

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2014.16.047

ASICs 的胞内分布及其功能调节机制的研究进展*

郭英俊¹ 毛海婷² 聂林¹ 张稳¹ 曲迅^{2Δ}

(1 山东大学齐鲁医院 脊柱外科 山东 济南 250012; 2 山东大学齐鲁医院 基础研究所 山东 济南 250012)

摘要: 随着对酸敏感离子通道(Acid-sensing ion channels, ASICs)研究的不断深入,其在临床相关疾病中的功能研究也逐渐受到重视。ASICs 的功能异常与一系列临床疾病和症状密切相关,包括神经系统肿瘤、缺血性损伤、癫痫、疼痛以及亨廷顿氏症等。在细胞内正常的分布与定位是 ASICs 发挥其生理功能的前提,而多项研究已经确认,在正常生理的状态下,ASICs 在细胞内具有相对固定的分布方式。换言之,正常的细胞内存在着可以对 ASICs 的分布进行调节的调控系统。目前也发现了包括 PICK1、HSP70 等与之相关的一系列物质分子。鉴于 ASICs 在人体诸多生理、病理过程中发挥重要作用,对 ASICs 功能异常的相关研究便成为了目前基础研究工作的重点之一。本文拟就 ASICs 在细胞内的分布定位及其转运调节机制作一综述,进而初步探讨其在临床应用中的前景。

关键词: ASICs; 胞内分布与转运; 胰岛素; 肿瘤

中图分类号: Q26; R338.8 **文献标识码:** A **文章编号:** 1673-6273(2014)16-3177-04

The Researching Progress in Regulation Mechanism of Intracellular Distribution and Function of ASICs*

GUO Ying-jun¹, MAO Hai-ting², NIE Lin¹, ZHANG Wen¹, QU Xun^{2Δ}

(1 Dept. of Orthopedic in Qilu Hospital, Shandong University, Jinan, Shandong, 250012, China;

2 Dept. of Basic Medicine in Qilu Hospital, Shandong University, Jinan, Shandong, 250012, China)

ABSTRACT: Along with the deeper understanding of the functions of Acid-sensing ion channels (ASICs), we got more and more clinical researches related to them. The abnormality of ASICs is, to a great degree, responsible for numerous diseases, including Neurologic tumors, ischemic injury, seizure, pain and Huntington's disease, and many reports have identified that there is a relative fixed intracellular distributing pattern for ASICs under physiological status. In another word, there exists a intracellular regulatory system for ASICs distribution. It is the basement for ASICs' functions that ASICs distribute normally. Up to now, we have found a series of relative molecules, such as PICK1 and HSP70. Seeing the significance of ASICs in many physiological and pathological processes, it is a researching point to identify the abnormalities of ASICs' function. This review will simply conclude the intracellular distribution and transportation mechanism of ASICs. Furthermore, the concomitant therapeutic implications will also be discussed.

Key words: ASICs; Intracellular distribution and transportation; Insulin; Tumor

Chinese Library Classification(CLC): Q26; R338.8 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2014)16-3177-04

前言

离子通道是分布于细胞表面的一类具有离子通透性的蛋白质,其功能的正常发挥对细胞的膜电位维持,胞内生理活动的进行以及细胞的各种行为如迁移、增殖等都具有至关重要的调节作用。近年来,一组被称为“酸敏感离子通道”(Acid-sensing ion channels, ASICs)的 H⁺ 门控 Na⁺ 通道,由于其独特的体内分布特点和在神经系统中的重要意义而备受关注。研究发现 ASICs 功能的异常与机体的许多病理反应有关,如癫痫、学习记忆能力降低、疼痛过敏、缺血性神经损伤及情感状态异常

等^[1-5]。鉴于 ASICs 在机体许多生理及病理生理过程中的重要作用不断被揭示,本文将就 ASICs 的体内分布及其功能调控,以及在疾病发生及转归过程中的研究进展综述如下。

1 酸敏感离子通道

1980 年, Krishtal 等在神经元中首次发现了酸诱导产生的膜电流。时至今日,研究人员已发现并确认了介导该膜电流的一组通道,即 ASICs。ASICs 是属于上皮钠离子通道/退化蛋白家族(ENaC/DEG)的一类配体门控的 Na⁺ 通道,除此之外, ASICs 对 Li⁺, K⁺, Ca²⁺ 以及 H⁺ 等具也有一定通透性^[6]。目前人们

