

双孔钾通道研究进展

董侃¹,陶谦民¹,夏强²

(1. 浙江大学医学院 附属第一医院心内科,浙江 杭州 310003;2. 浙江大学医学院 生理教研室,浙江 杭州 310031)

[摘要] 双孔钾通道是具有 4 个跨膜片段(4TMS)和 2 个孔道结构域(2P)的钾通道亚型,按其功能可分成 6 类:①TWIK-1 和 TWIK-2,②TREK-1 和 TREK-2,③TRAAK,④TASK-1、TASK-2、TASK-3、TASK-4 和 TASK-5,⑤THIK-1 和 THIK-2,⑥TALK-1 和 TALK-2。双孔钾通道组织分布广泛,在可兴奋细胞和非可兴奋细胞中均可发现,其产生的电流是瞬时性和非失活性的,在所有膜电位时程中均有活性,且对经典的钾通道阻滞剂不敏感。

[关键词] 钾通道;双孔钾通道;生理学;文献综述

[中图分类号] R 33 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1008-9292(2005)05-0476-05

钾离子通道是细胞内 K^+ 外流而引起外向或内向电流的离子通道,广泛分布于骨骼肌、神经、心脏、血管、气管、胃肠道、血液、内分泌和腺体等细胞,是目前发现的亚型最多、功能最复杂的一类离子通道。根据电压敏感性、生理和药理特性可将钾通道分为电压门控类、钙敏感类、受体耦联类、内向整流类和其他类钾通道。根据拓扑结构差异,将通道亚型分为 3 个超家族:①具有 6 个跨膜片段(6 transmembrane segments, 6TMS)和 1 个孔道结构域(1 pore, 1P)的钾通道亚型。②具有 2 个跨膜片段(2TMS)和 1 个孔道结构域(1P)的钾通道亚型。这两类钾通道亚型与电压依赖性钾通道、ATP 敏感性钾通道等相关。③近来发现的具有 4 个跨膜片段(4TMS)和 2 个孔道结构域(2P)的钾通道亚型,故也被称为双孔钾通道(two-pore-domain potassium channels),其功能有编码背景钾电流通道。目前,有关双孔钾通道的研究进展较快,且其具有重要的生理学和药理学意义,现综述如下。

1 双孔钾通道的分类和结构及分布

双孔钾通道具有 4 个跨膜片段(4TMS)和 2 个孔道结构域(2P),其氨基端与羧基端均位于胞浆侧,而胞外侧含 M1 与 P1 形成的环行结构。双孔钾通道按照其功能可被分为 6 类:①TWIK-1(weak inward rectifiers K channel)和 TWIK-2 表达弱内向整流钾通道;②TREK-1

(TWIK-related K channels)和 TREK-2 表达的通道被多不饱和脂肪酸和机械张力所激活;③ TRAAK (TWIK-related arachidonic acid-stimulated K channels)通道也能被多不饱和脂肪酸和机械张力所激活;④TASK-1 (Tandem pore domain acid-sensitive K channel)、TASK-2、TASK-3、TASK-4 和 TASK-5 表达酸度敏感性外向整流钾通道;⑤THIK-1(tandem pore domain halothane inhibited K channel)和 THIK-2 表达氟烷可抑制的钾通道;⑥TALK-1 (TWIK-related alkaline pH activated K^+ channel)和 TALK-2 表达碱性激活的背景钾通道。它们以二聚体方式发挥作用,其组织分布广泛,在可兴奋细胞和非可兴奋细胞中均可发现^[1,2]。

1.1 TWIK TWIK-1 及 TWIK-1 样通道(KCNK7)主要在中枢神经系统表达,如小脑颗粒细胞层、丘脑网状核、粒状核、纹状体、部分皮质、海马,以及运动神经元;而 TWIK-2 主要在外周组织表达^[3,4]。

1.2 TREK TREK-1 在皮质、基底神经节、海马、下丘脑、丘脑等的皮层下神经元均有发现,在背根神经节感觉神经纤维和下丘脑视前区温度受体密集区大量聚集。人 TREK-1

收稿日期:2004-04-05 修回日期:2005-07-27

作者简介:董侃(1976—),男,硕士,从事心血管疾病的临床与基础研究;E-mail:dongkan76@sohu.com

(hTREK-1)通道含411个氨基酸,与鼠TREK-1(rTREK-1)通道相比在C'端多了41个氨基酸。hTREK-1在尾状核、内核、杏仁核、丘脑和脊髓分布水平较高,而在多数外周组织中水平较低。分析显示其mRNA与rTREK-1有93%同源性。TREK-2在胰腺和肾脏中有高表达,而在脑、睾丸、结肠中低表达。TREK-2含538个氨基酸,与TREK-1有78%同源性,其基因位于14q31^[5]。

