

# 水通道蛋白与白内障研究进展

魏远建, 徐国兴

基金项目: 中国国家自然科学基金面上资助项目 (No. 81070715)

作者单位: (350005) 中国福建省福州市, 福建医科大学附属第一医院 福建省眼科研究所

作者简介: 魏远建, 眼科硕士研究生, 主治医师, 研究方向: 晶状体病。

通讯作者: 徐国兴, 教授, 眼科学博士研究生导师, 研究方向: 晶状体病、视网膜病。 fjmuxuguoxing@hotmail.com

收稿日期: 2013-04-13 修回日期: 2013-06-18

## Research progress in aquaporins protein and cataract

Yuan-Jian Wei, Guo-Xing Xu

**Foundation item:** National Natural Science Foundation of China (No. 81070715)

Department of Ophthalmology, the First Affiliated Hospital of Fujian Medical University, Fuzhou 350005, Fujian Province, China

**Correspondence to:** Guo-Xing Xu. Department of Ophthalmology, the First Affiliated Hospital of Fujian Medical University, Fuzhou 350005, Fujian Province, China. fjmuxuguoxing@hotmail.com

Received: 2013-04-13 Accepted: 2013-06-18

### Abstract

• Water channel protein (aquaporins, AQP) mainly mediates the passive transport of free water along the osmotic pressure gradient to across biological membrane. It is highly selective for water. There are only two kinds of water channel protein in lens, lens epithelial cells express AQP1, lens fiber cells express AQP0, together they adjust the lens water metabolism, physiological functions and maintain the lens transparency, their abnormal expression can lead to cataracts. We reviewed the research of the water channel protein 0, 1 in recent years and discussed the relationship between water channel protein and cataract.

• **KEYWORDS:** aquaporins; lens; cataract

**Citation:** Wei YJ, Xu GX. Research progress in aquaporins protein and cataract. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2013;13(7):1341-1343

### 摘要

水通道蛋白 (aquaporins, AQP) 主要介导自由水沿渗透压梯度的被动跨生物膜转运, 对水有高度选择性。晶状体只有两种水通道蛋白, 晶状体上皮细胞表达的 AQP1 和晶状体纤维细胞表达的 AQP0, 它们共同调节晶状体水代谢, 维持晶状体生理功能及透明性, 其异常表达可导致白内障的发生。术文综述了近年来对水通道蛋白 0, 1 的研究, 并讨论水通道蛋白与白内障发生的关系。

**关键词:** 水通道蛋白; 晶状体; 白内障

DOI: 10.3980/j.issn.1672-5123.2013.07.12

**引用:** 魏远建, 徐国兴. 水通道蛋白与白内障研究进展. 国际眼科杂志 2013;13(7):1341-1343

### 0 引言

早在 1950 年代, 就有学者提出在细胞膜上存在水通道 (aqueous pores)。直到 1988 年, Agre 等从人类红细胞膜上纯化分离分子量为  $32 \times 10^6$  的 Rh 多肽时, 偶然鉴定到一种新的分子量为  $28 \times 10^6$  的整合膜蛋白, 把它称为类通道整合膜蛋白 (channel-like integral membrane protein, CHIP28)。1992 年, Preston 等通过在非洲爪蟾的卵母细胞中显微注射体外转录的 CHIP28 的 RNA 后, 卵母细胞在低渗溶液中迅速膨胀, 并于 5min 内破裂, 这一现象表明注射 CHIP28 的 RNA 后卵母细胞膜的水通透性有了明显提高。为了进一步确定 CHIP28 的功能, 将提纯的 CHIP28 构建在蛋白磷脂体中, 构建后的蛋白磷脂体对水的通透性增长了 50 倍。该实验首次证实 CHIP28 是一种水通道蛋白, 后由人类基因组委员会定名为 AQP1。随着研究的不断深入, 不断有新的 AQP 被发现, 迄今为止, 哺乳动物细胞膜上共发现 13 种 AQPs, 分别为 AQP0 ~ AQP12<sup>[1]</sup>, 其中在晶状体只有两种水通道蛋白, 即 AQP0 和 AQP1<sup>[2]</sup>。近年研究发现, AQP0, 1 与白内障的发生关系密切。

