

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2014.14.049

去甲肾上腺素转运体的研究进展*

仪丹¹ 侯丛佳² 文学方³ 陈明刚¹ 李磊¹ 牛健⁴ 邢春阳⁵
林志萍⁶ 王挽涛⁷ 麦尔旦·麦麦提敏⁸ 白玉华^{1△}

(1 哈尔滨医科大学大庆校区 黑龙江 大庆 163319; 2 大庆市第五医院 黑龙江 大庆 163711;

3 冈山大学大学院医齿药学综合研究科 日本 冈山 700-8525; 4 哈尔滨医科大学附属第四医院 黑龙江 哈尔滨 150001;

5 福建省漳州市医院神经外科 福建 漳州 363000; 6 哈尔滨医科大学药学院 黑龙江 哈尔滨 150081;

7 哈尔滨医科大学附属第一医院 黑龙江 哈尔滨 150081; 8 冈山大学大学院自然科学研究科 日本 冈山 700-8530)

摘要:随着分子克隆技术的发展和运用,已经可以克隆出人的去甲肾上腺素转运体(Norepinephrine transporter, NET)基因转染进哺乳动物细胞内进行体外研究。去甲肾上腺素转运体在神经传递中有着非常重要的作用,许多神经以及精神系统方面的疾病,心血管疾病等都与去甲肾上腺素转运体的功能缺失或紊乱有关。本文主要介绍了去甲肾上腺素转运体的基本概念和近年来国外对去甲肾上腺素转运体的研究概况,综述了与该转运体相关的药物的研究进展以及由于去甲肾上腺素转运体的功能紊乱或丧失而导致的疾病的临床研究。最近几年对于 NET 基因表达调控以及各种临床疾病的研究对这些疾病的治疗方法的探索有着非常重要的意义。

关键词:去甲肾上腺素转运体;去甲肾上腺素;疾病

中图分类号:Q279, Q344+14 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2014)14-2794-04

Advancement on Norepinephrine Transporter*

YI Dan¹, HOU Cong-jia², WEN Xue-fang³, CHEN Ming-gang¹, LI Lei¹, NIU Jian⁴, XING Chun-yang⁵, LIN Zhi-ping⁶, WANG Wan-tao⁷,
MAIERDAN MAIMAITIMIN⁸, BAI Yu-hua^{1△}

(1 Daqing Campus, Harbin Medical University, Daqing, Heilongjiang, 163319, China;

2 Daqing the 5th Hospital, Daqing, Heilongjiang, 163711, China;

3 Graduate School of Medicine, Dentistry and Pharmaceutical Sciences, Okayama University, Okayama, 700-8530, Japan;

4 The Forth Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin, Heilongjiang, 150001, China;

5 Department of Neurosurgery, Zhangzhou City Hospital, Zhangzhou, Fujian, 363000, China;

6 The First Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin, Heilongjiang, 150081, China;

7 Pharmacy college of Harbin Medical University, Harbin, Heilongjiang, 150081, China;

8 Graduate School of Natural Science and Technology, Okayama University, Okayama, 700-8530, Japan)

ABSTRACT: As the development and application of molecular cloning technology, human norepinephrine transporter (NET) gene can be cloned and transfected into mammalian cells to research *in vitro*. Norepinephrine transporter has a very important role in the neurotransmitter. And many neurological and psychiatric diseases, cardiovascular diseases and other diseases are related to norepinephrine transporter dysfunction or disorder. This article mainly introduced norepinephrine transporter and the study of NET abroad in recent years, and summarized the research of drugs related to NET, and the clinic research of diseases as a result of norepinephrine transporter dysfunction or disorder. The research about NET in recent years have very important significance in the exploration of the treatment for these clinical disease.

