

综述

尿素通道蛋白的肾脏生理学研究进展

李英杰, 杨宝学*

北京大学基础医学院药理学系, 北京 100191

摘要: 尿素通道蛋白(urea transporter, UT)是一类特异性通透尿素的跨膜蛋白, 包括两个亚家族, UT-A和UT-B。UT-A亚家族有六个成员UT-A1~UT-A6, 主要在肾脏表达。UT-B亚家族仅有一个成员, 在全身多脏器表达。通过对6个UT基因敲除小鼠的肾脏表型研究发现UT在尿液浓缩机制中发挥重要作用。研究结果提示UT可作为新的利尿药作用靶点, 其抑制剂可研发成为新型利尿药。本文就UT的肾脏生理学功能及药物研发等方面的研究进展进行综述。

关键词: 尿素通道蛋白; 肾脏; 尿浓缩; 生理功能; 利尿药

中图分类号: R334.1

Renal physiology of urea transporters

LI Ying-Jie, YANG Bao-Xue*

Department of Pharmacology, School of Basic Medical Sciences, Peking University, Beijing 100191, China

Abstract: Urea transporters (UTs) are transmembrane urea-selective channel proteins that include two UT subfamilies, UT-A and UT-B. UT-A subfamily includes six members, UT-A1 to UT-A6, which are mainly expressed in kidney. UT-B subfamily has only one member that has a wide distribution in the body. UTs have been confirmed to play important roles in urinary concentration via the phenotypic analysis of 6 UT selective knockout mouse models. Experimental results suggest that UTs might be diuretic targets and that UT inhibitors might be developed as novel diuretics. This article reviews the physiological function and drug discovery of UT.

Key words: urea transporter; kidney; urine concentration; physiological function; diuretics

1 尿素通道蛋白(urea transporter, UT)概述

UT 是一类特异性通透尿素的跨膜蛋白, 在浓度差的作用下, 介导尿素快速通过细胞膜, 其通透尿素的速度大约是单纯扩散的 10~100 倍^[1,2]。自 1993 年第一个 UT 被克隆以来, 在哺乳动物体内共发现两个 UT 亚家族, 分别命名为 UT-A 和 UT-B。

UT-A 由位于第 18 号染色体上的 *Slc14a2* 基因所编码。*Slc14a2* 基因含有 2 个启动子 UT-A α 和 UT-A β 以及 24 个外显子, 长度 300 kb, 由 mRNA 经不同剪切方式产生 6 个成员 UT-A1~UT-A6^[3]。UT-A1 是 UT 家族中最大的分子, 由 1~12 号外显

子和 14~23 号外显子编码。UT-A2 的大小约为 UT-A1 的一半, 由 13~23 号外显子编码, 与 UT-A1 拥有共同的 C 末端氨基酸序列。UT-A3 由 1~12 号外显子编码, 与 UT-A1 拥有共同的 N 末端氨基酸序列。UT-A4 由 1~7 号和 18~23 号外显子编码, 相当于由 UT-A1 的 N 末端的 1/4 和 C 末端的 1/4 拼接组成, 目前仅在大鼠肾脏内检测到。UT-A5 由 6~13 号外显子编码, 表达于睾丸^[4]。UT-A6 由 1~11 号外显子编码, 表达于结肠^[5]。

UT-B 由位于第 18 号染色体上的 *Slc14a1* 基因所编码^[6,7], 与 *Slc14a2* 基因连锁。已在人、大鼠和

Received 2018-06-05 Accepted 2018-09-30

Research from the corresponding author's laboratory was supported by grants from the National Natural Science Foundation of China (No. 81620108029, 81330074).

*Corresponding author. Tel: +86-10-82805559; E-mail: baoyue@bjmu.edu.cn

小鼠骨髓细胞系克隆^[8,9]。UT-B 基因含有 11 个外显子,其中 1~3 号为非编码区,4~11 号为编码区域,长度为 30 kb。目前,UT-B 家族仅发现一个成员即 UT-B,主要在肾脏、红细胞、心脏、大脑、肝脏、脾脏、结肠、小肠、膀胱、输尿管、睾丸等器官表达^[10–21]。

牛 UT-B 的结构已经被解析^[22]。UT-B 以三聚体状态结晶。每一个 UT-B 分子的结构相当于两个半圆柱状结构域相向扣合而成的空心圆柱,这两个半圆柱状结构域结构相似,分别由 6 段 α 螺旋构成。每一个 UT-B 分子圆柱状结构的中心孔是选择性滤过尿素分子的通道。其他 UT 的立体结构尚不清楚。

2 UT在肾脏中的表达调控

2.1 UT-A1

UT-A1 主要表达于肾集合管末端主细胞的顶膜和细胞内囊泡^[23–27]。在肾脏内髓可以检测到 97 kDa 和 117 kDa 大小的 UT-A1 蛋白,均为 UT-A1 的糖基化形式^[28]。UT-A1 的功能调控涉及多水平、多层次的调节机制。

2.1.1 UT-A1的磷酸化调节

UT-A1 功能主要受血管加压素调节。加压素通过与内髓集合管(inner medulla collecting duct, IMCD)末端主细胞基底膜上的 V2 受体结合,激活磷酸腺苷环化酶,增加 cAMP 生成,进而激活蛋白激酶 A (protein kinase A, PKA) 通路。活化的 PKA 可促进 UT-A1 在 Ser486 与 Ser499 位点的磷酸化^[29,30],磷酸化的 UT-A1 转位到细胞膜,增加细胞膜尿素通透性。除了 cAMP-PKA 途径,UT-A1 还受 PKC 通路调节。UT-A1 细胞内亲水内环上有多个 PKA 和 PKC 的磷酸化位点^[31,32]。cAMP 激动剂均可以激活 UT-A1 的尿素通透活性^[33]。而高渗透压和血管紧张素 II 则通过活化 PKC 通路激活 UT-A1 的活性^[34,35]。

