

· 研究进展 ·

# 胰岛素分泌的双开关:KCNH6 的促胰岛素分泌作用

杨金奎\*

(首都医科大学附属同仁医院内分泌科 北京市糖尿病研究所,北京 100730)

**[摘要]** 以往认为,使用 60 年的经典降糖老药磺脲类药物作用于体内的胰岛素“开关”,即胰岛  $\beta$  细胞去极化钾通道  $K_{ATP}$ ,从而促进胰岛素分泌。我们的研究发现,体内胰岛素分泌还受胰岛  $\beta$  细胞复极化钾通道 KCNH6 的调节。本项目从一个大型四代糖尿病家系入手,发现该家系同时存在新生儿低血糖与成年糖尿病。该家系 KCNH6 钾通道基因突变与新生儿低血糖与成年糖尿病共分离。有趣的是,KCNH6 基因敲除(KO)或点突变人源化敲入(KI)小鼠的糖尿病表型特征与该家系糖尿病患者一致。经过近 10 年的研究,揭示了 KCNH6 对胰岛素分泌至关重要,提出了胰岛素分泌“双开关”控制理论。研究成果发表在 2018 年末的 *Cell* 子刊 *Cell Reports* 上。

**[关键词]** 胰岛素分泌;钾离子通道;糖尿病;KCNH6

糖尿病是一类成因十分复杂的疾病,找准病因才有利于新疗法的开展。目前的医学技术对于这类复杂性疾病认识存在瓶颈,很难找到突破口。糖尿病存在家族聚集的现象,如果一个家族中三代人都有糖尿病,且特征较为一致,即为糖尿病家系<sup>[1,2]</sup>。我们从多年的临床实践中认识到,“家系”是糖尿病研究的重要窗口。

我们通过 KCNH6 基因 p. P235L 点突变四代糖尿病家系和 KCNH6 基因敲除及 p. P235L 点突变基因敲入小鼠模型,证明了 KCNH6 在调节胰岛素分泌中的关键作用。提出了胰岛素分泌受  $K_{ATP}$  钾通道和 KCNH6 钾通道“双开关”控制。

胰岛  $\beta$  细胞的葡萄糖刺激的胰岛素分泌(GSIS)受一系列电生理事件的调节。这种电生理过程通常被称为 ATP 敏感性钾通道( $K_{ATP}$ )途径。葡萄糖的代谢导致 ATP/ADP 比率的增加,使  $K_{ATP}$  钾通道关闭,质膜去极化,使电压门控钙通道(VDCC)开放,离子流入细胞,触发胰岛素分泌。我们的研究发现,KCNH6 钾通道对胰岛素分泌至关重要。

## 1 研究背景

2009 年,我接诊了一位来自湖北山区的糖尿病

患者。从交流中了解到,这位患者出身自一个 60 多人的大家庭,但家族中四代人都有糖尿病,且同时存在新生儿低血糖和成年高血糖的现象。最令人惊讶的是,这个家系中糖尿病患者人数达 25 人。半数都有糖尿病,这是已收集到 100 余个家系资料中最完善的糖尿病家系<sup>[3]</sup>。

以这一特殊糖尿病家系的发现为契机,我们开始了持续近 10 年的数据采集、全基因组分析等工作。在基因分析过程中,发现该家系的糖尿病可能与 KCNH6 钾通道基因有关,并开始了进一步的验证;通过建立小鼠糖尿病模型,包括基因敲除和点突变两种模型,使小鼠与病人有相同的基因突变,观察小鼠模型是否符合患者家系中出现的特征<sup>[4]</sup>。

## 2 研究进展与成果

### 2.1 KCNH6 基因 p. P235L 点突变糖尿病家系:从高胰岛素到低胰岛素分泌

2009 年,我们从湖北山区的村庄发现了一个单基因糖尿病的四代家系。我们排除了所有已知的单基因糖尿病。2010 年,我们对家系中的 4 名青年起病的糖尿病个体进行了全外显子测序。经筛选并通过对所有家系成员 Sanger 测序验证后发现,只有

