

# 三聚体配体门控离子通道胞内区域的功能研究进展

鲁燕, 林义雨, 汪津

中国药科大学基础医学与临床药学院, 江苏南京 210009

[摘要] 配体门控离子通道是一大类重要的膜蛋白。嘌呤能配体门控离子通道(P2X)受体和酸敏感离子通道(ASIC)是三聚体配体门控离子通道的代表成员。P2X受体胞内区域的结构差异可影响脱敏过程,胞内区域的侧窗可作为离子渗透到细胞内的潜在路径并对离子选择性有决定作用,胞内区域众多氨基酸残基的磷酸化参与调节离子通道的活性。此外,胞内区域与N-甲基-D-天冬氨酸受体、 $\gamma$ -氨基丁酸受体、5-羟色胺受体和N型乙酰胆碱受体等其他配体门控离子通道存在相互作用并介导突触可塑性等病理生理过程。ASIC胞内区域的构象变化会暴露胞内信号分子的结合位点并促进代谢信号转导,胞内区域的氨基酸Val16、Ser17、Ile18、Gln19和Ala20可以调节通道上膜表达并参与门控过程,胞内区域的PDZ结构域可与多种细胞内蛋白质如骨架蛋白CIPP和p11相互作用从而参与对受体的调控,胞内区域羧基端和氨基端的众多磷酸化位点参与了对受体的调控。此外,胞内区域参与了疼痛、缺血性脑卒中、精神疾病、神经退行性疾病等多种病理生理过程。本文综述了P2X受体和ASIC胞内区域的结构以及在调节离子通道的门控特性和病理生理功能中的作用,以期为三聚体配体门控离子通道的药物研发提供新思路。



[关键词] 三聚体配体门控离子通道;胞内区域;门控;功能;综述

[中图分类号] Q71 [文献标志码] A

## Progress on functions of intracellular domain of trimeric ligand-gated ion channels

LU Yan, LIN Yiyu, WANG Jin (School of Basic Medicine and Clinical Pharmacy, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China)

Corresponding author: WANG Jin, E-mail: wangjin@cpu.edu.cn, <https://orcid.org/0000-0001-8337-0434>

收稿日期(Received):2023-09-30 接受日期(Accepted):2023-11-11 网络预发表日期(Online):2024-02-02

基金项目(Funding):国家自然科学基金(32000869)

第一作者(First author):鲁燕,硕士研究生,主要从事离子通道药理学研究;E-mail: luuyaiin123@163.com; <https://orcid.org/0009-0007-5627-7024>

通信作者(Corresponding author):汪津,副研究员,主要从事膜生物物理与化学生物学研究;E-mail: wangjin@cpu.edu.cn; <https://orcid.org/0000-0001-8337-0434>

[ **Abstract** ] Ligand-gated ion channels are a large category of essential ion channels, modulating their state by binding to specific ligands to allow ions to pass through the cell membrane. Purinergic ligand-gated ion channel receptors (P2XRs) and acid-sensitive ion channels (ASICs) are representative members of trimeric ligand-gated ion channel. Recent studies have shown that structural differences in the intracellular domain of P2XRs may determine the desensitization process. The lateral fenestrations of P2XRs potentially serve as a pathway for ion conductance and play a decisive role in ion selectivity. Phosphorylation of numerous amino acid residues in the P2XRs are involved in regulating the activity of ion channels. Additionally, the P2XRs interact with other ligand-gated ion channels including *N*-methyl-*D*-aspartate receptors,  $\gamma$ -aminobutyric acid receptors, 5-hydroxytryptamin receptors and nicotinic acetylcholine receptors, mediating physiological processes such as synaptic plasticity. Conformational changes in the intracellular domain of the ASICs expose binding sites of intracellular signal partners, facilitating metabolic signal transduction. Amino acids such as Val16, Ser17, Ile18, Gln19 and Ala20 in the ASICs participate in channel opening and membrane expression. ASICs can also bind to intracellular proteins, such as CIPP and p11, to regulate channel function. Many phosphorylation sites at the C-terminus and N-terminus of ASICs are involved in the regulation of receptors. Furthermore, ASICs are involved in various physiological and pathophysiological processes, which include pain, ischemic stroke, psychiatric disorders, and neurodegenerative disease. In this article, we review the roles of the intracellular domains of these trimeric ligand-gated ion channels in channel gating as well as their physiological and pathological functions, in order to provide new insights into the discovery of related drugs.

[ **Key words** ] Trimeric ligand-gated ion channels; Intracellular domain; Gating; Function; Review

[J Zhejiang Univ (Med Sci), 2024, 53(2): 221-230.]

[ **缩略语** ] 嘌呤能配体门控离子通道(purinergic ligand-gated ion channel, P2X); 酸敏感离子通道(acid-sensitive ion channel, ASIC); 腺苷三磷酸(adenosine triphosphate, ATP); 苏氨酸(threonine, Thr); 脯氨酸(proline, Pro); 丝氨酸(serine, Ser); 缬氨酸(valine, Val); 异亮氨酸(isoleucine, Ile); 赖氨酸(lysine, Lys); 酪氨酸(tyrosine, Tyr); *N*-甲基-*D*-天冬氨酸(*N*-methyl-*D*-aspartate, NMDA);  $\alpha$ -氨基-3-羟基-5-甲基-4-异噁唑丙酸( $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isox-azolepropionic acid, AMPA);  $\gamma$ -氨基丁酸( $\gamma$ -aminobutyric acid, GABA); 5-羟色胺(5-hydroxytryptamin, 5-HT); 谷氨酰胺(glutamine, Gln); 甘氨酸(glycine, Gly); 丙氨酸(alanine, Ala); 钠氢交换子调节因子( $\text{Na}^+/\text{H}^+$  exchanger regulatory factor, NHERF); 蛋白激酶C相互作用蛋白(protein interacting with C kinase, PICK); 受体相互作用蛋白激酶(receptor-interacting protein kinase, RIPK); 钙离子-钙调蛋白依赖性蛋白激酶( $\text{Ca}^{2+}$ /calmodulin-dependent protein kinase, CaMK)

