

塞来昔布对心脏钠离子通道 $\text{Na}_v 1.5$ 电生理特性的影响

孙健芳¹, 徐艺珈², 王占友¹

(1. 东北大学 生命科学与健康学院, 辽宁 沈阳 110169; 2. 沈阳药科大学 生命科学与生物制药学院, 辽宁 沈阳 110016)

摘 要: 针对塞来昔布对与心脏毒性密切相关的钠离子通道 $\text{Na}_v 1.5$ 电生理特性的影响进行了研究. 采用全细胞膜片钳技术, 检测塞来昔布对 $\text{Na}_v 1.5$ 的电生理特性的影响, 包括电流峰值、电压依赖性激活、电压依赖性失活以及恢复动力学. 研究表明, 塞来昔布对 $\text{Na}_v 1.5$ 的峰电流具有抑制作用, 且呈浓度依赖性, 其抑制作用的 IC_{50} 值为 $1.54 \times 10^{-8} \text{ mol/L}$; 塞来昔布促进了 $\text{Na}_v 1.5$ 的激活及失活过程, 使其难以恢复到静息状态. 塞来昔布对 $\text{Na}_v 1.5$ 峰电流的明显抑制作用, 表明其潜在的的心脏风险可能与 $\text{Na}_v 1.5$ 密切相关.

关 键 词: 塞来昔布; 心血管风险; 全细胞膜片钳; $\text{Na}_v 1.5$; 电生理特性

中图分类号: Q 513

文献标志码: A

文章编号: 1005-3026(2019)03-0452-05

Effect of Celecoxib on Electrophysiological Property of Cardiac Sodium Channel $\text{Na}_v 1.5$

SUN Jian-fang¹, XU Yi-jia², WANG Zhan-you¹

(1. School of Life and Health Sciences, Northeastern University, Shenyang 110169, China; 2. School of Life Sciences and Biopharmaceutical Science, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China. Corresponding author: WANG Zhan-you, E-mail: wangzy@cmu.edu.cn)

Abstract: The effect of celecoxib on electrophysiological property of $\text{Na}_v 1.5$ was studied, which was associated with cardiac toxicity. The effects of celecoxib on the electrophysiological properties of $\text{Na}_v 1.5$, including peak current, voltage-dependent activation, voltage-dependent inactivation and recovery kinetics, were investigated by whole cell patch clamp technique. The results showed that celecoxib inhibited the peak currents of $\text{Na}_v 1.5$ in a concentration-dependent manner with a calculated IC_{50} value of $1.54 \times 10^{-8} \text{ mol/L}$. Moreover, celecoxib promoted the activation and inactivation phase of $\text{Na}_v 1.5$, making it somewhat difficult to recover from the inactivation to the resting state. The prominent inhibition of celecoxib on $\text{Na}_v 1.5$ indicated that there might be a close relationship between potential cardiovascular risks and $\text{Na}_v 1.5$.

Key words: celecoxib; cardiovascular risk; whole cell patch clamp; $\text{Na}_v 1.5$; electrophysiological property

环氧化酶(cyclooxygenase, COX)又称前列腺素内氧化酶还原酶,是一种双功能酶,同时具有环氧化酶和过氧化氢酶的活性. 目前发现的环氧化酶共有两种:环氧化酶1(COX-1)和环氧化酶2(COX-2). 其中,COX-1主要分布于血管、胃和肾等组织中,参与血小板的聚集、血管的舒缩以及肾血流的调节,维持细胞及组织稳态;COX-2

在正常组织细胞中的活性极低,然而,当细胞受到炎症等刺激时,COX-2在炎症细胞中的表达水平则明显升高,可达到正常水平的10~80倍,从而导致炎症反应和组织损伤. 因此,特异性的COX-2抑制剂是良好的抗炎药物,在临床上被广泛应用. 然而,由于2004年美国默沙东公司对罗非昔布的撤回,人们对这类抗炎镇痛药的不良

反应更加重视. 塞来昔布是一种特异性 COX - 2 抑制剂, 主要用于治疗骨关节炎、风湿性关节炎、关节痛、术后痛、经期痛等, 与其他非甾体抗炎药相比, 塞来昔布具有较低的胃肠道毒性, 因此被广泛应用^[1]. 然而, 随着塞来昔布的广泛应用, 与其有关的不良反应也愈来愈受到重视, 如心血管风险、心肌梗塞及中风等^[2].