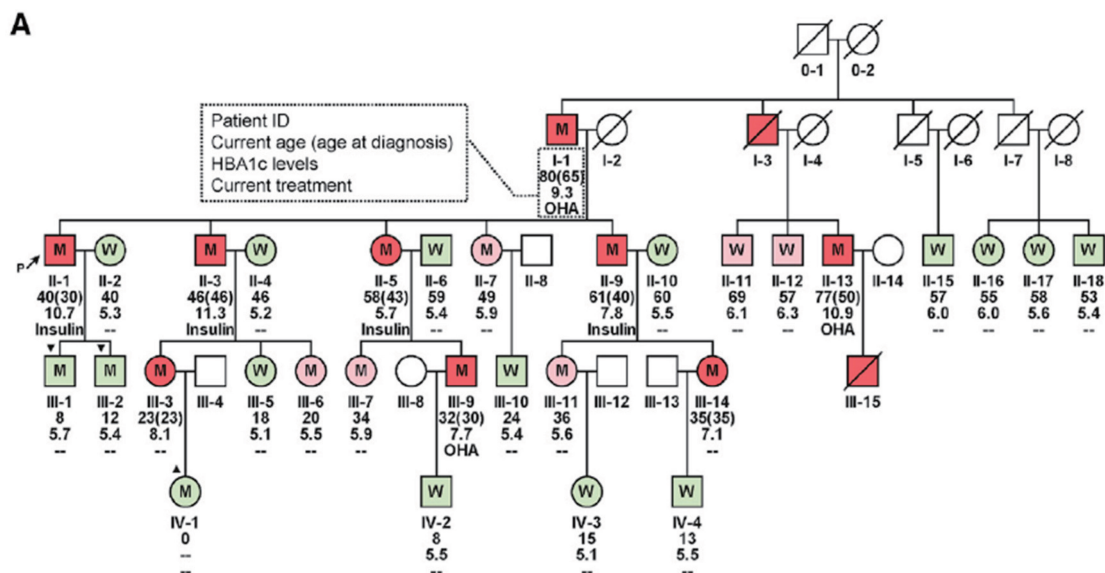


图1 一个多代单基因糖尿病的家系有 *KCNH6* 突变

四代人的 *KCNH6* 单基因突变糖尿病家系图。注：圆圈代表女性，方框代表男性；绿、粉、红三色分别代表糖耐量正常、糖耐量受损和糖尿病；圈或框下为病人编码、当前年龄（确诊时年龄）、糖化血红蛋白水平和当前治疗方式；▼：高胰岛素血症的 *KCNH6* 基因突变儿童，▲：一个存在严重低血糖的 *KCNH6* 基因突变新生儿。

*KCNH6* 基因<sup>[5]</sup>中的 p. P235L 杂合突变 (Mut) 与糖尿病表型共同分离。

2014年，患者 III-3 生下新生儿低血糖症婴儿 (IV-1)。这名婴儿在葡萄糖治疗前后的血糖水平分别为 1.3 和 2.2 mmol/L。低血糖症的新生儿是 *KCNH6* 基因 P235L 突变体。此外，在家系中的两名 P235L 儿童有高胰岛素血症和相对较低的血糖水平 (图 2A)。相反，在成年 P235L 家庭成员中发现了低胰岛素血症 (图 2B)。P235L 患者的胰岛素分泌随着年龄的增长而减少 (图 2C)，但野生型 (WT) 家庭成员的胰岛素分泌则没有减少 (图 2D)。在 13 名成人 Mut 成员中，所有成员均患有糖代谢异常 (6 名先前诊断为糖尿病，3 名新诊断为糖尿病，4 名糖耐量受损 (IGT))。P235L 突变者的血糖 (图 2E) 和糖化血红蛋白 (图 2F) 水平较高，胰岛  $\beta$  细胞功能较低 (图 2G-D)。而在 WT 成年成员中，只有 2 人有 IGT，没有 1 人为糖尿病。

因此，我们推测 *KCNH6* p. P235L 突变导致单基因糖尿病，其特征是儿童高胰岛素血症和成人低胰岛素血症以及糖尿病。

后来，我们对其他 99 名早发多代糖尿病患者进行了基因测序，鉴定出两个杂合子错义突变 (p. r385g, p. r715w) 家族，这两个家族在公共数据库 dbSNP v. 135 中没有报道。这意味着 *KCNH6* 突变

