

Transport Characteristics of Urea Transporter-B

Dandan Zhong, Baoxue Yang*

State Key Laboratory of Natural and Biomimetic Drugs, Department of Pharmacology, School of Basic Medical Sciences, Peking University, Beijing
Email: zddnjmu@sina.com, baoxue@bjmu.edu.cn

Received: Jan. 18th, 2014; revised: Feb. 18th, 2014; accepted: Feb. 25th, 2014

Copyright © 2014 Dandan Zhong, Baoxue Yang. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited. In accordance of the Creative Commons Attribution License all Copyrights © 2014 are reserved for Hans and the owner of the intellectual property Dandan Zhong, Baoxue Yang. All Copyright © 2014 are guarded by law and by Hans as a guardian.

Abstract: Urea transporter UT-B is highly expressed in the membrane of erythrocytes and some epithelial and endothelial cells, in which UT-B facilitates urea transport. Recently, studies find that water, ammonia and urea analogues can also be transported by UT-B. This review mainly focuses on the transport characteristics of UT-B, and the possible physiological significance will be discussed as well.

Keywords: UT-B; Urea; Urea Analogues; Ammonia; Water

尿素通道蛋白 B 的转运特性

钟丹丹, 杨宝学*

天然药物及仿生药物国家重点实验室, 北京大学基础医学院药理学系, 北京
Email: zddnjmu@sina.com, baoxue@bjmu.edu.cn

收稿日期: 2014 年 1 月 18 日; 修回日期: 2014 年 2 月 18 日; 录用日期: 2014 年 2 月 25 日

摘要: 尿素通道蛋白 B(urea transporters B, UT-B)主要表达在红细胞和一些上皮及内皮细胞膜, 介导尿素的跨膜转运。近年来研究发现 UT-B 亦参与其他物质的转运, 如水、NH₃ 和尿素类似物等, 提示 UT-B 还可以作为水和气体通道。本文主要阐述 UT-B 对这些物质的转运特性, 并探究其可能的生理学意义。

关键词: 尿素通道蛋白 B; 尿素; 尿素类似物; NH₃; 水

1. 引言

尿素通道蛋白(Urea Transporter, UT)是特异性通透尿素的跨膜蛋白, 介导尿素在浓度差驱动下快速穿过细胞膜, 其速度是简单扩散的 10~100 倍。哺乳动物的 UT 家族目前有 7 个成员, 分为 UT-A 和 UT-B 两个亚家族, UT-A1-6 由 SLC14A2 编码, UT-B 由 SLC14A1 编码, 串联位于 18 号染色体的 q12-21 之间, 他们具有高度的同源性^[1-3]。近年来的研究主要集中在利用转基因小鼠模型阐明尿素通道蛋白转运的分子*通讯作者。

和细胞机制, 并取得了新的进展。随着研究的深入, 人们发现 UT-B 不仅能特异性地通透尿素, 对尿素类似物、NH₃ 和水等也具有有良好的通透性。

2. UT-B 介导的尿素转运

尿素是蛋白质代谢的主要终产物, 也是尿液的主要溶质成分。红细胞膜和肾集合管末段对尿素的通透性远远高于脂相单纯扩散。早在 1970 年, Hunter 发现并证实了人红细胞膜尿素的转运具有饱和现象^[4]。Macey 和 Farmer 发现根皮素可以显著抑制红细胞膜