除了环氧化酶, 塞来昔布还作用于细胞的其他靶点, 如电压门控钠离子通道 (voltage-gated sodium channels, VGSCs)^[3]. 电压门控钠离子通道广泛存在于人体中, 参与动作电位的产生与传导, 维持细胞稳态, 是一种极其重要的跨膜蛋白. VGSCs 由一个 α 亚基 (230 ~ 260 kDa) 和一个或多个 β 亚基 (33 ~ 36 kDa) 组成, 其中 α 亚基和 β 亚基通过二硫键或非共价键相连接. α 亚基是其主要的功能性亚基, 是由约 2 000 个氨基酸残基组成的跨膜糖基化蛋白, 跨膜部分由 4 个高度相似的同源结构域组成 (Domain 1 ~ Domain 4, DI ~ DIV), 每个结构域包含 6 个跨膜片段 (S1 ~ S6), 每个跨膜片段呈放射状围绕着通道孔排列. 其中, S5 ~ S6 以及二者之间的片段 SS1 和 SS2 形成了跨膜孔道结构的外庭, S4 片段被认为是 VGSCs 的电压敏感元件, 其氨基酸序列高度保守. β 亚基不参与构成 VGSCs 的孔状结构, 主要是对 α 亚基的表达、电压依赖性、动力学以及稳定性等起到一定的调节作用^[4-5]. 目前, 人类的 VGSCs 的 α 亚基已发现至少 9 种, 分别命名为 $\text{Na}_v1.1 \sim \text{Na}_v1.9$, 由 9 种不同的基因编码 (SCN1A ~ SCN5A, SCN8A ~ SCN11A), 具有高度的同源性及组织特异性. 其中, $\text{Na}_v1.1$, $\text{Na}_v1.2$, $\text{Na}_v1.3$ 及 $\text{Na}_v1.6$ 主要分布在中枢神经系统 (central nervous system, CNS); $\text{Na}_v1.4$ 主要分布在骨骼肌细胞; $\text{Na}_v1.5$ 主要分布在心脏; $\text{Na}_v1.7$, $\text{Na}_v1.8$ 及 $\text{Na}_v1.9$ 主要分布在外周神经系统 (peripheral nervous system, PNS). VGSCs 主要分布在心肌、骨骼肌、神经细胞膜上, 负责调控动作电位的初始上升相. VGSCs 在轴突和肌肉中的分布最为密集, 常常是该组织中数量最多的离子通道. 以哺乳动物的心肌细胞为例, 每个心肌细胞表达的 VGSCs 可达到十万多个, 每个浦肯野纤维表达的 VGSCs 可达到一百多万个, 通过心脏 VGSCs 的离子流直接决定着心房肌、浦肯野纤维和心室肌的兴奋性和传导性.

鉴于心脏钠离子通道在心脏电兴奋性中的重要作用, 其功能获得性及功能缺失性的突变均会导致一系列心脏相关疾病的产生与发展, 如长

QT 综合征 (long-QT syndrome, LQTS), Brugada 综合征 (Brugada syndrome, BrS), 病态窦性综合征 (sick sinus syndrome, SSS), 进行性心脏传导疾病 (progressive cardiac conduction disease, PCCD) 和扩张型心肌病 (dilated cardiomyopathy, DCM) 等^[6-10]. 在人类和小鼠的心脏中可不同程度地检测到 $\text{Na}_v1.1 \sim \text{Na}_v1.5$ 通道的表达^[11], 其中, 位于染色体 3p21 由 SCN5A 编码的 $\text{Na}_v1.5$ 的表达最为丰富, 遍布于所有类型的心肌细胞, 包括窦房结、传导系统、心房肌和心室肌, 定位于所有的亚细胞膜结构, 如闰盘区、外质膜和 T 管系统等, 对心肌细胞兴奋的产生及传导具有重要的意义. 在人及猪的全心脏中, $\text{Na}_v1.5$ 的表达明显高于其在小鼠及大鼠全心脏中的表达, 说明越高级的哺乳动物心脏中 $\text{Na}_v1.5$ 占据的比例越高, 起到的作用也越重要. 在 SCN5A 基因敲除的小鼠中, SCN5A^{-/-} 的小鼠心室形态发生严重缺陷, 导致了宫内致死; SCN5A^{+/-} 的小鼠会正常存活, 但是存在心脏缺陷, 如房室传导阻滞、心肌内传导延迟、室性心动过速等. $\text{Na}_v1.5$ 决定了心脏的兴奋性, 是目前公认的表达最丰富也最为重要的心脏钠离子通道.