* 基金项目:国家自然科学基金面上项目(81072406)

作者简介:郭英俊(1990-),男,临床本硕博连读,主要研究方向:ASICs,破骨细胞,椎间盘,

电话:15216407913; E-mail: Gyingjun@163.com

Δ 通讯作者:曲迅,电话:0531-82169251, E-mail: quxun@sdu.edu.cn

(收稿日期:2013-10-20 接受日期:2013-11-14)

已经鉴定出了 6 种 ASICs 亚基,并分别命名为 ASIC1a、ASIC1b、ASIC2a、ASIC2b、ASIC3 以及 ASIC4^[7]。这些亚基可以形成同聚体或异聚体的三聚体通道。目前的研究已证实 ASIC2b 与 ASIC4 构成的同聚体通道没有功能外,其他亚基形成的聚合通道均显示有离子通道活性^[8]。已有的研究显示 H⁺ 是 ASICs 最主要的激活物,不同的 ASIC 亚基对 H⁺ 的亲和程度也有差异。其中,ASIC3 对 H⁺ 的敏感度最高,而 ASIC1a 与 ASIC1b 居中,ASIC2a 与 ASIC2b 为最低^[7]。

对 ASICs 研究最大的瓶颈在于目前对 ASICs 的特异性抑制药物知之甚少,已经确认的特异性药物有 ASIC1a 的特异性抑制剂 PcTx1^[9] 与 ASIC3 的特异性抑制剂 APETx2^[10]。由于上述特异性抑制剂尚未商品化,所以现阶段大部分的 ASICs 相关工作依然是利用 ASICs 的非特异性抑制剂阿米洛利。

ASICs 在各种生理和病理过程中都发挥着关键的作用,生理过程如突触的重塑、学习与记忆等过程;病理过程如缺血性损伤、癫痫发作、组织炎症、肿瘤等。值得注意的是,ASICs 的各项功能都依赖于其正常的分布。所以,对 ASICs 分布的研究工作是其功能相关研究的基础。

2 ASICs 的胞内分布

ASICs 首先于神经系统中被发现,并且目前研究表明,该通道也主要于神经系统中发挥功能。另外,在骨细胞、免疫细胞等其他组织细胞中也发现了 ASICs 的表达。而针对 ASICs 亚细胞分布的研究还十分有限。目前已知的正常生理状态下的 ASIC 亚细胞分布方式为:ASIC1 与 ASIC3 主要分布于细胞质内,其中 ASIC1 聚集于核周区域与内质网,ASIC3 有定位于线粒体的倾向;而 ASIC2 则主要分布于细胞表面。

Chai 等^[11]在利用 CHO 细胞作为 ASICs 转染模型进行研究的过程中发现,在成功表达 ASICs 的 CHO 细胞中,ASIC1 主要定位于胞质中,尤其是核周区域;而 ASIC2 则集中于质膜。Chai 等接着对神经元进行了检测并发现,ASIC1a 同样集中定位于核周围,并呈簇分布^[11]。另外有研究表明,在哺乳动物神经元中,ASIC1 只存在于膜结构中,而并不单独存在于胞质中^[12]。这说明,ASIC1 在胞质内可能只存在于内质网膜与核膜上,而不能以游离态存在于胞质中。除神经元外,在人正常的胶质细胞中,ASIC2 也是质膜上最为主要的 ASIC 亚型,而 ASIC1 在非病理状态下是不会表达于细胞表面的^[13]。龚非力等^[14]在对树突状细胞(Dendritic cells, DCs)的研究过程中也发现了类似的 ASICs 分布情况。Jahr 等^[15]在对骨组织细胞的研究中发现,人成骨细胞质膜中的 ASIC2 与 ASIC4 的信号强度要比 ASIC1 与 ASIC3 的强得多;相反,在胞质中则是以 ASIC3 为主。

