

人体平衡型核苷转运蛋白的结构及应用研究进展

郝振宇¹ 刘瑞华² 王莹莹^{1*} Mark Bartlam²

(¹环境污染过程与基准教育部重点实验室, 天津市城市生态环境修复与污染防治重点实验室, 南开大学环境科学与工程学院, 天津 300071; ²南开大学生命科学学院, 天津 300071)

摘要 通过参与合成和转运核苷及其类似物, 人体中的平衡型核苷转运蛋白在生物体内参与了细胞发育、能量代谢和信号转导等众多生理生化过程, 其研究对于癌症、病毒感染等相关疾病的治疗有着极为重要的意义。该文综述了该类蛋白质在人体内的发现历程、分类、结构和作用机制, 并对于其在一些疾病治疗和药物开发方面的前景进行了展望。

关键词 平衡型核苷转运蛋白; 核苷转运; 蛋白结构; 转运机制

Structure and Application of Human Equilibrative Nucleoside Transporter—A Review

Hao Zhenyu¹, Liu Ruihua², Wang Yingying^{1*}, Mark Bartlam²

(¹Tianjin Key Laboratory of Environmental Remediation and Pollution Control, Ministry of Education Key Laboratory of Pollution Processes and Environmental Criteria, College of Environmental Science and Engineering, Nankai University, Tianjin 300071, China; ²College of Life Sciences, Nankai University, Tianjin 300071, China)

Abstract The equilibrative nucleoside transporters play critical roles in various biochemical and physiological process by regulating the synthesis and transport of nucleosides, such as cell growth, energy metabolism and signal transduction in human being. Meanwhile, the related studies are meaningful for the therapy of cancer and viral infection and other diseases. Here in this review, the recent research progresses of equilibrative nucleoside transporters, including history, classification, molecular structure and mechanism, were summarized and their potential applications in disease treatment and drug development were also discussed.

Keywords equilibrative nucleoside transporter; nucleoside transport; protein structure; transport mechanism

核苷和碱基作为生物体内遗传物质的基本单位, 在生物体内参与了众多生理、生化过程, 例如腺苷作为一种内生核苷, 在调节淋巴细胞功能、血液流动、糖代谢和神经传递等过程中发挥着重要作用^[1]。但是, 核苷及其类似物(多用于抗癌或抗病毒药物)都属于亲水性大分子, 导致其不能简单地扩散穿过生物膜, 其跨膜运输需要依赖特殊的转运蛋白, 也即核苷转运蛋白^[2]。核苷转运蛋白广泛存在

于各类生物体内, 通过跨膜转运核苷, 参与和调节了生物体内诸多生理、生化反应, 例如能量代谢、信号转导、神经发育、细胞和组织发育等, 同时通过转运核苷类似物, 在癌症治疗和抗病毒感染方面发挥着重要作用^[3]。根据其转运特点及驱动力的不同, 核苷转运蛋白主要分为两个家族: (1)浓度型核苷转运蛋白(concentrative nucleoside transporter, CNT或SLC28), 依赖于钠离子和氢离子等离子浓度梯度,

收稿日期: 2016-01-30 接受日期: 2016-04-19

国家重点基础研究发展规划项目(973计划)(批准号: 2014CB560709)资助的课题

*通讯作者。Tel: 022-66229721, E-mail: wangyy@nankai.edu.cn

Received: January 30, 2016 Accepted: April 19, 2016

This work was supported by the Major State Basic Research Development Program of China (973 Program) (Grant No.2014CB560709)

*Corresponding author. Tel: +86-22-66229721, E-mail: wangyy@nankai.edu.cn

网络出版时间: 2016-06-30 16:23:37

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20160630.1623.008.html>

高亲和性的单向转运核苷及其类似物; (2)平衡型核苷转运蛋白(equilibrative nucleoside transporter, ENT或SLC29), 存在于大多数真核生物细胞中^[4]。平衡型核苷转运蛋白主要以低亲和性结合核苷及其类似物跨膜向相对浓度较低的一方扩散, 作为核苷转运蛋白重要的一个分支, 在生物体内扮演着极为重要的角色。经过40多年的研究, 人们对该类蛋白的功能和分布已经有了一定了解, 但是由于蛋白质结晶方面存在的困难, 其蛋白质结构和作用机制研究仍处于探索阶段。在此, 本文简要回顾了平衡型核苷转运蛋白的发现历程及分类, 并重点综述了平衡型核苷转运蛋白的结构和作用机制方面的研究进展, 同时对于其在药物开发方面的潜力进行了阐述, 希望增进人们对于平衡型核苷转运蛋白的了解, 进一步促进国内跨膜转运蛋白的机制研究。

1 ENT蛋白的分类和历史

上世纪80年代, 科研人员利用快速动力学技术和特殊反应底物从小鼠体内首次发现了非浓度型核苷转运系统, 该类转运系统分布于所有哺乳动物细胞体内, 属于非能耗扩散系统, 可以被双嘧达莫(Dipyridamole)和硝基苯硫嘌呤核苷(Nitrobenzylthioinosine)抑制, 也即后来的平衡型核苷转运蛋白^[5-7]。在研究初期, 平衡型核苷转运蛋白最初的分类依据为针对底物NBMPR(Nitrobenzylmercaptapurine riboside)的抑制特异性, 分为对于NBMPR抑制敏感的NBMPR-