离子通道是细胞膜上的一种特殊类型的通道,可以允许特定类型的离子如钠离子、钾离子、钙离子等通过细胞膜,从而调节细胞内外离子浓

度和电位平衡。离子通道可以对广泛的化学刺激(神经递质、第二信使)和物理刺激(膜电位、机械力、温度)产生响应,在生物体内起着重要的信

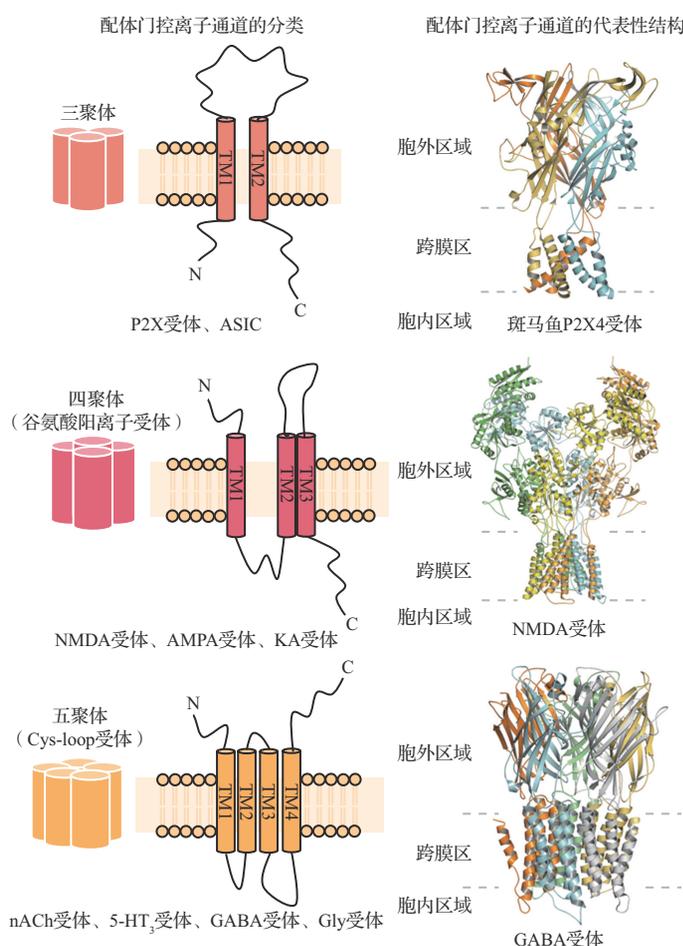
号传递作用,对生物体的生理和病理过程至关重要<sup>[1]</sup>。

根据激活机制的不同,离子通道可分为配体门控离子通道、电压门控离子通道、机械门控离子通道等。其中,配体门控离子通道是由适当的配体结合到相应受体上,引发构象变化,从而打开孔道,使离子沿着电化学梯度通过细胞膜。配体门控离子通道在神经传导、肌肉收缩和细胞信号转导等生理过程中起着关键作用,如在神经传导过程中,神经递质释放后,递质分子会与突触后膜上的配体门控离子通道结合,导致通道开放,离子进入或离开突触后神经元,从而产生或抑制神经冲动传递。配体门控离子通道也与多种疾病的发生和发展密切相关,如某些神经递质失调或通道突变可能导致癫痫、帕金森病等神经系统疾病<sup>[2]</sup>,提示可针对特定的离子通道研发具有选择性的药物,以调节通道活性,从而治疗相关疾病<sup>[3-7]</sup>。深入了解这些通道的结构、功能以及调节机制,可以为药物的设计和开发提供指导。

配体门控离子通道根据所结合的配体可分为N型乙酰胆碱受体通道、谷氨酸受体通道和门冬氨酸受体通道等,这些通道由不同数量的亚基组装而成,形成三聚体配体门控离子通道、四聚体配体门控离子通道(谷氨酸阳离子受体超家族)和五聚体配体门控离子通道(半胱氨酸-环受体超家族)<sup>[8]</sup>。配体门控离子通道根据细胞膜的位置可以分为胞外区域、跨膜区以及胞内区域。不同亚基的胞外区域相互作用组成了通道的配体结合位点以及众多调节位点;不同亚基的跨膜区相互作用组成了通道的离子通透区域,在细胞膜上形成一个通道,允许特定类型的离子通过;胞内区域除了提供不同跨膜螺旋之间必要的连接之外,还往往与通道组装和上膜相关联。见图1。

随着结构生物学的快速发展,许多配体门控离子通道的结构都得以

解析<sup>[9-27]</sup>。基于这些结构,可以深入了解配体门控离子通道的工作原理和调控机制。如可以直观地观察配体与通道蛋白之间的相互作用,从而揭示配体如何结合以及如何控制通道的开放和关闭。此外,这些结构还有助于理解离子通道的选择性。遗憾的是,早期研究为了获得表达稳定的高质量晶体结构,往往会删除用来进行结构解析的晶体结构的胞内区域,因此胞内区域的氨基端和羧基端未能得到充分研究<sup>[28]</sup>。近年来,随着多种手段的综合运用,以P2X受体和ASIC为代表的三聚体配体门控离子通道的胞内区域的结构与功能研究取得了极大进展,本文就其进行归纳和总结,以



三聚体配体门控离子通道单个亚基具有两次跨膜螺旋,N端和C端都在胞内区域;四聚体配体门控离子通道具有三次跨膜螺旋,N端在胞外区域,C端在胞内区域;五聚体配体门控离子通道具有四次跨膜,N端和C端都在胞外区域.TM:跨膜结构域;P2X:嘌呤能配体门控离子通道;ASIC:酸敏感离子通道;NMDA:N-甲基-D-天冬氨酸;AMPA:α-氨基-3-羟基-5-甲基-4-异噁唑丙酸;KA:海人藻酸;nACh:N型乙酰胆碱;5-HT:5-羟色胺;GABA:γ-氨基丁酸;Gly:甘氨酸。

图1 配体门控离子通道的分类及结构示意图

Figure 1 Schematic representation of the classification and structure of ligand-gated ion channels

