

doi:10.3969/j.issn.2095-4344.2012.36.023 [http://www.cjter.org/cjter-2012-qikanquanwen.html]

李先花, 李建美, 陶四明, 张新金. 超极化激活环化核苷酸门控通道2基因转染后293T细胞中目的基因的表达[J]. 中国组织工程研究, 2012, 16(36):6779-6784.

## 超极化激活环化核苷酸门控通道2基因转染后293T细胞中目的基因的表达\*

李先花, 李建美, 陶四明, 张新金

**文章亮点:** 观察 HCN2 基因重组质粒转染后 293T 细胞中目的基因在核酸和蛋白质水平的表达, 发现质粒 CMV-hHCN2-3xHA-IRES-EGFP 成功转染后的 293T 细胞中 hHCN2 基因可以在核酸和蛋白水平表达。

**关键词:** 超极化激活环化核苷酸门控通道 2; 293T 细胞; 生物心脏起搏器; 基因; 基因重组质粒; 起搏电流

**缩略语:** 超极化激活环化核苷酸门控通道: hyperpolarization-activated, cyclic nucleotide-gated, HCN

### 摘要

**背景:** 研究证实超极化激活环化核苷酸门控通道电流在调控心脏的自发搏动中起着非常重要的作用。

**目的:** 观察超极化激活环化核苷酸门控通道 2 基因重组质粒转染后 293T 细胞中目的基因在核酸和蛋白质水平的表达。

**方法:** 采用脂质体转染试剂 Lipofectamine2000 将含全长超极化激活环化核苷酸门控通道 2 基因的质粒 CMV-hHCN2-3xHA-IRES-EGFP 转染至 293T 细胞中。

**结果与结论:** 用脂质体转染试剂 Lipofectamine2000 成功地将质粒 CMV-hHCN2-3xHA-IRES-EGFP 转染至 293T 细胞中。反转录 PCR 定性地检测到在 100-250 bp 处可见高度特异 DNA 的条带, 与携带超极化激活环化核苷酸门控通道 2 基因的质粒扩增出的片段位置相同。经过 RT-PCR、Western-blot 方法检测提示超极化激活环化核苷酸门控通道 2 基因在 mRNA 和蛋白水平都有高表达。表明质粒 CMV-hHCN2-3xHA-IRES-EGFP 成功转染后的 293T 细胞中超极化激活环化核苷酸门控通道 2 基因可以在核酸和蛋白水平表达。

昆明医学院第四附属医院内科, 云南省昆明市 650021

李先花★, 女, 1985 年生, 山西省大同市人, 汉族, 2010 年昆明医学院毕业, 硕士, 医师, 主要从事心血管内科研究。  
lixianhua0223@163.com

通讯作者: 李建美, 教授, 昆明医学院第四附属医院内科, 云南省昆明市 650021  
lijianmei090@sina.com

中图分类号:R394.2  
文献标识码:B  
文章编号:2095-4344  
(2012)36-06779-06

收稿日期:2012-01-20  
修回日期:2012-02-26  
(20110928003/GW·S)

### Expression of target gene in 293T cells transfected by hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channel 2 gene

Li Xian-hua, Li Jian-mei, Tao Si-ming, Zhang Xin-jin

### Abstract

**BACKGROUND:** Hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated (HCN) currently plays an important role in regulating heart spontaneous pulsation.

**OBJECTIVE:** Target gene expression was observed at mRNA and protein level in 293T cells transfected with human hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channel 2 (hHCN2) gene recombinant plasmid.

**METHODS:** Plasmid CMV-hHCN2-3xHA-IRES-EGFP including full length hHCN2 gene was transfected into 293T cells by Liposome Lipofectamine 2000. Expression of hHCN2 mRNA was detected by reverse transcription polymerase chain reaction and real-time quantitative polymerase chain reaction respectively. Expression of HCN2 protein was examined by western blot method.

**RESULTS AND CONCLUSION:** Plasmid CMV-hHCN2-3xHA-IRES-EGFP including full length HCN2 gene was successfully transfected into 293T cells by Liposome Lipofectamine 2000. Reverse transcription polymerase chain reaction detected the highly visible specific DNA bands at 100-250 bp, which was the same as hHCN2 gene carried by plasmid. Reverse transcription-polymerase chain reaction and western blot method results showed that hHCN2 gene was highly expressed at mRNA and protein levels. These findings suggest that hHCN2 gene was expressed at the nucleic acid and protein levels in 293T cells transfected by plasmid of CMV-hHCN2-3xHA-the IRES-EGFP.