这样的分布方式具有其相应的生理学意义。先前研究已经确认,在 ASICs 的 6 种亚基中,ASIC2a 与 ASIC2b 对 H⁺ 的敏感度是最低的(pH0.5 约为 4.4)^[16];其次为 ASIC1a(pH0.5 约为 6.2)^[6]与 ASIC1b(pH0.5 约为 5.9)^[17];ASIC3 对 H⁺ 的敏感度最高,在 pH 降低至 7.0 时便可以激活^[18]。因此,定位于质膜的 ASIC2 对 H⁺ 敏感度最低,从而不会对正常生理 pH 水平产生应答。ASIC1a 同聚体通道对 Ca²⁺ 具有通透性,所以其在内质网膜上的分布对胞内 Ca²⁺ 水平有调控意义。在某些病理因素的刺激作用下导致 ASICs 分布发生变化,就有可能造成细胞的各项

生命活动受影响。例如,若 ASIC1a 在质膜上发生聚集,则有可能导致胞内 Ca²⁺ 水平升高而介导细胞损伤^[2]。

因此,在表达 ASICs 的细胞内,必定存在着相应的转运系统以调节细胞中 ASICs 的分布。而在病理状态下,该转运调节系统会发生异常而导致 ASICs 分布发生改变,进而可能引起 ASICs 样离子流的产生而对细胞功能产生影响。因此,该转运系统有望成为临床上治疗与 ASICs 表达失调有关疾病的靶点。

3 ASICs 胞内转运系统的研究

3.1 细胞内的 ASICs 转运相关物质

如前所述,ASICs 在细胞内具有相对固定的分布方式,这意味着细胞内存在着与之相应的转运调节系统。近年来,多项研究陆续发现了一系列与 ASICs 胞内转运相关的物质分子,它们在 ASICs 形成经典分布模式的过程中起着十分重要的作用。作为一种重要的衔接蛋白,PICK1(Protein interacting with C-kinase 1)可以通过其 PDZ 结构域与 ASIC1 发生相互作用。研究表明^[19],PICK1 的过表达可以增加 ASIC1 在细胞表面的表达量。另外,cAMP-PKA 途径可以将 ASIC1 胞质端的 Ser-479 位点磷酸化,从而阻断其与 PICK1 的相互作用进而影响 ASIC1 在细胞内的分布^[20]。重要的伴侣分子——甘油,以及重要的转录调节物——苯丁酸钠,都可以稳定蛋白质的结构并提高蛋白质的折叠速率。也有研究证明,这两种分子都有利于协助 ASIC2 向质膜的转移。这表明,在正常的生理状态下,甘油与苯丁酸钠,或是其同功物质分子对 ASICs 的正常分布起着关键作用。与之相反,细胞内另外一种重要的转运分子——热休克蛋白 70(Hot shocking protein 70, HSP70)对 ASIC2 的膜表达起到的是负调节作用^[21,22]。该研究也表明,HSP70 对 ASIC2 的调节具有特异性,而并不影响 ASIC1 与 ASIC3 的相互作用。

相应地,ASICs 结构中的某些区域也在其胞内转运过程中发挥着关键作用,最近的研究表明,利用衣霉素处理 ASIC1a 而抑制其糖基化会导致 ASIC1a 膜表达水平的降低^[23];而 ASIC1a 的穿膜结构域 -1(Transmembrane domain 1, TM1)与其胞外拇指结构的相互作用也在很大程度上决定了 ASIC1a 胞内转运的是否能够正常进行^[24]。另外,ASIC3 结构中的 D107-R153 与 D107-R160 两个盐键对 ASIC3 的质膜转移也同样意义重大^[24]。

3.2 细胞外影响 ASIC 分布的刺激因素

Chai 等^[11]通过对 ASIC1a 的转运研究表明,血清中的胰岛素是调节 ASIC1a 膜转移的重要胞外刺激物。正常状态下,ASIC1a 主要定位于内质网,而在缺少胰岛素的血清环境中,ASIC1a 从内质网大量地以膜泡的形式向质膜转移。但胰岛素的缺失并不会引起细胞内 ASIC1a 合成水平的增高,而仅仅是促进了 ASIC1a 向质膜的转移。值得注意的是,几乎所有的组织细胞表面都表达有胰岛素受体,这说明胰岛素可能是多种细胞内 ASICs 正常分布所必不可少的“组成性”调节物质。另外,许多促炎症介导体,如神经生长因子(Nerve growth factor, NGF)、白介素 -1(Interleukin-1, IL-1)、血清素(Serotonin)等,都可以促进 ASICs 的转录水平,在一定程度上也会影响 ASIC 的胞内分布^[25]。因此,我们可以推断 ASICs 在炎症的发生发展过程中可能起着重要作用。

