

脑脉络丛组织的连接蛋白、转运蛋白及其药理毒理学研究进展

刘君丽^{1,2}, 敬海明^{1,2}, 李国君^{1,2}

(1. 北京市疾病预防控制中心 北京市预防医学研究中心卫生毒理所, 北京 100013;

2. 首都医科大学公共卫生与家庭医学学院, 北京 100069)

摘要: 脑脉络丛组织是血-脑脊液屏障的物质基础,也是脑脊液的重要来源。其上皮细胞之间的紧密连接由连接蛋白组成,是维持细胞间机械屏障的结构基础,不仅具有调节细胞间物质流动和维持上皮细胞极性的功能,而且还参与细胞增殖分化和基因转录等过程的信息传递与调控;其上皮细胞膜上分布的各种转运蛋白,不仅在提供营养和激素等脑组织生长发育所必需的物质、清除脑脊液中的一些有害化合物及代谢物方面起关键作用,而且在药物与毒物的运输调控方面也起着至关重要的作用。这些连接蛋白和转运蛋白构成一个复杂的相互关联的网络结构,在维持脑室生理稳态以及保护脑组织免受内源性和外源性有害物质损害方面发挥着非常重要的作用,近年来备受关注。本文就脑脉络丛组织的连接蛋白、转运蛋白及其药理学与毒理学方面的研究进展作一综述。

关键词: 脉络丛; 血-脑脊液屏障; 连接蛋白; 转运蛋白; 药理; 毒理

中图分类号: R99 **文献标志码:** A **文章编号:** 1000-3002(2012)01-0120-07

DOI: 10.3867/j.issn.1000-3002.2012.01.025

脑脉络丛(chroid plexus, CP)组织存在于双侧侧脑室、第三脑室和第四脑室,是构成血-脑脊液屏障(blood-cerebrospinal fluid barrier, BCB)的物质基础,主要由脉络丛立方上皮细胞及富含窗孔毛细血管的基质构成(图 1A)。脉络丛上皮细胞表面有微绒毛,可分泌脑脊液(cerebrospinal fluid, CSF),对脑组织具有支持、营养和保护作用^[1-2]。上皮细胞间近游离端形成紧密连接(tight junction, TJ),可有效地将 CSF 与血液隔离开,并借助极性分布转运实现这两个液体之间的分子交换,起到扩散膜的作用(图 1B 和 C)。构成 TJ 的连接蛋白可以形成促进某些离子通过的选择性空隙,从而限制质膜内酯类及蛋白质的侧向扩散作用^[3]。CP 的毛细血管内皮细胞之间有窗孔,以便毛细血管中的水分和小分子物质等自由通过内皮细胞进入 CP 基质。虽然 CP 体积小,其湿重只占整个脑的 5%,但其表面积却占整个脑面积的 50%,并且血液流经 CP 的速度要比其他脑组织快 10 倍,这为 CSF 与血液间的物质交换提供了保障^[4]。另外,CP 不仅能合成甲状腺转运体和转铁蛋白等重金属整合蛋白,而且其膜上所分布的很多转运蛋白,在提供营养、激素等脑组织生长发育所必需的物质,清除 CSF 中的一些有害化合物及代谢物,以及维持脑室环境的动态平衡等方面起着非常重要的作用^[2]。总之,CP 所构成的 BCB 与脑毛细血管所构成的血-脑屏障(blood-brain barrier, BBB)一起形成了中枢神经系统的保护性屏障(图 2)。国内药理学毒理学领域对于 BBB 的认识和

研究已日渐成熟,但迄今为止对于 BCB 及其组织基础 CP 却知之甚少。本文就脑 CP 连接蛋白、转运蛋白及其药理毒理学研究进展作一综述。

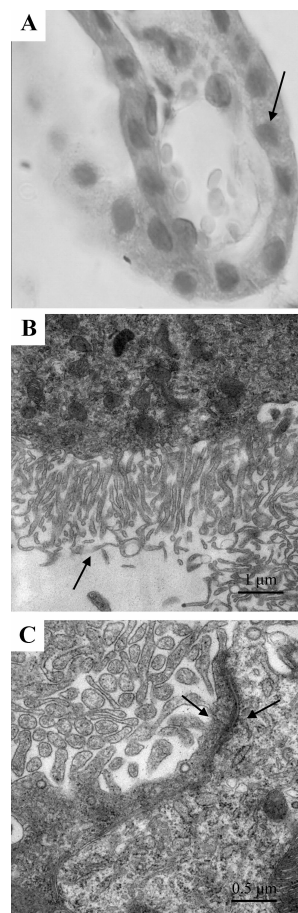


图 1 脑脉络丛组织及其上皮细胞结构^[1-2]。A: 光镜下大鼠脑脉络丛组织及其上皮细胞(HE, ×100),箭头所示为脉络丛上皮细胞。B: 透射电镜下大鼠脑脉络丛上皮细胞超微结构(×20 000),箭头所示为脉络丛上皮细胞的微绒毛。C: 透射电镜下大鼠脑脉络丛上皮细胞超微结构(×40 000),箭头所示为邻近的脉络丛上皮细胞之间的紧密连接。

基金项目: 北京市留学人员科技活动择优资助项目(2007-62); 2007 市属公益院所改革与发展项目(2007); 北京市“十百千”卫生人才培养专项经费资助(“百”层次,2007); 北京市“十百千”卫生人才培养专项经费资助(“十”层次,2009); 北京市卫生系统高层次卫生技术人才培养项目(2011)

作者简介: 刘君丽(1984-),女,硕士研究生,主要从事神经毒理学研究;敬海明(1983-),男,硕士研究生,主要从事毒理蛋白组学研究;李国君(1970-),女,研究员,博士,主要从事毒理学研究。

通讯作者: 李国君, E-mail: guojunli88@yahoo.com, Tel: (010) 64407197, Fax: (010)64407197

1 脉络丛紧密连接及其连接蛋白

电镜下 CP 上皮细胞间的 TJ 位于相邻细胞顶端,将两层质膜紧紧连接在一起(图 1),具有屏障和通道的功能:① 通过封闭连接或者在 TJ 中形成通道以调控离子,大分子物质以及水的细胞旁路渗透性;② 形成物理屏障阻止膜内脂质和蛋白质的扩散,以维持膜结构的不对称分布,稳定细胞极性,同时还可将 CSF 与血液隔离开,维持脑内环境的相对稳定,从而保证了 BCB 正常的生理功能。TJ 为动态复合结构,在多种蛋白质相互作用下形成,主要分为 TJs 蛋白和黏附连接(adhering junctions, AJs)蛋白,也有学者将其分为跨膜蛋白、胞质附着蛋白(zonula occludens protein, ZO)和细胞骨架蛋白。相邻细胞间跨膜蛋白的胞外域相互作用,跨膜蛋白的胞内域与胞质蛋白相连,胞质蛋白又与细胞骨架蛋白相连,使细胞间 TJ 形成网状结构(图 3)。