2.1.2 蛋白质N-糖基化修饰调节

UT-A1 作为高度糖基化膜蛋白分子,其活性受 N-糖基化的调控。Chen 等人发现细胞内糖基化的 UT-A1 在加压素的调节下可以快速转位到细胞膜,而将 UT-A1 两个 N-糖基化位点突变,去糖基化的 UT-A1 不稳定,易降解,且明显影响加压素刺激引起的 UT-A1 上膜反应及尿素通透性^[36]。

2.1.3 UT-A1细胞膜脂筏(lipid rafts)调节

细胞膜内 UT-A1 正常情况下集中分布在脂筏

内。糖基化水平影响 UT-A1 进入脂筏。糖基化成熟的 117 kDa 的 UT-A1 更容易进入细胞膜脂筏,增加 UT-A1 在细胞膜内的数量和活性^[37]。

2.2 UT-A2

UT-A2 主要表达于肾脏髓袢降支细段^[38–42]。在肾脏内髓可以检测到 55 kDa 大小的 UT-A2 蛋白。UT-A2 特异性转运尿素,对水、氨、甲基脲、二甲脲、甲酰胺等物质基本不通透。硫脲和根皮素均可以抑制 UT-A2 转运尿素的能力。UT-A2 转运尿素的速度为 4.6×10^4 尿素分子/秒/通道。

将 UT-A2 表达于蛙卵母细胞和人胚胎肾 293 细胞上时,其表达并不受 cAMP 及其类似物调控^[43–45],当表达于 MDCK 细胞上时,血管加压素和毛喉素均可以提高细胞对尿素的通透能力,但给予 PKA 抑制剂时,毛喉素的促进作用并没有减弱^[46]。

2.3 UT-A3

UT-A3 主要表达于肾内髓集合管末端,在内髓底部较少,在皮质集合管不表达^[47,48]。在肾脏内髓尖部可以检测到 44 kDa 和 67 kDa 大小的 UT-A3 蛋白,均为 UT-A3 的糖基化形式^[49]。UT-A3 特异性转运尿素,对水、氨、甲基脲、二甲脲、甲酰胺等物质基本不通透^[50]。UT-A3 转运尿素的速度为 5.9×10^4 尿素分子/秒/通道^[39],与 UT-A2 相近。将 UT-A3 表达于蛙卵母细胞和人胚胎肾 293 细胞时,其表达水平受 cAMP 及其类似物调控^[51]。血管加压素也可以通过 PKA 途径调节 UT-A3 表达^[52]。

2.4 UT-A4

UT-A4 仅在大鼠髓质检测到,但具体定位还不清楚,在人和小鼠体内还没有检测到。将 UT-A4 表达于人胚胎肾 293 细胞上时,其表达可以被 cAMP 及其类似物调控^[43]。

2.5 UT-B

在肾脏,UT-B 主要表达于直小血管降支内皮细胞。Western blot 法可以在人红细胞中检测到 45~65 kDa 大小范围的 UT-B 条带,而在大鼠或小鼠的红细胞中检测到的 UT-B 条带长度范围为 37~51 kDa。在肾脏髓质检测到的 UT-B 的条带长度为 41 kDa 和 54 kDa^[53]。

将 UT-B 表达在蛙卵母细胞膜上时,根皮素和硫脲可以抑制其尿素通透性。除了尿素,UT-B 还可以通透多种尿素类似物,包括甲基脲、甲酰胺、乙酰胺等物质^[54]。研究显示 UT-B 还可以通透水^[55,56]。

3 UT敲除小鼠的肾脏表型研究

3.1 UT-B敲除小鼠

UT-B 敲除小鼠是首个 UT 敲除小鼠模型, 于 2002 年应用基因打靶技术建立^[1, 57]。相较野生型小鼠, UT-B 敲除小鼠的肾脏形态、组织结构并未表现明显异常。但 UT-B 敲除小鼠的尿量显著增加, 尿渗透压下降, 尿浓缩能力下降 50%。血中钠、钾、氯、碳酸氢根等离子及肌酐水平保持正常水平, 而血尿素含量较野生型小鼠升高 30%。UT-B 敲除小鼠肾内髓组织的尿素浓度显著降低, 而其钠、钾、氯等其他溶质浓度没有变化。给予急性尿素负荷后, UT-B 敲除小鼠和野生型小鼠的尿量均有增加, UT-B 敲除小鼠增加的幅度更加明显。UT-B 敲除小鼠的尿尿素浓度、尿渗透压水平升高的幅度则低于野生型小鼠, 尿素及其他溶质的排出量在两种小鼠间没有统计学差异^[58]。上述实验说明 UT-B 的缺失会导致尿素选择性的尿浓缩能力缺失。

