

DOI: 10.13376/j.cbls/2015029

文章编号: 1004-0374(2015)02-0203-05

## P2X4受体的结构功能关系研究进展

李彬<sup>1,2,3</sup>, 卢向阳<sup>1,2</sup>, 于焯<sup>1,2,3\*</sup>, 田云<sup>1,2\*</sup>

(1 湖南农业大学生物科学技术学院, 长沙 410128;

2 湖南省农业生物工程研究所, 长沙 410128; 3 上海交通大学医学院, 上海 200025)

**摘要:** 嘌呤能受体 P2X4 是三磷酸腺苷 (ATP)- 门控的阳离子通道, 对生物体内多种重要生命活动起一定的调节作用。二次跨膜的三聚体通道 P2X4 受体的三维空间组成是由胞外结构域、跨膜域及胞内 N-、C- 端组成。ATP 的三磷酸基团能被位于亚基界面的 ATP 结合口袋的带正电氨基酸特异性识别, 嘌呤环则被疏水氨基酸和部分氨基酸的主链氧所识别。P2X4 受体激活后, 胞外阳离子更多是通过侧窗路径进入细胞内。就 P2X4 受体的空间结构、配体的识别、离子通透途径及门控机制作一综述。

**关键词:** P2X4 受体; ATP; 门控机制

中图分类号: Q51; R962 文献标志码: A

## Research progress on structure and activity of P2X4 receptors

LI Bin<sup>1,2,3</sup>, LU Xiang-Yang<sup>1,2</sup>, YU Ye<sup>1,2,3\*</sup>, TIAN Yun<sup>1,2\*</sup>

(1 College of Bioscience and Biotechnology, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China;

2 Hunan Agricultural Bioengineering Research Institute, Changsha 410128, China;

3 Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 200025, China)

**Abstract:** P2X4 receptors are ATP-gated non-selective trimetric cation channels involved in various physiological processes. Each subunit is comprised of intracellular amino and carboxyl termini linked via two transmembrane (TM)-spanning helices (TM1 and TM2) to a large extracellular (EC) ligand-binding domain. A large ATP-binding pocket is located at the subunit interface of P2X4 receptors, which is occupied by a conspicuous cluster of basic residues (K70, K72, R298 and K316, zebrafish P2X4 numbering, similarly hereinafter) to recognize triphosphate moiety of ATP. The adenine ring makes contacts with L191, K70, K72, I232 and T186 via hydrophobic contacts or hydrogen bonds. Conformational changes both in EC and TM domain induced by ATP binding have been proposed. Two potential pathways (central and lateral) exist through which ions traverse the EC domain of P2X4 receptors to enter or exit the TM pore. Here, we summarize the progress in recent findings on the three dimensional architecture, ligand recognition, ion permeation pathway, and gating mechanism of P2X4 receptors.

**Key words:** P2X4 receptors; ATP; gating mechanism

ATP 不仅是细胞内的组成成分和能源物质, 也是一种广泛分布于中枢和外周神经系统的神经递质, 通过与相应的受体结合, 从而发挥多种重要的生物学功能。嘌呤受体 (P) 分为 P1 和 P2 受体, P2 受体又分为离子型 P2X 和代谢型 P2Y 受体。P2X 受体是非选择性阳离子通道受体, 允许 Na<sup>+</sup>、K<sup>+</sup>、Ca<sup>2+</sup> 等离子通过。目前已有 7 种哺乳动物 P2X 受体亚型 (P2X1~P2X7) 的基因被克隆, 其中, P2X4 于

1995 年被成功克隆<sup>[1]</sup>。P2X4 受体由 3 个亚基组成, 每个亚基都具有一个胞外域, 两个跨膜片段 (TM1 和 TM2) 及胞内 N- 端和 C- 端<sup>[2]</sup>。

