

- 53.
- [11] Dooley S, Ten Dijke P. TGF- β in progression of liver disease[J]. Cell Tissue Res, 2012, 347(1): 245-256.
- [12] 来丽娜, 杨柳絮, 郭春花, 等. 青蒿琥酯抗大鼠免疫性肝纤维化的作用及机制研究[J]. 中国药理学通报, 2011, 27(1): 125-129.
- [13] 王媛, 方步武, 彭龙希. 青蒿琥酯对大鼠原代肝星状细胞产生与分泌转化生长因子 β 1 的影响[J]. 中华肝脏病杂志, 2012, 20(4): 294-299.
- [14] 来丽娜, 任泽恩, 杨柳絮, 等. ERK1/2 信号通路在青蒿琥酯抑制 PDGF-BB 诱导 HSC 细胞增殖中的作用[J]. 中国临床药理学与治疗学, 2011, 16(2): 126-130.
- [15] 来丽娜, 宋晓亮, 任泽恩, 等. 青蒿琥酯通过抑制 ERK1/2 蛋白活化负性调控 HSC-T6 细胞 cyclin D1 的表达和 AP-1 活性[J]. 中国病理生理杂志, 2012, 28(1): 94-99.
- [16] 刘金元, 杨冬娣. 青蒿琥酯对 HSC-T6 细胞 PKC 蛋白细胞内转位的影响[J]. 新中医, 2012, 44(3): 128-130.
- [17] Huang RL, Yuan Y, Zou GM, et al. LPS-stimulated inflammatory environment inhibits BMP-2-induced osteoblastic differentiation through crosstalk between TLR4/MyD88/NF- κ B and BMP/Smad signaling[J]. Stem Cells Dev, 2014, 23(3): 277-289.
- [18] Bai T, Yang Y, Wu YL, et al. Thymoquinone alleviates thioacetamide-induced hepatic fibrosis and inflammation by activating LKB1-AMPK signaling pathway in mice [J]. Int Immunopharmacol, 2014, 19(2): 351-357.
- 综 述 • doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2017.02.044
- [19] Lai L, Chen Y, Tian X, et al. Artesunate alleviates hepatic fibrosis induced by multiple pathogenic factors and inflammation through the inhibition of LPS/TLR4/NF- κ B signaling pathway in rats [J]. Eur J Pharmacol, 2015 (765): 234-241.
- [20] 张晓燕, 马淑晶, 徐亚洁, 等. 青蒿琥酯对人源肝星状细胞 LX-2 增殖、胶原产生以及 KLF6 表达的影响[J]. 天津医科大学学报, 2014, 20(4): 257-259, 263.
- [21] 杨冬娣, 刘金元. 青蒿琥酯对肝纤维化小鼠肝星状细胞凋亡及其相关蛋白的影响[J]. 长春中医药大学学报, 2009, 25(3): 323-324.
- [22] Longxi P, Buwu F, Yuan W, et al. Expression of p53 in the effects of artesunate on induction of apoptosis and inhibition of proliferation in rat primary hepatic stellate cells[J]. PLoS One, 2011, 6(10): e26500.
- [23] 杜岩, 李立楠. 青蒿琥酯抑制肝纤维化的作用及其机制 [J]. 中国应用生理学杂志, 2015, 31(1): 14-17.
- [24] Xu Y, Liu W, Fang B, et al. Artesunate ameliorates hepatic fibrosis induced by bovine serum albumin in rats through regulating matrix metalloproteinases [J]. Eur J Pharmacol, 2014(744): 1-9.
- [25] 刘文东, 李英娴, 姜婷婷, 等. 青蒿琥酯对肝纤维化大鼠肝组织基质金属蛋白酶表达的影响[J]. 天津医科大学学报, 2013, 19(5): 362-364, 372.

