

基于PiggyBac转座子优化稳定表达细胞系的新型瞬时受体电位M2通道抑制剂筛选

应凯悦, 华 宁, 骆燕萍, 刘星宇, 刘 敏, 杨 巍

浙江大学基础医学院生物物理学系, 浙江 杭州 310058

[摘 要] **目的:** 使用PiggyBac(PB)转座系统建立稳定表达瞬时受体电位M2 (TRPM2)通道的人胚胎肾细胞HEK293T,并进行TRPM2通道抑制剂筛选,为治疗脑缺血等疾病寻找潜在的药物。**方法:** 根据PB转座原理,构建pPB-hTRPM2真核表达载体。将重组质粒和辅助质粒共同转染至HEK293T细胞中,利用系统携带的荧光与膜片钳鉴定TRPM2基因表达,通过Z'因子评估细胞模型是否适用于钙成像法的高通量筛选。利用钙成像法和膜片钳对11个先导化合物分子进行初步活性评价,测定化合物分子对TRPM2通道的抑制活性。利用氧糖剥夺/再灌注(OGD/R)损伤模型和细胞计数试剂盒8(CCK-8)方法验证筛选得到的化合物分子对损伤细胞的保护作用。利用流式细胞术检测细胞活性氧水平。利用小鼠短暂性大脑中动脉栓塞(tMCAO)模型评价化合物的神经保护作用。**结果:** 成功构建pPB-hTRPM2真核表达载体,构建出可高效表达TRPM2基因的HEK293T细胞系,并同时表达增强型绿色荧光蛋白(EGFP)。在筛选获得的嘌呤霉素抗性细胞中,所有细胞荧光明亮可见,诱导后细胞表现出经典的TRPM2通道电流特征,TRPM2通道电流值与瞬时转染对照组差异无统计学意义($P>0.05$)。该筛选系统进行钙成像实验的Z'因子为0.5416,表明其适用于高通量筛选。通过钙成像法结合膜片钳筛选出化合物6,其具有显著的TRPM2通道抑制作用,且1.0 $\mu\text{mol/L}$ 的化合物6能够显著提高OGD/R后SH-SY5Y细胞的存活率($P<0.05$),降低活性氧水平($P<0.05$),0.3、1.0 mg/kg的化合物6能降低tMCAO小鼠脑梗死体积百分比(均 $P<0.05$)。**结论:** 利用PiggyBac基因编辑技术成功构建了TRPM2基因稳定表达细胞系,利用钙成像法和膜片钳在候选化合物中成功筛选出一个高亲和力的新的TRPM2通道抑制剂。该抑制剂可以通过降低细胞活性氧水平缓解OGD/R后细胞损伤,并对小鼠脑缺血再灌注损伤具有保护作用。



[关键词] PiggyBac转座系统;瞬时受体电位M2型;高通量筛选;膜片钳;氧糖剥夺/再灌注损伤;短暂性大脑中动脉栓塞;小鼠

收稿日期(Received):2024-06-09 接受日期(Accepted):2024-08-12 网络预发表日期(Online):2024-09-26

基金项目(Funding):国家自然科学基金(82030108);宁夏回族自治区重点研发项目(2019BFH02003)

第一作者(First author):应凯悦,硕士研究生,主要从事脑卒中中药理学研究及新药开发;E-mail:22160383@zju.edu.cn;
<https://orcid.org/0009-0004-6028-2369>

通信作者(Corresponding author):杨 巍,教授,博士生导师,主要从事神经生物学、生物物理学、分子药理学研究;
E-mail:yangwei@zju.edu.cn;<https://orcid.org/0000-0003-3065-1843>

[中图分类号] Q189 [文献标志码] A

Construction of HEK293T cell line stably expressing TRPM2 channel based on PiggyBac transposition system and its application in drug screening for cerebral ischemia and other diseases

YING Kaiyue, HUA Ning, LUO Yanping, LIU Xingyu, LIU Min, YANG Wei
(Department of Biophysics, School of Basic Medical Sciences, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China)

Corresponding author: YANG Wei, E-mail: yangwei@zju.edu.cn, <https://orcid.org/0000-0003-3065-1843>

[**Abstract**] **Objective:** To establish a cell line stably expressing the transient receptor potential melastatin 2 (TRPM2) channel for screening TRPM2 inhibitors based on PiggyBac transposition system. **Methods:** A plasmid PiggyBac-human TRPM2 (pPB-hTRPM2) eukaryotic expression vector was constructed using PiggyBac transposition system. The plasmid and a helper plasmid were co-transfected into HEK293T cells to express TRPM2, which was identified by fluorescence and patch-clamp assays. The high throughput screening performance was assessed with the Z' factor. Calcium imaging and patch clamp techniques were employed to assess the initial activity of eleven compound molecules, confirming the inhibitory effects of the primary molecules on TRPM2. The protective effect of the screened compounds on damaged cells was validated using the oxygen-glucose deprivation/reperfusion (OGD/R) injury model and CCK-8 kit. The level of cellular reactive oxygen species (ROS) was detected by flow cytometry. The neuroprotective effects of the compounds were evaluated using a transient middle cerebral artery occlusion (tMCAO) mouse model. **Results:** The HEK293T cells transfected with pPB-hTRPM2-EGFP showed high TRPM2 expression. Puromycin-resistant cells, selected through screening, exhibited robust fluorescence. Whole-cell patch results revealed that induced cells displayed classical TRPM2 current characteristics comparable to the control group, showing no significant differences ($P>0.05$). With a Z' factor of 0.5416 in calcium imaging, the model demonstrated suitability for high-throughput screening of TRPM2 inhibitors. Calcium imaging and electrophysiological experiments indicated that compound 6 significantly inhibited the TRPM2 channel. Further experiments showed that 1.0 $\mu\text{mol/L}$ of compound 6 enhanced cell viability ($P<0.05$) and reduced the level of ROS ($P<0.05$) of SH-SY5Y under OGD/R injury. 0.3 and 1.0 mg/kg of compound 6 reduced the cerebral infarction volume in tMCAO mice (both $P<0.05$). **Conclusions:** A stable TRPM2 gene expressing cell line has been successfully established using PiggyBac gene editing in this study. TRPM2 channel inhibitors were screened through calcium imaging and patch clamp techniques, and an inhibitor compound 6 was identified. This compound can alleviate cell damage after OGD/R by reducing cellular ROS levels and has a protective effect against cerebral ischemia-reperfusion injury in mice.

[**Key words**] PiggyBac transposition system; Transient receptor potential melastatin 2;

High-throughput screening; Patch clamp; Oxygen-glucose deprivation/reperfusion injury;
Transient middle cerebral artery occlusion; Mice

[J Zhejiang Univ (Med Sci), 2024, 53(5): 604-614.]

