

文章编号: 1004-0374(2009)04-0499-05

V-ATPases 的功能及其抑制剂研究进展

游海燕, 邓云, 覃文新*

(上海交通大学肿瘤研究所癌基因及相关基因国家重点实验室, 上海 200032)

摘要: V-ATPases 作为一类酶, 在真核细胞中广泛存在。V-ATPases 是一个由多个亚基组成的复合物, 主要有两个结构域, 分别是位于外周的 V_1 结构域和跨膜的 V_0 结构域。 V_1 结构域可以通过水解 ATP 供能; 而 V_0 结构域是质子的通道。它们发挥作用主要是通过水解 ATP 供能, 泵运 H^+ 进入囊泡腔中或泵 H^+ 出细胞外。V-ATPases 定位于细胞器膜及某些特殊细胞的细胞质膜, 参与骨吸收、肿瘤的侵袭及耐药等生理及病理过程, 因而 V-ATPases 是治疗骨质疏松、糖尿病及肿瘤等人类疾病的候选分子靶标。目前有许多研究致力于发现新的潜在的特有的 V-ATPase 抑制剂。

关键词: V-ATPases; 耐药; 肿瘤; 骨质疏松; 抑制剂

中图分类号: Q55; Q71; R979.1; R730.272 **文献标识码:** A

Progress in the functions of V-ATPases and its inhibitors

YOU Hai-yan, DENG Yun, QIN Wen-xin*

(State Key Laboratory for Oncogenes and Related Genes, Shanghai Cancer Institute,
Shanghai Jiaotong University of Medicine, Shanghai 200032, China)

Abstract: The vacuolar ATPases (V-ATPases) are a class of enzymes distributed throughout eukaryotes. They are large, multi-subunit complexes organized into two domains, the peripheral V_1 domain and the integral V_0 domain. V_1 domain is responsible for ATP hydrolysis whereas V_0 domain carries out proton translocation. V-ATPases provide energy by ATP hydrolysis to pump protons from the cytoplasm to the lumen of vacuoles or into the extracellular environment. They locate in the membrane of intracellular compartments and in the plasma membrane of some specific cells. V-ATPases involve in bone resorption, tumor cell invasion and drug resistance, respectively. Therefore, V-ATPases are thought to be a good molecular target in the treatment of a variety of human diseases, including osteoporosis, diabetes and cancer. Scientists focus on finding novel potential and specific inhibitors of V-ATPase.

Key words: V-ATPases; drug resistance; cancer; osteoporosis; inhibitors

真核细胞中的阳离子转运 ATPase 主要有三类: P-ATPase、F-ATPase 及 V-ATPase。P-ATPase 包括 Na^+/K^+ -ATPase、 H^+/K^+ -ATPase 和 Ca^{2+} -ATPase 等, 可以参与转运多种阳离子, 如 Na^+ 、 K^+ 、 H^+ 和 Ca^{2+} 等^[1]。F-ATPase 主要存在于线粒体中, 依赖跨膜的质子电化学梯度合成 ATP。V-ATPase 存在于细胞器膜上, 如内体、溶酶体及网格蛋白包被囊泡上, 通过 ATP 供能把质子泵入这些细胞器中维持这些细胞器的相对酸性的内环境。另外, V-ATPase 还存在于某些特殊细胞的细胞质膜上, 如肾小管上皮细

胞、破骨细胞、巨噬细胞和附睾上皮细胞的细胞质膜上, 参与这些特殊细胞的功能^[2-5]。除此之外, 肿瘤细胞的质膜上也有 V-ATPase 的表达。

1 V-ATPases 的结构

V-ATPase 是一个由多个亚基组成的复合物, 主要有两个结构域^[6]: 一个是位于细胞浆的 V_1 结构域

收稿日期: 2009-03-23; 修回日期: 2009-04-22

基金项目: 上海市国际科技合作项目(08410700900); 国家重点基础研究发展计划“973”项目(2009CB521803)