在中国多代早发糖尿病患者中并不罕见。

## 2.2 *KCNH6* 基因 p. P235L 点突变是显性的功能缺失突变

为了研究 *KCNH6* p. P235L 突变对 *KCNH6* 通道功能的影响，我们进行了膜片钳实验。我们构建了编码人 WT 和纯合子 (m/m) *KCNH6* p. P235L 突变体的质粒，然后将其导入人胚肾 (HEK) 293 细胞。将 WT 和 Mut 纯合子 *KCNH6* 以 1:1 的比例作为杂合子 (W/m) 导入 HEK293 细胞。分别用编码 WT、m/m 和 W/m *KCNH6* 的质粒瞬时转染 HEK293 细胞，检测到相同水平的 *KCNH6* 蛋白表达 (图 3A)。E4031 是 ERG 通道的阻滞剂，用作 *KCNH6* 通道特异性阻断 (图 3B)。图中显示了由膜片钳记录的代表性 *KCNH6* 电流轨迹 (图 3C)。与 WT 相比，m/m 和 W/m 具有较低的阶跃电流密度 (图 3D) 和尾电流密度 (图 3E)。其他电生理特性包括失活曲线和恢复曲线在三组中相似。稳态激活曲线 (图 3F) 和电流激活时间常数 (图 3G) 表明 m/m 和 W/m 比 WT 具有更快激活的特性。

电流密度表示整个通道功能。尽管门控动力学结果表明 *KCNH6* p. P235L 不是一种功能障碍突变，但通道的整体功能受两个因素的影响：门控动力学和通道靶向在质膜上的数量。

