

综述

靶向酸敏感离子通道的神经保护：酸毒性损伤机制的重新审视

王晶晶, 徐天乐*

上海交通大学医学院基础医学院解剖学与组织胚胎学系, 脑科学协同创新中心, 上海 200025

摘要: 生理水平的质子在生物体内分布广泛, 具有重要的生理功能。在特定的病理条件下, 正常的酸碱平衡被破坏, 导致质子大量生成和累积, 产生对机体有害的酸毒(acidotoxicity)。组织酸化是多种神经系统疾病(如缺血性中风、多发性硬化症以及亨廷顿舞蹈症等)的共同病理特征, 也是致这些疾病神经损伤的原因之一。质子可直接激活酸敏感离子通道(acid-sensing ion channel, ASIC), 介导组织酸化相关的生理和病理功能, 例如, 缺血性神经损伤。一直以来, ASIC引起酸毒性神经损伤被认为主要依赖于通道介导的细胞内钙离子升高。然而, 本研究组新近的研究表明ASIC1a亚型通道能够通过激活受体相互作用蛋白1 (receptor-interacting protein 1, RIP1), 介导不依赖于通道离子通透功能的细胞程序性坏死。另外, 亚细胞定位研究发现, 除了在神经元膜表面, ASIC1a还可以定位在线粒体内膜上, 通过调控线粒体通透性转变(mitochondrial permeability transition, MPT)过程, 在缺血性神经损伤中发挥重要作用。这些进展使人们对于ASIC介导神经元死亡的机制有了新的认识。

关键词: 酸敏感离子通道1a; 酸毒; 神经保护; 缺血性中风

中图分类号: Q426; R363

Acid-sensing ion channels as a target for neuroprotection: acidotoxicity revisited

WANG Jing-Jing, XU Tian-Le*

Department of Anatomy, Histology and Embryology, Institute of Medical Sciences, Collaborative Innovation Center for Brain Science, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 200025, China

Abstract: Protons are widespread in cells and serve a variety of important functions. In certain pathological conditions, acid-base balance was disrupted and therefore excessive protons were generated and accumulated, which is termed acidosis and proved toxic to the organism. In the nervous system, it has been reported that acidosis was a common phenomenon and contributed to neuronal injury in various kinds of neurological diseases, such as ischemic stroke, multiple sclerosis and Huntington's disease. Acid-sensing ion channels (ASICs) is the key receptor of protons and mediates acidosis-induced neuronal injury, but the underlying mechanism remains unclear. Traditionally, Ca^{2+} influx through homomeric ASIC1a channels has been considered to be the main cause of acidotoxicity. Recent research showed that extracellular protons trigger a novel form of necroptosis in neurons via ASIC1a-mediated serine/threonine kinase receptor interaction protein 1 (RIP1) activation, independent of ion-conducting function of ASIC1a. In addition, ASIC1a was found in mitochondria and regulated mitochondrial permeability transition-dependent neuronal death. In this article, we will review the recent progresses on the mechanisms underlying ASIC-mediated neuronal death and discuss ASIC modulators involved in this process.

Key words: ASIC1a; acidotoxicity; neuroprotection; ischemic stroke

质子是自然界最小的分子, 在生物体内却承担重要生理功能^[1]。然而在神经系统疾病中(如创伤性脑损伤、缺血性中风、癫痫等), 酸碱平衡失调

会导致质子积累(亦称组织酸化, acidosis), 引发酸毒性损伤^[1-6]。

1997年Waldmann等人克隆出了第一个酸敏感

Received 2016-05-25 Accepted 2016-06-15

Research from the corresponding author's laboratory was supported by grants from the National Basic Research Development Program of China (No. 2014CB910300) and the National Natural Science Foundation of China (No. 31461143004).

*Corresponding author. Tel: +86-21-34696302; Fax: +86-21-53065329; E-mail: xu-happiness@shsmu.edu.cn

离子通道 (acid-sensing ion channel, ASIC) 亚基, 揭示其广泛分布于外周和中枢神经系统^[7]。这个发现改变了人们对组织酸化损伤的认识, 目前 ASIC 被视为是酸毒性损伤的重要治疗靶点, 并得到了广泛的研究^[7]。随着研究的不断深入, 研究者发现 ASIC 介导了诸多酸化相关的病理生理过程。比如在脑缺血动物模型中, 不论是药物抑制 ASIC1a 还是敲除 *Asic1a* 基因, 都有明显的神经保护作用^[8, 9]。此外, 很多内源性分子通过调控 ASIC1a 贡献于缺血性神经元死亡这一过程^[10]。因此, ASIC1a 被认为是临床治疗酸毒相关疾病的新型分子靶点。本文将着重阐述 ASIC1a 在酸毒性损伤中的机制。

1 酸信号与酸毒

1.1 酸信号

机体内的质子主要来源于代谢过程。在神经系统, 质子可以调节神经元的兴奋性, 突触传递和可塑性^[11–13]。研究表明, 突触囊泡呈酸性, 其 pH 值比细胞质低大约 1.5 个 pH 单位^[14]。当神经递质释放时, 质子会被同时释放到突触间隙, 引起神经元突触间隙快速的局部酸化, 因而调节突触的活动^[14, 15]。一方面, 细胞间隙的质子可以抑制位于突触前膜的电压门控钙通道, 减少突触前递质释放^[16, 17]。另一方面, 质子还可以调节位于突触后膜的受体, 比如 NMDA 受体^[18, 19], GABA_A 受体^[20–22]。有意思的是, 在秀丽隐杆线虫 (*Caenorhabditis elegans*), 钠氢转运体 7 (Na⁺/H⁺ exchanger-7, NHX-7) 活动产生的质子可作为一种神经递质, 释放后激活突触后细胞膜上表达的质子受体, 从而产生下游信号最终控制肠道的蠕动^[23, 24]。在小鼠的伏隔核上发现突触后 ASIC 可感知突触前释放的质子, 从而抑制可卡因成瘾相关可塑性及其行为^[25]; 在杏仁核脑区, 质子也可以作为神经递质, 贡献于恐惧记忆的学习过程^[26]。这些新发现颠覆了人们对神经信号的传统认识, 提示在特定条件下 (供体、受体、缓冲体系), 质子可能成为脑内一种新型神经信号, 通过酸信号的产生和传播, 影响脑功能。

1.2 酸毒

维持细胞内外正常的质子浓度是神经元发挥正常生理功能的必要条件。神经元通过质子转运体维持正常的 pH 波动, 例如 Na⁺/H⁺ 交换体和 Cl⁻/HCO₃⁻ 交换体^[27]。正常生理情况下, 脑组织的胞外 pH 维持在 7.3 左右, 胞内 pH 维持在 7.0 左右^[2, 27, 28]。在

一些病理情况下, 机体内的酸碱平衡被打破, 积累过多质子, 介导神经元损伤, 称为酸毒 (acidotoxicity)。

根据质子的来源不同, 机体的酸毒主要分为两大类: 代谢性酸毒和呼吸性酸毒。代谢性酸毒是因为酸碱平衡紊乱, 细胞外液 H⁺ 增加或 HCO₃⁻ 丢失而引起的^[3]; 呼吸性酸毒主要是由于肺换气不足使得呼吸生成的 CO₂ 过度积累所造成的^[29]。相比生理性酸信号的波动, 病理性酸毒过程缓慢而持久。对于神经系统来说, 由于其结构和功能的特殊性, 除了上述两类酸毒途径之外, 还存在一类基于突触囊泡过度释放导致的酸化。鉴于突触囊泡内液是酸性的, 当释放神经递质的时候, 质子会一并释放于突触间隙, 导致突触间隙快速酸化。在正常情况下, 这些释放的质子会被缓冲体系快速中和或者被重新吸收, 以维持 pH 值处于正常的生理区间。在一些病理条件如癫痫时, 神经元兴奋性异常升高, 突触囊泡持续释放, 产生大量质子, 远远超过机体中和或者重吸收的能力, 从而导致神经元胞外过度酸化^[5]。无论何种途径的持续酸化都会影响神经元正常生理活动, 引起酸毒性神经元损伤。