(收稿日期: 2016-07-21 修回日期: 2016-11-08)

钠氢通道 1 在脑缺血再灌注损伤中的相关机制研究进展

周 炬 综述, 刘红亮[△]审校
(重庆市肿瘤研究所麻醉科 400030)

【关键词】 脑缺血; 再灌注; 再灌注损伤; 钠氢通道 1

【中图分类号】 R614.4 【文献标识码】 A

【文章编号】 1671-8348(2017)02-0271-03

大脑发生缺血一段时间后恢复血供, 不仅不能改善脑缺血的症状, 还会引起更加严重的脑功能障碍, 该现象被称为脑缺血再灌注损伤。各种疾病(脑卒中)、创伤, 以及手术(颈内动脉内膜切除术、动脉瘤修补术)都是脑缺血再灌注损伤的常见原因。脑缺血再灌注损伤的机制复杂, 缺血和再灌注过程通过引起一系列细胞、分子及其调节过程的变化损伤脑功能, 其中主要包括离子失衡、血脑屏障破坏、氧化应激、炎症反应、细胞凋亡等。

钠氢通道(Na^+ - H^+ Exchanger, NHE)家族是细胞膜上普遍存在并广泛表达的一种蛋白离子通道, 对维持细胞内 pH 以及细胞体积稳定至关重要^[1-2]。NHE-1 离子通道是 NHE 家族的重要亚型, 其在脑组织分布广泛。近年来研究发现, 该离子通道的激活与脑缺血再灌注损伤有密切联系^[2], 通过阻断 NHE-1 离子通道可以改善大脑缺血再灌注损伤。本文将从离子失衡、细胞水肿、炎症反应、细胞凋亡 4 个方面描述 NHE-1 在脑缺血再灌注损伤中的作用, 并探讨未来对脑缺血再灌注损伤的保护策略。

1 离子失衡

中枢神经系统作为高代谢器官对缺血缺氧异常敏感, 短时

间的缺血、缺氧即可引起脑组织细胞无氧代谢增加, 从而导致细胞内酸中毒。而神经元细胞及胶质细胞对酸中毒极为敏感, 因此, 有效的细胞内 pH 调节机制对于脑保护至关重要, 而 NHE-1 的主要生理功能即调节细胞内 pH^[3]。组织缺血、缺氧的情况下, 细胞内 H^+ 浓度增加, 细胞内出现酸中毒, 为纠正细胞内酸中毒 NHE-1 被激活, Na^+ 和 H^+ 以 1:1 的形式反向交换, 细胞内 H^+ 被排出细胞的同时将细胞外的 Na^+ 交换到细胞内。而 NHE-1 的过度激活导致细胞内 Na^+ 超载, 进而激活钠钙离子通道(Na^+ - Ca^{2+} Exchanger, NCX), 引起细胞内 Ca^{2+} 超载, 造成细胞损伤。在其他细胞, 如上皮细胞、心肌细胞及肺泡上皮细胞, 都已经证实了 NHE-1 的阻滞剂能够保护由缺血再灌注中引起的钙离子介导的细胞损伤^[4-5]。

Luo 等^[6]观察到在脑缺氧无糖损伤(OGD)3 h, 再灌注(REOX)1 h 后神经细胞内 Na^+ 浓度增加了 7 倍, 而细胞内 Ca^{2+} 浓度增加了 1.5 倍, 再灌注 21 h 后发生了 (68±10)% 的神经细胞死亡。在运用 NHE-1 特异性阻滞剂 HOE642 后, OGD 引发的神经细胞死亡减少 40%~50%, 并且细胞内 Na^+ 和 Ca^{2+} 的蓄积出现了明显的缓解。