离子型 P2X 受体在神经系统、循环系统和免

收稿日期: 2014-07-16; 修回日期: 2014-08-21

\*通信作者: 于焯, E-mail: yuye@shsmu.edu.cn; 田云, E-mail: tianyun79616@163.com

疫系统等中均有丰富表达,参与了许多不同的生理过程,如突触传递,平滑肌收缩,味觉、炎症和伤害性感受等<sup>[3-5]</sup>。P2X4受体广泛分布在大脑、脊髓、自主和感觉神经节和垂体前叶等<sup>[6-7]</sup>。2014年,Cheng等<sup>[8]</sup>研究表明,P2X4受体在神经胶质细胞里也有分布。实验证明在多种脑损伤模型里,P2X4受体的表达量是明显增加的。表达在小胶质细胞中的P2X4受体与缺血性脑损伤和创伤性脑损伤引起的炎症有关,如中风引起的大脑局部缺血,能引起P2X4受体在小胶质细胞或肥大细胞中表达显著上调,P2拮抗剂能有效减少缺血性细胞死亡和P2X4受体的表达上调<sup>[8]</sup>。活化的脊髓背角小胶质细胞所表达的P2X4受体参与神经损伤及炎症诱发的神经病理性疼痛的发生机制<sup>[9]</sup>。研究证明P2X4受体在人体脊髓神经元中表达,脊髓损伤后,P2X4能引起包括半胱氨酸蛋白酶1(caspase-1)的激活和白细胞介素1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ )的积累在内的信号转导。P2X4可能作为一个潜在的药物作用靶点来限制与脊髓损伤和神经退行性疾病有关的炎症反应<sup>[10]</sup>。除此之外,P2X4受体还参与血管内皮的功能,P2X4受体缺失的小鼠表现为高血压且动脉直径较小<sup>[11]</sup>。P2X4受体在血管中大量表达,对血管张力的调节起重要作用。P2X4在网膜动脉血管平滑肌中表达,控制系统血管阻力和血压。因此,P2X4在血管阻力方面可能成为重要靶标,干预与血管张力相关的治疗,成为一种新的治疗高血压等疾病的药物疗法。此外,P2X4受体在巨噬细胞中也有表达,与外周炎性疼痛相关<sup>[12]</sup>。

P2X4受体在人体不同部位表达丰富,与中风、高血压、神经退行性疾病等的发病机制是息息相关的。除此之外,P2X4与癌症的发病机制也有关联。在前列腺癌、肺癌、骨肉癌、膀胱癌、脑肿瘤等中,发病部位都能检测到P2X4受体的表达。Burnstock和Di Virgilio<sup>[13]</sup>研究显示,淋巴细胞性白血病中P2X4受体的表达明显上调,化疗之后P2X4受体的表达下降。因此,P2X4受体与多种疾病的发作是密切相关的,引起了人们很大的研究兴趣。

利用X射线晶体学可以对关闭和开放状态下的P2X受体的原子结构进行测定,为利用分子模拟对P2X受体进行研究提供了一个新途径,如利用分子动力学模拟、基因点突变和功能表达、亚基间的多样性、通道开放时胞外域发生实质性的结构重排的过程,这些都为以P2X4受体为药物靶点的新药研发提供了重要的结构基础<sup>[14]</sup>。

## 1 P2X4受体

### 1.1 P2X4受体三维结构

随着P2X4受体的基因被成功克隆,各研究组对P2X4受体的结构和功能的分析研究至今已取得了很大的进展。2009年,Kawate等<sup>[15]</sup>解析出了关闭状态的斑马鱼P2X4(zfP2X4)的晶体结构,推动了P2X受体领域的快速发展。晶体结构证实了P2X4受体是以三聚体形式存在,每个亚基外形类似于跃出水面的海豚,如图1所示。根据海豚的身体结构,可以将P2X4的每个亚基划分为头部、身体上部、左鳍、右鳍、身体下部、背鳍及尾巴7个部分<sup>[16]</sup>(图1),其中身体上部起主要的支撑作用。P2X4受体晶体结构提供的信息不仅证明了每一个P2X4单位是由一个大的胞外环、两个跨膜结构域(TM1和TM2)和胞内N-和C-端组成,也证实了3个TM2的 $\alpha$ -螺旋形成了P2X受体的通道孔区,以及离子流的疏水性屏障,称为门。门的上方有一个细胞外前庭<sup>[17]</sup>,结构还表明,存在两个额外的前庭(中庭和上庭)和侧窗。