2 ASIC

神经系统中感受质子的受体有几类, 如 ASIC, 辣椒素受体 (transient receptor potential vanilloid type 1, TRPV1) 等。其中, ASIC 是一类被质子激活的阳离子通道, 属于退化素 / 上皮钠离子通道 (degenerin/epithelial Na⁺ channels, DEG/ENaC) 超家族的成员。ASIC 家族成员包括四种基因 (*Asic1*, *Asic2*, *Asic3*, *Asic4*) 编码的至少 6 种不同亚基 (ASIC1a, ASIC1b, ASIC2a, ASIC2b, ASIC3, ASIC4), 它们通过组成同聚或异聚的三聚体发挥功能^[7, 30–32]。除了 ASIC1a 的同聚体和 ASIC1a/2b 的异聚体在激活后可以通透钙离子之外, 其它三聚体主要通透钠离子^[7, 8, 33, 34]。虽然 ASIC 广泛分布于神经系统^[12, 35], 但是其亚基分布却是有差异的。研究表明, ASIC3 和 ASIC1b 在外周神经系统中特异表达, 而在中枢神经系统中只存在 ASIC1a, ASIC2a 和 ASIC2b 三种亚基^[30, 36]。

2.1 ASIC的激活条件

组织酸化是激活 ASIC 的必要条件, 然而由于其固有的快速脱敏 (desensitization) 特性, ASIC 的激活有赖于 pH 值快速 (< 1 s) 且显著的下降^[37], 所以 ASIC 很难在持续组织酸化条件下开放。但是局部的、短时间内迅速积累的质子可激活 ASIC^[38]。

在突触间隙, 酸性囊泡^[39]在突触前释放导致的局部 pH 值降低可能构成激活突触后 ASIC 的条件^[40]。有趣的是, 电刺激伏隔核或杏仁核的突触前神经元时, 都记录到了 ASIC 介导的突触后电流成分^[25, 26], 为突触 ASIC 激活机制提供了直接的实验证据支持。最新的研究通过引入光遗传学工具与精确可控的光电工程控件, 发现单个细胞释放的质子即足以激活神经元自身或相邻细胞上表达的 ASIC1a 通道^[41-43]。这些新证据提示, 在生理条件下, ASIC 可能也是通过与邻近的质子泵或通道相耦联而被激活, 然而突触 ASIC 传递酸信号仍需要整体动物水平的实验支持。

ASIC 除了可以被质子激活, 还可以被非质子配体激活。作者所在课题组最先报道了小分子 2-甲基-4-喹唑啉 (2-methyl 2-guanidine-4-methylquinazoline, GMQ) 和内源性肌酐丁胺都可作为 ASIC3 通道亚型的非质子配体, 在中性 pH 条件下直接引起通道开放, 介导生物学效应^[44, 45]。随后, Bohlen 等在中性 pH 条件下, 发现了天然多肽 MitTx- α/β 能够激活 ASIC1a 通道亚型^[46]; 近期也有报道溶血磷脂酰胆碱 (lysophosphatidylcholine, LPC) 能够激活 ASIC3 离子通道, 花生四烯酸 (arachidonic acid, AA) 则能够放大其效应^[47]。

2.2 ASIC的门控调节

如上所述, ASIC1a 被质子激活后脱敏很快^[7]。通道脱敏后, 即使胞外酸化存在, ASIC1a 也不会随之开放; 另一方面, 较弱的细胞外酸化在不引起通道显著开放的同时却导致稳态脱敏 (steady-state desensitization), 使得通道无法再次开放^[36, 48]。显然, 这种低效率的 ASIC1a 激活机制与其介导的长时程病理生理效应并不匹配。有研究发现, 体内存在很多内源性调节因子可作用于 ASIC1a, 可提高通道功能的效率^[10]。因此, 了解这些调节因子对于全面了解 ASIC1a 的功能以及靶向 ASIC1a 相关疾病的治疗都具有重要的意义。其中, 乳酸作为代谢性酸化过程产生的主要物质, 可通过解除胞外钙离子对 ASIC1a 的抑制作用, 从而显著增强 ASIC1a 的功能^[49]。NO 可通过氧化 ASIC3 的半胱氨酸残基来调控 ASIC3 的功能, 增强通道电流^[50]。内源性多胺——精胺可通过降低 ASIC1a 对质子的表观亲和力, 使通道更快地从稳态脱敏状态中恢复, 增强通道多次响应酸刺激的能力。在缺血性中风时, 精胺可以显著增强 ASIC1a 介导的脑损伤, 抑制内源性精胺的

合成则有明显的保护作用^[48]。除了精胺以外, 强啡肽也有类似的调节作用^[51]。这些协同激活因子 (或共激动剂) 都可能成为靶向 ASIC1a 的分子靶点。

2.3 ASIC的膜转运调控

作为细胞接受外界信号的感受器, 离子通道基本功能的实现有赖于在细胞膜表面的正确定位, 即实现从内质网翻译, 历经多种细胞器的加工, 转运至细胞膜表面, 并通过一系列分子机器识别, 再从膜表面回到胞内这一系列过程的顺利达成^[52]。ASIC1a 通道的功能同样取决于其在膜表面的表达水平和定位模式。研究发现胰岛素可以控制 ASIC1a 在神经元膜表面的表达水平。当移除培养基中的胰岛素 (或者去血清) 时, 胞内的 ASIC1a 会大量上膜, 从而放大通道介导的生理病理效应^[53]。在炎症痛模型中, 脑源神经营养因子 (brain-derived neurotrophic factor, BDNF) 可促进 ASIC1a 从胞内到细胞膜的转运^[54]。具有类似功能的还有花生四烯酸^[47, 55, 56]。还有研究发现, 突触后脚手架蛋白 PICK1 (protein interacting with C kinase-1) 与 ASIC1a 直接相互作用^[57], 提示 ASIC1a 可能定位于突触后膜^[12, 58, 59]。干预 PICK1 的功能可调节 ASIC1a 在突触上的表达, 进而使之发挥不同的功能。除了上膜机制, ASIC1a 如何从细胞膜运输到细胞内, 即其内吞的分子机制也是重要的调控靶点。现已发现, ASIC1a 通过其胞内段羧基端近膜域的氨基酸序列^{465LCRRG469} (该序列可作为一种非经典的内吞信号), 依赖网格蛋白 (clathrin) 和动力蛋白 (dynamin) 实现组成型内吞, 阻断 ASIC1a 的内吞会加重酸诱导的神经元死亡^[60]。这一发现揭示了调控 ASIC1a 细胞膜表达的新机制, 并在缺血、癫痫、脑损伤等伴随组织酸化的病理过程中, 为神经保护提供了一个可能的靶点。通道的表达模式也对功能有重要的影响, 通道成簇表达相比于离散分布有更高的工作效率^[61-63]。有报道证明蛋白激酶 A (protein kinase A, PKA) 可以磷酸化 ASIC1a, 从而削弱其成簇化分布的程度, 这可能也是一种潜在的神经保护机制^[57]。

2.4 ASIC与其它离子通道的协同作用

其它种类离子通道也可以和 ASIC1a 协同作用, 从而调控 ASIC1a 的功能。例如在缺血性中风发生时, 大量谷氨酸被释放到胞外, 持续激活包含 GluN2B 亚基的 NMDA 受体, 通过 CaMKII 这条通路磷酸化 ASIC1a 上的第 478 位和 479 位的丝氨酸位点, 增强通道电流, 从而加剧 ASIC1a 介导的神