对尿素的转运而对水的转运影响甚微^[5]。随后, Wieth 等人证明了硫脲和尿素的之间的转运存在竞争^[6]。这些研究均表明人红细胞对尿素的转运类似易化扩散转运。在随后的 30 年, 人们对哺乳动物红细胞膜介导的尿素的转运进行了深入的研究。研究结果提示尿素跨膜转运由特殊的膜通道蛋白介导。1993 年 Hediger 等人^[7]首次应用爪蟾卵母细胞表达系统克隆出尿素通道蛋白的 cDNA, 该蛋白被称为 UT-A2。随后, Oliver 等人^[8]根据 UT-A2 cDNA 序列, 以同源克隆的方法从人骨髓 cDNA 文库中筛选出 UT-B。UT-B 亚家族主要表达于红细胞膜和肾脏的直小血管降支, 能够快速、特异性地转运尿素, 维持肾脏髓质的高尿素浓度梯度, 保证肾脏直小血管逆流交换的进行。Yang 等人^[9]首次建立了 UT-B 基因敲除小鼠模型, 发现与野生型小鼠相比, UT-B 敲除的小鼠饮水量和排尿量大大增加, 血浆中尿素的浓度升高了 30% 且尿液浓缩能力降低了 50%, 而非尿素溶质浓度未发生明显变化。2004 年, Bankir 等人^[10]检测了野生型小鼠与 UT-B 敲除小鼠各项生理指标的变化, 发现在正常情况下 UT-B 敲除小鼠其血浆尿素浓度升高了 44%, 肌酐清除率不变, 而尿素的清除率下降了 25%。在急性尿素负荷条件下, 野生型小鼠的尿液中尿素的浓缩逐渐增加, 随后其尿浓缩能力恢复正常。而在 UT-B 敲除小鼠中, 因髓质尿素的聚集受损, 其尿液的渗透压和尿液中尿素的浓缩均上升。随着蛋白饮食量的增加, UT-B 敲除小鼠的血浆尿素浓度增加而野生型小鼠血浆尿素浓度不变, 这些结果证实 UT-B 在肾脏逆流交换和尿浓缩机制中发挥重要作用, 其作用机制是 UT-B 通过介导尿素从直小血管升支向降支的逆流交换。此外, 红细胞通过髓质时可能会带走尿素进入血液循环, 而 UT-B 可以防止皮质 - 髓质渗透梯度的逸散, 还可预防红细胞穿过有尿素渗透梯度的髓质时发生有害的快速细胞皱缩和膨胀。

3. UT-B 介导的尿素类似物转运

Yang 等人^[11]利用停流实验方法对哺乳动物红细胞 UT-B 介导的尿素和尿素类似物的转运效率进行了比较。实验发现 UT-B 对甲酰胺、乙酰胺、甲基脲、甲基酰胺、氨基甲基脲、丙烯酰胺、羟基乙酰胺、羟基脲和碳酰肼的通透率高, 对丁酰胺和异丁酰胺的通透率较低。本研究还发现二甲基脲和硫脲会抑制 UT-B

介导的尿素转运, 该抑制作用是通过阻断 UT-B 的孔道而不是与尿素竞争 UT-B。结果表明 UT-B 介导转运的化合物需要至少一个氨基, 如甲酰胺、乙酰胺、氨基甲酸酯和丙烯酰胺均含氨基功能, 其通过 UT-B 转运的效率很高。N 甲基化的酰胺其亲水能力下降, 亲脂性和分子量增加, 故转运效率较低。甘氨酸和乙酸也不具有氨基功能, 故而不能经 UT-B 转运。这些结果表明 UT-B 能够有效地转运尿素类似物, 其转运效率与尿素类似物的分子大小、氢键结合能力、亲脂性和极性密切相关。

UT-B 对尿素类似物的转运表明其可以作为一个选择特异性的亲水性转运通道。此外, 某些尿素类似物能够显著抑制 UT-B 介导的尿素转运。

4. UT-B 介导的 NH₃ 转运

传统的观点认为气体分子的跨膜转运是气体首先溶解到细胞膜的脂质双分子层, 然后由简单扩散穿过脂质层。该观点直到发现 AQP1 (Aquaporin 1) 能够通透 CO₂ 才被推翻^[12,13], AQP1 是第一个被发现的气体通道。随后发现 AQP1 也能转运 NH₃^[14] 和 NO^[15,16]。第二个被发现的气体通道是 RhAG (Rhesus proteins), 可以转运 CO₂^[17] 和 NH₃^[18]。但 RhAG 和 AQP1 介导 CO₂ 和 NH₃ 转运的生理学意义尚不能确定^[19,20]。随后, R. Ryan Geyer 等人^[21]证实了人 UT-B 可以介导 NH₃ 的转运, 使得 UT-B 成为第三个气体通道家族。他们通过记录成像监测表达 UT-B 的卵母细胞对 C¹⁴ 标记的尿素的吸收过程和水的渗透压, 采用微电极记录卵母细胞暴露于 5% CO₂/33 mM HCO₃⁻ 或 0.5 mM NH₃/NH₄⁺ 中 ΔpH 的最大变化值。实验发现, 表达 UT-B 的卵母细胞对尿素的通透性及水的通透性分别是对照组卵母细胞的 20 倍和 8 倍。同时, UT-B 对 CO₂ 诱导的 ΔpH 无影响, 但 NH₃ 诱导的 ΔpH 增加了两倍。根皮素使 UT-B 介导的尿素和水的通透性分别减少了 45% 和 50%, 对氯汞苯磺酸酯使尿素、水的通透性以及 ΔpH 分别减少了 25%、30% 和 100%, 这表明 UT-B 是一种对根皮素和对氯汞苯磺酸酯敏感的氨转运通道。他们还利用 MD 模拟计算 H₂O 渗透的自由能和 US 算法计算 NH₃ 渗透的自由能, 发现在 UT-B 的 Sm 区域, H₂O 通透单分子 UT-B 孔道的最大自由能仅 ~2 kcal/mol, NH₃ ~2.2 kcal/mol, 这表明 NH₃ 透过孔道的效率很高。Sm 区域是 UT-B 孔道最狭窄的部分, 也是屏障能量的