*通讯作者 E-mail: qinwenxin@smmail.cn

(相对分子质量是 640 k)；另一个是跨膜的 V_0 结构域(相对分子质量是 260 k)。 V_1 结构域可以水解 ATP 供能；而 V_0 结构域是质子进入的通道。 V_1 结构域由 A—H 等 8 个不同的亚单位组成，交替排列的 A 和 B 亚单位组成六聚体。3 个催化位点主要位于 A 亚单位，3 个调节位点主要位于 B 亚单位上，其他亚单位分别组成 2 个连接 V_0 与 V_1 结构域的杆状结构。亚单位 C、E、G 和 H 与亚单位 a 的氨基末端组成外周杆状结构。亚单位 D 和 F 组成中间杆状结构。 V_0 结构域由 a、d、e、c、c'、c'' 6 个不同的亚单位组成，亚单位 c、c'、c'' 是高度疏水的蛋白，也被称为蛋白脂亚单位。亚单位 c、c' 有 4 个跨膜螺旋，c'' 有 5 个跨膜螺旋，每个蛋白脂亚单位都包含 1 个质子转运所必需的羧基基团。1 个 c'、1 个 c'' 及 4—5 个 c 形成一个蛋白脂环。d 亚单位是一个疏水蛋白，它与这个蛋白脂环的胞浆面紧紧结合，另外它还有与中间杆状结构结合的位点。蛋白脂环、d 亚单位和 V_1 结构域的 D、F 亚单位被称为旋转复合物(图 1)。

每个亚单位的精确功能及它们的相互作用仍有

待研究。另外，有证据表明亚单位存在多种形式的异构体，而且它们在不同器官及组织中表达不同(表 1)。附加的 V-ATPase 亚单位可能参与器官特异的调节^[7-9]。

在细胞内有多种机制可以严格控制 V-ATPase 的活性，这样可以维持不同细胞器具有特定的 pH，如溶酶体的酸性比晚期内体强，而晚期内体的酸性又

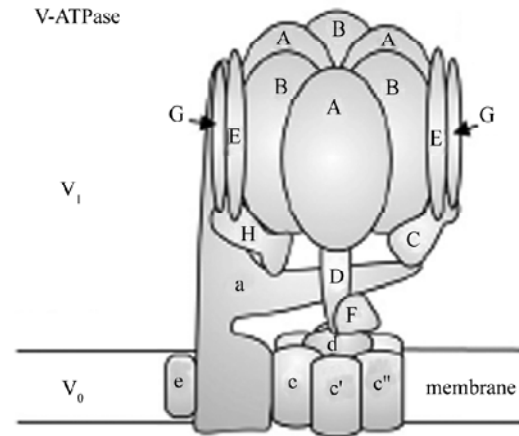


图 1 V-ATPase 的结构

表 1 V-ATPase 的各个亚基及其功能

结构域	亚单位	功能(已知的)	异构体	组织
V_1	A	催化位点, 结合 ATP		
	B	非催化位点, 结合 ATP	B1	肾脏
			B2	广谱
	C	外周定子, 组合装置	C1	广谱
			C2	肺, 肾脏
	D	中央转子		
	E	外周定子 (E1, 顶体酸化; 与醛缩酶相关)	E1	睾丸
			E2	广谱
V_0	F	中央转子		
	G	外周定子	G1	广谱
			G2	神经元
			G3	肾脏
	H	外周定子		
	a	H^+ 转运	a1	广谱
			a2	广谱
			a3	广谱, (破骨细胞)
			a4	肾脏
	c	H^+ 转运		
	c'	H^+ 转运		
	c''	H^+ 转运		
d	组合装置	d1	广谱	
		d2	肾脏, 肺, 破骨细胞	
e	膜部分相关	e1		
		e2		