脑缺血、缺氧后, 细胞内酸中毒导致星形胶质细胞肿胀, 而

这种现象与星形胶质细胞上的 NHE 通道激活有关。Kintner 等^[7]认为,NHE-1 是星形胶质细胞中管理细胞内 pH 的主要离子通道,缺血导致的 NHE-1 基因敲除后的小鼠星形胶质细胞离子失衡以及细胞肿胀减轻,而运用 NHE-1 特异性抑制剂 HOE642 的实验组也观察到同样的结果。缺血后的野生型小鼠离体皮质星形细胞的 NHE-1 活性提高,缺血 2 h 后细胞内 Na^+ 增加了 5 倍,26% 的细胞出现了水肿。作者认为对野生型小鼠使用 HOE642 同样可以减少缺血导致的星形胶质细胞离子失衡及细胞肿胀,具体机制可能与两者都能抑制 NHE-1 相关。

小胶质细胞是一种在神经受损等病理情况下被激活的细胞^[8-10],它的激活与细胞吞噬、增殖、释放活性物质相关。NHE-1 通过活化的小胶质细胞,参与维持细胞内的 pH 及离子平衡。Liu 等^[11]证明了 NHE-1 在小胶质细胞上的表达,又观察到缺血再灌注后小胶质细胞内 Na^+ 和 Ca^{2+} 浓度增加。活化的小胶质细胞膜上 NHE-1 被过度激活,细胞内钠钙离子蓄积,细胞内离子失衡,活性物质释放,引起神经细胞的损失^[12]。

脑细胞内的碱化被认为是由脑缺血、缺氧引发的,而持续性的细胞内碱化可能与脑缺血、缺氧后 NHE-1 过度被激活引起细胞内离子失衡相关。离子失衡是新生儿缺血、缺氧(HI)后的重要生理改变,且可能是 HI 导致脑损伤的直接原因^[2]。最近的研究表明,在新生儿脑缺血、缺氧模型中运用 NHE-1 特异性抑制剂 HOE642 有神经保护作用,HOE642 保存了海马体结构的完整性,并且减少了神经元的退行性变^[6]。这些发现都证明了 NHE-1 过度激活介导的离子失衡可能是新生儿缺血、缺氧后脑损伤最重要的原因。

2 脑细胞水肿

血脑屏障是毛细血管与脑实质间的物理和代谢屏障,主要维持中枢神经功能的稳定。血脑屏障主要由毛细血管内皮细胞和细胞间的缝隙连接形成。脑细胞缺氧后会导致细胞间紧密连接的破坏,细胞外液被动进入脑组织,形成血管源性脑水肿,造成脑组织的第 2 次伤害^[13]。Suzuki 等^[14]观察到 NHE-1 阻滞剂的运用可以减轻大脑缺血后的脑组织水肿,因此,作者推测脑组织的水肿可能与 NHE-1 相关。另一项研究也证实了 HOE642 可减轻脑缺血早期数小时的脑水肿和 Na^+ 浓度增加^[15]。同时,NHE1 也通过影响血脑屏障的通透性和紧密连接功能,加重功能紊乱。NHE1 另一抑制剂 sabiporide 也可减小缺血/低糖缺氧引起的脑梗死面积,降低血脑屏障的通透性,从而起到脑保护的作用^[16]。Lam 等^[17]也证明 NHE-1 和 NHE-2 存在于脑血管内皮细胞,当脑缺血、缺氧时,NHE-1 被过度激活,NHE-2 仅有部分激活,细胞内 Na^+ 浓度增加,早期细胞外液内流引起细胞水肿,而静脉注射 NHE-1 特异性抑制剂 HOE642 后可以减少缺血再灌注 3 h 后的大鼠脑细胞的水肿程度和脑组织的缺血坏死面积。

钙离子对维持缝隙连接的完整性和正常的结构功能很重要,而缺血再灌注后血管内皮细胞的 NHE-1 过度激活,细胞内钙离子超载,高浓度钙离子可以损伤血脑屏障,增加血脑屏障通透性,引起脑细胞水肿。以上实验都说明,在缺血再灌注后脑实质的水肿与血脑屏障上毛细血管的 NHE-1 表达相关,且该通道的特异性阻滞剂可以减轻脑实质水肿。

