

DOI:10.16781/j.0258-879x.2018.07.0775

• 综述 •

水通道蛋白抑制剂和分子靶向治疗的研究进展

胡皓^{1,2}, 江华^{1*}

1. 海军军医大学(第二军医大学)长征医院整形外科, 上海 200003
2. 武警总队医院皮肤科, 北京 100600

[摘要] 水通道蛋白是细胞膜转运水分子的特异性通道蛋白, 在维持机体水平衡中发挥重要作用。研究发现水通道蛋白广泛分布在人体各组织器官, 其表达异常与一系列水平衡紊乱导致的疾病密切相关。近年来针对水通道蛋白的基础研究、水通道蛋白特异性抑制剂和水通道蛋白分子靶向治疗等取得了诸多进展, 本文对此进行综述。

[关键词] 水通道蛋白质类; 抑制剂; 分子靶向治疗; 视神经脊髓炎; 辐射损伤

[中图分类号] R 341; R 977.6 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2018)07-0775-05

Advances in aquaporin inhibitors and molecular targeted therapy

HU Hao^{1,2}, JIANG Hua^{1*}

1. Department of Plastic Surgery, Changzheng Hospital, Navy Medical University (Second Military Medical University), Shanghai 200003, China
2. Department of Dermatology, General Hospital of Armed Police Forces, Beijing 100600, China

[Abstract] Aquaporins (AQPs) are the specific channel proteins located in cell membrane for transporting water, and they play an important role in maintaining the body's water balance. AQPs are widely distributed in human tissues and organs, and their abnormal expressions are closely related to a series of diseases caused by water balance disorders. In recent years, great advances have been made in molecular researches, specific inhibitors, and targeted therapies of AQPs. In this review, we summarized the recent research progresses.

[Key words] aquaporins; inhibitors; molecular targeted therapy; neuromyelitis; radiation injuries

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2018, 39(7): 775-779]

20世纪80年代, 美国学者Agre等^[1]在分离、纯化红细胞膜上的Rh多肽时, 发现了一个疏水性跨膜蛋白, 称为形成通道的整合膜蛋白28(28-kD channel-forming integral protein, CHIP28), 后来研究证明CHIP28是细胞膜转运水的特异性通道蛋白, 并将其命名为水通道蛋白(aquaporin, AQP)1(AQP1)。迄今为止, 已在哺乳动物体内发现了13种水通道蛋白(AQP0~12), 这些相继发现的水通道蛋白统称为AQPs。由于AQPs在维持机体水平衡中发挥重要作用, 与一系列水平衡紊乱导致的疾病密切相关, 因此对AQPs特异性抑制剂和分子靶向治疗的研究具有重要的临床价值。本文主要就近年来AQPs的基础研究、抑制剂及分子靶向治疗的研究进展进行综述。

1 AQPs的基础研究

1.1 AQPs结构 AQPs的一级结构: 由2个分别位于肽链两侧的重叠部分构成, 呈180°中心对称排列。每个AQPs分子包含6个跨膜区域和A、B、C、D、E5个环, 其中A、C、E环位于细胞膜外侧, B、D环及氨基末端(N端)、羧基端(C端)位于细胞内。B、E环呈疏水性, 均含有天冬酰胺-脯氨酸-丙氨酸[asparagine (Asn) - proline (Pro) -alanine (Ala), NPA]的特征性保守序列。AQPs主要在细胞膜上表达, 任何原因导致的序列变异都可使AQPs活性下降^[2], 从而降低

[收稿日期] 2018-01-06 **[接受日期]** 2018-05-07

[基金项目] 国家自然科学基金(31271264, 81301054), 上海市自然科学基金(13ZR1450600), 上海市卫生局青年科研项目(2012Y142). Supported by National Natural Science Foundation of China (31271264, 81301054), Project of Natural Science Foundation of Shanghai (13ZR1450600), and Project of of Shanghai Municipal Health Bureau for Young Scholars (2012Y142).