[缩略语] 瞬时受体电位(transient receptor potential, TRP);瞬时受体电位(transient receptor potential, TRP);聚合酶链反应(polymerase chain reaction, PCR);细胞计数试剂盒(cell counting kit, CCK);质粒PiggyBac(plasmid PiggyBac, pPB);人TRPM2(human TRPM2, hTRPM2);反向末端重复序列(inverted terminal repeat, ITR);四环素转录沉默子(tetracycline-controlled transcriptional silencer, tTS);反式四环素转录激活因子(reverse tetracycline-controlled transcriptional activator, rtTA);四环素反应元件(tetracycline-responsive element, TRE);增强型绿色荧光蛋白(enhanced green fluorescent protein, EGFP);腺苷二磷酸核糖(adenosine diphosphate ribose, ADPR);*N*-(对戊基桂皮酰基)邻氨基苯甲酸[*N*-(p-aminocinnamoyl) anthranilic acid, ACA];氧糖剥夺再灌注(oxygen-glucose deprivation/reperfusion, OGD/R);短暂性大脑中动脉栓塞(transient middle cerebral artery occlusion, tMCAO);2,3,5-氯化三苯基四氮唑(2,3,5-triphenyltetrazolium chloride, TTC)

离子通道是一类介导离子跨膜流动的膜蛋白,在细胞功能的执行以及细胞间信号传递等生理过程中扮演重要角色。离子通道与多种疾病相关,并被作为重要的药物靶点受到越来越多的关注。TRP通道作为一类多模态激活的非选择性阳离子通道,在细胞中作为化学毒性和物理刺激的传感器,负责感知温度、疼痛、压力、视觉和味觉等,并且可被许多刺激激活^[1]。TRP通道在各种组织和细胞中广泛分布,并具有多种作用,参与不同器官多种疾病的发病进程^[2-3]。TRPM2通道属于TRP家族的TRPM亚型,参与氧化应激、胰岛素分泌以及体温调节等多种生理功能^[4-5]。已有研究证明,TRPM2通道抑制剂可以减小糖氧剥夺模型中不同脑区的梗死体积^[6-7],减少神经毒素MPTP诱导的细胞死亡^[8-9],以及提高血管紧张素2诱导的高血压过程中脂肪组织的胰岛素敏感性^[10],表明TRPM2通道抑制剂在治疗缺血性脑卒中、帕金森病等领域的潜力。但目前已开发的TRPM2通道抑制剂存在活性低、特异性差、代谢快速等缺点^[11-13],亟需开发高活性、高特异性的TRPM2通道抑制剂,为治疗TRPM2相关疾病寻找潜在药物。

由于化合物分子库庞大,高特异性调节剂的发现受限于筛选策略的不足。目前,离子通道调节剂的筛选方法主要有电生理技术和钙成像法等,前者被公认为是离子通道功能检测的“金标

准”^[14]。但电生理技术操作烦琐、成本较高,而且只能在单个细胞上逐一测试,导致效率低,从而限制了药物的快速筛选。钙成像法利用荧光染料与钙离子结合增强荧光强度,能直观、实时地检测细胞内钙离子浓度的变化和通道开放情况,可以同时检测多个化合物,大大提高了离子通道调节剂的筛选效率^[15]。钙成像法的高通量筛选通常需要使用高表达率的稳定表达细胞系。目前已有的TRPM2稳转细胞系由于表达效率低且不稳定,不能满足钙成像法的高通量筛选需求^[16]。基于此,本研究拟构建稳定高表达TRPM2通道的HEK293T细胞系,为TRPM2通道特异性调节剂的高效筛选提供细胞模型和工具。

为确保子代细胞能稳定表达外源基因,需要将外源基因整合到细胞的基因组中。传统的构建方法有质粒转染法和慢病毒法。质粒转染法将外源基因随机整合到细胞基因组中,利用质粒携带的耐药基因筛选出稳定表达外源基因的细胞系。这种方法把基因整合到宿主细胞高度转录活性区域的概率较低,且大多数蛋白质表达不足^[17]。慢病毒法利用病毒逆转录酶和整合酶将病毒携带的基因信息稳定插入宿主基因组。由于慢病毒感染能力强,慢病毒法适用于绝大部分细胞,目前在实验室中使用最广泛^[18]。近年来,转座子技术开始应用于稳转细胞系的构建,其在质粒转染法的基础上利用“剪切-粘贴”机制将特

定的外源基因高效、快速地整合至宿主基因组中的转录活性区域,相比质粒转染法,大大提高了稳转细胞构建的成功率,并缩短了实验周期(图1)。在易转染细胞中,转座子转染法表现出了与慢病毒法相媲美的整合效率^[19],并具有多种优势:①采用常规细胞实验设备即可操作,无需使用病毒载体,安全性更高;②步骤少、操作简单、实验周期短;③载体容量大,可以轻松插入10 kb以内的基因;④未利用逆转录机制进行整合,减少了逆转录酶诱导的突变,可用于更为复杂的基因转入^[20]。基于上述优点,转座子转染法获得越来越广泛的认可和使用。PiggyBac转座系统是目前应用较广泛的转座系统之一,已在酵母、植物和多种哺乳动物生物体中显示其活性,具有快速、高容量、低成本、高效率 and 稳定基因表达的特点^[21]。

本研究旨在利用 PiggyBac 转座系统构建 TRPM2 通道稳转细胞系,结合钙成像法和电生理技术对候选化合物进行测试,以筛选高效的 TRPM2 通道抑制剂。

1 材料与方法

1.1 实验动物、细胞、试剂及仪器

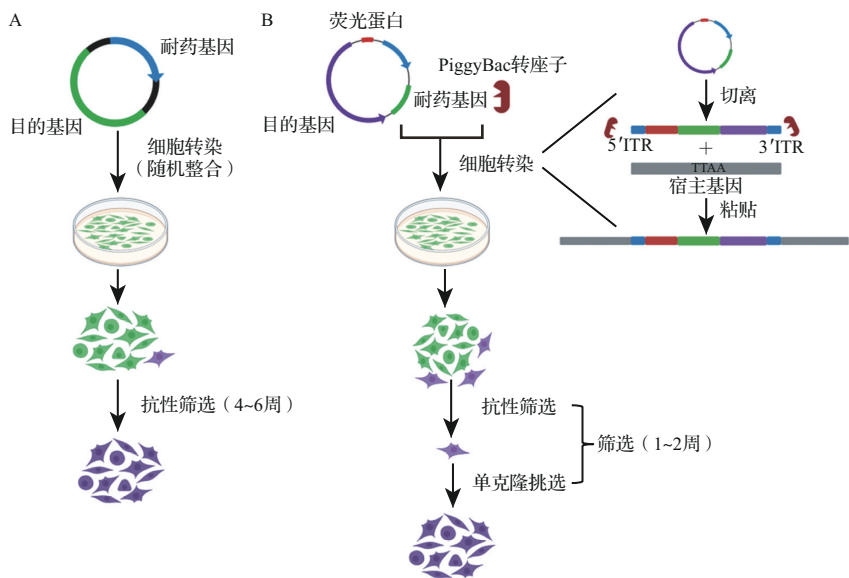
ICR 雄性小鼠(8~12 周龄)购自杭州杭斯生物科技有限公司。小鼠饲养于 12 h 光照/12 h 无光照、24~26 °C 环境,可自由进食和饮水。HEK293T

