

综述

Ca²⁺激活Cl⁻通道功能及分子基础研究进展

王 莉^{1,2} 张海林^{1*}

(¹河北医科大学基础医学院药理学教研室, 省部共建神经和血管生物学重点实验室, 河北省新药药理毒理重点实验室, 石家庄 050017; ²河北科技大学生物科学与工程学院, 石家庄 050018)

摘要 自从1983年Barish在爪蟾卵母细胞中发现钙激活的Cl⁻通道以来, 此种类型Cl⁻通道一直在被广泛的研究, 其不同组织中的重要作用也被不断报道。但是, 钙激活氯电流的分子机制一直未被阐明。直到2008年, 由三个实验室分别发现了构成钙激活Cl⁻通道的分子基础为跨膜蛋白16A(transmembrane protein 16A, TMEM16A), 这一发现使得人为通过基因手段调控钙激活Cl⁻通道的功能与表达成为可能。该文综述了钙激活Cl⁻通道在不同组织中的作用、TMEM16A的电生理和药理学特性以及TMEM16A在心肌肥厚和心衰中的可能作用, 以及以Cl⁻通道作为药物作用靶点的研究进展。

关键词 钙激活氯通道; 跨膜蛋白16A; 药理学; 心肌肥厚; 信号转导

细胞膜离子通道是最古老的功能蛋白之一, 广泛存在于从细菌到植物到动物包括人类在内的生物界, 是许多基本生物活动如电活动、离子转运和细胞分泌等的基础。对于人类而言, 由离子通道参与的功能(如电活动)是神经及心血管等系统生理功能的最基本形式之一。对离子通道功能调节机制的深入研究是了解其生理学和生理病理学意义的关键所在。Cl⁻通道是广泛分布的一种阴离子通道, 存在于各种细胞, 包括原核和真核细胞。Cl⁻是细胞内外的主要阴离子, 所以细胞内外Cl⁻的转运是一个重要的生理过程。Cl⁻通道在细胞功能的各个方面都起调节作用, 包括细胞兴奋性、胞内细胞器的酸化、细胞体积的平衡、细胞迁移以及细胞的增殖、分化和凋亡等方面^[1]。从功能调节或电生理学特性上, 哺乳动物Cl⁻通道主要分为五大类: 囊性纤维化跨膜传导调节因子(cystic fibrosis transmembrane conductance regulator, CFTR)、钙激活氯通道(calcium-activated chloride channels, CaCCs)、电压门控氯通道(voltage-gated chloride channels, ClCs)、配体门控氯通道[GABA(γ -aminobutyric acid) and glycine activated chloride channels]和细胞容积调节氯通道(volume-regulated chloride channels, VRCCs)。

CaCCs最早发现于非洲爪蟾卵母细胞中^[2], 是

一类具有重要生理功能的离子通道, 在神经元、平滑肌细胞、血管内皮细胞、心肌细胞及上皮细胞等很多细胞中都有表达, 组织分布广泛。在神经系统中, 嗅觉神经元、视锥与视杆细胞、味觉细胞及背根神经元中都存在功能性的CaCCs, 参与了诸如嗅觉、味觉与视觉的产生与传导过程。此外, 在心肌兴奋性(复极化和动作电位的产生)、平滑肌收缩、腺体分泌及受精过程中具有重要作用^[3-5]。虽然在各种细胞上分布广泛并被研究了20多年, 但是由于CaCCs没有选择性阻断剂, 对此类通道的分子基础等研究一直进展缓慢。直到2008年其分子结构被阐明, 对CaCCs的研究又重新成为Cl⁻通道研究领域的新热点。本文对CaCCs的生物物理学、药理学和分子特性以及其在心血管功能方面的可能作用的研究进展进行了综述。

1 CaCCs的生物物理学及药理学特性

1.1 CaCCs的生物物理学特性

CaCCs的重要特征是在多种类型细胞中(如唾液腺腺泡细胞和肺泡上皮细胞)可以呈电压依赖性

收稿日期: 2011-11-24 接受日期: 2012-02-21

国家自然科学基金(No.30730031)资助项目

*通讯作者。Tel: 0311-86265562, E-mail: z.hailin@yahoo.com

地被细胞内不同浓度的 Ca^{2+} 离子进行调节(浓度范围为 $0.2\sim 5\ \mu\text{mol/L}$),不同种属的动物及不同组织,CaCCs的激活所需的 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 值也有较大的不同。在胞内游离钙离子浓度($[\text{Ca}^{2+}]_i$)较低时($<1\ \mu\text{mol/L}$),内源性CaCCs通道可以被正/负膜电位激活或者失活,正电压引发慢激活电流($\tau > 100\ \text{ms}$),在负电压下却是快速失活,所以其电流-电压关系(I-V曲线)呈外向整流特性;在高 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 离子浓度($>1\ \mu\text{mol/L}$)时,通道在所有膜电位条件下都能被激活,其电流-电压关系呈线性。说明当 $[\text{Ca}^{2+}]_i < 1\ \mu\text{mol/L}$ 时, Ca^{2+} 只能让CaCCs通道部分打开,但仍然受电压调节而呈现单向导通性;而当 $[\text{Ca}^{2+}]_i > 1\ \mu\text{mol/L}$ 时, Ca^{2+} 使通道完全打开而呈现双向导通性^[6]。

CaCCs单通道电导具有多样性,已报道的CaCCs单通道电导介于 $1\sim 70\ \text{pS}$ 之间。根据其电导的大小不同可将CaCCs分为小电导($1\sim 3\ \text{pS}$)CaCCs、大电导($50\sim 70\ \text{pS}$)CaCCs以及中间态($10\sim 30\ \text{pS}$)CaCCs。小电导($1\sim 3\ \text{pS}$)CaCCs存在于各种不同的组织,如爪蟾卵母细胞、胰腺细胞、平滑肌细胞和心肌细胞等。单通道研究表明:狗心肌细胞上CaCCs的单通道电导较小,为 $1.0\sim 1.3\ \text{pS}$ ^[7]。