[作者简介] 胡皓, 博士生, 主治医师. E-mail: cs0701@126.com

*通信作者(Corresponding author). Tel: 021-81886777, E-mail: dosjh@126.com

水的通透性。

AQPs 立体结构: AQPs 在细胞膜中以同源四聚体形式存在, 4 个单体的中间部分内含有独立的孔道, 直径约为 31.8 nm。其特异性透水性由 2 个保守的结构域决定, 即 NPA 结构域和芳香/精氨酸 (Ar/R) 结构域, 研究发现抑制剂须与 AQPs 的这 2 个结构域结合才能够发挥抑制作用^[3]。研究 AQPs 的结构发现, 亲脂性的抑制剂与 AQPs 的疏水位点结合能极大地提高药物的抑制作用^[4], 这一特点为

改进 AQPs 抑制剂的相关研究提供了新思路。

1.2 AQPs 各亚型分布及相关疾病的研究进展 AQPs 各亚型的渗透特异性主要分为两类: (1) 水渗透性 AQPs, 包括 AQP0、AQP1、AQP2、AQP4、AQP5、AQP6、AQP8、AQP11; (2) 除转运水分子外, 对其他溶质如甘油、尿素具有渗透性的 AQPs, 包括 AQP3、AQP7、AQP9、AQP10。根据 AQPs 在人体各组织器官的分布, 目前因 AQPs 过度表达或激活导致的相关疾病见表 1^[5]。

表 1 AQPs 各亚型物质渗透性、人体组织分布及相关疾病^[5]

Tab 1 AQPs permeability, distribution of human tissue and related diseases^[5]

	Selectivity	Localization	Disease implication
AQP0	Water	Eye lens	Cataract
AQP1	Water	Renal proximal tubule, brain choroid plexus, blood, red blood cells	Tumor angiogenesis and metastasis, nephrogenic diabetes insipidus, glaucoma
AQP2	Water	Kidney collecting duct	Nephrogenic diabetes insipidus
AQP3	Water, glycerol, urea	Kidney, skin, intestine, eye, red blood cells, immune system	Skin cancer
AQP4	Water	Brain, kidney, gastrointestinal tract, eye, airways	Brain edema, epilepsy, neuromyelitis optica
AQP5	Water	Lacrimal glands, sweat glands, salivary glands	Sjögren's syndrome, asthma
AQP6	Water	Kidney (intracellular)	
AQP7	Water, glycerol, urea	Kidney, liver, testis, adipose tissue	Obesity, type 2 diabetes
AQP8	Water	Kidney, liver, gastrointestinal tract	
AQP9	Water, glycerol, urea	Liver, red blood cells	Obesity, type 2 diabetes
AQP10	Water, glycerol, urea	Small intestine	
AQP11	Water	Liver, testis, kidney (intracellular)	Polycystic kidney disease
AQP12	Unknown	Pancreas	

AQP: Aquaporin

2 AQPs 抑制剂的研究进展

AQPs 空间结构复杂, 蛋白质丰度较低, 对 AQPs 抑制剂的研究也进展缓慢, 但 AQPs 抑制剂作为靶向药物治疗疾病仍有重大意义^[4]。目前对 AQPs 抑制剂的研究主要集中于离子化合物和小分子有机化合物, 使用半数抑制浓度 (half maximal inhibitory concentration, IC₅₀), 即抑制剂阻断 AQPs 50% 时的药物浓度表示抑制效率。

2.1 金属离子化合物抑制剂 金属离子化合物是目前发现的最有效的 AQPs 抑制剂。由于其共价的金属-硫醇盐络合物的高亲和力, 能产生约 100 kcal/mol (1 kcal=4.186 kJ) 的能量, 约为完全共价键三分之一的结合能, 可与 AQPs 细胞膜外侧 A 环 NPA 序列上的半胱氨酸 (cysteine, Cys) 位点结合发挥抑制作用^[6]。早前已有研究证实, 氯化汞 (HgCl₂) 和有机汞化合物能够抑制人红细胞