本研究针对塞来昔布对与心脏毒性密切相关的钠离子通道 $\text{Na}_v1.5$ 的电生理特性的影响进行分析. 采用全细胞膜片钳技术, 检测塞来昔布对 $\text{Na}_v1.5$ 的电生理特性的影响, 包括电流峰值、电压依赖性的激活、电压依赖性的失活, 以及恢复动力学. 初步检测其潜在的心脏风险与 $\text{Na}_v1.5$ 的相关性, 对有潜在心脏毒性风险的药物在临床上安全应用具有重要的理论意义.

1 材料和方法

1.1 材料

- 1) 细胞: CHO - h $\text{Na}_v1.5$.
- 2) 试剂: FBS (Gibco, Lot 1715753); IMDM Medium (Gibco, Lot 8116139); HT Supplement (Gibco, Lot 1176570); L - Glutamax (Gibco, Lot 1677467); DMSO (Sigma, Lot RNBC1952); Celecoxib (MCE, Lot 19552); 0.25% Trypsin - EDTA (Gibco, Lot 1858331); Hepes (Sigma, Lot SLBK4457V); NaCl (Sigma, Lot SLBF7626V); KCl (Sigma, Lot SLBH5524V); MgCl_2 (Sigma, Lot SLBJ0767V); CaCl_2 (Sigma, Lot SLBK1794V); NaOH (Sigma, Lot RNBD4782); Glucose (Sigma, Lot SLBK7372V).

3) 溶液: 细胞外液 (mmol/L: 100 Hepes, 140 NaCl, 5 Glucose, 4 KCl, 2 CaCl₂, 1 MgCl₂, pH 7.4); 细胞内液 (mmol/L: 20 EGTA, 10 Hepes, 10 NaCl, 50 CsCl, 60 CsF, pH 7.2); 封接液 (mmol/L: 10 Hepes, 80 NaCl, 3 KCl, 35 CaCl₂, 10 MgCl₂, pH 7.4).

1.2 方法

0.25% Trypsin - EDTA 溶液消化细胞后, 1 000 r/min 离心 2 min 后弃上清, 加入细胞外液. 启动膜片钳刺激程序, 控制电位为 -80 mV, 刺激电压从 -80 mV 到 80 mV, 间隔为 10 mV, 记录加入不同浓度塞来昔布前后的电流峰值及反转电位, 绘制电压电流曲线及激活曲线. 控制电位为 -80 mV, 预刺激电压持续 30 ms, -100 mV 到 20 mV, 间隔为 5 mV, 之后进行持续 20 ms 的 -20 mV 的刺激, 分别记录每次刺激的电流峰值, 绘制失活曲线. 控制电位为 -80 mV, 预刺激电压为 -20 mV, 时间持续 200 ms, 之后再次回到 -80 mV, 持续 2 ms, 间隔 3 ms, 之后再次给予 -20 mV 的刺激, 持续 10 ms. 分别记录预刺激峰电流值和刺激电压电流峰值, 绘制恢复曲线^[12].

1.3 统计学处理

数据均为: 平均值 ± 标准误差 (Mean ± SEM), 应用 SPSS(13.0 版) 统计软件进行数据处理分析, 数据统计均使用单因素方差分析. 结果图均使用 GraphPad Prism 5 进行绘图, 应用非线性回归方程计算 IC₅₀ 值.

2 实验结果

2.1 塞来昔布对 Na_v1.5 电流峰值的影响

膜片钳的钳夹电位为 -80 mV, 给予从 -80 mV 到 80 mV 的电压刺激, 记录电流, 绘制电流 - 电压曲线. 如图 1 所示, 100 nmol/L 的塞来昔布对 Na_v1.5 电流曲线具有明显的抑制作用, 使 Na_v1.5 的电流峰值抑制了 62.8%; 当给予 10 pmol/L ~ 10 μmol/L 的塞来昔布时, 发现不同浓度的塞来昔布对 Na_v1.5 的电流峰值具有抑制作用, 且呈浓度依赖性, 其抑制作用的 IC₅₀ 值为 1.54 × 10⁻⁸ mol/L.

