

· 综述 · doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2015.26.035

## 钙激活性氯离子通道抑制剂对肺动脉平滑肌作用的研究进展\*

潘宣任 综述,王 凯,庞玉生<sup>△</sup> 审校

(广西医科大学第一附属医院儿科,南宁 530021)

[关键词] 钙激活性氯离子通道;肺动脉平滑肌细胞;跨膜蛋白 16A

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-8348(2015)26-3699-03

## 1 肺动脉平滑肌细胞(PASMCs)的钙激活性氯离子通道(CaCCs)与跨膜蛋白 16A(TMEM16A)

肺血管张力维持需要 CaCCs 参与。人们对不同组织(包括肺动脉)中平滑肌细胞上 CaCCs 进行了广泛研究,发现其通道活性在维持肺血管张力中起着重要作用<sup>[1-2]</sup>。

CaCCs 如何参与平滑肌细胞收缩,现有 2 种假设机制<sup>[3-4]</sup>: (1)“ryanodine 受体(RyR)通道”机制。肌浆网上的 RyR 中,存在 Ca<sup>2+</sup>-钙调蛋白依赖性蛋白激酶 II(CaMK II)的特异性磷酸化结合位点,CaMK II 能增加兔 PASMCs 上 CaCCs 的电流 $I_{(Cl)Ca}$ 强度<sup>[5]</sup>。有研究者通过影响 Ca<sup>2+</sup>内流,触发胞内钙池 Ca<sup>2+</sup>释放,引起血管平滑肌收缩。值得注意的是,低浓度 ryanodine(1.0 nmol/L~10.0 μmol/L)可使 RyR 处于开放状态,但是高浓度 ryanodine(0.3~2.0 mmol/L)反而会使 RyR 通道关闭<sup>[6]</sup>。此外,肌浆网表面 RyR 通道产生的自发瞬时钙释放也可引发  $I_{(Cl)Ca}$ 。(2)“CaCCs 激动剂+三磷酸肌醇受体(IP3R)通道”机制——CaCCs 激动剂有内皮素-1(ET-1)、5-羟色胺(5-HT)等<sup>[7]</sup>。膜 G 蛋白耦联受体 Gq 由 CaCCs 激动剂激活,促使三磷酸肌醇(IP3)作用于 IP3 受体通道,导致肌浆网释放 Ca<sup>2+</sup>,CaCCs 激活,诱发  $I_{(Cl)Ca}$ ;另一方面,被激活的 CaCCs 使细胞膜去极化,电压依赖性钙通道(VDCC)开放,更多 Ca<sup>2+</sup>内流,平滑肌收缩。而 PASMCs 中的 Ca<sup>2+</sup>浓度在这一正反馈循环中也升高了 200~1 000 nmol/L<sup>[8]</sup>,激活的 CaCCs 在此过程中起了重要作用。

2008 年 3 个实验室同时发现构成 CaCCs 的分子基础为 TMEM16A,并证实它能编码 CaCCs,这使通过基因手段调控 CaCCs 功能与表达成为了可能,为进一步探究 CaCCs 生理与生物学特性提供了坚实基础<sup>[9-11]</sup>。在包括心、肺、肝脏、小肠、胎盘和骨骼肌的人类诸多组织中,TMEM16A mRNA 均有分布<sup>[12]</sup>。Manoury 等<sup>[13]</sup>使用细胞膜片钳技术检测离体的大鼠 PASMCs 上的生理电流,分离出较强的外向整流性慢激活型  $I_{(Cl)Ca}$ ,与同源型 TMEM16A 通道蛋白中检测到的电流存在高度相似性;另一方面,他们使用小 RNA 干扰技术将离体培养大鼠 PASMCs 上 TMEM16A 的表达下调,发现与之相伴的是全细胞上  $I_{(Cl)Ca}$  几乎完全缺失。这说明 TMEM16A 是大鼠 PASMCs 上 CaCCs 蛋白的主要组成部分,对 TMEM16A 功能与表达的调控完全可以影响 PASMCs 上 CaCCs 的功能特性。此发现为与肺动脉相关疾病的研究提供了新平台。

