

研究论文

磷酸二酯酶9型抑制剂PF-04449613对大鼠心脏正性肌力作用及其机理

朱晓佳¹, 王羽维¹, 张文慧¹, 高丽¹, 肖钰洁¹, 高倩雯¹, 王荣荣¹, 陈龙^{1,2,*}

¹南京中医药大学药学院-江苏省中药药效与安全性评价重点实验室, 南京 210023; ²泰州中国医药城中医药研究院, 泰州 225300

摘要: 本文旨在研究磷酸二酯酶9型抑制剂PF-04449613对大鼠心脏正性肌力作用及其机理。采用在体双压力-容积环及离体心脏收缩力技术分析其对成年健康大鼠心脏正性肌力的作用特点; 运用大鼠心肌细胞钙释放技术分析其作用机理。双压力-容积环实验表明: PF-04449613 (5.5 mg/kg)显著增加大鼠搏出功、心输出量、每搏输出量、收缩末期压力及射血分数 ($P < 0.05$), 降低收缩末期容积、舒张末期容积及舒张末期压力 ($P < 0.05$)。PF-04449613对外周动脉血压的作用表现为增加收缩压、降低舒张压及血管阻力 ($P < 0.05$)。大鼠离体心脏灌流实验表明, PF-04449613浓度依赖性地增加离体大鼠左心室发展压 ($P < 0.05$)。以Fluo-4 AM为钙离子荧光指示剂的钙释放结果表明, PF-04449613 (5 $\mu\text{mol/L}$)显著增强肌浆网钙泵(sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase-2a, SERCA2a)介导的钙释放下降相的快成分, 显著增加大鼠心肌细胞钙释放幅值 ($P < 0.05$)。PF-04449613 (5 $\mu\text{mol/L}$)降低肌浆网钙泄漏率 ($P < 0.05$)。以上结果提示, PF-04449613通过增加SERCA2a活性发挥其对大鼠心脏正性肌力作用。

关键词: 磷酸二酯酶9型; 心室压力-容积环; 钙释放; 肌浆网钙泵

中图分类号: R969.4

Positive inotropic effect of phosphodiesterase type 9 inhibitor PF-04449613 in rats and its underlying mechanism

ZHU Xiao-Jia¹, WANG Yu-Wei¹, ZHANG Wen-Hui¹, GAO Li¹, XIAO Yu-Jie¹, GAO Qian-Wen¹, WANG Rong-Rong¹, CHEN Long^{1,2,*}

¹Jiangsu Key Laboratory for Pharmacology and Safety Evaluation of Chinese Materia Medica, School of Pharmacy, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China; ²Institute of Chinese Medicine of Taizhou China Medical City, Taizhou 225300, China

Abstract: This study aimed to explore the positive inotropic effect of phosphodiesterase type 9 (PDE9) inhibitor PF-04449613 in rats and its cellular and molecular mechanisms. The heart pressure-volume loop (P-V loop) analysis was used to detect the effects of PF-04449613 on rat left ventricular pressure-volume relationship, aortic pressures and peripheral vessel resistance in healthy rats. The Langendorff perfusion of isolated rat heart was used to explore the effects of PF-04449613 on heart contractility. The cardiomyocyte sarcoplasmic reticulum (SR) Ca^{2+} transients induced by field stimulation and caffeine were used to analyze the mechanism underlying the effect of PF-04449613 using Fluo-4 AM as a Ca^{2+} indicator. The results indicated as follows: (1) PF-04449613 (5.5 mg/kg, ip) significantly increased the stroke work, cardiac output, stroke volume, end-systolic pressure and ejection fraction ($P < 0.05$), and decreased the end-systolic volume, end-diastolic volume and end-diastolic pressure ($P < 0.05$). Meanwhile, the systolic blood pressure was increased and diastolic blood pressure and arterial elastance were decreased after PF-04449613 treatment ($P < 0.05$). (2) PF-04449613

Received 2020-05-31 Accepted 2021-01-25

This work was supported by “113 Talent Project” of the Fourth Round High Level Innovation Program in Taizhou China Medical City (No. 2016024) and “Six Talent Peaks” High Level Innovative Talent Team of Jiangsu Province, China (No. TD-SWYY-069).

*Corresponding author. E-mail: longchen@njucm.edu.cn

(0.001, 0.01, 0.1, 1 $\mu\text{mol/L}$) significantly increased the left ventricular developed pressure (LVDP) in a concentration-dependent manner *in vitro* ($P < 0.05$). (3) PF-04449613 (5 $\mu\text{mol/L}$) significantly increased the amplitude of SR Ca^{2+} transients mediated by facilitating sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase-2a (SERCA2a) ($P < 0.05$). (4) PF-04449613 (5 $\mu\text{mol/L}$) decreased the SR Ca^{2+} leak rate via ryanodine receptor 2 (RyR2) ($P < 0.05$). In conclusion, PF-04449613 exerted positive inotropic effect both *in vivo* and *in vitro* by enhancing SERCA2a activity.

Key words: phosphodiesterase type 9; ventricular pressure-volume loop; Ca^{2+} transient; SERCA2a

磷酸二酯酶 (phosphodiesterase, PDE) 有 11 个家族 (PDE1~11), 每一个家族有若干个不同基因型及剪接变体, 因此有超过 100 个同工酶类。每一个家族 PDE 呈现在细胞内特定的部位, 并表现出独特的调节作用, 目前已明确 PDE1、2、3、4、5、8、9 在心肌细胞内有表达。其中, PDE1、2、3 水解 cAMP 及 cGMP, PDE4、8 仅水解 cAMP, PDE5、9 仅水解 cGMP^[1,2]。

在所有的 PDE 中 PDE9 是对 cGMP 亲和力最高的水解酶^[3], 研究表明 PDE9 抑制剂具有广泛的生理和药理作用。由于 PDE9 抑制剂能够快速提升细胞内的 cGMP 浓度, 早期被开发用于神经性疾病^[4], 后有研究表明其还具有提高认知功能^[5]、抗抑郁及焦虑^[6]、改善学习功能^[7]、抗乳腺癌^[8]的药理作用。PDE9 抑制剂目前正进行临床试验, 用于老年痴呆及精神分裂症的治疗^[9]。此外, PDE9 抑制剂增加细胞内 cGMP 浓度而舒张气管平滑肌, 具有治疗气道高反应性疾病的潜力^[10]。

PDE9 在扩张性心力衰竭 (心衰) 及射血分数保留型心衰患者的心肌内表达增加^[11]。在小鼠实验中, 具备完整的 PDE9 基因和缺少 PDE9 基因的转基因小鼠分别作为对照组和实验组, 使用化学方法以及行主动脉缩窄术来诱导心衰, 结果显示, 与对照组相比, 缺少 PDE9 基因的小鼠 cGMP 含量更高, 可改善其左心功能、减少心肌纤维化及心肌肥大^[11-13], PDE9 抑制剂通过上调 cGMP 延缓心衰的发展^[14]。有研究表明肥胖、糖尿病及射血分数保留型心衰患者的冠状动脉微血管具有炎症反应, 表现为血管上皮功能受损, PDE9 抑制剂通过 NO-cGMP-PKG 通路改善其血管上皮功能^[15]。此外, PDE9 抑制剂还能通过 NO-cGMP-PKG 通路改善动脉粥样硬化^[16]。