### 1 AQP0, 1 的结构、功能及调节

**1.1 AQP0, 1 的结构** AQPs 是一类高度保守的疏水小分子膜整合蛋白, 各种亚型之间蛋白序列及三维结构非常相似。AQP1 的一级结构由 2 个分别位于肽链两侧的重叠部分构成, 各自拥有天冬酰胺-脯氨酸-丙氨酸 (Asn-Pro-Ala, NPA) 特征性序列, 呈  $180^\circ$  中心对称排列。每个分子包括 6 个跨膜区域和 5 个环 (A、B、C、D、E), 其中: B、D 环及羧基、氨基末端均在胞内, A、C、E 环定位于质膜外侧。B、E 环显著疏水, E、B 环的任何变异都会引起水通道活性的下降; A 环有 N-连接糖基化位点; E 环 NPA 序列前的半胱氨酸是水通道蛋白的汞抑制部位<sup>[3]</sup>。水通道蛋白的三维结构及其完成水通透功能的机理的解释存在颇多争议, 其中“沙漏”模型<sup>[4]</sup> 是一种被普遍接受的解释。指出: 肽链中的 B 环和 E 环具有高度保守的天冬酰胺-脯氨酸-丙氨酸 (Asn-Pro-Ala, NPA) 特征性序列, B 环和 E 环折返进入膜双分子层, 并且分别与邻近的跨膜区形成半个孔道, 彼此对称分布, 2 个保守的 NPA 序列在膜的磷脂双层中间位置相互结合, 6 条跨膜区域在四周包围, 共同构成了一个供水分子通过的亲水通道, 其中的天冬酰胺-脯氨酸-丙氨酸 (Asn-Pro-Ala, NPA) 序列是水通道蛋白中构成孔道中心的序列, 这个特异的序列在三维结构上位于通道的核心。然而, AQP0 除了上述共同结构外, 还有其特异性, Gonen 等<sup>[5]</sup> 在研究 AQP0 的结构时发现, AQP0 是活体内已知的唯一形成膜节点的水通道。电子结晶照相术所展示的晶状体核心区 AQP0 蛋白排列成双层结晶状, 在胞膜上呈现出以 AQP0 为膜节点的结构, 且节点上的 AQP0

水孔是闭合的,而先前已确定结构的水通道均显示水孔为开放构象。

**1.2 AQP0,1 的功能** AQPs 发现以前,研究认为水通过自由扩散的方式穿透脂质双分子层,然而脂质双分子层的特征不足以解释如此大量的渗透作用所驱使的水转运,水通道的发现恰好解决了这一问题。AQPs 主要介导水沿渗透压梯度的被动跨生物膜转运,对水有高度选择性,在保持细胞内外环境的稳态平衡,完成生理功能方面发挥着重要的作用<sup>[6]</sup>。AQP1 发现时即已证实其对水有通透性,为证实 AQP0 也有确切的水通透性功能,Mulders 等<sup>[7]</sup>通过爪蟾卵母细胞实验发现:表达 AQP0 膜对水的转运力增加了 4~5 倍,而表达 AQP1 膜对水的转运力增加 35 倍。该实验证实了 AQP0 的水通透性,且对水的通透能力较 AQP1 明显更小。哺乳动物中,AQP0 仅存在于晶状体纤维细胞膜上,称主要内源性蛋白(major intrinsic protein MIP),是活体内已知的唯一形成膜节点的水通道,除对水有渗透性功能外,还具有黏附分子作用<sup>[8]</sup>,对维持晶状体透明起重要作用。

