

# 稳定抑制 *TRPM2* 基因表达肺微血管 内皮细胞系的构建与鉴定

梁亭<sup>2</sup> 李珮瑶<sup>1</sup> 罗强<sup>2</sup> 王少华<sup>1</sup> 李军<sup>2</sup> 徐明举<sup>1</sup> 张瑞华<sup>1</sup> 徐彤<sup>1,2\*</sup>

(<sup>1</sup>河北北方学院预防兽医学重点实验室, 张家口 075000; <sup>2</sup>河北北方学院生命科学研究中心, 张家口 075000)

**摘要** 应用短发卡RNA(shRNA)慢病毒表达载体感染小鼠肺微血管内皮细胞(PMVEC), 对其M2型瞬时受体电位(*TRPM2*)基因进行干扰, 以建立稳定shRNA *TRPM2* PMVEC细胞株。结果表明, 正常PMVEC对胰酶的最大耐受浓度和嘌呤霉素最小致死剂量分别为0.4 μg/mL和0.6 μg/mL; 然后加入0.6、2.0、4.0、8.0 μg/mL嘌呤霉素筛选稳定抑制*TRPM2*表达的shRNA *TRPM2* PMVEC株, 结果在嘌呤霉素达到8 μg/mL时该细胞株仍细胞生长良好; Semi-quantitative PCR和Western blot对获得阳性细胞株进行*TRPM2*基因和蛋白表达的检测显示, shRNA *TRPM2*阳性PMVEC的*TRPM2*基因和蛋白表达相对量显著低于阴性对照和正常对照组( $P < 0.01$ )。该研究通过shRNA慢病毒载体成功建立了稳定shRNA *TRPM2* PMVEC细胞株, 为进一步开展*TRPM2*在流感病毒诱导肺微血管内皮细胞损伤的作用机制奠定了基础。

**关键词** shRNA; M2型瞬时受体电位离子通道; PMVEC; 慢病毒载体

## Construction and Verification of a Mouse Pulmonary Microvascular Endothelial Cell Lines to Inhibit *TRPM2* Gene Expression with shRNA Lentivirus System

Liang Ting<sup>2</sup>, Li Peiyao<sup>1</sup>, Luo Qiang<sup>2</sup>, Wang Shaohua<sup>1</sup>, Li Jun<sup>2</sup>, Xu Mingju<sup>1</sup>, Zhang Ruihua<sup>1</sup>, Xu Tong<sup>1,2\*</sup>

(<sup>1</sup>Key Laboratory of Preventive Veterinary Medicine, Department of Veterinary Medicine, Animal Science College, Hebei North University, Zhangjiakou 075000, China; <sup>2</sup>Life Science Research Center, Hebei North University, Zhangjiakou 075000, China)

**Abstract** To construct and verify transient receptor potential melastatin-2 (*TRPM2*) gene silencing of mouse pulmonary microvascular endothelial cell (PMVEC), the PMVEC was infected by short hairpin RNA (shRNA) *trpm2* lentivirus particles. The results showed that the maximal tolerance concentration of TPCK-trypsin to PMVEC was 0.4 μg/mL and minimal lethal dose of puromycin dihydrochloride to PMVEC was 0.6 μg/mL, respectively. The stable clones expressing the shRNA *TRPM2* were selected by adding 0.6, 2.0, 4.0, 8.0 μg/mL puromycin dihydrochloride to kill the non-transduced PMVEC, and there was no effect on PMVEC of the stable clones expressing shRNA *TRPM2* even the puromycin dihydrochloride concentration reach to maximal 8 μg/mL. The result of Semi-quantitative PCR showed that the *TRPM2* gene was silenced significantly in shRNA *TRPM2* cell compared to shRNA control and uninfected PMVEC ( $P < 0.01$ ). Similarly, the protein expression of shRNA *TRPM2* PMVEC was also decreased markedly compared with shRNA control and PMVEC group ( $P < 0.01$ ). The shRNA *TRPM2* PMVEC cell line was successfully constructed by shRNA *TRPM2* lentivirus particles and lie the

收稿日期: 2018-10-15

接受日期: 2019-01-16

国家自然科学基金(批准号: 31672522、31602030)、河北省第二期农业现代化产业体系瘦肉鸡创新团队专项经费(批准号: HBCT2018150207)资助的课题  
\*通讯作者。Tel: 0313-4029358, E-mail: xutong1969@sohu.com

Received: October 15, 2018

Accepted: January 16, 2019

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.31672522, 31602030) and the Earmarked Fund for Hebei Layer-Broiler Innovation Team of Modern Agro-industry Technology Research System (Grant No.HBCT2018150207)

\*Corresponding author. Tel: +86-313-4029358, E-mail: xutong1969@sohu.com

网络出版时间: 2019-04-01 13:46:24

URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20190401.1346.026.html>

foundation for further to investigate the mechanism of TRPM2 on PMVEC damage infected by influenza virus.