sensitive(es)和不敏感的NBMPR-insensitive(ei)的两类转运蛋白^[8-9]。研究发现, es类核苷转运蛋白对于NBMPR的抑制性极其敏感(抑制剂常数 $K_i=0.1\sim 10$ nmol/L), ei类转运蛋白与NBMPR的反应抑制性常数达到 $\mu\text{mol/L}$ 数量级^[10-11]。但不同来源的ENT对于不同的抑制剂具有不同的抗性, 例如人体内的es和ei两类ENT都可以被Dipyridamole、地拉卓(Dilazep)和曲氟嗪(Draflazine)所抑制, 而大鼠体内的ENT对于这些抑制剂却具有一定的抗性, 其中, Dipyridamole对于人体、小鼠和大鼠中的es类核苷转运蛋白抑制的 K_i 值分别为10 nmol/L、100 nmol/L和10 $\mu\text{mol/L}$ ^[10-12]。这也使得原有依靠ENT对于抑制剂抗性不同而进行的分类方法不太可靠, 如何进行科学而严谨的分类就提上了日程。

在此基础上, 依据其转运机制和类型的不同, 该家族蛋白被划分为四类(表1)^[3-4]: (1)ENT1, 该类蛋白几乎存在于所有细胞系和组织中; (2)ENT2, 主要存在于脑、心脏、胰脏和肾等组织器官中, 并且在骨骼肌中相对更为富集; (3)ENT3, 相对于ENT1和ENT2该蛋白含有一个相对较长的亲水N-端区域, 除了存在于人体器官外, 还存在于人体的核内质溶酶体系统, 且在人体胎盘中相对富集; (4)ENT4, 主要富集于脑和心脏组织中, 可被核苷转运蛋白常见的抑制剂Dipyridamole和Dilazep所抑制^[13-14]。ENT家族蛋白(ENT1和ENT2)一般依靠被动扩散来跨膜转运核苷及相应底物, 且已知ENT家族蛋白都具有转运

表1 平衡型核苷转运蛋白分类信息(根据参考文献[3,15]修改)

Table 1 The classification of equilibrative nucleoside transporters (modified from references [3,15])

名称 Name	长度(残基数) Length (numbers of amino acid residues)	相似度(以 hENT1为参照) Identities (using hENT1 as reference)	人类基因名称 Name of human gene	转运类型 Transport type	Uniprot登录号 Accession ID of UniProt	底物 Substrate	组织分布 Tissue distribution
ENT1	465	1	SLC29A1	Facilitated transporter	Q99808	Purine and pyrimidine nucleosides	Widely distributed
ENT2	465	46%	SLC29A2	Facilitated transporter	Q14542	Purine and pyrimidine nucleosides and nucleobases	Widely distributed Particularly abundant in skeletal muscle
ENT3	475	29%	SLC29A3	Unclear	Q9BZD2	Purine and pyrimidine nucleosides and some nucleobase	Widely expressed
ENT4	530	19%	SLC29A4	Unclear	Q7RTT9	Adenosine and some organic ions	Heart, brain, and skeletal muscle. Primarily plasma membrane-located

腺苷的能力^[3]。这也是现有对于ENT较为严谨的分类方法,得到了大多数科研人员的认可。

1997年,在对人体红细胞中的es转运蛋白进行纯化和测序的基础上,Griffiths等^[12,16]利用克隆及测序手段,第一次从人体胎盘组织中发现了两种平衡型核苷转运蛋白,并对其进行了初步克隆鉴定。研究发现,这两种转运蛋白约为50 kDa左右,含有11个跨膜区域,随后这两类转运蛋白分别被命名为ENT1(es类型)和ENT2(ei类型)。2001年,Hyde等^[14]和Baldwin等^[17]从人体和小鼠体内发现了ENT3,ENT3能够有效转运嘧啶和嘌呤类核苷以及抗癌类药物,其后的研究表明,ENT3在酸性条件下(pH5.5~6.5)具有最大的转运活性。而hENT1、hENT2和hENT3也是已知的参与人体内组织和细胞中碱基回收的主要转运蛋白^[4]。2002年,Acimovic和Coe^[18]利用序列比对方法从基因组数据库中发现了另一ENT,亦即后来的ENT4,该蛋白质与家族中其他三类蛋白的相似度较低(约20%)。同时,相较于人体ENT4与ENT1序列的低相似度(19%),hENT4与果蝇中的*CG11010*基因以及甘比亚疟蚊中的*CG56160*基因相似度分别为28%和30%,这也意味着人体ENT4可能是ENT家族蛋白在长期进化过程中的一个变种^[15]。经过克隆和性质研究发现,与ENT1-3主要转运核苷底物不同,ENT4主要转运各种各样的有机离子同时也可转运腺苷,例如,1-甲基-4-苯基吡啶、四乙铵和生物胺等,与核苷或核苷类似物的结合并不多见^[19]。此外,人体内的ENT4与ENT3一样,其转运活性在不同pH环境下不同,在酸性环境中活性较高^[15]。而Barnes等^[13]的研究也发现,人体和小鼠体中的ENT4在酸性环境中能够正常转运核苷(pH5.5时,两者转运腺苷的米氏常数*K_m*值可分别高达0.78 mmol/L和0.13 mmol/L),但是pH高于7.4时,其转运核苷的功能就会丧失,而它们转运有机离子如5-羟色胺的能力并不受pH值影响。相对于人体ENT1和ENT2的易化扩散模式,ENT3和ENT4的转运模式还未为可知。而ENT4并不受NBMPR抑制剂影响,仅仅被Dipyridamole和Dilazep稍微抑制^[13]。在此基础上,越来越多的平衡型核苷转运蛋白从动物、植物、昆虫、真菌、线虫和原生动物中被发现和鉴定出来。例如,研究人员从植物拟南芥中发现和鉴定了一个ENT1;而在酿酒酵母中得到的ENT(FUN26)与人体ENT1-3的序列相似度约为19%^[14,18,20-22]。但是所有的研究表明,ENT家族蛋