P2X4受体胞外域有10个高度保守的半胱氨酸残基,两两之间共形成五对二硫键(图1中的SS1、SS2、SS3、SS4和SS5)。zfP2X4的晶体结构为这些二硫键的存在提供了直接证据<sup>[15]</sup>,前三对二硫键位于海豚的头部,第四对位于背鳍,第五对二硫键形成于两个 $\beta$ 折叠的末端,位于身体下部<sup>[18]</sup>。在大

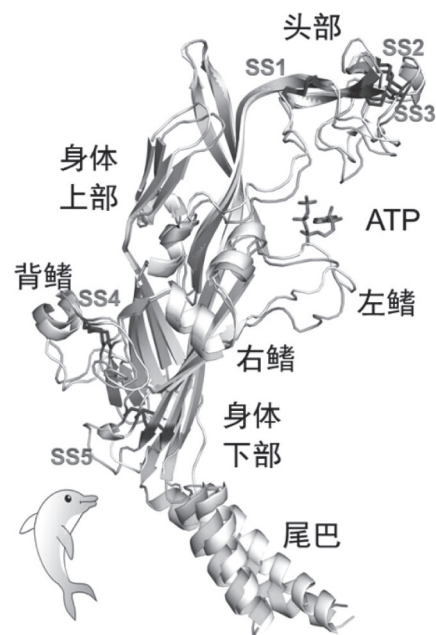


图1 嘌呤能受体P2X4三维结构<sup>[16]</sup>

鼠 P2X4 (rP2X4) 受体中用苏氨酸取代形成二硫键的半胱氨酸, 破坏 SS1、SS2、SS4 键, 受体对 ATP 的敏感性会下降。其中, 破坏 SS4 键对受体的影响最大。SS1、SS2 和 SS4 键对 ATP 结合口袋有较大贡献, 而 SS5 键位于跨膜结构域上方, 对受体离子通道门控起重要作用<sup>[19]</sup>。

## 1.2 激动剂ATP的结合位点

P2X4 受体胞外域包含有 3 个 ATP 结合位点, 每个 ATP 结合位点是由相邻亚基间的保守性氨基酸相互作用形成的。Wilkinson 等<sup>[20]</sup>的研究认为, 两个亚基之间的区域对于 ATP 的结合位点很重要; 而 Marquez-Klaka 等<sup>[21]</sup>证实了 ATP 结合位点位于两个亚基之间。rP2X4 受体中有 8 个氨基酸残基可能参与 ATP 的结合, 即 K67、K69、F185、T186、N293、F294、R295 和 K313<sup>[22]</sup>。zfP2X4 的晶体结构显示亚基间存在一个大的 ATP 结合口袋, 由一个亚基 (A 链) 的头部、身体上部及另一个亚基 (B 链) 的身体下部和背鳍组成, 包含 K70、K72、R298 和 K316 带电基团, 能特异性识别 ATP 的磷酸基团<sup>[16]</sup>, 其他氨基酸与 ATP 的腺嘌呤结合, 从而形成不同的结合位点。Hattori 和 Gouaux<sup>[16]</sup>的研究结果表明, ATP 以折叠成 U 型的结构和 zfP2X4 受体结合, 该 U 型结构参与盐桥和氢键的相互作用。残基 K70(B 链) 位于三磷酸的 U 型中心, 与  $\alpha$ 、 $\beta$  和  $\gamma$ -磷酸基团的氧原子相互作用。腺嘌呤环埋藏在 ATP 结合口袋深处, 与身体下部的 K70 和 T189 的羰基氧原子