中水和溶质的渗透性^[7]。在对大鼠的研究中发现, HgCl₂ 与 AQP1 Cys189 位点上的巯基结合可使细胞膜上的孔道收缩^[8]。近年有研究报道, HgCl₂ 通过与 AQP1 的 Cys 位点结合, 在浓度为 0.3 mmol/L 时对 AQP1 的抑制率可达 95% 以上^[9]; 对 AQP2 的抑制是通过与 Cys181 位点结合而发挥作用^[10], 对 AQP3 的抑制过程中与 Cys11 位点结合^[11]。AQP4 由于特殊的丙氨酸 (alanine, Ala) 位点阻碍了 HgCl₂ 与 Cys 位点结合而未被抑制^[12]; 但是在 AQP4 重组脂质体的研究中, HgCl₂ 可通过结合其 Cys 位点而发挥抑制作用, 结合的位点位于 Cys178^[13]。

含金、银、铜、镍、铅、锡的其他金属化合物也能抑制 AQPs^[14]。在红细胞中由于 AQP3 位于细胞外的 Cys40 位点能与金属配合物结合, 故极低浓度的三价金配合物便能选择性抑制 AQP3, 从而阻断水和甘油的转运, 但 AQP1 的 Cys189 位点

却难以与此类化合物结合,故不受影响^[14-15]。脂肪细胞中的AQP7也能被三价金属配合物抑制^[16],但由于AQP7缺乏Cys40位点,因此三价金属配合物抑制AQP7可能是通过结合其他位点发挥作用。

根据以上金属离子化合物对AQPs不同亚型产生的不同作用效果,可见金属离子化合物的抑制机制不仅限于与AQPs的Cys残基结合,其他可能的结合位点仍需要通过进一步研究证实;同时在应用金属离子化合物抑制剂时还必须确保其对AQPs的特异性修饰,以防止因修饰其他分子而导致不良反应的发生。类风湿性关节炎药物金诺芬、抗癌药物顺铂等金属药物的临床应用证明金属药物有其治疗价值^[17],但目前针对金属离子化合物的药物特性、相关药理学及毒理学研究仍需进一步深入。

2.2 非金属离子化合物抑制剂 以季铵盐化合物四乙铵(tetraethylammonium, TEA)为代表的一类非金属离子化合物抑制剂,发挥抑制作用所需的结合位点可能是AQP1位于细胞膜外侧E环上的酪氨酸186(tyrosine 186, Tyr186)位点^[18]。研究证实TEA类似物三丙胺(tripropylamine, TPrA)能有效抑制AQP1,但Fisher大鼠甲状腺(Fisher rat thyroid, FRT)滤泡上皮细胞中慢病毒转染的AQP1不受TPrA的抑制^[19]。在胎盘细胞中,TEA对AQP1也没有显著的抑制作用^[20]。上述结果提示这类非金属离子化合物抑制剂对AQP1的作用可能还存在的其他机制。

2.3 小分子有机化合物抑制剂 与离子类抑制剂相比,小分子有机化合物抑制剂是当前的研究热点。碳酸酐酶抑制剂乙酰唑胺(acetazolamide, AZA)因可抑制肾集合管上皮细胞的AQP1而被广泛关注,随后在非洲爪蟾卵母细胞和慢病毒转染的人胚胎肾细胞HEK293中表现出对AQP1呈剂量依赖性抑制作用^[21]。近年研究发现AZA对AQP4有明显抑制作用,可用于治疗脑水肿^[22];而在红细胞和慢病毒转染AQP1的FRT滤泡上皮细胞实验中,AZA对AQP1没有抑制作用^[19];在非洲爪蟾卵母细胞中对AQP4产生可逆性抑制时,IC₅₀为1.25 mmol/L^[23];而在神经胶质细胞或慢病毒转染AQP4的FRT滤泡上皮细胞中,AZA对AQP4又无抑制效应^[24]。近年来通过分子生物学和分子药理学研究发现,AZA在HEK293细胞中可能通过与肌球蛋白重链(myosin heavy chain, MHC)相互

作用而调节AQPs的表达^[25-26],这一发现有助于在分子水平对以上诸多相互矛盾的现象展开深入细致的研究。

此外,磺酰基类药物袪利尿剂(速尿)在非洲爪蟾卵母细胞内能够抑制AQP1,但是在细胞外干预却没有影响^[27]。实验证明细胞外应用布美他尼衍生物AqB013能同时抑制AQP1和AQP4,其IC₅₀为20 μmol/L^[28]。抗癫痫类药物托吡酯、苯妥英、拉莫三嗪和曲坦类药物舒马曲坦、利扎曲普坦在非洲爪蟾卵母细胞中抑制AQP4的IC₅₀为20 μmol/L^[13,29]。但该类物质即使浓度达到100 μmol/L,在红细胞和慢病毒转染AQP4的FRT滤泡上皮细胞中也没有抑制作用^[24]。因此对此类物质的具体作用机制仍有待于进一步研究。

