

. 综 述 .

胶质瘤大电导钙激活钾通道的研究进展

杜小林 王襄阳 穆军博 童俊江 毛修月 李 恒 综述 田新华 审校

【关键词】胶质瘤;大电导钙激活钾通道;肿瘤靶向治疗;肿瘤免疫治疗

【文章编号】1009-153X(2019)06-0378-03 【文献标志码】A 【中国图书资料分类号】R 739.41

大电导 Ca^{2+} 激活的 K^{+} 通道 (large conductance Ca^{2+} -activated K^{+} channels, big Ca^{2+} -activated K^{+} channel, BKC) 属于跨膜蛋白, 也称为 BKCa、Slo1、KCa、KCa1.1 或 MaxiK 通道^[1]。BKC 广泛表达于哺乳动物各种组织, 但其功能仍不清楚^[2]。它在许多肿瘤细胞中异常表达, 并在肿瘤侵袭和转移等过程中起着重要作用。胶质瘤是最常见的原发性恶性脑肿瘤, 尽管积极采取手术联合放、化疗, 平均寿命仍不足 14 个月, 5 年生存率仍然低于 10%, 与肿瘤浸润转移、复发和对放化疗不敏感、易耐药等密切相关。作用于离子通道的药物可以逆转多药耐药, 因而离子通道可作为潜在的抗肿瘤靶点^[3]。本文就胶质瘤 BKC 研究进展进行综述。

1 BKC 的分子结构

BKC 是由 α 与 β 亚单位组成, 再进一步聚集形成的四聚体结构, 由 Slo1 基因编码^[1], 其拓扑结构类似电压门控钾通道。 α 亚基具有四种亚型 ($\alpha 1 \sim \alpha 4$), 由氨基末端的 7 个跨膜结构域 (S0~S6) 以及位于胞质内的羧基末端的 4 个疏水区段 (S7~10) 构成; S0、S1 构成 α/β 亚单位结合区; S0~S4 构成电压感受域 (voltage sensing domain, VSD); S5~S6 和一个环状结构构成孔道门控域 (pore gate domain, PGD), 是 K^{+} 的选择性过滤器; S7~S10 构成通道的调节域, 其中 S7~S8 调节区段包含两个称为“钾电导调节因子 (regulator of K conductance, RCK)”的同源结构域 (RCK 1 和 RCK 2), RCK 1 和 RCK 2 组成感受胞内 Ca^{2+} 浓度变化的胞浆域 (cytosolic domain, CTD), 具有与 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Zn^{2+} 等离子结合的位点^[4-6]。S10 区段第

一个被鉴定为与 BKC 具有高亲和力的 Ca^{2+} 结合位点, 被称为“钙池”。钡离子选择性激活 BKC 就是通过“钙池”起作用的^[7]。而 β 亚单位由两个跨膜区 (transmembrane, TM) TM 1 和 TM 2 和一个大的胞外环状结构 (P-loop) 将其连接起来所构成, 与 α 亚基相同的是, 都有四种不同的亚型 ($\beta 1 \sim \beta 4$), 而不同的是, β 亚单位的 C 端和 N 端都位于胞质中, β 亚单位在一定程度上调节电压依赖性门控, β 亚单位的调节使得 BKC 在不同组织中产生不同作用。

BKC 能够与多种受体结合, 包括 β -肾上腺素能受体、G-蛋白偶联雌激素受体、乙酰胆碱受体、血栓素 $\alpha 2$ 受体和血管紧张素 II 受体, 不仅在调节肌肉细胞的收缩/松弛或脑内的神经传递方面具有不同的功能, 而且在细胞代谢、增殖、迁移和基因表达方面也具有不同的功能。另外, BKC 也可通过酸化、脂化、蛋白激酶磷酸化、泛素化和棕榈酰化等方式发挥调节作用, 尤其是 BKC β 亚基的棕榈酰化, 促进内质网形成孔道 α 亚基, 促进 BKC 在其表面的表达。

2 BKC 与胶质瘤

胶质瘤组织 BKC 呈特异性高表达, 表达水平与肿瘤恶性程度具有高度相关性^[8]。不仅如此, BKC 还与胶质瘤细胞凋亡坏死、增殖迁移、肿瘤放化疗、免疫治疗等过程息息相关。

