

TRPM7 通道激酶研究进展

李 霜¹, 张 政¹, 王 觅^{2*}

(1.中南大学湘雅药学院药理学系,湖南长沙 410078;2.中南大学湘雅二医院心内科)

摘 要: TRPM7(Transient Receptor Potential melastatin 7)是一种具有阳离子通道和激酶活性双重功能的跨膜蛋白。作为非选择性的阳离子通道,其开放后可介导 Mg^{2+} 、 Ca^{2+} 、 Zn^{2+} 等二价阳离子内流以及 K^+ 等单价阳离子外流;作为一种丝/苏氨酸激酶,其可磷酸化底物及自身,并可发挥表观遗传因子作用,参与基因表达调控等过程。TRPM7 在机体各组织中均有表达,并且参与细胞内 Mg^{2+} 稳态、细胞迁移与黏附等过程。结构独特、功能广泛、表达丰富等特点,使 TRPM7 有望成为局部脑缺血、心血管疾病、癌症等重大疾病的新治疗靶点。

关键词: TRPM7; 阳离子通道; 激酶活性

中图分类号: R9 **文献标识码:** A

瞬时受体电位(Transient Receptor Potential, TRP)通道最初是在 TRP 基因突变或缺陷的果蝇感光细胞中发现的;目前已发现 29 种 TRP 通道成员,分为 TRPC (TRPC1-7)、TRPV (TRPV1-6)、TRPM (TRPM1-8)、TRPML (TRPML1-3)、TRPP (TRPP2/3/5)、TRPA (TRPA1)、TRPN 七大家族^[1]。TRPM 家族中的 TRPM7 于 2001 年由 D. Clapham、A. Scharenberg 及 A. Ryazanov 实验室分别独立克隆,由于其独特的双重蛋白结构,最初也被命名为 TRP-PLIK, CHAK1, LTRPC7^[2];近年来,TRPM7 已成为最具代表性、研究最广泛的双功能膜蛋白。

1 TRPM7 的表达与结构特点

在人类基因组中,TRPM7 基因位于第 15 号染色体上,由 39 个外显子组成,共编码 1865 个氨基酸。TRPM7 在哺乳动物各器官中广泛分布,是成年小鼠各器官中表达量最高的 TRP 通道,如在脑、心脏、肾、肺、肠和睾丸等器官中均有较高表达。与其他 TRP 通道成员相比,TRPM7 在背根神经节中的表达最为丰富^[3]。在小鼠胚胎发育的不同时期,TRPM7 的表达水平也表现出明显差异:其在胚胎发育 18 天达到最高峰,在出生后第四天可再次出现表达高峰,此后可维持其表达水平直至小鼠成年。

TRPM7 通道是一种跨细胞膜的、以异源四聚体

形式存在的通道蛋白,在细胞膜上是一段六次跨膜结构(S1-S6),S5 与 S6 之间形成通道孔径;位于通道孔径中的 E1047 或 Y1049 可影响通道对 Ca^{2+} 的敏感性^[4]。其 N 端与 C 端均位于细胞膜内,N 端主要为四个 TRPM 家族的同源结构域(Melastatin Homology Domain, MHD),C 端结构依次为:TRP box, 双螺旋结构域(coiled-coil domain, CC)以及蛋白激酶区。TRP box 是一个高度保守并富含脯氨酸的结构域,大约由 25 个氨基酸残基组成,可与 PIP_2 相互作用,共同调节 TRP 通道的功能^[1];CC 结构域除可介导 TRPM7 亚基形成异源四聚体外,还可影响其通道部分对 $Mg \cdot NTP$ 复合物的敏感性^[5];C 末端的蛋白激酶结构域属于非典型 α -激酶结构,除可将其自身及底物磷酸化外,也可被活化的 caspase 切割,并在不影响自身磷酸化活性的情况下增强离子通道功能^[6]。TRPM7 激酶结构域由 1580~1863 位氨基酸残基组成^[7],其中 1781~1799 氨基酸序列内包含一个保守的 ATP 结合基序;H1751、H1808、C1804 和 C1810 可与 Zn^{2+} 络合形成一个 Zn^{2+} 结合模序,对维持激酶稳定性有着重要作用;K1646、D1765、Q1767 和 D1775 则为激酶活性所必需。此外,1553~1562 氨基酸残基构成丝氨酸/脯氨酸的富集片段,1563~1670 氨基酸残基构成二聚化区域(图 1 为 TRPM7 亚基的基本结构)。