Li XH, Li JM, Tao SM, Zhang XJ. Expression of target gene in 293T cells transfected by hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channel 2 gene. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu. 2012;16(36): 6779-6784.

Department of  
Cardiology, the  
Fourth Affiliated  
Hospital of Kunming  
Medical College,  
Kunming 650021,  
Yunnan Province,  
China

Li Xian-hua★,  
Master, Physician,  
Department of  
Cardiology, the  
Fourth Affiliated  
Hospital of Kunming  
Medical College,  
Kunming 650021,  
Yunnan Province,  
China  
lixianhua0223@  
163.com

Corresponding  
author: Li Jian-mei,  
Professor,  
Department of  
Cardiology, the  
Fourth Affiliated  
Hospital of Kunming  
Medical College,  
Kunming 650021,  
Yunnan Province,  
China  
lijianmei090@  
sina.com

Received: 2012-01-20  
Accepted: 2012-02-26

## 0 引言

正常心脏的节律有赖于窦房结发放冲动以及完善的传导系统。缓慢型心律失常是由窦房结自律性低下或传导系统阻滞引起,以心率减慢为特征的一类心脏传导系统疾病<sup>[1]</sup>。目前对于药物治疗无效的缓慢型心律失常患者,只能接受人工心脏起搏器植入治疗<sup>[2]</sup>。近年,随着基因工程学、遗传工程技术、分子生物学、细胞生物学和细胞电生理技术的飞速发展,使生物起搏器的研制成为可能<sup>[3]</sup>,为根治此类疾病提供一种新方法。研究发现心脏的起搏主要由内向超极化电流即起搏电流来调控,即If电流或起搏电流的基因编码超极化激活环化核苷酸门控通道(hyperpolarization-activated, cyclic nucleotide-gated, HCN), HCN2是HCN家族中的一员,其激活动力学和cAMP反应性较为均衡<sup>[4]</sup>,且与维持稳定的心率和维持普通心肌细胞兴奋性有关<sup>[5-9]</sup>,因此近年来多采用转染HCN2增强If来构建生物起搏器<sup>[10-11]</sup>。本实验研究在体外将携带有HCN2全长基因的重组质粒用脂质体转染至293T细胞中,并运用反转录PCR和实时荧光定量PCR及Western-blot的方法检测HCN2基因在核酸和蛋白质水平的表达。

## 1 材料和方法

**设计:** 细胞-基因学体外观察。

**时间及地点:** 于2009-11/2010-01在中国医学科学院医学生物研究所遗传室完成。

**材料:**

**主要试剂:**

试剂	来源
HDMEM 培养基	HYCLONE 公司
胎牛血清	GIBCO 公司
无内毒素质粒小量制备试剂盒 (离心柱型)	北京百泰克生物技术 有限公司
Lipofectamine2000 转染试剂	Invitrogen 公司
膜蛋白提取试剂盒	上海生工生物工程 有限公司
一抗(HCN2 羊抗人单抗)、 二抗(驴抗羊 PE 单抗)	SANTA CRUZ 公司
Mouse Anti-β-Actin Polyclonal Antibody	武汉博士德生物工程 有限公司

293T细胞株及看家基因引物HBOA由中国医学科学院医学生物研究所遗传室杨昭庆教授赠送。携带全长hHCN2基因的质粒CMV-hHCN2-3xHA-IRES-EGFP由美国Genecopoeia公司制备。

**实验方法:**

**质粒的扩增、鉴定:** 在无菌环境下,将含HCN2全长基因质粒的DH5α感受态细胞进行扩增,取过夜培养的浑浊菌液用无内毒素质粒小量制备试剂盒(离心柱型)提取质粒。

根据GenBank中hHCN2基因序列(基因序列号: NC000019.9),用Premier5软件设计扩增引物见表1,以提取的质粒分别为模板,以表1中的3对引物分别为引物(质量浓度为10 mg/L),配制20 μL反应体系,进行PCR反应。取PCR产物各5 μL进行1%琼脂糖凝胶电泳;取以引物Qpcr23-67扩增的PCR产物进行基因测序。

