

DOI: 10.13376/j.cblls/2022017

文章编号: 1004-0374(2022)02-0145-10

神经系统中HCN通道及其调控分子的研究进展

吴凡^{1,2}, 舒渝茜^{1,2}, 章帆^{1,2}, 鲁娇^{1,2}, 王清^{1,2}, 赵航^{1,2}, 何治^{1,2*}

(1 国家中医药管理局中药药理科研三级实验室, 宜昌 443002; 2 三峡大学医学院, 宜昌 443002)

摘要: 超极化激活的环核苷酸门控 (hyperpolarization-activated and cyclic nucleotide-gated, HCN) 阳离子通道属于电压门控孔环通道超家族, 并且广泛表达于心脏和中枢神经系统 (central nervous system, CNS) 中。HCN 通道在膜电位超极化时被激活, 并在神经系统内传导一种内向的超极化激活电流 (I_h)。在 CNS 中, HCN 通道的表达、分布及生理功能受到细胞内外小分子、辅助蛋白、蛋白激酶及多种神经递质的调控, 并进一步影响其下游信号。该文就 HCN 通道的结构及其在 CNS 中的分布及调控作一综述。

关键词: HCN 通道; I_h ; 中枢神经系统; cAMP; TRIP8b; 神经递质

中图分类号: R338; R742 **文献标志码:** A

Research progress of HCN channels and the regulatory molecules in nervous system

WU Fan^{1,2}, SHU Yu-Qian^{1,2}, ZHANG Fan^{1,2}, LU Jiao^{1,2}, WANG Qing^{1,2}, ZHAO Hang^{1,2}, HE Zhi^{1,2*}

(1 Third-grade Pharmacological Laboratory on Traditional Chinese Medicine Approved by State Administration of Traditional Chinese Medicine, Yichang 443002, China; 2 Medical College, China Three Gorges University, Yichang 443002, China)

Abstract: Hyperpolarization activated and cyclic nucleotide gated (HCN) cation channels belong to the voltage-gated pore ring channel superfamily and are widely expressed in the heart and central nervous system (CNS). HCN channels are activated during membrane potential hyperpolarization and conduct an inward hyperpolarization activated current (I_h) in the nervous system. In the CNS, HCN channels and their distribution and physiological functions are regulated by intracellular and extracellular small molecules, accessory proteins, protein kinases and many neurotransmitters, then affect the downstream signals. Here we review the structure, distribution and regulation of HCN channels in CNS.

Key words: HCN channel; I_h ; central nervous system; cAMP; TRIP8b; neurotransmitter

超极化激活电流 (hyperpolarization-activated currents, I_h) 在窦房结组织中首次被检测到^[1], 之后在海马 CA1 区锥体神经元中被发现^[2], 其独特的膜超极化时激活的特性使得其在哺乳动物中是独一无二的。 I_h 也被称为 I_f (funny current) 或 I_q (queer current)。后期研究中发现, 这种特殊的内向电流受超极化和环核苷酸的调控, 其通道因复杂的双门控模式被称为超极化激活的环核苷酸门控阳离子 (hyperpolarization-activated and cyclic nucleotide-gated, HCN) 通道^[3]。

与大多数电压门控通道不同, HCN 通道在膜

电位超极化时激活, 允许 Na^+ 和 K^+ 按照 1:3~1:5 的比例通过。在此过程中, 环磷酸腺苷 (cyclic adenosine monophosphate, cAMP) 直接与通道蛋白相互作用, 促进在中枢神经系统中 (central nervous system, CNS) 产生内向电流 I_h ^[3-4]。 I_h 电流参与多种生理功能, 包括静息膜电位的测定、神经元振荡的产生、树突整合和突触传递的调节等^[4], 并参与睡眠觉醒^[4-5]、学习记忆^[3,6]、感觉和知觉^[7] 等多个生理过程。在

收稿日期: 2021-08-06; 修回日期: 2021-09-22

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(82073824)

*通信作者: E-mail: 329856208@qq.com

CNS 中, HCN 通道的功能特性和表达是多样化的, 它可以通过细胞代谢物与通道或蛋白激酶相互作用, 其表达、异构体或亚细胞的重新分布也可被动态和精确地调节, 从而发挥不同的生理作用^[4]。事实上, HCN 通道功能障碍与几种病理生理状态密切相关, 包括癫痫^[8-10]、神经病理性疼痛^[7-8,11]、炎症性疼痛^[11-13]以及神经退行性疾病^[8,10,14], 但目前针对 HCN 通道且被美国食品药品监督管理局批准的药物只有伊伐布雷定。该药物用于治疗心律正常患者的慢性稳定型心绞痛^[15]。目前尚未出现针对 HCN 通道治疗神经系统疾病的有效药物。

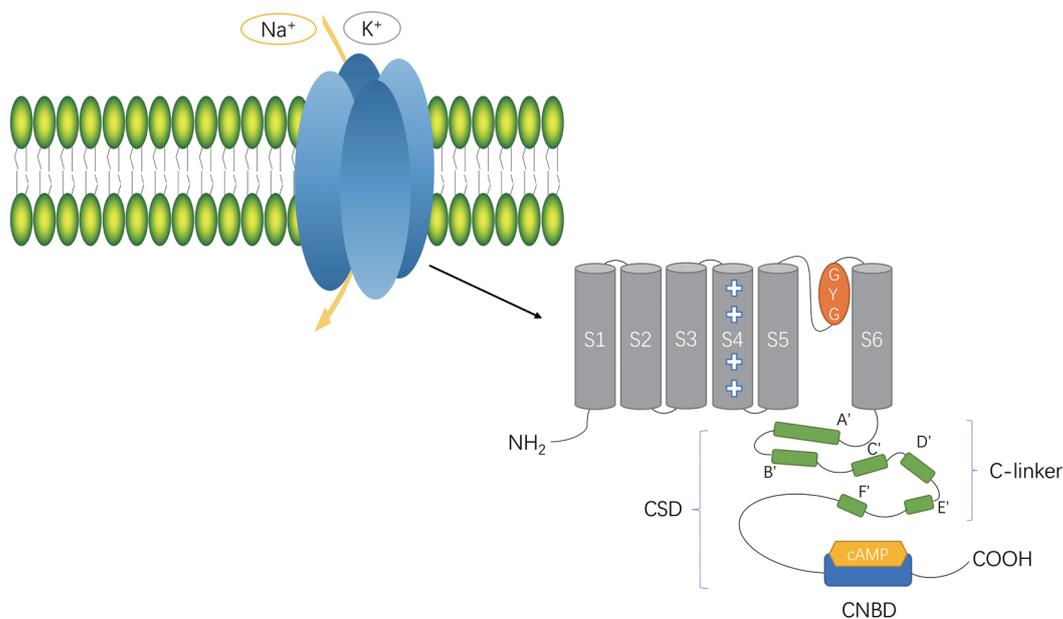
HCN 通道的基本结构及其生理特性等已在其他文献中被报道^[3-4,16]。本文将简要介绍 HCN 通道的结构及分布, 重点关注 HCN 通道在 CNS 中的调控机制。