白只存在于真核生物中,未见关于原核生物中鉴定得到ENT的报道^[23]。由此可以推测,ENT在真核生物中尤其是人体内发挥着极为重要的作用,研究并阐释其功能和机构对于后续有关疾病治疗和新药研发具有非常重要的意义。

2 ENT的蛋白结构和转运机制

跨膜蛋白由于蛋白质表达的问题难以获得足量的稳定活性蛋白质用于结晶实验,且在结晶过程中由于去垢剂的影响,其结晶难度极大^[24-25]。而平衡型核苷转运蛋白作为一种跨膜蛋白,迄今为止,还未有任何关于ENT高级结构的报告公布出来,现有的结构信息都源于生物信息学分析和拓扑结构预测。Sundaram等^[21]克隆了人源ENT1并在非洲爪蟾卵母细胞中进行了表达,得到了含有456个氨基酸残基的重组蛋白,利用抗体作为探针结合糖基化扫描诱变(glycosylation scanning mutagenesis)技术对其拓扑结构进行了预测,发现该蛋白质含有11个跨膜结构域(transmembrane region, TM),并含有位于细胞膜内的N-端和位于细胞膜外的C-端。其中,TM1和TM2之间被一个膜外糖基化环A(41个氨基酸残基)所连接,TM6和TM7之间被较大的膜内环B(66个氨基酸残基)所连接,其余的跨膜结构域都是由稍短的亲水区域所连接(图1)^[21]。Aseervatham等^[26]研究发现,在ENT折叠校正和底物转运过程中,C-端的跨膜结构域是必需的,而胞外和胞内连接环则不是必需的,但其可能参与着转运调节的微调过程。研究发现,糖基化位点对于蛋白质转运活性或底物识别有一定的调节作用,但并非必要条件,在hENT1和hENT3的A环中存在着1个N-糖基化受体位点,hENT2的A环中具有2个糖基化位点,而hENT4的糖基化位点则位于蛋白C-端^[13,27]。除此之外,hENT1的A环中还含有一个线粒体的定位基团(PEXN motif),推测ENT中的A环和B环在转运蛋白底物识别和调节其转运活性方面具有重要的调节作用^[26,28]。TM3-6区域被认为是结合抑制剂NBMPR的结合位点,而TM5-6区域则被认为是决定转运碱基能力的区域,同时也可能是形成ENT2底物转运通道的关键区域^[21,29]。研究表明,ENT3与ENT1/2的结构有所不同,它具有一个更长的亲水N-端,其中含有一个特殊的核内质溶酶体系统定向序列——双亮氨酸基团^[17]。

有关其转运机制,跨膜转运蛋白的底物转运

过程一般来说主要包括不同的构象转换过程, 其中研究较为深入的是交替访问机制(alternating-access mechanism), 该机制主要包括不同的构象转换、离子梯度化学势和相应的分子替换过程等^[30-31]。该机制的主要部分为两个不同构象的循环往复, 包括: (1)外向型构象(outward-facing conformation), 主要是转运蛋白形成识别和结合膜外转运底物的结合位点, 并与底物结合形成复合体的构象; (2)内向型构象(inward-facing conformation), 是转运蛋白与底物结合的复合体朝向细胞膜内并且释放底物所形成的构象^[30,32]。通过序列比对, 推测ENT与主要促进体超家族(major facilitator superfamily, MFS)蛋白存在着共同的分子进化起源, 这也意味着作为MFS家族一员的大肠杆菌乳糖透过酶(lactose permease of *Escherichia coli*, LacY)的分子模型和作用机制对于ENT的研究具有很大的借鉴意义^[15]。LacY具有12个跨膜结构域, 且分别形成两个由6个TM组成的C-端和N-端“bundle”结构, 而底物和离子的结合位点就位于这两个“bundle”结构之间的巨大空隙中^[33-34]。LacY识别底物时, 膜外空隙部分打开与底物结合, 也即LacY的外向型构象, 两个“bundle”结构旋转使得蛋白由外向型构象向内向型构象转变且底物通过细胞膜, 而在内向型构象中, 膜外空隙部分关闭而对应的膜内空隙部分打开, 底物被释放到膜内, 两种构象的交替重复, 也即LacY的转运循环过程^[33-34]。但是, 由于LacY具有12个跨膜结构域, 较ENT多出1个跨膜结构域, 使得LacY转运模式对于ENT的参考价值受到影响。

Young等^[15]结合LacY和大肠杆菌3-磷酸甘油转运蛋白(glycerol-3-phosphate transporter of *Escherichia coli*, GlpT)的高级结构提出了一个ENT的结构模型, 该模型中ENT的TM1、2、4、5、8和11跨膜结构域聚集形成了一个大的结合部位, 可能是ENT结合核苷底物的部位^[33]。在此基础上, Valdes等^[23,35]结合杜氏利什曼虫核苷转运蛋白(*Leishmania donovani* nucleoside transporter, LdNT)分子模型对于ENT的作用机制进行了阐释。他们认为, ENT的跨膜结构域1、2和7在细胞膜外聚集形成一个膜外“阀门”结构, 该结构在转运蛋白与底物的复合物为内向型构象时关闭转运通道, 在外向型构象时打开通道, 而该膜外“阀门”结构可能就是ENT蛋白转运核苷底物时跨膜通道的重要组成部分(图2)。而后, 同一实验