细胞购自美国菌种保藏中心;人神经母细胞瘤细胞系 SH-SY5Y 由浙江大学医学院段树民课题组馈赠;pCIneo-hTRPM2 稳转细胞由河南新乡医学院江林华课题组馈赠;大肠杆菌 DH5 α 购自北京擎科生物科技有限公司。化合物 1~11 由北京大学药学院张亮仁课题组馈赠;PCR 试剂盒(KOD ONE™ PCR Master Mix-Blue)为东洋纺(上海)生物科技有限公司产品;同源重组试剂盒为南京诺唯赞生物科技股份有限公司产品;琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒为天根生化科技(北京)有限公司产品;DMEM 培养基、无葡萄糖 DMEM 培养基、0.25% 胰蛋白酶-乙二胺四乙酸为美国 Gibco 公司产品;胎牛血清为德国 PAN-Seratech 公司产品;Lipofectamine 3000 转染试剂为美国 Invitrogen 公司产品;Hanks 平衡盐溶液为美国 Thermo Fisher Scientific 公司产品;Rhod-4/AM 为美国 AAT Bioquest 公司产品;CCK-8 试剂盒、活性氧检测试剂盒为上海碧云天生物技术有限公司产品。

荧光倒置显微镜为日本 Olympus 公司产品;PCR 仪为美国 Bio-Rad 公司产品;细胞培养箱为美国 Thermo Fisher Scientific 公司产品;M5 全波段多功能酶标仪为美国 Molecular Devices 公司产品;700B 型膜片钳放大器及 Digidata 1440A 型数模转换器为美国 Axon 仪器公司产品;模块化孵育器为美国 Billups-Rothenberg 公司产品;流式细胞仪(ACEA NovoCyte)为美国 Agilent 公司产品。

1.2 构建 pPB-hTRPM2 载体

1.2.1 pPB-hTRPM2 质粒设计 研究设计了一个以 PiggyBac 为载体的 pPB-hTRPM2 质粒。与哺乳动物细胞系中瞬时表达的常用载体 pcDNA3.1 (图 2A)和传统稳转细胞构建使用的 pCIneo 系统(图 2B)比较,PiggyBac 载体中的转座区域(5'ITR 和 3'ITR 之间)会在转座酶的辅助下整合到宿主基因组中,实现稳定高水平的表达(图 2C)。pPB-



A:质粒转染法;B:PiggyBac转座子转染法. ITR:反向末端重复序列.

图1 PiggyBac转座子转染法与质粒转染法构建稳转细胞流程比较

Figure 1 Comparison of PiggyBac transposon and traditional plasmid to construct stable cell line

hTRPM2质粒包含两个阅读框,一个阅读框编码tTS蛋白和rtTA蛋白,其中tTS蛋白在无强力霉素情况下与TRE启动子结合,抑制基因转录,而rtTA蛋白在有强力霉素情况下结合至TRE启动子,激活转录,实现通过强力霉素调控基因的表达;另一个阅读框编码hTRPM2、EGFP荧光蛋白、嘌呤霉素抗性基因。

1.2.2 pPB-hTRPM2质粒构建 以PiggyBac载体为模板制备线性化骨架,利用同源重组的方法将四环素开启系统(Tet-on)元件以及hTRPM2、嘌呤霉素抗性基因、EGFP元件分别整合到PiggyBac空载体中。载体和片段连接后转化至大肠杆菌感受态细胞中,利用固体LB培养基挑选阳性克隆,并对阳性克隆进行测序验证。将连接成功的pPB-hTRPM2克隆菌液进行质粒提取。

1.3 构建稳转细胞系

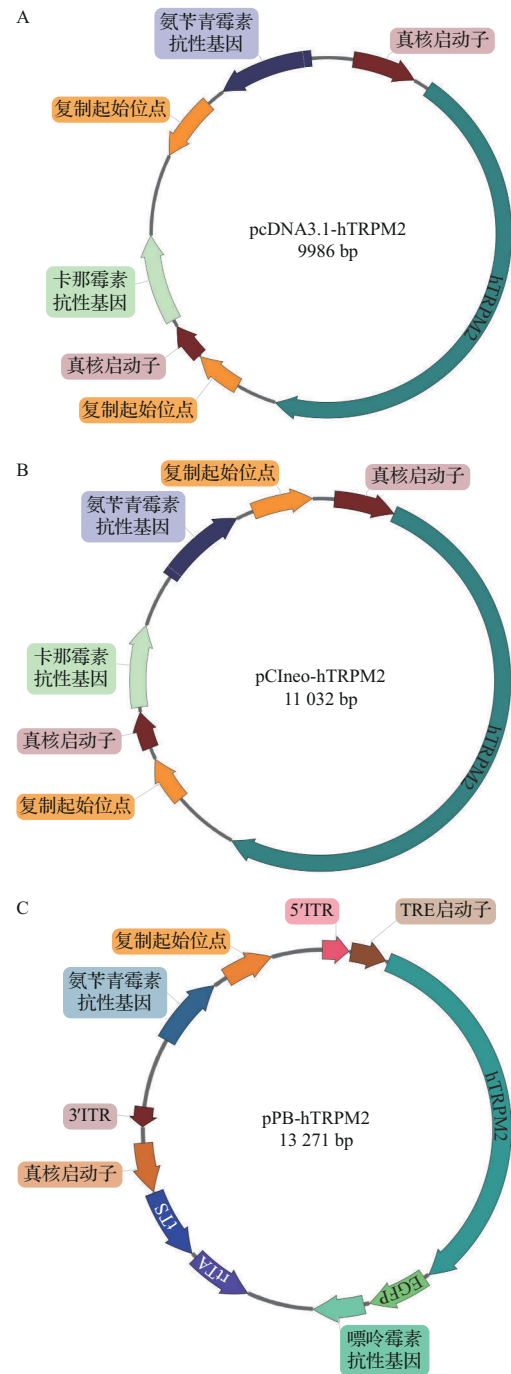
1.3.1 细胞培养和转染 HEK293T细胞用含10%胎牛血清的杜氏改良Eagle培养基-高糖培养基于37℃、5%二氧化碳的恒温培养箱中培养。将生长状态良好的细胞接种到六孔板,待细胞密度达60%~80%、细胞数约 1×10^6 时进行转染。pcDNA3.1-hTRPM2瞬转细胞按Lipofectamine3000™转染试剂说明书以pcDNA3.1-hTRPM2:EGFP质粒质量比30:1转染进HEK293T细胞,转染48 h后观察荧光和转染效率。pPB-hTRPM2稳转细胞按Lipofectamine3000™转染试剂说明书以pPB-hTRPM2:PBbase mRNA质粒质量比1:1转染进HEK293T细胞,转染12 h后更换完全培养基,转染24 h后换含1 μg/mL强力霉素的完全培养基。

1.3.2 单克隆细胞挑选 pPB-hTRPM2稳转细胞转染48 h后消化传代,12 h后加入强力霉素和嘌呤霉素进行药杀处理。筛选10 d左右,细胞感染效率超过80%,消化稀释至10个/mL,传代到培养皿中,形成单克隆细胞群落后在显微镜下挑选单克隆株。

1.3.3 稳转细胞系表达效率观察 将挑选得到的pPB-hTRPM2稳转细胞单克隆株进行扩培,通过体视荧光显微镜在蓝色激发光下观察荧光表达情况,并与pcDNA3.1-hTRPM2瞬转细胞以及pCIneo-hTRPM2稳转细胞进行比较。

