

研究报告

# A 型流感病毒 H5N1 的 M2 离子通道稳定细胞株的建立

孙娟娟<sup>1,2</sup>, 李楚芳<sup>1</sup>, 徐伟<sup>1</sup>, 李志远<sup>1,3</sup>, 刘劲松<sup>1</sup>, 陈凌<sup>1,2</sup>

1 中国科学院广州生物医药与健康研究院, 广州 510663

2 中国科学技术大学 医药生物技术系, 合肥 230027

3 Department of Pharmacological and Physiological Science, Saint Louis University School of Medicine, St. Louis, Missouri 63104, USA

**摘要:** A 型流感病毒 H5N1 的 M2 离子通道 (H5M2) 基因经优化后由人工合成, 适合于哺乳动物细胞中表达。通过酶切克隆于 pcDNA4 质粒, 并在 HEK293 细胞中建立稳定细胞株。Western blotting 和免疫荧光证实 H5M2 在稳定细胞中只有在四环素诱导下才能表达, 并经膜片钳证实 HEK293 细胞中表达的 H5M2 具有 H<sup>+</sup>通道活性, 为 M2 离子通道功能的研究和 M2 离子通道阻断剂筛选方法的建立提供了参考。

**关键词:** 流感病毒, M2 离子通道, 四环素诱导

## Establish Stable Cell Line to Express M2 Ion Channel of Influenza a Virus H5N1

Juanjuan Sun<sup>1,2</sup>, Chufang Li<sup>1</sup>, Wei Xu<sup>1</sup>, Zhiyuan Li<sup>1,3</sup>, Jinsong Liu<sup>1</sup>, and Ling Chen<sup>1,2</sup>

1 Guangzhou Institute of Biomedicine and Health, Chinese Academy of Sciences (GIBH), Guangzhou 510663, China

2 Department of Biomedicine and Biotechnology, University of Science and Technology of China, Hefei 230027, China

3 Department of Pharmacological and Physiological Science, Saint Louis University School of Medicine, St. Louis, Missouri 63104, USA

**Abstract:** The M2 ion channel protein is an important target against influenza A virus. In this study, H5N1 influenza A virus M2 ion channel (H5M2) gene was cloned into pcDNA4 vector. The HEK293 stable cell line expressing H5M2 was successfully established. The expression of H5M2 ion channel protein was induced only by tetracycline and confirmed by immunofluorescence and Western blot. The ion channel activity of H5M2 was confirmed by whole cell patch-clamp recording. Fifty  $\mu\text{mol}$  per liter amantadine blocked the H5M2 channel conductance completely in HEK293 cells. This stable cell line may provide a model for screening inhibitors of M2 ion channel.

**Keywords:** influenza virus, M2 ion channel, induced by tetracycline

流感病毒引起急性病毒性呼吸道传染病, 特别是近年来出现的感染人的 H5N1 病毒株极大地危害人类健康, 给社会经济造成了巨大损失, 禽流感病毒 H5N1 属于 A 型流感病毒<sup>[1,2]</sup>。A 型流感病毒 M2 离子通道蛋白分布于流感病毒表面, 是由 97 个氨基

酸组成的跨膜蛋白, N 端在胞外, C 端在胞内。目前研究认为 M2 蛋白以二硫键相连而形成二聚体, 二聚体通过疏水作用在膜上形成具有离子通道活性的四聚体。M2 离子通道是抗流感药物的重要靶标, 金刚烷胺和金刚乙胺作为 A 型流感病毒 M2 离子通道

**Received:** April 14, 2008; **Accepted:** May 8, 2008

**Supported by:** Guangdong Natural Science Foundation (No. 06200872), the National Basic Research Program of China (No. 2005CB523008).