CaCCs在不同细胞类型中对离子选择通透特性并不完全一致,这可能和不同细胞中CaCCs的分子结构和功能有关。CaCCs并非 Cl^- 的专一通道,它是一类典型的阴离子通道,阴阳离子替换法实验证明,CaCCs通道对不同阴离子都能通过,但识别能力各有不同。CaCCs通道离子通透顺序为: $\text{C}(\text{CN})_3 > \text{SCN} > \text{N}(\text{CN})_2 > \text{ClO}_4 > \text{I} > \text{N}_3 > \text{Br} > \text{Cl} > \text{formate} > \text{HCO}_3 > \text{acetate} > \text{F} > \text{gluconate}$ 。可见,CaCCs对大的阴离子如SCN和 $\text{C}(\text{CN})_3$ 有很高的相对通透性,由 $\text{C}(\text{CN})_3$ 离子的大小可以推测CaCCs通道孔直径可能很大($>0.6\ \text{nm}$)^[8]。对于CaCCs在其它多种不同组织细胞上的离子选择通透性深入研究,发现CaCCs一般表现出 $\text{I} > \text{NO}_3 > \text{Br} > \text{Cl}^-$ 的单价阴离子通透顺序,而且对谷氨酸几乎不通透。另外, I_{Cl} 在体温条件下呈外向整流特性。如负于反转电位时, I_{Cl} 为内向电流。当 $[\text{Cl}^-]_o > [\text{Cl}^-]_i$ 时,电流-电压关系曲线(I-V)呈外向整流特性;而当 $[\text{Cl}^-]_o = [\text{Cl}^-]_i$ 时,I-V曲线则呈线性。

1.2 CaCCs的激活与调控机制

Ca^{2+} 激活CaCCs有两种可能机制:(1) Ca^{2+} 可以直接结合到通道蛋白上(如在爪蟾卵母细胞、血管内皮细胞、腮腺细胞上),并且激活CaCCs的 EC_{50} 具

有明显电压依赖性,膜电位为正时 Ca^{2+} 与通道蛋白的结合更顺利,量效关系拟合所得的Hill系数 n_H 从 $-80\ \text{mV}$ 时的1增加到 $100\ \text{mV}$ 时的2, $n_H > 2$ 说明通道存在多个 Ca^{2+} 结合位点^[9];(2) Ca^{2+} 间接通过钙结合蛋白(Ca^{2+} -binding proteins, CBP)或钙调素依赖的蛋白激酶II(calmodulin-dependent protein kinase II, CaMKII)产生的钙依赖磷酸化途径发挥作用(如在T84肠上皮肿瘤细胞上),钙调素拮抗剂在不影响CaCCs动力学特性和整流特性的同时能减小钙激活氯电流(Ca^{2+} -activated Cl^- currents, $I_{\text{Cl,Ca}}$)。在心肌组织中, Ca^{2+} 调节CaCCs的分子机制还不清楚,还没有实验证明 Ca^{2+} 在心肌组织中是以何种方式结合到CaCCs上的。

$[\text{Ca}^{2+}]_i$ 升高有三种形式:(1)CaCCs在生理条件下能被核苷酸结合蛋白(G蛋白)偶联受体(G-protein coupled receptors, GPCRs)所激活。激动剂激活GPCRs后,可产生能引起胞内钙库释放的第二信使(如 IP_3),最终激活 $I_{\text{Cl,Ca}}$ 。应用膜片钳技术证明能释放钙库 Ca^{2+} 的几种受体激动剂均能激活单个平滑肌细胞上的 $I_{\text{Cl,Ca}}$,如去甲肾上腺素诱导的大鼠门静脉细胞上的 $I_{\text{Cl,Ca}}$ 与 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 的升高同时发生,即使当细胞外液不含 Ca^{2+} 时也出现相同结果,表明去甲肾上腺素引起的 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 升高是由于胞内钙库释放 Ca^{2+} 的原因。同样,在含 Ca^{2+} 或无 Ca^{2+} 的细胞外液中,咖啡因和氯化铵甲酰胆碱(carbachol)诱导的大鼠小肠平滑肌上的 $I_{\text{Cl,Ca}}$ 也伴有 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 的升高。如果先用咖啡因($10\ \text{mmol/L}$ 或更高浓度)消耗掉钙库中的 Ca^{2+} 后,再加激动剂则不能使 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 显著升高,也不能激活 $I_{\text{Cl,Ca}}$;(2)胞外 Ca^{2+} 可以通过电压依赖的钙通道(voltage dependant calcium channels, VDCCs)流入胞内引起 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 升高激活 $I_{\text{Cl,Ca}}$ ^[10];(3)在心肌组织中,当细胞内 Na^+ 浓度升高时(如强心苷抑制 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$ 酶时),反向的 $\text{Na}^+ - \text{Ca}^{2+}$ 交换,使细胞外 Ca^{2+} 内流增加,可以触发内质网内的 Ca^{2+} 释放,这种 Ca^{2+} 诱导的 Ca^{2+} 释放(Ca^{2+} -induced Ca^{2+} release, CICR)可以激活CaCCs^[11]。在兔门静脉平滑肌细胞上的研究表明,胞内 Na^+ 浓度 $\geq 30\ \text{mmol/L}$ 时能逆转 $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 的方向,即 Ca^{2+} 能通过这种机制进入胞内激活 $I_{\text{Cl,Ca}}$;相反,除去电极内液中的 Na^+ 则无 $I_{\text{Cl,Ca}}$ 的激活^[12](图1)。