**1.3 AQP0,1 的调节** AQPs 对水的通透性有一定的调节能力, $H^+$  和  $Ca^{2+}$  可对 AQP0 发挥一定的调节作用,而对 AQP1 无明显影响。Kulandaiappan 等通过实验发现<sup>[9]</sup>,pH 值从 7.5 降至 6.5,哺乳动物晶状体 AQP0 对水的渗透性升高 2~4 倍; $Ca^{2+}$  可使哺乳动物内源性 AQP0 对水的渗透性提高 2~4 倍,使小鼠的晶状体 AQP0 对水的渗透性增加 2.5 倍;然而,pH 变化和  $Ca^{2+}$  浓度改变并未引起 AQP1 对水渗透性有影响。他们认为, $H^+$  变化对 AQP0 的水渗透性调节是通过  $H^+$  与位于细胞外的第 40 位的组氨酸(His40)结合来介导的; $Ca^{2+}$  是通过钙调节蛋白结合 AQP0 蛋白 C-羧基端邻近区域的结合,进而调节其对水的渗透性。由于 AQP1 缺乏 His40 和钙调节蛋白结合的 C 羧基端邻近区域,故对  $H^+$  和  $Ca^{2+}$  均不敏感。

## 2 AQP0,1 在晶状体的分布

晶状体起源于表皮外胚层细胞,成熟的晶状体由三部分组成,即囊膜、晶状体上皮和晶状体纤维组成,在晶状体发育过程中,赤道部的前端晶状体上皮细胞不断分裂形成晶状体纤维,形成皮质层状结构。研究发现,正常晶状体上皮细胞(Lens epithelial cells,LECs)中可见到 AQP1 表达,晶状体纤维细胞可见 AQP0 表达。AQP1 在发育过程中不断转化成 AQP0 成为晶状体纤维细胞的主要内在蛋白,两者共同调节晶状体水代谢,维持晶状体生理功能及透明性。

## 3 AQP0,1 与白内障的关系

白内障是世界首要的致盲性眼病,其发病机制比较复杂,与营养、代谢、环境和遗传等多种因素有关,是机体内外各种因素对晶状体长期综合作用的结果。临床上较常见白内障类型为年龄相关性白内障、先天性白内障及糖尿病性白内障。目前研究发现,AQP0,1 与年龄相关性白内障、先天性白内障及糖尿病性白内障的发生关系密切。

**3.1 AQP0,1 与年龄相关性白内障** 年龄相关性白内障是最为常见的白内障类型,多见于 50 岁以上的中、老年人,随年龄增加其发病率升高,80 岁以上的老年人,白内障的患病率为 100%,其病因及发病机制迄今尚未完全阐明,可能是许多因素的综合结果。研究表明,晶状体内的 AQP0,1 的表达变化与年龄相关性白内障的发生、发展密切相关。各种原因引起晶状体 AQP0,1 的减少及表达降低,均会造成晶状体生理功能紊乱,导致晶状体混浊,引起

白内障发生。

**3.1.1 氧化损伤** 年龄相关性白内障的发生、发展中,位于晶状体前囊膜的 LECs 被自由基逐渐氧化是目前被学者公认的主要病因<sup>[10]</sup>。张虹等<sup>[11]</sup>在研究水通道蛋白与氧化性白内障实验中发现,LECs 仍能够见到 AQP1 的表达,但其数量与正常大鼠 LECs 相比明显减少。表明 AQP1 表达的变化与氧化性白内障的发生相关。据他们推测,氧化损伤主要以直接和间接两种方式影响 AQP1 在 LECs 膜的表达。AQP1 的分子结构第 189 位氨基酸残基是半胱氨酸(-SH),极易被氧化,初步氧化后,蛋白质结构展开,显露出一些其他基团,进一步氧化,可导致蛋白质聚合和交叉链形成;LECs 胞膜上  $Na^+-K^+-ATP$  酶的巯基被自由基氧化,导致  $Na^+-K^+-ATP$  酶的功能发生障碍,电解质平衡紊乱,渗透梯度难以形成,使作为渗透压感受器的 AQP1 失去了其转运水的驱动力,从而降低其选择性快速转运水分子功能的发挥,导致 LECs 代谢障碍,晶状体纤维肿胀、变性。随年龄增加,患病时间的延长,LECs 上 AQP1 表达量进一步减少,其转运水功能显著降低,晶状体循环障碍,代谢废物蓄积,晶状体混浊,导致年龄相关性白内障发生。