**Corresponding author:** Ling Chen. Tel: +86-20-32290600; E-mail: chen\_ling@gibh.ac.cn

广东省自然科学基金项目(No. 06200872), 国家重点基础研究发展计划(No. 2005CB523008)资助。

的特异阻断剂是第一类合成的抗流感药物, 在 A 型流感的预防与治疗中发挥了重要作用<sup>[3-5]</sup>。金刚烷胺耐药病毒株大量出现, 使得设计合成或从化合物库中筛选新型的对野生型和耐药型病毒均有效的 M2 离子通道阻断剂成为当前的热点<sup>[4-10]</sup>。但是目前还没有针对 M2 离子通道阻断剂的大规模筛选方法。膜片钳是研究离子通道的经典方法, 由于操作复杂, 技术要求高而不能广泛使用。本研究通过 pcDNA4 表达质粒在 HEK293 细胞中建立稳定细胞, 为建立 M2 离子通道阻断剂的高通量筛选方法奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 试剂与仪器

Amantadine(金刚烷胺)、tetracycline(四环素)、HRP 标记的羊抗鼠二抗、用于电生理实验的化合物均购自 Sigma-Aldrich(St. louis, MO, USA), HEK293Trex 细胞、Zeocin、pcDNA4 质粒购自 Invitrogen。FITC 标记的羊抗鼠二抗购自 Santa Cruz, 抗 M2 鼠多克隆血清为本实验室制备。主要仪器有: Leica 荧光显微镜、电流放大器(Axopatch 200B amplifier; Axon Instruments Inc., Union City, CA)、电极控制器(Model P-87; Sutter Instrument Company, Novato, CA)、内径 1.5 mm 的硼酸玻璃(Borosilicate pipettes; World Precision Instruments, Inc., Sarasota, FL)。

### 1.2 M2 离子通道蛋白表达质粒的构建

由于 A 型流感病毒的 M2 离子通道基因序列高度保守<sup>[10]</sup>, 以 H5N1 病毒株的 M2 离子通道蛋白的共有氨基酸序列(GenBank Accession No. AAV32638.1) 为模板, 经过密码子优化后<sup>[11,12]</sup>, 氨基酸序列不变, 但适合哺乳动物细胞内高水平表达。该基因序列由人工合成(广州复能基因有限公司), 命名为 H5M2, 通过 *Bam*H I 和 *Xba* I 酶切克隆于 pcDNA4 质粒, 该质粒在 HEK293 细胞中需在四环素的诱导下才能表达目的基因。A 型流感病毒的野生型 H5M2 基因序列(GenBank Accession No. AY627887)为:

5'-ATG AGT CTT CTA ACC GAG GTC GAA ACG CCT ACC AGA AAC GAA TGG GAG TGC AGA TGC AGC GAT TCA AGT GAT CCT ATT GTT GTT GCC GCA AAT ATC ATT GGG ATC TTG CAC TTG ATA TTG TGG ATT CTT GAT CGT CTT TTC TTC AAA TGC ATT TAT CGT CGC CTT AAA TAC GGT TTG AAA AGA GGG CCT GCT ACG

GCA GGG GTA CCT GAG TCT ATG AGG GAA GAG TAC CGG CAG GAA CAG CAG AGT GCT GTG GAT GTT GAC GAT GGT CAT TTT GTC AAC ATA GAA TTG GAG TAA-3';

合成的优化后的野生型 H5M2 基因序列为:

5'-ATG TCC CTG CTG ACA GAG GTG GAG ACC CCC ACC AGG AAT GAG TGG GAG TGC AGG TGC TCT GAC TCC TCT GAC CCC CTG GTG GTG GCT GCC TCC ATC ATT GGC ATC CTG CAT CTG ATC CTG TGG ATT CTG GAC AGG CTG TTC TTC AAG TGC ATC TAC AGG AGG CTG AAG TAT GGC CTG AAG AGG GGC CCT GCC ACA GCT GGC GTG CCT GAG TCC ATG AGG GAG GAG TAC AGG CAG GAG CAG CAG TCT GCT GTG GAT GTG GAT GAT GGC CAC TTT GTG AAC ATT GAG CTG GAG TAA-3' (深色部分为优化的碱基), 质粒 pcDNA4-H5M2 经过测序(TaKaRa)鉴定正确后进行表达鉴定并在 HEK293 细胞中建立稳定细胞。

### 1.3 建立 M2 离子通道的稳定细胞株

采用 Lipofectamine 2000 (Invitrogen)将质粒 pcDNA4-H5M2 及其空载体 pcDNA4 分别转染 HEK293-Trex 细胞(参考说明书), 48 h 后将细胞按 1:12 传代并加入 200  $\mu$ g/mL 的 Zeocin 进行克隆筛选。维持 200  $\mu$ g/mL 的 Zeocin 培养 3 周, 待单细胞克隆形成进行扩大培养鉴定。细胞在 37°C, 5%的 CO<sub>2</sub> 下培养, 培养基为含 10%胎牛血清 DMEM。

