

- HPV-16 IgG seropositivity and cancer of the cervix, anogenital organs, oral cavity and pharynx, oesophagus and prostate in a black South African population. *Infectious Agents and Cancer*,2007,2:6
- 7 Moubayed P., Mwakyoma H, Schneider D. T. High frequency of human papillomavirus 6/11, 16, and 18 infections in precancerous lesions and squamous cell carcinoma of the conjunctiva in subtropical Tanzania. *Am J Clin Pathol*,2004,122(6):938-943
 - 8 Bosch F. X., Manos M. M., Munoz N., *et al.* Prevalence of human papillomavirus in cervical cancer: a worldwide perspective. *J Natl Cancer Inst*,1995,87:796-802
 - 9 Far A. E., Aghakhani A, Hamkar R, Ramezani A, Pishbigar HF, Mirmomen S, Roshan MR, Vahidi S, Shahnazi V, Deljoodokht Z. Frequency of human papillomavirus infection in oesophageal squamous cell carcinoma in Iranian patients. *Scand J Infect Dis*,2007,39(1):58-62
 - 10 Gumus M., Yumuk P. F., Salepci T., *et al.* HPV DNA frequency and subset analysis in human breast cancer patients'normal and tumoral tissue samples. *J Exp Clin Cancer Res*,2006,25(4):515-521
 - 11 Lörincz A. T., Lancaster W. D., and Temple G. F. Cloning and characterization of the DNA of a new human papillomavirus from a woman with dysplasia of the uterine cervix. *J. Virol*,1986,58:225-229
 - 12 Hama N., Ohtsuka T., Yamazaki S. Detection of mucosal human papilloma virus DNA in bowenoid papulosis, Bowen's disease and squamous cell carcinoma of the skin. *J Dermatol*,2006,33(5):331-337
 - 13 Bosch F X, Lorincz A N, Mu? oz N, *et al.* The causal relation between human papillomavirus and cervical cancer. *J Clin Pathol*,2002,55:244-265
 - 14 Bulkman N W J, Bleeker M C G, Berkhof J., *et al.* Prevalence of types 16 and 33 is increased in high-risk human papillomavirus positive women with cervical intraepithelial neoplasia grade 2 or worse. *Int J Cancer*,2005,117:177-181
 - 15 16. Syrjänen S. HPV infections and tonsillar carcinoma. *J Clin Pathol*,2004,57(5):449-455
 - 16 17Huang S, Afonina I, Miller B A,*et al.* Human papillomavirus types 52 and 58 are prevalent in cervical cancers from Chinese women. *Int J Cancer*,1997,70:408-411
 - 17 18Huang S L, Chao A, Hsueh S, *et al.* Comparison between the Hybrid Capture II Test and an SPF1/GP6+ PCR-based assay for detection of human papillomavirus DNA in cervical swab samples. *J Clin Microbiol*,2006,44(5):1733-1739
 - 18 Stevens M P, Tabrizi S N, Quinn M A, *et al.* Human papillomavirus genotype prevalence in cervical biopsies from women diagnosed with cervical intraepithelial neoplasia or cervical cancer in Melbourne, Australia. *Int J Gynecol Cancer*,2006,16(3):1017-1024

(收稿:2009-12-24)

P2X₂ 和 P2X₄ 受体的调制

徐 珍 张玉芹

ATP 是细胞内组成成分和能源物质,但它也可以作为许多细胞表面 P2 受体的胞外配体。1972 年, Burnstock 首次提出嘌呤受体的概念,用来描述细胞膜腺苷受体和 ATP 受体。Harden 等 1995 从分子生物学上证实 ATP 受体的存在。据国际药理协会的分类命名,胞外腺苷的受体叫 P1,是一类 G 蛋白偶联受体(G protein coupled receptors, GPCRs),对腺苷敏感,包括 A₁、A_{2A}、A_{2B}、A₃ 4 类;胞外核苷酸的受体称为 P2,包括两个类别:P2X 和 P2Y。P2Y 是 GPCRs;P2X 是配体 ATP 门控的离子通道(ligand gated ion channels, LGICs),当胞外 ATP 结合时 P2X 通道打开,通道允许阳离子通过。在哺乳动物细胞内,有 5 个 P2Y

