

TRPC6 与肾脏疾病

匡新宇 综述 黄文彦 审校

(复旦大学附属儿科医院肾内科, 上海 200032)

[摘要] 瞬时受体电位阳离子通道(transient receptor potential channel, TRPC)作为瞬时受体电位(transient receptor potential, TRP)超家族中的一员,是一种非选择性的离子通道,在人体的各种组织、器官和细胞中均有表达。TRPC6 基因突变致局灶节段性肾小球硬化(focal segmental glomerulosclerosis, FSGS),从而揭示了 TRPC 通道,尤其 TRPC6 与肾脏疾病的密切关系。TRPC6 突变可引起细胞内钙离子浓度升高,也可直接影响肌动蛋白细胞支架组织,这些都是导致肾脏疾病的机制。

[关键词] TRPC6; 肾脏; 足细胞; 蛋白尿; 局灶节段性肾小球硬化

[中图分类号] R692 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1673-2588(2008)05-0456-05

TRPC6 and kidney diseases

KUANG Xin-yu, HUANG Wen-yan

(Children's Hospital of Fudan University, Shanghai 200032, China)

[Abstract] Transient receptor potential channel (TRPC), which is one of the members of transient receptor potential (TRP) channel, is a nonselective ion channel. It generally distributes in human body, including nervous system, immune system, kidney, lung, spleen, smooth muscle and so on. The mutation of TRPC6 could result in focal segmental glomerulosclerosis (FSGS), and this suggest a close correlation between TRPC6 and kidney diseases. The mutation of TRPC6 could elevate the intracellular Ca^{2+} concentrations and could directly affect cytoskeletal organization in podocytes.

[Key words] transient receptor potential channel 6; kidney; podocyte; proteinuria; focal segmental glomerulosclerosis

[Int J Pathol Clin Med, 2008,28(5):0456-05]

1 TRPC 家族

瞬时受体电位阳离子通道(transient receptor potential channel, TRPC)与 TRPV, TRPA, TRPM, TRPP, TRPML 通道一起组成瞬时受体电位(transient receptor potential, TRP)超家族。从 1995 年首次发现^[1]至今,人们已经发现 TRPC 通道在神经系统、免疫系统、血液循环系统、肾脏、肺脏、脾脏、卵巢和平滑肌等多个系统和组织器官中均有表达^[2-7]。哺乳动物 TRPC 家族共有 7 个成员,包括 TRPC1~7,根据其结构与功能的相似度和相近性,可分为 4 个亚

家族,分别是:TRPC1, TRPC2, TRPC3, 6, 7 和 TRPC4, 5^[8]。在人类,TRPC2 为假基因,TRPC4, 5(有时 TRPC1 也包含在此组中)的氨基酸序列有 65% 的相近性,而 TRPC3, 6, 7 的氨基酸序列则有 80%~90% 的相近性^[9-10]。

TRPC 基因的表达产物 TRPC 蛋白间相互结合,形成同型或异型四聚体,组成一组非选择性离子通道,钠离子和钙离子均可经由此通道进入细胞内。在 TRPC3, 6, 7 亚家族中,钙离子和钠离子通透的比值为 1.5~6:1。TRPC 通道在钙离子信号转导中起

收稿日期:2008-06-15 修回日期:2008-07-06

作者简介:匡新宇(1983-),女,山东青岛人,硕士研究生,主要从事激素耐药性肾病综合征基础与临床研究。

基金项目:上海市卫生局科研项目(2007-138) This work was supported by the scientific research item of Shanghai Health Bureau of P. R. China (2007-138)

重要作用^[8,11-12]。在细胞内,TRPC 各家族成员位于脂质层,其中 TRPC3,5,6 位于细胞内流动的囊泡中,一旦细胞受到刺激,它们就会移动到质膜上发挥作用。研究发现^[13],TRPC 通道可与内质网、细胞骨架结构相互作用,因此,TRPC 通道的异常必然会引起人类的各种疾病。