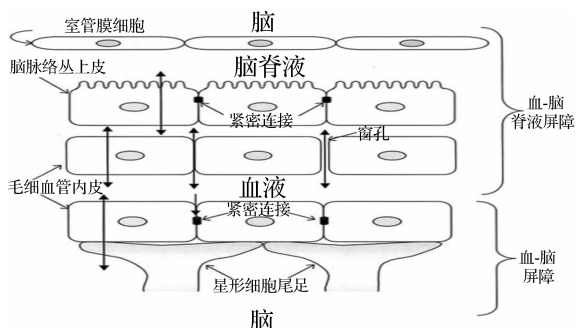


图 2 中枢神经系统脑屏障系统(血-脑屏障与血-脑脊液屏障)的结构^[5]。

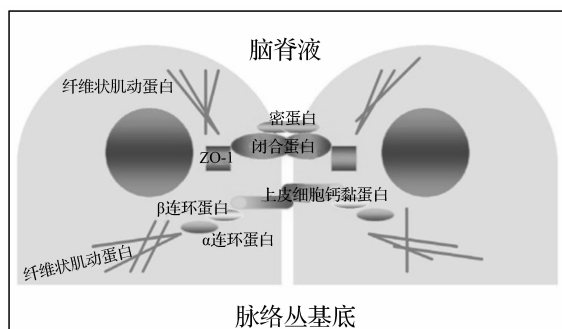


图 3 脉络丛连接蛋白分布^[6]. ZO-1: 胞质附着蛋白。

构成 TJ 的蛋白主要有闭合蛋白(occludin)、密蛋白类(claudins)、连接黏附分子(junction adherence molecular, JAM),胞质附着蛋白、AJs 以及细胞骨架蛋白,前三者属于跨膜蛋白,决定了 CP 上皮的基本形态特征。跨膜蛋白与胞质附着蛋白均称为 TJs,通常人们所说的 TJ 主要是指 TJs 和 AJs。CP 上皮细胞单层膜的完整性、细胞旁路渗透性以及膜的极化等取决于 TJs 蛋白和 AJs 蛋白的表达。以下分别介绍这两大类蛋白复合物的结构与功能。

1.1 闭合蛋白

闭合蛋白是细胞间 TJ 中最早被发现的连接蛋白,分布于上皮细胞和内皮细胞内,有 4 个跨膜结构域:短的胞质氨基端结构域,长的胞质羧基端结构域,以及 2 个存在于细胞间隙内连接相邻细胞闭合蛋白的胞外环。

在这些结构域中,酪氨酸和甘氨酸残基的比例异常高,并且羧基端有 150 个相对保守的氨基酸序列,可与 ZO-1 结合,从而使其间接地与肌动蛋白-细胞骨架结合蛋白相连,并且定位于 TJ 链中的闭合蛋白的结构域呈高度的磷酸化,以 G 蛋白依赖或者非依赖的方式调控着 TJ 结构的渗透性;闭合蛋白的 N 端结构域调控着嗜中性粒细胞的跨上皮迁移,这个过程不依赖于跨膜电阻和细胞旁路通透性,被删去顶端的闭合蛋白可导致顶膜与基底外侧膜之间的栅栏被破坏;闭合蛋白还可以使丝氨酸与苏氨酸残基磷酸化,被认为是蛋白质定位和屏障完整性的调控元件,因此闭合蛋白是维持 TJ 结构和功能的重要成分^[7-8]。另外, Lacaz-Vieira 等^[9]发现闭合蛋白负责紧密接头的密封,同源于闭合蛋白的部分外环路多肽分子干扰由 Ca^{2+} 流失而打开的 TJ 结构的再封闭。总之,闭合蛋白在成熟细胞中的主要作用体现在其调控功能上。

1.2 密蛋白

密蛋白是维持 TJs 结构和功能的主要跨膜蛋白之一。在细胞中广泛表达,是一个多基因家族,也由 4 个跨膜结构域组成,2 个胞外环和 2 个胞质结构域,一个短的氨基序列和一个长的羧基序列,但其与闭合蛋白序列无同源性。

密蛋白在各组织中的表达具有一定的特异性,目前在所有物种中已有 24 种密蛋白被鉴定^[8],但在 CP 组织中却只发现了 5 种密蛋白(密蛋白-1, -2, -3, -5, -11)。荧光染色发现在上皮细胞 TJ 及其附近的密蛋白 5 低表达,而密蛋白 1 高表达,与内皮细胞的情况正好相反。起初人们认为密蛋白 1 在 CP 中含量最多,并且是 CP TJ 的标志物,后来发现密蛋白 1 的抗体与密蛋白 3 存在交叉反应,实际上 CP 中密蛋白 3 的含量最丰富^[10]。密蛋白可通过调节特定 TJs 中密蛋白亚型的组成进而控制 TJs 的急性生理改变,且密蛋白种类的组成直接决定了 BCB 的功能^[11]。有研究显示,密蛋白 2 充当阳离子选择性通道,它能降低上皮屏障的电阻并提高脉络丛的渗透性,但是到目前为止,尚未在体外细胞系中发现密蛋白 2 的表达^[6]。密蛋白与闭合蛋白形成了 TJ 的胞外成分,而且是 BCB 的必要成分。Matter 等^[12]在冰冻切片上发现密蛋白与闭合蛋白汇聚,形成膜内链,因此推测这些链包括水通道,均允许离子和亲水性分子选择性扩散。