2.2 塞来昔布对 Na_v1.5 激活及失活的影响

与对照组相比, 100 nmol/L 塞来昔布使 Na_v1.5 的电压依赖性的激活曲线向复极化的方向移动 (左移), 使激活曲线的 V_{1/2} 值减小了 2.6 mV, 说明其对 Na_v1.5 的激活起到了促进作

用; 与对照组相比, 100 nmol/L 的塞来昔布使 Na_v1.5 的失活曲线同样向复极化的方向移动, 其失活曲线的 V_{1/2} 减小了 5.7 mV, 说明其对 Na_v1.5 的失活过程具有促进作用, 结果如图 2 所示. 电压依赖性的激活及失活曲线的动力学参数如表 1 所示.

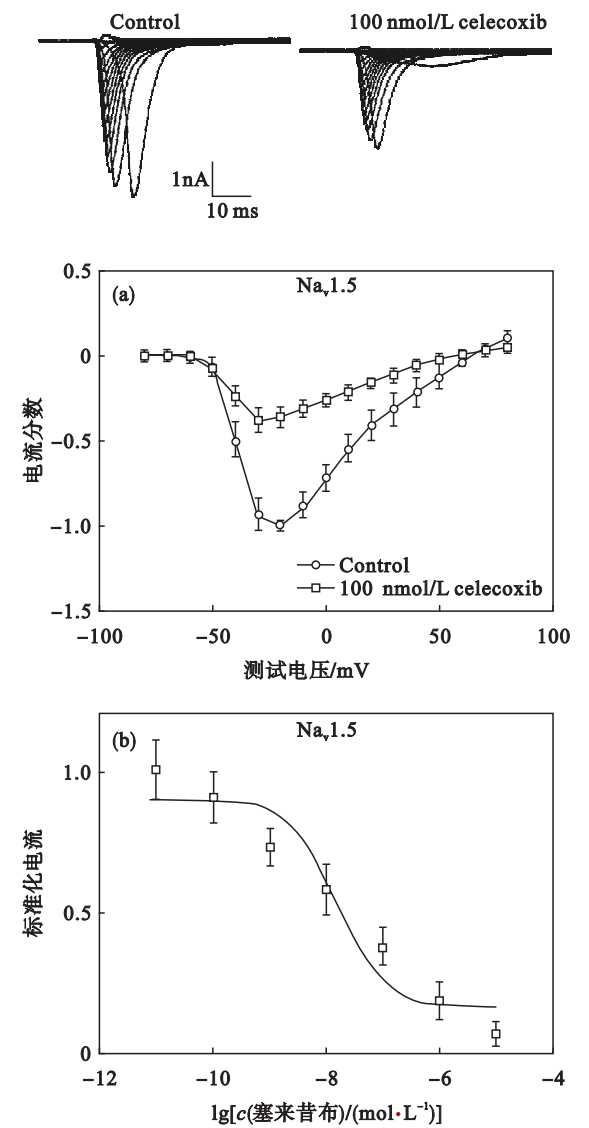


图 1 塞来昔布对 Na_v1.5 电流峰值的影响
Fig. 1 Inhibitory effect of celecoxib on the peak currents of Na_v1.5
(a)—电流 - 电压曲线; (b)—浓度依赖曲线.

2.3 塞来昔布对 Na_v1.5 恢复的影响

与对照组相比, 100 nmol/L 的塞来昔布使 Na_v1.5 的恢复曲线向右移动, 恢复时间常数增加了 2.5 ms, 并且使 Na_v1.5 的恢复曲线恢复到正常状态的百分比有所下降, 说明塞来昔布会使 Na_v1.5 在一定程度上难以恢复到静息状态, 结果如图 3 所示, 恢复动力学参数如表 1 所示.