3 炎症反应

大量实验已经证实,脑缺血后强烈的炎症反应是造成脑组织继发性损伤的因素之一,在此炎症反应过程中,多种因素相互作用,共同引起再灌注损伤^[18]。许多炎症介质和炎症细胞参与了炎症反应,在再灌注过程中主要是白细胞、小胶质细胞、星形胶质细胞等炎症细胞释放的炎症介质产生细胞损伤^[19]。虽然炎症反应是一种自我修复机制,但是也与细胞死亡相关。

NHE-1 广泛存在于神经胶质细胞,多项研究证实其与炎症损伤相关。小胶质细胞的激活是通过清除坏死细胞,释放神经营养因子的组织自我修复能力来实现的,但是激活的小胶质细胞也会通过释放炎症因子 IL-1b、TNF- α 、ROS、NO 来加重脑损伤^[20]。

小胶质细胞的增生高峰发生在局部脑缺血 48 至 72 h 间,持续 30 d。缺血早期激活的小胶质细胞多在中央缺血区,再灌注期激活的小胶质细胞多位于半阴影区。激活的小胶质细胞和活化的星形神经细胞产生大量的促炎因子 IL-1b、TNF- α 、ROS、NO 加重组织损伤^[21]。脑缺血再灌注过程中促炎因子产生的分子细胞机制一直不清楚,最近有文献认为这种作用与神经胶质细胞维持氢离子稳定相关,这又与小胶质细胞表面的 NHE-1 保持 NADPH 呼吸链阻止细胞内氢离子蓄积相关^[12]。在脑缺血再灌注模型中,同侧缺血区域生理盐水组与 HOE642 组相比 IL-1b 和 TNF- α 的表达明显增加,在 NHE-1 基因敲除组的缺血区域观察到 IL-1b 的表达被抑制,基因敲除和 HOE642 两种方法目的均是抑制小胶质细胞上 NHE-1 的活性。通过 NHE-1 活性被抑制后,促炎因子的释放减少的现象,作者认为小胶质细胞在缺血再灌注损伤过程中的激活,以及炎症因子的释放与 NHE-1 相关。

海马星形胶质细胞通过包裹神经元的突触与神经元产生密切联系,它主要功能是在突触间的联系过程中保持离子和神经递质的平衡,并且通过钙的级联反应和产生活性介质(谷氨酸盐,ATP,腺苷)改变神经细胞的兴奋性,以及在缺氧情况下通过提供 ATP 给神经细胞,减少神经细胞的损伤^[22-23]。在离体缺血再灌注模型中,NHE-1 蛋白的表达对海马体星形胶质细胞活化起正调节作用,提高 NHE-1 活性将增加星形胶质细胞内 Na^+ 、 Ca^{2+} 浓度,以及谷氨酸盐和细胞炎症因子的释放,缺血后海马星形胶质细胞释放促炎因子 IL-1B、IL-6 和 TNF- α ,再灌注 5 h 后 3 种促炎因子释放大量增加,而运用 HOE642 后,这些炎症因子在再灌注 5 h 后的释放量减少了 26%^[24]。缺血再灌注后海马细胞内钠钙离子浓度的增加是星形胶质细胞激活,以及一系列炎症介质释放等原因。Kim 等^[25]证明了钙信号通路在星形胶质细胞的炎症释放中有重要作用,因此,作者认为海马星形胶质细胞在缺血再灌注过程中炎症介质的释放与 NHE-1 过度激活引起的细胞内钙离子超载相关。

4 凋亡发生

迟发性的神经损伤多发生在缺血再灌注后几天到几周的时间内,这段时间也是进行神经保护的主要目标。研究证明,缺血再灌注后的脑损伤是由于离子失衡导致的细胞内 Na^+ 和 Ca^{2+} 超载引起的细胞损伤,但是迟发型脑神经损伤除了与 NHE-1 激活导致离子失衡相关外,也与 NHE-1 激活引起细胞凋亡和线粒体功能紊乱相关^[26]。