M2 离子通道蛋白表达 Western blotting 鉴定: 收集 H5M2 稳定细胞克隆经过 1  $\mu$ g/mL 四环素诱导<sup>[13]</sup> 24 h 后的细胞, 用上样缓冲液裂解, 并于 100°C 煮 10 min, 经 PAGE 电泳后用鼠抗 M2 离子通道蛋白抗体(1:1000 稀释)和 HRP 标记的羊抗鼠二抗进行 Western blotting 分析。为了观察 M2 离子通道蛋白的四聚体和二聚体形成情况, 可用不含还原剂的上样缓冲液裂解细胞进行电泳。本试验设置没有四环素诱导的对照及空载体稳定细胞对照。

M2 离子通道蛋白表达的免疫荧光鉴定: H5M2 稳定细胞接种在盖玻片上, 用 1  $\mu$ g/mL 四环素诱导 24 h<sup>[13]</sup>, 用 4°C 预冷的 4%多聚甲醛固定细胞 15 min, 接着按以下步骤顺序操作: PBS 洗 3 次, 0.1%Triton X-100 透膜 15 min, 用 5%的脱脂奶粉封闭过夜(4°C), 用 1:200 稀释的鼠抗 M2 孵育 2 h, 含 0.05% Triton X-100 的 PBS 洗 3 次, 每次 15 min, 接着用 1:500 稀释的 FITC 标记的羊抗鼠二抗孵育 1 h, 含 0.05% Triton X-100 的 PBS 洗 3 次, 每次 15 min, 用 Leica 荧光显

显微镜观察。

#### 1.4 H5M2 离子通道蛋白离子通道活性的测定

采用 AXON 200B 放大器, 在 23°C~25°C 下以全细胞记录方式记录通道电流<sup>[14,15]</sup>。用 Macintosh G4 电脑 (Apple Computer, Cupertino, CA) 和模数转换器 ITC-16 在 10 kHz 频率下采集电流信号, 数据用绘图软件 IGOR Pro (Wavemetrics, Lake Oswego, OR) 分析。

##### 1.4.1 缓冲液

pH 6.8 细胞外缓冲液: 150 mmol/L NaCl, 1 mmol/L MgCl<sub>2</sub>, 1 mmol/L CaCl<sub>2</sub>, 10 mmol/L glucose, 10 mmol/L HEPES; pH 5.5 细胞外缓冲液: 150 mmol/L NaCl, 1 mmol/L MgCl<sub>2</sub>, 1 mmol/L CaCl<sub>2</sub>, 10 mmol/L glucose, 10 mmol/L MES, 缓冲液的 pH 值用 HCl 或 NaOH 调节。

电极充灌液 (细胞内缓冲液): 130 mmol/L Cs-methanesulfonate, 24 mmol/L CsCl, 1 mmol/L CaCl<sub>2</sub>, 1 mmol/L MgCl<sub>2</sub>, 10 mmol/L HEPES, 200 μg/mL amphotericin B. 用 CsOH 调节 pH 至 6.8, 电极阻抗为 1.8 MΩ 至 2.5 MΩ。

##### 1.4.2 实验方法

H5M2 稳定细胞经 1 μg/mL 四环素诱导 24 h, 未诱导细胞作为对照。在 pH 6.8 缓冲液中 (含 10 μmol/L 的 amiloride 的 pH 6.8 缓冲液预处理细胞可消除细胞本身的质子电流) 将细胞钳制在 -30mV, 用快速换液系统 (RSC-200 Rapid solution changer) 将 pH 6.8 缓冲液更换为 pH 5.5 缓冲液, 记录电流。在金刚烷胺抑制试验中, 将一系列不同浓度的金刚烷胺加入 pH 6.8 缓冲液中, 并与细胞孵育至少 30 s, 更换为 pH 5.5 缓冲液后记录电流。

## 2 结果

### 2.1 H5M2 离子通道蛋白表达的鉴定

通过非还原性 PAGE 电泳和 Western blotting 鉴定表明, H5M2 的 HEK293 稳定细胞经四环素诱导表达后在细胞中以单体、二聚体、四聚体形式存在, 单体约 14 kD, 二聚体约为 28 kD, 四聚体约为 56 kD<sup>[16,17]</sup> (图 1)。

