核苷转运蛋白的研究进展

李 剑 李光永 王道文*

(中国科学院遗传与发育生物学研究所植物细胞与染色体工程国家重点实验室, 北京 100101. * 联系人,

E-mail: dwwang@genetics.ac.cn)

生物膜构成了细胞与外界环境之间的一道天然屏障, 细胞生存所需的各种营养物质或其代谢产物必须通过这道屏障才能进入或输出细胞. 无论是原核还是真核细胞, 细胞膜上都存在多种起运输作用的膜蛋白分子, 它们以各种不同的机制参与营养物质或代谢产物的转运. 根据跨膜转运蛋白(transmembrane solute transporter)起运输作用时的底物特异性、转运机制及转运蛋白间的同源性, Paulsen 等人^[1]将真核细胞中的跨膜转运蛋白进行了系统分类, 有关这个分类系统的详细内容和最新进展可以从互联网(<http://biology.ucsd.edu/~msaier/transport/titlepage.html>)中获得. 在这个分类系统中, 有两类核苷转运蛋白: 扩散型核苷转运蛋白和富集型核苷转运蛋白. 它们的生化功能是跨膜运输核苷. 众所周知, 核苷不仅是细胞合成核苷酸的一种重要前体, 而且在生物体内还参与调节许多重要的生理过程, 如神经传递和心血管活性的调节等^[2,3]. 核苷转运蛋白通过介导核苷的转运和吸收, 在许多不同的生理过程中发挥重要作用. 在植物基因组中也存在编码核苷转运蛋白的基因, 但有关植物核苷转运蛋白的功能还远未被人们所知. 本文根据已有的研究成果并结合我们实验室的工作阐述核苷转运蛋白的功能及其研究进展.

1 核苷转运蛋白的分类

核苷转运蛋白根据它转运核苷的机制可分为两种类型: 一种为扩散型核苷转运蛋白(equilibrative nucleoside transporter, ENT), 另一种为富集型核苷转运蛋白(concentrative nucleoside transporter, CNT)^[4~7]. 扩散型核苷转运蛋白又称为依赖于浓度梯度的核苷转运蛋白, 它只能将核苷从浓度高的一侧转运到浓度低的一侧. 富集型核苷转运蛋白又称为不依赖于浓度梯度的核苷转运蛋白, 它既能将核苷从浓度高的一侧向浓度低的一侧转运, 又能利用 Na⁺协同转运提供的动力将核苷从浓度低的一侧向浓度高的一侧转运.

扩散型核苷转运蛋白在体内的分布非常广泛, 而且转运核苷的类型也很多, 嘌呤核苷和嘧啶核苷都能被它转运. 根据对抑制物 NBMPR (6-thiopurine ribonucleoside nitrobenzylthioinosine)的敏感程度, 扩散型核苷转运蛋白可分为 2 种亚型: 一种是 NBMPR 敏感型(*es* 型), 这种亚型的核苷转运蛋白能被极低浓度的 NBMPR 所抑制(K_i 为 0.1~10 nmol/L); 另一种是 NBMPR 不敏感型(*ei* 型), 当用浓度低于 1 μ mol/L 的 NBMPR 处理时, 其转运核苷的能力基本不受影响.

富集型核苷转运蛋白在体内的分布范围较窄, 主要存在于一些特异的细胞中, 如小肠、肾的上皮细胞和肝细胞等. 它对 NBMPR 不敏感. 根据对转运核苷的特异性, 富集型核苷转运蛋白可分为 3 种亚型: 一种只转运嘧啶核苷(简称为 *cit* 的类型), 一种只转运嘌呤核苷(简称为 *cif* 的类型), 另一种既转运嘌呤核苷又转运嘧啶核苷(简称为 *cib* 的类型).

2 核苷转运蛋白的分子结构及影响其核苷转运功能的结构因子

2.1 扩散型的核苷转运蛋白

20 世纪 90 年代末, 研究人员最先从人(*Homo sapiens*)的细胞中克隆了 *es* 和 *ei* 两种类型的扩散型核苷转运蛋白基因, 并将其蛋白产物分别命名为 hENT1 和 hENT2^[8~10]. 在这之后, 扩散型核苷转运蛋白家族在其他哺乳动物、植物、真菌和线虫中也相继被克隆^[6,7,11~16], 但目前为止在细菌中还没有发现其代表类型. hENT1 和 hENT2 均有 456 个氨基酸, 两者之间的序列同源性为 50%. hENT1 和 hENT2 的底物特异性要求都不高, 都能转运各种类型的核苷.