一些肺血管病变,如低氧或高肺血流所致肺动脉高压,都有肺血管收缩异常,结构重塑等病理表现,PASMCs 参与了这些病理变化过程,而 CaCCs 功能异常是其中的重要环节。因此对 PASMCs 上 CaCCs 的研究,有助于进一步了解上述疾病

形成机制,从而为相关疾病防治找到新思路与新靶点。

## 2 PASMCs 的 CaCCs 抑制剂

2.1 尼氟灭酸(niflumic acid, NFA) 研究 PASMCs 上 CaCCs,需要对其具有特异性的药物工具,才能从细胞膜上混合生理电流中分离出 CaCCs 的特定电流,单独完整地证明该通道的生理功能与特性。目前国内研究中,常用于 PASMCs 的 Cl<sup>-</sup>通道抑制剂有:三苯氧胺(他莫昔芬,tamoxifen, TAM)<sup>[14]</sup>、NFA 和 indaryloxyacetic acid(IAA-94)等<sup>[15]</sup>。其中 TAM 是一般氯通道阻滞剂<sup>[16]</sup>,在低氧性肺动脉高压中,莫碧文等<sup>[14]</sup>发现其抑制 PASMCs 增生作用与肺动脉血管扩张效应,不仅是通过抑制 PASMCs 上的 CaCCs,也是通过抑制了其上的容量敏感性 Cl<sup>-</sup>通道活性来完成的,因此 TAM 对于 CaCCs 不具特异性;而后二者则是常见的 CaCCs 抑制剂,其中以 NFA 最具代表性。NFA 是一种单羧酸衍生物,曾被认为是 CaCCs 特异性抑制剂,它能阻滞各种激动剂诱导的血管收缩效应,其浓度在 10.0~100.0 μmol/L 时,能引起细胞膜超极化和血管舒张,但对胞外高钾介导的收缩效应无影响<sup>[8]</sup>。杨朝等<sup>[17]</sup>通过实验证明,NFA 可以抑制急性低氧人 PASMCs 胞内游离钙离子浓度([Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>)升高,并发现 NFA 对急性低氧人肺动脉血管环张力具有舒张作用。可能机制是:低氧致 [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>升高,CaCCs 激活,细胞膜去极化,电压依赖性钙通道开放,胞外大量 Ca<sup>2+</sup>内流,[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>进一步升高,平滑肌收缩;NFA 抑制 CaCCs 后,细胞膜去极化作用减弱,胞外 Ca<sup>2+</sup>内流减少,[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>降低,平滑肌舒张。另一方面,盛文超等<sup>[18]</sup>发现,在低氧性肺动脉高压大鼠肺动脉平滑肌细胞中,对于 CaCCs 的通道蛋白 mRNA 以及丝裂原活化蛋白激酶(MAPK),NFA 都有着抑制二者表达的作用。前者证明了 NFA 对肺动脉平滑肌细胞收缩的抑制作用;而对于后者,MAPK 通路与细胞增殖、凋亡密切相关,NFA 可以负反馈调节 [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>,阻断 MAPK 通路激活,抑制平滑肌细胞增殖。但 NFA 具有双重效应。Ledoux 等<sup>[19]</sup>发现在兔 PASMCs 上,NFA 既能抑制 CaCCs,也能刺激出现一个持续的浓度依赖型  $I_{(Cl)Ca}$ 。在 [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> 为 250~500 nmol/L、电压条件为负的情况下,胞外浓度在 100.0 μmol/L 的 NFA 可以增强平滑肌细胞的  $I_{(Cl)Ca}$ ,而外向电流在正电压条件下却受抑制;对 NFA 洗脱后,正负电压下  $I_{(Cl)Ca}$  都增大了。NFA 能阻断容积调节性阴离子通道(VRACs)和 K<sup>+</sup>通道,也能影响 Ca<sup>2+</sup>电流,其应用于 PASMCs 研究将增大解释 I(Cl)Ca 的复杂性<sup>[20]</sup>。所以,NFA 并非可以完全分离  $I_{(Cl)Ca}$  的药理学工具,亦不能成为最理想的研究 PASMCs 上 CaCCs 的特异