主要来源, 该屏障在室温低时易使这些分子通透。此外, 他们对人 UT-B 的 T177V 和 T399V 位点进行突变, 发现突变后水的通透性接近零, 且 NH_3 的通透性也大大降低。同时, 突变 T339V 能减少单分子尿素通道的直径从而阻止尿素、 H_2O 和 NH_3 的转运。这些结果表明这两个位点对 UT-B 介导的水和 NH_3 的转运至关重要。

作为气体通道, UT-B 与 AQP1 和 RhAG 作用类似, 均是作为 NH_3 的载体, UT-B 对 NH_3 的通透性能增强红细胞在各组织中对 NH_3 的吸收, 将其从 NH_3 的合成部位转运到肝脏脱毒。血浆 NH_3 浓度的轻微升高主要有两个原因: 一是血浆尿素的聚集会减少肝脏消耗 NH_3 ; 另一个原因是血液中 NH_3 的有效分布容积减少。血浆 NH_3 浓度升高时, 对肝外的组织具有很强的毒性作用。血浆中 NH_3 浓度超过 0.7 mmol/L, 可干扰脑的能量代谢及三羧酸循环, 造成中枢神经系统功能障碍, 严重者可致动物痉挛直至死亡^[22]。红细胞膜上的 UT-B 不仅能够作为 NH_3 的潜在载体, 将其从合成部位转运至肝脏, 并可通过一系列反应转化为尿素, 从而避免 NH_3 浓度过高引起毒性作用。此外, 在肾脏内髓, UT-B 还可以减少尿素和 NH_3 的渗透系数, 进而减少红细胞进出肾脏内髓的细胞体积的改变。

5. UT-B 介导的水转运

一直以来人们认为水是以简单扩散的形式通过细胞的脂质双分子层——即水的简单扩散学说。然而, 该理论不能解释以下生理学现象: 如尿的浓缩、 P_f/P_d (渗透水渗透性/扩散水渗透性) > 1 时水的转运以及有些细胞的水转运可被通道蛋白阻断剂抑制等。因而人们推测细胞膜上存在水分子转运的特殊通道。Agre 等首先发现了水通道蛋白 AQP1^[23]。Yang^[24]在研究爪蟾卵母细胞表达的 UT3(现称为 UT-B)时偶然发现并首次证明了 UT-B 能够通透水。发现 UT-B 介导的水和尿素的转运几乎不受温度影响, 但却能被尿素类似物 1,3 二甲基硫脲和根皮素显著抑制。随后, Sidoux-Walter 等人^[25]研究发现 UT-B 在正常生理表达水平时不能够转运水。他们采用红细胞 Kidd 基因编码的人的 UT-B, 将编码不同剂量的 UT-B 的 cDNA 注射到爪蟾卵母细胞, 产生不同表达水平的 UT-B 卵母