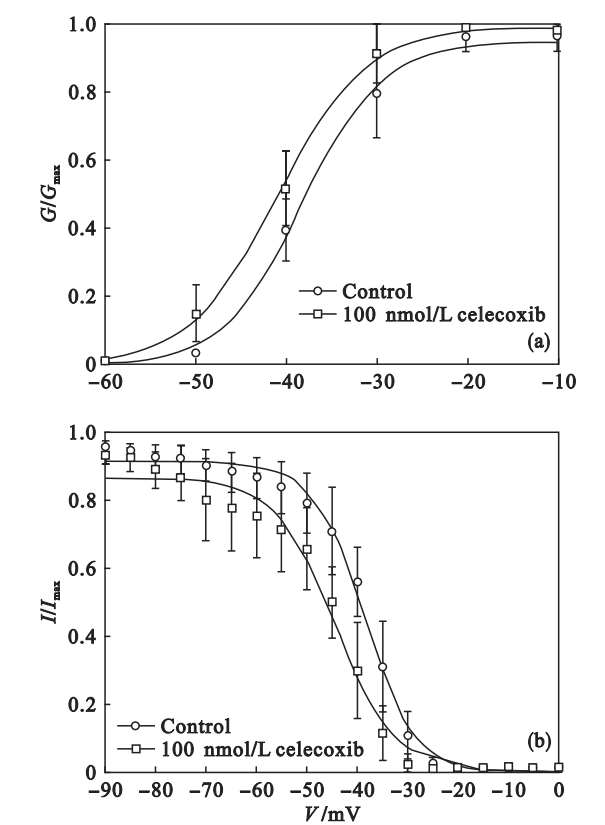


图2 塞来昔布对 $\text{Na}_v1.5$ 激活及失活曲线的影响
Fig. 2 Effects of celecoxib on the activation/inactivation kinetics of $\text{Na}_v1.5$
(a)—激活; (b)—失活.

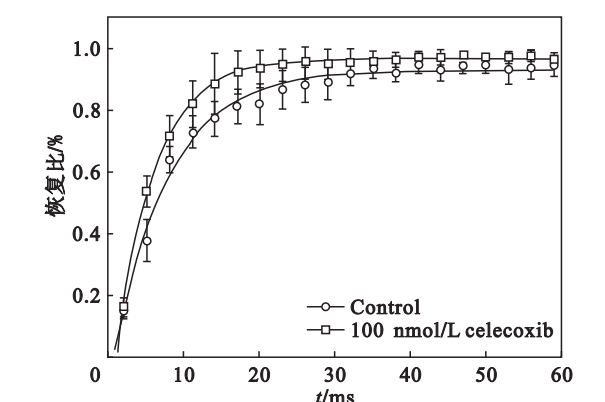


图3 塞来昔布对 $\text{Na}_v1.5$ 恢复曲线的影响
Fig. 3 Effects of celecoxib on the recovery from the inactivation of $\text{Na}_v1.5$

表1 塞来昔布对 $\text{Na}_v1.5$ 动力学及恢复参数的影响
Table 1 Effects of celecoxib on the kinetic and recovery properties of $\text{Na}_v1.5$

过程	变量	对照组	100 nmol·L ⁻¹ celecoxib
激活	$V_{1/2}/\text{mV}$	-38.27 ± 0.58	-40.83 ± 0.44
	k	4.47 ± 0.54	4.86 ± 0.42
失活	$V_{1/2}/\text{mV}$	-38.46 ± 0.47	$-44.15 \pm 0.81^*$
	k	5.10 ± 0.41	5.36 ± 0.64
恢复	t/ms	5.09 ± 0.59	$7.54 \pm 0.51^*$

注: * 表示 $P < 0.05$.

3 讨 论

环氧化酶抑制剂一直是临床上广泛应用的抗炎镇痛药物,然而,美国默沙东公司在项研究中发现,长期服用较高剂量的罗非昔布会导致心脏病及中风的发生概率较高,心血管风险较大,因此,美国默沙东公司于2004年对罗非昔布实行了全球撤回.