期为靶向特定通道药物的发现提供参考。

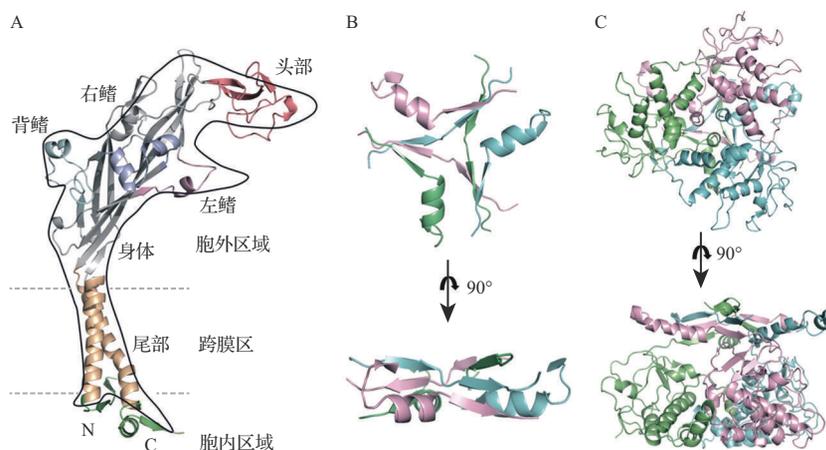
## 1 嘌呤能配体门控离子通道受体

P2X受体是一类响应细胞外ATP信号的配体门控离子通道,当细胞外的ATP作用于细胞膜上的P2X受体时,离子通道开放,允许钠离子、钾离子、钙离子等阳离子跨膜运输<sup>[29]</sup>。迄今,在哺乳动物体内发现了七种不同的P2X亚型(P2X1~7),其以同源或异源的方式组装在一起,形成三聚体离子通道结构。P2X受体单个亚基的形状似海豚,根据各结构域在亚基上所处的位置,P2X受体各组成部分分别命名为头部、左鳍、右鳍、背鳍、身体和尾部,其中头部、左鳍、右鳍、背鳍和身体区域构成胞外区域,尾部的两个 $\alpha$ 螺旋构成跨膜区<sup>[30]</sup>(图2A)。Hattori等<sup>[31]</sup>报道了斑马鱼P2X4受体开放态结构,同时也揭示了ATP结合位点,并提出了P2X受体的激活机制。P2X受体的激动剂结合于每个亚基与相邻亚基交界处的空隙中,结合位点由背鳍、左鳍和相邻亚基的头部构成,虽然配体结合口袋主要位于胞外区域,但其与P2X受体结合的过程会带动受体整体构象产生变化来协调配合,最终实现离子通道开放。ATP的结合会导致头部向下摆动而背鳍上移向头部靠近,左鳍向下移动,整个ATP结合口袋呈现出一种“收紧”的运动趋势,背鳍和左鳍则分别带动与其相连的 $\beta$ 折叠运动,导致身体下部外扩,这一系列的变化会引起跨膜区

### 1.1 P2X受体胞内区域的结构及基本功能

P2X受体胞内区域的结构解析最早见于2016年,Mansoor等<sup>[9]</sup>报道了P2X3受体处于不同状态下的晶体结构,其中处于开放状态的P2X3受体结构中的部分胞内区域是清晰可见的。借助于减缓脱敏的三个突变(Thr13Pro、Ser15Val、

Val16Ile),研究人员捕获了人源P2X3的开放状态,发现只有在ATP结合的开放状态结构中可以观察到细胞质帽结构,而在静息和脱敏状态结构中细胞内没有清晰可见的电子密度,提示在后两种状态下帽形成元件是无序的<sup>[9]</sup>。在ATP结合后静息态转变为开放态的过程中,一系列的运动偶联到跨膜结构域2,细胞质帽的形成固定了跨膜结构域2的细胞质,使其从 $\alpha$ -螺旋转变 $3_{10}$ -螺旋,从而稳定了孔道开放;从开放状态过渡到脱敏状态的过程中细胞质帽解体,跨膜结构域2从 $3_{10}$ -螺旋还原为 $\alpha$ -螺旋,称为受体脱敏的螺旋反冲模型。通过对于不同状态结构的比较,有学者提出存在于P2X3受体胞内区域的独特结构——细胞质帽的不稳定性导致了P2X3受体的快速脱敏性质,并提出细胞质帽的结构稳定了开放状态,其稳定性可以调节受体脱敏的速度和程度<sup>[9]</sup>。值得进一步探讨的是,虽然P2X3受体和P2X7受体含有类似的胞内结构,但其胞内氨基酸序列存在极大差异,因此两者的细胞质帽稳定性和脱敏速度不同,P2X3受体的细胞质帽迅速从跨膜结构域上解体,因此脱敏迅速(图2B);而P2X7受体的细胞质帽被富含半胱氨酸残基的胞质半胱氨酸富集区(C-cys锚)的结构固定,通过棕榈酰化使细胞质帽的稳定性大大增加,故而造成脱敏过程十分缓慢<sup>[9-10]</sup>(图2C)。此外,其他P2X受体亚型的脱敏过程同样与其胞内区域相关,如在P2X2受



A: P2X受体单个亚基的结构示意图;B:人源P2X3开放态的胞内区域结构仰视图及侧视图;C:鼠源P2X7开放态的胞内区域结构仰视图及侧视图。P2X7受体的细胞质帽与P2X3受体的细胞质帽相比,由于其被胞质半胱氨酸富集区的结构固定,通过棕榈酰化使其稳定性大大增加,故而脱敏缓慢。P2X:嘌呤能配体门控离子通道;N:氨基;C:羧基。

图2 P2X受体的亚基结构及胞内结构示意图

Figure 2 Schematic representation of the subunit structure and intracellular structure of the P2X receptor

胞内区域的 Lys369 剪接位点处截断受体,可以显著增加脱敏速度,使其对 ATP 产生响应的电流形状类似于 P2X3 受体<sup>[35]</sup>;在 P2X4 受体中,当胞内区域的两个残基 Lys373 和 Tyr374 突变为丙氨酸后脱敏迅速<sup>[36]</sup>。概括言之,胞内区域的结构差异可能决定了 P2X 受体的脱敏过程。最新研究还发现 P2X 受体胞内区域存在侧窗,该侧窗可作为离子渗透到细胞内端的潜在路径,并对 P2X 受体的离子选择性有决定作用<sup>[37]</sup>。

### 1.2 P2X 受体胞内区域与其他蛋白质的相互作用

P2X 受体胞内区域除了在门控过程中发挥作用外,还具有众多功能。胞内 Ser、Thr 和 Tyr 残基的磷酸化是调节离子通道和细胞表面受体活性的重要机制<sup>[38]</sup>。如在缓慢脱敏的 P2X7 受体中,需要 Tyr343 残基的磷酸化来维持电流以及维持 P2X7 受体与几种细胞骨架蛋白的相互作用<sup>[38]</sup>。此外,目前已经有很多关于 NMDA 受体、AMPA 受体、GABA 受体、5-HT<sub>3</sub>受体和 N 型乙酰胆碱受体与 P2X 受体相互作用的报道<sup>[39-43]</sup>。例如,Rodriguez 等<sup>[39]</sup>发现 P2X4 受体胞内区域的 11 个羧基末端残基是 P2X4 受体与 NMDA 受体相互作用所必需的,这种相互作用可以抑制 NMDA 受体介导的长时程增强,在突触可塑性中发挥作用。Pougné 等<sup>[40]</sup>报道了位于羧基末端的 Ser831 和环 1 的 Ser567,被谷氨酸 A1 磷酸化后,在 P2X2 受体介导的 AMPA 受体内化和 ATP 驱动的突触抑制中起关键作用。Toulmé 等<sup>[41]</sup>研究发现 P2X3 受体通过其羧基末端残基 Gln386、Ser387 和 Thr388 与 GABA<sub>A</sub>受体相互作用,可能有助于调节脊髓中的感觉突触传递。Emerit 等<sup>[42]</sup>报道了 P2X2 受体胞内区域

