

TRPM7 通道过表达细胞株的建立、鉴定及其功能的初步研究

肖楚瑶, 陈少锐, 余 洋, 章 艳, 刘培庆, 蒋建敏*

(中山大学药学院药理与毒理学实验室, 广州 510006)

摘要 通过瞬时转染 TRPM7-eGFP 质粒至人胚胎肾细胞 HEK293T 细胞建立瞬时受体电位 Melastatin 的 7 型通道 (TRPM7 通道) 过表达体系并利用此体系对通道特性进行研究。经荧光显微镜观察, 转染率可达 30%~40%, RT-PCR 及 Western 印迹结果显示转染后的细胞在相应的基因及蛋白水平上均有明显的表达。膜片钳结果显示转染后全细胞电流可达 2 800 pA, pH 7.4 至 pH 4.0 时通道内向电流显著增加, 200 $\mu\text{mol/L}$ 二苯硼酸-2-氨基乙酯 (2-APB) 显著抑制通道外向电流。结果表明瞬时转染 HEK293T 细胞的 TRPM7 过表达体系成功构建, 细胞外酸性条件及 TRPM7 通道抑制剂 2-APB 对通道电流有不同影响, 提示该通道功能可受到多种因素的影响。

关键词 瞬时转染; TRPM7-eGFP 质粒; TRPM7 通道; 膜片钳; 二苯硼酸 2-氨基乙酯

中图分类号 Q27 文献标识码 A 文章编号 1000-5048(2011)05-0462-05

Construction and identification of TRPM7 channel overexpression cell strain and preliminary functional research of the channel

XIAO Chu-yao, CHEN Shao-rui, YU Yang, ZHANG Yan, LIU Pei-qing, JIANG Jian-min*

Department of Pharmacology and Toxicology, School of Pharmaceutical Sciences, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510006, China

Abstract To explore the function of TRPM7 (transient receptor potential melastatin 7) channel, the overexpression system of TRPM7 channel was constructed by transiently transfection of HEK293T (human embryonic kidney 293T) cell with TRPM7-eGFP plasmid. Through the fluorescence microscope analysis, the transfection efficiency was about 30% - 40%. The corresponding expression of the gene and protein was observed by RT-PCR and western blotting. And the result of patch clamp showed that the whole cell current was about 2 800 pA. Acidic extracellular solution increased the TRPM7 inward currents and 200 $\mu\text{mol/L}$ 2-APB (2-aminoethyl diphenyl borate) inhibited the TRPM7 outward currents. These results demonstrated that the transiently transfected TRPM7-HEK293T cell line was successfully constructed. The acidic pH and the non-specific inhibitor of TRPM7, 2-APB made different changes on TRPM7, which indicates that the function of the channel can be affected by multiple factors.

Key words transient transfection; TRPM7-eGFP plasmid; TRPM7 channel; patch clamp; 2-aminoethyl diphenyl borate

This study was supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 30670837), and China-Canada Joint Health Research Initiative Proposal (No. 30811120434)

TRPM7 通道是第一个被发现同时具有通道功能和激酶功能的离子通道^[1], 因此亦被称为“通道酶”。其广泛表达于机体的多种组织器官中, 参与众多的生理和病理过程, 包括钙超载及缺血/缺氧

神经元损伤、调节细胞内 Mg^{2+} 平衡、介导微量元素进入细胞、参与神经递质的释放、细胞运动等^[2-4]。关于 TRPM7 通道生理功能的研究仍在进行中, 但是它具有一些特性: ① TRPM7 含有 6 个

跨膜节段,在C-端有一个磷脂酶C(PLC)互动激酶节段。② TRPM7 通道含有一内向整流电流,该电流对 Ca^{2+} 和 Mg^{2+} 具有通透性。③ 细胞内 Mg^{2+} 降低及细胞外二价阳离子的降低都会升高 TRPM7 通道的电流幅度。④ 刺激 G_q -相关受体激活 PLC,PLC 水解磷脂酰肌醇-4,5-二磷酸(PIP_2),随后使 TRPM7 失活^[1]。目前对 TRPM7 通道的研究大多来自体外转染体系,由于缺乏选择性的抑制剂或激动剂,在机体组织上深入研究 TRPM7 通道的难度极大。因此本实验通过瞬时转染人胚胎肾细胞 HEK293T 细胞构建 TRPM7 通道的过表达载体,为进一步探讨 TRPM7 通道的功能及其作用机制,以及进一步筛选出高选择性抑制剂或激动剂奠定基础。

