

· 论 著 ·

表达在 HEK293 细胞上的 BK<sub>Ca</sub> 通道基本特性与动力学调控研究\*谭晓秋<sup>1</sup>, 程俊<sup>1</sup>, 程秀丽<sup>2</sup>, 李畅<sup>1</sup>, 毛亮<sup>1</sup>, 曾晓荣<sup>1</sup>, 曹济民<sup>2</sup>, 杨艳<sup>1△</sup>

(1. 泸州医学院医学电生理学部共建教育部重点实验室, 四川泸州 646000;

2. 中国医学科学院/北京协和医学院基础医学研究所, 北京 100005)

**摘要:**目的 构建稳定表达人血管平滑肌大电导钙激活钾通道(BK<sub>Ca</sub>)的 293 细胞系,并研究其基本电生理学特征和动力学模型。方法 通过脂质体(lipofectamine 2000)转染法转染 BK<sub>Ca</sub>表达质粒 pcDNA3.1-BK<sub>α</sub>和(或) pIRES-BK<sub>β</sub>1,筛选稳定表达的单克隆细胞系。使用膜片钳多种记录方式研究其基本电生理学特性,同时建立 BK<sub>Ca</sub>动力学研究模型。结果 构建稳定转染 BK<sub>Ca</sub>通道 α和(或)β1 亚单位的 HEK293 细胞系,通过膜片钳能够记录到具有与天然细胞 BK<sub>Ca</sub>电生理学特性相似的电流,包括大电导特性[内面向外式构型下单通道电导为(216.38±3.55)pS]、电压依赖性、Ca<sup>2+</sup>依赖性、钾离子选择性和 200 nmol/L IbTX(BK<sub>Ca</sub>特异性阻断剂)阻断;联合表达 β1 亚单位能够明显增加通道的开放时程。采用 inside-out 宏观电流记录方式可以记录到明显的尾电流。可以用于分析通道激活、去激活等动力学模型及药物动力学作用机制。结论 成功构建稳定转染 BK<sub>Ca</sub>通道 α和(或)β1 亚单位的 HEK293 细胞系。膜片钳实验证明具有典型的 BK<sub>Ca</sub>电生理学特性,同时建立的细胞系可以很好的用于 BK<sub>Ca</sub>通道功能调控研究和动力学参数分析。

**关键词:**大电导钙激活钾通道;肌,平滑,血管;动力学

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2013.15.002

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2013)15-1685-04

**Basic characteristics and kinetic regulation of BK<sub>Ca</sub> expressed in HEK 293 cell lines\***Tan Xiaoci<sup>1</sup>, Cheng Jun<sup>1</sup>, Cheng Xiuli<sup>2</sup>, Li Chang<sup>1</sup>, Mao Liang<sup>1</sup>, Zeng Xiaorong<sup>1</sup>, Cao Jimin<sup>2</sup>, Yang Yan<sup>1△</sup>

(1. Key Laboratory of Medical Electrophysiology of Ministry of Education, Luzhou Medical College,

Luzhou, Sichuan 646000, China; 2. Institute of Basic Medical Sciences, Chinese Academy of

Medical Sciences &amp; Peking Union Medical College, Beijing 100005, China)

**Abstract:** Objective To construct the HEK 293 cell lines with stably expressed large-conductance calcium-activated potassium channels (BK<sub>Ca</sub>) and to investigate the basic characteristics and the kinetic model by using patch clamp technique. **Methods** pcDNA3.1-BK<sub>α</sub> and/or pIRES-BK<sub>β</sub>1 were transfected in HEK 293 cells with lipofectamine 2000 and the cell lines with stable expression were constructed. The basic electrophysiological characteristics were investigated by patch clamp technique including single channels recording and whole cell recording and the kinetic model of BK<sub>Ca</sub> was constructed in inside-out and outside-out configuration. **Results** The basic property of cell lines with stably expressed BK<sub>Ca</sub> α with/without β1 subunits was consistent with that in native cells, including large conductance (216.38±3.55 pS in insideout patches), voltage dependence, calcium dependence, K<sup>+</sup> ion selectivity and being stocked by IbTX, a special blocker of BK<sub>Ca</sub>. BK<sub>Ca</sub> macro-currents and STOCs were significantly suppressed by 200 nmol/L IbTX, a specific blocker of BK<sub>Ca</sub>. β1 subunits increased the open duration. The tail currents were recorded by macro-insideout configuration. These currents could be used for analyzing the kinetics including the activation and deactivation and the mechanism of drugs. **Conclusion** The HEK 293 cell lines with stably expressed BK<sub>Ca</sub> α and/or β1 are constructed successfully, which has typical electrophysiological properties of BK<sub>Ca</sub>. The cell lines can be used for studying the kinetic modulation of BK<sub>Ca</sub>.