Key words: Norepinephrine transporter; Norepinephrine; Disease

Chinese Library Classification(CLC): Q279, Q344+14 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2014)14-2794-04

前言

去甲肾上腺素转运体(Norepinephrine transporter, NET)是一种可以转运神经递质的蛋白,属于单胺类转运蛋白,与多巴

胺转运体,五羟色胺转运体做为同一家族转运体,有很高的序列同源性。NET 可以将突触间的神经递质重新转移到细胞内,从而终止神经传导。随着分子生物学和分子克隆技术的发展,已经可以将人的 NET 基因克隆出进行体外研究,这对 NET 的

* 基金项目:黑龙江省科技攻关项目(GC09C406-4)

作者简介:仪丹(1987-),女,硕士研究生,2012-2013 年日本冈山大学 O-NECUS 项目留学生

主要研究方向:去甲肾上腺素转运体基因表达调控, E-mail: yidanr9@gmail.com

△ 通讯作者:白玉华,电话:0459-8153167, 13936961506, E-mail: yuhuabai58@yahoo.com

(收稿日期:2013-10-29 接受日期:2013-11-15)

研究有了质的飞跃。NET 在中枢神经系统疾病、精神兴奋和抗抑郁药作用机制及心血管疾病等方面,NET 都扮演着重要的角色。

1 去甲肾上腺素转运体简介

1.1 溶质转运蛋白转运体家族

去甲肾上腺素转运体属于溶质转运蛋白(Solute Carrier 6, SLC6) 转运体家族,SLC6 家族中的一些转运体可以协同转运 Cl^- , 所以最初又被称为 Na^+/Cl^- 依赖性神经递质转运蛋白^[1]。SLC6 家族转运体可以分为四个亚型, 神经递质转运体(Neurotransmitter Transporter, NTT) 包括 3 个 γ -氨基丁酸

(GABA)转运体(GAT), 2 个甘氨酸转运体(GLY)和一些单胺转运体,单胺转运体有多巴胺转运体(DAT, SLC6A3), 五羟色胺转运体(SERT, SLC6A4), 去甲肾上腺素转运体(NET, SLC6A2); 氨基酸转运体包括脯氨酸转运体(PROT, IMINO), 阳性和中性氨基酸转运体(AA0, AA0,+); 渗透物转运体包括甜菜碱转运体(BGT1), 牛黄碱转运体(TauT), 肌氨酸转运体(CT) 和一个孤寡转运体(Orphan), 如表 1。在这些转运体中,单胺转运体备受关注,因为它们在许多抗抑郁药以及治疗药物滥用的靶点^[2]。

表 1 溶质转运蛋白分类

Table 1 Solute Carrier

溶质转运蛋白	分类
单胺转运体 (monoamine transporter)	去甲肾上腺素转运体(NET, SLC6A2), 多巴胺转运体(DAT, SLC6A3) 五羟色胺转运体(SERT, SLC6A4)
γ -氨基丁酸转运体 (GAT)	GAT1, GAT2, GAT3
氨基酸转运体 (Amino Acid Transporter)	脯氨酸转运体(PROT, IMINO), 阳性和中性氨基酸转运体(AA0, AA0,+)
渗透物转运体 (Osmolyte Transporter)	甜菜碱转运体(BGT1), 牛黄碱转运体(TauT), 肌氨酸转运体(CT), 孤寡转运体(Orphan)

1.2 NET 结构与功能

亲水性分析展示出单胺神经转运体的结构都有 α -螺旋构成的十二个疏水区域(transmembrane domains, TMDs), 分别在细胞内和细胞外交替排列, 有十二个疏水区, 其中第三和第四疏水去之间有一个较大的细胞外环, C-端和 N-端都在细胞内^[3], 如图 1。

