

洪梅, 王旭阳. 药物转运体的翻译后处置及相关关键位点研究进展 [J]. 华南农业大学学报, 2022, 43(6): 160-172.
HONG Mei, WANG Xuyang. Current advances on post-translational processing and related essential domains of drug transporters[J]. Journal of South China Agricultural University, 2022, 43(6): 160-172.



药物转运体的翻译后处置及相关关键位点研究进展

洪 梅, 王旭阳
(华南农业大学 生命科学学院, 广东 广州 510642)

摘要: 药物转运体介导种类不同、结构各异的药物跨越细胞膜, 影响药物在各组织器官中的浓度以及系统暴露量, 不但是影响药效的关键因素, 也是重要的药物-药物相互作用位点。人体中关键的药物转运体属于 ABC 结合盒 (ATP-binding cassette) 超家族或溶质载体 (Solute carrier) 超家族, 分别介导细胞对药物的外排和吸收, 两者协同作用, 共同决定细胞内的药物浓度。作为膜蛋白, 药物转运体在翻译后需要经过一系列复杂而精细的调控才能到达作用位点, 发挥功能。此外, 人体在药物的摄取过程中需要作出快速应对, 因此往往以翻译后修饰的方式进行响应; 而病理条件下转运体的功能也可能因细胞中各翻译后调控机制的非常态化而受到影响。明确药物转运体的翻译后处置过程, 对于解析转运体药物转运的分子机制、阐明遗传多态性造成的个体药物响应差异有重要意义。本文对目前药物转运体的翻译后加工和修饰的相关研究进行了综述, 也对在这些调控过程中发挥关键作用的转运体基序和位点进行了总结。

关键词: 药物转运蛋白; 翻译后处置; 功能调控; 关键位点
中图分类号: R963; R966 **文献标志码:** A **文章编号:** 1001-411X(2022)06-0160-13

Current advances on post-translational processing and related essential domains of drug transporters

HONG Mei, WANG Xuyang
(College of Life Sciences, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

Abstract: Drug transporters mediate different types of drugs with diverse structures across cell membranes, affecting concentration of drugs in various tissues and organs and the systemic exposure. They are not only key factors that determine drug efficacy, but also important sites for drug-drug interaction. The major human drug transporters belong to the ATP-binding cassette (ABC) superfamily or the solute carrier superfamily, which mediate the efflux and absorption of drugs, respectively. These two kinds of transporters coordinate with each other and work in concert to determine intracellular drug concentrations. As membrane proteins, drug transporters need to go through a series of precise and complicated post-translational modifications before arriving at the site of action. Additionally, the human body needs to respond promptly during the intake of drugs and post-translational regulations hence become the manner of choice in such a process; The function of transporters may be affected by the abnormality of various post-translational regulatory mechanisms under pathological conditions as well. Therefore, a comprehensive understanding of the post-translational processing

收稿日期:2022-06-13 网络首发时间:2022-09-22 12:33:18
网络首发地址:<https://kns.cnki.net/kcms/detail/44.1110.S.20220921.0955.006.html>
作者简介:洪 梅, 教授, 博士, 主要从事膜蛋白的生物化学研究, E-mail: mh2788@scau.edu.cn
基金项目:广东省自然科学基金(2022A1515010552); 国家自然科学基金联合基金(U1832101); 国家自然科学基金(81373473)

of drug transporters is of great importance for investigating the molecular mechanism(s) of drug transport and clarifying the inter-individual variability of drug response caused by genetic polymorphisms. The present article reviewed current reports on post-translational processing and modification of drug transporters, and summarized essential motifs and/or sites in transporters that play key roles in these regulatory processes.

Key words: Drug transporter; Post-translational processing; Functional regulation; Essential domain

药物在体内的吸收、分布、代谢 (生物转化) 和排泄 (Adsorption, distribution, metabolism, excretion, ADME) 过程, 除了与传统的 I 相和 II 相代谢酶相关外, 也取决于被看作是 0 相和 III 相的药物转运过程^[1]。近年来, 药物代谢动力学、药物效应动力学以及生物化学和分子生物学技术迅速发展, 转运体 (蛋白) 对各类药物, 尤其是口服药物的影响越来越受到人们的重视。药物转运体是决定细胞内药物积累的关键因素, 其活性往往与药物的治疗效果、毒性及药物-药物相互作用 (Drug-drug interaction) 直接相关。在新药设计和对个体间不同药物反应的分析预测中, 药物转运体往往也被认为是一个新的靶标^[2]。转运体在药物 ADME 过程中具有重要作用, 其转运功能必然受到多个层次的调控。转运体的调控主要分为长时 (Long-term) 和短时 (Short-term) 调控。长时调控主要为转运体表达量的调控, 通过改变基因表达水平实现, 由于涉及到基因的转录、翻译过程, 往往需要几个小时甚至更长的时间; 短时调控则主要指翻译后调控过程, 由于是对已有的蛋白质进行修饰, 所以只需要较短的时间, 几分钟到一两个小时就能实现。在对药物、食物的摄取过程中, 人体往往通过短时调控以实现对这些变化的快速应对^[3]。

近年来冷冻电镜等物理技术快速发展, 已有一些膜蛋白的高分辨晶体结构获得了解析, 但膜蛋白表面结构的两亲性、在组织中的低浓度以及它们固有的构象灵活性使得难以获得稳定的转运体晶体^[4], 因此相对于可溶性蛋白, 膜蛋白三维结构的解析仍进展较为缓慢。且蛋白序列中所具有的影响其空间构象折叠、在不同细胞器中的处理修饰及调控蛋白质整体结构的特殊基序, 往往无法通过晶体结构进行深入的分析, 因此目前仍有大量研究利用传统的生化手段揭示这类膜蛋白的关键结构。转运体的关键结构包括翻译后处置的识别基序、翻译后修饰位点、用于组装和蛋白质-蛋白质相互作用的结构域以及跨膜结构域等。这些重要位点的变化可能会改变转运体的稳定性、与底物的相互作用以及跨膜转运的能力。

本文总结了目前与药物转运体的翻译后加工和修饰相关的研究成果, 其中对在这些调控过程中发挥关键作用的转运体基序和位点进行了重点阐述, 为系统深入地解析转运体药物转运的分子机制、阐明遗传多态性造成的个体药物响应差异提供一定的参考。

1 药物转运体及基本结构特征

根据转运结构和分子机制的不同, 人体中的药物转运体分为外排转运体和摄取转运体, 前者主要为 ATP 结合盒 (ATP-binding cassette, ABC) 超家族成员, 后者则属于溶质载体 (Solute carrier, SLC) 超家族。

1.1 ABC 超家族

ABC 转运体是一类 ATP 驱动泵, 广泛分布于细菌到人类的各种生物体中, 在人体肝脏、小肠和肾等器官的质膜中分布丰富, 能将天然毒物和代谢废物排出体外。ABC 转运体的底物包括内源性的脂质、胆汁酸以及异源性的物质如毒素和多种药物^[5]。典型的 ABC 转运体序列中包含 3 个基序: Walker A、Walker B 序列以及 ABC 特征序列 (即 C 基序, “LSGGQ”)^[6]。1 个完整的 ABC 转运体由 2 个核苷酸结合域 (Nucleotide binding domain, NBD) 和 2 个跨膜域 (Transmembrane domain, TMD) 组成。每个 TMD 包含 6 个跨膜螺旋 (Transmembrane helix, TM), 主要参与底物识别、结合和转运; 而 NBD 则负责 ATP 的结合和水解, 从而促进底物的运输^[7]。不同 ABC 蛋白间的整体序列相似性低, 尤其是在 TMD 中, 这与跨膜螺旋参与转运体对不同物质转运的概念相符合; 另一方面, NBD 在结构上则比较保守^[8]。药物通过 TMD 的转运和在 NBD 上发生的 ATP 水解必须协同工作才能实现底物的外排, 因此域间通信对于转运体正常功能的发挥至关重要^[9]。

外排药物转运体主要包括 ABCB 亚家族的 ABCB1, 也称为 P-糖蛋白 (P-glycoprotein, P-gp); ABCC 亚家族的 ABCC1, 也称为多药耐药相关蛋白 1 (Multidrug resistance protein 1, MRP1);

ABCG 亚家族的 ABCG2, 也称为乳腺癌耐药蛋白 (Breast cancer resistance protein, BCRP)。它们在多种器官组织中都有表达, 如 P-gp 在血脑屏障 (Blood-brain barrier) 中表达, 是阻止药物穿越血脑屏障的重要因素。此外, 许多肿瘤细胞在药物压力下会过表达这些外排转运体, 是造成抗肿瘤药物多药耐药的关键原因^[5]。

1.1.1 P-糖蛋白 (P-gp/ABCB1) P-糖蛋白最显著的特征之一是它可以结合并转运数百种结构和功能多样的底物^[10], 其底物主要是具有不同相对分子质量的疏水性和两亲性化合物, 含有不同的化学基团 (如芳香环、甲氧基、酰胺键等), 以及具有不同拓扑结构 (如有机分子、线性和环状肽、共轭结构等) 的化合物。近年的晶体结构解析获得了小鼠 P-gp 的精细结构, 该结构显示该蛋白具有 2 个向膜内叶开放的入口, 由一侧的 TM3 和 4 以及另一侧的 TM9 和 10 所构成^[11-12]。P-gp 的显著特征之一是药物的结合口袋中没有携带正电荷或负电荷的氨基酸残基。因此, 底物和蛋白质残基之间的相互作用主要是氢键、范德华力和疏水相互作用^[10]。在所有 P-gp 的跨膜螺旋中都具有影响其功能的关键氨基酸残基, 其中大部分是疏水或极性的^[13]。