扩散型核苷转运蛋白的空间结构主要是利用计算机模型根据其一级结构预测得到的, 最近获得的实验结果证实了这种预测的科学性^[17]. 一般而言, 扩散型核苷转运蛋白含有 11 个由 α -螺旋组成的疏水跨膜区, 在第 1 和第 2 个跨膜区之间有一个向膜外的多肽环, 环上有一个糖基化位点, 这个糖基化位点可能决定了 ENT 对抑制物 NBMPR, 双嘧啶胺醇

(dipyridamole)和克冠二氮卓(dilazep)的结合特性. 实验结果表明, 如果鼠 rENT1 的糖基化位点缺失后, 则它与 NBMPR, dipyridamole 和 dilazep 的结合能力大大下降, 由对这些抑制物敏感的类型变成不敏感的类型^[18]. 在第 6 和第 7 个跨膜区之间有一个很大的向膜内的亲水多肽环. 由于核苷相对来说是一个亲水分子, 可以推测, 扩散型核苷转运蛋白的跨膜螺旋必然在膜上形成了一个亲水的通道而使得核苷能进入膜内. 实验证据表明, 第 3 到第 6 跨膜螺旋可能在形成这个亲水通道方面起着重要的作用^[19,20](图 1).

图 1 推测的扩散型核苷转运蛋白分子结构模式图
1 ~ 11 为跨膜区, 根据文献[4 ~ 7]绘制

2.2 富集型核苷转运蛋白

1994 年, Huang 等人^[21]从小鼠空肠(jejunum)中克隆到一个富集型核苷转运蛋白基因, 其蛋白产物为 rCNT1. 随后, Che 和 Yao 等人^[22,23]分别在小鼠肝和小肠中克隆到另一种 Na⁺依赖型的嘌呤核苷转运蛋白基因, 其蛋白产物为 rCNT2. 将 rCNT1 基因在非洲爪蟾卵细胞中表达后, 其动力学特征表明, 它是典型的 *cit* 类型的核苷转运蛋白, 主要转运嘧啶核苷如尿苷等, 并需要 Na⁺提供动力. 将 rCNT2 基因在非洲爪蟾卵细胞或 HeLa 细胞中表达后进行核苷转运动力学研究表明, rCNT2 是典型的 *cif* 类型的核苷转运蛋白, 主要转运嘌呤核苷如腺苷等, 而且它还是 Na⁺依赖型的核苷转运蛋白. 根据计算机模拟的预测, CNT 有 8 ~ 14 个 α -螺旋组成的疏水跨膜区, 其中最常见的是 13 个跨膜区, 且 N 端位于细胞内, C 末端有一个糖基化的位点. 通常第 7 和第 8 个跨膜区上的某些氨基酸残基决定了转运核苷的特异性(图 2), 这些氨基酸残基的突变可能导致转运核苷特异性的改变. 如在人类中, 运用定点突变的方法将 hCNT1 的第 7 和第 8 个跨膜区上的氨基酸残基 Ser³¹⁹/Gln³²⁰ 和 Ser³⁵³/Leu³⁵⁴ 分别换成 hCNT2 的相应残基 Gly³¹³/Met³¹⁴ 和 Thr³⁴⁷/Val³⁴⁸ 时, hCNT1 转运核苷的特异性就由转运

图 2 推测的富集型核苷转运蛋白分子结构模式图
1 ~ 13 为跨膜区, 根据文献[4 ~ 7]绘制

3 核苷转运蛋白在癌症、神经及心血管和寄生虫等疾病治疗中的作用

核苷转运蛋白除转运天然的核苷外还能转运核苷的衍生物^[5-7]. 这些核苷衍生物在细胞内有些能参与核酸的合成及引起 DNA 双链的断裂, 有些能打破细胞内核苷酸的平衡. 因此, 在医学上这些核苷类似物常被用于肿瘤、心血管疾病和寄生虫病等的治疗. 当然, 利用核苷转运蛋白介导核苷类药物的吸收进行疾病治疗的过程是一个综合运用核苷转运蛋白各种分子和生理生化特征的过程. 随着对核苷转运蛋白认识的加深, 如它的细胞组织定位、转运核苷的机理、生化特性等, 我们将能更好地利用各类核苷转运蛋白的功能来介导核苷类药物的吸收和转运, 从而提高这类药物的治疗效果.

