磷酸化对 HERG 钾通道的调控作用

黄瑞燕综述 林吉进审校

【摘要】 HERG (human ether-a-go-go-related gene)编码的钾通道介导快速激活延迟整流钾电流(I_{Kr})。I_{Kr}在心肌动作电位复极中发挥极其关键的作用，I_{Kr}的减弱可延长心肌动作电位时程，导致长 QT 综合征(LQTS)。HERG 突变和 HERG 钾通道的药物性阻滞是 LQTS 的常见原因之一。心脏 HERG 钾通道功能受众多因素的调控，该通道的磷酸化是重要的调控因素之一。现有报道证实 HERG 钾通道的调节由蛋白激酶(protein kinases A、C 和 protein tyrosine kinases Src 等)介导完成。

【关键词】 HERG；磷酸化钾通道；蛋白激酶

心脏 HERG (human ether-a-go-go related gene) 钾通道属于电压依赖性钾通道，其介导的快速激活延迟整流钾电流(I_{Kr})是人类心肌细胞动作电位 3 期快速复极的主要电流。HERG 突变是先天性长 QT 综合征(LQTS)的主要原因之一，且一些药物可以通过阻滞该基因编码的 HERG 钾通道而诱发致死性心律失常。磷酸化是离子通道功能包括 HERG 钾通道的重要调控因素之一。

1 HERG 钾通道

1.1 HERG 钾通道与 LQTS

HERG 钾通道是心脏正常电活动的基础，HERG 突变及药物阻断该通道后可导致心律失常。LQTS 是一类因编码心肌细胞离子通道基因突变导致心肌细胞动作电位复极时离子流紊乱，诱发尖端扭转型室速、心室颤动等恶性心律失常的临床综合征。目前已发现 10 个与 LQTS 相关基因[1]，其中，HERG 突变是先天性 LQTS 的第二常见原因。在 HERG 上已发现 400 多个突变位点，均导致 LQTS。一些药物因阻滞 HERG 钾通道并诱发心律失常而被禁止销售。目前，获得性 LQTS 成为美国 FDA 终止某些药物上市的主要原因，是否阻滞心脏 I_{Kr}成为多种药物应用于临床前的常规检验项目之一。

1.2 HERG 钾通道的调控因素

HERG 钾通道是电压门控钾通道中一员，其功能受多种因素调节，包括肾上腺素能受体对 HERG 钾通道调控[2]。肾上腺素能受体是膜蛋白中一类 G 蛋白偶联受体，当刺激作用于 α_1肾上腺素受体(α_1AR)时，通过激活 Gq 蛋白，引起膜上磷脂酶 C 活化后水解 4,5-二磷酸磷脂酰肌醇(PIP_2)为第二信使：1,4,5-三磷酸肌醇(IP_3)和二酯酰甘油(DAG)。IP_3使胞内钙动员，DAG 是蛋白激酶 C(PKC)的生理性激活剂。激活的 PKC 与蛋白激酶 A(PKA)相互作用，通过不依赖于 PKA 或 PKC 介导的磷酸化的中间因子，减弱 HERG 钾通道的激活。而 PIP_2直接与通道作用增强 I_{Kr}。电压门控通道的失活包括 N 型和 C 型失活：前者是 N 末端远端约 20 个氨基酸形成的球体阻塞钾通道孔内口，使通道失活，即“球-链机制”，失活较快；后者是通道孔外口构型变化，使通道孔关闭，即"门脚机制"，失活较慢。当 β_1肾上腺素能受体(β_1AR)活化后，通过增加胞内钙离子浓度及激活 PKC，减少 C 型失活而使得 I_{Kr}幅度增大。

2 HERG 钾通道的磷酸化

HERG 钾通道上含有多个丝氨酸/苏氨酸和

基金项目：国家自然科学基金(30600254)；广东省自然科学基金(6301076)

作者单位：515041 汕头大学医学院第一附属医院心内科(黄瑞燕)；510080 广东省人民医院，广东省心血管病研究所心内科(林吉进)

万方数据

酪氨酸残基，这些酶可作用于 HERG 钾通道蛋白的合成、转运、聚集/解聚、定位、更新和降解以及通道门控等位点，改变 HERG 蛋白磷酸化状态，调节 HERG 钾通道的功能。

