

文章编号: 1004-0374(2003)06-0383-08

·评述与综述·

水通道的生物学研究

李学军

(北京大学基础医学院药理学系, 北京 100083)

摘要: 美国约翰·霍普金斯大学生物化学教授彼得·埃格瑞博士, 他被瑞典皇家科学院授予 2003 年诺贝尔化学奖, 以承认他们的实验室在 1991 年发现的水通道。水通道或称水孔蛋白的发现为这类蛋白的生物学、生理学和遗传学开创了一个黄金时代。

现在已鉴定了 10 余种哺乳动物水通道, 每种都有其特定的组织分布。在肾脏、肺、眼和脑等组织表达多种水通道, 构成水转运的网络。已确定水孔蛋白的基本结构是在细胞膜中以四聚体的形式存在。水通道参与许多临床疾病, 包括尿崩症到各种形式水肿的病理生理学过程。它们可能是治疗水平衡紊乱性疾病的靶。

关键词: 水通道; 水孔蛋白; AQP; 3D 结构; 水平衡; 治疗靶

中图分类号: Q71 **文献标识码:** A

Biology of water channel

LI Xue-Jun

(Department of Pharmacology, Peking University School of Basic Medical Sciences, Beijing 100083, China)

Abstract: Peter Agre, M.D, professor of biological chemistry at the Johns Hopkins University School of Medicine, was awarded the 2003 Nobel Prize in Chemistry by the Royal Swedish Academy of Sciences. The Academy recognized him for his laboratory's 1991 discovery of the long-sought "channels" that regulate and facilitate water molecule transport through cell membranes, a process essential to all living organisms. The discovery of the water channel, or aquaporin, ushered in a golden age of biochemical, physiological and genetic studies of these proteins. More than ten mammalian aquaporins have been identified, each with a distinct distribution. In the kidney, lung, eye and brain, multiple water-channel homologs are expressed, providing a network for water transport in those locations. Basic features of aquaporin structure have been defined and appeared to assemble in membranes as homotetramers. Aquaporins are likely to prove central to the pathophysiology of a variety of clinical conditions from diabetes insipidus to various forms of edema and, ultimately, they could be a target for therapy in diseases of altered water homeostasis.

Key words: water channel; aquaporins; AQP; 3D structure; water homeostasis; target of therapy

瑞典皇家科学院 2003 年 10 月 8 日宣布, 将 2003 年诺贝尔化学奖授予 Peter Agre 和 Roderick MacKinnon, 表彰他们在细胞膜通道方面做出的开创性贡献。

Dr. Agre 得奖是因为发现了细胞膜水通道, 他的发现阐明了水如何进出细胞以及肾脏如何从尿液中重新吸收水分等, 这对人类探索肾脏等疾病具

有极其重要的意义。早在 100 多年前, 人们就猜测细胞中存在特异的转运水分子的通道, 但直到 1988 年, Dr. Agre 才成功分离出了一种膜蛋白, 后来进一步证实这种膜蛋白就是科学家长期以来孜孜以求

收稿日期: 2003-11-16

作者简介: 李学军 (1952—), 女, 医学硕士, 教授, 博导。

的水通道。

诺贝尔评选委员会说,这是一个重大的发现,它开启了细菌、植物和哺乳动物水通道的生物化学、生理学和遗传学研究之门。

水是细胞维持正常的生理功能不可缺少的组成部分。在消化、呼吸、体温调节、毒物的清除以及神经内环境稳定等许多生理活动中都存在水的跨膜转运。但在此之前,人们一直认为水的跨膜转运是通过简单扩散完成的。

20 年以前,人们在研究中发现眼睛晶状体的内环境稳定依赖于一种存在于晶状体纤维细胞细胞膜上特殊通道蛋白,该蛋白的分子量为 26kD,属于主体内在蛋白(major intrinsic protein, MIP)家族成员,具有亲水性。这种蛋白的结构与现在所认识的水通道蛋白结构具有相似性,目前也将该蛋白归类为水通道蛋白,称为水孔蛋白-0(Aquaporin-0, AQP0)。它是水通道最早的雏形。但是当时并没有认识到它有水通道的功能。

直到 10 多年前,Agre 及其同事^[1]在纯化红细胞 Rh 血型抗原 32kD 的核心多肽时,从人红细胞膜中意外发现一种分子量为 28kD,含有亲水性氨基酸的未知多肽。这种蛋白存在的形式有两种:一种为非糖基化形式,分子量为 28kD;另一种为 N-糖基化形式,分子量为 40~60kD。

他们最初认为这个多肽是 Rh 抗原的蛋白降解产物,但与兔抗血清反应,发现与 Rh 抗原无关。这种蛋白最早被命名为 CHIP28(28kD channel-forming integral membrane protein),即现在的水孔蛋白 1(Aquaporin-1, AQP1)。

后来,他们完成了对 CHIP28 的分子克隆,阐明了其 cDNA 的分子组成^[2]。1991 年 10 月,他们又成功地完成了对该蛋白的功能鉴定。他们将这种蛋白的编码序列插入到非洲爪蟾的 β 珠蛋白 cDNA 的 5' 和 3' 非翻译序列中构成表达构建,经体外转录用得到 cRNA,并将其注射到非洲爪蟾卵母细胞中(*Xenopus laevis* oocyte),在低渗溶液中观察细胞体积的变化。结果发现注射卵母细胞表达 CHIP 基因后细胞体积增加,当达到 30%~50% 时,全部破裂。以上实验表明,CHIP28 参与了水的转运。现在,水通道蛋白均统称为水孔蛋白(Aquaporins, AQPs)。CHIP28 是第一个被证实的水通道蛋白,故称为 AQP1。