4 植物中的核苷转运蛋白

由于核苷转运蛋白与癌症、神经和心血管疾病的治疗以及寄生虫防治有密切关系, 因此在动物中得到了深入而广泛的研究. 然而在植物界, 相关的研究却很少. 现代植物生理学的研究表明, 高等植物中也存在着核苷酸合成的挽救途径^[25,26], 编码这个过程所需的关键酶的基因已被克隆^[27], 并且在高等植物中也检测到了核苷的转运^[28-30], 这意味着在高等植物中也应存在核苷转运蛋白. 为了深入认识这类蛋白在植物生长发育过程中的作用, 我们开展了对拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)基因组所编码的核苷转运蛋白的研究. 拟南芥具有基因组小、生活史短等优点, 尤为重要其基因组测序计划已经完成. 从基因组测序结果来看, 拟南芥基因组中可能含有 8 个编码核苷转运蛋白的基因(表 1)^[31]. EST 数据库检索的结果表明, 至少有一个核苷转运蛋白的基因可以得到表达^[32].

表 1 拟南芥基因组中 8 个可能的核苷转运蛋白

基因	染色体定位	跨膜区数目	N-末端位置	EST 库中有无其序列
<i>AtENT1</i>	1	11	膜内	有
<i>AtENT2</i>	3	11	膜内	无
<i>AtENT3</i>	4	11	膜内	无
<i>AtENT4</i>	4	11	膜内	无
<i>AtENT5</i>	4	11	膜内	无
<i>AtENT6</i>	4	11	膜内	无
<i>AtENT7</i>	1	11	膜内	无
<i>AtENT8</i>	1	11	膜内	无

我们首先从拟南芥的幼苗中克隆了可能的核苷转运蛋白的基因 *AtENT1*, 并对它的表达模式进行了研究^[33]. 结果表明, *AtENT1* 在拟南芥的根、叶、花序轴和花中都有较高的表达, 表明核苷酸合成的挽救途径在植物的各个器官中均普遍存在. 在拟南芥发育的各个阶段, *AtENT1* 也都有一定程度的表达, 但其在生殖生长阶段比营养生长阶段的表达水平相对要高, 这可能与植物的开花和种子成熟过程中细胞快速分裂需要大量的核苷酸作为 DNA 合成的底物有关. 通过在真核表达系统昆虫细胞表达体系中表达 *AtENT1* 和 GFP-*AtENT1* 融合蛋白, 证实了 *AtENT1* 定位于细胞膜上. 对拟南芥中另外 7 个可能的核苷转运蛋白基因的研究也已开展, 并已取得初步结果, 除 *AtENT5* 和 *AtENT8* 之外的 5 个基因的 cDNA 都已被克隆和测序, 这 5 个基因的 cDNA 序列在 GenBank 中的基因接受号分别为 AF426398, AF426399, AF426400, AF426401 和 AF426402.

Mohlmann 等人^[34]通过互补酵母腺嘌呤合成突变体也从拟南芥 cDNA 文库中筛选到了基因 *ENT1*, *AtENT1* 的氨基酸序列与来源于人和鼠的扩散型核苷转运蛋白的氨基酸序列有较高的一致性. 核苷转运实验表明, *ENT1* 对腺苷具有很高的亲和力, K_m 值为 3.6 $\mu\text{mol/L}$, 但对其他类型核苷的结合能力相对较低, 对各种碱基和核苷酸没有结合能力, 因此可以认为, *ENT1* 是一个高亲和力的腺苷转运蛋白. 这是第一次确认植物核苷转运蛋白的功能, 但同时也发现 *ENT1* 与来源于人和鼠的扩散型核苷转运蛋白在底物选择上存在较大的差异. 进一步的实验表明, *ENT1* 对扩散型核苷转运蛋白的特异抑制剂 dilazep 和 dipyrindamole 皆不敏感, 这两种抑制剂都不影响其对腺苷的转运. 另外, *ENT1* 对腺苷的转运依赖于跨膜质子势的存在. 根据上述这些结果, Mohlmann 等人^[34]建议将 *ENT1*

划归为富集型核苷转运蛋白. 这与来源于 *T. brucei* 的核苷转运蛋白 TbNT2 有相似之处^[14]. 由此可见, 高等植物的核苷转运蛋白与来源于动物的同类蛋白在生化功能上有较大的差别.

目前, 尽管我们对核苷转运蛋白的结构和功能有了一定的了解, 但仍有许多问题有待解决, 如核苷转运蛋白特异性识别转运底物的详细机制以及在癌症细胞治疗中应该如何利用核苷转运蛋白才能更特异性地作用于靶细胞而不伤害正常细胞等. 对植物核苷转运蛋白的深入认识将有助于揭示核苷酸合成挽救途径在植物细胞增殖及其自身 DNA 代谢过程中所产生核苷再利用等过程中的功能. 在这些认识的基础上, 通过基因工程手段, 将有可能调节核苷转运蛋白的功能、提高植物细胞中核苷酸合成挽救途径的作用并进而改良农作物对自然界中氮元素的利用效率.