细胞。研究发现随着 UT-B 的表达量逐步减少, UT-B 透水的性质消失, 但尿素的通透性不变。这表明, UT-B 透水的前提是在膜上高度表达。

为了进一步证实在生理条件下 UT-B 能够通透水, 2002 年, Yang 等人^[26]建立了 UT-B 和 AQP1 双敲除小鼠, 采用停流实验发现双敲除小鼠的红细胞水渗透性比 AQP1 单敲除小鼠低了 4.2 倍。此外, 定量分析了 UT-B 对红细胞转运水的贡献比例, 在 10°C 时, ~90% 的水通过 AQP1 转运, ~8% 的水通过 UT-B 转运, 其他部分通过生物膜单纯扩散的方式。在 37°C 时, ~79% 的水经 AQP1 转运, ~6% 的水经 UT-B 转运, 其余部分经生物膜单纯扩散的方式通透。这些结果也说明红细胞 UT-B 介导的水转运几乎不受温度影响, 其原因是 UT-B 介导的水转运的阿仑尼乌斯能很低, <2 kcal/mol, 甚至低于生物膜透水的能量。这些实验证明了 UT-B 在正常的生理条件可以转运水。

2013 年, Slim Azouzi 等人^[27]又进一步研究了 UT-B 介导的水转运, 并对其转运机制进行了探究。他们发现在人类红细胞对水的转运过程中, UT-B 介导的水转运约占 10%, 且单个 UT-B 孔道对水的通透性与单个 AQP1 孔道的水渗透性相同。Ming Zhou 等人^[28]对 UT-B 的晶体结构做了详尽的解析。他们发现 UT-B 以三聚体状态结晶。每一个 UT-B 分子的结构相当于两个半圆柱状结构域相向扣合而成的空心圆柱, 这两个半圆柱状结构域结构相似, 分别由 6 段 α 螺旋构成, 并以准 2 次轴相联系。每一个 UT-B 分子圆柱状结构的中心孔道是尿素分子通过的选择性滤过通道。这一通道的两端分别称为 S_o 位点(向细胞外侧开口)和 S_i 位点(向细胞内侧开口), 孔道的中央称为 S_m 位点, 位于 S_o 和 S_i 之间。Slim Azouzi 等人发现水分子在 S_o 和 S_i 区会形成三个氢键, 而在 S_m 区氢键数量则减少, 表明 S_m 区是水分子通过的主要屏障区。 S_m 区富含 Thr177 和 Thr339, 这两个氨基酸残基是主要的活性位点, 该位点与 UT-B 介导的氨的转运特性也密切相关^[21]。

总之, 这些研究表明尿素、尿素类似物、 NH_3 和水在 UT-B 中经过同一孔道转运。但是, 在 UT-B 转运过程中这些物质之间是否会通过相互竞争来影响其他物质的转运以及 UT-B 是否还参与其他物质的转运等有待研究。

基金项目

国家自然科学基金(No. 30870921, 81170632, 81261160507)、科技部国际科技合作与交流专项(No. 2012DFA11070)、教育部高等学校博士学科点专项科研基金(No. 20100001110047)。

参考文献 (References)