**Key words:** large-conductance calcium-activated potassium channels; muscle, smooth, vascular; kinetics

大电导钙激活钾通道(large-conductance calcium-activated potassium channels, BK<sub>Ca</sub>)是血管平滑肌重要的钾离子通道之一,携带了 70%~80%的外向电流,在调节血管张力、血流量和血压活动中起重要作用。了解作为调节血管张力的靶点及内源性活性物质配体的 BK<sub>Ca</sub>通道的特性,对于深入研究通道调控机制及临床治疗药物筛选等有重要意义<sup>[1-4]</sup>。BK<sub>Ca</sub>通道受细胞内 Ca<sup>2+</sup>浓度和膜电位二者的调节<sup>[5]</sup>。当肌紧张性增高时, Ca<sup>2+</sup>内流激活肌浆网释放细胞内钙,再加上膜的去极化共同激活 BK<sub>Ca</sub>通道,使 K<sup>+</sup>外流,膜电位向超极化方向变化而使血管舒张,从而对抗张力增高引起的去极化及收缩作用,使细胞恢复到下一次兴奋前的备用状态。BK<sub>Ca</sub>通道就是通过环形负反馈机制来控制平滑肌细胞肌源性张力和静息膜电位去极

化的程度。而 BK<sub>Ca</sub>通道的高电导性及在平滑肌细胞上的高密度表达决定了它对血管张力的调节尤显重要<sup>[6-9]</sup>。目前对于 BK<sub>Ca</sub>通道的研究更是深入基因和分析水平,而离子通道药物作用的动力学调控更是研究的热点之一<sup>[4,6]</sup>。但是天然细胞由于通道不单一、表达密度不确定等特点,在研究动力学调控方面,异源表达越来越受人们青睐。本研究以 HEK293 细胞系为载体,构建稳定表达人 BK<sub>Ca</sub>通道细胞系,研究其基本电生理学特征和建立动力学调控模型,为进一步广泛深入的研究药物动力学作用机制奠定基础。

**1 材料与方**

**1.1 材料** 含有人血管平滑肌 BK<sub>Ca</sub>通道 α亚单位的表达质粒 pcDNA3.1-BK<sub>α</sub>由丹麦 NeuroSearch 公司 Philip K. Ahring

教授馈赠,  $\beta 1$  亚单位的表达质粒 pIRES- $\beta 1$  由本实验室构建。改良 Eagle 高糖培养基(DMEM)购自 Invitrogen 公司。

## 1.2 方法

**1.2.1 HEK293 细胞培养及转染和筛选** HEK293 细胞使用 DMEM 高糖培养基(含 10% FBS)在 5%  $\text{CO}_2$  的培养箱中进行培养和传代。细胞密度 80% 左右使用脂质体(lipofectamine 2000, Invitrogen)转染法, 将 4  $\mu\text{g}$  的质粒转染到 3.5 mm 的培养皿中。使用 0.8 mg/mL G418 进行筛选, 得到稳定表达 pcDNA3.1-BK $\alpha$  和(或)  $\beta 1$  的 HEK293 细胞系用于进一步实验。

