

# 钠氢交换蛋白的研究进展

曾军英<sup>1,2</sup> 汤少勋<sup>1,2</sup> 孙志洪<sup>1,2</sup> 谭支良<sup>2\*</sup><sup>(1</sup>中国科学院研究生院, 北京 100039; <sup>2</sup>中国科学院亚热带农业生态研究所, 长沙 410125)

**摘要** 钠氢交换蛋白是一类存在于细胞膜表面的离子转运蛋白家族。它负责将细胞内  $H^+$  与胞外  $Na^+$  按照 1:1 的比例进行交换来调控细胞内 pH 的动态平衡, 影响细胞的容积、运动、分化、凋亡和营养吸收, 从而参与许多复杂的生理和病理过程。迄今为止, 钠氢交换蛋白家族已发现有 9 个成员, 各亚型间具有结构相似性和组织分布特异性。深入研究 NHE 的结构、功能及基因表达调控, 将为人和哺乳动物的营养生理、疾病治疗提供新的思路和方法。

**关键词** 钠氢交换蛋白; 细胞内 pH; 拓扑结构; 组织分布; 基因表达

细胞内 pH 被调控在一定生理范围内, 对于维持细胞的正常生理功能至关重要。细胞内酶的活性、细胞骨架的相互整合以及细胞生长分化的速度, 都与细胞内 pH 密切相关。细胞主要依赖于质膜上的钠氢交换蛋白( $Na^+/H^+$  exchanger, NHE)来调控细胞内 pH 的动态平衡。近来研究发现, NHE 不仅能通过调控细胞内 pH 的稳态来影响细胞的形态和功能, 而且参与许多复杂的生理和病理过程。因此, 本文拟对 NHE 家族成员的拓扑结构、组织分布、基因表达和生物学功能及疾病的相关性进行综述。

## 1 NHE 家族的拓扑结构与组织分布

### 1.1 拓扑结构

自从 1989 年 Sardet 等<sup>[1]</sup>克隆了第一个 NHE 基因后, 迄今为止人们已发现 NHE 存在有 9 个亚型(分别命名为 NHE1~NHE9), 共同构成膜交换蛋白的一个基因家族<sup>[2]</sup>。所有 NHE 亚型均具有相似的拓扑结构, 即 N 端有 12 个跨膜(transmembrane, TM)的  $\alpha$  螺旋, 在离子交换中共同发挥作用; C 端则是细胞质调节区域, 通过 N 端 TM 结构调节 NHE 的转运活性。所有 NHE 亚型由 600~900 个氨基酸组成, 约有 40% 的氨基酸同源性, 相互之间的差异主要在于从 TM 段到胞质部分的碱基序列不同。在 N 端的跨膜区, TM-6 和 TM-7 具有 95% 的同源性, 两者在转运  $Na^+$  和  $H^+$  中具有重要作用<sup>[3]</sup>。与 N 端相反, NHE 细胞质内 C 末端序列的同源性非常低(约 25%~35%)。NHE 的结构与其对离子的转运功能密切相关。研究认为, C 末端的结构差异性与该结构域在不同亚型的调控行为相关<sup>[4]</sup>。离子通过 NHE 主要是由  $Na^+$  浓度梯度所驱

动, 不需要直接消耗代谢能。NHE1 的离子转运通常表现为一种简单的米氏常数关系( $K_m$  值约为 5~50 mmol/L), 且依赖于细胞外的  $Na^+$  浓度梯度<sup>[5]</sup>。胞外  $Li^+$  和  $H^+$  可与  $Na^+$  竞争其结合位点, 而胞外高浓度的  $K^+$  也会抑制 NHE1 活性<sup>[6]</sup>。

