

# 中电导钙激活钾通道在血栓性疾病中的作用

虞宇楠 周琳 宋浩明

**【摘要】** 中电导钙激活钾通道(KCa3.1 通道)属于钙激活钾通道家族,由胞内  $\text{Ca}^{2+}$  水平升高而激活,表达于与血栓性疾病相关的多种细胞,如平滑肌细胞、T 淋巴细胞、巨噬细胞等。KCa3.1 通道通过调控  $\text{Ca}^{2+}$  内流及膜电位水平调节细胞活化、迁移和黏附等功能,参与血栓性疾病的发生发展。KCa3.1 通道阻断剂能有效抑制动脉斑块进展及减轻血管再狭窄程度,有望成为治疗血栓性疾病的靶向药物。

**【关键词】** 中电导钙激活钾通道;动脉粥样硬化;静脉血栓;平滑肌细胞;淋巴细胞;巨噬细胞

doi:10.3969/j.issn.1673-6583.2017.01.004

中电导钙激活钾通道(intermediate-conductance  $\text{Ca}^{2+}$ -activated  $\text{K}^{+}$  channel)即 KCa3.1 离子通道,属于钙激活钾通道家族,因胞内  $\text{Ca}^{2+}$  水平升高而激活,可促使  $\text{K}^{+}$  外流,进而调节细胞膜电位和胞内钙信号<sup>[1]</sup>。血栓形成和血栓栓塞引起的疾病称为血栓性疾病。血栓形成是指一定条件下,血液有形成分在血管内形成栓子,造成血管部分或完全堵塞,相应部位血液供应障碍的病理过程。动脉血栓的起始原因为动脉受损或粥样硬化,斑块破溃引起血小板黏附聚集进而启动凝血过程,临床主要表现为心肌梗死、脑梗死和外周动脉疾病。静脉血栓是在静脉血流迟缓、血液高凝状态及血管内膜损伤条件下,静脉发生急性非化脓性炎症,并继发血栓形成。血栓栓塞是血栓由形成部位脱落造成远端血管堵塞,引起相应器官或系统缺血缺氧坏死及淤血水肿的病理现象,可引起相关脏器功能障碍,如肺栓塞。血栓性疾病发病率高,严重危害人类生命健康。本文介绍 KCa3.1 离子通道与血栓性疾病关系的研究进展。

## 1 KCa3.1 离子通道概述

KCa3.1 通道于 1997 年被 3 个研究小组克隆,其编码基因为 KCNN4,位于第 19 号染色体(19q13.2)。该通道为非电压依赖性通道,由胞内  $\text{Ca}^{2+}$  (半数有效浓度为 95~350 nmol/L)与钙调

蛋白相结合而激活<sup>[2-3]</sup>。在基因水平,阻遏元件 1 沉默转录因子(repressor element-1 silencing transcription factor, REST)可抑制 KCa3.1 通道的转录水平<sup>[4]</sup>,而转录因子 AP-1(activator protein-1)和 Ikaros-2 可增强其转录水平<sup>[5]</sup>。KCa3.1 通道在体内分布广泛,在红细胞、血小板、淋巴细胞、肥大细胞、单核/巨噬细胞、上皮组织(胃肠、肺、内分泌腺、外分泌腺)、血管内皮细胞、血管平滑肌细胞(VSMC)及成纤维细胞上均有表达。KCa3.1 通道的主要生理作用有:(1)调节红细胞容积,通道激活后  $\text{K}^{+}$  外流伴水分丢失,使红细胞脱水皱缩<sup>[6]</sup>;(2)通过控制膜电位调节  $\text{Ca}^{2+}$  进入细胞和  $\text{Ca}^{2+}$  信号转导过程;(3)参与血管内皮下平滑肌细胞超极化,介导电压门控  $\text{Ca}^{2+}$  通道关闭,引起平滑肌松弛<sup>[7]</sup>;(4)参与消化道、肺和分泌腺上皮细胞的分泌过程<sup>[8]</sup>。

## 2 KCa3.1 离子通道与血栓性疾病的细胞学基础

动脉粥样硬化是一种慢性血管炎症、增生性病变,其发病机制涉及多种可参与动脉血栓形成的细胞。近年来,静脉血栓与免疫功能和炎症反应的关系也越来越受到关注。王乐民等<sup>[9]</sup>提出,静脉血栓的发生是在免疫功能低下时,因无法及时、有效清除感染细胞或恶变细胞,静脉内发生的感染性或非感染性炎症。KCa3.1 离子通道可表达在参与动静脉血栓形成的多种细胞上,在血栓性疾病发病中发挥重要作用。