1.3 CaCCs的药理学特性

特异性阻断剂在证明离子通道生理功能和从混合电流中分离出特定电流的过程中是必需的。同时,在解释孔道结构和分析组织分布以及通道蛋白的亲

和纯化时, 阻断剂同样是有用的工具药物。可是, 几乎没有有效的阴离子通道阻断剂, 能用于CaCCs分析的特异性阻断剂则更少, 但9-羧酸蒽(anthracene-9-carboxylic acid, 9-AC)、尼氟灭酸(niflumic acid, NFA)、dichlorodiphenylamine-2-carboxylic acid(DCDPC)、4,49-diisothiocyanatostilbene-2,29-disulphonic acid(DIDS)以及5-nitro-2-(3-phenylpropylamino)-benzoic acid(NPPB)等都能部分阻断 $I_{\text{Cl,Ca}}$, 这些物质大多都是芳香酸, 说明其阻断机制可能与其结构相关联。目前的研究中, 多数是通过增加阻断剂浓度完全阻断 Cl^- 电流, 但这可能引起很多我们不想要的副作用。最常用的内源性CaCCs的阻断剂为NFA和氟芬那酸(flufenamic acid), 在大约10 $\mu\text{mol/L}$ 范围内二者均可阻断爪蟾卵母细胞的CaCCs。在不同的组织中, NFA经常被作为特异阻断剂用于证明CaCCs等阴离子电流, 但是, NFA还不是理想的可以分离CaCCs的工具药物, 在 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 为250~500 nmol/L时, 胞外100 $\mu\text{mol/L}$ 的NFA可以在负电压下增强平滑肌细胞的 $I_{\text{Cl,Ca}}$, 而在正电压下却抑制外向电流, 洗脱NFA后在正负电压下的 $I_{\text{Cl,Ca}}$ 都有很大的增加。NFA还可以阻断容积调节的阴离子通道(volume-regulated anion channels, VRACs)和 K^+ 通道, 同时, 它甚至会影响 Ca^{2+} 电流, 从而使对 $I_{\text{Cl,Ca}}$ 的解释更加复杂化。DCDPC(100 $\mu\text{mol/L}$)能产生和NFA一样的作用, 而1 mmol/L DIDS对正负电压下的电流都是起到抑制作用, 且在洗脱后没有增大电流的现象。说明NFA和DCDPC都是通过结合胞外一个接近CaCCs通道孔口的同一个位点而增大或抑制 $I_{\text{Cl,Ca}}$, 而DIDS却不能。最近, 甘氨酸酰肼(glycine hydrazine)和acidic dacylureas被作为CFTR和VRACs的高亲和阻断剂使用, 但它们对CaCCs的作用还不明确^[9]。

有报道认为, 3-酰基-2-氨基噻吩和5-酰基-2-氨基噻唑类型的CaCC_{inh}A01和CaCC_{inh}B01是潜在的CaCC抑制剂^[13]。在小肠细胞系, 它们可以完全抑制卤离子的流动, 对于不同的激动剂来说, 它们的 IC_{50} 值甚至可以低至1 $\mu\text{mol/L}$ 。小分子CaCCs抑制剂具有潜在治疗某些感染和药物引起的分泌性腹泻的作用, 并可以减少哮喘和囊性纤维化病人的粘膜分泌, 以及通过减少血管阻力从而减轻患者的高血压症状。

2 CaCCs的分子基础为跨膜蛋白16A

2008年, 由三个实验室分别发现了构成CaCCs

的分子基础为TMEM16A^[6,14-15], 这一发现使得人通过基因手段研究CaCCs的功能与表达成为可能。hTMEM16A mRNA在人类很多组织中均有分布, 包括心脏、肺脏、胎盘、肝脏、骨骼肌和小肠^[16]。至于TMEM16A是否形成功能性内源CaCCs, 以及激活和调控机制还有必要进行深入的研究。

2.1 TMEM16A的结构特点及电生理特性

由于TMEM16A的表达序列标签(the expressed sequence tags, EST)在视网膜中表达丰度较高, Yang等^[6]从小鼠眼中分离得到总RNA后, 利用RT-PCR技术扩增到全长的*Tmem16a* cDNA。小鼠的*Tmem16a*全长cDNA的开放阅读框含2 880个核苷酸, 它编码一个960个氨基酸的蛋白。小鼠的TMEM16A的氨基酸序列与人的同源蛋白具有高达91%的同源性。大鼠的TMEM16A同源蛋白在氨基末端比小鼠的TMEM16A蛋白多123个氨基酸, 除这些氨基酸之外, 剩余序列与小鼠的TMEM16A蛋白的同源性高达99%。有趣的是, TMEM16蛋白家族与其他离子通道家族几乎没有什么显著的序列同源性。

嗜水性分析表明, TMEM16A蛋白有八个跨膜结构域。群体一致性分析(集成分析法)预测发现TMEM16A在细胞内的N末端和C末端具有蛋白激酶A(protein kinase, PKA)、蛋白激酶C(protein kinase, PKC)、钙调素依赖激酶(calmodulin-dependent kinase, CAMK)、酪蛋白激酶2(casein kinase 2, CK2)和胞外调节激酶1, 2[(extracellular regulated kinase 1, 2), ErK1, 2]磷酸化位点的保守序列, 在最后一个细胞外片段处至少具有一个糖基化位点(图2)。尽管没有像电压依赖性钙通道的EF和C2臂或者钙调素结合序列IQ等特异的 Ca^{2+} 结合位点, TMEM16A依然可以被细胞内 Ca^{2+} 激活。可能是由其他位点提供 Ca^{2+} 结合, 或者是有一种还未发现的 Ca^{2+} 结合域的结构形式, 如类似于BK钾通道的 Ca^{2+} 杯^[18]。随着研究的进一步深入, 发现在富含酸性氨基酸的N末端和第一个胞质内环形结构域可以辅助结合 Ca^{2+} 。TMEM16A的不同剪接形式会影响离子通道的特性, 如果跳过外显子6B, 可以增加钙离子敏感性, 而跳过外显子13后CaCCs的时间依赖性特性则会消失。TMEM16A产生的 $I_{\text{Cl,Ca}}$ 会被acd剪接形式的第五和第六跨膜结构域之间的孔道环型结构中的三个半胱氨酸(C651、C656和C661)及半胱氨酸试剂阻断。TMEM16A不会以单独的蛋白形式存在, 其形成类似于CLC-0的稳定同