1.4 膜片钳鉴定细胞中TRPM2通道表达水平

将诱导表达TRPM2通道的HEK293T细胞铺于玻片上,贴壁12 h后采用全细胞记录模式



A: pcDNA3.1-hTRPM2质粒; B: pCIneo-hTRPM2质粒; C: pPB-hTRPM2质粒. hTRPM2: 人瞬时受体电位M2型; ITR: 反向末端重复序列; tTS: 四环素转录沉默子; rtTA: 反式四环素转录激活因子; TRE: 四环素反应元件; EGFP: 增强型绿色荧光蛋白。

图2 三种质粒的设计示意图

Figure 2 Schematic diagram of the plasmids

在21~25℃下由Axonpatch 700B放大器进行记录。通过电极向细胞内给予500 μmol/L的ADPR (TRPM2通道激活剂)激活TRPM2通道^[22],电流稳定后在细胞外给予20 μmol/L阳性对照ACA

(TRPM 通道抑制剂)对 TRPM2 通道电流进行抑制^[23]。TRPM2 通道电生理记录方式为 -100~100 mV 的电压斜坡(ramp)模式记录,记录 -80 mV 电压时的电流值并完成电流-时间曲线作图。

1.5 利用 Z' 因子评估 pPB-hTRPM2 稳转细胞进行钙成像法筛选的稳定性

将诱导表达 TRPM2 的 HEK293T 细胞使用多聚赖氨酸种植于 96 孔板中,细胞密度为 2×10^4 /孔,培养过夜。贴壁细胞于 $4 \mu\text{mol/L}$ Rhod-4/AM 的 Hanks 平衡盐溶液中在 37°C 下孵育 30 min,用 Hanks 平衡盐溶液洗涤两次后,每孔加入 $120 \mu\text{L}$ Hanks 平衡盐溶液并测定荧光基值 F0。给予 $20 \mu\text{mol/L}$ 阳性对照 ACA 孵育 30 min,每孔再给予 3 mmol/L 过氧化氢激活 TRPM2 通道,使用全波段多功能酶标仪于 540 nm 激发波长和 590 nm 发射波长下读取 Rhod-4 荧光值,测算细胞相对荧光强度(荧光强度增值与测量零时刻荧光初始值的比值)的动态变化。上述所有步骤避光进行。

利用 Z' 因子评估和比较 pPB-hTRPM2 稳转细胞与 pCIneo-hTRPM2 稳转细胞进行钙成像法筛选的稳定性。Z' 值计算公式为 $Z' = 1 - 3 \times (\text{SD}_{\text{阳性}} + \text{SD}_{\text{背景}}) / (M_{\text{阳性}} - M_{\text{背景}})$ 。式中,SD 表示阳性信号或背景的标准偏差,M 表示阳性信号或背景的平均值。Z' 因子数值大于 0.5 时表示筛选模型具有高稳定性,Z' 因子数值越大说明筛选模型稳定性越强^[24]。

1.6 钙成像法初步筛选活性化合物

将 1.5 钙成像法中 $20 \mu\text{mol/L}$ 阳性对照 ACA 替换为 $20 \mu\text{mol/L}$ 待测化合物,测算待测化合物的相对荧光强度,筛选有活性的化合物分子。

1.7 膜片钳验证化合物分子对 TRPM2 通道的抑制活性

进行化合物分子抑制测试时,待 TRPM2 通道激活电流稳定后,在细胞外给予不同浓度的化合物灌流,记录电流变化,再给予 $20 \mu\text{mol/L}$ 阳性对照 ACA 抑制 TRPM2 通道电流。TRPM2 通道电生理记录及数据处理方式见 1.4。

1.8 体外实验

1.8.1 细胞造模、分组和干预 将生长状态良好的 SH-SY5Y 细胞以 2×10^4 /孔的密度种植于 96 孔板中,培养过夜。造模前先进行化合物毒性检测:在细胞中加入含待测化合物的正常培养基,并将细胞分为正常对照组和不同剂量化合物组(在完全

培养基中分别加入 0.1 、 0.3 、 1.0 、 3.0 、 $10.0 \mu\text{mol/L}$ 化合物)。采用 OGD/R 细胞损伤模型评估化合物的神经保护作用^[25]。取两块 SH-SY5Y 细胞生长状态良好的 96 孔板,分为 OGD/R 细胞(模型对照组)和非 OGD/R 细胞(正常对照组)。模型对照组将 96 孔板中的完全培养基替换为无糖和胎牛血清的杜氏改良 Eagle 培养基,并放入模块化孵育器中。向孵育器内充入 95% 氮气和 5% 二氧化碳的混合气体以置换孵育器中的空气,持续 10 min。正常对照组更换一次完全培养基。将模块化孵育器用 75% 的乙醇擦拭后与正常对照组 96 孔板在 37°C 培养箱中继续培养。8 h 后,模型对照组和正常对照组同时更换为完全培养基,并将细胞分为正常对照组、模型对照组和不同剂量化合物组(在更换的完全培养基中加入不同浓度化合物),然后在含 5% 二氧化碳、95% 空气条件下继续培养 12 h。另将 SH-SY5Y 细胞接种于六孔板(浓度为 4×10^5 /孔)进行细胞活性氧测定,每组设三个复孔,共三组:正常对照组、模型对照组(操作同上述 OGD/R 模型细胞)、化合物组(即细胞在 OGD/R 前加入适量化合物处理 12 h)。

1.8.2 CCK-8 法测定细胞活性 将 96 孔板中的培养基更换为含 10% CCK8 的完全培养基,在 37°C 培养箱中继续培养 2 h,用全波段多功能酶标仪采用双波长读取吸光度(A)值,检测波长为 450 nm ,参比波长为 630 nm 。细胞活性计算公式:细胞存活率 = $[(A_{\text{模型对照或化合物组}} - A_{\text{空白孔}}) / (A_{\text{正常对照组}} - A_{\text{空白孔}})] \times 100\%$ 。

1.8.3 流式细胞术测定细胞活性氧水平 将六孔板中各组细胞吸弃上清液后用培养基清洗,加入 1:1000 培养基稀释的活性氧探针,于 37°C 、5% 二氧化碳恒温培养箱避光孵育 30 min;弃探针液,用培养基清洗细胞后在避光条件下收集细胞于 EP 管,用磷酸盐缓冲液洗涤后加入 $200 \mu\text{L}$ 磷酸盐缓冲液重悬,用流式细胞仪测定荧光强度。比较各组细胞的平均荧光强度。

1.9 体内实验

1.9.1 实验动物建模、分组和干预 5 周龄雄性 ICR 小鼠使用线栓法进行 tMCAO 造模。使用异氟烷(5% 诱导,1.5%~2.0% 维持)麻醉小鼠,分离颈总动脉、颈内动脉、颈外动脉。将准备好的线栓沿颈外动脉上切开的小口插入,朝着颈内动脉方向缓慢插入,再向内侧、上方缓慢插入,栓线进线深

度约 10 mm, 感受到轻微阻力时将大脑中动脉阻塞, 90 min 后缓慢拔出线栓。造模后小鼠随机分为模型对照组、不同剂量化合物组(即小鼠再灌注的同时分别给予 0.3、1.0 mg/kg 的化合物), 每组 5 只。化合物溶于 5% DMSO、20% 聚乙二醇 400、5% 吐温-80、70% 等渗氯化钠溶液中, 经尾静脉注射给药。模型对照组尾静脉注射等量溶剂。