形成氢键, 与身体下部的 L191 和背鳍的 I232 有疏水作用。Du 等<sup>[23]</sup>研究了 zfP2X4 受体中处于相反位置的 L191 和 D145 与腺嘌呤环的结合情况。腺嘌呤环朝下时, 即 L191 位置, ATP 的 N6 原子与 G294 的羰基氧原子形成氢键, 腺嘌呤起到支点的作用, 可引起跨膜域发生明显的扩张; 而腺嘌呤朝上时, 即 D145 位置, 受体并没有出现明显的构象变化。Huang 等<sup>[24]</sup>通过分子对接提出了 3 种 ATP 识别模式 AR1、AR2 和 AR3, 分别对应 3 个结合位点 S1、S2 和 S3, 如图 2 所示。AR1 模式腺嘌呤环与 L191、K70、K72、I232 和 T186 结合, 与 Hattori 和 Gouaux<sup>[16]</sup>的研究相似; AR2 模式腺嘌呤环与 I94、F297、Q97 和 Y295 相互作用, 与 Du 等<sup>[23]</sup>的研究相似; AR3 模式腺嘌呤环与 S3 位点的 W167、I173、L170、D145 和 E171 共价结合, 与 Jiang 等<sup>[25]</sup>的研究相似。分子动力学结果表明, 随着 ATP 的结合, 相比于 AR2 和 AR3 模式, AR1 模式更容易出现头部向下运动, 下游构象变化, 能量释放增加, 从而触发 P2X4 受体的激活。进一步分析表明, AR1 模式诱导的构象变化可以进一步阻碍 AR2 和 AR3 识别模式的发生。

## 2 离子通透途径

### 2.1 两种离子通透途径

zfP2X4 受体的晶体结构显示, 可能存在两种离子通透路径, 第一种路径是阳离子从上庭进入通

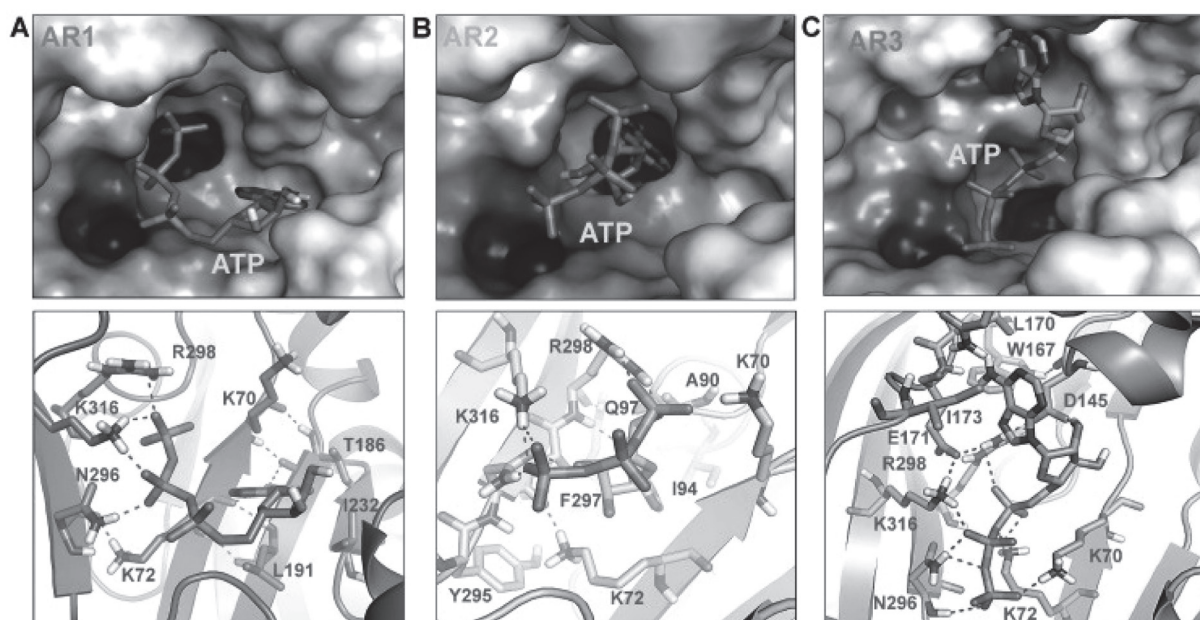


图2 zfP2X4受体三种可能的ATP识别模式<sup>[24]</sup>



道, 途经中庭、胞外庭、门控部位、胞内庭最后进入细胞<sup>[15]</sup>, 如图3中的中央途径虚线箭头所示。然而, 在受体关闭状态下上庭的开口过于狭窄 (~0.23 nm), 不利于离子通过, 但当激动剂结合受体后, 受体构象改变能增大开口半径, 此时离子有可能更容易进入<sup>[26]</sup>。第二种路径是细胞膜上方的胞外域有一个侧窗样的结构, 使胞外庭与胞外溶液接触, 离子直接进入胞外区, 途经门控部位、胞内庭最后进入细胞, 如图3中侧窗途径虚线箭头所示。