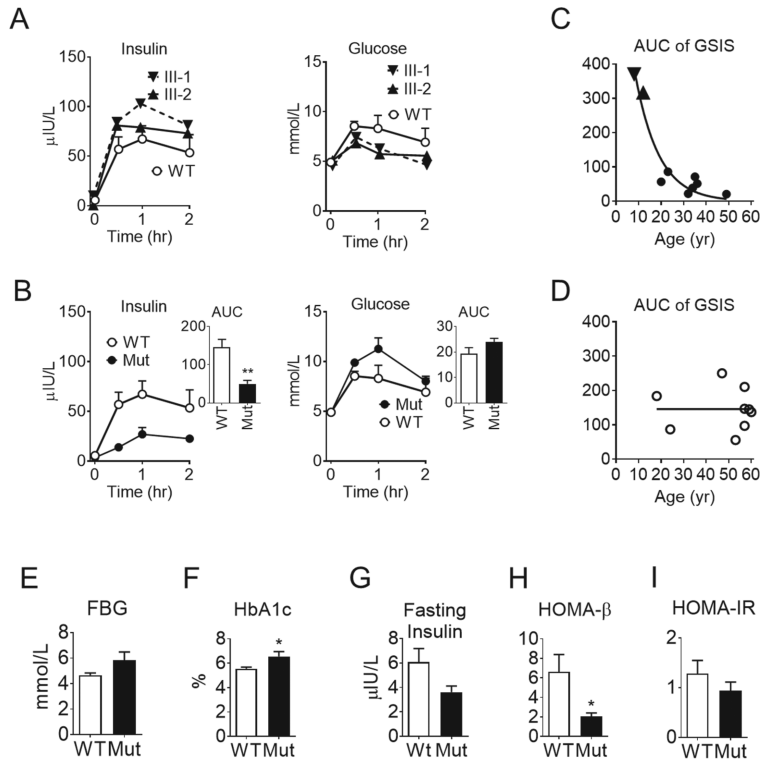


图 2 家庭成员的临床参数

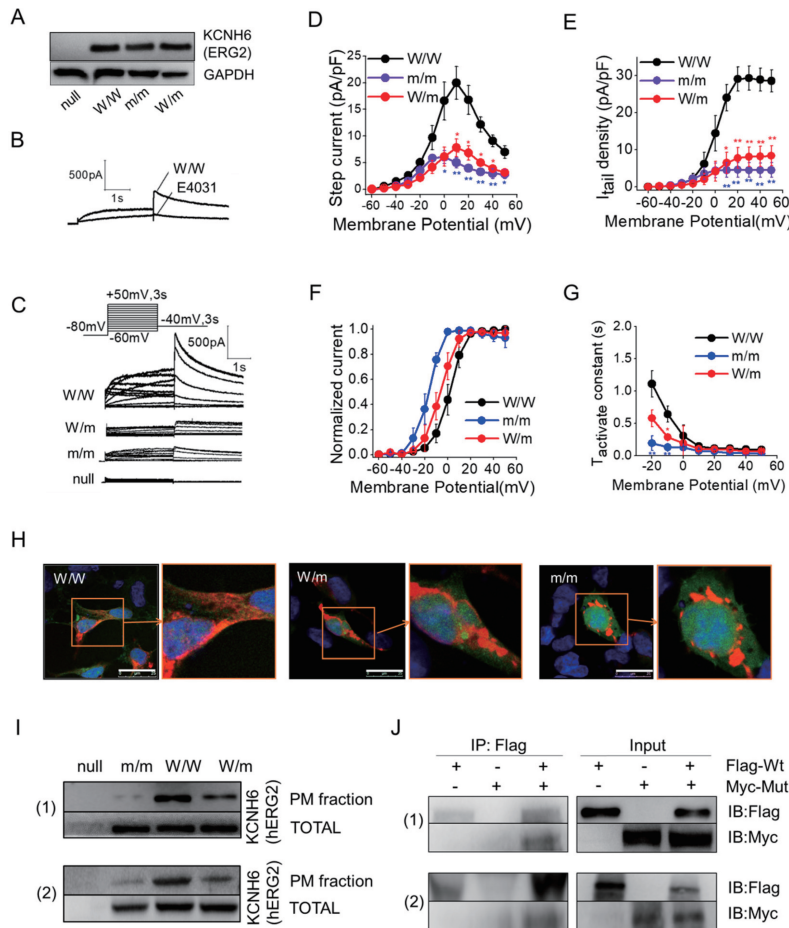


图 3 KCNH6 钾通道 p235L 突变的电生理及免疫组化分析

因此,我们研究了靶向质膜的数量。免疫细胞化学和 Western blot 分析将 WT 和 P235L 通道蛋白的亚细胞定位进行了比较。结果表明,大多数 WT 的 KCNH6 分布在质膜上,而 m/m 和 W/m KCNH6 通道聚集在细胞核周围(图 3H)。亚细胞组分 Western blot 分析也表明, m/m 和 W/m KCNH6 的细胞膜中表达的 KCNH6 水平明显低于 WT(图 3I)。因此, P235L 突变导致 KCNH6 通道的显性功能障碍,归因于亚细胞运输受损和蛋白在质膜上的定位。免疫沉淀分析显示, WT 和 m/m 之间的相互作用(图 3j)。这些结果表明,杂合子 KCNH6 p. P235L 突变的显性功能障碍可能是由 WT 蛋白和 p. P235L 突变蛋白之间的相互作用引

起的,因为 KCNH6 通道是四个相同亚单位的四聚体四个相同亚单位排列成一个环,形成跨膜  $K^+$  通道孔壁,因此,四个相同亚单位中有一个突变,就可使通道失活。

### 2.3 KCNH6 基因敲除及 p. P235L 点突变基因敲入小鼠均出现糖尿病

为了论证 KCNH6 通道功能缺失突变是否引起 KCNH6 突变家系中发现的葡萄糖稳态和胰岛素分泌障碍,我们使用 TALEN 的方法构建 KCNH6 基因敲除(KO)小鼠(图 4A)。在 Western blot 和免疫组化实验中, KCNH6 在人和小鼠分泌胰岛素的胰岛  $\beta$ -细胞中均有表达(图 4B)。在新生 KO 小鼠中,与年龄匹配的 WT 对照组相比,随机血糖水平较