当给予 UT-B 敲除小鼠和野生型小鼠不同蛋白含量(高蛋白饲料: 蛋白 40%; 正常饲料: 蛋白 20%; 低蛋白饲料: 蛋白 10%) 饲料喂养时, 同一蛋白含量饲料组中, 与野生型小鼠相比, UT-B 敲除小鼠的尿渗透压显著降低, 尿量显著增高。高蛋白组中, UT-B 敲除小鼠的尿尿素浓度仅为 1000 mmol/L, 远远低于野生型小鼠。UT-B 敲除小鼠的血尿素水平随蛋白含量的增加而增高, 正常蛋白饮食组是低蛋白饮食组的 1.5 倍, 高蛋白饮食组是低蛋白饮食组的 1.75 倍。UT-B 敲除小鼠与野生型小鼠血尿素比值随蛋白含量的增加而增加。随着蛋白摄入量的梯度升高, 两种小鼠的尿素排泄量同步升高, 但升高机制不同, 野生型小鼠是通过提高尿中尿素浓度, 而 UT-B 敲除小鼠只能通过增加尿量实现尿素排泄的平衡。即使连续喂食一周高蛋白饮食后, UT-B 敲除小鼠仍不能利用额外的尿素来提高尿浓缩能力。上述实验结果说明 UT-B 在尿浓缩过程中发挥着重要作用^[58, 59]。

3.2 UT-A1/A3双敲除小鼠

Fenton 等人应用基因打靶技术, 将 UT-A 编码基因中第十号外显子敲除, 获得了 UT-A1/A3 双敲除小鼠^[60], 由于 UT-A 基因编码的复杂性^[61], 所以 UT-A1/A3 双敲除小鼠体内仍有其他 UT 成员的表达。UT-A1/A3 双敲除小鼠在体重、外观、行为学等方面与野生型小鼠均没有显著性差异^[62]。UT-A1/A3 双敲除后, 小鼠的肾脏较野生型小鼠偏小。给

予 UT-A1/A3 双敲除小鼠和野生型小鼠高蛋白和正常蛋白饮食时, UT-A1/A3 双敲除小鼠的饮水量和尿量明显高于野生型小鼠。而低蛋白饮食组中两种小鼠之间无明显差异。给予小鼠 18 h 禁水处理后, 低蛋白组小鼠的尿量有所降低。实验结果表明 UT-A1/A3 双敲除小鼠尿浓缩能力缺失是尿素依赖的渗透性利尿所导致的^[63]。

3.3 UT-A2敲除小鼠

为了探究 UT-A2 在肾脏的生理作用, Uchida 等人针对 UT-A2 的启动子进行基因打靶, 特异性地敲除了 UT-A2。UT-A2 敲除小鼠并未表现出明显的生理异常, 血生化水平也与野生型小鼠相一致^[64]。与野生型小鼠相比, UT-A2 敲除小鼠的尿量和尿渗透压没有变化, 只是在低蛋白饲料喂食情况下, UT-A2 敲除小鼠的尿浓缩能力有轻微下降。该结果提示, 在基础状态下, UT-A2 对于维持尿浓缩能力作用不大。

3.4 UT-A2/UT-B双敲除小鼠

利用基因打靶技术, 本研究组对 UT-B 敲除小鼠胚胎干细胞进行 UT-A2 启动子敲除, 建立了 UT-A2/UT-B 双敲除小鼠模型^[65]。UT-A2/UT-B 双敲除小鼠在外观、形态、体重、肾重等方面与野生型小鼠并无差异。UT-A2/UT-B 双敲除小鼠的尿量高于野生型小鼠, 但低于 UT-B 敲除小鼠, 尿渗透压水平也介于两种小鼠之间。给予小鼠禁水 18 h 处理后, UT-A2/UT-B 双敲除小鼠的尿渗透压升高了 50%~60%, 达到 2 900 mOsm/kg, 说明 UT-A2 在基础状态下介导尿素从髓袢降支细段管腔内跨膜转运到组织中^[65, 66]。

3.5 UT-A3敲除小鼠

为了探究 UT-A1 单独在尿浓缩过程中的作用, Sands 实验室在 UT-A1/A3 双敲除小鼠的基础上, 用单纯转基因技术在集合管末端主细胞特异性表达 UT-A1, 获得了只表达 UT-A1, 而不表达 UT-A3 的小鼠模型。UT-A3 敲除小鼠生长发育较野生型小鼠并无差异, 也不表现任何生理学异常^[67]。集合管离体灌流实验中, UT-A3 敲除的集合管对尿素的通透性几乎和野生型一致, 显著高于 UT-A1/A3 双敲除小鼠, 当给予抗利尿激素处理时, 仅野生型小鼠对尿素的通透性会有明显增加, 而 UT-A3 敲除小鼠和 UT-A1/A3 双敲除小鼠对尿素的通透性均只有轻微升高。UT-A3 敲除小鼠的尿量和尿渗透压基本和野生型小鼠相同, 尿量远远低于 UT-A1/A3 敲除小鼠,

约为双敲除小鼠的 1/3, 渗透压则高于双敲除小鼠, 约为双敲鼠的 2 倍。当三种小鼠禁水 24 h 后, UT-A3 敲除小鼠和野生型小鼠的尿渗透压明显升高, 约为 40%, 而 UT-A1/A3 敲除小鼠仅轻微升高。这些实验结果说明, 在 UT-A1 和 UT-A3 缺失的基础上, 恢复 UT-A1 的表达可以将尿浓缩能力恢复到接近正常水平, 但并不能恢复抗利尿激素促进的尿素通透作用。相较于 UT-A3, 在维持肾脏内髓尿素浓度梯度, 保证肾脏正常尿浓缩功能过程中, UT-A1 更为重要。