### 1.2 组织分布

NHE 各亚型具有不同的组织分布及亚细胞定位, 涉及不同的细胞学功能(表 1)<sup>[7]</sup>。NHE1 型也被称为管家基因亚型, 广泛分布于所有组织的细胞膜上。作为第一个被确认的 NHE 亚型, 最先发现于心肌细胞膜表面<sup>[8]</sup>。同样, NHE2~NHE5 也主要亚细胞定位于细胞膜上, 但组织分布更具特异性。NHE2 和 NHE3 主要存在于上皮细胞基底膜, 在肾脏和小肠上高表达<sup>[9]</sup>。NHE4 更多是在胃上皮细胞中丰富存在, 但也存在于小肠、肾脏<sup>[10]</sup>。NHE5 主要在大脑表达, 但也在一些非上皮组织低表达, 例如脾、睾丸和肌肉组织<sup>[11]</sup>。与此相反, NHE6~NHE9 则广泛存在和表达于细胞膜内。NHE6 在心脏、大脑和骨骼肌高表达, 并定位于早期循环小泡的膜表面, 与物质回收有关<sup>[12]</sup>。NHE7 主要定位于高尔基体的反面区, 主要间接负责  $Na^+$  和  $K^+$  在与  $H^+$  交换后的内流<sup>[13]</sup>。NHE8 主要在骨骼肌和肾脏高表达, 亚细胞定位于高尔基体的中部和反面区域; 而最近才发现的 NHE9 则定位于晚期回收小泡<sup>[7]</sup>。

## 2 NHE 对细胞形态及功能的影响

收稿日期: 2007-11-23 接受日期: 2008-05-12  
中国科学院知识创新工程重要方向项目(No.KSCX2-YW-N-051)、  
国家自然科学基金(No.30600436, No.30571352)资助  
\* 通讯作者。Tel: 0731-4619702, E-mail: zltan@isa.ac.cn

表1 钠氢交换蛋白基因家族成员及组织分布<sup>[7]</sup>

| 成员名称  | 蛋白质产物大小        | 组织分布       |
|-------|----------------|------------|
| NHE-1 | 815 aa, 91 kDa | 广泛存在于细胞膜表面 |
| NHE-2 | 831 aa, 93 kDa | 胃、结肠、肾脏    |
| NHE-3 | 815 aa, 91 kDa | 结肠、胃、小肠    |
| NHE-4 | 未知             | 胃、结肠、肾脏    |
| NHE-5 | 896 aa, 99 kDa | 大脑、肌肉、脾脏   |
| NHE-6 | 659 aa, 74 kDa | 肌肉、心脏、大脑   |
| NHE-7 | 725 aa, 80 kDa | 大脑、胰腺、甲状腺  |
| NHE-8 | 未知             | 肾脏         |
| NHE-9 | 未知             | 胃、小肠       |

NHE 通过将细胞内  $H^+$  与胞外  $Na^+$  按照 1:1 的比例进行交换, 来调控细胞内 pH 值的动态平衡, 从而影响细胞的形态与功能<sup>[14]</sup>。在哺乳动物细胞内, 尽管存在 NHE、 $Na^+$  依赖型和  $Na^+$  独立型  $Cl^-HCO_3^-$  交换蛋白等多种 pH 调节途经, 但 NHE 起着主要调控作用。细胞内大约 60% 的  $H^+$  是通过 NHE 排出到细胞外<sup>[15]</sup>。Orlowski 等<sup>[16]</sup>认为, NHE 主要是通过影响细胞外的渗透压来调节细胞容积。实际上,  $Na^+/H^+$  交换并不直接影响细胞内渗透压, 而是由于排出的  $H^+$  很快被缓冲系统所代偿, 结果造成  $Na^+$  的净增和渗透压的升高, 从而使细胞容积恢复。