1 HCN通道的结构和分布

HCN 通道属于哺乳动物 HCN1~4 基因家族编码的具有四个成孔亚基 (HCN1~4) 的电压依赖性钾通道和环核苷酸门控通道超家族, 四个亚基排列在位于中心的孔隙周围, 形成四种不同的同质异构体, 具有不同的生理特性^[16]。每个亚基都主要由 3 部分组成, 即胞质 N 末端、跨膜核心、C 末端结构域。跨膜核心由 6 个 α 跨膜螺旋片段组成 (S1~6), 带有正电荷的电压传感器 (S4) 和 S5~6 之间携带甘氨酸 -

酪氨酸 - 甘氨酸 (GYG) 基序的离子传导孔区形成了离子选择性过滤器^[17]。在 S5 和孔环之间的胞外环中高度保守的天冬酰胺残基是糖基化的重要位点, 这种翻译后通道修饰对于正常的细胞表面表达是至关重要的^[18]。在 S6 之后连接的是由 6 个 α -螺旋 (A'~F') 组成的 C-接头 (C-linker), 以及含有 120 个氨基酸的环核苷酸结合区 (cyclic nucleotide-binding domain, CNBD)。而 C-linker 和 CNBD 组成的区域被称为“环磷酸腺苷敏感结构域” (cAMP-sensing domain, CSD), 因为他们对 cAMP 诱导的 HCN 通道电压依赖性激活的正移发挥重要作用^[4,19-20](图 1)。4 种 HCN 通道对 cAMP 的敏感性不同, 其中 HCN2 和 HCN4 受调控较强, HCN1 和 HCN3 受调控较弱。HCN 通道亚型的激活动力学也有差异: HCN1 的激活速度最快, HCN4 的激活速度最慢, HCN2 和 HCN3 的激活时间居中^[11,19]。

HCN 通道 4 个亚基在 CNS 中表现出不同的表达模式, 并且已经在 mRNA 和蛋白质水平上进行了广泛的研究。HCN1 主要在大脑皮层、海马、小脑皮质和脑中表达^[4,8,21]。此外, 据报道在脊髓中也有 HCN1 的表达^[22]。HCN2 分布在几乎所有的大脑区域, 其中丘脑、苍白球和脑干核团的表达最高^[3-4,21]。相比之下, HCN3 在 CNS 中的分布较少, 水平非常低。仅在嗅球和一些下丘脑核团中检测到^[3-4,21]。HCN4 的分布模式与 HCN1 互补, HCN4



HCN通道是四聚体, 一个单体由6个跨膜螺旋段组成。C端结构域包含C-接头(C-linker)和环核苷酸结合区(CNBD)。

图1 HCN结构图

在大脑的某些部位有很强的表达,例如丘脑的各个核团和嗅球的二尖瓣细胞层。在其他脑区,HCN4的表达要低得多^[4]。在外周神经系统(peripheral nervous system, PNS)中,所有4种HCN亚型都被报道在背根神经节中表达,其中HCN1是含量最丰富的一种^[11,23]。大多数三叉神经节神经元中HCN1、HCN2和HCN3免疫阳性^[4](表1)。

2 HCN通道的调节

2.1 细胞内分子对HCN通道的调节

2.1.1 小分子

2.1.1.1 环核苷酸

cAMP是HCN通道的生理调节剂,使 I_h 的激活曲线向正值移动,促进通道电压依赖性激活。cAMP使HCN2、HCN4电压依赖性激活向正方向位移约17 mV,并促进通道开放;但对HCN1和HCN3反应较弱,仅能使HCN1的激活曲线移动约2~4 mV^[4,19,24]。在大鼠糖尿病神经性疼痛(diabetic neuropathic pain, DNP)模型中,DNP大鼠表现出明显的机械性痛觉异常,这与脊髓背角HCN2和HCN4通道表达增加、cAMP生成增加、蛋白激酶A(protein kinase A, PKA)蛋白表达增加有关,鞘内注射ZD7288可使其减弱,提示脊髓背角HCN通道参与了DNP大鼠痛觉过敏的发病过程,并可能受cAMP-PKA信号的调节^[25]。

与cAMP一样,环磷酸鸟苷(cyclic guanosine monophosphate, cGMP)也是HCN通道的完全激动剂:饱和浓度时, $V_{1/2}$ 的变化与cAMP的变化范围相同。然而,cGMP对HCN通道的效力降低了90%^[4,19,26]。环磷酸胞苷(cytidine cyclic monophosphate, cCMP)也能调节HCN通道,是部分激动剂。在HCN2和HCN4通道上,cCMP使激活曲线向正电位移动,加速电流激活,减少电流失活,但对HCN1和HCN3无影响^[19]。

2.1.1.2 磷脂酰肌醇二磷酸酯(phosphatidylinositol bisphosphate, PIP2)

PIP2是一种含肌醇的甘油磷脂,其头基上含

有数量不等的磷酸基。它在细胞膜中参与细胞骨架连接、离子通道调节和细胞内运输等过程^[27]。同时,PIP2起细胞内变构激活剂的作用,促进通道开放。PIP2右移了超极化依赖的HCN通道激活,使哺乳动物HCN通道的激活向正方向移动约20 mV,且不受cAMP及cGMP的调节^[6,28]。小鼠丘脑膝间小叶(intergeniculate leaflet, IGL)神经元高表达HCN3,而PIP2在该神经元上表达可上调 I_h ,相反,PIP2缺失可降低其兴奋性,提示PIP2可能通过HCN通道对神经元的兴奋性和节律性放电产生重要影响^[29]。

2.1.1.3 质子

HCN通道的激活依赖胞内和胞外质子浓度。质子使通道激活的电压向负方向移动,减慢通道开放的速度^[3]。丘脑皮质神经元和异源表达系统中的HCN通道在生理范围内受细胞内质子的调节。细胞内酸化使HCN通道向负方向移动,降低激活速率,导致 I_h 下调;而碱化对 I_h 产生相反的影响^[4]。定点突变表明,在电压敏感的S4螺旋和胞质S4-S5连接子之间的组氨酸残基(HCN2中的His321)决定了质子的敏感性^[4]。

2.1.1.4 Cl^-

HCN通道也受到 Cl^- 的调节, Cl^- 对HCN2和HCN4的影响较大,而对HCN1影响较小。 Cl^- 对HCN通道的调节可能与心脏病理生理有关^[16]。有研究表明,细胞内的 Cl^- 对快速瞬时电流(fast instantaneous current, I_{INS})具有生理抑制作用。当细胞内 Cl^- 从生理浓度(10 mmol/L)增加到高浓度(140 mmol/L)时, I_{INS} 几乎完全消失,而对稳态电流(steady-state current, I_{SS})无明显影响^[30]。