(P2Y₁、P2Y₂、P2Y₄、P2Y₆、P2Y₁₁)和 7 个 P2X(P2X₁₋₇)受体已被克隆并阐明其药理学特性。IUPHAR2001 年对 PX 受体及其亚基的报告表明,P2X 受体的研究已成为当今生物医学研究的活跃领域。P2X 受体在许多组织中广泛存在,其功能与信号转导有关。近年对 P2X 受体亚基的结构、分布、功能、药理和生物物理学特性的研究做了大量的工作^[1]。

一、P2X 受体的结构概述

P2X₁₋₇受体的亚单位是由胞内的 C 末端和 N 末端,M1、M2 两个跨膜结构域组成,连接 M1 和 M2 的是由约 300 个氨基酸组成的亲水性的胞外环。每一个亚型是由 3~6 个亚单位形成的同聚体或者异聚体构成。P2X 受体的 7 个亚单位经鉴定都分布于 CNS 并且组合成不同的同聚性通道和异聚性通道,例如,P2X_{2/3}和 P2X_{1/5}。存在于突触前膜和突触后膜,还有神经胶质细胞上。P2X 受体允许快速的、非选择性的阳离子通过细

基金项目:湖北省自然科学基金(2004ABA152);湖北省教育厅重点项目(D20081108)

作者单位:430065 武汉科技大学医学院生理学教研室

胞膜,游离的钙离子能穿透通道并且诱发胞内钙离子依赖性系列反应,因此,单个细胞内钙离子成像,加上电生理记录,提供给 P2X 通道活性有价值的监控工具^[7,8]。

二、P2X₂ 的分布和药理学特性

多种神经细胞表达 P2X₂ 受体。P2X₂ 转录本限制在端脑皮质下的中隔核、背侧丘脑的前核和室旁核、视丘下部、迷走神经背动支、交感神经背根等区域。P2X₂ 受体在输精管精液中表达。P2X₂ 有两个剪接变体。P2X₂ 受体是 Ca²⁺ 通透性受体,细胞外 2 价阳离子对该受体的作用表现为:首先关闭开放的离子通道,Ca²⁺ 作用的 EC₅₀ 值为 5mmol/L,其阳离子作用强度为 Mn²⁺ > Mg²⁺ > Ca²⁺ > Ba²⁺;其次,减少可能开放的离子通道,Ca²⁺ 作用的 EC₅₀ 值为 1.3mmol/L,其阳离子作用强度为 Ca²⁺ > Mg²⁺ > Ba²⁺ > Mg²⁺^[5]。

三、P2X₄ 的分布和药理学特性

P2X₄ 受体最早从脑内被克隆,在神经系统内分布最广泛,对 ATP 类似物 α 、 β - MeATP 及拮抗剂 suramine 和 PPADS 不敏感。原位杂交结果表明 P2X₄ 受体 mRNA 阳性神经元见于嗅球、大脑皮质、背侧丘脑和下丘,但其在延髓及脑桥区域(包括网状结构、前庭核、网状核)更密集。P2X₄ 受体免疫组化染色阳性结构在孤束核和前庭中央核内最密集。另外,P2X₄ 转录本也在肝脏、肾脏、脾脏、肺、肠、睾丸、肾上腺、唾液腺、膀胱、输精管、大动脉、许多内分泌组织和激素分泌细胞系中表达^[3]。一般而言,P2X₄ 受体需形成异聚体后,才具有生物学活性。P2X₄ 受体被 ATP 及其同系物激活后,主要是通过引起细胞内钙离子浓度的显著升高,将信号传递给下游的信号分子。但 P2X₄ 受体的这种作用不具有选择性。P2X₄ 受体同时还可以通过增加细胞内钠离子的浓度而产生动作电位^[4]。P2X₄ 受体可被 ATP 激活,但不能被 α 、 β - MeATP 激活,当 ATP 作用时间短时,P2X₄ 受体类似于阳离子选择性离子通道受体,Ca²⁺ 通透性高,当 ATP 作用时间持续几秒时,P2X₄ 受体会对更大的组织阳离子(如 N 甲基 - D - 葡聚糖)通透^[5]。

