

HCN通道在神经系统中的功能和作用*

岳 鑫 王均辉 秦绿叶 于常海

(北京大学神经科学研究所;北京大学医学部神经生物学系;教育部神经科学重点实验室,北京 100083)

摘要 HCN通道(hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channels)是一种超极化激活的,选择性通透 K^+ 、 Na^+ ,直接受cAMP调控的离子通道,其在神经系统中有多方面的功能并与癫痫等神经疾病有关系。对HCN通道正常生理功能以及与疾病的关系的深入认识,必将对今后的研究和临床有深远的意义。

关键词 HCN通道;超极化激活;神经系统

中图分类号 Q42

1976年Noma等在记录心脏窦房结组织时记录到一种超极化激活的电流,随后Brown和DiFrancesco发现这一电流是膜电位超极化激活的内向阳离子电流,电流激活的大小与速率呈电压依赖性,并能被胞外的 Cs^+ 特异性阻断。随后在感光细胞和海马CA1区的锥体细胞也记录到这种超极化激活的内向电流,称之为 I_h (hyperpolarization-activated current),其具有稳定细胞膜电位、参与心脏和神经节律调节、参与树突整合,以及调节神经递质释放等生理功能^[1]。1997年Santoro等发现了介导 I_h 的离子通道HCN(hyperpolarization-activated, cyclic nucleotide-gated channels),此后两年间陆续克隆出多种HCN通道,其中在哺乳动物有四种,分别称之为HCN1、HCN2、HCN3和HCN4。

一、HCN通道的电生理特征及调节因素

HCN通道产生的 I_h 电流主要电生理特征是超极化激活(图1),非选择性通透阳离子包括 Na^+ 、 K^+ ,受cAMP调控。HCN通道的显著激活电位为 $-50 \sim -60$ mV,接近大多数细胞的静息电位。激活通常有明显的延迟,去极化时失活,激活曲线呈现电压依赖性的S形曲线,能很好地被Boltzmann方程拟合。在心脏和丘脑的中间神经元 I_h 激活比较慢,需几秒钟达到稳定电流。在海马CA1神经元 I_h 的激活非常快,激活时间常数在 $30 \sim 60$ ms之间。不同的细胞最大半激活电位($V_{1/2}$)变化很大,通常在 -60 mV ~ -90 mV之间,但在成年心室的肌细胞可达 -120 mV。

HCN通道允许 K^+ 和 Na^+ 通过,但 Li^+ 不能通过,二价阳离子既不能通过也不能阻断通道。 K^+ 、 Na^+ 通透性的比率 $P_K:P_{Na}$ 为 $3:1 \sim 5:1$,翻转电位

为 -40 mV ~ -20 mV。在通常的静息膜电位HCN通道即被激活,产生净内向电流,主要由 Na^+ 携带,使膜电位去极化,接近阈电位,所以能提高细胞兴奋性,促进动作电位发放。细胞内外的 K^+ 、 Na^+ 浓度的改变会影响HCN通道的激活和电导。降低细胞外 Na^+ 、 K^+ 浓度,会产生浓度依赖性的HCN通道电导减少和翻转电位向超极化移动,HCN通道的电导对细胞外 K^+ 浓度高度敏感,细胞外 K^+ 低于正常浓度时($2 \sim 4$ mmol/L) I_h 电流幅值急剧降低。 I_h 对细胞外低浓度的 Cs^+ 敏感($1 \sim 2$ mmol/L阻断50%以上的 I_h)、对 $1 \sim 2$ mmol/L Ba^{2+} (内向整合 K^+ 通道的强阻断剂)不敏感,常利用这一特性把 I_h 从其它电流中区分出来。然而这一浓度的 Cs^+ 对其它 K^+ 通道还是有一定阻断作用,于是又寻找到一些特异性阻断HCN通道的有机复合物,包括ZD7288、UL-FS49、DK-AH 268和S-16257。

细胞内 Ca^{2+} 、 H^+ 及温度对 I_h 也有影响, Ca^{2+} 升高,pH升高或在一定范围内升高温度都能促进 I_h 激活,增加 I_h 电导,使激活电压向去极化移动。在多巴胺通过D2受体激活G蛋白抑制 I_h 的过程中 Ca^{2+} 起关键作用,而cAMP对其影响不大。在海马CA1有AMPA受体的锥体神经元,谷氨酸激活AMPA受体引起去极化时也能增加 I_h ,并且也依赖 Ca^{2+} 内流^[2]。