**Keywords** short hairpin RNA; transient receptor potential melastatin 2; pulmonary microvascular endothelial cell; lentivirus particles

TRPM2(transient receptor potential melastatin 2, TRPM2)是瞬时受体电位超家族中M亚家族成员之一,作为氧化应激敏感性传感器TRPM2介导氧化应激引起的细胞内Ca<sup>2+</sup>浓度升高,参与多种细胞的生理/病理过程,因此,TRPM2可作为氧化应激相关性疾病一个潜在的治疗靶点<sup>[1]</sup>。Hecquet等<sup>[2]</sup>的研究表明,TRPM2离子通道在H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>作用下导致细胞质内Ca<sup>2+</sup>浓度增加,同时,通过不同方法抑制内源性TRPM2的表达和功能,有效地缓解了氧化应激导致的血管内皮细胞损伤。因此,TRPM2离子通道可能是氧化应激导致血管内皮细胞进一步损伤的重要途径之一。

研究证实,H5N1禽流感病毒感染致小鼠肺损伤与活性氧类自由基有关<sup>[3-4]</sup>。同时,研究人员在研究H9N2猪源性流感病毒(H9N2-SIV)感染致小鼠肺损伤机制时亦发现,氧化应激是导致急性肺损伤发生的重要原因之一<sup>[5-7]</sup>。因此,氧化应激损伤在流感病毒感染致急性肺损伤中起着非常重要的作用。肺微血管内皮细胞(pulmonary microvascular endothelial cell, PMVEC)和肺泡上皮细胞是维持肺PMVEC屏障结构和功能完整的主要成分和结构基础。各种因素引起PMVEC损伤,进而导致急性肺损伤的发生,因此,PMVEC损伤成为急性肺损伤的中心环节。目前研究证实,PMVEC也是流感病毒复制的重要靶细胞之一。Zeng等<sup>[8]</sup>报道,人PMVEC支持高致病禽流感H5N1病毒复制,并认为其可能与H5N1病毒的致病机制有关。张增峰等<sup>[9]</sup>实验证实,H9N2病毒也可以在人肺组织内增殖。同时,人工感染的实验动物及人类患者肺病理组织学损伤特征为弥漫性肺泡损伤,PMVEC损伤可能是流感病毒引起急性肺损伤的重要环节之一。以上研究表明,TRPM2在流感病毒诱导氧化应激导致PMVEC损伤及肺损伤中可能发挥重要作用,但目前文献中未见相关报道,因此,本研究拟通过RNA干扰技术,建立小鼠shRNA TRPM2 PMVEC细胞株,为进一步阐明TRPM2在流感病毒诱导PMVEC损伤中的作用机制奠定基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

Pricells-小鼠肺微血管内皮细胞(PMVEC)购

自上海拜力生物科技有限公司;TRPM2 shRNA (m) Lentiviral Particles、Control shRNA Lentiviral Particles、Puromycin dihydrochloride和Polybrene等购自美国Santa Cruz Biotechnology公司;DMEM-H购自Gibco公司;FBS购自Corning公司;TPCK-胰蛋白酶、GAPDH、BCA蛋白定量试剂盒、ECL试剂盒购自南京凯基生物技术有限公司;Anti-TRPM2抗体购自Abcam公司;goat anti rabbit IgG购自Invitrogen公司。

### 1.2 方法

1.2.1 PMVEC培养 将PMVEC细胞使用DMEM-H培养基,含10% FBS,培养基中含L-谷氨酰胺、丙酮酸钠、青链霉素,培养至对数生长期使用。

1.2.2 TPCK-胰蛋白酶浓度对PMVEC生长的影响 将对数生长期的PMVEC细胞收集计数,调整浓度至 $5 \times 10^4$ 个/mL,接种于96孔板中,每孔100  $\mu$ L,37  $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub>条件下过夜培养,细胞贴壁后,使用培养基配制TPCK-胰蛋白酶,浓度为0、0.1、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0、1.2、1.4、1.6、1.8、2.0  $\mu$ g/mL,共12个浓度,将96孔板中的上清弃掉,更换为不同浓度的胰酶培养基继续培养,每个浓度设置4个重复孔,分别于24 h和48 h显微镜下观察细胞生长状态。