比早期体内强。早期发现的一个调节 V-ATPase 活性的机制: 在 V-ATPase 的催化位点的保守半胱氨酸残基形成的可逆的二硫键可以抑制 V-ATPase 的活性^[10, 11]。第二个重要的机制是调节质子泵的密度: 通过细胞质膜与包含高密度 V-ATPase 的细胞内囊泡的顶端膜融合来调节质子泵的密度, 这个机制对于调控依赖 V-ATPase 的质子经上皮细胞质膜转运尤其重要。第三个机制是通过 V_0 结构域与 V_1 结构域可逆的分离来调节酶的活性。在酵母和昆虫细胞中, 营养缺乏时 V_1 与 V_0 结构域会发生分离, 这可能是保存储备 ATP 能量的一个途径。在酵母中, 这两个结构域的可逆分离非常迅速且不需要新蛋白的合成。再聚集和分离是两个独立控制的过程。复合体依赖葡萄糖的再聚集过程需要一个新的异源三聚体复合物囊泡和体内酸性的调节剂 (regulator of the H^+ -ATPase of the vacuolar and endosomal membranes, RAVE)。RAVE 由两个新蛋白 Rav1p、Rav2p 和泛素化连接酶亚单位 Skp1 组成。RAVE 促进依赖葡萄糖和正常生物合成的 V-ATPase 的再聚集^[12, 13]。第四个机制是调节质子转运和 ATP 水解的偶联率。一系列的变化, 如限制蛋白水解作用、升高的 ATP 浓度、亚单位 D 和没有同源性的亚单位 A 的突变都可以导致质子转运与 ATP 水解部分解偶联。另外, 亚单位 a 异构体为 Vph1p 的复合物质子转运和 ATP 水解的偶联率是异构体为 Stv1p 的复合物的 5 倍^[14]。不同形式的亚单位 a 异构体对于质子转运和 ATP 水解的偶联率非常重要。体内囊泡酸性还可以由 V-ATPase 以外的其他转运体调节。V-ATPase 在转运质子的过程中, 建立了腔内阳性的膜电势, 因而必须有补偿的其他电子流才能发生质子的转运^[15]。

2 V-ATPases 的功能

存在于细胞器膜上的 V-ATPase 可以把质子泵入细胞器中, 维持细胞器相对酸性的 pH。内体的酸性 pH 对受体介导的内吞非常关键, 内化的受体配体复合物的分离及受体循环回细胞膜都依赖酸化的条件。内体的酸性微环境有助于流感病毒等多种被膜病毒及炭疽毒素等毒素的细胞毒性部分进入细胞。溶酶体的酸性可以激活溶酶体腔中的降解酶, 还可以为偶联转运小分子及离子进出溶酶体膜提供动力。分泌囊泡如突触囊泡的酸性可以驱动小分子如神经递质的转运。

位于细胞质膜上的 V-ATPase 参与正常生理及疾病的过程。位于肾脏远端肾小管及集合管肾单位闰

细胞细胞质膜上的 V-ATPase 对机体的酸碱平衡是必需的, V-ATPase 亚基上的基因突变可以导致机体代谢性酸中毒^[16]。破骨细胞皱褶缘的细胞质膜上存在的 V-ATPase 可以酸化吸收腔隙, 这种酸性微环境利于羟磷灰石溶解及激活 cathepsin K 这种消化胶原的酶, 从而利于骨吸收, 阻止破骨细胞 V-ATPase 的功能可以抑制骨吸收, 破骨细胞 V-ATPase 已成为治疗骨质疏松症的新靶标^[17]。巨噬细胞及嗜中性粒细胞胞膜上的 V-ATPase 参与调控 pH 稳态。位于附睾及输精管的 V-ATPase 对于精子成熟及储存很重要。

V-ATPase 还与肿瘤治疗的耐药及肿瘤的侵袭转移相关。肿瘤细胞细胞质膜上的质子泵一方面可以把 H^+ 泵出细胞, 使得肿瘤细胞存在的微环境呈酸性, 而导致进入细胞的弱碱性药物如蒽环类药物的总量减少; 另一方面位于细胞器膜上的质子泵可以将 H^+ 泵至如溶酶体等细胞器, 导致弱碱性药物积聚于酸性细胞器中。位于细胞不同部位的质子泵共同导致细胞内有效药物浓度降低, 从而引起细胞耐药。我们的研究表明, 靶向质子泵的 RNA 干扰 (干扰沉默 ATP6L, 质子泵 V_0 结构域的 c 亚基) 可以增敏化疗药物阿霉素等对乳腺癌耐药细胞的作用^[18]。肿瘤细胞的酸性微环境还可诱导溶酶体酶 cathepsin B、D 及 L 的活化和分泌增强^[19]。另外, 它还可以激活蛋白水解酶, 促进细胞外基质 (extracellular matrix, ECM) 的降解和重构, 从而促进肿瘤的侵袭和转移^[20]。其中, MMPs 是降解和重构 ECM 的重要蛋白酶类。我们实验室的研究结果表明, RNA 干扰沉默 ATP6L 后, 可阻滞肝癌细胞生长及抑制肝癌侵袭及转移^[21]。