2.1.2 相互作用蛋白

不同的辅助蛋白与HCN通道亚基形成大分子复合物,决定了HCN介导的活体电流特征、HCN蛋白的区域或亚细胞定位以及它们对调控信号的敏感性。MinK相关肽1(MinK-related peptide 1, MiRP1),由KCNE2编码,能够增强HCN的表达并改变各种HCN通道的动力学。MiRP1在心脏组织中高表达,已知MiRP1功能障碍会抑制起搏电流,与窦性心

表1 HCN各亚型在神经系统中主要表达的部位

亚型	HCN1	HCN2	HCN3	HCN4
CNS主要表达	大脑皮层、海马、小脑皮质及脑干	几乎所有大脑区域,丘脑、苍白球和脑干核团表达最高	分布较少,表达水平较低	丘脑各核团、嗅球二尖瓣细胞层表达较强
PNS主要表达	背根神经节(表达最多)、三叉神经节	背根神经节、三叉神经节	背根神经节、三叉神经节	背根神经节

动过缓有关,但也存在于大脑中^[31-32]。细丝蛋白 A (filamin A) 是一种肌动蛋白交联蛋白,是神经元迁移到皮层所必需的,其突变与人类脑室周围异位症有关。已知该蛋白与 HCN1 相互作用,但不与 HCN2 和 HCN4 相互作用^[19]。小窝蛋白-3 (caveolin-3, CAV3) 影响 I_f 及 HCN4 的功能。在窦房结 (sinoatrial node, SAN) 细胞中,CAV3 通过与 HCN4 相互作用将 V1/2 移至负电压,影响通道电压依赖性;此外,还通过加速通道失活来改变 HCN4 电流动力学^[33]。

相互作用蛋白中研究最多的是含有四三肽重复序列的 Rab8b 相互作用蛋白 (tetra-tricopeptide repeats-containing Rab8b-interacting protein, TRIP8b)。TRIP8b 包含 9 种亚型^[34],其中 TRIP8b (1a-4) 是哺乳动物大脑中最丰富的亚型,约占 30%~40%,能可靠地增加 HCN 通道的表面表达^[35-36];第二丰富的是 TRIP8b (1a),约占 25%~30%;TRIP8b (1b-2) 水平较低,约占 10%~15%^[36]。同时,有研究表明 TRIP8b (1a-4) 显著增加 HCN1 的表面表达,但降低 HCN2 的表面表达^[34,36-37]。相比之下,TRIP8b (1a) 使 HCN1 的表面表达减少了 90%^[38],且 TRIP8b (1b-2) 有效下调 HCN1 和 HCN2 的表面表达^[38-39]。虽然 TRIP8b 存在多个亚型,但有实验数据表明该蛋白质在大脑中的主要作用是促进 HCN 通道表面表达并增强 I_h ^[34]。消除 TRIP8b 的表达显著上调海马锥体神经元中的 I_h 。 I_h 依赖的膜电压特性的损失可归因于神经元表面 HCN 通道的减少,并且锥体神经元树突状细胞中 HCN 通道的正常表达模式受到显著破坏^[40]。

2.1.3 蛋白激酶

2.1.3.1 酪氨酸激酶(Src)

Src 在神经元和心肌细胞中广泛表达,是电压和配体门控离子通道的重要调节器。研究表明,Src 特异性地与 HCN 通道的 C 末端结合,使通道磷酸化,从而影响 I_h 的激活动力学。此外,研究人员还在 HCN 通道的 C-linker 发现了一个特定的酪氨酸残基,它是 Src 的分子靶点^[19]。Src 对 HCN 通道动力学的影响是由所有 HCN 通道亚型的 C-linker 的 β -螺旋中高度保守的酪氨酸残基 (HCN2 中的 Tyr476, HCN4 中的 Tyr554) 来实现的^[41]。Src 对 HCN4 通道门控的作用依赖于 HCN4-Tyr531 的磷酸化,用苯丙氨酸取代 HCN4-Tyr531 可在很大程度上消除 Src 抑制剂对 HCN 通道门控的影响^[42]。特异性阻滞剂对 Src 的抑制可减缓天然和异源表达的 HCN 通道的激活动力学。在与显性抑制 Src 突变体共转

染的细胞中也观察到了同样的影响。免疫沉淀实验表明,Src 能与天然和异源表达的 HCN2 结合并磷酸化^[41]。

2.1.3.2 p38 丝裂原活化蛋白激酶(p38-mitogen-activated protein kinase, p38 MAPK)

海马锥体神经元树突中的 HCN 通道 (主要由 HCN1 亚型组成) 受到 p38 MAPK 的双向调节,激活上调而抑制下调。药物抑制海马锥体神经元 p38 MAPK 的活性可引起 I_h 电压依赖性激活的超极化位移约 25 mV,使静息电位超极化,增加神经元输入阻力和时间总和。然而,激活 p38 MAPK 使 I_h 电压依赖性激活的去极化位移约 11 mV,使静息电位去极化,并降低输入电阻和时间总和^[43]。p38 MAPK 在 HCN 通道中的作用也与癫痫等病理有关。在慢性癫痫动物海马 CA1 区 p38 MAPK 活性降低,p38 MAPK 的激活部分逆转了癫痫诱发的 HCN 通道门控超极化转变,无论是在离体模型中还是在慢性癫痫动物的锥体神经元中都是如此^[44]。

2.1.3.3 蛋白激酶 C (protein kinases C, PKC)

PKC 是神经递质抑制 HCN 通道的重要下游靶点,其药理阻断可消除神经递质对 HCN 通道的抑制作用^[4]。此外,在转染 HCN1 的非神经元和神经元哺乳动物细胞中,PKC 具有降低并减慢 I_h 的作用。然而,在这些表达系统中,PKC 的激活并不影响通道电压敏感性^[45]。2015 年,有研究表明 PKC 可双向调节海马主神经元的振幅和 HCN1 的表面表达:PKC 的激活不可逆地降低 I_h 和 HCN1 表面的表达,而抑制 PKC 则起相反的作用;研究还发现,PKC 激活增加了 HCN1 通道的磷酸化^[46]。

2.1.3.4 钙调蛋白依赖性蛋白激酶 II (calmodulin-dependent protein kinase II, CaMK II)