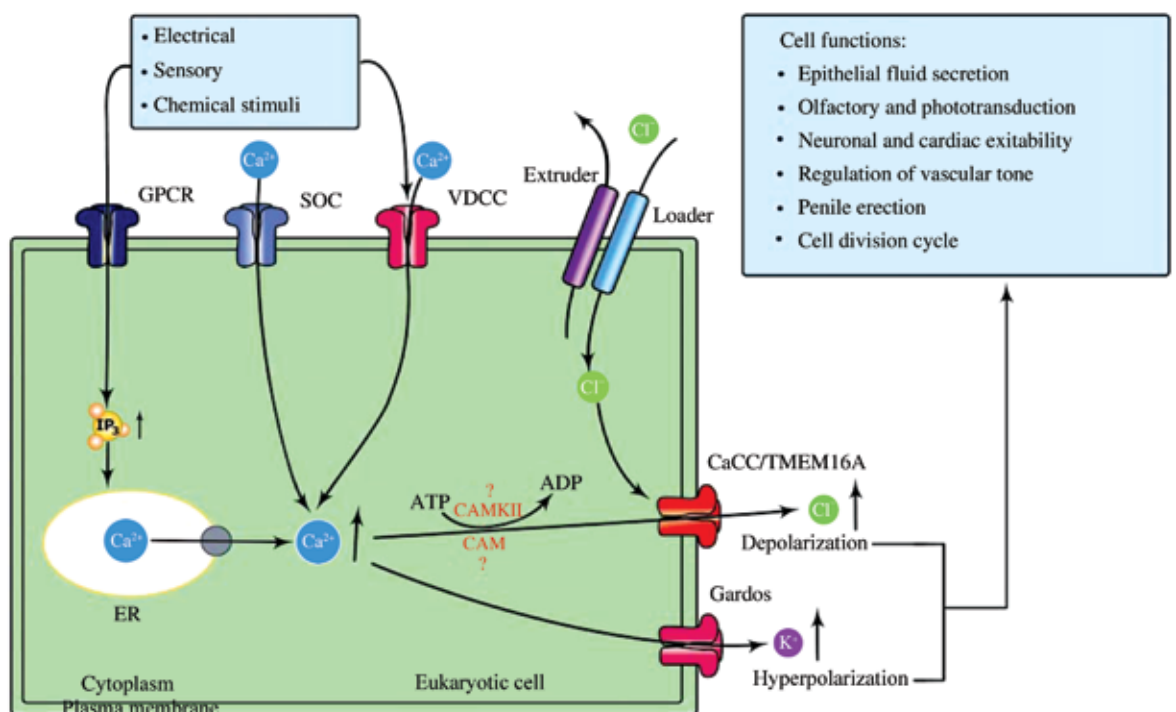


图1 $[Ca^{2+}]_i$ 升高途径及对CaCC的调控
Fig.1 The signaling pathways of $[Ca^{2+}]_i$ increase and the regulation of CaCC by Ca^{2+}

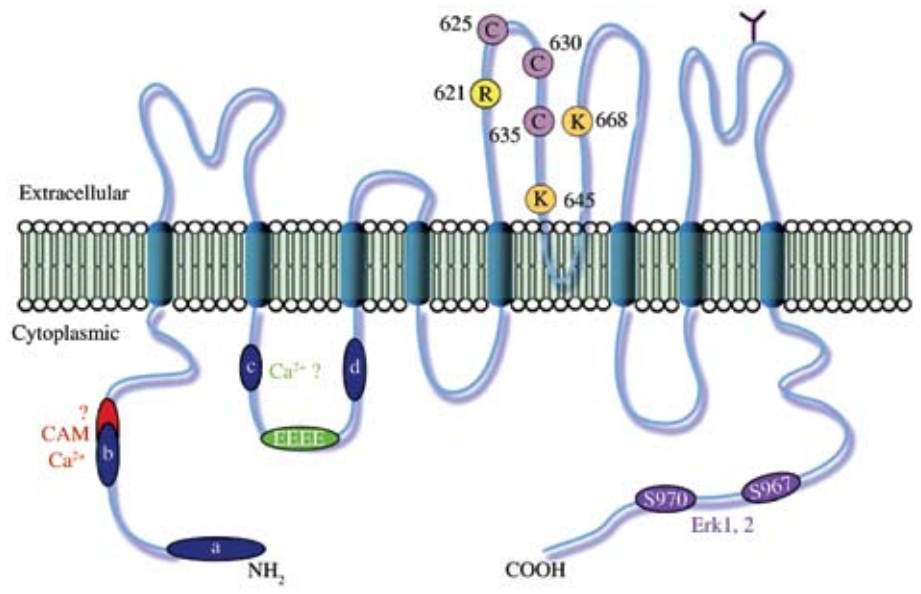


图2 TMEM16A拓扑结构预测图(根据参考文献[17]修改)
Fig.2 Scheme of predicted TMEM16A topology(modified from reference [17])

源二聚体, 但是否形成与C1C一样的具有两个独立的孔道形式的同源二聚体, 还是形成一个孔道的形式还不清楚。后期研究将会揭示TMEM16A是否能形成类似于C1C的异源二聚体, 异源二聚体的结构形式能够解释为什么实验中出现不同的TMEM16之

间的相互作用现象。胞内 Ca^{2+} 浓度的改变并不会使TMEM16A的四级结构变化, 所以其二聚体的形式是持久的, 并不依赖 Ca^{2+} 和细胞骨架, 并且, 目前还没有发现TMEM16A与其它蛋白有相互作用^[17]。