1.3 TRAAK 人TRAAK(hTRAAK)在所有神经元和体细胞中有表达,在小脑皮质、新皮质、尾状核、脑干某些神经元,以及胎盘有高表达,但在脑和脊髓多数部位的轴突和树突中较少,而在视网膜神经节等树突中聚集。hTRAAK通道基因是在人大脑中被克隆的,位于染色体11q13,与鼠TRAAK有88%的同源性^[6]。

1.4 TASK TASK-1分布在中枢神经系统和外周组织。小脑、躯体运动神经元有TASK-1 mRNA高表达,在舌下神经运动神经元和肾小球细胞中也有发现^[7]。TASK-2主要在外周表达,但其mRNA在脊神经节和脊髓中有发现。小鼠TASK-2(mTASK-2)在嗜酸细胞和肾组织中有表达^[3]。TASK-3分布较广泛,在脑、肾、肝、肺、胃肠、睾丸和骨骼肌高表达,特别是在运动神经元、小脑颗粒神经元、蓝斑、脊神经及下丘脑的许多神经元中,在心脏中表达很少。人TASK-3与TASK-1有62%相同,但胞浆侧C端序列仅有很少的保守性^[8]。TASK-4在肝、肺、胎盘、主动脉和心脏有表达^[9]。TASK-5的mRNA在胰、肝、肾、肺、卵巢、睾丸、心脏中有高表达,与TASK-1和TASK-3有51%相同^[10]。

1.5 THIK 在大鼠rTHIK-1表达无所不在,而rTHIK-2仅在脑、肾等几种组织中表达。THIK-1和THIK-2间有58%相同,人THIK基因分别位于染色体14q24.1-14q24.3(hTHIK-1)和2p22-2p21(hTHIK-2)^[11]。

1.6 TALK TALK-1仅在胰腺表达, TALK-2主要在胰腺表达,但在肝、胎盘、心、肺中低水平表达。TALK-1和TALK-2基因位于染色体6p21.1-p21.2^[12]。

2 双孔钾通道的功能特性

哺乳类动物中的双孔钾通道所产生的电流具有瞬时性和非失活性特征,在所有膜电位时程中有活性,而且对经典的钾通道阻滞剂不敏感。这些特性与背景电流相关,在许多细胞静息电位的维持中起主要作用,其产生的渗漏性电流通过使膜电位超极化来抑制兴奋性;与此相反,电压依赖性钾通道允许兴奋产生,因为它不干涉膜电位升至阈值,而是积极促进膜电位恢复和快速地再兴奋^[13]。

2.1 鼠TWIK-2 电流较人TWIK-2电流大15倍,两者在生理 $[K^+]$ 梯度下表现为外向整流电流,在对称性 $[K^+]$ 梯度下表现为中度内向整流电流。TWIK-2具低电导特性,其电流在去极化状态是失活的,且有高度的温度敏感性^[14]。

2.2 TREK-1 能被温度逐渐激活,具可复性。温度每升高10℃TREK-1电流放大近7倍。在转染细胞中,TREK-2产生快速激活、非失活性外向整流钾电流,在-40 mV时,其平均开放时间0.9 ms;其单通道电导在40 mV和150 mmol/L K^+ 时为100 ps^[5]。