致谢 本工作为国家自然科学基金资助项目(批准号: 39770491).

参 考 文 献

- 1 Paulsen I T, Sliwinski M K, Saier M H. Microbial genome analyses: Global comparisons of transport capabilities based on phylogenies, bioenergetics and substrate specificities. *J Mol Biol*, 1998, 277: 573 ~ 592
- 2 Shryock J C, Belardinelli L. Adenosine and adenosine receptors in the cardiovascular system: Biochemistry, physiology, and pharmacology. *Am J Cardiol*, 1997, 79: 2 ~ 10
- 3 Rathbone M P, Middlemiss P J, Gysbers J W, et al. Tropic effects of purines in neurons and glial cells. *Prog Neurobiol*, 1999, 59: 663
- 4 Griffith D A, Jarvis S M. Nucleoside and nucleobase transport systems of mammalian cells. *Biochim Biophys Acta*, 1996, 1286: 153 ~ 181
- 5 Cass C E, Young J D, Baldwin S A. Recent advances in the molecular biology of nucleoside transporters of mammalian cells. *Biochem Cell Biol*, 1998, 76: 761 ~ 770
- 6 Cass C E, Young J D, Baldwin S A, et al. Nucleoside transporters of mammalian cells. *Pharm/Biotech*, 1999, 12: 313 ~ 352
- 7 Baldwin S A, Mackey J R, Cass C E, et al. Nucleoside transporters: Molecular biology and implications for therapeutic development. *Mol Med Today*, 1999, 5: 216 ~ 224
- 8 Crawford C R, Patel D H, Naeve C, et al. Cloning of the human equilibrative, nitrobenzylmercaptopurine riboside (NBMPR)-insensitive nucleoside transporter *ei* by functional expression in a transport-deficient cell line. *J Biol Chem*, 1998, 273: 5288 ~ 5293
- 9 Griffiths M, Beaumont N, Yao S Y M, et al. Cloning of a human nucleoside transporter implicated in the cellular uptake of adenosine and chemotherapeutic drugs. *Nat Med*, 1997, 3: 89 ~ 93