### 2.2 H5M2 免疫荧光鉴定

A 型流感病毒 M2 离子通道蛋白分布于流感病毒表面, 是由 97 个氨基酸组成的跨膜蛋白, 用鼠抗 H5M2 离子通道蛋白的抗体进行免疫荧光鉴定表明,

H5M2 主要表达于细胞膜上。图 2 中上图为荧光照片, 下图为普通光镜照片 (Leica, 放大倍数: 20×10)。

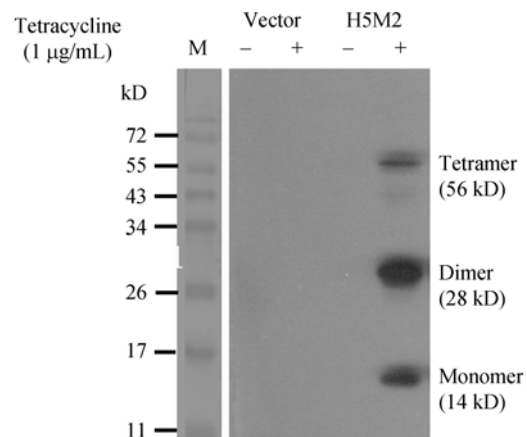


图 1 H5M2 离子通道稳定细胞的 Western blotting 鉴定  
Fig. 1 Detection of H5M2 ion channel protein in HEK293 cell by Western blotting

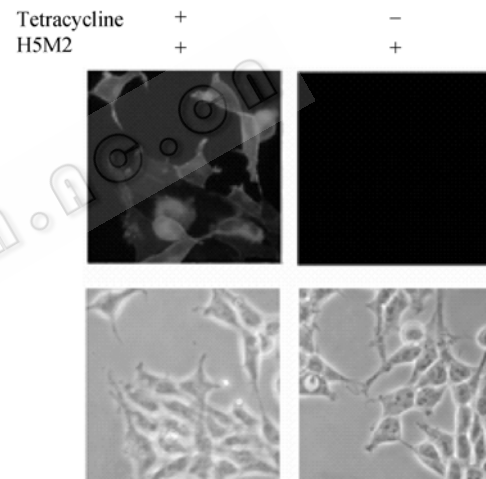


图 2 H5M2 表达的免疫荧光鉴定  
Fig. 2 Immunofluorescence detection of H5M2 expressing in HEK293 cell

### 2.3 H5M2 在 HEK293 细胞中离子通道活性

M2 离子通道在 pH 低于 6.2 时开放, H<sup>+</sup>从 M2 离子通道的 N 端向 C 端流动, 产生一个由胞外向胞内的电流。图 3 结果显示, 在 -40 mV 钳制细胞, 当胞外缓冲液由 pH 6.8 更换为 pH 5.5 的缓冲液时, 无 H5M2 表达的细胞的 H<sup>+</sup>电流为 0 (结果未列出), 而 H5M2 离子通道表达的细胞产生一个内向质子电流。50 μmol/L 的金刚烷胺能完全阻断 H5M2 离子通道介导的内向质子电流 (图 3A)。50 μmol/L 的金刚烷胺预处理的细胞用无金刚烷胺的缓冲液冲洗后不再具有抑制作用。在电极充灌液 (细胞内缓冲液) 中加入 50 μmol/L 的金刚烷胺不具有抑制作用, 表明金刚烷胺只能从

胞外作用于 H5M2 离子通道(结果未列出)。用不同浓度的金刚烷胺抑制 H5M2 离子通道, 数据用绘图软件 IGOR Pro (Wavemetrics, Lake Oswego, OR) 分析, 得到金刚烷胺抑制 H5M2 离子通道的  $IC_{50}$  值为  $4.18 \mu\text{mol/L}$  (图 3B)。

