

以 ANO1 蛋白为靶点的钙激活氯通道调节剂研究进展

王昱曦¹, 刘振明^{1*}, 张桂森^{2*}, 张亮仁^{1*}

(1. 北京大学药学院, 天然药物及仿生药物国家重点实验室, 北京 100191; 2. 江苏恩华药物研究院, 江苏 徐州 221100)

摘要: 钙激活氯通道是广泛存在于人体内的一种阴离子通道, 参与分泌、心肌细胞去极化、神经信号传导等多种生理活动。ANO1 蛋白是钙激活氯通道的分子基础之一, 对 ANO1 蛋白进行调节能够产生多种药效作用, 例如镇痛、治疗痢疾、哮喘、抑制肿瘤等。近 10 年来发展出许多 ANO1 蛋白调节剂筛选测试方法, 虽然筛选出一系列以 ANO1 蛋白为靶点的钙激活氯通道调节分子, 但是这些分子的药理学作用却并不一致。本文从筛选方法、构效关系、潜在应用前景等多方面对 ANO1 蛋白调节分子的研究进展进行论述。

关键词: 钙激活氯通道; ANO1; 调节剂; 构效关系; 测试方法; 潜在应用

中图分类号: R916

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870 (2017) 10-1505-10

A review of ANO1-based calcium activated chloride channel modulators

WANG Yu-xi¹, LIU Zhen-ming^{1*}, ZHANG Gui-sen^{2*}, ZHANG Liang-ren^{1*}

(1. State Key Laboratory of Natural and Biomimetic Drugs, School of Pharmacy, Peking University, Beijing 100191, China;
2. Jiang Su Enhwa Drug Research Institution, Xuzhou 221100, China)

Abstract: Calcium-activated chloride channel (CaCC) is an anion channel, widely distributed in the human body, taking a part in cell functions including secretion, heart muscle repolarization, nerve signal transmission and several physiological activities. The anoctamin 1 (ANO1) protein is the molecular basis of CaCC and the modification of ANO1 protein will produce a variety of pharmacological effects, such as analgesia, treating dysentery and asthma, even tumor proliferation and migration inhibition. In the past decade, many methods in screening of ANO1 regulators have been developed. Although a series of the ANO1-based CaCC regulatory molecules have been identified, the pharmacological effects of these molecules are not consistent. In this review, we introduce ANO1 protein regulators from many aspects including bio-test methods, structure-activity relationships, and the potential applications.

Key words: calcium-activated chloride channel; anoctamin 1; modulators; structure-activity relationship; bio-test methods; application

钙激活氯通道 (calcium-activated chloride channel, CaCC) 作为人体阴离子通道, 广泛分布于呼吸道、消化道等具有分泌功能的腺上皮细胞中, 也存在于视网膜、背根神经节及平滑肌细胞中, 参与多种细胞生理活动, 例如分泌蛋白及盐的跨上皮转运、神经信号传

导、动作电位复极、平滑肌收缩等^[1-5]。迄今为止, 发现的 CaCC 分子基础主要有 CLCA (chloride channel accessory)^[6]、tweety (hTTHY1 and hTTYH3)^[7]、bestrophins^[8]和 anoctamins^[9]。

Anoctamin 1 (ANO1), 也被称为 TMEM16A (transmembrane protein 16A), 是一类具有 8 次跨膜结构的膜蛋白。ANO1 最初被发现的部分肿瘤组织中特异性高表达, 如胃肠道间质瘤^[10]、口腔鳞状细胞癌^[11]、头颈部鳞状细胞癌^[12]等, 而在相同起源的正常

收稿日期: 2017-04-20; 修回日期: 2017-05-09.

基金项目: 北京市自然科学基金资助项目 (7172118).

*通讯作者 Tel: 86-10-82802567, E-mail: liangren@bjmu.edu.cn

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2017-0386

组织低表达或不表达。ANO1 抗体能够作为检测胃肠道间质瘤的一种敏感的特异性标志物^[13]。2008 年, ANO1 蛋白首次被确认为 CaCC 的分子基础, 在体外可表现完整的钙激活氯电流特征^[14–17]。

理论上, 如果对 ANO1 蛋白进行调控, 可能产生一系列与离子通道功能相关的药效作用, 例如 Lee 等^[18]在小鼠中使用干扰 RNA 将 ANO1 敲低后, 小鼠对针刺和热刺激产生明显痛觉钝化现象; Namkung 等^[19]使用离体肠平滑肌组织进行肠蠕动力监测, 发现 ANO1 抑制剂 TMEM16A_{inh}-A01 可以显著降低肠蠕动舒张力和收缩力, 但不改变蠕动节律。此外, ANO1 也具有肿瘤相关的调控功能, 具有明显的抑制肿瘤增殖和迁移的作用^[20], 例如 Liu 等^[21]在前列腺癌细胞中使用 shRNA 对 ANO1 进行沉默, 显著抑制了肿瘤的增殖和迁移。

针对 ANO1 蛋白的小分子调节剂研究还处于起步阶段, 数量少、活性低是当前存在的主要问题。文献报道较强的 ANO1 特异性抑制剂 IC₅₀ 值在 1 μmol·L⁻¹ 以上, 较低的活性一定程度上制约了 ANO1 蛋白的基础研究工作。

ANO1 特异性抑制剂主要有 CaCC_{inh} 系列^[22], TMEM16A_{inh}-A 系列^[23]、MONNA 系列^[24]、Ani9 系列^[25]和部分天然化合物^[26], 以上化合物普遍对 ANO1 稳转细胞系中的 CaCC 电流具有明显抑制作用, 但是对具有 CaCC 电生理特征的正常人体组织细胞抑制作用存在明显差异; 此外, 以上抑制剂对于 ANO1 相关的肿瘤增殖抑制效果也存在差异, CaCC_{inh}-A01 和 tannic acid 具有明显抑制作用, 而其余抑制剂则无效。目前 ANO1 激动剂只有 Eact 系列^[27], 其可在无 Ca²⁺环境下直接激动 ANO1 蛋白, 产生离子通道功能。

本文将从以 ANO1 为靶点的钙激活氯通道调节剂的测活方法、结构及构效关系和潜在应用方向进行论述。

1 钙激活氯通道调节剂的生物活性测试方法

目前对于 ANO1 蛋白调节剂的测活方法, 主要围绕 ANO1 蛋白的钙激活氯通道特性, 即转运阴离子, 且通道开闭受到细胞内 Ca²⁺浓度和细胞膜电位的双重影响。当通道开放时, 细胞膜电阻显著下降, 并出现跨细胞膜的阴离子流, 这种电流可以被电极检测到, 不同的开放程度产生的跨细胞膜电流不同。因此, 通过调整细胞内 Ca²⁺浓度或改变膜电位来控制通道开放程度, 检测调节剂对跨膜电流的影响, 是大多数 ANO1 蛋白调节剂测活方法的基本原理; 与此同时, 也可通过使用对阴离子敏感的荧光指示蛋白, 检测阴离子浓度变化的方式来进行间接检测。ANO1 蛋白调节剂的测活方法主要有黄色荧光蛋白-碘离子荧光淬灭法、短路电流法、全细胞膜片钳法和电压钳法, 以下分别阐述。