3 V-ATPase 的抑制剂

发现的第一种特异的 V-ATPase 抑制剂 bafilomycin A1 在纳摩尔浓度时即可以抑制 V-ATPase 的活性, 但要在微摩尔浓度才影响 P-ATPase 的活性, 对 F-ATPase 的活性毫无影响^[22], 因而 bafilomycin A1 作为一个有效工具用来特异研究 V-ATPase 的化学及生理作用。concanamycin A 与 bafilomycin A1 同属于微生物抗生素大环内酯类, concanamycin A 也是 V-ATPase 的特异抑制剂。bafilomycin A1 与 V_0 结构域的 c 亚基结合, 可能通过阻止 c 亚单位参与组成的蛋白脂环的转动而抑制酶活性; 但是由于 bafilomycin A1 没有选择性, 可以作用于真核细胞内所有的 V-ATPase, 造成它们的体内外毒副作用太强, 而未能用于临床。对 bafilomycin A1 进行系统

化学修饰得到了针对溶骨性疾病的合成抑制剂H362/48和SB242784,它们对破骨细胞V-ATPase具有相对的组织特异性。H362/48抑制脑V-ATPase的能力只有抑制破骨细胞V-ATPase的1/6。据报道SB242784抑制破骨细胞只需抑制其他组织如肝脏、肾脏及脑组织细胞1%的浓度^[23]。

后来又发现了一类benzolactone enamides的V-ATPase抑制剂,包括salicylihalamide A和Lobatamides等^[24],是从海洋海绵动物、海鞘及细菌中分离得到,其中salicylihalamide A可特异地抑制哺乳类V-ATPase,而对真菌类及酵母V-ATPase无效^[25]。

发现的第三类V-ATPase抑制剂是chondropsins类,是从海洋海绵动物分离得到。它们与前两种自然来源的抑制剂不一样,它们的抑制能力稍低,但与抑制哺乳类V-ATPase相比,它们更倾向于抑制真菌类V-ATPase。

通过破骨细胞微体随机筛选发现新的V-ATPase抑制剂FR167356,它的化学结构及抑制特性与其他已经发现的抑制剂不同。它是第一个可以区分破骨细胞细胞质膜及溶酶体V-ATPase的抑制剂,但是它对巨噬细胞及肾脏的作用与对破骨细胞的作用相同^[26-27]。

另外还有一类H⁺-K⁺-ATPase的抑制剂,如奥美拉唑(Omeprazole)、艾美拉唑(esomeprazole)等,这类苯并咪唑类质子泵抑制剂可以抑制胃黏膜壁细胞的H⁺-K⁺-ATPase泵的作用,在临床上已经广泛地被用于治疗消化性溃疡。此外,它们还可以直接抑制V-ATPase的功能^[28-30],它们的原药不能发挥作用,必须选择性地聚集在酸性的空间里,才能使其吡啶及苯并咪唑氮质子化,从而形成四环结构的甲磺酸烯胺这种药物的活性形式,随后与质子泵共价及不可逆相互作用从而抑制泌酸^[31]。肿瘤组织存在于缺氧环境中,糖酵解作用增强。肿瘤细胞为了适应这种不利环境,逃避凋亡,其pH调节能力增强,使得细胞外呈酸性、细胞内相对碱性。而正是肿瘤组织存在这种酸性微环境,正常组织细胞外pH不呈酸性,因而奥美拉唑等可以特异性地对肿瘤组织发挥作用。奥美拉唑可以聚集在肿瘤组织中,形成活性形式,抑制肿瘤组织中的质子泵功能,改变肿瘤细胞存在的pH梯度,从而增敏弱碱性药物对肿瘤的作用^[32,33]。