现在的研究发现,在哺乳动物中有至少 11 种 AQPs 亚型,在植物、微生物、脊椎动物和无脊椎动物中已经发现了 200 多种水通道亚型^[3]。

目前认为^[4],水的跨膜转运有两种基本方式,即穿越膜脂质双分子层的简单扩散以及水通道介导的水转运,水通道是水分子在溶液渗透压梯度的作用下跨膜转运的主要途径。

1 水通道的分类

目前在哺乳动物中发现的 11 种水通道蛋白,分别命名为 AQP0、AQP1、AQP2、AQP3、AQP4、AQP5、AQP6、AQP7、AQP8、AQP9 和 AQP10。按其功能,哺乳类动物 AQPs 可以分为两类。第一类,主要包括 AQP0、AQP1、AQP2、AQP4、AQP5 和 AQP6,只能通透水,属于经典的选择性水通道,英文名称为 water-selective channels(或 orthodox aquaporins)。第二类,主要包括 AQP3、AQP7 和 AQP9,对水有高通透性,同时也能通透甘油、尿素和其他的小分子,英文名称为 aquaglyceroporins。这些 AQPs 在生理学上的差别是否与结构的差别有关还不十分清楚,如 AQP8 位于水选择型和甘油渗透型之间,其功能上的定义还未来明确^[5]。

2 水通道的分子结构及生化特性

不同水通道 cDNA 具有高度同源性,AQP1 和 MIP(AQP0) cDNA 有 42% 的同源性,AQP1 和家族其他成员的 cDNA 有 30%~40% 的同源性。人 AQP1 基因定位于染色体 7q14,包含四个外显子。AQP1 基因的转录产物约为 3.1kb,5' 末端为 58bp 的非编码区,随后是编码 28.5kD 蛋白质的 807bp 的开放阅读框架^[6]。

演绎的氨基酸序列的拓扑学分析揭示,水通道在细胞中以四聚体的形式存在,每一亚单位在功能上都可作为一个单水通道。它的四级结构是由四个对称排列的各长 5nm,直径 3.2nm 的圆筒状亚基包绕而成的四聚体^[7](图 1)。目前对于组成四聚体形式的原因和意义仍然未被揭示。

水通道单体的一级结构为跨越细胞膜 6 次的单肽链,含有 2 个胞内襻(B、D)和 3 个胞外襻(A、C、E)。各种水通道亚型蛋白结构的 B 襻和 E 襻具有高度的同源性,并且都存在有天冬酰胺-脯氨酸-丙氨酸(Asn-Pro-Ala, NPA)的重复串联序列(motif)。因此,NPA 是水通道家族成员共有的特征性结构。在膜上处于反向相对位置的 B 襻和 E 襻对构成功能性水的选择性通透十分重要^[8]。分别位于细胞内和细胞外的疏水 B 襻和 E 襻向膜脂质双分子层中折叠,两个 NPA 在折叠中形成一个直

径约为 0.3nm, 大小为一个单水分子的单水孔道, 这种结构称为“沙漏模型 (hourglass fashion)” [9] (图 2)。

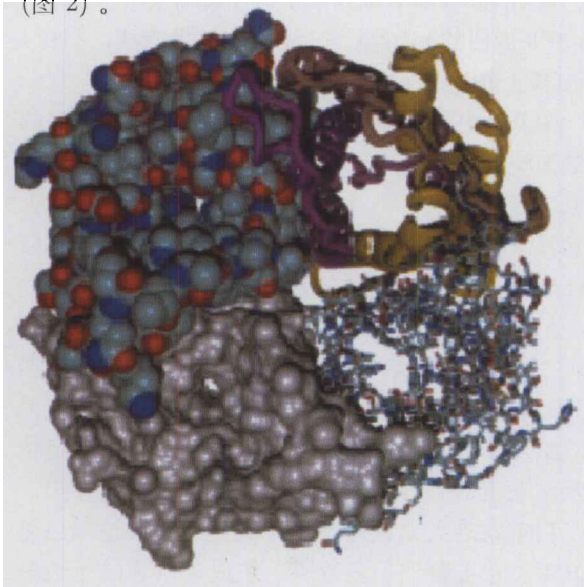


图 1 由四个单体组成的水通道的空间结构

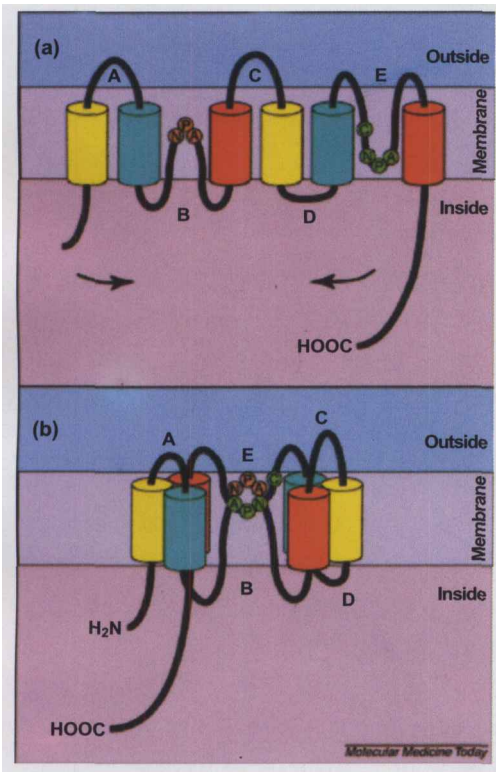


图 2 AQP1 单体结构的沙漏模型 (hourglass fashion)