HCN通道能与cAMP直接结合,增强通道活性,使门控电压向去极化移动,但是cAMP只改变

* 国家自然科学基金(30270426, 30470543)和北京市自然科学基金(7032026, 7051004)资助课题
通讯作者

I_h 的激活速度,而不影响 I_h 的最大电流。cAMP对 HCN通道的调节不依赖蛋白质磷酸化,在没有 MgATP的情况下 cAMP仍能增强 HCN通道的开放,因此认为 cAMP与 HCN通道的细胞内侧结合直接调节 I_h 。cGMP也能与该位点结合促进通道激活,但亲和力比 cAMP低。此外,多种神经递质通过对胞内 cAMP的调节调控 HCN通道,如去甲肾上腺素(NA)、5羟色胺(5-HT)、乙酰胆碱(ACh)、前列腺素(PGE2)、P物质(substance P)以及阿片肽(opioid)等。HCN四种亚型对 cAMP的反应不一致,HCN3、4的反应最强,HCN2次之,HCN1几乎不受 cAMP的调节。

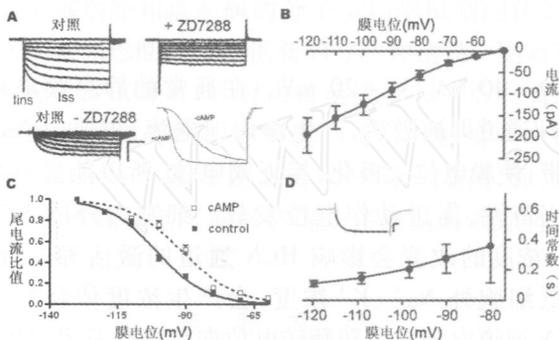


图 1 超极化激活电流 I_h 的电生理学特性

A: 全细胞电压钳模式下记录到的 I_h 电流,超极化刺激可激活两种电流:瞬时电流和稳态电流,50 μ M ZD7288 阻断 I_{ss} , ZD7288阻断前电流减去 ZD7288阻断后电流即可得 I_h 电流(标尺 250 pA 和 200 ms),cAMP加快 I_h 激活;B: I_h 的电流-电压曲线;C: 对电流-电压进行 Boltzmann 指数拟合得到的 I_h 控制膜电阻和树突整合激活曲线,cAMP使激活曲线右移;D: 激活时间常数与膜电位的关系,对电流 I_h 增加时相进行单指数拟合计算出激活时间常数

二、HCN通道的各亚型及其分布

迄今在人和小鼠的组织器官中共找到四个 HCN 家族成员,分别为 HCN1~HCN4。这些亚型结构类似,核心部分序列高度同源都与电压门控 K^+ 通道类似。HCN四种亚型也有细微差异,它们的激活动力学和对 cAMP的反应不一致,HCN1 激活最快,HCN2次之,HCN3、4激活速度慢。

四种 HCN在体内具有一定的组织和细胞特异性。目前,对 HCN通道的研究集中在神经元,心肌细胞及心脏传导束。HCN2和 HCN4广泛分布在大脑和心脏多种组织中,而 HCN1和 HCN3则主要表达在神经组织中。在脑内 HCN2表达多,分布广,在大多数脑区都有表达^[3]。HCN1和 HCN4分布较局

限且分布位置相互补充。HCN1主要在新皮层、海马、小脑皮层的神经元表达,在大脑皮层第 4 层锥体神经元高表达,而在皮层的其它层没有表达;HCN4 在内侧缰核、丘脑、嗅球、基底神经节的某些特定神经元高表达,而 HCN3表达最弱。

激活速度快的 HCN1主要分布在外周神经系统和感觉器官及与精细感觉有关的脑区;而参与情绪反应的中枢神经系统,尤其表现出节律性活动的神经元主要表达激活较慢的 HCN2、HCN3、HCN4 亚型。这一分布特点与它们的功能相关。外周 HCN 主要参与信号转导,把各种刺激快速、准确地转换为电活动并传向中枢;中枢的电活动复杂,需要精细调节。在心脏,窦房结是心脏的起搏点,自律性高,受神经和体液调控,主要表达 HCN4和 HCN1;自律性低的传导组织 I_h 电流小,主要表达 HCN4和 HCN2。

