过提高SERCA2a的活性,HNO可以促进Ca²⁺的摄取,从而提高细胞内Ca²⁺减少速率[13]。对HNO能否改变横桥循环率以使横桥产生的肌力在(肌动蛋白的)解离速度不变(或更快)的情况下(如肌肉舒张)更大这一问题的研究仍然受到广泛关注。

笔者之前的研究间接地证明了HNO对EC₅₀和F_{max}的增强至少在一定程度上依赖于其对肌丝收缩或调控蛋白中半胱氨酸残基的修饰作用[16, 17]。但是如果获得直接证据,只能通过利用丙氨酸代替关键半胱氨酸残基的方法。除此之外,根据笔者之前的研究,HNO还可修饰其他残基,如MyBPC中的Cyst 475 [17]。但是,这种修饰作用是偶然的还是与功能相关的依然未知。因此,目标半胱氨酸残基诱变的实验会在分子水平上为HNO肌丝肌动蛋白提供直接证据。

最后,尚没有研究对H₂O₂等内源性氧化物能否在预测生理学水平以不同的方式影响肌力形成且最终靶向作用位点进行测试。除此之外,HNO对HF的作用还应进一步在HF体内模型上进行研究,尤其是在最大Ca²⁺激活肌力显著下降的位置。

5 结语

在HF治疗中,旨在肌丝水平上生成更大肌力的治疗干预措施的药物可被归纳为三种:钙增敏剂、肌球蛋白激活剂和HNO供体。第一种药物可提高一定量的Ca²⁺在产生肌力时的有效性。多数钙增敏剂都是通过让其自身进入调控蛋白的分子结构内以产生PTM,从而提高蛋白质的Ca²⁺亲和性。但是,这种PTM会提高心脏舒张力,从而加剧HF中的舒张期功能障碍并导致心律失常。肌球蛋白激活剂是最近发现的可促进肌力生成并提高心脏舒张力的分子[30]。通过与收缩性蛋白质中关键半胱氨酸残基的相互作用,HNO供体代表了以氧化还原为基础的一类新药物,该类药物可以独立地提高心肌收缩力而不依赖于β肾上腺素的刺激,并且不改变舒张力也不消耗ATP。因此,HNO介导的PTM在HF的成功治疗中蕴含着巨大的潜力:由于HNO消耗了潜在的细胞内硫醇缓冲液且对ROS清除具有抵抗性,其功效可以持续甚至是增强。因此,这个以氧化还原为机制的独特的新型心肌收缩调节剂可为治疗HF患者制定新策略提供依据。