的羧基末端与 5-HT<sub>3</sub>受体的 IL-2 之间存在相互作用,P2X2 受体可以协助 5-HT<sub>3</sub>受体在轴突和树突中远端靶向。Decker 等<sup>[43]</sup>报道了 P2X2 受体胞内区域的羧基末端介导了 N 型乙酰胆碱受体与 P2X2 受体之间的交叉抑制,这种相互作用可能会调节肠道突触的传输。总之,P2X 受体与其他蛋白质的相互作用为其参与生理和病理过程提供了基础,也为设计靶向 P2X 受体的药物提供了新思路。表 1 对本文中所涉及的 P2X 受体不同亚型胞内区域的作用位点及其功能进行了总结。

## 2 酸敏感离子通道

ASIC 是质子门控阳离子通道,属于上皮钠离子通道/退化蛋白离子通道超家族,这类通道具有阳离子选择性和利尿剂阿米洛利敏感性的特点<sup>[17, 44]</sup>。目前已发现有四种编码 ASIC 的基因:ASIC1、ASIC2、ASIC3、ASIC4,它们编码六种 ASIC 亚基蛋白(ASIC1a、ASIC1b、ASIC2a、ASIC2b、ASIC3、ASIC4)<sup>[6]</sup>。这六种 ASIC 亚基在体内分布广泛,参与了多种中枢神经生理病理过程,包括情绪调节、学习记忆等高级功能、视网膜光信息处理、脑缺血损伤以及脑肿瘤等<sup>[45]</sup>。ASIC 单个亚基的形状似手,根据各结构域在亚基上所处的位置,分别被命名为手掌、β-球、指关节、手指和拇指<sup>[46]</sup>(图 3A)。在拇指和手指之间的酸性残基簇与来自相邻亚基的残基构成一个保守的“酸性口袋”,该口袋可能为质子结合位点<sup>[47]</sup>。在生理 pH 条件下,ASIC 处于静息状态;当暴露于低 pH 时,酸性口袋采用坍塌的构象,α5 转向通道核心,实现质子介导的拇指和手指结构域之间

表 1 P2X 受体各亚基胞内区域的作用位点及对应功能

Table 1 Functional sites and corresponding functions of the intracellular region of each subunit of the P2X receptor

| 亚 基  | 作用位点 | 功 能   | 文 献      |
|------|------|---|----------|
| P2X2 | 羧基末端 | ①P2X2 受体羧基末端和 5-HT <sub>3</sub> 受体的 IL-2 存在相互作用,P2X2 受体可以协助 5-HT <sub>3</sub> 受体在轴突和树突中的远端靶向;②P2X2 受体羧基末端介导 N 型乙酰胆碱受体与 P2X2 受体之间的交叉抑制,调节肠道突触的传输 | [42-43]  |
| P2X3 | 羧基末端 | ①胞内特殊结构细胞质帽的不稳定性导致快速脱敏;②P2X3 受体通过其羧基末端残基 Gln386、Ser387 和 Thr388 与 GABA <sub>A</sub> 受体相互作用,可能有助于调节脊髓中的感觉突触传递                                    | [9, 41]  |
| P2X4 | 羧基末端 | P2X4 受体胞内区域的最后 11 个羧基末端残基与 NMDA 受体相互作用,抑制 NMDA 受体介导的长时程增强,在突触可塑性中发挥作用   | [39]     |
| P2X7 | 羧基末端 | ①胞内特殊结构胞质半胱氨酸富集区(C-cys 锚)通过棕榈酰化使细胞质帽的稳定性大大增加,造成脱敏过程十分缓慢;②P2X7 受体羧基末端 Tyr343 残基的磷酸化来维持电流以及维持 P2X7 与几种细胞骨架蛋白的相互作用                                 | [10, 38] |

P2X:嘌呤能配体门控离子通道;5-HT:5-羟色胺;Gln:谷氨酰胺;Ser:丝氨酸;Thr:苏氨酸;GABA:γ-氨基丁酸;NMDA:N-甲基-D-天冬氨酸;Tyr:酪氨酸。

的羧基-羧酸配对,酸性口袋的坍塌启动了整个胞外域的协调运动,表现为单个亚基围绕其上掌结构域侧向旋转,所有亚基的协同旋转使下掌结构域的β1和β12链朝向膜并远离分子三重轴,下掌结构域的移位可导致胞外开窗的扩大和通道门的虹膜状开口,扩大了Gly-Ala-Ser带并允许离子通过通道孔<sup>[48]</sup>。

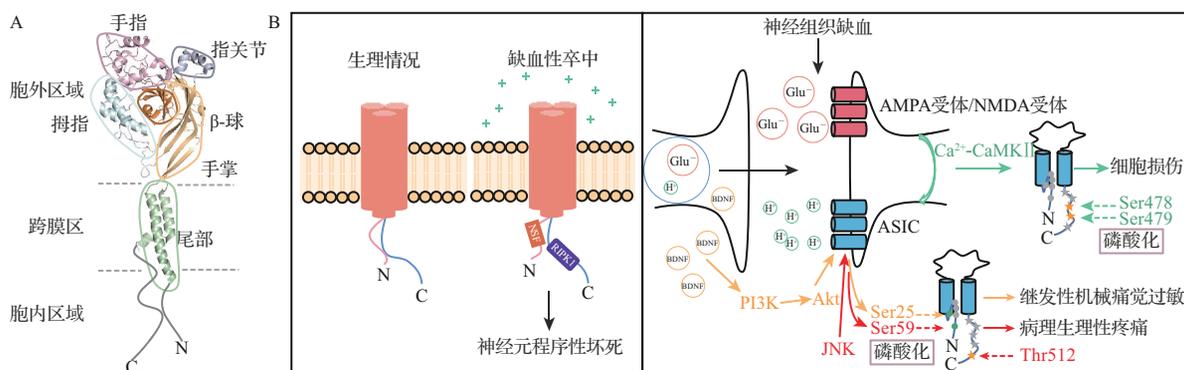
### 2.1 ASIC胞内区域的结构及基本功能

尽管冷冻电镜已经解析出了ASIC胞外区域和跨膜区不同状态下的多个结构<sup>[13-17]</sup>,但关于胞内区域末端的结构问题研究依然很少。有研究通过荧光共振能量转移确定了鸡ASIC1胞内结构域的粗略结构,为胞外酸化诱导胞内构象改变提供了研究背景<sup>[47, 49]</sup>。他们通过使用膜片钳荧光测量法和荧光寿命显微成像技术相结合的方法,发现氨基端和羧基端在酸化后向质膜方向移动,而没有明显的侧向移动,这提示胞外酸化促进ASIC胞内区域构象发生变化可能是通过膜近端的位点来结合胞内信号分子,并促进代谢信号转导。近年来的一项研究发现ASIC1a胞内区域会影响通道门控,其氨基末端可以调节上膜表达,并且其中的氨基酸残基Val16、Ser17、Ile18、Gln19和Ala20参与了门控的打开,其中Ile18是最重要的残基<sup>[50]</sup>。