1.9.2 TTC 染色测定脑梗死体积 24 h 后将小鼠处死, 迅速开颅取脑, 于 -20°C 保存 20 min。将脑组织用脑切片机切成 5 个 1.0 mm 厚的冠状切片。脑片于 2% TTC 溶液在 37°C 下孵育 30 min, 然后浸泡在 4% 多聚甲醛中过夜。正常脑组织染成红褐色, 缺血梗死灶出现苍白色, 利用 Image J 以未处理侧为参照计算梗死灶体积占造模侧大脑体积的百分比。

1.10 统计学方法

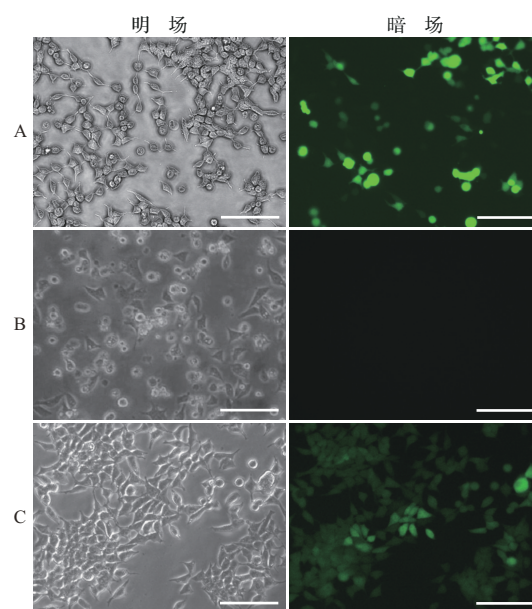
采用 GraphPad Prism 8.0 软件对实验数据进行统计分析。正态分布的计量数据以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm s$)表示, 所有体外实验至少重复三次, 采用 *t* 检验、单因素方差分析进行差异比较, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 成功构建 pPB-hTRPM2 稳转 HEK293T 细胞系

利用脂质体转染法将 pPB-hTRPM2 质粒转染至 HEK293T 细胞后, 由于质粒携带 *EGFP* 基因, 可通过体视荧光显微镜在蓝色激发光下观察 TRPM2 通道表达情况, 弥补了传统方法构建的 pCIneo-hTRPM2 稳转细胞无法直接观察 TRPM2 通道表达率的缺陷。经过嘌呤霉素抗性筛选和单克隆细胞挑选后, 可得到荧光率接近 100% 的单克隆细胞系, 且表达效率高于 pcDNA3.1-hTRPM2 和 EGFP 瞬时共转染细胞的最高转染效率(图 3), 有利于进行后续实验。

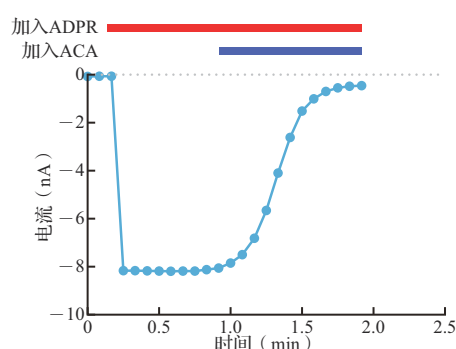
采用全细胞模式记录细胞电流, 发现该电流能被 500 $\mu\text{mol/L}$ 的 ADPR 特异性激活, 并被 20 $\mu\text{mol/L}$ ACA 特异性抑制, 具有经典的 TRPM2 通道电流特征, 证明该细胞上表达 TRPM2 蛋白且具有通道功能(图 4)。pPB-hTRPM2 稳转细胞激活的 TRPM2 通道电流值为 (-7.0461 ± 1.0415) nA, 与相同记录条件下 pcDNA3.1-hTRPM2 瞬转细胞中 TRPM2 电流 $[(-7.5173\pm 1.5417)\text{nA}]$ 差异



A: pcDNA3.1-hTRPM2 和增强型绿色荧光蛋白瞬时共转染, 部分细胞有荧光; B: pCIneo-hTRPM2 稳转细胞无荧光; C: pPB-hTRPM2 稳转细胞荧光率接近 100%。标尺 = 100 μm 。TRPM2: 瞬时受体电位 M2 型。

图 3 不同细胞系中 TRPM2 通道表达

Figure 3 Expression of TRPM2 channel in different cells



ADPR: 腺苷二磷酸核糖; ACA: *N*-(对戊基桂皮酰基)邻氨基苯甲酸; TRPM2: 瞬时受体电位 M2 型。

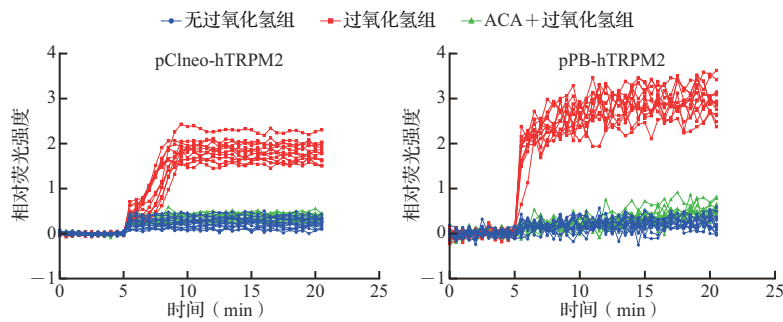
图 4 pPB-hTRPM2 稳转细胞的 TRPM2 电流图

Figure 4 TRPM2 current of pPB-hTRPM2 stable cell lines

无统计学意义($P>0.05$), 证明 pPB-hTRPM2 稳转细胞的蛋白表达水平与瞬时转染相当。

2.2 pPB-hTRPM2 稳转细胞进行钙成像法筛选的稳定性

如图 5 所示, 过氧化氢可以激活 TRPM2 通道, 引起钙离子内流, 使得细胞内荧光值快速升高, 而使用 TRPM2 阳性抑制剂 ACA 处理后再给予过氧化氢, 可抑制过氧化氢对 TRPM2 的激活效果。在 pCIneo-hTRPM2 稳转细胞和 pPB-hTRPM2



相对荧光强度为荧光强度增值与测量零时刻荧光初始值的比值。hTRPM2: 人瞬时受体电位 M2 型; ACA: *N*-(对戊基桂皮酰基)邻氨基苯甲酸。

图5 两种稳转细胞钙成像法相对荧光强度动态变化($n=15$)

Figure 5 Dynamic changes in relative fluorescence intensity of two stable cells in calcium imaging experiments ($n=15$)

稳转细胞筛选系统中,阴性对照(过氧化氢组)与阳性对照(ACA+过氧化氢组)比较差异均具有统计学意义(均 $P<0.01$)。利用 Z' 因子对两种细胞筛选模型的稳定性进行评估。pCIneo-hTRPM2 稳转细胞 $Z'=0.3873$,pPB-hTRPM2 稳转细胞 $Z'=0.5416$ 。说明构建的 TRPM2 通道抑制剂筛选细胞模型具有更好的稳定性,且符合高通量筛选的要求。