1.1 黄色荧光蛋白-碘离子荧光淬灭法 该方法使用 ANO1 和黄色荧光蛋白 (yellow fluorescence protein, YFP) 共转染的 FRT 细胞, 或 YFP 转染的内源性表达 CaCC 的人体组织细胞。YFP 的黄色荧光可以被碘离子淬灭。当细胞外液加入卡巴胆碱 (CCh) 或 ATP 时, 细胞内钙库会释放钙离子, 使钙离子浓度升高, 从而激活 CaCC 通道。而 CaCC 通道可以将细胞外碘离子转运进入细胞内部, 因而在加入调节剂时细胞内的 YFP 荧光会被淬灭, 在酶标仪检测下, 荧光值会显著降低。如图 1 所示, 当加入 CaCC 抑制剂时, 荧光值降低的速度会减慢; 反之, 当加入激动剂时, 荧光值降低速度会加快, 通过比较荧光值的下降速率, 可间接评价调节剂的活性。

1.2 短路电流法 短路电流法 (short circle current) 使用经典的尤斯室装置, 如图 2 所示, 上皮组织或单层细胞接种在基底上, 形成具有极性的紧密连接, 将两个小室完全隔离开。在基底上下两侧通过电极连接一个电压表, 用于测量细胞外侧和基底侧之间的电

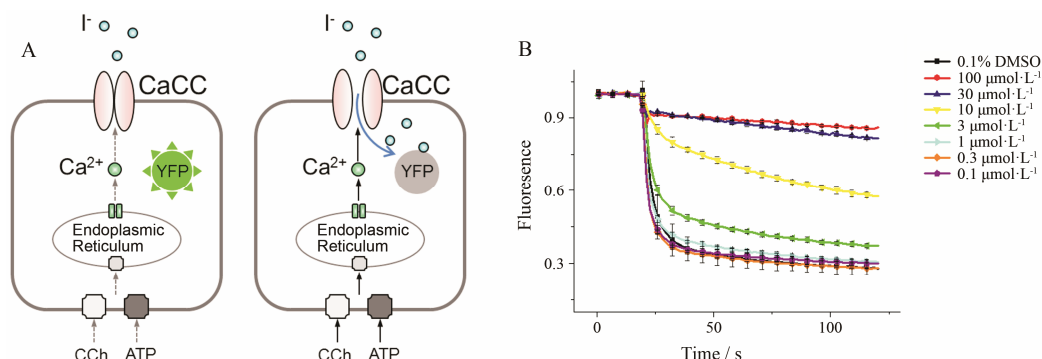


Figure 1 Yellow fluorescence protein (YFP) fluorescence quenching assay. (A) Experiment method of YFP fluorescence quenching assay; (B) Changes of yellow fluorescence in response to different CaCC_{inh}-A01 concentration^[22]

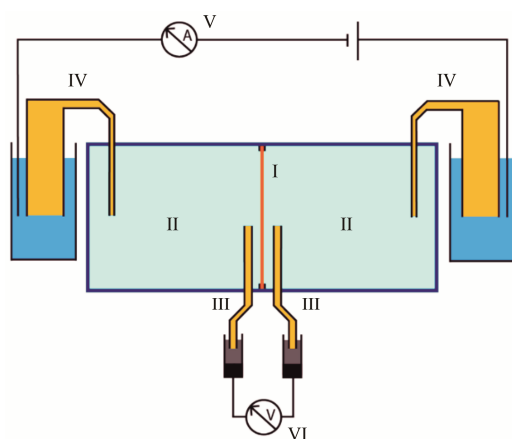


Figure 2 Ussing chamber. (I) Epithelial tissue or cells; (II) The two half chambers with ringer solution; (III) (IV) Agar-Ringer bridges; (V) Amperemeter; (VI) Voltmeter

压。两个小室内装有不同盐溶液, 通过盐桥串联一个外接电源和电流表。在离子通道开放状态下, 基底细胞会自发在两个小室之间转运离子, 产生转运电流和转运电压, 转运电压会被基底层两侧连接的电压表记录下来。此时外接电源给予一个与转运电流大小相同、方向相反的电流, 将转运电压抵消至 0 mV, 电流表记录此时给予的外接电流的大小, 即为转运电流的大小。当加入 ATP 时, 促进细胞内钙库释放钙离子, 进一步激活 ANO1 通道, 转运电流上升。若再向其中加入 ANO1 抑制剂, 通道关闭, 此时转运电流会急剧下降。不同强度的抑制剂, 电流的下降幅度不一, 因此可判断抑制剂强弱。

1.3 全细胞膜片钳 膜片钳实验被称为离子通道研究领域的“金标准”。全细胞膜片钳使用特制的中空玻璃电极吸住并吸破细胞表面, 使细胞膜和电极之间形成封闭回路, 电极可检测全细胞膜的离子转运电流。通过中空电极向细胞内液中加入钙离子, 激活 ANO1 通道。此时电极外加梯度电压, 检测电流变化情况。当细胞外液加入抑制剂后, 通道闭合, 电阻升高, 在相同的梯度电压下, 相比不加药的空白组离子转运电流降低; 激动剂反之。由此可评估调节剂对离子通道的影响。

1.4 电压钳法 本方法在 CaCC 通道检测方面的应用是由 Oh 等于 2008 年提出^[28]。电压钳与膜片钳的基本原理相似, 但装置有所区别。电压钳更有利于间接测定在某一特定膜电位下, 细胞膜电阻值, 即离子通道开放程度。装置由两根电极刺入细胞, 其中一根电极连接电压计和指令电压装置, 设定好某一指令电压后, 判断电路会判断膜电压和指令电压值之间的差距, 而后命令外接电源通过另一根电极向细胞

内输入一定电流, 使膜电位和指令电压大小相等, 方向相反, 此输入电流会被电流计记录下来。在一定指令电压和钙离子浓度下, 抑制剂活性越强, ANO1 通道开放程度越小, 膜电阻越大, 意味着要使膜电位和指令电压相等, 需要输出的电流越小。因此通过比较输入电流, 可间接反映抑制剂活性强弱。

2 ANO1 调节剂

CaCC 抑制剂根据作用选择性可分为非特异性和特异性两类。最初发现的 CaCC 抑制剂都属于非特异性类, 其选择性较差, 抑制活性弱, 例如 niflumic acid (NFA)^[29], 能在非洲爪蟾卵母细胞中以 $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的剂量阻断 CaCC^[30]。曾经人们一度认为 NFA 是一种特异性阻断剂, 甚至将其用于在不同组织的阴离子电流中识别 CaCC 电流。然而, NFA 有时也能提高钙激活氯电流^[31]。NFA 除阻滞 CaCC 外, 还能对许多离子通道进行抑制, 例如电压门控阴离子通道 (VRAC)^[32]和钾离子通道^[33,34]。此外, NFA 对 Ca^{2+} 电流也有影响^[34,35]。

