

【 药物转运体专栏 】

P-糖蛋白分子结构及转运机制

杨晓波, 刘克辛*

大连医科大学药学院, 辽宁 大连 116044

摘要: P-糖蛋白 (P-gp) 是一种跨膜转运蛋白, 属于三磷酸腺苷结合盒式结构转运蛋白超家族成员, 其主要分布于肝脏、肾脏、胃肠道和血脑屏障等组织。一方面, P-gp 在细胞营养的摄取、代谢物的排泄、能量的产生和细胞信号的传导等正常细胞生理学功能方面起到了至关重要的作用; 另一方面, P-gp 的过度表达也是造成肿瘤细胞多药耐药 (MDR) 的主要机制。介绍 P-糖蛋白的分子结构和转运机制的相关研究进展, 为其进一步研究提供参考。

关键词: 膜转运蛋白; P-糖蛋白; 多药耐药; 分子结构

中图分类号: R962.2 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-6376 (2018) 01- 0001 - 04

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2018.01.001

Molecular structure and mechanism of P-glycoprotein functions

YANG Xiaobo, LIU Kexin

College of Pharmacy, Dalian Medical University, Dalian 116044, China

Abstract: P-glycoprotein (P-gp) is one kind of membrane proteins which belongs to sub-family B of the ATP-binding cassette transporter superfamily. P-gp is mainly localized in the liver, kidney, gastrointestinal tract and blood brain barrier. On one hand, P-gp plays an important part in transporting ligands across cellular lipid membranes, which is critical for most aspects of cell physiology, including the uptake of nutrients and elimination of waste products, energy generation, and cell signaling. On the other hand, there is a greater likelihood of treatment failure if P-gp expression increases after therapy. One of the best-understood MDR involved mechanisms is the over-expression of P-gp. In the present review, we will provide the latest advances in the studies of the molecular structure basis and the mechanism of P-glycoprotein functions.

Key words: membrane transport protein; P-glycoprotein; multidrug resistance; molecular structure

P-糖蛋白 (P-glycoprotein, P-gp), 属于三磷酸腺苷结合盒式 (ATP-binding cassette, ABC) 结构转运蛋白超家族中的一员, 是一种依赖 ATP 的跨膜转运蛋白, 在人体中由多药耐药基因 (multidrug resistance 1, MDR1 或 ABCB1) 编码^[1-2]。P-gp 的主要生理功能是防止机体重要组织对有害物质的吸收, 并能够介导多种化学性质不同、结构和功能各异的异生物质和代谢产物的细胞排出过程。P-gp 广泛分布于脑、胎盘、肝脏、肾脏和胃肠道等组织^[3], 既对血脑屏障、胎盘屏障、肠道吸收屏障等起重要

作用, 又对胆汁和肾脏排泄有一定的影响, 在药物及内、外毒素的体内过程中发挥了关键作用。此外, P-gp 可在肿瘤细胞内高度表达, 这是肿瘤细胞产生多药耐药性及化疗失败的重要原因^[4-5]。目前, P-gp 转运底物的机制尚未完全明了, 本文就 P-gp 的分子结构及作用机制的相关研究进行简单介绍。

1 P-gp 的分子结构

1.1 P-gp 一级结构

编码 P-gp 的人类 MDR1 基因全长 4 669 bp, 在第 179~3 840 bp 有一个起始密码为 ATG 的开放读

收稿日期: 2017-05-12

基金项目: 国家自然科学基金项目 (81473280, 81502992)

第一作者: 杨晓波 (1982—), 男, 博士, 讲师, 研究方向为新型药物运系统逆转多药耐药研究。E-mail: bocai789770@163.com。

*通信作者: 刘克辛, 男, 博士, 教授, 博士生导师、享受国务院特殊津贴专家, 研究方向为药物转运体与药理学。

Tel: (0411)86110407 E-mail: kexinliu@dlmedu.edu.cn

框,负责编码一段含有 1 280 个氨基酸残基、相对分子质量约为 1.4×10^5 的多肽链,该多肽链为两个同源性片段经由一个链接区组成^[6]。在胞膜外侧,P-gp 有 3 个 N 连接的糖基化位点,P-gp 在内质网合成后经高尔基体的糖基化修饰加上去的糖链约为 3×10^4 Da,使得成熟的 P-gp 相对分子质量为 1.7×10^5 Da,并最终定位于细胞膜上。