室又结合大肠杆菌海藻糖转运蛋白(*Escherichia coli* fucose transporter, FucP)的高级结构, 通过定点突变和化学交联发现, 跨膜结构域4、5、10和11之间存在着特定区域的连接, 进而推测ENT的这些跨膜结构域组成了膜内“阀门”结构, 该结构可能是ENT在细胞膜内控制转运通道开合(被疏水作用力驱动)的主要部分^[36]。同时, 该课题组推测, N-端区域(TM1-6)和C-端区域(TM7-11)分别聚拢形成特殊的“bundle”结构, 而这种结构对于ENT的转运功能极为关键, 这也与前文所述的LacY的“bundle”模式相似(图2)^[36]。在此, 我们可以推测, ENT所形成的2个“bundle”结构之间的空隙可能就是底物结合及转运的通道, 而“bundle”结构的相对旋转会使得ENT的构象发生变化。ENT依靠膜外与膜内“阀门”结构的次第开合对于底物转运通道进行管控, 在此基础上与底物结合的不同构象可能是ENT的外向型和内向型构象, 而内向型构象与外向型构象的循环往复也就形成了ENT转运核苷底物的完整过程。这也是与交替访问机制的构象转换理论较为相似的^[37-38]。

3 ENT蛋白的应用

已知ENT作为人体内主要的碱基、核苷及其类似物的主要转运蛋白之一, 参与了众多生理生化过程, 发挥着重要作用。ENT家族蛋白质可以通过调节腺苷的浓度来影响细胞表面的受体, 进而调节细胞信号转导。例如, hENT1通过转运腺苷进而调节人体气管上皮细胞中的K⁺通道^[15]。Szkotak等^[39]研究发现, 人体内的ENT1和ENT2通过控制人体气管上皮细胞中的腺苷转运, 在调节囊性纤维化跨膜转导调节因子的过程中发挥着重要作用。虽然ENT结构和作用机制的研究还处于探索阶段, 但ENT作为许多抗癌、抗病毒药物的传递介质在科学研究和实际应用中得到了推广, 在疾病治疗和药物开发方面的应用已经广泛深入地开展起来。

在癌症治疗方面, 基于核苷及其类似物所研发的药物应用于癌症治疗已经过去了将近60年。上世纪50年代, Elion^[40]首先将硫鸟嘌呤(thioguanine)和6-巯基嘌呤(6-mercaptopurine, 6-MP)应用到了白血病的治疗中。随着人们对于核苷类药物作用模式的研究逐渐深入, 越来越多的同类药物被应用到癌症治疗中来。如5-氟尿嘧啶(5-fluorouracil, 5-FU)、6-MP和氟达拉滨(Fludarabine)等药物作为被ENT转

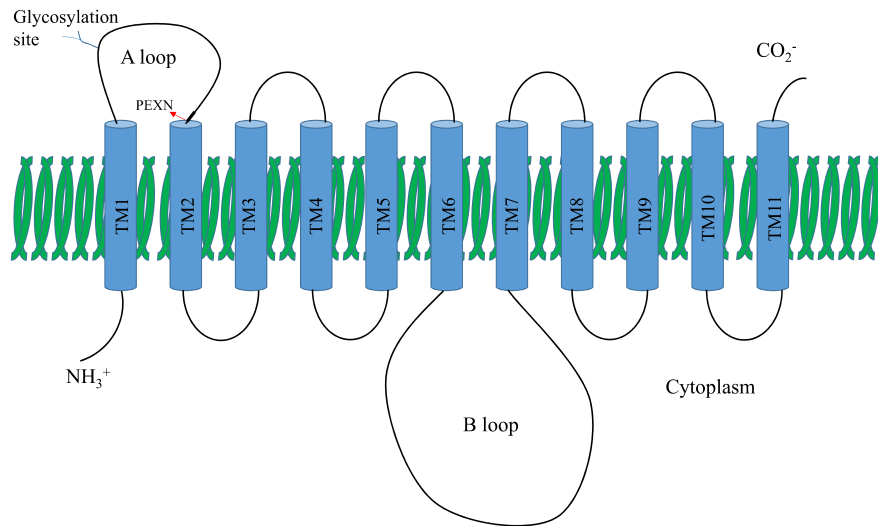
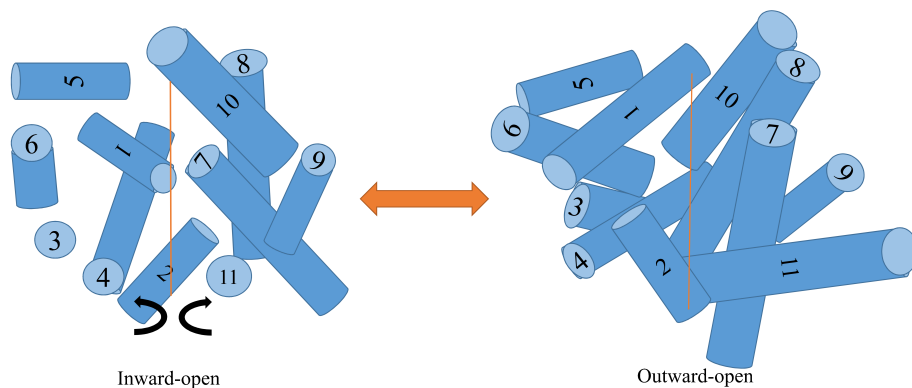


图1 人体ENT1的拓扑结构预测模型(根据参考文献[21]修改)

Fig.1 The topological model of ENT1 from human being (modified from reference [21])



该图视角是从胞外部分到胞内。左图为内向型打开的构象,而右图为外向型打开的构象,是TM1-6和TM7-11绕着中轴线(红线,平行于细胞膜)旋转而成。

The view is from extracellular surface to intracellular surface. The left one is the inward-open conformation, and the right one is outward-open conformation, generated by rotating the TM1-6 and TM7-11, around the central axis (red line, parallel to the lipid bilayer).