2.3 TRAAK 通道电流能被不饱和脂肪酸和机械张力激活。TREK、TRAAK均能在神经细胞(鼠坐骨神经)轴突中进行快速、双相运输^[15]。

2.4 TASK-1 通道对pH和电压敏感,并能被去甲肾上腺素、P物质、促甲状腺激素释放激素等物质完全抑制。mTASK-2在HEK-293细胞的表达在胞内无钙时产生钾电流。TASK-2通道对阳离子的选择性为 $K^+ > Rb^+ > Cs^+ > NH_4^+ > Na^+$ 。细胞吸附膜片钳记录HEK-293中的TASK-3通道电流,其单通道的电流-电压关系表现为内向整流特性,去极化可显著增加通道的开放概率。在爪蟾卵母细胞和HEK-293细胞中,hTASK-3产生稳定的膜电流,该电流完全服从Goldman-Hodgkin-Katz方程。此外,当电压从-80 mV接近-20 mV时,能诱导出时间依赖性、逐渐增大的电流,此电流从动力学上呈单指数,时间常数为10 ms,且与处在-20到+80 mV间的测试电压无关^[8]。在爪蟾卵母细胞中,TASK-4电流为外向整流电流,

能被胞外高钾所抑制。hTASK-5 基因位于 20q12-20q13, 在爪蟾卵母细胞为无功能性表达, 但 TASK-5/TASK-3 嵌合体(包含 TASK-3 的 M1、M3 区)能产生选择性钾电流。TASK-5 表达主要在中枢听觉传导通路, 这提示其可能与一些辅助蛋白联合, 在听觉系统短暂的信息传输中起重要作用^[10]。

2.5 爪蟾卵母细胞表达的 rTHIK-1 钾通道在对称性钾溶液中产生弱内向整流电流。rTHIK-2 表达是非功能性的。对卵母细胞注入绿荧光蛋白标记的 rTHIK-1 或 rTHIK-2, 并用共聚焦显微镜观察, 发现两者均定位于外膜, 而且 rTHIK-1 产生的电流不被共转染的 rTHIK-2 影响, 提示两者未形成二聚体^[11]。

2.6 TALK 编码通道可被碱性环境所激活, 产生瞬时性和非失活性电流。

3 双孔钾通道的调控

双孔钾通道的调控机制差异很大, 其能被体内外的许多生理和病理因素所调节, 神经递质、麻醉剂、温度、pH、氧分压、渗透压等均可影响其通道特性^[16]。而且, 双孔钾通道也可影响心律失常、细胞凋亡、脑缺血保护、动脉张力调节等病理过程^[17~20]。

3.1 TWIK-1 和 TWIK-2 可被蛋白激酶 C 激活, 并受胞内酸度抑制。在生理钾浓度下, TWIK-2 能被 0.1 mmol/L Ba^{2+} 、奎尼丁抑制一半的活性。作为第一个被报道的非活性 2P 钾通道 TWIK-2 具有基线、瞬时和迟发的激活特性, 这提示它在细胞生电性上具有重要作用^[4, 14]。

3.2 TREK-1 和 TRAAK 是首次克隆的多不饱和脂肪酸激活和机械张力门控性钾通道。前列腺素 E_2 和 cAMP 可通过蛋白激酶 A 介导的 TREK-1 通道上 333 位丝氨酸磷酸化, 逆转由温度升高激活的 TREK-1 电流。在西帕曲近(sipatrigine, 10 $\mu\text{mol/L}$)作用下, 人 TREK-1 通道及 TRAAK 通道分别被抑制 $(73.3 \pm 4.4)\%$ 和 $(45.1 \pm 11.2)\%$, 具有剂量依赖性。利用全细胞膜片钳技术, 在大鼠心室肌细胞首次发现 TREK-1 样电流 $[I(\text{TREK})]$, 它被 ATP 激活, 对花生四烯酸、细胞内酸中毒及多种钾电

流抑制剂敏感^[5, 21]。TREK-2 电流能被 2 mmol/L Ba^{2+} 、花生四烯酸、亚油酸、溶血卵磷脂和胞内酸性所激活; 挥发性麻醉剂如氯仿、氟烷、异氟醚以及利鲁唑也可激活之; 胞内 cAMP 可抑制 TREK-2 电流。此外, G_s 蛋白耦联受体 5HT 4sR 或 G_q 蛋白耦联受体 mGluR1 能抑制其活性, 而激活 G_i 蛋白耦联受体 mGluR2, 能增加 TREK-2 电流^[22]。