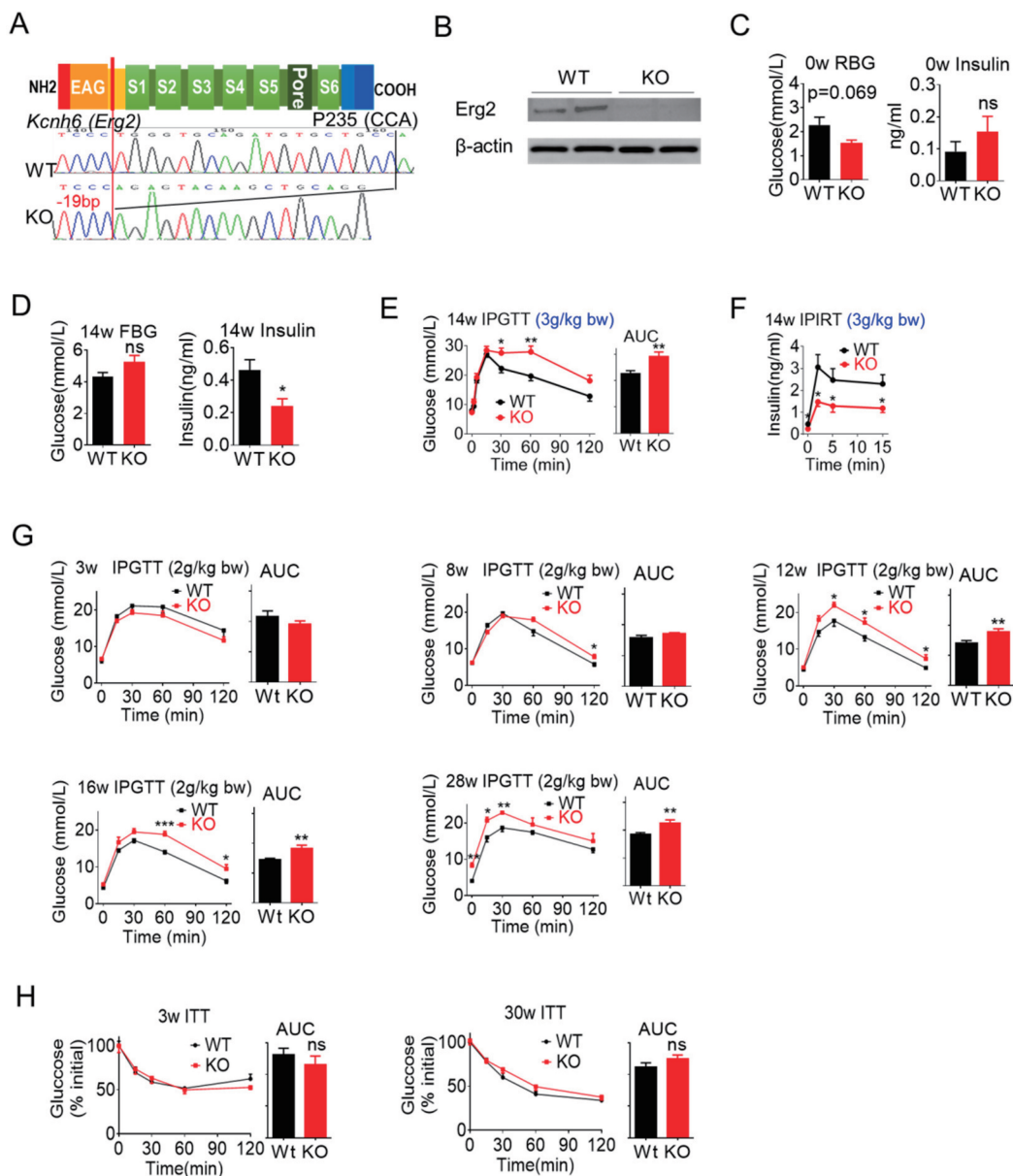


图 4 TALEN 介导的 KCNH6-KO 小鼠重现家系的血糖调节异常病理特征

低,而相应的血浆胰岛素水平有较高的趋势(图 4C)。然而,与年龄匹配的 WT 对照组相比,成年鼠空腹血糖水平高,相应的血浆胰岛素水平低(图 4D)。同时,腹膜内葡萄糖耐量试验(IPGTT)中的血糖水平显著升高(图 4E),而葡萄糖刺激的第一和第二时相胰岛素分泌降低(图 4F)。通过连续观察,与 WT 小鼠相比,KO 小鼠的 IPGTT 血糖水平也显著升高(图 4G)。经胰岛素耐受试验(ITT)证实,KO 小鼠的外周组织胰岛素敏感性与 WT 小鼠在 3 周和 30 周时无明显差异(图 4H)。因此,KCNH6-KO 小鼠的表型特征是从高胰岛素血症转变为低胰岛素血症和糖尿病。

近期,我们使用基于 Cas9 的方法来创建 KCNH6 p. P235L 点突变基因敲入(KI)小鼠(图 5A,B)。在新生 KI 小鼠中,与年龄匹配的 WT 对照组相比,随机血糖水平较低,相应的血浆胰岛素水平相对较高(图 5C)。3 周时,IPGTT 的血糖水平较低(图 5D)。而在成年 KI 小鼠中,IPGTT 的血糖水平较高(图 5E,G),同时空腹胰岛素水平和葡萄糖刺激

的第一和第二时相胰岛素分泌(图 5F)降低。KI 小鼠的体重和食物摄入量与年龄匹配的 WT 相似。ITT 证明,KI 小鼠在 3 周龄和 30 周龄时外周组织胰岛素敏感性与 WT 小鼠无明显差异(图 5H)。