1.1.2 多药耐药相关蛋白 1 (MRP1/ABCC1) MRP1 被认为是造成多药耐药 (Multidrug resistance, MDR) 的第 2 个主要外排转运蛋白^[7]。除了抗癌药物阿霉素、长春新碱和甲氨蝶呤, MRP1 还转运多种谷胱甘肽、葡糖苷酸和硫酸盐共轭有机阴离子, 如白三烯 C4 (Leukotriene C4, LTC4)、17-β-(D-葡糖苷酸) (Estradiol-17-β-glucuronide, E217βG) 和硫酸雌酮 (Estrone sulfate) 等。除了 2 个 NBD 和 2 个 TMD 组成的典型核心结构外, MRP1 还包含由 5 个跨膜螺旋所组成的 TMD0 区域, 该区域前面是 1 个位于胞外的氨基末端, 其羧基端则通过 1 个 L0 接头序列与 TMD1 连接^[7], 因此 MRP1 具有 17 个跨膜螺旋。

定点突变后进行的转运能力检测揭示, MRP1 的所有跨膜螺旋中均含有行使正常功能所必需的氨基酸残基, 特别是在 TM4、6、7、8、10、11、14、16 和 17 中^[13]。与 P-gp 不同的是, 许多影响 MRP1 底物结合、底物特异性和选择性的关键残基是携带电荷的氨基酸。因为 MRP1 主要是 1 个阴离子泵, 因此携带正电荷的氨基酸如精氨酸、组氨酸和赖氨酸都可能在底物结合和转运中起重要作用^[7]。

1.1.3 乳腺癌耐药蛋白 (BCRP/ABCG2) BCRP 是先天性和获得性多药耐药的一个重要分子, 对于调

节药物生物利用度、造血和实体恶性肿瘤的预后预测以及癌症干细胞的保护均有作用^[14]。BCRP 分子中只有 1 个 NBD 和 1 个含有 6 个跨膜螺旋的 TMD, 因此被认为是 1 个半转运蛋白, 往往需要形成二聚体或更高阶的寡聚体才能发挥转运功能^[14]。与 P-gp 和 MRP1 类似, BCRP 的所有 6 个跨膜螺旋中都含有影响其正常功能的关键氨基酸残基。ABCG2 基因编码区中已发现多个自然变异的单核苷酸多态性 (Single nucleotide polymorphism, SNP), 如跨膜螺旋中的关键氨基酸残基发生了突变, 就有可能造成 BCRP 功能的改变, 造成生理和药理学后果^[13]。

1.2 SLC 超家族

溶质载体 (Solute carrier, SLC) 超家族是人类细胞膜上最重要的膜转运体家族之一, 它参与了细胞间的物质运输、能量传递、营养代谢、信号传导等重要生理活动。SLC 超家族包括 52 个亚家族, 共有 400 多名成员。研究表明, 人类基因突变所致的 SLC 蛋白表达异常或功能缺陷与糖尿病、高血压、抑郁症等多种重大疾病密切相关^[15]。SLC 超家族成员广泛存在于原核和真核生物中, 其成员的功能多样, 转运底物包括糖类、氨基酸、无机盐离子、维生素、神经递质、多肽及多肽类药物等众多离子和小分子物质^[13]。

摄取型药物转运体主要包括有机阴离子转运多肽 (SLCO) (也称为 Organic anion transporting polypeptide, OATP) 亚家族中的 OATP1A2、1B1、1B3 以及 2B1, SLC22 (也称为 Organic anion transporter/Organic cation transporter, OAT/OCT) 亚家族中的 OAT1、3、4 以及 OCT1 和 2, SLC15 (也称为 Peptide transporter, PepT) 亚家族中的 PepT1 和 2 等。此外, 近年来的研究发现, SLC47 (Multidrug and toxin extrusion, MATE) 家族的成员在药物转运过程中也发挥着重要作用, 但 SLC47 家族成员主要发挥外排功能。

1.2.1 SLCO (OATP) 以 Na⁺和 ATP 非依赖性的方式跨膜转运各类结构多样的内源和外源物质, 其底物包括胆酸盐、类固醇以及类固醇结合物、甲状腺激素等内源性物质, 微囊藻毒素等毒素和异源性物质, 其中的家族成员 OATP1A2、1B1、1B3 和 2B1 对多种重要的临床药物如他汀类降脂药物、治疗高血压病和充血性心衰的血管紧张素转换酶抑制剂、强心苷类药物、抗肿瘤药物、抗生素药物等具有转运能力, 因此被认为是重要的药物摄取转运体^[16]。OATP 功能的缺失, 会造成人体药物排除或解毒障碍, 从而造成药物诱导的肝或肾衰竭。OATP 家族成员在多种上皮屏障中表达, 包括肠上皮细

胞、肝细胞、肾小管细胞和血脑屏障^[17]。计算机亲水分析模型预测 OATP 家族成员 (含有 643~722 个氨基酸) 具有非常相似的跨膜结构域构造, OATP 都含有 12 个跨膜螺旋和 1 个带有大量保守半胱氨酸残基的大胞外环 5。有 1 个 OATP 的家族特征序列 D-X-RW-(I,V)-GAWWX-G-(F,L)-L 位于胞外环 3 和 TM6 的边界处^[18]。

对 OATP 家族成员 OATP1B3 和 2B1 的同源建模指出, 这些转运体靠近氨基端的 TM1、2、4、5 和靠近羧基端的 TM7、8、10、11 构成与底物相互作用的通路, 而 TM3、6、9 和 12 则主要嵌入在膜双层中^[19]。与该模型相一致, 生化研究在 TM1、2 以及 TM7、8、10 和 11 中都鉴定到与底物转运密切相关的关键氨基酸残基, 对 OATP 功能的发挥或底物的选择起重要作用^[13]。

1.2.2 SLC22 (OAT/OCT/OCTN) 由 SLC22 基因家族编码的有机阴离子转运蛋白是另一个多特异性的转运体家族, 可介导各种更小、更亲水底物的转运, 如类固醇激素缀合物、生物胺、各种药物和毒素^[20]。OAT 在全身不同组织的细胞膜上表达, 肾脏的 OAT1 和 OAT3 是药物排泄过程中重要的转运体, 通过反膜电位交换 β -酮戊二酸对有机阴离子进行转运, 而该浓度梯度由次级主动转运蛋白钠-二羧酸协同转运体维持。除了 OAT, SLC22 家族的药物转运蛋白还包含主要转运有机阳离子的有机阳离子转运体 OCT1 和 OCT2, 以及有机两性离子/阳离子转运体 OCTN1 和 OCTN2。OCT 的底物包括范围广泛的、结构上不相关的小分子有机阳离子, 例如类固醇、激素、神经递质、多种药物和其他外源性物质。OCT 介导有机阳离子沿其电化学梯度被动扩散, 因此转运可能发生在任一个方向上^[21]。

与 OATP 家族相似, 计算机模型预测 SLC22 家族成员具有 12 个跨膜螺旋结构, 其氨基和羧基末端位于细胞内^[22]。TM1 和 2 之间有 1 个大的细胞外环, TM6 和 7 之间有 1 个大的细胞内环。以大肠埃希菌甘油-3-磷酸转运体 (GlpT) 的晶体结构为基础进行人体 OAT1 同源建模, 结果显示, TM5、7、8、10 和 11 围绕在该转运蛋白的负电性活性位点的周围, 该活性位点在胞质方向开放, 被 TM5 的 Tyr230 和 TM10 的 Lys431、Phe438 包围^[23]。生物化学研究也在 TM1、2、5、7、10 和 12 上发现了多个与 OAT1 功能相关的关键氨基酸残基^[13]。另一方面, 基于大肠埃希菌乳糖渗透酶 LacY 的晶体结构进行同源性建模预测, OCT1 与底物的相互作用可

能是发生在一个区域内而非单个结合位点, 其中 TM4、10 和 11 都存在可能参与底物结合和转运的关键氨基酸^[24]。关于 OCTN 的研究则发现, 其中的 TM3、4、7、9、10 和 11 可能与其转运功能有关^[13]。但 OCTN2 以 Na^+ 依赖性的方式转运肉碱而以 Na^+ 非依赖性的方式转运有机阳离子, 研究发现参与这 2 种转运过程所涉及的关键氨基酸残基有重叠但并非完全相同^[25]。

1.2.3 SLC15 (POT/PTR) 质子偶联寡肽转运体 (Proton oligopeptide transporter/Peptide transporter, POT/PTR 家族或 SLC15 家族) 负责跨细胞膜转运 8 000 多种不同的二肽和三肽配体^[26], 除了摄取和滞留膳食蛋白质的二肽和三肽以促进细胞代谢外, POT/PTR 还在识别和转运抗生素、抗病毒药物和抗肿瘤药物中扮演着关键角色^[27]。POT/PTR 家族转运体是质子驱动的同向转运体, 使用内向的质子电化学梯度来驱动肽在细胞膜上的摄取^[28]。