1.2.3 嘌呤霉素对PMVEC致死浓度的确定 由于shRNA TRPM2 PMVEC阳性细胞对嘌呤霉素具有抗性,因此在阳性细胞筛选时需要在细胞中加入嘌呤霉素以杀死未转染的细胞,因此,本研究首先确定嘌呤霉素对正常PMVEC的致死浓度。试验中将对数生长期的PMVEC细胞收集计数,调整浓度至 $5 \times 10^4$ 个/mL,接种于96孔板中,每孔100  $\mu$ L,37 $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub>条件下过夜培养,细胞贴壁后,使用培养基配制嘌呤霉素,浓度为0、0.1、0.2、0.4、0.6、0.8  $\mu$ g/mL,共6个浓度,将96孔板中的上清弃掉,更换为不同浓度的嘌呤霉素培养基继续培养,每个浓度设置4个重复孔,分别于24 h和48 h显微镜下观察细胞生长状态。

1.2.4 shRNA慢病毒转染 将PMVEC培养至对数生长期,收集并计数,将浓度调整至 $2 \times 10^4$ 个/mL,接种于12孔板中,每孔500  $\mu$ L,补500  $\mu$ L完全培养基,使每孔培养基体积为1 mL,37  $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub>条件下

孵育过夜,使细胞贴壁后的密度为20%,第2天将孔中的培养液弃除,更换为含有Polybrene(浓度为5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )的培养基,每孔1 mL。室温下融化阳性和阴性对照慢病毒颗粒,轻轻混匀后,在12孔板培养基中加入慢病毒,阴性和阳性各设置3个体积,分别为10、20、40  $\mu\text{L}$ ,每种体积设置4个重复孔,37  $^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$ 条件下过夜培养后,镜下观察细胞,将孔中培养基弃掉,更换为不含Polybrene的完全培养基,每孔1 mL,继续培养24 h。镜下观察细胞,此时孔中细胞明显增殖,状态良好;再次将孔中培养基弃掉,每孔加入500  $\mu\text{L}$ 胰酶/EDTA消化液,将2个重复孔中的细胞收集后,平均分配至6孔板中的3个孔中,继续培养。待6孔板细胞密度长满时,转移至细胞培养瓶中继续培养。

**1.2.5 shRNA TRPM2 PMVEC阳性细胞的筛选** 将转染好慢病毒的细胞(shRNA-control和shRNA TRPM2 PMVEC)分别加入含嘌呤霉素(0.6  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )培养基,以去除未成功转染慢病毒的细胞,上述培养基每天换液1次,连续3次,将嘌呤霉素浓度提高至2.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ,继续培养72 h;将培养基更换为含嘌呤霉素(4.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )的培养基继续培养48 h;然后用8.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 嘌呤霉素筛选1周,以获得稳定shRNA TRPM2 PMVEC细胞株。

**1.2.6 Semi-quantitative PCR检测转染后PMVEC TRPM2基因的表达** 收获shRNA TRPM2 PMVEC,在细胞培养板中,不同处理作用后,将相同数量细胞移入离心管内1 500 r/min离心5 min去上清液,倒置控干,加入Trizol液混匀,静置5 min,加入氯仿振荡,冰上静置5 min,12 000  $\times\text{g}$ 离心15 min,将上层无色水相移入另一离心管内,加入等体积异丙醇12 000  $\times\text{g}$ 离心10 min,加入75%乙醇洗涤RNA沉淀,DEPC水重悬RNA沉淀,RNA浓度要求 $D_{260}/D_{280}$ 大于2.0。用Promega公司提供的Reverse Transcription System试剂盒进行总RNA逆转录合成cDNA;Semi-quantitative PCR反应,参考设计的TRPM2引物为F: 5'-GGC ACC UUU AUA UCA UUA ATT-3', R: 5'-UUA AUG AUA UAA AGG UGC CTT-3'; GAPDH的引物为F: 5'-GTG GAG TCA TAC TGG AAC ATG TAG-3', R: 5'-AAT GGT GAA GGT CGG TGT G-3'。加入上述引物,95  $^{\circ}\text{C}$  10 s和55  $^{\circ}\text{C}$  40 s为一个循环,共进行40个循环。在55  $^{\circ}\text{C}$ 条件下检测荧光信号,检测熔解度曲线。

**1.2.7 Western blot检测转染后PMVEC TRPM2蛋白的表达** 收获稳定细胞株,细胞裂解液冰上裂解60 min;然后4  $^{\circ}\text{C}$ 、12 000 r/min离心5 min取上清,BCA进行蛋白定量。加入5 $\times$ loading buffer,沸水煮10 min,得到蛋白样品。将制备好的蛋白样品进行SDS-PAGE凝胶电泳;80 mA恒流4 h,将蛋白从凝胶中转移至PVDF膜上;TBST溶液配制的5%脱脂奶粉室温封闭60 min;Anti-TRPM2抗体(1:300稀释)和GAPDH抗体(1:1 000稀释)于4  $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜;TBS溶液洗2次,再用TBST溶液洗1次,每次10 min;二抗室温孵育1 h;TBS溶液洗2次,再用TBST溶液洗1次,每次10 min;ECL显色系统显影检测目的蛋白。