1 材料

1.1 细胞与质粒

HEK293T 细胞,由中山大学生命科学院惠赠,来自美国 ATCC(CRL-11268TM)。用含 10% 新生牛血清的 DMEM 培养基培养,培养条件为 37 °C,5% CO_2 。TRPM7-eGFP 质粒 DNA(载体为 pTracerTM-CMV2)由美国哈佛大学医学院 Dr. David E. Clapham 惠赠,带有 eGFP 标签。

1.2 试剂

脂质体转染试剂 Lipofectamin 2000(美国 Invitrogen 公司);DMEM 培养基、Opti-MEM(美国 Gibco 公司);新生牛血清(美国 PAA 公司);质粒大提试剂盒(美国 Omega 公司);TRPM7 单克隆抗体(英国 Abcam 公司);羊抗小鼠 IgG(美国 Proteintech 公司);Trizol、AMV、AMV 缓冲液、核酸酶抑制剂、dNTP、随机引物、DL2000[宝生物工程(大连)有限公司]、Taq Premix(美国 GenScript 公司)、二苯硼酸-2-氨基乙酯(2-APB,美国 Sigma 公司);CsCl(台湾 MDBio 公司);CsOH(美国 Fluka 公司);Cs-SO₃CH₃(美国 Aldrich 公司),EDTA、4-羟乙基哌嗪乙磺酸(HEPES)(上海 Mbchem 公司);其余试剂为市售分析纯。引物由生工生物(上海)有限公司合成,序列见表 1。

Table 1 PCR primer sequence of mouse *trpm7* gene

Gene	Sense(5'→3')	Antisense(5'→3')
<i>trpm7</i>	CCT TCG TTC CTG TAC CTC CA	AGG CCT AGC TGA GAC CAT GA
GADPH	TTG TTG CCA TCA ACG ACC CC	ATG AGC CCT TCC ACA ATG CC

1.3 主要电生理溶液

台氏液(细胞外液):葡萄糖,10 mmol/L; NaCl, 145 mmol/L; KCl, 5 mmol/L; HEPES, 10 mmol/L; CaCl₂, 2 mmol/L, 调节 pH 到 7.4。细胞内液:Cs-SO₃CH₃, 115 mmol/L; NaCl, 8 mmol/L; HEPES, 10 mmol/L; EGTA-Cs, 10 mmol/L; 用 1 mol/L CsOH 调节 pH 至 7.2。

1.4 仪器

IX 71 型倒置荧光显微镜(日本 Olympus 公司);P-97 型电极拉制仪(美国 Sutter 公司);5520XR 型渗透压仪(美国 Wescor 公司);膜片器放大器(Axopatch 200B)及附件均为美国 Axon 公司产品。

2 方法

2.1 质粒的转化与抽提

将质粒 DNA 转化至 DH5 α 感受态大肠杆菌中,接种到含 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 氨苄青霉素(Amp)的 LB 平板上,将平板倒置于 37 °C 恒温培养箱过夜。挑取单个菌落于含 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Amp 的 LB 液体培养基,180 r/min,37 °C 过夜培养。使用试剂盒进行 DNA 的抽提。

2.2 细胞的转染

转染前 24 h 细胞接种于 35 mm² 平皿,细胞融合至约 50% 进行转染。使用脂质体转染试剂 Lipofectamine 2000 进行转染,每皿加质粒 2 μg 与脂质体 4 μL 。6 h 后将含脂质体的培养基换成含 10% 新生牛血清、无抗生素的 DMEM 培养基。24 h 后倒置荧光显微镜观察。