Kawate 等<sup>[15]</sup>在解析 zfP2X4 受体晶体结构的同时, 还发现镱离子 ( $Gd^{3+}$ ) 对 P2X4 的中央前庭起协调作用, 能抑制 ATP 门控电流。这种抑制可以通过增加 ATP 浓度的方式克服, 表明电流的抑制不是由离子转导通路的阻塞造成的。研究表明, 即使在通道关闭的状态下, 一价阳离子也能轻易得穿透侧窗, 而中央路径呈现很强的静电屏障, 将需要结构重排, 才允许离子通过。Samways 等<sup>[27]</sup>分别在人源 P2X4 受体 (hP2X4) 的中央途径以及侧窗域位置引入半胱氨酸, 发现中央途径沿途的氨基酸残基不能被 MTSET<sup>+</sup> 修饰, 而侧窗域的 E56C 和 D58C 可以被 MTSET<sup>+</sup> 修饰。MTSET<sup>+</sup> 的修饰显著抑制这两个突变体中的跨膜电流, 使用 DTT 还原之后, 电流得到恢复。无论 ATP 是否存在, 这种修饰对电流的抑制都能被观察到, 这意味着尽管通道关闭, 巯基反应试剂仍然可以穿透侧窗。Hattori 和 Gouaux<sup>[16]</sup>解析结合有 ATP 的 zfP2X4 通道的开放结构验证了侧窗假设。在开放态晶体结构里的中央途径和静息

态的结构一样, 直径太小不能使离子渗透, 而胞外庭侧窗是敞开的。因此, 侧窗孔是水合离子进出受体的通路。一旦离子通过侧窗, 酸性 (带负电荷) 中央庭吸引阳离子, 排斥阴离子, 从而浓缩阳离子使其接近离子通道孔入口。而 Rokic 等<sup>[17]</sup>的研究表明,  $Cd^{2+}$  对通道门控也有影响,  $Cd^{2+}$  通过侧窗进入细胞外庭和中央庭, TM1 上的残基负责离子的吸收。受体激活后, 离子渗透到门控区域, 涌向 TM2, TM2 主要负责门控和渗透。综上, 虽然 P2X4 的晶体结构提供了两种可能途径供外界阳离子进入细胞, 但多数的研究结论都认为侧窗途径是外界阳离子进入细胞的主要途径。

## 2.2 P2X4受体可能的激活机制

Kawate 等<sup>[15]</sup>在 zfP2X4 晶体结构的基础上提出了一种 P2X 受体可能的激活机制, 而 Chataigneau 等<sup>[28]</sup>在侧窗途径的基础上, 结合各种实验方法, 进一步完善了这种机制, 并将其分为5个步骤。ATP 与受体亚基间的口袋结合, 亚基内部破裂, 导致头部相对于背鳍向下紧缩 (第一步)。核糖和腺嘌呤与背鳍的 L217 和 I232 (B 链) 产生疏水作用, 使背鳍向上运动 (第二步)。随后身体下部与背鳍耦合并向外扩张, 造成侧窗扩大 (第三步)。身体下部弯曲, 每个亚基的身体上部在很大程度上表现为一个刚性支撑 (第四步)。最后, 身体下部直接耦合到 TM1 和 TM2, 其向外弯曲运动直接促进 TM 螺旋孔扩大 ~3Å (第五步), 这个扩展允许离子跨通道。这种激活机制与之前 Hattori 和 Gouaux<sup>[16]</sup>