1.3 连接黏附分子

第 3 种膜整合蛋白是由免疫球蛋白组成,可以分为 2 组:一组由 JAM 蛋白组成,一组由细胞黏附调节基因、内皮选择黏附分子和 JAM-4 组成。JAM 在上皮细胞和内皮细胞的 TJ 处广泛表达。除了 JAM-1,尚不知道这些蛋白在 TJ 组装和功能方面发挥的作用^[8]。JAM-1,原 F11 受体,与免疫细胞迁移或细胞粘附有关,但它并不位于连接带中。JAM-1 胞质结构域中的 PDZ 结合域可以与 ZO-1、丝状肌动蛋白结合蛋白、细胞极性蛋白-3 和多 PDZ 域支架蛋白交互作用,而且 JAM-1 与扣带蛋白也存在交互作用。因此,尽管 JAM-1 不是 TJ 带的组成部分,但它的信号级联转导作用不容忽视。JAM 蛋白可在 TJs 组装和细胞旁路渗透性调节方面发挥作用^[8,13],并且其调节功能与闭合蛋白存在着直接或间接的交互作用^[14]。

1.4 胞质附着蛋白

胞质附着蛋白主要是 ZOs,如 ZO-1, -2, -3,均是膜相关鸟苷酸激酶,存在于不同细胞类型的 TJ 相关结构中。它们共有 3 个限制性核心结构域:SH3 结构域、鸟苷酸环化酶和 PDZ 结构域,这些结构域在信号转导和锚定跨膜蛋白的细胞骨架方

面发挥着重要作用,并且在细胞质的蛋白质组装中起主导作用:SH3 结构域通常绑定信号蛋白和细胞骨架元素;鸟苷酸激酶促成 GMP 向 GDP 进行 ATP 依赖性转换;PDZ 结构域与蛋白质的羧基端相结合^[15]。ZO_s 与肌动蛋白、丝状肌动蛋白结合蛋白、扣带蛋白形成 TJ 结构的支架;所有的 ZO_s 都已被证实能直接与肌动蛋白纤维相联合,因此被认为在跨膜蛋白与细胞骨架的连接中起着非常重要的中心作用,除此之外 ZO_s 在信号级联与转录调控中也起着一定的作用,有研究显示 ZO-1 是丝氨酸激酶和蛋白激酶 C 的底物,其水平下降和活性降低均将影响细胞间 TJ 的稳定性和细胞功能的完整性^[16-18]。ZO_s 在 BBB 研究中报道得比较多,除了 ZO-1,CP 中目前还没有其他有关 ZO_s 的报道。

1.5 黏附连接

AJs 由上皮钙黏附蛋白形成,上皮钙黏附蛋白是一种单一跨膜蛋白,具有钙依赖嗜同性。在胞内区域上皮钙黏附蛋白与 β 连环蛋白结合,β 连环蛋白与 α 连环蛋白结合,而 α 连环蛋白又与肌动蛋白交互作用,这种由连环蛋白介导的上皮钙黏附蛋白与肌动蛋白细胞骨架间的锚定需要很强的细胞黏附^[9]。AJs 在等离子体膜蛋白的极性分布和启动其他细胞间连接复合物如紧密连接蛋白和桥粒方面发挥着重要作用^[19-20]。

2 脉络丛紧密连接的毒理学与药理学意义

TJs 由跨膜蛋白、ZO 及细胞骨架蛋白共同组成,是胞旁通路的结构基础,同时也是细胞间的通透屏障以及脑屏障结构和功能的基础。许多亲水性小分子药物、多肽、蛋白质的膜通透性较差,主要是经胞旁通路吸收入脑。正常情况下,局部化

学信号诱导细胞内分子信号转导,进而造成脑屏障连接复合体骨架的重排,最终导致细胞间通透性改变。

Tenenbaum 等^[21]研究发现链球菌感染可导致 CP 上皮处 TJ 蛋白 ZO-1, 闭合蛋白, 密蛋白-1 发生大规模地重排,游离端细胞肌动蛋白消失,诱发形成基底应力纤维,使 TJs 由不溶性 Triton X 变成可溶性 Triton X 片断,另外还能使闭合蛋白去磷酸化甚至降解。地塞米松能够阻止链球菌导致的这种蛋白以及 TJ 形态学的改变,抑制胞外受体活化激酶活化及基质金属硫蛋白酶-3 的表达。

最近的研究均显示了连接蛋白的复杂性和主动调节性,连接蛋白的表达与分布变化主要通过信号转导通路实现。而何种蛋白的改变对连接蛋白破坏起主要作用、连接蛋白改变后的主要表现及相关信号转导通路对连接蛋白的具体作用等仍然存在许多亟待解决的问题。随着对屏障连接蛋白的研究日趋深入,使得通过调控屏障连接蛋白这些特殊分子瞬间可逆地改变屏障通透性成为了可能,进而为人为地阻止毒物进入脑组织或调节药物经脑屏障转运的相关研究带来了希望。

一些中枢神经药物(如蛋白质类和多肽类药物)由于其较差的脑屏障透过性,而无法到达作用部位或者无法达到起效浓度。如果通过一些外源性物质可控、可逆地调节脑屏障的紧密连接,提高药物的胞旁通路吸收率,从而提高这些药物的脑内分布,可最终达到治疗的目的。