3.3 质膜上存在 ASICs 集中分布的区域

PICK1 在介导 ASIC1a 向质膜转移的过程中牵扯到了 PICK1 与质膜脂质分子的相互作用^[19]。PICK1 的 BAR 结构域可以与细胞质膜中的脂质分子相互结合,尤其是磷脂酰肌醇。另外,在神经元突触模型中发现质膜中的 ASIC3 主要分布于质膜的脂筏区域,并且受到突触后膜密度蛋白 PSD-95 的负调节^[20]。

4 ASICs 的分布与肿瘤

肿瘤微环境是典型的病理酸性环境,因此,很多研究者希望能够找到肿瘤微环境与 ASICs 之间的联系。由于目前对 ASICs 的大多研究都来自于神经系统,所以,神经系统肿瘤,尤其是恶性胶质瘤,自然成为了人们关注的热点。早在 2003 年已有报道^[15],在正常的胶质细胞与病理状态的胶质瘤细胞中都有 ASICs 的表达。其差别在于:正常胶质细胞和恶性程度较低的胶

瘤细胞中 ASICs 的分布与之前所述的经典分布方式相符合;而在 IV 级高度恶性胶质瘤,即胶质母细胞瘤的细胞,以及一些胶质瘤细胞系中(如 U87、D54 等)ASICs 的分布情况发生异常。其异常表现为细胞表面 ASIC2 表达缺失,且 ASIC1a 的表达显著升高。ASIC1a 在胶质瘤细胞表面的聚集导致 ASICs 样离子流的出现,进而增强了胶质瘤的增殖与迁移能力。若敲除掉 ASIC1a,胶质瘤细胞的增殖与迁移都会受到抑制^[27]。已有报道,HSP70 在介导胶质瘤表面 ASIC2 表达下调以及 ASIC1a 表达上调的过程中起着关键的作用^[28]。另外,Wanda 等发现,利用甘油与苯丁酸钠可以恢复 ASIC2 向质膜的转运。虽然尚无确切研究证实,但由于胰岛素在 ASICs 分布调控中的重要作用,我们有理由推测胶质瘤微环境中血管异常而导致的胰岛素缺乏很有可能介导 ASIC1a 在质膜的聚集。