4 总结

目前,人们对V-ATPase的基本结构在生理及病理过程中所起的作用、V-ATPase的活性如何调节及发现V-ATPase的抑制剂等各方面都已经取得了较大的进步。虽然已经发现了数种V-ATPase抑制剂,但是除了知道bafilomycin A1等少数抑制剂抑制V-ATPase的机理外,其他抑制剂如何抑制V-ATPase的功能,尚不甚清楚。V-ATPase不同亚单位如何相互作用,机体对V-ATPase的活性如何进行更精细的调节,寻找及合成更多的特定靶向某种组织的V-ATPase抑制剂都是今后亟待解决的问题。

[参 考 文 献]

- [1] Niikura K. Vacuolar ATPase as a drug discovery target. *Drug News Perspect*, 2006, 19(3): 139-44
- [2] Gluck SL, Underhill DM, Iyori M, et al. Physiology and biochemistry of the kidney vacuolar H⁺-ATPase. *Annu Rev Physiol*, 1996, 58: 427-45
- [3] Blair HC, Teitelbaum SL, Ghiselli R, et al. Osteoclastic bone resorption by a polarized vacuolar proton pump. *Science*, 1989, 245(4920): 855-7
- [4] Swallow CJ, Grinstein S, Rotstein OD. A vacuolar type H⁺-ATPase regulates cytoplasmic pH in murine macrophages. *J Biol Chem*, 1990, 265(13): 7645-54
- [5] Brown D, Lui B, Gluck S, et al. A plasma membrane proton ATPase in specialized cells of rat epididymis. *Am J Physiol*, 1992, 263(4 Pt 1): C913-6
- [6] Cipriano DJ, Wang Y, Bond S, et al. Structure and regulation of the vacuolar ATPases. *Biochim Biophys Acta*, 2008, 1777(7-8): 599-604
- [7] Malkus P, Graham LA, Stevens TH, et al. Role of Vma21p in assembly and transport of the yeast vacuolar ATPase. *Mol Biol Cell*, 2004, 15(11): 5075-91
- [8] Supek F, Supekova L, Mandiyan S, et al. A novel accessory subunit for vacuolar H⁺-ATPase from chromaffin granules. *J Biol Chem*, 1994, 269(39): 24102-6
- [9] Holthuis JC, Jansen EJ, Schoonderwoert VT, et al. Biosynthesis of the vacuolar H⁺-ATPase accessory subunit Ac45 in *Xenopus* pituitary. *Eur J Biochem*, 1999, 262(2): 484-91
- [10] Feng Y, Forgac M. A novel mechanism for regulation of vacuolar acidification. *J Biol Chem*, 1992, 267(28): 19769-72
- [11] Feng Y, Forgac M. Inhibition of vacuolar H⁺-ATPase by disulfide bond formation between cysteine 254 and cysteine 532 in subunit A. *J Biol Chem*, 1994, 269(18): 13224-30
- [12] Seol JH, Shevchenko A, Shevchenko A, et al. Skp1 forms multiple protein complexes, including RAVE, a regulator of V-ATPase assembly. *Nat Cell Biol*, 2001, 3(4): 384-91
- [13] Smardon AM, Tarsio M, Kane PM. The RAVE complex is essential for stable assembly of the yeast V-ATPase. *J Biol Chem*, 2002, 277(16): 13831-9
- [14] Kawasaki-Nishi S, Nishi T, Forgac M. Yeast V-ATPase com-