PTR 可能包含一个可容纳不同方向的肽的结合位点, 因此具有广泛的底物转运能力。人体中有 2 个 POT/PTR 家族成员: PepT1 (SLC15A1) 和 PepT2 (SLC15A2), 表现出不同的转运动力学特性。PepT1 转运二肽和三肽的 K_m 值在较低的 mmol 水平^[29]; 而 PepT2 对其底物具有更高的亲和力, K_m 值在 μmol 范围内。通过定点突变对 PepT1 和 PepT2 跨膜螺旋进行分析, 鉴定出 TM2、3、4、5、7、8 和 10 均含有与其摄取功能相关的关键氨基酸残基^[13]。

1.2.4 SLC47 (MATE) 外源性有毒化合物的排出对维持细胞的稳态必不可少。多药和有毒化合物排出蛋白 (Multidrug and toxin extrusion, MATE) 为次级主动转运蛋白, 参与各种化合物跨细胞和细胞器的转运。人体 MATE 在肝脏和肾脏均有高表达, 主要分布于肝细胞的顶端及肾近端小管的刷状缘膜上, 参与体内阳离子药物清除, 其转运谱与 OCT 和 OCTN 所转运的药物多有重合^[30]。MATE 是一种电中性、不依赖 Na^+ 的 pH 依赖型质子逆向转运体, 预测含有 13 个跨膜螺旋, 其羧基端位于胞外。但研究发现, MATE 的功能核心是由 12 个跨膜螺旋而非 13 个跨膜螺旋组成^[31]。对 MATE 的 TM7 螺旋上的氨基酸残基进行突变后进行生化分析发现, 突变体与底物结合能力降低, 转运功能下降, 说明该跨膜螺旋是 MATE 功能发挥的关键结构^[32]。

图 1 总结了上述药物转运体在人体中的分布, 这些跨膜蛋白在药物吸收、代谢和排泄的主要组织器官中表达, 协同作用影响各类药物的生物利用度。

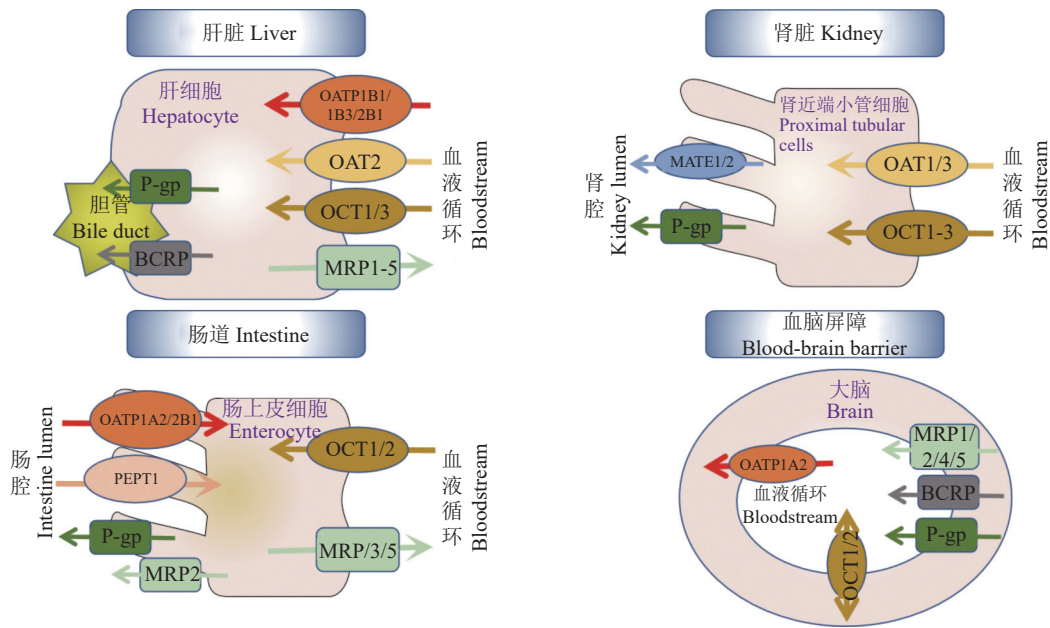


图 1 药物转运蛋白在人体各组织器官中的分布

Fig. 1 Distribution of drug transporters in human tissue and organs

1.3 转运体在细胞中的处置过程

在正常的细胞生理过程中，新合成的转运体往往需要经历一系列的翻译后处置过程才可以正确靶向到其行使功能的质膜上。翻译后修饰在协调新合成转运体的折叠和靶向上发挥着重要的作用。发生在内质网 (Endoplasmic reticulum) 和高尔基体中的过程通常被称为“中央质量控制”，而发生在质膜附近的调节机制则被称为“外围质量控制”，通过调节质膜附近的内体循环和溶酶体降解控制转运体的动态平衡。中央和外围质量控制途径相互关联并协同工作，在胞内传输转运体——将其从内质网和高尔基体靶定到质膜，或将其传送到各种细胞内降解机制 (如内体、溶酶体、蛋白酶体、聚集体降解等)。由于受到如此复杂而精细的调控，在转运体序列中任何一个关键序列或位点的错误都可能导致其错误的折叠、靶定，滞留在错误的位点或无法行使正常的功能。例如，由 *ABCC7* 编码的囊性纤维化跨膜电导调节因子 (Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator) 的错误折叠和降解是导致囊性纤维化的主因，但由于对其机制的了解，目前可采用辅助其折叠及增加其稳定性的药物，如复方鲁马卡托和依伐卡托，作为相关患者的治疗选择^[33]。

2 药物转运体的翻译后修饰及相关的
关键位点

近年来，研究者们提出了一个“Proteoforms”的概念，即对于同一个蛋白，由于其翻译后修饰 (Post-translational modification) 的不同而产生一系

列在功能、构象、表达位点等方面略有不同的蛋白种类，以应对细胞中不同微环境变化的需求^[34]。由于翻译后修饰是对已有的蛋白质进行修饰，所以只需要较短的时间就能实现。在对药物的摄取过程中，人体往往通过这种短时调控的方式快速应对这些变化^[3]。

2.1 蛋白激酶调控及相关位点

2.1.1 ABC 转运体 哺乳动物的蛋白磷酸化主要发生在肽链中的酪氨酸、丝氨酸、苏氨酸残基上，这些残基上具有游离的羟基，且本身不带电荷，当磷酸化作用后，蛋白质便具有了电荷，从而使结构发生变化，进一步引起蛋白质活性的变化^[34]。研究发现，P-gp 受蛋白激酶 C (Protein kinase, PKC) 和蛋白激酶 A (Protein kinase A, PKA) 的调控。其中 Ser661、671、667、675、683 中的 1 个或多个可能为 PKC 的磷酸化位点。进一步的研究揭示，PKC 可直接磷酸化 Ser661、667 和 671，PKA 则磷酸化 Ser683。但应该指出的是，PKC 和 PKA 磷酸化是否显著影响 P-gp 的易位和功能仍存在争议——因为同时突变 P-gp 的 5 个丝氨酸残基 (Ser661、667、671、675 和 683) 并不影响该蛋白靶向质膜或改变转运体的多药耐药性^[35]。MRP1 受酪氨酸激酶 2 (Casein kinase 2, CK2) 调节，该激酶是一种高度保守的丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶，被认为是细胞的“主要调节剂”之一，参与细胞生长、增殖、死亡和存活的相关过程。位于第 249 位的苏氨酸是 MRP1 受 CK2 调节所必需的残基。用丙氨酸取代 Thr249 使 MRP1 无法发生磷酸化会导致该转运体功能显著降

低, 而将 Thr249 进行磷酸化模拟突变为谷氨酸则导致转运蛋白功能增加。Thr249 的突变消除了 MRP1 对 CK2 的反应, 表明 CK2 是通过该残基磷酸化调控 MRP1 的^[36]。BCRP 的功能可能与 Pim-1/Pim-1L 相关, 当位于 ATP 结合口袋和跨膜结构域间接头区域的 Thr362 被突变为丙氨酸时, 会影响质膜上 BCRP 的表达和蛋白质的二聚化或寡聚化^[37]。