表 1 RT-PCR 目的基因的引物序列  
Table 1 RT-PCR primer sequences of the target genes

Gene	Upstream primer (5'→3')	Downstream primer (5'→3')	Fragment length (bp)
Qpcr23	GCC TCT CAC GCC TGA TCC GCT A	GCA GAT CCT CAT CAC CGC GCT GG	89
Qpcr67	AGC GTG CTC ACT AAG GGC AAC AA	CTC AGC GAA TAG AGG CCG CAG TA	134
Qpcr23-67	GCC TCT CAC GCC TGA TCC GCT A	CTC AGC GAA TAG AGG CCG CAG TA	886

**293T细胞的培养及传代:** 将冻存的293T细胞株常规复苏,接种于100 mm培养皿(含1%双抗和体积分数10%FBS的H-DMEM)中培养。24 h换液。生长二三天达到90%融合时进行消化,计数,测定细胞浓度。分别以每孔 $0.3 \times 10^6$ ,  $0.5 \times 10^6$ ,  $0.6 \times 10^6$ ,  $1.0 \times 10^6$ ,  $1.2 \times 10^6$ ,  $1.5 \times 10^6$ 总量接种于6孔板中(含1%双抗和体积分数10%FBS的H-DMEM),第2天观察生长密度、筛选最佳接种量以备后续转染。

**细胞转染:** 转染前1 d,以合适的细胞总量 $1.2 \times 10^6$ 接种于6孔板(含体积分数10%FBS的H-DMEM)中,以备转染。第2天按Lipofectamine2000说明书做转染,设对照孔。

**总RNA提取:** 取转染48 h后的293T细胞,提取总RNA。

**RT-PCR定性检测hHCN2 mRNA的表达:** 取上步获得的总RNA, 用Super RT Kit试剂盒获取cDNA。取RT产物cDNA(实验组)、cDNA(对照组)为模板, 引物为Qpcr67, 内参为HBOA(上游引物: CAC AGA CAG TTC AGA AAG TGA TGG C; 下游引物: TAG AGT AAG CAG GCT CCT CAG TGC; 扩增基因片段长度为143 bp), 配制总体积20  $\mu$ L的反应体系, 按以下条件进行PCR反应: 94  $^{\circ}$ C, 3 min; 94  $^{\circ}$ C, 30 s; 57  $^{\circ}$ C, 30 s; 72  $^{\circ}$ C, 1 min; 94  $^{\circ}$ C, 30 s, 25个循环; 72  $^{\circ}$ C, 10 min。

**Sybr green qPCR定量检测hHCN2 mRNA的表达:** 分别取RT产物实验组cDNA、对照组cDNA按Real Time PCR mix说明书配制20  $\mu$ L反应体系, 引物为Qpcr67, 内参为HBOA。

**蛋白提取:** 取转染72 h后的293T细胞分别提取总蛋白及膜蛋白, 以未做转染的293T细胞为对照组。BCA法测定蛋白含量。

**Western-blot检测hHCN2 蛋白水平的表达:** 取上步提取的总蛋白和膜蛋白进行Western-blot: 4  $^{\circ}$ C, 5% milk-TBST封闭2 h; 5% milk-TBST稀释一抗(1:500), 5% milk-TBST稀释 $\beta$ -actin(1:1000), 4  $^{\circ}$ C孵育过夜; 5% milk-TBST稀释二抗(1:5000), 室温孵育2 h。用ECL试剂盒显色, 有目的蛋白表达的条带呈黑色; 内参为 $\beta$ -actin。