(a) AQP1 单体的 6 个跨膜区域和细胞外襻 A, C, E 及细胞内襻 B, D。2 个 NPA 基元序列定位于 B 和 E 襻。(b) 在 B 和 E 襻中的 NPA 基元序列共同构成了可通透单水分子的水通道。

在水通道蛋白的 B 襻和 E 襻的末端部分含有 α 螺旋结构, 该结构可以在细胞膜中产生正电位,

大分子, 如尿素和质子等将被排斥而不能通过。因此, 肾脏每日约 150L 的滤液中有 99% 被重吸收。然而, 尿素、肌氨酸酐和酸性物质将不被重吸收。

目前认为 AQP1、AQP2、AQP5 的 E 襻和 AQP3 的 B 襻 NPA 序列中的半胱氨酸是汞抑制水通道的作用位点。汞离子和有机汞可通过与半胱氨酸结合阻塞水孔道, 抑制水通道对水的转运。某些水通道, 如 AQP4 在该位置无半胱氨酸, 故对汞不敏感 [10]。

3 水通道的分布

3.1 水通道在血细胞的分布 AQP1 最早就是在哺乳动物的红细胞膜上发现的, 最初认为 AQP1 介导的水通透性与红细胞通过高张的肾髓质和微血管时的变形性及其恢复有关。也可能影响红细胞的成熟过程以及红细胞对水的通透性。

3.2 水通道在肾脏的分布 肾脏作为整个机体调节水平衡的主要器官, 其水通道的亚型分布也是最多的。

AQP1 在肾单位的近曲小管和降支细段中很丰富, 它组成将近 4% 的顶质膜刷状缘蛋白, 对水都有很高的通透性。

AQP2 位于集合管的主细胞中。在静息条件下, AQP2 主要存在于顶质膜下的细胞内囊泡中。在精氨酸加压素 (arginine vasopressin, AVP) 的作用下, AQP2 重新分布到顶质膜, 并产生对水的通透性。

AQP3 存在于集合管基侧质膜。AQP4 存在于髓质内小血管结构中, 为集合管重吸收的水分提供出路。

AQP6 存在于集合管泌酸细胞和近曲小管上皮细胞的囊泡中。AQP6 分布的独特性预示了它可能与其他水通道蛋白有功能上的差别, 包括对酸碱平衡的调节。

AQP7 存在于肾脏近端小管, 可能具有通透甘油和尿素的作用 [11]。

3.3 水通道在呼吸道的分布 呼吸道的液体转运很复杂。在远端的肺组织, 围产期水的转运对于胎盘和子宫的气体交换非常重要。在整个生命过程中, 血管、间质和肺中水的适当调节对正常的气体交换和肺的防御是必须的。气道表面液体层的精细调节对于有效的粘膜纤毛的运输是必需的。在气道和鼻咽中, 吸入的气体必须是潮湿的, 以防止远端的气道干燥, 而且必须从呼出的气流中吸收水分, 将呼出的水分损失减少到最小。

有 4 个水通道存在于呼吸道中, 它们的分布各不相同。AQP1 丰富的定位于大鼠的微血管和胸膜的顶质膜和基侧质膜中。在气道粘膜下腺体的 I 型肺泡细胞和分泌细胞的顶质膜中则有 AQP5 的表达。在气道和鼻咽的上皮组织, 不同细胞的基侧质膜中都有 AQP3 和 AQP4 的表达。水通道的非重叠分布可能为呼吸道的跨细胞水转运提供了一个网络协调系统。

I 型肺泡细胞的基侧质膜和呼吸道上皮组织的顶质膜缺乏已知的水通道, 推测在那些部位可能存在未知的水通道。另外一种解释是, 跨细胞膜的水转运不一定存在于呼吸道上皮组织的每一个位置^[12]。

水通道在肺中的发生过程是很有意思的。AQP1 在妊娠晚期的胚胎大鼠肺中有表达, 在出生时明显增加, 而且在成年动物中维持很高的水平。甾体类药物能诱导胎鼠和成年鼠肺中 AQP1 的表达, 这与已知甾体类药物可以加速胎肺成熟的作用一致。出生后 1~2 日大鼠肺中有 AQP5 的表达, 在成年动物中有高水平的表达。与 AQP1 不同, AQP5 不能被甾体类药物所诱导。出生后 2 日在远端的肺组织中有短暂的 AQP4 的表达。甾体激素诱导的 AQP1 表达, 可促使水从肺间质流回血管系统, 这可能是激素治疗哮喘或肺水肿的作用机制。

另外, 用游离的远端气道灌注法证实水通道蛋白通过远端的气道上皮组织介导水的转运。气道和鼻咽的上皮下血管和腺体参与了气道的湿润和气道表面液体的形成和调节。气道表面液体层的改变是肺囊性纤维化的重要临床表现, 而且可能在肺水肿中起一定作用。