### 2.4 从高胰岛素分泌到低胰岛素分泌的机制

体外实验表明,从幼年(3W)和中年(30W)KO 小鼠的胰岛中观察到,从高胰岛素分泌到低胰岛素分泌的变化。在幼鼠胰岛细胞中,细胞内钙含量高(图 6A)。在高葡萄糖刺激下,胰岛素分泌持续升高(图 6B)。然而,在中年小鼠中,在高葡萄糖刺激下,细胞内钙升高减弱(图 6A),胰岛素分泌功能障碍(图 6B)。Western blot 显示,在中年小鼠中,KO 小鼠胰岛的增殖减少,内质网(ER)应激增加,细胞凋亡增加(图 6D)。KO 小鼠的胰岛  $\beta$ -细胞质量在 30w 时下降。免疫细胞化学分析显示胰岛素染色减少,胰岛的胰高血糖素染色细胞增加(图 6E)。免疫化学还显示,KO 小鼠 30w 时胰岛内质网应激(图 6F)和凋亡(图 6G)增加。吖啶橙/碘化丙啶(AO/PI)染色显示,KO 小鼠 30w 时死亡的胰岛细胞升高(图 6H)。

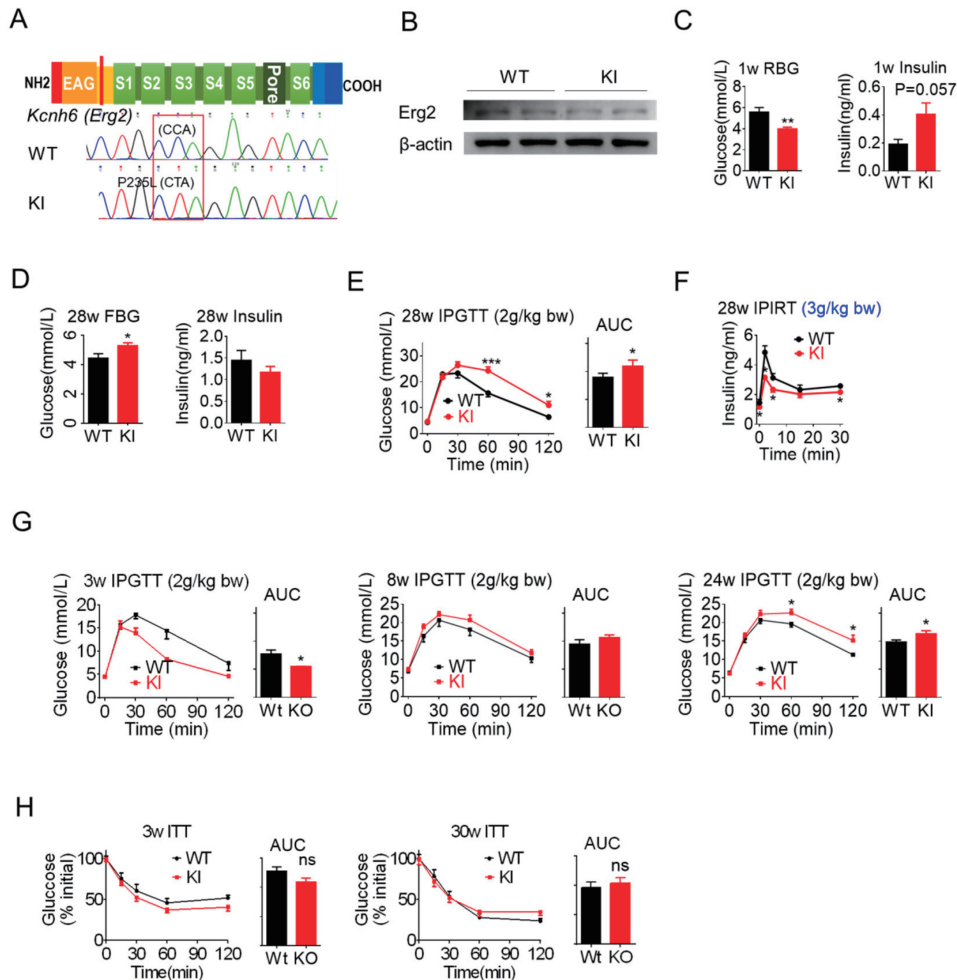


图 5 Cas9 介导的 KCNH6 p. P235L 点突变敲入小鼠重现家系的血糖调节异常病理特征

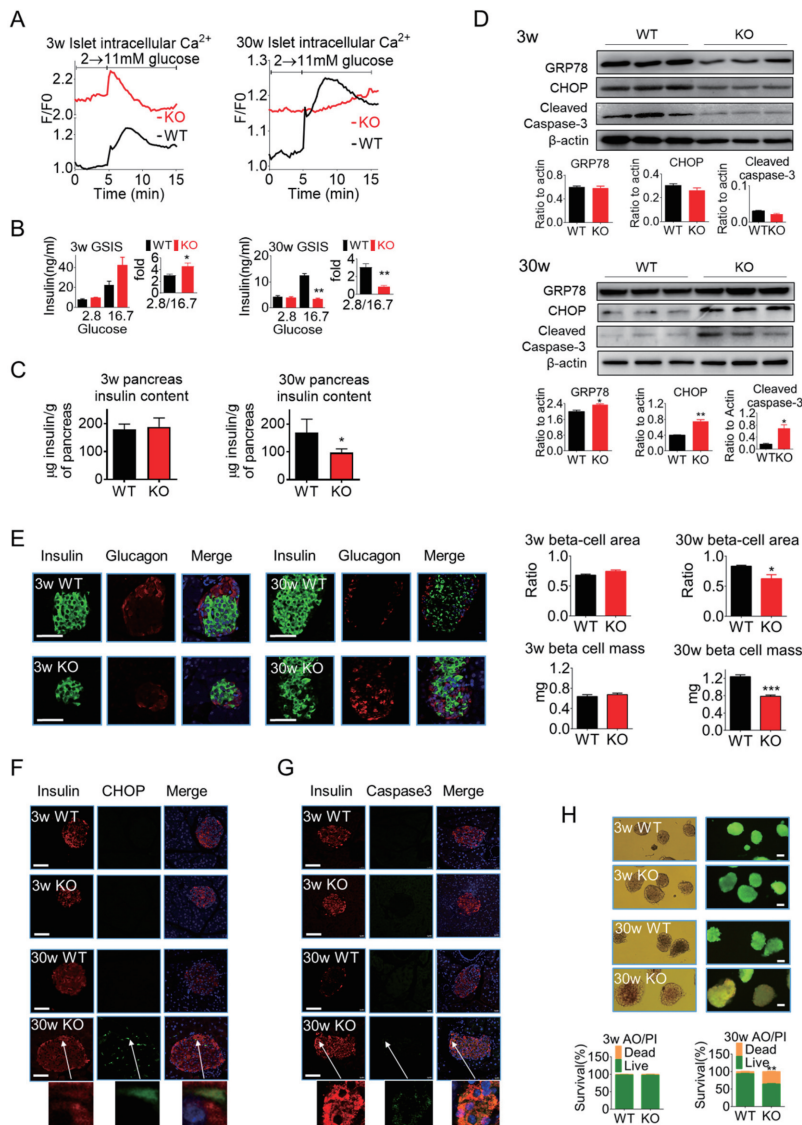