2.3 化合物分子 TRPM2 通道抑制活性检测结果

基于 pPB-hTRPM2 稳转细胞,使用钙成像法初步筛选化合物 1~11 中对 TRPM2 通道有抑制活性的化合物。化合物相对荧光强度的增加与 TRPM2 通道的抑制作用呈负相关。结果显示,ACA 化合物 6 相对荧光强度增加水平显著低于过氧化氢组,两组最大相对荧光强度差异有统计学意义($P<0.01$),其他组间差异无统计学意义,见图 6。

研究进一步通过膜片钳验证化合物 6 对 TRPM2 通道的抑制效果。结果显示,化合物 6 在 10.0 $\mu\text{mol/L}$ 浓度下可以完全抑制 TRPM2 通道电流,与 20 $\mu\text{mol/L}$ ACA 的作用相当,其对 TRPM2 的半数抑制浓度为 1.187 $\mu\text{mol/L}$,见图 7、8。

2.4 化合物 6 对 OGD/R 损伤细胞具有保护作用

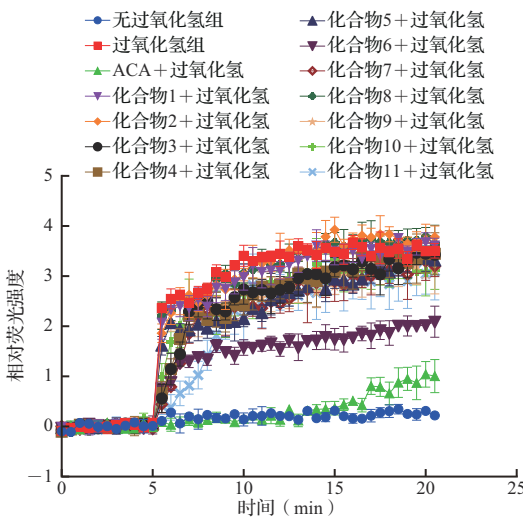
先采用 CCK-8 法评估化合物 6 对 SH-SY5Y 细胞活性的影响。结果表明,0.1、0.3、1.0 $\mu\text{mol/L}$ 化合物 6 处理后细胞存活率分别为(99.6 $\pm$ 3.5)%、(104.1 $\pm$ 14.1)%、(95.3 $\pm$ 7.3)%,与正常对照组比较差异均无统计学意义(均 $P>0.05$);3.0、10.0 $\mu\text{mol/L}$ 化合物 6 作用后 SH-SY5Y 细胞存活率分别下降至(88.3 $\pm$ 4.5)%、(76.8 $\pm$ 5.3)%,与正常对照组[(100.0 $\pm$ 0.0)%]比较差异均有统计学意义(均 $P<0.05$)。由于 10.0 $\mu\text{mol/L}$ 化合物 6 毒性较大,因此

选择 0.1、0.3、1.0、3.0 $\mu\text{mol/L}$ 的浓度进行下一步实验。

相比正常对照组[(100.0 $\pm$ 0.0)%],模型对照组细胞存活率下降至(47.8 $\pm$ 3.6)%($P<0.01$);而 0.1、0.3、1.0、3.0 $\mu\text{mol/L}$ 化合物 6 处理后,细胞存活率分别为(56.3 $\pm$ 7.2)%、(56.3 $\pm$ 8.2)%、(60.4 $\pm$ 6.4)%、(53.7 $\pm$ 1.7)%,其中 1.0 $\mu\text{mol/L}$ 化合物 6 处理后的细胞存活率比模型对照组增加($P<0.05$),其他浓度化合物 6 处理后的细胞存活率与模型对照组比较差异无统计学意义(均 $P>0.05$),提示 1.0 $\mu\text{mol/L}$ 化合物 6 对 OGD/R 导致细胞损伤具有保护作用。

2.5 化合物 6 通过降低细胞活性氧水平缓解 OGD/R 后细胞损伤

流式细胞检测结果显示,与正常对照组平均荧光强度(261 908 $\pm$ 21 265)比较,模型对照组平均荧光强度(494 403 $\pm$ 26 134)升高($P<0.01$),而这种效应可被 1.0 $\mu\text{mol/L}$ 化合物 6(372 197 $\pm$ 43 011)有效抑制($P<0.05$),见图 9。结果提示,1.0 $\mu\text{mol/L}$ 化合物 6 通过降低细胞活性氧水平可以缓解



ACA: *N*-(对戊基桂皮酰基)邻氨基苯甲酸; TRPM2: 瞬时受体电位 M2 型。

图6 11 个化合物分子对 TRPM2 通道抑制活性的初步筛查结果($n=3$)

Figure 6 Preliminary screening results of 11 compounds for inhibitory activity of TRPM2 channel ($n=3$)

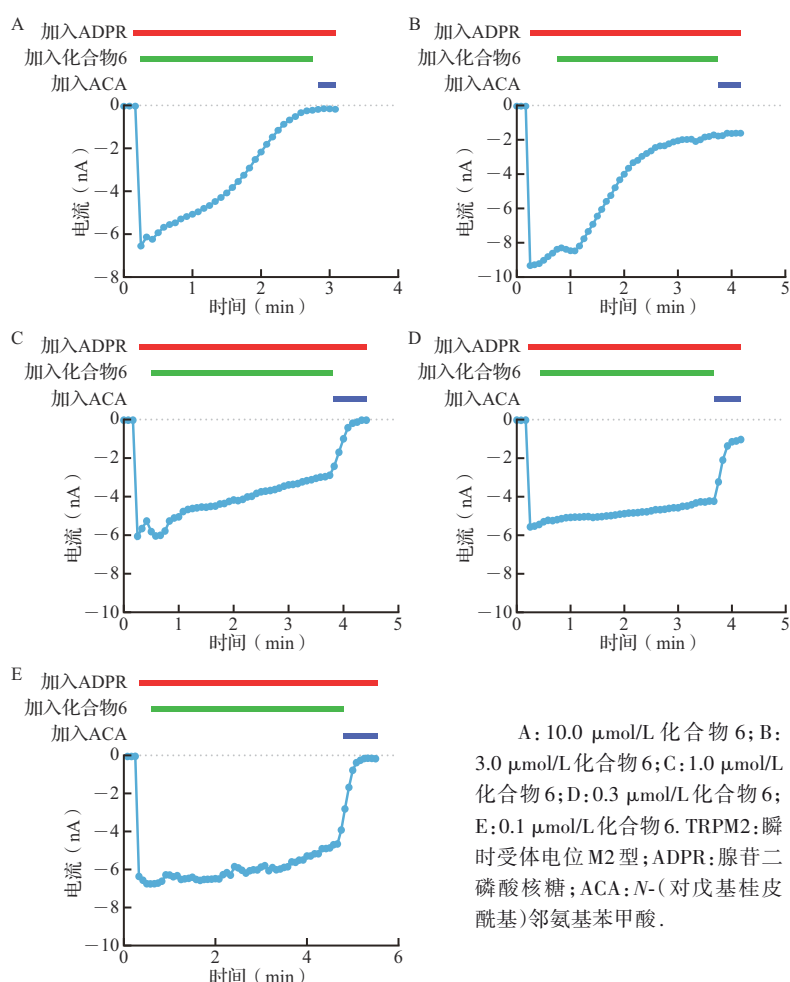


图7 不同浓度化合物6抑制TRPM2通道电流的电生理检测结果

Figure 7 The results of patch clamp of compound 6 with different concentrations in the inhibition of TRPM2 channel