3.4 水通道在消化道的分布 存在于消化道中的水通道有 AQP3、AQP4、AQP8、AQP10^[13]。

AQP3 主要分布于上起口腔下至前胃(胃体的非腺体部分)的上消化道、远端结肠至肛门部分的上皮细胞。由此推断, AQP3 可能参与了这些上皮细胞的渗透压的维持。

AQP4 主要分布于胃壁细胞, 可能参与了胃酸的分泌。但是采用 AQP4 基因敲除小鼠研究表明, AQP4 对胃酸的分泌没有作用。

目前对于 AQP8 参与肠道水吸收的机制尚不清楚。

在小肠中还存在 AQP10。

3.5 水通道在唾液腺的分布 唾液腺中主要分布有 AQP3、AQP4、AQP5、AQP8^[14]。

有研究表明, AQP3 存在于人体唾液腺腺体的基侧膜中。

采用 RT-PCR 对大鼠下颌下腺腺体中 AQP0~AQP9 蛋白的 mRNA 进行检测, 结果表明, AQP4 和 AQP8 mRNA 呈阳性。

AQP5 主要存在于下颌下腺、腮腺和舌下腺的分泌细胞的顶质膜中。有研究表明, 在 Sjögren's 综合症患者中常常出现 AQP5 在唾液腺中分布异常。对 5 只 AQP5 缺陷小鼠的唾液分泌进行了研究, 结果证实 AQP5 参与了唾液腺的分泌^[15]。

AQP8 在唾液腺腺体上的分布位置存在异议。

3.6 水通道在脑的分布 免疫定位的研究证实 AQP1 丰富地表达于脉络膜上皮组织顶质膜微绒毛中, AQP1 和 Na⁺K⁺ ATPase 在顶质膜中的共定位提示水通道对脑脊液的产生具有非常重要的作用。

目前发现大量在脑组织中表达的水通道蛋白是 AQP4。它主要位于室管膜、组成皮质和脑干边沿的神经胶质细胞、下丘脑视上核和室旁核分泌血管及脑浦肯野细胞^[16]。

根据其分布部位, 脑中 AQP4 的功能有两方面: (1) 通过脑脊液的重吸收, 调节脑室内液体的出入平衡, 并可能对脑水肿的病理状态起调节作用; (2) 感受渗透压的变化, 调节抗利尿激素(antidiuretic hormone, ADH) 的分泌, 间接起到调节肾脏 AQP2 的作用。

3.7 水通道在眼的分布 在眼组织中的不同区域中已经有 5 个 AQPs 被确定。大约一半的晶体纤维细胞蛋白是 MIP (AQP0), 最近证实 AQP0 有弱的水通道的功能, 小鼠 MIP 基因的 2 个不同的突变可导致先天性白内障。

在角膜内皮组织和晶体前囊上皮组织中的 AQP1 和在角膜上皮的 AQP5 可能参与减少这些组织水含量的过程, 这对维持角膜和晶体的透明很重要。在睫状体上皮前部和 Schlemm 管中存在 AQP1, 这说明玻璃体具有分泌和摄取水的功能。AQP1 也存在于虹膜的非色素上皮中, 此处有很高的水通透性, 以促进虹膜随着瞳孔收缩发生快速形状变化。

在视网膜 Müller 细胞中存在 AQP4, 表明它在光感受器周围光依赖的水化中起一定的作用。

在球结膜中的 AQP3 对于防护眼球的水化也有一定的调节功能^[17]。

AQP4 在视网膜 Müller 细胞中非常丰富, 这些细胞围绕并支持着光感受器细胞。因此, AQP4 可能通过影响包绕光感受器的光感性水合作用而参与视觉活动^[18]。

3.8 水通道在其他组织的分布^[19] 研究发现,进行腹膜透析的尿毒症病人,其腹膜上存在 AQP1, 这为腹膜透析的机制提供了进一步的理论解释。肝脏中与肝内胆管相连的胆管细胞中有 AQP1 的表达,提示 AQP1 参与该细胞的水转运,而肝细胞的水转运方式则主要是通过非通道介导的途径进行。

4 水通道与疾病的关系

水通道在组织中的分布表明,水通道基因表达异常可能参与某些水平衡紊乱性疾病的发病。

4.1 AQP1 有一种先天性促红素功能不良性贫血的疾病,对其研究发现,这种病人血液中红细胞 AQP1 的水平 < 正常人的 10%, 红细胞水通透性显著降低,而 AQP1 在基因水平没有突变发生^[20]。这一现象提示这种疾病可能与红细胞中 AQP1 表达水平的缺陷有关,可能影响红细胞的成熟过程。

AQP1 是 Colton (Co) 血型的分子基础,已确定 Colton 抗原源于 AQP1 第 45 残基上丙氨酸/缬氨酸的多态性。目前,在世界范围内已确认了有五个不同的家族完全缺乏 Co 抗原。检查了其中三个家族先证者的血液和尿样,发现她们的红细胞及尿沉淀物中缺乏 AQP1。基因组 DNA 分析证实,这些先证者具有不同的 AQP1 突变的纯合体。两人发生了 AQP1 的基因敲除;另一人有 AQP1 的错义突变。先证者一的外显子 I 缺失;先证者二在 307 位有一个单碱基插入导致了 104 位甘氨酸后的移码突变;而先证者三的 113 位核苷酸由胞嘧啶变成胸腺嘧啶,从而使 38 位残基上的脯氨酸变成了亮氨酸,产生错义突变。这样,基因的突变导致了无 Colton 表型的产生。但令人惊讶的是,这三人均不表现出在血液、肾脏、眼睛、呼吸、胃肠道、生殖以及神经系统的明显异常。但在 AQP1 的基因变异的成人却没有相应特殊的临床表现^[21]。原因可能是其他的 AQP 或其他机制补偿了 AQP1 的缺陷。