因为有八个跨膜结构域(transmembrane domain,

TMD)和阴离子通道特性, TMEM16A蛋白又被称为ANO1(anoctamin 1)^[15]。ANO1至少有四个可变剪接外显子, 蛋白氨基酸含量从712个到1 006个不等。其中a和b两个可变剪接外显子位于胞质内N末端, c和d位于胞质内第二段跨膜区和第三段跨膜区之间的环形结构域中。研究发现, a、ac、abc和abcd四种剪接形式分别在HEK细胞中表达时均可产生 CaCCs 电流, 但是, 当这些片段都不存在时(ANO1(0)), ANO1是没有功能的。突变分析表明, ANO1的第五和第六跨膜结构域之间的胞外折返入膜的环型结构对于离子的敏感性起着非常重要的作用。折返环上带正电荷的氨基酸可以形成离子电导通路的一部分。另外, 由于ANO1在一些肿瘤组织中有非常高的表达水平, 从而又被称为肿瘤倍增和过表达序列(tumour amplified and overexpressed sequence, TAOS2)^[19]、口腔癌过表达序列(oral cancer overexpressed, ORAOV2)^[20]和发现于胃肠间质瘤的序列(discovered on GIST-1, DOG-1)^[21]等。

Yang等^[6]研究认为, 过表达ANO1/ ET_AR 的HEK细胞中, 不同电压下随着 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 的改变, I-V曲线的特性与 CaCCs 的表现一致。单价阴离子通透顺序特征也与 CaCCs 的一致 $[\text{NO}_3^- (2.20) > \text{I}^- (1.85) > \text{Br}^- (1.74) > \text{Cl}^- (1.0) > \text{F}^- (0.43)]$ 。他们还研究了内皮素A亚型受体(endothelin receptor subtype A, ET_AR)、血管紧张素II的1亚型受体(angiotensin II receptor subtype 1, AT1R)、毒蕈碱1亚型受体(muscarinic receptor subtype 1, M1R)、组胺1亚型受体(histamine receptor subtype 1, H1R)、嘌呤能2亚型受体(purinergic receptor subtype 2, P2Y2R)对通道的激活作用, 发现分别加入各自的激动剂后会明显地增大 $I_{\text{Cl,Ca}}$ 。Schroeder等^[14]研究发现, GPCRs的激活能使xTMEM16A的外向整流特性表现得更加明显。

2.2 TMEM16A的信号调控及药理学最新研究进展

明确TMEM16A的调控机制可以使新类型的通道调节先导化合物的筛选飞速发展。尽管TMEM16A可以被 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 的升高所激活, 但还没有实验证明其具有典型的 Ca^{2+} 结合域。Ferrera等^[22]研究发现, TMEM16A的第一个胞内环上具有四个连在一起的谷氨酸, 他们认为此结构可能是与 Ca^{2+} 结合的位点。Tian等^[13]通过研究认为, TMEM16A的激活需要ATP和CaM的共同作用, CaM可以结合到TMEM16A的N端。这种调节类似于小电导钙激活钾通道(small

conductance Ca^{2+} -activated K^+ channels, SK)的激活模式, 并且这两类通道均在人气道上皮表达, 它们的药理学特性也是相同的。苯丙咪唑啉类(benzimidazolinones)化合物是广为人知的钙激活钾通道开放剂, 可以增强 Ca^{2+} /CaM和此类钾通道的亲和性, 如1-乙基-2-苯并咪唑啉酮(1-ethyl-2-benzimidazolinone, 1-EBIO)。1-EBIO(50 $\mu\text{mol/L}$)和SK4的另外一种开放剂riluzole(50 $\mu\text{mol/L}$)均可激活TMEM16A。另外, 相关的化合物S0011198和1 $\mu\text{mol/L}$ 5,6-二氯-1-乙基-1,3-二氢-2-苯并咪唑啉酮(5,6-dichloro-1-ethyl-1,3-dihydro-2Hbenzimidazol-2-one, DCEBIO)同样可以激活TMEM16A。所以, 苯丙咪唑啉类化合物有可能作为气道和肺组织纤维化患者恢复 Cl^- 分泌的理想药物进行开发。他们还发现, NFA和NPPB可以强烈地抑制TMEM16A激活诱发的 $I_{\text{Cl,Ca}}$; 而CFTR的选择性抑制剂CFTR_{inh}172则不能抑制ATP诱导的TMEM16A通道电流。关于 $I_{\text{Cl,Ca}}$ 阻断剂的相关研究还有必要进行深入的探讨与分析。

尽管TMEM16A具有复合的蛋白激酶A、C, CAMK和CK2等的磷酸化位点, 但这些激酶与TMEM16A的门控无关。虽然CaM和ATP在TMEM16A的激活中具有重要作用, 但CaMKII的存在并不是必需的。但是, 在C末端的ErK1,2作用位点与TMEM16A的受体介导的激活相关(图2)。然而, 通过直接增加 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 激活TMEM16A的过程并不需要ErK1,2磷酸化此位点, 说明TMEM16A可以通过不依赖 Ca^{2+} 的其它途径进行。

3 CaCCs 在心脏电生理中的作用

1989年, Harvey等^[23]和Bahinski等^[24]分别在兔子和豚鼠心脏中发现了cAMP激活的 Cl^- 电流。这些发现使对于心脏 Cl^- 通道的研究进入了一个崭新的历史阶段。在不同动物心脏的不同区域的细胞中, 至少发现了八种不同类型的 Cl^- 电流^[25-27]。最近的研究证实了几个心脏 Cl^- 通道基因, 包括CFTR、CIC-2、CIC-3、CLCA、Betrophins和Tmem16a^[28]。利用基因靶和转基因技术研究发现, Cl^- 通道可能在心律不齐、心肌肥厚和心衰以及缺血再灌注的心脏保护等方面起作用。然而, 心脏 Cl^- 通道的生理学及病理学的表型改变可能是因为动物对基因靶操作的代偿性反应。