图 6 KCNH6 敲除导致新生及成年小鼠胰岛细胞的胰岛素分泌由高变低,伴有胰岛细胞氧化应激和细胞凋亡

### 3 结论与展望

观察结果证实,两种基因突变小鼠都发生了糖尿病。KCNH6 基因敲除(KO)或 KCNH6 基因 p. P235 突变的人源化敲入(KI)小鼠的糖尿病表型特征与该家系糖尿病人一致:从伴有高胰岛素血症的新生儿低血糖,发展为成年后伴有低胰岛素血症的高血糖和糖尿病。至此,该基因与糖尿病发病的关系得到了肯定。

进一步实验发现,新生 KO 小鼠的胰岛细胞内钙浓度增加,伴胰岛素分泌增加;成年 KO 小鼠胰岛细胞内钙浓度升高,并呈现明显的胰岛 β 细胞内质网应激、细胞凋亡和胰岛素分泌减少等现象。膜片钳研究发现,这与 KCNH6 基因 p. P235 突变导致复极化 KCNH6 钾离子通道的电生功能消失有关。

KCNH6 钾离子通道,正是掌控胰岛素分泌的“开关”,加上已知的磺脲类药物对胰岛素分泌的作用“开关”,这一研究成果也被称为“胰岛素分泌双开关”理论。

#### 3.1 研究意义

这项新研究的意义主要有两点,一是指导优生优育,防止糖尿病在患者后代中再现;二是利于新药研发。目前很多中药被发现具有降血糖作用,但具体机理尚未研究清楚,且药物存在一定毒副作用。新作用靶点的发现可以促进药物的改进、升级,增加正作用、减小副作用。