2.1 PKA 介导的 HERG 钾通道磷酸化

三磷酸腺苷(cAMP)依赖的 PKA 是丝氨酸/苏氨酸激酶，胞外信号刺激可提高胞内 cAMP 浓度，cAMP 结合 PKA 调节亚基，促使调节亚基和催化亚基解离，催化亚基磷酸化底物特异的磷酸化位点。应激状态时，I_{Kr} 是肾上腺素能/cAMP 介导的心肌复极化中最主要部分，β-肾上腺素刺激后使 cAMP 升高，结合到通道蛋白，引起 PKA 介导的磷酸化，抑制 I_{Kr} 幅度。HERG 蛋白磷酸化位点位于 N 端 S283 和 C 端 S890、S895、S1137，其相互作用是动态的，其突变(S283A，S890A，T895A，S1137A)对 I_{Kr} 有影响，但并不能显著改变 HERG 蛋白磷酸化水平[3]。研究发现 cAMP 特异性磷酸二酯酶抑制剂 Ro-20-1724 和腺苷酸环化酶(AC)激活剂 forskolin 对 HERG 蛋白磷酸化位点的影响，两者可提高 cAMP，激活 PKA，直接磷酸化 HERG 蛋白，减弱 I_{Kr}，在心脏复极化过程中起重要作用[4]。当 cAMP 持续升高时，尽管 cAMP 介导的总效应是有效电流净衰减，但如果 PKA 介导的途径被选择性抑制，如当 HERG 结合钾通道的附属蛋白 MiRP1 或 minK[5]，则肾上腺素刺激对心肌细胞膜复极化产生有利效应[6]。因此，应激与心律失常存在直接联系，第二信使通过两条途径对离子通道发挥复杂调控作用。

目前已鉴定出 HERG 蛋白与衔接蛋白 14-3-3ε 存在相互作用[7]。HERG 钾通道上 PKA 磷酸化位点(S283、S1137)能促进 14-3-3ε 结合，结合后由于屏蔽细胞内磷脂酶的作用，稳定其磷酸化状态，使作用于 HERG 的肾上腺素能效应得以维持[8]。在 LQTS 2 家族中，位于 HERG 钾通道 C 端 3 种新的杂合突变体(G965X，R1014PfsX39，V1038AfsX21)可导致蛋白平截和结合 14-3-3ε 的 PKA 磷酸化位点(S283、S1137)缺失。虽然突变体通道仍结合 14-3-3ε，但对野生型通道中电压依赖的超极化转变无反应，显示 3 个 HERG 蛋白突变体的显性负相特性。14-3-3ε 引起 HERG 钾通道平截 C 端的衰减效应证实了偶联 β-肾上腺素对调节 HERG 钾通道活性的生理意义[9]。由 cAMP 介导的 PKA 效应参与野生型 β_1-AR 和 14-3-3ε 相互作用，与 HERG 钾通道和 14-3-3ε 的作用竞争。在转染的细胞和心脏组织中，β_1-AR 与 14-3-3ε 的结合受 AC 激活剂 forskolin 刺激而增强。14-3-3ε 与 β_1-AR 和 HERG 钾通道的动态结合构成心脏复极化和不应性的重要的肾上腺素能调节子[10]。另外，磷酸二酯酶(PDE)抑制剂通过通道阻滞和 PKA 介导的磷酸化下调 HERG 蛋白的活性而抑制[11]，在 PDE 的 3 种抑制剂(vesnarinone，amrinone 和 milrinone)中，只有 vesnarinone 显示出对 I_{Kr} 的抑制效应。Vinpocetine 的抑制效应与 vesnarinone 相似，能明显减弱 I_{Kr}，但不受 PKA 抑制剂的显著影响，而且 PKA 激动剂对 I_{Kr} 无效。在转染 HERG 的 CHO-K1 细胞中，vinpocetine 和 vesnarinone 直接阻滞通道，其对 I_{Kr} 的抑制并不存在 PKA 依赖的对胞内 PDE 的抑制效应。