\* 基金项目:国家自然科学基金资助项目(81160040)。 作者简介:潘宣任(1983-),硕士,住院医师,主要从事肺动脉高压研究工作。

△ 通讯作者,E-mail:pangyush@163.com.cn。

性抑制剂。

**2.2 CaCCinh-A01** 随着人们对 CaCCs 研究的深入,近年来国外出现了更具特异性的合成物,其中较新型的药物工具有:CaCCinh-A01<sup>[21]</sup>和 T16Ainh-A01<sup>[22]</sup>。有研究者在对 150 种以上红酒进行筛选,发现赤霞珠(一种酿造红葡萄酒的红葡萄品种)的提取物和小分子合成物可以抑制 T84 细胞的  $I_{(Cl)Ca}$ ,其半抑制浓度( $IC_{50}$ )是该提取物纯品的 1:200 稀释度,而且更高浓度的该药物能产生 100% 的抑制作用<sup>[23]</sup>。他们发现给小鼠接种轮状病毒后,再予以口服该药物处理可以阻止腹泻发生。其机制是该药物抑制了上皮细胞 CaCCs 活性,从而抑制了小鼠肠道上皮细胞液体分泌,此过程中该药物并未影响轮状病毒感染情况。此药物不能阻止霍乱毒素所致水样便的产生,在水样便形成过程中,囊性纤维化  $Cl^-$  通道(CFTR)(一种 cAMP 调节性  $Cl^-$  通道)依赖性液体分泌起到激活机制的作用,这说明该药物并不能抑制肠道上皮 CFTR,而只针对 CaCCs。此药物即 CaCCinh-A01。Yang 等<sup>[24]</sup>以转染了 TMEM16A 通道蛋白的 CHO 细胞为研究平台,用以原子吸收光谱技术为基础的检测系统对 CaCCs/TMEM16A 抑制剂进行了高通量筛选,发现 NPPB(一种  $Ca^{2+}$  敏感性  $I_{Cl^-}$  抑制剂)和 CaCCinh-A01 都对 CaCCs/TMEM16A 具有较好的浓度依赖性效应,二者在浓度为 300.0  $\mu\text{mol/L}$  时,都能完全抑制 CaCCs/TMEM16A 的电流;而 CaCCinh-A01 的  $IC_{50}$  为  $(6.35 \pm 0.27) \mu\text{mol/L}$ ,NPPB 的  $IC_{50}$  为  $(39.35 \pm 4.72) \mu\text{mol/L}$ ,前者  $IC_{50}$  低于后者,说明 CaCCinh-A01 对 CaCCs/TMEM16A 电流抑制作用强于 NPPB。较早前就有研究认为,3-酰基-2-氨基噻吩类型的 CaCCinh-A01 是潜在的 CaCCs 抑制剂<sup>[25]</sup>,说明其对 PSMCs 潜在的收缩拮抗作用。但是目前尚未有将其应用于 PSMCs 中 CaCCs 的研究。如前所述, TMEM16A 是 PSMCs 上 CaCCs 的主要成分,而 CaCCinh-A01 作为 CaCCs/TMEM16A 电流相对有效的特异抑制剂,将其应用在该方面的研究具有可行性。