References

1. D. A. Kass, R. J. Solaro. Mechanisms and use of calcium-sensitizing agents in the failing heart. *Circulation*, 2006, 113(2): 305–315
2. M. Wang, R. Mazhari, I. Ilsar, A. Wang, M. S. Sabbah, H. N. Sabbah. Intravenous infusion of CXL-1020, a novel nitroxyl (HNO) donor, improves left ventricular systolic and diastolic function in dogs with advanced heart failure. *J. Card. Fail.*, 2009, 15(6 Suppl): S73–S74
3. S. Daya, R. Mazhari, R. S. Tunin, D. A. Kass. Intravenous infusion of novel HNO donor, CXL-1020, improves left ventricular contractile function in normal and failing dogs. *J. Card. Fail.*, 2009, 15(6 Suppl): S75
4. J. M. Fukuto, M. I. Jackson, N. Kaludercic, N. Paolucci. Examining nitroxyl in biological systems. *Meth. Enzymol.*, 2008, 440: 411–431
5. C. G. Tocchetti, et al. Playing with cardiac “redox switches”: The “HNO way” to modulate cardiac function. *Antioxid. Redox Signal.*, 2011, 14(9): 1687–1698
6. J. M. Fukuto, K. Chiang, R. Hsieh, P. Wong, G. Chaudhuri. The pharmacological activity of nitroxyl: A potent vasodilator with activity similar to nitric oxide and/or endothelium-derived relaxing factor. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 1992, 263(2): 546–551
7. N. Paolucci, et al. Nitroxyl anion exerts redox-sensitive positive cardiac inotropy *in vivo* by calcitonin gene-related peptide signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2001, 98(18): 10463–10468
8. N. Paolucci, et al. Positive inotropic and lusitropic effects of HNO/NO- in failing hearts: Independence from β-adrenergic signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2003, 100(9): 5537–5542
9. A. Fabiato. Calcium-induced release of calcium from the cardiac sarcoplasmic reticulum. *Am. J. Physiol.*, 1983, 245(1): C1–C14
10. G. A. Krudy, Q. Kleerekoper, X. Guo, J. W. Howarth, R. J. Solaro, P. R. Rosevear. NMR studies delineating spatial relationships within the cardiac troponin I-troponin C complex. *J. Biol. Chem.*, 1994, 269(38): 23731–23735
11. Q. Kleerekoper, J. W. Howarth, X. Guo, R. J. Solaro, P. R. Rosevear. Cardiac troponin I induced conformational changes in cardiac troponin C as monitored by NMR using site-directed spin and isotope labeling. *Biochemistry*, 1995, 34(41): 13343–13352
12. W. J. Dong, J. M. Robinson, S. Stagg, J. Xing, H. C. Cheung. Ca²⁺-induced conformational transition in the inhibitory and regulatory regions of cardiac troponin I. *J. Biol. Chem.*, 2003, 278(10): 8686–8692
13. C. G. Tocchetti, et al. Nitroxyl improves cellular heart function by directly enhancing cardiac sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ cycling. *Circ. Res.*, 2007, 100(1): 96–104
14. M. J. Kohr, et al. Nitroxyl enhances myocyte Ca²⁺ transients by exclusively targeting SR Ca²⁺-cycling. *Front. Biosci. (Elite Ed.)*, 2010, E2(2): 614–626
15. J. P. Froehlich, et al. Phospholamban thiols play a central role in activation of the cardiac muscle sarcoplasmic reticulum calcium pump by nitroxyl. *Biochemistry*, 2008, 47(50): 13150–13152
16. T. Dai, et al. Nitroxyl increases force development in rat cardiac muscle. *J. Physiol. (Lond.)*, 2007, 580(3): 951–960
17. W. D. Gao, et al. Nitroxyl-mediated disulfide bond formation between cardiac myofibrillar cysteines enhances contractile function. *Circ. Res.*, 2012, 111(8): 1002–1011
18. N. G. MacFarlane, D. J. Miller. Depression of peak force without altering calcium sensitivity by the superoxide anion in chemically skinned cardiac muscle of rat. *Circ. Res.*, 1992, 70(6): 1217–1224
19. W. D. Gao, Y. Liu, E. Marban. Selective effects of oxygen free radicals on excitation-contraction coupling in ventricular muscle. Implications for the mechanism of stunned myocardium. *Circulation*, 1996, 94(10): 2597–2604
20. M. Canton, et al. Oxidative modification of tropomyosin and myocardial dysfunction following coronary microembolization. *Eur. Heart J.*, 2006, 27(7): 875–881
21. N. Paolucci, et al. The pharmacology of nitroxyl (HNO) and its therapeutic poten-

- tial: Not just the Janus face of NO. *Pharmacol. Ther.*, 2007, 113(2): 442–458
22. F. J. Giordano. Oxygen, oxidative stress, hypoxia, and heart failure. *J. Clin. Invest.*, 2005, 115(3): 500–508
23. M. Seddon, Y. H. Looi, A. M. Shah. Oxidative stress and redox signalling in cardiac hypertrophy and heart failure. *Heart*, 2007, 93(8): 903–907
24. G. W. Dorn II. Adrenergic signaling polymorphisms and their impact on cardiovascular disease. *Physiol. Rev.*, 2010, 90(3): 1013–1062
25. J. G. Duncan, R. Ravi, L. B. Stull, A. M. Murphy. Chronic xanthine oxidase inhibition prevents myofibrillar protein oxidation and preserves cardiac function in a transgenic mouse model of cardiomyopathy. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, 2005, 289(4): H1512–H1518
26. J. van der Velden. Functional significance of myofilament protein oxidation. *Eur. Heart J.*, 2006, 27(7): 764–765
27. Z. Hertelendi, et al. Oxidation of myofilament protein sulfhydryl groups reduces the contractile force and its Ca²⁺ sensitivity in human cardiomyocytes. *Antioxid. Redox Signal.*, 2008, 10(7): 1175–1184
28. E. R. Stadtman, R. L. Levine. Free radical-mediated oxidation of free amino acids and amino acid residues in proteins. *Amino Acids*, 2003, 25(3–4): 207–218
29. H. N. Sabbah, et al. Nitroxyl (HNO): A novel approach for the acute treatment of heart failure. *Circ. Heart Fail.*, 2013, 6(6): 1250–1258
30. F. I. Malik, et al. Cardiac myosin activation: A potential therapeutic approach for systolic heart failure. *Science*, 2011, 331(6023): 1439–1443