PDE9 抑制剂早期虽然致力于对神经系统疾病的治疗研究, 但其对心血管的作用也较为显著, 可显著改善心衰小鼠的心脏功能, 改善冠状动脉上皮细胞功能, 扩张血管, 改善动脉粥样硬化等^[14-16]。然而这些研究并没有系统地对心脏功能进行详细研

究, 尤其是对心脏血流动力学缺乏系统研究。已有的研究大都局限于微观研究, 并没有从系统、器官、细胞水平进行逐层研究。虽然 PDE9 的基本作用机理是通过 cGMP-PKG 通路发挥其生理和病理效应, 但由于其在细胞内分布空间差异性, 很难简单地通过 cGMP 变化推导其细胞及器官功能改变。本研究采用正常大鼠研究 PDE9 抑制剂对心脏血流动力学的影响, 并分析其可能的细胞水平的机理。本研究虽然针对正常大鼠, 而不是疾病模型动物, 但也将为 PDE9 抑制剂对心血管疾病动物模型的研究提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 实验药品与试剂 PDE9 抑制剂 PF-04449613 购于 Tocris Bioscience, 货号 5915, 纯度大于 99%; 钙荧光指示剂 Fluo-4 AM 购于东仁化学科技 (上海) 有限公司, 货号 F312; 其它试剂均购于 Sigma 公司。

1.2 实验仪器 多导生理记录仪 (PowerLab 8/35, 澳大利亚 AD Instruments 公司); 放大器 (35-2083 Rev. F Millar)、双压力-容积导管 (SPR-901 型) (美国 Millar 公司); Langendorff 离体心脏灌流装置 (M402173, 中国西仪北京科技有限公司); Olympus IX53 倒置显微镜 (日本 Olympus 公司); 科研级高灵敏制冷 CCD (ZYLA-5.5-CL3, 英国 ANDOR 公司); 超高速波长切换装置 (Lambda DG-4, 美国 Sutter); 灌流给药系统 (VC3-8, 美国 ALA 公司)。

1.3 实验动物 7~8 周龄的成年健康雄性 Sprague-Dawley (SD) 大鼠 (300~350 g) 购于南京中医药大学实验动物中心, 实验动物使用许可证: SCXK(苏) 2017-0001; 动物实验伦理批准号: 201910A049; 饲养室内 12 h 明暗周期, 温度 21~26 $^{\circ}\text{C}$, 湿度 40%~70%, 自由进食和饮水。

1.4 浓度设计 经大鼠在体预实验, 选择 PF-04449613 剂量能够引起最大药效的最低剂量 (大约), 最终选择剂量为 5.5 mg/kg 的 PF-04449613 进行在体实验。离体心脏收缩力实验 PF-04449613 浓

度为 0.001、0.01、0.1 和 1 $\mu\text{mol/L}$ 。心肌细胞钙释放实验在室温条件下进行,为了实验功能变化最大化并分析其机理,PF-04449613 浓度选择为 5 $\mu\text{mol/L}$ 。

1.5 在体大鼠压力-容积环测定 按照本实验室之前方法^[1,17],用 20% 乌拉坦 (5 mL/kg) 腹腔注射麻醉雄性健康 SD 大鼠。将已定标完的 Millar 双压力导管经右侧位的颈总动脉插入到大鼠的左心室内,调整导管在心室内的位置,观察多导生理记录仪记录的波形变化,直到出现类长方形的压力-容积环时,即表明导管位置合适,可停止调整。待压力-容积环稳定后,记录大鼠各指标作为空白对照,记录结束后,将 PF-04449613 溶于 DMSO (0.3 mL) 后按 5.5 mg/kg 腹腔注射,待药效稳定后记录大鼠加药后各血流动力学参数。实验结束后,向颈静脉推注 30% 高渗盐水 20~50 μL ,并取自身血液进行容积定标,采用 5 只大鼠重复上述实验 ($n = 5$)。前期实验表明 0.3 mL DMSO 腹腔注射对大鼠血流动力学参数无明显作用 ($n = 3$),其代表性压力-容积环见图 1。

1.6 离体大鼠心脏左心室收缩力测定 雄性健康 SD 大鼠麻醉方法同在体实验,迅速取心脏置于 0~4 $^{\circ}\text{C}$ 无钙台氏灌流液中,使其停搏。离体大鼠心脏挂于已充满灌流液的 Langendorff 装置上,在充氧 (95% $\text{O}_2 + 5\% \text{CO}_2$)、温度为 (37.5 $\pm$ 0.5) $^{\circ}\text{C}$ 条件下,经主动脉逆行灌流,灌流压为 90 cm H_2O (1 cm $\text{H}_2\text{O} = 0.098 \text{ kPa}$)。将充满灌流液并排空气泡的压力换能器插管,经由左心房插入左心室,连接 RM6240 型多道生理信号采集处理系统用以记录左心室收缩曲线。将刺激强度约 5 V 的一对刺激电极加于离体心脏心房两侧,刺激心脏以 4 Hz 固定频率 (即心率 240 次/min) 进行起搏。PF-0444961 溶于 20 mL 含钙灌流液中配制成相应浓度 (0.001、0.01、0.1 和 1 $\mu\text{mol/L}$),灌流给药。采用 5 只大鼠重复上述实验 ($n = 5$)。灌流液的组成 (mmol/L): NaCl 135, KCl 5.4, NaH_2PO_4 0.33, HEPES 5, 葡萄糖 10, MgCl_2 1, CaCl_2 1.8, NaOH 调 pH 至 7.3~7.4。

1.7 大鼠左心室心肌细胞场刺激诱导的钙释放

雄性健康 SD 大鼠麻醉方法同在体实验,大鼠离体心脏置于 Langendorff 装置上灌流,用无钙台氏灌流液将心脏冲洗干净后,用含 2 mg/mL 胶原酶 II 的灌流液消化。将消化完后的心脏置于无钙台氏灌流液中,充分剪碎过滤,静置后用无钙台氏灌流液冲洗 2 次。依次用钙离子浓度为 0.25 mmol/L、0.5 mmol/L、1 mmol/L 的台氏液进行梯度复钙。复钙

完的细胞悬液加入钙荧光指示剂 Fluo-4 AM (5 $\mu\text{mol/L}$) 于 37 $^{\circ}\text{C}$ 避光孵育 30 min。细胞外液为含钙 (1.8 mmol/L) 台氏液。使用激光共聚焦显微镜激发细胞中的荧光探针 Fluo-4 AM 发出荧光,采用空气冷却 CCD 相机采集并记录荧光信号。激发波长为 488 nm,吸收波长为 510 nm^[1]。由刺激器通过一对电极将频率为 1 Hz、强度为 15 V 的刺激加于心肌细胞两侧,刺激细胞收缩并记录钙释放。当钙释放幅值达到稳定时,记录其曲线作为空白对照,随后灌流含 PF-04449613 (5 $\mu\text{mol/L}$) 的灌流液约 5 min,再次刺激细胞并记录钙释放,当钙释放曲线稳定后记录其曲线作为 PF-04449613 的效应。