经元死亡^[9]。近期有研究报道 ASIC1a 通过易化 NMDA 受体功能导致海马神经元死亡, 进一步支持 NMDA 受体和 ASIC1a 的协同作用^[64]。此外, 体外实验表明, 电压门控质子通道 (voltage-gated proton channel 1, H_v1) 可为邻近神经元上的 ASIC1a 提供质子配体, 从而调控 ASIC1a 的功能^[41]。在体质子信号是否由 H_v1 和 ASIC1a 协同传递尚属未知, 有待进一步研究。

总体来说, 虽然目前发现了不少 ASIC1a 的调节机制, 但是对大部分调节机制的生理病理意义尚缺乏深入细致的研究。我们相信, 随着人们对 ASIC1a 在疾病中发挥的作用的深入了解, 会有越来越多的调节机制被阐明, 并且有可能促进相关疾病的治疗。

3 酸毒与神经系统疾病

3.1 神经系统疾病中的酸毒

大多数神经系统疾病都伴随着酸毒这一病理特征。例如, 在缺血性中风患者的脑内, 由于乳酸过量积累和 ATP 过度水解导致质子的大量积累^[2, 65–67], pH 值下降至 6.5~6.0; 在实验性自身免疫性脑脊髓炎 (experimental autoimmune encephalomyelitis) 小鼠脊髓中, pH 值下降至 6.6 左右^[68]; 在大鼠动物模型上, 当癫痫发作时, 脑内的 pH 值会降到 6.9 左右^[6]。除了急性发作的中枢神经系统疾病外, 酸毒也普遍发生于慢性神经退行性疾病。早在 1990 年, 人们就已经观测到阿尔茨海默病 (Alzheimer's disease) 患者大脑皮层中乳酸盐的积累, 脑内 pH 值下降到 6.6 左右^[69]。有研究表明, 这种酸毒是由能量代谢异常和炎症所导致, 进而加剧 β 样淀粉蛋白 (amyloid β -protein, A β) 的聚集并加重脑损伤^[70–72]。此外, 研究者分别在帕金森病 (Parkinson's disease) 患者^[73] 和小鼠模型^[74] 上观测到了线粒体功能损伤所引起的酸毒。动物实验表明, 这种酸毒加剧了黑质多巴胺能神经元的退化^[75]。亨廷顿舞蹈症 (Huntington's disease) 患者和模型动物的脑内都存在乳酸积累导致的酸毒, 这种酸毒会加剧多聚谷氨酰胺的聚集, 从而加速亨廷顿舞蹈症的病理生理学进程^[76–79]。可见, 不管是急性的中枢神经系统疾病, 还是慢性的神经退行性疾病, 纠正机体的酸碱稳态失衡, 或者阻断酸毒的下游通路都会有助于治疗相关疾病。因此, 寻找神经系统中关键的质子受体作为治疗靶点就显得尤为重要。

3.2 ASIC1a 在酸毒中的作用

ASIC1a 可敏感地感受胞外 pH 值的降低, 通道激活的阈值约为 6.9。中枢神经系统疾病发生的组织酸化, 理论上足以激活 ASIC1a, 因而推测 ASIC1a 在其中起到了重要作用^[8, 9, 68, 75, 79–81]。例如, 通过对中动脉栓塞局灶性缺血 (middle cerebral artery occlusion, MCAO) 动物模型的研究, 研究人员发现 ASIC1a 的特异性抑制剂 PcTX1 可以明显减少梗死体积, 而 *Asic1a* 基因敲除动物也对缺血性损伤表现出明显的神经保护作用, 表明 ASIC1a 在很大程度上介导了缺血性神经元死亡^[8, 9]。此外, 也有证据表明在实验性自身免疫性脑脊髓炎模型动物中, *Asic1a* 基因敲除可明显减缓神经元轴突的退化, 提示 ASIC1a 在神经炎症类疾病中也发挥重要作用^[68]。ASIC1a 在神经退行性疾病中也具有重要的病理意义, ASIC1a 抑制剂可降低帕金森病模型小鼠黑质神经元的死亡^[75], 缓解亨廷顿舞蹈症模型小鼠脑内多聚谷氨酰胺的聚集^[79]。此外, ASIC1a 功能也与抑郁样行为相关^[82], *Asic1a* 基因敲除小鼠在强迫游泳、悬尾等一系列行为实验中均表现出抗抑郁样作用, 药理学抑制 ASIC1a 也观察到类似的效果。ASIC1a 在抑郁相关行为中的作用机制仍然不清楚, 推测可能与 BDNF 有关, 阻断 ASIC1a 能够逆转应激导致的海马 BDNF 的降低。ASIC1a 在焦虑调控中也有作用。研究显示, ASIC1a 抑制剂对啮齿动物焦虑的发生和行为指标具有改善作用, 其机制可能与 GABA 浓度的增高有关^[83]。

3.3 ASIC1a 在酸毒中的作用机制

尽管 ASIC1a 介导神经损伤这一结论已经得到广泛的认可, 但是具体的损伤机理仍不清楚。研究者发现, 在原代培养神经元的体外模型中, 降低胞外的钙离子浓度会抑制酸化诱导时 ASIC1a 介导的细胞死亡^[8, 33]。该现象提示因 ASIC1a 激活而导致的胞内钙离子浓度升高进而激活 CaMKII 这条通路可能是其死亡机制中的关键步骤。很多离子通道过度激活都会导致钙超载依赖的细胞死亡, 比如 NMDA 受体。当神经元过度兴奋时, 大量的谷氨酸释放到胞外, 致使 NMDA 受体持续开放, 钙离子大量流入胞内, 从而诱导细胞死亡 (兴奋性毒)^[84, 85]。相比于 NMDA 受体, ASIC1a 通透钙离子的能力极为有限, 主要因为 ASIC1a 的开放是瞬时性的; 而且 ASIC1a 存在非常明显的稳态脱敏性质, 即不能持续激活^[7, 33]。因此不少研究者认为酸诱导引起的

胞内钙离子增高, 其主要成分不是由激活 ASIC1a 后直接通透^[58, 86, 87], 而是通过 ASIC1a 介导的去极化进一步激活电压依赖性钙离子通道而导致。事实上, 由 ASIC1a 介导微量钙离子内流导致缺血性神经元酸毒死亡这一理论一直存在争议^[88, 89]。虽然 ASIC 领域内不断提出新的假说来试图回答或者弥补这一悖论, 但都缺乏令人满意的解释。另外, 在线虫体内存在一类和 ASIC1a 同属于 DEG/ENaC 超家族的机械敏感通道 4 (mechanosensory channel, MEC-4), 其激活后流入的钙离子可以促进内质网中滞留的钙离子释放, 进而激活钙蛋白酶 (calpain) 通路, 引起细胞坏死^[90]。从通道结构的相似性来说, 这种机制很可能也适用于 ASIC1a 介导的细胞死亡。

作者所在研究组最新的研究显示, 在脑缺血的病理条件下, 存在着不依赖于离子通道功能的死亡机制^[91]。缺血导致氧气和葡萄糖缺失, 进而引起脑组织酸化, 导致质子的浓度持续升高, 一方面会激活 ASIC1a 通道并促使其脱敏; 另一方面会使 ASIC1a 蛋白构象发生改变, 使得原先被包埋的 ASIC1a 羧基端暴露出来, 特异地与一种细胞内死亡诱发激酶受体相互作用蛋白 1 (receptor-interacting protein 1, RIP1) 特异性结合, 引发后者的磷酸化, 进而激活神经细胞程序性坏死 (necroptosis) 进程和脑损伤。在这一重要病理过程中, ASIC1a 与 RIP1 的结合以及介导的 RIP1 磷酸化都与 ASIC1a 的离子通透信号通路相互独立, 属于 ASIC1a 的代谢信号通路。这一新发现更新了缺血过程中 ASIC1a 引起细胞内钙离子超载致死的传统认识, 为基于 ASIC1a 的脑卒中治疗药物研究提供了全新的理论指导。鉴于多发性硬化症、亨廷顿舞蹈症等神经退行性疾病也伴有明显的神经组织酸化, 该发现可能对包括这些疾病在内的其它神经系统疾病防治具有广泛指导意义。