### 2.1 VSMC KCa3.1 离子通道与血栓性疾病

VSMC 存在收缩型和合成型两种表型。正常

基金项目:国家自然科学基金(81400347,81370422)

作者单位:200092 上海,同济大学医学院(虞宇楠);200065 上海,同济大学附属同济医院心内科(周琳,宋浩明)

通信作者:宋浩明,Email:songhao-ming@163.com

情况下 VSMC 处于收缩状态即收缩型,此时检测不到 KCa3.1 通道的表达<sup>[10]</sup>。在血管损伤或疾病状态下, VSMC 发生表型转换,并且表达 KCa3.1 通道。Tharp 等<sup>[11]</sup>通过血小板源性生长因子(PDGF)刺激 VSMC 增殖,发现 KCa3.1 通道 mRNA 表达上调,但 VSMC 收缩型标志物如平滑肌肌球蛋白重链、平滑肌  $\alpha$  肌动蛋白等表达受到抑制。进一步研究发现 KCa3.1 通道阻断剂 TRAM-34 或基因沉默 KCa3.1 离子通道能完全阻断 PDGF 引起的 VSMC 收缩型标志物表达下降。KCa3.1 离子通道引起 VSMC 增殖的机制可能是 KCa3.1 离子通道开放后  $K^+$  外流引起细胞膜超极化,导致  $Ca^{2+}$  内流的电学驱动力增强,胞内  $Ca^{2+}$  水平持续升高,调控基因表达、蛋白激酶活化及细胞分裂进程<sup>[5,12]</sup>。

在冠状动脉(冠脉)疾病患者的冠脉和载脂蛋白  $E^{-/-}$  (ApoE $^{-/-}$ ) 小鼠(动脉粥样硬化的遗传模型)的主动脉中,血管中层和内膜斑块的 VSMC 均高表达 KCa3.1 通道<sup>[13]</sup>。Tharp 等<sup>[11]</sup>在研究猪冠脉粥样硬化早期的冠脉中层 VSMC 时发现,合成型 VSMC 较其收缩型 KCa3.1 mRNA 表达水平显著升高,收缩型标志物表达下降。这些结果提示 KCa3.1 通道通过促进 VSMC 增殖在动脉血栓性疾病的发生发展中发挥作用。

## 2.2 T 淋巴细胞 KCa3.1 离子通道与血栓性疾病

在淋巴细胞膜上主要存在两种类型的钾通道,电压门控钾通道(voltage-gated potassium channel, Kv 通道)和 KCa 通道。钾通道通过调节胞内离子浓度及膜电位参与淋巴细胞分化、增殖和激活<sup>[14]</sup>。T 淋巴细胞受到抗原刺激后,T 细胞受体(TCR)识别抗原,并将活化信号传向胞内,引起细胞外  $Ca^{2+}$  内流<sup>[15]</sup>。胞内浓度升高的  $Ca^{2+}$  活化钙调磷酸酶,使转录因子活化 T 细胞核因子(nuclear factor of activated T cells,NFAT)去磷酸化并迅速活化相应的靶基因,从而激活 T 淋巴细胞<sup>[16]</sup>。 $Ca^{2+}$  的快速内流可引起细胞膜去极化,限制  $Ca^{2+}$  顺电化学梯度进一步内流,而 T 淋巴细胞激活时,KCa3.1 通道表达迅速上调<sup>[5]</sup>,通过  $K^+$  外流使细胞膜超极化,对于维持  $Ca^{2+}$  的持续内流至关重要<sup>[17]</sup>。Di 等<sup>[18]</sup>发现,KCa3.1 $^{-/-}$  小鼠 CD4 $^+$  辅助 T 细胞(Th 细胞)的分化未受到影响,但由于缺乏 KCa3.1 离子通道,其 Th1 和 Th2 细胞均出现  $Ca^{2+}$  内流减少及细胞因子分泌功能受损;进一步研究发现,KCa3.1 离子通道受抑制的结肠炎小鼠结肠炎性细胞浸润及组织破

坏程度显著减轻。由此说明 KCa3.1 通道通过调节  $Ca^{2+}$  内流和膜电位影响 T 淋巴细胞的活化和分泌等功能,阻断 KCa3.1 通道可减轻免疫反应。