1.8 大鼠左心室心肌细胞咖啡因诱导的钙释放分析钙泄漏率及 $\text{Na}^+ - \text{Ca}^{2+}$ 交换体 ($\text{Na}^+ - \text{Ca}^{2+}$ exchanger, NCX)、质膜 Ca^{2+} 泵 (plasma membrane Ca^{2+} -ATPase, PMCA) 作用 心肌细胞的分离方法与钙释放实验相同,用含有 1.8 mmol/L Ca^{2+} 的台氏液作为细胞外液灌流,用 1 Hz 场刺激至少 20 次,确保肌浆网中 Ca^{2+} 含量稳定。结束刺激后,喷射咖啡因 (caffeine, 20 mmol/L) 于细胞表面,诱导出完全的钙瞬变,此时的钙瞬变的下降相主要由 NCX 和 PMCA 介导,其 Ca^{2+} 释放下降相经拟合获得的衰退常数即为 $r_{\text{NCX+PMCA}}$,该常数反映 NCX 和 PMCA 外排钙于细胞外的功能。

PMCA 外排钙的速率常数 (r_{PMCA}) 测定: 用含有 1.8 mmol/L Ca^{2+} 的台氏液作为细胞外液灌流,用 1 Hz 场刺激至少 20 次,待肌浆网中 Ca^{2+} 含量稳定后停止刺激,用含 1 mmol/L 丁卡因 (Tetracaine) 的无 Na^+ 无 Ca^{2+} 细胞外液灌流 1 min,此时的 NCX 被无 Na^+ 无 Ca^{2+} 溶液阻断,兰尼碱受体 2 (ryanodine receptor 2, RyR2) 的 Ca^{2+} 泄漏被 Tetracaine 阻断,测定此条件下的荧光含量作为舒张期的钙浓度 $F_{0(\text{0Ca/0Na/ Tetracaine})}$ 。测定 1 min 结束后,细胞再用无 Na^+ 无 Ca^{2+} 无 Tetracaine 细胞外液灌流 60 s,此条件下 RyR2 的 Ca^{2+} 泄漏重新出现,测定此条件下的荧光含量作为舒张期的钙浓度 $F_{0(\text{0Ca/0Na})}$ 。RyR2 钙泄漏 = $F_{0(\text{0Ca/0Na})} - F_{0(\text{0Ca/0Na/ Tetracaine})}$, 钙泄漏率为钙泄漏与肌浆网钙容量的比值^[1],此时是对 RyR2 钙泄露的测定。当继续使用无 Na^+ 无 Ca^{2+} 无 Tetracaine 细胞外液灌流,喷射 20 mmol/L 的 caffeine 时,肌浆网钙泵 2a (sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase-2a, SERCA2a) 的功能被间接废除,NCX 外排钙的作用也被消除,此时是对 PMCA 外排钙的速率常数测定,即 r_{PMCA} 。

1.9 统计学方法 实验数据以 mean $\pm$ SD 的方式表

示,在体大鼠和钙释放实验数据分析采用配对 t 检验;咖啡因诱导的钙释放实验和钙泄露实验数据分析采用组间比较 t 检验;离体大鼠心脏实验数据采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 时认为差异具有统计学意义。采用 SigmaPlot 12.5 软件进行数据统计并绘图。

2 结果

2.1 PF-04449613对在体大鼠血流动力学的作用

心脏及主动脉双压力 Millar 导管实验结果表明, PF-04449613 (5.5 mg/kg, ip) 显著影响大鼠左心室功能, 具体表现为增加搏出功 (stroke work, SW)、心输出量 (cardiac output, CO)、每搏输出量 (stroke volume, SV)、左室收缩末期压 (end-systolic pressure, Pes) 及射血分数 (ejection fraction, EF), 降低左室收缩末期容积 (end-systolic volume, Ves)、左室舒张末期容积 (end-diastolic volume, Ved) 及左室舒张末期压 (end-diastolic pressure, Ped) ($P < 0.05$, $n = 5$)。此外, PF-04449613 对血管血流动力学的作用表现为显著增加收缩压 (systolic blood pressure, SBP)、降低舒张压 (diastolic blood pressure, DBP), 且降低动脉弹性 (arterial elastance, Ea)(与外周血管阻力正相关) ($P < 0.05$, $n = 5$)。表 1 为 PF-04449613 对正常大鼠心脏血管血流动力学参数的统计结果, 心脏及动脉血流动力学变化的代表性曲线见图 1 和图 2。

2.2 PF-04449613对大鼠离体心脏收缩力的作用

为了排除神经体液因素的影响, 大鼠离体心脏

灌流实验被用于分析 PF-04449613 对心脏的直接作用。离体心脏实验除采用心脏自发节律 (non-pacing) 外, 还采用固定频率刺激法 (pacing) 触发离体心脏产生恒定频率收缩, 排除心率对收缩力的影响。Pacing 法采用 4 Hz 刺激频率, 该频率形成的心率为 240 次/min, 与 Non-pacing 法的心率相近。结果表明: PF-04449613 (0.001, 0.01, 0.1, 1 $\mu\text{mol/L}$) 浓度依赖性地增加大鼠左心室 non-pacing 及 pacing 法的左心室发展压 (left ventricular developed pressure, LVDP) 及左心室压力上升最大速率 ($+dp/dt_{\max}$) ($P < 0.05$, $n = 5$); 在 non-pacing 状态下, 心率出现浓度依赖性降低 ($P < 0.05$, $n = 5$) (表 2, 图 3)。

2.3 PF-04449613对大鼠左心室心肌细胞钙释放的作用

采用场刺激诱导下的左心室肌细胞钙释放技术探究 PF-04449613 对在体及离体心脏的正性肌力作用的细胞水平机理。来自 6 个不同大鼠心脏的 6 个细胞的实验结果表明: PF-04449613 (5 $\mu\text{mol/L}$) 增加大鼠左心室钙释放幅值 (从正常对照组的 100.00 ± 58.81 增加到 PF-04449613 组的 111.61 ± 67.55 , $P = 0.00695$, $n = 6$), 并增强其回吸收的速率 (图 4A, B)。钙释放曲线分为快速上升相及下降相, 上升相主要由 RyR2 通道开放引起肌浆网钙释放至胞浆, 下降相主要由 SERCA2a 回吸收钙至肌浆网, 以及通过 NCX 及 PMCA 外排至细胞外引起的。其中 SERCA2a 的回吸收介导了快速下降相, 其回吸收钙的速率常数为 α , NCX 和 PMCA 外排钙于细胞外介

表1. PF-04449613对正常麻醉大鼠左心室和动脉血流动力学参数的影响

Table 1. Effects of PF-04449613 on left ventricular and aortic hemodynamic parameters of anesthetized normal rats

Kinetic parameters	Control	PF-04449613 (5.5 mg/kg, ip)
SW (mmHg· μL)	4 728.8 $\pm$ 409.6	5 303.4 $\pm$ 408.4*
CO ($\mu\text{L}/\text{min}$)	20 457.5 $\pm$ 3 996.0	24 753.8 $\pm$ 6 097.9*
SV (μL)	62.6 $\pm$ 5.8	67.6 $\pm$ 6.9*
Ves (μL)	74.8 $\pm$ 7.5	59.6 $\pm$ 13.5*
Ved (μL)	137.3 $\pm$ 12.5	127.3 $\pm$ 18.9*
Pes (mmHg)	75.9 $\pm$ 7.2	78.9 $\pm$ 7.6*
Ped (mmHg)	6.4 $\pm$ 2.0	5.8 $\pm$ 2.2*
HR (beats/min)	325.0 $\pm$ 40.3	363.5 $\pm$ 68.1
EF (%)	45.6 $\pm$ 1.7	53.6 $\pm$ 4.4*
SBP (mmHg)	107.4 $\pm$ 6.4	110.8 $\pm$ 4.6*
DBP (mmHg)	56.6 $\pm$ 5.2	48.4 $\pm$ 4.8*
Ea (mmHg/ μL)	1.23 $\pm$ 0.2	1.18 $\pm$ 0.2*

Data were expressed as mean $\pm$ SD, $n = 5$. Paired t -test was used. * $P < 0.05$ vs respective control. SW: stroke work; CO: cardiac output; SV: stroke volume; Ves: end-systolic volume; Ved: end-diastolic volume; Pes: end-systolic pressure; Ped: end-diastolic pressure; HR: heart rate; EF: ejection fraction; SBP: systolic blood pressure; DBP: diastolic blood pressure; Ea: arterial elastance.