已发现 AQP1 缺陷患者肾髓质的间质渗透梯度被破坏,但红细胞膜上有低水平的 AQP3 表达。另外, AQP3 在人类外周白细胞上有表达,其生理功能与病理意义不详^[22]。

AQP1 在分泌眼房水的前睫状体的非色素上皮中含丰富,同时也存在于小梁网上皮及巩膜静脉窦,这里是房水流出通道,并在此重吸收水。因此, AQP1 可能在某些类型的青光眼的发病中起重要作用。

4.2 AQP2 AQP2 缺陷有明显的临床表现^[3-6]。肾源性尿崩症 (nephrogenic diabetes insipidus, NDI)

是一种肾对精氨酸加压素 (AVP) 无反应的疾病,它的临床表现是排泄大量的稀释尿。现已知部分 NDI 病人是由于 AVP 的 V₂ 受体的基因突变引起的。然而有些 NDI 表现为常染色体显性或常染色体隐性遗传方式, Deen 和他的同事已经发现这些方式遗传的 NDI 与 AQP2 水通道基因的突变有关。

后天的 NDI 可由许多原因引起,包括 AQP2 在表达水平的变化。Nielsen 和他的同事最近证实,锂、双侧输尿管阻塞和慢性低钾血症均能引起 NDI, 动物肾脏 AQP2 表达减少,泌尿系统的浓缩功能降低。另外,某些形式的中枢性肾源性尿崩症亦是 AQP2 分子表达异常造成的。

在充血性心力衰竭、肝硬变、抗利尿激素分泌不当综合征等疾病情况下,可发生机体水排泄障碍;而且现在发现在充血性心力衰竭、肝硬变时, AQP2 表达增加,但在抗利尿激素分泌不当综合征中则 AVP 表达增加。

还有报告指出, AQP2 参与了妊娠和适应高海拔时改变水代谢的病理生理过程,并预测 AQP2 表达可能与水平衡失调有关, AQP2 可能是治疗各种原因引起的水平衡失调的靶点之一。

在肾细胞性肿瘤的小管上皮中发现 AQP2, 说明集合管上皮可能是肾细胞癌的来源。

最近的研究表明, AQP1 和 AQP2 共同参与引起一些肾脏疾病的病理生理机制。常染色体显性遗传的多囊肾是一种由许多小管上皮包绕充满液体的囊肿形成的遗传性疾病, AQP1 和 AQP2 均在多囊肾病肾脏内表达。

4.3 AQP4 AQP4 可能对脑水肿的发病与改善起重要作用,而且 AQP4 去磷酸化或分布异常可能改变血脑屏障的通透性,这种情况多见于肿瘤、中风、脑缺血或感染。AQP4 可能在肾功能衰竭、急性血浆渗透压减低、糖尿病高渗状态时提供水进入的通道引起脑水肿。AQP4 在小脑及室管膜细胞中的存在,提示它可能参与运动失调或脑脊液重吸收障碍的病理生理过程。

4.5 AQP5 AQP5 在肺、泪腺及唾液腺的分布可以为干燥综合征的病因学提供解释。

现在人们更加认识到水在哮喘时对气道阻塞的作用。在冷或运动诱发的哮喘中,气流通过鼻及上呼吸道的阻力很大程度上直接来源于上皮血管、鼻、气管及支气管的肿胀。AQP5 存在于 I 型肺泡细胞,提示 AQP5 与淡水溺水、成人呼吸窘迫综合

征及高原性肺水肿的发病机制有关。AQP5 也可能参与充血性心力衰竭的肺脏反应。

5 水通道的调节

目前研究表明,水通道在特殊的生理条件下,可以通过渗透压、激素和药物对水通道的表达和功能产生一定的影响^[23]。

5.1 限水对水通道的调节 正常状态下, AQP2 弥漫地分布于集合管上皮细胞质,限水后, AQP2 向顶质膜转移。限水也可使 AQP2 的表达量增加。限水导致 AQP2 表达量的增加是机体克服长期缺水的生理学调节机制之一。

免疫组化和免疫荧光的研究显示 AQP3 局限于集合管细胞基侧质膜区,但在细胞内囊泡也有少量标记。限水 48 小时后, AQP3 的蛋白质含量均增加了 2 倍。大鼠失水量达体重的 14%~21% 时,肾脏水通道 AQP3 的 mRNA 的含量也增加。

5.2 精氨酸加压素对水通道的调节 除限水外, AQP2 也受精氨酸加压素 (AVP) 的急性调节。经加压素处理后,集合管水的通透性显著增加。长时间用 AVP 处理,将会导致水通道 AQP2 蛋白的合成。

用大鼠肾脏 AQP1 和 AQP2 的 cDNA 在 LLC-PK1 猪肾小管上皮细胞作稳定转染。免疫荧光法显示 AQP1 主要分布于细胞膜; AQP2 则分布于细胞内囊泡。经 AVP 处理后, AQP2 多由细胞内囊泡向细胞膜转移,同时其转染细胞的水通透性显著增加,而 AQP1 转染细胞,其分布未发生变化且对水的通透性只有轻微增加。由此推断, AQP2 转染的细胞在 AVP 作用下可导致功能性水通道插入细胞膜产生所谓的“穿梭机制”。