### 2.2 ASIC胞内区域与其他蛋白质的相互作用及在疾病过程中的作用

ASIC可与多种细胞内蛋白质相互作用,参

与对受体的调控,PDZ结构域在这些蛋白质相互作用中起到重要的作用。脊髓和背根神经节细胞中的四种含有PDZ结构域的骨架蛋白(突触后密度蛋白-95、膜相关鸟苷酸激酶转化蛋白、重组人GOPC蛋白和Lin-7b蛋白)与ASIC3胞内区域羧基末端的PDZ结合基序相互作用,表明其可能在ASIC3参与伤害感受和机械感觉中发挥作用<sup>[51]</sup>。NHERF1和NHERF2均通过PDZ结构域与ASIC3胞内区域羧基末端相互作用,其中与NHERF1的相互作用显著增加了ASIC3的表达<sup>[52]</sup>。骨架蛋白CIPP通过PDZ结构域特异性与ASIC3胞内区域羧基末端结合,增强ASIC3的表面表达,同时将ASIC3和感觉神经细胞膜上的功能相关蛋白聚集,对于探究ASIC在感觉尤其伤害性感觉中的调节作用至关重要<sup>[53]</sup>。PICK1通过PDZ结构域与ASIC1a和ASIC2胞内区域羧基末端结合,调节了ASIC1在外周神经元和中枢神经元中的突触分布<sup>[54-55]</sup>。p11蛋白与ASIC1a胞内区域的氨基端相互作用,增加了ASIC1a的表面表达和电流密度<sup>[56]</sup>。此外,ASIC胞内区域羧基端和氨基端含有众多磷酸化位点,磷酸化在ASIC与PICK1的相互作用中扮演重要角色。蛋白激酶A磷酸化ASIC2a胞内区域羧基端的Ser479,干扰其与PICK1结合,减少磷酸化或将Ser479突变为Ala479,可以增强其与PICK1的结合<sup>[57]</sup>。蛋白激酶C可以磷酸化ASIC2a胞内区域氨基端的Thr39,同样是依赖于PICK1对ASIC进行调节<sup>[58]</sup>。



A: ASIC单个亚基的结构示意图;B: ASIC胞内区域参与的疾病过程示意图,其中左图是RIPK1介导的神经程序性坏死,右图是磷酸化介导的细胞损伤和疼痛。ASIC:酸敏感离子通道;NSF:N-乙基马来酰亚胺敏感因子;RIPK:受体相互作用蛋白激酶;Glu:谷氨酸;BDNF:脑源性神经营养因子;PI3K:磷脂酰肌醇-3-激酶;Akt:蛋白激酶B;JNK:e-Jun氨基末端激酶;AMPA:α-氨基-3-羟基-5-甲基-4-异噁唑丙酸;NMDA:N-甲基-D-天冬氨酸;CaMK:钙离子-钙调蛋白依赖性蛋白激酶;Ser:丝氨酸;Thr:苏氨酸;N:氨基;C:羧基。

图3 ASIC亚基结构及胞内区域相关疾病示意图

Figure 3 Schematic representation of the subunit structure of ASIC and intracellular regions associated with diseases

通过磷酸化这种相互作用,为调控 ASIC 的细胞定位提供了依据。

ASIC 参与多种病理生理过程,包括缺血性卒中、精神疾病、神经退行性疾病、心血管疾病、疼痛、恐惧条件反射以及学习记忆等<sup>[59-60]</sup>, ASIC 胞内区域在疾病的发生发展中起到一定的作用(图 3B)。ASIC3 是不同类型疼痛模型的重要参与者,最新研究发现 ASIC1b 参与了外周疼痛的疾病过程:c-Jun 氨基末端激酶可增强 ASIC1b 和 ASIC3 的活性,主要依赖于 ASIC1b 氨基末端的 Ser59 和 ASIC3 羧基末端的 Thr512 磷酸化,提示胞内区域的磷酸化可能在包括 ASIC1b 和/或 ASIC3 参与的炎症、神经病理性疼痛和偏头痛等多种病理生理疼痛过程中具有重要作用<sup>[61]</sup>。ASIC1a 胞内区域控制着细胞死亡途径的启动,而细胞死亡与脑卒中等缺血性疾病相关<sup>[62-63]</sup>。脑卒中时细胞外溶液的 pH 值下降可导致 ASIC1a 构象变化,暴露出羧基末端的 RIPK1 结合位点,而生理 pH 条件下 ASIC1a 的氨基端和羧基端会形成一个复合物,堵塞 RIPK1 的结合位点,这项研究为脑卒中药物的设计提供了新见解:稳定氨基端和羧基端之间的复合物或破坏羧基端与 RIPK1 相互作用<sup>[63]</sup>。相关研究也证实了 RIPK1 与 ASIC1a 的相互作用可能介导了炎症、缺血性脑卒中、神经创伤和癫痫发作的脊髓小脑性共济失调等多种疾病<sup>[64-65]</sup>。表 2 对本文中所涉及的 ASIC 不同亚型胞内区域作用位

点及相应功能进行了总结。

ASIC 还能与其他配体门控离子通道相互作用在疾病过程中发挥协同作用。如海马细胞内钙离子/CaMK II 可以磷酸化 ASIC1a 胞内区域羧基末端的 Ser478 和 Ser479,在神经组织缺血条件下, CaMKII 被 NMDA 受体激活,磷酸化会增强 ASIC1a 电流,导致 NMDA 受体介导的兴奋毒和 ASIC1a 介导的酸毒协同加强<sup>[66-67]</sup>。ASIC1a 与 AMPA 受体也存在协同作用, ASIC1a 的激活可以驱动某些形式的钙离子通透的 AMPA 受体可塑性,提示 ASIC1a 在 AMPA 受体可塑性和细胞死亡中具有一定的作用,这一相互作用是否依赖于 ASIC1a 的胞内区域有待于进一步研究<sup>[68-69]</sup>。

### 3 结 语

离子通道的胞内区域在调节离子通道的门控特性和发挥离子通道在病理生理方面的功能起着重要作用。本文以 P2X 受体和 ASIC 为例,综述了三聚体配体门控离子通道的胞内区域的三维结构构造、在门控过程中的功能、与其他蛋白的相互作用以及在疾病发生中的作用等。尽管目前已经取得了初步的研究进展,但是关于 P2X 受体和 ASIC 胞内区域依然存在诸多有待进一步深入研究的问题:(1)目前这一类通道的胞内区域的组装方式仍不明确,以及序列差异巨大的各个亚型之间胞内区域的作用异同点分别是什么?