2 TRPM7 通道的离子通透性及蛋白激酶活性

2.1 离子通透特性 TRPM7 对单价(如 K^+ 、 Na^+)

收稿日期:2018-04-06;修回日期:2018-05-14

基金项目:国家自然科学基金青年基金项目(No.81500226)。

* 通信作者,E-mail:wangmi@csu.edu.cn.

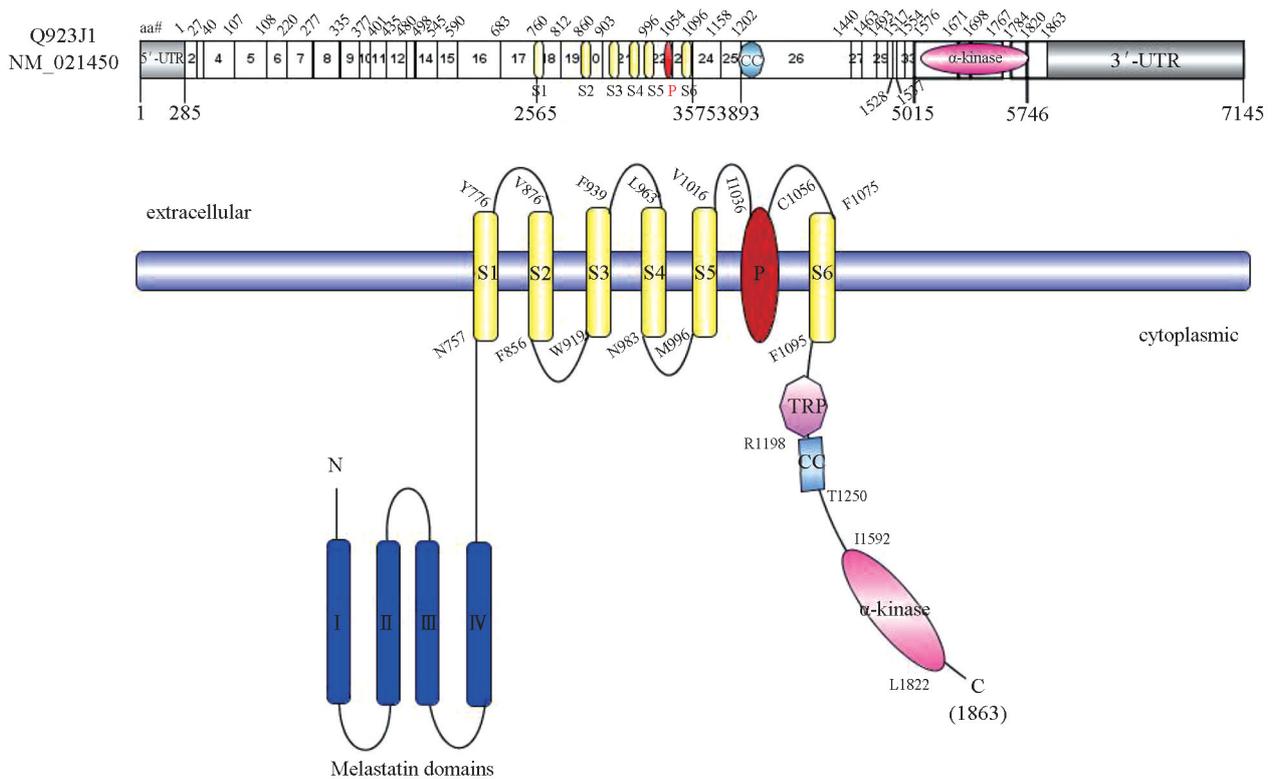


图1 TRPM7 亚基的基本结构

等)和二价金属阳离子(如 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Ba^{2+} 、 Ni^{2+} 等)均有通透性,但对阴离子不通透。对二价阳离子的通透能力依次为: $\text{Zn}^{2+} \approx \text{Ni}^{2+} \gg \text{Ba}^{2+} > \text{Co}^{2+} > \text{Mg}^{2+} \geq \text{Mn}^{2+} \geq \text{Sr}^{2+} \geq \text{Cd}^{2+} \geq \text{Ca}^{2+}$ 。其离子通透性可被分子量相对较大且结构复杂的多胺类所抑制^[8]。研究表明,位于 TRPM7 通道孔径内的部分氨基酸残基可控制其对 Ca^{2+} 和 Mg^{2+} 的通透性,例如将 Glu-1047 或 Glu-1052 突变成 Gln,可分别降低甚至消除其对 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 的通透性^[9];此外,D1054 和 D1059 也可影响二价阳离子的通透性^[8]。膜片钳技术记录的 TRPM7 通道电流具有以下 4 个特点^[8]:(1) 电流具有明显外向整流特性;(2) 通道的失活或激活均无时间或电压依赖性;(3) 电流可被细胞内高浓度的 Mg^{2+} 抑制,但这种抑制不影响其整流特性;(4) 其通道电导可达到 40pS,且开放时间较长,一般可达几百毫秒。