**2.3 T16Ainh-A01** TMEM16A 是 CaCCs 分子基础的发现,使很多实验课题组将 CaCCs 特异性抑制剂的研发聚焦其上。有研究者筛选了 10 万多种化合物,发现小分子抑制剂苯并吡啶类化合物能明显抑制 TMEM16A 电流,抑制作用较强的 A 组化合物结构母核为硫代乙酰基连接的嘧啶环与苯并吡啶环,其中抑制作用最强的一种化合物的  $IC_{50}$  仅 1.0  $\mu\text{mol/L}$  左右,并且其对 TMEM16A 的  $Cl^-$  电流抑制并未干扰细胞信号通路上游  $Ca^{2+}$  信号<sup>[22]</sup>,说明该化合物能直接作用于 TMEM16A,因此其被命名为 T16Ainh-A01。此外,该研究还发现 CaCCinh-A01 可以完全抑制人气管和小肠细胞上的  $I_{(Cl)Ca}$ ,而 T16Ainh-A01 在这些细胞上的抑制作用则相对较弱。研究显示 T16Ainh-A01 主要抑制的是初始的激动剂刺激性瞬时  $Cl^-$  电流。Davis 等<sup>[26]</sup>在兔 PSMCs 上应用了 T16Ainh-A01,并以全细胞模式膜片钳技术记录了给药前后以及药物洗脱后细胞膜  $I_{(Cl)Ca}$  变化:给药后 400 s,标准化电流由原来的 1.0 下降到 0.8 以下,而药物洗脱后 300 s 内电流回升至 1.0 以上。此前有研究显示,在兔 PSMCs 全细胞  $I_{(Cl)Ca}$  记录中,使用 NFA 对其具有抑制与刺激的双重效应,刺激效应表现为在负性检验电位时  $I_{(Cl)Ca}$  增加,药物洗脱后全细胞电流增强到了给药前水平约 200%<sup>[5]</sup>。而在有的研究者的实验中,无论是给予 T16Ainh-A01 后,还是药物洗脱后,皆未观察到刺激效应,以 10.0  $\mu\text{mol/L}$  浓度给药,5 min 后洗脱,全细胞电流恢复到给药前水平  $(105 \pm 5)\%$ 。这说明 T16Ainh-A01 在有效抑制

PSMCs 上  $I_{(Cl)Ca}$  的同时,并未产生过多反向效应,相较于 NFA,其将能更真实地反映 PSMCs 上 CaCCs 的功能特点。10.0  $\mu\text{mol/L}$  的 T16Ainh-A01 对阻力性动脉血管有显著抑制性,这些动脉血管上已证明有 TMEM16A 表达,而且它对于 5-HT 诱导的大鼠肺动脉收缩亦有拮抗作用<sup>[27]</sup>,其还对高钾引起的血管收缩无显著影响;它的抑制效能并不受钙激活钾通道阻滞剂(paxilline)、格列苯脲(glibenclamide)或利诺吡啶(linopirdine)影响,上述 3 种药物分别是 ATP 敏感性钾通道,  $KCa_{3.1}$ 、KCNQ 编码的钾通道的有效抑制剂,这些通道蛋白也表达在 PSMCs 中。另外, T16Ainh-A01 也同样能拮抗甲氧胺(methoxamine)或 U46619 诱导的细胞收缩,说明其并非以受体阻断剂的形式来发挥作用的<sup>[26]</sup>。以上都证明对于 PSMCs 上的 CaCCs, T16Ainh-A01 比其他传统 CaCCs 抑制剂具有更强特异性。

### 3 总 结

TMEM16A 是 PSMCs 上 CaCCs 蛋白的主要成分,此发现极大带动了 CaCCs 特异性抑制剂的研发,较新的药理学工具因而得以出现,而这又推动了 CaCCs 研究的进一步加深。但运用抑制性药物工具去分析 PSMCs 上 CaCCs 功能特点时仍需谨慎,因为相似程度的 PSMCs 收缩拮抗,也可由直接抑制  $Ca^{2+}$  通道或激活  $K^+$  通道来完成,这都能间接导致具有相同功能的离子通道关闭,从而增加细胞离子通道中生理电流研究的复杂性。另一方面,血管平滑肌上 CaCCs 是否仅由 TMEM16A 组成仍具争议,从兔肺动脉上测得天然的 CaCCs 单通道电导性为 1-3 pS<sup>[27]</sup>,比 Yang 等<sup>[9]</sup>在 TMEM16A 通道蛋白过表达研究中测得的 TMEM16A 电导性(8 pS)要小,这或许是于表达在血管平滑肌细胞上的不同的 TMEM16A 剪切变体具体特性不同所致。因此,对 PSMCs 上 CaCCs 完全特异的抑制剂或许尚未出现,仍需大量 CaCCs 的实验研究去促进更新型 CaCCs 特异性抑制剂的研发。