3 脉络丛表达的转运蛋白

图 4 结果显示,长期以来,一直认为 BBB 是人体内最重要的物质转运屏障,但随着对中枢神经系统的深入研究,

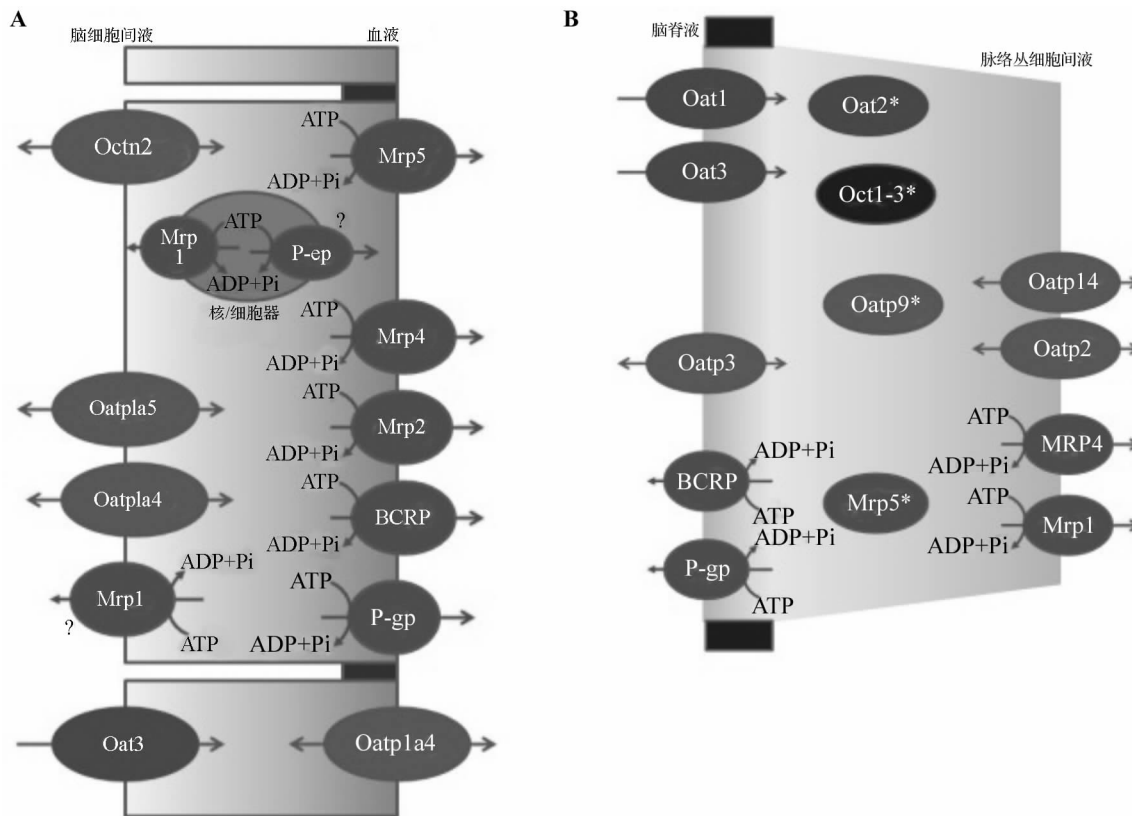


图 4 ABC 转运蛋白,有机阴/阳离子转运蛋白和有机阴离子转运多肽在脑内皮细胞(A)和脑脉络丛上皮细胞(B)中的分布及转运方向^[10]。Mrp: 多药耐药相关蛋白; P-gp: 膜糖蛋白; BCRP: 乳腺癌耐药蛋白; Oatp: SLC21 家族有机阴离子转运体; Oat: SLC22 家族有机阴离子转运蛋白; Oct: 有机阳离子转运蛋白。*: 提示有研究发现这些蛋白在上皮细胞中表达,但其具体功能和细胞定位尚不清楚。

发现 BCB 不但有独特的结构,而且 BCB 上还分布有很多转运蛋白,在维持脑内的环境稳定、代谢物外排、保护脑不受外源物质伤害等方面起着不容忽视的重要作用。研究发现,CP 上存在多种转运蛋白,能够参与药物代谢,具有抗氧化以及调节各种药物和毒物摄取的功能,进而影响药物在脑内的分布,故对这些转运蛋白进行深入研究有助于了解其功能特性,为进一步设计开发脑靶向和非脑靶向的药物提供理论依据。CP 中涉及到药物和代谢物转运的蛋白主要是 ATP 结合盒转运蛋白(ATP-binding cassette, ABC)和溶质载体转运蛋白(solute carrier, SLC),以及金属转运蛋白和其他的一些脉络丛自身合成的蛋白等。

3.1 ABC 转运蛋白

ABC 转运蛋白存在于血-脑屏障交界处,通过积极地将复合物从脑转入血液发挥解毒功能,分为 7 个不同的亚系,它们的底物多样化,包括许多药物、毒物,为脑神经保护功能提供了一个重要的机制。其中 P-糖蛋白(P-glycoprotein, P-gp)和多药耐药相关蛋白(multidrug resistance-related proteins, Mrps)依赖能量将药物和外源化学物由 CSF 单向转入血液,以清除 CSF 中的有害物质,发挥解毒功能。Ek 等^[22]在胎儿和新生大鼠大脑血管(BBB 处)和脉络丛(BCB 处)发现了 4 种 ABC 转运蛋白,分别是 P-gp, Mrp1, Mrp4 以及乳腺癌耐药蛋白(breast cancer resistance protein, BCRP),并证实 ABC 转运蛋白在早期胚胎阶段已在脑屏障处出现。BCRP 在发育的 CP 中高水平表达,并且仅在胎鼠阶段的上皮细胞向血面被检测到,这提示 BCRP 在脑早期外排机制中发挥着特殊作用。

3.1.1 P-糖蛋白

P-gp 属于膜糖蛋白,分子结构包括位于中间的连接区以及 N 端和 C 端 2 个同源功能区,每个功能区各含有 6 个疏水的跨膜通道位点和 1 个位于胞浆内的亲水性 ATP 结合位点。P-gp 一直被认为是 BBB 的一种重要转运蛋白,是目前了解最为深入的一种 ABC 家族成员,可广泛运输中性或者阳性亲脂性复合物,包括不同的化疗药物和艾滋病病毒蛋白酶抑制剂,通过积极的转出运输防止这些物质在胞内积累,常被看作阳离子外排泵。早在 1999 年, Rao 等^[23]便通过对培养的脉络丛原代细胞进行蛋白印迹和免疫组织化学分析发现了 P-gp 和 Mrps 的存在,且只在脉络丛上皮细胞上表达。但是脑部 P-gp 依赖性外排的主要场所是在 BBB,而不是 CP^[24]。

3.1.2 多药耐药相关蛋白

Mrps 属于膜固定性转运蛋白,有 2 个含 6 个 α 螺旋结构的跨膜域、1 个胞质结合域和 2 个位于胞内的 ATP 结合位点,是多特性的有机阴离子转运蛋白,更多的是接受亲水性物质如谷胱甘肽和磺酸基的共轭物,常被认为是阴离子外排泵,从而补充由胞内外排共轭代谢物的药物代谢过程,这些蛋白也接受各种阴离子化合物为底物,其中一些与谷胱甘肽一起被转运。现已发现 Mrps 有 7 个成员,但在 CP 中只发现了 Mrp1 和 Mrp4 这两个成员。Marques 等^[25]利用免疫荧光染色技术发现 Mrp1 和 Mrp4 位于侧脑室脉络丛的基底侧面。Mrp1 在产后早期便能达到成年表达水平,并且在 CP 中的浓度是脑毛细管的 25 倍^[26]。它是一种重要主动转运蛋白,需要消耗 2 个 ATP 分子才能启动转运,与白细胞三烯 C4 和非结合胆红素有非常高的亲和力,对葡萄糖醛酸化或硫酸化的复合物也有较低的亲和力。Mrp4 比 Mrp1 小,同样需要两个 ATP 分子才能启动转运,它能混杂运输葡萄糖醛酸化或硫酸化