**主要观察指标:** 通过反转录PCR和实时荧光定量PCR及Western-blot的方法检测HCN2基因在293T细胞核酸和蛋白质水平的表达。

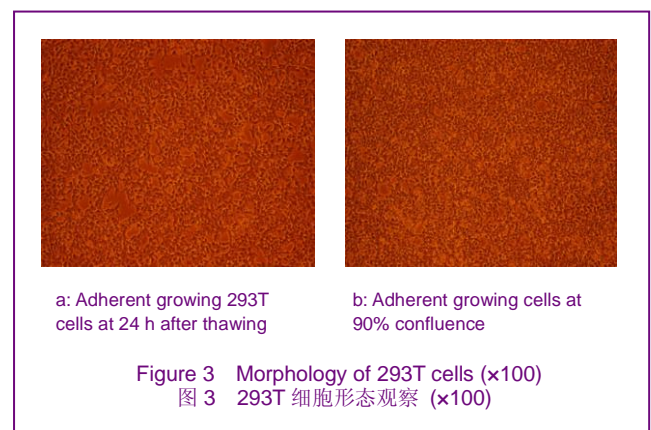
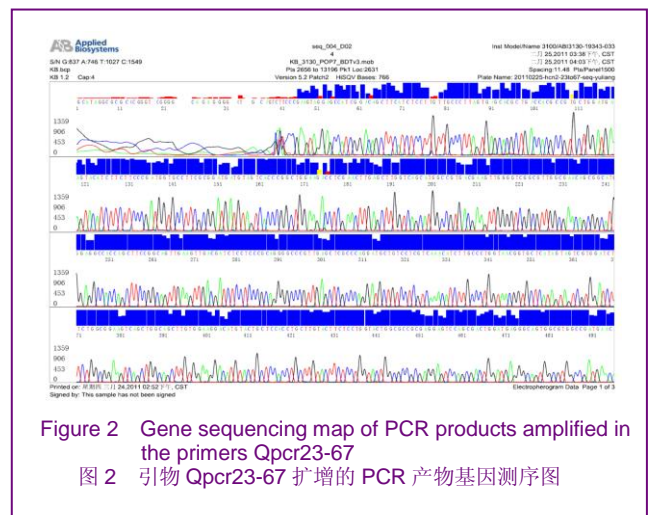
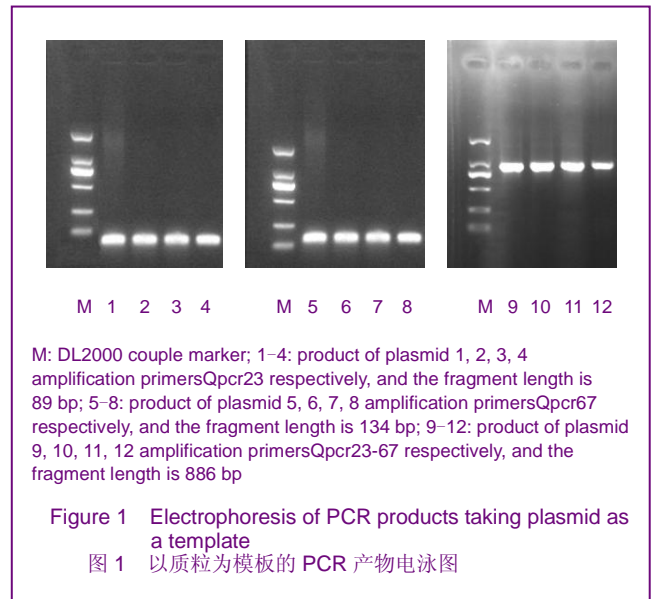
**统计学分析:** 所有数据均以 $\bar{x}\pm s$ 表示, 两两样本均数比较用 $t$ 检验, 所有统计计算由SPSS 10.0软件完成。

## 2 结果

**2.1 质粒扩增后的鉴定** PCR产物的1%琼脂糖凝胶电泳图, 见图1, 初步证实提取的质粒为含全长hHCN2基因的质粒。

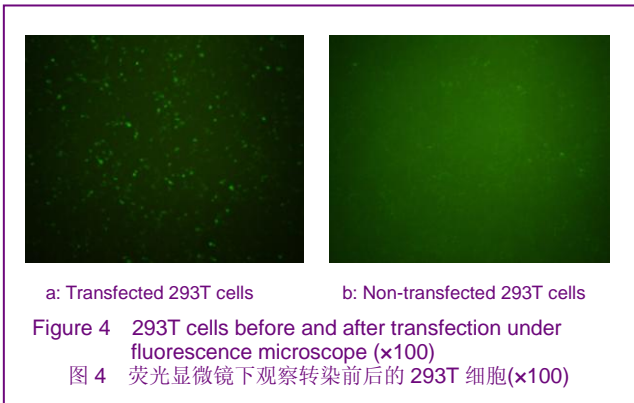
基因测序结果显示: 扩增产物的基因序列与hHCN2所含的基因序列一致, 测序图见图2。

**2.2 293T细胞的形态观察** 在显微镜下刚复苏的293T细胞呈球形, 悬浮于培养液中。8-10 h开始逐渐沉降贴壁, 24 h完全贴壁, 贴壁细胞呈不规则形, 细胞体积较小, 边缘清楚, 胞质清亮, 见图3a。生长二三天后, 达到90%融合, 见图3b。以 $1.2\times 10^6$ 的总量接种于6孔板中的细胞第2天生长达到90%, 适合转染。