2.3 逆转录 PCR(RT-PCR)

转染后 24 h,用 Trizol 试剂提取细胞总 RNA,进行 RT-PCR。PCR 反应参数为:94 °C 预变性 5 min,94 °C 变性 30 s,56 °C 退火 45 s,72 °C 延伸 1 min,扩增 28 个循环,最后 72 °C 延伸 10 min。

2.4 蛋白印迹

转染后 24 h,用三去污裂解液提取转染细胞的总蛋白,测定浓度并分装,取总蛋白 40 μg 与 5 \times SDS 上样缓冲液混合,进行 8% SDS-PAGE 电泳,随后电转至 PVDF 膜上,用含 5% 脱脂奶粉的封闭液室温封闭 1.5 h。用 TRPM7 单克隆一抗(1:500)4 °C 孵育过夜。用辣根过氧化物酶(HRP)标记的羊抗鼠 IgG(1:1 500)室温孵育 1 h。随后进行显影。以 α -

tubulin 作为内参。

2.5 膜片钳记录电流

细胞转染后 24 h, 将细胞用质量分数为 0.25% 胰酶消化, 接种于事先用多聚赖氨酸处理过的盖玻片表面。细胞完全贴壁后, 在荧光显微镜下, 挑选转染成功带绿色荧光的细胞, 采用全细胞膜片钳方式记录。玻璃微电极经 3 步拉制后热抛光, 冲灌电极内液后, 入水电阻为 3 ~ 5 M Ω , 微电极尖端贴附于细胞膜表面后, 给予适当负压吸引, 使电极与细胞表面形成高阻封接, 继续加大负压, 吸破细胞膜, 形成全细胞记录。信号经 Ag/AgCl 电极引导, 应用软件 Clampex 10.1 (美国 Axon 公司) 进行数据采集, 采样频率为 2 kHz, 滤波为 1 kHz, 增益为 1。记录的信号将膜片钳放大器进行模拟数字信号转换机滤波放大后保存。TRPM7 通道电流记录方案如下: 阶跃电位 -120 mV ~ +100 mV, 持续时间 250 ms, 采样间隔 1 s。细胞破膜后等候 10 min 使电流增至稳态^[6], 采用软件 Clampfit 10.1 测量电流数据。用 2 mol/L 盐酸将台氏液 pH 调至 4.0, 并用台氏液配制 200 μ mol/L 2-APB 溶液, 用于灌流。

3 结果

3.1 倒置荧光显微镜观察

转染 HEK 293T 细胞 24 h 后, 荧光显微镜观察结果显示在转染的 HEK 293T 细胞中有荧光蛋白的表达, 可以认为该目的基因已成功转入细胞, 见图 1。

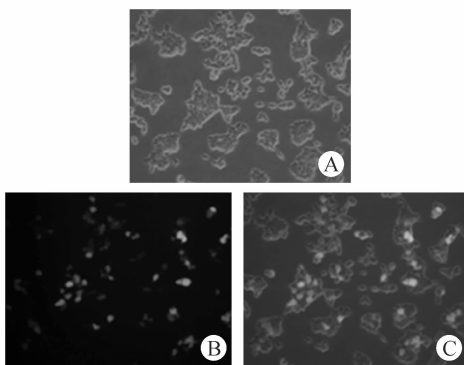


Figure 1 Expression of eGFP in transfected HEK 293T cells (100 \times) A: View under the phase contrast microscope of the transfected cells; B: View under the fluorescence microscope of the transfected cells; C: Merge of A and B

3.2 过表达 TRPM7 的 RT-PCR 扩增鉴定

所用质粒从小鼠源性基因克隆所得, 因此使用小鼠源性的引物进行扩增。在对照组中, 并无扩增出明显的条带, 而在转染组中, 可见在 100 kb 处扩增出一较明显的条带 (图 2), 说明在基因水平上该质粒转染成功。