AQP2 迁移和合成调节目前还在研究之中。将加压素 V₂ 受体克隆到集合管的基底膜中,加压素受体将被活化,通过 AVP-腺苷酸环化酶-cAMP-PKA 调节通路,磷酸化 AQP2 细胞内 C-末端 256 位的丝氨酸 (Ser),激发水通道蛋白 AQP2 向集合管腔膜迁移。同时研究表明, AQP2 基因的增强子中包含有环腺苷酸反应元件。

AVP 通过调控水通道 AQP2 蛋白向集合管主细胞管腔膜的穿梭实现尿液稀释与浓缩的调节^[11,24](图 3)。

5.3 水通道蛋白的泛素化调节 AQP1 作为转运水的一种膜蛋白,其代谢降解途径一直是人们关注的问题,因为 AQP1 的代谢方式影响着水通道蛋白的表达和含量,从而影响体内水的转运和机体各器官的功能。

真核细胞中蛋白质的降解途径主要有溶酶体途径和非溶酶体途径。前者主要通过摄粒作用或胞饮作用,吞噬进入细胞的胞外蛋白质;后者则在蛋白酶复合体 (20s/26s 蛋白酶体) 颗粒内进行,被降解的蛋白底物经过 E1(泛素连接酶)的作用与多聚泛素 (ubiquitin) 结合,从而递呈给 26s 蛋白酶复合体降解。

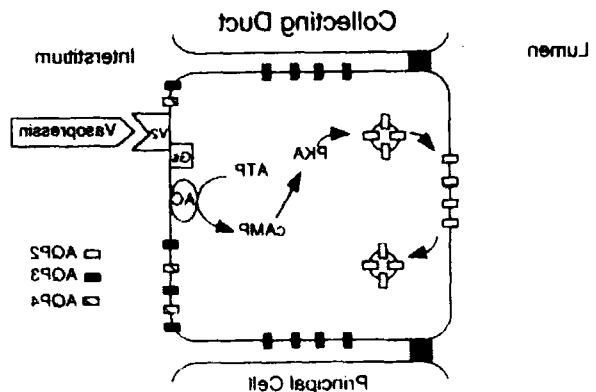


图 3 AVP 对肾脏集合管上皮细胞 AQP2 的调节机制

Agre 等的研究表明水通道主要是通过以泛素化为主要途径的非溶酶体途径。水通道泛素化在一般情况下,半衰期 <4 小时,当细胞暴露在高渗透压介质中 4 小时,水通道的泛素化减少,水通道蛋白的稳定性显著增加。在高渗透压下,水通道泛素化减少可以持续 24 小时。抑制水通道的泛素化,可以增加水通道的稳定性,促进水的转运^[25]。

6 作用于水通道的药物

水通道作为人体内广泛分布的转运水的细胞膜蛋白,研究表明它与机体一些疾病的病理生理因素有关。水通道蛋白能否作为水平衡紊乱性疾病治疗药物的靶点一直是人们关注的热点,目前发现的影响水通道功能的药物综述如下。

6.1 汞制剂 AQP1、AQP2 和 AQP3 都是汞敏感水通道,受汞化合物的抑制,这正是临床曾经使用汞利尿剂治疗心功能不全的机制。

在水通道结构中,定位在 AQP1 E 襻的 NPA (Asn-Pro-Ala) 序列前有一半胱氨酸 (C-189),被认为是 AQP1 水通道的汞抑制部位。汞离子和有机汞通过与 C-189 结合,从而阻塞或破坏这个孔,降低水的通透性。

在 AQP2 的相关部位也有半胱氨酸存在,因而也对汞敏感。

但在汞不敏感水通道 (MIWC) 和汞敏感的 AQP3 相应部位,均无半胱氨酸,推测 AQP3 是由于在 B 襻靠近 NAP 处有一半胱氨酸 (C-78),因

而对汞敏感。定点诱变的研究证实, MIWC 之所以对汞不敏感, 是由于其 NPA 序列附近缺少一个半胱氨酸残基, 而且其残基 70~73 和 189 接近其通水孔道^[26]。

6.2 四乙铵 (tetraethylammonium, TEA) Andrea 等将人的 AQP1 基因表达于爪蟾卵母细胞中, TEA (0.05~10mM) 可以抑制水通道对水的转运。但是对水通道 AQP1 的 cGMP 依赖性离子转运没有明显的抑制作用。最近已有人证实 TEA 通过与 AQP1 蛋白 E 襻一个酪氨酸 186 残基的 OH⁻ 基团相互作用, 影响 AQP1 对水的通透性。这也为水通道功能的研究提供了有力工具^[27]。

6.3 锂制剂 锂常用于治疗狂躁抑郁性精神病, 其副作用为肾源性尿崩症 (NDI)。有证据表明锂可抑制抗利尿激素 (加压素) 的作用, 但机制未明。Marpls 等用免疫印迹的方法研究发现, 经 10 日锂治疗, AQP2 的表达减少到 31%, 25 日后继续减少到 4%, 与尿频的发展程度相平行。此外, 免疫荧光法和免疫金定量也证实了锂诱导 AQP2 向下调节^[28]。