- plexes containing different isoforms of the 100-kDa α -subunit differ in coupling efficiency and *in vivo* dissociation. *J Biol Chem*, 2001, 276(21): 17941-8
- [15] Marshansky V, Futai M. The V-type H^+ -ATPase in vesicular trafficking: targeting, regulation and function. *Curr Opin Cell Biol*, 2008, 20(4): 415-26
- [16] Karet FE, Finberg KE, Nelson RD, et al. Mutations in the gene encoding B1 subunit of H^+ -ATPase cause renal tubular acidosis with sensorineural deafness. *Nat Genet*, 1999, 21(1): 84-90
- [17] Beutler JA, McKee TC. Novel marine and microbial natural product inhibitors of vacuolar ATPase. *Curr Med Chem*, 2003, 10(9): 787-96
- [18] You HY, Jin J, Shu HQ, et al. Small interfering RNA targeting the subunit ATP6L of proton pump ATPase overcomes chemoresistance of breast cancer cells. *Cancer Lett*, 2009, 280(1): 110-9
- [19] Raghunand N, Gatenby RA, Gillies RJ. Microenvironmental and cellular consequences of altered blood flow in tumours. *Br J Radiol*, 2003, 76: S11-22
- [20] Rofstad EK, Mathiesen B, Kindem K, et al. Acidic extracellular pH promotes experimental metastasis of human melanoma cells in athymic nude mice. *Cancer Res*, 2006, 66(13): 6699-707
- [21] Lu XD, Qin WX, Li JJ, et al. The growth and metastasis of human hepatocellular carcinoma xenografts are inhibited by small interfering RNA targeting to the subunit ATP6L of proton pump. *Cancer Res*, 2005, 65(15): 6843-9
- [22] Bowman EJ, Bowman BJ. V-ATPases as drug targets. *J Bioenerg Biomembr*, 2005, 37(6): 431-5
- [23] Visentin L, Dodds RA, Valente M, et al. A selective inhibitor of the osteoclastic V- H^+ -ATPase prevents bone loss in both thyroparathyroidectomized and ovariectomized rats. *J Clin Invest*, 2000, 106(2): 309-18
- [24] Lebreton S, Jaunbergs J, Roth MG, et al. Evaluating the potential of vacuolar ATPase inhibitors as anticancer agents and multigram synthesis of the potent salicylilamide analog saliphenylhalamide. *Bioorg Med Chem Lett*, 2008, 18(22): 5879-83
- [25] Boyd MR, Farina C, Belfiore P, et al. Discovery of a novel antitumor benzolactone enamide class that selectively inhibits mammalian vacuolar-type H^+ -ATPases. *J Pharmacol Exp Ther*, 2001, 297(1): 114-20
- [26] Niikura K, Takano M, Sawada M. A novel inhibitor of vacuolar ATPase, FR167356, which can discriminate between osteoclast vacuolar ATPase and lysosomal vacuolar ATPase. *Br J Pharmacol*, 2004, 142(3): 558-66
- [27] Niikura K, Takeshita N, Takano M. A vacuolar ATPase inhibitor, FR167356, prevents bone resorption in ovariectomized rats with high potency and specificity: potential for clinical application. *J Bone Miner Res*, 2005, 20(9): 1579-88
- [28] Mizunashi K, Furukawa Y, Katano K, et al. Effect of omeprazole, an inhibitor of H^+ , K^+ -ATPase, on bone resorption in humans. *Calcif Tissue Int*, 1993, 53(1): 21-5
- [29] Graber ML, Devine P. Omeprazole and SCH-28080 inhibit acid secretion by the turtle urinary bladder. *Ren Physiol Biochem*, 1993, 16(5): 257-67
- [30] Sabolic I, Brown D, Verbavatz JM, et al. H^+ -ATPases of renal cortical and medullary endosomes are differentially sensitive to Sch-28080 and omeprazole. *Am J Physiol*, 1994, 266(6 Pt 2): F868-77
- [31] Wallmark B, Brandstrom A, Larsson H. Evidence for acid-induced transformation of omeprazole into an active inhibitor of H^+ - K^+ -ATPase within the parietal cell. *Biochim Biophys Acta*, 1984, 778(3): 549-58
- [32] Fais S, De Milito A, You H, et al. Targeting vacuolar H^+ -ATPases as a new strategy against cancer. *Cancer Res*, 2007, 67(22): 10627-30
- [33] Luciani F, Spada M, De Milito A, et al. Effect of proton pump inhibitor pretreatment on resistance of solid tumors to cytotoxic drugs. *J Natl Cancer Inst*, 2004, 96(22): 1702-13