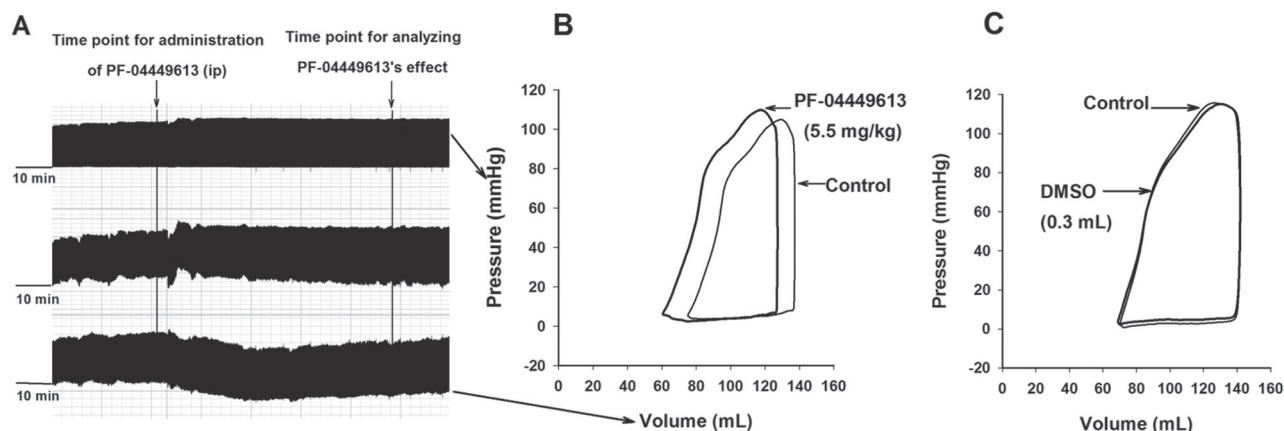


图 1. PF-04449613 (5.5 mg/kg, ip)对在体正常大鼠左心室压力-容积环及主动脉压影响的代表性曲线

Fig. 1. Representative simultaneously recorded curves of rat left ventricular pressure, volume and aortic blood pressure (A), and the derived left ventricular pressure-volume relationship (B) before and after administration of PF-04449613 (5.5 mg/kg, ip). Intraperitoneal injection of 0.3 mL DMSO had no significant effect on hemodynamic parameters in rats (C).

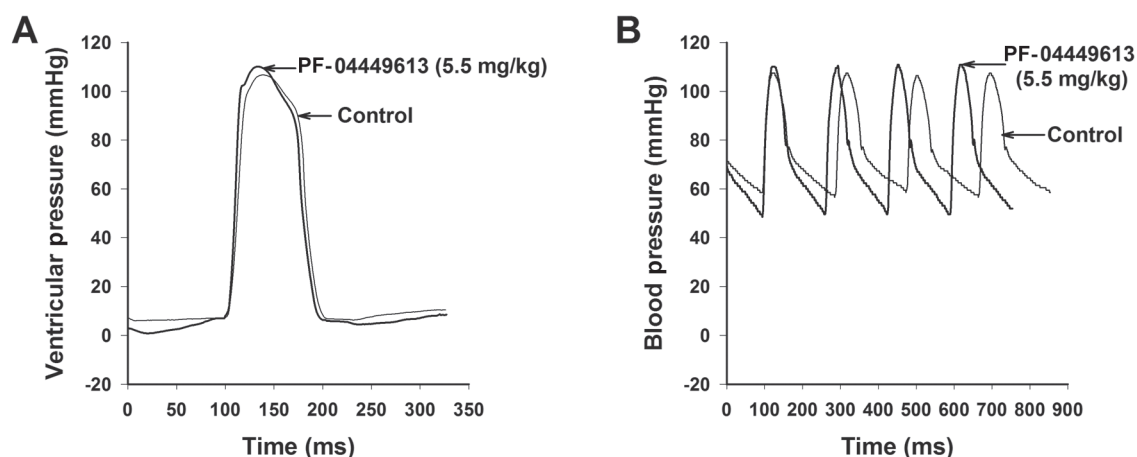


图 2. PF-04449613 (5.5 mg/kg, ip)对正常大鼠左心室压力与动脉压影响的代表性曲线

Fig. 2. The simultaneously recorded curves of rat left ventricular pressures (A) and aortic blood pressures (B) before and after administration of PF-04449613 (5.5 mg/kg, ip).

导了缓慢下降相, 其外排钙的速率常数为 β 。PF-04449613 (5 $\mu\text{mol/L}$) 显著增强 SERCA2a 介导的快成分, 其速率常数 α 值显著增加 (从正常对照组的 3.85 ± 1.00 增加到 PF-04449613 组的 4.18 ± 1.15 , $P = 0.0132$, $n = 6$, 图 4G); PF-04449613 降低 NCX 和 PMCA 介导的慢成分, 其速率常数 β 值显著降低 (从正常对照组的 0.20 ± 0.07 下降到 PF-04449613 组的 0.18 ± 0.06 , $P = 0.0278$, $n = 6$, 图 4H)。钙释放代表性曲线及其下降相拟合曲线见图 4。

2.4 PF-04449613对大鼠左心室心肌细胞NCX、PMCA及肌浆网钙泄漏率的作用

本实验在场刺激诱导钙释放的基础上, 结合高

浓度咖啡因诱导肌浆网 RyR2 完全开放, 使肌浆网与胞浆之间的钙浓度梯度消失, 从而间接废除肌浆网 SERCA2a 的功能, 实现胞浆钙浓度下降由 NCX 及 PMCA 外排细胞外所介导, 从而实现分析 NCX 及 PMCA 单独或联合外排钙的速率, 以及分析舒张期钙泄漏占肌浆网钙容量 (与肌浆网及胞浆之间钙浓度梯度正相关) 的比值 (钙泄漏率)。实验结果表明, PF-04449613 (5 $\mu\text{mol/L}$) 未显著性改变 NCX 及 PMCA 联合活性速率常数 ($r_{\text{NCX+PMCA}}$) (从对照组的 0.207 ± 0.07 到 PF-04449613 组的 0.215 ± 0.14 , $n = 10$, $P = 0.89$, 图 5)。同样, PF-04449613 (5 $\mu\text{mol/L}$) 未显著改变 PMCA 外排钙的速率常数 (r_{PMCA}) (从对

表2. PF-04449613对正常大鼠离体心脏左心室收缩力及心率的作用

Table 2. Effects of PF-04449613 on left ventricular contractility and heart rate in isolated rat hearts in the non-pacing and pacing modes