如今,鉴于塞来昔布较好的抗炎镇痛疗效以及其较低的胃肠道毒性^[1],其作为另一个昔布类的抗炎镇痛药仍被广泛应用. 尽管塞来昔布与罗非昔布同属于昔布类的药物,然而,二者的结构却大不相同,最明显的一点即为塞来昔布是磺胺类药物,而罗非昔布则为磺类药物(图4). 同时,有研究报道了塞来昔布与罗非昔布的三大差异. 第一,含芳香磺胺基的塞来昔布与碳酸酐酶结合力较强,具有轻微利尿作用,而含甲磺基团的罗非昔布则不具有这一作用^[13];第二,塞来昔布主要经细胞色素 P450 2C9 代谢,有三种代谢产物,醇、相应的羧酸和葡萄糖苷酸结合物,而罗非昔布则经细胞质还原作用代谢,因此,有研究者认为罗非昔布可与醛固酮竞争胞质还原酶,最终导致心血管风险^[14];第三,罗非昔布会促进脂蛋白颗粒的氧化损伤,从而可能导致动脉粥样硬化,而塞来昔布则没有这一特点.

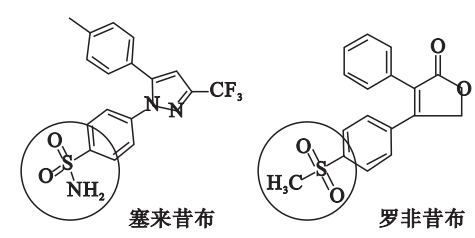


图4 塞来昔布与罗非昔布结构对比图
Fig. 4 Structure comparison of celecoxib and rofecoxib

塞来昔布是特异性的 COX - 2 抑制剂,有研究显示其对 COX - 2 的选择性是 COX - 1 的 30 倍,明显高于其他临床上常见的非甾体抗炎药,如布洛芬、萘普生、美洛昔康、尼美舒利等. 在动物炎性模型实验中,塞来昔布表现出良好的抗炎镇痛活性. 塞来昔布的临床有效性及安全性已得到证实,然而,对于其的药理作用及安全性研究仍在继续,更是由于罗非昔布事件,塞来昔布的心血管风险也进一步受到了大众广泛的关注. 有研究发现,塞来昔布可以抑制心脏钾离子通道 $\text{K}_v1.5$, $\text{K}_v4.3$, $\text{K}_v7.1$ 以及 hERG 的电流^[15-16],这可能与其心血管风险具有一定的相关性. 同时,还有研究

发现塞来昔布可以抑制大鼠背根神经节神经元上的钠电流,这可能是其镇痛机制之一^[3].而电压门控钠离子通道 α 亚基的各亚型之间具有较高的同源性,因此,塞来昔布对钠离子通道的其他亚型也可能具有一定程度的抑制作用.其中,表达在心脏中的 $\text{Na}_v1.5$ 对心肌细胞兴奋的产生及传导具有重要的意义,同时与很多心脏疾病的发生和发展密切相关.

因此,本文检测了塞来昔布对 $\text{Na}_v1.5$ 的作用.结果发现,塞来昔布可以明显抑制 $\text{Na}_v1.5$ 的电流峰值,这说明塞来昔布的心血管风险很可能与其对 $\text{Na}_v1.5$ 的抑制作用具有相关性.在通道动力学上,100 nmol/L 的塞来昔布对 $\text{Na}_v1.5$ 的动力学也产生了影响,其促进了 $\text{Na}_v1.5$ 的电压依赖性的激活、失活,使 $\text{Na}_v1.5$ 通道更易开放及关闭.100 nmol/L 的塞来昔布使 $\text{Na}_v1.5$ 的恢复曲线难以恢复到静息状态.这些结果进一步说明了塞来昔布对 $\text{Na}_v1.5$ 具有一定的影响,可能是其产生心脏风险的重要靶点之一.

尽管塞来昔布具有一定的心血管风险,然而这是建立在长时间以及较高的使用剂量的前提下.近些年,有研究还发现塞来昔布除了具有抗炎镇痛的药理活性外,还具有增强免疫及抗肿瘤的活性.塞来昔布可以诱导宫颈癌细胞的凋亡^[17],并且还可以有效抑制肝癌细胞的生长和血管生成^[18].因此,尽管塞来昔布具有一定的心血管风险,其卓越的抗炎镇痛疗效、潜在的抗肿瘤药理活性以及其较高的消化道安全性均使其成为值得关注的药物.