**1.2.2 全细胞膜片钳实验** 选取电极阻抗 3~5  $\text{m}\Omega$  进行。溶液为: NaCl 137.00 mmol/L, KCl 5.90 mmol/L,  $\text{MgCl}_2$  1.20 mmol/L,  $\text{CaCl}_2$  1.8 mmol/L, 葡萄糖 14.00 mmol/L, 4-羟乙基哌嗪乙磺酸(HEPES) 10.00 mmol/L (pH 7.4); 电极液: KCl 128.00 mmol/L, NaCl 12.00 mmol/L,  $\text{MgCl}_2$  4.00 mmol/L, HEPES 10.00 mmol/L, 乙二醇-双-(2-氨基乙醚)四乙酸(EGTA) 0.05 mmol/L (pH 7.2)。钳制电位为 -80 mV, 刺激方案包括阶跃刺激方案: -80 mV ~ +90 mV, 时程 400 ms。

**1.2.3 单通道膜片钳实验** 本实验采用的单通道膜片钳记录方式包括细胞贴附式、内面向外式和外面向外出式, 溶液和电极液使用对称性高钾溶液, 电极阻抗 12~15  $\text{m}\Omega$ 。电极液和溶液根据细胞膜的方式选择, 保持细胞内液: 天门冬氨酸钾(K-Asp) 100.00 mmol/L, KCl 40.00 mmol/L, HEPES 10.00/L mmol (pH 7.2), EGTA 1.00 mmol/L; 细胞外液: K-Asp 40.00 mmol/L, KCl 100.00 mmol/L, HEPES-K 10.00 mmol/L (pH 7.4), EGTA 2.00 mmol/L。

**1.2.4 内面向外式宏观电流(macro-insideout)检测** 选择离子通道表达密度较高的细胞, 使用电极阻抗为 3~5  $\text{m}\Omega$ , 形成内面向外式膜片, 使用宏观电流记录方案, 观察局部膜片电流, 研究其动力学调控。电极液: K-Asp 40.00 mmol/L, KCl 100.00 mmol/L, HEPES 10.00 mmol/L (pH 7.2), EGTA 2.00 mmol/L; 溶液: K-Asp 100.00 mmol/L, KCl 40.00 mmol/L, HEPES 10.00 mmol/L (pH 7.4), EGTA 1.00 mmol/L。

**1.3 统计学处理** 采用 SPSS14.0 统计学软件进行统计学分析, 数据采用 Clampfit10.1 进行处理。计量资料采用  $\bar{x} \pm s$  表示, 以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 HEK293 细胞上 BK $\alpha$  的基本电生理学特性** 转染在 HEK293 细胞系的 BK $\alpha$  电流基本电生理学特性, 全细胞构型下, 转染 BK $\alpha$  通道  $\alpha$  亚单位的 HEK293 细胞能够记录到一较大外向电流, I-V 曲线呈现外向整流特性, 能够被 BK $\alpha$  特异性阻断剂 IbTX (200 nmol/L) 所阻断(图 1), 表明所记录到的外向电流主要为 BK $\alpha$  所携带。在单通道构型下, 细胞贴附式和内面向外式均能记录到电流幅度随着电压增加而增大的单通道电流, 开放概率呈现明显的电压依赖性。在 cell-attached 和 inside-out 构型下, BK $\alpha$  通道具有明显的电压依赖性(图 2); cell-attached 和 inside-out BK $\alpha$  单通道斜率电导分别为  $(212.64 \pm 4.86)$  pS ( $n=12$ ) 和  $(216.38 \pm 3.55)$  pS ( $n=10$ ), 二者之间差异无统计学意义(图 3); 在 inside-out 构型下(+40 mV 膜电位)BK $\alpha$  通道钙离子依赖性的典型电流记录图, 见图 4; BK $\alpha$  通道 IbTX 敏感性, 在 outside-out 构型下, BK $\alpha$  通道能够被 200 nmol/L IbTX 阻断(图 5)。在外面向外出式膜片构型下, 200 nmol/L IbTX 几乎完全阻断该单通道电流, 进一步证明该电流为 BK $\alpha$  电流。同时, 通过图 3 的 I-V 曲线可以看, I-V 曲线通过 0 点, 反转电位为 0 mV, 这与对称性高钾时的平衡电位