2 TRPC6 的结构与功能

人类 TRPC6 基因定位于常染色体 11q21-22,共有 13 个外显子,其表达产物 TRPC6 蛋白编码 931 个氨基酸^[6,14]。在 TRPC 家族中,各成员有相似的拓扑结构,即细胞质内 N 端和 C 端之间被分为 6 个跨膜区,在第 1 和第 2 跨膜区的细胞外结构中有一个糖基化位点(Asn473,Asn561),此结构对 TRPC6 的受体介导作用非常重要^[6],并且在第 5 和第 6 跨膜区之间有一个假定的小孔区域^[15]。细胞质内 N 端有 3 个结构组成,分别有 4 个锚蛋白重复序列相连,1 个卷曲螺旋区(coiled-coil,CC)和 1 个小窝结合蛋白区(caveolin-binding region);C 端也有 3 个结构组成,一个是高度保守的 TRP 结构域,内有 EWKFAR 基序和其后的一段富含脯氨酸的区域,一个是钙调蛋白/三磷酸肌醇受体结合域(calmodulin/IP3 receptor binding,CIRB),还有一段卷曲螺旋区。

对 TRPC6 位点定向突变的研究表明^[7],小孔区域的表达异常不仅导致 TRPC6 通道的完全失活,还会出现一种负性优势作用,即在一个同型或异型的四聚体通道中,只要有一个单体产生突变,就会使整个通道受到影响^[7]。最近的研究发现^[6],第 2 个锚蛋白重复序列可与发动蛋白超家族的 MxA 相互作用,MxA 可通过鸟苷三磷酸(guanosine triphosphate,GTP)依赖的途径增强 TRPC6 活性。

TRPC6 蛋白通常可相互结合形成同型四聚体通道,或与同在一个亚家族的 TRPC3,TRPC7 形成异型四聚体通道^[6],而在 HEK293 细胞和鼠胚胎脑细胞中 TRPC6 还可与 TRPC1,4,5 形成复合体,且这一复合体在成年鼠脑组织中消失^[16]。Lepage 等^[17]研究发现,TRPC 蛋白的相互结合主要通过两个结合域,第 1 个结合域位于氨基端,包括 N 端的锚蛋白重复序列和卷曲螺旋区;第 2 个结合域位于羧基端,围绕小窝结合蛋白区由第 4,5 跨膜区和 C 端的卷曲螺旋区组成。

Winn 等^[18]利用免疫荧光首次发现 TRPC6 在正常人肾小球和肾小管均有明显表达;Reiser 等^[11]通

过激光共聚焦进一步证实 TRPC6 广泛分布于肾小球和肾小管,而在肾小球中,TRPC6 蛋白主要表达于足细胞,肾小球内皮细胞仅见少量表达。Möller 等^[19]通过免疫荧光发现 TRPC6 在正常人肾组织中遍布整个肾小球,尤其在毛细血管袢外周表达更强。以上结果提示 TRPC6 为重要的足细胞膜蛋白之一。进一步通过免疫金标记发现 TRPC6 主要分布于足细胞胞体,尤其在临近裂隙膜的足细胞足突表达更强;而且 TRPC6 与 nephrin, podocin, CD2AP 等其他足细胞骨架蛋白共同表达于相邻两个足细胞膜接合区域^[11,20]。Nephrin, podocin 和 CD2AP 是足细胞足突和裂隙膜的重要骨架蛋白质,其分布和功能异常与蛋白尿性肾小球疾病密切相关^[3,11,20]。免疫共沉淀证实,TRPC6 可与 nephrin, podocin, CD2AP 等蛋白相互作用;破坏敲除了 nephrin 的小鼠的裂隙膜结构,可使足细胞上的 TRPC6 过表达并且分布错乱^[21],说明 TRPC6 可能和它们一起组成裂隙膜上的一个信号复合体,共同调节足细胞的功能。