3.3 TRAAK 通道电流是瞬时性和非失活性的, 且不被经典钾通道阻滞剂如四乙铵、4-AP、TTX、 Ba^{2+} 、 Cs^+ 和奎尼丁所抑制。在 COS-7 细胞中表达的鼠 TRAAK 能产生中等内向整流性电流, 当胞内 pH 由 7.3 升至 8.3 或 8.8 时, 通道活性升高 5~14 倍。将 TRAAK 的 C' 端用 TASK-1 和 TASK-3 的 C' 端代替, 不影响它对压力、脂肪酸和碱的反应。TRAAK 能被利鲁唑持续激活; 而利鲁唑对 TREK-1 的激活短暂且伴随着抑制, 此抑制是由于利鲁唑引起胞内 cAMP 聚集, 继而发生蛋白激酶 A 依赖的 TREK-1 抑制^[15]。

最近国内学者对 TREK-1、TREK-2 和 TRAAK 进行研究, 发现它们可能与脑缺血时的神经保护作用有关^[19]。

3.4 TASK-1 和 TASK-2 通道对胞外的生理 pH 的小范围变化敏感。溶血磷脂酸通过其受体, 血管紧张素 II 和卡巴胆碱分别通过 Ang II 1a 受体及 M1 受体抑制 TASK-1。磷脂酶 C 抑制剂 U-73122 可抑制此过程, 但磷脂酶 C 的下游信号因子(IP_3 、胞浆钙浓度、二酰甘油)不中介此抑制过程。这提示磷脂酶 C 在受体中介的 TASK-1 信号转导过程的重要性。TASK-1 能被低于 10^{-3}mmol/L 浓度的内源性大麻类物质 anandamide 直接抑制而不依赖 CB1 和 CB2 受体, 在小脑中 anandamide 能抑制 TASK-1 的标准外向电流(I_{kso}), 并诱导去极化^[23]。氨甲酰基血小板活化因子(C-PAF)可通过对 TASK-1 的阻断, 经 PKC 途径抑制心肌细胞电活动, 最终引起室性心律失常^[17]。最近研究还表明 TASK-1 与肺动脉张力调节有关^[20]。TASK-2 通道能被细胞体积的变化所调节, 说明此电流在容量调节上起一定作用。TASK-2 的 C' 端第 4 个跨膜段的 10~25 氨基酸与通道

动力学及其对压力、脂肪酸、pH 的敏感性有关。将 TASK-2 的 C' 端用 TASK-3 的 C' 端代替则前者对脂肪酸和酸的敏感性消失。低渗能增加 mTASK-2 电流, 渗透性细胞皱缩则抑制 mTASK-2 电流^[3]。

若细胞外 pH 从 7.2 降至 6.4 和 6.0 时, TASK-3 电流分别被抑制 74% 和 96%。爪蟾卵母细胞中表达的 TASK-3 通道电流表现为外向整流钾电流, 且可被较低的胞外 pH 所抑制。在 HEK-293 细胞, hTASK-3 电流能被胞外酸性所抑制, 其中位 pH 为 6.4。若用天冬氨酸和酪氨酸替换 98 位组氨酸, 则其酸敏感性消失。此外, TASK-3 能不同程度地被硫酸钡 (57%, 3 mmol/L)、奎尼丁 (37%, 100 μ mol/L)、和利多卡因 (62%, 1 mmol/L) 抑制^[8]。

但当 TASK-1 和 TASK-3 被共同转染至爪蟾卵母细胞中时, 其电流表现为中度 pH 敏感性, 且对钉红不敏感 (TASK-3 对钉红敏感), 这提示 TASK-1/TASK-3 异二聚体形成, 这与其它双孔钾通道以同二聚体方式发挥作用时表现的特性不同^[24]。最近的研究表明, 钉红对 TASK-3 抑制的作用是通过将两个亚基的第 70 位谷氨酸互相连接而实现的^[25]。

TASK-4 电流可被硫酸钡有效抑制 (83%, 2 mmol/L), 但仅被 1 mmol/L 奎宁、布比卡因和利多卡因微弱抑制, 且不被四乙铵、4-氨基吡啶和 Cs⁺ 抑制。TASK-4 对胞外 pH 敏感, 但与其它 TASK 相比其对碱性 pH 更敏感。因此, TASK-4 与其它 TASK 协调配合能在较宽范围的胞外 pH 下调节细胞膜电位^[9]。