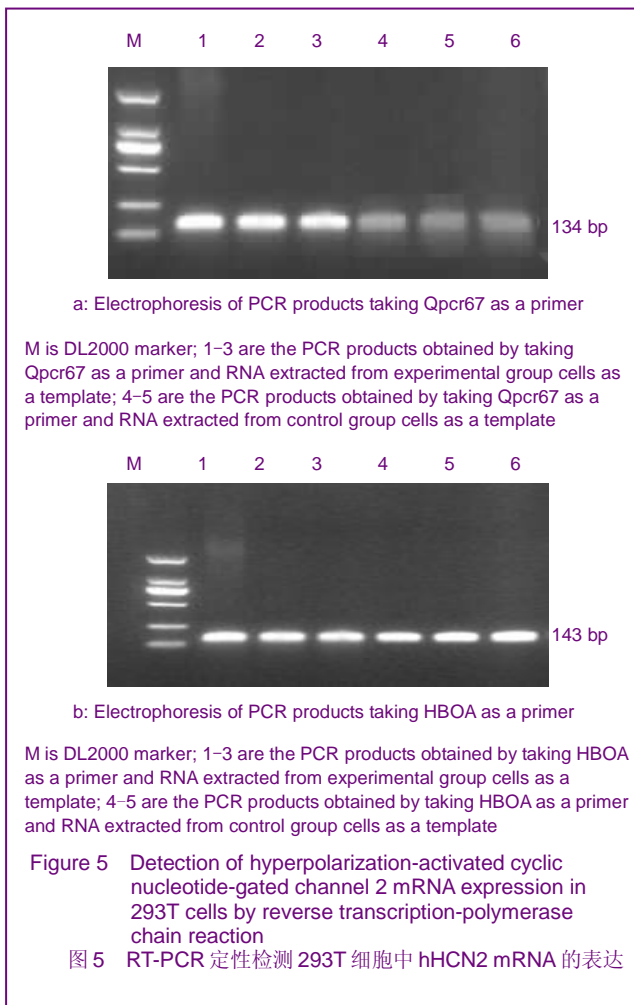


**2.3 细胞转染** 转染48 h后的293T细胞在荧光显微镜下, 实验孔可以观察到绿色荧光, 其转染率约为30%, 见图4a, 与文献[12]中报道的脂质体转染效率为20%-30%一致, 并没有电转染的转染效率30%-40%高<sup>[13]</sup>。对照孔中无明显绿色荧光, 见图4b。