的复合物,以及某些核苷化合物类似物与甲氨蝶呤。两者均能被丙磺舒抑制,与 Mrp1 不同的是, Mrp4 能转运前列腺素。Mrp1 和 Mrp4 能转运化疗药物,因此常用于临床治疗^[27]。

3.1.3 乳腺癌耐药蛋白

BCRP 是一种新型的 ABC 转运蛋白,结构上最主要的特点是只有 1 个 ATP 结合结构域和 1 个疏水性跨膜结构域,位于各种组织细胞包括脑内皮细胞。它的组织定位与 P-gp 相似,被认为是通过本身或其他转运分子形成二聚体或多聚体而发挥作用。有研究显示,在高效抗逆转录治疗中, BCRP 与体内药物间存在交互作用,对运送抗 HIV 药物到达脉络丛颇具价值^[28]。由于 BCRP 主要定位于 BBB,且只在胎鼠阶段 CP 上皮细胞的基底膜上表达^[22],故在此不多做描述。

3.2 溶质载体转运蛋白

SLC 超级家族转运蛋白只能特异性地接受相当窄范围内的生理性底物, CP 中所存在的 SLC 转运蛋白多数属于 SLC21 和 SLC22 家族,能以药物和外源化学物作为底物呈现较宽的选择性。

3.2.1 SLC21 家族

SLC21 家族成员主要是有机阴离子转运多肽(organic anion transporting polypeptide, Oatp),可运送多肽及相对较大的两性物如胆盐、牛黄胆酸钠、甲状腺激素、白细胞三烯和类固醇的各种共轭物,药物或者其他外源性化学物。其中 Oatp1 存在于脉络丛顶膜^[29],可作为摄取载体介导雌二醇-17 β D2 葡萄糖醛酸苷、两性有机阴离子、肽类以及甲状腺素的转运^[30]; Oatp2 存在于脉络丛基底外侧膜上,能够将物质从脉络丛上皮细胞转运入血^[31],也有研究表明, Oatp2 可能具有双向转运功能^[32]; Oatp3 存在于脉络丛的顶端膜上,具有广泛的底物专属性,参与 CP 上皮细胞有机阴离子的摄取,其底物包括两性有机阴离子如胆酸、硫酸雌酮、脱氢表雄酮硫酸盐与甲状腺激素^[33]。有研究证实 Oatpa 在大脑毛细血管内皮细胞中大量表达,且与 Oatp2 及 Oatp3 具有高度同源性^[32],但在目前尚未在脉络丛上发现 Oatpa 的表达。

3.2.2 SLC22 家族

SLC22 家族主要包含有机阴离子转运蛋白(organic anion transporter, Oat)和有机阳离子转运蛋白(organic cation transporter, Oct)两种类型,二者具有很强的同源性。其中 Oat 是聚乙烯有机阴离子转运蛋白,与 SLC21 家族相比,它接受分子量较小、亲水性较高的底物; Oat 的代表性底物包括内源性分子,外源化学物质和许多药物,其中也包括一些阳离子。目前已证实有 3 种 Oat mRNA 在脉络丛顶膜表达,其中 Oat3 在脉络丛中表达最多,其次是 Oat1 与 Oat2^[34]; Oct 的底物包括内源性和外源性阳离子, Sweet 等^[35]利用逆转录 PCR 技术在脉络丛发现 Oct2 和 Oct3 的 mRNA,但并未发现 Oct1 mRNA 的表达,用 rOct2/绿荧光蛋白融合转染完整 CP 可在顶膜处检测到很强的荧光而在基底和侧面未见。Choudhuri 等^[34]发现脉络丛中存在大量的 Octn2,以及少量 Octn1。Octn1 能将有机阳离子和质子进行交换转运,可以介导吡拉明、奎尼丁和维拉帕米的转运, Octn2 为 Na⁺ 依赖性肉毒碱转运蛋白。它们在 CP 中的其他功能尚未见更多报道。

3.3 金属离子转运蛋白

CP 组织还可表达几种与金属转运有关的蛋白以及蛋白受体,其中转铁蛋白受体(transferrin receptor, TfR)存在于毛细血管内皮细胞和 CP 上皮细胞细胞核周围的囊泡中,可通

过受体介导的内吞作用调节铁离子的摄入;二价金属离子转运蛋白 1 (divalent metal-ion transporter 1, DMT1) 位于上皮细胞顶膜下,担负二价金属离子的内流;金属转运蛋白 1 (metal transporter protein 1, MTP1) 在细胞质中弥散,介导金属离子的外流^[36-37]。也有研究证实 CP 拥有 ATP7A 转运蛋白,这种蛋白可以控制血液与脑脊液间的铜运输^[38]。Wang 等^[39]运用免疫化学技术证实大鼠 CP 上皮有 Zn 转运蛋白 1,它可作为一个锌离子外排泵调节细胞内 Zn^{2+} 的浓度。正常生理状态下,这几种转运蛋白的数量及分布的协调对称性对细胞生存和正常功能发挥着非常重要的作用。

3.4 营养转运蛋白

肽转运蛋白 (peptide transporter, PEPT) 为续发性主动转运蛋白,以质子浓度梯度差为驱动力将物质转运至细胞内。Shu 等^[40]在大鼠脉络丛上皮细胞刷状缘检测出 PEPT2,但未检测出 PEPT1, PEPT2 转运二肽、三肽以及类肽药物如氨基乙酰肌氨酸与头孢羟氨苄等。葡萄糖对维持脑的功能十分重要,它透过 BCB 是由特殊的葡萄糖转运蛋白 1 来完成的,葡萄糖转运蛋白 1 是一种高效易化转运蛋白,对脑部物质转运十分重要,也是 BBB 以及 BCB 上研究得最清楚的转运系统之一。其在脑内皮细胞中广泛存在,也可在上皮膜如肾集尿管,脉络丛和胎盘合体滋养层的基底膜位置以及近第三脑室底部室管膜上皮顶膜存在^[41]。