研究表明,CaMK II 活性是建立和维持 CA1 锥体神经元中 HCN1 远端树突状富集所必需的。药物阻断 CaMK II 活性后,HCN1 在树突中重新均匀分布,而蛋白表达水平没有明显变化^[47]。在培养的海马神经元中,诱导 Ca^{2+} 内流,随后激活 CaMK II,可使 HCN1 通道表达增加,并伴随 I_h 的增加^[48]。在神经病理性疼痛大鼠模型中,HCN2 的表达上调,而 CaMK II 抑制剂 KN-93 可显著逆转 HCN2 过表达引起的机械痛和冷痛及热痛觉过敏^[49]。

2.2 神经递质对 HCN 通道的调节

2.2.1 谷氨酸 (glutamate, Glu)

Glu 是 CNS 中主要的兴奋性神经递质之一。Glu 介导许多长期效应,从突触可塑性到兴奋性

毒性。突触前 Glu 的释放激活了离子型谷氨酸受体 *N*-甲基-*D*-天冬氨酸受体 (*N*-methyl-*D*-aspartic acid receptor, NMDAR)、 α -氨基-3-羟基-5-甲基-4-异恶唑丙酸受体 (α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole-propionic acid receptor, AMPAR) 及代谢型谷氨酸受体 (metabotropic glutamate receptors, mGluR)。研究发现, 海马 Glu 对离子型和代谢型受体的激活调节了 HCN1 通道在树突膜的表达; 此外, 癫痫模型中 Glu 释放的增强影响了体外 HCN 通道的转录^[4]。在海马 CA1 锥体神经元中, 由内嗅皮层 (entorhinal cortex, EC) 通过兴奋性颞腺途径的投影来激活离子型谷氨酸受体对于建立和维持 HCN1 的梯度分布模式是必要的, 而不会改变蛋白表达水平^[47]。在一项海马神经元分离培养的研究中, 通过激活 NMDAR 或 AMPAR, HCN1 通道表面的表达增加^[48]。在大鼠坐骨神经慢性压迫损伤 (chronic constriction injury, CCI) 模型中, HCN1 表达明显降低, mGluR1 水平明显升高, 显著增加了神经元的兴奋性。这一效应可通过激活 mGluR1 来模拟, 抑制 mGluR1 则可阻断。因此, Glu 的作用很可能是通过激活下游 PLC-PKC 信号通路的 mGluR1 介导的^[50]。

2.2.2 γ -氨基丁酸(γ -aminobutyric acid, GABA)

GABA 是哺乳动物 CNS 中重要的抑制性神经递质, 分为 GABA_A、GABA_B、GABA_C 三种亚型。GABA_B 受体是哺乳动物大脑中含量最丰富的抑制性 G 蛋白耦联受体, 可激活 Go/Gi 蛋白, 调节腺苷酸环化酶 (adenylate cyclase, AC)、Ca²⁺ 通道和 K⁺ 通道^[51]。在慢性脑低灌注 (chronic cerebral hypoperfusion, CCH) 模型中, GABA_B 激动剂巴氯芬能通过逆转大鼠前额叶皮质 (prefrontal cortex, PFC) 中 HCN2 表达的下降低来改善 CCH 大鼠的空间记忆^[52]。

2.2.3 单胺类神经递质

单胺类神经递质包括去甲肾上腺素 (noradrenaline, NE)、5-羟色胺 (5-hydroxytryptamine, 5-HT)、多巴胺 (dopamine, DA), 在运动、睡眠和觉醒以及学习、工作记忆、注意力等高级认知功能中起着重要的调节作用。HCN 通道是单胺类神经递质的重要靶点, 影响神经元的兴奋性、突触传递、整合性和可塑性。NE 可以通过刺激 α 2-肾上腺素能受体 (α 2-adrenergic receptor, α 2-AR) 抑制腺苷酸环化酶 (adenylate cyclase, AC) 的活性, 从而降低 cAMP 浓度, 进而抑制 HCN 通道的激活^[53]。右美托咪啶, 一种高效、高选择性的 α 2-ARs 激动剂, 可抑制 HEK293 细胞的 HCN1 和 HCN2 通道电流, 使最大电流降低, I_h 电流抑制

率增加^[54]。

早期研究发现, 5-HT1A 受体与抑制性 G 蛋白 Gi/o 耦联, 抑制 AC/PKA 信号级联, 从而降低 cAMP 浓度^[55-57]。在整个内侧上橄榄 (medial superior olive, MSO) 神经元上应用 5-HT 可降低 I_h , 使其活化范围降低约 10 mV, 并减缓通道的激活动力学, 这与 AC 活性的降低和 cAMP 对 I_h 变构调节的减少是一致的^[58]。在小鼠脑片上发现, 5-HT 通过激活两个不同的 5-HT 受体亚家族, 5-HT2A/2CR 和 5-HT7R, 直接增强梭形主细胞的兴奋性。这种兴奋效应是 HCN 通道增强的结果。5-HT 能调节兴奋性是 G 蛋白依赖性的, 涉及 cAMP 和 Src 信号通路^[59]。

体外全细胞膜片钳记录显示, DA 引起 V 层 EC 锥体神经元兴奋性降低, I_h 电流增加。这些作用是通过多巴胺 D1 受体 (dopamine D1 receptor, D1R) 介导的, 可能涉及 cAMP 介导的 HCN 通道的直接调节^[4]。考虑到 D1Rs 在浅层 PFC 的脊髓中广泛表达, DA 可能通过依赖 D1Rs 上调细胞内 cAMP 浓度来调节 PFC 中的 HCN 通道, 从而减少 PFC 神经元的放电, 损害工作记忆^[60]。

2.2.4 乙酰胆碱(acetylcholine, Ach)

神经系统中的 Ach 与许多生理功能相关, 如调节注意力和学习记忆、控制运动、增强感觉知觉、促进快速眼动 (rapid eye movement, REM) 睡眠等^[4,61]。它的作用是通过毒蕈碱样受体 (M 受体) 和烟碱样受体 (N 受体) 介导的。M 受体是 G 蛋白耦联受体, 有 5 种不同的亚型 (M1~5)。Ach 通过不同类型的 mAChRs 改变 I_h 的功能, 一般对 I_h 有抑制作用。早期研究报道, Ach 降低了啮齿类动物运动相关脊髓中间神经元的 I_h , 暗示运动系统可以用来限制某些神经元在运动中的参与^[62]。此外, Ach 能与 mAChRs 结合并耦联至 Gi 蛋白, 并且抑制 AC 活性, 从而降低 cAMP 水平, 导致 I_h 下调, 使运动相关神经元的兴奋性降低, 从而限制某些神经元参与运动^[63]。2016 年, 研究报道 Ach 通过阻断 HCN 通道来降低纹状体胆碱能中间神经元 (cholinergic interneurons, CHIs) 的放电频率, 从而调节纹状体投射神经元的输出, 参与运动调节^[64]。