以下分别详述以 ANO1 为靶点的 CaCC 特异性抑制剂。

2.1 天然产物 该系列化合物由 Namkung 等^[26]于 2010 年发表, 代表结构主要有 digallic acid (**1**, IC_{50} $3.6 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)、dichlorophene (**2**, IC_{50} $4.5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)、tannic acid (**3**, IC_{50} $6.1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)、candesartan (**4**, IC_{50} $3.7 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)、gossypol (**5**, IC_{50} $6.1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 和 gambogic acid (**6**, IC_{50} $3.7 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) (图 3)。在 ANO1 稳转的 FRT 细胞上对 3 200 种天然产物进行基于黄色荧光蛋白-碘离子荧光淬灭模型测试后筛选出以上化合物。其中, tannic acid (**3**) 对 ANO1 稳转 FRT 细胞、内源性高表达 ANO1 的肠 T84 细胞、支气管上皮细胞均具有良好的 CaCC 抑制作用。同时其对囊性纤维化跨膜转导因子相关氯通道 (cystic fibrosis transmembrane conductance regulator, CFTR)、上皮细胞钾通道 (epithelial sodium channel, EnaC) 等离子通道均无抑制作用, 亦不影响细胞内钙离子浓度。

2.2 $\text{CaCC}_{\text{inh-A01}}$ 和 $\text{CaCC}_{\text{inh-B01}}$ $\text{CaCC}_{\text{inh-A01}}$ (**7**) 是第一个特异性 CaCC 抑制剂, 其起效迅速, 抑制能力较强。该系列化合物由 Namkung 等^[22]于 2008 年发表并申请专利。由于 ANO1 蛋白作为 CaCC 的分子基础直到 2008 年才被揭示, 因此 Namkung 等进行 $\text{CaCC}_{\text{inh-A01}}$ 系列研究时并未使用 ANO1 蛋白稳转细胞系, 而使用人结肠癌细胞 HT-29 (内源性 CaCC 高表达) 构建黄色荧光蛋白-碘离子荧光淬灭模型。对 50 000 种类药化合物进行高通量筛选获得了 $\text{CaCC}_{\text{inh-A}}$ (**7**)、 $\text{CaCC}_{\text{inh-B}}$ (**8**) 两类化合物。二者在抑制 CaCC 通

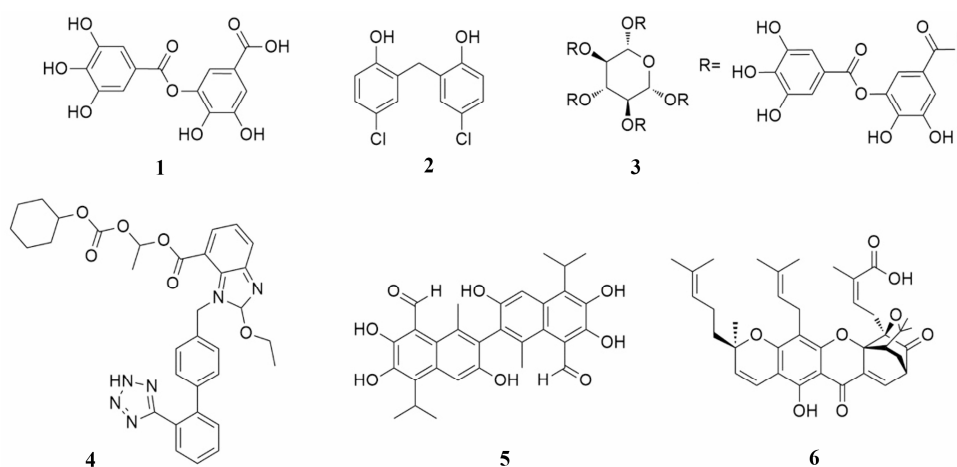


Figure 3 Calcium-activated chloride channel (CaCC) inhibitor natural products

道同时, 不影响细胞内钙浓度, 同时对 CFTR 无抑制作用。

如图 4 所示, 对 $\text{CaCC}_{\text{inh-A}}$ (**7a**) 系列 18 个类似物分子进行构效关系研究发现, n 为 1 (即噻吩并环己烷母核) 活性最高, n 为 2 (即噻吩并环庚烷母核) 次之, 而 n 为 0 (即噻吩并叔丁基环戊烷母核) 活性消失; R_1 部分为叔丁基有利于活性提升; R_2 部分为 OH (即噻吩甲酸) 时活性最高, 为甲氧基 (即噻吩甲酸甲酯) 或乙氧基 (噻吩甲酸乙酯) 时活性次之, 为取代氨基时 (即噻吩酰胺) 活性消失; R_3 部分对活性影响较弱, 为 2-呋喃甲酰基或 (*trans*)- $\text{C}=\text{OC}=\text{CCO}_2\text{H}$ 时活性最高, 为取代苯基或 $-\text{C}=\text{O}(\text{CH}_2)_2\text{CO}_2\text{H}$ 时活性次之。

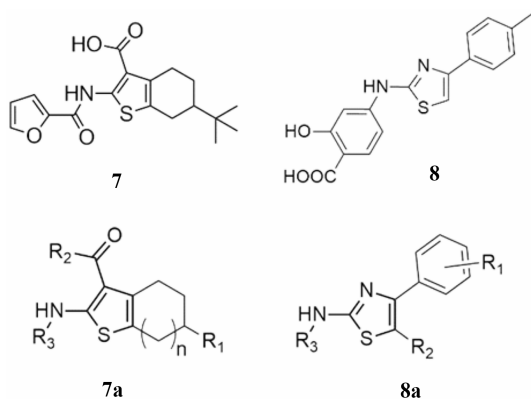


Figure 4 The series of CaCC_{inh} inhibitors

对 $\text{CaCC}_{\text{inh-B}}$ (**8a**) 系列 14 个类似物进行构效关系研究发现, R_1 部分为 4 位取代甲基或乙基活性最好, 3 位取代活性消失; R_2 部分为正丙基、乙酸基或氢时活性最高, 为苯基时活性消失; R_3 分别为 2,3,4 位取代苯基活性均可。