3 AQPs分子靶向治疗的研究进展

通过对不同AQPs靶点抑制剂的研究将会影响或改变细胞代谢路径,从而影响细胞增殖,进而达到对疾病特异性诊断和靶向治疗的目的。目前的AQPs分子靶向治疗方向主要有以下2种。

3.1 阻断AQPs与自身抗体的相互作用 研究报道,AQP4位于细胞膜外的结构域可与退行性疾病视神经脊髓炎(neuromyelitis optica, NMO)的自身抗体靶向结合,并认为这可能是NMO的致病机制^[30]。因此通过在原代细胞、脊髓切片和NMO小鼠模型中进行空间位阻的研究,均是以阻断NMO-免疫球蛋白G(immunoglobulin G, IgG)抗体与AQP4的结合为目的。针对AQP4的细胞外结构域研发的单克隆抗体aquaporinab,能够在不影响细胞中水通透性的前提下阻断AQP4与NMO-IgG的相互作用^[31]。将重组单克隆NMO-IgG抗体加入到稳定表达AQP4的FRT滤泡上皮细胞,在小分子化合物干预下,利用高通量测序筛选阻断NMO-IgG与AQP4结合的小分子并进行鉴定,从60 000种化合物中筛选出抗病毒药物阿比朵尔和类黄酮,IC₅₀均为5 μmol/L^[32]。但此类化合物的安全性和特异性仍需进一步的临床试验研究予以证实。

3.2 AQPs基因替代疗法 头颈部放射治疗造成的涎腺损伤会导致口干症,患者因唾液分泌少,继而罹患猖獗性龋齿、吞咽困难、口腔干燥、口腔黏膜的慢性炎症及咽喉部的持续感染^[33]。有学者尝试在大鼠辐照模型中进行基因治疗,使AQP1表达增

加并恢复唾液分泌且已取得阶段性的进展,在临床 I 期试验中,通过腺病毒载体将 AQP1 cDNA 转染到 11 例患者体内,患者在 42 d 内均表现出较好的耐受性;然而,腺病毒载体的相关风险导致研究不能进一步深入到 II 期临床试验^[34]。最新研究报道,在超声辅助下,成功地将非病毒介导 AQP1 基因转移到辐照猪模型的方法可能会开辟临床试验的新方向^[35]。以上实验证明基因替代疗法也将成为 AQPs 相关疾病治疗的研究方向,其治疗意义值得进一步深入研究。

4 小结

目前, AQPs 及其抑制剂的研究已经取得一定进展,但研究结果与临床应用之间还存在较大差距,相关的表达调控机制仍需要进一步研究。针对每种 AQPs 亚型特异性抑制剂的研究及以 AQPs 为靶点的分子靶向治疗将对各类相关疾病的早期诊治产生更大的意义。

[参考文献]