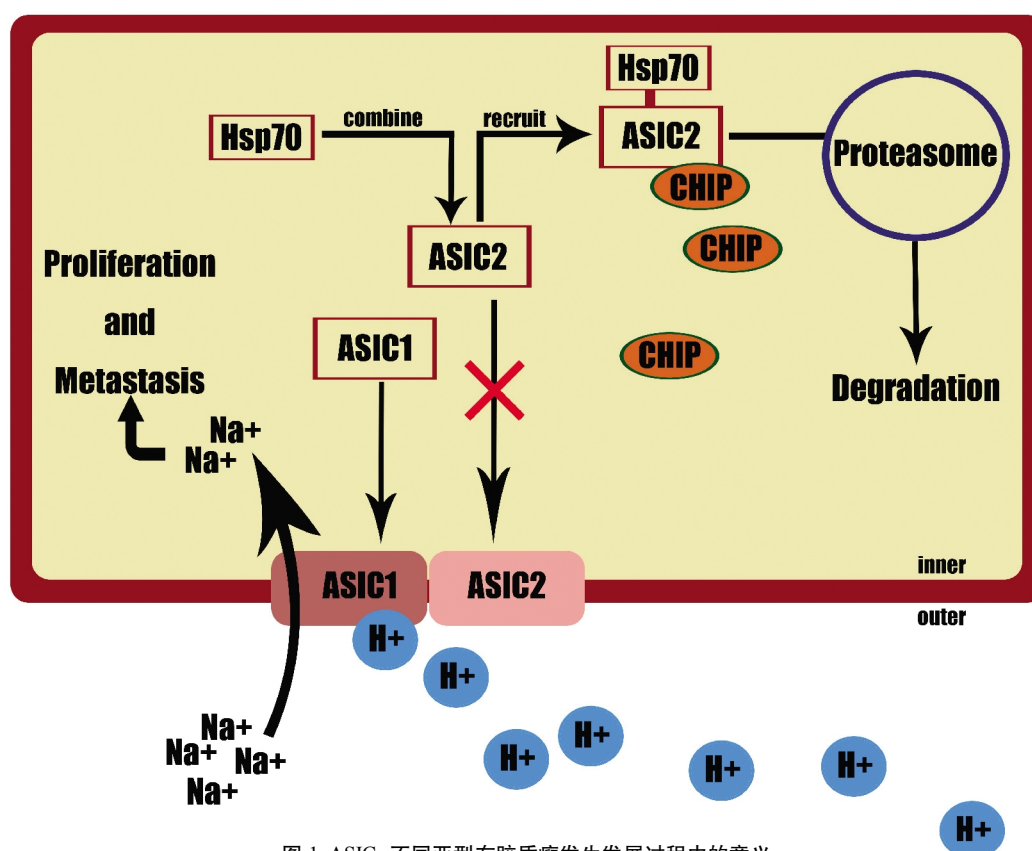


图 1 ASICs 不同亚型在胶质瘤发生发展过程中的意义

Fig.1 The significance of different subtypes of ASICs in developing process of gliomas

除神经系统胶质瘤外,研究者们在腺样囊性癌细胞中也观察到了 ASICs 样离子流,并且利用 Western Blot 检测出细胞中 ASIC2a 与 ASIC3 具有较高水平的表达^[29]。这意味着 ASICs 在腺样囊性癌的发展过程中可能也发挥着类似的作用。

目前对 ASICs 与肿瘤的相关研究十分有限,但个人认为随着 ASICs 在各个系统中的重要意义被逐渐阐明,其在其它系统肿瘤中的作用也会被深入研究。

5 小结

综上所述,在正常生理状态下,ASICs 在细胞内的分布趋向于经典分布方式,即 ASIC2 聚集于质膜,而 ASIC1 与 ASIC3

分布于细胞质。这样的分布可以防止细胞对生理或病理的酸环境产生应答。细胞内特定的转运对 ASICs 的分布进行调节,目前已经较为明确的是,胰岛素在维持 ASICs 的正常分布过程中起着关键作用;而 PICK1、甘油、苯丁酸钠、HSP70 等分子也都对 ASICs 的胞内转运和定位有重要影响。对上述转运调节系统的深入了解可能会为临床上治疗 ASICs 分布异常相关疾病,如胶质瘤等的治疗提供新的思路。

参考文献(References)

- [1] Ziemann A E, Allen J E, Dahdaleh N S, et al. The amygdala is a chemosensor that detects carbon dioxide and acidosis to elicit fear behavior[J]. Cell, 2009, 139(5): 1012-1021