由于 ANO1 蛋白在肿瘤组织中高度表达, 使用 siRNA 对 ANO1 进行沉默会导致相应 ANO1 高表

达肿瘤细胞增殖抑制, 因此使用 ANO1 抑制剂进行肿瘤相关研究也是学界的研究热点之一。2014 年诺华生物医学研究中心的 Hall 等^[36]发表文章, 发现 $\text{CaCC}_{\text{inh-A01}}$ 系列分子在抑制肿瘤增殖方面具有一定活性, 同时此种活性是通过促进 ANO1 蛋白降解而产生的。分别在 ANO1 内源性高表达癌细胞 (Te11 和 Fadu) 和 ANO1 低表达的癌细胞上测试, ANO1 特异性抑制剂 $\text{CaCC}_{\text{inh-A01}}$ (**7**)、 $\text{TMEM16A}_{\text{inh-A01}}$ (**9**)、ANO1 天然抑制剂 tannic acid (**3**) 和 digallic acid (**1**) 4 种化合物的作用并不一致。只有 $\text{CaCC}_{\text{inh-A01}}$ 和 tannic acid 在 ANO1 高表达癌细胞上具有增殖抑制活性, 并且对 ANO1 低表达细胞增殖抑制活性较低; 其余两种抑制剂对 ANO1 高、低表达的细胞均无增殖抑制活性。对 $\text{CaCC}_{\text{inh-A01}}$ 衍生物进行测试发现, 此种增殖抑制效果与化学结构密切相关, 如图 4 所示 $n=1$ 时, R_1 叔丁基和 R_2 羟基对增殖抑制活性为必需基团, 当 R_1 变为氢原子或 R_2 部分成酯后, 增殖抑制活性消失, 但仍具有 CaCC 通道抑制活性。Hall 等又将 $\text{CaCC}_{\text{inh-A01}}$ 羧酸形态和钙离子共孵育结晶, 进行 X-射线晶体衍射发现, 6 个 $\text{CaCC}_{\text{inh-A01}}$ 分子的羧酸部分与 3 个钙离子形成稳定的配位, 而 R_2 部分成酯的 $\text{CaCC}_{\text{inh-A01}}$ 衍生物则无法形成稳定配位, 猜想肿瘤增殖抑制活性可能是由抑制剂与 ANO1 钙结合区的钙离子配位引起的。进而使用 10 种钙配位剂进行增殖抑制测试, 均无活性, 而后使用 EGTA-AM (即 EGTA 的可透膜形式) 进行增殖抑制测试, 发现其具有的增殖抑制活性与 ANO1 的表达量无关。因此提出与钙离子的配位能力可能是肿瘤增殖抑制活性的必要条件, 但不是充分条件。

2.3 $\text{TMEM16A}_{\text{inh-A01}}$ 该系列化合物由 Namkung 和 Verkman 等^[23]于 2011 年通过高通量筛选发现。对

商业化合物库 10 万个分子进行基于黄色荧光蛋白-碘离子黄色荧光淬灭实验发现, TMEM16A_{inh}-A01 (**9**, IC₅₀ 1.8 μmol·L⁻¹)、B01 (**10**, IC₅₀ 4.4 μmol·L⁻¹)、C01 (**11**, IC₅₀ 8.4 μmol·L⁻¹)、D01 (**12**, IC₅₀ 4.4 μmol·L⁻¹) (图 5) 4 个分子在 ANO1 稳转的 FRT 细胞中表现出良好的抑制活性, 同时不影响细胞内钙浓度。随后在短路电流实验中发现, TMEM16A_{inh} 系列分子以及 ANO1 天然抑制剂 digallic acid (**1**) 仅对唾液分泌腺上皮细胞中的 CaCC 通道有抑制作用, 而对支气管和肠上皮细胞中的 CaCC 通道抑制作用微弱; 与此相比, CaCC 经典抑制剂 CaCC_{inh}-A01 (**7**) 和天然抑制剂 tannic acid (**3**) 则对上述唾液腺细胞、肠上皮细胞、支气管上皮细胞均有良好的抑制作用。在对唾液腺上皮细胞和支气管上皮细胞进行 Western blot 检测后发现, 唾液腺细胞 ANO1 蛋白表达量远高于支气管上皮细胞。白细胞介素 4 (interleukin-4, IL-4) 可以显著提高 ANO1 蛋白含量, 在对支气管上皮细胞进行 IL-4 孵育后, Western blot 结果表明其 ANO1 蛋白含量也并未出现显著增加。以上实验表明: 在支气管上皮细胞中, ANO1 介导的 CaCC 电流只占小部分; CaCC_{inh}-A01 和 tannic acid 除抑制 ANO1 蛋白外, 还能够抑制其他 CaCC 的分子基础。

Namkung 等^[23]还进行了 ANO 家族另一亚型 ANO2 通道的相关抑制试验 (此前有报道表明其也是 CaCC 的分子基础之一, 主要分布于中枢神经系统), 结果表明上述 CaCC_{inh}-A01 (**7**)、TMEM16A_{inh}-A01 (**9**)、digallic acid (**1**) 和 tannic acid (**3**) 均同时抑制 ANO1 及 ANO2 通道。

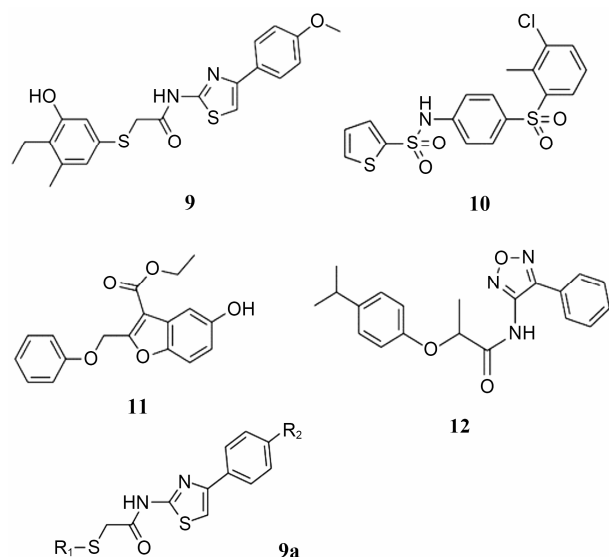


Figure 5 The series of TMEM_{inh} inhibitors

在对 TMEM16A_{inh}-A 系列 18 个衍生物进行的构效关系分析表明, R₁ 部分对活性影响显著, R₁ 为小疏水基团取代的苯基时活性最好, 例如 3,4,5 位甲基或乙基取代的苯基; R₁ 为亲水基团取代的苯基时活性较差, 例如多氨基、多羟基取代苯基; 连接芳基取代的苯基时活性消失。R₂ 部分对活性影响较小, 氢、甲氧基、氟、氯取代时活性相差不大。

2.4 MONNA MONNA 系列分子是 Oh 和 Lee 于 2013 年发表^[24], 该系列使用 Oh 等^[28]在 2008 年建立的非洲蟾蜍卵母细胞电压钳模型进行生物活性测试, 通过合成优化的手段获得 MONNA (**13**, IC₅₀ 0.08 μmol·L⁻¹, 电压钳) (图 6) 分子。该研究中未将 MONNA 和其他 ANO1 特异性抑制剂进行比较, 只与非特异性 CaCC 抑制剂 NFA 等进行比较。MONNA (**13**) 在全细胞膜片钳实验中 IC₅₀ 为 1.27 μmol·L⁻¹, 在数据上与 ANO1 抑制剂 TMEM16A_{inh}-A01 (**9**) 相近。MONNA 系列分子对 bestrophin-1 和 CFTR 等通道均无明显抑制作用。

在对 MONNA 系列 72 个类似物分子进行构效关系研究后表明 (**13a**) (图 6), R₁ 为 5 取代硝基时活性最强, 吸电子基团有利于活性提高。R₂ 为 2-萘环有助于活性提升, 其中 4-甲氧基-2-萘基时活性最强。