三、HCN通道的基本结构

HCN通道家族 4 个亚型的基本结构与电压门控 K^+ 通道同源,如图 2 所示,每一个 HCN 亚基都有 6 个跨膜螺旋片段组成的核心区(S1~S6)及跨膜片段间的连接区(loop/linker),包括带正电荷的电压感受器 S4、通道的孔(pore)形成的 P区、C端 120 个氨基酸残基组成的 cAMP 结合区 CNBD(cyclic nucleotide binding domain)。HCN 各亚型的跨膜核心区和 cAMP 结合区高度保守(80%~90%相同),在细胞内侧 N 端和 C 端有差别。HCN 的结构对激活动力学影响的研究表明,S1 与 S2 间连接区(S1-S2 linker)以及 S6 与 CNBD 间连接区(S6-CNBD linker)是 HCN 激活门控的重要部位,CNBD 对 HCN 激活影响很大。感受电压变化的主要结构是 S4,而 S4-S5 linker 参与了电压感受和通道开放耦联,对控制通道开放起重要作用。

HCN通道一个显著特征是在细胞内侧 C 端有 120 个氨基酸残基组成的 cAMP 结合区(CNBD),介导通道对 cAMP 的反应。HCN 通道的四种亚型中间区域高度保守,但它们的两端却有很大的变化,致使它们的激活曲线和对 cAMP 的反应不同。HCN1 比 HCN4 的激活速度快,但对 cAMP 的敏感性很差,这种差异是由 C 端决定的。

从 mRNA 和蛋白水平来看,不同的 HCN 亚型可在同一个细胞表达,对 I_h 的激活动力学分析也提示,HCN 的各亚型可能形成异源聚合体,体外实验早已证明 HCN 的各亚型可以形成异源聚合体。最近在在体情况下通过免疫共沉淀也证明,体内存在 HCN1 和 HCN2 的异聚体^[4]。

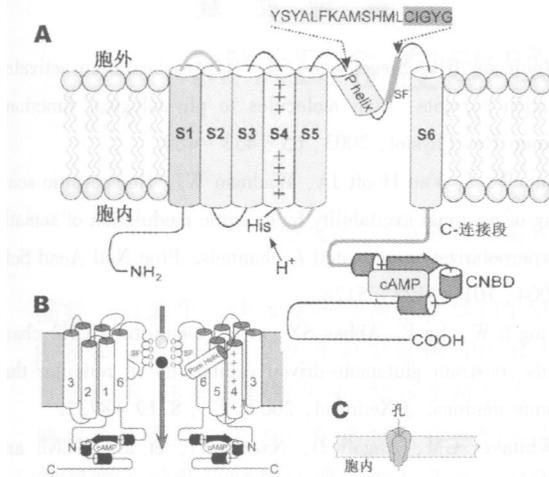


图 2 HCN 的分子结构

A: HCN 基本结构包括 6 个跨膜的螺旋 S1 ~ S6, C 端有 cAMP 结合片段 (CNBD); B: 亚基组装成离子通道时, S5 与 S6 间的连接片段断组成了通道孔; C: 一个 HCN 通道由四个亚基组成

四、HCN 通道生理作用的一般原理

HCN 通道至少有四种生理功能: (1) 参与心脏起搏和某些神经元的节律性活动; (2) 控制和限定静息电位; (3) 调节突触传递; (4) 控制膜电阻和树突整合。其基本的生理功能是对膜电位的调节。

(一) 参与心脏起搏和某些神经元的节律性活动 HCN 通道最显著的特征是它所产生的 I_h 作为一些有自发性活动的细胞的基本起搏电流, 包括心脏的窦房结细胞和浦肯野纤维、丘脑皮层接替神经元、脑干下橄榄神经元、海马多形细胞层中间神经元。在动作电位复极化达到超射时, 其负电位激活了 HCN 通道, 产生 I_h 内向电流, 使膜电位向阈电位去极化, 拮抗膜电位的超级化趋势, 为下一次动作电位作准备。

在其它有自发性活动的细胞, I_h 不作为基本起搏电流, 阻断这类细胞的 I_h 不能降低动作电位发放频率, 如小脑浦肯野神经元、海马透明层中间神经元、脑干呼吸核团神经元, 它们常依赖持续内向 Na^+ 电流 (I_{NaP}) 产生节律性发放。在这些细胞中 I_h 被认为起到安全防线作用, 防止膜超级化超出维持 Na^+ 电流引发自发放电的电位范围^[4]。