- [1] Shayakul, C., Clemencon B. and Hediger, M.A. (2013) The urea transporter family (SLC14): Physiological, pathological and structural aspects. *Molecular Aspects of Medicine*, **34**, 313-322.
- [2] Bagnasco, S.M. (2003) Gene Structure of Urea Transporters. *The American Journal of Physiology-Renal Physiology*, **284**, F3-F10.
- [3] Fenton, R.A., et al. (1999) The murine urea transporter genes Slc14a1 and Slc14a2 Occur in Tandem on Chromosome 18. *Cytogenetics and Cell Genetics*, **87**, 95-96.
- [4] Hunter, F.R. (1967) Facilitated diffusion in the chloride shift in human erythrocytes. *Biochimica et Biophysica Acta*, **135**, 784-787.
- [5] Macey, R.I. and Farmer, R.E. (1970) Inhibition of water and solute permeability in human red cells. *Biochimica et Biophysica Acta-Biomembranes*, **211**, 104-106.
- [6] Funder, J. and Wieth, J.O. (1974) Human red cell sodium and potassium in metabolic alkalosis. *Scandinavian Journal of Clinical & Laboratory Investigation*, **34**, 49-59.
- [7] You, G., et al. (1993) Cloning and characterization of the vasopressin-regulated urea transporter. *Nature*, **365**, 844-847.
- [8] Olives, B., et al. (1994) Cloning and functional expression of a urea transporter from human bone marrow cells. *Journal of Biological Chemistry*, **269**, 31649-31652.
- [9] Yang, B., et al. (2002) Urea-selective concentrating defect in transgenic mice lacking urea transporter UT-B. *Journal of Biological Chemistry*, **277**, 10633-10637.
- [10] Bankir, L., Chen, K. and Yang, B. (2004) Lack of UT-B in vasa recta and red blood cells prevents urea-induced improvement of urinary concentrating ability. *The American Journal of Physiology-Renal Physiology*, **286**, F144-F151.
- [11] Zhao, D., et al. (2007) Comparative transport efficiencies of urea analogues through urea transporter UT-B. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1768**, 1815-1821.
- [12] Nakhoul, N.L., et al. (1998) Effect of expressing the water channel aquaporin-1 on the CO₂ permeability of Xenopus oocytes. *The American Journal of Physiology*, **274**, C543-548.
- [13] Endeward, V., et al. (2006) Evidence that aquaporin 1 is a major pathway for CO₂ transport across the human erythrocyte membrane. *Faseb Journal*, **20**, 1974-1981.
- [14] Holm, L.M., et al. (2005) NH₃ and NH₄⁺ permeability in aquaporin-expressing Xenopus oocytes. *Pflügers Archiv-European Journal of Physiology*, **450**, 415-428.
- [15] Herrera, M., Hong N.J. and Garvin, J.L. (2006) Aquaporin-1 transports NO across cell membranes. *Hypertension*, **48**, 157-164.
- [16] Herrera, M. and Garvin, J.L. (2007) Novel role of AQP-1 in NO-dependent vasorelaxation. *The American Journal of Physiology-Renal Physiology*, **292**, F1443-F1451.
- [17] Endeward, V., et al. (2008) RhAG protein of the Rhesus complex is a CO₂ channel in the human red cell membrane. *FASEB Journal*, **22**, 64-73.
- [18] Marini, A.M., et al. (2000) The human Rhesus-associated RhAG protein and a kidney homologue promote ammonium transport in yeast. *Nature Genetics*, **26**, 341-344.
- [19] Fang, X., Yang, B.X., Matthey, M.A. and Verkman, A.S. (2002) Evidence against aquaporin-1-dependent CO₂ permeability in lung and kidney. *The Journal of Physiology*, **542**, 63-69.
- [20] Yang, B., et al. (2000) Carbon dioxide permeability of aquaporin-1 measured in erythrocytes and lung of aquaporin-1 null mice and in reconstituted proteoliposomes. *The American Journal of Physiology*, **275**, 2686-2692.
- [21] Geyer, R.R., et al. (2013) Movement of NH₃ through the human urea transporter B: a new gas channel. *The American Journal of Physiology-Renal Physiology*, **304**, F1447-F1457.
- [22] Eastridge, M.L., Bucholtz, H.F., Slater, A.L. and Hall, C.S. (1998) Nutrient requirements for dairy cattle of the National Research Council versus some commonly used ration software. *Journal of Dairy Science*, **81**, 3049-3062.
- [23] Preston, G.M., Carroll, T.P., Guggino, W.B. and Agre, P. (1992) Appearance of water channels in Xenopus oocytes expressing red cell CHIP28 protein. *Science*, **256**, 385-387.
- [24] Yang, B. and Verkman, A.S. (1998) Urea transporter UT3 functions as an efficient water channel. Direct evidence for a common water/urea pathway. *The American Journal of Physiology*, **273**, 9369-9372.
- [25] Sidoux-Walter, F., et al. (1999) At physiological expression levels the Kidd blood group/urea transporter protein is not a water channel. *The American Journal of Physiology*, **274**, 30228-30235.
- [26] Yang, B. and A.S. (2002) Verkman, Analysis of double knockout mice lacking aquaporin-1 and urea transporter UT-B. Evidence for UT-B-facilitated water transport in erythrocytes. *The American Journal of Physiology*, **277**, 36782-36786.
- [27] Azouzi, S., et al. (2013) Energetic and Molecular Water Permeation Mechanisms of the Human Red Blood Cell Urea Transporter B. *PLoS ONE*, **12**, Article ID: e82338.
- [28] Levin, E.J., et al. (2012) Structure and permeation mechanism of a mammalian urea transporter. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **109**, 11194-11199.