	Non-pacing			Pacing (4 Hz)		
	LVDP (mmHg)	HR (beats/min)	+dp/dt _{max} (mmHg/s)	LVDP (mmHg)	HR (beats/min)	+dp/dt _{max} (mmHg/s)
Control	11.1 ± 0.9	231.6 ± 10.3	889.9 ± 224.4	18.3 ± 2.7	240.0	1 266.2 ± 82.8
0.001 μmol/L PF04449613	11.9 ± 0.9	217.8 ± 9.1*	1 203.0 ± 261.4*	21.5 ± 3.2*	240.0	1 384.0 ± 66.0*
0.01 μmol/L PF04449613	13.7 ± 0.8*#	203.2 ± 9.2*#	1 251.5 ± 273.9*	22.7 ± 3.5*#	240.0	1 399.3 ± 72.1*#
0.1 μmol/L PF04449613	20.5 ± 2.1*#Δ	195.8 ± 9.6*#Δ	1 698.4 ± 293.7*#Δ	24.2 ± 3.2*#Δ	240.0	1 441.2 ± 79.7*#Δ
1 μmol/L PF04449613	22.1 ± 1.9*#Δ▲	192.4 ± 9.5*#Δ▲	1 728.1 ± 289.0*#Δ▲	25.2 ± 3.0*#Δ▲	240.0	1 671.5 ± 81.7*#Δ▲

Data were expressed as mean ± SD, *n* = 5. One-way ANOVA was used. **P* < 0.05 vs control; #*P* < 0.05 vs 0.001 μmol/L group; Δ*P* < 0.05 vs 0.01 μmol/L group; ▲*P* < 0.05 vs 0.1 μmol/L group. LVDP: left ventricular developed pressure; HR: heart rate; +dp/dt_{max}: peak rate of rise of left ventricular pressure.

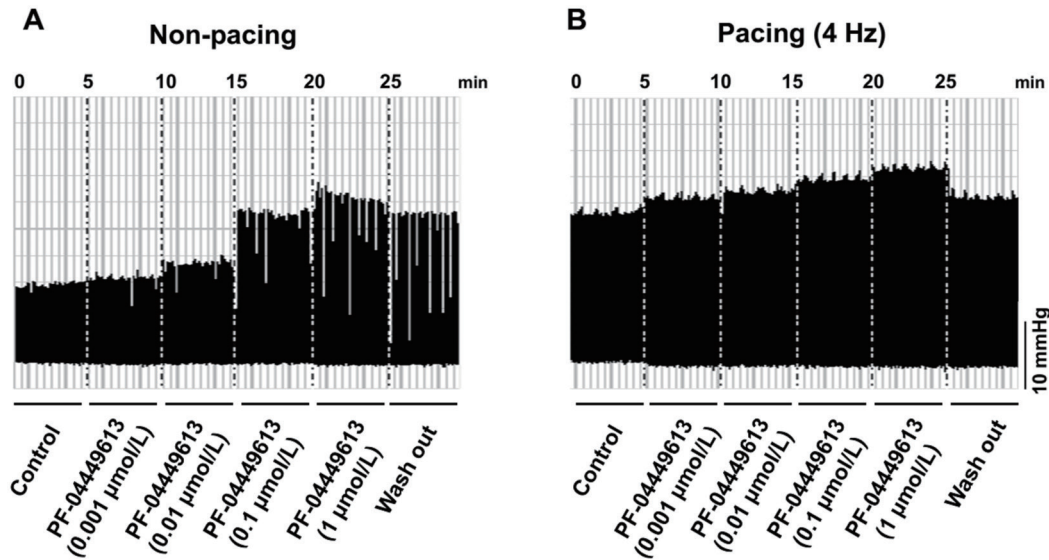


图 3. PF-04449613对大鼠离体心脏左心室发展压的影响

Fig. 3. Representative left ventricular developed pressure curves from the isolated rat hearts in non-pacing (A) and pacing (B) modes before and after perfusion of PF-04449613 (0.001, 0.01, 0.1, 1 μmol/L).

照组的 0.030 ± 0.019 到 PF-04449613 组的 0.032 ± 0.011 , $n = 12$, $P = 0.815$, 图 6D)。然而, PF-04449613 (5 μmol/L) 显著降低舒张期 Ca^{2+} 泄漏率 [从对照组的 $(7.1 \pm 0.03)\%$ 降低至 PF-04449613 组的 $(4.5 \pm 0.02)\%$, $n = 12$, $P = 0.0198$, 图 6C]。

3 讨论

本研究从整体、离体心脏及细胞水平阐明了 PDE9 抑制剂 PF-04449613 对正常大鼠血流动力学作用及其细胞的作用机理, 虽然没有研究其心脏病

理模型条件下的作用, 但为病理模型研究提供了理论基础, 同时也间接提供了 PDE9 对血流动力学的作用。PDE9 是所有水解 cGMP 的 PDE 中对 cGMP 亲和力最高的酶^[3], 虽然早期研究大多关注其对神经系统的研究与开发^[9], 近年来其对心血管的作用越来越受到关注^[11–13]。单纯的正性肌力药物很难满足于心衰的治疗, 心衰的功能障碍主要在心脏, 而治疗主要以减轻心脏负担为目的。2016 欧洲心脏病学会发布的更新版充血性心衰药物治疗指南^[18]指出, 洋地黄 (正性肌力药物) 仅仅发挥辅助作用。