3.6 UT全敲除小鼠

2017 年, 本研究组通过基因打靶技术同时敲除了 UT-A 基因 (*Slc14a2*) 的第 4~24 号外显子及 UT-B 基因 (*Slc14a1*) 的第 1~7 号外显子, 获得 UT 全敲除小鼠。UT 全敲除小鼠生长发育、外观行为均与野生型小鼠无明显差异。UT 全敲除小鼠表现显著性多尿, 日均尿量约为野生型小鼠的 3 倍^[68]。UT 全敲除小鼠的尿渗透压显著低于野生型小鼠。禁水 24 h 处理后, 野生型小鼠的尿渗透压显著升高, 而 UT 全敲除小鼠的尿渗透压升高平缓。

UT 全敲除小鼠的肾脏皮质和外髓未见组织学异常, 而内髓组织出现集合管扩张, 这一现象可能是由于尿量增加所造成。UT 全敲除小鼠的尿尿素浓度与野生型小鼠相比, 显著降低; 但血尿素及血钠、钾、氯等离子基本一致。两种小鼠之间血肌酐

和肌酐清除率基本相同, 说明 UT 全敲除对于肾小球滤过功能没有影响。急性尿素负荷实验中, 注射尿素后, 两种小鼠的尿量均有显著增加, 随后尿量逐渐减少, 而 UT 全敲除小鼠的尿量一直多于野生型小鼠。野生型小鼠的尿渗透压、尿尿素浓度随着时间延长逐渐升高, 而 UT 全敲除小鼠变化幅度较缓, 说明没有 UT, 小鼠肾脏内髓组织无法积累尿素^[68]。

为了评估 UT 全敲除小鼠在不同尿素排泄量的情况下的肾脏尿浓缩功能, 分别给予野生型小鼠和 UT 全敲除小鼠连续喂食含有高蛋白、正常蛋白以及低蛋白的饲料一周。低蛋白组中, 两种小鼠的尿量均减少, 而高蛋白组中, 两种小鼠的尿量均增加。喂食同一蛋白含量的两组小鼠中, UT 全敲除小鼠的尿量均多于野生型小鼠。随着蛋白含量的升高, 野生型小鼠尿渗透压、尿尿素浓度随之升高, 而 UT 全敲除小鼠的尿渗透压、尿尿素浓度不随蛋白含量变化, 并且 UT 全敲除小鼠的尿渗透压和尿尿素浓度远远低于野生型小鼠^[68]。

上述各 UT 敲除小鼠模型解析了尿素和 UT 在尿浓缩过程中的作用 (如图 1)^[68]。当尿液流经集合管时, 水在管内外渗透压差的作用下通过水通道蛋白被重吸收, 使管腔内的尿素浓度逐渐升高。高浓度的尿素在集合管末端通过 UT-A1 和 UT-A3 被重吸收到组织间隙, 使内髓尖部组织呈现高浓度尿素

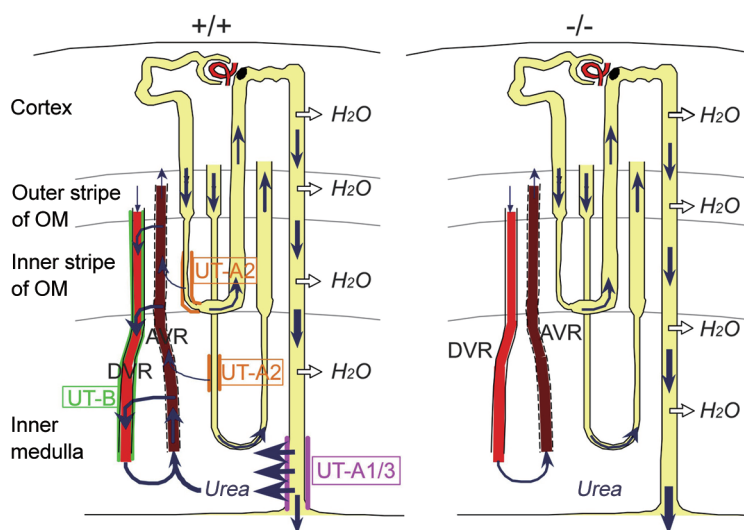


图 1. 野生型小鼠(+/+)和UT全敲除小鼠(-/-)的肾内尿素循环模式图

Fig. 1. Diagram of urea recycling in the kidney of wild-type (+/+) and all-UT-knockout (-/-) mice. Blue arrows mean the orientation and concentration of urea. OM: outer medulla; AVR: ascending vasa recta; DVR: descending vasa recta. Reproduced from Jiang *et al.*, 2017^[68].

积累^[69]。组织中高浓度的尿素在浓度差的作用下通过微孔进入直小血管升支, 然后尿素以逆流交换的方式通过 UT-B 从直小血管升支转运到直小血管降支, 随血液重新回到内髓, 以保持肾脏内髓组织的尿素浓度梯度^[72]。该过程是肾内尿素循环生理学基础。UT-A2 的作用主要是基于髓袢降支细段管内外的尿素浓度, 调节管腔内和组织之间的尿素浓度平衡。因此, 肾内髓组织的尿素浓度梯度和渗透压梯度依赖各 UT 介导的肾内尿素循环。上述研究结果也提示 UT 在尿浓缩机制中发挥重要作用, UT 的功能性抑制导致尿浓缩能力下降, 同时并不引起血内各种离子的紊乱, UT 可作为利尿药开发靶点, 其抑制剂可研发成为新型利尿药^[70-72]。

4 UT相关药物研发进展

2012 年, Verkman 研究组发现了第一个具有体内利尿作用的 UT-B 抑制剂, Triazolothienopyrimidine^[73]。该抑制剂特异性地抑制 UT-B, 对 UT-A 没有作用, 其利尿机制是阻断肾内尿素循环中尿素从直小血管升支向直小血管降支转移过程, 使部分尿素不能回到肾髓质而进入血液循环。因此, 其利尿作用较弱, 只是在加压素作用的特殊条件下才表现出利尿作用。