4 结 论

塞来昔布可以抑制心脏钠离子通道 $\text{Na}_v1.5$ 的电流峰值,且呈剂量依赖性;100 nmol/L 的塞来昔布可以促进 $\text{Na}_v1.5$ 电压依赖性的激活及失活过程,使 $\text{Na}_v1.5$ 的恢复曲线难以恢复到静息状态.因此, $\text{Na}_v1.5$ 可能是塞来昔布产生心血管风险的靶点之一.

参考文献:

[1] Flower R J. The development of COX2 inhibitors [J]. *Nature Reviews Drug Discovery*,2003,2(3):179–191.
[2] Solomon S D, Wittes J, Finn P V, et al. Cardiovascular risk of celecoxib in 6 randomized placebo-controlled trials; the cross trial safety analysis [J]. *Circulation*,2008,117(16):

2104–2113.
[3] Park S Y, Kim T H, Kim H I, et al. Celecoxib inhibits Na^+ currents in rat dorsal root ganglion neurons [J]. *Brain Research*,2007,1148:53–61.
[4] Ekberg J, Adams D J. Neuronal voltage-gated sodium channel subtypes; key roles in inflammatory and neuropathic pain [J]. *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology*,2006,38(12):2005–2010.
[5] Payandeh J, Gamal El-Din T M, Scheuer T, et al. Crystal structure of a voltage-gated sodium channel in two potentially inactivated states [J]. *Nature*,2012,486(7401):135–139.
[6] Clancy C E, Tateyama M, Liu H, et al. Non-equilibrium gating in cardiac Na^+ channels: an original mechanism of arrhythmia [J]. *Circulation*,2003,107(17):2233–2237.
[7] Moreau A, Keller D I, Huang H, et al. Mexiletine differentially restores the trafficking defects caused by two brugada syndrome mutations [J]. *Frontiers in Pharmacology*, 2012,3:62.
[8] Veldkamp M W, Wilders R, Baartscheer A, et al. Contribution of sodium channel mutations to bradycardia and sinus node dysfunction in LQT3 families [J]. *Circulation Research*,2003,92(9):976–983.
[9] Probst V, Kyndt F, Potet F, et al. Haploinsufficiency in combination with aging causes SCN5A-linked hereditary Lenègre disease [J]. *Journal of the American College Cardiology*, 2003,41(4):643–652.
[10] Olson T M, Michels V V, Ballew J D, et al. Sodium channel mutations and susceptibility to heart failure and atrial fibrillation [J]. *JAMA*,2005,293(4):447–454.
[11] Blechschmidt S, Haufe V, Benndorf K, et al. Voltage-gated Na^+ channel transcript patterns in the mammalian heart are species-dependent [J]. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*,2008,98(2/3):309–318.
[12] Liu Z R, Tao J, Dong B Q, et al. Pharmacological kinetics of BmK AS, a sodium channel site 4-specific modulator on $\text{Nav}1.3$ [J]. *Neuroscience Bulletin*,2012,28(3):209–221.
[13] Weber A, Casini A, Heine A, et al. Unexpected nanomolar inhibition of carbonic anhydrase by COX-2-selective celecoxib; new pharmacological opportunities due to related binding site recognition [J]. *Journal of Medicinal Chemistry*,2004,47(3):550–557.
[14] Krum H, Liew D, Aw J, et al. Cardiovascular effects of selective cyclooxygenase-2 inhibitors [J]. *Expert Review of Cardiovascular Therapy*,2004,2(2):265–270.
[15] Macías A, Moreno C, Moral-Sanz J, et al. Celecoxib blocks cardiac $\text{Kv}1.5$, $\text{Kv}4.3$ and $\text{Kv}7.1$ (KCNQ1) channels; effects on cardiac action potentials [J]. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*,2010,49(6):984–992.
[16] Frolov R V, Ignatova I I, Singh S. Inhibition of HERG potassium channels by celecoxib and its mechanism [J]. *PLoS One*,2011,6(10):e26344.
[17] Kim S H, Song S H, Kim S G, et al. Celecoxib induces apoptosis in cervical cancer cells independent of cyclooxygenase using NF- κ B as a possible target [J]. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, 2004, 130(9):551–560.
[18] Zuo C H, Li Z R, Zhou X, et al. Inhibitory effects of cyclooxygenase-2 inhibitor celecoxib on growth and angiogenesis of human liver cancer HepG2 cell xenografts in small nude mice [J]. *Chinese Journal of Cancer*,2006,25(4):414–420.