在动脉粥样斑块中,巨噬细胞可通过向 T 细胞提呈抗原和分泌  $\alpha$  干扰素(IFN- $\alpha$ )等细胞因子启动免疫反应<sup>[19]</sup>,随后 T 淋巴细胞激活并分泌 IFN- $\gamma$  和白细胞介素(IL)-2 促进斑块进展<sup>[20-21]</sup>。Robertson 等<sup>[22]</sup>发现动脉粥样硬化小鼠病变处 T 淋巴细胞和活化的巨噬细胞数目增多,且伴有外周循环中 T 淋巴细胞数目上升。Toyama 等<sup>[13]</sup>研究发现,ApoE $^{-/-}$  小鼠粥样斑块处 CD3 $^+$  T 淋巴细胞聚集,且高表达 KCa3.1 通道,推测为富含 KCa3.1 通道(约为 500 个/细胞)的初始 T 细胞和中枢记忆性 T 细胞。这提示 KCa3.1 通道可通过调节 T 淋巴细胞功能参与动脉血栓的发生发展。

Wang 等<sup>[23]</sup>发现,静脉血栓栓塞症(VTE)患者的免疫细胞表面分化抗原 CD3、CD8 降低,同时其外周血淋巴细胞电镜下可见胞质内似病毒样微生物,提示 VTE 患者免疫功能紊乱,清除病毒的细胞功能减弱。通过研究 T 淋巴细胞基因表达谱发现,VTE 患者 T 细胞部分基因表达显著下调。全基因组芯片分析发现 VTE 患者 KCa3.1 mRNA 表达水平显著升高,同时 VTE 患者的 KCa3.1 通道蛋白表达水平也明显升高。

## 2.3 巨噬细胞 KCa3.1 离子通道与血栓性疾病

巨噬细胞功能依赖于胞内  $Ca^{2+}$  增加的程度和持续时间。Penna 等<sup>[24]</sup>应用趋化肽 N-甲酰-L-甲硫氨酰-L-亮氨酰-L-苯丙氨酸(N-formyl-Met-Leu-Phe,fMLP)刺激 U-937 细胞,发现 KCa3.1 通道激活后可促进巨噬细胞  $Ca^{2+}$  内流和细胞膜超极化,进而调节巨噬细胞的趋化、吞噬以及产生炎性因子和氧自由基等功能。阻断 KCa3.1 离子通道,单核/巨噬细胞的趋化能力明显下降<sup>[25]</sup>。

巨噬细胞参与了动脉粥样硬化斑块的形成,产生的炎性因子和氧自由基等促进了斑块的进展<sup>[26]</sup>。Toyama 等<sup>[13]</sup>在 ApoE $^{-/-}$  小鼠血管内膜斑块中发现了大量表达 KCa3.1 离子通道的 Mac-3 $^+$  巨噬细胞,提示巨噬细胞 KCa3.1 离子通道在动脉斑块形成中发挥作用。

VTE 患者中发现吞噬细胞模式识别受体及调理性受体 mRNA 表达水平上调,提示 VTE 患者单核/巨噬细胞的功能加强<sup>[23]</sup>,但巨噬细胞 KCa3.1 离子通道与 VTE 的关系尚不明确。

## 2.4 其他参与血栓形成的细胞与 KCa3.1 离子通道

内皮细胞、B 淋巴细胞、成纤维细胞和血小板等多种参与动静脉血栓形成的细胞,也表达 KCa3.1 离子通道,并且 KCa3.1 通道的激活与细胞的活化、迁移等多项功能密切相关<sup>[8]</sup>。Grgic 等<sup>[27]</sup>使用碱性成纤维母细胞生长因子(bFGF)和血管内皮生长因子(VEGF)刺激内皮细胞增殖后发现,内皮细胞 KCa3.1 离子通道 mRNA 表达水平显著升高,表明 KCa3.1 离子通道在内皮细胞增殖中起重要作用。但是,目前缺乏足够的实验室依据说明这些细胞的 KCa3.1 通道与血栓性疾病存在直接关系。

## 3 KCa3.1 离子通道阻断剂对血栓性疾病的治疗前景

KCa3.1 通道阻断剂可阻断镰状红细胞脱水,目前已进入治疗镰状细胞贫血的临床试验阶段<sup>[28]</sup>。KCa3.1 通道阻断剂还有望用于延缓肿瘤进展<sup>[29]</sup>。如前所述,KCa3.1 离子通道通过调节多种细胞功能,参与动静脉血栓形成,因此阻断 KCa3.1 离子通道靶向干预血栓性疾病受到关注。