一致, 表明为钾离子选择性电流。

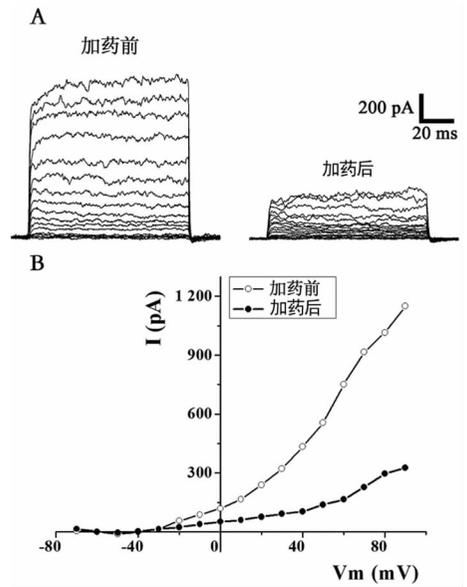


图 1 表达在 HEK 293 细胞系上的 BK 通道全细胞电流

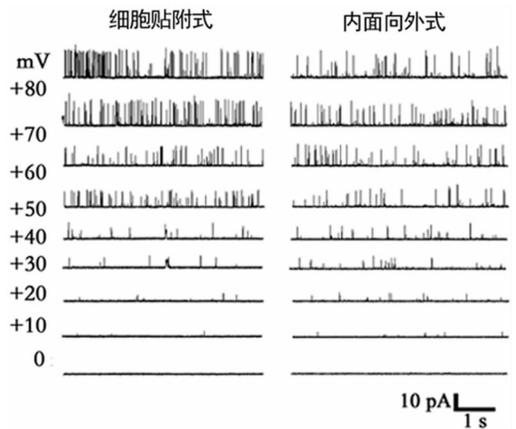


图 2 BK $\alpha$  通道电压依赖性电流图

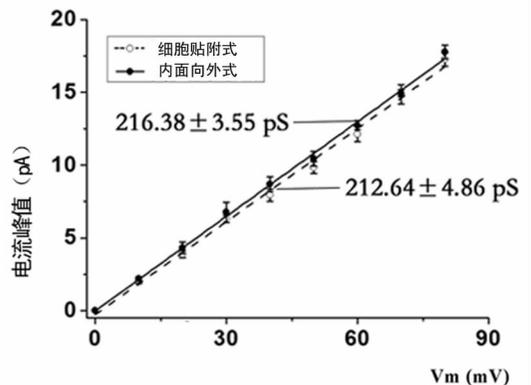


图 3 BK $\alpha$  单通道斜率电导比较电流图

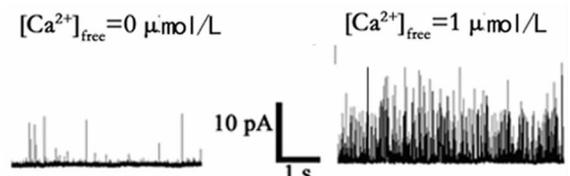


图 4 BK $\alpha$  通道钙离子依赖性的典型电流图

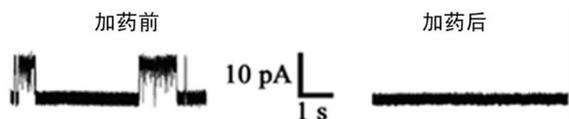
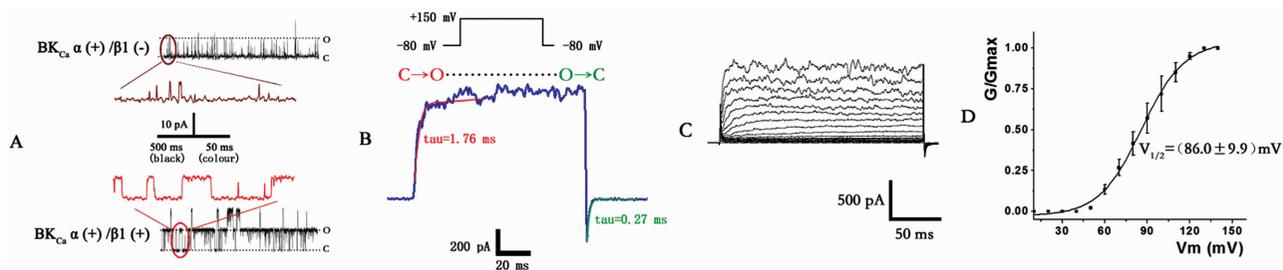


