

①

CFTR 与囊性纤维化

王 瑞,李学军

(北京大学基础医学院药理系,北京100083)

[摘要] 囊性纤维化跨膜传导调节因子(CFTR)是一种cAMP激活的ATP门控性氯离子通道,表达于气道,消化道和生殖道上皮细胞的顶部质膜中。囊性纤维化(CF)是白人中最常见的遗传性疾病之一,由CFTR基因突变造成。对CFTR基因的破译使人们进一步了解CF的发病机制,并为该疾病的诊断提供了新的线索。

[关键词] 囊性纤维化; 囊性纤维跨膜电导调节因子; ATP结合盒; Δ F508; 基因疗法; 药物治疗

[中图分类号] Q71 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1673-2588(2006)02-0142-04

CFTR and cystic fibrosis

WANG Rui, LI Xue-jun

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

[Abstract] The cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) is a cAMP-activated and ATP-gated Cl^- channel expressed in the apical plasma membrane of epithelial cells in the airways, digestive and reproductive tracts. Cystic Fibrosis (CF), caused by mutations in the CFTR gene, is one of the most common inherited disorders of white populations. The identification of the CF gene led us to a further understanding of the CFTR structure and function, the mutational basis as well as the complexity of the disease.

[Key words] cystic fibrosis (CF); cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR); ATP binding cassette(ABC); Δ F508; gene therapy; drug treatment

[*Int J Pathol Clin Med*, 2006,26(2):0142-04]

囊性纤维化(cystic fibrosis, CF)是一种致命的常染色体隐性疾病,主要临床症状为慢性梗阻性肺部病变,是白人中最常见的遗传性疾病之一。虽然在过去的几十年中,CF患者的寿命已经大大延长,但至今为止尚未发现安全而又有效的方法^[1]。由于CF是由囊性纤维化跨膜传导调节因子(cystic fibrosis transmembrane conductance regulator, CFTR)基因的突变引起的,近年来人们在研究CFTR的结构、功能、与其他蛋白的相互作用及其在CF治疗中扮演的角色等方面进行了大量的研究。

1 CFTR 的结构

CFTR是ATP结合盒(ATP binding cassette, ABC)转运蛋白超家族的成员。ABC转运蛋白具有重要的功能,如:吸收营养物质,排出毒素,介导真核

生物和细菌的细胞间通讯等。其最基本的功能单位包括两个跨膜区(transmembrane domains, TMDs),分别含有6个跨膜的袢(loop),以及2个核苷酸结合区(nucleotide binding domains, NBDs)。每个NBD都含有共有序列Walker A和B,参与和ATP的相互作用。在WalkerA和WalkerB基序间有一个高度保守的LSGGQ区,又被称为签名区(signature region)。这种保守的结构使得所有ABC转运蛋白在机械化学方面拥有很多共同的性质。和其他的转运蛋白一样,CFTR也含有2个NBDs和2个TMDs,用以构成一个介导氯离子跨膜转运的通道。同时,CFTR还含有一个调节区R,含有蛋白激酶A(PKA)和蛋白激酶C(PKC)共有的磷酸化位点以及许多荷电的氨基酸。当该区被蛋白激酶磷酸化时,可以激活CFTR

①收稿日期:2005-11-09 修回日期:2006-03-01

作者简介:王瑞(1985-),女,北京人,硕士研究生,主要从事分子药理学方面的研究。

氯离子通道,而ATP与CFTR-NBDs相互作用是对激活通道进行门控的关键步骤^[2,3]。曾有报道指出CFTR的基本功能单位是一个单体,而近年来也有研究表明CFTR其实是以二聚体的形式存在于质膜中。当CFTR从膜中分离出来时是以单体的形式存在,但在脂质体重组实验中能同时检查出具有氯离子通道和ATP酶的活性单体和二聚体^[3]。所以,至今对于CFTR到底是一个单体还是多聚体这一问题仍存在争论。

2 CFTR的功能

2.1 CFTR的氯离子转运功能 CFTR的主要功能是调节cAMP依赖的氯离子通道,该通道的开放可以分为2步:首先,cAMP介导的磷酸激酶磷酸化R区(实验证明,这个过程还可以促进R区与CFTR其他区域间的联系);其次,ATP结合NBDs,当NBD1末端的磷酸基被剪切,CFTR立体构象改变,通道打开,氯离子流出。之后,当NBD2的ATP被水解时,通道关闭。而通道的关闭依赖于CFTR的去磷酸化^[3,4]。在这个过程中,2个NBD扮演不同的角色:NBD2负责对ATP进行剪切,因为只有它含有必需的起催化作用的氨基酸。现在也有结果支持氯离子浓度的改变会改变CFTR的立体构象,从而影响CFTR的磷酸化。事实上,这个复杂的氯离子分泌过程至今尚未阐明,氯离子浓度变化究竟会不会改变CFTR的立体结构也有待更多的研究结果来证实。在未受刺激的上皮细胞中,由于钾离子的不断外流,细胞内部为负性环境,使得阴离子排出细胞。但是由于细胞内的氯离子浓度(约40 mmol/L)低于细胞外的氯离子浓度,所以当CFTR转运未被激活时,氯离子最终的流向要由两个不同方向的梯度因素平衡后决定,即促使氯离子内流的扩散梯度和外流的电性梯度^[5,6]。