CaCCs 抑制剂不仅是研究 PSMCs 上 CaCCs 较好的药理学工具,其对 PSMCs 收缩的拮抗作用,也将对人们研发新型血管舒张性药物以防治相关肺动脉高压疾病,提供新的思维与手段。

### 参考文献

- [1] Huang F, Wong X, Jan LY. International union of basic and clinical pharmacology, LXXXV: calcium-activated chloride channels[J]. *Pharmacol Rev*, 2012, 64(1):1-15.
- [2] Angermann JE, Sanguinetti AR, Kenyon JL, et al. Mechanism of the inhibition of  $Ca^{2+}$ -activated  $Cl^-$  currents by phosphorylation in pulmonary arterial smooth muscle cells[J]. *J Gen Physiol*, 2006, 128(1):73-87.
- [3] Leblanc N, Ledoux J, Saleh S, et al. Regulation of calcium-activated chloride channels in smooth muscle cells; a complex picture is emerging[J]. *Can J Physiol Pharmacol*, 2005, 83(7):541-556.
- [4] Townsley MI. Special topics issue Townsley. Microcirculation: ion channels and pulmonary vascular function[J]. *Microcirculation*, 2006, 13(8):611-613.
- [5] Piper AS, Greenwood IA, Large WA. Dual effect of blocking agents on  $Ca^{2+}$ -activated  $Cl^-$  currents in rabbit pulmonary artery smooth muscle cells[J]. *J Physiol*, 2002, 539(Pt 1):119-131.