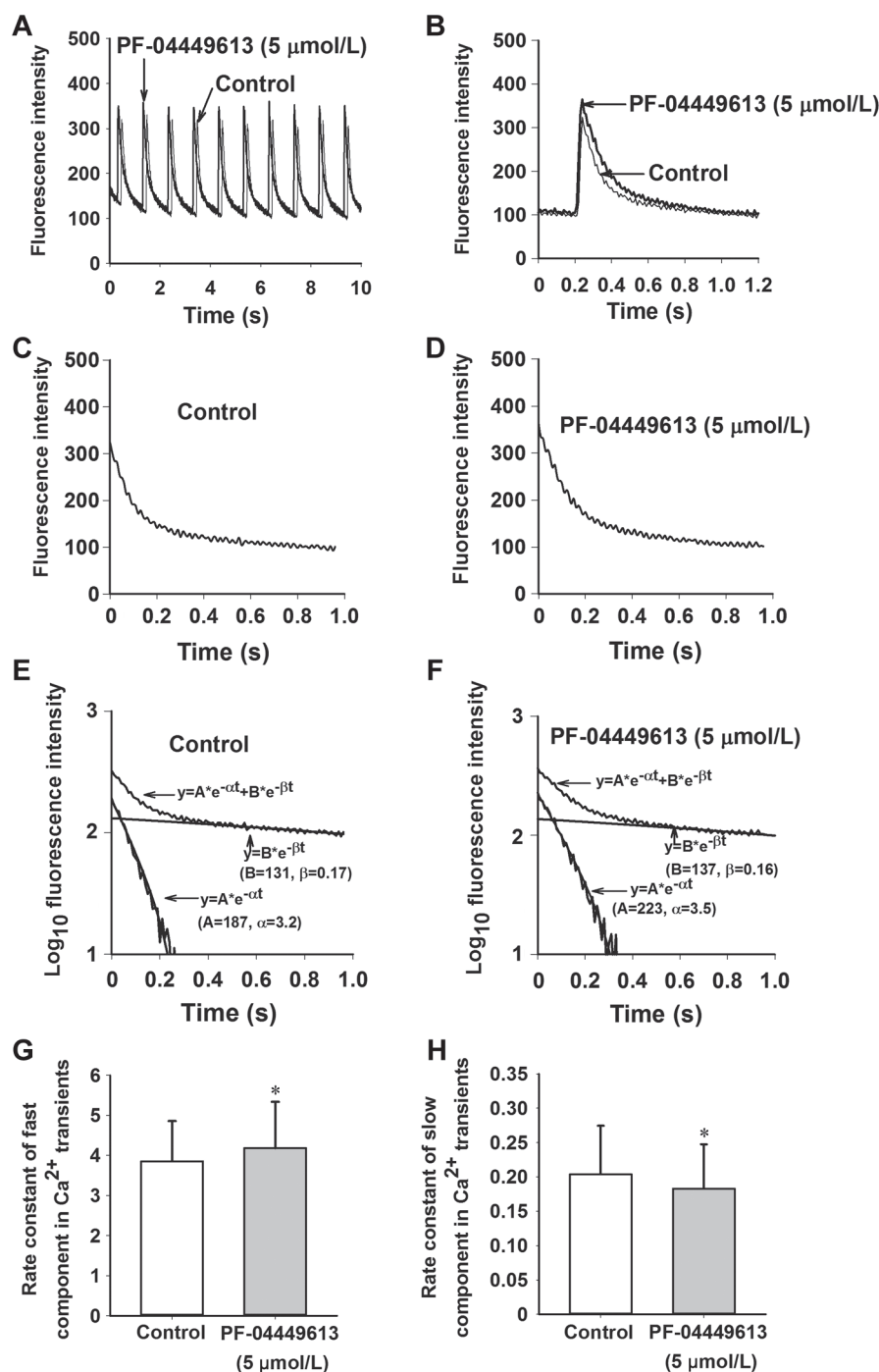


图 4. PF-04449613 (5 $\mu\text{mol/L}$)对大鼠左心室肌细胞场刺激诱导的钙释放作用代表性曲线及其下降相拟合曲线

Fig. 4. Representative curves of field stimulation induced Ca^{2+} transients and the representative curve fittings by two exponential equation. *A*: The continuously recorded Ca^{2+} transients curves before (Control) and after perfusion of PF-04449613 (5 $\mu\text{mol/L}$). *B*: The Ca^{2+} transients curves before (Control) and after perfusion of PF-04449613 (5 $\mu\text{mol/L}$). *C* and *D*: The decaying phase curves of Ca^{2+} transients by deleting the fast rise phase curves before and after perfusion of PF-04449613 (5 $\mu\text{mol/L}$). *E* and *F*: The decaying phase curves are presented as the relationships between timings of s in X axis and the $\log_{10}$ fluorescence intensities in Y axis. The decaying phase is expressed as an equation of $y = A \cdot e^{-\alpha t} + B \cdot e^{-\beta t}$. The equation of fast component is described as $y = A \cdot e^{-\alpha t}$ and slow one as $y = B \cdot e^{-\beta t}$. *G* is the fast component rate constant (α) mediated by SERCA2a and *H* is the slow component rate constant (β) mediated by combined NCX and PMCA. The representative two exponential fittings before and after perfusion of PF-04449613 (5 $\mu\text{mol/L}$), respectively, are also presented in (*E*) and (*F*). Data were expressed as mean $\pm$ SD, $n = 6$. The statistical analysis was performed by paired *t*-test. * $P < 0.05$ vs control.

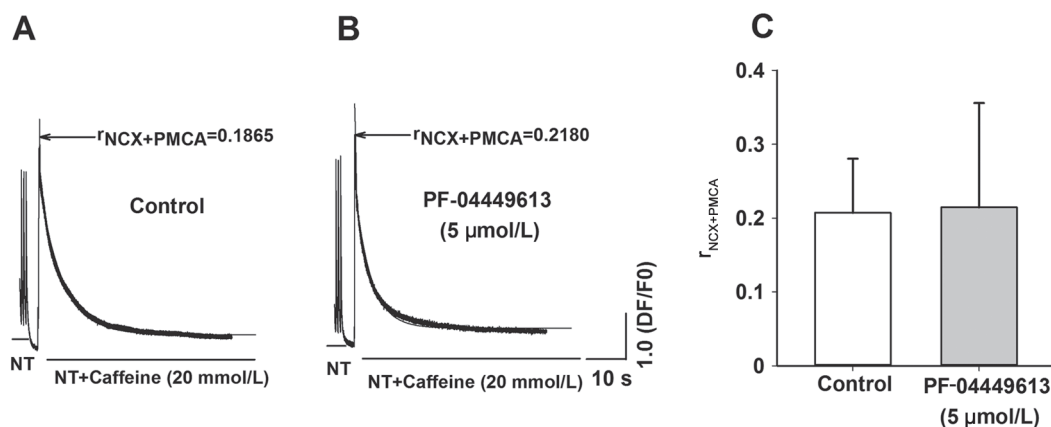


图 5. PF-04449613 (5 $\mu\text{mol/L}$)对NCX及PMCA联合活性速率常数($r_{\text{NCX+PMCA}}$)作用的代表性曲线及其统计结果
Fig. 5. Effect of PF-04449613 on decaying rate constant of Ca^{2+} extrusion by NCX plus PMCA ($r_{\text{NCX+PMCA}}$). A and B: The representative curves of Ca^{2+} transients induced by caffeine (20 mmol/L) in control and PF-04449613 (5 $\mu\text{mol/L}$) treated rat left ventricular myocytes. C: Statistical result of $r_{\text{NCX+PMCA}}$. NT: normal Tyrode's solution. Mean $\pm$ SD, $n = 10$ for both control and PF-04449613 (5 $\mu\text{mol/L}$) groups. The t -test was used for statistical analysis.