Wulff 等<sup>[1]</sup>于 2000 年研制出的 KCa3.1 通道阻断剂 TRAM-34,其阻断效果强,且无明显肝脏不良反应,目前广泛应用于动物及细胞实验中。Toyama 等<sup>[13]</sup>发现 TRAM-34 能抑制单核巨噬细胞趋化蛋白 1(MCP-1)对巨噬细胞的趋化作用,并能使 ApoE<sup>-/-</sup>小鼠巨噬细胞向斑块病变的浸润程度减轻 60%,CD3<sup>+</sup>T 淋巴细胞向斑块病变的浸润程度减轻 50%。Köhler 等<sup>[30]</sup>建立了颈动脉球囊损伤大鼠模型,并全身给予 KCa3.1 通道阻断剂 TRAM-34,发现血管内膜增生减少约 40%,颈动脉管腔狭窄程度也明显减轻,且大鼠无明显不良反应。Tharp 等<sup>[31]</sup>在建立冠脉球囊损伤模型时,使用 TRAM-34 涂抹球囊导管,使药物直接作用于血管壁,结果发现 TRAM-34 球囊导管能有效抑制 VSMC 表型转换,并减轻了术后再狭窄程度。

Toyama 等<sup>[13]</sup>对 TRAM-34 的药物不良反应进行评估,得出以下结论:(1)TRAM-34 具有高度选择性,对 KCa3.1 通道的阻断作用是对其他钾通道、钠通道及钙通道的 1 000 倍以上;(2)体外实验发现 TRAM-34 不会降低人 T 淋巴细胞、VSMC、巨噬细胞和内皮细胞等的细胞活性;(3)反复 TRAM-34 给药未引起小鼠血常规、血生化及各脏器组织出现明显改变,未引起小鼠血压改变及左心室肥厚;(4)

TRAM-34 不影响机体正常的抗病毒免疫反应。

总之,KCa3.1 通道阻断剂如 TRAM-34 主要通过抑制 VSMC 增殖及炎症反应起到抗动脉粥样硬化作用,具有一定的安全性。

## 4 结语

近年来,随着电压钳及膜片钳技术的应用,关于 KCa3.1 通道的电生理学及药理学研究逐步深入。参与动静脉血栓形成的多种细胞如 VSMC、T 淋巴细胞、巨噬细胞等均表达 KCa3.1 通道,KCa3.1 通道通过调控 Ca<sup>2+</sup> 内流及膜电位水平调节细胞活化、迁移和黏附等功能,参与血栓性疾病的发生发展。KCa3.1 通道有望成为血栓性疾病治疗的新型药物靶点。

## 参 考 文 献

- [1] Wulff H, Castle NA. Therapeutic potential of KCa3.1 blockers: recent advances and promising trends [J]. *Expert Rev Clin Pharmacol*, 2010, 3(3):385-396.
- [2] Joiner WJ, Wang LY, Tang MD, et al. HSK4, a member of a novel subfamily of calcium-activated potassium channel [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1997, 94(20):11013-11018.
- [3] Ishii TM, Silvia C, Hirschberg B, et al. A human intermediate conductance calcium-activated potassium channel [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1997, 94(21):11651-11656.
- [4] Cheong A, Bingham AJ, Li J, et al. Downregulated REST transcription factor is a switch enabling critical potassium channel expression and cell proliferation [J]. *Mol Cell*, 2005, 20(1):45-52.
- [5] Ghanshani S, Wulff H, Miller MJ, et al. Up-regulation of the IKCa1 potassium channel during T-cell activation. Molecular mechanism and functional consequences [J]. *J Biol Chem*, 2000, 275(47):37137-37149.
- [6] Ataga KI, Smith WR, De Castro LM, et al. Efficacy and safety of the Gardos channel blocker, senicapoc (ICA-17043), in patients with sickle cell anemia [J]. *Blood*, 2008, 111(8):3991-3997.
- [7] Brahler S, Kaistha A, Schmidt VJ, et al. Genetic deficit of SK3 and IK1 channels disrupts the endothelium-derived hyperpolarizing factor vasodilator pathway and causes hypertension [J]. *Circulation*, 2009, 119(17):2323-2332.
- [8] 邓秀玲. KCa3.1: 心血管疾病的潜在治疗靶点 [J]. *西安交通大学学报*, 2013, 34(2):139-143.
- [9] 王乐民. 静脉血栓的起源与发生 [J]. *慢性病学杂志*, 2015, 16(4):405-411.
- [10] Tharp DL, Bowles DK. The intermediate conductance Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channel (KCa3.1) in vascular diseases [J]. *Cardiovasc Hematol Agents Med Chem*, 2009, 7(1):1-11.
- [11] Tharp DL, Wamhoff BR, Turk JR, et al. Upregulation of intermediate-conductance Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channel (IKCa1) mediates phenotypic modulation of coronary smooth