表 2 ASIC 各亚基胞内区域功能位点及功能

Table 2 Functional sites and corresponding functions of intracellular regions of each subunit of ASICs

| 亚 基    | 作用位点      | 功 能  | 文 献         |
|--------|-----------|--|-------------|
| ASIC1a | 羧基末端、氨基末端 | ①PICK1 与 ASIC1a 胞内区域羧基末端相互作用,调节 ASIC1 在外周神经元和中枢神经元中的突触分布;②p11 蛋白与 ASIC1a 胞内区域氨基末端相互作用,增加 ASIC1a 的表面表达和电流密度;③RIPK1 与 ASIC1a 胞内区域羧基末端相互作用介导缺血性脑卒中等疾病   | [54-56, 63] |
| ASIC1b | 氨基末端      | JNK 可增强 ASIC1b 活性,依赖于 ASIC1b 亚基在 Ser59 位点的磷酸化,进而参与神经病理性疼痛和偏头痛等多种病理生理性疼痛的过程   | [61]        |
| ASIC2a | 羧基末端、氨基末端 | ①蛋白激酶 A 磷酸化 ASIC2a 胞内区域羧基末端的 Ser479,干扰其与 PICK1 结合,为调控 ASIC1 的细胞定位提供了依据;②蛋白激酶 C 磷酸化 ASIC2a 胞内区域氨基末端的 Thr39,依赖于 PICK1 对 ASIC 进行调节  | [57-58]     |
| ASIC3  | 羧基末端      | ①与突触后密度蛋白-95、膜相关鸟苷酸激酶转化蛋白、重组人 GOPC 蛋白和 Lin-7b 蛋白相互作用,在 ASIC3 参与伤害感受和机械感觉中发挥作用;②与 NHERF1 相互作用,增加了 ASIC3 的表面表达、峰值幅度和持续电流;③与骨架蛋白 CIPP 相互作用,对于探究 ASIC 在感觉尤其伤害性感觉中的调节作用至关重要;④JNK 对 ASIC3 活性增强依赖于 ASIC3 亚基在 Thr512 位点的磷酸化,进而参与神经病理性疼痛和偏头痛等多种病理生理性疼痛的过程 | [51-53, 61] |

ASIC:酸敏感离子通道;PICK:蛋白激酶 C 相互作用蛋白;RIPK:受体相互作用蛋白激酶;JNK:c-Jun 氨基末端激酶;Ser:丝氨酸;Thr:苏氨酸;NHERF:钠氢交换子调节因子。

(2)尽管已经发现三聚体配体门控离子通道与其他蛋白质存在众多相互作用,但如何基于这些相互作用的原理设计新的小分子化合物,从而特异性调节该通道的某一功能?(3)目前靶向配体门控离子通道的小分子大多作用在胞外区域,如何基于胞内区域设计具有更优活性的小分子化合物?未来针对这些问题的进一步研究将有望拓展对于三聚体配体门控离子通道的认识,并助力开发出具有临床意义的小分子化合物。

志谢 研究得到国家自然科学基金(32000869)支持

**Acknowledgements** This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (32000869)

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

**Conflict of Interests** The authors declare that there is no conflict of interests

©The author(s) 2024. This is an open access article under the CC BY-NC-ND 4.0 License (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>)

## 参考文献(References)

- [1] ZHANG T, LIU Q, LI Z, et al. The role of ion channels in immune-related diseases[J]. *Prog Biophys Mol Biol*, 2023, 177: 129-140.
- [2] FOSTER V S, RASH L D, KING G F, et al. Acid-sensing ion channels: expression and function in resident and infiltrating immune cells in the central nervous system[J]. *Front Cell Neurosci*, 2021, 15: 738043.
- [3] ZOU Y, YANG R, LI L, et al. Purinergic signaling: a potential therapeutic target for depression and chronic pain[J]. *Purinergic Signal*, 2023, 19(1): 163-172.
- [4] WU P, WANG Y, LIU Y, et al. Emerging roles of the P2X7 receptor in cancer pain[J]. *Purinergic Signal*, 2023, 19(2): 441-450.
- [5] YI B, WANG S, LI W, et al. Potential applications of P2X3 receptor antagonists in the treatment of refractory cough[J]. *Respir Med*, 2023, 217: 107336.
- [6] HEUSSER S A, PLESS S A. Acid-sensing ion channels as potential therapeutic targets[J]. *Trends Pharmacol Sci*, 2021, 42(12): 1035-1050.
- [7] ORTEGA-RAMÍREZ A, VEGA R, SOTO E. Acid-sensing ion channels as potential therapeutic targets in neurodegeneration and neuroinflammation[J]. *Mediators Inflamm*, 2017, 2017: 3728096.
- [8] SIVCEV S, KUDOVA E, ZEMKOVA H. Neurosteroids as positive and negative allosteric modulators of ligand-gated ion channels: P2X receptor perspective [J]. *Neuropharmacology*, 2023, 234: 109542.
- [9] MANSOOR S E, LÜ W, OOSTERHEERT W, et al. X-ray structures define human P2X(3) receptor gating cycle and antagonist action[J]. *Nature*, 2016, 538(7623): 66-71.
- [10] MCCARTHY A E, YOSHIOKA C, MANSOOR S E. Full-length P2X7 structures reveal how palmitoylation prevents channel desensitization[J]. *Cell*, 2019, 179(3): 659-670.e13.
- [11] SHEN C, ZHANG Y, CUI W, et al. Structural insights into the allosteric inhibition of P2X4 receptors[J]. *Nat Commun*, 2023, 14(1): 6437.
- [12] SHENG D, HATTORI M. Recent progress in the structural biology of P2X receptors[J]. *Proteins*, 2022, 90(10): 1779-1785.
- [13] JASTI J, FURUKAWA H, GONZALES E B, et al. Structure of acid-sensing ion channel 1 at 1.9 Å resolution and low pH[J]. *Nature*, 2007, 449(7160): 316-323.
- [14] BACONGUIS I, BOHLEN C J, GOEHRING A, et al. X-ray structure of acid-sensing ion channel 1-snake toxin complex reveals open state of a Na(+)-selective channel[J]. *Cell*, 2014, 156(4): 717-729.
- [15] DAWSON R J, BENZ J, STOHLER P, et al. Structure of the acid-sensing ion channel 1 in complex with the gating modifier psalmotoxin 1[J]. *Nat Commun*, 2012, 3: 936.
- [16] BACONGUIS I, GOUAUX E. Structural plasticity and dynamic selectivity of acid-sensing ion channel-spider toxin complexes[J]. *Nature*, 2012, 489(7416): 400-405.
- [17] LIU Y, MA J, DESJARLAIS R L, et al. Molecular mechanism and structural basis of small-molecule modulation of the gating of acid-sensing ion channel 1 [J]. *Commun Biol*, 2021, 4(1): 174.
- [18] SOBOLEVSKY A I, ROSCONI M P, GOUAUX E. X-ray structure, symmetry and mechanism of an AMPA-subtype glutamate receptor[J]. *Nature*, 2009, 462(7274): 745-756.
- [19] GREGER I H, WATSON J F, CULL-CANDY S G. Structural and functional architecture of AMPA-type glutamate receptors and their auxiliary proteins[J]. *Neuron*, 2017, 94(4): 713-730.
- [20] AITTONIEMI J, JENSEN M Ø, PAN A C, et al. Desensitization dynamics of the AMPA receptor[J]. *Structure*, 2023, 31(6): 724-734.e3.
- [21] ZHOU C, TAJIMA N. Structural insights into NMDA receptor pharmacology[J]. *Biochem Soc Trans*, 2023, 51(4): 1713-1731.
- [22] MASTERNAK M, KOCH A, LAULUMAA S, et al. Differences between the GluD1 and GluD2 receptors revealed by GluD1 X-ray crystallography, binding studies and molecular dynamics[J]. *FEBS J*, 2023, 290(15): 3781-3801.
- [23] HASSAINE G, DELUZ C, GRASSO L, et al. X-ray structure of the mouse serotonin 5-HT3 receptor[J].