细胞凋亡受多种基因和蛋白的调控,B 淋巴细胞瘤-2(B-cell lymphoma-2,Bcl-2)是目前最受关注的凋亡基因家族,促凋亡和抗凋亡基因维持平衡保证线粒体稳定,阻止促凋亡蛋白从线粒体释放,抗凋亡基因表达增加抑制细胞色素 C、凋亡诱导因子(AIF)从线粒体释放^[27]。缺血再灌注后 0.5 h 可以出现凋亡细胞,高峰在 24~48 h,最长可持续 28 d,凋亡与缺血时间呈正相关,多出现在梗死的边缘区域,且免疫组织化学的方法证明凋亡多发生在神经细胞内。Wang 等^[26]在实验中观察到野生型小鼠在缺血再灌注 24 h 后线粒体细胞色素 C、AIF(凋亡诱导因子)释放,以及核染色质的浓缩。同时发现 caspase-3 在缺血再灌注模型中呈现时间依赖性的激活,但在 NHE-1 基因敲除小鼠中 caspase-3、细胞色素 C、凋亡诱导因子 AIF 释放明显减少,且这种改变与运用 HOE642 效果相似。作者认为 NHE-1 在脑缺血再灌注的细胞凋亡过程中有重要作用,但是

NHE-1 与凋亡基因家族的关系有待进一步研究。

根据最近的一些研究发现,NHE-1 与脑缺血再灌注损伤相关,生理条件下 NHE-1 对维持细胞内离子平衡有重要作用,但是过度激活 NHE-1 将会加重缺血后再灌注损伤。特异性的药物阻滞剂 HOE642 和 NHE-1 基因敲除的小鼠在脑缺血再灌注过程中又表现出了神经保护作用,因此未来阻断 NHE-1 可以作为脑缺血再灌注损伤治疗的主要目标。