心肌细胞 Cl^- 的平衡电位为-65 mV~-45 mV, 所

以在膜电位比 Cl^- 平衡电位为正时(去极化), I_{Cl} 为外向电流; 比平衡电位为负时(静息水平), I_{Cl} 为内向电流。虽然在一般情况下, I_{Cl} 在心肌细胞的电活动中作用并不明显, 然而, 在某些情况下, 它可以产生明显作用。 I_{Cl} 在去极化时为外向电流, 使动作电位时程变短; 但在静息时, I_{Cl} 是内向电流而使静息电位变小, 呈轻微去极化。若在低钾条件下, 静息电位会进一步下降, 出现部分去极化, 此时, 如引起 I_{ClCFTR} 或 I_{ClVOL} 活动, 就会出现早期后除极(early after depolarization, EAD)。如另外情况下, 某些因素使 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 增加, 则在 I_{ClCa} 的活动下, 出现延迟后除极(delayed after depolarization, DAD)。

CaCCs广泛分布在心脏组织中, 并且在心肌细胞兴奋性调节方面起重要作用。但是此前心脏中此通道起作用的分子机制还不清楚。最初, *CLCA-1*和*Betrophins*均被认为是产生 I_{ClCa} 的功能基因之一。研究证实鼠科*Betrophin*家族至少三个成员mBest1、mBest2和mBest3在小鼠心脏中表达。转染心脏mBest1和mBest3的HEK293细胞的全细胞膜片钳实验均能引导出一个对 Ca^{2+} 敏感且具有时间依赖性的 Cl^- 电流, 表明mBest1和mBest3在生理水平 Ca^{2+} 浓度激活的 Cl^- 通道的孔道形成中起作用^[28]。直到2008年, TMEM16A分子结构及功能的揭示才确认了它作为CaCCs的功能蛋白的地位。然而对于心肌细胞CaCCs的分子构成仍需进一步研究。

由于 I_{Cl} 有缩短动作电位时程的作用, 它的拮抗剂就可以延长动作电位时程而具有抗心律失常的作用, 这可能成为一个新的抗心律失常药物的来源。

3.1 CaCCs在心律失常中的可能作用

尽管 I_{ClCa} 在生理条件下具有外向整流特性, 但有研究认为 I_{ClCa} 的激活对心脏动作电位和静息膜电位的作用与CFTR和C1C-3的作用不同。这是因为 I_{ClCa} 的动力学行为明显由 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 瞬变的时间曲线决定^[29]。一般来说, 当静息 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 很低时, I_{ClCa} 对心舒张膜电位没有明显作用; 当静息 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 增加到生理水平以上时, I_{ClCa} 形成显著的瞬时外向整合电流。 I_{ClCa} 在动作电位初期即可被活化, 来应答与 Ca^{2+} 诱导的 Ca^{2+} 释放增加相关的 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 增加。 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 瞬变的下降曲线将决定1期 I_{ClCa} 对早期复极化作用的程度。在 Ca^{2+} 超载的心脏实验中, I_{ClCa} 可导致心律不齐性瞬态内向整合电流(transient inward current, ITI)^[30]。ITI可产生DAD^[31], 并诱导触发电活动, 这是非正常脉搏

形成的重要机制。

3.2 CaCCs在心肌肥厚和心衰中的可能作用

Ca^{2+} 在心脏发育、功能和疾病发生过程中起决定性作用。 Ca^{2+} 动态平衡的改变是心肌肥厚和心衰的标志^[32]。心肌衰亡过程中的 Ca^{2+} 瞬变特征为振幅减少、心舒张期 Ca^{2+} 水平升高以及 Ca^{2+} 瞬变衰退期延长。有研究发现, 在非心肌细胞中, I_{ClCa} 是凋亡的重要介导因素^[33]。但是, 目前关于 I_{ClCa} 在心衰中的可能作用方面的研究还很少。

许多研究表明, 血管紧张素II(angiotensin, Ang II)可以激活G蛋白偶联受体AT1R, 从而上调 $\text{PLC}\beta$, 后者使 PIP_2 水解、 IP_3 含量增加, 使得细胞内钙库释放 Ca^{2+} 。 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 上调后, 一方面激活 $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ 依赖的钙调神经磷酸酶(calcineurin, CaN), 后者使T细胞核转录因子(nuclear factor of activated T-cells, NFATs)磷酸化水平下降, NFATs脱磷酸化后暴露出核定位序列(nuclear localization signal, NLS), 从而进入细胞核活化转录因子, 启动心肌肥厚相关基因的转录, 当胞核内的NFATs被肌酸激酶(creatinekinase, CK)、双位点特异性酪氨酸调控激酶(dual-specificity tyrosine-phosphorylationregulated kinase, DYRK)、糖原合成激酶3(glycogen synthase kinase 3, GSK3)等激酶磷酸化后可以从细胞核转位至细胞质, 活化肥厚信号的作用终止; 另一方面, $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 的持续增加, 使得整体心肌收缩功能增强, 出现肥厚趋势, 继而发展成为心肌间纤维化, 心肌细胞收缩功能下降, 进入失代偿期的心衰状态。

多项研究均将心肌肥厚信号指向了 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 的上调, 而 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 的上调同时可以激活CaCCs, 那么 I_{ClCa} 在心肌肥厚的形成中有没有直接作用和影响呢? 这一点还有必要进行深入的研究与探讨。