3 TRPC6 基因突变与肾脏疾病的关系

2005 年,Winn 等^[18]首次报道 TRPC6 通道位于肾小球足细胞,是裂隙膜的重要组成部分,编码足细胞结构蛋白,其基因突变产物可导致大量蛋白尿,从而引起局灶节段性肾小球硬化(FSGS)和进行性肾衰竭。Möller 等^[19]发现在人类非遗传性蛋白尿性肾脏疾病如 FSGS、微小病变性肾病(minimal-change disease,MCD)和膜性肾病(membranous glomerulonephritis,MN)患者中,TRPC6 表达显著增加,并且成群分布,有节段性密集性。通过 FLAG 标记技术将 TRPC6 基因转染到小鼠肾脏,发现 TRPC6 主要分布于足细胞足突并紧邻裂隙膜,并且 15 h 后,小鼠产生一过性蛋白尿^[19],说明过度表达 TRPC6 同样可引起蛋白尿。

足细胞是一种高度特异性,终末分化的上皮细胞,在其分化的成熟阶段,足突与足突相接形成裂隙膜^[22]。裂隙膜与基底膜和肾小球内皮细胞共同组成肾小球滤过膜,它可以阻止大分子蛋白质从毛细血管中透过,在滤过膜的选择渗透作用中起决定作用^[23]。FSGS 是一种常见的肾小球疾病,人群发生率约为百万分之二^[24],组织病理学上表现为部分肾小球硬化,其临床特征为大量蛋白尿、肾病综合征和进行性肾功能不全。FSGS 约占激素耐药性肾病综合征儿童的 7%~15%,而占成人激素耐药性肾

病综合征的15%~20%;且分别占儿童终末期肾病(end-stage renal disease, ESRD)的20%和成人ESRD的5%^[25-27]。

4 TRPC6 突变致肾脏疾病的可能机制

4.1 TRPC6 突变 TRPC6 突变有6种,分别为P112Q, N143S, S270T, R875C, E897K, K874X^[6,11,18]。这些突变均可导致氨基酸置换。P112Q是第2外显子错义突变(C335A),即位于TRPC6蛋白第2个锚蛋白重复序列P112Q段谷氨酰胺替代了脯氨酸^[18];N143S和S270T突变也发生在第2外显子,K874X突变发生在第12外显子,R895C和E897K突变则发生在第13外显子^[11],E897K还可使近C端产生一个未成熟的终止密码子^[6]。

4.2 TRPC6 导致肾脏疾病的可能机制

4.2.1 TRPC6 突变使细胞内钙离子浓度升高

TRPC6 突变引起肾小球疾病的机制可能是足细胞裂隙膜钙内流增加而使细胞内钙离子浓度增高。在静止的细胞内, Ca^{2+} 进入细胞内受到两种机制控制,一是受体介导的钙离子内流(receptor-operated calcium entry, ROCE),另一种是钙池调控钙离子内流(store-operated calcium entry, SOCE),当位于内质网上的钙池为空的时候,钙离子由质膜上一个特殊的通道进入,从而使钙内流增加,即钙池调控钙离子通道起作用^[28]。SOCE通道由Orai蛋白和TRPC通道共同组成^[27],内质网钙池排空可使其激活,如胡萝卜素可抑制内质网钙泵引起钙池被动性排空,从而激活SOCE通道;基质作用分子-1(STIM1)也是激活SOC通道的一个重要因子^[28]。ROCE的发生需要TRPC通道和SOCE通道的激活,当它们激活时可刺激其下游受体-G蛋白-磷脂酶-C信号通路,从而使得钙离子内流,而且这一方式不依赖于钙池的排空^[29]。

TRPC6 诱导细胞内钙内流增加的机制主要有2种:首先是二酰甘油(diacylglycerol, DAG)直接作用于TRPC6通道,它经由蛋白激酶-C(protein kinase C, PKC)依赖机制使细胞内钙离子浓度升高,从而调节TRPC6通道的活性^[30]。DAG是TRPC6强有力的激活物,DAG的类似物OAG(1-oleoyl-2-acetyl-sn-glycerol)可使转染了P112Q突变型(TRPC6^{P112Q})人胚肾细胞(human embryonic kidney cells, HEK293)中的 Ca^{2+} 浓度显著升高^[18]。但也有研究发