2.1.2 SLC 转运体 研究发现, OAT 家族成员 OAT1 受到 PKC 的调控, PKC 的激活可加速 OAT1 的内化, 降低其在质膜上的表达, 导致转运功能下降^[38]。血清和糖皮质激素诱导蛋白激酶 2 (Serum and glucocorticoid inducible kinase 2, SGK2) 则被发现对 OAT1 在细胞膜上的表达有促进作用, 过表达 SGK2 可增加 OAT1 的最大转运速度 ($v_{\max}$) 而对其与底物的亲和力无影响^[39]。但无论是 PKC 还是 SGK2 似乎都不是通过直接磷酸化 OAT1 发挥作用的。非受体酪氨酸激酶家族 Src 的成员 Yes1 可以直接磷酸化 OCT2, 显著影响其功能。OCT2 转运奥沙利铂会造成急性感觉神经病变, 因此在使用奥沙利铂时, 联合临床用于肿瘤治疗的 Yes1 抑制剂达沙替尼, 可有效降低奥沙利铂的副作用。Yes1 对 OCT2 的作用是直接的, 酪氨酸激酶抑制剂可抑制 OCT2 的磷酸化水平。质谱分析发现 OCT2 序列中的 Tyr241、362、377 均被磷酸化, 且对 3 个位点的苯丙氨酸突变体进行动力学分析表明, 3 个突变体的转运功能均下降, 其中 Y362F 造成的影响最大^[40]。OATP 家族成员的功能则被发现受丝氨酸/苏氨酸激酶的影响, 如 PKC^[41-43] 和 CK2^[44]。虽然有多个研究尝试确定 PKC 在这些转运蛋白序列上的直接磷酸化位点, 迄今获得的结果仍均为阴性^[41, 43]。2021 年的一项关于临床酪氨酸激酶抑制剂 (Tyrosine kinase inhibitor, TKI) 造成的药物-药物相互作用的研究发现, 多种 TKI 药物包括尼洛替尼可显著抑制 OATP1B1 的功能, 该抑制作用可能与 OATP1B1 的 Tyr645 磷酸化有关, 该调控过程所涉及的激酶为 Src 家族的 Lyn^[45]。PepT1 和 PepT2 分别包含着 2 个和 1 个与血清和糖皮质激素诱导激酶 1 (Serum and glucocorticoid inducible kinase 1, SGK1) 相关的潜在磷酸化位点 (R-X-R-X-X-S/T)。当 PepT2 中的 Ser185 磷酸化位点突变为丙氨酸时, SGK1 对该转运蛋白的调节被大大抑制^[46]。MATE 家族成员 MATE1 上有 2 个预测的磷酸化位点 (Thr17、299), 而 MATE2 则可能包含 4 个磷酸化位点 (Ser544、586, Thr588、594), 但其所涉及的具体机制并不清楚^[47]。最近有研究认为 CK2

可能对人体 MATE1 有调控作用, 因为抑制 CK2 可造成 MATE1 外排功能的下降^[48]。

2.2 糖基化及相关位点

糖基化是新合成蛋白质最常见和最多样化的翻译后修饰方式。在大多数情况下, 1 个以上的碳水化合物单元被添加到蛋白质中, 并通过 N 型或 O 型糖苷键连接在不同的位置。N-连接和 O-连接寡糖链的末端糖具有不同的结构。整合膜蛋白和分泌蛋白合成后往往会进行糖基化修饰, N-糖基化在蛋白靶向、折叠、功能修饰, 维持蛋白稳定性以及为配体提供识别结构等过程中发挥着重要作用^[49]。

P-gp 是高度糖基化的蛋白, 在其预测的第 1 个胞外环中存在 3 个可能发生 N-糖基化的共有氨基酸序列 Asn-X-Thr/Ser (Asn91、94 和 99), 对这些位点的定点突变使耐药性克隆的形成效率显著降低, 表明这些位点的糖基化有助于 P-gp 的正确靶向或稳定性的维持^[50]。2009 年的一项研究发现, 如破坏 BCRP 的 N-糖基化, 可加快转运蛋白的降解, 但该降解过程可通过蛋白酶体抑制剂 MG132 来挽救; 此外, N596Q 的泛素化水平显著提高, 表明如 Asn596 糖基化受影响, 则蛋白的泛素水平增加, 进而加速蛋白通过蛋白酶体的降解, 同时也可能影响 BCRP 同二聚体的形成^[51]。该结果与之前认为 BCRP 的糖基化不影响其蛋白水平和功能的报道不一致, 有可能是因为使用的是不同的表达体系。

在 OATP1B1 细胞外环 2 和 5 上有 3 个糖基化位点 (Asn134、503 和 516), 每个位点的单独突变均对蛋白的表达和功能没有影响, 但当 3 个糖基化位点同时突变时, 蛋白水平和转运功能显著下降。未糖基化的转运蛋白滞留在内质网内, 降解速率可能增加^[52]。OAT 家族所有成员的第 1 个胞外环都含有潜在的 N-糖基化位点。将 OAT1 (Asn39、56、92 和 97)^[53] 和 OAT4 (Asn39、56、63 和 99)^[54] 中所有的糖基化位点突变后, 会导致转运蛋白滞留在胞质区室中, 进而降低它们的转运功能。对 OCTN2 中糖基化位点的研究发现, 预测的 3 个糖基化位点 (Asn57、64 和 91) 中任何一个的突变都会降低肉碱的转运。当所有天冬酰胺残基同时被谷氨酰胺取代时, 转运功能会完全丧失。显微镜观察发现突变的蛋白质滞留胞质; 然而, 如果仅利用糖基化抑制剂衣霉素处理 OCTN2, 则不影响该蛋白的成熟和质膜的靶向, 表明 OCTN2 的糖基化位点除了与糖基化过程相关外, 还在底物转运中发挥作用^[55]。

2.3 泛素化及相关位点

近年越来越多的证据表明泛素化在控制质

膜蛋白的传送和靶向方面发挥着重要作用。泛素是一种由 76 个氨基酸残基组成的球状蛋白,在真核生物中高度保守,是泛素化过程的基本单元,可修饰底物蛋白的赖氨酸残基发生单泛素化 (Monoubiquitination)、多重单泛素化 (Multiple monoubiquitination) 或多泛素化 (Polyubiquitination)。泛素化由泛素激活酶 E1、泛素结合酶 E2 以及泛素-蛋白质连接酶 E3 这 3 种酶协调介导^[56]。通过泛素修饰受体和通道蛋白,可以影响蛋白的降解、形成质膜内化和内体分选机制的识别信号,从而调节膜蛋白的稳定性、内化、细胞内分选和周转^[3]。

糖基化抑制剂衣霉素处理会显著降低 BCRP 的蛋白水平,从而降低其介导的对抗癌药物 SN-38 的耐药性。当用谷氨酰胺代替 BCRP 位于第 596 位的糖基化位点 Asn596 后,非糖基化的 N596Q 蛋白水平仅为野生型的 1/3,该突变体泛素化水平显著增加,且蛋白酶体抑制剂 MG132 可显著增加其蛋白水平,说明在 BCRP 中,糖基化与泛素化可能具有交互作用,糖基化丧失会导致蛋白不稳定,增加泛素介导的蛋白酶体降解^[51]。

PKC 加快了 OAT1 从细胞膜上内化的速度但不改变 OAT1 的重循环速度,因此造成细胞膜上 OAT1 水平的下降以及转运功能的降低^[38]。OAT1 内化之前的一个关键步骤是转运体的泛素化。在 OAT1 TM6 和 7 之间的大胞内环中鉴定出 3 个重要的泛素化位点,分别为 Lys297、303 和 315。这些赖氨酸残基在 PKC 调节的 OAT1 泛素化中发挥协同作用,突变其中任何 1 个赖氨酸残基都会阻止泛素与其他 2 个赖氨酸的结合^[57]。

2.4 寡聚化及相关位点

从蛋白结构的角度来看,跨膜的通道和转运体在膜二维空间中的位置及取向使其易于形成多聚体复合物。大量研究表明,转运体,尤其是次级转运体,往往以寡聚体的形式存在。跨膜结构域内的几个保守基序,如 GXXXG 和七重亮氨酸序列对于寡聚化是非常关键的。寡聚化在蛋白质量控制中发挥作用,多个单体的适当结合可能有利于屏蔽内质网的保留信号或将多个不同输出信号拉近到一起,从而使相应的蛋白质复合物从内质网释放并靶向细胞表面^[49]。

药物转运蛋白寡聚化的一个典型例子是 BCRP。如前所述,该 ABC 家族成员是一个半转运蛋白,需要形成同二聚体或更高阶的寡聚体 (四聚体、八聚体或十二聚体) 来发挥其功能。Xu 等^[58] 鉴定了一个参与 BCRP 寡聚化的重要结构域 TM5-ECL3-

TM6, 该结构域在 HEK293 细胞中表达时,会像完整蛋白一样形成寡聚体;此外,该结构域对 BCRP 的转运活性表现显性负性效应,可能因为其与 BCRP 形成寡聚体从而影响完整蛋白之间形成功能性的同源寡聚体。对该区域的进一步研究表明, TM5- ECL3-TM6 的每个片段在 BCRP 寡聚化和转运功能中发挥着不同的作用;3 个片段都参与寡聚化,但只有 TM5 对 BCRP 的功能是必不可少的^[59]。MRP1 可形成同源二聚体,其氨基端的 281 个氨基酸残基 (包括 MSD0 和 L0 结构域) 被证明参与二聚化并对 MRP1 的转运功能产生显性负性影响^[60]。进一步的研究发现一个亚基中的 TM5 和 ECL3 可以与另一个亚基中的 TM5 和 ECL3 以序列非依赖的方式相互作用, TM5 的位置和疏水性以及 ECL3 的长度对 MRP1 二聚体的形成可能非常关键^[61]。