- [1] AGRE P, SASAKI S, CHRISPPEELS M J. Aquaporins: a family of water channel proteins[J/OL]. *Am J Physiol*, 1993, 265: F461. doi: 10.1152/ajprenal.1993.265.3.F461.
- [2] YOOL A J, CAMPBELL E M. Structure, function and translational relevance of aquaporin dual water and ion channels[J]. *Mol Aspects Med*, 2012, 33: 553-561.
- [3] WANG S, ING C, EMAMI S, JIANG Y, LIANG H, POMÈS R, et al. Structure and dynamics of extracellular loops in human aquaporin-1 from solid-state NMR and molecular dynamics[J]. *J Phys Chem B*, 2016, 120: 9887-9902.
- [4] BEITZ E, GOLLDACK A, ROTHERT M, VON BÜLOW J. Challenges and achievements in the therapeutic modulation of aquaporin functionality[J]. *Pharmacol Ther*, 2015, 155: 22-35.
- [5] KREIDA S, TÖRNROTH-HORSEFIELD S. Structural insights into aquaporin selectivity and regulation[J]. *Curr Opin Struct Biol*, 2015, 33: 126-134.
- [6] KIRSCHT A, SURVERY S, KJELBOM P, JOHANSON U. Increased permeability of the aquaporin SoPIP2;1 by mercury and mutations in loop A[J/OL]. *Front Plant Sci*, 2016, 7: 1249. doi: 10.3389/fpls.2016.01249.
- [7] MACEY R I, FARMER R E. Inhibition of water and solute permeability in human red cells[J]. *Biochim Biophys Acta*, 1970, 211: 104-106.
- [8] ZHANG R, VAN HOEK A N, BIWERSI J, VERKMAN A S. A point mutation at cysteine 189 blocks the water permeability of rat kidney water channel CHIP28k[J]. *Biochemistry*, 1993, 32: 2938-2941.
- [9] ESTEVA-FONT C, JIN B J, LEE S, PHUAN P W, ANDERSON M O, VERKMAN A S. Experimental evaluation of proposed small-molecule inhibitors of water channel aquaporin-1[J]. *Mol Pharmacol*, 2016, 89: 686-693.
- [10] MULDER S M, RIJSS J P, HARTOG A, BINDELS R J, VAN OS C H, DEEN P M. Importance of the mercury-sensitive cysteine on function and routing of AQP1 and AQP2 in oocytes[J]. *Am J Physiol*, 1997, 273: F451-F456.
- [11] KUWAHARA M, GU Y, ISHIBASHI K, MARUMO F, SASAKI S. Mercury-sensitive residues and pore site in AQP3 water channel[J]. *Biochemistry*, 1997, 36: 13973-13978.
- [12] HASEGAWA H, MA T, SKACH W, MATTHAY M A, VERKMAN A S. Molecular cloning of a mercurial-insensitive water channel expressed in selected water-transporting tissues[J]. *J Biol Chem*, 1994, 269: 5497-5500.
- [13] YUKUTAKE Y, YASUI M. Regulation of water permeability through aquaporin-4[J]. *Neuroscience*, 2010, 168: 885-891.
- [14] MARTINS A P, MARRONE A, CIANCETTA A, GALÁN COBO A, ECHEVARRÍA M, MOURA T F, et al. Targeting aquaporin function: potent inhibition of aquaglyceroporin-3 by a gold-based compound[J/OL]. *PLoS One*, 2012, 7: e37435. doi: 10.1371/journal.pone.0037435.
- [15] SERNA A, GALÁN-COBO A, RODRIGUES C, SÁNCHEZ-GOMAR I, TOLEDO-ARAL J J, MOURA T F, et al. Functional inhibition of aquaporin-3 with a gold-based compound induces blockage of cell proliferation[J]. *J Cell Physiol*, 2014, 229: 1787-1801.
- [16] MADEIRA A, DE ALMEIDA A, DE GRAAF C, CAMPS M, ZORZANO A, MOURA T F, et al. A gold coordination compound as a chemical probe to unravel aquaporin-7 function[J]. *Chembiochem*, 2014, 15: 1487-1494.
- [17] MJOS K D, ORVIG C. Metallodrugs in medicinal inorganic chemistry[J]. *Chem Rev*, 2014, 114: 4540-4563.
- [18] BROOKS H L, REGAN J W, YOOL A J. Inhibition of aquaporin-1 water permeability by tetraethylammonium: involvement of the loop E pore region[J]. *Mol Pharmacol*, 2000, 57: 1021-1026.
- [19] YANG B, KIM J K, VERKMAN A S. Comparative efficacy of HgCl₂ with candidate aquaporin-1 inhibitors DMSO, gold, TEA⁺ and acetazolamide[J]. *FEBS Lett*, 2006, 580: 6679-6684.
- [20] SZPILBARG N, CASTRO-PARODI M, REPPETTI