图2 基于LdNT1.1结构的ENT转运模式图(根据参考文献[23,35]修改)

Fig.2 The transport model of ENT based on the structure of LdNT1.1 (modified from references [23,35])

运的核苷类似物,已经被广泛应用于癌症治疗^[41-43]。在Mohelnikova-Duchonova和Melichar^[44]的研究中,ENT1的大量表达可以促进癌细胞转运吸收更多的核苷药物,进而抑制癌细胞的增殖,且研究表明,在利用吉西他滨(Gemcitabine)治疗过程中,存活病人体内ENT1的表达量更高。体外实验表明,hENT1的活性是决定Gemcitabine作用高低的决定性因素,hENT1的过量表达会使得Gemcitabine对人体胰腺癌的效果更加明显,反之则降低疗效^[45]。这也意味着hENT1可以作为Gemcitabine疗效的生物标记。

此外,ENT1的表达水平高低能够反应癌细胞的

增殖水平,进而能够有效衡量基于核苷类药物的癌症化疗疗效,例如,氚化胸腺嘧啶(tritiated thymidine, ³H-TdR)、FLT(3'-fluoro-3'-deoxythymidine)等药物可以作为检测肿瘤存在与否和癌症疗效的生物标记^[46]。在新药开发方面,Rayala等^[47]研究发现,经烷基化反应修饰的丰加霉素和桑霉素等衍生物药物能够通过抑制ENT转运核苷进而对肿瘤细胞的增殖产生抑制。核苷类似物5-氮杂胞苷(5-azacytidine)作为DNA甲基化抑制剂是治疗癌症的一种有效药物,在治疗骨髓增生异常综合征和急性骨髓性白血病中发挥着重要作用,Hummel-Eisenbeiss等^[48]研究发现,hENT1

是人体肺细胞中吸收该药物的主要转运蛋白。同时,胞苷类似物的衍生药物地西他滨(Decitabine)作为一种DNA甲基化转移酶抑制剂,能够被ENT1和ENT2转运,可用于治疗急性髓细胞样白血病^[49]。

另外,一些核苷及其类似物的相关药物具有抑制病毒反转录酶或DNA聚合酶的效果,包括叠氮胸苷(Azidothymidine)、地丹诺辛(2',3'-dideoxyinosine, ddI)和拉米夫定(Lamivudine)等,被应用于多种病毒感染的治疗^[50-52]。相对于癌症治疗,应用于抗病毒治疗的核苷类药物种类更为广泛,包含了核苷和开链核苷等^[53]。研究发现,开链核苷对于多种DNA病毒感染、乙型肝炎(hepatitis B)和获得性免疫缺陷综合征(acquired immunodeficiency syndrome, AIDS)的治疗具有较好的效果^[50]。例如,扎西他滨(Zalcitabine)作为能够被ENT3转运的脱氧胞苷衍生物,能够通过结合人类免疫缺陷病毒(human immunodeficiency virus, HIV)反转录酶,进而终止DNA链的延伸,成为第三个获准用于治疗HIV的药物^[54]。同时,能够被ENT转运的嘧啶类核苷类似物如齐多夫定(Zidovudine)和司他夫定(Stavudine)等,应用到HIV治疗中已经很长一段时间^[55-56]。而能够被ENT1和ENT2转运的利巴韦林(Ribavirin, RBV)作为重要的抗病毒药物成分,与干扰素 α (IFN- α)制成的药物应用于治疗慢性丙型肝炎病毒(hepatitis C virus, HCV)感染已经超过10年, RBV还被应用于其他一系列病毒感染的治疗,包括呼吸道合胞病毒(respiratory syncytial virus, RSV)和拉沙病毒(Lassa virus, LASV)等引起的疾病治疗^[57-58]。

4 结论与前景

作为人体中极为重要的功能蛋白, ENT的相关研究已经持续了近30年,越来越多的ENT家族蛋白质被鉴定出来,对于其分类、组织分布和功能已经有了一定的了解。在ENT1和ENT2蛋白相关研究中,随着核苷及其类似物在疾病治疗和药物开发的广泛应用, ENT的功能及分布已经研究得比较深入,尤其是ENT1的拓扑结构预测,对于后续该家族蛋白质高级结构的解析奠定了基础。相对而言, ENT3和ENT4的研究则还处于一个探索阶段,它们的转运模式至今还没有鉴定出来。同时,由于蛋白质高级结构的缺失,至今还没有建立一个令人信服的ENT分子模型,这也使得ENT家族蛋白质转运核苷及其类