图 5 BK<sub>Ca</sub>通道被 bTX 阻断电流图

**2.2 HEK293 细胞上 BK<sub>Ca</sub> 动力学调控模型研究** 本研究采用两种方式研究 BK<sub>Ca</sub> 动力学调控模型(图 6),一种为内面向外式单通道膜片钳,一种为内面向外式宏观电流(图 6A)。在内面向外式单通道下,共转染 BK<sub>Ca</sub> 通道  $\alpha$  和(或) $\beta 1$  亚单位发现, $\beta 1$  的表达一方面增加了通道的开放该概率,另一方面可以明显增加通道的开放时程(即平均开放时间,见图 6A 彩色)。通过增加通道表达密度,使用内面向外式宏观电流记录方式研究通道电压依赖性、Ca<sup>2+</sup> 敏感性和通道动力学。在内外向外式



A: BK<sub>Ca</sub> 通道  $\beta 1$  亚单位增加通道的开放时程; B: Macro-insideout 构型下去极化刺激方案电动力学特征; C: Macro-insideout 构型下去极化阶跃刺激方案记录到的原始电流图; D: G/Gmax-Vm 曲线图。

图 6 表达在 HEK293 细胞系上的 BK<sub>Ca</sub> 通道动力学特性

**3 讨 论**

**3.1 BK<sub>Ca</sub> 通道在 HEK293 细胞中的表达** 作为血管平滑肌细胞膜上表达最为丰富的 BK<sub>Ca</sub> 通道,一直以来是从事血管活动调控研究的热点和重点。BK<sub>Ca</sub> 通道是很多临床降血压药物中的作用靶点之一,包括一些常见的活血化瘀中药也可以通过激活该通道而发挥调控血压的作用<sup>[10-13]</sup>。随着研究的深入,仅仅利用急性酶分离的细胞从事 BK<sub>Ca</sub> 通道调控研究是远远不够的,尤其是血管平滑肌细胞培养之后常常发生表型的改变, BK<sub>Ca</sub> 通道的表达和功能也发生变化。因此,将通道克隆到工具细胞进行研究是常见的研究方法之一。尤其是一些针对 BK<sub>Ca</sub> 通道功能结构域和位点突变以及动力学研究。本实验通过构建和筛选稳定的单克隆细胞株并通过电生理学 and 分子生物学的方法进行鉴定。表达在 HEK293 细胞上 BK<sub>Ca</sub> 通道电生理学特性与文献和本研究报道的急性酶分离天然细胞是一致的,主要包括大电导特性[本实验内面向外式构型下的电导值为(216.38±3.55)pS]、电压依赖性、Ca<sup>2+</sup> 敏感性和 IbTX 敏感性。通过多种技术和手段证明本实验构建的细胞株能够很好的用于 BK<sub>Ca</sub> 通道功能调控研究。

**3.2 BK<sub>Ca</sub> 通道动力学调控** 目前,对于 BK<sub>Ca</sub> 通道的功能调控研究已比较的深入,但是从文献报道看不同药物表现出不同的作用特点,主要表现在动力学的差异<sup>[12]</sup>。所谓的通道动力学主要是指通道开放和关闭状态相互转变过程中的机制。这是一个非常复杂的过程。膜片钳技术是研究离子通道动力学调控的最有效的技术,一方面可以通过单通道记录技术研究某一个离子通道的开放和关闭的动力学特点(图 6A),另一方面也可通过全细胞记录研究整个细胞的离子通道宏观动力学,

宏观电流记录中可以分析通道从关闭向开放(C→O)和开放向关闭(O→C)之间转变的动力学特征(图 6B)。从 -80 mV 去极化到 +150 mV 通道完全开放,通过拟合得到时间常数为 Tau=1.76 ms,而当通道由 +150 mV 超极化到 -80 mV 时,通道关闭。在此过程中产生尾电流,可以反映通道从开放向关闭转换的过程,通过拟合得到本例的时间常数 Tau=0.27 ms。通过在阶跃(step)刺激方案得到的内面向外式宏观电流(图 6C),随着去极化电压的增加,电流幅度增加。计算得到不同电压下的电导值(G),以 G/Gmax-Vm 作图,曲线经 Boltzmann 方程拟合,得到通道的半数最大激活电压(V<sub>1/2</sub>),本实验在细胞内游离钙浓度([Ca<sup>2+</sup>]<sub>free</sub>)为 0.01 μmol/L 的是 V<sub>1/2</sub> 为 (86.0±9.9)mV,见图 6D。