值得关注的是, ASIC1a 除了在神经质膜表面表达, 也存在于线粒体内膜上^[92]。在敲除 *Asic1a* 基因的小鼠中, 大脑线粒体相关的蛋白质组也发生了变化, 表明 ASIC1a 在线粒体中可能行使特定的功能。有研究发现, 相比于野生型小鼠, *Asic1a* 基因敲除对钙离子诱导的线粒体肿胀, 以及双氧水诱导的细胞色素 C 的释放, 线粒体膜电势下降和细胞死亡都有更强的抵抗力。这些结果表明, *Asic1a* 基因敲除小鼠线粒体通透性转变通道 (mitochondrial permeability transition pore, MPTP) 可能受到了抑制。这也就不难理解以往观察到 ASIC1a 通道的抑制剂

PcTX1 和 amiloride 可以抑制活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 的生成^[88], 因为胞内 ROS 主要来源于线粒体^[93], 提示 ASIC1a 的激活可以诱导线粒体生成 ROS, 从而导致神经损伤。由于线粒体在细胞死亡的过程中处于枢纽的位置, 当细胞接收到死亡信号之后, 线粒体通过释放促进死亡的因子从而实现了死亡过程的执行, 所以进一步了解线粒体上的 ASIC1a 介导死亡的机制对于靶向 ASIC1a 的临床转化研究具有重要的指导意义。

4 靶向ASIC1a的转化医学研究

随着人们对 ASIC1a 介导损伤机制认识的深入了解, 靶向 ASIC1a 的转化医学研究优势逐步显现。以缺血性中风为例, 基于 NMDA 受体拮抗剂的神经保护对策未获成功。最主要的原因之一是有效治疗时间窗很短, 大约只有缺血后 1 h。超过这个时间窗, 治疗效果会大大降低^[94-96]。更重要的是, NMDA 受体承担了许多重要的生理功能, 阻断或抑制 NMDA 受体可致严重的副作用。比如有报道指出, NMDA 受体的阻断剂会诱发类似于精神分裂症的行为症状^[94, 97]。这些缺陷严重限制了靶向 NMDA 受体的药物在临床治疗方面的应用。相比于 NMDA 受体而言, ASIC1a 阻断剂的有效治疗时间窗要长很多, 大约缺血后 5 h 仍旧有效^[98, 99]。更重要的是, *Asic1a* 基因敲除小鼠并未表现出明显的生理功能缺陷^[12, 30], 推测其阻断剂的副作用也会小得多, 用于临床治疗也更为安全。因此, 从安全性和应用范围方面, ASIC1a 可能是较 NMDA 受体更有潜力的新型治疗靶点。

基于对酸毒性神经损伤机制更全面的认识 (图 1), 干预 ASIC1a 可以从以下四种方式入手。(1) ASIC1a 通道阻断剂。ASIC1a 阻断剂 amiloride 和 PcTX1 在动物体内都表现出了明显的神经保护效应。一些非特异性 ASIC1a 阻断剂的发现, 也预示着“老药新用”, 从已知药物发现神经保护剂的巨大前景。例如, 具有神经保护作用的非甾类抗炎化合物: 阿斯匹林, 布洛芬, 氟比洛芬, 双氯芬等^[100-103], 以及钾通道阻断剂四乙胺和钡离子、锌离子等^[34, 104]都发现具有阻断 ASIC1a 的作用。(2) ASIC1a 调控因子。通过钙调磷酸酶 (calcineurin) 去磷酸化使 ASIC1a 失活^[105]; 通过组织型激肽释放酶 (tissue kallikrein, TK) 酶切 ASIC1a, 从而降解通道蛋白^[106]; 通过 A 激酶锚定蛋白 79/150 (A-kinase anchor pro-

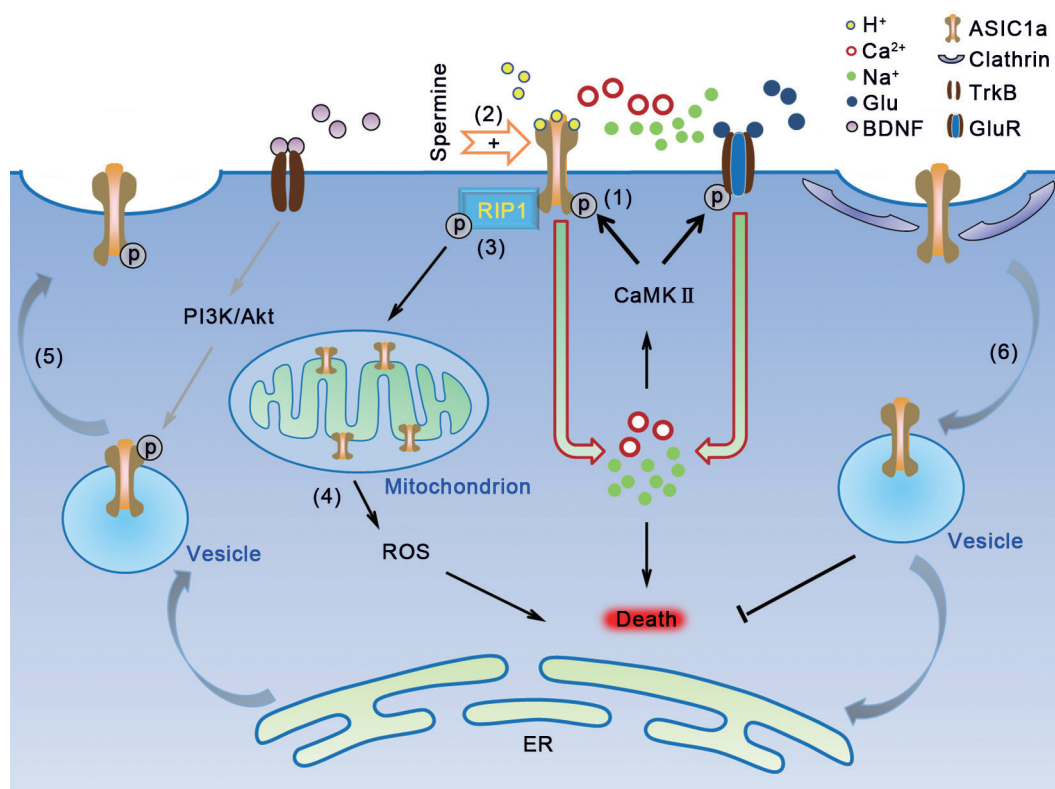


图 1. 酸毒性神经损伤的分子机制(主要依据作者所在研究组的系列研究结果绘制)

Fig. 1. Molecular mechanisms of ASIC1a in acidotoxicity (Image illustrated based on literatures from the team of authors). (1) Activation of NR2B-containing NMDA receptors during ischemia enhances ASIC1a channel currents through phosphorylation at Ser478 and Ser479 of ASIC1a by Ca^{2+} /CaMKII, leading to exacerbated neuronal death^[9]; (2) Spermine exacerbates ischemic neuronal damage by sensitization of ASIC1a channel^[48]; (3) Acid stimulation exposes proximal C-terminal region of ASIC1a, allowing for association with and activation of RIP1, which in turn leads to necroptosis^[91]; (4) ASIC1a is distributed in the inner mitochondrial membrane and plays an important role in ROS-induced and MPT-dependent neuronal death^[92]; (5) Activation of TrkB receptor by BDNF facilitates the PI3K/Akt pathway, and then induces ASIC1a phosphorylation and promotes forward targeting to the cell surface^[54]; (6) Constitutive endocytosis of ASIC1a is mediated by clathrin and dynamin-dependent processes, which depends on membrane proximal residues at the cytoplasmic C-terminus. Inhibition of the endocytosis leads to membrane retention of ASIC1a and thus enhances acidosis-induced neuronal death^[60]. RIP1, receptor-interacting protein 1; ROS, reactive oxygen species; MPT, mitochondrial permeability transition; CaMKII, CaM kinase II; ER, endoplasmic reticulum; BDNF, brain-derived neurotrophic factor.