似物的分子机制还未可知。

随着该家族蛋白质研究的深入,越来越多的核苷或核苷类似物应用于癌症、心脑血管、病毒感染等疾病治疗。许多研究人员开始关注核苷转运蛋白的生物标记功能以及由此衍生的在疾病治疗中诊断、预测或是疗效评估方面的应用,这使得提前预防癌症变成一种可能,同时有效评估药物疗效对于新药开发有着巨大的潜在价值。但是,由于缺少高效可靠的抗体以用于免疫组织化学和流式细胞术等检测技术,使得其在生物标记这一方面的应用受到了极大阻碍。研究核苷转运蛋白在生物体内参与生理生化反应的分子反应动力学机制,对于探索并阐释其在生物标记方面的分子机制具有巨大的促进作用。这也就要求我们投入更大的精力到相关的ENT高级结构和分子机制的研究中来。唯有彻底地解析ENT转运核苷及其类似物的分子机制,我们对于其在科研和生产中的应用也才会变得更加深入。在未来一段时间内,随着膜蛋白表达纯化和结晶技术的发展, ENT的相关高级结构研究必将迎来丰硕成果,随之而来对于其分子机制的研究也将获得突破性进展,在此基础上,治疗癌症、心脑血管疾病和病毒感染等的相关新药也将会层出不穷。

参考文献 (References)

- 1 Manjunath S, Sakhare PM. Adenosine and adenosine receptors: Newer therapeutic perspective. *Indian J Pharmacol* 2009; 41(3): 97-105.
- 2 Choi JS, Berdis AJ. Nucleoside transporters: Biological insights and therapeutic applications. *Future Med Chem* 2012; 4(11): 1461-78.
- 3 Baldwin SA, Beal PR, Yao SY, King AE, Cass CE, Young JD. The equilibrative nucleoside transporter family, SLC29. *Pflugers Arch* 2004; 447(5): 735-43.
- 4 Young JD, Yao SY, Baldwin JM, Cass CE, Baldwin SA. The human concentrative and equilibrative nucleoside transporter families, SLC28 and SLC29. *Mol Aspects Med* 2013; 34(2/3): 529-47.
- 5 Belt JA, Noel LD. Nucleoside transport in Walker 256 rat carcinosarcoma and S49 mouse lymphoma cells. Differences in sensitivity to nitrobenzylthioinosine and thiol reagents. *Biochem J* 1985; 232(3): 681-8.
- 6 Plagemann PG, Woffendin C. Na⁺-dependent and -independent transport of uridine and its phosphorylation in mouse spleen cells. *Biochim Biophys Acta* 1989; 981(2): 315-25.
- 7 Plagemann PG, Aran JM, Woffendin C. Na⁺-dependent, active and Na⁺-independent, facilitated transport of formycin B in mouse spleen lymphocytes. *Biochim Biophys Acta* 1990; 1022(1): 93-102.
- 8 Roovers KI, Meckling-Gill KA. Characterization of equilibrative and concentrative Na⁺-dependent (cif) nucleoside transport