2.2 PKC 介导的 HERG 钾通道磷酸化

PKC 是丝氨酸/苏氨酸和酪氨酸依赖的激酶。曾有研究 PKC 介导多个钙离子通道直接磷酸化的调节机制，但 HERG 钾通道受 PKC 介导的分子机制并非依赖于 PKC 介导的通道直接磷酸化，可能是中间信号转导蛋白调节该效应。PKC 的生化功能受丝氨酸/苏氨酸依赖蛋白磷酸酶(PP1、PP2A 和 PP2B)抑制[12]。2003 年，Thomas 等[13]鉴定出 PKC 介导 HERG 蛋白直接磷酸化的 18 个特异的磷酸化突变位点：S26、T74、T162、T174、S179、S250、S278、S354、T371、T526、S606、S636、T670、S890、T895、S918、S960 和 T1133，所有磷酸化位点为丙氨酸残基置换后并不出现磷酸化。分子克隆后产生 4 种结构：ⅰ(S26A、T74A、T162A、T174A、T179A)；ⅱ(S250A、S278A、S354A、T371A)；ⅲ(T526A、S606A、S636A、T670A)；ⅳ(S890A、T895A、S918A、S960A、T1133A)。膜片钳术观察：结构ⅱ、ⅲ、ⅳ在表达后均能检测到典型的 I_{Kr}，而结构ⅰ未检出电流。然而，非特异的蛋白激酶激活剂

万方数据

佛波酯(PMA)能激活传统的 cPKCs(α、βⅠ、βⅡ、γ)和新型的 nPKCs(δ、ε、η、θ)亚型,而对非典型的 aPKCs(ζ、ι/λ)亚型无影响。该效应可由 cPKC 亚型的特异性激活剂 thymeleatoxin 模仿,其能诱导 HERG 的激活,非依赖于 PKC 介导的通道磷酸化。同时,共表达 β-minK 或 hMiRP1 均不引起 PMA 调节的 I_{Kr} 的显著变化。而特异性抑制 PKC 却能撤销 PMA 诱导的 HERG 蛋白激活。在 PKC 介导的磷酸化位点突变缺失后,PMA 诱导的效应仍然存在,而细胞骨架蛋白如肌丝或微管并不影响 PMA 对 HERG 蛋白激活,说明细胞骨架完整性受 PMA 对 I_{Kr} 的调节不显著。α_1AR 亦通过 PKA 和 PKC 介导的非依赖于直接通道磷酸化作用调节心脏 HERG/I_{Kr} 的复极化[14],应用 α_1AR 拮抗剂哌唑嗪(20 mM)、PKC 抑制剂(Ro-32-0432 3mM,)或 PKA 抑制剂(KT5720 2.5mM,)抑制 HERG/I_{Kr}。当 HERG 钾通道中 PKA 和 PKC 依赖的磷酸化突变位点缺失时,这种效应仍然存在。

另外,观察 PKC 抑制剂 bisindolylmaleimide I(BIM I)与 HERG、KvLQT1/minK、I_{Kr} 直接作用,发现 BIM I 阻断 I_{Kr},而酪氨酸 652 丙氨酸(Y652A)、苯丙氨酸 656 丙氨酸(F656A)突变位点减弱该效应,提示 BIM I 在 P 环区结合一普通药物受体,并不明显改变 KvLQT1/minK 电流,使用 BIM I 应考虑非依赖于 PKC 的效应[15]。2007 年,Cockerill 等[16]发现 PKC 介导了表达于 HEK293 中通道亚单位的直接磷酸化和毒蕈碱对 I_{Kr} 的调节。由乙酰胆碱活化的 G(aq/11)-M(3)-毒蕈碱受体,能减弱对电压依赖的激活和失活仅起微弱作用的 I_{Kr} 幅度。采用 1-oleoyl 2-acetylglycerol(OAG)刺激 PKC,模仿毒蕈碱受体激活,能增加 HERG 磷酸化。同时应用 BIM I 和下调 PKC 能使 OAG 效应消失,但基本磷酸化水平不变。