6.4 秋水仙碱 微管对于膜转运和上皮细胞极性的维持有重要作用, 秋水仙碱可致微管破裂而影响其上述功能。免疫荧光和免疫电镜显示了秋水仙碱诱导的 AQP1 在细胞内分布的巨大变化, AQP1 一般几乎只分布于细胞质膜, 经秋水仙碱治疗后, 有一部分转移到了细胞内小囊泡^[29]。

6.5 碳酸酐酶抑制剂对水通道的调节 我们对于碳酸酐酶抑制剂乙酰唑胺和托吡酯对水通道 AQP1 的表达和功能做了比较深入的研究。结果表明, 乙酰唑胺对水通道蛋白转运水的功能和水通道蛋白的表达具有抑制作用。采用经典的爪蟾卵母细胞测定水通道转运水功能的实验结果表明, 乙酰唑胺在 1×10^{-7} mol/L~ 1×10^{-5} mol/L 剂量范围内可呈剂量依赖性地抑制爪蟾卵母细胞的膨胀, 表明乙酰唑胺也能抑制 AQP1 转运水的功能^[30]; 在大鼠肾脏近曲小管上皮细胞实验中, 用 1×10^{-5} mol/L 乙酰唑胺处理 3 日后, 大鼠肾脏近曲小管上的 AQP1 蛋白含量即减少到 66.6%, 处理 7 日后, AQP1 的含量进一步减少到 58.4%^[31]。在动物实验中, 发现可以对 C57BL/6 小鼠 Lewis 肺癌自发性肺转移模型小鼠肺部水通道 AQP1 表达明显高于正常组, 乙酰唑胺 (40mg/kg/d, po 21 日) 可以明显地抑制

肺部水通道 AQP1 的表达, 同时对肿瘤转移抑制率为 83.9%^[32]。以上研究表明, 乙酰唑胺对水通道转运水的功能有一定抑制作用。水通道是否是肿瘤发生和发展的某一关键环节, 以及是否可以作为肿瘤药物作用的靶点, 相关的研究仍在继续进行中。目前已有较多的研究发现, 在一些肿瘤细胞中发现 AQP1 表达, 如肾癌细胞、乳腺癌细胞、恶性角肿瘤细胞。在 AQP1 基因缺陷小鼠, 肿瘤的生长和血管的生成明显减慢, 说明 AQP1 可能与肿瘤的生长和血管的生成有关。这也许为肿瘤发病机制和药物研制提供了新的思路。

6.6 乙醇、乙腈 最近, Lahajnar 等^[33] 研究了乙醇和乙腈对牛和小鸡红细胞水扩散通透性的影响。他们推测乙醇和乙腈通过介入牛红细胞膜脂质而影响 AQP1 水通道的通透性, 但不影响脂对水的扩散。他们还推测, 水经 AQP1 水通道跨膜转运的抑制, 也许与一些麻醉剂, 如乙醇的抗溶血性作用有关。

6.7 其他药物对水通道的调节 我们用 RT-PCR 的方法发现雌二醇及 anordiol (一种雌激素的部分拮抗剂) 可以使未成年大鼠子宫 AQP1 基因表达增多, 一次给药在 8 小时后达到最大程度的增加^[34]。提示雌激素类或抗雌激素物质对雌性动物体内组织水的渗透作用可能是通过 AQP1 水通道的基因表达而实现的。

[参 考 文 献]

- [1] Preston G M, Carroll T P, Guggino W B, et al. Appearance of water channels in *Xenopus* oocytes expressing red cell CHIP28 protein. *Science*, 1992, **256**: 385~387
- [2] Preston G M, Agre P. Isolation of the cDNA for erythrocyte integral membrane protein of 28 kilodaltons: member of an ancient channel family. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1991, **88**(24): 11110~11114
- [3] 陈或, 李学军, 王京生. 水通道及其生理与病理意义. *基础医学与临床*, 2000, **20**(1): 90~94
- [4] 李学军, 于和鸣. 水通道的分子生物学研究. *生理科学进展*, 1996, **27**(1): 19~24
- [5] 马兵, 李学军. 水通道的生理功能及与疾病的关系. *国外医学生理病理科学和临床分册*, 1998, **18**(2): 101~104
- [6] 李学军. 水通道的分子生物学研究进展. *药理学进展*, 1998, 65~71
- [7] Kozono D, Yasui M, King L S, et al. Aquaporin water channels: atomic structure and molecular dynamics meet clinical medicine. *J Clin Invest*, 2002, **109**(11): 1395~1399
- [8] 姚小皓, 李学军. AQP1 的结构和功能. *生理科学进展*, 2000, **31**(4): 345~348
- [9] Agre P, Preston G M, Smith B L, et al. Aquaporin CHIP: the archetypal molecular water channel. *Am J Physiol*, 1993, **265**: F463~F476