四、P2X 受体功能的调制

1. 痕量金属对 P2X 受体的变构性调制:锌和铜作为调制剂所起的作用很大程度取决于 P2X 受体亚单位的组成,而相对较少取决于金属浓度。这些金属主要产生两种效果:增强或抑制 ATP 激活电流,观察产生结果的浓度范围在 0.3 ~ 100 μ mol/L。例如,锌对 P2X₁ 受体活性的抑制具有浓度依赖性,锌或者铜增强 P2X₂ 受体活性,锌对 P2X₃ 受体也有增强作用,

然而铜对这种受体却没有明显作用。但是,与 P2X₂ 或 P2X₃ 受体相反,锌和铜都能抑制 P2X₇ 受体门极电流。一个有趣的例外例子是 P2X₄ 受体,锌对该嘌呤受体增强作用但铜抑制,展现出更加复杂的调制方式。向爪蟾卵母细胞注射不同 P2X 受体获得电生理图像,显示锌和铜的选择性和可逆性的调制作用,强调这些金属对 P2X 受体的特征性作用。该图像也显示每种 P2X 受体亚型拥有不同的电生理特性,包括 ATP 激活和脱敏速度。我们观察到锌对 P2X₂ 和 P2X₄ 受体作用方式是 ATP 浓度 - 反应可逆性的平行左移。锌的作用方式提示该金属结合到调节位点上可以增加受体对 ATP 的亲合力。变构调节必须在某种程度上改变受体构造产生更大通道的传导性。铜作为抑制调制剂,至少在 P2X₄ 和 P2X₇ 受体遵循非竞争性抑制的方式,提示铜改变受体构造通过变构结合的方式,结果它减低受体对 ATP 反应,最终关系到通道 - 激活电流的减少。

为了检测和确定痕量金属调制 P2X 受体中起作用的主要氨基酸残基,定点突变是格外有用的工具。该分子生物学手段可以造成单个氨基酸突变,并表达在爪蟾卵母细胞或 HEK 细胞,使用电生理技术测量金属调制,因此可以确定突变的特定残基的重要程度。使用这种途径我们已经鉴定出在金属调制中起关键作用的特定的氨基酸,这些残基是协调痕量金属的特定变构位点的一部分,而不是间接影响痕量金属和 ATP 之间相互作用单位结果。

(1) 金属离子对 P2X₂ 的变构性调制:锌和铜促进 ATP 门控电流以相同的方式,于是得出假设两种痕量金属在受体细胞外结构域的金属结合位点上可能发生相互作用。因此推测受体突变可能会修饰锌的作用效果,同样的修饰作用也会发生在铜的作用效果上。这看上去情况属实,除了极少数例外,因为大多数的研究表明突变体之间的并行受体活性与锌或者铜有关。因为组氨酸杂环系统通常参与协调锌或者铜,细胞外组氨酸的突变体应该可以帮助我们确定 9 个组氨酸中哪些是这两种金属调制必不可少的。在细胞外 9 种组氨酸中,His - 120 和 His - 213 被报道在锌和铜的增强调制中起关键作用;这两种组氨酸残基中任何一个被替代形成单独的受体突变体,都对两种金属有抵抗力。此外,最近许多报道推测这两种残基在受体三聚体毗邻亚单位紧密接触点上,形成锌亚单位间的结合位点,很有可能也是铜的。亚单位间的金属结合位点在先前的环状核苷酸通道中得到证

明。除了 His - 120 和 His - 213 之外,若干残基已经被涉及铜和锌的调制。这些残基 (His - 192、His - 245 和 His - 319) 似乎仅仅部分参与金属调制,提示起稳定金属结合位点的作用。此外,稳定转染表达在 HEK293 细胞上的 P2X₂ 受体的单个通道记录提示铜增加 P2X₂ 通道感受器开启以协作的方式。该结果的合理解释是痕量金属可能在受体解剖结构的不同水平发挥作用。