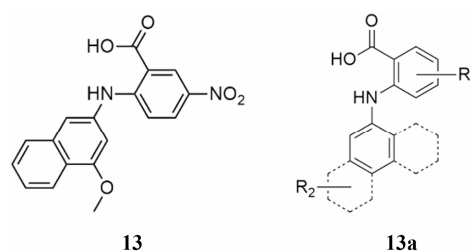


Figure 6 The series of MONNA inhibitors

2.5 Ani9 该系列由 Seo 和 Namkung 在 2016 年发表^[25], 是目前抑制能力最强的选择性 ANO1 蛋白抑制剂。Namkung 等在 ANO1 稳转 FRT 细胞上使用黄色荧光蛋白-碘离子荧光淬灭法对 54000 个分子进行高通量筛选, 使用短路电流实验进行验证, 筛选出 Ani9 (**14**, IC₅₀ 0.107 μmol·L⁻¹) (图 7) 系列分子。该系列化合物对 ANO1 具有很强的选择性, 在短路电流实验中, 该分子对 ANO2、CFTR、VRAC 等均无明显抑制作用, 在 ANO1 高表达的 FRT 细胞、PC-3 细胞、Capan-1 细胞及 IL-4 孵育的 NHNE (normal human nasal epithelial) 细胞中, Ani9 (**14**) 均具有良好抑制作用。

Ani9 系列分子没有进行衍生合成, 对其现有 9 个类似物进行测试表明 (**14a**) (图 7), R₁ 为 2-甲基-4-

氯苯基时活性最强,特别是2位甲基取代对活性提升帮助较大。 R_2 部分进行了甲氧基取代苯基和羟基取代苯基类似物的测活,其中2-甲氧基苯基取代时活性最强。

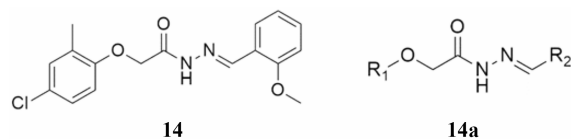


Figure 7 The series of Ani9 inhibitors

2.6 激动剂: Eact 和 Fact 该系列分子由 Namkung 在 2011 年发表^[19],通过黄色荧光蛋白-碘离子荧光淬灭实验筛选和短路电流实验验证,对 Chemdiv 和 Asinex 商业化合物库 10 万个合成分子以及 7 500 个天然分子进行测试,获得了 Eact (**15**, EC_{50} 3 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 和 Fact (**16**, EC_{50} 37 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) (图 8) 两个代表分子。二者在 ANO1 稳转的 FRT 细胞中,激动 CaCC 通道的同时不影响细胞内钙浓度。二者激动的 CaCC 电流可被 ANO1 抑制剂 TMEM16A_{inh}-A01 (**9**) 抑制。

在全细胞膜片钳实验中, Eact (**15**) 可在细胞内、外钙离子浓度极低的情况下,轻度激活 ANO1 通道,但 Fact (**16**) 则不具有此种功能;在 Eact 和 Fact 联合给药试验中,二者呈现明显的协同作用: 1 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Eact 激动能力小于 20%, 1 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Fact 激动能力小于 5%, 而各 1 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的二者联用,激动能力超过 40%; 1 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Eact 和 3 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Fact 联用,激动能力则高达 80%。

Namkung 等^[19]合成了 17 种 Eact 类似物 (**15a**) (图 8), R_1 为芳环或醚链, R_2 部分则替代为不同取代位置的苯环。其中, R_1 部分的取代基对活性影响较小,芳烃或环状烷烃利于活性提升; R_2 为无取代苯基或卤代苯基、甲氧基取代苯基、4-哌啶基活性相近;仅当 R_1 为 2-甲氧基乙基,且 R_2 为 3,6-二甲氧基苯基或 4-哌啶基时无活性,但是当 R_1 为其他芳烃或环烷烃时, R_2 为上述两种取代基时有活性。

3 ANO1 调节剂构效关系比较

以 ANO1 为靶点的特异性钙激活氯通道抑制剂结构差异较大,但可能具有相似的药效团特征。如图 9 (A),以 CaCC_{inh}-A01 模板,比较分析 TMEM16A_{inh}-A01、MONNA、Ani9、dalligic acid、Eact、Fact 等调控分子,可见分子基本骨架由芳环-连接链-芳环体系组成,连接链两侧芳环中心距离 6.2Å 左右,在 TMEM16A_{inh}-A01 和 Ani9 中,硫醚的硫原子或醚链的氧原子到左侧芳环中心的距离在 7Å 左右。在

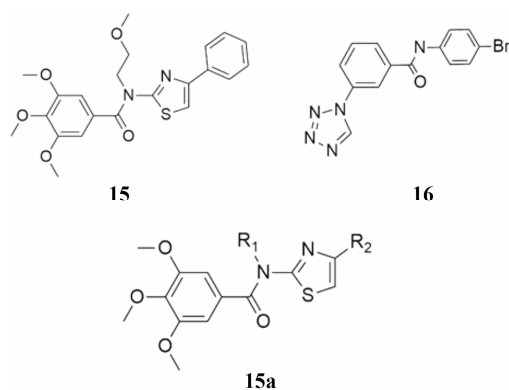


Figure 8 The series of Eact agonists

MONNA 中,右侧萘环与 1-硝基苯环中心距离 7.5Å 左右,与 TMEM16A_{inh}-A01 中硫苯和噻唑中心距离 7.8Å 相近。

在上述分子中,连接链与两侧芳环可能并不处于平面共轭状态。如图 9 (B) 左图,观察 CaCC_{inh}-A01 的类似物——K01,其是纺锤体驱动蛋白 (kinesin spindle protein, KSP) 的非共价抑制剂分子 (kinesin-like 蛋白与 ANO1 蛋白完全不相关,仅其抑制剂分子 K01 和 ANO1 抑制剂分子 CaCC_{inh}-A01 结构相近)。选取 K01 共晶结构 (PDB ID:2PG2) 中的活性构象,将 CaCC_{inh}-A01 与之叠合,如图 9 (B) 右图所示,酰胺键 N 侧的芳环平面与酰胺键平面呈约 45 度夹角。而将 CaCC_{inh}-A01 与 K01 进行叠合,而后将所有调节剂分子与 CaCC_{inh}-A01 进行叠合,如图 9 (C),可发现图 9 (A) 中相同的结构特征部分叠合较好,说明 ANO1 系列调节剂具有一定的相似性。

结合文献^[19, 22–26, 36]报道的调节剂构效关系,可以猜想: ANO1 调节剂可能结合于一狭长口袋之中,长度在 16Å 范围内,口袋内部较为疏水。以 TMEM16A_{inh}-A01 分子为例,4-取代苯基噻唑结合于口袋右侧,而芳香硫醚基团结合于口袋左侧。口袋内部右侧为弱的氢键给体,与 TMEM16A_{inh}-A01 苯环上的甲氧基形成弱氢键;结合口袋中部可能有含正电荷的氨基酸残基与 CaCC_{inh}-A01 的羧基形成静电相互作用或氢键,而口袋左侧则较为疏水,是否存在氢键还不得而知。在 CaCC_{inh}-A01 中存在的叔丁基可能暴露在口袋外侧,以疏水作用将分子推入口袋内部;而 TMEM16A_{inh}-A01 芳香硫醚和 Ani9 中芳香醚一般与主链形成弯折,可能固定于口袋外部较为疏水的区域。以上猜想是基于构效关系的综合分析,对于 TMEM16A_{inh}-A01 和 Ani9 等分子,口袋左侧芳香醚部分的改变对于活性影响不大;而几乎所有调节剂分子,右侧芳环改变或芳环取代基改变可以显著影响活性。