- [10] Zhang R B, van Hoek A N, Biwersi J, *et al.* A point mutation at cysteine 189 blocks the water permeability of rat kidney water channel CHIP28k. *Biochemistry*, 1993, **32**(12): 2938~2941
- [11] Schriera R W, Cadnapaphornchai M A. Renal aquaporin water channels: from molecules to human disease. *Prog Biophys Mol Biol*, 2003, **8**: 117~131
- [12] Jiao G Y, Li E R, Yu R J. Decreased expression of AQP1 and AQP5 in acute injured lungs in rats. *Chin Med J (Engl)*, 2002, **115**(7): 963~967
- [13] Calanitta G, Mazzone A, Bizzoca A, *et al.* Expression and immunolocalization of the aquaporin-8 water channel in rat gastrointestinal tract. *Eur J Cell Biol*, 2001, **80**(11): 711~719
- [14] Murdiastuti K, Miki O, Yao C, *et al.* Divergent expression and localization of aquaporin 5, an exocrine-type water channel, in the submandibular gland of Sprague-Dawley rats. *Pflugers Arch*, 2002, **445**(3): 405~412
- [15] Ma T H, Song Y L, Gillespie A, *et al.* Defective secretion of saliva in transgenic mice lacking aquaporin-5 water channels. *J Biol Chem*, 1999, **274**(29): 20071~20074
- [16] Jung J S, Bhat R V, Preston G M, *et al.* Molecular characterization of an aquaporin cDNA from brain: candidate osmoreceptor and regulator of water balance. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994, **91**(26): 13052~13056
- [17] Hamann S, Zeuthen T, La Cour M, *et al.* Aquaporins in complex tissues: distribution of aquaporins 1-5 in human and rat eye. *Am J Physiol*, 1998, **274**(5 Pt 1): C1332~C1345
- [18] Stamer W D, Peppel K, O'Donnell M E, *et al.* Expression of aquaporin-1 in human trabecular meshwork cells: role in resting cell volume. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2001, **42**(8): 1803~1811
- [19] Matsuzaki T, Tajika Y. Aquaporins: a water channel family. *Anat Sci Int*, 2002, **77**: 85~93
- [20] Agre P, Smith B L, Baumgarten R, *et al.* Human red cell aquaporin CHIP. II. Expression during normal fetal development and in a novel form of congenital dyserythropoietic anemia. *J Clin Invest*, 1994, **94**(3): 1050~1058
- [21] Preston G M, Smith B L, Zeidel M L, *et al.* Mutations in aquaporin-1 in phenotypically normal humans without functional CHIP water channels. *Science*, 1994, **265**(5178): 1585~1587
- [22] Roudier N, Verbavatz J M, Maurel C, *et al.* Evidence for the presence of aquaporin-3 in human red blood cells. *J Biol Chem*, 1998, **273**(14): 8407~8412
- [23] 母生梅, 李学军. 水通道基因表达和功能的调节. 国外医学-分子生物学分册, 1998, **20**(1): 26~30
- [24] Hamilton K L, Butt A G. The molecular basis of renal tubular transport disorders. *Comp Biochem Physiol A: Mol Integr Physiol*, 2000, **126**(3): 305~321
- [25] Leitch V, Agre P. Altered ubiquitination and stability of aquaporin-1 in hypertonic stress. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, **98**(5): 2894~2898
- [26] Shi L B, Verkman A S. Selected cysteine point mutations confer mercurial sensitivity to the mercurial-insensitive water channel MIWC/AQP-4. *Biochemistry*, 1996, **35**(2): 538~544
- [27] Brooks H L, Regan J W, Yool A J. Inhibition of aquaporin-1 water permeability by tetraethylammonium: involvement of the loop E pore region. *Mol Pharmacol*, 2000, **57**(5): 1021~1026
- [28] Marples D, Christensen S, Christensen E I, *et al.* Lithium-induced downregulation of aquaporin-2 water channel expression in rat kidney medulla. *J Clin Invest*, 1995, **95**(4): 1838~1845
- [29] Katsura T, Verbavatz J M, Farinas J, *et al.* Constitutive and regulated membrane expression of aquaporin 1 and aquaporin 2 water channels in stably transfected LLC-PK1 epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1995, **92**(16): 7212~7216
- [30] 母生梅, 马兵, 姚小皓等. 乙酰唑胺对表达水孔蛋白 1 的非爪蟾卵母细胞转运水功能的影响. 药理学学报, 2002, **37**(12): 934~937
- [31] 母生梅, 暨荀鹤, 马兵等. 乙酰唑胺对大鼠肾脏近曲小管上皮细胞作用的差异蛋白分析及其与 AQP1 抑制的关系. 药理学学报, 2003, **38**(3): 169~172
- [32] Xiang Y, Ma B, Li T, *et al.* Acetazolamide suppresses tumour metastasis and related protein expression in mice bearing Lewis lung carcinoma. *Acta Pharmacol Sin*, 2002, **23**(8): 745~751
- [33] Lahajnar G, Macek P, Smid P, *et al.* Ethanol- and acetone-induced inhibition of water diffusional permeability across bovine red blood cell membrane. *Biochim Biophys Acta*, 1995, **1235**(2): 437~442
- [34] Li X J, Yu H M, Koide S S. Regulation of water channel gene(AQP-CHIP) expression by estradiol and andriol in rat uterus. *Acta Pharmaceutica Sinica*, 1997, **32**(8): 586~592

书 讯:

复旦大学遗传学研究所赵寿元教授编写的《英汉遗传工程词典》(第三版)已由复旦大学出版社出版。该书收录了遗传工程、分子遗传学和基因组学的名词逾 2 000 条, 每条均有言简意赅的释义, 有些还附有简图。同时还收录了基因组学、蛋白质学等相关网址。该书可作为高等院校师生和研究人员教学和科研的参考工具书。

购买请垂询复旦大学出版社发行科, 电话: (021)65118853。