1.2 P-gp 二级结构

对 P-gp 的二级结构分析显示,其包含 32%~43% α 螺旋、16%~26% β 折叠、15%~29% β 转角和 13%~26% 无规则卷曲。利用半胱氨酸交联实验,研究人员推测 P-gp 可能存在两种二级结构:一种为两个重复序列片段呈螺旋状跨膜排列的离心旋转结构;一种为两个重复序列片段对称、平行跨膜排列的线型结构,目前多支持前者^[7]。P-gp 的基本结构包含 4 个关键核心区域,即两个位于胞浆内的亲水性核苷酸结合区域(nucleotide-binding domains, NBD)和两个疏水性的跨膜区域(transmembrane domains, TMD)。每个跨膜区由 6 个跨膜的 α 螺旋组成,螺旋之间由亲水性环连接,使 P-gp 多肽链嵌于细胞膜内。TMD 作为膜通道有利于药物的转运,而位于胞浆内的 NBD 则是 ATP 的结合位点,与药物转运的能量供应有关。两个核苷酸结合区各含一个 ATP 结合位点,分别在第 426-433/541-551 和 1068-1075/1184-1196 氨基酸残基之间,包含了许多的保守序列(图 1),ATP 结合区由 Walker A、Walker B、H 环、芳香族环簇(LSGGQ 序列)和核心子结构域 Q 环组成,Q 环从 NBD 的顶面一直延伸至 α

螺旋子结构域,起着能量和信号传导的作用。 α 螺旋子结构域包含着可与 ATP 接触的 ABC 标记区。各结构域交互折叠保证了 NBD 与 ATP 的高亲和能力^[8]。

1.3 P-gp 三级结构

虽然目前尚未获得 P-gp 的晶体 X 射线衍射图谱,但通过对最大的 ABC 超家族成员 MsbA 的单粒子图像和晶体结构分析^[9],推测 P-gp 位于细胞膜外的结构为一个高约 8 nm,直径约 10 nm,内含一个直径约 5 nm 孔道的对称六边形环形结构;孔道内径由细胞膜内层向外层逐渐变大,并可以在细胞浆面进行关闭,P-gp 在细胞膜磷脂双分子层内形成的这一亲水性漏斗状囊袋,可能作为底物转运的通道;另外,在细胞浆面还存在两个高约 3 nm 的突起,其大小与 NBD 相当。

2 P-gp 的作用机制

2.1 P-gp 与底物

通过对 P-gp 同系物 MsbA 的研究和光亲和标记实验表明,P-gp 的底物结合位点就位于前文所述的两个疏水性跨膜区交界处的亲水性囊袋中^[10]。转运功能和放射配体结合实验提示,囊袋中可能存在多个底物结合位点,且不同的底物能够同时与 P-gp 进行特异性结合^[11]。不过也有学者认为,仅存在一个共用的结合位点,P-gp 的分子构象能够在不同底物的诱导下进行相应改变并与之结合,这或许是 P-gp 能够识别并转运一系列分子结构各异底物的真正原因^[12]。研究表明,影响底物与 P-gp 亲和力的最重要的理化因素是相对分子质量及亲脂性,相对分子质量为 391~490、油水分配系数值介于 3.6~4.5 的化合物最适于与 P-gp 进行结合^[13]。在 P-gp 跨膜通道中有多种氨基酸残基,对底物转运功能至关重要,因此 P-gp 底物中必须具备适当数目的氢键受体或供体,这样可以与关键氨基酸残基通过氢键等作用力有效结合于 P-gp,引起 P-gp 构象改变而影响其转运能力。通常面向细胞浆面时,底物与结合位点的亲和力较高,而面向胞外时,亲和力迅速降低,进而被释放并排出细胞^[14]。

2.2 P-gp 与 ATP

NBD 是 ATP 的结合位点,同时也具有 ATP 酶的功能,P-gp 转运底物所需要的能量由 ATP 和 NBD 的结合和水解过程来提供。两个 NBD 是以 ATP 为链接形成的二聚体结构,而非直接通过核苷酸互连接。当用蛋氨酸取代 NBD 中 Walker A 基序上

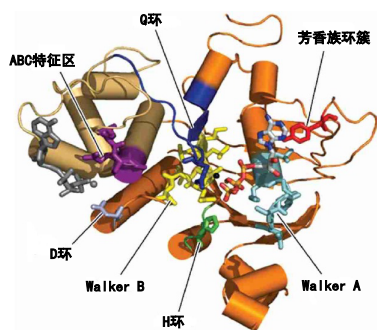


图 1 核苷酸结合区(NBD)保守序列结构模型
Fig. 1 Nucleotide-binding domains (NBD) conserved motifs model