**3.1.2 磷酸化降低** 晶状体不含血管,其营养靠房水和玻璃体通过扩散方式获得,仅依靠简单扩散无法满足其代谢需要,晶状体细胞需要充足的水转运才能维持其自我平衡和功能稳定,AQP1 的水转运能力下降必将引起白内障。AQP1 功能受 AQP1 蛋白磷酸化和去磷酸化的调节,AQP1 在磷酸化状态时,膜对水的转运能力远大于非磷酸化状态<sup>[12]</sup>。AQP1 磷酸化为 cAMP 依赖性,在某些因素作用下,腺苷酸环化酶被激活,使细胞内 cAMP 增加,进而活化蛋白激酶 A(PKA),PKA 催化水通道蛋白上的丝氨酸磷酸化,从而增加膜对水的通透性。研究表明,年龄相关性白内障晶状体上皮细胞的 cAMP 含量显著下降,使 AQP1 磷酸化水平降低,AQP1 对水的转运能力明显下降,晶状体代谢出现障碍,晶状体混浊,白内障形成。

**3.1.3 离子平衡紊乱** 目前研究表明,晶状体细胞内的  $Ca^{2+}$  浓度失调在年龄相关性白内障的发病机制中起到重要作用。实验表明,75% 白内障患者晶状体内的  $Ca^{2+}$  浓度比正常人晶状体的高约 4 倍。 $Ca^{2+}$  细胞内向被动扩散主要通过细胞膜上非特异性阳离子通道实现,其逆向转运出细胞由细胞膜(亦包括肌浆网和线粒体膜)Ca-ATPase 介导。随着年龄增加,进入细胞内的  $Ca^{2+}$  增加,Ca-ATPase 活性相应增强,以保持细胞内的  $Ca^{2+}$  浓度不出现明显升高。然而,年龄相关性白内障患者中,LECs 胞膜对钙离子通透性增强,而  $Ca^{2+}-ATPase$  活性却下降约 50%,造成晶状体内  $Ca^{2+}$  浓度显著增加<sup>[13]</sup>。晶状体内  $Ca^{2+}$  浓度增加,使 LECs 膜上的  $Na^+-K^+-ATP$  酶活性下降,cAMP 显著减少,进一步使 LECs 膜上的 AQP1 表达降低。 $Ca^{2+}$  浓度增加还通过激活 calpain-2,引起晶状体内多种蛋白质水解导致白内障发生<sup>[14]</sup>。目前研究已证实年龄在年龄相关性白内障的 LECs 膜 AQP1 及晶状体纤维细胞 AQP0 表达均较正常晶状体显著减少<sup>[15,16]</sup>。AQP1 表达降低引起 LECs 水转运功能失调,致使晶状体内环境紊乱,引起晶状体纤维肿胀、变性、混浊、排列错乱;随晶状体混浊程度加重,使 AQP0 的表达减少,而 AQP0 表达减少,促进白内障的进一步发展,由此形成恶性循环,使年龄相关性白内障进展加速。

**3.2 AQP0,1 与先天性白内障** 先天性白内障是导致儿童失明的主要原因之一,占儿童致盲眼病的第二位。先天

性白内障中,约有一半的病例与遗传有关,绝大多数表现为常染色体显性遗传。AQPO 在晶状体中呈高表达状态,占晶状体膜蛋白总量的 50%,是成人晶状体中含量丰富的膜连接蛋白,编码基因位于人染色体 12q13,其功能仅在终末分化的晶状体纤维细胞中表达<sup>[17]</sup>,AQPO 与先天性白内障发生关系密切。