2.2 蛋白激酶活性 TRPM7 的激酶结构域属于 α 激酶家族,在序列上除了其催化结构域以外,几乎与经典的真核蛋白激酶序列无同源性。TRPM7 激酶以镁离子依赖的形式特异性磷酸化丝氨酸与苏氨酸,其磷酸化底物主要有髓磷脂碱性蛋白(MBP)、组蛋白以及其自身等。S1511 和 S1567 是目前已确认的两个自我磷酸化位点,二者的突变可

影响激酶活性,但不影响其通道功能^[10]。Ryazanova 等人发现^[10], Mn^{2+} 和 Mg^{2+} 可显著增强 TRPM7 激酶活性;相反的, Zn^{2+} 和 Co^{2+} 却可明显抑制其激酶活性,而 Ca^{2+} 则对激酶活性无影响。但是体内实验表明,在所有 TRM7 可通透的二价阳离子中,只有 Mg^{2+} 可直接调节激酶活性。目前仅发现 TRPM6 通道与 TRPM7 有着相似的双重蛋白结构,而且 TRPM6 激酶可磷酸化 TRPM7 激酶结构域,进而调控 TRPM7/TRPM6 通道复合物的功能^[11-12]。此外,TRPM7 激酶结构域翻译后还可被剪切并转位至细胞核中,通过与 RNA 结合蛋白(RNA binding proteins, RBPs)相互作用或者磷酸化组蛋白 H3 等,进而发挥表观调节因子作用^[13]。与 TRPM7 通道功能的调节机制相比,目前对其激酶结构域的作用仍知之甚少,还有待进一步深入研究。

3 通道功能的调控机制

3.1 镁离子 TRPM7 的离子通道功能和激酶活性都依赖于细胞内二价阳离子浓度,但当细胞内二价阳离子(如 Mg^{2+} 、 Ca^{2+} 、 Ba^{2+} 、 Zn^{2+} 等)浓度过高时,其通道功能也可受到明显抑制^[8]。研究表明, Mg^{2+} 是影响 TRPM7 通道功能的二价阳离子中最重要的抑