- [2] Xiong Z G, Chu X P, Simon R P. Acid sensing ion channels--novel therapeutic targets for ischemic brain injury [J]. *Front Biosci*, 2007, 12:1376-1386
- [3] Maren S. An acid-sensing channel sows fear and panic [J]. *Cell*, 2009, 139(5): 867-869
- [4] Li M, Inoue K, Branigan D, et al. Acid-sensing ion channels in acidosis-induced injury of human brain neurons [J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2010, 30(6): 1247-1260
- [5] Wemmie J A, Chen J, Askwith C C, et al. The acid-activated ion channel ASIC contributes to synaptic plasticity, learning, and memory [J]. *Neuron*, 2002, 34(3): 463-477
- [6] Waldmann R, Champigny G, Bassilana F, et al. A proton-gated cation channel involved in acid-sensing [J]. *Nature*, 1997, 386 (6621): 173-177
- [7] Wemmie J A, Price M P, Welsh M J. Acid-sensing ion channels: advances, questions and therapeutic opportunities[J]. *Trends Neurosci*, 2006, 29(10): 578-586
- [8] Xiong Z G, Zhu X M, Chu X P, et al. Neuroprotection in ischemia: blocking calcium-permeable acid-sensing ion channels[J]. *Cell*, 2004, 118(6): 687-698
- [9] Chen X, Kalbacher H, Grunder S. The tarantula toxin psalmotoxin 1 inhibits acid-sensing ion channel (ASIC) 1a by increasing its apparent H⁺ affinity[J]. *J Gen Physiol*, 2005, 126(1): 71-79
- [10] Diochot S, Baron A, Rash L D, et al. A new sea anemone peptide, APETx2, inhibits ASIC3, a major acid-sensitive channel in sensory neurons[J]. *EMBO J*, 2004, 23(7): 1516-1525
- [11] Chai S, Li M, Branigan D, et al. Activation of acid-sensing ion channel 1a (ASIC1a) by surface trafficking [J]. *J Biol Chem*, 2010, 285(17): 13002-13011
- [12] Alvarez de la Rosa D, Krueger S R, Kolar A, et al. Distribution, subcellular localization and ontogeny of ASIC1 in the mammalian central nervous system[J]. *J Physiol*, 2003, 546(Pt 1): 77-87
- [13] Berdiev B K, Xia J, McLean L A, et al. Acid-sensing ion channels in malignant gliomas[J]. *J Biol Chem*, 2003, 278(17): 15023-15034
- [14] Tong J, Wu W N, Kong X, et al. Acid-sensing ion channels contribute to the effect of acidosis on the function of dendritic cells [J]. *J Immunol*, 2011, 186(6): 3686-3692
- [15] Jansen J H, van der Jagt O P, Punt B J, et al. Stimulation of osteogenic differentiation in human osteoprogenitor cells by pulsed electromagnetic fields: an in vitro study [J]. *BMC Musculoskelet Disord*, 2010, 11:188
- [16] Waldmann R, Bassilana F, de Weille J, et al. Molecular cloning of a non-inactivating proton-gated Na⁺ channel specific for sensory neurons[J]. *J Biol Chem*, 1997, 272(34): 20975-20978
- [17] Chen C C, England S, Akopian A N, et al. A sensory neuron-specific, proton-gated ion channel[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1998, 95(17): 10240-10245
- [18] Immke D C, McCleskey E W. Protons open acid-sensing ion channels by catalyzing relief of Ca²⁺ blockade[J]. *Neuron*, 2003, 37(1): 75-84
- [19] Jin W, Shen C, Jing L, et al. PICK1 regulates the trafficking of ASIC1a and acidotoxicity in a BAR domain lipid binding-dependent manner[J]. *Mol Brain*, 2010, 3:39
- [20] 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
- [21] Jing L, Jiang Y Q, Jiang Q, et al. The interaction between the first transmembrane domain and the thumb of ASIC1a is critical for its N-glycosylation and trafficking[J]. *PLoS One*, 2011, 6(10): e26909
- [22] Grifoni S C, McKey S E, Drummond H A. Hsc70 regulates cell surface ASIC2 expression and vascular smooth muscle cell migration [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2008, 294(5): H2022-2030
- [23] Jing L, Chu X P, Jiang Y Q, et al. N-glycosylation of acid-sensing ion channel 1a regulates its trafficking and acidosis-induced spine remodeling[J]. *J Neurosci*, 2012, 32(12): 4080-4091
- [24] Yang Y, Yu Y, Cheng J, et al. Highly conserved salt bridge stabilizes rigid signal patch at extracellular loop critical for surface expression of acid-sensing ion channels [J]. *J Biol Chem*, 2012, 287 (18): 14443-14455
- [25] Mamet J, Baron A, Lazdunski M, et al. Proinflammatory mediators, stimulators of sensory neuron excitability via the expression of acid-sensing ion channels[J]. *J Neurosci*, 2002, 22(24): 10662-10670
- [26] Eshcol J O, Harding A M, Hattori T, et al. Acid-sensing ion channel 3 (ASIC3) cell surface expression is modulated by PSD-95 within lipid rafts[J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2008, 295(3): C732-739
- [27] Kapoor N, Bartoszewski R, Qadri Y J, et al. Knockdown of ASIC1 and epithelial sodium channel subunits inhibits glioblastoma whole cell current and cell migration [J]. *J Biol Chem*, 2009, 284 (36): 24526-24541
- [28] Vila-Carriles W H, Zhou Z H, Bubien J K, et al. Participation of the chaperone Hsc70 in the trafficking and functional expression of ASIC2 in glioma cells[J]. *J Biol Chem*, 2007, 282(47): 34381-34391
- [29] Yuan F L, Chen F H, Lu W G, et al. Acid-sensing ion channel 1a mediates acid-induced increases in intracellular calcium in rat articular chondrocytes [J]. *Mol Cell Biochem*, 2010, 340 (1-2): 153-159