为了确定受体的特定金属结合位点并确定是否其他金属也与痕量金属调节位点有相互作用,其他的 2 价金属也被检验^[6]。不管是在人体还是在实验诱导的大鼠身上注射 Mg²⁺ 都可使得某种形式的疼痛缓解, Mg²⁺ 缺乏可以使得痛觉增敏; Mg²⁺ 的镇痛作用在中枢可能和 NMDA 有关,在外周可能涉及其他的神经递质。Mg²⁺ 却是 P2X₂ 的高效抑制剂。浓度范围在 10 ~ 100 μmol/L, 镉、汞、镍、钡和钴能增强 P2X₂ 受体活性; 铂对 P2X₂ 受体没有任何的作用,揭示对于 P2X₂ 受体有某种程度上的特异性。此外,不同的金属对 ATP 电流的增强级别也不同,铜是最有效的, 10 μmol/L 就可引出增加了 25 个褶皱的 10 μmol/L ATP 激活电流。

汞是一种能导致脑认知功能永久性退化的金属,能引起特别的关注原因是一些对铜不敏感的受体突变体并不能消除汞的抑制调节作用。我们因此有充分的理由说明铜和汞必定作用于单独的不同的位点。为了能更好地解释汞的作用,我们检验嵌合体 P2X_{4/2a} 和 P2X_{4/2b} 受体。这些嵌合体受体的胞外域与 P2X₄ 受体相似,然而跨膜和胞内区域是 P2X₂ 受体表型。此外,还有 P2X₂ 受体的结合变异体,在受体的羧基末端缺乏 69 氨基酸片段。初步数据提示汞与 P2X₂ 受体的 P2X_{2a} 剪接变异体胞内的半胱氨酸有交互作用。很明显 P2X_{2a} 受体的 Cys - 430 的巯基作为细胞内氧化还原剂的传感器,由于过氧化氢浓度依赖性增加 ATP 门控电流。与胞内有汞和过氧化物的位点一致,汞和过氧化氢对 P2X₂ 受体突变体 C430A 作用被消除,提示胞内的半胱氨酸必定参与汞的抑制调节,于是我们提出胞内的 Cys - 430 在受体的活动中起中心作用,很可能作为胞内氧化还原剂的传感器。

(2) 金属离子对 P2X₄ 的变构性调制: 正如前面所提到的, P2X₄ 受体是特别有趣的并且不同于剩余的 P2X₂ 受体成员,因为锌和铜对 ATP 门控电流有相反的效应,该特点意味着它是分析受体是否对锌和铜包含两个独立的变构调节位点的理想模型。还有一

种可能就是这些金属对共同的变构调节金属识别位点作用方式不同。关于胞外的组氨酸,作为锌和铜作用 P2X₂ 受体的配体的主要氨基酸,该受体仅仅包含 3 个胞外组氨酸的杂环系统,这 3 种组氨酸中,仅仅 His - 140 在铜诱导抑制中起决定性作用。除了铜对 H140A 突变体有抵抗力外,锌的增强作用显著增加并改变金属浓度 - 反应曲线,从野生型受体的贝形到 S 形曲线。这些结果的合理解释是 P2X₄ 受体拥有两个独立的、不同的变构调节位点用于金属调节。一个是抑制剂结合位点对铜有高亲和力但是锌的作用浓度要高于 10 μmol/L。另一个变构调节位点是增强剂位点用于锌诱导的增强作用。由于锌对两个位点有不同的亲和力,所以野生型 P2X₄ 受体的最终效果是双相贝形曲线。最近有研究确定这两种独立的、不同的变构调节位点存在于 P2X₄ 受体。在 His - 140 附近的 Cys - 132 是锌增强作用的关键因素,因此必定是增强位点的一部分。此外, C132A 突变体对金属诱导的增强作用有抵抗力,但是始终抑制锌,这些结果在 C126A 突变体中未观察到,确定 Cys - 132 对锌增强作用的特征性并提示该残基也许处于自由形态的自身结构来解释对锌的作用效果。另外也确定残基 (Asp - 138) 是抑制剂位点的一部分。P2X₄ 受体除了细胞外增强剂和抑制剂位点外,对于 2 价金属也许还有第 3 个变构调节位点,因为汞与铜对该受体的作用近似,它却极强地抑制了对铜有抵抗力的 H140A 突变体的功能。这个具有争议的第 3 变构调节位点的定位至今还未研究清楚。就像 P2X₂ 受体一样,我们也检验是否其他金属也与 P2X₄ 受体的两个调节位点相互作用。镉与锌的作用相似,尽管汞的作用与 His - 140 无关,但是它却引出了与铜相似的抑制作用。钴也不可逆地增强 ATP 激活电流,然而锰、钡、铅和镍对 P2X₄ 受体活性没有任何的作用^[6]。