2.1 BKC 与胶质瘤细胞凋亡坏死 Bury 等^[9]指出蛇孢菌素 A (ophiobolin A, OP-A) 可使胶质母细胞瘤 (glioblastoma, GBM) 细胞死亡, 而 BKCa 通道在 GBM 中也可诱导出现类似的细胞死亡现象, 进一步深入研究发现 OP-A 是通过抑制 BKCa 通道的活性而使 GBM 出现这种凋亡的死亡现象, 但是这种程序性死亡与经典的凋亡不同, 它不涉及凋亡的典型特征, 如核固缩、DNA 片段化或凋亡蛋白酶的活化过程, 而是需要一种新合成的蛋白质参与, 这种现象出现的原因可能与细胞内的钾离子平衡受到破坏相关。BKCa 通

道开放剂激活 BKC 可诱导胶质瘤细胞死亡的机制是使细胞外 Ca^{2+} 流入细胞内,增加细胞内钙离子浓度,然后激活钙蛋白酶,最终导致细胞死亡。而 BKCa 通道开放剂诱导凋亡的途径是通过不典型的凋亡途径诱导神经胶质瘤细胞死亡,因为这个凋亡过程也不涉及 DNA 片段化、caspase3 等激活,并且使用凋亡蛋白酶抑制剂后,并未降低细胞死亡率^[10]。另外, Hoa 等^[11]发现大鼠 T9 胶质瘤细胞可通过活性氧的释放引发凋亡,这个过程的启动依赖于 BKC。

2.2 BKC 与胶质瘤增殖、迁移 BKC 可通过改变细胞体积形态、胞膜的收缩、细胞周期进程,影响胶质瘤细胞增殖、迁移,而细胞膜内外建立的离子浓度差,是促进迁移的重要生理过程。Sontheimer^[8]发现 BKCa 通道在胶质瘤迁移方面起重要的作用,可能的机制是细胞内钙离子浓度增加后, BKCa 和 CIC-3 通道被激活,释放 K^+ 和 Cl^- 离子,导致细胞体积快速缩小,促进细胞通过狭窄细胞胞外间隙的能力,从而增强肿瘤的侵袭、转移能力,当使用 KCa 通道特异性抑制剂、 Cl^- 通道相对特异抑制剂后,胶质瘤的侵袭、迁移能力降低;而且,胶质瘤不能出现脑外转移,是因为不能经血液转移,而通常是沿着神经纤维或血管周围的路径在脑内浸润转移。Bury 等^[9]也指出 OP-A 可抑制 GBM 细胞的生长,并改变细胞周期的进程,使形态学发生变化,通过减少细胞增殖和迁移而抑制 GBM 细胞的侵袭。另外,离子通道的突变也可促进细胞迁移和侵袭^[12]。胶质瘤干细胞也有 BKCa 通道的高表达,与胶质瘤迁移有关,GBM 的高侵袭潜能主要来源于干细胞库;而这类干细胞与神经元干细胞具有共同特性,具有能广泛增殖、自我更新和多向分化的能力^[13,14]。这提示胶质瘤的发生发展在干细胞阶段就存在某些癌基因,随着干细胞分化过程变异和环境变化等作用,导致致癌基因激活、抑癌基因失活,引起胶质瘤的发生发展。

2.3 BKC 与胶质瘤放、化疗 脑胶质瘤的治疗,手术是首选方式,而放、化疗也是不可或缺的重要治疗方式。Hoa 等^[15]发现 BKC 有多个剪接变体,其中脑胶质瘤变体称为 gBKC,正常脑组织主要表达 BK,而 GBM 组织主要表现为 gBK 形式,替莫唑胺可诱导 gBK 和人类组织相容性抗原表达增加,抑制 FasCIN-1 的表达,从而抑制 GBM 细胞的生长和迁移。另一方面,替莫唑胺化疗后再次复发胶质瘤的侵袭性进一步增强,可能是因为复发胶质瘤 gBK 表达更多的缘故。体外研究显示以哇巴因作为典型的 Na^+/K^+ -ATP 酶抑制剂,可以诱导 GBM 细胞坏死凋亡,增强

替莫唑胺耐药癌细胞株的化疗敏感性^[16]。X 射线照射的人 T98 和 U87 胶质瘤细胞可激活 BKC,相比较于未经电离辐射的胶质瘤细胞具有更强的迁移性^[17]。这表明 BKC 在胶质瘤放、化疗过程中参与重要的病理过程,同时为放、化疗和离子通道之间如何形成多方位治疗架起了理论的桥梁。