的赖氨酸残基时, NBD 则无法结合 ATP, 表明 Walker A 上高度保守的赖氨酸残基是 ATP 的结合位点。突变分析实验发现, 两个 ATP 结合位点 Walker A 基序上任何一处基因编码序列的突变均能使 P-gp 丧失转运底物的功能, 提示 P-gp 分子中两个 ATP 结合位点对维持其功能缺一不可^[17]。ATP 的腺嘌呤与位于 Walker A 顶端的 A 环形成的环间 π - π 键, 是 ATP 和 NBD 能够结合的重要决定因素^[15]。Walker B 则在二价阳离子 (通常为 Mg^{2+}) 的介导下通过氢键与 ATP 结合, 二者还共同参与 ATP 的水解; 而 LSGGQ 序列、A 环、D 环、H 环和 Q 环则通过芳香族氨基酸与 ATP 的腺苷酸环相互作用。每个 NBD 的 Walker A、H 环、Walker B 和 Q 环合围形成一个可以容纳 ATP 分子的腔隙, 另一个 NBD 的 D 环和 LSGGQ 序列则关闭腔隙, 进而形成一种特殊的“ATP 三明治 (ATP sandwich)”结构。该结构形式有利于 ATP 自由能的有效释放, 便于 P-gp 构象的改变, 从而促进其对底物的识别和转运^[16]。

2.3 P-gp 转运功能机制

P-gp 跨膜转运功能机制尚未完全研究清楚, 目前有很多假说试图解释 P-gp 偶联 ATP 外排底物的过程, 其中疏水性真空清除泵 (hydrophobic vacuum cleaner, HVC) 理论得到了较广泛的认同^[18]。该假说认为 P-gp 转运底物过程主要分为四个阶段。首先, P-gp 分别与底物及两个 ATP 分子进行结合, 诱导底物外排循环过程的开始; 然后, 与 P-gp 结合的其中一个 ATP 分子发生水解并提供能量, 引起底物结合位点构象的改变, 进而导致 TMD 与底物之间亲和力的急剧下降并释放、排出底物, 此时 NBD 无法结合新的 ATP 分子; 随后, ATP 的水解产物 ADP 自动解离, 同时由于底物结合位点的亲和力仍然很低, 故暂时无法结合新的底物分子; 最后, 剩下的一个 ATP 分子水解并释放 ADP 和磷酸根离子, 驱使 P-gp 恢复起始构象并可结合新的底物分子和 ATP, 进入下一轮循环。

近年来也有研究发现, 在与 ATP 分子结合后, P-gp 底物结合位点的亲和力才明显下降^[18], 因此有学者认为 P-gp 构象的改变是由 ATP 分子的结合而非 ATP 分子的水解引起的, 该假说即是以 ATP 结合为核心的泵模型理论^[19]。该理论认为底物分子首先与 P-gp 特异性结合位点进行结合, 并加强了 ATP 与 NBD 的结合, 进而促进 NBD 二聚体的形成; TMD 在 NBD 二聚体的影响下发生构象改变, 将底

物结合位点暴露至细胞外, 亲和力降低, 释出底物; 最后, ATP 水解使二聚体分离, P-gp 恢复起始构象。简而言之, P-gp 的外排泵循环就像一架不断运转的风车, 动力来自于 ATP 水解或 NBD 二聚体, 底物结合位点则是调节装置, 依据结合底物的不同, 或加速或减速。

3 结语

很多研究表明, P-gp 在药物的吸收、分布、代谢和排泄等体内过程中都起着举足轻重的作用^[20-21]。临床上 90% 以上肿瘤患者的死亡在某种程度上均与肿瘤细胞的耐药有关, 而其中 P-gp 介导的抗癌药物外排增加、药效降低, 是 MDR 形成的主要原因^[22]。对 P-gp 的研究, 应首先明确其在细胞和分子水平上的具体转运机制, 进而合理设计药物, 有效干预或调节 P-gp 的功能, 达到增强药效、避免多药耐药产生的最终目的。不过, 在希望通过调节 P-gp 逆转或改善药物耐药的同时, 肯定会干扰 P-gp 的正常生理功能, 使外来物质或有害代谢产物在细胞内浓度增加, 危害身体健康。如何平衡两者之间的利害关系, 将是面临的一个不可避免的重大挑战。