teins, AKAP79/150), 膜粘连蛋白 2 (annexin A2) 的辅助蛋白 p11, α -辅肌动蛋白 (α -actinin) 等控制 ASIC1a 的膜转运^[105, 107, 108]。(3) 干预 ASIC1a 介导的下游信号通路。例如 ASIC1a 与 RIP1 结合介导程序性坏死^[91], 干预 ASIC1a 与 RIP1 的结合可以干预死亡通路。(4) 降低 *Asic1a* 基因表达。采用腺病毒或慢病毒载体, 利用病毒载体的高感染率、高表达特性, 将靶向沉默 ASIC1a 的短发卡 RNA 或小干扰 RNA 带到目的细胞, 从而进行 RNA 干扰 (RNA interference, RNAi)。

虽然目前还没有很好的临床应用, 但是靶向 ASIC 的治疗方案在动物层面表现出良好的神经保

护疗效^[8], 这让研究者看到了临床转化的前景。更多的靶向 ASIC 与其调控因子之间相互作用位点的药物有待开发。

5 展望

显而易见, ASIC1a-RIP1 新型通路的发现, 拓展了原有的对酸毒性神经损伤机制的传统认识^[91]。针对 ASIC1a 和 RIP1 的结合来设计具有神经保护作用的特异性人工多肽, 并在此基础上筛选开发相关的小分子药物, 寻找靶向干预神经元死亡通路的新策略, 将会给缺血性中风的治疗带来新的希望, 具有重大的理论和临床意义。

另一方面, 线粒体内膜定位的 ASIC1a 的揭示^[92], 可能带动与线粒体相关的生理功能^[109]和疾病分子机理^[110]研究。线粒体不仅是细胞的能源中心, 也是细胞内钙离子信号的枢纽。钙离子流入线粒体, 然后再泵出。这种看似徒劳无功的钙离子穿梭其实在代谢过程中发挥了重要的作用——钙离子对 Krebs 循环中至少 3 个组分以及 F1/F0 复合物都有重要的调节作用^[111, 112]。由此, 线粒体的钙离子穿梭将钙离子信号和 ATP 生成耦联起来。其中钙离子内流的驱动力是由线粒体膜电势提供的, 而线粒体内膜定位的 ASIC1a 贡献了线粒体膜电势^[92]。研究清楚 ASIC1a 影响线粒体钙离子稳态的具体机制有望为理解线粒体钙离子超载——诸多神经系统疾病的共同病理机制提供新线索。

* * *

致谢: 本文得到了李伟广、胡琴、王宜之等的帮助, 在此表示感谢。

参考文献

- 1 Zeng WZ, Xu TL. Proton production, regulation and pathophysiological roles in the mammalian brain. *Neurosci Bull* 2012; 28(1): 1–13.
- 2 Nedergaard M, Kraig RP, Tanabe J, Pulsinelli WA. Dynamics of interstitial and intracellular pH in evolving brain infarct. *Am J Physiol* 1991; 260(3 Pt 2): R581–R588.
- 3 Kraut JA, Madias NE. Metabolic acidosis: pathophysiology, diagnosis and management. *Nat Rev Nephrol* 2010; 6(5): 274–285.
- 4 Sutherland SP, Cook SP, McCleskey EW. Chemical mediators of pain due to tissue damage and ischemia. *Prog Brain Res* 2000; 129: 21–38.
- 5 Chesler M. Regulation and modulation of pH in the brain. *Physiol Rev* 2003; 83(4): 1183–1221.
- 6 Somjen GG. Acidification of interstitial fluid in hippocampal formation caused by seizures and by spreading depression. *Brain Res* 1984; 311(1): 186–188.
- 7 Waldmann R, Champigny G, Bassilana F, Heurteaux C, Lazdunski M. A proton-gated cation channel involved in acid-sensing. *Nature* 1997; 386(6621): 173–177.
- 8 Xiong ZG, Zhu XM, Chu XP, Minami M, Hey J, Wei WL, MacDonald JF, Wemmie JA, Price MP, Welsh MJ, Simon RP. Neuroprotection in ischemia: blocking calcium-permeable acid-sensing ion channels. *Cell* 2004; 118(6): 687–698.
- 9 Gao J, Duan B, Wang DG, Deng XH, Zhang GY, Xu L, Xu TL. Coupling between NMDA receptor and acid-sensing ion channel contributes to ischemic neuronal death. *Neuron* 2005; 48(4): 635–646.
- 10 Xu TL, Xiong ZG. Dynamic regulation of acid-sensing ion channels by extracellular and intracellular modulators. *Curr Med Chem* 2007; 14(16): 1753–1763.
- 11 Mao J, Li L, McManus M, Wu J, Cui N, Jiang C. Molecular determinants for activation of G-protein-coupled inward rectifier K⁺ (GIRK) channels by extracellular acidosis. *J Biol Chem* 2002; 277(48): 46166–46171.
- 12 Wemmie JA, Chen J, Askwith CC, Hruska-Hageman AM, Price MP, Nolan BC, Yoder PG, Lamani E, Hoshi T, Freeman JH Jr, Welsh MJ. The acid-activated ion channel ASIC contributes to synaptic plasticity, learning, and memory. *Neuron* 2002; 34(3): 463–477.
- 13 Vukicevic M, Kellenberger S. Modulatory effects of acid-sensing ion channels on action potential generation in hippocampal neurons. *Am J Physiol Cell Physiol* 2004; 287(3): C682–C690.
- 14 Liu Y, Edwards RH. The role of vesicular transport proteins in synaptic transmission and neural degeneration. *Annu Rev Neurosci* 1997; 20: 125–156.
- 15 Miesenbock G, De Angelis DA, Rothman JE. Visualizing secretion and synaptic transmission with pH-sensitive green fluorescent proteins. *Nature* 1998; 394(6689): 192–195.
- 16 DeVries SH. Exocytosed protons feedback to suppress the Ca²⁺ current in mammalian cone photoreceptors. *Neuron* 2001; 32(6): 1107–1117.
- 17 Vessey JP, Stratis AK, Daniels BA, Da Silva N, Jonz MG, Lalonde MR, Baldrige WH, Barnes S. Proton-mediated feedback inhibition of presynaptic calcium channels at the cone photoreceptor synapse. *J Neurosci* 2005; 25(16): 4108–4117.
- 18 Traynelis SF, Cull-Candy SG. Proton inhibition of *N*-methyl-*D*-aspartate receptors in cerebellar neurons. *Nature* 1990; 345(6273): 347–350.
- 19 Tang CM, Dichter M, Morad M. Modulation of the *N*-methyl-*D*-aspartate channel by extracellular H⁺. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990; 87(16): 6445–6449.
- 20 Mozrzymas JW, Zarnowska ED, Pytel M, Mercik K. Modulation of GABA(A) receptors by hydrogen ions reveals synaptic GABA transient and a crucial role of the desensitization process. *J Neurosci* 2003; 23(22): 7981–7992.
- 21 Mercik K, Pytel M, Cherubini E, Mozrzymas JW. Effect of extracellular pH on recombinant $\alpha 1\beta 2\gamma 2$ and $\alpha 1\beta 2\gamma$ GABAA receptors. *Neuropharmacology* 2006; 51(2): 305–314.
- 22 Dietrich CJ, Morad M. Synaptic acidification enhances GABAA signaling. *J Neurosci* 2010; 30(47): 16044–16052.