现^[10,28],在HEK细胞中仅DAG不足以激活TRPC6通道,还需要其他受体协同作用,如卡巴胆碱(carbachol, CCh), CCh可能通过细胞外排机制作用于TRPC6通道,并且其作用具有剂量和时间依赖性。其次是PLC依赖机制。在许多蛋白尿性的肾脏疾病(包括FSGS)的发生发展过程中,血管紧张素II及其受体AT1起重要作用。AT1与异源三聚体鸟嘌呤核苷酸结合蛋白(G蛋白)结合,激活磷脂酶C- β 亚型(PLC- β),水解4,5-二磷酸磷脂酰肌醇(PIP2),这一过程产生了1,4,5-三磷酸肌醇(InsP3),随之DAG打开钙池,钙离子内流使胞内钙离子浓度明显升高。血管紧张素II可使转染了TRPC6^{P112Q}·HEK293细胞中的钙离子浓度显著增高,说明TRPC6^{P112Q}突变加强了其对G蛋白激动剂如血管紧张素II的反应,使钙内流增加^[18]。

细胞内钙离子浓度与细胞损伤密切相关,如果钙离子浓度增高,将会启动细胞凋亡机制^[31]。足细胞内钙离子浓度增加可使足细胞凋亡、分离和足细胞增生性缺失,从而减少足细胞的数量,其数量的减少将导致进行性肾功能衰竭^[20];同时,TRPC6^{P112Q}突变使细胞内钙内流增加,改变了足细胞足突的收缩结构,破坏了肾小球的动态平衡,从而使肾小球滤过系数发生变化,并最终导致蛋白尿的发生^[11,31]。

4.2.2 直接影响肌动蛋白细胞支架 肌动蛋白细胞支架对正常的足细胞功能十分重要,TRP通道与肌动蛋白细胞支架密切相关。在体外培养的足细胞中加入细胞松弛素D(cytochalasin D)使丝状肌动蛋白(F-actin)解聚合,发现TRPC6在细胞膜上重新分布,如果移除细胞松弛素D,TRPC6则恢复初始位置。将绿色荧光蛋白标记的TRPC6加入培养的足细胞中,发现表达GFP-TRPC6的细胞中缺乏肌动蛋白张力丝,而没有加入TRPC6的对照组细胞中存在肌动蛋白张力丝。说明TRPC6与足细胞肌动蛋白骨架分子相关,并且可直接影响这些细胞骨架的组织。TRPC6表达增加可致足细胞肌动蛋白骨架分子重排和钙离子重新分布^[19]。

4.2.3 组成机械敏感性钙离子通道 TRPC1和TRPC6是哺乳动物压力激活的机械敏感性钙离子通道(mammalian stretch-activated mechano-sensitive Ca^{2+} permeable cation channel, MscCa)的组成部分。起初,人们认为MscCa是由细胞骨架(cytoskeleton, CSK)获得的压力敏感性,但是在缺乏细胞骨架的囊

泡和脂质层中也存在 MscCa 的活动,说明脂质双分子层内的压力能够控制这一通道。人 TRPC1 的表达可上调 MscCa,同时,抗人 TRPC1 抗体可降低内生的或基底卵母细胞通道的活性,过表达人 TRPC1 还可上调 CHO (Chinese hamster ovary) 细胞中 MscCa 的活性。进一步研究提示 TRPC1 在血管平滑肌不是张力激活的或是钙池介导的离子通道的必要组成成分,因为 TRPC1 敲除的小鼠没有明显的表型改变^[32]。Spasova 等^[33]发现 TRPC6 是一个机械和渗透作用诱导的膜牵张反应,可能与 MscCa 作用相同,并且这种压力诱导的 TRPC6 活化不依赖于磷脂酶-C。提示 TRPC6 突变可以改变静水压驱动的超滤作用,从而引起蛋白尿和肾小球硬化。

5 展望

TRPC6 为重要的足细胞膜蛋白并在维系足细胞正常生物学功能中发挥重要作用。TRPC6 基因突变致其蛋白表达和分布异常可能参与了某些肾脏疾病,尤其蛋白尿发生发展过程,然而有关 TRPC6 在肾脏疾病的作用、参与蛋白尿形成的机制、与其他足细胞骨架分子的关系等诸多问题尚有待进一步阐明。