参考文献

- [1] Hennessy M, Spiers J P. A primer on the mechanics of P-glycoprotein the multidrug transporter [J]. *Pharmacol Res*, 2007, 55(1): 1-15.
- [2] Yang X B, Liu K X. P-gp inhibition-based strategies for modulating pharmacokinetics of anticancer drugs: An update [J]. *Curr Drug Metab*, 2016, 17(8): 806-826.
- [3] Gupta P, Garg T, Tanmay M, et al. Polymeric drug-delivery systems: Role in P-gp efflux system inhibition [J]. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst*. 2015, 32(3): 247-275.
- [4] Dean M, Fojo T, Bates S. Tumour stem cells and drug resistance [J]. *Nat Rev Cancer*, 2005, 5(4): 275-284.
- [5] Ana Ferreira, Sarah Pousinho, Ana Fortuna, et al. Flavonoid compounds as reversal agents of the P-glycoprotein-mediated multidrug resistance: biology, chemistry and pharmacology [J]. *Phytochem Rev*, 2015, 14(2): 233-272.
- [6] Sauna Z E, In-Wha K, Amudkar S V. Genomics and the mechanism of P-glycoprotein (ABCB1) [J]. *J Bioenerg Biomembr*, 2007, 39: 481-487.
- [7] Loo T W, Bartlett M C, Clarke D M. Disulfide cross-linking analysis shows that transmembrane segments 5 and 8 of human P-glycoprotein are close

- together on the cytoplasmic side of the membrane [J]. *J Biol Chem*, 2004, 279(9): 7692-7697.
- [8] Linton K J. Structure and function of ABC transporters [J]. *Physiologist*, 2007, 22: 122-130.
- [9] Lee J Y, Urbatsch I L, Senior A E, et al. Nucleotide-induced structural changes in P-glycoprotein observed by electron microscopy [J]. *J Biol Chem*, 2008, 283(9): 5769-5679.
- [10] Pleban K, Kopp S, Cszasz E, et al. P-glycoprotein substrate binding domains are located at the transmembrane domain/transmembrane domain interfaces: a combined photoaffinity labeling-protein homology modeling approach [J]. *Mol Pharmacol*, 2005, 67 (2): 365-374.
- [11] Lugo M R, Sharom F J. Interaction of LDS-751 and rhodamine 123 with P-glycoprotein: evidence for simultaneous binding of both drugs [J]. *Biochemistry*, 2005, 44(42): 14020-14029.
- [12] Loo T W, Bartlett M C, Clarke D M. Methanethiosulfonate derivatives of rhodamine and verapamil activate human P-glycoprotein at different sites [J]. *J Biol Chem*, 2003, 278(50): 50136-50141.
- [13] Bain L J, LeBlanc G A. Interaction of structurally diverse pesticides with the human MDR1 gene product P-glycoprotein [J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 1996, 141(1): 288-298.
- [14] Higgins C F, Linton K J. The ATP switch model for ABC transporters [J]. *Nat Struct Mol Biol*, 2004, 11(10): 918-926.
- [15] Robert J. Resistance to cytotoxic agents [J]. *Curr Opin Pharmacol*, 2001, 1(4): 353-357.
- [16] Ambudkar S V, In-waha K, Sauna Z E, et al. The A loop, a novel conserved aromatic acid subdomain upstream of the Walker A motif in ABC transporters, is critical for ATP binding [J]. *FEBS Lett*, 2006, 4: 1049-1055.
- [17] Jones P M, George A M. The ABC transporter structure and mechanism: perspectives on recent research [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2004, 61(6): 682-699.
- [18] Rosenberg M F, Kamis A B, Collaghan R, et al. Three-dimensional structures of the mammalian multidrug resistance P-glycoprotein demonstrate major conformational changes in the transmembrane domains upon nucleotide binding [J]. *J Biol Chem*, 2003, 278(10): 8294-8299.
- [19] Linton K J, Higgins C F. Structure and function of ABC transporters: the ATP switch provides flexible control [J]. *Pfluegers Arch*, 2007, 453(5): 555-567.
- [20] Wang L, Wang C, Peng J, et al. Dioscin enhances methotrexate absorption by down-regulating MDR1 in vitro and in vivo [J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2014, 277 (2): 146-154.
- [21] Huo X, Liu Q, Wang C, et al. Enhancement effect of P-gp inhibitors on the intestinal absorption and antiproliferative activity of bestatin [J]. *Eur J Pharm Sci*, 2013, 50 (3/4): 420-428.
- [22] Chen T, Wang C, Liu Q, et al. Dasatinib reverses the multidrug resistance of breast cancer MCF-7 cells to doxorubicin by downregulating P-gp expression via inhibiting the activation of ERK signaling pathway [J]. *Cancer Biol Ther*, 2015, 16 (1): 106-114.