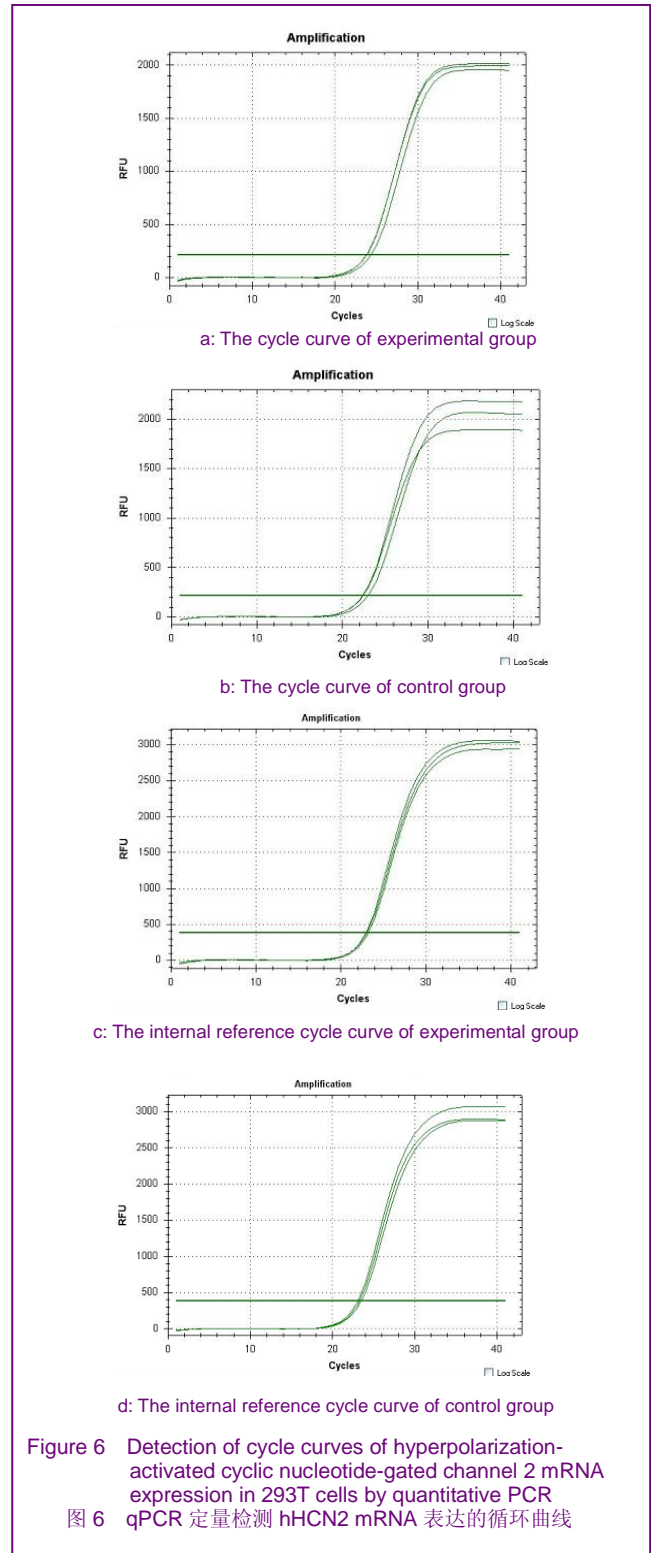




**2.4 RT-PCR定性检测hHCN2 mRNA的表达** PCR产物1%琼脂糖凝胶电泳图示: 实验组与对照组在100-250 bp处都可见高度特异DNA的条带, 见图5a, 但是实验组条带明显较对照组亮度高, 反映出实验组中hHCN2 mRNA的含量较高。实验组内参与对照组内参亦在100-250 bp处可见高度特异DNA的条带, 见图5b, 但是两组条带之间没有明显的亮度差异。与李红霞等<sup>[14]</sup>报道的用脂质体转染的方法, 将质粒pcDNA3-hHCN2导入间充质干细胞中, RT-PCR检测有hHCN2 mRNA的高表达是一致的。



**2.5 qPCR定量检测hHCN2 mRNA的表达** 循环曲线图所示, 见图6。



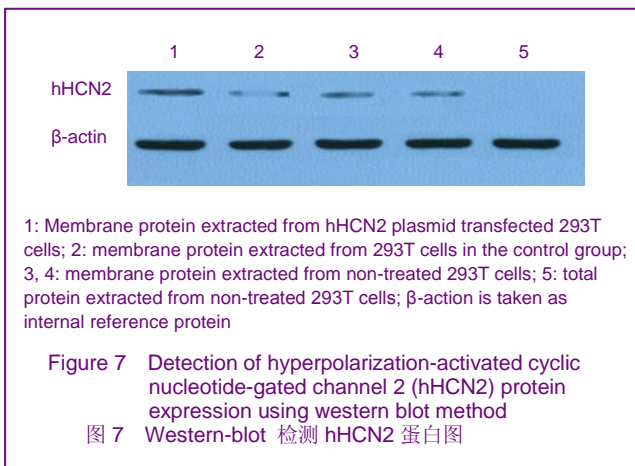
从表2中看出: 在获得相同量的反应产物时实验组循环数较对照组少, 从而说明实验组的hHCN2 mRNA的表达量较对照组高, Ct值均数的差值大于1且小于2, 说明实验组的hHCN2 mRNA的表达量是对照组的2倍多, 但不到4倍; 而实验组内参与对照组内参之间比较无统计学

意义。这与文献[14-15]中报道的一致。但并没有马金等<sup>[12]</sup>报道的已转染质粒间充质干细胞的mHCN2 mRNA的平均相对表达量是未转染间充质干细胞的5.31倍( $P < 0.05$ ), 可能与脂质体转染效率较低有关。

表2 实时荧光 PCR 循环数 Ct 值统计表  
Table 2 Real-time PCR cycle number Ct value (x±s)

Group	Primer Qpcr67	Primer HBOA
Experimental	22.59±0.37	23.27±0.19
Control	23.99±0.28	23.09±0.12
<i>P</i>	0.006	0.241

2.6 Western-blot检测hHCN2蛋白水平的表达 结果见图7所示: 转染后的293T细胞膜蛋白中hHCN2蛋白的含量与对照组、未作处理组比较明显较高; 对照组与未作处理组之间无明显差别; 总蛋白中的hHCN2蛋白未检测到。



各组中的内参蛋白 $\beta$ -actin含量无明显差别。证实转染起搏基因质粒CMV-hHCN2-3xHA-IRES-EGFP的293T细胞中有质粒中hHCN2基因蛋白水平的表达。结果与文献[12, 14, 16]中报道的一致。