- 23 Beg AA, Ernstrom GG, Nix P, Davis MW, Jorgensen EM. Protons act as a transmitter for muscle contraction in *C. elegans*. *Cell* 2008; 132(1): 149–160.
- 24 Pfeiffer J, Johnson D, Nehrke K. Oscillatory transepithelial H⁺ flux regulates a rhythmic behavior in *C. elegans*. *Curr Biol* 2008; 18(4): 297–302.
- 25 Kreple CJ, Lu Y, Taugher RJ, Schwager-Gutman AL, Du J, Stump M, Wang Y, Ghobbeh A, Fan R, Cosme CV, Sowers LP, Welsh MJ, Radley JJ, LaLumiere RT, Wemmie JA. Acid-sensing ion channels contribute to synaptic transmission and inhibit cocaine-evoked plasticity. *Nat Neurosci* 2014; 17(8): 1083–1091.
- 26 Du J, Reznikov LR, Price MP, Zha XM, Lu Y, Moninger TO, Wemmie JA, Welsh MJ. Protons are a neurotransmitter that regulates synaptic plasticity in the lateral amygdala. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2014; 111(24): 8961–8966.
- 27 Chesler M. The regulation and modulation of pH in the nervous system. *Prog Neurobiol* 1990; 34(5): 401–427.
- 28 Back T, Hoehn M, Mies G, Busch E, Schmitz B, Kohno K, Hossmann KA. Penumbral tissue alkalosis in focal cerebral ischemia: relationship to energy metabolism, blood flow, and steady potential. *Ann Neurol* 2000; 47(4): 485–492.
- 29 Flamant M, Azar H, Bonay M. Metabolic and respiratory acidosis. *Rev Prat* 2008; 58(12): 1363–1371 (in French).
- 30 Wemmie JA, Price MP, Welsh MJ. Acid-sensing ion channels: advances, questions and therapeutic opportunities. *Trends Neurosci* 2006; 29(10): 578–586.
- 31 Lingueglia E. Acid-sensing ion channels in sensory perception. *J Biol Chem* 2007; 282(24): 17325–17329.
- 32 Jasti J, Furukawa H, Gonzales EB, Gouaux E. Structure of acid-sensing ion channel 1 at 1.9 Å resolution and low pH. *Nature* 2007; 449(7160): 316–323.
- 33 Yermolaieva O, Leonard AS, Schnizler MK, Abboud FM, Welsh MJ. Extracellular acidosis increases neuronal cell calcium by activating acid-sensing ion channel 1a. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; 101(17): 6752–6757.
- 34 Sherwood TW, Lee KG, Gormley MG, Askwith CC. Heteromeric acid-sensing ion channels (ASICs) composed of ASIC2b and ASIC1a display novel channel properties and contribute to acidosis-induced neuronal death. *J Neurosci* 2011; 31(26): 9723–9734.
- 35 Gao J, Wu LJ, Xu L, Xu TL. Properties of the proton-evoked currents and their modulation by Ca²⁺ and Zn²⁺ in the acutely dissociated hippocampus CA1 neurons. *Brain Res* 2004; 1017(1–2): 197–207.
- 36 Krishtal O. The ASICs: signaling molecules? Modulators? *Trends Neurosci* 2003; 26(9): 477–483.
- 37 Boyden ES, Zhang F, Bamberg E, Nagel G, Deisseroth K. Millisecond-timescale, genetically targeted optical control of neural activity. *Nat Neurosci* 2005; 8(9): 1263–1268.
- 38 Abrams ZR, Warrier A, Trauner D, Zhang X. A signal processing analysis of Purkinje cells *in vitro*. *Front Neural Circuits* 2010; 4: 13.
- 39 Wyart C, Del Bene F, Warp E, Scott EK, Trauner D, Baier H, Isacoff EY. Optogenetic dissection of a behavioural module in the vertebrate spinal cord. *Nature* 2009; 461(7262): 407–410.
- 40 Volgraf M, Gorostiza P, Szobota S, Helix MR, Isacoff EY, Trauner D. Reversibly caged glutamate: a photochromic agonist of ionotropic glutamate receptors. *J Am Chem Soc* 2007; 129(2): 260–261.
- 41 Zeng WZ, Liu DS, Liu L, She L, Wu LJ, Xu TL. Activation of acid-sensing ion channels by localized proton transient reveals their role in proton signaling. *Sci Rep* 2015; 5: 14125.
- 42 Ferenczi EA, Vierock J, Atsuta-Tsunoda K, Tsunoda SP, Ramakrishnan C, Gorini C, Thompson K, Lee SY, Berndt A, Perry C, Minniberger S, Vogt A, Mattis J, Prakash R, Delp S, Deisseroth K, Hegemann P. Optogenetic approaches addressing extracellular modulation of neural excitability. *Sci Rep* 2016; 6: 23947.
- 43 Li T, Yang Y, Canessa CM. A method for activation of endogenous acid-sensing ion channel 1a (ASIC1a) in the nervous system with high spatial and temporal precision. *J Biol Chem* 2014; 289(22): 15441–15448.
- 44 Yu Y, Chen Z, Li WG, Cao H, Feng EG, Yu F, Liu H, Jiang H, Xu TL. A nonproton ligand sensor in the acid-sensing ion channel. *Neuron* 2010; 68(1): 61–72.
- 45 Li WG, Yu Y, Zhang ZD, Cao H, Xu TL. ASIC3 channels integrate agmatine and multiple inflammatory signals through the nonproton ligand sensing domain. *Mol Pain* 2010; 6: 88.
- 46 Bohlen CJ, Chesler AT, Sharif-Naeini R, Medzihradsky KF, Zhou S, King D, Sanchez EE, Burlingame AL, Basbaum AI, Julius D. A heteromeric Texas coral snake toxin targets acid-sensing ion channels to produce pain. *Nature* 2011; 479(7373): 410–414.
- 47 Marra S, Ferru-Clement R, Breuil V, Delaunay A, Christin M, Friend V, Sebille S, Cognard C, Ferreira T, Roux C, Euller-Ziegler L, Noel J, Lingueglia E, Deval E. Non-acidic activation of pain-related Acid-Sensing Ion Channel 3 by lipids. *EMBO J* 2016; 35(4): 414–428.
- 48 Duan B, Wang YZ, Yang T, Chu XP, Yu Y, Huang Y, Cao H, Hansen J, Simon RP, Zhu MX, Xiong ZG, Xu TL. Extracellular spermine exacerbates ischemic neuronal injury through sensitization of ASIC1a channels to extracellular acidosis. *J Neurosci* 2011; 31(6): 2101–2112.
- 49 Immke DC, McCleskey EW. Lactate enhances the acid-