2.2.5 嘌呤能神经递质

三磷酸腺苷 (adenosine triphosphate, ATP) 及其降解产物腺苷在某些突触中起神经递质的作用。ATP 的作用是通过 P2X 受体和 G 蛋白耦联 P2Y 受体介导的, 而腺苷则通过激活 G 蛋白耦联受体 (A1、A2a、A2b、A3) 作为抑制性神经调节剂^[65]。ATP

和腺苷通过调节神经系统 HCN 通道的活性,对神经元的兴奋性产生影响,并参与神经系统的广泛活动。ATP 通过 P2Y1 受体激活中脑三叉神经元上的 HCN 通道。实验显示, P2Y 受体激动剂 ADP- β -S 可增强中脑三叉神经元 I_h 通道的活性,其增强作用可被特异性 P2Y1 受体拮抗剂 MRS2179 所阻断^[66]。2018 年的研究发现,腺苷通过 A2a 受体增强大鼠颈动脉体化学感觉神经元的 I_h 电流,引起 I_h 激活曲线的去极化位移和放电频率的增加^[67]。

2.2.6 一氧化氮(nitric oxide, NO)

NO 是 CNS 中的一种气体神经递质,在突触前和突触后突触传递的调节中起重要作用。HCN 通道是舌下运动神经元、小脑深部神经元等 NO/cGMP 信号的潜在下游靶点^[4]。有实验证明,由于 HCN 通道激活的电压依赖性的去极化移动,NO 供体的应用可引起 I_h 幅度的可逆性增加。同时,研究还发现,NO 不仅依赖 cGMP 对 HCN 通道进行调节,还依赖 S-亚硝酸化^[68]。NO 与两个敏感的鸟苷酸环化酶 (guanylate cyclase, GC) 相互作用,随后导致细胞内 cGMP 的增加。NO/cGMP 信号通路通过介导对 HCN 通道的调控参与对突触传递的调节。海马 CA1 区神经元的电生理分析显示,敲除 NO-GC2 基因后 HCN 电流减少,激活曲线超极化移动,并伴随静息膜电位的降低^[69]。在海马 CA1 区敲除 NO-GC1 基因的小鼠中,细胞内 cGMP 产生减少,自发和诱发的谷氨酸释放减少,并诱导 I_h 的下调^[70-71]。

2.2.7 神经肽(neuropeptide, NP)

多种神经肽参与对 HCN 通道的调节,包括食欲素、阿片肽、神经肽 Y (neuropeptide Y, NPY)、神经降压素 (neurotensin, NT) 和 P 物质 (substance P, SP)、血管紧张素 II 等,其能通过抑制 AC 降低 cAMP 水平或通过磷脂酶 C (phospholipase C, PLC)-PKC 信号通路来降低 I_h ,从而调节 HCN 通道^[4]。实验显示,神经肽 S (neuropeptide S, NPS) 通过激活 NPS 受体抑制大鼠杏仁核 HCN 通道的 I_h 电流,在此过程中主要抑制 HCN1 介导的 I_h ; NPS 抑制的 I_h 电流刺激谷氨酸能驱动杏仁核内 GABA 能中间神经元快速放电,进而促进 GABA 释放到锥体样神经元^[72]。

3 HCN影响的下游信号

3.1 BDNF-mTOR

在神经元中,哺乳动物雷帕霉素靶蛋白 (mammalian target of rapamycin, mTOR) 存在于突触

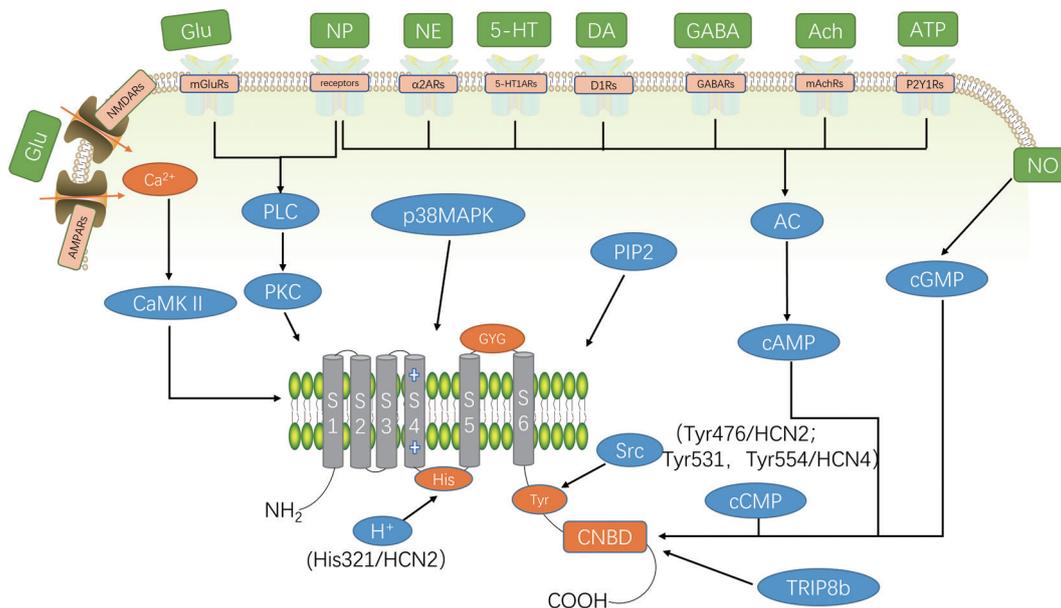
区域,是翻译能力的关键调节因子,能通过直接或间接磷酸化翻译相关蛋白因子来调节翻译及蛋白质合成,从而影响细胞生长、增殖和突触可塑性^[73-74]。mTOR 受神经元表面受体和通道 (包括 NMDAR 和 HCN1) 活性的影响,也是这些受体下游的汇聚节点^[75]。在抗抑郁模型中发现,海马 CA1 区敲除 HCN1 增强细胞兴奋性,上调脑源性神经营养因子 (brain derived neurotrophic factor, BDNF)-mTOR 信号,增强海马活性,从而诱导抗焦虑和抗抑郁行为^[76]。研究发现,HCN1 的功能和 BDNF 的表达可能参与创伤后应激障碍 (post-traumatic stress disorder, PTSD) 的发病。实验结果表明,HCN1 的抑制作用可能与上调 BDNF-mTOR 信号通路和突触传递有关^[75,77]。