2.4 BKC 与胶质瘤免疫治疗 研究发现 gBKC 在胶质瘤各种细胞系 (D54、LN18、LNZ308、T98G、U87、U251) 中呈现高表达,但表达具有差异性。有趣的是,在 gBK 基因座控制区内,含有两个抗原表位 gBK1 和 gBK2,能与 HLA-A*0201 结合。将 gBK1 或 gBK2 肽转移到树突状细胞,然后刺激幼稚的 CD^{8+} 细胞,成功地产生人 HLA-A2 限制性细胞毒性 T 淋巴细胞 (CTL),不仅可以杀死所有表达 gBK 的人脑胶质瘤细胞,还能杀伤其他 HLA-A2/gBK 肿瘤细胞。因此,肿瘤相关离子通道的免疫靶向也许是靶向胶质瘤浸润性和其他癌症治疗的新方法^[2]。替莫唑胺可诱导 gBK 和 HLA 表达增加,抑制 FasCIN-1 的表达,而敲除 FasCIN-1 基因使胶质瘤细胞更容易受到 gBK 特异性 CTL 的杀伤,因为失去了具有防御功能的微绒毛的保护,使这些细胞成为更好的 gBK 特异性 CTL 重要靶点^[15]。Hoa 等^[11]将大鼠接种经长时间激活 BKC 致死的 T9 细胞,发现所有接种该类细胞的大鼠对 T9 胶质瘤细胞产生特异性免疫;而注射经 X 射线照射致凋亡的 T9 细胞则不能产生免疫效应。这就提示可以通过长时间的体外活化 BKC 来杀死肿瘤细胞,并将处理后的细胞作为一种功能灭活自体疫苗,接种于胶质瘤病人,作为治疗性抗体起到免疫治疗的目的。随着现代基因组技术的发展,目前正在开发的抗体有许多,如针对表皮生长因子受体、细胞黏合素 C、非转移性黑色素瘤蛋白糖蛋白 B、血管内皮生长因子、神经细胞黏着分子、神经节苷脂、多药耐药蛋白 3 等。值得一提的是,针对肿瘤免疫治疗而开发的多种单克隆抗体,如西妥昔单抗、尼妥珠单抗和贝伐单抗等正在被研究用于治疗胶质瘤。

2.5 BKC 与胶质瘤病人预后 BKCa 通道的表达与胶质瘤病理级别呈正相关,胶质瘤 WHO 分级越高,预后越差。然而, Wang 等^[18]发现 KCNMA1 的基因表达与胶质瘤分级呈负相关,胶质瘤病人的存活时间与 KCNMA 1 的表达水平呈负相关。另外, KCa 1 通道虽然在胶质瘤细胞系中表达,但在病人群体中只有 10.2% 的病人表达,而且这种上调与病人预后的变化无关^[19]。而 Ben 等对使用特定离子通道阻断剂与 GBM 风险和生存的关系进行巢式病例对照和回顾

性队列研究,发现GBM病人使用特异性离子通道阻滞剂治疗与GBM风险无关,但使用胺碘酮治疗的病人生存率下降^[20]。另外,Joshi等^[12]认为离子通道突变是癌变的诱因,GBM病人组织中离子通道基因突变率高,突变的离子通道可促进细胞迁移和侵袭,影响病人的生存率。存在这种差异的原因:一是胶质瘤细胞系不能很好地代表原发性GBM;二是离子通道功能结构特点的多样性;三是个体差异。所以,寻找特异性的预后相关因子至关重要。

总之,BKC是细胞增殖、迁移和凋亡过程中的重要调节因子,离子通道的异常表达可能破坏这些重要的生物学过程并影响肿瘤的进展。随着BKC的分子结构和功能调控特点逐步被揭示,这些研究将对寻找特异性的BKC相关蛋白提供重要的理论依据,为新的药物相关靶点和预后指标指出新的路径。