### 1.3 数据统计

实验数据以 $\text{mean}\pm\text{S.D.}$ 形式表示,显著性差异分析用SPSS 11.5软件进行。 $P<0.05$ 为差异具有显著意义, $P<0.01$ 为差异具有极显著意义。

## 2 结果

### 2.1 胰酶浓度对正常PMVEC生长的影响

PMVEC细胞培养至对数生长期,在浓度为 $5\times 10^4$ 个/mL细胞培养液中液加入不同浓度TPCK-胰蛋白酶,培养至24 h,从0.4  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 组细胞开始部分PMVEC出现停止增殖、逐渐变圆、肿胀死亡、从孔底脱离等现象;在胰酶浓度为0.6  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上组,PMVEC大量死亡脱落,其损伤与TPCK-胰蛋白酶浓度的增加和培养时间的延长呈正相关。培养至48 h时,0.4  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 组细胞尽管在24 h时观察时有少量细胞发生损伤,但是由于细胞的增殖量多余损伤的量,因而呈现细胞增多现象;0.6  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上组细胞逐渐肿胀、变圆并大量死亡脱落(图1)。因0.2  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 组在24 h和48 h时对细胞生长没有影响,0.4  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 组在24 h时对细胞生长有一定影响,但培养至48 h时则对细胞生长没有影响。我们综合考虑胰酶对病毒的裂解以及细胞的生长影响,最终确定使用0.3  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 胰酶浓度作为最佳浓度。

### 2.2 嘌呤霉素对PMVEC致死浓度的确定

正常PMVEC细胞培养液加入不同浓度嘌呤霉素后,从0.4  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 组细胞开始出现停止增殖、死亡,细胞从孔底脱离;细胞损伤程度与嘌呤霉素浓度的增加呈正相关。当嘌呤霉素达到0.6  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ,细胞开始大量死亡;当嘌呤霉素浓度为0.8  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时,细胞培养至24 h,90%的正常PMVEC死亡。