- Nature**, 2014, 512(7514): 276-281.
- [24] ZHU S, NOVIELLO C M, TENG J, et al. Structure of a human synaptic GABA<sub>A</sub> receptor[J]. **Nature**, 2018, 559(7712): 67-72.
- [25] TEREJKO K, KACZOR P T, MICHAŁOWSKI M A, et al. The C loop at the orthosteric binding site is critically involved in GABA<sub>A</sub> receptor gating[J]. **Neuropharmacology**, 2020, 166: 107903.
- [26] YU J, ZHU H, LAPE R, et al. Mechanism of gating and partial agonist action in the glycine receptor[J]. **Cell**, 2021, 184(4): 957-968.e21.
- [27] HUANG X, CHEN H, MICHELSEN K, et al. Crystal structure of human glycine receptor- $\alpha$ 3 bound to antagonist strychnine[J]. **Nature**, 2015, 526(7572): 277-280.
- [28] GONZALES E B, KAWATE T, GOUAUX E. Pore architecture and ion sites in acid-sensing ion channels and P2X receptors[J]. **Nature**, 2009, 460(7255): 599-604.
- [29] LIU J P, LIU S C, HU S Q, et al. ATP ion channel P2X purinergic receptors in inflammation response[J]. **Biomed Pharmacother**, 2023, 158: 114205.
- [30] KAWATE T, MICHEL J C, BIRDSOONG W T, et al. Crystal structure of the ATP-gated P2X(4) ion channel in the closed state[J]. **Nature**, 2009, 460(7255): 592-598.
- [31] HATTORI M, GOUAUX E. Molecular mechanism of ATP binding and ion channel activation in P2X receptors[J]. **Nature**, 2012, 485(7397): 207-212.
- [32] SATTLER C, BENNDORF K. Enlightening activation gating in P2X receptors[J]. **Purinergic Signal**, 2022, 18(2): 177-191.
- [33] WANG J, YU Y. Insights into the channel gating of P2X receptors from structures, dynamics and small molecules[J]. **Acta Pharmacol Sin**, 2016, 37(1): 44-55.
- [34] MANSOOR S E. How structural biology has directly impacted our understanding of P2X receptor function and gating[J]. **Methods Mol Biol**, 2022, 2510: 1-29.
- [35] SMITH F M, HUMPHREY P P, MURRELL-LAGNADO R D. Identification of amino acids within the P2X2 receptor C-terminus that regulate desensitization[J]. **J Physiol**, 1999, 520(Pt 1): 91-99.
- [36] ZEMKOVA H, HE M L, KOSHIMIZU T A, et al. Identification of ectodomain regions contributing to gating, deactivation, and resensitization of purinergic P2X receptors[J]. **J Neurosci**, 2004, 24(31): 6968-6978.
- [37] TAM S W, HUFFER K, LI M, et al. Ion permeation pathway within the internal pore of P2X receptor channels[J/OL]. **Elife**, 2023, 12: e84796.
- [38] YAFFE M B. Phosphotyrosine-binding domains in signal transduction[J]. **Nat Rev Mol Cell Biol**, 2002, 3(3): 177-186.
- [39] RODRIGUEZ L, YI C, CHU C, et al. Cross-talk between P2X and NMDA receptors[J]. **Int J Mol Sci**, 2020, 21(19): 7187.
- [40] POUGNET J T, COMPANS B, MARTINEZ A, et al. P2X-mediated AMPA receptor internalization and synaptic depression is controlled by two CaMKII phosphorylation sites on GluA1 in hippocampal neurons[J]. **Sci Rep**, 2016, 6: 31836.
- [41] TOULMÉ E, BLAIS D, LÉGER C, et al. An intracellular motif of P2X(3) receptors is required for functional cross-talk with GABA(A) receptors in nociceptive DRG neurons[J]. **J Neurochem**, 2007, 102(4): 1357-1368.
- [42] EMERIT M B, BARANOWSKI C, DIAZ J, et al. A new mechanism of receptor targeting by interaction between two classes of ligand-gated ion channels[J]. **J Neurosci**, 2016, 36(5): 1456-1470.
- [43] DECKER D A, GALLIGAN J J. Molecular mechanisms of cross-inhibition between nicotinic acetylcholine receptors and P2X receptors in myenteric neurons and HEK-293 cells[J]. **Neurogastroenterol Motil**, 2010, 22(8): 901-908, e235.
- [44] SIVILS A, YANG F, WANG J Q, et al. Acid-sensing ion channel 2: function and modulation[J]. **Membranes (Basel)**, 2022, 12(2): 113.
- [45] VAN BEMMELEN M X, HUSER D, GAUTSCHI I, et al. The human acid-sensing ion channel ASIC1a: evidence for a homotetrameric assembly state at the cell surface[J/OL]. **PLoS One**, 2015, 10(8): e0135191.
- [46] GWIAZDA K, BONIFACIO G, VULLO S, et al. Extracellular subunit interactions control transitions between functional states of acid-sensing ion channel 1a[J]. **J Biol Chem**, 2015, 290(29): 17956-17966.
- [47] ROOK M L, MUSGAARD M, MACLEAN D M. Coupling structure with function in acid-sensing ion channels: challenges in pursuit of proton sensors[J]. **J Physiol**, 2021, 599(2): 417-430.
- [48] YODER N, YOSHIOKA C, GOUAUX E. Gating mechanisms of acid-sensing ion channels[J]. **Nature**, 2018, 555(7696): 397-401.
- [49] COUCH T, BERGER K D, KNEISLEY D L, et al. Topography and motion of acid-sensing ion channel intracellular domains[J/OL]. **Elife**, 2021, 10: e68955.
- [50] LI W, WANG X, MENG X, et al. The intracellular N-terminal domain of the acid-sensing ion channel 1a participates in channel opening and membrane expression[J]. **Mol Pharmacol**, 2021, 100(2): 113-118.
- [51] HRUSKA-HAGEMAN A M, BENSON C J, LEONARD A S, et al. PSD-95 and Lin-7b interact with acid-sensing ion channel-3 and have opposite effects on H<sup>+</sup>-gated current[J]. **J Biol Chem**, 2004, 279(45): 46962-46968.
- [52] DEVAL E, FRIEND V, THIRANT C, et al. Regulation of sensory neuron-specific acid-sensing ion channel 3 by the adaptor protein Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger regulatory factor-1[J]. **J Biol Chem**, 2006, 281(3): 1796-1807.
- [53] ANZAI N, DEVAL E, SCHAEFER L, et al. The multivalent PDZ domain-containing protein CIPP is