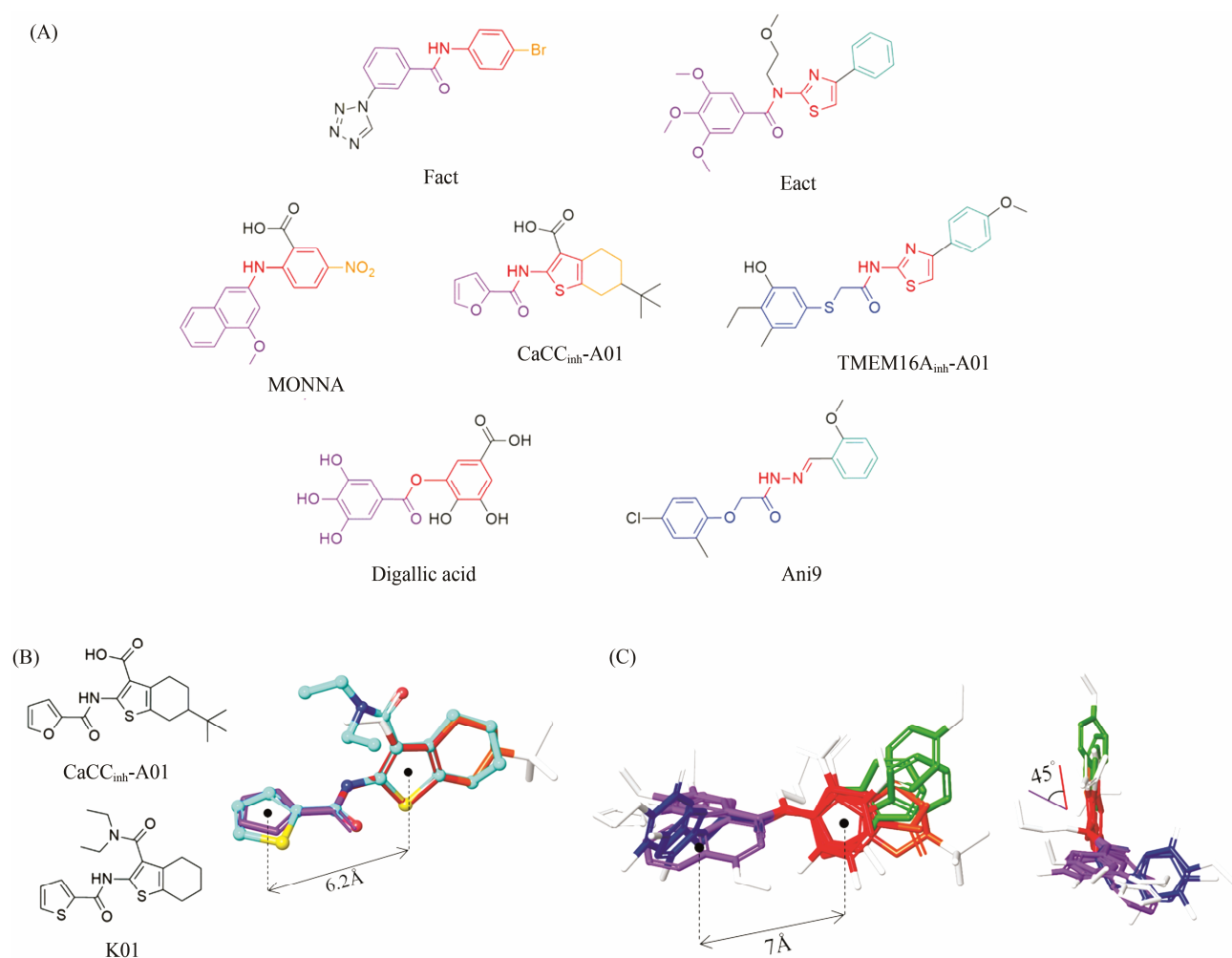


Figure 9 SAR of ANO1 modulators. (A) Comparing with ANO1 modulators, different colours means different structural features; such as CaCC_{inh}-A01, red means aromatic rings (Ar) or conjugated functional group bonding to amide nitrogen, purple means Ar which attaching to amide carbonyl, orange means hydrophobic functional group bonding to thiophene; And in TMEM16A_{inh}-A01, blue means aromatic ether attaching to amide carbonyl, green means Ar bonding to 4 position of thiophene; (B) left: CaCC_{inh}-A01 and K01, right: alignment CaCC_{inh}-A01 to K01 conformation from KSP-K01 complex crystal structure, and the distance between two Ar centers which bonding to amide carbonyl and amide nitrogen is 6.2Å; (C) Alignment many ANO1 inhibitors in (A) method, the angle between Ar plate and amide plate is approximately 45°; the distance of S or O, in TMEM16A_{inh}-A01 and Ani9, to the Ar central which bonding to amide nitrogen is approximately 7Å

4 以 ANO1 为靶点的 CaCC 调节剂潜在应用

ANO1 在包括气管和肠上皮细胞、平滑肌细胞、肠起搏细胞、感觉神经元和许多肿瘤细胞在内的多种细胞中具有重要作用^[16, 37], 并参与到多种病理过程中^[12, 38-40]。抑制 ANO1 蛋白将有助于多种疾病的治疗, 例如肿瘤、痢疾、哮喘、高血压、疼痛等。ANO1 高度表达于多种人类肿瘤细胞中, 包括头颈部鳞状细胞癌、胃肠道恶性间质细胞瘤、乳腺癌和前列腺癌细胞等^[39-41], 抑制 ANO1 蛋白可以显著降低上述肿瘤细胞的生存能力^[12, 39, 42, 43]。在轮状病毒引起的痢疾中, 通常认为轮状非结构蛋白 4 (rotavirus nonstructure protein 4, NSP4) 作为一种肠毒素, 是通过激活 CaCC 而引起痢疾^[44], 使用小分子对 CaCC 进行抑制可以减少轮状病

毒介导的肠液流失。在卵清蛋白 (oval albumin, OVA) 介导的小鼠哮喘模型中, ANO1 高度表达于气管黏蛋白分泌细胞和气管平滑肌细胞中。抑制 ANO1 导致气管上皮细胞黏液分泌抑制, 同时也会导致平滑肌收缩抑制^[45]。最近, ANO1 蛋白在血压调节中的作用逐渐被揭示出来, ANO1 在原发性高血压患者的动脉中高度表达, 使用 ANO1 抑制剂 TMEM16A_{inh}-A01 可以明显降低血压 (动物实验), 并且使用 siRNA 对 ANO1 进行敲低可以预防原发性高血压的出现^[46]。此外, 在使用野百合碱 (monocrotaline, MCT) 介导的肺高压大鼠模型中 ANO1 mRNA 和蛋白水平均出现上调; 在五羟色胺相关肺高压中, 抑制 ANO1 可以明显降低肺动脉收缩^[47]。ANO1 还在痛觉传导中扮演重

要角色, 例如, ANO1 高度表达于痛觉相关的背根神经节 (DRG) 细胞中, 在 DRG 中阻断或敲低 ANO1 蛋白可显著降低小鼠在疼痛模型中的痛觉反应^[37]。此外, 辣椒素引起的痛觉相关模型中, 痛觉行为可以被 ANO1 抑制剂 TMEM16A_{inh}-A01 降低^[48]。