3.2 T型Ca²⁺通道

HCN 通道是阈下电压门控离子通道,在海马和皮质锥体细胞树突中高表达,在调节突触电位整合和可塑性中发挥重要作用。HCN1 也在以小鼠内嗅皮层第三层锥体神经元为靶点的成熟的非对称突触终末的活动区表达。同时,HCN 通道通过抑制低阈值电压门控 T-(CaV 3.2) 型钙通道的活性来抑制突触释放 Glu^[78]。2017 年, Fan 等^[79] 研究发现,在小鼠脑或 TSA-201 细胞裂解液中 HCN1 与 Cav 3.2 共沉淀,HCN1 的 N 端与 Cav 3.2 的 N 端相连; Cav 3.2 通道活动似乎受 HCN1 的功能调节: HCN1 的表达导致 Cav 3.2 内向电流减少,同时通道动力学发生改变,激活门控发生去极化转变。同时,该研究强调了 HCN1 对 Cav 3.2 电压依赖性特性的调节作用,这些特性预计会影响突触传递和细胞兴奋性等生理功能。

3.3 淀粉样蛋白 β (amyloid- β , A β)

A β 的产生是阿尔茨海默病 (Alzheimer's disease, AD) 主要的致病因素之一。A β 是由跨膜淀粉样蛋白 β 前体蛋白 (amyloid- β precursor protein, APP) 被 β -分泌酶和 γ -分泌酶复合体顺序切割而产生的。 γ -分泌酶可以在两个位点中的任何一处裂解,形成两个不同长度的 A β , 包括 A β 40 和更具神经毒性的 A β 42^[14]。神经元活性的增加可以增强 A β 的产生。研究结果显示, Neuro2a (N2a) 细胞中过表达 HCN1 可减少 A β 的产生,而阻断 N2a 细胞中的 HCN1 通道活性可恢复 A β 的水平^[80]。Eslamizade 等^[81] 进一步观察到,将 A β 肽注射到额叶皮质的大鼠海马 CA1 锥体层中 HCN1 mRNA 上调,并且 I_h 电流密度增加,激活曲线向更小的负电位移动。



细胞内小分子、蛋白激酶、相互作用蛋白及神经递质(如Glu、GABA、Ach等)对HCN通道的调控。

图2 HCN通道的上游调控

4 总结与展望

HCN通道作为细胞信号的靶点,能精细地调节神经元对外界刺激的反应。许多细胞内分子,例如小分子(如cAMP、PIP2、质子)、蛋白激酶(如Src、p38 MAPK、CaMKII)和相互作用蛋白(如TRIP8b),影响HCN通道动力学及表面表达(图2)。此外,神经元的离子通道是其电生理活动的基础。在不同的生理条件下,HCN通道的表达和门控特性是多样化的,而这些差异则是由细胞外信号,如Glu、GABA、Ach等大量神经递质的调控导致的(图2)。同时,HCN通道功能障碍在癫痫、AD、情感障碍(焦虑、抑郁等)、神经病理性疼痛等疾病的发展中发挥重要的作用。例如,HCN1通过调节BDNF-mTOR信号通路,改善大鼠PTSD样行为;HCN1和HCN2通过调节Aβ的产生,与AD的发生发展密切相关;除此之外,海马背侧HCN1敲除的大鼠表现出抗抑郁和焦虑缓解类行为。因此,对HCN通道的调节可以为神经系统相关疾病提供新的治疗靶点。

尽管对HCN通道的结构分布、生理特性及其生理病理作用的研究已积累了大量信息,但目前大多数针对HCN的研究都是以临床前实验为主,因此在临床上开展对HCN的研究将是今后的重点。同时,以往的研究证实HCN通道的功能障碍与神经系统疾病关系密切,如在帕金森病等神经退行性

疾病和神经病理性疼痛等慢性病理条件的发病过程中发挥重要作用,然而,这些研究还不能明确HCN通道的功能障碍是导致这些疾病发展的原因还是结果。在未来,了解HCN通道如何决定或促进临床表型的发展将至关重要,以便调节其活动从而达到治疗的目的。

[参考文献]

- [1] Brown HF, DiFrancesco D, Noble SJ. How does adrenaline accelerate the heart? *Nature*, 1979, 280: 235-6
- [2] Halliwell JV, Adams PR. Voltage-clamp analysis of muscarinic excitation in hippocampal neurons. *Brain Res*, 1982, 250: 71-92
- [3] Biel M, Wahl-Schott C, Michalakis S, et al. Hyperpolarization-activated cation channels: from genes to function. *Physiol Rev*, 2009, 89: 847-85
- [4] He C, Chen F, Li B, et al. Neurophysiology of HCN channels: from cellular functions to multiple regulations. *Prog Neurobiol*, 2014, 112: 1-23
- [5] Zhong P, Vickstrom CR, Liu X, et al. HCN2 channels in the ventral tegmental area regulate behavioral responses to chronic stress. *Elife*, 2018, 7
- [6] Benarroch EE. HCN channels: function and clinical implications. *Neurology*, 2013, 80: 304-10
- [7] Ding W, You Z, Shen S, et al. Increased HCN channel activity in the gasserian ganglion contributes to trigeminal neuropathic pain. *J Pain*, 2018, 19: 626-34
- [8] Santoro B, Shah MM. Hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channels as drug targets for neurological disorders. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 2020, 60: 109-31
- [9] Kharouf Q, Phillips AM, Bleakley LE, et al. The

- hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated 4 channel as a potential anti-seizure drug target. *Br J Pharmacol*, 2020, 177: 3712-29
- [10] Rivolta I, Binda A, Masi A, et al. Cardiac and neuronal HCN channelopathies. *Pflugers Arch*, 2020, 472: 931-51
- [11] He JT, Li XY, Zhao X, et al. Hyperpolarization-activated and cyclic nucleotide-gated channel proteins as emerging new targets in neuropathic pain. *Rev Neurosci*, 2019, 30: 639-49
- [12] Emery EC, Young GT, Berrocoso EM, et al. HCN2 ion channels play a central role in inflammatory and neuropathic pain. *Science*, 2011, 333: 1462-6
- [13] DiFrancesco JC, DiFrancesco D. Dysfunctional HCN ion channels in neurological diseases. *Front Cell Neurosci*, 2015, 6: 174
- [14] Chang X, Wang J, Jiang H, et al. Hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channels: an emerging role in neurodegenerative diseases. *Front Mol Neurosci*, 2019, 12: 141
- [15] Fala L. Corlanor (Ivabradine), first HCN channel blocker, FDA approved for the treatment of patients with heart failure. *Am Health Drug Benefits*, 2016, 9: 56-9
- [16] Wahl-Schott C, Biel M. HCN channels: structure, cellular regulation and physiological function. *Cell Mol Life Sci*, 2009, 66: 470-94
- [17] Macri V, Angoli D, Accili EA. Architecture of the HCN selectivity filter and control of cation permeation. *Sci Rep*, 2012, 2: 894
- [18] Much B, Wahl-Schott C, Zong X, et al. Role of subunit heteromerization and N-linked glycosylation in the formation of functional hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channels. *J Biol Chem*, 2003, 278: 43781-6
- [19] Sartiani L, Mannaioni G, Masi A, et al. The hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channels: from biophysics to pharmacology of a unique family of ion channels. *Pharmacol Rev*, 2017, 69: 354-95
- [20] Lee CH, MacKinnon R. Structures of the human HCN1 hyperpolarization-activated channel. *Cell*, 2017, 168: 111-20
- [21] Notomi T, Shigemoto R. Immunohistochemical localization of Ih channel subunits, HCN1-4, in the rat brain. *J Comp Neurol*, 2004, 471: 241-76
- [22] Milligan CJ, Edwards IJ, Deuchars J. HCN1 ion channel immunoreactivity in spinal cord and medulla oblongata. *Brain Res*, 2006, 1081: 79-91
- [23] Dini L, Del Lungo M, Resta F, et al. Selective blockade of HCN1/HCN2 channels as a potential pharmacological strategy against pain. *Front Pharmacol*, 2018, 9: 1252
- [24] Patra C, Foster K, Corley JE, et al. *Biochemistry, cAMP [M]*. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing, 2022
- [25] Ma Y, Chen J, Yu D, et al. cAMP-PKA signaling is involved in regulation of spinal HCN channels function in diabetic neuropathic pain. *Neurosci Lett*, 2021, 750: 135763
- [26] Datunashvili M, Chaudhary R, Zobeiri M, et al. Modulation of hyperpolarization-activated inward current and thalamic activity modes by different cyclic nucleotides. *Front Cell Neurosci*, 2018, 12: 369
- [27] Mandal K. Review of PIP2 in cellular signaling, functions and diseases. *Int J Mol Sci*, 2020, 21
- [28] Rodriguez-Menchaca AA, Adney SK, Zhou L, et al. Dual regulation of voltage-sensitive ion channels by PIP2. *Front Pharmacol*, 2012, 3: 170
- [29] Ying SW, Tibbs GR, Picollo A, et al. PIP2-mediated HCN3 channel gating is crucial for rhythmic burst firing in thalamic intergeniculate leaflet neurons. *J Neurosci*, 2011, 31: 10412-23
- [30] Mistrík P, Pfeifer A, Biel M. The enhancement of HCN channel instantaneous current facilitated by slow deactivation is regulated by intracellular chloride concentration. *Pflugers Arch*, 2006, 452: 718-27
- [31] DiFrancesco JC, Castellotti B, Milanese R, et al. HCN ion channels and accessory proteins in epilepsy: genetic analysis of a large cohort of patients and review of the literature. *Epilepsy Res*, 2019, 153: 49-58
- [32] Brandt MC, Endres-Becker J, Zagidullin N, et al. Effects of KCNE2 on HCN isoforms: distinct modulation of membrane expression and single channel properties. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2009, 297: H355-63
- [33] Barbuti A, Scavone A, Mazzocchi N, et al. A caveolin-binding domain in the HCN4 channels mediates functional interaction with caveolin proteins. *J Mol Cell Cardiol*, 2012, 53: 187-95
- [34] Lewis AS, Schwartz E, Chan CS, et al. Alternatively spliced isoforms of TRIP8b differentially control h channel trafficking and function. *J Neurosci*, 2009, 29: 6250-65
- [35] Han Y, Lyman KA, Foote KM, et al. The structure and function of TRIP8b, an auxiliary subunit of hyperpolarization-activated cyclic-nucleotide gated channels. *Channels (Austin)*, 2020, 14: 110-22
- [36] Santoro B, Piskorowski RA, Pian P, et al. TRIP8b splice variants form a family of auxiliary subunits that regulate gating and trafficking of HCN channels in the brain. *Neuron*, 2009, 62: 802-13
- [37] Zolles G, Wenzel D, Bildl W, et al. Association with the auxiliary subunit PEX5R/Trip8b controls responsiveness of HCN channels to cAMP and adrenergic stimulation. *Neuron*, 2009, 62: 814-25
- [38] Santoro B, Hu L, Liu H, et al. TRIP8b regulates HCN1 channel trafficking and gating through two distinct C-terminal interaction sites. *J Neurosci*, 2011, 31: 4074-86
- [39] Li CJ, Lu Y, Zhou M, et al. Activation of GABAB receptors ameliorates cognitive impairment via restoring the balance of HCN1/HCN2 surface expression in the hippocampal CA1 area in rats with chronic cerebral hypoperfusion. *Mol Neurobiol*, 2014, 50: 704-20
- [40] Lewis AS, Vaidya SP, Blaiss CA, et al. Deletion of the hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channel auxiliary subunit TRIP8b impairs hippocampal Ih localization and function and promotes antidepressant behavior in mice. *J Neurosci*, 2011, 31: 7424-40
- [41] Zong X, Eckert C, Yuan H, et al. A novel mechanism of