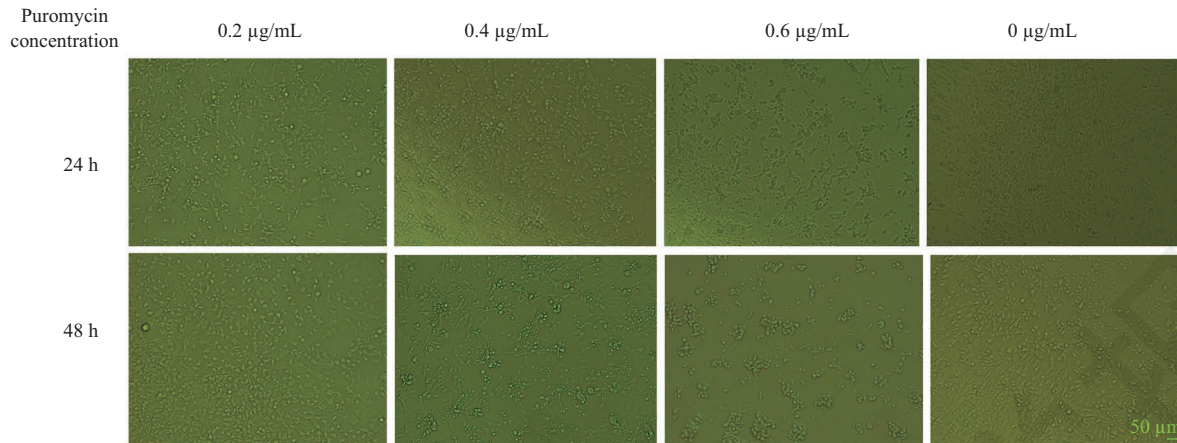


图1 不同TPCK-胰蛋白酶浓度对PMVEC生长的影响

Fig.1 The effect of different concentration of TPCK-trypsin on PMVEC growth

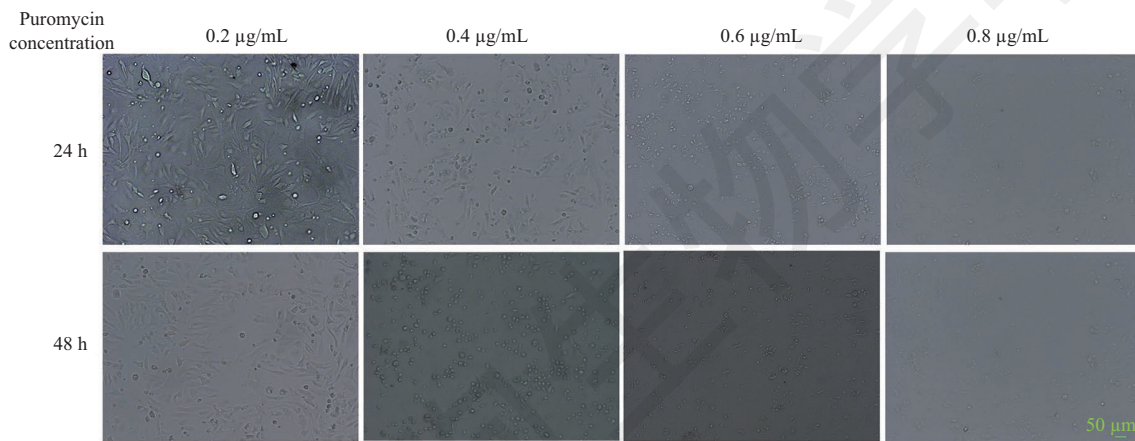


图2 嘌呤霉素对PMVEC的影响

Fig.2 The effect of puromycin dihydrochloride on PMVEC

### 2.3 shRNA TRPM2阳性PMVEC对嘌呤霉素耐受性

在转染后的shRNA TRPM2 PMVEC中, 为保证去除未转染PMVEC, 在培养基中加入2  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的嘌呤霉素作用24 h后, 镜下观察, PMVEC组开始出现死亡细胞, 而shRNA阴性对照和shRNA TRPM2阳性组中, 细胞明显增殖, 未受到嘌呤霉素影响。嘌呤霉素作用48 h后, PMVEC对照组细胞绝大部分细胞死亡, shRNA阴性对照和shRNA TRPM2阳性组中PMVEC明显增殖, 未受嘌呤霉素影响(图3)。将shRNA和shRNA TRPM2组细胞传代后依次更换为含有4  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 和8  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 嘌呤霉素的培养基, 继续培养, 细胞生长均未受影响; 即使在浓度为8  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 嘌呤霉素的培养基条件下继续培养1周后, 细胞未出现死亡, 增殖明显。因此, 该转染细胞为稳定TRPM2基因沉默的PMVEC细胞株。

### 2.4 Semi-quantitative PCR的检测转染后阳性PMVEC TRPM2基因的表达

选择GAPDH为校准基因, 所有样本进行3个重复, 计算 $-\Delta\Delta C_t$ 值, 以平均相对含量 $=2^{-\Delta\Delta C_t}$ 计算TRPM2基因的相对含量, 依此数据做图4。实时定量PCR结果显示, 未转染的正常PMVEC TRPM2相对含量最高, 其相对值为6.4; 慢病毒感染shRNA阴性对照组中TRPM2相对含量为5.7, 两组比较没有显著性差异( $P>0.05$ ); 而慢病毒感染shRNA TRPM2阳性PMVEC TRPM2相对含量为仅为1.2, 与前两组相比具有显著差异( $P<0.01$ )(图4)。

### 2.5 Westren blot检测shRNA TRPM2 PMVEC TRPM2蛋白的表达

Westren blot检测结果显示, 正常PMVEC组在分子量为171 kDa附近出现明显的条带; 同样, 慢病毒感染的shRNA阴性对照组在同样位置也出现一

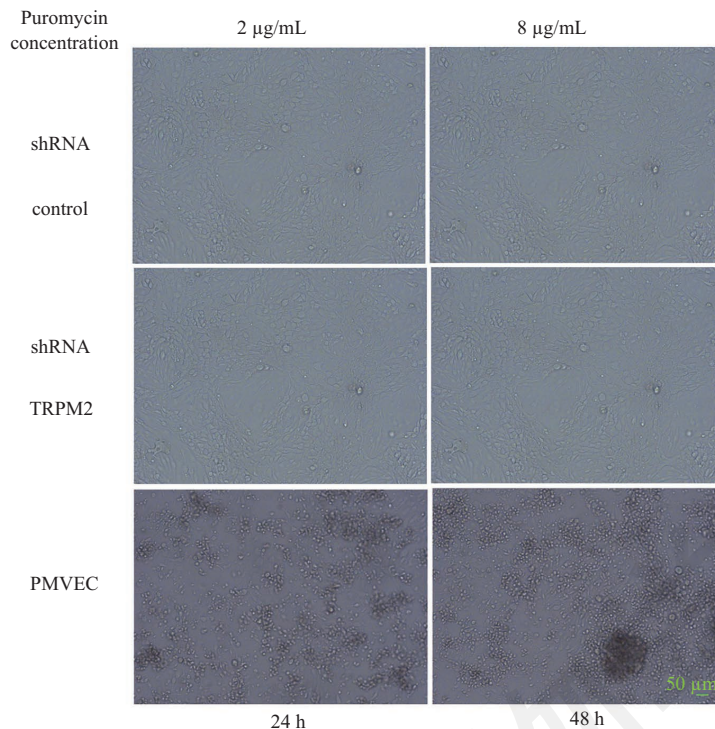


图3 嘌呤霉素筛选稳定表达shRNA TRPM2 PMVEC阳性细胞株  
Fig.3 The selection of stable clones expressing shRNA TRPM2 PMVEC by different concentration of puromycin dihydrochloride