- in acute promyelocytic leukemia NB4 cells. *J Cell Physiol* 1996; 166(3): 593-600.
- 9 Boleti H, Coe IR, Baldwin SA, Young JD, Cass CE. Molecular identification of the equilibrative NBMPR-sensitive (es) nucleoside transporter and demonstration of an equilibrative NBMPR-insensitive (ei) transport activity in human erythroleukemia (K562) cells. *Neuropharmacology* 1997; 36(9): 1167-79.
 - 10 Griffith DA, Jarvis SM. Nucleoside and nucleobase transport systems of mammalian cells. *Biochim Biophys Acta* 1996; 1286(3): 153-81.
 - 11 Kiss A, Farah K, Kim J, Garriock RJ, Drysdale TA, Hammond JR. Molecular cloning and functional characterization of inhibitor-sensitive (mENT1) and inhibitor-resistant (mENT2) equilibrative nucleoside transporters from mouse brain. *Biochem J* 2000; 352(Pt 2): 363-72.
 - 12 Griffiths M, Yao SY, Abidi F, Phillips SE, Cass CE, Young JD, *et al.* Molecular cloning and characterization of a nitrobenzylthioinosine-insensitive (ei) equilibrative nucleoside transporter from human placenta. *Biochem J* 1997; 328(Pt 3): 739-43.
 - 13 Barnes K, Dobrzynski H, Foppolo S, Beal PR, Ismat F, Scullion ER, *et al.* Distribution and functional characterization of equilibrative nucleoside transporter-4, a novel cardiac adenosine transporter activated at acidic pH. *Circ Res* 2006; 99(5): 510-9.
 - 14 Hyde RJ, Cass CE, Young JD, Baldwin SA. 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(1): 53-63.
 - 15 Young JD, Yao SY, Sun L, Cass CE, Baldwin SA. Human equilibrative nucleoside transporter (ENT) family of nucleoside and nucleobase transporter proteins. *Xenobiotica* 2008; 38(7/8): 995-1021.
 - 16 Griffiths M, Beaumont N, Yao SY, Sundaram M, Boumah CE, Davies A, *et al.* Cloning of a human nucleoside transporter implicated in the cellular uptake of adenosine and chemotherapeutic drugs. *Nat Med* 1997; 3(1): 89-93.
 - 17 Baldwin SA, Yao SY, Hyde RJ, Ng AM, Foppolo S, Barnes K, *et al.* Functional characterization of novel human and mouse equilibrative nucleoside transporters (hENT3 and mENT3) located in intracellular membranes. *J Biol Chem* 2005; 280(16): 15880-7.
 - 18 Acimovic Y, Coe IR. Molecular evolution of the equilibrative nucleoside transporter family: Identification of novel family members in prokaryotes and eukaryotes. *Mol Biol Evol* 2002; 19(12): 2199-210.
 - 19 Zhou M, Xia L, Engel K, Wang J. Molecular determinants of substrate selectivity of a novel organic cation transporter (PMAT) in the SLC29 family. *J Biol Chem* 2007; 282(5): 3188-95.
 - 20 Mohlmann T, Mezher Z, Schwerdtfeger G, Neuhaus HE. Characterisation of a concentrative type of adenosine transporter from *Arabidopsis thaliana* (ENT1,At). *FEBS Lett* 2001; 509(3): 370-4.
 - 21 Sundaram M, Yao SY, Ingram JC, Berry ZA, Abidi F, Cass CE, *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(48): 45270-5.
 - 22 Boswell-Casteel RC, Johnson JM, Duggan KD, Roe-Zurz Z, Schmitz H, Burlison C, *et al.* FUN26 (function unknown now 26) protein from *Saccharomyces cerevisiae* is a broad selectivity, high affinity, nucleoside and nucleobase transporter. *J Biol Chem* 2014; 289(35): 24440-51.
 - 23 Valdes R, Arastu-Kapur S, Landfear SM, Shinde U. An ab Initio structural model of a nucleoside permease predicts functionally important residues. *J Biol Chem* 2009; 284(28): 19067-76.
 - 24 Ma C, Hao Z, Huysmans G, Lesiuk A, Bullough P, Wang Y, *et al.* A versatile strategy for production of membrane proteins with diverse topologies: Application to investigation of bacterial homologues of human divalent metal ion and nucleoside transporters. *PLoS One* 2015; 10(11): e0143010.
 - 25 姚贺帮, 蔡洪敏, 李典范. 脂立方相技术体系在膜蛋白结构与功能研究中的应用进展. *中国细胞生物学学报* (Yao Hebang, Cai Hongmin, Li Dianfan. Lipid cubic phase technology for membrane protein structural and functional research. *Chinese Journal of Cell Biology*) 2015; 37(7): 925-35.
 - 26 Aseervatham J, Tran L, Machaca K, Boudker O. The role of flexible loops in folding, trafficking and activity of equilibrative nucleoside transporters. *PLoS One* 2015; 10 (9): e0136779.
 - 27 Ward JL, Leung GP, Toan SV, Tse CM. Functional analysis of site-directed glycosylation mutants of the human equilibrative nucleoside transporter-2. *Arch Biochem Biophys* 2003; 411(1): 19-26.
 - 28 Lee EW, Lai Y, Zhang H, Unadkat JD. Identification of the mitochondrial targeting signal of the human equilibrative nucleoside transporter 1 (hENT1): Implications for interspecies differences in mitochondrial toxicity of fialuridine. *J Biol Chem* 2006; 281(24): 16700-6.
 - 29 Yao SY, Ng AM, Vickers MF, Sundaram M, Cass CE, Baldwin SA, *et al.* Functional and molecular characterization of nucleobase transport by recombinant human and rat equilibrative nucleoside transporters 1 and 2. Chimeric constructs reveal a role for the ENT2 helix 5-6 region in nucleobase translocation. *J Biol Chem* 2002; 277(28): 24938-48.
 - 30 Krishnamurthy H, Piscitelli CL, Gouaux E. Unlocking the molecular secrets of sodium-coupled transporters. *Nature* 2009; 459(7245): 347-55.
 - 31 Zdravkovic I, Zhao C, Lev B, Cuervo JE, Noskov SY. Atomistic models of ion and solute transport by the sodium-dependent secondary active transporters. *Biochim Biophys Acta* 2012; 1818(2): 337-47.
 - 32 许可, 赵琴, 张鹏. 叶酸ECF转运蛋白的结构和转运机制. *中国细胞生物学学报* (Xu Ke, Zhao Qin, Zhang Peng. Structure and mechanism of a folate energy-coupling factor transporter. *Chinese Journal of Cell Biology*) 2013; 35(6): 747-50.
 - 33 Abramson J, Smirnova I, Kasho V, Verner G, Kaback HR, Iwata S. Structure and mechanism of the lactose permease of *Escherichia coli*. *Science* 2003; 301(5633): 610-5.
 - 34 Kaback HR, Smirnova I, Kasho V, Nie Y, Zhou Y. The alternating access transport mechanism in LacY. *J Membr Biol* 2011; 239(1/2): 85-93.
 - 35 Valdes R, Shinde U, Landfear SM. Cysteine cross-linking defines the extracellular gate for the *Leishmania donovani* nucleoside transporter 1.1 (LdNT1.1). *J Biol Chem* 2012; 287(53): 44036-45.
 - 36 Valdes R, Elferich J, Shinde U, Landfear SM. Identification of the intracellular gate for a member of the equilibrative nucleoside transporter (ENT) family. *J Biol Chem* 2014; 289(13): 8799-809.