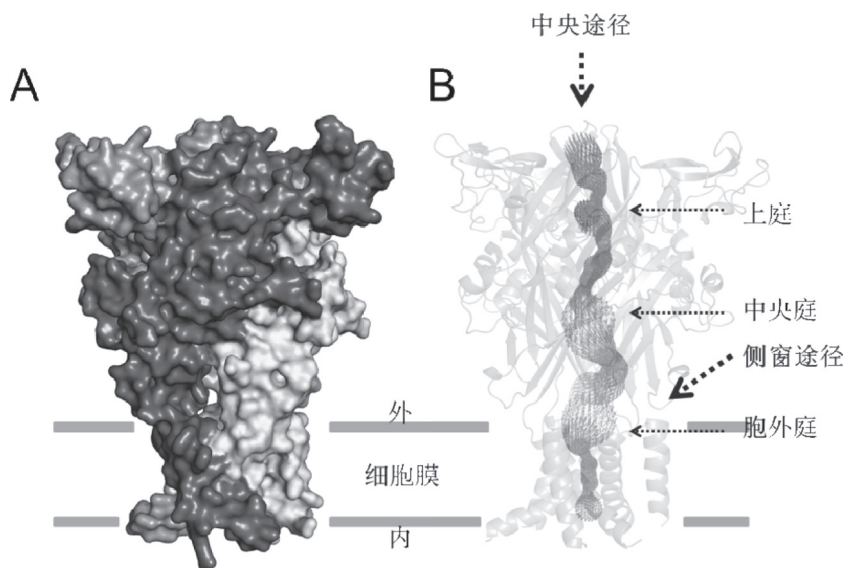


图3 细胞外离子进入P2X受体跨膜孔的两种可能的途径

提出的 zP2X4 受体的激活机制是类似的, 随后也被 Zhao 等<sup>[29]</sup> 的研究所证实。

### 3 总结与展望

如前面所言, P2X4 受体参与诸多生理病理功能, 如中风、病理性疼痛、高血压等等, 目前这些疾病都缺乏高效特异的治疗药物。P2X4 受体为这些疾病的治疗提供了一个新的靶点。而 P2X4 受体晶体结构的解析可以辅助基于受体结构的药物设计, 利用传统的药物设计方法发现新的药物骨架类型, 进而改造成为先导药物。自从 Kawate 等<sup>[15]</sup> 在 2009 年解析出了关闭状态的 zP2X4 的晶体结构, 对 P2X 受体的空间结构、与激动剂的结合及离子渗透机制等的研究也日益增多, 以及稳定细胞系的构建、自动膜片钳技术等一系列实验方法也日趋成熟, 这些都为以后的实验研究奠定了一定的基础。所以, P2X4 受体作为新药的潜在靶标具有广阔的研究前景和潜在的应用价值。