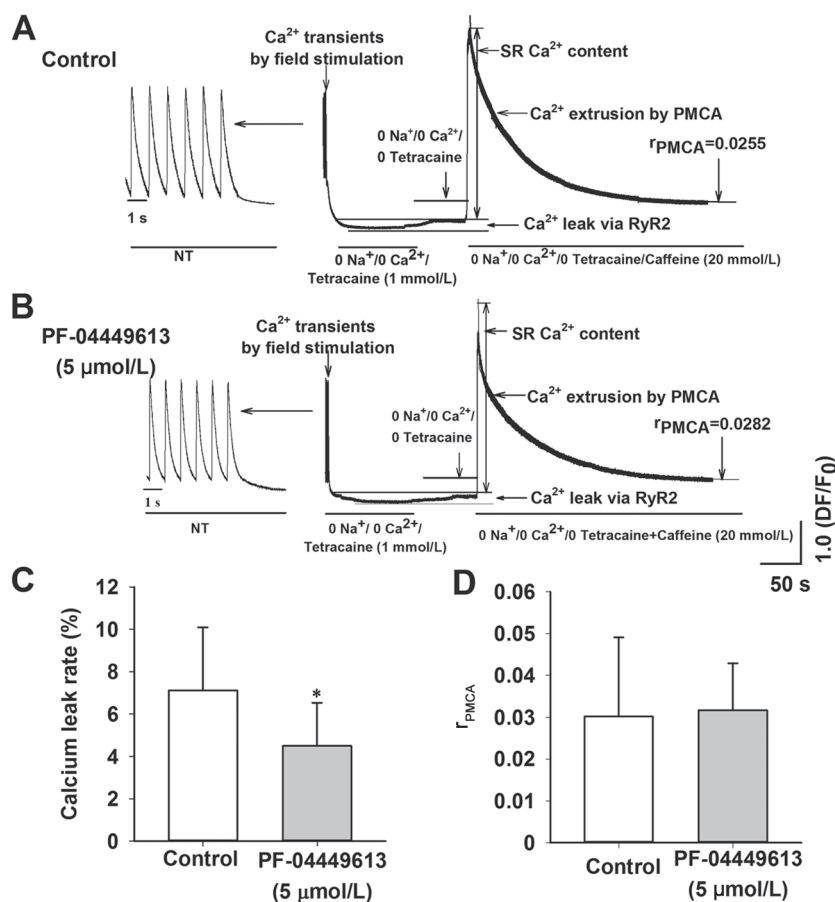


图 6. PF-04449613 (5 $\mu\text{mol/L}$)对PMCA外排钙的速率常数(r_{PMCA})及钙泄漏率作用的代表性曲线及统计分析
Fig. 6. Effect of PF-04449613 on decaying phase rate constant of Ca^{2+} extrusion by PMCA alone (r_{PMCA}) and Ca^{2+} leak rate. A and B: Representative curves of Ca^{2+} transients induced by caffeine (20 mmol/L) and Ca^{2+} leak rate in absence (A) and presence (B) of PF-04449613 (5 $\mu\text{mol/L}$) in the conditions of Na^+ and Ca^{2+} free extracellular solution with or without Tetracaine following steady field stimulation induced Ca^{2+} transient in normal Tyrode's solution (NT). Tetracaine, a RyR2 blocker, was used to block the Ca^{2+} leak from RyR2. The histograms show the statistical results of Ca^{2+} leak rates of real leak value to Ca^{2+} content (C) and r_{PMCA} (D). Mean $\pm$ SD, $n = 12$ for both control and PF-04449613 (5 $\mu\text{mol/L}$) treated group. The t -test was used for statistical analysis. * $P < 0.05$ vs control.

而新的抗心衰药物 Ivabradine 在发挥正性肌力的同时还能降低外周阻力降低心率, 越来越受到临床的关注^[19]。

本研究的双压力-容积导管实验表明 PDE9 抑制剂 PF-04449613 对大鼠心脏具有正性肌力作用, 同时增加收缩压, 降低舒张压及血管外周阻力。有研究报道, PF-04449613 使细胞内 cGMP 水平升高, 激活环鸟苷酸依赖的蛋白激酶 (PKG) 从而使肌浆网 SERCA2a 摄取钙离子增加; PKG 还可以磷酸化三磷酸肌醇受体 (IP₃ 受体), 导致肌浆网和内质网钙释放减少^[20]; PKG 可以激活钙离子依赖的大电导钾离子通道 (BK), 从而打开该通道, 使细胞膜超极化, 并关闭许多其他通道, 包括 L 型钙通道^[21]。这些途径都降低了细胞内游离的钙离子浓度而使血管平滑肌舒张, 最终导致血管外周阻力的降低。本研究离体心脏实验同样表明 PF-04449613 具有正性肌力作用, 表明 PF-04449613 的这种作用是不依赖于神经体液。然而, PF-04449613 对心率的作用, 在体与离体表现相反的作用, PF-04449613 对心脏的直接作用 (离体心脏实验) 是减慢心率; 而在体实验条件下, PF-04449613 显著增加心率。在体实验条件下, PF-04449613 增加心率可能是降低血管外周阻力导致的交感神经活性增强, 但这需要进一步实验确认。

基于正性肌力作用与胞浆钙释放有着密切关联, 本研究采用钙释放实验探讨 PF-04449613 正性肌力的作用机理。钙释放直接影响心肌的收缩与舒张, 受到多种因子和酶的调控。钙从肌浆网中释放到胞浆, 必须具备两个条件, 一是肌浆网钙浓度高于胞浆, 二是钙释放的通道 RyR2 通道突然开放。随后舒张期钙被肌浆网 SERCA2a 逆浓度耗能回吸收到肌浆网, 还有少量钙经过细胞膜上 NCX 及 PMCA 外排出细胞。此外, 在舒张期 RyR2 存在一定程度的钙泄漏, 而钙泄漏直接影响心肌舒张期的舒张程度^[22, 23]。RyR2 及 SERCA2a 功能受多种酶的调控, 其中包括蛋白激酶 A (protein kinase A, PKA)^[24] 及钙/钙调蛋白依赖性蛋白激酶 II (Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II, CaMKII)^[25]。PDE9 抑制剂增加细胞内不同时空内 cGMP 浓度, 实现对 PKA 及 CaMKII 的调控, 从而调节钙释放。本研究场刺激诱导的钙释放实验中, PF-04449613 增加肌浆网的钙释放幅值, 该作用或是 RyR2 通道开放程度增加, 或是肌浆网 SERCA2a 活性增加而导致肌浆网内

钙浓度梯度增加。而钙泄漏实验表明 PF-04449613 并没有影响 RyR2 活性, 因此判断 SERCA2a 活性增加是正性肌力作用的主要作用靶点。钙释放的下降相主要由 SERCA2a 介导, 采用药物代谢动力学的药物浓度-时间分析的方法, 对下降相曲线进行分析, 结果表明钙释放的下降相具有两个成分, 一是由 SERCA2a 介导的快速下降成分, 另一个为 NCX 及 PMCA 介导的缓慢下降成分。PF-04449613 能增加快速下降相快成分的速率, 降低下降相慢成分的速率 (NCX 及 PMCA 介导)。此外, 咖啡因诱导的钙释放实验表明, PF-04449613 并未显著影响 NCX 及 PMCA 的活性。这两个结果表面上是不一致, 但实际上并不相互矛盾。在场刺激钙释放实验中, 由于并没有采用咖啡因, SERCA2a 的功能未被废除, 钙释放的回吸收相由 SERCA2a、NCX 及 PMCA 参与。由于 SERCA2a 的活性被 PF-04449613 增强, 钙主要通过 SERCA2a 回吸收至肌浆网, 而钙通过 NCX 及 PMCA 外排至细胞外的作用减弱。在咖啡因诱导的钙释放中, SERCA2a 的功能被废除, PF-04449613 对 NCX 及 PMCA 的直接作用无显著性改变, 这也反映了整体生理功能实验的优势。在咖啡因诱导的钙释放实验中, PF-04449613 显著降低舒张期钙泄漏率。此作用很好地解释了在体实验中舒张期心室压力下降的现象。

本研究仅从正常大鼠的生理功能阐明 PDE9 抑制剂 PF-04449613 对心脏正性肌力作用机理, 但仍需要在心衰模型动物和分子生物学方面进一步确认 PF-04449613 增加 SERCA2a 活性的具体靶点, 包括受磷蛋白磷酸化等。尽管如此, 本研究首次阐明 PDE9 抑制剂可改变心脏血管血流动力学参数, 显著影响大鼠左心室功能。

综上所述, PDE9 抑制剂 PF-04449613 通过增加 SERCA2a 活性发挥其对大鼠心脏正性肌力作用, 降低外周血管阻力从而导致舒张压降低。

参考文献

- 1 Huang HL, Xie M, Gao L, Zhang WH, Zhu XJ, Wang YW, Li W, Wang RR, Chen KS, Boutjdir M, Chen L. Rolipram, a PDE4 Inhibitor, enhances the inotropic effect of rat heart by activating SERCA2a. *Front Pharmacol* 2019; 10: 221.
- 2 Lugnier C, Meyer A, Charloux A, Andrès E, Gény B, Talha S. The endocrine function of the heart: physiology and involvements of natriuretic peptides and cyclic nucleotide phosphodiesterases in heart failure. *J Clin Med* 2019; 8(10): 1746.