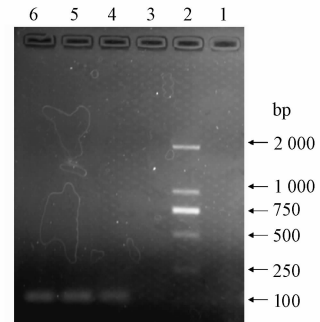


Figure 2 Electrophoresis of *trpm7* gene product derived from the transfected HEK293T cells

Lane 1: Transfection of vacant vector; Lane 2: DL2000 Marker; Lane 3: Blank control; Lane 4-6: 24, 48, 72 h after transfection respectively

3.3 过表达 TRPM7 通道的蛋白印迹鉴定

蛋白印迹检测结果表明, 在 220 kD 处均有一清晰条带为野生型细胞自身所具有的 TRPM7 通道蛋白基础表达, 在该条带上方约 250 kD 处有一清晰条带为 TRPM7-eGFP 融合蛋白, 而空白对照组不具备此条带, 如图 3 所示。蛋白印迹实验表明质粒转染成功。

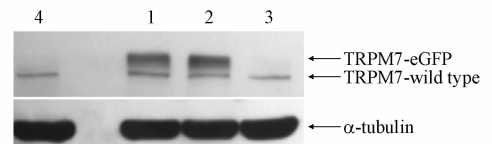


Figure 3 Protein expression of TRPM7 and α -tubulin in transfected cells analyzed by Western blot

Lane 1-2: 24, 48 h after transfection respectively; Lane 3: Blank control; Lane 4: Transfection of vector only

3.4 膜片钳记录 TRPM7 通道原始电流

未经转染和转染后的 HEK293T 细胞上记录得的原始电流如图 4 所示, 未转染的细胞只能记录到低于 500 pA 的微小电流, 经转染后的细胞, 所记得的外向电流随时间增加而增大。细胞破膜后, 至 10 min 时电流幅度达到一个稳定的状态, 约为 2 800 pA, 而内向电流则未显示出明显变化, 如图 4。

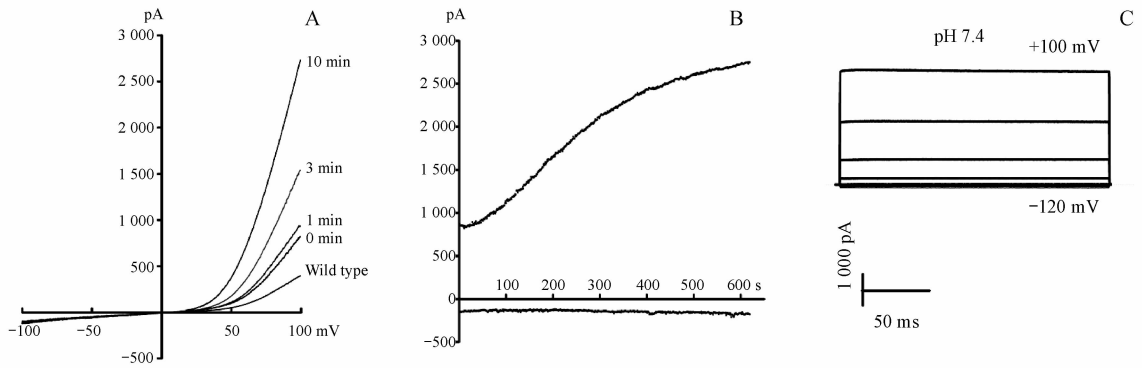


Figure 4 Changes of the TRPM7 currents of the transfected cell

A: Currents of wild type HEK293T cells and the change of the currents of the transfected cells; B: Changes of the TRPM7 outward currents in the first 10 min, the current became stable at about 10 min; C: TRPM7 currents elicited by voltage steps ranging from -120 mV to $+100$ mV with an increment of 20 mV