2.2 CFTR与其他离子通道间的相互作用 值得注意的是,CFTR不是一个单纯的氯离子通道,可以认为CFTR是一个多重离子通道及调控子的复合体。现在已经知道有很多PDZ区的蛋白在细胞顶膜处与CFTR相互作用,其中包括NHE-RF(Na^+/H^+ 交换蛋白调节因子)/EBP-50和CAP70。在CFTR胞质区处加入含有重组NHE-RF或是CAP70的融合蛋白可以提高CFTR活性。同时,NHE-RF还能把CFTR锚定在细胞骨架上,起到稳定膜CFTR的作用。不仅如此,NHE-RF还能把 β 2-肾上腺素受体与CFTR连接起来。NHE-RF及其相关蛋白E-

3KARP可以将PKA连接到CFTR上。这些都表明这种大分子复合体提高了激活CFTR的效率^[7]。虽然现在还不清楚CFTR究竟是以独立个体形式存在还是必需与其他蛋白形成复合体才能正常发挥作用,但是确有研究结果表明CFTR可以调控其他2个氯离子通道:外向纠正性氯离子通道(outwardly rectifying chloride channel, ORCC)以及钙依赖性氯离子通道(calcium-dependent Cl^- channels)。它们存在于上皮细胞中,与CFTR生物物理性质不同,并且是由不同的基因编码而成的。当CFTR被激活时,排入腺体管腔中的ATP能激活一系列氯离子通道,包括ORCC和钙依赖性氯离子通道。但是在突变的囊性纤维化细胞中,CFTR不能正常分泌ATP和氯离子,也就不能激活这些氯离子通道了^[8]。人们之所以关注这些氯离子通道,是因为它们有可能取代缺陷的CFTR,分泌氯离子,成为一个可以解决导致肺部病变的黏液堆积阻塞问题的方法^[9]。同时,作为一个阴离子通道,CFTR还能调控上皮细胞钠离子通道(epithelial sodium channel, ENaC)以及碳酸氢根离子的分泌和转运。最近也有研究表明,CFTR与水通道蛋白(AQP)之间也可能有相互作用^[5,8,10]。可见CFTR确实不是一个简单的氯离子转运蛋白。

3 CFTR突变与CF

3.1 CFTR基因突变——CF的分子遗传学基础

CF是常染色体隐性遗传疾病,其相关基因位于染色体7q基因组DNA的250 000对碱基对上。CFTR含1 480个氨基酸,位于气道、消化道和生殖道上皮细胞的顶部质膜中。迄今为止,已经发现超过1 000种可以导致CF的CFTR基因突变^[1]。根据这些突变的分子机制将其分为5类:第一类突变是无义突变,由于一个碱基的改变得到新的终止密码子,产生不稳定的mRNA,或是从核糖体中释放出经过删节的、缩短的肽段;第二类突变导致CFTR的合成和折叠受损,不能被正常运输至顶膜处,而在内质网中发生降解;第三类突变会破坏CFTR的调节区,使CFTR的磷酸化和ATP结合不能正常进行;第四类突变会导致氯离子转运降低;第五类突变影响RNA剪接,同时产生正常和异常的转录子,这些转录子在不同患者以及同一患者的不同器官所呈现的水平不尽相同。所以能促进基因选择性剪切,如:外显子遗漏(exon skipping)和外显子增加(exon inclusion)的剪接因子都能使正确拼接的转录子水平上升^[11]。

超过70%的CF患者都含有基因突变

DeltaF508,它属于第二类突变,其结果是CFTR蛋白第508位上的苯丙氨酸残基缺失^[1]。虽然突变体仅有细微的构象变化,但能被“质控系统”识别并将其滞留在内质网,导致突变的CFTR降解。突变CFTR不能运输至细胞顶膜,使得细胞功能受限而不能正常分泌氯离子^[12]。