### 3 讨论

根据窦房结细胞自律性产生的离子基础可知当细胞膜发生除极时, 主要由内向 $\text{Na}^+$ 流实现(部分由于 $\text{Na}^+$ - $\text{Ca}^+$ 交换及T型和L型 $\text{Ca}^+$ 流); 然后由于逐渐增强的 $\text{K}^+$ 通道携带的外向 $\text{K}^+$ 流, 使膜复极。由此可见, 任何在除极开始后增加内向 $\text{Na}^+$ 流或减少外向 $\text{K}^+$ 流的干预措施, 都可以增强除极电流, 加快除极速度和起搏频率。心脏的起搏主要由内向超极化电流-起搏电流来调控, 即If电流或起搏电流的基因编码HCN, 其起搏通道电流

的特性<sup>[17-19]</sup>: ①被超极化所激活。②对 $\text{Na}^+$ 和 $\text{K}^+$ 的混合通透。③受细胞内cAMP的调控。④微小单通道电导。⑤虽然HCN通道中存在钠电流, 但是该通道不能被河豚毒素阻断, 却可被细胞外低浓度(4 mmol/L) $\text{Cs}^+$ 抑制, 由此显示它与其他钠通道也不甚相同。在哺乳类动物中HCN有4个亚型<sup>[4, 20]</sup>, 分别是HCN1、HCN2、HCN3和HCN4。这4种亚型在不同的组织中分布不同。同一亚型在不同组织中编码的电流的激活曲线亦不同。就激活来讲, HCN1比其他几种亚型要快, HCN4最慢, HCN2介于HCN1(快)和HCN4(慢)之间<sup>[4]</sup>。而HCN2对cAMP的反应则与HCN4相似, 相当或大于HCN1。比较而言, HCN2亚型的激活动力学和cAMP反应性较为均衡。由于这些特点, 近年来多采用转染HCN2增强If来构建生物起搏器<sup>[10-11]</sup>。

293T细胞是转染腺病毒E1A基因的人肾上皮细胞系, 293T细胞由293细胞派生, 同时表达SV40大T抗原, 含有SV40复制起始点与启动子区的质粒可以复制。用 $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ 转染效率可高达50%。蛋白表达水平高, 转染后二三天用碱性磷酸酶分析可较容易地检测到表达的蛋白。瞬时转染293T细胞是过表达蛋白并获得细胞内及细胞外(分泌的或膜)蛋白的便捷方式。因此本实验研究选取293T细胞作为质粒转染的宿主细胞。

本实验在体外通过CMV-hHCN2-3xHA-IRES-EGFP质粒成功转染293T细胞的方法构建生物起搏器, 经过RT-PCR、实时定量PCR、Western-blot方法检测提示hHCN2基因在mRNA和蛋白水平都有高表达, 在分子水平上证实了利用hHCN2构建生物心脏起搏器的可行性, 为进一步的生物起搏研究奠定了良好的实验基础。

致谢: 感谢同门闵锐同学在课题中给予的帮助!

### 4 参考文献

- [1] Baruscotti M, Robinson RB. Electrophysiology and pacemaker function of the developing sinoatrial node. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2007; 293(5):2613-2623.
- [2] Khan IA. Mechanisms of syncope and Stokes-Adams attacks in bradyarrhythmias: asystole and torsade de pointes. *Cardiology*. 2003;99(1):54.
- [3] Zalesskii VN, Dynnik OB. Molecular medicine: proteomic diagnostic technology and methods of molecular therapy in arrhythmology. *Lik Sprava*. 2005;(1-2):3-10.
- [4] Schram G, Pourrier M, Melnyk P, et al. Differential distribution of cardiac ion channel expression as a basis for regional specialization in electrical function. *Circ Res*. 2002;90(9):939-950.