2.3 Src 调控 HERG 钾通道

Src 家族蛋白酪氨酸激酶(SFK)包括 9 个蛋白酪氨酸激酶(PTKs),通过 Src 同源性区域(SH2、SH3)结合底物和磷酸化靶酪氨酸蛋白,酪氨酸磷酸化能上调 HERG 的活性,此与 PKA 和 PKC 途径相反[17]。新近研究发现广谱 PTKs 抑制剂木黄酮(30 mμM)、选择性 EGFR 激酶抑制剂 AG556(10 mμM)和 Src 抑制剂 PP2(10 mμM)能减弱 HERG 蛋白酪氨酸磷酸化,显著抑制 I_{Kr};Y475A 或 Y611A 点突变使 I_{Kr} 抑制效应显著减弱,该效应与 PTPs 抑制剂正矾酸盐(1 mM)相反。表明:HERG 钾通道不仅由 Src 调节,也受 EGFR 激酶调节;Y475A 和 Y611A 可能是优先的磷酸化位点;PTKs 调节 HERG 活性,改变其电生理特性,包括心脏和神经元的动作电位时程和细胞兴奋性[18]。

2.4 其他途径的磷酸化

2.4.1 PI-3K/PKB 和 PI-3K/SGK3 途径的磷酸化 磷酸肌醇-3 激酶(PI-3K)下游靶点包括血清和糖皮质激素诱导激酶(SGK)、蛋白激酶 B(PKB)亚型。PKB 磷酸化位点位于(S890、S331),PI-3K/PKB 信号途径调节 HERG 钾通道[19]:PKB 的效应比 PI3K 明显,PKB 磷酸化介导通道抑制减弱 I_{Kr},而通道活化则增强 I_{Kr};PKB 通过药物(Wortmannin,WMN,PI-3K 抑制剂)阻断或分子失活[显性负相 PI-3K(dnPI-3K)和显性负相 PKB(dnPKB)]抑制 I_{Kr},而组成性激活的 PKB(caPKB)则增强 I_{Kr}。研究发现,PKB 的活化依赖 PI-3K:PI-3K 介导 PKB 活化是 WMN 敏感的,而非 PI-3K 介导 PKB 活化是 WMN 非敏感的。另外,在 SGK3 上两个共同位点置换色氨酸为丙氨酸能减弱 I_{Kr},但两者突变不能减弱 SGK3 的刺激效应,共表达 SGK3 能稳定 I_{Kr} 激活状态[20]。

2.4.2 MAPKs 途径介导的磷酸化 丝裂原活化蛋白激酶(MAPKs)是丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶,包括 ERKs、Akt、JNK、P38 等。HERG 钾通道通过 MAPKs 激活和 Akt 失活使细胞 DNA 断裂[21]。

2.5 磷酸化的逆反应

磷酸化的逆反应,即去磷酸化是由磷酸酶介导的以磷酸化蛋白为底物,与 PTKs 共同调节细胞生长、分化、代谢、细胞周期、细胞通讯、细胞转移、基因转录、通道活性和免疫反应等[22]。曾有报道,存在于小胶质细胞中的酪氨酸磷酸酶

万方数据

SHP-1 在脑损伤时升高，并受集落刺激因子-1 激活，与 ERG-1 相关并调节其电流[23]。而磷酸酶除了控制蛋白激酶底物的磷酸化状态，可直接调节蛋白激酶的活性。

总之，HERG 钾通道由一系列蛋白激酶和磷酸酶介导调节，具有多样化，其调节异常可能引起心律失常。那么，在众多调节机制中，是否以某一种方式为主，其他方式为辅；亦或多种方式独立影响通道功能，仍需进一步研究。

参 考 文 献

[1] Lehnart SE, Ackerman MJ, Benson DW Jr, et al. Inherited arrhythmias: a National Heart, Lung, and Blood Institute and Office of Rare Diseases workshop consensus report about the diagnosis, phenotyping, molecular mechanisms, and therapeutic approaches for primary cardiomyopathies of gene mutations affecting ion channel function[J]. Circulation, 2007, 116(20): 2325-2345.

[2] Bian JS, Kagan A, McDonald TV. Molecular analysis of PIP2 regulation of HERG and IKr[J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2004, 287(5): H2154-H2163.

[3] Wei Z, Thomas D, Karle CA. Protein kinase A-mediated phosphorylation of HERG potassium channels in a human cell line[J]. Chin Med J (Engl), 2002, 115(5): 668-676.

[4] Thomas D, Zhang W, Karle CA, et al. Deletion of protein kinase A phosphorylation sites in the HERG potassium channel inhibits activation shift by protein kinase A [J]. J Biol Chem, 1999, 274(39): 27457-27462.

[5] Abbott GW, Sesti F, Splawski I, et al. MiRP1 forms I_{Kr} potassium channels with HERG and is associated with cardiac arrhythmia[J]. Cell, 1999, 97(2): 175-187.