- J, REPETTO M, MASKIN B, MARTINEZ N, et al. Placental programmed cell death: insights into the role of aquaporins[J]. *Mol Hum Reprod*, 2016, 22: 46-56.
- [21] SEELIGER D, ZAPATER C, KRENC D, HADDOUB R, FLITSCH S, BEITZ E, et al. Discovery of novel human aquaporin-1 blockers[J]. *ACS Chem Biol*, 2013, 8: 249-256.
- [22] STURDIVANT N M, SMITH S G, ALI S F, WOLCHOK J C, BALACHANDRAN K. Acetazolamide mitigates astrocyte cellular edema following mild traumatic brain injury[J/OL]. *Sci Rep*, 2016, 6: 33330. doi: 10.1038/srep33330.
- [23] TANIMURA Y, HIROAKI Y, FUJIYOSHI Y. Acetazolamide reversibly inhibits water conduction by aquaporin-4[J]. *J Struct Biol*, 2009, 166: 16-21.
- [24] YANG B, ZHANG H, VERKMAN A S. Lack of aquaporin-4 water transport inhibition by antiepileptics and arylsulfonamides[J]. *Bioorg Med Chem*, 2008, 16: 7489-7493.
- [25] ZHANG J, AN Y, GAO J, HAN J, PAN X, PAN Y, et al. Aquaporin-1 translocation and degradation mediates the water transportation mechanism of acetazolamide[J/OL]. *PLoS One*, 2012, 7: e45976. doi: 10.1371/journal.pone.0045976.
- [26] VILAS G, KRISHNAN D, LOGANATHAN S K, MALHOTRA D, LIU L, BEGGS M R, et al. Increased water flux induced by an aquaporin-1/carbonic anhydrase II interaction[J]. *Mol Biol Cell*, 2015, 26: 1106-1118.
- [27] OZU M, DORR R A, TERESA P M, PARISI M, TORIANO R. Water flux through human aquaporin 1: inhibition by intracellular furosemide and maximal response with high osmotic gradients[J]. *Eur Biophys J*, 2011, 40: 737-746.
- [28] DORWARD H S, DU A, BRUHN M A, WRIN J, PEI J V, EVDOKIOU A, et al. Pharmacological blockade of aquaporin-1 water channel by AqB013 restricts migration and invasiveness of colon cancer cells and prevents endothelial tube formation *in vitro*[J/OL]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2016, 35: 36. doi: 10.1186/s13046-016-0310-6.
- [29] HUBER V J, TSUJITA M, KWEE I L, NAKADA T. Inhibition of aquaporin 4 by antiepileptic drugs[J]. *Bioorg Med Chem*, 2009, 17: 418-424.
- [30] TRADTRANTIP L, ZHANG H, SAADOUN S, PHUAN P W, LAM C, PAPADOPOULOS M C, et al. Anti-aquaporin-4 monoclonal antibody blocker therapy for neuromyelitis optica[J]. *Ann Neurol*, 2012, 71: 314-322.
- [31] LONG Y, LIANG J, WU L, LIN S, GAO C, CHEN X, et al. Different phenotypes at onset in neuromyelitis optica spectrum disorder patients with aquaporin-4 autoimmunity[J/OL]. *Front Neurol*, 2017, 8: 62. doi: 10.3389/fneur.2017.00062.
- [32] TRADTRANTIP L, ZHANG H, ANDERSON M O, SAADOUN S, PHUAN P W, PAPADOPOULOS M C, et al. Small-molecule inhibitors of NMO-IgG binding to aquaporin-4 reduce astrocyte cytotoxicity in neuromyelitis optica[J]. *FASEB J*, 2012, 26: 2197-2208.
- [33] LEE S, CHOI J S, KIM H J, KIM Y M, LIM J Y. Impact of irradiation on laryngeal hydration and lubrication in rat larynx[J]. *Laryngoscope*, 2015, 125: 1900-1907.
- [34] BAUM B J, ALEVIZOS I, ZHENG C, COTRIM A P, LIU S, MCCULLAGH L, et al. Early responses to adenoviral-mediated transfer of the aquaporin-1 cDNA for radiation-induced salivary hypofunction[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2012, 109: 19403-19407.
- [35] WANG Z, ZOURELIAS L, WU C, EDWARDS P C, TROMBETTA M, PASSINEAU M J. Ultrasound-assisted nonviral gene transfer of AQP1 to the irradiated minipig parotid gland restores fluid secretion[J]. *Gene Ther*, 2015, 22: 739-749.

[本文编辑] 杨亚红