2. pH 值对 P2X 受体的调制: ATP 诱导电流的改变出现的很快,当 pH 值复原的时候消失的也很快。我们因此推断原因来自胞外的而非胞内的改变。有实验指出胞内的 pH 值改变 (6 ~ 9) 并不会导致 ATP 对 P2X₂ 受体作用的明显变化。pH 值的改变对电流的峰值缺乏影响,尽管需要单通道研究或者测量渗透性来论证后者的可能性,但是更倾向于改变的是配体或者结合位点的形式,而不是改变通道孔。有两个理由说明改变的并非 ATP 自身的形式。首先,一些受体的电流增加而另外一些受体电流却减少。其次,当 pH 改变范围在 6.3 ~ 9.3 时,溶液中使用 ATP⁴⁻,

MgATP²⁻和CaATP²⁻提示改变<10%。对比P2X₂和P2X₄受体对pH值的敏感性不同,直接原因可能是胞外环组氨酸残基组成不同。推测有个属于P2X₂受体的特定组氨酸残基位点,才可以解释唯独该受体在pH值低时电流增加的现象,但是也似乎少不了焦碳酸二乙酯的作用。负责pH作用受体的特定氨基酸仍需要进一步的研究。酸化可以抑制P2X₄受体介导的电流提示改变半个电位的pH值可以减少ATP的效应。如果ATP与谷氨酸盐共同作用于中枢突触,任何伴随的酸化都可能降低它的效应。同样的,神经元的活动或者其他原因导致pH值改变都可能改变ATP的效应。可以评价这些作用通过直接检验pH值对ATP介导的突触传递的影响^[11]。

3. 乙醇对P2X受体的调制:乙醇对ATP激活电流的作用最早的实验始于重组的P2X₄受体,发现乙醇能抑制该受体的ATP激活电流并具有浓度依赖性。近些年有研究比较P2X₂和P2X₄受体对乙醇的敏感性。结果发现乙醇对P2X₂和P2X₄受体都具有可逆性的抑制,而且都具有浓度依赖性。P2X₂对乙醇的敏感性显著低于P2X₄受体提示P2X受体对乙醇的敏感性是与亚基有关的^[9]。

4. pH值和Zn²⁺能改变ATP激活电流对乙醇的敏感性:既然乙醇能抑制ATP激活电流通过降低受体对ATP的亲合力,细胞外的pH和Zn²⁺也能通过改变激动剂的亲合力来调制P2X受体,ATP门控通道对乙醇的敏感性能否被细胞外的pH和Zn²⁺调制已经被研究。pH和Zn²⁺都能改变乙醇抑制的ATP激活电流。酸化到pH=6.8能将乙醇的浓度-反应曲线平行右移,将乙醇的EC₅₀从72mmol/L增加到120mmol/L(ANOVA;P<0.005),然而碱化到pH=7.6引起乙醇浓度-反应曲线平行左移,将乙醇的EC₅₀从72降低到38mmol/L(ANOVA;P<0.005)。相似的,Zn²⁺能将乙醇的浓度-反应曲线平行左移,乙醇的EC₅₀从72mmol/L降低到47mmol/L(ANOVA;P<0.005)^[10]。