由于 TRPC6 可能主要通过调控钙离子内流而影响足细胞功能,而 DAG 可直接作用于 TRPC6 通道,使细胞内钙离子浓度升高,所以有理由认为 DAG,TRPC6 下游信号通路分子如 IP3 受体等可能作为一个新的治疗靶点治疗 TRPC6 基因突变蛋白尿病例;同时,由于 CaM 和 IP3 的结合位点重叠且与内质网钙池密切相关,也可通过干扰内质网上钙池的充盈来调节 TRPC 通道的活性^[34],这些都为 TRPC6 相关性蛋白尿采用 ACEI,ARB 等肾素-血管紧张素系统阻断剂,环孢霉素,FK506 等钙离子通道下游信号通路抑制剂治疗该类疾病提供依据。通过测定激素耐药性或者蛋白尿病人 TRPC6 基因并及早发现和了解其基因多态性将为临床深入研究和治疗该类疾病提供依据。

参 考 文 献

- [1] Li S, Gosling M, Poll C. Determining the functional role of TRPC channels in primary cells[J]. *Pflügers Arch*, 2005, 451(1):43-52.
- [2] Glazebrook PA, Schilling WP, Kunze DL. TRPC channels as signal transducers[J]. *Pflügers Arch*, 2005, 451(1):125-130.
- [3] Hsu YJ, Hoenderop JG, Bindels RJ. TRP channels in kidney disease[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2007, 1772(8):928-936.
- [4] Weissmann N, Dietrich A, Fuchs B, et al. Classical transient receptor potential channel 6 (TRPC6) is essential for hypoxic pulmonary vasoconstriction and alveolar gas exchange [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103(50):19093-190938.
- [5] Bae YM, Kim A, Lee YJ, et al. Enhancement of receptor-operated cation current and TRPC6 expression in arterial smooth muscle cells of deoxycorticosterone acetate-salt hypertensive rats[J]. *J Hypertens*, 2007, 25(4):809-817.
- [6] Dietrich A, Gudermann T. TRPC6[J]. *Handb Exp Pharmacol*, 2007, (179):125-141.
- [7] Dietrich A, Kalwa H, Rost BR, et al. The diacylglycerol-sensitive TRPC3/6/7 subfamily of cation channels: functional characterization and physiological relevance [J]. *Pflügers Arch*, 2005, 451(1):72-80.
- [8] Winn MP, Daskalakis N, Spurney RF, et al. Unexpected role of TRPC6 channel in familial nephrotic syndrome; does it have clinical implications? [J]. *J Am Soc Nephrol*, 2006, 17(2):378-387.
- [9] Plant TD, Schaefer M. TRPC4 and TRPC5 receptor-operated Ca²⁺-permeable nonselective cation channels [J]. *Cell Calcium*, 2003, 33(5-6):441-450.
- [10] Cayouette S, Lussier MP, Mathieu EL, et al. Exocytotic insertion of TRPC6 channel into the plasma membrane upon Gq protein-coupled receptor activation [J]. *J Biol Chem*, 2004, 279(8):7241-7246.
- [11] Reiser J, Polu KR, Möller CC, et al. TRPC6 is a glomerular slit diaphragm-associated channel required for normal renal function [J]. *Nat Genet*, 2005, 37(7):739-744.
- [12] Goel M, Sinkins WG, Zuo CD, et al. Identification and localization of TRPC channels in the rat kidney [J]. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2006, 290(5):F1241-1252.
- [13] Lockwich T, Pant J, Makusky A, et al. Analysis of TRPC3-interacting proteins by tandem mass spectrometry [J]. *J Proteome Res*, 2008, 7(3):979-989.
- [14] D'Esposito M, Strazzullo M, Cuccurese M, et al. Identification and assignment of the human transient receptor potential channel 6 gene TRPC6 to chromosome 11q21→q22 [J]. *Cytogenet Cell Genet*, 1998, 83(1-2):46-47.
- [15] Vazquez G, Wedel BJ, Aziz O, et al. The mammalian TRPC cation channels [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2004, 1742(1-3):21-36.
- [16] Strübing C, Krapivinsky G, Krapivinsky L, et al. Formation of novel TRPC channels by complex subunit interactions in embryonic brain [J]. *J Biol Chem*, 2003, 278(40):39014-39019.
- [17] Lepage PK, Lussier MP, Barajas-Martinez H, et al. Identification of two domains involved in the assembly of transient receptor potential canonical channels [J]. *J Biol Chem*, 2006, 281(41):30356-30364.
- [18] Winn MP, Conlon PJ, Lynn KL, et al. A mutation in the trpc6 cation channel causes familial focal segmental glomerulosclerosis [J]. *Science*, 2005, 308(5729):1801-1804.