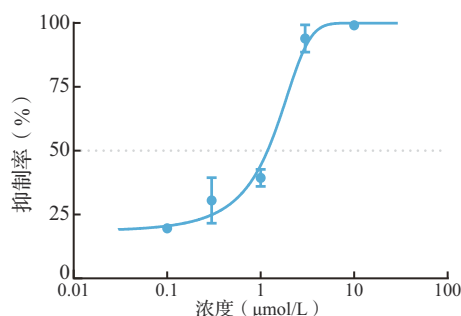


图8 化合物6抑制TRPM2通道电流的半数抑制浓度

Figure 8 The half maximal inhibitory concentration of compound 6 in the inhibition of TRPM2 channel

OGD/R后的细胞损伤。

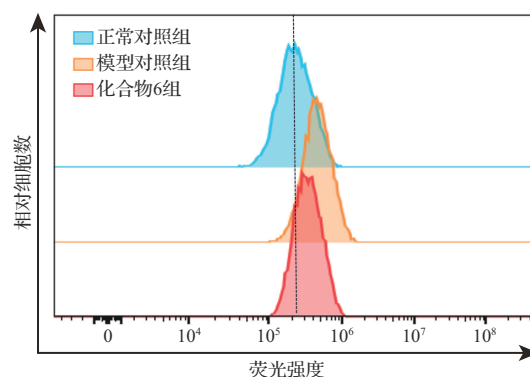
2.6 化合物6可改善脑梗死组织病理改变

如图10所示,模型对照组左侧未处理的脑组

织呈均匀的红色,无脑梗死,右侧呈现大面积的白色区域,其脑梗死体积占比为(53.70 ± 2.58)%;给予0.3、1.0 mg/kg 化合物6后脑组织白色区域面积较模型对照组明显减小,其梗死体积占比分别为(30.58 ± 9.63)%、(26.36 ± 12.41)%,与模型对照组比较差异有统计学意义(均 $P < 0.01$),提示化合物6对小鼠缺血性脑卒中后的脑梗死有保护作用。

3 讨论

转座子是一类能够切除和整合DNA的移动性遗传元件,可以将外源基因高效整合到宿主细胞的基因组中,已经越来越多地被用作基因编辑的实验工具。PiggyBac转座子是依赖于PiggyBac转座酶的DNA转座子,最初起源于昆虫^[26]。研究发现,PiggyBac转座子在酵母、植物和哺乳动物等多种生物细胞中具有活性^[27-28]。相较于其他转座子,PiggyBac转座子在哺乳动物细胞中的转座效率最高,在构建稳定过表达、短发卡RNA敲低、向导RNA敲除、环状RNA过表达细胞系等研



各组活性氧荧光位移,曲线代表相应荧光强度下的细胞数,以正常对照组类正态分布的中轴线设定为阈值。

图9 各组活性氧荧光强度比较

Figure 9 Comparison of reactive oxygen species fluorescence intensity in each group

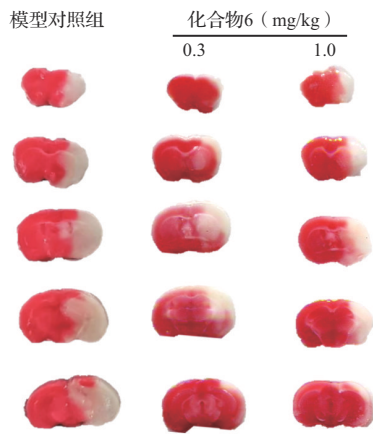


图 10 是否加化合物 6 各组模型小鼠大脑外观
Figure 10 Comparison of cerebral infarction volume in each group

究中可提供稳定的工具细胞^[29-30]。本研究基于 PiggyBac 转座系统在 HEK293T 细胞中建立了稳定过表达 TRPM2 通道的细胞系,应用于 TRPM2 通道抑制剂的高通量筛选和研究。

HEK293T 细胞具有转染效率高、易于培养、细胞表面离子通道表达较少等优点,常用于离子通道的研究及其调节剂的筛选。本研究在稳转系统设置了 TRE,利用“Tet-on”系统调控 *TRPM2* 基因表达,在无强力霉素情况下抑制基因转录,在有强力霉素情况下激活基因转录,防止细胞过度表达 TRPM2 造成细胞损伤。同时,在该稳转系统中加入 *EGFP* 基因,通过 EGFP 荧光蛋白的表达直观、方便地监测 TRPM2 的表达情况。在强力霉素处理 12 h 后,荧光显微镜下即可观察到细胞中 EGFP 的表达,与瞬时转染对照组比较,pPB-hTRPM2 稳转细胞中的表达效率高于瞬时转染 48 h 后的细胞。使用单细胞膜片钳评估 pPB-hTRPM2 稳转细胞的表达水平,膜片钳下记录到 TRPM2 经典电流,电流大小与瞬时转染细胞无异,而且电流值更加均匀稳定。钙成像法结果表明,本细胞模型可敏感地检测细胞内钙离子浓度,激活后荧光值增加 3~4 倍, Z' 因子为 0.5416,相较于 pCIneo-hTRPM2 稳转细胞稳定性更好,符合高通量筛选的需求。利用该筛选系统对 11 个候选化合物进行检测,发现化合物 6 表现出较好的 TRPM2 通道抑制活性,在 3.0 $\mu\text{mol/L}$ 的浓度下即可以抑制超过 95% TRPM2 通道介导的电流。采用 OGD/R 细胞模型,对化合物 6 进行抗缺血性损伤功能的研究发现 1.0 $\mu\text{mol/L}$ 的化合物 6 对 SH-SY5Y 细胞安全性

好,且能对 OGD/R 诱导的细胞损伤发挥抗氧化效应,产生一定的保护作用,并使小鼠 tMCAO 模型脑梗死体积明显减小,表现出抗脑缺血功效,提示其有潜力开发为治疗脑缺血再灌注的治疗药物。

综上所述,本研究基于 PiggyBac 转座系统,构建了性能更优的 TRPM2 通道稳定表达细胞系,并用于 TRPM2 抑制剂筛选,该筛选系统高效稳定、操作简便,为研究和开发 TRPM2 新型抑制剂以及 TRPM2 相关疾病的潜在治疗药物奠定了基础。研究筛选得到了一个新型的小分子化合物——化合物 6。化合物 6 在钙成像法和电生理技术中表现出良好的 TRPM2 抑制活性,对缺血性脑卒中细胞和动物模型具有保护作用,其药物特性以及其他 TRPM2 通道相关疾病中的药理作用值得进一步深入研究。

志谢 研究得到国家自然科学基金(82030108)、宁夏回族自治区重点研发项目(2019BFH02003)支持

Acknowledgements This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (82030108), Key R&D Project of Ningxia Hui Autonomous Region (2019 BFH02003)