- modulation of hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channels by Src kinase. *J Biol Chem*, 2005, 280: 34224-32
- [42] Li CH, Zhang Q, Teng B, et al. Src tyrosine kinase alters gating of hyperpolarization-activated HCN4 pacemaker channel through Tyr531. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2008, 294: C355-62
- [43] Poolos NP, Bullis JB, Roth MK. Modulation of h-channels in hippocampal pyramidal neurons by p38 mitogen-activated protein kinase. *J Neurosci*, 2006, 26: 7995-8003
- [44] Jung S, Bullis JB, Lau IH, et al. Downregulation of dendritic HCN channel gating in epilepsy is mediated by altered phosphorylation signaling. *J Neurosci*, 2010, 30: 6678-88
- [45] Reetz O, Strauss U. Protein kinase C activation inhibits rat and human hyperpolarization activated cyclic nucleotide gated channel (HCN)1--mediated current in mammalian cells. *Cell Physiol Biochem*, 2013, 31: 532-41
- [46] Williams AD, Jung S, Poolos NP. Protein kinase C bidirectionally modulates Ih and hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated (HCN) channel surface expression in hippocampal pyramidal neurons. *J Physiol*, 2015, 593: 2779-92
- [47] Shin M, Chetkovich DM. Activity-dependent regulation of h channel distribution in hippocampal CA1 pyramidal neurons. *J Biol Chem*, 2007, 282: 33168-80
- [48] Noam Y, Zha Q, Phan L, et al. Trafficking and surface expression of hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channels in hippocampal neurons. *J Biol Chem*, 2010, 285: 14724-36
- [49] Liu X, Zhang L, Jin L, et al. HCN2 contributes to oxaliplatin-induced neuropathic pain through activation of the CaMKII/CREB cascade in spinal neurons. *Mol Pain*, 2018, 14: 1744806918778490
- [50] Gao SH, Wen HZ, Shen LL, et al. Activation of mGluR1 contributes to neuronal hyperexcitability in the rat anterior cingulate cortex via inhibition of HCN channels. *Neuropharmacology*, 2016, 105: 361-77
- [51] Fritzius T, Stawarski M, Isogai S, et al. Structural basis of GABAB receptor regulation and signaling. *Curr Top Behav Neurosci*, 2020
- [52] Luo P, Chen C, Lu Y, et al. Baclofen ameliorates spatial working memory impairments induced by chronic cerebral hypoperfusion via up-regulation of HCN2 expression in the PFC in rats. *Behav Brain Res*, 2016, 308: 6-13
- [53] Wang M, Ramos BP, Paspalas CD, et al. α 2A-adrenoceptors strengthen working memory networks by inhibiting cAMP-HCN channel signaling in prefrontal cortex. *Cell*, 2007, 129: 397-410
- [54] Yang YC, Meng QT, Pan X, et al. Dexmedetomidine produced analgesic effect via inhibition of HCN currents. *Eur J Pharmacol*, 2014, 740: 560-4
- [55] Polter AM, Li X. 5-HT1A receptor-regulated signal transduction pathways in brain. *Cell Signal*, 2010, 22: 1406-12
- [56] Bockaert J, Claeysen S, Bécamel C, et al. Neuronal 5-HT metabotropic receptors: fine-tuning of their structure, signaling, and roles in synaptic modulation. *Cell Tissue Res*, 2006, 326: 553-72
- [57] Schoeffter P, Hoyer D. Centrally acting hypotensive agents with affinity for 5-HT1A binding sites inhibit forskolin-stimulated adenylate cyclase activity in calf hippocampus. *Br J Pharmacol*, 1988, 95: 975-85
- [58] Ko KW, Rasband MN, Meseguer V, et al. Serotonin modulates spike probability in the axon initial segment through HCN channels. *Nat Neurosci*, 2016, 19: 826-34
- [59] Tang ZQ, Trussell LO. Serotonergic regulation of excitability of principal cells of the dorsal cochlear nucleus. *J Neurosci*, 2015, 35: 4540-51
- [60] Gamo NJ, Lur G, Higley MJ, et al. Stress impairs prefrontal cortical function via D1 dopamine receptor interactions with hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channels. *Biol Psychiatry*, 2015, 78: 860-70
- [61] Haam J, Yakel JL. Cholinergic modulation of the hippocampal region and memory function. *J Neurochem*, 2017, 142: 111-21
- [62] Dai Y, Jordan LM. Multiple effects of serotonin and acetylcholine on hyperpolarization-activated inward current in locomotor activity-related neurons in Cfos-EGFP mice. *J Neurophysiol*, 2010, 104: 366-81
- [63] Heys JG, Giocomo LM, Hasselmo ME. Cholinergic modulation of the resonance properties of stellate cells in layer II of medial entorhinal cortex. *J Neurophysiol*, 2010, 104: 258-70
- [64] Zhao Z, Zhang K, Liu X, et al. Involvement of HCN channel in muscarinic inhibitory action on tonic firing of dorsolateral striatal cholinergic interneurons. *Front Cell Neurosci*, 2016, 10: 71
- [65] Jacobson KA, Müller CE. Medicinal chemistry of adenosine, P2Y and P2X receptors. *Neuropharmacology*, 2016, 104: 31-49
- [66] Huang W, Xiu Y, Yan JA, et al. Facilitation of Ih channels by P2Y1 receptors activation in mesencephalic trigeminal neurons. *Neurosci Lett*, 2010, 482: 156-9
- [67] Zhang M, Vollmer C, Nurse CA. Adenosine and dopamine oppositely modulate a hyperpolarization-activated current I(h) in chemosensory neurons of the rat carotid body in co-culture. *J Physiol*, 2018, 596: 3101-17
- [68] Wenker IC, Benoit JP, Chen X, et al. Nitric oxide activates hypoglossal motoneurons by cGMP-dependent inhibition of TASK channels and cGMP-independent activation of HCN channels. *J Neurophysiol*, 2012, 107: 1489-99
- [69] Neitz A, Mergia E, Imbrosci B, et al. Postsynaptic NO/cGMP increases NMDA receptor currents via hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channels in the hippocampus. *Cereb Cortex*, 2014, 24: 1923-36
- [70] Wang Q, Mergia E, Koesling D, et al. Nitric oxide/cGMP signaling via guanylyl cyclase isoform 1 modulates glutamate and GABA release in somatosensory cortex of mice. *Neuroscience*, 2017, 360: 180-9
- [71] Neitz A, Mergia E, Eysel UT, et al. Presynaptic nitric oxide/cGMP facilitates glutamate release via hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated

- channels in the hippocampus. *Eur J Neurosci*, 2011, 33: 1611-21
- [72] Zhang S, You Z, Wang S, et al. Neuropeptide S modulates the amygdaloidal HCN activities (Ih) in rats: Implication in chronic pain. *Neuropharmacology*, 2016, 105: 420-33
- [73] Tang SJ, Reis G, Kang H, et al. A rapamycin-sensitive signaling pathway contributes to long-term synaptic plasticity in the hippocampus. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 99: 467-72
- [74] Slipczuk L, Bekinschtein P, Katche C, et al. BDNF activates mTOR to regulate GluR1 expression required for memory formation. *PLoS One*, 2009, 4: e6007
- [75] Ni L, Xu Y, Dong S, et al. The potential role of the HCN1 ion channel and BDNF-mTOR signaling pathways and synaptic transmission in the alleviation of PTSD. *Transl Psychiatry*, 2020, 10: 101
- [76] Kim CS, Chang PY, Johnston D. Enhancement of dorsal hippocampal activity by knockdown of HCN1 channels leads to anxiolytic- and antidepressant-like behaviors. *Neuron*, 2012, 75: 503-16
- [77] Hou L, Qi Y, Sun H, et al. Applying ketamine to alleviate the PTSD-like effects by regulating the HCN1-related BDNF. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 2018, 86: 313-21
- [78] Huang Z, Lujan R, Kadurin I, et al. Presynaptic HCN1 channels regulate Cav3.2 activity and neurotransmission at select cortical synapses. *Nat Neurosci*, 2011, 14: 478-86
- [79] Fan J, Gandini MA, Zhang FX, et al. Down-regulation of T-type Cav3.2 channels by hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channel 1 (HCN1): Evidence of a signaling complex. *Channels (Austin)*, 2017, 11: 434-43
- [80] Saito Y, Inoue T, Zhu G, et al. Hyperpolarization-activated cyclic nucleotide gated channels: a potential molecular link between epileptic seizures and A β generation in Alzheimer's disease. *Mol Neurodegener*, 2012, 7: 50
- [81] Eslamizade MJ, Saffarzadeh F, Mousavi SM, et al. Alterations in CA1 pyramidal neuronal intrinsic excitability mediated by Ih channel currents in a rat model of amyloid β pathology. *Neuroscience*, 2015, 305: 279-92