3.5 其他

除上述转运蛋白外,脉络丛本身还能合成转甲状腺素蛋白、转铁蛋白结合蛋白 (transferrin-binding protein, TfBP)。TfBP 最早是在鸡卵卵管中被发现,经进一步研究发现其在脉络丛上皮细胞也有表达,尽管其生理功能到目前还不是很明朗,但可初步推测其在转铁蛋白与铁的储存方面发挥着作用^[42-43]。CP 中的转运蛋白远不止这些,还可能存在一些重要但未知的转运蛋白,需要进一步更深入的研究。

4 脉络丛转运蛋白的药理学与毒理学意义

近年来,人们对 BCB 的研究日益增多,通过体外细胞培养及基因克隆等技术对 CP 中转运蛋白有了较深入的理解。由于 CP 中这些转运蛋白的特殊功能,其在各种疾病的药理学机制研究中的重要作用越来越引起人们的重视。如 Behl 等^[44-45]发现急性铅暴露后,CP 中原本定位于胞质的低密度脂蛋白受体蛋白 1 和蛋白激酶 C 向顶膜转移,并且铅可以通过影响 CP 中金属内肽酶活性及减少 CP 中 LRP1 的表达,导致 β -淀粉样蛋白肽在脑中不断累积,进而导致阿尔茨海默病的发生。铁和锰可导致大鼠 CP 金属转运蛋白 (如 MTP1, TfR) 亚细胞分布重新定位。体外实验表明,锰能稳固铁调节蛋白与 TfR mRNA 及 DMT1 mRNA 的结合,从而增加 CP 上皮细胞 TfR 和 DMT1 的 mRNA 和蛋白水平的表达。体内实验也表明,锰暴露后 TfR mRNA 表达明显增加,铁蛋白 mRNA 的表达略微降低^[36-37, 46],增加 DMT1 与 TfR 介导的铁转入,可导致 CSF 铁离子浓度增高^[47-48],这种脑内铁浓度的改变可能是锰导致神经退行性帕金森病的原因之一^[49]。

毒性物质可影响 CP 中转运蛋白的表达与分布,反过来转运蛋白也可限制药物与毒物的转运与代谢。有研究发现使用 P-gp 抑制剂可提高 BBB 对紫杉醇的通透性,从而使紫杉醇在脑内的浓度明显增高^[50]。也有研究发现 Mrp 抑制剂

丙磺舒能够增高大鼠脑细胞间液中苯妥英钠水平,在癫痫激发模型中,同时应用丙磺舒能明显增强苯妥英钠的抗惊厥效果^[51],Gibbs 等^[52]应用小剂量 Mrp 抑制剂叫咪美辛和丙磺舒后,发现细胞对丙戊酸钠摄取增加;应用较大剂量时摄取却减少,这种双相反应说明,Mrp 抑制剂对摄取转运体和外排转运体同时具有抑制作用,但敏感性不同,也就是说外排转运体对 Mrp 抑制剂的作用可能更敏感,可以肯定的是 Mrp 在丙戊酸钠的外排转运中发挥着作用,但也不排除其他转运机制。转运蛋白的研究是复杂的,同时也是非常必要的。如脑和 CSF 内的 HIV 与 HIV 导致的艾滋病痴呆综合征有着直接关系。为了减少艾滋病的发生,抗病毒药物必须到达脑、CP 和 CSF,并且达到一定的浓度。若中枢神经系统内抗 HIV 药物治疗水平不足可能会导致耐药病毒株向外周组织转移,目前 HIV 治疗的热点却还停留在药物穿过 CP 到达 CSF 的能力上。作用于中枢神经系统的药物需要通过脑屏障在脑内达到有效的治疗浓度才能起作用,毒性物质以及病毒可以影响 CP 中转运蛋白的分布,进而对治疗药物的转运产生一定的影响。全面系统地了解 CP 上皮的转运蛋白,明确转运蛋白与底物以及底物与底物之间的交互作用,可以为毒性物质中枢神经系统前沿防御屏障的毒性机制研究以及治疗药物的选择与研发提供必要的实验依据和理论基础。

综上所述,脉络丛在保护中枢神经系统、维持脑稳态、以及物质运输方面发挥着至关重要的作用,全面深入地研究 CP 的连接蛋白以及转运蛋白的功能和作用可为中枢神经系统的药物研发和中枢神经系统疾病的治疗带来新的希望。

参考文献:

- [1] Jing HM, Liu JZ, Gao WH, Zhao CY, Ma L, Li GJ. Injury of chloride manganese to blood cerebrospinal fluid barrier in rats [J]. *Chin J Pharmacol* (中国药理学与毒理学杂志), 2011, **25**(4):364-368.
- [2] Jing HM, Li GJ. Progress in structure, function and toxicological research of blood-cerebrospinal fluid barrier [J]. *Chin J Pharmacol Toxicol* (中国药理学与毒理学杂志), 2010, **24**(6):562-565.
- [3] Aijaz S, Balda MS, Matter K. Tight junctions; molecular architecture and function [J]. *Int Rev Cytol*, 2006, **248**:261-298.
- [4] Johanson CE, Stopa EG, McMillan PN. The blood-cerebrospinal fluid barrier: structure and functional significance [J]. *Methods Mol Biol*, 2011, **686**(1):101-131.
- [5] Ghersi-Egea JF, Strazielle N. Choroid plexus transporters for drugs and other xenobiotics [J]. *J Drug Target*, 2002, **10**(4):353-357.
- [6] Szmydynger-Chodobska J, Pascale CL, Pfeffer AN, Coulter C, Chodobski A. Expression of junctional proteins in choroid plexus epithelial cell lines: a comparative study [J]. *Cerebrospinal Fluid Res*, 2007, **4**:11.
- [7] Hirase T, Kawashima S, Wong EY, Ueyama T, Rikitake Y, Tsukita S, et al. Regulation of tight junction permeability and occludin phosphorylation by RhoA-p160 ROCK-dependent and -independent mechanisms [J]. *J Biol Chem*, 2001, **276**(13):10423-10431.
- [8] Förster C. Tight junctions and the modulation of barrier function in disease [J]. *Histochem Cell Biol*, 2008, **130**(1):55-70.