制因素,主要通过减少激活形式的通道数量来减少单通道电导。Chokshi 等用单通道膜片钳技术记录 Jurkat T 细胞内源性 TRPM7 电流发现,其可产生 39pS 和 186pS 两个电导峰,但当细胞内镁离子浓度升高时,其电流可明显受到抑制; Mg^{2+} 的这种抑制作用呈现浓度依赖性,其 IC_{50} 值分别为 25 μ M 和 91 μ M。全细胞膜片钳实验表明,无论是在过表达体系还是内源性表达体系中,抑制 50%的通道活性均需要 750 μ M 以上的 $[Mg^{2+}]_i$;但单通道膜片钳实验检测到的 Mg^{2+} 抑制效能比全细胞膜片钳实验中检测到的要小 10 到 20 倍,说明细胞中很可能还存在其他调节因子可影响 TRPM7 通道对 Mg^{2+} 的敏感性。由于 TRPM7 独特的蛋白结构,其激酶结构与离子通道结构之间存在何种关系成为该领域的一个热门问题。2003 年, Schmitz 等人将位于激酶结构域的 $Mg \cdot NTP$ 结合位点进行单点突变(G1799D, K1648R),发现突变不仅影响 TRPM7 的磷酸化活性,而且可明显降低通道对 $[Mg^{2+}]_i$ 的敏感性。但通道功能的改变并非是由于磷酸化活性的改变所引起, Matsushita 等人在 2005 年证明了这一点^[10]:他们将 S1511/S1567 进行单点突变,发现突变型与野生型的通道功能并无差异。随后科学家们陆续证明细胞内 Mg^{2+} 可通过与 TRPM7 抑制剂 waixenicin A、胞内氯化物和 $Mg \cdot NTP$ 等因子协同作用,共同调节 TRPM7 通道功能。

3.2 $Mg \cdot NTP$ 细胞内镁离子水平对 TRPM7 通道功能的调节作用是被公认的。在生理状态下细胞内游离 Mg^{2+} 可与 ATP 形成 $Mg \cdot ATP$ 复合物,该复合物与激酶结构域中的核苷酸结合位点(K1648)相结合,进而发挥其抑制作用^[14]。几乎所有 $Mg \cdot NTP$ 复合物都可不同程度地抑制 TRPM7 的通道活性: $ATP > TTP > CTP \geq GTP \geq UTP > ITP$ 。此外, $Mg \cdot ADP$ 也有相似的抑制作用,但 $Mg \cdot AMP$ 却没有,提示在细胞能量水平变化时,TRPM7 通道的激活将受到限制。在 1599 位氨基酸残基处截断激酶结构,发现 TRPM7 将完全丧失其通道功能^[10];而在 1569 位氨基酸残基处截断激酶结构时,其部分通道功能将得到恢复^[14];若进一步在 1510 位截断,其通道功能便可完全恢复^[6]。由此可推测,1510~1599 氨基酸序列中可能包含 Mg^{2+} 的结合位点。此外,TRPM7 与 TRPM6 之间的相互作用可增加 Mg^{2+} 及其复合物对通道抑制作用的阈值^[15]。

3.3 受体门控性调节 近年来,很多研究发现磷脂酶 C(phospholipase C, PLC)通路是调节 TRPM7 通

道活性的另一重要因素。Macianskiene R 等在心肌细胞中过表达 TRPM7,发现 $G\alpha_q$ 受体、酪氨酸激酶受体或者 GTP 类似物(GTP- γ -S)都可以通过激活 PLC 水解 PIP_2 ,最终导致 TRPM7 通道失活。对大鼠海马神经元细胞的研究也表明,神经生长因子(Nerve Growth Factor, NGF)可以通过激活 PLC 来减少 TRPM7 的外向电流^[16]。但是, PIP_2 耗竭对 TRPM7 门控的影响存在一定的争议,主要取决于实验方法以及 PIP_2 消耗与再合成的速率。Langeslag 等认为 PLC 对 TRPM7 通道功能的调节与细胞内 Mg^{2+} 浓度有关;当细胞内 Mg^{2+} 浓度维持在正常生理浓度时,G 蛋白偶联受体、缓激肽等激活 PLC 后可激活 TRPM7 通道,而非抑制其活性。而 Takezawa 等则认为 TRPM7 通道活性的调节与其自身激酶结构域以及蛋白激酶 A(PKA)有关,而非 PLC 通路。

4 TRPM7 通道与疾病的研究

研究表明,TRPM7 可参与细胞内钙/镁平衡的调节,以及细胞增殖、迁移、黏附等过程,TRPM7 功能缺陷对局部脑缺血、心血管疾病、癌症等疾病也存在一定的潜在影响。