【参考文献】

- [1] Toro L, Li M, Zhang Z, *et al.* MaxiK channel and cell signaling [J]. *Pflug Arch*, 2014, 466(5): 875-886.
- [2] Ge L, Hoa NT, Cornforth AN, *et al.* Glioma big potassium channel expression in human cancers and possible T cell epitopes for their immunotherapy [J]. *J Immunol*, 2012, 189(5): 2625-2634.
- [3] Bai YF, Liao HZ, Liu TZ, *et al.* MiR-296-3p regulates cell growth and multi-drug resistance of human glioblastoma by targeting ether-à-go-go (EAG1) [J]. *Eur J Canc*, 2013, 49(3):710-724.
- [4] Latorre R, Morera FJ, Zaelzer C. Allosteric interactions and the modular nature of the voltage- and Ca^{2+} -activated (BK) channel [J]. *J Physiol Lon*, 2010, 588(17): 3141-3148.
- [5] Hou S, Heinemann SH, Hoshi T. Modulation of BKCa channel gating by endogenous signaling molecules [J]. *Physiology*, 2009, 24(1): 26-35.
- [6] Hou S, Lezhang V. Zn^{2+} activates large conductance Ca^{2+} -activated K^{+} channel via an intracellular domain [J]. *J Biol Chem*, 2010, 285(9): 6434-6442.
- [7] Zhou Y, Zeng X, Lingle CJ. Barium ions selectively activate BK channels through the Ca^{2+} -bowl site [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2012, 102(3): 683A.
- [8] Sontheimer H. An unexpected role for ion channels in brain tumor metastasis [J]. *Exp Biol Me*, 2008, 233(7): 779-791.
- [9] Bury M, Girault A, Mégalizzi V, *et al.* Ophiobolin A induces paraptosis-like cell death in human glioblastoma cells by decreasing BKCa channel activity [J]. *Cell Deat D*, 2013, 4(3): e561.
- [10] Debskavielhaber G, Godlewski MM, Kicinska A, *et al.* Large-conductance K^{+} channel openers induce death of human glioma cells [J]. *J Physiol Ph*, 2009, 60(4): 27-36.
- [11] Hoa N, Myers MP, Douglass TG, *et al.* Molecular mechanisms of paraptosis induction: implications for a non-genetically modified tumor vaccine [J]. *Plos One*, 2009, 4(2): e4631.
- [12] Joshi AD, Parsons DW, Velculescu VE, *et al.* Sodium ion channel mutations in glioblastoma patients correlate with shorter survival [J]. *Mol Canc*, 2011, 10(1): 17-25.
- [13] Rosa P, Sforza L, Carlomagno S, *et al.* Overexpression of large-conductance calcium-activated potassium channels in human glioblastoma stem-like cells and their role in cell migration [J]. *J Cell Phys*, 2017, 232(9): 2478-2488.
- [14] Maugeriaccà M, Martino SD, Maria RD. Biological and clinical implications of cancer stem cells in primary brain tumors [J]. *Front Oncol*, 2013, 3: 6.
- [15] Hoa NT, Ge L, Martini F, *et al.* Temozolomide induces the expression of the glioma Big Potassium (gBK) ion channel, while inhibiting fascin-1 expression: Possible targets for glioma therapy [J]. *Expert Op T*, 2016, 20(10): 1155-1167.
- [16] Chen D, Song M, Mohamad O, *et al.* Inhibition of $\text{Na}^{+}/\text{K}^{+}$ -ATPase induces hybrid cell death and enhanced sensitivity to chemotherapy in human glioblastoma cells [J]. *BMC Cancer*, 2014, 14(1): 716-730.
- [17] Steinle M, Palme D, Misovic M, *et al.* Ionizing radiation induces migration of glioblastoma cells by activating BK K^{+} channels [J]. *Radiother Onc*, 2011, 101(1): 122-126.
- [18] Wang R, Gurguis CI, Gu W, *et al.* Ion channel gene expression predicts survival in glioma patients [J]. *Sci Rep*, 2015, 5: 11593.
- [19] Turner KL, Honasoge A, Robert SM, *et al.* A proinvasive role for the Ca^{2+} -activated K^{+} channel KCa3.1 in malignant glioma [J]. *Glia*, 2014, 62(6): 971-981.
- [20] Boursi B, Han HJ, Haynes K, *et al.* Ion-channel blockers and glioblastoma risk and outcome: a nested case-control and retrospective cohort studies [J]. *Pharma D S*, 2016, 25(10):1179-1185.

(2018-06-05 收稿, 2018-07-17 修回)