5 总结和展望

ANO1 特异性调节剂的发展自 2008 年开始已经走过 9 个年头, 包括 CaCC_{inh}-A01、TMEM16A_{inh}-A01、MONNA、tannic acid、Eact、Ani9 在内的众多分子已经为 ANO1 基础研究提供了极大帮助。

但是 ANO1 蛋白作为 CaCC 通道的分子基础之一, 与其他分子基础之间的关系并没有得到阐明。特别是在 ANO1 抑制剂研究中, 各型 ANO1 抑制剂对支气管上皮细胞、肠上皮细胞中的 CaCC 通道抑制作用并不一致, 鉴于各种上皮细胞中的 ANO1 表达量不尽相同, 现无法确定抑制作用差异现象是由 ANO1 蛋白表达量引起, 还是由抑制剂在各 CaCC 通道分子基础之间选择性引起。与此同时, CaCC_{inh}-A01 抑制活性可能与 ANO1 的 Ca²⁺ 激活特性有关, 其对其他钙激活离子通道也具有一定作用, 目前难以确定 ANO1 调节剂的各种药理作用是否只与 ANO1 蛋白有关。

此外, ANO1 蛋白与其他蛋白的相互作用机制也未得到阐明, 在 ANO1 参与的多种生理功能中, 可能存在多种调控通路。使用 ANO1 调节剂治疗某种疾病时, 是否会因此产生其他不良反应, 目前仍缺少证据。

虽然 ANO1 研究中存在许多问题亟待解决, 但在疾病的治疗中 ANO1 调节剂存在的巨大应用潜力仍然极具“诱惑”^[18, 48–56]。特别是对于疼痛治疗, 目前还未出现任何一种针对阴离子通道的镇痛药物或麻醉药物, 以 ANO1 为靶点的药物, 有望开启新的镇痛治疗模式。未来, 相信在结构生物学、化学生物学研究的帮助下, 人们对于 ANO1 蛋白的研究会越来越明朗, 也会有更多高选择性的抑制剂出现, 为众多疾病的治疗带来曙光。

References

- [1] 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: 2305–2314.
- [2] Ousingsawat J, Martins JR, Schreiber R, et al. Loss of TMEM16A causes a defect in epithelial Ca²⁺-dependent chloride transport [J]. *J Biol Chem*, 2009, 284: 28698–28703.
- [3] Rock JR, O'Neal WK, Gabriel SE, et al. Transmembrane protein 16A (TMEM16A) is a Ca²⁺-regulated Cl⁻ secretory channel in mouse airways [J]. *J Biol Chem*, 2009, 284: 14875–14880.
- [4] Davis AJ, Forrest AS, Jepps TA, et al. Expression profile and protein translation of TMEM16A in murine smooth muscle [J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2010, 299: C948–C959.
- [5] Gomez-Pinilla PJ, Gibbons SJ, Bardsley MR, et al. Anol1 is a selective marker of interstitial cells of Cajal in the human and mouse gastrointestinal tract [J]. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2009, 296: G1370–G1381.
- [6] Loewen ME, Forsyth GW. Structure and function of CLCA proteins [J]. *Physiol Rev*, 2005, 85: 1061–1092.
- [7] Suzuki M. The Drosophila tweety family: molecular candidates for large-conductance Ca²⁺-activated Cl⁻ channels [J]. *Exp Physiol*, 2006, 91: 141–147.
- [8] Kane D, Pedi VL, Long SB. Structure and insights into the function of a Ca²⁺-activated Cl⁻ channel [J]. *Nature*, 2014, 516: 213–218.
- [9] Hartzell C, Putzier I, Arreola J. Calcium-activated chloride channels [J]. *Annu Rev Physiol*, 2005, 67: 719–758.
- [10] Espinosa I, Lee CH, Kim MK, et al. A novel monoclonal antibody against DOG1 is a sensitive and specific marker for gastrointestinal stromal tumors [J]. *Am J Surg Pathol*, 2008, 32: 210–218.
- [11] 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: 1058–1069.
- [12] Duvvuri U, Shiwarski DJ, Xiao D, et al. TMEM16A induces MAPK and contributes directly to tumorigenesis and cancer progression [J]. *Cancer Res*, 2012, 72: 3270–3281.
- [13] Lee CH, Liang CW, Espinosa I. The utility of discovered on gastrointestinal stromal tumor 1 (DOG1) antibody in surgical pathology—the GIST of it [J]. *Adv Anat Pathol*, 2010, 17: 222–232.
- [14] Caputo A, Caci E, Ferrera L, et al. TMEM16A, a membrane protein associated with calcium-dependent chloride channel activity [J]. *Science*, 2008, 322: 590–594.
- [15] Schroeder BC, Cheng T, Jan YN, et al. Expression cloning of TMEM16A as a calcium-activated chloride channel subunit [J]. *Cell*, 2008, 134: 1019–1029.
- [16] Yang YD, Cho H, Koo JY, et al. TMEM16A confers receptor-activated calcium-dependent chloride conductance [J]. *Nature*, 2008, 455: 1210–1215.
- [17] Ferrera L, Caputo A, Galiotta LJ. TMEM16A protein: a new identity for Ca²⁺-dependent Cl⁻ channels [J]. *Physiology*