TASK-5、TASK-3 和 TASK-1 在 C' 端都含有 5 个保守的氨基酸序列。TASK-5、TASK-3 和 TASK-1 (而非 TASK-4) 与衔接蛋白 14-3-3 的亚型有相互作用。TASK-1 的 C' 末端的五肽 RRx(S/T)x 对于它与衔接蛋白 14-3-3 间的弱作用是相关的, 然而其最后 40 位氨基酸对于两者间的强作用是必须的。TASK-1 和 14-3-3 在突触膜提取物和突触后致密膜中获得, 这提示 TASK-3 和 TASK-1 与衔接蛋白 14-3-3 的相互作用有助于通道转运至膜表面^[26]。

3.5 THIK 电流被花生四烯酸增强, 而被氟烷抑制。

3.6 TALK 电流对 Ba²⁺、奎宁、奎尼丁、氯仿、氟烷和异氟醚敏感, 但不被 TEA、4-AP、Cs⁺、花生四烯酸、高渗溶液、蛋白激酶 C 和 A 的激动剂、胞内 Ca²⁺ 改变和 Gi 和 Gq 蛋白的激活所影响^[12]。

综上所述, 由于细胞内外的生理和/或病理相关的环境变化能影响或调控双孔钾通道的活性与功能, 这种通道活性与功能的改变进而可能影响细胞、组织和器官的功能。但由于双孔钾通道的阻断剂和开放剂难以获得, 使得双孔钾通道特性的研究存在较大难度。最近几年, 对双孔钾通道的研究已从结构、分布逐渐向功能和调控方向发展, 例如, 最新研究认为虽然这些钾通道的结构和生理特性迥异, 但二磷酸磷脂酰肌醇 (PIP2) 是其共同的门控分子^[27]。相信随着工具药的不断开发和对双孔钾通道的进一步研究, 其确切生理功能将得到进一步阐明, 并将成为一个新的药物治疗靶点。

References:

- [1] LESAGE F, LAZDUNSKI M. Molecular and functional properties of two-pore-domain potassium channels [J]. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2000, 279(5): F793—F801.
- [2] MEDHURST A D, RENNIE G, CHAPMAN C G, et al. Distribution analysis of human two pore domain potassium channels in tissues of the central nervous system and periphery [J]. *Brain Res Mol Brain Res*, 2001, 86(1-2): 101—114.
- [3] KIM Y, GNATENCO C, BANG H, et al. Localization of TREK-2 K⁺ channel domains that regulate channel kinetics and sensitivity to pressure, fatty acids and pH [J]. *Pflugers Arch*, 2001, 442(6): 952—960.
- [4] PATEL A J, MAINGRET F, MAGNONE V, et al. TWIK-2, an inactivating 2P domain K⁺ channel [J]. *J Biol Chem*, 2000, 275(37): 28 722—28 730.
- [5] LESAGE F, TERRENOIRE C, ROMEV G, et al. Human TREK2, a 2P domain mechano-sensitive K⁺ channel with multiple regulations by polyunsaturated fatty acids, lysophospholipids, and Gs, Gi, and Gq protein-coupled receptors [J]. *J Biol Chem*, 2000, 275(37): 28 398—28 405.
- [6] REYES R, LAURITZEN I, LESAGE F, et al. Immunolocalization of the arachidonic acid and mechanosensitive baseline traak potassium channel in the nervous system [J]. *Neuroscience*, 2000, 95(3): 893—901.