3.2 CFTR异常与CF的关系 CF的临床表现一般为急性细菌感染和强烈的炎症反应。在正常的上皮细胞中,CFTR通道开放,氯离子从细胞顶膜处离开细胞,随后钠离子从细胞侧面的紧密连接通路离开细胞,水分子也循此路出胞。当突变造成CFTR功能异常时,氯离子不能正常排出,钠离子和水分子的输出也受到严重影响,导致细胞外缺少水分,黏液堆积增多,在一些器官(如胰腺、呼吸道)的腔道中形成栓塞。同时,细菌也会在黏液中寄生,造成感染,使嗜中性粒细胞释放大量蛋白酶,从而引起免疫介导的炎症反应^[13]。长期的感染和炎症最终造成病情的恶化,疾病晚期会出现器官功能衰竭。由于CFTR的异常可导致多种CF表现型,典型的有胰腺外分泌腺缺乏、汗腺中氯化物浓度提高以及慢性阻塞性肺疾病,还有一些不常见的症状如胎粪梗阻等,这使得目前在CF的诊断上尚无理想的标准^[1]。

3.3 基因型与表型的关系 CF是一种多向性疾病。所谓“多向性”,是指多个不同的,甚至看起来不相关的临床表型是由同一个基因控制的。现在看来,虽然CF的临床症状有很多种,但是其中有一些的确与相应的基因突变有关^[14]。例如,已经有数据表明DeltaF508以及其他的一些突变与胰腺功能不足有很明显的连锁关系。但也不可一概而论,也有些CF疾病的基因型和表型之间的关系尚未建立^[1]。

4 CFTR在CF治疗中的研究现状及展望

4.1 针对CFTR的基因治疗 迄今为止,CF的普遍治疗方案都是针对临床症状的,即设法促进氯离子分泌,减轻感染和炎症等^[1],但是CFTR基因的破译以及一些突变型和表型间连锁关系的建立提出了一个令人鼓舞的可能性:那就是如果能够把合成的正常的CFTR基因拷贝导入患者不正常的细胞,或许它们会开始发挥正常功能。然而基因治疗还面临着很多棘手的问题,例如:选择合适的靶细胞;获得基因转移的持久性以及整合的稳定性;避免发生机体免疫反应;激活已经转移的基因等^[15]。

近年来基因治疗有了较大的进展,临床试验报

告表明,多次肺部给予携带野生型CFTR基因的腺相关病毒载体不会引起免疫反应;首次应用于CF患者鼻部的携带野生型CFTR基因的纳米载体也是安全的,并且可以部分纠正鼻上皮细胞的氯离子转运缺陷;新的病毒和非病毒类载体也正在开发过程中^[16]。在大量前期和临床试验的基础上,基因治疗作为一种新的治疗模式,必将给CF患者带来更大的福音。

4.2 作用于CFTR的药物治理 CF基因的破译以及基因型-表型间关系的建立为人们提供了很多的药物作用靶点。现在应用于临床治疗的与CFTR相关的药物大致有以下几类。①针对由终止突变(第一类突变)造成的CF,如氨基糖苷类抗生素。这类抗生素能抑制终止密码子,使得翻译能进行到正常水平。动物实验和体外细胞实验显示,庆大霉素可以提高CFTR在顶膜处的表达,并且恢复其功能^[17]。②能够抑制第二类突DeltaF508CFTR的降解,使得更多突变蛋白得以被运输至顶膜的化合物。由于DeltaF508CFTR的立体构象仅发生了轻微的变化,而且少部分突变体可以到达顶膜,这说明如果能改善运输途径,降低CFTR在内质网内的降解,还是有可能实现其正常运输的。例如4-苯基丁酸盐(4-phenylbutyrate, 4-PBA)类化合物,它们可以作为化学分子伴侣,减少突变体在内质网中的滞留,从而促进CFTR的运输,增加细胞顶膜处的CFTR密度^[18]。③促进氯离子分泌。这些药物可以分为2种:一种是激活CFTR及其突变体,增加氯离子流量,例如黄嘌呤(xanthines),异黄酮素以及一些其他的化合物,如菲啰啉(phenantrolines),苯并唑(benzoxazoles)和benzoquinolizinium类化合物^[19,20]。其中比较具有发展潜力的是一类可以用来替代benzoquinolizinium类化合物的MPB类化合物,因为它们可以纠正CFTR的错误合成,促进CFTR氯离子分泌,还不影响其他氯通道^[21]。另外一种也是激活其他的氯通道分泌氯离子,从而补偿缺陷的CFTR,例如ATP和UTP,但是它们的半衰期较短,应用受到了限制。④降低钠离子跨膜重吸收水平,例如利尿药阿米洛利(amiloride),但是它的临床检测效果并不理想。长效的钠通道阻断剂,如阿米洛利的类似物benzamil,或许会有更好的疗效。