SLC 家族成员也能形成同源寡聚体。OAT1 在细胞膜中以寡聚复合物的形式存在^[62],其 TM6 参与不同单体的接触使寡聚化发生。当多聚体状态被破坏时,质膜上的 OAT1 表达减少^[63]。将 TM2 上可能与寡聚化相关的 GXXXG 基序中的 G144 和 G148 突变为丙氨酸会导致突变体在内质网中累积,无法靶向质膜,并随后被蛋白酶体降解。蛋白酶体抑制剂 MG132 虽然可以增加突变体总蛋白水平,但无法使其正确靶向到细胞表面^[64]。OCT2 单体间则通过共价二硫键以二聚体或更高级的寡聚形式存在。在 TM1 和 TM2 之间大胞外环上的 6 个半胱氨酸残基对 OCT2 的转运功能很重要,而位于质膜附近的 Cys51 和 Cys143 是影响 OCT2 寡聚化的重要氨基酸残基^[65]。OATP1B1 可形成寡聚体,且该寡聚体的形成可能影响其转运功能。在 OATP1B1 的 TM8 螺旋上有一个保守的 GXXXG 基序,将其中的 G393 残基突变会使寡聚体的蛋白间结合能力显著下降^[66]。对 OATP1B1 寡聚化的进一步研究发现,在其 TM3 上有一个非典型的亮氨酸七重复序列与该转运体的寡聚化相关,将含有该亮氨酸七重复序列的 TM3 与完整的 OATP1B1 蛋白共表达,会显著降低 OATP1B1 的蛋白表达水平和功能。该七重复序列在 OATP1 家族中高度保守,因此可能也参与了 OATP1B1 和 1B3 间寡聚体的形成^[67]。

除了转运体间形成寡聚体外,这些跨膜蛋白也可能与其他蛋白,如细胞骨架蛋白发生蛋白-蛋白相互作用,调控它们在细胞内的动态平衡。许多膜蛋白含有 PDZ (Postsynaptic density 95/disc-large/zona occludens) 结合基序,用于与支架蛋白发生相互作用。PDZ 基序通常由 3~8 个氨基酸残基

组成, 位于膜蛋白的胞内区域或羧基末端。支架蛋白可调节膜蛋白的亚细胞靶向、蛋白质稳定性、转运活性以及招募其他蛋白质形成复合体^[68]。MRP2 位于极化细胞的顶端膜, 其在肝细胞中的顶端定位对于内源和外源性化合物的胆汁排泄非常重要。MRP2 的羧基端含有共有序列 X(S/T)X ϕ (其中 X 可以是任何氨基酸, ϕ 是疏水氨基酸), 是 I 型 PDZ-containing kidney protein 1 (PDZK1) 的结合位点。将这个羧基端序列 (第 1 541—1 545 位, NSTKF) 均以丙氨酸替换后, 所获得的丙氨酸五突变体丧失了与 PDZK1 的相互作用, 且其在极化细胞顶端膜的表达显著降低^[69]。早期的分析发现, OATP 家族成员 OATP1A2、OATP2B1、OATP3A1、OATP4A1 以及 OATP1C1 的羧基端均含有 I 型的 PDZ 结合基序。其中 OATP1A2 与 PDZK1、IKEPP (Intestinal and kidney-enriched PDZ protein)、NHERF1 (Na⁺/H⁺ exchanger regulatory factor 1) 以及 NHERF2 可能都有相互作用^[70]。2018 年的一项研究将 OATP2B1 的羧基端 PDZ 结合基序删除后, 也同样观察到 OATP2B1 和 PDZK1 相互作用减弱、转运蛋白功能降低的现象^[71]。SLC22 家族的成员 OAT4 也与 PDZ 蛋白有相互作用。将其羧基端最后的 3 个氨基酸残基删除、或将其羧基末端-2 位置的 Thr548 或最后位置上 Leu550 以丙氨酸替换后, 这些突变体都失去了与 PDZK1 和 NHERF1 相互作用的能力, 并对底物的转运产生了影响^[72]。OCTN1 和 OCTN4 的末端 4 个氨基酸残基删除后, 也丧失了与 PDZK 蛋白相互作用的能力^[73]。PepT2 与 PDZK1 的互作增加了转运体在细胞表面的表达以及对 Gly-Sar 的转运功能。该转运体氨基末端的 4 个氨基酸残基同样与 PDZK1 的相互作用有关, 将其删除后, PepT2 几乎完全丧失了与 PDZK1 的互作能力^[46]。此外, 这些氨基酸残基也与 PepT2 和 NHERF2 的互作相关^[74]。

3 蛋白稳定性和翻译后处置相关的关键基序

3.1 氨基端序列

蛋白质的氨基端往往是辅助蛋白进行正确靶定、维持蛋白正确折叠和稳定性的重要区域。研究发现, 缺乏氨基端 67 个氨基酸的截短 MRP1 (第 67—1531 位) 无法转运 LTC4, 表明含有胞外氨基端和第 1 个跨膜螺旋的区域可能对 MRP1 的功能是关键。对该区域内的半胱氨酸残基作进一步的研究表明, 以丝氨酸取代 Cys43 (TM1) 和

Cys265 (CL3) 的突变体对亚砷酸盐的抗性分别降低了 71% 和增加了 3 倍。此外, C43S 对长春新碱的抗性也降低了^[75]。对 OATP1B3 的研究发现, 其氨基端 (特别是位于第 12—28 位的氨基酸残基) 对该转运蛋白的膜靶向是必不可少的, 缺失了该序列的蛋白分散地分布于胞浆中, 无法有效靶定到细胞膜上^[76]。

3.2 带酪氨酸的基序

NPXY (其中 X 可以是任何氨基酸) 是参与基底外侧膜蛋白分选最常见类型的信号之一。它通常位于分选蛋白质的“胞浆面结构域”中。除了作为基底外侧分选信号外, NPXY 还可能在调节蛋白质的内吞过程中发挥作用^[77]。虽然大部分 NPXY 分选信号位于蛋白质的羧基端, OATP1B1 序列中的胞内环 3 中却发现了 1 个高度保守的 NPXY 基序。其中的 N335/P336 共同作用于该转运体的翻译后处置, 用丙氨酸共同取代这 2 个氨基酸残基会导致突变体滞留在高尔基体中, 无法进行有效的糖基替换进而靶定到细胞表面; 而 Y338 则可能与蛋白稳定性有关, Y338A 突变体降解速率加快, 而低温则可以部分恢复蛋白的表达水平和转运功能^[78]。OATP1B1 序列中还含有 1 个非典型的 YXX ϕ (ϕ 为疏水性氨基酸残基), 位于其氨基端, 该序列与 OATP1B1 的蛋白表达以及转运功能相关。动力学研究发现, 缺失了该序列 (YCNGL) 转运体的 K_m 和 v_{max} 值都发生了显著的改变^[79]。

3.3 双亮氨酸基序

蛋白中的双亮氨酸基序常常以 [DE]XXXL[LI] 和 DXXLL 的形式出现, 但已有多项研究表明非典型双亮氨酸基序的存在。该基序与蛋白质的内体分选或内质网输出相关, 决定着许多跨膜蛋白的亚细胞定位^[80]。例如, MRP1 的羧基端含有 1 个高度保守的双亮氨酸基序, 虽然丙氨酸替换不改变转运蛋白的运输, 但会显著影响蛋白功能, 而且如果同时突变双亮氨酸基序和删除 MSD0, 突变体会滞留在内质网中^[81]。OAT1 的 TM12 中含有 1 个双亮氨酸基序 (Leu503Leu504), 其对该转运体的功能是关键, L503A/L504A 双突变体被滞留内质网中, 丧失了转运能力^[82]。该转运蛋白的氨基端也含有 1 个关键的双亮氨酸基序 (Leu6Leu7), 将这 2 个亮氨酸残基同时突变为丙氨酸会造成转运体在细胞表面的表达水平显著降低, 从而失去转运能力。该突变体滞留在内质网中, 并通过蛋白酶体降解, 说明该氨基端双亮氨酸序列与 OAT1 的内质网输出与蛋白稳定性相关^[83]。

4 跨膜区域

跨膜螺旋是膜转运体的重要结构特征。在膜脂质双层中,水基本上被排除在外,多肽通常会采用 α -螺旋结构,使其内部氢键最大化。跨膜螺旋一般含有 18~21 个非极性疏水的氨基酸残基,其形成的 α -螺旋长度足以跨越通常的脂双层宽度,跨膜蛋白具有一个到多个的这种跨膜区域,对于辅助物质转运的各种药物转运体来说,这些跨膜区域对底物识别、结合和转运往往起着重要作用。SNP 的研究发现,位于跨膜螺旋内的突变体通常会导致转运体功能的变化^[18]。关于跨膜区域对药物转运体功能的影响,在之前的综述论文^[13]中已有详细总结,在此不作赘述。