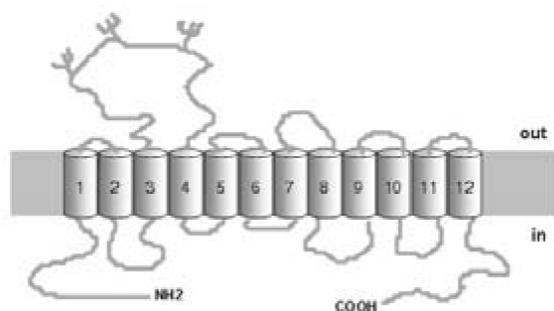


图 1 去甲肾上腺素转运体(NET)的结构

Fig.1 The structure of NET

大部分在细胞膜表面的 NET 功能是通过 Na^+/Cl^- 依赖的对释放的去甲肾上腺素的重吸收到神经细胞或胶质细胞中, 终止突出传递。在细胞内累积神经递质不仅清理了突触间隙神经递质, 而且调节了突触小泡中神经递质的存储^[4]。

2 NET 的表达调控

2.1 NET 与基因调控

由于分子克隆技术的应用, 研究人员已经可以克隆出人的

NET 基因转染哺乳细胞内进行体外研究。NET 不仅可以转运去甲肾上腺素, 而且也可以转运多巴胺, 甚至对多巴胺的亲合力高于 DAT。

NET 基因位于第八条染色体, 该染色体是酗酒者出现变异较多的一条染色体。Kitayama.S 等人通过 RT-PCR 和可变剪切技术, 在 COS-7 细胞中表达各种克隆出的 NET 基因亚型, 证明了 NET 基因上的 13 号外显子对 NET 的功能表达是不可避免的^[5]。该实验室也证明了 NET 基因 5' 上游 9.0kb 和一个位于 5' 非翻译区的内含子对 NET 的转录非常关键^[6]。NET 基因转录的 RNA 拼接时会在 3' 端的编码区和非编码区发生可变剪切, 导致了不同的羧基端。NET 在突出传递中的可变剪切对研究 NET 的生理作用非常重要^[5]。

瞬时转染实验证明了 5' 上游 4.0 kb 的序列包含了非常多的用于 NET 转录的信息, 如: -4.0 至 3.0 kb 的增强子区, -133 bp 至 -75 bp 附近的区域, 以及在这两个区域中间的一个沉默子区域^[5]。通过 DNaseI 分析这一区域包括一个亚功能区(Subdomain) -128 至 80 bp。很多蛋白通过与这个区域发生相互作用来调节 NET 的转录。这其中就包括一个同源异型域(Homedomain, HD), 该区域与 Phox2a、HoxA5 等 HD 因子相互作用。共转染分析显示 HoxA5 和 Phox2a 可能是通过 hNET 基因的启动子来发挥作用的^[6]。

2.2 以 NET 为靶点的药物作用

可卡因、吗啡等成瘾性药物主要作用于单胺转运体, 通过阻止转运体对神经递质的重吸收, 从而增强神经递质的兴奋作用。滥用的药物的特别刺激功能在认知、保持和吸毒的恢复中有重要作用^[7]。神经激肽-1 受体(NK1R)可以通过蛋白激酶 C

(PKC)上调 hNET。NK1R 介导的苏氨酸和丝氨酸通过 NET 与 NK1R 结合而翻译,并且与 PKC α 共同在空间上限制 NET 的调节^[8]。

另外,NE 的释放和被突出前神经元与成骨细胞的重吸收在复杂的自我稳定机制中是个很重要的现象,交感神经系统正是通过这个机制来控制骨骼重构^[9]。所以,那些以 NET 为靶点的药物在治疗多动症的同时,对骨骼生长也会有副作用。

3 NET 与疾病的关系

3.1 心血管疾病

大约 80%~90%在大脑或其他组织中被释放的去甲肾上腺素会被 NET 重吸收。对 NET 抑制剂的药理学研究表明在大脑和其他组织中,NET 对心血管交感神经的调节有相反的作用。进而,NET 在血管,心脏,肾脏等神经系统中的不尽相同。在一些原发性高血压病人中 NET 的功能会减少。NET 对心血管的功能可以缓解常见的心脏病,比如充血性心衰竭,局部缺血性心脏病和应激性心脏病^[13]。