本研究组通过对 Asinex 公司小分子化合物库进行高通量筛选, 发现了具有特异性抑制 UT 活性的噻吩并喹啉类化合物 PU-14。该化合物对尿素通道 UT-A 和 UT-B 的尿素通透性均有抑制作用^[74, 75]。体内实验发现皮下注射 PU-14 可显著增加大鼠尿量, 降低尿渗透压, 表明其具有明显的尿素选择性利尿作用。血生化指标检测结果显示 PU-14 的利尿作用不引起 Na^+ 、 K^+ 、 Cl^- 和血脂、血糖水平的改变, 提示 PU-14 类化合物具有药理学研究和药物开发价值。由于 PU-14 抑制 UT-B 和 UT-A 活性, 其在阻断肾内尿素循环中尿素从直小血管升支向直小血管降支转移过程时, 也同时阻断肾内尿素循环中集合管末端的尿素向髓质组织中扩散, 可促进尿素排出, 因此不明显改变血尿素水平; 而且最大利尿活性显著高于 Triazolothienopyrimidine。

在 PU-14 的基础上, 本研究组根据构效关系, 对 PU-14 进行化学结构改造和类似物药理学活性筛选, 获得了利尿作用更强的化合物 PU-48, 相较于 PU-14, PU-48 对 UT-A 的抑制活性要强于对 UT-B 的抑制^[76]。体内实验显示, PU-48 可以显著增加大

鼠尿量, 降低尿渗透压, 并且不引起电解质平衡紊乱。大鼠集合管灌流实验表明 PU-48 可以显著抑制跨集合管上皮细胞的尿素转运, 提示噻吩并喹啉类化合物主要通过抑制表达于集合管末端的 UT-A 发挥利尿作用, 其有望研发成为不引起电解质紊乱的新型利尿药。

5 展望

从第一个 UT 被克隆至今不足 30 年, UT 家族共发现包括 UT-A1~UT-A6 及 UT-B 在内的七个成员。UT 在全身多个器官均有表达, 发挥着重要作用, 其相关生理学功能越来越受到研究人员的关注。

UT 在肾脏的生理学功能已比较清楚, 其在肾脏尿浓缩过程中发挥着重要作用, UT 敲除小鼠表现出尿量增加而不影响血液内电解质的平衡, *Kidney International* 杂志曾发表评论将 UT 列为研发利尿药的潜在靶点, 提出其抑制剂极有可能作为新型利尿药应用于临床心衰、水肿、高血压等疾病的长期治疗^[77]。UT 抑制剂作为利尿药的优势在于发挥良好的利尿效果, 同时不会引起电解质平衡紊乱。

参考文献

- 1 Yang B, Bankir L, Gillespie A, Epstein CJ, Verkman AS. Urea-selective concentrating defect in transgenic mice lacking urea transporter UT-B. *J Biol Chem* 2002; 277(12): 10633-10637.
- 2 Sands JM, Blount MA. Genes and proteins of urea transporters. *Subcell Biochem* 2014; 73: 45-63.
- 3 Nakayama Y, Naruse M, Karakashian A, Peng T, Sands JM, Bagnasco SM. Cloning of the rat Slc14a2 gene and genomic organization of the UT-A urea transporter. *Biochim Biophys Acta* 2001; 1518(1-2): 19-26.
- 4 Fenton RA, Howorth A, Cooper GJ, Meccariello R, Morris ID, Smith CP. Molecular characterization of a novel UT-A urea transporter isoform (UT-A5) in testis. *Am J Physiol Cell Physiol* 2000; 279(5): C1425-C1431.
- 5 Mcgrane A, Stewart G. Hyperosmolality regulates UT-A6 urea transporter expression in the Caco-2 cell line. *Physiol Rep* 2016; 4(18). pii: e12984.
- 6 Fenton RA, Hewitt JE, Howorth A, Cottingham CA, Smith CP. The murine urea transporter genes Slc14a1 and Slc14a2 occur in tandem on chromosome 18. *Cytogenet Cell Genet* 1999; 87(1-2): 95-96.
- 7 Smith CP, Fenton RA. Genomic organization of the mammalian SLC14a2 urea transporter genes. *J Membr Biol* 2006; 212(2): 109-117.