4.1 TRPM7 与缺血性脑卒中 缺血性中风是世界上残疾和死亡的主要原因之一。研究表明,离子稳态的破坏在脑缺血后的细胞死亡中起重要作用。谷氨酸受体途径(NMDA)介导的离子失衡和神经毒性可导致脑卒中后脑缺血。近年来,也发现 TRPM7 可通过非 NMDA 途径参与缺血性脑卒中的发病机制。在局部脑缺血损伤时,细胞外 Ca^{2+} 内流以及 pH 降低均可反馈性地激活 TRPM7 通道,造成细胞内钙超载以及氧自由基水平升高,从而参与神经元死亡过程^[17]。TRPM7 过度激活使 Zn^{2+} 等毒性阳离子内流增加也是导致脑卒中的另一原因。此外,TRPM7 介导的钙离子内流可调控 eNOS 活性并促进 NO 生成,最终导致衰老时脑血管炎症^[18]。Tseveleki V 等将 TRPM7 与脑相关疾病(如阿尔兹海默症,多发性硬化症和脑中风等)进行流行病学统计分析,发现在这些小鼠疾病模型中有 18 种常见基因受到异常调控,而 TRPM7 正是其中之一。

4.2 TRPM7 与心血管疾病 TRPM7 在心血管疾病的发病机制中起着重要作用。早年有学者发现在猪、大鼠和人的心肌细胞均存在 TRPM7 样电流。2010 年, Du J 等对心房颤动患者进行研究发现,在患者心肌成纤维细胞中,TRPM7 介导的 Ca^{2+} 电流明显增加,进而诱导转化生长因子 $\beta 1$ (TGF $\beta 1$)表达上调,并增

加成纤维细胞的分化与纤维化,这也是导致患者心房纤颤的主要原因。血管钙化是慢性肾病患者存在的一个普遍现象,而矿物质代谢紊乱是促成血管钙化主要因素,尤其是细胞内高磷水平。TRPM7在平滑肌细胞中对维持 Mg^{2+} 稳态以及血管平滑肌细胞生长和分化起到重要作用^[19]。研究表明^[20],在主动脉平滑肌细胞中 Mg^{2+} 过高也可导致主动脉钙化。而在用TRPM7抑制剂2-APB或siRNA特异性干扰后,可逆转血管钙化现象,提示TRPM7可通过介导细胞内 Mg^{2+} 浓度升高进而参与血管钙化。

4.3 TRPM7与癌症 TRPM7参与多种癌细胞生长、增殖、分化与迁移等过程,例如,减少TRPM7的表达可抑制膀胱癌、前列腺癌等癌细胞的增殖与侵袭等,因此TRPM7也被列为癌症治疗的靶点之一。此外,由于TRPM7对 Ca^{2+} 和 Mg^{2+} 具有独特通透性,也使得其与癌症之间的联系更加密切。例如,TRPM7的多态性点突变T1482I可加重遗传性肌萎缩和麻痹痴呆症状,而当 $Ca^{2+} : Mg^{2+}$ 摄取比例增高时,其患病风险也将进一步增加^[20]。

TRPM7不仅结构独特,而且其活性在细胞生命活动过程中也具有重要地位,是促进器官生成与维持组织稳态的关键调节剂。在过去十年中,学者们已花费大量精力来阐述TRPM7及其下游的调控机制,证实了TRPM7是维持细胞与其组织微环境之间的联系所必需。对TRPM7表达与功能的深入研究将有助于理解一些重大疾病如癌症、缺血性中风和心血管疾病等的病理过程。使用TRPM7通道和激酶突变体以及选择性抑制通道或激酶的药理学工具进行系统研究,也将为评估其治疗价值提供重要的研究手段。此外,目前对其自身在转录以及翻译水平上的调控机制尚未完全清楚,是否存在其他mRNA或蛋白亚型以及其作用也仍需进一步研究。因此,我们对TRPM7基础作用机制以及临床转化的研究能够为这些疾病提供新的治疗方法。

参考文献:

- [1] VENKATACHALAM K, MONTELL C. TRP channels[J]. *Annu Rev Biochem*,2007,76:387-417.
- [2] VISSER D, MIDDELBEEK J, van LEEUWEN FN, et al. Function and regulation of the channel-kinase TRPM7 in health and disease[J]. *Eur J Cell Biol*,2014,93(10-12):455-65.
- [3] VANDEWAUW I, OWSIANIK G, VOETS T. Systematic and quantitative mRNA expression analysis of TRP channel genes at the single trigeminal and dorsal root ganglion level in mouse[J]. *BMC Neurosci*,2013,14:21.
- [4] MEDEROS YSCHNITZLERM, WARING J, GUDERMANN T, et al. Evolutionary determinants of divergent calcium selectivity of TRPM channels[J]. *FASEB J*,2008,22(5):1540-51.
- [5] JANSEN C, SAHNI J, SUZUKI S, et al. The coiled-coil domain of zebrafish TRPM7 regulates Mg nucleotide sensitivity[J]. *Sci Rep*,2016,6:33459.
- [6] DESAI BN, KRAPIVINSKY G, NAVARRO B, et al. Cleavage of TRPM7 releases the kinase domain from the ion channel and regulates its participation in Fas-induced apoptosis[J]. *Dev Cell*,2012,22(6):1149-62.
- [7] FUJIWARA Y, MINOR DLJR. X-ray crystal structure of a TRPM assembly domain reveals an antiparallel four-stranded coiled-coil[J]. *J Mol Biol*,2008,383(4):854-70.
- [8] KERSCHBAUM HH, KOZAK JA, CAHALAN MD. Polyvalent cations as permeant probes of MIC and TRPM7 pores[J]. *Biophys J*,2003,84(4):2293-305.
- [9] LI M, Du J, JIANG J, et al. Molecular determinants of Mg^{2+} and Ca^{2+} permeability and pH sensitivity in TRPM6 and TRPM7[J]. *J Biol Chem*,2007,282(35):25817-30.
- [10] MATSUSHITA M, KOZAK JA, SHIMIZU Y, et al. Channel function is dissociated from the intrinsic kinase activity and autophosphorylation of TRPM7/ChaK1[J]. *J Biol Chem*,2005,280(21):20793-803.
- [11] ZHANG Z, YU H, HUANG J, et al. The TRPM6 kinase domain determines the Mg-ATP sensitivity of TRPM7/M6 heteromeric ion channels[J]. *J Biol Chem*,2014,289(8):5217-27.
- [12] CAIN, BAI Z, NANDA V, et al. Mass spectrometric analysis of TRPM6 and TRPM7 phosphorylation reveals regulatory mechanisms of the channel-kinases[J]. *Sci Rep*,2017,7:42739.
- [13] KRAPIVINSKY G, KRAPIVINSKY L, MANASIAN Y, et al. The TRPM7 chanzyme is cleaved to release a chromatin-modifying kinase[J]. *Cell*,2014,157(5):1061-72.
- [14] SCHMITZ C, PERRAUD AL, JOHNSON CO, et al. Regulation of vertebrate cellular Mg^{2+} homeostasis by TRPM7[J]. *Cell*,2003,114(2):191-200.
- [15] FERIOLI S, ZIERLER S, ZAISSERER J, et al. TRPM6 and TRPM7 differentially contribute to the relief of heteromeric TRPM6/7 channels from inhibition by cytosolic $Mg(2+)$ and Mg-ATP[J]. *Sci Rep*,2017,7(1):8806.
- [16] TIAN SL, JIANG H, ZENG Y, et al. NGF-induced reduction of an outward-rectifying TRPM7-like current in rat CA1 hippocampal neurons[J]. *Neurosci Lett*,2007,419(2):93-8.
- [17] LIN J, XIONG ZG. TRPM7 is a unique target for therapeutic intervention of stroke[J]. *Int J Physiol Pathophysiol Pharmacol*,2017,9(6):211-6.
- [18] 朱子祥,王宽,张政. 瞬时受体电位离子通道与血管衰老[J]. *中南医学科学杂志*,2017(4):427-9.
- [19] 刘晓如,林默君. 瞬时感受器电位超家族与血管平滑肌功能[J]. *中国动脉硬化杂志*,2008(8):659-61, 672.
- [20] DAI Q, SHRUBSOLE MJ, NESS RM, et al. The relation of magnesium and calcium intakes and a genetic polymorphism in the magnesium transporter to colorectal neoplasia risk[J]. *Am J Clin Nutr*,2007,86(3):743-51.