(二) 控制和限定静息电位 HCN 通道通过负反馈稳定膜电位。当 HCN 通道激活 Na^+ 内流引起去极化时, 去极化将使 HCN 通道关闭, 降低 Na^+ 内流, 使去极化限定在一定程度。超级化时 HCN 通道被激活, 产生内向电流, 防止膜过度超级化。在电流钳实验中很容易看到 HCN 通道电流 I_h 稳定膜电位

的作用。没有 I_h 的细胞, 指令一个负电流使膜电位超级化, 呈现近似由被动膜时间常数控制的指数时程, 停止输入电流, 膜电位平滑地回到静息膜电位。而有 I_h 细胞膜电位超级化反应时有一去极化内凹, 这一内凹是由 HCN 通道激活引起的, 这样 I_h 驱使膜回到起始静息电位。当 I_h 介导的内向电流终止时有一去极化反弹, 是由额外的 Na^+ 通过超级化时激活的 HCN 通道内流引起的。在某些细胞去极化反弹能触发一次动作电位。同样在去极化时 HCN 通道失活, 也促进膜电位回到静息水平。

(三) HCN 通道在突触传递中的作用 HCN 通道最令人感兴趣也最有争议的作用是控制突触传递。电生理证明在许多突触前末梢存在 HCN 通道, 但 HCN 通道调节突触传递的机制还不清楚。HCN 通道调节突触传递最有力的证据是小龙虾神经肌肉接头对 5-HT 反应时 cAMP 依赖的、长时程易化突触传递^[5]。Beaumont 等用细胞内记录的方法证明, 小龙虾运动神经末梢存在 HCN 通道, ZD7288 或 Cs^+ 阻断 HCN 通道可以抑制 5-HT 对突触的易化作用, 而没有 5-HT 时, 超级化激活 HCN 通道也能产生易化作用。

Chen 等对海马 HCN 通道是否参与 LTP 进行了研究, 结果显示 ZD7288 抑制 AMPA 和 NMDA 受体, 因此认为 ZD7288 抑制 LTP 是通过抑制 AMPA 和 NMDA 受体, HCN 通道不参与 LTP^[6]。以上实验结果的差异主要有: ZD7288 对 I_h 是否有抑制作用; $CsCl$ 是否抑制 LTP。造成差异的原因是: (1) 选用的细胞不同, 这些细胞表达 HCN 可能有差异; (2) $CsCl$ 对 I_h 的抑制是可逆的, 所以实验过程中需连续给药。因此 HCN 通道在 LTP 中的作用尚无定论。

(四) 控制膜电阻和树突整合 树突上的 HCN 通道被认为在修整兴奋性突触传入引起的电位反应中具有重要作用。按照被动传导理论, 远端突触传入产生的去极化兴奋性突触后电位 (EPSP) 从树突棘突向胞体传播时, EPSP 的时程将被延长, 到达胞体时, 就会造成远端和近端的 EPSP 到达胞体时程不同。但实际情况是它们的 EPSP 到达胞体的时程是相同的, 这是由于距离远的突触 I_h 电流密度大, I_h 加快 EPSP 的产生和消灭, 使 EPSP 时程变短, 所以距离远的 EPSP 产生快, 到达胞体时, 它们的 EPSP 时程就相同了。

五、HCN 通道与神经系统疾病

HCN 通道可能也参与神经系统疾病。发热性癫痫模型的大鼠 HCN 通道上调, 用于解释这些动物

后来癫痫发作的易感性增加^[7],癫痫模型鼠 CA1 锥体神经元 HCN通道的 V1/2向去极化移动, I_h 电流变大,导致膜电位去极化,输入电阻变小。当给予类似抑制性突触后电位(IPSP)的电刺激产生 IPSP之后紧接着出现去极化反弹,产生动作电位发放,抑制 I_h 则反弹性发放消失,表明 I_h 变化后使 CA1对抑制性输入的反应发生了很大变化,导致癫痫的发作。与这一 I_h 变化相关的是癫痫形成过程中在海马 CA1和 CA3锥体神经元 HCN2 mRNA 表达水平增加,HCN1下调,HCN4未变化^[8]。还有报道损伤内嗅皮层后 I_h 上调^[9],这个区为海马提供大多数突触传入,在 Alzheimer's病时发生退行性变化。然而 HCN通道是否是人类一些疾病的致病因子还需探讨^[10]。