二者互为补充。BK<sub>Ca</sub> 通道由  $\alpha$  和  $\beta 1$  亚单位组成, $\beta 1$  亚单位是通道发挥正常功能的组成部分,研究表明  $\beta 1$  亚单位的功能异常与高血压的发生存在密切关系<sup>[14-15]</sup>。本课题前期研究提示,在高血压患者存在  $\beta 1$  亚单位水平的下调<sup>[16]</sup>。本研究通过共表达  $\alpha$  和  $\beta 1$  亚单位可以看出, $\beta 1$  亚单位通过增加通道的开放时程而使通道的开放增加。另外,由于很多物质对 BK<sub>Ca</sub> 通道的作用位点是在细胞内(如 Ca<sup>2+</sup>),因此单通道记录上多采用内面向外式膜片钳。由于传统全细胞膜片钳技术胞内换液非常困难而且稳定性较差,因而全细胞膜片钳在研究 BK<sub>Ca</sub> 通道胞内作用物质动力学机制上表现出一定的不足之处。本实验通过增加 BK<sub>Ca</sub> 通道在 HEK293 细胞上的表达密度,同时实验过程中增大记录电极的口径(本实验为 3~5 m $\Omega$ ,而不是常用的单通道阻抗 12~15 m $\Omega$ ),这样在一个膜片上就有几十或者上百个离子通道表达,从而记录到与全细胞类似的电流,称之为 macro-insideout current(图 6C)。在此基础上,可以很方便地进行细胞内物质作用研究,比如改变不同的钙离子浓度。该记录方式还有一个有单通道记录相同的优点就是记录更加稳定,对防震的要求比传统全细胞低。因此,该记录方式可以很好的研究通道的开关动力学、电压依赖性和钙离子敏感性。但是,该记录方式适用于一些直接作用于通道内侧的物质进行研究,而对于直接细胞外作用或者与细胞膜上的受体结合而间接作用于通道的物质不适宜选用此种方法。

综上所述,本实验构建的稳定表达 BK<sub>Ca</sub> 通道的 HEK293 细胞系及在此基础上建立的动力学模型可以很好的用于部分 BK<sub>Ca</sub> 通道功能研究。