#### [参 考 文 献]

- [1] Bo X, Zhang Y, Nassar M, et al. A P2X purinoceptor cDNA conferring a novel pharmacological profile. *FEBS Lett*, 1995, 375(1-2): 129-33
- [2] Silberberg SD, Chang TH, Swartz KJ. Secondary structure and gating rearrangements of transmembrane. *J Gen Physiol*, 2005, 125(4): 347-59
- [3] Surprenant A, North RA. Signaling at purinergic P2X receptors. *Annu Rev Physiol*, 2009, 71: 333-59
- [4] Franke H, Illes P. Nucleotide signaling in astrogliosis. *Neurosci Lett*, 2014, 565: 14-22
- [5] Burnstock G. Purinergic signalling: pathophysiology and therapeutic potential. *Keio J Med*, 2013, 62(3): 63-73
- [6] Coddou C, Yan Z, Obsil T, et al. Activation and regulation of purinergic P2X receptor channels. *Pharmacol Rev*, 2011, 63(3): 641-83
- [7] Khakh BS, North RA. Neuromodulation by extracellular ATP and P2X receptors in the CNS. *Neuron*, 2012, 76(1): 51-69
- [8] Cheng RD, Ren JJ, Zhang YY, et al. P2X4 receptors expressed on microglial cells in post-ischemic inflammation of brain ischemic injury. *Neurochem Int*, 2014, 67: 9-13
- [9] Kobayashi K, Yamanaka H, Noguchi K. Expression of ATP receptors in the rat dorsal root ganglion and spinal cord. *Anat Sci Int*, 2013, 88(1): 10-6
- [10] De Rivero Vaccari JP, Bastien D, Yurcisin G, et al. P2X4 receptors influence inflammasome activation after spinal cord injury. *J Neurosci*, 2012, 32(9): 3058-66
- [11] Yamamoto K, Sokabe T, Matsumoto T, et al. Impaired flow-dependent control of vascular tone and remodeling in P2X4-deficient mice. *Nat Med*, 2006, 12(1): 133-7
- [12] Nichols CM, Povstyan OV, Albert AP, et al. Vascular smooth muscle cells from small human omental arteries express P2X1 and P2X4 receptor subunits. *Purinergic Signal*, 2014, 10: 565-72
- [13] Burnstock G, Di Virgilio F. Purinergic signalling and cancer. *Purinergic Signal*, 2013, 9(4): 491-540
- [14] North RA, Jarvis MF. P2X receptors as drug targets. *Mol Pharmacol*, 2013, 83(4): 759-69
- [15] Kawate T, Michel JC, Birdsong WT, et al. Crystal structure of the ATP-gated P2X4 ion channel in the closed state. *Nature*, 2009, 460(7255): 592-8
- [16] Hattori M, Gouaux E. Molecular mechanism of ATP binding and ion channel activation in P2X receptors. *Nature*, 2012, 485(7397): 207-12
- [17] Rokic MB, Stojilkovic SS, Zemkova H. Structural and functional properties of the rat P2X4 purinoreceptor extracellular vestibule during gating. *Front Cell Neurosci*, 2014, 8(3): 1-10
- [18] Stojilkovic SS, He ML, Koshimizu TA, et al. Signaling by purinergic receptors and channels in the pituitary gland. *Mol Cell Endocrinol*, 2011, 314(2): 184-91
- [19] Rokic M, Tvrdonova V, Vavra V, et al. Roles of conserved ectodomain cysteines of the rat P2X4 purinoreceptor in agonist binding and channel gating. *Physiol Res*, 2010, 59(6): 927-35
- [20] Wilkinson WJ, Jiang LH, Surprenant A, et al. Role of ectodomain lysines in the subunits of the heteromeric P2X2/3 receptor. *Mol Pharmacol*, 2006, 70(4): 1159-63
- [21] Marquez-Klaka B, Rettinger J, Nicke A. Inter-subunit disulfide cross-linking in homomeric and heteromeric P2X receptors. *Eur Biophys J*, 2009, 38(3): 329-38
- [22] Coddou C, Yan Z, Obsil T, et al. Activation and regulation of purinergic P2X receptor channels. *Pharmacol Rev*, 2011, 63(3): 641-83
- [23] Du J, Dong H, Zhou HX. Gating mechanism of a P2X4 receptor developed from normal mode analysis and molecular dynamics simulations. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2012, 109(11): 4140-5
- [24] Huang LD, Fan YZ, Tian Y, et al. Inherent dynamics of head domain correlates with ATP recognition of P2X4 receptors: Insights gained from molecular simulations. *PLoS One*, 2014, 9(5): e97528
- [25] Jiang RT, Lemoine D, Martz A, et al. Agonist trapped in ATP-binding sites of the P2X2 receptor. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2011, 108(22): 9066-71
- [26] Kawate T, Robertson JL, Li M, et al. Ion access pathway to the transmembrane pore in P2X receptor channels. *J Gen Physiol*, 2011, 137(6): 579-90
- [27] Samways DS, Khakh BS, Dutertre S, et al. Preferential use of unobstructed lateral portals as the access route to the pore of human ATP-gated ion channels (P2X receptors). *Proc Natl Acad Sci USA*, 2011, 108(33): 13800-5
- [28] Chataigneau T, Lemoine D, Grutter T. Exploring the ATP-binding site of P2X receptors. *Front Cell Neurosci*, 2013, 7: 273
- [29] Zhao WS, Wang J, Ma XJ, et al. Relative motions between left flipper and dorsal fin domains favour P2X4 receptor activation. *Nat Commun*, 2014, 5: 4189