- [19] Möller CC, Wei C, Altintas MM, et al. Induction of TRPC6 channel in acquired forms of proteinuric kidney disease[J]. *J Am Soc Nephrol*, 2007, 18(1):29-36.
- [20] Mukerji N, Damodaran TV, Winn MP. TRPC6 and FSGS; the latest TRP channelopathy[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2007, 1772(8):859-868.
- [21] Gudermann T. A new TRP to kidney disease[J]. *Nat Genet*, 2005, 37(7):663-664.
- [22] Saleem MA, O'Hare MJ, Reiser J, et al. A conditionally immortalized human podocyte cell line demonstrating nephrin and podocin expression[J]. *J Am Soc Nephrol*, 2002, 13(3):630-638.
- [23] Durvasula RV, Shankland SJ. Podocyte injury and targeting therapy: an update[J]. *Curr Opin Nephrol Hypertens*, 2006, 15(1):1-7.
- [24] Conlon PJ, Lynn K, Winn MP, et al. Spectrum of disease in familial focal and segmental glomerulosclerosis[J]. *Kidney Int*, 1999, 56(5):1863-1871.
- [25] Tsukaguchi H, Yager H, Dawborn J, et al. A locus for adolescent and adult onset familial focal segmental glomerulosclerosis on chromosome 1q25-31[J]. *J Am Soc Nephrol*, 2000, 11(9):1674-1680.
- [26] Winn MP, Conlon PJ, Lynn KL, et al. Linkage of a gene causing familial focal segmental glomerulosclerosis to chromosome 11 and further evidence of genetic heterogeneity[J]. *Genomics*, 1999, 58(2):113-120.
- [27] Copelovitch L, Guttenberg M, Pollak MR, et al. Renin-angiotensin axis blockade reduces proteinuria in presymptomatic patients with familial FSGS[J]. *Pediatr Nephrol*, 2007, 22(10):1779-1784.
- [28] Estacion M, Li S, Sinkins WG, et al. Activation of human TRPC6 channels by receptor stimulation[J]. *J Biol Chem*, 2004, 279(21):22047-22056.
- [29] Liao Y, Erxleben C, Abramowitz J, et al. Functional interactions among Orai1, TRPCs, and STIM1 suggest a STIM-regulated heteromeric Orai/TRPC model for SOCE/terac channels[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105(8):2895-2900.
- [30] Aires V, Hichami A, Boulay G, et al. Activation of TRPC6 calcium channels by diacylglycerol (DAG)-containing arachidonic acid; A comparative study with DAG-containing docosahexaenoic acid[J]. *Biochimie*, 2007, 89(8):926-937.
- [31] Walz G. Slit or pore? A mutation of the ion channel TRPC6 causes FSGS[J]. *Nephrol Dial Transplant*, 2005, 20(9):1777-1779.
- [32] Gottlieb P, Folgering J, Maroto R, et al. Revisiting TRPC1 and TRPC6 mechanosensitivity[J]. *Pflugers Arch*, 2008, 455(6):1097-1103.
- [33] Spassova MA, Hewavitharana T, Xu W, et al. A common mechanism underlies stretch activation and receptor activation of TRPC6 channels[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103(44):16586-16591.
- [34] Alfonso S, Benito O, Alicia S, et al. Regulation of the cellular localization and function of human transient receptor potential channel 1 by other members of the TRPC family[J]. *Cell Calcium*, 2008, 43(4):375-387.