## 参考文献:

- [1] Ledoux J, Werner ME, Brayden JE, et al. Calcium-activated Potassium channels and the regulation of vascular tone [J]. *Physiology (Bethesda)*, 2006, 21(1): 69-78.
- [2] Ko EA, Han J, Jung ID, et al. Physiological roles of  $K^+$  channels in vascular smooth muscle cells [J]. *J Smooth Muscle Res*, 2008, 44(2): 65-81.
- [3] Li P, Zeng X, Yang Y, et al. Role of Calcium mobilization in the regulation of spontaneous transient outward currents in porcine coronary artery myocytes [J]. *Sci China C Life Sci*, 2007, 50(5): 660-668.
- [4] Eichhorn B, Dobrev D. Vascular large conductance calcium-activated Potassium channels; functional role and therapeutic potential [J]. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 2007, 376(3): 145-155.
- [5] Latorre R, Brauchi S. Large conductance  $Ca^{2+}$ -activated  $K^+$  (BK) Channel; activation by  $Ca^{2+}$  and voltage [J]. *Biol Res*, 2006, 39(3): 385-401.
- [6] Wu SN. Large-conductance  $Ca^{2+}$ -activated  $K^+$  channels: physiological role and pharmacology [J]. *Curr Med Chem*, 2003, 10(8): 649-661.
- [7] Jaggar JH, Porter VA, Lederer WJ, et al. Calcium Sparks in smooth muscle [J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2000, 278(2): C235-256.
- [8] Wray S, Burdyga T, Noble K. Calcium signalling in smooth muscle [J]. *Cell Calcium*, 2005, 38(3/4): 397-407.
- [9] Karaki H, Ozaki H, Hori M, et al. Calcium movements, distribution, and functions in smooth muscle [J]. *Pharmacol Rev*, 1997, 49(2): 157-230.
- [10] Tan X, Yang Y, Cheng J, et al. Unique action of Sodium tanshinone II-A sulfonate (DS-201) on the  $Ca^{2+}$  dependent BK (Ca) activation in mouse cerebral arterial smooth muscle cells [J]. *Eur J Pharmacol*, 2011, 656(1/2/3): 27-32.
- [11] Yang Y, Cai F, Li PY, et al. Activation of high conductance  $Ca^{2+}$ -activated  $K^+$  channels by Sodium tanshinone II-A sulfonate (DS-201) in porcine coronary artery smooth muscle cells [J]. *Eur J Pharmacol*, 2008, 598(1/2/3): 9-15.
- [12] Wu SN, Chen CC, Li HF, et al. Stimulation of the BK (Ca) Channel in cultured smooth muscle cells of human trachea by magnolol [J]. *Thorax*, 2002, 57(1): 67-74.
- [13] Liu XR, Tan XQ, Yang Y, et al. Propofol increases the  $Ca^{2+}$  sensitivity of  $BK_{Ca}$  in the cerebral arterial smooth muscle cells of mice [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2012, 33(1): 19-26.
- [14] Plüger S, Faulhaber J, Fürstenau M, et al. Mice with disrupted BK Channel beta1 subunit gene feature abnormal  $Ca^{2+}$  spark/STOC coupling and elevated blood pressure [J]. *Circ Res*, 2000, 87(11): E53-60.
- [15] Brenner R, Pérez GJ, Bonev AD, et al. Vasoregulation by the beta1 subunit of the calcium-activated Potassium Channel [J]. *Nature*, 2000, 407(6806): 870-876.
- [16] Yang Y, Li PY, Cheng J, et al. Function of  $BK_{Ca}$  channels is reduced in human vascular smooth muscle cells from Han Chinese patients with hypertension [J]. *Hypertension*, 2013, 61(2): 519-525.

(收稿日期: 2012-11-26 修回日期: 2013-02-10)

(上接第 1684 页)

- [5] 杨洋. 巨噬细胞在子宫内膜异位症中的作用研究进展 [J]. *重庆医学*, 2011, 40(15): 1532-1534.
- [6] 中华医学会肝脏病学分会脂肪肝和酒精性肝病学组. 非酒精性脂肪性肝病诊疗指南 [J]. *中华肝病杂志*, 2006, 14(3): 161-163.
- [7] Hirata Y, Tabata M, Kurobe H, et al. Coronary atherosclerosis is associated with macrophage polarization in epicardial adipose tissue [J]. *J Am Coll Cardiol*, 2011, 58(3): 248-255.
- [8] Kleiner DE, Brunt EM, Van Natta M, et al. Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease [J]. *Hepatology*, 2005, 41(6): 1313-1321.
- [9] 李娟, 叶菲. 非酒精性脂肪性肝病发病机制的研究进展 [J]. *国际药学研究杂志*, 2011, 38(5): 341-344.
- [10] 王万东, 陈东风. 内质网应激线粒体功能紊乱与非酒精性脂肪性肝病 [J]. *重庆医学*, 2009, 38(4): 423-424.
- [11] Neyrinck AM, Cani PD, Dewulf EM, et al. Critical role of Kupffer cells in the management of diet-induced diabetes and obesity [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2009, 385(3): 351-356.
- [12] Rivera CA, Adegboyega PA, van Rooijen N, et al. Toll-like receptor-4 signaling and Kupffer cells play pivotal roles in the pathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis [J]. *J Hepatol*, 2007, 47(4): 571-579.
- [13] Oh DY, Morinaga H, Talukdar S, et al. Increased macrophage migration into adipose tissue in obese mice [J]. *Diabetes*, 2012, 61(2): 346-354.
- [14] Maina V, Sutti S, Locatelli I, et al. Bias in macrophage activation pattern influences non-alcoholic steatohepatitis (NASH) in mice [J]. *Clin Sci*, 2012, 122(11): 545-553.

(收稿日期: 2012-10-08 修回日期: 2013-02-22)