- (Bethesda), 2010, 25: 357–363.
- [18] Lee B, Cho H, Jung J, et al. Anoctamin 1 contributes to inflammatory and nerve-injury induced hypersensitivity [J]. *Mol Pain*, 2014, 10: 5.
- [19] Namkung W, Yao Z, Finkbeiner WE, et al. Small-molecule activators of TMEM16A, a calcium-activated chloride channel, stimulate epithelial chloride secretion and intestinal contraction [J]. *FASEB J*, 2011, 25: 4048–4062.
- [20] Jia L, Liu W, Guan L, et al. Inhibition of calcium-activated chloride channel ANO1/TMEM16A suppresses tumor growth and invasion in human lung cancer [J]. *PLoS One*, 2015, 10: e0136584.
- [21] Liu W, Lu M, Liu B, et al. Inhibition of Ca²⁺-activated Cl⁻ channel ANO1/TMEM16A expression suppresses tumor growth and invasiveness in human prostate carcinoma [J]. *Cancer Lett*, 2012, 326: 41–51.
- [22] 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: 758–768.
- [23] 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: 2365–2374.
- [24] Oh SJ, Hwang SJ, Jung J, et al. MONNA, a potent and selective blocker for transmembrane protein with unknown function 16/anoctamin-1 [J]. *Mol Pharmacol*, 2013, 84: 726–735.
- [25] Seo Y, Lee HK, Park J, et al. Ani9, A novel potent small-molecule ANO1 inhibitor with negligible effect on ANO2 [J]. *PLoS One*, 2016, 11: e0155771.
- [26] Namkung W, Thiagarajah JR, Phuan PW, et al. Inhibition of Ca²⁺-activated Cl⁻ channels by gallotannins as a possible molecular basis for health benefits of red wine and green tea [J]. *FASEB J*, 2010, 24: 4178–4186.
- [27] Liu SB, Feng J, Luo JL, et al. Eact, a small molecule activator of TMEM16A, activates TRPV1 and elicits pain- and itch-related behaviours [J]. *Br J Pharmacol*, 2016, 173: 1208–1218.
- [28] Oh SJ, Park JH, Han S, et al. Development of selective blockers for Ca²⁺-activated Cl⁻ channel using *Xenopus laevis* oocytes with an improved drug screening strategy [J]. *Mol Brain*, 2008, 1: 14.
- [29] White MM, Aylwin M. Niflumic and flufenamic acids are potent reversible blockers of Ca²⁺-activated Cl⁻ channels in *Xenopus* oocytes [J]. *Mol Pharmacol*, 1990, 37: 720–724.
- [30] Qu Z, Hartzell HC. Functional geometry of the permeation pathway of Ca²⁺-activated Cl⁻ channels inferred from analysis of voltage-dependent block [J]. *J Biol Chem*, 2001, 276: 18423–18429.
- [31] Piper AS, Greenwood IA, Large WA. Dual effect of blocking agents on Ca²⁺-activated Cl⁻ currents in rabbit pulmonary artery smooth muscle cells [J]. *J Physiol*, 2002, 539: 119–131.
- [32] Xu WX, Kim SJ, So I, et al. Volume-sensitive chloride current activated by hyposmotic swelling in antral gastric myocytes of the guinea-pig [J]. *Pflugers Arch*, 1997, 435: 9–19.
- [33] Wang HS, Dixon JE, McKinnon D. Unexpected and differential effects of Cl⁻ channel blockers on the Kv4.3 and Kv4.2 K⁺ channels. Implications for the study of the I(to2) current [J]. *Circ Res*, 1997, 81: 711–718.
- [34] Doughty JM, Miller AL, Langton PD. Non-specificity of chloride channel blockers in rat cerebral arteries: block of the L-type calcium channel [J]. *J Physiol*, 1998, 507: 433–439.
- [35] Reinsprecht M, Rohn MH, Spadinger RJ, et al. Blockade of capacitive Ca²⁺ influx by Cl⁻ channel blockers inhibits secretion from rat mucosal-type mast cells [J]. *Mol Pharmacol*, 1995, 47: 1014–1020.
- [36] Bill A, Hall ML, Borawski J, et al. Small molecule-facilitated degradation of ANO1 protein [J]. *J Biol Chem*, 2014, 289: 11029–11041.
- [37] Cho H, Yang YD, Lee J, et al. The calcium-activated chloride channel anoctamin 1 acts as a heat sensor in nociceptive neurons [J]. *Nat Neurosci*, 2012, 15: 1015–1021.
- [38] Mazzone A, Eisenman ST, Stregge PR, et al. Inhibition of cell proliferation by a selective inhibitor of the Ca²⁺-activated Cl⁻ channel, Ano1 [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2012, 427: 248–253.
- [39] Shiwerski DJ, Shao C, Bill A, et al. To "grow" or "go": TMEM16A expression as a switch between tumor growth and metastasis in SCCHN [J]. *Clin Cancer Res*, 2014, 20: 4673–4688.
- [40] Bill A, Gutierrez A, Kulkarni S, et al. ANO1/TMEM16A interacts with EGFR and correlates with sensitivity to EGFR-targeting therapy in head and neck cancer [J]. *Oncotarget*, 2015, 6: 9173–9188.
- [41] Matsuba S, Niwa S, Muraki K, et al. Downregulation of Ca²⁺-activated Cl⁻ channel TMEM16A by the inhibition of histone deacetylase in TMEM16A-expressing cancer cells [J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2014, 351: 510–518.
- [42] Britschgi A, Bill A, Brinkhaus H, et al. Calcium-activated chloride channel ANO1 promotes breast cancer progression by activating EGFR and CAMK signaling [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2013, 110: E1026–E1034.
- [43] Seo Y, Park J, Kim M, et al. Inhibition of ANO1/TMEM16A chloride channel by idebenone and its cytotoxicity to cancer

- cell lines [J]. *PLoS One*, 2015, 10: e0133656.
- [44] Ousingsawat J, Mirza M, Tian Y, et al. Rotavirus toxin NSP4 induces diarrhea by activation of TMEM16A and inhibition of Na^+ absorption [J]. *Pflugers Arch*, 2011, 461: 579–589.
- [45] Huang F, Zhang H, Wu M, et al. Calcium-activated chloride channel TMEM16A modulates mucin secretion and airway smooth muscle contraction [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2012, 109: 16354–16359.
- [46] Wang B, Li C, Huai R, et al. Overexpression of ANO1/TMEM16A, an arterial Ca^{2+} -activated Cl^- channel, contributes to spontaneous hypertension [J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2015, 82: 22–32.
- [47] Forrest AS, Joyce TC, Huebner ML, et al. Increased TMEM16A-encoded calcium-activated chloride channel activity is associated with pulmonary hypertension [J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2012, 303: C1229–C1243.
- [48] Takayama Y, Uta D, Furue H, et al. Pain-enhancing mechanism through interaction between TRPV1 and anoctamin 1 in sensory neurons [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2015, 112: 5213–5218.
- [49] Liu B, Linley JE, Du X, et al. The acute nociceptive signals induced by bradykinin in rat sensory neurons are mediated by inhibition of M-type K^+ channels and activation of Ca^{2+} -activated Cl^- channels [J]. *J Clin Invest*, 2010, 120: 1240–1252.
- [50] Iqbal J, Tonta MA, Mitsui R, et al. Potassium and ANO1/TMEM16A chloride channel profiles distinguish atypical and typical smooth muscle cells from interstitial cells in the mouse renal pelvis [J]. *Br J Pharmacol*, 2012, 165: 2389–2408.
- [51] Cho H, Oh U. Anoctamin 1 mediates thermal pain as a heat sensor [J]. *Curr Neuropharmacol*, 2013, 11: 641–651.
- [52] Jin X, Shah S, Liu YN, et al. Activation of the Cl^- channel ANO1 by localized calcium signals in nociceptive sensory neurons requires coupling with the IP3 receptor [J]. *Sci Signaling*, 2013, 6: 290.
- [53] Deba F, Bessac BF. Anoctamin-1 Cl^- channels in nociception: activation by an *N*-aroylaminothiazole and capsaicin and inhibition by T16A[inh]-A01 [J]. *Mol Pain*, 2015, 11: 55.
- [54] Pineda-Farias JB, Barragan-Iglesias P, Loeza-Alcocer E, et al. Role of anoctamin-1 and bestrophin-1 in spinal nerve ligation-induced neuropathic pain in rats [J]. *Mol Pain*, 2015, 11: 1–14.
- [55] Hwang SJ, Basma N, Sanders KM, et al. Effects of new-generation inhibitors of the calcium-activated chloride channel anoctamin 1 on slow waves in the gastrointestinal tract [J]. *Br J Pharmacol*, 2016, 173: 1339–1349.
- [56] Ta CM, Adomaviciene A, Rorsman NJG, et al. Mechanism of allosteric activation of TMEM16A/ANO1 channels by a commonly used chloride channel blocker [J]. *Br J Pharmacol*, 2016, 173: 511–528.