- sensing Na^+ channel on ischemia-sensing neurons. *Nat Neurosci* 2001; 4(9): 869–870.
- 50 Cadiou H, Studer M, Jones NG, Smith ES, Ballard A, McMahon SB, McNaughton PA. Modulation of acid-sensing ion channel activity by nitric oxide. *J Neurosci* 2007; 27(48): 13251–13260.
 - 51 Sherwood TW, Askwith CC. Dynorphin opioid peptides enhance acid-sensing ion channel 1a activity and acidosis-induced neuronal death. *J Neurosci* 2009; 29(45): 14371–14380.
 - 52 McMahon HT, Boucrot E. Molecular mechanism and physiological functions of clathrin-mediated endocytosis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2011; 12(8): 517–533.
 - 53 Chai S, Li M, Branigan D, Xiong ZG, Simon RP. Activation of acid-sensing ion channel 1a (ASIC1a) by surface trafficking. *J Biol Chem* 2010; 285(17): 13002–13011.
 - 54 Duan B, Liu DS, Huang Y, Zeng WZ, Wang X, Yu H, Zhu MX, Chen ZY, Xu TL. PI3-kinase/Akt pathway-regulated membrane insertion of acid-sensing ion channel 1a underlies BDNF-induced pain hypersensitivity. *J Neurosci* 2012; 32(18): 6351–6363.
 - 55 Allen NJ, Attwell D. Modulation of ASIC channels in rat cerebellar Purkinje neurons by ischaemia-related signals. *J Physiol* 2002; 543(Pt 2): 521–529.
 - 56 Smith ES, Cadiou H, McNaughton PA. Arachidonic acid potentiates acid-sensing ion channels in rat sensory neurons by a direct action. *Neuroscience* 2007; 145(2): 686–698.
 - 57 Leonard AS, Yermolaieva O, Hruska-Hageman A, Askwith CC, Price MP, Wemmie JA, Welsh MJ. cAMP-dependent protein kinase phosphorylation of the acid-sensing ion channel-1 regulates its binding to the protein interacting with C-kinase-1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; 100(4): 2029–2034.
 - 58 Zha XM, Wemmie JA, Green SH, Welsh MJ. Acid-sensing ion channel 1a is a postsynaptic proton receptor that affects the density of dendritic spines. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006; 103(44): 16556–16561.
 - 59 Wemmie JA, Askwith CC, Lamani E, Cassell MD, Freeman JH Jr, Welsh MJ. Acid-sensing ion channel 1 is localized in brain regions with high synaptic density and contributes to fear conditioning. *J Neurosci* 2003; 23(13): 5496–5502.
 - 60 Zeng WZ, Liu DS, Duan B, Song XL, Wang X, Wei D, Jiang W, Zhu MX, Li Y, Xu TL. Molecular mechanism of constitutive endocytosis of Acid-sensing ion channel 1a and its protective function in acidosis-induced neuronal death. *J Neurosci* 2013; 33(16): 7066–7078.
 - 61 Sheng M, Pak DT. Ligand-gated ion channel interactions with cytoskeletal and signaling proteins. *Annu Rev Physiol* 2000; 62: 755–778.
 - 62 Kneussel M, Betz H. Clustering of inhibitory neurotransmitter receptors at developing postsynaptic sites: the membrane activation model. *Trends Neurosci* 2000; 23(9): 429–435.
 - 63 Hirai H. Modification of AMPA receptor clustering regulates cerebellar synaptic plasticity. *Neurosci Res* 2001; 39(3): 261–267.
 - 64 Gao S, Yu Y, Ma ZY, Sun H, Zhang YL, Wang XT, Wang C, Fan WM, Zheng QY, Ma CL. NMDAR-mediated hippocampal neuronal death is exacerbated by activities of ASIC1a. *Neurotox Res* 2015; 28(2): 122–137.
 - 65 Rehncrona S. Brain acidosis. *Ann Emerg Med* 1985; 14(8): 770–776.
 - 66 Siesjo BK, Katsura K, Kristian T. Acidosis-related damage. *Adv Neurol* 1996; 71: 209–233; discussion 234–206.
 - 67 Regli L, Anderson RE, Meyer FB. Effects of intermittent reperfusion on brain pH, rCBF, and NADH during rabbit focal cerebral ischemia. *Stroke* 1995; 26(8): 1444–1451; discussion 1451–1442.
 - 68 Friese MA, Craner MJ, Etzensperger R, Vergo S, Wemmie JA, Welsh MJ, Vincent A, Fugger L. Acid-sensing ion channel-1 contributes to axonal degeneration in autoimmune inflammation of the central nervous system. *Nat Med* 2007; 13(12): 1483–1489.
 - 69 Yates CM, Butterworth J, Tennant MC, Gordon A. Enzyme activities in relation to pH and lactate in postmortem brain in Alzheimer-type and other dementias. *J Neurochem* 1990; 55(5): 1624–1630.
 - 70 Atwood CS, Moir RD, Huang X, Scarpa RC, Bacarra NM, Romano DM, Hartshorn MA, Tanzi RE, Bush AI. Dramatic aggregation of Alzheimer abeta by Cu(II) is induced by conditions representing physiological acidosis. *J Biol Chem* 1998; 273(21): 12817–12826.
 - 71 Pirchl M, Marksteiner J, Humpel C. Effects of acidosis on brain capillary endothelial cells and cholinergic neurons: relevance to vascular dementia and Alzheimer's disease. *Neurol Res* 2006; 28(6): 657–664.
 - 72 Messier C, Gagnon M. Glucose regulation and cognitive functions: relation to Alzheimer's disease and diabetes. *Behav Brain Res* 1996; 75(1–2): 1–11.
 - 73 Bowen BC, Block RE, Sanchez-Ramos J, Pattany PM, Lampman DA, Murdoch JB, Quencer RM. Proton MR spectroscopy of the brain in 14 patients with Parkinson disease. *AJNR Am J Neuroradiol* 1995; 16(1): 61–68.
 - 74 Koga K, Mori A, Ohashi S, Kurihara N, Kitagawa H, Ishikawa M, Mitsumoto Y, Nakai M. H MRS identifies lactate rise in the striatum of MPTP-treated C57BL/6 mice. *Eur J Neurosci* 2006; 23(4): 1077–1081.
 - 75 Arias RL, Sung ML, Vasylyev D, Zhang MY, Albinson K,