[6] Cui J, Melman Y, Palma E, et al. Cyclic AMP regulates the HERG K(+) channel by dual pathways[J]. Curr Biol, 2000, 10(11): 671-674.

[7] Kagan A, Melman YF, Krumerman A, et al. 14-3-3 amplifies and prolongs adrenergic stimulation of HERG K (+) channel activity[J]. EMBO J, 2002, 21(8): 1889-1898.

[8] Kagan A, McDonald TV. Dynamic control of hERG/I(Kr) by PKA-mediated interactions with 14-3-3[J]. Novartis Found Symp, 2005, 266: 75-89; discussion 89-99.

[9] Choe CU, Schulze-Bahr E, Neu A, et al. C-terminal HERG (LQT2) mutations disrupt IKr channel regulation through 14-3-3epsilon[J]. Hum Mol Genet, 2006, 15(19): 2888-2902.

[10] Tutor AS, Delpon E, Caballero R, et al. Association of 14-3-3 proteins to beta1-adrenergic receptors modulates Kv11.1 K(+) channel activity in recombinant systems [J]. Mol Biol Cell, 2006, 17(11): 4666-4674.

[11] Yunomae K, Ichisaki S, Matsuo J, et al. Effects of phosphodiesterase (PDE) inhibitors on human ether-a-go-go related gene (hERG) channel activity[J]. J Appl Toxicol, 2007, 27(1): 78-85.

[12] Ron D, Kazanietz MG. New insights into the regulation of protein kinase C and novel phorbol ester receptors[J]. FASEB J, 1999, 13(13): 1658-1676.

[13] Thomas D, Zhang W, Wu K, et al. Regulation of HERG potassium channel activation by protein kinase C independent of direct phosphorylation of the channel protein[J]. Cardiovasc Res, 2003, 59(1): 14-26.

[14] Thomas D, Wu K, Wimmer AB, et al. Activation of cardiac human ether-a-go-go related gene potassium currents is regulated by alpha(1A)-adrenoceptors[J]. J Mol Med, 2004, 82(12): 826-837.

[15] Thomas D, Hammerling BC, Wimmer AB, et al. Direct block of hERG potassium channels by the protein kinase C inhibitor bisindolylmaleimide I (GF109203X)[J]. Cardiovasc Res, 2004, 64(3): 467-476.

[16] Cockerill SL, Tobin AB, Torrecilla I, et al. Modulation of hERG potassium currents in HEK-293 cells by protein kinase C. Evidence for direct phosphorylation of pore forming subunits[J]. J Physiol, 2007, 581(Pt 2): 479-493.

[17] Cayabyab FS, Schlichter LC. Regulation of an ERG K (+) current by Src tyrosine kinase[J]. J Biol Chem, 2002, 277(16): 13673-13681.

[18] Zhang DY, Wang Y, Lau CP, et al. Both EGFR kinase and Src-related tyrosine kinases regulate human ether-a-go-go-related gene potassium channels[J]. Cell Signal, 2008, (10): 1815-1821.

[19] Zhang Y, Wang H, Wang J, et al. Normal function of HERG K+ channels expressed in HEK293 cells requires basal protein kinase B activity[J]. FEBS Lett, 2003, 534(1-3): 125-132.

[20] Maier G, Palmada M, Rajamanickam J, et al. Upregulation of HERG channels by the serum and glucocorticoid inducible kinase isoform SGK3[J]. Cell Physiol Biochem, 2006, 18(4-5): 177-186.

[21] Han H, Wang J, Zhang Y, et al. HERG K(+) channel conductance promotes H_2O_2-induced apoptosis in HEK293 cells: cellular mechanisms[J]. Cell Physiol Biochem, 2004, 14(3): 121-134.

[22] Thomas SM, Brugge JS. Cellular functions regulated by Src family kinases[J]. Annu Rev Cell Dev Biol, 1997, 13: 513-609.

[23] Cayabyab FS, Tsui FW, Schlichter LC. Modulation of the ERG K(+) current by the tyrosine phosphatase, SHP-1 [J]. J Biol Chem, 2002, 277(50): 48130-48138.

(收稿：2008-12-15 修回：2009-03-09)

(本文编辑：金谷英)

万方数据