此外, NHE 对细胞的运动、生长、分化和凋亡也有调控作用。NHE 对细胞运动的影响依赖于与膜突蛋白的相互作用来影响细胞骨架的稳定性, 从而调控细胞的运动和迁移, 特别是肿瘤细胞的转移<sup>[17]</sup>。以 NHE1 缺陷的中国仓鼠肺成纤维细胞为模型研究发现, 在缺少  $Na^+/H^+$  交换活性时细胞不能在中性或酸性条件下生存<sup>[18]</sup>。NHE 对细胞周期的调控作用可能是其涉及细胞生长和分化的根本原因<sup>[19]</sup>。提高胞内 pH 后能促进细胞由 S 期向  $G_2/M$  转变; 而在缺少  $Na^+/H^+$  交换活性的细胞中 S 期的发生则显著延迟, 有丝分裂出现停滞。进一步研究表明, 对细胞用 NHE1 抑制剂处理后, 发现由维甲酸所诱导的细胞分化受到显著抑制<sup>[20]</sup>。但 NHE 调控细胞周期进程的机制尚未完全清楚。Putney 等<sup>[21]</sup>研究认为 NHE1 是通过间接调控细胞周期进程的相关基因表达, 来影响细胞生长与分化。NHE 活性与细胞凋亡也有密切相关。细胞内 pH 下降促进细胞凋亡, 而 pH 升高则抑制凋亡的发生<sup>[22]</sup>。

### 3 NHE 基因的表达调控

NHE 基因表达主要受到蛋白质活性位点的共价修饰和 G 蛋白信号转导通路两个方面的调控。NHE 基因表达调控受到糖基化、磷酸化、激素以及 C 末

端特殊结合位点的影响。蛋白质结构分析表明, 在 N 末端区 NHE1 有两种潜在的糖基化位点<sup>[1]</sup>。一种是 N-连接的糖基化位点, 位于第一个细胞外环的 Asn<sup>75</sup>, 而其他均为 O-连接的糖基化位点。同时, NHE 的活性受到细胞表面不同类型的受体调节, 包括受体酪氨酸激酶、G 蛋白偶联受体等<sup>[21]</sup>。这些受体通过已知的信号传递网络, 最后汇集到几个有限的与 NHE 相互作用的蛋白质上, 这些蛋白质再进一步修饰 NHE 胞浆内 C 端调节区。这些修饰作用包括磷酸化、共价结合和 NHE 构象的改变, 进而改变  $H^+$  转运位点的亲和力来调控其转运活性。分析 NHE1 的拓扑结构, 发现其 C 末端存在两种不同类型的钙调节蛋白结合位点, 负责通过钙离子介导的信号机制调控 NHE1 的活性。在 C 末端还存在有其他一些特殊结合位点如磷脂酰肌醇二磷酸盐、膜突蛋白和碳酸酐酶结合位点等也与 NHE1 的活性调控有关<sup>[23]</sup>。

NHE 活性调控的 G 蛋白信号通路比较复杂。各种激素和生长因子通过与细胞膜上的相应受体作用, 进而与酪氨酸激酶、G 蛋白偶联来调控 NHE 的基因表达和活性<sup>[24]</sup>。其下游事件是酪氨酸激酶受体活化相应的信号通路, 引发 Ras-ERK 信号级联放大反应, 涉及多个下游效应子(例如 Raf-1、MEK1/2 和 p42/44 MAPK)<sup>[25]</sup>。也有研究认为, G 蛋白偶联不能直接活化 NHE1, 但能够促进 p90 核糖体 S6 激酶 (p90RSK) 从而介导 NHE1 的磷酸化来调控其活性<sup>[26]</sup>。此外, 也可通过与系统偶联的磷脂酶来产生脂质第二信使, 例如通过二酰基甘油来调控 NHE1 的活性<sup>[27]</sup>。

## 4 NHE 生物学功能与疾病

### 4.1 营养吸收

NHE1~NHE4 广泛表达于哺乳动物胃肠道上皮细胞, 并对营养吸收起着重要的调控作用<sup>[28]</sup>。NHE 通过向细胞外泵出  $H^+$ , 从而在小肠上皮刷状缘膜形成  $H^+$  电化学梯度, 促进营养物质与  $H^+$  偶联的跨膜共转运(图 1)。目前, 大量  $H^+$  偶联的共转运机制在哺乳动物小肠内膜上已经被证实<sup>[29]</sup>。这些转运载体负责大量的必需营养素和非必需营养素、微量元素, 包括蛋白质消化产物(二肽、三肽和氨基酸)、维生素、短链脂肪酸及二价金属离子的跨膜转运。在哺乳动物小肠细胞刷状缘膜的  $H^+$  偶联型共转运载体, 主要有二肽和三肽转运载体 PepT1、 $H^+$  偶联型氨基酸转运载体 PAT1、单羧酸转运载体 MCT1、葡萄糖转运载体 SGLT1、兴奋氨基酸转运载体 EAAC1 等。