- 10 Griffiths M, Yao S Y M, Abidi F, et al. Molecular cloning and characterization of a nitrobenzylthioinosine-insensitive (*ei*) equilibrative nucleoside transporter from human placenta. *Biochem J*, 1997, 328: 739 ~ 743
- 11 Yao S Y M, Ng A M L, Muzyka W R, et al. Molecular cloning and functional characterization of nitrobenzylthioinosine (NBMPR)-sensitive (*es*) and NBMPR-insensitive (*ei*) equilibrative nucleoside transporter proteins (rENT1 and rENT2) from rat tissues. *J Biol Chem*, 1997, 272: 28423 ~ 28430
- 12 Vasudevan G, Carter N S, Drew M E, et al. Cloning of *Leishmania* nucleoside transporter genes by rescue of a transport-deficient mutant. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, 95: 9873 ~ 9878
- 13 Maser P, Sutterlin C, Kralli A, et al. A nucleoside transporter from *Trypanosoma brucei* involved in drug resistance. *Science*, 1999, 285: 242 ~ 244
- 14 Sanchez M A, Ullman B, Landfear S M, et al. Cloning and functional expression of a gene encoding a P1 type nucleoside transporter from *Trypanosoma brucei*. *J Biol Chem*, 1999, 274: 30244 ~ 30249
- 15 Chiang C W, Carter N, Sullivan W J, et al. The adenosine transporter of *Toxoplasma gondii*: Identification by insertional mutagenesis, cloning and recombinant expression. *J Biol Chem*, 1999, 274: 35255 ~ 35261
- 16 Carter N S, Mamoun C B, Liu W, et al. Isolation and functional characterization of the PfNT1 nucleoside transporter gene from *Plasmodium falciparum*. *J Biol Chem*, 2000, 275: 10683 ~ 10691
- 17 Sundaram M, Yao S Y M, Ingram J C, et al. Topology of a human equilibrative, nitrobenzylthioinosine (NBMPR)-sensitive nucleoside transporter (hENT1) implicated in the cellular uptake of adenosine and anti-cancer drugs. *J Biol Chem*, 2001, 276: 45270 ~ 45275
- 18 Vickers M F, Mani R S, Sundaram M, et al. Functional production and reconstitution of the human equilibrative nucleoside transporter (hENT1) in *Saccharomyces cerevisiae*. Interaction of inhibitors of nucleoside transport with recombinant hENT1 and a glycosylation-detective derivative (hENT1/N48Q). *Biochem J*, 1999, 339: 21 ~ 32
- 19 Sundaram M, Yao S Y M, Ng A M L, et al. Chimeric constructs between human and rat equilibrative nucleoside transporters (hENT1 and rENT1) reveal hENT1 structural domains interacting with coronary vasoactive drugs. *J Biol Chem*, 1998, 273: 21519 ~ 21525
- 20 Yao S Y M, Sundaram M, Chomey E G, et al. Identification of Cys¹⁴⁰ in helix 4 as an exofacial cysteine residue within the substrate-translocation channel of rat equilibrative nitrobenzylthioinosine (NBMPR)-insensitive nucleoside transporter rENT2. *Biochem J*, 2001, 353: 387 ~ 393
- 21 Huang Q Q, Yao S Y M, Ritzel M W L, et al. Cloning and functional expression of a complementary DNA encoding a mammalian nucleoside transport protein. *J Biol Chem*, 1994, 269: 17757 ~ 17760
- 22 Che M, Ortiz D F, Arias I M. Primary structure and functional expression of a cDNA encoding the bile canalicular, purine-specific Na⁺-nucleoside co-transporter. *J Biol Chem*, 1995, 270: 13596 ~ 13599
- 23 Yao S Y M, Ng A M L, Ritzel M W, et al. Transporter of adenosine by recombinant purine- and pyrimidine-selective sodium/nucleoside cotransporters from rat jejunum expressed in *Xenopus laevis* oocytes. *Mol Pharmacol*, 1996, 50: 1529 ~ 1535
- 24 Loewen S K, Ng A M L, Yao S Y M, et al. Identification of amino acid residues responsible for the pyrimidine and purine nucleoside specificities of human concentrative Na⁺ nucleoside cotransporters hCNT1 and hCNT2. *J Biol Chem*, 1999, 274: 24475 ~ 24484
- 25 Guranowski A, Pawelkiewicz J. Adenosylhomocysteinase and adenosine nucleosidase activities in *Lupinus luteus* cotyledons during seed formation and germination. *Planta*, 1978, 139: 245~247
- 26 Guranowski A, Barankiewicz J. Purine salvage in cotyledons of germinating lupin seeds. *FEBS Lett*, 1979, 104: 95 ~ 98
- 27 Moffatt B, McWhinney E A, Burkhardt W E, et al. A complete cDNA for adenine phosphoribosyltransferase from *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol Biol*, 1992, 18: 653 ~ 662
- 28 Kombrink E, Beevers H. Transporter of purine and pyrimidine bases and nucleosides from endosperm to cotyledons in germinating castor bean seedlings. *Plant Physiol*, 1983, 73: 370 ~ 376
- 29 Kamboj R K, Jackson J F. Pyrimidine nucleoside uptake by petunia pollen: Specificity and inhibitor studies on the carrier-mediated transport. *Plant Physiol*, 1985, 79: 801 ~ 805
- 30 Kamboj R K, Jackson J F. Purine nucleoside transport in petunia pollen is an active, carrier-mediated system not sensitive to nitrobenzylthioinosine and not renewed during pollen tube growth. *Plant Physiol*, 1987, 84: 688 ~ 691
- 31 Hyde R J, Cass C E, Young J D, et al. The ENT family of eukaryote nucleoside and nucleobase transporters: Recent advances in the investigation of structure/function relationships and the identification of novel isoforms. *Mol Membr Biol*, 2001, 18: 53 ~ 63
- 32 Newman T, de Buijn F J, Green P, et al. Genes galore: A summary of methods for assessing results from large-scale partial sequencing of anonymous *Arabidopsis thaliana* cDNA clones. *Plant Physiol*, 1994, 106: 1241 ~ 1255
- 33 Li J, Wang D. Cloning and *in vitro* expression of the cDNA encoding a putative nucleoside transporter from *Arabidopsis thaliana*. *Plant Sci*, 2000, 157: 23 ~ 32
- 34 Mohlmann T, Mezher Z, Schwerdtfeger G, et al. Characterisation of a concentrative type of adenosine transporter from *Arabidopsis thaliana* (ENT1, At). *FEBS Lett*, 2001, 509: 370 ~ 374

<https://engine.scichina.com/doi/10.1360/csb2002-47-7-481>

(2001-09-19 收稿, 2002-01-30 收修改稿)