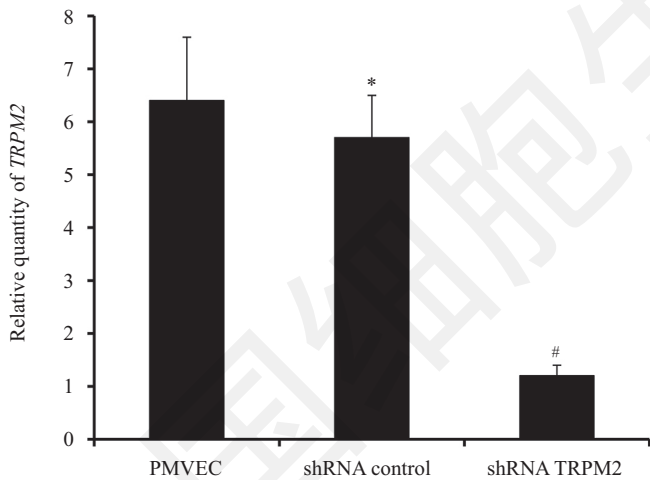


图4 Semi-quantitative PCR检测shRNA TRPM2 PMVEC中TRPM2基因的表达  
Fig.4 The gene expression of TRPM2 in shRNA TRPM2 PMVEC by Semi-quantitative PCR

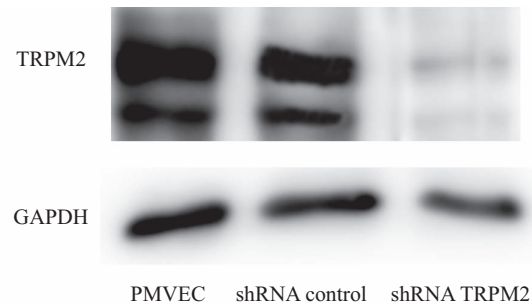


图5 shRNA TRPM2 PMVEC TRPM2蛋白的表达  
Fig.5 The protein expression of TRPM2 in shRNA TRPM2 PMVEC by Western blot

条明显的条带; 与上述两组比较, shRNA TRPM2阳性PMVEC则未见明显的条带。实验中所用TRPM2一抗为多克隆抗体, 故显示不是单一条带(图5)。

### 3 讨论

1995年首次发现RNA干扰现象, 1998年该现象被证实并被应用, 其中, shRNA慢病毒载体因具有转

染效率高的优点被广泛应用<sup>[10-11]</sup>。靳俊杰等<sup>[12]</sup>利用构建shRNA慢病毒载体对赖氨酸乙酰转移酶进行RNA干扰研究其对乳腺癌细胞的抑制功能。吴锦艳等<sup>[13]</sup>利用慢病毒表达技术建立稳定表达抑制繁殖呼吸综合病毒(PPRSV)的shRNA的Marc-145阳性细胞株, 研究抑制PPRSV的关键基因的干扰效果。

自从1997年以来, 不同的动物源性流感病毒,



如H5N1、H7N9以及H9N2等亚型流感病毒感染人类并导致致死性病例,其导致PMVEC损伤为中心的急性肺损伤以及急性呼吸窘迫综合征在其致病机制中占有重要作用<sup>[3-4,14]</sup>。因此,本研究通过shRNA慢病毒转染技术建立稳定shRNA TRPM2阳性PMVEC细胞株,沉默TRPM2基因,探讨TRPM2在猪源性H9N2流感病毒诱导PMEVC损伤的作用机制。鉴于低致病性流感病毒在复制过程中需要外源性胰蛋白酶帮助其裂解血凝素才能在体外培养细胞内增殖,因此,本研究在后续研究流感病毒感染致PMVEC损伤过程需要加入外源性胰酶,但是不同细胞对胰酶的耐受性不同,故本研究首先探讨TPCK-胰蛋白酶浓度对正常及转染后PMVEC生长的影响以便为后续开展流感病毒对PMVEC损伤的研究奠定基础。首先在前期筛选小鼠PMVEC培养的最佳条件的基础上,确定TPCK-胰蛋白酶以及嘌呤霉素影响正常未转染PMVEC生长的最大浓度和致死作用的最小浓度。研究显示,PMVEC对胰酶耐受浓度为0.3 μg/mL。根据Santa Cruz Biotechnology实验技术方案,shRNA TRPM2阳性细胞株在2~10 μg/mL作用下对嘌呤霉素具有明显的抗性,其生长不受其影响,但该浓度的嘌呤霉素能够完全杀死未转染的细胞。本研究表明,0.4 μg/mL的嘌呤霉素即可影响PMVEC的正常生长。用shRNA技术基因沉默的PMEVC可耐受嘌呤霉素的浓度为8 μg/mL,在上述浓度的嘌呤霉素作用下,PMEVC培养至144 h时,其生长和增殖未影响。