- [9] Lacaz-Vieira F, Jaeger MM, Farshori P, Kachar B. Small synthetic peptides homologous to segments of the first external loop of occludin impair tight junction resealing[J]. *J Membr Biol*, 1999, **168**(3):289-297.
- [10] Redzic Z. Molecular biology of the blood-brain and the blood-cerebrospinal fluid barriers: similarities and differences[J]. *Fluids Barriers CNS*, 2011, **8**(1):3.
- [11] Balkovetz DF. Claudins at the gate: determinants of renal epithelial tight junction paracellular permeability[J]. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2006, **290**(3):F572-F579.
- [12] Matter K, Balda MS. Signalling to and from tight junctions[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2003, **4**(3):225-236.
- [13] Cohen CJ, Shieh JT, Pickles RJ, Okegawa T, Hsieh JT, Bergelson JM. The coxsackievirus and adenovirus receptor is a transmembrane component of the tight junction[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, **98**(26):15191-15196.
- [14] Liu Y, Nusrat A, Schnell FJ, Reaves TA, Walsh S, Pochet M, et al. Human junction adhesion molecule regulates tight junction resealing in epithelia[J]. *J Cell Sci*, 2000, **113**(Pt 13):2363-2374.
- [15] Wolburg H, Lippoldt A. Tight junctions of the blood-brain barrier: development, composition and regulation[J]. *Vascul Pharmacol*, 2002, **38**(6):323-337.
- [16] Itoh M, Nagafuchi A, Moroi S, Tsukita S. Involvement of ZO-1 in cadherin-based cell adhesion through its direct binding to alpha catenin and actin filaments[J]. *J Cell Biol*, 1997, **138**(1):181-192.
- [17] Tsukita S, Katsuno T, Yamazaki Y, Umeda K, Tamura A, Tsukita S. Roles of ZO-1 and ZO-2 in establishment of the belt-like adherens and tight junctions with paracellular permselective barrier function[J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2009, **1165**:44-52.
- [18] Siliciano JD, Goodenough DA. Localization of the tight junction protein, ZO-1, is modulated by extracellular calcium and cell-cell contact in Madin-Darby canine kidney epithelial cells[J]. *J Cell Biol*, 1988, **107**(6 Pt 1):2389-2399.
- [19] Nelson WJ. Regulation of cell-cell adhesion by the cadherin-catenin complex[J]. *Biochem Soc Trans*, 2008, **36**(Pt 2):149-155.
- [20] McNeill H, Ozawa M, Kemler R, Nelson WJ. Novel function of the cell adhesion molecule uvomorulin as an inducer of cell surface polarity[J]. *Cell*, 1990, **62**(2):309-316.
- [21] Tenenbaum T, Matalon D, Adam R, Seibt A, Wewer C, Schwerk C, et al. Dexamethasone prevents alteration of tight junction-associated proteins and barrier function in porcine choroid plexus epithelial cells after infection with *Streptococcus suis* *in vitro*[J]. *Brain Res*, 2008, **1229**:1-17.
- [22] Ek CJ, Wong A, Liddelow SA, Johansson PA, Dziegielewska KM, Saunders NR. Efflux mechanisms at the developing brain barriers: ABC-transporters in the fetal and postnatal rat [J]. *Toxicol Lett*, 2010, **197**(1):51-9.
- [23] Rao VV, Dahlheimer JL, Bardgett ME, Snyder AZ, Finch RA, Sartorelli AC, et al. Choroid plexus epithelial expression of MDR1 P glycoprotein and multidrug resistance-associated protein contribute to the blood-cerebrospinal-fluid drug-permeability barrier[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, **96**(7):3900-3905.
- [24] Varatharajan L, Thomas SA. The transport of anti-HIV drugs across blood-CNS interfaces; summary of current knowledge and recommendations for further research[J]. *Antiviral Res*, 2009, **82**(2):A99-A109.
- [25] Marques F, Sousa JC, Coppola G, Geschwind DH, Sousa N, Palha JA, et al. The choroid plexus response to a repeated peripheral inflammatory stimulus[J]. *BMC Neurosci*, 2009, **10**:135.
- [26] Gazzin S, Strazielle N, Schmitt C, Fevre-Montange M, Ostrow JD, Tiribelli C, et al. Differential expression of the multidrug resistance-related proteins ABCB1 and ABCG1 between blood-brain interfaces[J]. *J Comp Neurol*, 2008, **510**(5):497-507.
- [27] Lagas JS, Vlaming ML, Schinkel AH. Pharmacokinetic assessment of multiple ATP-binding cassette transporters; the power of combination knockout mice[J]. *Mol Interv*, 2009, **9**(3):136-145.
- [28] Spector R, Johanson CE. Vectorial ligand transport through mammalian choroid plexus[J]. *Pharm Res*, 2010, **27**(10):2054-2062.
- [29] Angeletti RH, Novikoff PM, Juvvadi SR, Fritschy JM, Meier PJ, Wolkoff AW. The choroid plexus epithelium is the site of the organic anion transport protein in the brain[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, **94**(1):283-286.
- [30] Kusuha H, Sugiyama Y. Efflux transport systems for organic anions and cations at the blood-CSF barrier[J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2004, **56**(12):1741-1763.
- [31] Gao B, Stieger B, Noé B, Fritschy JM, Meier PJ. Localization of the organic anion transporting polypeptide 2 (Oatp2) in capillary endothelium and choroid plexus epithelium of rat brain [J]. *J Histochem Cytochem*, 1999, **47**(10):1255-1264.
- [32] Li L, Meier PJ, Ballatori N. Oatp2 mediates bidirectional organic solute transport: a role for intracellular glutathione [J]. *Mol Pharmacol*, 2000, **58**(2):335-340.
- [33] Kusuha H, He Z, Nagata Y, Nozaki Y, Ito T, Masuda H, et al. Expression and functional involvement of organic anion transporting polypeptide subtype 3 (Slc21a7) in rat choroid plexus[J]. *Pharm Res*, 2003, **20**(5):720-727.
- [34] Choudhuri S, Cherrington NJ, Li N, Klaassen CD. Constitutive expression of various xenobiotic and endobiotic transporter mRNAs in the choroid plexus of rats[J]. *Drug Metab Dispos*, 2003, **31**(11):1337-1345.
- [35] Sweet DH, Miller DS, Pritchard JB. Ventricular choline transport: a role for organic cation transporter 2 expressed in choroid plexus[J]. *J Biol Chem*, 2001, **276**(45):41611-41619.
- [36] Wang X, Miller DS, Zheng W. Intracellular localization and subsequent redistribution of metal transporters in a rat choroid plexus model following exposure to manganese or iron[J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2008, **230**(2):167-174.
- [37] Li GJ, Zhao Q, Zheng W. Alteration at translational but not transcriptional level of transferrin receptor expression following manganese exposure at the blood-CSF barrier *in vitro*[J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2005, **205**(2):188-200.
- [38] Niciu MJ, Ma XM, El Meskini R, Ronnett GV, Mains RE, Eipper BA. Developmental changes in the expression of ATP7A during a critical period in postnatal neurodevelopment[J]. *Neuroscience*, 2006, **139**(3):947-964.
- [39] Wang ZY, Stoltenberg M, Jo SM, Huang L, Larsen A, Dahlström A, et al. Dynamic zinc pools in mouse choroid plexus [J]. *Neuroreport*, 2004, **15**(11):1801-1804.
- [40] Shu C, Shen H, Teuscher NS, Lorenzi PJ, Keep RF, Smith DE. Role of PEPT2 in peptide/mimetic trafficking at the blood-cerebrospinal fluid barrier; studies in rat choroid plexus epithelial cells in primary culture[J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2002, **301**(3):820-829.