4 展望

随着国际上各大药物研发公司的关注与推动, CaCCs阻断剂已经开始成为研制新药的目标, 如选择性CaCCs阻断剂已成为治疗CFTR基因突变引起的囊性纤维化病变的突破点之一。另外, CaCCs通道在快速阻断多精子受精方面业已成为又一个科学研究热点。嘌呤P2Y2受体激动剂denofosol四钠盐(INS37217)是由Inspire制药公司开发的囊性纤维化治疗药物, 目前也已经进入III期临床试验阶段。denofosol与P2Y2受体的天然配体尿苷三磷酸(uridine

triphosphate, UTP)具有相似的药理作用,能使其它 Cl^- 通道激活,增加 Cl^- 和水的分泌、抑制钠离子的吸收、增加纤毛波动频率及黏蛋白的释放,还可增强体内粘液的转运。但是,目前还没有开发出直接作用于CaCCs而不引起 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 升高的CaCCs激动剂,但是这些研究为优于细胞钙信号通用激动剂的一些靶性治疗剂的开发提供了实验证据。并且最近TMEM16A分子结构与功能的证明也为CaCCs作为靶标的激动剂研发提供了新思路。

最近的研究均提供有力证据,认为 Cl^- 通道在心脏疾病,包括心律不齐、心肌局部缺血、心肌肥厚和心衰中起重要作用。但是,目前我们正面临针对完整的 Cl^- 通道研究的主要实验证据转换的挑战,探讨健康与疾病相关的心脏 Cl^- 通道的生理及病理学变化的细胞和分子机制需要在基因组和蛋白质组水平上进行深入的研究和实验。另外,随着TMEM16A通道分子的结构与功能的不断揭示,为在研究心肌肥厚的发病机制基础之上,寻找新的药物作用靶点提供了契机,进而为开发有效的抗心律失常等药物提供了实验依据。

另外,病毒离子通道蛋白是一种在病毒生命周期中起多种作用的小跨膜蛋白,可在宿主细胞膜上形成选择性离子通道,一些离子通道阻滞剂能阻滞这些离子通道,从而抑制这些病毒的繁殖,因而病毒离子通道蛋白可作为新的抗病毒作用靶。CaCCs作为 Cl^- 的一种重要通道类型,如果在流行性病毒颗粒上进行证明与深入研究,也将为抗病毒制剂的开发提供新的靶。

对于CaCCs来说,虽然TMEM16A通道分子的揭示将CaCCs的研究提到了一个新的研究阶段,但是还有几个方面问题的亟待解决:(1)在调控方面,还没有彻底阐明 Ca^{2+} 是如何结合到TMEM16A上进行调控的,以及TMEM16A激活后的信号转导等问题;(2)TMEM16A在癌变组织中呈高表达状态,但其与癌症的关系还有必要进行深入研究;(3)TMEM16A作为心血管疾病药物靶标可能性的探索;(4)TMEM16A的激活会诱发疼痛,但其信号机制还没有明确;(5)某种 Cl^- 通道基因敲除的动物用于表型研究是不够的,因为一种 Cl^- 通道可能会作为多种蛋白复合物或功能模块,用于构成离子转运的孔道亚单位,或者作为调节孔道门控机制的附属亚单位,以及作为第二信使在通道功能中发挥作用。从而,在不

同的基因靶操作的动物模型中,有共同的利于动物存活的代偿性变化,所以很难明确基因操作与动物表现现象之间的关系。如有可能,应该使用组织特异性定向敲除或过表达动物模型进行表型研究。

参考文献 (References)

- 1 Okada Y, Shimizu T, Maeno E, Tanabe S, Wang X, Takashashi N. Volume-sensitive chloride channels involved in apoptotic volume decrease and cell death. *J Membr Biol* 2006; 209(1): 21-9.
- 2 Barish ME. A transient calcium-dependent chloride current in the immature *Xenopus* oocyte. *J Physiol* 1983; 342: 309-25.
- 3 Eggermont J. Calcium-activated chloride channels, (Un)known, (Un)loved? *Proc Am Thorac Soc* 2004; 1(1): 22-7.
- 4 Blaug S, Rymer J, Jalickee S, Miller SS. P2 purinoceptors regulate calcium-activated chloride and fluid transport in 31EG4 mammary epithelia. *Am J Physiol Cell Physiol* 2003; 284(4): C897-909.
- 5 Li GR, Du XL, Siow YL, O K, Tse HF, Lau CP. Calcium-activated transient outward chloride current and phase 1 repolarization of swine ventricular action potential. *Cardiovasc Res* 2003; 58(1): 89-98.
- 6 Yang YD, Cho H, Koo JY, Tak MH, Cho Y, Shim WS, *et al.* TMEM16A confers receptor-activated calcium-dependent chloride conductance. *Nature* 2008; 455(7217): 1210-5.
- 7 Collier ML, Levesque PC, Kenyon JL, Hume JR. Unitary Cl^- channels activated by cytoplasmic Ca^{2+} in canine ventricular myocytes. *Circ Res* 1996; 78(5): 936-44.
- 8 Qu Z, Hartzell HC. Anion permeation in Ca^{2+} -activated Cl^- channels. *J Gen Physiol* 2000; 116(6): 825-44.
- 9 Hartzell C, Putzier I, Arreola J. Calcium-activated chloride channels. *Annu Rev Physiol* 2005; 67: 719-58.
- 10 Verkman AS, Galletta LJ. Chloride channels as drug targets. *Nat Rev Drug Discov* 2009; 8(2): 153-71.
- 11 Hiraoka M, Kawano S, Hirano Y, Furukawa T. Role of cardiac chloride currents in action potential characteristics and arrhythmias. *Cardiovasc Res* 1998; 40(1): 23-33.
- 12 Leblanc N, Leung PM. Indirect stimulation of Ca^{2+} -activated Cl^- current by $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchange in rabbit portal vein smooth muscle. *Am J Physiol* 1995; 268(5 Pt 2): H1906-17.
- 13 Tian Y, Kongsuphol P, Hug M, Ousingasawat J, Witzgall R, Schreiber R, *et al.* Calmodulin-dependent activation of the epithelial calcium-dependent chloride channel TMEM16A. *FASEB J* 2011; 25(3): 1058-68.
- 14 Schroeder BC, Cheng T, Jan YN, Jan LY. Expression cloning of TMEM16A as a calcium-activated chloride channel subunit. *Cell* 2008; 134(6): 1019-29.
- 15 Caputo A, Caci E, Ferrera L, Pedemonte N, Barsanti C, Sondo E, *et al.* TMEM16A, a membrane protein associated with calcium-dependent chloride channel activity. *Science* 2008; 322(5901): 590-4.
- 16 Huang X, Godfrey TE, Gooding WE, McCarty KS Jr, Gollin SM. Comprehensive genome and transcriptome analysis of the 11q13 amplicon in human oral cancer and synteny to the 7F5 amplicon in murine oral carcinoma. *Genes Chromosomes Cancer* 2006; 45(11): 1058-69.
- 17 Kunzelmann K, Tian Y, Martins JR, Faria D, Kongsuphol P, Ousing-