- 8 Sands JM, Timmer RT, Gunn RB. Urea transporters in kidney and erythrocytes. *Am J Physiol* 1997; 273(3 Pt 2): F321–F339.
- 9 Tsukaguchi H, Shayakul C, Berger UV, Tokui T, Brown D, Hediger MA. Cloning and characterization of the urea transporter UT3: localization in rat kidney and testis. *J Clin Invest* 1997; 99(7): 1506–1515.
- 10 Lucien N, Bruneval P, Lasbennes F, Belair MF, Mandet C, Cartron J, Bailly P, Trinh-Trang-Tan MM. UT-B1 urea transporter is expressed along the urinary and gastrointestinal tracts of the mouse. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2005; 288(4): R1046–R1056.
- 11 Inoue H, Jackson SD, Vikulina T, Klein JD, Tomita K, Bagnasco SM. Identification and characterization of a Kidd antigen/UT-B urea transporter expressed in human colon. *Am J Physiol Cell Physiol* 2004; 287(1): C30–C35.
- 12 Kwun YS, Yeo SW, Ahn YH, Lim SW, Jung JY, Kim WY, Sands JM, Kim J. Immunohistochemical localization of urea transporters A and B in the rat cochlea. *Hear Res* 2003; 183(1–2): 84–96.
- 13 Lucien N, Sidoux-Walter F, Roudier N, Ripoche P, Huet M, Trinh-Trang-Tan MM, Cartron JP, Bailly P. Antigenic and functional properties of the human red blood cell urea transporter hUT-B1. *J Biol Chem* 2002; 277(37): 34101–34108.
- 14 Prichett WP, Patton AJ, Field JA, Brun KA, Emery JG, Tan KB, Rieman DJ, Mcclung HA, Nadeau DP, Mooney JL, Suva LJ, Gowen M, Nuttall ME. Identification and cloning of a human urea transporter HUT11, which is downregulated during adipogenesis of explant cultures of human bone. *J Cell Biochem* 2000; 76(4): 639–650.
- 15 Berger UV, Tsukaguchi H, Hediger MA. Distribution of mRNA for the facilitated urea transporter UT3 in the rat nervous system. *Anat Embryol (Berl)* 1998; 197(5): 405–414.
- 16 Olives B, Martial S, Mattei MG, Matassi G, Rousselet G, Ripoche P, Cartron JP, Bailly P. Molecular characterization of a new urea transporter in the human kidney. *FEBS Lett* 1996; 386(2–3): 156–160.
- 17 Olives B, Neau P, Bailly P, Hediger MA, Rousselet G, Cartron JP, Ripoche P. Cloning and functional expression of a urea transporter from human bone marrow cells. *J Biol Chem* 1994; 269(50): 31649–31652.
- 18 Schilling F, Ros S, Hu DE, D'Santos P, McGuire S, Mair R, Wright AJ, Mannion E, Franklin RJ, Neves AA, Brindle KM. MRI measurements of reporter-mediated increases in transmembrane water exchange enable detection of a gene reporter. *Nat Biotechnol* 2017; 35(1): 75–80.
- 19 Wang J, Wang XH, Wang H, Chen L, Klein JD, Sands JM. Urea transporter B and MicroRNA-200c differ in kidney outer versus inner medulla following dehydration. *Am J Med Sci* 2016; 352(3): 296–301.
- 20 Geng X, Lei T, Zhou H, Yao W, Xin W, Yang B. The knock-out of urea transporter-B improves the hemorheological properties of erythrocyte. *Clin Hemorheol Microcirc* 2017; 65(3): 249–257.
- 21 Liu M, Li M, Liu J, Wang H, Zhong D, Zhou H, Yang B. Elevated urinary urea by high-protein diet could be one of the inducements of bladder disorders. *J Transl Med* 2016; 14: 53.
- 22 Levin EJ, Cao Y, Enkavi G, Quick M, Pan Y, Tajkhorshid E, Zhou M. Structure and permeation mechanism of a mammalian urea transporter. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2012; 109(28): 11194–11199.
- 23 Bagnasco SM, Peng T, Janech MG, Karakashian A, Sands JM. Cloning and characterization of the human urea transporter UT-A1 and mapping of the human Slc14a2 gene. *Am J Physiol Renal Physiol* 2001; 281(3): F400–F406.
- 24 Blount MA, Sim JH, Zhou R, Martin CF, Lu W, Sands JM, Klein JD. Expression of transporters involved in urine concentration recovers differently after cessation of lithium treatment. *Am J Physiol Renal Physiol* 2010; 298(3): F601–F608.
- 25 Doran JJ, Klein JD, Kim YH, Smith TD, Kozlowski SD, Gunn RB, Sands JM. Tissue distribution of UT-A and UT-B mRNA and protein in rat. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2006; 290(5): R1446–R1459.
- 26 Klein JD, Blount MA, Frohlich O, Denson CE, Tan X, Sim JH, Martin CF, Sands JM. Phosphorylation of UT-A1 on serine 486 correlates with membrane accumulation and urea transport activity in both rat IMCDs and cultured cells. *Am J Physiol Renal Physiol* 2010; 298(4): F935–F940.
- 27 Chen L, Larocque LM, Efe O, Wang J, Sands JM, Klein JD. Effect of dapagliflozin treatment on fluid and electrolyte balance in diabetic rats. *Am J Med Sci* 2016; 352(5): 517–523.
- 28 Qian X, Li X, Ilori TO, Klein JD, Hughey RP, Li CJ, Alli AA, Guo Z, Yu P, Song X, Chen G. RNA-seq analysis of glycosylation related gene expression in STZ-induced diabetic rat kidney inner medulla. *Front Physiol* 2015; 6: 274.
- 29 Hwang S, Gunaratne R, Rinschen MM, Yu MJ, Pisitkun T, Hoffert JD, Fenton RA, Knepper MA, Chou CL. Vasopressin increases phosphorylation of Ser84 and Ser486 in Slc14a2 collecting duct urea transporters. *Am J Physiol Renal Physiol* 2010; 299(3): F559–F567.
- 30 Su H, Chen M, Sands JM, Chen G. Activation of the cAMP/PKA pathway induces UT-A1 urea transporter monoubiquitination and targets it for lysosomal degradation. *Am J Physiol*