参考文献

- [1] Pang V, Counillon L, Lagadic-Gossmann D, et al. On the role of the difference in surface tensions involved in the allosteric regulation of NHE-1 induced by low to mild osmotic pressure, membrane tension and lipid asymmetry [J]. *Cell Biochem Biophys*, 2012, 63(1): 47-57.
- [2] Orlowski J, Grinstein S. Na^+/H^+ exchangers[J]. *Compr Physiol*, 2011, 1(4): 2083-2100.
- [3] Călinescu O, Paulino C, Kühlbrandt W, et al. Keeping it simple, transport mechanism and pH regulation in Na^+/H^+ exchangers[J]. *J Biol Chem*, 2014, 289(19): 13168-13176.
- [4] Wakabayashi S, Hisamitsu T, Nakamura TY. Regulation of the cardiac Na^+/H^+ exchanger in health and disease [J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2013, 61(8): 68-76.
- [5] Huetsch J, Shimoda LA. Na^+/H^+ exchange and hypoxic pulmonary hypertension[J]. *Pulm Circ*, 2015, 5(2): 228-243.
- [6] Luo J, Chen H, Kintner DB, et al. Decreased neuronal death in Na^+/H^+ exchanger isoform 1-null mice after in vitro and in vivo ischemia[J]. *J Neurosci*, 2005, 25(49): 11256-11268.
- [7] Kintner DB, Su G, Lenart B, et al. Increased tolerance to Oxygen and glucose deprivation in astrocytes from Na^+/H^+ exchanger isoform 1 null mice[J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2004, 287(1): C12-21.
- [8] Chen H, Song YS, Chan PH. Inhibition of NADPH oxidase is neuroprotective after ischemia-reperfusion [J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2009, 29(7): 1262-1272.
- [9] Cuomo O, Vinciguerra A, Cerullo P, et al. Ionic homeostasis in brain conditioning[J]. *Front Neurosci*, 2015, 9(8): 277.
- [10] Neumann H, Kotter MR, Franklin RJ. Debris clearance by microglia; an essential Link between degeneration and regeneration[J]. *Brain*, 2009, 132(Pt 2): 288-295.
- [11] Liu Y, Kintner DB, Chanana V, et al. Activation of microglia depends on Na^+/H^+ exchange-mediated H^+ homeostasis[J]. *J Neurosci*, 2010, 30(45): 15210-15220.
- [12] Shi Y, Chanana V, Watters JJ, et al. Role of Sodium/Hydrogen exchanger isoform 1 in microglial activation and proinflammatory responses in ischemic brains[J]. *J Neurochem*, 2011, 119(1): 124-135.
- [13] Alluri H, Wiggins-Dohlvik K, Davis ML, et al. Blood-brain barrier dysfunction following traumatic brain injury[J]. *Metab Brain Dis*, 2015, 30(5): 1093-1104.
- [14] Suzuki Y, Matsumoto Y, Ikeda Y, et al. SM-20220, a Na^+/H^+ exchanger inhibitor; effects on ischemic brain damage through edema and neutrophil accumulation in a rat middle cerebral artery occlusion model[J]. *Brain Res*, 2002, 945(2): 242-248.
- [15] O'donnell ME, Chen YJ, Lam TI, et al. Intravenous HOE-642 reduces brain edema and Na uptake in the rat permanent middle cerebral artery occlusion model of stroke; evidence for participation of the blood-brain barrier Na/H exchanger[J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2013, 33(2): 225-234.
- [16] Park SL, Lee DH, Yoo SE, et al. The effect of Na^+/H^+ exchanger-1 inhibition by sabiporide on blood-brain barrier dysfunction after ischemia/hypoxia in vivo and in vitro [J]. *Brain Res*, 2010, 1366(12): 189-196.
- [17] Lam TI, Wise PM, O'donnell ME. Cerebral microvascular endothelial cell Na/H exchange; evidence for the presence of NHE1 and NHE2 isoforms and regulation by arginine vasopressin[J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2009, 297(2): C278-289.
- [18] Chen B, Liao WQ, Xu N, et al. Adiponectin protects against cerebral ischemia-reperfusion injury through anti-inflammatory action[J]. *Brain Res*, 2009, 1273(6): 129-137.
- [19] 王光胜. 脑缺血/再灌注损伤机制研究进展[J]. *医学综述*, 2011, 17(24): 3753-3756.
- [20] Jin R, Yang G, Li G. Inflammatory mechanisms in ischemic stroke; role of inflammatory cells[J]. *J Leukoc Biol*, 2010, 87(5): 779-789.
- [21] Yenari MA, Kauppinen TM, Swanson RA. Microglial activation in stroke; therapeutic targets[J]. *Neurotherapeutics*, 2010, 7(4): 378-391.
- [22] Sofroniew MV, Vinters HV. Astrocytes; biology and pathology[J]. *Acta Neuropathol*, 2010, 119(1): 7-35.
- [23] Verma V, Bali A, Singh N, et al. Implications of Sodium Hydrogen exchangers in various brain diseases[J]. *J Basic Clin Physiol Pharmacol*, 2015, 26(5): 417-426.
- [24] Cengiz P, Kintner DB, Chanana V, et al. Sustained Na^+/H^+ exchanger activation promotes gliotransmitter release from reactive hippocampal astrocytes following oxygen-glucose deprivation[J]. *PLoS One*, 2014, 9(1): e84294.
- [25] Kim DY, Hong GU, Ro JY. Signal pathways in astrocytes activated by cross-talk between of astrocytes and mast cells through CD40-CD40L [J]. *J Neuroinflammation*, 2011, 8(25): 2637-2647.
- [26] Wang Y, Luo J, Chen X, et al. Gene inactivation of Na^+/H^+ exchanger isoform 1 attenuates apoptosis and mitochondrial damage following transient focal cerebral ischemia[J]. *Eur J Neurosci*, 2008, 28(1): 51-61.
- [27] 任俊伟, 杨琴. 白藜芦醇对脑缺血/再灌注氧化应激损伤保护机制的研究进展[J]. *中国药理学通报*, 2011, 27(4): 448-451.