- Kubek K, Kagan N, Beyer C, Lin Q, Dwyer JM, Zaleska MM, Bowlby MR, Dunlop J, Monaghan M. Amiloride is neuroprotective in an MPTP model of Parkinson's disease. *Neurobiol Dis* 2008; 31(3): 334–341.
- 76 Jenkins BG, Koroshetz WJ, Beal MF, Rosen BR. Evidence for impairment of energy metabolism *in vivo* in Huntington's disease using localized ^1H NMR spectroscopy. *Neurology* 1993; 43(12): 2689–2695.
- 77 Tsang TM, Woodman B, McLoughlin GA, Griffin JL, Tabrizi SJ, Bates GP, Holmes E. Metabolic characterization of the R6/2 transgenic mouse model of Huntington's disease by high-resolution MAS ^1H NMR spectroscopy. *J Proteome Res* 2006; 5(3): 483–492.
- 78 Tkac I, Dubinsky JM, Keene CD, Gruetter R, Low WC. Neurochemical changes in Huntington R6/2 mouse striatum detected by *in vivo* ^1H NMR spectroscopy. *J Neurochem* 2007; 100(5): 1397–1406.
- 79 Wong HK, Bauer PO, Kurosawa M, Goswami A, Washizu C, Machida Y, Tosaki A, Yamada M, Knopfel T, Nakamura T, Nukina N. Blocking acid-sensing ion channel 1 alleviates Huntington's disease pathology via an ubiquitin-proteasome system-dependent mechanism. *Hum Mol Genet* 2008; 17(20): 3223–3235.
- 80 Ziemann AE, Allen JE, Dahdaleh NS, Drebot, II, Coryell MW, Wunsch AM, Lynch CM, Faraci FM, Howard MA 3rd, Welsh MJ, Wemmie JA. The amygdala is a chemosensor that detects carbon dioxide and acidosis to elicit fear behavior. *Cell* 2009; 139(5): 1012–1021.
- 81 Sun L, Wang H, Wang Z, He S, Chen S, Liao D, Wang L, Yan J, Liu W, Lei X, Wang X. Mixed lineage kinase domain-like protein mediates necrosis signaling downstream of RIP3 kinase. *Cell* 2012; 148(1–2): 213–227.
- 82 Coryell MW, Wunsch AM, Haeflner JM, Allen JE, Schnizler M, Ziemann AE, Cook MN, Dunning JP, Price MP, Rainier JD, Liu Z, Light AR, Langbehn DR, Wemmie JA. Acid-sensing ion channel-1a in the amygdala, a novel therapeutic target in depression-related behavior. *J Neurosci* 2009; 29(17): 5381–5388.
- 83 Dwyer JM, Rizzo SJ, Neal SJ, Lin Q, Jow F, Arias RL, Rosenzweig-Lipson S, Dunlop J, Beyer CE. Acid sensing ion channel (ASIC) inhibitors exhibit anxiolytic-like activity in preclinical pharmacological models. *Psychopharmacology (Berl)* 2009; 203(1): 41–52.
- 84 Szydlowska K, Tymianski M. Calcium, ischemia and excitotoxicity. *Cell Calcium* 2010; 47(2): 122–129.
- 85 Kroemer G, Galluzzi L, Vandenabeele P, Abrams J, Alnemri ES, Baehrecke EH, Blagosklonny MV, El-Deiry WS, Golstein P, Green DR, Hengartner M, Knight RA, Kumar S, Lipton SA, Malorni W, Nunez G, Peter ME, Tschopp J, Yuan J, Piacentini M, Zhivotovsky B, Melino G, Nomenclature Committee on Cell D. Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. *Cell Death Differ* 2009; 16(1): 3–11.
- 86 Samways DS, Harkins AB, Egan TM. Native and recombinant ASIC1a receptors conduct negligible Ca^{2+} entry. *Cell Calcium* 2009; 45(4): 319–325.
- 87 Herrera Y, Katnik C, Rodriguez JD, Hall AA, Willing A, Pennypacker KR, Cuevas J. sigma-1 receptor modulation of acid-sensing ion channel a (ASIC1a) and ASIC1a-induced Ca^{2+} influx in rat cortical neurons. *J Pharmacol Exp Ther* 2008; 327(2): 491–502.
- 88 Liu L, Zhang R, Liu K, Zhou H, Yang X, Liu X, Tang M, Su J, Dong Q. Tissue kallikrein protects cortical neurons against *in vitro* ischemia-acidosis/reperfusion-induced injury through the ERK1/2 pathway. *Exp Neurol* 2009; 219(2): 453–465.
- 89 Wemmie JA, Taugher RJ, Kreple CJ. Acid-sensing ion channels in pain and disease. *Nat Rev Neurosci* 2013; 14(7): 461–471.
- 90 Bianchi L, Gerstbrein B, Frokjaer-Jensen C, Royal DC, Mukherjee G, Royal MA, Xue J, Schafer WR, Driscoll M. The neurotoxic MEC-4(d) DEG/ENaC sodium channel conducts calcium: implications for necrosis initiation. *Nat Neurosci* 2004; 7(12): 1337–1344.
- 91 Wang YZ, Wang JJ, Huang Y, Liu F, Zeng WZ, Li Y, Xiong ZG, Zhu MX, Xu TL. Tissue acidosis induces neuronal necroptosis via ASIC1a channel independent of its ionic conduction. *Elife* 2015; 4.
- 92 Wang YZ, Zeng WZ, Xiao X, Huang Y, Song XL, Yu Z, Tang D, Dong XP, Zhu MX, Xu TL. Intracellular ASIC1a regulates mitochondrial permeability transition-dependent neuronal death. *Cell Death Differ* 2013; 20(10): 1359–1369.
- 93 Orrenius S, Gogvadze V, Zhivotovsky B. Mitochondrial oxidative stress: implications for cell death. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2007; 47: 143–183.
- 94 MacDonald JF, Xiong ZG, Jackson MF. Paradox of Ca^{2+} signaling, cell death and stroke. *Trends Neurosci* 2006; 29(2): 75–81.
- 95 Hoyte L, Barber PA, Buchan AM, Hill MD. The rise and fall of NMDA antagonists for ischemic stroke. *Curr Mol Med* 2004; 4(2): 131–136.
- 96 Ginsberg MD. Neuroprotection for ischemic stroke: past, present and future. *Neuropharmacology* 2008; 55(3): 363–389.
- 97 Javitt DC, Zukin SR. Recent advances in the phencyclidine model of schizophrenia. *Am J Psychiatry* 1991; 148(10): 1301–1308.
- 98 Pignataro G, Simon RP, Xiong ZG. Prolonged activation of

- ASIC1a and the time window for neuroprotection in cerebral ischaemia. *Brain* 2007; 130(Pt 1): 151–158.
- 99 Simon RP. Acidotoxicity trumps excitotoxicity in ischemic brain. *Arch Neurol* 2006; 63(10): 1368–1371.
- 100 Voilley N. Acid-sensing ion channels (ASICs): new targets for the analgesic effects of non-steroid anti-inflammatory drugs (NSAIDs). *Curr Drug Targets Inflamm Allergy* 2004; 3(1): 71–79.
- 101 Wang W, Ye SD, Zhou KQ, Wu LM, Huang YN. High doses of salicylate and aspirin are inhibitory on acid-sensing ion channels and protective against acidosis-induced neuronal injury in the rat cortical neuron. *J Neurosci Res* 2012; 90(1): 267–277.
- 102 Dorofeeva NA, Barygin OI, Staruschenko A, Bolshakov KV, Magazanik LG. Mechanisms of non-steroid anti-inflammatory drugs action on ASICs expressed in hippocampal interneurons. *J Neurochem* 2008; 106(1): 429–441.
- 103 Voilley N, de Weille J, Mamet J, Lazdunski M. Nonsteroid anti-inflammatory drugs inhibit both the activity and the inflammation-induced expression of acid-sensing ion channels in nociceptors. *J Neurosci* 2001; 21(20): 8026–8033.
- 104 Chu XP, Wemmie JA, Wang WZ, Zhu XM, Saugstad JA, Price MP, Simon RP, Xiong ZG. Subunit-dependent high-affinity zinc inhibition of acid-sensing ion channels. *J Neurosci* 2004; 24(40): 8678–8689.
- 105 Chai S, Li M, Lan J, Xiong ZG, Saugstad JA, Simon RP. A kinase-anchoring protein 150 and calcineurin are involved in regulation of acid-sensing ion channels ASIC1a and ASIC2a. *J Biol Chem* 2007; 282(31): 22668–22677.
- 106 Su J, Tang Y, Liu L, Zhou H, Dong Q. Regulation of acid-sensing ion channel 1a function by tissue kallikrein may be through channel cleavage. *Neurosci Lett* 2011; 490(1): 46–51.
- 107 Donier E, Rugiero F, Okuse K, Wood JN. Annexin II light chain p11 promotes functional expression of acid-sensing ion channel ASIC1a. *J Biol Chem* 2005; 280(46): 38666–38672.
- 108 Schnizler MK, Schnizler K, Zha XM, Hall DD, Wemmie JA, Hell JW, Welsh MJ. The cytoskeletal protein alpha-actinin regulates acid-sensing ion channel 1a through a C-terminal interaction. *J Biol Chem* 2009; 284(5): 2697–2705.
- 109 Szabo I, Zoratti M. Mitochondrial channels: ion fluxes and more. *Physiol Rev* 2014; 94(2): 519–608.
- 110 Leanza L, Zoratti M, Gulbins E, Szabo I. Mitochondrial ion channels as oncological targets. *Oncogene* 2014; 33(49): 5569–5581.
- 111 Drago I, Pizzo P, Pozzan T. After half a century mitochondrial calcium in- and efflux machineries reveal themselves. *EMBO J* 2011; 30(20): 4119–4125.
- 112 McCormack JG, Denton RM. The role of mitochondrial Ca^{2+} transport and matrix Ca^{2+} in signal transduction in mammalian tissues. *Biochim Biophys Acta* 1990; 1018(2–3): 287–291.