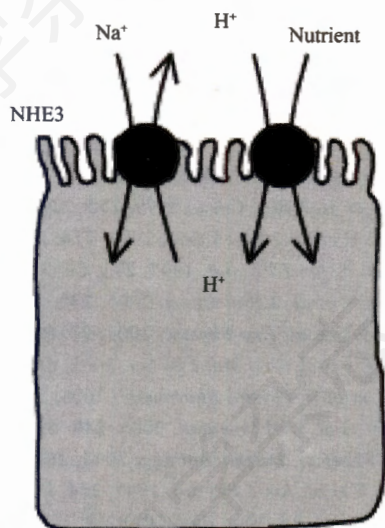


图1 NHE3与H<sup>+</sup>偶联共转运吸收营养物质模式图<sup>[29]</sup>

研究表明, 小肠上这些H<sup>+</sup>偶联共转运载体(例如PepT1和PAT1)最佳的吸收能力依赖于刷状缘上NHE3的活性<sup>[29]</sup>。通过NHE3的特异抑制剂试验证实, NHE能够激活PepT1所介导的小肽共转运<sup>[30]</sup>。研究发现, 尽管NHE3对于H<sup>+</sup>电化学梯度形成起着重要作用, 但还需要其他NHE的协同作用<sup>[31]</sup>。

#### 4.2 免疫调节

免疫细胞中的巨噬细胞和嗜中性粒细胞通过其吞噬作用和趋化因子的释放, 构成了哺乳动物免疫系统的第一道防线。细胞内pH升高是细胞因子和化学因子释放的一个重要信号, 而吞噬小体内pH下降则可诱导有效的抗原呈递。这就意味着机体内白细胞的功能与NHE有着重要相关性<sup>[32]</sup>。在酸性条件下体外培养单核细胞系U937时发现, 细胞内pH的恢复主要由NHE负责<sup>[33]</sup>。此外, NHE1与早期吞噬小体的酸化作用也有关系。有趣的是, 尽管NHE-1亚细胞定位于细胞膜表面, 但在吞噬作用过程中却被整合到吞噬小体膜上, 负责吞噬小体内的酸化作用<sup>[34]</sup>。促炎因子在活化单核细胞和巨噬细胞时, 也同步激活NHE。NHE则进一步促进其他细胞因子及前列腺素的释放, 同时也促进免疫细胞增殖和分化<sup>[35]</sup>。不仅如此, NHE不但能影响白细胞的功能, 还影响白细胞三烯B<sub>4</sub>的合成。Tedeschi等<sup>[36]</sup>利用NHE的抑制剂(己烷盐酸阿米洛利)培养白细胞, 发现能显著减少白细胞三烯B<sub>4</sub>的合成, 其原因可能是由于NHE的转运功能受到抑制, 导致细胞内环境酸化的结果。以上相关研究表明, NHE对机体的免疫功能有着重要调节作用。