NET 基因表达的缺失会导致神经或者心血管方面的疾病。在人体中 NET 的完全缺失的疾病还没有被发现,目前有研究表明 NET 基因敲除的小鼠 NET 的表达减少了一半,但是 NET 在海马区和皮质突触体中的作用并没有减少,被补偿的 NET 的功能是由于多巴胺转运体,五羟色胺转运体和有机阳离子转运体的作用。这一研究对人类 NET 功能缺失和 NET 的补偿功能有关的疾病有很大贡献^[14]。最近还有研究表明在肥胖个体中 NET 在丘脑和丘脑枕中的表达减少^[15]。

体位性心动过速综合征 (Postural Tachycardia Syndrome, POTS)与去甲肾上腺素转运体的功能紊乱有关,近年研究表明与去甲肾上腺素转运体 SLC6A2 家族序列的编码基因突变有关^[16]。NET 在 POTS 患者体内的表达比健康志愿者体内低,减少的表达可能与染色质修饰引起的 SCL6A2 基因抑制有关^[17]。

在去氧皮质酮(Deoxycorticosterone, DOCA)盐高血压的心脏,通过 NET 重吸收去甲肾上腺素会减少。在高血压心脏中并不是由于 NET 的 mRNA 与蛋白水平在星状神经节与心脏中的完全减少^[18]。动物高血压心脏病模型实验中,NET 的调节只是区域性地发生在大鼠的星状神经节与高血压心脏中^[19]。

3.2 镇痛药和抗抑郁药

五羟色胺和去甲肾上腺素重吸收抑制剂实验对神经痛动物模型有镇痛作用。神经痛动物模型的脊神经结扎(spinal nerve ligation, SNL)实验中,5-HTT 下调与 NET 上调说明靶作用于这两种转运体的抗抑郁药的不同镇痛作用机制^[20]。SLC6A2 家族基因的单核苷酸多态性(single-nucleotide polymorphisms, SNPs)与抗抑郁药奥氮平与氟西汀联合用药有关^[21]。单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphism, SNP)是指在基因组水平上由单个核苷酸的变异引起的一种 DNA 序列多态性。大部分抑郁症患者目前还不能完全治愈,对于儿童抑郁症临床上用药只有两种选择性的五羟色胺转运体抑制剂^[22,23]。近些年有研究表明共同抑制五羟色胺转运体与去甲肾上腺素转运体对单胺重吸收抑制剂与阿片类药物介导的镇痛作用的协同作用是必须的^[24]。通过作用 5-HT₃ 受体的过量五羟色胺可能会减少协同作用的效果,有实验观察到去甲肾上腺素和五羟

色胺的平衡影响单胺重吸收和吗啡的协同作用^[25]。

3.3 创伤后应激障碍

人类去甲肾上腺素能神经递质功能障碍与创伤后应激障碍(Posttraumatic Stress Disorder, PTSD)有关,动物模型实验表明,慢性压力与蓝斑中 NET 的活性减少有关,但是该实验中的动物模型是否完全符合 PTSD 还有待探究^[26]。利用正电子放射断层造影技术和同位素 ¹¹C 法测量正常人与创伤后导致与未导致 PTSD 的患者蓝斑内 NET 的活性,表明了 PTSD 显著地减少了蓝斑中 NET 的活性,NET 在大脑中的活性与 PTSD 患者个体焦急兴奋情绪的严重程度增加有关^[27]。

3.4 注意力障碍多动症

注意力障碍多动症 (Attention-deficit Hyperactivity Disorder, ADHD)多发生在儿童中,去甲肾上腺素能神经系统的调节异常是 ADHD 病理生理学的重要原因。SLC6A2 基因的多变性例如 G1287A 和 A-3081T 基因型可能与之相关^[28]。阿托西丁(Atomoxetine, ATX)是治疗抑郁症和 ADHD 的重要药物,阿托西丁的作用靶点主要是去甲肾上腺素转运体与五羟色胺转运体,但是临床上治疗抑郁症与 ADHD 可能比药物选择性阻断 NET 更复杂^[29]。