5. 胞内磷酸化性调制:近年研究证明:ATP受体功能可以被一些神经递质所调制。P物质和缓激肽能增强P2X₃或者P2X_{2/3}受体介导的电流,SP对P2X嘌呤受体的增强作用为非竞争性的,可能是由于SP(NK1)受体激活后通过胞内转导,从而使ATP受体胞内磷酸化的结果^[2]。

五、问题和展望

P2X受体的调制机制可以为临床的药理应用提供理论依据和新的治疗途径,这些年对P2X受体的调制

重点在三个因素上:痕量金属、乙醇、pH和参与调制的氨基酸,确定选择性参与痕量金属调制的主要氨基酸,可以为离子通道调制和脑兴奋性的分子理论提供结构基础,而且也许在不久的将来,选择性突变的转基因小鼠可能用于测定痕量金属在神经转导中作用的有效工具。随着嘌呤系统研究的日趋完善,无疑为疾病的病理机制和药物治疗提供的新的方向,例如具有高发病率和严重影响社会经济的肠道疾病,最近一种新观点认为腺苷在控制肠道功能方面有重要意义,可以促进腺苷类药物作为肠道疾病的新型治疗方法的发展^[12]。随着对P2X受体的分布、药理、电生理和功能调制的研究日益深入,但仍然有许多未能解决和尚有争议的问题,有待深入研究和探讨,例如缺乏特异性的激动剂和拮抗剂,P2X在细胞凋亡、免疫反应、疼痛转导中的作用和新的受体亚型等还需要进一步研究。

参考文献

- 1 张秀军,郑国光,吴克复. P2X受体研究进展. 生物物理报,2003,19(2):125-129
- 2 耿桂启,张励才,曾因明. P2X受体与痛觉调制. 国外医学(麻醉学与复苏分册),2004,25(2):68-71
- 3 王文,武胜昔,李云庆. P2X₄受体在大鼠神经系统的分布. 解剖科学进展,2001,7(4):289-293
- 4 陈鸣,吕军,向正华,等. 离子通道受体P2X₄的结构及生物学功能. 生命的化学,2004,24(5):403-405
- 5 山丽梅,赵艳玲,金城,等. 嘌呤P2受体的分子生物学研究进展. 中国药理学与毒理学杂志,2007,21(4):293-296
- 6 J Pablo Huidobro-Toro, Ramón A Lorca, Claudio Coddou. Trace metals in the brain: allosteric modulators of ligand-gated receptor channels, the case of ATP-gated P2X receptors. Eur Biophys,2008,37:301-314
- 7 Heike Franke, Ute Krügel, Peter Illes. P2 receptors and neuronal injury. Pflügers Arch - Eur J Physiol,2006,452:622-644
- 8 Taka-aki Koshimizu, Gozoh Tsujimoto. Functional Role of Spliced Cytoplasmic Tails in P2X₂-Receptor-Mediated Cellular Signaling. Pharmacol Sci,2006,101:261-266
- 9 Daryl L Davies, Andrei A Kochegarov, Sacha T. Kuo et al. Ethanol differentially affects ATP-gated P2X₃ and P2X₄ receptor subtypes expressed in Xenopus oocytes. J Neuropharmacology,2005,49:243-253
- 10 Forrest F Weight, Chaoying Li, Robert W Peoples. Alcohol action on membrane ion channels gated by extracellular ATP (P2X receptors). Neurochemistry International,1999,35:143-152
- 11 Ronstooop, Annmarie surprenant R. alan north. Different Sensitivities to pH of ATP-Induced Currents at Four Cloned P2X Receptors. Neurophysiol,1997,78:1837-1840
- 12 Luca Antonioli, Matteo Fornai, Rocchina Colucci, et al. Regulation of enteric functions by adenosine: Pathophysiological and pharmacological implications,2008,120(3):233-253 (收稿:2009-09-14)

(修回:2010-01-20)