- [41] Farrell CL, Yang J, Partridge WM. GLUT-1 glucose transporter is present within apical and basolateral membranes of brain epithelial interfaces and in microvascular endothelia with and without tight junctions[J]. *J Histochem Cytochem*, 1992, **40**(2):193-199.
- [42] Kim DW, Lee HN, Song JE, Jung KJ, Yang WM, Kwon K, et al. Expression of transferrin binding protein in the capillaries of the brain in the developing chick embryo[J]. *Neurochem Res*, 2008, **33**(11):2288-2293.
- [43] Park SW, Lee HN, Jeon GS, Sim KB, Cho IH, Cho SS. The expression of transferrin binding protein in the turtle nervous system [J]. *Arch Histol Cytol*, 2009, **72**(1):65-76.
- [44] Behl M, Zhang Y, Shi Y, Cheng J, Du Y, Zheng W. Lead-induced accumulation of beta-amyloid in the choroid plexus; role of low density lipoprotein receptor protein-1 and protein kinase C [J]. *Neurotoxicology*, 2010, **31**(5):524-532.
- [45] Behl M, Zhang Y, Zheng W. Involvement of insulin-degrading enzyme in the clearance of beta-amyloid at the blood-CSF barrier; Consequences of lead exposure [J]. *Cerebrospinal Fluid Res*, 2009, **6**:11.
- [46] Li GJ, Choi BS, Wang X, Liu J, Waalkes MP, Zheng W. Molecular mechanism of distorted iron regulation in the blood-CSF barrier and regional blood-brain barrier following *in vivo* subchronic manganese exposure[J]. *Neurotoxicology*, 2006, **27**(5):737-744.
- [47] Wang X, Li GJ, Zheng W. Efflux of iron from the cerebrospinal fluid to the blood at the blood-CSF barrier; effect of manganese exposure [J]. *Exp Biol Med (Maywood)*, 2008, **233**(12):1561-1571.
- [48] Shi LZ, Li GJ, Wang S, Zheng W. Use of Z310 cells as an *in vitro* blood-cerebrospinal fluid barrier model; tight junction proteins and transport properties [J]. *Toxicol In Vitro*, 2008, **22**(1):190-199.
- [49] Wang X, Li GJ, Zheng W. Upregulation of DMT1 expression in choroidal epithelia of the blood-CSF barrier following manganese exposure *in vitro* [J]. *Brain Res*, 2006, **1097**(1):1-10.
- [50] Kemper EM, Boogerd W, Thuis I, Beijnen JH, van Tellingen O. Modulation of the blood-brain barrier in oncology; therapeutic opportunities for the treatment of brain tumours [J]? *Cancer Treat Rev*, 2004, **30**(5):415-423.
- [51] Potschka H, Fedrowitz M, Löscher W. Multidrug resistance protein MRP2 contributes to blood-brain barrier function and restricts antiepileptic drug activity [J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2003, **306**(1):124-131.
- [52] Gibbs JP, Adeyeye MC, Yang Z, Shen DD. Valproic acid uptake by bovine brain microvessel endothelial cells; role of active efflux transport [J]. *Epilepsy Res*, 2004, **58**(1):53-66.

Junction proteins and transporter proteins of brain choroid plexus and their research progress in the field of pharmacology and toxicology

LIU Jun-li^{1,2}, JING Hai-ming^{1,2}, LI Guo-jun^{1,2}

(1. Institute of Toxicology, Beijing Centers for Disease Control and Prevention, Beijing Research Center for Preventive Medicine, Beijing 100013, China; 2. School of Public Health and Family Medicine, Capital Medical University, Beijing 100069, China)

Abstract: Choroid plexus tissue is the basis of blood-cerebrospinal fluid barrier within the brain in a variety of species; it is also the major source of cerebrospinal fluid. The tight junction among epithelial cells of choroid plexus is composed of a series of proteins and is the structural foundation of mechanic barriers. Not only can it regulate the flow of substances between cells and maintain the function of cell polarity, but also get involved in cell proliferation and division, genetic information transmission and modulation throughout transcription. A great number of transporters that are usually distributed over cell membrane play an extensive role in nutrition and/or hormones supplement, which are required by normal brain development, toxicants and metabolites scavenge from cerebrospinal fluid, and finally the transportation of drugs and poisons. It is noted that these junction proteins and transporter proteins interact one with another to form a systematic network, which is necessary for stabilizing physiological status in the ventricle and preventing brain tissue from the attack by internal and external toxicants. Therefore, this paper reviews the function of junction proteins and transporter proteins within choroid plexus and summarizes the research progress that has been made.

Key words: choroid plexus; blood-cerebrospinal fluid barrier; junction protein; transporter protein; pharmacology; toxicology

Foundation item: The project supported by the Outstanding Scientific Leadership for Study A broad by Beijing Municipal Personnel Bureau (2007-62); Project for Innovation & Development of Public Welfare Institutions (2007); Projects from Beijing Municipal Health Bureau (2007); Projects from Beijing Municipal Health Bureau (2009); and Project for Cultivation of Advanced Professional of Health System in Beijing (2011)

Corresponding author: LI Guo-jun, E-mail: guojunli88@yahoo.com, Tel: (010)64407197, Fax: (010)64407197

(收稿日期: 2011-06-05 接收日期: 2011-12-15)

(本文编辑: 付良青)