4 小结与展望

随着医学的发展以及分子生物学等其他学科与技术的发展和运用,NET 的研究已经越来越深入,以后会随着相关学科的发展,出现新的研究方法,以后会在 NET 在基因水平的表达和调控提供崭新的思路。NET 在疾病中的作用已经越来越受到人们的重视,随着研究的不断深入,对 NET 的结构与功能的进一步认识,这将对药物的成瘾研究以及 NET 功能与表达相关疾病的治疗有较大的临床意义^[30]。

参考文献(References)

- [1] Pramod AB, Foster J, Carvelli L, et al. SLC6 transporters: structure, function, regulation, disease association and therapeutics [J]. Mol Aspects Med, 2013, 34(2-3):197-219
- [2] Timple JM, Magalhães LG, Souza Rezende KC, et al. The Lignan (-)-Hinokinin Displays Modulatory Effects on Human Monoamine and GABA Transporter Activities [J]. J Nat Prod, 2013, 76(10):1889-1895
- [3] Kitayama S, Sogawa C, Dohi T. Structure, function, and regulated expression of neurotransmitter transporters [J]. Nihon Yakurigaku Zasshi, 2007, 130(6):444-449
- [4] Kielbasa W, Tesfaye E, Luffer-Atlas D, et al. The effect of hepatic or renal impairment on the pharmacokinetics of edivoxetine, a selective norepinephrine transporter reuptake inhibitor [J]. Eur J Clin Pharmacol, 2013, 8:17
- [5] Kitayama S, Kumagai K, Morita K, et al. Identification and functional characterization of the novel isoforms of bovine norepinephrine transporter produced by alternative splicing [J]. Brain Res, 2002, 934(2): 152-156
- [6] Yi D, Sogawa C, Wen XF, et al. Characterization of Noradrenaline Transporter Gene at 5'-Flanking Region [C]. The Third International Symposium of Medical-Dental-Pharmaceutical Education and Research in Okayama, 2013. 9. 22-2013. 9. 23
- [7] Kitayama S, Dohi T. Norepinephrine transporter splice variants and