- [5] Zong X, Stieber J, Ludwig A, et al. A single histidine residue determines the pH sensitivity of the pacemaker channel HCN2. *Biol Chem*. 2001; 276(9):6313-6319.
- [6] Li CH, Zhang Q, Teng B, et al. Src tyrosine kinase alters gating of hyperpolarization-activated HCN4 pacemaker channel through Tyr531. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2008; 294(1): C355-362.
- [7] Harzheim D, Pfeiffer KH, Fabritz L, et al. Cardiac pacemaker function of HCN4 channels in mice is confined to embryonic development and requires cyclic AMP. *EMBO J*. 2008; 27(4): 692-703.
- [8] Muto T, Ueda N, Ophof T, et al. Aldosterone modulates If current through gene expression in cultured neonatal rat ventricular myocytes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2007; 293(5):2710-2718.
- [9] Schweizer PA, Yampolsky P, Malik R, et al. Transcription profiling of HCN-channel isoforms throughout mouse cardiac development. *Basic Res Cardiol*. 2009; 104(6):621-629.
- [10] Qu J, Plotnikov AN, Danilo P Jr, et al. Expression and function of a biological pacemaker in canine heart. *Circulation*. 2003; 107(8):1106-1109.
- [11] Plotnikov AN, Sosunov EA, Qu J, et al. Biological pacemaker implanted in canine left bundle branch provides ventricular escape rhythms that have physiologically acceptable rates. *Circulation*. 2004; 109(4):506-512.
- [12] Ma J, Lin L, Quan XQ, et al. *Huazhong Keji Daxue Xuebao*. 2009; 38(3):291-295.  
马金, 林立, 全小庆, 等. mHCN2 基因修饰大鼠骨髓间充质干细胞用于构建生物起搏器的基础研究[J]. *华中科技大学学报*, 2009, 38(3):291-295.
- [13] Potapova I, Plotnikov A, Lu Z, et al. Human mesenchymal stem cells as a gene delivery system to create cardiac pacemakers. *Circ Res*. 2004; 94(7):952-959.
- [14] Li HX, Yang XJ, Zhao X, et al. *Zhonghua Xinxueguanbing Zazhi*. 2006; 34(10):917-921.  
李红霞, 杨向军, 赵欣, 等. 大鼠骨髓基质干细胞起搏电流基因的表达及转染人 HCN2 的表达及鉴定[J]. *中华心血管病杂志*, 2006, 34(10):917-921.
- [15] Niu P, Huang CX, Zhao YQ, et al. *Zhonghua Xinxueguanbing Zazhi*. 2006; 34(12):1126-1130.  
牛萍, 黄从新, 赵月强, 等. 重组起搏基因质粒构建生物起搏器的实验研究[J]. *中华心血管病杂志*, 2006, 34(12):1126-1130.
- [16] Yao YL, Zhang H, Huang SD, et al. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu*. 2009; 13(49):9673-9676.  
姚颖龙, 张浩, 黄盛东, 等. 超极化激活环化核苷酸门控通道基因转染猪骨髓间充质干细胞[J]. *中国组织工程研究与临床康复*, 2009, 13(49):9673-9676.
- [17] Francesco D. Funny channels in the control of cardiac rhythm and mode of action of selective blockers. *Pharmacol Res*. 2006; 3(5):399-406.
- [18] cili EA, Proenza C, Baruscotti M, et al. From funny current to HCN channels: 20 years of excitement. *News Physiol Sci*. 2002; 17:32-37.
- [19] Ludwig A, Zong X, Hofmann F, et al. Structure and function of cardiac pacemaker channels. *Cell Physiol Biochem*. 1999; 9(4/5):179-186.
- [20] Robinson RB, Siegelbaum SA. Hyperpolarization-activated cation currents: from molecules to physiological function. *Annu Rev Physiol*. 2003; 65:453-480.

#### 来自本文课题的更多信息--

**基金声明:** 云南省社会发展联合专项: 重组人起搏基因干细胞移植构建生物心脏起搏器的实验研究(2009CD191)。

**作者贡献:** 陶四明进行实验设计, 实验实施为李先花, 实验评估为张新金, 资料收集为李先花, 李先花成文, 李建美审校, 李建美对文章负责。

**利益冲突:** 课题未涉及任何厂家及相关雇主或其他经济组织直接或间接的经济或利益的赞助。

#### 文章概要:

**文章要点:** 通过检测被 HCN2 基因重组质粒转染的 293T 细胞中目的基因在核酸和蛋白质水平的表达, 为 HCN2 基因的起搏功能的研究做基础。

**关键信息:** 运用脂质体转染试剂进行转染, 并不干扰受体细胞的基因组成。

**研究的创新之处与不足:** 创新之处在于分别运用反转录 PCR 和实时荧光 PCR 检测目的基因在 mRNA 水平的表达。不足之处在于未进行转染后细胞功能学的检测。

**作者声明:** 文章为原创作品, 数据准确, 内容不涉及泄密, 无一稿两投, 无抄袭, 无内容剽窃, 无作者署名争议, 无与他人课题以及专利技术的争执, 内容真实, 文责自负。