- Renal Physiol 2013; 305(12): F1775–F1782.
- 31 Klein JD, Martin CF, Kent KJ, Sands JM. Protein kinase C- α mediates hypertonicity-stimulated increase in urea transporter phosphorylation in the inner medullary collecting duct. *Am J Physiol Renal Physiol* 2012; 302(9): F1098–F1103.
- 32 Blount MA, Cipriani P, Redd SK, Ordas RJ, Black LN, Gumina DL, Hoban CA, Klein JD, Sands JM. Activation of protein kinase C α increases phosphorylation of the UT-A1 urea transporter at serine 494 in the inner medullary collecting duct. *Am J Physiol Cell Physiol* 2015; 309(9): C608–C615.
- 33 Frohlich O, Klein JD, Smith PM, Sands JM, Gunn RB. Regulation of UT-A1-mediated transepithelial urea flux in MDCK cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 2006; 291(4): C600–C606.
- 34 Wang Y, Klein JD, Liedtke CM, Sands JM. Protein kinase C regulates urea permeability in the rat inner medullary collecting duct. *Am J Physiol Renal Physiol* 2010; 299(6): F1401–F1406.
- 35 Li YX, Huang Y, Liu S, Mao Y, Yuan CY, Yang X, Yao LJ. Glycogen synthase kinase-3 modulates hyperosmotic-induced urea transporter A1 relocation in the inner medullary collecting duct cells. *Nephron* 2016; 133(1): 71–79.
- 36 Chen G, Frohlich O, Yang Y, Klein JD, Sands JM. Loss of N-linked glycosylation reduces urea transporter UT-A1 response to vasopressin. *J Biol Chem* 2006; 281(37): 27436–27442.
- 37 Chen G, Howe AG, Xu G, Frohlich O, Klein JD, Sands JM. Mature N-linked glycans facilitate UT-A1 urea transporter lipid raft compartmentalization. *FASEB J* 2011; 25(12): 4531–4539.
- 38 Kim YH, Kim DU, Han KH, Jung JY, Sands JM, Knepper MA, Madsen KM, Kim J. Expression of urea transporters in the developing rat kidney. *Am J Physiol Renal Physiol* 2002; 282(3): F530–F540.
- 39 Maciver B, Smith CP, Hill WG, Zeidel ML. Functional characterization of mouse urea transporters UT-A2 and UT-A3 expressed in purified *Xenopus laevis* oocyte plasma membranes. *Am J Physiol Renal Physiol* 2008; 294(4): F956–F964.
- 40 Pallone TL, Zhang Z, Rhinehart K. Physiology of the renal medullary microcirculation. *Am J Physiol Renal Physiol* 2003; 284(2): F253–F266.
- 41 Pannabecker TL, Henderson CS, Dantzer WH. Quantitative analysis of functional reconstructions reveals lateral and axial zonation in the renal inner medulla. *Am J Physiol Renal Physiol* 2008; 294(6): F1306–F1314.
- 42 Kim WY, Lee HW, Han KH, Nam SA, Choi A, Kim YK, Kim J. Descending thin limb of the intermediate loop expresses both aquaporin 1 and urea transporter A2 in the mouse kidney. *Histochem Cell Biol* 2016; 146(1): 1–12.
- 43 Karakashian A, Timmer RT, Klein JD, Gunn RB, Sands JM, Bagnasco SM. Cloning and characterization of two new isoforms of the rat kidney urea transporter: UT-A3 and UT-A4. *J Am Soc Nephrol* 1999; 10(2): 230–237.
- 44 Promeneur D, Rousselet G, Bankir L, Bailly P, Cartron JP, Ripoché P, Trinh-Trang-Tan MM. Evidence for distinct vascular and tubular urea transporters in the rat kidney. *J Am Soc Nephrol* 1996; 7(6): 852–860.
- 45 Shayakul C, Knepper MA, Smith CP, Digiovanni SR, Hediger MA. Segmental localization of urea transporter mRNAs in rat kidney. *Am J Physiol* 1997; 272(5 Pt 2): F654–F660.
- 46 Potter EA, Stewart G, Smith CP. Urea flux across MDCK-mUT-A2 monolayers is acutely sensitive to AVP, cAMP, and $[Ca^{2+}]_i$. *Am J Physiol Renal Physiol* 2006; 291(1): F122–F128.
- 47 Blount MA, Klein JD, Martin CF, Tchapyjnikov D, Sands JM. Forskolin stimulates phosphorylation and membrane accumulation of UT-A3. *Am J Physiol Renal Physiol* 2007; 293(4): F1308–F1313.
- 48 Terris JM, Knepper MA, Wade JB. UT-A3: localization and characterization of an additional urea transporter isoform in the IMCD. *Am J Physiol Renal Physiol* 2001; 280(2): F325–F332.
- 49 Qian X, Sands JM, Song X, Chen G. Modulation of kidney urea transporter UT-A3 activity by α 2,6-sialylation. *Pflugers Arch* 2016; 468(7): 1161–1170.
- 50 Hill WG, Southern NM, Maciver B, Potter E, Apodaca G, Smith CP, Zeidel ML. Isolation and characterization of the *Xenopus* oocyte plasma membrane: a new method for studying activity of water and solute transporters. *Am J Physiol Renal Physiol* 2005; 289(1): F217–F224.
- 51 Fenton RA, Stewart GS, Carpenter B, Howorth A, Potter EA, Cooper GJ, Smith CP. Characterization of mouse urea transporters UT-A1 and UT-A2. *Am J Physiol Renal Physiol* 2002; 283(4): F817–F825.
- 52 Stewart GS, King SL, Potter EA, Smith CP. Acute regulation of mUT-A3 urea transporter expressed in a MDCK cell line. *Am J Physiol Renal Physiol* 2007; 292(4): F1157–F1163.
- 53 Timmer RT, Klein JD, Bagnasco SM, Doran JJ, Verlander JW, Gunn RB, Sands JM. Localization of the urea transporter UT-B protein in human and rat erythrocytes and tissues. *Am J Physiol Cell Physiol* 2001; 281(4): C1318–C1325.
- 54 Zhao D, Sonawane ND, Levin MH, Yang B. Comparative transport efficiencies of urea analogues through urea transporter UT-B. *Biochim Biophys Acta* 2007; 1768(7): 1815–1821.
- 55 Yang B, Verkman AS. Urea transporter UT3 functions as an