除此之外联合用药也是一个很有潜力的选择,例如钠通道抑制剂和氯通道开放剂的联合使用,以及促进突变CFTR运输的药物与直接激动CFTR的

药物联用,由于联合用药能从多个方面改善缺陷CFTR的功能,所以这也将是未来CF药物研究的一个重要方向^[22]。近年来,大规模的高通量筛选也提供了很多有潜力的CFTR调控化合物。

参 考 文 献

- 01 Turcios NL. Cystic fibrosis: an overview[J]. *J Clin Gastroenterol*, 2005,9(4):307-317.
- 02 Dorwart M, Thibodeau P, Thomas P. Cystic fibrosis; recent structural insights[J]. *J Cyst Fibros*,2004,(3 Suppl 2):91-94.
- 03 Scott Olenych. Investigation of CFTR intermolecular structure and protein-protein interaction[J]. *Diss Abstr Int*, 2002,63-08, Section B:3593.
- 04 Chappe V, Irvine T, Liao J, et al. Phosphorylation of CFTR by PKA promotes binding of the regulatory domain[J]. *EMBO J*, 2005,24(15):2730-2740.
- 05 Mehta A. CFTR; more than just a chloride channel[J]. *Pediatr Pulmonol*, 2005,39(4):292-298.
- 06 Wright AM, Gong X, Verdon B, et al. Novel regulation of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) channel gating by external chloride [J]. *J Biol Chem*, 2004, 279(40):41658-41663.
- 07 Guggino WB, Banks-Schlegel SP. Macromolecular interactions and ion transport in cystic fibrosis[J]. *Am J Respir Crit Care Med*,2004,170(7):815-820.
- 08 Bachhuber T, Konig J, Voelcker T, et al. Cl interference with the epithelial Na⁺ Channel ENaC[J]. *J Biol Chem*, 2005,280(36):31587-31594.
- 09 Cuppoletti J, Tewari KP, Sherry AM, et al. ClC-2 Cl⁻ channels in human lung epithelia: activation by arachidonic acid, amidation, and acid-activated omeprazole[J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2001, 281(1):C46-54.
- 10 Burghardt B, Elkaer mL, Kwon TH, et al. Distribution of aquaporin water channels AQP1 and AQP5 in the ductal system of the human pancreas[J]. *Gut*,2003,52(7):1008-1016.
- 11 Kerem E. Pharmacological induction of CFTR function in patients with cystic fibrosis: mutation-specific therapy [J]. *Pediatr Pulmonol*,2005,40(3):183-196.
- 12 Mall M, Kreda SM, Mengos A, et al. The DeltaF508 mutation in loss of CFTR function and mature protein in native human colon[J]. *Gastroenterology*, 2004, 126(1):32-41.
- 13 Nousia-Arvanitakis S. Cystic fibrosis and the pancreas: recent scientific advances[J]. *J Clin Gastroenterol*,1999,29(2):138-142.
- 14 Larson JE, Cohen JC. Developmental paradigm for early features of cystic fibrosis[J]. *Pediatr Pulmonol*,2005, 40(5):371-377.
- 15 Rubin BK. Emerging therapies for cystic fibrosis lung disease[J]. *Chest*,1999,115(4):1120-1126.
- 16 Griesenbach U, Geddes DM, Alton EW. Advances in cystic fibrosis gene therapy[J]. *Curr Opin Pulm Med*,2004, 10(6):542-546.
- 17 Kerem E. Pharmacologic therapy for stop mutation: how much CFTR activity is enough? [J]. *Curr Opin Pulm Med*, 2004,10(6):547-552.
- 18 Roomans GM. Pharmacological approaches to correcting the ion transport defect in cystic fibrosis[J]. *Am J Respir Med*,2003,2(5):413-431.
- 19 Becq F, Mettey Y, Gray MA, et al. Development of substituted Benzo[c] quinolizinium compounds as novel activators of the cystic fibrosis chloride channel[J]. *J Biol Chem*,1999,274(39):27415-27425.
- 20 Dormer RL, Derand R, McNeilly CM, et al. Correction of delF508-CFTR activity with benzo(c) quinolizinium compounds through facilitation of its processing in cystic fibrosis airway cells[J]. *J Cell Sci*, 2001,114(Pt 22):4073-4081.
- 21 Derand R, Bulteau-Pignoux L, Mettey Y, et al. Activation of G551D CFTR channel with MPB-91: regulation by ATPase activity and phosphorylation[J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2001, 281(5):C1657-C1666.
- 22 Rodgers HC, Knox AJ. Pharmacological treatment of the biochemical defect in cystic fibrosis airway [J]. *Eur Respir J*, 2001,17(6):1314-1321.