5 转运体调控和关键结构研究的临床意义

翻译后的处置会影响转运体的蛋白稳定性、正确位点的靶定,直接或间接地影响这类蛋白对药物底物的转运,进而影响药物的生物利用度,可能造成不良反应,影响药效。但在一些病理和药理情况下,翻译后修饰相关机制往往会受到影响。例如,酪氨酸激酶(Tyrosine kinases)参与了恶性肿瘤细胞增殖、凋亡、血管生成和转移等关键信号事件/通路的调节,许多类型的癌症被发现与酪氨酸激酶失调有关,因此近年来,越来越多的 TKI 被开发用于抑制特定类型的癌症。如索拉非尼可显著延长晚期肝癌患者的生命,是治疗肝癌的一线药物,它通过靶向血管内皮细胞生长因子受体(Vascular endothelial growth factor receptor, VEGFR) 1~3 和血小板衍生因子受体 β (Platelet-derived growth factor receptor, PDGFR- β)等受体酪氨酸激酶以阻断 VEGF 和 PDGF 依赖性血管生成^[84]。舒尼替尼靶向 VEGFR1~3、PDGFR- α 、PDGFR- β 、EGFR 等酪氨酸激酶,可抑制多种恶性肿瘤的增殖和血管生成^[85]。丝裂原活化蛋白激酶(Mitogen-activated protein kinase, MAPK)途径(也称 RAS/RAF/MEK/ERK 途径)是癌症生物学中最明确的信号转导途径之一,有 40% 以上的人类癌症病例与其过度激活有关。该通路激活增殖基因、促进细胞过度生长,同时通过抑制腺苷活化蛋白激酶(5' AMP-activated protein kinase, AMPK)信号使细胞克服代谢应激。有多个抗肿瘤药物靶定 MAPK 途径不同成员,例如抑制 BRAF 的维莫非尼、康奈非尼,抑制 ERK 的比美替尼、司美替尼、曲美替尼等^[86]。由于激酶抑制剂在

治疗中应用的广泛性,因此可能通过不同的途径直接或间接影响转运体的功能。

此外,功能性的 SNP 在药物转运体中也很常见,这些遗传多态性的存在,会使带有突变体的种群对药物有不同的转运能力,也可能产生不同的药物-药物相互作用。鉴于其重要的临床意义,美国食品和药物管理局(FDA)在 2013 年发布了临床药物基因组学指南《Guidance for industry clinical pharmacogenomics: Premarket evaluation in early-phase clinical studies and recommendations for labeling》,以辅助更高效安全的药物研发^[87]。许多与药物转运相关的转运体都具有非同义的 SNP,对于外排转运体 BCRP,研究得最广泛的是一个非同义的 SNP rs22331142 (c.421C>A),对应于第 141 位的谷氨酰胺突变为赖氨酸。该多态性在亚洲人中占比约 10%,相应蛋白表达水平比野生型下降 30%~40%,从而造成转运功能的下降。c.421C>A 突变体的泛素化水平增加,使其更容易被蛋白酶体降解且其靶向质膜的能力也受到抑制。带有该突变体的病人在多种药物如他汀类药物、抗肿瘤药物的处置中表现出中度到高度的突变-药物关联性^[88]。摄取型转运体 OATP1B1 的编码基因 *SLCO1B1* 也是一个高度变异基因,不同人种中的突变等位基因发生频率较高。其中,rs4149056 (c.521T>C) 突变是目前最具有临床意义的基因多态性,在欧洲人中占比约 8%~20%,在东亚人中占比可达到 10%~15%。该突变体在质膜上的蛋白表达水平下降,从而导致其功能减弱。带有该突变的患者如服食他汀类药物,会大大增加该药物的系统暴露量,导致这类患者发生肌病,甚至横纹肌溶解症^[89]。临床药物遗传学实施联盟(CPIC)据此在 2014 年的指南更新中建议根据 *SLCO1B1* 基因型调整相关他汀类药物的用药剂量^[90]。如能明确影响转运体功能发挥的关键位点及其作用机制,系统地阐明其结构-功能关系,将可以有效地预测功能性 SNP 的存在,对不同个体更有针对性地用药。

6 总结与展望

药物转运体是多种临床药物吸收、分布和排泄的关键决定因素,它们在药物的吸收和排泄过程中所发挥的重要作用毋庸置疑,但我们对它们的调控机制以及相关的结构-功能关系的了解仍然非常有限。翻译后修饰对蛋白功能快速而直接的调控作用使其成为重要的药物设计靶标,SNP 造成的药物代谢和药效的改变也日益引起重视。传统的药物-药

物相互作用主要关注直接在转运体上发生的相互作用——一个药物是否会竞争性或非竞争性地抑制或促进另一个药物的转运,但对转运体的翻译后处置过程特别是翻译后修饰过程的研究表明,新生成的膜蛋白需要经历一个复杂的过程才能到达细胞表面其发挥作用的位点,转运药物进出细胞期间的任何一个步骤受到干扰,都有可能改变这些跨膜蛋白的功能,对其底物药物的效应或代谢产生与预期不同的影响,从而可能使患者产生不良反应。而一些重要的临床药物,如主要用于治疗肿瘤的TKI对蛋白的翻译后修饰会有影响,且其多为长期口服的药物,往往需要每天服用,因而增加了其吸收方式和吸收效率的不可预测性,易造成药代动力学的个体差异以及多重用药所导致的药物-药物相互作用^[91]。2019年的一项研究表明,接受TKI治疗的患者中有97.1%同时服用至少1种其他药物,中位数为同时服用4种药物,而47.4%的患者经历了至少1种可能由TKI介导的药物-药物相互作用^[92],说明激酶抑制剂通过改变蛋白翻译后修饰,直接或间接影响转运体的功能是临床上一个高概率发生的事件。明确各类转运体的调控机制,可以更好地预测药物-药物相互作用,提高药效和防止不良反应的发生。此外,对患者间药物反应差异的因素进行有效地预测是药物开发的重要步骤和目标,如能阐明不同药物转运体序列中与转运功能调控相关的关键位点及明确其所涉及的分子与细胞学机制,可更有效地预测突变等位基因对药效和药物-药物相互作用的影响,从而进一步建立相应的预防措施,更好地为个性化用药提供信息。对药物转运体的翻译后处置过程及结构-功能关系的研究仍处于起步阶段,对其深入系统的研究将有助于更有效地预测药物-药物相互作用以及优化药物的转运、更有针对性和前瞻性地了解转运体遗传多态性对不同个体的影响、为药物设计提供更合理的方案,提高药物使用的安全性和效率。

参考文献:

- [1] SUN D, JIANG H, ZENG S. Drug design based on the function of membrane transporters in drug absorption, distribution, metabolism and excretion[J]. *Journal of Chinese Pharmaceutical Sciences*, 2012, 21(6): 544-552.
- [2] GIACOMINI K M, HUANG S M, TWEEDIE D J, et al. Membrane transporters in drug development[J]. *Nature Reviews Drug Discovery*, 2010, 9(3): 215-236.
- [3] XU D, YOU G. Loops and layers of post-translational modifications of drug transporters[J]. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2017, 116: 37-44.
- [4] DAHL S G, SYLTE I, RAVNA A W. Structures and models of transporter proteins[J]. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 2004, 309(3): 853-860.
- [5] AMAWI H, SIM H M, TIWARI A K, et al. ABC transporter-mediated multidrug-resistant cancer[J]. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 2019, 1141: 549-580.
- [6] FRELET A, KLEIN M. Insight in eukaryotic ABC transporter function by mutation analysis[J]. *FEBS Letters*, 2006, 580(4): 1064-1084.
- [7] HE S M, LI R, KANWAR J R, et al. Structural and functional properties of human multidrug resistance protein 1 (MRP1/ABCC1)[J]. *Current Medicinal Chemistry*, 2011, 18(3): 439-481.
- [8] ALTENBERG G A. Structure of multidrug-resistance proteins of the ATP-binding cassette (ABC) superfamily[J]. *Current Medicinal Chemistry Anticancer Agents*, 2004, 4(1): 53-62.
- [9] CROWLEY E, O'MARA M L, REYNOLDS C, et al. Transmembrane helix 12 modulates progression of the ATP catalytic cycle in ABCB1[J]. *Biochemistry*, 2009, 48(26): 6249-6258.
- [10] CHUFAN E E, SIM H M, AMBUDKAR S V. Molecular basis of the polyspecificity of P-glycoprotein (ABCB1): Recent biochemical and structural studies[J]. *Advances in Cancer Research*, 2015, 125: 71-96.
- [11] WARD A B, SZEWCZYK P, GRIMARD V, et al. Structures of P-glycoprotein reveal its conformational flexibility and an epitope on the nucleotide-binding domain[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2013, 110(33): 13386-13391.
- [12] LI J Z, JAIMESE K F, ALLER S G. Refined structures of mouse P-glycoprotein[J]. *Protein Science*, 2014, 23(1): 34-46.
- [13] HONG M. Biochemical studies on the structure-function relationship of major drug transporters in the ATP-binding cassette family and solute carrier family[J]. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2017, 116: 3-20.
- [14] NI Z, BIKADI Z, CAI X, et al. Transmembrane helices 1 and 6 of the human breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2): Identification of polar residues important for drug transport[J]. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 2010, 299(5): C1100-C1109.
- [15] CÉSAR-RAZQUIN A, SNIJDER B, FRAPPIER-BRINTON T, et al. A call for systematic research on solute carriers[J]. *Cell*, 2015, 162(3): 478-487.
- [16] SHITARA Y, MAEDA K, IKEJIRI K, et al. Clinical significance of organic anion transporting polypeptides (OATPs) in drug disposition: Their roles in hepatic clearance and intestinal absorption[J]. *Biopharmaceutics & Drug Disposition*, 2013, 34(1): 45-78.
- [17] ZAI R Z M, ELORANTA J J, STIEGER B, et al. Pharmacogenetics of OATP (SLC21/SLCO), OAT and OCT (SLC22) and PEPT (SLC15) transporters in the intestine, liver and kidney[J]. *Pharmacogenomics*, 2008, 9(5): 597-