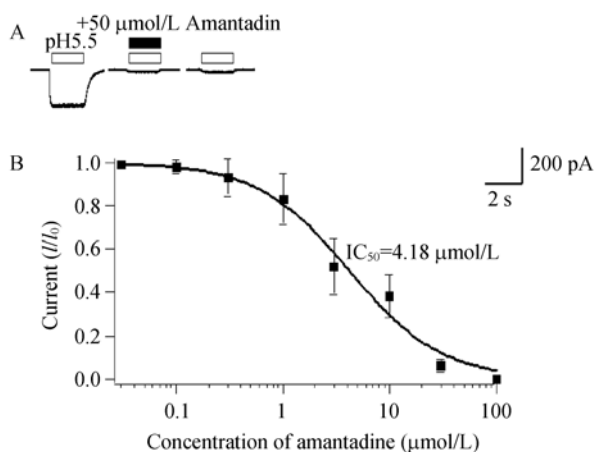


图 3 H5M2 离子通道活性

Fig. 3 Ion channel activity of H5M2

A: the ion channel activity of H5M2 was opened in pH 5.5;

B: the ion channel activity of H5M2 was inhibited by amantadine

### 3 讨论

M2 离子通道是研发抗流感病毒药物的重要靶标<sup>[4,5]</sup>。建立高效的 M2 离子通道阻断剂筛选方法是从化合物库中筛选新型的对野生型和耐药型病毒均有效的 M2 离子通道阻断剂的关键。A 型流感病毒 M2 离子通道蛋白在多种细胞中表达并用于其功能研究及阻断剂化合物分析<sup>[18-21]</sup>。由于 M2 蛋白具有离子通道活性, 在细胞中表达将对细胞造成损伤<sup>[20,22]</sup>, 特别是对细胞内的膜系结构功能造成影响, 这不利于建立持续表达的稳定细胞。目前大部分研究中, M2 离子通道表达质粒往往通过转染或注射进入细胞, 在真核细胞中瞬时表达用于 M2 离子通道的研究, 给 M2 离子通道蛋白的功能研究带来不便<sup>[21]</sup>。本研究通过将 H5M2 基因克隆于 pcDNA4 载体, 在 HEK293 细胞中建立诱导表达型稳定细胞。未经四环素诱导时基本上检测不到目的基因的表达, 经诱导后表达的 M2 离子通道蛋白主要存在于膜上, 而且经非还原性 PAGE 电泳和 Western blotting 证实, H5M2 离子通道以单体、二聚体、四聚体的形式存

在, 而四聚体是 M2 离子通道的活性结构。经膜片钳证实在 HEK293 细胞表达的 H5M2 具有 H<sup>+</sup>通道活性, 而且能被金刚烷胺抑制, 这一成功建立 H5M2 的 HEK293 稳定细胞为后续研究 M2 离子通道的功能及建立 M2 离子通道阻断剂的筛选方法奠定了基础。

### REFERENCES

- [1] Nicholson KG, Wood JM, Maria Z. Influenza. *Lancet*, 2003, **362**: 1733-1745.
- [2] Beigel JH. Avian influenza a (H5N1) infection in humans. *N Engl J Med*, 2005, **353**: 1374-1385.
- [3] Takeda M, Pekosz A, Shuck K, et al. Influenza A Virus M2 ion channel activity is essential for efficient replication in tissue culture. *J Virol*, 2002, **76**(3): 1391-1399.
- [4] De Clercq E. Strategies in the design of antiviral drugs. *Nature Rev Drug Discov*, 2002, **1**: 13-25.
- [5] De Clercq E. Antiviral agents active against influenza A viruses. *Nat Rev Drug Discov*, 2006, **5**(12): 1015-1025.
- [6] Ilyushina NA, Govorkova EA, Webster RG. Detection of amantadine-resistant variants among avian influenza viruses isolated in North America and Asia. *Virology*, 2005, **341**(1): 102-106.
- [7] Weinstock DM, Zuccotti G. Adamantane resistance in Influenza A. *J Am Med Assoc*, 2006, **22**, **295**(8): 934-936.
- [8] He G, Qiao J, Dong C, He C, et al. Amantadine-resistance among H5N1 avian influenza viruses isolated in Northern China. *Antiviral Res*, 2008, **77**(1): 72-76.
- [9] Hurt AC, Selleck P, Komadina N, et al. Susceptibility of highly pathogenic A(H5N1) avian influenza viruses to the neuraminidase inhibitors and adamantanes. *Antiviral Res*, 2007; **73**(3): 228-231. Epub 2006 Nov 10.
- [10] Pinto LH, Lamb RA. Influenza virus proton channels. *Photochem Photobiol Sci*, 2006, **5**(6): 629-632.
- [11] Ramakrishna L, Anand KK, Mohankumar KM, et al. Codon optimization of the tat antigen of human immunodeficiency virus type 1 generates strong immune responses in mice following genetic immunization. *J Virol*, 2004, **78**(17): 9174-9189.
- [12] Mechold U, Gilbert C, Ogryzko V. Codon optimization of the BirA enzyme gene leads to higher expression and an improved efficiency of biotinylation of targetproteins in mammalian cells. *J Biotechnol*, 2005, **116**: 245-249.
- [13] Bandyopadhyay B, Li GB, Yin HS, et al. Tau aggregation and toxicity in a cell culture model of tauopathy. *J Biol Chem*, 2007, **282**(22): 16454-16464.
- [14] Wang C, Takeuchi K, Pinto LH, et al. Ion channel activity of influenza A virus M2 protein: characterization of the amantadine block. *J Virol*, 1993, **67**(9): 5585-5594.
- [15] Li Z, Migita K, Samways DS, et al. Gain and loss of channel function by alanine substitutions in the transmembrane