- their interaction with substrates and blockers [J]. *Eur J Pharmacol*, 2003, 479(1-3): 65-70
- [8] Colzato LS, Zmigrod S, Hommel B. Dopamine, norepinephrine, and the management of sensorimotor bindings: individual differences in updating of stimulus-response episodes are predicted by DAT1, but not DBH5'-ins/del [J]. *Exp Brain Res*, 2013, 228(2): 213-220
- [9] Kim CH, Hwang DY, Park JJ, et al. A proximal promoter domain containing a homeodomain-binding core motif interacts with multiple transcription factors, including HoxA5 and Phox2 proteins, and critically regulates cell type-specific transcription of the human norepinephrine transporter gene [J]. *J Neurosci*, 2002, 22(7):2579-2589
- [10] Kohut SJ, Decicco-Skinner KL, Johari S, et al. Differential modulation of cocaine's discriminative cue by repeated and variable stress exposure: relation to monoamine transporter levels [J]. *Neuropharmacology*, 2012, 63(2): 330-337
- [11] Arapulisamy O, Mannangatti P, Jayanthi LD, et al. Regulated norepinephrine transporter interaction with the neurokinin-1 receptor establishes transporter subcellular localization [J]. *J Biol Chem*, 2013, 288(40): 28599-28610
- [12] Ma Y, Krueger JJ, Redmon SN, et al. Extracellular norepinephrine clearance by the norepinephrine transporter is required for skeletal homeostasis [J]. *J Biol Chem*, 2013, 288(42): 30105-30113
- [13] Schroeder C, Jordan J. Norepinephrine transporter function and human cardiovascular disease [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2012, 303(11): H1273-282
- [14] Fentress HM, Klar R, Krueger JJ, et al. Norepinephrine transporter heterozygous knockout mice exhibit altered transport and behavior [J]. *Genes Brain Behav*, 2013, 12(8):749-759
- [15] Li CS, Potenza MN, Lee DE, et al. Decreased norepinephrine transporter availability in obesity: Positron Emission Tomography imaging with (S,S)-[11C] O-methylreboxetine. [J]. *Neuroimage*, 2013, S1053-8119(13):01014-01018
- [16] Bayles R, Harikrishnan KN, Lambert E, et al. Epigenetic modification of the norepinephrine transporter gene in postural tachycardia syndrome [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2012, 32(8):1910-1916
- [17] Green EA, Raj V, Shibao CA, et al. Effects of norepinephrine reuptake inhibition on postural tachycardia syndrome[J]. *J Am Heart Assoc*, 2013, 2(5): e000395
- [18] Wehrwein EA, Novotny M, Swain GM, et al. Regional changes in cardiac and stellate ganglion norepinephrine transporter in DOCA-salt hypertension [J]. *Auton Neurosci*, 2013, S1566-0702 (13): 00679-00676
- [19] Sterley TL, Howells FM, Russell VA. Evidence for reduced tonic levels of GABA in the hippocampus of an animal model of ADHD, the spontaneously hypertensive rat [J]. *Brain Res*, 2013, S0006-8993 (13)01414-01415
- [20] Rojo ML, Rodríguez-Gaztelumendi A, Pazos, et al. Differential adaptive changes on serotonin and noradrenaline transporters in a rat model of peripheral neuropathic pain [J]. *Neurosci Lett*, 2012, 515(2):181-186
- [21] Houston JP, Lau K, Aris V, et al. Association of common variations in the norepinephrine transporter gene with response to olanzapine-fluoxetine combination versus continued-fluoxetine treatment in patients with treatment-resistant depression: a candidate gene analysis [J]. *J Clin Psychiatry*, 2012, 73(6):878-885
- [22] Mitchell NC, Gould GG, Smolik CM, et al. Antidepressant-like drug effects in juvenile and adolescent mice in the tail suspension test: Relationship with hippocampal serotonin and norepinephrine transporter expression and function [J]. *Front Pharmacol*, 2013, 28(4):131
- [23] Blier P. Rational site-directed pharmacotherapy for major depressive disorder[J]. *Int J Neuropsychopharmacol*, 2013, 6(10):1-12
- [24] Shen F, Tsuruda PR, Smith JA, et al. Relative Contributions of Norepinephrine and Serotonin Transporters to Antinociceptive Synergy between Monoamine Reuptake Inhibitors and Morphine in the Rat Formalin Model [J]. *PLoS One*, 2013, 8(9):e74891
- [25] Zhang H, Huang R, Pillarsetty N, et al. Synthesis and evaluation of 18F-labeled benzylguanidine analogs for targeting the human norepinephrine transporter [J]. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*, 2013,10: 31
- [26] Pietrzak RH, Gallezot JD, Ding YS, et al. Association of Posttraumatic Stress Disorder With Reduced In Vivo Norepinephrine Transporter Availability in the Locus Coeruleus [J]. *JAMA Psychiatry*, 2013, 70(11):1199-1205
- [27] Zhao X, Huang Y, Ma H, et al. Association between major depressive disorder and the norepinephrine transporter polymorphisms T-182C and G1287A: a meta-analysis [J]. *J Affect Disord*, 2013,150(1):23-28
- [28] Park S, Kim JW, Yang YH, et al. Possible effect of norepinephrine transporter polymorphisms on methylphenidate-induced changes in neuropsychological function in attention-deficit hyperactivity disorder [J]. *Behav Brain Funct*, 2012, 16(8):22
- [29] Ding YS, Naganawa M, Gallezot JD, et al. Clinical doses of atomoxetine significantly occupy both norepinephrine and serotonin transporters: Implications on treatment of depression and ADHD [J]. *Neuroimage*, 2013, S1053-8119(13)00850-00851
- [30] Trillo L, Das D, Hsieh W, et al. Ascending monoaminergic systems alterations in Alzheimer's disease. translating basic science into clinical care [J]. *Neurosci Biobehav Rev*, 2013, 37(8): 1363-1379