- 624.
- [18] HONG M. Critical domains within the sequence of human organic anion transporting polypeptides[J]. *Current Drug Metabolism*, 2014, 15(3): 265-270.
- [19] MEIER-ABT F, MOKRAB Y, MIZUGUCHI K. Organic anion transporting polypeptides of the OATP/SLCO superfamily: Identification of new members in nonmammalian species, comparative modeling and a potential transport mode[J]. *Journal of Membrane Biology*, 2005, 208(3): 213-227.
- [20] ZHOU F, YOU G. Molecular insights into the structure-function relationship of organic anion transporters OATs[J]. *Pharmaceutical Research*, 2007, 24(1): 28-36.
- [21] ROTH M, OBAIDAT A, HAGENBUCH B. OATPs, OATs and OCTs: The organic anion and cation transporters of the SLCO and SLC22A gene superfamilies[J]. *British Journal of Pharmacology*, 2012, 165(5): 1260-1287.
- [22] HONG M, TANAKA K, YOU G, et al. Determination of the external loops and the cellular orientation of the N- and the C-termini of the human organic anion transporter hOAT1[J]. *Biochemical Journal*, 2007, 401(2): 515-520.
- [23] PERRY J L, DEMBLA-RAJPAL N, HALL L A, et al. A three-dimensional model of human organic anion transporter 1: Aromatic amino acids required for substrate transport[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2006, 281(49): 38071-38079.
- [24] KOEPESELL H. The SLC22 family with transporters of organic cations, anions and zwitterions[J]. *Molecular Aspects of Medicine*, 2013, 34(2/3): 413-443.
- [25] INANO A, SAI Y, KATO Y, et al. Functional regions of organic cation/carnitine transporter OCTN2 (SLC22A5): Roles in carnitine recognition[J]. *Drug Metabolism and Pharmacokinetics*, 2004, 19(3): 180-189.
- [26] LYONS J A, PARKER J L, SOLCAN N, et al. Structural basis for polyspecificity in the POT family of proton-coupled oligopeptide transporters[J]. *EMBO Reports*, 2014, 15(8): 886-893.
- [27] BRANDSCH M. Drug transport via the intestinal peptide transporter PepT1[J]. *Current Opinion in Pharmacology*, 2013, 13(6): 881-887.
- [28] NEWSTEAD S. Molecular insights into proton coupled peptide transport in the PTR family of oligopeptide transporters[J]. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*, 2015, 1850(3): 488-499.
- [29] KNÜTTER I, HARTTRODT B, THEIS S, et al. Analysis of the transport properties of side chain modified dipeptides at the mammalian peptide transporter PEPT1[J]. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2004, 21(1): 61-67.
- [30] KUSAKIZAKO T, MIYAUCHI H, ISHITANI R, et al. Structural biology of the multidrug and toxic compound extrusion superfamily transporters[J]. *Biochimica et Biophysica Acta-Biomembranes*, 2020, 1862(12): 183154. doi: 10.1016/j.bbmem.2019.183154.
- [31] ZHANG X, HE X, BARKE J, et al. Twelve transmembrane helices form the functional core of mammalian MATE1 (multidrug and toxin extruder 1) protein[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2012, 287(33): 27971-27982.
- [32] OTSUKA M, MATSUMOTO T, MORIMOTO R, et al. A human transporter protein that mediates the final excretion step for toxic organic cations[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2005, 102(50): 17923-17928.
- [33] CONNETT G J. Lumacaftor-ivacaftor in the treatment of cystic fibrosis: Design, development and place in therapy[J]. *Drug Design Development and Therapy*, 2019, 13: 2405-2412.
- [34] TOBY T K, FORNELLI L, KELLEHER N L. Progress in top-down proteomics and the analysis of proteoforms[J]. *Annual Review of Analytical Chemistry*, 2016, 9(1): 499-519.
- [35] KAZUHIRO K, KOHJI N, YOSHIKAZU S. Regulations of P-glycoprotein/ABCB1/MDR1 in human cancer cells[J]. *New Journal of Science*, 2014: 476974. doi: 10.1155/2014/476974.
- [36] STOLARCZYK E I, REILING C J, PICKIN K A, et al. Casein kinase 2a regulates multidrug resistance-associated protein 1 function via phosphorylation of Thr249[J]. *Molecular Pharmacology*, 2012, 282(3): 488-499.
- [37] XIE Y, XU K, LINN D E, et al. The 44-kDa pim-1 kinase phosphorylates BCRP/ABCG2 and thereby promotes its multimerization and drug-resistant activity in human prostate cancer cells[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2008, 283(6): 3349-3356.
- [38] ZHANG Q, HONG M, DUAN P, et al. Organic anion transporter OAT1 undergoes constitutive and protein kinase C regulated trafficking through a dynamin- and clathrin-dependent pathway[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2008, 283(47): 32570-32579.
- [39] XU D, HUANG H, YOU G, et al. Serum- and glucocorticoid-inducible kinase sgk2 stimulates the transport activity of human organic anion transporters 1 by enhancing the stability of the transporter[J]. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 2016, 7(1): 19-26.
- [40] SPROWL J A, ONG S S, GIBSON A A, et al. A phosphorylation switch regulates organic cation transporters[J]. *Nature Communications*, 2016, 7: 10880. doi: 10.1038/ncomms10880.
- [41] KÖCK K, KOENEN A, GIESE B, et al. Rapid modulation of the organic anion transporting polypeptide 2B1 (OATP2B1, SLCO2B1) function by protein kinase C-mediated internalization[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2010, 285(15): 11336-11347.
- [42] ZHOU F, LEE A C, KRAFCZYK K, et al. Protein kinase C regulates the internalization and function of the human organic anion transporting polypeptide 1A2[J]. *British Journal of Pharmacology*, 2011, 162(6): 1380-1388.
- [43] HONG M, HONG W, NI C, et al. Protein kinase C affects the internalization and recycling of organic anion transporting polypeptide 1B1[J]. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, 2015, 1848(10): 2022-2030.
- [44] CHAN T, CHEUNG F, ZHENG J, et al. Casein kinase 2