通过Semi-quantitative PCR检测shRNA TRPM2 PMVEC表达情况,结果表明,TRPM2基因表达相对量明显低于PMVEC和shRNA阴性对照组;Western blot检测TRPM2蛋白表达也证实该阳性PMVEC细胞株TRPM2蛋白表达明显低于正常PMVEC和shRNA阴性对照的PMVEC。以上结果显示,本研究成功建立了稳定表达的shRNA TRPM2 PMVEC细胞株。

TRPM2作为氧化应激敏感性传感器介导氧化应激引起的细胞内Ca<sup>2+</sup>浓度升高,参与多种细胞的生理/病理过程<sup>[1]</sup>。Yamamoto等发现<sup>[15]</sup>,H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>通过TRPM2活化Ca<sup>2+</sup>依赖性络氨酸激酶Pyk2引起Ca<sup>2+</sup>内流,导致Ras GTPase放大Erk信号通路,证实TRPM2离子通道是活性氧类自由基进一步引起炎性反应的重要级联信号通路之一。TRPM2离子通道介导的Ca<sup>2+</sup>内流可以调控氧化物诱导趋化因子产生的信号

级联反应,反馈性增加嗜中性粒细胞对内皮细胞的黏附和ROS的产生,进而导致内皮细胞炎症和损伤加重,血管渗出性增强<sup>[15]</sup>。此外,Hecquet等<sup>[16]</sup>证实,氧化应激过程中抑制TRPM2介导的Ca<sup>2+</sup>内流可以减缓内皮细胞凋亡进而缓解血管损伤和炎症反应。同时,某些病毒感染可激活细胞钙信号通路而引发病理生物学反应。在研究H5N1禽流感病毒致病机制时,Ueda等<sup>[17]</sup>发现,H5N1禽流感病毒可以诱导细胞外Ca<sup>2+</sup>内流增加,导致细胞凋亡发生和线粒体功能异常。同时,这种现象在H5N1病毒感染肺泡上皮细胞和血管内皮细胞也存在<sup>[17-18]</sup>。因此,为了有效探讨TRPM2在相关疾病中的作用机制,目前已经建立一些shRNA TRPM2细胞株,如H-SY5Y神经细胞株和人舌鳞状细胞癌SCC9细胞系<sup>[19-20]</sup>,但是目前未见shRNA TRPM2 PMVEC细胞株。本研究成功建立了shRNA TRPM2 PMVEC细胞株,为今后有效开展TRPM2离子通道在动物源性流感病毒以及其他致病因素诱导的肺损伤机理奠定基础。

### 参考文献 (References)

- 1 Ru XC, Yao XQ. TRPM2: a multifunctional ion channel for oxidative stress sensing. *Acta Physiologica Sinica* 2014; 66(1): 7-15.
- 2 Hecquet CM, Malik AB. Role of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-activated TRPM2 calcium channel in oxidant-induced endothelial injury. *Thromb Haemost* 2009; 101(4): 619-25.
- 3 He GM, Dong CG, Luan Z, Mcallan BM, Xu T, Zhao LH, *et al.* Oxygen free radical involvement in acute lung injury induced by H5N1 virus in mice. *Influenza Other Resp* 2013; 7(6): 945-53.
- 4 Imai Y, Kuba K, Neely GG, Yaghubianmalhami R, Perkmann T, Van GL, *et al.* Identification of oxidative stress and Toll-like receptor 4 signaling as a key pathway of acute lung injury. *Cell* 2008; 133(2): 235-49.
- 5 Zhang RH, Li CH, Wang CL, Xu MJ, Xu T, Wei D, *et al.* N-acetyl-l-cystine (NAC) protects against H9N2 swine influenza virus-induced acute lung injury. *Int Immunopharmacol* 2014; 22(1): 1-8.
- 6 Xu MJ, Liu B J, Wang CL, Wang GH, Tian Y, Wang SH, *et al.* Epigallocatechin-3-gallate inhibits TLR4 signaling through the 67-kDa laminin receptor and effectively alleviates acute lung injury induced by H9N2 swine influenza virus. *Int Immunopharmacol* 2017; 52: 24-33.
- 7 Xu T, Wang CL, Zhang RH, Xu MJ, Liu BJ, Wei D, *et al.* Carnosine markedly ameliorates H9N2 swine influenza virus-induced acute lung injury. *J Gen Virol* 2015; 96(10): 2939-50.
- 8 Zeng H, Pappas C, Belsler JA, Houser KV, Zhong W, Wadford DA, *et al.* Human pulmonary microvascular endothelial cells support productive replication of highly pathogenic avian influenza viruses: possible involvement in the pathogenesis of human H5N1 virus infection. *J Virol* 2012; 86(2): 667-78.