- [6] 吴钢,李卫华,黄鹤. 心脏离子通道病:从基础到临床[M]. 北京:科学出版社,2010:122-131.
- [7] Mandegar M, Remillard CV, Yuan JX. Ion channels in pulmonary arterial hypertension[J]. Prog Cardiovasc Dis, 2002,45(2):81-114.
- [8] Yuan XJ. Role of calcium-activated chloride current in regulating pulmonary vasomotor tone[J]. Am J Physiol, 1997,272(5 Pt 1):L959-L968.
- [9] Yang YD, Cho H, Koo JY, et al. TMEM16A confers receptor-activated calcium-dependent chloride conductance [J]. Nature, 2008,455(7217):1210-1215.
- [10] Schroeder BC, Cheng T, Jan YN, et al. Expression cloning of TMEM16A as a calcium-activated chloride Channel subunit[J]. Cell, 2008,134(6):1019-1029.
- [11] Caputo A, Caci E, Ferrera L, et al. TMEM16A, a membrane protein associated with calcium-dependent chloride Channel activity[J]. Science, 2008,322(591):590-594.
- [12] Huang X, Godfrey TE, Gooding WE, et al. Comprehensive genome and transcriptome analysis of the 11q13 amplicon in human oral cancer and synteny to the 7F5 amplicon in murine oral carcinoma[J]. Genes Chromosomes Cancer, 2006,45(11):1058-1069.
- [13] Manoury B, Tamuleviciute A, Tammaro P. TMEM16A/anoctamin 1 protein mediates calcium-activated chloride currents in pulmonary arterial smooth muscle cells[J]. J Physiol, 2010,588(Pt 13):2305-2314.
- [14] 莫碧文,曾锦荣,李国坚,等. 氯离子通道阻断剂对大鼠低氧性肺动脉高压的影响[J]. 中国临床药理学与治疗学, 2006,6(6):677-680.
- [15] 杨朝,张珍祥,徐永健,等. 大鼠肺动脉平滑肌细胞膜钙激活氯通道与细胞质钙的关系及意义[J]. 华中科技大学学报:医学版,2007,1(1):27-30.
- [16] Henriquez M, Riquelme G. 17beta-estradiol and tamoxifen regulate a maxi-chloride Channel from human placenta [J]. J Membr Biol, 2003,191(1):59-68.
- [17] 杨朝,嵩冰,张丽萍,等. 尼氟灭酸对急性低氧人肺动脉收缩的影响[J]. 中国药理学通报, 2011,27(3):428-431.
- [18] 盛文超,刘建,余维巍,等. 尼氟灭酸对低氧性肺动脉高压大鼠肺动脉平滑肌细胞 mCLCA mRNA 及 MAPK 表达的影响[J]. 华中科技大学学报:医学版, 2012,6(6):727-730.
- [19] Ledoux J, Greenwood IA, Leblanc N. Dynamics of Ca<sup>2+</sup>-dependent Cl<sup>-</sup> Channel modulation by niflumic acid in rabbit coronary arterial myocytes [J]. Mol Pharmacol, 2005,67(1):163-173.
- [20] 王莉,张海林. Ca<sup>2+</sup> 激活 Cl<sup>-</sup> 通道功能及分子基础研究进展[J]. 中国细胞生物学学报, 2012,5(5):80-87.
- [21] De La Fuente R, Namkung W, Mills A, et al. small-molecule screen identifies inhibitors of a human intestinal calcium-activated chloride Channel [J]. Mol Pharmacol, 2008,73(3):758-768.
- [22] Namkung W, Phuan PW, Verkman AS. TMEM16A inhibitors reveal TMEM16A as a minor component of calcium-activated chloride Channel conductance in airway and intestinal epithelial cells[J]. J Biol Chem, 2011,286(3):2365-2374.
- [23] Ko EA, Jin BJ, Namkung W, et al. Chloride Channel inhibition by a red wine extract and a synthetic small molecule prevents rotaviral secretory diarrhoea in neonatal mice[J]. Gut, 2014,63(7):1120-1129.
- [24] Qi J, Wang Y, Liu Y, et al. Development and validation of HTS assay for screening the calcium-activated chloride Channel modulators in TMEM16A stably expressed CHO cells[J]. Anal Bioanal Chem, 2014,406(6):1713-1721.
- [25] Tian Y, Kongsuphol P, Hug M, et al. Calmodulin-dependent activation of the epithelial calcium-dependent chloride Channel TMEM16A [J]. FASEB J, 2011,25(3):1058-1068.
- [26] Davis AJ, Shi J, Pritchard HA, et al. Potent vasorelaxant activity of the TMEM16A inhibitor T16A(inh)-A01 [J]. Br J Pharmacol, 2013,168(3):773-784.
- [27] Sun H, Xia Y, Paudel O, et al. Chronic hypoxia-induced upregulation of Ca<sup>2+</sup>-activated Cl-Channel in pulmonary arterial myocytes: a mechanism contributing to enhanced vasoreactivity [J]. J Physiol, 2012,590(Pt 15):3507-3521.

(收稿日期:2015-03-28 修回日期:2015-05-12)

• 综 述 • doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2015.26.036

## 阿司匹林与急性肺损伤

张虹<sup>1</sup>综述,周发春<sup>2</sup>审校

(1. 重庆市开县人民医院重症医学科 405400; 2. 重庆医科大学附属第一医院重症医学科 400016)

[关键词] 阿司匹林;呼吸窘迫综合征,成人;血栓素 A<sub>2</sub>

[中图分类号] R563

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-8348(2015)26-3701-04

急性肺损伤是一个严重威胁人类健康的危重症,其病因复杂,治疗手段有限,仅保护性机械通气<sup>[1]</sup>和限制性液体管理<sup>[2]</sup>,其患病率和病死率仍居高不下<sup>[3-5]</sup>。除此之外,其高昂的医疗

费用及目前相关治疗对患者后期肺功能的影响,都严重威胁患者的生存质量及心理预后。因此寻找能够有效预防高危患者发生急性肺损伤的方法仍是目前的重要课题之一。

作者简介:张虹(1987—),硕士,主要从事危重症医学方面的研究。