- [7] CZIRJAK G, PETHEO G L, SPAT A, et al. Inhibition of TASK-1 potassium channel by phospholipase C [J]. **Am J Physiol Cell Physiol**, 2001, 281(2): C700—C708.
- [8] KIM Y, BANG H, KIM D. TASK-3, a new member of the tandem pore K(+) channel family [J]. **J Biol Chem**, 2000, 275(13): 9 340—9 347.
- [9] DECHER N, MAIER M, DITTRICH W, et al. Characterization of TASK-4, a novel member of the pH-sensitive, two-pore domain potassium channel family [J]. **FEBS Lett**, 2001, 492(1-2): 84—89.
- [10] KARSCHIN C, WISCHMEYER E, PREISIG-MULLER R, et al. Expression pattern in brain of TASK-1, TASK-3, and a tandem pore domain K(+) channel subunit, TASK-5, associated with the central auditory nervous system [J]. **Mol Cell Neurosci**, 2001, 18(6): 632—648.
- [11] RAJAN S, WISCHMEYER E, KARSCHIN C, et al. THIK-1 and THIK-2, a novel subfamily of tandem pore domain K⁺ channels [J]. **J Biol Chem**, 2001, 276(10): 7 302—7 311.
- [12] GIRARD C, DUPRAT F, TERRENOIRE C, et al. Genomic and functional characteristics of novel human pancreatic 2P domain K(+) channels [J]. **Biochem Biophys Res Commun**, 2001, 282(1): 249—256.
- [13] BOCKENHAUER D, ZILBERBERG N, GOLDSTEIN S A. KCNK2: reversible conversion of a hippocampal potassium leak into a voltage-dependent channel [J]. **Nat Neurosci**, 2001, 4(5): 486—491.
- [14] TALLEY E M, SOLORZANO G, LEI Q, et al. Cns distribution of members of the two-pore-domain (KCNK) potassium channel family [J]. **J Neurosci**, 2001, 21(19): 7 491—7 505.
- [15] LAURITZEN I, BLONDEAU N, HEURTEAUX C, et al. Polyunsaturated fatty acids are potent neuroprotectors [J]. **EMBO J**, 2000, 19(8): 1 784—1 793.
- [16] TALLEY E M, SIROIS J E, LEI Q, et al. Two-pore-Domain (KCNK) potassium channels: dynamic roles in neuronal function [J]. **Neuroscientist**, 2003, 9(1): 46—56.
- [17] BARBUTI A, ISHII S, SHIMIZU T, et al. Block of the background K(+) channel TASK-1 contributes to arrhythmogenic effects of platelet-activating factor [J]. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, 2002, 282(6): H2 024—H2 030.
- [18] TRIMARCHI J R, LIU L, SMITH P J, et al. Apoptosis recruits two-pore domain potassium channels used for homeostatic volume regulation [J]. **Am J Physiol Cell Physiol**, 2002, 282(3): C588—C594.
- [19] XU X, PAN Y, WANG X. Alterations in the expression of lipid and mechano-gated two-pore domain potassium channel genes in rat brain following chronic cerebral ischemia [J]. **Brain Res Mol Brain Res**, 2004, 120(2): 205—209.
- [20] GARDENER M J, JOHNSON I T, BURNHAM M P, et al. Functional evidence of a role for two-pore domain potassium channels in rat mesenteric and pulmonary arteries [J]. **Br J Pharmacol**, 2004, 142(1): 192—202.
- [21] AIMOND F, RAUZIER J M, BONY C, et al. Simultaneous activation of p38 MAPK and p42/44 MAPK by ATP stimulates the K⁺ current ITREK in cardiomyocytes [J]. **J Biol Chem**, 2000, 275(50): 39 110—39 116.
- [22] MEADOWS H J, CHAPMAN C G, DUCKWORTH D M, et al. The neuroprotective agent sipatrigine (BW619C89) potently inhibits the human tandem pore-domain K(+) channels TREK-1 and TRAAK [J]. **Brain Res**, 2001, 892(1): 94—101.
- [23] MAINGRET F, PATEL A J, LAZDUNSKI M, et al. The endocannabinoid anandamide is a direct and selective blocker of the background K(+) channel TASK-1 [J]. **EMBO J**, 2001, 20(1-2): 47—54.
- [24] CZIRJAK G, ENYEDI P. TASK-3 dominates the background potassium conductance in rat adrenal glomerulosa cells [J]. **Mol Endocrinol**, 2002, 16(3): 621—629.
- [25] CZIRJAK G, ENYEDI P. Ruthenium red inhibits TASK-3 potassium channel by interconnecting glutamate 70 of the two subunits [J]. **Mol Pharmacol**, 2003, 63(3): 646—652.
- [26] RAJAN S, PREISIG-MULLER R, WISCHMEYER E, et al. Interaction with 14-3-3 proteins promotes functional expression of the potassium channels TASK-1 and TASK-3 [J]. **J Physiol**, 2002, 545(Pt 1): 13—26.
- [27] LOPES C M, CZIRJAK G, et al. PIP₂ hydrolysis underlies agonist-induced inhibition and regulates voltage gating of two-pore domain K⁺ channels [J]. **J Physiol**, 2005, 564(Pt 1): 117—129.