- efficient water channel. Direct evidence for a common water/urea pathway. *J Biol Chem* 1998; 273(16): 9369–9372.
- 56 Huang B, Wang H, Yang B. Water transport mediated by other membrane proteins. *Adv Exp Med Biol* 2017; 969: 251–261.
 - 57 Fenton RA, Yang B. Urea transporter knockout mice and their renal phenotypes. *Subcell Biochem* 2014; 73: 137–152.
 - 58 Bankir L, Chen K, Yang B. Lack of UT-B in vasa recta and red blood cells prevents urea-induced improvement of urinary concentrating ability. *Am J Physiol Renal Physiol* 2004; 286(1): F144–F151.
 - 59 Bankir L, Yang B. New insights into urea and glucose handling by the kidney, and the urine concentrating mechanism. *Kidney Int* 2012; 81(12): 1179–1198.
 - 60 Fenton RA, Chou CL, Stewart GS, Smith CP, Knepper MA. Urinary concentrating defect in mice with selective deletion of phloretin-sensitive urea transporters in the renal collecting duct. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; 101(19): 7469–7474.
 - 61 Sands JM. Mammalian urea transporters. *Annu Rev Physiol* 2003; 65: 543–566.
 - 62 Fenton RA, Flynn A, Shodeinde A, Smith CP, Schnermann J, Knepper MA. Renal phenotype of UT-A urea transporter knockout mice. *J Am Soc Nephrol* 2005; 16(6): 1583–1592.
 - 63 Fenton RA. Urea transporters and renal function: lessons from knockout mice. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2008; 17(5): 513–518.
 - 64 Uchida S, Sohara E, Rai T, Ikawa M, Okabe M, Sasaki S. Impaired urea accumulation in the inner medulla of mice lacking the urea transporter UT-A2. *Mol Cell Biol* 2005; 25(16): 7357–7363.
 - 65 Lei T, Zhou L, Layton AT, Zhou H, Zhao X, Bankir L, Yang B. Role of thin descending limb urea transport in renal urea handling and the urine concentrating mechanism. *Am J Physiol Renal Physiol* 2011; 301(6): F1251–F1259.
 - 66 Klein JD, Sands JM, Qian L, Wang X, Yang B. Upregulation of urea transporter UT-A2 and water channels AQP2 and AQP3 in mice lacking urea transporter UT-B. *J Am Soc Nephrol* 2004; 15(5): 1161–1167.
 - 67 Klein JD, Wang Y, Mistry A, Larocque LM, Molina PA, Rogers RT, Blount MA, Sands JM. Transgenic restoration of urea transporter A1 confers maximal urinary concentration in the absence of urea transporter A3. *J Am Soc Nephrol* 2016; 27(5): 1448–1455.
 - 68 Jiang T, Li Y, Layton AT, Wang W, Sun Y, Li M, Zhou H, Yang B. Generation and phenotypic analysis of mice lacking all urea transporters. *Kidney Int* 2017; 91(2): 338–351.
 - 69 Reed GD, von Morze C, Verkman AS, Koelsch BL, Chaudhury MM, Lustig M, Ronen SM, Bok RA, Sands JM, Larson PE, Wang ZJ, Larsen JH, Kurhanewicz J, Vigneron DB. Imaging renal urea handling in rats at millimeter resolution using hyperpolarized magnetic resonance relaxometry. *Tomography* 2016; 2(2): 125–135.
 - 70 Yang B, Bankir L. Urea and urine concentrating ability: new insights from studies in mice. *Am J Physiol Renal Physiol* 2005; 288(5): F881–F896.
 - 71 Klein JD, Sands JM. Urea transport and clinical potential of urea transporters. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2016; 25(5): 444–451.
 - 72 Ran JH, Li M, Tou WI, Lei TL, Zhou H, Chen CY, Yang BX. Phenylphthalazines as small-molecule inhibitors of urea transporter UT-B and their binding model. *Acta Pharmacol Sin* 2016; 37(7): 973–983.
 - 73 Yao C, Anderson MO, Zhang J, Yang B, Phuan PW, Verkman AS. Triazolothienopyrimidine inhibitors of urea transporter UT-B reduce urine concentration. *J Am Soc Nephrol* 2012; 23(7): 1210–1220.
 - 74 Li F, Lei T, Zhu J, Wang W, Sun Y, Chen J, Dong Z, Zhou H, Yang B. A novel small-molecule thienoquinolin urea transporter inhibitor acts as a potential diuretic. *Kidney Int* 2013; 83(6): 1076–1086.
 - 75 Li M, Tou WI, Zhou H, Li F, Ren H, Chen CY, Yang B. Developing hypothetical inhibition mechanism of novel urea transporter B inhibitor. *Sci Rep* 2014; 4: 5775.
 - 76 Ren H, Wang Y, Xing Y, Ran J, Liu M, Lei T, Zhou H, Li R, Sands JM, Yang B. Thienoquinolins exert diuresis by strongly inhibiting UT-A urea transporters. *Am J Physiol Renal Physiol* 2014; 307(12): F1363–F1372.
 - 77 Knepper MA, Miranda CA. Urea channel inhibitors: a new functional class of aquaretics. *Kidney Int* 2013; 83(6): 991–993.