AQPO 基因突变在实验小鼠及人类均导致先天性白内障发生,突变的 AQPO 基因因影响蛋白质翻译,使 AQPO 羧基末端的氨基酸改变,导致 AQPO 在细胞膜上四聚体空间构象改变,使 AQPO 水孔由开放状态变为关闭,并且还影响 AQPO 的细胞粘附功能,从而引起了晶状体的水代谢障碍,导致白内障发生<sup>[18]</sup>。研究发现,AQP1 消除或突变的小鼠及人类,在正常的环境下均不会导致白内障发生,然而在小鼠体内外实验发现,AQP1 缺陷在应激环境下引起白内障,在人类应激状态下是否发生白内障目前尚无报道。虽然 AQP1 突变小鼠,其晶状体结构及透明度与正常小鼠晶状体无明显差别,但是在体内或体外实验均发现,AQP1 缺陷明显加速其白内障的发生<sup>[19]</sup>。AQPO 突变或缺失却能够引起人常染色体显性遗传性白内障,表明 AQPO 除了水通透性作用外,在维持晶状体透明中还有其独特的功能。最近,Varadaraj 等<sup>[20]</sup>通过构建 TgAQP1<sup>+/+</sup>/AQPO<sup>-/-</sup>小鼠模型在哺乳动物体内证实了 AQPO 除具有水通道作用外,还具有 AQP1 所不具有的细胞黏附分子的重要功能,其在维持晶状体透明结构起极其重要作用。

**3.3 AQPO,1 与糖尿病性白内障** 糖尿病性白内障是糖尿病最常见的并发症,其特点是进展较快、常双眼同时发病,是严重的致盲性眼病。糖尿病性白内障的发病机制复杂,是多因素、多途径共同作用的结果。研究发现,晶状体 AQPO,1 变化与糖尿病性白内障发生、发展有密切关系。

林雯等<sup>[21]</sup>发现糖尿病性白内障大鼠晶状体上的 AQPO,1 表达呈双相变化,即早期代偿性增加;晚期失代偿减少。在糖尿病早期,因血糖升高,进入晶状体内的葡萄糖增多,己糖激酶被饱和醛糖还原酶活化,将葡萄糖转化为山梨醇在晶状体内蓄积,晶状体细胞内渗透压升高。高渗透压使 AQPO,1 表达增加,从而增加 AQP 依赖的水的通透性;同时,蛋白激酶 A 磷酸化 AQP1,亦增加水的通透性。AQPO 对水的通透性明显低于 AQP1,且糖尿病时 AQPO 的糖基化使 AQPO 的构象发生改变,与钙调节蛋白结合能力下降<sup>[22]</sup>,引起晶状体内大量水分蓄积,导致晶状体膨胀。随着疾病发展,因葡萄糖代谢成山梨醇和果糖消耗大量的 cAMP,ATP 生成减少;另一方面,cAMP 依赖的 AQP1 磷酸化过程必须有 ATP 的分解来提供能量,又消耗大量的 ATP,因能量代谢障碍,使晶状体囊膜的正常生理功能遭到破坏,导致 AQPO,1 表达下降,白内障进一步发展。此外,晶状体中 AQPO 四周由连接子(Connexons,Cx)相连且有序地排列于晶状体纤维细胞上,这是 AQPO 可调节性水通透作用所必须的。Mangenot 等<sup>[23]</sup>通过原子力显微镜观察和生化化学的方法,分析比较糖尿病性白内障与正常晶状体细胞膜的连接超微结构发现,糖尿病性白内障晶状体的连接子退化,而且 AQPO 排列紊乱,影响晶状体纤维细胞的能量代谢,导致糖尿病性白内障发生。

#### 4 结语

目前,白内障的确切发病机制尚未完全明了。AQPO,1 与白内障的关联性越来越被研究者所重视,已取得相关实验证据的支持。但是,AQPO,1 与白内障发生、发展中的确切作用机制尚未完全清楚。当前对 AQPO,1 与白内障