- muscle [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2006, 291(5): H2493-2503.
- [12] Stevenson AS, Gomez MF, Hill-Eubanks DC, et al. NFAT4 movement in native smooth muscle. A role for differential  $Ca^{2+}$  signaling [J]. *J Biol Chem*, 2001, 276(18): 15018-15024.
- [13] Toyama K, Wulff H, Chandy KG, et al. The intermediate-conductance calcium-activated potassium channel  $KCa_{3.1}$  contributes to atherogenesis in mice and humans [J]. *J Clin Invest*, 2008, 118(9):3025-3037.
- [14] 杨胜, 张永祥. 淋巴细胞膜钾通道及其作用[J]. *免疫学杂志*, 2002, 18(3):48-53.
- [15] Feske S. Calcium signaling in lymphocyte activation and disease [J]. *Nat Rev Immunol*, 2007, 7(9):690-702.
- [16] Crabtree GR, Olson EN. NFAT signaling: choreographing the social lives of cells[J]. *Cell*, 2002, 109(3):S67-79.
- [17] Beeton C, Chandy KG. Potassium channels, memory T cells, and multiple sclerosis [J]. *Neuroscientist*, 2005, 11(6): 550-562.
- [18] Di L, Srivastava S, Zhdanova O, et al. Inhibition of the  $K^{+}$  channel  $KCa_{3.1}$  ameliorates T cell-mediated colitis [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2010, 107(4):1541-1546.
- [19] Niessner A, Sato K, Chaikof EL, et al. Pathogen-sensing plasmacytoid dendritic cells stimulate cytotoxic T-cell function in the atherosclerotic plaque through interferon-alpha [J]. *Circulation*, 2006, 114(23):2482-2489.
- [20] Whitman SC, Ravisankar P, Elam H, et al. Exogenous interferon-gamma enhances atherosclerosis in apolipoprotein E<sup>-/-</sup> mice [J]. *Am J Pathol*, 2000, 157(6):1819-1824.
- [21] Upadhyya S, Mooteri S, Peckham N, et al. Atherogenic effect of interleukin-2 and antiatherogenic effect of interleukin-2 antibody in apo-E-deficient mice [J]. *Angiology*, 2004, 55(3):289-294.
- [22] Robertson AK, Rudling M, Zhou X, et al. Disruption of TGF-beta signaling in T cells accelerates atherosclerosis [J]. *J Clin Invest*, 2003, 112(9):1342-1350.
- [23] Wang L, Gong Z, Liang A, et al. Compromised T-cell immunity and virus-like structure in a patient with pulmonary hypertension[J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2010, 182(3): 434-435.
- [24] Penna A, Stutzin A.  $KCa_{3.1}$ -dependent hyperpolarization enhances intracellular  $Ca^{2+}$  signaling induced by fMLF in differentiated U937 Cells [J]. *PLoS One*, 2015, 10(9):e0139243.
- [25] 张双霞, 宋宪沛, 高传玉, 等. 阻断  $Kv1.3$  和  $KCa_{3.1}$  钾通道对单核/巨噬细胞增殖和趋化功能的影响[J]. *生理学报*, 2015, 67(5):505-512.
- [26] Libby P. Inflammation in atherosclerosis [J]. *Nature*, 2002, 420(6917):868-874.
- [27] Grgic I, Eichler I, Heinau P, et al. Selective blockade of the intermediate-conductance  $Ca^{2+}$ -activated  $K^{+}$  channel suppresses proliferation of microvascular and macrovascular endothelial cell and angiogenesis in vivo [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2005, 25(4):704-709.
- [28] Brugnara C, de Franceschi L. Clinical trials of new therapeutic pharmacology for sickle cell disease [J]. *Sante*, 2006, 16(4):263-268.
- [29] Jäger H, Dreker T, Buck A, et al. Blockage of intermediate-conductance  $Ca^{2+}$ -activated  $K^{+}$  channels inhibit human pancreatic cancer cell growth in vitro [J]. *Mol Pharmacol*, 2004, 65(3):630-638.
- [30] Köhler R, Wulff H, Eichler I, et al. Blockade of the intermediate-conductance calcium-activated potassium channel as a new therapeutic strategy for restenosis [J]. *Circulation*, 2003, 108(9):1119-1125.
- [31] Tharp DL, Wamhoff BR, Wulff H, et al. Local delivery of the  $KCa_{3.1}$  blocker, TRAM-34, prevents acute angioplasty-induced coronary smooth muscle phenotypic modulation and limits stenosis [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2008, 28(6):1084-1089.

(收稿:2016-06-28 修回:2016-08-29)

(本文编辑:胡晓静)