例如,有些药物不仅能作用于胰岛细胞的离子通道,控制胰岛素分泌,还能作用于心肌细胞的相似通道,但此时就会表现为心脏毒性。若能使药物仅作用于控制胰岛素分泌的钾通道,则可提高药效、降低毒性。目前发现的钾通道,未来有望成为新的糖

尿病药物作用靶点。

在已沿用60余年的磺脲类降糖药的作用开关<sup>[6,7]</sup>之后,发现了控制胰岛素分泌的另一重要开关,提出“双开关”理论,是本研究的一大亮点。不过,后续还需要进行大量工作,才能落实到临床实践。但反过来,我们也可以从临床实践中观察现象、总结问题,并通过研究工作,从中提炼出严谨的科学理论。

我在门诊中会碰到各种各样的糖尿病患者,例如上文谈到的那个湖北患者家系,他们并不符合1型糖尿病的定义,也不符合典型的2型糖尿病。如果将其当做普通患者而不进一步跟踪分析,可能就会错过重大发现。青年医生在临床工作中,不妨多留心、多总结、多分析,对问题追究到底,这将推动人类对疾病的认识。

### 3.2 研究展望

接下来,我们还会在现有研究基础上,将胰岛素分泌“开关”作为新药靶点进行药物筛选,发现更特异的药物有效成分,对天然药物进行改进。目前已发现一种有降糖作用的传统中药,其活性成分或可通过KCNH6钾通道发挥作用。另外,本项目涉及的100多个家系中,明确为新发现的单基因糖尿病的有5个,相应的动物实验正在积极开展中。

**致谢** 本文工作得到国家自然科学基金(项目批准号:81471014)及国家重点研发专项(2017YFC0909600)资助。

### 参 考 文 献

- [1] Pezzilli S, Ludovico O, Biagini T, et al. Insights from molecular characterization of adult patients of families with multigenerational diabetes. *Diabetes*, 2018, 67(1): 137—145.
- [2] Ludovico O, Carella M, Bisceglia L, et al. Identification and clinical characterization of adult patients with multigenerational diabetes mellitus. *PLOS One*, 2015, 10(8): e0135855.
- [3] Li Q, Cao X, Qiu HY, et al. A three-step programmed method for the identification of causative gene mutations of maturity onset diabetes of the young (MODY). *Gene*, 2016, 588(2): 141—148.
- [4] Yang JK, Lu J, Yuan SS, et al. From hyper- to hypoinsulinemia and diabetes: effect of KCNH6 on insulin secretion. *Cell Reports*, 2018, 25(13): 3800—3810.
- [5] Qiu HY, Yuan SS, Yang FY, et al. HERG protein plays a role in moxifloxacin-induced hypoglycemia. *Journal of Diabetes Research*, 2016(6): 1—6.
- [6] Houamed KM, Sweet IR, Satin LS. BK channels mediate a novel ionic mechanism that regulates glucose-dependent electrical activity and insulin secretion in mouse pancreatic beta-cells. *Journal of Physiology-London*, 2010, 588(18): 3511—3523.
- [7] Braun M, Ramracheya R, Bengtsson M, et al. Voltage-gated ion channels in human pancreatic beta-cells: electrophysiological characterization and role in insulin secretion. *Diabetes*, 2008, 57(6): 1618—1628.

## Double switch of insulin secretion: the effect of KCNH6 on insulin secretion

Yang Jinkui

(Beijing Diabetes Institute, Department of Endocrinology, Beijing Tongren Hospital, Capital Medical University, Beijing 100730)

**Abstract** It was believed that sulfonylureas, a 60-year-old classical antidiabetic drug, acted on the insulin secretion “switch”, i. e.  $K_{ATP}$ , the depolarized potassium channel of islet  $\beta$ -cells in vivo, thus promoting insulin secretion. Our study found that insulin secretion is also regulated by KCNH6, the repolarization potassium channel of islet  $\beta$ -cells in vivo. This study was starting from finding a large family with four generation diabetes. We found that there were neonatal hypoglycemia and adult diabetes in this family. KCNH6 potassium channel gene mutation was co-separated from neonatal hypoglycemia and adult diabetes. Interestingly, mice with KCNH6 knockout (KO) or humanized point mutation knockin (KI) have the same diabetic phenotypic characteristics as those of the diabetic family. After nearly 10 years of research, it was revealed that KCNH6 is very important for insulin secretion, and the “double switch” control theory of insulin secretion was put forward. The results were published in the journal *Cell Reports* at the end of 2018.

**Key words** insulin secretion; potassium channel; diabetes; KCNH6