的研究仍处于初始阶段,其对水的运输、信号转导调节机制及其与白内障发病机制的详细关系及可能的治疗药物等还有待更深入的研究。

#### 参考文献

- Jeyaseekab K, Sepramaniam S, Armugam A, et al. Aquaporins: a promising target for drug development. *Expert Opin Ther Targets* 2006;10(6):889-909
- Kulandaiappan V, Sindhu SK, Richard TM, et al. Functional expression of aquaporins in embryonic, postnatal, and adult mouse lenses. *Developmental Dynamics* 2007;236:1319-1328
- 刘树荣,张少斌.水通道蛋白结构与功能研究进展. *现代预防医学* 2007;34(12):2260-2262
- Jung JS, Preston GM, Smith BL, et al. Molecular structure of the water channel through aquaporin CHIP, the hourglass model. *Biol Chem* 1994;269:1464-1465
- Gonen T, Sliz P, Kistler J, et al. Aquaporin-0 membrane junctions reveal the structure of a closed water pore. *Nature* 2004;429:193-197
- Verkman AS, Ruiz-Ederra J, Levin MH. Functions of aquaporins in the eye. *Prog Retin Eye Res* 2008;27(4):420-433
- Mulders SM, Preston GM, Deen PM, et al. Water channel properties of major intrinsic protein of lens. *Biol Chem* 1995;270:9010-9016
- Gonen T, Walz T. The structure of aquaporins. *Q Rev Biophys* 2006;39(4):361-396
- Varadaraj K, Kumari S, Shiels A, et al. Regulation of aquaporin water permeability in the lens. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2005;46(4):1393-1402
- 竺向往,卢奕.晶状体老化过程中的损伤和保护机制研究进展. *国际眼科纵览* 2007;31(6):368-372
- 张虹,张金玲.水通道蛋白在大鼠氧化性白内障晶状体上的表达. *华中科技大学学报(医学版)* 2007;36(2):374-376
- Conner MT, Conner AC, Brown JE, et al. Membrane trafficking of aquaporin1 is mediated by protein kinase C via microtubules and regulated by tonicity. *Biochemistry* 2010;49(5):821-823
- Sumerkina VA, Popov GK, Voronova LV. In Vitro Study of the Role of Lenticular Epithelial Calcium Channels and Aquaporins in the Development of Cataract. *Bull Exp Biol Med* 2008;145(2):184-187
- Biju PG, Rooban BN, Lija Y, et al. Drevogenin D prevents selenite-induced oxidative stress and calpain activation in cultured rat lens. *Mol Vis* 2007;13:1121-1129
- 张虹,彭洁,胡维琨,等.透明晶状体和老年性白内障晶状体上皮细胞水通道蛋白-1 的表达. *华中科技大学学报(医学版)* 2004;33(3):360-363
- 高炜,赖建武,李斌,等.老年性白内障晶状体纤维细胞水通道蛋白-0 表达变化. *细胞与分子免疫学杂志* 2011;27(3):320-321
- Gu F, Zhai H, Li D, et al. A novel mutation in major intrinsic protein of the lens gene (MIP) underlies autosomal dominant cataract in a Chinese family. *Mol Vis* 2007;13:1651-1656
- Chepelinsky AB. Structural function of MIP/aquaporin0 in the eye lens: genetic defects lead to congenital inherited cataracts. *Handb Exp Pharmacol* 2009;190:265-297
- Ruiz-Ederra J, Verkman AS. Accelerated cataract formation and reduced lens epithelial water permeability in aquaporin-1 deficient mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2006;47:3960-3967
- Varadaraj K, Kumari SS, Mathias RT. Transgenic expression of AQP1 in the fiber cells of AQPO knockout mouse: Effects on lens transparency. *Exp Eye Res* 2010;91:393-404
- 林雯,谢茂松,徐国兴,等.水通道蛋白 0,1 在 ST2Z 糖性白内障发病机制中的研究. *福建医科大学学报* 2009;43(11):6
- Rose KM, Wang Z, Magrath GN, et al. Aquaporin0-calmodulin interaction and the effect of aquaporin0 phosphorylation. *Biochemistry* 2008;47:339-347
- Mangenot S, Buzhynskyy N, Girmens JF, et al. Malformation of junctional microdomains in cataract lens membranes from a type II diabetes patient. *Pflugers Arch* 2009;457(6):1265-1274