- 3 Keravis T, Lugnier C. Cyclic nucleotide phosphodiesterase (PDE) isozymes as targets of the intracellular signalling network: benefits of PDE inhibitors in various diseases and perspectives for future therapeutic developments. *Br J Pharmacol* 2012; 165(5): 1288–1305.
- 4 Conran N, Torres L. cGMP modulation therapeutics for sickle cell disease. *Exp Biol Med* (Maywood) 2019; 244(2): 132–146.
- 5 Reneerkens OA, Rutten K, Steinbusch HW, Blokland A, Prickaerts J. Selective phosphodiesterase inhibitors: a promising target for cognition enhancement. *Psychopharmacology* (Berl) 2009; 202(1–3): 419–443.
- 6 Huang XF, Jiang WT, Liu L, Song FC, Zhu X, Shi GL, Ding SM, Ke HM, Wang W, O'Donnell JM, Zhang HT, Luo HB, Wan YQ, Song GQ, Xu Y. A novel PDE9 inhibitor WYQ-C36D ameliorates corticosterone-induced neurotoxicity and depression-like behaviors by cGMP-CREB-related signaling. *CNS Neurosci Ther* 2018; 24(10): 889–896.
- 7 Lai B, Li M, Hu WL, Li W, Gan WB. The phosphodiesterase 9 inhibitor PF-04449613 promotes dendritic spine formation and performance improvement after motor learning. *Dev Neurobiol* 2018; 78(9): 859–872.
- 8 Saravani R, Karami-Tehrani F, Hashemi M, Aghaei M, Edalat R. Inhibition of phosphodiesterase 9 induces cGMP accumulation and apoptosis in human breast cancer cell lines, MCF-7 and MDA-MB-468. *Cell Prolif* 2012; 45(3): 199–206.
- 9 Harms JF, Menniti FS, Schmidt CJ. Phosphodiesterase 9A in brain regulates cGMP signaling independent of nitric-oxide. *Front Neurosci* 2019; 13: 837.
- 10 Tajima T, Shinoda T, Urakawa N, Shimizu K, Kaneda T. Phosphodiesterase 9 (PDE9) regulates bovine tracheal smooth muscle relaxation. *J Vet Med Sci* 2018; 80(3): 499–502.
- 11 Lee DI, Zhu GS, Sasaki T, Cho GS, Hamdani N, Holewinski R, Jo SH, Danner T, Zhang M, Rainer PP, Bedja D, Kirk JA, Ranek MJ, Dostmann WR, Kwon C, Margulies KB, Van Eyk JE, Paulus WJ, Takimoto E, Kass DA. Phosphodiesterase 9A controls nitric-oxide-independent cGMP and hypertrophic heart disease. *Nature* 2015; 519(7544): 472–476.
- 12 Kim GE, Kass DA. Cardiac phosphodiesterases and their modulation for treating heart disease. *Handb Exp Pharmacol* 2017; 243: 249–269.
- 13 Patel RB, Shah SJ. Drug targets for heart failure with preserved ejection fraction: a mechanistic approach and review of contemporary clinical trials. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2019; 59: 41–63.
- 14 Wang PX, Li ZM, Cai SD, Li JY, He P, Huang Y, Feng GS, Luo HB, Chen SR, Liu PQ. C33(S), a novel PDE9A inhibitor, protects against rat cardiac hypertrophy through upregulating cGMP signaling. *Acta Pharmacol Sin* 2017; 38(9): 1257–1268.
- 15 Altara R, Giordano M, Nordén ES, Cataliotti A, Kurdi M, Bajestani SN, Booz GW. Targeting obesity and diabetes to treat heart failure with preserved ejection fraction. *Front Endocrinol (Lausanne)* 2017; 8: 160.
- 16 Priksz D, Bombicz M, Varga B, Kurucz A, Gesztelyi R, Balla J, Toth A, Papp Z, Szilvassy Z, Juhasz B. Upregulation of myocardial and vascular phosphodiesterase 9A in a model of atherosclerotic cardiovascular disease. *Int J Mol Sci* 2018; 19(10): 2882.
- 17 Li S, Huang HL, Zhang MD, Wang W, Xue SY, Gao Y, Xie M, Chen KS, Liu FM, Chen L. Liguzinediol enhances the inotropic effect of rat hearts via inhibition of protein phosphatase (PP1 and PP2A) activities. *J Cardiovasc Pharmacol* 2017; 69(4): 236–244.
- 18 Ponikowski P, Voors AA, Anker SD, Bueno H, Cleland JG, Coats AJ, Falk V, González-Juanatey JR, Harjola VP, Janikowska EA, Jessup M, Linde C, Nihoyannopoulos P, Parissis JT, Pieske B, Riley JP, Rosano GM, Ruilope LM, Ruschitzka F, Rutten FH, van der Meer P; Authors/Task Force Members; Document Reviewers. 2016 ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure: The Task Force for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure of the European Society of Cardiology (ESC). Developed with the special contribution of the Heart Failure Association (HFA) of the ESC. *Eur J Heart Fail* 2016; 18(8): 891–975.
- 19 Xie M, Huang HL, Zhang WH, Gao L, Wang YW, Zhu XJ, Li W, Chen KS, Boutjdir M, Chen L. Increased sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase 2a activity underlies the mechanism of the positive inotropic effect of ivabradine. *Exp Physiol* 2020; 105(3): 477–488.
- 20 Schlossmann J, Ammendola A, Ashman K, Zong X, Huber A, Neubauer G, Wang GX, Allescher HD, Korth M, Wilm M, Hofmann F, Ruth P. Regulation of intracellular calcium by a signalling complex of IRAG, IP3 receptor and cGMP kinase I β . *Nature* 2000; 404(6774): 197–201.
- 21 Tsai EJ, Kass DA. Cyclic GMP signaling in cardiovascular pathophysiology and therapeutics. *Pharmacol Ther* 2009; 122(3): 216–238.
- 22 Mustroph J, Wagemann O, Lebek S, Tarnowski D, Ackermann J, Drzymalski M, Pabel S, Schmid C, Wagner S, Sossalla S, Maier LS, Neef S. SR Ca²⁺-leak and disordered excitation-contraction coupling as the basis for arrhythmogenic and negative inotropic effects of acute ethanol exposure. *J Mol Cell Cardiol* 2018; 116: 81–90.
- 23 Bers DM. Cardiac sarcoplasmic reticulum calcium leak:

- basis and roles in cardiac dysfunction. *Annu Rev Physiol* 2014; 76: 107–127.
- 24 Kim J, Masterson LR, Cembran A, Verardi R, Shi L, Gao J, Taylor SS, Veglia G. Dysfunctional conformational dynamics of protein kinase A induced by a lethal mutant of phospholamban hinder phosphorylation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2015; 112(12): 3716–3721.
- 25 Haghighi K, Bidwell P, Kranias EG. Phospholamban interaction in cardiac contractility and survival: A new vision of an old friend. *J Mol Cell Cardiol* 2014; 77: 160–167.