医学伦理 研究通过浙江大学伦理委员会审查(ZJU2024 0176),所有动物实验及相关操作处理均严格遵守《浙江大学动物伦理委员会管理条例和准则》

Ethical approval The research was approved by the Ethics Committee of Zhejiang University (ZJU20240176), and all animal experiments and related operations were strictly conducted in accordance with the *Regulations and Guidelines of the Animal Ethics Committee of Zhejiang University*

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

Conflict of Interests The authors declare that there is no conflict of interests

©The author(s) 2024. This is an open access article under the CC BY-NC-ND 4.0 License (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>)

参考文献(References)

[1] CLAPHAM D E. TRP channels as cellular sensors[J]. *Nature*, 2003, 426(6966): 517-524.
[2] TSAGARELI M G, NOZADZE I. An overview on transient receptor potential channels superfamily[J]. *Behav Pharmacol*, 2020, 31(5): 413-434.
[3] ZHANG M, MA Y, YE X, et al. TRP (transient receptor

- potential) ion channel family: structures, biological functions and therapeutic interventions for diseases [J]. **Signal Transduct Target Ther**, 2023, 8(1): 261.
- [4] SUMOZA-TOLEDO A, PENNER R. TRPM2: a multi-functional ion channel for calcium signalling[J]. **J Physiol**, 2011, 589(Pt 7): 1515-1525.
 - [5] SITA G, HRELIA P, GRAZIOSI A, et al. TRPM2 in the brain: role in health and disease[J]. **Cells**, 2018, 7(7): 82.
 - [6] ZONG P, LIN Q, FENG J, et al. A systemic review of the integral role of TRPM2 in ischemic stroke: from upstream risk factors to ultimate neuronal death[J]. **Cells**, 2022, 11(3): 491.
 - [7] YILDIZHAN K, NAZIROĞLU M. Glutathione depletion and parkinsonian neurotoxin MPP(+)-induced TRPM2 channel activation play central roles in oxidative cytotoxicity and inflammation in microglia[J]. **Mol Neurobiol**, 2020, 57(8): 3508-3525.
 - [8] VERMA S, QUILLINAN N, YANG Y F, et al. TRPM2 channel activation following *in vitro* ischemia contributes to male hippocampal cell death[J]. **Neurosci Lett**, 2012, 530(1): 41-46.
 - [9] SUN Y, SUKUMARAN P, SELVARAJ S, et al. TRPM2 promotes neurotoxin MPP(+)/MPTP-induced cell death [J]. **Mol Neurobiol**, 2018, 55(1): 409-420.
 - [10] GAO M, DU Y, XIE J W, et al. Redox signal-mediated TRPM2 promotes Ang II-induced adipocyte insulin resistance via Ca(2+)-dependent CaMKII/JNK cascade [J]. **Metabolism**, 2018, 85: 313-324.
 - [11] CHEN G L, ZENG B, EASTMOND S, et al. Pharmacological comparison of novel synthetic fenamate analogues with econazole and 2-APB on the inhibition of TRPM2 channels[J]. **Br J Pharmacol**, 2012, 167(6): 1232-1243.
 - [12] GUINAMARD R, SIMARD C, DEL NEGRO C. Flufenamic acid as an ion channel modulator[J]. **Pharmacol Ther**, 2013, 138(2): 272-284.
 - [13] FOURGEAUD L, DVORAK C, FAOUZI M, et al. Pharmacology of JNJ-28583113: a novel TRPM2 antagonist [J]. **Eur J Pharmacol**, 2019, 853: 299-307.
 - [14] RUBAIY H N. A short guide to electrophysiology and ion channels[J]. **J Pharm Pharm Sci**, 2017, 20: 48-67.
 - [15] SONG Y, BUELOW B, PERRAUD A L, et al. Development and validation of a cell-based high-throughput screening assay for TRPM2 channel modulators[J]. **J Biomol Screen**, 2008, 13(1): 54-61.
 - [16] CRUZ-TORRES I, BACKOS D S, HERSON P S. Characterization and optimization of the novel transient receptor potential melastatin 2 antagonist tatM2NX[J]. **Mol Pharmacol**, 2020, 97(2): 102-111.
 - [17] STEPANENKO A A, HENG H H. Transient and stable vector transfection: pitfalls, off-target effects, artifacts [J]. **Mutat Res Rev Mutat Res**, 2017, 773: 91-103.
 - [18] MAO Y, YAN R, LI A, et al. Lentiviral vectors mediate long-term and high efficiency transgene expression in HEK 293T cells[J]. **Int J Med Sci**, 2015, 12(5): 407-415.
 - [19] SANDOVAL-VILLEGAS N, NURIEVA W, AMBERGER M, et al. Contemporary transposon tools: a review and guide through mechanisms and applications of sleeping beauty, piggyBac and Tol2 for genome engineering[J]. **Int J Mol Sci**, 2021, 22(10): 5084.
 - [20] IZSVÁK Z, CHUAH M K, VANDENDRIESCHE T, et al. Efficient stable gene transfer into human cells by the sleeping beauty transposon vectors[J]. **Methods**, 2009, 49(3): 287-297.
 - [21] CHEN Q, LUO W, VEACH R A, et al. Structural basis of seamless excision and specific targeting by piggyBac transposase[J]. **Nat Commun**, 2020, 11(1): 3446.
 - [22] YU X, XIE Y, ZHANG X, et al. Structural and functional basis of the selectivity filter as a gate in human TRPM2 channel[J]. **Cell Rep**, 2021, 37(7): 110025.
 - [23] KRAFT R, GRIMM C, FRENZEL H, et al. Inhibition of TRPM2 cation channels by *N*-(*p*-amylcinnamoyl) anthranilic acid[J]. **Br J Pharmacol**, 2006, 148(3): 264-273.
 - [24] ZHANG X D, WANG D, SUN S, et al. Issues of Z-factor and an approach to avoid them for quality control in high-throughput screening studies[J]. **Bioinformatics**, 2021, 36(22-23): 5299-5303.
 - [25] WANG H F, WANG Z Q, DING Y, et al. Endoplasmic reticulum stress regulates oxygen-glucose deprivation-induced parthanatos in human SH-SY5Y cells via improvement of intracellular ROS[J]. **CNS Neurosci Ther**, 2018, 24(1): 29-38.
 - [26] BONIN C P, MANN R S. A piggyBac transposon gene trap for the analysis of gene expression and function in drosophila[J]. **Genetics**, 2004, 167(4): 1801-1811.
 - [27] DING S, WU X, LI G, et al. Efficient transposition of the piggyBac (PB) transposon in mammalian cells and mice[J]. **Cell**, 2005, 122(3): 473-483.
 - [28] WILSON M H, COATES C J, GEORGE A L JR. PiggyBac transposon-mediated gene transfer in human cells[J]. **Mol Ther**, 2007, 15(1): 139-145.
 - [29] WU S C, MEIR Y J, COATES C J, et al. piggyBac is a flexible and highly active transposon as compared to sleeping beauty, Tol2, and Mos1 in mammalian cells [J]. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 2006, 103(41): 15008-15013.
 - [30] SUEMATSU M, YAGYU S, NAGAO N, et al. PiggyBac transposon-mediated CD19 chimeric antigen receptor-T cells derived from CD45RA-positive peripheral blood mononuclear cells possess potent and sustained antileukemic function[J]. **Front Immunol**, 2022, 13: 770132.

[本文编辑 余方沈敏]