3.5 膜片钳记录特定实验条件下 TRPM7 电流的变化

2-APB 是 TRPM7 通道的非特异性抑制剂,在一定浓度范围内对 TRPM7 电流有抑制作用^[5]。由于目前缺乏 TRPM7 的特异性抑制剂,因此亦有较多研究使用 2-APB 作为 TRPM7 通道的抑制剂。本研究使用 $200 \mu\text{mol/L}$ 2-APB 灌流细胞,外向电流有大幅度的降低,而内向电流则无明显变化,如图 5-A。本研究亦使用钙离子通道阻断剂维拉帕米 ($100 \mu\text{mol/L}$) 对细胞进行灌流,但外向及内向电流皆无表现出明显变化。表明 L-型钙离子通道阻断剂不参与调控该电流。

由于内向电流的改变在生理范围内更具有意义,因此本研究在病理刺激条件下,观察 TRPM7 内向电流的变化。有报道细胞外低 pH 能促进 TRPM7 的开放^[6],本研究分别使用 pH 7.4、pH 6.0、pH 5.0、pH 4.0 的细胞外液对细胞进行灌流。灌流时,内向电流随着酸度增加而增大,灌流液 pH 降至 4.0 时可增大至 -2000 pA,而外向电流则无明显变化,如图 5-B。有报道指出在心肌受损时细胞外 pH 可低至 5.4 ^[7],而人和大鼠心脏成纤维细胞也存在 TRPM7 通道^[8],提示心脏成纤维细胞 TRPM7 在低 pH 病理条件下电流可能产生变化,并可能在缺血损伤等等病理过程中产生作用。

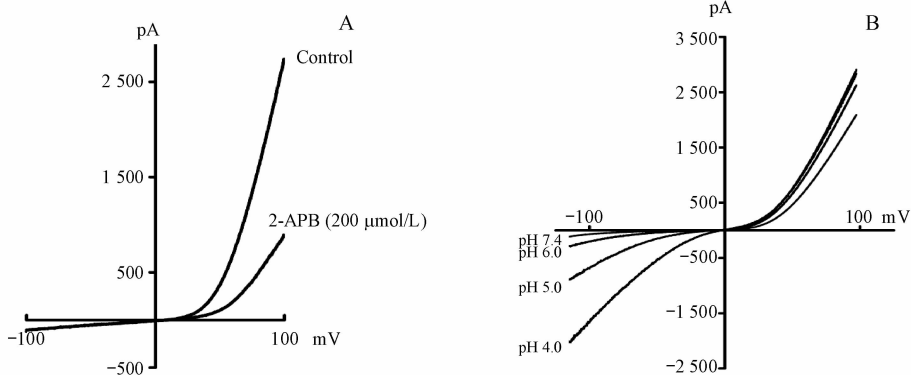


Figure 5 Differential modulation of TRPM7 currents by 2-aminoethyl diphenyl borate (2-APB) (A) and acidic pH (B)

4 讨论

TRPM7 通道广泛表达在众多器官组织中,作为一种非选择性阳离子通道,其对包括 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 、 K^+ 、 Na^+ 在内的众多二价和单价阳离子有通透性,其通道开放介导细胞内钙,镁的调控及具备

的激酶的活性参与多种生理病理过程,如神经细胞缺血性损伤^[9]、淋巴细胞增殖^[10]、平滑肌细胞增殖、肿瘤细胞的增殖和迁移等^[11],是近年来研究的热点。以往的研究进展已经使人们对 TRPM7 通道的分子结构、生物物理学特性及其调控机制的细节等方面都有了一定的认识。

然而在一些原代细胞上, TRPM7 通道的电流较小, 记录和研究 TRPM7 通道有一定的技术困难。为克服这一困难, 本研究采用过表达的手段, 在细胞上过表达该通道蛋白, 取得较好的转染率和蛋白表达, 记录到典型的 TRPM7 通道的电流。并利用这一表达体系, 系统地开展 TRPM7 通道阻断剂的筛选, 取得初步的成绩。

本研究利用 HEK293T 细胞, 成功构建瞬时转染 TRPM7 的细胞体系, 拟利用该体系, 对其调控和功能做进一步研究, 将有助于更深入地了解 TRPM7 通道的功能特型, 与此同时, 作为潜在的药物作用靶点, 为寻找特异性的 TRPM7 通道的激动剂或阻断剂提供了有效的研究工具。