- segments of the rat ATP-gated P2X2 receptor. *J Neurosci*, 2004, **24**(33): 7378–7386.
- [16] Holsinger LJ, Shaughnessy MA, Micko A, *et al.* Analysis of the posttranslational modifications of the influenza virus M2 protein. *J Virol*, 1995, **69**(2): 1219–1225.
- [17] Veit M, Klenk HD, Kendal A, *et al.* The M2 protein of influenza A virus is acylated. *J Gen Virol*, 1991, **72**: 1461–1465.
- [18] Black RA, Rota PA, Gorodkova N, *et al.* Antibody response to the M2 protein of influenza A virus expressed in insect cells. *J Gen Virol*, 1993, **74**(Pt 1): 143–146.
- [19] Guinea R, Carrasco L. Influenza virus M2 protein modifies membrane permeability in *E. coli* cells. *FEBS Lett*, 1994, **343**(3): 242–246.
- [20] Kurtz S, Luo G, Hahnenberger KM, *et al.* Growth impairment resulting from expression of influenza virus M2 protein in *Saccharomyces cerevisiae*: identification of a novel inhibitor of influenza virus. *Antimicrob Agents Chemother*, 1995, **39**(10): 2204–2209.
- [21] Giffin K, Rader RK, Marino MH, *et al.* Novel assay for the influenza virus M2 channel activity. *FEBS Lett*, 1995, **357**(3): 269–274.
- [22] Ilyinskii PO, Gabai VL, Sunyaev SR, *et al.* Toxicity of influenza A virus matrix protein 2 for mammalian cells is associated with its intrinsic proton-channeling activity. *Cell Cycle*, 2007, **6**(16): 2043–2047.



## 2009 年中科院微生物所期刊联合编辑部联合征订全面启动



《微生物学报》月刊(每月 4 日出版), 单价 55.00 元, 全年定价 660 元。刊号: ISSN 0001-6209; CODEN WSHPA8。国内邮发代号: 2-504; 国外邮发代号: BM67。



《生物工程学报》月刊(每月 25 日出版), 单价 65.00 元, 全年定价 780 元。刊号: ISSN 1000-3061; CODEN SGXUED。国内邮发代号: 82-13; 国外邮发代号: BM5608。



《微生物学通报》月刊(每月 20 日出版), 单价 48.00 元, 全年定价 576 元。刊号: ISSN 0253-2654; CODEN WSWPDI。国内邮发代号: 2-817; 国外邮发代号: BM413。



《菌物学报》双月刊(单月 15 日出版), 单价 80.00 元, 全年定价 480 元。刊号: ISSN 1672-6472, CODEN JXUUAЕ。国内邮发代号: 2-499; 国外邮发代号: Q723。

欢迎广大读者直接与本刊发行部联系订购, 我们将按期免费为您邮寄

汇款地址: (100101)北京市朝阳区大屯路中科院微生物所 B401

收信人: 《 》编辑部; 电话: (010)64807521; E-mail: bjb@im.ac.cn

请在附言处注明“订刊费”及所订期刊名称、年代、卷、期和数量

欲知详细信息请查看如下网址: <http://journals.im.ac.cn>