六、结语

HCN通道的研究起步较晚,但发展很快。由于 HCN通道一些特别的性质(如超极化激活、cAMP直接调控),使之从上世纪 70年代起就成为研究的热点。随着其基因的克隆,基因敲除小鼠的建立已经帮助人们解决了很多悬而未决的问题。但 HCN通道的一些功能及其意义还存在争议,其与疾病的关系还需要进一步的探讨。目前对 HCN通道的研究主要集中在神经元和心肌细胞,虽然免疫组化的染色结果指示一些非兴奋性细胞如胶质细胞可能也存在这种通道,但还没有相关报道探讨 HCN通道在非兴奋性细胞的分布和功能。由于 HCN主要参与调节细胞的兴奋性,使细胞活动加强或减弱,如果非兴奋性细胞上也存在这些通道,对 HCN在非兴奋性细胞的功能研究,必将加深人们对 HCN通道的理解,更全面地了解 HCN通道的功能和意义。

参 考 文 献

- 1 Robinson RB, Siegelbaum SA. Hyperpolarization-activated cation currents: from molecules to physiological function. *Annu Rev Physiol*, 2003, 65: 453 ~ 480.
- 2 Van W, I, Van Hooft JA, Wadman WJ. Homeostatic scaling of neuronal excitability by synaptic modulation of somatic hyperpolarization-activated I_h channels. *Proc Natl Acad Sci*, 2004, 101: 5123 ~ 5128.
- 3 Ying S-W, Jia F, Abbas SY, et al. Dendritic HCN2 channels constrain glutamate-driven excitability in reticular thalamic neurons. *J Neurosci*, 2007, 27: 8719 ~ 8732.
- 4 Whitaker GM, Angoli D, Nazzari H, et al. HCN2 and HCN4 isoforms self-assemble and co-assemble with equal preference to form functional pacemaker channels. *J Biol Chem*, 2007, 282: 22900 ~ 22909.
- 5 Zölles G, Klockner N, Wenzel D, et al. Pacemaking by HCN channels requires interaction with phosphoinositides. *Neuron*, 2006, 52: 1027 ~ 1036.
- 6 Chen C. ZD7288 inhibits postsynaptic glutamate receptor-mediated responses at hippocampal perforant path-granule cell synapses. *Eur J Neurosci*, 2004 19: 643 ~ 649.
- 7 Jung S, Jones TD, Lugo JN, et al. Progressive dendritic HCN channelopathy during epileptogenesis in the rat pilocarpine model of epilepsy. *J Neurosci*, 2007, 27: 13012 ~ 13021.
- 8 Brewster A, Bender RA, Chen Y, et al. Developmental febrile seizures modulate hippocampal gene expression of hyperpolarization-activated channels in an isoform- and cell-specific manner. *J Neurosci*, 2002, 22: 4591 ~ 4599.
- 9 Wang M, Ramos BP, Paspalas CD, et al. Alpha2a-adrenoceptors strengthen working memory networks by inhibiting camp-HCN channel signaling in prefrontal cortex. *Cell*, 2007, 129: 397 ~ 410.

新传染病的早期识别和遏制策略成为可能

世界范围内不断出现新的传染病(Emerging infectious diseases, EDs),如艾滋病、SARS、抗药性细菌和埃博拉病毒。这些新出现的传染病构成对世界经济和人类健康的一大威胁。它们的出现具有区域性的特点,有些地区出现 EDs的频率相对较高。但此前没有研究者对其进行时间和空间上比较的详细研究。Kate E Jones等研究者对在 1940年和 2004年间出现的 335例 EDs所做的一项统计分析表明:新传染病的出现不是随机的。EDs中动物传染病占 60.3%,其中大部分(71.8%)来源于野生动物。另外,此前普遍认为 EDs主要由病毒,特别是 RNA病毒引起。但研究者发现 54.3%的 EDs由细菌或立克次体引起,它们往往是已经产生抗药性的微生物。此项研究项目中的 EDs包括近期新出现的抗药性疾病(多重抗药性结核病,耐药性疟疾等)、HM-1、SARS等病原菌引起的疾病,以及莱姆病等曾经已经攻克的疾病重新恢复高发率。这些疾病的发生给人类健康带来严重的负面后果。研究证实 EDs的发生与社会经济、环境和生态因素显著相关。这些研究结果给人们以提示哪些区域有可能成为 EDs的高发区域。从而证实了在早期阶段发现健康风险和制定遏制它们的策略是完全可能的。但是存在的问题是:疾病监测工作以及当前研究经费中的很大部分都集中在发达国家,而风险图则表明,新疾病更有可能出现在发展中国家。

(Nature, 2008, 451: 990 ~ 994) (马娟)