- 37 Zhou X, Levin EJ, Pan Y, McCoy JG, Sharma R, Kloss B, *et al.* Structural basis of the alternating-access mechanism in a bile acid transporter. *Nature* 2014; 505(7484): 569-73.
- 38 Ruprecht JJ, Hellawell AM, Harding M, Crichton PG, McCoy AJ, Kunji ER. Structures of yeast mitochondrial ADP/ATP carriers support a domain-based alternating-access transport mechanism. *Proc Natl Acad Sci USA* 2014; 111(4): E426-34.
- 39 Szkotak AJ, Ng AM, Man SF, Baldwin SA, Cass CE, Young JD, *et al.* Coupling of CFTR-mediated anion secretion to nucleoside transporters and adenosine homeostasis in Calu-3 cells. *J Membr Biol* 2003; 192(3): 169-79.
- 40 Elion GB. Nobel lecture in physiology or medicine—1988. The purine path to chemotherapy. *In Vitro Cell Dev Biol* 1989; 25(4): 321-30.
- 41 Wang WB, Yang Y, Zhao YP, Zhang TP, Liao Q, Shu H. Recent studies of 5-fluorouracil resistance in pancreatic cancer. *World J Gastroenterol* 2014; 20(42): 15682-90.
- 42 Li AP, Peng JD, Zhou M, Zhang J. Resonance light scattering determination of 6-mercaptopurine coupled with HPLC technique. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc* 2016; 154: 1-7.
- 43 Perez-Chacon G, Martinez-Laperche C, Rebolleda N, Somovilla-Crespo B, Munoz-Calleja C, Buno I, *et al.* Indole-3-carbinol synergizes with and restores fludarabine sensitivity in chronic lymphocytic leukemia cells irrespective of p53 activity and treatment resistances. *Clin Cancer Res* 2016; 22(1): 134-45.
- 44 Mohelnikova-Duchonova B, Melichar B. Human equilibrative nucleoside transporter 1 (hENT1): Do we really have a new predictive biomarker of chemotherapy outcome in pancreatic cancer patients? *Pancreatol* 2013; 13(6): 558-63.
- 45 Pérez-Torras S, García-Manteiga J, Mercadé E, Casado FJ, Carbó N, Pastor-Anglada M, *et al.* Adenoviral-mediated overexpression of human equilibrative nucleoside transporter 1 (hENT1) enhances gemcitabine response in human pancreatic cancer. *Biochem Pharmacol* 2008; 76(3): 322-9.
- 46 Plotnik DA, Wu S, Linn GR, Yip FC, Comandante NL, Krohn KA, *et al.* *In vitro* analysis of transport and metabolism of 4'-thiothymidine in human tumor cells. *Nucl Med Biol* 2015; 42(5): 470-4.
- 47 Rayala R, Theard P, Ortiz H, Yao S, Young JD, Balzarini J, *et al.* Synthesis of purine and 7-deazapurine nucleoside analogues of 6-N-(4-Nitrobenzyl)adenosine; inhibition of nucleoside transport and proliferation of cancer cells. *ChemMedChem* 2014; 9(9): 2186-92.
- 48 Hummel-Eisenbeiss J, Hascher A, Hals PA, Sandvold ML, Muller-Tidow C, Lyko F, *et al.* The role of human equilibrative nucleoside transporter 1 on the cellular transport of the DNA methyltransferase inhibitors 5-azacytidine and CP-4200 in human leukemia cells. *Mol Pharmacol* 2013; 84(3): 438-50.
- 49 Damaraju VL, Mowles D, Yao S, Ng A, Young JD, Cass CE, *et al.* Role of human nucleoside transporters in the uptake and cytotoxicity of azacitidine and decitabine. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids* 2012; 31(3): 236-55.
- 50 Pastor-Anglada M, Perez-Torras S. Nucleoside transporter proteins as biomarkers of drug responsiveness and drug targets. *Front Pharmacol* 2015; 6: 13.
- 51 聂青和. 核苷酸类似物药物治疗乙型肝炎肝硬化的临床实践. 中国实用内科杂志(Nie Qinghe. Clinical practice of antiviral treatment for liver cirrhosis patients with chronic hepatitis B. *Chinese Journal of Practical Internal Medicine*) 2014; 34(6): 568-71.
- 52 单幼兰, 江培学. 连接酶检测反应技术应用于乙型肝炎病毒拉米夫定耐药和阿德福韦耐药突变的研究. 暨南大学学报(自然科学与医学版)[Shan Youlan, Jiang Peixue. Application of ligase detection reaction (LDR) in detection of Lamivudine-resistant and Adefovir-resistant mutations. *Journal of Jinan University (Natural Science & Medicine Edition)*] 2015; 36(6): 509-14.
- 53 de Clercq E, Holy A. Acyclic nucleoside phosphonates: A key class of antiviral drugs. *Nat Rev Drug Discov* 2005; 4(11): 928-40.
- 54 Leandro KC, Moreira JC, Farias PA. Determination of zalcitabine in medicaments by differential pulse voltammetry. *J Pharm (Cairo)* 2013; 2013: 495814.
- 55 Namba T, Kodama R, Moritomo S, Hoshino T, Mizushima T. Zidovudine, an anti-viral drug, resensitizes gemcitabine-resistant pancreatic cancer cells to gemcitabine by inhibition of the Akt-GSK3beta-Snail pathway. *Cell Death Dis* 2015; 6: e1795.
- 56 Podlekareva D, Grint D, Karpov I, Rakmanova A, Mansinho K, Chentsova N, *et al.* Changing utilization of Stavudine (d4T) in HIV-positive people in 2006-2013 in the EuroSIDA study. *HIV Med* 2015; 16(9): 533-43.
- 57 Panigrahi R, Chandra PK, Ferraris P, Kurt R, Song K, Garry RF, *et al.* Persistent hepatitis C virus infection impairs ribavirin antiviral activity through clathrin-mediated trafficking of equilibrative nucleoside transporter 1. *J Virol* 2015; 89(1): 626-42.
- 58 Gross AE, Bryson ML. Oral ribavirin for the treatment of noninfluenza respiratory viral infections: A systematic review. *Ann Pharmacother* 2015; 49(10): 1125-35.