- is a novel regulator of the human organic anion transporting polypeptide 1A2 (OATP1A2) trafficking[J]. *Molecular Pharmacology*, 2016, 13(1): 144-154.
- [45] HAYDEN E R, CHEN M, PASQUARIELLO K Z, et al. Regulation of OATP1B1 function by tyrosine kinase-mediated phosphorylation[J]. *Clinical Cancer Research*, 2021, 27(15): 4301-4310.
- [46] BOEHMER C, PALMADA M, KLAUS F, et al. The peptide transporter PEPT2 is targeted by the protein kinase SGK1 and the scaffold protein NHERF2[J]. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 2008, 22(5/6): 705-714.
- [47] NIES A T, DAMME K, KRUCK S, et al. Structure and function of multidrug and toxin extrusion proteins (MATEs) and their relevance to drug therapy and personalized medicine[J]. *Archives of Toxicology*, 2016, 90(7): 1555-1584.
- [48] KANTAUSKITE M, HUCKE A, REIKE M, et al. Rapid regulation of human multidrug and extrusion transporters hMATE1 and hMATE2K[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2020, 21(14): 5157.
- [49] YOU G, MORRIS M E. Drug transporters: Molecular characterization and role in drug disposition[M]. Hoboken: John Wiley & Sons, Inc., 2007: 517-533.
- [50] SCHINKEL A H, KEMP S, DOLLE M, et al. N-Glycosylation and deletion mutants of the human MDR1 P-glycoprotein[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1993, 268(10): 7474-7481.
- [51] NAKAGAWA H, WAKABAYASHI-NAKAO K, TAMURA A, et al. Disruption of N-linked glycosylation enhances ubiquitin-mediated proteasomal degradation of the human ATP-binding cassette transporter ABCG2[J]. *FEBS Journal*, 2009, 276(24): 7237-7252.
- [52] YAO J, HONG W, HONG M, et al. N-glycosylation dictates proper processing of organic anion transporting polypeptide 1B1[J]. *PLoS One*, 2012, 7: e52563.
- [53] TANAKA K, XU W, YOU G, et al. Role of glycosylation in the organic anion transporter OAT1[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2004, 279(15): 14961-14966.
- [54] ZHOU F, XU W, HONG M, et al. The role of N-linked glycosylation in protein folding, membrane targeting, and substrate binding of human organic anion transporter hOAT4[J]. *Molecular Pharmacology*, 2005, 67(3): 868-876.
- [55] FILIPPO C A, ARDON O, LONGO N. Glycosylation of the OCTN2 carnitine transporter: Study of natural mutations identified in patients with primary carnitine deficiency[J]. *Biochimica et Biophysica Acta-Molecular Basis of Diseases*, 2011, 1812(3): 312-320.
- [56] PICKART C M. Mechanisms underlying ubiquitination[J]. *Annual Review of Biochemistry*, 2001, 70: 503-533.
- [57] LI S, ZHANG Q, YOU G. Three ubiquitination sites of organic anion transporter-1 synergistically mediate protein kinase C-dependent endocytosis of the transporter[J]. *Molecular Pharmacology*, 2013, 84(1): 139-146.
- [58] XU J, PENG H, CHEN Q, et al. Oligomerization domain of the multidrug resistance-associated transporter ABCG2 and its dominant inhibitory activity[J]. *Cancer Research*, 2007, 67(9): 4373-4381.
- [59] MO W, QI J, ZHANG J. Different roles of TM5, TM6, and ECL3 in the oligomerization and function of human ABCG2[J]. *Biochemistry*, 2012, 51(17): 3634-3641.
- [60] YANG Y, LIU Y, DONG Z, et al. Regulation of function by dimerization through the amino-terminal membrane-spanning domain of human ABCC1/MRP1[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2007, 282(12): 8821-8830.
- [61] YANG Y, MO W, ZHANG J T. Role of transmembrane segment 5 and extracellular loop 3 in the homodimerization of human ABCC1[J]. *Biochemistry*, 2010, 49(51): 10854-10861.
- [62] HONG M, XU W, YOSHIDA T, et al. Human organic anion transporter hOAT1 forms homooligomers[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2005, 280(37): 32285-32290.
- [63] DUAN P, LI S, YOU G. Transmembrane peptide as potent inhibitor of oligomerization and function of human organic anion transporter 1[J]. *Molecular Pharmacology*, 2011, 79(3): 569-574.
- [64] DUAN P, WU J, YOU G. Mutational analysis of the role of GXXXG motif in the function of human organic anion transporter 1 (hOAT1)[J]. *International Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 2011, 2(1): 1-7.
- [65] BRAST S, GRABNER A, SUCIC S, et al. The cysteines of the extracellular loop are crucial for trafficking of human organic cation transporter 2 to the plasma membrane and are involved in oligomerization[J]. *The FASEB Journal*, 2012, 26(3): 976-986.
- [66] NI C, YU X, HONG M, et al. Oligomerization study of human organic anion transporting polypeptide 1B1[J]. *Molecular Pharmacology*, 2017, 14(2): 359-367.
- [67] NI C, WANG X, CHEN J, et al. Leucine heptad motifs within transmembrane domains affect function and oligomerization of human organic anion transporting polypeptide 1B1[J]. *Biochimica et Biophysica Acta-Biomembranes*, 2021, 1863(4): 183554. doi: 10.1016/j.bbamem.2021.183554.
- [68] LIU X, FUENTES E J. Emerging themes in PDZ domain signaling: Structure, function, and inhibition[J]. *International Review of Cell and Molecular Biology*, 2019, 343: 129-218.
- [69] EMI Y, YASUDA Y, SAKAGUCHI M. ATP-binding cassette transporter isoform C2 localizes to the apical plasma membrane via interactions with scaffolding protein[J]. *Journal of Cell Science*, 2012, 124(2): 177-189.
- [70] KATO Y, YOSHIDA K, WATANABE C, et al. Screening of the interaction between xenobiotic transporters and PDZ proteins[J]. *Pharmaceutical Research*, 2004, 21(10): 1886-1894.
- [71] FERREIRA C, HAGEN P, STERN M, et al. The scaffold protein PDZK1 modulates expression and function of the organic anion transporting polypeptide 2B1[J]. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2018, 120: 181-190.

- [72] MIYAZAKI H, ANZAI N, EKARATANAWONG S, et al. Modulation of renal apical organic anion transporter 4 function by two PDZ domain-containing proteins[J]. *Journal of the American Society of Nephrology*, 2005, 16(12): 3498-3506.
- [73] KATO Y, SAI Y, YOSHIDA K, et al. PDZK1 directly regulates the function of organic cation/carnitine transporter OCTN2[J]. *Molecular Pharmacology*, 2005, 67(3): 734-743.
- [74] NOSHIRO R, ANZAI N, SAKATA T, et al. The PDZ domain protein PDZK1 interacts with human peptide transporter PEPT2 and enhances its transport activity[J]. *Kidney International*, 2006, 70(2): 275-282.
- [75] LESLIE E M, LETOURNESU I J, DEELEY R G, et al. Functional and structural consequences of cysteine substitutions in the NH2 proximal region of the human multidrug resistance protein 1 (MRP1/ABCC1)[J]. *Biochemistry*, 2006, 42(18): 5214-5224.
- [76] CHUN S E, THAKKAR N, OH Y, et al. The N-terminal region of organic anion transporting polypeptide 1B3 (OATP1B3) plays an essential role in regulating its plasma membrane trafficking[J]. *Biochemical Pharmacology*, 2017, 131: 98-105.
- [77] STOOPE E, CAPLAN M J. Trafficking to the apical and basolateral membranes in polarized epithelial cells[J]. *Journal of the American Society of Nephrology*, 2014, 25(7): 1375-1386.
- [78] WANG X, LIANG Y, FANG Z, et al. The intracellular NPxY motif is critical in maintaining the function and expression of human organic anion transporting polypeptide 1B1[J]. *Biochimica et Biophysica Acta-Biomembranes*, 2019, 1861(6): 1189-1196.
- [79] WANG X, CHEN J, HONG M, et al. Amino-terminal region of human organic anion transporting polypeptide 1B1 dictates transporter stability and substrate interaction[J]. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 2019, 378: 114642.
- [80] BONIFACINO J S, TRAUB L M. Signals for sorting of transmembrane proteins to endosomes and lysosomes[J]. *Annual Review of Biochemistry*, 2003, 72: 395-447.
- [81] WESTLAKE C J, COLE S P, DEELEY R G. Role of the NH2-terminal membrane spanning domain of multidrug resistance protein 1/ABCC1 in protein processing and trafficking[J]. *Molecular Biology of the Cell*, 2005, 16(5): 2483-2492.
- [82] HONG M, LI S, YOU G, et al. Putative transmembrane domain 12 of the human organic anion transporter hOAT1 determines transporter stability and maturation efficiency[J]. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 2010, 332(2): 650-658.
- [83] ZHANG Q, WU J, PAN Z, et al. The role of dileucine in the expression and function of human organic anion transporter 1 (hOAT1)[J]. *International Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 2011, 2(1): 31-38.
- [84] BHULLAR K S, LAGARÓN N O, MCGOWAN E M, et al. Kinase-targeted cancer therapies: Progress, challenges and future directions[J]. *Molecular Cancer*, 2018, 17: 48. doi: 10.1186/s12943-018-0804-2.
- [85] MILLER M J, FOY K C, KAUMAYA P T. Cancer immunotherapy: Present status, future perspective, and a new paradigm of peptide immunotherapeutics[J]. *Discovery Medicine*, 2013, 15(82): 166-176.
- [86] YUAN J, DONG X, YAP J, et al. The MAPK and AMPK signalings: Interplay and implication in targeted cancer therapy[J]. *Journal of Hematology & Oncology*, 2020, 13(1): 113. doi: 10.1186/s13045-020-00949-4.
- [87] Center for drug evaluation and research. Guidance for industry clinical pharmacogenomics: Premarket evaluation in early-phase clinical studies and recommendations for labeling[S]. Silver Spring: Food and Drug Administration, 2013.
- [88] HEYES N, KAPOOR P, KERR I D. Polymorphisms of the multidrug pump ABCG2: A systematic review of their effect on protein expression, function, and drug pharmacokinetics[J]. *Drug Metabolism and Disposition*, 2018, 46(12): 1886-1899.
- [89] ALAM K, CROWE A, WANG X, et al. Regulation of organic anion transporting polypeptides (OATP) 1B1- and OATP1B3-mediated transport: An updated review in the context of OATP-mediated drug-drug interactions[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2018, 19(3): 855. doi: 10.3390/ijms19030855.
- [90] RAMSEY L B, JOHNSON S G, CAUDLE K E, et al. The clinical pharmacogenetics implementation consortium guideline for SLCO1B1 and simvastatin-induced myopathy: 2014 update[J]. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, 2014, 96(4): 423-428.
- [91] GARRISON D A, TALEBI Z, EISENMANN E D, et al. Role of OATP1B1 and OATP1B3 in drug-drug interactions mediated by tyrosine kinase inhibitors[J]. *Pharmaceutics*, 2020, 12(9): 856. doi: 10.3390/pharmaceutics12090856.
- [92] ERGUN Y, OZDEMIR N Y, TOPTAS S, et al. Drug-drug interactions in patients using tyrosine kinase inhibitors: A multicenter retrospective study[J]. *Journal of Buon*, 2019, 24(4): 1719-1726.



洪梅, 教授, 博士, 广东生物物理学会副理事长, 中国生物物理学会辐射与环境生物物理学分会常务理事, 中国药理学会代谢专业委员会委员, 广东省药理学会药物代谢专业委员会副主任委员。多年

从事膜蛋白的生物化学研究, 主要关注人体和食品动物药物转运蛋白的结构-功能关系及其调控机理; 在不同传能线密度的电离辐射胁迫下, 细胞突变过程中膜蛋白所受到的调节和在信号传导过程中的作用等。

【责任编辑 李庆玲】