- sawat J, *et al.* Anoctamins. *Pflugers Arch* 2011; 462(2): 195-208.
- 18 Bao L, Kaldany C, Holmstrand EC, Cox DH. Mapping the BKCa channel's "Ca²⁺ bowl": Side-chains essential for Ca²⁺ sensing. *J Gen Physiol* 2004; 123(5): 475-89.
 - 19 Huang X, Gollin SM, Raja S, Godfrey TE. High-resolution mapping of the 11q13 amplicon and identification of a gene, TAOS1, that is amplified and overexpressed in oral cancer cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99(17): 11369-74.
 - 20 Strausberg RL, Feingold EA, Grouse LH, Derge JG, Klausner RD, Collins FS, *et al.* Generation and initial analysis of more than 15,000 full-length human and mouse cDNA sequences. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99(26): 16899-903.
 - 21 Wes RB, Corless CL, Chen X, Rubin BP, Subramanian S, Montgomery K, *et al.* The novel marker, DOG1, is expressed ubiquitously in gastrointestinal stromal tumors irrespective of KIT or PDGFRA mutation status. *Am J Pathol* 2004; 165(1): 107-13.
 - 22 Ferrera L, Caputo A, Galletta LJ. TMEM16A protein: A new identity for Ca²⁺-dependent Cl⁻ channels. *Physiology (Bethesda)* 2010; 25(6): 357-63.
 - 23 Harvey RD, Hume JR. Autonomic regulation of a chloride current in heart. *Science* 1989; 244(4907): 983-5.
 - 24 Bahinski A, Nairn AC, Greengard P, Gadsby DC. Chloride conductance regulated by cyclic AMP-dependent protein kinase in cardiac myocytes. *Nature* 1989; 340(6236): 718-21.
 - 25 Hume JR, Duan D, Collier ML, Yamazaki J, Horowitz B. Anion transport in heart. *Physiol Rev* 2000; 80(1): 31-81.
 - 26 Duan DY, Liu LL, Bozeat N, Huang ZM, Xiang SY, Wang GL, *et al.* Functional role of anion channels in cardiac diseases. *Acta Pharmacol Sin* 2005; 26(3): 265-78.
 - 27 Yamamoto S, Ehara T. Acidic extracellular pH-activated outwardly rectifying chloride current in mammalian cardiac myocytes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2006; 290(5): H1905-14.
 - 28 Duan D. Phenomics of cardiac chloride channels: the systematic study of chloride channel function in the heart. *J Physiol* 2009; 587(Pt 10): 2163-77.
 - 29 Zygmunt AC, Gibbons WR. Calcium-activated chloride current in rabbit ventricular myocytes. *Circ Res* 1991; 68(2): 424-37.
 - 30 Zygmunt AC. Intracellular calcium activates a chloride current in canine ventricular myocytes. *Am J Physiol* 1994; 267(5 Pt 2): H1984-95.
 - 31 January CT, Fozzard HA. Delayed afterdepolarizations in heart muscle: Mechanisms and relevance. *Pharmacol Rev* 1988; 40(3): 219-27.
 - 32 Houser SR, Piacentino V 3rd, Weisser J. Abnormalities of calcium cycling in the hypertrophied and failing heart. *J Mol Cell Cardiol* 2000; 32(9): 1595-607.
 - 33 Elble RC, Pauli BU. Tumor suppression by a proapoptotic calcium-activated chloride channel in mammary epithelium. *J Biol Chem* 2001; 276(44): 40510-7.

Progress on Studies of Functions and Molecular Basis of the Ca²⁺-activated Cl⁻ Channel

Wang Li^{1,2}, Zhang Hailin^{1*}

(¹Department of Pharmacology, Hebei Medical University; the Key Laboratory of Neural and Vascular Biology, Ministry of Education; the Key Laboratory of New Drug Pharmacology and Toxicology, Shijiazhuang 050017, China;

²College of Bioscience and Bioengineering, Hebei University of Science and Technology, Shijiazhuang 050018, China)

Abstract Calcium-activated chloride channels (CaCCs), which play an important role in physiological functions, are gradually recognized since they were first described in the early 1980s by Barish in *Xenopus* oocytes. However, the molecular identification and pharmacology of CaCCs remained obscure. It was as late as 2008 that independent studies from three laboratories identified a gene encoding transmembrane protein 16A (TMEM16A) as the candidate for CaCCs. This finding made it possible that CaCCs could be studied by genetic manipulation. This article reviews the progress on studies of CaCCs functions in different tissues, the electrophysiological and pharmacological properties of TMEM16A as potential drug target and their possible role during the process of arrhythmogenesis, myocardial hypertrophy and heart failure.

Key words calcium-activated chloride channels; transmembrane protein 16A; pharmacology; myocardial hypertrophy; signal transduction

Received: November 24, 2011 Accepted: February 21, 2012

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (No.30730031)

*Corresponding author. Tel: 86-311-86265562, E-mail: z.hailin@yahoo.com