#### 4.3 肿瘤

由于肿瘤细胞糖酵解优势, 导致肿瘤细胞产生大量的乳酸和H<sup>+</sup>。以往人们一直认为肿瘤细胞内pH比正常细胞更偏酸性。但用核磁共振波谱等技术证明肿瘤细胞内pH为中性或偏碱性。NHE通过泵出肿瘤细胞因高代谢产生的H<sup>+</sup>, 维持肿瘤细胞内的pH值, 形成外酸内碱的局部微环境, 对肿瘤的增殖、侵袭和转移都起到重要的作用<sup>[37]</sup>。细胞凋亡存在两种经典的凋亡信号通路: 线粒体依赖信号通路和死亡受体通路<sup>[38]</sup>。但NHE活性与调控细胞凋亡或死亡的信号通路还不是很清楚<sup>[17]</sup>。对人类白血病细胞利用NHE的抑制剂(己烷盐酸阿米洛利)处理后, 发现能够显著降低细胞内pH, 进而诱导白血病细胞发生凋亡, 表明NHE抑制剂可作为潜在的治疗白血病的工具<sup>[39]</sup>。另外, NHE排出的酸可以直接溶解于基底膜和基质, 增强肿瘤细胞的侵袭力和运动能力<sup>[40]</sup>。因此, 通过药理学抑制剂来抑制NHE的活性, 诱导细胞内酸化可作为某些肿瘤的治疗手段, 提示在临床上NHE可作为肿瘤治疗的一个有效靶点<sup>[41]</sup>。

#### 4.4 酸中毒

酸中毒是危害反刍动物(如高产奶牛)一种常见的高发性代谢疾病。研究证实, 多个NHE家族成员包括NHE1、NHE2、NHE3和NHE8在瘤胃上皮表达<sup>[42]</sup>。瘤胃上皮具有强大吸收短链脂肪酸(short chain fatty acid, SCFA)的能力, 从而使反刍动物获得足够的营养物质用于葡萄糖或脂肪代谢。SCFA大量内流会使胞内pH迅速降低, 影响细胞的正常生理功能, 甚至引起细胞凋亡或死亡。反刍动物在酸中毒状态下, 在瘤胃上皮细胞内H<sup>+</sup>不断增加且不能被清除, 从而使发酵功能恶化, 最终导致黏膜上皮细胞的形态和功能发生改变<sup>[43]</sup>。为防止出现酸中毒, 反刍动物上皮细胞可通过以下几种机制能够排出H<sup>+</sup>: ①NHE; ②碳酸氢盐输入系统; ③单羧酸转运蛋白, 其中最为重要的是NHE<sup>[42]</sup>。通过提高瘤胃上皮细胞中NHE的表达和活性, 来提高细胞内pH, 对于防止酸中毒的发生具有重要意义<sup>[44]</sup>。

#### 5 小结与展望

NHE通过调控人和哺乳动物细胞内pH的动态平衡来影响细胞的形态和功能, 从而参与许多复杂的生理和病理过程。随着细胞生物学和分子生物学的发展, 将会对NHE的结构、功能和调控其活性的分子机制及信号转导通路有着更加深刻的认识。在