参考文献

- [1] Runnels LW, Yue L, Clapham DE. TRP-PLIK, a bifunctional protein with kinase and ion channel activities[J]. *Science*, 2001, **291**(5 506): 1 043 - 1 047.
- [2] Aarts M, Iihara K, Wei WL, et al. A key role for TRPM7 channels in anoxic neuronal death[J]. *Cell*, 2003, **115**(7): 863 - 877.
- [3] Schlingmann KP, Waldegger S, Konrad M, et al. TRPM6 and TRPM7-Gatekeepers of human magnesium metabolism[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2007, **1 772**(8): 813 - 821.
- [4] Clark K, Middelbeek J, Lasonder E, et al. TRPM7 regulates myosin IIA filament stability and protein localization by heavy chain phosphorylation[J]. *J Mol Biol*, 2008, **378**(4): 790 - 803.
- [5] Castillo B, Porzgen P, Penner R, et al. Development and optimization of a high-throughput bioassay for TRPM7 ion channel inhibitors[J]. *J Biomol Screen*, 2010, **15**(5): 498 - 507.
- [6] Jiang J, Li M, Yue L. Potentiation of TRPM7 inward currents by protons[J]. *J Gen Physiol*, 2005, **126**(2): 137 - 150.
- [7] Jacobus WE, Taylor GT, Hollis DP, et al. Phosphorus nuclear magnetic resonance of perfused working rat hearts[J]. *Nature*, 1977, **265**(5 596): 756 - 758.
- [8] Du J, Xie J, Zhang Z, et al. TRPM7-mediated Ca^{2+} signals confer fibrogenesis in human atrial fibrillation[J]. *Circ Res*, 2010, **106**(5): 992 - 1 003.
- [9] Tian SL, Jiang H, Zeng Y, et al. NGF-induced reduction of an outward-rectifying TRPM7-like current in rat CA1 hippocampal neurons[J]. *Neurosci Lett*, 2007, **419**(2): 93 - 98.
- [10] Sahni J, Tamura R, Sweet IR, et al. TRPM7 regulates quiescent/proliferative metabolic transitions in lymphocytes[J]. *Cell Cycle*, 2010, **9**(17): 3 565 - 3 574.
- [11] 田舜莲(Tian SL), 江 慧(Jiang H), 施 静(Shi J). TRPM7: 一种具有离子通道和激酶活性的多功能膜蛋白[J]. *生理科学进展(Prog Physiol Sci)*, 2009, **40**(3): 253 - 257.

· 征订启事 ·

欢迎订阅《中国药学年鉴》2010 卷

《中国药学年鉴》是一部连续记载我国药理学领域发展概况和重要成就的大型编年史册, 1982 年由卫生部创刊, 中国药科大学牵头组织全国著名药理学专家编纂, 中国工程院彭司勋院士担任主编。

《中国药学年鉴》是涵盖我国药理学领域各个方面的药理学综合性年刊, 内容包括专论、药理学研究、新药研发、药理学教育、药品生产与流通、医院药理学、药品监管、人物、书刊、学会与学术活动、大事记等。创刊 30 年来, 本书以其密集的信息、翔实的年报统计资料, 深受读者的欢迎和喜爱, 成为医药单位不可或缺的馆藏书目, 和医药工作者常备常考的工具书。

《中国药学年鉴》2010 卷于 2010 年 12 月出版, 面向海内外公开发售, 定价: 280 元/本。

订阅地址: 南京市童家巷 24 号 中国药科大学《中国药学年鉴》编辑部

咨询电话: 025 - 83271478 传真: 025 - 83271458 邮编: 210009

查询网址: <http://qk.cpu.edu.cn/nianjian/web/index.asp> E-mail: zgyxj@cpu.edu.cn

● 中国年鉴资源全文数据库核心年鉴

● 荣获首届中国年鉴奖提名奖

● 第四届全国年鉴编校质量检查一等奖

● 第四届全国年鉴编纂出版质量评比一等奖