- 9 张增峰, 樊晓晖, 陈晓燕, 冯安林, 杨利. 禽流感病毒H9N2在人肺组织的复制. 病毒学报(Zhang Zengfeng, Fan Xiaohui, Chen Xiaoyan, Feng Anlin, Yang Li. Replication of avian influenza virus H9N2 in human lung tissue. Chinese Journal of Virology) 2013; 29(2): 206-10.
- 10 Guo S, Kempthues KJ. par-1, a gene required for establishing polarity in *C. elegans* embryos, encodes a putative Ser/Thr kinase that is asymmetrically distributed. Cell 1995; 81(4): 611-20.
- 11 Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. Nature 1998; 391(6669): 806-11.
- 12 靳俊杰, 安静, 曹涤非, 宋爱利, 赵丽丽, 刘兆良. 蛋白赖氨酸转移酶KAT6B基因shRNA慢病毒载体的构建与鉴定. 实用肿瘤学杂志(Jin Junjie, An Jing, Cao Difei, Song Aili, Zhao Lili, Liu Zhaoliang. Construction and identification of shRNA lentiviral vectors targeting histone lysine transferase KAT6B gene. Journal of Practical Oncology) 2018; 32(1): 1-6.
- 13 吴锦艳, 田宏, 尚佑军, 陈妍, 王光祥, 刘湘涛, 等. 慢病毒介导稳定表达抑制PRRSV复制的shRNA细胞系的建立. 畜牧兽医学报(Wu Jinyan, Tian Hong, Shang Youjun, Chen Yan, Wang Guangxiang, Liu Xiangtao, *et al.* Establishment of cell lines with stable expression of shRNA to inhibit porcine productive and respiratory syndrome virus proliferation using the lentiviral expression system. Chinese Journal of Animal and Veterinary Sciences) 2016; 47(11): 2280-7.
- 14 Narasaraju T, Yang E, Samy RP, Ng HH, Poh WP, Liew AA, *et al.* Excessive neutrophils and neutrophil extracellular traps contribute to acute lung injury of influenza pneumonitis. Am J Pathol 2011; 179(1): 199-210.
- 15 Yamamoto S, Shimizu S, Kiyonaka S, Takahashi N, Wajima T, Hara Y, *et al.* TRPM2-mediated  $Ca^{2+}$  influx induces chemokine production in monocytes that aggravates inflammatory neutrophil infiltration. Nat Med 2008; 14(7): 738-47.
- 16 Hecquet CM, Zhang M, Mittal M, Vogel SM, Di A, Gao X, *et al.* Cooperative interaction of trp melastatin channel transient receptor potential (TRPM2) with its splice variant TRPM2 short variant is essential for endothelial cell apoptosis. Circ Res 2014; 114(3): 469-79.
- 17 Ueda M, Daidoji T, Du A, Yang CS, Ibrahim MS, Ikuta K, *et al.* Highly pathogenic H5N1 avian Influenza virus induces extracellular  $Ca^{2+}$  influx, leading to apoptosis in avian cells. J Virol 2010; 84(6): 3068-78.
- 18 Uiprasertkul M, Kitphati R, Puthavathana P, Kriwong R, Kongchanagul A, Ungchusak K, *et al.* Apoptosis and pathogenesis of avian influenza A (H5N1) virus in humans. Emerg Infect Dis 2007; 13(5): 708-12.
- 19 Sun Y, Sukumaran P, Selvaraj S, Cilz N I, Schaar A, Lei S, *et al.* TRPM2 promotes neurotoxin MPP<sup>+</sup>/MPTP-induced cell death. Mol Neurobiol 2018; 55(1): 409-20.
- 20 Zhao LY, Xu W L, Xu ZQ, Qi C, Li Y, Cheng J, *et al.* The overexpressed functional transient receptor potential channel TRPM2 in oral squamous cell carcinoma. Sci Rep 2016; 6: 38471.