- a partner of acid-sensing ion channel 3 in sensory neurons[J]. **J Biol Chem**, 2002, 277(19): 16655-16661.
- [54] CULLINAN M M, KLIPP R C, BANKSTON J R. Regulation of acid-sensing ion channels by protein binding partners[J]. **Channels (Austin)**, 2021, 15(1): 635-647.
- [55] DEV K K. PDZ domain protein-protein interactions: a case study with PICK1[J]. **Curr Top Med Chem**, 2007, 7(1): 3-20.
- [56] ZHA X M. Acid-sensing ion channels: trafficking and synaptic function[J]. **Mol Brain**, 2013, 6: 1.
- [57] LEONARD A S, YERMOLAIEVA O, HRUSKA-HAGEMAN A, et al. cAMP-dependent protein kinase phosphorylation of the acid-sensing ion channel-1 regulates its binding to the protein interacting with C-kinase-1[J]. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 2003, 100(4): 2029-2034.
- [58] BARON A, DEVAL E, SALINAS M, et al. Protein kinase C stimulates the acid-sensing ion channel ASIC2a via the PDZ domain-containing protein PICK1[J]. **J Biol Chem**, 2002, 277(52): 50463-50468.
- [59] LÓPEZ-RAMÍREZ O, GONZÁLEZ-GARRIDO A. The role of acid sensing ion channels in the cardiovascular function[J]. **Front Physiol**, 2023, 14: 1194948.
- [60] KLIPP R C, CULLINAN M M, BANKSTON J R. Insights into the molecular mechanisms underlying the inhibition of acid-sensing ion channel 3 gating by stomatin[J/OL]. **J Gen Physiol**, 2020, 152(3): e201912471.
- [61] VERKEST C, DIOCHOT S, LINGUEGLIA E, et al. C-Jun N-terminal kinase post-translational regulation of pain-related acid-sensing ion channels 1b and 3[J]. **J Neurosci**, 2021, 41(42): 8673-8685.
- [62] WANG J J, LIU F, YANG F, et al. Disruption of auto-inhibition underlies conformational signaling of ASIC1a to induce neuronal necroptosis[J]. **Nat Commun**, 2020, 11(1): 475.
- [63] WANG Y Z, WANG J J, HUANG Y, et al. Tissue acidosis induces neuronal necroptosis via ASIC1a channel independent of its ionic conduction[J/OL]. **Elife**, 2015, 4: e05682.
- [64] FOCANT M C, HERMANS E. Protein interacting with C kinase and neurological disorders[J]. **Synapse**, 2013, 67(8): 532-540.
- [65] RADU B M, BANCIU A, BANCIU D D, et al. Acid-sensing ion channels as potential pharmacological targets in peripheral and central nervous system diseases[J]. **Adv Protein Chem Struct Biol**, 2016, 103: 137-167.
- [66] GAO J, DUAN B, WANG D G, et al. Coupling between NMDA receptor and acid-sensing ion channel contributes to ischemic neuronal death[J]. **Neuron**, 2005, 48(4): 635-646.
- [67] EVLANENKOV K K, ZHIGULIN A S, TIKHONOV D B. Possible compensatory role of ASICs in glutamatergic synapses[J]. **Int J Mol Sci**, 2023, 24(16): 12974.
- [68] VONDERWALDE I, KOVACS-LITMAN A. Acid-sensing ion channel 1a induces AMPA receptor plasticity: a link between acidotoxicity and excitotoxicity in hippocampal CA1 neurons[J]. **J Physiol**, 2016, 594(4): 803-805.
- [69] BOWIE D. Neurotransmitter-gated ion channels, still front and centre stage[J]. **J Physiol**, 2021, 599(2): 389-395.

[本文编辑 沈敏 沈洁]

## · 学术动态 ·

### 王慧明教授团队构建干细胞增强新策略用于骨骼及肌肉修复

2023年12月,《先进材料》(*Advanced Materials*)刊登了浙江大学医学院王慧明教授团队的研究成果论文“Exoskeleton partial-coated stem cells for infarcted myocardium restoring”(DOI: 10.1002/adma.202307169)。论文阐明了细胞-外骨骼相互作用的潜在分子和细胞机制,提示了纳米生物杂化体作为一种新兴策略在组织工程的潜在应用。

首先,研究人员发现部分包裹的外骨骼能作为悬浮干细胞的支撑基质来促进细胞存活,并保持了其原有的黏附、外分泌和细胞间通信功能。外骨骼增强的干细胞能够抵抗体内损伤炎症微环境常见的不利因素如氧化应激升高、pH改变。外骨骼增强了干细胞的成血管、迁移、抗凋亡及黏附能力。进一步研究发现外骨骼通过激活整合素触发下游信号级联反应,促进细胞存活,增强治疗潜力。最终,外骨骼增强的干细胞能在体内促进颅骨及肌肉缺损修复。

论文第一作者为浙江大学医学院附属口腔医院何卉蕙博士研究生和国际联合学院袁渊教授。研究获得了国家重点研发计划等支持。