此基础上进一步研究 NHE 活性的特异抑制剂和激活剂, 对于促进人和动物的营养吸收、调控机体免疫、防治肿瘤与酸中毒等疾病的发生, 具有现实而重要的意义。

### 参考文献(References)

- [1] Sardet C *et al. Cell*, 1989, **56**: 271
- [2] Slepkov ER *et al. Biochem J*, 2007, **401**: 623
- [3] Putney LK *et al. Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 2002, **42**: 527
- [4] Zachos NC *et al. Annu Rev Physiol*, 2005, **67**: 411
- [5] Pedersen SF *et al. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 2006, **291**: R1
- [6] Masereel B *et al. Eur J Med Chem*, 2003, **38**: 547
- [7] Nakamura N *et al. J Biol Chem*, 2005, **280**: 1561
- [8] Karmazyn M *et al. Circ Res*, 1999, **85**: 777
- [9] Noel J *et al. J Cell Sci*, 1996, **109**: 929
- [10] Orłowski J *et al. J Biol Chem*, 1992, **267**: 9331
- [11] Attaphitaya S *et al. J Biol Chem*, 1999, **274**: 4383
- [12] Brett CL *et al. Am J Physiol Cell Physiol*, 2002, **282**: C1031
- [13] Numata M *et al. J Biol Chem*, 2001, **276**: 17387
- [14] Dibrov P *et al. FEBS Lett*, 1998, **424**: 1
- [15] Nath SK *et al. Am J Physiol*, 1996, **270**: G431
- [16] Orłowski J *et al. Pflugers Arch*, 2004, **447**: 549
- [17] Lagadic-Gossman D *et al. Cell Death Differ*, 2004, **11**: 953
- [18] Pouyssegur J *et al. Proc Natl Acad Sci USA*, 1984, **81**: 4833
- [19] Putney LK *et al. J Biol Chem*, 2003, **278**: 44645
- [20] Wang H *et al. Biochemistry*, 1997, **36**: 9151
- [21] Putney LK *et al. BMC Genomics*, 2004, **5**: 46
- [22] Khaled AR *et al. Mol Cell Biol*, 2001, **21**: 7545
- [23] Denker SP *et al. Mol Cell*, 2000, **6**: 1425
- [24] Incerpi S *et al. Steroids*, 2005, **70**: 434
- [25] Moor AN *et al. J Biol Chem*, 1999, **274**: 22985
- [26] Takahashi E *et al. J Biol Chem*, 1999, **274**: 20206
- [27] Ricci R *et al. Am J Physiol*, 1997, **273**: C643
- [28] Nakamura N *et al. J Biol Chem*, 2005, **280**: 1561
- [29] Thwaites DT *et al. Exp Physiol*, 2007, **92**: 603
- [30] Kennedy DJ *et al. Cell Mol Life Sci*, 2005, **62**: 1621
- [31] Kiela PR *et al. J Physiol Pharmacol*, 2006, **Suppl 7**: 51
- [32] De Vito P *et al. Cell Immunol*, 2006, **240**: 69
- [33] Heming TA *et al. Immunobiology*, 2003, **207**: 141
- [34] Grinstein S *et al. Am J Physiol*, 1988, **254**: C272
- [35] Lardner A *et al. J Leukoc Biol*, 2001, **69**: 522
- [36] Tedeschi A *et al. Biochem Pharmacol*, 2004, **67**: 385
- [37] Slepkov E *et al. Biochem Cell Biol*, 2002, **80**: 499
- [38] 马 泰等. *细胞生物学杂志*, 2006, **28**: 671
- [39] Rich IN *et al. Blood*, 2000, **95**: 1427
- [40] Bourguignon LY *et al. J Biol Chem*, 2004, **279**: 26991
- [41] Harguindey S *et al. Biochim Biophys Acta*, 2005, **1756**: 1
- [42] Graham C *et al. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 2007, **292**: R997
- [43] Gabel G *et al. Anim Health Res Rev*, 2002, **3**: 15
- [44] Uppal SK *et al. J Anim Physiol Anim Nutr (Berl)*, 2003, **87**: 380

## The Progress in Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> Exchanger

Jun-Ying Zeng<sup>1,2</sup>, Shao-Xun Tang<sup>1,2</sup>, Zhi-Hong Sun<sup>1,2</sup>, Zhi-Liang Tan<sup>2\*</sup>

(<sup>1</sup>Graduate School of the Chinese Academy of Science, Beijing 100039, China; <sup>2</sup>Institute of Subtropical Agriculture, Chinese Academy of Science, Changsha 410125, China)

**Abstract** In mammalian eukaryotic cells, the Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger (NHE) is a family of membrane protein that regulates ions fluxes across membranes, which regulates intracellular pH homeostasis by extruding one intracellular proton in exchange for one extracellular sodium. It also plays a key role in the cellular functions including volume regulation, migration, proliferation, differentiation and apoptosis, which involved in a variety of complex physiological and pathological events. To date, The NHE family consists of 9 known isoforms, NHE1–NHE9, which have homology structure and different tissue distribution. To study the topology, function and gene expression of NHE, it may provide a new way on nutrition regulation, immune enhancement and treating for diseases of human and animal.

**Key words** Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger; intracellular pH; topology; tissue distribution; gene expression

Received: November 23, 2007 Accepted: May 12, 2008

This work was supported by the Knowledge Innovation Program of the Chinese Academy of Sciences (No.KSCX2-YW-N-051) and the National Natural Science Foundation of China (No.30600436, No.30571352)

\*Corresponding author. Tel: 86-731-4619702, E-mail: zltan@isa.ac.cn